فصلنامه (علمی – پژوهشی)
زیست شناسی تکوینی
سال دهم، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۷

بررسی اثر مقادیر مختلف کلسیم و منیزیوم بر تغییرات سلولی - تکوینی ریزغده‌های سیب‌زمینی در شرایط درون شیشه‌ای

زهرا زارع[۱*]، علیرضا ایرانبخش[۲]، مصطفی عبادی[۳]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران.
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
[۳] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، سمنان، ایران.

[*] Email: Zahrazarebio@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۳۱

چکیده

گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.)، گیاه زراعی و بسیار مهم دنیا است. روش تکثیر این گیاه عمدتا از طریق غیرجنسی است. روش‌های مرسوم و سنتی در تکثیر غیر جنسی گیاه با مشکلات مهمی مواجه است. اما ریزغده‌های سیب زمینی حاصل از کشت بافت جایگزین مناسبی برای غده‌های بذری است. هدف از این پژوهش بررسی اثر غلظت‌های مختلف $CaCl_2$ و $MgSO_4$ در محیط‌های کشت در شیشه بر تغییرات سلولی تکوینی ریز غده‌های حاصل از کشت بافت این گیاه است. در این پژوهش از محیط‌های کشت آزمایشگاهی جامد و مایع برای تهیه گیاهچه استریل والقای ریزغده زایی استفاده شد. در محیط‌های ریزغده‌زایی غلظت هر یک از ترکیبات حاوی کلسیم و منیزیوم ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ برابر حد تعیین شده در محیط‌کشت استاندارد MS در نظر گرفته شد. ریزغده‌زایی درتناوب نوری صورت گرفت. به منظور بررسی‌های تکوینی و تشریحی ریز غده‌ها، پس از تشکیل ریزغده ها، ابعاد طولی و عرضی آنها، تغییرات تعداد و ابعاد سلول‌ها و محتوای نشاسته در سلول‌های بافت پارانشیم پوست و مغز سنجیده شد. نتایج آماری معنی‌دار نشان داد در غلظت‌های مختلف $CaCL_2$ بیشترین تعداد ردیف‌های سلولی متعلق به محیط‌کشت با غلظت نیم تا یک برابر غلظت این ترکیب در محیط‌کشت استاندارد بود و از نظر تعداد دانه‌های نشاسته ریزغده‌های تکوین یافته در محیطی با غلظت برابر با غلظت استاندارد این ترکیب درمحیط‌کشت، بیشترین مقدار را نشان دادند. در گروه‌های $MgSO_4$ هر چند حضور حداقل مقدار منیزیوم برای تشکیل ریز غده ضروری است اما بر تغییرات سلولی بافتی ریزغده‌ها و میزان نشاسته اثر آماری معنی‌داری ندارد. بنابراین غلظت‌های استاندارد محیط‌کشت از این دو ترکیب تا نیمی از مقدار آن‌ها، بهترین محیط در کیفیت ریزغده‌ها می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: درشیشه، ریزغده زایی، سولفات منیزیوم ، سیب زمینی، کلرید کلسیم.

مقدمه

سیب‌زمینی *Solanum tuberosum* L. گیاهی دو لپه‌ای، یک‌ساله و علفی است که به علت تکثیر ازطریق غده ظرفیت بالقوه چند ساله بودن را داراست. متعلق به خانواده *Solanaceae* است که بیش از ۹۰ جنس و ۲۸۰۰ گونه در آن موجود است. اکثر گیاهان این

خانواده در سراسر جهان یافت می‌شوند [۱۸] در ایران سیب زمینی تقریبا در تمام استان‌ها از مناطق بیابانی تا مناطق مرطوب کرانه دریای خزر کشت می‌شود [٤]. از آنجا که این گیاه نقش مهمی در تغذیه مردم جهان و سبد غذایی خانواده ایرانی دارد [۱۳] در این مطالعه مورد توجه قرار گرفته است. این گیاه به دو روش جنسی (تولید بذر حقیقی) و غیر جنسی تکثیر می‌شود استفاده از روش جنسی و تولید بذر حقیقی اغلب در مطالعات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاح نژاد سیب‌زمینی متداول است. اما تولید تجاری عمدتا از طریق تکثیر رویشی است. روش‌های سنتی در تکثیر این گیاه بسیاری از بیماری‌ها را از نسلی به نسل دیگر انتقال می‌دهد و با افت شدید محصول روبروست [٤]. و از جمله مشکلاتی که در مسیر تولید سیب زمینی در دنیا وجود دارد کمبود بذر سالم و عاری از بیماری است [۸]. ازطرفی انبارداری و نگاهداری غده‌های بذری با هزینه بالا و مشکلاتی مواجه است از این رو در سراسر دنیا توجه ویژه‌ای به تولید ریزغده‌ها در شیشه متمرکز شده است [٤].

ریزغده‌ها، غده‌های بسیار کوچک هستند که در شرایط القای غده دهی در شیشه از گیاهچه‌های عاری از ویروس تولید می‌شوند ریز غده‌های تولید شده قابل کشت در گلدان و نهایتا در مزرعه هستند و از این طریق می‌توان به گیاه‌هایی با غده مطلوب دست یافت. ریز غده‌های تولید شده ابتدا در حالت خواب هستند و از این رو قبل از کاشت در مزرعه و یا گلخانه باید آنها را به مدت ۳ تا ٤ ماه در دمای ٦-٥ درجه نگهداری نمود [۱۳].

امروزه این محصول در جهان از نظر اهمیت غذایی مقام چهارم را بعد از گندم، برنج و ذرت دارد. از نظر محتوی مواد شامل ماکرو مولکول‌های اصلی چون پروتئین یا چربی و کربوهیدرات است و علاوه بر آن داری موادی مثل آب، فیبر، عناصر معدنی مثل کلسیم، فسفر، آهن، سدیم، پتاسیم و گروهی از ویتامین ها مثل بتا کاروتن، تیامین، ریبو فلاوین، نیاسین و اسید آسکوربیک است [۱۰].

سیب‌زمینی تقریبا در تمام استان‌های ایران از مناطق بیابانی تا مناطق مرطوب کرانه دریای خزر کشت می‌شود. گیاه سیب زمینی دارای ارقام زراعی زیادی است. رقم اگریا رقمی متوسط تا دیرس و از تلاقی بین ارقام کوآرتا و سملو در سال ۱۹۸۵ در کشور آلمان به بوجود آمده است و رشد ساقه‌ها بصورت ایستا می‌باشد رنگ گل آن سفید، میوه حاصل از آن بدون دانه است و عملکرد آن بسته به شرایط محیطی بسیار متغیر است، اندازه غده‌ها متغیر است غده‌های آن تخم مرغی شکل، رنگ پوست زرد و بخش گوشتی زرد تیره است. عمق چشم‌های غده‌ها نیز کم است و دارای دوره خواب بلند تا بسیار بلند هستند وزن خشک غده‌های آن بسته به شرایط محیطی رشد، متغیر است میزان نشاسته و قندهای احیایی در آن پایین است و از این رو در صنایع تبدیلی بسیار مناسب است [٦].

امروزه در دنیا و در کشور ما تحقیقات زیادی در ارتباط با ریزازدیادی گیاهانی با ارزش اقتصادی و یا دارویی صورت گرفته است [۱و۱۹] که در این میان پژوهش‌هایی نیز بر روند ریز غده‌زایی سیب‌زمینی و بهبود کیفیت آن صورت گرفته است. Khalil et al (2017)، Ashrafzadeh and Leung (2015)، Snnowald and Ebadi and Iranbakhsh (2011)، Snnowald (2015)، Hoque (2010)، Gami et al (2013)، عبادی و همکاران (۱۳۸۰)، بلندی و همکاران (۱۳۹۵) از جمله محققینی هستند که بر روند

ریزغده‌زایی سیب‌زمینی تحقیقات موثری انجام داده اند. در این تحقیق سعی بر این است که به بررسی بافت شناسی و سلولی تکوینی ریزغده ها ی حاصل از کشت در شیشه پرداخته شود. تا کنون تحقیقات اندکی در زمینه‌ی بافت شناختی ریز غده ها انجام شده است. Artschwager (1924)، Xu (1998) Cutter (1978) و Lee (2002) تحقیقاتی در این زمینه انجام داده‌اند. عبادی وهمکاران(۱۳۸۰) ضمن طراحی بیوراکتورهای پیوسته و نیمه پیوسته و تولید آزمایشگاهی ریزغده‌ها، روند تکوینی و سلولی ریز غده‌ها را از دید میکروسکپ نوری و الکترونی مورد بررسی قرار دادند.

بنابراین با توجه به اهمیت گیاه سیب‌زمینی در تغذیه خانواده‌ی ایرانی و نیز با توجه به اینکه امروزه کشت سلول و بافت جایگزین مناسبی برای تهیه‌ی غده بذری است [٤]، هدف از این پژوهش بررسی اثر غلظت‌های مختلف $CaCl_2$ و $MgSO_4$ در محیط‌های کشت در شیشه بر تغییرات سلولی تکوینی ریزغده‌های حاصل از کشت بافت این گیاه است. تا بتوان به کمک آن به شرایط مطلوب در تولید ریزغده‌ها پرداخت.

مواد و روش‌ها:

این تحقیق در سال ۱۳۹۲ در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام شد. رقم مورد بررسی رقم اگریا (*Agria*) و از موسسه تهیه و اصلاح بذر کرج تهیه گردید این رقم در کشت خاک از ارقام دیررس می‌باشد. مراحل کار در سه مرحله، الف – تهیه گیاهچه استریل، ب – شاخه‌زایی و ج – القای ریز غده درشیشه انجام شد. نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در کشت بافت، جوانه‌های چشم‌های غده‌های سیب زمینی بذری [۱۳] تهیه شده و همچنین تک گره‌های ساقه‌های گیاه سیب زمینی بود که از کاشت غده‌های سیب زمینی بذری در گلدان پس از یک ماه بدست آمده بودند[۲۱ و ۲۳].

برای تهیه گیاهچه‌های استریل، نمونه‌های گیاهی پس از استریل شدن با هیپوکلریت سدیم ۲ ٪ والکل ۷۰٪ در محیط‌کشت جامد MS (Murashing and skoog 1962) [۱۵]، به اضافه ۰,۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰,۵ میلی‌گرم GA3 و مقدار ۳۰ گرم بر لیتر ساکاروز و آگار در شرایط ١٦ h تاریکی و ٨h روشنایی استریل کشت داده شدند و پس از ٦ هفته گیاهچه‌های استریل قابل استفاده برای مراحل بعدی بدست آمدند. در مرحله بعدی به منظور شاخه‌زایی، شاخه‌های ۲ تا ۳ گرهی گیاهچه‌های استریل به‌دست آمده در مرحله‌ی قبلی، از گیاهچه‌ها جدا شدند و در ارلن‌های محیط‌کشت مایع MS حاوی ۰,۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰,٤ میلی‌گرم بر لیتر GA3و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، وا کشت شدند [۵ و۲۵] و بر روی شیکر (GFL) با تعداد دور ۱۰۰ در دقیقه در شرایط ١٦h روشنایی و ٨h تاریکی قرار داده شدند و پس از چهار هفته گیاهچه‌هایی با شاخه‌های فراوان ایجاد شد که این شاخه‌ها نمونه‌های کشت بافتی مورد نیاز برای القای ریزغده بودند [١٤و١٦].

در ادامه محیط‌های‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ٦٠ گرم در لیتر ساکاروز به منظور شرایط بهینه ریز غده‌زایی ساخته شد [٦]. سپس در شرایط استریل و استفاده از دستگاه لامینار ایرفلو محیط مایع MS شاخه‌زایی را از گیاهچه‌های پر شاخه مرحله قبلی خارج و محیط‌های MS مایع ریزغده‌زایی فوق را به عنوان گروه شاهد به آنها افزودیم و در شرایط نوری فتو پریود ٨ h نور ١٦h تاریکی و دمای

۲۲-۲۰ درجه بر روی شیکر با تعداد ۱۰۰دور دقیقه به مدت ۲ ماه، زمان ریزغده‌زایی و کیفیت ریزغده‌ها سنجیده شد [۱٤]. سپس تیمارهای مختلف شیمیایی را بنا بر غلظت‌های مختلف هر یک از ترکیبات $CaCl_2$, $MgSO_4$ محیط MS به صورت (۲MS، ۳/۲MS، ۱MS ۱/۲MS و ۰) ساخته و بر دیگر ارلن‌های محتوی شاخه‌های تکثیر شده به‌عنوان گروه‌های تیمار، اثر داده شد و نتایج مختلف متفاوتی به دست آمد [۱۱و۱۲].

در ادامه به‌منظور بررسی تغیرات تکوینی و تشریحی ریز غده‌ها در پایان مدت القا و پس از انجام ریزغده‌زایی، ریزغده‌های تولید شده از هر تیمار جدا شدند و ابعاد ریزغده‌ها در محور طولی و عرضی، تغیرات تعداد و ابعاد سلول‌های پارانشیمی پوست و مغز ریز غده‌ها و نیز محتوای نشاسته در این سلول‌ها در هر یک از تیمارها سنجیده شد.

به این منظور، ابعاد ریزغده‌ها با خط‌کش، تعداد و ابعاد سلول‌های پارانشیمی و محتوای نشاسته‌ی آن‌ها با گراتیکول و میکروسکوپ نوری(NIKON) مدل فوتو الفا بر روی مقاطع تهیه شده با میکروتوم (Laica) و برش‌های دستی بر روی هر تیمار مورد مطالعه قرار گرفت (بزرگنمایی X40 و X10).

به منظور بررسی‌های آماری از طرح کاملا تصادفی (Complete Randomized Design) (CRD) که مخصوص طرح‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای است استفاده گردید. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و SPSS صورت پذیرفت.

نتایج:

در این قسمت به ارائه نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف کلسیم و منیزیوم برروند ریزغده‌زایی و چگونگی ریزغده‌های تشکیل یافته، پرداخته می‌شود. هدف از انجام پژوهش بررسی های سلولی تکوینی ریزغده‌های حاصل از هر تیمار است و اینکه آیا تغییر مقادیر متفاوت این عناصر می‌توانند بر تغییر ساختار سلول و بافت ریزغده‌ها، اثری داشته باشند یا خیر؟ و درصورت ایجاد تغییر، این تمایز چگونه است؟

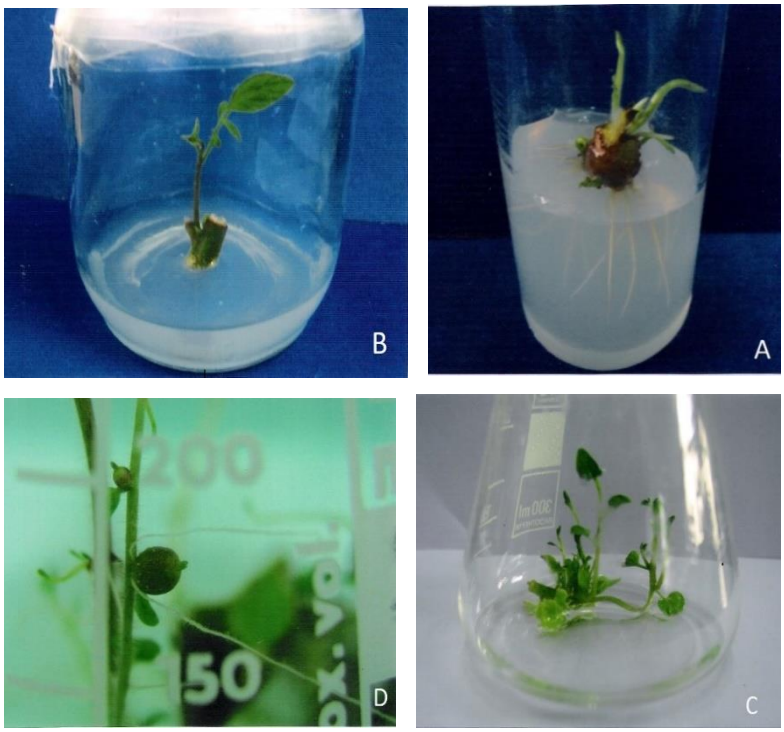
شکل ۱ جوانه‌های غده بذری و یا تک گره‌های ساقه‌ی گیاه سیب زمینی را در محیط‌کشت MS (شکل ۱، A و B) که برای تولید گیاهچه کشت داده شد نشان می‌دهد. در مرحله‌ی بعد گیاهچه‌های استریل به منظور شاخه‌زایی، به قطعات چند گرهی خرد شدند و در محیط MS مایع با هورمون‌های مناسب جهت شاخه‌زایی قرار گرفتند (حدود ۱ ماه) و پس از اینکه به اندازه ی کافی شاخه‌ها افزایش یافت (شکل ۱،C) به منظور القای ریز غده‌زایی، شاخه‌ها در محیط‌های القای غده‌زایی قرار گرفتند و پس از حدود دو ماه ریزغده‌ها تشکیل شدند (شکل ۱، D).

در ادامه محیط‌های‌کشت MS با غلظت‌های مختلفی از مقادیر متفاوت کلرید کلسیم و سولفات منیزیوم نسبت به استاندارد محیط کشت MS تهیه و به منظور القای ریزغده زایی مورد استفاده قرار گرفتند و در پایان مدت القا، ریزغده‌ها مورد بررسی قرار گرفتند (شکل‌های ۲و ۳).

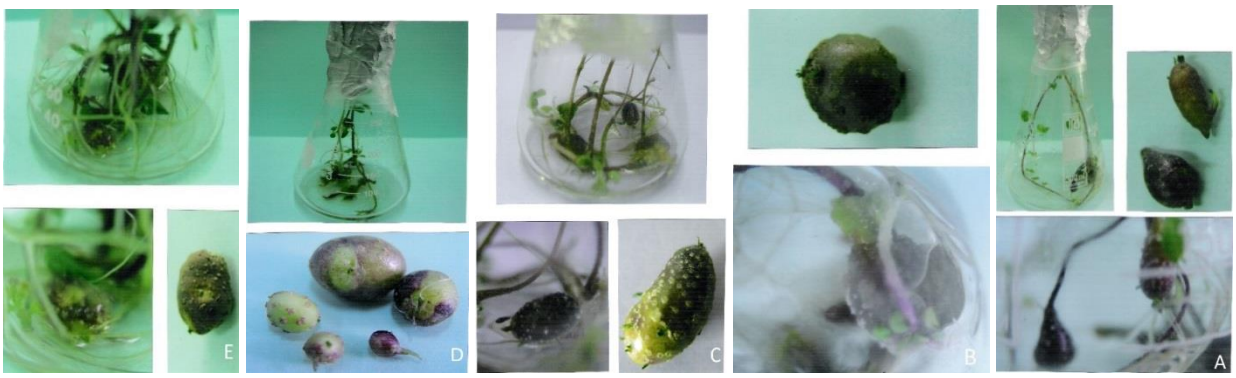
۱- نتایج اثر غلظت‌های مختلف $CaCl_2$ بر تکوین ریزغده‌ها

به منظور بررسی اثر ترکیب $CaCl_2$، غلظت‌های $۰/۲۲gl^{-1}$، $۰/٤٤\ gl^{-1}$، $۰/٦٦\ gl^{-1}$، $۰/۸۸gl^{-1}$ و محیط‌های فاقد این ترکیب در نظر گرفته شد که به ترتیب 1/2MS، 1MS، 3/2MS، 2MS و 0 می‌باشند. ریزغده‌های تشکیل یافته در غلظت‌های مختلف

$CaCl_2$ در بررسی ظاهری حالت کروی تا کمی کشیده قرار داشتند که ابعاد آنها در غلظت‌های ۰، ۱/۲، ۱، ۳/۲ و ۲ به ترتیب بر حسب میلی‌متر (٦/٥ و ٧) و (٦و ٧/٥) و (٧ و ٧/٥) و (٥/٦ و ٧١ /٦) و (٦ و ٦/٥) قرار داشتند(شکل ۲).



شکل ۱ – مراحل تکوین ریز غده‌های گیاه سیب زمینی A) کشت جوانه‌ی غده بذری B) کشت تک گره‌های ساقه C) شاخه‌زایی و D) القای ریز غده‌زایی (ترکیب کلی محیط کشت MS: عناصر پرمصرف، عناصر کم مصرف، ویتامین، هورمون، ساکارز و آگار)



شکل۲ – ریزغده‌زایی در غلظت های مختلف CaCl2 : A) شاهد B) محیط فاقد کلرید کلسیم C) کلرید کلسیم با غلظت 1/2 استاندارد محیط کشت MS. D)کلرید کلسیم با غلظت 3/2 استاندارد محیط کشت MS و E) کلرید کلسیم با غلظت ۲ برابر استاندارد محیط کشت MS.

پس از انجام ریزغده‌زایی، ریزغده ها از هر تیمار جدا شدند و ابعاد آنها اندازه‌گیری شد و از هر تیمار بزرگترین غده‌ها که نشان دهنده‌ی پایان تمایزات هریک بود، برای انجام بررسی‌های تکوینی انتخاب

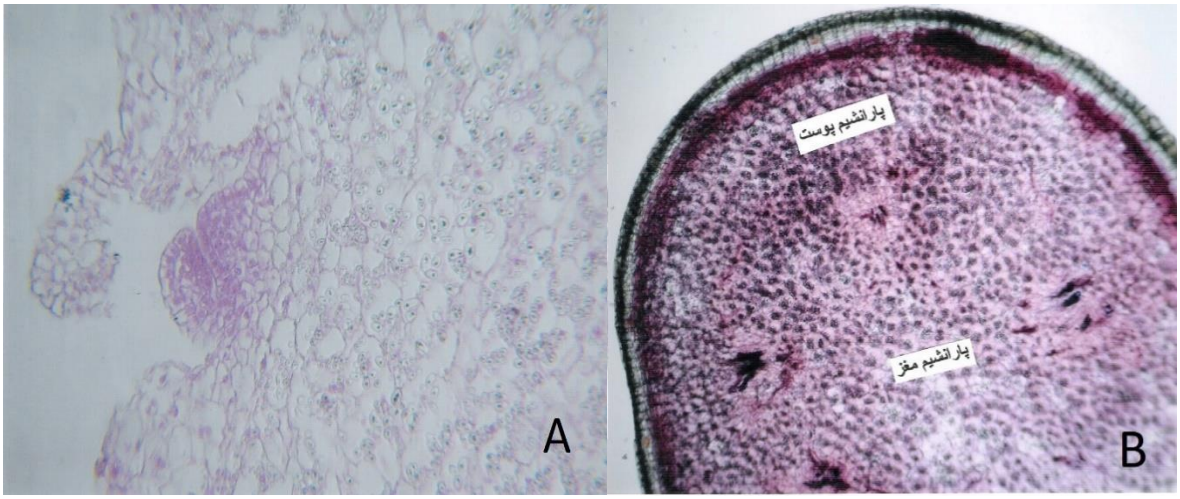
شد، نتایج هریک از گروه‌های تیماری در ادامه آمده است.

از آنجا که عمده بافت غده سیب زمینی متشکل از بافت پارانشیم‌های پوست و مغز است بنابراین سلول‌های این دو بافت از نظر تغییرات تکوینی مورد پژوهش قرار گرفتند. ویژگی‌هایی از سلول‌ها که برای اینگونه بررسی‌های تمایزی انتخاب شدند عبارت بودند از تعداد ردیف‌های سلولی بافت پارانشیم پوست و مغز، اندازه ابعاد سلول‌های پارانشیم پوست و مغز و تعداد دانه‌های آمیدون در سلول‌های پارانشیم پوست و مغز.

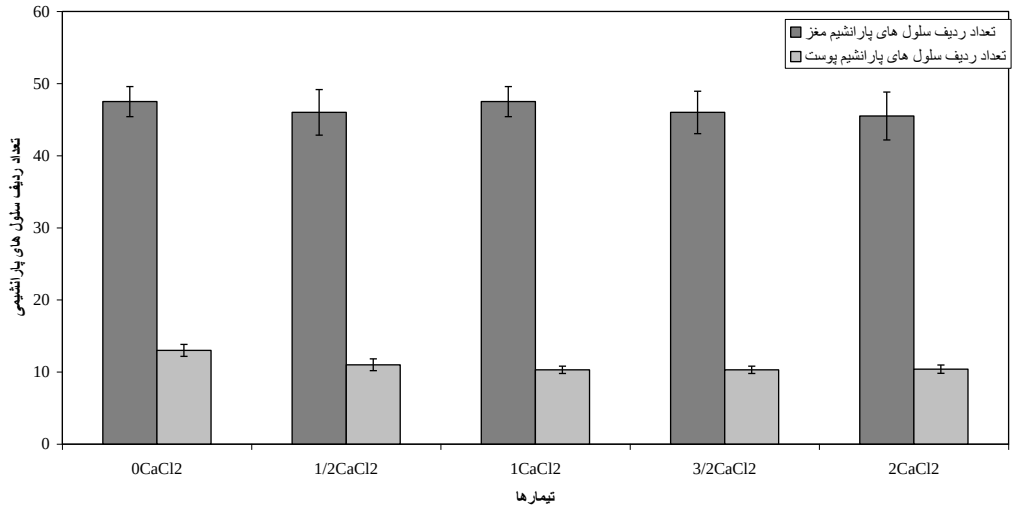
در ادامه ریزغده‌ها مورد برش‌گیری و ارزیابی میکروسکوپی قرار گرفتند (شکل ۳) نتایج آنالیز در مورد ویژگی‌های مورد پژوهش نشان داد که غلظت‌های مختلف $CaCl_2$ بر تعداد ردیف‌های سلول‌های پارانشیمی مغز تأثیری ندارد اما بر تعداد سلول‌های پارانشیمی پوست در نبود این عنصر تأثیر می‌گذارد، به‌طوری که تعداد لایه‌های سلولی نسبت به شاهد و حتی گروه‌های دیگر، افزایش معنی‌داری می‌دهد این مسأله در میانگین ابعاد این غده‌ها نیز مشخص است.

بررسی آماری برروی اطلاعات مربوط به طول و عرض سلول‌های پارانشیم پوست و مغز نشان داد که غلظت‌های مختلف $CaCl_2$ بر روی طول و عرض سلول‌های پارانشیم مغز و همچنین بر طول سلول‌های پارانشیم پوست اثر معنی‌داری داشته است و بیشترین رشد ابعاد از این نظر در گره‌های $Cacl_2$ ۰/۵ و ۱ برابر غلظت استاندارد دیده می‌شود. همچنین در ادامه نتایج در مورد تراکم دانه‌های آمیدون نشان داد که تراکم دانه‌های آمیدون در غلظت‌های کمتر از 1MS در پارانشیم مغز کاهش می‌یابد و در پارانشیم پوست نیز در فقدان این ماده کاهش دانه‌های آمیدون اتفاق می‌افتد. به هرحال غلظت‌های بالاتر از نظر تعداد دانه‌های آمیدون تفاوتی با شاهد نشان نمی‌دهند. با بررسی این نتایج مشخص شد که بهترین ریزغده ها از نظر اندازه و مقدار دانه‌های آمیدون گروه‌های با غلظت ۱ و ۱/۲ استاندارد کلرید کلسیم می‌باشد.

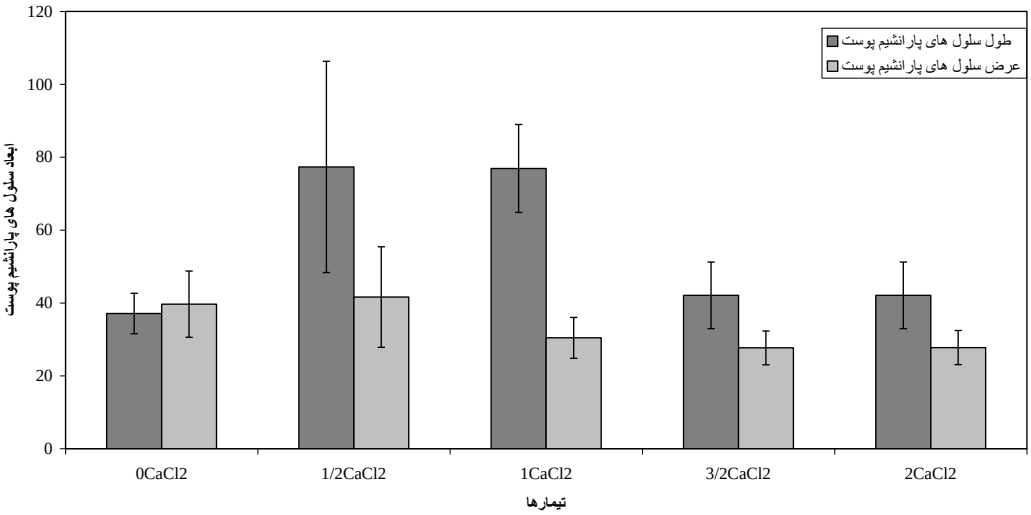
نمودارهای ۱-٤، نتایج حاصل از شمارش ردیف‌های سلولی پارانشیم‌های پوست و مغز، ابعاد سلول‌ها و محتوای آمیدن را در آن‌ها نشان می‌دهد:



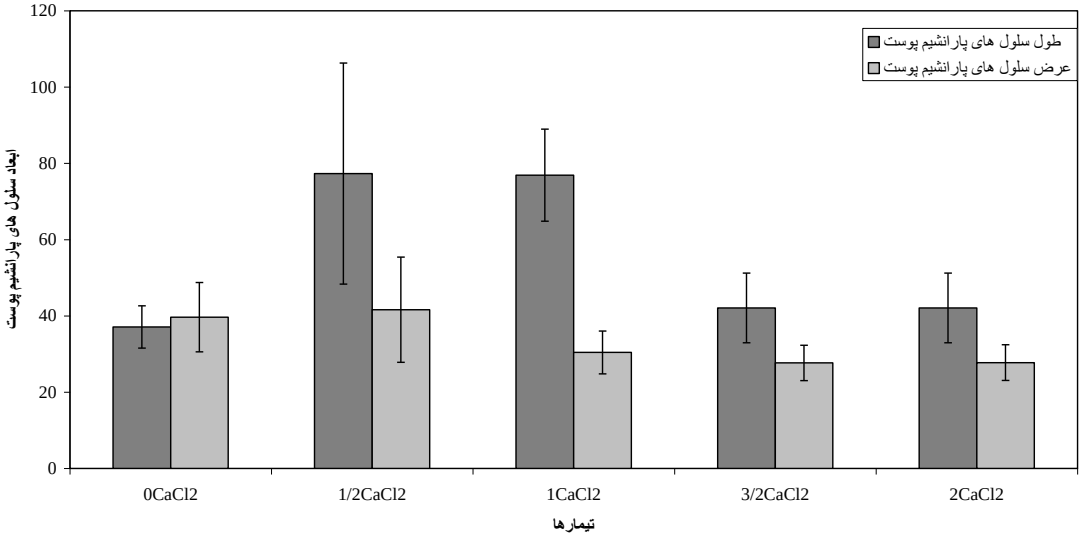
شکل ۳: نمایی از برش عرضی ریزغده ها A) برش میکروتومی از ناحیه جوانه روی ریزغده و B) برش دستی از یک ریز غده، نواحی پارانشیم مغز و پوست در ریز غده‌ها (A: X40 , B: X10).



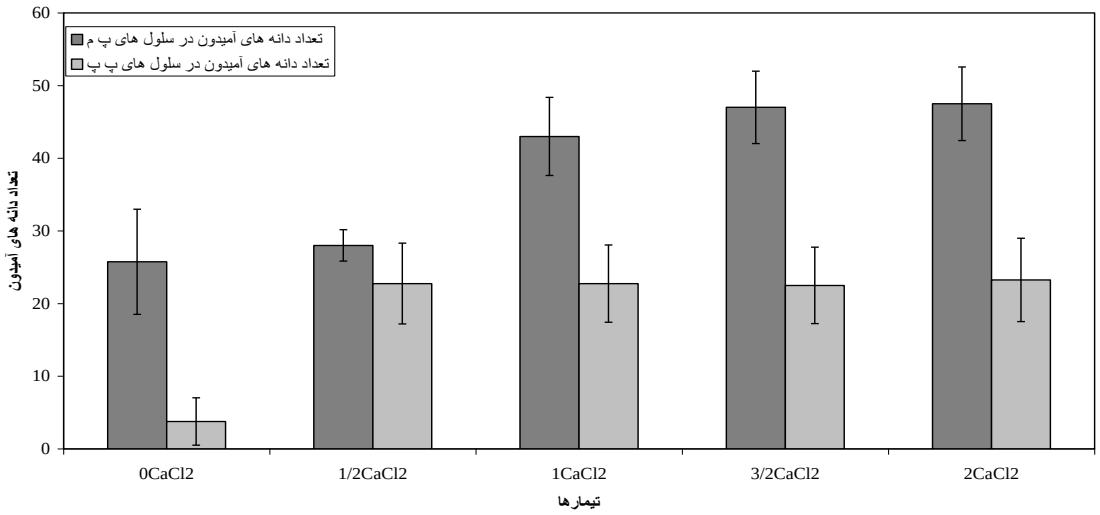
نمودار ۱ – اثرات غلظت‌های مختلف $CaCl_2$ بر تعداد ردیف‌های سلول‌های پارانشیم پوست و مغز



نمودار۲ – اثرات غلظت‌های مختلف $CaCl_2$ بر ابعادسلول‌های پارانشیم مغز



نمودار ۳ – اثرات غلظت‌های مختلف $CaCl_2$ بر ابعاد سلول های پارانشیم پوست

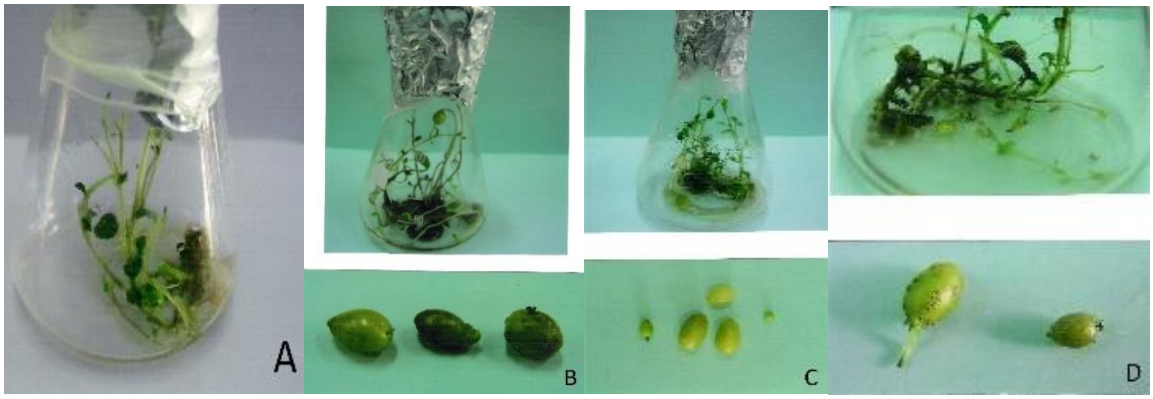


نمودار ٤- اثرات غلظت‌های مختلف $CaCl_2$ بر تعداد دانه‌های آمیدون درپارانشیم مغز و پوست

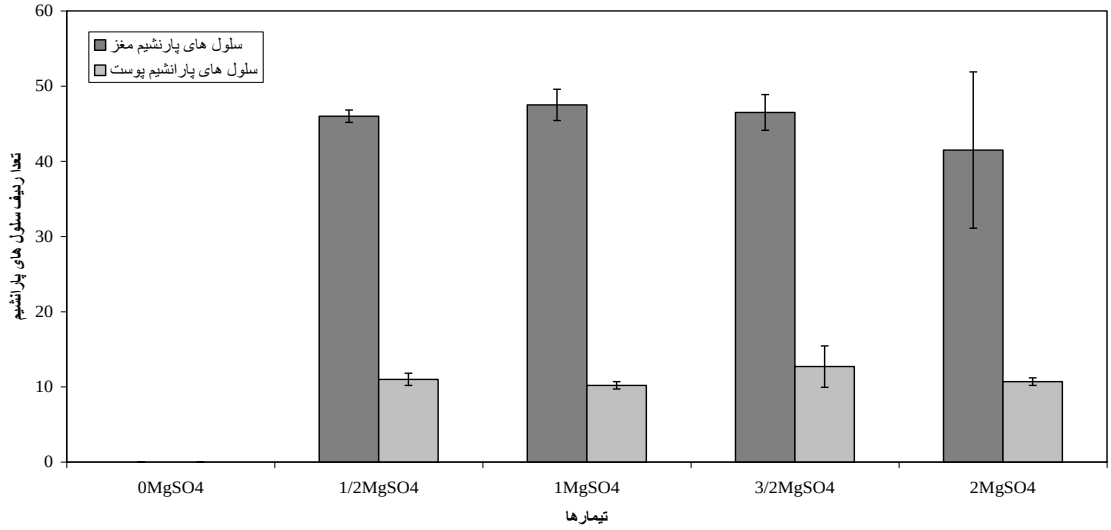
۲- نتایج اثر غلظت‌های مختلف $MgSO_4$ بر تکوین ریزغده‌ها:

ترکیب $MgSO_4$ به‌عنوان تنها منبع تأمین کننده یون Mg، نیز در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت، غلظت‌های بکار رفته از این ترکیب gl^{-1} ۰/۱۸۵، gl^{-1} ۰/۳۷۵ gl^{-1} ۰/۵۵، gl^{-1} ۰/۷٤ و محیط فاقد این ترکیب بود که ترتیب مقادیر 1/2 MS, ۱ MS، 3/2 MS، ۲ MS و ۰ بودند. شکل ظاهری ریزغده ها در این گروه نیز، حالت کروی تا کمی تخم مرغی و کشیده و البته با رنگی روشن‌تر نسبت به گروه‌های قبلی دیده شد. میانگین ابعاد این ریزغده‌ها به ترتیب در تیمارهای ۱/۲، ۳/۲،۱، و ۲ بر حسب میلی‌متر (٤ و ٦/٥) و (٦ و ٧/٥) و (٥/٥ و ٧) و (٥/٤ و ٦/٨) بودند.

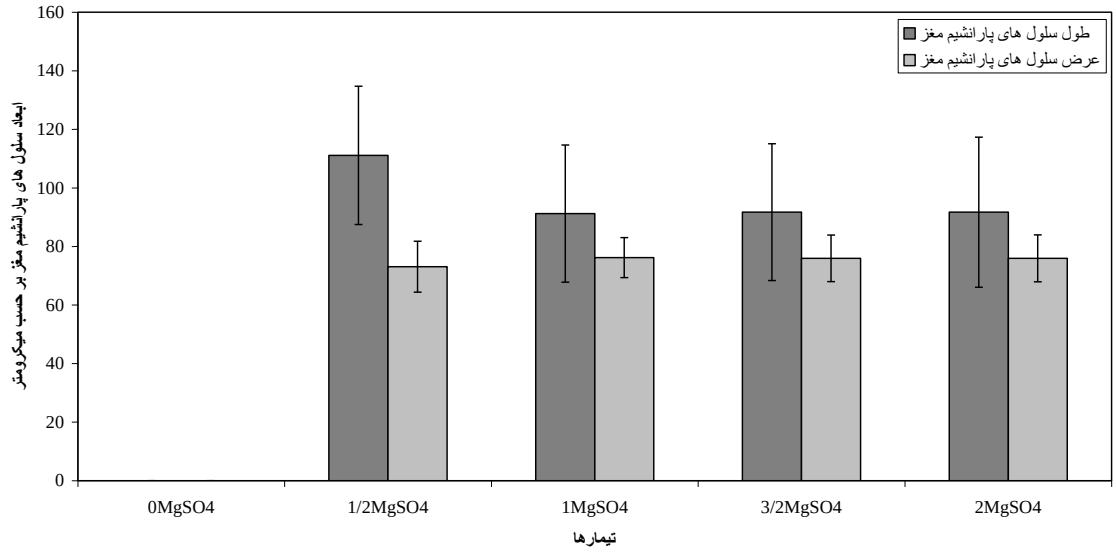
ریزغده‌های حاصل از اثر غلظت‌های مختلف تر کیب منیزیم (شکل ٤) نیز پس از انجام مراحل آنالیز رشد برای بررسی‌های میکروسکوپی و تکوینی برش داده شدند. ویژگی‌های برش‌های مختلف مورد اطلاعات‌برداری و شمارش قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در این گروه تیماری از آنجا که در فقدان $MgSO_4$ به‌کلی ریزغده‌ای تشکیل نشده است، بنابر این، ریزغده‌ای برای ارزیابی تکوینی در تیمار بدون $MgSO_4$ موجود نبود اما بررسی‌های آماری بر روی دیگر گروه‌های موجود نشان داد که غلظت‌های مختلف $MgSO_4$ بر تغییرات بافت شناختی ریزغده‌ها از حیث تعداد ردیف‌های سلولی پارانشیمی و ابعاد آنها و همچنین مقدار دانه های آمیدون تأثیرمعنی‌داری ندارد و نتیجه اینکه هرچند حضور منیزیم در تشکیل ریزغده‌ها نقش دارد و در تکوین اولیه غده بسیار مؤثر و مهم است ولی افزایش مقدار آن در تمایزات بعدی غده تأثیر معنی‌داری ندارد. (نمودارهای ٤-۸) آنالیز واریانس اثرغلظت‌های مختلف $MgSO_4$ بر تعداد ردیف‌های سلول‌های پارانشیم، ابعاد سلول‌های پارانشیم مغز، ابعاد سلول‌های پارانشیمی پوست و محتوای دانه‌های آمیدون در سلول‌های پارانشیم پوست و مغز، نشان داد که اختلافات مشاهده شده در هیچ یک از ویژگی‌های فوق در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نیست.



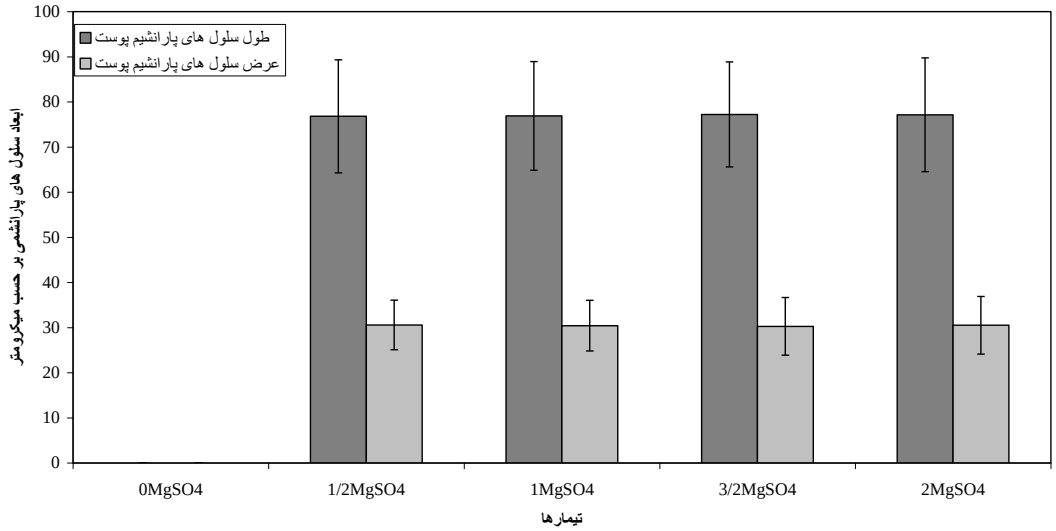
شکل ٤– ریزغده زایی در غلظت‌های مختلف $MgSO_4$: A) محیط فاقد سولفات منیزیوم B) سولفات منیزیوم با غلظت ۱/۲ استاندارد محیط کشت MS. C) سولفات منیزیوم با غلظت 3/2 استاندارد محیط کشت MS و D) سولفات منیزیوم با غلظت ۲ برابر استاندارد محیط کشت MS.



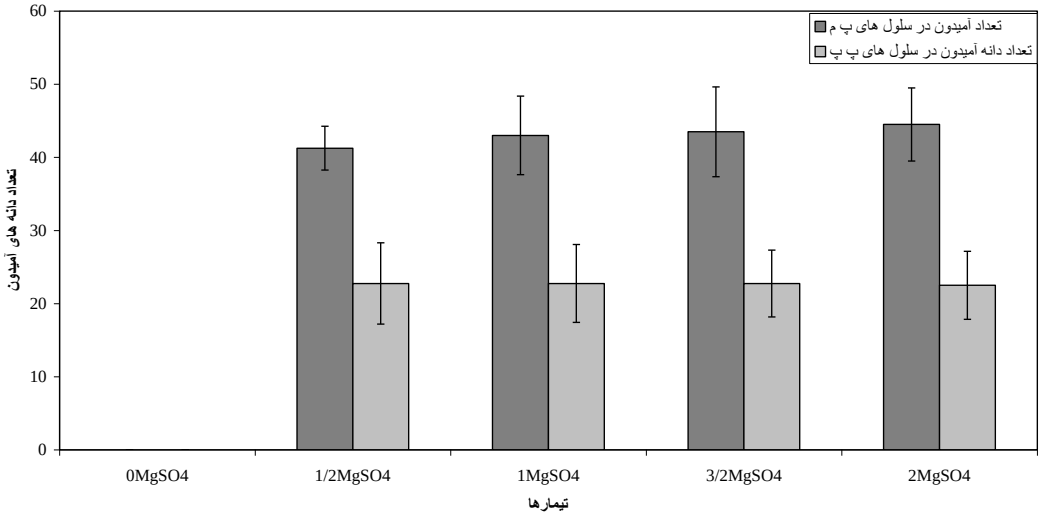
نمودار ۵ – اثرات غلظت‌های مختلف $MgSO_4$ بر تعداد ردیف‌های سلول‌های پارانشیم پوست و مغز



نمودار ٦ – اثرات غلظت‌های مختلف $MgSO_4$ بر ابعادسلول‌های پارانشیم مغز



نمودار ۷ – اثرات غلظت‌های مختلف $MgSO_4$ بر ابعاد سلول‌های پارانشیم پوست



نمودار ۸ – اثرات غلظت‌های مختلف $MgSO_4$ بر تعداد دانه‌های آمیدون در پارانشیم مغز و پوست

بحث:

در این تحقیق گیاه سیب‌زمینی رقم اگریا از دیدگاه بررسی مقاطع میکروسکپی نوری از ریزغده‌های بدست آمده از تیمارهای غلظت‌های مختلف $CaCl_2$ و $MgSO_4$ به منظور بررسی روند سلولی تکوینی ریزغده‌های هر تیمار مورد بررسی قرار گرفت.

تشکیل ریزغده‌های سیب‌زمینی از دونظر مورد توجه است: یکی نمو ریخت‌شناختی غده‌ها و دیگری تغییرات بیوشیمیایی که منجر به تشکیل و ذخیره نشاسته می‌شود. تغییرات بیوشیمیایی طی سال‌های گذشته مورد مطالعه زیادی قرار گرفته است اما تغییرات ریخت‌شناسی تا کنون کمتر مورد مطالعه بوده است.

مطالعه حجیم شدن سلول‌ها و تقسیمات میتوزی سلول‌ها، کلیدی برای روشن شدن چگونگی تبدیل رشد طولی استولون به رشد شعاعی است. اولین علائم ریزغده‌زایی که تا حد زیادی هم زمان در مریستم‌های القاء شده دیده می‌شود، حجیم شدن سلول‌های

پارانشیم پوستی در اثر توسعه واکوئل‌های آنها می‌باشد. تقسیم سلولی و حجیم شدن سلول‌ها، هر دو در نمو غده‌ها دخالت دارند [۲۲]. پژوهش‌ها در این زمینه که افزایش اندازه سلول‌ها همگام با افزایش اندازه غده‌ها می‌باشد، از سوی Reeve و همکاران (۱۹۷۳) نیز مورد تأیید قرار گرفته و نشانگر اهمیت زیاد حجیم شدن سلول‌ها در رشد غده‌ها می‌باشد. همچنین پژوهش‌های عبادی و همکاران (۱۳۸۰) نشان داد که روند افزایش تعداد سلول‌ها در محور طولی و عرضی ریزغده‌ها مشابه با تغییرات ابعاد ریزغده هاست و افزایش ابعاد ریزغده‌ها نتیجه افزایش تعداد و ابعاد سلول‌ها به ویژه سلول‌های پارانشیمی پوست و مغز است [٦]. نتایج بدست آمده در این پژوهش نیز از نظر هم راستا بودن ابعاد ریزغده‌ها با افزایش تعداد ردیف‌های سلولی پارانشیم‌های پوست و مغز و همچنین با ابعاد سلول‌ها، با مطالعات عبادی و همکاران ۱۳۸۰ هم خوانی دارد [٦].

۱- بحث و بررسی نقش کلسیم در تکوین و تغییرات ریزغده‌ها:

در بررسی نتایج اثر غلظت‌های مختلف کلسیم بر ویژگی‌های بافتی ریزغده‌های حاصل از کشت بافت دریافتیم که بهترین غلظت کلسیم برای افزایش تقسیمات و ابعاد سلول‌ها و حتی تجمع دانه‌های آمیدون غلظت برابراستاندارد MS و تاحدی نصف مقداراستاندارد آن است. به این معنی که غلظت‌های پایین‌تر برای رشد کافی نیستند و غلظت‌های بالاتر اثرات مسمومیت نشان می‌دهند. اما درمورد نقش کلسیم در مورد این تغییرات باید به نقش اصلی کلسیم در سلول‌های گیاهی اشاره کرد، کلسیم به‌عنوان یک ترکیب ساختمانی دیواره سلولی است و در تقسیم سلولی و طویل شدن سلول‌ها نقش دارد و در نفوذپذیری غشای سلولی نیز دخالت دارد [۲٦]. افزایش ابعاد سلول‌ها خصوصاً طول آنها در غلظت‌های 1MS و 1/2MS از $CaCL_2$ در این پژوهش اشاره به نقش Ca در طویل شدن سلول دارد. همچنین کلسیم به عکس پتاسیم و منیزیم خیلی کم تحرک است و در بخش‌های رویشی گیاه رسوب خواهد کرد نه اینکه در غده انباشته شود و بر تغییرات بافتی آن تاثیرداشته باشد [۲٦]. تثبیت کلسیم بر روی قطب‌های لیپیدی فسفولیپیدهای غشایی موجب نزدیک شدن این قطبها به یکدیگر می‌شود و به آنها خاصیت چسبندگی بیشتری می‌دهد. بدین‌سان کلسیم از تراوایی یاخته می‌کاهد. کلسیم از نفوذ آب و اکثر یون‌ها بخصوص پتاسیم و آهن جلوگیری می‌کند و به همین دلیل مقادیر بیشتر کلسیم تاثیری در افزایش رشد و تغییرات سلولی ریزغده‌ها نشان نمی‌دهد [۲۷].

همچنین، افزایش نسبت Ca^{2+} به کاتیون‌های اختصاصی، سبب کاهش مقدار نسبی $NH4^{+}$، Mg^{2+} یا K^{+} و مقدار کمتر رشد در این محیط‌ها دارد. که با افزایش نسبت کلسیم به کل کاتیون ها از طریق بالا بردن غلظت کلسیم، در این پژوهش با عدم تغییر در ابعاد ریز غده مطابقت دارد[٦].

۲- بحث و بررسی نقش منیزیوم در تکوین و تغییرات ریزغده‌ها:

در نتایجی که از این پژوهش حاصل شد منیزیوم به‌عنوان یک عنصر ضروری برای تشکیل و تکوین ریزغده از جوانه‌های جانبی برگ‌ها و یا استولون‌ها مطرح شد به طوری‌که در نبود این عنصر تشکیل غده را شاهد نبودیم. از آنجا که اطلاعات زیادی در مورد عناصر پرمصرف بر روند تکوین ریزغده‌ها در کشت

بافت در دسترس نیست لذا از اطلاعات مشابه در مورد نقش این عنصر در گیاه مورد نظر غیر از شرایط کشت بافت استفاده خواهیم نمود. باتوجه به تحقیقات Westermann (۲۰۰۵)، منیزیوم عنصری با تحرک بالا در فلوئم است و سرانجام در غده ذخیره خواهد شد. منیزیوم غیر از نقش عمده و مهم در ساختار کلروفیل، از عناصر فعال کننده اکثر ATP آزها ست که موجب انتقال عامل‌های فسفریل می‌شوند و از طرف دیگر ATP در شکل فعال خود با Mg^{2+} درگیر است [۱۱] و با توجه به اینکه که درفرایند چرخه سلولی فعالیت جزء کاتالیتیکی سایکلین‌ها به وسیله پروتئین کینازها و پروتئین فسفاتازها تنظیم می‌شود [۱۳] و برای عمل این آنزیم‌ها حضور ATP در فرم فعال خود (همراه با منیزیوم) لازم است، این عنصر در تنظیم چرخه‌ی سلولی نقش دارد. همچنین منیزیم نقش اساسی در اجتماع زیر واحدهای ریبوزومی دارد. با کمبود Mg^{2+}، واحدهای ریبوزومی از هم جدا شده و سنتز پروتئین متوقف می‌شود. منیزیم همچنین برای فعالیت RNA پلیمراز و تشکیل RNA در هسته ضروری است [۲۲]. با کمبود Mg^{2+}، ساخت خالص RNA به فوریت متوقف می‌شود. اما سنتز پروتئین‌ها تا بیش از ۵ ساعت تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد و بعد از این زمان به سرعت کاهش می‌یابد. افزایش Mg^{2+} بیش از سطح محدود کننده رشد منجر به ذخیره شدن Mg^{2+} به صورت نمک‌های معدنی در واکوئل می‌شود [۶]. با توجه به موارد ذکر شده نقش منیزیم را در القای سلول‌های مریستم‌های رأسی رویشی به سمت تقسیم و تشکیل ریزغده ها لازم می‌دانیم و افزایش بیش از مقدار آن، به دلیل انباشتگی در واکوئل‌ها تاثیر معنی‌داری در افزایش رشد و تغییرات سلولی – بافتی ریزغده‌ها ندارد.

با توجه به موارد ذکر شده و نیز ضرورت و اهمیت عناصر معدنی در تکوین ریزغده‌ها و با توجه به اینکه کنترل مقدار این ترکیبات در محیط‌های‌کشت در شیشه راحت‌تر صورت می‌گیرد و می‌توان غلظت‌های ترکیبات معدنی را برای به دست آوردن ریز غده‌های مطلوب کنترل نمود، روش کشت بافت جایگزین مناسبی برای به دست آوردن غده‌های بذری سالم سیب‌زمینی نسبت به روش‌های سنتی می‌باشد. که بخش زیادی از آنها با صرف هزینه‌های یالایی به کشور وارد می‌شوند.

منابع:

[۱] احمدی، س و جبارزاده، ز. ۱۳۹۵، تاثیر غلظت‌های مختلف جیبرلیک اسید و بنزیل آمینو پورین در ریز ازدیادی زیتون دو رقم کرونایکی و دزفولی، اولین همایش ملی کشت سلول و بافت گیاهی، اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان).

[۲] احمدیان، ش؛ عبدمیشانی، س و ضرغامی، ر. ۱۳۷٤. تولید ریزغده‌های عاری از ویروس سیب زمینی از طریق کشت بافت. پایان نامه کارشناسی ارشد،دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

[۳] بلندی، ا؛ حفیظی، ب و حمیدی، ح. ۱۳۹۵. تأثیر ساکارز و هورمون بر ریزغده‌زایی سه رقم سیب زمینی در کشت درون شیشه‌ای. فناوری زیستی در کشاورزی. ۱۵(۲): ۵۹ – ٦۷.

[٤] رشیدی، ط. ۱۳۸۳. بررسی تراکم‌های مختلف کاشت گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت بر آنالیزهای رشد و تولید مینی تیوبر در دو رقم سیب زمینی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین.

[۵] روستا، ح؛ وزیری نسب، س و رقامی، م ۱۳۹٤. اثر ٦- بنزیل آمینوپورین و سایکوسل بر تولید ریزغده در دو رقم سیب زمینی در شرایط درون شیشه ای. علوم باغبانی ایران. ٤٦(۱): ۱٤۱-۱٥٦.

[٦] عبادی، م. ۱۳۸۰ بررسی روند تکوینی سلولی گیاه سیب‌زمینی *Solanum tuberosum* در کشت بافت، سلول و بیوراکتورهای نیمه پیوسته و پیوسته پایان نامه دوره‌ی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

[۷] قربانلی، م. ۱۳۷۲ فیزیولوژی گیاهی. تهران: مرکز نشر دانشگاهی: ۹۷-۱۰۰.

[۸] کشمیری، ا؛ کافی، م؛ پارسا، م؛ نباتی، ج و زارع مهرجردی، م. ۱۳۹۷. اثر سطوح مختلف کود نیتروژن و اسیدیته محلول غذایی بر ویژگی‌های فیزیولوژیک و تولید ریزغده سیب‌زمینی *Solanum tuberosum* L. فیزیولوژی گیاهان زراعی. ۱۰(۳۷): ۹۷-۱۱۸.

[۹] مجد، ا و شریعت زاده، م. ۱۳۷۷. زیست‌شناسی سلولی. انتشارات اراک: ۳۷۹-۳۷۳.

[10] Ashrafzadeh, S. and Leung, D.W.M. 2015. Microtuber formation in potato callus. ScienceAsia,41(1):1-4.

[11] Ebadi, M. and Iranbakhsh, A. 2011. The induction and growth of potato (*Solanum tuberosum*. L) microtubers (sante cultivar) in response to the different concentrations of 6-benzylaminopurine and sucrose. African Journal of Biotechnology,10(52): 10626-10635

[12] Fufa, M. and Diro, M. 2013. The Effects of Sucrose on in vitro Tuberization of Potato Cultivars. Advances in Crop Science and Technology,1(4): 1-3.

[13] Gami R. A., Parmar S. K., Patel P. T., Tank C. J., Chauhan R. M., Bhadauria H.S. and Solanki S.D. 2013. Microtuberization, minitubers formation and in vitro shoot regeneration from bud sprout of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar K. Badshah. African Journal of Biotechnology, 12 (38): 5640-5647.

[14] Gopal, J., Minocha, J. L, Dhaliwal, H. S. 1998. Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum*.L). Plant Cell Reports (1998) 17: 794–798.

[15] Higgins, Sh., Francis, R. D. and Smith, A. M., 2017. Production of Solanum tuberosum L. Microtuber Using Temporary Immersion System. European Journal of Experimental Biology. 7(6): 1- 3.

[16] Hoque, M. E. 2010. In vitro tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Omics Journals, 3 (1):7-11.

[17] Husain, S., Shah, S. A. H., Asghar, S., Hussain, N., Ali, N, Hussain, I., Rafiq, S., Shah, S., Imtiaz, M., Ali, M., Jala, F., and Rashid, M. 2017. Micro-Tuberization of Four Potato (*Solanum tuberosum*. L) Cultivars Through Tissue Culture. Journal of Botanical Sciences. 6 (3): 35-40.

[18] Jao, R.C and Fang, w. 2004. Growth of potato plantlets in vitro is different when provided concurrent versus alternating Blue and Redlight photoperiods. Hortscience, 39(2):380-382.

[19] Joshi, A. and Mature, N., 2015. Micropropagation and Conservation of Endanger Medicinal Plant – *Leptadenia rticulata* (Retz.) wight and Arn. Trought Nodal Explant. International Journal of Current Advanced Research. 4(9): 382-385.

[20] Khalil, M.M., Abd El Aal, A. M. H. and Samy, M. M. 2017. Studies on Microtuberization of Five Potato Genotypes. Egyptian Journal of Horticulture, 44 (1): 91- 97.

[21] Pevalek – Kozlina, B. and Berljack, J. 1997. Starch accumulation as a marker For Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.) Biologia – section Botany, 52 (4): 553-559.

[22] Reeve, RM., Timm, H. and Weaver, M.L. 1973. Parenchyma cell growth in potato tubers I. Different tuber regions. American potato journal, 50 (2): 49-57.

[23] Seabrook, JEA., Douglass, L.K, and Arnold, DA. 2004. Effect of leaves on microtubers produced from potato single - node cuttings invitro .American Journal of Potato Research, 81 (1): 1-5.

[24] Sonnewald, S. and Sonnewald, U. 2014. Regulation of potato tuber sprouting. Planta, 239:27–38.

[25] Tabori, K.M., Dobranszki, J. and Ferenczy, A. 2000. Efeects of culture density on growth and in vitro tuberization capacity of potato plantlets. Acta - Agronomica - Hungaria. 48 (2): 185 – 189.

[26] Westermann, D.T. 2005. Nutritional Requirements of potato. American Journal of potato Research, 82:301-307.

[27] Xu, X., Vreugdenhil, D. and Lammeren, A.A.M. 1998. Cell division and cell enlargement during potato tuber formation. Journal of Experimental Botany, 49(320): 573- 582.