مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۲، شماره ۱، ۱۳۹۰ (۷۲-۶۵)

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه بر تولید کالوس‌های جنین‌زا در آلسترومریا رقم فیگو

علیرضا خالقی[1]*، احمد خلیقی[2] و پژمان آزادی[3]
۱، ۲، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳، مربی پژوهشی مرکز ملی تحقیقات گل و گیاهان زینتی ایران، محلات، بخش بیوتکنولوژی
(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۱۸ - تاریخ تصویب: ۸۸/۱۱/۷)

چکیده

آلسترومریا (از خانواده آلسترومریاسه) یکی از گونه‌های زینتی تک لپه بوده و به عنوان گل شاخه بریده استفاده می‌شود. در آلسترومریا جهت انتقال ژن از کالوس‌های جنینی استفاده می‌شود. این پژوهش به منظور تولید کالوس‌های جنین‌زا در گل آلسترومریا رقم فیگو انجام شد. بدین منظور، ریزنمونه‌های رویشی (گره، میانگره، برگ) و غلظت‌های مختلف ۴ نوع اکسین (2,4-D، NAA، IAA، Picloram) همراه یا بدون هورمون BAP مورد آزمایش قرار گرفتند. بهترین ریزنمونه جهت به دست آوردن کالوس‌های جنین‌زا، گره‌ها (خصوصاً سه گره اول) بودند و ریزنمونه‌های میانگره اگرچه مستعد تولید کالوس‌های جنینی بودند اما در مقایسه با گره‌ها دارای درصد کالوس‌زایی پایین‌تری بودند و ریزنمونه‌های برگ مستعد تولید کالوس‌های جنین‌زا نبودند. بهترین تیمار هورمونی جهت به دست آوردن کالوس‌های جنین‌زا محیط کشت MS ½ حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. کالوس‌ها جهت باززایی، به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP منتقل شدند.

واژه‌های کلیدی: آلسترومریا، کالوس‌های جنینی، گره، محیط کشت MS ½.

مقدمه

آلسترومریا گیاهی تک لپه می‌باشد که به عنوان گل شاخه بریده در گلخانه ها کشت و کار می‌شود (Van, 1995). از این گل به عنوان گیاهی گلدانی و باغچه ای نیز استفاده می‌شود (Van et al., 1996). گلهای آلسترومریا دارای طول عمر پس از برداشت طولانی و دارای رنگ‌های متنوعی می‌باشند؛ علاوه بر این برای کشت و کار این گل در گلخانه نیاز به صرف انرژی اندکی است (Van et al., 1996). روش‌های اصلاحی در آلسترومریا جهت تولید گلهایی با رنگ‌های جدید، افزایش طول عمر پس از برداشت گلها، افزایش میزان تولید در واحد سطح گلخانه و افزایش مقاومت به بیماریها استفاده شده است. با این حال آلسترومریا دارای ژنوم ضعیفی می‌باشد که فاقد بسیاری از ژن‌های مفید می‌باشد (Kim et al., 2006). در تک‌لپه‌ای‌ها ثابت شده است که کالوس‌های جنین‌زا بهترین بافت هدف جهت انتقال ژن می‌باشد (Smith & Hood, 1995). از آنجایی که در آلسترومریا انتقال ژن ممکن است مهمترین ابزار

* نویسنده مسئول: علیرضا خالقی تلفن: ۰۹۱۸-۳۶۷۳۷۴۷ E-mail: alikhaleghi_re@yahoo.com

جهت اصلاح باشد، مطالعات حاصل در زمینه تولید کالوس‌های جنین‌زا برای کارهای اصلاحی و انتقال ژن بسیار مهم است (Lin et al., 2000a). Van et al. (1996) جهت القای کالوس در جنین‌های زیگوتی نابالغ از محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP استفاده نمودند. نخستین بار، جهت القای کالوس در اندامهای رویشی (قطعات ساقه) از ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP استفاده شد (Lin et al., 2000a). Kim et al. (2006) برای نخستین بار از محیط کشت SH[1] جهت القای کالوس در ریزنمونه گره استفاده نمودند. آنها بیشترین کالوس‌زایی را در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA داشتند. به طور کلی ۲ نوع کالوس جنینی در آلسترومریا مشاهده شده است. کالوس‌های جنینی توده‌ای (CEC[2]) و کالوس‌های جنینی کروی (FEC[3]). CEC با کشت جنینهای زیگوتی در محیط کشت حاوی اکسین به دست آمده است (Van et al., 1996). این نوع کالوس، کالوس‌هایی فشرده با قطر بیش از ۰/۵ میلی‌متر می‌باشند. FEC با کشت قطعات ساقه نشاء و یا کشت تخمک در محیط کشت حاوی اکسین حاصل شده است (Lin et al., 2000a; Akutsu & Sato, 2002). این نوع کالوس، کالوس‌هایی به قطر کمتر از ۱ میلی‌متر می‌باشند که می‌توان به راحتی به واحدهای منفرد جدا نمود. از این نوع کالوس به طور موفقی جهت تولید گیاهان تراریختی استفاده شده است (Lin et al., 2000b). اما از آنجایی که آلسترومریا به طور رویشی تکثیر می‌شود و به شدت هتروزیگوت است، کالوس‌های جنینی حاصل از کشت بافت‌های نشاء، تخمک و یا جنین‌های زیگوتی را نمی‌توان جهت اصلاح آلسترومریا استفاده نمود (Kim et al., 2006). بنابراین به منظور بررسی امکان تولید کالوس‌های جنین‌زا از ریزنمونه‌های حاصل از گیاهان بالغ کشت شده در گلخانه که به طور رویشی تکثیر شده بودند، تحقیقی در ایستگاه ملی تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات انجام شد.

1. Schenk and Hildebrandt (1972) medium
2. Compact embryogenic callus
3. Friable embryogenic callus

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این تحقیق از آلسترومریا رقم فیگو[4] به‌عنوان مواد گیاهی استفاده گردید. شاخه‌های جوان آلسترومریا قبل از فاز گلدهی از گلخانه‌های شهر محلات تهیه و از ریزنمونه‌های گره، میانگره و قطعات برگ به عنوان مواد آزمایشی استفاده گردید.

محیط کالوس‌زایی: جهت القای کالوس از محیط کشت 1/2 MS (۱/۲ نمک‌های ماکرو و میکرو المنت) همراه با ۳ درصد ساکارز و ۳۲ تیمارهورمونی (به شرح ذیل) استفاده گردید. پس از تهیه محیط کشت pH محلول به میزان ۵/۸ تنظیم گردید و ۲/۵ گرم در لیتر ژلرایت به عنوان جامدکننده به محلول افزوده شد. سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت۲۰ دقیقه با استفاده از اتوکلاو استریل و در پتری دیش توزیع گردید. تیمارهای هورمونی به کار رفته شامل ۱۶ سطح هورمون اکسین شامل Picloram (۱، ۲، ۴، ۸ mg/l)، (۴ mg/l، ۲، ۱، ۰/۵) NAA، (۴ mg/l، ۲، ۱، ۰/۵) IAA و (۴ mg/l، ۲، ۱، ۰/۵) 2,4-D می‌باشد که هر یک از غلظت‌های اکسین نام برده، همراه یا بدون ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP جهت کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های گره، میانگره و برگ استفاده گردید.

ضدعفونی نمونه‌ها: از ساقه‌های جوان آلسترومریا در مرحله قبل از گلدهی نمونه‌گیری شد. ساقه و برگ‌ها ابتدا با محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد بمدت ۱۵ دقیقه در شرایط استریل ضد عفونی شدند، سپس در زیر لامینار ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

تهیه و کشت ریزنمونه گره، میانگره و برگ: با استفاده از اسکارپل گره و میانگره به ضخامت ۱ میلی‌متر از ساقه‌های ضد عفونی شده جدا و به تعداد ۶ گره و ۱۰ میانگره در هر پتری‌دیش کشت گردیدند. همچنین برگ‌ها به اندازه ۰/۷×۰/۷ سانتی‌متر مربع برش داده و به دو روش پشت و رو به تعداد ۶ عدد در هر پتری‌دیش کشت گردیدند و در اتاق رشد در شرایط تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و به فواصل هر ۳ هفته یک بار واکشت شدند.

محیط پرآوری کالوس: کالوس‌های حاصل از مرحله قبل برای افزایش حجم کالوس به محیط MS تغییر داده شده حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام منتقل شدند و

4. Fuego

در اتاقک رشد، در شرایط تاریکی نگهداری شدند. محیط پر آوری شامل MS کامل همراه با ۲۰ گرم در لیتر ساکارز، ۱۸/۲ گرم در لیتر مانیتول، ۰/۴۸ گرم در لیتر MES[1]، ۰/۱ گرم در لیتر کازئین، ۰/۰۸ گرم در لیتر آدنین سولفات، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید نیکوتینیک، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر پیرودکسین، ۱۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تیامین، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر بیوتین، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر گلایسین، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر سیستئین و ۵ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام بود.

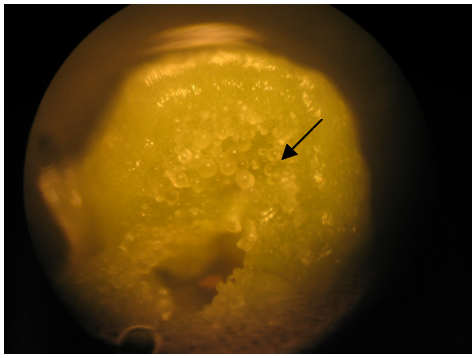
محیط کشت باززایی: جهت باززایی، کالوس‌ها به محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز، ۶ گرم در لیتر فیتاآگار و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP منتقل شدند و سپس در اتاق رشد در محیط روشنایی و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و به فواصل هر ۲ هفته یکبار واکشت شدند.

طرح آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. یادداشت برداری در فواصل منظم صورت گرفت و برای تجزیه داده‌های به دست آمده از نرم‌افزارهای SPSS و SAS استفاده گردید.

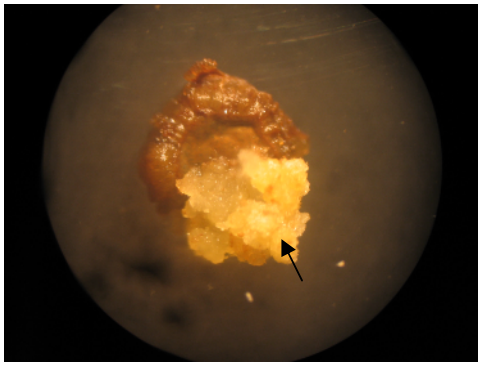
نتایج و بحث

مرحله القای کالوس: در این مرحله عمدتاً دو نوع کالوس توده‌ای و کروی مشاهده شد. کالوس‌های کروی دو هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها، بر روی سطح برش خورده گره، میانگره و برگ‌ها ظاهر شدند. کالوس‌های کروی، کالوس‌هایی کروی شکل به رنگ سفید یا شیری رنگ به قطر تقریبی یک میلی‌متر بودند (شکل ۱-الف). کالوس‌های توده‌ای حدوداً سه ماه پس از کشت در قسمت‌های برش خورده گره و میانگره‌ها ظاهر شدند، در صورتی که بر روی ریزنمونه برگ کالوس‌های توده‌ای ظاهر نشدند. این کالوس‌ها، به هم فشرده و به رنگ زرد بودند (شکل ۱-ب).

1. 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid



الف)



ب)

شکل ۱- الف) تشکیل کالوس‌های کروی در سطح برش خورده ریزنمونه، ب) تشکیل کالوس‌های توده‌ای

اکثر ریزنمونه‌های برگ فاقد توانایی کالوس‌زایی بودند و به ندرت برخی از ریزنمونه‌ها تولید کالوس‌های کروی نمودند که پس از انتقال به محیط باززایی قهوه‌ای و از بین رفتند. به همین دلیل در تجزیه آماری داده‌ها و مقایسه ریزنمونه‌ها در کالوس‌زایی، ریزنمونه‌های گره و میانگره مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مرحله چهار صفت میانگین حجم کالوس‌های کروی، درصد کالوس‌های کروی، میانگین حجم کالوس‌های توده‌ای و درصد کالوس‌های توده‌ای درنظر گرفته شد. یادداشت برداری حجم کالوس‌های کروی و توده‌ای ابتدا به صورت کیفی انجام شدند و سپس به اعداد کمی مطابق با موارد ذکر شده تبدیل شدند. فاقد کالوس: ۰، حجم بسیار کم کالوس:۱، حجم کم کالوس: ۲، حجم متوسط کالوس: ۳، حجم زیاد کالوس: ۴، حجم بسیار زیاد کالوس:۵ (Margaret et al., 1994).

اثر نوع ریزنمونه بر کالوس‌زایی: نتایج نشان داد که نوع ریزنمونه بر میانگین حجم و درصد کالوس‌های کروی و توده‌ای تشکیل شده معنی‌دار می‌باشد (جدول۱) و گره‌ها در تشکیل کالوس‌های جنین‌زا بسیار

مؤثرتر از میانگرها می‌باشند. بر اساس نتایج دیگر تحقیقات، میان ریزنمونه‌هایی که از بافت‌های مختلف تهیه می‌شوند به دلیل مشارکت هورمون‌های گیاهی درونی دارای قابلیت کالوس‌زایی و جنین‌زایی متفاوتی می‌باشند. در این رابطه، یک همبستگی بین غلظت بالاتر IAA درونی و افزایش واکنش جنین‌زایی در برگ‌های یونجه مشاهده شده است (Pasternak et al., 2002). از آنجایی که گره‌ها دارای سلول‌های مریستمی فعال و در حال تقسیم می‌باشند، در نتیجه دارای مقادیر اکسین طبیعی IAA بالاتری نسبت به بخش‌های میانگره هستند که باعث افزایش توان کالوس‌زایی در گره‌ها نسبت به میانگره‌ها می‌شود (جدول۲).

اثر BAP بر کالوس‌زایی: افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به محیط کشت تنها باعث افزایش درصد کالوس‌های کروی از ۳۵/۲٪ به ۴۰/۶٪ می‌شود در حالی که در سایر صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۱). Kim et al. (2006) گزارش نمودند که افزودن BAP به محیط کشت باعث افزایش تشکیل کالوس‌های کروی و توده‌ای می‌شود که این نتایج مطابق با گزارش این محققین مبنی بر اثر مثبت BAP بر تشکیل کالوس‌های کروی می‌باشد. اما با قسمت دوم یعنی اثر مثبت BAP بر روی تشکیل کالوس‌های توده‌ای مطابقت ندارد. سایتوکنین‌ها نقش مهمی را در تقسیم سلولی دارند (Danin et al. 1993)؛ ظاهراً بافت‌های مورد استفاده، دارای مقادیر کافی از سایتوکینین‌های درونی به منظور تحریک تقسیم سلولی می‌باشند.

اثر اکسین‌ها بر کالوس‌زایی: نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر نوع و غلظت اکسین بر تشکیل کالوس‌های کروی و توده‌ای معنی‌دار می‌باشد و اکسین NAA با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر، بهترین تیمار هورمونی جهت به دست آوردن کالوس‌های جنینی می‌باشد (جدول۳). Hutchinson et al. (1994) ۳ اکسین IAA، NAA و 2,4-D را جهت القای کالوس مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند که اکسین IAA باعث کالوس‌زایی ضعیفی می‌گردد و 2,4-D در غلظت‌های به کار برده توسط آنها باعث قهوه‌ای شدن و مرگ ریزنمونه‌ها و یا کالوس‌ها پس از چهار هفته می‌شود و بهترین هورمون جهت القای کالوس هورمون NAA با غلظت ۲۰µm کینیتین و NAA ۲۰µm می‌باشد. از اکسین‌ها، اکسینی که بیشترین کاربرد را در القای کالوس‌های جنین‌زا دارد، اکسین مصنوعی 2,4-D می‌باشد (Raemakers et al., 1995). با این وجود در ارتباط با نتیجه به دست آمده، می‌توان گفت NAA نسبت به 2,4-D به دلیل فعالیت بیولوژیکی ضعیف تر می‌تواند باعث ایجاد توازن اکسینی مناسبی جهت تشکیل کالوس‌های جنین‌زا شود (Victor & Clement, 2005).

اثر متقابل نوع ریزنمونه و نوع اکسین بر روی کالوس‌زایی: نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل نوع ریزنمونه و نوع اکسین تنها بر درصد کالوس‌های کروی تولید شده در سطح ۵٪ معنی‌دار می‌باشد. با توجه به نمودار مقایسه

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر ریزنمونه، نوع اکسین و BAP بر صفات مختلف اندازه‌گیری شده

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		متوسط حجم کالوس‌های کروی	درصد کالوس‌های کروی	متوسط حجم کالوس‌های توده‌ای	درصد کالوس‌های توده‌ای
نوع ریزنمونه	۱	۰/۱۰۵*	۸۸/۴۵**	۰/۰۲۵*	۷/۲۵*
نوع اکسین	۱۵	۰/۰۴۳*	۴۲/۴۶**	۰/۰۱۱*	۳/۴۷**
نوع ریزنمونه* نوع اکسین	۱۵	۰/۰۳۳ns	۱۱/۸۲*	۰/۰۰۸ns	۲/۴۱ns
BAP	۱	۰/۰۰۱ns	۲۴/۸۴*	۰/۰۰۰۳ns	۰/۰۳ns
نوع ریزنمونه*BAP	۱	۰/۰۰۲ns	۱۷/۱۲ns	۰/۰۰۰۶ns	۱/۲۲ns
نوع اکسین*BAP	۱۵	۰/۰۱ns	۱۶/۸۸**	۰/۰۰۲۹ns	۱/۰۹ns
نوع ریزنمونه* نوع اکسین*BA	۱۵	۰/۰۲۴ns	۳/۵۶ns	۰/۰۰۵۹ns	۱/۲۲ns
خطای آزمایش	۱۲۸	۰/۰۲۲	۰/۰۳۹۱	۰/۰۰۵۶	۱/۵۱
cv.		۱۹/۸	۴۶/۵	۸/۶۳	۹۷/۷۱

**: معنی‌دار بودن اثر تیمارها در سطح ۱٪ *: معنی‌دار بودن اثر تیمارها در سطح ۵٪ ns: معنی‌دار نبودن اثر تیمارها.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر نوع ریزنمونه بر درصد و حجم کالوس‌های کروی و توده‌ای

	متوسط حجم کالوس‌های کروی	درصد کالوس‌های کروی	متوسط حجم کالوس‌های توده‌ای	درصد کالوس‌های توده‌ای
گره	۰/۷۸a	۴۲/۰۶a	۰/۱۵a	۳/۹۹a
میانگره	۰/۷۳b	۳۳/۷۵b	۰/۰۵b	۱/۵۶b

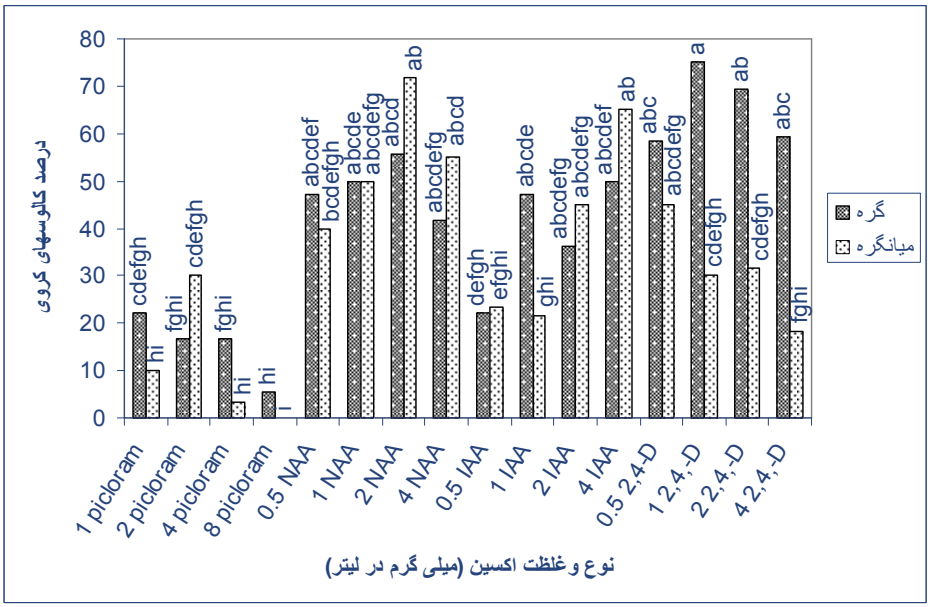
حروف متفاوت در هر ستون حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر نوع و غلظت اکسین‌ها بر صفات اندازه‌گیری شده

نوع و غلظت اکسین	تیمار	متوسط حجم کالوس‌های کروی	درصد کالوس‌های کروی	متوسط حجم کالوس‌های توده‌ای	درصد کالوس‌های توده‌ای
۱ Picloram	۱	۰/۷۸ abc	۱۶/۱ def	۰/۱۶ ab	۲/۲۲ abc
۲ Picloram	۲	۰/۸۴ abc	۲۳/۳ cde	۰/۲۸ ab	۴/۱۶ abc
۴ Picloram	۳	۰/۷۶ abc	۱۰ ef	۰/۱ ab	۱/۶۶ bc
۸ Picloram	۴	۰/۷۲ bc	۲/۶ f	۰/۰۳ b	۱/۳۸ bc
۰/۵ NAA	۵	۰/۷۲ bc	۴۳/۵ abc	۰/۰۳ b	۱/۶۶ bc
۱ NAA	۶	۰/۷۲ bc	۵۰ ab	۰/۰۲ b	۲/۲۲ abc
۲ NAA	۷	۰/۸۸ a	۶۳/۶ a	۰/۳۶ a	۸/۰ a
۴NAA	۸	۰/۷۷ abc	۴۸/۳ ab	۰/۱۲ ab	۴/۱۶ abc
۰/۵ IAA	۹	۰/۷۰ c	۲۲/۷ cde	۰ b	۰ c
۱ IAA	۱۰	۰/۷۰ c	۳۴/۴ bcd	۰ b	۰ c
۲ IAA	۱۱	۰/۷۰ c	۴۰/۵ abc	۰ b	۰ c
۴ IAA	۱۲	۰/۷۰ c	۵۷/۵ ab	۰ b	۰ c
۰/۵ 2,4-D	۱۳	۰/۷۰ c	۵۱/۶ ab	۰ b	۰ c
۱ 2,4-D	۱۴	۰/۷۹ abc	۵۲/۵ ab	۰/۱۴ ab	۶/۹۴ ab
۲ 2,4-D	۱۵	۰/۷۵ abc	۵۰/۵ ab	۰/۰۷ ab	۴/۱۶ abc
۴ 2,4-D	۱۶	۰/۸۷ ab	۳۸/۸ abc	۰/۳۲ a	۷/۷۷ a

* بر حسب میلی‌گرم در لیتر

حروف متفاوت در هر ستون حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

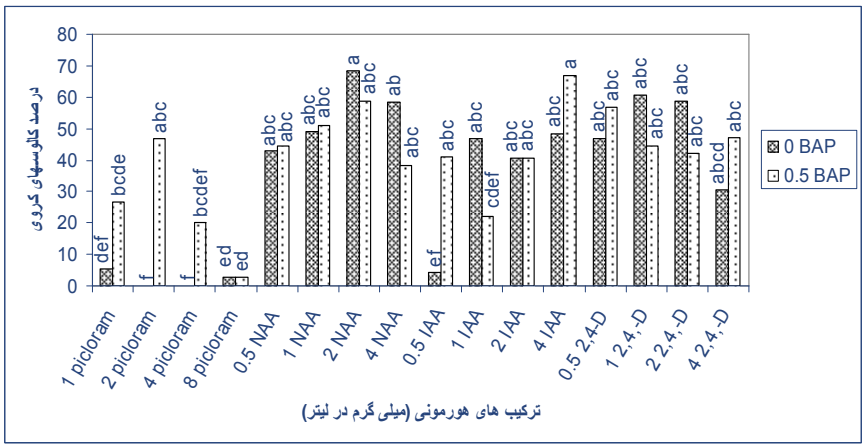


شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و نوع و غلظت اکسین روی صفات اندازه‌گیری شده

میانگین‌ها (شکل ۲) بالاترین درصد کالوس کروی در گره‌ها و در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۷۴/۹٪ کالوس کروی، حاصل شد.

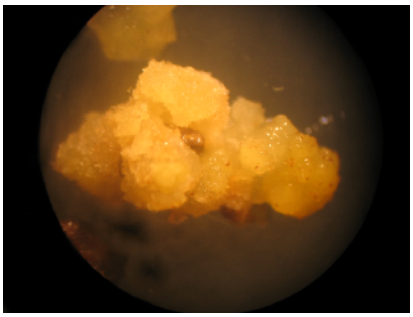
اثر متقابل نوع اکسین و BAP بر روی کالوس‌زایی: با توجه به نتایج به دست آمده (جدول ۱) اثر متقابل نوع اکسین و کاربرد یا عدم کاربرد BAP تنها بر درصد کالوس‌های کروی تولید شده معنی‌دار می‌باشد. نتایج حاصل از نمودار مقایسه میانگین‌ها (شکل ۳) نشان داد که دو میلی‌گرم در لیتر NAA و بدون حضور BAP با تولید کالوس کروی در ۶۸/۳ درصد از ریزنمونه‌ها، بهترین تیمارهای هورمونی جهت القای کالوس‌های کروی می‌باشند. همچنین، نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری در اثر متقابل نوع ریزنمونه و BAP و همچنین اثر متقابل نوع ریزنمونه، نوع اکسین و BAP در هیچکدام از فاکتورهای ذکر شده وجود ندارد.

پرآوری کالوس: سه ماه پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت کالوس‌زایی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS تغییر یافته، حاوی عناصر و ویتامین‌های ذکر شده در قسمت مواد و روش‌ها منتقل شدند. در طی مدت زمانی که ریزنمونه‌ها در این محیط قرار داشتند، کالوس‌های کروی تغییری نکردند، اما حجم کالوس‌های توده‌ای افزایش یافته و کالوس‌های توده‌ای، تشکیل کالوس‌های توده‌ای جدیدی را نمودند (شکل ۴).

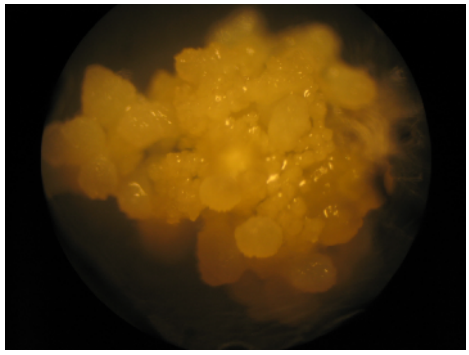


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع و غلظت اکسین و BAP روی صفات اندازه‌گیری شده

محیط باززایی: پس از گذشت ۳ ماه از کشت کالوس‌های کروی و توده‌ای در محیط پرآوری، هر دو نوع کالوس کروی و توده‌ای به محیط کشت باززایی شامل محیط MS پایه همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، شش گرم در لیتر فیتا آگار و دو میلی‌گرم در لیتر BAP منتقل شدند. جهت انتقال کالوس‌های توده‌ای، به دلیل حجیم بودن کالوس‌ها، آنها را به قطعات حدوداً ۷-۵ میلی‌متری تقسیم شدند و سپس به محیط باززایی منتقل شدند. در این محیط کالوس‌های کروی با گذشت زمان قهوه ای رنگ شدند و از بین رفتند. حدود سه هفته پس از کشت کالوس‌های توده‌ای در محیط باززایی، پیش جنین‌های کروی شکل به قطر تقریبی ۲-۱ میلی‌متر در سطح کالوس‌های توده‌ای تشکیل شدند (شکل ۵) و به منظور نمو پیش جنین‌ها، پیش جنین‌ها را به محیط کشت تازه که حاوی همان غلظت قبلی BAP بودند واکشت شدند. اما در مراحل بعدی این پیش‌جنین‌ها نکروزه شدند و از بین رفتند.



شکل ۴- تشکیل کالوس‌های توده‌ای جدید بر روی کالوس‌های توده‌ای منتقل شده به محیط MS تغییر یافته



شکل ۵- تشکیل پیش جنین‌ها بر روی سطح کالوس‌های توده‌ای

نتیجه گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که بافت‌های مختلف یک گیاه دارای قابلیت کالوس‌زایی مختلفی می‌باشد که این موضوع بیشتر مربوط به میزان هورمون‌های درونی بافت‌ها می‌شود. پتانسیل جنین‌زایی اولین فاکتور لازم جهت جنین‌زایی می‌باشد (Moltrasio et al., 2004) بالاترین پتانسیل جنین‌زایی مربوط به بافت‌های جنینی و از سویی کمترین پتانسیل جنین‌زایی مربوط به هیپوکوتیل، دمبرگ، برگ و ریشه می‌باشد (Neumann, 2000). در گیاه آلسترومریا نیز جنین‌های زیگوتی بالغ و نابالغ جهت القای کالوس‌های جنینی بیشترین کاربرد را داشته‌اند (Akutsu & Sato, 2002; Gonzales & Alderson, 1990; Hutchinson et al., 1994; Kim et al., 2001; Van et al., 1996). اما در صورتی که جنین‌زایی سوماتیکی به منظور به کارگیری در کارهای اصلاحی خصوصاً انتقال ژن انجام گیرد، به دلیل هتروزیگوتی بالای آلسترومریا از کالوس‌های حاصل از جنین‌های زیگوتی در کارهای اصلاحی نمی‌توان استفاده نمود (Kim et al., 2006) به همین دلیل به دست آوردن یک روشی با بازده بالای تولید کالوس جنین‌زا، از اندامهای رویشی ضروری می‌باشد. در این زمینه تنها سه گزارش وجود دارد (Kim et al., 2001; Kim et al., 2006; Lin et al., 2000a). که این محققین در گزارش‌های خود عنوان نمودند که به دلیل بازده پایین تولید کالوس‌های توده‌ای جنین‌زا در تحقیقاتشان، نیاز به تحقیقات بیشتر جهت اپتیمم کردن این مرحله می‌باشد. در این پژوهش نیز نتایج نشان داد که جهت به دست آوردن کالوس‌های کروی و توده‌ای، ریزنمونه گره دارای قابلیت کالوس‌زایی بالاتری نسبت به میانگره و برگ می‌باشد. بیشتر تحقیقات این موضوع را تأیید می‌کنند که مقدار اکسین در بافت‌های مستعد جنین‌زایی بیشتر از بافت‌های غیرجنینی می‌باشد (Jimenez, 2001). با وجود این، در دیگر تحقیقات نشان داده شده که محتویات اکسین درونی در کشت‌های جنینی و غیرجنینی می‌تواند اختلافی نداشته باشد (Besse et al., 1992). در کل اینگونه فرض شده است که غلظت بالای اکسین درونی باعث برقراری شیب اکسین مورد نیاز برای جنین‌زایی می‌گردد (Fischer & Neuhaus, 1996). در این تحقیق نیز می‌توان گفت وجود اکسین درونی (IAA) بالاتر در گره‌ها نسبت به میانگره و برگ‌ها باعث شده است تا در مرحله القای کالوس مؤثرتر باشند. از میان تیمارهای هورمونی مورد بررسی دو میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین تیمار هورمونی در مرحله القای کالوس می‌باشد. در میان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، اکسین‌ها بیشترین کاربرد را در کالوس‌زایی دارند. در بین اکسین‌ها 2,4-D بیشترین کاربرد را در این مرحله از جنین‌زایی سوماتیکی دارد. در گیاه آلسترومریا نیز در بیشتر تحقیقات انجام شده از 2,4-D جهت القای کالوس استفاده نموده اند و تنها دو گزارش وجود دارد که از اکسین NAA جهت القای کالوس استفاده نموده‌اند (Hutchinson et al., 1994; Akutsu & Sato, 2002). در بسیاری از گزارش‌ها ارائه شده در زمینه القای کالوس معمولاً اکسین‌ها را همراه با سایتوکینین‌ها در محیط کشت القای کالوس به کار می‌برند (Gaj, 2004) معمول‌ترین سایتوکینین‌هایی که در این مرحله استفاده می‌شود بنزیل آمینو پورین، کینتین، زآتین و اخیراً تیدیازورون می‌باشد. در آلسترومریا در بسیاری از گزارش‌ها ارائه شده در زمینه جنین‌زایی سوماتیکی، از سایتوکنینین BA همراه با اکسین جهت القای کالوس استفاده شده است (Akutsu & Sato, 2002; Kim et al., 2001; Kim et al., 2006; Lin et al., 2000a; Van et al., 1996). در نتایج به دست آمده در این پژوهش بکارگیری BAP همراه با اکسین‌ها تنها باعث افزایش درصد کالوس‌های کروی گردید. در این پژوهش برای نخستین بار از ریزنمونه حاصل از گیاهان بالغ که در

شرایط گلخانه کشت شده بودند جهت جنین‌زایی استفاده گردید. با توجه به فراهم آوردن پیش جنین‌ها از کالوس‌های توده‌ای می‌توان گفت که این بافت‌ها نیز توانایی جنین‌زایی سوماتیکی را داشته و نیاز به تحقیقات بیشتر جهت اپتیمم کردن مرحله باززایی می‌باشد.

سپاسگزاری

از زحمات و همکاری‌های رئیس مرکز ملی تحقیقات گل و گیاه محلات، جناب آقای مهندس بنی جمالی و همچنین از همکاری‌های خانم‌ها مهندس صفری و قاسمی در طول این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Akutsu, M. & Sato, H. (2002). Induction of proembryos in liquid culture increases the efficiency of plant regeneration from *Alstroemeria* calli. *Plant Science*, 163, 475-479.
2. Besse, I., Verdeil, J. L., Duval, Y., Sotta, B., Maldiney, R. & Miginiac E. (1992). Oil plam (*Elaeis guineensis Jacq*.) clonal fidelity: endogenous cytokinins and indoleacetic acid in embryogenic callus cultures. *Journal of Experimental Botany*, 43, 983-989.
3. Danin, M., Upfold, S. J., Levin, N., Nadel, B. L., Altman, A. & Van Staden, J. (1993). Polyamines and cytokinins in celery embryogenic cell cultures. *Plant Growth Regulation*, 12, 245-254.
4. Fischer, C. & Neuhaus, G. (1996). Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. *The plant journal*, 9, 659-669.
5. Gaj, M. D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43, 27.
6. Gonzales-benito, E. & Alderson, P. G. (1990). Regeneration from *Alstroemeria* callus. *Acta Horticulturae*, 280, 135-138.
7. Hutchinson, M. J., Tsujita, J. M. & Saxena, P. K. (1994). Callus induction and plant regeneration from mature zygotic embryos of a tetraploid *Alstroemeria (A. pelegrina×A. psittacina)*. *Plant Cell Reports*, 14, 184-187.
8. Jimenez, V. M. (2001). Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira Fisiologia Vegetal*, 13, 196–223.
9. Kim, J. B., Raemakers, C. J. J. M., Jacobsen, E. & Visser, R. G. F. (2001). In vitro studies on callus induction in both vegetative and generative parts in *Alstroemeria* for further application to transformation. *Acta Horticulturae*, 560, 437-440.
10. Kim, J. B., Raemakers, C. J. J. M., Jacobsen, E. & Visser, R. G. F. (2006). Efficient somatic embryogenesis in *Alstroemeria*. *Plant cell Tissue and Organ Culture*, 86, 233-238.
11. Lin, H. S., De Jeu, M. J. & Jacobsen, E. (2000a). Development of a plant regeneration system based on friable embryogenic callus in the ornamental *Alstroemeria*. *Plant Cell Reports*, 19, 529-534.
12. Lin, H. S., Van der Toorn, C., Raemarkers, C., Visser, R. & Jacobsen, E. (2000b). Genetic transformation of *Alstroemeria* using particle bombardment. *Molecular Breeding*, 6, 369-377.
13. Margaret, J., Hutchinson, J. M., Tsujita, & Praveen, K. (1994). Callus induction and plant regeneration from mature zygotic embryos of a tetraploid *Alstroemeria (A. pelegrina × A. psittacina)*. *Plant Cell Reports*, 14, 184-187.
14. Moltrasio, R., Robredo, C. G., Gomez, M. C., Paleo, A. H. D., Diaz, D. G., Rioz, R. D. & Franzone, P. M. (2004). Alfalfa (*Medicago sativa*) somatic embryogenesis: generic control and introduction of favourable alleles into elite Argentinean germplasm. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 77, 119-124
15. Neumann, K. H. (2000). *Somatic studies on somatic embryogenesis: A tool in plant biotechnology*. http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/321/
16. Pasternak, T. P., Prinsen, E., Ayaydin, F., Miskolczi, P., Potters, G., Asard, H., Van Onckelen, H. A., Dudits, D. & Feher, A. (2002). The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, 129, 1807–1819.
17. Raemakers, C. J. J. M., Jacobsen, E. & Visser, R. G. F. (1995). Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica*, 81, 93–107.
18. Smith, R. H. & Hood, E. E. (1995). Agrobacterium tumefaciens transformation of monocotyledons. *Crop Science*, 35, 301-309.
19. Van, S. C. E., Posthuma, A., De Jeu, M. J. & Jacobsen, E. (1996). Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on immature embryos of *Alstroemria* spp. L. *Plant Cell Reports*, 15, 377-380.
20. Van, Z. (1995). Alstroemeria. In: G. Loebenstein, R. H. Lawson and A. A. Brunt (Eds), *Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops* (pp 237-249), John Wiley & Sons, Chichester.
21. Victor, M. J. & Clement T. (2005). Participation of plant Hormones in Determination and Progression of Somatic Embryogenesis. *Plant cell Monographs*, (2), 103-118.