مجله علمی-پژوهشی

علوم کشاورزی

سال یازدهم، شماره (۳) ۱۳۸۴

بررسی اثرات غلظت پرولین در محیط پیش کشت و کاربرد ABA بر گیاهان مادری بر باز زایی پس از انجماد مریستم‌های سیب زمینی در روش cryopreservation*

مجتبی جعفرزاده کنارسری

دانشجوی سابق دکتری زراعت واحد علوم و تحقیقات تهران

رضا ضرغامی

عضو هیئت علمی، موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، بخش کشت بافت و انتقال ژن

جواد مظفری

عضو هیئت علمی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، بخش تحقیقات ژنتیک گیاهی

قربان نورمحمدی

استاد، واحد علوم و تحقیقات تهران

اسلام مجیدی هروان

استاد پژوهش، موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، بخش فیزیولوژی گیاهی

چکیده:

نگهداری ژرم پلاسم به روش انجماد در ازت مایع[1] برای حفظ طولانی مدت ذخایر توارثی بکار می‌رود. بهینه سازی دستورالعمل انجماد در ازت مایع در مورد هر ژرم پلاسم گیاهی، نیازمند بهینه نمودن هر یک از مراحل متعدد این روش است. یکی از مهمترین این مراحل، مرحله پیش کشت است که مواد گیاهی برای مواجهه با محلول‌های غلیظ آب‌گیری آماده می‌شوند. در این آزمایش طول مدت این مرحله و اجزای آن به همراه کاربرد هورمون اسید آبسسیک[2] روی گیاهان مادری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش طول مدت پیش کشت (از یک به ۱/۵ روز) به طور معنی داری میزان بازیابی را کاهش داد. از بین غلظتهای بررسی شده، بهترین غلظت پرولین در محیط پیش کشت، ۵ گرم در لیتر بود. همچنین کاربرد اسید آبسسیک روی گیاهان مادری هیچ اثر معنی داری بر میزان بازیابی نداشت اما این فاکتور به طور معنی داری با سایر فاکتورهای آزمایش روابط متقابل نشان داد.

* بخشی از رساله دکتری زراعت در واحد علوم و تحقیقات تهران

1. Cryopreservation
2. Abscisic acid (ABA)

تاریخ دریافت مقاله ۸۳/۴/۵ تاریخ دریافت نسخه نهایی ۸۳/۸/۱۳

Archive of SID

www.SID.ir

واژگان کلیدی: نگهداری ژرم پلاسم، انجماد در ازت مایع، سیب زمینی، دوره پیش کشت، پرولین، اسید آبسسیک.

مقدمه

نیاز فزاینده بشر به غذا در جهان امروز و قلمداد شدن گیاهان به عنوان منبع اصلی تامین آن از سویی، و نیاز به بهبود و اصلاح گیاهان زراعی و لزوم وجود تنوع ژنتیکی به عنوان اصلی‌ترین ابزار لازم برای این اصلاح، اهمیت حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی گیاهی را روزافزون کرده است.

روش‌های حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهی به دو دسته اصلی روش‌های سنتی و درون شیشه‌ای[1] دسته‌بندی می‌شوند. در روش سنتی، رشد و تکثیر گیاه در شرایط محیطی طبیعی خودش صورت می‌گیرد و مشکلات اصلی کاربرد این روش را می‌توان به صورت زیر خلاصه نمود (۲):

۱) عدم امکان حفظ ثبات ژنتیکی در روش تکثیر جنسی (تولید بذر) به خصوص در مورد گیاهان دگر گشن.

۲) مواجهه گیاهان با عوامل محیطی مخرب زنده و غیر زنده و در نتیجه امکان از بین رفتن ژرم پلاسم گیاهی.

۳) عدم قابلیت ماندگاری و انبارداری مناسب در مرد بافت‌های ریکالسیترنت[2] که حاصل آن نیاز به تکرار دفعات تکثیر و لذا بالا رفتن هزینه نگهداری و نیز خطر ناشی از دو بند قبلی خواهد بود.

ابداع روش‌های درون شیشه‌ای در پاسخ به مشکلات مذکور انجام گرفت. این روش‌ها به دو بخش میان مدت و بلند مدت قابل تقسیم بندی است. در روش میان مدت، گیاه درون شیشه در شرایط محیطی کنترل شده رشد می‌یابد. در این روش با ایجاد تغییراتی در شرایط محیطی یا اجزای محیط کشت، رشد گیاه درون شیشه کند می‌شود تا دفعات مورد نیاز برای تکثیر آن کاهش یابد. اما مشکل اصلی این روش نیاز به تجهیزات و امکانات قابل توجه برای کنترل شرایط محیطی مورد نیاز گیاه می‌باشد که به خصوص در هنگام بالا بودن حجم ژرم پلاسم مورد نگهداری، با افزایش میزان نیاز به هزینه (برای تجهیزات) و نیروی انسانی (برای تکثیر) مشکل ساز خواهد بود.

برای حل این مشکل روش بلند مدت ابداع گردید. در این روش از ازت مایع (دمای ۱۹۶ - درجه سانتیگراد) برای نگهداری ژرم پلاسم استفاده می‌شود. در این دما جنبش مولکولی فوق‌العاده کند می‌شود و لذا تغییرات متابولیکی سلول به طور عمده متوقف می‌گردد. بنابراین در این شرایط امکان نگهداری طولانی مدت ژرم پلاسم وجود خواهد داشت (۲ و ۶).

یکی از تکنیک‌هایی که امروزه به طور گسترده برای انجام انجماد در ازت مایع مورد استفاده قرار می‌گیرد، تکنیک شیشه‌ای سازی[3] است. در این تکنیک با وارد کردن مواد محلول خاصی به درون سلول گیاهی، آب آزاد سلول کاهش یافته و لذا از تشکیل کریستال‌های یخ در مرحله انتقال به ازت مایع جلوگیری خواهد شد. مراحل مختلف این تکنیک در شکل ۱ آمده است.

بهینه کردن دستورالعمل انجماد در ازت مایع در مورد مواد گیاهی مورد نظر، مستلزم بهینه نمودن هر یک از مراحل متعدد آن است (۲). یکی از مهمترین این مراحل مرحله پیش کشت است. در این مرحله از طرفی بایستی شوک ناشی از قطع ریز نمونه[4] از گیاه مادری برطرف گردد و از سوی دیگر بایستی مواد گیاهی مورد نظر نسبت به کاربرد محلول‌های غلیظ آب گیری، سازگار شوند. یکی از راه‌هایی که برای این منظور به کار می‌رود، افزایش غلظت مواد محلول خاصی در محیط پیش کشت است. ازجمله این مواد می توان به قندهایی چون ساکارز، مانیتول و سوربیتول یا اسید آمینه‌هایی مانند پرولین اشاره کرد (۶).

1. In vitro
2. Recalcitrant
3. Vitrification
4. Explant

Archive of SID

www.SID.ir

پرولین اسید آمینه آزادی است که به عنوان یک ماده محلول به طور طبیعی در پاسخ به استرس در سلول‌های گیاهی تجمع می‌یابد (۱). بنابراین کاربرد غلظت‌های متفاوت این ترکیب در محیط پیش کشت به همراه مدت زمان متفاوت این مرحله مورد بررسی قرار گرفت.

از سوی دیگر هورمون گیاهی اسید آبسسیک با استرس مرتبط است و در برخی از منابع به اثرات مثبت ناشی از کاربرد آن در روش انجماد در ازت مایع اشاره شده است (۴ و۱۰). کاربرد این هورمون اغلب در محیط پیش کشت صورت می‌گیرد اما از آنجایی که هر گونه افزایش در مدت پیش کشت (نسبت به حالت بهینه) سبب کاهش در میزان بازیابی پس از انجماد خواهد شد (۳ و ۷)، لذا ممکن است کاهش مدت زمانی که سلول‌ها بدین صورت در معرض اسید آبسسیک هستند، سبب عدم بروز اثرات احتمالی مثبت آن شود. بنابراین روشی که مورد بررسی قرار گرفت، عبارت از کاربرد این هورمون بر روی گیاهان مادری بود (۸ و ۱۱).

مواد و روش‌ها

الف ـ مواد گیاهی:

گیاهان درون شیشه سیب زمینی (رقم آگریا) با سن حدود ۳۰ تا ۴۵ روز، برای جدا سازی مریستم در نظر گرفته شد. این گیاهان عاری از ویروس در محیط MS (۹) و در شرایط محیطی ۱۶ ساعت دوره نوری شبانه روزی، دمای روز و شب به ترتیب ۲۲ و۲۰ درجه سانتیگراد، شدت نور حدود ۵۰۰۰ لوکس و رطوبت نسبی حدود ۵۰٪ پرورش داده شدند. مراحل روش انجماد در ازت مایع بر روی مریستم‌های (نوک ساقه‌های[1]) اخذ شده از جوانه‌های محوری ساقه با ابعاد حدود ۰/۵ تا ۱ میلیمتر انجام گردید.

ب ـ روش‌های بکار گرفته شده :

دستورالعمل موسسه تحقیقاتی بین‌المللی سیب زمینی[2](۵) برای بهینه سازی مورد استفاده قرار گرفت و فاکتورهای آزمایشی زیر(جدول شماره ۱) در قالب طرح کاملا تصادفی (با دو تکرار) و به صورت فاکتوریل انجام گردید.

جدول ۱: فاکتورهای به کار رفته در آزمایش

فاکتور	سطح	توضیحات
A	۱	بدون کاربرد اسید آبسسیک بر گیاهان مادری
A	۲	کاربرد۰/۵ میلی گرم در لیتر اسید آبسسیک بر گیاهان مادری به مدت ۲ هفته
B	۱	غلظت ۱ گرم در لیتر پرولین در محیط پیش کشت
B	۲	غلظت ۵ گرم در لیتر پرولین در محیط پیش کشت
B	۳	غلظت ۹ گرم در لیتر پرولین در محیط پیش کشت
C	۱	پیش کشت به مدت ۱ روز
C	۲	پیش کشت به مدت ۱/۵ روز

لازم به توضیح است که مریستم‌ها پس از انجماد در ازت مایع به مدت یک روز در حالت انجماد باقی ماندند. پس از گذشت دو هفته از خارج کردن مریستم‌ها از حالت انجماد، بررسی بر روی مریستم‌های هر پلات (یک پتری شامل ۳ تا ۵ مریستم) برای تعیین نحوه عکس‌العمل[3] آنها انجام گردید و بر اساس بهترین وضعیت مریستم‌های هر پلات، کدهای زیر برای کمی نمودن نتایج، به هر یک از پلات‌های آزمایشی نسبت داده شد:

1. Shoot tips
2. CIP
3. Performance (Per.)

Archive of SID

www.SID.ir

۰ = مریستم‌های تیره شده و تخریب شده.

۲ = مریستم‌های به طور جزئی قهوه‌ای شده.

۴ = مریستم‌های سبز.

۶ = مریستم‌های سبز و باززایی شده.

کلیه اعداد حاصله (Per.) قبل از تجزیه و تحلیل آماری به صورت زیر نرمال شدند:

$$SqPer. = \sqrt{Per. + 0.5}$$

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SAS و برای رسم نمودارها از نرم افزارExcell استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌های آزمایش در جدول ۲ و نتایج مقایسات میانگین‌ها در شکل‌های ۱ تا ۳ آمده است. همان طور که در جدول ۲ مشخص است، از کاربرد اسید آبسسیک بر گیاهان مادری تاثیر معنی داری بر میزان بازیابی مشاهده نشد (۱۱). اما کاربرد این هورمون واکنش مریستم‌ها را به سایر فاکتورهای آزمایش تغییر داد. برای مثال اثرات غلظت پرولین در محیط پیش کشت روابط متقابل معنی داری با فاکتور مذکور داشته است (شکل ۱). بدین صورت که کاربرد اسید آبسسیک در پایین‌ترین غلظت پرولین (یک گرم در لیتر) سبب بهبود عکس‌العمل مریستم‌ها شد در حالی که این تاثیر در بالاترین غلظت پرولین (۹ گرم در لیتر) منفی بوده است.

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس با روش GLM (General Linear Model).

منابع تغییر	df	SS	MS	F	Pr>F
کاربرد ABA بر گیاهان مادری (فاکتور A)	۱	۰/۰۲	۰/۰۲۰	۰/۲۳	۰/۶۳۷۹
غلظت پرولین در محیط پیش کشت (فاکتورB)	۲	۳/۸۱	۱/۹۰۵	۲۱/۵۴	۰/۰۰۰۱
طول مدت پیش کشت (فاکتورC)	۱	۴/۰۸	۴/۰۸۲	۴۶/۱۷	۰/۰۰۰۱
فاکتور A × فاکتور B	۲	۱/۹۰	۰/۹۵۱	۱۰/۷۶	۰/۰۰۰۵
فاکتور A × فاکتور C	۱	۰/۶۲	۰/۶۲۲	۷/۰۳	۰/۰۱۴۰
فاکتور B × فاکتور C	۲	۰/۷۶	۰/۳۷۹	۴/۲۹	۰/۰۲۵۶
فاکتور A × فاکتور B × فاکتور C	۲	۵/۷۴	۲/۸۶۹	۳۲/۴۵	۰/۰۰۰۱

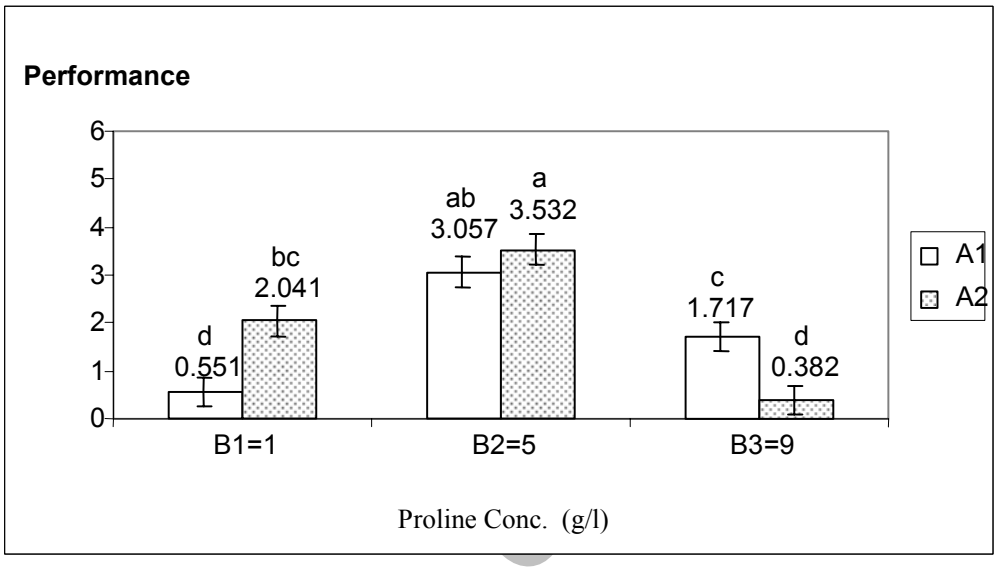
این پدیده را می‌توان به فعال شدن مکانیسم‌های سازگاری سلول نسبت به فرآیند انجماد توسط کاربرد اسید آبسسیک نسبت داد (۴). بر این اساس می‌توان گفت که نتیجه این فرآیند سازگاری، جایگزین بخشی از غلظت ناکافی پرولین در تیمار شامل سطح B۱ شده و از سوی دیگر غلظت بیش از اندازه پرولین در تیمار B۳ با حاصل این فرآیند سازگاری تشدید شده است. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، مناسب‌ترین غلظت پرولین در محیط پیش کشت (از بین غلظت‌های آزمون شده) ۵ گرم در لیتر بوده است.

همچنین بین دو فاکتور کاربرد اسید آبسسیک بر گیاهان مادری و طول مدت پیش کشت، روابط متقابل مشاهده شد (جدول ۲ و شکل ۲). بر اساس آنچه گفته شد، به نظر می‌رسد که فرآیند سازگاری حاصل از کاربرد اسید آبسسیک بر گیاهان مادری، اثرات منفی ناشی از طول مدت پیش کشت را کاهش داده است. از طرفی مدت پیش کشت کوتاه (یک روز) نسبت به تیمار طولانی‌تر (۱/۵ روز) به طور معنی داری برتری دارد (شکل‌های ۲و۳). همانگونه که در شکل ۳ مشهود است، اثرات منفی غلظت‌های نامناسب پرولین در محیط پیش کشت، با افزایش مدت این مرحله، به طور معنی دار و قابل توجهی تشدید شده است کما اینکه مدت طولانی پیش کشت در برخی منابع به عنوان یک فاکتور منفی برشمرده شده است (۷ و ۸).

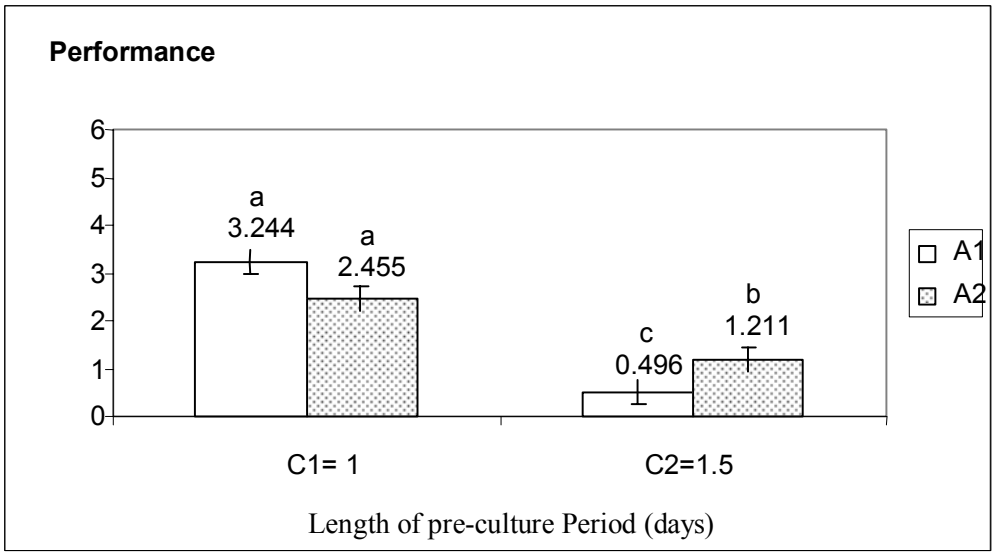
Archive of SID

www.SID.ir

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که از بین تیمارهای مورد بررسی بهترین روش برای نگهداری رقم آگریا در روش انجماد در ازت مایع، استفاده از غلظت ۵ گرم در لیتر پرولین در محیط پیش کشت به مدت یک روز می‌باشد. همچنین با توجه به نتایج به دست آمده، بررسی مدت پیش کشت کمتر از یک روز نیز مناسب به نظر می‌رسد. به علاوه تغییر نحوه کاربرد ABA بر گیاهان مادری از نظر مدت و غلظت تیمار می‌تواند به عنوان بررسی بیشتر مد نظر قرار گیرد.

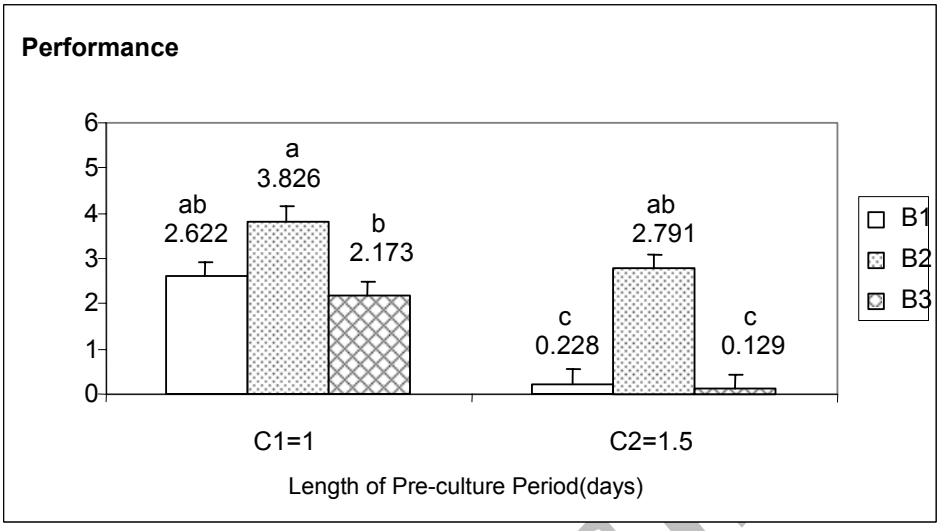


شکل ۱: مقایسه میانگین‌های فاکتورهای A (کاربرد اسید آبسسیک بر گیاهان مادری) و B (غلظت پرولین در محیط پیش کشت.



شکل ۲: مقایسه میانگین‌های فاکتورهای A (کاربرد اسید آبسسیک بر گیاهان مادری) و C (طول مدت پیش کشت)

www.SID.ir



شکل ۳: مقایسه میانگین‌های فاکتورهای B (غلظت پرولین در محیط پیش کشت) و C (طول مدت پیش کشت)

منابع و مآخذ:

1. Aspinall, D. and Paleg, L.G. 1981. Proline accumulation: Physiological aspects. In Paleg, L.G. and Aspinall, D. (Eds.), The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Sidney, Academic Press, pp. 205-241.
2. Benson, E. E. (Ed.), 1999, Plant Conservation Biotechnology, Talor and Fransis Press, London
3. Benson, E.E. and Withers, L.A. 1988. The application of germplasm storage in biotechnology. In Paris, M.S.S., Mavituna, F. and Novis, J.M. (Eds.), Plant Cell Biotechnology, NATO ASI Series, Vol. III 8, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 431-443.
4. Dumet, D. and Benson, E. E. 2000. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated / desiccated germplasm, in Engelmann, F. and Hiroko, T. (Eds.), Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm (Current Research Progress and Application), JIRCAS Press, Tsukuba, Japan, pp. 43-56
5. Golmirzaie, A. M. and Panta, A. 1997. Advances in potato cryopreservation by vitrification, CIP Program Report, International Potato Center, Lima, Peru. pp . 71-76.
6. Grout, B. (Ed.). 1995. Genetic Preservation of Plant Cells in vitro, Springer-Verlag, Berlin .
7. Harding, K., Benson, E.E. and Smith, H. 1991. The effects of pre-freeze in vitro culture period on the recovery of cryopreserved shoot-tips of Solanum tuberosum, Cryo Letters 12: 17-22.
8. Kartha, K.K., 1985. Cryopreservatoin of Plant, Cells & Organs, CRC Press.
9. Murashige,T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, Physiologia Plantarum, 15:473-479.
10. Reed, B.M. 1996. Pre-treatment strategies for cryopreservation of plant tissues. In Normah, M.N., Narimah, M.K. and Clyde, M.M. (Eds.), Techniques in In Vitro Conservation, Proceedings of the International Workshop on In Vitro Conservation of Plant Genetic Resources, July 4-6 1995, University of Kebangsaan Malaysia Publishers, Kuala Lumpur, Malaysia,PP.73 – 87.
11. Vandenbussche, B.,1998, Cryopreservation of in vitro sugar beet shoot tips using the encapsulation-dehydration technique: influence of abscisic acid and cold acclimation, Plant Cell Report, 17:791-793.

Archive of SID

www.SID.ir

JOURNAL OF
AGRICULTURAL
SCIENCES
Islamic Azad University

Effects of proline concentration of pre-culture medium and application of ABA on donor plants on post-freeze recovery of potato meristems

M.Jafarzadeh Kenarsari,
The Previous Ph.D, Student in Agronomy, Science& Research Unit, I. A. Univ., Tehran.
R. Zarghami
Scientific member and Research Prof., Biotechnoloy Research Institute, Karadj, Iran, respectively
J. Mozaffari
Scientific member, Plant Genetic Resources Section, Seed and Plant Improvement Institute, Karadj, Iran
G. Noormohammadi
Prof., Dept. of Agron. College of Ag. and Natural Resources, Science & Research Branch, I. A. Univ., Tehran, Iran.
E. Majidi heravan
Scientific member and Research Prof., Biotechnoloy Research Institute, Karadj, Iran, respectively

Abstract:
At present, cryopreservation applies for long-term storage of plant genetic resources. Optimizing of each protocol for any accession depends on optimizing each of its several stages. One of the most important of these steps is pre-culture which plant materials acclimate to desiccation stress. Duration of this stage and components of pre-culture medium and also application of ABA on donor plants (before the step) were studied. Results showed that recovery percentage decreased by increasing the duration (from 1 to 1.5 days) of this stage. The best concentration of proline in the pre-culture medium of potato shoot tips was 5 g/l. Application of ABA on donor plants had no significant effects on recovery percentage but had interactions with other factors.

Keywords: Cryopreservation, Pre-culture period, Proline, ABA.

Archive of SID

www.SID.ir