جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۳، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۱، ۳۳٦-۳۲۷

بازازایی و تنوعات سوماتیکی در گیاه شمعدانی عطری (*Pelargonium roseum* L.)

زهرا رضایتمند .Ph.D

– دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه زیست شناسی، اصفهان، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: zrezayatmand12@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۱۲

چکیده

هدف: شمعدانی عطری (*Pelargomium roseum* L.) گیاهی زینتی با خواص ارزشمند دارویی می‌باشد. هدف از این مطالعه، بهینه سازی شرایط تکثیر و باززایی گیاه شمعدانی عطری و همچنین بررسی تنوعات سوماتیکی احتمالی گیاهان باززایی شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ابتدا از گیاهان گلدانی جدا کشت هایی از ساقه که حاوی جوانه انتهایی و چند برگ کوچک بود تهیه و در محیط کشت MS پایه کشت داده شد. از گیاهان تکثیر شده، قطعاتی از ساقه و برگ انتخاب و به محیط‌های کشت حاوی تنظیم کنندگان رشد مختلف جهت باززایی منتقل شد. از بین گیاهان باززایی شده چندین لاین از نظر مورفولوژیکی و همچنین تنوع ژنتیکی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: بیشترین میزان تولید نوساقه و ریشه در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با بکارگیری جدا کشت برگ مشاهده شد. بررسی تنوعات سوماتیکی لاین‌های باززایی شده اختلافاتی را از نظر شکل برگ و تعداد و نوع کرک‌های برگ نسبت به شاهد و همچنین اختلافات ژنتیکی به صورت حذف و اضافه شدن باندها را در الگوی باندینگ DNA نشان داد.

نتیجه گیری: تولید نوساقه و ریشه با درصد متفاوت نشانگر اثر القایی محیط کشت ها و قطعات جدا کشت مختلف در باززایی این گیاه می باشد. تطابق اختلاف ژنتیکی گیاهان باززایی شده با تنوعات مورفولوژیکی احتمالا می‌تواند نشانگر پایه و اساس ژنتیکی تنوعات سوماتیکی ایجاد شده باشد.

واژگان کلیدی: باززایی، تنوعات ژنتیکی، تنوعات مورفولوژیکی، شمعدانی عطری، نشانگرهای RAPD

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

شمعدانی عطری (*Pelargonium graveolens* L.) گیاهی از خانواده Geraniaceae می‌باشد. گیاهان این خانواده اغلب علفی بوده و بندرت به حالت چوبی در می‌آیند (۱). گونه‌های مختلف شمعدانی، گیاهان گلداری هستند که از نظر اقتصادی دارای اهمیت می‌باشند. قدرت نژاد زایی این گیاه تولید واریته‌ها و هیبریدهای زیادی را نموده است. اصولا هدف از برنامه‌ی اصلاح نبات برای این گیاه، تولید شمعدانی‌هایی با شکل‌ها و رنگ‌های متفاوت و همچنین مواد موثره (متابولیت‌های ثانویه) بیشتر می‌باشد. بخش مورد استفاده این گیاه جهت اسانس گیری برگ و قسمت‌های هوایی گیاه است. میزان اسانس حاصل از گیاه بسیار وابسته به سن گیاه می‌باشد و با افزایش سن گیاه میزان آن کاهش می‌یابد. اسانس این گیاه شبیه به اسانس گل رُز می‌باشد و حاوی ژرانیول (Geraniol)، سیترونلول (Citronelol)، ترپینئول (Terpineol) والکل‌ها می‌باشد. این اسانس زمانی ارزشمند است که محتوی مقادیر بیشتر سیترونلول باشد (۲).

در تحقیقات زیادی بازازیی گونه‌های مختلف شمعدانی توسط تکنیک کشت بافت گزارش شده است. Marsolais و همکاران (۳) جنین‌زایی سوماتیکی(*Pelargonium* × *hortorum*) و (*Pelargonium* × *domatium*) را گزارش نمودند. Agarwal و همکاران (۴) نیز گزارش نمودند که قطعات جدا کشت برگ بالغ (*Pelargonium* × *hortorum*) دارای پتانسیل بالای بازازیی نسبت به قطعات جدا کشت برگ جوان می‌باشند.

کشت قطعات برگ شمعدانی در محیط نصف غلظت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و Zeatin و در شرایط تاریکی بیشترین میزان بازازیی برای این گیاهان را ایجاد نموده است (۵). Saxena و همکاران (۶) یک دستورالعمل کارآمد برای بازازیی گیاه *P.graveolence* پیشنهاد نمودند. در این دستورالعمل پس از انتقال کالوس به محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA بیشترین میزان تولید نو ساقه گزارش شده است.

در گزارشات دیگری محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین محیط برای رشد گیاهچه و ریشه دار شدن آن عنوان شده است (۷). اخیرا نشان دادند که محیط کشت MS پایه حاوی ۰/۵ تا ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA می‌تواند باعث ایجاد نو ساقه و محیط کشت MS پایه حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA می‌تواند بهترین محیط برای ریشه دار شدن گیاه *P.graveolence* باشد (۸).

تنوع سوماکلونال فرایندی است که منجر به تغییرات شیمیایی جدا کشت‌ها شده و تنوع خاصی را ایجاد می‌نماید. این تنوع تغییرات ژنتیکی است که پاره‌ای از تغییرات دیگر از جمله تغییر در مورفولوژی، بیوشیمی و امثال آن را به دنبال دارد. تنوع سوماکلونال در گیاهان به طور عمده پس از کشت بافت در بعضی از سیستم‌های بازازیی گیاه که در آن گیاه مرحله کالوس را طی می‌کند دیده می‌شود. در واقع تنوع سوماکلونال نوعی ناپایداری ژنتیکی جدا کشت‌ها بوده و از مشکلات کشت بافت می‌باشد ولی می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های اصلاح نباتات نیز بکار رود (۹).

گیاهان حاصله از بازازیی گیاه شمعدانی عطری را از نظر خصوصیات مورفولوژیکی Saxena و همکاران (۱۰) مورد بررسی قرار دارند. نتایج بررسی‌های آن‌ها نشان دهنده تنوع مورفولوژیکی برگ این گیاهان می‌باشد به صورتی که برگ گیاهان بازازیی شده دارای بریدگی‌های کمتری نسبت به گیاهان والد می‌باشند.

بررسی‌های مورفولوژی کرک‌های گیاه شمعدانی عطری نیز حضور سه نوع کرک را نشان می‌دهد که یکی حالت کشیده و نوک تیز داشته و سه تای دیگر دارای بخش انتهای متورم می‌باشد. مشابه این نتیجه در گونه‌های دیگر این گیاه نیز گزارش شده است (۱۱).

گیاهان از طریق تنوعات سوماتیکی می‌توانند بهبود ژنتیکی پیدا نمایند و تنوعات سوماتیکی به عنوان یک فرآیند منطقی برای القا تغییرات وراثتی جهت ایجاد واگرایی یا انشعاب در گونه‌های گیاهی عنوان شده است. نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی برای نشان دادن تنوع ژنتیکی در گیاهان می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد، اما به دلیل اینکه این نشانگرها نسبت به عوامل محیطی آسیب پذیر می باشند و نیز لوکوس های محدودی بر روی ژنوم گیاه دارند نمی‌توانند کاربرد وسیعی داشته باشند. لذا نشانگرهای DNA با توانایی بسیار بالا و تعداد لوکوس‌های نامحدود را می‌توان جهت بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان مورد استفاده قرار داد. یکی از نشانگرهای معروف مبتنی بر PCR، نشانگر RAPD است. این تکنیک به علت قابلیت دسترسی سریع و آسان جهت مطالعات ژنتیکی متعددی مورد استفاده قرار می‌گیرد و این تکنیک می‌تواند جهت تشخیص تنوع سوماکلونال

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

گیاهان باززایی شده بسیار سودمند باشد (۱۲).

برای تعدادی از گونه‌های شمعدانی زینتی همانند *Pelargonium zonal* و *Pelargonium × hortorum* تکنیک‌های کشت بافت جهت بهبود ژنتیکی این گیاهان استفاده شده است (۶). یکی از تنوع یافته‌های سوماتیکی در شمعدانی که در حال حاضر به عنوان یک کولیتوار جدید معرفی شده است رز مخملی (*Velvet rose*) می‌باشد (۱۳). در سال‌های اخیر نیز روی گونه‌ی *Pelargonium graveolence* تحقیقات متعددی در نقاط مختلف دنیا انجام شده است ولی روش بهینه‌سازی و متد جهانی برای کشت درون شیشه گونه‌های شمعدانی هنوز توسعه کاملی نیافته است (۱۴).

گزارشی مبنی بر کشت بافت گیاه شمعدانی عطری در ایران ثبت نشده است. لذا در این پژوهش سعی بر آن است که با توجه به مطالعات قبلی که روی این گیاه انجام شده یک دستورالعمل بهینه جهت تکثیر و باززایی این گیاه پیشنهاد شود و همچنین تنوعات سوماتیکی گیاهان باززایی شده از نظر مورفولوژیکی و ژنتیکی نیز مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تکثیر گیاه شمعدانی عطری: برای تکثیر گیاه شمعدانی عطری از گیاهان گلدانی تهیه شده از گلخانه‌ی تحقیقاتی مرکز پژوهشی شهید فزوه اصفهان استفاده گردید. برای تکثیر گیاه قطعاتی از ساقه به طول حدود ۱/۵ تا ۲سانتی‌متر از بخش راس گیاه که حاوی ۱ یا ۲ عدد برگ کوچک و جوانه انتهایی بود جدا نموده، ابتدا توسط آب حاوی ماده شوینده (مایع ظرفشویی) و سپس توسط آب مقطر شستشوی آن‌ها انجام شد. بعد از این مرحله قطعات جدا کشت به مدت ۲۰ دقیقه به محلول ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد منتقل شدند. سپس قطعات با آب مقطر استریل شستشو داده شد و در پایان قطعات جداکشت به مدت ۱ دقیقه به محلول قارچ کش ویتاواکس ۲ درصد انتقال داده شد و در پایان مجدد قطعات جدا کشت با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

قطعات جداکشت در شرایط استریل به محیط کشت MS پایه جهت تکثیر انتقال داده شدند. محیط کشت‌های حاوی قطعات جداکشت به اتاقک رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای حدود ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. نمونه‌ها پس از ۱۵ روز به مرحله‌ی ریشه دهی وارد شد و از روز ۲۱ به بعد گیاهان افزایش رشد طولی و تولید برگ‌های جدید نمودند. گیاهان رشد یافته در این مرحله جهت مرحله‌ی باززایی گیاه مورد استفاده قرار گرفت.

باززایی گیاه شمعدانی عطری: در شرایط استریل، برگ و ساقه گیاه در قطعات حدود ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری برش یافتند و سپس این جدا کشت‌ها از بخش سطح شکمی در مورد برگ و افقی در مورد ساقه به ظروف کشت حاوی محیط‌های کشت MS پایه حاوی تنظیم کنندگان رشد بر اساس جدول ۱ انتقال داده شدند (۸ و۱۵). پس از یک هفته در لبه‌های جدا کشت برگ و انتهای ساقه کالوس های کوچک تولید شد و پس از دو هفته نوساقه (shoot) از این کالوس ها ایجاد و پس از چهار هفته نو ساقه‌های رشد یافته تولید ریشه نموده و بدین ترتیب گیاه شمعدانی عطری بارزایی شد. گیاهان باززایی شده سپس برای تکمیل رشد به محیط کشت MS پایه انتقال داده شدند.

بررسی تنوع مرفولوژیکی و آناتومیکی در گیاهان باززایی شده: پنج گیاه باززایی شده به صورت تصادفی انتخاب شدند و از نظر شکل برگ با یکدیگر و با نمونه شاهد (غیر باززائی) مقایسه گردیدند. همچنین از برگ گیاهان اپی‌درم تهیه شد و زیر میکروسکوپ تعداد و شکل کرک‌های گیاه مورد بررسی قرار گرفت. شمارش تعداد کرک در ۳ تکرار انجام شد.

بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان باززایی شده: پنج گیاه باززایی شده در مرحله‌ی قبل که تنوع مورفولوژیکی و آناتومیکی آن‌ها بررسی شده بود جهت بررسی تنوع ژنتیکی نیز استفاده گردید. از این گیاهان ابتدا DNA با استفاده از CTAB (۱۶) استخراج شد و سپس بررسی تنوعات سوماکلونال تعدادی از گیاهان باززایی شده با استفاده از پرایمرهای: RAPD (Randomly Amplification Polymorphism Analysis DNA) شامل: OPAA-14 , FPK 1-05 , OPB-08 , OPB-07, OPA-18 و پرایمر های: ISSR (Inter Simple Repeat Sequence) شامل: (AC)8 TA , (AC)8 CG , (AC)8 T , (AC)8 C , (GATA)4 مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

برای استخراج DNA ، ابتدا ۰/۵ گرم از بافت برگ گیاه با استفاده از دانه‌های کوچک شیشه (Glass beed) در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری خرد گردید. سپس به هر یک از تیوپ‌ها ۲۵۰ میکرو لیتر بافر استخراج اضافه گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰میکرولیتر انجام گردید و شامل مواد زیر بود:

Taq DNA polymerase (یک واحد در میکرولیتر) ۰/۲ میکرولیتر، dNTp (۲۰ میلی مولار) ۲ میکرولیتر ، PCR buffer(l0x) ۲ میکرولیتر ، DNA ۳ میکرولیتر، primer (۱۰ پیکومول در لیتر) ۱/۵ میکرولیتر و $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) ۰/۸ میکرولیتر. پرایمرهای مورد استفاده از شرکت ARANCO, IRAN تهیه گردید. شرایط انجام PCR در جدول شماره ۲ آورده شده است.

بررسی آماری: هر آزمایش در پنج تکرار و با چهار قطعه‌ی جدا کشت از برگ بالغ و ساقه در قالب طرح کامل تصادفی اجرا گردید. تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS-18 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

جدول ۱: محیط های کشت مختلف مورد استفاده برای بازازایی گیاه شمعدانی

نام محیط کشت	ترکیبات محیط کشت
M_0	MS
M_1	MS + Ki(2mg/lit) + NAA (2mg/lit)+2,4.D(2mg/lit)
M_2	MS + BAP (2mg/lit) + NAA (0/1mg/lit)
M_3	MS + BAP(2mg/lit) + NAA (1mg/lit)
M_4	MS + BAP (2mg/lit) + NAA (2mg/lit)

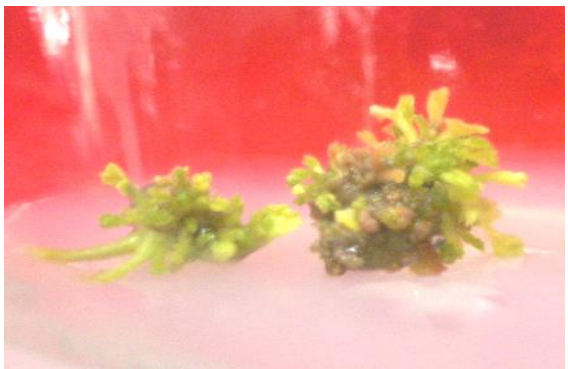
جدول ۲: شرایط انجام PCR.

Denataration	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه
Denaturation	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۱ دقیقه
Anelling	۳۷ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه
Extension	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه
تعداد سیکل	۳۵	

نتایج

اثر محیط کشت و نوع قطعه‌ی جدا کشت در تولید نوساقه و ریشه

در جدول ۳ اثر محیط کشت‌های مختلف و قطعات جدا کشت متفاوت بر درصد تولید نوساقه و ریشه نشان داده شده است. داده های جدول گویای این نکته است که درصد تولید نوساقه در محیط کشتM_1 (شاهد) حاوی قطعات جدا کشت ساقه و برگ حداقل یعنی صفر بود.

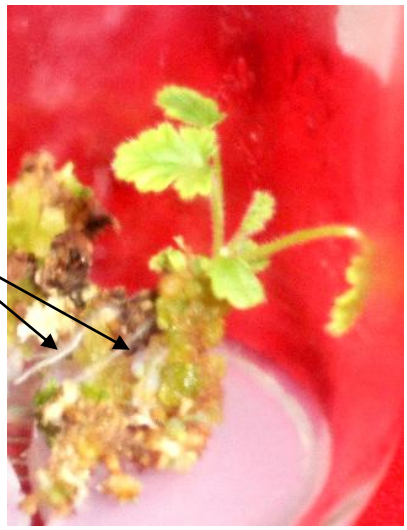


شکل ۱: تولید نوساقه روی کالوس حاصل از جداکشت برگ در محیط کشت M_2

در محیط کشت M_2 حاوی جدا کشت ساقه نیز تولید نوساقه حداقل بود. ولی در همین محیط کشت در حضور قطعه‌ی جداکشت برگ حداکثر تولید نوساقه ۹۵ درصد مشاهده شد (شکل ۱) که اختلاف معنی‌داری بین نوع قطعه‌ی به کار برده شده جهت کشت از نظر آماری را عنوان می‌کند. بین محیط‌های کشت M_3 و M_4 در حضور قطعات جدا کشت ساقه و برگ تفاوت معنی‌داری از نظر درصد تولید نوساقه مشاهده نشد (جدول ۳).

بررسی داده‌ها نشان داد که در محیط کشت M_1 هیچگونه ریشه‌ای تولید نشد. محیط کشت M_2 با جدا کشت برگ با ریشه‌زایی ۱۰۰ درصد بیشترین میزان ریشه‌زایی را نشان داد که تفاوت معنی‌داری را از نظر نوع محیط کشت و قطعه‌ی جدا کشت با سایر محیط ها و قطعات جدا کشت مشاهده نشد (شکل ۲). در محیط کشت M_3 نیز درصد ریشه‌زایی در قطعات جدا کشت ساقه ۴۵ درصد و در برگ ۶۰ درصد بود که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در محیط کشت M_4 نیز در حضور قطعه‌ی جدا کشت برگ تنها ۱۰ درصد و در حضور

قطعه‌ی جدا کشت ساقه ۲۰ درصد ریشه‌زایی مشاهده شد کـه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد. بین محیط کشت M_3 و M_4 از نظر تولید ریشه اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نشد (جدول ۳).



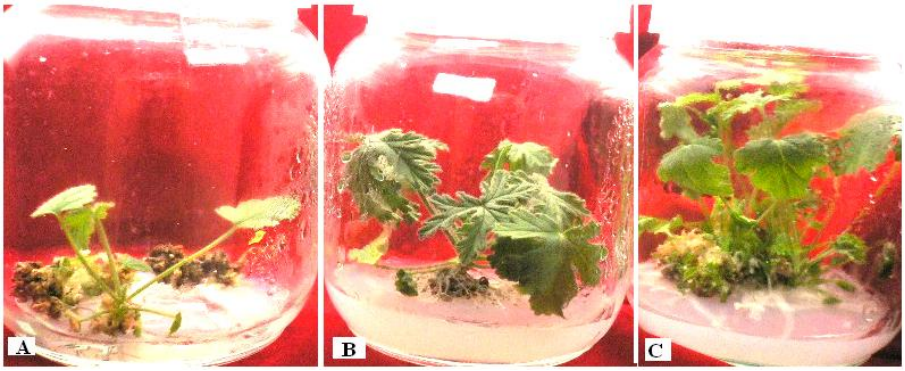
شکل ۲: تولید ریشه روی کالوس حاصل از جداکشت بـرگ در محـیط کشت M_3

جدول ۳: اثرنوع محیط کشت و نوع قطعه‌ی جدا کشت در تولید نوساقه و ریشه گیاه شمعدانی عطری. حروف غیرمشابه در هر ستون بطور مستقل بیـانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن ($P\leq ۰/۰۵$) است. اعداد به صوت میانگین±SE بیان شده است.

قطعه جدا کشت	محیط کشت	درصد تولید نو ساقه	در صد تولید ریشه
ســاقه	M_0	۰±۰ c	۰±۰ c
	M_1	۰±۰ c	۰±۰ c
	M_2	۰±۰ c	۰±۰ c
	M_3	۳۵±۱۸/۷ b	۴۵±۱۴/۰۴ b
	M_4	۲۰±۵/۰ bc	۲۰±۵/۰ c
بــرگ	M_0	۰±۰ c	۰±۰ c
	M_1	۰±۰ c	۰±۰ c
	M_2	۹۵±۱۱/۱ a	۱۰۰±۰ a
	M_3	۳۰±۱۸/۳ bc	۶۰±۱۲/۷ b
	M_4	۳۵±۶/۱ b	۱۰±۶/۱ c

مورفولوژی برگ گیاهان گیاهان غیر باززائی و باززایی شده

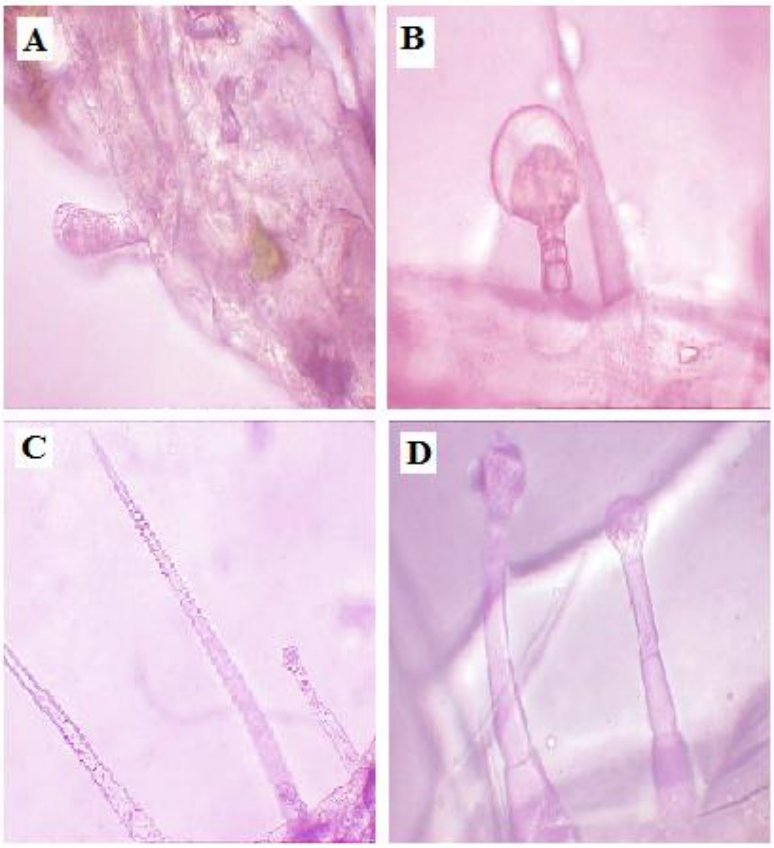
در گیاهان غیر باززایی شده بـرگ از نظـر شـکل ظـاهری دارای بریدگی‌های عمیق و زیاد می باشد. در گیاهان باززایی شـده نیـز سه نوع تنوع برگ از نظر شکل ظاهری قابل تشخیص مـی‌باشـد. الف) برگی که مشابه با گیاهان والد بوده دارای بریدگی‌های زیـاد و عمیق می‌باشد که حدود ۵۰ درصد از گیاهان بـاززایی شـده را تشکیل می‌دهد (شکلB۳). ب) برگـی بـا تعـداد بریـدگی‌هـای بسیار کم در حاشیه که عمق این بریـدگی‌هـا نیـز بسـیار کـم و نامحسوس است و حدود تقریبا ۲۰ درصد از گیاهان باززایی شده را در برمی‌گیرد (شکل A۳). ج) برگی که حالت حد واسـط بـین دو نوع قبلی را دارد و حدود ۳۰ درصد از گیاهان باززایی شـده را شامل می‌شود (شکل C۳).



شکل۳: تنوع شکل برگ در گیاهان باززایی شده

مورفولوژی کرکهای غـدهای و غیرغـدهای در گیـاه غیـر بازائی وبازایی شده

در برش‌های تهیـه شـده از بخـش اپـی‌درم فوقـانی بـرگ گیـاه شمعدانی عطری سه نوع کرک غده‌ای و همچنین یک نوع کرک غیرغده‌ای از هم قابل تشخیص بود که شامل: الف) کرک غـده‌ای با ۵ سلول که ۳ سلول آن پایه کرک را می‌سازد و یکی به عنوان سلول نگهدارنده در بخش قاعده‌ای قرار دارد و یک سلول متـورم که در راس قرار گرفته و حاوی ماده ترشحی است. این کـرک از نظر طولی کوتاه قد بود (شکل۴B). ب)ـ کـرک غـده ای، کـرک کوتاهی است که قسمت راسی کرک به سـمت نـوک بـرگ فـرم خمیده پیدا کرده است و سلول انتهای این کرک به فـرم کـروی شکل است و به نظر دارای مواد ترشحی کمی مـی‌باشـد (شـکل ۴A). ج) کرک غیر غده‌ای که دارای قسمت راسی نوک تیز می باشد و نقش محافظتی دارد (شکل ۴C) و د) کرک غده‌ای مشابه با نـوع اول از ۵ سـلول تشـکیل شـده ولـی نسـبت بـه نـوع اول کشیده‌تر است و سلول انتهای آن نیز تـورم زیـادی پیـدا نکـرده است (شکل ۴D). بین گیاهان غیر بازایی و بازایی شده ار نظـر مورفولوژی کرک‌هـا تفـاوتی مشـاهده نشـد و انـواع کـرک‌هـای مشاهده شده در گیاهان غیر بازایی در گیاهان بازایی شده نیـز مشاهده گردید.



شکل۴: انواع کرک در اپیدرم برگ گیاه شمعدانی عطری بازائی شده و غیر بازائی

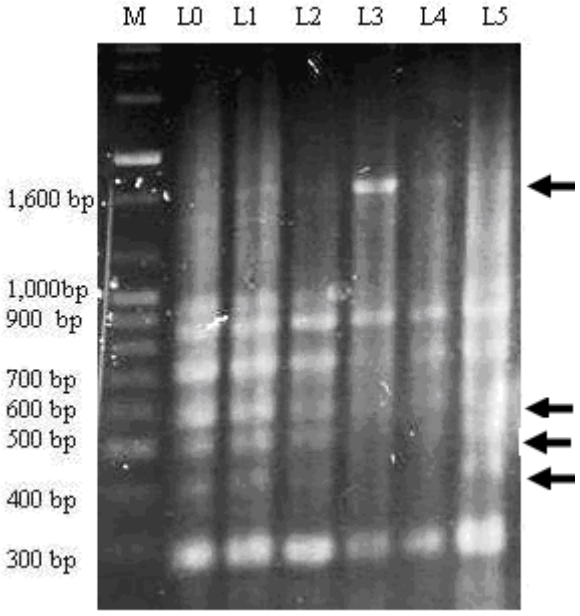
تعداد کرک‌هـای غـدهای و غیـر غـدهای گیاهـان غیـر بازائی(شاهد) و گیاهان بازایی شده

داده‌های جدول۴ نشان می‌دهد که از نظر تعـداد کـرک غـده‌ای بین گیاه غیر بازایی (شـاهد) ولایـن‌هـای ۱، ۳، ۴ و ۵ گیاهـان بازایی شده اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده مـی‌شـود. بدین صورت که گیاه شاهد بـا میـانگین تعـداد ۷۳ عـدد کـرک غده‌ای در هر میلی‌متر برگ دارای بیشترین تعداد کرک غـده‌ای ولاین‌های ۳ و۴ به ترتیب با داشتن ۲۲ و ۲۶/۳ میـانگین تعـداد کرک غده‌ای در هر میلی‌متر برگ دارای کمتـرین تعـداد کـرک غدهای هستند.

نتایج بررسی تعداد کرک‌های غیرغده‌ای و مقایسه میانگین آن‌ها نیـز نشـان داد کـه بـین تعـداد کـرک غیرغـده‌ای گیـاه شـاهد ولاین‌های ۱و۵ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشـاهده نشـد، ولی لاین‌های ۳ و ۴ با کمترین میانگین تعداد کرک غیر غـده‌ای در هر میلی‌متر مربع اپی‌درم فوقانی برگ شمعدانی عطری نسبت به گیاه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

جدول۴: مقایسه میانگین تعداد کرک‌های غده‌ای و غیرغده‌ای در هر میلی‌متر مربع سطح اپی‌درم فوقانی برگ لاین‌های گیاهان بازرایی شده با گیاه شاهد (غیر بازرایی شده). حروف غیرمشابه در هر ستون بطور مستقل بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن ($P\leq ۰/۰۵$) است. اعداد به صورت میانگین±SE بیان شده است.

گیاه	تعداد کرک غده‌ای	تعداد کرک غیر غده‌ای
شاهد(غیر بازرایی)	۷۳± ۷ a	۵۹/۶± ۶/۵ b
لاین۱	۶۲± ۳/۴ b	۶۶/۳± ۶/۵ ab
لاین۲	۶۴± ۴/۳ ab	۷۵/۳± ۴ a
لاین۳	۲۲± ۳/۴ d	۴۴/۳± ۷/۵ c
لاین۴	۲۶/۳± ۶/۵ d	۳۹/۶± ۶/۵ c
لاین۵	۴۱/۶± ۷/۵ c	۶۶/۳± ۶/۵ ab



شکل۵: الگوی باندهای حاصل از RAPD-PCR پنج لاین گیاه بازرایی شده در مقایسه با گیاه شاهد (غیر بازرایی). نمونه ها پس از PCR با پرایمرهای OPB-08, OPB-07 برروی ژل آگارز ۱ درصد تفکیک شدند. M: مارکر، L0: گیاه شاهد و L1 تا L5 به ترتیب گیاهان بازرایی شده می باشند. (فلش‌ها باندهای متفاوت را نشان می دهد)

تنوعات ژنتیکی گیاهان بازرایی شده

به منظور بررسی تنوعات سوماتیکی احتمالی بین گیاهان بازرایی شده و مقایسه‌ی آن با گیاه شاهد RAPD-PCR بر روی این گیاهان انجام شد که تنها نتایج ثابت و قابل تکرار با استفاده از پرایمرهای OPB-08 وOPB-07 که به صورت ترکیبی استفاده شدند بدست آمد. با توجه به شکل ۵ با استفاده از پرایمرهای OPB-08 وOPB-07 باندهایی در محدوده 300 bp تا 1600 مشاهده شد. با مقایسه این باندها بین گیاه شاهد و گیاهان بازرایی شده تنها بین گیاه شاهد ولاین‌های ۳ و ۴ اختلاف از نظر حضور باندهایی اختصاصی در محدوده ۱۶۰۰ bp و حذف باندهایی در این لاین‌ها در محدوده ۴۰۰ bp تا ۷۰۰ مشاهده شد و سایر لاین‌ها از نظر حضور یا عدم حضور باند با گیاه شاهد تفاوتی نداشت. وجود باندهای اختصاصی و عدم حضور سایر باندهای مربوط به شاهد در دو لاین ۳و۴ بیانگر اختلاف این دولاین با سایر لاین‌های بازرایی شده و شاهد بود.

بحث

در این مطالعه اثر نوع قطعه جداکشت و محیط کشت‌های مختلف بر بازرایی گیاه شمعدانی عطری مورد مطالعه قرار گرفت. بازرایی گیاهان در شرایط کشت در شیشه تحت تاثیر تنظیم کنندگان رشد اندوژن و اگزوژن و وابسته به مقادیر اکسین و سیتوکینین و نوع قطعه‌ی جدا کشت و شرایط محیط کشت

می‌باشد (۱۸). در حضور قطعه جدا کشت برگ، بیشترین میزان تولید نوساقه و ریشه در محیط کشت M_2 یعنی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. با استفاده از قطعه جداکشت ساقه در حضور همین محیط کشت هیچگونه اندام زایی مشاهده نشد و اختلاف معنی‌داری بین کاربرد این دو نوع قطعه‌ی جداکشت از نظر آماری مشاهده شد که این گویای تاثیر استفاده از قطعات جداکشت متفاوت در ارگانوژنز این گیاه می‌باشد و دلیل آن را می توان به میزان سطح غلظت هورمون های درونی قطعات جداکشت نسبت داد. افزایش توان بازززایی گیاه شمعدانی عطری توسط به‌کارگیری قطعه جداکشت برگ در گزارش‌های پیشین نیز عنوان شده که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد (۱۹و۲۰).

در محیط‌های کشت مختلف در حضور جداکشت برگ تفاوت معنی‌داری از نظر تولید نوساقه و ریشه از نظر آماری مشاهده شد که این گویای این نکته است که القا نوساقه و ریشه در گیاه شمعدانی تحت تاثیر غلظت تنظیم کنندگان، به خصوص سیتوکینین و اکسین می‌باشد (۲۱). در محیط کشت M_1 هیچگونه اندام زائی مشاهده نشد که این امر احتمالا به علت اثرات نامطلوب 2,4-D می‌باشد که یک علف کش و متوقف کننده ارگانوژنز است (۲۲). در این پژوهش محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با به کارگیری قطعه‌ی جدا کشت برگ بهترین محیط برای بازززایی گیاه شمعدانی عطری در بین سایر محیط های کشت بدست آمده است. در این راستا گزارش‌هایی مبنی بر استفاده محیط کشت حاوی ۰/۵ تا ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA (۸) جهت بیشترین میزان تولید نوساقه و محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA برای ریشه‌زایی گیاه شمعدانی پیشنهاد شده است (۱۵) که تا حدودی با نتایج ما مطابقت دارد.

محیط‌های کشت مورد استفاده برای بازززایی گیاه کامل از قطعات جدا کشت اغلب منشا تنوع هستند. این بدین مفهوم است که درصد قابل توجهی از گیاهان بازززایی شده ممکن است از نظر ژنوتیپ و فنوتیپ شبیه گیاهان والدی که ریز نمونه‌ی اولیه از آن گرفته شده است نباشد. برای ارزیابی تنوع سوماتیکی در گیاهان بازززایی شده می‌توان از تجزیه و تحلیل‌های فنوتیپی استفاده نمود ولی به تازگی فنون مولکولی به طور فزآینده‌ای در این زمینه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۳).

نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی برگ گیاهان بازززایی تنوع شکل برگ را در بخش حاشیه‌ی برگ و تنوع عمق بریدگیها در این بخش را نشان می‌دهد. این نتایج با یافته‌های گزارش شده توسط saxena و همکاران (۶) مبنی به تنوع مورفولوژیکی برگ‌ها در گیاهان بازززایی شده شمعدانی عطری نسبت به گیاهان والد تطابق دارد. در این گزارش عنوان شده که گیاهان بازززایی شده دارای برگ‌هایی با بریدگی کمتر نسبت به والدین می‌باشند. بررسی‌های مورفولوژیکی کرک‌های گیاه شمعدانی عطری نیز حضور سه نوع کرک را نشان می‌دهد که یکی حالت کشیده و نوک تیز داشته و سه تای دیگر دارای بخش انتهای متورم می‌باشد. مشابه این نتیجه در گونه‌های دیگرشمعدانی نیز گزارش شده است (۱۰). دلیل حضور سه نوع کرک غده‌ای با مورفولوژی متفاوت مشخص نمی‌باشد. احتمالا کرک‌های غده‌ای کوچک، کرک‌های مشابه با کرک‌های غده‌ای بزرگ هستند که موفق به رشد کامل نشده‌اند و تکامل به منظور ترشح یا ذخیره روغن فرار را پیدا نکرده‌اند (۲۴). از نظر تعداد کرک‌های غده‌ای و غیر غده‌ای نیز مقایسه‌ی میانگین تعداد کرکها در گیاهان بازززایی شده با گیاه شاهد نشان داده که در بیشتر لاین‌های بازززایی شده از نظر تعداد کرک ترشحی و غیر ترشحی کاهشی نسبت به گیاه شاهد مشاهده می‌شود که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد. با بررسی داده‌ها مشاهده می‌شود که این کاهش در لاین ۳ و ۴ بیشتر می‌باشد. کاهش تعداد کرک غده‌ای برای این گیاه با توجه به اینکه کرک‌های غده‌ای در این گیاه حاوی مواد ترشحی می‌باشند یک صفت مطلوب نیست. البته در مطالعه‌ای که روی این گیاه برای اثر تعداد کرک بر میزان تولید مواد ترشحه انجام گرفت عنوان شده که تعداد کرک تاثیر زیادی بر میزان تولید روغن فرار در این گیاه ندارد (۲۴).

بررسی تنوع سوماتیکی ۵ لاین بازززایی شده گیاه شمعدانی عطری به روش RAPD-PCR نیز گویای وقوع تنوع سوماتیکی می‌باشد. مقایسه‌ی الگوی باندهای حاصل از تکثیر قطعات DNA در نمونه شاهد ولاین‌های بازززایی شده نشان می‌دهد که در لاین‌های ۱، ۲ و ۵ الگوی باندها مشابه با شاهد می‌باشد ولی در لاین‌های ۳و۴ تغییری در الگوی باندها نسبت به گیاه شاهد مشاهده می‌شود. با توجه به نتایج حاصل از بررسی‌های مرفولوژیکی روی تعداد کرک‌های غده‌ای و غیرغده‌ای که بیشترین کاهش تعداد این کرک‌ها نیز در لاین‌ها ۳ و۴ مشاهده شد و نتایج حاصل از بررسی الگوی باندهای الکتروفورزی این لاین‌ها می‌توان نتیجه گرفت که تغییر در میزان تعداد کرک‌های

غده‌ای و غیرغده‌ای در این گیاه در تنوع سوماتیکی ایجاد شده می‌تواند پایه و اساس ژنتیکی داشته باشد. این تنوعات می‌تواند در اثر هورمون‌های بکار رفته در سیستم باززائی و استعداد ذاتی گیاه شمعدانی جهت تنوع‌پذیری باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از تکثیر و باززایی گیاه شمعدانی عطری در این پژوهش نشان می‌دهد که این گیاه می تواند در محیط MS پایه تکثیر یابد و در محیط حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA دارای بیشترین میزان باززایی می باشد. بررسی تنوعات سوماتیکی این گیاه نیز تنوع مورفولوژیکی برگ و کرک را در گیاهان باززایی شده نسبت به شاهد نشان می‌دهد که منطبق بر تغییرات ژنتیکی در این گیاهان می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسنده مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به واسطه حمایت از این پژوهش تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Mozafarian, V.A. The culture of the Iranian plant name. 2th Ed. Iran: Contemporary Culture company; 2004.

2. Mithila J, Murch SJ, KrishnaRaj S, Saxena PK. Recent advances in Pelargonium in vitro regeneration system. Plant Cell Tissue Org. Cult. 2001; 67: 1-9.

3. Marsolias AA, Wilson DPM, Tsuita MJ, enaratna T. Somatic emberigenesis and artifical seed production in zonal (*Pelargonium× hortorum*) and ragal(*Pelargonium × domesticum*) geranium.Can. J. Bot. 2001; 69: 1188-1193.

4. Agarwal PK, Ranu RS. Regeneration of plantlets from leaf and petiole explants of *Pelargonium×hortorum*. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 2000; 36: 392-397.

5. Hassanein A, Dorion N. Efficient plant regeneration system from leaf discs of zonal (*Pelargonium×hortorum*) and two scented (*P. capitatum* and *P. graveolens*) geranium. Plant Cell Tissue Org. Cult. 2000; 83: 231-240.

6. Saxena G, Banerjee S, Rahman L, Mallavarapu GR, et al. An efficient *in vitro* procedure for micropropagation and generation of somaclones of rose-scented Pelargonium. Plant Sci. 2005;155: 133-140.

7. Zhou jh, Yang MX, Xian YX. Study on leaves *in vitro* culture of *Pelargonium graveolens*, Journal of Zhongkai Agrotechnical College. 2005; 2: 5-9.

8.Yi Qy, Xia Kg, Jiang M, Ren H. Study on in vitro Shoot Culture of *Pelargonium graveolens* and Its Production. Southwest China Journal of Agricultural. 2010**:** 2: 59-67.

9. Ehsanpour, AA, Amini F. Plant cell and tissue culture. 2th Ed. Jahad University, Isfahan branch; 2003.

10. Saxenaa G, Rahmanb L, Vermac P, Banerjeed S, et al. Field performance of somaclones of rose scented geranium (Pelargonium graveolens L'Her Ex Ait.) for evaluation of their essential oil yield and composition. industrial crops and products. 2008; 27: 86-90.

11. Oosthuzen L, Coetzee J. Morphogenesis of thrichomes of Plargonium scabrum. South African Journal of Botany. 1983; 2: 305-310.

12. Gutierrez N, Avila CM, Due G, Marget P, et al. CAPs markers to assist selection for low vicine and convicine contents in faba bean (*Vicia faba* L.) Theor. Appl. Genet. 2006; 114(1): 59-66.

13. Skirvin RM, Janick J. Velvet rose, Pelargonium a scented geranium, Hort. Sci. 1976; 11: 61- 62.

14. Wojtana A, Gabryszewska E, Marasek A. Regeneration of Pelargonium× Hederaefolium 'Bonete' from petiole explants. Acta Physiol. Plant. 2004; 26: 255-262.

15.Sukhumpinij P, Kakihara F, Kato M. *In vitro* regeneration from mature leaf explants of *Pelargonium rapaceum* (L.). Science Horticulturae. 2010; 126: 385-389.

16. Ehsanpour AA, Twell D. Analysis of SFL1 and SFL2 promoter region in Arabidopsis thaliana using gateway cloning system. Journal of Science. 2005; 16(4): 303-309.

17. Ehsanpour AA, Tavassoli M, Arab L. Sex determination of Pistacia vera L. using ISSR markers. Malays Appl Biol. 2008; 37(2): 25-28.

18. Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 1957; 11: 118-131.

19. Dunbar KB, Stephen CT. Shoot regeneration of hybrid seed geranium (*Pelargonium×hortorum*) and regal geranium (*Pelargonium×domesticum*) from primary callus cultures. Plant Cell Tissue Org. Cult. 1989; 19: 13-21.

20. Yi QY, Xia KG, Jiang M, Ren Ht. Study on *in vitro* shoot culture of *Pelargonium graveolens* and Its production. Southwest China Journal of Agricultural. 2010; 2: 59-67.

21. Poudyal BK, Zhang Y, Du G. Adventitious shoot regeneration from the leaves of some pear varieties (*Pyrus* spp.) grown *in vitro*. Front Agric. China. 2008; 2: 82-92.

22. Dodd JH, Robert LW. Experiment in Plant Tissue Culture. 3th Ed. Cambridge University Press, New York. 1995.

23. Khosrosahi, M, Behnamian M. Plant cell culture. 1th Ed. Tabriz University; 2007.

24. Eiasu BK, Steyn JM, Soundy P. Physiomorphological response of rose-scented geranium (*Pelargonium* spp.) to irrigation frequency South African Journal of Botany. 2011; 5: 1-8.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Winter 2013; 3(4): 327-326

Regeneration and Somatic Variation in *Pelargonium roseum* L.

Rezayatmand Z. Ph.D.

- Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

* Email corresponding author: zrezayatmand12@yahoo.com

Received: 10 Jun. 2012 Accepted: 1 Jan. 2013

Abstract

Aim: The *Pelargonium roseum* L. is an ornamental plant with important medical properties. The purpose of this study was to optimized the proliferation and regeneration of *Pelargonium roseum* L. and investigation of the possible somatic variation in the regenerated plant.

Material and methods: In this study first explants from the terminal buds as well as some small part of the stem were prepared and cultured in MS basal medium. Then some fragments of the cultured explants including parts of stems and leaves were isolated and transferred to mediums containing different growth regulators to stimulate micro-regeneration of the plants. From regenerated plants several lines were selected and their morphological characters as well as genetic diversity were evaluated.

Results: The rate of shoots and roots production was maximum in mediums containing leaf explants supplemented with 2mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA. Somatic variation of the regenerated lines in comparison with control group showed differences in leaf shape and number, in addition genetic differences were expressed in form of band addition and band removal in bonding pattern of DNA.

Conclusion: The different percentage of shoots and roots production was an indication of the inductive effect of mediums and explants variation on regeneration of the *Pelargonium roseum* L. Comparison of genetic variation and morphological diversity of regenerated plants could show the common base of genetic for somatic variation.

Key word: Genetic variation, *Pelargonium roseum* L., RAPD molecular marker, Regeneration, Somatic variation