بررسی تأثیر نوع اکسین، جهت استقرار ریزنمونه و نور بر کالوس‌زایی و تشکیل ریشه مویین گیاه دارویی خربزه تلخ(*Momordica charantia*)

مژده شفائی[1*]، آرش مختاری[2] و مرتضی ابراهیمی[2]

[1] **ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی**

[2] **ایران، اصفهان، آموزش و ترویج کشاورزی، سازمان تحقیقات، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور-اصفهان، بخش تحقیقات کشت بافت گیاهی**

تاریخ دریافت:۹۶/۸/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۵

چکیده

خربزه تلخ (*Momordica charantia*) گیاه دارویی از خانواده کدوییان است. این گیاه به‌عنوان داروی سنتی برای درمان دیابت به کار می‌رود. این پژوهش باهدف بررسی تأثیر جهت استقرار ریزنمونه برگ، نوع اکسین و شرایط نوری بر درصد کالوس‌زایی و تشکیل ریشه مویین از کالوس گیاه دارویی خربزه تلخ انجام شد. ریزنمونه برگ در دو جهت (سطح بالایی/ سطح زیرین) در تماس با محیط کشت حاوی دو نوع اکسین در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (نفتالین استیک اسید (Naphthaleneacetic acid)) و 2,4-D (دی کلروفنوکسی استیک اسید(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)) کشت و تحت دو شرایط تاریکی و نور قرارگرفت. بالاترین میزان کالوس‌زایی (۹۵/۴۰٪) و ریشه‌زایی (۴۰/۶۰٪) در شرایطی حاصل شد که سطح بالایی برگ در تماس با محیط موراشیگ و اسکوگ(MS)حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و در تاریکی قرارگرفت. نتایج نشان داد که تاریکی به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر تحریک و افزایش تولید کالوس تأثیر داشته و اکسین 2,4-D با اختلاف معنی‌داری نسبت به NAA، اکسین مناسب‌تری جهت کالوس‌زایی و ریشه‌زایی بوده است.

واژه‌های کلیدی: خربزه تلخ، کالوس‌زایی، تاریکی، جهت ریزنمونه، 2,4-D

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۲۳۶۱۶۶۷، پست الکترونیکی: m.shafaee@srbiau.ac.ir

مقدمه

خربزه تلخ (*Momordica charantia*) گیاه دارویی مهمی از خانواده کدوییان (*Cucurbitacea*) بوده که منشأ آن هند و مالایا است (۱۲و ۲۳). این گیاه حاوی مقادیر فراوانی اسید آسکوربیک و آهن بوده و به‌عنوان داروی سنتی برای درمان دیابت در بسیاری از کشورهای گرمسیری به کار می‌رود (۲۰). اثرات بازدارندگی آن بر روی ویروس HIV نیز اثبات شده است (۱۲و ۲۳). تحقیقات نشان می‌دهد که ترکیبات اولیه مسئول کاهش قندخون در گیاه خربزه تلخ شامل شبه انسولین حیوانی موسوم به پلی‌پپتید P، کوکوربیتوئید، مموردیسین و اولینولیک اسید است. پلی پپتید P ازلحاظ ساختاری و دارویی شبیه انسولین گاوی است (۱۲). امروزه بسیاری از ترکیبات شیمیایی در بدن انسان عوارض جانبی بسیاری ایجاد می‌نماید. به همین دلیل استخراج و بهره‌گیری از این ترکیبات طبیعی بسیار حائز اهمیت است. امروزه بیوتکنولوژی برای انتخاب، تکثیر و حفظ ژنوتیپ‌های درخطر گیاهان دارویی و استخراج متابولیت‌های ثانویه گیاهی ابزار مهمی محسوب می‌شود (۴). تکثیر سنتی گیاه خربزه تلخ به علت وجود پوسته سخت بذر و عدم جذب آب و گاز و نیز بازدارنده‌های موجود در آن با مشکلاتی مواجه بوده و

ازدیاد آن از طریق قلمه ساقه و ریشه نیز بسیار دشوار است (۹ و ۲۵). از طرف دیگر، تکثیر رویشی این گیاه به کمک روش‌های مرسوم و سنتی علاوه بر بازده پایین، عموماً موجب ضعف گیاه می‌شود (۸ و ۱۵). دراین راستا، کشت بافت این گیاه، روش تکثیر مهمی محسوب است و می‌تواند برای تکثیر انبوه گیاهان بکار رود (۲، ۸، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۵ ،۱۷، ۲۳، ۲۹و ۳۱).

یکی از روش‌های تولید گیاه درون شیشه‌ای، استفاده از سیستم باز زایی غیرمستقیم است. از این روش می‌توان به‌طور مستقیم برای تکثیر یا تهیه مواد اولیه موردنیاز برای ریز ازدیادی از طریق سایر روش‌ها، برنامه‌های انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخت استفاده کرد. سیستم باز زایی غیرمستقیم گیاه اگرچه معایبی ازنظر احتمال وقوع تنوع ژنتیکی دارد، اما این احتمال را با مدیریت روش تولید ازجمله نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد می‌توان کاهش داد. از طرف دیگر و به‌منظور افزایش تنوع ژنتیکی و استفاده ازاین تنوع در برنامه‌های اصلاحی و تولید متابولیت‌های ثانویه، می‌توان با اعمال تیمارهایی این احتمال را افزایش داد.

در مطالعه دوندرا و همکاران (۲۰۰۹) (۱۲) بر روی گونه *Momordica dioica (Roxb)*، از ریزنمونه برگ و گره برای تولید کالوس استفاده شد و بیشترین میزان کالوس (۸۰ درصد) از ریزنمونه برگ روی محیط MS حاوی (۱ mg/l) 2, 4-D و BAP (۲ mg/l) گزارش گردید. در بررسی مالیک و همکاران (۱۵)، تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی و اندام‌زایی مستقیم و غیرمستقیم موردبررسی قرارگرفت. کشت ریز نمونه‌های برگ، ساقه و کوتیلدون‌های خربزه تلخ در محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف از اکسین و سیتوکینین به‌تنهایی یا در ترکیب باهم انجام شد. بهترین پاسخ کالوس‌زایی از هر سه ریزنمونه (برگ، ساقه، کوتیلدون) در محیط MS حاوی(۱ mg/l– ۱/۵) BAP، NAA (۱/۵ mg/l) و 2,4-D (۱ mg/l) به دست آمد و کالوس حاصل سفت، سبز و فشرده بود. بر اساس مطالعه دوندرا و همکاران (۱۲) نیز ریز نمونه‌های برگی بیش‌ترین میزان کالوس‌زایی را در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP نشان دادند. در مشاهدات ولی خان و همکاران (۲۶) مشخص شد که تاریکی سبب افزایش فراوانی تولید کالوس گیاه آناتو (*Bixa Orellana*) می‌شود. به‌طور مشابه، عثمان و همکاران (۲۵) با بررسی کشت دانه گرده گیاه خربزه تلخ در شرایط تاریکی نشان دادند که عدم وجود نور به‌طور معنی‌دار در تحریک کالوس مؤثر بوده است (۲۷). مطالعه شفائی (۵) در زمینهٔ امکان باز زایی غیرمستقیم گیاه دارویی خربزه تلخ نشان داد که بهترین غلظت 2,4-D جهت کالوس‌زایی این گیاه ۲ میلی‌گرم در لیتر است. مطالعه حاضر در ادامه پژوهش پیشین و باهدف بررسی تأثیر جهت استقرار ریزنمونه برگ، نور و تنظیم‌کننده‌های رشد جهت بهینه‌سازی شرایط تشکیل کالوس حاصل از برگ گیاه دارویی خربزه تلخ و انجام مطالعات آتی در خصوص بهینه‌سازی شرایط کشت بر طبق نتایج فوق می‌تواند جهت پایه‌ریزی تولید کالوس جهت باز زایی غیرمستقیم، کشت سوسپانسیون سلولی و نیز کشت ریشه مویین برای تولید متابولیت‌های ثانویه خاص در مطالعات آتی مورد بهره‌برداری قرارگیرد.

مواد و روشها

بذور گیاه خربزه تلخ از شهرستان چابهار تهیه شد. پس از شستشوی بذور با آب شهری، ضدعفونی با اتانل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و سپس وایتکس ۲۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و آبکشی با آب مقطر استریل در زیر لامینار فلو انجام گرفت. تعداد ۶ بذر در شیشه‌های حاوی ۲۵ سی‌سی محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده رشد کشت گردید. به‌منظور جوانه‌زنی، ظروف کشت در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶/۸ (نور/ تاریکی)، شدت نور حدود ۲۵۰ µmol m-2 s-1 نگهداری شدند. بعد از

جوانه‌زنی، از برگ‌های گیاهچه‌های درون شیشه به‌عنوان منبع ریزنمونه استفاده شد. قطعاتی با اندازه تقریبی ۲ cm ۲ از پهنک‌برگ تهیه و در دو جهت بر روی محیط کشت MS حاوی دو نوع هورمون 2,4-D یا NAA در غلظت ۲ mg/l کشت شد. تعداد ۶ ریزنمونه از سطح بالایی برگ گیاه خربزه تلخ (ریزنمونه ۱) و۶ ریزنمونه از سطح زیرین برگ گیاه خربزه تلخ (ریزنمونه ۲) در هر پتری دیش‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های فوق کشت شد. درب پتری‌دیش‌ها با پارافیلم مسدود و در دو شرایط نوری فتوپریود ۸/۱۶ (نور/ تاریکی، شدت نور حدود 250 µmol m-2 s-1) و تاریکی مطلق در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت ۲ هفته از کشت، درصد تشکیل کالوس و اندام‌زایی احتمالی برای هر تیمار یادداشت شد. به‌منظور آنالیز آماری صفات کالوس‌زایی و ریشه‌زایی با استفاده از فرمول‌های زیر مورد ارزیابی قرارگرفت (۱).

۱۰۰× (تعداد کل قطعات جدا کشت) / (میانگین میزان تولید کالوس × تعداد قطعات کالوس داده) = درصد کالوس‌زایی

۱۰۰× (تعداد کل قطعات جدا کشت) / (میانگین میزان تولید ریشه کالوس × تعداد قطعات ریشه داده) = درصد ریشه‌زایی

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به‌صورت فاکتوریل و با ۵ تکرار (پتری‌دیش) به اجرا در آمد. تجزیه واریانس داده‌های حاصل و مقایسه میانگین‌ها به ترتیب بااستفاده از نرم‌افزار آماری SAS ver. 9.2 و با آزمون چند دامنه دانکن (Duncan's multiple range test, P≤ ۰,۰۵) انجام شد.

نتایج

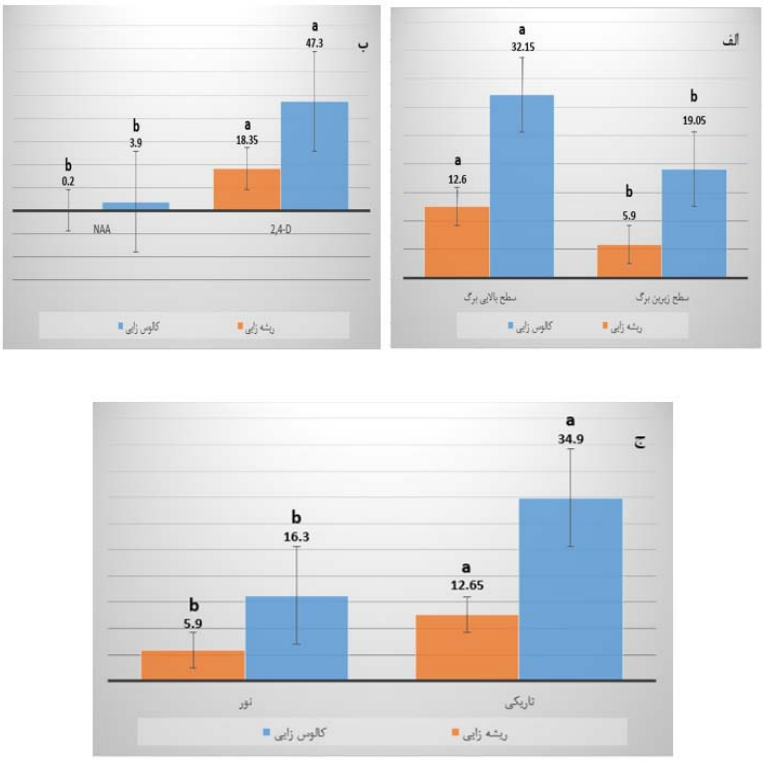
نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به درصد تشکیل کالوس و ریشه بر روی ریزنمونه گیاه خربزه تلخ (جدول ۱) نشان داد که تأثیر منفرد هریک از تیمارهای آزمایش شامل جهت استقرار ریزنمونه بر روی محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و شرایط نوری در سطح احتمال ۵ درصد (P≤۰,۰۵) بر درصد تشکیل کالوس معنی‌دار می‌باشد. همین روند در خصوص اثرات متقابل دو و سه‌گانه نیز مشاهده شد. در خصوص صفت دوم (درصد تشکیل ریشه از کالوس)، جهت استقرار ریزنمونه، نوع اکسین، شرایط نوری، اثر متقابل بین جهت ریزنمونه × اکسین و اکسین × شرایط نوری در سطح ۱ درصد و اثر متقابل بین جهت ریزنمونه × شرایط نوری و اثرات متقابل سه‌گانه بین جهت ریزنمونه × اکسین × شرایط نوری در سطح احتمال ۵ درصد (P≤۰,۰۵) تأثیر معنی‌دار نشان داده‌اند (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تأثیر جهت استقرار ریزنمونه، اکسین و شرایط نوری بر درصد کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در گیاه دارویی خربزه تلخ

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد کالوس‌زایی	درصد ریشه‌زایی
تیمار	۷	۴۳۹۴**	۷۸۵/۱۳**
جهت ریزنمونه	۱	۱۷۱۶/۱۰**	۴۵۵/۶۲**
اکسین	۱	۱۸۸۳۵/۶۰**	۳۲۹۴/۲۲**
شرایط نوری	۱	۳۴۵۹/۶۰**	۴۵۵/۶۲**
جهت ریزنمونه × اکسین	۱	۳۵۷۲/۱۰**	۴۵۵/۶۲**
جهت ریزنمونه × شرایط نوری	۱	۴۴۸/۹۰**	۲۰۷/۰۲*
اکسین × شرایط نوری	۱	۱۵۳۷/۶۰**	۴۵۵/۶۲**
جهت ریزنمونه × اکسین × شرایط نوری	۱	۱۵۳۷/۶۰**	۱۷۲/۲۲*
خطا	۳۲	۳۶/۵۵	۵۴/۱۸
کل	۳۹		

ns: عدم تفاوت معنی‌دار *: تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد **: تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

بررسی اثرات منفرد تیمارها: همانگونه که در شکل ۱- الف مشاهده می‌شود، درصد کالوس‌زایی و ریشه‌زایی تحت تأثیر جهت استقرار ریزنمونه بر روی محیط کشت میانگین‌های متفاوتی ازلحاظ آماری (P≤۰,۰۵) داشته‌اند. در خصوص هر دو صفت فوق، بیشترین درصد کالوس‌زایی (۳۲/۱۵) و ریشه‌زایی (۱۲/۶۰) زمانی رخ‌داده که سطح بالایی برگ در تماس با محیط کشت بوده است. نوع اکسین بکار رفته در این آزمایش منجر به اختلاف معنی‌دار بر روی(P≤۰,۰۵) صفات مورد بررسی شده است. طبق شکل ۱- ب، 2,4-D ازلحاظ درصد تشکیل کالوس و تولید ریشه از کالوس به ترتیب با ۴۷/۳۰ و ۱۸/۳۵ درصد بیشترین تأثیر را داشته و پاسخ بهتری نسبت به NAA ایجاد کرده است. شکل ۱- ج، مقایسه میانگین تأثیر شرایط نوری مختلف را بر درصد کالوس‌زایی و ریشه‌زایی نشان می‌دهد. درصد تشکیل کالوس و ریشه حاصل از کالوس در شرایط تاریکی بهتر از استقرار کشت‌ها در نور بوده و بیشترین میزان کالوس (۳۴/۹۰ درصد) در شرایط یک هفته تاریکی و سپس انتقال به شرایط نوری حاصل شده است. این میزان با درصد کالوس‌زایی (۱۶/۳۰) تحت شرایط نوری ازلحاظ آماری (P≤۰,۰۵) تفاوت معنی‌دار نشان داده است.



شکل ۱- مقایسه میانگین (P≤۰,۰۵) مربوطه به تأثیر جهت استقرار برگ بر روی محیط کشت (الف) نوع اکسین (ب) و شرایط نوری ج) بر درصد کالوس‌زایی و ریشه‌زایی گیاه خربزه تلخ

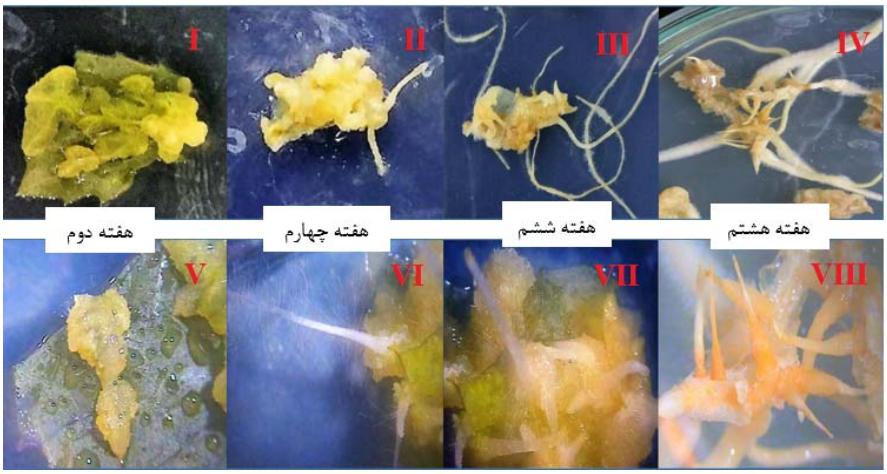
بررسی اثرات متقابل تیمارها: در جدول شماره ۲، نتایج مقایسه میانگین مربوط به اثرات متقابل بین ۳ تیمار بکار رفته روی درصد کالوس‌زایی و ریشه حاصل از کالوس ارائه شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود، بهترین تأثیر ازلحاظ درصد تشکیل کالوس و ریشه حاصل از کالوس زمانی حادث می‌شود که سطح بالایی برگ در تماس با محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بوده و کشت‌ها به مدت ۱ هفته اول کشت در تاریکی نگهداری

شده باشند. تحت این شرایط بیشترین درصد کالوس‌زایی و تشکیل ریشه به ترتیب به میزان ۹۵/۴۰ و ۴۰/۶۰ درصد اندازه‌گیری شد. طبق جدول ۲، تاریکی نقش تعیین‌کننده داشته چنانچه ریزنمونه از سطح بالایی در محیط حاوی 2,4-D قرار گیرد میانگین درصد کالوس و ریشه با اختلاف معنی‌دار ($P\leq$۰,۰۵) نسبت به تیمار تاریکی تغییر کرده و در رتبه دوم قرار می‌گیرد. سودمندی 2,4-D نسبت به NAA مشهود بوده به نحوی که کمترین میزان تشکیل کالوس و ریشه را می‌توان در بین محیط‌های حاوی NAA جستجو نمود. در حضور نور و فارغ از جهت استقرار ریزنمونه، در محیط‌های حاوی NAA نشانه‌ای از تشکیل کالوس گزارش نشد. اشکال ۲ و ۳ کالوس و ریشه حاصل از برگ در حالتی که سطح بالایی ریزنمونه در تماس با محیط به ترتیب حاوی 2,4-D و NAA بوده را طی مراحل مختلف زمانی از نمای ماکرو و میکروسکوپی نشان می‌دهد.

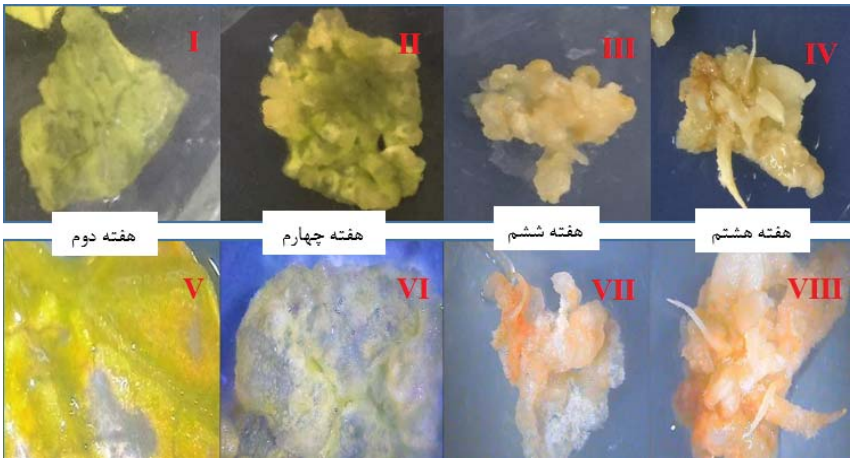
جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر جهت استقرار ریزنمونه، نوع اکسین و شرایط نوری بر درصد کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در ریزنمونه برگ گیاه دارویی خربزه تلخ(*Momordica charantia*)

تیمار	درصد کالوس‌زایی	درصد ریشه‌زایی
سطح بالایی برگ+NAA+تاریکی	۱۳/۶۰^{c}	۱/۰۰^{c}
سطح زیرین برگ +NAA+تاریکی	۶/۲۰ ^{dc}	۱/۸۰^{c}
سطح زیرین برگ+2,4-D+ تاریکی	۱۰/۰۰^{c}	۲/۰۰^{c}
سطح بالایی برگ+ 2,4-D+ تاریکی	۹۵/۴۰^{a}	۴۰/۶۰^{a}
سطح بالایی برگ+ 2,4-D+ نور	۳۹/۰۰^{b}	۸/۰۰ ^{b}
سطح بالایی برگ+NAA+نور	۰ ^{d}	۰ ^{d}
سطح زیرین برگ+2,4-D+ نور	۱۲/۰۰^{c}	۴/۰۰^{bc}
سطح زیرین برگ+NAA+نور	۰^{d}	۰ ^{d}

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.



شکل ۲- مراحل مختلف تشکیل کالوس و ریشه بر روی ریزنمونه قطعات برگ در حالتی که سطح بالایی ریزنمونه برگ خربزه تلخ در تماس با محیط کشت MS حاوی 2,4-D بوده است. تصاویر IV, III, II, I نمای ماکروسکوپی مربوط به استقرار سطح بالایی برگ بروی محیط کشت حاوی mg/l ۲، 2,4-D تحت شرایط تاریکی که به ترتیب از هفته دوم، چهارم، ششم و هشتم تهیه شده است. (نمای ماکروسکوپی با دوربین دیجیتال کانن مدل Powershot SX60 HS تهیه شده است) و تصاویر VIII, VII, VI, V نمای میکروسکوپی مربوط به استقرار سطح بالایی برگ بروی محیط کشت حاوی mg/l ۲، 2,4-D تحت شرایط تاریکی که به ترتیب از هفته دوم، چهارم، ششم و هشتم تهیه شده است. (نمای میکروسکوپی با دوربین Color Video Camera Sony مدل SSD-DC58AP که روی بیناکولار Olympus قرارگرفته و در بزرگنمایی 100x تهیه شده است).



شکل۳- مراحل مختلف تشکیل کالوس و ریشه بر روی برگ در حالتی که سطح بالایی ریزنمونه برگ خربزه تلخ در تماس با محیط کشت MS حاوی NAA بوده است. تصاویر IV, III, II, I نمای ماکروسکوپی مربوط به استقرار سطح بالایی برگ بروی محیط کشت حاوی ۲ mg/l NAA تحت شرایط تاریکی که به ترتیب از هفته دوم، چهارم، ششم و هشتم تهیه شده است. (نمای ماکروسکوپی با دوربین دیجیتال کانن مدل Powershot SX60 HS تهیه شده است) و تصاویر VIII, VII, VI, V نمای میکروسکوپی مربوط به استقرار سطح بالایی برگ بروی محیط کشت حاوی ۲ mg/l NAA تحت شرایط تاریکی که به ترتیب از هفته دوم، چهارم، ششم و هشتم تهیه شده است. (نمای میکروسکوپی با دوربین Color Video Camera Sony مدل SSD-DC58AP که روی بیناکولار Olympus قرارگرفته و در بزرگنمایی 100x تهیه شده است).

بحث

اکسین‌ها به‌خصوص 2,4-D منجر به تقسیم سلولی شده، در تشکیل کالوس نقش داشته و از رشد جوانه‌های جانبی جلوگیری می‌کنند (۱۱). معمولاً در بیشتر مطالعات، 2,4-D برای تمایز زدایی و تولید کالوس مؤثرتر از سایر اکسین‌ها است (۱۳و ۱۴). در مطالعه حاضر، بهترین درصد القاء کالوس (۹۵/۴۰ درصد) در گیاه خربزه تلخ در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D حاصل شد. به‌طور مشابه سومارت و همکاران (۲۰۰۸) (۲۱) نیز در بررسی کالوس‌زایی از بذور واریته‌هایی از برنج معطر تایلندی، بهترین محیط کشت جهت کالوس‌زایی را محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D گزارش نمودند. هم‌چنین نتایج شفاهی (۱۳۹۴) (۵) و نتایج سگلام و همکاران (۲۰۱۷) (۱۹) در بررسی باز زایی غیرمستقیم گیاه خربزه تلخ و تکثیر درون شیشه این گیاه، این موضوع را تأیید نموده به نحوی که بهترین غلظت برای کالوس‌زایی غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بوده و افزایش غلظت تا۴ میلی‌گرم بر لیتر سبب کاهش رشد کالوس شده است.

بالاترین میزان کالوس‌زایی از گیاه *Linum glaucum* در محیط کشت MS حاوی 2,4-D رخ داده و محققین نشان دادند که NAA تأثیری بر روی تشکیل و رشد کالوس ندارد (۲۴). به‌طور مشابه، حضرتی و همکاران (۱۳۹۶) (۲) که پژوهش خود را روی بررسی تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر رشد درون شیشه‌ای فندق و تولید تاکسول در کالوس انجام دادند، بهترین غلظت 2,4-D جهت تولید کالوس را ۲ میلی‌گرم در لیتر گزارش نمودند.

تأثیر 2,4-D و عدم وجود نور در هفته اول کشت نیز افزایش چشم‌گیری در بهینه‌سازی کالوس‌زایی نشان داد. تحریک و شدت تکثیر کالوس در حضور 2,4-D و تاریکی به حدی بود که پس از گذشت دو هفته بافت کالوس تمام قطعات ریزنمونه را در برگرفته و به دنبال آن ریشه‌زایی آغاز شد. در مطالعه عثمان و همکاران (۲۰۱۵) (۲۶) در خصوص کشت درون شیشه دانه گرده گیاه خربزه تلخ مشخص شد که نگهداری کشت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط تاریکی سبب افزایش کالوس‌زایی (۷۱ درصد) شده است. به طور مشابه در مطالعه توکل و همکاران (۲۰۱۱)

(۲۴) نتایجی در تأیید نتایج حاصل این پژوهش گزارش کردند که تاریکی و محیط کشت MS به همراه 2,4-D به‌منظور تولید کالوس کلزا بهینه خواهد بود. طبق نتایج این بررسی، تاریکی سبب بالاترین میزان کالوس‌زایی (۴۷/۳ درصد) در ریز نمونه‌های برگی شد. نتایج مطالعه زاره و همکاران (۲۰۱۵) (۲۸) در مورد اثر نور، نوع ریزنمونه و غلظت‌های اکسین و سیتوکینین‌ها روی کالوس‌زایی گیاه دارویی *Linum glaucum* این موضوع را تأیید می‌کند به نحوی که تاریکی سبب افزایش تشکیل کالوس و افزایش وزن‌تر کالوس شده است. همچنین نتایج مطالعات ولی خان و همکاران (۲۷) در خصوص بررسی اثر تاریکی و تنظیم کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی گیاه آناتو (*Bixa orellana*) نیز ثابت کرده که تاریکی به طور معنی‌داری سبب افزایش تشکیل کالوس نسبت به شرایط نوری خواهد شد. نتایج رضا نژاد و طراحی (۱۳۹۲) (۳) نیز تأثیر منفی نور بر رشد کالوس را تأیید نمود. این در حالی است که برخلاف نتایج تحقیق حاضر، سیدیک و همکاران (۲۰۱۵) (۲۲)، پایین‌ترین میزان کالوس‌زایی (۲۴/۴۰ درصد) را در شرایط تاریکی از ریزنمونه ریشه در واریته ویرجینا تنباکو بدست آوردند. کالوس حاصله آبکی بوده و اثراتی از جنین‌زایی نشان نداد که این موضوع به اهمیت نوع ریزنمونه مورد استفاده و جهت قرارگیری نمونه روی محیط کشت و تأثیر آن روی کالوس‌زایی اشاره دارد.

گزارشی از جهت قرارگیری ریزنمونه و تأثیر آن روی کالوس‌زایی در مطالعه ژنگ و همکاران (۲۰۱۷) (۳۰) وجود دارد به نحوی که کالوس‌زایی حاصل از لیزماخیا (*Lismachia davurica*) زمانی به بالاترین میزان خواهد رسید که سطح بالایی برگ در تماس با محیط کشت قرار گیرد و این موضوع مؤید نتایج مطالعه حاضر می‌باشد که تماس سطح بالایی برگ با محیط کشت سبب تحریک و افزایش تولید کالوس و ریشه شد. همچنین مطالعه مازومدار و همکاران (۲۰۱۰) (۱۶) در ارتباط با بررسی جهت قرارگیری ریزنمونه گیاه جاتروفا (*Jatropha curas*) نشان داد زمانی که سطح‌رویی قطعات برگ در تماس با محیط کشت باشد، کالوس‌زایی بهتری صورت خواهد گرفت. مطالعه ستارم و همکاران (۱۹۹۷) (۱۸) که باهدف بررسی جهت قرارگیری برگ کوتیلدونی بر روی محیط کشت صورت پذیرفت نیز مؤید این است که وقتی قسمت انتهایی کوتیلدون در تماس با محیط باشد، مسیر باز زایی غیرمستقیم و تشکیل کالوس تحریک‌شده و کالوس باکیفیت بهتری به دست خواهد آمد.

صفت تولید ریشه مویین از کالوس باهدف ادامه تحقیقات مرتبط با بررسی قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه درکشت ریشه مویین از گزینه‌های مورد علاقه بسیاری از تحقیقات کنونی است. در آزمایش حاضر، ریشه نیز از کالوس حاصل از برخی تیمارهای مورد استفاده به دست آمد. سودمندی 2,4-D در این خصوص با نتایج آزمایشات قبلی تأیید می‌شود. براساس مطالعات قدیری و همکاران (۱۳۹۱) (۶) از ریز نمونه‌های برگ کوتیلدونی، ریشه و ساقه گیاه *Eucalyptus rubida* در محیط کشت MS حاوی ۹ تیمار هورمونی مختلف TDZ و 2,4-D جهت کالوس‌زایی و متعاقب آن اندام‌زایی از کالوس استفاده شد. بهترین نتیجه کالوس‌زایی در ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به دست آمد و تولید کالوس‌های ریشه زا نمود. طبق نتایج امیری و همکاران (۲۰۱۳) (۷) در خصوص تأثیر سطوح مختلف 2,4-D در محیط کشت MS بر روی کالوس‌زایی حاصل از ریز نمونه‌های برگ و شاخه دو لاین بذر حقیقی سیب‌زمینی مشخص شد که غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بالاترین میزان تشکیل کالوس و باز زایی ریشه از کالوس را در تمامی ریز نمونه‌های برگ، شاخه داشته است. به‌طورکلی و برطبق نتایج این تحقیق، کشت ریزنمونه برگ به نحوی که سطح بالایی آن در تماس با محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و استقرار کشت‌ها به مدت ۱ هفته تحت رژیم تاریکی بهترین میزان تولید کالوس و ریشه حاصل از کالوس را در

پی خواهد داشت. بهینه‌سازی شرایط کشت بر طبق نتایج فوق می‌تواند جهت پایه‌ریزی تولید کالوس جهت باز زایی غیرمستقیم، کشت سوسپانسیون سلولی و نیز کشت ریشه مویین برای تولید متابولیت‌های ثانویه خاص در مطالعات آتی مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

منابع

۱- پیروز، م.، امیری، ح.، و دوستی، ب.، ۱۳۹۵. بررسی کالزایی و باز زایی گیاه دارویی آویشن دنایی (*Thymus daenensis Celak*)، دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۳۲ ، شماره ۶، صفحات ۹۵۸-۹۶۷.

۲- حضرتی‌جهان، ر.، زارع، ر.، دژستان، س.، شیخ‌زاده مصدق، پ.، و فرجامی‌نژاد، م.، ۱۳۹۶. تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر رشد درون شیشه‌ای فندق (*Corylus avellana*) و تولید تاکسول در کالوس، مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۳۰، شماره۳، صفحات ۵۵۹-۵۴۱.

۳- رضانژاد، ف.، و طراحی، ر.، ۱۳۹۲. اثر نور و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و تجمع آنتوسیانین در کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های مختلف در رز گالیکا (Rosa gallica L.)، مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، شماره ۲، صفحات ۱۹۵-۱۸۴.

۴- شفایی، م.، اطرشی، م.، و مختاری، آ.، ۱۳۹۳. مروری بر نقش امواج فراصوت در استخراج متابولیت‌های ثانویه، اولین کنگره ملی زیست‌شناسی و علوم طبیعی ایران، تهران، مرکز راهکارهای دستیابی به توسعه پایدار، انجمن حمایت از طبیعت ایران، https://www.civilica.com/Paper-BSCONF01-BSCONF01_064.htm

۵- شفائی، م.، ۱۳۹۴. بررسی امکان باز زایی غیرمستقیم گیاه دارویی خربزه تلخ (*Momordica charantia*) در شرایط درون شیشه، پایان‌نامه برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور، اصفهان، صفحات ۱۰۰-۱.

۶- قدیری سردرود، س.، قمری‌زارع، ع.، عصاره، م.، شهرزاد، ش.، و بخشی خانیکی، غ.، ۱۳۹۱. تأثیر هورمونهای TDZ و 2,4-D بر تولید کالوس و اندام‌زایی در گونه *Eucalyptus rubida*. دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، جلد ۲۰، شماره ۲، صفحات ۳۰۴-۳۱۳.

7- Amiri, M., Gerdakaneh, M., Mamghani, R., and Nouri, F., 2013. Effect of Different Concentrations of 2,4-D on Callus Induction and Callus root Indication in 2 Explants from True Potato (Solanum tuberosum L.) Seeds, Scientific Journal of Agronomy and Plant Breeding, 1(2), PP: 56-63

8- Balkhande, S. V., Kure, S. R., and Surwase, B. S., 2013. Influence of silver nitrat on shoot regeneration from excised meristems of Momordica cymbalaria Hook: A diminishing species, Research Journal of Biotechnology, Vol 8(2). PP: 42-27.

9- Bharathi, L. K., and John, K. j., 2013. Momordica Genus in Asia: An overview, Description and crop production, Springer, India. PP: 1-147

10- Das, J. A., Paratap, M., and Handique, J., 2013. Callus-mediated organagenesis and effect of growth regulators on production of different valepotriates in Indian valerian (Valeriana jatamansi Jones). Acta Physiol Plant. Ashiho Das, 35, PP: 55-63

11- DeKlerk, G. J., 2006. Plant hormone and tissue culture. Plant cell and tissue culture phytopathology Biochemical, PP: 17-25.

12- Devendra, N. k., Subhas, B., and Seetharam, Y. N., 2009. Callus growth and plant regeneration in Momordica dioica (Roxb.) willd. Cucurbitaceae, American-Eurasian Journal of sustainable agriculture (AENSI), 3(4), PP: 743-748.

13- Dixon, R. A., and Gonzales, R. A., 1996. Plant Cell Culture: A Practical Approach. 2nd Ed. IRL Press, PP: 1–230.

14- Konate, S., Kone, M., Kouakou, H. T., Kouadiob, J. Y., and Zouzou, M., 2013. Callus induction and proliferation from cotyledon explants in Bamvara groundnut, African Crop Science Journal, Vol. 21, No. 3, PP: 255 - 263

15- Malik, S., Zia, M., Rehman, R., and Chaudhary, M. F., 2007. In vitro plant regeneration from direct and indirect organogenesis of Momordica charantia, Pakistan Journal of biological Science, 10 (22), PP: 4118-4122.

16- Mazumdar, P., Basu, A., Paul, A., Mahanta, C., and Sahoo, L., 2010. Age and orientation of the cotyledonary leaf explants determine the

efficiency of de novo plant regeneration and Agrobacterium tumefaciens mediated transformation in Jatropha curcas, L., South African Journal of Botany, 76, PP: 337–344.

17- Ray, R., Raychoudhuri, B. A., Steele, R., and Nerurkar, P., 2010. Bitter melon (Momordica charantia) Extract inhibits Breast Cancer cell proliferation by modulating cell cycle Regulatory Genes and Promotes Apoptosis, Journal of cancer Research(Cancer Res),70, PP: 1925-1931.

18- Santarem, E. R., Pelissier, B., and Finer, J. J., 1996. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos, In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, January 1997, Volume 33, Issue 1, PP: 13-19.

19- Sagalam, S., 2017. In Vitro Propagation of Bitter Gourd (Momordica charantia L.), Scientifc Bulletin. Series F. Biotechnologies, Vol. XXI, 2017 p.

20- Shafaei, M., 2016. Bitter Gourd: A Natural Green Gold, Lambert Academic Publishing, Germany, PP: 1-50. (In English)

21- Summart, J., Panichajakul, S., Prathepha, P., and Thanonkeo, P., 2008. Callus Induction and Influence of Culture Condition and Culture Medium on Growth of Thai Aromatic Rice, Khao Dawk Mali 105, Cell Culture, World Applied Sciences Journal 5 (2), PP: 246-251

22- Siddigue, A., and Shahinul Islam, S., 2015. Effect of light and dark on callus induction and Regeneration in (Nicotiana tabacum L.), Bangladesh, J., Bot. 44(4), PP: 643-651.

23- Tang, Y., Liu, J., Liu, B., Li, X. M., Li, J., and Li, H. X., 2010. Endogenous hormone concentrations in explants and calluses of bitter melon (Momordica charanitiae L.), Journal of science and technology (INTERCIENCIA), Vol 35, 9 p.

24- Tavakkol Afshari, R., Angoshtari, R., and Kalantari, S., 2011. Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (Brassica napus L.) genotypes, Plant Omics Journal (POJ), 4(2), PP: 60-67.

25- Thiruvengadam, M., Praveen, N., and Chung, I. M., 2012. In vitro regeneration from intermodal explants of bitter melon (Momordica charantiae L.) via indirect organogenesis, African journal of Biotechnology, Vol: 11, PP: 8218-8224.

26- Usman, M., Bakhsh, K., Fatima, B., Zaman, Q., and Shah, M. H., 2015. Exploring embryogenic competence in anthers of bitter gourd (Momordica charantia L.) cultivar faisalabad long, J. Anim. Pla The Journal of Animal & Plant Sciences, 25(1), PP: 181-188.

27- Valli Khan, S., Prakash, E., and Rao, K. R., 2002. Callus induction and plantlet regeneration in Bixa oreliana L., an annatto-yielding tree, In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, March 2002, Volume 38, Issue 2, PP: 186–190.

28- Zare, K. H., Movafeghi, A., Nazemiyeh, H., and Mohammad, S. A., 2015. Effect of Culture Conditions on Callus Induction in Linum glaucum Boiss. and Noë, Russian Agricultural Sciences, 2015, Vol. 41, No. 5, PP: 311–316.

29- Zhang, M., Zhao, D., Ma, Z., Li, X., Xiao, Y., 2009. Growth and Photosynthesis capability of Momordica Grosvenori plantlets grown photoautotrophically in response to the light intensity, Hrt Science, 44(3), PP: 757-763.

30- Zhang, Y., Sun, D., and Hu, S., 2017. In vitro propagation of medicinal and ornamental plant Lysimachia davurica, Eur. J. Hortic. Sci. 82(1), PP: 54–60.

31- Zhe, H., Yuan, L., and Xinmei, J., 2009. Effects of differenets soaking time on seed germination in Balsam pear (Momordia charantiae L.) after dry heat treatment, Journal of Northeast Agriculture university, PP: 1-2009.

The effect of auxin type, explant orientation and light condition on induction of callus and the formation of hairy roots on leaf explants of medicinal plant Bitter melon (*Momordica charantia L.*)

Shafaei M.,[1] Mokhtari A.[2] and Ebrahimi M.[2]

[1] Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Plant Tissue Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-Central Branch-Isfahan; Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The bitter melon (Momordica charantia) is a medicinal herb from the Cucurbitaceae family. This herb is used as a traditional drug for the treatment of diabetes. This research was carried out with the aim of investigating the effect of the leaf orientation, auxin type and light conditions on the percentage of callus induction and the formation of hairy root from derived callus. The leaf explants were cultured in two directions (up/ down side) in a medium containing 2 types of auxins at a concentration of 2 mg /l NAA and 2,4-D, under dark and light conditions. The highest callogenesis (95.40%) and induction of roots (40.60%) were obtained when the upper surface of the leaf placed on the Murashige and Skoog (MS) medium contained 2 mg /l 2,4 -D under the dark condition. These results indicate that dark condition has a significant effect on stimulating and increasing of callus induction ($P \leq 0.05$) and 2, 4-D was the better auxin compared to NAA for induction of callus and subsequently roots on the leaf-derived callus tissues.

Key words: *Momordica charantia*, Callus, Light, Explant Orientation