Archive of SID

شاخه‌زایی چندگانه مستقیم پنج رقم نخود (*Cicer arietinum* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

نسرین مشتاقی[۱]، عبدالرضا باقری[۲]، مختار جلالی جواران[۳] و بهزاد قره‌یاضی[۴]

چکیده

باززایی غیرمستقیم نخود به‌خاطر کالوس‌دهی بسیار پایین و عدم ثبات ژنتیکی کالوس همواره با مشکل همراه است. در این پژوهش، باززایی مستقیم به‌روش شاخه‌زایی چندگانه از ریزنمونه‌های محور جنینی پنج ژنوتیپ نخود (هاشم، آرمان، پیروز، MCC505 و MCC426) در محیط کشت MB، نمک‌های MS و ویتامین‌های B_5، به همراه سطوح مختلف چهار نوع سیتوکینین (BAP: ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر، TDZ: ۰/۲، ۰/۴، ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر، Zeatin: ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و Kin: ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) بررسی شد. برای ریشه‌زایی شاخه‌های به‌دست آمده، از محیط کشت MB کامل و MB ۱/۲ به‌همراه ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده گردید. نتایج نشان داد که بهترین تیمار سیتوکینین برای شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها با توجه به ژنوتیپ، متفاوت است. در مجموع BAP برای افزایش شاخه‌زایی در اکثر ژنوتیپ‌ها (۱ میلی‌گرم در لیتر برای ژنوتیپ MCC505 و ۳ میلی‌گرم در لیتر برای سایر ژنوتیپ‌ها) مناسب و نسبت به سایر سیتوکینین‌های استفاده شده بهتر بود، ضمن این‌که شاخه‌های به‌دست آمده نیز از رشد طبیعی برخوردار بودند. نتایج پژوهش نشان‌داد که محیط کشت MB ۱/۲ حاوی IBA (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) نیز برای ریشه‌زایی شاخه‌های به‌دست آمده از ژنوتیپ‌های مختلف مناسب، و تعداد و طول ریشه‌های به‌دست آمده به گونه‌ای بود که برای انتقال شاخه‌ها به شرایط طبیعی نتایج خوبی دربر داشت.

واژه های کلیدی: نخود، *Cicer arietinum*، شاخه‌زایی چندگانه مستقیم، کشت درون شیشه‌ای.

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد.
۲. عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد.
۳. عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران.
۴. عضو هیات علمی موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج.

---

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

نخود بعد از لوبیا و نخودفرنگی سومین محصول مهم از حبوبات در دنیا محسوب می‌شود. این گیاه علاوه بر این‌که منبع مهمی برای تامین پروتئین مورد نیاز انسان و دام به حساب می‌آید، نقش به‌سزایی در تثبیت نیتروژن و بهبود وضعیت حاصل‌خیزی خاک نیز دارد. در سال ۲۰۰۵ سطح زیر کشت این محصول در دنیا ۱۰/۳۵ میلیون هکتار و میزان تولید آن ۸ میلیون تن با متوسط عملکرد ۷۷۳ کیلوگرم در هکتار بوده است که عمدتاً به‌صورت دیم کشت می‌شود (فائو، ۲۰۰۵). در ۴۰ سال اخیر پیشرفت‌های قابل توجهی در زمینه تولید نخود و افزایش عملکرد آن صورت گرفته است، به گونه‌ای که عملکرد این محصول از ۵۵۰ کیلوگرم در هکتار در اوایل دهه ۱۹۶۰ به ۸۰۰ کیلوگرم در هکتار در سال ۲۰۰۳ رسیده است. با توجه به این پیشرفت در افزایش عملکرد، هنوز بین عملکرد این محصول در مزرعه با حداکثر پتانسیل ثبت شده فاصله نسبتاً زیادی وجود دارد. از دلایل این شکاف، حساسیت آن به آفات، بیماری‌های قارچی و تنش‌های غیرزیستی است. اصلاح نخود برای ایجاد مقاومت به تنش‌ها راه‌کار اصلی برای جلوگیری از کاهش عملکرد آن است. فقدان تنوع ژنتیکی کافی درون ژرم پلاسم نخود زراعی و عدم تلاقی سازگار گونه زراعی آن با اکثر گونه‌های وحشی (بجاج،۱۹۹۰) نیز از موانع اصلاح مقاومت به روش کلاسیک می‌باشد. به‌همین دلیل یک روش موثر و جای‌گزین، استفاده از منابع ژنی مختلف و مهندسی ژنتیک برای اصلاح مقاومت در این گیاه است (سامرز و همکاران، ۲۰۰۳؛ چاندرا و پتال، ۲۰۰۳). موفقیت در انتقال ژن نیز بستگی به‌دسترسی به‌یک دستورالعمل باززایی موثر و کارا در شرایط درون شیشه‌ای دارد. نخود مانند سایر بقولات دانه‌ای از لحاظ باززایی و انتقال ژن سرسخت و مشکل است (چاندرا و پتال، ۲۰۰۳). به‌طور کلی سیستم‌های باززایی نخود در سه بخش باززایی از مریستم‌های از قبل موجود، اندام‌زایی از نقاط مریستمی تمایز یافته در کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی مورد بررسی قرار گرفته و هر یک از این شیوه‌ها با نقاط قوت و محدودیت‌هایی همراه می‌باشند (شالینی و همکاران، ۲۰۰۱). تاکنون از روش‌هایی نظیر شاخه‌زایی از طریق القای کالوس و اندام‌زایی در ریزنمونه‌های مختلف و نواحی مریستمی برای باززایی در نخود استفاده شده است (جفرسون، ۱۹۸۷؛ بارنا و واخلو، ۱۹۹۴؛ رامانا و همکاران، ۱۹۹۶؛ پولی سیتی و همکاران، ۱۹۹۶؛ اسلام و همکاران، ۱۹۹۹؛ کریشنامورسی و همکاران، ۲۰۰۰؛ سانیال و همکاران، ۲۰۰۵).

تقریباً هر بخش از گیاه نخود در محیط کشت با ترکیبات هورمونی مناسب، کالوس تولید می‌نماید، اما کالوس‌های به‌دست آمده خصوصاً در حضور 2,4-D تغییرات کروموزومی پلی‌پلوییدی را نشان می‌دهند و پس از مدتی نکروزه و قهوه‌ای شده و قادر به باززایی گیاه نیستند و در مجموع اندام‌زایی از کالوس نخود با موفقیت کمی همراه است(بارنا و واخلو، ۱۹۹۴). کالوس‌های جنین‌زا سیستم مناسبی را برای مطالعه جنین‌زایی و عوامل موثر بر آن فراهم می‌کنند ولی به‌علت تولید کم جنین، جوانه‌زنی ضعیف، تنوع سوماکلونال و پایین بودن تبدیل جنین‌های سوماتیکی به گیاه‌چه، این روش نیز برای باززایی نخود چندان مناسب نیست (بجاج،۱۹۹۰؛ پاوان، ۲۰۰۱). با توجه به محدودیت‌های فوق، در سال‌های اخیر روش باززایی مستقیم از طریق شاخه‌زایی چندگانه مورد توجه قرار گرفته و گزارش هایی در مورد استفاده از ریزنمونه‌های مختلف حاوی نواحی مریستمی نظیر گره لپه‌ای (سانیال و همکاران، ۲۰۰۵)، محور جنینی (پولی سیتی و همکاران، ۱۹۹۷؛ سنتیل و همکاران،۲۰۰۴) و جنین نابالغ (کریشنامورسی و همکاران،۲۰۰۰) وجود دارد. اما بررسی‌ها نشان می‌دهند که تعداد شاخه‌های به‌دست

---

www.SID.ir

Archive of SID

آمده از هر گره لپه‌ای پایین (در حد ۵ شاخه از هر ریزنمونه) است. استفاده از محور جنینی بر سایر ریزنمونه‌های استفاده شده خصوصا در برنامه‌های انتقال ژن ترجیح داده می‌شود زیرا محور جنینی حاوی سلول‌هایی است که مستعد باززایی هستند و می‌توانند اهداف مناسبی برای دریافت ژن باشند. برای انجام باززایی مستقیم شاخه در نخود از ریزنمونه‌ها و هورمون‌های گوناگون در غلظت‌های مختلف استفاده شده است که در اکثر مطالعات هورمون BAP به تنهایی یا به‌صورت ترکیب با یک اکسین نتایج مطلوبی داشته است (شالینی و همکاران ، ۲۰۰۱). نتایج این بررسی‌ها نشان می‌دهند که در این روش نیز دستورالعمل ثابتی برای تمامی ژنوتیپ‌های نخود قابل توصیه نیست و باززایی آن به عواملی همچون ژنوتیپ، نوع ریزنمونه مورد استفاده، تنظیم کننده های رشد و شرایط محیط کشت بستگی دارد. ضمن اینکه در اکثر این گزارش‌ها، ریشه‌زایی قلمه ها و انتقال موفق آنها به شرایط گلخانه نیز با مشکلات زیادی همراه بوده است (سنتیل و همکاران ، ۲۰۰۴). به همین دلیل قبل از شروع هر گونه پروژه مهندسی ژنتیک در این گیاه لازم است تا باززایی در ژنوتیپ‌های مورد نظر بهینه گردد. لذا در این بررسی، تاثیر نوع و غلظت سیتوکینین‌های مختلف بر روی شاخه‌زایی چندگانه مستقیم از ریزنمونه‌های محور جنینی چند ژنوتیپ نخود مورد آزمون قرار گرفته است و هم‌چنین محیط مطلوب برای ریشه‌زایی و روش سازگاری گیاهچه‌های تولیدی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این مطالعه از ژنوتیپ‌های هاشم، آرمان، پیروز، لاین MCC505 (ILC533) و لاین MCC426 (لاین گزینش شده از توده بومی قزوین) به‌منظور باززایی استفاده گردید. ریزنمونه‌های محور جنینی نوک‌زدایی شده برای تحریک شاخه‌زایی چندگانه در ترکیبات هورمونی مختلف استفاده شدند. برای تهیه ریزنمونه‌ها، ابتدا بذور سالم و یکنواخت از هر ژنوتیپ انتخاب و پس از شستشو با آب مقطر، با الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. با حذف مایع ضدعفونی کننده، بذور با آب‌مقطر استریل سه الی چهار بار و در مجموع به‌مدت ۱۰ دقیقه آب‌کشی شدند. به‌دنبال آن بذور در محیط حاوی آب و آگار در تاریکی به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و محور جنینی هر یک از بذور با کمک پنس و اسکالپل جداسازی و نوک‌زدایی گردید.

شاخه‌زایی

به‌منظور بررسی تاثیر نوع هورمون سیتوکینین و غلظت آن بر تحریک شاخه‌زایی محورهای جنینی، از چهار نوع سیتوکینین شامل بنزیل آمینوپورین (BAP : ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر)، تیدیازورون (TDZ: ۰/۲، ۰/۴، ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر)، زآتین (Zeatin: ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و کینتین (Kin: ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) به صورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور ژنوتیپ (پنج سطح) و نوع و غلظت سیتوکینین (۱۳ سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تکرار و ۴ ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. از محیط کشت MB حاوی نمک‌های MS (موراشی و اسکوگ، ۱۹۶۲) و ویتامین‌های B_5 (گامبورگ و همکاران، ۱۹۶۸) به‌همراه ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار با pH= ۵/۷ استفاده شد. ۴ محور جنینی تهیه شده از ۵ ژنوتیپ نخود در هر یک از پتری دیش‌های به قطر ۹ سانتی‌متر حاوی محیط کشت MB و هورمون قرار داده شده و در اتاقک رشد در دمای ۳±۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۸:۱۶ (روشنایی: تاریکی) با شدت نور ۵۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه به مدت یک هفته نگهداری شدند. پس از یک هفته تحریک

---

www.SID.ir

Archive of SID

هورمونی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت تازه MB بدون هورمون برای شاخه‌زایی واکشت گردیدند. به‌دنبال آن تعداد شاخه‌های تولید شده در هر ریزنمونه در فواصل معین یک هفته تا سه هفته شمارش شد.

طویل شدن شاخه

پس از گذشت ۴۰ روز، شاخه‌های تولید شده در محیط‌کشت حاوی هورمون تیدیازورون، بسیار فشرده، قطور و کوتاه بودند، به‌همین دلیل به محیط کشت MB، جهت طویل شدن ساقه، ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک اضافه شد. این آزمایش با دو فاکتور ژنوتیپ در پنج سطح و غلظت اسید جیبرلیک با دو سطح ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر با ۴ تکرار و ۳ ریزنمونه در هر تکرار اجرا گردید و پس از سه هفته تاثیر غلظت اسید جیبرلیک بر طویل شدن ساقه مورد بررسی قرار گرفت.

ریشه‌زایی

به‌منظور انتخاب محیط مناسب ریشه‌زایی و بررسی تاثیر هورمون ایندول بوتیریک اسید (IBA) بر میزان ریشه‌زایی شاخه‌ها، از محیط کشت MB کامل و MB $^1/_2$ به‌همراه ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده شد. پس از دو هفته ریشه‌ها ظاهر شده و درصد ریشه‌زایی، طول و تعداد ریشه‌های به‌دست آمده از هر ریزنمونه تعیین گردید. تیمارهای ریشه‌زایی به صورت آزمایش فاکتوریل با ۳ فاکتور ژنوتیپ (پنج سطح)، محیط کشت (دو سطح) و غلظت IBA (دو سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و ۴ ریزنمونه در هر تکرار انجام و آنالیز شد.

سازگاری

به‌منظور سازگاری و انطباق گیاهچه‌های حاصله با شرایط بیرون، از دو روش برای کشت شاخه‌های ریشه‌دار شده استفاده گردید. در روش اول شاخه‌های ریشه‌دار شده در محلول‌های غذایی هوگلند و کوپر تحت شرایط کشت هیدروپونیک (کشت آبی) در اتاق کشت انتقال یافتند و از لیوان پلاستیکی شفاف برای حفظ رطوبت بالا در اطراف ریزنمونه‌ها استفاده شد. در روش دوم ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده ابتدا به درون لوله‌های آزمایش به قطر ۲ سانتی‌متر حاوی محیط کشت MB $^1/_4$ مایع با pH= ۵/۸ و ساکارز ۲ درصد بر روی پل کاغذی انتقال یافتند (شکل ۲-ج). پس از دو هفته درپوش آلومینیومی هر یک از لوله‌ها بتدریج برداشته شده و پس از چند روز به‌داخل گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۵ سانتی‌متر حاوی مخلوط ۱:۱ پرلیت و کوکوپیت انتقال یافتند. ابتدا پلاستیک‌های شفافی بر روی گیاهچه‌ها قرار داده شد و هر چند روز یک‌بار با محلول غذایی حاوی نمک‌های MB $^1/_4$ محلول‌پاشی گردیدند. پس از مدتی پلاستیک‌های شفاف به‌تدریج برداشته شد تا گیاهچه‌ها با محیط اتاقک رشد سازگار گردند.

نتیجه و بحث

شاخه‌زایی

نتایج تجزیه واریانس داده‌های شاخه‌زایی نشان می‌دهد که بین ژنوتیپ‌های مختلف نخود، نوع و غلظت هورمون، از نظر شاخه‌زایی اختلاف معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) وجود دارد. هم‌چنین عکس‌العمل ژنوتیپ‌ها در سطوح مختلف هورمون‌ها نیز متفاوت است. به‌عبارت دیگر اثر متقابل معنی‌داری بین ژنوتیپ و ترکیب هورمونی در تحریک شاخه‌زایی وجود دارد (جدول ۱). به‌طوری‌که با افزایش غلظت BAP، میزان شاخه‌زایی در ارقام هاشم، آرمان، پیروز و لاین MCC426 افزایش ولی در ژنوتیپ MCC505 کاهش یافت. علاوه بر این سطوح متوسط هورمون‌های زآتین و TDZ برای شاخه‌زایی مناسب بود ولی هورمون کینتین و غلظت‌های آن تاثیری بر شاخه‌زایی ژنوتیپ‌ها نداشت.

---

www.SID.ir

جدول۱: تاثیر انواع هورمون سیتوکینین و غلظت‌های مختلف آن‌ها بر میانگین تعداد شاخه تولیدی در ۵ ژنوتیپ نخود

نوع سیتوکینین و غلظت های آن (mg/L) / رقم	Zeatin			TDZ				Kin			BAP		
	۰/۵	۱	۲	۰/۲	۰/۴	۱	۳	۱	۲	۳	۱	۲	۳
هاشم	۳/۰o-t	۳/۱۱n-s	۳/۴j-q	۲/۸p-t	۴/۱f-i	۳/۳k-s	۳/۸g-m	۳/۰o-t	۲/۷r-t	۳/۷g-o	۵/۳e	۵/۵ e	۶/۵cd
آرمان	۱/۸uv	۲/۷q-t	۱/۷uv	۲/۴tu	۲/۶st	۴/۲f-i	۳/۷g-o	۳/۹g-l	۴/۱f-i	۳/۴j-q	۶/۹c	۶/۴ cd	۸/۶b
پیروز	۲/۳tu	۳/۳j-r	۳/۱o-s	۳/۶h-o	۵/۲e	۳/۹g-l	۲/۷r-t	۱/۹uv	۱/۶v	۱/۴v	۳/۳j-r	۴/۶ f	۳/۹f-k
MCC505	۳/۳k-s	۳/۷g-o	۳/۱o-s	۳/۹f-k	۶/۳cd	۴/۳f-h	۴/۳Fg	۳/۸g-n	۴/۰f-j	۳/۵i-p	۱۰/۴a	۵/۳ e	۴/۲f-h
MCC426	۳/۱o-s	۳/۳k-s	۳/۲m-s	۴/۲f-h	۳/۲l-s	۴/۲f-h	۲/۹f-k	۳/۳j-r	۳/۳k-s	۳/۷g-o	۴/۰f-j	۵/۳ e	۶/۱d

Archive of SID

چنین به‌نظر می‌رسد که این هورمون در مقایسه با سایر سیتوکنین‌های مورد بررسی، برای شاخه‌زایی در نخود مناسب نیست. در ارقام هاشم، آرمان و لاین MCC426 غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP بالاترین شاخه‌زایی را به‌دنبال داشت. با این‌حال ژنوتیپ MCC505 با تولید بیش از ۱۰ شاخه در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP، بالاترین میزان شاخه‌زایی را در بین ژنوتیپ‌ها و سطوح هورمونی نشان داد. رقم پیروز بیش‌ترین شاخه‌زایی را در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر از هورمون TDZ با تولید متوسط ۵ شاخه در هر ریزنمونه داشت که البته پاسخ آن به هورمون‌های زآتین و BAP نیز مشابه TDZ بود (جدول ۱).

تعداد شاخه‌های تولید شده در هر ریزنمونه با گذشت زمان افزایش یافت (شکل ۱) و از این نظر ژنوتیپ‌ها پاسخ متفاوتی نشان دادند. در هفته اول میزان شاخه‌های تولیدی در ژنوتیپ‌های مختلف یک‌سان بود و به‌تدریج اختلاف بین ژنوتیپ‌ها از نظر تعداد شاخه تولیدی نمایان شد. به‌طوری‌که تعداد آن در پایان هفته سوم پس از کاشت بیش‌ترین بود و ژنوتیپ MCC505 با متوسط تولید ۷ تا ۸ شاخه در هر ریزنمونه دارای بیش‌ترین تعداد شاخه و رقم پیروز دارای کم‌ترین تعداد شاخه بود. میزان شاخه‌زایی در ژنوتیپ MCC505 به گونه‌ای بود که تا ۱۵ شاخه نیز در برخی ریزنمونه‌ها در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد.

داده‌های جدول ۲ نشان می‌دهند که ارقام نخود عکس‌العمل متفاوتی نسبت به سطوح هورمونی مختلف از نظر طول شاخه‌ی تولیدی نشان می‌دهند و روند مشخصی را بیان نمی‌کنند. علاوه بر آن طول شاخه تولیدی در سطوح مختلف هورمون کینتین و زآتین بیش‌ترین و در سطوح مختلف هورمون‌های BAP و TDZ در حد کم‌ترین مقدار بود. این یافته‌ها بر خلاف نتایج به‌دست آمده از تاثیر این هورمون‌ها بر تعداد شاخه است. به این‌نحو که هورمون‌های BAP و TDZ اگرچه بیش‌ترین تعداد شاخه را تولید کردند ولی طول شاخه‌های تولید شده در آن‌ها کم بود. با توجه به این‌که در باززایی، تعداد بیشتر شاخه طبیعی و قابل انتقال از اهمیت بیش‌تری نسبت به‌طول شاخه برخوردار است، به‌همین دلیل هورمون BAP به‌خاطر تولید تعداد شاخه‌های بیشتر و طبیعی مناسب‌تر است. تعداد شاخه‌های تولیدی در هورمون TDZ نیز اگرچه افزایش نشان داد ولی شاخه‌های به‌دست آمده در این تیمار به‌هم فشرده و غیر طبیعی بوده و برای انتقال مناسب نبودند.

طول شاخه تولیدی در تمام ژنوتیپ‌ها نیز با گذشت زمان روندی افزایشی داشت ولی تفاوت قابل توجهی در طول شاخه تولیدی بین ارقام وجود نداشت. بیش‌ترین طول شاخه تولیدی (۲/۵ سانتی‌متر) پس از سه هفته، مربوط به رقم هاشم و کم‌ترین طول شاخه (۱/۷ سانتی‌متر) مربوط به رقم پیروز بود (شکل۱).

کار و همکاران (۱۹۹۶) از طریق شاخه‌زایی چندگانه با استفاده از ریزنمونه‌ی محور جنینی توانستند دو ژنوتیپ ICCV-1 و ICCV-2 را باززایی نمایند. آن‌ها شاخه‌زایی چندگانه را در محیط کشت MS حاوی ویتامین‌های B_5 و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۰۴ میلی‌گرم در لیتر NAA انجام دادند و توانستند حداکثر ۶ شاخه در هر ریزنمونه به‌دست آورند. باترا (۲۰۰۲) نیز توانست یک دستورالعمل برای باززایی مستقیم دو رقم نخود هندی بهینه کند. وی از لپه‌های نارس (۸-۷ میلی‌متر) بر روی محیط MS حاوی ویتامین‌های B5 و هورمون‌های BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (۰/۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر) توانست شاخه را به‌طور مستقیم و بدون واسطه‌ی کالوس تولید نماید. با توجه به‌این پژوهش و هم‌چنین پژوهش‌های انجام شده می‌توان ابراز داشت که هورمون

---

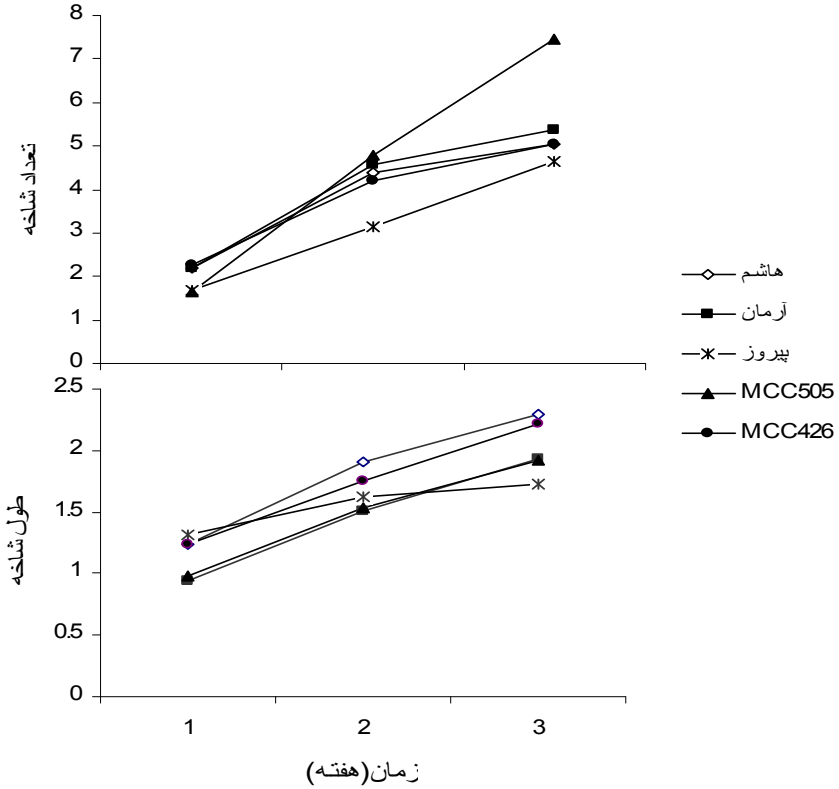
www.SID.ir

جدول۲: تاثیر انواع هورمون سیتوکینین و غلظت‌های مختلف آن‌ها بر میانگین طول شاخه تولیدی(سانتی‌متر) در ۵ ژنوتیپ نخود

نوع سیتوکینین و غلظت های آن (mg/L) / رقم	Zeatin			TDZ				Kin			BAP		
	۰/۵	۱	۲	۰/۲	۰/۴	۱	۳	۱	۲	۳	۱	۲	۳
هاشم	۲/۵c-e	۲/۳ef	۱/۹ij	۱/۰r-y	۱/۴l-p	۰/۸w-y	۰/۸v-y	۳/۶a	۲/۵c-e	۲/۲f-h	۱/۸i-k	۱/۵l-o	۱/۳n-r
آرمان	۱/۰q-x	۱/۷i-l	۱/۶j-m	۰/۷y	۰/۷xy	۰/۸v-y	۰/۹t-y	۲/۳e-g	۲/۴d-f	۲/۷c	۱/۵k-n	۱/۵k-o	۱/۱q-v
پیروز	۲/۳d-f	۳/۲b	۲/۸c	۱/۲n-s	۱/۲o-t	۱/۰s-y	۱/۱p-u	۰/۹s-y	m-۱/۳q	۱/۹ij	۰/۹u-y	۱/۵k-o	۰/۹u-y
MCC505	۲/۲e-h	۲/۳e-g	۱/۷i-l	۰/۹s-y	۱/۰s-y	۰/۸v-y	۰/۷w-y	۲/۳e-g	۱/۹hi	۱/۹ij	۱/۴l-p	۱/۲o-t	۰/۹v-y
MCC426	۲/۴d-f	۲/۰g-i	۱/۹ij	۱/۳m-q	۰/۹t-y	۰/۹s-y	۰/۸w-y	۲/۷c	۲/۶cd	۲/۶cd	۱/۸i-k	q-۱/۰w	۱/۵k-n

حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد (P< ۰/۰۱) است.

Archive of SID



شکل ۱: تعداد و طول شاخه در خلال سه هفته پس از کاشت پنج ژنوتیپ نخود

BAP می‌تواند سیتوکینین مناسبی برای تحریک شاخه‌زایی چندگانه در ژنوتیپ‌های نخود باشد. عموماً استفاده از غلظت‌های بالای این هورمون نظیر ۲ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر سبب تولید تعداد کافی شاخه در هر ریزنمونه می‌شود. اگرچه در برخی از پژوهش‌های انجام شده از هورمون TDZ برای شاخه‌زایی نخود استفاده نموده‌اند، ولی نتایج این بررسی نشان می‌دهد که شاخه‌های به‌دست آمده به‌هم فشرده و به‌راحتی قابل تفکیک نیستند. از طرفی استفاده از هورمون BAP نسبت به TDZ از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر بوده و شاخه‌های طبیعی‌تری در اکثر ژنوتیپ‌ها تولید می‌نماید (شکل ۲-الف).

شکل ۲: الف- شاخه‌زایی محورهای جنینی، ب- ریشه‌زایی شاخه‌ها و ج- انتقال شاخه‌های ریشه‌دار شده به درون محیط مایع MS$_{۱/۴}$ در لوله آزمایش

---

www.SID.ir

Archive of SID

همان‌طوری‌که ذکر شد شاخه‌های تولید شده در تیمارهای هورمونی TDZ بسیار به‌هم فشرده و به آسانی از یکدیگر تفکیک نمی‌شدند. به‌نظر می‌رسد این هورمون سبب تحریک شدید تقسیم سلولی و در نتیجه قطور شدن و به‌هم فشردگی شاخه‌ها و جوانه‌ها می‌شود و بیشتر تولید یک توده می‌کند تا اینکه شبیه به شاخه‌های مجزا باشد. لذا از یک محیط کشت طویل شدن شاخه برای افزایش رشد این شاخه‌ها قبل از انتقال به محیط ریشه‌زایی استفاده گردید. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از این آزمایش نشان داد که کاربرد اسید جیبرلیک سبب افزایش طول شاخه می‌شود. اسید جیبرلیک با تحریک طویل شدن سلول‌ها سبب طویل شدن شاخه‌ها می‌شود (جیتا و همکاران، ۱۹۹۸) و در نتیجه می‌توان از آن برای برطرف کردن مشکل به‌هم فشردگی شاخه‌ها استفاده کرد. بین دو سطح هورمونی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک اختلاف معنی‌داری در طویل شدن شاخه‌ها وجود نداشت. ضمن این‌که پاسخ ژنوتیپ‌ها نیز در این دو سطح یک‌سان بود. افزایش در طول شاخه از ۰/۸ سانتی‌متر در ژنوتیپ MCC426 تا ۱/۳ سانتی‌متر در رقم هاشم متغیر بود. به‌طور متوسط هر دو سطح هورمونی سبب افزایش ۱ سانتی‌متر در طول شاخه‌های تولیدی شدند. بنابراین زمانی که از هورمون TDZ برای افزایش شاخه‌زایی در ژنوتیپ‌ها استفاده می‌شود، بهتر است که قبل از ریشه‌زایی، شاخه‌ها در یک محیط‌کشت طویل شدن شاخه کشت شوند تا شاخه‌های به‌دست آمده رشد نموده و قابل تفکیک باشند.

ریشه‌زایی

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از درصد ریشه‌زایی نشان داد که عکس‌العمل ارقام در این دو محیط و دو ترکیب هورمونی متفاوت بود. در مجموع محیط کشت MB ۱/۲ برای ریشه‌زایی در تمام ژنوتیپ‌ها مناسب‌تر بود به‌طوری که ۸۵ درصد شاخه‌ها در این محیط ریشه‌دار شدند. استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA نیز ریشه‌زایی ۷۴ درصد شاخه‌ها را در پی داشت که تاثیر بهتر بر ریشه‌زایی را نسبت به ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA نشان می‌دهد (شکل۲-ب). با توجه به وجود اثر متقابل معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها و محیط‌های کشت برای هر یک از ژنوتیپ‌ها از محیط کشت مناسب آن استفاده نمود. همان‌طوری که شکل ۳ نشان می‌دهد برای رقم آرمان محیط MB ۱/۲ به اضافه ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و برای سایر ژنوتیپ‌ها محیط کشت MB ۱/۲ حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی شاخه‌های به‌دست آمده مناسب‌تر است.

یکی از مشکلات اصلی در باززایی نخود، ریشه‌دار نمودن شاخه‌های به‌دست آمده در شرایط کشت بافت برای تولید یک گیاه کامل و قابل انتقال است و بر طبق گزارش‌های موجود میزان ریشه‌زایی در شاخه‌های به‌دست آمده پایین است (سامرز و همکاران، ۲۰۰۳). استفاده از محیط‌کشت‌های رقیق نمکی با غلظت‌های مختلف IBA برای ریشه‌زایی شاخه‌ها مناسب است. عموماً محیط کشت مورد استفاده برای تحریک ریشه‌زایی نیاز به مواد غذایی کم‌تری نسبت به محیط کشت شاخه‌زایی دارد. به‌نظر می‌رسد برهم‌کنش عناصر غذایی در غلظت بالا اثر منفی بر ریشه‌زایی شاخه‌ها داشته و اثر هورمون IBA را از بین می‌برد (پولی‌سیتی و همکاران، ۱۹۹۶).

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تعداد ریشه در هر شاخه نشان داد که پاسخ ارقام مختلف به نوع محیط کشت و سطوح IBA متفاوت است. در مجموع اختلافی بین سطوح هورمونی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA در تعداد ریشه به‌دست آمده وجود نداشت. بیش‌ترین تعداد ریشه (۷ تا ۸ ریشه) در ژنوتیپ‌های MCC505 و MCC426 به‌ترتیب در محیط‌های MB ۱/۲ +۱mg/l IBA و +۲mg/l IBA

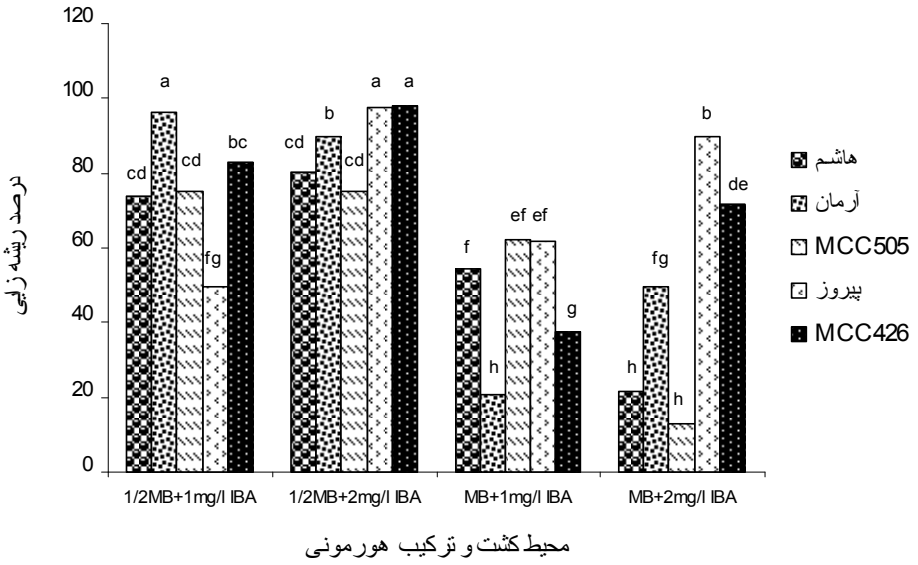
---

www.SID.ir

Archive of SID

MB ۱/۲ مشاهده شد (جدول ۳). داده‌های حاصل از طول ریشه نیز نشان می‌دهد که اختلاف چندانی بین محیط کشت‌ها و ژنوتیپ‌ها وجود ندارد و نکته مهم در این‌جا تشکیل ریشه و درصد ریشه‌زایی بالا است.

بنابراین در مجموع می‌توان گفت محیط‌های mg/l MB ۱/۲ +۱IBA و MB ۱/۲ +۲mg/l IBA محیط‌کشت مطلوبی برای ریشه‌زایی در شاخه‌های به‌دست آمده می‌باشند.



شکل ۳: درصد ریشه‌زایی ۵ ژنوتیپ نخود در ۴ ترکیب هورمونی و محیط کشت (حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد (P< ۰/۰۱) است)

برطبق پژوهشی که پولی‌سیتی و همکاران (۱۹۹۶) انجام داده‌اند، بهترین محیط برای ریشه‌زایی شاخه‌های به‌دست آمده از شاخه‌زایی چندگانه محیط کشت MS ۱/۴ بود. آنها ریشه‌دار شدن شاخه‌های باززایی شده را در محیط ۱/۴ ، ۱/۲ و محیط کشت کامل MS بررسی نموده و مشاهده کردند که بیشترین ریشه‌دهی در محیط MS ۱/۴ صورت گرفته و با انتقال این شاخه‌های ریشه‌دار شده به محلول غذایی هوگلند، تعداد و طول ریشه افزایش یافت. باترا (۲۰۰۲) نیز شاخه‌های باززایی شده را در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی IBA در تاریکی نسبی ریشه‌دار نمود. سوهاسینی و همکاران (۱۹۹۴) از روش غیرمستقیم جنین‌زایی سوماتیکی استفاده نمودند و جنین‌ها را برای ریشه‌دار شدن به محیط کشت حاوی نصف غلظت نمک‌های MS منتقل نموده و گیاهچه‌های رسیده را به خاک انتقال دادند. مرور پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد که غلظت پایین نمک‌های معدنی و آلی در محیط کشت برای ریشه‌زایی مناسب‌تر است. در این پژوهش نیز غلظت MB ۱/۲ برای ریشه‌زایی مناسب بود و درصد بالایی از شاخه‌ها در این محیط‌کشت ریشه‌دار شدند. اگرچه در برخی مطالعات از محیط کشت MS ۱/۴ برای ریشه‌زایی استفاده شده ولی نتایج این مطالعه نشان داد که کاهش ناگهانی غلظت نمک‌ها از MS کامل به MS ۱/۴ به گیاهچه شوک وارد کرده و سبب اندک رنگ‌پریدگی در برخی شاخه‌ها می‌شود که

---

www.SID.ir

جدول۳: تاثیر محیط کشت و ترکیب هورمونی بر تعداد و طول ریشه به‌دست آمده در ۵ ژنوتیپ نخود

محیط کشت و ترکیب هورمونی / رقم	½MB +۱mg/l IBA		½MB+۲mg/l IBA		MB+۱mg/l IBA		MB+۲mg/l IBA	
	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی متر)	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی متر)	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی متر)	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی متر)
هاشم	۴/۵bc	۲/۲۵ab	۵/۵b	۲/۰abc	۴/۵bc	۲/۲۵ab	۲/۵de	۱/۵a-d
آرمان	۴/۵bc	۲/۰a-c	۵/۵b	۱/۶۳a-d	۳/۵cd	۱/۵a-d	۳/۵cd	۲/۰a-c
پیروز	۴/۵bc	۰/۵d	۵/۲۵b	۰/۸۸cd	۲/۲۵ef	۱/۳۸b-d	۵/۵b	۲/۱۳a-c
MCC505	۷/۵a	۲/۵ab	۴/۵bc	۲/۷۵a	۴/۵bc	۱/۵a-d	۲/۲۵ef	۱/۸۸a-c
MCC426	۵/۵b	۲/۵ab	۷/۵a	۱/۸۸a-c	۱/۲۵f	۲/۵ab	۱/۲۵f	۱/۵a-d

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد ($P< ۰/۰۱$) است

Archive of SID

ممکن است ناشی از کاهش کلرور کلسیم موجود در محیط کشت باشد. از طرفی استفاده از یک اکسین ضعیف نظیر IBA در محیط‌کشت برای تحریک ریشه‌زایی کافی است. اگرچه از غلظت‌های پایین IBA برای تحریک ریشه‌زایی استفاده شده است ولی تجربه این پژوهش نشان داده که ریشه‌های به‌دست آمده در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA از تعداد و شکل نرمال‌تری برخوردار هستند و تنها قرارگرفتن شاخه‌ها به‌مدت کوتاه ۲ هفته می‌تواند سبب تحریک ریشه‌زایی در اکثر نمونه‌ها شود.

سازگاری

سازگاری شاخه‌های ریشه‌دار شده با شرایط طبیعی نیز از اهمیت خاصی خصوصاً در بحث کشت بافت و مهندسی ژنتیک برخوردار است. انتقال شاخه‌های ریشه‌دار شده به محیط‌کشت هیدروپونیک موفقیت‌آمیز نبود و پس از یک الی دو هفته تمام شاخه‌ها از بین رفتند که یکی از دلایل آن می‌تواند به‌خاطر عدم اندازه مناسب شاخه‌ها و ضعیف بودن آن‌ها برای استقرار در محیط هیدروپونیک با فضای بزرگ‌تر نسبت به کشت درون شیشه باشد. انتقال شاخه‌های ریشه‌دار شده به درون ظروف لوله آزمایش حاوی محیط مایع MB۴/۱ به مدت دو هفته (شکل ۲-ج) و سپس انتقال این شاخه‌ها به داخل گلدان‌های پلاستیکی حاوی نسبت ۱:۱ از پرلیت و کوکوپیت با موفقیت همراه بود و حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد از شاخه‌ها بقا یافتند. لذا به‌نظر می‌رسد استفاده از درپوش‌های پلاستیکی شفاف برای حفظ رطوبت شاخه‌ها مناسب بوده و محلول پاشی گیاهچه‌ها با محلول نمک‌های MS۴/۱ در فواصل ۲ تا ۳ روز یک‌بار و به‌دنبال آن برداشتن تدریجی درپوش‌ها برای سازگاری گیاهچه‌ها با محیط بیرون مناسب باشد.

هم‌چنین نتایج سازگاری نشان داد که انتقال مستقیم شاخه‌های ریشه‌دار شده به گلدان از موفقیت کمی برخوردار است و استفاده از یک محیط‌کشت واسطه برای سازگاری توصیه می‌شود. در این محیط‌کشت واسطه (MS۴/۱) غلظت نمک‌ها نسبت به محیط‌کشت ریشه‌زایی (MS ۲/۱) کم‌تر شده است و به‌تدریج گیاه با شرایط بیرونی اتاق کشت سازگار می‌شود. از طرفی قرار گرفتن شاخه‌ها در این محیط‌کشت مایع واسطه سبب تحریک رشد ریشه و افزایش طول آن می‌شود. تعداد و طول ریشه بیش‌تر از جمله عوامل مهم تعیین کننده برای افزایش درصد بقای شاخه‌ها در شرایط گلدان است.

در مجموع می‌توان ابراز داشت که نتایج این آزمایش نیز مشابه با گزارش دیگران به این موضوع تاکید دارد که ژنوتیپ، نوع و غلظت سیتوکینین در موفقیت و کارایی باززایی مستقیم نخود موثر هستند. برای هر یک از ژنوتیپ‌ها، نوع خاصی از سیتوکینین با غلظت خاصی بالاترین میزان شاخه‌زایی را در پی دارد. به‌نحوی که ژنوتیپ MCC505 به محیط‌کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و سایر ژنوتیپ‌ها به محیط‌کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP پاسخ بهتری دادند، ولی از نظر میانگین درصد ریشه‌زایی پاسخ تمام ژنوتیپ‌ها اندکی با هم متفاوت بود و می‌توان برای هر ژنوتیپ ترکیب خاصی از محیط کشت تغییر یافته MS و هورمون IBA را توصیه نمود. لذا توصیه می‌شود برای حصول درصد بالای باززایی در هر یک از ژنوتیپ‌های مورد نظر نخود، ابتدا انواع محیط‌کشت‌ها و غلظت‌های مختلف هورمونی مورد بررسی قرار گیرد. نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نشان می‌دهد که روش شاخه‌زایی مستقیم روش مناسبی برای کشت بافت نخود می‌باشد و با توجه به تولید تعداد مناسب شاخه در این روش ممکن است به‌توان از آن به‌خوبی در پروژه‌های انتقال ژن استفاده نمود. با این حال پژوهش‌های بیشتر در زمینه کشت درون شیشه‌ای نخود بخصوص در زمینه بهبود باززایی غیرمستقیم نیز کاملاً ضروری به‌نظر می‌رسد.

---

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Bajaj, Y. P. S. 1990. Biotechnology in Agriculture and Forestry10. Legumes and Oilseed Crops I. New Dehli. India. pp: 180-245.

Barna, K. S. and Wakhlu, A. K. 1994. Whole plant regeneration of *Cicer arietinum* from callus cultures via organogenesis. Plant Cell Rep. 13: 510-513.

Batra, P., Yadav, N. R., Sindhu, A., Yadav, R. C., Chowdhury, V. K. and Chowdhury, J. B. 2002. Efficient protocol for *in vitro* direct plant regeneration in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Indian J. Exp. Biol. 40: 600-602.

FAO. 2005. http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx

Chandra, A. and Petal, D. 2003. Regeneration and genetic transformation of grain legumes : An overview. Current Science 84: 381-387.

Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 152-159.

Geetha, N and Venkatachalam, P and Prakash, V and Sita, Lakshmi G. (1998). High frequency induction of multiple shoots and plant regeneration from seedling explants of pigeonpea (*Cajanus cajan* l.). *Current Science* 75(10):1036-1041.

Islam, R., Farooqui, H. and Riazuddin, S. 1999. Improved efficiency in chickpea tissue culture effects of presoaking and age of explants on *in vitro* shoot proliferation. ICN 6: 21-23.

Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405.

Kar, S., Johnson, T. M., Nayak, P. and Sen, S. K. 1996. Efficient transgenic plant regeneration through agrobacterium mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Rep. 16: 32-37.

Krishnamurthy, K. V., Suhasini, K., Sagare, A. P., Meixner, M., Dekathen, A., Pikardt, T. and Schieder, O. 2000. *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) embryo axes. Plant Cell Rep. 19: 235-240.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479.

Pawan, K. J. 2001. Chickpea regeneration and transformation. Current Science 80: 18-19.

Polisetty, R., Paul, V., Deveshvar, J. J. and Khetarpal, S. 1997. Multiple shoot induction by benzyladenine and complete plant regeneration from seed explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Rep. 16: 565-571.

Polisetty, R., Patil, P., Deveshvar, J. J., Khetarpal, S. and Chandra, R. 1996. Rooting and establishment of *in vitro* grown shoot tip explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Indian J. Exp. Biol. 34: 806-809.

Ramana, R. V., Venu, C., Jayasree, T. and Sadanadam, A. 1996. Direct somatic embryogenesis and transformation in *Cicer arietinum* L. Indian J. Exp. Biol. 34: 716-718.

Sanyal, I., Singh, A. K., Kaushik, M. and Amla, D. V. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera*. Plant Sci. 168: 1135-1146.

Senthil, G., Williamson, B., Dinkins, R. D. and Ramsay, G. 2004. An efficient transformation system for chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Rep. 23: 297-303.

Shalini, S., Batra, P., Sindhu, A. and Chowdhury, V. K. 2001. Multiple shoot induction and complete plant regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Crop Res. 21: 308-311.

Somers, D. A., Samac, D. A. and Olhof, P. 2003. Recent advances in legume transformation. Plant Physiol. 131: 892-899.

Suhasini, K., Sagare, A. P. and Krishnamurthy, K. V. 1994. Direct somatic embryogenesis from mature embryo axis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Sci. 102: 189–194.

---

www.SID.ir

Archive of SID

In vitro direct multiple shoot regeneration in five genotypes of chickpea (*Cicer arietinum* L.)

Moshtaghi, N. [1] Bagheri, A. [2] Jalali Javaran, M. [3] and Ghareyazi, B.[4]

Abstract

Indirect regeneration of chickpea is difficult due to low producing of callus and genetic instability. In this study, direct regeneration through multiple shoot from embryo axes of five chickpea genotypes (Hashem, Arman, Piruz, MCC505 and MCC426) in MB media (including MS salts and B_5 vitamins) with different levels of cytokinin hormones (BAP: 1, 2, 3 mg/L; TDZ: 0.2, 0.4, 1, 3 mg/L; Zeatin: 0.5, 1, 2 mg/L and Kin: 1, 2, 3 mg/L) were reviewed and then rooting of regenerated shoots in MB and $^1/_2$MB media with IBA (1 and 2 mg/L) have been studied. For regeneration of roots, MB and $^1/_2$MB media with IBA (1 and 2 mg/L) were allied. The results showed that the best medium for shooting of embryo axes was genotype dependent. In overall, the MB media containing BAP produces more and better shoots (1 mg/L in MCC505 and 3 mg/L in other genotypes) and shoots had normal growth. The medium containing $^1/_2$ MB and IBA (1 and 2 mg/L) was found to be suitable for rooting of regenerated shoots. The number and the length of obtained roots were appropriate for acclimation step.

Keywords: Chickpea (*Cicer arietinum* L.), Direct multiple shoot regeneration, *In vitro* culture

1. PhD student of Plant Biotechnology, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.
2. Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.
3. Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4. Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran.

---

www.SID.ir