

بررسی کشت بافت و تنوع سوماکلون در سیب زمینی

آذر شاه‌پیری^۱، منصور امیدی^۲، پریچهره احمدیان تهرانی^۳، داریوش داودی^۴
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
۴، عضو هیات علمی، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/۷/۹

خلاصه

برای مطالعه کشت بافت در سیب زمینی، ابتدا ریزنمونه‌های ساقه حاوی تک جوانه در ۶ نوع محیط کشت MS که از نظر غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد متفاوت بودند، قرار داده شدند. براساس اندازه ساقه رشد کرده از جوانه، بهترین محیط کشت جهت کشت تک جوانه انتخاب شد. سپس با استفاده از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره که از گیاهچه‌های حاصل از کشت تک جوانه به دست آمده بودند، اثر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد (2,4-D و کیتین) بر کالزایی، اثر رقم و نوع ریزنمونه بر کالزایی و باززایی، اثر نور بر کالزایی و در نهایت باززایی مستقیم بررسی شد. تنوع سوماکلون از نظر تغییر در سطح پلوئیدی در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره، اندام‌های باززاشده از کالوس‌های حاصل از برگ و میان‌گره و همچنین اندام‌های هوایی باززا شده مستقیم بررسی شد. نتیجه این بررسی، مشاهده تغییراتی مانند دی‌هاپلوئیدی، پنتاپلوئیدی، هگزاپلوئیدی و اکتاپلوئیدی در سلول‌های کالوس بود در حالیکه تغییری در اندام‌های هوایی باززا شده از کالوس و یا باززا شده به طور مستقیم مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی، برگ، میان‌گره، محیط MS، 2,4-D - کیتین

مقدمه

افزایش جمعیت جهان و کاهش منابع تولید فرآورده‌های گیاهی و دامی در جهان یک مشکل جدی و اساسی است که دانشمندان را در دهه‌های اخیر به این فکر ترغیب نموده تا با استفاده از شیوه‌های جدید در حفظ محیط زیست و عدم تغییر بنیادی در طبیعت، دست به تولید بهتر و بیشتر محصولات گیاهی بزنند. یکی از این روش‌های مدرن، استفاده از فناوری کشت سلول و بافت‌های گیاهی است که از این طریق می‌توان نسبت به تکثیر گیاهان مختلف اعم از صنعتی، دارویی، مرتعی و کشاورزی اقدام نمود. علاوه بر این، کشت بافت گیاهی می‌تواند بستر مناسبی جهت حفظ و نگهداری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادری و یا در حال انقراض طبیعت بعنوان منابع با ارزش ژرم پلاسما محسوب شود. همچنین فناوری کشت سلول و بافت‌های گیاهی طی سال‌های اخیر به گونه‌ای توسعه یافته که هم اکنون

در سطح گسترده برای انتقال ژن‌های مطلوب به ویژه ژن‌های ایجادکننده مقاومت نسبت به آفات و بیماری‌های گیاهی، مورد استفاده قرار می‌گیرد. بدیهی است اصلاح گیاهان به روش سنتی، علاوه بر وقت‌گیر بودن در بسیاری از موارد امکان‌پذیر نیست در حالیکه فناوری جدید کشت سلول و بافت گیاهی، این راه را به خوبی هموار ساخته و به پیش می‌برد (۱۵).

سیب زمینی یکی از اولین محصولات غذایی مهم جهان است که تا به حال روش‌های متنوع و متعددی از کشت بافت در آن با موفقیت صورت گرفته است. از کشت مریستم در سیب‌زمینی به عنوان روشی مناسب جهت نگهداری منابع ژنتیکی، تکثیر ژنوتیپ‌های خاص و حذف ویروس‌ها استفاده کردند (۱۶). استفاده از امتزاج پروتوپلاست‌ها جهت تولید هیبریدهای سوماتیکی در این گیاه صورت گرفت (۱۳). القاء کالوس و اندام‌زایی از آن در بسیاری از ریزنمونه‌ها مانند برگ،

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

شش رقم سیب زمینی به نام‌های آگریا، دیامنت، آژاکس، سانته، کنکورد و کاسموس که از ارقام تجاری با مبدا خارجی هستند، از مرکز تحقیقات اصلاح نهال و بذر کرج تهیه شده و در سال ۱۳۷۹ در گلخانه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی کرج در گلدان‌های ۲۵ سانتیمتری حاوی ماسه کاشته شدند و از زمانی که ارتفاع بوته‌ها به حدود ۱۰ سانتیمتر رسید، ساقه‌های جوان از قسمت انتهایی گیاه جدا شده و در داخل کیسه‌های پلاستیکی از گلخانه به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

کشت تک جوانه^۱

منظور از کشت تک جوانه، جدا کردن یک جوانه به همراه قسمتی از ساقه، به منظور تشکیل ساقه از طریق نمو جوانه است. این روش، طبیعی‌ترین روش تکثیر رویشی گیاهان در شرایط این‌ویترو است. برای اجرای این آزمایش، ابتدا محیط کشت پایه MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، شش گرم در لیتر آگار و pH برابر ۵/۶ با ترکیبات هورمونی متفاوت به نام‌های A، B، C، D، E و F تهیه شد (جدول ۱). محیط‌های کشت در اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار یک بار سترون شده و در ظروف شیشه‌های مربایی سترون توزیع گردیدند. ریزنمونه‌های ساقه پس از قرار گرفتن در الکل ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر، در محلول وایتکس (حاوی ۵/۲۵٪ هیپوکلریت سدیم) ۸۰٪، همراه با دو قطره توین بیست ۰/۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس سه بار با آب مقطر سترون شسته شده و پس از تقسیم به قطعات یک سانتیمتری حاوی یک جوانه، روی محیط کشت جامد در ظروف شیشه‌های مربایی (پنج ریزنمونه در هر شیشه‌ی مربایی) کشت شدند. ظروف کشت شده تحت شرایط سترون در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۶ ساعت روشنایی (۷۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) در اتاقک رشد قرار داده شدند و پس از گذشت ۳۰ روز، رشد جوانه جانبی اندازه‌گیری شد. این آزمایش در یک طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار و پنج تکرار انجام شد.

ساقه و گل صورت گرفت (۳، ۱۴). در سال ۱۹۹۰ برای اولین بار در چهارمین کنگره بین‌المللی کشت بافت گیاهی، تولید ریزغده به شکل انبوه را در شرایط این‌ویترو گزارش شد (۳). کاردی و همکاران (۱۹۹۳) به بررسی تاثیر محیط کشت و ژنوتیپ در باززایی از ریزنمونه‌های برگ سیب‌زمینی پرداختند. کارپوتو و همکاران (۱۹۹۵) نیز اثر ریزنمونه و ژنوتیپ بر کال‌زایی و باززایی را مورد بررسی قرار دادند.

اگر چه کشت بافت گیاهی اصولاً روشی برای کلون کردن ژنوتیپ‌های خاص می‌باشد و همیشه این فرض مورد قبول بوده است که گیاهان حاصل از کشت بافت، شبیه والدین می‌باشند ولی گاهی تنوعات فنوتیپی در بین گیاهان باززاشده مشاهده می‌شود که به این تنوعات ایجاد شده، تنوعات سوماکلون گفته می‌شود (۹).

تنوع سوماکلون، در اصل تغییرات ژنتیکی است که پاره‌ای از تغییرات دیگر مورفولوژی، بیوشیمی و امثال آن را به دنبال دارد. تنوع سوماکلون در گیاهان به طور عمده در سیستم‌های باززایی که در آن گیاه مرحله کالوس را طی می‌کند، دیده می‌شود. لارکین و اسکوکرافت تنوع سوماکلون را در گیاهان باززا شده سیب‌زمینی که مرحله کالوس را طی کرده بودند، مشاهده کردند. ایوانز با انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای بر روی گیاهان باززاشده مشاهده شد که نه تنها عملکرد، بلکه صفاتی مانند زمان بلوغ، صفات غده مانند شکل، اندازه، تعداد و رنگ آن تغییر کرد (۱۹). کریسن و کارپ گیاهان باززا شده در شرایط این‌ویترو را بر اساس تعداد کروموزوم به سه دسته تتراپلوئید، آنیوپلوئید در سطح تتراپلوئید و اکتاپلوئید و یا آنیوپلوئید در سطح اکتاپلوئید تقسیم کردند (۳).

در این تحقیق، ابتدا به بررسی کشت بافت سیب زمینی و چگونگی تأثیر عواملی از جمله تنظیم‌کننده‌های رشد، ژنوتیپ، نوع ریزنمونه و نور در کشت تک جوانه، کال‌زایی و باززایی سیب زمینی در شرایط این‌ویترو پرداخته شد و سپس تنوع سوماکلون از نظر تغییر در سطح پلوئیدی کروموزوم‌ها در کالوس‌ها و اندام‌های باززاشده از کالوس و یا باززاشده مستقیم از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره بررسی شد.

1. Single-node culture

تنظیم‌کننده‌های رشد بر رشد کالوس پس از واگشت نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۲- غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در هر محیط کشت مورد استفاده جهت القاء کالوس

غلظت کینتین (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت 2,4-D (میلی‌گرم بر لیتر)	محیط کشت
۰	۱	A
۰/۰۱	۱	B
۰/۰۱	۱	C
۰	۲	D
۰/۰۱	۲	E
۰/۱	۲	F
۰	۳	G
۰/۰۱	۳	H
۰/۱	۳	I

اثر رقم و نوع ریزنمونه بر کال‌زایی و باززایی

ریزنمونه‌های میان‌گره با طول تقریبی پنج میلی‌متر و ریزنمونه‌های برگ به طول و عرض پنج میلی‌متر از شش رقم مورد مطالعه بر روی محیط کشت MS (حاوی ۳٪ ساکارز و ۰/۶٪ آگار و $\text{pH} = 5/6$) غنی شده با ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین قرار داده شدند (۱۸). ظروف پتری کشت شده، تحت دمای 1 ± 25 درجه سانتیگراد و تاریکی کامل قرار داده شدند. زمان شروع القاء کالوس یادداشت شد و بعد از ۳۰ روز، حجم کالوس تولید شده، درصد تولید کالوس و تعداد ریشه‌های حاصل از کالوس اندازه‌گیری شد. کالوس‌های به دست آمده از دو نوع ریزنمونه برگ و میان‌گره از ۶ رقم مورد مطالعه، پس از جداسدن از ریزنمونه‌های مادری خود، بر روی محیط MS (حاوی ۳٪ ساکارز و ۰/۶٪ آگار، $\text{pH} = 5/6$) با ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱۸۶ میلی‌گرم در لیتر NAA (کارپ و همکاران، ۱۹۸۴)، قرار داده شدند (۱۲) و سپس به اتافک رشد با دمای 1 ± 25 °C و طول روز ۱۶ ساعت روشنایی (۷۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) انتقال داده شدند و بعد از ۳۰ روز، درصد باززایی، تعداد ساقه حاصل از کالوس و طول ساقه اندازه‌گیری شد.

اثر نور بر تولید کالوس

به منظور بررسی اثر نور بر تولید کالوس، ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره در محیط کشت مناسب جهت القاء کالوس قرار داده

جدول ۱- نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در کشت تک جوانه

محیط کشت	غلظت NAA (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت سیتوکینین (میلی‌گرم بر لیتر)
A	۰/۰	۰/۰
B	۰/۰	۲/۵BAP
C	۰/۱	۲/۵BAP
D	۰/۱	۰/۰
E	۰/۰	۲/۵Kinetin
F	۰/۱	۲/۵Kinetin

اثر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر کال‌زایی

جهت بررسی اثر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر کال‌زایی، اثر سه غلظت 2,4-D (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و سه غلظت کینتین (۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با پنج تکرار در ریزنمونه‌های میان‌گره سیب زمینی در محیط کشت پایه MS با همان شرایط آزمایش قبل و ۹ ترکیب هورمونی (جدول ۲) بررسی شد. به این صورت که ریزنمونه‌های میان‌گره رقم آگریا به طول پنج میلی‌متر که از گیاهچه‌های حاصل از کشت تک‌جوانه به دست آمدند و نیاز به ضدعفونی نداشتند بر روی این محیط‌ها در ظروف پتری (در هر ظرف ۱۰ ریزنمونه) کشت شدند و در دمای 1 ± 25 درجه سانتیگراد و ۱۶ ساعت روشنایی (۷۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) قرار داده شدند. زمان شروع القاء کالوس یادداشت شد و بعد از گذشت ۳۰ روز، حجم کالوس با استفاده از روش استاندارد هوکر و نی‌برز، درصد تولید کالوس و تعداد ریشه حاصل از کالوس اندازه‌گیری گردید. سپس کالوس‌های به دست آمده از هر محیط کشت تحت شرایط سترون به قطعاتی مساوی به قطر هشت میلی‌متر تقسیم و در همان محیط قبلی خود واگشت شدند. کالوس‌های واگشت شده تقریباً ۶-۷ روز پس از واگشت مجدداً شروع به رشد کردند. پس از گذشت ۳۰ روز حجم کالوس با استفاده از روش استاندارد هوکر و نی‌برز، اندازه‌گیری شد و بدین ترتیب اثر غلظت

1. Callus induction

مربوط در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. بعد از ۳-۴ روز، ریشه‌های ایجاد شده به طول‌های ۱-۱/۵، ۲-۲/۵ و ۳-۴ سانتیمتر در زمان‌های مختلف (صبح، ۱/۵ بعدازظهر، ۵ عصر و ۸ شب) مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین پیش تیمارهای مختلف آب سرد صفر درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، α -برمونفتالین^۱ اشباع به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه، کلشی سین^۲ ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲ و ۴ ساعت در دمای آزمایشگاه، ۸-هیدروکسی کینولین^۳ ۰/۰۰۲ مولار به مدت ۲ و ۴ ساعت در دمای ۴°C و قراردادن غده دارای ریشه در سرمای یخچال به مدت ۲-۳ ساعت و سپس قراردادن غده در دمای آزمایشگاه، استفاده شد.

جهت تثبیت از محلول اسید استیک: الکل مطلق به نسبت ۳:۱ به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد. برای هیدرولیز از اسید کلریدریک یک نرمال به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰°C و یا دمای آزمایشگاه استفاده شد. جهت رنگ آمیزی سه رنگ استوکارمن، فوشین و استوارسین مورد بررسی قرار گرفت. تهیه نمونه متافازی با استفاده از روش اسکواش در ریشه‌های تیمار شده صورت گرفت و سپس مشاهده کروموزوم با استفاده از میکروسکوپ انجام شد.

کالوس‌های به دست آمده بر روی ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره در پتری‌های جدید حاوی محیط کشت واکشت شدند. ۶ الی ۷ روز پس از واکشت، زمانی که کالوس‌ها شروع به رشد مجدد نمودند، از مناطق مرستمی فعال که به راحتی از زیر بینوکولر قابل تشخیص بودند، قطعه‌ای از بافت کالوس برداشته شد و بلافاصله در پیش تیمار (۸ - هیدروکسی کینولین) گذاشته شد. تمام مراحل جهت مشاهده کروموزوم‌ها در سلول‌های کالوس مشابه مراحل انجام شده برای مطالعه در ریشه گیاهان شاهد بود ولی با توجه به سخت و فشرده بودن برخی از کالوس‌ها، زمان هیدرولیز با HCl یک نرمال، ۱۲ دقیقه در نظر گرفته شد.

به منظور مطالعه سیتوژنتیک در اندام‌های هوایی باززاشده از کالوس و یا باززاشده مستقیم، ابتدا اندام‌های هوایی در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده رشد جهت ریشه‌زایی قرار داده

شدند. سپس تعدادی از ظروف پتری حاوی ریزنمونه‌های میان‌گره و برگ به اتفاق رشد با دمای 25 ± 1 درجه سانتیگراد و طول روز ۱۶ ساعت روشنایی انتقال یافتند. همچنین تعدادی ظروف پتری کشت شده در تاریکی کامل قرار داده شدند و بدین ترتیب مقایسه‌ای از نظر تولید کالوس در ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره در دو شرایط نور و تاریکی انجام شد.

باززایی مستقیم

جهت انجام این بررسی، از سه دستور العمل A، B و C پیشنهاد شده توسط محققین برای باززایی مستقیم استفاده شد که عبارت بودند از:

(A) ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 (۴).

(B) ۰/۱۸۶ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 برای ۱۵ روز و سپس ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 (۶).

(C) ۰/۱۸۶ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای ۱۵ روز و سپس ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 برای ۳۵ روز (۱۲).

ریزنمونه‌های میان‌گره رقم کنکورده به طول پنج میلی‌متر و ریزنمونه‌های برگ به ابعاد پنج میلی‌متر از گیاهچه‌های سیب زمینی به دست آمده از طریق کشت بافت، تهیه شده و بر روی محیط‌های کشت تهیه شده طبق دستورالعمل‌های بالا کشت و سپس تحت دمای 25 ± 1 درجه سانتیگراد و طول روز ۱۶ ساعت روشنایی قرار داده شدند (۶).

محاسبات آماری

پس از انجام اندازه‌گیری‌های لازم در آزمایشگاه، داده‌های به دست آمده در نرم‌افزار EXCEL ذخیره گردید. داده‌ها در طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن انجام شد.

مطالعه سیتوژنتیک در ریشه گیاهان شاهد، کالوس‌ها و

اندام‌های باززا شده

جهت تعیین مناسب‌ترین روش برای مشاهده کروموزوم‌ها، غده‌هایی از سیب زمینی حاوی جوانه در لابلای روزنامه‌های

1- α -Bromo naphthaline

2-Colchicine

3-Hydroxy quinoline

میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به عنوان بهترین محیط کشت جهت کشت تک جوانه در سیب زمینی معرفی می‌گردد.

تولید کالوس به مقدار بسیار ناچیز بر روی ریزنمونه‌های کشت شده در محیط‌های D, C و F که حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (اکسین) بودند، صورت گرفت ولی تولید کالوس در سه محیط دیگر که فاقد منبع اکسینی بودند، مشاهده نشد و این با نتایج کریکوریان (۱۹۸۸) که وجود اکسین را در تولید کالوس به عنوان یک عامل اساسی معرفی کرده است، مطابقت دارد.

اثر غلظت 2,4-D و کینتین بر کالزایی

تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت 2, 4-D بر روی حجم کالوس و زمان شروع القاء کالوس بی‌معنی است در حالیکه اثر

تعداد ریز نمونه که کالوس تولید کرده است
کل ریز نمونه

آن بر روی درصد کالزایی

در سطح ۵٪ و تعداد ریشه ایجاد شده بر روی کالوس در سطح ۱٪ معنی‌دار است.

جدول مقایسه میانگین دانکن (جدول ۴) که به مقایسه اثرات اصلی غلظت 2,4-D بدون در نظر گرفتن عامل دوم (کینتین) می‌پردازد، نشان می‌دهد بین سه غلظت 2,4-D استفاده شده در این آزمایش از نظر درصد کالزایی و تعداد ریشه بر روی کالوس اختلاف معنی‌داری وجود دارد به طوریکه بالاترین درصد کالزایی و تعداد ریشه بر روی کالوس در کمترین مقدار 2,4-D (۱ میلی‌گرم در لیتر) به دست آمده است و استفاده از مقادیر بیشتر 2,4-D، درصد کالزایی و تعداد ریشه بر روی کالوس را کاهش داده است. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط نیوکامب مطابقت دارد (۱۵).

وجود کینتین در تولید کالوس ضروری نیست به طوریکه حتی در سه محیط کشت A، D و G (جدول ۲) که فاقد کینتین بودند نیز کالوس تولید شد. بنابراین حضور یک منبع اکسین به تنهایی برای القاء کالوس در ریزنمونه‌های میان‌گره سیب زمینی کافی است. با این حال تجزیه واریانس اثر معنی‌دار غلظت کینتین بر روی حجم کالوس، درصد کالزایی، زمان شروع القاء کالوس و تعداد ریشه حاصل بر روی کالوس را نشان داد. بنابراین اگرچه حضور کینتین برای تولید کالوس

شدند و مطالعه سیتوژنتیک به منظور تعیین سطح پلوئیدی از ریشه‌های حاصل از اندام‌های هوایی بازآشده صورت گرفت.

نتایج و بحث

کشت تک جوانه

تجزیه واریانس نشان داد که اثر محیط کشت بر روی رشد جوانه جانبی بسیار معنی‌دار است (در سطح ۱٪). جدول مقایسه میانگین دانکن (جدول ۳) نشان می‌دهد که سیتوکنین از نوع BAP نسبت به کینتین بر روی رشد جوانه جانبی مؤثرتر است به طوریکه رشد جوانه جانبی در دو محیط B و C نسبت به دو محیط E و F بیشتر بوده است که با نتایج به دست آمده توسط آندراد و اچوریگری، مطابقت دارد (۱).

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های طول ساقه در انواع محیط کشت (مقایسه میانگین‌ها طبق روش دانکن در سطح ۵٪)

نام محیط کشت	طول ساقه (سانتیمتر)
A	۲/۵ e
B	۷/۵ b
C	۱۰/۱ a
D	۱ f
E	۴ d
F	۵/۶ c

همچنین نتایج نشان می‌دهد که اضافه کردن NAA (یک منبع اکسین) به میزان ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در کنار منبع سیتوکینی (BAP یا کینتین) باعث افزایش رشد جوانه جانبی می‌شود به طوریکه رشد جوانه جانبی در محیط C نسبت به محیط B و در محیط F نسبت به محیط E بیشتر بوده است. هرچند که در تحقیقاتی که توسط آندراد و اچوریگری (۱۹۹۹) صورت گرفت، افزودن NAA به محیط کشت هیچگونه تأثیری در افزایش رشد جوانه جانبی نداشت.

به طور کلی هرچند که در محیط A (فاقد تنظیم‌کننده رشد)، جوانه جانبی در تمام ریزنمونه‌های کشت شده رشد کرد ولی نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که استفاده از مقدار قابل توجهی از سیتوکنین مانند BAP همراه با مقدار کمی اکسین مانند NAA در رشد جوانه جانبی اثر قابل توجهی خواهد داشت به طوریکه در این آزمایش محیط C حاوی ۲/۵

متقابل بین 2,4-D و کینتین (جدول ۶)، سرعت کالزایی در محیط H به طور معنی‌داری از بقیه محیط‌ها بالاتر است (زمان شروع القاء کالوس کمتر است).

تشکیل ریشه بر روی کالوس، تولید اندام هوایی نابجا بر روی آن را با مشکل روبرو می‌سازد و هرچه بر روی کالوس تعداد ریشه بیشتری تشکیل شده باشد، تولید اندام هوایی بر روی آن مشکل‌تر می‌شود. لذا هنگامی که هدف از تولید کالوس باززایی است، توصیه می‌شود که محیط کشتی به کار رود که تعداد ریشه کمتری بر روی کالوس تولید کند. جدول مقایسه میانگین (جدول ۶) نشان می‌دهد که در محیط کشت F (۲) میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) و محیط کشت H (۳) میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین)، کمترین تعداد ریشه بر روی کالوس تولید شده است.

در مجموع با در نظر گرفتن تمام موارد بالا، محیط کشت H (۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) به دلیل ظرفیت بالای آن در تولید کالوس با حجم بزرگتر، درصد کالزایی بالا، سرعت بالا در تولید کالوس و تعداد ریشه کم بر روی کالوس، محیط کشت مناسبی جهت القاء کالوس بر روی ریزنمونه‌های میان‌گره سبب زمینی معرفی می‌گردد (شکل ۱).



شکل ۱- تشکیل کالوس و ریزغده در ریزنمونه‌های میان‌گره در محیط H

ضروری نیست ولی اثر غلظت آن بر روی صفات ارزیابی شده معنی‌دار است. جدول مقایسه میانگین (جدول ۵) نشان می‌دهد که بالاترین میزان حجم کالوس، درصد کالزایی، تعداد ریشه بر روی کالوس و زمان شروع القاء کالوس در سطح دوم غلظت کینتین (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) حاصل شده است. فقدان کینتین در محیط کشت باعث کاهش حجم کالوس، درصد کالزایی و زمان شروع القاء کالوس نسبت به مصرف کینتین در سطح ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر شده است. به نظر می‌رسد استفاده از غلظت بالاتر کینتین در حدود ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر (۱۰ برابر سطح دوم) باعث کاهش درصد کالزایی و تعداد ریشه حاصل بر روی کالوس شده است. اگرچه از نظر حجم کالوس و زمان شروع القاء کالوس، اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۰/۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر وجود ندارد.

همچنین تجزیه واریانس وجود اثر متقابل معنی‌داری را بین غلظت 2,4-D و کینتین بر روی تمام صفات ارزیابی شده نشان داد. جدول مقایسه میانگین دانکن (جدول ۶) نشان می‌دهد که محیط‌های کشت H (۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) و I (۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) بهترین محیط‌های کشت از نظر تولید کالوس با حجم بالا هستند. بنابراین اگرچه در مقایسه میانگین مربوط به آثار اصلی 2,4-D اختلاف معنی‌داری بین سه سطح ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D از نظر حجم کالوس مشاهده نمی‌شود با اینحال به دلیل وجود اثر متقابل معنی‌دار بین 2,4-D و کینتین، به نظر می‌رسد که در حضور ۰/۱ یا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین، مصرف مقدار بالای 2,4-D از نظر تولید کالوس با حجم بالا مؤثر است.

محیط کشت B (۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) دارای بالاترین میزان درصد کالزایی است و پس از آن محیط‌های H و E نیز از پتانسیل کالزایی خوبی برخوردارند (جدول ۶). در مقایسه میانگین مربوط به اثر اصلی 2,4-D (جدول ۴) بین سطوح 2,4-D از نظر زمان شروع القاء کالوس، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. همچنین در مقایسه میانگین مربوط به اثر اصلی کینتین (جدول ۵) مشاهده می‌شود که زمان شروع القاء کالوس در محیط کشت فاقد کینتین دارای کمترین مقدار می‌باشد. با اینحال به دلیل اثر

جدول ۴- مقایسه میانگین بین سطوح غلظت 2,4-D از نظر حجم کالوس، درصد کال‌زایی، تعداد ریشه بر روی کالوس، زمان شروع کال‌زایی و حجم کالوس پس از واكشت

غلظت 2,4-D (میلی‌گرم بر لیتر)	حجم کالوس	درصد کال‌زایی	تعداد ریشه روی کالوس	زمان شروع کال‌زایی (روز)	حجم کالوس پس از واكشت
۱	۱۳/۳۲a	۰/۸۷a	۱/۳۹ a	۵/۱۳ a	۱۵/۵۸ a
۲	۱۳/۵۱a	۰/۷۷b	۰/۹۱ b	۵/۲۲ a	۱۵/۰۲ a
۳	۱۳/۸۶a	۰/۷۷b	۰/۸ b	۴/۸۸ a	۱۳/۱۶ b

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۵ - مقایسه میانگین سطوح غلظت کینتین از نظر حجم کالوس، درصد کال‌زایی، تعداد ریشه بر روی کالوس، زمان شروع کال‌زایی و حجم کالوس پس از واكشت

غلظت کینتین (میلی‌گرم بر لیتر)	حجم کالوس	درصد کال‌زایی	تعداد ریشه روی کالوس	زمان شروع کال‌زایی (روز)	حجم کالوس پس از واكشت
۰	۱۴/۰۰b	۰/۸۲b	۱/۳۶ a	۴/۷۳ b	۱۵/۰۴ a
۰/۰۱	۱۵/۱۱ a	۰/۹۶a	۱/۵۲ a	۵/۲۴ a	۱۵/۳۵ a
۰/۱	۱۴/۴۳ab	۰/۵۸c	۰/۳۲ b	۵/۲۶ a	۱۳/۳۶ b

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۶- مقایسه میانگین مربوط به اثر متقابل 2,4-D × کینتین بر روی حجم کالوس، درصد کال‌زایی، تعداد ریشه بر روی کالوس، زمان شروع کال‌زایی و حجم کالوس پس از واكشت

نام محیط کشت	غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد	حجم کالوس	درصد کال‌زایی	تعداد ریشه	زمان شروع کال‌زایی (روز)	حجم کالوس پس از واكشت
A	۱(2,4-D) + ۰(Kinetin)	۱۱/۰۴d	۰/۹۰bc	۱/۶۰b	۴/۹۳a	۱۵ a
B	۱(2,4-D) + ۰/۰۱(Kinetin)	۱۴/۶c	۱/۰۰a	۲/۳۷a	۵/۲۷a	۱۶/۶۷ a
C	۱(2,4-D) + ۰/۱(Kinetin)	۱۱/۰۶d	۰/۵۶e	۰/۹۳bcd	۵/۲۰a	۱۵/۰۵ a
D	۲(2,4-D) + ۰(Kinetin)	۱۱/۵۴d	۰/۸۶c	۱/۴۷bc	۵/۴۳a	۱۶/۵۲ a
E	۲(2,4-D) + ۰/۰۱(Kinetin)	۱۵/۲ab	۰/۹۳abc	۱/۲۷bcd	۵/۲۰	۱۴/۶۱ a
F	۲(2,4-D) + ۰/۱(Kinetin)	۱۰/۵۶d	۰/۵۳e	۰/۰۰f	۵/۰۳	۸/۵ b
G	۳(2,4-D) + ۰(Kinetin)	۱۰/۵d	۰/۷d	۰/۷۰de	۵/۲۷	۸/۴ b
H	۳(2,4-D) + ۰/۰۱(Kinetin)	۱۶/۵a	۰/۹۶ab	۰/۲۰ef	۵/۲۷	۱۴/۶۵ a
D	۳(2,4-D) + ۰/۱(Kinetin)	۱۶/۱a	۰/۶۶d	۰/۷۷cde	۵/۵۳	۸/۱ b

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

کالوس می‌شود. با این حال به دلیل اثر متقابل معنی‌داری که بین این دو عامل بر روی حجم کالوس پس از واكشت وجود دارد، مشاهده می‌شود (جدول ۶) که محیط کشت های A, B, C, D, E و H بدون اختلاف معنی‌داری باهم از نظر تأثیر بر روی حجم کالوس محیط‌های مناسبی جهت واكشت می‌باشند و حجم کالوس در محیط های F, G و I به طور معنی‌داری از حجم کالوس در ۶ محیط دیگر کمتر است.

تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت 2,4-D، کینتین و اثر متقابل آنها بر روی حجم کالوس در محیط واكشت در سطح ۱٪ معنی‌دار است. مقایسه میانگین سطوح 2,4-D (جدول ۴) نشان می‌دهد که مصرف بالاترین سطح 2,4-D (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) باعث رشد کمتری در کالوس شده است. همچنین جدول مقایسه میانگین سطوح کینتین (جدول ۵) نشان می‌دهد که مصرف بالاترین سطح کینتین منجر به رشد کمتری در

جدول ۷ - جدول مقایسه میانگین حجم، تعداد ریشه و زمان شروع کالزایی بین ارقام مورد مطالعه

رقم	حجم کالوس	تعداد ریشه	زمان شروع القاء کالوس (روز)
اگریا	۱۰/۱۴d	۰/۵e	۵/۵a
آژاکس	۱۴/۳۸b	۱/۵de	۵ ab
دیامنت	۱۲/۸bc	۲cd	۵/۸ a
سانته	۱۳/۷۵ bc	۳ c	۴/۸ab
کاسموس	۱۳/۸۹ bc	۱۰a	۴bc
کنکورد	۱۶/۵۲ a	۶b	۳c

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۸ - جدول مقایسه میانگین حجم کالوس، تعداد ریشه و زمان القاء کالوس بین ریزنمونه‌های مختلف

ریزنمونه	حجم کالوس	تعداد ریشه	زمان شروع القاء کالوس (روز)
برگ	۱۳/۹۲a	۳/۲ b	۳/۱b
میان‌گره	۱۳/۸۷ a	۵/۹۵ a	۵ a

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۹ - مقایسه میانگین مربوط به اثر متقابل رقم × ریزنمونه بر روی حجم کالوس، تعداد ریشه حاصل بر روی کالوس و زمان شروع القاء کالوس

رقم	ریزنمونه	حجم کالوس	تعداد ریشه	زمان شروع تولید کالوس (روز)
میان‌گره	۱۴/۲۸bc	۱/۶fg	۵/۱b	
آژاکس	۱۳/۷۶Cd	۱/۲ fg	۵ b	
دیامنت	۱۴ cd	۲/۵ef	۴/۸ b	
برگ	۱۰/۸۳d	۱fg	۵ b	
اگریا	۱۰/۷ d	۰/۷g	۴/۸ b	
برگ	۱۰/۹ d	۰/۵ g	۳/۵ bc	
میان‌گره	۱۴/۵ bc	۳/۵ de	۶/۸ a	
سانته	۱۲ de	۲/۵ ef	۴ bc	
میان‌گره	۱۶ b	۱۵ a	۴/۵ b	
کاسموس	۱۵/۳۵ bc	۵/۳c	۴/۵ b	
میان‌گره	۱۵/۴ bc	۴/۵ cd	۳/۵ bc	
کنکورد	۱۷/۹۸a	۷ b	۲/۵c	

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

بررسی اثر رقم و نوع ریزنمونه بر کالزایی و باززایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر رقم بر روی حجم کالوس‌های حاصله، زمان شروع القاء کالوس و تعداد ریشه تولید شده بر روی کالوس معنی‌دار است و این موضوع با نتایج تحقیقات بارسبی بر روی ۱۶ ژنوتیپ از سیب زمینی، مطابقت دارد (۲). اثر رقم بر روی درصد کالزایی معنی‌دار نیست و به نظر می‌رسد تمام ارقام تحت مطالعه در این آزمایش از درصد کالزایی بالایی برخوردارند.

جدول مقایسه میانگین دانکن (جدول ۱۰) نشان می‌دهد که بین ۶ رقم مورد مطالعه، رقم کنکورد بهترین رقم از نظر حجم کالوس و سرعت کالزایی است در حالیکه رقم اگریا از نظر کمتر بودن تعداد ریشه حاصل بر روی کالوس که از نظر تولید اندام هوایی در مرحله باززایی اهمیت دارد، رقم مناسب‌تری است.

حجم کالوس تولید شده و درصد کالزایی تحت تأثیر نوع ریزنمونه قرار ندارند در حالیکه اثر نوع ریزنمونه بر روی صفاتی مانند زمان شروع القاء کالوس و تعداد ریشه حاصل از کالوس کاملاً معنی‌دار است. جدول مقایسه میانگین دانکن (جدول ۸) نشان می‌دهد که بین دونوع ریزنمونه مورد استفاده در این آزمایش، برگ هم از نظر سرعت کالزایی و هم از نظر تعداد ریشه کمتر بر روی کالوس‌های حاصل از آن نسبت به ریزنمونه میان‌گره برتری دارد و این با نتایج تحقیقات کریستوفر و همکاران مطابقت دارد (۱۰).

اثر متقابل معنی‌داری بین رقم و نوع ریزنمونه از نظر صفاتی مانند حجم کالوس، تعداد ریشه حاصل بر روی کالوس و زمان شروع القاء کالوس مشاهده شد. جدول مقایسه میانگین دانکن (جدول ۹) نشان می‌دهد که ریزنمونه‌های برگ رقم کنکورد، بزرگترین کالوس‌ها و ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره در رقم اگریا، کوچکترین کالوس‌ها را تولید می‌نمایند. همچنین ریزنمونه‌های برگ در رقم کنکورد، دارای بالاترین سرعت کالزایی و ریزنمونه‌های میان‌گره رقم سانته دارای کمترین سرعت کالزایی می‌باشند.

بالاترین تعداد ریشه بر روی کالوس حاصل از ریزنمونه‌های میان‌گره در رقم کاسموس تولید می‌شود در حالیکه کمترین تعداد ریشه بر روی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های میان‌گره و برگ قرار دارند.

لازم به ذکر است که اثر متقابل معنی‌داری بین رقم و نوع ریزنمونه در صفات مربوط به باززایی مشاهده نشد و بنابراین بر اساس موارد ذکر شده در بالا، رقم کنکور به عنوان بهترین رقم از نظر باززایی معرفی می‌گردد. به علاوه، این رقم از نظر کال‌زایی نیز رقم مناسبی بود. همچنین کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ از نظر درصد باززایی، طول ساقه و تعداد ساقه نسبت به کالوس‌های حاصل از میان‌گره مطلوب‌ترند.

جدول ۱۱ - مقایسه میانگین بین ریزنمونه‌های مختلف

از نظر درصد باززایی، تعداد ساقه و طول ساقه

ریزنمونه	درصد باززایی	تعداد ساقه	طول ساقه (سانتیمتر)
برگ	۰/۴۸ a	۳/۶ a	۳/۵ a
میان‌گره	۰/۱۵ b	۲/۵ b	۲ b

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک بر مبنای آزمون دانکن در سطح

احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۲- باززایی از کالوس حاصل از میان‌گره

اثر نور بر تولید کالوس بر روی ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره

گیاهان از نظر نیاز به شرایط فیزیکی مثل نور و حرارت جهت تولید کالوس باهم متفاوتند. بعضی از گیاهان در نور و بعضی در تاریکی کالوس بیشتری تولید می‌نمایند. در اکثر منابع جهت تولید کالوس در سیب‌زمینی، محیط تاریکی در نظر گرفته شده است.

در این آزمایش مشاهده شد که ریزنمونه‌های میان‌گره هم در حضور نور و هم در تاریکی کامل قادر به تولید کالوس بودند در حالیکه ریزنمونه‌های برگ فقط در محیط تاریکی کالوس تولید نمودند و در حضور نور فاقد پتانسیل تولید کالوس بودند. با اینحال تعدادی ریشه به طور مستقیم بدون تشکیل کالوس بر روی برگ (مخصوصاً ریزنمونه‌های جدا شده از قسمت قاعده

در مجموع با در نظر گرفتن تمام موارد بالا به نظر می‌رسد ریزنمونه برگ و رقم کنکور بهترین نوع ریزنمونه و رقم جهت تولید کالوس با حجم بالا و سرعت کال‌زایی بالا می‌باشد.

همچنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که درصد باززایی، تعداد ساقه بر روی کالوس و طول ساقه تحت تأثیر رقم و نوع ریزنمونه قرار دارد و این موضوع با نتایج کالاک و همکارانش مطابقت دارد (۱۱).

جدول مقایسه میانگین (جدول ۱۰) نشان می‌دهد که در بین ارقام مورد مطالعه در این بررسی، رقم کنکور با میانگین باززایی ۶۱ درصد، دارای بالاترین پتانسیل باززایی است در حالیکه کالوس‌های حاصل از دورقم سانته و کاسموس فاقد باززایی بودند و پس از انتقال به محیط باززایی، هیچگونه عکس‌العملی در آنها مشاهده نشد که این موضوع را می‌توان تا حدودی به وجود تعداد زیاد ریشه بر روی این کالوس‌ها ارتباط داد. با این حال این دلیل قاطعی نیست چون با اینکه میانگین تعداد ریشه‌های بر روی کالوس‌های حاصل از رقم کنکور نسبت به ارقام آژاکس، اگریا، دیامنت و سانته بیشتر است (جدول ۷)، ولی رقم کنکور دارای بالاترین درصد باززایی است (شکل ۲).

جدول ۱۰ - مقایسه میانگین بین ارقام مختلف از نظر درصد

باززایی، تعداد ساقه و طول ساقه

واریته	درصد باززایی	تعداد ساقه در کالوس	طول ساقه (سانتیمتر)
آژاکس	۰/۲۹b	۱/۵ b	۱ b
دیامنت	۰/۴۵ab	۲ b	۲ b
اگریا	۰/۳۲ b	۲/۵ b	۱/۵ b
سانته	۰/۰d	۰/۰ c	۰/۰ c
کاسموس	۰/۰ d	۰/۰ c	۰/۰ c
کنکور	۰/۶۱a	۴ a	۳/۵ a

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک بر مبنای آزمون دانکن در سطح

احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول مقایسه میانگین (جدول ۱۱) نشان می‌دهد که کالوس‌های به دست آمده در ریزنمونه‌های برگ دارای پتانسیل باززایی بیشتری نسبت به ریزنمونه‌های میان‌گره بودند و این موضوع با نتایج به دست آمده از تحقیقات شارما و راجام مطابقت دارد (۱۱).

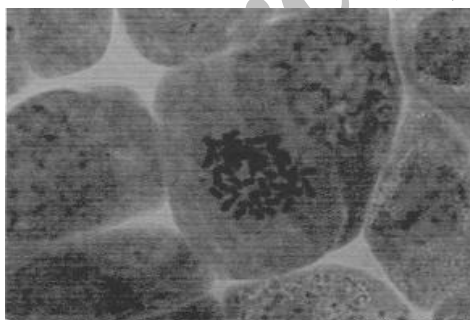
بررسی تنوع سوماکلون

مطالعه سیتوژنتیک در ریشه گیاهان شاهد، کالوس‌ها و اندام‌های باززاشده

در بین زمان‌های مختلف قطع کردن ریشه و قراردادن آنها در پیش تیمار تفاوتی مشاهده نشد. از بین طول ریشه‌هایی که جهت مطالعه آزمایش شدند، ریشه‌هایی به طول ۲/۵ - ۲ سانتیمتر، مناسب‌ترین طول ریشه جهت بررسی سیتوژنتیک بودند. از بین پیش تیمارهای مختلف، پیش تیمار ۸ - هیدروکسی کینولین به مدت ۲ ساعت در دمای 4°C بهترین نتیجه را داد. همچنین برای هیدرولیز، بهترین پاسخ در اثر تیمار با اسیدکلریدریک یک نرمال به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه به دست آمد و جهت رنگ آمیزی نیز استوارسین رنگ مناسبی تشخیص داده شد.

مطالعه سیتوژنتیک ریشه ارقام مورد مطالعه در این آزمایش نشان داد که این ارقام همگی $2n=4x=48$ یا تتراپلوئید بودند ($X=12$).

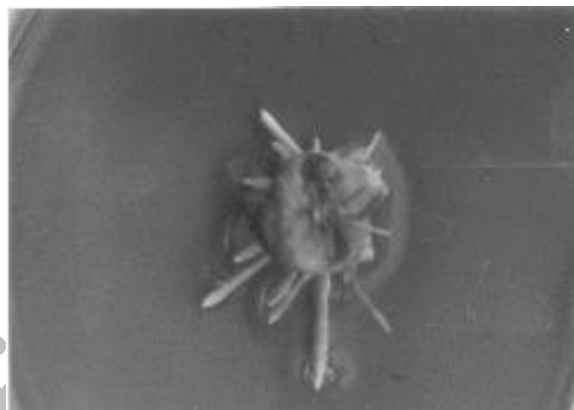
از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره، چهل سلول متافازی خوب تهیه گردید و تعداد کروموزوم آنها شمارش شد و سپس تغییر تعداد کروموزوم از نظر سطح پلوئیدی مورد ارزیابی قرار گرفت. همانطور که جدول زیر نشان می‌دهد، در بین نمونه‌های تهیه شده، سلول‌هایی با ۲۴ کروموزوم (دی‌هاپلوئید)، ۴۸ کروموزوم (تتراپلوئید) (شکل ۴)، ۶۰ کروموزوم (پنتاپلوئید)، ۷۲ کروموزوم (هگزاپلوئید) و ۹۶ کروموزوم (اکتاپلوئید) مشاهده شدند.



شکل ۴- یک سلول در مرحله متافاز با ۴۸ کروموزوم در ریشه گیاهان شاهد

اگرچه مقایسه تغییر در تعداد کروموزوم (از نظر سطح پلوئیدی) از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره نیاز به بررسی تعداد زیادی نمونه دارد ولی مقایسه نتایج حاصل

پهنک برگ) تشکیل شد (شکل ۳). کالوس‌های تولید شده بر روی ریزنمونه‌های میان‌گره در معرض نور، همگی زرد رنگ با ساختمان سفت و سخت بودند در حالیکه کالوس‌های تولید شده در محیط تاریکی کامل، اکثراً ترد و شکننده، برخی زرد و برخی زرد متمایل به سفید بوده و در ضمن از شادابی و تازگی کمتری برخوردار بودند.



شکل ۳- تولید ریشه بر روی ریزنمونه‌های برگ به طور مستقیم بدون تولید کالوس در شرایط روشنایی

باززایی مستقیم

ریزنمونه‌های برگ تیمار شده براساس دستورالعمل‌های A، B و C فاقد عکس العمل باززایی بودند در حالیکه باززایی مستقیم بر روی ریزنمونه‌های میان‌گره براساس دستورالعمل C مشاهده شد. بنابراین برخلاف نتایج به دست آمده از تحقیق انجام شده توسط کاردی و همکاران مبنی بر بیشتر بودن پتانسیل باززایی مستقیم در برگ نسبت به پتانسیل باززایی مستقیم در ساقه و نیز برخلاف نتایج به دست آمده توسط ویسر و همکاران (۱۹۹۱)، کاردی و همکاران (۱۹۹۲) و یاپیکینو و همکاران (۱۹۹۲) که پتانسیل باززایی مستقیم در برگ و میان‌گره را یکسان ارزیابی کرده‌اند، در این آزمایش هیچگونه باززایی مستقیم در ریزنمونه‌های برگ مشاهده نشد. تقریباً در ۲۵٪ از ریزنمونه‌های میان‌گره تحت تیمار با دستورالعمل C ($0/1186$ میلی‌گرم در لیتر NAA، $2/25$ میلی‌گرم در لیتر BAP برای ۱۵ روز و سپس $2/25$ میلی‌گرم در لیتر BAP و 5 میلی‌گرم در لیتر GA_3 برای ۳۵ روز) با تولید ۱-۲ ساقه بر روی هر ریز نمونه باززایی مستقیم مشاهده شد.

جدول ۱۲- تغییر در تعداد کروموزوم (از نظر سطح پلوئیدی) در ریشه‌های به دست آمده از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره

ریزنمونه	تعداد نمونه تهیه شده	$2n = 2x = 24$	$2n = 4x = 48$	$2n = 5x = 60$	$2n = 6x = 72$	$2n = 8x = 96$
		دیپلوئید	تتراپلوئید	پنتاپلوئید	هگزاپلوئید	اکتاپلوئید
برگ	۲۰	۱	۱۵	۰	۲	۲
میان‌گره	۲۰	۰	۱۶	۱	۱	۲

اگر چه در مطالعات انجام شده توسط ورسان و دات بر روی گیاهان باززاشده از کالوس، تغییرات پلی‌پلوئیدی مشاهده شد (۱۹) با این حال در نمونه‌های تهیه شده از ریشه‌های به دست آمده از اندام‌های هوایی باززا شده مستقیم (۲۰ نمونه) و یا باززاشده از کالوس (۲۰ نمونه) در این تحقیق هیچگونه تغییر کروموزومی مشاهده نشد.

سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از طرح بررسی تنوع سوماکلون در سیب‌زمینی به شماره ۷۱۵/۳/۵۰۵ می‌باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام شده است بدینوسیله مراتب تشکر و سپاسگزاری اعلام می‌گردد.

از بررسی ۴۰ سلول متافاز از ریشه‌های تولید شده بر روی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره نشان می‌دهد که از نظر فراوانی تغییر در تعداد کروموزوم تفاوت زیادی بین این دو ریزنمونه وجود ندارد (جدول ۱۲).

جهت مطالعه کروموزومی اندام‌های هوایی باززا شده، ابتدا اندام‌های هوایی باززا شده به طور مستقیم و یا اندام‌های هوایی حاصل از کالوس به محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد جهت ریشه‌زایی انتقال داده شدند. تعداد زیادی ریشه از محل قطع شده اندام‌های هوایی و یا گره‌های پایینی آنها ایجاد شد. ریشه‌هایی به طول ۲-۲/۵ سانتیمتر جدا شده و بلافاصله در پیش تیمار قرار گرفتند و بقیه مراحل جهت تهیه نمونه متافازی مناسب در زیر میکروسکوپ مانند قبل انجام شد.

REFERENCES

- Andrade, L.B., S.E. Echeverrigaray., F. Fracaro., G.F. Pauletti, & L. Roto. 1999. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 56:79-83
- Barsby, T.L. & J.F. Shepard. 1983. Regeneration of plants from mesophyl protoplast of solanum species of *etuberosa* group. *Plant Sci. Lett.* 31:101-105.
- Bhojwani, S.S. (ed.). 1990. *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. Elsevier, Amsterdam.
- Bokelmann, G.S. & S. Roest. 1983. Plant regeneration from protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* cv Bintje). *Z. Pflanzenphysiol.* 109: 259-265.
- Cardi, T., V. Iannamico., F. D'Ambrosio., E. Filippone, & P.F. Lurquin. 1992. Agrobacterium mediated genetic transformation of *Solanum commersonii*. *Plant Sci.* 87:179-189.
- Cardi, I., V. Iannamico, F. D'Ambrosio, E. Filippone, & P.F. Lurquin. 1993. In vitro regeneration and cytological characterization of shoots from leaf explants of three accessions of *Solanum commersonii*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 34:107-114.
- Carpato, T., T. Cardi, T. Chiari, & L. Frusciante. 1995. Tissue culture response in various wild and cultivated solanum germplasm accessions for exploitation in potato breeding. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 41:151-158.
- Centeno, M.L., A. Rodriguez, I. Feito, & B. Fernandez. 1996. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic response in *Actinidia delisiosa* tissue cultures. *Plant Cell Rep.* 16:58-62.
- Choi, H.W., P.G. Lemaux, & M.J. Cho. 2000. Increased chromosomal variation in transgenic barley (*Hordeum vulgare*) plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 37:217-222
- Christopher, T. & M.V. Rajam. 1996. Effect of genotype, explant and medium on in vitro regeneration of red paper. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46:245-250.
- Kalak, H., M. Reidlla, I. Hilpus, & K. Viruma. 1997. Effects of genotype, explant source and growth regulators on organogenesis in carnation callus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51:127-135.

12. Karp, A., R. Risiott, M.J.K. Jones, & S.W.J. Bright. 1984. chromosome doubling in monohaploid and dihaploid potatoes by regeneration from cultured leaf explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 3:363-373.
13. Krikorian, A.D. 1988. *Plant Tissue Culture: Perceptions and Realities*. Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.). pp:425-464.
14. Krikorian, A.D. 1994. In vitro methods for plantation crops. In: I.K. Vasil and T.A. Thorpe (eds.), *Plant Tissue Culture: Theory and Applications*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
15. Newcomb, W. & D.F. Wetherell. 1970. The effect of 2,4,6-trichlorophenoxyacetic acid on embryogenesis in wild carrot tissue culture. *Bot. Gaz.* 131:242-245.
16. Pollard, J.W. & S. Walker (eds.). 1990. *Plant Cell and Tissue Culture: Methods in Molecular Biology*. Vol. 6, Humana Press, Clifton.
17. Smith, R.H. 1992. *Plant tissue culture (Techniques and Experiments)*. Academic press. San Diego.
18. Tavazza, R., R.J. Ordas, & G. Ancora. 1988. Procedure for regeneration of plants from cell suspension protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum L.*) cv. Desiree. *Plant Sci.* 58: 223-230.
19. Wersuhn, G. & U. Dathe. 1998. Genome selection within cell culture of potato and tobacco. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 54:15-20.

Archive of SID

A Study of Tissue Culture and Somaclonal Variation in Potato

A. SHAHPURI¹, M. OMIDI², P. AHMADIAN TEHRANI³ AND D. DAVOODI⁴

1, 2, 3, Former Graduate Student, Assistant Professor, and Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran 4, Staff Member, Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran

Accepted Oct. 1, 2003

SUMMARY

To study tissue culture in potato, stem explants with axillary buds were cultured on 6 MS media with different types and concentrations of growth regulators. The most suitable medium was specified on the basis of growth of axillary buds. Using internode and leaf explants taken from in vitro grown plants, the effect of growth regulator concentration on callus induction, the effect of cultivar and explant on callus induction and regeneration, the effect of light on callus induction and finally direct regeneration were investigated. Somaclonal variation was studied in view of variations in the number of chromosomes on calli, regenerated shoots of calli as well as direct regenerated shoots. Variations such as dihaploidy, pentaploidy, hexaploidy as well as octaploidy were observed on the derived roots of callus but there was no variation observed on either regenerated shoots of calli or direct regenerated shoots.

Key words: Potato, Leaf, Node, MS, 2, 4-D, Kinetine

Archive of SID