کشت مریستم در اسپرس

منصور امیدی، بهرام گرامی و اصغر مشاری

بترتیب مربی گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، استادیار و مربی

دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

تاریخ وصول ششم بهمن ماه ۱۳۷۰

چکیده

با استفاده از محیط کشت پایه MS وهورمونها ومواد آلی مختلف چهار محیط کشت متفاوت تهیه وطی هفت آزمایش به کشت مریستم انتهائی ساقه گیاه جوان اسپرس[1] دراین محیطها باشرایط نوری مختلف وتجدید کشت آنها مبادرت گردید. محیط کشت مایع حاوی ۰/۴، ۰/۵ و ۰/۰۱ میلی گرم بترتیب برای هورمونهای GA، BAP و NAA بهترین نتیجه را برای رشدقسمتهای هوائی بدست داد. برای تولید بیشتر کالوس، حذف دو هورمون GA و NAA و افزودن هورمون IBA به میزان ۰/۰۵ میلیگرم اثرمثبت داشت. استفاده ازمحیط کشت فاقد هورمون بطور قابل ملاحظه‌ای موجب تولید ریشه بیشتر گردید.

مقدمه

کشت بافتهای گیاهی باهدف تولید گیاه کامل یا فراهم آوردن امکان مطالعات سیتوژنتیك، فیزیولوژی تمایز، اثرهورمونها ومواد آلی، انتخاب توده های سلولی مقاوم به تنش های مختلف و بالاخره کشت بساك ودانه گرده برای تولید گیاه هاپلوئید ومآلا" دیپلوئید مقبولیت روزافزون یافته است (۱۷).

تولیدکالوس[2] و کشت آن وایجاد تمایز (تولید ریشه وقسمتهای هوائی) درآن ازروشهای معمول کشت بافت است (۹). کشت مریستم نیز به عنوان روشی برای تکثیر غیرجنسی گیاه درآزمایشگاه متداول است (۱۳). امروزه محیطهای کشت مختلفی وجوددارد که به عنوان پایه مورداستفاده قرارمی‌گیرندو به‌اقتضای اهداف وشرایط ونوع آزمایش، مقادیر معین ازهورمونها ومواد آلی گوناگون به محیط کشت پایه اضافه می‌گردد(۱۴). گونه ها و حتی ژنوتیپهای یك گونه ممکن است برای کشت بافت وتمایزآن نیازمندی خاصی نسبت به شرایط محیطی وعوامل شیمیائی داشته باشند (۲و۱۱). محیطهای کشت MS ، بی‌لییدز[3]، B5 ، وایت[4] و SH بیشتر متداول هستند(۴). برای کشت بافت وتولید کالوس ازمریستم ساقه، هیپوکتیل، تخمدان، کوتیلدون، برگ، جنین، ریشه وبساك استفاده می‌شود (۳).

کشت بافت درگونه های علوفه‌ای لگومینوزه از جمله یونجه (۵)، شبدربرسیم (۵)، شبدرقرمز(۱۲)، شبدرسفید(۱۵) ولوتوس[5](۷) گزارش شده است.

1-Onobrychis viciifolia scop 2-Callus 3-Blades 4-White 5- Lotus

لگومهای دانه‌ای عموما " تمایل بیشتری به تشکیل ریشه نسبت به ساقه دارند درحالیکه درلگومهای علوفه‌ای فراوانی تشکیل ریشه نسبت به لگومهای دانه‌ای کمتراست(۴)۰

درمجارستان ازقسمتهای مختلف گیاه اسپرس در محیط کشت بی‌لیبدز باهورمونهای کینیتین، NAA و 2,4-D برای تولید کالوس وسپس درهمان محیط کشت با مزواینوزیتال[1] و عصاره مخمر و سپس بدون هیچیک ازاین دو ماده برای تولید قسمتهای هوائی استفاده‌شد۰ ایجاد ریشه فقط پس از انتقال به گلدان وگلخانه در محیط بدون هورمون ممکن گردید (۶)۰ درایتالیا نیز از برگ اسپرس درمحیطهای کشت مختلف همراه با ترکیبات گوناگون هورمونی استفاده شدوبهترین نتیجه ازمحیط کشت MS باهورمونهای IAA و 2-ip و سپس درمحیط کشت SH بدون هورمون بدست‌آمد (۱)۰

باتوجه به‌اینکه اسپرس گیاهی دگرگشن است وهر توده آن مرکب ازژنوتیپ های مختلف وعموما " به حالت هتروزیگوت می‌باشد وتکثیرجنسی‌آن حتی از طریق خودگشنی اجباری منجر به‌ایجاد ژنوتیپهای مختلف می‌شود، لذا تکثیر غیرجنسی آن از طریق کشت بافت می‌تواند روش مفیدی برای ازدیادبوته‌های انتخابی واجد صفت معین درمسیراصلاح آن باشد۰

مواد و روشها

تکثیر غیرجنسی اسپرس ازطریق کشت بافت در چهارنوع محیط کشت مرکب از۱۱ تیمار طی هفت آزمایش انجام گرفت (جدول ۱)۰ کلیه آزمایشها به‌صورت طرح کاملا" تصادفی درسه تکرارانجام شد۰

محیط کشت پایه درهفت آزمایش همان ترکیبات معدنی پرنیاز وکم نیاز برای محیط کشت MS با موراشی و اسکوگ[2] (۱۰) می‌باشد (جدول ۲)۰ به محیط کشت پایه MS موادآلی تکمیل کننده و هورمونهای مختلف افزوده گردید که بسته به نوع ومقدارآنها محیطهای کشت متفاوتی بوجود آمدند که ازآنها به عنوان محیط کشت A ، B ، C و D یادخواهد شد(جدول ۳)۰ محیط کشت A مایع و سه محیط کشت دیگر بواسطه افزودن آکاربصورت جامد هستند۰ محیط کشت D فاقد هرگونه ماده آلی (بجزشکر) وهورمون است۰ pH هرچهارمحیط بوسیله اسیدکلریدریك ۰/۱ نرمال یا هیدرات پتاسیم نرمال در دامنه۵/۶-۶ تنظیم گردید۰ هرمحیط کشت درون لوله آزمایش یاشیشه‌کشت ریخته‌شدودردمای۱۲۰درجه‌سانتیگراد وفشاریك اتمسفربه‌مدت۱۵دقیقه‌درشرایط مرطوب ابتدا استریل‌وسپس دردمای۲۵°C جهت استفاده‌بعدی‌نگهداری‌شد۰

مقدارکافی ازبذراسپرس توده فریدن محصول کشت دیم سال ۱۳۶۳ درگلدانهائی به ارتفاع ۱۰ سانتیمتر کشت گردید وپس از۸ تا ۱۳ هفته هنگامی که گیاهچه‌ها به ارتفاع ۱۵-۱۰ سانتیمتربودند مریستم ساقه یا مریستم ریشه آنها جداگردید۰ برای این منظور بعد از خارج کردن گیاه جوان ازخاك، تمامی آن را باآب مقطر شسته و از نیم تا دودقیقه (بسته به سن گیاه) دراتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت ده تا بیست دقیقه درمحلول ۲۰ درصد مواد سفیدکننده تجارتی (برابربا محلول یك درصد هیپوکلریت سدیم) قرارداده سه بار با آب مقطراستریل شسته شده بلافاصله تحت شرایط استریل وبااستفاده ازمیکروسکوپ دوچشمی[3] مریستم انتهائی ساقه گیاه جدا وبه لوله کشت منتقل گردید۰ در مورد گیاهان مسن (۲ ساله وبیشتر) درمزرعه، تا حدامکان از ریشه درآورده شدند ومریستم آنها ازنزدیکی طوقه

1- Meso-inositol 2- Murashige and Skoog 3- Binocolar microscope

جدول ۱ـ مشخصات و شرایط کلی آزمایشات کشت مریستم دراسپرس

شماره آزمایش	بافت کشت شده (تعداد نمونه)	محیط کشت	تیمار نوری و شدت آن (قوت شمع)	دما
۱	مریستم انتهائی ساقه گیاه جوان (۲۸)	A (مایع)	نور ممتد در کشت اول وسپس نور متناوب ۱۶ساعت (۸ساعت تاریکی) (۲۰۰)	۲ ± ۲۲
	مریستم انتهائی ساقه گیاه مسن (۳۵)	"		
	پرچم باز شده (۶)	"		
	پرچم باز نشده (۵)	"		
	تخمدان لقاح یافته (۵)	"		
۲	مریستم انتهائی ساقه گیاه جوان (۴۹)	"	۷۲ساعت تاریکی ممتد وسپس نور ممتد و متناوب مانند آزمایش اول (۲۰۰)	۲ ± ۲۲
	مریستم انتهائی ریشه گیاه جوان (۲۷)	"		
۳	مریستم انتهائی ساقه گیاه جوان (۱۷)	"	۷۲ساعت تاریکی ممتد وسپس نور متناوب ۱۶ساعت (۸ ساعت تاریکی) (۲۰۰)	۲ ± ۲۲
۴	مریستم انتهائی ساقه گیاه جوان (۲۲)	ابتدا B (جامد) بعد C (جامد)	مانند آزمایش سوم (۲۰۰)	۱ ± ۲۵
۵	مریستم انتهائی ساقه گیاه جوان (۳۲)	ابتدا C (جامد) بعد D (جامد)	مانند آزمایش سوم (۱۰۰)	۱ ± ۲۵
۶	مریستم انتهائی ساقه گیاه جوان (۴۰)	ابتدا C (جامد) بعد D (جامد)	مانند آزمایش سوم (۱۰۰)	۱ ± ۲۵
۷	مریستم انتهائی ساقه گیاه جوان (۱۴)	D (جامد)	نور متناوب ۱۲ساعت (۱۲ساعت تاریکی) (۱۰۰)	۱ ± ۲۵

جدول ۲ـ ترکیبات معدنی محیط کشت پایه MS

ترکیبات پرنیاز	میلی‌گرم	ترکیبات کم نیاز	میلی گرم
NH_4NO_3	۱۶۵۰	H_3BO_4	۶/۲۰
KNO_3	۱۹۰۰	$MnSO_4.H_2O$	۱۶/۹۰
$CaCl_2$	۳۳۲/۶	$ZnSO_4.7H_2O$	۸/۶
KH_2PO_4	۱۷۰	KI	۰/۸۳
$MgSO_4.7H_2O$	۳۷۰	$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۲۵
Na_2-EDTA	۳۷/۲۵	$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۲۵
$FeSO_4.7H_2O$	۲۷/۸	$CoCl_2.6H_2O$	۰/۰۲۵

جدول ۳ـ مواد آلی تکمیل‌کننده و هورمونهای مختلف درمحیطهای کشت

ترکیبات آلی و هورمونها	مقدار ترکیبات آلی وهورمونها برحسب میلیگرم درلیتر در چهار محیط کشت			
	A	B	C	D
Myo-Inositol	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	–
Thiamine-Hcl	۰/۱	۰/۱	۰/۵	–
Pyridoxine-Hcl	۰/۵	۰/۵	۰/۱	–
Nicotinic-Acid	۰/۵	۰/۵	۰/۵	–
Glycine	۲	۲	۲	–
Ca-Pantothenale	۲	۲	۲	–
Naphtalene Acetic Acid	۰/۰۱	۰/۰۵	–	–
6-Benzylaminopurine	۰/۵	۰/۵	۰/۵	–
Gibberellins	–	۰/۴	–	–
Indolbutyric Acid	–	–	۰/۰۵	–
Sucrose	۲۰×۱۰^{۳}	۲۰×۱۰^{۳}	۳۰×۱۰^{۳}	۲۰×۱۰^{۳}
Agar	–	۸×۱۰^{۳}	۸×۱۰^{۳}	۱۰×۱۰^{۳}

گیاه جداگردید۰ برای محیط کشت مایع (A) ازلوله‌های ۱۱۰ میلیمتری باقطردهانه۹ میلیمتر استفاده شد۰ در هرلوله ۴-۳ میلیمتر ازمحیط کشت ریخته، یك پل از جنس کاغذ صافی به‌ابعاد تقریبی ۵-۴×۵۰-۴۰ میلیمتر برای گذاردن نمونه گیاهی روی آن درمایع قرارداده‌شد۰ دهانه لوله‌ها به نحوی با درپوش مارپیچ استریل بسته شد که ضمن حفظ لوله ازآلودگی، تبادل گازی با بیرون را برای آن امکان پذیرمی‌نمود۰ علاوه بر لوله ها از شیشه هائی به ارتفاع ۱۰ سانتیمتر باقطر دهانه ۲ سانتیمتر و درپوش مارپیچ فلزی استفاده ۰ گردید۰ با نیم دوربازکردن درپوش، بدون امکان آلودگی تبادل گازی صورت می‌گرفت۰ برای محیطهای کشت جامد (BوC و D) نیازی به پل کاغذی نبوده و بطورکلی نحوه کارآسان‌تراست۰ به خصوص آنکه قطردهانه این شیشه ها نسبت به ارتفاع شیشه نسبتا" زیاد و تجدید کشت بافت (انتقال نمونه به محیط جدید) درآنها با سهولت بیشتری انجام می‌شود۰

بطوریکه‌درجدول ۱ ذکرشده‌است شرایط شدت نور و میزان نور و تاریکی دراین آزمایشات متفاوت ولی دما(۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) تقریبا" ثابت بوده است۰ قبلا" نیز استفاده از دمای ثابت ۲۰ درجه سانتیگراد درآزمایشگاه بجای دمای متناوب ۲۰/۳۰ درجه توصیه گردیده است (۱۶)۰ وضعیت تاریکی با پیچیدن کامل لوله های کشت درکاغذ آلومینیم ایجاد گردید۰ تقریبا" هرچهار هفته یکبار تجدید کشت صورت گرفته و درموارد ممکن گیاهان به گلدانهای فین حاوی مقادیرمساوی ماسه و خاك برگ استریل منتقل شدند۰

نتایج

آزمایش اول : به هنگام تجدید کشت درمرحله چهار هفتگی دربرخی نمونه ها کالوس تشکیل شده بود که بر روی آنها اثرات مختصری از تمایز مشاهده می‌گردید۰ قسمتهای هوائی رشد کرده بود ولی اثری از ریشه مشاهده نمی‌شد (شکل ۱)۰ بافت گیاه مسن رشد بیشتری از نظرارتفاع قسمت هوائی و میزان کالوس نشان می‌داد (جدول۴)۰ درموقع تجدید کشت، کالوسهای نسبتا" بزرگ باآثارتمایز بر روی آنها به قطعات کوچکتر تقسیم و بطور جدا کشت و برای مدت ۶ تا ۸ هفته دیگر نگاهداری شدند۰ تحت شرایط جدید۱۶ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، رشد قسمت هوائی بطور محسوسی کاهش و رشد کالوس افزایش یافت۰ طی دومین دوره رشد یك نمونه متعلق به گیاه جوان یك

شکل ۱ـ کشت مریستم برروی پل کاغذی درمحیط کشت مایع A ، رشد قسمت هوائی در لوله های کشت (رشد کالوس بویژه درلوله‌کشت سمت راست مشخص است)۰

جدول۴- نتایج نهائی کشت مریستم در اسپرس در ۷ آزمایش درمحیطهای کشت متفاوت وشرایط محیطی مختلف

تیمارهای آزمایش	کشت اول		شمارش نهائی		
	ارتفاع قسمت هوائی(میلیمتر)	تولیدکالوس	تعدادتولید قسمتهوائی	تعدادتولید کالوس (٪)	تعدادتولید ریشه (٪)
آزمایش اول :					
مریستم انتهائی ساقه گیاه جوان	۱۱/۵	کمتراز ۱۰میلیمترمکعب	۸۷	۳۵	۶
مریستم انتهائی ساقه گیاه مسن	۱۴/۳	تقریبا"دوبرابرمریستم	۸۸	۳۳	۵
پرچم بازنشده (بساك نترکیده)	-	-	-	-	-
پرچم بازشده (بساك ترکیده)	-	-	-	-	-
تخمدان لقاح یافته	-	تقریبا"باندازه‌یك عدس	-	-	-
آزمایش دوم:					
مریستم انتهائی ساقه‌گیاه‌جوان	۲۱/۷	کمتراز ۱۰میلیمترمکعب	۱۰۰	۳۰	۳
مریستم انتهائی ریشه‌گیاه‌جوان	-	خیلی مختصر	-	۱۸	-
آزمایش سوم :					
مریستم انتهائی ساقه‌گیاه‌جوان	۱۰/۴	کمتراز ۱۰میلیمترمکعب	۵۴	۱۱	۳
آزمایش چهارم :					
مریستم انتهائی ساقه‌گیاه‌جوان	۲۶/۳	۲۰تا ۵۰ میلیمترمکعب	۹۱	۳۸	-
کالوس وقسمت هوائی ازکشت قبل	۳۷/۳	افزایش نسبت به‌مقدارفوق	-	-	۷
آزمایش پنجم :					
مریستم انتهائی ساقه‌گیاه‌جوان	۱۶/۵	بیش از ۳ آزمایش قبل	۸۵	۴۳	-
کالوس وقسمت هوائی ازکشت‌قبل	۴۰-۱۰	بیش از ۴ آزمایش قبل	-	-	۱۹
آزمایش ششم :					
مریستم انتهائی ساقه‌گیاه‌جوان	۱۷/۳	مشابه‌آزمایش پنجم	۷۵	۴۴	-
کالوس وقسمت هوائی ازکشت قبل	۱۳۰-۳۵	مشابه آزمایش پنجم	-		۱۵
آزمایش هفتم :					
مریستم انتهائی ساقه گیاه جوان	۸/۴	بدون کالوس	۹۲	-	۱۱

تار ریشه به طول یك سانتیمتر و نمونه دیگر متعلق به گیاه مسن ریشه نسبتا " قطوری به طول ۱۰ سانتیمتر تولید کرد. درپایان این دوره ۱۰ تا ۱۲ هفته، گیاهان جوانی که بیش از ۳۰ میلیمتر ارتفاع داشتند به‌محیط کشت سوم مشتمل برگلدانهای فین حاوی ماسه و خاك برگ منتقل گردیدند و برای جلوگیری از خشك شدن گیاه، روی گلدانها با لیوان شیشه‌ای به مدت۷۲ ساعت پوشانده شد. از ۵۳ مریستم انتهائی ساقه گیاه جوان ۴۶ نمونه (۸۷ درصد) تولید قسمت هوائی، ۱۹ نمونه (۳۵ درصد) تولید کالوس و روی هم درلوله و درخاك ۳ نمونه (۶ درصد) تولید ریشه نمودند. از ۷۸ مریستم انتهائی ساقه گیاه مسن ۶۹ نمونه (۸۸ درصد) تولید قسمت هوائی، ۲۶ نمونه (۳۳ درصد) تولید کالوس و روی هم درلوله و درخاك ۴ نمونه (۵ درصد) تولید ریشه نمودند (جدول ۴). به طوریکه ملاحظه می‌شود نتیجه حاصل از کشت بافت مریستم درهردو نوع گیاه جوان و مسن تقریبا " همانند است. ضمنا " کشت پرچم بازنشده و بازشده و نیز کشت تخمدان لقاح یافته منجر

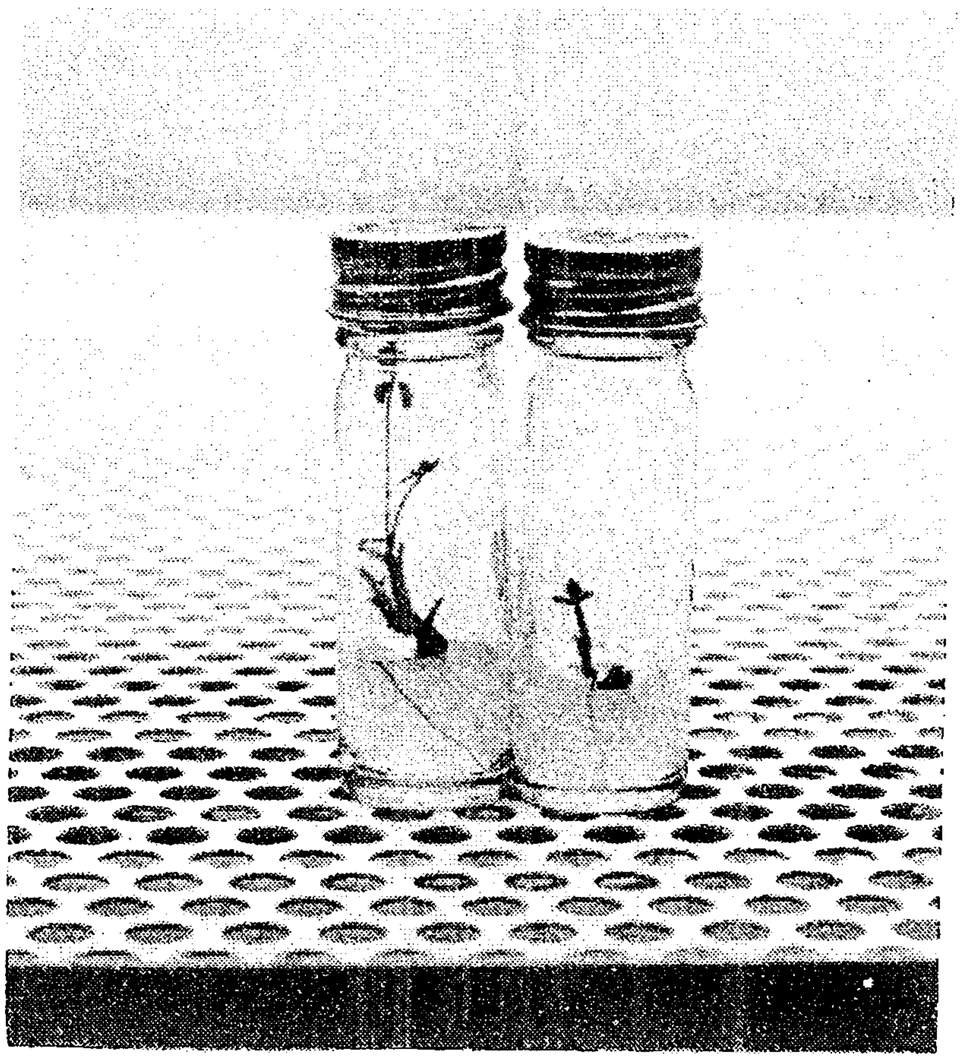
به‌نتیجه نگردید۰

آزمایش دوم : دراین آزمایش که بجز قراردادن کشتها به مدت ۷۲ ساعت درتاریکی درشروع آزمایش ازجهات دیگر مشابه آزمایش اول است۰ مریستم انتهائی متعلق به گیاه جوان، قسمتهای هوائی و کالوس تولید کردند ولی مریستم انتهائی گیاه مسن رشدی نشان نداد۰ درهیچ مورد نیز اثری از ریشه مشاهده نگردید۰ نمونه ها بعدازچهارهفته تجدیدگشت و برای ۶ تا ۸ هفته دیگرنیز نگهداری شدند۰ درپایان این مدت از مریستمهای ساقه تقریبا " تمام نمونه‌ها تولید قسمت هوائی وفقط یك نمونه تولید ریشه کرد۰ ازمریستم‌های ریشه نیزنهایتا " ۹ نمونه تولید کالوس کردند وبقیه هیچگونه رشدی نشان ندادند۰ سپس نمونه ها مشابه شرایط آزمایش اول به محیط کشت سوم منتقل گردید۰ دراین آزمایش از ۹۳ مریستم ساقه در ۹۳ نمونه(۱۰۰٪) تولید قسمت هوائی ۲۸ نمونه (۳۰ درصد) تولید کالوس و رویهم درلوله و درخاك ۳ نمونه (۳ درصد) تولید ریشه نمودند۰ از ۵۱ مریستم ریشه فقط ۹نمونه (۱۸ درصد) تولید کالوس نمودند (جدول ۴)۰

آزمایش سوم : دراین آزمایش پس از ۷۲ ساعت تاریکی درشروع آزمایش،ازنورمتناوب(۱۶ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی) استفاده گردید۰ ارتفاع قسمت هوائی درکشت اول در حدود آزمایش اول بود و درکشت دوم از ۳۵ مریستم ساقه ۱۹ نمونه (۵۴ درصد) تولید قسمت هوائی، چهانمونه (۱۱ درصد) تولیدکالوس ویك نمونه (۳ درصد) تولید ریشه نمودند(جدول ۴)۰

آزمایش چهارم : برخلاف سه‌آزمایش قبلی محیط کشت این آزمایش وآزمایشهای بعدی به صورت جامد (دارای آگار) بودند۰ نظربه اینکه درسه آزمایش قبلی نمونه ها بندرت ریشه تولید کردند، لذا دراین آزمایش مقدارنفتالین استیك اسید (NAA) که خاصیت ریشه - زائی دارد به ۵ برابرافزایش داده شد۰ کالوسهای بزرگ (۲۰ تا ۵۰ میلیمترمکعب) که برروی آنها آثار تمایز دیده می‌شد به قطعات کوچکتر تقسیم و پس از ۸ هفته به محیط کشت جدید (C) انتقال یافتند۰ چون با وجود استفاده از هورمون NAA دردومحیط کشت قبلی باز هم ریشه تولید نگردیده بود لذا بجای هورمون مزبور از ایندول بوتیریك اسید (IBA) که هورمون ریشه زای دیگری می‌باشد استفاده شد۰ جیبرلین نیز حذف گردید۰ براثرتغییرمحیط کشت ارتفاع قسمت هوائی از ۲۶ به ۳۷ میلیمتر افزایش یافت۰ از ۴۵ مریستم مورد آزمایش ۴۱ نمونه (۹۱ درصد) تولید قسمت هوائی، ۱۷ نمونه (۳۸ درصد) تولید کالوس و۳ نمونه (۷ درصد) تولیدریشه نمود (جدول ۴)۰

آزمایش پنجم : پس از ۶ هفته، درمحیط کشت C از ۵۳ مریستم ۴۵ نمونه (۸۵ درصد) تولید قسمت هوائی و ۲۳ نمونه (۴۳ درصد) تولید کالوس نمودند۰ در این مرحله نمونه ها به محیط کشت جدید (D) منتقل شدند۰ محیط کشت D عاری از هورمون بود و چون تا این مرحله تولید گیاه کامل ریشه‌دارتقریبا " میسر نگردیده بود، لذا از محیط کشت بدون هورمون برای امکان ریشه دهی استفاده گردید۰ نمونه هائی که کالوس تولید کرده بودند نیز کالوس آنها به‌قطعات کوچکتر تقسیم وبه محیط جدید منتقل شدند۰ سه‌روز بعد از انتقال دربعضی نمونه ها که دارای قسمتهای هوائی شده بودند آثار ریشه ظاهر گردید و یك هفته بعد از انتقال هفت نمونه دارای ریشه هائی به طول ۲ تا ۵ سانتیمتر گردیدند (شکل ۲)۰ ده هفته بعدازشروع آزمایش گیاهان ریشه دار به گلدانهای فین منتقل و تحت شرایط مشابه باآزمایشهای قبلی قرارداده شدند۰



شکل ۲ـ گیاه ریشه‌دار درمحیط کشت جامدD

طی دوهفته دمای محیط آنهااز ۱۸ به ۲۱ درجه‌ـ سانتیگراد وشدت نوراز۱۰۰ به ۲۰۰ فوت شمع‌وتناوب نوراز۱۲ ساعت به ۱۶ ساعت نوردر۲۴ ساعت تغییرداده شد. نمونه‌های بدون ریشه که‌ارتفاع قسمت هوائی آنها به ۴ تا۱۲ سانتیمترمی‌رسد نیز درپایان هفته دوازدهم بعدازشروع آزمایش به گلدانهای فین منتقل و دردمای ۱۸ درجه‌سانتیگراد با۱۲ ساعت نورمتناوب‌به شدت ۱۰۰ فوت شمع منتقل شدند. به طوریکه درجدول ۴ ملاحظه می‌شود نهایتا" ۱۹ درصد ازگیاهان دارای ریشه گردیدند که با لاترین درصدتااین مرحله‌از آزمایشات بوده‌است.

آزمایش ششم : این آزمایش درواقع‌تکرارآزمایش پنجم بوده‌است. درتخستین محیط کشت C از۶۱مریستم ۴۶نمونه (۷۵ درصد) دارای قسمتهای هوائی و۲۷ نمونه (۴۴ درصد) دارای کالوس شدند. دراین آزمایش پس از ۶ هفته نمونه‌ها به محیط کشت D منتقل، پس از۴ روز آثار ریشه‌دهی ظاهرو درپایان هفته دهم بعداز شروع آزمایش ۶ نمونه ریشه‌داربه گلدانهای فین منتقل گردیدند. پس از دوهفته دیگر شرایط محیطی یعنی دمای ۱۸ به۲۱ درجه سانتیگراد، شدت نور از۱۰۰ به ۲۰۰ فوت شمع‌وتناوب نوراز۱۲ ساعت به ۱۶ ساعت در ۲۴ ساعت تغییرداده شد. تغییرمحیط کشت وشرایط آزمایش منجربه حصول ۱۵ درصد ریشه دهی درگیاهان گردید. درمرحله بعدی گلدانهای فین به گلدانهای بزرگتر وبه محیط گلخانه منتقل شدند. ۱۲ هفته بعد از شروع آزمایش نموته‌های بدون ریشه نیز که ارتفاعی درحدود ۳/۵ تا۱۳ سانتیمتر داشتند به گلدانهای فین منتقل و درهمان شرایط محیطی آزمایش قبل قرارداده شدند (جدول ۴).

آزمایش هفتم : دراین آزمایش از ابتدا و بجای محیط کشت C محیط کشت D انتخاب گردید و هدف پاسخ به این سوال بود که آیا ازابتدا و بدون نیاز به تغییر محیط کشت می‌توان گیاهان تواما" دارای قسمتهای هوائی و ریشه تولید نمود؟ طی ۶ هفته اول تعدادی از نمونه ها قسمتهای هوائی تولید کردند که ارتفاع آنها به ۸/۴ میلیمتر رسید ولی درهیچیك ازنمونه‌ها کالوس تشکیل نگردید. دونمونه نیز ریشه تولید کردند. گیاهان درمرحله ۶ هفتگی درهمان نوع محیط کشت (D) تجدید کشت و درپایان هفته دوازدهم به گلدانهای فین منتقل گردیدند. شرایط محیطی آزمایش مشابه آزمایش ششم بوده است. از ۲۷ مریستم ۲۵ نمونه (۹۳ درصد) تولید قسمت هوائی و ۳ نمونه (۱۱ درصد) تولید ریشه کردند. علیرغم ۹۳ درصد تعداد تولید قسمت هوائی، میزان رشد این قسمتها کمترازآزمایشات قبلی و عموما" به صورت کوتاه ولاغربودند (جدول ۴).

نتیجه گیری از هفت آزمایش :

جدول ۵ ـ تجزیه‌واریانس مربوط به تعدادنمونه جاوی کالوس، ساقه، ریشه درلوله‌و ریشه درخاك

منابع تنوع	درجات آزادی+	میانگین مربعات			
		تولید کالوس	تولیدساقه	تولیدریشه‌درخاك	تولیدریشه‌درلوله
تیمار	۷ (۱۰)	۷۴۹/۱۲**	۹۵۶/۹۶**	۱۵/۹۸	۷۵/۳۵**
خطا	۱۶(۲۲)	۲۸/۰۲	۷۶/۰۲	۲۳/۵۳	۱۱/۸۷
کل	۲۳(۳۲)	-	-	-	-

+ : درجه‌آزادی داخل پرانتز مربوط به تولید ریشه درلوله است۰

** : معنی دار درسطح ۰/۰۱

نتایج حاصل از هفت آزمایش که در ۱۱ تیمار و ۳ تکرار به صورت طرح کاملا" تصادفی صورت پذیرفت برای تولید کالوس، تولید قسمت هوائی و تولید ریشه به طورجداگانه ازنظرآماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (جدول ۵)۰

درمورد تولید کالوس، تفاوت تیمارها ازنظر میانگین تعداد نمونه که تولید کالوس نمودندمعنی دار بود۰ بهترین محیط کشت برای تولید کالوس از کشت مریستم ساقه محیط کشت C (درشرایط محیطی آزمایشات ۵ و۶) و دردرجه بعد محیط کشت B (درشرایط محیطی آزمایش چهار) و محیط کشت A بوده است۰ در محیط فاقد هورمون کالوس تولید نگردید (جدول ۵)۰

درمورد تولید قسمت هوائی، تفاوت تیمارها از نظرمیانگین تعداد نمونه که تولید قسمت هوائی نمودند نیز درسطح ۱٪ معنی داربوده است۰ بهترین محیط کشت برای تولید قسمت هوائی محیط کشت A (درشرایط آزمایشات ۱و۲) بوده است۰ تحت شرایط آزمایش ۳ که درآن از نورمتناوب ۱۶ ساعت در ۲۴ساعت استفاده گردید محیط کشت A قسمت هوائی کمتری تولید نمود۰ درسایرمحیطهای کشت نیز قسمت هوائی تولید گردید ولی به نظرمی‌رسد که فقدان هورمون‌در نخستین‌کشت آزمایش هفت باعث تولید قسمتهای هوائی ضعیف شده باشد (جدول ۵)۰

درموردتولید ریشه، تفاوت تیمارهاازنظرمیانگین تعدادنمونه که ریشه تولید نمودندمعنی داربوده‌است۰ به وضوح معلوم است که محیط کشت D (فاقد هورمون) به طور معنی داری سبب ریشه دهی درکشت مریستم ساقه اسپرس می‌گردد۰ کشت مریستم ریشه منتهی به تولید ریشه نگردید۰ محیطهای کشت A و B و C هر یك به تنهائی مختصری (درحدود ۳ تا ۷ درصد) ریشه تولید کردند و فقط درصورت انتقال به محیط کشت D این درصدها به حدود ۳ برابرافزایش یافتند۰ ضمنا" تفاوت قابل توجهی نیز بین ریشه دهی درلوله‌ودرخاك مشاهده نگرید (جدول ۵)۰

بحث

کشت مریستم یکی از روشهای متداول تکثیر غیر-جنسی گیاهان درآزمایشگاه است۰ دراین روش یا مریستم مستقیما" رشد می‌کند و قسمتهای هوائی را تشکیل می‌دهد و یا درمورد مریستمهای کوچك و بدون

اتصال به قطعه‌ای از بافت گیاهی غالبا" و براثر ترکیبی از هورمونها کالوس تولید می‌شود که باانتقال به محیط کشت جدید مناسب، قسمتهای هوائی یا ریشه و یا جنینی تولید می‌شود. درحالت تولید کالوس امکان ایجاد جهش درسلولها و تغییرژنتیکی درگیاه وجود خواهد داشت ولی تکثیراز طریق کشت مریستم به طور مستقیم سبب حفظ ساختمان ژنتیکی گیاه طی تکثیرهای مکرر درزمان طولانی می‌گردد واین امر به‌ویژه درمورد گیاهان چندساله و دگرگشن حائزاهمیت می‌باشد.

دراین بررسی از محیط کشت پایه MS متشکل از نمکهای عناصر پرنیاز و کم نیاز استفاده گردیده که‌در کشت مریستم بسیار رایج است. به جز درمورد پنتا تونات کلسیم، میزان و نوع سایرویتامینها تقریبا" مطابق با دستورالعمل توصیه شده برای محیط کشت MS بوده است. وجود ویتامین ها درعین آنکه مفید و گاهی ضروری است چنانچه میزان حداقل را تامین نماید، کم و بیش مقدارآن نقشی درتمایزسلولی نخواهد داشت. ضمنا" اسیدآمینه گلیسین[1] نیز درهر سه محیط A و B و C بکاررفته است. برای مقایسه محیطهای کشت دراین بررسی، مایع (A) یا جامد (B، C و D) بودن محیط کشت نباید تفاوتی در نتایج حاصل داشته باشد و این دو گونه محیط فقط از نظر شیوه اجرای آزمایش با هم فرق دارند. یکی از تفاوتهای بین محیط کشت C با دو محیط کشت A و B مقدار شکر بوده است که درمحیط کشت C ، ۳ درصد و در دو محیط دیگر ۲ درصد است و شاید همین عامل از نظر غلظت و ایجاد فشار اسمزی مناسب ، موثربوده است.

دربین هورمونهای گیاهی دو گروه عمده تحت عنوان آکسین ها[2] و سیتوکنین ها[3] وجود دارد. بطور کلی آکسین ها سبب تقسیم سلولی و تولید ریشه و سیتوکنین ها موجب تولید قسمتهای هوائی می‌شوند. نکته بسیارمهم و در خور توجه آن است که نه فقط مقدار مطلق هورمون متعلق به یکی از این دو گروه، بلکه مقدار آنها نسبت به یکدیگر باعث می‌شود که رشد یك قسمت از گیاه افزایش یابد و رشد قسمت دیگر کند یا متوقف گردد. در این آزمایشها از گروه آکسین‌ها هورمون NAA بکاررفته است. جیبرلین (GA) غالبا" درگروه جداگانه‌ای جای می‌گیرد ولی از نظر شیوه تاثیر تا حدی شبیه به آکسین ها است. درمحیط کشت C هر دو ترکیب NAA و GA حذف و با آکسین دیگری بنام IBA جانشین گردید. درمقابل این آکسین ها در هرسه محیط کشت A و B و C از سیتوکنین BA استفاده شده که هورمون موجه قسمتهای هوائی است.

نتایج حاصل از این آزمایشات بر روی کشت بافت مریستم نشان می‌دهد که علیرغم‌تولیدکالوس وقسمتهای هوائی ، تولید و تمایز ریشه تحت این شرایط براحتی صورت نگرفته است. درمورد تولید کالوس هم محیط کشت و هم دیگر شرایط محیطی موثر هستند و درهر حال وجود هر دو گروه هورمون آکسین و سیتو کنین موجب تولید کالوس گردیده است. میزان تولیدکالوس در سه محیط کشت A ، B و C درحدود ۳۰ تا ۴۴ درصد بوده است ولی درمحیط کشت D که فاقد هر گونه هورمون بوده کالوس تولید نشده است و این خود ضرورت وجود هورمون برای تشکیل کالوس را تائید می‌نماید. با توجه به یکسان بودن محیط کشت (A) در آزمایشات ۱ و ۲ و۳ و متفارت بودن شرایط میزان نور

1- Glycine 2- Auxins 3- Cytokinins

به نظر می‌رسد که تیمار نور ممتد طی ۴ هفته اول (اعم ازوجودیاعدم وجود تیمار تاریکی در شروع آزمایش) در تشکیل کالوس اثرمثبت داشته است۰

درمورد تولید قسمت هوائی، محیطهای کشت A و D مناسبترین و سایر محیطهای کشت نیز کم یا بیش مناسب بوده اند۰ دراینجا بیشتر نتایج سه آزمایش اول تا سوم درمحیطهای کشت یکسان با میزان طول مدت روشنائی متفاوت نشان می‌دهد که نور ممتد بویژه متعاقب تیمار تاریکی ممکن است درتولید بیشتر قسمت هوائی تاثیر مطلوب داشته است۰

درمورد تولید ریشه، در محیط کشت بدون هورمون (D) تعداد قابل توجهی از نمونه ها تولید ریشه نمودند۰ برای هدف تکثیر گیاه، تولید ریشه تا آخرین مرحله انتقال به گلخانه ضروری نیست۰ قاعده کلی برای تولید ریشه افزودن مواد ریشه زا و یاغالبا" استفاده از محیط کشت فاقد هورمونهای گیاهی می‌باشد۰

بنابراین به منظور تکثیر غیرجنسی اسپرس، کشت مریستم انتهائی ساقه گیاه جوان درمحیط کشت A با ۷۲ ساعت تاریکی درشروع آزمایش و سپس نور ممتد به مدت چهارهفته و متعاقبا" تجدید کشت نمونه های واجد قسمتهای هوائی در محیط کشت بدون هورمون (D) به مدت چهارهفته دیگربهترین نتیجه را بدست داده است۰ گیاهان ریشه دار به گلدان و شرایط گلخانه منتقل گردیدند۰ محیط کشت C حاوی دو نوع هورمون BL و IBA برای تولید کالوس و قسمتهای هوائی و سپس انتقال به محیط کشت D برای تولید ریشه نیز نتیجه مطلوبی داشته است۰

REFERENCES:

1- Arcioni, S. & D. Mariotti. 1982. Tissue culture and plant regeneration in onobrychis viciaefolia scop. Z. Pflanzenzuchtg 90: 192-197.

2- Brown, D.C.W., & E. M. Koehl. 1983, Regeneration of alfalfa from protoplast, cell and callus cultures. Plant Bre. Abstr. 54: 1277.

3- Clark, E.A. 1975. Crop improvement through techniques of plant cell and tissue culture. Bioscience 25: 747-749.

4- Evans, D.A. & W.R. Sharp. 1981. Plant regeneration from cell cultures. Hort. Rev. 3: 240-245.

5- Groose, R,W., & E.T. Bingham. 1984. Variation in plants regeneration from tissue culture of tetraploid alfalfa heterozygous for several traits. Crop Sci. 24: 655-658.

6- Heszky, L. 1975. Production of sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop.) callus and plant regeneration from tissue culture. Bot. Közlem. 62(2): 85-88.

7- Mariotti, D., M. Pezzotti, E.Fallistocco, & S. Arcioni. 1984. Plant regeneration from leaf-derived callus or lotus corniculatus L. CV.Franco.(Plant Bre. Abstr. 54: 8229).

8- Mokhtarzadeh, A. & M.J. Constantin. 1978. Plant regeneration from hypocotyl- and anther-derived callus of Berseem clover. Crop Sci. 18: 567-572.

9- Murashige, T. 1977. Current status of plant cell and organ culture. Hortscience 12: 127-130.

10-Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.

11-Oelck, M.M, & O. Schieder. 1983. Genotypic differences in some legume species affecting the redifferentiation ability from callus to plants. (Plant Bre. Abstr, 54: 3100).

12-Phillips, G.C. & G.B. Collins. 1979. Invitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Sci. 19: 59-64.

13-Roca, M., N.O.E.Spinosa., M.R.Roca. & J.E. Bryan. 1978. A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes . Am. Potato. 1.55: 691-701.

14- Snaselova, V. 1982. Regeneration of plants in callus cultures derived from the apical meristem of red clover. (Plant Bre. Abstr. 54: 3146).

15- White, D.W.R. 1984. Plant regeneration from long-term suspension cultures of white clover. Plant Bre. Abstr. 54: 8225.

16- Wiesner, L.E., A.E. Carleton, & C.S. Cooper. 1968. factors affecting sainfoin seed germination and emergence. In sainfoin symposium. Mont. State Univ. Bull. 627: pp. 13-15.

17- Yeuny, E.C., T.A. Thorpe., & J. Jensen. 1981, In vitro fertilization and embryo culture. PP. 253-271. In : T.A. Thorpe(ed.). Plant tissue culture. Academic press, Inc. N.Y.

Iranian J. Agric. Sci., Vol.23, Nos.3,4. 1992.

Meristem Culture in Sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop.).

M. OMIDI, B. GHERAMI and A. MOSHARI
Instructor, Department of Agronomy, College of Agricultural, University of Tehran, Karaj, Assistant Professor and Insturctor, Respectively, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
Received for Publication, January 26, 1992.

SUMMARY

Apical meristems of young seedlings were cultured in seven experiments, using Murashige and skoog (MS) basic medium with various combinations of hormones and organic compounds as well as different light/dark duration. A liquid culture medium containing o.4, 0.5, and 0.01 mg/l of GA, BAP, and NAA , respectively, was most suitable for shoot growth. For more callus formation, both GA and NAA were exculded and 0.05 mg/l IBA was included. Rhizogenesis was notably more in hormone-free media.