Archive of SID

مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۳، شماره ۴، سال ۱۳۸۱ (۶۳۵-۶۲۷)

بررسی کشت بافت و اثر کشت همجواری ریزنمونه‌ها در کلزا* (*Brassica napus* L.)

علی اشرف مهرابی[۱]، منصور امیدی[۲]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[۳]، علی‌اکبر شاه‌نجات بوشهری[۴] و رضا توکل افشاری[۵]
۱، ۲، ۳، ٤، ٥، دانشجوی دوره دکتری اصلاح نباتات و استادیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۲/۲۵

خلاصه

جهت بررسی پینه‌زایی و باز زایی در ده ژنوتیپ کلزا، ریز نمونهٔ زیر لپه حاصل از گیاهچه‌های (دانه رست‌های) ٦ روزه در محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA کشت گردید. ژنوتیپ Syn1 سریعتر از بقیه ژنوتیپ‌ها شروع به پینه‌زایی کرد و بالاترین میزان پینه‌زایی در ژنوتیپ PF7045/91 مشاهده گردید. پینه‌های ژنوتیپ‌های Colvert و Okapi بزرگتر از بقیه بودند. واکشت قطعاتی از پینه‌های حاصل پینه‌زایی و اندام‌زایی را به شدت در تمامی ژنوتیپ‌ها کاهش داد. پس از انتقال پینه‌ها به دو محیط باززایی با تنظیم کننده‌های رشدی متفاوت، باززایی در ژنوتیپ Regent×Cobra بیشتر از بقیه ژنوتیپ‌ها بود. تجزیه آماری صفت حجم پینه، تفاوت معنی‌داری را بین ژنوتیپ‌ها و محیط کشت‌ها نشان داد، اما تفاوت رویان زایی بدنی فقط در بین ژنوتیپ‌ها معنی‌دار بود. در تمامی مراحل ژنوتیپ SLM.046 هیچ واکنشی نسبت به کشت زیر لپه نشان نداد. در کشت همجوار ریز نمونه‌های مختلف از ژنوتیپ Colvert در محیط کشت MS تغییر یافته با حذف پیریدوکسین-HClونیکوتینیک‌اسید،همراه با ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر تیامین-HCl، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA ترکیب لپه - زیر لپه بهترین پاسخ را از نظر پینه‌زایی نشان داد و تمامی پینه‌های حاصل رویان‌زا بودند، اما شاخه‌زایی فقط در کشت لپه مشاهده گردید. در این آزمایش همواره کشت ریشه در جوار سایر ریزنمونه‌ها به شدت پینه‌زایی و تمایز پینه‌های حاصل از آنها را تحت تأثیر قرار داد، احتمال می‌رود این اثر مربوط به وجود موادی اختصاصی در ریزنمونه‌های ریشه باشد. شناسایی این عوامل می‌تواند موجب تغییرات اپی‌ژنتیکی جهت‌دار در کشت‌های پینه‌ای گردد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، کشت بافت، پینه، محیط کشت (MS)، کشت همجوار

مقدمه

کلزا *Brassica napus* L.، گیاه روغنی یکساله‌ای است که آمفی دیپلوئیدطبیعی بوده (AACC، ۲n=۳۸) و دارای تیپ‌های پاییزه و بهاره است. این گیاه با شرایط مختلف آب و هوایی مختلف وگسترهٔوسیعی از مناطق جهان سازگار شده است (۱۷).

کلزا جزء اولین گیاهانی است که اصلاح آن به وسیلهٔ ترکیبی از روش‌های سنتی و نوین دنبال می‌شود. در این گیـــاه اغلب روشهای آزمایشگاهی کشت بافت در طیف وسیعی از ریزنمونه‌ها با موفقیت به کار گرفته شده است (۵، ۱۳). به طور کلی از کشت بافت کلزا انواع پینه‌های رویان‌زا، ریشه‌زا، شاخه‌زا و غیر اندام‌زا گزارش شده است (۱۳، ۱۶، ۲۲). اگر چه روش اصلی برای باززایی جنس براسیکا از طریق اندام‌زایی از کشت‌های غیر پینه‌ای[1] است ولی موارد نادری نیز راجع به باززایی از طریق

1 . Non-Callus Culture

مکاتبه کننده: علی‌اشرف مهرابی

* کلزا واژه فرانسوی منداب است که به ارقام اصلاح شده آن کانولا (منداب کانادایی) گفته می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

رویان زایی بدنی[1] گزارش شده است (۲۲). در کلزا بسته به ژنوتیپ، ترکیبات محیط کشت، نوع و سن ریزنمونه، عکس‌العمل‌های متفاوتی گزارش شده است (۵، ۱۱، ۱۳، ۱۶، ۲۲، ۲۳)

مشخص شده است که ژنوم C کلزا حامل ژن‌های کنترل کننده ریخت‌زایی می‌باشد (۲۰). قبلاً تصور می‌شد که باززایی پایین در گونه‌های سرسخت کلزا[2] نسبت به کشت بافت مربوط به نقش بازدارندگی ژنوم A از *B. compestris* است اما تحقیقات بعدی نشان داد که این سرسختی در ارقام کلزا با استفاده از بازدارنده‌های اتیلن از بین برده می‌شود (۲۵، ۳۱). برگ‌های جوان کاملاً توسعه یافته و زیر لپهٔ گیاهچه۲ تا ۶ روزه رایج‌ترین منبع برای بافت مورد استفاده جهت تهیه پروتوپلاست در کلزا می‌باشد (۲۴).

تولید انواع پینه‌های رویان‌زا، اندام‌زا و غیر اندام‌زا از بافت‌های مختلف یک گیاه و یا کشت‌های پینه‌ای با یک ژنوتیپ یکسان دلالت بر ناهمگون بودن شرایط فیزیولوژیکی درونی حاکم بر سلولهای تشکیل دهندهٔ هر یک از آنها دارد. با استفاده از کشت همجوار[3] ریز نمونه‌های مختلف از یک گیاه و یا پینه‌های گونه‌های گیاهی مختلف می‌توان این شرایط فیزیولوژیکی درونی را تغییر داد. از کشت همجوار پینه‌های ژنوتیپ‌های مختلف گندم و ذرت مشاهده شده است که فرایند رشد و تمایز در پینه‌های گندم به شدت از ذرت متأثر می‌شود (۲). شناسایی این عوامل می‌تواند منجر به سازماندهی تغییرات اپی‌ژنتیکی جهت‌دار در کشت‌های پینه‌ای گردد.

هدف از این پژوهش بررسی پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف کلزا به کشت بافت و نحوهٔ تأثیر ریزنمونه‌های مختلف بر همدیگر در شرایط کشت همجواری بود.

مواد و روشها

آزمایش اول: ده ژنوتیپ کلزا با مبداء ایرانی و اروپایی در پاییز سال ۱۳۷۹ از بخش دانه‌های روغنی مؤسسه اصلاح نهال و بذر کرج (جدول ۱) اخذ گردید.

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های کلزا استفاده شده در آزمایش

شماره در آزمایش	ژنوتیپ	مبداء	تیپ رشدی
۱	Hensen	ایتالیا	پاییزه
۲	Colvert	فرانسه	پاییزه
۳	PF7045/91	آلمان	بهاره
۴	GWC	ایتالیا	بهاره
۵	Synl	ایران	پاییزه
۶	Consul	هلند	پاییزه
۷	Okapi	فرانسه	پاییزه
۸	Regent × Cobra	ایران	پاییزه
۹	Hyola 42	استرالیا	بهاره
۱۰	SLM.046	آلمان	پاییزه

ابتدا ضد عفونی سطحی بذور، با استفاده از الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (NaCl با ۲/۵ درصد کلر فعال) با اضافه کردن چند قطره صابون مایع (حاوی آمیزهٔ سورفکتانت‌های آنیونی[4]) جهت افزایش جذب سطحی، انجام شد. بذور پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر سترون شده و جداگانه روی چند لایه کاغذ صافی سترون، خشک گردیدند.

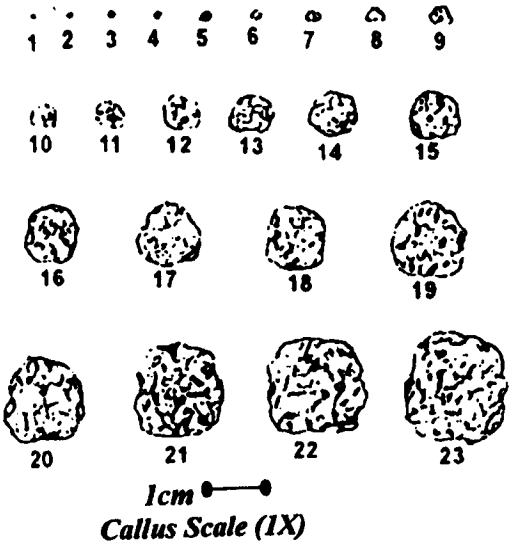
جهت تهیه ریزنمونه، محیط جوانه‌زنی شامل ترکیبات MS ۱/۲، بدون تنظیم کننده رشدی، همراه با ۳ درصدساکاروز، ۸ گرم آگار در PH = ۵/۸ با استفاده از سود رقیق تصحیح شده و سپس با استفاد از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ °C به مدت ۲۰ دقیقه در فشار ۱ بار سترون شد و در ظرف پتری ۲۰×۱۴۰×۱۴۰ میلی‌متری با حدود ۱۰۰ میلی‌متر درهر پتری توزیع گردید. بذور در شرایط کاملاً استریل به سطح محیط جوانه‌زنی منتقل گردید و پتری‌ها در اتاقک رشد با دورهٔ نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۱°C±۲۵ نگهداری شد. پس از ۶ روز، از گیاهچه‌های حاصل از هر ژنوتیپ ریزنمونه‌های زیرلپه[5] از قسمت ۵ میلی‌متر پائین‌تر از ناحیه مریستمی به طول تقریبی ۵ تا ۷ میلی‌متر جدا شده و در محیط کشت MS به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (بنزیل آمینوپورین[6]) و ۲ میلی‌گرم در لیتر

1 . Somatic embriogenesis
2 . Recalcitrant species
3 . Coculture
4 . Anion Surfactants
5 . Hypocotyledon
6 . Banzil Amino purine

www.SID.ir

Archive of SID

NAA (نفتالین استیک اسید)[1] در پتری‌های ۱۰×۹۰×۹۰ میلی‌متری حاوی تقریباً ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت، کشت گردید. کشت‌ها در تاریکی و در دمای ۲۵±۱°C نگهداری شد. طی دوره رشدی به منظور ارزیابی قابلیت پینه‌زایی بین ژنوتیپ‌ها، مدت زمان کشت تا شروع پینه‌زایی و صفات درصد پینه‌زایی، حجم پینه‌ها و درصد ریشه‌زایی ۴ هفته پس از کشت اندازه‌گیری شد. حجم پینه‌ها به روش استاندارد هوکرونی برز (شکل ۱) رتبه‌دهی شد (۱، ۵).



شکل ۱- الگوی مورد استفاده جهت برآورد حجم کالوس (مقیاس هوکرونی برز)

سپس پینه‌ها به قطعاتی به وزن تقریبی ۲۰۰ میلی‌گرم برش داده و در همان محیط قبلی واکشت گردیدند؛ در این مرحله کشت‌ها در دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در همان دمای قبلی نگهداری شد. صفات رشدی فوق‌الذکر در واکشت نیز پس از ۴ هفته ارزیابی شد. پینه‌های حاصل به محیط‌های تمایزیابی شامل ترکیبات MS به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط دوم شامل MS به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IAA[2] و ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین[3] منتقل گردید و ۴ هفته بعد صفات رشدی قبلی به علاوهٔ درصد شاخه‌زایی و وضعیت رویان‌زایی رویشی و یا غیر رویان‌زا بودن پینه‌ها ارزیابی گردید.

آزمایش دوم: در این آزمایش نیز از گیاهچه‌های ۶ روزهٔ ژنوتیپ Colvert ریز نمونه‌های لپه (برگ‌های لپه‌ای همراه با ۲ میلی‌متر از دمبرگ)، زیر لپه و ریشه جدا شد و در ترکیبات مختلف (جدول ۲) به صورت مخلوط و در جوار همدیگر در محیط کشت MS تغییر یافته[4] با حذف پیریدوکسین HCl[5] و نیکوتینیک اسید[6]، همراه با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر تیامین – HCl[7] ۲۰ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳ درصد ساکاروز و ۸ گرم آگار (۲۷) کشت گردید. پس از ۴ هفته تمامی صفات قبلی همراه با وزن تر پینه (میلی‌گرم) اندازه‌گیری شد.

آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی و طرح کاملاً تصادفی ساده انجام شده و تجزیه آماری داده‌های حاصل، پس از انجام تبدیل‌های لازم با توجه به ماهیت صفات ارزیابی شده، با استفاده از نرم‌افزارهای Minitab و SAS صورت گرفت.

جدول۲-ترکیبات‌مختلف‌ریزنمونه‌ای در آزمایش کشت همجواری

ریز نمونه	علامت مورد استفاده در آزمایش
ریشه	R
لپه	C
زیر لپه	H
ریشه + لپه	RC
ریشه + زیر لپه	RH
لپه + زیرلپه	CH
ریشه+لپه + زیرلپه	RCH

نتایج

آزمایش اول: اولین علائم مربوط به تورم و تکثیر سلولی در زیر لپه‌های کشت شدهٔ ژنوتیپ‌های Okapi, Synl و Consul مشاهده شد و ژنوتیپ‌های PF7045/91 و Hansen دیرتر از

1 . Naphtalin Acetic Acid
2 . Indol Acetic Acid
3 . Kinetin
4 . Modified MS
5 . pyridoxin - HCl
6 . Nicotinic Acid
7 . Thiamin - HCl

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات ارزیابی شده در کشت زیرلپه‌ها و واکشت پینه‌ها بین ژنوتیپ‌های مختلف کلزا

شماره در آزمایش	ژنوتیپ	کشت				واکشت	
		شروع پینه زایی(روز)	پینه زایی ٪	حجم پینه (مقیاس هوکر)	ریشه زایی ٪	حجم پینه (مقیاس هوکر)	ریشه زایی ٪
۱	*Hansen*	۱۳/۰۰ c	۹۳/۳۳ a	۸/۵۳ cd	۹۳/۳۳ a	۵/۰۰ b	۱۳/۳۳ c
۲	*Colvert*	۷/۶۶ab	۹۳/۳۳ a	۱۳/۲ a	۹۳/۳۳ a	۷/۰۰ ab	۶/۶۷ cd
۳	*PF7045/91*	۱۲/۳۳c	۱۰۰/۰۰ a	۸/۹۳ bcd	۱۰۰/۰۰ a	۶/۹۳ ab	۶۰/۰۰ a
۴	*GWC*	۹/۰۰ab	۶۶/۶۷ b	۱۰/۸۷ abcd	۶۶/۶۷ b	۴/۰۷ bc	۱۳/۳۳ C
۵	*Syn1*	۷/۳۳a	۹۳/۳۳ a	۹/۶۷ abcd	۹۳/۳۳ a	۱/۵۰ cd	۰/۰۰ d
۶	*Consul*	۷/۰۰a	۸۰/۰۰ ab	۱۲/۷۳ abc	۸۰/۰۰ ab	۵/۵۳ ab	۲۰/۰۰ c
۷	*Okapi*	۷/۳۳a	۸۰/۰۰ ab	۱۳/۸۷ a	۸۰/۰۰ ab	۶/۰۰ ab	۲۰/۰۰ c
۸	*Regent × cobra*	۱۰/۰۰b	۸۰/۰۰ ab	۸۰/۰۰ abcd	۸۰/۰۰ ab	۸/۳۳ a	۲۶/۶۷ bc
۹	*Hyola42*	۷/۶۶ab	۸۰/۰۰ ab	۷/۲۰ d	۶۶/۶۷ b	۵/۸۶ ab	۵۳/۳۳ ab
۱۰	*SLM.046*	بدون پینه زایی d	۰/۰۰ c	۰/۰۰ e	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d

میانگین‌های با یک حرف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

بقیه شروع به پینه‌زایی کردند. ناحیه پینه‌زا در زیر لپه‌های استقرار یافته، دو سر برش یافته آنها بود که به تدریج طی چند روز سرتاسر زیر لپه را فرا می‌گرفت. در کلیه ژنوتیپ‌ها به جز ژنوتیپ SLM.046 از کشت زیرلپه پینه‌زایی صورت گرفت. تجزیه واریانس صفات بررسی شده جهت پینه‌زایی، اختلاف کاملاً معنی‌داری را بین ژنوتیپ‌ها نشان داد. بالاترین میزان پینه‌زایی را ژنوتیپ‌های Hansen, Consul, PF7045/91 و Synl و بزرگترین پینه‌ها را ژنوتیپ‌های Okapi و Clovert دارا بودند. در هر حال اکثر پینه‌های حاصل از کشت زیرلپه‌ها ریشه‌زا شدند که در این میان ژنوتیپ PF7045/91 حداکثر ریشه‌زایی را نشان داد (جدول ۳).

پس از واکشت قطعاتی از پینه‌های حاصل مشاهده شد که واکشت مجدد به شدت پینه‌زایی و اندامزایی را در تمامی ژنوتیپها کاهش داد.

پینه‌های تولید شده از زیرلپه‌های کشت شده را می‌توان به سه نوع، پینه‌های زرد رنگ غیر رویان‌زا[1] با سلول‌های ریز، آبدار و متراکم، پینه‌های شفاف رویان‌زا[2] با سلول‌های درشت و کشیده‌وشکل بسیار ترد و شکننده[3] و پینه‌های حد واسط ریشه‌زا تقسیم نمود (شکل ۲).

شکل ۲- انواع پاسخهای متفاوت کشت پینه در محیط تمایزیابی

A: پینه غیر رویان‌زا به شکل متراکم و آبدار که تمایز و اندامزائی در آنها صورت نمی‌گیرد.

B: پینه‌رویان‌زا

C: پینه تعیین سرنوشت شده (ریشه‌زا) که غالباً باززا شدن آنها ناممکن است

D: شاخه‌زایی و ریشه‌زایی از پینه رویان‌زا (پینه باززا شده)

پس از انتقال پینه‌ها به دو محیط باززایی با ترکیبات مختلف از تنظیم کننده‌های رشدی مشاهده گردید که فقط در محیط MS (۲ BAP ،۰/۱ NAA) در بعضی از ژنوتیپ‌ها شاخه‌زایی صورت گرفت. به طوریکه حداکثر شاخه‌زایی در ژنوتیپ

1. Non – Embryogenic Callus
2. Embryogenic Callus
3. Fragil Calli

www.SID.ir

Archive of SID

Regent×Cobra صورت گرفت. تجزیه واریانس صفات حجم پینه و درصد رویان‌زایی رویشی در پینه‌های ژنوتیپ‌های مختلف در دو محیط کشت نشان داد که اثر ژنوتیپ کاملاً معنی‌دار است، اما تفاوت بین دو محیط کشت فقط برای صفت حجم پینه معنی‌دار گردید (جدول ۴).

جدول ۴- تجزیه واریانس صفات حجم پینه و درصد رویان‌زایی رویشی در دو محیط باززائی

منابع تغییرات		حجم پینه		٪ رویان‌زایی	
(S.O.V)	df	MS	F	MS	F
ژنوتیپ	۹	۰/۵۴۷	۱۴/۷۸**	۰/۸۳۰	۱۰/۶۷**
محیط کشت	۱	۰/۲۵۹	۷/۰۱	۰/۱۴۰	۱/۸۰ ns
ژنوتیپ × محیط کشت	۹	۰/۰۳۲	۰/۸۷ ns	۰/۰۷۷	۰/۹۹ ns
خطا	۴	۰/۰۳۷	—	۰/۰۷۸	

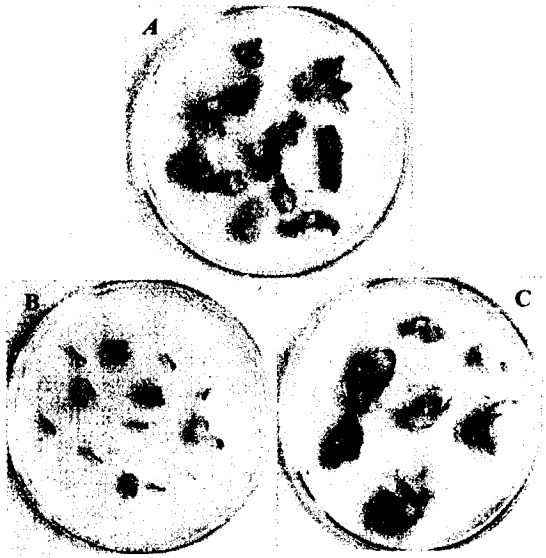
** معنی‌دار در سطح ۱ درصد * معنی‌دار در سطح ۵ درصد

ns غیر معنی‌دار

در محیط (NAA ۰/۱، BAP ۲) MS اکثر ژنوتیپ‌ها پینه‌های بزرگتری را تولید نمودند. حداکثر رویان‌زایی بدنی مربوط به ارقام PF7045/91 و Hansen بود و فقط در ژنوتیپ‌های Colvert و PF7045/91 و Cobra×Regent بازززایی (ابتدا شاخه‌زایی و سپس ریشه‌زایی) مشاهده گردید، که در بین آنها حداکثر بازززایی مربوط به ژنوتیپ Cobra×Regent (۸/۶۷ درصد) بود. در تمامی این مراحل ژنوتیپ SLM.046 هیچ پاسخی نسبت به کشت زیر لپه نشان نداد (جدول ۵).

آزمایش دوم: در کشت همجوار ریزنمونه‌های مختلف ژنوتیپ Colvert، ترکیب لپه – زیرلپه (CH) بهترین پاسخ را از نظر پینه‌زایی نشان داد. به طوریکه درصد پینه‌زایی، حجم پینه و وزن‌تر پینه در این ترکیب حداکثر مقدار را در بین ترکیبات مختلف کشت شده، دارا بود (جدول ۶). در تمامی پینه‌های حاصل از کشت همجوار لپه – زیرلپه رویان‌زایی مشاهده گردید در حالیکه پینه‌های حاصل از سایر ترکیبات ریزنمونه‌ای رویان‌زا نبودند. ولی شاخه‌زایی به صورت مستقیم تنها از ریزنمونه‌های لپه (C) که جداگانه کشت شده بودند، مشاهده شد.

به استثناء ریزنمونه‌های زیر لپه (H) در سایر ترکیبات، ریشه‌زایی صورت گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که کشت ریشه در جوار لپه و زیرلپه به شدت پینه‌زایی و تمایز پینه‌های حاصل از آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (شکل ۳).



شکل ۳- پاسخ‌های متفاوت مشاهده شده از کشت همجوار ریزنمونه‌های مختلف

A: کشت لپه – زیرلپه که بهترین عکس‌العمل را در بین ترکیبات مختلف نشان داد.

B – کشت ریشه – لپه – زیرلپه که حضور ریشه مانع از پینه‌زائی و تمایز در سایر ریزنمونه‌ها گردید.

C – کشت جداگانه ریزنمونه لپه

(تصاویر ۲۰ روز پس از کشت تهیه شده‌اند).

جدول ۵- مقایسه میانگین حجم پینه، درصد رویان‌زایی رویشی و درصد بازززائی در دو محیط کشت بین ژنوتیپ‌های مختلف

ژنوتیپ	MS(۲ BAP ,۰/۱NAA)			MS(۲ Kin ,۰/۲IAA)	
	حجم پینه	٪ رویان زایی	٪ بازززایی	حجم پینه	رویان زایی
۱	۱۴/۵۲ bcd	۲۱/۶۷ ab	۰/۰۰ d	۱۳/۰۶ bcd	۳۱/۶۷ bc
۲	۱۷/۲۵ ab	۵۸/۳۳ ab	۶/۳۳ b	۱۳/۵۸ bc	۲۱/۶۷ cd
۳	۱۸/۳۳ ab	۸۱/۶۷ a	۳/۲۳ c	۱۶/۱۶ a	۷۱/۶۷ a
۴	۱۲/۹۷ cd	۵۰/۰۰ ab	۰/۰۰ d	۱۲/۳۳ cd	۲۰/۰۰ cd
۵	۱۱/۱۶ cd	۸/۳۳ c	۰/۰۰ d	۱۱/۱۱ d	۶/۶۷ de
۶	۱۱/۸۶ cd	۸/۳۳ c	۰/۰۰ d	۱۱/۹۲ cd	۱۵/۰۰ cde
۷	۱۶/۹۱ ab	۵۸/۳۳ ab	۰/۰۰ d	۱۵/۲۵ ab	۳۶/۶۷ abc
۸	۱۴/۹۱ bc	۲۰/۰۰ bc	۸/۶۷ a	۱۵/۱۶ ab	۴۸/۳۳ ab
۹	۱۹/۲۲ a	۷۵/۰۰ a	۰/۰۰ d	۱۶/۹۲ a	۷۵/۰۰ a
۱۰	۰/۰۰ e	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ e	۰/۰۰ e

میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۶- مقایسه میانگین صفات ارزیابی شده در کشت همجواری ریزنمونه‌های مختلف

ریز نمونه	پینه زایی ٪	حجم پینه (مقیاس هوکر)	وزن تر پینه (mg)	ریشه زایی ٪
ریشه	۴۳/۳۳ c	۴/۱۷ cd	۵۰/۳۳ c	۳۶/۶۷ a
لپه	۶۱/۷۷ bc	۶/۳۳ bc	۴۳۶/۶۷ b	۳۸/۳۴ a
زیرلپه	۷۰/۰۰ ab	۴/۵ cd	۶۴/۱۵ c	۰/۰۰ c
ریشه + لپه	۲۱/۶۷ de	۳/۶۷ cd	۷۴/۳۳ c	۲۳/۳۳ ab
ریشه + زیر لپه	۱۵/۰۰ e	۳/۱۷d	۵۴/۲۷ c	۲۰/۰۰ ab
لپه + زیر لپه	۱۰۰/۰۰ a	۱۴/۰۰ a	۶۴۲/۱۶ a	۳۳/۳۳ a
ریشه + لپه + زیر لپه	۲۰/۰۰ de	۸/۰۰ b	۵۶/۷۳ c	۲۰/۰۰ a

میانگین‌های با یک حرف مشترک تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد ندارند

بحث

در این پژوهش مشاهده انواع پینه‌های رویان‌زا، غیر رویان‌زا، اندام‌زا و باززا و تفاوت آنها بین ژنوتیپ‌های مختلف دلالت بر وابستگی شدید این تنوع به ژنوتیپ و نوع ریز نمونه کشت شده دارد. از طرفی وجود پینه‌های ریشه‌زا که باززایی در آنها غالباً ناممکن است حاکی از وجود سلولهای تعیین سرنوشت شده مختلف در کشت‌های پینه‌زا می‌باشد، که هر کدام به نوبهٔ خود کنترل ژنتیکی متفاوتی دارد؛ اینکه چگونه می‌توان کلید هر کدام از این کنترل‌ها را روشن یا خاموش کرد اهمیت بسیاری در این مطالعات دارد که تا به حال جواب صریحی که به وسیله آن بتوان به طور کنترل شده مسیر تحول کشت‌های پینه‌ای را القاء نمود، ارائه نشده است؛ از طرف دیگر زایل شدن سریع پتانسیل باززایی در این کشت‌ها مشکل بزرگ محققین کشت بافت است (۲).

شاخه‌زایی و باززایی پایین در کشت پینهٔ ژنوتیپ‌های مختلف کلزا را در کنار عوامل ژنتیکی، می‌توان به عوامل فیزیولوژیکی نسبت داد؛ شناسایی عوامل مؤثر بر بهبود وضعیت کشت پینه‌ای کلزا تحقیقات بیشتری را می‌طلبد؛ به نحوی که اکثر دستورالعمل‌های ارائه شده برای کشت بافت‌های مختلف کلزا جهت باززایی مستقیم می‌باشد (۵، ۱۳، ۱۶، ۲۳).

تنش وارد شده از طریق زخم‌های مکانیکی به سلولهای کشت شده در کشت پینه کلزا و از طرف دیگر اکسین خارجی محیط کشت می‌تواند منجر به تحریک تولید اتیلن توسط سلولهای زنده گردد (۷). گزارش‌های شی‌شوان (۱۹۹۸)، برنت و همکاران (۱۹۹۴)، هاچی و همکاران (۱۹۹۱) و ستی و همکاران (۱۹۹۰) اثر بازدارنده‌های اتیلن نظیر نیترات نقره ($AgNO_3$) و آمینواتوکسی گلایسین[1] را در بالا بردن درصد باززایی از ریزنمونه‌های لپه و زیرلپه تا سه برابر نشان دادند. تولید اتیلن در واکنش به تنش وارد شده به سلولهای کشت شده ظاهراً یک پیک ثانویه[2] است (۷). از بررسی نتایج حاصل از آزمایش دوم چنین به نظر می‌رسد که کاهش پینه‌زایی و رویان‌زایی در ترکیبات مختلف ریز نمونه‌ای مربوط به وجود ماده‌ای اختصاصی در ریشه‌های جوان باشد. شناسایی این عوامل می‌تواند موجب تحولی در بهبود وضعیت کشت‌های پینه‌ای در کلزا گردد، علاوه بر این از نتایج این تحقیق می‌توان در مطالعات اللوپاتی[3] (دگرآسیبی) و آللوشیمیایی[4] (دگر شیمیایی)، کشت پروتوپلاست، گزینش سلول‌های جهش یافته[5] و القاء یا کنترل تغییرات سوماکلونال[6] (ناگهانی رویشی) استفاده نمود.

1. Amino Eutoxy Glycin
2. Secondary massenger
3. Allelopathy
4. Allelochemical
5. Mutant cells
6. Somaclonal Variation

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱. امیدی، م. ۱۳۷۹. بررسی کشت بافت، تنوع سیتوژنتیکی و پروتئینی جو. رسالهٔ دکتری. دانشگاه تهران. دانشکده کشاورزی. گروه زراعت و اصلاح نباتات. ۲۱۵ ص.

۲. باغبان کهنه‌روز، ب. ۱۳۷۲. باززایی گیاه از کشت بافت ذرت و گندم و بررسی اثر متقابل کالوس آنها در شرایط همجواری. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران. دانشکده کشاورزی. گروه زراعت و اصلاح نباتات. ۹۱ ص.

۳. باقری، ع و م. مهری. ۱۳۷۶. مبانی کشت بافتهای گیاهی. (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۴۰۸ ص.

۴. سلطانی، ا. ۱۳۷۷. کاربرد نرم‌افزار SAS در تجزیه‌های آماری. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۱۶۸ ص.

www.SID.ir

Archive of SID

۵. طاعی، آ. ۱۳۷۷. بررسی اثرات ژنوتیپ، محیط کشت و ریز نمونه بر پیه‌زائی و باززائی در کلزا و سویا. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران. دانشکده کشاورزی. گروه زراعت و اصلاح نباتات. ۱۱۶ ص.

۶. قربانلی، م. ۱۳۷۰. فیزیولوژی رشد گیاهی. جلد ۲: رشد و نمو (ترجمه). مرکز نشر دانشگاهی، تهران. ۲۶۸ ص.

7. Arteca, R. N. 1996. Plant growth substance (Principles and Application). Chapman & Hall. 331 PP.
8. Burrnet, L., M. Arnoldo., S. Yarrow and B. Huang. 1997. Enhancement of shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica rapa* ssp oleifera throught pre-treatment with auxin and cytokinin and use of ethylene inhibitors. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 37: 253-256.
9. Dixon, R. A. 1991. Plant cell culture (A practical approach). Oxford. Washington DC. 236pp.
10. Chen, B. Y., W. K. Hereen & R. J. Onsson. 1998. Resynthesis of *Brassica napus* L. through inter specific hybridization between *B. alboglabra* and *B. compestris* with special emphasis on seed color. Plant Breeding. 101: 52-59.
11. Dietert. M. F, et al. 1982. Effect of Genotype on *In vitro* culture in genus *Brassica.* Plant Science. 26: 233-240.
12. Drowrdoskw, L. & J. Rogonisca. 1987. Plantlet formation from roots of oilseed rape cultivars differing in Glocosinolate. Third International Repeseed Congress.
13. Gyulai. E. E. & L. E. Hezhky. 1992. Biotechnology of rapeseed (*Brassica. Napus L.)* Acta Agronomica Hungiorica. 41(3-4): 277-287.
14. Hachy. J. E, K. K. Sharma & M. M. Molony. 1991. Efficient shoot regeneration of *Brassica compestris* using cotyledon explant *In vitro* culture. Pl. Cel. Rep. 9: 547-554.
15. Karta. K. K., O. L. Gamborg & F. Constablle. 1974. *In vitro* Plant formation stem explant of rape (*B. napus. Cv. Zerhyr).* Phys. Plant. 31: 217-220.
16. Khehra, G. S. & R. J. Mathas. 1992. The Interaction of Genotype, explant and media on the regeneration of shoots from complex explats of *Brassica. napus L. J.* of Exp. Bot. 43: (256): 1413-1418.
17. Kimber, D. S. & M. D. MC- Gregor. 1995. The species and their origin, cultivation and word production. *Brassica* oil seed production and utilization. PP: 1-7.
18. Kirti, P. B. 1997. Somatic embryogenesis inhypocotyle protoplast cultured of rapeseed (*Brassica. napus L.)* Plant Breeding. 100: 222-227.
19. Millam. D. D., L. Wen & P. Powel. 1991. A protocol for efficient tissue culture regeneration of rapid cycling *Brassicas.* Bio. Education. 2(2): 63-64.
20. Murta, M. & T. J. Orton. 1987. Callus Initiation and regeneration capacity in *Brassica species.* Plant Cell Tissue and Organ Culture. 11: 111-123.
21. Nassimhula, S. B, et al. 1988. Comparative shoot regeneration response of diploid *Brassica* and their synthtic amphiploid product. P. Cell. Rep. 7: 525-527.
22. Ono. Y., T. Yoshinito & N. Kazuma. 1994. Effect of Genotype on Shoot regeneration from cotyledonary explants of rape seed (*Brassica napus L.)* Pl. Cell. Rep. 14: 13-17.
23. Ovesan. J, et al. 1993. Factors influencing regeneration capacity of oilseed rape and cauliflower in transformation experiments. Biaol. Plant. 35(1): 107-112): In: Plant breeding abstracts . 65(5): 5288.
24. Palmer, C. E. & W. A. Keller. 1994. In vitro culture of oilseeds. In: Vasil. K, et al. [eds]. Plant Cell Tissue and Organ culture. PP: 413-455. Kluwer. Academic publisher.
25. Pua. E. C. 1993. Cellular and molecular aspects of ethylene on Plant morphogenesis of realicitrant *Brassica* Species in vitro. Botanical Bulletin of Academia sinica. 34: 3, 191-209. In CAB abstracts 1999.
26. Punia, M. S, R. K. Behl, S. Hari, H. Singh. 1993. Plant regeneration in Brassica species effect of genotype and culture medium. Annals of Biology Ludhiana. 9: 2, 230-234.
27. Pushapa. K, et al. 1995. General medium supporting shoot regeneration in *Brassica* Species. Crucifera News Letter. 17: 28-29.
28. Sethi. U, A. Basa & S. J. ukherjee. 1990. Role of Inhibitors in the induction of differentation in callus culture of *Brassica*, Datura and Nicotina. Pl. Cell. Rep. 8: 598-608.

www.SID.ir

Archive of SID

29. Sharma, K & T. E. Thrope. 1989. *In vitro* regeneration of shoot, bud and plantlet from seedling root segment of *Brassica napus*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 18: 129-141.
30. Sharma, K. K., S. S. Bhojuany and T. E. Thrope. 1991. The role of Cotyledonary tissue in the differentation of shoot and root from cotyledon explant of *Brassica Juncea* L. Plant Sci. 60: 247-252.
31. Shuwen She,. et al. 1998. A study of the techniques of hypo cotyledon explant culture for high frequency shoot regeneration of rape seed. Chinese Journal of Oil Crop Science. 20: 2, 1-6. in CAB Abstracts 1999.
32. Simmonds, D. H, N. E. Long & W. A. Keller. 1991. High planting efficiency and plant regeneration in low density protoplast cultures from an embryogenic *Brassica napus* Cell suspension. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 27: 231-241.
33. Shukla. Z & V. K. Sawhng. 1991. Comparative regenerative ability of internodal segment of wild type and Genetic male strile line of rape seed (*Brassica napus*) cultured *in vitro*. Plant Sci. 79· 95-98.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian, J. Agric.Sci. Vol.33, No.4, 2002

In vitro Culture and Effects of Explants Coculturing in Canola (*Brassica napus* L.)

A. A. MEHRABI[1], M. OMIDI[2], B. E. SEIED TABATABAEI[3]
1, 2, 3, Ph. D. student and Assistant Professors, faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran
Accepted May. 15, 2002

SUMMARY

In order to investigate callus induction and regeneration in canola, hypocotyledonary explants from 6-day seedlings were cultured in MS medium complemented with2mg lit^{-1} BAP and 1 mg lit^{-1} NAA. Callus initiation was earlier in Syn1 with the most callus induction occurring in PF7045/91. Calli in Okapi and Colvert were greater than in other genotypes. Subculturing of callus pieces, decreased callus inductions as well as organ genesis dramatically in all genotypes. After subculturing of calli in two regeneration media with different growth regulators, shoot regeneration in Regent×Cobra was more than in others. ANOVA for callus volume showed that media and genotypes were significantly different, with embryogenesis being significant only for genotypes. In all these procedures SLM.046 didn't respond to hypocotyledon in vitro culture. In coculturing of different explants of Colvert genotype in modified MS (excluding Pyridoxine – HCl and Nicotinic Acid, and including 0.4 mg lit^{-1} Thiamin – HCl, 2 mg lit^{-1} BAP and 0.2 mg lit^{-1} NAA) cotyledon – hypocotyl cultures had the best callus induction response and in all of the obtained calli, embryogenesis occurred. But shoot regeneration was observed only in cotyledon culture. In this research, root cultured with other explants, seriously influenced callus induction and their differentiation. It seems that these effects are related to special substances in root explants, the identification of which would lead to epigenetic variation in callus cultures.

Key words: Canola (Rapeseed), Tissue culture, Callus, MS medium, Coculture.

www.SID.ir