نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰ ، ص. ۴۱۶-۴۱۱
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 25, No. 4, Winter 2012, P. 411-416
ISSN: 2008 - 4730

بررسی واکنش ارقام طالبی به اندام‌زایی درکشت درون‌شیشه‌ای

ریحانه مرادمند[۱]- احمد ارزانی[۲*]- قدرت‌ا... سعیدی[۳]

تاریخ دریافت:۸۹/۹/۱۶
تاریخ پذیرش:۹۰/۱۰/۶

چکیده

کاربرد فنون کشت سلول، بافت و مولکولی در طالبی به لحاظ ویژگی هتروزیگوستی بالا و محدودیت در روش‌های به نژادی متداول، از جایگاه خاصی برخوردار است. مطالعه حاضر به منظور تعیین شرایط محیط کشت مطلوب جهت اندام‌زایی مستقیم از ریزنمونه‌های کوتیلدون، برگ و ریشه‌چه در سه ژنوتیپ طالبی اصفهان، گرمک بومی اصفهان و گرگر بومی ایلام اجرا شده است. ریزنمونه‌های کوتیلدون، برگ و ریشه‌چه بر روی محیط موراشیگ و اسکوک (MS) حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (BA) قرار داده شد و واکنش ژنوتیپ‌ها مورد بررسی قرارگرفت. از میان ریزنمونه‌های کوتیلدون، برگ و ریشه‌چه، ریزنمونه‌ی ریشه‌چه در هیچ محیطی قادر به باززایی نبود. کشت قطعات کوتیلدون ظرفیت بالایی در محیط MS و در حضور تنظیم‌کننده رشد BA نشان داد. بیشترین درصد القای شاخه در غلظت۱میلی‌گرم درلیتر BA مشاهده شد که به منظور ریشه‌دار شدن ساقه‌های القا شده در حضور BA از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) استفاده شد. بیشترین القای شاخه، ۲/۵ شاخه به ازای هر نمونه کشت‌شده در محیط ۱میلی‌گرم در لیتر BA در ژنوتیپ طالبی اصفهان رخ داد. بیشترین طول ساقه و تعداد برگ از قطعه کوتیلدون در حضور ۱میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد. در ریزنمونه برگ نیز همانند کوتیلدون، بیشترین میزان باززایی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد. در این آزمایش BA تنظیم‌کننده رشد ضروری برای اندام‌زایی در ریزنمونه‌های کشت‌شده طالبی بوده و غلظت ۰/۵تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BA غلظت مناسبی جهت القای شاخساره بود. ضمن‌اینکه با افزایش غلظت آن از ۱ به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، آثار منفی معنی‌داری را در این رابطه به همراه داشت. در مطالعه حاضر عوامل ژنوتیپ، ریزنمونه و تنظیم کننده‌های رشد تاثیر بارزی در واکنش به اندام‌زایی در طالبی داشته‌اند. ضمن اینکه با ترکیب مناسبی از محیط کشت و تنظیم‌کننده برای اندام‌زایی طالبی، تنها ژنوتیپ‌های دارای تنوع‌ژنتیکی زیاد از لحاظ واکنش با یکدیگر متمایز می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: طالبی، کشت بافت، اندام‌زایی، کوتیله‌دون، تنظیم‌کننده رشد

مقدمه

روش کشت بافت به‌عنوان ابزاری برای مطالعات بنیادی گیاهی نظیر بیوشیمی، فیزیولوژی و تشریح و همچنین کاربردهای عملی نظیر انتقال ژن[۴]، حفظ ژرم پلاسم[۵]، تولید بذر مصنوعی[۶]، ایجاد تنوع ژنتیکی (تنوع سوماکلونی)[۷] و حذف ویروس[۸] از گیاه استفاده می‌شود (۲). از دیگر پتانسیل‌های کشت‌بافت می‌توان به اندام‌زایی مستقیم از ریز نمونه‌های گیاهی یکی از مسیرهای کشت این‌ویترو اشاره نمود، به طوریکه گسترش و بهینه سازی این مسیر برای تکثیر در مقیاس بالا و تسریع بخشیدن برنامه‌های اصلاحی سودمند است (۵ و ۷).

در طالبی به لحاظ وجود محدودیت در روش‌های به نژادی متداول (تلاقی و گزینش) و داشتن ویژگی‌های هتروزیگوتی بالا، فنون کشت بافت جهت اصلاح خصوصیات اقتصادی دراین گیاه کاربرد بیشتری دارد. از طرفی بکارگیری فنون مولکولی از جمله مهندسی ژنتیک نیازمند توسعه روش‌های مختلف کشت بافت است.

کشت بافت به عنوان روشی برای تکثیر گیاه طالبی با استفاده از قطعات کوتیلدون[۹] مورد استفاده قرار گرفته است (۳، ۷، ۱۲، ۱۴ و ۱۵). قابل ذکر است که عوامل زیادی چون ریز نمونه‌ی[۱۰] کشت شده،

۱،۲و۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد و استادان گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
(*- نویسنده مسئول: Email: a_arzani@cc.iut.ac.ir)

4-Gene transformation
5- Germplasm
6-Artificial seed
7- Genetic variation (somaclonal variation)
8- Virus elimination

9- Cotyledon
10- Explant

محیط کشت، شرایط محیط کشت، و ژنوتیپ در نتایج بدست آمده دخیل می‌باشند (۴). کشت بافت درزمینه‌های گوناگون از جمله تکثیر سریع یک کلون در مقیاس زیاد ازیک منبع گیاهی برتر، حذف عوامل بیماری‌زا از طریق کشت مریستم، تهیه منبع عاری ازبیماری، حفاظت ژرم پلاسم گیاهان، گزینش جهش یافته‌ها ازجهش‌های خودبخودی یاالقایی، تولید گیاهان هاپلوئید ازطریق کشت بافت، انتخاب جهت مقاومت دربرابر آفات و بیماری، تنش‌هایی نظیر شوری، سموم، علف‌کش، آنتی بیوتیک، باززایی هیبریدها درگونه‌های ناسازگار، نجات جنین، کشت پروتوپلاست وامتزاج آن و تولید هیبریدهای سوماتیکی، تولید ریز قلمه‌های ریشه دار شده درگونه‌های زینتی چوبی سخت‌ریشه‌زا بکار می‌رود. قابل ذکراست که برخی از روش‌های بیوتکنولوژی، مهندسی ژنتیک و انتقال ژن به تکنولوژی کشت بافت وسلول متکی می‌باشد (۲ و ۸).

در تحقیقات کشت بافت باید توجه داشت که ژنوتیپ به طور اختصاصی، در عکس العمل ارقام به رشد و باززایی در محیط درون شیشه‌ای موثراست. در طالبی هر دو مسیر کشت بافت جنین‌زایی (۱۲،۶،۱ و ۱۵) و اندام‌زایی (۱۴،۱ و ۱۵) تحت تاثیر ژنوتیپ قرار دارد. باززایی این ارقام با کشت قطعات کوتیلدون در محیط MS حاوی کاینتین و IAA (۹ و ۱۷) و یا BA (۵ و ۱۷) فراهم شده‌است.

ریزنمونه‌های مورد استفاده گیاه طالبی و خربزه شامل قطعات کوتیلدون (۱۴)، برگ (۹ و ۱۴)، هیپوکوتیل (۸) است. در تحقیقی اندام‌زایی از ریزنمونه‌های کوتیلدون و قطعات کوچکی از برگ در غلظت‌های مختلف BA، کاینتین و TDZ در ترکیب با NAA مورد آزمایش قرارگرفت وBA بعنوان مطلوب‌ترین هورمون در اندام‌زایی طالبی شناسایی شد (۱۴). در مطالعه مزبور ترکیب NAA و TDZ کالوس به همراه ریشه تولید کرده و دربسیاری‌های از نمونه‌های کشت شده در حضور کاینتین جوانه ساقه مشاهده نشد. ریزنمونه‌های کشت شده در غیاب BA قادر به القای شاخه نبودند.

با توجه به قدمت تاریخی سه هزار ساله کشت خربزه و طالبی در ایران و سطح زیر کشت ۷۹۹۹۲ هکتار در سال ۱۳۸۳، گسترش رقم‌های اصلاح شده‌ی غیربومی و افزایش فرسایش ژنتیکی رقم‌های بومی احساس می‌شود. بنابراین خطر نابودی میراث چندین هزار ساله، لزوم اولویت به منابع ژنتیکی طالبی را اجتناب ناپذیر نموده است. همچنین علیرغم اهمیت جالیزکاری درایران تحقیقات محدودی در زمینه ارزیابی‌های ژنتیکی و مقایسه ارقام از لحاظ واکنش به کشت بافت انجام گرفته است.

بنابراین اهداف مطالعه‌ی حاضر مشتمل بر: ۱- ارزیابی واکنش به کشت بافت (اندام‌زایی) برخی از ارقام بومی‌طالبی کشور و ۲- ارائه محیط کشت مناسب برای ژنوتیپ‌های متنوع طالبی از لحاظ تنظیم‌کننده‌های رشد و با استفاده از انواع مختلف ریزنمونه بوده است. قابل ذکر است که رقم‌بومی[1] گرگر که در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفته است، در دیمزارهای استان ایلام پس از برداشت گندم‌دیم کشت می‌شود. این رقم طالبی مقاوم به گرما و خشکی با ایجاد ریشه‌های عمیق از آب موجود در اعماق دیمزارها در طی فصل تابستان استفاده کرده و آب مورد نیاز را تامین می‌کند. این ژنوتیپ طالبی در شرایط تنش‌های شدید گرما و خشکی محتوای آب اندام‌ها را حفظ نموده و از پژمردگی برگهایش جلوگیری بعمل می‌آورد.

مواد و روش‌ها

دراین مطالعه از سه ژنوتیپ طالبی شامل رقم بومی منطقه ایلام (گرگر)، گرمک و طالبی اصفهان استفاده گردید. ناحیه کوتیلدون بذری، برگ‌های جوان و ریشه‌چه، ریز نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه بودند. جهت تهیه ریشه‌چه، بذور درون پتری دیش قرار داده شده و با انجام آبیاری در فواصل مورد نیاز درون انکوباتور با شرایط دمایی ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و ریشه‌های گیاهچه‌های حاصل بعنوان ریزنمونه استفاده شد. جهت استفاده از برگ نیز، تعدادی از بذور در خاک گلدان با شرایط خاک زراعی کشت و از برگ‌های جوان اولیه به عنوان ریز نمونه استفاده گردید.

برای سترون نمودن ظروف شیشه‌ای از اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند براینچ مربع به مدت ۲۵ – ۱۵ دقیقه استفاده شد. ترکیبات محیط کشت نیز به همین ترتیب سترون شد. محلول‌های حاوی تنظیم کننده‌های رشد با عبور از فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرونی سترون و سپس به محیط کشت اضافه گردید.

برای بررسی قابلیت باززایی ریزنمونه‌های مختلف (کوتیلدون، برگ و ریشه‌چه) سه رقم طالبی از محیط کشت موراشیگ و اسکوک (MS) (۱۱) استفاده شد. ترکیبات تشکیل‌دهنده این محیط کشت شامل مواد معدنی پرمصرف، کم‌مصرف، ویتامین‌ها، تنظیم کننده‌های رشد، منبع کربنی (سوکروز) و اسید آمینه گلایسین و میوانیوزیتول بود. تنظیم‌کننده‌های رشد، ویتامین‌ها، میواینوزیتول، اسیدهای آمینه و آگار مورد استفاده دراین مطالعه از نوع آزمون شده برای کشت بافت وسلول شرکت سیگما بودند.

ریزنمونه‌ها در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه سترون شده و سپس در محیط کشت MS حاوی چهار غلظت BA (۰ ، ۰/۵ ، ۱، ۱/۵) میلی‌گرم در لیتر) قرار داده شدند. همه محیط‌ها حاوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ۸ میلی گرم در لیتر آگار بود. پس از انجام عملیات کشت، ظروف پس از علامت‌گذاری داخل ژرمیناتور در شرایط تاریکی و ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت ده روز ریز نمونه‌ها به محیط روشنایی با رژیم

1- Landrace/accession

روشنایی ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی تحت دمای۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. پس از گذشت دو هفته ریزنمونه‌ها به منظور رشد طولی ساقه‌ها، ریزنمونه‌های القا شده به محیط کشت MS حاوی۰/۱میلی‌گرم بر لیتر تنظیم کننده‌ی رشد BA انتقال داده شدند و پس از گذشت یک هفته دیگر ریزنمونه‌ها به محیط MS حاوی ۰/۵ میلی گرم NAA جهت ریشه‌زایی منتقل شدند. هر چند در برخی از تیمارها، ریزنمونه‌ها دارای ریشه‌های ضعیفی نیز شده بودند. لیکن پس از گذشت ۶ هفته ارزیابی‌ها شامل‌اندازه‌گیری تعداد ساقه، طول ساقه، تعداد برگ و تعداد ریز نمونه‌ی شاخه دار انجام گرفت.

در این مطالعه از آزمایش فاکتوریل دارای دو فاکتور (تیمار و رقم) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ده تکرار استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌ها بصورت فاکتوریل ۳ × ۴ و با استفاده از نرم افزار کامپیوتری SAS (۱۳)، انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل دامنه معنی‌دار ($LSD_{5\%}$) فیشر انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس ریزنمونه‌ها و تاثیر تیمار سیتوکنین (غلظت‌های BA) و رقم و اثر متقابل آنها در مورد صفات مرتبط با اندام‌زایی در جدول ۱ ارائه شده است. تنظیم‌کننده رشد (سیتوکنین) تاثیر بسیار معنی‌داری ($P \leq$۰/۰۱) در اندام‌زایی در ریزنمونه کوتیلدون و تاثیر معنی‌داری ($P \leq$ ۰/۰۵) در ریز نمونه برگ داشت. تاثیر معنی‌دار غلظت سیتوکنین در اندام‌زایی طالبی در تایید پژوهش‌های گذشته از جمله گزارش اخیر یالسین‌مندی و همکاران (۱۷) می‌باشد. ارقام طالبی مورد مطالعه اختلاف بسیارمعنی‌داری از لحاظ اندام‌زایی با کشت ریزنمونه کوتیلدون داشتند. در حالیکه این ارقام از لحاظ اندام‌زایی با ریزنمونه برگ اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. این نتایج با گزارش ارزانی و همکاران (۱)، استیپ و همکاران (۱۴) و سوز و همکاران (۱۵) که تاثیر معنی‌دار ژنوتیپ در اندام‌زایی طالبی را مشاهده کردند، هماهنگی دارد. اثرمتقابل سیتوکنین × رقم برای اندام‌زایی فقط در ریزنمونه کوتیلدون و از لحاظ طول شاخه معنی‌دار بود (جدول ۱). ضمن این‌که ریزنمونه ریشه‌ای کشت‌شده موفق به اندام‌زایی نشد.

استفاده از قطعات کوتیلدون پتانسیل بسیار خوبی را جهت القای ساقه به طریق اندام‌زایی مستقیم در حضور تنظیم‌کننده‌ی رشد BA از خود نشان دادند (جدول ۲). ریزنمونه‌ها در محیط فاقد تنظیم کننده‌های رشد متورم ولی رشد اندکی از خود نشان دادند، بطوری‌که قادر به ایجاد ساقه، برگ و ریشه نبودند. با افزودن غلظت‌های مختلف BA به محیط کشت، القای ساقه‌دهی با سرعت قابل توجهی افزایش یافت. به منظور رشد طولی ساقه، ریزنمونه‌ها ۲ هفته پس از کشت به محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA منتقل و حدود ۷ تا ۸ روز در این محیط و در شرایط نوری (۱۶ نور و ۸ ساعت تاریکی) نگه داشته شد. هر چند در حضور BA برخی از نمونه‌ها تولید ریشه‌های نه چندان قوی نمودند اما با توجه به اثر اکسین بر روی ریشه‌زایی، افزودن NAA به محیط‌کشت باغلظت نیمMS جهت ریشه‌زایی موثر از کارایی لازم برخوردار بود. ترکیبات اکسینی (NAA) از این جهت به محیط کشت اضافه شدندکه در اکثر منابع به نقش مهم اکسین‌ها در القای ریشه‌دهی نمونه‌های ساقه‌دار در اکثر گونه‌های دو لپه‌ای اشاره شده است. اکسین‌ها باعث تمایزیابی سلول‌هایی می‌شود که قادر به تشکیل سیستم‌های ریشه‌ای می‌باشند (۲ و ۸). یک تا دو هفته پس از کشت شاخه‌ها در محیط حاوی اکسین، القای ریشه‌دهی از شاخه‌های طالبی انجام شد. واسودوان (۱۶) اضافه‌کردن NAA را به محیط MS حاویBA در القای شاخه‌زایی از محور جنینی در مقایسه با محیط MS حاوی BA به تنهایی، موثر اعلام کرد.

در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش اختلاف بسیارمعنی‌داری ($P \leq$ 0.01) از لحاظ صفات مرتبط با اندام‌زایی مشاهده گردید (جدول ۱). از نظر طول ساقه رقم گرگر نسبت به دو رقم دیگر دارای طول ساقه کوتاهتری بود و دو رقم طالبی اصفهان و گرمک برتری معنی‌داری از این لحاظ داشته‌اند (شکل ۱). از لحاظ دو صفت دیگر اندام‌زایی (تعداد شاخه و برگ) روند تقریبا مشابهی از لحاظ عدم تفاوت معنی‌دار بین دو رقم طالی اصفهان و گرمک و اختلاف معنی‌دار این‌دو با رقم گرگر مشاهده شد. شکل‌های ۲ و ۳ به‌ترتیب باززایی دو ژنوتیپ طالبی–اصفهان و گرگر در حضور تنظیم‌کننده‌ی رشد یک میلی‌گرم BA نشان داده است. قابل‌ذکر است که به منظور ریشه‌زایی گیاه به محیط‌کشت نیمMS (با غلظت یک–دوم) منتقل شده و ریشه‌ها تشکیل شده‌اند. این نتایج با گزارش استیپ و همکاران (۱۴) که غلظت ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BA را بهترین تیمار جهت القای ساقه‌زایی در طالبی دانسته‌اند، مطابقت دارد. رقم گرگر رقمی است که در شرایط دیم در ایلام کاشته می‌شود و سازگاری‌های ویژه‌ای از لحاظ مقاوت به تنش‌های گرما و خشکی است. این رقم با داشتن ریشه‌های عمیق، برگ‌های کشیده–کوچک و ساقه‌های کوتاه از نظر فیزیولوژی خود را با شرایط محیطی تنش‌دار سازگار نموده است. میوه‌های این رقم خوش‌طعم و خوشمزه اما با شیرینی اندک است، که حاکی از شباهت با نمونه‌های وحشی طالبی و قدیمی‌بودن این رقم می‌باشد. گزارش حاضر اولین مطالعه‌ای است که ارقام طالبی دارای تنوع‌زیاد را از لحاظ کشت درون‌شیشه‌ای مورد مقایسه قرار داده و نشان می‌دهد که واکنش رقم اولیه گرگر بطوری بسیارمعنی‌داری کمتر از ارقام اصلاح‌شده است. در حالیکه گزارش‌های اندام‌زایی اخیر با استفاده از یک رقم اصلاح‌شده (۱۴،۱۲،۹ و ۱۵) و یا یک رقم اولیه (۱۷) اجرا شده است.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس از کشت دو ریزنمونه کوتیلدون و برگ در محیط کشت حاوی چهار سطح سیتوکنین (BA) و القای اندام‌زایی در سه رقم طالبی

		میانگین مربعات					
		ریزنمونه کوتیلدون			ریزنمونه برگ		
منابع تغییر	درجه آزادی	تعداد شاخه	طول شاخه	تعداد برگ	تعداد شاخه	طول شاخه	تعداد برگ
سیتوکنین(A)	۳	۱۱/۲۰**	۷/۶۴**	۷/۵۹**	۲/۴*	۲/۰۳*	۱/۹*
رقم(B)	۲	۴۰/۲۸**	۲۱/۶۱**	۲۶/۵۶**	۶/۱۳	۵/۹۷	۶/۰۴
سیتوکنین × رقم (A×B)	۶	۰/۴	۷/۰۹*	۰/۳۸	۰/۷	۱/۰۱	۰/۳۵
اشتباه آزمایشی	۱۰۸	۰/۲۹	۰/۸۴	۰/۵۱	۰/۴۳	۰/۰۴	۰/۳۵

** و * به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

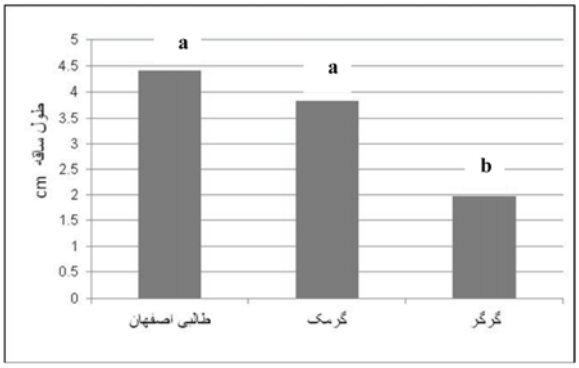
جدول ۲- مقایسه میانگین طول ساقه، تعداد شاخه و تعداد برگ در غلظت‌های مختلف BA از کشت ریز نمونه کوتیلدون در سه ژنوتیپ طالبی

غلظت BA ($mg\ L^{-1}$)	طول ساقه (cm)	تعداد شاخه	تعداد برگ
صفر	۰	۰	۰
۰/۵	۵/۸^{a}	۱/۷^{b}	۴/۵^{b}
۱	۵/۸^{a}	۲/۵^{a}	۵/۵^{a}
۱/۵	۲/۹^{b}	۱/۲^{c}	۳^{b}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک می‌باشند از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (P</01)

از میان ارقام بکارگرفته شده طالبی اصفهان واکنش بهتری به اندام‌زایی مستقیم از ریز نمونه‌ی کوتیلدون نشان داده است. رقم طالبی اصفهان و تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA با ۷ سانتی‌متر طول ساقه بیشترین میانگین را به خود اختصاص داده است. در بررسی دو صفت دیگر هر سه رقم در تیمارهای BA هماهنگ عمل کرده‌اند. تعداد شاخه در نمونه یکی دیگر از صفات اندازه‌گیری شده در این آزمایش بود. در هر دو ریزنمونه بیشترین تعداد شاخه در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد که با تیمارهای دیگر به کار گرفته شده تفاوت معنی‌دار داشت.

در این آزمایش سه هفته پس‌از قرار دادن ریزنمونه‌های ریشه‌ای کشت‌شده در شرایط تاریکی و دمایی کنترل شده، اندام‌زایی در ریزنمونه‌ها مشاهده نشد. نمونه‌ها در ابتدا کمی متورم و مدتها به این حالت باقی ماند، ولی تدریجا رنگ آنها قهوه‌ای و تیره و سپس از بین رفتند. به منظور بهینه‌سازی روش از غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده‌ی رشد BA به تنهایی و ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به کار گرفته شد. با وجود به کارگیری تنظیم‌کننده‌های رشد، هیچ گونه القا در ریز نمونه در هر سه رقم مشاهده نشد. در رابطه با ریزنمونه برگ، مقایسه‌ی سطوح مختلف BA بر القای شاخه‌دهی، طول ساقه و تعداد برگ نشان داد که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین میانگین‌ها را دارا بوده است و از نظر آماری غلظت ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۲).



شکل ۱- مقایسه میانگین ارقام طالبی از نظر طول ساقه در کشت کوتیلدون در حضور هورمون BA (تیمارهایی که حروف مشابه دارند از نظر آزمون LSD ٪۵ اختلاف معنی‌داری ندارند)

ضمن‌اینکه با افزایش غلظت آن از ۱ به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، آثار منفی معنی‌داری را در این رابطه به همراه داشت. نتایج مطالعه حاضر با گزارش ارزانی و همکاران (۱)، استیپ و همکاران (۱۴) و یالسین-مندی و همکاران (۱۷) که بر اهمیت هورمون BA در اندام‌زایی طالبی تاکید داشتند، مطابقت دارد، اگرچه ممکن است غلظت بهینه در برخی از مطالعات ذکر شده هماهنگ نباشد. این موضوع به لحاظ نوع ژنوتیپ و شرایط کشت متفاوت در آزمایشگاه‌ها، مورد انتظار می‌باشد.

شکل۲- القای گیاه کامل از کوتیلدون درحضور یک میلی گرم بر لیتر BA و NAA در ژنوتیپ طالبی اصفهان

مشاهده ریزنمونه‌های مختلف کشت‌شده بر روی محیط موراشیگ و اسکوک (MS) حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (BA) حاکی از این بود قطعات کوتیلدون پتانسیل بالایی در محیط MS و در حضور BA داشته است، بیشترین درصد القای شاخه در غلظت۱میلی‌گرم درلیتر BA مشاهده شد که به منظور ریشه‌دار شدن ساقه‌های القا شده در حضور BA از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) استفاده شد. بیشترین القای شاخه، ۲/۵ شاخه به ازای هر نمونه کشت‌شده در محیط ۱میلی‌گرم در لیتر BA در ژنوتیپ طالبی اصفهان رخ داد. بیشترین میزان طول ساقه و تعداد برگ از قطعه کوتیلدون در حضور ۱میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد. میزان باززایی ساقه از ریزنمونه‌های برگ بسیار کم بود. در این ریزنمونه نیز همانند کوتیلدون، بیشترین میزان باززایی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد.

نتیجه‌گیری

در این آزمایش BA تنظیم‌کننده رشد ضروری برای اندام‌زایی در ریزنمونه‌های کشت‌شده طالبی بوده و غلظت ۰/۵تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BA غلظت مناسبی جهت القای شاخساره بود. در مطالعه حاضر عوامل ژنوتیپ، ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد تاثیر بارزی در واکنش به اندام‌زایی در طالبی داشته‌اند. همچنین یافته حاضر دال بر این بود که با ترکیب مناسبی از محیط کشت و تنظیم‌کننده برای اندام‌زایی طالبی، تنها ژنوتیپ‌های دارای تنوع‌ژنتیکی زیاد از لحاظ واکنش با یکدیگر متمایز می‌شوند.

شکل ۳- القای گیاه کامل از کوتیلدون در حضور BA و NAA در ژنوتیپ گرگر

منابع

1- Arzani A., Shimonishi K., Asano Y., and Oosawa K. 1989. Somatic embryogenesis and organogenesis from *in vitro* seed culture of melon (*Cucumis melo* L.). Jap. J. Breed. 39: 108-109.

2- Bhojwani S.S., and Razdan M.K. 1998. Plant tissue culture: theory and practice. Elsevier Science B.V., 1000 AM Amsterdam, The Netherlands.

3- Chee P. 1990. Plant regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* Topmark. Hort Sci. 26: 908-910.

4- Chovelon V., Restier V., Dogimont C., and Aarrouf J. 2008. Histological study of shoot organogenesis in melon (*Cucumis melo* L.) after genetic transformation. In: Pitrat M. (ed), Proc. 9th EUCARPIA Meet. Genet. Breed. Cucurbitaceae, May 21-24th, 2008, INRA, Avignon, France. pp. 633-637.

5- Drinks R., and Buggenum M. 1989. In vitro plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo*

L. Plant Cell Rep. 7:626-627.

6- Ficcadenti N., and Rotino G.L. 1995. Genotype and medium affect shoot regeneration of melon. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 40: 293-295
7- Gaba V., Schlaram E., Elam C., Sagoo O., Watad A.A., and Gray D.J. 1999. In vitro studies on the anatomy and morphology of bud regeneration in melon cotyledon. In Vitro Cell Dev. Biol. -Plant. 35:1-7.
8- Gupta S.D., and Ibaraki Y. 2008. Plant Tissue Culture Engineering. Springer, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.
9- Kathal R., Bhatnagar S.P., and Bhojwani S.S. 1988. Regeneration of plant from leaf explants of *Cucumis melo* cv. Pusa Sharbati. Plant Cell Rep. 7:449-451.
10- Moreno V., Garcia-Sogo M., Granell I., Garcia- Sogo B., and Roig L. 1985. Plant regeneration from calli of melon (*Cucumis melo* L., cv. Amarillo Oro). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 5:139-146
11- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
12- Niedz R.P., Smith S.S., Dunbar K.B., Stemphens C.T., and Murakishi H.H. 1989. Factor influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 18:313-319.
13- SAS Institute. 2003. SAS/STAT user's guide. Release 8.0. SAS Institute, Cary, North Carolina.
14- Stipp L.C.L., Mendes B.M.J., Piedade S.M.D., and Rodriguez A.P.M. 2001. *In vitro* morphogenesis of *Cucumis melo* var Inodorus. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 65:81-89.
15- Souza F.V.D., Garcia-Sogo B., Souza A.S., San-Juán A.P., and Moreno V. 2006. Morphogenetic response of cotyledon and leaf explants of melon (*Cucumis melo* L.) cv. Amarillo Oro. Braz. Arch. Biol. Techn. 49: 21-27.
16- Vasudevan A., Selvaray N., Canapathi A., Cho C.W., Manickavasa M., and Kasthuriengan S. 2007. Direct plant regeneration from cucumber emberyonal axis. Biol. Plant. 51:521-524.
17- Yalcin Mendi Y., Eldogan S., Gutakev R., Ipek M., Curuk P., and Cetiner S. 2010. Regeneration and histological analysis of snake melon (*Cucumis melo* var. *flexuosus* (L.) Naudin) by direct organogenesis. Turk. J. Agric. For. 34: 309-317.