Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 48, No 3, Autumn 2017 (877-888)
DOI: 10.22059/ijfcs.2017.212076.654155

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۶ (ص ۸۸۸-۸۷۷)

ارزیابی تأثیر هورمون‌های بنزیل آمینو پورین، کینتین و غلظت نیترات آمونیوم روی کشت بساک بادمجان (*Solanum melongena* L.)

مسعود عمرانی دهکهان[۱]، احمد معینی[۲*] و زهرا موحدی[۳]
۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/٤ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲)

چکیده

بادمجان (*Solanum melongena* L.)، یکی از مهم‌ترین گیاهان صیفی در خانوادهٔ سولاناسه است. در این پژوهش نرزایی (آندروژنز) از راه کشت بساک در دو رقم دورگ (هیبرید) بادمجان شامل شانتال و والنتینا بررسی شده است. برای این منظور، ارزیابی تأثیر هورمون بنزیل آمینو-پورین (۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦ و ۷ میلی‌گرم بر لیتر) و کینتین (٤، ٤/٥، ٥، ٥/٥، ٦، ٦/٥ و ۷ میلی‌گرم بر لیتر) و همچنین نیترات آمونیوم (۰، ۱۲۳۸، ۱۵٤۷/٥، ۱۸٥۷، ۲۱٦٦/٥ و ۲٤۷٦ میلی‌گرم بر لیتر) در سه آزمایش جداگانه بررسی شدند. بنا بر نتایج تجزیهٔ واریانس، رقم‌های مختلف در تیمارهای مختلف پاسخ متفاوتی داشتند. به‌طورکلی، رقم شانتال در دو تیمار ٤ میلی‌گرم بر لیتر از بنزیل آمینو پورین و ٦ میلی‌گرم بر لیتر از کینتین، بیشترین میزان گیاهچه‌های باززایی‌شده را به خود اختصاص داد (به ترتیب، ۲۵ و ۲۷/۷ درصد). درحالی‌که رقم والنتینا در دو تیمار ٥ میلی‌گرم بر لیتر از بنزیل آمینو پورین و ۷ میلی‌گرم بر لیتر از کینتین، بیشترین میزان گیاهچه را تولید کرد (به ترتیب، ۱۹/٦ و ۲۷/۸ درصد). همچنین نتایج نشان داد، افزایش غلظت نیترات آمونیوم در محیط کشت، کارایی کشت بساک بادمجان را بهبود بخشیده است. به‌طورکلی در این پژوهش، از رقم‌های شانتال و والنتینا ، به ترتیب ۳۱ و ۱۳ گیاه به دست آمد. برای بررسی‌های ژنتیک یاخته‌ای (سیتوژنتیکی)، به‌صورت تصادفی شمار ده گیاه از هر رقم تجزیه شد و نتایج نشان داد، در رقم‌های شانتال و والنتینا، به ترتیب ٤۰ و ٥۰ درصد گیاهان بررسی‌شده، هاپلوئید بودند.

واژه‌های کلیدی: بادمجان، سایتوکینین، کشت بساک، نیترات آمونیوم و هاپلوئیدی.

Effects of BAP, Kin and NH_4NO_3 concentration on the eggplant anther culture (*Solanum melongena* L.)

Masoud Emrani Dehkehan[1], Ahmad Moieni[2*] and Zahra Movahedi[3]
1, 2. Former M.Sc. Student and Associate Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran
(Received: Aug. 25, 2016- Accepted: Feb. 20, 2017)

ABSTRACT

Eggplant (*Solanum melongena* L.) is one of the most important vegetable plants in Solanaceae family. In this research, androgenesis by anther culture has investigated in two eggplant cultivars including Chantal and Valentina. For this reason the effects of the BAP (1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 mg l^{-1}), Kin (4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 and 7 mg l^{-1}) and NH_4NO_3 (0, 1238, 1547.5, 1857, 2166.5 and 2476 mg l^{-1}) concentrations were investigated in the independent experiments. These experiments were performed according to a factorial experiment in a randomized complete blocks design (RCBD) layout with three replications and each replication contained a unique Petri dish containing 9 ml C medium with 12 anthers. The results of analysis of variance showed a significant interaction between the cultivars and treatments. The highest plant regeneration in cultivar Chantal was obtained by the use of 6 mg l^{-1}Kin and 4 mg l^{-1} BAP (27.7 and 25 %, respectively). The highest plant regeneration in cultivar Valentina was produced by the treatments containing 7 mg l^{-1} Kin and 5 mg l^{-1} BAP (27.8 and 19.6 %, respectively). Also results indicated that the increased concentrations of NH_4NO_3 has improved the anther culture efficiency in eggplant. In cultivars Chantale and Valentina 31 and 13 plants were obtained, respectively. Then 10 plants were randomly selected in each cultivar, and their ploidy levels were determined through flow cytometry. The results showed that in cultivars Chantale and Valentina, 40 and 50% of the plants were haploid, respectively.

Keywords: Ammonioum nitrate, anther culture, cytokinin, eggplant, haploidy.

* Corresponding author E-mail: moieni_a@modares.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بادمجان (*Solanum melongena* L.، 2n = 2x = 24)، یکی از مهم‌ترین گیاهان خانوادهٔ سیب‌زمینی‌سانان (سولاناسه) و از گیاهان مهم مناطق گرمسیری و معتدل جهان است. میزان تولید جهانی بادمجان در سال ۲۰۱۳ میلادی، بیش از ۴۹/۳ میلیون تن بوده است. ایران با تولید ۱/۳ میلیون تن، سومین تولیدکنندهٔ بادمجان در سطح جهانی است (Anonymous, 2016). امروزه، برآورد می‌شود که جمعیت جهان در سال ۲۰۳۰، با رشد افزایشی سالانه ۱/۱۸ درصد، (نزدیک به هر سال ۸۳ میلیون نفر)، به ۸/۶ – ۸/۴ میلیارد نفر برسد. این افزایش جمعیت موجب شده که محققان بخش کشاورزی برای افزایش تولید مواد غذایی به دنبال روش‌های نوینی باشند و توجه قابل ملاحظه‌ای به افزایش کمی و کیفی محصولات زراعی با استفاده از تغییر در ساختار ژنتیکی آن‌ها معطوف شود. لذا، استفاده از روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات همراه با به‌کارگیری روش‌های نوین زیست‌فناوری (بیوتکنولوژی) گیاهی، نویدبخش خواهد بود. یکی از مهم‌ترین روش‌های اصلاحی، روش مبتنی بر دورگ‌گیری است که تلفیق صفات مطلوب رقم‌های مختلف را امکان‌پذیر می‌کند (Poehlman, 2013). روش شجره‌ای یک روش اصلاحی مبتنی بر دورگ‌گیری است که با وقت و هزینهٔ زیادی همراه است، چراکه این برنامهٔ اصلاحی از زمان دورگ‌گیری، تا آزاد شدن رقم، به حدود ۱۵-۱۰ سال زمان نیاز دارد. در یک برنامهٔ اصلاحی متداول، انتخاب و تولید رگهٔ (لاین) خالص، وقت‌گیر و دشوار است و حتی با شش نسل خود گرده‌افشانی ، تنها حدود ۹۸درصد خلوص به دست می‌آید (Ferrie & Möllers, 2011; Germana, 2006).

امروزه، استفاده از رگه‌های هاپلوئید مضاعف‌شده در برنامه‌های اصلاحی بسیار ارزشمند هستند زیرا در آن‌ها، صفات بدون نسل‌های پرشمار خودگشنی تثبیت شده‌اند. تولید هاپلوئیدهای مضاعف‌شده به‌عنوان روشی برای سرعت بخشیدن به مراحل اصلاحی و استفاده در پژوهش‌های عملی و پایه در بسیاری از گیاهان مدنظر هستند (Dunwell, 2010; Ferrie & Caswell, 2011; Germanà, 2011). گیاهان هاپلوئید مضاعف‌شده پایدار و همگون (هموژن) هستند و به همین علت کارایی انتخاب را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهند چراکه انتخاب در میان گیاهان صد در صد خلوص (هموزیگوت) انجام می‌شود درحالی‌که در روش تولید رگه‌های خالص از راه خودگشنی، میزانی ناخالصی باقی می‌ماند (Henry & De Buyser, 1990).

نرزایی (آندروژنز) یا کشت گامتوفیت نر از راه کشت بساک یا میکروسپور، به خاطر در دسترس بودن تودهٔ بسیار بزرگی از یاخته‌های جنسی نر، می‌تواند مؤثرترین روش تولید گیاهان هاپلوئید باشد و کشت بساک ساده‌ترین روش تولید گیاهان هاپلوییید به شمار می‌آید.

تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف‌شده با نرزایی در بسیاری از گیاهان انجام شده است. خانوادهٔ سولاناسه یک مثال مناسبی از ناهمگونی (هتروژنی) در پاسخ به این روش است که شامل پاسخ‌دهی بالا در گونهٔ توتون به‌عنوان یک گیاه مدل در این زمینه و گوجه‌فرنگی به‌عنوان یکی از سخت پاسخ‌دهنده‌ترین گونه‌ها است. تاکنون هیچ روش قابل اعتماد و تکراری در گیاه گوجه‌فرنگی گزارش نشده است (Seguí-Simarro, 2016). در گیاه بادمجان، روش کشت بساک تا حدودی گسترش پیدا کرده و تحقیقات مختلفی نیز انجام شده است (Rotino, 2016). نخستین گزارش باززایی گیاه از کشت بساک بادمجان، توسط Raina & Iyer (1973) منتشر شد که در آن از پینه (کالوس)های تولیدی از کشت بساک گیاه تولید کردند، اما منشأ گیاهان بافت دیوارهٔ بساک بود. از آن زمان تاکنون تحقیقات مختلفی درزمینهٔ بهبود تولید گیاهان هاپلوییید بادمجان انجام شده است همچنان‌که در بررسی تأثیر نژادگان (ژنوتیپ) و زمان جدا کردن بساک‌ها مشخص شده است که پاسخ به کشت بساک وابستگی شدیدی به نژادگان و مرحلهٔ رشد و نموی میکروسپورها دارد (Başay & Ellialtioglu, 2013; Rotino *et al*., 1987; Salas *et al*., 2012).

با توجه به اهمیت گیاه بادمجان و ضرورت اقدام‌های عملی برای تولید بذرهای دورگ (هیبرید)

Archive of SID

www.SID.ir

در کشور، این پژوهش در راستای بهبود کشت بساک بادمجان انجام شد و برای این منظور، تأثیر جداگانهٔ هورمون‌های کینیتین و BAP و نیز تأثیر غلظت نیترات آمونیوم در محیط کشت بساک بادمجان روی صفات نرزایی (آندروژنیک) جنین‌زایی و باززایی گیاهچه بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از دو رقم بادمجان دورگ شانتال و والنتینا، کشت‌شده در شرایط گلخانهٔ پلاستیکی با دمای ۱۸ تا ۳۳ °C و شرایط نور طبیعی در اواخر مردادماه استفاده شد. برای کشت، از بساک‌های با بیشترین میکروسپورهایی که در مرحلهٔ آغازین تک‌هسته‌ای تا اواسط تک‌هسته‌ای بودند، استفاده شد (در این مرحله، بساک‌ها رنگ زرد متمایل به سبز دارند) (Salas *et al.*, 2012). محیط کشت مورد استفاده برای القاء نرزایی در کشت بساک بادمجان، محیط کشت C (Callus)، (Dumas de Vaulx & Chambonnet, 1982) تغییریافته حاوی ۱۲۰ گرم بر لیتر ساکارز و هورمون‌های نفتالین استیک اسید (NAA)[1] و کینتین (Kin)[2]، هرکدام ۵ میلی‌گرم بر لیتر، (Rotino, 1996) بود و از محیط کشت R حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر از کینتین (Dumas de Vaulx & Chambonnet, 1982) برای باززایی گیاه استفاده شد. همچنین برای رشد و نمو بعدی گیاهچه‌های باززایی‌شده و نیز ریشه‌دار کردن آن‌ها، از محیط کشت MS بدون هورمون استفاده شد. غنچه‌ها با استفاده از هیپوکلریت سدیم (w/v ۱ درصد) به مدت ۲۰ دقیقه استریل و سه مرتبه و هر مرتبه به مدت یک دقیقه با آب مقطر شسته شدند. نمونه‌ها به مدت هشت روز در دمای ۳۵ °C در تاریکی و پس از آن چهار روز در دمای ۲۵ °C و دورهٔ نوری (فتوپریود) ۱۲/۱۲ (تاریکی / روشنایی) قرار گرفتند. در مرحلهٔ بعد، بساک‌ها به محیط کشتR (Regeneration) منتقل و در دمای ۲۵ °C و دورهٔ نوری ۱۲/۱۲ نگهداری شدند. هر سه هفته یک‌بار، محیط کشتR تعویض می‌شد. در این پژوهش آزمایش‌هایی به شرح زیر انجام شدند.

آزمایش اول: بررسی تأثیر غلظت هورمون کینتین بر القاء نرزایی بادمجان

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. عامل اول، شامل رقم در دو سطح (شانتال و والنتینا) و عامل دوم، شامل غلظت کینتین در هفت سطح (۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵ و ۷ میلی‌گرم بر لیتر) بود. به همهٔ تیمارهای مربوط به غلظت کینتین، ۵ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون نفتالین استیک اسید اضافه شد.

آزمایش دوم: بررسی تأثیر غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP[3]) بر القاء نرزایی بادمجان

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. عامل اول، شامل رقم در دو سطح (شانتال و والنتینا) و عامل دوم، شامل غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین در هفت سطح (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ میلی‌گرم بر لیتر) بود. به همهٔ تیمارهای مربوط به غلظت بنزیل آمینو پورین، ۵ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون نفتالین استیک اسید اضافه شد.

آزمایش سوم: بررسی تأثیر غلظت نیترات آمونیوم بر القاء نرزایی بادمجان

این آزمایش نیز به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. عامل اول، شامل رقم در دو سطح (شانتال و والنتینا) و عامل دوم، شامل غلظت نیترات آمونیوم در شش سطح (۰، ۱۲۳۸، ۱۵۴۷/۵، ۱۸۵۷، ۲۱۶۶/۵ و ۲۴۷۶ میلی‌گرم بر لیتر) بود. در این آزمایش از تیمار هورمونی نفتالین استیک اسید و کینتین هرکدام با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. در همهٔ آزمایش‌ها، هر تکرار شامل یک پتری‌دیش یک‌بارمصرف (۶۰×۱۵mm) حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط کشت C و ۱۲ بساک بود. همچنین در همهٔ آزمایش‌ها، سه صفت نرزایی شامل درصد بساک‌های نرزایی، درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده و درصد نوساقه‌های باززایی‌شده بررسی شدند.

1. 1-Naphthalene Acetic Acid
2. Kinetin
3. 6-*Benzylaminopurine*

Archive of SID

www.SID.ir

فلوسایتومتری

برای تعیین سطح پلوئیدی از دستگاه فلوسایتومتری مدل BD FACSCantoTM-KE با ویژگی‌های (BD: Biosciences, Bedford, MA, USA) و از نمونه‌های برگی گیاه گوجه‌فرنگی (DNA 2C-value= 1.95 pg) به‌عنوان گیاه استاندارد استفاده شد. میزان مناسبی از برگ گیاه تولیدی از کشت بساک و گیاه استاندارد (حدود ۱ سانتی‌متر مربع)، انتخاب و در ۱ میلی‌لیتر بافر WPB[1] (Loureiro *et al.*, 2007) کامل خرد شدند. سپس مخلوط به‌دست‌آمده به ترتیب از پالایشگر (فیلتر)های ۵۰ و۳۰ µm به‌منظور حذف ضایعات، عبور داده شد. در مرحلهٔ بعد، به ترتیب ۵۰ مایکرولیتر RNase و ۵۰ مایکرولیتر از رنگ *Propidium Iodide* (PI) به هر نمونه اضافه شد (رنگ فلورسنت PI برای رنگ‌آمیزی DNAهسته‌ای و RNase برای از بین بردن RNA و جلوگیری از اتصال PI به RNA استفاده می‌شود (Loureiro *et al.*, 2005). سپس، سوسپانسیون هسته (هر نمونه به حجم تقریبی ۲-۱ میلی‌لیتر) در دستگاه قرار می‌گرفت و با عبور هسته‌ها از قسمت جلوی آشکارساز دستگاه، میزان DNA آن‌ها تعیین می‌شد. با مقایسهٔ میزان میانگین اوج (پیک) گیاه تولیدی از کشت بساک و گیاه استاندارد، DNA 2C-value گیاه مورد نظر با استفاده از رابطهٔ زیر محاسبه شد (Karimzadeh *et al.*, 2011).

$$\text{DNA 2C – value (pg)} = \text{گیاه استاندارد} \times \frac{\text{میانگین اوج گیاه تولیدی از کشت بساک}}{\text{میانگین اوج گیاه استاندارد}}$$

در این رابطه، DNA 2C-value، میزان DNA ژنگانی (ژنومی) یک گیاه برحسب Pg (Pico gram) را نشان می‌دهد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 و مقایسهٔ میانگین تیمارها نیز با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) انجام شد. همچنین برای تجزیه‌وتحلیل نتایج به‌دست‌آمده از فلوسایتومتری از نرم‌افزار FLOW MAX نسخهٔ 2.0.0.1 استفاده شد.

1. Woody Plant Buffer

نتایج و بحث

در همهٔ آزمایش‌ها، نتایج آزمون Kolmogorov-Smirnov، نرمال بودن خطاهای آزمایشی صفات بررسی شده را نشان داد. بنابراین محاسبه‌های آماری متعارف برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها انجام شد.

آزمایش بررسی تأثیر غلظت هورمون کینتین بر القاء نرزایی بادمجان

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد، اثر متقابل غلظت هورمون کینتین و رقم‌های بررسی‌شده در سطح احتمال ۱ درصد برای هر سه صفت معنی‌دار بود و لذا مقایسهٔ میانگین تنها برای اثر متقابل انجام شد. همچنین نتایج مقایسهٔ میانگین تیمارها نشان داد، رقم شانتال در غلظت ۶ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون کینتین و رقم والنتینا در غلظت ۷ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون کینتین، بیشترین میزان بساک‌های نرزایی را به خود اختصاص داده‌اند (به ترتیب، ۳۰/۵ و ۲۵درصد). برای صفت درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده و صفت درصد نوساقه‌های باززایی‌شده نیز نتایج همسانی به دست آمد به‌طوری‌که رقم شانتال در غلظت ۶ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون کینتین و رقم والنتینا در غلظت ۷ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون کینتین بیشترین درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده (به‌ترتیب، ۲۷/۷ و ۲۷/۸) و درصد نوساقه‌های باززایی‌شده (به ترتیب، ۱۹/۴ و ۱۴/۶ درصد،) را داشتند (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

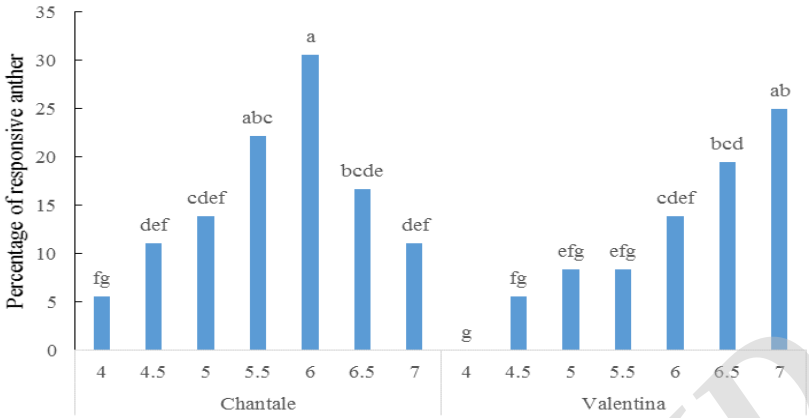
بررسی تأثیر غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین بر القاء نرزایی بادمجان

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد، اثر اصلی رقم برای صفت درصد نوساقه‌های باززایی‌شده معنی‌دار بود. درحالی‌که برای صفات درصد بساک‌های نرزایی و درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده، اثر متقابل بین غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین و رقم‌های بررسی‌شده معنی‌داری شد، لذا مقایسهٔ میانگین برای این صفات تنها برای اثر متقابل انجام شد. با توجه به نتایج، بیشترین درصد نوساقه‌های باززایی‌شده در رقم شانتال مشاهده شد (۷/۱ درصد). همچنین رقم شانتال در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر از بنزیل- آمینو پورین و رقم والنتینا در غلظت ۵ میلی‌گرم

Archive of SID

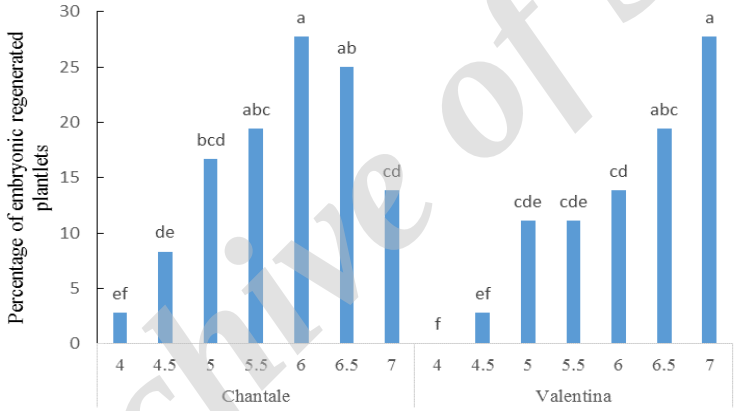
www.SID.ir

در لیتر از بنزیل آمینو پورین، بیشترین درصد بساک‌های نرزایی (به ترتیب، ۲۲/۲ و ۱۴/۴) و درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده (به ترتیب، ۲۵ و ۱۹/۶ درصد) را به خود اختصاص دادند (شکل‌های ۴، ۵ و ۶).



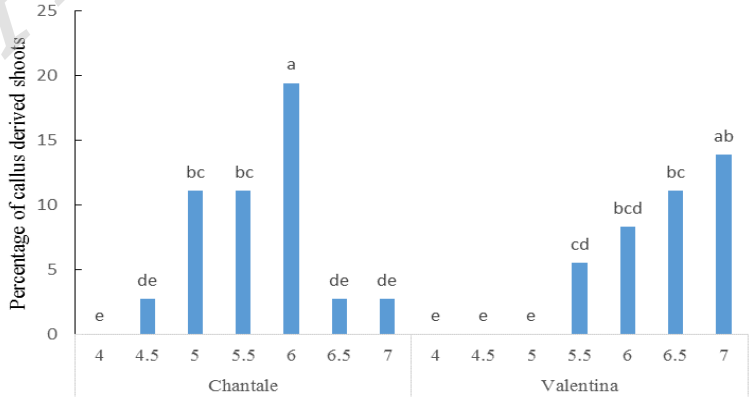
شکل ۱. مقایسهٔ میانگین اثر متقابل رقم و غلظت هورمون کینتین (۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵ و ۷ میلی‌گرم بر لیتر) برای صفت درصد بساک‌های نرزایی

Figure 1. Mean Comparison for the interaction of cultivar and concentration of kinetin (4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 and 7 mg l^{-1}) on the percentage of responsive anthers.



شکل ۲. مقایسهٔ میانگین رقم و غلظت هورمون کینتین (۴، ۴/۵، ۵، ۵،۵، ۶، ۶/۵ و ۷ میلی‌گرم بر لیتر) برای صفت درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده

Figure 2. Mean Comparison for the interaction of cultivar and concentration of kinetin (4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 and 7 mg l^{-1}) on the percentage of embryonic regenerated plantlets.

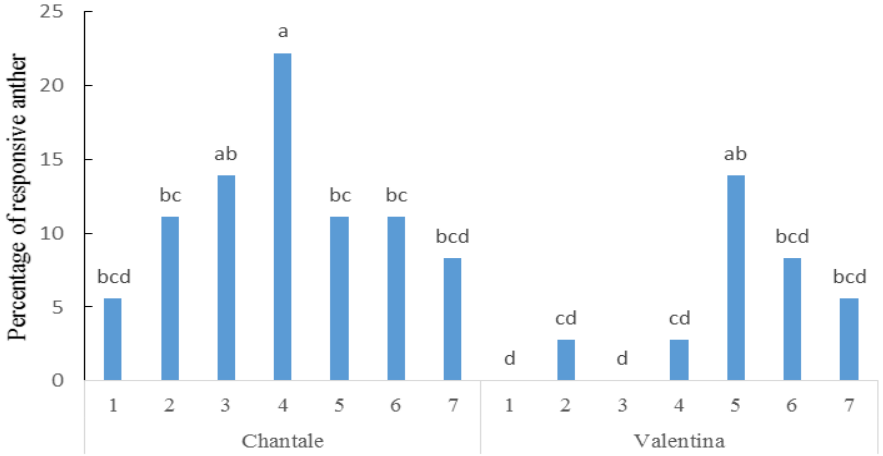


شکل ۳. مقایسهٔ میانگین رقم و غلظت هورمون کینتین (۴، ۴/۵، ۵، ۵،۵، ۶، ۶/۵ و ۷) برای صفت درصد نوساقه‌های باززایی‌شده

Figure 3. Mean Comparison for the interaction of cultivar and concentration of kinetin (4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 and 7 mg l^{-1}) on the percentage of callus-derived shoots.

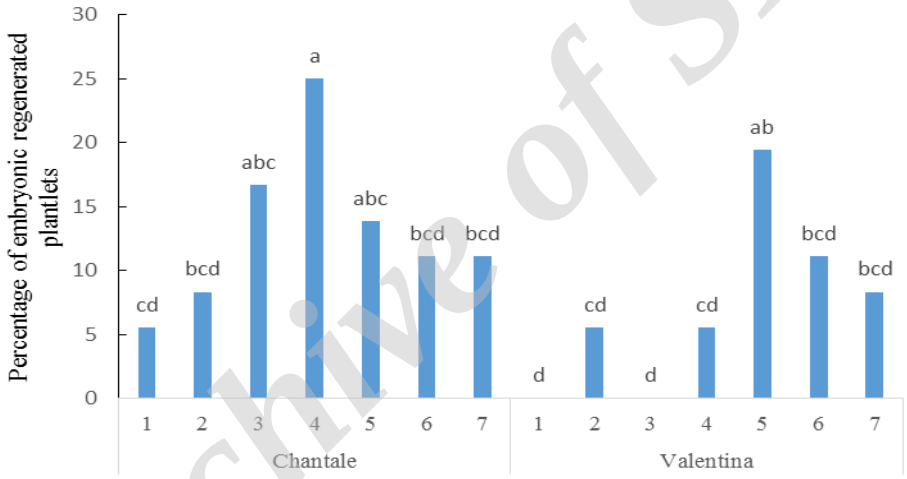
Archive of SID

www.SID.ir



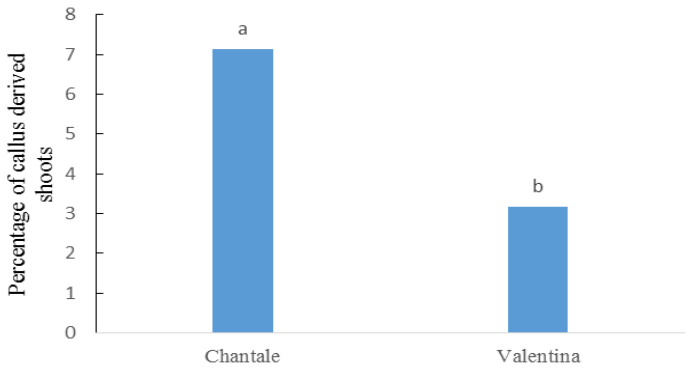
شکل ۴. مقایسهٔ میانگین اثر متقابل رقم و غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ میلی‌گرم بر لیتر) برای صفت درصد بساک‌های نرزایی

Figure 4. Mean Comparison for the interaction of cultivar and concentration of BAP (1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 mg l^{-1}) on the percentage of responsive anthers.



شکل ۵. مقایسهٔ میانگین اثر متقابل رقم و غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ میلی‌گرم بر لیتر) برای صفت درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده

Figure 5. Mean Comparison for the interaction of cultivar and concentration of BAP (1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 mg l^{-1}) on the percentage of embryonic regenerated plantlets.



شکل ۶. اثر سادهٔ رقم روی صفت درصد نوساقه‌های ناشی از پینه

Figure 6. Main effect of cultivar on the percentage of callus -derived shoots.

Archive of SID

www.SID.ir

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، کلید مهار نشانه‌های مولکولی رشد و نمو گیاه هستند (Kohli *et al.*, 2013). به‌طورکلی در کشت درون شیشه‌ای، تعادل عمل اکسین و سیتوکینین مهم است زیرا نسبت بهینهٔ این دو هورمون موجب کنترل تقسیم یاخته‌ای و ریخت‌زایی می‌شود. این دو گروه از هورمون، به‌طورمعمول به‌صورت متضاد عمل می‌کنند اما تأثیر آن‌ها با ژنگان و یا بافت خاص تعدیل می‌شود (Moubayidin *et al.*, 2009). مشاهده‌ها در مورد پاسخ‌دهی نژادگان‌های متفاوت به هورمون‌ها نشان می‌دهد که بعضی از آن‌ها تنها در یک محیط کشت با ترکیب خاصی از تنظیم‌کننده‌های رشد می‌توانند گیاهان نرزایی را تولید کنند. لذا، پیشنهاد می‌شود که به‌طور همزمان از چند محیط کشت برای القاء و باززایی گیاه به‌ویژه برای گیاه دهندهٔ جدید استفاده شود (Rotino, 2016). تداخل و تعامل تنظیم‌کننده‌های رشد با نژادگان‌های گیاهی و عامل‌های محیطی نقش مهمی در جنین‌زایی میکروسپورها دارند (Zur *et al.*, 2015) همچنان‌که نتایج این پژوهش نشان داد، در کشت بساک بادمجان، پاسخ رقم‌های مختلف در تیمارهای مختلف هورمونی، متفاوت است.

ترکیب‌های مختلفی از اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در محیط کشت برای انجام کشت بساک در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شده‌اند. Dumas de Vaulx & Chambonnet (1982)، بیشترین میزان گیاهچه‌ها را از محیط کشت C با استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر از دو هورمون 2,4-D[1] و کینتین به‌دست آوردند. همچنین Rotino *et al.* (1987) و نیز Tuberosa *et al.* (1987)، در بادمجان گیاهان هاپلوئید را به ترتیب با نرخ ۴/۴ درصد و ۴/۸۷ درصد تولید کردند. در گزارشی (Rotino, 1996)، درزمینهٔ نتایج ارزیابی چهار ترکیب هورمونی شامل: ۴/۹۶ میلی‌گرم بر لیتر از 2,4-D+ ۵/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر از کینتین، ۲/۱۰ میلی‌گرم بر لیتر از نفتالین استیک اسید + ۱ میلی‌گرم بر لیتر از زئاتین، ۴/۹۹ میلی‌گرم بر لیتر از نفتالین استیک اسید+ ۵/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر از کینتین و ترکیب ۰/۱۰ میلی‌گرم بر لیتر از ایندول استیک اسید+ ۲/۹۹ میلی‌گرم بر لیتر از کینتین، به ترتیب به‌عنوان بهترین ترکیب‌های هورمونی برای القاء نرزایی در بادمجان معرفی شدند که از میان آن‌ها، ترکیب حاوی ۴/۹۹ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید + ۵/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین، بیشترین میزان جنین‌زایی (۷۶/۵ درصد) را داشت. همچنین در نتایج تحقیق دیگری (Rotino *et al.*, 2005) مشخص شد که تیمار حاوی نفتالین استیک اسید و کینتین (هرکدام با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر) با ۷/۹ درصد جنین‌زایی، بهترین تیمار برای کشت بساک بادمجان بوده است. در پژوهش دیگری، تأثیر دو ترکیب هورمونی 2,4-Dبه همراه کینتین (هرکدام با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید به همراه کینتین (هرکدام با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر) با یکدیگر مقایسه و مشخص شد که ترکیب هورمونی نفتالین استیک اسید به همراه کینتین، از نظر میزان جنین‌زایی و باززایی گیاهچه مؤثرتر بوده است. (Shadmand *et al.*, 2015). لذا با توجه به نتایج این گزارش‌ها و نیز دیگر پژوهش‌ها درزمینهٔ کشت بساک بادمجان (Rotino, 1996; Rotino *et al.*, 2005) و با توجه به آزمایش‌های مقدماتی در این تحقیق، غلظت‌های ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر از نفتالین استیک اسید ثابت در نظر گرفته شد و به ترتیب تأثیر غلظت‌های مختلف دو سیتوکینین شامل بنزیل آمینو پورین و کینتین همراه با نفتالین استیک اسید بررسی شد. دو ویژگی عمدهٔ سیتوکینین‌ها به‌عنوان مشتقات آدنین، توانایی القاء تقسیم یاخته‌ای و تمایززایی است (Rotino, 1996). به‌طورکلی نتایج این پژوهش نشان داد، نسبت متناسب اکسین به سیتوکینین نقش مهمی در القای هاپلوئیدی در رقم‌های بررسی‌شده دارد به‌طوری‌که رقم شانتال در غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر از بنزیل آمینو پورین و ۶ میلی‌گرم بر لیتر از کینتین (به ترتیب، ۲۷/۷ و ۲۵)، و رقم والنتینا در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر از بنزیل آمینو پورین و ۷ میلی‌گرم بر لیتر از کینتین (به ترتیب، ۱۹/۶ و ۲۷/۸ درصد) به ترتیب بیشترین میزان گیاهچهٔ تولیدشده را

1. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

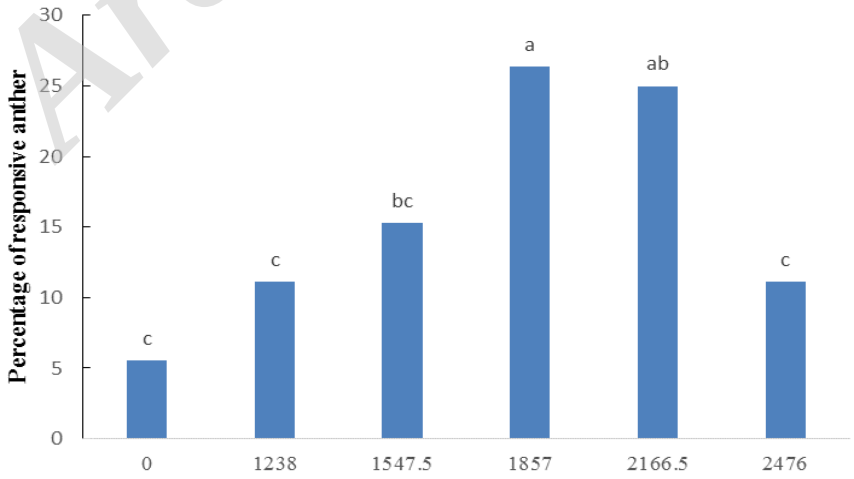
Archive of SID

www.SID.ir

داشتند. همچنین اثر متقابل معنی‌دار نشان می‌دهد، باید برای هر رقم بادمجان، ترکیب هورمونی محیط کشت بهینه شود. به‌طورکلی می‌توان گفت یکی از عامل‌های اصلی تفاوت در میزان پاسخ‌دهی به کشت بساک بادمجان نژادگان است که در پژوهش‌های پیشین نیز از آن به‌عنوان یکی از عامل‌های مهم محدودکننده یاد شده است (Basay & Ellialtıoğlu, 2013; Salas *et al.*, 2011) راهکارهای مختلفی برای افزایش بازدهٔ نرزایی در نژادگان‌های مختلف وجود دارد از جمله تلاقی بین نژادگان‌های پاسخ‌ده و کم پاسخ‌ده به‌منظور انتقال ژن‌های مربوطه، یا شناسایی شرایط کشت بهینه برای نرزایی در هر نژادگان (Basay & Ellialtıoğlu, 2013).

بررسی تأثیر غلظت نیترات آمونیوم بر القاء نرزایی بادمجان

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد، اثر متقابل غلظت نیترات آمونیوم و رقم‌های بررسی‌شده و نیز اثر سادهٔ رقم برای هر سه صفت در این آزمایش معنی‌دار نبود و لذا مقایسهٔ میانگین تنها برای اثر سادهٔ غلظت نیترات آمونیوم انجام شد. مقایسهٔ میانگین برای صفات درصد بساک‌های نرزایی، درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده و درصد نوساقه‌های باززایی‌شده نشان داد (شکل‌های ۷، ۸ و ۹) که تا حدودی به موازات افزایش غلظت نیترات آمونیوم در محیط القاء نرزایی، میزان این صفات، افزایش یافته است و در غلظت ۱۸۵۷ میلی‌گرم بر لیتر (۱/۵ برابر غلظت اصلی)، به بالاترین میزان رسیده است و پس از آن به‌طور قابل توجهی کاهش یافته است (احتمال دارد در این غلظت تأثیر سمیت ایجاد کرده باشد). به نظر می‌رسد که نیتروژن نقش کلیدی در مسیر توسعهٔ میکروسپور داشته و در این زمینه، نسبت نیترات آمونیوم به نیترات پتاسیم اهمیت دارد. در این پژوهش، با ثابت در نظر گرفتن میزان نیترات پتاسیم، غلظت نیترات آمونیوم تا دو برابر غلظت اصلی آن افزایش یافت و نتایج نشان داد، با افزایش غلظت نیترات آمونیوم، میزان پینه‌زایی کاهش و میزان جنین‌زایی افزایش یافته است. تحقیقات مختلفی درزمینهٔ تأمین نیتروژن در محیط کشت و نسبت آن صورت گرفته است همچنان‌که در گیاه جو تغییر در نسبت نیتروژن کانی (نیترات آمونیوم و نیترات پتاسیم) به نیتروژن آلی (گلوتامین) موجب افزایش قابل توجه جنین‌زایی و تولید گیاه شده است (Mordhorst & Lörz, 1993). نقش کلیدی نسبت نیترات آمونیوم به نیترات پتاسیم در جنین‌زایی بدنی (سوماتیکی) چندگونهٔ دیگر شامل یونجه، سویا و *Agrostis alba* L. نیز بررسی شده است (Gamborg, 1970; Shetty & Asano, 1991; Stuart & Strickland, 1984).

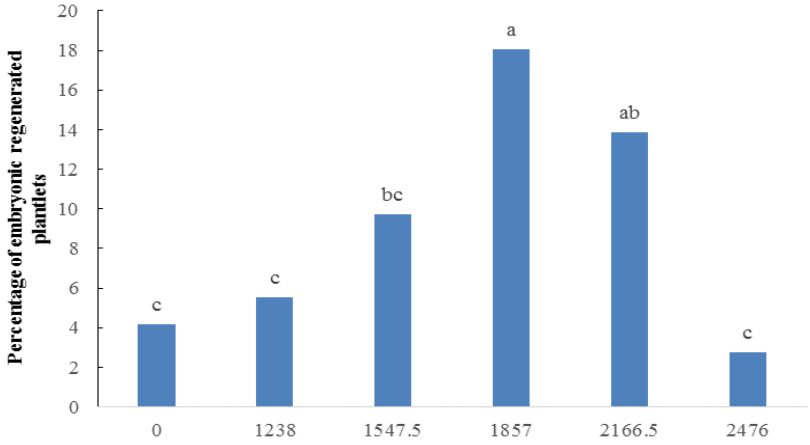


شکل ۷. مقایسهٔ میانگین تأثیر غلظت نیترات آمونیوم (میلی‌گرم بر لیتر) روی صفت درصد بساک‌های نرزایی

Figure 7. Mean Comparison for the effect of ammonioum nitrate concentration (mg l^{-1}) on the percentage of responsive anthers.

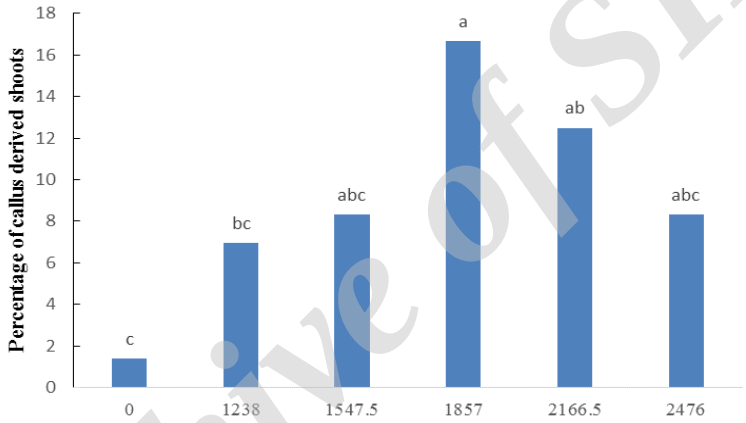
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۸. مقایسهٔ میانگین تأثیر غلظت نیترات آمونیوم (میلی‌گرم بر لیتر) روی صفت درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده

Figure 8. Mean Comparison for the effect of ammonioum nitrate concentration (mg l^{-1}) on the percentage of embryonic regenerated plantlets.



شکل ۹. مقایسهٔ میانگین تأثیر غلظت نیترات آمونیوم (میلی‌گرم بر لیتر) روی صفت درصد نوساقه‌های ناشی از پینه

Figure 9. Mean Comparison for the effect of ammonioum nitrate concentration (mg l^{-1}) on the percentage of callus-derived shoots.

در این پژوهش مشاهده شد، در بساک‌های پاسخده، به‌طورمعمول چند روز پس از کشت، بافت دیوارهٔ بساک قهوه‌ای شده و پس از چهار تا شش هفته، دیوارهٔ بساک‌ها در نتیجهٔ فشار ناشی از رشد یاخته‌ها پاره و جنین‌ها یا پینه‌ها پدیدار می‌شوند. به‌طورکلی دو نوع پاسخ مشاهده شد: بعضی از بساک‌ها، پینه‌های جنین‌زا و بعضی دیگر به‌طور مستقیم جنین تولید می‌کردند. البته تولید همزمان پینه و جنین روی یک بساک با فراوانی بالایی نیز مشاهده شد. پینه‌های تولیدشده منشأ تولید شمار قابل توجهی نو ساقه بودند. این نو ساقه‌ها، پس از ریشه‌دار شدن در محیط کشت R، برای ادامهٔ رشد و نمو به محیط کشت MS منتقل می‌شدند. درصورتی‌که ساختارهای جنینی ریشه‌دار به محیط کشت MS بدون هورمون منتقل می‌شدند، همهٔ آن‌ها به گیاهان کاملی تبدیل می‌شدند. به‌طورکلی برای سازگار کردن گیاهچه‌های تولیدی، آن‌ها در مرحلهٔ پنج تا شش برگی و با ریشه‌های بسیار توسعه‌یافته از ظرف‌های شیشه‌ای خارج شده و به مدت یک هفته در شرایط رطوبت بالای ۷۰ درصد قرار می‌گرفتند (در این دوره آبیاری گیاهچه‌ها موجب له شدن ریشه‌ها می‌شد، لذا آبیاری به هیچ عنوان انجام نمی‌شد)، در این مدت به مرور میزان رطوبت نسبی کاهش داده می‌شد (گیاهچه‌ها پس از گذشت پنج روز، هر روز دو ساعت

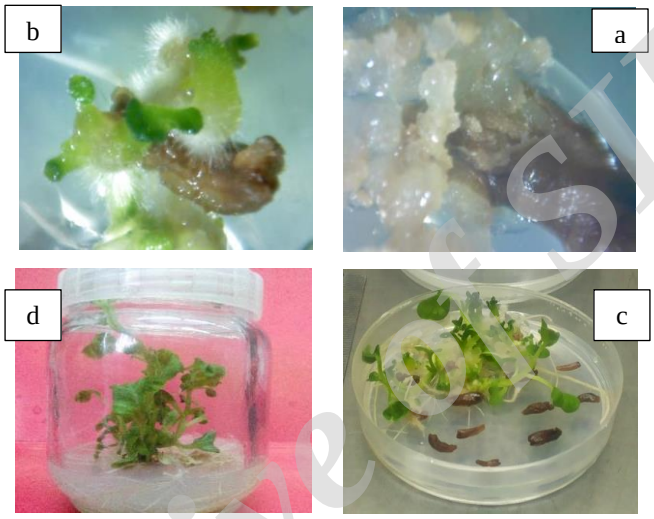
Archive of SID

www.SID.ir

در شرایط اتاق رشد قرار داده می‌شدند و پس از این زمان، به‌طور کامل از شرایط رطوبت بالا خارج می‌شدند). گیاهچه‌ها به مدت یک هفته در شرایط اتاق رشد بودند و سپس به گلخانه منتقل شدند.

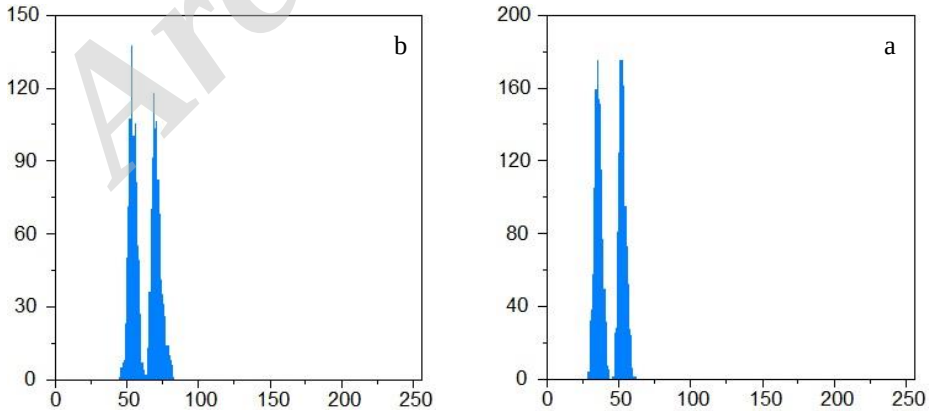
بررسی ژنتیک یاخته‌ای گیاهان باززایی‌شده به‌دست‌آمده از کشت بساک بادمجان

به‌طورکلی در این پژوهش از رقم شانتال و والنتینا به ترتیب ۳۱ و ۱۳ گیاه به‌دست آمد. برای بررسی‌های ژنتیک یاخته‌ای، به‌طور تصادفی، شمار ده گیاه از هر رقم تجزیه‌وتحلیل شدند. نتایج (شکل ۱۱) نشان داد، در رقم شانتال و والنتینا، به ترتیب ۴۰ و ۵۰ درصد گیاهان بررسی شده هاپلوئید بودند. نتایج بسیار متفاوتی برای تولید گیاهان هاپلوئید از راه کشت بساک در بادمجان گزارش شده است به‌طوری‌که در بررسی (Rotino, 1996)، ۷۴/۳ درصد و در نتایج تحقیق دیگری (Salas *et al.*, 2011) ۱۷/۹درصد از گیاهان به‌دست‌آمده از راه کشت بساک هاپلوئید بودند.



شکل ۱۰. کشت بساک و باززایی گیاه در بادمجان. a، b) بساک های نرزا، c) باززایی نوساقه و گیاهچه در کشت بساک، d) گیاه حاصل از کشت بساک

Figure 10. Anther culture and plant regeneration in eggplant. a, b) Responsive anthers, c) Shoot and plantlet regeneration in anther culture, d) Anther-derived plant



شکل ۱۱. تجزیهٔ سطح پلوئیدی گیاهان به‌دست‌آمده از کشت بساک بادمجان توسط فلوسایتومتری. A) فاز G_1 گیاه هاپلوئید؛ b) فاز G_1 گیاه دیپلوئید. محور Y شمار هسته‌های شمارش‌شده و محور X شدت فلورسنت را نشان می‌دهد. اوج ۵۰ مربوط به فاز G_1 گیاه استاندارد (گوجه‌فرنگی) است.

Figure 11. Flow cytometric ploidy level analysis of eggplant plants. a) G_1 phase of cell cycle of haploid plants. b) G_1 phase of cell cycle of diploid plants. The y-axis represents the number of nuclei and the x-axis represents the log of absorbance of propidium iodide (PI). 50 peak is G_1 standard plant (tomato).

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی نتایج به‌دست‌آمده از کشت بساک بادمجان در دو رقم دورگ تجاری بررسی‌شده نشان داد، رقم‌های مختلف پاسخ‌های متفاوتی به القای هاپلوئیدی در شرایط کشت بساک از خود نشان داده‌اند و نسبت بهینهٔ اکسین به سیتوکینین می‌تواند موجب بهبود پاسخ‌دهی و در نتیجه افزایش تولید گیاهچه در آن رقم‌ها شود. افزون بر تأثیر نوع سیتوکینین، غلظت آن در محیط کشت نیز اهمیت داشته و لازم است که در رقم‌های مختلف بررسی و بهینه شود. با توجه به نتایج این پژوهش، کارایی کشت بساک در رقم‌های شانتال و والنتینا به‌طور نسبی بهبود یافت و می‌توان از این نتایج برای بررسی بهینه‌سازی کارایی کشت بساک در دیگر رقم‌های بادمجان استفاده کرد.

REFERENCES

1. Anonymous. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available on: http://faostat.fao.org/. Last accessed 2016/4/10.
2. Başay, S. & Ellialtioğlu, Ş. Ş. (2013). Effect of genotypical factors on the effectiveness of anther culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Turkish Journal of Biology*, *37*(4), 499-505.
3. Dumas de Vaulx, R. & Chambonnet, D. (1982). Culture *in vitro* d'anthères d'aubergine (*Solanum melongena* L.): stimulation de la production de plantes au moyen de traitements à + 35 °C associés à de faibles teneurs en substances de croissance, *Agronomie*, 983-988 pp.
4. Dunwell, J. M. (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation, *Plant Biotechnology Journal*, 8(4), 377-424.
5. Ferrie, A. M. R. & Möllers, C. (2011), Haploids and doubled haploids in *Brassica* spp. for genetic and genomic research, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), 375-386.
6. Ferrie, A. M. R. & Caswell, K. L. (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), 301-309.
7. Gamborg, O. L. (1970). The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture, *Plant Physiology*, 45(4), 372-375.
8. Germana, M. A. (2006). Doubled haploid production in fruit crops, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 131-146.
9. Germanà, M. A. (2011), Anther culture for haploid and doubled haploid production, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), 283-300.
10. Henry, Y. & De Buyser, J. (1990). *Wheat anther culture*: agronomic performance of doubled haploid lines and the release of a new variety Florin Wheat. *Springer*, 285-352 pp.
11. Karimzadeh, GH., Danesh-Gilevaei, M. & Aghaalikhani, M. (2011). Karyotypic and nuclear DNA variations in *Lathyrus sativus* (Fabaceae), *Caryologia*, 64(1), 42-54.
12. Kohli, A., Sreenivasulu, N., Lakshmanan, P. & Kumar, P. P. (2013). The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses, *Plant Cell Reports*, 32(7), 945-957.
13. Loureiro, J., Pinto, G., Lopes, T., Doležel, J. & Santos, C. (2005). Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercussuber* L. using flow cytometry, *Planta*, 221(6), 815-822.
14. Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J. & Santos, C. (2007). Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species, *Annals of Botany*, 100(4), 875-888.
15. Mordhorst, A. P. & Lörz, H. (1993). Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media, *Journal of Plant Physiology*, 142(4), 485-492.
16. Moubayidin, L., Di Mambro, R. & Sabatini, S. (2009). Cytokinin–auxin crosstalk, *Trends In Plant Science*, 14(10), 557-562.
17. Olsen, F. L. (1987). Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources, *Carlsberg Research Communications*, 52(6), 393-404.
18. Poehlman, J. M. (2013). *Breeding field crops*. Springer Science and Business Media.
19. Raina, S. K. & Iyer, R. D. (1973). Differentiation of diploid plants from pollen callus in anther cultures of *Solanum melongena* L. *Z Pflanzenzucht*, 70, 275-280
20. Rotino, G. L. (1996). Haploidy in eggplant, *In Vitro* Haploid Production In Higher Plants. *Springer*, 115-141 pp.
21. Rotino, G. L., Falavigna, A. & Restaino, F. (1987). Production of anther-derived plantlets of eggplant, *Capsicum News letter*, 6, 89-90.

Archive of SID

www.SID.ir

22. Rotino, G. L. (2016). Anther culture in eggplant (*Solanum melongena* L.), In vitro Embryogenesis In Higher Plants. *Springer*, 453-466.
23. Rotino, G. L., Sihachakr, D., Rizza, F., Valè, G., Tacconi, M. G. & Alberti, P. (2005). Current status in production and utilization of dihaploids from somatic hybrids between eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relatives, *Acta Physiologiae Plantarum*, 27(4), 723-733.
24. Salas, P., Prohens, J. & Seguí-Simarro, J. M. (2011). Evaluation of androgenic competence through anther culture in common eggplant and related species, *Euphytica*, 182(2), 261-274.
25. Salas, P., Rivas-Sendra, A., Prohens, J. & Seguí-Simarro, J. M. (2012). Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures, *Euphytica*, 184(2), 235-250.
26. Seguí-Simarro, J. M. (2016). Androgenesis in solanaceae, In vitro embryogenesis in higher plants. *Springer*, 209-244 pp.
27. Shetty, K. & Asano, Y. (1991). The influence of organic nitrogen sources on the induction of embryogenic callus in *Agrostis alba* L., *Journal of Plant Physiology*, 139(1), 82-85.
28. Shadmand, M., Moeini, A. & Rashidi Monfared, S. (2015). *Study on embryo induction and production in some eggplant (Solanum melongena L.) cultivars anther culture using growth regulatore and calcium pretreatment.* M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University, Iran. (in Farsi)
29. Stuart, D. A. & Strickland, S. G. (1984). Somatic embryogenesis from cell cultures of Medicagosativa L. The role of amino acid additions to the regeneration medium, *Plant Science Letters*, 34(1), 165-174.
30. Tuberosa, R., Sanghineti, M. C. & Conti, S. (1987). Anther culture of eggplant Solanum *melongena* L. lines and hybrids, *Genética Agrária*, 41(3), 267-274.
31. Kohli, A., Sreenivasulu, N., Lakshmanan, P. & Kumar, P. P. (2013). The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses, *Plant Cell Reports*, 32(7), 945-957.
32. Moubayidin, L., Di Mambro, R. & Sabatini, S. (2009). Cytokinin-auxin crosstalk, *Trends In Plant Science*, 14(10), 557-562.
33. Żur, I., Dubas, E., Krzewska, M. & Janowiak, F. (2015). Current insights into hormonal regulation of microspore embryogenesis, *Frontiers In Plant Science*, 6, 424.

Archive of SID

www.SID.ir