بررسی روشهای مختلف تکثیر دو گونه مرتعی از سرده *Aeluropus* در شرایط کنترل شده

خدیجه رضوی[۱و۲] ، محمدعلی ملبوبی[۱] ، صادق فرهی آشتیانی[۲] ، فائزه قناتی[۲] ، ساسان محسن زاده[۱،۲]

[۱]پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فنآوری ، تهران

[۲]دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تهران

چکیده

گیاهان بیابانی ایران با شرایط زیستی دشوار این مناطق طی سالیان متمادی سازگاری یافته اند . در نتیجه دارای پتانسیل ژنتیکی وسیعی جهت تحمل تنشهای غیر زیستی از جمله شوری و خشکی هستند . از جمله گیاهان این منطقه می توان از سرده *Aeluropus* نام برد که از خویشاوندان نزدیک گندم است. در این پژوهش، شرایط متفاوت کشت دو گونه *A. lagopoides* و *A. littoralis* به روشهای کشت بذر، تکثیر رویشی گیاه و کشت هیدروپونیک، و نیز استفاده از تیمارهای هورمونی مناسب برای کشت کالوس، کشت تعلیقی و باززایی گیاهان مزبور در شرایط درون شیشه ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تکثیر از طریق استولون یکی از مناسب ترین روشهای تکثیر رویشی برای این دو گونه است. همچنین با استفاده از غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر اکسین و ۱ تا ۲ میلی گرم بر لیتر از سیتوکینین می توان بیشترین در صد کالوس زایی را از جداکشتهای نوک ریشه القا نمود. کالوسهای کوچک و شکننده شیری رنگ برای ایجاد کشت تعلیقی گیاهان مذکور استفاده شد. در عمل برای ایجاد کالوسهای جنین زا از کشت تعلیقی، ترکیبی از هورمونهای کینتین و اکسین مناسب بود. از این تجربیات می توان در آینده برای بررسیهای مولکولی پاسخ گیاه به تنشهای شوری و خشکی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: *Aeluropus* ، تکثیر رویشی، کشت بافت، کشت تعلیقی

مقدمه

اعضا تیره Poaceae از رده تک لپه ایها بعنوان گیاهان متحمل به تنشهای محیطی شناخته شده اند. *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. و *Aeluropus lagopoides* (L) Trin. Ex Thw دو گونه علفی از خویشاوندان گندم هستند که به سرده *Aeluropus* از طایفه Clorideae تعلق دارند. این گیاهان چندساله هستند و در حواشی دریاچه های نمک، سواحل و مصب رودخانه ها و نهرهای شور و مردابها می رویند (۲). این گیاهان نمک را توسط غدد نمکی به خارج ترشح می کنند و بدین ترتیب شوری تا ۱٪ را بخوبی تحمل می نمایند (۱۲). بعلاوه، فتوسنتز در این گیاهان از نوع متابولیسم C٤ است که به آنها انعطاف پذیری بیشتری را در برابر تنشهای خشکی و شوری می دهد.

با توجه به تحمل شرایط محیطی دشوار، این گیاهان واجد خصوصیات فیزیولوژیک و مولکولی برجسته ای هستند که کاربرد آنها در کشاورزی مهم می باشد. بعنوان مثال، Wei و همکاران (۳۰) با استفاده از روش دورگ گیری سوماتیک نامتقارن، انتقال صفت تحمل به شوری از *A. littoralis* به گندم نان را گزارش نموده اند. این یافته نشان می دهد که امکان انتقال صفات مطلوب از خویشاوندان وحشی به واریته های زراعی وجود دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

برای پی بردن به ویژگیهای فیزیولوژیکی و مولکولی این گیاهان و شناسایی ژنهای ارزشمند آنها، تکثیر و عادت دادن آنها به رشد در شرایط کنترل شده درون شیشه ای و گلخانه ای ضروری می باشد. اکثر پژوهشگران برای این منظور به روشهای کشت بافت روی آورده اند. از جمله، کشت بافت گیاه *Spartina patens* (Aiton) Muhl برای مطالعه مکانیسمهای تحمل به شوری استفاده شده است (۳۱ و ۳۲).

علاوه بر آن، ایجاد کشتهای تعلیقی یا کشتهای کالوس با کیفیت خوب و باززایی گیاهان پیش شرط لازم برای انتخاب دودمانهای سوموکلونال و یا انتقال ژنهای مطلوب به علفها محسوب می گردد. همچنین، برخی از گونه های باتلاقهای شور همچون *Spartina* Spp. و *Spartina patens* (۱۳)، *Sporobolus virginicus* (۲٤)، *Distichlis spicata* (۲۳)، *Typha latifolia* L. (۱۹)، *Juncus accuminatus* Michaux. (۲۱)، *Phragmites australis* (۲۰ و۲۲)، و *Kosteletzkya virginica* L (٦) قبلاً تحت بررسیهای مربوط به کشت بافت قرارگرفته، و گیاهانی نیز از این راه باززایی شده اند.

عوامل متعددی کشت بافت، بخصوص تشکیل کالوسهای جنین زا و باززایی گیاه جدید از کالوس را تحت تأثیر قرار می دهند. از جمله این عوامل می توان به ژنوتیپ، نوع جداکشت، نوع محیط کشت ، ترکیبات مغذی آن و وجود هورمونهای گیاهی اشاره کرد (۳). بر اساس اطلاعات موجود، نحوه القا کالوس جنین زا و باززایی در بسیاری از جداکشتهای گونه های علفی خویشاوند در گندم (۱۸ ، ۳۳ و ۳۵) ، جو (۹ و ۱۱) و ذرت (۷) مورد بررسی قرار گرفته است. بر خلاف خویشاوندان زراعی، گیاهان *Aeluropus* دارای ریزوم و استولون می باشند و می توانند در طبیعت هم تکثیر رویشی و هم تکثیر زایشی داشته باشند. بنابراین، علاوه بر روشهای کشت بافت، تکثیر رویشی این گیاهان نیز قابل تأمل است. با توجه به اینکه تا کنون گزارشی مبنی بر کشت و تکثیر گیاه *A. lagopoides* در شرایط آزمایشگاهی ارایه نشده است، هدف این پژوهش، بررسی امکان تکثیر گیاهان *Aeluropus* بصورتهای مختلف بوده است تا: الف) با استفاده از بخشهای رویشی تکثیر غیرجنسی انجام گیرد؛ ب) ایجاد کالوس جنین زا و در نهایت باززایی گیاه از کالوس مورد مطالعه قرار گیرد، و پ) سامانه ساده کشت بافتی برای اعمال تیمارهای شوری و خشکی ایجاد شود. نتایج حاصل می تواند در ایجاد گیاهان با ژنوتیپ یکسان تحت تیمارهای تکرار پذیر برای مطالعات مولکولی بعدی بکار رود.

مواد و روشها

تهیه نمونه : بذور *A. lagopoides* و *A. littoralis* از حواشی رودخانه قندی آباد کاشان که درنواحی مرکزی ایران واقع شده است، در سال ۱۳۸۲ جمع آوری گردید. طول جغرافیایی منطقه "۲۵ ، °۳٤ و عرض آن"۱۵ ، ° ۵۳ می باشد و از سطح دریا ۱۲۰۹ متر ارتفاع دارد. میانگین بارش باران در این منطقه ۹۰ میلی متر است.

کشت گلدانی: بدین منظور بذرها بین دو قطعه کاغذ واتمن خیس قرار داده شد تا جوانه بزنند. پس از جوانه زنی بذرها، دانه رستها به گلدانهای دارای ورمیکولیت، خاک برگ و خاک با نسبت حجمی ۱:۱:۱ منتقل شد. پس از رشد کافی و برای تکثیر رویشی، استولونهای دارای چندین گره به فاصله ۵ سانتیمتر به نحوی بریده شدند که در هر قطعه حداقل یک گره موجود باشد. سپس قطعات مذکور بر روی خاک منتقل شدند تا گیاه جدید از هر گره بروید. گلدانها در گلخانه ای با دوره نوری ١٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی، با دمای کمینه ۱۵°Cو بیشینه ۳۰°C و با رطوبت نسبی ٦۰ ٪ قرار داده شدند. آبیاری گیاهان هر روز و بمدت شش ماه انجام گرفت (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

کشت هیدروپونیک: بذرها در محلول دارای سدیم هیپوکلریت تجاری ۳ ٪، و تریتون ۱۰ ٪ بمدت ۱۰ دقیقه سترون شدند و سپس ۱۰-۵ بار با آب مقطر سترون شستشوداده شدند. آن گاه بذرهای سترون بر روی مشهای (توریهای فلزی با سوراخهای کوچک که در ابعاد تقریبی ۱×۱ سانتیمتر بریده می شوند) واقع بر محیط کشت MS (۱۵) کشت داده شدند. پلیتها بمدت دو روز در سردخانه (٤°C) و تاریکی قرار گرفتند. سپس به گلخانه ای با دمای ۲۵°C-۲۰ و دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. پس از ۲۱ روز و ظهور ٤-۳ برگ، مشهای حاوی دانه رستها به ارلنهای ۱۰۰ میلی لیتری دارای ۱۰-۵ میلی لیتر از محیط کشت با نصف املاح MS منتقل شدند. ارلنها بر روی شیکر با ۸۰- ۷۰ دور در دقیقه و در گلخانه با شرایط بالا قرارگرفتند. هر سه روز محیط داخل ارلنها با محیط جدید تعویض گردید(١٤).

تشکیل کالوس جنین زا و باززایی گیاه از آن: پس از سترون نمودن به روش فوق، بذرها در محیط MS پایه جامد کشت داده شدند. پلیتها تا زمان ظهور ریشه چه و بخش هوایی در گلخانه و با شرایط ۱۸ ساعت روشنایی، ٦ ساعت تاریکی و دمای ۲۵°C-۲۰ قرار داده شدند. ۲ تا ٤ میلی متر از بخش های مختلف رویشی گیاهان ۲۱ روزه شامل برگها و ریشه، بر روی محیط MS جامد و دارای ترکیب های تلفیقی از هورمونهای گیاهی اکسین و سیتوکینین منتقل شدند. در هر پتری دیش ۵ الی ۱۰ قطعه از بخشهای مختلف برگ و ریشه قرار داده شد. تیمارهای هورمونی شامل همه ترکیبات تلفیقی ممکن صفر، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D و BAP بود (جدول ۱). برای هر تیمار ۵ تکرار و با طرح آماری بلوکهای کاملاً تصادفی انجام شد. کالوسها هر ۱۵ روز به محیط MS جامد تازه و دارای همان تیمار هورمونی منتقل می شدند. تعداد کالوسها پس از یک ماه از شروع کشت بافت شمارش گردید. کشت در همین محیط برای باززایی ادامه یافت. داده های بدست آمده توسط نرم افزار MSTATC (version 1.42 دانشکاه میشیگان) با روش ANOVA تجزیه وتحلیل واریانس شد. مقایسه میانگین به روش آزمون دانکن در سطح $P<0.05$ انجام گرفت.

کشت تعلیقی جنین زا و باززایی گیاه جدید از آن: پس از ۳۰ تا ٤۰ روز از شروع کشت بافت، کالوسهای حاصل از کشت بافت *A. lagopoides* و *A. littoralis* به محیط مایع MS دارای اکسین منتقل شد. کشتها بر روی شیکر با حرکت دورانی (۹۰-۸۰ دور در دقیقه) و با دمای محیط ۲۵°C-۲۰ و در تاریکی قرار گرفت. هر ۷ روز یک بار واکشت انجام و به دنبال آن پس از تشکیل توده های کوچک سلولی ، واکشت هر ۱۵ روز انجام می گرفت. برای باززایی، توده های سلولی تشکیل شده در محیط مایع به محیط جامد MS دارای ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۳ میلی گرم بر لیتر کینتین منتقل شدند. گیاهچه های ایجاد شده، ابتدا بر روی محیط جامد MS با نصف غلظت و فاقد هورمون قرار گرفتند تا ریشه آنها توسعه یابد. سپس بر روی محیط جامد MS دارای ۲ میلی گرم بر لیتر هورمون کینتین منتقل شدند تا رشد آنها تسریع شود.

نتایج

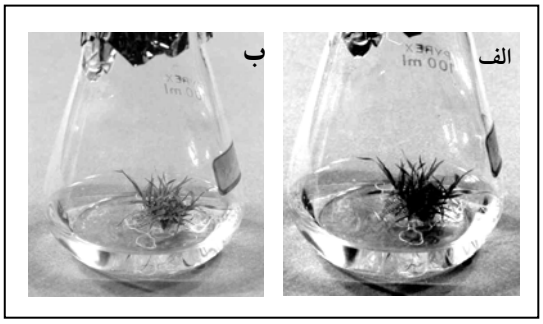
تکثیر رویشی: بذرهای جمع آوری شده *A. lagopoides* در خاک با میزان رطوبت ٦۰٪ جوانه زدند و دانه رستها بخوبی در گلدان ودر شرایط گلخانه رشد نمودند. تکثیر رویشی گیاهان از طریق قطعات استولون دارای گره نیز موفقیت آمیز بود (شکل ۱). جالب آنکه در عرض کمتر از ۱۲ ساعت پس از قرار دادن قطعات استولون در آب ویا خاک مرطوب ریشه در محل گره ها ظاهر می گردید. بدین ترتیب، به آسانی از قطعات استولون گیاهانی با ژنوتیپ همسان بوجود آمد که می

Archive of SID
www.SID.ir

توان از آن جهت بررسی اثر شرایط محیطی مختلف استفاده نمود.

شکل ۱- کشت گلدانی *A. lagopoides* در گلخانه که از طریق رویشی تکثیر یافته اند.

کشت هیدروپونیک: در بررسیهای سترون سازی بذرهای *A. lagopoides* و *A. littoralis*، محلول سفید کننده (وایتکس) و تریتون بخوبی برای سترون سازی سطحی بکار رفت (نتایج مربوط به سایر روشهای سترون سازی در این مقاله گنجانده نشده است). گیاهانی که بر روی مش ایجاد شده بودند، روی محیط کشت MS جامد بخوبی رشد کردند و با شرایط کشت بر روی محیط مایع نیز سازگاری نشان دادند. با تعویض محیط کشت هر سه روز یک بار، گیاهان تا حداقل ۲۱ روز در شرایط هیدروپونیک به رشد خود ادامه دادند (شکل ۲).با توجه به تجربه مذکور، می توان از این روش برای بررسی پاسخ گیاه به شرایط محیطی مختلف از جمله تنش شوری، تغییر میزان مواد تغذیه ای وحتی خشکی استفاده کرد.



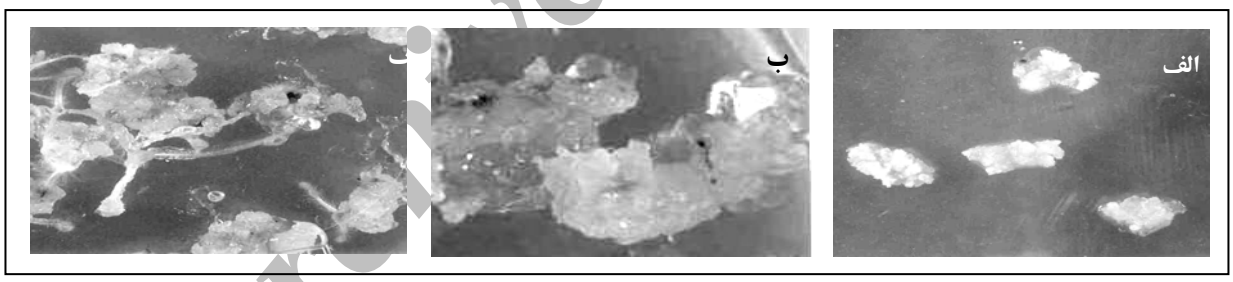
شکل ۲- کشت هیدروپونیک: الف) *A. lagopoides*، ب) *A. littoralis*.

کشت کالوسهای جنین زا: در این پژوهش، جدا کشت کلیه بخشهای هوایی و ریشه ای دانه رستهای هر دو گونه *Aeluropus* بمنظور کالوس زایی مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نوک ریشه ها قابلیت تشکیل کالوس را دارند (قسمت الف شکلهای ۳ و ٤). کالوس پس از ۱۰ روز از شروع کشت، تشکیل شد. پس از چهل روز از آغاز کشت بافت، کالوس های جنین زا بیشتر قسمت های متراکم کالوس را پوشاندند (قسمتهای ب شکل های ۳ و٤). در جدول ۱، ترکیبهایی از هورمونهای گیاهی اکسین و سیتوکینین با بالاترین میزان ایجاد کالوس دیده می شوند. اگر چه نقش اکسین در این مورد بسیار برجسته تر است، بالاترین فراوانی تشکیل کالوس جنین زا در گونه *A. littoralis* بترتیب با مقادیر ۲ و ۱ میلی گرم بر لیتر اکسین و سیتوکنین (BAP) بدست آمد. در مقایسه، تأثیر سیتوکنین بر افزایش میزان کالوس زائی گونه *A. lagopoides* کمتر بود. بطوری که مقادیر فوق و یا مقادیر مساوی (۲ میلی گرم در لیتر) دو هورمون اثر افزاینده داشتند (جدول ۱). البته بهترین باززایی بترتیب در محیط کشت واجد مقادیر ۲ و ۱ میلی گرم بر لیتر اکسین و سیتوکنین بدست آمد (قسمتهای پ شکل های ۳ و٤).

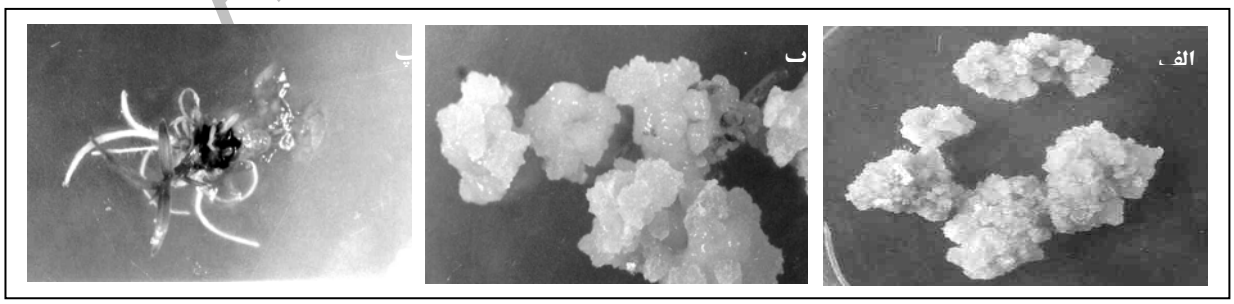
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- میزان کالوس زایی در حضور دو هورمون 2,4-D و BAP در دو گونه از *Aeluropus* اعداد مندرج در دو ستون آخر، میانگین در صد تعداد کالوس بر تعداد جداکشت در ۵ تکرار می باشد. انحراف معیارها بصورت ± در کنار اعداد ذکر شده است. حروف بزرگ غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در بین تیمارهای مختلف در سطح ۰/۰۵ می باشد. گروه بندی میانگینهای درصد کالوس زائی با روش آزمون دانکن انجام شده است.

شماره تیمار	تیمار		درصد کالوس	درصد کالوس
	BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l)	*A. lagopoides*	*A. littoralis*
۱	۰	۰	۰ F	۰ F
۲	۰	۱	۷۳/٤±۱۱/۵ D	٦۷/٦٦±٤/٦۳ D
۳	۰	۲	۸۰/۰±۰ C	۷۸/٤±۲/۸۹ C
٤	۱	۰	۰ F	۰ F
۵	۲	۰	۱۳/٤±۲۳/۰۹ E	٦/٦۷±۱۱/۵ E
٦	۱	۱	۷۳/۳۳±۱۱/۵ D	۷٦/٦۷±۲۵/۱۷ C
۷	۱	۲	۱۰۰±۰ A	۱۰۰±۰ A
۸	۲	۲	۱۰۰±۰ A	۸۸/٦۷±۱۰/۲٦ B
۹	۲	۱	۹۳/٤±۱۱/۵ B	۹۳/٤±۱۱/۵ B



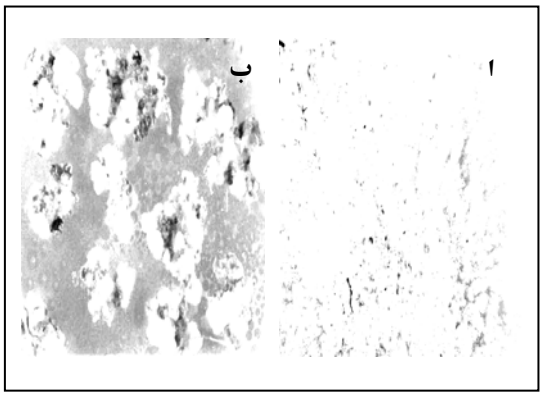
شکل ۳- الف) تشکیل کالوس از بافت نوک ریشه *A. littoralis*، ب) تشکیل کالوسهای جنین زا از کشت بافت نوک ریشه *A. littoralis*، پ) گیاهچه باز زایی شده *A. littoralis* از کالوسهای جنین زا.



شکل ٤- الف) تشکیل کالوس از بافت نوک ریشه *A. lagopoides*، ب) تشکیل کالوسهای جنین زا از کشت بافت نوک ریشه *A. lagopoides*، پ) گیاهچه باز زایی شده *A. lagopoides* از کالوسهای جنین زا.

Archive of SID
www.SID.ir

کشت تعلیقی و باززایی گیاه از کالوس: کالوسهای به دست آمده از کشت بافت *A. lagopoides* و *A. littoralis* به محیط MS مایع حاوی ۱/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D منتقل و در تاریکی با سرعت ۹۰-۸۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. انتخاب کالوس مناسب برای شروع کشت تعلیقی بسیار مهم است. پس از حدود دو هفته کالوسهای موجود در محیط مایع را می توان به دو دسته کالوسهای کوچک فشرده ولی شکننده و شیری رنگ و کالوسهای بزرگ و سخت و پررنگ تر تقسیم نمود. پس از یک ماه از شروع کشت تعلیقی کالوسهای کوچک تر و شیری رنگ به رشد سریع خود ادامه می دادند. بنابراین، این توده های کوچک برای واکشت انتخاب شدند. پس از حدود دو ماه، این توده های سلولی برای بررسی توان باززایی مورد آزمایش قرار گرفتند. در این مرحله کالوسها به محیط MS جامد منتقل شده پس از یک هفته تا ده روز بر روی محیط MS دارای 2,4-D (۱ mg/l) و کینتین (۳ mg/l) واکشت شدند ودر دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای C ° ۲۵-۲۰ قرار گرفتند. پس از یک هفته تا ده روز بر روی تعداد زیادی از کالوسها ساختارهای جنین زا ظاهر شدند (شکل ۵).



شکل ۵- الف) تشکیل توده های کوچک و متراکم از کشت تعلیقی در *A. littoralis*، ب) کالوسهای جنین زا و باززایی شده در کشت تعلیقی *A. lagopoides*.

بحث

دو گونه ی مورد مطالعه در این تحقیق ، از گیاهان اصلی اکوسیستمهای نواحی باتلاقی با آب شور محسوب می شوند. این دو گونه بعنوان گیاهان مرتعی و همچنین گیاهان تثبیت کننده شنهای روان شناخته شده اند (۱ و ۲٦). توانایی تحمل و بقای این گیاهان در شرایط بسیار نامساعد محیطی، آنها را برای بررسیهای فیزیولوژیک و مولکولی پاسخ گیاهان در برابر تنشها مناسب ساخته است. در این مطالعه سازگاری این گیاهان به شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای و امکان تکثیر آنها به روشهای مختلف مورد بررسی قرار گرفته است.

در این دو گونه، همچون سایر علفها از جداکشتهای مربوط به بخشهای رویشی (برگها و ریشه) برای کشت بافت استفاده شد. لزوم وجود هورمونهای اکسینی مثل 2,4-D برای شروع کالوس زایی در سایر گونه های علفی هم مشاهده شده است (۸ ، ۱۷ ، ۲۵ و۳٤). در سایر گونه های علفی (۵ ، ۱۰ و۲۷)، استفاده از مقادیر اندک سیتوکینین (BAP) در محیط کشت بافت توصیه شده است. همان گونه که از جدول ۱ استنباط می شود، BAP کیفیت کالوسها را بهتر می نماید و توان باززایی را افزایش می دهد. با توجه به نتایج بنظر می رسد حداقل غلظت لازم از BAP برای ایجاد حداکثر تعداد کالوسها ۱/۲ و یا برابر غلظت لازم از اکسین است. همچنین بنظر می رسد در مقادیر مساوی از هورمون اکسین القا کالوس زایی، در گونه *A. lagopoides* بیشتر از *A. littoralis* می باشد. بطور خاص، تأثیر تلفیقی از دو هورمون گیاهی اکسین و سیتوکینین در افزایش توان باززایی جنینهای *Paspalum* (از جنسهای بسیار نزدیک به *Aeluropus*) نیز نشان داده شده است (٤) .

از مدتها پیش، استفاده از بافتهای مریستمی برای کشت بافت و ایجاد کالوس جنین زا در علفهای مرتعی توصیه شده است (۲۹). در این بررسی نشان داده شد که در

Archive of SID
www.SID.ir

حضور مقادیر مساوی از اکسین و سیتوکینین، استعداد بافتهای مریستمی نوک ریشه برای کالوس زایی بیشتر است. همچنین، برخلاف سایر علفهای مناطق شور، در این دو گونه از نوک ریشه ها کالوس و کالوسهای جنین زا ایجاد شدند. احتمالاً بعلت تمایز یافتگی فیزیولوژیکی سایر بخشهای رویشی و نیز تفاوت در محتوای هورمونی بافتها چنین اختلافی در قدرت کالوس زایی دیده می شود(۲٤). با این وجود، برای بررسیهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و حذف اثر تمایز، کشتهای تعلیقی مناسب تر از کالوسهای رشد کرده بر روی محیط جامد می باشند. زیرا از این طریق سیستم تغذیه ای یکنواخت تری بدست می آید و سلولها وارد مراحل تکوینی نمی شوند (۱٦). با وجود گزارشهای زیادی که از دشواری حفظ توان باززایی در کشت تعلیقی گرامینه ها خبر داده اند (۲۸)، در عمل، باززایی از کشت تعلیقی هر دو گونه *Aeluropus* ، در حضور هورمون اکسین و کینتین بخوبی صورت گرفت (شکل ٥). با این حال، بهینه سازی شرایط باززایی از این نوع کشت مستلزم تحقیق بیشتر است.

روش کشت هیدروپونیک که توسط ملبوبی و همکاران (۱۹۹۷) گزارش شده بود، نیز برای کشت بذر گیاهان *A. lagopoides* و *A. littoralis* در محیط مایع استفاده شد. با توجه به آزمایشهای انجام گرفته معلوم گردید که هر دو گیاه را می توان بمدت طولانی در شرایط هیدروپونیک نگه داری نمود. با توجه به اینکه در این روش مواد غذایی بصورت مایع در اختیار گیاه قرار می گیرد، پس اعمال برخی از تنشهای تغذیه ای حتی در دوره های طولانی بر روی گیاهچه کامل امکان پذیر می شود.

از پژوهش حاضر می توان نتیجه گرفت که تولید مثل رویشی از طریق استولون بهترین روش برای تکثیر می باشد. از آن گذشته، تکثیر این دو گونه از طریق کالوس و کشت تعلیقی راهی آسان را برای تحقیقات مولکولی آینده فراهم می سازد. در ادامه این پژوهش، از هر دو نوع روش کشت برای بررسی تأثیر خشکی و شوری بر شاخصهای فیزیولوژیکی و مولکولی استفاده می شود.

سپاسگزاری: این پژوهش با استفاده از بودجه طرحهای تحقیقاتی مصوب آکادمی علوم جهان سوم (TWAS) به شماره 99-269-RG/BIO/AS و مصوب پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به شماره های ۱۵۷ و ۱۵۸ انجام شده است که بدین وسیله قدردانی می گردد.

منابع

1. Abarsaji, GA (2000) Identification and investigation on some of ecophysiologic characteristics of *Aeluropus spp*. In saline and alkaline rangelands in the north of gorgan. Pajouhesh-Va-Sazandegi **46**: 21-25.
2. Akhani, H, and M Ghorbanli (1993) A contribution to the halophytic vegetation and flora of Iran. Towards the rational use of high salinity tolerant plants **1**: 35-44.
3. Bhaskaran, S, and R Smith (1990) Regeneration in cereal tissue culture: A review. Crop Sci **30**: 1328-1336.
4. Bove, OA, and LA Mroginsky (1985) Tissue culture in *Paspalum* (Gramineae): Plant regeneration from cultured inflorescences. J Plant Physiol **124**: 481-492.
5. Chaudhurry, A, and R Qu (1995) Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. Plant Cell Tiss Org Cult **60**: 113-120.
6. Cook, DA, DM Decker, and JL Gallagher (1989) Regeneration of *Kosteletzkya virginica* (L) Presl. Seashore Mallow from callus cultures. Plant Cell Tiss and Org Cult **17**: 111-119.
7. D'Halluin, K, E Bonne, M Bossut, M de Beuckleer, and J Leemans (1992) Transgenic maize plants by tissue electroporation. Plant Cell **4**: 1495-1505.

Archive of SID
www.SID.ir

8. Gawel, NJ, J Robacker, and WL Corley (1990) In vitro propagation of *Miscanthus sinensis* Andress. Hort Sci **25**: 1291-1293.

9. Golds, TJ, J Babczinsky, and HU Koop (1993) Regeneration from intact and sectioned immature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.): The scutellum exhibits an apico-basal gradient of embryogenic capacity. Plant Sci **90**: 211-218.

10. Griffin, JD, and MS Dibble (1995) High-frequency plant regeneration from seed derived callus cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). Plant Cell Rep **14**: 721-724.

11. Huang Chunung, H, YQ Yan, M Zhu, M Yuan, and A Xu (1993) Establishment and characterization of embryogenic cell suspension cultures from immature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell Tiss Org Cult **32**: 19-25.

12. Li, M Y, and Y J Liu (1994) Halophytes of Yellow River delta in North Shandong Province of China. J Qvfu Nomal Univ 125-133.

13. Li, X, DM Seliskar, and JL Gallagher (1995) Plant regeneration from callus cultures of salt marsh hay, *Spartina patens* and its culture-based salt tolerance. Aquatic Botany **51**: 103-113.

14. Malboobi, MA and DD Lefebvre (1997) A phosphate-starvation inducible-beta-glucosidase gene (*psr3.2*) isolated from *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct subfamily of the BGA family. Plant Mol Biol **34**: 57-68.

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

16. Ozawa, K, and Komamine (1989) Establishment of system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension culture of rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet **77**: 205-211.

17. Pareddy, DR, and JF Petolino (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. Plant Sci **67**: 211-219.

18. Redway, FA, V Vasil, and IK Vasil (1990) Characterization and regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryogenic cell suspension cultures. Plant Cell Rep **8**: 714-717.

19. Rogers, SMD, J Beech, and KS Sarma (1998) Shoot regeneration and plant acclimatization of wetland monocot cattail (*Typha latifolia*). Plant Cell Rep **18**: 71-75.

20. Saltman, T, and JL Gallagher (1998) An analysis of *Phragmites* use in municipal sludge drying beds. Ameri J Bot (Abstract) **85**: 40.

21. Sarma, KS, and SMD Rogers (1998) Plant regeneration and multipilication of the emergent wetland monocot *Juncus accuminatus*. Plant Cell Rep **17**: 656-660.

22. Straub, PF, JL Gallagher, and DM Decker (1988) Tissue culture and long-term regeneration of *Phragmites australis* (cav.) Trin. Ex Steud. Plant Cell Tiss and Org Cult **15**: 73-78.

23. Straub, PF, DM Decker, and JL Gallagher (1989) Tissue culture and regeneration of *Distichlis spicata* (Gramineae). Ameri J Bot 76: 1448-1451.

24. Straub, PF, DM Decker, and JL Gallagher (1992) Characterization of tissue culture initiation and regeneration in *Sporobolus virginicus* (Gramineae). Amer J Bot **79**: 1119-1125.

25. Talwar, M, and A Rashid (1990) Factors affecting formation of somatic embryos and embryogenic callus from unemerged inflorescences of a graminaceous crop *Pennisetum*. Ann Bot (London) **66**: 17-21.

26. Tewari A (1970) A note on the value of *Sporobolus caromandelianus* (Trin.) Kunth and *Aeluropus lagopoides* (Linn.) as feed and soil binder. Plant Science **2**: 135-136.

27. van der Valk, p, F Ruis, AM Tettelaar-Schrier, and CM van de Velde (1995) Optimizing plant regeneration from seed-derived callus of kentucky bluegrass: The effect of benzyladenine. Plant Cell Tiss Org Cult **40**: 101-103.

28. Vasil, IK, and V Vasil (1984) Regeneration in cereal and other grass species, in: I.K. Vasil (Ed.), cell culture and somatic genetics of plants. Academic Press, Orlando, Pp. 121-150.

29. Vasil, IK (1988) Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. Bio/Technology **6**: 397-402.

30. Wei, Y, X Guangmin, Z Daying, and C Huimin (2001) Transfer of salt tolerance from *Aeluropus littoralis* sinensis to wheat

Archive of SID

www.SID.ir

(*Triticum aestivum* L.) via asymmetric somatic hybridization. Plant Sci **161**: 259-266.

31. Wu, J, and DM Seliskar (1998) Salinity adaptation of plasma membrane H^+ -ATPase in the salt marsh plant *Spartina patens*: ATP hydrolysis and enzyme kinetics. J Exp Bot **49**: 1005-1013.
32. Wu, J, DM Seliskar, and JL Gallagher (1998) Stress tolerance in the marsh plant *Spartina patens*: Impact of NaCl on growth and root plasma membrane lipid composition. Physiol Plant **102**: 307-317.
33. Yang, YM, DD He, and KJ Scott (1993) Plant regeneration from protoplasts of durum wheat (*Triticum durum* Desf. Cv. D6962). Plant Cell Rep **12**: 320-323.
34. Zhong, H, C Srinivasan, and MB Sticklen (1991) Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bentgrass (*Agrstis palustris* Huds.) Plant Cell Rep **10**: 453-456.
35. Zhong-Yi, L, X Guang-Min, and C Huimin (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplast isolated from embryogenic cell suspensions of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Tiss Org Cult **28**:79-85.

Methods for propagations of two *Aeluropus* species in controlled environments

Razavi K [1,2] , Malboobi M.A[1], Aschtiani S.F [2], Ghanati F [2], and Mohsenzadeh S [1,2]

[1]National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran.

[2] Biology Dept., Faculty of Basic Science, Tarbiat Modarres Univ., Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

The Iranian desert plants have evolved adaptive mechanisms to tolerate harsh environmental conditions throughout the years. As a result, these plants have developed great genetic potential for tolerance toward abiotic stresses such as drought and salinity. One of such plants is genus *Aeluropus* which is an intertrible and native relative of wheat. In this research, plant culture of *A. lagopoides and A. littoralis* in controlled conditions with methods such as seed or vegetative propagation, hydroponic culture as well as suspension and callus cultures and subsequent regenerations were determined. We found that plant reproduction via stolon is the best way for vegetative propagation. In addition, it was shown using 2 mg/l auxin and 1-2 mg/l cytokinin hormones induced the highest embryonic callus formation from root tip explants. The small, fragile and milky calli were selected for establishing suspension culture. A combination of kinetin and auxin treatment induced embryonic culture form the suspension cells. These methodologies would be valuable in upcoming investigations aimed at elucidation of plant molecular responses to salt and drought stresses.

Key words: *Aeluropus* , tissue culture, suspension culture, regeneration

Archive of SID

www.SID.ir