بررسی باززایی مستقیم گیاهچه در دو جمعیت گیاه دارویی هندوانه ابوجهل (*Citrullus colosynthis* L.) با استفاده از انواع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد

زینب قاسمی، اسد معصومی‌اصل* و رضا امیری فهلیانی

یاسوج، دانشگاه یاسوج، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲۲

چکیده

هندوانه ابوجهل از گیاهان دارویی ضد سرطان است که ساپونین‌ها و فلاونوئیدهای موجود در آن، سیستم ایمنی بدن را تحریک کرده و از این رو یکی از مهمترین گیاهان دارویی می‌باشد. باززایی مستقیم گیاهچه در جمعیتهای ایرانی این گیاه در جهت تکثیر درون شیشه‌ای آن بسیار کاربردی خواهد بود. به این منظور، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد که فاکتورهای آن شامل ریزنمونه (ساقه و برگ)، ترکیبات مواد تنظیم‌کننده رشد (سطوح مختلف BAP و NAA)، محیط کشت (MS کامل، ½MS و ¼ MS) و جمعیت (گچساران و دهدشت) بودند. نتایج نشان دادند که در جمعیت دهدشت، ریزنمونه ساقه بهتر از ریزنمونه برگ، ولی در جمعیت گچساران میزان باززایی مستقیم از هر دو ریزنمونه یکسان بود. با توجه به صفات درصد شاخساره‌زایی، تعداد شاخساره و طول شاخساره در هر دو جمعیت دهدشت و گچساران، ترکیب مواد تنظیم‌کننده رشدی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با یک میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت ½MS بهترین باززایی مستقیم را در هر دو جمعیت (به ترتیب ۴۴/۴ و ۳۳/۳ درصد) نشان داد. بهترین محیط ریشه‌زایی برای گیاهچه‌های حاصل از باززایی در هر دو جمعیت گچساران و دهدشت محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود (به ترتیب ۷۶/۸ و ۷۳/۳۳ درصد). نتایج این تحقیق نشان داد که دو جمعیت ایرانی مورد بررسی در محیط کشت درون شیشه‌ای به باززایی مستقیم گیاهچه پاسخ خوبی می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: شاخساره‌زایی، ریشه‌زایی، بنزیل آمینوپورین، ژنوتیپ

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۷۴۳۳۲۲۴۸۴۰ ، پست الکترونیکی:masoumiasl@yu.ac.ir

مقدمه

هندوانه ابوجهل با نام علمی *Citrulus colocynthis* L. گیاهی دارویی از خانواده کدوئیان است. این گیاه متعلق به نواحی گرمسیری بوده و به صورت خودرو رشد می‌کند (۱۰). در طب سنتی، عموماً از این گیاه برای درمان بیماریهای گوناگون استفاده می‌شود. این گیاه جزء گیاهان دارویی سمی می‌باشد که علاوه بر مسهل بودن، به دلیل وجود ماده تلخی که در آن است، درصد قند خون انسان را کاهش داده و در درمان دیابت مؤثر می‌باشد (۴).

از آنجا که کشت بافت درون‌شیشه‌ای امکان شناخت و کنترل عوامل موثر در تمایز زدایی، باززایی و تکثیر انبوه را فراهم می‌سازد، بنابراین می‌تواند ابزار مناسبی برای حذف عوامل محیطی و یکسان‌سازی مواد گیاهی باشد (۲). تشکیل مستقیم اندامها روی سطح قطعات ریزنمونه‌های گیاهی، بدون مداخله مرحله پینه را باززایی مستقیم می‌نامند (۹). که پایداری ژنتیکی در باززایی مستقیم بیشتر می‌باشد (۶). به‌طورکلی، باززایی مستقیم از راهکارهای قابل توجه برای تکثیر درون‌شیشه‌ای سریع و در مقیاس وسیع گیاهان

بوده و مزایایی نظیر صرفه‌جویی در زمان، سادگی، ثبات ژنتیکی و پایین بودن تنوع سوماکلونی را دارد (۱۲). ساتیاوانی و همکاران (۲۰۱۱) (۲۴) اثر تنظیم کننده‌های رشد روی پینه‌زایی و باززایی غیرمستقیم هندوانه ابوجهل جمعیت پارانگی‌پتایی هند را بررسی کرده و روش ریزازدیادی با استفاده از ریزنمونه ساقه را ارائه نمودند (۲۴). نتایج آنها نشان داد که حداکثر تعداد پینه القا شده در محیط MS، همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از مواد تنظیم-کننده رشد IAA و 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر 6-BA به دست آمد. در همین مطالعه، بیشترین درصد ریشه‌زایی در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش شد. در تحقیق دیگری، بیشترین باززایی هندوانه ابوجهل از ریزنمونه نوک ساقه هندوانه ابوجهل، در محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیترNAA گزارش گردیده است (۱۸). ورما و همکاران (۲۰۱۳) (۲۶) دستورالعمل باززایی گیاهچه با استفاده از ریزنمونه‌های قطعات گره‌دار و نوک ساقه را برای هندوانه ابوجهل ارائه نموده‌اند. در این تحقیق القای شاخساره و تکثیر آن روی محیط کشت MS حاوی ۲/۲ میکرومول BA انجام و شاخساره‌های به دست آمده در همین محیط کشت طویل شدند. ریشه‌زایی نیز در محیط کشت ½MS حاوی ۴/۹ میکرومول IBA انجام شد (۲۶). گاریماتروسیان (۲۰۱۵) (۱۷) از ریزنمونه‌های کوتیلدون، جوانه انتهایی، هیپوکوتیل و ریشه دانهالهای ۱۰ روزه هندوانه ابوجهل استفاده کرد که برای ریزنمونه جوانه انتهایی از دو محیط کشت MS حاوی IAA و کینتین (۱ میلی‌گرم در لیتر) و نیز از محیط کشتهای شامل مقادیر دو برابر ویتامینهای محیط کشت MS و مواد تنظیم‌کننده رشد BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد (۱۷). نتایج وی نشان داد که پینه‌زایی در حضور مواد تنظیم‌کننده رشد BAP و NAA بهتر از مواد تنظیم‌کننده رشد IAA و کینتین بود ولی شاخساره‌زایی در حضور مواد تنظیم‌کننده رشد IAA و کینتین انجام شد. راما کریشنا و شاستری (۲۰۱۵) (۲۲) نشان دادند که بهترین ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های ساقه هندوانه ابوجهل روی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA انجام می‌شود (۲۲). ساویتا و همکاران (۲۰۱۰) (۲۵) با استفاده از ریزنمونه های برگ و ساقه هندوانه ابوجهل نشان دادند که حداکثر شاخساره‌زایی (۷۵ درصد) روی پینه حاصل از ریزنمونه برگ و در محیط کشت MS حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون به دست آمد (۲۵). حداکثر ریشه‌زایی (۶۰ درصد) نیز روی محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده گردید. مینا و همکاران (۲۰۱۴) (۱۹) دستورالعملی برای باززایی سریع از ریزنمونه نوک ساقه ارائه کردند که در آن از محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده گردید. ریشه‌زایی نیز در محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر IBA دارای ۰/۲ درصد زغال فعال انجام گردید (۱۹).

از آنجا که در باززایی غیرمستقیم، گیاهچه با واسطه پینه تشکیل می‌شود بنابراین ممکن است در آنها تنوع سوماکلونال ایجاد شود که این تنوع می‌تواند گیاهچه‌هایی با ساختار ژنتیکی متفاوت ایجاد نماید (۱۶). از این رو به نظر می‌رسد باززایی مستقیم گیاهچه در جهت ایجاد گیاهان یکنواخت و بدون هیچ گونه تنوع ناخواسته مطلوب‌تر می‌باشد. با توجه به اینکه گزارشی از ریزازدیادی جمعیتهای ایرانی گیاه دارویی هندوانه ابوجهل موجود نیست و اکثر گزارشات در مورد جمعیتهای بومی کشورهایی مثل هند و ارمنستان یا افریقاست و از طرفی در هیچ یک از آنها همزمان از دو جمعیت به طور مقایسه‌ای استفاده نشده، لذا در تحقیق حاضر پاسخ به باززایی مستقیم دو جمعیت بومی هندوانه ابوجهل متعلق به استان کهگیلویه و بویراحمد بررسی شد. از آنجایی که بررسی پاسخ به کشت بافت هر گیاه دارویی (به خصوص باززایی مستقیم) مطالعه‌ای بنیادی است که می‌تواند مقدمه تکثیر کلونی آن در محیط آزمایشگاهی باشد که قادر است در زمان و

فضای کم تعداد زیادی گیاه همسان تولید نماید، از این رو با بهینه‌سازی روش باززایی مستقیم این گیاه می توان تعداد زیادی گیاه همسان تولید و آن را از خطر انقراض نجات داد. از این جهت گزارش دستورالعمل باززایی مستقیم برای جمعیتهای بومی گیاهان دارویی مهم کشور اهمیت زیادی دارد.

مواد و روشها

میوه‌های هندوانه ابوجهل در اواخر مردادماه سال ۱۳۹۱ همزمان با رسیدگی کامل، از مناطق اطراف شهرستانهای گچساران و دهدشت واقع در استان کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری گردید. بذرهای هندوانه ابوجهل در آفتاب خشک شد و سپس از مغز بذور جهت تولید گیاهچه و از اندام هوایی گیاهچه‌های تولید شده در شرایط درون شیشه-ای (شامل برگ و ساقه) جهت انجام آزمایش باززایی استفاده گردید. بذرها ابتدا با استفاده از آب لوله‌کشی شسته شده، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضدعفونی و در نهایت با آب دوبار تقطیر سه بار شستشو داده شد و جهت نرم شدن پوسته به مدت ۲۴ ساعت در آب دو بار تقطیر قرار داده شدند. در زمان کشت، بذور فوق به زیر لامینارایرفلو منتقل و پوسته بذور توسط پنس و اسکالپل جدا شده و مغز بذور در محیط MS کشت شدند.

جهت تعیین مناسب‌ترین نوع ریزنمونه، محیط کشت و ترکیب مواد تنظیم‌کننده رشد در آزمون شاخساره‌زایی از ریزنمونه‌های ساقه و برگ، محیطهای کشت MS کامل، ½MS و ¼ MS و ترکیبات مختلف مواد تنظیم‌کننده رشد BAP (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. لازم به ذکر است که از بین همه ترکیبات ممکنه، بر اساس مقالات موجود تعدادی از بهترین ترکیبات مواد تنظیم‌کننده رشد انتخاب و سپس آزمایش طراحی گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. پس از کاشت ریزنمونه‌ها، ظروف کشت به قفسه‌های اتاق کشت منتقل و ۵ هفته پس از کاشت، صفاتی از قبیل درصد شاخساره‌زایی، تعداد شاخساره، طول اندام هوایی (میلی‌متر) و وزن تر و خشک اندام هوایی (میلی‌گرم) اندازه‌گیری شدند.

به منظور تعیین بهترین غلظت مواد تنظیم‌کننده رشد جهت ریشه‌زایی، شاخساره‌های کاملاً رشدیافته حاصل از آزمایشهای قبلی بر روی محیطهای کشت MSکامل، ½MS و ¼ MS حاوی ترکیبات مختلف مواد تنظیم‌کننده رشد کشت گردیدند. تیمارهای مواد تنظیم‌کننده رشد به‌کار رفته ترکیبات منتخبی از مواد تنظیم‌کننده رشد BAP (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بود. این آزمایش نیز به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار پیاده گردید. ظروف کشت حاوی شاخساره‌های تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای به قفسه‌های اتاق کشت منتقل و ۳ هفته پس از تشکیل و رشد ریشه، صفات درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه (میلی‌متر) اندازه‌گیری شدند. گیاهچه‌های باززایی شده از هر دو روش باززایی، به گلدانهای کوچک حاوی خاک استریل (نسبت ۳ به ۱ خاک و ماسه) منتقل شدند. برای سازگاری تدریجی با شرایط طبیعی و حفظ رطوبت نسبی بالا و کنترل آلودگی، از درپوشهای شیشه‌ای استفاده گردید. پس از سازگاری گیاهچه‌ها با شرایط طبیعی، درپوشها برداشته شده و گیاهچه‌ها به گلدانهای بزرگ‌تر منتقل شدند. این گیاهچه‌ها تبدیل به گیاه کامل گردیده و توانستند به خوبی مستقر شده و رشد کنند. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گردید. مقایسه میانگین اثرهای اصلی به روش LSD در سطح ۵ درصد و در صورت معنی‌دار بودن برهمکنشها، مقایسه میانگینها با استفاده از رویه LSmeans انجام شد. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Excel صورت پذیرفت.

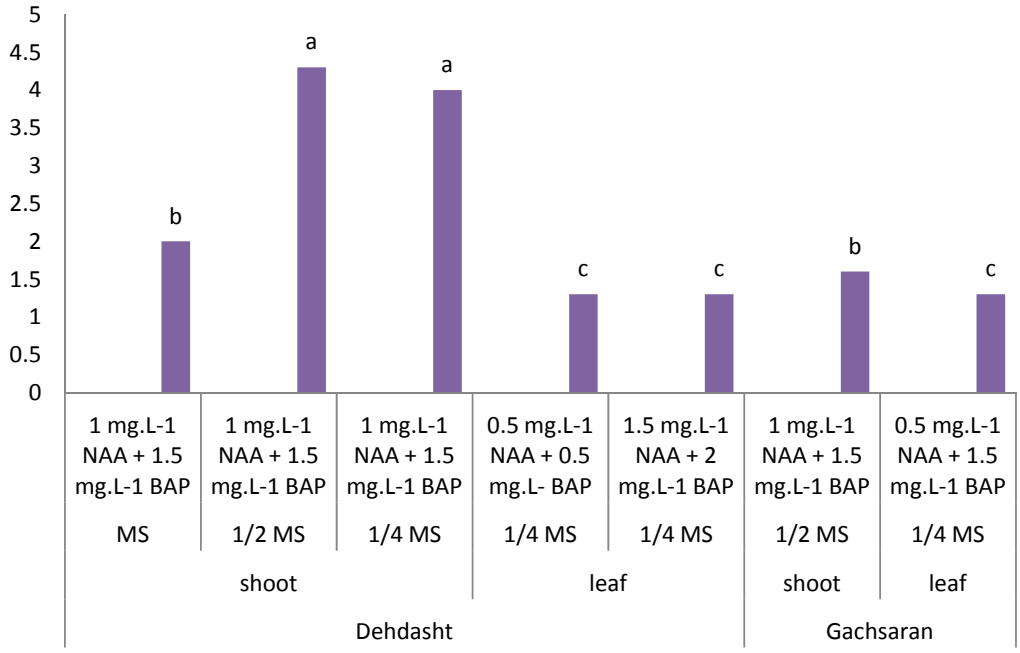
نتایج

حدود ۵ هفته پس از کاشت ریزنمونه‌ها تشکیل شاخساره شروع گردید. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهمکنش ریزنمونه، محیط کشت، ترکیب مواد تنظیم‌کننده رشد و جمعیت برای همه صفات مورد بررسی معنی‌دار شد (جدول نشان داده نشده است). مقایسه میانگین این برهمکنش در جمعیتهای دهدشت و گچساران (جدول ۱) نشان داد که در جمعیت دهدشت، بیشترین درصد شاخساره‌زایی (۴۴/۴ درصد) با ریزنمونه ساقه و در ترکیبهای ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA در محیطهای کشت MS کامل، ½MS و ¼ MS به دست آمد (شکل ۱).

جدول۱ – مقایسه میانگین برهمکنش ریزنمونه، جمعیت، محیط‌کشت، BAP و NAA برای صفات مورد ارزیابی در مرحله باززایی مستقیم

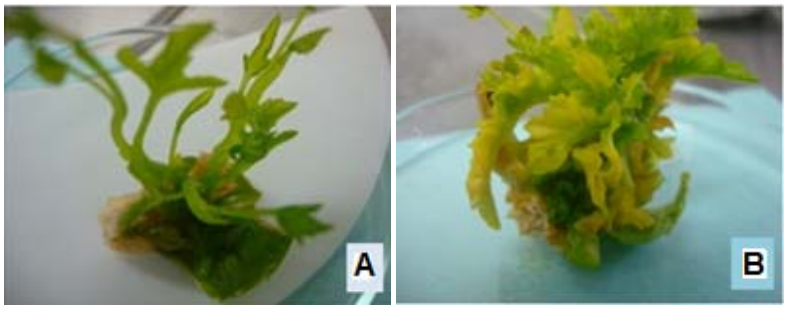
وزن تر شاخساره (میلی‌گرم) Shoot fresh weight (mg)	طول شاخساره (میلی‌متر) Shoot height (mm)	تعداد شاخساره Shoot number	درصد شاخساره زایی Shoot regeneration percent	BAP ($mg.L^{-1}$)	NAA ($mg.L^{-1}$)	محیط کشت Medium	ریز نمونه Explant	جمعیت population
270^{c}	16^{b}	2^{b}	44.4^{a}	1.5	1	MS	ساقه Shoot	دهدشت Dehdasht
700^{a}	19.6^{a}	4.3^{a}	44.4^{a}	1.5	1	½MS		
430^{b}	16^{b}	4^{a}	44.4^{a}	1.5	1	¼MS		
70^{c}	9^{c}	1.3^{c}	44.4^{a}	0.5	0.5			
150^{c}	14.3^{b}	1.3^{c}	33.3^{b}	2	1.5	¼MS	برگ Leaf	
160^{c}	13.6^{b}	1.6^{b}	33.3^{b}	1.5	1	½MS	ساقه Shoot	گچساران Gachsaran
43^{cd}	7.3^{c}	1.3^{c}	33.3^{b}	1.5	0.5	¼MS	برگ Leaf	

در هر ستون میانگینهایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت ندارند.



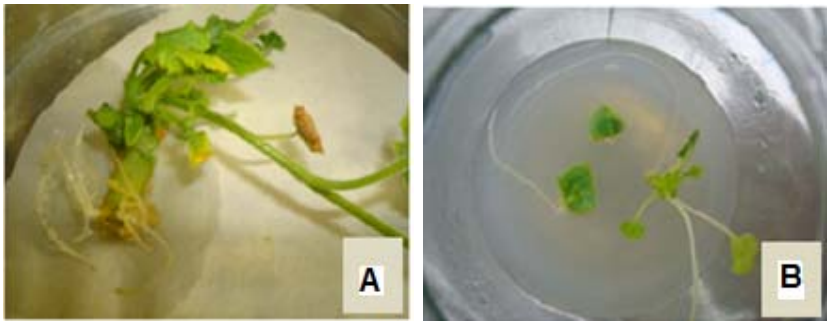
شکل ۱– روند تغییرات تعداد شاخساره تولید شده از ریز نمونه‌های ساقه و برگ در ترکیبات هورمونی متفاوت

برای کمتر مصرف کردن و اقتصادی نمودن محیط کشت و مواد تنظیم کننده رشد می توان از ترکیب مواد تنظیم‌کننده رشد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت ¼MS را برای ریزنمونه ساقه در جمعیت دهدشت پیشنهاد کرد. در همین جمعیت، بیشترین درصد شاخساره‌زایی از ریزنمونه برگ با ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت MS ¼ به دست آمد (شکل ۲).



شکل ۲- باززایی مستقیم شاخساره از (A) ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و (B) ریزنمونه ساقه در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در جمعیت دهدشت

ریزنمونه برگ نسبت به ریزنمونه ساقه شاخساره‌زایی کمتری دارد. بنابراین هم از نظر میزان باززایی و هم از نظر اقتصادی، بهتر است برای باززایی مستقیم شاخساره در جمعیت دهدشت از ریزنمونه ساقه استفاده گردد (شکل ۳).

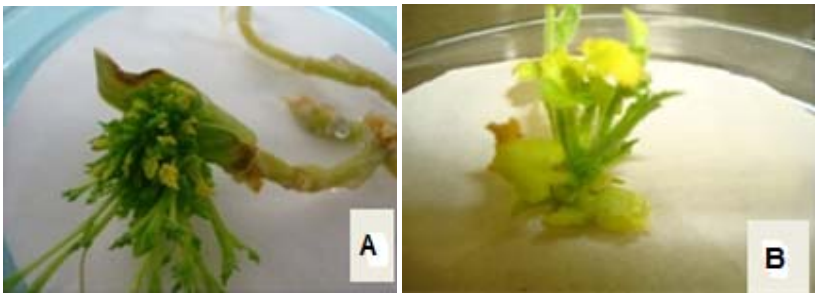


شکل۳- باززایی ریشه از (A) ریزنمونه ساقه و (B) ریزنمونه برگ در ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در جمعیت دهدشت

لازم به‌ذکر است ترکیبات مواد تنظیم‌کننده رشد زیادی در هر آزمایش بررسی شدند که به جهت اختصار فقط ترکیبات مواد تنظیم‌کننده رشد که پاسخ مناسبی نشان دادند، گزارش می‌شود. براساس جدول ۱، در جمعیت گچساران دو ریزنمونه از نظر درصد شاخساره‌زایی تفاوتی با همدیگر ندارند، ولی ریزنمونه برگ محیط کشت کمتری نسبت به ریزنمونه ساقه نیاز دارد، چرا که ریزنمونه برگ با یک چهارم ولی ریزنمونه ساقه با یک دوم محیط کشت کامل MS توانسته شاخساره‌زایی را شروع نماید (شکل ۴).

با این حال با در نظر گرفتن مجموع صفات مورد بررسی، ریزنمونه ساقه نسبت به ریزنمونه برگ برتری نشان می‌دهد، لذا برای باززایی مستقیم شاخساره در جمعیت گچساران، بهتر است از ریزنمونه ساقه استفاده گردد. براساس نتایج به دست آمده، دو جمعیت مورد بررسی از نظر میزان باززایی مستقیم تفاوت داشته و جمعیت دهدشت بهتر از جمعیت گچساران به باززایی مستقیم پاسخ می‌دهد. علت احتمالی این برتری، جمعیت متفاوت

و نیز تفاوت آب و هوایی دو منطقه دهدشت و گچساران می باشد.



شکل ۴- باززایی مستقیم از (A) ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و (B) ریزنمونه ساقه در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در جمعیت گچساران

از نظر ریشه‌زایی (جدول ۲) هر دو جمعیت مورد بررسی در ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی-گرم در لیتر NAA در محیط کشت MS ریشه‌زایی نشان دادند. در جمعیت گچساران ریشه‌زایی ۷۶/۸۰ درصد ولی در جمعیت دهدشت، ریشه‌زایی ۹۳/۳۳ درصد بود. با توجه به مجموع صفات مورد بررسی در این مرحله، جمعیت دهدشت از نظر ریشه‌دهی نسبت به جمعیت گچساران برتری نشان می‌دهد.

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده حاصل از باززایی مستقیم حدود یک ماه پس از انتقال در محیط خاک نیز رشد مناسبی انجام داده و به خوبی مستقر شدند (شکل ۵).

جدول ۲- مقایسه میانگین برهمکنش جمعیت و ترکیب هورمونی برای صفات مورد ارزیابی در مرحله ریشه‌زایی

جمعیت population	BAP (mg.L^{-1})	NAA (mg.L^{-1})	درصد ریشه‌زایی Rooting percent	تعداد ریشه Root number	طول ریشه (میلی‌متر) Root length (mm)
دهدشت Dehdasht	0.5	0.5	93.33 a	8.86 a	47 a
گچساران Gachsaran	0.5	0.5	76.80 b	5.66 b	41 b

در هر ستون میانگینهایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت ندارند.

شکل ۵- انتقال و سازگاری گیاهچه باززایی شده (A و B)

بحث

با توجه به اینکه هر یک از این جمعیتها ساختار ژنتیکی متفاوت داشته و میزان هورمونهای داخلی آنها متفاوت از هم است، بنابراین تفاوت پاسخ آنها به ترکیبات مختلف مواد تنظیم‌کننده رشد و نوع محیط کشت دور از انتظار نیست. کبیرهاشمی و همکاران (۱۳۹۵) (۷) نیز با بررسی باززایی گیاهچه از پینه در دو رقم خربزه ایرانی به روش

درون شیشه‌ای نشان دادند که اثر نوع رقم روی باززایی پینه‌ها معنی‌دار می‌باشد (۷).

سیتوکینین‌ها نقش اساسی در تقسیم سلولی داشته، باعث رفع غالبیت انتهایی شده و بر رشد ساقه اثر می‌گذارند. بر اساس گزارش پریس (۱۹۹۵) (۲۱) و بایلیس (۱۹۸۵) (۱۱)، علت همگرایی سیتوکینین با اکسین در تقسیم سلولی این است که اولاً، برای تقسیم سلول ابتدا باید بزرگ شدن سلول اتفاق بیفتد و به دنبال آن تقسیم سلولی انجام بگیرد و تا زمانی‌که سلول به یک اندازه مشخص نرسیده، تقسیم سلولی صورت نخواهد پذیرفت. ثانیاً، مراحل اولیه تقسیم سلولی نیازمند به اثر اکسین است (۱۱ و ۲۱). باید توجه داشت که تبدیل محیط کشت MS کامل به محیط کشتهای ½MS و ¼MS باعث می‌شود که اثر مواد تنظیم‌کننده رشد نیز متفاوت باشد، چرا که مواد مختلف موجود در محیط کشت رویهم اثرات هم‌افزایی یا متضاد دارند. نتایج تحقیق حاضر تا حدودی با نتایج تحقیق مینا و همکاران (۲۰۰۷) (۱۹) مطابقت داشت هر چند به واسطه تغییر محیط کشت و جمعیت، مقادیر مواد تنظیم‌کننده رشد متفاوت بودند. آنها گزارش داده‌اند که بیشترین باززایی هندوانه ابوجهل از ریزنمونه ساقه در محیط کشت MS کامل حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست می‌آید. بررسی ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاه دارویی پروانش نیز نشان داد که با افزایش غلظت کینتین درصد اندام‌زایی و با افزایش غلظت NAA تعداد ساقه به ازای هر ریزنمونه افزایش یافت. ترکیب مواد تنظیم‌کننده رشد یک میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین با میانگین ۱۳ گیاهچه بالاترین تعداد تولید گیاهچه را دارا بودند. همچنین بهترین مقدار BAP با ۸۷ درصد اندام‌زایی، غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و بهترین ترکیب مواد تنظیم‌کننده رشد ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۱۰۰ درصد اندام زایی بود (۱).

به‌طورکلی، با توجه به مقایسه‌ای که بین دو ریزنمونه ساقه و برگ صورت گرفت، مشخص شد که ریزنمونه ساقه پاسخ بهتری به باززایی مستقیم در هر دو جمعیت دهدشت و گچساران نشان داده است. این نتیجه با نتایج به دست آمده توسط ساتیاوانی و همکاران (۲۰۱۱) (۲۴) در گیاه هندوانه ابوجهل که از ریزنمونه ساقه جهت ریزازدیادی استفاده کرده بودند، مطابقت دارد که دلیل احتمالی آن را میزان غلظت مواد تنظیم‌کننده رشد درونی قطعات ریزنمونه می‌تواند باشد. بررسی ریزازدیادی گیاه دارویی سرخارگل با استفاده از ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل نیز نشان داد که بیشترین میزان پینه‌زایی در ریزنمونه کوتیلدون به میزان ۹۷ درصد و در ریزنمونه هیپوکوتیل به میزان ۹۱ درصد بود (۵).

باززایی یک فرآیند فوق‌العاده پیچیده است که عوامل متعدد کمی و کیفی مانند خصوصیات ژنتیکی گیاه، نوع ریزنمونه، سن ریزنمونه، میزان هورمونهای درون‌زا، اندازه ریزنمونه و مقدار تنظیم‌کننده‌های رشد و غیره بر آن تأثیر می‌گذارند (۲). بر اساس نتایج به دست آمده و با استناد به یافته‌های دلپوزا و همکاران (۲۰۰۵) (۱۵)، اثر سیتوکینین‌ها در کشت بافت بسیار قابل توجه است و اغلب همراه با اکسین جهت بهبود تقسیم سلولی و کنترل اندام‌زایی استفاده می‌شود (۱۵). ثابت شده است که هورمونها با همدیگر برهمکنش داشته و می‌توانند اثرات همدیگر را بهبود بخشند. به‌طور کلی تشکیل شاخساره چه به طور مستقیم از بافت ریزنمونه یا غیرمستقیم از پینه، توسط تعادل مواد تنظیم‌کننده رشدی بین اکسین و سیتوکینین تنظیم می‌شود. بر اساس نتایج مسزاروس (۲۰۰۶)(۲۰)، غلظت مناسب از هر نوع تنظیم‌کننده رشد، تا حد زیادی بستگی به نوع گونه گیاهی، شرایط کشت و ترکیبات محیط کشت دارد (۲۰). ترکیب مواد تنظیم‌کننده رشد معرفی شده در این آزمایش هم دارای این ویژگی است، به طوری که با افزودن اکسین به محیط کشت شاخساره‌زایی، تشکیل ساقه‌های جانبی از ریزنمونه‌های ساقه شروع و باعث افزایش رشد اندام کشت

شده می‌گردد. از آنجا که افزودن اکسین در غلظتهای کم به محیط کشت ساقه‌زایی، باعث مهار اثر غلظتهای بالای سیتوکینین روی طویل شدن شاخه‌های جانبی می‌شود، لذا در این تحقیق نیز غلظت پایین NAA در برابر BAP بالا پاسخ بهتری به باززایی نشان داد. تأثیر NAA و BAP برای افزایش تولید شاخساره در گیاه ریحان (*Basilicum polystachyon*) (۱۴) و هندوانه ابوجهل (۱۸، ۱۹، ۲۳، ۲۵ و ۲۶) گزارش شده است. نتایج مشابهی نیز در رابطه با شاخساره‌زایی از ریزنمونه ساقه در محیط MS حاوی ترکیب هورمونی BAP و NAA در درختچه زراوند هندی (*Aristolochia sp.*) (۲۲) و خربزه (*Cucumis melo* L.) (۳) گزارش شده است. بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، کاربرد مقدار مشخصی BAP، باعث افزایش باززایی می‌شود که این نتیجه با یافته‌های کبیر هاشمی و همکاران (۱۳۹۵) نیز مطابقت دارد.

طبق تحقیقات بوربولیس و همکاران (۲۰۰۹) (۱۳) که روی اثرات ژنوتیپ و تنظیم‌کننده‌های رشد در کشت ریزنمونه‌های محور زیرلپه کتان روغنی (*Linum usitatissimum* L.) صورت گرفت، مشخص شد که در بین ژنوتیپهای مورد مطالعه، تفاوت معنی‌داری از لحاظ پتانسیل تشکیل ریشه وجود دارد (۱۳). نسبت بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد برای تولید ریشه به ژنوتیپ یا جمعیت بستگی دارد. باززایی ریشه در حضور NAA و BAP در گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) (۸) و غلظتهای متفاوتی از IBA در گیاه دارویی هندوانه ابوجهل (۱۸، ۱۹، ۲۵ و ۲۶) گزارش شده است. از آنجاکه هورمون NAA نقش به‌سزایی در ایجاد ریشه دارد (۸)، لذا در این تحقیق، از ترکیب این مواد تنظیم‌کننده رشد و BAP در ریشه‌زایی هندوانه ابوجهل استفاده شد که نتیجه بخش بود.

نتیجه‌گیری کلی

در باززایی مستقیم گیاهچه در جمعیت دهدشت ریزنمونه ساقه پاسخ بهتری نشان داده و ترکیب ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت ½MS بهترین ترکیب مواد تنظیم‌کننده رشد و محیط کشت بود. در جمعیت گچساران نیز بیشترین درصد ساقه‌زایی (۳۳/۳ درصد) مربوط به ریزنمونه ساقه در ترکیب مواد تنظیم‌کننده رشد ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت ½MS بود. در مجموع، جمعیت دهدشت در مقایسه با جمعیت گچساران پاسخ بهتری به باززایی مستقیم نشان می‌دهد. در مرحله ریشه‌زایی نیز بهترین ترکیب، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای گیاهچه‌های حاصل از باززایی مستقیم در هر دو جمعیت دهدشت و گچساران بود.

منابع

۱- احمدی، ج.، ر. محمدی و ق. گروسی .۱۳۹۳. ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاه دارویی پروانش (*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don) از طریق اندام‌زایی ساقه. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۷ (۱): ۱۴-۲۵.

۲- پیریک آر. ال. ام. ۱۳۷۶. مبانی کشت بافت گیاهی (برگردان از عبدالرضا باقری). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۲۵۲ صفحه.

۳- خیرآبادی، م. ا.، م. لطفی، م. توحیدفر، د. نادری و ش. صداقت‌فر. ۱۳۸۹. بررسی تاثیر عمر دانهالی بر باززایی مستقیم شاخه در خربزه ایرانی، پنجمین همایش ایده‌های نو در کشاورزی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، اصفهان، ایران.

۴- دوازده امامی، س. و ن. مجنون حسینی. ۱۳۸۶ . زراعت و تولید برخی گیاهان دارویی و ادویه‌ای .انتشارات دانشگاه تهران، ۳۰۰ صفحه.

۵- زبرجدی، ع.، م. ج. معتمدی، ا. طراوت و ا. اسماعیلی. ۱۳۹۲. ریزازدیادی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) با استفاده از قطعات کوتیلدون و هیپوکوتیل. مجله

پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۶(۳): ۳۱۱-۳۱۹.

۶- عصاره، م. ح. و ح. سردابی. ۱۳۸۶. اکالیپتوس (شناخت، معرفی و ازدیاد با استفاده از فناوری‌های نوین). چاپ اول. تهران، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. ۳۶۸ صفحه.

۷- کبیرهاشمی، س. م.، ع. قنبری، و ع. کاشی. ۱۳۹۵. اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 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.

۸- کرمی، م.، م. ب. باقریه نجار، و م. اقدسی. ۱۳۹۲. بهینه سازی شرایط باززایی گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.)، زیست‌شناسی گیاهی، ۱۵: ۱-۱۴.

۹- میرلوحی، ف.، و م. خیام نکوئی. ۱۳۸۳. فرهنگ واژگان کشت بافت گیاهی. کرج، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، ۳۶۴ صفحه.

10- Bankole S. A., Osho A., Joda A. O., Enikuomehin A. O. 2005. Effect of drying methods on the quality and storability of Egusi Melon seeds (*Colocynthis citrullus* L.). Afri. J. Biotechnol, 4: 799-803.

11- Bayliss, M. 1985. Control of cell division in cultured cells. In: Bryant J. A and Francis D (eds) The cell division cycle in plants. Cambridge: Cambrige Univercity Press, pp. 157-178.

12- Beegum, S. A., K. P. Martin, C. L. Zhang, I. K. Nishitha, M. Ligimol, A. Slater, and P. V. Madhusoodanan. 2007. Organogenesis from leaf and internode explants of *Ophiorrhiza prostrata*, an anticancer drug (camptothecin) producing plant. Electron J. Biotechnol, 10 (1): 114–123.

13- Burbulis, N., A. Blinstrubiene, and R. Kupriene. 2009. Regeneration of adventitious shoots of linseed (*Linum usitatissimum* L.) from hypocotyle explants. Zemdirbyste-Agricul, 96 (3): 168-175.

14- Chakraborty, D., K. Bhattacharya, A. Bandyopadhyay and K. Gupta. 2006. Studies on the germination behavior of *Basilicum polystachyon*- an ethnobotanically important medicinal plant. Iranian J. Medi. Aroma. Plants, 25: 58-62.

15- Del-Poza, J. C., M. A. Lopeza-Matas E. Ramireza-Parra and C. Gutierrez. 2005. Hormonal control of the plant cell cycle. Physiol. Planta, 123: 173-183.

16- Evan, D. E., Coleman, J. O. D. and Kearns, A. 2003. Plant Cell Culture. Bios Scie. Publishers. pp: 153-158.

17- Gharehmatrossian S. 2015. Evaluation of callus induction and plant regeneration in *citrullus colocynthis* (L.) Schard. Iranian J. Plant Physiol, 5(2): 1333-1338.

18- Meena M., Meena R., and Patni V. 2010. High frequency plant regeneration from shoot tip explants of *Citrullus colocynthis* an important medicinal herb. Afri. J. Biotechnol, 9 (31): 5037- 5041.

19- Meena M. Ch., Meena R. K. and V. Patni. 2014. High frequency plant regeneration from shoot tip explants of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad.–An important medicinal herb. J. Pharmacog. and Phytochem, 2 (6): 53-56.

20- Meeszaros, A. 2006. Application of methods suitable for improving the efficiency of *in vitro* propagathin on Horticultural Plants. Ph.D. Thesis. Corvinus University of Budapest, 26 (2): 156-189.

21- Preece, J. E. 1995. Can nutrient salts partially substitute for plant prowth regulators. Plant Tiss. Cult. Biotech, 1: 26-37.

22- Rama Krishna D., T. Shasthree. 2015. Adventitious Rooting and Proliferation from Different Explants of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad an Endangered Medicinally Important Cucurbit. Asian J. Biotech, 7 (2): 88-95.

23- Rani Mallick. S., R. Chandra Jena and K. Chandra Samal. 2012. Rapid *in vitro* Multiplication of an Endangered Medicinal Plant Sarpgandha (*Rauwolfia serpentina*). American J. Plant Sci, 3: 437-442.

24- Satyavani. K., T. Ramanathan and S. Gurudeeban. 2011. Effect of plant growth regulators on callus inducthion and plantlet regeneration of Bitter Apple (*Citrullus colosynthis)* from stem explant. Asian J. Biotech, 10: 508-602.

25- Savitha R., Shasthree T., Sudhakar, Mallaiah B. 2010. High frequency of plantlet regeneration and multiple shoot induction from leaf and stem explant of *citrullus colosynthis* (L.) schrad, an endangered medicinal cucurbit. International J. Pharma and Bio Sci, 1(2): 1-8.

26- Verma K. S., Kachhwaha S. and S. L. Kothari. 2013. *In vitro* plant regeneration of *Citrullus colocynthis* (L.) Schard. And assessment of

genetic fidelity using ISSR and RAPD markers. Indian J. Biotech, 12: 409-414.

Study of direct plantlet regeneration in two populations of medicinal bitter melon (*Citrulus colosynthis* L.) using types of explants and plant growth regulators

Ghasemi Z., Masoumiasl A. and Amiri-Fahliani R.

Plant Breeding Dept., Yasouj University, Yasou, I.R. of Iran

Abstract

Bitter melon is an anticancer medicinal plant that its saponins and flovonoids induce immunity system of body, thus it is one of the most important medicinal plants. Direct plantlet regeneration from Iranian accessions of this plant for its *in vitro* propagation will be very functional. For this, an experiment was conducted in factorial based on Complete Randomized Design. It`s factors included explants (shoot and leaf), PGRs (different levels of BAP ad NAA), culture medium (complete MS, ½MS and ¼MS) and population (Gachsaran and Dehdasht). In Dehdasht population, shoot explants were better than leaf explants, but in Gachsaran population was similar for both explants. In respect to shoot regeneration percent, shoot number and shoot length, PGRs combination of 1.5 $mg.L^{-1}$ BAP together with 1 $mg.L^{-1}$ NAA in ½MS showed the best direct regeneration in both populations (44.4 and 33.3 percent, respectively). The best medium for rooting in shoot obtained from regeneration was MS medium containing 0.5 $mg.L^{-1}$ BAP and 0.5 $mg.L^{-1}$NAA (76.8 and 73.33 percent, respectively). The results of this research showed that these two assessed Iranian populations have good response to in vitro culture and direct plantlet regeneration.

Key words: Shooting, Rooting, Benzylaminopurine, Genotype.