مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، ۱۳۷-۱۲۹

بهینه‌سازی تولید کالوس و باززایی در گیاه *Salsola arbuscula* pall.

فریبا امینی .Ph.D [۱*]، زهره قنبرزاده .M.Sc [۲]، مهری عسکری مهرآبادی .Ph.D [۱]

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، کد پستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: f-amini@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۲۴

چکیده

هدف: تولید گیاه از طریق کشت بافت از نظر مهندسی ژنتیک اهمیت زیادی دارد لذا در این تحقیق بهینه‌سازی شرایط کشت به‌منظور تولید کالوس و باززایی گیاه *Salsola arbuscula* بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: ابتدا بذر گیاه در محیط کشت MS کشت گردید و پس از دو ماه، جداکشت‌های ریشه، ساقه و برگ گیاهان تولید شده جهت تولید کالوس در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف از هورمون‌های ۲و۴-دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) و کینتین (Kin) کشت گردیدند. باززایی گیاه نیز در محیط کشت‌های مختلف بررسی شد.

نتایج: بررسی‌ها نشان داد که بهترین جداکشت در القا تولید کالوس، جداکشت ریشه و مناسب‌ترین محیط کشت (۱ mg/L) + (۱ mg/L 2,4-D + MS بود. همچنین در محیط ۰/۵ mg/L Kin + MS و ۱ mg/L Kin + MS از ساقه باززایی مستقیم صورت گرفت.

نتیجه‌گیری: با وجود تولید کالوس در محیط کشت حاوی فقط هورمون 2,4-D، ترکیب دو هورمون اکسین و سیتوکینین باعث افزایش قابل توجهی در میزان تولید کالوس گردید. باززایی مستقیم نیز فقط در محیط کشت فاقد اکسین رخ داد. بنابراین میزان تولید کالوس و باززایی به میزان تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی وابسته است و میزان تنظیم کننده‌های رشد خارجی نیز به‌شدت به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه بستگی دارد.

واژگان کلیدی: باززایی، کالوس، 2,4-D، Kin، *Salsola arbuscula*

مقدمه

گونه‌های یک‌ساله سالسولا از جمله *Salsola arbuscula* از گیاهان هالوفیت خانواده Chenopodiaceae می‌باشند که در مراحل بلوغ مقاومت بالایی نسبت به شوری و خشکی خاک، تغییرات pH و عدم ثبات شرایط آب‌وهوایی دارند (۱ و ۲). در نواحی خشک و نیمه خشک به‌علت کمبود آب و تعرق بالا نمک‌های محلول در خاک زیاد شده و شوری خاک افزایش می‌یابد در نتیجه دسترسی گیاهان به آب محدود می‌گردد (۳)، بنابراین به‌علت تحمل بالای نسبت به شوری، این گیاهان می‌توانند برای بهبود زمین‌های خشک و نیمه‌خشک مورد استفاده قرار گیرند (۱ و ۲). این گیاه در فصول بهار و پاییز از منابع علوفه حیوانی است و از جمله استفاده‌های دیگر از این نوع گیاهان، تزیین نواحی شهری، در شهرهایی با آب‌وهوای بیابانی است (۴). شاخ و برگ گیاه دارای مقادیری از ایزوکونیولین آلکالوئیدها مانند سالسولین و سالسولیدین است. همچنین نمک‌های معدنی به طور ویژه پتاسیم، کلسیم، منگنز، آلومینیوم و آهن در بافت‌های این جنس گیاهی وجود دارد. سالسولین و سالسولیدین در کاهش فشار خون موثر است (۵).

تحقیقات نشان داده است که هالوفیت‌ها به دلیل مقاومت بالا نسبت به تنش شوری می‌توانند به عنوان منبعی مناسب جهت انتقال ژن مقاومت نسبت به تنش شوری به گیاهان گلیکوفیت غیر مقاوم جهت بهبود استفاده از زمین‌های شور و خشک باشند. تکنولوژی کشت بافت برای جمع‌آوری، ذخیره‌سازی و تکثیر ژرم‌پلاسم گیاهی بسیار مورد توجه است. به کمک تکنیک کشت بافت می‌توان ژنوتیپ‌هایی تولید کرد که خصوصیات بهتری دارند (۶). لذا بهینه‌سازی تولید کالوس و باززایی گیاه در این ارتباط حائز اهمیت می‌باشد. از جمله عواملی که در تولید کالوس موثرند، ژنوتیپ، تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت، نوع کربوهیدرات، نوع جداکشت، سن جداکشت و شرایط محیطی می‌باشد. نتایج نشان داده است که وابستگی خاص القای کالوس و باززایی گیاه به ژنوتیپ اجتناب ناپذیر و کلی است و القای کالوس و باززایی گیاه با ژنوتیپ گیاه تغییر می‌کند (۷). میزان تنظیم‌کننده‌های خارجی و مواد مغذی موجود جهت القای کالوس به رقم گیاهی وابسته است بنابراین ترکیبات محیط کشت وابسته به ژنوتیپ گیاهی تغییر می‌کند (۷). رشد کالوس در یک گونه گیاهی بر اساس نوع جداکشت آن گیاه متفاوت بوده و علت آن به درستی مشخص نشده است (۸)، بنابراین انتخاب جداکشت نیز وابسته به نوع گونه گیاهی است، به طوری‌که در گونه *Salsola pestifer* کالوس از جداکشت ساقه نسبت به جداکشت برگ بهتر نمو می‌یابد در حالی‌که جداکشت برگ از گونه *Salsola lanata* در تشکیل کالوس مناسب‌تر است (۶). قطعات میانی هر جداکشت، تولید کالوس و باززایی بیشتری دارند چون احتمالا قطعات وسط دو لبه بریده دارند و زخمی شدن و قطعه قطعه شدن می‌تواند ظرفیت القای کالوس و درنتیجه باززایی را افزایش دهد (۸ و ۹). توانایی القای کالوس و باززایی با سن برگ نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد. معمولا برگ‌های جوان برای باززایی مناسب‌ترند (۸). در گیاه *Salsola ferganica* بهترین جداکشت جهت تولید کالوس هیپوکوتیل می‌باشد (۱۰). به‌هرحال، تاکنون اطلاعات کافی در مورد شرایط مناسب تولید کالوس و باززایی گیاه *Salsola arbuscula* وجود ندارد. از آنجایی‌که گیاه *Salsola arbuscula* یکی از گونه‌های هالوفیت است که حامل ژن‌های مقاومت به شوری بالا می‌باشد و همچنین به‌دلیل اهمیت‌های دارویی این گیاه، این تحقیق با هدف بهینه سازی شرایط تولید کالوس و باززایی به‌منظور استفاده در مهندسی ژنتیک برای انتقال ژن‌های مقاوم به شوری وهمچنین افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه انجام گردید.

مواد و روش‌ها

بذر گیاه *Salsola arbuscula* از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. این بذر دارای باله می‌باشد که این باله‌ها علاوه بر این‌که حاوی آبسیزیک اسید می‌باشند یک سد مکانیکی در مقابل ظهور ریشه‌چه بوده و در نتیجه از جوانه‌زنی بذر جلوگیری می‌کنند (۱۱) از این رو قبل از کشت بذر، باله‌ها جدا و سپس بذرها استریل شدند. جهت استریل، ابتدا بذرها به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گفته و پس از شستشوی کامل به مدت ۲۰ دقیقه در آب ژاول ۳۵ درصد (هیپوکلریت سدیم حاوی ۵ درصد کلر فعال) قرار گفتند. در پایان۳ تا ۴بار شستشو در شرایط استریل در زیر ایرفلو و با استفاده از آب مقطر استریل انجام گرفت. سپس بذرهای استریل *Salsola arbuscula* به تعداد ۱۰ تا ۱۲ عدد در شیشه‌های حاوی محیط کشت MS (Murashing and Skoog) (۱۲)کشت شدند. بذرهای کشت شده در اتاق کشت با نور حدود ۱۱۰ mmol photons.m^{-2}.S^{-1} و فتوپریود ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت نور و دمای ۲۴ تا ۲۶درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید (۱۳). پس از جوانه‌زنی بذر

و رشد گیاهان به مدت دو ماه، از جداکشت‌های ریشه، ساقه (میانگره) و برگ گیاهان دو ماهه در محیط کشت‌های مختلف (جدول ۱) جهت تولید کالوس استفاده گردید. تمامی آزمایش‌ها در ۵ تا ۶ تکرار در هر تیمار انجام گرفت و در هر تکرار ۶ تا ۸ قطعه جداکشت، کشت گردید و در شرایط ذکر شده برای کشت گیاه نگه‌داری شدند و پس از ۴۰ روز مورد بررسی‌های کمی و کیفی قرار گرفتند و بهترین محیط کشت و مناسب‌ترین جداکشت جهت تولید کالوس مشخص شد. سپس فراوانی کالوس‌زایی با شمارش تعداد جداکشت‌هایی که تولید کالوس داشتند به تعداد جداکشت‌های کشت شده اولیه به‌دست آمد و با توجه به این امر ۵ درجه تشکیل کالوس درنظر گرفته شد. درجه صفر: کالوس تولید نشده و جداکشت‌ها نیز نکروزه شده و از بین رفتند. درجه۱: کالوس تولید نشده اما جداکشت‌ها زنده بوده و تاحدی نیز رشد داشتند. درجه۲: تا ۲۵درصد تولید کالوس مشاهده شده. درجه۳: ۲۵ تا ۵۰ درصد تولید کالوس مشاهده گردید. درجه ۴: ۵۰ تا ۷۵ درصد تولید کالوس مشاهده شده. درجه ۵: ۷۵ تا ۱۰۰ درصد تولید کالوس مشاهده گردید. وزن کالوس‌ها در پایان با ترازوی دیجیتالی مدل (CE N92 SER 14230642 AC ADAPTER DC 12V 0.3A) اندازه‌گیری شد. فراوانی باززایی نوساقه با شمارش تعداد نوساقه تولید شده به تعداد جداکشت کشت شده در هر شیشه به‌صورت درصد محاسبه گردید. طرح آماری مورد استفاده، طرح کاملا تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل با سه فاکتور A (فاکتور جداکشت) در ۳سطح (ریشه، ساقه و برگ)، B (فاکتور هورمون 2,4-D (2,4- dichlorophenoxy acetic acid)) در سه سطح (۰، ۰/۵، ۱ میلی‌گرم در لیتر) و C (فاکتور هورمون Kin (Kinetin)) در سه سطح (۰، ۰/۵، ۱ میلی‌گرم در لیتر) بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام گردید و قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

جدول ۱: ترکیبات محیط کشت مورد استفاده جهت القاء تولید کالوس گیاه ***Salsola arbuscula***

	ترکیبات محیط کشت
۱	MS فاقد هورمون
۲	MS +۰/۵ mg/L 2,4-D
۳	MS +۱ mg/L 2,4-D
۴	MS +۰/۵ mg/L Kin
۵	MS +۱ mg/L Kin
۶	MS + 2,4D (۰/۵ mg/L) + Kin (۰/۵ mg/L)
۷	MS + 2,4D (۰/۵ mg/L) + Kin (۱ mg/L)
۸	MS + 2,4D (۱ mg/L) + Kin (۰/۵ mg/L)
۹	MS + 2,4D (۱ mg/L) + Kin (۱ mg/L)

نتایج

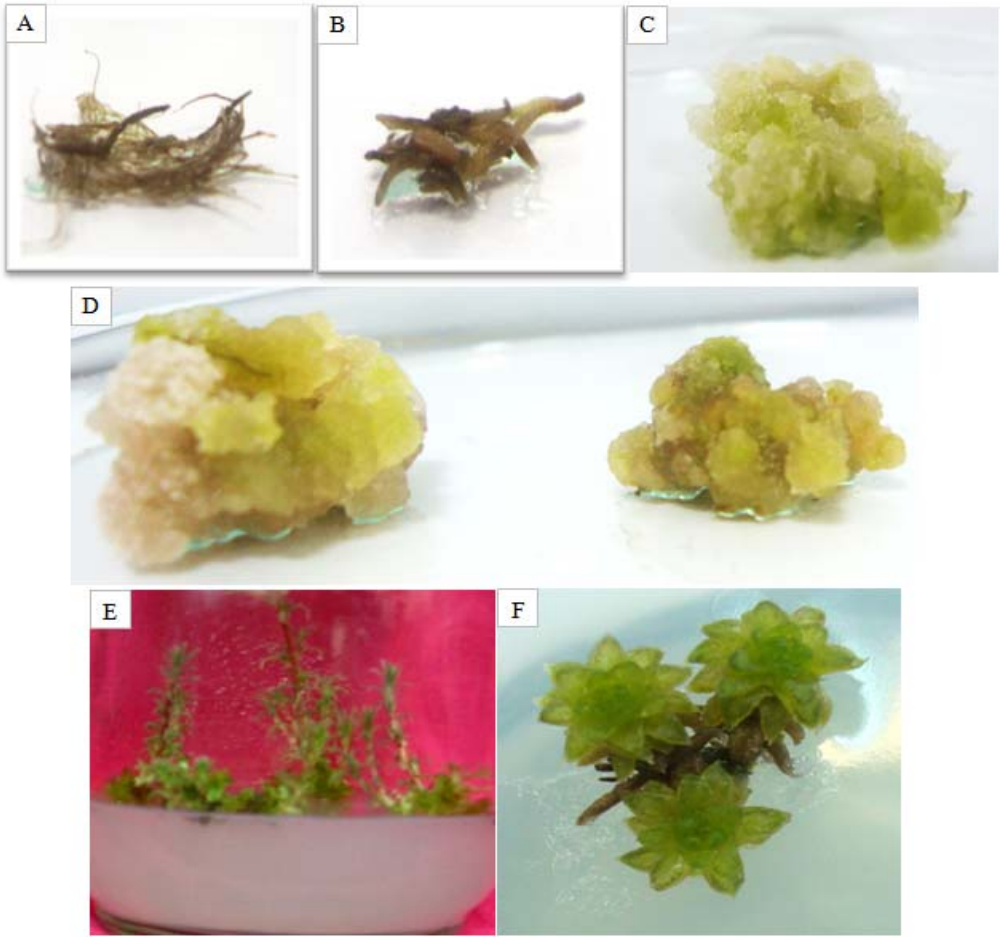
نتایج آنالیز واریانس برای صفات کالوس‌زایی و باززایی در جدول۲ آورده شده است. نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده‌های مربوط به درجه تشکیل کالوس و اندازه کالوس بر روی هر قطعه جداکشت نشان داد که اثر هریک از ترکیبات تنظیم کننده‌ی رشد و جداکشت به‌تنهایی و همچنین اثر متقابل دو فاکتوردر سطح احتمال ۱ درصد (P<۰/۰۱) معنی‌دار می‌باشد. این بدان مفهوم است که فاکتورهای مورد مطالعه از نظر تاثیر بر صفت مورد مطالعه به‌صورت مستقل از یکدیگر عمل نمی‌کنند و وابسته به یکدیگر می‌باشند.

زمان شروع تولید کالوس بسته به نوع جداکشت و نوع هورمون مورد استفاده در فاصله زمانی ۸ تا ۱۳ روز پس از کشت بود (جدول۳). بین درجه تشکیل کالوس در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۱) مشاهده گردید (جدول۲). بیشترین درجه تشکیل کالوس ۵ و کم ترین آن صفر بود. درجه صفر برای تمام جداکشت‌ها در محیط کشت MS فاقد هورمون و در محیط کشت MS +۰/۵ و MS + ۱ mg/L Kin برای جداکشت‌های ریشه و برگ مشاهده گردید (جدول۳، شکل ۱A و ۱B). در تمام محیط کشت‌ها جداکشت ریشه ۱۰۰درصد تولید کالوس داشت (جدول۳) بنابراین ریشه به‌عنوان بهترین جدا کشت جهت تولید کالوس در نظر گرفته شد.

جدول ۲: آنالیز واریانس برای صفات کالوس‌زایی و باززایی گیاه *Salsola arbuscula*

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS) Mean square		
		درجه کالوس‌زایی	وزن کالوس	باززایی
فاکتور A (جداکشت)	۲	3.955**	2.639**	10800
فاکتور B (2,4-D)	۲	520.115**	9.51**	10800
فاکتور AB	۴	3.677**	0.964**	10800
فاکتور C (Kin)	۲	9.152**	3.362**	2800
فاکتور AC	۴	3.066**	1.982**	2800
فاکتور BC	۴	4.060**	1.740**	2800
فاکتور ABC	۸	2.427**	0.572**	2800
اشتباه آزمایشی Error	۲۱۶	0.152	0.009	6.481
کل Total	۲۴۳			

ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار، ** وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱



شکل۱: مراحل تولید کالوس و باززایی گیاه A, B. Salsola arbuscula) نکروزه شدن بافت‌ها و عدم تولید کالوس در محیط کشت‌های mg/L Kin ۰/۵ + MS و MS + ۱mg/L Kin مربوط به جداکشت‌های به ترتیب ریشه و برگ؛ C) کالوس حاصل از جداکشت ریشه در محیط کشت (۱mg/L) MS + 2,4D (۱mg/L) + Kin؛ D) مقایسه تفاوت وزن دو توده کالوس حاصل از جداکشت ریشه در محیط MS + 2,4D (۱mg/L) + Kin (۱mg/L) (سمت چپ) و محیط MS + 2,4-D (۰/۵mg/L) + Kin (۱mg/L) (سمت راست)؛ E) مرحله آغازی باززایی مستقیم حاصل از جداکشت ساقه در محیط کشت MS + ۰/۵mg/L Kin؛ F) رشد گیاه باززایی شده .

جدول۳: اثر محیط کشت MS همراه با غلظت‌های متفاوت هورمون‌های 2,4-D و Kin بر القای تولید کالوس و ویژگی‌های کالوس گیاه Salsola arbuscula . داده‌ها میانگین ۶ تکرار ±خطای استاندارد(STDEV) و حروف غیر مشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

2,4D (mg/L)	Kin (mg/L)	نوع جداکشت	زمان شروع تشکیل کالوس (روز)	بافت کالوس	رنگ کالوس	وزن کالوس (g)	درجه تشکیل کالوس	درصد باززایی مستقیم
				شاخص‌های رشد				
۰	۰	ریشه	۰	۰	–	۰^{m} ±۰	۰^{g} ±۰	۰^{c} ±۰
۰	۰	برگ	۰	۰	–	۰^{m} ±۰	۰^{g} ±۰	۰^{c} ±۰
۰	۰	ساقه	۰	۰	–	۰^{m} ±۰	۰^{g} ±۰	۰^{c} ±۰
۰/۵	۰	ریشه	۱۳	نرم	کرم سبز	۰/۳۲^{hi} ±۰/۰۴	۵^{a} ±۰	۰^{c} ±۰
۰/۵	۰	برگ	۱۳	نرم	کرم‌قهوه‌ای	۰/۱۹^{jk} ±۰/۰۴	۴/۱۱^{c} ±۰/۷۸	۰^{c} ±۰
۰/۵	۰	ساقه	۱۳	نرم	کرم سبز	۰/۲۷^{ij} ±۰/۰۴	۵^{a} ±۰	۰^{c} ±۰
۱	۰	ریشه	۱۳	نرم	کرم	۰/۵۴^{ef} ±۰/۰۴	۵^{a} ±۰	۰^{c} ±۰
۱	۰	برگ	۱۱/۸	متوسط	کرم سبز	۰/۰۹^{lm} ±۰/۰۵	۲/۳۳^{e} ±۰/۷۱	۰^{c} ±۰
۱	۰	ساقه	۱۲/۲	نرم	کرم	۰/۱۴^{kl} ±۰/۰۳	۳/۴۴^{d} ±۰/۷۳	۰^{c} ±۰
۰	۰/۵	ریشه	۰	۰	–	۰^{m} ±۰	۰^{g} ±۰	۰^{c} ±۰
۰	۰/۵	برگ	۰	۰	–	۰^{m} ±۰	۰^{g} ±۰	۰^{c} ±۰
۰	۰/۵	ساقه	۰	۰	–	۰^{m} ±۰	۱^{t} ±۰	۱۰۰^{a} ±۰
۰/۵	۰/۵	ریشه	۱۱/۷	نرم	کرم	۰/۶۲^{de}±۰/۰۳	۵^{a} ±۰	۰^{c} ±۰
۰/۵	۰/۵	برگ	۱۱	نرم	کرم	۰/۹۲^{c} ±۰/۱۰	۵^{a} ±۰	۰^{c} ±۰
۰/۵	۰/۵	ساقه	۱۱	نرم	کرم سبز	۰/۶۷^{d} ±۰/۲۷	۴/۶۷^{ab}±۰/۷۱	۰^{c} ±۰
۱	۰/۵	ریشه	۸/۷۵	نرم	کرم	۰/۴۹^{fg} ±۰/۰۳	۵^{a} ±۰	۰^{c} ±۰
۱	۰/۵	برگ	۸	متوسط	کرم سبز	۰/۶۹^{d} ±۰/۰۵	۵^{a} ±۰	۰^{c} ±۰
۱	۰/۵	ساقه	۸	نرم	کرم سبز	۰/۴۴^{g} ±۰/۰۴	۵^{a} ±۰	۰^{c} ±۰
۰	۱	ریشه	۰	۰	–	۰^{m} ±۰	۰^{g} ±۰	۰^{c} ±۰
۰	۱	برگ	۰	۰	–	۰^{m} ±۰	۰^{g} ±۰	۰^{c} ±۰
۰	۱	ساقه	۰	۰	–	۰^{m} ±۰	۱^{t} ±۰	±۱۳/۲ ^{b}
۰/۵	۱	ریشه	۱۱/۵	نرم	کرم سبز	۱/۱۹b±۰/۲۵	۵^{a} ±۰	۰^{c} ±۰
۰/۵	۱	برگ	۱۱/۵	متوسط	کرم	۰/۴۱^{gh}±۰/۱۲	۴/۶۷^{ab} ±۰/۵	۰^{c} ±۰
۰/۵	۱	ساقه	۱۱/۵	نرم	کرم سبز	۰/۲۲^{jk} ±۰/۰۹	۴/۲۲^{c} ±۰/۹۷	۰^{c} ±۰
۱	۱	ریشه	۱۱	نرم	کرم سبز	۲/۱۱^{a} ±۰/۰۹	۵^{a} ±۰	۰^{c} ±۰
۱	۱	برگ	۱۱	متوسط	کرم سبز	۰/۹۲^{c} ±۰/۰۷	۵^{a} ±۰	۰^{c} ±۰
۱	۱	ساقه	۱۱	متوسط	کرم	۰/۳۲^{hi} ±۰/۱۸	۴/۴۴^{bc} ±۰/۸۸	۰^{c} ±۰

رنگ و بافت کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های ساقه و برگ نیز بسته به هورمون‌های مورد استفاده متفاوت بود (جدول۳). بافت کالوس‌های حاصل از ریشه در تمام محیط‌کشت‌های مورد استفاده نرم بود و همچنین کالوس‌ها بسته به ترکیبات محیط کشت رنگ کرم روشن و کرم سبز را نشان دادند (شکل 1C). بهترین محیط کشت جهت تولید کالوس محیط کشت (mg/L ۱) MS + 2,4D (۱ mg/L) + Kin شناسایی شد و با وجود تولید کالوس در محیط کشت حاوی فقط هورمون 2,4-D، ترکیب دو هورمون اکسین و سیتوکینین میزان تولید کالوس را به میزان معنی‌داری افزایش دادند.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس وزن کالوس (جدول۲) نشان داد که کم‌ترین و بیشترین میانگین وزن کالوس به‌ترتیب برابر صفر و ۲/۱۱ گرم بود که کم‌ترین میانگین وزن کالوس در محیط کشت MS فاقد هورمون، MS +۰/۵ mg/L Kin و MS ۱ mg/L Kin + برای تمام جداکشت‌ها بدست آمد و بیشترین میانگین وزن کالوس برای جداکشت ریشه در محیط کشت (۱ mg/L)

MS + 2,4-D (۱ mg/L) + Kin مشاهده گردید (جدول۳). جداکشت ریشه در محیط کشت (۱ mg/L) + Kin (۱ mg/L) MS + 2,4-D صددرصد افزایش وزن را نشان داد. ریشه در محیط کشت MS + 2,4-D (۰/۵ mg/L) + Kin (۱ mg/L) با میانگین وزن کالوس برابر ۱/۱۹ گرم دومین گروه نشان‌دهنده بیشترین وزن کالوس بود. به طورکلی وزن کالوس‌های تشکیل شده از جداکشت ریشه بطور معنی‌داری (P<۰/۰۱) نسبت به کالوس‌های حاصل از برگ و ساقه بیشتر بود (جدول ۳و ۴، شکل ۱D).

نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که در محیط کشت mg/L MS +۰/۵ Kin و MS +۱ mg/L Kin کالوس تولید نشد اما جداکشت ساقه در این محیط کشت‌ها باززایی مستقیم داشتند و گیاهان باززایی شده به صورت گوشتی و شکننده بودند (شکل ۱E و ۱F). محیط کشت MS +۰/۵ mg/L Kin نسبت به MS +۱ mg/L Kin در باززایی مستقیم کارایی بیشتری را نشان داد (جدول۲). باززایی در این محیط کشت‌ها در فاصله ۲۰ روز پس از کشت شروع گردید. در بقیه محیط کشت‌ها باززایی مستقیم مشاهده نشد. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که بهترین محیط کشت جهت باززایی این گیاه محیط کشت فاقد اکسین بوده و تنها جداکشت مناسب باززایی مستقیم نیز ساقه (میان‌گره) می‌باشد.

جدول ۴ : اثر محیط کشت MS همراه با غلظت‌های متفاوت هورمون‌های 2,4-D و Kin بر القای تولید کالوس و ویژگی‌های کالوس گیاه Salsola arbuscula. داده‌ها میانگین ۶ تکرار ±خطای استاندارد(STDEV) و حروف غیر مشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

2,4D (mg/L)	Kin (mg/L)	نوع جداکشت	میانگین وزن کالوس (g)	افزایش یا کاهش نسبت به شاهد
۰	۰	ریشه	۰^{m} ±۰	-
۰	۰	برگ	۰^{m} ±۰	-
۰	۰	ساقه	۰^{m} ±۰	-
۰/۵	۰	ریشه	۰/۳۲^{hi} ±۰/۰۴	۱۵٪ افزایش
۰/۵	۰	برگ	۰/۱۹^{jk} ±۰/۰۴	۹٪ افزایش
۰/۵	۰	ساقه	۰/۲۷^{ij} ±۰/۰۴	۱۳٪ افزایش
۱	۰	ریشه	۰/۵۴^{ef} ±۰/۰۴	۲۶٪ افزایش
۱	۰	برگ	۰/۰۹^{lm} ±۰/۰۵	۴٪ افزایش
۱	۰	ساقه	۰/۱۴^{kl} ±۰/۰۳	۷٪ افزایش
۰	۰/۵	ریشه	۰^{m} ±۰	۰
۰	۰/۵	برگ	۰^{m} ±۰	۰
۰	۰/۵	ساقه	۰^{m} ±۰	۰
۰/۵	۰/۵	ریشه	۰/۶۲^{de}±۰/۰۳	۲۹٪ افزایش
۰/۵	۰/۵	برگ	۰/۹۲^{c} ±۰/۱۰	۴۴٪ افزایش
۰/۵	۰/۵	ساقه	۰/۶۷^{d} ±۰/۲۷	۳۲٪ افزایش
۱	۰/۵	ریشه	۰/۴۹^{fg} ±۰/۰۳	۲۳٪ افزایش
۱	۰/۵	برگ	۰/۶۹^{d} ±۰/۰۵	۳۳٪ افزایش
۱	۰/۵	ساقه	۰/۴۴^{g} ±۰/۰۴	۲۱٪ افزایش
۰	۱	ریشه	۰^{m} ±۰	۰
۰	۱	برگ	۰^{m} ±۰	۰
۰	۱	ساقه	۰^{m} ±۰	۰
۰/۵	۱	ریشه	۱/۱۹b±۰/۲۵	۵۶٪ افزایش
۰/۵	۱	برگ	۰/۴۱^{gh}±۰/۱۲	۱۹٪ افزایش
۰/۵	۱	ساقه	۰/۲۲^{jk} ±۰/۰۹	۱۰٪ افزایش
۱	۱	ریشه	۲/۱۱^{a} ±۰/۰۹	۱۰۰٪ افزایش
۱	۱	برگ	۰/۹۲^{c} ±۰/۰۷	۴۳٪ افزایش
۱	۱	ساقه	۰/۳۲^{hi} ±۰/۱۸	۱۵٪ افزایش

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد بهترین محیط کشت و جداکشت در القا تولید کالوس، محیط کشت (۱ mg/L) MS + 2,4-D (۱ mg/L + Kin) و جداکشت ریشه بود (جدول ۳ و ۴). نتایج نشان دادند که جهت تولید کالوس وجود هورمون ضروری است و در محیط کشت فاقد هورمون کالوس تولید نگردید. نتایج مشابهی نیز در این رابطه توسط دانشمندان دیگر در چند گونه گیاهی ثبت شده است (۱۴، ۱۵، ۱۶و ۱۷). تحقیقات نشان داده است که در محیط کشت دارای اکسین و فاقد سیتوکینین، کالوس تولید می‌گردد اما بدون حضور اکسین کالوس تولید نمی‌شود (۱۸). در لپه‌های گیاه گردو نیز بدون وجود اکسین در محیط کشت، کالوس تولید نمی‌گردد (۱۹). معمولا محیط کشت حاوی 2,4-D به‌تنهایی نیز برای تولید کالوس موثر نیست و بهترین کالوس‌زایی در محیط کشت با ترکیب 2,4-D و Kin (۱-۵ mg/L:۱ mg/L) مشاهده شده است و تشکیل کالوس ترد و تازه در دوره زمانی کوتاه ۲۰ تا ۲۵ روز شروع می‌شود (۲۰). تحقیقات در گیاه داوودی نشان داد که افزایش تراکم Kin و 2,4-D در حد ۱ میلی‌گرم در لیتر تولید کالوس را افزایش داده است (۲۱). در گیاه *Stevia rebaudiana* با اضافه‌کردن بنزیل آدنین به محیط کشت‌های حاوی اکسین تولید کالوس افزایش پیدا کرد (۱۴). همچنین گزارش شده‌است که جنس داتوره جهت تولید کالوس به حضور هم‌زمان اکسین و سیتوکینین نیازمند است (۲۲). بنابراین میزان تولید کالوس بستگی به ترکیب هورمون‌های رشد به‌کار رفته در محیط کشت دارد و تعادل بین هورمون‌های اکسین و سیتوکینین یک فاکتور مورفوژنتیکی تعیین‌کننده و مهم به‌شمار می‌رود (۲۳). همچنین گزارش شده است که ترکیب هورمون 2,4-D و سیتوکینین در تسهیل القای کالوس و حفظ آن موثر است (۱۷). در گیاه *Allium chinense* مشخص شد که بیشترین میزان تولید کالوس در محیط کشت همراه با هورمون‌های 2,4-D و BA ((۱ mg/L:۱ mg/L) بوده و با افزایش غلظت اکسین و یا سیتوکینین اثرات عکسی مشاهده گردید (۲۴). نتایج پژوهش‌های انجام شده جهت تولید کالوس از گیاه *Paspallum vaginatum* نیز نشان داد که نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مانند اکسین و سیتوکینین به‌عنوان اجزا حیاتی در القای کالوس و باززایی گیاه هستند (۹).

بافت کالوس‌های حاصل از ریشه در تمام محیط‌کشت‌های مورد استفاده نرم بود و بسته به محیط کشت مورد استفاده کالوس‌های حاصل از ریشه رنگ کرم روشن و کرم سبز را نشان دادند (شکل 1C، جدول ۲). رنگ و بافت کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های ساقه و برگ نیز بسته به هورمون‌های مورد استفاده متفاوت بودند، بنابراین درصد کشت‌های نمویافته به کالوس، بافت، رنگ و درجه تشکیل کالوس به ترکیبات محیط کشت وابسته است (۱۷).

بنابر نتایج حاصله از این تحقیق نوع جداکشت در تولید کالوس بسیار موثر می‌باشد. به طور مشابه اثر نوع جداکشت در تولید کالوس توسط محققین دیگر به اثبات رسیده است، به طوری‌که در گونه *Salsola pestifer* تولید کالوس از جداکشت‌های ساقه نسبت به جداکشت برگ بهتر انجام گرفت در حالی‌که جداکشت‌های برگ از گونه *Salsola lanata* در تشکیل کالوس مناسب‌تر بودند (۶). انتخاب یک ریزنمونه در مرحله رشد مطلوب نقش اساسی در موفقیت‌آمیز بودن کشت بافت در شرایط در شیشه بازی می‌کند. پیچیدگی مورفولوژیکی یک ریزنمونه به‌همراه انتخاب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب تاثیر چشمگیری بر القا کالوس و باززایی نوساقه‌ها دارد (۲۵)، هرچند که سن گیاهچه و نحوه قرارگرفتن آن‌ها روی محیط کشت نیز در برخی از گیاهان حائز اهمیت است (۹).

در تمام محیط کشت‌های بررسی شده در این تحقیق میزان تولید کالوس حاصل از جداکشت ریشه نسبت به جداکشت برگ بیشتر بود اما در محیط کشت‌های با ترکیب (۰/۵ mg/L) MS + 2,4-D (۱ mg/L) + Kin و (۰/۵ mg/L) + (۰/۵ mg/L) Kin) MS + 2,4-D میزان تولید کالوس حاصل از جداکشت برگ نسبت به ریشه بیشتر گزارش شد.

داده‌های به‌دست آمده برای ریزنمونه‌های مختلف در واکنش به کالوس‌زایی نشان داد که بسته به نوع ریزنمونه، غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی تغییر کرده و این امر تفاوت چشمگیری در روند کالوس‌زایی و باززایی نوساقه‌ها اعمال می‌کند. در این رابطه مطالعات متعددی وجود دارند که صحت این نتیجه را تایید می‌کنند (۲۶، ۲۷ و ۲۸).

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که با وجود عدم تولید کالوس در محیط کشت MS +۰/۵ mg/L Kin و mg/L Kin ۱+ MS، جداکشت ساقه در این محیط کشت‌ها باززایی مستقیم را نشان داد. محیط کشت MS +۰/۵ mg/L Kin نسبت به MS +۱ mg/L Kin در باززایی مستقیم کارایی بیشتری را

نشان داد. در بقیه محیط کشت‌ها باززایی مستقیم مشاهده نشد. سیتوکینین‌ها به‌عنوان مهم‌ترین فاکتور موثر در باززایی ساقه به اثبات رسیده‌اند و اثرات چشمگیر آن‌ها شاید با تغییرات بافت‌شناسی در بافت‌های القا شده مرتبط باشد (۹). در گیاه *Taxus wallichiana* گزارش شده است که با افزایش سیتوکینین و کاهش اکسین، باززایی افزایش می‌یابد (۲۹). این نتایج در گیاه هالوفیت *Leymus chinensis* نیز به اثبات رسید (۳۰). غلظت‌های کم سیتوکینین در داوودی می‌تواند درصد جوانه‌زنی از برگ را افزایش دهد (۳۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد حذف اکسین از محیط کشت پیش‌نیاز خاموش شدن چند ژن و یا سنتز محصولات جدید ژنی می‌باشد که برای نمو رویان لازم است (۲۱). همچنین نوع و غلظت سیتوکینین بکاررفته بطور چشمگیری باززایی ساقه را در ژنوتیپ‌های متفاوت سیب تحت تاثیر قرار می‌دهد (۸). در گیاه *Passiflora suberosa* استفاده از هورمون بنزیل آدنین میزان باززایی از این گیاه را افزایش داد (۳۲). در گونه‌ای دیگر از این گیاه نیز استفاده از سیتوکینین جهت افزایش باززایی بخوبی به اثبات رسید و نتایج نشان داد که توازن هورمونی لازم جهت فرآیند تمایز به میزان اکسین‌های داخلی در بافت وابسته است (۳۳). بنابراین اندام‌زایی در شرایط در شیشه به استفاده از هورمون‌های گیاهی و همچنین به توانایی بافت‌ها برای پاسخ به این تغییرات هورمونی در طول کشت وابسته است (۳۴). به‌طورکلی کنترل فرایندهای تمایزیابی بستگی به حضور اکسین و سیتوکینین داشته و توازن بین آن‌ها تولید اندام هوایی و ریشه‌ها را از کالوس سبب می‌شود. گرچه میزان تنظیم کننده‌های خارجی به‌شدت به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه بستگی دارد (۳۵).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصله بیانگر این مطلب است که محیط کشت (۱ mg/L) MS + 2,4-D (۱ mg/L) + Kin، بهترین محیط کشت جهت القای کالوس بوده و با وجود تولید کالوس در محیط کشت حاوی فقط هورمون 2,4-D ، ترکیب دو هورمون اکسین و سیتوکینین میزان تولید کالوس را افزایش داد. جداکشت ریشه نیز جهت تولید کالوس بهترین جداکشت شناخته شد. باززایی مستقیم از میانگره و فقط در محیط کشت MS +۰/۵ mg/L Kin و mg/L MS +۱ Kin رخ داد. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که بهترین محیط کشت جهت باززایی این گیاه محیط فاقد اکسین بوده و تنها جداکشت نشان دهنده باززایی نیز ساقه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از حوزه معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه اراک که حمایت مالی این تحقیق را به‌عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. نویسندگان مقاله از قطب تنش‌های گیاهی دانشگاه اصفهان نیز تشکر می نمایند.

منابع

1. Heidari-Sharifabadi H, Mirzaie-Nodoushan H. Salinity-induced growth and some metabolic changes in three *Salsola* species. J. Arid Environ. 2006; 67: 715–720.

2. Malcolm CV, Lindley VA, O'Leary JW, Runciman HV, et al., Halophyte and glycophyte salt tolerance at germination and the establishment of halophyte shrubs in saline environments. Plant Soil. 2003; 253: 171–185.

3. Mudgal V, Madaan N, Mudgal A. biochemical mechanism of salt tolerance in plants: a review. Int. J. Botany. 2010; 6(2): 136-143

4. Ryan FJ, Mosyakin SL, Pitcairin MJ. Molecular comparisons of *Salsola tragus* from California and Ukraine. Canadian J. Botany. 2007; 85(2): 224-229.

5. Kaufman TS. Synthetic pathways to salsolidine. Asymmetry. 2004; 15: 1203–1237.

6. Stefaniak B, Wozny A, Li V. Plant micropropagation and callus induction of some annual *Salsola* species. Biologia plantarum. 2003; 46(2): 305-308.

7. Han Y, Jin X, Wu F, Zhang G. Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). JZUS. 2011; 12(5): 399-407.

8. Magyar-Tabori K, Dobranszki J, Teixeira da, Silva JA, et al. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell Tiss Organ Cult. 2010; 101: 251–267.

9. Neibaur I, Gallo M, Altpeter F. The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). In Vitro Cell Dev Biol-Plant. 2008; 44(6): 480-486.

10. Gao HB, Zeng YL, Zhang FC. Callus induction, differentiation and establishment of plantlet regeneration system of *Salsola ferganica*. J. Wuhan Bot. Res. 2008; 26(6): 634-638.

11. Wei Y, Dong M, Huang Z, Tan D. Factors influencing seed germination of *Salsola affinis* (Chenopodiaceaea dominant annual halophyte)

inhabiting the deserts of Xinjiang. China. Flora. 2008; 203(2): 134–140.

12. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tabacco tissue cultures. Plant Physiol. 1962; 15: 473-479.

13. Ajmal Khan M, Gul B, Weber DJ. Seed germination in the Great Basin halophyte *Salsola iberica*. Canadian J. Bot. 2002; 80: 650–655.

14. Ahmad N, Fazal H, Zamir R. Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.). Sugar Tech. 2011; 13(2): 174-177.

15. Jayasree T, Pavan U, Ramesh M, Rao AV, et al. Somatic embryogenesis from leaf culture of potato. Plant Cell Tiss Organ Cult. 2001; 64: 13-17.

16. Yasmin S, Nasiruddin KM, Begum R, Talukder SK. Regeneration and establishment of potato plantlets through callus formation with BAP and NAA. Asian J. Plant Sci. 2003; 2(12): 936-940.

17. Abd Elaleem KG, Modawi RS, Khalafalla MM. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. African J. Biotech. 2009; 8 (11): 2529-2534.

18. Hohtola A. Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue culture from mature scot pine. Plant Cell Tiss Organ Cult. 1988; 15: 211-222.

19. Rodriguez R. Callus initiation and root formation from *in vitro* culture of walnut cotyledon. Hort sci. 1982; 17(2): 195-196.

20. Roy A, Ghosh S, Chaudhuri M, Saha PK. Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* R.BR. (Asclepiadaceae). African J. Biotech. 2008; 7(13) 2209-2211.

21. Shinoyama H, Nomura Y, Tsuchiya T, Kazuma T. A simple and efficient method for somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Chrysanthemum* (dendranthema× grandiflorum (Ramat.) Kitamura). Plant Bio Tech. 2004; 21(1): 25-33.

22. Dessouky M, Taha H, El-Bahr M. Enhancement of alkaloids production in suspension cultures of *Datura stramonium* L. and *Datura metel* L. Biotech. 2001; 4: 23-30.

23. Abbasi B, Saxena PK, Murch SJ, Liu CZ. *Echinacea* biotechnology: Challenges and opportunities. In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant. 2007; 43: 481-492.

24. Yan MM, Xu C, Kim CH, Um YC, et al. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chines jiaotou (*Allium Chinense*). Scientia Hort. 2009; 123: 124-128.

25. Khawar KM, Sarýhan E, Sevimay C, Cocu S, et al. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L. Period Biol. 2005; 107: 113-116.

26. Mandal AKH, Gupta SD. Direct shoot organogenesis and plant regeneration in safflower. In Vitro Cell. Dev. Bio-Plant. 2001; 37: 50-54.

27. Sujatha M, Dinesh Kumar V. *In vitro* bud regeneration of *Carthamus tinctorius* and wild *Carthamus* species from leaf explants and axillary bud. Biologia Plantarum. 2007; 51(4): 782-786.

28. Basalma D, Uranbey S, Mirici S, Kolsarici O. TDZ×IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and *in vitro* multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). African J. Biotech. 2008; 7(8): 960-966.

29. Datta MM, Jha S. Embryo culture of *Taxus wallichiana* (Zucc.). J. Plant Biotech. 2004; 6(4): 213-219.

30. Sun YL, Hong SK. Effects of plant growth regulators and L-glutamic acid on shoot organogenesis in the *halophyte Leymus* chinensis (Trin.). Plant Cell Tiss Organ Cult. 2010; 100: 317-328.

31. Rout G, Mohapatra A, Mohan S, Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotech. Advance. 2006; 24: 531-560.

32. Garcia R, Pacheco G, Falcao E, Borges G, et al. Influence of type explant, plant regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis in *Passiflora subersoa* L. (Passifloraceae). Plant Cell Tiss Organ Cult. 2011; 106: 47-45.

33. Lombardi SP, Passos IRS, Nogueira MCS, Appezzato-da-Gloria B. *In vitro* shoot regeneration from root and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. Braz Arch Bio Technol. 2007; 50: 239-247.

34. Akbas F, Isikalan C, Namli S. Callus induction and plant regeneration from different explants of *Actinidia deliciosa*. Appl Biochem Biotechnol. 2009; 158: 470-475.

35. Bhaskaran S, Smith RH. Regeneration in cereal tissue culture: A review. Crop Sci. 1990; 30: 1329–1336.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2013; 4(2): 129-137

Original Article

Optimization of Callus Production and Plant Regeneration in *Salsola arbuscula* pall.

Amini F. Ph.D. [1*], Ganbarzade Z. M.Sc.[2], Askary Mehrabadi M. Ph.D. [1]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

2- Graduated M.Sc. in Plant Physiology, Faculty of Sciences, Arak University

* Email corresponding author: f-amini@araku.ac.ir

Received: 16 Oct. 2012 Accepted: 14 May. 2013

Abstract

Aim: Plant production from tissue culture is of high importance from genetic engineering point of view, so in this study, optimization of tissue culture conditions for callus production and plant regeneration of *Salsola arbuscula* were examined.

Material and Methods: Seeds were planted MS medium and after two months, roots, stems (internodes) and leaves explants were transferred to the MS medium with different concentration of 2,4-D and Kinetin hormones for production callus. Plant regeneration was also examined on the various media.

Results: Results showed that the best medium to induce callus production were medium of MS + 2,4-D (1 mg/L) + Kin(1 mg/L) and the best explants were roots. So, direct shoot regeneration produced in the medium MS + Kin(1 mg/l) and MS + Kin (0.5 mg/L).

Conclusion: Despite production of callus on medium containing only 2,4-D, combined two hormones, auxin and cytokinin, increased the rate of callus production. Also direct shoot regeneration has occurred in medium without auxin. So, production rate of callus and plant regeneration are dependent on amount of external plant growth regulators, and also, amount of external plant growth regulators significantly dependent to genotype and amount of internal plant hormones.

Keywords: Callus, 2,4-D, Kin, Regeneration, *Salsola arbuscula*