بررسی و بهینه سازی کشت درون شیشه‌ای جهت کالوس‌زایی در برگ و ساقه پایه رویشی پسته فندقی و UCB1

عاطفه نادعلی‌زاده قناد[1*]، سید حسن مرعشی[2]، علیرضا سیفی[3]، فرشته مشیری[4]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی گیاهی، [2] استاد تمام گروه ژنتیک و به نژادی گیاهان زراعی، [3] استادیار گروه ژنتیک و به نژادی گیاهان زراعی، [4] کارشناس آزمایشگاه کشت بافت گروه ژنتیک و به نژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

*Atefenad7575@gmail.com

چکیده

پسته اهلی با نام علمی *Pistacia vera* L. در رده گیاهان گلدار و متعلق به خانواده Anacardiaceae است که یکی از مهم‌ترین محصولات باغی و صادرات غیرنفتی کشور محسوب می‌شود. بهینه‌سازی شرایط کشت بافت گیاهی و تولید مستقیم یا غیرمستقیم گیاهچه (کالوس رویان‌زا) به عنوان هدف مطالعه از جهات مختلف اهمیت دارد؛ از جمله برطرف کردن نیاز به پیوند گیاه، یک دست سازی باغات، تولید گیاهان عاری از آلودگی و اصلاح گیاهان اشاره کرد. در این پژوهش از بذر پسته فندقی جهت کشت در شرایط استریل و از نهال یکساله پسته UCB1 استفاده شد. همچنین از ریزنمونه‌های برگ و ساقه در محیط‌های کشت MS و DKW مکمل شده با غلظت‌های مختلف هورمون‌های گیاهی اکسین (NAA و IAA) و سیتوکنین (BAP) و از زغال فعال، اسید آسکوربیک، اسید سیتریک و PVP به منظور جلوگیری از سیاه شدن ریزنمونه‌های گیاهی و محیط کشت استفاده شد. نتایج نشان داد تولید کالوس در هر دو ریزنمونه و در تمامی تیمارهای هورمونی صورت گرفت. مقدار ایجاد کالوس در ریزنمونه ساقه فندقی بیشتر از برگ آن بود. همچنین در محیط کشت DKW با تیمار هورمونی NAA با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و BAP با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر ۹۳ درصد کالوس‌زایی اتفاق افتاد.

کلمات کلیدی: پسته، تنظیم کننده‌های رشد، کالوس، کشت بافت

مقدمه

گیاه پسته اهلی با نام علمی *Pistacia vera* L. در رده‌ی گیاهان گلدار و متعلق به خانواده Anacardiaceae که تنها گونه خوراکی و مهم از لحاظ تجاری می‌باشد. پایه‌های عمده پسته شامل: *P. atlantica, P. integerrima, P. terebinthus, P. mutica, P. khinjuk, P. palestina, P. chinensis* و هیبرید بین دو گونه *P. atlantica* و *P. integerima* به نام PG2 و UCB1 است (۱). آنجایی که پسته بطور طبیعی، گیاهی دگرگشن و تکثیر آن نیز از طریق قلمه مشکل است، تکثیر غیرجنسی پسته از طریق پیوند جوانه از کلونی‌های برتر، بر روی پایه هتروزیگوس انجام می‌شود (۳). ازدیاد و تکثیر گیاه پسته بواسطه روش‌های قدیمی ناکافی و زمان‌بر بوده و بازدهی مناسبی ندارد. بنابراین اتخاذ روش‌های نوین تکثیر و ازدیاد گیاهان امری اجتناب‌ناپذیر است که منجر به افزایش راندمان تولید و کاهش هزینه‌ها می‌شود (٤، ٥). برای ازدیاد نهال‌های سالم و یکنواخت از نظر ژنتیکی، تکثیر سریع پایه‌ها و ارقام پرمحصول بدون نیاز به پیوند در مدت زمان کوتاه، می‌توان از فناوری ریزازدیادی و

تکثیر درون شیشه‌ای استفاده کرد، علاوه بر این کشت بافت از نیازهای اولیه و ضروری برای اصلاح گیاهان از جمله پسته با استفاده از فناوری‌های نوین مانند دست‌ورزی ژنتیکی می‌باشد. کالوس‌زایی لازمه تولید جنین‌زایی سوماتیکی است جوانه‌های گل ماده پسته در حضور تنظیم کننده‌های رشد کالوس‌زایی داشتند (۲). محیط کشت MS حاوی NAA کالوس‌زایی بعد از ٦ روز مشاهده شد، که در حضور یا عدم حضور BA نوع کالوس متفاوت بود. محیط کشت‌های MS شامل یک میلی‌گرم بر لیتر BA، ٦٥ درصد از کشت‌ها، کالوس جنین‌زا تشکیل دادند. در مقابل، TDZ و NAA جنین‌زایی را کاهش دادند. بعضی از جنین‌های سوماتیکی به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP جوانه زدند، اما بیشتر به گیاهچه تبدیل می‌شوند (۳). مطالعه‌ای با هدف باززایی گیاه پسته از ریز نمونه‌های اولیه برگ‌های بالغ پایه نر در شرایط آزمایشگاهی انجام شد که در آن از سه ترکیب هورمونی IAA و IBA و BAP استفاده شد. نتیجه آزمایش حاکی از آن بود که استفاده از محیط MS به همراه یک میلی‌گرم در لیتر از IAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر از BA بهترین محیط برای رشد این ریز نمونه‌های اولیه است. در این پژوهش با استفاده از کشت بافت گیاهی میزان کالوس‌زایی و باززایی در دو محیط کشت MS و DKW با دو ریزنمونه برگ و ساقه‌های جوان حاصل از کشت درون شیشه پسته در دو پایه رویشی فندقی و UCB1 در ٤ تیمار هورمونی جهت تولید انواع کالوس و باززایی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

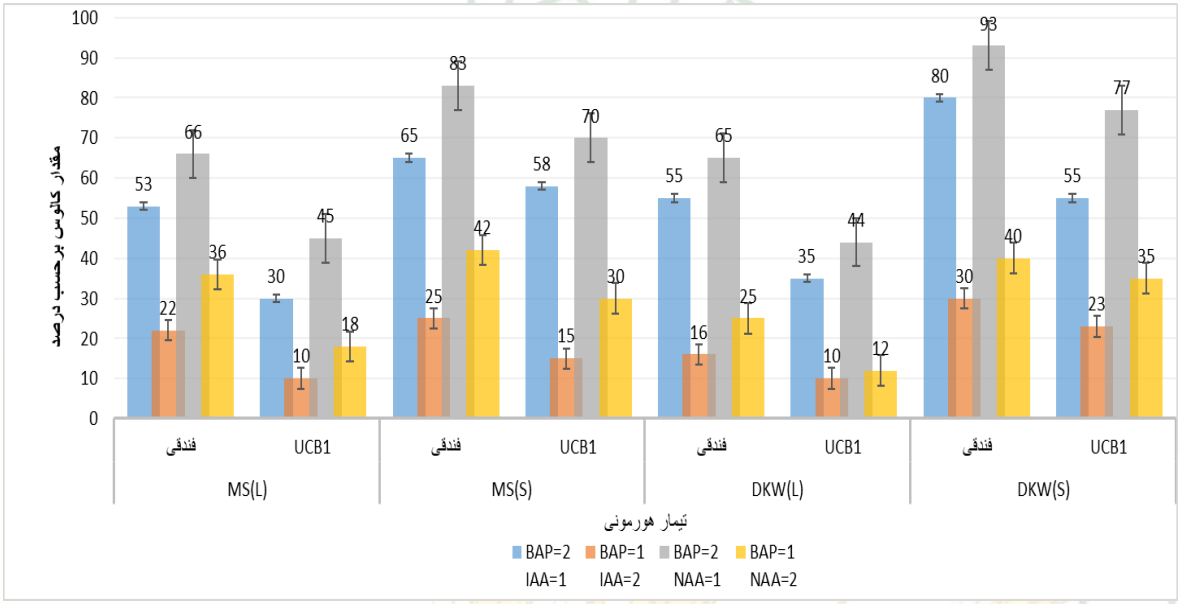
مواد و روش‌ها

در این آزمایش از برگ‌ها وساقه‌های جوان رقم UCB1 که حاصل کشت درون شیشه از جوانه‌های رویشی نهال**های** پسته یکساله تکثیر شده بوسیله کشت بافت از شرکت ایتاصدرا تهیه و **به دست آمدند** و برگ‌ها و ساقه‌های تازه رقم فندقی حاصل کشت بذرپسته در محیط ½MS که عاری از بیماری بودند بعنوان ریزنمونه استفاده شدند. برگ‌های نیمه بالغ به همراه مقداری از دمبرگ و ساقه‌های جوان به طول یک سانتی‌متر به صورت افقی، بر روی محیط‌های کشت MS و DKW که حاوی سه گرم در لیتر زغال فعال و بدون آن، علاوه بر زغال فعال برای کنترل هرچه بیشتر مواد فنلی، اسید آسکوربیک، اسید سیتریک و PVP از هرکدام به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط‌های کشت افزوده شد. مقدار ۸ گرم در لیتر آگار، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و pH=5.8 تهیه و در اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. بعد از خنک شدن، هورمون‌های گیاهی سیتوکینین BAP جهت بررسی میزان تولید کالوس کشت گردید. این آزمایش بصورت فاکتوریل با استفاده از ۲ ریزنمونه و در ۲ رقم پسته و همراه با ۳ سطح هورمون سیتوکنین و ۳ سطح اکسین در قالب طرح کامل تصادفی با حداقل ۳ تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از یادداشت برداری با استفاده از نرم افزار Excel فراخوانی و توسط نرم‌افزار SAS-version 9.3 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج و بحث

اثر نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد بر میزان کالوس‌زایی در ساقه و برگ پسته؛ با توجه به داده‌های به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها، بین نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد؛ همچنین بین محیط‌های کشت و انواع ریزنمونه و رقم پسته بر میزان کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. از بین ۱۸ تیمار اعمال شده بر روی ساقه‌ها، در محیط شاهد که هیچ تنظیم کننده رشدی نبود، کالوس‌زایی مشاهده نشد. نتیجه مقایسه میانگین نشان داد تیمارهایی که حاوی اکسین (NAA و IAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر) در حضور BAP با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بالاترین کالوس‌دهی را داشتند که با نتایج آزمایش سایر محققان مطابقت داشت (۵)، بنابراین باتوجه به نمودار ۱ مشاهده می‌شود که NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر و BAP

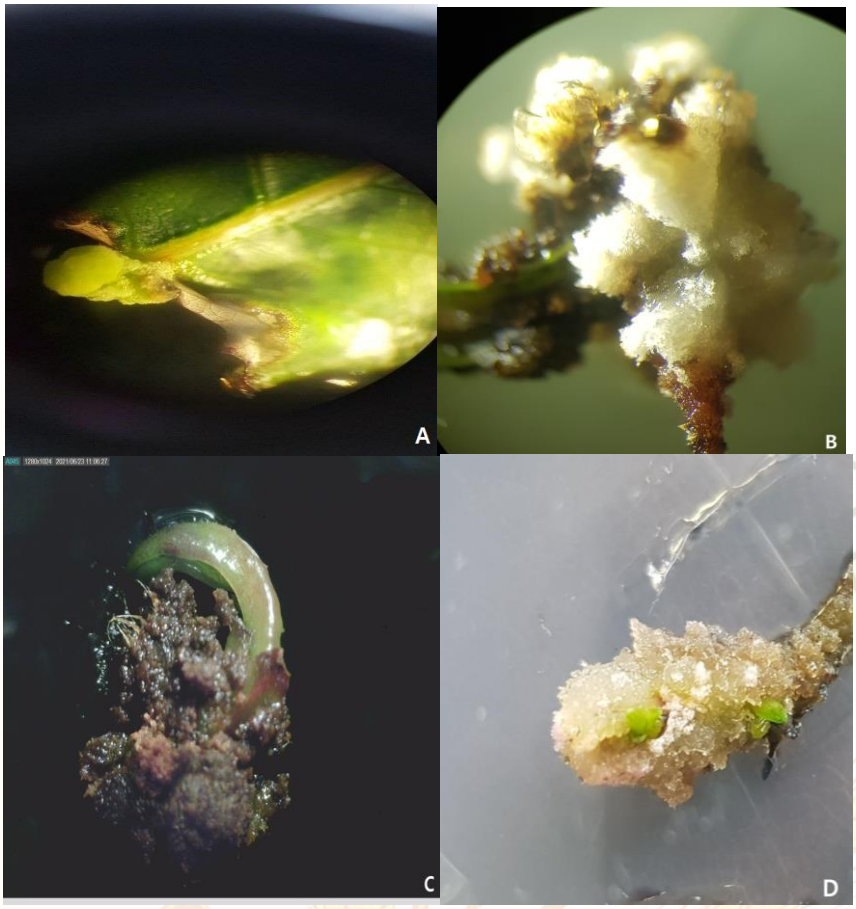
با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر ۹۳ درصد کالوس‌زایی در ریز نمونه ساقه از رقم فندقی داشت (شکل ۱ ـ تصویر D). و کمترین میزان کالوس‌زایی برای ریزنمونه برگ از رقم UCB1 در هردو محیط کشت با تیمارهورمونی IAA در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر و BAP با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بود.



نمودار ۱- میزان درصد کالوس تشکیل شده در ۲ محیط کشت MS و DKW در ۲ رقم فندقی و UCB1 و در ۲ ریزنمونه برگ (L) و ساقه (S)

اما از نظر کیفیت ظاهری بهترین نتیجه کالوس‌زایی که منجر به کالوس‌های با ظاهر سبز روشن و سفید ایجاد کرد محیط کشت DKW بدون زغال فعال حاوی ترکیب ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بود (شکل ۱ـ تصویر B)؛ که بر اساس نتایج این کالوس‌ها مستعد جنین‌زایی و اندام‌زایی هستند. بر اساس مطالعات منبع برگ تاثیر مستقیمی بر تولید کالوس جنین‌زا دارد و بهترین نتایج از برگ‌های گرفته شده از بذر پسته فندقی به دست آمد (٤). طبق مشاهدات در این آزمایش برگ‌های مشتق شده از شاخساره‌های پرآوری شده درون شیشه رقم UCB1 نمی‌تواند منبع مناسبی برای ایجاد کالوس باشد (شکل ۱ـ تصویر A). در ۸۵ درصد از کالوس‌های تشکیل شده از ریزنمونه ساقه فندقی اندام‌زایی مشاهده شد، بطوری که در محیط کشت DKW مکمل شده با ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP شاخه‌زایی به دست آمد (شکل ۱ـ تصویر C). در بخش دیگر این تحقیق استفاده از زغال فعال به مقدار سه گرم در لیتر به مدت ۲۱ روز در مرحله استقرار مقدار ترشح فنول و بدنبال آن مرگ گیاهچه‌ها را کاهش می‌دهد. تاکنون استفاده از زغال فعال در محیط کشت و کاربرد آن در افزایش سرعت رشد و کاهش سوختگی نمونه‌ها توسط محققین بسیاری گزارش شده است.

با توجه به اهمیت بالای پسته در ایران و نیز تحقیقات کمی که در زمینه اصلاح این گیاه به ویژه با استفاده از پیشرفت‌های حاصله در زمینه بیوتکنولوژی انجام گرفته، تلاش بر این است که با استفاده از فناوری تکثیر درون شیشه‌ای و باززایی ارقام بومی مهم این گیاه را با مقایسه محیط‌های کشت مختلف و نیز با استفاده از انواع ریزنمونه‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف نتیجه‌ای کاربردی حاصل شود. نتایج این آزمایش از یکسو امکان تولید یکنواخت تعداد زیادی گیاه در زمانی کوتاه و از سوی دیگر توانایی اصلاح آن با بکارگیری فناوری مهندسی ژنتیک امکان‌پذیر می‌کند.



شکل ۱ـ کالوس سبز روشن تشکیل شده از برگ UCB1 (A) کالوس سفید تشکیل شده ازبرگ حاصل از بذر فندقی در محیط کشت DKW حاوی NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و BAP با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر (B) کالوس قهوه‌ای و گیاهچه باززا شده در محیط کشت MS حاوی زغال فعال (C) کالوس شفاف ریزنمونه ساقه فندقی در محیط کشت DKW بدون زغال فعال حاوی IAA با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر و BAP با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر (D).

References

1. Ferguson, L.O., Poss, J. A., Grattan, S. R., Grieve, C. M., Wang, D. O., Wilson, C., Donovan, T. J., Chao, C. T., 2002. Pistachio rootstocks influence scion growth and ion relations under salinity and boron stress. Journal of the American Society for Horticultural Science. 127(2):194-9.
2. Onay, A., Pirinç, V., Tilkat, E., Aktürk, Z., Yildirim, H., 2004. Somatic embryogenesis of pistachio from female flowers. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 79(6): 960-964.
3. Onay, A., Jeffree, C. E., Yeoman, M. M., 1995. Somatic embryogenesis in cultured immature kernels of Pistachio, Pistacia vera L. Plant cell reports. 15(3-4): 192-195.
4. Onay, A., Jeffree, C. E., 2000. Somatic embryogenesis in pistachio (Pistacia Vera L.). In Somatic Embryogenesis in Woody Plants. (Eds: Mohan, S., Gupta, J. P. K., and Newton, R. J.) Springer Science+Business Media Dordrecht. 6:361-390.
5. Tilkat, E., Onay, A., 2009. Direct shoot organogenesis from in vitro-derived mature leaf explants of pistachio. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 45(1): 92-98.

Investigation and optimization of in vitro culture for callus formation in leaves and stem of hazelnut pistachio and UCB1

Atefeh Nadalizadeh*[1], Hassan Marashi[2], Alireza Seifi[3], Fershte Moshiri[4]

[1] MSc Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, [2] Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, [3]Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, [4] Expert Tissue Culture, Laboratory of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
*Atefenad7575@gmail.com

Abstract

Pistachio (*Pistachia vera* L.) a member of Magnoliophyta Division, belongs to the Anacardiaceae family, which is one of the most important horticultural products and non-oil exports of the country. Optimization of plant tissue culture conditions and direct or indirect seedling production (embryogenic callus) as purpose of this study is important in various ways that can be mentioned eliminating the need for plant transplants, a handicraft of orchards, producing plants free of contamination, and improving plants for example. In this study, hazelnut pistachio seeds for cultivation under sterile conditions and annual pistachio seedlings were used. Also leaf and stem explants were utilized in MS and DKW culture media supplemented with different concentrations of the plant hormones auxin IAA, NAA and cytokinin BAP, and activated charcoal of citric acid and PVP were used to prevent blackening of plant explants and culture medium. The results showed that callus production was performed in both explants and all hormonal treatments, and the amount of callus formation in the stem explant of tissue culture was higher than the leaf. Also in DKW culture medium with hormonal treatment of NAA with a concentration of 1 mg / l and BAP with a concentration of 2 mg / l, 90% callus formation occurred.

Keywords: Pistachio, Growth regulators, Callus, Tissue culture