تولید بذر مصنوعی بوسیله کپسولی کردن رویان های پیکری در گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum L.*)

احمد مجد[۱]، شهره احساندار[۱](عهده دادر مکاتبات) Shohrehehsandar@yahoo.com ، **رجب چوگان[۲] و حمید رضا عبدی[۲]**

۱-دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی ۲. موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

چکیده

در پژوهش حاضر، روشی برای تکنولوژی تولید بذر مصنوعی بوسیله رویان های پیکری در گیاه سیب زمینی.(*Solanum) tuberosum L* رقم اگریا گزارش شده است. یک روش موثر برای القای رویانزایی پیکری از کشت های دمبرگی رقم آگریا سیب زمینی ارائه شده است که قبلا" گزارش نشده است، همچنین تولید بذر مصنوعی در گیاه سیب زمینی بوسیله رویان های پیکری در ایران تاکنون گزارش نشده است. رویان های پیکری بوسیله یک پروتوکل دو مرحله ای بدست آمدند. جداکشت های دمبرگی در آغاز روی محیط MS تکمیل شده با 2,4-Dو BAP کشت شدند. کالوس های رویانزای گره دار بر روی جداکشت ها روی محیط حاوی 2,4-D و BAP تشکیل شدند. جداکشت های دارای کالوس اولیه سپس به محیط MS حاوی ژیبرلیک اسید(GA_3) , زآتین(Z) وBAP برده شدند . تیمار با Z وBAP منجر به القای مستقیم بیشترین تعداد رویان های پیکری شد. در این پژوهش برای کپسولی کردن رویانهای پیکری در گویچه های آلژینات کلسیم آزمایش شد. این تکنیک شامل به تعلیق در آوردن مواد گیاهی (مثل سلولهای گیاهی ،بافت ها ،اندامها ، نوک های ساقه ای ، رویان های پیکری) در یک محلول سدیم آلژینات و سپس چکاندن آن در یک محلول کلرید کلسیم در حال چرخش می باشد. رویان های پیکری برای تولید بذر مصنوعی به محیط محلول MS پایه منتقل شدند و با سدیم آلژینات مخلوط شدند و در محلول کلرید کلسیم چکانده شدند. سدیم آلژینات ۲ ٪ و کلرید کلسیم ۱ ٪ مناسب ترین برای کپسولی کردن بودند. ۸۰٪ رویان های پیکری کپسولی شده در گویچه های آلژینات کلسیم جوانه زدند. بذر ها روی محیط MS بدون هورمون پس از ۶ روز با موفقیت جوانه زدند و پس از ۴-۳ هفته به گیاهچه های کامل تبدیل شدند.

واژه هایی کلیدی : کشت بافت ، رویان زایی پیکری ، سیب زمینی ،جدا کشت دمبرگی ، بذر مصنوعی ، سدیم آلژینات

مجله زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی

واحد گرمسار،۱۳۸۸، دوره۴، شماره۴، ۳۲-۲۳

Production of synthetic seed by encapsulating somatic embryo in potato
(*Solanum tuberosum L.*)

Majd. A[1], Ehsandar. SH[1], Choukan. R[2] and Abdi. H. R.[2]

[1] Dept. of Biology, Faculty of sciences, Islamic Azad university , Tehran.I.R.of Iran

[2] Seed and Plant Improvement Institute, Karaj.I.R.of Iran

In this research, a procedure for technology of synthetic seed production using somatic embryo of potato (*Solanum tuberosum L.*)cv. Agria has been reported. An efficient procedure has been developed for inducing somatic embryogenesis from petiole cultures of potato cv. Agria, which has not reported previously, in addition production of synthetic seed in potato by induction of somatic embryogenesis in iran has not been reported previously. A two-step protocol produced somatic embryo .petiole sections were initially cultured on 2,4 Dicchlorophenoxyacetic acid (2,4-D) + 6-Benzylaminopurine (BAP) supplemented Murashige and skoog (MS) Media. Nodoular embryogenic callus developed the explants on media containing 2,4-D and BAP. The explants with primary callus were subsequently moved onto MS media containing Z , GA_3 and BAP. Treatment with Z and BAP resulted in the induction of the highest number of somatic embryos directly. In this research, A technique for the encapsulation of somatic embryo in calcium alginate beads was tested. The technique involves suspending plant material (i.e. plant cell, tissues, organs, shoot tips, somatic embryo) in a sodium alginate solution and then dripping it into a stirred calcium chloride solution. somatic embryo transferred to liquid basal Murashige and Skoog medium with sodium alginate mixture and then dripping into calcium chloride solution to produce synthetic seed. sodium alginate 2% and calcium chloride 1% was best for encapsulation. Eighty percent of somatic embryo encapsulated in calcium alginate beads germinated. The seed germinated on hormone-free MS medium and after 6 days developed into complete plantlets successfully, which grew into full plants in 3-4 weeks.

Keywords: tissue culture, somatic embryogenesis, *Solanum tuberosum* cv. Agria, petiole

مجله زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی

واحد گرمسار،۱۳۸۸، دوره۴، شماره۴، ۳۲- ۲۳

www.SID.ir

مقدمه

براساس آمار منتشر شده‌جهانی، سیب زمینی (*Solanum tuberosum L.*) یکی از۴محصول عمده جهان بعد از گندم ، برنج و ذرت به شمار می رود. ایران در سال۲۰۰۷، دهمین کشور تولید کننده سیب زمینی در جهان بوده است (Faostate 2007). بنابراین یک محصول دو لپه ای و غده ای مهم در جهان است.سیب زمینی مبزبان۵۰ نوع ویروس با نژادهای مختلف است که مهمترین آنها Potato virus X ، Potato virus Y (PVY) (PVX) ، Potato virus M (PVM) و (Alfalfa mosaic virus (AMV هستند. حمل و نقل غده های بذری آلوده در نقاط مختلف جهان موجب شیوع گسترده این ویروس ها شده است(Hooker,1981). این گیاه کاندیدای مهم برای دستکاری ژنتیکی می باشد که زیست فناوری تولید بذر مصنوعی برای تکثیر این گیاه می تواند بسیار کارآمد و موثر واقع شود. بوجود آمدن ژرم پلاسم جدید از طریق تکنیک های کشت بافت و انتقال ژن توان بالقوه ای را برای اصلاح کیفیت ، مقاوت به بیماری های برای سیب زمینی فراهم آورده است(Haberlach *et al.*,1997).

تهیه بذر حقیقی در همه گیاهان مقدور نیست لذا تهیه بذر مصنوعی در این گیاهان قابل توجیه است. در گیاه سیب زمینی به دلیل عدم ثبات ژنتیکی از بذرهای حقیقی نمی توان استفاده کرد همچنین تکثیر با غده های سیب زمینی سبب شیوع انواع بیماری های می گردد و از آنجا که انبارداری غده های سیب‌زمینی مشکل و پرهزینه می باشد ، کاربرد بذر مصنوعی مصداق می یابد .

رویانزایی پیکری فرایندی‌است که طی‌آن سلولهای پیکری به رویان های پیکری متمایز می شوند. رویان پیکری از لحاظ ریخت شناسی شبیه رویان های تخمی می‌باشند. رویان پیکری ساختارهای دو قطبی و به طور عام دارای اندام‌های رویانی نظیر ریشه چه و محور زیر لپه‌ها می‌باشد. رویانزایی پیکری اساس چند توانی سلولی است که مختص گیاهان عالی است. رویان های پیکری متفاوت از همتای زیگوتی خود به آسانی قابل ردیابی هستند، شرایط کشت آنها به آسانی کنترل می شود و فقدان یک عامل، محدود کننده‌ای برای ادامه آزمایش نیست (Kawahara and Komamire,1995). این ویژگی ها باعث شده اند که، رویانزایی پیکری یک مدل برای بررسی حوادث ریختی ، فیزیولوژیکی ، مولکولی و بیوشیمیایی طی شروع ونمو رویانزایی گیاهان عالی باشد. رویان های پیکری به صورت بالقوه کاربرد های زیست فناوری زیادی دارند که از آن جمله می توان به تولید بذر مصنوعی، ریزازدیادی و گیاهان تراژن اشاره کرد (Francisco *et al.*,2006).

بذرهای مصنوعی به عنوان رویان های پیکری کپسولی شده مصنوعی، جوانه های ساقه ای، تجمعات سلولی یا هر نوع بافت دیگری هستند که می توانند برای کاشتن به عنوان یک بذر استفاده شوند و دارای قابلیت تبدیل به یک گیاه در شرایط درون شیشه ای یا شرایط برون شیشه ای (ex vitro) می باشندکه این پتانسیل را بعد از ذخیره سازی حفظ می کنند (Capuano *et al.* 1998).

اجرای تکنولوژی بذر مصنوعی نیارمند دستکاری سیستم های کشت درون شیشه ای برای تولید مقیاس بزرگ مواد زنده برای کپسولی کردن است که می توانند به گیاهان کامل تبدیل شوند. از طریق این سیستم، تعداد زیادی از رویان های پیکری یا جوانه های ساقه ای تولید می شوند که به عنوان مواد نوزایی گیاهی استفاده می شوند زیرا آنها ساختارهای قوی برای نوزایی گیاه، چه بعد از تیمار جزیی چه بدون تیمار با تنظیم‌کننده‌های رشد هستند. کپسولی کردن بهترین روش برای فراهم کردن محافظت و تبدیل قلمه‌های درون شیشه‌ای به بذرهای مصنوعی است. بذر مصنوعی خشک، در آن دسته از گونه های گیاهی تولید می شود که در آن ها رویان های پیکری در برابر خشکی مقاوم هستند و تحمل شرایط سخت و کم آبی را دارند. رویان های پیکری را با ماده ای به نام پلی اکسی اتیلن گلیکول می پوشانند، بدین صورت که رویان های پیکری در پوسته ای از جنس پلی اکسی اتیلن گلیکول قرار می گیرند. این بذر ها را درون محفظه هود استریل قرار می دهند تا خشک شوند و سپس آنها را در محیط

Archive of SID

www.SID.ir

کشت درون شیشه کشت می دهند.بذر مصنوعی هیدراته، تنها در آن دسته از گونه های گیاهی تولید می شود که در آن ها رویان های پیکری بـه خـشکی حـساس هـستند و تحمل شرایط سخت را ندارند. این بذر هـا شـامل رویـان های پیکری هستند کـه بـا یـک هیـدروژل مثـل آلژینـات کلسیم کپسولی شده اند. پوسته کپسول را آلژینات کلـسیم و درون کپسول را رویان های پیکری تـشکیل مـی دهنـد. کپسول های فوق را با آب مقطر شسته و آن را کشت مـی کنند (Hussain Ara *et al.*,2000).

در سال ۱۹۸۴ ، Redenbaugh و همکـاران تکنیکـی را برای کپسولاسیون هیدروژلی رویان هـای پیکـری یونجـه ابداع کردند. از آن پس،کپسولی کردن در هیدروژل مطالعه شده ترین روش تولید بذر مصنوعی بوده اسـت . چنـدین ماده مثل پتاسیم آلژینات، سدیم آلژینات، آگـار، ژلریـت و غیره بعنوان هیدروژل آزمایش شـده انـد ولـی ژل سـدیم آلژینات معروف تر از همه است.

یکی از دلایلی که مـا را بـر آن داشـت تـا در تولیـد بـذر مصنوعی تلاشمان را به کار بندیم، عدم تولید بذر حقیقـی در گیاه سیب زمینـی اسـت بـه دلایـل زیرمـی باشـد: ۱- ریزش غنچه ها و گل ها قبل یا پس از باروری ۲- تولیـد گرده اندک و عدم تولید دانه های زنده گرده ۳- نر عقیمی ۴- خود ناسازگاری

هدف از پژوهش حاضر شناخت شرایط مناسب و بهینه برای القای رویانزایی پیکری، بلوغ وجوانه زنی رویان ها، ایجاد گیاهچه های کامل از رویان های پیکری در گیاه سیب زمینی و تولید بذر مصنوعی این گیاه می باشد. در این تحقیق پس از ایجاد شرایط مناسب برای رویان زایی پیکری و به دست آوردن رویان ها، با استفاده از روش کپسولی کردن در ژل سدیم آلژینات به منظور محافظت از رویان ها و تولید بذر مصنوعی را دنبال کردیم. زنده مانی بذرهای مصنوعی، رویش آنها تا تولید گیاهچه های کامل نیز انجام شد.

مواد وروش ها

گیاهچه های ذخیره درون شیشه: غده های عاری از ویروس گیاه سیب زمینی واریته آگریا از بخش تحقیقات سیب زمینی، پیاز و حبوبات آبی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر و نهال کرج تهیه شد. غده ها پس از شتشو با آب معمولی، به مدت ۲۰ تا ۲۵ دقیقه در محلول ضد عفونی کننده هیپوکلریت سدیم ۵ درصد فعال غوطه ور و سپس با آب مقطر استریل شتشو شدند. غده ها در گلدانهای حاوی ماسه مرطوب کاشته شده و در گلخانه نگهداری شدند. آبیاری غده ها در دمای تقریبی ۲۵ درجه سانتی گراد گلخانه، هر ۳ الی ۴ روز یک بار انجام شد. برای تهیه قلمه های تک گره، از بوته های ۳۰ تا ۴۵ روزه استفاده شد. قلمه های تک گره در محلول ضد عفونی کننده۲/۵ ٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و سپس توسط آب مقطر استریل سه تا چهار بار شتشو شدند.۱۰ml از محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) در لوله‌های آزمایش(۱۵×۲۰۰ mm) ریخته شدند و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. تک گره های استریل شده در محیط کشت پایه MS محلولهای نمکی، ویتامین ها، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، بدون تنظیم کننده های رشد که با ۶/۵ گرم در لیتر آگار (Sigma) جامد شده بودند، قرار داده شدند. گیاهچه های کشت بافت ذخیره بوسیله قلمه های تک گره تکثیر یافتند. تمامی هورمونهای استفاده شده در این تحقیق بوسیله فیلترهای میلی پور (۰/۲ میکرون) استریل شده و سپس به محیط کشت اتوکلاو شده سرد شده اضافه شدند.

شرایط کشت: لوله ها پس از کشت در اتاقک رشد تحت شرایط کنترل شده با دوره نوری ۱۶ ساعت نور حاصل از لامپ های فلورسانت سفید و زرد رنگ با شدت ۳۵۰۰ لوکس و دمای ۱±۲۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. گیاهچه های کشت بافت ذخیره بوسیله قلمه های تک گره تکثیر یافتند. واکشت نمونه ها هر چهار هفته یک بار

Archive of SID

www.SID.ir

انجام شد. انجام واکشت ها به منظور تحریک رشد بیشتر و گیاهچه های قدرتمند تر انجام شد.

القای رویان های پیکری: از دمبرگ‌های گیاهچه های ذخیره۶-۴ هفته‌ای به عنوان جداکشت استفاده شد. جداکشت‌های دمبرگ، به طول۰٫۵سانتی‌متر در یک موقعیت افقی در روی پلیت های حاوی محیط کشت پایه MS (محیط۱) تکمیل شده با۳ ٪ ساکارز, 2,4-D $^{-1}$ ۰/۵ mgl^{-1} BAP +۲ mgl به مدت یکماه در تاریکی در دمای ۱±۲۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. کالوسهای تشکیل شده بر روی محیط۱ به محیط کشت پایه MS (محیط ۲) تکمیل شده با ۳ ٪ ساکارز $^{-1}$ ۴mgl زآتین و$^{-1}$mgl۱ژیبرلیک اسید و$^{-1}$mgl BAP ۱ منتقل شدند و درروشنایی بادوره نوری۱۶ساعت نگهداری شدند

کپسولی کردن رویان های پیکری: رویان های پیکری گیاه سیب زمینی را در مرحله لپه ای جداکرده با ml ۱۰۰محلول محیط کشت پایه MS به همراه ۳ ٪ ساکارز و ۲ ٪ سدیم آلژینات استریل شده مخلوط کردیم سپس محلول بوسیله یک پی پت ml ۲۰ در یک محلول کلرید کلسیم ۱ ٪ استریل تحت شرایط چرخشی چکانده شد. گویچه های تشکیل شده به مدت۲۰دقیقه در کلرید کلسیم چرخیدند، سپس ۲ مرتبه بوسیله آب مقطر استریل شده شتشو داده شدند. کپسولهای بدست آمده را بهml ۱۰۰ محیط کشت پایه MS و۱۰ گرم ساکارز در فلاسک ارلن مایر ml منتقل کردیم. پس از پوشانیدن کامل در فلاسک آن در تاریکی در ۲۶ درجه سانتی گراد بر روی شیکر ۱۲۰rpm قرار دادیم. بعد از۶روز بذرها را به محیط کشت پایه MS جامد در لوله های آزمایش منتقل کردیم.

انتقال گیاهچه های حاصل از رویش رویانها به خاک: گیاهچه‌های حاصل از رویان‌های پیکری‌در شرایط سترون از درون لوله های کشت خارج، و پس از شتشوی محیط اطراف ریشه با آب مقطر سترون به درون پرلیت سترون منتقل و در شرایط کاملا" مرطوب در زیر پوششهای پلاستیکی نگهداری شدند. گیاهچه ها طی مدت یک هفته با سوراخ کردن تدریجی درپوش آنها مرحله سازش را طی‌کرده و با محیط خشکی سازگار شدند.انتقال گیاهچه‌ها به گلدانهای دارای خاک معمولی سترون (اتوکلاو شده) انجام شد. گیاهان مرحله رویشی را با موفقیت گذراندند.

بررسی های آماری: مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan's) یا همان طرح متعادل کاملا تصادفی تنظیم و برای هر آزمایش حداقل ۳ تکرار (سه ظرف محیط کشت و در هر ظرف حداقل ۶ جداکشت) در نظر گرفته شد. آنالیز ها با استفاده از نرم افزار MSTAT- C انجام شدند.

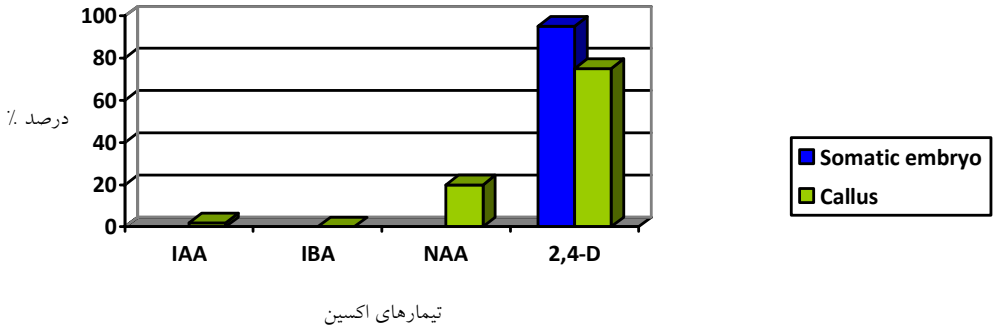
نتایج

تولید کالوس، باززایی و ایجاد رویان پیکری در محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده های رشد در هیچ یک از جداکشت های برگی، میانگره ای و دمبرگی مشاهده نشد و قطعات جداکشت نکروزه شده و از بین رفتند نمونه ای از این کشت ها در شکل ۱ آورده شده است. در محیط های کشت حاوی تنظیم کننده های رشد کالوس ها تشکیل شدند و بهترین زمان برای واکشت این کالوس ها زمانی بین ۳ تا چهار هفته بود. تاخیر در این زمان باعث قهوه ای رنگ شدن کالوس ها می شد.

تیمارها با اکسین های IAA , IBA , NAA نه تنها در کالوس زایی موثر نبودند، بلکه در ایجاد کالوس های رویان زا نیز به هیچ عنوان تاثیری نداشتند (شکل ۱ و نمودار ۱)، در حالی که هورمون 2,4-D باعث تشکیل کالوس های رویانزا شد (شکل ۳). همچنین مقدار هورمون در نتیجه آزمایش ها بسیار مهم بود، غلظت بهینه 2,4-D برای دستیابی به کالوس زایی بین ۲ تا $^{-1}$mgl ۳ بود، به طوری که این هورمون در غلظت های پایین (کمتر از $^{-1}$mgl ۱) فقط باعث ریشه زایی می شد (شکل ۲) و در غلظت های بالا (بیشتر از $^{-1}$mgl ۵) کالوس های قهوه ای رنگ تشکیل می شدند (شکل ۴).

Archive of SID

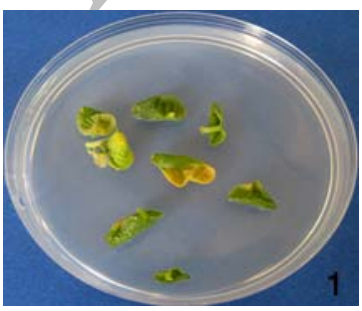
www.SID.ir



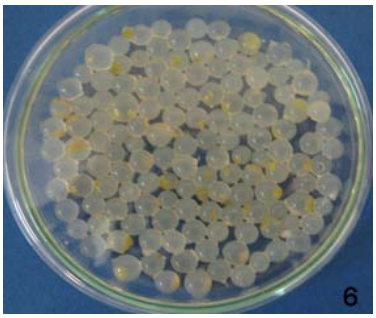
نمودار ۱: تاثیر اکسین بر روی تشکیل کالوس های غیر رویان زا و رویان زا (برحسب٪)

کالوس های حاصل از کشت جداکشت های دمبرگی گیاهچه های یک ماهه رقم اگریا در محیط کشت دارای ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA ویژگی های ظاهری کالوس های رویان زا را داشتند که پس از گذشت ۲-۳ ماه مراحل مختلفی از رویان زایی (رویان های گویچه ای، قلبی شکل) روی کالوس ها قابل تشخیص بودند. واکشت کالوس ها در این محیط (محیط ۱) تاثیر قابل توجهی در تکمیل مراحل رویان زایی، بلوغ رویان ها و در نهایت آشکار شدن ساختارهای رویانی کامل را نداشت. به همین علت کالوس ها را به محیط کشت پایه MS تکمیل شده با mgl^{-1} ۴ زآتین و mgl^{-1} ۱ژیبرلیک اسید و mgl^{-1} BAP ۱ (محیط ۲) منتقل شدند و با گذشت یک تا دو هفته دیگر رویانزایی شدت گرفت و بر تعداد رویان های پیکری بر روی کالوس ها افزوده شد (شکل ۵).

در ادامه آزمایش ها ما از رویان های پیکری که در مرحله قبل پژوهش بدست آوردیم، استفاده کردیم. اولین قدم در کشت مستقیم رویان های پیکری، پوشش دادن رویان ها در پوسته های هیدراته می باشد در پژوهش حاضر تکنیک جدید کپسولی کردن بوسیله کلسیم آلژینات استفاده شد. رویان های پیکری گیاه سیب زمینی رقم آگریا را که با محیط کشت پایه MS به همراه ۳ ٪ ساکارز و ۱٪ سدیم آلژینات استریل مخلوط شده بودند بوسیله سرنگ ml ۱۰ در محلول کلرید کلسیم ۰/۵٪ چکاندیم، گویچه هایی تشکیل شدند که به محض چکاندن در کلرید کلسیم متلاشی شده و حالت کروی نمی گرفتند، استفاده از سرنگ ml ۱۰ باعث تشکیل گویچه هایی می شد که قطر آنها بسیار کوچک بود و رویان ها در قسمت مرکزی گویچه جای نمی گرفتند. به همین دلیل نسبت های آلژینات سدیم وکلرید کلسیم را تغییر داده و از محیط کشت پایه MS به همراه ۳ ٪ ساکارز و ۲٪ سدیم آلژینات استریل استفاده کردیم. بوسیله یک پی پت ml ۲۰ از محیط مذکور در یک محلول کلرید کلسیم ۱٪ چکاندیم، گویچه هایی تشکیل شدند که به محض چکاندن در کلرید کلسیم حالت کروی می گرفتند که در ابتدای چرخش حالت شفافی داشتند وبه مرور زمان گویچه های مات رنگ شکل گرفتند، همچنین استفاده از پی پت ml ۲۰ باعث شد رویان ها در قسمت مرکزی گویچه جا بگیرند.



Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱: کشت جداکشت های برگی در محیط کشت MS بدون تنظیم کننده های رشد

شکل۲: کشت جداکشت های برگی در محیط کشت MS دارای ۱ mgl^{-1} IAA

شکل۳: تشکیل کالوس‌های رویانزا در محیط کشت MS دارای ۲ mgl^{-1} 2,4-D و ۰/۵ mgl^{-1} BAP

شکل۴: کشت جداکشت های برگی در محیط کشت MS دارای ۵ mgl^{-1} 2,4-D

شکل ۵: رویان پیکری در محیط کشت پایه MS دارای ۴ میلی گرم در لیتر Z ، ۱میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر GA_3

شکل ۶: رویان های پیکری کپسولی شده با سدیم آلژینات (بذر مصنوعی)

بذر های مصنوعی را به تاریکی در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد بر روی شیکر ۱۲۰ rpmانتقال دادیم، که علت این کار جوانه زنی سریعتر رویان ها و همچنین هوادهی مناسب برای تامین مواد مغذی و اکسیژن به بذرها بود. در ادامه، نمو گیاهچه هایی که از بذرهای کپسولی شده در کلسیم آلژینات رشد کردند بررسی شد. بذرهای مصنوعی رقم اگریا را که پس از ۶ روز شروع به جوانه زنی کردند به محیط کشت پایه MS انتقال دادیم. بعد از ۱۴ روز کشت در نور فلورسانت پوسته کلسیم آلژینات تحلیل رفت، بذرها نمو پیدا کردند و یک ماه بعد گیاهچه هایی با طول بین ۷ الی ۱۵ سانتی متر با ۶ تا ۸ برگ بوجود آوردند. این گیاهچه ها بسیار ضعیف تر از گیاهچه های حاصل از کشت غده ها بودند. از میان ۲۰ بذر کشت شده، ۱۶ تای آنها به گیاهان کامل تبدیل شدند، در حالیکه ۲ گیاهچه در کپسول باقی ماندند و ۲ تای دیگر بدون هیچ تغییری باقی ماندند.

Archive of SID

www.SID.ir

نو ساقه
(Shoot)

بذر مصنوعی
(Artificial Seed)

ریشه(Root)

شکل۷: مراحل جوانه زدن بذر مصنوعی در محیط کشت MS بدون تنظیم کننده های رشد

شکل۸: انتقال گیاهچه حاصل از بذر مصنوعی به شرایط گلخانه ای

بحث

مطالعات گزارش شده بر روی کشت بافت گیاه سیب زمینی اغلب به بازایی گیاه از طریق اندام زایی محدود شده اند و مقالات بسیار کمی به رویان زایی پیکری در این گیاه پرداخته اند. باززایی از طریق رویان زایی پیکری از کالوس های جداکشت دمبرگی تاکنون گزارش نشده است. در این پژوهش یک روش ساده برای القای مستقیم رویان های پیکری از جداکشت های دمبرگی ارائه کرده ایم. روند مشابهی از رویان زایی پیکری حاصل از جداکشت های برگی گیاه سیب زمینی توسط JayaSree و همکاران در سال ۲۰۰۱ ارائه شده است.

بر اساس نتایج حاصل از مطالعات متعدد، کالوس زایی گیاهان بدون تنظیم کننده های رشد تقریبا" نا ممکن می باشد (George, 1996). نتایج ما در این تحقیق نیز نشان داد که بدون وجود هورمون ها قطعات جداکشت نمی توانند تولید کالوس کنند، در نتیجه نکروزه شده و از بین می روند. واکشت کردن کالوس ها در محیط های کشت دارای هورمون بر روی زمان تشکیل رویان های پیکری و تعداد آنها بر روی جداکشت های سیب زمینی تاثیر داشت. افزایش تعداد رویان های پیکری به علت واکشت کالوس ها در این تحقیق با نتایج پژوهش های Seabrook& Douglass در سال ۲۰۰۱ مطابقت دارد.

عوامل موثر مهم در القای کالوسهای رویانزا و رویان های پیکری و باززایی گیاهان شامل نوع جداکشت، سن جداکشت و تنظیم کننده های رشد می باشد. تنظیم کننده های رشد، عامل مهم در تشکیل نوع کالوس هستند. می توان در حالت عمومی نتیجه گرفت که اکثر تیمار هایی که رویانزایی پیکری را القا می کنند، مثل 2,4-D می-توانندروی تعادل درون سلول تاثیر بگذارند. Mazrooei و همکاران در ۱۹۹۷ اظهار داشتند که نوع اکسین استفاده شده در آزمایش های رویان زایی پیکری تاثیر اساسی دارد و به این نتیجه رسیدندکه موثرترین اکسین ها برای رویان زایی پیکری در سیب زمینی شیرین 2,4-D و 2,4,5-T می باشند نتایج آزمایش های پژوهش حاضر نیز نقش 2,4-D در تشکیل رویان های پیکری را تایید می کند.Ammirato (۱۹۸۷) گزارش داد که نمو طبیعی رویان های پیکری نیازمند تنظیم مکانی (جایگاه رویان ها بر روی بخش های متفاوت جداکشت و متفاوت بودن شیب غلظت هورمونی در این قسمتها) و زمانی پیدایش رویان ها (رویان ها همگی در یک زمان پدیدار نشدند) و تمایز سلولی است. تنظیم کننده های رشد می توانند چندین تاثیر در این فرایند ها داشته باشند که به غلظت یا به مرحله به کارگیری هورمونها بستگی دارد. در پژوهش

Archive of SID
www.SID.ir

حاضر، نمو غیر همزمان رویان های پیکری مشاهده شد. این پدیده توسط De Garcia *et al.*, 1995 و JayaSree *et al.*, 2001 گزارش شده است. همچنین منبع جداکشت نقش مهمی در رویان زایی دارد، جداکشت هایی که دارای سطح بالای اکسین داخلی هستند، می توانند مناسب باشند (Jimenez and Thomas ,2006) احتمال دارد یکی از دلایل تشکیل کالوس های رویان زا و رویان های پیکری از جداکشت های دمبرگی در پژوهش حاضر نسبت بیشتر هورمون های درون زا در این جداکشت ها نسبت به سایر آنها باشد.

Zakia Latif *etal.*,2007 نشان دادند که تیمار با اکسین های IAA , IBA در کالوس زایی و ایجاد کالوس های رویان زا تاثیری ندارند اما هورمون NAA تنها به مقدار بسیار کمی در تشکیل کالوس زایی موثر است.نتایج آزمایش‌های ما نیز بااین گزارش‌ها مشابه است. سخت شدن کلسیم آلژینات با غلظت سدیم آلژینات و کلرید کلسیم و نیز مدت تشکیل کمپلکس تنظیم می شود؛ معمولا" ۲٪ ژل سدیم آلژینات همراه با ی محلول حاوی $Mm\ Ca^{+2}$ ۱۰۰است کار می رود و نتایج رضایت بخشی به همراه دارد. بررسیهای ما در این زمینه با نتایجی که Redenbaugh *et al.*,1993 بدست آورده اند، هم سویی دارد. غلظت مواد پوشاننده یک عامل مهم در فناوری بذر مصنوعی است. پوشش بایستی دارای مواد تغذیه ای، تنظیم کننده های رشد و سایر اجزایی باشد که برای جوانه زنی و تبدیل لازم هستند و باید بوسیله ماشین های کشاورزی حاضر قابل کاشت باشد(Ara و همکاران، ۲۰۰۰). دلیل استفاده از آلژینات کلسیم سهولت کاربرد و عدم سمیت آن است.کپسولهای آلژینات کلسیم با چکاندن مخلوط رویان های پیکری و آلژینات سدیم در محلول نمک کلسیم بوجود می آیند. این پوسته ژلاتینی رویان ها را حفاظت نموده و می تواند به عنوان آندوسپرم مصنوعی نیز به بقا و دوام رویان کمک نماید (Fujii,J.Ann *et al.*,1987).

هیدروژل آلژینات گزینه مناسبی به عنوان ماتریکس بذر مصنوعی می باشد به دلیل چسبندگی متعادل، سمیت پایین و ژلی شدن سریع که از مشخصات مهم برای کاربرد کپسولی کردن می باشد. پس از تشکیل شدن کپسول، شتشو با آب مقطرموجب حذف یونهای کلسیم از سطح کپسول می شود. درمیان مواد متفاوت که برای کپسولی کردن وجود دارند، سدیم آلژینات به دلیل قابلیت حل شدن در دمای اتاق و خاصیت نفوذپذیری کامل ژل با کلرید کلسیم انتخابی مناسب برای رویان های پیکری و تولید بذر مصنوعی است. (Bapat *et al.*, 1987). ما نیز با توجه به نتایج تحقیقاتی در پژوهش حاضر از سدیم آلژینات و محلول کلرید کلسیم استفاده کردیم.

رویان های پیکری کپسولی شده توانستند به گیاهچه های کامل دارای ریشه، محور زیر لپه و محور ساقه برگی تکامل بیابند، تشکیل محور ریشه‌ای- ساقه‌ای نیاز به تشکیل و فعالیت مریستم های راسی دارد.(Arae *et al.*,2000) نیز در گزارش های خود وجود مریستم های ریشه ای و ساقه ای در رویان های پیکری را گزارش داده اند.

بذر های مصنوعی ساخته شده را به منظور ارزیابی در شرایط گلخانه کشت می کنند و میزان تبدیل آنها به گیاه کامل را بدست می آورند. بسیاری از بذرهای مصنوعی ایجاد شده در شرایط محیط کشت قادر به رشد می باشند ولی در صورت کشت در داخل خاک قادر به رشد نیستند در تحقیق ما بذر مصنوعی پس از انتقال به شرایط گلخانه رشد مناسب خود را پیگیری کرد و به ادامه رشد خود پرداخت.

علی‌رغم تحقیقات گسترده درمورد تولیدبذرهای مصنوعی طی یک دهه گذشته، چندین مسئله مهم در مورد تجاری سازی آن پاسخ داده نشده است.اولین شرط برای به کارگیری عملی تکنولوژی بذر مصنوعی تولید مقیاس بالای ریزازدیادی با کیفیت است، که در حال حاضر یک عامل محدودکنندهٔ جدی است. فاکتور های دیگری که عامل جوانه زنی ضعیف بذرهای مصنوعی هستند عبارتند از عدم تامین مواد مغذی و اکسیژن، تهاجم میکروبی، آسیب مکانیکی به رویان‌های پیکری. فناوری بذر مصنوعی پتانسیل عظیمی در ریزازدیادی و تبدیل ژرم

Archive of SID

www.SID.ir

پلاسم و اصلاح نباتاتی دارد. به هر حال، تحقیق بیشتری برای تکمیل این تکنولوژی لازم است، بطوریکه می توان در یک مقیاس تجاری از آن استفاده کرد (Arae *et al.*,2000).

گرچه در پژوهش حاضر گیاهچه های حاصل از رشد بذرهای مصنوعی رشد و نمو مناسبی داشتند، اما عاری بودن آنها از آلودگی های ویروسی و باکتریایی نیاز به بررسی های لازم را دارد.گیاهان زیادی سترون هستند و قادر به تشکیل دانه نمی باشند، زیست فناوری تولید بذرهای مصنوعی برای تکثیر این گیاهان کاربرد وسیعی دارد. سیستم تهیه بذر های مصنوعی می تواند به عنوان یک روش کشت و تکثیر مورد استفاده قرار گیرد. بذر های مصنوعی در صورتی بالاترین سود و منفعت را می رسانند که بتوان از آنها به عنوان بذر حقیقی استفاده کرد. با این حال تولید گلخانه ای بذر های مصنوعی می تواند راه میانه ای جهت تکثیر و ازدیاد گیاهان باشد. تحقیقات بعدی بایستی در جهت یافتن راه حلی برای افزایش کیفیت رویان و نسبت رشد مناسب در شرایط کشت مستقیم در مزرعه باشد.

References

Ammirato PV(1987). Organisational events during somatic embryogenesis. In: Green CE, Somers DA, Hackett WP & Biesboer DD(eds) *Plant tissue and cell culture* (pp 57-81). AR Liss, New york

Ara, H., U . Jaiswal and V.S. Jaiswal (2000). Synthetic seed: Prospects and limitations. *Current Science*., 78: 1438-1444

Bapat , V. A., M . Mhatre and P. S. Rao (1987). Propagation of *Morus indica L.* (Mulberry) by encapsulated shoot buds. *Plant cell Rep*., 6:393-395

Capuano, G., Piccioni, E. and Standardi, A., J. Hortic (1998) Sci.Biotechnol., 73, 299 –305.

De Garcia E, Martinez S & Dw Garcia E (1995). Somatic embryogenesis in Solanum tuberosum L. CV. Desiree from stem nodal sections. *J. Plant physiol*. 145: 526-530

Francisco R. Quiroz-Figueroa .Rafael Rojas-Herrera . Rosa M. Galaz-Avalos .Vı´ctor M. Loyola-Vargas (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, Springer Science +Business Media B.V. 86:285–30

Fujii, J.O Ann A. D. Slade and R.Redenbangh (1987). Artificial seeds for plant propagation, *Tibtech* 5: 335-339

George,E.F. (1996). The components of culture media. In: George,E (Ed). Plant propagation by tissue culture. *Exegetics Ltd*., UK. 274-338

Haberlach GT, Cohen BA, Reichert NA, Baer MA, Towill LE & Helgeson JP (1985) Isolation, culture and regeneration of protoplasts from potato and several related Solanum species. *Plant Sci*. 39: 67–74

Hooker, w.j (1981). compendium of potato diseases. APS press, *Minnesota*,125 pp.

Hussain Ara, Uma Jaiswal and V. S. Jaiswal (2000). Synthetic seed: Prospects and limitations. *Current Science*, 78: 1438-1444

Jaya sree. T., Pavan U., Ramesh M., Rao a.v. et al (2001) Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 64: 13-17

Jimenez V, Thomas C (2006). Participation of Plant Hormones in Determination and Progression of Somatic embryogenesis., Plant cell Monographs, Vol.2, Robinson DG, series ed., *Springer-Verlag*, Berlin Heidelberg, Germany, pp.103-118

Kawahara R, Komamine A (1995). Molecular basis of somatic embryogenesis. In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 30. Somatic embryogenesis and synthetic seed I. *Springer-Verlag*, Berlin, pp 30–40

Mazrooei, S.Al., Bhatti, M.H. and Henshaw, G.G (1997) Optimisation of somatic embryogenesis in fourteen cultivars of sweet potato . *Plant cell Reports* 16:710-714

Archive of SID

www.SID.ir

Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*., 15: 473-497

Nawy T, Lulowitz W, Bayer M (2008) . Talk global, act local – patterning the Arabidopsis embryo. *Curropin plant Bio*ll 11:28-33

Redenbaugh, K., Nichol, J., Kossler, M. E. and Paasch, B (1984). In vitro, 20, 256–257

Rederbangh, K., J.A. Fujii and D. Slade(1993). Hydrated coatings for synthetic seeds. In: Synseeds pp 35-46. (Ed.): K. Redenbaugh. CRC Press, Boca Raton.

Sanjeev Kumar Sharma . Glenn J. Bryan . Steve Millam (2007). Auxin pulse treatment holds the potential to enhance efficiency and practicability of somatic embryogenesis in potato. Plant Cell, , *Springer-Verlag*, 26:945–950

Seabrook, J.E.A., Douglass, L.K. (2001) Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20:175–182

Zakia latif, Idress, A. Nasir , S. Riazuddin (2007). Indigenous production of Synthetic seed in *Daucus carota* , *pak. J. Bot*., 39(3):849-855

Archive of SID

www.SID.ir