Archive of SID

بررسی تحمل به شوری و تنوع کروموزومی در کشت سلول چغندرقند

Investigation on salt tolerance and chromosomal variation in cell culture of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.)

پیمان نوروزی[۱]، سیدیعقوب صادقیان[۱] , محمود مصباح[۱] و تهمینه لهراسبی[۲]

چکیده

به منظور بررسی اثرات محیط کشت حاوی ترکیبات هورمونی بر روی تغییرات فنوتیپی و کروموزومی بافت‌های کشت شده چغندرقند، آزمایش‌هایی در سطوح مختلف نمک طعام و نیز مطالعات سیتولوژیکی کالوس‌های حاصل از کشت تعلیقی صورت گرفت. ابتدا هیپوکوتیل گیاه‌چه‌های هفت روزه دو رگه زراعی دیپلوئید، در محیط MS حاوی ترکیبات هورمونی کشت شده و کالوس تولید نمودند. دستجات سلولی و قطعات کالوس حاصل از آن بر روی محیط‌های PG_{OB} با غلظت‌های متفاوت شوری (۳۰۰-۰ میلی‌مولار نمک طعام) قرار گرفتند و رشد آن‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که کالوس حاصل از رگه مولتی‌ژرم نسبت به رگه منوژرم به غلظت‌های متفاوت نمک طعام به طور آشکار، تحمل بیشتری نشان می‌دهد؛ به طوری که با انتقال کالوس‌های رگه منوژرم و مولتی ژرم از محیط شاهد به محیط حاوی ۲۰۰ میلی‌مولار نمک طعام به ترتیب ۱۵ و ۷۵ درصد قطعات کالوس رشد نمودند. با انتقال کالوس رقم مولتی‌ژرم به محیط حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار نمک طعام، کلیه قطعات کالوس رشد خوبی داشتند. هم چنین در بین قطعات کالوس مربوط به هر تیمار نیز از نظر تحمل به شوری تنوع وجود داشت. در آزمایشی دیگر، تنوع سماکلونی در سطح کروموزوم سلول‌های کالوس حاصل از کشت تعلیقی بررسی گردید و حالاتی از پلی پلوئیدی و انیوپلوئیدی در بعضی سلول‌ها مشخص گردید. از این رو، شناسائی و کنترل پدیده تنوع سماکلونی در کشت سلول چغندرقند در جهت دلخواه برای انتخاب رگه‌های متحمل به شوری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: تنوع کروموزومی, چغندرقند، کشت تعلیقی، کشت کالوس، نمک طعام

۱ - اعضای هیئت علمی مؤسسه تحقیقات چغندرقند - کرج Email:norouzi@sbsi.ir
۲ - عضو هیئت علمی مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی - تهران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

عدم ثبات ژنتیکی یک پدیده معمول در کشت سلول گیاهی است و کشت بافت چغندرقند نیز از این قاعده مستثنی نیست. میزان تنوع حاصل بستگی به منبع جداکشت مورد استفاده و تکنیک به کار رفته در کشت درون شیشه (*In vitro*) دارد. همه گیاهان تشکیل شده از نقاط انتهایی ساقه از نظر صفات سیتولوژیکی و فنوتیپی پایدارتر هستند. تنوع در بافت‌های کالوس چغندرقند یک پدیده معمول است. پلی پلوئیدی و انیوپلوئیدی بعد از تشکیل کالوس ایجاد می‌گردد. (Atanassov 1986)

استفاده از تنوع سماکلونی (Somaclonal variation) ایجاد شده در محیط کشت بافت و سلول گیاهی می‌تواند کمک مؤثری در به‌نژادی چغندرقند از طریق گزینش درون شیشه برای صفات مفیدی هم چون مقاومت به علف‌کش، تحمل یا مقاومت به شوری، خشکی، فلزات مضر، سموم عوامل بیماری‌زا و سایر صفات قابل گزینش در سطح سلولی باشد. راه‌کار به کارگیری تنوع سماکلونی و گامتوکلونی (Gametoclonal)، بر استفاده از بهترین ارقام در دسترس، به منظور گزینش یک صفت خاص در گیاهان باززائی شده از سلول‌های گیاهی کشت شده استوار است. در این صورت ژنوتیپ‌های جدید نه تنها واجد صفات واریته‌های مادری هستند بلکه یک صفت مناسب زراعی، علاوه بر صفات قبلی، مانند مقاومت به یک نوع بیماری یا شوری و غیره را نیز دارا خواهند بود. با کاربرد این روش، محدودیت‌های روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات از قبیل کاهش باروری در دورگ‌گیری، کمبود تنوع ژنتیکی و یا طولانی شدن فرآیندهای دورگ‌گیری و گزینش تا حدودی برطرف خواهند شد. (Lindsey and Jones 1992)

مصباح و یاوری (۱۳۷۰) در بررسی میزان تحمل به شوری در لاین‌های مختلف چغندرقند در شرایط گلخانه‌ای حدود ۲۰۰ رگه چغندرقند را در سطوح شوری ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی موس بر سانتی‌متر ارزیابی نمودند و دریافتند که واکنش ارقام در برابر غلظت نمک یکسان نبوده و ارقام دیپلوئید و تتراپلوئید مولتی‌ژرم در مقایسه با ارقام منوژرم تنوع ژنتیکی بیشتری برای تحمل به شوری دارند. هم چنین بررسی تحمل پذیری و تطبیق یافتن بافت چغندرقند در سطوح مختلف پلوئیدی به شرایط تنش شوری در محیط باززائی (یاوری، ۱۳۸۰) در مؤسسه تحقیقات چغندرقند انجام گرفته است.

ایجاد و گزینش گیاهان مقاوم و یا متحمل به بعضی عوامل تنش‌زای محیطی از طریق کشت بافت و سلول در تعدادی از گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است و در مورد تنش شوری گیاهان مقاوم از این طریق بدست آمده اند (شکیب۱۳۷۳ و Tal 1990). تنوع بدست آمده از کشت درون شیشه در گیاهان باززائی شده از کالوس، کشت سلول تعلیقی و پروتوپلاست چغندرقند گزارش شده است. (Saunders et al. 1990)

www.SID.ir

Archive of SID

کشت سلول تعلیقی چغندرقند در غلظت‌های متفاوت نمک طعام (۲۰۰-۰ میلی مولار) انجام گرفته است و تحمل سلول‌ها برای یون سدیم (Na^+) با تحمل گیاه کامل، قابل مقایسه بوده است (Blumvald and Poole 1987). هم چنین گیاهان متحمل به املاح مرکب از طریق گزینش درون شیشه جداکشت‌های دمبرگ کشت شده در غلظت‌های متفاوت نمک در چغندرقند به دست آمده است. (Freytag et al. 1990)

در این تحقیق، پس از تهیه کالوس چغندرقند، قطعات و دستجات سلولی آن به محیطهایی با سطوح مختلف شوری انتقال یافت و عکس‌العمل سلول‌های کالوس به غلظت‌های متفاوت نمک طعام بررسی گردید. هم چنین از کالوس‌های حاصل از کشت سلول تعلیقی برای مطالعه تنوع کروموزومی سلول‌ها استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

قطعات کالوس و کشت تعلیقی حاصل از کالوس به دست آمده از هیپوکوتیل گیاهچه هفت روزه دو رگه زراعی دیپلوئید منوژرم P.۲۷ – ۹۵۹۷ و مولتی ژرم P.۱۰۷ – ۷۲۳۳ برای آزمایش‌های این تحقیق در آزمایشگاه کشت بافت مؤسسه تحقیقات چغندرقند در سال ۱۳۷۴ به کار رفتند.

تهیه کالوس

بافت هیپوکوتیل از گیاهچه‌های استریل جدا شده و در محیط MS (Murashige and Skoog 1962) به همراه یک میلی‌گرم در لیتر هورمون توفوردی (2-4-D) و نیم میلی گرم در لیتر کینتین (Kinetin) کشت شدند و پس از ۳-۲ هفته تولید کالوس نمودند.

آزمایش تحمل به شوری

برای بررسی اثر غلظت‌های متفاوت نمک طعام بر روی رشد کالوس قرار گرفته در محیط کشت جامد PG_{oB} (De Greef and Jacobs 1979) از کالوس حاصل از هیپوکوتیل هر دو رگه استفاده گردید و هدف مطالعه تنوع موجود برای صفت تحمل به شوری در سطح سلول‌های کالوس بین و درون دو رگه مذکور بود. برای این منظور، ابتدا ۴۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت PG_{oB} به همراه ۲۵/. میلی گرم در لیتر BA و ۵/. میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱۰ گرم در لیتر آگار تهیه و به چهار قسمت ۱۰۰ میلی لیتری تقسیم و به درون چهار ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری توزیع گردید. سپس طبق جدول شماره یک، چهار غلظت نمک طعام (صفر، ۱۰۰،۲۰۰ و ۳۰۰ میلی مولار) را به چهار ارلن مایر حاوی محیط کشت اختصاص داده شد. برای این کار مقدار صفر، ۱/۰،۱۶۸/۵۸۴ و ۱/۷۵۲ گرم نمک طعام به محلول‌های غذائی درون ارلن اضافه شد. توضیح این که این مقدار نمک،

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت‌های ذکر شده فوق را تأمین نمود. به این ترتیب چهار ارلن هریک محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت PG_{oB} جامد اولیه با ترکیب هورمونی ذکر شده و غلظت متفاوت نمک طعام به دست آمد که طبق جدول یک نامگذاری و مشخص گردیدند.

جدول ۱- غلظت‌های نمک طعام در محیط کشت جامد اولیه
Table 1 Concentrations of NaCl in primary solid medium

علامت مشخصه سطوح شوری Salt levels signs	S_0	S_1	S_2	S_3
غلظت نمک طعام (میلی مولار) NaCl concentration (mM)	0	100	200	300
غلظت نمک طعام (گرم در لیتر) NaCl concentration (gr/l)	0	5.84	11.68	17.52
هدایت الکتریکی (میلی موس بر سانتیمتر) Electric conductivity (mmos/cm)	5.08	15.43	24.30	35.40

پس از تهیه محیط‌های کشت اولیه با غلظت‌های متفاوت نمک طعام، مقداری از کالوس‌های حاصل از دو رگه به محیط کشت مایع PG_{oB} به همراه یک میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۵/. میلی‌گرم در لیتر کینتین در شرایط استریل انتقال داده شد. سپس با میله شیشه‌ای استریل مخلوط حاصل را به هم زده تا شرایط برای آزاد شدن سلول‌ها و جدا شدن دستجات سلولی فراهم گردد. پس از عبور مخلوط از صافی با منافذ ۲۹۰ میکرومتری، مایع عبور نموده که حاوی سلول‌ها و دستجات کوچک سلولی بود از دستجات سلولی بزرگتر از ۲۹۰ میکرومتر که بر روی صافی قرار گرفته بودند، جدا گردید. در این مرحله به هر یک از محیط‌های دارای غلظت متفاوت نمک طعام (پس از اتوکلاو و توزیع در ظروف پتری به مقدار ۲۴ میلی‌لیتر در هر پتری و قبل از سرد و جامد شدن کامل) مقدار شش میلی‌لیتر از مایع حاوی سلول‌های عبور داده شده از صافی اضافه نمودیم. سپس مخلوط حاصل را به آرامی به هم زده تا شرایط توزیع یکنواخت سلول‌ها در محیط فراهم گردید. با توجه به آنکه شش میلی‌لیتر محیط کشت مایع سلولی فاقد نمک طعام اضافی بوده، از این رو غلظت نهائی نمک طعام در این تیمارها براساس رابطه $C_1V_1 = C_2V_2$ به ۸۰ درصد غلظت اولیه کاهش یافت. غلظت‌های نهائی تقلیل یافته شوری به صورت حرف s کوچک با اندیس‌های مربوطه نشان داده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

علاوه بر توزیع مایع سلولی صاف شده در محیط نیمه جامد، همچنین قطعات خرد شده کالوس را که بزرگتر از ۲۹۰ میکرومتر بوده و بر روی صافی باقی مانده بودند، بر سطح محیط کشت جامدPG_{oB} با ترکیبات هورمونی مشابه و غلظت‌های صفر،۱۰۰،۲۰۰ و۳۰۰ میلی مولار نمک طعام کشت گردیدند.

تیمارها در دو روش کشت مربوط به این آزمایش با ذکر مشخصات در زیر آمده‌اند. ضمناً رگه منوژرم با حرف M و رگه مولتی ژرم با حرف P مشخص گردید.

روش کشت اول

توزیع مایع سلولی صاف شده برروی محیط نیمه جامد PG_{oB}

علامت مشخصه تیمارها:

$Ms_0 - Ms_1 - Ms_2 - Ms_3 - Ps_0 - Ps_1 - Ps_2 - Ps_3$

در علامت مشخصه تیمارها، s_0 ، s_1 ، s_2 ، s_3 به ترتیب غلظت‌های ۰،۸۰،۱۶۰و۲۴۰ میلی مولار نمک طعام را نشان می‌دهند.

روش کشت دوم

انتقال قطعات کالوس بزرگتر از ۲۹۰ میکرومتر در محیط جامد PG_{oB}

علامت مشخصه تیمارها:

$MS_0 - MS_1 - MS_2 - MS_3 - PS_0 - PS_1 - PS_2 - PS_3$

در علامت مشخصه تیمارها S_0 ، S_1 ، S_2 ، S_3 به ترتیب غلظت‌های صفر،۱۰۰،۲۰۰و۳۰۰ میلی مولار نمک طعام را نشان می‌دهند.

هم چنین تعدادی از کالوس‌های حاصل از تیمار PS_3 به محیط PG_{oB} به همراه ۱/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین (BA) جهت القای جوانه‌زائی منتقل گردید.

تجزیه آماری

در هریک از دو روش کشت فوق‌الذکر با توجه به دو رگه منوژرم و مولتی‌ژرم و چهار سطح شوری به کار رفته، جمعاً هشت تیمار به دست آمدند که پس از دو هفته از نظر کال‌زائی و رشد کالوس مورد مقایسه ظاهری قرار گرفتند. سپس ۱۰۰ قطعه کالوس از پلیت‌های روش کشت دوم در پنج تکرار ۲۰ نمونه‌ای درقالب طرح کاملا" تصادفی به محیط‌هایی با غلظت متفاوت نمک طعام منتقل شدند(مشخصات این تیمارها در جدول ۲ آمده است) و ۲۵ روز پس از شروع کشت، تعداد کالوس‌های رشد یافته یادداشت‌برداری و تجزیه واریانس تیمارها با نرم‌افزار SAS و گروه‌بندی تیمارها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- تیمارهای حاصل از انتقال تعدادی نمونه از روش کشت دوم به محیط‌هایی با غلظت‌های متفاوت نمک طعام
Table 2 Treatments derived from transferring some samples of the culture method-II to media containing different NaCl concentrations

علامت مشخصه تیمار Treatment sign	نمونه sample	محیط ثانویه Second medium
MS0S2	MS_0	S_2
MS1S0	MS_1	S_0
MS2S0	MS_2	S_0
MS3S0	MS_3	S_0
PS0S1	PS_0	S_1
PS0S2	PS_0	S_2
PS1S0	PS_1	S_0
PS1S1	PS_1	S_1
PS2S0	PS_2	S_0
PS2S2	PS_2	S_2
PS3S0	PS_3	S_0

تهیه کشت سلول تعلیقی

برای این کار قطعات یک گرمی از کالوس‌های حاصل از کشت هیپوکوتیل در ۶۰ میلی‌لیتر محیط مایع G_{oB} حاوی یک میلی‌گرم توفوردی، ۰/۵ میلی گرم در لیتر کینتین و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر کازئین هیدرولازات در داخل ظروف ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه گردیدند. این ظروف بر روی شیکر دورانی در ۹۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. عمل زیرکشت (Sub culture) هر هفت روز یک بار با افزودن ۲۰ میلی‌لیتر کشت تعلیقی به ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه انجام گرفت. پس از ۵-۳ زیرکشت، سلول‌ها و دستجات سلولی کشت تعلیقی به منظور تشکیل کالوس به سطح محیط کشت جامد مشابه منتقل شدند.

بررسی تنوع کروموزومی

در این مرحله به منظور بررسی تنوع کروموزومی در سلول‌های کالوس حاصل از کشت سلول تعلیقی، آزمایش زیر با اقتباس از روش شارما و شارما (Sharma and Sharma 1980) برای تعیین تعداد کروموزوم‌ها و تشخیص حالات احتمالی پلی پلوئیدی و انیوپلوئیدی سلول‌ها انجام گردید. برای این کار کالوس‌های حاصل ازکشت تعلیقی به محیط کشت تازه انتقال یافته و پس از یک هفته از شروع زیرکشت که کالوس در مرحله تقسیم فعال سلولی قرار گرفت، از نقاط مختلف رشد یافته کالوس در شرایط استریل توسط پنس، نمونه‌هایی برداشت شد و از آن‌ها به منظور شمارش کروموزومی به شرح زیر استفاده گردید.

۱ - قرار دادن قطعات کالوس در پیش تیمار کولشی سین با غلظت ۰/۲۵ گرم در لیتر به مدت چهار ساعت

www.SID.ir

Archive of SID

در یخچال (کولشی‌سین یکی از ترکیباتی است که به عنوان پیش تیمار در بررسی کاریوتایپی کروموزوم‌ها به کار می‌رود. نقش اصلی آن مهار تشکیل دوک تقسیم و در نتیجه افزایش فراوانی مراحل متافازی سلول‌های مورد مطالعه است. به این ترتیب امکان شمارش کروموزوم‌ها و بررسی تنوع کروموزومی تسهیل می‌گردد).

۲ – بیرون آوردن نمونه‌ها از محلول کولشی‌سین و چندین بار شستشو با آب مقطر.

۳ – قراردادن نمونه‌ها در محلول تثبیت کننده اسید استیک: الکل اتانول (نسبت ۱ به ۳) به مدت ۲۰ ساعت در یخچال.

۴ – بیرون آوردن نمونه‌ها از محلول تثبیت‌کننده و چندین بار شستشو با آب مقطر.

۵ – هیدرولیز نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در اسید کلریدریک یک نرمال که دمای آن قبلاً توسط آوون به ۶۰ درجه سانتی‌گراد رسیده بود.

۶ – بیرون آوردن نمونه‌ها و چندین بار شستشو با آب مقطر.

۷ – رنگ‌آمیزی با استواورسئین یک درصد با قراردادن نمونه‌ها در شیشه ساعتی حاوی رنگ به مدت چند دقیقه و سپس قراردادن قطعات خیلی کوچکی از نمونه‌ها بر روی لام.

۸ – اضافه نمودن یک قطره استواورسئین یک درصد و قراردادن لامل بر روی نمونه‌ها.

۹ – استفاده از تکنیک له کردن (Squash) و مشاهده در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ نمائی ۴۰۰ برابر (۴۰ شیء × ۱۰ چشمی).

۱۰ – تهیه اسلاید یا عکس از سلول‌های در حال تقسیم با بزرگ‌نمائی ۱۰۰۰ برابر (۱۰۰ شیء × ۱۰ چشمی) با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین(فتومیکروسکوپ).

علاوه بر روش عمومی فوق جهت تجزیه کروموزومی، در بعضی مراحل آن تغییراتی داده شد تا اثر این تغییرات در بازدهی روش به کار رفته بررسی گردد. مثلاً در مرحله اول از کلشی‌سین با غلظت ۰/۵ گرم در لیتر استفاده گردید و مرحله تثبیت با مخلوط سه به یک (الکل: اسید استیک) نیز انجام نگرفت ولی سایر مراحل بدون تغییر انجام گرفت. هم چنین در مقداری از نمونه‌های کالوس نیز عمل هیدرولیز را در دمای آزمایشگاه (۲۵° C) به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت و اثر این تیمار هیدرولیز تعیین گردید.

نتایج و بحث

تحمل به شوری

نتایج اولیه عکس‌العمل بافت‌ها به غلظت‌های متفاوت نمک طعام در جدول شماره ۳ ارائه گردیده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- عکس‌العمل اولیه سلول‌ها و قطعات کالوس مربوط به هشت تیمار در دو روش کشت بعد از دو هفته
Table 3 Cells and callus fragments response to 8 treatments in the two culture methods after two weeks

روش کشت Culture method	مشخصات تیمارها Treatments discriptions	میزان رشد سلولی Rate of cell growth
	Ps_0 = رگه مولتی ژرم در محیط کشت فاقد نمک طعام اضافی	ایجاد کلنی های خیلی ریز، با رنگ روشن
	Ps_1 = رگه مولتی ژرم در محیط ۸۰ میلی مولار نمک طعام	ایجاد کلنی های خیلی ریز، با رنگ روشن
روش	Ps_2 = رگه مولتی ژرم در محیط ۱۶۰ میلی مولار نمک طعام	کلنی هایی با فراوانی کمتر و رنگی تیره تر
کشت	Ps_3 = رگه مولتی ژرم در محیط ۲۴۰ میلی مولار نمک طعام	۷ مورد رشد سلولی دیده شد
اول	Ms_0 = رگه منوژرم در محیط کشت فاقد نمک طعام اضافی	ایجاد کلنی های خیلی ریز با رنگ روشن
Culture method –I	Ms_1 = رگه منوژرم در محیط ۸۰ میلی مولار نمک طعام	ایجاد شش کلنی سلولی
	Ms_2 = رگه منوژرم در محیط ۱۶۰ میلی مولار نمک طعام	عدم تشکیل کلنی و نکروزه شدن اکثر سلولها
	Ms_3 = رگه منوژرم در محیط ۲۴۰ میلی مولار نمک طعام	عدم تشکیل کلنی و نکروزه شدن تمامی سلولها
	PS_0 = رگه مولتی ژرم در محیط کشت فاقد نمک طعام اضافی	تشکیل میکروکالوس هایی با رشد زیاد و رنگ سفید
	PS_1 = رگه مولتی ژرم در محیط ۱۰۰ میلی مولار نمک طعام	۹۰ درصد کالوس ها با رشد متوسط و ۱۰ درصد نکروزه
روش	PS_2 = رگه مولتی ژرم در محیط ۲۰۰ میلی مولار نمک طعام	کالوس ها با رشد کم و رنگی کرم شیری داشتند
کشت	PS_3 = رگه مولتی ژرم در محیط ۳۰۰ میلی مولار نمک طعام	کالوس ها با رشد کم با رنگی کرم و زرد مایل به قهوه ای
دوم	MS_0 = رگه منوژرم در محیط کشت فاقد نمک طعام اضافی	تشکیل میکروکالوس هایی با رشد متوسط و رنگ روشن
Culture method-II	MS_1 = رگه منوژرم در ۱۰۰ میلی مولار نمک طعام	تشکیل میکروکالوس هایی با رنگ روشن و رشد کم
	MS_2 = رگه منوژرم در محیط ۲۰۰ میلی مولار نمک طعام	رشد کم میکروکالوس ها و نکروزه شدن ۳۰ در صد آنها
	MS_3 = رگه منوژرم در محیط ۳۰۰ میلی مولار نمک طعام	رشد ناچیز میکروکالوس ها و نکروزه شدن ۵۰ درصد آنها

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارهای مربوط به روش کشت دوم که پس از دو هفته از شروع کشت اولیه به محیط هایی با غلظت‌های متفاوت نمک طعام منتقل شده بودند (به منظور بررسی تطبیق‌پذیری بافت‌های کالوس حاصل) پس از ۲۵ روز از زمان شروع کشت به ترتیب در جداول ۴ و ۵ آمده است.

جدول ۴- تجزیه واریانس برای رشد کالوس
Table 4 Analysis of variance for callus growth

منبع تغییرات Source of variations	درجه آزادی D. F	میانگین مربعات Mean of squares
تیمار (Treatment)	10	2027.7**
خطای آزمایش(Experimental error)	44	91.6
کل (Total)	54	

** - معنی‌دار در سطح یک درصد

**- Significant at the 1 % level

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- میانگین تیمارها برای رشد کالوس
Table 5 Mean of treatments for callus growth

تیمارها (Treatments)	میانگین * (Mean)
MS0S2	15F
MS1S0	73B
MS2S0	93A
MS3S0	25E
PS0S1	100A
PS0S2	75B
PS1S0	100A
PS1S1	100A
PS2S0	93A
PS2S2	40D
PS3S0	50C

*- میانگین های دارای حروف مشترک تفاوت معنی دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند.
*- Means followed by the similar letters are not significant at 5% probability level.

نتایج حاصل از جدول ۵ نشان می‌دهد که رگه مولتی‌ژرم P.۱۰۷ – ۷۲۳۳ نسبت به رگه منوژرم P.۲۷ – ۹۵۹۷ به غلظت‌های متفاوت نمک طعام به طوری آشکار، تحمل بیشتری نشان دادند و از تعداد بیشتر کالوس رشد یافته برخوردار بودند. برای مثال با انتقال کالوس رگه منوژرم از محیط شاهد (S_0) به محیط حاوی ۲۰۰ میلی‌مولار نمک طعام تنها ۱۵ درصد کالوس‌ها رشد نمودند در حالی این عدد برای رگه مولتی‌ژرم ۷۵ درصد بود (جدول ۵). هم چنین در بین قطعات کالوس مربوط به هر تیمار نیز از نظر تحمل به شوری تنوع وجود داشت و تعدادی از میکروکالوس‌ها از بین رفته، تعدادی رشد کم و باقیمانده رشد خوبی داشتند.

تیمار PS_1S1 تقریباً مانند تیمار $PS1S_0$ از رشد خوبی در کالوس برخوردار بود ولی تیمار MS_1S0 به علت حساس بودن به شوری نسبت به تیمار PS_1S0 رشد کمی داشت و در غلظت‌های بالاتر نمک طعام اثر مانع‌شوندگی بر روی رگه منوژرم بیشتر بوده و کالوس‌ها رشدی کم داشته و اکثراً نکروزه می‌شدند. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که حداقل دو نوع تنوع از نظر تحمل یا مقاومت به نمک طعام در این جا وجود دارد، یکی تنوع موجود بین دو رگه منوژرم و مولتی‌ژرم به کار رفته در آزمایش و دیگری تنوع در بین قطعات کالوس یا سلول‌های مربوط به هر رگه که از این تنوع به منظور گزینش رگه‌های سلولی متحمل به شوری می‌توان استفاده نمود به شرط آن که تنوع حاصل ژنتیکی بوده و در سطح گیاه کامل در مزرعه نیز تظاهر یابد که این امر پس از باززایی گیاه و تعیین وراثت‌پذیری صفت بهتر مشخص می‌گردد.

تهیه رگه‌های سلولی متحمل به نمک طعام از طریق گزینش بافت کالوس در گیاهانی هم چون یونجه، کلزا و ذرت انجام شده است. با این حال،

www.SID.ir

Archive of SID

بیشتر گیاهان باززائی شده از رگه‌های سلولی متحمل به نمک طعام، تحمل خود را از دست دادند (Freytag et al. 1990). در تحقیقاتی دیگر، از کالوس‌های متحمل به نمک طعام در توتون، یولاف و برنج گیاهانی باززائی شدند که در نسل‌های بعدی توانستند تحمل به شوری را حفظ نمایند (Freytag et al. 1990).در چغندرقند برای اولین بار گیاهان متحمل به املاح مرکب (شامل $NaHCO_3$، $NaCl$، $CaCl_2$، $MgSO_4$ و $CaSO_4$) با غلظت کلی ۷/۶ گرم در لیتر از طریق گزینش درون شیشه جداکشت‌های دمبرگ چغندرقند به دست آمد و مشخص گردید که تحمل ایجاد شده در اثر جهش و به صورت وراثت‌پذیر بوده است (Freytag et al. 1990).

یاوری (۱۳۸۰) در بررسی تحمل‌پذیری بافت‌های چغندرقند در سطوح مختلف پلوئیدی به تنش شوری در سطوح فزاینده نمک طعام در محیط باززائی نشان دادند که افزایش سطح تنش شوری موجب کاهش میزان باززائی می‌گردد و آثار تنش بر میزان باززائی از سطح ۱۵۰ میلی مولار نمک مشاهده گردید. در آزمایش ما قطعات کالوس گزینش شده در تیمار شوری S_3 (۳۰۰ میلی‌مولار نمک طعام) که به محیط باززائی فاقد نمک طعام منتقل شده بودند پس از دو هفته تعداد کمی ریز جوانه تولید نمودند.

گولاتی و جایوال (Gulati and Jaiwal 1993) با غربال جداکشت‌های کوتیلدونی گیاه ماش در محیط درون شیشه حاوی ۲۰۰ میلی‌مولار نمک طعام توانستند گیاهانی باززائی نمایند که در محیط کشت با شوری مشابه تحمل خود را حفظ می‌کردند.

وینیکوف(Winicov 1995) با کشت کالوس از دو رگه برنج و گزینش یک مرحله‌ای آن در محیط کشت حاوی یک درصد (۱۷۰ میلی‌مولار) نمک طعام موفق به تولید رگه‌های سلولی متحمل به شوری شدند. نتایج آن‌ها نشان داد که گزینش کوتاه مدت کالوس برنج در محیط شور نمی‌تواند تغییرات وراثت‌پذیر زیادی در فنوتیپ تحمل به شوری ایجاد نماید و بنابراین طولانی کردن زمان گزینش در محیط درون شیشه احتمال گیاهان باززائی شده متحمل به شوری را افزایش می‌دهد.

کالوس چغندرقند که یک گونه متحمل به شوری است نسبت به کالوس لوبیا که یک گونه حساس به شوری است مقاومت بیشتری به شوری دارد و مقاومت در چغندرقند در سطح سلولی است (Lindsey and Jones 1992). با توجه به آن که همبستگی مثبتی بین مقاومت یا تحمل به شوری در کشت سلول و کالوس با گیاه کامل چغندرقند دیده شده است (Blumvald and Poole 1987; Tal 1990) از این همبستگی می‌توان به عنوان معیاری در جهت گزینش ژنوتیپ‌های مقاوم به شوری در چغندرقند استفاده نمود. به این ترتیب با گزینش ژنوتیپ‌هایی از قبل مقاوم در محیط کشت می‌توان در مکان، زمان و هزینه مصرفی در طرح‌های مربوط به غربال رگه‌های متحمل به شوری صرفه جوئی نمود و پس از انتخاب

www.SID.ir

Archive of SID

چند ژنوتیپ برتر در محیط کشت درون شیشه، آن‌ها را جهت گزینش نهائی در آزمایشات مزرعه‌ای گزینش برای تحمل به شوری وارد نمود. البته برای گزینش مواد ژنتیکی متحمل به شوری، باید رابطه بین عکس‌العمل گیاه در محیط شور و پاسخ اندام گیاهی در محیط شور (شامل شوری از نوع املاح آب دریا) بررسی عمیق‌تر گردد. در ضمن نوع پروتئین های گیاهی که در شرایط تنش شوری در گیاه چغندرقند تولید و تجمع می‌یابند می‌تواند مورد بررسی مولکولی قرار گیرد.

تنوع کروموزومی

در ارتباط با نتایج مشاهدات میکروسکوپی و شمارش کروموزومی، از آنجایی که روش تجزیه کروموزومی به کار رفته برای سلول‌های کالوس یک روش عمومی بود و به علت عدم دسترسی به روش اختصاصی برای کالوس چغندرقند، فراوانی نمونه‌های متافازی، انقباض و وضوح کرموزومی زیاد نبود، ولی با این حال تعدادی نمونه‌های متافازی که در آن‌ها تعداد کروموزوم‌ها قابل شمارش بوده به دست آمد و همان طور که انتظار می‌رفت علاوه بر سلول‌های دیپلوئید، حالاتی از انیوپلوئیدی و پلی‌پلوئیدی در تعدادی از سلول‌های متافازی مشاهده گردید که تصویر یکی از سلول‌های هگزاپلوئید ایجاد شده در شکل یک نمایش داده شده است.

تنوع در سلول‌های کالوس یک پدیده معمول بوده و حالات پلی پلوئیدی و انیوپلوئیدی پس از تشکیل کالوس مشاهده شده است (Atanassov 1986).

استین و همکاران (Steen et al. 1986) در بررسی تنوع‌پذیری گیاهان باززائی شده از کالوس، کشت تعلیقی سلول و پروتوپلاست چغندرقند دریافتند که انواع تنوع ژنتیکی هم چون دو برابر شدن یا نصف شدن تعداد کروموزوم و نیز حالاتی از انیوپلوئیدی ایجاد شده است. آن ها هم چنین نشان دادند که تنوع ژنتیکی حاصل از سلول‌های تعلیقی در مقایسه با کشت کالوس بیشتر است.

ژاک و همکاران (Jacq et al. 1992) گیاهان باززائی شده حاصل از کالوس بدست آمده از هیپوکوتیل چغندرقند را مورد بررسی سیتولوژیکی قرار دادند تا پایداری سطح پلوئیدی را مشخص نمایند. آن‌ها دریافتند که گیاهان باززائی شده از کشت کوتاه مدت و بلند مدت کالوس به ترتیب چهار و ۱۷ درصد تنوع کروموزومی نشان می‌دهند.

دیکالووا و همکاران (Dikalova et al. 1993) در بررسی تغییرات ساختاری DNA میتوکندری در کالوس، سلول‌های کشت تعلیقی و گیاهان باززائی شده از کالوس حاصل از یک رقم نرعقیم سیتوپلاسمی دریافتند که تغییراتی در الگوی DNA میتوکندری ایجاد شده است که در اثر پدیده تنوع سماکلونی در حین کشت درون شیشه سلول‌های چغندرقند می‌باشد.

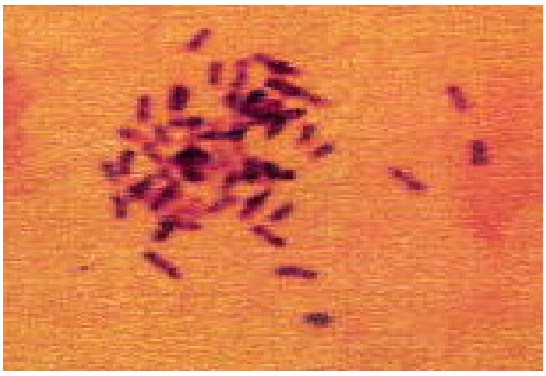
از جمله عواملی که نقش آن‌ها در بازدهی روش تجزیه کروموزومی به کار رفته بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

گردید یکی شکننده و جوان بودن نمونه کالوس موردنظر و دیگری مدت و درجه حرارت هیدرولیز اعمال شده بود. هرچه کالوس در مرحله فعال‌تر تقسیم سلولی بود، تعداد سلول‌های متافازی نیز بیشتر و هرچه بافتی شکننده‌تر داشت، بهتر و یکنواخت‌تر هیدرولیز می‌گردید. عمل هیدرولیز در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۰ دقیقه مؤثرتر از هیدرولیز در دمای آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت.

به هر حال با توجه به آن که تنوع کروموزومی کالوس در سطح گیاهان باززائی شده از آن‌ها نیز امکان تظاهر دارد (Meredith 1984) می‌توان از گیاهان پلی‌پلوئید یا انیوپلوئید حاصل در برنامه‌های به‌نژادی و تحقیقات ژنتیکی استفاده نمود



شکل۱- سلول هگزاپلوئید حاصل از رگه مولتي ژرم با تعداد کروموزوم 2N=6X=54 در اثر پدیده تنوع سماکلوني

Fig. 1 Hexaploid cell with 2N=6X=54 chromosome resulted in somaclonal variation

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از سرکار خانم مهندس یاوری به خاطر راهنمائی در برخی امور آزمایشگاهی قدردانی می‌گردد. هم چنین از بخش بانک ژن مؤسسه تحقیقات نهال و بذر که تجهیزات میکروسکوپی را در اختیار اینجانب قرار دادند تشکر می نمایم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده References

شکیب، ع. م.۱۳۷۳ . مطالعه مقدماتی گزینش به شوری از طریق کشت بافت در گندم. چکیده مقالات سومین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، ص۲۹۲

مصباح، م. و یاوری، ن. ۱۳۷۰. نتایج بررسی میزان تحمل به شوری در لاین‌های مختلف چغندرقند در شرایط گلخانه‌ای. نشریه چغندرقند. شماره ۷۱/۸۳. انتشارات مؤسسه تحقیقات چغندرقند. ص ۲-۱

یاوری، ن. ۱۳۸۰. بررسی تحمل‌پذیری و تطبیق یافتن بافت چغندرقند در سطوح مختلف پلوئیدی به شرایط تنش شوری در محیط باززائی. گزارش پژوهشی بخش تحقیقات به‌نژدای. انتشارات مؤسسه تحقیقات چغندرقند. ص ۱۲۸-۱۲۰

Atanassov AI (1986) Sugarbeet. In: Handbook of Plant Cell Cultures. Vol. 4(Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, eds) Macmillan Publishing Co., New York. pp.652-680

Blumvald E, Poole RJ (1987) Salt tolerance in suspension cultures of sugar beet. Plant Physiol. 83:884-887

De Greef W, Jacobs M (1979) *In vitro* culture of the sugarbeet: description of a cell line with high regeneration capacity. Plant Science Letters. 17: 55-61

Dikalova AE, Dudareva NA, Kubalakova M, Salganik RI (1993) Rearrangements in sugar beet mitochondrial DNA induced by cell suspention, callus cultures and regeneration. Theor. Appl. Genet. 86: 699-704

Freytag AH, Wrather JA, Erichsen AW (1990) Salt tolerance sugar beet progeny from tissue challenged with multiple salts. Plant Cell Reports. 8:647-650

Gulati A, Jaiwal PK (1993) *In vitro* selection of salt resistance *Vigna radiata* (L.) Wilczek plants by adventitious shoot formation from cultured cotyledon explants. J. Plant Physiol. 142: 99-102.

Jacq B, Tetu T, Sangwan RS, Laat AD, Sangwan-Norreel BS (1992) Plant regeneration from sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) hypocotyls cultured *in vitro* and flow cytometric nuclear DNA analysis of regenerants. Plant Cell Reports. 11: 329-333

www.SID.ir

Archive of SID

Lindsey K, Jones MGK (1992) Crop improvement through biotechnology. Agro-Industry Hi-Tech. University of Leicester, Leicester, LE1 7RH, UK. Pp.9-16

Meredith CP (1984) Selecting better crops from cultured cells. In: Gene Manipulation in Plant Improvement(J.P. Gustafson., ed) Plenum Press. New York and London. 668p

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

Saunders Jw, Doley WP, Theurer JC, Yu MH (1990) Somaclonal variation in sugar beet. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 11: Somaclonal Variation in Crop Improvement I (YPS Bajaj, ed) Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. Pp:465-490

Sharma AK, Sharma A (1980) Chromosomal Techniques, Theory and Practice. pp.322-323. Butterworth and Co (publishers) Ltd. London. 711p

Steen P, Keimer B, D' Halluin K, Pedersen HC (1986) Variability in plants of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) regenerated from callus, cell suspention and protoplasts. In: Walter G & Co (eds.): Genetic Manipulation in Plant Breeding. Berlin. New York- Printed in Germany. Pp 633-636

Tal, M (1990) Somaclonal variation for salt resistance. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 11: Somaclonal Variantion in Crop Improvement I (YPS Bajaj, ed) Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. Pp:236-257

Winicov I (1995) Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt-tolerant cell lines. Plant Science. 113: 105-111

www.SID.ir