مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۴، شماره ۱، ۱۳۹۲ (۸۰-۷۳)

واکنش برخی توده‌های تره ایرانی به ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای

زهرا قهرمانی[۱]، محمدرضا حسندخت[۲*]، عبدالکریم کاشی[۳]، منصور امیدی[۴] و مریم جعفرخانی کرمانی[۵]
۲،۱، ۳، ۴، دانشجوی سابق دکتری و استادیار دانشگاه زنجان، دانشیار و استادان پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۵، استادیار موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کرج
(تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۲۹ – تاریخ تصویب: ۹۱/۱/۲۷)

چکیده

این پژوهش به منظور ارزیابی واکنش هفت توده منتخب تره ایرانی از نظر صفات زراعی به ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در طرح پایه کاملا تصادفی که شامل سه سطح هورمونی B2D0 (۲ میلی‌گرم در لیتر BA) ، B2D2 (۲ میلی-گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) و B2D4 (۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) و هفت توده تره ایرانی (گرگان، نیشابور، همدان، میانه، کنگاور، ورامین و کرمان) در سه تکرار انجام شد . صفات درصد رویان‌زایی، درصد باززایی گیاه، درصد بقای گیاه، درصد کالوس‌زایی، درصد شیشه‌ای شدن گل‌ها و زمان لازم جهت ظهور رویان ارزیابی شدند. در این آزمایش از مجموع ۱۸۹۰۰ گل کشت شده در محیط کشت‌های مختلف، ۴۵۹ رویان (۲/۴۳ درصد) تولید شد، که همه آن‌ها به گیاه کامل تبدیل شدند. بیشترین درصد رویان‌زایی و باززایی گیاه (۲۵ درصد) در توده گرگان و میانه در محیط کشت B2D2 مشاهده شد. نتایج نشان داد کشت گل گرده افشانی نشده روش موثری برای ماده‌زایی تره ایرانی در محیط درون شیشه‌ای است.

واژه های کلیدی: **تره ایرانی، ماده‌زایی، کشت درون شیشه‌ای و کشت گل کامل.**

مقدمه

تره ایرانی (*Allium ampeloprasum* spp. Persicum) گیاهی از تیره Alliaceae است که اندمیک ایران می‌باشد و در هیچ کشوری غیر از ایران یافت نمی-شود. این گیاه با رشد زیاد و متراکم دارای برگ‌هایی است که غلاف آن‌ها در قسمت ابتدایی همپوشانی داشته و به صورت دسته جمعی یک ساقه کوتاه مجازی را ایجاد می‌کند. برگ‌ها قسمت خوراکی و قابل برداشت تره ایرانی را تشکیل می‌دهند که به صورت خام و پخته به مصرف می‌رسند. بو و مزه تره ایرانی مانند سایر سبزی های پیازی توسط مواد قندی و روغن‌های فرار گوگردی حاصل می شود. سالیانه حدود ۵۰۰۰ تن تره ایرانی برداشت می‌شود (Musavi et al., 2006). از آنجائی که تره ایرانی بومی ایران بوده و سال‌های زیادی مورد کشت و کار قرار گرفته است، توده‌های زیادی از آن با ویژگی‌های متفاوت در مناطق مختلف سازگار شده‌اند. با وجود پراکنش وسیع تره ایرانی و نیز اهمیت آن در تغذیه روزمره مردم کشور، برنامه به نژادی در خور توجهی روی آن صورت نگرفته است. تره ایرانی به علت ناهمرسی از نوع پروتاندری، گیاهی دگرگشن می‌باشد. توده‌های موجود در ایران هتروزیگوت بوده و به منظور تولید بذر هیبرید F_1 لازم است از آن‌ها لاین خالص تهیه شود. اولین قدم در تولید لاین خالص تولید گیاهان هاپلوئید می‌باشد. به روش‌های مختلفی می‌توان گیاه

* نویسنده مسئول: محمدرضا حسندخت تلفن: ۰۲۶-۳۲۲۴۸۷۲۱ E-mail: mrhassan@ut.ac.ir

هاپلوئید تهیه کرد که ماده‌زایی و نرزایی در محیط درون شیشه‌ای از جمله این روش‌ها می باشند. علیرغم تلاش-های فراوان در کشت بساک آلیوم‌ها از جمله پیاز، این گونه هیچ واکنشی به نرزایی نشان نداده است (Campion et al., 1992). در طی دهه اخیر استفاده از ماده‌زایی برای تولید گیاهان هاپلوئید و لاین‌های خالص در پیاز خوراکی و سایر سبزی های پیازی معمول شده است (Alan et al., 2004; Bohance, 2002; Keller, 1990; Campion & Alloni, 1990 Hassandokht et al., 2000; Muren, 1989). القا رویان از طریق تخمک و تخمدان به طور موفقیت آمیزی انجام گرفته است (Campion et al., 1995b; Jakse et al., 1996)، اما کشت گل کامل گرده افشانی نشده نسبت به کشت تخمدان و تخمک راحت تر بوده و تعداد رویان بیشتری نیز تولید می‌کند (Hassandokht & Campion, 2002; Campion & Alloni, 1990 Hassandokht et al., 2000). ترکیب‌های مختلف محیط کشت بر روی رویان-زایی تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی مطالعه گردیده است و نمک‌های محیط کشت پایه BDS (Dunstan & Short, 1977) و B_5 (Gamborg et al., 1968) مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Bohance, 2002). تاثیر مثبت BA و 2,4-D بر رویان‌زایی پیاز خوراکی توسط برخی محققین (Campion et al., 1992, 1995; Hassandokht & Campion, 2002; و Martinez et al., 2000) گزارش شده است. نوع اکسین مورد استفاده بستگی به نوع اندام کشت شده دارد. در کشت گل 2,4-D بهتر از NAA است (Campion et al., 1992). Muren (1989) از 2,4-D و بنزیل آدنین (BA) هر کدام به مقدار ۲ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت استفاده نمود. این ترکیب به عنوان یک ترکیب استاندارد از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی جهت رویان‌زایی شناخته شده است. آزمایش‌های انجام شده نشان داده است که ژنوتیپ یکی از مهم‌ترین عوامل موثر در واکنش به روش ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای است (Bohance, 2002; ; Campion et al., 1992; Hassandokht & Keller, 1990; Campion, 2002). با توجه به این که تره ایرانی بومی ایران بوده و واکنش توده‌های ایرانی به روش ماده‌زایی در محیط درون شیشه ای مشخص نشده است، این آزمایش با هدف ارزیابی واکنش توده‌های تره ایرانی منتخب به ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای انجام گرفت، تا پروتکل تولید رویان جهت تحقیقات بعدی تولید گیاه هاپلوئید و لاین خالص مشخص شود.

مواد و روش ها

در آزمایش مقدماتی از میان ۲۷ توده جمع‌آوری شده از ۲۵ استان عمده کشت تره ایرانی، هفت توده برتر (گرگان، میانه، کرمان، همدان، نیشابور، ورامین و کنگاور) با صفات زراعی مطلوب (بیشترین تعداد برگ، بالاترین طول و عرض برگ، دیر گلی، تعداد گلچه بالا ، درصد ماده خشک بالا، درصد وزن تر بالا و مقاومت به تریپس) انتخاب شدند (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات محل جمع آوری و مشخصات صفات زراعی مطلوب توده‌های منتخب

محل نمونه برداری توده	موقعیت جغرافیایی	عرض جغرافیایی دقیقه-درجه	طول جغرافیایی دقیقه-درجه	ارتفاع از سطح دریا (متر)	صفات زراعی مطلوب
ورامین	مرکز	۱۹-۳۵	۳۹-۵۱	۹۱۵	قطر اسپات بالا، تعداد گلچه بالا و وزن تر بالا (موسوی و همکاران،۲۰۰۶)
کنگاور	غرب	۱۸-۳۴	۵۷-۴۷	۱۴۲۰	بالاترین عرض و ضخامت برگ، دیرگل و مقاوم به تریپس (موسوی و همکاران،۲۰۰۶)
گرگان	شمال	۱۵-۳۰	۵۶-۵۴	۲۶	بالاترین تعداد و ضخامت برگ، وزن تر بالا، دیر گل و مقاوم به تریپس (موسوی و همکاران،۲۰۰۶)
میانه	شمال غربی	۲۰-۳۷	۴۲-۴۷	۱۱۰۰	دیرگل، تعداد گلچه بالا، درصد ماده خشک بالا و مقاوم به تریپس (موسوی و همکاران،۲۰۰۶)
کرمان	جنوب	۱۷-۳۰	۰۵-۵۷	۱۸۴۵	دیر گل، تعداد گلچه بالا، درصد ماده خشک بالا و مقاوم به تریپس (موسوی و همکاران،۲۰۰۶)
نیشابور	شمال شرقی	۱۲-۳۲	۴۷-۵۸	۱۲۵۰	ضخامت بالای برگ، تعداد گلچه بالا، وزن تر بالا و مقاوم به تریپس (موسوی و همکاران،۲۰۰۶)
همدان	غرب	۴۸-۳۴	۳۱-۴۷	۱۸۵۰	بالاترین تعداد و طول برگ، دیر گل، تعداد گلچه بالا، وزن تر بالا و مقاوم به تریپس (موسوی و همکاران،۲۰۰۶)

آزمایش به صورت فاکتوریل در پایه طرح کاملا تصادفی شامل هفت توده و سه محیط کشت، B2D0 ، B2D2و B2D4 در سه تکرار انجام شد. برای کشت گل-ها در محیط درون شیشه‌ای، چتر گل سه تا پنج روز

قبل از باز شدن از بوته جدا شده و به منظور ضدعفونی سطحی، ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در الکل صنعتی ۹۶٪ و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ قرار گرفتند و پس از آن سه بار با آب مقطر دو بار تقطیر شده سترون شستشو شدند. سپس گل‌ها با دم گل کوتاه (۲ میلی‌متر) روی محیط کشت القایی ۱ (حاوی سطوح مختلف هورمونی) کاشته شدند (جدول ۲).

جدول ۲- ترکیب محیط های کشت B2D4، B2D2 و B2D0 (محیط کشت القایی ۱)

ترکیبات	محیط کشت		
	B2D4	B2D2	B2D0
عناصر پر مصرف محیط کشت پایه BDS	+	+	+
عناصر کم مصرف محیط کشت پایه B5	+	+	+
ساکارز (گرم در لیتر)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
2,4-D(میلی گرم در لیتر)	۴	۲	-
BA(میلی گرم در لیتر)	۲	۲	۲
آنتی بیوتیک استرپتومایسین (میلی گرم در لیتر)	۳۰	۳۰	۳۰

ویتامین‌ها شامل: تیامین ۲ میلی گرم در لیتر، پیریدوکسین ۱ میلی گرم در لیتر، نیکوتینیک اسید ۱ میلی گرم در لیتر، میواینوزیتول ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، آگار ۶ گرم در لیتر

محیط کشت‌های حاوی عناصر پر مصرف محیط کشت پایه BDS (Dunstan & Short, 1977) ، عناصر کم مصرف محیط کشت پایه B5 (Gamborg et al., 1968) و ویتامین‌های اسید نیکوتینیک، پیریدوکسین، تیامین، آگار ۶ گرم در لیتر و ساکارز ۱۰۰ گرم در لیتر بودند. در هر پتری دیش ۱۵ ×۹۰ میلی‌متر، ۳۰ غنچه گل کاشته شد. درب پتری‌ها به وسیله پارافیلم پوشانده شدند و در اطاقک رشد با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و تحت نور مصنوعی لامپ‌های فلورسنت به مدت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. گل-های متورم شده پس از گذشت یک ماه به محیط کشت القائی ۲ که حاوی عناصر پر مصرف محیط کشت پایه BDS، عناصر کم مصرف محیط کشت پایه B5 و بدون هورمون و میزان ساکارز ۱۰۰ گرم در لیتر بود، انتقال داده شدند (Campion et al., 1995). رویان‌ها پس از ظهور، در شرایط سترون از گل جدا شده و به محیط کشت باززایی که حاوی عناصر پر مصرف محیط کشت پایه BDS، عناصر کم مصرف محیط کشت پایه B5 و بدون تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و میزان ساکارز آن ۴۰ گرم در لیتر بود، انتقال (Campion et al., 1995 b) و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و با همان دوره نوری قبلی قرار داده شدند (جدول ۳).

جدول ۳- ترکیب محیط‌های کشت القایی ۲ و باززایی مورد استفاده در ماده‌زایی توده های تره ایرانی

ترکیبات	**محیط کشت القایی ۲**	**محیط کشت باززایی**
عناصر پر مصرف محیط کشت پایه BDS	+	+
عناصر کم مصرف محیط کشت پایه B5	+	+
ساکارز (گرم در لیتر)	۱۰۰	۴۰
آنتی بیوتیک استرپتومایسین (میلی گرم در لیتر)	۳۰	-

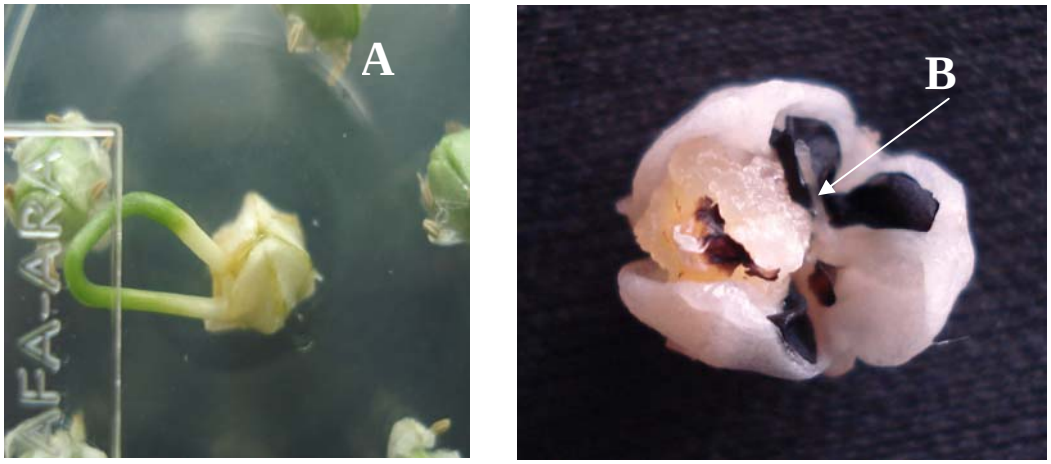
ویتامین‌ها شامل، تیامین ۲ میلی گرم در لیتر، پیریدوکسین ۱ میلی گرم در لیتر، نیکوتینیک اسید ۱ میلی گرم در لیتر، میواینوزیتول ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، آگار ۶ گرم در لیتر

لازم به ذکر است pH در تمام محیط‌های کشت ۶-۵/۸ تنظیم گردید (Campion et al., 1992). صفات درصد رویان‌زایی (تعداد رویان مشاهده شده در ۱۰۰ گل کشت شده)، درصد باززایی گیاه (تعداد گیاه باززایی شده در ۱۰۰ گل کشت شده)، درصد بقا گیاه (تعداد گیاه باززایی شده در ۱۰۰ رویان)، زمان لازم جهت ظهور

رویان (روز)، درصد شیشه‌ای شدن گل‌ها و درصد تولید کالوس یادداشت برداری شدند. تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزار SAS انجام گرفت. میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

گل های کشت شده در محیط کشت بعد از یک تا دو روز باز و کلاله آن‌ها طویل شدند. تخمدان‌ها رشد متفاوتی داشتند و از روز چهارم به بعد شروع به متورم شدن کردند و تا ۳۰ روز بعد از کاشت این عمل ادامه یافت. رویان ها ۲۶ تا ۱۵۵ روز پس از واکشت گل‌ها در محیط کشت القایی ۲ ظاهر شدند (شکل 1.A). منشا مادەزایی رویان‌ها زمانی تایید شد که آن‌ها هنوز تا حدودی با باقیمانده تخمک پوش[1] سیاه رنگ پیچیده شده بودند (شکل 1.B). طبق گزارش Campion et al., 1992 منشا رویان‌های دارای تخمک پوش مستقیما کیسه جنینی می باشد.



شکل ۱- تولید رویان به روش ماده زایی در تره ایرانی. (A) ظهور رویان مادەزا، (B) ظهور رویان احاطه شده به وسیله پوشش سیاه رنگ

کالوس‌زایی ۱۰۰ روز بعد از کشت گل‌ها در محیط کشت القایی ۲ در توده‌های کرمان، همدان، ورامین، نیشابور و کنگاور مشاهده شد. شیشه‌ای شدن گل‌ها در هیچ کدام از واحدهای آزمایشی مشاهده نشد.

نتایج نشان داد اثرمحیط کشت، توده‌های مورد بررسی و اثر متقابل محیط کشت و توده بر درصد رویان‌زایی، درصد باززایی و درصد گل‌های تشکیل دهنده کالوس بسیار معنی‌دار بود (جدول ۴).

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس صفات رویان‌زایی، باززایی و درصد کالوس‌زایی در هفت توده تره ایرانی

	درجه آزادی	میانگین مربعات		
منابع تغییر		درصد رویان زایی	درصد باززایی	درصد کالوس زایی
محیط کشت	۲	۲۱۱/۹۲**	۲۱۱/۹۲**	۱۷/۹۲**
توده	۶	۲۴۶/۸۴**	۲۴۶/۸۴**	۸/۴۶**
توده × محیط کشت	۱۲	۶۰/۴۷**	۶۰/۴۷**	۶/۶۴**
اشتباه آزمایشی	۴۲	۳/۵۳	۳/۵۳	۰/۸۵

** تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد

محیط کشت B2D2 دارای بیشترین رویان‌زایی (۱۰/۸ درصد) و محیط کشت B2D0 کمترین رویان‌زایی (۴/۶۱ درصد) بودند (جدول ۵). به طور کلی استفاده از محیط‌های کشت با تنظیم کننده‌های رشد BA و 2,4-D به صورت توام نتیجه موثرتری بر رویان‌زایی داشتند.

1. Integument

تاثیر مثبت BA و 2,4-D بر رویان‌زایی پیاز خوراکی توسط محققان متعددی گزارش شده است (Campion et al., (1992, 1995); Martinez et al., 2000; Bohance, 2002; Bohanec & Jakše, 1999; Hassandokht & Campion 2002; Hssandokht et al., 2000;).

جدول ۵- مقایسه میانگین محیط های کشت از نظر رویان‌زایی، باززایی، درصد بقای گیاه و درصد کالوس‌زایی در هفت توده تره ایرانی

محیط کشت	درصد رویان زایی	درصد باززایی	درصد بقا	درصد کالوس زایی
B2D2	a۱۰/۸۰	a۱۰/۸۰	a۱۰۰	a۳۹/۹
B2D4	b۶/۴۷	b۶/۴۷	a۱۰۰	a۳۲/۶۱
B2D0	c۴/۶۱	c۴/۶۱	a۱۰۰	b۸/۲۳

ستون های دارای حروف مشابه در سطح ۱ درصد با هم تفاوت معنی‌داری ندارند

توده گرگان و توده میانه دارای بیشترین درصد رویان‌زایی (۱۴/۸۸ و ۱۴/۷۷) و باززایی (۱۴/۸۸ و ۱۴/۷۷) و در گروه برتر نسبت به سایر توده‌ها قرار گرفتند (جدول ۶). بنابراین به نظر می‌رسد که این دو توده از پتانسیل ژنتیکی خوبی جهت اهداف به‌نژدای برخوردار باشند. کمترین درصد رویان‌زایی و باززایی (۳/۱۱٪) مربوط به توده‌های نیشابور و ورامین بود. توده-های کرمان و کنگاور دارای بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱/۷۷ و ۲/۴۴) بودند و در توده‌های میانه و گرگان کالوس تشکیل نشد. درصد بقا در تمام توده‌ها ۱۰۰ درصد بود. تاثیر قوی ژنوتیپ بر ماده‌زایی توسط سایر محققین به اثبات رسیده است (Allan et al., 2004; Geoffriau et al., Hssandokht & Campion, 2002 .(Sulistyaningsih et 1997; Bohanec et al., 1999 al., 2006;)نتایج به دست آمده از این آزمایش با نتایج Muren (1989) و Hssandokht et al. (2000) با رویان‌زایی نزدیک به صفر تا ۳ درصد در ژنوتیپ‌های مختلف پیاز خوراکی مطابقت داشت، ولی با نتایج برخی محققین (Geoffriau et al., 1997; Bohanec & Jakše., 1999 و Allan et al., 2004) در مورد برخی از ژنوتیپ-ها که درصد رویان‌زایی بالایی نشان دادند (۷-۵ درصد)، تفاوت داشت. Bohanec (2002) بالا بودن درصد رویان-زایی در برخی ژنوتیپ‌های پیاز خوراکی را به دلیل اینبرد لاین و دورگ بودن آن‌ها ذکر کرده و احتمال می‌دهد که ژن‌های نامطلوب در این ژنوتیپ‌ها حذف شده است. توده‌های مورد استفاده در این آزمایش توده-های تره ایرانی با گرده‌افشانی آزاد بودند، بنابراین واکنش کم آن‌ها به پدیده ماده‌زایی طبیعی بود.

جدول ۶- مقایسه میانگین توده های تره ایرانی از نظر رویان زایی، باززایی ، درصد بقای گیاه و درصد کالوس‌زایی

توده	درصد رویان زایی	درصد باززایی	درصد بقا	درصد کالوس زایی
گرگان	۱۴/۸۸ a	۱۴/۸۸ a	۱۰۰ a	۰ b
کرمان	۴/۲۲ bc	۴/۲۲ bc	۱۰۰ a	۱/۷۷ a
همدان	۵/۵۵ b	۵/۵۵ b	۱۰۰ a	۰/۸۸ b
ورامین	۳/۱۱c	۳/۱۱c	۱۰۰ a	۰/۳۳ b
میانه	۱۴/۷۷ a	۱۴/۷۷ a	۱۰۰ a	۰ b
نیشابور	۳/۱۱c	۳/۱۱c	۱۰۰ a	۰/۱۱ b
کنگاور	۵/۴۴ b	۵/۴۴ b	۱۰۰ a	۲/۴۴ a

ستون های دارای حروف مشابه در سطح ۱ درصد با هم تفاوت معنی‌داری ندارند

بر اساس نتایج اثر متقابل توده و محیط کشت (جدول ۷) بیشترین میزان رویان‌زایی (۲۵ و ۲۴ درصد) و باززایی (۲۵ و ۲۴ درصد) مربوط به توده‌های گرگان و میانه در محیط کشت B2D2 (۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) بود. توده‌های کرمان و ورامین با میانگین ۲ درصد رویان و گیاه باززایی شده در

محیط کشت B2D4 (۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) و توده‌های همدان، ورامین و نیشابور به ترتیب با میانگین ۲/۲ و ۱/۶۶ درصد رویان و گیاه باززایی شده در محیط کشت B2D0 (۲ میلی‌گرم در لیتر BA) کمترین درصد رویان‌زایی و باززایی را به خود اختصاص دادند. وجود غلظت بالای 2,4-D (۴ میلی گرم در لیتر) در محیط کشت B2D4 و عدم وجود 2,4-D در محیط کشت B2D0 منجر به کاهش درصد رویان-زایی و باززایی شده است. 2,4-D برای بعضی از لاین های با پاسخ پایین مضر است و باعث کاهش میزان القای رویان‌زایی در آن‌ها می گردد (Bohanec., 2002).

جدول ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل محیط‌های کشت (M_1: B2D2, M_2: B2D4, M_3: B2D0) و توده‌ها (گرگان G_1، کرمان G_2، همدان G_3، ورامین G_4، میانه G_5، نیشابور G_6، کنگاور G_7) از نظر رویان‌زایی، باززایی، بقای گیاه و کالوس‌زایی

صفات / توده× محیط کشت	درصد رویان زایی	درصد باززایی	درصد بقا	درصد کالوس زایی
M_1G_1	۲۵ a	۲۵ a	۱۰۰ a	۰c
M_1G_2	۶/۶۶ ed	۶/۶۶ ed	۱۰۰ a	۴/۳۳ b
M_1G_3	۸/۳۳ cd	۸/۳۳ cd	۱۰۰ a	۱ c
M_1G_4	۵/۳۳ def	۵/۳۳ def	۱۰۰ a	۱ c
M_1G_5	۲۴a	۲۴a	۱۰۰ a	۰ c
M_1G_6	۲fg	۲fg	۱۰۰ a	۰ c
M_1G_7	۴/۳۳ efg	۴/۳۳ efg	۱۰۰ a	۶/۶۶ a
M_2G_1	۸/۳۳ cd	۸/۳۳ cd	۱۰۰ a	۰ c
M_2G_2	۲ fg	۲ fg	۱۰۰ a	۱ c
M_2G_3	۶/۳۳ de	۶/۳۳ de	۱۰۰ a	۱/۳۳ c
M_2G_4	۲ fg	۲ fg	۱۰۰ a	۰ c
M_2G_5	۱۵ b	۱۵ b	۱۰۰ a	۰ c
M_2G_6	۵/۶۶ ed	۵/۶۶ ed	۱۰۰ a	۰ c
M_2G_7	۶ ed	۶ ed	۱۰۰ a	۰ c
M_3G_1	۱۱/۳۳ c	۱۱/۳۳ c	۱۰۰ a	۰ c
M_3G_2	۴ efg	۴ efg	۱۰۰ a	۰ c
M_3G_3	۲ fg	۲ fg	۱۰۰ a	۰/۳۳ c
M_3G_4	۲ fg	۲ fg	۱۰۰ a	۰ c
M_3G_5	۵/۳۳ def	۵/۳۳ def	۱۰۰ a	۰ c
M_3G_6	۱/۶۶ g	۱/۶۶ g	۱۰۰ a	۰/۳۳ c
M_3G_7	۶ed	۶ed	۱۰۰ a	۰/۶۶ c

ستون های دارای حروف مشابه در سطح ۱ درصد با هم تفاوت معنی داری ندارند.

تمام توده‌ها در کلیه محیط‌های کشت از ۱۰۰ درصد بقای گیاه بر خوردار بودند. توده کنگاور در محیط کشت B2D4 (۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) دارای بیشترین میزان کالوس‌زایی بود. اثر مثبت 2,4-D بر کالوس‌زایی قبلا توسط محققین زیادی گزارش شده است (Muren, 1989; Hassandokht et al., 2000; Alan et al., 2004; Bohance, 2002; Keller, 1990). در محیط کشت B2D0 (۲ میلی‌گرم در لیتر BA) کالوس‌زایی در کلیه توده‌ها نزدیک به صفر درصد بود. توده گرگان اولین رویان را ۳۹ روز پس از قرارگیری در محیط کشت B2D2 که حاوی ۲ میلی-گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D تولید کرد بیشترین زمان برای ظهور رویان در توده گرگان ۱۵۵ روز در محیط کشت B2D0 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بود. در توده کرمان کمترین و بیشترین زمان برای ظهور رویان ۴۸ روز در محیط کشت B2D0 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱۰۷ روز در محیط کشت B2D4 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. در توده همدان اولین رویان در محیط کشت B2D2 (۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در

لیتر 2,4-D) ۵۷ روز بعد از کشت و آخرین رویان در همین توده ۱۵۵ روز بعد از کشت در محیط کشت B2D4 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ظاهر شدند. کمترین و بیشترین زمان برای ظهور رویان در توده نیشابور به ترتیب ۶۰ و ۹۳ روز در محیط کشت B2D2 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. در توده ورامین کمترین و بیشترین زمان برای ظهور رویان ۲۶ روز در محیط کشت B2D0 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۹۳ روز در محیط کشت B2D2 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. در توده کرمانشاه کمترین و بیشترین زمان برای ظهور رویان به ترتیب ۴۳ و ۹۳ روز در محیط کشت B2D4 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بودند. در توده میانه کمترین و بیشترین زمان برای ظهور رویان به ترتیب ۴۳ و ۱۵۵ روز در محیط کشت B2D2 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود.

در این آزمایش از مجموع ۱۸۹۰۰ گل کشت شده در محیط کشت‌های مختلف ۴۵۹ رویان (۲/۴۳ درصد) تولید شد. از این تعداد ۲۰ رویان (۴/۳۵ درصد) فقط ریشه تولید کردند و ۴۳۹ رویان (۹۵/۶۴) به گیاه کامل تبدیل شدند (شکل 2.C).

شکل ۲- (C) گیاه کامل حاصل از ماده‌زایی

بررسی اثر سه سطح هورمونی، BA و 2,4-D نشان داد که سطوح مختلف هورمونی در توده‌های تره ایرانی ، بسته به نوع توده می‌تواند باعث القای رویان‌زایی متفاوت در کشت درون شیشه‌ای شود. با توجه به این که توده‌های مورد استفاده در این پژوهش دارای گرده افشانی آزاد بودند، لذا واکنش کم آن‌ها به پدیده ماده زایی طبیعی بود. Bohanec (2002) علت نوسان داشتن پتانسیل ماده‌زایی در ژنوتیپ‌ها را وجود برخی ژن‌ها در گیاهان باززایی شده ماده‌زا می داند. تلاقی لاین های با موفقیت و بدون موفقیت باعث افزایش توان ماده زایی نتاج هیبرید می گردد، زیرا با تلاقی ژنوتیپ های با پاسخ دهی بالا با لاین های بدون پاسخ و با پاسخ کم می‌توان ماده‌زایی را در نتاج آن‌ها ایجاد و یا افزایش داد (Bohanec et al., 1999). لذا باید پژوهش‌های بعدی بر روی توده‌های تره ایرانی که پاسخ کمی به القای رویان-زایی نشان دادند، مورد توجه قرار گیرد. این آزمایش اولین گزارش در مورد رویان‌زایی گیاه تره ایرانی در محیط درون شیشه‌ای می‌باشد و باید توده‌ها و محیط-های کشت بیشتری مورد آزمایش قرار گیرند، زیرا از معایب روش ماده‌زایی درصد موفقیت کم در تولید رویان است و باید توده‌های زیادی مورد آزمایش قرار گیرند تا بهترین آن‌ها با پتانسیل تولید رویان بالا برای تولید

گیاهان دابل هاپلوئید به منظور تولید لاین خالص انتخاب شود.

REFERENCES

1. 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.
2. Bohanec, B. (2002). Double-haploid onions. In: Rabinowich, H.D., Currah, L. (ed.): *Allium Crop Science* - Recent Advances. CABI, London. 145-157.
3. Bohanec, B. & Jakše, M. (1999). Variation in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. *Plant Cell Report*, 18, 737-742.
4. Campion, B. & Alloni, C. (1990). Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules. *Plant Cell, Tissue and Organ Cul*ture, 20 (1), 1-6.
5. Campion, B., Azzimonti, M.T., Vicini, E., Schiavi, M. & Falavigna, A. (1992). Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. *Plant Science*, 86, 97 – 104.
6. Campion, B., Perri, E. & Azzimonti, M.T. (1995b). Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Breeding*, 114, 243-246.
7. Dunstan, D.I. & Short, K.C. (1977). Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiologia Plantarum*, 41, 70-72.
8. Gamburg, O.L., Miller, R.A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Response*, 50, 151-158.
9. Geoffriau, E., Kahane, R. & Rancillac, M. (1997). Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). Euphytica, 94, 37–44.
10. Hassandokht, M.R., Kashi, A., Campion, B. & Bozorgipur, R. (2000). Study of haploid production in Iranian onions (*Allium cepa* L.) via *in vitro* gynogenesis. *Seed and Plant*, 16 (3), 300-312 (In Farsi).
11. 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 Horticulture *Science*, 16, 72-78.
12. Jakše, M., Bohanec, B. & Ihan, A. (1996). Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars and analysis of regenerates. *Plant Cell Report*, 15, 934–938.
13. Keller, J. (1990). Culture of unpollinated 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.
14. Martínez, L., Agüero, 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.
15. 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.
16. Muren, P. (1989). Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. *HortScience*, 24, 833–834.
17. Sulistyaningsih, E., Aoyagi, Y. & Tashiro, Y. (2006). Flower bud culture of shallot (*Allium cepa* L. *aggregatum* group) with cytogenetic analysis of resulting gynogenic plants and somaclones. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 87, 249-255.