Archive of SID

مجله علمی کشاورزی، جلد۲۵ ، شماره ۱، سال ۱۳۸۱

اثر ترکیبات هورمونی و ریزنمونه درتولید کالوس سیر در لوله آزمایش (*In vitro*)

علی اکبر رامین[۱]، عبدلکریم کاشی[۲] و نعمت الله اعتمادی[۳]

چکیده

پژوهش‌هائی بمنظور تکثیر شیرچه‌های حاصل از کشت بافت در لوله (*In vitro*) رقم سفید شمال بطریقه کشت نوک ساقه (Shoot tip) و کالوس (Callus) انجام گرفت. در این بررسی ریز نمونه‌هایی از طبق، انتهای ساقه، طبق بهمراه انتهای ساقه و انتهای ریشه پس از ضدعفونی در محیط کشت MS همراه با اکسین‌های مختلف (2,4-D و NAA ، IAA) و کنتین (Kinetin) کشت گردید. مناسبترین ماده ضدعفونی کننده ریزنمونه‌ها، وایتکس با ماده مؤثر۱/۵ در صد هیپوکلرید سدیم برای مدت ۳۰ دقیقه و سپس شستشو با الکل اتانول ۶۰ در صد بمدت ده دقیقه بدست آمد. بالاترین درصد کالوس در محیط MS با یک میلی گرم در لیتر IAA و یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در تاریکی دائم تشکیل گردید. همچنین بیشترین افزایش وزن کالوس برای ریزنمونه طبق در محیط MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی گرم در لیتر کنتین و برای ریزنمونه انتهای ساقه در محیط MS همراه با یک میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و در ۱۶ ساعت نور (۲۵۰۰ لوکس) بدست آمد. بیشترین درصد کالوس جنین‌زا و تمایزیابی و تولید ریشه بوسیله کاشت کالوس حاصل از ریزنمونه طبق که به محیط MS با یک میلی‌گرم در لیتر IAA و یک میلی گرم در لیتر کنیتن منتقل شده بود، مشاهده شد. سلول‌های تمایز یافته در رقم سیر مورد آزمایش (سفید شمال) ابتدا تولید ریشه کردند.

لغات کلیدی: سیر، کشت بافت، اکسین، سیتوکنین و کالوس.

مقدمه

سیر یکی از محصولات قدیمی و مهم ایران می‌باشد که علاوه بر مصارف خوراکی از نظر دارویی نیز دارای اهمیت زیادی است. سیر بعلت عقیم بودن گلها و عدم امکان تولید بذر، به طریقه غیرجنسی و بوسیله کاشت سیرچه‌ها تکثیر می گردد. بنابراین همانند غالب گیاهانی که با این روش تکثیر می‌شوند، احتمال آلوده شدن سیرچه‌ها به بیماریهای ویروسی و انتقال آن به نسل‌های بعدی، زیاد می‌باشد (۴). نتیجه آلودگیهای ویروسی کاهش شدید عملکرد بوده که غالب اوقات یکی از عوامل پائین بودن تولید، محسوب می‌شود (۵ و ۶).

براساس گزارشات متعدد، تقریبا در تمام مناطق زیر کشت این محصول در جهان، مشکل آلودگی ویروسی سیر وجود داشته و گاهی میزان آلودگی و کاهش محصول تا ۵۰ درصد نیز بالغ می‌گردد (۲۰ و ۲۱). در حال حاضر، روش‌های کشت بسلول، بافت و

[۱] –دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۲] –استاد گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

[۳] – مربی گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۰/۲۹/۱۱

تاریخ پذیرش: ۸۱/۲/۳۰

www.SID.ir

Archive of SID

اندام‌های گیاهی در بسیاری از آزمایشگاههای تحقیقاتی دنیا بکار گرفته می‌شود و این روش‌ها برای جداسازی تغییرات مفید، تکثیر سریع ژنوتیپ‌ها، تولید گیاهان هاپلوئید ، گسترش دامنه تغییرپذیری، تشکیل کالوس و کشت‌های سلولی برای مطالعه اثر مواد غذائی و عاری از ویروس کردن گیاهان، استفاده می‌گردد. همچنین روش کشت بافت در تولید تجاری بسیاری از گیاهان نیز کاربرد وسیعی پیدا کرده است (۱، ۶، ۹، ۱۰ و ۱۶).

معمولاً کشت مریستم نوک ساقه برای تهیه پایه‌های عاری از ویروس مورد استفاده قرار می‌گیرد و از کشت کالوس در صورتیکه با برنامه تکثیر گیاه توأم گردد نیز می‌توان برای سالم سازی گیاهان استفاده کرد (۲، ۳ و۶). آزمایشات ویروس شناسی از کشت کالوس توتون آلوده به ویروس موزائیک توتون[1] (TMV) نشان داد که تنها ۳۰ درصد گیاهانی که از سلول‌های بافت کالوس توتون آلوده، حاصل شده بودند، به ویروس آلوده بودند (۱۶). بنظر می‌رسد که حذف ویروس بدان جهت است که سرعت ازدیاد سلولها بیشتر از سرعت تکثیر ویروس است (۱۶). گاهی واکشت مکرر ممکن است موجب حذف کامل ویروس شود (۷). همچنین گزارش گردیده، از گیاهان حاصله از کشت برگ توتون که به ویروس PVX آلوده بودند، در نتیجه کشت بافت بیشتر از ۸۰ درصد گیاهان حاصل ، عاری از ویروس می‌گردند (۱۱و ۱۶).

سیر بعلت عدم تولید بذر حقیقی و تکثیر از طریق سیرچه‌ها (عضو رویشی) به ویروسهای مختلف آلوده می‌شود و کاشت مریستم معمولاً جهت حذف بیماریهای ویروسی، انجام می‌گیرد (۲و ۱۰). مآء و همکاران (۱۰) مریستم به ابعاد ۰/۶-۰/۴ میلی متر را از گیاهان جوان آلوده به ویروس موزائیک سیر (TMV) جدا کرده و در محیط MS کشت نمودند، گیاهان حاصله ۸۷ درصد عاری از ویروس بودند. ریزنمونه‌های بزرگتر از ۰/۶ میلی‌متر اگرچه دارای رشد بیشتری بودند، ولی گیاهان عاری از ویروس تولید نکردند. بوجوانی و همکاران (۴)، مریستم ۶ رقم سیر نیوزلندی را به ابعاد ۰/۹-۰/۴ میلیمتر در محیط غذایی B5 کشت دادند، از گیاهچه‌های تولیدی از ۵ رقم، ۱۰۰ درصد عاری از ویروس بودند. در آزمایش دیگر بر روی ۵ رقم دیگر سیر، برتاسینی و همکاران (۲) توانستند با کشت نوک مریستم به ابعاد ۰/۳-۰/۲ میلی‌متر در محیط MS و B5، درصد گیاهان عاری از ویروس را به ۸۵ درصد افزایش دهند. همچنین دیگر پژوهشگران با کشت نوک ساقه ارقام دیگر سیر به ابعاد ۰/۸-۰/۵ میلی‌متر در محیط غذائی B5 توانستند گیاهچه‌های عاری از ویروس سیر را به بیش از ۹۰ درصد افزایش دهند (۱۸ و۲۱).

بنابراین با تجربیاتی که در کشت بافت و کاربرد آن در تکثیر گیاهان مختلف بدست آمده است و از آنجائیکه تا کنون چنین مطالعه‌ای بر روی ارقام ایرانی سیر گزارش نشده است، این بررسی بمنظور یافتن مناسبترین شرایط برای تولید گیاهان سیر و همچنین انتخاب ریزنمونه وترکیب هورمونی برای تکثیر و تولید سیرچه، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

بمنظور بررسی اثر انواع شرایط کشت، ترکیب هورمونی و ریزنمونه در تولید گیاهچه‌های سیر در لوله آزمایش (*In vitro*) ، پژوهشهایی در دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی ، صورت پذیرفت. با توجه به اینکه برخی از مواد و روش‌های مورد استفاده، مشابه بوده است، لذا ابتدا به شرح قسمت‌های مشترک، پرداخته می‌شود.

درون شیشه‌های در پیچدار به ابعاد ۸×۲/۵ سانتیمتر پس از شستشو در آب مقطر و خشک کردن ۱۰

[1]–Tobacco Mosaic Virus

www.SID.ir

Archive of SID

میلی لیتر محیط کشت پایه MS (۱۲) با pH =۵/۷ ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد تحت فشار یک اتمسفر در اتوکلاو، سترون گردید. وسایل لازم جهت انتقال ریزنمونه به محیط کشت از قبیل پنس، اسکالپل و ... در آون و در دمای ۱۶۰ درجه سانتیگراد بمدت دو ساعت سترون گردید. ریزنمونه از سیر سفید شمال گرفته شد و شامل: طبق با قطر ۵-۳ میلی‌متر (Basal Plate=S)، مریستم همراه با ۳ تا چهار برگ اولیه به طول ۸-۵ میلی‌متر (Shoot tip=M)، مریستم با سه تا چهار برگ اولیه همراه با طبق بطول ۱۰-۸ میلی‌متر (Basal plate+shoot tip=SM) ، مریستم ساقه بطول ۰/۵-۰/۳ میلی‌متر (Meristem=m) و انتهای ریشه بطول ۱/۵-۱ میلی‌متر (Root tip=R) . ریزنمونه ها ابتدا با آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شد. پس از ضدعفونی، سه بار با آب مقطر شستشو و به محیط کشت انتقال داده شد. سپس درب شیشه‌ها بلافاصله بسته و با نوار پارافیلم عایق بندی شده و در اطاقک رشد در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی و یا ۱۶ ساعت روشنایی با شدت ۲۵۰۰ لوکس منتقل شدند (۱۶). کشت‌ها به فاصله ۱ تا ۱/۵ ماه، واکشت گردیدند.

آزمایش ۱، ضدعفونی ریزنمونه‌ها:

در این آزمایش ریزنمونه‌ها (چهار نوع ریز نمونه) تحت تیمارهای مختلف (جدول ۱) هر آزمایش بصورت مستقل در ده تکرار ضدعفونی شدند. پس از ضدعفونی، ریزنمونه‌ها به محیط پایه MS بدون هورمون منتقل گردید و در اطاقک رشد ۲۵ درجه سانتیگراد با ۱۶ ساعت روشنائی قرار داده شدند. تقریباً هر دو روز یکبار نمونه‌ها بررسی شده وضمن حذف نمونه‌های آلوده، درصد ریزنمونه‌های سالم (بدون آلودگی) نیز محاسبه و یادداشت گردید. آزمایش بصورت طرح کاملا تصادفی با ده تکرار برای هر تیمار (هر شیشه واحد آزمایشی) در نظر گرفته شد و در پایان میانگین درصد آلودگی تیمارها با استفاده از آزمون LSD در سطوح ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

جدول ۱- مواد ضدعفونی کننده ریزنمونه‌ها (تیمارها)

مواد ضدعفونی کننده (تیمار)	زمان ضدعفونی (دقیقه)					
	۳۰	۲۰	۱۰	۱	۰/۵	بلافاصله
وایتکس ۰/۲۵ درصد	×	×	×	×		
وایتکس ۰/۵ درصد	×	×	×			
وایتکس ۱/۵ درصد	×	×				
الکل اتانول ۹۶ درصد			×	×	×	×
وایتکس ۰/۵ درصد	×	×				
الکل اتانول ۹۶ درصد			×	×		
وایتکس ۱/۵ درصد	×					
الکل اتانول ۹۶ درصد			×			
وایتکس ۱/۵ درصد	×					
الکل اتانول ۹۶ درصد			×			

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش ۲- تعیین مناسبترین ترکیب هورمونی و ریزنمونه برای تولید کالوس

در این بررسی از محیط کشت MS که بوسیله سایر پژوهشگران برای سیر توصیه شده است(۳،۹ و۲۱) با سه سطح هورمون برای تولید کالوس استفاده گردید. محیط MS علاوه بر عناصر ماکرو و میکرو حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اینوزیتول، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیامین، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم آگار در لیتر بود. این محیط کشت بوسیله سه سطح مختلف هورمون همراه گردید. محیط اول (A) حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. محیط دوم (B) حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و محیط سوم (C) دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-4,D و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kinetin بود. وزن کالوس منتقل شده با استفاده از تفاوت وزن بین شیشه‌های فاقد و دارای کالوس قبل و بعد از انتقال معین گردید و هر ۱۵ روز یکبار اندازه کالوس‌ها نیز یادداشت گردید. پس از شش هفته وزن کالوس نهائی با استفاده از روش فوق تعیین گردید و سپس وزن کالوس تولید شده در این مدت محاسبه شد. آزمایش بصورت فاکتوریل درقالب طرح کامل تصادفی که در آن محیط های کشت (ترکیب هورمونی) بعنوان فاکتوراصلی (۳ سطح هورمون) و نوع ریزنمونه‌ها(۴ ریز نمونه) فاکتور فرعی در نظر گرفته شد. تعداد تکرار برای هر تیمار ده شیشه ، در نظر گرفته شد. معنی‌دار بودن سطوح اثرات هورمون بوسیله جدول تجزیه واریانس مشخص و میانگین‌ها از طریق آزمون LSD در سطح ۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای تمایزیابی، کالوس‌های تولید شده به محیط پایه MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kinetin (محیط F) و یا ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kinetin منتقل گردید (محیط G). پانزده روز پس از انتقال به محیط های کشت F و G برای شناسائی تمایز یافتن سلول‌ها، مطالعه ماکروسکوپی و میکروسکوپی صورت گرفت. اندازه هسته و واکوئل‌ها و سلول‌ها مورد بررسی و تحت عنوان کالوس جنین زا و غیر جنین زا طبقه‌بندی گردید (۶ و ۱۴). همینطور رنگ کالوس وضعیت ظاهری از قبیل چسبندگی سلول‌ها و سهولت در جداسازی توده از هم، مورد بررسی قرار گرفت. شش هفته پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت برای تمایز، درصد تمایزیابی (با ظهور ریشه) از کالوس‌های حاصل از کشت مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش بصورت طرح کامل تصادفی با ۳ سطح هورمون و چهار نوع ریزنمونه و هر تیمار ۱۰ بار تکرار گردید(هر شیشه بعنوان واحد آزمایش).

نتایج

۱- ضدعفونی ریزنمونه:

بطوریکه در جدول ۲ مشاهده می‌شود ضدعفونی سیرچه‌ها (B) بوسیله هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد و برای مدت ۳۰ دقیقه و شستشو با الکل اتانول ۶۰ درصد برای مدت ۱۰ دقیقه ضمن جلوگیری از آلودگی موجب زنده ماندن صد درصد ریزنمونه گردیده است. حال آنکه همین تیمار با الکل ۹۶ درصد تنها ۵۰ درصد ریزنمونه‌ها زیوائی داشته‌اند. ضدعفونی ریزنمونه مریستم + طبق (SM) با تیمارهای مختلف علاوه بر آلودگی موجب توقف رشد گشته است (باستثنای تیمار ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم و الکل ۶۰ در صدکه موجب زنده ماندن ۵۰ درصد ریزنمونه‌ها شده است). هیچ یک از تیمارهای ضدعفونی فوق نتوانست بطور کامل در محیط کشت مانع پیشرفت آلودگی ریزنمونه حاصل از مریستم (M) گردد (جدول ۲). همچنین ضدعفونی

www.SID.ir

Archive of SID

نوک ریشه (R) در الکل اتانول ۹۶ درصد برای یک لحظه ضمن جلوگیری از گسترش آلودگی موجب زنده ماندن صددرصد ریزنمونه گردیده است.

جدول ۲- درصد آلودگی ریزنمونه‌های ضدعفونی شده (اعداد نوشته در داخل پرانتز بیانگر درصد نمونه‌های زنده می‌باشد).

مواد ضدعفونی کننده / ریزنمونه	وایتکس ۰/۵ درصد (دقیقه)		الکل ۹۶ درصد (ثانیه)			وایتکس ۱/۵ درصد + ۲۰ دقیقه + الکل ۹۶٪		وایتکس ۱/۵ درصد ۳۰ دقیقه + ۱۰ دقیقه الکل	
	۲۰′	۳۰′	بلافاصله	۳۰″	۶″	۳۰″	۶۰″	الکل ۶۰٪	الکل ۹۶٪
سیرچه (B)	۳۳/۳	۳۳/۳	۱۰۰	۱۰۰	۱۰	۳۳/۳	۳۳/۳	۰	۰
					۰	(۶۶/۷)	(۶۶/۷)	(۱۰۰)	(۵۰)
مریستم + طبق (SM)	۶۶/۷	۶۶/۷	۱۰۰	۶۶/۷	۳/ ۳۳	۳۳/۳	۵۰	۰	۰
						(۶۶/۷)	(۰)	(۵۰)	(۴۰)
مریستم انتهایی (M)	۶۶/۷	۳۳/۳	۶۶/۷	۳۳/۳	۳/ ۳۳	۳۳/۳	۳۳/۳	۰	۰
						(۵۰)	(۰)	(۰)	(۰)
انتهای ریشه (R)	—	—	(۱۰۰)	(۵۰)	۰ (۰)	—	—	—	—

۲- تشکیل کالوس:

با توجه به شکل ۱، ریزنمونه گرفته شده از طبق (S)، بیشترین درصد کالوس را داشته است ولی ریزنمونه از نوک ریشه (R) در همان شرایط هیچگونه کالوسی ایجاد نکرده است. لذا بنظر می‌رسد مریستم حاصل از نوک ریشه، نمونه مناسبی برای تولید کالوس نمی‌باشد (نتیجه ارائه نشده است). متوسط کالوس تولید شده در تاریکی ۴۳/۳ درصد بوده که حدود ۱۰ درصد بیشتر از متوسط کالوس تولید شده در تناوب نوری است (شکل ۱). ضریب تشابه بین محیط‌های کشت بیانگر آن است که تفاوت زیادی بین محیط‌های کشت مورد آزمایش برای تشکیل کالوس وجود ندارد. ولی بهرحال، در محیط‌های کشت C و A در تاریکی، درصد تشکیل کالوس مقداری بیشتر از محیط کشت B بوده است.

مقایسه وزن کالوس تشکیل شده نشان می‌دهد که بین ریزنمونه‌ها صرفنظر از محیط کشت و تناوب نوری، ریزنمونه M (مریستم) بطور متوسط ۴۵/۹ میلی‌گرم کالوس را بوجود آورده است که تقریباً دو برابر میزان کالوس تولیدی برای ریزنمونه‌های S و SM می‌باشد و اختلاف کالوس تولیدی در سطح پنج درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۳). همچنین مقایسه محیط‌های کشت از نظر وزن کالوس تولید شده نشان می‌دهد که محیط کشت C تقریباً دو برابر محیط کشت A، کالوس تولید کرده ولی با محیط کشت B اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (جدول ۳). تأثیر نور دائم و تناوب نوری بر وزن کالوس تولید شده بسته به نوع ریزنمونه و محیط کشت متفاوت بوده است (شکل ۲). بعنوان مثال ریزنمونه‌های SM و M در محیط کشت B و در نور (L) بیشترین وزن کالوس را موجب شده‌اند حال آنکه

www.SID.ir

Archive of SID

ریز نمونه‌های S در محیط کشت C و در شرایط تاریکی (D)، وزن کالوس تولیدی، بیشتر بوده است.

جدول ۳- مقایسه میانگین وزن کالوس تولید شده در ریز نمونه و محیط کشت‌های مختلف(حروف مشترک نشان دهنده آنست که اختلاف میانگین‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار نمی‌باشد).

ریزنمونه / محیط کشت	میانگین وزن کالوس تولیدی از هر نمونه (میلی‌گرم)
ریزنمونه	
M	٤٥/ ٩A
S	١٦/ ٩٦b
SM	١٥/ ٩٧b
m	١٥/ ٠١b
محیط کشت	
A	١٦/٦٥A
B	٢٨/٧٦b
C	٣٢/٦٢b

۳- تمایزیابی

مطالعه میکروسکپی کالوس‌های تولید شده ۱۵ روز پس از انتقال به محیط F و G نشان داد که دو نوع سلول در کالوسها وجود دارد. یکدسته از سلولها بسیار کوچک، دارای هسته‌های درشت و واکوئل‌های کوچک بودند. ظاهر این نوع کالوس دانه دانه و به رنگ سفید یا سفید شیری بوده و براحتی توده‌های کشت تمایزیابی در آن صورت می‌گیرد. دسته دوم کوچک کالوس از هم جدا می‌گردیدند. این نوع کالوس جنین‌زا بوده و در صورت مناسب بودن محیط دارای سلولهای بزرگ و کاملا کشیده با هسته کوچک و تعداد واکوئل‌های زیاد. رنگ این نوع کالوس‌ها زرد و کمی آبکی و توده کالوس براحتی از هم جدا نمی‌گردید. در این نوع کالوس تمایزیابی صورت نمی‌گیرد و به آن کالوس غیرجنین‌زا گویند. بر روی این کالوس ممکن است در بعضی سلولها در محیط کشت مناسب، تغییراتی بوجود آید و کالوس جنین‌زا بر روی آن تشکیل گردد. کالوس تولید شده در محیط‌های کشت A و B و C از نوع غیرجنین‌زا بوده و پس از انتقال آنها به محیط‌های کشت F و G تغییراتی در نوع کالوس بوجود آمد.

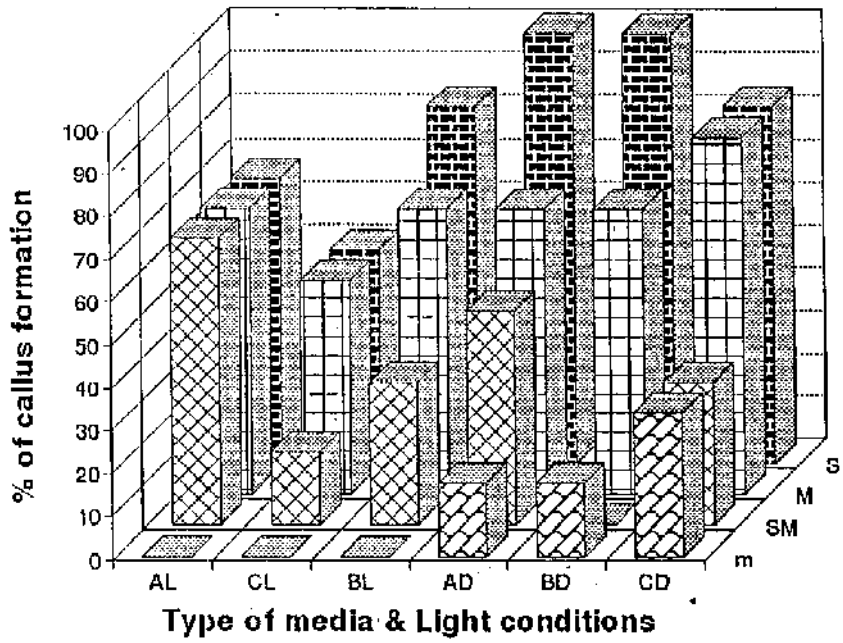
در جدول ۴ فاصله درصد کالوس‌های جنین‌زا و غیرجنین زا پس از یک ماه نشان داده شده است. همانطوری که مشاهده می‌شود، قدرت تولید کالوس جنین‌زا در محیط G بیشتر بوده و ریزنمونه S که قبلا در محیط کشت C تولید کالوس کرده بود، نسبت به سایر ریزنمونه‌ها درصد بیشتری کالوس جنین‌زا تولید کرده است. پس از سه هفته از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط F و G تمایزیابی شروع گردید. سلول‌های تمایز یافته ابتدا تولید ریشه کرده و پس از ۶ هفته بیشترین درصد تمایزیابی در محیط G و ریزنمونه S بدست آمد (جدول ۵).

جدول ٤- درصد کالوس جنین‌زا و غیرجنین‌زا در محیط‌های کشت F و G

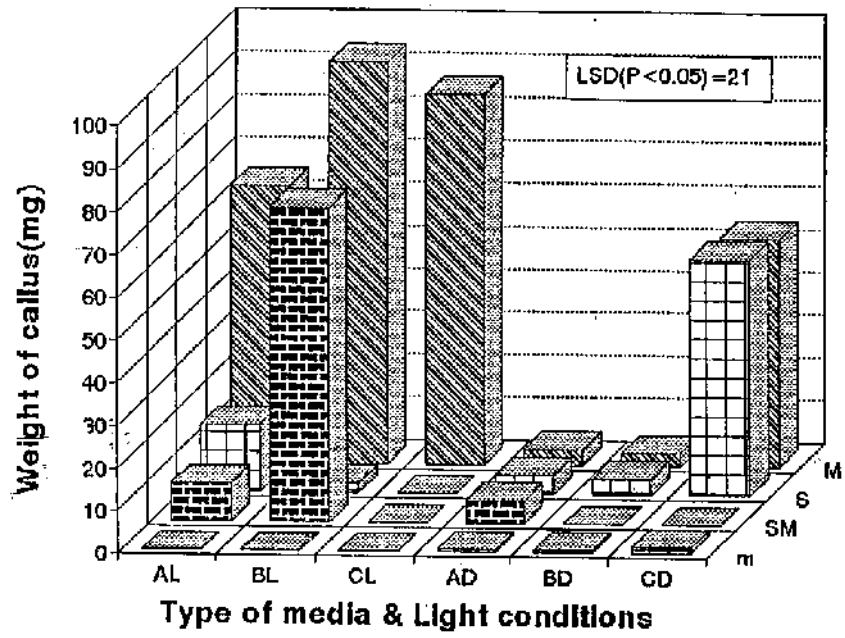
محیط کشت قبلی	ریزنمونه	محیط کشت F		محیط کشت G	
		جنین‌زا	غیرجنین‌زا	جنین‌زا	غیرجنین‌زا
A	S	۰	۱۰۰	۳۳/۳	٦٦/٧
	M	۰	۱۰۰	۳۳/۳	٦٦/٧
	SM	١٦/٧	۸۳/۳	۰	۱۰۰
B	S	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰
	M	۳۳/۳	٦٦/٧	۳۳/۳	٦٦/٧
	SM	۳۳/۳	٦٦/٧	۵۰	۵۰
C	S	۳۳/۳	٦٦/٧	٦٦/٧	۳۳/۳

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ در صد کالوس ریز نمونه ها: S (طبق)، M (نوک ساقه)، SM (طبق + نوک ساقه) و m (مریستم ساقه) در محیط کشت‌های مختلف، در شرایط تاریکی مطلق (D) و تناوب نوری (L).



شکل ۲ – وزن کالوس تولید شده ریزنمونه‌ها: S (طبق)، M (نوک ساقه)، SM (طبق + نوک ساقه) و m (مریستم ساقه) در محیط کشت‌های مختلف، در شرایط تاریکی مطلق (D) و تناوب نوری (L).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- درصد تمایزیابی کالوس‌های جنین‌زا در محیط‌های کشت F و G

محیط کشت قبلی	ریزنمونه	محیط کشت F	محیط کشت G
A	S	۰	۰
	M	۰	۵۰
	SM	۰	۰
B	S	۰	۰
	M	۵۰	۶۶/۷
	SM	۱۶/۷	۵۰
C	S	۱۶/۷	۶۶/۷
	M	۳۳/۳	۳۳/۳

بحث :

نتیجه تأثیر مواد ضدعفونی کننده بر انواع ریزنمونه‌ها نشان داد که ریزنمونه طبق (S) و طبق + نوک ساقه (SM) بعلت آلودگی شدید نسبت به سایر ریز نمونه ها برای ضد عفونی به غلظت های بالاتر و زمان بیشتر نیاز دارد. بهمین دلیل ضدعفونی ریزنمونه دارای طبق به دلیل آلودگی زیاد با عدم موفقیت همراه بوده و افزایش غلظت و مدت موجب صدمه سلول‌ها و عدم رشد آنان گردید. ریزنمونه طبق + نوک ساقه (SM) نیز بعلت آلودگی شدید منطقه تحتانی طبق حداکثر ۶۶/۷ درصد از ریزنمونه‌ها ضدعفونی سطحی شدند و با افزایش غلظت ماده ضدعفونی کننده، رشد آن بعلت آسیب‌دیدگی سلولها متوقف گردید (۱۳، ۱۷). ریزنمونه نوک ساقه (M) همراه با ۳-۲ برگ اولیه ضمن بکارگیری غلظت کمتر از ماده ضدعفونی کننده تنها ۳۳/۲ درصد آلودگی سطحی نشان داد ولی این ریزنمونه پس از گذشت ۲۰ روز دچار آلودگی گردید که احتمالا مربوط به آلودگی‌های داخلی است که میبایست از مواد آنتی بیوتیک استفاده کرد (۱۶). ولی طبق گزارشات نواک (۱۵)، کاربرد آنتی‌بیوتیک باعث توقف رشد و نکروزه شدن ریزنمونه‌ها می‌گردد.

ضدعفونی شیرچه‌ها بوسیله هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد برای ۳۰ دقیقه و سپس شستشو با الکل ۶۰ در صد برای مدت ۱۰ دقیقه ضمن جلوگیری از آلودگی موجب زیوائی صد درصد ریزنمونه گردید (جدول۲). این بخش از نتیجه با نتایج دیگر پژوهشگران مطابقت دارد (۲، ۳ و ۱۴). همچنین فروبردن ریزنمونه نوک ریشه[1] برای یک لحظه در الکل اتانول ۹۶ درصد ضمن جلوگیری از آلودگی مانع صدمه رسیدن به سلولها گشته است. علت عدم توانایی غلظت کم مواد ضدعفونی بدلیل نفوذ نکردن به تمام جدار سطحی ریزنمونه بوده است. از بین رفتن ریز نمونه در غلظت زیاد مواد، بواسطه نفوذ بداخل سلولها و از بین بردن غشاء سلولی گزارش گردیده است (۶ و ۱۷).

ریزنمونه گرفته شده از طبق (s) بیشترین درصد تشکیل کالوس را داشته است (شکل۱). قبلا تولید کالوس از طبق (S) ، مناسب‌تر از ریزنمونه‌های تهیه شده از قسمت‌های هوائی گیاه گزارش گردیده است (۵). تولید کالوس سریعتر و بیشتر توسیله ریز نمونه طبق احتمالا بدلیل داشتن لایه‌ای از سلول‌های مریستمی است که در ساختمان آن وجود دارد (۷). درصد تشکیل کالوس در تاریکی اندکی بیشتر از

[1] Root tip

www.SID.ir

Archive of SID

روشنایی بوده است (۵). احتمالا نور در تشکیل کالوس اثر منفی داشته و علت آن از بین رفتن هورمون اکسین در مقابل نور است که در تقسیم سلولی به همراه سایتوکنین شرکت فعال دارد (۱۹). همچنین بیشترین کالوس تولیدی از محیط کشت C و سپس B حاصل گردید. دلیل آن ممکن است مربوط به مناسب بودن نسبت هورمون اکسین به سایتوکنین باشد که در سیستم سلولی نقش بسیار مهم را بعهده دارند (۱۷).

- کالوس جدا شده از ریز نمونه نوک ساقه(M) در طول ۱/۵ ماه، افزایش وزن بیشتری نسبت به سایر ریز نمونه‌ها داشته است. علت آن را می‌توان در نوع ریزنمونه جستجو کرد. رشد کالوس در داخل یک گونه گیاهی براساس منشأ محل ریزنمونه آن گیاه متفاوت بوده و علت آن به درستی مشخص نشده است (۱۶).
- نواک (۱۵)، کاهان (۸) و وان در والک (۱۰) برای تمایزیابی کالوس، در ارقام مختلف سیر وجود هورمون کینتین و اکسین را لازم دانسته‌اند. لذا در این آزمایش به محیط‌های کشت مورد استفاده برای تمایزیابی، این هورمون‌ها اضافه گردید (F و G). با توجه به نتایج بدست آمده محیط G (MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیترKinetin) مناسب‌تر برای تمایزیابی سیر سفید شمال تشخیص داده شد. این نسبت اکسین و سیتوکنین قبلا برای ارقام دیگر سیر جهت تمایزیابی مناسب گزارش داده شده است (۵). سلول‌های تمایز یافته در سیر سفید رقم شمال منحصرا تولید ریشه کردند، بنظر می‌رسد علت آن علاوه بر اینکه کالوس از قدرت تولید ریشه بیشتری برخوردار است، در این رقم به نسبت بالاتری از سیتوکنین به اکسین برای شاخه‌زائی نیاز است. لذا محیط G که دارای اکسین بیشتری است، درصد ریشه‌زایی بیشتری نسبت به محیط F داشته است (۱۸). در محیط غذایی F، افزایش مقدار سایتوکنین به گونه‌ای نبوده که ایجاد شاخه کند و بنابراین در این محیط بخش اعظم نمونه‌ها بجای تمایزیابی، میزان کالوس آنها افزایش یافته است.

References

1- BARRUETO, L.P., ILLG, R.D. AND PIEDRABUENA, A.E. 1994 Regeneration of garlic plants (*Allium sativum L., Chonan*) via cell culture in liquied medium. In Vitro Cell Dev. Biol. :150-155.

2- BERTACCINI, A., MARIANI, F. AND BORGIA, M. 1986 Shoot tip culture of different garlic lines for virus elimination. Istituto di patologia vegetable Universita Bologna.

3- BHOJWANI, S.S. 1980 In vitro propagation of garlic by shoot proliferation: Scientia Hort. 13:39-43

4- BHOJWANI, S.S., COHEN, D. AND FRY, P.R. 1982 Production of virus free garlic and field performance of micropropagated plants. Scientia Hort., 18: 39-43.

5- CONCI, V.C., MORICONI, D.N. AND HOME, S.F. 1987 In vitro plantlet regeneration from callus in garlic. Plant Physiol., 83: 342-349.

6- DOLEZEL, J. AND NOVAK, F.J. 1985 Cariological and cytophotometric study of callus induction in *Allium sativum*. J. of Plant Physiol., 5: 116-123.

www.SID.ir

Archive of SID

7- HARTMAN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES JR, F.T. AND GENEVER, R.L. 1997 Plant propagation principles and practices. ,Prentice Hall, New Jersey, 770p.

8- KAHANE, R., RANCILLAC, M. AND DE LA SERVE, B.T. 1992 Long-term multiplication of onion (*Allium sativum* L.) by cyclic shoot regeneration in vitro. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 28:281-288.

9- LU, Q.Y., ZHOU, W.Y. AND DONG, Y.Y. 1982 Induction of callus from young leaves of arlic and plantlet regeneration. Acta Hort., 9: 23-29.

10-MA, Y., WANG, H.L., ZHANG, C.J., KANG, Y.Q. 1994 High rate of virus-free plantlet regeneration via garlic scare-tip culture. Plant Cell Reports, 14: 65-68.

11- MURASHIGE, T. 1977 Current status of plant cell and organ culture. HortScience, 12:127-130.

12- MURASHIGE, T. AND SKOOG, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.

13- NOVAK, F.J. 1976 In vitro techniques in garlic (*Allium sativum* L.) breeding. Usta Experimentalni Botanika, 50-60.

14- NOVAK, F.J. 1980 Phenotype and cytological status of plants regerated from callus cultures of *Allium sativum* L. Inst. Bot. Czech. 4-6

15- NOVAK, F.J. AND HAVRANEK, P. 1974 A cytological study on tissue cultures of *Allium sativum* L. Ustav Zelinarsky CAZ. 48-53.

16- PIERIK, R.L.M. 1987 In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands, 344 p.

17- RUBATZKY, V.E. AND YAMAGUCHI, M. 1997 World vegetables, principle, production and nutritive values. Second edition. Chapman and Hall, New York, 483p.

18- SEABROOK, J.E.A. 1994 In vitro propagation and bulb formation of garlic. Can. J. Plant Sci., 74:155-158.

19- TAIZ, L. AND ZEIGER, E. 1998 Plant Physiology. Second edition, Sinauer Associates, Inc, Publishers, Massachusetts.

20-VAN DER VALK, O.E., VERSTAPPEN, S.F., JANSON, R.C. AND DONS, J.J.M. 1992 High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three *Allium* species. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 30: 181-191.

21-YASSEEN, Y.M., SPLITTSTOESSER, W.E. AND LITZ, R.E. 1994 In vitro shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. Plant Cell Tissue and Organ Cultures, 36:243-247.

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of hormone combination and explants on garlic(*Allium sativum L.*) callus induction *In vitro*

A. A. Ramin[1], A.K. Kashi[2] and N. Etemadi[3]

Abstract

Experiments were carried out with the aim of plantlet produced from the tissue culture of garlic cv. Saphide Shomal by means of shoot tip and callus culture. In this experiment, small sample of basal plate (S), shoot tip (M), basal plate with shoot tip (SM) and root tip (R) were cultured after disinfecting in a MS medium with various auxin (IAA, NAA, 2,4-D) and Kinetin. The most suitable achieved disinfecting substance for the explants was bleach (Vortex) with the effective substance of 1.5 percent Sodium hypochloride for the period of 30 minutes and then, rinsing with 60 percent Ethanol alcohol for 10 minutes. The highest percentage of callus in the MS medium with 1 mg/l IAA and 1 mg/l 2,4-D was established in perpetual darkness. Also, the highest callus weight increase for the basal plate explant in the MS medium contains 2 mg/l IAA, 0.5mg/l 2,4-D and 1 mg/l kinetin. And for the shoot tip, in MS medium supplied with 1 mg/l IAA, 0.5mg/l 2,4-D and in 16 hours light (2500 Lux) was achieved. The highest percent of embryonic callus, differentiation and root formation were obtained through the callus resulting from basal plate explant which had been transferred to the MS medium with 1 mg/l IAA and 1mg/l kinetin. Also, it was observed that the differentiation cells of garlic cv. Saphide Shomal primary had produced roots

Keywords: *Garlic, tissue culture, Auxin, Cytokenin and Callusing*

[1] –Associate professor, Shahid Chamran University, College of Agriculture, Ahwaz, Iran
[2] –Professor, Tehran University, College of Agriculture, Tehran, Iran
[3] –Instructor, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

www.SID.ir