SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

اصول تنظیم قراردادها

مقاله نویسی علوم انسانی

چهارمين همايش ملي بيوتكنولوژي جمهوري اسلامي ايران
كرمان مردادماه ۱۳۸٤
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

بررسي اثر جايگزيني اسيد گلوتاميك با $(NH_4)_2SO_4$ محيطكشت در رشد، قهوه‌اي شدن و ريشه‌زايي كالوس نخود

زارع مهرجردي محمد[1]*، باقري عبدالرضا[2] و وصال سعيد رضا[3]**
1- كارشناس ارشد رشتة بيوتكنولوژي، 2و3- اعضاي هيات علمي دانشگاه فردوسي مشهد.

چكيده
بهبود شرايط براي القاي كالوس در نخود كه سرسختي خاصي به كشت بافت و باززايي از خود نشان مي‌دهد نقش به‌سزايي در پيشبرد تكنيكهاي اصلاحي مبتني بر كشت بافت دراين گياه دارد. در اين مطالعه به منظور بررسي اثر جايگزيني اسيد گلوتاميك با (NH4)2SO4 در رشد، قهوه‌اي شدن و ريشه‌زايي كالوس نخود، ريز نمونه‌هاي محور جنيني در سه محيط كشت مختلف شامل محيط كشت پاية MS تغييريافته با جايگزيني نمكهاي ماكرو B5 و دو محيط كشت ديگر با همان تركيب محيط كشت قبلي اما بدون نمك (NH4)2SO4 و حاوي به ترتيب دو و چهار گرم در ليتر اسيد گلوتاميك كشت شد. نتايج اين مطالعه نشان داد كه جايگزيني اسيد گلوتاميك با (NH4)2SO4 در محيط كشت نقش موثري در افزايش رشد وجلوگيري از قهوه‌اي شدن كالوسها داشت به نحوي كه اين جايگزيني به طور ميانيگن باعث افزايش وزن خشك كالوسها از 5/61 ميلي‌گرم به 11/19 ميلي‌گرم و كاهش ميزان قهوه‌اي شدن آنها از 39 درصد به 12 درصد در محيط كشت حاوي دو گرم در ليتر اسيد گلوتاميك شد. همچنين افزودن اسيد گلوتاميك به محيط كشت قبل از اتوكلاو كاهش ريشه زايي و رشد بعدي آن را موجب شد.
واژه‌هاي كليدي: نخود، كشت كالوس، اسيد گلوتاميك

Effect of replacement $(NH_4)_2SO_4$ with glutamic acid on the growth, browning and root regeneration of chickpea callus

Abstract:

Optimizing the conditions in callus induction of chickpea, being rather recalcitrant to in vitro manipulation, is a key element for technique improvement based on tissue culture. In order to analyze $(NH_4)_2SO_4$ replacement with glutamic acid on growth, browning and root regeneration of chickpea, embryo exe explants were cultured on three different media including modified MS with B5 macro salts and other two media with the same composition without $(NH_4)_2SO_4$ and supplemented with 2 and 4 g/l glutamic acid, respectly. Results proved that of glutamic acid replacement with $(NH_4)_2SO_4$ had considerable, positive effect on increasing the growth and preventing from browning in calli, where this replacement caused an increase in average dry weight of calli, ranging from 5.61 to 11.19 mg and decrease of browning from 39 to 12 percent on the culture medium supplemented with 2g/l glutamic acid. Furthermore, addition of glutamic acid before autoclaving, decrease root regeneration and its following growth.
Keywords: callus culture, chickpea, glutamic acid.

مقدمه

در هر مطالعه‌اي كه كالوس به عنوان ماده آزمايشي آن محسوب مي‌شود بهينه سازي شرايط براي دستيابي به كالوسهاي با رشد، بقا و توانمندي مناسب در باززايي از اهميت خاصي برخوردار است. گرچه امروزه توانايي القاي كالوس در نخود در مطالعات زيادي گزارش شده‌است(ساگاره و همكاران، 1993) اما با اين وجود اين گياه سرسختي خاصي به كشت بافت، سلول و باززايي از خود نشان مي‌دهد(التف و احمد، 1990). نخود نسبت به شرايط كشت بافت بسيار حساس است. مخصوصاً بكارگيري مقدار نامناسب2,4-D و در برخي موارد Kin به قهوه‌اي شدن كالوسها منجر مي‌شود(رائو و چوپرا، 1987). قهوه‌اي شدن فرايندي است كه در اثر توليد تركيبات فنلي و اكسيد شدن آنها رخ مي‌دهد(سينگ و همكاران، 1997). علاوه براين شواهدي وجود دارد كه توليد و تجمع آنتوسيانين‌ها مي‌توانند در بروز اين فرايند موثر باشند. تجمع اين مواد در سلولها و محيط كشت به مروز زمان باعث كاهش رشد سلولها و در نهايت مرگ سلولي مي‌شود(هاك و ضفر، 2004). در حقيقت اين فرايند يك شيوة حفاظتي گياه در برابر تنشهاي محيطي است كه بروز آن در شرايط كشت بافت مي‌تواند مشكل‌ساز باشد. به نظر مي‌رسد كه تغيير در تركيبات محيط كشت به نحوي كه ميزان تنشهاي ناشي از كشت بافت را بر ريزنمونه‌ها كاهش دهد، مي‌تواند در كاهش بروز اين پديده موثر باشد. در اين رابطه بنظر مي‌رسد اعمال دو شيوه كاهش نمك هاي محيط كشت و ديگري افزودن اسيد گلوتاميك كه در بيوسنتز مواد ضد تنش نظير پرولين، پلي آمينها و پروتئينهاي محافظت كننده اسمزي نقش دارد موثر باشد(گمز و همكاران،2003؛ موريتا و همكاران، 2002). با توجه به نتايج مثبت بكارگيري دو شيوة فوق، اين تحقيق به منظور بررسي جايگزيني اسيد گلوتاميك با نمك $(NH_4)_2SO_4$ بر روي رشد، ريشه‌زايي و قهوه‌اي شدن كالوس در نخود انجام پذيرفت.

مواد و روش

در اين تحقيق از چهار ژنوتيپ MCC99، MCC252، MCC283 و MCC505 استفاده شد. به منظور القاي كالوس از ريزنمونه هاي محور جنيني در ويالهاي شيشه‌اي محتوي 12 ميلي ليتر از يكي از سه محيط كشت M1 با محيط كشت پاية MS تغييريافته با جايگزيني نمكهاي ماكرو B5 و محيط كشتهاي M2 و M3 با همان تركيب محيط كشت M1 اما بدون نمك $(NH_4)_2SO_4$ و حاوي به ترتيب دو و چهار گرم در ليتر اسيد گلوتاميك استفاده شد. هر سه نوع محيط كشت حاوي 0/75 ميلي گرم در ليتر 2,4-D و 0/25 ميلي گرم در ليتر BA، سه درصد ساكارز و 0/7 درصد آگار بودند. pH هر سه محيط كشت قبل از اتوكلاو برابر 5/8 تنظيم شد. ويالهاي حاوي ريز نمونه در اتاق‌رشد با دماي 2±23 درجة سانتيگراد و شدت نور 30 ميكرومول بر متر مربع و فتوپريود 16 ساعت روشنايي نگهداري شد. براي اندازه گيري ميزان رشد كالوسها از وزن خشك استفاده شد. به اين منظور پس از پنج هفته از كشت ريزنمونه‌هاي محور جنيني، كالوسها از تيمارهاي مختلف در شش تكرار برداشته در دماي 80 درجه سانتيگراد به مدت 12 ساعت خشك شده و در نهايت وزن خشك كالوسها اندازه‌گيري شد. براي بررسي ميزان قهوه اي شدن از پردازش تصويري[1] بر روي عكسهاي گرفته شده از كالوسهاي پس پنج هفته از كشت ريز نمونه ها در محيط القاي كالوس با نرم افزار IPLAB استفاده شد. به اين ترتيب كه پس از تعريف نواحي تيره و قهوه اي شده با استفاده از رنگ براي اين نرم افزار و در ادامه، تعريف كل سطح كالوس، نرم افزار درصد سطح تيره و قهوه‌اي شده كالوس را محاسبه و در اختيار قرار داد. براي بررسي اثر تيمارهاي مورد مطالعه بر روي ريشه زايي، كالوسهاي بدست آمده از هر محيط كشت در همان محيط كشت قبلي اما با تركيب هورموني Kin، BA و NAA به ترتيب 0/5، 0/2 و 0/2 ميلي گرم در ليتر منتقل شد و پس از پنج هفته درصد كالوسهاي باززايي كنندة ريشه تعيين شد. به منظور بررسي اثر جايگزيني مقادير مختلف اسيد گلوتاميك با نمك $(NH_4)_2SO_4$ بر روي رشد، ريشه زايي و قهوه‌اي شدن كالوسها به صورت فاكتوريل 3*4 در قالب طرح كاملاً تصادفي انجام شد. فاكتورهاي تشكيل دهنده شامل ژنوتيپ در چهار سطح و محيط كشت هاي مورد مطالعه در سه سطح بود. در قالب طرح فوق، داده هاي وزن خشك كالوس ها در شش تكرار و درصد ريشه زايي و قهوه‌اي شدن پس از تبديل زاويه اي به ترتيب در سه و شش تكرار تجزيه شد.

نتايج و بحث

نتايج تجزية واريانس داده‌هاي حاصل از وزن خشك نشان داد كه اثر رقم و محيط كشت در سطح يك درصد و اثرات متقابل رقم در محيط كشت در سطح پنج درصد معني‌دار شد. همچنين مشخص شد كه جايگزيني اسيد گلوتاميك به جاي $(NH_4)_2SO_4$ بطور معني‌داري باعث افزايش وزن خشك كالوسها مي‌شود. با اين حال اختلاف معني‌داري بين بكارگيري دو و چهار گرم درليتر اسيد گلوتاميك وجود نداشت. در اين ارتباط مطالعه بر روي تاثير بكارگيري اسيد آمينه‌هاي مختلف در ميزان رشد كالوس و تشكيل جوانه در دو گياه داكوس و تورنيا(كامادا و هارادا، 1997) نشان داد كه بكارگيري اسيد گلوتاميك تاثير مثبتي در افزايش ميزان رشد كالوسها و تشكيل جوانه داشته است. در اين بررسي بيشترين وزن خشك كالوس در بين ارقام، متعلق به ژنوتيپ MCC252 بود. به علاوه بكار گيري اسيد گلوتاميك و حذف نمك $(NH_4)_2SO_4$ در تمامي ژنوتيپ ها به افزايش وزن خشك كالوس تا حدود دو برابر نسبت به القاي كالوس در محيط MS منجر شد(جدول 1).

نتايج حاصل از آناليز ميزان قهوه‌اي شدن كالوس‌ها نشان داد كه اثر ژنوتيپ و اثر محيطكشت بر قهوه‌اي شدن كالوس‌ها در سطح يك درصد معني‌دار است. اما اثر متقابل اين دو معني‌دار نبود. در ميان ژنوتيپ ها بيشترين مقدار قهوه‌اي شدن با 35 درصد مربوط به رقم حساس به سرماي MCC505 و كمترين مقدار با 11/32 درصد مربوط به رقم دسي مقاوم به سرماي MCC99 بود. در ارتباط با تاثير تيمار ها بر روي مقدار قهوه اي شدن در تيمار هايي كه اسيد گلوتاميك جايگزين $(NH_4)_2SO_4$ شده بود درصد قهوه‌اي شدن كالوسها به طور معني داري كاهش يافته بود. به نحوي كه اين مقدار از 39/47 درصد در تيمار M1 حاوي $(NH_4)_2SO_4$ به 8/23 درصد در تيمار M3 حاوي چهار گرم درليتر اسيد گلوتاميك كاهش يافته بود. با اين حال مقايسه تيمار حاوي دو و چهار گرم در ليتر اسيد گلوتاميك با وجود كاهش درصد قهوه‌اي شدن كالوسها، اختلاف معني‌داري نداشتند (شكل 1). دو دليل عمدة تاثير مثبت حذف يون آمونيوم معدني و تاثير اسيد گلوتاميك را مي‌توان در افزايش وزن كالوسها و همچنين كاهش درصد قهوه‌اي شدن فرض كرد. در رابطه با حذف يون آمونيوم معدني مطالعه بر روي القاي كالوس جنين زا در پنبه نشان داد كه جايگزيني KNO_3 به جاي NH_4NO_3 در محيط كشت باعث افزايش وزن كالوسها، جنين زايي و كاهش توليد آنتوسيانين شد(هاك و ضفر، 2004). اسيدگلوتاميك نيز پيش مادة بيوسنتز پرولين و پلي آمينها در سلول است(گمز و همكاران،2003؛ موريتا و همكاران، 2002). تاثير پرولين در افزايش مقاومت گياه در برابر تنش‌هاي محيطي كاملاً شناخته شده است(موريتا و همكاران، 2002). پلي آمينها نيز بر روي مقاومت گياه در

[1]-Image Processing

برابر تنش‌ها موثرند. همچنين شواهدي وجود دارد كه پلي آمينها مي‌توانند به عنوان فاكتور رشد عمل كنند. بطوريكه بافتهايي كه داراي محتواي پلي آمين بيشتري هستند داراي رشد بيشتري هستند(كاو، 1997).
تجزيه واريانس درصد كالوسهايي كه ريشة كامل باززايي كرده بودند نشان داد كه اثر اسيد گلوتاميك در سطح يك درصد و رقم درسطح پنج درصد در ريشه‌زايي معني‌دار بود. بيشترين درصد كالوسهاي ريشه‌زا متعلق به رقم MCC252 و كمترين مقدار متعلق به رقم MCC505 بود. همچنين جايگزيني اسيد گلوتاميك به جاي $(NH_4)_2SO_4$ اثر بازدارنده بر روي باززايي ريشه داشت(شكل 1). استفاده از اسيد گلوتاميك در ريشه دار كردن قلمه هاي تمشك وحشي نشان داد كه اتوكلاو كردن اسيد گلوتاميك به توليد تركيبات بازدارنده ريشه‌زايي مشابه 5- اكسي پرولين منجر مي‌شود و فيلتر كردن آن اثر مثبتي بر روي رشد ريشه دارد(پدروتيا و همكاران، 1994).

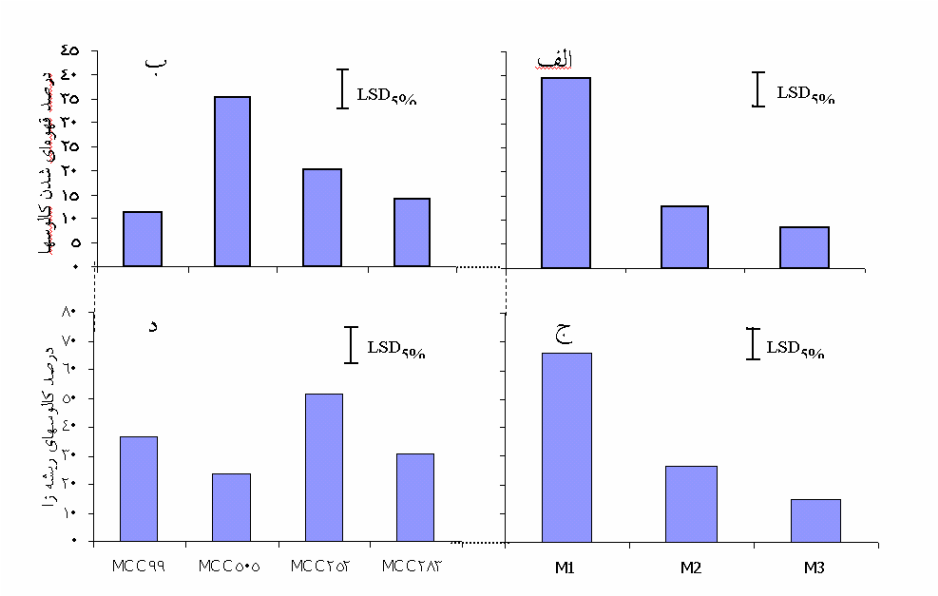
منابع

- Altaf, N. and M.S., Ahmad, 1990. In: Bajaj. Y.P.S. (Eds.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 10, Legumes and Oilseed Crop 1, Springer-Verlag, Berlin Hediberg, pp. 100-113.
- Gomez, R.V., Orgueira, H.A. and O., Varela, 2003. L-Glutamic acid and L-alanine derivatives as building blocks for the synthesis of a chiral monomer precursor of AABB-type polyamide. Arkivoc 201-208.
- Haq, I. and Y., Zafar, 2004. Effect of nitrates on embryo induction efficiency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). African Journal of Biotechnology 3: 319-323.
- Kamada, H. and H., Harada, 1997. Influence of several growth regulators and amino acids on *In vitro* organogenesis of torenia and daucus. In "ISHS Acta Horticulturae 78"(Ed. P. Debergh). http://www.actahort.org
- Kao, C.H. 1997. Physiological significance of stress-induced changes in polyamines in plants. Bot. Bull. Acad. Sin. 38: 41-44.
- Morita, Y., Nakamori, S. and H., Takagi, 2002. Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of Saccharomyces cerevisiae. Journal of Bioscience And Bioengineering 94: 390-394.
- Pedrottia, E.L., Allemandb, C.J., Doumasb, P. and D., Cornub, 1994. Effect of autoclaving amino acids on *In vitro* rooting response of wild cherry shoot. Scientia Horticulturae 57: 89-98.
- Rao, B.G. and V.L., Chopra, 1987. The influence of media on callusing and organogenesis in chickpea. Chickpea Newsletter 17: 7-10.
- Sagare, A.P., Subasini, K. and Krishmamurthy 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Repo. 12: 652-655.
- Singh, A., Singh, N.P. and A.N., Asthana, 1997. Callus induction and direct regeneration from immature embryo in chickpea. Chickpea and Pigeonpea Newsletter 4: 39-40.

جدول1: پاسخ ارقام مورد مطالعه نسبت به محيطكشت‌هاي مختلف.

محيط كشت	وزن (ميلي‌گرم)				ميانگين
	MCC99	MCC252	MCC283	MCC505	
M1	*5/32	6/40	4/90	5/83	5/61
M2	10/65	14/12	7/70	12/28	11/19
M3	9/28	19/58	9/18	9/77	11/95
ميانگين	8/42	13/37	7/26	9/29	

* LSDα:5% اثر اصلي ژنوتيپ، محيط كشت و اثر متقابل ژنوتيپ در محيط كشت به ترتيب برابر با 2/48، 2/14 و 4/32 است.



شكل 1: ميانگين درصد قهوه‌اي شدن كالوسها (الف) و ريشه زايي (ج)در تيمارهاي مختلف محيط كشت. ميانگين درصد قهوه‌اي شدن(ب) و ريشه زايي(د) در ژنوتيپهاي مختلف.

SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

اصول تنظیم قراردادها

مقاله نویسی علوم انسانی