دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

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

سیمین موگویی[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲]، احمد اسماعیلی[۳] و میترا خادمی[۴]

۱- دانش‌آموخته 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 مسوول: Nazarian.f@lu.ac.ir)
۳- استاد، گروه گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
۴- دانش‌آموخته دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۱/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۲۴
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 ریزنمونه (برگ و میانگره)، دو نوع غلظت آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و پنج نوع محیط کشت A, B, C، D1 و D2 در آزمایشی به‌صورت فاکتوریل با چهار تکرار در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی اجرا گردید. ریزنمونه‌ها توسط ناقل pBIN19 حاوی ژن *npt*II تراریزش شدند. آزمایش‌های مولکولی نشان داد که ژن *npt*II به‌درستی در ژنوم هر دو رقم سیب‌زمینی درج شده است. میزان کارایی تراریزش به ژنوتیپ ریزنمونه وابسته نبود و کارایی تراریزش در حدود ۳/۶ درصد محاسبه گردید. تجزیه واریانس صفت درصد کالوس‌زایی نشان داد که محیط D2، ریزنمونه برگ، رقم مارفونا با غلظت آنتی‌بیوتیک ۵۰ میکروگرم در لیتر با مقدار ۱۰۰ درصد شناخته شد. کمترین درصد کالوس‌زایی در محیط C با ریزنمونه‌های میانگره مشاهده گردید. در بررسی تأثیر هورمون‌ها بر روی صفت کالوس‌زایی، در صورتی که هورمون زآتین به‌تنهایی استفاده شود، کالوس‌زایی بیشتری در مقایسه با سایر هورمون‌ها مشاهده شد. همچنین ریزنمونه برگ بهتر از ریزنمونه میانگره و رقم مارفونا نیز با حدود ۹ درصد کالوس‌دهی بیشتر، بهتر از آگریا بود. نتایج نشان داد که کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های میانگره بهتر از کالوس‌های ریزنمونه‌های برگی توانستند گیاهچه تولید کنند. به‌طور کلی، ریزنمونه‌های برگ رقم مارفونا سیب‌زمینی در حضور هورمون زآتین کالوس بیشتری تولید کردند.

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

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) با تولید سالانه نزدیک به ۴۰۳ میلیون تن محصول به‌همراه 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 به‌دلیل طبیعت تتراپلوئیدی (2n=4x=28) مشکل می‌باشد. لذا مهندسی ژنتیک آن نسبت به سایر گیاهان زودتر و بیشتر مورد توجه بوده است. سیب‌زمینی به‌دلیل داشتن مزایای همچون سهولت تکثیر، تولید محصول و ماده‌ی خشک بالا، سادگی ایجاد تراریزش[۱]، 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 (۱،۱۶،۷،۵،۳).

اغلب هدف نهایی هر نوع کشت سلولی، باززایی گیاهان مورد نظر است. برخی گیاهان به‌خوبی 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 (۲،۴،۱۵،۲۰). در همین راستا، تحقیقات متعددی در مورد بهینه‌سازی کشت بافت سیب‌زمینی به‌منظور انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخت با استفاده از ریزنمونه‌های میانگره، برگ و ریزغده‌ها صورت گرفته است (۲۰،۴،۱۵،۲). جنین‌زایی سوماتیکی و یا باززایی مستقیم گیاه از قطعات مختلف ریزنمونه، از جمله مهم‌ترین روش‌های باززایی پس از تراریزش گیاه سیب‌زمینی است (۶). در روند تولید جنین‌های سوماتیکی و باززایی گیاه سیب‌زمینی، از قطعات ریزنمونه‌ی متفاوتی مانند کالوس‌های برگی دیسک‌های ریزغده، گرهک‌های ساقه‌ای گیاهان حاصل از کشت در شرایط درون‌شیشه‌ای، قطعات میانگره ساقه‌ای و جنین‌های زیگوتی استفاده شده است. با این‌وجود، هر یک از این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی در مراحل مختلف کشت بافت، نظیر فراوانی پایین تراریزش، مقدار کم باززایی، وقوع تنوع سوماکلونال (به‌ویژه در بحث تغییر سطح پلوئیدی) می‌باشند. از این‌رو، بهینه‌سازی کشت‌بافت از قطعات ریزنمونه‌ی مناسب از جمله برگ، میانگره و ریزغده‌ی 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 متداول است، اما هنوز هم برخی ژنوتیپ‌ها وجود دارند که پاسخ خوبی به ترایزش نمی‌دهند (۸،۲) و مطالعات نشان می‌دهند که کارایی تراریزش در این گیاه به‌شدت 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 ریزنمونه 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 به‌نژادی در

1- Tansformation

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-08]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.39]

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 کانامایسین صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

انتقال پلاسمید حاوی ژن به اگروباکتری

پلاسمید pBIN19 حامل ژن *npt*II از باکتری *E.coli* استخراج و به‌روش انجماد و ذوب به *A.tumefacience* سویه LBA4404انتقال داده‌شد (شکل ۱). باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط کشت LB واجد آنتی‌بیوتیک گزینش‌گر ونکومایسین ۱۰۰ میکرگرم بر لیتر به‌صورت شبانه و در دمای 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 ژن *npt*II (Forward:5′-GTAAAACGACGGCCAG-3′, Reverse: 5′-GGATAACAATTTCACACAGG-3′) انجام شد.

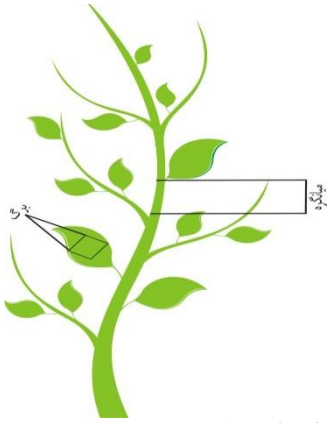
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه یک‌بار در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل، واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و برای ۵۰ ثانیه، تکثیر DNA الگو در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه و یک چرخه تکثیر نهایی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

شکل ۱- شماتیک تصویر سازه ژنی برای تراریزش ریزنمونه‌های سیب‌زمینی، RB: مرز راست؛ LB: مرز چپ؛ Pnos: پروموتور ژن نوپالین سنتتاز؛ *npt*II: ژن کدکننده‌ی نئومایسین فسفوترانسفراز؛حاوی ژن مقاومت به کانامایسین، Tnos: خاتمه‌دهنده نوپالین سنتتاز، LacZ': قسمت پایانه‌ی N (۱۴۶ اسید آمینه) ژن بتاگلاکتوزیداز؛ MCS: جایگاه همسانه‌سازی چندگانه

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

مواد گیاهی: در این تحقیق از دو رقم سیب‌زمینی تجاری به نام‌های آگریا و مارفونا استفاده شد. این ارقام به‌صورت گیاهچه‌های کوچک درون‌شیشه‌ای داخل محیط MS از پژوهشکده‌ی بیوتکنولوژی مرکزی اصفهان در نجف‌آباد دریافت شد. به تعداد کافی گیاهچه‌های دارای میانگره به‌همراه 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 ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد تکثیر شدند.

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 تهیه ریزنمونه میانگره و برگ استفاده شد (شکل ۲). ریزنمونه مورد نظر به‌روش نظریان فیروزآبادی و همکاران (۱۴) در مایع تلقیح حاوی اگروباکتری حاوی سامانه ژنی به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها روی محیط هم‌کشتی[1] MS در تاریکی و در دمای دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سه روز پس از تراریختی زیرنمونه‌ها از محیط هم‌کشتی به محیط گزینشگر انتقال داده شدند.



شکل ۲- شماتیک یک گیاهچه سیب‌زمینی با تعیین محل ریزنمونه‌ها

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

1- Co-cultivation

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-08]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.39]

روش انجام تیمارهای آزمایشی:

در ادامه پس از تراریختی با اگروباکتری از پنج محیط کشت با ترکیبات متفاوتی به شرح زیر استفاده شد.

محیطA (محیط باززایی مستقیم): در این محیط از محیط پایه MS، سه درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار استفاده شد. در این محیط از ترکیب هورمونی ۰/۱۸۶ میلی‌گرم بر لیتر هورمونNAA و ۲/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP به‌مدت پنج هفته استفاده شد، سپس ریزنمونه‌ها برای سه هفته به محیط جدید حاوی ۲/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP و ۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون GA3 منتقل شدند.

محیط B: در این محیط نیز از محیط پایه MS، سه درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار استفاده شد. در این محیط از ۳ میلی‌گرم بر لیتر هورمون 2, 4- D و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون کینتین به‌مدت چهار هفته و ۰/۱۸۶ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA و ۲/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP تا زمان تشکیل کالوس‌ها و شروع باززایی استفاده شد.

محیط C: این محیط محتوای نمک‌های MS، ویتامین‌های B5، ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات، ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۲۰ گرم بر لیتر مانیتول ، ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA، ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون GA3، ۲ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از ۲-اتان سولفونیک اسید (MES) بود. همچنین در این محیط جای ساکارز، از گلوکز به‌عنوان منبع کربن و از مانیتول به‌عنوان یک ماده‌ی اسموتیک استفاده شد.

محیط D۱: در این محیط از ساکارز دو درصد به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون زآتین استفاده شد.

محیط D۲: ترکیبات این محیط دقیقاً مشابه محیط D۱ بود با این تفاوت که از غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر زآتین استفاده شد.

همچنین در محیط‌های پنجگانه‌ی فوق، عکس‌العمل دو رقم سیب‌زمینی (آگریا و مارفونا)، دو نوع ریزنمونه (برگ و میانگره)، دو غلظت آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با یک طرح آزمایشی فاکتوریل با چهار تکرار و هر تکرار شامل ده قطعه‌ی ریزنمونه به‌صورت کاملاً تصادفی روی صفات کالوس‌زایی مورد مقایسه قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد در اتاق کشت نگه‌داری شدند. همچنین میزان درصد کالوس‌زایی بر حسب تعداد ریزنمونه که کالوس تولید کرده است به کل ریزنمونه بدست آمده است. به‌علاوه، میزان باززایی از کالوس‌ها نیز مورد مقایسه قرار گرفت.

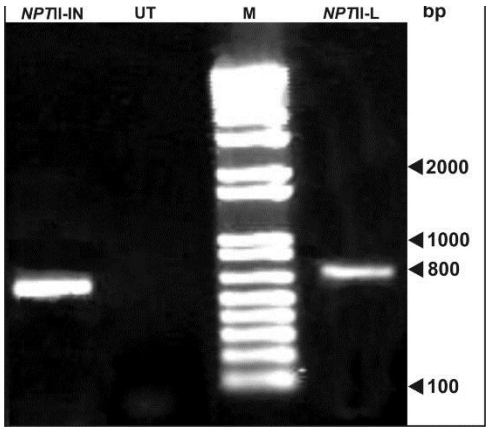
نتایج این تحقیق پس از بررسی آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از برنامه آماری MSTAT-C تجزیه و تحلیل شدند.

استخراج DNA ژنومی و تایید تراژنی

به‌منظور تایید تراریختی گیاهچه‌ها DNAی ژنومی از گیاهچه به‌روش CTAB استخراج شد. واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *npt*II اجرا و گیاهاچه‌های تراریخت گزینش شدند (۵).

نتایج و بحث

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



شکل ۳- آزمون PCR روی ژن *npt*II به‌کمک آغازگرهای اختصاصی برای گیاهچه‌های تراریخت حاصل از کالوس برگ (*npt*II-L) و کالوس میانگره (*npt*II-IN)، M: نشانگر اندازه‌ی 1Kb (CinnaGen co)، Ut: گیاهچه‌ی غیرتراریخت

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-08]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.39]

از ۵ تیمار محیط کشت مورد بررسی، تنها سه محیط (D۱، D۲ و C) باقیمانده ماند و نتایج آن‌ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس این داده‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفت درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها

Table 1. Analysis of variance of callus formation of explants

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی DF	میانگین مربعات (MS)
محیط	۲	۳۱۷/۴*
غلظت آنتی‌بیوتیک	۱	۰/۵۱۰ns
محیط × غلظت‌آنتی بیوتیک	۲	۰/۳۲۳ns
رقم	۱	۴/۵۹*
رقم ×محیط	۲	۰.۰۹۴ns
رقم × غلظت آنتی‌بیوتیک	۱	۰/۲۶۰ns
رقم × غلظت آنتی‌بیوتیک× محیط	۲	۰/۰۷۳ns
ریزنمونه	۱	۱۸۴/۲۶*
ریزنمونه × محیط	۲	۹۵/۰۱۰*
ریزنمونه × غلظت آنتی‌بیوتیک	۱	۰/۰۱۰ns
ریزنمونه × غلظت آنتی‌بیوتیک × محیط	۲	۰/۹۴۸*
ریزنمونه× رقم	۱	۰/۰۱۰ns
ریزنمونه × رقم × محیط	۲	۰/۷۶۰*
ریزنمونه × رقم × آنتی‌بیوتیک	۱	۰/۰۱۰ns
ریزنمونه × رقم × آنتی‌بیوتیک× محیط	۲	۰/۰۷۳ns
خطا	۷۲	۰/۷۴۷ns
کل	۹۵	۱۰۷۲/۹۰۶

ns، *، **: به‌ترتیب بی‌معنی، معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و۰/۰۱

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل چهارگانه محیط× غلظت آنتی‌بیوتیک× رقم× ریزنمونه با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد بر روی صفت کالوس‌زایی انجام شد (جدول ۲).

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

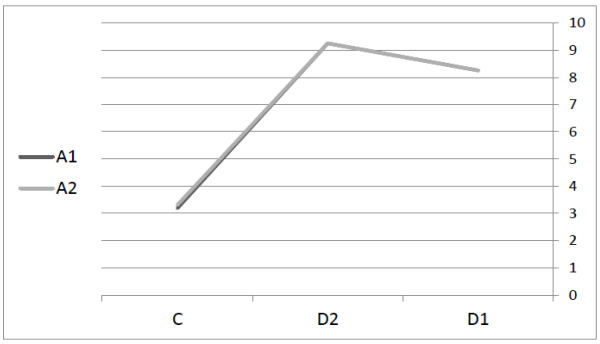
Table 2. Mean comparison of explant× medium× antibiotic× cultivar concentration interaction effects on callus formation. Means with at least one common letter are not significantly different (P≤0.05).

محیط	آنتی‌بیوتیک (میلی گرم در لیتر)	رقم	ریزنمونه	درصد کالوس‌زایی
D1	۵۰	آگریا	برگ	bced۸۵
D1	۵۰	آگریا	میانگره ساقه	۷۲/۵efg
D1	۵۰	مارفونا	برگ	۹۰abc
D1	۵۰	مارفونا	میانگره ساقه	۸۲/۵bced
D1	۱۰۰	آگریا	برگ	۸۵bced
D1	۱۰۰	آگریا	میانگره ساقه	۷۷/۵defg
D1	۱۰۰	مارفونا	برگ	۸۷/۵abcd
D1	۱۰۰	مارفونا	میانگره ساقه	۸۲/۵bcde
D2	۵۰	آگریا	برگ	۹۵ab
D2	۵۰	آگریا	میانگره ساقه	۸۵bcde
D2	۵۰	مارفونا	برگ	۱۰۰ a
D2	۵۰	مارفونا	میانگره ساقه	۹۰abc
D2	۱۰۰	آگریا	برگ	۹۵ab
D2	۱۰۰	آگریا	میانگره ساقه	۸۷/۵bced
D2	۱۰۰	مارفونا	برگ	۹۵ab
D2	۱۰۰	مارفونا	میانگره ساقه	۹۲/۵abc
C	۵۰	آگریا	برگ	۶۰g
C	۵۰	آگریا	میانگره ساقه	۰h
C	۵۰	مارفونا	برگ	۶۷/۵fg
C	۵۰	مارفونا	میانگره ساقه	۰h
C	۱۰۰	آگریا	برگ	۶۷/۵fg
C	۱۰۰	آگریا	میانگره ساقه	۰h
C	۱۰۰	مارفونا	برگ	fg۶۵
C	۱۰۰	مارفونا	میانگره ساقه	۰h

بر اساس نتایج حاصل، بهترین تیمار با صد در صد 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 آنتی‌بیوتیک مشاهده نمی‌شود. همانطور که شکل ۴ دیده می‌شود، به‌نظر می‌رسد که چه در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و چه در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین تقریباً اثر یکسانی بر درصد کالوس‌دهی روی محیط‌های مورد استفاده داشته‌اند (شکل ۴).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-08]

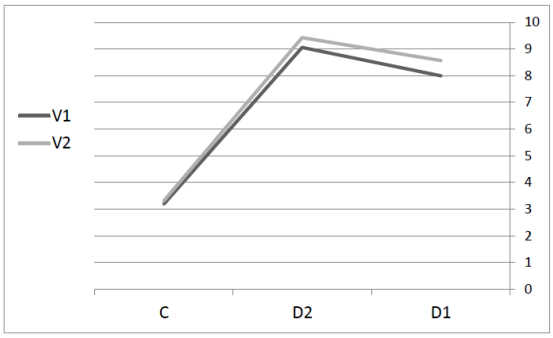
[DOI: 10.52547/jcb.12.36.39]



شکل ۴- اثر سطوح مختلف محیط در سطوح مشخص آنتی‌بیوتیک: D1، D2 وC، انواع سطوح محیط. A1 و A2 به‌ترتیب غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک

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

در این آزمایش رقم مارفونا کالوس‌زایی بیشتری نسبت به رقم آگریا برای هر دو ریزنمونه برگ و میانگره 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 کرده‌اند (۱۴). علی‌رغم تولید کالوس بیشتر، میزان باززایی از کالوس‌های میانگره (۷۳٪) به‌طور معنی‌داری ($p\leq0.05$) بیشتر از کالوس‌های برگ (۲۷٪) بود. این موضوع نشان می‌دهد که کالوس‌های میانگره از توانایی بالاتری در باززایی برخوردارند. میزان تولید فیتوهورمون‌ها و منبع کربوهیدرات‌ها در ریزنمونه‌های میانگره بیشتر است (۲۱). این موضوع می‌تواند کارایی بالای این ریزنمونه‌ها را در تولید اندام‌های گیاهی توجیه کند (داده‌ها نشان داده نشده است).



شکل ۵- اثر سطوح مختلف محیط در سطوح مشخص ریزنمونه: D1، D2 وC، انواع سطوح محیط. E1 و E2 به‌ترتیب ریزنمونه‌ی برگ و میانگره

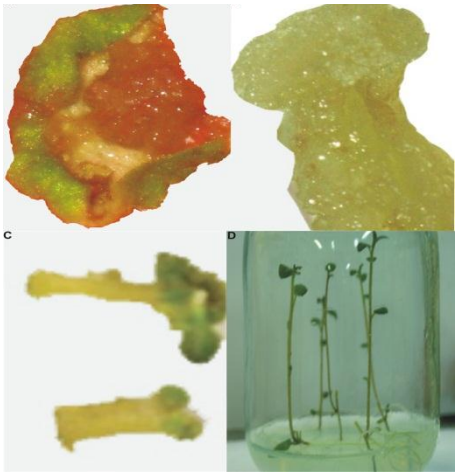
Figure 5. The effect of different levels of the media on specific levels of the sample: D1, D2 and C, types of levels of the media. E1 and E2 are leaf and internode explants, respectively

همچنین نتایج نشان داد که ریزنمونه برگ خیلی زودتر ازریزنمونه میانگره 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 این‌حال، تیمارهای این مطالعه تفاوت‌های فاحشی با مطالعه‌ی شاه پیری و همکاران (۱۹) داشتند. تراریزش با ناقل دوگانه‌ی pBIN19 و تفاوت در نوع رقم و ژنوتیپ ممکن است بتواند این نتایج را توجیه کند.

سایر تیمارهای این آزمایش به‌خوبی توانستند سبب کالوس-زایی در هر دو رقم سیب‌زمینی شوند (شکل ۶). همانطوری که مشاهده می‌شود، هر دو ریزنمونه‌ی برگ (شکل ۶A) ریزنمونه‌ی میانگره (شکل ۶B) مبادرت به تولید کالوس در محیط حاوی کانامایسین نمودند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-08]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.39]



شکل ۶- کالوس‌زایی در ریزنمونه‌ها مختلف سیب‌زمینی، (A) ریزنمونه‌ی برگ رقم مارفونا در محیط D۲. (B) ریزنمونه‌ی میانگره رقم مارفونا در محیط D۲. (C) باززایی و تولید گیاهچه از ریزنمونه‌ی میانگره رقم مارفونا (D) گیاهچه‌های چهار هفته‌ای رقم مارفونا

Figure 6. Callogenesis 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

در مجموع بر اساس نتایج حاصل، محیط D۲ (۹۲/۵ درصد کالوس‌زایی) با غلظت هورمون زآتین ۲ میلی‌گرم بر لیتر از محیط D۱ (۸۲/۸۱ درصد کالوس‌زایی) با غلظت هورمون زآتین ۱ میلی‌گرم بر لیتر کالوس‌زایی بیشتری نشان داد (شکل ۵). ثباتی و همکاران (۱۸) به نتایج مشابهی روی رقم آگریا رسیدند (۱۸). زآتین از جمله سیتوکینین‌هایی است که اثر بالایی روی میزان کالوس‌زایی دارد، با این‌حال، محققان تأثیر مثبت آن را همراه با یک اکسین گزارش کرده‌اند (۱۱). همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که میزان کالوس‌زایی محیط D۱ حدوداً ۲/۵ برابر محیط C بود. بهبود میزان کالوس‌زایی پس از تراریزش را می‌توان به افزایش میزان هورمون زآتین نسبت داد. این در حالی است که محیط C با دارا بودن ۲ میلی‌گرم بر لیتر زآتین 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 (۱۷) تا حدودی مغایرت داشت اما رهنما و همکاران (۱۷) این محیط را بهترین محیط برای کالوس‌زایی معرفی کرده‌اند، غلظت بالای اکسین NAA و جیبرلین GA3 از جمله عوامل بازدارنده‌ی کالوس‌زایی است (۱۷).

به‌طور کلی با مقایسه میانگین کل داده‌ها می‌توان دریافت که محیط D۲، رقم مارفونا، ریزنمونه برگ و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین بالاترین درصد کالوس‌زایی را نشان می‌دهد و از آن می‌توان به‌عنوان مناسب‌ترین تیمار در بین سایر تیمارها برای تولید کالوس در دو رقم آگریا و مارفونای گیاه سیب‌زمینی استفاده کرد. همچنین مشاهدات این آزمایش نشان‌داد 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 خواهند بود (شکل ۶). نتایج مطالعه‌ی حاضر از جنبه‌ی تولید تعلیقی 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 این‌حال، میزان باززایی و تولید گیاهچه از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های میانگره بیشتر بود (داده‌ها نشان داده نشده است). لذا پیشنهاد 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-08]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.39]

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. Ashrafzadeh, 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 & Biotecnology, 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 Jouranal, 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 Sciencec, 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-08]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.39]

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

Simin Mogoei[1], Farhad Nazarian Firoozabadi[2], Ahmad Esmaili[3] and Mitra Khademi[4]

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 *npt*II. 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 pretense of zeatin can be used for callus induction.

Keywords: Callogenesis, Internodes, Potato, Regeneration, Transformation

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-08]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.39]