

باززایی و تنوعات سوماتیکی در گیاه شمعدانی عطری (*Pelargonium roseum* L.)

زهرا رضایتمند Ph.D.

- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه زیست شناسی، اصفهان، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: zrezayatmand12@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۲۱

چکیده

هدف: شمعدانی عطری (*Pelargonium roseum* L.) گیاهی زینتی با خواص ارزشمند دارویی می باشد. هدف از این مطالعه، بهینه سازی شرایط تکثیر و باززایی گیاه شمعدانی عطری و همچنین بررسی تنوعات سوماتیکی احتمالی گیاهان باززایی شده می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه ابتدا از گیاهان گلدانی جدا کشت هایی از ساقه که حاوی جوانه انتهایی و چند برگ کوچک بود تهیه و در محیط کشت MS پایه کشت داده شد. از گیاهان تکثیر شده، قطعاتی از ساقه و برگ انتخاب و به محیط های کشت حاوی تنظیم کنندگان رشد مختلف جهت باززایی منتقل شد. از بین گیاهان باززایی شده چندین لاین از نظر مورفولوژیکی و همچنین تنوع ژنتیکی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: بیشترین میزان تولید نوساقه و ریشه در محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA با بکارگیری جدا کشت برگ مشاهده شد. بررسی تنوعات سوماتیکی لاین های باززایی شده اختلافاتی را از نظر شکل برگ و تعداد و نوع کرک های برگ نسبت به شاهد و همچنین اختلافات ژنتیکی به صورت حذف و اضافه شدن باندها را در الگوی باندینگ DNA نشان داد.

نتیجه گیری: تولید نوساقه و ریشه با درصد متفاوت نشانگر اثر القایی محیط کشت ها و قطعات جدا کشت مختلف در باززایی این گیاه می باشد. تطابق اختلاف ژنتیکی گیاهان باززایی شده با تنوعات مورفولوژیکی احتمالا می تواند نشانگر پایه و اساس ژنتیکی تنوعات سوماتیکی ایجاد شده باشد.

واژگان کلیدی: باززایی، تنوعات ژنتیکی، تنوعات مورفولوژیکی، شمعدانی عطری، نشانگرهای RAPD

مقدمه

شمعدانی عطری (*Pelargonium graveolens* L.) گیاهی از خانواده Geraniaceae می‌باشد. گیاهان این خانواده اغلب علفی بوده و بندرت به حالت چوبی در می‌آیند (۱). گونه‌های مختلف شمعدانی، گیاهان گلدار هستند که از نظر اقتصادی دارای اهمیت می‌باشند. قدرت نژاد زایی این گیاه تولید واریته‌ها و هیبریدهای زیادی را نموده است. اصولاً هدف از برنامه‌ی اصلاح نبات برای این گیاه، تولید شمعدانی‌هایی با شکل‌ها و رنگ‌های متفاوت و همچنین مواد موثره (متابولیت‌های ثانویه) بیشتر می‌باشد. بخش مورد استفاده این گیاه جهت اسانس گیری برگ و قسمت‌های هوایی گیاه است. میزان اسانس حاصل از گیاه بسیار وابسته به سن گیاه می‌باشد و با افزایش سن گیاه میزان آن کاهش می‌یابد. اسانس این گیاه شبیه به اسانس گل رز می‌باشد و حاوی ژرانیول (Geraniol)، سیترونلول (Citronelol)، ترپینئول (Terpineol) و الکل‌ها می‌باشد. این اسانس زمانی ارزشمند است که محتوی مقادیر بیشتر سیترونلول باشد (۲).

در تحقیقات زیادی باززایی گونه‌های مختلف شمعدانی توسط تکنیک کشت بافت گزارش شده است. Marsolais و همکاران (۳) جنین‌زایی سوماتیکی (*Pelargonium × hortorum*) و Agarwal (۴) را گزارش نمودند. همکاران (۴) نیز گزارش نمودند که قطعات جدا کشت برگ بالغ (*Pelargonium × hortorum*) دارای پتانسیل بالای باززایی نسبت به قطعات جدا کشت برگ جوان می‌باشند.

کشت قطعات برگ شمعدانی در محیط نصف غلظت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و Zeatin و در شرایط تاریکی بیشترین میزان باززایی برای این گیاهان را ایجاد نموده است (۵). Saxena و همکاران (۶) یک دستورالعمل کارآمد برای باززایی گیاه *P. graveolens* پیشنهاد نمودند. در این دستورالعمل پس از انتقال کالوس به محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین میزان تولید نو ساقه گزارش شده است.

در گزارشات دیگری محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین محیط برای رشد گیاهچه و ریشه دار شدن آن عنوان شده است (۷). اخیراً نشان دادند که محیط کشت MS پایه حاوی ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم

در لیتر NAA می‌تواند باعث ایجاد نو ساقه و محیط کشت MS پایه حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA می‌تواند بهترین محیط برای ریشه دار شدن گیاه *P. graveolens* باشد (۸).

تنوع سوماکلونال فرایندی است که منجر به تغییرات شیمیایی جدا کشت‌ها شده و تنوع خاصی را ایجاد می‌نماید. این تنوع تغییرات ژنتیکی است که پاره‌ای از تغییرات دیگر از جمله تغییر در مورفولوژی، بیوشیمی و امثال آن را به دنبال دارد. تنوع سوماکلونال در گیاهان به طور عمده پس از کشت بافت در بعضی از سیستم‌های باززایی گیاه که در آن گیاه مرحله کالوس را طی می‌کند دیده می‌شود. در واقع تنوع سوماکلونال نوعی ناپایداری ژنتیکی جدا کشت‌ها بوده و از مشکلات کشت بافت می‌باشد ولی می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های اصلاح نباتات نیز بکار رود (۹).

گیاهان حاصله از باززایی گیاه شمعدانی عطری را از نظر خصوصیات مورفولوژیکی Saxena و همکاران (۱۰) مورد بررسی قرار دارند. نتایج بررسی‌های آن‌ها نشان دهنده تنوع مورفولوژیکی برگ این گیاهان می‌باشد به صورتی که برگ گیاهان باززایی شده دارای بریدگی‌های کمتری نسبت به گیاهان والد می‌باشند.

بررسی‌های مورفولوژی کرک‌های گیاه شمعدانی عطری نیز حضور سه نوع کرک را نشان می‌دهد که یکی حالت کشیده و نوک تیز داشته و سه تای دیگر دارای بخش انتهایی متورم می‌باشد. مشابه این نتیجه در گونه‌های دیگر این گیاه نیز گزارش شده است (۱۱).

گیاهان از طریق تنوعات سوماتیکی می‌توانند بهبود ژنتیکی پیدا نمایند و تنوعات سوماتیکی به عنوان یک فرآیند منطقی برای القا تغییرات وراثتی جهت ایجاد واگرایی یا انشعاب در گونه‌های گیاهی عنوان شده است. نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی برای نشان دادن تنوع ژنتیکی در گیاهان می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد، اما به دلیل اینکه این نشانگرها نسبت به عوامل محیطی آسیب پذیر می‌باشند و نیز لوکوس‌های محدودی بر روی ژنوم گیاه دارند نمی‌توانند کاربرد وسیعی داشته باشند. لذا نشانگرهای DNA با توانایی بسیار بالا و تعداد لوکوس‌های نامحدود را می‌توان جهت بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان مورد استفاده قرار داد. یکی از نشانگرهای معروف مبتنی بر PCR، نشانگر RAPD است. این تکنیک به علت قابلیت دسترسی سریع و آسان جهت مطالعات ژنتیکی متعددی مورد استفاده قرار

شد. نمونه‌ها پس از ۱۵ روز به مرحله‌ی ریشه دهی وارد شد و از روز ۲۱ به بعد گیاهان افزایش رشد طولی و تولید برگ‌های جدید نمودند. گیاهان رشد یافته در این مرحله جهت مرحله‌ی باززایی گیاه مورد استفاده قرار گرفت.

باززایی گیاه شمعدانی عطری: در شرایط استریل، برگ و ساقه گیاه در قطعات حدود ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری برش یافتند و سپس این جدا کشت‌ها از بخش سطح شکمی در مورد برگ و افقی در مورد ساقه به ظروف کشت حاوی محیط‌های کشت MS پایه حاوی تنظیم‌کنندگان رشد بر اساس جدول ۱ انتقال داده شدند (۸ و ۱۵). پس از یک هفته در لبه‌های جدا کشت برگ و انتهای ساقه کالوس‌های کوچک تولید شد و پس از دو هفته نوساقه (shoot) از این کالوس‌ها ایجاد و پس از چهار هفته نوساقه‌های رشد یافته تولید ریشه نموده و بدین ترتیب گیاه شمعدانی عطری باززایی شد. گیاهان باززایی شده سپس برای تکمیل رشد به محیط کشت MS پایه انتقال داده شدند.

بررسی تنوع مورفولوژیکی و آناتومیکی در گیاهان باززایی

شده: پنج گیاه باززایی شده به صورت تصادفی انتخاب شدند و از نظر شکل برگ با یکدیگر و با نمونه شاهد (غیر باززایی) مقایسه گردیدند. همچنین از برگ گیاهان اپی‌درم تهیه شد و زیر میکروسکوپ تعداد و شکل کرک‌های گیاه مورد بررسی قرار گرفت. شمارش تعداد کرک در ۳ تکرار انجام شد.

بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان باززایی شده: پنج گیاه باززایی شده در مرحله‌ی قبل که تنوع مورفولوژیکی و آناتومیکی آن‌ها بررسی شده بود جهت بررسی تنوع ژنتیکی نیز استفاده گردید. از این گیاهان ابتدا DNA با استفاده از CTAB (۱۶) استخراج شد و سپس بررسی تنوعات سوماکلونال تعدادی از گیاهان باززایی شده با استفاده از پرایمرهای: RAPD (DNA Randomly Amplification Polymorphism Analysis) شامل: OPA-14, FPK 1-05, OPB-08, OPB-07, OPA-18 و پرایمرهای: ISSR (Inter Simple Repeat Sequence) شامل: (AC)8 TA, (AC)8 CG, (AC)8 T, (GATA)4, (AC)8 C مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

برای استخراج DNA، ابتدا ۰/۵ گرم از بافت برگ گیاه با استفاده از دانه‌های کوچک شیشه (Glass bead) در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری خرد گردید. سپس به هر یک از تیوب‌ها ۲۵۰

می‌گیرد و این تکنیک می‌تواند جهت تشخیص تنوع سوماکلونال گیاهان باززایی شده بسیار سودمند باشد (۱۲).

برای تعدادی از گونه‌های شمعدانی زینتی همانند *Pelargonium zonal* و *Pelargonium × hortorum* تکنیک‌های کشت بافت جهت بهبود ژنتیکی این گیاهان استفاده شده است (۶). یکی از تنوع یافته‌های سوماتیکی در شمعدانی که در حال حاضر به عنوان یک کولیتوار جدید معرفی شده است رز مخملی (*Velvet rose*) می‌باشد (۱۳). در سال‌های اخیر نیز روی گونه‌ی *Pelargonium graveolence* تحقیقات متعددی در نقاط مختلف دنیا انجام شده است ولی روش بهینه‌سازی و متد جهانی برای کشت درون شیشه گونه‌های شمعدانی هنوز توسعه کاملی نیافته است (۱۴).

گزارشی مبنی بر کشت بافت گیاه شمعدانی عطری در ایران ثبت نشده است. لذا در این پژوهش سعی بر آن است که با توجه به مطالعات قبلی که روی این گیاه انجام شده یک دستورالعمل بهینه جهت تکثیر و باززایی این گیاه پیشنهاد شود و همچنین تنوعات سوماتیکی گیاهان باززایی شده از نظر مورفولوژیکی و ژنتیکی نیز مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تکثیر گیاه شمعدانی عطری: برای تکثیر گیاه شمعدانی عطری از گیاهان گلدانی تهیه شده از گلخانه‌ی تحقیقاتی مرکز پژوهشی شهید فزوه اصفهان استفاده گردید. برای تکثیر گیاه قطعاتی از ساقه به طول حدود ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر از بخش راس گیاه که حاوی ۱ یا ۲ عدد برگ کوچک و جوانه انتهایی بود جدا نموده، ابتدا توسط آب حاوی ماده شوینده (مایع ظرفشویی) و سپس توسط آب مقطر شستشوی آن‌ها انجام شد. بعد از این مرحله قطعات جدا کشت به مدت ۲۰ دقیقه به محلول ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد منتقل شدند. سپس قطعات با آب مقطر استریل شستشو داده شد و در پایان قطعات جداکشت به مدت ۱ دقیقه به محلول قارچ کش ویتاواکس ۲ درصد انتقال داده شد و در پایان مجدد قطعات جدا کشت با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

قطعات جداکشت در شرایط استریل به محیط کشت MS پایه جهت تکثیر انتقال داده شدند. محیط کشت‌های حاوی قطعات جداکشت به اتاقک رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای حدود 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد منتقل

IRAN تهیه گردید. شرایط انجام PCR در جدول شماره ۲ آورده شده است.

بررسی آماری: هر آزمایش در پنج تکرار و با چهار قطعه‌ی جدا کشت از برگ بالغ و ساقه در قالب طرح کامل تصادفی اجرا گردید. تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS-18 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

میکرو لیتر بافر استخراج اضافه گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر انجام گردید و شامل مواد زیر بود:

Taq DNA polymerase (یک واحد در میکرو لیتر) ۰/۲ میکرو لیتر، dNTP (۲۰ میلی مولار) ۲ میکرو لیتر، PCR buffer (10x) ۲ میکرو لیتر، DNA ۳ میکرو لیتر، primer (۱۰ پیکومول در لیتر) ۱/۵ میکرو لیتر و $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار) ۰/۸ میکرو لیتر. پرایمرهای مورد استفاده از شرکت ARANCO

جدول ۱: محیط های کشت مختلف مورد استفاده برای باززایی گیاه شمعدانی

| نام محیط کشت | ترکیبات محیط کشت |
|----------------|---|
| M ₀ | MS |
| M ₁ | MS + Ki(2mg/lit) + NAA (2mg/lit)+2,4.D(2mg/lit) |
| M ₂ | MS + BAP (2mg/lit) + NAA (0/1mg/lit) |
| M ₃ | MS + BAP(2mg/lit) + NAA (1mg/lit) |
| M ₄ | MS + BAP (2mg/lit) + NAA (2mg/lit) |

جدول ۲: شرایط انجام PCR

| | | |
|--------------|--------------------|----------|
| Denaturation | ۹۴ درجه سانتی‌گراد | ۵ دقیقه |
| Denaturation | ۹۴ درجه سانتی‌گراد | ۱ دقیقه |
| Anelling | ۳۷ درجه سانتی‌گراد | ۳۰ ثانیه |
| Extension | ۷۲ درجه سانتی‌گراد | ۳۰ ثانیه |
| تعداد سیکل | ۳۵ | |

شکل ۱: تولید نوساقه روی کالوس حاصل از جدا کشت برگ در محیط کشت M₂

در محیط کشت M₂ حاوی جدا کشت ساقه نیز تولید نوساقه حداقل بود. ولی در همین محیط کشت در حضور قطعه‌ی جدا کشت برگ حداکثر تولید نوساقه ۹۵ درصد مشاهده شد (شکل ۱) که اختلاف معنی‌داری بین نوع قطعه‌ی به کار برده شده جهت کشت از نظر آماری را عنوان می‌کند. بین محیط‌های کشت M₃ و M₄ در حضور قطعات جدا کشت ساقه و برگ تفاوت معنی‌داری از نظر درصد تولید نوساقه مشاهده نشد (جدول ۳).

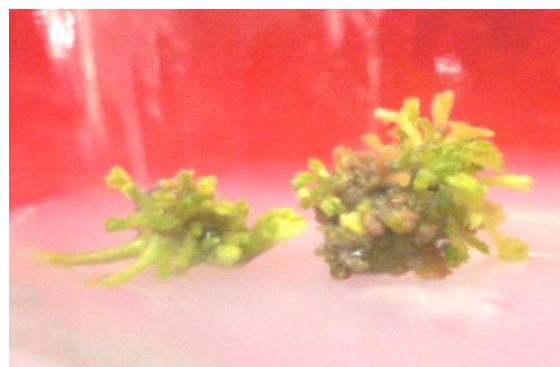
بررسی داده‌ها نشان داد که در محیط کشت M₁ هیچگونه ریشه‌ای تولید نشد. محیط کشت M₂ با جدا کشت برگ با ریشه‌زایی ۱۰۰ درصد بیشترین میزان ریشه‌زایی را نشان داد که تفاوت معنی‌داری را از نظر نوع محیط کشت و قطعه‌ی جدا کشت با سایر محیط‌ها و قطعات جدا کشت مشاهده نشد (شکل ۲). در محیط کشت M₃ نیز درصد ریشه‌زایی در قطعات جدا کشت ساقه ۴۵ درصد و در برگ ۶۰ درصد بود که از نظر

نتایج

اثر محیط کشت و نوع قطعه‌ی جدا کشت در تولید نوساقه

و ریشه

در جدول ۳ اثر محیط کشت‌های مختلف و قطعات جدا کشت متفاوت بر درصد تولید نوساقه و ریشه نشان داده شده است. داده‌های جدول گویای این نکته است که درصد تولید نوساقه در محیط کشت M₁ (شاهد) حاوی قطعات جدا کشت ساقه و برگ حداقل یعنی صفر بود.

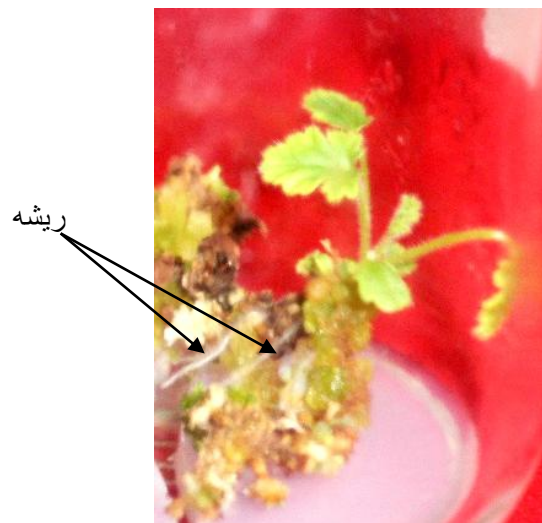


شکل ۲: تولید ریشه روی کالوس حاصل از جداکشت برگ در محیط کشت M_3

مورفولوژی برگ گیاهان غیر باززایی و باززایی شده

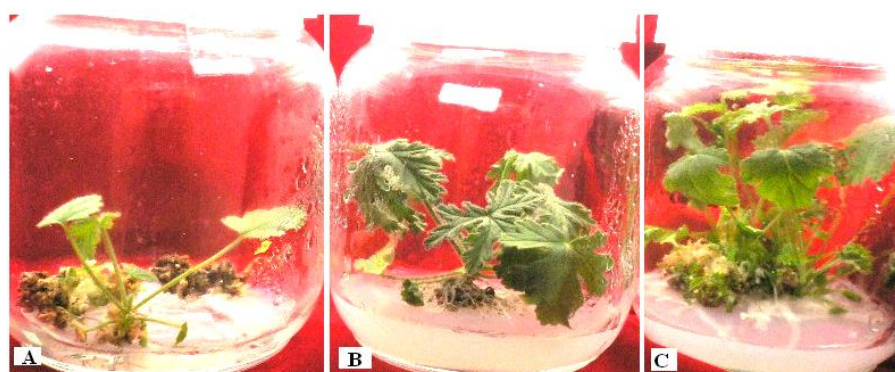
در گیاهان غیر باززایی شده برگ از نظر شکل ظاهری دارای بریدگی‌های عمیق و زیاد می‌باشد. در گیاهان باززایی شده نیز سه نوع تنوع برگ از نظر شکل ظاهری قابل تشخیص می‌باشد. الف) برگ‌هایی که مشابه با گیاهان والد بوده دارای بریدگی‌های زیاد و عمیق می‌باشد که حدود ۵۰ درصد از گیاهان باززایی شده را تشکیل می‌دهد (شکل ۳B). ب) برگ‌هایی با تعداد بریدگی‌های بسیار کم در حاشیه که عمق این بریدگی‌ها نیز بسیار کم و نامحسوس است و حدود تقریباً ۲۰ درصد از گیاهان باززایی شده را در برمی‌گیرد (شکل ۳A). ج) برگ‌هایی که حالت حد واسط بین دو نوع قبلی را دارد و حدود ۳۰ درصد از گیاهان باززایی شده را شامل می‌شود (شکل ۳C).

آماري تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در محیط کشت M_4 نیز در حضور قطعه‌ی جدا کشت برگ تنها ۱۰ درصد و در حضور قطعه‌ی جدا کشت ساقه ۲۰ درصد ریشه‌زایی مشاهده شد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد. بین محیط کشت M_3 و M_4 از نظر تولید ریشه اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نشد (جدول ۳).



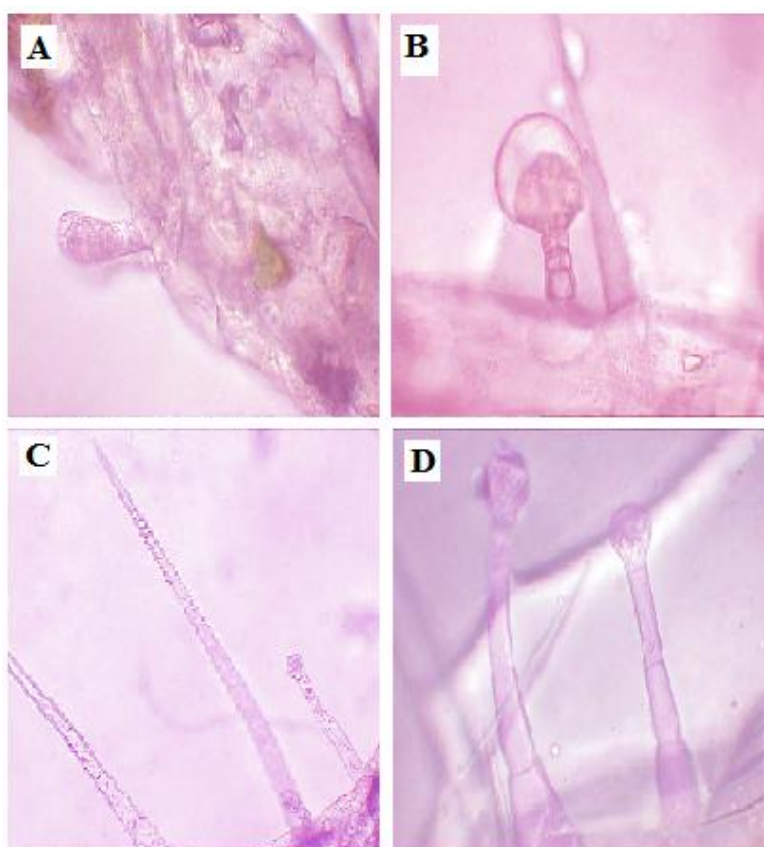
جدول ۳: اثرنوع محیط کشت و نوع قطعه‌ی جدا کشت در تولید نوساقه و ریشه گیاه شمعدانی عطری. حروف غیرمشابه در هر ستون بطور مستقل بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) است. اعداد به صوت میانگین $\pm SE$ بیان شده است.

| درصد تولید ریشه | درصد تولید نو ساقه | محیط کشت | قطعه جدا کشت |
|---------------------|--------------------|----------|--------------|
| 0 ± 0 c | 0 ± 0 c | M_0 | ساقه |
| 0 ± 0 c | 0 ± 0 c | M_1 | |
| 0 ± 0 c | 0 ± 0 c | M_2 | |
| $45 \pm 14 / 0.4$ b | $35 \pm 18 / 7$ b | M_3 | |
| $20 \pm 5 / 0$ c | $20 \pm 5 / 0$ bc | M_4 | |
| 0 ± 0 c | 0 ± 0 c | M_0 | برگ |
| 0 ± 0 c | 0 ± 0 c | M_1 | |
| 100 ± 0 a | $95 \pm 11 / 1$ a | M_2 | |
| $60 \pm 12 / 7$ b | $30 \pm 18 / 3$ bc | M_3 | |
| $10 \pm 6 / 1$ c | $35 \pm 6 / 1$ b | M_4 | |



شکل ۳: تنوع شکل برگ در گیاهان باززایی شده

خمیده پیدا کرده است و سلول انتهایی این کرک به فرم کروی شکل است و به نظر دارای مواد ترشحي کمی می باشد (شکل ۴A). ج) کرک غیر غده‌ای که دارای قسمت راسی نوک تیز می باشد و نقش محافظتی دارد (شکل ۴C) و د) کرک غده‌ای مشابه با نوع اول از ۵ سلول تشکیل شده ولی نسبت به نوع اول کشیده تر است و سلول انتهایی آن نیز تورم زیادی پیدا نکرده است (شکل ۴D). بین گیاهان غیر باززایی و باززایی شده از نظر مورفولوژی کرکها تفاوتی مشاهده نشد و انواع کرکهای مشاهده شده در گیاهان غیر باززایی در گیاهان باززایی شده نیز مشاهده گردید.



شکل ۴: انواع کرک در اپیدرم برگ گیاه شمعدانی عطری باززایی شده و غیر باززایی

کرک غده‌ای در هر میلی متر برگ دارای کمترین تعداد کرک غده‌ای هستند.

نتایج بررسی تعداد کرکهای غیرغده‌ای و مقایسه میانگین آنها نیز نشان داد که بین تعداد کرک غیرغده‌ای گیاه شاهد ولاین‌های ۱ و ۵ از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نشد، ولی لاین‌های ۳ و ۴ با کمترین میانگین تعداد کرک غیر غده‌ای در هر میلی متر مربع اپی‌درم فوقانی برگ شمعدانی عطری نسبت به گیاه شاهد اختلاف معنی داری را نشان داد.

مورفولوژی کرکهای غده‌ای و غیرغده‌ای در گیاه غیر باززایی و باززایی شده

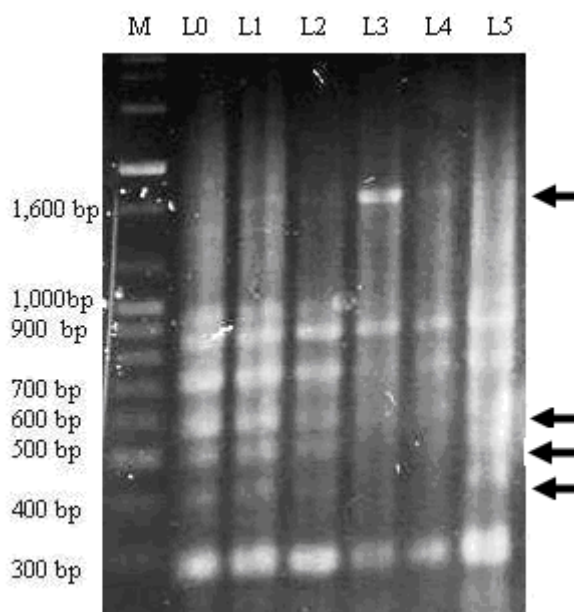
در برش‌های تهیه شده از بخش اپی‌درم فوقانی برگ گیاه شمعدانی عطری سه نوع کرک غده‌ای و همچنین یک نوع کرک غیرغده‌ای از هم قابل تشخیص بود که شامل: الف) کرک غده‌ای با ۵ سلول که ۳ سلول آن پایه کرک را می‌سازد و یکی به عنوان سلول نگهدارنده در بخش قاعده‌ای قرار دارد و یک سلول متورم که در راس قرار گرفته و حاوی ماده ترشحي است. این کرک از نظر طولی کوتاه قد بود (شکل ۴B). ب) کرک غده‌ای، کرک کوتاهی است که قسمت راسی کرک به سمت نوک برگ فرم

تعداد کرکهای غده‌ای و غیر غده‌ای گیاهان غیر باززایی (شاهد) و گیاهان باززایی شده

داده‌های جدول ۴ نشان می‌دهد که از نظر تعداد کرک غده‌ای بین گیاه غیر باززایی (شاهد) ولاین‌های ۱، ۳، ۴ و ۵ گیاهان باززایی شده اختلاف معنی داری از نظر آماری مشاهده می‌شود. بدین صورت که گیاه شاهد با میانگین تعداد ۷۳ عدد کرک غده‌ای در هر میلی متر برگ دارای بیشترین تعداد کرک غده‌ای ولاین‌های ۳ و ۴ به ترتیب با داشتن ۲۲ و ۲۶/۳ میانگین تعداد

جدول ۴: مقایسه میانگین تعداد کرک‌های غده‌ای و غیرغده‌ای در هر میلی‌متر مربع سطح اپی‌درم فوقانی برگ لاین‌های گیاهان باززایی شده با گیاه شاهد (غیر باززایی شده). حروف غیرمشابه در هر ستون بطور مستقل بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) است. اعداد به صورت میانگین \pm SE بیان شده است.

| تعداد کرک غیر غده‌ای | تعداد کرک غده‌ای | گیاه |
|----------------------|------------------|--------------------|
| ۵۹/۶ ± ۶/۵ b | ۷۳ ± ۷ a | شاهد (غیر باززایی) |
| ۶۶/۳ ± ۶/۵ ab | ۶۲ ± ۳/۴ b | لاین ۱ |
| ۷۵/۳ ± ۴ a | ۶۴ ± ۴/۳ ab | لاین ۲ |
| ۴۴/۳ ± ۷/۵ c | ۲۲ ± ۳/۴ d | لاین ۳ |
| ۳۹/۶ ± ۶/۵ c | ۲۶/۳ ± ۶/۵ d | لاین ۴ |
| ۶۶/۳ ± ۶/۵ ab | ۴۱/۶ ± ۷/۵ c | لاین ۵ |



شکل ۵: الگوی باندهای حاصل از RAPD-PCR پنج لاین گیاه باززایی شده در مقایسه با گیاه شاهد (غیر باززایی). نمونه‌ها پس از PCR با پرایمرهای OPB-07, OPB-08 بر روی ژل آگارز ۱ درصد تفکیک شدند. M، مارکر، L0 گیاه شاهد و L1 تا L5 به ترتیب گیاهان باززایی شده می‌باشند. (فلش‌ها باندهای متفاوت را نشان می‌دهد)

شد و سایر لاین‌ها از نظر حضور یا عدم حضور باند با گیاه شاهد تفاوتی نداشت. وجود باندهای اختصاصی و عدم حضور سایر باندهای مربوط به شاهد در دو لاین ۳ و ۴ بیانگر اختلاف این دولاین با سایر لاین‌های باززایی شده و شاهد بود.

بحث

در این مطالعه اثر نوع قطعه جداگشت و محیط کشت‌های مختلف بر باززایی گیاه شمعدانی عطری مورد مطالعه قرار گرفت. باززایی گیاهان در شرایط کشت در شیشه تحت تاثیر تنظیم کنندگان رشد اندوژن و اکزوژن و وابسته به مقادیر اکسین و سیتوکینین و نوع قطعه‌ی جدا کشت و شرایط محیط کشت

تنوعات ژنتیکی گیاهان باززایی شده

به منظور بررسی تنوعات سوماتیکی احتمالی بین گیاهان باززایی شده و مقایسه‌ی آن با گیاه شاهد RAPD-PCR بر روی این گیاهان انجام شد که تنها نتایج ثابت و قابل تکرار با استفاده از پرایمرهای OPB-07 و OPB-08 که به صورت ترکیبی استفاده شدند بدست آمد. با توجه به شکل ۵ با استفاده از پرایمرهای OPB-07 و OPB-08 باندهایی در محدوده 300 تا 1600 مشاهده شد. با مقایسه این باندها بین گیاه شاهد و گیاهان باززایی شده تنها بین گیاه شاهد ولاین‌های ۳ و ۴ اختلاف از نظر حضور باندهایی اختصاصی در محدوده 1600 bp و حذف باندهایی در این لاین‌ها در محدوده 400 تا 700 مشاهده

نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی برگ گیاهان باززایی تنوع شکل برگ را در بخش حاشیه‌ی برگ و تنوع عمق بریدگیها در این بخش را نشان می‌دهد. این نتایج با یافته‌های گزارش شده توسط saxena و همکاران (۶) مبنی به تنوع مورفولوژیکی برگ‌ها در گیاهان باززایی شده شمعدانی عطری نسبت به گیاهان والد تطابق دارد. در این گزارش عنوان شده که گیاهان باززایی شده دارای برگ‌هایی با بریدگی کمتر نسبت به والدین می‌باشند. بررسی‌های مورفولوژیکی کرک‌های گیاه شمعدانی عطری نیز حضور سه نوع کرک را نشان می‌دهد که یکی حالت کشیده و نوک تیز داشته و سه تای دیگر دارای بخش انتهایی متورم می‌باشد. مشابه این نتیجه در گونه‌های دیگر شمعدانی نیز گزارش شده است (۱۰). دلیل حضور سه نوع کرک غده‌ای با مورفولوژی متفاوت مشخص نمی‌باشد. احتمالاً کرک‌های غده‌ای کوچک، کرک‌های مشابه با کرک‌های غده‌ای بزرگ هستند که موفق به رشد کامل نشده‌اند و تکامل به منظور ترشح یا ذخیره روغن فرار را پیدا نکرده‌اند (۲۴). از نظر تعداد کرک‌های غده‌ای و غیر غده‌ای نیز مقایسه‌ی میانگین تعداد کرکها در گیاهان باززایی شده با گیاه شاهد نشان داده که در بیشتر لاین‌های باززایی شده از نظر تعداد کرک ترش‌خی و غیر ترش‌خی کاهشی نسبت به گیاه شاهد مشاهده می‌شود که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد. با بررسی داده‌ها مشاهده می‌شود که این کاهش در لاین ۳ و ۴ بیشتر می‌باشد. کاهش تعداد کرک غده‌ای برای این گیاه با توجه به اینکه کرک‌های غده‌ای در این گیاه حاوی مواد ترش‌خی می‌باشند یک صفت مطلوب نیست. البته در مطالعه‌ای که روی این گیاه برای اثر تعداد کرک بر میزان تولید مواد ترش‌حه انجام گرفت عنوان شده که تعداد کرک تاثیر زیادی بر میزان تولید روغن فرار در این گیاه ندارد (۲۴).

بررسی تنوع سوماتیکی ۵ لاین باززایی شده گیاه شمعدانی عطری به روش RAPD-PCR نیز گویای وقوع تنوع سوماتیکی می‌باشد. مقایسه‌ی الگوی باندهای حاصل از تکثیر قطعات DNA در نمونه شاهد ولاین‌های باززایی شده نشان می‌دهد که در لاین‌های ۱، ۲ و ۵ الگوی باندها مشابه با شاهد می‌باشد ولی در لاین‌های ۳ و ۴ تغییری در الگوی باندها نسبت به گیاه شاهد مشاهده می‌شود. با توجه به نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی روی تعداد کرک‌های غده‌ای و غیر غده‌ای که بیشترین کاهش تعداد این کرکها نیز در لاین‌ها ۳ و ۴ مشاهده شد و نتایج حاصل از بررسی الگوی باندهای الکتروفورزی این لاین‌ها می‌توان نتیجه گرفت که تغییر در میزان تعداد کرک‌های

می‌باشد (۱۸). در حضور قطعه جدا کشت برگ، بیشترین میزان تولید نوساقه و ریشه در محیط کشت M₂ یعنی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. با استفاده از قطعه جدا کشت ساقه در حضور همین محیط کشت هیچگونه اندام زایی مشاهده نشد و اختلاف معنی‌داری بین کاربرد این دو نوع قطعه‌ی جدا کشت از نظر آماری مشاهده شد که این گویای تاثیر استفاده از قطعات جدا کشت متفاوت در ارگانوژنز این گیاه می‌باشد و دلیل آن را می‌توان به میزان سطح غلظت هورمون‌های درونی قطعات جدا کشت نسبت داد. افزایش توان باززایی گیاه شمعدانی عطری توسط به‌کارگیری قطعه جدا کشت برگ در گزارش‌های پیشین نیز عنوان شده که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد (۱۹ و ۲۰).

در محیط‌های کشت مختلف در حضور جدا کشت برگ تفاوت معنی‌داری از نظر تولید نوساقه و ریشه از نظر آماری مشاهده شد که این گویای این نکته است که القا نوساقه و ریشه در گیاه شمعدانی تحت تاثیر غلظت تنظیم کنندگان، به خصوص سیتوکینین و اکسین می‌باشد (۲۱). در محیط کشت M₁ هیچگونه اندام زائی مشاهده نشد که این امر احتمالاً به علت اثرات نامطلوب 2,4-D می‌باشد که یک علف کش و متوقف کننده ارگانوژنز است (۲۲). در این پژوهش محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با به کارگیری قطعه‌ی جدا کشت برگ بهترین محیط برای باززایی گیاه شمعدانی عطری در بین سایر محیط‌های کشت بدست آمده است. در این راستا گزارش‌هایی مبنی بر استفاده محیط کشت حاوی ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (۸) جهت بیشترین میزان تولید نوساقه و محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA برای ریشه‌زایی گیاه شمعدانی پیشنهاد شده است (۱۵) که تا حدودی با نتایج ما مطابقت دارد.

محیط‌های کشت مورد استفاده برای باززایی گیاه کامل از قطعات جدا کشت اغلب منشا تنوع هستند. این بدین مفهوم است که درصد قابل توجهی از گیاهان باززایی شده ممکن است از نظر ژنوتیپ و فنوتیپ شبیه گیاهان والدی که ریز نمونه‌ی اولیه از آن گرفته شده است نباشد. برای ارزیابی تنوع سوماتیکی در گیاهان باززایی شده می‌توان از تجزیه و تحلیل‌های فنوتیپی استفاده نمود ولی به تازگی فنون مولکولی به طور فزاینده‌ای در این زمینه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۳).

7. Zhou JH, Yang MX, Xian YX. Study on leaves *in vitro* culture of *Pelargonium graveolens*, Journal of Zhongkai Agrotechnical College. 2005; 2: 5-9.
8. Yi QY, Xia KG, Jiang M, Ren H. Study on *in vitro* Shoot Culture of *Pelargonium graveolens* and Its Production. Southwest China Journal of Agricultural. 2010; 2: 59-67.
9. Ehsanpour, AA, Amini F. Plant cell and tissue culture. 2th Ed. Jahad University, Isfahan branch; 2003.
10. Saxena G, Rahman L, Vermac P, Banerjee S, et al. Field performance of somaclones of rose scented geranium (*Pelargonium graveolens* L'Her Ex Ait.) for evaluation of their essential oil yield and composition. industrial crops and products. 2008; 27: 86-90.
11. Oosthuizen L, Coetzee J. Morphogenesis of trichomes of *Pelargonium scabrum*. South African Journal of Botany. 1983; 2: 305-310.
12. Gutierrez N, Avila CM, Due G, Marget P, et al. CAPs markers to assist selection for low vicine and convicine contents in faba bean (*Vicia faba* L.) Theor. Appl. Genet. 2006; 114(1): 59-66.
13. Skirvin RM, Janick J. Velvet rose, *Pelargonium* a scented geranium, Hort. Sci. 1976; 11: 61- 62.
14. Wojtana A, Gabryszewska E, Marasek A. Regeneration of *Pelargonium* × *Hederaefolium* 'Bonete' from petiole explants. Acta Physiol. Plant. 2004; 26: 255-262.
15. Sukhumpinij P, Kakihara F, Kato M. *In vitro* regeneration from mature leaf explants of *Pelargonium rapaceum* (L.). Science Horticulturae. 2010; 126: 385-389.
16. Ehsanpour AA, Twell D. Analysis of SFL1 and SFL2 promoter region in *Arabidopsis thaliana* using gateway cloning system. Journal of Science. 2005; 16(4): 303-309.
17. Ehsanpour AA, Tavassoli M, Arab L. Sex determination of *Pistacia vera* L. using ISSR markers. Malays Appl Biol. 2008; 37(2): 25-28.
18. Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 1957; 11: 118-131.
19. Dunbar KB, Stephen CT. Shoot regeneration of hybrid seed geranium (*Pelargonium* × *hortorum*) and regal geranium (*Pelargonium* × *domesticum*) from primary callus cultures. Plant Cell Tissue Org. Cult. 1989; 19: 13-21.
20. Yi QY, Xia KG, Jiang M, Ren H. Study on *in vitro* shoot culture of *Pelargonium graveolens* and Its production. Southwest China Journal of Agricultural. 2010; 2: 59-67.

غده‌ای و غیرغده‌ای در این گیاه در تنوع سوماتیکی ایجاد شده می‌تواند پایه و اساس ژنتیکی داشته باشد. این تنوعات می‌تواند در اثر هورمون‌های بکار رفته در سیستم باززایی و استعداد ذاتی گیاه شمعدانی جهت تنوع‌پذیری باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از تکثیر و باززایی گیاه شمعدانی عطری در این پژوهش نشان می‌دهد که این گیاه می‌تواند در محیط MS پایه تکثیر یابد و در محیط حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA دارای بیشترین میزان باززایی می‌باشد. بررسی تنوعات سوماتیکی این گیاه نیز تنوع مورفولوژیکی برگ و کرک را در گیاهان باززایی شده نسبت به شاهد نشان می‌دهد که منطبق بر تغییرات ژنتیکی در این گیاهان می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسنده مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به واسطه حمایت از این پژوهش تشکر می‌نماید.

منابع

1. Mozafarian, V.A. The culture of the Iranian plant name. 2th Ed. Iran: Contemporary Culture company; 2004.
2. Mithila J, Murch SJ, KrishnaRaj S, Saxena PK. Recent advances in *Pelargonium* *in vitro* regeneration system. Plant Cell Tissue Org. Cult. 2001; 67: 1-9.
3. Marsolias AA, Wilson DPM, Tsuita MJ, enaratna T. Somatic embryogenesis and artificial seed production in zonal (*Pelargonium* × *hortorum*) and regal (*Pelargonium* × *domesticum*) geranium. Can. J. Bot. 2001; 69: 1188-1193.
4. Agarwal PK, Ranu RS. Regeneration of plantlets from leaf and petiole explants of *Pelargonium* × *hortorum*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2000; 36: 392-397.
5. Hassanein A, Dorion N. Efficient plant regeneration system from leaf discs of zonal (*Pelargonium* × *hortorum*) and two scented (*P. capitatum* and *P. graveolens*) geranium. Plant Cell Tissue Org. Cult. 2000; 83: 231-240.
6. Saxena G, Banerjee S, Rahman L, Mallavarapu GR, et al. An efficient *in vitro* procedure for micropropagation and generation of somaclones of rose-scented *Pelargonium*. Plant Sci. 2005; 155: 133-140.

21. Poudyal BK, Zhang Y, Du G. Adventitious shoot regeneration from the leaves of some pear varieties (*Pyrus* spp.) grown *in vitro*. Front Agric. China. 2008; 2: 82-92.
22. Dodd JH, Robert LW. Experiment in Plant Tissue Culture. 3th Ed. Cambridge University Press, New York. 1995.
23. Khosrosahi, M, Behnamian M. Plant cell culture. 1th Ed. Tabriz University; 2007.
24. Eiasu BK, Steyn JM, Soundy P. Physiomorphological response of rose-scented geranium (*Pelargonium* spp.) to irrigation frequency South African Journal of Botany. 2011; 5: 1-8.

Regeneration and Somatic Variation in *Pelargonium roseum* L.

Rezayatmand Z. Ph.D.

- Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

* Email corresponding author: zrezayatmand12@yahoo.com

Received: 10 Jun. 2012

Accepted: 1 Jan. 2013

Abstract

Aim: The *Pelargonium roseum* L. is an ornamental plant with important medical properties. The purpose of this study was to optimized the proliferation and regeneration of *Pelargonium roseum* L. and investigation of the possible somatic variation in the regenerated plant.

Material and methods: In this study first explants from the terminal buds as well as some small part of the stem were prepared and cultured in MS basal medium. Then some fragments of the cultured explants including parts of stems and leaves were isolated and transferred to mediums containing different growth regulators to stimulate micro-regeneration of the plants. From regenerated plants several lines were selected and their morphological characters as well as genetic diversity were evaluated.

Results: The rate of shoots and roots production was maximum in mediums containing leaf explants supplemented with 2mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA. Somatic variation of the regenerated lines in comparison with control group showed differences in leaf shape and number, in addition genetic differences were expressed in form of band addition and band removal in bonding pattern of DNA.

Conclusion: The different percentage of shoots and roots production was an indication of the inductive effect of mediums and explants variation on regeneration of the *Pelargonium roseum* L. Comparison of genetic variation and morphological diversity of regenerated plants could show the common base of genetic for somatic variation.

Key word: Genetic variation, *Pelargonium roseum* L., RAPD molecular marker, Regeneration, Somatic variation