ترجمه فا

TarjomeFa.Com

ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

استقرار محیط های کشت سوسپانسیون سلول جنینی سیر(Allium sativum)، تولید مثل گیاهی و تجزیه و تحلیل های بیوشیمیایی

چکیده

محیط های کشت سوسپانسیون سلول جنینی سیر(Allium sativum) در یک محیط مایع از بافت جنینی قابل تکثیر قرار گرفتند. پارامترهای بهینه برای حفظ کشت بافت شامل موارد ذیل بودند:1- تراکم اولیه سلول 1-4٪(v/v)،2-تعویض محیط کشت هر 14 روز یکبار و استفاده از محیط های کشت کوچکتر در هر 28 روز یک بار 30 غلظت اسید 2-4 دی کلرو فنوکسی استیک(0.1 تا 0.3 میلی گرم بر لیتر). طی یک دوره چهارده ماهه ، کشت ها تحت تکثیر قرار گرفتند.بعد از انتقال به محیط القای جنین نیمه جامد، محیط های کشت سوسپانسیون سلول تمایز شدند که در این بین مطالعات بافت شناسی، ماهیت جنینی فرایند را تایید کرد.چهل درصد این جنین ها به گیاهچه تبدیل شدند که تولید پیازچه های آزمایشگاهی(درون شیشه ای) میکرو کردند. ترکیبات گوگرد پیازچه های در مقیاس میکرو حاصل از گیاهچه های رشد یافته از جنین سوسپانسیون سلول از ترکیبات تولید شده توسط گیاهچه های تولید شده از تکثیر ساقه ای درون شیشه ای اختلاف اندکی نشان داد با این حال بعد از دو دوره تکثیر در محیط، این اختلاف ناپدید شد.

لغات کلیدی:تشکیل جنین سوماتیک، بافت شناسی، ترکیبات گوگردی

مقدمه

همه ارقام تجاری سیرعقیم می باشند(اتوه و سیمون 2002،کانتسکی و رابینوویچ2001) و بایستی به طور رویشی تکثیر و تولید مثل شوند. در نتیجه،شانس انتقال بیماری افزایش می یابد(نواک 1990)، به خصوص واریته های سیر با انواع مختلفی از ویروس ها آلوده می شوند(دولورس و همکاران 2002،لوت و همکاران 1994).

روش های خارج سازی و حذف ویروس و تولید مواد عاری از ویروس با استفاده از کشت راس مریستم ایجاد شده اند(آیاب 2001، چولون و همکاران 1990،سنولا و همکاران 2000). محققان مختلف با استفاده از پروتوکل ها و روش های مختلف تکثیر میکرو سرعت تکثیر و زاداوری محدودی را با توجه به تولید مواد عاری از ویروس حاصل کرده اند(باراندیاران و همکاران 1999، هاکیو و همکاران 1997، کاهن و همکاران 1993، روبلدو و همکاران 2000، مایرز و سیمون 1998، زنگ و همکاران 2003). در واقع، جنین زایی را می توان به تکثیر بافت های سالم سیر در بزرگ مقیاس اعمال کرد(فرئول و همکاران 2002). برای مثال، فرایند تشکیل جنین سوماتیک اخیرا گزارش شده است(فرئول و همکاران 2002). با این وجود، تا به امروز، سرعت های تکثیر برای تولید گیاهان سیر عاری ار ویروس نتوانسته اند نیازهای اقتصادی یک سیستم تکثیر توده ای کاربردی را براورده کنند. تولید گیاهان از جنین سوماتیک رشد یافته از محیط کشت سوسپانسیون تشکیل جنین می تواند رویکرد احتمالی دیگر باشد.

به دلیل تماس بالای محیط-بافت در سیستم کشت مایع، تاثیرات محیط تسریع شده و رشد جنین می تواند شدیدا تحت کنترل نسبت به یک سیستم پشتیبانی محکم قرار گیرد.در خصوص کشت های سوسپانسیون سیر گزارشات محدودی وجود دارند. ناگاساوا و فینر 1988 کشت سوسپانسیون تکثیر کالوس را به عنوان خوشه گروی دانستند با این حال آنها سوسپانسیون سلولی و یا تکثیر گیاهی واقعی را بدست نیاوردند. باروتو سید و همکاران 1994، کشت بافت های سوسپانسیون و گیاهان تکثیر شده را ثابت کردند با این حال آنها نه خصوصیات تشکیل جنین و نه فراوانی تکثیر را گزارش کردند. به علاوه، پروتوکل انها مستلزم غلظت بالای 2-4-D بود که به موجب آن ریسک تغییرات تکثیر سوماتیک را افزایش می دهد.

هدف اصلی تحقیق اثبات و تعیین خصوصیات یک پروتکل مطمئن برای تکثیر سیر از طریق کشت های سوسپانسیون سلول جنینی بود. ما اثرات چندین پارامتر را بر روی تکثیر سلولو و زاداوری گیاهی برای تعیین و بهینه سازی شرایط حفظ کشت بافت ها بررسی کردیم.توجهی خاصی در جهت حفظ غلظت 2-4-D در پایین ترین سطح ممکن شد. مطالعات بافت شناسی، قابلیت تشکل جنین القا شده در کشت بافت های سوسپانسیون سلول را نشان داد. تجزیه تحلیل های شیمیایی بر روی پیازچه های میکرو رشد یافته از گیاهچه های جنین سوسپانسیون و نیز گیاهچه های تکثیر ساقه درون شیشه ای به عنوان یک صفت کیفی بین این دو راهبرد تکثیر سیر انجام شدند.

Nutrients (mg/l)	CMM	SM	EPM
Macro nutrients (modified)[b]	(B5)	(N6 m)	(N6 m)
KNO_3	2,500	2,850	2,850
$(NH_4)_2SO_4$	134	463	463
$NaH_2PO_4, 2H_2O$	150	400	400
$CaCl_2, 2H_2O$	150	440	440 q
$MgSO_4, 7H_2O$	250	185	185
Micro nutrients[c]	(MS)	(H)	(H)
Vitamins	(B5)	(B5)	(B5)
Nicotinic acid	1	1	1
Pyridoxine	1	1	1
Thiamine HCl	10	10	10
Myo-inositol	100	100	100
Malt extract	100	100	100
Amino acid			
Proline	230		
Glutamine		150	150
Growth regulators			
2.4.D	0.5	0.3	0.1
IAA	0.2		
NAA	0.2		
kinetin	0.1		0.5
BAP		0.1	
Sucrose (g/l)	60	45	45
Agar, Phytagel	3g	0	3
p^H before autoclaving	5.8	5.8	5.8

جدول1

شرایط کشت

بارگذاری کشت های سوسپانسیون سلولی

کالوس های جنینی به طور مکرر هر 45 روز بر روی محیط حفظ کالوس کشت شدند(CMM، جدول1). بعد از 5 ماه کشت، آنها تشکیل ترکیبی از کالوس های فشرده، نیمه تکثیر پذیر و تکثیرناپذیر دادند که قادر به تولید جنین های سوماتیک بودند. این کالوس ها برای تشکیل کشت سوسپانسیون سلول مورد استفاده قرار گرفتند.کالوس در شش دیش (ظرف) شش چاهکی حاوی 5 میلی گرم سوسپانسیون مایع در هر چاهک(SM جدول1) بر اساس املاح اصلاح شده N6 رشد داده شد. محیط های کشت در دمای 24 تا 26 درجه سانتیگراد در تاریکی با دور پیوسته (100rpm) انکوبات شدند. بعد از 14 روز، 4 میلی لیتر مایع خارج شده و توسط 4 میلی لیتر مایع تازه جایگزین شد. بعد از 28 روز، این محلول از الک با منفذ 800 میکرومتر فیلتر شده و مواد حاصل در لوله ازمایش مدرج استریل قرار داده شد. بعد از رسوب گذاری مواد فیلتر شده، حجم سلول رسوب یافته اندازه گیری شد.

تثبیت محیط کشت سوسپانسیون سلول

محیط کشت سوسپانسیون فوق در چندین دیش چند چاهکه با انتقال 0.06-0.48 میلی لیتر SCV در نمونه های 2 میلی لیتری از محیط SM به یک چاهک که 4 میلی لیتر محیط تاره SM برای رسیدن به حجم 6 میلی لیتر انتقال داده شد تحت کشت های مجدد قرار گرفتند. پتانسیل زاودآوری کشت های سوسپانسیون توسط محیط تولید جنین نیمه جامد مورد مطالعه قرار گرفت. تعداد جنین دو ماه بعد شمارش شد.

ثبت داده ها

متغیرهای ذیل اندازه گیری شدند(v1)-سرعت SCV(SCV نهایی/SCV اولیه) که معیار اندازه گیری رشد کشت بافت های سلولی بعد از 14 روز بعد از کشت دوم است،(v2) تعداد متوسط جنین های تکثیر شده در هر میلیمتر SCV در محیط EPM،(V3)- تولید کل بالقوه جنین با در نظر گرفتن سرعت رشد بافت سلولی(v1)، پتانسیل زاداوری و تکثیر در هر میلیمتر SCV(V2) و کمیت SCV اولیه در محیط با در نظر گرفتن $V3=v1\times v2\times q\ ml$.

تیمارهای آزمایشی

چندین پارامتر برای تست تاثیر آنها بر بر حفظ کشت سوسپانسیون سلول و تولید جنین تست شد.

تراکم های سلولی اولیه: کمیت های SCV در نمونه های 6 میلی لیتری در محیطSM کشت شدند:0.2،0.18،0.12،0.06 و 0.48 میلی لیتر. این غلظت ها به صورت درصد های و 5،4،3،2،1 و 8 درصد بیانش شدند. (V1) در 42،28،14 و 56 روز بعد از کشت و د رحالی که V2 در 42 روز بعد از کشت دوم بدون کشت مجدد اندازه گیری شدند.

حالت دوره ای کشت مجدد: دوره های کشت مجدد به ترتیب 21،14،7 و 28 روز بود. تراکم اولیه سلول با میزان 4 درصد در 63،56،49،42،35،28،21،14،7 و 70 روز بعد از کشت در حالیکه V2 در 42 روز بعد از 42 روز اندازه گیری شدند. کشت مجدد نیز انجام نگرفت.

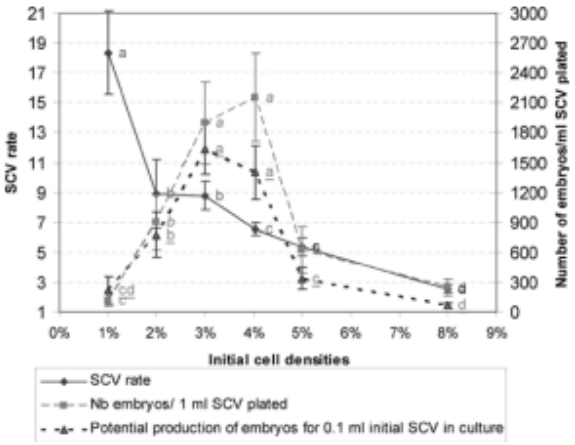
غلظت 2-4-D: غلظت های 2-4-D حدود 0.3،0.1 و 0.5 میلی گرم بر لیتر بود. تراکم اولیه سلول 4٪ بود. V1-V2 طی 28 روز در سه دوره متوالی کشت مجدد اندازه گیری شدند. محیط هر چهارده روز یکبار عوض شده و کشت نجدد هر 28 روز یکبار انجام پذیرفت.

سن کشت سوسپانسیون: از یک تا 5 ماه بعد از کشت اولیه، V1-V2 در هر کشت مجدد اندازه گیری شدند. تراکم اولیه سلول 4٪ بودو محیط هر 14 روز یکبار تجدیدشده و کشت مجددهر 28 روز انجام شد. محیط کشت سوسپانسیون از الک های با منفذ 800 میکرومتر در 8ر 56 روز فیلتر شده و مواد حاصله برای ازمایشات انتقال داده شدند.

مقایسه ترکیب گوگرد: غلظت الین (اس-الیل-سیستئین سولوکسید)،GLUAICS(آفا-گلوتامیل-اس-الیل سیستئین) و GLUPeCS بر روی CS و پیازهای میکرو اندازه گیری شدند.

تحلیل های آماری

نتایج ما با استفاده از روش مدل خطی نرم افزار اماری SAS نسخه 8.2 برای ویندوز تجزیه تحلیل شد. آنالیز واریانس یک سویه برای متغیرهای v1-v2 و v3 شامل شش تکرار از یک چاهک برای v1 و چهار تکرار بری v2 و v3 بود. مقایسات چندگانه با استفاده از آزمون دامنه ای توکی در سطح 5 درصد انجام شد.



شکل1

مطالعه بافت شناسی

هم سلول های سوسپانسیون و هم سلول های محیط نیمه جامد در پتری دیش ها در مراحل مختلف جمع اوری، تثبیت، آبگیری و لکه گذاری شدند.

روش نمونه برداری برای آنالیز های شیمیایی

Alliin، GLUAlCS، GLUPeCS بر طبق روش آرنالت اندازه گیری شدند. یک گرم پیازچه تازه با 3 میلی لیتر متانول به علاوه 0.05٪ اسید فرمیک در دمای اتاق همگن شد. یک نمونه ده برابر رقیق شده و از غشای پلیوینیل دیفلوروید با 0.3 میکرومتر قطر عبور داده شد. یک نمونه 15 میکرولیتری از مواد فیلتر شده به درون ستون کراماتوگرافی مایع فشار قوی تزریق شد. یک پیازچه بیاگر یک تکرار بود طوری که 5 تکرار در هر تیمار ثبت گردید.

نتایج و بحث

تاثیر تراکم اولیه سلول

تراکم اولیه سلول به طور معناداری بر سرعت scv و پتانسیل سلول ها برای تولید جنین (v2v3) تاثیر گذاشت. افزایش تراکم سلول از 1 به 8 درصد کاهش یافت.در نتیجه، تراکم پایین سلول یک وضعیت بهینه برای تولید توده ای سلول بود. همچنین تراکم اولیه سلول بر تعداد جنین ها در هر میلی لیتر scv تاثیر گذاشتند. برای این اثرات می توان چندین دلیل و توجیه آورد. اول این که سلول های کشت شده محیط را طوری تغییر دادند که امکان تمایز سلولی را فراهم کردند از این رو در پایین تر از حداقل تراکم، سلول های اندکی بودند.v1 طی دوره کشت در 42،28،14 و 56روز اندازه گیری شد. تراکم اولیه سلول 1 و 2 درصد بود و فاز رشد اولیه در چارچوب 28 روز حاصل شد و در سطح 8 درصد، فاز رشد بهینه طی 14 روز حاصل شد. تراکم اولیه سلول 3 تا 4٪ برای هر دو کشت بلند مدت قبل از تکثیر مجدد و برایحفظ پتانسیل بهتر برای زاداوری جنین ها ترجیح داده شد.

تاثیر تیمارهای دوره ای تجدید محیط

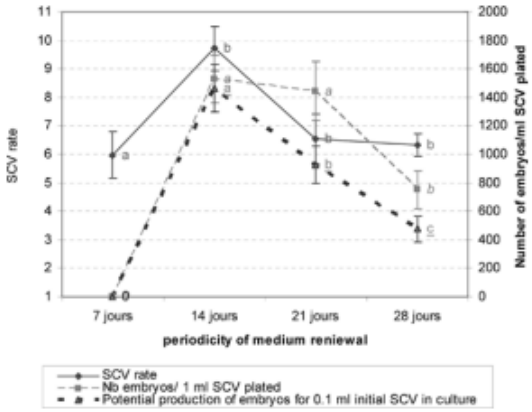
دوره های مختلف تجدید محیط به طور معناداری بر scv و پتانسیل تولید جنین ها تاثیر گذاشت. از این رو، بعد از 25 روز کشت مجدد، در 14 روز v1،در روز های 14 و 21 v2 و در 14 روز v3 بیشتر بود. از این رو، ما نشان دادیم که 14 روز بین تجدید محیط ها بهترین شرایط برای هم تکثیر و هم بر تکثیر جنین است.

تاثیره دوره تکثیر مجدد

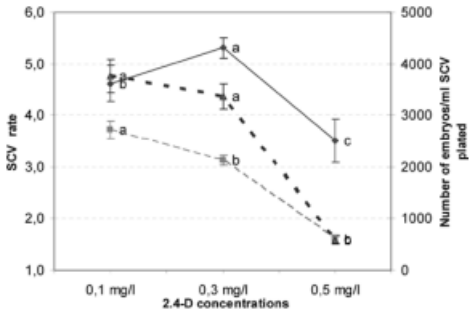
V1 بعد از 63،56،49،42،35،35،28،21،14،7 و 70 روز برای بررسی تاثیر دوره های مختلف تجدید کشت اندازه گیری شد. در بهترین دوره تجدید، یعنی 14 روز، ما کاهشی در سرعت رشد بعد از 28 روز مشاهده کردیم. از این رو، تجدید محیط رشد هر 14 روز و سپس کشت مجدد هر 28 روز را توصیه می کنیم.

تاثیر غلظت های 2-4-D در محیط های SM

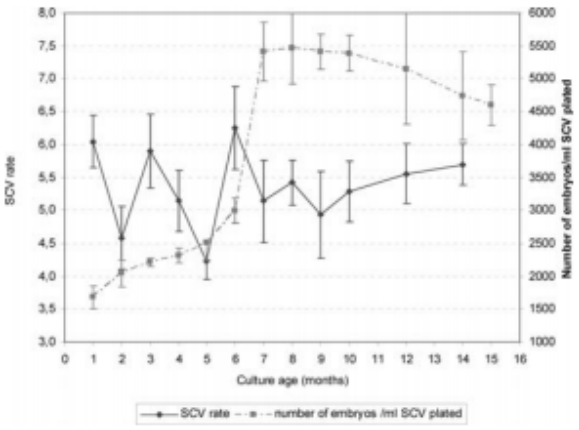
غلظت های 2-4-D در محیط SM به طور معناداری بر سرعت SCV (V1) و پتانسیل تولید جنین(V2-V3) تاثیر گذاشت. در میان غلظت های تست شده، 0.3 میلی گرم بر لیتر در تولید بیشترین میزان(V1) کارامد بود، در حالی که کم ترین پاسخ با 0.5 میلی گرم بر لیتر حاصل شد. با توجه به (V2)،0.1 میلی گرم موجب بالاترین میزان پتانسیل کرد در حالیکه 0.5 میلی گرم کم ترین میزان را القا کرد.کاهش غلظت های 2-4-D امکان تمایز بیشتر سلولی و توانایی تکثیر شد. این نتیجه با مشاهدات برناردین و همکاران 1999 همخوانی دارد طوری که غلظت های 2-4-D پایین، موجب افزاییش درصد نهال های سیر شد که حاکی از تکثیر بوسله کالوس و زاداوری است. در خصوص V3،نتایج مربوط به کم ترین غلظت های 2-4-D اختلاف معناداری نداشت. از این رو استفاده از کم ترین غلظت 2-4-D برای کاهش ریسک تغییر ساموکلونال توصیه می شود.



شکل2: تاثیر کشت مجدد، 42 روز بعد از کشت اولیه. علائم a-b-c در روی یک منحنی حاکی از گروه های همگن بر طبق تست F است.



شکل3: تاثیر غلظت های 2-4-D در سه دوره متوالی کشت مجدد با سن 28 روز. حوف a-b-c در روی یک منحنی حاکی از گروه های همگن بر طبق آزمون تست F



شکل4:تاثیر سن کشت سوسپانسیون سلول بر سرعت SCV و ظرفیت جنین زایی

تاثیر سن کشت بافت از زمان تثبیت

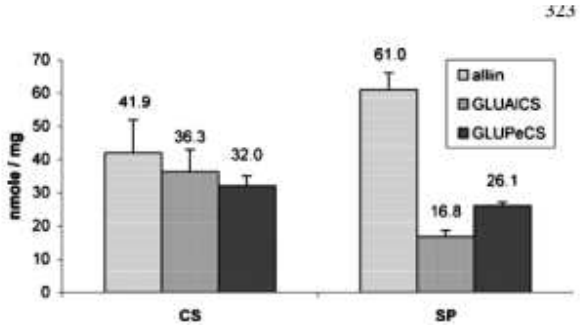
سرعت رشد کشت سوسپانسیون سلول به طور مطابق با افزایش سن کشت،و افزایش 4.5 تا 6 برابری در دوره 28 روزه بود. با این وجود، برای یک دوره 7 ماهه، این میزان در مقیاس بزرگ تر نوسان داشت و نشان داد که محیط کشت تا حدودی ناپایدار است. از ماه هفتم به بعد، سرعت رشد در یک محدوده باریک نوسان داشت که خود حاکی از وجود شرایط پایدارتر است.

بر عکس تعداد جنین ها در هر میلی متر SCV با افزایش سن کشت سوسپانسیون تا 7 ماه افزایش یافت. سپس از ماه هفتم تا دوازدهم به صورت پایدار بوده و سپس کاهش یافت. برای اکثر گونه ها، سرعت تکثیر با افزایش سن کاهش یافت که مخالف وضعیت فعلی در این مطالعه است. نتایج مشابهی در خصوص سیر(میر و سیمون1998) و پیاز(فیلیپس و لوتین 1983) در گذشته حاصل شده است. شرایط رشدی ویژه منجر به افزایش تعداد ساقه و گیاهچه با افزایش سن کالوس شد. این نتایج را می توان بر اساس این که شرایط کشت سوسپانسیون

نسبت به شرایط کشت جامد کارامدتر می باشد. این توجیه بر اساس ناپایداری محیط کشت در دوره زمانی یکسان است.

تکثیر سوسپانسیون سلولی و تبدیل جنین به گیاهچه

نمونه های محلول سلولی در محیط کشت جنین نیمه جامد قادر به تولید تعداد زیاد جنین سوماتیک در جارچوب 8 هفته بود. نخستین جنین ها طی 3 هفته بعد از کاشت تمایز حاصل کردند. آنها مشابه با ساختار های کروی بزرگ به طول 1-2 میلی متر با سطح صاف ناشی از وجود یک اپیدرم بودند. درصد جنین های تبدیل شده به گیاهچه 39.4 درصد بود.



شکل5: غلظت متوسط ترکیبات گوگردی در پیزچه های CSو SP

طی بیست روز فرایند جوانه زنی رخ داد. جنین های جوانه زده شده کشت شدند و گیتهچه ها قادر به تولید پیازهای میکرو درون شیشه ای بودند.

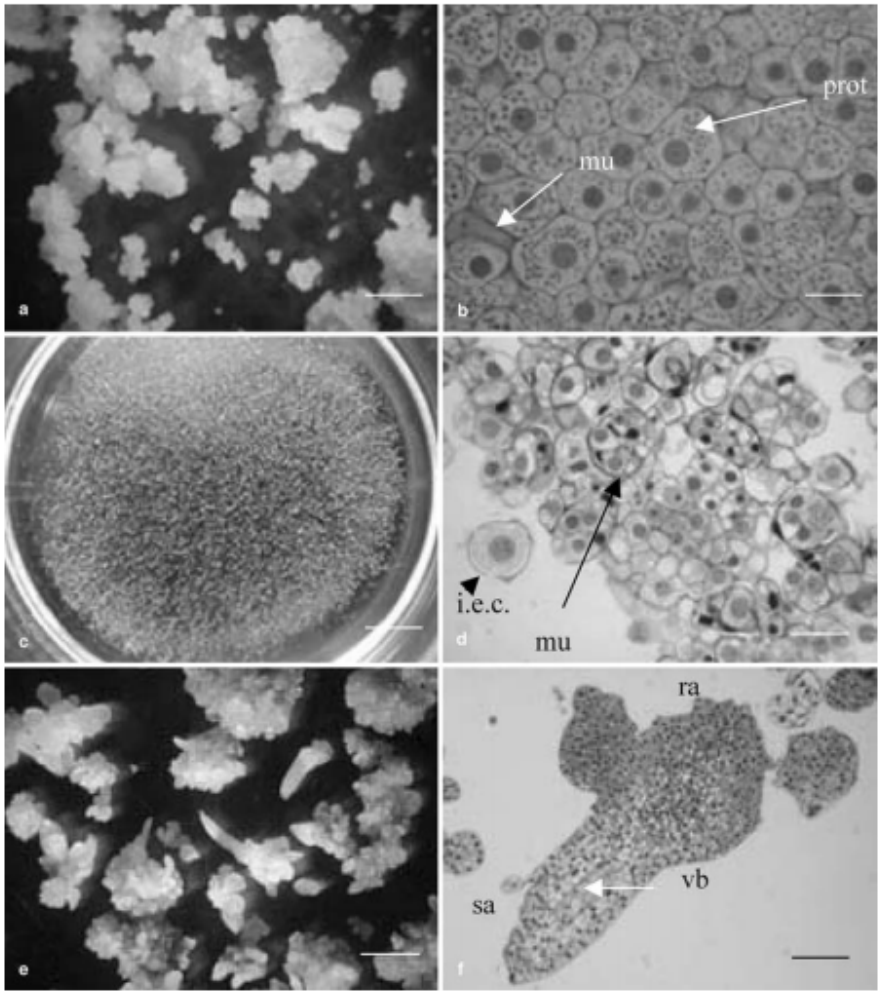
مقایسه پیازهای میکرو با توجه به ترکیبات گوگرد

بین پیازهای میکرو CS و SP اختلافاتی مشاهده شد(شکل5). آلین به علاوه GLUAICS حدود 70٪ ترکیبات گوگرد را برای هر دو منبع نشان داد با این حال، توزیع متفاوتی داشتند. در پیازهای میکرو CS، مقدار آلین کاهش یافت و این در حالی بود که GLUAICS روند افزایشی نشان داد. در پیازهای SP، برخلاف دو پپتید GLUAICS

وGLUPeCS ، غلظت آلین بیشتر بود. تعیین کمی ترکیبات گوگرد حاکی از وجود اختلاف در ترکیب گوگرد بین دو نوع تکثیر گیاه سیر بود. با این حال، بعد از دو دوره کشت در مزرعه، این اختلاف حفظ نشد.

مطالعه بافت شناسی

هنگامی که کالوس های جنین در محیط مایع کشت شدند، بافت های تشکیل جنین قابل تکثیر، قطعات جنینی از سلول های کوی ازاد کردند. این قطعات تکثیر شده و ایجاد بافت های جدید کردند. بعد از 28 روز کشت در محیط مایع، کشت سوسپانسیون سلول تثبیت شد. این توده متشکل از ترکیبی از سلول های منفرد با اندازه های مختلف 1200 میکرو متر بود. این مواد از الک با منفذ 1200 میکرومتر عبور داده شدند. سلول های جنینی پلی هیدرال و تا حدودی هم قطر بودند. سیتوپلاسم با واکوئل های کوچک متراکم بوده و غنی از پروتین بود. بعد از قرار گرفتن در محیط EPM نیمه جامد، این سلول ها تحت تقسیم معکوس قرار گرفته و و تولید ساختار های دو، چهار و چندگانه کردند. این سلول ها به نوبه خود تکثیر شده و تولید جنین های کروی کردند. بعد از انتقال آنها به EPM، آنها تبدیل به جنین های بالغ و کامل شدند که دارای ساختمان دو قطبی با مریستم های ریشه و ساقه مرتبط با با دستجات آوندی بوده و و با اپیدرم محاط شدند. این مطالعات بافت شناسی ماهیت جنین زایی این فرایند را ثابت کردند. فرایند های جنین زایی مشابه در دیگر گونه ها به خصوص در موز و هویج گزارش شده است.



شكل 6

ترجمه فا
TarjomeFa.Com

این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

✔ لیست مقالات ترجمه شده

✔ لیست مقالات ترجمه شده رایگان

✔ لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی