تشکیل کالوس و باززایی علف دریایی

Sargasopsis zanardinii (Phaeophyta, Laminarial)

از طریق کشت بافت

حسن ابراهیم‌زاده[۱] - فرح کریمی[۲] و سیدرضا ابهری[۳]

۱ ـ دانشگاه تهران، دانشکده علوم، آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی. تهران، صندوق پستی : ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵
۲ ـ دانشگاه شهیدبهشتی، مرکز تحقیقات جهاددانشگاهی. تهران، صندوق پستی : ۳۷۱-۱۹۸۳۵
۳ ـ دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده دریانوردی، چابهار

تاریخ دریافت : آذر ۱۳۷۸ تاریخ پذیرش : آبان ۱۳۷۹

چکیده

امروزه علف‌های دریایی مصارف متعددی در صنایع غذایی، نساجی، داروسازی، پزشکی، بیوتکنولوژی و غیره یافته‌اند. به همین علت از دهۀ ۷۰ به بعد تلاشهای فراوانی برای باززایی این جلبکها در محیط‌های کشت مصنوعی به منظور تسهیل بکارگیری روش‌های مهندسی ژنتیک در مورد آنها صورت گرفته است. در همین راستا تحقیق حاضر شرایط سترون سازی و کشت بافت علف دریایی *Sargasopsis zanardinii* را در محیط کشتهای PES $\frac{1}{2}$ ، PES و PES۲ مورد بررسی قرار داده است.

قطعات پهنک جلبک مزبور پس از گذراندن مراحل سترون سازی در محیط‌های کشت مایع و جامد PES $\frac{1}{2}$ ، PES و PES ۲ کشت داده شدند. مطابق نتایج بدست آمده، در تمام موارد در محیط‌های جامد PES و PES ۲ حالت تورم و آمادگی برای تقسیم سلولی، در ۱۰ درصد موارد (پس از ۹ ماه و ۱۶ واکشت) تقسیمات طولی و تشکیل رشته‌های کرک مانند و همچنین در ۲۰ درصد موارد (پس از ۹ ماه و ۱۶ واکشت) تشکیل میکروکالوس‌های سفید رنگ مشاهده شد. به علاوه انتقال کشت از محیط مایع به جامد در محیط PES در ۱۰۰ درصد موارد موجب تشکیل اندام‌های کوزه مانندی در سطح محیط جامد شد که رشته‌های قهوه‌ای رنگی از این اندام‌ها رویش یافته و شروع به پهن شدن نمودند. هیچیک از نتایج مزبور در محیط PES $\frac{1}{2}$ مشاهده نشد.

لغات کلیدی: کشت بافت، کالوس، *Sargasopsis zanardinii*

مقدمه

برخلاف گیاهان عالی که امروزه در بسیاری موارد شرایط باززایی آنها در محیط‌های کشت مصنوعی بدست آمده است، در مورد علفهای دریایی (Seaweeds) بیشترین گزارشها مربوط به رویش سلولهای منفرد و کالوسها می‌باشد. موارد باززایی گیاه کامل از سلول یا بافت علف دریایی محدود است و جوان بودن این علم از آنجا ثابت می‌شود که اولین بار در سال ۱۹۷۸ در گزارشی در زمینه باززایی علف دریایی *Chondrus crispus* محیط کشت ارائه شده است (Cheney, 1984 ; Polne-Fuller, 1988 ; Polne-Fuller *et al.*, 1984 ; Tokuda & Kawashima, 1987).

توسعه روش‌های کشت بافت جلبکهای دریایی وسیله‌ای برای مطالعات ژنتیک پایه، تولید مثل، فیزیولوژی و بیوشیمی این جلبکها فراهم می‌کند و همچنین ممکن است منجر به کشف روشهایی برای کشت تجاری آنها و تولید متابولیتهای جلبکی گردد (Lawlor *et al.*, 1987).

از آنجائیکه برخی از محصولات طبیعی علفهای دریایی نظیر فیکوکلوئیدها دارای مصارف ارزشمند صنعتی هستند به تازگی مهندسی ژنتیک به منظور تولید فرآورده‌های مرغوبتر و فراوانتر در این جلبکها مطرح شده و گام اول برای انجام این مهم، یافتن شرایط باززایی جلبک در آزمایشگاه جهت تراریخت سازی (transformation) می‌باشد (کریمی، ۱۳۷۵ ؛ Polne-Fuller *et al.*, 1984). به همین علت به منظور ایجاد زمینهٔ لازم برای ادامه مطالعات بعدی در مورد تکثیر و پرورش و همچنین انتقال ژن و مهندسی ژنتیک در جلبک‌ها، در این پژوهش یکی از گونه‌های علفهای دریایی قهوه‌ای ایران که دارای ارزش اقتصادی از نظر تولید آلژینات می‌باشد (کریمی، ۱۳۷۵) مورد مطالعات کشت بافت قرار گرفته است.

این گونه به سردهٔ سارگازو پسیس (*Sargasopsis*)، تیرهٔ آلاریاسه (Alariaceae) و راسته لامیناریال (Laminariale) تعلق دارد (ابهری، ۱۳۷۲). پهنک این جلبک در انتهای دوره رویش به طول ۸ تا ۹ سانتیمتر و طول یک متر یا بیشتر می‌رسد و دارای یک رگبرگ میانی است. انتهای پهنک در ابتدای دوره رویش فاقد انشعاب بوده ولی در انتهای دوره رویش منشعب شده و در امتداد رگبرگ میانی، محوری با انشعابات فراوان و کیسه‌های هوایی ایجاد

می‌کند. رسپتاکل‌ها (اندام‌های زایای گیاه شامل اووگونیوم و آنتریدیوم را در خود جا می‌دهند) برروی همین انشعابات انتهایی پدید می‌آیند.

مواد و روشها

نمونه‌برداری از بندر چابهار، ساحل دانشکده دریانوردی، مابین اسکله‌های شهید کلانتری و شهید بهشتی با عرض جغرافیایی ۱۸′ و ۲۵° شمالی و طول جغرافیایی ۳۰″ و ۳۷′ و ۶۰° غربی صورت گرفت. نمونه‌ها درون کیسه‌های نایلونی واجد هوا و مقداری آب دریا و باگذاشتن قطعات یخ در اطراف کیسه‌ها توسط هواپیما به تهران انتقال یافت و همان روز اقدام به کشت گردید.

سترون سازی بافتها (Polne-Fuller and Gibor, 1987):

جهت تهیه قطعات جداکشت (explants) سترون، از قطعات پهنک جلبک *Sargasopsis zanardinii* استفاده شد. این قطعات توسط شوینده شستشو و به قطعات ۵ سانتیمتری تقسیم شدند و پس از آن مراحل زیر را طی نمودند:

تیمار با بتادین :

به این منظور از بتادین ۱۰ درصد (ساخت شرکت داروسازی تولیدارو) محلول ۱ درصد تهیه شد و بافتها به مدت ۱۰ دقیقه درون این محلول قرارگرفتند و سپس چند بار توسط آب دریای سترون شده شستشو داده شدند.

تیمار با آنتی بیوتیک :

محلولی از آنتی بیوتیکها تهیه گردید (جدول ۱) و برای تحریک رشد و تقسیم میکروبها و در نتیجه حساسیت به آنتی بیوتیکها، آبگوشت مغذی (nutrient broth) به مقدار ۰/۰۸ درصد به این محلول افزوده شد. محلول آنتی بیوتیک پس از تهیه با عبور از فیلتر Milipore با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون سترون گردید.

قطعات پهنک جلبک بمدت ۱۵ دقیقه تحت تیمار آنتی بیوتیک قرارگرفته و سپس بمدت ۱۰ دقیقه توسط آب ژاول ۱۵ درصد تیمار شدند. لازم به ذکر است که قطعات مزبور پس از

هر بار تیمار با مواد سترون کننده شامل محلول آنتی بیوتیک و آب ژاول، چندین بار توسط آب دریای سترون شده شستشو داده شدند.

جدول ۱ : ترکیبات محلول آنتی بیوتیکی مورد استفاده برای سترون سازی بافتها

آنتی بیوتیک	مقدار (گرم)
استرپتومایسین سولفات	۲
پنی سیلین	۱
نئومایسین	۰/۲
نیستاتین (میکوستاتین)	۱۵
کانامایسین	۱
آب	۱۰۰ میلی‌لیتر

هنگام کشت، قطعات ۵ سانتیمتری پهنک سترون شده، تحت شرایط سترون به قطعات ۵ میلی‌متری تقسیم شده و بر روی محیط مصنوعی کشت داده شدند.

تهیه محیط کشت (McLachlan, 1973):

محیط کشت غنی شده PES (Provasoli's Enriched Seawater) جهت کشت نمونه مورد نظر استفاده شد.

در این پژوهش برای تهیهٔ محیط کشت، مقادیر ۴۰ میلی‌لیتر (۲PES) و ۱۰ میلی‌لیتر ($\frac{1}{2}$PES) نیز برای غنی سازی یک لیتر آب دریا بکار رفتند.

طریقه کشت :

محیط‌های PES $\frac{1}{2}$, PES و۲PES بصورت مایع و جامد (۶ گرم در لیتر آگار) بکار رفته و قطعات جداکشت ۵ میلی‌متری پهنک جلبک مورد مطالعه پس از سترون‌سازی در این محیط‌ها کشت داده شدند. لازم به ذکر است برای کشت در محیط جامد از ظرف‌های پتری با قطر دهانه ۱۰ سانتیمتر استفاده شد و حجم محیط کشت بکار رفته در هر ظرف پتری حدود ۲۵ میلی‌لیتر بود. برای کشت در محیط مایع از ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتر با ۲۵ میلی‌لیتر محیط

کشت استفاده گردید. واکشت نمونه‌ها هر دو هفته یکبار انجام گرفت.

نتایج

محیط جامد :

قطعات جداکشت پهنک جلبک مورد مطالعه در محیط‌های جامد PES و ۲PES بدون اینکه رنگ خود را از دست بدهند حالت تورم و آمادگی برای تقسیم از خود نشان دادند (شکل ۱) و این آمادگی در ۱۰ درصد موارد (پس از گذشت ۹ ماه و طی ۱۶ واکشت) منجر به تقسیمات طولی سلولها و تشکیل رشته‌های کرک مانند و باریک (شکل ۲) و در ۲۰ درصد موارد (پس از گذشت ۹ ماه و طی ۱۶ واکشت) منجر به تشکیل کالوسهای بسیار کوچک (میکروکالوس) سفید رنگ گردید (شکل ۳). لازم به ذکر است در هیچ یک از موارد مزبور از هیچ یک از هورمون‌های رشد جهت باززایی یاکالوس زایی استفاده نشد و هدف در مرحله اول مقایسه پاسخ قطعات جداکشت به میزان غنی‌سازی محیط‌های کشت بوده است.

محیط مایع :

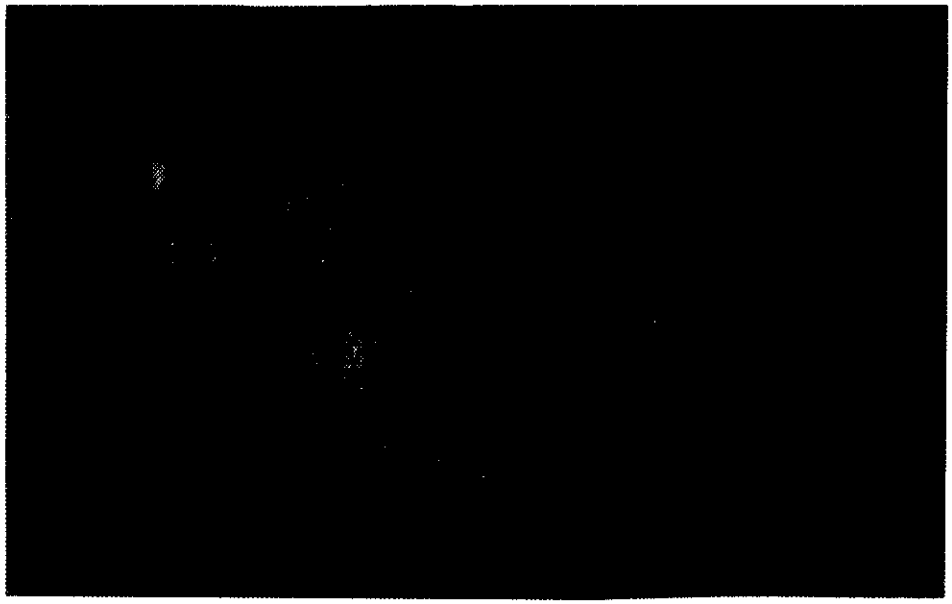
کشت قطعات جدا پهنک در هر سه محیط مایع ($\frac{1}{2}$PES , PES , ۲PES) با قرارگرفتن بر روی تکان دهنده برقی (Shaker) و حرکت دائم ظروف حاوی آنها برای تأمین هوای لازم برای بافت پس از مدت دو هفته محیط مایع راکدر نموده و جرمی قهوه‌ای رنگ بر دیوار ظروف ایجاد نمودند (شکل ۴). از آنجائیکه در محیط مایع بیش از این تغییری مشاهده نشد برخی از کشت‌های مایع به محیط جامد انتقال یافتند.

انتقال از محیط مایع به محیط جامد:

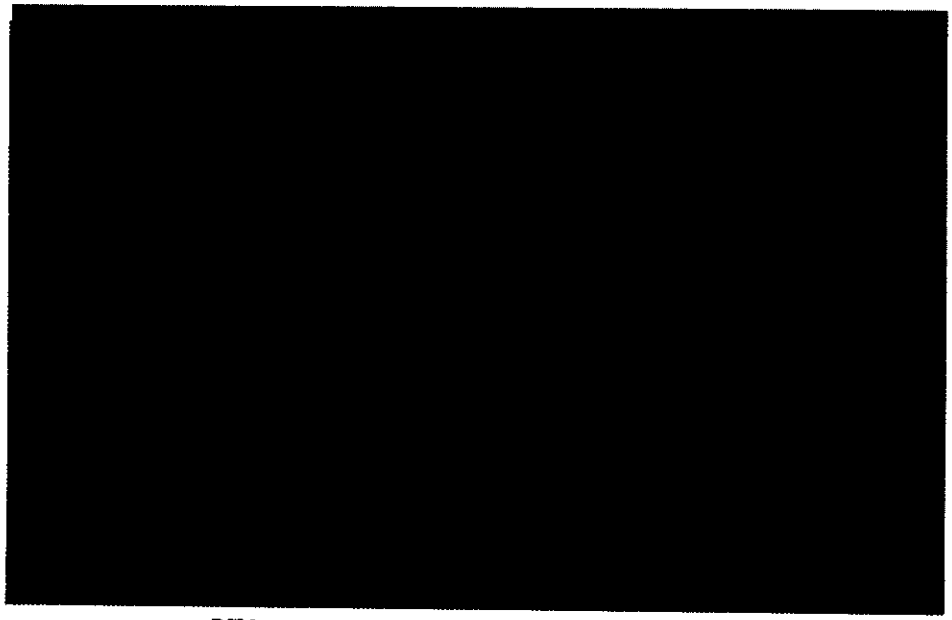
در کشت‌های مایع انتقال یافته به محیط جامد پس از دو ماه در تاریکی در محیط PES برروی سطح محیط دانه‌های کروی سیاه رنگی مشاهده شد. این دانه‌ها پس از مدتی ابتدا منفذ و مجرایی تشکیل داده و به شکل اندام کوزه مانندی در آمدند و از داخل این مجرا تعداد یک تا دو و چند رشته قهوه‌ای رنگ خارج شدند و در ادامه این رویش بخشی از این رشته‌ها شروع به پهن شدن نمودند.

شکل ۱ : قطعه جدا کشت پهنک *S. zanardinii* در محیط PES . انجام تقسیمات طولی در حاشیه‌های متورم و تشکیل رشته‌های کرک مانند (فلش ضخیم) و ابتدای تشکیل میکروکالوس (فلش نازک) قابل توجه می‌باشد.

شکل ۲ : تشکیل میکروکالوس سفیدرنگ در قطعه جدا کشت پهنک *S. zanardinii* در محیط *PES*



شکل ۳ : انتقال قطعات جداکشت پهنک *S. zanardinii* از محیط PES مایع به جامد و تشکیل اندام کوزه مانند.



شکل ۴ : انتقال قطعه جداکشت پهنک *S. zanardinii* از محیط PES مایع به جامد و نحوهٔ تشکیل منشاء پهنک

بحث

بطوریکه ملاحظه شد مشکل عمده در کشت بافت جلبکهای دریایی، سترون‌سازی آنها است. اغلب آب دریا بعلت تنوع بسیار زیاد باکتریها و تعداد قابل ملاحظه‌ای که دارند سوپ باکتری نامیده می‌شود و در کشت بافت جلبک‌های دریایی نیز مشکل عمده را باکتریها ایجاد می‌کنند. سترون سازی بافت این جلبکها نیاز به گسترهٔ وسیعی از آنتی بیوتیکها در مقادیر بالا دارد. همین امر احتمالاً موجب عدم رشد بعدی بافت در محیط کشت می‌گردد، بدین معنی که پایین آوردن زمان و مقدار آنتی بیوتیکها موجب ایجاد آلودگی وسیع در محیط‌های کشت می‌گردد و استفاده از مقادیر مناسب آنتی بیوتیک قدرت رشد بافت را از آن سلب می‌کند. به نظر می‌رسد که همین امر، عامل عدم رشد ۷۰ درصد قطعات جداکشت در این پژوهش باشد. علی‌الخصوص که در این جلبکها خارجی‌ترین لایه سلولی (مریستودرم) بیشترین قدرت تقسیم و تکثیر را دارد که به احتمال زیاد طی مراحل سترون‌سازی از بین می‌رود و به همین علت اغلب قطعات جداکشت سترون شده در محیط کشت بدون اینکه بمیرند، قدرت تقسیم سلولی خود را از دست می‌دهند (Polne-Fuller *et al.*, 1984 ; Reed *et al.*, 1985 ; Robyt & White, 1987).

عامل دوم مزاحم در کشت جلبکهای دریایی دیاتومه‌هایی هستند که بطور اپی‌فیت برروی این جلبکها زندگی می‌کنند و اغلب قطعات جداکشتی را که از حمله باکتریها و قارچها مصون مانده‌اند آلوده می‌سازند.

با وجود چنین منابع آلاینده‌ای تهیه کشت‌های خالص از جلبکهای دریایی بسیار مشکل می‌باشد و اغلب سترون‌سازی گونه‌هایی که از انشعابات فراوان برخوردارند مشکل‌تر می‌باشد و بنابراین احتمال از دست دادن قدرت رویش در آنها بیش از سایر نمونه‌ها است. در مورد جلبک *Sargasopsis zanardinii* که دارای پهنک‌هایی صاف و بزرگ و فاقد انشعابات ریز می‌باشد و ضمناً بافت آن نیز نسبتاً ضخیم است، سترون‌سازی در ۵۰ درصد موارد با موفقیت همراه بود و تقسیم سلولی و تشکیل میکروکالوس نیز مشاهده شد.

به دلیل تنوعی گونه‌ای که در جلبک‌های دریایی وجود دارد، هرگونه از آنها مطالعات مجزایی را برای تعیین شرایط فیزیکی و شیمیایی لازم برای القای تقسیم سلولی و نمو می‌طلبد

مجزایی را برای تعیین شرایط فیزیکی و شیمیایی لازم برای القای تقسیم سلولی و نمو می‌طلبد (Polne-Fuller & Gibor, 1987).

عوامل تنظیم کننده رشد در علفهای دریایی هنوز بخوبی شناخته نشده‌اند بطوریکه برخی مطالعات انجام شده نشان می‌دهند، این نمونه‌ها عموماً به عوامل تنظیم کننده رشد شناخته شده در گیاهان عالی پاسخ نمی‌دهند و احتمالاً تغییر در عناصر معدنی محیط کشت کمک بیشتری در این زمینه خواهد نمود (Polne - Fuller *et al.*, 1984 ; Reed *et al.*, 1985 ; Robyt & White, 1987). شواهد دیگری نیز مبنی بر تأثیر مثبت اکسین‌ها در رشد قطعات جدا کشت علفهای دریایی در محیط کشت MMS، تهیه شده با آب دریا و همچنین تأثیر منفی سیتوکینین‌ها در رشد و تکثیر سلولی این جلبکها وجود دارد (Cheney, 1984).

در این پژوهش برای غنی‌سازی آب دریا از مقادیر مختلف محیط PES استفاده شد. بطوریکه نتایج نشان می‌دهد حالت تورم و آمادگی برای تقسیم سلولی و تقسیمات طولی و ایجاد رشته‌های کرک مانند و باریک و میکروکالوسهای کوچک همگی در محیط‌های PES و 2PES صورت گرفته‌اند ولی محیط 1/2PES که از غنای کمتری برخوردار است فاقد نتایج مزبور می‌باشد. همچنین تولید اندام‌های کوزه مانند نیز در محیط PES صورت گرفت. شناخت بیشتر عوامل تنظیم کننده رشد و تقسیم سلولی در این جلبک نیاز به مطالعات پیگیر و منظم بعدی دارد.

منابع

ابهری، س.ر. ، ۱۳۷۲. شناسایی گیاهان ماکروسکوپی بین جزر و مدی خلیج گواتر، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران. صفحات ۱ تا ۸۰.

کریمی، ف. ، ۱۳۷۵. بررسی کمی و کیفی آلژیناتها در برخی از سرده‌های جلبکهای قهوه‌ای (Phaeophyceae). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دانشگاه تهران. صفحات ۱۰۷ تا ۱۱۵

Cheney, D. , 1984. Genetic engineering in seaweeds: applications and current status.

Lawlor, H.J. ; McComb, J.A. and Borowitzka, M.A. , 1987. The development of filamentous and callus like growth in axenic tissue cultures of *Ecklonia radiata* (*Phaeophyta*). Elsevier Applied Science. pp.139-150.

McLachlan, F. , 1973. Growth media-marine. Cambridge, University Press. pp.25-51.

Polne-Fuller, M. and Gibor, A. , 1987. Tissue culture of seaweeds. Elsevier Applied Science. pp.219-239.

Polne-Fuller, M. ; Saga, N. and Gibor, A. , 1984. Algal cell, callus and tissue culture and selection of algal strains. J. Cramer Berlin Stuttgart. pp.30-36.

Polne-Fuller, M. , 1988. The past, present, and future of tissue culture and biotechnology of seaweeds. Elsevier Applied Science. pp.17-30.

Reed, R.H. ; Davison, J.R. ; Chudek, J.A. and Foster, R. , 1985. The osmotic role of manitol in phaeophyta, phycologia. No. 24, pp.35-47.

Robyt , J.F. and White, B.J. , 1987. Biochemical Techniques, theory and practice, Books Cole Publishing Company. pp.25-30.

Tokuda, H. and Kawashima, Y. , 1987. Protoplast isolation and culture of a brown alga, *Undaria pinnatifida*. Elsevier Applied Science. pp.151-157.

Callous Formation and Regeneration of *Sargasopsis zanardinii* through Culturing Media

Ebrahim zadeh H.[1] ; Karimi F.[2] and Abbari S.R.[3]

1 - Laboratory of Plant Physiology, Dept. of Science, Tehran University, P.O.Box : 14155-6455 Tehran, Iran

2 - Jahad Daneshgahi Research Center, Shahid Beheshti University, P.O.Box : 19835-371 Tehran, Iran

3 - Dept. of Marine Science, Sistan & Baluchestan University, Chahbahar

Received : November 1999 Accepted : October 2000

Key words : tissue culture, Callous, *Sargasopsis zanardinii*

ABSTRACT

Nocdays, seaweeds have many uses in food industry, weaving, pharmacy, medicine, biotechnology and so on. Many efforts has been made to regenerate seaweeds in artificial media in order to carry out genetic engineering process since 1970. In this study we have tried to establish a proper method for sterilization and tissue culture of brown seaweed, *Sargasopsis zanardinii*, in 1/2PES, PES and 2PES media. After sterilization, the explants of the seaweed were cultured in liquid and solid media.

Consequently turgidity in margin of explants, longitudinal cell divission and formation of hairy strands, and microcallous formation were showed by explants which cultured in PES and 2PES solid media.

After transporting from liquid to solid media, juglike bodies were formed on the surface of solid PES media and then some brown strands were grown from these bodies that finally were flattened. None of these results was obtained from 1/2PES media.