مقاله پژوهشی

بررسی امکان باززایی ارقام سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) در شرایط درون شیشه‌ای با ترکیبات هورمونی مختلف

حسین پاسالاری[1*] و جوادکریمی[2]

۱- استادیار بخش کشاورزی،گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، مجتمع آموزش عالی میناب، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
۲- استادیار بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

*نویسنده مسئول: حسین پاسالاری، دکتری تخصصی بیوتکنولوژی، hossein.pasalari@hormozgan.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۳/۱۰ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۵/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۸/۳۰

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: تراکم تراریزش کم و ظهور تنوع بالای سوما کلونال (soma clonal) از معایب کشت درون شیشه‌ای سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) تلقی می‌شود. در این پژوهش، دو نوع هورمون گیاهیِ اکسین (NAA, 2, 4-D) و سیتوکینین (BAP, ZR) با غلظت‌هایی خاص بصورت ترکیبی برای دستیابی به یک پروتکل باززایی کارا برای سه ژنوتیپ سیب زمینی وتراز (Vetraz)، اسکارب (Scarb) و ادیسای (Odyssey) استفاده شد.

روش مطالعه: ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت MS با ترکیبات هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر D-۲.۴، ۱ میلی‌گرم در لیتر ZR و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA قرار داده شد.

نتایج: بیشترین درصد و تعداد ریشه‌زایی و باززایی شاخساره در محیط حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و 2.4-D و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ZR به ترتیب، رخ داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه سه ژنوتیپ سیب زمینی از لحاظ آماری در ظرفیت باززایی برگ‌هایشان متفاوت بودند. ژنوتیپ ادیسای (Odyssey) پاسخ ضعیفی به باززایی برگ نشان داد.

واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی، باززایی، هورمون‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، کارایی باززایی

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یک گیاه ریشه‌ای چندساله و غده نشاسته‌ای از خانواده سولاناسه است. امروزه سیب زمینی در بسیاری از نقاط دنیا به عنوان یک غذای مقوی و به عنوان منبع غذایی جهانی تلقی می‌شود. در سال ۲۰۱۴، این محصول به عنوان چهارمین منبع غذایی بعد از گندم، برنج و ذرت معرفی شد. در حدود ۵ هزار واریته سیب‌زمینی در سراسر جهان شناخته شده‌اند (Ishida *et al.*, 1989). عقیمی، تتراپلوئیدی و سطح بالایی از هتروزیگوسیتی، به شدت کارایی روش‌های سنتی برای اصلاح سیب‌زمینی را کاهش می‌دهند. لذا به عنوان یک رویکرد جایگزین برای بهینه‌سازی واریته‌های تجاری سیب‌زمینی، استفاده از تکنیک‌های درون‌شیشه‌ای مانند هیبریداسیون سوماتیکی، جهش و ترانسفورماسیون ژنتیکی ضروری و سودمند است (Begum *et al.*, 2002). روش ازدیاد در شرایط درون شیشه‌ای برای تولید سریع پایه‌های رویشی عاری از بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد. با وجود مزایای فراوان کشت بافت، انتخاب محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده های رشد برای گونه‌ها و ارقام مختلف از جمله مشکلات این روش محسوب می‌شود (Mohamadzadeh *et al.*, 2019; Gerdakaneh *et al.*, 2020). تاکنون، چندین پروتکل برای تراریزش ژنتیکی با استفاده از دیسک‌های برگی و غده‌ای به طور موفقیت‌آمیزی

به کار گرفته شده است تا گیاهان تراریخته مقاوم به علف کش، حشرات و بیماری‌ها ایجاد شود (De Block, 1988; Sahoo *et al.*, 1997; Esfahani *et al.*, 2010). همه این موارد، دارای محدودیت‌های اصلی مانند تراکم پائین تراریزش و از همه مهم‌تر، ظهور تنوع سوما کلونال (soma clonal) (به خاطر تغییرات در سطوح پلوئیدی) به میزان بالا، دشواری‌هایی را در زمینه کشت بافت این گیاه خصوصا برای اهداف تجاری ایجاد کرده است (Beaujean *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2007; Bipasha and Wang-Pruski, 2010; Asghari *et al.*, 2013). ازدیاد درون‌شیشه‌ای یک روش موثر برای ازدیاد و تکثیر سریع گونه‌های گیاهی است که باعث تولید نتاجی با یکنواختی بالا می‌شود (Hijmans and Spooner, 2001). اهمیت ریزازدیادی سیب‌زمینی با تکنیک‌های کشت بافت در منابع مختلفی ذکر گردیده است که از آن جمله می‌توان به مطالعات پاسالاری و همکاران در سال‌های ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶ اشاره کرد (Imai *et al.*, 1993; Hossein and Nikolaevich, 2015; Pasalari, 2020). در موفقیت کشت بافت گیاهی شرایط متفاوت، پیچیده و تأثیرگذاری دخیل هستند که از آن‌ها می‌توان به ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه و از همه مهم‌تر، ترکیب هورمونی محیط کشت و شرایط محیطی اشاره نمود (Van Eck and Kitto, 1992). هدف از این مطالعه، دست‌یابی به یک پروتکل کارا و استاندارد و یک سیستم باززایی با تراکم بالا برای سه نوع ژنوتیپ مختلف سیب‌زمینی می‌باشد.

روش مطالعه

انتخاب و ضدعفونی ریزنمونه‌ها: این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌مولکولی گیاهی مرکز کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه دولتی بلاروس (روسیه سفید) در سال ۲۰۱۸ اجرا گردید. به منظور انتخاب و ضدعفونی ریزنمونه ها، ابتدا گیاهان شاداب، عاری از بیماری و در مرحله رشد فعال، انتخاب و جهت تهیه ریزنمونه به آزمایشگاه منتقل شدند. برای ضدعفونی پایه‌های گیاهی ابتدا برگ ها و سایر قسمت های زائد گیاه جدا شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری و چند قطره ماده شوینده رایج هیپوکلریت‌سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند تا گرد و غبار و مواد زائد دیگر از سطح آن برطرف گردند. به منظور کاهش کشش سطحی و افزایش سطح تماس گیاه و ماده گندزدا، بسته به حجم محلول گندزدا ۲ تا ۳ قطره توین ۲۰ به محلول ضدعفونی اضافه شد. در پایان مدت ضدعفونی، ریزنمونه‌ها تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار ۳ مرتبه در بازه‌های زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. پس از آن نمونه‌ها در داخل پتری‌دیش روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند. قسمت‌های جانبی آسیب دیده بافت جدا گردیده و ریز نمونه های گره ای به طول مشخص به محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی منتقل گردیدند. سه رقم مختلف سیب‌زمینی بلاروسی (وتراز (Vetraz)، اسکارب (Scarb) و ادیسای (Odyssey))، برای این مطالعه انتخاب شده بود. ارقام انتخاب شده در شرایط درون‌شیشه‌ای در لوله‌های آزمایش شامل محیط MS بدون هورمون‌های گیاهی شامل ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار (سیگما)، تکثیر و کشت شدند. در مراحل بعدی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، مانند (2, 4-Dichloropenoxy acetic acid، Naphthalene acetic acid، Benzyl Amino Purine، Zeatin Riboside) خریداری شده از Danagel (Ets J Bourigeaud, Lille, France)، قبل از اتوکلاو به محیط کشت اضافه شده بودند (جدول۱). محیط کشت برای القای کالوس و برگ از سه نوع ژنوتیپ فوق با ۳ درصد ساکارز، غلظت‌های مختلفی از (2, 4-D و NAA) و سیتوکینین‌ها (BAP و ZR) تهیه شد و با آگار ۰/۸ درصد جامد و سفت شد. بعد از کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط MS تهیه شده با غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد، کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه تحت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد برای القای کالوس و تشکیل برگ و ریشه نگهداری شدند. برگ‌های ریشه دار شده به خاک گلدان منتقل شدند تا با شرایط گلخانه‌ای سازگار شوند (شکل۱).

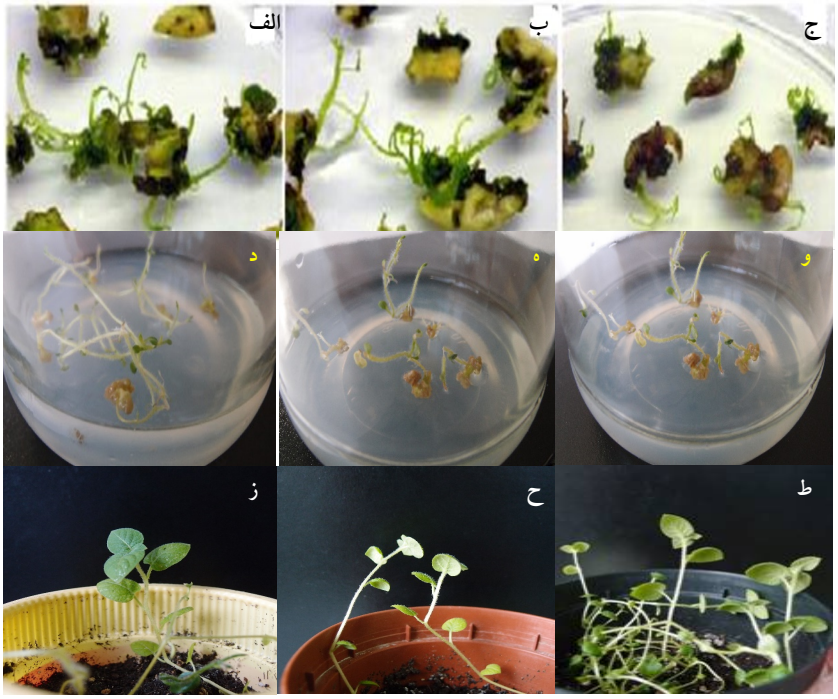
تجزیه و تحلیل آماری: اطلاعات از پارامترهایی چون XPC یا Number of explants producing callus (تعداد ریزنمونه‌های تولیدکننده کالوس)، DCF یا Days to callus formation (روزهای تشکیل کالوس)، EFR یا Number of explants forming roots (تعداد زیزنمونه‌های ایجاد کننده ریشه)، DRF یا Days to roots formation (روزهای تشکیل ریشه)، DSI یا Days to shoots initiation (روزهای شروع تشکیل برگ) و NPS یا Number of explants forming shoots (تعداد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده برگ) به دست آمد و ثبت گردید. نرخ باززایی (Regeneration efficiency) از فرمول زیر محاسبه شد:

$$RE = (SP/NE) \times 100$$

که در این فرمول SP (Number of shoots) و NE (Number of explants) به ترتیب تعداد برگ و تعداد ریزنمونه است (Muktadir *et al.*, 2016). تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD (در سطح ۵٪) انجام شد.

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت

اولین سری محیط کشت	CIM_1= MS+BAP (1 mg l^{-1}) + NAA (0.1 mg l^{-1}) + GA_3 (0.1 mg l^{-1}) SIM_1= MS+ BAP (1 mg l^{-1}) + GA3 (0.1 mg l^{-1}) RIM= MS + NAA (0.1 mg l^{-1})
دومین سری محیط کشت	CIM_2 = MS+ ZR (1 mg l^{-1}) +2.4-D (0.1 mg l^{-1}) SIM_2 = MS+ ZR (0.8 mg l^{-1}) + GA3 (2 mg l^{-1}) RIM = MS + NAA (0.1 mg l^{-1})



شکل ۱- باززایی درون شیشه‌ای ارقام مختلف سیب‌زمینی تحت ترکیبات مختلف هورمون‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی. (الف، ب و ج) طرح شماتیکی از تشکیل کالوس و باززایی ساقه از نمونه‌های میانگره‌ای ارقام مختلف سیب‌زمینی تحت ترکیبات هورمونی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی. (د، ه و و) طرح شماتیکی از تشکیل ساقه، برگ‌ها و تمایزات آنها بعد از ۴ هفته رشد بر روی محیط MS شامل ترکیبات مختلف هورمون‌ها و تنظیم‌کننده های رشد گیاهی. (ز، ح و ط) طرح شماتیکی از ریشه‌زایی و نمونه‌های باززایی شده ارقام مختلف سیب‌زمینی بعد از ۷-۸ هفته رشد بر روی محیط MS شامل ترکیبات هورمونی و تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد گیاهی

نتایج

بعد از کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط MS تهیه شده با غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد، کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای القای کالوس و تشکیل برگ و ریشه نگهداری شدند. برگ‌های ریشه‌دار شده به خاک گلدان منتقل شدند تا با شرایط گلخانه‌ای سازگار شوند (شکل۱).

اثر BAP/NAA برروی تعداد ریزنمونه‌های تشکیل‌دهنده برگ (NPS): نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی¬داری از نظر پارامترهای اندازه‌گیری‌شده سه ژنوتیپ مختلف سیب‌زمینی تیمارشده با غلظت‌های مختلف از ترکیبات هورمونی و تنظیم-کننده¬های رشد گیاهی در سطوح ۱ و ۵ درصد وجود داشت اما این اختلاف برای کارایی باززایی در همه سطوح، معنی¬دار نبود (جدول۱). ارزش میانگین ثبت شده برای تعداد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده برگ برای سه ژنوتیپ فوق بر روی محیط MS شامل سه غلظت متفاوت از NAA و BAP (جدول ۲) نشان داد که حداقل تعداد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده برگ (۵/۲۴) کالوس‌هایی را بر روی محیط MS شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، در حالی که حداکثر تعداد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده برگ (۱۹/۳۰) کالوس‌هایی

را بر روی محیط MS شامل ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA نشان داد.

اثر BAP/NAA برروی کارایی باززایی (Regeneration efficiency): حداقل مقدار کارایی باززایی (۳/۰۶) در ارتباط با محیط MS شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، در حالی که حداکثر مقدار کارایی باززایی (۱۰/۱۲) در ارتباط با محیط MS شامل ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (جدول۲). میزان حداقل تفاوت معنی‌داری برای کارایی باززایی در سطح ۵٪ برابر با ۴/۱۲ بود. این در حالی است که برای تعداد ریزنمونه‌های تشکیل‌دهنده کالوس، تعداد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده برگ و روزهای شکل‌گیری ریشه، حداقل تفاوت معنی‌داری، برای سه ژنوتیپ، مشاهده نشد. اثر غلظت‌های هورمونی مختلف برای سه پارامتر فوق الذکر معنی‌دار نبود (جدول ۲).

اثر ZR/2,4-D برروی تعداد ریزنمونه‌های تشکیل‌دهنده برگ (NPS): ارزش میانگین برای تعداد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده برگ، به وسیله سه ژنوتیپ بر روی سه غلظت هورمونی مختلف از 2,4-D و ZR در جدول ۲ نشان داده شده است. ارزش میانگین ثبت شده برای تعداد ریزنمونه‌های تشکیل‌دهنده برگ برای سه ژنوتیپ فوق بر روی محیط MS شامل سه غلظت متفاوت از NAA و BAP (جدول ۲) نشان داد که حداقل تعداد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده برگ (۶/۲۸)، کالوس‌هایی را بر روی محیط MS شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر ZR و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، در حالی که حداکثر تعداد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده برگ (۱۸/۲۹) کالوس‌هایی را بر روی محیط MS شامل ۳ میلی‌گرم در لیتر ZR و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D نشان داد. حداقل تفاوت معنی‌داری در میان این سه ترکیب هورمونی مختلف برای تولید برگ برابر با ۸/۵۱ بود.

اثر ZR/2,4-D برروی کارایی باززایی (RE): درصد ریزنمونه‌هایی که برگ‌هایی بر روی محیط‌هایی با ۳ درصد هورمونی مختلف از ZR و ۲,۴-D (شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر ZR و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۲ میلی‌گرم در لیتر ZR و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۳ میلی‌گرم در لیتر ZR و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) تولید کردند در جدول ۱ نشان داده شده است. حداقل مقدار کارایی باززایی (۱/۴۸) در ارتباط با محیط MS شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر ZR و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، در حالی که حداکثر مقدار کارایی باززایی (۳/۳۵) در ارتباط با محیط MS شامل ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (جدول۳). کارایی باززایی سه ژنوتیپ مطالعه شده در غلظت هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر ZR و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D نسبت به دو ترکیب هورمونی دیگر بالاتر بود. میزان حداقل تفاوت معنی‌داری برای کارایی باززایی در سطح ۵٪ برای ۳ ترکیب هورمونی برابر با ۲/۳۵ بود (جدول ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس برای پارامترهای اندازه‌گیری‌شده سه ژنوتیپ مختلف سیب‌زمینی تیمارشده با غلظت‌های مختلف از ترکیبات هورمونی و تنظیم¬کننده‌های رشد گیاهی

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد ریزنمونه‌های تولیدکننده کالوس	روزهای تشکیل کالوس	تعداد ریزنمونه‌های ایجادکننده ریشه	روزهای تشکیل ریشه	روزهای شروع تشکیل برگ	تعداد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده برگ	کارایی باززایی
Replication	2	995.75	453	62.396	0.00012	0.0024	0.004	.008
Hormonal treatments	6	453.36*	1.450 *	119.577 *	0.0001 *	0.0005 **	0.007**	.004 ns
(Error)	12	338.92	0.833	57.767	0.552	13.036	0.002	.003

**، *، ns – تفاوت معنی¬داری بترتیب در سطح ۵ درصد، یک درصد و عدم معنی¬داری.

جدول ۳- ارزش‌های میانگین برای پارامترهای اندازه‌گیری‌شده سه ژنوتیپ مختلف سیب‌زمینی تیمارشده با غلظت‌های مختلف از ترکیبات هورمونی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

هورمون*	تعداد ریزنمونه‌های تولیدکننده کالوس	روزهای تشکیل کالوس	تعداد ریزنمونه‌های ایجادکننده ریشه	روزهای تشکیل ریشه	روزهای شروع تشکیل برگ	تعداد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده برگ	کارایی باززایی
MS medium containing BAP/NAA							
H_1	60.27	14.62^{b}	47.65	14.33	28.22^{b}	5.24^{b}	3.06^{b}
H_2	62.55	12.023^{c}	46.03	15.37	20.48^{a}	12.28^{ab}	5.83^{ab}
H_3	59.42	13.04^{a}	56/05	15.66	39.62^{c}	19.30^{a}	10/12a
LSD		2.35			3.37	8.2	4.12
MS medium containing ZR/2,4-D							
H_4	47.16	17.55^{a}	54.07	21.25	36.12^{c}	6.28^{b}	1.48^{a}
H_5	48.29	15.23^{b}	50.32	16.70	25.32^{a}	13.65^{b}	0.78^{a}
H_6	50.79	16.30^{b}	50.63	17.44	27.11^{b}	18.29^{a}	3.35^{a}
LSD		6.35			5.22	8.51	2.35

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد ندارند.

*H_1: BAP 1.0 mgL^{-1}; NAA 0.1 mgL^{-1} H_2: BAP 2.0 mgL^{-1}; NAA 0.2 mgL^{-1} H_3: BAP 3.0 mgL^{-1}; NAA 0.3 mgL^{-1}, H_4: ZR 1 mgL^{-1}; 2, 4-D 0.1 mgL^{-1} H_5: ZR 2 mgL^{-1}; 2, 4-D 0.2 mgL^{-1}, H_6: ZR 3 mgL^{-1}; 2, 4-D 0.3 mgL^{-1}.

اثر ژنوتیپ: با محیط MS شامل BAP/NAA، ارزش میانگین وابسته به روزهای تشکیل کالوس نشان داد که حداقل ارزش (۱۴/۰۵) برای ژنوتیپ‌های اسکارب و وتراز بر روی محیط MS شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، و حداکثر ارزش (۱۸/۳۲) برای ژنوتیپ ادیسای بر روی محیط MS شامل ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA، به دست آمده بود. ژنوتیپ اسکارب نسبت به دو ژنوتیپ دیگر در تولید کالوس موثرتر بود. حداقل تفاوت معنی‌داری برای روزهایی که کالوس تشکیل می‌شود در سطح ۰/۵ درصد برابر با ۰/۴۱ بود (جدول ۳). با محیط MS شامل ZR/2,4-D، ارزش میانگین وابسته به روزهای تشکیل کالوس نشان داد که حداقل ارزش (۱۱/۶۸) برای ژنوتیپ ادیسای بر روی محیط MS شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر ZR و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، و حداکثر ارزش (۱۴/۳۲) برای ژنوتیپ وتراز بر روی محیط MS شامل ۳ میلی‌گرم در لیتر ZR و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، به دست آمده بود (جدول ۴). ارزش میانگین ثبت شده برای تعداد ریزنمونه‌های تولیدکننده کالوس، تعداد زیزنمونه های ایجادکننده ریشه، روزهای تشکیل ریشه، روزهای شروع تشکیل برگ، تعداد ریزنمونه‌های تشکیل‌دهنده برگ و کارایی باززایی آن‌ها از لحاظ آماری برای سه ژنوتیپ مطالعه شده معنی‌دار نبود (جدول ۴).

بحث

این چهار تنظیم‌کننده رشد (NAA, 2,4-D, ZR و BAP) از گروه اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها بیشتر از همه تنظیم‌کننده‌های گیاهی در مطالعات کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان استفاده می‌شوند (Ooms *et al.*, 1987). استفاده از ریز نمونه‌های گره‌ای، جهت باززایی درون‌شیشه‌ای سیب‌زمینی قبلا گزارش شده است (Beaujean *et al.*, 1998; Pasalari, 2020). در مطالعه‌ای تحت بررسی قابلیت باززایی درون‌شیشه‌ای گیاه سیب‌زمینی از ریز نمونه‌های مختلف، مشاهده شد که ریزنمونه‌های گره‌ای از پتانسیل بالایی جهت باززایی شاخساره‌ها برخوردار می‌باشند (Begum *et al.*, 2002). در این بررسی ریزنمونه گره‌ای به عنوان ریزنمونه اصلی جهت بررسی اثرات ترکیبات هورمونی مختلف انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. بررسی اثر ترکیب هورمونی مختلف برروی کارایی باززایی نشان داد که حداکثر باززایی در محیط‌های حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA، یا ۳ میلی‌گرم در لیتر ZR و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D حاصل شد. این نتایج نشان داد که هورمون‌های BAP و ZR در تحریک شاخه‌زایی در ریزنمونه‌های گره‌ای دارای نقش فوق‌العاده‌ای می‌باشند. گزارش شده است که نوع سیتوکینین و غلظت آن فاکتورهای مهمی در موفقیت پراوری درون شیشه ای هستند (Fatima and Anis, 2012). باززایی یک فرایند فوق العاده پیچیده است که عوامل متعدد کمی و کیفی مانند خصوصیات ژنتیکی گیاه، موقعیت اولیه قلمه روی گیاه، سن قلمه، میزان هورمون‌های درون‌زا، مقدار مواد تنظیم‌کننده رشد و غیره بر آن اثر می‌گذارند. همچنین نسبت اکسین به

سیتوکینین نیز مهم است. با تغییر مقدار دو تنظیم کننده رشد در محیط کشت، می توان قدرت ریخت‌زایی و باززایی در ریز نمونه ها را به مقدار قابل توجهی کنترل نمود (Fatima *et al.*, 2015). هورمون‌ها اثر متقابل روی همدیگر داشته و می‌توانند اثرات همدیگر را بهبود ببخشند. هم‌گرایی اکسین با سیتوکینین در تقسیم سلولی دو علت دارد: اولاً برای تقسیم سلولی باید بزرگ‌شدن سلول اتفاق بیفتد و بعد به دنبال آن تقسیم سلولی رخ دهد. ثانیاً مراحل اولیه تقسیم سلولی نیازمند به اثر اکسین است (Fatima and Anis, 2012). پدیده شیشه‌ای شدن (جذب زیاد آب)، در اثر عدم تعادل فاکتورهای موثر بر رشد ایجاد و منجر به کاهش تولید گیاهچه‌های باززایی شده می‌شود. در این بررسی مشخص شد که کاربرد هورمون اکسین به خصوص NAA در محیط کشت در القای باززایی موثر ریشه‌ها در محیط کشت، موثر است. در این بررسی مقدار ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر هم NAA و هم 2,4-D توانستند بیشترین میزان باززایی موثر ریشه‌ها را القا کنند. هورمون اکسین تنها برای القای ریشه مناسب است و پس از آن از رشد ریشه جلوگیری می‌کند (Olivera-Ortega *et al.*, 2000). در این بررسی اثرات غلظت‌های محتلف BAP در ترکیب با NAA و ZR در ترکیب با 2, 4-D مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که بیشترین میزان باززایی از لحاظ درصد و تعداد، در محیط کشت غنی شده با ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA، یا ۳ میلی‌گرم در لیتر ZR و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به دست آمد. براساس نتایج این آزمایش بیشترین ریشه‌زایی در محیط حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و 2,4-D و بیشترین میزان باززایی شاخساره نیز برای محیط حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ZR رخ داد. میزان ارزش میانگین ثبت شده برای فاکتورهای مختلف چون تعداد ریزنمونه‌های تولیدکننده کالوس، روزهای تشکیل کالوس، تعداد ریزنمونه های ایجادکننده ریشه، روزهای تشکیل ریشه، روزهای شروع تشکیل برگ، تعداد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده برگ و کارایی باززایی برای سه ژنوتیپ بررسی شده از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. تعداد کل برگ‌های باززایی شده از لحاظ معنی‌داری در میان سه ژنوتیپ متنوع بود. در طی این بررسی تعداد حداکثر برگ‌ها (بیشتر از ۲۵ برگ) به وسیله ژنوتیپ Scarb تولید شده بود. به هرحال فاکتور جداسازی میانگین نشان داد که سه ژنوتیپ سیب زمینی از لحاظ آماری در ظرفیت باززایی برگ‌هایشان متفاوت بودند. ژنوتیپ ادیسای پاسخ ضعیفی به باززایی برگ نشان داد. پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف به تشکیل کالوس به طور قابل ملاحظه‌ای متنوع بود که این با نتایج خرازی و همکاران بر روی گیاه ژربرا همسویی دارد (Kharrazi *et al.*, 2018). همچنین مدت زمانی که ریزنمونه‌های سه ژنوتیپ برای تشکیل کالوس داشتند متفاوت دیده شد. چنین نتایجی می‌تواند به تفاوت‌های ژنتیکی ژنوتیپ‌های استفاده شده ارتباط داده شود.

جدول ٤– ارزش‌های میانگین برای پارامترهای اندازه‌گیری‌شده سه ژنوتیپ مختلف سیب‌زمینی

ارقام	تعداد ریزنمونه‌های تولیدکننده کالوس	روزهای تشکیل کالوس	تعداد ریزنمونه‌های ایجادکننده ریشه	روزهای تشکیل ریشه	روزهای شروع تشکیل برگ	تعداد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده برگ	کارایی باززایی
MS medium containing BAP/NAA							
Vetraz	58.89	16.56[b]	53.59	14.33	24.14	15.64	5.06
Scarb	64.55	14.5[a]	49.68	15.37	25.07	14.90	4.74
Odyssey	59.42	18.32[c]	46.55	15.66	24.96	13.33	4.21
LSD		0.41					
MS medium containing ZR/2,4-D							
Vetraz	47.08	13.25[b]	51.31	16.81	23.88	13.98	4.64
Scarb	47.06	14.32[a]	51.66	21.51	25.22	11.87	4.36
Odyssey	51.10	11.68[b]	52.05	16.07	24.44	13.70	4.54
LSD		4.37					

نتیجه‌گیری

نتایج آزمایش نشان داد که بیشترین میزان باززایی از لحاظ درصد و تعداد، در محیط کشت غنی شده با ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA، یا ۳ میلی‌گرم در لیتر ZR و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر D-۲,۴ به دست آمد. بیشترین ریشه‌زایی در محیط حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و D-۲,۴ و بیشترین میزان باززایی شاخساره نیز برای محیط حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ZR رخ داد. سه

ژنوتیپ سیب زمینی از لحاظ آماری در ظرفیت باززایی برگ‌هایشان متفاوت بودند. ژنوتیپ ادیسای پاسخ ضعیفی به باززایی برگ نشان داد.

تقدیر و تشکر

از پروفسور آناتولی نیکلایویچ یوتوشنکوف و کلیه همکاران در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌مولکولی گیاهی مرکز کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه دولتی بلاروس (بلاروس) که همکاری لازم داشته‌اند، کمال تشکر صورت می‌گیرد.

مراجع

Asghari, F., Hossini, B., Hassani, A., Asghari, M. and Farokhi, J. 2013. Effect of different hormonal combination on in vitro direct shoot regeneration of basil (ocimum basilicum). Agricultural Biotechnology Journal, 4(2): 1-15.

Beaujean, A., Sangwan, R ,.Lecardonnel, A. and Sangwan-Norreel, B. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: An efficient protocol of transformation. Journal of experimental Botany, 49(326): 1589.۱۵۹۵-

Begum, F., Amin, M. and Azad, M. 2002. In vitro rapid clonal propagation of ocimum basilicum l.

Bipasha, C. and Wang-Pruski, G. 2010. Rapid regeneration of stable transformants in cultures of potato by improving factors influencing agrobacterium-mediated transformation. Advances in Bioscience and Biotechnology, 1(5): 409-416.

Chen, S.-C., Liu, H.-W., Lee, K.-T. and Yamakawa, T. 2007. High-efficiency agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of heat inducible shsp18. 2-gus in nicotiana tabacum .Plant cell reports, 26(1): 29-37.

De Block, M. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (solanum tuberosum) using agrobacterium tumefaciens. Theoretical and applied genetics, 76(5): 767-774.

Esfahani, K., MOTALEBI, M., Zamani, M.R ,. HASHEMI, S.H. and Jourabchi, E. 2010. Transformation of potato (solanum tuberosum cv. Savalan) by chitinase and β-1, 3-glucanase genes of mycoparasitic fungi towards improving resistance to rhizoctonia solani ag-3.

Fatima, N., Ahmad, N., Ahmad, I. and Anis, M. 2015. Interactive effects of growth regulators, carbon sources, ph on plant regeneration and assessment of genetic fidelity using single primer amplification reaction (spars) techniques in withania somnifera l. Applied biochemistry and biotechnology, 177(1): 118-136.

Fatima, N. and Anis, M. 2012. Role of growth regulators on in vitro regeneration and histological analysis in indian ginseng (withania somnifera l.) dunal. Physiology and molecular biology of plants, 18(1): 59-67.

Gerdakaneh, M., Badakhshan, H., Mohamadi, M. and Arji, I. 2020. Effect of different media and growth regulators on micropropagation of gf677. Journal of Plant Productions (Agronomy, Breeding and Horticulture), 43(2): 241-254.

Hijmans, R.J. and Spooner, D.M. 2001. Geographic distribution of wild potato species. American journal of Botany, 88(11): 2101-2112.

Hossein, P. and Nikolaevich, E.A. 2015. Statistical analysis of growth factors in potato during regeneration with different hormonal treatments. Austrian Journal of Technical and Natural Sciences.(۱۲-۱۱)

Imai, T., Aida, R. and Ishige, T. 1993. High frequency of tetraploidy in agrobacterium-mediated transformants regenerated from tuber discs of diploid potato lines. Plant cell reports, 12(6): 299-302.

Ishida, B.K., Snyder, G.W. and Belknap, W.R. 1989. The use of in vitro-grown microtuber discs in agrobacterium-mediated transformation of russet burbank and lemhi russet potatoes. Plant cell reports, 8(6): 325-328.

Kharrazi, M., Sharifi, A., Keykha Akhar, F., Bagheri, A. and Moradian, Y. 2018. Effect of hormonal compositions on micropropagation of fifteen cultivars of gerbera (gerbera jamesonii bolus ex hooker f.). Journal of Plant Productions (Agronomy, Breeding and Horticulture), 40(4): 91-102.

Mohamadzadeh, M.N., Safipour, A.A. and Saeid, N.F. 2019. The effects of medium, sterilization and hormonal treatment on micropropagation of some apple (mallus domestica borkh.) rootstocks.

Muktadir, M.A., Habib, M.A., Mian, M.A.K. and Akhond, M.A.Y. 2016. Regeneration efficiency based on genotype, culture condition and growth regulators of eggplant (solanum melongena l.). Agriculture and Natural Resources, 50(1): 38-42.

Olivera-Ortega, V., Gutiérrez-Espinosa, M. and Andrade-Rodríguez, M. 2000. In vitro culture of gerbera (gerbera jamesonii h. Bolus) and its acclimation in greenhouse. Bioagro, 12(3): 75-80.

Ooms, G., Burrell, M., Karp, A., Bevan, M. and Hille, J. 1987. Genetic transformation in two potato cultivars with t-DNA from disarmed agrobacterium. Theoretical and Applied Genetics, 73(5): 744-750.

Pasalari, H. 2020. Evaluating the resistance of potato tubers under different temperatures related to potato bacterial soft rot disease control. Plant Protection, 43(3): 35-42.

Sahoo, Y., Pattnaik, S. and Chand, P. 1997. In vitro clonal propagation of an aromatic medicinal herb ocimum basilicum l.(sweet basil) by axillary shoot proliferation. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 33(4): 293-296.

Van Eck, J. and Kitto, S. 1992. Regeneration of peppermint and orange mint from leaf disks. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 30(1): 41-49.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 1, Issue 2, 2020 Pages 27-34

Research Article

Assessment of regeneration of Potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars using in vitro culture under different hormonal compositions

Hossein Pasalari[1,*] and Javad Karimi[2]

[1] Assistant professor, Agriculture Department, Production engineering and plant breeding Group, Minab Higher Education Center, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

[2] Department of Biology, faculty of Sciences, University of Shiraz, Shiraz, Iran

*Correspondence to Hossein Pasalari, Ph.D., hossein.pasalari@hormozgan.ac.ir

Received 30th May 2020 Revised 16th August 2020 Accepted 20th November 2020

Abstract

Introduction and Aim: Low frequency of transformation and, more importantly, the occurrence of soma clonal variation at very high rates have considered disadvantages of Potato *In vitro* culture. Two Phytohormones, auxins (NAA, 2, 4-D), and cytokines (BAP, ZR) with concentrations were used to develop an efficient regeneration protocol for three genotypes of Potato.

Methods: The explants cultured on MS-medium supplemented with BAP 1 $mg.l^{-1}$; NAA 0.1 $mg.l^{-1}$; BAP 2 $mg.l^{-1}$; NAA 0.2 $mg.l^{-1}$; BAP 3 $mg.l^{-1}$; NAA 0.3 $mg.l^{-1}$; ZR 1 $mg.l^{-1}$; 2.4-D 0.1 $mg.l^{-1}$; ZR 2 $mg.l^{-1}$; 2.4-D 0.2 $mg.l^{-1}$; ZR 3 $mg.l^{-1}$; 2.4-D 0.3 $mg.l^{-1}$.

Results: The results showed that the highest percentage and number of root formation and shoot regeneration obtained in the medium included BAP 3 $mg.l^{-1}$; NAA 0.3 $mg.l^{-1}$ or ZR 3 $mg.l^{-1}$; 2.4-D 0.3 $mg.l^{-1}$ respectively. In this study, 0.3 $mg.l^{-1}$ of both NAA and 2, 4-D were able to induce the most effective root regeneration.

Conclusion: The three potato genotypes were statistically different in their leaf regeneration efficiency. The Odyssey genotype showed a weak response to leaf regeneration.

***Keywords*:** Potato, Regeneration, Phytohormones and growth regulators, Regeneration efficiency