



"مقاله پژوهشی"

تأثیر تراریزش و تیمارهای هورمونی روی کالوس‌زایی و باززایی کارآمد (*Solanum tuberosum* L.)

سیمین موگوبی^۱, فرهاد نظریان فیروزآبادی^۲, احمد اسماعیلی^۳ و میترا خادمی^۴

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد (نویسنده مسؤول: Nazarian.f@lu.ac.ir)
۳- استاد، گروه گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
۴- دانش آموخته دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۲۴

صفحه: ۳۹ تا ۴۶

چکیده

بهینه‌سازی کشت بافت گیاهی پس از تراریزش برای تولید گیاهچه‌های بیشتر، یکی از اولین اقدامات مهم برای تولید گیاهان تراریخت است. برای بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر روی صفات کالوس‌زایی دو رقم سیب‌زمینی (آگریا و مارفونا)، دو نوع ریزنومونه (برگ و میانگره)، دو نوع غلظت آنتی‌بیوتیک کاناامایسین (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و پنج نوع محیط کشت C، A، B، D1 و D2 در آزمایشی به صورت فاکتوریل با چهار تکرار در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی اجرا گردید. ریزنومونه‌ها توسط ناقل pBIN19 حاوی ژن *nptII* تراریزش شدند. آزمایش‌های مولکولی نشان داد که ژن *nptII* به درستی در ژنوم هر دو رقم سیب‌زمینی درج شده است. میزان کارایی تراریزش به ژنوتیپ ریزنومونه وابسته نبود و کارایی تراریزش در حدود ۳/۶ درصد محسوبه گردید. تجزیه واریانس صفت درصد کالوس‌زایی نشان داد که محیط D2، ریزنومونه برگ، رقم مارفونا با غلظت آنتی‌بیوتیک ۵۰ یکروگرم در لیتر با مقدار ۱۰۰ درصد شناخته شد. کمترین درصد کالوس‌زایی در محیط C با ریزنومونه‌های میانگره مشاهده گردید. در بررسی تأثیر هورمون‌ها بر روی صفت کالوس‌زایی، در صورتی که هورمون زایین به تنهایی استفاده شود، کالوس‌زایی بیشتری در مقایسه با سایر هورمون‌ها مشاهده شد. همچنین ریزنومونه برگ بهتر از ریزنومونه میانگره و رقم مارفونا نیز با حدود ۹ درصد کالوس‌دهی بیشتر، بهتر از آگریا بود. نتایج نشان داد که کالوس‌های حاصل از ریزنومونه‌های میانگره بهتر از کالوس‌های ریزنومونه‌های برگی توانستند گیاهچه تولید کنند. به طور کلی، ریزنومونه‌های برگ رقم مارفونا سیب‌زمینی در حضور هورمون زایین کالوس بیشتری تولید کردند.

واژه‌های کلیدی: باززایی، تراریزش، سیب‌زمینی، کالوس‌زایی، میانگره

روش‌های باززایی پس از تراریزش گیاه سیب‌زمینی است (۶). در روند تولید جنین‌های سوماتیکی و باززایی گیاه سیب‌زمینی، از قطعات ریزنومونه متفاوتی مانند کالوس‌های برگی دیسک‌های ریزگرده، گرهک‌های ساقه‌ای گیاهان حاصل از کشت در شرایط درون‌شیشه‌ای، قطعات میانگره ساقه‌ای و جنین‌های زیگوتی استفاده شده است. با این وجود، هر یک از این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی در مراحل مختلف کشت بافت، نظری فراوانی پایین تراریزش، مقدار کم باززایی، وقوع تنوء سوماکلونال (بهویله در بحث تعییر سطح پلوبیڈی) می‌باشد. از این‌رو، بهینه‌سازی کشت بافت از قطعات ریزنومونه مناسب از جمله برگ، میانگره و ریزگرده سیب‌زمینی برای دستیابی به میزان بالایی از باززایی جهت اهدافی مانند انتقال ژن، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. اگرچه انجام تراریزش در اکثر ارقام مهم تجاری سیب‌زمینی امری متدابول است، اما هنوز هم برخی ژنوتیپ‌ها وجود دارند که پاسخ خوبی به تراریزش نمی‌دهند (۸،۲) و مطالعات نشان می‌دهند که کارایی تراریزش در این گیاه بهشت به نوع ژنوتیپ وابسته است (۹). میزان باززایی در سیب‌زمینی به عوامل متفاوتی مانند نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد (هورمون‌ها)، ژنوتیپ گیاه، نوع و منشاء قطعات ریزنومونه بستگی دارد (۹،۱۰). انتقال ژن به سیب‌زمینی برای مقاصد مختلف از جمله تولید سیب‌زمینی‌های تراریخت مقاوم به آفات و بیماری‌ها، از جمله اهداف استراتژیک برنامه‌های بهترزایی در

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) با تولید سالانه نزدیک به ۴۰۳ میلیون تن محصول به همراه گندم، برنج و ذرت یکی از چهار محصول پر مصرف در دنیاست (۳). چون روش‌های معمول و کلاسیک اصلاح زمان بر و در مورد ژنوم سیب‌زمینی به دلیل طبیعت تترابلولئیدی ($2n=4x=28$) مشکل می‌باشد. لذا مهندسی ژنتیک آن نسبت به سایر گیاهان زودتر و بیشتر مورد توجه بوده است. سیب‌زمینی به دلیل داشتن مزایای همچون سهولت تکثیر، تولید محصول و ماده‌ی خشک بالا، سادگی ایجاد تراریزش، دسترسی به توالی کامل ژنوم، قابلیت نگهداری و همچنین جایگاه این گیاه در مبحث زراعت مولکولی سبب شده است جایگاه ویژه‌ای برای بیان پروتئین‌های نوترکیب پیدا کند (۱۰،۷،۵،۳).

اغلب هدف نهایی هر نوع کشت سلولی، باززایی گیاهان مورد نظر است. برخی گیاهان به خوبی در شرایط درون‌شیشه‌ای باززایی می‌شوند و برخی دیگر مشکل دارند (۱۲،۲۲) درصد باززایی در گیاهان بسته به گونه گیاه، شرایط محیط و ترکیبات هورمونی متفاوت است (۲۰، ۲۴، ۱۵، ۲۰). در همین راستا، تحقیقات متعددی در مورد بهینه‌سازی کشت بافت سیب‌زمینی به منظور انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخت با استفاده از ریزنومونه‌های میانگره، برگ و ریزگردها صورت گرفته است (۲۰، ۱۵، ۲). جنین‌زایی سوماتیکی و یا باززایی مستقیم گیاه از قطعات مختلف ریزنومونه، از جمله مهم‌ترین

۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و غربال شدند. استخراج پلاسمید از کلونی‌های منتخب با استفاده از کیت (شرکت Thermo Fisher) و تایید همسانه‌سازی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) توسط آغازگرهای اختصاصی مربوط به *nptII* (Forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'، Reverse: 5'-GGATAACAAATTACACACAGG-3') انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه یکبار در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل، واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و برای ۵۰ ثانیه، تکثیر DNA الگو در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه و یک چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

کشور است. از آنجایی که انتقال ژن باید به ارقام مهم زراعی صورت گیرد و ارقام آگریا و مارفونا از جمله ارقام مهم زراعی کشور هستند، این تحقیق برای بررسی تأثیر عوامل متعددی مانند نوع ریزنمونه، رقم، غلظت آنتی‌بیوتیک و محیط‌هایی با غلظت هورمونی متفاوت در گیاه سیب‌زمینی پس از تراریزش با اگروباکتری، حاوی ژن مقاومت به کاناامایسین صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

انتقال پلاسمید حاوی ژن به اگروباکتری

پلاسمید pBIN19 حامل ژن *nptII* از باکتری *E.coli* استخراج و به روش انجماد و ذوب به *A.tumefaciens* سویه انتقال داده شد (شکل ۱). باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط کشت LB واجد آنتی‌بیوتیک گزینش گر و نکومایسین ۱۰۰ میکرگرم بر لیتر به صورت شبانه و در دمای

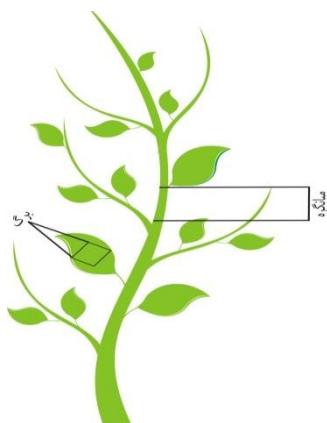


شکل ۱- شماتیک تصویر سازه ژنی برای تراریزش ریزنمونه‌های سیب‌زمینی، p: پروموتور ژن نوپالین سنتتاز؛ nptII: ژن کدکننده نکومایسین فسفرترانسفراز؛ LacZ': خاتمه‌دهنده نوپالین سنتتاز، 'P: جایگاه همسانه‌سازی چندگانه
پایانه‌ی N (اسید آمینه) ژن بتا‌گلاکتوزیداز؛ MCS: مکانیزم انتقال

Figure 1. Schematic representation of the gene construct used for potato transformation. RB: Right border; LB: Left border; Pnos: Nopaline synthetase gene promoter; nptII: Neomycin phosphotransferase gene; Tnos: Nopaline Synthetase; LacZ': N terminus (146 amino acids) beta-galactosidase gene; MCS: Multiple site

پس از گذشت پنج تا شش روز از واکشت، گیاهچه‌ها شروع به ریشه‌زایی و رشد در محیط MS نمودند. از گیاهچه‌های چهار هفت‌های دارای تک گره‌های مناسب برای تهییه ریزنمونه میانگرده و برگ استفاده شد (شکل ۲). ریزنمونه مورد نظر به روش نظریان فیروزآبادی و همکاران (۱۴) در مایع تلقیح حاوی اگروباکتری حاوی سامانه ژنی به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها روی محیط هم‌کشتی MS در تاریکی و در دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سه روز پس از تراریختی زیرنمونه‌ها از محیط هم‌کشتی به محیط گزینشگر انتقال داده شدند.

مواد گیاهی: در این تحقیق از دو رقم سیب‌زمینی تجاری به نام‌های آگریا و مارفونا استفاده شد. این ارقام به صورت گیاهچه‌های کوچک درون‌شیشه‌ای داخل محیط MS از پژوهشکده‌ی بیوتکنولوژی مرکزی اصفهان در نجف‌آباد دریافت شد. به تعداد کافی گیاهچه‌های دارای میانگرده به همراه حداقل یک برگ از هر دو رقم آگریا و مارفونا در محیط کشت پایه MS (۱۳) حاوی سه درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار (pH= ۵/۷)، تحت شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد تکثیر شدند.



شکل ۲- شماتیک یک گیاهچه سیب‌زمینی با تعیین محل ریزنمونه‌ها

Figure 2. Schematic representation of a potato seedling showing the location of explants

میانگرۀ، دو غلظت آنتیبیوتیک کانامایسین (۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) با یک طرح آزمایشی فاکتوریل با چهار تکرار و هر تکرار شامل ده قطعه‌ی ریزنمونه به صورت کاملاً تصادفی روی صفات کالوس‌زایی مورد مقایسه قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در دمای 23 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد در اتاق کشت نگهداری شدند. همچنین میزان درصد کالوس‌زایی بر حسب تعداد ریزنمونه که کالوس تولید کرده است به کل ریزنمونه بسته آمده است. به علاوه، میزان بازازایی از کالوس‌ها نیز مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج این تحقیق پس از بررسی آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از برنامه آماری MSTAT-C تجزیه و تحلیل شدند.

استخراج DNA ژنومی و تایید تراژنی

به منظور تایید تاریختی گیاهچه‌ها DNA ژنومی از گیاهچه بهروش CTAB استخراج شد. واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* اجرا و گیاهچه‌های تاریخت گزینش شدند (۵).

نتایج و بحث

به منظور غربالگری گیاهان به ظاهر تاریخت، DNA ژنومی از این گیاهان تاریخت و شاهد جداسازی شد و کمیت و کیفیت آن با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگار ۱ درصد بررسی گردید. سپس با آزمون PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* روی گیاهان به ظاهر تاریخت نشان داد که ژن *nptII* با موفقیت در ژنوم گیاهان تاریخت وارد شده است (شکل ۳). یک قطعه به طول تقریبی ۸۰۰ bp در گیاهان تاریخت مشاهده شد که نشان می‌دهد ژن مورد نظر در ژنوم سیبزمنی وارد شده است. هیچ قطعه‌ای در گیاه غیر تاریخت مشاهده نشد (شکل ۳).

روش انجام تیمارهای آزمایشی:
در ادامه پس از تاریختی با اگروباکتری از پنج محیط کشت با ترکیبات متفاوتی به شرح زیر استفاده شد.

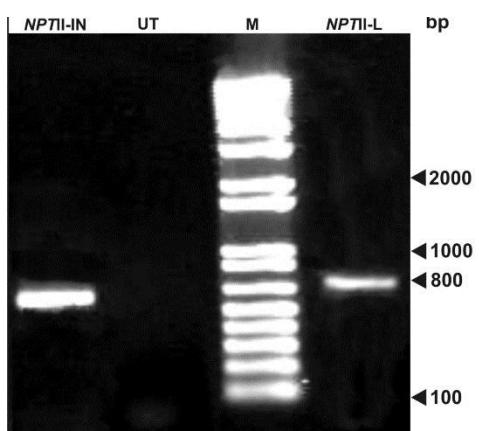
محیط A (محیط بازازایی مستقیم): در این محیط از محیط پایه MS، سه درصد ساکارز و ۰/۰ درصد آگار استفاده شد. در این محیط از ترکیب هورمونی ۱/۸۶ میلی گرم بر لیتر BAP هورمون NAA و ۲/۲۵ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP به مدت پنج هفته استفاده شد، سپس ریزنمونه‌ها برای سه هفته به محیط جدید حاوی ۲/۲۵ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP و ۵ میلی گرم بر لیتر هورمون GA3 منتقل شدند.

محیط B: در این محیط نیز از محیط پایه MS، سه درصد ساکارز و ۰/۰ درصد آگار استفاده شد. در این محیط از ۳ میلی گرم بر لیتر هورمون D ۲، ۴-۰/۰ میلی گرم بر لیتر هورمون کیتینین به مدت چهار هفته و ۱/۸۶ میلی گرم بر لیتر هورمون NAA و ۲/۲۵ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP زمان تشکیل کالوس‌ها و شروع بازازایی استفاده شد.

محیط C: این محیط محتوای نمک‌های MS، ویتامین‌های B5، ۴۰ میلی گرم بر لیتر آدنین‌سولفات، ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۲۰ گرم بر لیتر مانیتول، ۰/۰۲ میلی گرم بر لیتر هورمون NAA، ۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر هورمون GA3، ۲ میلی گرم بر لیتر زأتین و ۹۰۰ میلی گرم بر لیتر از ۲-اتان سولفونیک اسید (MES) بود. همچنین در این محیط جای ساکارز، از گلوكز به عنوان منبع کربن و از مانیتول به عنوان یک ماده اسماوتیک استفاده شد.

محیط D1: در این محیط از ساکارز دو درصد به همراه ۱ میلی گرم بر لیتر هورمون زأتین استفاده شد.

محیط D2: ترکیبات این محیط دقیقاً مشابه محیط D1 بود با این تفاوت که از غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر زأتین استفاده شد. همچنین در محیط‌های پنجگانه‌ی فوق، عکس العمل دو رقم سیبزمنی (آگریا و مارفونا)، دو نوع ریزنمونه (برگ و



شکل ۳- آزمون PCR روی ژن *nptII* به کمک آغازگرهای اختصاصی برای گیاهچه‌های تاریخت حاصل از کالوس برگ (NPTII-L) و کالوس میانگر (NPTII-IN)، M: نشانگر اندازه‌ی 1Kb، (CinnaGen co)

Figure 3. PCR analysis of transgenic seedlings derived from leaf (NPTII-L) and internode callus (NPTII-IN) by using *nptII* gene specific primers. M: 1Kb marker; Ut: non-transgenic seedling.

آماری قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس این داده‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

از ۵ تیمار محیط کشت مورد بررسی، تنها سه محیط (D1، D2 و C) باقیمانده ماند و نتایج آن‌ها مورد تجزیه و تحلیل

جدول ۱- تجزیه واریانس صفت درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها

Table 1. Analysis of variance of callus formation of explants

(S.O.V)	منبع تغییرات	درجه آزادی	DF	میانگین مربعات (MS)
محیط		۲		۳۷/۴*
غلظت آنتی‌بیوتیک		۱		.۰۵۰ ns
محیط × غلظت آنتی‌بیوتیک		۲		.۰۳۳ ns
رقم		۱		۴/۵۹*
رقم × محیط		۲		.۰۰۹۴ ns
رقم × غلظت آنتی‌بیوتیک		۱		.۰۲۶ ns
رقم × غلظت آنتی‌بیوتیک × محیط		۲		.۰۰۷۳ ns
ریزنمونه		۱		۱۸۴/۲۶*
ریزنمونه × محیط		۲		.۹۵/۰۱*
ریزنمونه × غلظت آنتی‌بیوتیک		۱		.۰۰۱ ns
ریزنمونه × غلظت آنتی‌بیوتیک × محیط		۲		.۰۰۴۸*
ریزنمونه × رقم		۱		.۰۰۱ ns
ریزنمونه × رقم × محیط		۲		.۰۰۷۶*
ریزنمونه × رقم × آنتی‌بیوتیک		۱		.۰۰۱ ns
ریزنمونه × رقم × آنتی‌بیوتیک × محیط		۲		.۰۰۷۳ ns
خطا		۷۲		.۰۷۴۷ ns
کل		۹۵		۱۰۷۲/۹۰.۶

**: به ترتیب بی معنی، معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ ns

دامنهای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد بر روی صفت کالوس‌زایی انجام شد (جدول ۲).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل چهارگانه محیط × غلظت آنتی‌بیوتیک × رقم × ریزنمونه با استفاده از آزمون چند

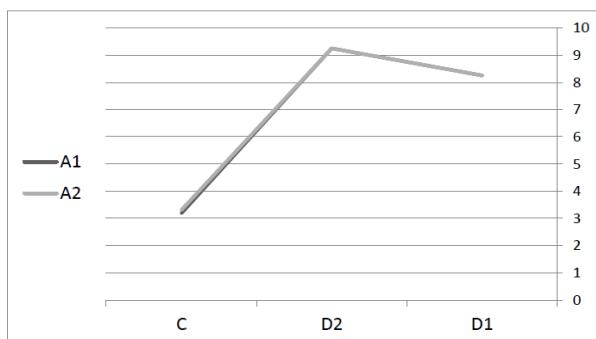
جدول ۲- مقایسه میانگین تاثیر اثر متقابل ریزنمونه × غلظت آنتی‌بیوتیک × محیط × رقم بر درصد کالوس‌زایی. میانگین‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. میانگین‌ها در سطح ۵ درصد با هم مقایسه شده‌اند.

Table 2. Mean comparison of explant × medium × antibiotic × cultivar concentration interaction effects on callus formation. Means with at least one common letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

محیط	آنٹی‌بیوتیک (میلی گرم در لیتر)	رقم	ریزنمونه	درصد کالوس‌زایی
D1	۵۰	اگریا	برگ	bced\h
D1	۵۰	اگریا	میانگره ساقه	۷۷/۵efg
D1	۵۰	مارفونا	برگ	۹.abc
D1	۵۰	مارفونا	میانگره ساقه	۸۷/abcd
D1	۱۰۰	اگریا	برگ	۸۵bcd
D1	۱۰۰	اگریا	میانگره ساقه	۷۷/۵defg
D1	۱۰۰	مارفونا	برگ	۸۷/۵abcd
D1	۱۰۰	مارفونا	میانگره ساقه	۸۷/۵bcde
D2	۵۰	اگریا	برگ	۹.5ab
D2	۵۰	اگریا	میانگره ساقه	۸۵bcde
D2	۵۰	مارفونا	برگ	۱۰۰ a
D2	۵۰	مارفونا	میانگره ساقه	۹.abc
D2	۱۰۰	اگریا	برگ	۹.5ab
D2	۱۰۰	اگریا	میانگره ساقه	۸۷/۵bcd
D2	۱۰۰	مارفونا	برگ	۹.5ab
D2	۱۰۰	مارفونا	میانگره ساقه	۹۲/۵abc
C	۵۰	اگریا	برگ	۶.g
C	۵۰	اگریا	میانگره ساقه	.h
C	۵۰	مارفونا	برگ	۶۷/۵fg
C	۵۰	مارفونا	میانگره ساقه	.h
C	۱۰۰	اگریا	برگ	۶۷/۵fg
C	۱۰۰	اگریا	میانگره ساقه	.h
C	۱۰۰	مارفونا	برگ	fgh
C	۱۰۰	مارفونا	میانگره ساقه	.h

آنٹی‌بیوتیک مشاهده نمی‌شود. همانطور که شکل ۴ دیده می‌شود، به نظر می‌رسد که چه در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و چه در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کاناکامایسین تقریباً اثر یکسانی بر درصد کالوس‌دهی روی محیط‌های مورد استفاده داشته‌اند (شکل ۴).

بر اساس نتایج حاصل، بهترین تیمار با صد درصد کالوس‌زایی عبارت است از محیط D2، ریزنمونه برگ، رقم مارفونا و غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بود و کمترین مقدار کالوس‌زایی در این آزمایش مربوط به محیط C مشاهده شد به طوری که در ریزنمونه میانگره این درصد به صفر رسیده است. در این محیط‌ها تفاوت معنی‌داری در سطوح

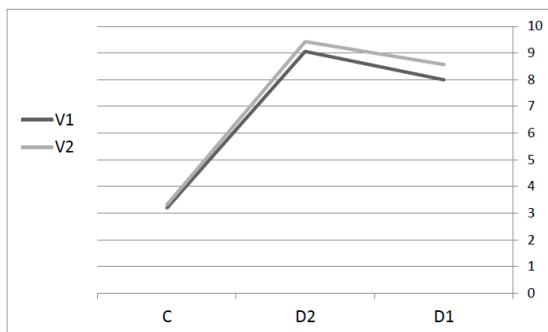


شکل ۴- اثر سطوح مختلف محیط در سطوح مشخص آنتی بیوتیک: A1 و A2 به ترتیب غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک

Figure 4: Effect of different levels of the media on specific levels of antibiotics: D1, D2 and C, types of media levels. A1 and A2 are concentrations of 50 and 100 mg/l of antibiotics, respectively

($p \leq 0.05$) بیشتر از کالوس‌های برگ (۳۷٪) بود. این موضوع نشان می‌دهد که کالوس‌های میانگرۀ از توانایی بالاتری در باززایی برخوردارند. میزان تولید فیتوهورمون‌ها و منبع کربوهیدرات‌ها در ریزنمونه‌های میانگرۀ بیشتر است (۲۱). این موضوع می‌تواند کارایی بالای این ریزنمونه‌ها را در تولید اندام‌های گیاهی توجیه کند (داده‌ها نشان داده نشده است).

در این آزمایش رقم مارفونا کالوس‌زایی بیشتری نسبت به رقم آگریا برای هر دو ریزنمونه برگ و میانگرۀ ساقه از خود نشان داد (شکل ۵). رهنما و همکاران (۱۴) نیز میزان کالوس‌زایی هر دو ریزنمونه برگ و ساقه مارفونا را بیشتر از رقم آگریا گزارش کردند (۱۴). علی‌رغم تولید کالوس بیشتر، میزان باززایی از کالوس‌های میانگرۀ (۷۳٪) به طور معنی‌داری

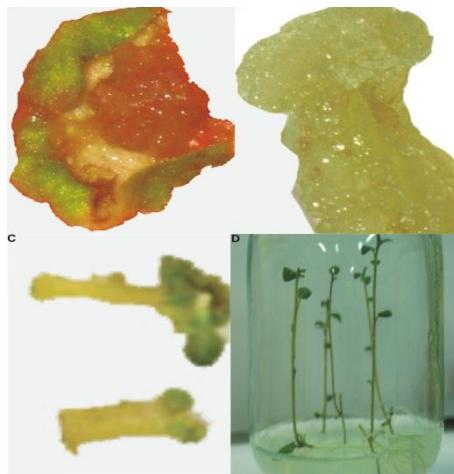


شکل ۵- اثر سطوح مختلف محیط در سطوح مشخص ریزنمونه: E1 و E2 به ترتیب ریزنمونه‌ی برگ و میانگرۀ

Figure 5. The effect of different levels of the media on specific levels of the sample: D1, D2 and C, types of levels of the media. E1 and E2 are leaf and internode explants, respectively

pBIN19 و تفاوت در نوع رقم و ژنوتیپ ممکن است بتواند این نتایج را توجیه کند. سایر تیمارهای این آزمایش به خوبی توانستند سبب کالوس‌زایی در هر دو رقم سبیازمینی شوند (شکل ۶). همانطوری که مشاهده می‌شود، هر دو ریزنمونه‌ی برگ (شکل ۶A) و ریزنمونه‌ی میانگرۀ (شکل ۶B) مبادرت به تولید کالوس در محیط حاوی کانامایسین نمودند.

همچنین نتایج نشان داد که ریزنمونه برگ خیلی زودتر از ریزنمونه میانگرۀ به محیط کالوس‌زایی جواب می‌دهد که با نتایج رهنما و همکاران مغایرت زیادی دارد. همچنین این نتایج در تقابل با نتایج شاه پیری و همکاران (۱۹) است. با این حال، تیمارهای این مطالعه تفاوت‌های فاحشی با مطالعه‌ی شاه پیری و همکاران (۱۹) داشتند. تراریزش با ناقل دوگانه‌ی



شکل ۶- کالوس‌زایی در ریزنمونه‌ها مختلف سیب‌زمینی، (A) ریزنمونه‌ی برگ رقم مارفونا در محیط D2. (B) ریزنمونه‌ی میانگره رقم مارفونا در محیط D2. (C) باززایی و تولید گیاهچه از ریزنمونه‌ی میانگره رقم مارفونا (D) گیاهچه‌های چهار هفتاد روزه از رقم مارفونا

Figure 6. Calllogenesis in different potato explants, (A) Marfona leaf explants in D2 medium (B) Marifona cultivar internode explants in D2 medium. (C) Plant regeneration from Marfona cultivar. (D) Four-week-old Marfona

به طور کلی با مقایسه میانگین کل داده‌ها می‌توان دریافت که محیط D2، رقم مارفونا، ریزنمونه برگ و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کاتامایسین بالاترین درصد کالوس‌زایی را نشان می‌دهد و از آن می‌توان به عنوان مناسب‌ترین تیمار در بین سایر تیمارها برای تولید کالوس در دو رقم آگریا و مارفونای گیاه سیب‌زمینی استفاده کرد. همچنین مشاهدات این آزمایش نشان داد که ریزنمونه برگ خیلی زودتر از ریزنمونه میانگره به محیط کالوس‌زا جواب می‌دهد و هر چه برگ‌ها جوان‌تر و به قسمت راس ساقه نزدیک‌تر باشند، زمان کالوس‌زایی زودتر و حجم کالوس نیز بزرگ‌تر خواهد بود (شکل ۶). نتایج مطالعه‌ی حاضر از جنبه‌ی تولید تعليقی نیز می‌تواند حائز اهمیت باشد. در این چنین مواردی، هر چقدر حجم و میزان کالوس بیشتر باشد، کارایی تولید ترکیبات و از آن جمله متابولیت‌ها نیز بیشتر می‌شود. با این حال، میزان باززایی و تولید گیاهچه از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های میانگره بیشتر بود (داده‌ها نشان داده نشده است)، لذا بیشنهاد می‌شود تا برای تولید گیاهچه از ریزنمونه‌ی میانگره استفاده شود. تاکنون هیچ توضیحی در خصوص علت پاسخ بهتر کالوس حاصل از میانگره در مقایسه با کالوس مربوط به برگ ارائه نشده است.

در مجموع بر اساس نتایج حاصل، محیط D2 درصد کالوس‌زایی) با غلظت هورمون زأتین ۲ میلی‌گرم بر لیتر از محیط D1 (۸۲/۸۱ درصد کالوس‌زایی) با غلظت هورمون زأتین ۱ میلی‌گرم بر لیتر کالوس‌زایی بیشتری نشان داد (شکل ۵). ثباتی و همکاران (۱۸) به نتایج مشابهی روی رقم آگریا رسیدند (۱۸). زأتین از جمله سیتوکینین‌هایی است که اثر بالایی روی میزان کالوس‌زایی دارد، با این حال، محققان تأثیر مشبت آن را همراه با یک اکسین گزارش کردند (۱۱). همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که میزان کالوس‌زایی محیط D1 حدوداً ۲/۵ برابر محیط C بود. بهمود میزان کالوس‌زایی پس از تراریزیش را می‌توان به افزایش میزان هورمون زأتین نسبت داد. این در حالی است که محیط C با دارا بودن ۲ میلی‌گرم بر لیتر زأتین روی صفت کالوس‌زایی تأثیر بازدارنده‌ای داشت. این تأثیر منفی را شاید بتوان به اثر متقابل هورمون‌های NAA و GA3 و یا منبع غذایی گلوگز منتسب دانست. اگرچه نتایج مطالعه حاضر با نتایج رهنما و همکاران (۷) تا حدودی مغایرت داشت اما رهنما و همکاران (۷) این محیط را بهترین محیط برای کالوس‌زایی معرفی کردند، غلظت بالای اکسین NAA و جیرلين GA3 از جمله عوامل بازدارنده کالوس‌زایی است (۷).

منابع

1. Arsenault, W.J. and B.R. Christie. 2004. Effect of whole seed tuber size and pre-plant storage conditions on yield and tuber size distribution of russet burbank. American Journal of Potato Research, 81: 371-376.
2. Ashrafszadeh, S. and D.W. Leung. 2015. Microtuber formation in potato callus. Scienceasia, 41: 1-4.
3. Banerjee, A., S. Prat and A. Hannapel. 2006. Efficient production of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L. ssp *andigena*) plant via agrobacterium mediated transformation. Plant Science, 170: 1732-8.
4. Bakhsh, A. 2020. Development of efficient, reproducible and stable agrobacterium-mediated genetic transformation of five potato cultivars. Food Technology & Biotechnology, ISSN 1330-9862.
5. Beaujean, A., R. Sangwan, A. Lecardonnel and B. Sangwan-Norreel. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. Journal of Experimental Botany, 49: 1589-1595.
6. Bolar, J.P., J.L. Norelli, K.W. Wong, C.K. Hayes, G.E. Harman and H.S. Aldwinckle. 2000. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. Phytopathology, 90: 72-77.
7. De García, E. and S. Martínez. 1995. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. desiree from stem nodal sections. Journal of Plant Physiology, 145: 526-530.
8. Gebru, H., A. Mohammed, N. Dechassa and D. Belew. 2017. Assessment of production practices of smallholder potato (*Solanum tuberosum* L.) farmers in wolaita zone, southern ethiopia. Agriculture & Food Security, 6(1): 31.
9. Gustafson, V., S. Mallubhotla, J. MacDonnell, M. Sanyal-Bagchi, B. Chakravarty, G. Wang-Pruski, C. Rothwell, P. Audy, D. De Koeyer and M. Siahbazi. 2006. Transformation and plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. 'shepody'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 85: 361-366.
10. Jiménez, V.M. and C. Thomas. 2006. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. Springer, 103-118.
11. Komamine, A., R. Kawahara, M. Matsumoto, S. Sunabori, T. Toya, A. Fujiwara, M. Tsukahara, J. Smith, M. Ito and H. Fukuda. 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 28: 11-14.
12. Lam, S.-L. 1977. Regeneration of plantlets from single cells in potatoes. American Potato Journal, 54: 575-580.
13. Mazaheri Kohanestani, H., F. Nazarian-Firozabadi, A. Ismaili and M. Khademi. 2018. Adventitious shoot production using petiole explants through direct regeneration in sugae beet. Journal of Crop Breeding, 24(9): 179-189.
14. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
15. Nazarian-Firouzabadi, F., J.P. Vincken, Q. Ji, L.C. Suurs, A. Buléon and R.G. Visser. 2007. Accumulation of multiple-repeat starch-binding domains (SBD2-SBD5) does not reduce amylose content of potato starch granules. Planta, 225: 919-933.
16. Newell, C., R. Rozman, M. Hinchee, E. Lawson, L. Haley, P. Sanders, W. Kaniewski, N. Tumer, R. Horsch and R. Fraley. 1991. Agrobacterium-mediated transformation of *Solanum tuberosum* L. cv. 'Russet Burbank'. Plant Cell Reports, 10: 30-34.
17. Pazhouhandeh, M., G. Karvan, and R. Atefeh-Sadat. 2017. A review on potato genetic engineering researches yet. Gentic Engineering and Biosafety Journalal, 6(1): 175-188.
18. Rahnama, H., S. Montaser Kohsari, H. Naderi and H. Fahimi. 2012. High frequency plant regeneration from leaf, internode and microtuber explants of potato (*Solanum tuberosum* L.). Iranian Journal of Biology, 25: 120-129.
19. Sabeti, M. 2013. Effects of explants and growth regulators on callogenesis and somatic embryogenesis of agria potato cultivar. International Journal of Agricultural Sciences, 3: 213-221.
20. Shahpiri, A., M. Omidi, P. Ahmadian Tehrani and D. Davoodi. 2004. A study of tissue culture and somaclonal variation in potato. Iranian Journal Agricultural Science, 35: 323-335.
21. Visser, R., E. Jacobsen, B. Witholt and W. Feenstra. 1989. Efficient transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a binary vector in agrobacterium rhizogenes. Theoretical and Applied Genetics, 78: 594-600.
22. Zhang, Y., J. Zhou, T. Wu and J. Cao. 2008. Shoot regeneration and the relationship between organogenic capacity and endogenous hormonal contents in pumpkin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 93: 323-331.
23. Zamanifar, M., F. Nazarian Firouzabadi and A. Ismaili. 2016. Comparative study of two different cytokinins on direct regeneration of different sugar beet explants in tissue culture condition. Journal of Crop Breeding, 19(8): 203-208.

The Effect of Transformation and Hormones Treatments on Callogenesis and Regeneration in Potato (*Solanum tuberosum L.*)

Simin Mogoei¹, Farhad Nazarian Firoozabadi², Ahmad Esmaili³ and Mitra Khademi⁴

1- Graduated M.Sc. Student, Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad

2- Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad (Corresponding author: Nazarian.f@lu.ac.ir)

3- Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad

4- PhD Student, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad

Received: April 19, 2020

Accepted: November 14, 2020

Abstract

To obtain a higher percentage of callogenesis and consequently the maximum number of plantlets, plant tissue culture conditions must be optimized prior to any transformation protocol. To this end, a factorial experiment using completely randomized design (CRD) with four replications was carried out to assess the effect of cultivar (Marfona and Agria), type of explants (leaf and internode), Kanamycin concentration (50 mg/l and 100 mg/l) and medium (A, B, C, D1, D2) on callogenesis. Explants were transformed with pBIN19 construct harboring *nptII*. Analysis of variance of percentage of callogenesis trait showed that effect of tissue culture medium, type of explants, cultivar, type of explants × cultivar, type of explants × medium × kanamycin concentration and type of explants × cultivar × tissue culture medium were significant ($P \leq 0.05$). Results of this study suggested that D2 tissue culture medium containing 2 mg/l zeatin produced a higher amount of callus (92.5 percent). The lowest percentage of callus formation was observed in medium C with internode explants. When zeatin was the only growth hormone regulator, a higher percentage of callogenesis was observed. Moreover, leaf explants exhibited superiority over internode and marfona cultivar over agria counterparts, respectively. Results of these experiments showed that callus tissues from internode explants responded better to shoot regeneration in comparison to leaf driven calli. In conclusion, results of this study suggest, marfona leaf explants in the presence of zeatin can be used for callus induction.

Keywords: Callogenesis, Internodes, Potato, Regeneration, Transformation