فصلنامه (علمی – پژوهشی)
زیست شناسی تکوینی
سال یازدهم، شماره ۲، بهار ۱۳۹۸ ص ۷۵-۶۵

مقاله پژوهشی

اثر ترکیب‌های مختلف تنظیم کننده رشد بر ماده‌زایی توده‌های تره ایرانی (*Allium ampeloprasum* Taree group) در محیط درون شیشه‌ای

محمد جواد شکوری[۱]، محمد رضا حسندخت[۲]، سپیده کلاته جاری*[۱]، کامبیز لاریجانی[۳]، فائزه قناتی[۴]

[۱] گروه باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[۲] گروه باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
[۳] گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[۴] گروه تولیدات گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* Email: kalatejari@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۰۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۳۱

چکیده

سبزی تره ایرانی در زنجیره غذایی مردم ایران از جایگاه ویژه ای برخوردار است و توده‌های زیادی از آن با ویژگی‌های متفاوت در مناطق مختلف ایران کاشته و سازگاری یافته‌اند. لذا به منظور بهنژادی در این سبزی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در هفت توده منتخب انجام پذیرفت. از ترکیب های مختلف تنظیم‌کننده رشد 2,4-D به غلظت‌های صفر، ۲، ۴ میلی‌گرم بر لیتر و BA با غلظت صفر، ۲، ۴ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت‌ها استفاده گردید. تیمارها بر چتر گل‌های باز نشده انجام شد و درصد رویان‌زایی، درصد باززایی، درصد بقا، درصد شیشه‌ای شدن، درصد کالوس‌زایی ریزنمونه ها و تعداد گیاهان هاپلوئید مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد توده شادگان در محیط کشت حاوی۴ میلی گرم در لیتر BA و ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D دارای بیشترین درصد رویان‌زایی (۱۲/۸۱٪) و درصد باززایی(۱۲/۶٪) بود. در توده اراک بیشترین درصد کالوس زایی (۰/۵۱٪) و در توده شادگان کمترین (۰/۱۶٪) میزان مشاهده شد. از مجموع ۴۲۵۲۵ گل کشت شده، ۱۰۰۱ رویان(۲/۳۵ ٪) و ۹۷۲ باززائی(۹۷/۱ ٪) و ۹۴۶ گیاه (۹۴/۵٪) بقا یافتند. در مجموع هفت گیاه هاپلوئید به دست آمد که بیشترین تعداد هاپلوئیدی مربوط به توده گیلان به تعداد ۴ گیاه از مجموع ۶۰۷۵ گل کشت شده و در محیط کشت دارای۴ میلی گرم در لیتر BA و ۲ میلی گرم در لیتر-2,4 D بود.

کلیدواژه‌ها: به‌نژادی، کشت گل، رویان زایی، باززایی.

مقدمه

تره ایرانی (*Allium ampeloprasum* Taree group) گیاهی دو ساله و تتراپلوئید (۲n=٤x=۳۲) از خانواده Alliaceae و بومی ایران می‌باشد [۱۹]. تره از جمله سبزی‌های برگی و پرمصرف در ایران می باشد که بصورت خام و یا پخته در انواع غذاهای ایرانی استفاده می شود [۳]. آمار دقیقی از میزان عملکرد و سطح زیر کشت تره در ایران در دسترس نیست اما با توجه به سازگاری بالای این سبزی به انواع شرایط آب و هوایی، کشت و پرورش آن در تمام نقاط ایران رایج است. بسیاری از توده های تره ایرانی دارای صفات کیفی مطلوبی می‌باشند اما با توجه به پراکنش وسیع و تنوع خصوصیات مورفولوژیکی در کشور، برنامه های اصلاحی محدودی روی این توده ها صورت گرفته است. توده‌های تره ایرانی هتروزیگوت هستند و به علت ناهمرسی از نوع پروتاندری[1]، گیاهی دگرگشن می‌باشند [٤]. برای تولید بذر هیبرید F1 لازم است از آنها لاین خالص تهیه شود. خالص سازی از طریق تولید هاپلوئید راه را برای دستیابی به سایر هدف های به‌نژادی و تولید سریع‌تر هیبرید F1 هموار می‌سازد [۸]. مزیت تولید لاین خالص از طریق تولید جنین هاپلوئید نسبت به روش‌های سنتی، دستیابی در مدت زمان کوتاهتر به لاین خالص است. اگرچه در صورت وجود آلل‌های نامطلوب نهفته، هاپلوئید کردن و به دنبال آن دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌ها منجر به هموزیگوت شدن آلل نامطلوب و بروز صفات نامطلوب خواهد شد [۱،۲]. تحقیقات حاکی از آن است تره هیچ واکنشی به نرزائی[2] نشان نمی‌دهد [٤] و کشت تخمک [۸]، تخمدان و گل کامل [۱۵] می تواند به تولید گیاهان هاپلوئید در پیاز و تره بیانجامد.

اثر ترکیب‌های مختلف تنظیم کننده رشد در محیط‌های کشت، بر رویان‌زایی گونه‌های گیاهی مطالعه گردیده است و تاثیر مثبت 2,4-D و BA بر رویان‌زایی آنها توسط محققین گزارش شده است [٤] بطوری که Muren [۱۸] از 2,4-D و BA هر کدام به مقدار ۲ میلی‌گرم در محیط‌کشت پیاز خوراکی استفاده نمود. این ترکیب به عنوان یک ترکیب استاندارد از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی جهت رویان‌زایی شناخته شده است. همچنین این آزمایش نشان داد ژنوتیپ یکی از عوامل موثر مهم در واکنش به روش ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای پیاز است. زنگویی[۸] نشان داد اسپرمیدین در دو غلظت ۰/۵ و ۱ میکرومولار، بدون تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر ماده‌زایی پیاز تاثیر مثبت نداشت و نمی‌بایست جایگزین 2,4-D و BA شود. Campion *et al.* [۸] به این نتیجه دست یافتند 2,4-D بهتر از NAA در محیط کشت پیاز خوراکی می‌باشد و استفاده از ماده‌زایی برای تولید گیاهان هاپلوئید و لاین خالص در محیط دارای2,4-D کارایی بهتری دارد. همچنین قهرمانی و همکاران [٤] از ترکیب ۰، ۲و٤ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در BA در محیط‌کشت تره ایرانی استفاده نمودند این تحقیق نشان داد بیشترین درصد رویان‌زایی و باززایی گیاه (۲۵ درصد) در توده گرگان و میانه در محیط‌کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر2,4-D بدست آمد. این آزمایش نشان داد کشت گل گرده افشانی نشده روش موثری بر ماده‌زایی تره ایرانی در محیط درون شیشه‌ای

[1] Protandry
[2] Androgenic

است[٤] با توجه به ارزش غذایی – دارویی تره ایرانی و نیاز به تولید ارقام جدید با استفاده از ژرم پلاسم های بومی، در این پژوهش به بررسی اثر غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد BA و 2,4-D بر القای ماده زائی هفت توده منتخب تره ایرانی در محیط کشت درون شیشه ای اقدام گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این آزمایش بذرهای دوازده توده تره ایرانی از نقاط مختلف ایران (قزوین، لنگرود، زنجان، اصفهان، آبادان، ورامین، شادگان، ساری، اراک، کرمان، کرج، سمنان) جمع‌آوری شدند. از میان توده های کشت شده، هفت توده (قزوین، لنگرود، زنجان، اصفهان، شادگان، ساری، اراک) با خصوصیات زراعی مطلوب (جدول۱) انتخاب شدند.

در ارزیابی صفات گیاه تره ایرانی از مطالعات موسوی و همکاران [۱۷] استفاده شد. این محققین به بررسی خصوصیات مورفولوژی همچون ساختار پرچم، شکل گلبرگ و غیره گیاه تره ایرانی پرداختند و دریافتند تره ایرانی در یک گروه مجزا از سایر تره ها می باشد. تجزیه و تحلیل آنها نشان داد که تره ایرانی زیرمجموعه *A. ampeloprasum* قرار دارد.

کشت و کار در محیط درون شیشه ای

برای ماده‌زایی، گل‌ها در مرحله‌ای که ۱۰٪ گلچه‌ها باز شدند، برداشت شدند. گلچه‌های باز شده دور ریخته و از گلچه‌های بسته به عنوان مواد گیاهی آزمایش استفاده شد (شکل ۱). با توجه به آلودگی سطحی ریزنمونه ها از ترکیب الکل اتانول ٪۷۰ (به مدت ۳۰ ثانیه و ۳ بار آبکشی)، کلرید جیوه ٪۰/۱ (به مدت ۵ دقیقه و ۳ بار آبکشی) و هیپوکلرید سدیم ٪۲/۵ (به مدت ۸ دقیقه و ۳ بار آبکشی) جهت ضدعفونی استفاده شد. سپس گلچه‌ها با دم کوتاه ۲ میلی‌متری روی محیط‌کشت القایی I حاوی سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D و BA کشت شدند (جدول۲). محیط‌کشت ریزنمونه‌ها حاوی عناصر پرمصرف محیط LS [۱۰] و عناصر کم مصرف محیط‌کشت B5 [۱۱] و ویتامین‌های اسید نیکوتینیک، پیریدوکسین، تیامین، ٦ گرم در لیتر آگار،۱۰۰گرم در لیتر ساکاروز و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین بود. ترکیب‌های مختلفی از تنظیم-کننده‌های رشد 2,4-D به غلظت‌های صفر، ۲، ٤ میلی‌گرم بر لیتر و BA با غلظت صفر، ۲، ٤ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت‌ها استفاده شد. pH محیط کشت روی ۵/۸ تنظیم شد.

طرح مورد بررسی

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و در هر تکرار ۱۰ پتری-دیش و در هر پتری‌دیش بطور میانگین ۱۵ گل انجام پذیرفت. فاکتور اصلی در این آزمایش شامل نوع تنظیم کننده های رشد(BA و 2,4-D) و فاکتور فرعی سطوح مختلف تنظیم کننده رشد به میزان ۰، ۲و٤ میلی گرم در لیتر برای هر تنظیم کننده رشد بود. متغیر وابسته شامل میزان درصد رویان‌زایی، درصد باززایی، درصد بقا، درصد شیشه‌ای شدن، درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها و تعداد گیاهان هاپلوئید بود که مورد بررسی قرار گرفت.

محیط‌کشت‌های مورد استفاده در ماده‌زایی توده‌های تره ایرانی

به منظور بقا ریز نمونه‌ها، گل‌های متورم شده ۳۰ تا ۵۰ روز پس از کاشت در محیط‌کشت القائی I به محیط کشت القائی II که حاوی عناصر کم مصرف B5 و عناصر پرمصرف LS و ساکارز به میزان ۱۰۰ گرم در لیتر و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به میزان ۳۰ گرم در لیتر بود، انتقال داده شد. از هیچ تنظیم کننده رشدی در این محیط کشت استفاده نشد. رویان های حاصل از تخمک گل‌های متورم شده پس از ظهور در شرایط استریل جدا شد و به محیط‌کشت باززایی، شامل محیط کشت حاوی عناصر کم مصرف B5 و عناصر پرمصرف LS بدون تنظیم کننده رشد گیاهی و ساکارز به میزان ٤٠ گرم در لیتر انتقال داده شد (جدول ۳). رویان ها ۱۰ الی٦٠ روز پس از انتقال به محیط باززایی به گیاه کامل تبدیل شدند. پتری‌دیش‌ها در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۲ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

درصد رویان‌زایی(تعداد رویان مشاهده شده در هر ۱۰۰ گل کشت شده)، درصد باززایی(تعداد گیاهان باززایی شده در هر ۱۰۰ گل کشت شده)، درصد بقا(تعداد گیاه باززایی شده از هر ۱۰۰ جنین)، درصد شیشه‌ای شدن، درصد کالوس‌زایی در طول انجام آزمایش و تعداد گیاهان هاپلوئید در محیط کشت باززائی ریز نمونه ها مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول۱- مشخصات صفات زراعی مطلوب توده های منتخب

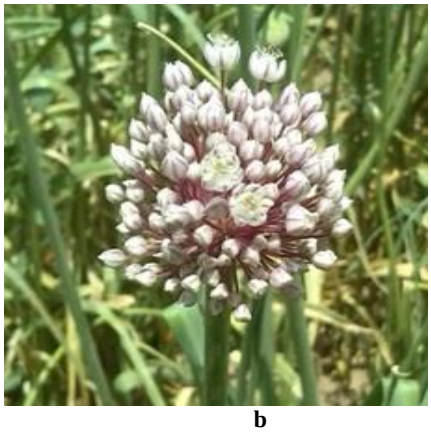
توده	صفات زراعی مطلوب
شادگان	دیرگل بودن، درصد ماده خشک بالا، تعداد گلچه بالا، ضخامت برگ، مقدار آلیسین بالا
قزوین	دیرگل بودن، درصد ماده خشک بالا، عرض برگ مناسب، تعداد دفعات چیدن برگ
گیلان	تعداد برگ، وزن تر بالا، تعداد دفعات چین برگ، آلیسین بالا
اراک	طول برگ بالا، تعداد گلچه بالا، وزن خشک بالا
اصفهان	دیرگل بودن، ضخامت برگ، درصد ماده خشک، تعداد دفعات چین برگ، مقدار آلیسین بالا
مازندران	تعداد گلچه بالا، وزن تر بالا، طول برگ بالا، مقدار آلیسین بالا
زنجان	وزن تر بالا، تعداد گلچه بالا، بیشترین مقدار آهن

جدول ۲- ترکیب محیط کشت القائی I حاوی سطوح مختلف تنظیم کننده رشد BA و2,4-D

ترکیبات	محیط کشت								
	D4B4*	D4B2	D4B0	D2B4	D2B2	D2B0	D0B4	D0B2	D0B0
عناصر پرمصرف محیط کشت پایه LS	+	+	+	+	+	+	+	+	+
عناصرکم مصرف محیط کشت پایه B5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ساکارز(گرم در لیتر)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
2,4-D(میلی گرم در لیتر)	٤	٤	٤	۲	۲	۲	۰	۰	۰
BA(میلی گرم در لیتر)	٤	۲	۰	٤	۲	۰	٤	۲	۰

*

B مخفف BA، D مخفف 2,4-D و اعداد بیانگر میزان مورد استفاده(میلی گرم در لیتر) می باشد.



b a

شکل۱- نمایی از اسپات بسته (a)، نمایان شدن گلچه‌های بسته یا باز شده پس از شکافتن اسپات(b)

جدول ۳- ترکیب محیط کشت القائیII و محیط کشت باززائی مورد استفاده در ماده زائی توده‌های تره ایرانی

ترکیبات	محیط کشت القائی II	محیط کشت باز زائی
عناصر پرمصرف محیط کشت پایه LS	+	+
عناصرکم مصرف محیط کشت پایه B5	+	+
ساکارز(گرم بر لیتر)	۱۰۰	٤۰

بررسی سطح پلوئیدی

جهت تعیین سطح پلوئیدی گیاهان باززایی شده از روش تغییر یافته فولگن (Feulgen stain) استفاده شد[۹] بدین منظور مریستم‌های نزدیک به انتهای ریشه قطع گردید و با کلشی سین ۰/۱ ٪ به مدت سه ساعت تیمار شد. پس از حذف کلشی سین چند میلی لیتر محلول کارنوی (۲۵۰ میلی‌لیتر استیک اسید خالص و ۷۵۰ میلی‌لیتر اتیلیک الکل خالص) به ریشه افزوده شد و ریشه‌ها به مدت ٢٤ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. سپس سه میلی‌لیتر کلرید و یک اسید نرمال به ریشه‌ها تزریق و نمونه‌ها در بن ماری جوشان با دمای ٦۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. پس از آن اسید حذف و معرف شیف به نمونه‌ها داده شد و نمونه‌ها به مدت دو ساعت در تاریکی قرار گرفتند. جهت حذف معرف شیف دوبار شستشو با آب معمولی انجام گردید و چند میلی‌لیتر اتیل الکل ۷۵ درجه افزوده شد و نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور مشاهده کروموزوم‌ها قسمت انتهای ریشه روی لام قرار داده شد و پس از افزودن یک قطره استوکارمن و قرار دادن لامل روی آن، با زدن ضرباتی توسط انتهای اسکالپل و فشار دادن لامل با نوک انگشت، سلول‌ها از هم جدا و با میکروسکوپ معمولی تعداد کرومزوم‌های متافازی شمارش گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۸,۷ و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

مشاهدات رشدی گلچه ها

پس از کشت ریزنمونه‌ها، اولین رویان در توده

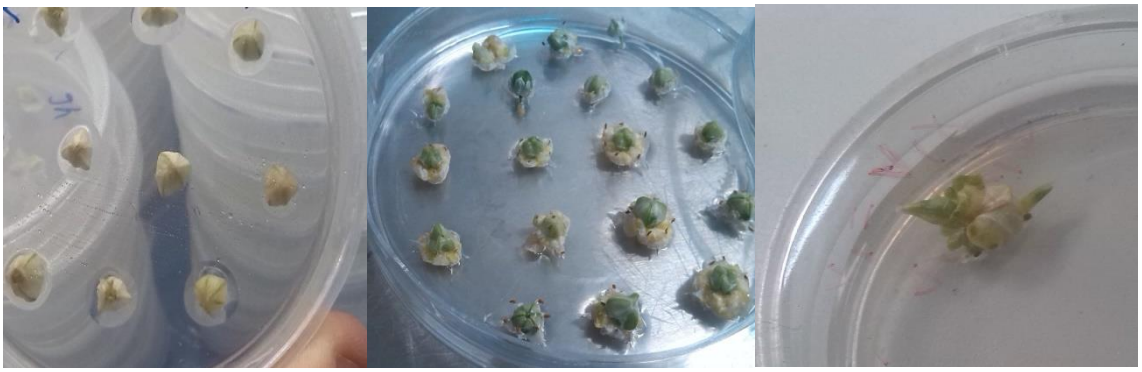
گیلان و در محیط کشتBA (۲ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (٤ میلی گرم در لیتر) در روز ٤١ و آخرین رویان مربوط به توده شادگان در روز ۱۵۲ و در محیط کشت BA(۲ میلی‌گرم در لیتر) و بدون 2,4-D مشاهده شد. شکل۲ مراحل رشدی کشت، رویان زائی، باززائی و بقاء را نشان می دهد.

نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی

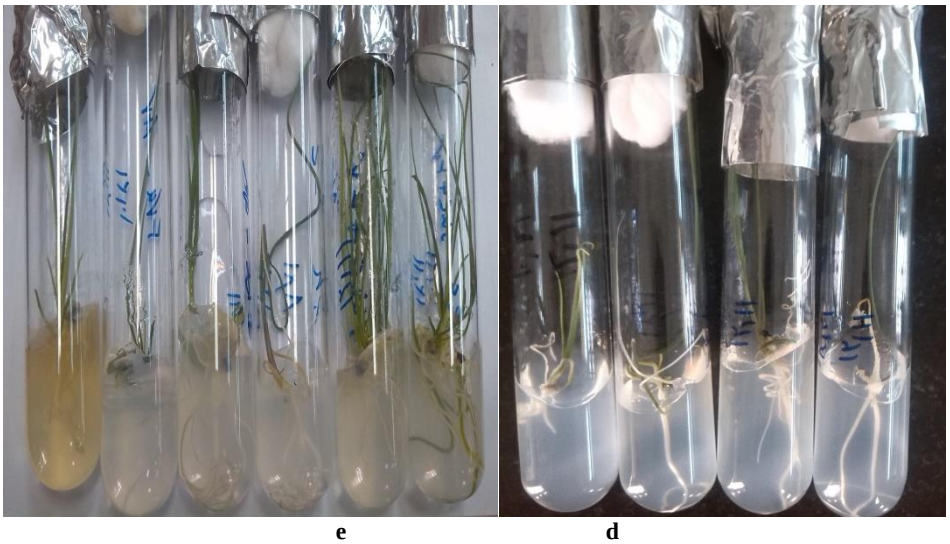
براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ٤) اثر محیط‌کشت و نیز توده بر درصد رویان‌زایی، درصد باززایی، درصد بقای گیاه، درصد کالوس‌زائی و درصد تشکیل گیاه هاپلوئید در سطح ۱درصد معنی دار بود. اثر متقابل محیط‌کشت و توده بر درصد رویان‌زایی، درصد باززایی و درصد تشکیل گیاه هاپلوئید در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود، اما بر صفات درصد بقا و درصد کالوس زائی معنی‌دار نبود.

نتایج مقایسه میانگین صفات مورد بررسی

نتایج نشان داد محیط‌کشت B4D2 (٤ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) دارای بیشترین میزان رویان‌زایی (۱۲/۸۱٪) و باززائی (۱۲/٦٪) بود (نمودار ۱ و۲). به‌طورکلی استفاده از محیط‌های دارای تنظیم‌کننده رشد BA و 2,4-D به صورت توام نتیجه موثری بر رویان‌زایی داشت. Campion et al [۹] دریافتند در کشت گل، 2,4-D بهتر از NAA است و نتیجه موثری بر رویان‌زایی پیاز خوراکی داشت.



C b a



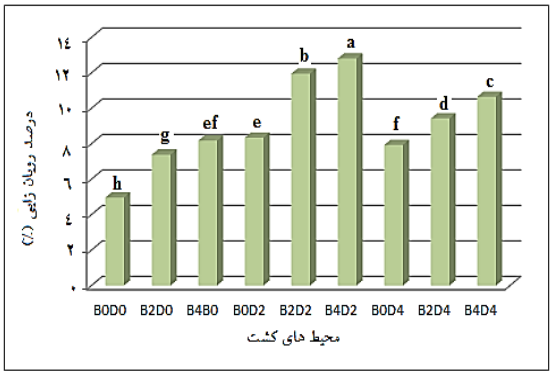
e d

شکل۲- مراحل رشدی کشت. کشت گلچه(a)، رشد جنین(b) ، رویان زائی(c)، باززائی(d) و بقا(e)

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس صفات رویان‌زایی، باززایی، بقای گیاه، کالوس‌زایی، هاپلوئیدی در هفت توده تره ایرانی

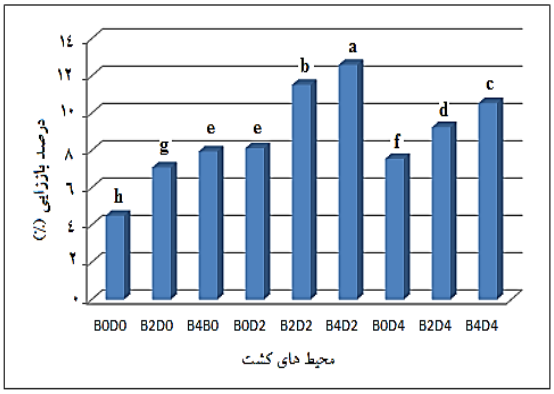
		میانگین مربعات				
منابع تغییرات	درجه آزادی	رویان زائی	باز زائی	بقای گیاه	کالوس زایی	هاپلوئید
محیط کشت	۸	۱۲٤/۰٦**	۱۲۸/۸۹**	۲۰۰/٦۷**	۰/۹٥**	۰/۱٦**
توده	٦	۱۳٥/۱۲**	۱۲۸/٤٤**	۱۸۳/۸۱**	۰/۳۲**	۰/۱۲**
محیط کشت* توده	٤۸	۲/۷۱**	۲/۲٦**	۳۷/٦٤^{ns}	۰/۱۰٦^{ns}	۰/۰٤*
خطای آزمایش	۱۲٤	۰/۲٥	۰/۳٥	٥۹/۳٤	۰/۱۰۱	۰/۰۲

**: تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد و ns : عدم تفاوت معنی‌دار



نمودار ۱ مقایسه میانگین محیط‌های کشت از نظر رویانزایی

همچنین نتایج بدست آمده توسط قهرمانی و همکاران[٤] نیز نشان داد محیط‌کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D دارای بیشترین رویان زایی و باززایی در تره ایرانی بود و بر اثربخشی BA و2,4-D حکایت داشت که مطابق نتایج این تحقیق بود.



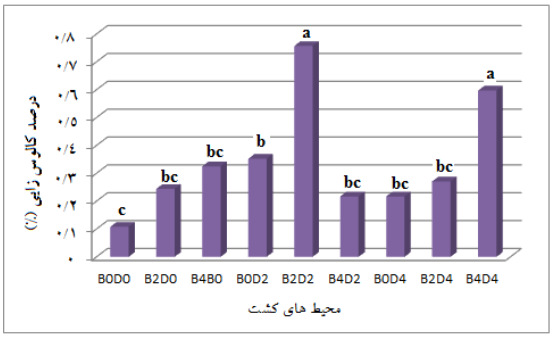
نمودار ۲ مقایسه میانگین محیط‌های کشت از نظر باززایی

درصد بقای گیاه تقریبا در تمامی محیط‌های کشت مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (نمودار ۳). محیط کشت‌های B4D4 (٤ میلی‌گرم در لیتر BA و ٤ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) و B2D2 (۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) بیشترین میزان کالوس‌زایی (به ترتیب ۰/۵۹۷٪ و ۰/۷۸۷٪) و محیط‌کشت B0D0 (بدون دو تنظیم کننده رشد BA و 2,4-D) کمترین (۰/۱۰۸٪) میزان کالوس‌زایی را نشان داد (نمودار ٤).

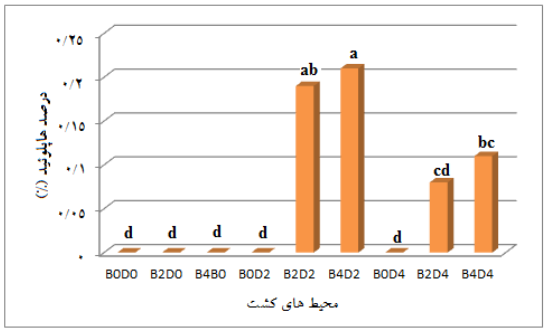
نتایج نشان داد محیط‌های کشت دارای ترکیب توام BA و 2,4-D به میزان ۲و٤ میلی‌گرم در لیتر، سبب تولید گیاه هاپلوئید شد و فقدان هریک از تنظیم کننده‌های رشد منتج به عدم تولید گیاه هاپلوئید گردید (نمودار ٥). این نتیجه با مطالعه صورت گرفته توسط قهرمانی و همکاران[٤] یکسان بود.

نمودار ۳ مقایسه میانگین محیط های کشت از نظر باززایی

نتایج آزمون مقایسه میانگین توده‌های تره ایرانی مورد مطالعه (جدول۵) نشان داد توده شادگان دارای بیشترین درصد رویان‌زایی (۱۲/۵٤٪) و درصد باززایی (۱۲/۲۵٪) بود و در گروه برتر نسبت به سایر توده‌ها قرار گرفت، لذا به نظر می‌رسد که این توده از پتانسیل ژنتیکی خوبی جهت اهداف به‌نژادی برخوردار باشد. کمترین درصد رویان‌زایی و باززایی به ترتیب با میزان‌های (٦/۳٤٪ و ٦/۰۷٪) مربوط به توده زنجان بود.



نمودار ٤ مقایسه میانگین محیط‌های‌کشت از نظر کالوس‌زائی



نمودار ۵ مقایسه میانگین محیط‌های کشت از نظر هاپلوئید

پتانسیل ماده‌زایی در ژنوتیپ‌ها

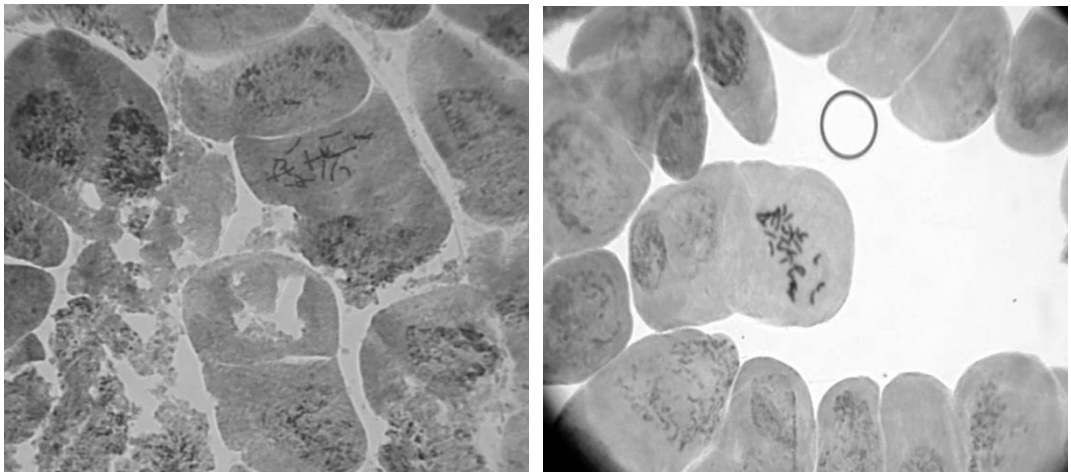
اثر ژنوتیپ بر ماده‌زایی در پیاز خوراکی(Allium cepa L.) توسط Geoffriau et al [۱۲]، Alan et al., [۵] و Hassandokhtand and Campion [۱٤] به اثبات رسیده است. نتایج این محققین بر واکنش پذیری انواع ارقام مختلف پیاز خوراکی بر القا جنین‌زایی و تولید گیاهان هاپلوئید حکایت دارد که نشان دهنده اثرات ژنوتیپی توده‌ها بر ماده‌زایی بود. Bohanec [٦] علت نوسان داشتن پتانسیل ماده زایی در ژنوتیپ‌ها را وجود برخی ژن‌ها در گیاهان باززایی شده ماده زا می داند.

نتایج بدست آمده از این آزمایش با نتایج Muren [۱۸] با رویان‌زایی پایین در ژنوتیپ‌های مختلف پیاز خوراکی مطابقت داشت، ولی با نتایج Geoffriau et al. [۱۳] و Bohanec and Jakse [۷] و Alan et al. [۵] در مورد برخی از ژنوتیپ‌ها که درصد رویان‌زایی بالایی نشان دادند، متفاوت بود. علت بالا بودن درصد رویان‌زایی در برخی ژنوتیپ‌ها به دلیل تولید لاین خالص گیاهان به جهت حذف ژن‌های نامطلوب احتمالی در این ژنوتیپ‌ها بود. نتایج بررسی میانگین توده‌های تره ایرانی از نظر درصد بقاء (جدول ۵) نشان داد درصد بقا در تمام توده‌ها بالا بود. مقایسه میانگین میزان کالوس زایی توده‌های تره ایرانی (جدول۵) نشان داد توده اراک دارای بیشترین درصد کالوس زایی (۰/۵۰٦٪) و کمترین کالوس تشکیل شده مربوط به توده شادگان بود. از آنجا که صفت کالوس‌زایی در ماده‌زایی ایجاد مزاحمت می‌کند، استفاده از توده شادگان در امور به‌نژادی حائز اهمیت می باشد. همچنین مقایسه میانگین میزان تشکیل گیاه

هاپلوئید توده‌های تره ایرانی(جدول۵) نشان داد توده گیلان دارای بیشترین درصد هاپلوئیدی (۰/۲٪) بود و توده‌های قزوین و اصفهان هیچ گیاه هاپلوئیدی تشکیل نداد. سایر توده ها دیپلوئید بودند(شکل۲).

جدول ۵–مقایسه میانگین توده‌های کشت از نظر رویان‌زایی، باززایی، بقای گیاه، کالوس‌زایی، هاپلوئیدی در هفت توده تره ایرانی

صفات/ توده	رویان زائی (٪)	باز زائی (٪)	بقای گیاه (٪)	کالوس زایی (٪)	هاپلوئید (٪)
H1 شادگان	۱۲/۵٤a	۱۲/۲۵a	۹۵/٦۷ab	۰/۱٦c	۰/۰۸b
H2 قزوین	۸/۸۸d	۸/۷۵c	۹۷/۸۵a	۰/۳۸ab	۰c
H3 گیلان	۱۱/٤b	۱۰/۹۳b	۹۲/٤۲bc	۰/۲۵bc	۰/۱۹a
H4 اراک	۹/۳۷c	۹/۰۱c	۹۳/۱۹bc	۰/۵۱a	۰/۰۲۱b
H5 اصفهان	۷/٤٤e	۷/۲۷d	۹۵/۵٦ab	۰/۳۳abc	۰c
H6 مازندران	۷/۵۵e	۷/۲۹d	۹۱/٦۲bc	۰/۳۸ab	۰/۰۸b
H7 زنجان	٦/۳٤f	٦/۰۷e	۹۰/۵۲c	۰/٤۰ab	۰/۰۸b



شکل۳– نمایی از کروموزوم‌های دیپلوئید در توده اصفهان (سمت راست) و هاپلوئیدی در توده گیلان (سمت چپ) گیاه تره ایرانی با استفاده از روش رنگ‌آمیزی Feulgen

نتایج اثر متقابل توده و محیط‌کشت

بیشترین میزان رویان‌زایی و باززایی مربوط به توده شادگان در محیط کشت B4D2 (٤ میلی‌گرم در لیتر BA و دو میلی گرم در لیتر 2,4-D) بود. این ترکیب تیماری به ترتیب با میانگین تولید ۱٤/۲۸٪ و ۱٤/۰۹٪ رویان‌زایی و گیاه باززایی شده، بیشترین درصد رویان‌زایی و باززایی را به خود اختصاص دادند. توده زنجان با میانگین ۱/۷۱٪ رویان و ۱/۳۳٪ گیاه باززایی شده در محیط‌کشت B0D0 (محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد) کمترین درصد رویان‌زایی و باززایی را به خود اختصاص دادند. نتایج Campion and Alloni [۸] نشان داد تنظیم کننده‌های رشد مختلف (IAA, 2,4-D, NAA, ABA) بر رویان زایی رقم‌های ایتالیایی پیاز (*Allium cepa* L.)

اثربخش بودند و عملکرد القا جنین در بهترین شرایط این تحقیق (۰/۲۸٪) بود. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل توده و محیط‌کشت نشان داد تمام توده‌ها در کلیه محیط کشت‌ها از درصد بالایی بقای گیاه برخوردار بودند. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل توده و محیط کشت نشان داد که توده‌های مازندران در محیط‌کشت B4D0 (٤ میلی‌گرم در لیتر BA و بدون 2,4-D) دارای بیشترین میزان کالوس‌زایی بود. بیشترین هاپلوئیدی در توده گیلان و محیط B4D2 (٤ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) مشاهده شد. بطور کلی نتایج نشان داد بیشترین درصد رویان زائی و باززائی مربوط به محیط‌کشت دارای BA (٤ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) بود. در بین توده‌های مختلف، توده شادگان بیشترین تعداد رویان‌زائی و باززائی را به خود اختصاص داد. کالوس‌زائی در تمامی محیط‌های کشت و توده‌ها مشاهده شد. بیشترین کالوس در محیط کشت حاوی BA (۲ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۲ میلی گرم در لیتر) و در توده اراک مشاهده شد. شیشه‌ای شدن مشاهده نگردید. شیشه‌ای شدن در بررسی صورت گرفته توسط قهرمانی و همکاران در تره ایرانی نیز مشاهده نشد [٤]. از مجموع ٤۲٥۲٥ گل کشت شده، ۱۰۰۱ رویان (۲/۳٥ ٪) و ۹۷۲ باززائی (۹۷/۱ ٪) و ۹٤٦ گیاه (۹٤/٥٪) بقا یافتند. در مجموع ۷ گیاه هاپلوئید مشاهده شد که بیشترین تعداد هاپلوئیدی مربوط به توده گیلان به تعداد ٤ گیاه از مجموع ٦۰۷٥ گل کشت شده و در محیط‌کشت دارای ٤ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. میزان پایین هاپلوئید تولید شده در تحقیق Campion and Alloni [8] نیز مشاهده گردید بطوری‌که از مجموع ۲٦۰۰۰ گلچه کشت شده پیاز (*Allium cepa* L.)، ۱۳ جنین به دست آمد و ۷ جنین به گیاه هاپلوئید تبدیل شد.

این پژوهش بر اثرپذیری ماده‌زایی تحت اثر تنظیم کننده‌های رشد BA و 2,4-D در محیط‌کشت درون شیشه‌ای اذعان داشت و نشان داد استفاده از گلچه گرده افشانی نشده روشی کارا در القای ماده‌زایی تره ایرانی خواهد بود. نوع توده‌ها نیز بر القا ماده‌زایی اثرات متفاوتی داشت که می‌توان علت این امر را تفاوت پتانسیل ماده‌زایی در ژنوتیپ‌ها دانست که می‌توان با تلاقی ژنوتیپ‌های توده های برتر میزان ماده‌زایی را بهبود بخشید.

منابع

[۱] ارزانی، ا. ۱۳۸۹. اصلاح گیاهان زراعی. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان، ٦۰٦ صفحه.

[۲] زنگویی، ژ، م ر، حسندخت و ع ا، کاشی ع. ۱۳۹٤. اثر اسپرمیدین بر ماده‌زایی شش توده پیاز خوراکی بومی استان خراسان در محیط درون شیشه‌ای. مجله علوم باغبانی ایران، دوره ٤٦، شماره ۲، ص۲۳۱-۲۲٥.

[۳] شمیلی، م و ع، کاشی. ۱۳۸٦. بررسی اثرات تراکم و زمان کاشت بر خصوصیات رویشی و زایشی تره ایرانی. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد۳۸، صفحه ۲٥٦-۲٥۱.

[٤] قهرمانی، ز، م ر، حسندخت، ه ا، کاشی، م، امیدی و م، جعفرخانی کرمانی. ۱۳۹۲. واکنش برخی توده‌های تره ایرانی به ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای. مجله علوم باغبانی ایران، دوره٤٤. شماره۱، ص ۸۰-۷۳.

[5] Alan, A.R., Brants, A., Cobb, E., Goldschmied, P.A., Mutschler, M.A., Earle E.D. 2004. Fecund gynogenic lines

from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. Plant Science, 167: 1055-1066.

[6] Bohanec, B. 2002. Double-haploid onions. In: Rabinowich, H.D., Currah, L. (ed.): Allium Crop Science - Recent Advances. CABI, London. 145-157.

[7] Bohanec, B., Jakse, M. 1999. Variation in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. Plant Cell Report, 18: 737-742.

[8] Campion, B., Alloni, C. 1990. Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules.

[9] Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 20 (1): 1-6.

[10] Campion, B., Perri, E., Azzimonti, M.T. 1995. Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.). Plant Breeding, 114: 243-246.

[11] Dunstan, D.I., Short, K.C. 1977. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. Physiol Plant, 41: 70-72.

[12] Gamborg, OL, Miller, RA, Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soyabean root cells. Experimental cell research. 50:151-158.

[13] Geoffriau, E., Kahane, R., Martin-Tanguy, J. 2006. Polyamines are involved in the gynogenesis process in onion. *Physiologia Plantarum*, 127: 119-129.

[14] Geoffriau, E., Kahane, R., Rancillac, M. 1997. Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). Euphytica, 94: 37–44.

[15] Hassandokht, M.R., Campion, B. 2002. Low temperature, medium and genotype effect on the gynogenic ability of onion (*Allium cepa* L.) flowers cultured *in vitro*.

Advance in Horticulture Science, 16: 72-78.

[16] [Keller, J. 1990. Culture of un-pollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction *via* gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). Euphytica, 47 (3): 241-247.

[17] Martinez, L., Aguero, C., Lopez, M.E., Galmarini, C.R. 2000. Improvement of *in vitro* gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines. Plant Science, 156: 221-226.

[18] Mousavi, A., Kashi, A., Davoodi, D., Sanei Shariatpanahi, M. 2006. Characterization of an allium cultivated in Iran: the Persian leek. *Belgian Journal of Botany*, 139 (1): 115-123.

[19] Muren, P. 1989. Haploid plant induction from un-pollinated ovaries in onion. HortScience, 24: 833–834.

[20] Vander Meer, Q.P. 1997. Old and new crops within edible Allium. Acta Hort. 433: 17-31.

[21]

The effect of various growth regulator compounds on gynogenesis of *Allium ampeloprasum* Taree group in vitro

Shakouri M.[1], Hassandokht M.[2], Kalateh Jari S.[1*], Larijani K.[3], Ghanati F.[4]

[1] Department of Horticultural Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Horticulture, Univ. College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
[3] Department of Chemistry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[4] Department of Plant Biology Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran

[*] Email: kalatejari@yahoo.com

Received: 30 June 2018 Accepted: 22 September 2018

Abstract

Persian leek (*Allium ampeloprasum* Taree group) has a special place in Iraninan's food chain. Many accessions by different characteristics have been cultivated and adapted in different regions of Iran. In order to investigate the breeding of this vegetable, an experiment was conducted in a randomized complete block design in three replications. For this purpose, 7 accessions of Persian leeks were selected. Various growth regulator componds2, 4 D at 0, 2 and 4 mg/lit and BA with 0, 2 and 4 mg/l were used in culture medium. The treatments were done on unopened flowers' umbrella and embryogenesis, regeneration and callus percentages of micro samples and the number of haploid plants were measured. The results indicated that Shadegan accessions in culture medium including 4 mg/l BA and 2 mg/l D-4,2 had the highest Percentage of embryogenesis (12.81 %) and regeneration (12.6%). The highest percentage of callus (0.51%) and lowest percentage of callus (0.16%) have been observed in arak and shadegan accession, respectively. Out of 42525 flowers cultivated, 1001 embryo (2.35%), 972 regenerate (97.1%) and 946 plants (94.5%) have survived. Eventually, seven haploid plants were observed. The highest number of haploid was observed in culture medium with 4 mg /liters BA and 2 mg/liters 2.4.D. in Guilan accession.

Keywords: Breeding, Flower Cultivation, Embryogenesis, Regeneration.