Crop Biotech.
Spring (2015) 9: 29-38.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره نهم، بهار ۱۳۹۴ (۳۸-۲۹)

بهینه‌سازی کال‌زایی و باززایی دو رقم برنج ایندیکا (*Oryza sativa* L.) در شرایط فقدان پرولین جهت کاهش تغییرات ناخواسته بر 2-acetyl-1-pyrroline و سایر مواد موثر در عطر برنج

کی‌قباد کیکاوسی[1*]، الطاف حسین نداف[2]، غلامرضا بخشی خانیکی[3]

۱. دکتری تخصصی، آزمایشگاه سیتوژنتیک گروه علوم گیاهی، دانشگاه پونا، هندوستان. ۲. دانشیار گروه علوم گیاهی، دانشگاه پونا، هندوستان.
۳. استاد گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۳/۲۰)

Optimization of callus induction and regeneration in two Indica rice (*Oryza sativa* L.) varieties under absence of proline to decline its undesirable effects on 2-acetyl-1-pyrroline and other aromatic compounds

Keyghobad Kaikavoosi[1]*, Altaf Hosseini Nadaf[2], Gholamreza Bakhshi Khaniki
1. Ph.D, Cytogenetic Lab, Department of Botany, University of Pune, Pune, India.2. Associate Professor, Department of Botany, University of Pune, Pune, India. 3. Professor, Department of Agriculture, Payeme Noor University, Tehran, Iran.

(Received: Mar. 7, 2015 - Accepted: Jun. 10, 2015)

Abstract

In most transformation studies it has been indicated that adding proline to the tissue culture medium can increase the callus induction frequency and reduce induction time. Adding proline to callus induction medium in this phase can affect the production of aromatic compounds in rice and if the goal of exogenous gene transformation is increasing the rice aromatic associated secondary metabolites such as 2-acetyl-1-pyrroline (2AP), this amino acid can slipup the final results. Although, absence of amino acids such as proline can reduce callus induction percentage. In this research, callus induction from two *indica* rice varieties; Ambemohar 157 and Indrayani were optimized, using MS medium having various concentrations of 2,4-D, without using proline. The results revealed that 2.5 mgl^{-1} of 2,4-D for Ambemohar 157 and 4 mgl^{-1} for *Indrayani* can lead to better callus induction. These results indicated that absence of proline can be disregard by increasing of 2,4-D concentrations. Calluses obtained from the best hormone treatment were cultured on MS fortified with 0.01 mgl^{-1} NAA + (1, 2, 3, 4, 5) mgl^{-1} BAP for shoot regeneration. The highest percentage of regeneration was achieved on MS supplemented with 2 $mgl^{-1}$and 3 mgl^{-1} for Ambemohar157 and Indrayani cultivar respectively. Proline contents in calli which were growth in MS medium supplemented with 500 mg/L of proline showed approximately 12 to 14 fold increase over the calli growth in non-proline added medium.

Keywords: Rice, 2,4-D, Callus induction, Proline, 2-acetyl-1-pyrroline.

چکیده

در اکثر مطالعات انتقال ژن های گیاهی، استفاده از پرولین و سایر اسید های آمینه در محیط کشت، یکی از عوامل موثر بر موفقیت و افزایش میزان کالوس زایی و کاهش زمان آن می باشد. افزودن این اسید آمینه در محیط کشت کالوس زایی با توجه به ماهیت تاثیر گزارش بر مواد موثر در متابولیت های ثانویه دخیل در عطر برنج، می تواند منجر به ایجاد تاثیرات ناخواسته ای در نتایج حاصل از انتقال ژن های مربوط به ترکیبات معطری نظیر 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) گردد. از طرف دیگر کمبود این اسید آمینه و سایر اسید های آمینه می تواند سبب کاهش شدید درصد کالوس زایی و باززایی گردد. در این مطالعه، قابلیت کالوس زایی دو رقم برنج شامل Ambemohar 157 و Indrayani از ارقام indica بدون حضور پرولین در محیط کشت پایه MS ، حاوی سطوح مختلفی از هورمون 2,4-D مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که افزودن 2,4-D تا مقدار ۲,۵ میلی‌گرم در لیتر برای واریته Ambemohar157 و ٤ میلی‌گرم در لیتر برای واریته Indrayani می‌تواند منجر به تولید حداکثری کالوس شده و جایگزینی مناسب برای استفاده از پرولین در محیط کشت القای کالوس باشد. بالاترین درصد باززایی برای رقم Ambemohar157 در ۲ میلی‌گرم در لیتر Benzylaminopurine (BAP) و برای رقم Indrayani در ۳ میلی‌گرم در لیتر BAPمشاهده شد. همچنین مشاهده شد که با افزودن پرولین به مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت، میزان پرولین آزاد در کالوس‌های تولید شده در هر دو رقم بین ۱۲ تا ۱٤ برابر بیشتر شد.

واژه‌های کلیدی: برنج، 2-acetyl-1-pyrroline، کالوس‌زایی، پرولین، 2,4-D .

* نویسنده مسئول: کی‌قباد کیکاوسی
E-mail: Kayghobadb@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

امروزه امنیت غذایی به یکی از مهم‌ترین چالش‌های جامعه جهانی تبدیل شده است. روش‌های اصلاح کلاسیک جهت افزایش عملکرد و یا افزایش میزان مقاومت در گیاهان بسیار وقت‌گیر و در عین حال پر هزینه می‌باشند و از این‌رو مطالعات و تحقیقات آزمایشگاهی، اصلاح نباتات مولکولی و بیوتکنولوژی به دلیل نیاز به زمان محدودتر و نتایج موفقیت آمیزتر مورد توجه محققان قرار گرفته است. برنج با تغذیه بیش از نیمی از جمعیت جهان به عنوان یکی از مهمترین گیاهان زراعی موجود شناخته شده است (Kathuria *et al.* ,2007). این گیاه با دارا بودن ژنومی با سایز کوتاه (~۳۴۰Mb) و اطلاعات ژنتیکی شناخته شده به گزینه‌ای مناسب جهت مطالعات ژنتیکی مبدل گردیده است (Sahi *et al.*, 2006).

در مطالعات انتقال ژن، توسعه و بهینه‌سازی تکنیک‌های کشت بافت، پایه تحقیق می‌باشند. از طرف دیگر القاء و تولید کالوس و سپس باززایی گیاه از جنین‌های رسیده در بعضی از واریته‌های زیرگونه ایندیکا با توجه به ماهیت سلولی و عدم پاسخ مناسب گیاه به شرایط درون شیشه‌ای بسیار سخت و زمان‌بر می‌باشد (Khanna and Raina, 1998; Martinez, 2003; Ge *et al.*, 2006). از این رو محققان با استفاده از اسیدهای آمینه و ترکیبات مختلف تلاش می‌نمایند تا با تسریع در فرآیندهای مربوط به القای کالوس، به ماده گیاهی اولیه مناسب و کافی برای مطالعات بعدی در زمان کمتری برسند.

در مسیر بیوشیمیایی تولید 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) که اصلی‌ترین ترکیبات موثر در عطر برنج می‌باشد، اسیدآمینه پرولین به عنوان ذخیره مرکزی ترکیب نیتروژنی نقش ایفا می‌کند (Wakte *et al.*, 2011; Buttery *et al.*, 1982). افزایش پرولین در گیاه به هر طریقی، چه تحت تاثیر انتقال ژن و چه از طریق افزایش به دلیل استرس‌های محیطی، باعث دسترسی بیشتر چرخه تولید غیرآنزیمی 2AP به متیل‌گلایوکسال از چرخه کلوین (Huang *et al.*, 2008) و دلتا-۱-پایرولین از مسیر چرخه کربس (Mezl and Knox, 1976) می‌شود. Wu و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که اورنتین و گلوتامات باعث تولید Δ^1-pyrroline می‌شوند که هنگام واکنش با متیل‌گلایوکسال منجر به تولید 2AP در سویا می‌شود. Huang *et al.* (2007) مسیر تولید 2-acetyl-1-pyrroline را در *Bacillus subtilis* ssp. natto معرفی کردند. -Δ^1 Pyrroline-5-carboxylic Acid تولید شده به عنوان پیش‌نیاز تولید 2AP معرفی شد. مکانیسم پیشنهادی Huang *et al.* (2008) برای تولید 2AP در کالوس برنج، پرولین را نیز به عنوان یکی از عوامل موثر در تولید این ماده آرماتیک معرفی کردند.

در مطالعه‌ای Kumar *et al.* (2010) نشان دادند که انتقال ژن *P5CS* به برنج باعث افزایش Δ^1-pyrroline در این گیاه می‌شود که خود باعث افزایش پرولین آزاد در بافت گیاهی می‌شود و در نهایت منجر به افزایش مقاومت به خشکی گردید. در آزمایشی Suprasanna *et al.* (1998) با افزودن پرولین به محیط کشت سلولی برنج باسمتی نشان دادند که افزودن پرولین به محیط کشت می‌تواند باعث افزایش عطر توده سلولی شود. پس با توجه به پتانسیل‌ذاتی گیاه در تولید 2-acetyl-1-pyrroline، بسته به میزان در دسترس بودن ماده اولیه یعنی پرولین، افزایش مقدار پرولین در محیط کشت می‌تواند نهایتاً منجر به تغییر مقدار و افزایش تولید 2AP شود. با توجه به شرح یاد شده، انتقال ژن‌های خارجی چون *P5CS* به منظور افزایش کیفیت عطر برنج، باعث تغییر در اکثر فرایندهای مربوط به تولید ماده شیمیائی 2-acetyl-1-pyrroline می‌شود که با توجه به نقش پرولین در مسیر بیوشیمیایی یاد شده فوق که منجر به تولید این ماده معطر می گردد،

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از این اسیدآمینه در محیط کشت برای القای و تولید کالوس، بطور حتم بر نتایج نهایی اندازه‌گیری برخی از متابولیت‌های ثانویه مرتبط با مواد موثر در عطر برنج تاثیر خواهد داشت و بنابر این نمی‌توان ارزیابی مناسبی از بیان ژن انتقال یافته داشت. همچنین محققان به دلیل توجه مطلق به اهداف از پیش تعیین‌شده انتقال ژن، به اثرات جانبی استفاده این مواد و تنظیم کننده‌ها توجه زیادی نکرده و این مهم باعث به دست آمدن نتایج غیر واقعی در آنالیز نهایی به خصوص تولید متابولیت‌های ثانویه موثر در عطر برنج پس از انتقال ژن خواهد شد. در مطالعه‌ای بر روی کالوس‌های برنج توسط، Yoshihashi *et al.* (2002) با اضافه کردن پرولین، گلوتامیک‌اسید و اورنتین به محیط کشت به منظور تولید و نگهداری بیشتر کالوس، گزارش گردید که نیتروژن این ترکیبات به عنوان نیتروژن ضروری جهت بالا بردن تولید ترکیب 2AP که عامل اصلی در عطر در برنج است، مورد استفاده قرار گرفت. در آزمایش دیگری Naik (2011) با افزودن پرولین، گلوتامیک اسید و اورنتین به محیط کشت نگهداری کالوس‌های برنج Basmati و Ambemohar 157 این موضوع را نیز مورد تائید قرار دادند. در مطالعه‌ای که توسط Kaikavoosi (2012) به منظور انتقال ژن *P5CS* به برنج انجام داد، دخالت این ترکیبات را در چرخه کربس و ارتباط آنها را با افزایش و یا کاهش برخی از مواد حاصل از متابولیت‌های ثانویه همچون متیل‌پایردین، استیل‌پایرلین، هگزانول، دکانوئیک اسید، نونانول، اکتانول و غیره را گزارش نمود. در اکثر تحقیقات، محققان از ترکیباتی نظیر پرولین در محیط‌های کشت بافت استاندارد و هم‌چنین توصیه شده در منابع دیگر، استفاده می‌کنند و به دلیل صرفه‌جویی در زمان از بررسی اثر محیط‌های کشت بدون اسیدآمینه بر کالوس‌زایی و باززایی نمونه‌های خود، خودداری می‌نمایند. از این رو در این تحقیق بمنظور بهینه‌سازی کالوس‌زایی حداکثری، از جنین بذرهای رسیده برنج، بر خلاف محیط کشت‌های متداول از محیط کشتی بدون پرولین با هدف کاهش اثرات جانبی این ماده بر تولید متابولیت های ثانویه موثر در عطر برنج زیرگونه ایندیکا استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

دو رقم پرمصرف از برنج زیرگونه ایندیکا کشت شده در مناطق مرکزی و غرب هند از گروه برنج‌های عطری (Aromatic) به نام‌های Ambemohar-157 و Indrayani که از مرکز تحقیقاتی برنج Karjat در هند تهیه شده بودند، جهت این مطالعه استفاده شدند و فعالیت‌های آزمایشگاهی مطالعه فوق در سال ۲۰۱۱ و ۲۰۱۲ در آزمایشگاه سیتوژنتیک دانشگاه پونا، هندوستان انجام گرفت. رقم Ambemohar 157 رقم دانه کوتاه و عطری (حاوی ۰/۱۱۵ میلی گرم 2AP در یک کیلو بذر) با عملکرد متوسط ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار و رقم Indrayani دانه متوسط، عطری (حاوی ۰/۳۰۰ میلی‌گرم 2AP در یک کیلو بذر) (Mathure *et al.*, 2011) و عملکرد متوسط ۴۰۰۰ کیلوگرم در هکتار می‌باشد. بذر هر دو رقم توسط دست پوست‌زدایی و با آب مقطر استریل به میزان لازم شسته شدند. جهت ضدعفونی سطحی ابتدا بذرهای فوق به مدت ۳۰ ثانیه توسط الکل ۷۰٪ تیمار داده شده و سپس به وسیله آب مقطر استریل مورد شستشو قرار گرفتند. سپس در زیر هود لامینارایرفلو بذور به مدت ۱۰ دقیقه در محلول $HgCl_2$ ۰/۱٪ قرار داده شده و پس از این مدت ۵ مرتبه توسط آب مقطر استریل شسته شدند.

کالوس‌زایی

از محیط کشت MS جهت کالوس‌زایی استفاده گردید. مقادیر متفاوت از 2,4-D شامل ۰، ۱، ۱,۵، ۲، ۲,۵، ۳، ۴، ۵ و ۶ میلی‌گرم در لیتر جهت کالوس‌زایی

Archive of SID

www.SID.ir

به محیط کشت افزوده شد. پس از تنظیم pH ظروف حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت در دمای ۱۲۱°C و فشار psi ۱۵ به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. داخل هر کدام از تیوب‌های حاوی محیط‌های کشت جامد و سرد شده با مقادیر یاد شده 2,4-D، سه عدد بذر قرار داده شدند. لوله‌های آزمایش به مدت ۱۰ روز در تاریکی جهت به حداقل رساندن فعالیت‌های فتوسنتزی در صورت ظهور جوانه‌ها و دمای ۲۷°C قرار داده شدند. پس از این مدت بذرهای جوانه زده به محیط کشت‌های جدید با مقادیر مشابه هورمون انتقال و در فتوپریود ۱۶ ساعت نور و شدت ۲۴۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۶°C در اتاق کشت قرار گرفتند. هر ۲۱ روز کالوس‌های تولید شده به محیط کشت جدید منتقل و پارامترهایی نظیر جنین‌زایی سوماتیکی، وزن و اندازه مناسب کالوس‌ها بررسی شدند. درصد کالوس‌زایی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Summart *et al.*, 2008):

$$\text{درصد کالوس‌زایی} = \frac{\text{تعداد کالوس‌های بدست آمده}}{\text{تعداد بذر های اولیه}} \times ۱۰۰$$

باززایی گیاهچه از کالوس

کالوس‌های دارای بافت یک‌دست، نیمه سفت و دارای رنگ طبیعی (کرم و سفید) جهت باززایی به محیط کشت MS حاوی مقادیر متفاوت از BAP شامل ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA به میزان ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند. کالوس‌های فوق در دمای ۲۵±۲°C درجه و ۱۶ ساعت نور و شدت ۲۴۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند و پس از هر ۲۰ روز به محیط کشت تازه انتقال داده شدند. ساقه‌های باززایی شده پس از رسیدن به اندازه‌ی حدود ۶ سانتی‌متر جهت ریشه‌زایی به محیط کشت ½MS و ۸ گرم آگار در لیتر و فاقد هورمون انتقال داده شدند. ریزنمونه‌ها در دمای ۲۵±۲°C و ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. جهت سازگار کردن گیاهان باززایی شده پس از رشد کافی ریشه‌ها، گیاهچه‌های سالم و قوی از محیط کشت ½MS خارج شده، بقایای محیط کشت موجود بر روی ریشه‌ها با آب استریل به طور کامل و با دقت شسته و جدا شدند. گیاهچه‌ها در گلدان‌های با قطر ۱۰ سانتی‌متر حاوی خاک استریل ورمی‌کولیت انتقال و به ژرمیناتور با دمای ۲۵±۲°C و رطوبت نسبی ۷۰ درصد منتقل شدند. پس از این مدت گیاهچه‌ها به گلخانه با همین شرایط دما و نور انتقال یافتند.

سنجش پرولین

جهت بررسی تاثیر پرولین موجود در محیط کشت بر افزایش یا کاهش مقدار پرولین آزاد در کالوس‌های تولید شده، دو محیط کشت MS با مقادیر بهینه از 2,4-D (۲/۵ میلی‌گرم در لیتر برای رقم Ambemohar157 و ۴ میلی‌گرم در لیتر در رقم Indrayani) برای هرکدام از ارقام جهت کالوس‌زایی تهیه شد. محیط کشت کنترل، بدون پرولین و محیط کشت بعدی با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین نیز مورد مطالعه قرار گرفت. پرولین موجود در کالوس‌های تازه هر دو تیمار فاقد پرولین و واجد پرولین، به روش Bates *et al.* (1973) اندازه‌گیری شد. از هر نمونه مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم کالوس تازه و سالم انتخاب شد. کالوس‌های فوق در سولفوسالیک‌اسید[1] ۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه هموژنیزه شده و توسط فیلتر شماره ۱ واتمن فیلتر شدند. به ۲ میلی‌لیتر از مواد استخراج شده فوق ۲ میلی‌لیتر اسید نینهیدرین[2] و ۲ میلی‌لیتر Glacial acetic acid ۹۹٪ اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰°C قرار داده شد. بلافاصله پس از حرارت‌دهی نمونه‌های مورد مطالعه جهت توقف فعالیت‌های شیمیایی به ظرف یخ منتقل و ۴ میلی‌لیتر

1. Sulphosalicylic acid
2 Ninhydrin

Archive of SID

www.SID.ir

تولوئن[1] به نمونه‌ها اضافه شد. بخش رنگی حاوی تولوئن به آرامی جدا و تفاوت ظاهری رنگ این بخش حضور پرولین را از روی رنگ ترکیب فوق به راحتی قابل تشخیص کرد. میزان جذب رنگ قرمز نمونه توسط اسپکتروفوتومتر Shimadzu, Japan در طول موج ۵۲۰nm قرائت و اندازه‌گیری شد.

طرح آماری

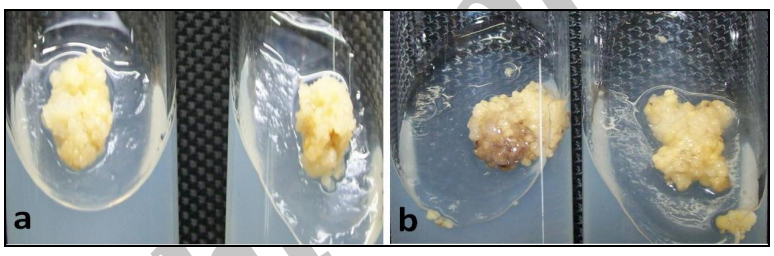
این آزمایش با چهار تکرار و در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی اجرا گردید. تجزیه واریانس در سطح معنی‌داری ۹۵٪ ($P\leq0.05$) انجام و برای مقایسه میانگین از روش مقایسه چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (ver 9.1) بصورت آماری تجزیه گردید.

1. Toluene

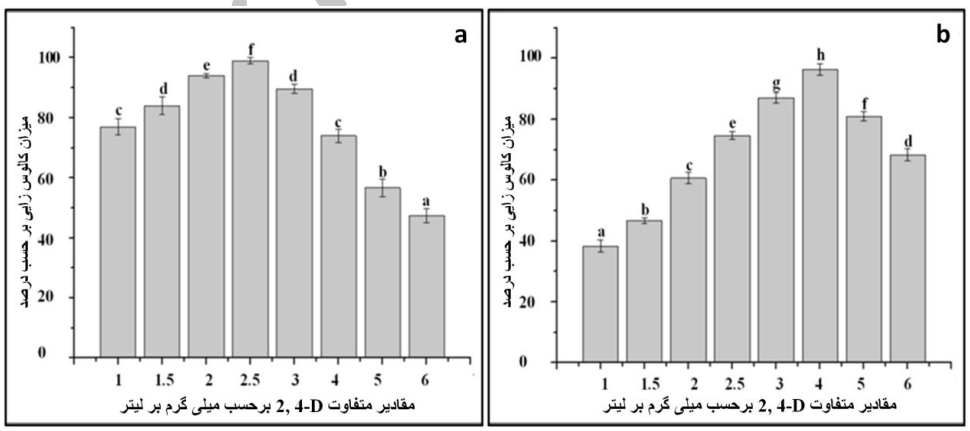
نتایج و بحث

کالوس زایی

پس از گذشت ۱۰ روز از انتقال بذر به محیط کشت اولین کالوس‌زایی از بخش جنینی شروع شد. بعد از ۳۰ روز در رقم Ambemohar157، بیشترین تولید کالوس (۹۹٪) در نمونه‌های حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (شکل ۱ و ۲، a) و کمترین مقدار کالوس تولید شده (۵۲٪) در ترکیب ۶ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به ثبت رسید. در رقم Indrayani بیشترین تولید کالوس (۹۶٪) در نمونه‌های حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر2,4-D (شکل ۱ و ۲، b) و کمترین مقدار کالوس تولید شده در ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به مشاهده شد.



شکل ۱. کالوس زایی پس از ۳۰ روز در رقم Ambemohar157 (a) و رقم Indrayani (b)



شکل ۲. کالوس‌زایی درحضور مقادیر متفاوت 2,4-D در رقم Ambemohar157 (a) و رقم Indrayani (b)

* هر کدام از ستون‌ها مقدار میانگین از چهار تکرار در غلظت مورد نظر و اندازه بارهای افقی روی هر ستون نشانگر خطای استاندارد موجود است. حروف غیرمشابه بالای هر ستون نمایانگر اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌ها در سطح ۰/۰۵ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

ارقام برنج زیرگونه ایندیکا به عنوان ارقامی با پاسخ‌دهی کم در برابر فعالیت‌های مرتبط با کشت بافت

www.SID.ir

شناخته می‌شوند (Abe and Futsuhara, 1986; Ge *et al.,* 2006; Kumar *et al.,* 2010). کالوس‌های استحصال شده از سلول‌های جنین رسیده بذر پرکاربردترین مورد در مطالعات روی ارقام برنج زیرگونه ایندیکا می‌باشند (Khanna and Raina, 1998; Wakte *et al.,* 2005;Kumar *et al.,* 2010; Naik, 2011). از بین طیف گسترده هورمون‌ها و ترکیبات موثر جهت تولید کالوس، 2,4-D بیشترین گزارشات را به خود اختصاص داده است (Mohanty *et al.,*1999; Sridevi *et al.,* 2005; Wakte *et al.,* 2005; Rachmawati and Anzai 2006; Kumar *et al.,* 2010). علی‌رغم تفاوت موجود گزارش شده بین ارقام برنج زیرگونه ایندیکا در میزان کالوس‌زایی Peng و Hodges (1989) بهینه‌سازی تولید کالوس توسط محققین بسیاری انجام گرفته است (Lin and Zhang 2005; Ge *et al.,*2006; Kumar *et al.,* 2010). کالوس‌زایی ۳۵ درصدی را برای رقم Indrayani با استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در حضور ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین توسط Suprasarma *et al.* (1998) گزارش نمودند در حالی‌که در این تحقیق با افزایش مقدار 2,4-D به ۴ میلی‌گرم در لیتر تولید کالوس به حدود ۹۰ درصد رسید، البته باید این نکته را در نظر داشت که این رقم جزء ارقامی است که در برابر فرایندهای کشت بافت به خوبی نتایج قابل توجهی را نشان نمی‌دهد و به طبع مقدار باززایی آن نیز کمتر از ارقام دیگر می‌باشد. توسط Naik (2011) در محیط کشت MS و در حضور پرولین درمقدار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D میزان ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی در رقم Ambemohar 157 گزارش شد. در حالی‌که در آزمایش حاضر حداکثر کالوس‌زایی (۹۸٪) در شرایط نبود پرولین و در حضور ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد.

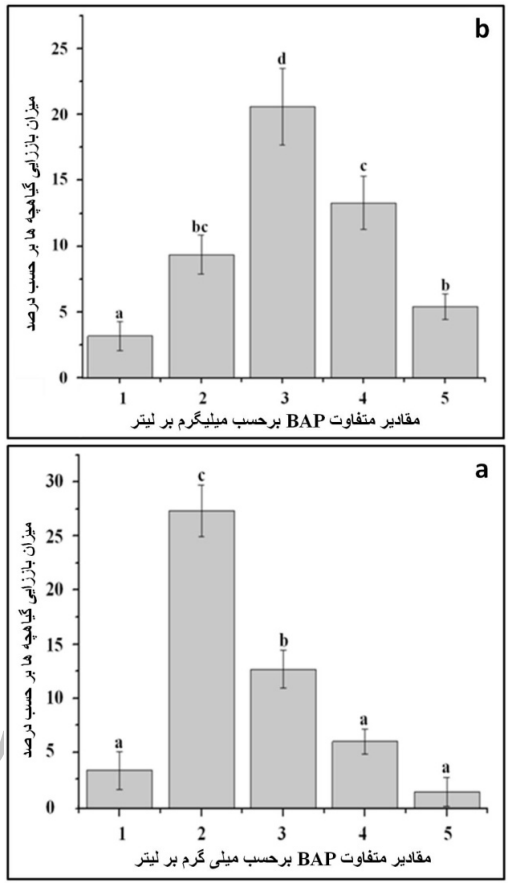
باززایی گیاهچه از کالوس و ریشه‌زایی آنها

کالوس‌های بدست آمده از بهترین ترکیبات هورمونی (۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در رقم Ambemohar157 و ۴ میلی‌گرم در لیتر2,4-D در رقم Indrayani) که دارای یکنواختی، رنگ ظاهری کرم و تراکم مطلوب بودند جهت باززایی گیاهچه‌هایی از هر دو واریته انتخاب شدند. کالوس‌های حاصل از بهترین تیمارهای هورمونی، برروی محیط کشت MS جامد حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم NAA در لیتر به همراه مقادیر متفاوتی از BAP شامل ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر جهت باززایی گیاهچه از کالوس قرار داده شدند. بالاترین درصد باززایی برای رقم Ambemohar157 در ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و برای رقم Indrayani در ۳ میلی‌گرم BAP در لیتر مشاهده شد (شکل ۳) که البته کاهش درصد باززایی را می‌توان به افزایش 2,4-D در هنگام کالوس‌زایی نسبت داد. پس از گذشت ۳ هفته لکه‌های سبز در بعضی از کالوس‌ها ظاهر شدند و کالوس‌های سالم به محیط کشت مشابه منتقل شدند. روند باززایی تا ۱۰ هفته به طول انجامید و عمل واکشت محیط باززایی هر ۳ هفته یک‌بار تکرار شد. در نهایت گیاهچه‌های سالم به دست آمده جهت ریشه‌زایی در محیط درون‌شیشه‌ای به محیط کشت ½MS فاقد هورمون انتقال یافتند و پس از ریشه‌زایی مناسب، جهت سازگار کردن آنها به شرایط گلخانه و مزرعه اقدام شد. از بین محرک‌های باززایی Kin و BAP بیشترین کاربرد را دارند و معمولاً فقط یکی از آنها در محیط کشت باززایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. Nancy *et al.* (1991) نیز با افزوده ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۲ میلی‌گرم NAA موفق به باززایی گیاهچه از کالوس‌های دو رقم Fang 7 و H124 شدند. هفتاد و یک درصد باززایی توسط Hamid *et al.* (2003) برای رقم ایندیکای Basmati 370 در حضور ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP گزارش نمودند. در مطالعه دیگری که Kumar *et al.* (2005) انجام دادند، میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP را مطلوب‌ترین مقدار

Archive of SID

www.SID.ir

جهت باززایی دو رقم کم پاسخ IR64 و IR72 به باززایی کالوس گزارش نمودند.



شکل ۳. اثر مقادیر مختلف BAP بر باززایی گیاهچه‌ها در رقم Ambemohar157 (a) و رقم Indrayani (b)

* هر کدام از ستون‌ها مقدار میانگین از سه تکرار در غلظت مورد نظر و اندازه بارهای افقی روی هر ستون نشانگر خطای استاندارد موجود است. حروف غیر مشابه بالای هر ستون نمایانگر اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌ها در سطح ۰/۰۵ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

بررسی تاثیر حضور پرولین در محیط کشت بر پرولین آزاد کالوس

جهت بررسی میزان اثر پرولین موجود در محیط کشت بر افزایش پرولین در کالوس‌های استحصال شده، مقدار پرولین آزاد کالوس‌های رشد یافته درپر بازده‌ترین ترکیب هورمونی (۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در رقم Ambemohar157 و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در رقم Indrayani) بدون حضور پرولین و کالوس‌های رشد یافته در همان مقدار هورمون به همراه ۵۰۰ میلی‌گرم پرولین اندازه‌گیری شد. مقدار پرولین اندازه‌گیری شده در کالوس‌های تازه در رقم Ambemohar157 نشان‌دهنده وجود ۳۳/۸ میکروگرم در هر گرم پرولین از کالوس‌های رشد یافته در محیط کشت فاقد این ماده بود در حالی‌که این مقدار، در کالوس‌های حاصل از محیط کشت حاوی پرولین بیش از ۱۴ برابر یعنی ۴۹۰ میکروگرم در هر گرم یادداشت‌برداری شد. میزان پرولین اندازه‌گیری شده برای کالوس‌های حاصل از محیط کشت فاقد پرولین در رقم Indrayani، ۲۴ میکروگرم در هر گرم بود، در حالی‌که در کالوس‌های رشد یافته در حضور پرولین حدود ۱۲ برابر بیشتر (۳۰۵ میکروگرم در هر گرم) گزارش گردید. افزایش مقدار پرولین خارجی اضافه شده به محیط کشت القای کالوس، منجر به افزایش بیش از ۱۰ برابری این اسیدآمینه در کالوس‌های حاصل شد. با بررسی به‌عمل آمده، تاکنون مطالعه دقیقی در این مورد صورت نگرفته است و اکثر مطالعات قبلی فقط به بررسی اثر حضور پرولین بر افزایش یا کاهش کالوس‌زایی، باززایی و یا مقدار 2AP بوده است. در مطالعات قبلی، Naik (2011) نیز با افزودن ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین به محیط کشت مایع MS و قرار دادن کالوس‌ها به مدت ۶ ساعت در آن، افزایش معنی‌دار 2AP را گزارش نمود. هم‌چنین Romanczyk *et al.* (1995) تاثیر حضور پرولین در محیط کشت بر افزایش 2AP را در *Bacillus cereus* به اثبات رسانده بودند. با توجه به نتایج حاصله و بررسی مطالعات گذشته به احتمال قوی افزایش میزان پرولین ناشی از حضور آن در محیط کشت کالوس‌زایی یا باززایی باعث افزایش فعالیت بعضی از متابولیت‌های ثانویه موثر بر تولید 2AP در گیاه برنج خواهند شد. این تاثیر ناخواسته می‌تواند بررسی عملکرد و کارآیی دقیق ژن انتقال یافته در مطالعات انتقال ژن برای افزایش عطر برنج را با خطا مواجه سازد. هنگام انتقال ژن و تولید گیاه تراریخت معمولاً، رسیدن به افزایش کارآیی یک صفت یا ایجاد یک مقاومت با تغییر

Archive

www.SID.ir

ساختار بیوشیمیایی در گیاه هدف می‌باشد. بنابر این باید همیشه این نکته را در نظر داشت که تمام شرایط محیطی فرآیند انتقال ژن (از کشت بافت تا بذردهی) می‌توانند اثرات ناخواسته‌ای را در نتایج آزمایش بجا بگذارند و گاه نتایج غیرواقعی را ارائه کنند. با توجه به اینکه بطور معمول اولین مرحله در تحقیقات انتقال ژن، مطالعات کشت بافت و تولید کالوس می‌باشد در تحقیق حاضر جهت تولید کالوس از محیط کشت MS فاقد متداول‌ترین و اثرگذارترین اسیدآمینه گزارش شده در دیگر تحقیقات، یعنی پرولین استفاده شد. با بررسی نتایج مطالعات قبلی مشخص شد که افزایش مقدار 2,4-D در محیط کشت کالوس‌زایی می‌تواند اثر کمبود پرولین را جبران کند و به علاوه به خاطر ماهیت هورمونی آن اثر کمتری بر ایجاد تغییر بر بعضی از متابولیت‌های ثانویه به خصوص 2AP خواهد داشت.

مطالعه کالوس‌زایی و باززایی در شرایط فقدان اسید آمینه پرولین در سایر گیاهان زراعی و ردیابی متابولیت‌های ثانویه وابسته به این اسید آمینه می تواند به نتایج مثبتی در حذف اثرات ناخواسته پرولین در نتیجه نهایی تحقیقات انتقال ژن و شناخت دقیق اثرات مستقیم ژن‌های خارجی بر متابولیت‌های ثانویه منجر شود.

REFERENCES

AbeT, Futsuhara YG (1986) Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice. Theoretical and Applied Genetics 72: 3-10.

Ali SS,Jafri SJ, Khan MJ, ButtMA (1993) Inheritance studies on aroma in two aromatic varieties of Pakistan. International Rice Research Newsletter 18(2): 6-7.

Ayers NM, Park WD (1994) Genetic transformation of rice. Critical Rev. Plant Science 13: 219-239.

Bates L (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205- 207.

Buttery RG, Ling L., Juliano B O (1982) 2-acetyl-1-pyrolline; an important aroma component of cooked rice. Chem. Ind. (London) 23: 958-959.

ChandS ,Sahrawat A K (2001) Stimulatory effect of partial desiccation on plant regeneration in *indica* rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 10: 43-47.

Ge X, Chu Z, Lin Y, Wang S (2006) A tissue culture system for different germplasms of *indica*rice. Plant Cell Report 25: 392-402.

Huang CT, Teng SC, Chang LJ, Chuang SH, Ho T C, Wu LM (2008) Biosynthetic mechanism of 2-Acetyl-1-pyrroline and Its relationship with Δ^1-pyrroline-5-carboxylic acid and methylglyoxal in aromatic rice (*Oryza sativa* L.) Callus. Journal of Agriculture Food Chemistry. 56: 7399-7404.

Huang CT, Huang YW, Hung HJ, Ho CT, Wu ML (2007) Δ^1-Pyrroline-5-carboxylic Acid Formed by Proline Dehydrogenase from the *Bacillus subtilis* ssp. natto Expressed in *Escherichia coli* as a Precursor for 2-Acetyl-1-pyrroline. Journal of Agriculture and Food Chemistry 55: 5097-5102.

Kaikavoosi K (2012) Overexpression of proline synthesizing gene for increasing aroma quality in non-basmati scented rice (*Oryza sativa* L.) through genetic transformation. Ph.D dissertation, Department of Botany, University of Pune, Pune, India.

Kaikavoosi K, Nadaf AB (2012) Aroma augmentation in *indica* rice varieties through genetic transformation and its analysis using headspace-solidphasemicroextraction (HS-SPME) coupled with GC-FID). In the International Conference on Business Opportunities in Life Sciences, Pune, India, 28-30 January, pp: 44-45.

Archive of SID

www.SID.ir

Kathuria H, Giri J, Tyagi H, Tayagi AK (2007) Advances in transgenic rice biotechnology. Critical Reviews in Plant Sciences 26: 65-103.

KaviKishor PB, Hong Z, Miao G, Chein H, Verma, D (1995) Overexpression of Δ^1-pyrroline-5-Carboxylate synthetase increases proline production and confers osmo tolerance in transgenic plants. Plant Physiology 108: 1387-1394.

Khanna HK, Raina SK (1998) Genotype and culture media interaction effects on regeneration response of three *indica* cultivars. Plant Cell, Tissue Organ Culture 52: 145-152.

Kumar KK, Muruthasalam S, Loganathan M, Sudhaka, Balasubramanian P (2005) An improved *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for recalcitrant elite *indica* rice cultivars. Plant Molecular and Biology Report 23: 67-73.

Kumar V, Shriram V, KaviKishor PP, Jawali N, Shitole MG (2010) Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic *indica* rice by over-expressing *P5CSF129A* gene. Plant Biotechnology Report. 4: 37-48.

Lin YZ, Zhang Q (2005) Optimizing the tissue culture conditions for high efficiency transformation of *indica* rice. Plant Cell Report 23: 540-547.

Martinez TM, Cabrera PJL Herrera EL (2003) Improvement of Rice Transformation Using Bombardment of Scutellum-Derived Calli. Plant Molecular Biology Report. 21: 429-437.

Mathure S, Wakte KV, Jawali N, Nadaf AB (2011) Quantification of 2-Acetyl-1-pyrroline and Other Rice Aroma Volatiles Among Indian Scented Rice Cultivars by HS-SPME/GC-FID. Food Analytical Methods 2011; 4(3):326-333.

Mezl VA, Knox W (1976) Properties and analysis of a stable derivative of pyrroline-5-carboxylic acid for use in metabolic studies. Analytical Biochemistry. 74: 430-440.

Mohanty A, Sarma NP, TyagiAK (1999) *Agrobacterium*-mediated high frequency transformation of an elite *indica* rice variety Pusa Basmati 1 and transmission of the transgenes to R2 progeny. Plant Science. 147: 127-137.

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

Naik SD (2011) *In vitro* expression analysis of 2-acetyl-1-pyrrolin in scented rice (*Oryza sativa* L.). M. Phil dissertation, Department of Botany, University of Pune, Pune, India.

Nancy L, Yunzhu W, Jinshui Y, Koulin G, Shu H, Jiazhen T, Douglas T (1991) Efficient transformation and regeneration of rice small cell groups. Proc. Natural Academic Science Journal of USA 88: 6389-6393.

Peng J, Hodges TK (1989) Genetic analysis of plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology 25: 91-94.

Rachmawati D, Anzai H (2006) Studies on callus induction, plant regeneration and transformation of Javanica rice cultivars. Plant Biotechnology. 23: 521-524.

Rashid H, Abbasi FM, Quraishi A (2003) Plant Regeneration from Seed Derived Callus of three varieties of Basmati Rice. Plant Tissue Culture Journal. 13(1): 75-79.

Romanczyk LJ Jr, McClelland LS, Aitken WM (1995) Formation of 2-Acetyl-I-pyrroline by Several *Bacillus cereus* Strains Isolated from Cocoa Fermentation Boxes. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 43: 469-475.

Sadhukhan RN, Roy K, Chattopadhyay P (1997) Inheritance of aroma in two local aromatic rice cultivars. Environment and Ecology. 15(2): 315-317.

Sahi C, Sing A, Blumwald E, Grover A (2006) Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerances-related genes from

Archive of SID

www.SID.ir

transcriptional profiling data. Plant Physiology. 127: 1-9.

Sridevi G, Dhandapani M, Veluthambi K (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of White Ponni, a non-basmati variety of *indica*rice (*Oryza sativa* L.) Current Science. 88 (1): 128-132.

Summart J, Panichajakul S, Prathepha P, Thanonkeo P (2008) Callus Induction and Influence of Culture Condition and Culture Medium on Growth of Thai Aromatic Rice, "KhaoDawk Mail 105", Cell Culture. World Applied Sciences Journal. 5(2): 246-251.

Suprasanna P, Ganapathi TR, Ramaswamy NK, Surendranathan K, Rao PS (1998) Aroma synthesis in cell and callus cultures of rice. In Rice Genetics, Proceedings of the International Rice Genetics Symposium, International Rice Research Institute. 15: 123-125.

Wakte VK, Patil GB, Nadaf AB (2005) Tissue culture technique as a tool in micropropagation, synthesis of aroma compounds and conservation of local scented non-basmati type rice varieties (*Oryza sativa* L.). In Karuppay SM and Gacche RN (eds). The National Conference on Bioactive Compounds: new frontiers and therapeutic usage, Nanded, India, 25-26 Feb., pp: 7-16.

Wakte VK, Kad T, Zanan RL, Nadaf AB (2011) Mechanism of 2-acetyl-1-pyrroline biosynthesis in BassialatifoliaRoxb. Flowers. PhysiolMolBiol Plants. (July–September 2011) 17(3): 231-237.

Wu ML, Chou KL, Wu CR, Chen JK, Huang TC (2009) Characterization and the Possible Formation Mechanism of 2-Acetyl-1-Pyrroline in Aromatic Vegetable Soybean (*Glycine max* L.). Journal of Food Science. 74: 192-197.

Yamchi A, Jazii RF, Ghobadi C, Mousavi A, Karkhanehee AA (2005) Increasing of tolerance to osmotic stresses in tobacco *Nicotianatabacum*cv. Xanthi through Overexpression of *P5CS* Gene. Journal of Science and technology of Agriculture and Natural Resources. Isfahan University, Iran 8(4): 31-40.

Yoshihashi TN, Huong TT, Inatomi H (2002) Precursors of 2-acetyl-1-pyrroline, a potent flavor compound of an aromatic rice variety. Journal of Agricultural Food Chemistry. 50: 2001-2004.

Zhang L, Hattori K, Zhang L (1996) Genetic analysis of regeneration ability in rice seed callus. Genes and Genetics Systems. 71: 313-317.

Archive of SID

www.SID.ir