بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زائی گیاه داروئی *Momordica charantia* L.

رقیه اصغرزاده[۱]، حسین مرادی*[۲]، قربانعلی نعمت‌زاده[۳]، علی قنبری[٤]

[۱]کارشناسی‌ارشد، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

[۲]استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

[۳]استاد، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

[۴]کارشناسی‌ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۹٤/۱۲/۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/٦/۲۱

چکیده

گیاه داروئی خربزه تلخ (*Momordica charantia* L.) متعلق به تیره کدو، گیاهی گرمسیری، چند ساله و سرشار از آهن، فسفر و ویتامین A و C است. با توجه به اهمیت اقتصادی و نیز محدود بودن این گونه گیاهی در ایران، روش کشت بافت علاوه بر زمینه پایه‌ریزی تحقیقات مولکولی، راه مناسبی برای تولید و تکثیر تجاری آن می‌باشد. در این تحقیق بذرهای گیاه از منطقه زابل در سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری و آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه فاکتور شامل ریزنمونه (برگ، میانگره، گره با میانگره)، در سطوح مختلف توفوردی (2,4-D) با غلظت‌های صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و بنزیل آدنین (BA) با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) با سه تکرار اجرا شد. پس از گذشت سه ماه به‌ترتیب : طول، عرض، ارتفاع، درصد کالوس‌زایی، رنگ کالوس، وزن‌تر و خشک آن اندازه‌گیری شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که در تمامی صفات اندازه‌گیری شده غلظت‌های مختلف هورمون‌های BA, 2, 4-D و نوع ریزنمونه و اثر متقابل آنها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد داشتند. به‌طوری‌که بیشترین عرض، طول، وزن تر و خشک کالوس در ترکیب تیماری BA (۱ mg/l) به همراه 2,4-D (۰/۲۵ mg/l) مشاهده گردید و برهمکنش هورمون BA (mg/l ۰/۵) و 2,4-D (mg/l ۰/۲۵) بر روی ریزنمونه برگ نسبت به سایر فاکتورها اثر بهتری بر ارتفاع کالوس داشته‌اند. همچنین تمامی غلظت‌های 2,4-D و BA در ریزنمونه‌های برگ، صد در صد کالوس‌زائی را به‌همراه داشته و بیشترین کالوس‌های تولید شده به رنگ سبز زرد بوده‌اند.

واژه‌های کلیدی: خربزه تلخ، تنظیم‌کننده رشد، کشت بافت، کالوس‌زائی

*نویسنده مسئول: moradiho@yahoo.com

مقدمه

گیاهان با فرآورده‌های مختلف غذایی، صنعتی و دارویی محور اصلی چرخه‌های نظام تولیدات کشاورزی و طبیعی را تشکیل می‌دهند. از جمله این گیاهان، گیاه داروئی خربزه تلخ[1] از خانواده کدوئیان است. گیاهی گرمسیری و چند ساله که هنگام برداشت میوه‌های خوراکی آن سبز و طعم آن تلخ است. برگ‌ها، میوه‌ها و ساقه‌های خربزه تلخ غنی از آهن، فسفر، و ویتامین‌های C و A می‌باشد. عملکرد اصلی آن کاهنده قند خون، محرک گوارش، ضد سرطان، ضدنفخ، ضدویروس و ضدباکتری می‌باشد (Agarwal, 2015). پودر گیاه خربزه تلخ سرشار از ترکیبات شیمیایی فعال و مفید است که به‌طور طبیعی در این گیاه وجود دارند. خربزه تلخ حاوی مواد شیمیایی فعال بیولوژی از جمله تری ترپن‌ها، پروتئین‌ها، و استروئیدهاست. در این راستا کوبولا و سری مورپن (Kubola and Siriamornpun, 2008) در مطالعه‌ای به این نتیجه رسیدند که عصاره برگ بالاترین مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی را بر اساس فعالیت‌های DPPH و عصاره میوه سبز بالاترین ارزش فعالیت آنتی‌اکسیدانی را بر اساس فعالیت‌های رادیکال هیدروکسیل دارند. همچنین کومار و همکاران (Kumar et al., 2010) بیان کردند که خربزه تلخ، یک گیاه رایج گرمسیری با عطر، طعم و کیفیت خاص است که به‌عنوان دارو، و برای درمان بیماری‌ها و اختلالات از زمان باستان تا حال حاضر در طب سنتی آسیا استفاده می‌شود. در این بررسی، قدرت دارویی این گیاه در درمان دیابت نشان داده شده است. اسنی و همکاران (Snee et al., 2010) نیز در مطالعه خود استراتژی بهبود طعم و افزایش مصرف گیاه خربزه تلخ در درمان دیابت در هاوایی با مصاحبه از ۵۰ متخصص بررسی نمودند. یکی از جنبه‌های مهم تکنیک‌های بیوتکنولوژی گیاهی، کشت سلول، بافت‌ها و اندام‌های گیاهی در محیط درون شیشه‌ای است. فن‌آوری کشت درون شیشه‌ای با تکمیل کردن روش اصلاح سنتی به‌منظور دست‌ورزی و بهبود گیاهان بسیار مورد استقبال قرار گرفت (Gaspar et al., 1996). ازدیاد درون شیشه‌ای تکنیکی است که جاذبه تجاری بالایی دارد، زیرا به کمک آن می‌توان به سرعت تعداد زیادی از واریته‌های جدید گیاهی را در فضای آزمایشگاهی محدود و کنترل شده تولید نمود یا برای تولید گیاهان مادری عاری از بیماری از آن بهره جست. ازدیاد در شرایط درون تنی دارای پتانسیل بالقوه در تولید گیاهان دارویی با کیفیت بالا می‌باشد که این مهم، می‌تواند از طریق روشهای مختلف ریز ازدیادی به‌دست آید. ریزازدیادی در گونه‌های متنوعی از جمله تعداد زیادی از گیاهان دارویی نتایج مطلوبی را نشان داده است (Tripathi and Tripathi, 2003; Kayser and Quax, 2007). در تکثیر گیاهان دارویی، باززایی گیاه از کالوس، نیز به‌منظور تکثیر گیاهان دارویی کاربرد فراوانی دارد (Thiruvengadam et al, 2012). همچنین بافت کالوس گیاهی علاوه بر ازدیاد گیاهان، قابلیت‌های متنوع دیگری نیز دارد که از جمله می‌توان به استفاده از آنها در انتقال ژن به گیاه و یا کاربرد آن در تهیه کشت‌های سوسپانسیون سلولی به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه و یا ترکیبات مفید دیگر حاصل از آنها اشاره نمود (Sharafi et al., 2008; Mahmood et al., 2012). از سوی دیگر یکی از مزیت‌های روش کشت بافت مستقل بودن از تغییرات جغرافیایی و عوامل محیطی و در عین حال سرعت بالای رشدآن می‌باشد. در این روش ممکن است ترکیبات جدیدی تولید شود که در شرایط طبیعی در گیاه مادری نیز وجود نداشته باشند (Kartal et al., 2004). با توجه به اهمیت اقتصادی گیاهان دارویی و نیز محدود بودن این گونه‌ها در رویشگاه‌های طبیعی،

1-*Momordica charantia*

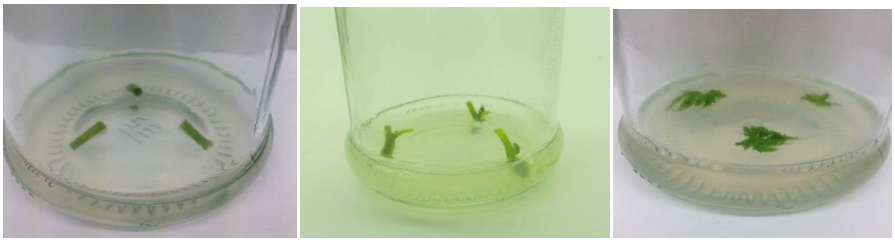
روش کشت بافت راه مناسبی برای تولید آنها می‌باشد (Farkya et al., 2004). مانسر و همکاران (Munsur et al., 2009) تکثیر درون شیشه‌ای از بخش‌های گره و ریشه گیاه خربزه تلخ را بررسی نمودند. در این مطالعه ریزنمونه‌هایی از بخش‌های گره و ریشه خربزه تلخ در محیط کشت MS همراه با غلظت‌های مختلف BAP در ترکیب با 2,4-D و NAA کشت شدند. در این مطالعه بخش گره بالاترین درصد (۹۳/۷۵) کالوس را در محیط کشت MS با یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر BAP تولید و قسمت ریشه بالاترین درصد کالوس (۸۵ درصد) را در محیط کشت MS با ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP تولید نمودند. همچنین الکساندر و دوریکا (Alexandra and Dorica, 2010) باززایی گیاه خربزه تلخ را در شرایط درون شیشه‌ای بررسی نمودند. آنها چندین ترکیب از سیتوکینین و اکسین را در ظرفیت باززایی ریز نمونه‌های مختلف جوانه‌های ریشه‌ای بررسی نمودند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که تنظیم کننده‌های رشد BAP و NAA باعث اندام‌زایی مستقیم و BAP در ترکیب با TDZ و BA در اندام‌زایی غیرمستقیم این گیاه نقش دارند. در همین راستا سولتانا و رامن (Sultana and Rahman, 2012) ساختار سلول و شکل‌گیری جنین را در گیاه خربزه تلخ بررسی کردند و نشان دادند که کالوس را می‌توان با استفاده از برگ‌های گیاه خربزه تلخ در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم هورمون 2,4-D تولید نمود و در کشت سوسپانسیون سلولی، بالاترین کارایی رشد سلول در محیط کشت مایع MS شامل ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر بیوتین مشاهده شد. در مطالعه‌ای نیز سریو ونگ‌دام و همکاران (Thiruvengadam et al., 2012) باززایی درون شیشه‌ای ریز نمونه‌های خربزه تلخ را از طریق اندام‌زایی غیر مستقیم بررسی نمودند.

در این مطالعه کالوس‌زایی و جوانه‌زنی از ریز نمونه میان گره‌ای خربزه تلخ به‌دست آمد و نشان داده شد که حدود ۹۷/۵ درصد از ریز نمونه میان‌گره‌ای در ۳۰ روز بعد از کشت در محیط کشت (MS) و ۱۱ روز بعد از کشت در محیط کشت (B5) حاوی پنج میکرومولار 2,4-D و دو میکرومولار (TDZ) سبز شدند. ۹۶/۵ درصد جوانه‌های نابجا از کالوس در محیط کشت MS حاوی چهار میکرومولار TDZ، ۱/۵ میکرومولار 2,4-D و ۰/۰۷ میلی‌مول گلوتامین (۴۸ جوانه در هر ریز نمونه) تولید شدند. تاثیر غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵) هورمون‌های NAA و 2,4-D بر کالوس‌زایی هندوانه توسط قانعی و همکاران (Ghanei et al., 2013) بررسی شد و نشان داده شد که درصد کالوس‌زایی، وزن تر و وزن خشک کالوس تحت تاثیر هر دو تیمار افزایش یافت. رنگ کالوس نیز تحت تاثیر هر دو تیمار قرار گرفت. القای کالوس و رویان‌زایی پیکری در گیاه خیار (*Cucumis sativus* L.) رقم سوپردومینوس توسط ستوده‌نیا و همکاران (Setoodehnia korani et al., 2014) انجام شد که ریزنمونه‌های نوک برگی، دمبرگی، برگ لپه‌ای، هیپوکوتیل خیار (رقم سوپردومینوس) در ۱۲ نوع محیط کشت شامل محیط کشت MS با ترکیبات هورمونی (2, 4-D, BAP, NAA, KIN) به نسبت‌های متفاوت بر حسب میلی‌گرم در لیتر مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای تکثیر کالوس‌های رویان‌زا از همان محیط کشت و برای نمو رویان‌ها از محیط کشت MS+ ساکارز ۳ درصد و بدون هیچ هورمون استفاده شد. محیط‌های القای MS10, MS6, MS4, MS1 بیشترین درصد، القای کالوس را داشتند. درصد رویان‌زایی پیکری نیز در دو محیط بیشتر و بهتر بود. کالوس کشت شده را برای چندین سال می‌توان نگهداری نمود. در بیشتر موارد با نگهداری کشت‌های کالوس در شرایط رشد کم، از آنها برای حفظ ذخایر

ژنتیکی استفاده می‌شود. بنابراین هدف از این پژوهش دستیابی به بهترین محیط کالوس‌زائی برای گیاه داروئی خربزه تلخ می‌باشد. در تحقیق حاضر سعی بر آن است که بهینه‌سازی کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های گیاه داروئی خربزه تلخ تحت تاثیر هورمون اکسین و سیتوکنین مورد ارزیابی قرار گیرد. قابل ذکر است که کالوس‌زایی در گیاه دارویی خربزه تلخ در ایران تا کنون گزارش نشده است و برای اولین بار در این پژوهش انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۳ در آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی مازندران انجام گرفت. بذرهای گیاه خربزه تلخ از نواحی سیستان و بلوچستان، شهرستان زابل جمع‌آوری گردید. نمونه‌های بذر به‌مدت ۵ دقیقه زیر آب روان قرار گرفت تا گرد و غبار از روی آنها پاک گردد، سپس ابتدا با الکل ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و بعد با آب مقطر استریل به‌مدت یک دقیقه شستشو گردید. بعد از این مرحله به‌مدت ۲ دقیقه هم در محلول اسید کلریدریک غوطه‌ور و بار دیگر با آب مقطر استریل شستشو و به‌مدت ۵ دقیقه هم در اسید سولفوریک غلیظ شناور گردید و این‌بار در محلول هیپوکلریت سدیم بهمراه یک قطره توین ۲۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار داده و در مرحله آخر جهت حذف بقایای مواد ضدعفونی کننده، ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل چندین مرتبه شستشو شد و در محیط کشت MS و در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس تحت فتوپریود ۱۶/۸ ساعت تاریکی/ روشنائی قرار گرفت. پس از گذشت سی و پنج روز که گیاهچه‌ها به حد کافی رشد کردند، از آنها ریز نمونه استریل (برگ، میانگره، گره و میانگره) (شکل ۱) تهیه و برای بهینه سازی محیط کالوس‌زایی در محیط کشت MS به همراه 2,4-D با غلظت‌های ۰ و ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و هورمون BA با غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر با سه تکرار و در هر تکرار سه ریزنمونه کشت گردید و با توجه به سرعت رشد کالوس‌ها هر ۳-۶ هفته واکشت شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه فاکتور و سه تکرار بود. (فاکتورها شامل ریز نمونه (برگ، میانگره، گره با میانگره)، سطوح مختلف توفوردی (2,4-D) با غلظت‌های ۰ ، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و بنزیل آدنین (BA) با غلظت‌های ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بودند) و پس از گذشت ۳ ماه ارزیابی رشد صورت گرفت. صفات اندازه‌گیری شده شامل طول، عرض، ارتفاع، وزن تر، وزن خشک، رنگ و درصد کالوس‌زایی بوده است. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS, MSTATC و برای رسم نمودارها از اکسل استفاده گردید و مقایسه میانگین داده‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج و یک درصد مقایسه شدند.



شکل ۱: ریزنمونه‌ها به‌ترتیب از راست به چپ شامل: برگ، گره با میانگره و میانگره.

نتایج

ریزنمونه‌ها بعد از گذشت ۱۰ روز به تدریج متورم شدند (شکل ۲). تجزیه واریانس نشان داد که اثر هورمون‌ها، نوع ریزنمونه و اثر متقابل بین آنها بر تمامی صفات مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین‌های بدست آمده از هر تیمار در سطح احتمال یک درصد با استفاده از روش چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

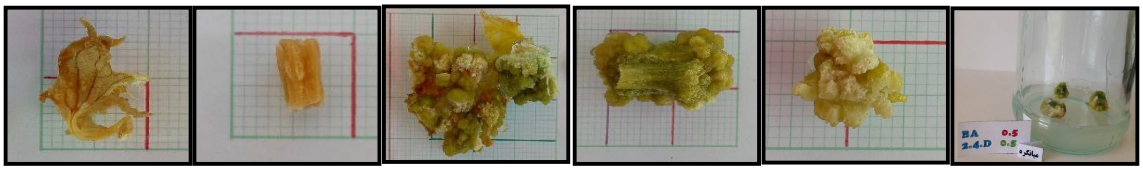
جدول ۱: میانگین مربعات صفات اندازه‌گیری شده در شرایط اعمال تیمارها.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)					
		عرض کالوس	طول کالوس	ارتفاع کالوس	درصد کالزائی	وزن تر کالوس	وزن خشک
A (ریزنمونه)	۲	۰/۶۱ **	۰/۵۰ **	۰/۲۷ **	۱۹/۲۲ **	۰/۳۷ **	۰/۰۳ **
B (بنزیل آدنین)	۲	۰/۱۲ **	۰/۱۶ **	۰/۰۲ ns	۷/۳۶ **	۰/۲۷ **	۰/۰۲ **
C (توفوردی)	۲	۰/۷۶ **	۱/۰۷ **	۰/۴۸ **	۲۸/۶۹ **	۰/۸۵ **	۰/۱۱ **
A×B	۴	۰/۱۴ **	۰/۲۰ **	۰/۱۰ **	۸/۶۱ **	۰/۱۵ **	۰/۰۱ **
A×C	۴	۰/۳۷ **	۰/۴۰ **	۰/۱۵ **	۱۹/۲۲ **	۰/۲۸ **	۰/۰۴ **
B×C	۴	۰/۱۲ **	۰/۲۱ **	۰/۰۸ **	۷/۳۶ **	۰/۱۰ **	۰/۰۰۶ ns
A×B×C	۸	۰/۰۹ **	۰/۱۱ **	۰/۰۷ **	۸/۶۱ **	۰/۰۴ **	۰/۰۰۵ ns
خطا	۵۴	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰۹	۰/۲۸	۰/۰۲	۰/۰۰۳
ضریب تغییرات(٪)	-	۸/۵۴	۷/۶۹	۱۰/۲۰	۵/۶۲	۱۵/۲۰	۱۵/۵۷

ns ,**: به‌ترتیب بدون تفاوت معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

طبق نتایج جدول مقایسه میانگین (جدول ۲)، بهترین نوع ریزنمونه، گره با میانگره بود که در تمامی صفات مورد مطالعه بهترین نتیجه را داشت و از میان غلظت‌های مختلف هورمون BA (۰/۲۵ و ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) بهترین پاسخ مربوط به غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بود. همچنین غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D تقریباً در یک سطح قرار داشتند و نسبت به غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر نتیجه بسیار خوبی داشتند.

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل 2,4-D، BA و نوع ریزنمونه (جدول ۳) نشان می‌دهد که ترکیبات تیماری مختلف اثرات متفاوتی بر عرض کالوس داشتند، بطوریکه بیشترین عرض کالوس در تیمار ترکیبی BA (یک میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین عرض کالوس در تیمار ترکیبی BA (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (صفر میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد. با افزایش غلظت BA از ۰/۲۵ به یک میلی‌گرم در لیتر عرض کالوس افزایش یافت. از طرفی میان دو غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D تفاوت چندانی مشاهده نشد، اما نسبت به غلظت صفر تاثیر بیشتری داشتند و سبب افزایش عرض کالوس شدند.



شکل ۲: نمونه کالوس‌های ایجاد شده که برای درک بهتر از تغییر اندازه آنها برروی کاغذ شطرنجی قرار داده شد. به‌ترتیب از چپ به راست ریزنمونه برگ، ریزنمونه میانگره (که کالوس تولید نشد)، کالوس تولید شده از ریزنمونه برگ، کالوس تولید شده از ریزنمونه میانگره، کالوس تولید شده از از ریزنمونه گره+میانگره و شیشه حاوی ریزنمونه میانگره.

جدول ۲: مقایسه میانگین اثر ساده برای صفات مورد مطالعه.

اثرات ساده	عرض کالوس	طول کالوس	ارتفاع کالوس	درصد کالزائی	وزن تر کالوس	وزن خشک
ریزنمونه						
میانگره	۱/۰۰ b	۱/۵۲ b	۰/۷۸ c	۸۱/۴۸ b	۰/۸۱ b	۰/۰۹ b
گره + میانگره	۱/۲۸ a	۱/۹۶ a	۱/۰۵ a	۱۰۰/۰۰ a	۱/۱۳ a	۰/۱۲ a
برگ	۱/۲۲ a	۱/۸۶ a	۰/۹۰ b	۹۶/۲۹ a	۰/۹۱۸ b	۰/۱۱ ab
بنزیل آدنین (میلی‌گرم در لیتر)						
۰/۲۵	۱/۱۴ b	۱/۷۰ b	۰/۹۲ a	۹۰/۱۱ b	۰/۷۹ b	۰/۰۹ b
۰/۵	۱/۱۲ b	۱/۷۲ b	۰/۹۱ a	۸۸/۸۸ b	۰/۹۲ b	۰/۱۱ b
۱	۱/۲۵ a	۱/۹۳ a	۰/۹۰ a	۹۸/۷۷ a	۱/۱۴ a	۰/۱۳ a
توفوردی (میلی‌گرم در لیتر)						
۰	۰/۹۷ b	۱/۳۴ b	۰/۶۹ b	۷۷/۷۷ b	۰/۶۵ b	۰/۰۷ b
۰/۲۵	۱/۲۷ a	۲/۰۰ a	۱/۰۴ a	۱۰۰/۰۰ a	۱/۰۹ a	۰/۱۳ a
۰/۵	۱/۲۶ a	۲/۰۱ a	۰/۹۹ a	۱۰۰/۰۰ a	۱/۱۱ a	۰/۱۲ a

* میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه در هر ستون برای هر تیمار می‌باشند تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

بیشترین طول کالوس از غلظت یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BA به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D بدست آمد و کمترین هم به ترکیب ریزنمونه گره + میانگره به همراه صفر میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D مربوط می‌شد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین مؤید آن است که نوع ریزنمونه و غلظت BA و 2,4-D اثرات متفاوتی روی ارتفاع کالوس تولید شده دارند (جدول ۳). بیشترین ارتفاع کالوس از ریزنمونه برگ در ترکیب با هورمون BA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد، با این حال ترکیب ریزنمونه برگ با هورمون 2,4-D (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) از نظر ارتفاع با بهترین محیط کشت از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت. کمترین ارتفاع نیز به ریزنمونه گره با میانگره در ترکیب با هورمون BA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مربوط می‌شد، که از نظر آماری با ترکیب هورمونی 2,4-D (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) با ریزنمونه گره با میانگره اختلاف معنی‌داری نداشتند. کمترین درصد کالزائی، در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با ریزنمونه گره با میانگره بدست آمد.

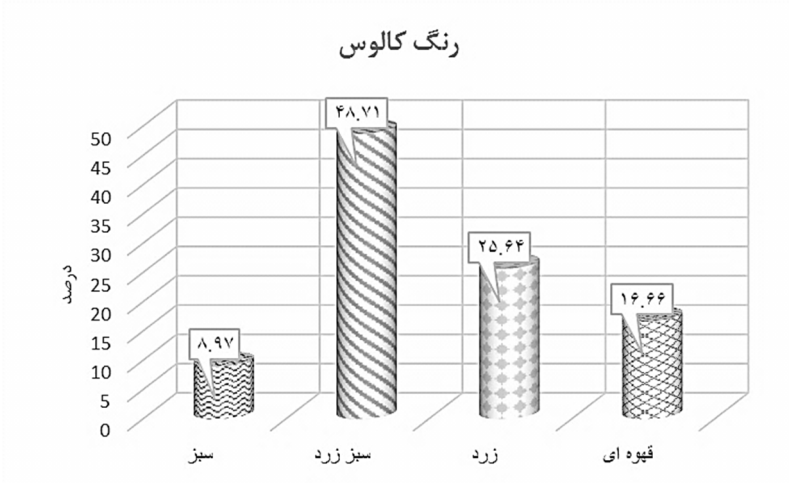
جدول ۳: مقایسه میانگین برهمکنش صفات مورد مطالعه طی اعمال تیمارهای مختلف.

اثر متقابل دوگانه		عرض کالوس	طول کالوس	ارتفاع کالوس	درصد کالزائی	وزن تر کالوس	وزن خشک
ریزنمونه	بنزیل آدنین						
میانگره	۰/۲۵	۱/۳۹ c	۱/۷۳ b	۰/۸۹ bc	۸۸/۸۹ c	۰/۷۸ de	۰/۱۰ a
	۰/۵	۱/۶۷ a	۱/۹۷ a	۰/۹۸ ab	۱۰۰/۰۰ a	۱/۰۱ bcd	۰/۱۲ a
	۱	۱/۵۶ abc	۱/۸۹ ab	۰/۸۴ bc	۱۰۰/۰۰ a	۰/۹۶ cd	۰/۱۲ a
گره + میانگره	۰/۲۵	۱/۱۳ d	۱/۴۱ c	۰/۸۰ c	۸۱/۴۴ d	۰/۶۶ e	۰/۰۸ a
	۰/۵	۰/۹۶ e	۱/۲۱ d	۰/۶۴ d	۶۶/۶۷ e	۰/۵۷ e	۰/۰۸ a
	۱	۱/۴۵ bc	۱/۹۷ a	۰/۹۰ bc	۹۶/۳۳ b	۱/۲۱ ab	۰/۱۴ a
برگ	۰/۲۵	۱/۵۸ ab	۱/۹۷ a	۱/۰۷ a	۱۰۰/۰۰ a	۰/۹۴ cd	۰/۱۰ a
	۰/۵	۱/۷۰ a	۱/۹۹ a	۱/۱۲ a	۱۰۰/۰۰ a	۱/۱۹ abc	۰/۱۳ a
	۱	۱/۷۳ a	۱/۹۵ a	۰/۹۷ abc	۱۰۰/۰۰ a	۱/۲۷ a	۰/۱۵ a
ریزنمونه	توفوردی						
میانگره	۰	۱/۳۱ c	۱/۵۳ d	۰/۸۹ bc	۸۸/۸۹ b	۰/۷۱ b	۰/۰۸ ab
	۰/۲۵	۱/۷۲ a	۲/۱۰ ab	۰/۹۸ ab	۱۰۰/۰۰ a	۱/۰۲ a	۰/۱۳ ab
	۰/۵	۱/۵۹ ab	۱/۹۶ bc	۰/۸۴ bc	۱۰۰/۰۰ a	۱/۰۳ a	۰/۱۲ ab
گره + میانگره	c_1	۰/۴۹ d	۰/۶۷ e	۰/۸۰ c	۴۴/۴۴ c	۰/۲۴ c	۰/۰۳ b
	۰/۲۵	۱/۵۱ b	۲/۰۰ abc	۰/۶۴ d	۱۰۰/۰۰ a	۱/۱۳ a	۰/۱۵ a
	۰/۵	۱/۵۴ ab	۱/۹۲ c	۰/۹۰ bc	۱۰۰/۰۰ a	۱/۰۸ a	۰/۱۲ ab
برگ	۰	۱/۶۲ ab	۱/۸۳ c	۱/۰۷ a	۱۰۰/۰۰ a	۱/۰۳ a	۰/۱۲ ab
	۰/۲۵	۱/۶۶ ab	۱/۹۲ c	۱/۱۲ a	۱۰۰/۰۰ a	۱/۱۳ a	۰/۱۳ ab
	۰/۵	۱/۷۲ a	۲/۱۵ a	۰/۹۷ abc	۱۰۰/۰۰ a	۱/۲۳ a	۰/۱۳ ab
بنزیل آدنین	توفوردی						
۰/۲۵	۰	۰/۸۹ f	۱/۰۴ e	۰/۶۳ c	۷۰/۳۳ c	۰/۴۱ f	۰/۰۵ b
	۰/۲۵	۱/۴۹ cd	۱/۸۶ c	۱/۰۵ a	۱۰۰/۰۰ a	۰/۸۶ cde	۰/۱۲ ab
	۰/۵	۱/۷۱ ab	۲/۲۰ ab	۱/۰۸ a	۱۰۰/۰۰ a	۱/۱۱ bc	۰/۱۱ ab
۰/۵	۰	۱/۰۷ e	۱/۲۲ d	۰/۶۳ c	۶۶/۶۷ d	۰/۷۲ e	۰/۰۸ ab
	۰/۲۵	۱/۵۹ bcd	۱/۸۶ c	۱/۰۲ a	۱۰۰/۰۰ a	۰/۸۹ cde	۰/۱۲ ab
	۰/۵	۱/۶۶ abc	۲/۰۹ b	۱/۰۸ a	۱۰۰/۰۰ a	۱/۱۷ b	۰/۱۴ ab
۱	۰	۱/۴۶ d	۱/۷۷ c	۰/۸۲ b	۹۶/۳۳ b	۰/۸۴ de	۰/۱۰ ab
	۰/۲۵	۱/۸۱ a	۲/۳۰ a	۱/۰۷ a	۱۰۰/۰۰ a	۱/۵۳ a	۰/۱۷ a
	۰/۵	۱/۴۸ d	۱/۷۵ c	۰/۸۳ b	۱۰۰/۰۰ a	۱/۰۶ bcd	۰/۱۳ ab

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه در هر ستون برای هر تیمار می‌باشند تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

در تمامی غلظت‌های صفر 2,4-D درصد کالزائی پائین بوده که نشان دهنده اهمیت 2,4-D در تولید کالوس می‌باشد (جدول ۳). بیشترین وزن تر کالوس در ترکیب تیماری یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BA

با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D بدست آمد و کمترین وزن تر کالوس در ترکیب تیماری هورمون BA (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) با هورمون 2,4-D (صفر میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شد (جدول ۳). بیشترین وزن خشک کالوس مربوط به ترکیب تیماری BA (یک میلی‌گرم در لیتر) و هورمون 2,4-D (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) بود و کمترین میزان آن از ترکیب تیماری هورمون 2,4-D (صفر میلی‌گرم در لیتر) با ریزنمونه گره با میانگره بدست آمد (جدول ۳). مطابق شکل ۳ بیشترین کالوس تولید شده به رنگ سبز زرد بوده و کمترین آن هم مربوط به رنگ سبز می‌باشد.



شکل ۳: تاثیر تنظیم کننده‌ها بر رنگ کالوس

بحث

ترکیبات محیط کشت در کالزایی و اندام‌زایی تاثیر بسزایی دارند این اثر زمانی مشهود است که تنظیم کننده‌های رشد به محیط کشت اضافه می‌گردند (George et al., 2008). در این پژوهش از هورمون‌های اکسین و سیتوکینین به‌منظور القای کالوس استفاده گردید. اکسین و سیتوکنین به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، فاکتورهای کلیدی برای کنترل تقسیم سلولی در شرایط کشت بافت می‌باشند. استفاده از 2,4-D (به عنوان اکسین) و BA (به‌عنوان سیتوکنین) به‌منظور تولید کالوس در کشت بافت گیاهان زیادی گزارش شده است (Khorrami Raad et al., 2012; Sharafi et al., 2008). براساس بررسی‌های صورت گرفته در این پژوهش اثر هورمون BA، 2,4-D و نوع ریزنمونه و اثرات متقابل BA با 2,4-D ، 2,4-D با ریزنمونه و BA با ریزنمونه معنی‌دار بود. با توجه به نتایج مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت 2,4-D درصد کالوس‌زایی افزایش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های سلواراج و همکاران (Selvaraj et al., 2006) که اذعان داشتند کالوس را در حضور 2,4-D و BA بدست آوردند مطابقت داشت با این تفاوت که ریزنمونه به کار گرفته شده در تحقیق مذکور محور زیر لپه خیار بوده است. در تحقیق حاضر در برهمکنش هورمون یک میلی‌گرم در لیتر BA با هورمون توفوردی نشان داده شده است که با افزایش 2,4-D عملکرد افزایش نیافت و غلظت بالاتر هورمون 2,4-D تقریباً نقش بازدارنده داشته است، که با گزارش محمود و همکاران (Mahmood et al., 2012) که اعلام کرده بودند غلظت‌های خیلی زیاد هورمون 2,4-D ممکن است برای بیان ژن‌های درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافت، مهار کننده باشد مطابقت داشت. اکسین یکی از هورمون‌های گیاهی است که برای فعال‌سازی تقسیم سلولی در سلول‌های گیاهی تمایز یافته در شرایط کشت بافت مورد نیاز می‌باشد. اکسین در تنظیم مرحله رونویسی ژن‌ها عمل خود را اعمال میکند. در

یکی از اهداف احتمالی عمل اکسین از این لحاظ القای بیان ژن Cdc2 است که یک پروتئین کیناز کلیدی و مهم در سیکل سلولی را به رمز در می‌آورد و موجب انباشتگی این پروتئین می‌گردد. بر اساس یافته‌ها بیشترین عرض، طول، وزن تر و وزن خشک کالوس در ترکیب تیماری (۱ mg/l) BA به همراه (۰/۲۵ mg/l) 2,4-D مشاهده شد که با نتایج تحقیقات پونجا و همکاران (Punja et al., 1990)، سئو و همکاران (Seo et al., 2000) و سلواراج و همکاران (Selvaraj et al., 2007) که گزارش کرده بودند کالوس در ترکیب BAP و NAA روی ریزنمونه‌های دمبرگ، برگ و لپه رقمی از خیار به خوبی شکل می‌گیرد، نیز مطابقت داشت. با این تفاوت که هورمون اکسین استفاده شده در گزارش آنها NAA و ریزنمونه متفاوت به کار گرفته شده لپه بوده است. همچنین یاسمین و همکاران (Yasmin et al., 2003) گزارش کردند در سیب‌زمینی کالوس در تمام سطوح 2,4-D تولید می‌شود. در گزارش آنها نشان داده شد که بالاترین وزن تر کالوس مربوط به تیمار یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در محیط کشت می‌باشد و تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D وزن تر کالوس کمتری را نسبت به تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D نشان داد. در این آزمایش بر وزن تر و خشک کالوس اثر معنی‌داری داشت. که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. همچنین نبی و همکاران (Nabi et al., 2002)، دوندرا و همکاران (Devendra et al., 2009) وسلواراج و همکاران (Selvaraj et al., 2007) یافتند که ترکیبی از BAP و NAA یا 2,4-D در گیاه خربزه تلخ و خیار تولید کالوس می‌کند. بیشترین کالوس‌های تولیدی در تحقیق حاضر به رنگ سبز زرد بوده که این نتیجه با تحقیقات مالیک و همکاران (Malik et al., 2007) که اذعان داشتند کالوسهای تولیدی در تمامی غلظت‌های 2,4-D به رنگ قهوه‌ای تا سبز زرد، محکم و سخت بودند مطابقت داشت. همچنین در گزارش سلوارج و همکاران (Selvaraj et al., 2006) تمامی کالوسهای بدست آمده در حضور 2,4-D و BA به رنگ سبز بوده‌اند که علت تفاوت در این گزارش با تحقیق حاضر می‌تواند مربوط به نوع ریزنمونه (که در تحقیق آنها محور زیر لپه بود) باشد. همچنین در تحقیقات نبی و همکاران (Nabi et al., 2002) در محیط ترکیبی BA (یک میلی‌گرم در لیتر) به‌علاوه هورمون NAA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) کالوس‌های نرم به رنگ سبز روشن تولید شد.

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس یافته‌های این تحقیق، بهترین بافت برای کالوس‌زائی، برگ و ریزنمونه گره + میانگره بوده است. بیشترین عرض، طول، وزن تر و وزن خشک کالوس در ترکیب تیماری (۱ mg/l) BA به همراه (۰/۲۵ mg/l) 2,4-D مشاهده شد و کمترین عرض و وزن تر کالوس در ترکیب تیماری BA (۰/۲۵ mg/l) و 2,4-D (۰ mg/l) بدست آمد. همچنین کمترین طول، وزن خشک و درصد کالوس‌زائی از ریزنمونه گره + میانگره به همراه (۰ mg/l) هورمون 2,4-D، بهترین ترکیب تیماری برای ارتفاع کالوس از ریزنمونه برگ با هورمون (۰/۵ mg/l) BA و همچنین ترکیب ریزنمونه برگ با هورمون 2,4-D (۰/۲۵ mg/l) بوده است. کمترین ارتفاع نیز در دو ترکیب تیماری ریزنمونه گره + میانگره با هورمون (۰/۵ mg/l) BA و ریزنمونه گره + میانگره با هورمون 2,4-D (۰/۲۵ mg/l) مشاهده شد. در تمامی غلظت‌های صفر 2,4-D درصد کالوس‌زائی پائین بوده که نشان‌دهنده اهمیت 2,4-D در تولید کالوس می‌باشد. بیشترین کالوس تولید شده به رنگ سبز زرد بوده و کمترین آن هم مربوط به رنگ سبز می‌باشد.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت‌های مادی و معنوی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان انجام شد و بدین وسیله از مدیریت آن تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Agarwal, M. 2015. Tissue culture of *Momordica charantia* L.: A review, Journal of Plant Sciences, 3(1-1): 24-32.
2. Alexandra, F. and Dorica, B. 2010. Researches regarding bitter melon (*Momordica charantia*) in vitro regeneration, Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology, 14(3): 75-80.
3. Devendra, N.K., Subhash, B. and Seetharam, Y.N. 2009. Callus growth and plant regeneration in *Momordica dioica* (Roxb.) Wild Cucurbitaceae. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture.3: 743-748.
4. Farkya, S., Bisaria, V., Sirvastava, A. 2004. Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. Appl Microbiol Biotechnol; 65(5): 504–519.
5. Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M. and Trevor, A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture ,In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 32 (4): 272–289.
6. Ghanei, R., Taheri, G. and Rasouli Namaghi, M. 2013. Effect of NAA and 2-4D on callus production in *Citrullus lanatus*. First National Conference of Agricultural Sciences, Payame Noor University . (In Persion).
7. George, E.F., Hall, M.A. and Klerk, G.J.D. 2008. Plant propagation bay Tissue Culture 3rd Edition Springer. Pp: 504.
8. Kartal, M., Konuklugil, B., Indrayanto, G. and Alfermann, A.W. 2004. Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin in Linum species. Pharmaco Biomed, 35: 441-447.
9. Khorrami Raad, M., Bohluli Zanjani, S., Ramezani Sayyad, A., Maghsudi, M., Kaviani, B. 2012. Effect of cultivar, type and age of explants, light conditions and plant growth regulators on callus formation of anthurium, american-eurasian. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture. 12(6): 706-712.
10. Kokate, C.K. 2006. Medicinal plant biotechnology, CBS publisher and distributors.
11. Kumar, D., Sharathnath, K., Yogeswaran, P., Harani, A., Sudhakar, K., Sudha, P .and Banji, D. 2010. A Medicinal Potency of *Momordica Charantia*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 1, 2, 018. 95-100.
12. Kubola, J. and Siriamornpun, S. 2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf stem and fruit fraction extracts in vitro. Food Chemistry, 110(4): 881–890.
13. Mahmood, I., Razzaq, A., Khan, Z., Hafez, IA. and Kaleem, S. 2012. Evaluation of tissue culture responses of promising Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system. Pakistan Journal of Botany, 44: 277-284
14. Malik, M., Zia, R. and Chaudhary, F. 2007. In vitro plant regeneration from direct and indirect organogenesis of *Momordica charantia*. Pakistan Journal of Biological Sciences., 10(22): 4118-4122
15. Munsur, M., Haque, M. and Nasiruddin, K. 2009. In vitro Propagation of Bitter Gourd (*Momordica charantia* L.) from Nodal and Root Segments and M.S. Hossain. Plant Tissue Culture and Biotechnology. 19(1): 45-52.
16. Nabi, A., Rashid, M.M., Al-Amin M. and Rasul M.G. 2002. Organogenesis in teasle gourd (*Momordica dioica* Roxb.), Plant Tissue Culture., 12: 173-180
17. Punja, Z.K., Abbas, N., Sarmento, C.G. and Tang, F.A. 1990. Regeneration of Cucumis sativus vars, sativus and hardwickii, C. melo and C. metuliferus from explants through somatic embryogenesis and organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 21(2): 93–102.
18. Selvaraj, N., Vasudevan, A., Manickavasagam, M. and Ganapathi, A. 2006. In vitro organogenesis and plant formation in cucumber. Biologia Plantarum. 50: 123-126.

19. Selvaraj, N., Vasudevan, A., Manickavasagam, M., Kasthurirengan, S. and Ganapathi, A. 2007. High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of *cucumber via* organogenesis. Scientia Horticulturae, 112: 2-8.
20. Seo, S.H., Bai, D.G. and Park, H.Y. 2000. High frequency shoot regeneration from leaf explants of *cucumber via* organogenesis. Journal Plant Biotechnol, 2: 51-54.
21. Setoodehnia korani, S., Majd, A., Nejadsattarit, T. 2014. Callus induction and Somatic embryogenesis in cucumber (*cucumis sativus* L cv.) super dominus, First International and 13th iranian of Genetics Congress. http://www.civilica.com/Paper-CIGS13-CIGS13_0636.html. (In Persion)
22..Sharafi, A., Hashemi Sohi, H. and Jourabchi, E. 2008. Improvement on the situation of regeneration of medicinal plant *Artemisia annua* L. Journal of Environmental Research. 21: 565-573. (In Persian).
23. Snee, S., Nerurkar, R., Dooley, D., Efird, J., Shovic, A. and Nerurkar, P. 2011. Strategies to improve palatability and increase consumption intentions for *Momordica charantia* (bitter melon): A vegetable commonly used for diabetes management, Nutrition Journal, 10:78.
24. Sultana, R. and Rahman, M. 2012. Cells structure and morphogenesis of embryogenic aggregates in suspension culture of bitter melon (*Momordica charantia* L.). International Journal of Biosciences 2, 3, p. 97-105,
25. Thiruvengadam, M., Chung, M. and Chun, S. 2012. Influence of polyamines on in vitro organogenesis in bitter melon (*Momordica charantia* L.). Journal of Medicinal Plants Research. 6(19): 3579-3585
26. Tripathi, L. and Tripathi, J, N. 2003, Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2(2): 243-253.
27. Yasmin, S., Nasiruddin, K.M., Begum, R. and Talukder, S.K. 2003. Regeneration and establishment of potato plantlets through callus formation with BAP and NAA. Asian Journal of Plant Sciences, 2: 936-940.S.