بررسی اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر کشت بافت مریستم سیب‌زمینی (Solanum tuberosum L.)

راضیه رستمی*[۱]، پروانه ابریشم‌چی[۲] و مهرداد لاهوتی[۲]

*پست الکترونیکی: razirostami1361@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۲۰

چکیده

امروزه تکنیک‌های کشت بافت گیاهی به عنوان ابزار مفیدی برای ایجاد تنوع ژنتیکی به منظور به نژادی محصولات کشاورزی و همچنین تولید گیاهان عاری از بیماری به کار می‌روند. باززایی گیاه از طریق کشت مریستم یکی از مهم‌ترین روش‌های تولید گیاهان عاری از ویروس است. هدف از این پژوهش ارائه یک روش مؤثر برای کالوس‌زایی و باززایی گیاه از کشت مریستم سیب‌زمینی (Solanum tuberosum L. var. Premier) بوده است. کالوس‌زایی در قطعات ریزنمونهٔ مریستم جانبی سیب‌زمینی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی 2,4-D با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر القا شد. کالوس‌زایی بهینه در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. حداکثر اندام‌زایی (ساقه‌زایی، ریشه‌زایی و رشد آن‌ها) در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر این تنظیم کننده رشد مشاهده گردید. بنابراین پیشنهاد می‌شود به منظور ایجاد بیش‌ترین وزن خشک و تر کالوس در محیط کشت، تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، و به منظور باززایی بیش‌ترین میزان ریشه و ساقه از کالوس، غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر این هورمون در محیط کشت به کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: *سیب‌زمینی (Solanum tuberosum L.)، کالوس‌زایی، کشت مریستم*

مقدمه

سیب‌زمینی (Solanum tuberosum L.) یکی از اعضای تیره Solanaceae است. سیب‌زمینی یکی از محصولات غذایی مهم مردم دنیا است که از نظر اقتصادی در بسیاری از کشورها اهمیت زیادی دارد و غذای بسیاری از مردم جهان را تشکیل می‌دهد [۱]. این گیاه بعد از گندم، برنج و ذرت مهم‌ترین گیاه زراعی است که در جهان کشت می‌شود و از مهم‌ترین دو لپه‌ای‌ها محسوب می‌شود. سیب‌زمینی در مقایسه با سایر محصولات غذایی دارای انرژی و پروتئین بالاتری است و همچنین سرشار از آهن، منیزیوم، پتاسیم و ویتامین‌های C و B است [۲].

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه زیست‌شناسی- دانشگاه فردوسی مشهد

۲- به ترتیب استادیار و دانشیار گروه زیست‌شناسی- دانشگاه فردوسی مشهد

در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، میزان محصول سیب‌زمینی بسیار پائین‌تر از پتانسیل ذاتی تولید آن است زیرا بیماری‌های سیب‌زمینی و از جمله بیماری‌های ویروسی باعث از بین رفتن و کاهش محصول آن می‌شوند [۳]. مهم‌ترین این ویروس‌ها عبارتند از: ویروس لوله‌ای شدن برگ سیب‌زمینی (PLRV)[1]، ویروس X سیب‌زمینی (PVX)[2] و ویروس Y سیب زمینی (PVY)[3] [۳ و ٤]. بیماری‌های ویروسی سیب زمینی در ایران اولین بار در سال ۱۳۳۰ توسط استیارت، کارشناس بلژیکی، از اطراف تبریز گزارش شد و پس از آن اولین قدم مثبت در راه شناسایی بیماری‌های ویروسی سیب‌زمینی در ایران در سال ۱۳٤۳ توسط مهندس علیرضا کریمی برداشته شد [۵].

کشت مریستم به تنهایی و یا به همراه تیمار گرما (ترموتراپی)، ابزار مفید و موثری برای حذف آلودگی‌های ویروسی از گیاهان است [٦-۸]. به طور کلی از تمام مریستم‌های گیاه برای تولید گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زا می‌توان استفاده کرد [۵ و ۹]. سیب‌زمینی اولین محصول غذایی است که از طریق تکنیک‌های کشت بافت ویروس‌های آن حذف شده‌اند [۳ و ٤]. نجیب و همکاران اعلام کردند که با استفاده از غده‌های بذری سیب‌زمینی عاری از ویروس تولید محصول حدود ٤۰٪ افزایش می‌یابد [۳]. فیک و همکاران گزارش کردند که حذف ویروس X سیب‌زمینی، تعداد، وزن و قطر ریزغده‌های سیب‌زمینی را افزایش می‌دهد [٤].

تنظیم کننده‌های رشد گیاهی کاربردهای فراوانی در تکنیک‌های کشت بافت گیاهی داشته‌اند. دانشمندان با افزودن این مواد به محیط‌های کشت و تغییر مقادیر آن‌ها سعی در ایجاد شرایط بهتری در محیط کشت برای دست‌یابی سریع و آسان به اهداف مورد نظر داشته‌اند. در بین تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، هورمون‌های گروه اکسین نقش بسیار مهمی در کنترل تقسیم و تمایز سلول‌های گیاهی بر عهده دارند [۹]. شاکیا و همکاران مشاهده کردند هنگامی که مریستم‌های سیب‌زمینی در محیط کشت MS[4] همراه با یک میلی‌گرم در لیتر NAA[5] و یک میلی‌گرم در لیتر BA[6] کشت داده شدند، تولید گیاهچه‌هایی نمودند که عاری از ویروس بوده و می‌توانند با کشت قطعات گرهی و مریستم‌های جانبی تکثیر شوند و تولید گیاه سالم نمایند [۱۰]. دودیتس و همکاران با کشت مریستم سیب‌زمینی، بیش‌ترین میزان کالوس‌زایی را در محیط کشت MS حاوی 2,4-D[7] (۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) و بیش‌ترین میزان تولید بخش هوایی را در محیط کشت دارای BAP[8] (۵ میلی‌گرم در لیتر) و IBA[9] (۰/۱میلی‌گرم در لیتر) گزارش کردند [۱۱]. کونوور و ولیتز اثر سه تنظیم کنندهٔ رشد (NAA، IAA[10]، IBA) را در پنج غلظت (۰، ۰/۰۵، ۰/۱۵، ۰/۲۵ و ۰/۳۵ میلی‌گرم در لیتر) بر کشت بافت مریستم سیب‌زمینی بررسی کردند. در تحقیق آنان بیش‌ترین ارتفاع گیاهچه‌ها در محیط کشت حاوی NAA (۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده گردید. همچنین بیش‌ترین تعداد گره‌ها و بیش‌ترین تعداد برگ‌ها به ترتیب در محیط‌های کشت دارای IBA (۰/۳۵ میلی‌گرم در لیتر) و IAA (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) گزارش شده است [۷].

از آن‌جا که کشت مریستم از مهم‌ترین روش‌های تولید گیاهان عاری از بیماری است، هدف این مطالعه ایجاد یک روش بهینه برای القای کالوس بر روی

1- Potato leaf roll virus
2- Potato virus X
3- Potato virus Y

4- Murashige & Skoog
5- Naphthalene acetic acid
6- Benzyle adenine
7- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
8- Benzyleamino purine
9- Isobutyric acid
10- Indole acetic acid

مریستم سیب‌زمینی و سپس باززایی گیاهچه از کالوس بود. در این تحقیق مریستم‌های جانبی به عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. زیرا استفاده از مریستم جانبی نسبت به مریستم انتهای ساقه احتمال وقوع پدیده تنوع سوماکلونال و در نتیجهٔ بروز ناهنجاری‌های ریخت‌شناختی در گیاهچه‌های باززایی شده را کاهش می‌دهد [۱۲]. با توجه به بررسی نتایج تحقیقات دانشمندان مختلف در زمینه استفاده از مقادیر مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در محیط‌های کشت [٤، ۷، ۱۰ و ۱۱]، در این تحقیق اثر پنج غلظت مختلف 2,4-D (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) بر کالوس‌زایی و باززایی گیاه از کشت مریستم سیب‌زمینی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

غده‌های بذری سیب‌زمینی رقم پرمیر[1] از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان تهیه و در گلدان حاوی مخلوط شن و ماسه کشت داده شدند. گلدان‌ها در دمای آزمایشگاه و دوره نوری ۱٦ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. بعد از یک ماه گیاهچه‌های سیب‌زمینی رشد کرده و مریستم‌های جانبی گیاهچه‌های حاصل به ابعاد تقریبی ۲ میلی‌متر، به عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند.

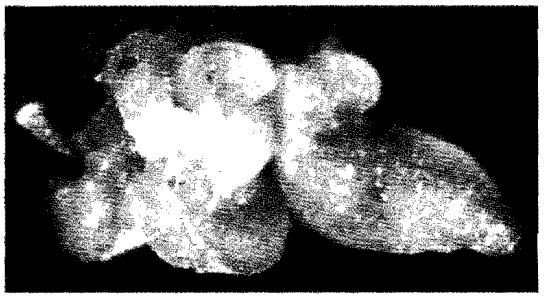
مریستم‌های جانبی به همراه مقداری از بافت ساقه به دقت از گیاهچه‌ها جدا شدند و بعد از شستشوی سطحی، ضدعفونی کردن آن‌ها با کمک الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه انجام شد [۱۳ و ۱٤]. بافت ساقه اطراف مریستم به دقت جدا شد و مریستم به کمک سوزن تشریح به شیشه‌های حاوی محیط کشت جامد MS (۲۲) حاوی غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شد [۱۵]. برای هر تیمار ۱۰ تکرار در نظر گرفته شد. کلیه عملیات ضدعفونی کردن، برش و انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت، در اتاق انتقال که مجهز به اتاقک دمنده هوای استریل بود و به کمک ذره بین انجام شد. شیشه‌های حاوی محیط کشت ابتدا به مدت یک هفته در تاریکی (انکوباتور) و دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرارگرفتند و سپس به دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد منتقل شدند [۱٦ و ۱۷].

پس از کالوس‌زایی و اندام‌زایی، وزن تر و خشک کالوس‌ها، ارتفاع بخش هوایی و طول ریشه‌های تشکیل شده اندازه‌گیری شد و تعداد برگ‌ها و ریشه‌های ایجاد شده شمارش گردید. داده‌های حاصل به کمک نرم‌افزار آماری Jmp مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسهٔ میانگین‌ها توسط آزمون HSD (Tukey) در سطح اطمینان ۹۵٪ (α= ۰/۰۵) انجام شد.

نتایج

الف-کالوس‌زایی در تیمارهای مختلف 2,4-D

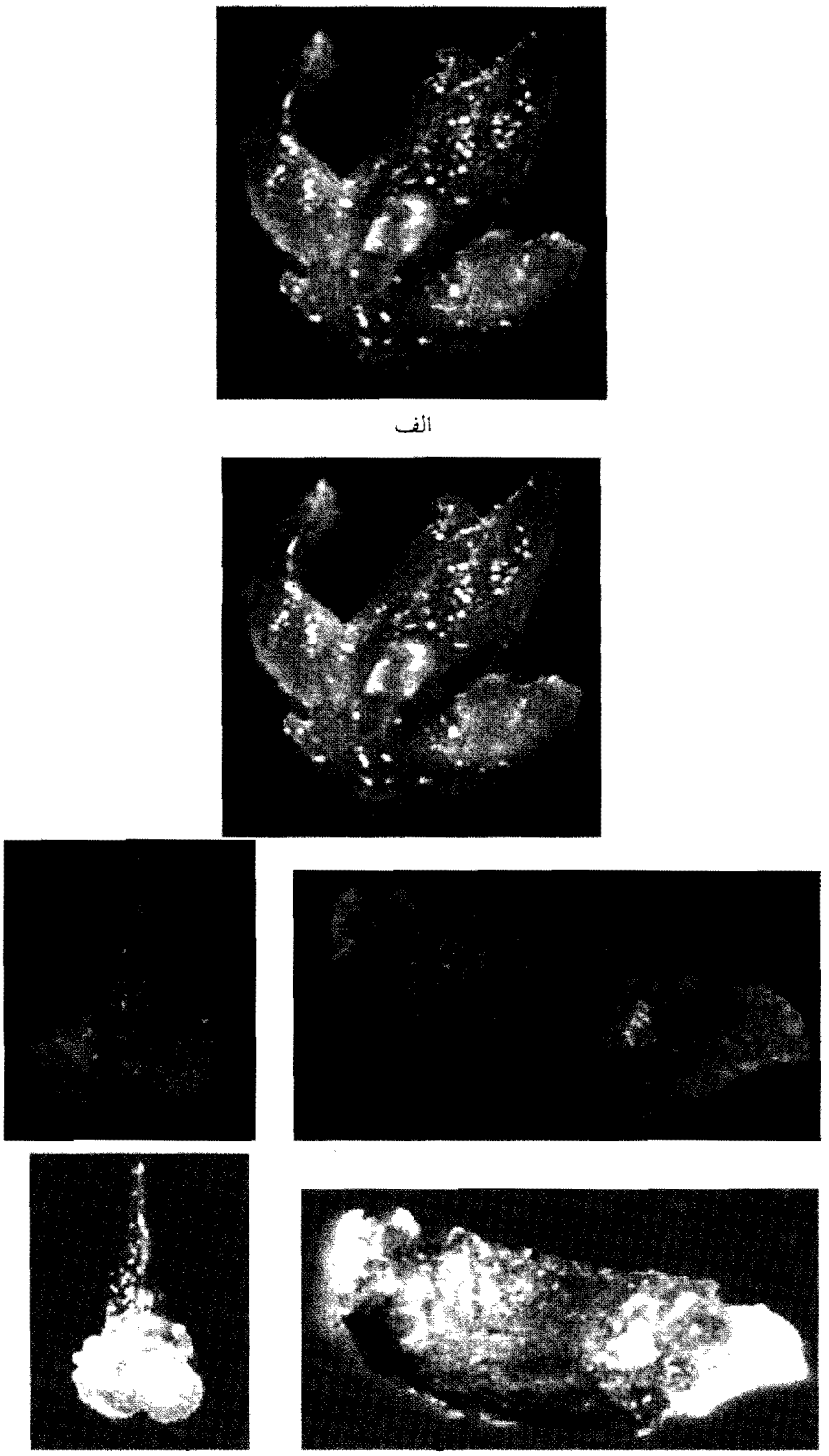
یک هفته بعد از کشت، کالوس‌زایی در انکوباتور صورت گرفت. در محیط کشت بدون اکسین (شاهد)، کالوس‌هایی به رنگ سبز و دارای بافتی دانه‌بندی شده، ایجاد شدند (شکل ۱).



شکل ۱- کالوس‌زایی در محیط کشت پایه **MS** فاقد هورمون

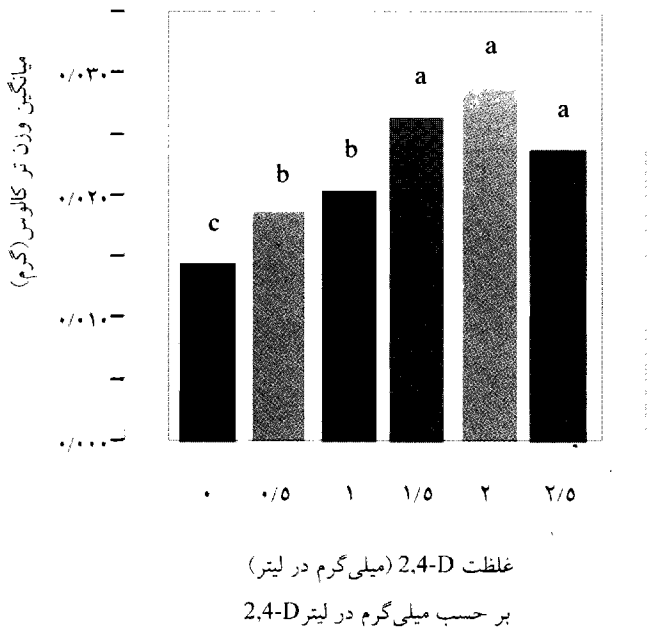
1- Premier

در تیمارهای مختلف 2,4-D کالوس‌ها بافتی نرم داشتند، کرم رنگ بوده و حتی بعد از انتقال به نور سبز نشدند (شکل ۲).

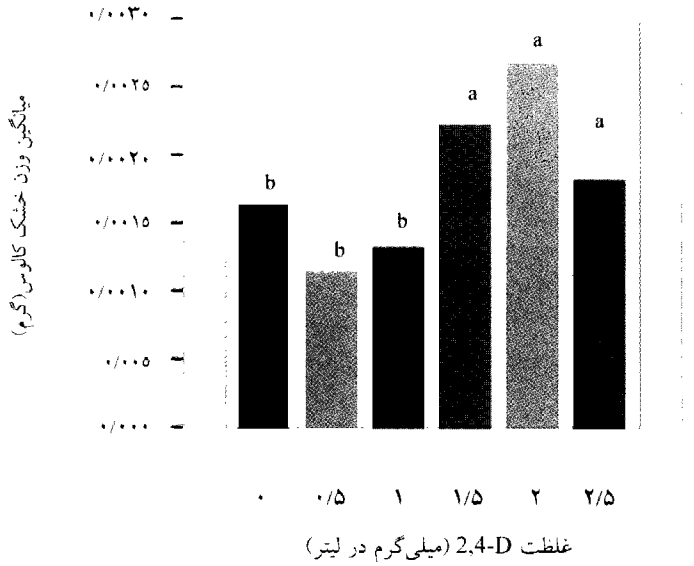


شکل ۲- کالوس‌زایی در محیط کشت پایه MS حاوی الف) ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ب) ۲ میلی‌گرم در لیتر و ج) ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

با افزایش غلظت 2,4-D تا ۲ میلی‌گرم در لیتر، وزن تر و خشک کالوس‌ها افزایش یافت ولی در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D کاهشی در وزن تر و خشک کالوس‌ها مشاهده گردید (جدول ۱ و شکل‌های ۳ و ٤).



شکل ۳- نمودار تغییرات میانگین وزن تر کالوس ایجاد شده در محیط کشت پایهٔ MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D
حروف مشابه نشان دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار از نظر آماری است (α=۰/۰۵)



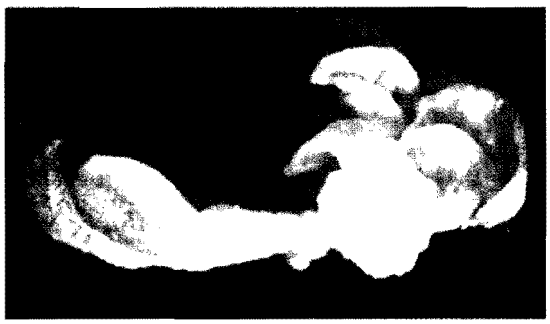
شکل ٤- نمودار تغییرات میانگین وزن خشک کالوس ایجاد شده در محیط کشت پایهٔ MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D

حروف مشابه نشان دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار از نظر آماری است (α=۰/۰۵).

بیش‌ترین وزن تر کالوس در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر2,4-D ایجاد شد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از اندازه‌گیری وزن تر کالوس‌ها نشان داد که این افزایش، در تیمارهای ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D نسبت به تیمارهای ۰ (شاهد)، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر این هورمون معنی‌دار بود. بیش‌ترین وزن خشک کالوس نیز در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ایجاد شد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از اندازه‌گیری وزن خشک کالوس‌ها نشان داد که این افزایش، در تیمارهای ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر این هورمون نسبت به تیمارهای ۰ (شاهد)، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر این هورمون معنی‌دار بود. در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، وزن تر و خشک کالوس‌ها کاهش یافت، اما از نظر آماری این کاهش نسبت به تیمارهای ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر این هورمون معنی‌دار نبود. الگوی تغییرات وزن تر و خشک کالوس‌ها به جز در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، مشابه بود. در غلظت‌های اخیر وزن تر کالوس‌ها نسبت به شاهد افزایش یافت اما وزن خشک کاهش یافت. این مسئله نشان می‌دهد که کالوس ایجاد شده در این تیمارها آبدارتر بوده است.

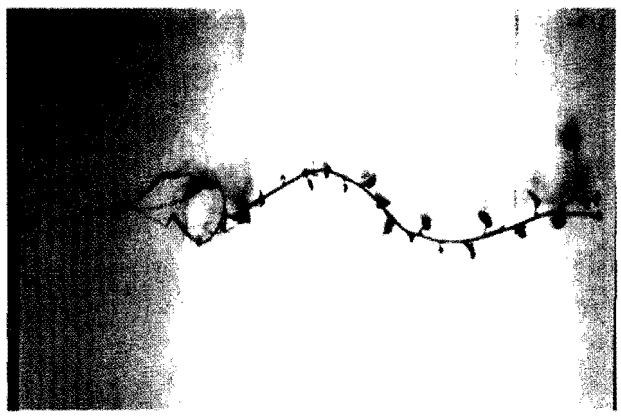
ب- باززایی گیاهچه‌ها در تیمارهای مختلف 2,4-D

در محیط بدون هورمون (شاهد) باززایی بخش هوایی (ساقه زایی) انجام شد اما ریشه زایی صورت نگرفت (شکل ۵).

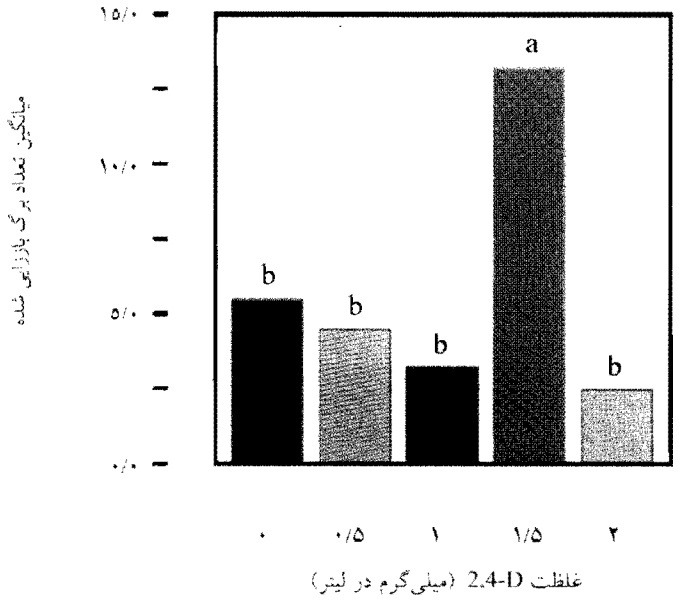


شکل ۵- باززایی بخش هوایی در محیط کشت پایهٔ MS فاقد هورمون

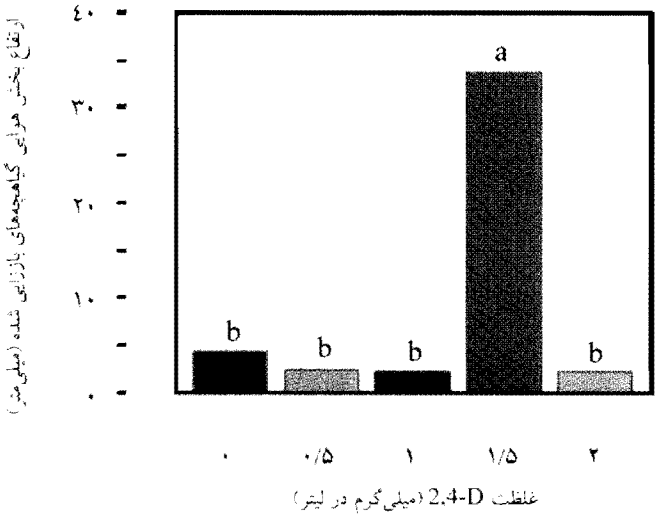
ارتفاع بخش هوایی و تعداد برگ‌های باززایی شده در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون به طور معنی‌داری بیش‌تر از شاهد و سایر تیمارها بود (جدول ۱ و شکل‌های ٦-۸).



شکل ٦- اندام‌زایی در کالوس حاصل از کشت مریستم سیب‌زمینی در محیط کشت پایهٔ MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

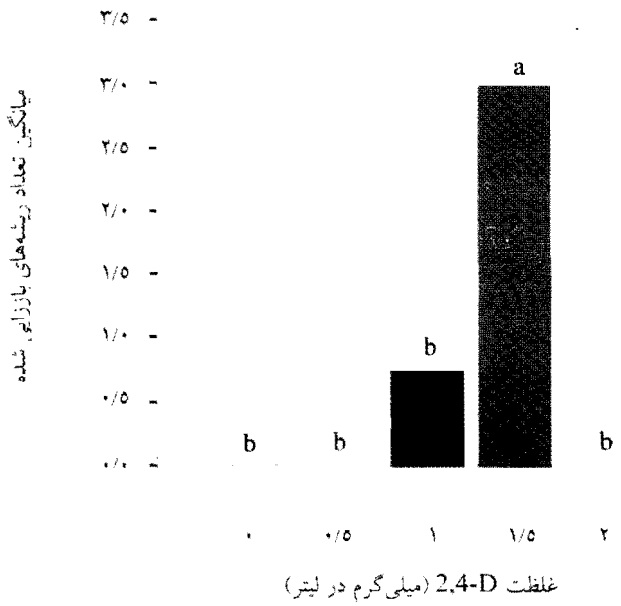


شکل ۷- نمودار تغییرات میانگین تعداد برگ ایجاد شده در محیط کشت پایهٔ MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D
حروف مشابه نشان دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار از نظر آماری است (α=۰/۰۵)



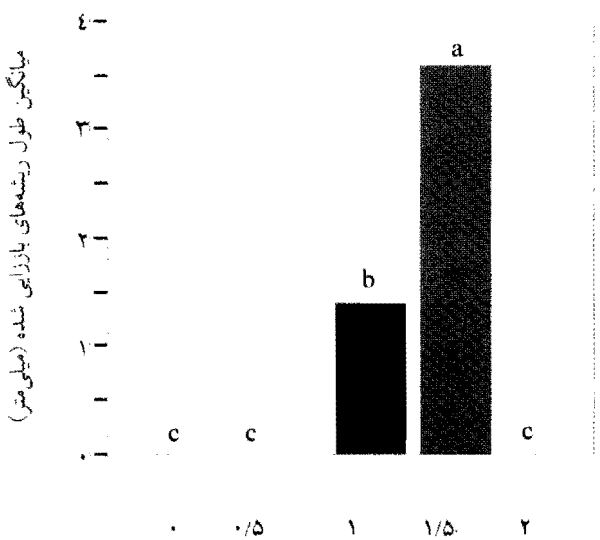
شکل ۸- نمودار تغییرات میانگین ارتفاع بخش هوایی ایجاد شده در محیط کشت پایهٔ MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D
حروف مشابه نشان دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار از نظر آماری است (α=۰/۰۵)

در غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ریشه‌زایی صورت نگرفت. بیش‌ترین تعداد و طول ریشه در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر این هورمون مشاهده شدکه از نظر آماری نسبت به شاهد و سایر تیمارها معنی‌دار بود (جدول ۱ و شکل‌های ۶، ۹ و ۱۰).



شکل ۹- نمودار تغییرات تعداد ریشهٔ تشکیل شده در محیط کشت پایهٔ MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D

حروف مشابه نشان دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار از نظر آماری است (α=۰/۰۵)



شکل ۱۰- نمودار تغییرات میانگین طول ریشه ایجاد شده در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D

حروف مشابه نشان دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار از نظر آماری است (α=۰/۰۵)

جدول ۱- میانگین وزن تر و خشک کالوس و ویژگی‌های گیاهچه‌های باززایی شده در تیمارهای مختلف 2,4-D

2,4-D (میلی‌گرم در لیتر)	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۲	۲/۵
وزن تر کالوس (گرم)	۰/۰۱۴۶	۰/۰۱۸۶	۰/۱۵۲	۰/۰۲۵۸	۰/۰۲۸۸	۰/۰۲۱۸
وزن خشک کالوس (گرم)	۰/۰۰۱۶	۰/۰۰۱	۰/۰۱۳۲	۰/۰۰۲۲۴	۰/۰۰۲۶۸	۰/۰۰۱۸۲
تعداد برگ	۵/۵	۴/۵	۳/۲۵	۱۳/۲۵	۲/۵	۰
ارتفاع بخش هوایی (میلی‌متر)	۴/۵	۲/۵	۲/۲۵	۳۳/۷۵	۱/۷۵	۰
تعداد ریشه	۰	۰	۰/۸	۲/۶	۰	۰
طول ریشه (میلی‌متر)	۰	۰	۱/۴	۳/۷۵	۰	۰

بحث و نتیجه‌گیری

کشت مریستم به طور موفقیت‌آمیزی در سیب‌زمینی برای ایجاد گیاهان عاری از ویروس به کار گرفته شده است. فیک و همکاران [۴]، شاکیا و همکاران [۱۰]، چاندرا و همکاران [۱۸]، در زمینهٔ کشت بافت مریستم سیب‌زمینی و باززایی گیاه از آن تحقیق نمودند و گیاهچه‌های عاری از ویروس باززایی کردند. این محققین با تغییر مقادیر مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت سعی در ایجاد یک محیط کشت مناسب برای باززایی گیاهچه‌ها از طریق کشت بافت مریستم داشته‌اند [۱۹]. گرچه تحقیقات زیادی در زمینه اثرات تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کشت بافت‌های گیاهی صورت گرفته است، ولی با در نظر گرفتن اثر متقابل بسیاری از آن‌ها با یکدیگر هنوز هم تحقیق در زمینه تأثیر این ترکیبات در کشت بافت‌های گیاهی ضروری به نظر می‌رسد [۲۰].

گزارشات نشان می‌دهند که برای برای تشکیل کالوس وجود سیتوکینین و اکسین الزامی می‌باشد [۲۱ و ۲۲]. مهم‌ترین تنظیم کننده‌های رشدی که به طور موفقیت‌آمیزی در القای کالوس و رشد آن مورد استفاده قرار گرفته‌اند عبارتند ازکینتین، نفتالین استیک اسید، ۲و۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید، زآتین و جیبرلیک اسید [۱۱، ۱۶ و ۲۳].

در این بررسی مشاهده شد که 2,4-D در افزایش وزن خشک و تر کالوس اثر معنی‌دار داشته است. حداکثر وزن خشک و تر کالوس در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون حاصل شد. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط خاتون و همکاران مطابقت دارد. این دانشمندان نیز در کشت قطعات گرهی سیب‌زمینی حداکثر کالوس‌زایی را در این غلظت هورمونی به دست آوردند [۱۴]. در تحقیقات دیگر دانشمندان نیز مشخص شده است که در بین اکسین‌ها 2,4-D نسبت به NAA از نظر تولید کالوس اثر بیش‌تری داشته است [۲۴، ۲۵ و ۲۶].

در مورد نحوهٔ عمل 2,4-D در محیط کشت تحقیقاتی صورت گرفته است. مشخص شده است که 2,4-D در سلول‌های هویج هم خود به عنوان یک اکسین عمل می‌کند و هم متابولسیم اکسین درون‌زا (IAA) را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱۴]. در پروتوپلاست‌های یونجه نیز IAA درون‌زا (هم به فرم آزاد و هم به فرم همیوغ) در پاسخ به 2,4-D افزایش می‌یابد [۲۰]. به طور کلی اکسین یکی ازهورمون‌های گیاهی است که برای فعال‌سازی تقسیم سلولی در سلول‌های گیاهی تمایز یافته هم در

شیشه[1] و هم در زیوه[2] نیازاست. اکسین در تنظیم مرحلهٔ رونویسی ژن‌ها عمل خود را اعمال می‌کند. یکی از اهداف احتمالی عمل اکسین از این لحاظ القای بیان ژن cdc_2 است که یک پروتئین کیناز کلیدی و مهم در سیکل سلولی را به رمز در می‌آورد. نشان داده شده است که در پروتوپلاست‌های سلول‌های برگ یونجه اکسین به تنهایی می‌تواند موجب انباشتگی این پروتیئن گردد [۲۰]. بنابراین با افزایش غلظت 2,4-D در محیط کشت، افزایش تقسیمات سلولی در سطح ریزنمونه ودر نتیجه افزایش وزن تر و خشک کالوس مورد انتظار خواهد بود. تأثیر مثبت 2,4-D در القا و رشد کالوس دارای یک حد آستانه است و پس از این حد، افزایش غلظت این هورمون در محیط کشت اثر بازدارندگی در میزان تقسیم سلولی خواهد داشت و در نتیجه موجب کاهش وزن تر و خشک کالوس خواهد شد [۲۷]. همان طور که از نتایج این بررسی بر می‌آید، افزودن 2,4-D به محیط کشت تا غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر اثرتقویت کننده و ازآن به بعد (در ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D)، اثر ممانعت کننده در افزایش وزن تر و خشک کالوس داشته است. غلظت 2,4-D که در آن بیش‌ترین کالوس‌زایی صورت می‌گیرد، بسته به نوع گونه گیاهی و نوع ریزنمونه متفاوت است [۲۸ و ۲۹].

2,4-D از سنتز کلروفیل وتولید پروتوکلروفیلید a در برگ‌های ٦ تا ۸ روزه جو ممانعت می‌کند [۳۰]. اثرات مشابهی نیز در مورد کلرامفنیکل گزارش شده است [۳۰]. نتایج کار دانشمندان مشخص کرده است که 2,4-D ممکن است مشابه کلرامفنیکل از طریق سنتز یک پروتئین پلاستیدی باز دارنده عمل کند. به نظر می‌رسد که این پروتئین از عمل آنزیم‌های مورد نیاز برای سنتز دلتا آمینو لوولینیک اسید (پیش ساز بیوسنتز کلروفیل در کلروپلاست)، جلوگیری می‌کند و در نتیجه کلروفیل ساخته نمی‌شود [۳۰]. در پژوهش حاضر ایجاد کالوس‌های کرم رنگ در تیمارهای مختلف هورمون 2,4-D که حتی پس از ورود به نور سبز نمی‌شوند، می‌تواند با این اثر هورمون قابل توضیح باشد.

در این تحقیق، در محیط بدون هورمون (شاهد) ساقه‌زایی انجام شد ولی ریشه‌زایی صورت نگرفت. اما برخی تحقیقات نشان می‌دهند که ممکن است در ریزنمونه‌های گرهی برخی از ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی بدون استفاده از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ریشه تشکیل شود. ولی در این حالت در مقایسه با محیط کشت‌هایی که به آن‌ها هورمون اضافه شده است ریشه‌ها کوتاه تر و تعداد آن‌ها کم‌تر است [۲۹ و ۳۱].

در این بررسی بیش‌ترین و کم‌ترین اندام‌زایی (تعداد برگ و ارتفاع بخش هوایی، تعداد و طول ریشه) به ترتیب در غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D صورت گرفت یعنی با افزایش غلظت هورمون اندام‌زایی مهار شده است. در تحقیقات دانشمندان دیگر هم مشخص شده است که مقادیر بالای هورمون 2,4-D، اندام‌زایی را مهار می‌کند [۲٤ و۲٦].

به طور کلی از تحقیقات دانشمندان چنین بر می‌آید که بهترین غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای القای کالوس در ریزنمونه‌ها و باززایی گیاهچه از این کالوس‌ها، بر حسب نوع گونهٔ گیاهی، نوع هورمون استفاده شده در محیط کشت، مرحله نموی و سن گیاه مادری و نوع ریزنمونه، متفاوت خواهد بود [۲۸]. بنابراین به طور یقین و قطع نمی‌توان استفاده از یک تیمار هورمونی مشخص را برای تمام گیاهان و در تمام عملیات کشت بافت گیاهی پیشنهاد کرد بلکه برای هر گونه گیاهی باید به طور جداگانه بررسی شود.

1- in vitro
2- in vivo

به طور کلی با توجه به نتایج تحقیق حاضر پیشنهادات زیر ارائه می‌گردد:

۱- به منظور حداکثر تولید کالوس در مریستم جانبی سیب‌زمینی، از غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D استفاده شود.

۲- به منظور ایجاد بیش‌ترین ریشه و ساقه در کالوس از تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D استفاده شود.

۳- در تحقیقات آینده اثرات دو یا چند نوع تنظیم کنندهٔ رشد گیاهی به طور همزمان بر کشت بافت مریستم سیب‌زمینی بررسی شود.

٤- در تحقیقات آینده اثر این تیمارهای هورمونی بر کشت بافت مریستم انتهای ساقه و یا جوانه‌های موجود روی غده سیب‌زمینی بررسی شود.

٥- در بررسی‌های بعدی با انتخاب دو رقم متفاوت از سیب‌زمینی، فنوتیپ این ارقام در تیمارهای مختلف هورمونی مقایسه شود.

٦- به منظور اطمینان از سالم بودن گیاهچه‌های باززایی شده تست ویروس انجام شود.

۷- در آینده در زمینهٔ جنین‌زایی در کشت بافت مریستم سیب‌زمینی کار شود.

مراجع

[۱] قهرمان، ا، کورموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی)، مرکز نشر دانشگاهی تهران، ۱۳۷۳، صفحهٔ ۲۸۰.

[2] Apia, M., Effect of light on callus induction, Agro Cienecia, 12 (1996) 149-154.

[3]Nagib, A., Hossain, S.A., Alam, M.F., Hossaini, M.M., Islam, R. and Saltana, R., Virus free potato tuber seed production through meristem culture in tropical Asia, Asian Journal of Plant Sciences, 2 (2003) 616-622.

[4]Fik, E.A., El-Din, T.M.N., Mandy, A.M.M. and Ali, A.S., Elimination of potato virus X and comprsion of microtuber productivity of some infected potatoes *in vitro*, Ann. Agri. Sci. Mosttohor, 30 (1992) 195-209.

[۵] پیریک، آر، ال، ام، مبانی کشت بافت‌های گیاهی، ترجمهٔ دکتر عبدالرضا باقری و مهندس مهری صفاری، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۱۳۷٦، صفحهٔ ۳۰۰.

[6] Bapat V. A. and P. S. Roa .1977. Shoot apical meristem culture of *Pharbitis nil* . Plant Science Letters 10:327-334.

[7] Conover R. A. and R. Wlitz .1978. Progress in breeding papayas with tolerance to papaya ring-spot virus. Proc. Fla. State Hort. soc. 21:182-184.

[8] Hussey, G. and Gunn, H.V., Plant production in pea (*Pisum sativum* L. cvs. Puget and Upton) from long-trerm callus with superficial meristems, Plant Science Letters, 37 (1984) 143-148.

[۹] مور، ت، س، بیوشیمی و فیزیولوژی هورمون‌های گیاهی، ترجمهٔ دکتر مهرداد لاهوتی، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۱۳۸۲، صفحهٔ ۳۵۹.

[10]Shakya, P., Panjit, M., Manandhar, A. and Joshi, S.D., Elimination of three viruses from potato cv. Cardinal by meristem culture, J. Inset. Agric. and Anim. Sci. 13 (1993) 89-93.

[11]Dudits, D., Bogre, L. and Gyroyey, L., Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro,* J. Cell Sci. 99 (1997) 475-484.

[12]Jang, Y., Oh, Y., Choi, L., Song, Y., Park, J. and Jang, Y.S., Effect of the concentration and treatment period of colchisine on polyploidy formation of garlic, J. Korean Soc. Sci. 41 (2000) 157-160.

[13]Jones, D.A.C., Hyman, L.J., Tumeseit, M., Smith, P. and Perombelon, M.C.M., Potentioal of potato seed : determination of tuber contamination by *Erwinia carotovora* subsp. Artroceptica by immunoflourescence cloning staning and stock and tuber sampling, Annals of Applied Biology, 124 (1994) 557-568.

[14]Khatun, N., Bari, M.A., Islam, R.S., Huda, Siddique, N.A., Rahman, M.H. and Mollah, M.U., Callus induction and plant regeneration from nodal segment of potato cultivar Diamandt, Journal of Biological Sciences, 3 (2003) 1101-1106.

[15]Murashige, T. and Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, Physiol. Planta, 15 (1962) 473-497.

[16]Dong, C., Effect of growth regulators on sweet potato, Plant Physiology, 12 (2000) 123-126.

[17]Eddriss, M., Badawy, H.M.A., Fathi, S. and El-Barkouki, T.M., Propagation of potato using tissue culture technique, Acta Horticulture, 33 (2000) 434-442.

[18] Chandra, R., Upadhya, M.D. and Thao, K.K., Morphological evaluation of somaclones of potato, J. Indian Potato Assoc. 12 (1985) 88-91.

[19]Ghaffoor, A., Bahra Shah, G. and Waseem, K., *In vitro* response of potato (*Solanum tuberosum* L.) to various growth regulators, Biotechnology, 2 (2000) 191-197.

[20]Pasternak, T., Miscolzi, P., Ayaydin, F., Dudits, T. and Feher, A., Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-drived cells of alfalfa, Plant Growth Regulators, 32 (2000) 129-141.

[21]Kodou, R., Fujime, Y., Fukoda, N. and Amimoto, K., Effects of plant growth regulators and cold storage of bulb on callus formation of garlic, Tec. Bull. of Agriculture, 47 (1995)99-106.

[22]Schneider, E.A. and Whightman, F., Metabolism of auxin in plants, Annual Rev. Plant Physiology, 25 (1974) 487-513.

[23]Ridge, R.W., Bender, G.L. and Rolfe, B.G., Nodul -like structures induced on the roots of wheat seedlings by the additioin of the synthetic auxin 2,4-Dichlorophenoxyasetic acid and the effects of microorganisms, Plant Physiology, 19 (2005) 481-492.

[24]Binh, D.Q., L. E. Heszky, G. Gyulai, Kiss, and Csillag, A., Plant regeneration from callus culture of *Puccinella distance* (L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 18 (1989) 195-200.

[25]Conner, A.J., Tissue culture of *Solanum laciniatum*. New Zealand Journal of Botany, 20 (1981) 1-6.

[26]Dixon, R.A. and Gonzales, R.A., Plant cell culture, Plant Physiology 13 (2002) 456-460.

[27]Haque, M.A., Nath, U.K., Ahmad, Q.N. and Alam, S., Effect of 2,4-D and BAP on *in vitro* regeneration of Garlic, Journal of Biological Sciences, 2 (2000) 771-774.

[28]Tang, G.X., Zhou, W.J., Li, H.Z., Mao, B.Z., Hi, Z.H. and Yoneyama, K., Medium, explant and genotype factors influencing shoot regeneration in oil seed *Brassica* Spp. Journal Of Agronomy and Crop Sciences, 189, (2003) 351.

[29]Turhan, H., Callus induction and growth in transgenic potato genotypes, African Journal of Biotechnology, 3 (2004) 375-378.

[30]Shewry, P.R., Pinfield, N.J. and Stobart, A.K., The effect of 2.4-dichlorophenoxyacetic acid and (2-chloroethyle)-trimethylammo chloride on chlorophyll synthesis in barley leaves, Planta, 101 (1971) 352-359.

[31]Shu, Y., Ying-cai, Y. and Hong-Hu, L., Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Dioscorea zingibrensis*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80 (2005) 157-161.