مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد هفدهم، شماره اول، ۱۳۸۹
www.gau.ac.ir/journals

تولید کالوس و جنین‌زایی بدنی گونه مرتعی *Agropyron cristatum* در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ

***معصومه امیرخانی[۱]، کامبیز مشایخی[۲] و منصور مصداقی[۳]**

[۱]دانشجوی دکتری گروه علوم مرتع، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استاد گروه مرتعداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۱٤ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱/۲۵

چکیده

گونه علف گندمی *Agropyron cristatum* L. Gaertn. از گونه‌های مرتعی بومی مناطق نیمه‌خشک ایران است که طی سالیان متمادی با شرایط آب و هوایی نامناسب این مناطق سازش‌یافته است. این گونه از جمله علف‌گندمیان مقاوم به سرما، خشکی و چرا و از خویشاوندان نزدیک گندم و جو می‌باشد. در این پژوهش اثر ۷ غلظت متفاوت تنظیم‌کننده رشد 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) بر کالوس و جنین‌زایی بدنی گونه علف‌گندمی *Agropyron cristatum* L. Gaertn. در محیط کشت MS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان کالوس، جنین‌زایی بدنی در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌دست می‌آید. تولید کالوس با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد 2,4-D تا سطح ۱ میلی‌گرم بر لیتر این ماده رخ داد در حالی‌که غلظت‌های ۵/۵ و ۹ میلی‌گرم بر لیتر موجب کاهش چشم‌گیر آن شد. با این وجود جنین‌های بدنی در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های ۱ و ٤ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده شد. تشکیل جنین‌های تکامل‌یافته و تولید گیاهچه فقط در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر این هورمون رخ داد. در واقع غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون 2,4-D از نظر ایجاد جنین کروی، اژدری، گیاهچه و همچنین کالوس‌های ریشه‌دار و تعداد ریشه‌های آن‌ها با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشته و در تیمار شاهد که فاقد این تنظیم‌کننده رشد بود، کالوس‌زایی و جنین‌زایی بدنی انجام نشد.

واژه‌های کلیدی: 2,4-D، کالوس‌زایی، جنین‌زایی بدنی، علف‌گندمی *Agropyron cristatum*

* مسئول مکاتبه: m.amirkhani@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

استقرار سیستم کشت بافت به‌منظور باززایی گیاهان در علف‌گندمیان، اساس دست‌ورزی[1] و اصلاح ژنتیکی در سطح سلولی است. باززایی گیاهان تحت شرایط کنترل شده شامل کشت اندام‌ها، بافت‌ها، و سلول‌ها طی ۳۰ سال گذشته برای دامنه وسیعی از گیاهان خانواده گندمیان و گیاهان علوفه‌ای گسترش یافته است (ونگ و همکاران، ۲۰۰۱). توانایی تحمل و بقای این گیاهان در برابر شرایط نامساعد محیطی آن‌ها را جهت بررسی تغییرات فیزیولوژیکی و مولکولی در مقابله با تنش‌های محیطی مناسب ساخته است. دارا بودن خصوصیات فیزیولوژیکی و مولکولی برجسته و به‌کارگیری این خصوصیات در کشاورزی به‌منظور انتقال صفات مطلوب از انواع وحشی آن‌ها به‌واریته‌های زراعی، اهمیت این گونه‌ها را بیشتر کرده است. برای پی بردن به‌ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مولکولی این گیاهان و شناسایی ژن‌های ارزشمند آن‌ها، تکثیر و عادت دادن آن‌ها به رشد در شرایط کنترل شده درون شیشه‌ای و گلخانه‌ای اهمیت زیادی دارد. بیشتر پژوهش‌گران برای دست‌یابی به این اهداف به روش‌های کشت بافت روی آورده‌اند. ایجاد کشت‌های تعلیقی یا کشت‌های کالوس‌زا با کیفیت خوب و باززایی گیاهان، پیش‌شرط لازم برای انتخاب و انتقال ژن‌های مطلوب به‌گونه‌های علفی محسوب می‌گردد (ونگ و همکاران، ۲۰۰۳).

جنین‌زایی بدنی روش جدیدی برای تولید انبوه گیاهان در محیط کشت درون شیشه است که با القاء توانایی تولید جنین در سلول‌های بدنی منجر به تولید گیاه کامل می‌شود (گرم و همکاران، ۱۹۹۶). برای رسیدن به این هدف نمونه گیاهی در مرحله القاء در محیط حاوی اکسین قرار می‌گیرد که در بیشتر موارد 2,4-D است. اکسین‌ها طویل شدن و رشد سلولی، تقسیم سلولی، تشکیل کالوس و تشکیل ریشه‌های نابه‌جا را تحریک می‌کنند. اکسین‌ها همچنین از نمو جوانه‌های جانبی و تشکیل جنین‌های سوماتیکی برروی کالوس جلوگیری می‌نمایند. سپس به محیط دیگری که اکسین از آن حذف شده انتقال می‌یابند تا جنین‌ها ظاهر شوند (معینی و کهریزی،۲۰۰۳؛ هالپرین، ۱۹۹۵). اکسین‌ها نقش‌های متفاوتی در رشد و نمو گیاه دارند. تشکیل جنین‌های بدنی توسط تیمار بافت‌ها با اکسین‌هایی مانند 2,4-D مشاهده شده اما باید توجه داشت که اکسین‌ها فقط در طی فاز القایی تشکیل ریشه نابه‌جا و جنین‌زایی بدنی، مورد نیاز هستند و سپس اثر بازدارندگی بر تمایز سلول‌های القای شده جهت اندام‌زایی و یا جنین‌زایی دارند. 2,4-D بیشتر به‌عنوان یک اکسین قوی محسوب می‌شود و جهت

1- Manipulation

Archive of SID

www.SID.ir

تشکیل کالوس و القاء جنین‌زایی بدنی به‌کار می‌رود (مشایخی و اکبرپور، ۲۰۰۸). علاوه‌بر اکسین‌ها تولید جنین‌های بدنی تحت‌تأثیر فاکتورهای زیاد دیگری مانند سایر هورمون‌های گیاهی، مواد معدنی، ژنوتیپ و سن نمونه قرار می‌گیرد (باقری و صفاری، ۲۰۰٤).

مای‌فوجی و همکاران (۲۰۰۵) در پژوهشی روی گونه‌های *Agropyron cristatum*، *A. desertorum*، *A. mongolicum* و *Agropyron cristatum* × *A. mongolicum* به این نتیجه رسیدند که باززایی این گیاهان از کالوس حاصل از ریزنمونه‌های گل‌های نابالغ آن موفقیت‌آمیز است. محیط کشت استفاده شده توسط آن‌ها، محیط کشت پایه[1] MS و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بود. زونگ و همکاران (۱۹۹۱) باززایی علف‌گندمی *Agrostis palustris* Huds را از طریق جنین‌زایی سوماتیکی انجام دادند. تالوار و رشید (۱۹۸۹) برای گونه علف‌گندمی *Pennisetum* sp. Ann Bot London فاکتورهای مؤثر در تشکیل کالوس‌های جنین‌زا را مورد بررسی قرار دادند. هر دو پژوهش بالا لزوم وجود هورمون‌های اکسین مثل 2,4-D برای تشکیل کالوس‌های جنین‌زا در کشت بافت را تأکید کردند. رضوی و همکاران (۲۰۰۵) روش‌های مختلف تکثیر دو گونه مرتعی *Aeluropus lagopoides* و *Aeluropus littoralis* شامل کشت بذر، کشت هیدروپونیک، تکثیر رویشی گیاه، کشت کالوس و کشت تعلیقی و باززایی گیاهان یادشده در شرایط کنترل شده را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش مشخص شد که کشت بافت نوک ریشه‌های بذرهای جوانه‌زده به‌عنوان ریزنمونه مناسب بوده و منجر به‌تشکیل کالوس شده است. همچنین در این پژوهش برای ایجاد کالوس‌های جنین‌زا در کشت تعلیقی، افزودن ترکیبی از هورمون‌های کینتین و اکسین ضروری تشخیص داده شد و بهترین باززایی گیاهچه‌ها از کالوس‌های جنین‌زا به‌ترتیب در محیط کشت دارای مقادیر ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر اکسین و کینتین به‌دست آمد. همچنین آن‌ها عنوان نمودند که تکثیر این دو گونه مرتعی از طریق کالوس و کشت تعلیقی، برای پژوهش‌های مولکولی آینده راهی آسان را فراهم می‌کند. عنایتی‌شریعت‌پناهی و دبیراشرافی (۲۰۰۳) کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های جنین نارس و رسیده گیاه جو که هم‌خانواده گندم و دیگر علف‌گندمیان است را در شرایط کنترل شده بررسی و بهترین محیط کشت کالوس‌زایی را محیط MS با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D معرفی و در محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین بیش‌ترین ریشه‌زایی را در کالوس‌ها مشاهده کردند. استفاده از بذر

1- Murashig and Skoog

Archive of SID

www.SID.ir

یا جنین بالغ به‌منظور شروع کشت کالوس عملی‌تر و راحت‌تر است و جدا کردن گل‌های نابالغ و جنین‌های نارس به‌عنوان ریزنمونه معمولاً زمان‌بر و مشکل‌تر است. استقرار کشت‌های کالوس و باززایی گیاهان برای بیش از ٦٥ گونه علف‌گندمی و علوفه‌ای از ۳۰ جنس شامل *Agropyron*، *Agrostis*، *Alopecurus*، *Bromus*، *Bothriochloa*، *Cenchrus*، *Dactylis*، *Elymus*، *Festuca*، *Poa*، *Panicum*، *Phragmites*، *Puccinellia*، *Thinopyrum* و *Stipa* گزارش شده است (فرانکلین و همکاران، ۱۹۹۰؛ راس و همکاران، ۱۹۹۵؛ چاین و واسیل، ۱۹۸۲؛ لازر و همکاران، ۲۰۰۰).

در بین کل گیاهان، خانواده گندمیان یکی از مهم‌ترین خانواده‌های گیاهی و از نظر تعداد گونه، رتبه چهارم (٦۰۰ جنس و ۱۰۰۰۰ گونه) را داراست (واتسون و دالویتس، ۱۹۹۲). همچنین غلات و ۷۵ درصد گونه‌های علوفه‌ای زیر کشت، از گندمیان می‌باشند. طبق بررسی‌های انجام شده انواع *Agropyron* جزو گونه‌های چندساله مقاوم و سازگار به دامنه وسیعی از دما و بارندگی هستند و اغلب در جوامع گیاهی حفاظت‌شده، جوامع غالب را تشکیل می‌دهند (بنوان و همکاران، ۱۹۷۳). این گونه‌ها بخشی از علوفه مورد نیاز میلیون‌ها دام اهلی و وحشی را تأمین کرده و به واسطه ریشه‌های محکم و قدرت ازدیاد فراوان نقش مهمی در حفاظت خاک، حفظ محیط زیست، و دست‌یابی به اهداف زیبایی‌شناختی (aesthetics) دارند (بارنز و بایلور، ۱۹۹۵). در زمینه کشت بافت گونه‌های مرتعی در ایران به‌خصوص در مورد علف‌گندمیان و تعیین بهترین اندام و محیط کشت جهت باززایی این گیاهان در شرایط کنترل شده بررسی‌های اندکی (رضوی و همکاران، ۲۰۰۵) صورت گرفته است. هدف از این پژوهش بررسی تعیین شرایط مناسب جهت تولید کالوس، جنین بدنی و تکامل جنین‌های به‌وجود آمده در گونه تحت بررسی در شرایط کنترل شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه: بذرهای گونه *Agropyron cristatum* L. Gaertn. در تابستان سال ۱۳۸۷ از بخش مرتعی پارک ملی گلستان که رویشگاه این گونه است جمع‌آوری گردید و از آن ریزنمونه تهیه شد. محل نمونه‌گیری در محدوده جغرافیایی ′۱۲ °٥٦ طول شرقی و ′۲۳ °۳۷ عرض شمالی قسمت شرقی پارک و جنوب‌شرقی محدوده‌ای به‌نام یاغ‌تیکلان قرار دارد. ارتفاع منطقه ۱٦۰۰ متر و میزان متوسط بارندگی‌های سالیانه در این منطقه حدود ۳۰۰ میلی‌متر است (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱- رویشگاه، خوشه، سنبلک و بذر گونه *Agropyron cristatum* L. Gaertn. در محدوده پارک ملی گلستان.

استریل کردن ریزنمونه‌های بذر: این عمل از طریق ضدعفونی سطحی با الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم تجاری ٦۰ درصد به همراه یک قطره توین به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام شد و سپس بذرها ۳ بار با آب مقطر آب‌شویی و سپس بیش‌تر پوشینه‌های دربرگیرنده بذرها جدا شدند.

کشت در محیط مایع: جهت تعیین بهترین اندام به‌دست آمده از بذر برای تولید کالوس و جنین، بذرهای ضدعفونی شده در ۷ تیمار در محیط کشت مایع حاوی نمک‌های کامل MS، بدون هورمون به‌عنوان شاهد، ۰/۵، ۱، ۲، ٤، ۵/۵ و ۹ میلی‌گرم بر لیتر هورمون 2,4-D با ٤ تکرار برای هر تیمار در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی (جدول ۱) و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زیر نور فلورسنت داخل دستگاه شیکر با ۸٦ دور در دقیقه در اتاق کشت قرار داده شدند.

جدول ۱- تیمارهای اعمال‌شده هورمون 2,4-D در محیط کشت پایه مایع MS بر ریزنمونه بذر گونه *Agropyron cristatum*.

تیمار	هورمون 2,4-D						
غلظت (میلی‌گرم بر لیتر)	۰	۰/۵	۱	۲	٤	۵/۵	۹
غلظت (میکرومولار)	۰	۲/۲٦	٤/۵۲	۹	۱۸	۲۵	٤۰

Archive of SID

www.SID.ir

هر ظرف کشت (ارلن‌مایر) ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت بوده و در هر محیط کشت ۸-٦ عدد بذر قرار داده شد. بعد از گذشت ۳۰ روز کالوس‌های به‌دست آمده از محور زیر لپه که دارای آمادگی زیاد جهت تولید کالوس بود، به‌منظور ظهور جنین‌های بدنی به محیط کشت MS که تنها هورمون اکسین از آن حذف گردید، انتقال داده شدند. برای از بین بردن اثر هورمون‌ها، نمونه‌ها ۳ بار در محیط کشت بدون هورمون به‌مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه شستشو شده و سپس در محیط ظهور جنین کشت شدند. بعد از حدود ۱ ماه نمونه‌ها از نظر تعداد جنین‌های بدنی در مراحل مختلف کروی، قلبی، اژدری، گیاهچه‌ای و همچنین تغییرات مورفولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از دستگاه استرواسکوپ[1] متصل به کامپیوتر و دستگاه مونیتورینگ مدل سونی تعداد جنین‌ها، نئومورف‌ها و تغییرات ظاهری ریزنمونه بررسی شد. سپس داده‌های به‌دست آمده توسط نرم‌افزار MINITAB با روش ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین نیز به روش آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

در این بررسی بذرهای گونه مرتعی *Agropyron cristatum* در غلظت‌های مختلف (جدول ۱) کشت شدند تا نشان داده شود که در محیط کشت کدام قسمت از بذرها برای تولید کالوس مناسب‌تر است.

القای کالوس: طبق جدول ۳ با افزایش غلظت هورمون 2,4-D درصد جوانه‌زنی بذرها کاهش یافت و بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی مربوط به تیمار شاهد بود که از نظر آماری بین تیمارها تفاوت معنی‌داری در مورد جوانه‌زنی بذرها وجود داشت (جدول ۲، P<۰/۰۵). کالوس‌زایی از محور زیرلپه گیاهک بذرها آغاز شد و بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون 2,4-D بوده است که ۳۸ درصد کالوس‌زایی داشته و همچنین در غلظت ٤ میلی‌گرم بر لیتر از این هورمون نیز ۱۲/۱ درصد کالوس‌زایی مشاهده شد. از نظر کالوس‌زایی به غیر از دو سطح ۵/۵ و ۹ میلی‌گرم بر لیتر بقیه سطوح هورمون 2,4-D تفاوت معنی‌داری با هم داشتند (جدول‌های ۲ و ۳، شکل ۲). در شکل ۳ تصاویر مربوط به کالوس‌های ایجاد شده در محیط کشت مایع MS با سطوح مختلف هورمون 2,4-D نشان داده شده است.

1- Sony, Model

Archive of SID

www.SID.ir

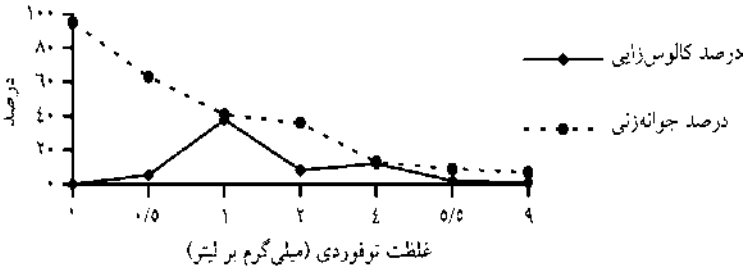
جدول ۲- تجزیه واریانس میزان کالوس ایجاد شده و بذرهای جوانه‌زده گونه *Agropyron cristatum* L. Gaertn. در محیط کشت مایع MS با سطوح مختلف هورمون 2,4-D.

منبع تغییرات	درجه آزادی	SS		MS		F		P	
		کالوس‌زایی	جوانه‌زنی	کالوس‌زایی	جوانه‌زنی	کالوس‌زایی	جوانه‌زنی	کالوس‌زایی	جوانه‌زنی
تیمار	٦	٢٤/٥١	٢٤٦٩٥	٤/٠٨	٤١١٦	٣/٩١	٢٧/١٨	٠/٠١٣	٠/٠٠
خطا	١٦	١٦/١٧	٢٤٢٣	١/٠٤	١٥١				
کل	٢٢	٤١/٢٢	٢٧١١٨						

جدول ۳- القای کالوس در ریزنمونه‌های بذر گونه *Agropyron cristatum* L. Gaertn. در محیط کشت مایع MS با سطوح مختلف هورمون 2,4-D برروی دستگاه شیکر.

2,4-D (میلی‌گرم بر لیتر)	درصد کالوس‌زایی (کالوس/ بذر)	طول مدت کشت (هفته)	درصد جوانه‌زنی بذرهای کشت شده	زمان از کشت (هفته)	توضیحات*
٠	٠^{f}	٦	٩٥^{a}	٤	بدون کالوس
٠/٥	٥/٤^{d}	٦	٦٣^{b}	٤	کالوس‌سفید رنگ غیرمتراکم با ساقه‌چه
١	٣٨^{a}	٦	٤١^{c}	٤	کالوس سفید رنگ ریشه‌دار غیرمتراکم با ساقه‌چه
٢	٨/٣^{c}	٦	٣٦^{d}	٤	کالوس‌سفید رنگ غیرمتراکم با ساقه‌چه
٤	١٢/١^{b}	٦	١٣^{e}	٤	کالوس سفید رنگ غیرمتراکم
٥/٥	٢^{e}	٦	٩^{f}	٤	کالوس سفید رنگ غیرمتراکم بسیار ریز
٩	١^{e}	٦	٧^{f}	٤	کالوس سفید رنگ غیرمتراکم

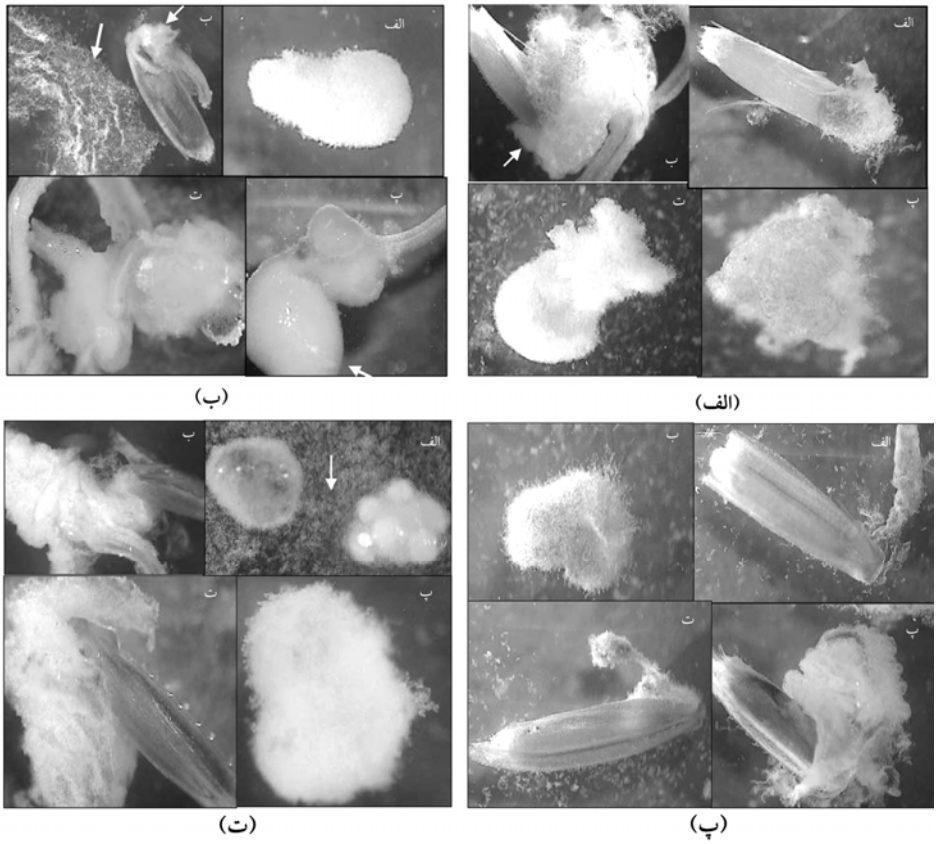
● در کلیه غلظت‌های هورمون 2,4-D کالوس‌زایی پس از گذشت ٤ روز از محور زیرلپه گیاهک آغاز شد. در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک باشند، براساس آزمون LSD در سطح ٥ درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۲- درصد کالوس‌زایی و جوانه‌زنی ریزنمونه‌های بذر گونه *Agropyron cristatum* L. Gaertn. در محیط کشت مایع MS با سطوح مختلف هورمون 2,4-D.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- تصاویر مربوط به کالوس‌های ایجاد شده از ریزنمونه بذر گونه *Agropyron cristatum* L. Gaertn. در محیط کشت مایع MS با سطوح مختلف هورمون 2,4-D. (الف) محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، الف) ریزنمونه بذر، ب) ریز نمونه بذر در حال جوانه‌زنی، رشد کالوس در منطقه هیپوکوتیل انجام می‌گردد، پ و ت) کالوس‌ها **(ب)** محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، الف، پ و ت) کالوس‌ها، ب) ریز نمونه بذر در حال جوانه‌زنی، رشد کالوس در منطقه هیپوکوتیل انجام می‌گردد و پمز (سلول‌های جدا و پراکنده شده از ریزنمونه در محیط کشت)، **(پ)** محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، الف، ب، پ و ت) ریزنمونه بذر و کالوس‌های تشکیل شده **(ت)** محیط کشت حاوی ٤ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، الف) کالوس جنین‌زا، تشکیل جنین‌های کروی در داخل توده مشخص است پ) کالوس پیش‌جنین‌زا، ب) و ت) ریزنمونه و کالوس.

Archive

www.SID.ir

جنین‌زایی بدنی: طبق جدول ٤ اعمال سطوح مختلف هورمون 2,4-D در ترکیب محیط کشت، اثر معنی‌داری بر مراحل مختلف جنین‌زایی بدنی و همچنین تشکیل نئومورف[1] ($P<۰/۰۵$) دارد. نئومورف‌ها جنین‌هایی می‌باشند که در طی مراحل تکاملی تولید جنین‌های سوماتیکی نتوانسته‌اند به جنین کامل تبدیل شوند، اما این جنین‌ها در کشت مجدد در حضور سیتوکنین‌هایی نظیر بنزیل‌آدنین[2]، کینتین[3] و تیدیازورون[4] این پتانسیل را دارند که دوباره به‌صورت یک جنین تکامل‌یافته درآیند (چنگالریان و همکاران، ۱۹۹۷). از نظر مورفولوژیکی نئومورف‌ها در رأس ریشه‌ای رشد کرده و ریشه کاملی دارند اما در قسمت مربوط به لپه نتوانستند تکامل یابند (شکل ٤- ت و ٥- پ). عوامل زیادی در ایجاد چنین جنین‌هایی در محیط کشت وجود دارد از جمله می‌توان به غلظت‌های زیاد اسید آبسزیک داخلی اشاره نمود که آن هم بر اثر افزایش میزان 2,4-D درون محیط کشت ایجاد می‌شود. طبق جدول ٥ تنها تیمار 2,4-D که نئومورف در آن مشاهده شده غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر از این هورمون است. دلیل نبود نئومورف در غلظت‌های بالای 2,4-D میزان بالای اسید آبسزیک ایجاد شده است (جان و همکاران، ۱۹۹۵).

جدول ٤- تجزیه واریانس مراحل مختلف جنین‌زایی بدنی و کالوس‌زایی گونه *Agropyron cristatum* L. Gaertn. برحسب میانگین مربعات در محیط کشت مایع MS با سطوح مختلف هورمون 2,4-D.

منبع تغییرات	درجه آزادی	جنین کروی	جنین قلبی	جنین اژدری	جنین گیاهچه‌ای تک‌ریشه	جنین گیاهچه‌ای دو ریشه	کالوس ریشه‌دار	کالوس بدون ریشه	تعداد ریشه کالوس‌ها	نئومورف
تیمار	٦	۰/۷۹۱*	۰	۰/۳۰٤*	۳۹/۸*	۱۷/۱۲	۱۱٤/۱**	۸/۸۲**	۲/٤۰٤	٦/۱٦*
خطا	۱٦	۰/٦۹۸	۰	۰/۱۲٥	۱۷/٦	۳/۷۸	۳۸/۸	۲/۳٥	۰/٤٥٦	۲/٥۳

* معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵، ** معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱.

1- Neomorph
2- Banzil Adnin
3- Kintine
4- Thidiazuron

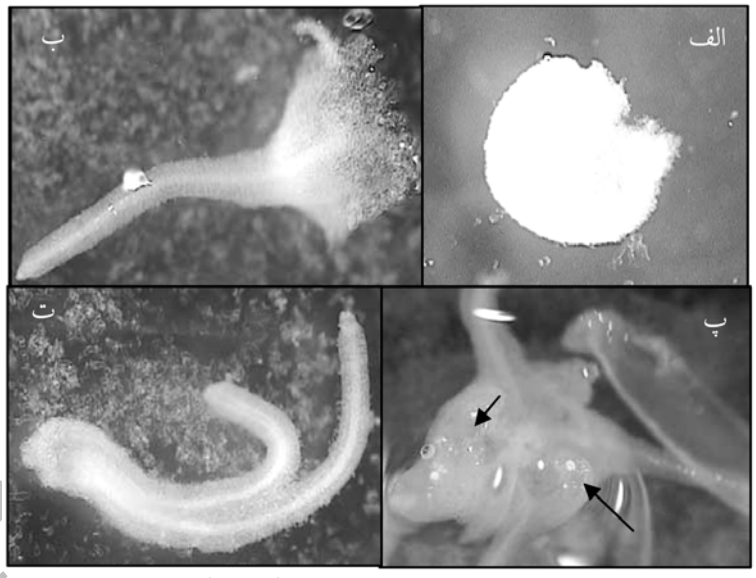
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- مقایسه میانگین‌های مربوط به مراحل مختلف جنین‌زایی بدنی و کالوس‌زایی گونه *Agropyron cristatum* L. Gaertn. در محیط کشت مایع MS با سطوح مختلف هورمون 2,4-D

تیمار 2,4-D	جنین کروی	جنین اژدری	جنین گیاهچه‌ای تک‌ریشه	جنین گیاهچه‌ای دوریشه	کالوس ریشه‌دار	کالوس بدون ریشه	تعداد ریشه کالوس‌ها	نئومورف
۰	۰^{b}	۰	۰^{b}	۰	۰^{b}	۰^{c}	۰	۰^{b}
۰/۵	۰^{b}	۰	۰^{b}	۰	۰^{b}	۲/۷۵^{bc}	۰	۰^{b}
۱	۰/۵^{b}	۱	۱۱/۵^{a}	۷/۵	۱۹/۵^{a}	۲/۵^{bc}	۲/۷۵	٤/۵^{a}
۲	۰^{b}	۰	۰^{b}	۰	۰^{b}	۳^{bc}	۰	۰^{b}
٤	۱/۳۳^{a}	۰	۱/٦٦^{b}	۰	۲^{b}	٤/٦۷^{ab}	۰/۸۳۳	۰^{b}
۵/۵	۰^{b}	۰	۰^{b}	۰	۰^{b}	۱/۲۵^{bc}	۰	۰^{b}
۹	۰^{b}	۰	۰^{b}	۰	۰^{b}	۰/۵^{c}	۰	۰^{b}

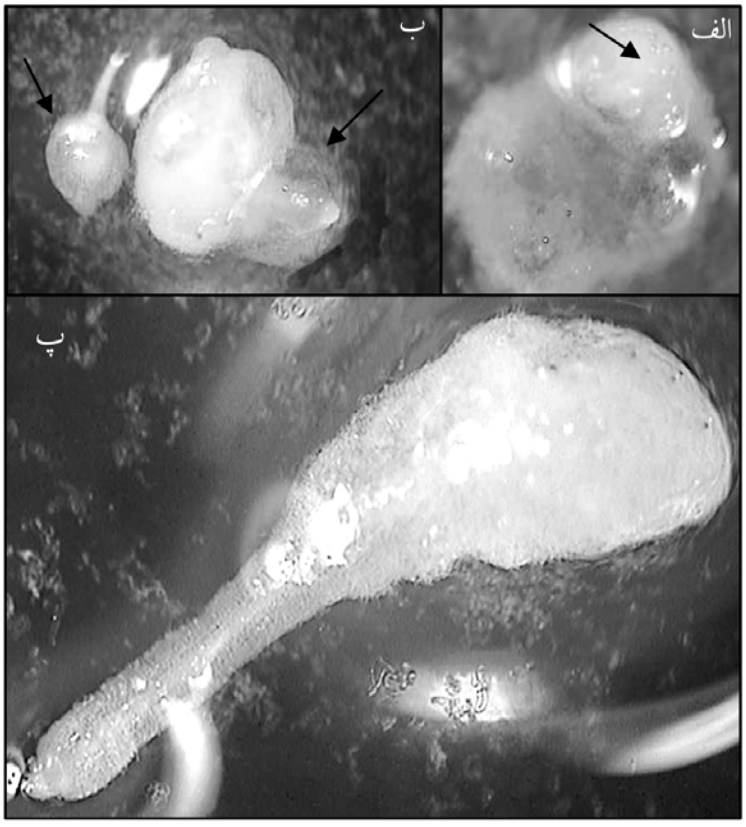
در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک باشند، براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ٤- تصاویر مربوط به مراحل مختلف تشکیل و رشد جنین و گیاهچه گونه *Agropyron cristatum* L. Gaertn. در محیط کشت مایع MS با ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D الف) جنین کروی، ب) جنین بدنی گونه *A. cristatum* در مرحله بعد از اژدری. گیاهچه و ریشه با لپه رشد کرده در این شکل مشخص می باشد که این گیاه در حالت جنینی فقط یک‌لپه مانند سایر تک‌لپه‌ها تولید می‌نماید.، پ) جنین‌های در حال آزاد شدن از کالوس جنین‌زا و ت) جنین بدنی که لپه کاملاً متمایز نشده (نئومورف).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- تصاویر مربوط به مراحل مختلف تشکیل و رشد جنین و گیاهچه گونه *Agropyron cristatum* L. Gaertn. در محیط کشت مایع MS با ٤ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D الف) جنین در حال آزاد شدن از کالوس جنین‌زا، ب) گیاهچه در حال رشد که ریشه آن کاملاً مشخص است و جنین کروی (با فلش نشان داده شده است) و پ) جنین بدنی که لپه کاملاً متمایز نشده (نئومورف) با انتقال این‌گونه جنین‌ها به محیط حاوی سیتوکنین می‌توان آن‌ها را به گیاهچه کامل تبدیل و تکثیر کرد. تعادل اکسین و سیتوکنین داخلی به نفع ریشه است.

بحث و نتیجه‌گیری

گونه مورد مطالعه در این پژوهش از عناصر اصلی اکوسیستم‌های مرتعی مناطق استپی و نیمه‌استپی محسوب می‌شود. این گونه مقاوم به خشکی و سرما و کاملاً خوش‌خوراک است (بنوان و همکاران، ۱۹۷۳). توانایی تحمل و بقای این گونه‌ها در شرایط نامساعد محیطی آن‌ها را برای بررسی‌های فیزیولوژیک و مولکولی عکس‌العمل گیاهان در برابر تنش‌ها مناسب ساخته است. دارا بودن

Archive of SID

www.SID.ir

خصوصیات فیزیولوژیکی و مولکولی برجسته و به‌کارگیری این خصوصیات در کشاورزی به‌منظور انتقال صفات مطلوب از انواع وحشی آن‌ها به واریته‌های زراعی، اهمیت این گونه‌ها را بیش‌تر کرده است (ونگ و همکاران، ۲۰۰۳). محیط کشت پایه MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹۶۲) معمولاً در کشت بافت علف‌گندمیان استفاده می‌شود (ونگ و همکاران، ۲۰۰۱). لزوم وجود هورمون‌های اکسین مثل 2,4-D برای شروع کالوس‌زایی در سایر گونه‌های علفی مشاهده شده است (رضوی و همکاران، ۲۰۰۵). ولی یافتن غلظت بهینه هورمون‌ها در شرایط کنترل شده، جهت ایجاد کالوس و جنین‌زایی در گونه‌های بومی که به‌رغم ارزش بالای آن‌ها هنوز مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند، ضروری است.

نتایج این بررسی نشان داد که بهترین روش تکثیر درون شیشه‌ای، گرفتن کالوس به‌صورت مستقیم از بذر می‌باشد که در این گیاه محور زیرلپه به راحتی تولید کالوس می‌نماید. بنابراین این روش جهت تکثیر علف‌های گندمی پیشنهاد می‌گردد. با توجه به نتایج به‌نظر می‌رسد میزان بهینه غلظت هورمون 2,4-D برای ایجاد حداکثر تعداد کالوس از ریزنمونه‌های بذر گونه *Agropyron cristatum* در محیط کشت MS، ۱ میلی‌گرم بر لیتر است. همچنین با توجه به جدول ۵ محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بهترین محیط از لحاظ کالوس‌زایی، ریشه‌زایی در کالوس‌ها، ایجاد کالوس جنین‌زا و جنین‌زایی بوده است. حال آن‌که بهترین محیط کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های جنین نارس و رسیده گیاه جو توسط عنایتی‌شریعت‌پناهی و دبیراشرافی (۲۰۰۳) محیط کشت MS با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D معرفی شده است و در محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین بیش‌ترین ریشه‌زایی را در کالوس‌ها مشاهده کردند. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش مشابه با نتایج بررسی ونگ و همکاران (۲۰۰۳) روی گونه علف‌گندمی *Thinopyrum ponticum* بوده که بیش‌ترین القای کالوس را در محیط کشت MS با ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌دست آوردند. همچنین لازر و همکاران (۲۰۰۰) بیش‌ترین مقدار کالوس جنین‌زا را از ریزنمونه‌های گل نابالغ علف‌گندمی *Phragmites australis* (Cav.) Trin را در محیط کشت MS حاوی اکسین 2,4-D به‌دست آوردند و بیان کردند که ۲۸ درصد کالوس‌های به‌دست آمده در حضور این هورمون، جنین‌زا می‌باشند. فرانکلین و همکاران (۱۹۹۰) بهترین محیط القای کالوس و تولید گیاهچه را برای ریزنمونه‌های بذر گونه علف‌گندمی *Bothriochloa caucasica*، محیط کشت MS با ۵ میکرومولار 2,4-D معرفی کردند. نتایج به‌دست آمده در این پژوهش از نظر آغاز جوانه‌زنی بذرهای گونه *Agropyron cristatum* پس از

Archive of SID

www.SID.ir

گذشت ۳–٤ روز از کشت و تولید کالوس‌های اولیه از هیپوکوتیل و قسمت پایینی کولئوپتیل پس از ۷ تا ۱۰ روز و کیفیت کالوس‌ها از لحاظ رنگ و شکل ظاهری با نتایج بررسی فرانکلین و همکاران (۱۹۹۰) برروی ریزنمونه بذر گونه *Bothriochloa caucasica* مطابقت دارد.

مای‌فوجی و همکاران (۲۰۰۵) در پژوهشی روی ٤ گونه *Agropyron cristatum*، *A. desertorum*، *A. mongolicum* و *Agropyron cristatum*×*A. mongolicum* به این نتیجه رسیدند که باززایی این گیاهان از کالوس به‌دست آمده از ریزنمونه‌های گل‌های نابالغ موفقیت‌آمیز است، محیط کشت استفاده شده محیط کشت پایه MS و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بوده، همچنین گونه‌های *Agropyron* را از علف‌گندمیان برای انتقال ژن مناسب معرفی کرده‌اند.

راس و همکاران (۱۹۹۵) در استرالیا روی تولید کالوس جنین‌زا از ریزنمونه بذر گونه علف‌گندمی *Cenchrus ciliaris* مطالعه کردند و بیان داشتند که محیط کشت MS حاوی ٤ میلی‌گرم بر لیتر اکسین 2,4-D جهت ایجاد کالوس جنین‌زا مناسب است و پس از انتقال کالوس‌ها به همین محیط با حذف هورمون 2,4-D، جنین‌ها توسعه‌یافته و باززایی گیاهچه‌ها صورت می‌گیرد. چاین و واسیل (۱۹۸۲) روی کشت بافت و جنین‌زایی سوماتیکی علف‌گندمی *Panicum maximum* بررسی کردند و محیط کشت MS حاوی ۲/۵ تا ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر اکسین 2,4-D را از نظر تولید کالوس جنین‌زا و ایجاد کالوس‌های دارای کیفیت یکسان، مناسب و دارای تفاوت غیرمعنی‌دار دانستند. همچنین ظهور جنین‌ها را پس از ۵–۳ هفته بعد از انتقال به محیط بدون هورمون گزارش کردند که از این نظر با نتایج این پژوهش مشابه است. از نتایج پژوهش حاضر می‌توان در برنامه‌های اصلاحی که مبتنی بر کشت کالوس و کشت تعلیقی گونه‌های بومی مرتعی و گونه‌های زراعی هم‌خانواده نظیر گندم و جو می‌باشد، بهره جست.

سپاسگزاری

به این وسیله از زحمات مهندس موسوی‌زاده دانشجوی کارشناسی‌ارشد علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی گرگان در آزمایشگاه کشت بافت آن دانشگاه سپاسگزاری می‌نمائیم.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1.Bagheri, A., and Saffari, M. 2004. Principals of Plant tissues culture. Ferdowsi University of Mashhad, 406p. (Translated In Persian)

2.Barnes, R.F., and Baylor, J.E. 1995. Forages in a changing world. In: Forages, Vol. 1. An introduction to grassland agriculture, 5th Edition, P 3-13. In: Barns, R.F., D.A., Miller, and Nelson, C.J., (Eds.), Iowa State University Press, Ames, Iowa.

3.Bonvan, M.T., Mesaghi, M., and Malek, A. 1973. Phenology of native and foreign range plant species in homand Absard Experimental Station. Forests and Rangelands Researches Organization of Iran. J. 13p. (In Persian)

4.Chengalrayan, K., Mahask, V.B., and Hazra, S. 1997. High frequency conversion of abnormal peanut somatic embryogenesis. Plant cell report, 16: 11. 783-786.

5.Chin, Y.L., and Vasil, I.K. 1982. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Tissue Cultures of *Panicum Maximum* Jacq. J. Bot. 69: 1. 77-81.

6.Enayati Shariatpanahi, M., and Dabir Ashrafi, O. 2003. Production of high salt tolerant Barely (*Hordeum Volgare* L.) Lines using somaclonal variation. Iranian, J. Agric. Sci. 4: 2. 367-377. (In Persian)

7.Franklin, C.I., Trieu, T.N., and Gonzales, R.A. 1990. Plant regeneration through somatic embryogenesis in the forage grass Caucasian bluestem (*Bothriochloa caucasica*). Plant Cell Reports, 9: 443-446.

8.Gram, T., Mattson, O., and Joerson, M. 1996. Division frequently of pea protoplast in relation to startch accumulation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 45: 3. 179-187.

9.Halprin, W. 1995. Invitro embryogenesis: Some historical issue and uresolved problem, P 155-203. In: Thorpe, T.A. (ed.): Invitro embryogenesis in plant. Kluwer academic publisher, Netherlands.

10.John, A., Drake, P., and Selby, C. 1995. Somatic embryogenesis in Sitka spruce (Picea sitchensis (Bong.) Carr.). In: Jan, M.S., Gupta, P.K., and Newton, R.J. (eds.), Somatic embryogenesis in woody plants, Kluwer Academic Publisher. Netherlands, 3: 125-143.

11.Lauzer, D., Dallaire, S., and Vincent G. 2000. In vitro propagation of reed grass by somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60: 3. 229-234.

12.Mashayekhi, K., and Akbarpour, V. 2008. Mineral and organic material that used in plant tissue culture. Makhtoomgholi Faraghi, 286p. (In Persian)

13.Mi Fugui, Jinfeng, Y., and Xiuwen, H. 2005. Genetic engineering for drought resistance and salt tolerance in *Agropyron* spp. (Wheatgrass). Wageningen Academic Publishers. The Netherlands 2005, 119p.

14.Moini, A., and Kahrizi, D. 2003. Plant tissue culture. Tehran Basij Student Organization, 163p. (Translated In Persian)

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

Archive of SID

www.SID.ir

16. Razavi, Kh., Malboobi, M.A., Farahi Ashtiani, S., Ghanati, F., and Mohsenzadeh, S. 2005. An investigation on different methods of propagation of tow range species of *Aeluropus* on in vitro condition. J. Iran Biol. 18: 1. 60-68. (In Persian)
17. Ross, A.H., Manners, J.M., and Birch, R.G. 1995. Embryogenic Callus Production, Plant Regeneration and Transient Gene Expression Following Particle Bombardment in the Pasture Grass, Cenchrus ciliaris (Gramineae). Austr. J. Bot. 43: 2. 193-199.
18. Talwar, M., and Rashid, A. 1989. Somatic embryo formation from unemerged inflorescences and immature embryos of a graminaceous crop Echinochloa. Ann. Bot. 64: 195-199.
19. Wang, Z.Y., Hopkins, A., and Main, R. 2001. Forage and turf grass biotechnology: A critical review. J. Plant Sci. 20: 6. 573-619.
20. Wang, Z.Y., Bell, J., and Hopkins, A. 2003. Establishment of a plant regeneration system for wheatgrasses (*Thinopyrom, Agropyron and Pascopyrum*). J. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73: 265-273.
21. Watson, L., and Dallwitz, M.J. 1992. The grasses genera of the world. CAB Int., Wallingford, England. 1038p.
22. Zhong, H., Srinivasan, C., and Sticklen, M.B. 1991. Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) Plant Cell Rep. 10: 453-456.

Archive of SID

www.SID.ir

J. of Plant Production, Vol. 17(1), 2010
www.gau.ac.ir/journals

Producing callus and somatic embryogenesis of *Agropyron cristatum* on Murashige and Skoog medium

[*]M. Amirkhani[1], K. Mashayekhi[2] and M. Mesdaghi[3]
[1]Ph.D. Student, Dept. of Range Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associate Prof., Dept. of Horticulture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Professor, Dept. of Range Management, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

Agropyron cristatum L. Gaertn. is a native grass of semiarid region in Iran which is quit resistant to cool and drought climate and withstand heavy grazing. This species has close phylogenetic relationship with *Triticum* and *Hordeum*. In this research, the effect of seven different concentrations of growth regulator 2,4-D on callus production and somatic embryogenesis of *A. cristatum* was investigated on Murashige and Skoog medium. The results showed that the rate of callus, embryo and neomorph were highest in 1 mg L^{-1} 2,4-D. Callus production was increased in 1 mg L^{-1} 2,4-D but dramatically decreased at 5.5 and 9 mg L^{-1} 2,4-D. The somatic embryos were observed at 1 and 4 mg L^{-1} 2,4-D but matured embryos and plantlet were only occurred at 1 mg L^{-1} 2,4-D. There were significant differences between 1 mg L^{-1} 2,4-D and other treatments for producing globular and torpedo embryos, plantlet, rooted callus and number of roots ($P<0.05$) and there was not any callus production and embryogenesis in control treatment without growth regulator.

Keywords: 2,4-D, Callus production, Somatic embryogenesis, *Agropyron cristatum*

* Corresponding Author; Email: m.amirkhani@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir