رویان‌زایی بدنی مستقیم و باززایی گیاه در میخک (*Dianthus caryophyllus* L.)

امید کرمی[۱*]، علی دلجو[۱] و عقیل محمودی پور[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۵/۹/۱۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۴/۱۱)

چکیده

شرایط لازم برای باززایی دو رقم میخک ('Nelson و 'Impulse') به روش رویان‌زایی بدنی مستقیم بررسی شد. رویان‌های بدنی به طور مستقیم از ریز نمونه‌های گلبرگ گیاه میخک روی محیط کشت MS دارای ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام ایجاد شدند. بیشترین رویان‌زایی روی محیط کشت حاوی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام به‌دست آمد. وقتی که رویان کروی به محیط‌های کشت بدون تنظیم کننده رشد دارای غلظت‌ها مختلف سوکروز (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ گرم در لیتر) منتقل شدند به صورت رویان‌های لپه‌ای توسعه یافتند. با افزایش غلظت سوکروز توسعه رویان‌های کروی افزایش نشان دادند. وقتی که رویان‌های لپه‌ای به محیط کشت نیم غلظت MS دارای ۳۰ گرم در لیتر سوکروز انتقال داده شدند، به صورت گیاهچه در آمدند. گیاهچه‌های به دست آمده در شرایط گلخانه نیز به طور عادی مراحل رشد خود را ادامه دادند.

واژه‌های کلیدی: باززایی، رویان بدنی، کشت بافت، میخک

مقدمه

میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات گلکاری دنیا می‌باشد که هم به جهت زیبایی و گوناگونی رنگ و هم از نظر اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخودار است (۲). محدودیت‌های موجود در روش‌های بهنژادی سنتی (تلاقی و گزینش) و داشتن ویژگی‌های هتروزیگوتی بالا در گیاه میخک باعث شده است که کاربرد فنون جدید مهندسی ژنتیک برای بهبود ویژگی‌های اقتصادی این گیاه ضرورت پیدا کند. کاربردی شدن فنون مهندسی ژنتیک خود نیازمند گسترش روش‌های مختلف کشت بافت است.

رویان‌زایی بدنی عبارت از تشکیل رویان از یاخته‌های رویشی در شرایط کشت درون شیشه‌ای است به طوری‌که این رویان‌ها شبیه به رویان معمولی بذر می‌باشند و قادر هستند به صورت گیاه کامل نمو پیدا کنند. از این روش کشت بافت به صورت ابزاری می‌توان برای بررسی‌های پایه مانند بیوشیمی، فیزیولوژی، مرفولوژی و تشریح در بسیاری از دستاوردهای فناوری زیستی مانند انتقال ژن، نگه‌داری ژرم پلاسم، تولید بذر مصنوعی، تولید متابولیت‌های ثانویه، ایجاد گوناگونی ژنتیکی و حذف ویروس از گیاه استفاده نمود (۱۵).

در گیاهان رویان‌های بدنی به دو صورت مستقیم و غیر

۱. به ترتیب مربی و استادیار بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hiva@basu.ac.ir

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.2.5]

مستقیم ایجاد می‌شوند. در رویان‌زایی مستقیم بافت‌های گیاهی به‌طور مستقیم به رویان بدنی تبدیل می‌شوند اما در رویان‌زایی غیر مستقیم ابتدا از بافت‌های گیاهی پینه ایجاد می‌شود و سپس پینه‌ها به رویان بدنی تبدیل می‌شوند. ایجاد تغییرهای ژنتیکی در گیاهان بازازایی شده از بافت پینه، پدیده‌ای است که به‌طور معمول اتفاق می‌افتد. بنابراین در رویان‌زایی غیر مستقیم به طور بالقوه امکان ایجاد تغییرهای ژنتیکی وجودارد. بر خلاف رویان‌زایی غیر مستقیم، گیاهان تولید شده از راه رویان‌زایی مستقیم فاقد هر گونه ناپایداری ژنتیکی هستند به گونه‌ای که گیاه به‌دست آمده با والد مادری به طور کامل مشابه است(۸). تولید گیاهان کاملا مشابه با والد مادری از راه کشت بافت برای ریزافزایی گیاهان دارای اهمیت است (۱۸). در گیاه میخک رویان‌زایی بدنی مستقیم از ریزنمونه‌های برگ در شرایط کشت مایع گزارش شده است (۱۸). در این بررسی برای اولین بار ایجاد رویان بدنی مستقیم از ریزنمونه‌های گلبرگ گیاه میخک در شرایط کشت نیمه جامد شرح داده شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این پژوهش روی دو رقم میخک ('Nelson' و 'Impulse') که و در شهرستان محلات کشت و کار می‌شوند در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه بوعلی سینا انجام گرفت. جوانه‌های گل نارس به طول ۱/۵-۱سانتی متر از گیاهان در حال رشد در گلخانه برداشت شده و به مدت سه هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سطح خارجی جوانه‌ها با قرار دادن در محلول ۲٪ هیپوکلریت سدیم (سفید کننده تجارتی وایتکس) دارای ۵/۲۵ ٪ کلر فعال به مدت ۲۰ دقیقه گندزدایی شدند و سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو گردیدند. کاسبرگ‌ها و نهنج از جوانه‌ها حذف شدند و گلبرگ‌ها به قطعاتی به طول تقریبی ۴- ۳ میلی‌متر بریده شد و سپس روی محیط کشت قرار داده شدند.

ترکیبات محیط کشت و شرایط نگه‌داری

(۱) تشکیل رویان: برای تشکیل رویان ریزنمونه‌های گلبرگ روی محیط‌های کشت MS (۹) محتوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۴،۲- دی کلروفنوکسی استیک اسید)، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام (۴ - آمینو- ۳،۵،۶ تری کلرو – ۲- پیریدین کاربوکسیلیک اسید)، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر NAA (آلفا نفتالن استیک اسید) کشت شدند. بعد از ۴ هفته درصد ریزنمونه‌های دارای رویان بدنی و تعداد رویان‌های ایجاد شده روی هر ریزنمونه شمارش شدند. ۲۰ ریز نمونه در هر پلات و چهار تکرار در هر تیمار برای این مرحله از آزمایش منظور شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا گردید و با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند. (۲) توسعه رویان: پس از ۵-۴ هفته پس از شروع کشت، رویان‌های کروی شکل از محیط ایجاد برداشته شدند و به منظور توسعه به محیط‌های کشت MS دارای ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ گرم در لیتر سوکروز فاقد تنظیم کننده رشد منتقل شدند. بعد از ۵ هفته تعداد رویان‌های کروی که به صورت رویان لپه توسعه یافته بودند شمارش شدند. ۱۰۰ رویان در هر پلات و چهار تکرار در هر تیمار برای این مرحله از آزمایش منظور شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید و با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند (۳).

جوانه زنی

برای جوانه زنی، رویان‌های لپه‌ای به محیط کشت نیم غلظت MS حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر سوکروز فاقد تنظیم کننده رشد منتقل شدند. پس از چهار هفته، تعداد رویان‌های باززایی شده شمارش شدند.

همه محیط‌های کشت در شرایط محیطی ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت فتوپریود نگه‌داری شدند. pH همه

[Downloaded from jstmar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.2.5]

محیط‌های کشت پیش از اتوکلاو نمودن با استفاده از NaOH یک نرمال تا حد ۵/۸ تنظیم گردید و برای محیط‌های کشت نیمه جامد از آگار به میزان ۷ گرم در لیتر استفاده شد.

انتقال گیاهچه‌ها به خاک

گیاهچه‌های با طول تقریبی ۷۰ میلی‌متر از محیط کشت جوانه‌زنی برداشته شده و پس از شستشوی ریشه آنها توسط آب مقطر استریل به گلدان‌های حاوی مخلوطی از پیت، ماسه و خاک باغچه استریل با نسبت حجمی ۱:۱:۱ منتقل گردیدند و در شرایط محیطی ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و نور ۱۶/۸ ساعت نور نگه‌داری شده و سپس برای ادامه رشد در گلخانه نگه‌داری شدند.

نتایج

تشکیل رویان بدنی

سه الی چهار هفته پس از کشت، رویان‌های کروی روی حاشیه برش خورده ریزنمونه‌های گلبرگ ایجاد شدند (شکل۱ A). توسعه رویان‌های کروی به صورت رویان‌های اژدری و لپه‌ای درمحیط ایجاد رویان مشاهده نشد. با طولانی شدن زمان کشت (بیش از ۶ هفته) رویان‌های کروی به بافت پینه تبدیل شدند.

از میان تیمارهای هورمونی استفاده شده برای ایجاد رویان، رویان‌زایی بدنی مستقیم تنها روی محیط‌های کشت حاوی پیکلورام حاصل شد. اختلاف‌های رضایت بخش ($P<۰/۰۵$) بین غلظت‌های مختلف پیکلورام و اثرهای آنها بر درصد پاسخ ریزنمونه و میانگین تعداد رویان‌های ایجاد شده در ریزنمونه در جدول ۱ نشان داده شده است. بیش‌ترین درصد پاسخ ریزنمونه و بیشترین تعداد رویان در هر ریزنمونه روی محیط‌های کشت دارای ۱ و۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده شد. در غلظت‌های بالا (۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر) و پایین (۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) پیکلورام رویان‌زایی کاهش یافت.

توسعه رویان بدنی

دو هفته پس از انتقال رویان‌های کروی به محیط‌های کشت MS دارای غلظت‌های مختلف سوکروز به صورت رویان‌های لپه‌ای توسعه یافتند (شکل۱ B). جدول ۲ اثر مقادیر مختلف سوکروز بر تعداد رویان کروی توسعه یافته را نشان می‌دهد. چنانچه مشاهده می‌شود با افزایش غلظت سوکروز در محیط کشت، تعداد رویان‌های کروی توسعه یافته به طوررضایت بخشی ($P<۰/۰۵$) افزایش‌می‌یابد.

جوانه زنی

دو هفته پس از انتقال رویان‌های لپه‌ای به محیط کشت نیم غلظت MS به صورت گیاهچه در آمدند (شکل۱ C). در هر دو رقم رویان‌های بدنی با فراوانی نسبتاً بالا (حدود ۸۵ درصد) تولید شدند. حدود ۸۰ درصد از گیاهچه‌های منتقل شده به گلدان‌های حاوی پیت، ماسه و خاک باغچه به گیاه کامل تبدیل شدند (شکل۱D).

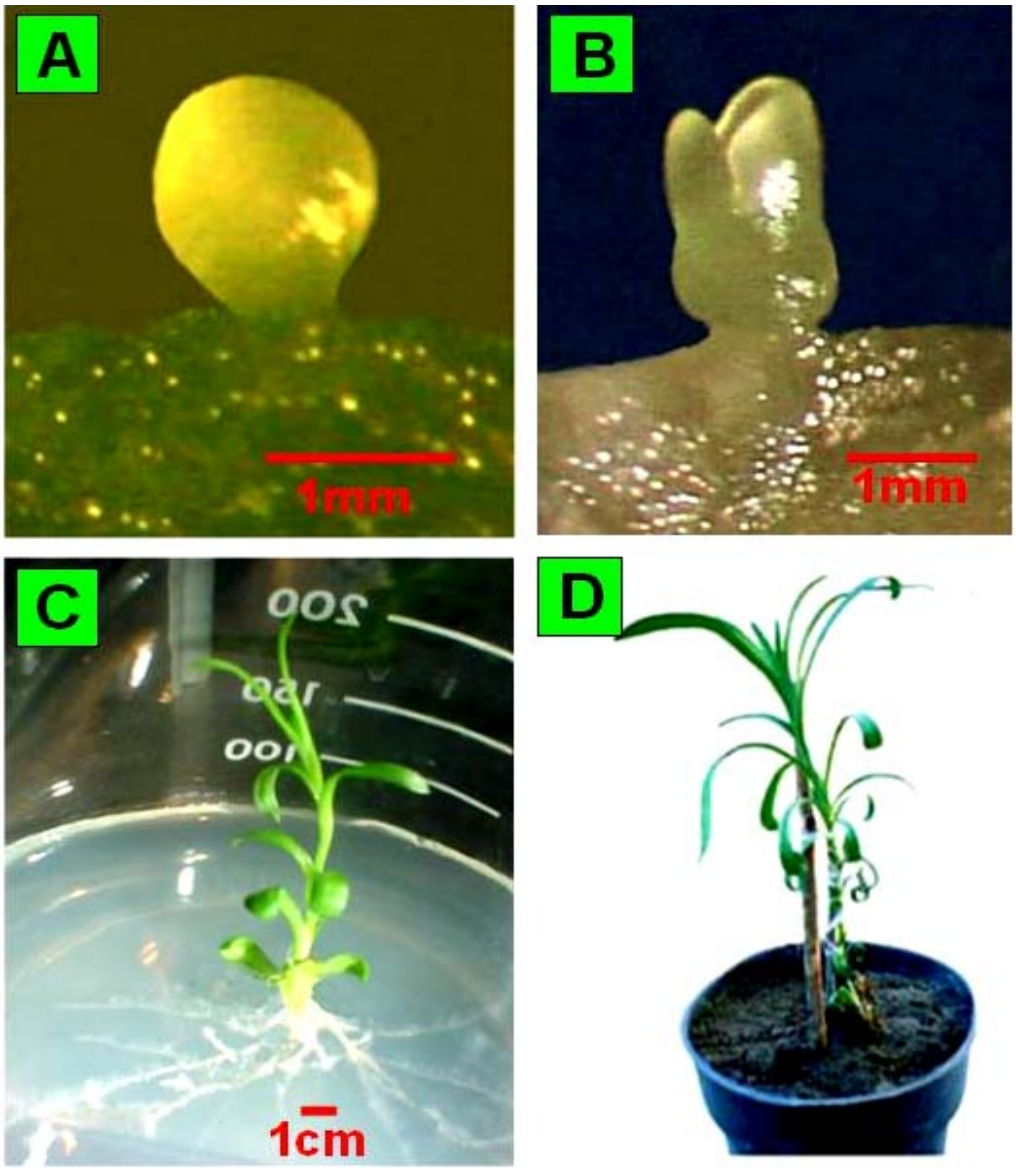
بحث

در گیاهان، اکسین‌ها در محیط کشت اصلی‌ترین فاکتور انگیزاننده رویان‌زایی بدنی هستند (۸). فری و همکاران و یان چواو و همکاران ایجاد رویان بدنی از گیاه میخک را با استفاده از 2,4-D گزارش کرده‌اند (۴ و ۱۸). ایجاد رویان بدنی با استفاده پیکلورام در چندین گونه گیاهی همچون گندم و تریوردئوم (۱)، مورد (۳)، گندم دروم (۵) و ارزن (۱۱) گزارش شده است. تاکنون ایجاد رویان بدنی با استفاده از پیکلورام در گیاه میخک گزارش نشده است.

پاسخ‌های متفاوت رویان‌زایی بدنی بافت‌های مختلف گیاهی به اکسین‌هادر محیط کشت مختلف برای بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده است. یان چواو و همکاران ایجاد رویان بدنی به طور مستقیم از ریز نمونه برگ این گیاه میخک را در محیط کشت حاوی 2,4-D گزارش کرده‌اند (۱۸). در نتایج این

[Downloaded from jstmar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.2.5]



شکل ۱. مراحل مختلف رویان‌زایی بدنی و باززایی گیاه در میخک. (A): تشکیل رویان‌های کروی روی ریزنمونه گلبرگ ۳ هفته پس از کشت روی محیط کشت MS دارای ۲ میلی‌گرم پیکلورام (B): توسعه رویان بدنی پس از ۴ هفته بر روی محیط کشت MS دارای ۶۰ گرم در لی‌تر سوکروز. (C): جوانه زنی رویان‌های بدنی دو هفته پس از کشت روی محیط کشت نیم غلظت MS فاقد تنظیم کننده رشد. (D): توسعه گیاهچه در گلدان پس از ۵ هفته.

بررسی، ایجاد رویان‌های مستقیم روی ریزنمونه‌های گلبرگ روی محیط کشت حاوی 2,4-D مشاهده نشد. اگرچه در بسیاری از مطالعات نشان داده شده که پاسخ‌های متفاوت ریزنمونه‌های مختلف یک گیاه به هورمون در محیط کشت، در نتیجه اختلافات در حالات ویژه درون سلولی ریزنمونه از قبیل بیان ژن و سطوح هورمون‌های درونزاد ریزنمونه است (۱۶ و ۱۷). بنابراین پاسخ متفاوت ریزنمونه گلبرگ و برگ گیاه میخک به دو هورمون پیکلورام و 2,4-D می‌تواند در نتیجه حالات ویژه درون یاخت‌های این ریزنمونه‌ها باشد.

اگرچه به کار بردن اکسین‌ها در محیط کشت برای ایجاد رویان بدنی در گیاهان ضروری است اما در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده که حضور اکسین در محیط کشت از توسعه

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.2.5]

جدول ۱. اثر غلظت‌های مختلف پیکلورام بر درصد پاسخ ریزنمونه و همچنین میانگین تعداد رویان تشکیل شده در هر ریزنمونه ارقام میخک، چهار هفته پس از کشت

	رویان‌زایی مستقیم روی ریزنمونه گلبرگ			
	'Nelson'		'Impulse'	
پیکلورام (میلی‌گرم در لیتر)	درصد پاسخ ریزنمونه	میانگین تعداد رویان در هر ریزنمونه	درصد پاسخ ریزنمونه	میانگین تعداد رویان در هر ریزنمونه
۰/۲	۳۳/۳ bc	۶/۰ c	۱۳/۳ c	۳/۶ b
۰/۵	۳۷ b	۹/۶ b	۱۹/۶ b	۵/۰ b
۱	۵۲/۶ a	۱۴/۰ a	۴۱/۰ a	۱۰/۳ a
۲	۵۷/۶ a	۱۳/۳ a	۴۰/۰ a	۱۱/۳ a
۴	۲۹/۰ c	۶/۰ c	۱۳/۳ c	۵/۳ b
۶	۱۲/۳ d	۵/۶ c	۷/۳ d	۳/۳ b

*: حروف مشابه در هر سطر و ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف‌هاست (P<۰/۰۵).

جدول ۲. اثر غلظت‌های مختلف سوکروز بر توسعه رویان بدنی در ارقام میخک، ۵ هفته پس از کشت

	تعداد رویان‌های کروی توسعه یافته به صورت رویان لپه‌ای	
سوکروز (گرم در لیتر)	'Nelson'	'Impulse'
۲۰	۶۲/۶ c	۵۶/۰ d
۴۰	۷۰/۳ b	۶۷/۳ c
۶۰	۸۹/۰ a	۸۲/۶ b
۸۰	۹۳/۶ a	۹۲/۳ a
۱۰۰	۹۴/۰ a	۹۳/۶ a

* : حروف مشابه در هر سطر و ستون نشانگر معنی‌دار نبودن اختلاف‌هاست (P<۰/۰۵).

رویان‌های ایجاد شده جلوگیری می‌کند (۸). در نتایج این بررسی نشان داده شد که توسعه رویان‌های کروی روی محیط کشت حاوی پیکلورام متوقف می‌شوند و پس از انتقال آنها به محیط کشت بدون هورمون به صورت رویان‌های لپه‌ای توسعه می‌یابند. یان چواو و همکاران در نتایج مشابهی عدم توسعه رویان‌های بدنی ایجاد شده از ریزنمونه‌های برگ گیاه میخک روی محیط حاوی 2,4-D را گزارش کرده‌اند. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که اکسین‌های خارجی از توسعه رویان‌های بدنی گیاه میخک جلوگیری می‌کنند.

در نتایج این مطالعه نشان داده شد که افزایش غلظت سوکروز در محیط کشت، توسعه رویان‌های کروی را افزایش‌می‌دهد (جدول ۲). نتایج مشابهی برای برخی از گونه‌های گیاهان دیگر (۶، ۷، ۱۰، ۱۲و ۱۴) نیز گزارش شده است و اغلب در این بررسی‌ها نشان داده شده افزایش توسعه رویان بدنی در نتیجه افزایش غلظت سوکروز با تغییرات اسمزی ناشی از غلظت سوکروز در محیط کشت ارتباط دارد. مرکل و همکاران (۸) پیشنهاد کرده‌اند که نیاز برای تغییرات اسمزی برای توسعه نرمال رویان‌زایی بدنی در شرایط درون شیشه‌ای،

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.2.5]

تقلیدی از تغییرات اسمزی محیط طبیعی اطراف رویان جنسی در داخل بذر است که در زمان توسعه و بلوغ آن اتفاق می افتد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش توسعه رویان‌های بدنی گیاه میخک در نتیجه افزایش غلظت سوکروز، ممکن است با تغییرات اسمزی ناشی از غلظت سوکروز درمحیط کشت ارتباط داشته باشد.

در این پژوهش باززایی گیاه میخک از راه رویانزایی مستقیم بهدست آمده است و از این نتایج می‌توان برای ریزافزایی، تولید بذر مصنوعی و دستورزی‌های ژنتیکی گیاه میخک استفاده نمود.

منابع مورد استفاده

1. Barro, F., M.E. Cannell, P. A. Lazzeri and P. Barcelo. 1998. The influence of auxins on transformation of wheat and tritordeum and analysis of transgenic integration patterns in transformants. Theor. Appl Genet. 97: 684–695
2. Burich, G.A., P. Mercun, L. Benedtti and A. Giovannini. 1996. Transformation method applicable to ornamental plant. Plant. Tiss. Cult. Biotech. 12: 94-104.
3. Canhoto, J. M., M.L. Lopes and G. S. Cruz. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Myrtle. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 57: 13–21
4. Frey, L., Y. Saranga and J. Bjanik. 1992. Somatic embryogenesis in carnation. HortScience 27: 63-65.
5. He, G.Y. and P.A. Lazzeri. 2001. Improvement of somatic embryogenesis and plant regeneration from durum wheat (*Triticum turgidum* var. durum Desf.) scutellum and inflorescence cultures. Euphytica 119: 369–376
6. Lou, H. and S. Kako. 1995. Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. Sci. Hort. 64:11-20.
7. Luo, H., P. Obara-Okeyo, M. Tamaki and S. Kako. 1996. Influence of sucrose concentration on in vitro morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explant. HortScience 71: 497-502.
8. Merkle, S.A., W.A. Parrott and B.S. Flin. 1995. Morphogenic aspect of somatic embryogenesis. PP.155-203 *In*: Thorpetaed *in vitro* Embryogenesis in Plant. Klauwer Academhc Pub. Dordrecht, Bosta, London.
9. Murashige, T. and F.A. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 154: 473–479.
10. Nakagawa, H., T. Saijyo, N. Yamauchi, M. Shigyo, S. Kako and A. Ito. 2001. Effect of sugar and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. Sci. Hort. 90: 85-92.
11. Preeti, K. and S.L. Kothari. 2004. In vitro culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on tissue initiation and regeneration. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 77: 73–79
12. Ricci, A.P., F.A.M. Filho, B.M. Januzzi and S.M.S. Piedade. 2002. Somatic embryogenesis in Citrus sinensis, C. reticulata and C nobilis × C. deliciosa. Sci. Agric. 59: 41-46.
13. Sorvari, S., S. Ulvinen, T. Hietaranta and H. Hiirsalmi. 1993. Preculture medium promotes direct shoot regeneration from micropropagated strawberry leaf disks. HortScience 28: 55-57.
14. Tremblay, L. and. M. Tremblay. 1994. Maturation of black spruce somatic embryos: Sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 42: 39-46
15. Vicient, M.C and F.X. Martinez.1998. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. R. Bras. Fisiol. Veg. 10:1-12.
16. Wang, L., B. Huang, M. He and S. Hao. 1990. Somatic embryogenesis and its hormonal regulators in tissue culture of Freesia refracta. Ann. Bot. 65: 271-276
17. Williams, E. G. and G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. Ann. Bot. 57: 443-462.
18. Yantcheva, A., M. Vlahova and A. Antanassov. 1998. Direct somatic emberyogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthos caryophyllus*). Plant Cell Rep. 18:148-153.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.2.5]