Archive of SID

مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد هجدهم، شماره دوم، ۱۳۹۰
www.gau.ac.ir/journals

اثر منابع و غلظت‌های مختلف کربن و تنظیم‌کننده‌های رشد بر کشت بساک و جنین‌زایی *Datura stramonium* L.

***سکینه امیری[۱]، سیدکمال کاظمی‌تبار[۲]، غلامعلی رنجبر[۲] و محمد آزادبخت[۳]**

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
[۲]استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
[۳]استاد گروه داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱۷

چکیده

نوع قند و تنظیم‌کننده رشد از اجزاء ضروری تشکیل‌دهنده محیط کشت بافت می‌باشند. در این پژوهش، غلظت‌های مختلف برخی از کربوهیدرات‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد در طی کشت بساک و تولید جنین رویشی تاتوره (*D. stramonium* L.) در محیط کشت موراشیگی و اسکوگ (MS) مورد بررسی قرار گرفت. در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین (Kin) همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر ٤،۲- دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) و همچنین محیط کشت MS دارای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر ٤،۲- دی کلرو فنیل استیک اسید (2,4-D) بیش‌ترین تولید کالوس را می‌نمایند. در بین چهار نوع قند ساکاروز، گلوکوز، فروکتوز و مالتوز به‌کار برده شده در این پژوهش، بیش‌ترین میزان کالزایی در محیط کشت MS محتوی مالتوز با غلظت ٤۰ گرم در لیتر مشاهده گردید. بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر میزان جنین‌زایی نشان داد که بیش‌ترین میزان القا جنین سوماتیکی در کالوس‌های بساک در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر ٦- بنزیل آمینوپورین (BAP) همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر α- نفتالین اسید استیک (NAA) به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: *Datura stramonium* L.، کشت بساک، جنین‌زایی، منابع کربن، تنظیم‌کننده‌های رشد

* مسئول مکاتبه: amiri_s_m@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تاتوره (*Datura stamonium* L.) گیاهی یک‌ساله، علفی، از خانواده سولاناسه[1] می‌باشد (دریک و همکاران، ۱۹۹٦). برگ‌های این گیاه منبع مهمی از تروپان آلکالوییدهایی هم‌چون آتروپین، هیوسیامین و آسکوپولامین می‌باشد. اهمیت اقتصادی این مواد به‌دلیل کاربردهای دارویی بسیار مهم آن‌ها می‌باشد (برونتون، ۱۹۹۳).

امروزه تلفیق روش‌های کلاسیک به‌نژادی گیاهی با بیوتکنولوژی موجب کوتاه‌تر شدن دوره اصلاحی، کاهش هزینه‌ها، حجم کار و نیز افزایش راندمان برنامه‌های (کارهای) اصلاحی گردیده است (پیکرینگ و دیواکس، ۱۹۹۲؛ جرج و همکاران، ۲۰۰۸) و محققان بسیاری بر جنبه‌های مختلف کشت *in vitro* پژوهش نمودند (لو چیاوا و همکاران، ۱۹۸۹؛ ساندرلند و ولز، ۱۹٦۸؛ جوانیا، ۱۹۷۵؛ دومینو و همکاران، ۱۹۹۲).

در این راستا تولید گیاهان هاپلویید از طریق کشت بافت برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی و پژوهش‌های ژنتیکی بنیادی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (پیکرینگ و دیواکس، ۱۹۹۲). این تکنیک باعث سرعت اصلاح گیاهان با استفاده از هموزیگوت‌های دابل هاپلویید در مدت زمان کوتاه می‌گردد (نورهیدایا و همکاران، ۱۹۹٦). محققانی مانند وانگ و همکاران (۱۹۷۹)؛ حکیم و همکاران (۱۹۹۱)؛ براسیلیرو و همکاران (۱۹۹۹) به‌طور موفقیت‌آمیزی کالوس‌ها و گیاهچه‌ها را از طریق گامت‌ها و به کمک تکنیک کشت بساک تولید نمودند. به‌طوری‌که اخیراً تمامی پژوهش‌ها راجع به کشت بساک در شرایط *in vitro*، بر گزارش‌های مربوط به القای کالوس بساک، تمرکز نموده است (دائو و شامینا، ۱۹۷۸؛ جارامیلو و سامرز، ۱۹۹۰؛ جارامیلو و سامرز، ۱۹۹۱).

امکان تولید جنین سوماتیکی از کشت بساک، اولین بار در *Datura inoxia* گزارش شد (گاها و ماشواری، ۱۹٦٤؛ گاها و ماشواری، ۱۹٦٦). ساپوری و ماهاشواری (۱۹۷٦) توسعه و نمو جنین‌های گرده[2] را در کشت بساک *Datura inoxia* L. بررسی نمودند. شارما و همکاران (۱۹۹۳) به بررسی جنین‌زایی کشت سوسپانسیون سلولی در *Datura inoxia Mill.* پرداختند، راینا و ایر (۱۹۸۲) اثر عسل را در القای جنین‌زایی در کشت بساک *Datura metel* L. بررسی نمودند. در واقع، از زمانی‌که گاها و ماشواری (۱۹٦٤) و گاها و ماشواری (۱۹٦٦) آندروژنزیز در گیاهان جنس داتورا را کشف کردند، این تکنیک در صدها گونه متعلق به این خانواده (گولشان و همکاران، ۱۹۸۱؛ روگازینساکا و

1- Solanaceae
2- Pollen Embryoids

www.SID.ir

Archive of SID

اسکاتینگ، ۱۹۷٤؛ هیندیر، ۱۹۷۳؛ براسیلیرو و همکاران، ۱۹۹۹) و سایر خانواده‌ها به‌کار گرفته شد (رینالدز، ۱۹۹۷؛ شارپ و همکاران، ۱۹۸۰؛ اونای و همکاران، ۱۹۹۵؛ اونای و همکاران، ۱۹۹٦؛ لینسی، ۲۰۰۹؛ لو و واسیل، ۱۹۸۱؛ واچیرا و اوگادا، ۱۹۹۵؛ هیرناندز و همکاران، ۲۰۰۳؛ آلی و همکاران، ۲۰۰۲؛ ما و زو، ۲۰۰۰؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۰۵؛ کاهنل و همکاران، ۱۹۹۲؛ ماتسومو و کاهنل، ۱۹۹۷؛ دی‌ویت و همکاران، ۱۹۹۰؛ کینت‌زیوس و همکاران، ۱۹۹۸).

در *Datura metel*، هر دو نوع آندروژنزیز، مستقیم (تشکیل جنین‌ها) یا غیرمستقیم (تشکیل کالوس و سپس جنین‌ها) ممکن است مشاهده شود (آیر و رینا، ۱۹۷۲). این مسأله مشخص می‌کند که نوع آندروژنزیز[1] با استفاده از ترکیب محیط کشت و میزان درون‌زا بودن هورمون‌های تنظیم‌کننده غالب در بساک تعیین می‌گردد، میزان این تأثیرات در گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد (کان‌هوتو و همکاران، ۱۹۹۰).

در حقیقت، فاکتورهای بسیاری آندرنژنزیز را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند این فاکتورها شامل ژنوتیپ گیاهان، شرایط رشد گیاهان مادری، مرحله نمو میکروسپور، پیش‌تیمار غنچه‌های گل، شرایط و محیط کشت می‌باشند (باجاج، ۱۹۹۰). ترکیب محیط کشت، فاکتور کلیدی مؤثر بر القای کالوس/ جنین و به‌دنبال آن، باززایی می‌باشد. قند منبع کربن و انرژی می‌باشد و همچنین به‌عنوان تنظیم‌کننده اسمزی در محیط کشت القایی فعالیت می‌کند (فریه و همکاران، ۱۹۹۵). مشخص گردیده که نوع و غلظت قند در محیط کشت القایی، آندروژنزیز را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (فریه و همکاران، ۱۹۹۵). ساکاروز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز کربوهیدرات‌های اصلی به‌کار رفته در محیط‌های کشت آندروژنزیز می‌باشند (فریه و همکاران، ۱۹۹۵؛ لاست و بریتیل، ۱۹۹۰؛ آرسینکی و همکاران، ۱۹۹۰؛ کارسای و همکاران، ۱۹۹٤؛ دیملینگ و همکاران، ۱۹۹۲).

هدف از این پژوهش، بررسی اثر نوع و غلظت منابع کربن و تنظیم‌کننده‌های رشد بر کشت بساک و جنین‌زایی گیاه تاتوره می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد

الف: ریزنمونه: برای تهیه ریزنمونه از بساک استفاده گردید. گل‌های نشکفته و خیلی جوان از گیاه جدا گردیده و نمونه‌ها ابتدا توسط آب جاری به‌مدت نیم ساعت شسته سپس با محلول ۷۰ درصد

1- Androgenesis

www.SID.ir

Archive of SID

اتانول به‌مدت ۳۰ ثانیه شسته شدند. سپس با محلول سفیدکننده تجاری ۱۰ درصد دارای چند قطره توین (۲۸-۲۰) به‌مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی گردیدند، آن‌گاه سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس در شرایط استریل عمل حذف کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها صورت گرفت. به این ترتیب ریزنمونه‌های بساک در پتری‌دیش‌های مجزا کشت گردیدند.

ب: محیط کشت: از محیط کشت MS (موراشیگی و اسکوگ، ۱۹٦۲) به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز، ۸ گرم در لیتر آگار با ۱۲ تیمار مختلف هورمونی استفاده گردید، تیمارها عبارتند از کینتین با غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و ۲،٤- دی کلرو فنوکسی استیک اسید با غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بودند که به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب یک طرح کاملاً تصادفی اعمال گردیدند. pH محیط قبل از اتوکلاو بین ۵/۸ و ۵/۹ تنظیم گردید. ضدعفونی توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌مترمربع صورت گرفت (به‌استثنای فروکتوز که با فیلتر استریل گردید). محیط کشت‌ها در داخل پتری‌دیش‌ها در ٤ تکرار ریخته شدند.

بررسی بهترین منبع کربن: در این آزمایش اثر انواع منبع کربن بر کالزایی بررسی شد. به این منظور آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار طراحی شد که چهار نوع منبع کربن شامل ساکاروز، گلوکز، فروکتوز و مالتوز هر یک با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به محیط کشت بهینه‌سازی شده به‌عنوان تیمارها اضافه گردیدند و اثر آن‌ها مورد بررسی قرارگرفت.

بررسی بهترین غلظت کربن: پس از این‌که بهترین منبع کربوهیدرات (مالتوز) در القای کالوس مشخص گردید، به‌منظور تعیین بهترین غلظت مالتوز، تیمار غلظت در ٤ سطح ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ٤۰ گرم در لیتر به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار اعمال گردید.

بررسی جنین‌زایی: کالوس‌ها به محیط MS (موراشیگی و اسکوگ، ۱۹٦۲) که با ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز، ۸ گرم در لیتر آگار و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات تکمیل شده بود منتقل شدند. از هورمون‌های بنزیل آمینو پورین[1] با غلظت ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر و α- نفتالین اسید استیک[2] با غلظت ۰، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر به‌منظور القای جنین سوماتیکی از کالوس‌ها به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب یک طرح کاملاً در چهار تکرار استفاده گردید. کالوس‌ها پس از کشت در لوله آزمایش و یا پتری‌دیش در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در دوره نوری ۸ ساعت روشنایی و ۱٦

1- BAP
2- NAA

www.SID.ir

Archive of SID

ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از تشکیل مرحله کروی شکلی، جنین‌های سوماتیکی به محیط کشت MS بدون هورمون منتقل شدند.

داده‌های اصلی با استفاده از فرمول $\sqrt{(X+0/5)}$ (یزدی‌صمدی و همکاران، ۱۳۸۷)تبدیل گردیدند و تجزیه و تحلیل‌ها براساس داده‌های تبدیل شده صورت گرفت. تجزیه آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد.

نتایج

بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کشت بساک: ریزنمونه‌ها بعد از گذشت چند روز در محیط کشت، به‌تدریج متورم شدند به‌طوری‌که بعد از ۱۵–۱۰ روز ریزنمونه‌ها شروع به کالوس‌زایی نمودند. براساس نتایج مشاهده شده، در هفته سوم تا چهارم، در تمامی تیمارها به‌جز تیمار شاهد و تیمارهایی که تنها دارای هورمون کینتین در ۳ سطح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بودند، کالوس‌زایی مشاهده گردید و درصد کالزایی به‌تدریج افزایش یافته و به ۱۰۰ درصد رسید. از آنجایی‌که در بیش‌تر تیمارهای آزمایش ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌ها به کالوس تبدیل شده بودند بنابراین به‌منظور مقایسه تیمارها، وزن کالوس‌های تشکیل شده در این تیمارها با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر کینتین و 2,4-D بر وزن تر کالوس (گرم).

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
Kin	۳	۰/۰۰۱۷۱۷۴۹	۱/۵۶^{ns}
2,4-D	۲	۰/۳۵۲۷۳۰۰۹	۳۲۰/۶۶**
اثر متقابل کینتین در 2,4-D	۶	۰/۰۳۴۳۴۹۸۱	۳۱/۲۳**
خطا	۳۶	۰/۰۰۱۱	

^{ns}غیرمعنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، **معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

نتایج به‌دست آمده از تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در کالوس‌زایی در جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) آورده شده است. بررسی اثرات ساده نشان داد که 2,4-D اثر معنی‌داری بر وزن تر کالوس در سطح احتمال ۱ درصد داشت در حالی‌که اثر ساده کینتین معنی‌دار نبود. براساس این نتایج، دو هورمون 2,4-D و کینتین در ترکیب با یکدیگر تأثیر به‌سزایی را بر میزان

www.SID.ir

Archive of SID

کالوس‌زایی نشان دادند، به‌طوری‌که اثر متقابل این دو هورمون در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. براساس جدول ۲، تیمار هورمونی دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و تیمار هورمونی دارای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیش‌ترین میزان کالوس‌زایی را داشتند (شکل ۳). پس از تیمار هورمونی یاد شده، در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیش‌ترین میزان کالوس‌زایی مشاهده گردید. کم‌ترین میزان کالوس‌زایی را تیمار شاهد و تیمار دارای تنها ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف کینتین در 2,4-D بر وزن تر کالوس (گرم).

2,4-D (میلی‌گرم بر لیتر) / کینتین (میلی‌گرم بر لیتر)	۰	۱	۲
۰	۰/۰۰^{f}	۱/۶۱۵^{de}	۱/۷۴۹^{cd}
۰/۲۵	۰/۰۰^{f}	۱/۸۷۷^{bc}	۲/۱۶۴^{a}
۰/۵	۰/۰۱۳^{f}	۱/۹۳۷^{b}	۲/۲۸۷^{a}
۱	۰/ ۰۱^{f}	۱/۵۷۳^{e}	۱/۵۹^{e}

داده‌های موجود در جدول داده‌های اصلی (بدون تبدیل) هستند اما حروف‌گذاری براساس داده‌های تبدیل شده صورت گرفته است.

در هر ستون حروف مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (براساس آزمون دانکن).

بررسی بهترین منبع کربن بر کشت بساک: همان‌طورکه از جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) پیدا است اثر منبع کربن بر میزان کالزایی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. هم‌چنان‌که در شکل ۱ نمایان است، مناسب‌ترین منبع کربن جهت القای کالوس از بساک مالتوز و پس از آن گلوکز و ساکاروز می‌باشد. در بین منابع قندی مورد استفاده فروکتوز کم‌ترین تأثیر را بر میزان کالزایی داشت.

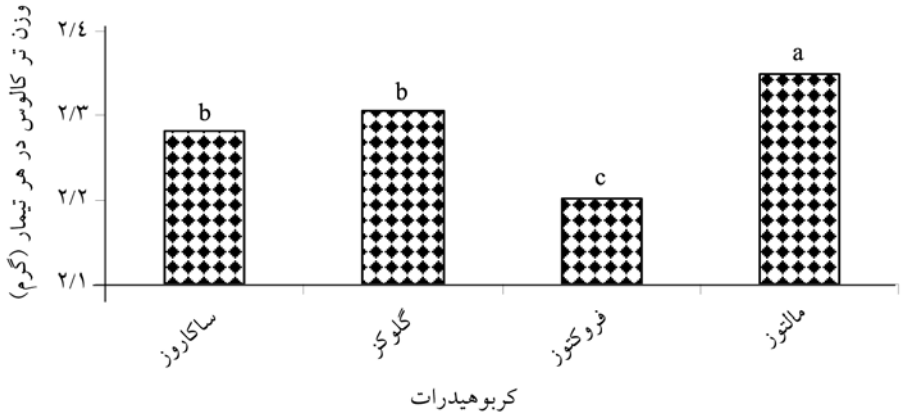
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر منبع کربن بر وزن تر کالوس (گرم).

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
منبع کربن	۳	۰/۰۱۳۸۷۹۱	۲۷/۷۵**
خطا	۱۲	۰/۰۰۰۵۰۰۲	

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- اثر نوع منبع کربن بر وزن تر کالوس (گرم) به‌دست آمده از بساک *D. stramonium*.

تعیین مناسب‌ترین غلظت کربوهیدرات بر کشت بساک: نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف مالتوز در جدول ٤ نشان داد که غلظت‌های مختلف مالتوز تأثیر معنی‌داری بر وزن تر کالوس در سطح احتمال ۱ درصد دارد. از طرفی مقایسه میانگین کالوس‌های تشکیل شده در تیمارهای مختلف براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف مالتوز وجود داشته است. هم‌چنان‌که در شکل ۲ آورده شده است، بیش‌ترین وزن تر کالوس در غلظت ٤۰ گرم در لیتر مالتوز و سپس در سطوح ۳۰ گرم در لیتر این ماده مشاهده می‌شود. کم‌ترین میزان وزن تر کالوس نیز مربوط به غلظت ۱۰ گرم در لیتر بود.

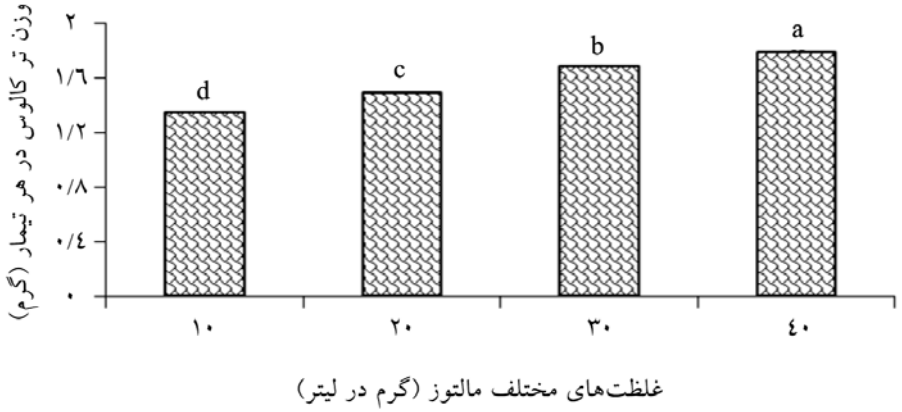
جدول ٤- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف مالتوز بر وزن تر کالوس (گرم).

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
غلظت مالتوز	۳	۰/۱۵۲۹٤۲۳۹	۷٤/۲۸**
خطا	۱۲	۰/۰۰۲۰۵۹۰۰	

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف مالتوز بر وزن تر کالوس (گرم) به‌دست آمده از بساک *D. stramonium*.

بررسی جنین‌زایی: براساس مشاهدات و تجزیه انجام شده، هم‌چنان‌که در جدول ۵ نشان داده شده است، اثر BAP، NAA، هر یک به تنهایی بر درصد ریزازدیادی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده است. همچنین اثر متقابل BAP در NAA اثر معنی‌داری را در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان جنین‌زایی داشت. بر طبق جدول مقایسه میانگین جدول ٦، سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیش‌ترین میزان جنین‌زایی را در بین ترکیبات مختلف BAP و NAA نشان داد (شکل ۳). پس از تیمار یاد شده بیش‌ترین درصد جنین‌زایی در تیمار هورمونی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده گردید.

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر BAP و NAA بر درصد جنین زایی.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
BAP	۲	۲۱/۷۹۷۱٤۱۱۲	۳۳/۹۲**
NAA	۳	۳۲/۰۵۱۸۸٦۷٦	٤۹/۸۷**
BAP×NAA	٦	۸/۵۵۵۵۳۷۲۵	۱۳/۳۱**
خطا	۳٦	۰/٦٤۲٦٤٦۹۵	

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٦- مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف BAP در NAA بر درصد جنین‌زایی.

BAP (میلی‌گرم بر لیتر) / NAA (میلی‌گرم بر لیتر)	۰	۰/۰۲	۰/۲	۰/۵
۱	۰/۰۰^{e}	۰/۰۰^{e}	۲۸/۱۲^{b}	۵۲/۰۸۳^{a}
۲	۰/۰۰^{e}	۰/۰۰^{e}	٤/۱۷^{cd}	۹/۳۷۵^{c}
۳	۰/۰۰^{e}	۰/۰۰^{e}	۱/۰٤۲^{de}	٤/۱۷^{cd}

داده‌های موجود در جدول داده‌های اصلی (بدون تبدیل) هستند اما حروف‌گذاری براساس داده‌های تبدیل شده صورت گرفته است.
در هر ستون حروف مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (براساس آزمون دانکن).
کالوس‌ها در محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در غلظت ٤۰ گرم در لیتر مالتوز القا شده و در همین محیط رشد داده شدند.

بحث

تنظیم‌کننده‌های رشد نقش مهمی در ایجاد کالوس دارند. در این پژوهش از دو نوع هورمون اکسین و سیتوکنین به‌منظور القای کالوس استفاده گردید. اکسین به‌طور متداول برای القای کالوس از ریزنمونه‌ها ضروری و لازم است (جرج و همکاران، ۲۰۰۸). معمول‌ترین اکسینی که به‌منظور آغازش کشت کالوس به‌کار می‌رود، 2,4-D می‌باشد (جرج و همکاران، ۲۰۰۸). سیتوکنین معمولاً به محیط کشت دارای اکسین افزوده می‌شود. در واقع این هورمون مسئول تنظیم سنتز پروتئین‌هاست که در طی تشکیل و دوک سلولی در زمان میتوز دخیل هستند (جوانیا، ۱۹۷۵). تصور می‌شود که کالوس‌هایی که به تقسیم سلولی، بدون نیاز به افزودن سیتوکنین به محیط کشت، ادامه می‌دهند، قادر به تولید این مواد به‌طور طبیعی هستند (ساندرلند و ولز، ۱۹٦۸). براساس بررسی‌های صورت گرفته در این پژوهش اثر دو هورمون 2,4-D و Kin در محیط کشت بر کالوس‌زایی معنی‌دار بود. با توجه به نتایج ملاحظه می‌گردد که میزان القاء کالوس در ریزنمونه‌ها در تیمارهایی با ترکیب هورمونی اکسین و سیتوکنین نسبت به تیمارهای بدون سیتوکنین بیش‌تر بود که این مسأله اثر متقابل این دو هورمون و اهمیت ترکیب مناسب آن‌ها را جهت دست‌یابی به حداکثر میزان القاء کالوس نشان می‌دهد. شاید بتوان این نتیجه را با توجه به نتایج دومینو و همکاران (۱۹۹۲) مبنی بر مشاهده اثرات تنظیمی متقابل بین اکسین و سیتوکنین در سطح ژن در *Nicotiana plumbaginifolia* توجیه نمود. کان‌هوتو و همکاران (۱۹۹۰) گزارش نمودند که برخی از اعضای خانواده سولاناسه توانایی تشکیل کالوس از گرده را در محیط کشت دارای فقط اکسین، یا در ترکیب با سیتوکنین دارند. اهمیت توازن هورمونی در کشت بساک سیب‌زمینی توسط چندین نویسنده اشاره شده است. گولشان و همکاران (۱۹۸۱) بیان نمودند که

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin بهترین محیط کشت برای تشکیل کالوس در گوجه‌فرنگی بود. در حالی‌که روگازینساکا و اسکاتینگ (۱۹۷٤) هر دو نوع هورمون NAA و BAP را در سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر در گوجه‌فرنگی مورد استفاده قرار دادند. هیندیر (۱۹۷۳) نمو بهتر کالوس بساک را در محیط کشت دارای 2,4-D مشاهده نمود. براسیلیرو و همکاران (۱۹۹۹) اعلام کردند که محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیش‌ترین میزان کالوس را از بساک سیب‌زمینی تولید کرد. در حالی‌که نتایج به‌دست آمده نشان داد که بهترین تیمار هورمونی به‌منظور کالزایی از بساک تاتوره را در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و هم‌چنین تیمار هورمونی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده کردیم.

کربوهیدرات نقش مهمی را در کشت‌های *in vitro* به‌عنوان منبع کربن و انرژی ایفا می‌کند. ریزنمونه‌های مورد استفاده در کشت بافت به‌طور اولیه قادر به تولید نیازشان به مواد آلی از طریق فتوسنتز نیستند. به این ترتیب افزودن کربوهیدرات به محیط کشت لازم و ضروری است (جرج و همکاران، ۲۰۰۸). در کنار بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد، به‌منظور تعیین مناسب‌ترین منبع و غلظت کربن به بررسی اثر قندهای مختلف بر میزان کالوس‌زایی پرداخته شد. در بین ٤ منبع کربن به‌کار برده شده، بهترین پاسخ به محیط کشت محتوی مالتوز و سپس به محیط کشت محتوی قند گلوکز مشاهده گردید. در این بررسی در غلظت ٤۰ و سپس ۳۰ گرم در لیتر قند مالتوز، بیش‌ترین میزان کالوس به‌دست آمد. این نتایج، با نتایج به‌دست آمده در کشت بساک غلات هم‌چون گندم (لاست و بریتیل، ۱۹۹۰؛ آرسینکی و همکاران، ۱۹۹۰)، جو (کارسای و همکاران، ۱۹۹٤) و چاودار (دیملینگ و همکاران، ۱۹۹۲) مبنی بر این‌که مالتوز سبب افزایش معنی‌دار میزان کالوس و باززایی گیاه می‌شود، مطابقت دارد. آرسینکی و همکاران (۱۹۹۰) بیان نمودند که القای کالوس در میکروسپورها و باززایی اندام‌های سبز[1] در محیط کشت دارای مالتوز بیش‌تر از محیط کشت محتوی ساکاروز بود.

جنین‌های سوماتیکی می‌توانند به‌صورت مستقیم یا به‌صورت غیرمستقیم در کشت بساک ایجاد گردند (جرج و همکاران، ۲۰۰۸). جریان جنین‌زایی سماتیک اغلب در محیط محتوی سطوح بالای اکسین (به‌خصوص 2,4-D) آغاز می‌شود اما تا وقتی‌که غلظت اکسین کاهش یابد پیش‌جنین‌ها معمولاً توسعه نمی‌یابند (جرج و همکاران، ۲۰۰۸). شارپ و همکاران (۱۹۸۰) بیان نمودند که اکسین به

1- Green Shoot Regeneration

www.SID.ir

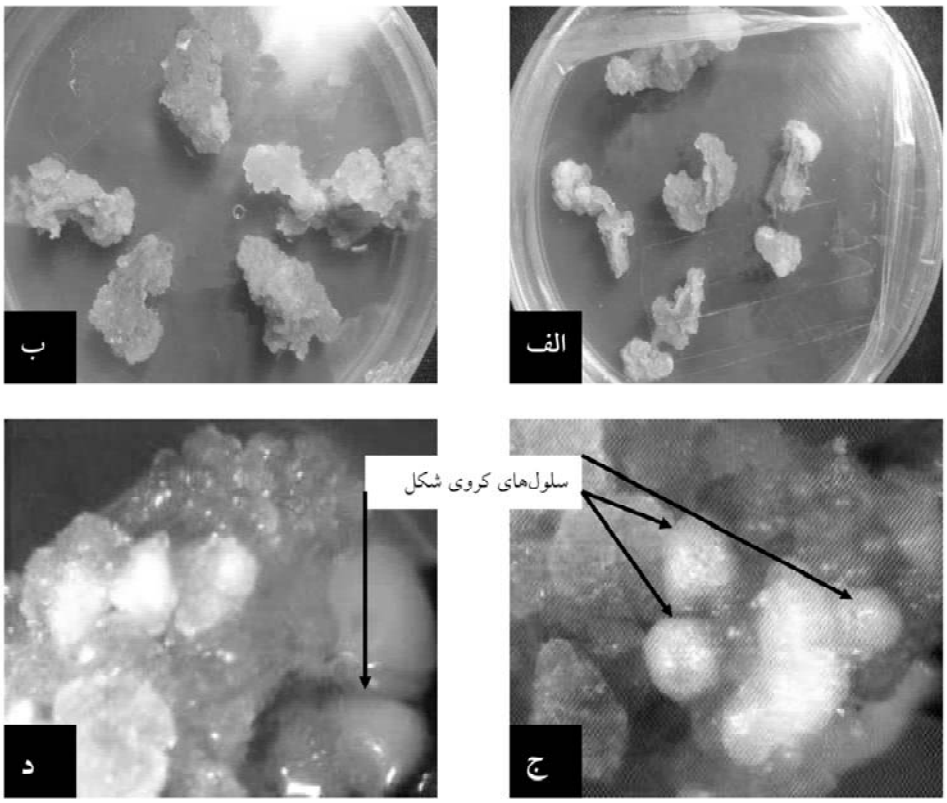
Archive of SID

آغازش پیش‌جنینی[1] کمک می‌کند ولی سبب توقف بیش‌تر در نمو جنین می‌شود. این موضوع پیشنهاد می‌کند که تقسیم سلول‌های پیش‌جنینی و توسعه جنین در غلظت‌های پایین اکسین به‌دست می‌آید. سیتوکنین در القای جنین در کالوس، تأثیر زیادی ندارد و از جنین‌زایی در برخی گیاهان جلوگیری به‌عمل می‌آورد (جرج و همکاران، ۲۰۰۸). در حالی‌که اونای (۱۹۹٦) و اونای و همکاران (۱۹۹۵) و اونای و همکاران (۱۹۹٦) گزارش دادند که اگرچه BAP به‌طور گسترده برای بلوغ جنین سوماتیکی در سایر گیاهان مورد استفاده قرار نمی‌گیرد، اما به‌منظور القای جنین‌ها و بلوغ آن‌ها در بافت‌های مختلف پسته مؤثر بوده است. لینسی (۲۰۰۹) اعلام کردند که کالوس‌ها در حضور BAP تبدیل به کالوس‌های جنین‌زا شدند. لو و واسیل (۱۹۸۱)گزارش دادند که در واقع، سیتوکنین برون‌زا به تنهایی یا در ترکیب با جیبرلین بلوغ جنین و نمو بعدی جنین‌ها را ترکیب با جیبرلین بلوغ جنین و نمو بعدی جنین‌ها را به گیاهچه‌ها افزایش می‌دهد. واچیرا و اوگادا (۱۹۹۵) بر ترکیب اکسین با سیتوکنین (2,4-D با BAP) به‌منظور القای کالوس‌های جنین‌زا اشاره نمودند. هم‌چون نتایج به‌دست آمده توسط آن‌ها، مطالعات زیادی بر مؤثر بودن ترکیب تیمارهای اکسین و ستوکنین به‌منظور القای کالوس جنین‌زا تأکید نمودند (هیرناندز و همکاران، ۲۰۰۳ (در *Quercus suber*)؛ آلی و همکاران، ۲۰۰۲ (در *Limonium bellidifolium*)؛ ما و زو، ۲۰۰۰ (در کاساوا)). مشابه با نتایج آن‌ها، نتایج ما نشان داد که محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیش‌ترین میزان جنین‌زایی را به خود اختصاص داد. این نتیجه با نتایج انجام شده توسط ژانگ و همکاران (۲۰۰۵) که بیان نمودند تشکیل جنین‌ها و رشد شاخه در محیط MS محتوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA یا محیط محتوی ۲ میلی‌گرم در لیتر زآتین (Zin) به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA رخ داد، از نظر انتخاب نوع هورمون مطابقت دارد. بررسی‌های صورت گرفته در سه رقم آنتاریوم نشان داد که جنین‌زایی در این ارقام با کاربرد BA یا کینتین به همراه 2,4-D القا گردید (کاهنل و همکاران، ۱۹۹۲؛ ماتسومو و کاهنل، ۱۹۹۷). دی‌ویت و همکاران (۱۹۹۰) و کینت‌زیوس و همکاران (۱۹۹۸) از هورمون‌های مشابه با هورمون‌های به‌کار برده شده در این آزمایش به‌منظور القای جنین سوماتیکی بابونه رومی استفاده کردند (۲٦/۸ میکرومولار NAA و ۱۱/۵ میکرومولار کینتین یا ۸/۸۷ میکرومولار BA و ۱/۰۷ میکرومولار NAA).

1- Pro-Embryogenic Cells

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- الف- ب: کالوس به‌دست آمده از ریزنمونه‌های بساک در محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در غلظت ٤٠ گرم در لیتر؛ ج- د: تشکیل سلول‌های کروی‌شکل جنین سوماتیکی در کالوس به‌دست آمده از بساک در محیط دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA.

نتیجه‌گیری

براساس بررسی‌های صورت گرفته، بهترین محیط به‌منظور کالزایی ریزنمونه بساک در گیاه تاتوره، محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر ٤،۲- دی کلرو فنوکسی استیک اسید و ٤٠ گرم مالتوز بود. بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر میزان جنین‌زایی نشان داد که بیش‌ترین میزان القا جنین سوماتیکی در کالوس‌های بساک در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر ٦- بنزیل آمینوپورین (BAP) همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر α- نفتالین اسید استیک (NAA) به‌دست آمد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1.Aly, M.A.M., Rathinasabapathi, B. and Kelley, K. 2002. Somatic embryogenesis in perennial statice *Limonium bellidifolium*, Plumbaginaceae. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 68: 127-135.

2.Bajaj, Y.P.S. 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. Springer, Berlin, Pp: 3-44.

3.Brasileiro, A.C.R., Willadino, L., Carvalheira, G.G. and Guerra, M. 1999. Callus induction and plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. IPA 5) via anther culture. Ciência Rural, 29: 619-623.

4.Bruneton, J. 1993. Pharmacognosie, second ed. Tec. Doc, Paris, 975p.

5.Canhoto, J.M., Ludovina, M., Guimaraes, S. et al. 1990. *In vitro* induction of haploid, diploid and triploid plantlets by anther culture of *Iochroma warscewiczii* Regel. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 21: 171-177.

6.Dao, N.T. and Shamina, Z.B. 1978. Cultivation of isolated tomato anthers. Soviet Plant Physiology, 25: 120-126.

7.De Wit, J.C., Esendam, H.F., Honkanen, J.J. and Tuominen, U. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration of flowering plants in rose. Plant Cell Rep. 9: 456-458.

8.Deimling, S., Flehinghaus, T., Bohn, M. and Geiger, H.H. 1992. Sugary aspects of androgenesis-alterations in carbohydrates during haploid induction in Gramineous species, P 153-154. 18th Eucarpia Congress, Angers, France.

9.Dominov, J.A., Stenzler, L., Lee, S., Schwarz, J.J., Leisner, S. and Howell, S.H. 1992. Cytokinins and auxins control the expression of a gene in *Nicotiana plumbaginifolia* cells by feedback regulation. Plant cell, 4: 451-461.

10.Drake, L.R., Lin, S., Rayson, G.D. and Jackson, P. 1996. Chemical modification and metal binding studies of Datura innoxia. Environ. Sci. Technol. 30: 110-114.

11.Ferrie, A.M.R., Palmer, C.E. and Keller, W.A. 1995. Haploid embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (ed) *In Vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, Pp: 309-344.

12.George, E.F., Hall, M.A. and Klerk, G.J.D. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Third Edition. Dordrecht, The Netherlands, Springer, 504p.

13.Guha, S. and Maheshwari, S.C. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature, 204: 497.

14.Guha, S. and Maheshwari, S.C. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. Nature, 212: 97-98.

15.Gulshan, T.M., Varghese and Sharma, D.R. 1981. Studies on anther cultures of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. Biologia Plantarum, 23: 6. 414-420.

16.Hakim, L., Miah, A.J. and Mansur, M.A. 1991. *In vitro* plant regeneration in rice anther culture through anther culture. Plant Tissue Cult. 1: 2. 85-89.

17.Hender, A.B. 1973. Anther culture in the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*. Annual Report Glasshouse Crops Research Institute, Pp: 130-133.

www.SID.ir

Archive of SID

18.Hernandez, L., Celestino, C. and Toribio, M. 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. Plant Cell Reports, 21: 759-764.
19.Iyer, R.D. and Raina, S.K. 1972. The early ontogeny of embryoids and callus from pollen and subsequent organogenesis in anther cultures of *Datura metel* and rice. Planta. 104: 146-156.
20.Jaramillo, J. and Summers, W.L. 1990. Tomato anther callus production: solidifying agent and concentration influence induction of callus. J. Amer. Soc. for Horticul. Sci. 115: 1047-1050.
21.Jaramillo, J. and Summers, W.L. 1991. Dark–light treatments influence induction of tomato anther callus. HortSci. 26: 915-916.
22.Jouanneau, J.P. 1975. Protein synthesis requirement for the cytokinin effect upon tobacco cell division. Exp. Cell Res. 91: 184-190.
23.Karsai, I., Vedo, Z. and Hayes, P.M. 1994. Effect of induction medium, pH, and maltose concentration on in vitro androgenesis of hexaploid winter triticale and wheat. Plant Cell Tiss Organ Cult. 39: 49-53.
24.Kintzios, S. and Michaelakis, A. 1999. Induction of somatic embryogenesis and in vitro flowering from inflorescences of chamomile (*Chamomilla recutita* L.). Plant Cell Reports, 18: 684-690.
25.Kuehnle, A.R., Chen, F.C. and Sugii, N. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Anthurium andraeanum hybrids. Plant Cell Rep. 11: 438-442.
26.Last, D. and Brettell, R.I. 1990. Embryo yield in anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. Plant Cell Rep. 9: 14-16.
27.Lincy, A.K. 2009. Indirect and direct somatic embryogenesis from aerial stem explants of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Acta Bot. Croat. 68: 1. 93-103.
28.Lo Schiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nutronchi, V., Marazztti, D., Vergara, R., Orselli, S. and Terzi, M. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. Theor. Appl. Genet. 77: 325-31.
29.Lu, C. and Vasil, I.K. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum* Jacq.Theor. appl. Genet. 59: 275-280.
30.Ma, G. and Xu, Q. 2002. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 70: 281-288.
31.Matsumoto, T.K. and Kuehnle, A.R. 1997. Micropropagation of Anthurium, P 14-29. In: Bajaj, Y.P.S. (ed). Biotechnology in agriculture and forestry, vol 40. High-tech and micropropagation VI. Springer, Berlin Heidelberg New York.
32.Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and Bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
33.Nurhidayah, T., Horn, R., Rocher, T. et al. 1996. High regeneration rates in anther culture of interspecific sunflower hybrids. Plant Cell Reports, 16: 167-173.

www.SID.ir

Archive of SID

34.Onay, A. 1996. In vitro organogenesis and embryogenesis of pistachio, *Pistacia vera*, L. Ph.D. Thesis, University of Edinburgh.
35.Onay, A., Jeffree, C.E. and Yeoman, M.M. 1995. Somatic embryogenesis in cultured immature kernels of pistachio, *Pistacia vera* L. Plant Cell Reports. 15: 192-195.
36.Onay, A., Jeffree, C.E. and Yeoman, M.M. 1996. Plant regeneration from encapsulated embryoids and an embryogenic mass of pistachio. Plant Cell Reports, 15: 723-726.
37.Orsinky, B.L., McGregor, G.I., Johnson, G.I. and Kartha, K.K. 1990. Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anther cultures with medium with maltose. Plant Cell Rep. 9: 365-369.
38.Pickering, R.A. and Devaux, P. 1992. Haploid production approaches and use in plant breeding, P 519-547. In: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and U.K. CAB international, ed., Shewry, P.R. Barley.
39.Raina, S.K. and Iyer, R.D. 1982. Honey-induced pollen embryogenesis in anther cultures of *Datura metel*. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), 38: 3. 358-359.
40.Reynolds, T.L. 1997. Pollen embryogenesis. Plant Mol Biol. 33: 1-10.
41.Rogozinska, J.H. and Skutnik, L. 1974. Effects of auxins and cytokinins on tomato callus from anthers. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 43: 81-92.
42.Sharma, V.K., Jethwani, V. and Kothari, S.L. 1993. Embryogenesis in suspension cultures of *Datura innoxia* Mill. Plant Cell Reports, 12: 10. 581-584.
43.Sharp, W.R., Sondahl, M.R., Caldas, L.S. and Maraffa, S.B. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Hort. Rev. 2: 268-310.
44.Sopory, S.K. and Maheswari, S.C. 1976. Development of pollen embryoids in anther cultures of Datura innoxia l. General observations and effects of physical factors. J. Exp. Bot. 27: 49-57.
45.Sunderland, N. and Wells, B. 1968. Plastid structure and development in green callus tissues of *Oxalis dispar*. Ann. Bot. 32: 327-346.
46.Wachira, F. and Ogada, J. 1995. In vitro regeneration of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze by somatic embryogenesis. Plant Cell Reports, 14: 463-464.
47.Wang, R.F., Zuo, Q.Z., Zheng, S.W. and Tiang, W.Z. 1979.Induction on plantlets from isolated pollen culture in rice (*Oryza sativa* L.). Acta Genet. Sin. 6.
48.Yazdi Samadi, B., Rezaei, A. and Valyzadeh, M. 2008. Statistical designs in agricultural research. Tehran Univ. Press, 753p. (In Persian)
49.Zhang, Q., Chen, J. and Henny, R.J. 2005. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, petiole, and stem explants of Golden Pothos. Plant Cell Rep. 23: 587-595.

www.SID.ir

Archive of SID

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Plant Production, Vol. 18(2), 2011
www.gau.ac.ir/journals

The effect of different carbon sources and concentrations, and growth regulators on anther culture and embryogenesis of *Datura stramonium* L.

***S. Amiri[1], S.K. Kazemitabaar[2], G.A. Ranjbar[2] and M. Azadbakht[3]**
[1]M.Sc. Student, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Assistant Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Professor, Dept. of Pharmacognosy, Mazandaran University of Medical Sciences
Received: 2009/10/24; Accepted: 2011/06/07

Abstract

Sugar type and growth regulators are essential fundamental components of tissue culture media. In this study, different concentrations of some carbohydrate and growth regulators during anther culture and producing somatic embryo of *Datura stramonium* L. was investigated in MS medium. The MS medium supplemented with 0.5 mgL^{-1} kinetin and 2 mgL^{-1} 2,4-D, and also the medium supplemented with 0.25 mgL^{-1} kinetin and 2 mgL^{-1} 2,4-D indicated the highest of callus induction. Among the four sugar type applied in this study such as sucrose, glucose, fructose and maltose, the best callus formation was observed in medium containing 4% maltose. The investigation of growth regulators on amount of embryogenesis showed that, the highest frequency of somatic embryo induction on anther-derived calli was obtained in medium containing 1 mgL^{-1} 6-benzylaminopurine (BAP) and 0.5 mgL^{-1} naphthaleneacetic (NAA).

Keywords: *Datura stramonium* L., Anther culture, Embryogenesis, Carbon source, Growth regulators

* Corresponding Author; Email: amiri_s_m@yahoo.com

www.SID.ir