

تأثیر رقم و تراکم کشت کوتیلدون بر باززایی نوساقه در کلزا (*Brassica napus* L.)

Effect of Cultivar and Density of Cultured Cotyledons on Shoot Regeneration in Rapeseed (*Brassica napus* L.)

دانیال کهریزی^{1*}، علی هاتف سلمانیان² و علی رضا زبرجدی¹

چکیده

در این پژوهش اثر دو رقم تجاری کلزا (PF-7045-91 و SLM-046)، تراکم ریزنمونه (در دو سطح 15 و 30 کوتیلدون در یک پتری دیش به قطر 10 سانتی متر) و اثر متقابل آنها روی باززایی نوساقه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین رقم‌های کلزا از نظر باززایی نوساقه اختلاف معنی دار وجود دارد، به طوری که رقم PF-7045-91 (با 74% باززایی) برتر از رقم SLM-046 (با 56% باززایی) شناخته شد. بین دو تراکم کشت شده نیز از این لحاظ اختلاف معنی دار وجود داشت، به طوری که تراکم 15 ریزنمونه (با 79% باززایی) برتری معنی داری نسبت به تراکم 30 ریزنمونه (با 51% باززایی) نشان داد. هم‌چنین نتایج آزمون تجزیه واریانس حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار بین اثر متقابل رقم در تراکم کشت بود.

واژه‌های کلیدی: کلزا، کوتیلدون، باززایی

1. استادیاران گروه پژوهشی بیوتکنولوژی مقاومت به خشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه
2. دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، تهران

* نویسنده مسوول

بدون استفاده از اکسین به دست آمد. چنگ و همکاران (Cheng et al., 2001) ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل، قطعات ریشه و میان‌گره‌ای گیاه *Brassica oleracea* و ترکیب‌های مختلف هورمون‌های TDZ، IAA، NAA و BAP را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش کردند که در میان ریزنمونه‌های مختلف، هیپوکوتیل و قطعات میان‌گره‌ای در حضور BAP بیشترین باززایی (90%) را داشته‌اند. هم‌چنین IAA و TDZ نیز افزایش معنی‌داری در باززایی نوساقه نشان دادند. در سال 2007 سلمانیان و کهریزی تاثیر ژنوتیپ و نوع ریزنمونه بر روی باززایی گیاهچه‌های کلزا به منظور استفاده در تحقیقات مهندسی ژنتیک را مطالعه کردند و مشخص گردید که عوامل ژنوتیپ، نوع ریزنمونه و اثرات متقابل آن‌ها دارای اثرات معنی‌داری روی باززایی گیاهچه‌های کلزا بود. آن‌ها هم‌چنین گزارش کردند که ریزنمونه کوتیلدونی دارای کارایی بالاتری برای باززایی می‌باشد.

با توجه به این‌که تاثیر تراکم ریزنمونه روی باززایی نوساقه در کشت بافت گیاهان مختلف گزارش شده ولی در رابطه با کلزا چنین اطلاعاتی وجود ندارد، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر رقم گیاه کلزا، تراکم کوتیلدون‌های کشت شده و اثرات متقابل آن‌ها روی ایجاد نوساقه و باززایی گیاهچه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذور کلزا (*Brassica napus*) ارقام PF-7045-91 و SLM-046 از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید. این بذور با استفاده از محلول سفید کننده هیپوکلریت سدیم 1/5% به علاوه چند قطره تریتون 10% به مدت 10 دقیقه همراه با تکان دادن استریل شدند. سپس 3 مرتبه شستشو هر بار به مدت 5 دقیقه با آب مقطر استریل انجام گرفت. بذور فوق در محیط جوانه‌زنی حاوی نصف غلظت نمک‌های محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت داده شدند و در اتاق رشد، با زمان نوردهی شبانه‌روزی 16 ساعت روشنایی در درجه حرارت 25°C در روشنایی و 15°C در تاریکی نگهداری گردیدند.

کوتیلدون‌های گیاهچه‌های 5 روزه که طول دم‌برگ آن‌ها 2 میلی‌متر بود، جدا شدند و جوانه انتهایی آن‌ها به‌طور کامل قطع گردید. دم‌برگ‌ها در عمق 2 میلی‌متری محیط کشت پایه MS حاوی 4/5 میلی‌گرم در لیتر BAP و 30 گرم در لیتر ساکارز (pH=5/8) قرار داده شدند.

به‌کارگیری روش‌های مهندسی ژنتیک نقش مهمی در اصلاح گیاهان داشته و منجر به تولید ارقامی شده که از نظر صفات با ارزش کشاورزی و اقتصادی بسیار حائز اهمیت می‌باشند. انتقال ژن به گیاهان به‌منظور به‌نژادی آن‌ها، وابسته به توسعه روشی کارا برای باززایی نوساقه‌های زنده و سبز از بافت‌های کشت شده و روش تراریختی مناسب می‌باشد. در این روش سلول، بافت، اندام و یا هر قطعه جدا شده‌ای از گیاه (ریزنمونه) در یک محیط غذایی مصنوعی و در شرایط استریل کشت می‌گردد. تولید تعداد زیاد گیاه کامل، در مدت زمان کوتاه‌تر نسبت به شرایط طبیعی، از مزایای عمده کشت بافت گیاهی و لازمه فن‌آوری مهندسی ژنتیک می‌باشد (Hooykass & Schilperoort, 1992. and Mukhopadhyay et al., 1992).

در کشت بافت گیاهی شرایط متعدد و پیچیده‌ای دخالت می‌کنند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی اشاره نمود (معینی و کهریزی، 1382؛ کهریزی و همکاران، 1386الف). دانه‌های روغنی بعد از غلات به عنوان دومین منبع تامین کننده کالری برای جوامع بشری محسوب می‌شوند. کلزا (Rapeseed)، بعد از سویا و نخل روغنی، سومین منبع تولید روغن نباتی در جهان بوده و در مناطق معتدل، به‌عنوان مهم‌ترین گیاه روغنی به شمار می‌رود و حدود 13 درصد روغن خوراکی جهان را تامین می‌کند. این گیاه در طی 20 سال گذشته گیاهانی مانند بادام زمینی، آفتابگردان و پنبه دانه را پشت سر گذاشته و به دلیل کیفیت بالای روغن و کنجاله غنی از پروتئین، یکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی به‌شمار می‌رود. بر این اساس سطح زیر کشت این گیاه در چند سال گذشته توسعه چشم‌گیری داشته است (ERS, 2001).

تاکنون در کشت بافت و مهندسی ژنتیک گیاه کلزا از ریزنمونه‌های مختلفی استفاده شده است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان کوتیلدون و هیپوکوتیل را نام برد (زبرجدی و همکاران 1383؛ کهریزی و همکاران 1386؛ Kahrizi et al. 2007 و Zebarjadi et al. 2006).

در سال 1994، Ono و همکاران، اثر ژنوتیپ، ترکیب هورمونی و سن ریزنمونه را بر روی باززایی نوساقه از ریزنمونه‌های کوتیلدون 100 ژنوتیپ گیاه *Brassica napus* را بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که بیشترین فراوانی باززایی نوساقه (70%) از کاربرد 4 میلی‌گرم در لیتر BAP و

مناسب برای انتخاب بهترین ارقام، تجزیه و تحلیل اطلاعات را در مراحل بعدی انتقال ژن راحت تر نموده، اجرای طرح ساده تر و هزینه اجرای آن کمتر می شود. در پژوهش قبلی مشخص گردید که در بین ژنوتیپ های مورد بررسی دو رقم تجاری کلزا PF-7045-91 و SLM-046 و ریزنمونه کوتیلدون دارای بیشترین فراوانی باززایی می باشند (Salmanian & Kahrizi, 2007).

پس از کشت کوتیلدون های مناسب روی محیط ویژه و واکشت های لازم، نوساقه هایی روی آن ها ایجاد شد (شکل 1). نوساقه های حاصل از کشت کوتیلدون ها ناشی از اندام زایی مستقیم از انتهای بریده می باشد و انتظار می رود که کم ترین تنوع سوماکلونال را داشته باشند. گزارش ها نشان می دهد که نوساقه هایی که از کشت هیپوکوتیل ایجاد شده اند، ابتدا مرحله کالوس زایی را طی کرده اند و در اثر باززایی غیر مستقیم تشکیل شده اند. به همین سبب ممکن است در آن ها تنوع سوماکلونال مشاهده گردد (Evan *et al.* 2003؛ و Cheng *et al.* 2001). اگر چه تنوع سوماکلونال هم به نوبه خود جهت انتخاب در شرایط درون شیشه ای از اهمیت ویژه ای برخوردار است (Kahrizi *et al.*, 2007a)، اما هدف این پژوهش نبود. در این مطالعه جهت حفظ ساختار ژنتیکی از ریزنمونه کوتیلدون استفاده گردید. دلایل مختلفی را می توان ارائه نمود که چرا در کشت هیپوکوتیل تولید کالوس اتفاق می افتد، ولی در کشت کوتیلدون باززایی مستقیم مشاهده می شود. اول این که در کشت هیپوکوتیل چنان که قبلاً ذکر گردید، معمولاً از تنظیم کننده های رشد اکسینی قوی با مقادیر بالا استفاده شده است که به کارگیری این مواد در محیط کشت، تعادل هورمونی ریز نمونه را شدیداً بهم زده و باعث ایجاد توده سلولی تمایز نیافته می شود. این در حالی است که در کشت کوتیلدون از تنظیم کننده سیتوکینینی به همراه مقدار کم و ضعیف اکسین استفاده شده است. هم چنین برای تفسیر این موضوع باید به نوع بافت و ریزنمونه مورد استفاده هم توجه شود. برنامه و تمایز بافت کوتیلدونی بسیار مشابه برنامه و تمایز برگ می باشد و به همین دلیل تمایل به باززایی مستقیم دارد و این در حالی است که بافت هیپوکوتیل تمایز کمتری داشته و می توان برای تولید هر بافت جدیدی از آن استفاده نمود. هم چنین شرایط فیزیولوژیکی ریزنمونه ها تاثیر زیادی روی نوع باززایی آن دارد (Kahrizi *et al.*, 2007b). نتیجه با اهمیتی که از کشت کوتیلدون به دست آمد، امکان باززایی چندین نوساقه از یک

صفت مورد بررسی فراوانی باززایی نوساقه بود که طبق تعریف عبارت از نسبت تعداد نوساقه تولید شده به تعداد ریزنمونه کشت شده در هر پتری دیش می باشد. تجزیه آماری این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل با دو عامل، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در 4 تکرار انجام شد. عامل اول ژنوتیپ که سطوح آن شامل 2 رقم کلزای تجاری و عامل دوم تراکم ریزنمونه بود که از دو سطح 15 و 30 کوتیلدون در یک پتری دیش به قطر 10cm تشکیل می شد. نوساقه های ایجاد شده از کشت کوتیلدون پس از شمارش، به محیط کشت پایه MS بدون هورمون منتقل شدند. پس از این که طول نوساقه ها به اندازه حدود 8-10cm رسید به محیط پایه MS حاوی 2 میلی گرم در لیتر 20 IBA، 7 گرم در لیتر ساکارز و 7 گرم در لیتر آگار (pH=5/8) جهت ریشه زایی منتقل گردیدند.

گیاهچه های ریشه دار شده (با ارتفاع حدود 10cm)، به گلدان های کوچک حاوی خاک استریل (ترکیب یکسانی از پیت، ورمی کولیت و پرلیت) منتقل شدند. این نمونه ها تا زمان استقرار کامل و سازگاری با شرایط گلدانی، با محیط مایع حاوی نصف نمک های MS آبیاری شدند. برای سازگاری تدریجی با شرایط طبیعی (حفظ رطوبت نسبی بالا و کنترل آلودگی) از سرپوش های شفاف استفاده گردید. پس از سازگاری، سرپوش ها حذف گردید و به شرایط طبیعی خاک منتقل شدند. این گیاهچه در گلخانه کنترل شده با شرایط نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی، و دمای 25°C در روز و 15°C در شب منتقل شدند و تا زمان بذرگیری در همان شرایط باقی ماندند.

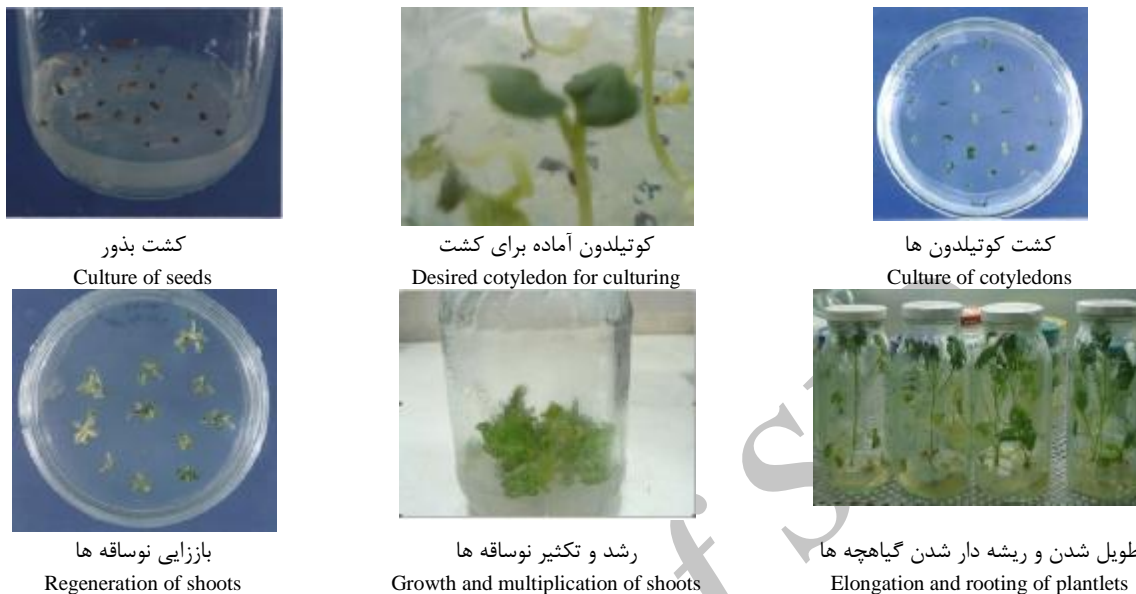
داده های به دست آمده، با استفاده از نرم افزارهای MSTATC تجزیه آماری شدند. با توجه به این که اکثر داده ها بر اساس درصد بودند، برای این که دارای توزیع نرمال باشند، از تبدیل داده زاویه ای \sqrt{X} Arcsin استفاده شد (Westhof, 1999). تجزیه واریانس با استفاده از آزمون F و مقایسه میانگین از طریق آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال 1% انجام شد.

نتایج و بحث

به منظور تولید گیاهان تراریخت، ابتدا باید فراوانی باززایی را بهینه سازی نمود. ژنوتیپ گیاه مورد بررسی، یکی از عوامل موثر بر فراوانی باززایی می باشد. چنانچه امکان دسترسی به تنوعی از ژنوتیپ های گیاهی وجود داشته باشد، لازم است که در قالب یک طرح آزمایشی مناسب بهترین ژنوتیپ برای هر ریزنمونه انتخاب گردد. انجام طرح آزمایشی

تاثیر رقم و تراکم کشت کوتیلدون بر باززایی نوساقه در کلزا (*Brassica napus* L.)

کوتیلدون می‌باشد که این موضوع در ریز ازدیادی و مهندسی ژنتیک کلزا بسیار حائز اهمیت می‌باشد (شکل 1). تراکم‌های مختلف ریزنمونه‌ها در جدول شماره 1 مشاهده می‌گردد.



شکل 1: مراحل باززایی نوساقه از طریق کشت کوتیلدون در کلزا

Fig. 1: Shoot regeneration stages via cotyledon culture in rapeseed

جدول 1: تجزیه واریانس باززایی نوساقه از کوتیلدون‌های دو رقم کلزا در دو تراکم کشت مختلف

Table 1: Analysis of variance of shoot regeneration from cotyledons in two cultivars and two culture densities in rapeseed

میانگین مربعات Mean of squares	درجه آزادی Degree of freedom	منبع تغییر Source of variation
4.63 **	1	رقم تراکم Cultivar
14.44 **	1	تراکم Density
0.55 ns	1	رقم × تراکم Cultivar × Density
0.28	12	خطای آزمایش Error
%C.V. =5.39	15	کل Total

** وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 1% (Significant P<0.1)

ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار (Non-significant)

برای اثرات متقابل رقم در تراکم کشت کوتیلدون، اختلافات معنی‌دار نمی‌باشند. در مقایسه میانگین داده‌ها بهتر می‌توان این نتایج را مشاهده نمود که در جدول شماره 2 آورده شده است.

جدول تجزیه واریانس فوق نشان می‌دهد که برای باززایی نوساقه از کوتیلدون‌های گیاه کلزا، اختلاف معنی‌دار بین دو رقم وجود دارد. هم‌چنین بین دو تراکم کشت شده نیز برای صفت فوق اختلاف معنی‌دار مشاهده می‌شود، ولی

جدول 2: مقایسه میانگین اثر رقم و تراکم کوتیلدون بر روی باززایی نوساقه کلزا

Table2: Mean comparison of cultivar and culture density effects on shoot regeneration in rapeseed

درصد باززایی Regeneration percutago	تیمار Treatment
	رقم Cultivar
85.0 a	PF-7045-91
63.0 b	SLM-046
	تراکم Density
87.0 a	15 ریزنمونه 15 explants
57.0 b	30 ریزنمونه 30 explants
	رقم × تراکم Cultivar × Density
91.0 a	15 × PF ریزنمونه PF×15 explants
57.3 c	30 × PF ریزنمونه PF×30 explants
66.0 b	15 × SLM ریزنمونه SLM×15 explants
42.7 d	30 × SLM ریزنمونه SLM×30 explants

حروف غیر مشابه بین سطوح هر تیمار بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین آن‌ها است.

Means in each column, followed by the similar letters are not significantly different at the 1% probability

سطح بالای 1 درصد معنی دار می‌باشد. چنان‌که ملاحظه می‌شود تمامی اثرات متقابل، در سطح احتمال 1 درصد اختلاف معنی دار نشان می‌دهند. این نکته بیانگر ضعف آزمون تجزیه واریانس در این رابطه می‌باشد و لذا لازم است مقایسه میانگین تیمارها انجام شود تا بتوان با اطمینان بیشتری قضاوت نمود. علت این موضوع احتمالاً به نوع توزیع فراوانی داده‌ها بر می‌گردد، به طوری که این توزیع به طریقی است که اثرات مثبت و منفی همدیگر را خنثی نموده و با وجود اختلاف در اثر تیمارها، تجزیه واریانس آن را معنی دار نشان نمی‌دهد (Westhof, 1999).

وجود اختلاف معنی دار بین ژنوتیپ‌ها، با نتایج Zhang and Bhalla (1999) در کلزا مطابقت دارد. پژوهش-گران مذکور به منظور بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن روی 7 رقم کلزا و برای فراوانی باززایی از دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل مطالعه کردند و اختلافات بین ارقام را بسیار معنی دار گزارش نمودند. وابستگی فراوانی باززایی به ژنوتیپ این را می‌رساند که جهت ریزازدیادی و یا انتقال ژن باید ژنوتیپ‌هایی به کار گرفته شوند که دارای درصد باززایی بالایی باشند. چنان‌چه رقم مناسبی (از نظر خصوصیات زراعی)

طبق جدول شماره 2، رقم PF-7045-91 بالاترین درصد باززایی نوساقه (85%) از طریق کشت کوتیلدون را نشان داده است و رقم SLM-046 (با 62% باززایی نوساقه) پس از آن قرار دارد ولی بین این دو رقم نیز در سطح احتمال 1% اختلاف معنی داری وجود دارد.

هم‌چنین بر اساس جدول فوق، تراکم 15 کوتیلدون در هر پتری‌دیش دارای فراوانی باززایی نوساقه بیشتری (87%) نسبت به 30 کوتیلدون در هر پتری (57%) می‌باشد. این کاهش باززایی که برای ریزنمونه‌های دیگر در گیاهان مختلف مطالعه شده است، می‌تواند به علت تولید مواد سمی و مضر از سوی ریزنمونه‌های غیر باززا باشد (معینی و کهریزی، 1382) و یا این‌که ممکن است افزایش رقابت بین ریزنمونه‌ها، باعث این امر شود (Kahrizi et al., 2007a).

هم‌چنین جدول مقایسه میانگین نشان می‌دهد که اثر متقابل 15 × PF ریزنمونه 91% باززایی دارای بیشترین میانگین در میان سایر اثرات متقابل است. نکته قابل توجه در رابطه با اثرات متقابل این است که جدول تجزیه واریانس این نوع اثر را برای درصد باززایی غیرمعنی‌دار نشان داد و این در حالی است که بر اساس نتایج مقایسه میانگین، این نوع اثر با

تأثیر رقم و تراکم کشت کوتیلدون بر باززایی نوساقه در کلزا (*Brassica napus* L.)

طوری که برخی محققین از دامنه وسیعی از ژنوتیپها استفاده کرده‌اند که تنوع بالایی برای صفت مورد نظر در خود دارند. بعضی از پژوهش‌گران نیز ژنوتیپ‌هایی را در پژوهش خود استفاده کرده‌اند که برای متغیر مورد مطالعه تنوع ندارند. از طرف دیگر صفت باززایی تحت کنترل ژنتیکی می‌باشد که تا کنون برای باززایی گیاهان مختلف از ریزنمونه‌های مختلف ژن‌های زیادی برای کروموزوم‌های مختلف گزارش شده است (Kahrizi *et al.*, 2000; Pierik, 1987; Smith, 2000).

وجود داشته باشد ولی فراوانی باززایی کمی داشته باشد، می‌توان از طریق دورگ‌گیری با ژنوتیپ دارای فراوانی باززایی بالا، این صفت را به ژنوتیپ برتر منتقل کرد. بر خلاف نتایج به دست آمده از این پژوهش، Menze و Mollers در سال 1999 گزارش کردند که برای باززایی نوساقه از کوتیلدون و هیپوکوتیل کلزا اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشده است. علت عدم تطابق بین نتایج تحقیقات، عمدتاً به اختلاف در ارقام و ژنوتیپ‌های مورد استفاده بر می‌گردد، به-

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های 1-2 متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID