مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۳۹، شماره ۱، ۱۳۸۷ (۱۸۰-۱۷۳)

باززایی درون شیشه‌ای ارقام کاهوی (*Lactuca sativa*) ایرانی

حسین هنری[۱]، هوشنگ علیزاده*[۲]، علی اکبر شاه نجات بوشهری[۳]، سید علی پیغمبری[۴] و مختار جلالی جواران[۵]
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی دوره دکتری، استادیار،دانشیار ،استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۵، دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
(تاریخ دریافت: ۸۶/۱/۲۸- تاریخ تصویب: ۸۷/۳/۸)

چکیده

گیاه کاهو با توجه به نوع مصرف و بیوماس آن دارای پتانسیل مطلوب برای تبدیل شدن به یک بیوراکتور جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب و واکسنهای خوراکی است. پیش نیاز نیل به این هدف، بهینه‌سازی مسیر کشت بافت و انتقال ژن به این گیاه است. در بررسی باز زایی درون شیشه‌ای، ابتدا بذور ۵ رقم کاهو TN-96-34 و TN-96- 39 و TN-96-41 ،TN-96-53 و TN-96-54 در غلظت‌های مختلف tween 20 و هیپو کلریت سدیم قرار گرفتند و به ترتیب غلظت‌های ۰/۱٪ و ۲/۵٪ به مدت۲۵ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل برای ضدعفونی بذر بهترین روش تشخیص داده شد. سپس بذوردر محیط استریل، با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و روشنایی ۱۶ ساعت در شبانه روز جهت جوانه زنی بر روی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند. ریز نمونه لپه گیاهچه‌ها بعد از ۷۲ ساعت به ٦ تا ۸ قطعه تقسیم، و بر روی محیط کشت MS حاوی غلظت های هورمونی۰/۱ :۰/۰۵: ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و۰/۱ :۰/۲: ۰/٤ میلی گرم درلیتر BA قرار گرفتند. از بین پنج رقم کاهوی مورد بررسی، دو رقم TN-96-39 وTN-96-41 بطور معنی‌داری کالوس‌زایی، جنین‌زایی و باززایی بیشتر داشتند. تیمار نسبت تنظیم کننده‌های رشد با غلظت های هورمونی۰/۰۵میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم درلیتر BA بیشترین کالوس‌زایی، نین زایی و باززایی را برای این صفات نشان داد. تیمار نسبت تنظیم کننده‌های رشد با غلظت های ۰/۰۵ میلی‌گرم درلیتر NAA و ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر BA دارای بیشترین شاخه‌زایی و برای باززایی مستقیم مناسب تشخیص داده شدند. شاخه‌های باززایی شده در محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA ریشه‌دار و پس از انتقال به گلدان بذرگیری انجام شد.

واژه‌های کلیدی: کاهو، کشت بافت، باززایی، تنظیم کننده‌های رشد.

مقدمه

کاهو یکی از قدیمی‌ترین سبزیجات دنیا ودارای بیوماس بالایی است. درحال حاضر کاهو در ۷۶ کشور جهان کشت، و از برگ‌های آن به عنوان سالاد استفاده می‌شود (۱، ۴، ۵).

امروزه به منظور تولید کالوس و باززایی گیاه کامل، ایجاد تنوع سوماکلونال و تولید گیاهان تراریخته، کشت سلول، بافت و اندامهای گیاهی تحت شرایط درون شیشه‌ای مورد توجه قرار گرفته است. در اغلب روش‌های تراریختی، جهت تولید پروتئین، یک سیستم کشت بافت کارآ با فراوانی بالای باززایی ضروری است. در برنامه‌های انتقال ژن، اولین گام در گیاهان مختلف، بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای آنها است. در گیاهان دو لپه‌ای از برگ، لپه، ساقه،

* نویسنده مسئول: هوشنگ علیزاده تلفن: ۰۹۱۲-۵۶۰۱۴۰۳ E-mail: halizade@ut.ac.ir

بذور جوانه زده و ریشه مویینه به عنوان ریز نمونه استفاده می شود. درگیاهان تک لپه ای از بافتهای مختلف مانندجنین بالغ، جنین نارس، کلئوپتیل، پرچم، میکروسپور، خوشه نارس قطعه قطعه شده به عنوان ریز نمونه استفاده شده است (۲). تولید کالوس جنین‌زا و ایجاد یک سیستم باززایی ساده و روان، کارآیی لازم را برای بسیاری از ژنوتیپ‌های گیاهان فراهم می‌سازد. تولید کالوس و قابلیت باززایی عمدتاً تحت تاثیر ژنوتیپ، شرایط فیزیولوژیک جداکشت، نوع محیط کشت و شرایط محیطی قرار می‌گیرد (۱، ۲). کشت بافت در گیاه کاهو با اهداف انتقال ژن‌های مختلف به کروموزوم و کلروپلاست انجام می‌شود.

برای باززایی درون شیشه‌ای گیاه کاهو از قطعات مختلف آن استفاده می شود. از لپه تورس، ا. سی و همکاران (۱۹۹۳)، پاتری سیا و همکاران (۱۹۹۷) و مارکوس پلیجلی و همکاران (۲۰۰۱) هایون جین سام و همکاران (۲۰۰۶) و از برگ و تومیا نیکی و همکاران (۲۰۰۱)، سیلیا و همکاران (۲۰۰۵)، هیروساکی کاناموتو و همکاران (۲۰۰۶) استفاده کرده اند.

در تولید کالوس و باززایی گیاه کامل، تنظیم غلظت اکسین و سیتوکنین و مقدار نور و دما از اهمیت خاصی برخودار است. تورس ،ا. سی و همکاران (۱۹۹۳) و مارکوس پلیجلی و همکاران (۲۰۰۱) برای باززایی گیاه از۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲ میلی گرم در لیترBA با pH:۵/۷ در ۱۶ ساعت نور، ۸ ساعت تاریکی و۲۲ تا۲۵ درجه سانتیگراد و ازتومیا نیکی و همکاران (۲۰۰۱) و هایون جین سام و همکاران (۲۰۰۶) ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۰/۱ میلی‌گرم در لیترBAP استفاده کرده اند. تورس، ا. سی و همکاران (۱۹۹۳) برای ساقه زایی از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر زآتین به جای NAA استفاده کرده است. برای ریشه‌دهی در گیاه کاهو عموما فاکتور هورمون NAA وغلظت محیط کشت در نظر گرفته می‌شود. برای ریشه‌دهی در گیاه کاهو، هیروساکی کاناموتو و همکاران (۲۰۰۶) از محیط کشت 1/2 MS و عاری از هورمون و مارکوس پلیجلی و همکاران (۲۰۰۱) از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده کرده‌اند.

این پژوهش با هدف تعیین شرایط لازم برای ضد عفونی بذر کاهو و شناسایی پاسخ رقم یا ارقام به کشت درون شیشه‌ای، غلظت هورمونی، نوع ریزنمونه، جهت کالوس‌زایی، جنین‌زایی، باز زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی در تعدادی از ارقام ایرانی کاهو، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه بذور

بذور پنج رقم گیاه کاهوی مناطق مختلف کشور از بانک ژن گیاهی ملی ایران تهیه و آزمایشات در آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام گردید.

ضد عفونی بذور و تهیه ریز نمونه

بذور کاهو به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در نسبت‌های مختلف از محلول‌های توین-۲۰، ۰/۱٪ و هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ قرار گرفتند. سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و به ظرف پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب استریل منتقل و بعد از ۴±۶۸ ساعت لپه، محور زیر لپه و محور زیر لپه همراه با لپه به عنوان ریز نمونه جدا و بر روی محیط کشت MS با غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد برای تولید کالوس، جنین‌زایی و باززایی قرار گرفتند.

غلظت هورمونی استفاده شده جهت باززائی

ریز نمونه های پنج رقم کاهو به محیط کشت MS با غلظت‌های هورمونی۰/۱،۰/۲و۰/۴ بنزیل آدنین (BA) mg/l، ۰/۱،۰/۵و۰/۲ نفتالین استیک اسید (NAA) mg/l۰ با pH: ۵/۷ در۴۵ تیمار به صورت یک آزمایش فاکتوریل با سه تکرار اجرا گردید.

غلظت هورمونی استفاده شده جهت تولید ریشه

گیاهچه‌های باززا شده از پنج رقم کاهو به محیط کشت MS ۰/۲۵، ۰/۵ و۱ با غلظت‌های هورمونی ۰/۱ و ۰/۲ و۰/۴ mg/l (NAA) و۵/۷ :pH (نه تیمار) در یک آزمایش فاکتوریل در قالب یک طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انتقال پیدا کردند.

برداشت بذور

ساقه‌های ریشه‌دار شده به گلدانهای کاغذی کوچک حاوی پرلیت استریل منتقل و در محیط ۲۵-۲۲ درجه سانتیگراد گلخانه قرار داده شدند. به منظور حفظ رطوبت گیاه، اطراف گلدانها با کیسه فریزر پوشش داده شد. برگهای پایینی گیاهچه قطع گردیدند و بعد از یک هفته به گلدانهای بزرگتر حاوی هوموس استریل انتقال داده شدند. گیاهان بعد از ۴۵ روز به گل نشستند. بذر گیری ۲/۵ ماه بعد از کاشت در گلدان صورت گرفت. از نرم افزار SPSS با انتخاب تبدیل داده مناسب برای نرمال‌سازی داده‌ها و برای تجزیه تحلیل آماری از نرم افزار SAS استفاده شد.

نتایج

جدول ۱ مدت زمان ۲۵ دقیقه در محلول توبین -۲۰، ۰/۱ ٪ همراه با هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ با نسبت‌های ۸۰ به ۲۰ (میزان آلودگی صفر و جوانه‌زنی ۱۰۰٪) مناسب‌ترین شرایط برای ضد عفونی بذر را نشان می‌دهد.

جدول ۱- میزان آلودگی قارچی وجوانه زنی به درصد وبه ترتیب نسبت‌های مختلف توبین -۲۰ ، ۰/۱٪ و هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪

نسبت	زمان (دقیقه)	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰
۹۰ به ۱۰	آلودگی	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	جوانه‌زنی	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۸۵ به ۱۵	آلودگی	۸۰	۸۰	۶۰	۶۰
	جوانه‌زنی	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۸۰ به ۲۰	آلودگی	۸۰	۱۰	۰	۰
	جوانه‌زنی	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶۰
۷۰ به ۳۰	آلودگی	۲۰	۰	۰	۰
	جوانه‌زنی	۷۰	۲۵	۰	۰

از بین سه تیمار انتخابی (لپه، محور زیر لپه و محور زیر لپه با لپه) بیشترین نسبت کالوس زایی به کل نمونه‌ها (۰/۸۵) و نسبت جنین‌زایی به کالوس‌زایی (۰/۹) و نسبت باز زایی به جنین‌زایی (۰/۸) و نسبت باز زایی به کل نمونه‌ها (۰/۶۱) در ریز نمونه لپه مشاهده شد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که لپه بهترین اندام برای کشت بافت کاهو می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲- بررسی نمونه‌های انتخابی با نسبت اندام زایی

اندام زایی / نمونه	نسبت‌کالوس‌زایی به کل نمونه‌ها	نسبت جنین‌زایی به کالوس‌زایی	نسبت باززایی به جنین‌زایی	نسبت‌باززایی به کل نمونه‌ها
لپه	۰/۸۵	۰/۹	۰/۸	۰/۶۱
محور زیرلپه	۰/۱۲	۰/۱	۰	۰
محورزیرلپه‌با لپه	۰/۴۵	۰/۷	۰/۷	۰/۲۲

انتخاب رقم و غلظت هورمونی مناسب جهت باززائی

نتایج به دست آمده نشان داد (جدول۳) که ارقام کاهو و غلظت‌های هورمونی به ترتیب برای صفات‌نسبت نمونه‌های زنده به کل مونه ها در سطح احتمال (۱٪ و ۱٪) و نسبت نمونه‌های کالوس‌زا به کل نمونه‌ها (۱٪ و ۵٪) و نسبت نمونه‌های جنین‌زا به کل نمونه‌های کالوس‌زا (۱٪ و ۱٪) و نسبت نمونه‌های شاخه‌زا به کل نمونه‌های جنین‌زا (۱٪ و ۵٪)معنی‌دارنداما اثرمتقابل بین ارقام و غلظت معنی‌دار نشد.

نتایج بدست آمده نشان داد (جدول۴) که صفات نسبت نمونه‌های شاخه‌زا به کل نمونه‌های جنین‌زا (۴۰/۰۸۹) و نسبت نمونه‌های زنده به کل نمونه‌ها (۱۹/۰۸) به ترتیب دارای بیشترین وکمترین ضریب تغییرات در بین صفات مورد مطالعه هستند. نتایج نشان داد که وقتی گیاه کامل می‌شود،تنوع نمونه‌ها افزایش یافته و نمونه‌های ضعیف حذف می‌شوند.

از بین پنج رقم کاهوی مورد بررسی برای کشت بافت، دو رقم TN-96-39 وTN-96-41 به شکل معنی‌داری از کالوس‌زایی و جنین‌زایی و باز زایی بیشتر نسبت به ارقام دیگر برخوردارند (شکل۱-A). تیمارهای نسبت تنظیم کننده‌های رشد (جدول ۶) با غلظت‌های هورمونی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین کالوس‌زایی و جنین‌زایی و باز زایی را برای این صفات نشان دادند. تیمار نسبت تنظیم کننده‌های رشد (جدول ۶) با غلظت‌های هورمونی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین شاخه‌زایی را برای این صفت نشان داد.

(شکل۱-B). اگرهدف آزمایش، باززایی مستقیم از ریز نمونه‌ها باشد تیمار نسبت تنظیم کننده‌های رشد (جدول۶) با غلظت‌های هورمونی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین شاخه‌زایی و کمترین کالوس‌زایی را نشان دادند.

جدول ۳- تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		نسبت نمونه‌ای زنده به کل نمونه‌ها	نسبت نمونه‌های کالوس‌زا به کل نمونه‌ها	نسبت نمونه‌های جنین‌زا به کل نمونه‌های کالوس‌زا	نسبت نمونه‌های شاخه‌زا به کل نمونه‌های جنین‌زا
ارقام	۴	۰/۱۹۴**	۰/۳۷۳**	۳/۰۱۹**	۰/۵۸۸**
غلظت	۸	۰/۰۴۵**	۰/۲۵۵*	۰/۸۱**	۰/۴۰۵*
ارقام×غلظت	۳۲	۰/۰۰۴^{ns}	۰/۰۸۸^{ns}	۰/۱۰۳^{ns}	۰/۱۴^{ns}
خطای آزمایش	۹۰	۰/۰۱۵	۰/۱	۰/۲۹۷	۰/۱۵۳

^{ns}، *و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

جدول ۴- مقادیر میانگین، انحراف معیار، ضریب تغییرات، حداکثر و حداقل مقادیر صفات مورد مطالعه

پارامترها	نسبت نمونه‌های زنده به کل نمونه‌ها	نسبت نمونه‌های کالوس‌زا به کل نمونه‌ها	نسبت نمونه‌های جنین‌زا به کل نمونه‌های کالوس‌زا	نسبت نمونه‌های شاخه‌زا به کل نمونه‌های جنین‌زا
میانگین	۰/۶۴	۰/۷۹	۲/۶۸	۰/۷۸
انحراف معیار	۰/۱۲۲	۰/۳۲	۰/۵۵	۰/۳۹۱
ضریب تغییرات (٪)	۱۹/۰۸	۴۰/۰۳	۲۰/۳۷	۴۰/۰۸۹
حداکثر	۰/۹۹	۳/۲۳	۴/۱۵	۳/۸۷
حداقل	۰/۴۳	۰/۲۳	۱/۳۲	۰/۳۲

جدول ۵- مقایسه و گروه بندی میانگین صفات مورد مطالعه برای پنج رقم کاهوی ایرانی

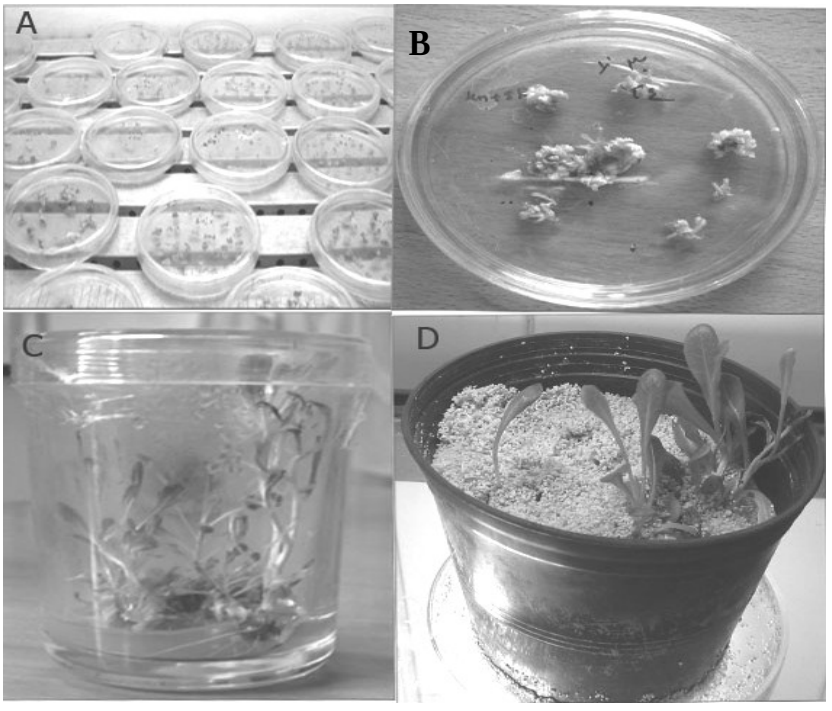
رقم / صفات	نسبت نمونه‌های زنده به کل نمونه‌ها	نسبت نمونه‌های کالوس‌زا به کل نمونه‌های زنده	نسبت نمونه‌های جنین‌زا به کل نمونه‌های کالوس‌زا	نسبت نمونه‌های شاخه‌زا به کل نمونه‌های جنین‌زا
TN-96-34	۰/۵۷۷ b	۰/۶۹۱ b	۲/۴۷۵b	۰/۸۰۴a
TN-96-39	۰/۷۳۸ a	۰/۸۹۲ a	۳/۱۰۲ a	۰/۸۰۷ a
TN-96-41	۰/۷۲۷ a	۰/۸۷۲ a	۲/۹۷۷ a	۰/۸۰۶ a
TN-96-53	۰/۵۸۱ b	۰/۶۳۷ b	۲/۴۲۲ b	۰/۶۷۳ a
TN-96-54	۰/۵۷۵ b	۰/۵۹۲ b	۲/۴۱۱ b	۰/۶۷۲ a

+ حروف متفاوت در هر ستون بیانگر معن دار درسطح ۱٪ است.

جدول ۶- مقایسه و گروه‌بندی میانگین صفات مورد مطالعه تحت تأثیر غلظت های هورمونیNAA و BA (میلی‌گرم درلیتردر محیط کشت MS)

غلظت / صفات		نسبت نمونه‌های زنده به کل نمونه‌ها	نسبت نمونه‌های کالوس‌زا به کل نمونه‌ها	نسبت نمونه‌های جنین‌زا به‌کل نمونه‌های کالوس‌زا	نسبت نمونه‌های شاخه‌زا به‌کل نمونه‌های جنین زا
NAA	BA				
۰/۰۲	۰/۱-	۰/۶۲۲ b	۰/۷۹۸ b	۳/۱۰۵ b	۰/۸۸۸ b
۰/۰۲	۰/۲-	۰/۶۱۳ c	۰/۷۹۲ b	۲/۴۷۱ c	۰/۷۴۴ c
۰/۰۲	۰/۴-	۰/۵۹۱ c	۰/۷۹۰ b	۲/۴۷۸ c	۰/۷۲۵ c
۰/۰۵	۰/۱-	۰/۶۶۳ b	۰/۷۹۴ b	۲/۹۹۵ b	۰/۷۲۱ c
۰/۰۵	۰/۲-	۰/۸۳۹ a	۰/۹۸۸a	۴/۰۱ a	۰/۸۲۶ b
۰/۰۵	۰/۴-	۰/۵۹۷ c	۰/۶۷۵ c	۲/۵۶۶ c	۰/۹۴۴ a
۰/۱	۰/۱-	۰/۶۱۹ b	۰/۷۹۸ b	۲/۸۰۳ b	۰/۷۲۳ c
۰/۱	۰/۲-	۰/۶۲۸ b	۰/۷۵۶ b	۳/۰۷۸ b	۰/۶۸۲ c
۰/۱	۰/۴-	۰/۵۸۷ c	۰/۶۹۵ c	۲/۵۰۳ c	۰/۶۹۳ c
معنی‌داری‌تیمارها		٪۱	٪۵	٪۱	٪۵

+ حروف متفاوت در هر ستون بیانگر معنی‌داری تیمارها حداقل در سطح قید شده است.



شکل ۱- مراحل مختلف باززائی گیاه کاهو (*Lactuca sativa L.*)

A) کالوس‌زایی و جنین‌زایی B) شاخه‌زایی C) ریشه‌زایی D) بذرگیری

آزمایش انتخاب غلظت هورمونی مناسب جهت تولید ریشه

مدت زمان برای بروز اولین ریشه یادداشت برداری شد (شکل۱-C). نتایج به دست آمده نشان داد (جدول۷) که ارقام، غلظت و اثر متقابل (شکل ۲) آنها جهت تولید ریشه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است.

نتایج مقادیر میانگین، انحراف معیار، ضریب تغییرات، حداکثر و حداقل صفت تولید ریشه در جدول (۸) آمده است. پس از گروه بندی میانگین‌ها مشخص شد که ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، در محیط کشت MS برای ریشه‌دار شدن مناسب‌تر است. با افزایش و کاهش مقادیر NAA و محیط کشت MS از سطح ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و محیط کشت MS، مدت زمان ریشه‌دار شدن افزایش می‌یابد.

برداشت بذور

در شاخه‌های ریشه‌دار شده (شکل۱ - **D**) بعد از ۴۵ روز گل‌ها ظاهر و بعد از ۷۵ روز بذور حاصل، برداشت شدند.

جدول۷- تجزیه واریانس وپارامترها برای صفت تولید ریشه

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
محیط کشت	۲	۱۰۱۶/۹۶	۵۰۸/۴۸	۳۲/۶۱**
غلظت هورمون NAA	۲	۵۱۱/۶۴	۲۵۵/۸۲	۱۶/۴۱**
محیط‌کشت×غلظت	۴	۳۸۴/۶۰	۹۶/۱۵	۶/۱۷**
خطای آزمایش	۱۸	۲۸۰/۶۲	۱۵/۵۹	

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

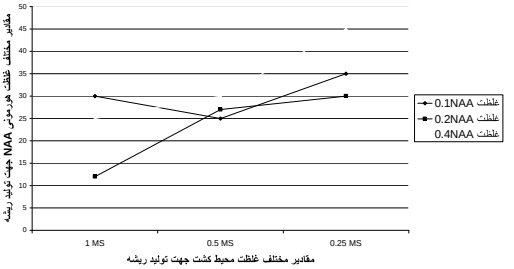
جدول ۸- مقادیرمیانگین، انحراف معیار، ضریب تغییرات حداکثر و حداقل مقادیر برای صفت تولید ریشه

پارامترها	میانگین	انحراف معیار	ضریب تغییرات	حداکثر	حداقل
مقادیر صفت تولید ریشه	۲۸/۹۳	۳/۹۵	۱۳/۶۵	۵۰	۱۰

جدول ۹- مقایسه میانگین صفت تولید ریشه با غلظت‌های هورمونی NAA در محیط‌های کشت MS متفاوت

غلظت mg/l \ محیط کشت	۱MS	۰/۵MS	۰/۲۵MS
۰/۱	۳۰b	۲۵ b	۳۵ c
۰/۲	۱۲a	۲۷b	۳۰b
۰/۴	۲۵ b	۳۰b	۴۵ c

+ حروف متفاوت در هر ستون بیانگر معنی‌دار درسطح ۱٪ است.



شکل ۲- نمودار اثرات متقابل محیط کشت و غلظت‌های هورمونی NAA

بحث

نتایج حاصل از بررسی غلظت‌های مختلف هیپو کلریت سدیم و تویین-۲۰ نشان داد که تویین-۲۰ ، ۰/۱٪ و هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ با نسبت‌های ۴ به ۱ و با زمان ۲۵ دقیقه جهت ضدعفونی بذور،کمترین آلودگی(۰٪)و بیشترین جوانه‌زنی (۱۰۰٪) را دارد. با افزایش غلظت هیپوکلریت سدیم میزان جوانه زنی بذور از ۱۰۰٪ در نسبت ۴ به۱) به ۰٪ در نسبت ۷ به ۳ در زمان ۲۵ دقیقه جهت ضدعفونی بذور کاهش پیدا کرده و با کاهش زمان و نسبت هیپوکلریت سدیم و تویین-۲۰ در نسبت ۴ به ۱ از ۲۰ دقیقه به ۱۵ دقیقه، میزان آلودگی بذور ۷۰٪ افزایش می‌یابد. با توجه به آلوده بودن بذور و پوشش‌های متفاوت آنها در ارقام مختلف، در صورت عدم استفاده از شوینده‌های قوی، آلودگی قارچی قابل حذف نخواهد بود. برای حذف آلودگی مارکوس پلیجی و همکاران (۲۰۰۱) از جوهر نمک و محلول تویین-۲۰، ۰/۱٪ و تورس.ا.سی و همکاران (۱۹۹۳) از کلریت سدیم ۱٪ و دو قطره تویین-۲۰ در۱۰۰ میلی لیتر محلول استفاده کرده‌اند. استفاده از یک شوینده قوی برای ضدعفونی یک ضرورت است و سایرین نیز در پروتکل خود از یک شوینده قوی استفاده کرده‌اند. به دلیل نازک بودن پوسته بذر کاهو استفاده از الکل و هیپوکلریت سدیم بطور همزمان جهت ضدعفونی بذر کاهو پیشنهاد نمی‌شود.

نتایج حاصل از انتقال بذور بعد از سه بار شستشو با آب مقطر استریل به روی محیط کشت MS فاقد هورمون یا ظرف پتری دارای کاغذ صافی مرطوب استریل نشان داد که جوانه زنی بذور بر روی محیط کشت MS فاقد هورمون حدود ۱۰٪ و سرعت رشد بسیار بطئی بود. با انتقال بذور استریل به ظرف پتری دارای کاغذ صافی مرطوب میزان جوانه‌زنی به حدود ۹۰ تا ۹۵ در صد افزایش یافت. نمونه‌ها در ۲۴±۹۶ ساعت آماده برای جداسازی ریزنمونه‌ها شدند. برای جوانه‌زنی بذور مارکوس پلیجی و همکاران (۲۰۰۱) از محیط کشت MS فاقد هورمون و تورس .ا. سی و همکاران (۱۹۹۳) از ظرف پتری دارای کاغذ صافی استریل مرطوب استفاده کرده اند. سرعت و مدت زمان جوانه‌زنی یکی از اهداف آزمایش بود که سرعت و مدت زمان جوانه‌زنی بر روی‌ظرف‌پتری مرطوب بسیار بالا بود.عدم‌موفقیت جوانه‌زنی بر روی محیط کشت MS فاقد هورمون ممکن است به متفاوت بودن ژنوتیپ‌های مورد استفاده ارتباط داشته باشد.

نتایج حاصل از بررسی انتخاب ریز نمونه‌ها (جدول ۲) نشان داد که لپه‌ها و محور زیر لپه‌ها به ترتیب بیشترین و کمترین کالوس‌زایی، جنین‌زایی و شاخه‌زایی را داشته‌اند. با انتخاب محور زیر لپه همراه با لپه نسبت نمونه‌های زنده به کل نمونه‌ها و کالوس به جنین‌زایی کاهش یافته ولی باززایی افزایش می‌یابد. با وجود مریستم انتهایی، ریز نمونه تولید شاخه نموده و میزان کالوس‌زایی و جنین‌زایی به شدت کاهش پیدا می‌کند. نمونه‌ها هر چه جوان‌تر باشند کالوس‌زایی آنها بیشتر خواهد بود. کالوس‌ها ۸ تا ۱۲روز بعد از کشت، قابل مشاهده می‌شوند.

بررسی منابع نیز نشان می‌دهد که لپه‌ها بهترین ریزنمونه برای کشت بافت ارقام مختلف کاهو هستند. هیروساکی کاناموتو و همکاران (۲۰۰۶) وسیلیا و همکاران (۲۰۰۵) و تومیا نیکی و همکاران (۲۰۰۱) از برگها و هایون جین سام و همکاران (۲۰۰۶) و مارکوس پلیجلی وهمکاران (۲۰۰۱) و ا، سی، تورس و همکاران (۱۹۹۳) و پاتری سیا و همکاران(۱۹۹۷) از لپه گیاه کاهو به عنوان ریزنمونه استفاده کرده‌اند. استفاده از برگ و لپه در آزمایش‌ها متداول بوده و نتایج تحقیق حاضر با نتایج افراد فوق‌الذکر تطابق دارد.

نتایج حاصل از بررسی تأثیرغلظت‌های مختلف هورمونی اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها نشان داد که ارقام مختلف کاهوی ایرانی با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA در ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتیگراد کالوس‌زایی و جنین‌زایی نشان می‌دهند. دو رقم TN-96-39 وTN-96-41 بهترین کالوس‌زایی و

جنین‌زایی و باززایی را در بین ۵ رقم نشان دادند (جدول۵). با تغییر نسبت هورمون‌ها ممکن است رقم دیگری بهترین کالوس‌زایی و جنین‌زایی و باز زایی را نشان دهد. معمولاً در گیاهان با افزایش نسبت غلظت هورمونی BA به NAA شاخه‌زایی در نمونه‌ها افزایش می‌یابد. در این آزمایش با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین شاخه‌زایی مشاهده شد (جدول۶). با توجه به نتایج جدول شماره ۶ در صورت کم اهمیت بودن کالوس‌زایی در آزمایش و با هدف باززایی مستقیم بهترین غلظت هورمونی، غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BA می‌باشد. برای شاخه‌زایی سیلیا- ال- لی لی ولت و همکاران (۲۰۰۵) و هایون جین سام و همکاران (۲۰۰۶) ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و هیروساکی کاناموتو و همکاران (۲۰۰۶) از ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA و تورس .ا. سی و همکاران (۱۹۹۳) و مارکوس پلیجلی و همکاران (۲۰۰۱)، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیترNAA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA در ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و ۲۲ تا۲۵ درجه سانتیگراد استفاده کرده‌اند. ممکن است اختلاف بوجود آمده نتیجه استفاده از ژنوتیپ‌های مختلف و نور باشد.

نتایج حاصل از بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف اکسینها و محیط کشت MS نشان داد که ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، درمحیط کشت MS برای ریشه‌دار شدن مناسب‌تر است. ریزنمونه‌ها در کوتاهترین زمان در این محیط ریشه‌دار شدند. با افزایش یا با کاهش غلظت هورمون NAA نمونه‌ها در مدت زمان طولانی تری ریشه‌دار شدند. با ایجاد رقابت در بین نمونه‌ها برای ریشه‌زایی هرچه مقدار محیط کشت در داخل لیوان کمتر باشد تعداد ریشه‌های به وجود آمده در مدت زمان معین بیشتر خواهد بود. با افزایش مقدار NAA در محیط کشت، کالوس‌های سفید در اطراف نمونه بوجود می‌آید و به مرور زمان به سمت باززایی تمایل پیدا می‌کنند.

هیروساکی کاناموتو و همکاران (۲۰۰۶) محیط کشت MS ½ و عاری از هورمون و مارکوس پلیجلی و همکاران (۲۰۰۱) از NAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برای ریشه‌زایی درگیاه کاهو استفاده کردند.

با توجه به یافته‌های پژوهشی از کشت بافت ارقام مختلف کاهوی ایرانی، برای انتقال ژن، ارقام TN-96-39 وTN-96-41 پیشنهاد و توصیه می‌شود، از ترکیب هورمونی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA برای کالوس‌زایی و جنین‌زایی و باززایی و از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BA برای شاخه‌زایی و باززائی مستقیم و برای ریشه‌زایی از ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و محیط کشت MS استفاده شود.

REFERENCES

1. Cilia L.C. Lelivelt, Matthew S. McCabe, Christine A. Newell, C. Bastiaan de Snoo1,Kees M.P. Van Dun1, Ian Birch-achin, John C. Gray, Kingston H.G. Mills and Jacqueline M. Nugent. 2005. Stable plastid transformation in lettuce *(Lactuca sativa L.*). Plant Molecular Biology 58:763–774
2. Evans, D. E, J .O.D. Colemen and A. Kearns. 2003. Plant cell culture Bio Scientific publishers (10-11)
3. Giovanna Frugis, Donato Giannino, Giovanni Mele, Chiara Nicolodi, Adriana Chiappetta, Maria Beatrice Bitonti, Anna Maria Innocenti, Walter Dewitte, Harry Van Onckelen, andDomenico Mariotti. 2001. Overexpression of *KNAT1* in lettuce shifts leaf determinate growth to a shoot-like indeterminate growth associated with an accumulation of isopentenyl-type cytokinins. *Plant Physiology*, 126: 1370–1380.
4. Hirosuke Kanamoto, Atsushi Yamashita, Hiroshi Asao, Satoru Okumura, Hisabumi Takase, Masahira Hattori, Akiho Yokota4 & Ken-Ichi Tomizawa. 2006. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa L*. cv. Cisco (lettuce) Plastids. Transgenic Research. 15:205–217
5. Honary, H., H. Alizadeh, A. Boshehri, S. A. Peighambari, & M. Jalali. 2007. Invitro regeneration of Iranian varieties of lettuce (Lactuca sativa L.) cultivars. 5th Iranian Horticultural Science Congress (14).

6. Hyeon-Jin Sun, Min-long Cui, Biao Ma and Hiroshi Ezura. 2006. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. FEBS Lett. 23:620-6.
7. Marcos Pileggi, Albanin Aparecida Mielniczki Pereira1, Joandrei dos Santos Silva, Sônia Alvim Veiga Pileggi and Desh Pal S. Verma . 2001. An improved method for transformation of lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* with a gene that confers freezing resistance. Brazilian Archives of Biology and Technology . 44: 191 – 196.
8. Matthew S. McCabe, Lee C. Garratt, Frank Schepers, Wilco J.R.M. Jordi, Geert M. Stoopen, Evert Davelaar, J. Hans A. van Rhijn, J. Brian Power, and Michael R. Davey. 2001. Effects of PSAG12-*IPT* gene expression on development and denescence in transgenic lettuce. *Plant Physiology*, 127: 505–516.
9. Patricia A. Okubara, Rosa Arroyo-Garcia, Katherine A. Shen, Marianne Mazier, Blake C. Meyers,Oswaldo E. Ochoa, Shinje Kim, Chang-Hsien Yang, and Richard W. Michelmore . 1997. A transgenic mutant of *Lactuca sativa* (lettuce) with a T-DNA tightly linked to lossof downy mildew resistance.Mpmi. 10: 970-977.
10. S. Curtis, C. HE, W. J. R.M. Jordi., E. Davelaar, J. B. Power, A. M. M. DE Laat and M. R. Davey. 1999. Promoter deletions are essential for transformation of lettuce by the T-*cyt* gene: the phenotypes of transgenic plants. *Annals of Botany* 83: 559-567.
11. Tomoya Niki, Takaaki Nishijima, Masayoshi Nakayama, Tamotsu Hisamatsu, Naomi Oyama-Okubo,Hiroko Yamazaki, Peter Hedden, Theo Lange, Lewis N. Mander, and Masaji Koshioka,. 2001. Production of dwarf tettuce by overexpressing a pumpkin gibberellin 20-oxidase gene. Plant Physiology, 126: 965–972.
12. Torres, A. C., Cantliffe, D. J., Laughner, B.; Bieniek, M.; Nagata, R.; Ashraf, M. and Ferl, R. J. 1993. Stable transformation of lettuce cultivar South Bay from cotyledon explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 34: 279-285