تاثیر تیمارهای مختلف هورمونی بر کالوس‌زایی و باززایی پیازچه از بافت آندوسپرم گیاه موسیر

امین جهانیان[۱]، علیرضا مطلبی آذر[۱*]، جابر پناهنده[۱]، محمد رضا دادپور[۱]

۱- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

*ایمیل نویسنده مسئول: motallebiazar@gmail.com

تاریخ دریافت : ۱۴۰۱/۰۸/۲۴ تارخ پذیرش : ۱۴۰۱/۰۹/۲۷

چکیده

اصلاح گیاهان برای ایجاد سطح پلوئیدی یکی از مهم‌ترین بخش‌های مربوط به تحقیقات گیاهی در هر کشور می‌باشد که اصلاح گیاهان بومی هر کشور در اولویت قرار دارند. صرف مدت زمان طولانی اصلاح گیاهان با روش‌های سنتی باعث گردیده تا تحقیقات اصلاحی گیاهان با استفاده از تکنیک‌های درون شیشه‌ای از اهمیت بیشتری برخوردار گردند. در این مطالعه برای بررسی کالوس‌زایی از بافت آندوسپرم بذر بالغ موسیر در محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد با ترکیب غلظت های مختلف 2-4,D (۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) از اکسین‌ها و BAP (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) از سایتوکینین‌ها استفاده گردید. نتایج نشان داد که استفاده از تیمار یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین تیمار کالوس‌زایی بود. در این تحقیق، غلظت ساکارز و غلظت‌های مختلف هورمونBAP برای تولید پیازچه تاثیرگذار بود. نتایج قطر پیازچه نشان داد که غلظت بالای ساکارز (۵۰ گرم در لیتر) و غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP برای تولید پیازچه‌های بزرگتر مناسب بود. با بررسی‌های کروموزومی پیازچه‌های ریشه‌زایی شده، گیاهچه‌های با سطح پلوئیدی تریپلوئید در پایان آین آزمایش به دست آمد. با توجه به کوتاه بودن اصلاح گیاهان تریپلوئید با استفاده از کشت آندوسپرم نسبت به روش‌های سنتی تلاقی، لذا این روش و همراه با ترکیبات هورمونی موثر برای تولید پیازچه در گیاه موسیر توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی

"بذر"، "تریپلوئید" ،"تنظیم کننده های رشدی"، "شاخساره"، "ساکارز"،

مقدمه

ذخایر گیاهی هر کشور، مهم‌ترین منابع و ثروت‌های آن کشور محسوب می‌شود. کشور ایران مساحت پهناوری دارد که آب و هوای متفاوت آن سبب تنوع گیاهی فراوان گردیده است. موسیر با نام علمی .Allium hirtifolium Boiss گیاهی چند ساله از خانواده Amarylidaceae است که از جمله گیاهان بومی ایران بوده و به‌صورت وحشی در مراتع و دامنه رشته کوه‌های زاگرس در غرب، جنوب و مناطق مرکزی ایران می‌روید (Celep et al., 2012; Friesen et al., 2021; Panahandeh & Mahna, 2011). با توجه اینکه برداشت‌های بی رویه از محیط زیست این گیاه انجام می‌گیرد، شناخت و ایجاد روش‌های تکثیری و اصلاحی جدید باعث می‌شود که با تولید بیشتر از انقراض این گونه بومی جلوگیری نمود. روش تکثیر گیاهان با استفاده از کشت بافت باعث گردیده که کشت و کار گیاهانی مانند موسیر که تکثیر آن‌ها با استفاده از بذر به علت شرایط رکود بذر با مشکل مواجه است به آسانی انجام پذیرد. موسیر دارای ارزش غذایی بالایی می‌باشد که قسمت‌های خوراکی آن برگ‌ها و پیازهای توپر آن می‌باشد و در بسیاری از مناطق کشور به صورت خشک شده و یا به‌صورت تازه به عنوان سبزی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ghahremani-majd et al., 2012). موسیر دارای پیاز نسبتا کروی به قطر ۵-۲/۵ سانتی‌متر با پوشش بیرونی خاکستری از رشته‌ها یا الیاف جدا از هم است. ساقه گل موسیر بلند، ۱۲۰-۸۰ سانتی‌متر ارتفاع و بین ۱ تا ۲ سانتی‌متر قطر دارد. ساقه ابتدا توپر است و در انتهای آن گل‌آذین کروی گیاه قرار دارد و در فصلی که گیاه خشک و بذرها پراکنده می‌گردند به‌صورت یک لوله زرد تو خالی باقی می‌ماند. زمان گل‌دهی موسیر، اردیبهشت ماه است (Asili et al., 2010; R Ebrahimi et al., 2009). پراکنش جغرافیایی این گیاه در غرب کشور در سنندج، کرمانشاه، همدان، اراک، خرم آباد و در بخش مرکزی در اصفهان، بختیاری و فارس گزارش شده است (Fritsch & Abbasi, 2013). مهم‌ترین ترکیبات موجود در جنس آلیوم از جمله موسیر، ترکیبات فرار گوگردی هستند و عمده‌ترین ترکیب موجود، آلیین یا s- آلیل سیستئین سولفوکسید است که با خرد کردن یا له کردن بافت‌های گیاه، آلیین توسط آنزیم آلیناز تجزیه و به پیرویک اسید و ۲-پیروین سولفونیک اسید تبدیل می‌گردد (Ismail et al., 2013; Jinous & Bahareh, 2012). ترکیب اخیر نیز سریع به آلیسین تبدیل می‌شود. موسیر به علت داشتن این ترکیبات از نظر طبی جزء گیاهان دارویی مهم بوده و برای کاهش فشار خون، درمان رماتیسم، دیابت و ترمیم زخم‌های سطحی و همچنین به عنوان عطر و طعم دهنده مورد استفاده قرار می‌گیرد(Mahboubi & Kazempour, 2015). ترکیبات فلاونوئیدی موجود در موسیر، چربی و کلسترول خون را کاهش می‌دهند آنتی اکسیدان‌های مانند آلیسین و کورستین موجود در موسیر فشار خون بالا را کاهش می دهند. ترکیبات گوگردی و اتیل استات موجود در موسیر رشد سلول‌های سرطانی را کاهش می‌دهند (Karthikkumar et al., 2020). آندوسپرم منبع تغذیه جنین می باشد که به صورت 3N می باشد که دو هسته قطبی از والد مادری 2N یک سلول اسپرم از والد پدری 1N در یافت کرده است (X. Wang et al., 2016). آندوسپرم ممکن است در زمان توسعه جنین به طور کامل به مصرف جنین برسد و بذور فاقد

آندوسپرم[1] ایجاد گردد ولی بذور آندوسپرم دار[2] که ممکن است حاوی نشاسته، پروتئین و چربی باشند در طول جوانه زنی بذور مصرف می شوند (Rangan, 2020). در بیشتر بذور گیاهی، وظیفه اصلی آندوسپرم فراهم کردن تغذیه برای جنین می باشد که به سبب آن نمو جنین و جوانه زنی بذر اتفاق می افتد (Thomas & Chaturvedi, 2008). مزیت کشت آندوسپرم نسبت به روش سنتی تلاقی (تلاقی گیاهان دیپلوئید با گیاهان تتراپلوئید) در این است که فرآیند تولید گیاهان تریپلوئید در کشت آندوسپرم یک پروتکل یک مرحله ای می‌باشد که زمان مورد نیاز برای تولید گیاه تریپلوئید کمتر از روش سنتی می‌باشد (da Silva et al., 2020). از مهم‌ترین عوامل موثر در کشت آندوسپرم می توان به نوع ژنوتیپ، زمان نمونه گیری(آندوسپرم بالغ و نابالغ) و محیط کشت اشاره کرد (X. Wang et al., 2016). اولین تلاش برای رشد آندوسپرم نابالغ توسط لمپ و میلز در سال ۱۹۳۳ در گیاه ذرت بر روی محیط کشتی که شامل عصاره سیب زمینی و عصاره ذرت جوان بود انجام شد و پرآوری کوچکی از سلول ها در نزدیکی جنین مشاهده شد (Popielarska-Konieczna et al., 2013). در سال ۱۹۴۹ لارو از دانشگاه میشیگان برای اولین بار از کشت آندوسپرم ذرت نابالغ، بافت رشد یافته را گزارش نمود (Bahadur et al., 2015). در مطالعه‌ای که بر روی کشت آندوسپرم نابالغ گیاه پاپایا انجام شد کالوس‌های قابل مشاهده از بافت آندوسپرم پس از ۲۱ روز پس از کشت ظاهر شدند. در این تحقیق، به منظور کالوس زایی ، آندوسپرم نابالغ همراه با جنین و بدون جنین بر روی محیط کشت MS همراه با تیمار های هورمونی مختلف در غلظت های مختلف کشت شدند. بیشترین میزان کالوس زایی با میزان ۶۸/۷ درصد از تیمار آندوسپرم نابالغ همراه با جنین بر روی محیط کشت MS همراه با ۶ میکرو مولار 2,4-D ، ۲/۵ میکرو مولارNAA ، به دست آمد (Sun et al., 2011). تامینا و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش دادند که در مطالعه بر روی کشت آندوسپرم بالغ و نابالغ گیاه شمشاد سرخ (Euonymus alatus (Thunb.))حدود ۵۰ درصد از نمونه های آندوسپرم نابالغ و ۱۴ درصد از نمونه های آندوسپرم بالغ پس از ۸ هفته تاریکی و ۴ هفته روشنایی بر روی محیط کشت MS همراه با ۲/۲ میکرو مولار BAP و ۲/۷ میکرو مولار NAA، کالوس های سبز رنگ و فشرده تشکیل شدند. حدود ۵/۶درصد از کالوس های تشکیل شده از آندوسپرم نابالغ و ۱۳/۴ درصد از کالوس های تشکیل شده از آندوسپرم بالغ پس از ۸ هفته کشت در محیط کشت MS حاوی ۴/۴ میکرومولار BAP و ۰/۵ میکرومولار IBA شروع به تولید شاخساره کردند. نتایج آزمایش کشت آندوسپرم نشان داد که گیاهان باززایی شده از این گیاه زینتی تریپلوئید بودند (Thammina et al., 2011). با توجه به اینکه بافت آندوسپرم در اصلاح گیاهان برای تولید گیاهان با سطح پلوئیدی تریپلوئید مورد استفاده قرار می‌گیرد لذا این تحقیق با هدف بررسی امکان‌سنجی تولید کالوس و پیازچه موسیر با استفاده از بافت آندوسپرم بالغ در شرایط درون شیشه‌ای مورد آزمایش قرار گرفت تا بهترین ترکیبات هورمونی برای تولید کالوس و ایجاد پیازچه و تولید گیاهان با سطح پلوئیدی جدید به دست آید.

۱- روش انجام تحقیق

- **ضد عفونی و کشت ریز نمونه آندوسپرم**

برداشت بذور از گیاهان مادری موسیر کشت شده در مزرعه استیگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز در اواخر خرداد ماه انجام و به آزمایشگاه کشت بافت گیاهی، گروه علوم باغبانیدانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز منتقل شدند. ابتدا بذرها در زیر آب جاری به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و پس از آن چند قطره Tween 20 به داخل آب مقطر اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. بعد از این مرحله بذرها با آب مقطر آبشویی شدند و به داخل هود لامینار منتقل شدند. در داخل هود لامینار بذور به مدت ۲۰ دقیقه با هیپوکلرید سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال (همراه با تکان دادن ملایم)قرار داده شد. سپس دوباره بذور با آب مقطر استریل آبشویی و با استفاده از الکل ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه و بعد از آن سه مرتبه آبشویی با آب مقطر استریل، مراحل ضد عفونی تکمیل گردید. سپس پوشش بذر و جنین از بافت آندوسپرم با استفاده از استریومیکروسکوپ با بزرگنمایی ۶۰ جدا گردید. هشت ریز نمونه آندوسپرم به داخل پتری دیش‌های حاوی محیط کشت MS دارای ترکیبات هورمونی انتقال داده شد.

- **ترکیبات هورمونی و شرایط نگهداری**

در این بررسی جهت کالوس زایی و باززایی پیازچه از بافت آندوسپرم بالغ موسیر از محیط کشت MS (موراشیک و اسکوگ، ۱۹۶۲) استفاده شد. محیط کشت حاوی هشت ترکیب از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بشرح زیر بود. با ترکیب غلظت‌های مختلف 2-4,D (۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) از اکسین‌ها و BAP (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) از سایتوکینین‌ها. کشت‌ها بمدت ۳ ماه در شرایط تاریکی با دمای روزانه ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دمای شبانه ۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از کالوس‌زایی و رشد آن عمل باز کشت کالوس‌ها به همان تیمارهای قبلی بصورت ماهانه با قطعه کردن، انجام شد. بعد از این مرحله قطعات کالوس حاوی شاخساره‌های اولیه به‌مدت یک و نیم ماه به محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده‌های رشد منتقل شدند. بعد از تولید شاخساره کافی، شاخساره‌ها به محیط کشت MS حاوی BAP (۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر) و NAA (۰/۵ میلی گرم در لیتر) در دو غلظت ۳۰ و ۵۰ گرم در لیتر ساکارز جهت تولید پیازچه و رشد آنها منتقل شدند. پس از تولید پیازچه گیاهچه‌ها به محیط کشت ریشه‌زایی حاوی نصف غلظت MS همراه با یک میلی‌گرم در لیتر IBA به مدت ۴۵ روز منتقل شدند.

- **مطالعه کروموزومی:**

ابتدا برای تهیه نمونه کروموزومی مناسب، ۰/۵ سانتی‌متر نوک ریشه را جدا و پس از پیش‌تیمار نمودن نوک ریشه مراحل تثبیت، هیدرولیز، رنگ‌آمیزی و اسکواش نمودیم و بعد صفحه گسترش متافازی مناسب انتخاب کرده و در نهایت عکس‌برداری و تهیه کاریوتیپ به منظور بررسی مطالعه سطح پلوئیدی نمونه‌ها انجام شد. برای پیش‌تیمار

1 non-endospermous or exalbuminous
2 Endospermous or albuminous

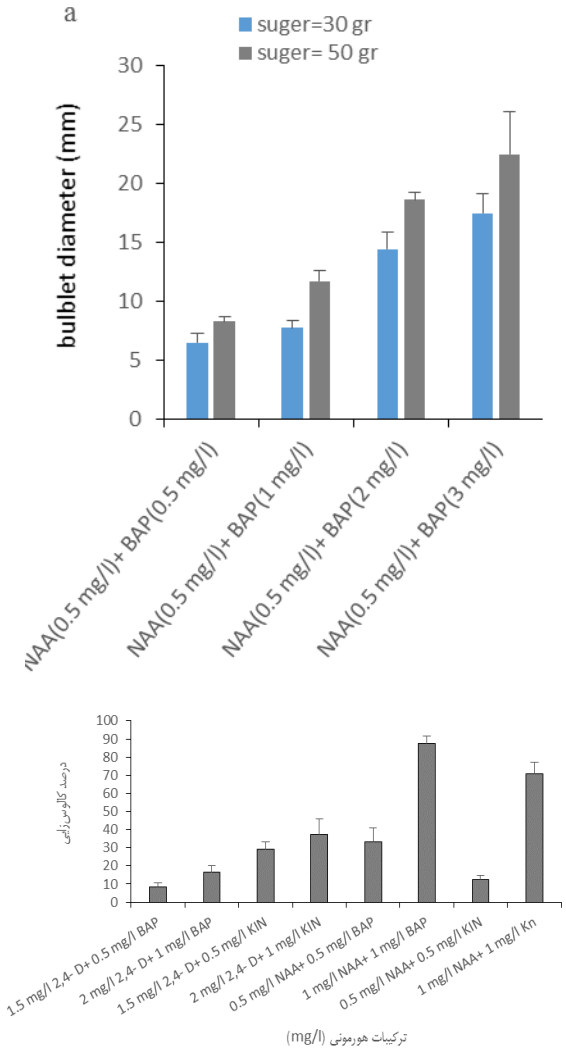
ریشه از محلول اشباع آلفا برومو نفتالین استفاده شد. ریشه‌ها به مدت چهار ساعت درون این محلول‌ها قرار گرفت. برای تثبیت ریشه‌ها از محلول تثبیت‌کننده کارنوی- ۱ استفاده شد و ریشه‌ها در کلریدریک اسید نرمال در دمای محیط به مدت ۲۰ دقیقه قرار دادیم تا بافت‌های ریشه نرم و بافت هیدرولیز شود. انتهای مریستمی ریشه پس از تثبیت و هیدرولیز از اسیدکلریدریک خارج و پس از شست‌وشوی کامل با آب مقطر به‌وسیله آب مقطر و دستمال کاغذی به خوبی آب‌گیری و برای رنگ‌آمیزی آماده شدند. در این مرحله ریشه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای محیط درون محلول رنگ استواورسئین قرار داده شد. بعد از رنگ‌آمیزی، نوک ریشه را با تیغ جدا نموده و بافت مریستمی نوک آن را با سوزن آزمایشگاه خرد و له نمودیم. یک قطره اسید استیک ۴۵ درصد به نمونه‌های موجود در روی لام اضافه و آن‌ها را روی اسید استیک له و لامل را روی نمونه قرار دادیم و با انتهای خودکار چند ضربه آهسته (به‌طوری‌که لامل حرکت نکند) به لامل زدیم و نمونه‌های متافازی آماده شده در زیر میکروسکوپ Nikon DXM 1200 digital camera (Nikon, Tokyo, Japan) مشاهده شدند.

- **طرح آزمایشی**

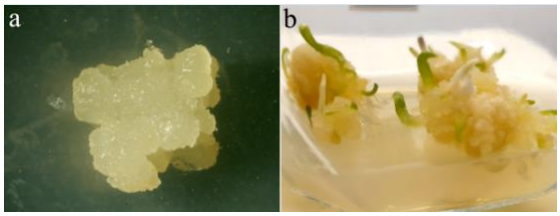
در این تحقیق از طرح کاملا تصادفی در سه تکرار که در هر تکرار تعداد ۸ عدد آندوسپرم کشت شد. تجزیه واریانس داده‌ها و نیز مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. نمودارهای مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از نرم افزار Microsoft Office Excel انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

بر اساس نتایج به دست آمده از تیمارهای کالوس‌زایی از بافت آندوسپرم موسیر مشاهد شد که تیمار هورمونی حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP با ۸۷/۶۲ درصد کالوس‌زایی بیشترین و بهترین ترکیب تیماری برای این منظور بود که با بقیه تیمارها دارای تفاوت معنی‌داری بود (شکل ۱ و شکل ۲a). ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر kin با ۷۰/۸۳ درصد کالوس‌دهی درجایگاه دوم قرار دارد که تفاوت معنی‌داری را با دیگر تیمارها نشان داد. در این آزمایش مشاهد شد که تیمارهای حاوی 2-4,D درصدهای پایینی برای کالوس‌زایی داشتند که بر این اساس برای تولید کالوس در گیاه موسیر NAA اکسین مناسب‌تر می‌باشد. در نتایجی که توسط سایر محققین منتشر شده است استفاده از از هورمون NAA کالوس‌ها را برای اندام‌زایی تحریک می‌کند و هورمون 2-4,D کالوس‌ها را به سمت جنین سوماتیکی تحریک می‌کند (Wang et al., 2008). همسو با نتایج این محققین در نتایج تحقیق حاضر نیز کالوس‌های به دست آمده از هورمون NAA نیز به سمت شاخساره‌زایی و تولید پیازچه موسیر تحریک شد (شکل ۲b).



شکل ۱- درصد کالوس‌زایی از بافت آندوسپرم در ترکیبات مختلف هورمونی



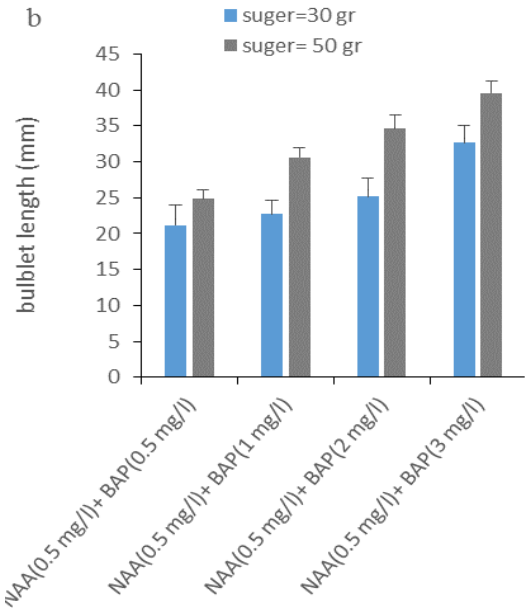
شکل ۲- کالوس تولید شده از کشت آندوسپرم (a) . شاخساره‌های اولیه تولید شده روی کالوس (b)

در بررسی تیمارهای هورمونی و غلظت ساکارز مشخص شد که بیشترین غلظت هورمون BAP تاثیر معنی‌داری در قطر و طول پیازچه داشت. به طوری که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، بیشترین قطر و طول پیازچه با ۲۲/۴۷ و ۳۹/۵۷ میلی‌متر در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. همچنین دو غلظت ساکارز تاثیر معنی‌داری روی قطر و طول پیاچه ها داشت بطوریکه غلظت ۵۰ گرم در لیتر ساکارز نسبت به غلظت ۳۰ گرم در لیتر در تمامی غلظتهای BAP باعث تاثیر بیشتری بر صفت قطر و طول پیازچه داشته است (شکل ۳a,b). مقایسات میانگین

غلظتهای مختلف BAP از نظر قطر و طول پیازچه نشان داد که با افزایش میزان غلظت BAP از ۰/۵ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر قطر و طول پیازچه موسیر افزایش پیدا کرده است. در شرایط درون شیشه‌ای استفاده از غلظت‌های بالاتر از غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز باعث افزایش فشار اسمزی می‌شود که برای افزایش اندازه اندام‌های دارای غده، پیازه و ریزوم در شرایط درون شیشه‌ای واکنش مثبتی را در پی دارد. مشابه نتایج این تحقیق در آزمایش دیگری که در گیاه سیر انجام گرفت، مشاهده شد که اثر ساکارز و هورمون BAP باعث بهبود رشد پیازچه شده است (Kim et al., 2006). همچنین تاثیر ساکارز در رشد پیازچه گیاهان A. chinense (Xu et al., 2008) ، A. cepa (Marlin et al., 2021) و A. porrum (Hong & Debergh, 1995) در تائید یافته‌های این آزمایش می‌باشد.

شکل ٤- گیاهچه موسیر تولید شده با بیشترین قطر پیازچه در شرایط درون شیشه‌ای

پس از کالوس‌زایی و استقرار گیاهچه‌های دارای پیازچه تحت تاثیر تیمارهای مختلف، گیاهچه‌ها به محیط کشت نصف غلظت MS همراه با یک میلی‌گرم در لیتر IBA بمدت ۴۵ روز منتقل شدند تا ریشه‌ها تشکیل شدند و از نوک ریشه‌ها برای شمارش کروموزوم‌ها استفاده شدند (شکل ۵). در این تحقیق گیاهان با سطح پلوئیدی تریپلوئید با تعداد ۲۴ کروموزوم به طور موفقیت آمیزی در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از کشت بافت آندوسپرم تولید شدند که با استفاده از این تکنیک سایر محققین نیز در گیاهان Lonicera caerulea (Miyashita et al., 2009), papaya (Sun et al., 2011), Euonymus alatus (Thammina et al., 2011), Actinidia kolomikta (Asakura & Hoshino, 2017), Melia azedazach (Van Thang et al., 2018), Passiflora edulis (Antoniazzi et al., 2018), and Passiflora cincinnata (da Silva et al., 2020) به طور موفقیت آمیز تریپلوئید تولید کردند. تا سال ۲۰۱۶، تلاش برای تولید و باززایی گیاهان تریپلوئید توسط کشت آندوسپرم در نزدیک به ۶۴ گونه گیاهی انجام گرفته است اما فقط در ۳۲ گونه گیاهی موفق به تشکیل شاخساره و جوانه اولیه در کشت نمونه های آندوسپرم شده اند و از این ۳۲ گونه توانستند



شکل ۳- تاثیر ترکیبات هورمونی و غلظت ساکارز بر قطر (a) و طول پیازچه (b) تشکیل شده روی کالوس تولیدی از کشت آندوسپرم گیاهچه موسیر

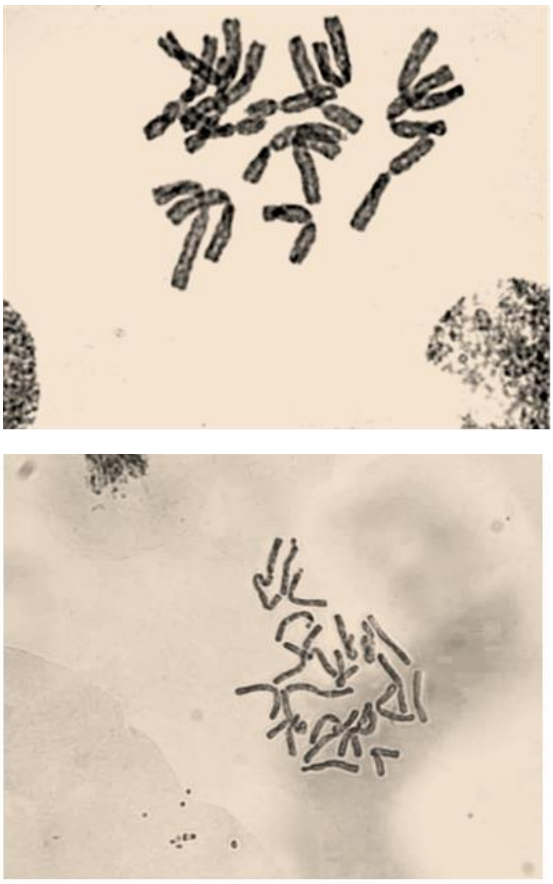
فقط ۱۵ گونه گیاه تریپلوئید را باززایی کنند (X. Wang et al., 2016). با توجه به اینکه بافت آندوسپرم در گیاهان تک لپه‌ای تا مرحله بالغ شدن بذر در ساختار بذر باقی می‌ماند بنابراین گیاه موسیر که از جنس آلیوم می‌باشد و از لحاظ طبقه‌بندی گیاه‌شناسی جزء گیاهان تک لپه است و به این دلیل گیاه موسیر برای مطالعات اصلاح با روش کشت آندوسپرم گزینه مناسب می‌باشد. از آن جهت که مطالعات در این گیاه محدود به جوانه زنی بذر (Raheleh Ebrahimi et al., 2014) و مطالعات تنوع ژنتیکی (Asili et al., 2010; R Ebrahimi et al., 2009) بیشتر صورت گرفته است. لذا این مطالعه با هدف ایجاد خزانه ژنی جدید و تولید گیاهان با سطح پلوئیدی تریپلوئید برای مقایسه کارایی عملکرد و خاصیت دارویی و سایر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی انجام پذیرفت. گیاه دیپلوئید موسیر با تعداد ۱۶ کروموزوم توسط (Panahandeh & Mahna, 2011) شمارش گردید و در این آزمایش نیز گیاهان شاهد با همین تعداد کروموزوم مشخص گردید و گیاهچه‌های به دست آمده از بافت آندوسپرم با تعداد ۲۴ کروموزوم به عنوان سطح پلوئیدی جدید تریپلوئید شناسایی شدند (شکل ۶). در مطالعه‌ای که اخیرا با استفاده از کشت آندوسپرم در گیاه زینتی *Haemanthus albiflos* که یک گیاه زینتی تک لپه‌ای از خانواده* Amaryllidaceae *است، صورت گرفته است، در مرحله اول گیاهان تریپلوئید تولید شده و با دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌ها با استفاده از مواد ضد تقسیم میتوزی (کلشی سین) گیاهان هگزاپلوئید تولید گردید (Nakano et al., 2021) بنابراین با استفاده از تکنیک درون شیشه‌ای کشت آندوسپرم در کوتاه ترین زمان ممکن گیاهان با دو سطح پلوئیدی 3x و 6x تولید شدکه به بهترین شکل ممکن از کارایی اصلاح گیاهان بهره برده‌اند.* دستورزی مصنوعی سطح پلوئیدی در شرایط درون شیشه‌ای که از جمله روش‌های

اصلاح گیاهان است، در دستیابی به ژنوتیپ‌های برتر موسیر می‌تواند موثر واقع شود. پلی پلوئیدی با تغییرات ساختاری، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گسترده‌ای در گیاهان همراه می‌باشد که نتیجه آن ایجاد تنوع گسترده در این صفات می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت که پلی پلوئیدی با ایجاد تنوع در صفات مختلف، گزینه‌ی جدیدی برای اصلاح گران فراهم می‌کند تا بسته به هدف که ممکن است کاربردهای تغذیه‌ای، دارویی، زینتی و .... باشد، گیاهان با صفات مطلوب انتخاب شوند. به‌طور کلی افزایش در سطح پلوئیدی هسته می‌تواند بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه اثر گذاشته و طی آن میزان فتوسنتز، تنفس، فعالیت ژن‌ها و آنزیم‌ها و بیان ایزوآنزیم‌ها را تغییر دهد (Thomas & Chaturvedi, 2008)، بنابراین گیاهان پلی پلوئید نسبت به انواع دیپلوئید اغلب فنوتیپ جدیدی را نشان خواهند داد و ممکن است از محدوده صفات اجداد دیپلوئید خود در ویژگی‌هایی نظیر افزایش بیوماس و تغییر در کیفیت و غلظت ترکیبات فعال گیاهی، افزایش مقاومت به تنش خشکی و مقاومت در برابر آفات فراتر رفته و در نتیجه این عمل، شانس انتخاب آن‌ها افزایش یابد. با توجه به اینکه گیاهان تریپلوئید امکان تولید بذر را ندارند لذا این گیاهان امکان تولید نتاج را ندارند ولی در گیاه موسیر با توجه به تکثیر جنسی و غیر جنسی که در این گیاه وجود دارد این امکان را فراهم می‌آورد که گیاهان تریپلوئید به دست آمده از کشت آندوسپرم، با استفاده از تکثیر غیر جنسی که توسط پیاز دختری انجام می‌شود افزایش پیدا کنند.

شکل ٥- گیاهچه‌های موسیر ریشه‌زایی شده تحت یک میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA برای بررسی کروموزومی

٤- نتیجه‌گیری

با توجه به هدف این آزمایش که امکان سنجی تولید کالوس از بافت آندوسپرم در ترکیبات هورمونی مختلف و اصلاح گیاه موسیر در سطح پلوئیدی مورد بررسی قرار گرفت، مشخص شد که ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین تیمار برای مرحله کالوس‌زایی بود و در مرحله بعدی با بررسی تاثیر غلظت ساکارز و تیمار هورمونی مشاهد شد که استفاده از غلظت ۵۰ گرم در لیتر ساکارز نسبت به غلظت معمول ۳۰ گرم در لیتر محیط کشت MS و تیمار در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA برای افزایش قطر و طول پیازچه درون شیشه‌ای مناسب است و برای تحقیقات مشابه با این زمینه نتایج این تحقیق توصیه می‌شود. اصلاح گیاهان با استفاده از تکنیک کشت آندوسپرم در شرایط درون شیشه‌ای نسبت به روش سنتی که با استفاده از تلاقی بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید انجام می‌گیرد و این روش دارای معیبی از جمله زمان‌بر بودن و مشکل در فرآیند تلاقی باعث گردیده است با استفاده از روش یه مرحله‌ای کشت آندوسپرم گیاه تریپلوئید موسیر در شرایط کشت بافت را تولید کنیم و در مراحل بعدی بعد از سازگاری و کشت در شرایط طبیعی، فرآیند مقایسه‌ای با گیاهان دیپلوئید انجام پذیرد تا با بررسی صفات مهمی از جمله عملکرد و خواص دارویی این گیاه بتوانیم نتایج مثبت و مهمی را در این زمینه ارائه نماییم.



شکل ٦- گیاهچه‌های باززایی شده موسیر تریپلوئید با تعداد کروموزوم ٢٤ (عکس پایین) و دیپلوئید با تعداد کرموزوم ١٦ (عکس بالا)

منابع

- Antoniazzi, C. A., Faria, R. B. de, Carvalho, P. P. de, Mikovski, A. I., Carvalho, I. F. de, Matos, E. M. de, Reis, A. C., Viccini, L. F., Paim Pinto, D. L., Rocha, D. I., Otoni, W. C., & Silva, M. L. da. (2018). In vitro regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (Passiflora edulis Sims). Scientia Horticulturae, 238(December 2017), 408–415. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.001
- Asakura, I., & Hoshino, Y. (2017). Endosperm-derived triploid plant regeneration in diploid Actinidia kolomikta, a cold-hardy kiwifruit relative. Scientia Horticulturae, 219, 53–59. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.02.045
- Asili, A., Behravan, J., Naghavi, M. R., & Asili, J. (2010). Genetic diversity of Persian shallot (Allium hirtifolium) ecotypes based on morphological traits, allicin content and RAPD markers. Open Access Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 1(1), 1.
- Bahadur, B., Rajam, M. V., Sahijram, L., & Krishnamurthy, K. V. (2015). Plant biology and biotechnology: Volume II: Plant genomics and biotechnology. Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology, II, 1–768. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5
- Celep, F., Koyuncu, M., Fritsch, R. M., Kahraman, A., & Doan, M. (2012). Taxonomic importance of seed morphology in allium (amaryllidaceae). Systematic Botany, 37(4), 893–912. https://doi.org/10.1600/036364412X656563
- da Silva, N. T., Silva, L. A. S., Reis, A. C., Machado, M., de Matos, E. M., Viccini, L. F., Otoni, W. C., de Carvalho, I. F., Rocha, D. I., & da Silva, M. L. (2020). Endosperm culture: a facile and efficient biotechnological tool to generate passion fruit (Passiflora cincinnata Mast.) triploid plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 142(3), 613–624. https://doi.org/10.1007/s11240-020-01887-2
- Ebrahimi, R, Zamani, Z., & Kashi, A. (2009). Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (Allium hirtifolium Boiss.) using morphological and RAPD markers. Scientia Horticulturae, 119(4), 345–351.
- Ebrahimi, Raheleh, Hassandokht, M., Zamani, Z., Kashi, A., Roldan-Ruiz, I., & Van Bockstaele, E. (2014). Seed morphogenesis and effect of pretreatments on seed germination of Persian shallot (Allium hirtifolium Boiss.), an endangered medicinal plant. Horticulture Environment and Biotechnology, 55(1), 19–26. https://doi.org/10.1007/s13580-014-0032-7
- Friesen, N., Smirnov, S. V, Leweke, M., Seregin, A. P., & Fritsch, R. M. (2021). Taxonomy and phylogenetics of Allium section Decipientia (Amaryllidaceae): morphological characters do not reflect the evolutionary history revealed by molecular markers. Botanical Journal of the Linnean Society, 197(2), 190–228.
- Fritsch, R. M., & Abbasi, M. (2013). A taxonomic review of Allium subg. Melanocrommyum in Iran. Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung.
- Ghahremani-majd, H., Dashti, F., Dastan, D., Mumivand, H., Hadian, J., & Esna-Ashari, M. (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of Iranian mooseer (Allium hirtifolium Boiss) populations. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 53(2), 116–122.
- Hong, W., & Debergh, P. (1995). Somatic embryogenesis and plant regeneration in garden leek. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43(1), 21–28.
- Ismail, S., Jalilian, F. A., Talebpour, A. H., Zargar, M., Shameli, K., Sekawi, Z., & Jahanshiri, F. (2013). Chemical composition and antibacterial and cytotoxic activities of Allium hirtifolium Boiss. BioMed Research International, 2013.
- Jinous, A., & Bahareh, G. (2012). Pharmacologic and medicinal properties of Allium hirtifolium Boiss. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 6(25), 1809–1814.
- Karthikkumar, V., Anbu, S., & Rajasekar, P. (2020). Beneficial Biological role of Allium hirtifolium on various diseases. Research Journal of Pharmacy and Technology, 13(2), 1009–1014.
- Kim, K., Jang, Y., Nam, S., Choi, I., & Bang, J. (2006). Multiple shoot regeneration and bulblet formation through meristem culture of garlic (Allium sativum L.)'Godang'. Korean Journal of Horticultural Science & Technology, 24(1), 37–42.
- Mahboubi, M., & Kazempour, N. (2015). The anti-dermatophyte activity of Allium hirtifolium Boiss aqueous extract. Journal de Mycologie Medicale, 25(1), e10–e14.
- Marlin, M., Handajani, M., Yulian, Y., Rustikawati, R., & Herawati, R. (2021). Induction of Plantlet Regeneration on Shallot (Allium cepa var. Aggregatum) . Proceedings of the

International Seminar on Promoting Local Resources for Sustainable Agriculture and Development (ISPLRSAD 2020), 13(Isplrsad 2020), 239–244. https://doi.org/10.2991/absr.k.210609.038

- Miyashita, T., Ohashi, T., Shibata, F., Araki, H., & Hoshino, Y. (2009). Plant regeneration with maintenance of the endosperm ploidy level by endosperm culture in Lonicera caerulea var. emphyllocalyx. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 98(3), 291–301. https://doi.org/10.1007/s11240-009-9562-6
- Nakano, A., Mii, M., & Hoshino, Y. (2021). Simultaneous production of triploid and hexaploid plants by endosperm culture with colchicine treatment in diploid Haemanthus albiflos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 144(3), 661–669. https://doi.org/10.1007/s11240-020-01974-4
- -Panahandeh, J., & Mahna, N. (2011). The karyomorphology of Allium hirtifolium Bioss., a less known edible species from Iran. Journal of Plant Physiology and Breeding, 1(2), 53–57.
- Popielarska-Konieczna, M., Kozieradzka-Kiszkurno, M., Tuleja, M., Ślesak, H., Kapusta, P., Marcińska, I., & Bohdanowicz, J. (2013). Genotype-dependent efficiency of endosperm development in culture of selected cereals: histological and ultrastructural studies. Protoplasma, 250(1), 361–369.
- Rangan, P. (2020). Endosperm variability: From endoreduplication within a seed to higher ploidy across species, and its competence. Seed Science Research, 30(3), 173–185. https://doi.org/10.1017/S0960258520000148
- -Sun, D. Q., Lu, X. H., Liang, G. L., Guo, Q. G., Mo, Y. W., & Xie, J. H. (2011). Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104(1), 23–29. https://doi.org/10.1007/s11240-010-9795-4
- Thammina, C., He, M., Lu, L., Cao, K., Yu, H., Chen, Y., Tian, L., Chen, J., Mcavoy, R., Ellis, D., Zhao, D., Wang, Y., Zhang, X., & Li, Y. (2011). In vitro regeneration of triploid plants of euonymus alatus “compactus” (burning bush) from endosperm tissues. HortScience, 46(8), 1141–1147. https://doi.org/10.21273/hortsci.46.8.1141
- Thomas, T. D., & Chaturvedi, R. (2008). Endosperm culture: A novel method for triploid plant production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 93(1), 1–14. https://doi.org/10.1007/s11240-008-9336-6
- Van Thang, B., Van Viet, N., Nam, V. Q., Tung, H. T., & Nhut, D. T. (2018). Triploid plant regeneration from immature endosperms of Melia azedazach. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 133(3), 351–357. https://doi.org/10.1007/s11240-018-1387-8
- Wang, W., Zhao, X., Zhuang, G., Wang, S., & Chen, F. (2008). Simple hormonal regulation of somatic embryogenesis and/or shoot organogenesis in caryopsis cultures of Pogonatherum paniceum (Poaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 95(1), 57–67. https://doi.org/10.1007/s11240-008-9414-9
- Wang, X., Cheng, Z. M. M., Zhi, S., & Xu, F. (2016). Breeding triploid plants: A review. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 52(2), 41–54. https://doi.org/10.17221/151/2015-CJGPB
- Xu, Z., Um, Y.-C., Kim, C.-H., Lu, G., Guo, D.-P., Liu, H.-L., Bah, A. A., & Mao, A. (2008). Effect of plant growth regulators, temperature and sucrose on shoot proliferation from the stem disc of Chinese jiaotou (Allium chinense) and in vitro bulblet formation. Acta Physiologiae Plantarum, 30(4), 521–528.

The Effect of Different Hormonal Treatments on Callus Formation and Bulblet Regeneration from Endosperm Tissue of Persian Shallot Plant

Amin Jahanian[1], Alireza Motallebiazar[1*], Jaber Panahandeh[1], Mohammadreza Dadpour[1]

1- Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Email address: motallebiazar@gmail.com

Abstract

Plant breeding to created ploidy level is one of the most important parts of plant research in every country, where the breeding of native plants is a priority in every country. Spending a long time on breeding plants with traditional methods has made plant breeding research using in vitro techniques to become more important. In this study, to investigate the callus formation from the endosperm tissue of mature shallot seeds in MS culture medium containing growth regulators with the combination of different concentrations of 2-4, D (1.5 and 2 mg/L) and NAA (0.5 and 1 mg/L) L) of auxins and BAP (0.5 and 1 mg/L) and Kin (0.5 and 1 mg/L) of cytokinins were used. The results showed that using the treatment of 1 mg/liter of NAA and 1 mg/liter of BAP was the best treatment for callus formation. In this research, the concentration of sucrose and different concentrations of BAP hormone were effective for onion production. The results of onion diameter showed that the high concentration of sucrose (50 g/L) and the concentration of 3 mg/L of BAP hormone were suitable for the production of larger onions. By chromosomal analysis of the rooted chives, triploid plantlets were obtained at the end of the experiment. Due to the shortness of triploid plant breeding in this method compared to traditional crossing methods, therefore, this method and the best hormonal compounds are recommended for the production of chives in shallots.

Introduction

Iranian plateau is known as specific habitat for Persian Shallot (Allium hirtifolium Boiss.) for which some evidences in terms of its domestication are available. It is distributed from North West to central and South West of Iran and grows as a wild plant in the Zagross Mountains. Traditionally, the powder of Persian Shallot is also utilized as highly demanded additive and spice for food relishing by local people. Persian shallot has recently attained arising consideration with respect to its potential in biosynthesizing the valuable secondary metabolites such as allicin, phenolic antioxidants, and ascorbic acid. In diploid plants, the endosperm is a triploid (i.e., having 3 sets of chromosomes) tissue as a result of double fertilization, which is a unique process in higher plants. Undoubtedly, the main source of triploid cells in the plants is endosperm, which has remained as storage tissue in most of monocots up to the final stage of seed formation. From this point of view, endosperm culture technique is known as direct and efficient procedure for micro-propagation of triploid plants which is also categorized as the easy, rapid and low cost way for this purpose. In diploid plants, the endosperm is a triploid (i.e., having 3 sets of chromosomes) tissue as a result of double fertilization, which is a unique process in higher plants (Hoshino et al. 2011; Wang et al. 2016). Triploid plants express the common form of polyploidy at which three complete sets of chromosomes could be distinguished and are traditionally produced through crossing a diploid with an induced tetraploid plant. However, the rate of induction of tetraploids had generally been low and doubling of the diploid chromosome number by the use of spindle inhibitors is lengthy and laborious.

Methodology

Harvesting of seeds from shallot plants in Khalat Pushan Research Center of Faculty of Agriculture, University of Tabriz was done during the end of June. In this study, for indirect regeneration for callus production, mature endosperm tissue of shallot in MS solid culture medium (Morashik and Skoog, 1962) containing plant growth regulators with the combination of different concentrations of 2-4, D (1.5 and 2 mg/ L) and NAA (0.5 and 1 mg/L) of auxins and BAP (0.5 and 1 mg/L) and Kin (0.5 and 1 mg/L) of cytokinins for a period of 3 months in dark conditions with temperature They were cultivated at 24°C daily and 18°C night temperature. After the production of callus during this period, calluses were divided into smaller pieces in the same previous treatments for one month. After this

stage, callus pieces containing primary shoots were transferred to MS culture medium without growth regulators for about 40 days. After producing enough shoots, the shoots were transferred to MS culture medium containing BAP (0.5, 1, 2 and 3 mg/L) and NAA (0.5 mg/L) in two concentrations of 30 and 50 g/L of sucrose.

Ploidy level of the plantlets derived from endosperm cultures was determined by chromosome counting. For this purpose, root tips were excised and pretreated with cooled alpha-bromo-naphthalene (4 °C) for 8 h and fixed in a acetic acid and ethyl alcohol solution (1:3 v/v) overnight. Afterward, the prepared root tips were hydrolyzed in 1 N hydrochloric acid at 60 °C for 8 min and were immediately stained with orcein 2%. The stained samples were squashed in 45% (v/v) acetic acid using traditional method (Panahandeh and Mahna 2011). All samples were inspected and the best ones with clear metaphase plates were selected for photomicrography. Image acquisition was done utilizing a Nikon E400 upright research microscope equipped with a high resolution Nikon DXM 1200 digital camera (Nikon, Tokyo, Japan).

Conclusion

According to the purpose of this experiment, the feasibility of producing callus from endosperm tissue in different hormonal combinations and the modification of Persian shallot plant in the ploidy level was investigated. and in the next step, by examining the effect of sucrose concentration and hormone treatment, it was observed that using a concentration of 50 g/l of sucrose compared to the usual concentration of 30 g/l of MS culture medium for increasing the diameter and length of the bulb is suitable and for similar research. Breeding of plants with using of endosperm culture technique under in vitro condition compared to the traditional method which is done by crossing between diploid and tetraploid plants, and this method has disadvantages such as time-consuming and difficulty in the crossing process. To produce the endosperm of triploid Persian shallot plant under tissue culture conditions and in the next stages after adaptation and cultivation under natural conditions, a comparative process with diploid plants will be done so that by examining important traits including the yield and medicinal properties of this plant we can get positive results to present an important point in this field.

Keywords

Seed; Triploid; Plant Growth Regulation; Shoots; Sucrose

Acknowledgment:

This work is based upon research founded by Iran National Science Foundation (INSF) under project number 99027060.