بررسی تاثیر تنظیم کننده‌های رشد و نوع ریز نمونه در القاء کالوس و بررسی روند رشد کالوس خیار چنبر

محمد مهدی جابری زاده، محمد حسین دانشور و خلیل عالمی سعید
دانشگاه شهید چمران اهواز

چکیده

خیار چنبر یک واریته گیاهشناسی (*flexuosus* Naud) از گونه خربزه (*Cucumis melo*) متعلق به خانواده کدوئیان (Cucurbitaceae) است. خیار چنبر به صورت عمده در منطقه خوزستان کشت می‌گردد و گیاهی مقاوم به گرما است و از خرداد تا مهر که به علت گرما امکان تولید میوه خیار در خوزستان میسر نیست، جایگزین خیار می‌گردد. این گیاه دارای میوه‌ای دراز و استوانه‌ای است که وقتی نارس است، به جای خیار مصرف می‌شود. نظر به اهمیت اقتصادی خیار چنبر در مناطق گرم کشور، این گیاه مدل خوبی برای بررسی‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی مربوط به گونه‌ی خربزه‌ها است و می‌توان از آن برای پیدا کردن ژن‌ها و راه‌کارهای مفید حل مسائل متعدد کشت انواع خربزه و خیار استفاده کرد. کالوس می‌تواند در تولید باززایی (اندام‌های ساقه و ریشه)، تهیه پروتوپلاست، تولید جنین سوماتیک و تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرد. پس از جدا نمودن پوست بذور و استریل نمودن آنها، بذور در محیط کشت MS قرار داده شدند تا جوانه‌زنی در روشنایی صورت گیرد. از هیپوکوتیل و کوتیلدون گیاهچه‌های ۱۰ روزه به عنوان ریزنمونه، جهت کشت در محیط‌های کالوس‌زایی استفاده شد. جهت کالوس‌زایی از محیط کشت MS، باضافه ۰/۸ درصد آگار، ۳ درصد ساکاروز و هورمون‌های NAA با دو غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و BAP با دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر استفاده شد. همچنین برای رسم منحنی رشد، در آزمایشی دیگر در طی مدت ٦ هفته، روند افزایش وزن تر کالوس مورد بررسی قرار گرفت. از چهار محیط کشت موجود بیشترین کالوس‌زایی مربوط به محیط کشت با هورمون‌های NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و BAP با غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بدست آمد. همچنین کوتیلدون میزان کالوس بیشتری نسبت به هیپوکوتیل طی٤ هفته تولید کرد.

مقدمه

خیار چنبر۲ یک واریته‌ی گیاهشناسی (*flexuosus* Naud) از گونه‌ی خربزه (*Cucumis melo*) متعلق به خانواده‌ی کدوئیان (*Cucurbitaceae*) است که تعداد کروموزومهای آنها برابر ۲n=۲٤ می‌باشد. خیار چنبر به صورت عمده در منطقه‌ی خوزستان کشت می‌گردد و گیاهی مقاوم به گرما است و از خرداد تا مهر که به علت گرما امکان تولید میوه خیار در خوزستان میسر نیست، جایگزین آن می‌گردد. این گیاه دارای میوه‌ای دراز و استوانه‌ای است که وقتی نارس است، به جای خیار مصرف می‌شود. نظر به اهمیت اقتصادی خیار چنبر در مناطق گرم کشور، این گیاه مدل خوبی برای بررسی‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی مربوط به گونه‌ی خربزه‌ها است. کالوس می‌تواند در تولید باززایی (اندام‌های ساقه و ریشه)، تهیه پروتوپلاست، تولید جنین سوماتیک و تولید متابولیتهای ثانویه مورد استفاده قرار گیرد.

[2]snake cucumber

مواد و روشها

۱-کشت بذور: بذور در محیط کشت موراشیک و اسکوگ حاوی ۰/۸ درصد آگار و ۳ درصد ساکاروز قرار داده می‌شوند تا جوانه‌زنی در روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انجام شود.

۲-تولید کالوس : از هیپوکوتیل و کوتیلدون گیاهچه‌های ۱۰ روزه به عنوان ریزنمونه مورد نیاز جهت کشت در محیط‌های کالوس‌زایی استفاده می‌گردد. کوتیلدون و هیپوکوتیل قطعه قطعه شده و روی محیط کشت کالوس‌زایی قرار داده می‌شوند. جهت کالوس زایی از محیط کشت MS ، باضافه ۰/۸ درصد آگار و ۳ درصد ساکاروز همراه با هورمون‌های NAA با دو غلظت ۱ و ۲ میلیگرم در لیتر و BAP با دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر استفاده می‌شود. این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ عامل: نوع اکسپلنت، غلظت هورمون NAA و غلظت هورمونBAP هر کدام با دو سطح و با ٤ تکرار صورت می‌گیرد. کالوس‌زایی در شرایط تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد صورت خواهد گرفت.

۳- بررسی روند رشد کالوس : این آزمایش جهت بررسی میزان افزایش رشد کالوس بر حسب زمان بر اساس وزن تر کالوس انجام می‌گیرد. در این آزمایش در هر ظرف محیط کشت ۱۵۰ سی‌سیِ حاوی ۳۰ سی‌سی محیط کشت کالوس زایی، حدود ۱ گرم کالوس قرار داده می‌شود. توزین کالوس هفته‌ای یکبار و به مدت ٦ هفته انجام می‌شود. لذا هر ۷ روز یکبار و هر بار ۸ ظرف محیط کشت به صورت تصادفی انتخاب و کالوس درون آن اندازه‌گیری و یادداشت می‌گردد.

نتایج و بحث

الف) القاء کالوس: کالوس تولید شده در محیط کشت کالوس‌زایی پس از ۵ هفته جدا شده و وزن گردید. از چهار محیط کشت موجود بیشترین کالوس‌زایی مربوط به محیط کشت با هورمون‌های NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و BAP با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. کوتیلدون نیز میزان کالوس بیشتری نسبت به هیپوکوتیل طی ٤ هفته تولید نمود.

تجزیه واریانس و نتایج حاصله: ۱- تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف غلظت اکسین (۱ و ۲ میلیگرم در لیتر NAA) وجود دارد. ۲- تفاوت معنی‌داری بین نوع اکسپلنت‌ها (کوتیلدون و هیپوکوتیل) وجود دارد. ۳- هر چند تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف غلظت سایتوکینین وجود ندارد ولی اثر متقابل بین غلظت اکسین و سایتوکینین معنی‌دار است. ٤- اثر متقابل بین غلظت اکسین و نوع اکسپلنت و اثر متقابل بین تمام عوامل معنی‌دار است. ۵- اثر متقابل بین غلظت سایتوکینین و نوع اکسپلنت معنی‌دار نیست.

ب) رشد کالوس: برای این آزمایش از ٤۸ شیشه حاوی محیط کشت MS همراه با هورمون NAA با غلظت ۱ میلیگرم در لیتر و BAP با غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر استفاده گردید. نمودار منحنی رشد کالوس در طی ٦ هفته بر اساس میانگین وزن تر کالوس‌های رشد یافته در ۸ شیشه محیط کشت و مراحل رشد کالوس در خیار چنبر به صورت زیر است:

۱- فاز تاخیری و رشد کم کالوس در هفته اول و آماده شدن سلولها جهت تقسیم سلولی. ۲- رشد تصاعدی کالوس و افزایش تقسیم سلولی در هفته دوم و سوم. ۳- رشد خطی کالوس در هفته‌های چهارم و پنجم. ٤- کاهش رشد پس از هفته پنجم و شروع حالت سکون در هفته ششم.

نتیجه‌گیری: به علت اینکه بهترین زمان برای انجام واکشت شروع مرحله سکون است، لذا با توجه به فاکتورهای موثر در رشد کالوس (مانند نوع گیاه، نوع بافت منبع کالوس و میزان کالوس اولیه، میزان محیط کشت، نوع محیط کشت، و دمای محیط)و با در نظر گرفتن شرایط فوق در این آزمایش، می‌توان هر ۵ تا ٦ هفته یکبار اقدام به واکشت نمودن کالوس‌ها نمود.

منابع

۱. حسندخت، م. و ابراهیمی، ر. ۱۳۸۵. مبانی کشت بافت گیاهی. انتشارات مرز دانش. تهران. ۳۲۸ص.

3. Fellner, M., and Lebeda, A. 1998. Callus Induction and Protoplast Isolation from
4. Tissues of *Cucumis sativus* L. and *C. melo* L. Seedlings. Biologia Plantarum. 41: 11-24.

Abstract:

Snake cucumber is a botany variety (*flexuosus* Naud) from the melon species (*Cucumis melo*) belonging to the family of *Cucurbitaceae*. This is principally cultivated in Khuzestan Province and due to its heat-resisting character, is cultivated in Khuzestan during Khordad (June) to Mehr (September) which cultivation of cucumber is impossible. Snake cucumber have long and cylinder shape fruit which when unripped is consumed as a cucumber substitute. Given the economic value of Snake cucumber for the hot region, this plant is an Appropriate model for physiologic and genetic studies of the cucumis melo species. This can be used to find genes and useful way of solving various cultivating problems related to cucumber and melon.

Callus can be used in Organogenesis, Somatic embryogenesis, Protoplast isolation and Secondary metabolite production**.** Explants when cultured on the appropriate medium, usually with both an auxin and a cytokinin, can give rise to an unorganised, growing and dividing mass of cells called callus.

After seed coat removal they were sterilized by sodium hypochlorite and ethanol then seeds were placed in MS media supplemented with 30 g.l sucrose and 8 g.l agar. Cotyledons and hypocotyl from 10-day-old plants were cut to segments and placed on the cullus induction media contain MS media supplemented with 30 g.l sucrose and 8 g.l agar with two levels of a-naphthalene acetic acid (NAA) : 1.0 and 2.0 mg/l and two levels of benzylaminopurine (BA) : 0.1, 0.2 mg/l.

Callus developed on the cut surface of all explants cultured in media but The best Callus developments were observed on medium consisting of 1.0 mg/l NAA AND 0.1 mg/l BAP.