مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۵، شماره ۲، سال ۱۳۸۳ (۳۳۵-۳۲۳)

بررسی کشت بافت و تنوع سوماکلون در سیب زمینی

آذر شاه‌پیری[۱]، منصور امیدی[۲]، پریچهره احمدیان تهرانی[۳]، داریوش داودی[٤]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
٤، عضو هیات علمی، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/۷/۹

خلاصه

برای مطالعه کشت بافت در سیب زمینی، ابتدا ریزنمونه‌های ساقه حاوی تک جوانه در ۶ نوع محیط کشت MS که از نظر غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد متفاوت بودند، قرار داده شدند. براساس اندازه ساقه رشد کرده از جوانه، بهترین محیط کشت جهت کشت تک جوانه انتخاب شد. سپس با استفاده از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره که از گیاهچه‌های حاصل از کشت تک جوانه به‌دست آمده بودند، اثرغلظت تنظیم‌کننده‌های رشد (2,4-D وکینتین) بر کال‌زایی، اثر رقم ونوع ریزنمونه بر کال‌زایی و باززایی، اثر نور بر کال‌زایی و در نهایت باززایی مستقیم بررسی شد. تنوع سوماکلون از نظر تغییر در سطح پلوئیدی در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره، اندام‌های باززاشده از کالوس‌های حاصل از برگ و میان‌گره و همچنین اندام‌های هوایی باززا شده مستقیم بررسی شد. نتیجه این بررسی، مشاهده تغییراتی مانند دی‌هاپلوئیدی، پنتاپلوئیدی، هگزاپلوئیدی و اکتاپلوئیدی در سلول‌های کالوس بود در حالیکه تغییری در اندام‌های هوایی باززا شده از کالوس و یا باززا شده به طور مستقیم مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: **سیب‌زمینی، برگ، میان‌گره، محیط MS، 2, 4-D - کینتین**

مقدمه

افزایش جمعیت جهان و کاهش منابع تولید فرآورده‌های گیاهی و دامی در جهان یک مشکل جدی و اساسی است که دانشمندان را در دهه‌های اخیر به این فکر ترغیب نموده تا با استفاده از شیوه‌های جدید در حفظ محیط زیست و عدم تغییر بنیادی در طبیعت، دست به تولید بهتر و بیشتر محصولات گیاهی بزنند. یکی از این روش‌های مدرن، استفاده از فناوری کشت سلول و بافت‌های گیاهی است که از این طریق می‌توان نسبت به تکثیر گیاهان مختلف اعم از صنعتی، دارویی، مرتعی و کشاورزی اقدام نمود. علاوه بر این، کشت بافت گیاهی می‌تواند بستر مناسبی جهت حفظ و نگهداری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادری و یا درحال انقراض طبیعت بعنوان منابع با ارزش ژرم پلاسم محسوب شود. همچنین فناوری کشت سلول و بافت‌های گیاهی طی سال‌های اخیر به گونه‌ای توسعه یافته که هم اکنون در سطح گسترده برای انتقال ژن‌های مطلوب به ویژه ژن‌های ایجادکننده مقاومت نسبت به آفات و بیماری‌های گیاهی، مورد استفاده قرار می‌گیرد. بدیهی است اصلاح گیاهان به روش سنتی، علاوه بر وقت‌گیر بودن در بسیاری از موارد امکان پذیر نیست در حالیکه فناوری جدید کشت سلول و بافت گیاهی، این راه را به خوبی هموار ساخته و به پیش می‌برد(۱۵).

سیب زمینی یکی از اولین محصولات غذایی مهم جهان است که تا به حال روش‌های متنوع ومتعددی از کشت بافت در آن با موفقیت صورت گرفته است. از کشت مریستم در سیب‌زمینی به عنوان روشی مناسب جهت نگهداری منابع ژنتیکی، تکثیر ژنوتیپ‌های خاص و حذف ویروس‌ها استفاده کردند (۱۶). استفاده از امتزاج پروتوپلاست‌ها جهت تولید هیبریدهای سوماتیکی در این گیاه صورت گرفت (۱۳). القاء کالوس و اندام‌زایی از آن در بسیاری از ریزنمونه‌ها مانند برگ،

مکاتبه کننده: آذر شاه‌پیری

ساقه و گل صورت گرفت (۳، ۱۴). در سال ۱۹۹۰ برای اولین بار در چهارمین کنگره بین‌المللی کشت بافت گیاهی، تولید ریزغده به شکل انبوه را در شرایط این‌ویترو گزارش شد (۳). کاردی و همکاران (۱۹۹۳) به بررسی تاثیر محیط کشت و ژنوتیپ در باززایی از ریزنمونه‌های برگ سیب‌زمینی پرداختند. کارپوتو و همکاران (۱۹۹۵) نیز اثر ریزنمونه و ژنوتیپ بر کال‌زایی و باززایی را مورد بررسی قرار دادند.

اگر چه کشت بافت گیاهی اصولا روشی برای کلون کردن ژنوتیپ‌های خاص می‌باشد و همیشه این فرض مورد قبول بوده است که گیاهان حاصل از کشت بافت، شبیه والدین می‌باشند ولی گاهی تنوعات فنوتیپی در بین گیاهان باززاشده مشاهده می‌شود که به این تنوعات ایجاد شده، تنوعات سوماکلون گفته می‌شود(۹).

تنوع سوماکلون، در اصل تغییرات ژنتیکی است که پاره‌ای از تغییرات دیگر مورفولوژی، بیوشیمی و امثال آن را به دنبال دارد. تنوع سوماکلون در گیاهان به طور عمده در سیستم‌های باززایی که در آن گیاه مرحله کالوس را طی می‌کند، دیده می‌شود. لارکین و اسکوکرافت تنوع سوماکلون را در گیاهان باززا شده سیب‌زمینی که مرحلهٔ کالوس را طی کرده بودند، مشاهده کردند. ایوانز با انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای بر روی گیاهان باززاشده مشاهده شد که نه تنها عملکرد، بلکه صفاتی مانند زمان بلوغ، صفات غده مانند شکل، اندازه، تعداد و رنگ آن تغییر کرد (۱۹). کریسن وکارپ گیاهان باززا شده در شرایط این‌ویترو را بر اساس تعداد کروموزوم به سه دسته تتراپلوئید، آنیوپلوئید در سطح تتراپلوئید و اکتاپلوئید و یا آنیوپلوئید در سطح اکتاپلوئید تقسیم کردند (۳).

در این تحقیق، ابتدا به بررسی کشت بافت سیب زمینی و چگونگی تأثیر عواملی از جمله تنظیم‌کننده‌های رشد، ژنوتیپ، نوع ریزنمونه و نور در کشت تک جوانه، کال‌زایی و باززایی سیب زمینی در شرایط این‌ویترو پرداخته شد و سپس تنوع سوماکلون از نظر تغییر در سطح پلوئیدی کروموزوم‌ها در کالوس‌ها و اندام‌های باززاشده از کالوس و یا باززاشده مستقیم از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

شش رقم سیب زمینی به نام‌های آگریا، دیامنت، آژاکس، سانته، کنکورد و کاسموس که از ارقام تجاری با مبدا خارجی هستند، از مرکز تحقیقات اصلاح نهال و بذر کرج تهیه شده و در سال ۱۳۷۹ در گلخانه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی کرج در گلدان‌های ۲۵ سانتیمتری حاوی ماسه کاشته شدند و از زمانی که ارتفاع بوته‌ها به حدود ۱۰ سانتیمتر رسید، ساقه‌های جوان از قسمت انتهایی گیاه جدا شده و در داخل کیسه‌های پلاستیکی از گلخانه به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

کشت تک جوانه[1]

منظور از کشت تک جوانه، جدا کردن یک جوانه به همراه قسمتی از ساقه، به منظور تشکیل ساقه از طریق نموجوانه است. این روش، طبیعی‌ترین روش تکثیر رویشی گیاهان در شرایط این‌ویترو است. برای اجرای این آزمایش، ابتدا محیط کشت پایه MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، شش گرم در لیتر آگار و pH برابر ۵/۶ با ترکیبات هورمونی متفاوت به نام‌های A، B، C ، D، E و F تهیه شد(جدول ۱). محیط‌های کشت در اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار یک بار سترون شده و در ظروف شیشه مربایی سترون توزیع گردیدند. ریزنمونه‌های ساقه پس از قرار گرفتن در الکل ٪۷۰ به مدت یک دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر، درمحلول وایتکس(حاوی ٪۵/۲۵ هیپوکلریت‌سدیم) ٪۸۰، همراه با دوقطره توین بیست ٪۰/۱ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس سه بار با آب مقطر سترون شسته شده و پس از تقسیم به قطعات یک سانتیمتری حاوی یک جوانه، روی محیط کشت جامد در ظروف شیشه مربایی (پنج ریزنمونه در هر شیشهٔ مربایی) کشت شدند. ظروف کشت شده تحت شرایط سترون در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد وطول روز۱۶ساعت روشنایی(۷۵ میکرومول بر مترمربع‌برثانیه) در اتاقک رشد قرار داده شدند و پس از گذشت ۳۰ روز، رشد جوانه جانبی اندازه‌گیری شد. این آزمایش در یک طرح کاملا تصادفی با شش تیمار و پنج تکرار انجام شد.

1. Single-node culture

جدول ۱ـ نوع وغلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در کشت تک جوانه

محیط کشت	غلظت NAA (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت سیتوکنین (میلی‌گرم بر لیتر)
A	۰/۰	۰/۰
B	۰/۰	۲/۵BAP
C	۰/۱	۲/۵BAP
D	۰/۱	۰/۰
E	۰/۰	۲/۵Kinetin
F	۰/۱	۲/۵Kinetin

اثر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر کال‌زایی

جهت بررسی اثر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر کال‌زایی[1]، اثر سه غلظت 2,4-D (۱، ۲و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و سه غلظت کینتین (۰ ، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با پنج تکرار در ریزنمونه‌های میان‌گره سیب زمینی در محیط کشت پایهMS با همان شرایط آزمایش قبل و ۹ ترکیب هورمونی(جدول۲) بررسی شد. به این صورت که ریز نمونه های میان‌گره رقم آگریا به طول پنج میلی‌متر که از گیاهچه‌های حاصل از کشت تک‌جوانه به‌دست آمدند و نیاز به ضدعفونی نداشتند بر روی این محیط‌ها در ظروف پتری (در هر ظرف ۱۰ ریز نمونه) کشت شدند و در دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد و ۱۶ ساعت روشنایی (۷۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) قرار داده شدند. زمان شروع القاء کالوس یادداشت شد و بعد از گذشت۳۰ روز، حجم کالوس با استفاده از روش استاندارد هوکر و نی‌برز، درصد تولید کالوس و تعداد ریشه حاصل از کالوس اندازه‌گیری گردید. سپس کالوس‌های به دست آمده از هر محیط کشت تحت شرایط سترون به قطعاتی مساوی به قطر هشت میلی‌متر تقسیم و در همان محیط قبلی خود واکشت شدند. کالوس‌های واکشت شده تقریبا ۷-۶ روز پس از واکشت مجددا شروع به رشد کردند. پس از گذشت ۳۰ روز حجم کالوس با استفاده از روش استاندارد هوکرونی‌برز، اندازه‌گیری شد و بدین‌ترتیب اثر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر رشد کالوس پس از واکشت نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

1. Callus induction

جدول ۲- غلظت تنظیم کننده‌های رشد در هر محیط کشت مورد استفاده جهت القاء کالوس

محیط کشت	غلظت 2,4-D (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت کینتین (میلی‌گرم بر لیتر)
A	۱	۰
B	۱	۰/۰۱
C	۱	۰/۰۱
D	۲	۰
E	۲	۰/۰۱
F	۲	۰/۱
G	۳	۰
H	۳	۰/۰۱
I	۳	۰/۱

اثر رقم و نوع ریزنمونه برکال‌زایی و باززایی

ریزنمونه‌های میان‌گره با طول تقریبی پنج میلی‌متر و ریزنمونه‌های برگ به طول و عرض پنج میلی‌متر از شش رقم مورد مطالعه بر روی محیط کشت MS (حاوی ٪۳ ساکارز و ٪۰/۶ آگار و pH = ۵/۶) غنی شده با ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین قرارداده شدند(۱۸). ظروف پتری کشت شده، تحت دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتیگراد و تاریکی کامل قرار داده شدند. زمان شروع القاء کالوس یادداشت شد و بعد از۳۰ روز، حجم کالوس تولید شده، درصد تولید کالوس و تعداد ریشه‌های حاصل از کالوس اندازه‌گیری شد.

کالوس‌های به دست آمده از دو نوع ریز نمونه برگ و میان‌گره از ۶ رقم مورد مطالعه، پس از جداشدن از ریزنمونه‌های مادری خود، بر روی محیط MS (حاوی ٪۳ ساکارز و ٪۰/۶ آگار، pH = ۵/۶) با ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و۰/۱۸۶ میلی‌گرم در لیتر NAA (کارپ و همکاران، ۱۹۸۴)، قرار داده شدند(۱۲) و سپس به اتاقک رشد با دمای °C ۱ ± ۲۵ و طول روز ۱۶ ساعت روشنایی (۷۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) انتقال داده شدند و بعد از۳۰ روز، درصد باززایی، تعداد ساقه حاصل از کالوس و طول ساقه اندازه‌گیری شد.

اثر نور بر تولید کالوس

به منظور بررسی اثر نور بر تولید کالوس، ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره در محیط کشت مناسب جهت القاء کالوس قرار داده

شدند. سپس تعدادی از ظروف پتری حاوی ریزنمونه‌های میان‌گره و برگ به اتاقک رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد و طول روز ۱۶ ساعت روشنایی انتقال یافتند. همچنین تعدادی ظروف پتری کشت شده در تاریکی کامل قرار داده شدند و بدین ترتیب مقایسه‌ای از نظر تولید کالوس در ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره در دو شرایط نور و تاریکی انجام شد.

باززایی مستقیم

جهت انجام این بررسی، از سه دستور العمل A، B و C پیشنهاد شده توسط محققین برای باززایی مستقیم استفاده شد که عبارت بودند از:

A) ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 (۴).

B) ۰/۱۸۶ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 برای ۱۵ روز و سپس ۲/۲۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 (۶).

C) ۰/۱۸۶ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای ۱۵ روز و سپس ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 برای ۳۵ روز (۱۲).

ریزنمونه‌های میان‌گره رقم کنکورد به طول پنج میلی‌متر و ریزنمونه‌های برگ به ابعاد پنج میلی‌متر از گیاهچه‌های سیب زمینی به دست آمده از طریق کشت بافت، تهیه شده و بر روی محیط‌های کشت تهیه شده طبق دستورالعمل‌های بالا کشت و سپس تحت دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد و طول روز ۱۶ ساعت روشنایی قرار داده شدند (۶).

محاسبات آماری

پس از انجام اندازه‌گیری‌های لازم در آزمایشگاه، داده‌های به دست آمده در نرم‌افزار EXCEL ذخیره گردید. داده‌ها در طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن انجام شد.

مطالعهٔ سیتوژنتیک در ریشهٔ گیاهان شاهد، کالوس‌ها و اندام‌های باززا شده

جهت تعیین مناسب‌ترین روش برای مشاهده کروموزوم‌ها، غده‌هایی از سیب زمینی حاوی جوانه در لابلای روزنامه‌های مرطوب در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. بعد از ۴-۳ روز، ریشه‌های ایجاد شده به طول‌های ۱/۵-۱، ۲/۵-۲ و ۴-۳ سانتیمتر در زمان‌های مختلف(۸صبح، ۱/۵ بعدازظهر، ۵ عصر و ۸ شب) مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین پیش تیمارهای مختلف آب سرد صفر درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، α-برمونفتالین[1] اشباع به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه، کلشی‌سین[2] ۰/۲میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲ و۴ ساعت در دمای آزمایشگاه، ۸- هیدروکسی کینولئین[3] ۰/۰۰۲ مولار به مدت ۲ و ۴ ساعت در دمای°C ۴ وقراردادن غده دارای ریشه در سرمای یخچال به مدت ۳-۲ ساعت و سپس قراردادن غده در دمای آزمایشگاه، استفاده شد.

جهت تثبیت از محلول اسید استیک: الکل مطلق به نسبت ۳:۱ به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد. برای هیدرولیز از اسید کلریدریک یک نرمال به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ °C و یا دمای آزمایشگاه استفاده شد. جهت رنگ آمیزی سه رنگ استوکارمن،فوشین واستواورسئین مورد بررسی قرار گرفت. تهیهٔ نمونهٔ متافازی با استفاده از روش اسکواش در ریشه‌های تیمار شده صورت گرفت و سپس مشاهده کروموزوم با استفاده از میکروسکوپ انجام شد.

کالوس‌های به دست آمده برروی ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره در پتری‌های جدید حاوی محیط کشت واکشت شدند. ۶ الی ۷ روز پس از واکشت، زمانی که کالوس‌ها شروع به رشد مجدد نمودند، از مناطق مریستمی فعال که به راحتی از زیر بینوکولر قابل تشخیص بودند، قطعه‌ای از بافت کالوس برداشته شد و بلافاصله در پیش تیمار (۸ ـ هیدروکسی کینولئین) گذاشته شد. تمام مراحل جهت مشاهده کروموزوم‌ها در سلول‌های کالوس مشابه مراحل انجام شده برای مطالعه در ریشه گیاهان شاهد بود ولی باتوجه به سخت و فشرده بودن برخی از کالوس‌ها، زمان هیدرولیز با HCl یک نرمال، ۱۲ دقیقه در نظر گرفته شد.

به منظور مطالعه سیتوژنتیک در اندام‌های هوایی باززاشده از کالوس و یا باززاشده مستقیم، ابتدا اندام‌های هوایی در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده رشد جهت ریشه‌زایی قرار داده

1-α-Bromo naphtaline
2-Colchicine
3-Hydroxy quinoline

شدند و مطالعه سیتوژنتیک به منظور تعیین سطح پلوئیدی از ریشه‌های حاصل از اندام‌های هوایی باززاشده صورت گرفت.

نتایج و بحث

کشت تک جوانه

تجزیه واریانس نشان داد که اثر محیط کشت بر روی رشد جوانه جانبی بسیار معنی‌دار است (درسطح ٪۱). جدول مقایسه میانگین دانکن (جدول ۳) نشان می‌دهد که سیتوکنین از نوع BAP نسبت به کینتین بر روی رشد جوانه جانبی مؤثرتر است به طوریکه رشد جوانه جانبی در دو محیط B و C نسبت به دو محیط E و F بیشتر بوده است که با نتایج به دست آمده توسط آندراد و اچوریگری، مطابقت دارد(۱).

جدول ۳ـ مقایسه میانگین‌های طول ساقه در انواع محیط کشت(مقایسه میانگین‌ها طبق روش دانکن در سطح ٪۵)

نام محیط کشت	طول ساقه (سانتیمتر)
A	۲/۵ e
B	۷/۵ b
C	۱۰/۱ a
D	۱ f
E	۴ d
F	۵/۶ c

همچنین نتایج نشان می‌دهد که اضافه کردن NAA (یک منبع اکسین) به میزان ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در کنار منبع سیتوکنینی (BAP یا کینتین) باعث افزایش رشد جوانه جانبی می‌شود به طوریکه رشد جوانه جانبی در محیطC نسبت به محیط B و در محیط F نسبت به محیط E بیشتر بوده است. هرچند که در تحقیقاتی که توسط آندرید و اچوریگری(۱۹۹۹) صورت گرفت، افزودن NAA به محیط کشت هیچگونه تأثیری در افزایش رشد جوانه جانبی نداشت.

به طورکلی هرچند که در محیط A (فاقد تنظیم‌کننده رشد)، جوانه جانبی در تمام ریزنمونه‌های کشت شده رشد کرد ولی نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که استفاده از مقدار قابل‌توجهی از سیتوکنین مانند BAP همراه با مقدار کمی اکسین مانند NAA در رشد جوانهٔ جانبی اثر قابل توجهی خواهد داشت به طوریکه در این آزمایش محیط C حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به عنوان بهترین محیط کشت جهت کشت تک جوانه در سیب زمینی معرفی می‌گردد.

تولید کالوس به مقدار بسیار ناچیز بر روی ریزنمونه‌های کشت شده در محیط های D،C و F که حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (اکسین) بودند، صورت گرفت ولی تولید کالوس در سه محیط دیگر که فاقد منبع اکسینی بودند، مشاهده نشد و این با نتایج کریکوریان (۱۹۸۸) که وجود اکسین را در تولید کالوس به عنوان یک عامل اساسی معرفی کرده است، مطابقت دارد .

اثر غلظت 2,4-D و کینیتین بر کال‌زایی

تجزیه واریانس نشان داد که اثرغلظت 2, 4-D برروی حجم کالـــوس و زمان شروع القاء کالوس بی‌معنی است در حالیکه اثر آن بر روی درصد کال‌زایی $\frac{\text{تعداد ریز نمونه که کالوس تولید کرده است}}{\text{کل ریز نمونه}}$ در سطح ٪۵ و تعداد ریشه ایجاد شده بر روی کالوس در سطح ٪۱ معنی‌دار است.

جدول مقایسه میانگین دانکن (جدول ۴) که به مقایسه اثرات اصلی غلظت 2,4-D بدون در نظر گرفتن عامل دوم (کینتین) می‌پردازد، نشان می‌دهد بین سه غلظت 2,4-D استفاده شده در این آزمایش از نظر درصد کال‌زایی و تعداد ریشه بر روی کالوس اختلاف معنی‌داری وجود دارد به طوریکه بالاترین درصد کال‌زایی و تعداد ریشه برروی کالوس در کمترین مقدار2,4-D (۱ میلی‌گرم در لیتر) به دست آمده است و استفاده از مقادیر بیشتر 2,4-D، درصد کال‌زایی و تعداد ریشه برروی کالوس را کاهش داده است. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط نیوکامب مطابقت دارد (۱۵).

وجود کینتین در تولید کالوس ضروری نیست به طوریکه حتی در سه محیط کشت A، D و G (جدول ۲) که فاقد کینتین بودند نیز کالوس تولید شد. بنابراین حضور یک منبع اکسین به تنهایی برای القاء کالوس در ریزنمونه‌های میان‌گره سیب زمینی کافی است . با این حال تجزیه واریانس اثر معنی‌دار غلظت کینتین برروی حجم کالوس، درصد کال‌زایی، زمان شروع القاء کالوس و تعداد ریشه حاصل بر روی کالوس را نشان داد. بنابراین اگرچه حضور کینتین برای تولید کالوس

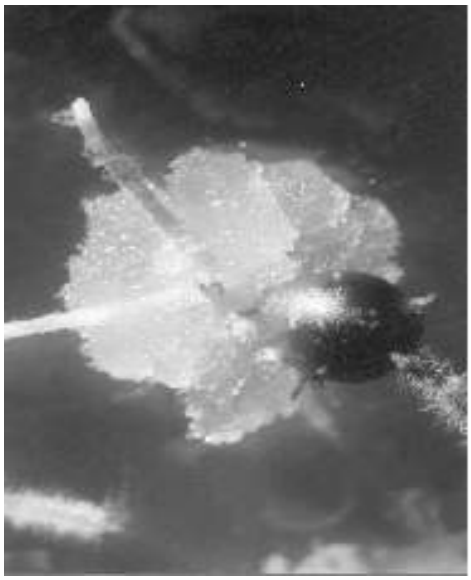
ضروری نیست ولی اثر غلظت آن برروی صفات ارزیابی شده معنی‌دار است. جدول مقایسه میانگین (جدول ۵) نشان می‌دهد که بالاترین میزان حجم کالوس، درصد کال‌زایی، تعداد ریشه برروی کالوس و زمان شروع القاء کالوس در سطح دوم غلظت کینتین (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) حاصل شده است. فقدان کینتین در محیط کشت باعث کاهش حجم کالوس، درصد کال‌زایی و زمان شروع القاء کالوس نسبت به مصرف کینتین در سطح ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر شده است. به نظر می‌رسد استفاده از غلظت بالاتر کینتین در حدود ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر (۱۰ برابر سطح دوم) باعث کاهش درصد کال‌زایی و تعداد ریشه حاصل برروی کالوس شده است. اگرچه ازنظر حجم کالوس و زمان شروع القاء کالوس، اختلاف معنی‌داری بین سطوح۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر وجود ندارد.

همچنین تجزیه واریانس وجود اثر متقابل معنی‌داری را بین غلظت2,4-D و کینتین برروی تمام صفات ارزیابی شده نشان داد.جدول مقایسه میانگین دانکن (جدول۶) نشان می‌دهد که محیط‌های کشتH (۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) و I (۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) بهترین محیط‌های کشت از نظر تولید کالوس با حجم بالا هستند. بنابراین اگرچه در مقایسه میانگین مربوط به آثار اصلی 2,4-D اختلاف معنی‌داری بین سه سطح ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر2,4-D از نظر حجم کالوس مشاهده نمی‌شود با اینحال به دلیل وجود اثر متقابل معنی‌دار بین 2,4-D و کینتین، به نظر می‌رسد که در حضور ۰/۰۱ یا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین، مصرف مقدار بالای 2,4-D از نظر تولید کالوس با حجم بالا مؤثر است.

محیط کشت B (۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) دارای بالاترین میزان درصد کال‌زایی است و پس از آن محیط های H وE نیز از پتانسیل کال‌زایی خوبی برخوردارند (جدول ۶). در مقایسه میانگین مربوط به اثر اصلی 2,4-D (جدول ۴) بین سطوح 2,4-D از نظر زمان شروع القاء کالوس، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. همچنین در مقایسه میانگین مربوط به اثر اصلی کینتین (جدول ۵) مشاهده می‌شود که زمان شروع القاء کالوس درمحیط کشت فاقد کینتین دارای کمترین مقدار می‌باشد. با اینحال به دلیل اثر متقابل بین 2,4-D و کینتین (جدول ۶)، سرعت کال‌زایی در محیط H به طور معنی‌داری از بقیه محیط‌ها بالاتر است (زمان شروع القاء کالوس کمتر است).

تشکیل ریشه برروی کالوس، تولید اندام هوایی نابجا برروی آن را با مشکل روبرو می‌سازد و هرچه برروی کالوس تعداد ریشهٔ بیشتری تشکیل شده باشد، تولید اندام هوایی برروی آن مشکل‌تر می‌شود. لذا هنگامی که هدف از تولید کالوس باززایی است، توصیه می‌شود که محیط کشتی به کار رود که تعداد ریشه کمتری بر روی کالوس تولید کند. جدول مقایسه میانگین (جدول ۶) نشان می‌دهد که در محیط کشت F (۲ میلی‌گرم در لیتر2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) و محیط کشت H (۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین)، کمترین تعداد ریشه برروی کالوس تولید شده است.

در مجموع با درنظر گرفتن تمام موارد بالا، محیط کشت H (۳ میلی‌گرم در لیتر2,4-D و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) به دلیل ظرفیت بالای آن در تولید کالوس با حجم بزرگتر، درصد کال‌زایی بالا، سرعت بالا در تولید کالوس و تعداد ریشه کم برروی کالوس، محیط کشت مناسبی جهت القاء کالوس برروی ریزنمونه‌های میان‌گره سیب زمینی معرفی می‌گردد (شکل ۱).



شکل ۱- تشکیل کالوس و ریزغده در ریزنمونه‌های میان گره در محیط H

جدول ۴ـ مقایسه میانگین بین سطوح غلظت 2,4-D از نظر حجم کالوس، درصد کال‌زایی، تعداد ریشه برروی کالوس، زمان شروع کال‌زایی و حجم کالوس پس از واکشت

غلظت 2,4-D (میلی‌گرم بر لیتر)	حجم کالوس	درصد کال‌زایی	تعدادریشه‌روی کالوس	زمان شروع کال‌زایی (روز)	حجم کالوس پس از واکشت
۱	۱۳/۳۲a	۰/۸۷a	۱/۳۹ a	۵/۱۳ a	۱۵/۵۸ a
۲	۱۳/۵۱a	۰/۷۷b	۰/۹۱ b	۵/۲۲ a	۱۵/۰۲ a
۳	۱۳/۸۶a	۰/۷۷b	۰/۸ b	۴/۸۸ a	۱۳/۱۶ b

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۵ ـ مقایسه میانگین سطوح غلظت کینتین ازنظر حجم کالوس، درصد کال‌زایی، تعداد ریشه برروی کالوس، زمان شروع کال‌زایی و حجم کالوس پس از واکشت

غلظت کینیتین (میلی‌گرم بر لیتر)	حجم کالوس	درصد کال‌زایی	تعدادریشه‌روی کالوس	زمان شروع کال‌زایی (روز)	حجم کالوس پس از واکشت
۰	۱۴/۰۰b	۰/۸۲b	۱/۳۶ a	۴/۷۳ b	۱۵/۰۴ a
۰/۰۱	۱۵/۱۱ a	۰/۹۶a	۱/۵۲ a	۵/۲۴ a	۱۵/۳۵ a
۰/۱	۱۴/۴۳ab	۰/۵۸c	۰/۳۲ b	۵/۲۶ a	۱۳/۳۶ b

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۶- مقایسه میانگین مربوط به اثر متقابل2,4-D × کینتین برروی حجم کالوس، درصد کال‌زایی، تعداد ریشه برروی کالوس، زمان شروع کال‌زایی و حجم کالوس پس از واکشت

نام‌محیط کشت	غلظت‌وترکیب تنظیم‌کننده‌های‌رشد	حجم کالوس	درصدکال‌زایی	تعداد ریشه	زمان شروع کال‌زایی(روز)	حجم کالوس پس از واکشت
A	۱(2,4-D) +۰(Kinetin)	۱۱/۰۴d	۰/۹۰bc	۱/۶۰b	۴/۹۳a	۱۵ a
B	۱(2,4-D) +۰/۰۱(Kinetin)	۱۴/۶c	۱/۰۰a	۲/۳۷a	۵/۲۷a	۱۶/۶۷ a
C	۱(2,4-D) +۰/۱(Kinetin)	۱۱/۰۶d	۰/۵۶e	۰/۹۳bcd	۵/۲۰a	۱۵/۰۵ a
D	۲(2,4-D) +۰(Kinetin)	۱۱/۵۴d	۰/۸۶c	۱/۴۷bc	۵/۴۳a	۱۶/۵۲ a
E	۲(2,4-D) +۰/۰۱(Kinetin)	۱۵/۲ab	۰/۹۳abc	۱/۲۷bcd	a۵/۲۰	۱۴/۶۱ a
F	۲(2,4-D) +۰/۱(Kinetin)	۱۰/۵۶d	۰/۵۳e	۰/۰۰f	a۵/۰۳	۸/۵ b
G	۳(2,4-D) +۰(Kinetin)	۱۰/۵d	۰/۷d	۰/۷۰de	a۵/۲۷	۸/۴ b
H	۳(2,4-D) +۰/۰۱(Kinetin)	۱۶/۵a	۰/۹۶ab	۰/۲۰ef	b۳/۸۳	۱۴/۶۵ a
D	۳(2,4-D) +۰/۱(Kinetin)	۱۶/۱a	۰/۶۶d	۰/۷۷cde	a۵/۵۳	۸/۱ b

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت 2,4-D ، کینتین و اثر متقابل آنها بر روی حجم کالوس در محیط واکشت در سطح ۱٪ معنی‌دار است. مقایسه میانگین سطوح 2,4-D (جدول۴) نشان می‌دهد که مصرف بالاترین سطح 2,4-D (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) باعث رشد کمتری در کالوس شده است. همچنین جدول مقایسه میانگین سطوح کینتین (جدول۵) نشان می‌دهد که مصرف بالاترین سطح کینتین منجر به رشد کمتری در کالوس می‌شود. با این حال به دلیل اثر متقابل معنی‌داری که بین این دوعامل برروی حجم کالوس پس از واکشت وجود دارد، مشاهده می‌شود (جدول ۶) که محیط کشت های A، B، C، D، E و H بدون اختلاف معنی‌داری باهم از نظر تأثیر برروی حجم کالوس محیط‌های مناسبی جهت واکشت می‌باشند و حجم کالوس در محیط های F، G و I به طور معنی‌داری از حجم کالوس در ۶ محیط دیگر کمتر است.

بررسی اثر رقم و نوع ریزنمونه برکال‌زایی وباززایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر رقم برروی حجم کالوس‌های حاصله، زمان شروع القاء کالوس و تعداد ریشه تولید شده برروی کالوس معنی‌دار است و این موضوع با نتایج تحقیقات بارسبی بر روی ۱۶ ژنوتیپ از سیب زمینی، مطابقت دارد(۲). اثر رقم بر روی درصد کال‌زایی معنی‌دار نیست و به نظر می‌رسد تمام ارقام تحت مطالعه در این آزمایش از درصد کال‌زایی بالایی برخوردارند.

جدول مقایسه میانگین دانکن (جدول ۱۰) نشان می‌دهد که بین ۶ رقم موردمطالعه، رقم کنکورد بهترین رقم از نظر حجم کالوس و سرعت کال‌زایی است درحالیکه رقم اگریا از نظر کمتر بودن تعداد ریشه حاصل برروی کالوس که از نظر تولید اندام هوایی در مرحله باززایی اهمیت دارد، رقم مناسب‌تری است.

حجم کالوس تولید شده و درصد کال‌زایی تحت تأثیر نوع ریزنمونه قرار ندارند درحالیکه اثر نوع ریزنمونه برروی صفاتی مانند زمان شروع القاء کالوس و تعداد ریشه حاصل از کالوس کاملا معنی‌دار است. جدول مقایسه میانگین دانکن (جدول ۸) نشان می‌دهد که بین دونوع ریزنمونه مورد استفاده در این آزمایش، برگ هم از نظر سرعت کال‌زایی و هم از نظر تعداد ریشه کمتر برروی کالوس‌های حاصل از آن نسبت به ریزنمونه میان‌گره برتری دارد و این با نتایج تحقیقات کریستوفر و همکاران مطابقت دارد(۱۰).

اثرمتقابل معنی‌داری بین رقم و نوع ریزنمونه از نظر صفاتی مانند حجم کالوس، تعداد ریشه حاصل برروی کالوس و زمان شروع القاء کالوس مشاهده شد. جدول مقایسه میانگین دانکن (جدول ۹) نشان می‌دهد که ریزنمونه‌های برگ رقم کنکورد، بزرگترین کالوس‌ها و ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره در رقم اگریا، کوچکترین کالوس‌ها را تولید می‌نمایند. همچنین ریزنمونه‌های برگ در رقم کنکورد، دارای بالاترین سرعت کال‌زایی و ریزنمونه‌های میان‌گره رقم سانته دارای کمترین سرعت کال‌زایی می‌باشند.

بالاترین تعداد ریشه برروی کالوس حاصل از ریزنمونه‌های میان‌گره در رقم کاسموس تولید می‌شود درحالیکه کمترین تعداد ریشه برروی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های میان‌گره و برگ قرار دارند.

جدول۷ ـ جدول مقایسه میانگین حجم، تعداد ریشه و زمان شروع کال‌زایی بین ارقام موردمطالعه

رقم	حجم کالوس	تعداد ریشه	زمان شروع القاء کالوس (روز)
اگریا	۱۰/۱۴d	۰/۵e	۵/۵a
آژاکس	۱۴/۳۸b	۱/۵de	۵ ab
دیامنت	۱۲/۸bc	۲cd	۵/۸ a
سانته	۱۳/۷۵ bc	۳ c	۴/۸ab
کاسموس	۱۳/۸۹ bc	۱۰a	۴bc
کنکورد	۱۶/۵۲ a	۶b	۳c

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۸ ـ جدول مقایسه میانگین حجم کالوس، تعداد ریشه و زمان القاء کالوس بین ریزنمونه‌های مختلف

ریزنمونه	حجم کالوس	تعداد ریشه	زمان شروع القاء کالوس(روز)
برگ	۱۳/۹۲a	۳/۲ b	۳/۱b
میان‌گره	۱۳/۸۷ a	۵/۹۵ a	۵ a

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۹ ـ مقایسه میانگین مربوط به اثر متقابل رقم × ریزنمونه بر روی حجم کالوس، تعداد ریشه حاصل برروی کالوس و زمان شروع القاء کالوس

رقم	ریزنمونه	حجم کالوس	تعدادریشه	زمان‌شروع‌تولید کالوس(روز)
آژاکس	میان‌گره	۱۴/۲۸bc	۱/۶fg	۵/۱b
	برگ	۱۳/۷۶Cd	۱/۲ fg	۵ b
دیامنت	میان‌گره	۱۴ cd	۲/۵ef	۴/۸ b
	برگ	۱۰/۸۳d	۱fg	۵ b
اگریا	میان‌گره	۱۰/۷ d	۰/۷g	۴/۸ b
	برگ	۱۰/۹ d	۰/۵ g	۳/۵ bc
سانته	میان‌گره	۱۴/۵ bc	۳/۵ de	۶/۸ a
	برگ	۱۲ de	۲/۵ ef	۴ bc
کاسموس	میان‌گره	۱۶ b	۱۵ a	۴/۵ b
	برگ	۱۵/۳۵ bc	۵/۳c	۴/۵ b
کنکورد	میان‌گره	۱۵/۴ bc	۴/۵ cd	۳/۵ bc
	برگ	۱۷/۹۸a	۷ b	۲/۵c

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

در مجموع با درنظر گرفتن تمام موارد بالا به نظر می‌رسد ریزنمونه برگ و رقم کنکورد بهترین نوع ریزنمونه و رقم جهت تولید کالوس با حجم بالا و سرعت کال‌زایی بالا می‌باشد.

همچنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که درصد باززایی، تعداد ساقه بر روی کالوس و طول ساقه تحت تأثیر رقم و نوع ریزنمونه قرار دارد و این موضوع با نتایج کالاک و همکارانش مطابقت دارد(۱۱).

جدول مقایسه میانگین (جدول۱۰) نشان می‌دهد که در بین ارقام مورد مطالعه در این بررسی، رقم کنکورد با میانگین باززایی ۶۱ درصد، دارای بالاترین پتانسیل باززایی است درحالیکه کالوس‌های حاصل از دورقم سانته و کاسموس فاقد باززایی بودند و پس از انتقال به محیط باززایی، هیچگونه عکس العملی در آنها مشاهده نشد که این موضوع را می‌توان تا حدودی به وجود تعداد زیاد ریشه برروی این کالوس‌ها ارتباط داد. با این حال این دلیل قاطعی نیست چون با اینکه میانگین تعداد ریشه‌های برروی کالوس‌های حاصل از رقم کنکورد نسبت به ارقام آژاکس، اگریا، دیامنت و سانته بیشتر است (جدول ۷)، ولی رقم کنکورد دارای بالاترین درصد باززایی است(شکل ۲).

جدول ۱۰ ـ مقایسه میانگین بین ارقام مختلف از نظر درصد باززایی، تعداد ساقه وطول ساقه

واریته	درصد باززایی	تعداد ساقه درکالوس	طول ساقه (سانتیمتر)
آژاکس	۰/۲۹b	۱/۵ b	۱ b
دیامنت	۰/۴۵ab	۲ b	۲ b
اگریا	۰/۳۲ b	۲/۵ b	۱/۵ b
سانته	۰/۰d	۰/۰ c	۰/۰ c
کاسموس	۰/۰ d	۰/۰ c	۰/۰ c
کنکورد	۰/۶۱a	۴ a	۳/۵ a

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

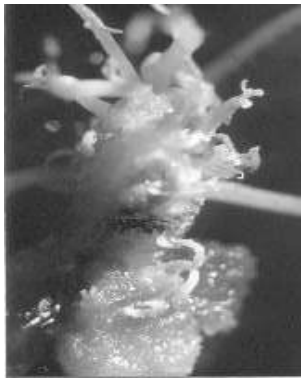
جدول مقایسه میانگین (جدول ۱۱) نشان می‌دهد که کالوس‌های به دست آمده در ریزنمونه‌های برگ دارای پتانسیل باززایی بیشتری نسبت به ریزنمونه‌های میان‌گره بودند و این موضوع با نتایج به دست آمده از تحقیقات شارما و راجام مطابقت دارد(۱۱).

لازم به ذکر است که اثر متقابل معنی‌داری بین رقم و نوع ریزنمونه در صفات مربوط به باززایی مشاهده نشد و بنابراین بر اساس موارد ذکر شده در بالا، رقم کنکورد به عنوان بهترین رقم از نظر باززایی معرفی می‌گردد. به علاوه، این رقم از نظر کال‌زایی نیز رقم مناسبی بود. همچنین کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ از نظر درصد باززایی، طول ساقه و تعداد ساقه نسبت به کالوس‌های حاصل از میان‌گره مطلوبترند.

جدول۱۱ ـ مقایسه میانگین بین ریزنمونه‌های مختلف ازنظردرصدباززایی ، تعداد ساقه وطول ساقه

ریزنمونه	درصد باززایی	تعداد ساقه	طول ساقه (سانتیمتر)
برگ	۰/۴۸ a	۳/۶ a	۳/۵ a
میان‌گره	۰/۱۵ b	۲/۵ b	۲ b

a, b: میانگین‌های دارای حروف مشترک بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۲- باززایی از کالوس حاصل از میان‌گره

اثر نور بر تولید کالوس بر روی ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره

گیاهان از نظر نیاز به شرایط فیزیکی مثل نور و حرارت جهت تولید کالوس باهم متفاوتند. بعضی از گیاهان در نور و بعضی در تاریکی کالوس بیشتری تولید می‌نمایند. در اکثر منابع جهت تولید کالوس در سیب زمینی، محیط تاریکی در نظر گرفته شده است.

دراین آزمایش مشاهده شد که ریزنمونه‌های میان‌گره هم در حضور نور و هم در تاریکی کامل قادر به تولید کالوس بودند در حالیکه ریزنمونه‌های برگ فقط در محیط تاریکی کالوس تولید نمودند و در حضور نور فاقد پتانسیل تولید کالوس بودند. با اینحال تعدادی ریشه به طور مستقیم بدون تشکیل کالوس برروی برگ (مخصوصا ریزنمونه‌های جدا شده از قسمت قاعده

پهنک برگ) تشکیل شد (شکل ۳). کالوس‌های تولید شده برروی ریزنمونه‌های میان‌گره در معرض نور، همگی زرد رنگ با ساختمان سفت و سخت بودند در حالیکه کالوس‌های تولید شده در محیط تاریکی کامل، اکثرا ترد و شکننده، برخی زرد و برخی زرد متمایل به سفید بوده و در ضمن از شادابی و تازگی کمتری برخوردار بودند.

شکل ۳- تولید ریشه بر روی ریزنمونه‌های برگ به طور مستقیم بدون تولید کالوس در شرایط روشنایی

باززایی مستقیم

ریزنمونه‌های برگ تیمار شده براساس دستورالعمل‌های A، B و C فاقد عکس العمل باززایی بودند در حالیکه باززایی مستقیم برروی ریزنمونه‌های میان‌گره براساس دستورالعمل C مشاهده شد. بنابراین برخلاف نتایج به دست آمده از تحقیق انجام شده توسط کاردی و همکاران مبنی بر بیشتر بودن پتانسیل باززایی مستقیم در برگ نسبت به پتانسیل باززایی مستقیم در ساقه و نیز برخلاف نتایج به دست آمده توسط ویسر و همکاران(۱۹۹۱)، کاردی و همکاران (۱۹۹۲) و یاپیکینو و همکاران (۱۹۹۲) که پتانسیل باززایی مستقیم در برگ و میان‌گره را یکسان ارزیابی کرده‌اند، دراین آزمایش هیچگونه باززایی مستقیم در ریزنمونه‌های برگ مشاهده نشد. تقریبا در ۲۵٪ از ریزنمونه‌های میان‌گره تحت تیمار با دستورالعمل C (۰/۱۸۶ میلی‌گرم در لیتر NAA ، ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای ۱۵ روز و سپس ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 برای ۳۵ روز) با تولید ۲-۱ ساقه بر روی هر ریز نمونه باززایی مستقیم مشاهده شد.

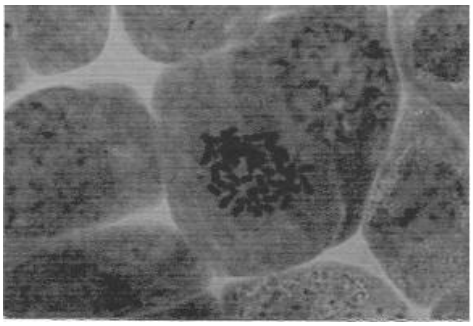
بررسی تنوع سوماکلون

مطالعهٔ سیتوژنتیک در ریشهٔگیاهان شاهد،کالوس‌ها و اندام‌های باززاشده

در بین زمان‌های مختلف قطع کردن ریشه و قراردادن آنها در پیش تیمار تفاوتی مشاهده نشد. از بین طول ریشه‌هایی که جهت مطالعه آزمایش شدند، ریشه‌هایی به طول ۲/۵ ـ ۲ سانتیمتر، مناسب‌ترین طول ریشه جهت بررسی سیتوژنتیک بودند. از بین پیش تیمارهای مختلف، پیش تیمار ۸ ـ هیدروکسی کینولئین به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ $^{\circ}C$ بهترین نتیجه را داد. همچنین برای هیدرولیز، بهترین پاسخ در اثر تیمار با اسیدکلریدریک یک نرمال به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه به دست آمد و جهت رنگ آمیزی نیز استواورسئین رنگ مناسبی تشخیص داده شد.

مطالعه سیتوژنتیک ریشه ارقام مورد مطالعه دراین آزمایش نشان داد که این ارقام همگی ۲n=۴x=۴۸ یا تتراپلوئید بودند (x = ۱۲).

از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره، چهل سلول متافازی خوب تهیه گردید و تعداد کروموزوم آنها شمارش شد و سپس تغییر تعداد کروموزوم از نظر سطح پلوئیدی مورد ارزیابی قرار گرفت. همانطور که جدول زیر نشان می‌دهد، در بین نمونه‌های تهیه شده، سلول‌هایی با ۲۴ کروموزوم (دی‌هاپلوئید)، ۴۸ کروموزوم (تتراپلوئید) (شکل۴)، ۶۰ کروموزوم (پنتاپلوئید)، ۷۲ کروموزوم (هگزاپلوئید) و ۹۶ کروموزوم (اکتاپلوئید) مشاهده شدند.



شکل ۴- یک سلول در مرحله متافاز با ۴۸ کروموزوم در ریشه گیاهان شاهد

اگرچه مقایسهٔ تغییر در تعداد کروموزوم (از نظر سطح پلوئیدی) از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره نیاز به بررسی تعداد زیادی نمونه دارد ولی مقایسهٔ نتایج حاصل

جدول ۱۲- تغییر در تعداد کروموزوم (از نظر سطح پلوئیدی) در ریشه‌های به دست آمده از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره

ریزنمونه	تعدادنمونه تهیه شده	۲n = ۲x = ۲۴ دیپلوئید	۲n = ۴x = ۴۸ تتراپلوئید	۲n = ۵x = ۶۰ پنتاپلوئید	۲n = ۶x = ۷۲ هگزاپلوئید	۲n = ۸x = ۹۶ اکتاپلوئید
برگ	۲۰	۱	۱۵	۰	۲	۲
میان‌گره	۲۰	۰	۱۶	۱	۱	۲

از بررسی ۴۰ سلول متافاز از ریشه‌های تولید شده بر روی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره نشان می‌دهد که از نظر فراوانی تغییر در تعداد کروموزوم تفاوت زیادی بین این دو ریزنمونه وجود ندارد (جدول ۱۲).

جهت مطالعه کروموزومی اندام های هوایی باززا شده، ابتدا اندام های هوایی باززا شده به طور مستقیم و یا اندام‌های هوایی حاصل از کالوس به محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد جهت ریشه‌زایی انتقال داده شدند. تعداد زیادی ریشه از محل قطع شده اندام‌های هوایی و یا گره‌های پایینی آنها ایجاد شد. ریشه‌هایی به طول ۲/۵ـ۲ سانتیمتر جدا شده و بلافاصله در پیش تیمار قرار گرفتند و بقیه مراحل جهت تهیه نمونه متافازی مناسب در زیر میکروسکوپ مانند قبل انجام شد.

اگر چه در مطالعات انجام شده توسط ورسان و دات بر روی گیاهان باززاشده از کالوس، تغییرات پلی‌پلوئیدی مشاهده شد (۱۹) با این حال در نمونه‌های تهیه شده از ریشه‌های به دست آمده از اندام‌های هوایی باززا شده مستقیم (۲۰ نمونه) ویا باززاشده از کالوس(۲۰نمونه) در این تحقیق هیچگونه تغییر کروموزومی مشاهده نشد.

سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از طرح بررسی تنوع سوماکلون در سیب‌زمینی به شماره ۷۱۵/۳/۵۰۵ می‌باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام شده است بدینوسیله مراتب تشکر و سپاسگزاری اعلام می‌گردد.

REFERENCES

1. Andrade, L.B., S.E. Echeverrigaray., F. Fracaro., G.F. Pauletti, & L. Roto. 1999. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 56:79-83
2. Barsby, T.L. & J.F. Shepard. 1983. Regeneration of plants from mesophyl protoplast of solanum species of etuberosa group. Plant Sci. Lett. 31:101-105.
3. Bhojwani, S.S. (ed.). 1990. Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Elsevier, Amsterdam.
4. Bokelmann, G.S. & S. Roest. 1983. Plant regeneration from protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* cv Bintje). Z. Pflanzenphysiol. 109: 259-265.
5. Cardi, T., V. Iannamico., F. D'Ambrosio., E. Filippone, & P.F. Lurquin. 1992. Agrobacterium mediated genetic transformation of *Solanum commersonii*. Plant Sci. 87:179-189.
6. Cardi, I., V. Iannamico, F. D'Ambrosio, E. Filippone, & P.F. Lurquin. 1993. In vitro regeneration and cytological characterization of shoots from leaf explants of three accessions of *Solanum commersoni*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 34:107-114.
7. Carputo, T., T. Cardi, T. Chiari, & L. Frusciante. 1995. Tissue culture response in various wild and cultivated solanum germplasm accessions for exploitaion in potato breeding. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 41:151-158.
8. Centeno, M.L., A. Rodriguez, I. Feito, & B. Fernandez. 1996. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic response in *Actinidia delisiosa* tissue cultures. Plant Cell Rep.16:58-62.
9. Choi, H.W., P.G. Lemaux, & M.J. Cho. 2000. Increased chromosomal variation in transgenic barley (*Hordeum vulgar*) plants. In Vitro Cell. Dev. Biol. 37:217-222
10. Christopher, T. & M.V. Rajam. 1996. Effect of genotype, explant and medium on in vitro regeneration of red paper. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46:245-250.
11. Kalak, H., M. Reidlla, I. Hilpus, & K. Viruma. 1997. Effects of genotype,explant source and growth regulaors on organogenesis in carnaion callus. Plant Cell Tiss. Org. cult. 51:127-135.

12. Karp, A. ,R. Risiott, M.J.K. Jones, & S.W.J. Bright. 1984.chromosome doublingin monohaploid and dihaploid potatoes by regenerationfrom cultured leaf explants. Plant Cell Tiss.Org.Cuit. 3:363-373.
13. Krikorian, A.D. 1988. Plant Tissue Culture: Perceptions and Realities. Proc. Indian Acad. Sci.(Plant Sci.).pp:425-464.
14. Krikorian, A.D. 1994. In vitro methods for plantation crops. In: I.K. Vasil and T.A. Thorpe (eds.), Plant Tissue Culture: Theory and Applications, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
15. Newcomb, W. & D.F. Wetherell. 1970. The effect of 2,4,6-thrichlorophenoxyaceic acid on embryogenesis in wild carrot tissue culture .Bot.Gaz. 131:242-245.
16. Pollard, J.W. & S. Walker (eds.). 1990. Plant Cell and Tissue Culture:Methods in Molecular Biology. Vol. 6, Humuna Press, Clifton.
17. Smith, R.H. 1992. Plant tissue culture (Techniques and Experiments). Academic press. San Diego.
18. Tavazza, R., R.J. Ordas, & G. Ancora.1988. Procedure for regeneration of plants from cell suspansion protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum L.*) cv.Desiree.Plant Sci. 58: 223-230.
19. Wersuhn, G. & U. Dathe. 1998. Genome selection within cell culture of potato and tobacco. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 54:15-20.

Iranian. J. Agric. Sci. Vol. 35, No. 2, 2004

A Study of Tissue Culture and Somaclonal Variation in Potato

A. SHAHPIRI[1], M. OMIDI[2], P. AHMADIAN TEHRANI[3] AND D. DAVOODI[4]
1, 2, 3, Former Graduate Student, Assistant Professor, and Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran 4, Staff Member, Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran
Accepted Oct. 1, 2003

SUMMARY

To study tissue culture in potato, stem explants with axillary buds were cultured on 6 MS media with different types and concentrations of growth regulators. The most suitable medium was specified on the basis of growth of axillary buds. Using internode and leaf explants taken from in vitro grown plants, the effect of growth regulator concentration on callus induction, the effect of cultivar and explant on callus induction and regeneration, the effect of light on callus induction and finally direct regeneration were investigated. Somaclonal variation was studied in view of variations in the number of chromosomes on calli, regenerated shoots of calli as well as direct regenerated shoots. Variations such as dihaploploidy, pentaploidy, hexaploidy as well as octaploidy were observed on the derived roots of callus but there was no variation observed on either regenerated shoots of calli or direct regenerated shoots.

Key words: Potato, Leaf, Node, MS, 2, 4-D, Kinetine