

## بررسی واکنش ارقام طالبی به اندام‌زایی در کشت درون‌شیشه‌ای

ریحانه مرادمند<sup>۱</sup> - احمد ارزانی<sup>۲\*</sup> - قدرت‌ا... سعیدی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۱۶

### 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 قرار گرفت. 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 غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 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 ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در ژنوتیپ طالبی اصفهان رخ داد. بیشترین طول ساقه و تعداد برگ از قطعه کوتیلدون در حضور ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به دست 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 ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BA غلظت مناسبی جهت القای شاخساره بود. ضمن اینکه 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 تنظیم‌کننده‌های 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 تنوع ژنتیکی زیاد از لحاظ واکنش با یکدیگر متمایز می‌شوند.

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

### مقدمه

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 در این 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<sup>۹</sup> مورد استفاده قرار گرفته است (۳، ۷، ۱۲، ۱۴ و ۱۵). قابل ذکر است که عوامل زیادی چون ریز نمونه‌ی<sup>۱۱</sup> کشت شده،

روش کشت بافت به‌عنوان ابزاری برای مطالعات بنیادی گیاهی نظیر بیوشیمی، فیزیولوژی و تشریح و همچنین کاربردهای عملی نظیر انتقال ژن<sup>۴</sup>، حفظ ژرم پلاسما<sup>۵</sup>، تولید بذر مصنوعی<sup>۶</sup>، ایجاد تنوع ژنتیکی (تنوع سوماکلونی)<sup>۷</sup> و حذف ویروس<sup>۸</sup> از گیاه استفاده می‌شود (۲). از دیگر پتانسیل‌های کشت بافت می‌توان به اندام‌زایی مستقیم از

۳ و ۲- 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

ذکر است که رقم بومی<sup>۱</sup> گرگر که در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفته است، در دیمزارهای استان ایلام پس از برداشت گندم-دیم کشت می‌شود. این رقم طالبی مقاوم به گرما و خشکی با ایجاد ریشه-های 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

در این 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  $1 \pm 25$  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 تنظیم‌کننده‌های 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، تنظیم‌کننده‌های رشد، منبع کربنی (سوکروز) و اسید آمینه گلايسين و میوانوزیتول بود. تنظیم‌کننده‌های رشد، ویتامین‌ها، میوانوزیتول، اسیدهای آمینه و آگار مورد استفاده در این مطالعه از نوع آزمون شده برای کشت بافت و سلول شرکت سیگما بودند.

ریزنمونه‌ها در محلول هیپوکلیت 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 میلی‌گرم در لیتر آگار بود. پس از انجام عملیات کشت، ظروف پس از علامت‌گذاری داخل ژرminatور در شرایط تاریکی و  $1 \pm 25$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت ده روز ریز نمونه‌ها به محیط روشنائی با رژیم

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 از یک منبع گیاهی برتر، حذف عوامل بیماری‌زا از طریق کشت مریستم، تهیه منبع عاری از بیماری، حفاظت ژرم پلاسما گیاهان، گزینش جهش یافته‌ها از جهش‌های خودبخودی یا القا، تولید گیاهان هاپلوئید از طریق کشت بافت، انتخاب جهت مقاومت در برابر آفات و بیماری، تنش‌هایی نظیر شوری، سموم، علف-کش، آنتی بیوتیک، باززایی هیبریدها در گونه‌های ناسازگار، نجات جنین، کشت پروتوپلاست و امتزاج آن و تولید هیبریدهای سوماتیکی، تولید ریز قلمه‌های ریشه دار شده در گونه‌های زینتی چوبی سخت-ریشه‌زا بکار می‌رود. قابل ذکر است که برخی از روش‌های بیوتکنولوژی، مهندسی ژنتیک و انتقال ژن به تکنولوژی کشت بافت و سلول 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 موثر است. در طالبی هر دو مسیر کشت بافت جنین‌زایی (۱۲، ۱۵ و ۱۴، ۱) و اندام‌زایی (۱۵ و ۱۴، ۱) تحت تاثیر ژنوتیپ قرار دارد. باززایی این ارقام با کشت قطعات کوتیلدون در محیط MS حاوی کاینیتین و IAA (۹ و ۱۷) و یا BA (۵ و ۱۷) فراهم شده است.

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، کاینیتین و TDZ در ترکیب با NAA مورد آزمایش قرار گرفت و BA بعنوان مطلوب‌ترین هورمون در اندام‌زایی طالبی شناسایی شد (۱۴). در مطالعه مزبور ترکیب NAA و TDZ کالوس به همراه ریشه تولید کرده و در بسیاری‌های از نمونه‌های کشت شده در حضور کاینیتین 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 شده 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 جالب‌کاری در ایران 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 بومی طالبی کشور و ۲- ارائه محیط کشت مناسب برای ژنوتیپ‌های متنوع طالبی از لحاظ تنظیم-کننده‌های رشد و با استفاده از انواع مختلف ریزنمونه بوده است. قابل

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 نیم MS جهت ریشه‌زایی موثر از کارایی لازم برخوردار بود. ترکیبات اکسینی (NAA) از این جهت به محیط کشت اضافه شدند که در اکثر منابع به نقش مهم اکسین‌ها در القای ریشه‌دهی نمونه‌های ساقه‌دار در اکثر گونه‌های دو لپه‌ای اشاره شده است. اکسین‌ها باعث تمایزبایی 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) اضافه کردن NAA را به محیط MS حاوی BA در القای شاخه‌زایی از محور جنینی در مقایسه با محیط MS حاوی BA به تنهایی، موثر اعلام کرد.

در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش اختلاف بسپارمعنی‌داری ( $P \leq 0.01$ ) 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 تقریباً مشابهی از لحاظ عدم تفاوت معنی‌دار بین دو رقم طالبی اصفهان و گرمک و اختلاف معنی‌دار این دو با رقم گرگر مشاهده شد. شکل‌های ۲ و ۳ به ترتیب 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 نیم MS (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 بسپارمعنی‌داری کمتر از ارقام اصلاح‌شده است. در حالیکه گزارش‌های اندام‌زایی اخیر با استفاده از یک رقم اصلاح‌شده (۱۲، ۱۴، ۱۵) و یا یک رقم اولیه (۱۷) اجرا شده است.

روشنایی ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی تحت دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. پس از گذشت دو هفته ریزنمونه‌ها به منظور رشد طولی ساقه‌ها، ریزنمونه‌های القا شده به محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر تنظیم‌کننده‌ی رشد BA انتقال داده شدند و پس از گذشت یک هفته دیگر ریزنمونه‌ها به محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم 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 شامل اندازه‌گیری 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  $3 \times 4$  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 سیتوکینین (غلظت‌های BA) و رقم و اثر متقابل آنها در مورد صفات مرتبط با اندام‌زایی در جدول ۱ ارائه شده است. تنظیم‌کننده رشد (سیتوکینین) تاثیر بسیار معنی‌داری ( $P \leq 0.01$ ) در اندام‌زایی در ریزنمونه کوتیلدون و تاثیر معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) در ریز نمونه برگ داشت. تاثیر معنی-دار غلظت سیتوکینین در اندام‌زایی طالبی در تایید پژوهش‌های گذشته از جمله گزارش اخیر یالسین‌مندی و همکاران (۱۷) می‌باشد. ارقام طالبی مورد مطالعه اختلاف بسپارمعنی‌داری از لحاظ اندام‌زایی با کشت ریزنمونه کوتیلدون داشتند. در حالیکه این ارقام از لحاظ اندام-زایی 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. اثر متقابل سیتوکینین  $\times$  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.

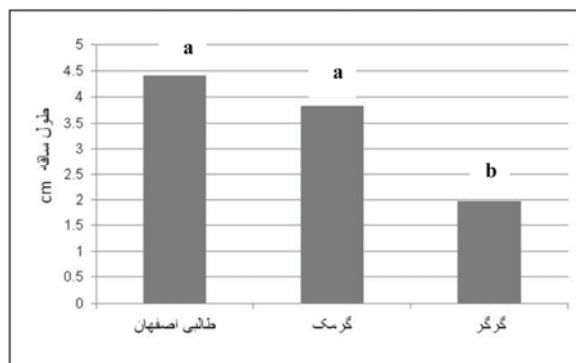
استفاده از قطعات کوتیلدون پتانسیل بسیار خوبی را جهت القای ساقه به طریق اندام‌زایی مستقیم در حضور تنظیم‌کننده‌ی رشد BA از خود نشان دادند (جدول ۲). ریزنمونه‌ها در محیط فاقد تنظیم‌کننده-های رشد متورم ولی رشد اندکی از خود نشان دادند، بطوری‌که قادر به ایجاد ساقه، برگ و ریشه نبودند. با افزودن غلظت‌های مختلف 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

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

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

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

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)

ضمن اینکه 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 یالسنین-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.

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

غلظت BA (mg L <sup>-1</sup> )	طول ساقه (cm)	تعداد شاخه	تعداد برگ
صفر	۰	۰	۰
۰/۵	۵/۸ <sup>a</sup>	۱/۷ <sup>b</sup>	۴/۵ <sup>b</sup>
۱	۵/۸ <sup>a</sup>	۲/۵ <sup>a</sup>	۵/۵ <sup>a</sup>
۱/۵	۲/۹ <sup>b</sup>	۱/۳ <sup>c</sup>	۳ <sup>b</sup>

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک می‌باشند از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (P<0/01)

از میان ارقام بکارگرفته شده طالبی اصفهان واکنش بهتری به اندام‌زایی مستقیم از ریزنمونه 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 پس از 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 تدریجاً 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



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 غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 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 ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در ژنوتیپ طالبی اصفهان رخ داد. بیشترین میزان طول ساقه و تعداد برگ از قطعه کوتیلدون در حضور ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به دست 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 ۰/۵ تا 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 تنوع ژنتیکی زیاد از لحاظ واکنش با یکدیگر متمایز می‌شوند.



شکل ۲- القای گیاه کامل از کوتیلدون در حضور یک میلی‌گرم بر لیتر BA و NAA در ژنوتیپ طالبی اصفهان



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 Aarouf J. 2008. Histological study of shoot organogenesis in melon (*Cucumis melo* L.) after genetic transformation. In: Pitrat M. (ed), Proc. 9<sup>th</sup> 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., Stempens 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 embryonal 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.