بررسی رویان زایی بدنی و تولید گیاهچه های نوپدید درکلزا (*Brassica napus* L.)

احمد مجد[۱]، فیروزه چمن دوستی*[۲]، صدیقه مهرابیان[۱] و مسعود شیدایی[۳]

[۱]تهران، دانشگاه تربیت معلم، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲]تهران، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور

[۳]تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت ۸٤/٦/۲۷ تاریخ پذیرش:۸٦/۲/۲۷

چکیده

در پژوهش حاضر روشی ساده و تقریباً تک مرحله ای برای رویان زایی پیکری در گیاه کلزا با استفاده از جداکشتهای محور زیر لپه مشخص و گزارش شده است. نتایج آزمایشها نشان داد که جداکشتهای محور زیر لپه ای برای رویان زایی بدنی مناسبتر می باشند. افزایش مقدار ساکارز از ۲۰ تا ٦۰ گرم در لیتر موجب کاهش توان رویان زایی کالوسها می شود. در محیط کشت پایه MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D ، ۲ میلی گرم در لیتر NAA ، ۲ میلی گرم در لیتر BAP ، روی کالوس ساختارهای رویان نما پدیدار شد. پس از به کار گیری غلظتهای متفاوتی از کلرید سدیم (۰، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦، ۷ و ۸ گرم در لیتر)، غلظت ٦ گرم در لیتر آن موجب القای رویان زایی بدنی روی کالوسها گردید. رویانها در این محیطهای کشت جوانه زدند. انتقال نمونه ها به محیطهای حاوی تنها ۱ میلی گرم در لیتر IBA ، موجب تشکیل ریشه شد و واکشت آنها گیاهچه های کاملی را بوجود آورد. گیاهچه های با سازگارسازی تدریجی و منتقل شده از گلدانهای پرلیت دار به گلدانهای دارای خاک معمولی، به رشد و نمو خود ادامه داده و به گیاهانی بالغ و گلدار تبدیل شدند.

واژه های کلیدی: رویان زایی بدنی، کلرید سدیم، کلزا

* نویسنده مسئول، تلفن تماس:٦٦٤۹۸٦٤۸، پست الکترونیک: fchamandoosti@yahoo.com

مقدمه

رویان زایی بدنی از دست آوردهای زیست فنآوری است که در سالهای اخیر بمنظور دستیابی به گیاهان با ویژگیهای ژنتیکی مشخص و تقریباً پایدار، گیاهان هاپلوئید و دی هاپلوئید، تهیه بذر مصنوعی و در مجموع بهینه سازی گیاهان مورد توجه می باشد. این فنآوری در مورد گیاهان استراتژیک از جمله کلزا که در دهه اخیر کشت آن جهت تأمین روغن نباتی و کنجاله مورد نیاز، گسترش سریعی یافته، اهمیت ویژه دارد. گرچه بدست آوردن رویان از کشت ریز هاگ (میکروسپور) گیاه کلزا بوسیله پژوهشگران انجام شده است (۱۰ و ۱۷)، اما در زمینه رویان زایی بدنی از جداکشتهای اندامهای رویشی پژوهشهای بسیار اندکی صورت گرفته است (**۹، ۱۰ و ۱۱**).

یک رویان بدنی از لحاظ مراحل عمومی رویان زایی، جوانه زنی و تولید گیاهچه های نوپدید شبیه به یک رویان تخمی است اما، طی مسیری متفاوت بدون عبور از مرحله لقاح بین دو سلول جنسی نر و ماده تشکیل می شود (۱۹).

بررسی رویان زایی بدنی از جنبه های علمی و عملی فواید بسیاری دارد. ساختارهای رویانی گیاه عموماً در درون بافتهای تغذیه ای پیرامونی خود فرو رفته و مطالعه و دسترسی به آنها مشکل است. از طرفی پدیده رویان زایی تحت تأثیر تنظیمهای ژنتیکی قوی می باشد تا آنجا که حتی

Archive of SID

www.SID.ir

با ایجاد تغییرات زیاد در محیطهای کشت، این تنظیمها اغلب پایدار می مانند. بنابراین می توان از رویان زایی بدنی بعنوان وسیله ای برای مطالعه رویان زایی (تخمی) استفاده کرد. رویان زایی بدنی زمینه ای برای بررسی حفظ بس توانی ژنها در سلولها طی پدیده تمایز است.

باز زایی گیاهان (۵)، ایجاد تنوع رویشی و یا سوماکلونال (۸،۹و۱٤)، بررسی پدیده گزینش در شیشه (In Vitro Selection) (۱۰) و فراهم سازی بستری برای تراریختی گیاهان و انتقال ژنهای کنترل کننده صفات مطلوب در گیاهان از فواید عملی رویان زایی بدنی محسوب می شود (۸ و ۱٤). تولید بذرهای مصنوعی با شرایط مطلوب، عاری از آلودگیهای ویروسی، قارچی و باکتریایی و حفظ دقیق ژرم پلاسم گیاهان از فواید دیگر رویان زایی بدنی است.

گیاه کلزا که متعلق به تیره کلمیان (*Brassicaceae*) می باشد بدلیل داشتن خواص تغذیه ای و روغنهای خوراکی با خواص مناسب همواره مورد توجه بشر بویژه در قرن بیستم و سالهای اخیر بوده است. فنآوری زیستی پیشرفته از دو دیدگاه بر تراریختی گیاه کلزا تأثیر عمده ای دارد. اول آنکه دامنه جدیدی از روشها را معرفی می کند که می توانند با کارائی بالا، به انتخاب برنامه های به نژادی کمک کنند. دیگر آنکه فرای محدودیتهای ژنتیکی موجود فرصتی را برای اصلاح ژرم پلاسم از طریق افزایش تنوع فراهم می سازند. بدلیل تغییر شکل و دگرگونی تقریباً آسان ژنتیکی، دانه های روغنی تیره کلمیان (*Brassicaceae*) از جمله اولین محصولاتی هستند که تحت آزمون دامنه کاملی از روشهای جدید فنآوری زیستی قرار گرفته اند (٤).

در سالهای اخیر پژوهشهای زیادی در زمینه رویان زایی بدنی در گیاهان تیره کلمیان *Brassicacea* در ایران انجام شده که از جمله آنها می توان به تحقیقات باقری کاظم آباد و معینی در ۱۳۷۹ (۱)، حبیبی خانیانی و معینی در ۱۳۸۲ (۲) و شریفی و معینی در ۱۳۸۲ (۳) در زمینه کشت میکروسپورهای ایزوله ارقام مختلف گیاه کلزا و حصول گیاهان هاپلوئید بمنظور تسهیل برنامه های اصلاحی در مورد این گیاه اشاره کرد.

Tian و همکاران در ۲۰۰٤ (۱۷) اظهار کردند که کشت میکروسپور ها و نوپدیدی گیاه کلزا با این روش، بدلیل تبدیل تعداد زیادی از میکروسپورهای تک سلولی و دانه های گرده ای که در شروع مرحله دو سلولی هستند به رویان های بدنی، از روشهای مطلوب برای ریز ازدیادی گیاه کلزا می باشد. این محققان همچنین تأکید دارند که روش فوق طی این تحقیقات تا حد زیادی بهینه سازی شده است.

هدف از پژوهش حاضر شناخت شرایط مناسب و بهینه برای القای رویان زایی بدنی، بلوغ و جوانه زنی رویانها، ایجاد گیاهچه های کامل از رویانهای بدنی در گیاه استراتژیک کلزا و فراهم آوردن زمینه برای تولید بذر مصنوعی این گیاه می باشد. بررسی اثر شوری بر تکوین کالوسها، القای رویان زایی بدنی و تکوین گیاهچه های نوپدید از اهداف دیگر این پژوهش می باشد. بررسیهای مرجع شناسی نشان می دهند که بیشتر پژوهشهای انجام شده در مورد رویان زایی بدنی گیاه کلزا با استفاده از کشت میکروسپورها و دانه های گرده بوده و گیاهچه های حاصل اغلب هاپلوئید بوده اند (۱، ۲، ۳ و ۱۷). این گیاهچه ها در تولید بذر و زادآوری موفقیتی ندارند. بهمین دلیل دستیابی به رویان زایی بدنی گیاه کلزا با استفاده از جداکشتهای پیکری (قطعات ریشه ها و محور های زیر لپه ای) هدف دیگری در پژوهش حاضر است.

مواد و روشها

تهیه جداکشت: بذرهای گیاه کلزا رقم طلایه پس از تهیه از مرکز توسعه و کشت و صنعت دانه های روغنی و انتقال به آزمایشگاه در شرایط سترون اتاقک کشت و با استفاده از وایتکس با ۵ در صد کلر فعال بمدت ۸ دقیقه ضد عفونی شدند و پس از ٤ بار شستشو با آب مقطر سترون

Archive of SID

www.SID.ir

در محیطهای کشت پایه MS (Mourashige and Skoog 1962) (۱۳) بدون مواد تنظیم کننده رشد گیاهی در ظروف ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر از این محیط، کشت شدند. ظروف کشت در شرایط نور دورگی ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و میزان نور تقریباً ۲۰۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه نگهداری شدند. پس از گذشت ۷ روز، ریشه ها و محور زیر لپه دانه رستهای سترون حاصل به قطعات ۵ تا ٦ میلیمتری تقسیم و بعنوان جداکشت استفاده شد.

محیط های کشت و شرایط کشت: آزمایشها با استفاده از محیطهای کشت پایه $\frac{1}{2}$MS، دارای ۱۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱۰ گرم در لیتر آگار برای کشت بذرها و تهیه دانه رستهای سترون و محیطهای کشت پایه MS، $\frac{1}{2}$MS و B5 (Gamborg et al., 1986) (۷) دارای ۲۰ تا ٦۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱۰ گرم در لیتر آگار با غلظتهای متفاوتی از اکسینها (2,4-D ، NAA و IBA) ، سیتوکینین (BAP)، و کلرید سدیم (NaCl) مطابق مقادیر مشخص شده در جدول شماره یک برای القای رویان زایی بدنی، بلوغ و جوانه زنی رویانها، ریشه دار کردن ساقه های حاصل از جوانه زنی رویانها و ایجاد گیاهچه های کامل از رویانها انجام شد. شاهد حاوی محیط کشت پایه MS بدون هورمون می باشد. pH محیطهای کشت قبل از اتوکلاو و با استفاده از سود یک نرمال و کلریدریک اسید یک نرمال در حد ۵/۸ تنظیم شد. تمام کشتها در دمای ۲±۲٤ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. کشتها در مرحله القای رویان زایی و بلوغ رویان در تاریکی و در مرحله رویش رویان و ایجاد گیاهچه در نور با شدت ۲۰۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه و نور دورگی ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شد.

انتقال گیاهچه های حاصل از رویش رویانها به خاک: گیاهچه های حاصل از رویانهای بدنی در شرایط سترون از درون ظروف کشت خارج، و پس از شستشوی محیط اطراف ریشه با آب مقطر سترون به درون پرلیت سترون منتقل و در شرایط کاملاً مرطوب در زیر پوششهای پلاستیکی نگهداری شد. گیاهچه ها طی مدت یک هفته با سوراخ کردن تدریجی در پوش آنها مرحله سازش را طی کرده و با محیط خشکی سازگار شدند. انتقال گیاهچه ها به گلدانهای دارای خاک معمولی سترون (اتوکلاو شده) انجام شد. گیاهان مرحله رویشی را با موفقیت گذراندند.

د: بررسی آماری: آزمایشها بر پایه طرح کاملاً تصادفی تنظیم و برای هر آزمایش حداقل ۳ تکرار (سه ظرف محیط کشت و در هر ظرف حداقل ۹ جداکشت) در نظر گرفته شد. مشاهدات بر مبنای تعداد رویانهای بدنی بر روی هر جداکشت تنظیم شد. داده ها با استفاده نرم افزار SPSS (Version 11) و نیز با آزمون دانکن (تستANOVA) گروهبندی شد.

نتایج و بحث

بررسی مقایسه ای نتایج حاصل از کشت جداکشتهای سترون ریشه ای و محور زیر لپه دانه رست های ۷ روزه کلزا نشان داد که قطعات محور زیر لپه توان تولید کالوسهای رویانزای بهتری را دارند، نتایج این آزمایشها در جدول ۱ آورده شده است. پس از گذشت حدود ۳ هفته از کشت قطعات محور زیر لپه، کال زایی از نمونه ها آغاز شد. نمونه ها در محیطهای فاقد کلرید سدیم توان رویان زایی قابل توجهی نشان نداده و تنها بر روی برخی از آنها به تعداد کم رویانهای بدنی ایجاد شد (شکل ۱). بررسیهای دقیق میکروسکوپی و برش گیری از کالوسها وجود رویانهای گویچه ای را تأیید کرد. افزایش مقدار ساکارز از ۲۰ تا ٦۰ (۲۰، ۳۰، ٤۵ و ٦۰) گرم در لیتر موجب رشد کمتر کالوسها و کاهش توان رویان زایی آنها شد. جداکشتهای محور زیر لپه ای، کشت شده در محیطهای دارای مقادیر متفاوت از کلرید سدیم (جدول ۱) پس از کالزایی (حدود ۳ هفته پس از کشت) بسرعت و درحالی که اندازه کالوسها هنوز کوچک بود (۵–۸ میلی متر مکعب)

Archive of SID

www.SID.ir

رویانهای نوپدید را ایجاد کردند. با گذشت حدود ۲ تا ۳ هفته پس از آن رویان زایی شدت گرفت و بر تعداد رویانهای روی کالوس رویان زا افزوده، و مراحل مختلفی از رویان زایی (رویانهای گویچه ای، قلبی شکل تا اژدری) بر روی کالوس ها تشخیص داده شد (شکلهای ۲ تا ٦).

جدول ۱- تأثیر مواد تنظیم کننده رشد گیاهی و کلرید سدیم بر رویان زایی پیکری گیاه گلزا

Concentrations				
2,4-D	NAA	BAP	NaCl	Average number of Somatic Embryos per explants
$mg1^{-1}$	$mg1^{-1}$	$mg1^{-1}$	$g1^{-1}$	
1	1	2	0	18.5 ± 12.05^{hgf}
1	1	2	2	26.5 ± 12.05^{hgf}
1	1	2	3	26.75 ± 12.06^{hgf}
1	1	2	4	49 ± 12.06^{abcd}
1	1	2	5	42.25 ± 12.06^{bcdef}
1	1	2	6	69 ± 12.06^{a}
1	1	2	7	62.5 ± 12.06^{ab}
1	1	2	8	53.5 ± 12.05^{cdefg}
1	2	2	0	44 ± 12.06^{cdef}
1	2	2	2	42.5 ± 12.06^{cdef}
1	2	2	3	$49.5 \pm 12.06c^{abcde}$
1	2	2	4	43 ± 12.06^{bcdeff}
1	2	2	5	47.25 ± 12.06^{abcd}
1	2	2	6	43.75 ± 12.06^{bcde}
1	2	2	7	41 ± 12.05^{bcdef}
1	2	2	8	37.75 ± 12.06^{cdefg}
2	2	2	0	24.8 ± 12.06^{fgh}
2	2	2	2	24.5 ± 12.06^{hgf}
2	2	2	3	31.25 ± 12.06^{efg}
2	2	2	4	38 ± 12.06^{cdef}
2	2	2	5	38.75 ± 12.06^{defg}
2	2	2	6	33.2 ± 12.06^{defg}
2	2	2	7	34 ± 12.06^{cdefg}
2	2	2	8	39 ± 12.05^{cde}

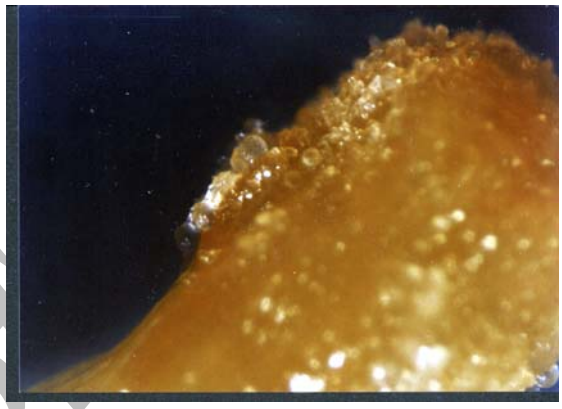
محیطهای کشت پایه عبارت بودند از محیط کشت پایه MS (Mourashig and Skoog 1962) دارای ۲۰ گرم در لیتر ساکارز، ۱۰ گرم در لیترآگار آگار که pH آنها قبل از اتوکلاو در حد ۵/۸ تنظیم شد. کشتها در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بمنظور القای رویان زایی قرار گرفت. بین تیمارها و تکرارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده اند اختلاف معنی دارای در حد $P<0.01$ وجود ندارد.

Kirti و همکاران در سال های ۱۹۸۹ و ۱۹۹۱ (۱۰ و ۹) و Koh (۱۱) و همکاران نیز درسال ۲۰۰۰ با انجام پژوهشهایی در مورد رویان زایی بدنی گیاه کلزا قطعات محور زیر لپه دانه رستهای جوان را برای این منظور مناسب دانستند که با نتایج آزمایشهای این پژوهش بر روی رقم طلایه کلزا مشابه است. کاهش توان رویان زایی بدنی با افزایش مقدار ساکارز در این تحقیق با نتایج پژوهشهای Kirti و Chopra درسال ۱۹۸۹ (۱۰) مطابقت دارد. مقادیر زیاد ساکارز می تواند با تأثیر بر مقدار جذب آب، تغییر فشار اسمزی محیط کشت و سلولها موجب تغییر مقدار جذب آب و مواد محلول موجود در محیط گردد. این تغییرات می توانند هم سبب بر هم زدن توازن متابولیکی رویان و هم تغییر در عملکرد آنزیمها باشد (یکی از شرایط عمل آنزیمها وجود رطوبت مناسب است). مجموعه این تغییرات می تواند دلیل کاهش فعالیتهای رویان زایی باشد. بیشترین رویان زایی و بلوغ رویانهای بدنی در محیط کشت

Archive of SID

www.SID.ir

MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D ، ۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم درلیتر BAP همراه با ٦ گرم در لیتر (٦۹±۱۲/۰۲) کلرید سدیم مشاهده شد. این نتیجه اولین گزارش در مورد نقش کلرید سدیم در القای رویان زایی بدنی در گیاه کلزاست که از نظر توازن هورمونی و نوع هورمونهای مورد استفاده، با پژوهشهای Kirti و Chopra در سال ۱۹۸۹ (۱۰) در گیاه *Brassica juncea* همسویی دارد.



شکل ۱: رویان نماها ویا رویانهای حاصل از کشت قطعات محور زیر لپه در محیط کشت MS دارای ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D، ۱ میلی گرم در لیتر NAA، ۲ میلی گرم در لیتر BAP (فاقد NaCl).

شکل ۲: رویانهای بدنی گویچه ای حاصل از کشت قطعات محور زیر لپه در محیط کشت MS دارای ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D، ۲ میلی گرم در لیتر NAA، ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۵ گرم در لیتر NaCl.

شکل ۳: رویانهای بدنی قلبی شکل حاصل از کشت قطعات محور زیر لپه در محیط کشت MS دارای ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D، ۱ میلی گرم در لیتر NAA، ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۵ گرم در لیتر NaCl.

شکل ٤: رویانهای بدنی قلبی پیشرفته حاصل از کشت قطعات محور زیر لپه در محیط کشت MS دارای ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D، ۱ میلی گرم در لیتر NAA، ۲ میلی گرم در لیتر BAP (فاقد NaCl).

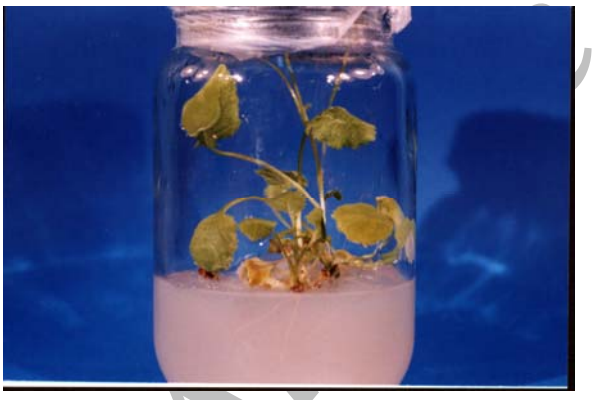
شکل ۵: رویانهای بدنی اژدری حاصل از کشت قطعات محور زیر لپه در محیط کشت MS دارای ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D، ۱ میلی گرم در لیتر NAA، ۲ میلی گرم در لیتر BAP (فاقد NaCl).

www.SID.ir

شکل ٦: رویانهای بدنی لپه ای حاصل از کشت قطعات محور زیر لپه در محیط کشت MS دارای ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D، ۱ میلی گرم در لیتر NAA، ۲ میلی گرم در لیتر BAP (فاقد NaCl).

در این بررسی رویانهای بدنی ایجاد شده بر روی جداکشتها همگی در یک مرحله نموی نبوده بطوریکه حتی پس از گذشت یک ماه رویانهائی در مراحل متفاوت نموی (گویچه ای، ابتدای قلبی شکل، قلبی پیشرفته، اژدری و رویان بالغ) بر روی جداکشتها دیده می شد (شکلهای ۲ تا ٦). این وضعیت بی تردید بموقعیت مکانی (جایگاه رویانها بر روی بخشهای متفاوت جداکشت و متفاوت بودن شیب غلظت هورمونی در این قسمتها) و زمانی پیدایش رویانها (رویانها همگی در یک زمان پدیدار نشدند) و اثرات متقابل آنها بستگی دارد. Koh و Loh در ۲۰۰۰ (۱۱) عواملی نظیر ایجاد زخم و برش روی جداکشت را در القای ایجاد رویانهای پیکری مؤثر دانستند. به اعتقاد این محققان ایجاد زخم و برش با رها شدن ترکیبات فنلی از محل زخم و بدنبال آن تحریک رویان زایی پیکری روی این پدیده تأثیر مثبت دارد. بنابراین می توان تصور کرد در جداکشتهای تهیه شده از محور زیر لپه مقدار این مواد در دو سر جداکشت یا محلهای برش با قسمتهای میانی آن متفاوت باشد. این تفاوت سبب متفاوت بودن قسمتهای مختلف جداکشت از لحاظ توان و استعداد رویان زایی پیکری می شود. از طرفی نیز همانطور که در قسمت مقدمه به آن اشاره شد در اکثر تجربیاتی که در باره رویان زایی پیکری گیاه کلزا انجام شده است از میکروسپورهای ایزوله این گیاه بعنوان جداکشت استفاده شده است. چنین جداکشتهایی در محیطهای کشت، رویانهای مجزا از هم ایجاد می کند. بنابراین ایجاد رویانهایی در مراحل متفاوت نموی بر روی جداکشتهای محور زیر لپه از ویژگیهای پژوهش حاضر محسوب می شود.

شکل ۷: ایجاد ساقه حاصل از جوانه زنی رویانها و نیز ایجاد ریشه روی آنها.



شکل ۸: ایجاد ریشه در قاعده ساقه های حاصل از جوانه زنی رویانها در محیط کشت MS دارای ۱ میلی گرم در لیتر IBA.

رویانهای بدنی ایجاد شده در محیط های مورد استفاده (جدول ۱)، جوانه زده و در صد بسیار کمی از آنها (حدود ۳۳ در صد) در همین شرایط ریشه ایجاد کردند (شکل۷). با جداسازی وانتقال اندامهای هوایی حاصل از جوانه زنی این رویانها به محیطهای دارای ۱ میلی گرم در لیتر IBA طی مدت ۲ تا ۳ روز در انتهای هر نمونه ۱۵ تا ۲۰ ریشه ایجاد شد . Gorecka و Krzyzanowska در تحقیقی در

www.SID.ir

سال ۱۹۹۷ (۸) روی رویان زایی بدنی از کشت بساک گیاهی از همین جنس (*Brassica oleracea* var *capitata*) وجود ۱ میلی گرم در لیتر IAA در محیط کشت را برای ریشه زایی اندامهای هوایی حاصل از جوانه زنی رویانها ضروری دانستند. نتایج ما نیز نقش مثبت اکسین (IBA) در القای ریشه زایی نمونه ها را نشان داد. واکشت نمونه های ریشه دار شده در محیطهای کشت جدید با ترکیب و شرایط قبلی موجب تشکیل گیاهچه های نوپدید گردید (شکل ۸). گیاهچه هایی که به این ترتیب بدست آمده بودند (حداقل ۳۳ در صد و حداکثر ٦٦ در صد از کل رویانهای بدنی ایجاد شده در شرایط کشت متفاوت به گیاهچه تبدیل شدند)، به درون گلدانهای کوچک دارای پرلیت منتقل شد، تا مرحله سازش را در زیر سرپوشهای پلاستیکی منفذدار طی کرده و گیاهان گلدانی را ایجاد نمایند (شکل ۹).

شکل ۹: مرحله سازش گیاهچه های حاصل از ریشه دار شدن ساقه های نوپدید حاصل از جوانه زنی رویانهای پیکری در محیط کشت پایه MS دارای ۱ میلی گرم در لیتر IBA.

ترکیبی از مواد تنظیم کننده رشد گیاهی و کلرید سدیم که در این پژوهش مصرف شد، اثرات متفاوتی را بر رویان زایی بدنی گیاه کلزا نشان داد. موضوع قابل توجه، اثر مثبت کلرید سدیم بر رویان زایی بدنی این گیاه است، بطوریکه غلظتی برابر با ۳ تا ۸ گرم در لیتر کلرید سدیم سبب القای رویان زایی بدنی این گیاه می شود. Kirti و همکاران در ۱۹۹۱ (۹) با توجه به این که گونه های جنس کلم (*Brassica*) در برابر تنش ناشی از کلرید سدیم تفاوتهای قابل توجهی را نشان می دهند، چنین تصور کردند که امکان دست رسی به ارقام مقاوم این گیاهان در برابر تنش ناشی از کلرید سدیم بوسیله گزینش درون شیشه ای وجود دارد، بنابراین سعی کردند با افزودن کلرید سدیم به محیط های القای رویان زایی بدنی *Brassica juncea* به رویانها و گیاهچه های مقاوم به شوری دست یابند. این پژوهشها موفقیت آمیز نبوده و پژوهشگران به این نتیجه رسیدند که با حذف کلرید سدیم از محیطهای القای رویان زایی و افزودن آن به محیطهای جوانه زنی و رشد رویانها می توانند گیاهچه های مقاوم به شوری را بدست آورند. گزارشهای این محققان با نتایج آزمایشهای ما مبنی بر اثر مثبت شوری ناشی از کلرید سدیم در محیط القای رویان زایی بدنی گونه *Brassica napus* L. همخوانی ندارد. Pellegrinesch و همکاران در سال ۲۰۰٤ (۱۵) اعلام داشتند که شرایط بهینه برای القای کالوس و نوپدیدی گیاه گندم (*Triticum turgidum*) (durum wheat and bread wheat) از راه رویان زایی بدنی با حضور ۲ میلی گرم درلیتر کلرید سدیم در محیطهای کشت این گیاهان حاصل می شود که با نتایج آزمایشهای ما هم خوانی بیشتری دارد.

پژوهش حاضر گزارشی از روشی ساده برای رویان زایی بدنی گیاه استراتژیک و مهم کلزا رقم طلایه است. درباره رویان زایی بدنی گیاه کلزا با کشت دانه های گرده تک سلولی گزارشهای زیادی وجود دارد و روشهای ارائه شده در این مورد طی سالهای متمادی بهینه سازی شده است (۱۰ و ۱۷). در تمام این موارد گیاهان مادر نیاز به پیش تیمارهای خاص دارند و ایجاد یک تقویم زمانی برای گرده افشانی گیاه و در دسترس داشتن دانه های گرده با قابلیت رویان زایی ضروری می باشد (۱۸). در مقایسه با مشکلات و محدودیتهای این روشها، روش رویان زایی بدنی مبتنی بر آزمایشها و داده های پژوهش حاضر می تواند راهی عملی، ساده تر و بسیار کم هزینه تر باشد. Srivastava و همکاران درسال ۲۰۰٤ (۱٦) و Zhang و همکاران در سال

Archive of SID

www.SID.ir

۲۰۰۱ (۲۰) با مهندسی ژنتیک موفق به ایجاد گیاهان کلزای مقاوم به مقادیر ۷۵ و ۲۰۰ میکرومولار از کلرید سدیم شدند. نکته جالب و قابل تعمق این است که در این پژوهش رویان زایی بدنی گیاه کلزا در همین شرایط شوری ناشی از کلرید سدیم انجام شده است. بنا بر این بررسی تغییرات احتمالی تنوع سوماکلونالی نمونه ها (٦ ، ۱۲ و ۹) در این شرایط حائز اهمیت است. مقاومت گیاهچه های نوپدید حاصل از رویان زایی بدنی و همچنین چگونگی اثر کلرید سدیم بر رویان زایی پیکری در دست بررسی است.

منابع

۱- باقری کاظم آباد، هدایت. معینی، احمد. ۱۳۷۹. بررسی پاسخ به کشت میکروسپورهای ایزوله تعدادی از ژنوتیپهای کلزا *Brassica napus* L. . پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تربیت مدرس.

۲- حبیبی خانیانی، بهنام. معینی، احمد. ۱۳۸۲. بهینه سازی پاسخ به کشت میکروسپورهای ایزوله در کلزا *Brassica napus* L. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تربیت مدرس.

۳- شریفی، پیمان. معینی، احمد. ۱۳۸۲. بهینه سازی جنین زایی و باززایی گیاه از کشت میکروسپورهای ایزوله کلزا. *Brassica napus* L. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تربیت مدرس.

٤- عزیزی، مهدی. سلطانی، افشین. خاوری خراسانی، سعید. ۱۳۷۸. کلزا فیزیولوژی، زراعت، به نژادی و تکنولوژی زیستی. ترجمه. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

5- Chen J.T ; Chang C; Chang W.C. 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium Gower Ramsey* and subsequent plant regeneration. Plant Cell Reports; 19: 143 – 149

6-Donovan A.M; Morgan R; Valobra C – Piagnani; Ridout M.S; James andGarrett C.M.E. 1994. Assessment of somaclonal variation in apple.I. resistance to the fire blight pathogen, Erwinia amylovora. Journal of Horticultural Science; 69(1): 105 – 113

7- Gamborg. OL., DE. Eveleigh. 1968. Cultures methods and detection of glucanases in suspension cultures of Wheat and Barley. Canadian Journal of Biochemistry; 49: 417 - 421

8- Gorecka K; Krzyanowska D. Plant regeneration from anther derived embryos of Cabbage (*Brassica olerasea* L.var. *capitata*). 1997 ISHS Acta Horticultureae 447: III International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding

9- Kirti P.B; Hadi S; Kumar P.A and Chopra V.L. 1991. Production of sodium – chloride – tolerant *Brassica juncea* plants by in vitro selsction at the somatic embryo level. Theor Appl Genet; 83: 233 – 237

10- Kirti P.B and Chopra V.L. 1989. A simple method of induction somatic embryogenesis in *Brassica juncea* (L.) Czern & Coss. Plant breeding; 102: 73 – 78

11- Koh W.L; C.S.Loh. 2000. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration and in vitro rapid – cycling *Brassica napus*. Plant Cell Reports; 19: 1177 – 1183

12- Lee Michael; Phillips Ronald L. 1988. The Chromosomal basis of somaclonal variation. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol; 39: 413 – 437

13- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 473 – 497

14- Ostry M.E and Skilling D.D. 1988. Somatic variation in resistance of *populus* to *Septoria musiva*. Plant diseases; 72: 8, 724 – 727

15- Pellgrineschi Alessandro; Brito Rosa Maria; McLean Scott & Hoisington David. 2004. Effect of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat. Plant Cell, Tissue and Organ culture; 77: 245 – 250

16- Srivastava Sanjeeva; Fristensky Brian and Kav Nat N.V. 2004. Constitutive expression of a PR10 protein enhances the germination of *Brassica napus* under Salin Conditions. Plant Cell Physiol; 45(9) 1320 – 1324

17- Tian Hui Cheng; Yao Yi & Xiang Sun Meng. 2004. High frequency conversion of microspore – derived embryos of *Brassica napus* cv. Topas by supplemented calcium and vitamins. Plant Cell Tissue and Organ Culture; 79: 159 – 165

18- Vencatachalam P; Geetha N Khandelwal Abha; Shaila Yi M.S and Lakshmi G Sita. 1996 .Induction of direct somatic embtyogenesis and plant regeneration from mature cotyledon explants of *Arachis hypogaea*L. Korean J. Plant Tissue culture 23: 9 – 13

Archive of SID

www.SID.ir

19- Von Arnold Sara; Sabala Izabela; Bozhkov Peter; Dyachok Julia & Filonova Lada. 2002. Development pathways of Somatic Embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture; 69: 233 – 249

20 - Zhang Hong; Joanna N; Hodson John; Williams P and Eduardo Blumwald. 2001. Engineering salt – tolerant *Brassica* plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacular sodium accumulation. Nat. Biotechnology 19: 795 – 798

Somatic embryogenesis and plant regeneration in Canola (*Brassica napus* L.)

Majd. A[1], Chamandoosti. F.[2], Mehrabian. S[1] and Shedai. M.[3]

[1]Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Teacher Training University, Tehran. I.R.of Iran

[2] Iranian Research Institute of Plant Protection

[3] Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran. I.R.of Iran

Abstract

In this study a simple method for the induction and development of somatic embryos from Canola (*Brassica napus* L.) hypocotyl explants is determined and reported. Hypocotyl explants were found to be more suitable than other plant parts for somatic embryogenesis. A low concentration of sucrose (20 g/lit) enhanced somatic embryogenesis, but greater concentrations (60 g/lit) decreased embryogenetic potential of the Calli. On modified MS medium containing 2% sucrose, 1 mg/lit 2,4-D, 2 mg/lit NAA and 2 mg/lit BAP each explant developed calli. Different NaCl concentrations (0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 mg/lit) were tested and somatic embryogenesis was improved in the presence of 6 mg/lit NaCl. Embryoids developed shoots on the same medium and rooted after being transported to a medium supplemented with 1 mg/lit IBA. Regenerated plants were transfered to pots after adaptation to dry condition and produced flowers normally.

Keywords: Somatic embryos, Sodium chloride, Canola

Archive of SID

www.SID.ir