تاثیر شرایط رشد ریز نمونه و تنظیم کننده‌های رشد بر القاءکالوس گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* **L.**)

معصومه عامریان

ایران، کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی سنقر

تاریخ دریافت:۹۵/۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱

چکیده

امروزه تکنیک‌های کشت بافت گیاهی بعنوان ابزار مفیدی برای ایجاد تنوع ژنتیکی بمنظور بهنژادی محصولات کشاورزی و همچنین تولید گیاهان عاری از ویروس به کار می‌روند. هدف از این پژوهش ارائه یک روش مؤثر بر کالوس‌زایی و باززایی در گیاه سیب‌زمینی می‌باشد. این تحقیق بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. در این تحقیق بمنظور ایجاد کالوس، ریزنمونه‌های مختلف (ساقه، برگ و غده) سه رقم سیب‌زمینی (سانته، آگریا و مارفونا) روی محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) حاوی غلظت‌های مختلف2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2-4,D)، (NAA) Naphthaleneacetic acid، Indole-3-acetic acid (IAA)، Indole-3-butyricacid (IBA) و پیکلورام بتنهایی و بهمراه کینتین و 6-Benzylaminopurine (BAP) قرار داده شدند. محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2-4,D با غلظت‌های مختلف کینتین بعنوان بهترین محیط‌های کشت کالوس‌زایی انتخاب شدند. واکنش سه رقم سیب‌زمینی به محیط کشت القاء کالوس متفاوت بود بدین صورت که رقم مارفونا بیشترین و رقم سانته کمترین میزان کالوس‌زایی را در کلیه محیط‌های کشت القاء کالوس داشتند. کالوس‌ها بطور مطلوب روی محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر 2-4,D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک باززا و در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌دار شدند.

واژه‌های کلیدی: 2-4,D، سیب‌زمینی، کالوس، کشت بافت و کینتین

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۳۷۷۴۶۶، پست الکترونیکی: Masoomehamerian@yahoo.com

مقدمه

سیب‌زمینی چهارمین گیاه زراعی مهم بعد از گندم، برنج و ذرت در جهان است. نامگذاری سال ۲۰۰۸ بعنوان سال سیب‌زمینی توسط سازمان ملل بیانگر اهمیت این محصول زراعی می‌باشد که هم اکنون غذای اصلی بسیاری از مردم دنیا است (۱۶). سیب‌زمینی یک منبع غنی از انواع کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و ویتامین‌ها می‌باشد (۲۵).

افزایش جمعیت جهان و کاهش منابع تولید فرآورده‌های گیاهی و دامی در جهان یک مشکل جدی و اساسی است که دانشمندان را در دهه‌های اخیر به این فکر ترغیب نموده تا با استفاده از شیوه‌های جدید در حفظ محیط زیست و عدم تغییر بنیادی در طبیعت، دست به تولید بهتر و بیشتر محصولات گیاهی بزنند. یکی از این روش‌های مدرن، استفاده از فناوری کشت سلول و بافت‌های گیاهی است که از این طریق می‌توان نسبت به تکثیر گیاهان مختلف اعم از صنعتی، دارویی، مرتعی و کشاورزی اقدام نمود. علاوه بر این، کشت بافت گیاهی می‌تواند بستر مناسبی جهت حفظ و نگهداری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادری و یا درحال انقراض طبیعت بعنوان منابع با ارزش ژرم پلاسم محسوب شود. همچنین فناوری کشت سلول و بافت‌های گیاهی طی سال‌های اخیر به گونه‌ای توسعه یافته که هم اکنون در

سطح گسترده برای انتقال ژن‌های مطلوب بویژه ژن‌های ایجادکننده مقاومت نسبت به آفات و بیماری‌های گیاهی، مورد استفاده قرار می‌گیرد. بدیهی است اصلاح گیاهان به روش سنتی، علاوه بر وقت‌گیر بودن در بسیاری از موارد امکان پذیر نیست در حالیکه فناوری جدید کشت سلول و بافت گیاهی، این راه را بخوبی هموار ساخته و به پیش می‌برد (۲). در واقع توسعه‌ی روش‌های نوین از جمله کشت بافت گیاهی در سال‌های اخیر منجر به پیشرفت‌های زیادی در زمینه‌ی کشاورزی شده است. روش‌های متداول اصلاح نباتات (تلاقی و انتخاب) با بسیاری از مشکلات و موانع مواجه است. بکارگیری روش‌های نوین کشت بافت بعنوان مکمل روش‌های مرسوم در این راستا نوید بخش بوده است، به گونه‌ای که امروزه علاقمندی به تکنیک‌های کشت بافت و توانایی آن در اصلاح و بهبودی گیاهان به‌صورت یک موضوع جهانی در آمده است (۸).

طی ۲۰ سال گذشته تحقیقات زیادی روی کشت‌های درون شیشه‌ای سیب‌زمینی انجام شده است و روش‌های زیادی پیشنهاد شده اما همه‌ی نتایج بدست آمده در اندام‌زایی و جنین‌زایی موفق آمیز نبوده است (۹). البته کشت بافت بعنوان یک ابزار قابل عرضه برای تکثیر و تنوع ژنتیکی محصول سیب‌زمینی مفید شناخته شده است که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی سیب‌زمینی نقش مهمی را ایفا کند (۲۸). القاء کالوس در بسیاری از ریزنمونه‌ها مانند برگ، میانگره، گره، ساقه و غده‌ی سیب‌زمینی با موفقیت انجام شده است (۲۰). نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد، میزان ساکارز، ژنوتیپ، نوع ریز نمونه و شرایط نگه‌داری زیرنمونه‌ها بر میزان کالوس‌زایی تاثیر گذار می‌باشد (۱۵، ۱۶ و ۲۰).

سیب‌زمینی از مهمترین محصولات غذایی انسانی است و از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. بدلیل اهمیت این محصول بهینه سازی سیستم کشت بافت و انتقال ژن به آن ضروری است. کشت گیاه سیب‌زمینی در شرایط محیط کشت می‌تواند زمینه‌ی مناسبی برای بهبود ژنتیکی سیب‌زمینی را فراهم نماید. تاکنون گزارشاتی در زمینه کالوس‌زایی و بازایی گیاه از بافت‌های مختلف سیب-زمینی ارائه شده است. دست‌یابی به یک سیستم تولید کالوس و شاخساره در انجام مطالعات مهندسی ژنتیک بر روی گیاهان اولین اقدام ضروری است در نتیجه نقش افزایش کالوس‌زایی و باززایی شاخساره از قطعات برگ، ساقه و غده‌ی سیب‌زمینی اهمیت بسیاری دارد. توجه به نتایج بدست آمده توسط Abd Elaleem و همکاران (۲۰۰۹) بیشترین میزان تشکیل کالوس از محیط MS حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2-4,D همراه با ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بدست آمد. محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر TDZ (Thidiazenon) بهترین محیط کشت باززایی بود. کالوس‌های باززا شده در محیط ریشه زایی حاوی ۵ میلی-گرم بر لیتر IBA ریشه‌دار شدند. در نهایت گیاهچه‌های ریشه‌دار شده پس از سازگاری به محیط گلخانه منتقل شدند (۶). تحقیقات Kumlay & Ercisli و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که میزان تولید کالوس در ریزنمونه های ساقه بیشتر از برگ بود. بیشترین درصد کالوس‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA بدست آمد. محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 بیشترین درصد باززایی مشاهده شد (۲۱). Khalafalla و همکاران (۲۰۱۰) ۱۰۰٪ تشکیل کالوس را از ریز نمونه‌های غده سیب‌زمینی در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2-4,D بدست آوردند. کالوس‌ها روی محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر TDZ بیشترین تعداد شاخه را تولید کردند. ریشه‌دار شدن در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA صورت گرفت. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده بعد از رشد کافی و سازگار شدن به شرایط آزمایشگاهی به گلخانه منتقل شدند و گیاهچه‌ها رشد نرمال داشتند (۱۸). با توجه به نتایج تحقیقات انجام شده نوع ریز نمونه، نوع هورمون‌های

رشدی و غلظت آنها بر میزان کالوس زایی تاثیر زیادی دارند. تحقیقات زیادی در ارتباط با کشت بافت سیب‌زمینی انجام شده است اما تاکنون پژوهشی با این وسعت انجام نشده است که همزمان تاثیر هورمون‌های گیاهی اکسین و سیتوکنین بر کالوس‌زایی آن مورد بررسی قرار گردد. لذا در این تحقیق غلظت هورمونی متفاوتی جهت بررسی میزان کالوس‌زایی قطعات ریزنمونه‌های ساقه، برگ و غده در ۳ رقم آگریا، مارفونا و سانته از ارقام مهم زراعی سیب‌زمینی که در شرایط درون شیشه‌ای وگلخانه‌ای رشد یافته‌اند جهت بهینه‌سازی محیط کشت کالوس‌زایی این ارقام مورد بررسی قرار گرفت. درنتیجه با استفاده از آن بتوان بعنوان یک الگو در مطالعات کشت بافت و انتقال ژن در این ارقام اقدام نمود.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی: غده‌های سه رقم سیب‌زمینی آگریا، مارفونا و سانته از مرکز تحقیقات سیب‌زمینی و پیاز کرج تهیه گردیدند. تعداد ۱۰ غده از هر رقم در شرایط گلخانه برای تولید اندام‌های هوایی در گلدان‌های بطول و قطر ۲۵ سانتی‌متری حاوی نسبت مساوی خاک زراعی، کود دامی پوسیده و ماسه کاشته شدند.

جهت آزمایش‌های کشت بافت، از محیط کشت پایه MS استفاده گردید (۲۲). اسیدیته همه محیط‌های تهیه شده ۵/۸ بود که با سود یک نرمال و اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال قبل از اضافه کردن آگار (۰/۸٪ آگار- آگار) برای محیط کشت جامد، و قبل از اتوکلاو کردن برای محیط کشت مایع، تنظیم گردید. نمونه‌ها در دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد و تحت ۱۶ ساعت فتوپریود با استفاده از لامپ فلورسنت سفید نگه‌داری شدند.

ایجاد کالوس: در این آزمایش از ریزنمونه‌های مختلف شامل ساقه، برگ و غده گیاهان سیب‌زمینی رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای و گلخانه استفاده گردید (شکل ۱).

شکل ۱- گیاه سیب‌زمینی رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای (سمت راست) و گلخانه (سمت چپ)

ایجاد کالوس از گیاهان رشد کرده در گلخانه: چهار ماه پس از کشت غده‌ها، اندام‌های ساقه و برگ از گیاهان در حال رشد در گلخانه برداشت گردیدند و بهمراه تعدادی از غده‌های کشت نشده جهت رفع گرد و غبار موجود در سطح آن‌ها با آب شهری شسته شدند. غده‌ها قبلاً توسط یک برس کاملاً تمیز زیر آب شسته و پوست کن شده بودند. نمونه‌ها سپس در محلول حاوی دو قطره مایع ظرفشویی بمدت ۵ دقیقه قرار داده و با آب شسته شدند. بمنظور ضدعفونی نمودن نمونه‌ها از محلول هیپوکلریت سدیم (سفیدکننده تجاری ۵ درصد) به غلظت ۱، ۲ و ۲/۵ درصد به‌ترتیب برای ریزنمونه‌های برگ (۱۵ دقیقه)، ساقه (۱۵ دقیقه) و غده (۳۰ دقیقه) استفاده گردید که به‌دنبال آن بلافاصله چهار بار توسط آب مقطر استریل و هر بار بمدت ۵ دقیقه جهت زدودن هیپوکلریت سدیم شستشو داده شدند.

ریزنمونه‌های آماده کشت از هر سه رقم بطریقی که قبلاً شرح داده شد، در داخل هود با استفاده از اسکالپل و پنس استریل، به قطعات ۱/۵-۱ سانتی‌متر (ریزنمونه‌های ساقه)، ۱×۱ سانتی‌متر (ریزنمونه‌های برگ) و ۵×۷/۵ میلی‌متر (ریزنمونه‌های غده) تقسیم گردیدند و ۴ قطعه از هر

ریزنمونه در یک پتری‌دیش و روی محیط کشت جامد با ترکیبات هورمونی مختلف (جدول ۱، مرحله مقدماتی) برای تشکیل کالوس قرار داده شدند. پس از مسدود نمودن مجدد پتری‌دیش‌ها با پارافیلم، محیط‌های کشت بهمراه ریزنمونه‌های کشت شده به اتاقک رشد با شرایطی که قبلاً گفته شد منتقل گردیدند.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی اعمال شده در مرحله مقدماتی آزمایش*

تیمار	غلظت تنظیم کننده‌های رشد
۱	۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D
۲	۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین
۳	۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۲، ۰/۴، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP
۴	۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA
۵	۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA
۶	۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام
۷	۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین+ ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA
۸	۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین+ ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA
۹	۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین + ۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام

*: کلیه غلظت‌های هورمونی در محیط کشت پایه MS به‌کار برده شدند.

پس از ۳ هفته، کالوس‌های تولید شده در اطراف ریزنمونه-های برگ، ساقه و غده جدا و روی محیط کشت MS با همان ترکیب هورمونی واکشت شدند.

ایجاد کالوس از ریزنمونه‌های گیاهان درون شیشه‌ای: برای تولید گیاهان درون شیشه‌ای ابتدا محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم ساکارز و ۸ گرم آگار بدون تنظیم کننده رشد تهیه و در ظروف استریل درب‌دار توزیع گردید. سپس قطعاتی از ساقه گیاهانی که در گلخانه رشد یافته بودند، بطول ۱ سانتی‌متر همراه با یک جوانه جانبی جدا و در ۲ درصد هیپوکلریت‌سدیم بمدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی گردیدند و ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. پس از برش و جدا کردن بافت‌های مرده، ریزنمونه‌ها بعنوان قلمه به ظروف حاوی محیط‌های کشت فوق‌الذکر انتقال داده شدند. ۴ ریزنمونه در هر ظرف کشت گردیدند و همه ظروف در اتاق رشد با دمای ۲۴ درجه سانتیگراد و فتوپریود ۱۶ ساعت نگه‌داری شدند. پس از ۳ هفته، از جوانه‌های جانبی قلمه‌ها، شاخه‌هایی رشد نمود که برای افزایش تعداد گیاهچه، مجدداً از آن‌ها قلمه تهیه گردید و به محیط کشت MS ۱/۲ منتقل شد.

پس از ۱ ماه، از اندام‌های مختلف گیاهان رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای (ساقه و برگ) بمنظور ایجاد کالوس استفاده گردید. ساقه و برگ این گیاهان نیازی به استریل کردن نداشتند و شیشه‌های حاوی این گیاهان به هود منتقل شده و در داخل هود با استفاده از اسکالپل و پنس استریل ریزنمونه‌های از ساقه و برگ این گیاهان بطول ۴-۳ میلی-متری (ریزنمونه‌های ساقه) و ۳×۳ میلی‌متری (ریزنمونه-های برگ) تهیه گردید. ۸ الی ۱۰ قطعه از هر ریزنمونه در یک پتری‌دیش و روی محیط کشت جامد با ترکیبات هورمونی مختلف (جدول ۱، مرحله مقدماتی) برای تشکیل کالوس قرار داده شدند. پس از مسدود نمودن مجدد پتری-دیش‌ها با پارافیلم، محیط‌های کشت بهمراه ریزنمونه‌های کشت شده به اتاقک رشد با شرایطی که قبلاً گفته شد، منتقل گردیدند.

میزان تشکیل کالوس در هر ۹ تیمار هورمونی از طریق مشاهدات عینی طی ۶ هفته در گیاهان گلخانه‌ای و درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت و فقط نتایج بهترین تیمارهای هورمونی و ریزنمونه در ایجاد کالوس مورد تجزیه آماری واقع شدند.

در مرحله دوم آزمایش تولید کالوس، آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۴ تکرار اجرا شدند که در آن‌ها اثر رقم (در ۳ سطح) و ترکیب هورمونی (در ۴ سطح برای هر یک از تیمارهای هورمونی ۱ و ۲ در جدول ۱) روی درصد کالوس‌زایی مورد مطالعه قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها نیز با استفاده از نرم افزار SAS (۹/۱) انجام شد و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P\leq0.05$) استفاده شد.

باززایی گیاه: کالوس‌هایی (کالوس‌های حاصل از ریز نمونه‌های ساقه) که روی محیط کالوس‌زایی با ترکیب هورمونی ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر کینتین همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D قرار داشتند روی محیط‌های مختلف باززایی (جدول ۲) منتقل شدند.

جدول ۲- تیمارهای هورمونی استفاده شده در محیط‌های کشت باززایی*

تیمار	غلظت و نوع هورمون
۱	۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید
۲	۳ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید
۳	۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید + ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر NAA
۴	۰/۴ میلی‌گرم در لیتر IAA + ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر کینتین + ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید
۵	۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱۸۶ میلی‌گرم در لیتر NAA

*: کلیه غلظت‌های هورمونی در محیط کشت پایه‌ی MS به‌کار برده شدند.

نتایج

ایجاد کالوس: درصد کالوس‌زایی با شمارش تعداد ریزنمونه‌هایی که کالوس تولید کرده بودند نسبت به کل ریزنمونه‌ها (۴ ریزنمونه در گیاهان گلخانه‌ای و ۸ ریزنمونه در گیاهان درون شیشه‌ای به‌دلیل تولید کالوس کمتر روی ریزنمونه‌های گیاهان درون شیشه‌ای و خشک شدن بیشتر این ریزنمونه‌ها روی محیط کشت کالوس‌زایی نسبت به ریزنمونه‌های گیاهان گلخانه‌ای) محاسبه گردید. با توجه به مشاهدات اولیه، از بین ترکیبات هورمونی فوق فقط ترکیبات ۱ و ۲ از جدول ۱ مرحله مقدماتی با ریزنمونه ساقه در کالوس‌زایی موفق بودند.

میزان کالوس‌زایی در ساقه گیاهان درون شیشه‌ای: در تمامی ریزنمونه‌های ساقه گیاهان درون شیشه‌ای بعد از ۱۵–۱۰ روز روی محیط‌های کشت حاوی تیمارهای هورمونی ۱ و ۲ (جدول ۱) کالوس مشاهده شد.

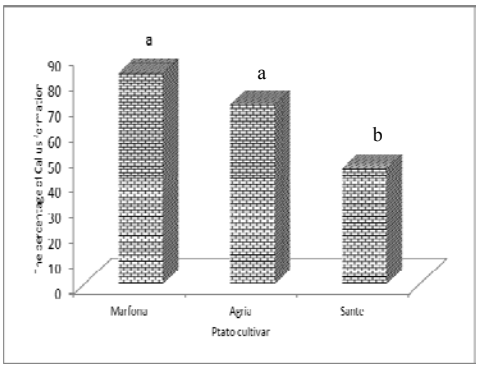
نتایج تجزیه واریانس جدول ۳ از نظر درصد تشکیل کالوس از ریزنمونه‌های ساقه گیاهان درون شیشه‌ای روی محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D نشان داد که رقم و سطح هورمون اثر معنی‌داری (در سطح ۱٪) روی تشکیل کالوس داشتند. اثر متقابل این دو فاکتور روی میزان تشکیل کالوس معنی‌دار نبود.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس درصد کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های ساقه سه رقم سیب‌زمینی رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد تشکیل کالوس (تیمار هورمونی ۱)	درصد تشکیل کالوس (تیمار هورمونی ۲)
رقم	۲	۵۸/۳ **	۲۴/۶ **
سطح هورمون	۳	۴۰/۴ **	۲۷/۸ **
رقم × سطح هورمون	۶	۰/۷ ns	۴۵ **
اشتباه آزمایش	۳۶	۳/۵	۱/۱

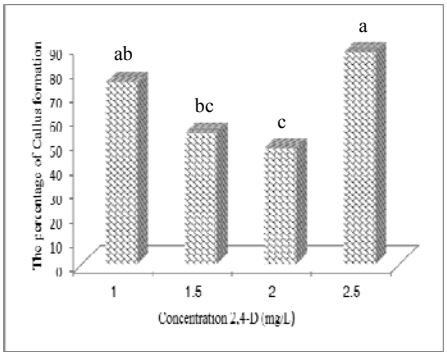
**و ns: بترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و تفاوت غیر معنی‌دار،

رقم مارفونا دارای بیشترین درصد تشکیل کالوس بود که اختلاف معنی‌داری با رقم آگریا نشان نداد و سانته دارای کمترین درصد تشکیل کالوس بود (شکل ۳).



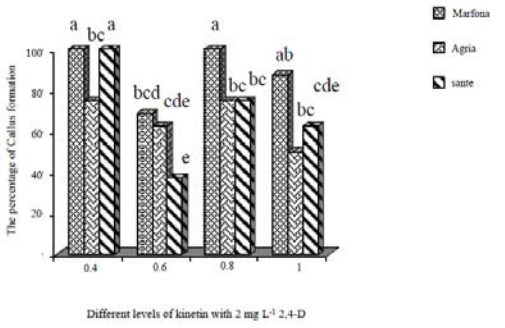
شکل ۳- تاثیر رقم بر درصد کالوس‌زایی سه رقم سیب‌زمینی در شرایط درون شیشه‌ای (آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P\leq0.05$))

در ترکیب هورمونی حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین میزان تشکیل کالوس در تیمار ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D نداشت و کمترین آن از ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D نشان نداد (شکل‌های ۴ و ۱۰).



شکل ۴- درصد تشکیل کالوس از ساقه گیاهان درون شیشه‌ای سیب-زمینی در حضور ۴ غلظت مختلف 2,4-D (آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P\leq0.05$))

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) درصد تشکیل کالوس از ریزنمونه‌های ساقه گیاهان درون شیشه‌ای روی محیط کشت حاوی 2,4-D و غلظت‌های مختلف کینتین نشان داد که رقم، سطح هورمون و اثر متقابل آن‌ها اثر معنی‌دار (سطح ۱٪) روی تشکیل کالوس داشتند. اثر متقابل رقم و سطح هورمون نشان داد که مارفونا در محیط حاوی ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر کینتین و رقم سانته با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین دارای بیشترین درصد کالوس هستند که میزان تشکیل کالوس در آن‌ها ۱۰۰ درصد بود و اختلاف معنی‌داری را با رقم مارفونا و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین نشان ندادند. درحالیکه رقم سانته و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر کینتین دارای کمترین میزان درصد کالوس بود که اختلاف معنی‌داری در با رقم آگریا با ۱ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر کینتین نشان نداد (شکل‌های ۵ و ۱۱).



شکل ۵- درصد تشکیل کالوس از ساقه‌ی گیاهان درون شیشه‌ای سیب‌زمینی در حضور ۴ غلظت مختلف کینتین همراه با ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D (آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P\leq0.05$))

میزان کالوس‌زایی در ساقه گیاهان گلخانه‌ای: در تمامی ریزنمونه‌های ساقه گیاهان گلخانه‌ای بعد از ۱۵-۲۰ روز روی محیط‌های کشت حاوی تیمارهای هورمونی ۱ و ۲ (جدول ۱)، کالوس مشاهده گردید.

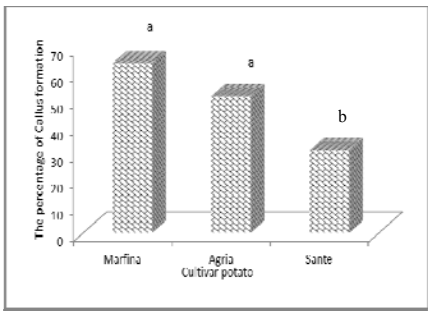
براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) رقم و سطح هورمون اثر معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) بر میزان تشکیل کالوس از ریزنمونه‌های ساقه گیاهان گلخانه‌ای در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D داشتند. اثر متقابل رقم و سطح هورمون بر میزان تشکیل کالوس معنی‌دار نبود.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس درصد کالوس‌زایی ریزنمونه ساقه ارقام سیب‌زمینی رشد کرده در شرایط گلخانه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد تشکیل کالوس (تیمار هورمونی ۱)	درصد تشکیل کالوس (تیمار هورمونی ۲)
رقم	۲	۴۳/۹ **	۱۳/۴ **
سطح هورمون	۳	۲۳/۸ **	۲۵/۱ **
رقم × سطح هورمون	۶	۰/۵ ns	۲ ns
اشتباه آزمایش	۳۶	۴/۲	۲

**و ns: بترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و تفاوت غیر معنی‌دار

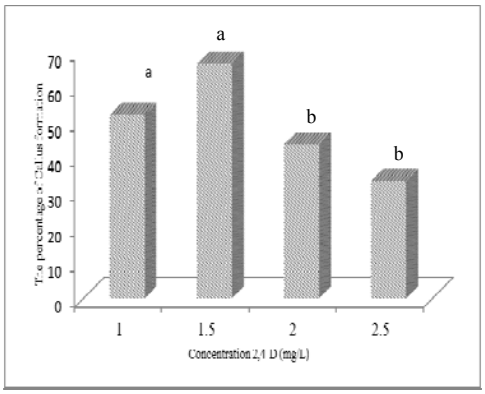
رقم مارفونا دارای بیشترین درصد تشکیل کالوس بود که اختلاف معنی‌داری با رقم آگریا نشان نداد و رقم سانته دارای کمترین درصد تشکیل کالوس بود (شکل ۶). هم‌چنین غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D دارای بیشترین میزان تشکیل کالوس بود که اختلاف معنی‌داری با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D نشان نداد. غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D دارای کمترین میزان تشکیل کالوس بود که اختلاف معنی‌داری با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده نشد (شکل‌های ۷ و ۱۰).



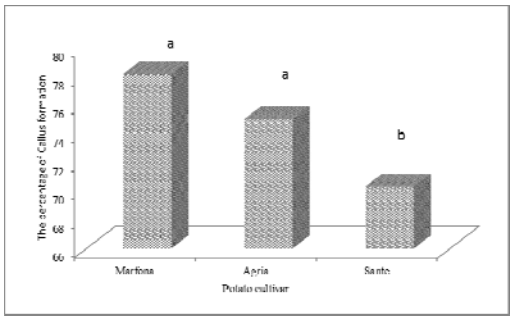
شکل ۶- درصد تشکیل کالوس در سه رقم سیب‌زمینی در سطوح مختلف 2,4-D (آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P\leq0.05$))

طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) رقم و سطح هورمون اثر معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) روی میزان تشکیل کالوس از ریزنمونه‌های ساقه گیاهان گلخانه‌ای در محیط کشت حاوی 2,4-D به‌علاوه غلظت‌های مختلف کینتین داشتند. اثر متقابل بین رقم و سطح هورمون بر میزان تشکیل کالوس معنی‌دار نبود.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که رقم‌های مارفونا و سانته به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین درصد تشکیل کالوس بودند که رقم مارفونا اختلاف معنی‌داری با رقم آگریا نشان نداد (شکل ۸).



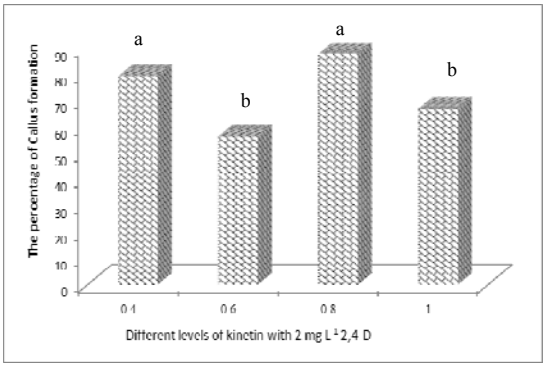
شکل ۷- درصد تشکیل کالوس از ساقه گیاهان گلخانه‌ای سیب‌زمینی در حضور ۴ غلظت مختلف 2,4-D (آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P\leq0.05$))



شکل ۸- درصد تشکیل کالوس در سه رقم سیب‌زمینی در سطوح مختلف کینتین همراه با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D (آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P\leq0.05$))

بیشترین درصد تشکیل کالوس در تیمار هورمونی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر کینتین مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین نشان نداد و کمترین آن در

۰/۶ میلی‌گرم در لیتر کینتین بود که اختلاف معنی‌داری با ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین نداشت (شکل‌های ۹ و ۱۱).

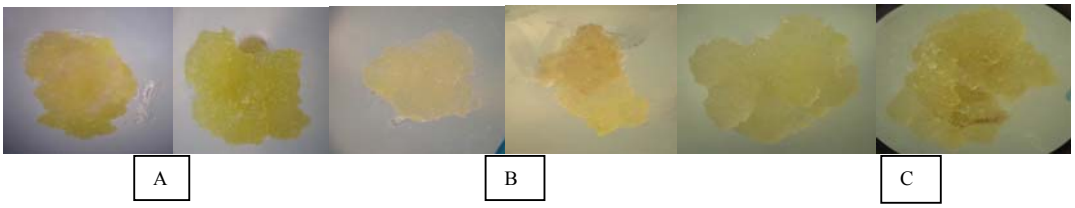


شکل ۹- درصد تشکیل کالوس در ساقه گیاه سیب‌زمینی در سطوح مختلف کینتین همراه با ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D (آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P\leq0.05$))

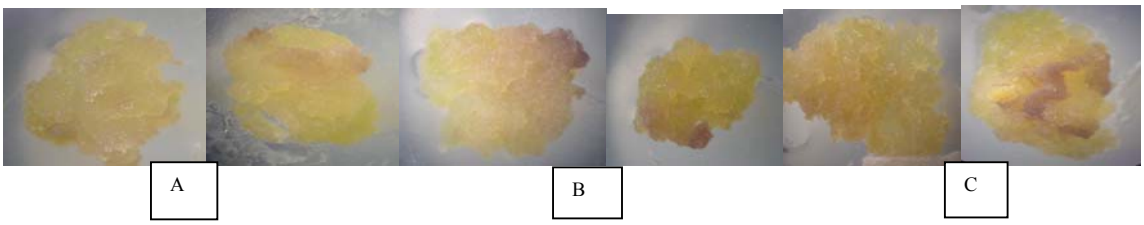
باززایی: کالوس‌هایی که روی محیط کالوس‌زایی در محیط جامد با ترکیب هورمونی ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر کینتین همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D قرار داشتند روی هیچیک از ترکیبات هورمونی باززایی شاخه تولید نکردند، اما کالوس‌های تولید شده از تیمار هورمونی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D روی محیط کشت باززایی حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک پس از ۶ هفته شاخه تولید کردند که در برخی تکرارها ریشه نیز دیده شد (شکل ۱۲). با توجه به اینکه تولید شاخه فقط روی محیط کشت باززایی حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک صورت گرفت و در بقیه تیمارهای هورمونی (جدول ۲) باززایی مشاهده نشد درنتیجه امکان تجزیه آماری درصد باززایی در هر سه رقم سیب‌زمینی (آگریا، سانته و مارفونا) امکان پذیر نبود و فقط نتایج باززایی گزارش شد.

گیاهچه‌های باززایی شده در هر سه رقم پس از ۶ هفته که طول شاخه‌ها تقریباً ۲ سانتی‌متر بود به محیط‌های ریشه‌زایی حاوی سطوح مختلف IBA (۲، ۲/۵ . ۳ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند و فقط در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌زایی صورت گرفت (شکل ۱۳).

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلدان‌های حاوی ماسه استریل منتقل و در شرایط اتاق رشد نگه‌داری شدند. دو هفته بعد در شرایطی که بطور طبیعی به رشد خود ادامه می‌دادند به گلدان‌های حاوی خاک باغچه استریل انتقال داده شدند (شکل ۱۴). گیاهچه‌ها در این مرحله بطور مطلوبی به رشد طبیعی خود ادامه دادند.



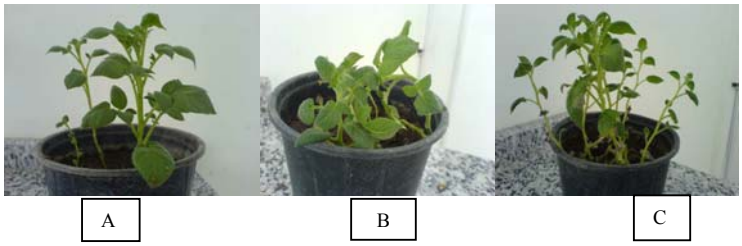
شکل ۱۰- کالوس‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D (سمت چپ: گیاهان رشد کرده در شرایط گلخانه–سمت راست: گیاهان رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای) .A: مارفونا. B: سانته و C: آگریا



شکل ۱۱- کالوس‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر کینتین (سمت چپ: گیاهان رشد کرده در شرایط گلخانه– سمت راست: گیاهان رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای).A: مارفونا. B: سانته و C: آگریا

شکل ۱۲- سه رقم سیب‌زمینی باززایی شده در محیط کشت حاوی۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک ۶ هفته پس از کشت. A: مارفونا، B: آگریا و C: سانته

شکل ۱۳- رشد گیاهچه‌ها در محیط ریشه‌زایی حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA پس از ۴ هفته. A: آگریا. B: مارفونا و C: سانته



شکل ۱۴ – انتقال گیاهچه‌ها به خاک. A: آگریا. B: مارفونا و C: سانته

بحث

با توجه به مشاهدات عینی میزان کالوس‌زایی از ریز نمونه-های ساقه بیشتر از برگ و غده بود. همچنین بیشتر ریزنمونه‌های برگ و غده روی محیط کشت خشک شدند و کالوس‌هایی که از این ریز نمونه‌ها تولید می‌شدند بافت برم و آبکی داشتند. لذا همانطور که قبلا ذکر گردید برای ادامه آزمایشات از ریزنمونه‌های ساقه در هر سه رقم و از تیمارهای هورمونی ۱ و ۲ (جدول ۱) استفاده شد.

بطور کلی نتایج نشان داد که درصد کالوس‌زایی گیاهان درون شیشه‌ای بیشتر از گیاهان گلخانه‌ای است که با نتایج آزمایشات Carputo و همکاران (۱۹۹۵) در مورد سیب-زمینی مطابقت دارد. بنظر می‌رسد به‌دلیل اینکه نمونه‌های استفاده شده از گیاهان درون شیشه‌ای قبلاً در این شرایط سازگار بوده و رشد مطلوبی داشته‌اند توانستند در تولید کالوس موفقیت بیشتری نشان دهند از طرف دیگر این نمونه‌ها احتیاج به ضدعفونی نداشته‌اند که خود بعنوان عاملی تنش‌زا جهت استفاده در محیط درون شیشه‌ای بحساب می‌آید. جهت دستیابی به موفقیت‌های کاربردی، بررسی رقم‌های متعلق به یک گونه گیاهی و نوع پاسخ آن-ها به سیستم‌های کشت بافت ضروری است (۱۱). شرایط رشد ریزنمونه مورد استفاده یکی از فاکتورهای مؤثر در نوع پاسخ سلول گیاه به شرایط درون شیشه‌ای است (۱۶ و ۱۷) که مطابق نتایج بدست آمده از این تحقیق است.

گیاهان مختلف بسته به نوع ژنوتیپ خود پاسخ‌های متفاوتی به شرایط کشت بافت می‌دهند (۴). مطالعات انجام شده روی گیاهان مختلف وابستگی پاسخ گیاه به ژنوتیپ را کاملا مورد تایید قرار داده است. بنابراین انتظار می‌رود ژنوتیپ‌های مختلف در پاسخ به یک سیستم کشت بافت واکنش‌های متفاوتی نشان دهند. واکنش ریزنمونه‌های سه رقم به تیمارهای هورمونی (تیمارهای هورمونی ۱ و ۲ جدول ۱) متفاوت بود، همچنین بیشترین درصد تشکیل کالوس در رقم مارفونا و کمترین آن در رقم سانته مشاهده شد که این بدلیل تفاوت ژنتیکی بین رقم‌ها است که Shamima و همکاران (۲۰۰۳) و Iqbal و همکاران (۲۰۱۶) به نتایج مشابهی در بررسی کالوس‌زایی ارقام مختلف سیب‌زمینی دست یافتند (۲۶ و ۱۶).

با توجه به اینکه روش‌های مختلفی جهت القاء کالوس در گیاه سیب‌زمینی وجود دارد ولی بطور کلی تفاوت اصلی بین آنها مربوط به نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاه است بطوریکه در تحقیق انجام شده، کاربرد 2,4-D به تنهایی یا در ترکیب با کینتین در ریز نمونه‌های ساقه‌ی گیاه سیب‌زمینی بیشترین تاثیر را در القاء کالوس داشت که با نتایج Abdul Jaleel و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد (۷). تشکیل کالوس بدون هورمون کینتین نشان داد که وجود کینتین برای تولید کالوس ضروری نیست، اما کینتین سبب افزایش درصد کالوس‌زایی شده و زمان تشکیل کالوس را کاهش می‌دهد (۵ و ۲۳). همچنین نتایج آزمایش‌های Dhingramk و همکاران (۱۹۹۱) نشان داد که بیشترین میزان تشکیل کالوس در ریزنمونه‌های سیب‌زمینی در محیط کشت حاوی کینیتن است که با نتایج آزمایش‌های حاضر که بیشترین درصد کالوس‌زایی در محیط‌های حاوی کینتین بود، مطابقت دارد (۱۲). هورمون 2,4-D بهترین اکسین برای القاء کالوس در تک لپه‌ای‌ها و حتی دو لپه‌ای-ها می‌باشد (۱۶). غلظت 2,4-D بر زمان آغازش کالوس، درصد کالوس‌زایی، بافت کالوس و رنگ کالوس تاثیر گذار است (۱۸ و ۱۹). اثر علظت‌های مختلف اکسین و سیتوکنین بر روی القاء کالوس در چند ژنوتیپ سیب‌زمینی توسط Andreea و همکاران (۲۰۰۹) و Iqbal و همکاران (۲۰۱۶) مورد بررسی قرار گرفت (۱۰ و ۱۶). بر اساس نتایج بدست آمده بیشترین درصد کالوس‌زایی در ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده شد. تشکیل کالوس از ریزنمونه‌های ساقه (۲-۱ سانتی‌متر) رقم سیب‌زمینی Cara روی محیط کشت MS با ترکیب هورمونی ۳/۲ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D پس از ۲۰ روز توسط Ahloowalia (۲۰۰۴) گزارش شده است (۹). القاء کالوس از ۷ رقم سیب‌زمینی در محیط نیمه‌جامد MS حاوی ۲۰-۱ میکرومول پیکلرام توسط Steven و همکاران (۱۹۹۰) صورت گرفت (۲۷). Sabbah و Tal (۱۹۹۰) موفق به تولید کالوس از ریزنمونه‌های برگ گیاه سیب-زمینی رقم Desire در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین شدند (۲۴). Dhingramk و همکاران (۱۹۹۱) و امیدی و شاه‌پیری (۱۳۸۳) بیشترین رشد کالوس‌های سیب‌زمینی را در محیط کشت حاوی کینتین مشاهده کردند (۱۲ و ۲). تحقیقات Edriss و همکاران (۱۹۹۶) روی کالوس‌زایی سیب‌زمینی نشان داد که استفاده از اکسین بالا سبب تولید کالوس شده و سیتوکینین در این رابطه هیچ نقشی ندارد. در محیط حاوی سیتوکینین به تنهایی، تولید شاخه بدون تشکیل کالوس مشاهده گردید. غلظت کم اکسین و نیز غلظت متوسط سیتوکینین منجر به تولید گیاه کامل از نوک مریستم بدون تشکیل کالوس می‌شود. غلظت بالای کینتین (۲ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت کم NAA (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) کالوس و شاخه تولید می‌کند. در حالیکه سطح بالای BAP و غلظت کم IBA تشکیل کالوس را بدون تشکیل شاخه تحریک می‌کند (۱۳).

کالوس‌های تولید شده از ریز نمونه‌های ساقه و تیمار هورمونی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D روی محیط کشت باززایی حاوی ۳ میلی‌گرم

در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک پس از ۶ هفته شاخه تولید کردند که در برخی تکرارها ریشه نیز دیده شد. Carputo و همکاران (۱۹۹۵)، ۱۱ رقم از سیب-زمینی‌های رشد کرده در شرایط گلخانه را برای القاء کالوس‌زایی مورد بررسی قرار دادند. ریزنمونه‌ها روی محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D کالوس تولید کردند. پس از ۴ هفته کالوس‌ها به محیط کشت باززایی حاوی ۰/۱۸۶ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۵ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک منتقل شدند (۱۱). باززایی شاخه از برگ‌ها و دمبرگ‌های سه رقم سیب‌زمینی (Posma, Folva, Oleva) توسط Hanson و همکاران (۱۹۹۹) بررسی گردید. ریزنمونه‌ها از گیاهان رشد کرده در گلخانه تهیه و برای تولید کالوس روی محیط کشت MSحاوی ۹/۰۵ میکرومول 2,4-D و ۴۰ میکرومول IBA کشت شدند. کالوس‌ها سپس برای باززایی به محیط کشت MS با ترکیب هورمونی ۲/۲۸ میکرومول اسید جیبرلیک و ۱ میکرومول BAP منتقل شدند (۱۴). Khatun و همکاران (۲۰۰۳) از میان‌گرهٔ گیاهچه‌های سیب‌زمینی رقم Diamant رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای برای تولید کالوس استفاده کردند و باززایی روی محیط کشت نیمه‌جامد MS با ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد شامل 2,4-D، NAA و IBA به‌تنهایی و در ترکیب با BAP صورت گرفت. بیشترین درصد کالوس در محیط کشت حاوی ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده شد. بیشترین درصد تولید شاخه از کالوس با محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد (۱۹). محیط کالوس زایی و باززایی این محققین مشابه بهترین ترکیب هورمونی بدست آمده در این تحقیق بود. بر اساس نتایج رحیمیان و ربیعی (۱۳۹۲) هورمون کینیتن در مقایسه با BAP تاثیر بیشتری بر باززایی سیب‌زمینی رقم مارادونا داشت (۱) که نتایج بدست آمده از این تحقیق مغایرت داشت. شیخی ده‌آبادی و جلالی جواران (۱۳۹۰) برای تعیین بهترین نوع ریزنمونه و محیط کشت گیاهی جهت باززایی سیب‌زمینی از ریزنمونه‌های ساقه و برگ در محیط کشت حاوی سطوح مختلف اکسین و سیتوکنین استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که ریزنمونه‌های ساقه در بسیاری از محیط‌ها باززا شده و دارای بیشترین درصد باززایی بودند (۳) که مشابه نتایج بدست آمده از این تحقیق بود.

براساس نتایج بدست آمده، بطور کلی مشخص نیست که چرا با افزایش مرحله به مرحله غلظت هورمون تولید کالوس نیز با همان روند ادامه نمی‌یابد. بدیهی است که واکنش ریزنمونه‌ها به غلظت هورمون تحت تأثیر عوامل متعددی است که نتیجه‌گیری یکنواخت را با مشکل مواجه می‌سازد. در این رابطه مطالعات دقیق در سطح مولکولی و با در نظر گرفتن همه عوامل لازم است تا بطور دقیق به این سؤال پاسخ داد.

نتیجه‌گیری کلی

یک پروتوکل برای القاء کالوس در سه رقم سیب‌زمینی (آگریا، مارفونا و سانته) بهینه‌سازی گردید. با توجه به نتایج بدست آمده بیشترین درصد کالوس‌زایی در محیط کشت-های حاوی ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D همراه با ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر کینتین بود. میزان کالوس‌زایی ۳ رقم سیب‌زمینی متفاوت بود. بطوریکه رقم مارفونا بیشترین و رقم سانته کمترین درصد کالوس‌زایی را نشان دادند. استفاده ازالقاء کالوس در کشت بافت سیب زمینی و دستیابی به بهترین محیط القاء کالوس زمینه بهره-گیری از تنوع سوماکلونال و نیز انتقال ژن برای رسیدن به صفات مطلوب را مهیا می‌سازد.

منابع

۱- رحیمیان، ب و ربیعی، م. (۱۳۹۲). بررسی باززایی مستقیم سیب-زمینی (*Solanum tuberosum* L.) رقم مارادونا. اولین همایش ملی الکترنیکی مباحث نوین در علوم باغبانی.

۲- شاه‌پیری، آ؛ امیدی، م؛ احمدیان تهرانی، پ و داودی، د. (۱۳۸۳). بررسی کشت بافت و تنوع سوماکلون در سیب‌زمینی. مجله علوم کشاورزی ایران، ۳۵ (۲): ۳۲۳-۳۳۵.

۳- شیخی ده‌آبادی، م و جلالی جواران، م. (۱۳۹۰). بهینه‌سازی باززایی برخی از ارقام پر محصول سیب‌زمینی بمنظور انتقال ژن tPA. پایان نامه ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی.

۴- کبیر هاشمی، س.م؛ قنبری، ع.ر و کاشی، عبدالکریم. ۱۳۹۵. اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاه بر باززایی گیاهچه از پینه دو رقم خربزه (*Cucumis melo* L.) ایرانی به روش درون شیشه‌ای. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۹ (۱): ۱۵۹-۱۶۸.

۵- مجتوی، س.ش و امیدی، م. ۱۳۹۵. تاثیر غلظت‌های مختلف هورمونی و نوع ریزنمونه بر کالوس‌زایی شقایق ایرانی (*Papaver bracteatum*). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۹(۱): ۱۹۸-۱۹۱.

6- Abd Elaleem, K. G., Modawi, R. S., Khalafalla, M. M. 2009. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. African Journal of Biotechnology, 8(11): 2529-2534.

7- Abdul Jaleel, C., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. & Panneerselvam, S. (2007). Water deficit stress mitigation by calcium chloride in Catharanthus roseus: Effects on oxidative stress, praline metabolism and indole alkaloid accumulation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 60 (1): 110–116.

8- Afrasiab, H. & Iqbal, J. (2012). Biochemical and molecular characterization of somaclonal variants and induced mutants of potato. Pakistan Journal of Botany, 44(5): 1503-1508.

9- Ahloowalia, B. S. (2004). Plant regeneration from callus culture in potato. Euphytica, 31: 755-759.

10- Andreea, N., Campeanu, G.H., Chriu, N. & Kracsonyi, D. (2009). Effect of auxine and cytokinine on callus induction in Potato (*Solanum tuberosum* L.) explants. Agricultura-Stiinta Si Practica, Pp: 47-50.

11- Carputo, D., Cardi, T., Chiar, T., Ferraiol, G. & Frusciante, L. (1995). Tissue culture response in various wild and cultivated Solanum germplasm accession for exploitation in potato breeding. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 41: 151-158.

12- Dhingramk, K.H. & Lakhapatin, C.H. (1991). Effect of cytoknins and light on the growth and virus content of potato leaf callus. National Academy Science Letters – India, 14(3): 117–120.

13- Edriss, M.H., Badawy, M.A. & Fathi, S. (1996). Propagation of potato using tissue culture techniaue. Acta Horticulturae, 434: 413-418.

14- Hanson, B., Grattan, S. B. & Fulton, A. (1999). Agricultural salinity and Drainge California University, Davis. P: 160.

15- Haque, A.V., Samad, M.A & Shapla, T.L. (2009). *In vitro* callus initiation and regeneration of potato. Bangladesh Journal of Agricultural Research, 34(3): 449-456.

16- Iqbal, A.A., Rizwan, A., Mukhtar, Z., Mansoor, S., Mehmood, Z & Asad, S. (2016). Establishment of an efficient and reproducible regeneration system for potato cultivars grown in Pakistan. Pakistan Journal of Botany, 48(1): 285-290.

17- Kalak, H., Hilpus, I. & Virumas, K. (1997). Influence of genotype and growth regulators on morphogenesis processes in carnation shoot apex couture. Scientia Horticulture, 60: 181-189.

18- Khalafalla, M.M., Abd Elaleem, K.G., Rasheid, S. & Modawi, R.S. (2010).Callus formation and organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar almera. Journal of Phytology, 2(5): 40–46.

19- Khatun, N., Bari, M. A., Islam, R., Huda, S., Rahman, M. H. & Mollah, M. U. (2003). Callus induction and regeneration from nodal segment of potato culture Diamant. Biological science, 3 (12): 1101–1106.

20- Kumar, V., Rashmi, D. & Banerjee, M. (2014). Callus induction and plant regeneration in *Solanum tuberosum* L. cultivars (Kufri Chipsona 3 and MP-97/644) via leaf explants. International Research Journal of Biological Sciences, 3(6): 66-72.

21- Kumlay, A. M & Ercisli, S. 2015. Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 29(6): 1075-1084.

22- Murashige, T & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473–497.

23- Omidi, M. & Shahpiri, A, (2003). Callus induction and plant regeneration *in vitro* in potato. Acta Horticulturae, 619: 315-322.

24- Sabbah, S. & Tal, M. (1990). Development of callus and suspension cultures of potato resistant to NaCl and mannitol and their response to stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 21: 2.

25- Shahriyar, S., Akram, S., Khan, K., Miya, F. & Sarkar, A.R. (2015). *In vitro* plant regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) at the rate of different hormonal concentration. Asian Journal of Medical and Biological Research, 1(2): 297-303

26- Shamima, N., Monzur, M. & Anjumanra, K. (2003). Induction and evalution of somaconal variation in potato. Biological Science, 3 (2): 183–190.

27- Steven, R.H., Duane, L., Paul. M. & Janice, B. (1990). Intiniation and culture of potato tuber callus tissue with picloram. Plant Growth Regulation, 9(4): 341-345.

28- Steward, F.C. & Caplin, S.M. (1951). A tissue culture from potato tuber: The synergistic action of 2, 4-D and of coconut milk. Science, 111: 518-520.

The Effect of Growing Conditions Explants and Growth Regulators on Callus Induction Potato Plant

(*Solanum tuberosum* L.)

Amerian M.

Sonqor Agriculture Faculty, Razi University, Kermanshaeh, I.R. of Iran

Abstract

Plant tissue culture techniques are a useful tool to increase the genetic diversity, crop production and production of plants virus free. The purpose of this study was reached to a useful method for callus induction and regeneration in potato plant. The experiment was set up based on factorial experiment and completely randomized design (CRD) with 3 replications. In this study, in order to induce callus, different explants (stem, leaf and tuber) of three potato (Sante, Agria and Marfona) were placed on MS (Murashige and Skoog) medium containing various concentrations of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), NAA (Naphthaleneacetic acid), IAA (Indole-3-acetic acid) and pikloram alone or combined with kinetin and BAP (6-Benzylaminopurine). MS medium containing 2 mg L^{-1} 2,4-D with different concentrations of kinetin was selected as the best callus-inducing medium. Response of three cultivars potato to medium callus induction was different so that the Marfona highest and Sante lowest callus induction were in all callus induction media. The calluses were regenerated in media containing 3 mg L^{-1} BAP combined with 0.5 mg L^{-1} GA_3. Regenerated shoot were transferred to root-inducing media containing 2 mg L^{-1} IBA (Indole-3-butyricacid) and, plantlets with roots were transferred to pots containing sterilized soil four weeks after culture.

Key words: Callus, Kinetin, Potato, Tissue culture and 2,4-D