باززایی با فراوانی بالا ازقطعات جداکشت میانگره، برگ و ریزغده گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.)

حسن رهنما[1*]، شیده منتصر کوهساری[2]، حجت نادری مشکین[1,2] و حسین فهیمی[1,2]

[1] کرج، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

[2] تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۲

چکیده

در اغلب موارد بهینه سازی کشت بافت به منظور دستیابی به درصد بالایی از باززایی اولین قدم برای انتقال ژن است. دراین تحقیق باززایی و جنین زایی دو رقم از ارقام زراعی سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) (آگریا و مارفونا) مورد بررسی قرار گرفته است. میانگره ها، برگها و ریزغده های سیب زمینی در محیطهای حاوی تیمارهای هورمونی مختلف کشت شدند. بر اساس نتایج به دست آمده، در محیط A (محیط تعدیل شده MS حاوی 2,4-D و سوکروز) باززایی میانگره ها و برگها در غلظت ۱ میلی گرم درلیتر تیدیازرون (TDZ) در مقایسه با غلظتهای ۰/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر آن سریع تر صورت گرفت. در محیط C (محیط تعدیل شده MS حاوی ۲۰ گرم در لیتر گلوکوز و ۲ میلی گرم در لیتر زئاتین ریبوزاید) درصد باززایی میانگره ها (اگریا ۹۵/۸ درصد، مارفونا ۱۰۰ درصد)، برگها (اگریا ۸۳/۳ درصد، مارفونا ۹۱/۶ درصد) و ریزغده ها (آگریا ۸۲/۶ درصد، مارفونا۸۶/۳ درصد) بسیار بالاتر از محیط A بود. همچنین باززایی در محیط C حدود ۳۵ روز سریع تر از محیط A (۲۰-۱۶ روز بعد از کشت) صورت گرفت. از طرف دیگر مراحل مختلف تشکیل جنینهای سوماتیکی هم در هر سه نوع قطعه جداکشت مشاهده شد. در نهایت محیط C به دلیل بالا بودن درصد و سرعت باززایی هر سه نوع قطعه جداکشت بهترین محیط برای باززایی ارقام سیب زمینی معرفی گردید.

واژه های کلیدی: باززایی، برگ، جنین زایی، ریزغده، سیب زمینی، میانگره

* نویسنده مسئول، تلفن : ۲۷۰۳۵۳۶- ۰۲۶۱، پست الکترونیکی: hrahnama@abrii.ac.ir

مقدمه

سیب زمینی با تولید سالیانه ۳۰۰ میلیون تن چهارمین محصول زراعی مهم در جهان است. نامگذاری سال ۲۰۰۸ به عنوان سال سیب زمینی توسط سازمان ملل بیانگر اهمیت این محصول زراعی می باشد که هم اکنون غذای اصلی بسیاری از مردم دنیا است (۲). غده سیب زمینی منبعی غنی از انواع کربوهیدراتها، پروتئینها و ویتامینها می باشد. به دلیل اهمیت تغذیه ای زیاد و تولید آسان، سیب زمینی یکی از اولین کاندیداهای مهم برای اصلاح از طریق زادآوری و بیوتکنولوژی بوده است. روشهای قدیمی برای اصلاح ارقام سیب زمینی مبتنی بر کشت و تلاقی ارقام سازگار، با عملکرد بالا و خصوصیات مطلوب آنها استوار بوده است. مشکلاتی نظیر عقیمی و تتراپلوئیدی به همراه سطوح بالای هتروزیگوسی، به میزان زیادی کارآیی روشهای قدیمی برای اصلاح ارقام سیب زمینی را کاهش می دهد. بنابراین، یک راه کار جایگزین برای اصلاح ارقام مهم سیب زمینی استفاده از تکنیکهای درون شیشه ای شامل دورگ گیری سوماتیک، جهش زایی و مهندسی ژنتیک می باشد (۱۵).

کشت بافت سیب زمینی توسط محققان زیادی مورد مطالعه

Archive of SID

www.SID.ir

قرار گرفته است. آنچه مسلم است میانگره ها، برگها و ریز غده ها (۴، ۶، ۷، ۸، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۲۴ و ۲۷) از مهمترین قطعات جداکشتی هستند که در انتقال ژن به گیاه سیب زمینی مورد استفاده می باشند. جنین زایی سوماتیکی یا باززایی مستقیم گیاه از قطعات جداکشت مهم ترین روش باززایی جهت استفاده در تراریختی گیاه سیب زمینی است. گزارشهای متعددی هم در زمینه تولید جنینهای سوماتیکی در گیاه سیب زمینی وجود دارد (۹ و ۲۱). تولید جنینهای سوماتیکی و باززایی گیاه سیب زمینی از قطعات جداکشت مختلفی صورت گرفته است مانند کالوسهای برگی (۵)، دیسکهای ریز غده ای (۱۶)، گرهکهای ساقه ای گیاهان رشد کرده در شرایط درون شیشه ای (۹)، قطعات میانگره ساقه ای و جنینهای زیگوتی (۲۱). با این وجود، در هیچ یک از روشهای فوق الذکر میزان تولید جنینهای سوماتیکی چندان زیاد نبوده است. Seabrook و Douglass (۲۰۰۱) در تحقیقات خود توانستند با استفاده از قطعات ساقه، برگ، ریز غده و ریشه در بیش از ۱۸ رقم سیب زمینی تولید تعداد قابل توجهی جنین سوماتیکی نمایند (۲۴). اخیراً Vargas و همکاران هم گزارشی منتشر کرده اند که با استفاده از سوسپانسیون سلولی توانستند به طور قابل توجهی ایجاد جنینهای سوماتیکی نمایند (۲۹).

با این وجود، هر یک از این روشها دارای محدودیتهایی در مراحل مختلف کشت بافت نظیر فراوانی پایین تراریختی، باززایی، وقوع تنوع سوماکلونال (به ویژه در بحث تغییر سطح پلوئیدی) و نوع رقم می باشند. به همین دلیل بهینه سازی کشت بافت از قطعات جدا کشت مناسب از جمله برگ، میانگره و ریزغده گیاه سیب زمینی برای دست یافتن به میزان بالایی از باززایی برای اهدافی مانند انتقال ژن حائز اهمیت فراوانی می باشد.

با توجه به اینکه میزان باززایی به عوامل مختلفی نظیر ژنوتیپ گیاه، نوع و منشأ قطعات جداکشت، نوع و غلظت تنظیم کننده های رشد (هورمونها) بستگی دارد (۱۴، ۱۷ و ۲۸)، لذا در این تحقیق ترکیب محیط کشتهای مختلف با غلظتهای هورمونی متفاوت جهت بررسی میزان باززایی قطعات جداکشت ساقه، برگ و ریزغده دو رقم از ارقام مهم زراعی سیب زمینی (مارفونا و آگریا) و نیز اثر غلظتهای مختلف تیوسولفات نقره بر روی میزان باززایی این ارقام مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

کشت و آماده سازی گیاهچه های استریل در آزمایشگاه: مواد اولیه گیاهی لازم برای این آزمایش به صورت گیاهچه های استریل درون شیشه ای از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تهیه گردید. تک گره های گیاهچه های استریل دو رقم آگریا و مارفونا در محیط کشت پایه MS (۱۹) حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار با pH ۵/۷، تحت شرایط دمای ۱± ۲۳ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت ۴۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی تکثیر شدند. آن دسته از گیاهچه های ۴ الی ۵ هفته ای دارای تک گره های مناسب انتخاب شده و برای جداسازی و تهیه قطعات جداکشت میانگره و برگ مورد استفاده قرار گرفتند.

روش تولید ریزغده: پس از رشد و تکثیر گیاهچه های سیب زمینی, تک گره های گیاهچه های ۵-۴ هفته ای جهت تولید ریزغده بریده شده و در محیط ریزغده زایی حاوی نمکهای MS، تیامین HCl (۰/۴ mg/l)، میواینوزیتول (۱۰۰ mg/l)، کایتین (۲/۵ mg/l)، ساکارز (۶۰ gr/l) با pH ۵/۷ در شرایط تاریکی و دمای ۱۹ درجه سانتی گراد کشت گردیدند. بعد از ۴ الی ۸ هفته ریزغده ها تشکیل شدند. ریزغده های مناسب با اندازه های مطلوب (با قطر تقریبی ۰/۵ سانتیمتر) جمع آوری و به منظور استفاده در مراحل بعدی در شرایط تاریکی و دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۱).

روش انجام تیمار های آزمایشی : قطعات جدا کشت

Archive of SID
www.SID.ir

میانگره به طول mm ۶-۴ و قطعات جداکشت برگ با قطر mm ۵×۵ و برشهای عرضی ریزغده ها به قطر mm ۱-۰/۵ در دمای ۱± ۲۳ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تحت تیمارهای زیر قرار گرفتند.

محیط **A**: قطعات جداکشت میانگره ها و برگها ابتدا در محیط کال زایی به نام A1 (محتوی نمکهای MS ، تیامین HCl (۸ mg/l)، آدنین سولفات (۸ mg/l)، میواینوزیتول (۱۰۰mg/l)، جیبرلیک اسید (۵ mg/l)، تیدیازرون (۱ mg/l)، بنزیل آمینوپورین (۲ mg/l)، ۴،۲- دی کلرو فنوکسی استیک اسید (۵ mg/l) و ساکارز (۳۰ gr/l)، دارای pH ۵/۷ و آگار ۰/۷ درصد کشت شدند (۱). ترکیبی از غلظتهای ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر تیدیازرون (TDZ) و ۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر تیو سولفات نقره (STS) به عنوان تیمارهای آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت. پس از ۱۰ الی ۱۴ روز کشت در شرایط نوری ۴۰۰۰ لوکس، قطعات جدا کشت به محیط باززایی A2 (A2=A1- 2,4-D) با همان تیمار ها و با شدت نور ۶۰۰۰ لوکس منتقل گردیدند. در محیط باززایی هر دو هفته یک بار واکشت انجام گرفت و میزان باززایی قطعات جداکشت هر رقم زراعی پس از ۵۰ روز بررسی شد.

محیط B: این محیط جهت بررسی باززایی ریز غده ها مورد استفاده قرار گرفت. ریزغده های مناسب و سالم از هر دو رقم آگریا و مارفونا به صورت دیسکهایی به ضخامت ۱ میلی متر بریده شده و در سطح محیط کشت قرار گرفتند. این محیط حاوی نمکها و ویتامینهای MS، زآتین (۱ mg/l)، جیبرلیک اسید (۰/۱ mg/l)، ساکارز (۳۰ gr/l)، pH ۵/۷ و آگار ۰/۷ درصد می باشد که با غلظتهای مختلف تیوسولفات نقره (۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با غلظت ۰/۲ میلی گرم در لیتر سه هورمون نفتالین استیک اسید، ۴،۲- دی کلرو فنوکسی استیک اسید و پیکلورام استفاده شد. پس از ۴ الی ۸ هفته میزان کالوس زایی و باززایی ریزغده ها مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۱).

محیط C: در محیط C میزان باززایی هر سه نوع قطعه جداکشت ارقام زراعی آگریا و مارفونا مورد بررسی قرار گرفت. این محیط محتوی نمکهای MS، ویتامینهای B_5، آدنین سولفات (۴۰ mg/l)، گلوکز (۲۰ gr/l)، مانیتول (۲۰gr/l)، MES (۹۰۰ mg/l)، نفتالین استیک اسید (۰/۰۲mg/l)، جیبرلیک اسید (۰/۰۵ mg/l)، زآتین ریبوزاید (۲mg/l)، با pH ۵/۷ و آگار ۰/۷ درصد است (۳). محیط C هم از نظر ترکیب تنظیم کننده های رشد گیاه و هم از نظر منبع کربن با محیط A تفاوت دارد. در این محیط منبع کربن به جای ساکارز، گلوکز می باشد و مانیتول به عنوان یک ماده اسموتیک در این محیط به کار گرفته شده است. در محیط C نیز تأثیر غلظتهای مختلف تیوسولفات نقره (۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) بر روی باززایی قطعات جدا کشت میانگره، برگ و ریز غده هر دو رقم آگریا و مارفونا بررسی شد.

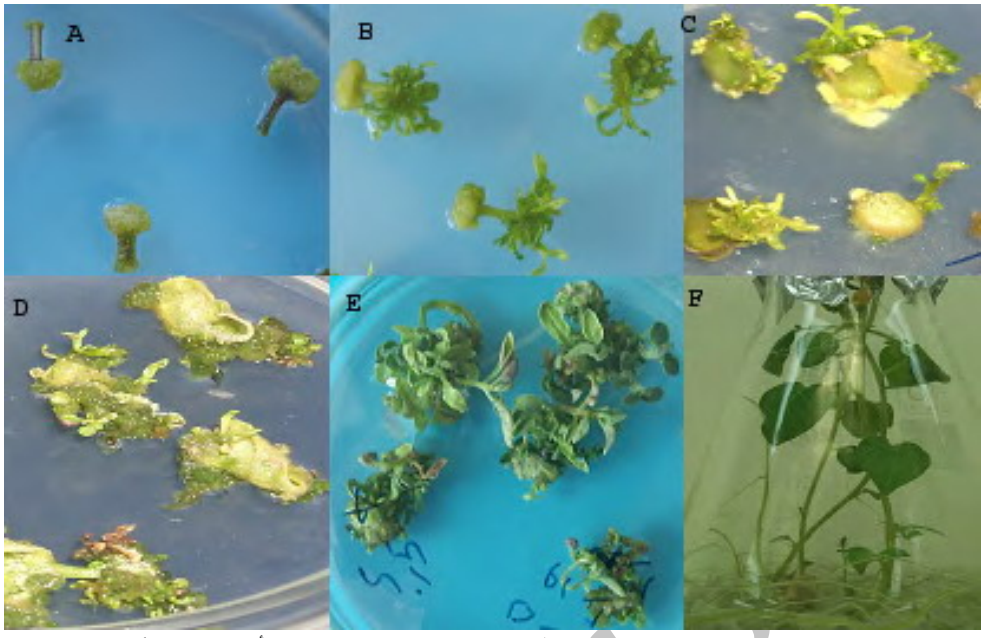
در آزمایشهای فوق هر کدام از تیمارها ۵ تکرار و هر تکرار شامل ۶ قطعه جداکشت بود که به طور کاملاً تصادفی در پتری دیش قرار داده شده بودند. نتایج حاصل از آزمایشهای فوق در قالب طرح بلوکهای کاملاً تصادفی با استفاده از برنامه آماری MSTATC تجزیه و تحلیل شد.

نتایج و بحث

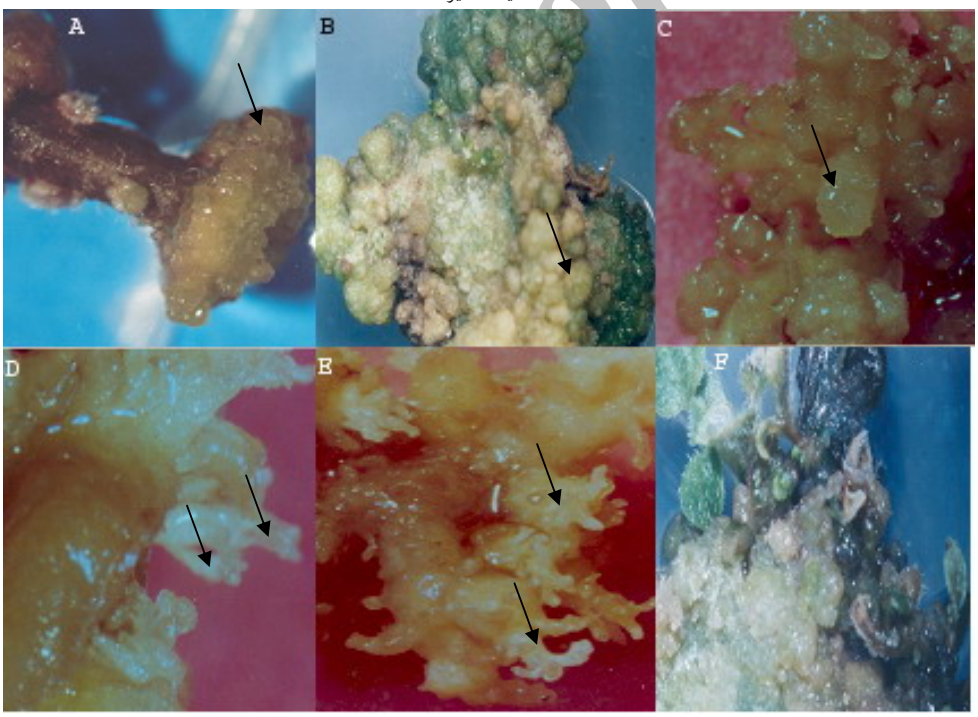
با وجودی که روشهای مختلفی برای باززایی گیاه سیب زمینی گزارش شده است ولی به طور کلی تفاوت اصلی بین آنها مربوط به نوع و غلظت تنظیم کننده های رشد گیاه (نفتالن استیک اسید، ایندول استیک اسید، توفوردی، پیکلورام، جیبرلیک اسید، بنزیل آمینو پورین، تیدیازرون، زاتین و زاتین ریبوزاید) و منبع کربوهیدرات (ساکارز یا گلوکز) و میزان آنها می باشد. مانیتول نیز به عنوان یک ماده اسموتیک در بعضی از محیطها استفاده شده است (۸ و ۲۴).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱- مراحل باززایی از قطعات مختلف جداکشت سیب زمینی. A- تشکیل کالوس در انتهای دور از رأس قطعات میانگره B- ساقه زایی در انتهای نزدیک رأس قطعات میانگره C- باززایی از دیسکهای ریزغده D- باززایی از قطعات برگی E- تشکیل ساقه از قطعات برگی F- انتقال ساقه ها به محیط تکثیر

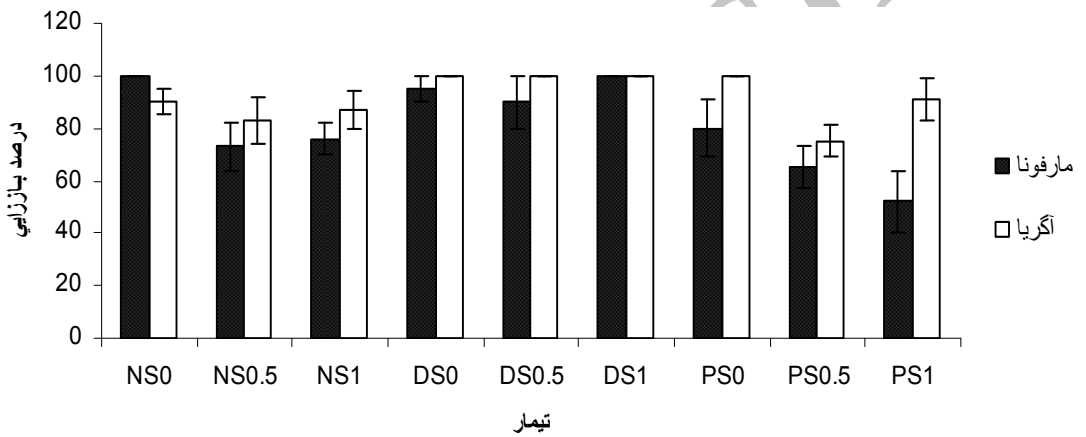


شکل ۲ – مراحل مختلف جنین زایی در گیاه سیب زمینی در محیطهای مختلف. A- تشکیل کالوسهای کروی (غده ای) در انتهای میانگره (بزرگنمایی ۵۰×) B- تشکیل کالوسهای کروی (غده ای) بر روی دیسکهای ریز غده (بزرگنمایی ۵۰×) C- تشکیل جنینهای کروی شکل (بزرگنمایی ۱۰۰×) D- تشکیل جنینهای اژدری شکل (بزرگنمایی ۱۰۰×) E- جنین در مرحله نموی پیشرفته (بزرگنمایی ۱۰۰×) F- تشکیل اندام هوایی از ساختارهای جنینی. فلشها در هر مورد جزء اشاره شده را نشان می دهد.

www.SID.ir

جدول ۱- درصد باززایی میانگره ها و برگها در محیط A با غلظتهای ترکیبی TDZ (۰/۵، ۱، ۲ میلی گرم در لیتر) با STS (۰، ۰/۵، ۱ میلی گرم در لیتر). **میانگینهای دارای حروف غیرمشابه اختلاف آماری معنی داری با هم دارند.**

TDZ(mg/l)		۰/۵	۱	۲	۰/۵	۱	۲
STS(mg/l)		میانگره			برگ		
۰	اگریا	۳۵/۳۳± ۲/۱ ^{h}	۶۱/۳ ±۳/۲ ^{c}	۳۹/۷± ۱/۷ ^{fg}	۲۲±۱/۴ ^{j}	۴۱/۳±۱/۸ ^{f}	۳۱±۱/۳ ^{i}
	مارفونا	۴۵/۳±۳/۴ ^{e}	۸۱/۳±۴/۲ ^{a}	۳۹± ۱/۲ ^{g}	۳۰/۳±۱/۹ ^{i}	۶۴/۳±۳/۹ ^{b}	۵۲±۲/۴ ^{d}
۰/۵	اگریا	۰ ^{q}	۰ ^{q}	۰ ^{q}	۷/۹±۰/۶ ^{op}	۱۷/۷±۱/۱ ^{lm}	۱۶±۰/۸ ^{m}
	مارفونا	۳۹/۷±۱/۲ ^{fg}	۳۴/۷±۱/۶ ^{h}	۱۳/۷±۰/۸ ^{n}	۱۹/۷±۰/۹ ^{kl}	۴۶/۷±۲/۸ ^{e}	۱۹/۳±۱/۱ ^{kl}
۱	اگریا	۰ ^{q}	۰ ^{q}	۰ ^{q}	۰ ^{q}	۰ ^{q}	۰ ^{q}
	مارفونا	۳۵±۱/۷ ^{h}	۲۱±۱/۱ ^{jk}	۸/۷±۰/۷ ^{p}	۹/۷±۰/۷ ^{op}	۲۰±۱/۲ ^{jk}	۱۱±۰/۸ ^{o}



نمودار ۱- اثر تیمارهای هورمونی مختلف بر میزان باززایی قطعات جداکشت ریزغده در محیط B – S0 : غلظت صفر میلی گرم در لیتر STS ، S0.5 : غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر STS ، S1 : غلظت ۱ میلی گرم در لیتر STS ، N : ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA ، D : ۰/۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D ، P : ۰/۲ میلی گرم در لیتر پیکلورام.

مراحل مختلف باززایی گیاه سیب زمینی تحت تیمارهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۱). نتایج حاصل نشان داد که در محیط A هر دو قطعه جداکشت برگ و میانگره باززایی حاصل می کنند. شاخه های ایجاد شده نازک و کوچک و تعداد شاخه ها کم و باززایی آنها تقریباً پس از ۵۰ روز صورت گرفت. باززایی در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر تیدیازرون نسبت به غلظتهای ۰/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر بیش تر بود (جدول ۱). درصد باززایی میانگره ها در این محیط در بهترین حالت (غلظت ۱ میلی گرم در لیتر TDZ و صفر میلی گرم در لیتر STS) برای رقم آگریا ۶۱/۳ درصد و برای رقم مارفونا ۸۱/۳ درصد بوده است.

در قطعات جداکشت برگی، میزان باززایی در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر TDZ در دو رقم اگریا و مارفونا به ترتیب ۴۱/۳ درصد و ۶۴/۳ درصد برآورد شد. در همه موارد فوق، میزان باززایی در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر TDZ به طور معنی داری با غلظتهای ۰/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر آن بیشتر می باشد. همان طور که از داده های جدول ۱ مشخص است، تیوسولفات نقره در مجموع به طور معنی داری بر میزان باززایی نمونه ها تاثیر منفی داشته است. تأثیر منفی STS در باززایی اگریا به مراتب بیشتر از رقم مارفونا بوده است به طوری که حتی در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر آن در میانگره ها میزان باززایی صفر بود. در

www.SID.ir

غلظت ۱ میلی گرم در لیتر STS چه در میانگره و چه در قطعات جداکشت برگی رقم اگریا هیچ گونه باززایی مشاهده نشد. در رقم مارفونا با وجودی که در حضور STS باززایی صورت گرفت ولی مقدار آن به طور قابل ملاحظه ای کمتر از وقتی بود که STS در محیط وجود نداشت. Seabrook و Douglass (۲۴) در تحقیقات خود از هورمون زآتین ریبوزاید برای جنین زایی و باززایی گیاه سیب زمینی استفاده کرده بودند اما در این تحقیق مشاهده شد که استفاده از TDZ هم می تواند کارآیی بالایی در باززایی ارقام اگریا و مارفونا داشته باشد. از طرف دیگر به نظر می رسد که STS در باززایی نمونه های برگی و میانگره در این محیط تأثیر منفی داشته باشد.

باززایی گیاهان از برشهای ریزغده منجر به سطح پایینی از تنوع سوماکلونال نسبت به گیاهان به دست آمده از سایر بافتهای سوماتیکی می شود (۱۳). به عبارت دیگر ایجاد اندامهای هوایی باززا شده از غده بیشتر از بافت سوماتیکی است تا از مراحل حدواسط تشکیل کالوس، که این مسئله از نظر کاهش میزان تنوع سوماکلونال در اثر کاهش مراحل مختلف کالوس زایی، در بحث انتقال ژن حائز اهمیت می باشد. لذا در این تحقیق باززایی از ریز غده هم در محیطی اختصاصی که برای این منظور معرفی شده است مورد بررسی قرار گرفت.

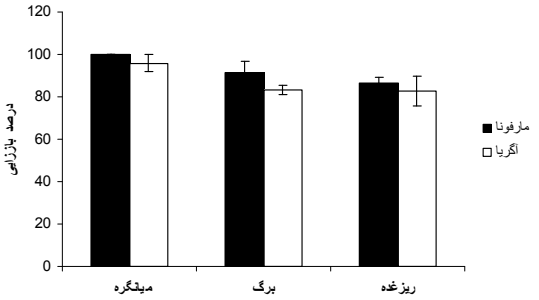
نتایج حاصل از بررسی میزان باززایی ریزغده ها در محیط B نشان داد با اینکه تفاوت معنی داری بین غلظتهای مختلف تیوسولفات نقره در میزان باززایی وجود ندارد، هورمون 2,4-D مؤثرتر از دو هورمون دیگر بوده و در غلظت ۱میلی گرم در لیتر تیوسولفات نقره در مورد هر دو رقم بالاترین میزان باززایی (۱۰۰ درصد) را باعث می شود (نمودار۱). بر خلاف نتایج به دست آمده در مورد اثر بازدارندگی تیوسولفات نقره بر باززایی میانگره ها و برگها، ارتباط معنی داری بین غلظتهای مورد مطالعه تیوسولفات نقره و میزان باززایی ریز غده ها مشاهده نگردید. از طرف دیگر مشاهده شد که تیوسولفات نقره اثر بازدارندگی شدیدی بر ایجاد کالوسهای پنبه ای شکل در ریزغده ها دارد (داده ها ارائه نشده است).

در محیط C باززایی بسیار سریع تر رخ داد. میانگره ها پس از ۱۸ روز باززایی حاصل شد و بعد از ۳۰ روز شاخه هایی ایجاد کردند که بسیار قطور تر، برگهای بزرگ تر و ظاهری شاداب تر داشتند. این محیط یک مرحله ای بوده و هر سه نوع قطعه جداکشت در این محیط باززایی حاصل کردند. البته باززایی برگ (شکل 1D) و ریزغده (شکل 1C) ۱۰ روز دیرتر از میانگره صورت گرفت. کارآیی باززایی هر دو نوع رقم زراعی آگریا (از میانگره ۹۵/۸ درصد، برگ ۸۳/۳ درصد و ریزغده ۸۲/۶ درصد) و مارفونا (از میانگره ۱۰۰ درصد، برگ ۹۱/۶ درصد و ریزغده ۸۶/۳ درصد) در مقایسه با گزارشهای موجود بسیار بالاست (نمودار۲). همچنین میزان شاخه زایی از میانگره های باززا شده در مقایسه با برگ و ریزغده بسیار بیشتر است. Demytro و همکاران (۱۰) گزارش کرده اند که در بین کربوهیدراتها گلوکز باعث تولید کالوسهای سبز و فشرده می شود که برای القای اندام زایی و شاخه زایی در سیب زمینی مطلوب تر است. در مطالعه حاضر با مقایسه دو محیط A و C به این نتیجه می توان رسید که تغییر منبع کربن از ساکارز به گلوکز در محیط C به طور قابل توجهی میزان باززایی را بالا می برد. در حضور ساکارز تعدادی از قطعات جداکشت، کالوس سبز و سفید رنگ ایجاد می کنند که اغلب سست می باشند و میزان باززایی پایین تر است. همچنین گزارش شده است که اضافه کردن مانیتول به همراه گلوکز به محیط کشت، رشد سلولی را تحریک کرده و باعث افزایش باززایی می شود (۱۰). مطالعات نشان داده که زآتین ریبوزاید (ZR) به عنوان منبع سیتوکینین به همراه ایندول-۳-استیک اسید (IAA) یا ۳-ایندول استیل DL-آسپارتیک اسید (IAA-AA) در باززایی و ایجاد گیاهان سیب زمینی تراریخته از برشهای غده بسیار

Archive of SID

www.SID.ir

مؤثرتر از ۶-بنزیل آمینوپورین (BAP) و آلفا-نفتالین استیک اسید (α-NAA) می باشد (۱۱ و ۲۲).



نمودار۲- میزان باززایی قطعات جداکشت میانگره، برگ و ریزغده در محیط C

مطالعه اخیر نشان داد که از بین سیتوکینینهای مورد بررسی، زاتین ریبوزاید برای همه انواع قطعات جداکشت و همچنین طیف وسیعی از ژنوتیپها بسیارکاراتر می باشد و سبب می شود که باززایی سریع تر و بهتر صورت گیرد. در محیط C که حاوی زاتین ریبوزاید است این موضوع کاملاً آشکار بوده و مؤید نتایج سایر محققان است.

تیوسولفات نقره معمولاً در شرایط کشت آزمایشگاهی برای تولید گیاهانی با برگهای بزرگ تر و ظاهری تازه تر استفاده می شود. به نظر می رسد دلیل این امر این باشد که تیوسولفات نقره قدرت دریافت اتیلن را به وسیله گیاه مهار می کند و اثر مفیدی روی باززایی گیاهچه ها از بافت برگ سیب زمینی دارد. حتی در مورد بعضی از ژنوتیپها در غیاب تیوسولفات نقره باززایی صورت نمی گیرد (۱۱). این مطالعه نشان داد که در محیط C نیز تیوسولفات نقره سبب کاهش باززایی هر دو رقم می گردد. در آزمایشهای اخیر اثر مفید تیوسولفات نقره تنها در باززایی ریز غده ها در محیط B مشاهده شد. نکته جالبی که در محیط C مشاهده شد این بود که قطعات جداکشت میانگره ابتدا در سمت دیستال (سطح برشی دور از رأس) شروع به کال زایی کرده (شکل ۱A) و سپس سلولهای قسمت پروکسیمال (سطح برشی نزدیک به رأس) که کال زایی نکرده اند، پس از ۱۵ روز باززایی حاصل می کنند (شکل ۱B). تأثیر جهت گیری قطعه جداکشت به عنوان یک فاکتور مهم در کنترل جنین زایی سوماتیک در بسیاری از گیاهان نشان داده شده است. علت این امر احتمالاً به دلیل جهت گیری جذب مواد غذایی از محیط کشت می باشد (۱۷، ۱۸، ۲۰، ۲۳).

جنین زایی سوماتیکی: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که کشت قطعات جداکشت سیب زمینی در محیطهای فوق منجر به تشکیل ساختارهای شبه جنینی می گردد. قطعات میانگره ساقه ۵ روز پس از کشت در محیط دارای اکسین (A) در دو انتهای برش خورده متورم شده و مقدار کمی کالوس گرهکی و کروی شکل تشکیل دادند. انتقال این قطعات جداکشت به محیط بدون اکسین در عرض۲ تا ۳ هفته تشکیل ساختارهای شبه جنینی نمود (شکل ۲). این ساختارهای شبه جنینی ابتدا در بخش دیستال (دور از رأس) و سپس در بخش پروگزیمال (نزدیک رأس) ظاهر شدند. نتایج این تحقیق با مشاهدات Seabrook و Douglass (۲۴) و Sharma و Millam (۲۵) مطابقت دارد. نتایج مشابهی هم در سطح مقطع قطعات جداکشت برگی و ریز غده مشاهد شد (شکل ۲).

جنینهای سوماتیکی در عرض ۴ هفته پس از انتقال به محیط A2 تشکیل شدند. این جنینها ابتدا در حاشیه کالوسهای گرهکی و سپس در تمامی سطح کالوس ظاهر گردیدند. بیش از ۶۰ درصد قطعات جداکشت در عرض ۵ هفته تشکیل جنینهای سوماتیکی دادند. به نظر می رسد که زخمی کردن بافت باعث تحریک جنین زایی می شود که این امر یافته های Sidorov و همکاران (۲۶) و Seabrook و Douglass (۲۴) را تائید می نماید. وقتی اکسین در محیط وجود داشته باشد جنین های سوماتیکی کمی تشکیل می شود. در غیاب اکسین، تشکیل جنینهای سوماتیکی تحریک می گردد. از طرف دیگر به نظر می رسد که حساسیت و پاسخ به اکسین و زخم احتمالاً با مکانیسم یکسانی اعمال می شود. Komamine و همکاران (۱۴) بیان کرده اند که اکسین تنها برای تشکیل توده های

Archive of SID
www.SID.ir

سلولی مریستمی لازم است و برای سایر مراحل نموی جنینهای سوماتیکی تأثیر بازدارنده دارد.

تمامی بافتهای کشت شده از جمله میانگره، پهنک برگ و برشهای ریز غده تشکیل ساختارهای شبه جنینی دادند.

Garcia و Martinez (۹) در اغلب گزارشهایی که در زمینه جنینهای سوماتیکی داشته اند، به منظور تحریک باززایی در محیط کشت گیاهچه ای از GA3 استفاده کرده اند. برعکس Sharma و Millam (۲۵) در مطالعه خود قدرت و توان باززایی را به وسیله تکرار واکشت گیاهچه ها, انتخاب مواد سالم گیاهی به عنوان قطعه جداکشت و حذف GA3 از محیط بالا برده اند. در این تحقیق هم تلفیقی از دو روش فوق را مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر استفاده از گیاهچه های سالم و تازه (۴ هفته ای) از آنها به عنوان یک عامل محرک باززایی از GA3 (محیط A) نیز بهره گرفته شد. به علاوه در محیط C امکان باززایی با کارآیی بسیار بالا برای تمامی قطعات جداکشت وجود دارد. Seabrook و Douglass (۲۴) هم درصد بالایی از باززایی را در برخی از ارقام سیب زمینی گزارش کرده اند. محیط مورد استفاده توسط آنها شامل دو محیط دارای اکسین و بدون اکسین بود در حالی که در اینجا تنها با استفاده از یک محیط درصد بالایی از باززایی برای ارقام اگریا و مارفونا به دست آمد. با این وجود زمان لازم برای باززایی در محیط یک مرحله ای C همانند گزارش Seabrook و Douglass (۲۴) ۱۶ تا ۳۰ روز بود که بسیار سریع تر از زمان گزارش شده توسط Garcia و Martinez (۱۵۰ روز) می باشد (۹). همچنین به نظر می رسد استفاده از سیتوکینن و حذف اکسین در مرحله دوم کشت محیط A نقش مهمی در باززایی داشته باشد.

در مجموع، محیط یک مرحله ای C به دلیل بالا بودن درصد و سرعت باززایی هر سه نوع قطعه جداکشت میانگره، برگ و ریزغده و همچنین کارآیی بالای آن در مورد هر دو رقم آگریا و مارفونا، به عنوان محیط کشت بهینه جهت باززایی گیاه سیب زمینی پیشنهاد گردید.

منابع

۱- رهنما، ح. ۱۳۸۲، مطالعه فیزیولوژی مقاومت و تولید ارقام مقاوم به شوری از طریق مهندسی ژنتیک در سیب زمینی. رساله دکتری, دانشکده علوم, دانشگاه تهران.

۲- هفته نامه سلامت، ۱۳۸۵، سال دوم، شماره ۹۱.

3- Banerjee, A., Part, S. and Hannapel, D. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. andigena) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Plant Science 170: 732-738.

4- Beanjean, A., Sangwan, R. S. and Lecadonnel, A. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. Journal of Experimental Botany 49: 1589-1595.

5- Chandra, R, Upadhya, M. D. and Jha, K. K. 1983. Regeneration of plantlets from potato callus. Journal of Indian Potato Assoc 10: 29-33

6- Craig, W., Gargano, D., Scotti, N. and Nguyen, T. 2005. Direct gene transfer in potato: A comparison of particle bombardment of leaf explants and PEG-mediated transformation of protoplasts. Plant Cell Reports 24: 603-611.

7- Dale, P. J. and Hampson, K. K. 1995. An assessment of morphogenic and transformation efficiency in a range of varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.). Euphytica 85: 101-108.

8- De Block, M. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens* . Theoretical Applied Genetics 76: 767-774.

9- De Garcia, E. and Martinez, S. 1995. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Desire from stem nodal sections. Journal of Plant Physiology 145: 526–30.

10- Demytro, P., Vladimir, A., Rafael, R., William, K. and Santosh, M. 2004. Wound-inducible promoter from poplar is responsive to fungal

Archive of SID
www.SID.ir

infection in transgenic potato. Plant Science 167: 715-724.

11- Gordon, W. S and William, R. B. 1993. A modified method for routine *Agrobacterium*-mediated transformation of *in vitro* grown potato microtubers. Plant Cell Reports 12: 324-327.

12- Gustafson, V., Mallubhola, S., MacDonnell, J. and Sanyal-baghchi, M. 2006. Transformation and plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L.CV. 'Shepody'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 85: 361-366.

13- Kim H. S., Joung-Won, E., Kim, M. S. and Byuug-Chan, L. 2003. Expression Human β-amyloid peptide in transgenic potato. Plant Science 165: 1445-1451.

14- Komamine, A, Kawahara, R., Matsumoto, M., Sunabori, S., Toya, T., Fujiwara, A., Tsukahara, M., Smith, J., Ito, M., Fukuda, H., Nomura, K. and Fujimura, T. 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. In Vitro Cell Dev Biol Plant 28: 11-14.

15- Kumar, A., Miller, M., Whitty, P., Lyon, J. and P. Davide. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of five wild *Solanum* species using in vitro microtubers. Plant Cell Reports 14: 324-328.

16- Lam, S. L. 1977. Plantlet formation from potato tuber discs *in vitro*. American Potato Journal 54: 465-468.

17- Leshem, B., Lilien-Kipnis, H. and Steinitz, B. 1982. The effect of light and of explant orientation on the regeneration and subsequent growth of bulblets on Lilium longiflorum Thumb bulb-scale section cultured in vitro. Scientia Horticulturae 17: 129-136.

18- McClelland, M. T. and Smith, M. A. L. 1990. Vessel type, closure, and explant orientation influence in vitro performance of five woody species. Horticultural Science 25: 797-800.

19- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473–497.

20- Papafotiou, M. and Martini, A.N. 2009. Effect of position and orientation of leaflet explants with respect to plant growth regulators on micropropagation of *Zamioculcas zamiifolia* Engl. (ZZ). Scientica Horticulturae 120: 115-120.

21- Petrova, A. and Dedicova, B. 1992. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. c.v. Desire from unripe zygotic embryos. Journal of Plant Physiology 139: 539–42.

22- Romano, A., Raemakers, K., Visser, R. and Mooibrek, H. 2001. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment. Plant Cell Reports 20: 198-204.

23- Santarem, E. R., Pelissier, B. and Finer, J. J. 1997. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. In Vitro Cell Dev Biol Plant 33: 13-19.

24- Seabrook, J. E. A. and Douglass, L. 2001. Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. Plant Cell Reports, 20: 178-182.

25- Sharma, K. and Millam, S. 2004. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. Plant Cell Reports 23: 115-119.

26- Sidorov, V. A., Kasten, D., Pang, S. Z., Hajdukiewicz, P. T. J., Staub, J. M. and Nehra, N. S. 1999. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. Plant Journal 19: 209-216.

27- Synder, G. W. and Belknap, W. R. 1993. A modified method for routine *Agrobacterium*-mediated transformation of *in vitro* grown potato microtubers. Plant Cell Reports 12: 324-327.

28- Thomas, C. Jimenze, M. 2005. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. Plant cell Monographs 2: 103-117.

29- Vargas, E, Garcia, D. and Oropeza, M. 2005. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: histological analysis and extracellular patterns. Journal of Plant Physiology 162: 449-456.

Archive of SID

www.SID.ir

High frequency plant regeneration from leaf, internode and microtuber explants of potato (*Solanum tuberosum* L.)

Rahnama H.[1], Montaser Kohsari S.[2], Naderi H.[1,2] and Fahimi H.[1,2]

[1] **Agricultural Biotechnology Research Center, Karaj, I.R. of IRAN**

[2] **Faculty of Biology, Science School, University of Tehran, Tehran, I.R. of IRAN**

Abstract

Potato is one of the most important crops in Iran. Optimization of tissue culture in order to achieve high frequency regeneration is the first step for genetic transformation. Here, regeneration of two important potato cultivars that are widely cultivated in Iran (Agria and Marfona) was investigated. Internodes, leaves, and microtubers explants of potato were treated with different hormone components. It was found that in the medium A, regeneration efficiency of internodes and leaves explants at 1mg/l TDZ is higher than the other TDZ concentrations. In the medium C, regeneration percentage of internodes (95.8% in Agria, 100 % in Marfona), leaves (83.3 % in Agria, 91.6 % in Marfona) and microtubers (82.6 % in Agria, 86.3 % in Marfona) has shown more efficient than medium A. On the other hand, regeneration time in medium C was 35 days less than that in medium A. We observed different stages of somatic embryogenesis for all explants at C medium. Finally, we were recommended the medium C as an efficient medium for high regeneration of these cultivars of potato.

Keywords: Embryogenesis, Internod, Leaf, Microtuber, Regeneration, *Solanum tuberosum*

Archive of SID

www.SID.ir