بررسی باززایی مستقیم شاخساره از قطعات جدا کشت ساقه سیب زمینی دلوار توسط هورمون TDZ (Thidiazuron)

علی اکبر احسان‌پور[۱] و مایکل جونز[۲]

چکیده

اصلاح ژنتیکی سیب‌زمینی با روش‌های سنتی بسیار مشکل و گاهی غیر ممکن است. بیوتکنولوژی و کشت بافت گیاهی یک متد مطلوب برای انتقال ژن به گیاهان، یا استفاده از ناقل اگروباکتریوم می‌باشد. در این مطالعه روش‌هایی به منظور القای شاخساره و اندام‌زایی و باززایی گیاه کامل، از قطعات ساقه سیب زمینی رقم دلوار، به صورت یک، دو و سه مرحله‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت.

در بین روش‌های مورد آزمایش، تنها روش یک مرحله‌ای با استفاده از TDZ، که یک سیتوکنین مصنوعی است، بهترین پاسخ را در باززایی گیاه نشان داد. در این محیط کشت چندین شاخساره از هر قطعه ساقه به وجود آمد. در حالی که در سایر روش‌ها وقتی محیط کشت با هورمون‌های BAP، NAA، Zeatin، 2ip و IAA استفاده شد تنها کالوس سفید و یا کالوس سبز ایجاد شد. بررسی ریخت‌شناسی و شمارش کروموزومی گیاهان باززایی شده شباهت بین گیاهان باززایی شده و گیاهان والد را نشان داد. نتایج حاکی از این است که سیستم باززایی به دست آمده برای رقم دلوار مناسب بوده و شرایط کشت از ایجاد تنوع ژنتیکی در گیاهان باززایی شده جلوگیری می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: *سیب زمینی، TDZ، باززایی، محیط کشت*

مقدمه

سیب زمینی یکی از گیاهان زراعی مهم از نظر اقتصادی و غذایی است. اصلاح ژنتیکی این گیاه با روش‌های معمول مانند گرده‌افشانی مقدور نیست. بنابراین، استفاده از کشت این گیاه در شرایط محیط کشت می‌تواند زمینهٔ مناسبی برای بهبود ژنتیکی سیب زمینی فراهم نماید (۱۹). تاکنون گزارش‌های متعددی در زمینهٔ باززایی گیاه از بافت‌های مختلف گیاه سیب زمینی ارائه شده است (۸، ۱۰، ۱۵، ۱۶، ۱۸ و ۱۹). دست‌یابی به یک سیستم تولید شاخساره[۳] در انجام مطالعات مهندسی ژنتیک بر روی گیاهان، اولین اقدام ضروری است تا بتوان به کمک این سیستم از پلاسمید Ti موجود *Agrobacterium*

۱. استادیار زیست شناسی ، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

۲. استاد بیوتکنولوژی کشاورزی، مرکز ایالتی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه مورداک، استرالیا

3. Shoot

tumefaciense به عنوان یک ناقل مناسب در ایجاد گیاهان ترانس ژنیک[1] استفاده نمود. با توجه به این که انتقال ژن توسط پلاسمید Ti، در سلول به طور تصادفی صورت می‌گیرد، بدیهی است نقش افزایش درصد باززایی شاخساره از قطعات برگ و یا ساقه بدین منظور اهمیت بسیار دارد.

گیاهان مختلف، بسته به نوع ژنوتیپ خود پاسخ‌های متفاوتی به شرایط کشت بافت می‌دهند. مطالعات بر روی گیاهان مختلف، وابستگی پاسخ گیاه به ژنوتیپ را کاملاً مورد تأیید قرار داده است (۳، ۴، ۵ و ۱۷). بنابراین، انتظار می‌رود ژنوتیپ‌های مختلف در پاسخ به یک سیستم کشت بافت، واکنش‌های متفاوتی نشان دهند.

رقم دلوار[2] سیب زمینی یکی از مهم‌ترین ارقام قابل کشت در مناطق نیمه سرد استرالیا است (۶ و ۷). ولی سیستم باززایی گیاه کامل از قطعات جداکشت ساقه و برگ این گیاه تاکنون به خوبی شناخته نشده است. این رقم، مشابه بسیاری از ارقام دیگر سیب زمینی، نسبت به ویروس‌های PVX، PVY و PVS حساس می‌باشد. علاوه بر این، آفاتی مانند نماتودها به این گیاه آسیب فراوان وارد می‌کنند (۲، ۱۱، ۲۰ و ۲۱). هدف اصلی این تحقیق دست‌یابی به یک روش کارا و سریع به منظور باززایی گیاه از قطعات جداکشت ساقه و یا برگ این گیاه است، تا با استفاده از آن بتوان به عنوان یک الگو، در مطالعات کشت بافت و انتقال ژن (ترانسفورماسیون) در این رقم، و احتمالاً سایر ارقام سیب زمینی اقدام نمود.

مواد و روش‌ها

آزمایش روی سیب‌زمینی عاری از ویروس رقم دلوار انجام شد. برای کشت شاخساره، غده‌ها در محلول ۵٪ حجمی هیپوکلریت سدیم به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شست و شو، و در گلدان‌های محتوی خاک ضدعفونی شده توسط بخار آب رشد داده شدند. پس از ۵-۶ هفته، جوانه‌های جانبی همراه با بخشی از ساقه از گیاه جدا شده و پس از آن مطابق قبل ضدعفونی سطحی و در محیط کشت موراشی و اسکوگ (MS) (۱۴) در ظروف شیشه‌ای ۲۵۰ میلی‌لیتری کشت شدند. محیط کشت با مقدار هفت گرم در لیتر آگار غلیظ و pH برابر ۵/۸ تهیه گردید. پس از ۴-۶ هفته، قطعات ساقه بدون جوانه از گیاهان رشد داده شده، در شرایط محیط کشت جدا شده، و هر ترکیب محیط کشت بر روی ۹۶ قطعه جداکشت ساقه، با شش تکرار در یک طرح بلوک‌های تصادفی، تحت تیمارهای مختلف هورمونی مورد آزمایش قرار گرفت.

آزمایش‌ها طبق سه روش یک مرحله‌ای، دو مرحله‌ای و سه مرحله‌ای انجام شد، و تمام قطعات در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی حاوی 2,4-D[3]، TDZ[4]، BAP[5]، zeatin[6]، GA_3[7]، NAA[8]، IAA[9]، Kinetin[10] و 2iP[11] مطابق جدول ۱ انجام گرفت. گیاهان کشت شده در ظروف کشت، در معرض نور ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۱۶ ساعت و ۸ ساعت تاریکی، در دمای تقریبی ۲۵°C کشت شدند. پس از ۶-۸ هفته، پاسخ گیاهان به محیط‌های کشت مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج بررسی شد. در بررسی نتایج، وضعیت رنگ کالوس ایجاد شده، و هم چنین، تعداد نمونه‌هایی که در هر آزمایش شاخساره ایجاد نموده، و تعداد شاخساره موجود در هر نمونه ثبت گردید. براساس داده‌های نمونه، فرض برابری نسبت‌ها با استفاده از آمارهٔ کای‌دوی پیرسن (۱) مورد آزمون قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از کشت قطعات جداکشت ساقه در محیط‌های کشت مختلف به صورت خلاصه در جدول ۱ آمده است. پنج نوع مختلف پاسخ پس از شش تا هشت هفته مشاهده شد، که

1. Transgenic 2. Delaware

۳. ۲و ۴- دی کلروفنیل استیک اسید ۴. N- نفتیل -N- و ۲ و ۳ و تیادیازول -۵- یلوریا ۵. ۶- بنزیل آمینوپورین
۶. ۶-۴- هیدروکسی -۳- متیل -۲ بوتنیل آمینوپورین ۷. اسیدجیبرلیک ۸. α- نفتالین اسیداستیک
۹. ایندول -۳- اسیداستیک ۱۰. ۶- فورفوریل آمینوپورین ۱۱. ۶- λ و λ- دی متیل‌آلیل آمینوپورین

جدول ۱. اثر ترکیب هورمون‌های مختلف روی باززایی شاخساره از قطعات ساقه کشت شده سیب زمینی رقم دلوار

روش	تنظیم‌کننده رشد (میلی‌گرم در لیتر)	میانگین درصد قطعات ساقه با ایجاد شاخساره	میانگین و خطای معیار تعداد شاخساره در هر قطعه	ویژگی‌های کالوس ایجادشده
A (یک مرحله‌ای)	TDZ (۰/۵)	۰	۰	کالوس سفید
	TDZ(۱)	۱۹	۲/۴±۰/۲۶	کالوس سفید
	TDZ(۲/۲۵)	۱۰۰**	۴/۸۰±۰/۶۶	کالوس سفید
	TDZ(۰/۵), NAA(۰/۱۸۶)	۰	۰	کالوس سفید
	TDZ(۱/۵), NAA(۰/۱۸۶)	۱۰	۲/۴±۰/۲۴	کالوس بسیارکوچک
B (دومرحله‌ای)				
مرحله ۱	BAP(۲/۲۵), NAA(۰/۱۸۶)	۰	۰	کالوس سفید
مرحله ۲	GA۳(۵), BAP(۲/۲۵)	۰	۰	کالوس سفید
	GA۳(۵), Zeatin(۱/۵)	۲۹/۶	۰/۳±۰/۱۵	کالوس سفید
	GA۳(۵), ۲iP(۱/۰)	۱۸/۵	۰/۴±۰/۱۶	کالوس سفید
	GA۳(۵), Kinetin(۱۰)	۱	۰	کالوس سبز
	IAA(۰/۲), BAP(۲/۲۵), شیرنارگیل (۱۰٪)	۰	۰	کالوس سبز
C (سه مرحله‌ای)	متد هولم (Hulme) و همکاران (۹)	۰	۰	کالوس سفید

(تعداد قطعه جداکشت در هر ظرف کشت ۹۶ عدد با ۶ تکرار)

**: P<۰/۰۰۰۱

عبارتند از:

کالوس سفید، کالوس سبز، کالوس سفید همراه با شاخساره، کالوس سبز همراه با شاخساره یا جوانه شاخساره[1] و شاخساره.

در کشت دو مرحله‌ای، ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی NAA و BAP به مدت دو هفته قرار گرفتند، که حاصل آن ایجاد کالوس سفید بود. سپس کالوس‌ها به محیط کشت حاوی BAP و GA_3 منتقل شدند. در نهایت پس از ۶-۸ هفته، روی این محیط کشت هیچ گونه نوساقه‌ای مشاهده نگردید. وقتی ۲iP و zeatin جای‌گزین BAP شد نتایج مطلوب‌تر گردید، و به ترتیب ۱۸/۵ و ۲۹/۱۶ درصد از نمونه‌ها ایجاد شاخساره نمودند. اضافه نمودن Kinetin و GA_3 به محیط کشت باعث شد تا ۹۵٪ از نمونه‌ها کالوس سبز تولید کنند، و تنها یک درصد شاخساره ایجاد نمایند. در حالی که مخلوطی از IAA، BAP و شیر نارگیل تنها منجر به تولید کالوس سبز گردید. در تست سه مرحله‌ای مطابق آنچه که هولم و همکاران (۹) پیشنهاد نمودند، آزمایش به طور کامل انجام شد، ولی تنها کالوس سفید ایجاد شد و شاخساره‌ای به وجود نیامد.

در محیط کشت یک مرحله‌ای با استفاده از TDZ در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، تنها کالوس سفید رنگ ایجاد شد. در غلظت یک میلی گرم در لیتر حدود ۱۹٪ از نمونه‌ها ایجاد شاخساره نمودند که تعداد شاخساره در هر قطعه ۲-۳ عدد بود. به هر حال، وقتی غلظت بیشتر TDZ یعنی ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر به کار رفت، زمانی که به تنهایی TDZ در محیط کشت وجود داشت تمام نمونه‌های ساقه ایجاد شاخساره نمودند، در

1. Shoot bud

حالی که مخلوطی از TDZ و NAA در محیط کشت به ترتیب با غلظت ۱/۵ و ۰/۱۸۶ میلی‌گرم در لیتر، موجب شد تا تعداد کمتری نوساقه از قطعات جدا کشت ساقه به وجود آید. شاخساره‌های ایجاد شده پس از رشد و نمو کافی به محیط کشت MS فاقد هورمون منتقل و ریشه‌دار شدند. این گیاهان سپس به گلدان‌های محتوی خاک ضدعفونی شده منتقل و در گلخانه تبدیل به گیاه کامل گردیدند. (شکل ۱ مراحل مختلف باززایی گیاه کامل از قطعات ساقه سیب زمینی را با استفاده از هورمون TDZ نشان می‌دهد). براساس آزمون پیرسون، نسبت ایجاد شاخساره در روش یک مرحله‌ای با استفاده از TDZ با غلظت ۲/۲۵ میلی گرم در لیتر، به طور معنی‌داری ($P<0/0001$) بیشتر از سایر روش‌ها می‌باشد.

در مطالعه‌ای جداگانه، قطعاتی از برگ این گیاه از نمونه‌های رشد داده شده در محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد، مطابق آزمایش‌هایی که روی ساقه انجام شد تکرار گردید. ولی معدودی از آنها ایجاد کالوس نمودند، و پس از مدتی از بین رفتند. روی گیاهان باززایی شده مطالعات شمارش کروموزومی مطابق پیشنهاد کارپ (۲۲) با روش فشردن[1] انجام شد. نتایج شمارش کروموزومی برای گیاهان باززایی شده، طبیعی بودن تعداد کروموزوم‌ها را نشان داد. بررسی و مقایسه مورفولوژی گیاهان باززایی شده با گیاهان والدینی اختلافی را نشان نداد.

بحث

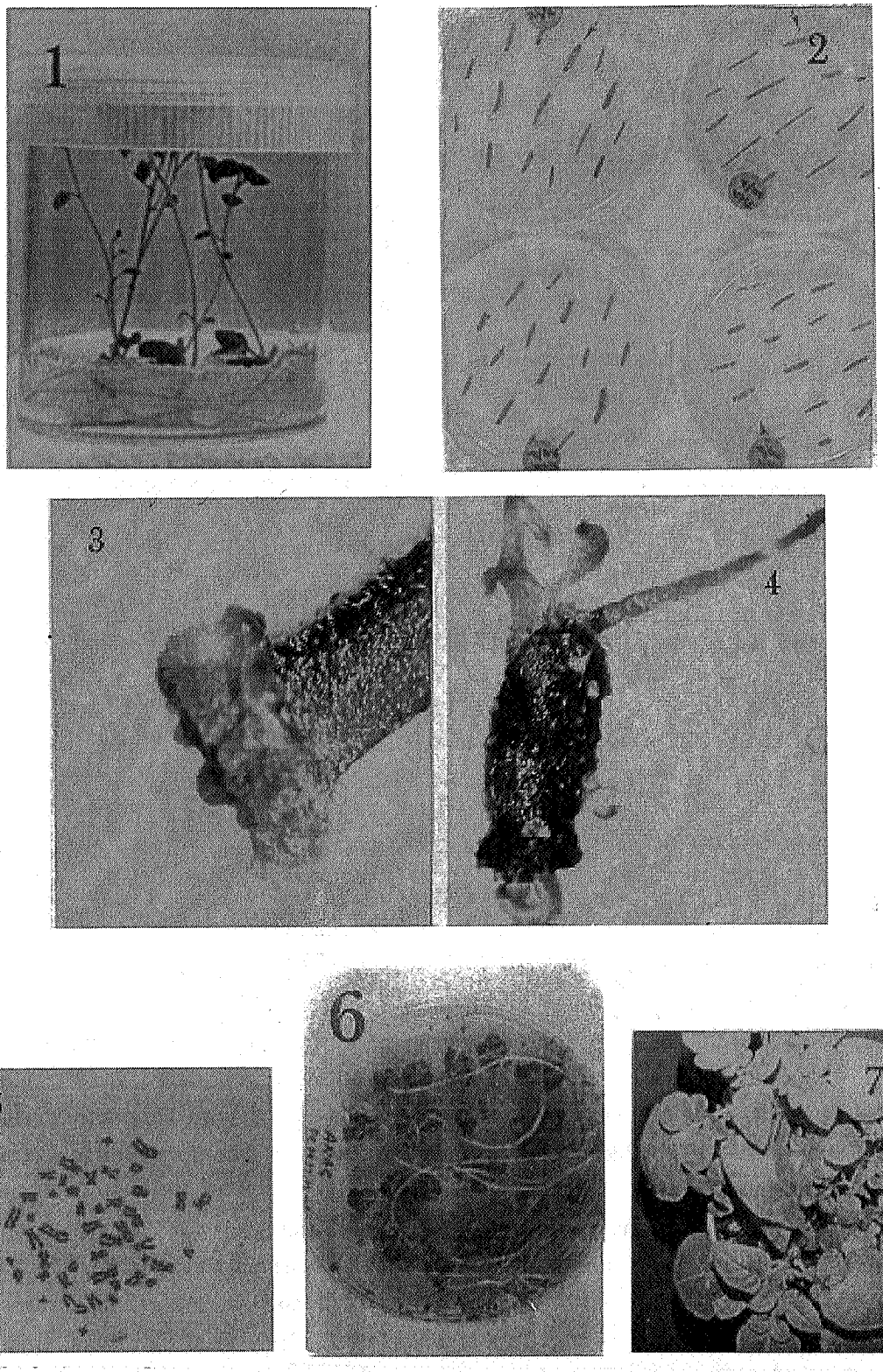
به دلیل اهمیت گیاه سیب زمینی از نظر ایجاد تغییرات ژنتیکی مورد نظر، از جمله امکان ایجاد مقاومت نسبت به آفات و بیماری‌ها، مطالعه در زمینه باززایی گیاه از قطعات جدا کشت این گیاه مورد توجه بسیاری از پژوهشگران بوده است. به عنوان مثال، ویلر و همکاران (۲۰) روش دو مرحله‌ای را پیشنهاد نمودند، ولی اختلاف فاحشی از نظر پاسخ بین ارقام مختلف مشاهده کردند. در آزمایش حاضر مشاهده شد که رقم دلوار، در مقایسه با مطالعاتی که قبلاً روی رقم دیزایری (۲۰) صورت گرفته، از نظر تولید شاخساره بسیار ضعیف‌تر است. در روش دو مرحله‌ای، ابتدا مخلوطی از هورمون‌های NAA و BAP در محیط کشت باعث تولید کالوس شد که مشابه نتایج رائو و همکاران (۱۵) می‌باشد. در بخش دوم این روش، وقتی کالوس‌ها به محیط کشت حاوی GA_3 و BAP منتقل شدند هیچ گونه شاخساره‌ای به وجود نیامد. وقتی هورمون‌های 2iP و zeatin (۲) به جای BAP به کار رفت، رشد و نمو کالوس بیشتر شده، تقریباً ۱۷-۳۳ درصد کالوس‌ها تولید شاخساره نمودند.

به هر حال، اگر چه در برخی مطالعات شیر نارگیل آثار مفیدی را از خود نشان داده است، ولی در این آزمایش چندان مؤثر واقع نشده و نتوانست در ایجاد شاخساره بهبود وسیعی اعمال نماید.

رائو و همکاران (۱۵) گزارش نمودند که سیتوکنین از جمله هورمون‌های محرک تولید شاخساره و جوانه شاخساره در قطعات جدا کشت گیاه است.

TDZ یک هورمون شبیه سیتوکنین نسبتاً جدید است. آثار فیزیولوژیکی که تاکنون از این هورمون مشاهده شده شامل حذف خواب جوانه، تولید اتیلن و باززایی شاخساره و ایجاد جنین سوماتیک است (۶ و ۸). ترکیبی از TDZ و IAA توسط وایزر و همکاران (۱۸) به منظور القای جنین سوماتیک در کشت هیپوکوتیل شمعدانی مورد استفاده قرار گرفته است. این پژوهشگران گزارش نمودند با ترکیبی از IAA و مقدار یک میلی‌مولار TDZ، تعداد زیادی جنین سوماتیک از کشت هیپوکوتیل شمعدانی به دست آمده است. نتایجی که در تحقیق حاضر توسط آزمایش‌های متعدد به دست آمد، مشابه با آزمایش‌های فوق، وقتی غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ همراه ۰/۱۸۶ میلی گرم در لیتر NAA استفاده شد، تعداد نسبتاً کمی شاخساره از نمونه‌های کشت شده به دست آمد، ولی هورمون TDZ به تنهایی در محیط کشت تولید شاخساره بسیار مطلوب‌تری داشت. به طور کلی، تمام نمونه‌ها حداقل یک

1. Squash



شکل ۱. مراحل مختلف باززایی گیاه از قطعات ساقه جدا کشت در محیط کشت MS حاوی هورمون TDZ

۱. کشت گیاه سیب زمینی در محیط کشت MS
۲. کشت قطعات ساقه در محیط کشت حاوی TDZ
۳. تحریک ایجاد جوانه شاخساره
۴. ایجاد شاخساره از انتهای ساقه
۵. بررسی کروموزومی گیاهان باززایی شده
۶. تولید انبوه ساقه از قطعات جدا کشت ساقه
۷. رشد گیاهان باززایی شده در گلخانه

شاخساره نشان دادند. در تأیید این نظریه، در مطالعات ترانسفورماسیون گیاه شبدر نیز، TDZ در باززایی شاخساره از برگ نتایج بسیار خوبی داشته است (۱۲ و ۱۳).

در مجموع به طور مشخص می‌توان بیان نمود که هورمون TDZ در ایجاد تعداد زیاد و قابل قبول شاخساره از قطعات ساقه کشت شده سیب زمینی دلوار اثر موفقیت‌آمیزی دارد. این ترکیب هورمونی می‌تواند به عنوان یک سیستم تکرارپذیر و قابل استفاده برای رقم دلوار، و احتمالاً تعداد زیادی از ارقام سیب زمینی به عنوان یک الگو توصیه شود. ایجاد شاخساره با فراوانی زیاد می‌تواند در انتقال ژن به این گیاه با استفاده از ناقل‌های مناسبی مانند *Agrobacterium tumefaciense* مورد استفاده قرار گیرد. از طرف دیگر، با توجه به این که ۱۰۰% از نمونه‌های کشت شده در محیط کشت حاوی TDZ ایجاد شاخساره نموده‌اند (جدول ۲، ستون دوم)، احتمال ایجاد گیاه ترانس‌ژنیک در مطالعات ترانسفورماسیون افزایش می‌یابد.

در نهایت، بررسی‌های شمارش کروموزومی انجام شده روی گیاهان حاصله از سیستم باززایی هیچ گونه آنوپلوییدی نشان نداد، و این خود بیانگر متناسب بودن سیستم باززایی معرفی شده می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری جناب آقای دکتر منوچهر خردمندنیا به خاطر راهنمایی‌های ارزنده خود در زمینه محاسبات آماری این پژوهش قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱. خردمندنیا، م. و غ. ق. قاسمی تودشکچویی. ۱۳۷۷. تحلیل آماری داده‌های طرح همه‌گیرشناسی اختلالات روانی اصفهان. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ۳: ۲۰۲-۲۰۶.

2. Cardi, T., V. Lannamico, F. D. Anbrosio, E. Filippone and P. F. Lurpin. 1993. *In vitro* regeneration and cytological characterisation of shoots from leaf explants of three accessions of *Solanum commersonii*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 34: 107-114.

3. Ehsanpour, A. A. and M. G. K. Jones. 1996. Glucuronidase expression in transgenic tobacco roots with a *Prasponia* promoter on infection with *Meloidogyne javanica*. J. Nemat. 28: 407-413.

4. Fish, N. and M. G. K. Jones. 1998. Engineering hybrid potatoes. Plants Today 1: 47-49.

5. Foulger, D. and M. G. K. Jones. 1986. Improved efficiency of genotype-dependent regeneration from protoplast of important potato cultivars. Plant Cell Reports 5: 72-76.

6. Gill, R. and P. K. Saxena. 1992. Direct somatic embryogenesis and regeneration of plants from seedling explants of peanut (*Arachis hypogaea*) promotiver role of thidiazuron. Can. J. Bot. 70: 1186-1192.

7. Gratte, H. 1988. Potato seed care and treatment. West. Aust. Dept. of Agric, Farmnote No. 107.

8. Henny, R. J. and Fooshee 1990. Thidiazuron stimulates basal bud and shoot formation in *Alocasiachantrieri* Andre. Hortscience 25: 124.

9. Hulme, J. S., E. S. Higgins and R. Shields. 1992. An efficient genotype independent method for regeneration of potato plants from leaf tissue. Plant Cell Tissue and Organ Culture 31: 161-167.

10. Imai, T., R. Aida and T. Ishige. 1993. High frequency of tetraploidy in *Agrobacterium-mediated* transformants regenerated from tuber discs of diploid potato lines. Plant Cell Reports 12: 299-302.

11. Jones, M. G. K. 1988. Electrofusion of plant protoplasts. Trends in Biotechnol 6: 153-158.

12. Khan, M. R., L. M. Tabe, L. C. Heath, D. Spencer and T. V. Higgins. 1994. *Agrobacterium* mediated transformation of subteranean clover (*Trifolium subterranean* L.) Plant Physiol. 105: 81-88.

13. Malik, K. A. and P. K. Saxena. 1992. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. High frequency induction of

direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron. Planta 186: 384-389.

14. Murashige, I. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 159: 473-497.
15. Rao, P. S., W. Handro and H. Harada. 1973. Hormonal control of differentiation of shoots, roots and embryos in leaf and stem cultures of *Petunia inflata* and *Petunia hybrida*. Physiol. Plant 28: 458-463.
16. Tavazza, R., M. Tavazza, R. J. Ordas, G. Ancora and E. Benvenuto. 1988. Genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum*): An efficient method to obtain transgenic plants. Plant Sci. 59: 175-181.
17. Thomas, E. 1981. Plant regeneration from shoot culture derived protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum cv*. Maris Bard). Plant Sci. 23: 81-88.
18. Visser, C., J. A. Qureshi, R. Gill and P. K. Saxena. 1992. Morphoregulatory role of thidiazuron. Plant Physiol. 99: 1704-1707.
19. Wenzler, H., G. Migenery, G. May and W. Park. 1989. A rapid and efficient transformation method for the production of large number of transgenic potato plants. Plant Sci. 63: 79-85.
20. Wheeler, V. A., N. E. Evans, D. Foulger, K. J. Webb, A. Karp, J. Franklin and S. W. J. Bright. 1985. Shoot formation from explant cultures of fourteen potato cultivars and studies of the cytology and morphology of regenerated plants. Annals of Botany 55: 309-320.
21. Wilson, C. R. and R. A. C. Jones. 1989. Virus content of seed potato stocks produced in a unique seed potato productions chem. Ann. Appl. Biol. 116: 103-109.
22. Karp, A. 1991. Cytological techniques. *In*: K. Lindsey, (Ed.), Plant Tissue Culture Manual, pp. C4, 1-3.