Archive of SID

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۴۷، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۵ (ص ۳۲۸-۳۱۵) DOI: 10.22059/ijfcs.2016.58866

باززایی درون شیشه‌ای اسپرس (*Onobrychis sativa*) با استفاده از ریزنمونهٔ نوک ساقه

لیلی هنرمند[۱]، ناصر زارع[۲*]، رسول اصغری زکریا[۳] و پریسا شیخ‌زاده مصدق[٤]
۱، ۲، ۳ و ٤. دانش‌آموختهٔ کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشیاران و استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲٦ - تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۹/۲۵)

چکیده

نیاز روزافزون به فرآورده‌های دامی، به‌کارگیری روش‌های زیست‌فناوری (بیوتکنولوژی) در بهبود گیاهان علوفه‌ای مانند اسپرس را با اهمیت کرده است. در این تحقیق، تأثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی اکسین (NAA و IBA) و سیتوکینین (BAP، زآتین و TDZ) بر پاسخ رشدی درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های نوک ساقهٔ رقم‌های خوانسار و شهرکرد اسپرس بررسی شد. برای این منظور، ریزنمونه‌های نوک ساقه از بذرهای ضدعفونی شده و جوانه‌زدهٔ ٤-۷ روزه تهیه و روی محیط کشت MS جامد حاوی سطوح مختلف اکسین و سیتوکینین کشت شدند. نتایج نشان داد که درصد ساقه‌های چندگانه، شمار ساقه در هر ریزنمونه و طول ساقه رشد کرده به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر رقم، ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی و اثر متقابل بین آن‌ها قرار گرفت. درصد ساقه‌های چندگانه و میانگین شمار ساقه در هر ریزنمونه به ترتیب از ۰ تا ۸۹/۱۷ درصد و ۱ تا ۵/۰۳ متغیر بود. به‌طورکلی، درصد پینه (کالوس)زایی، درصد ساقه‌های چندگانه و شمار ساقه در هر ریزنمونه در رقم خوانسار به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم شهرکرد بود. بیشترین درصد شاخه‌زایی (۹۸/۱۵ درصد)، ساقه‌های چندگانه (۸۹/۱۷ درصد) و شمار ساقه در هر ریزنمونه (٤/۳) در رقم خوانسار و محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد. ریشه‌زایی ساقه‌ها و رشد مناسب ریشه‌ها در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشدی مشاهده شد. این نتایج نه تنها از جنبهٔ ریزازدیادی و کشت درون شیشه‌ای، بلکه به‌عنوان پیش‌زمینهٔ مناسب برای هدف‌های اصلاحی و انتقال ژن به این گیاه اهمیت دارد.

واژه‌های کلیدی: افزایش درون شیشه‌ای، کشت بافت، *Onobrychis sativa*.

مقدمه

اسپرس (*Onobrychis sativa*)، یکی از گیاهان چندسالهٔ خانوادهٔ بقولات است که ارزش غذایی بالا داشته و بدون ایجاد نفخ در دام، حفظ حاصلخیزی خاک، پر محصول (Delgado *et al*., 2008)، مقاوم به خشکی و شوری (Soares *et al*., 2000) بوده و به دلیل مقاومت در برابر سرما اغلب، در مناطق سردسیری برای تولید علوفه استفاده می‌شود (Shigaki *et al*., 1998). کشت و کار آن از مدیترانه تا کوه‌های زاگرس و آسیای مرکزی توسعه یافته است (Delgado *et al*., 2008).

امروزه برای تولید رقم‌های جدید و پر محصول و تأمین بخشی از نیاز علوفه‌ای کشور، از روش‌های جدید اصلاحی و زیست‌فناوری (بیوتکنولوژی) استفاده می‌شود

* تلفن: ۰۴۵-۳۳۵۱۰۱۴۰
E-mail: zarenasser@yahoo.com, nzare@uma.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

(Tohidfar *et al*., 2013). ازاین‌رو استفاده از اصلاح ژنتیکی، راهی برای چیره آمدن بر نارسایی‌های اسپرس زراعی، افزایش مقاومت آن‌ها به تنش‌های محیطی و بیماری‌ها و افزایش عملکرد کمی و کیفی آن است (Cetin, 2008; Rubiales *et al*., 2015). افزایش آزمایشگاهی با استفاده از فناوری کشت بافت می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای روش‌های افزایش سنتی در نظر گرفته شود (Ehsanpour & Amini, 2002). با توجه به اینکه باززایی گیاه از راه جنین‌زایی بدنی (سوماتیکی) و ریخت‌زایی (ساقه‌زایی) به‌ویژه در لگوم‌ها به‌شدت تحت تأثیر ژنوتیپ است، امکان باززایی و در نتیجه دستکاری ژنتیکی همهٔ ژنوتیپ‌ها و رقم‌ها امکان‌پذیر نیست (Fontana *et al*., 1993; Zhang *et al*., 2010). از سوی دیگر، گیاهان باززاشده از جنین‌زایی بدنی یا ریخت‌زایی ممکن است تنوع همسانهٔ بدنی (سوماکلونال) دارند (Trolinder & Goodin, 1987; Cousins *et al*., 1991; Rajasekaran *et al*., 1996). همچنین، باززایی درون‌شیشه‌ای بعضی ریزنمونه‌ها مانند محور زیرلپه (Firoozabady & DeBoer, 1993)، لپه (Umbeck *et al*., 1989) افزون بر وابسته بودن به ژنوتیپ، فراوانی و کارایی پایینی نیز دارد. این چالش‌ها، محققان را ملزم به کاربرد یک سامانهٔ باززایی قابل‌اعتماد و مستقل از ژنوتیپ کرده است. کشت و رشد درون شیشه‌ای نوک ساقه (Shoot apex) مستقل از ژنوتیپ بوده، به دست‌کاری‌های کشت بافتی کمتری نیاز داشته و گیاهان ناشی از آن تنوع همسانهٔ بدنی بسیار کمتری دارند یا ندارند (Zapata *et al*., 1999; Srivatanakul *et al*., 2000). سامانهٔ باززایی نوک ساقه روشی ساده و سریع را فراهم کرده که می‌توان با استفاده از آن در مدت‌زمان کمتری با حذف مرحلهٔ پینه (کالوس)، شمار زیادی گیاه تولید کرد (Nasir *et al*., 1997). به‌عبارت‌دیگر، برای به‌دست آوردن گیاهان تراریخت ناشی از جنین‌زایی بدنی ۶-۱۲ ماه زمان لازم است و در طی ۶-۱۰ سال هم صفات مهم به رگه (لاین)های زراعی از راه تلاقی برگشتی (بک‌کراس) انتقال می‌یابد. بنابراین، بهینه‌سازی یک سامانهٔ تراریختی با استفاده از نوک ساقه امکان دستکاری ژنتیکی دامنهٔ گسترده‌ای از رقم‌ها را فراهم خواهد کرد (Saini & Jaiwal, 2005; Sticklen & Oraby, 2005).

تنظیم‌کننده‌های اکسین و سیتوکینین در تقسیم و ریخت‌زایی یاخته‌ها نقش بسیار مهم را دارند (Srivastava, 2002). سایتوکینین‌ها باعث تحریک رشد و نمو، افزایش رشد و تقسیم یاخته‌ای می‌شوند. این گروه از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از راه کم کردن غالبیت انتهایی باعث تحریک رشد جوانه‌های جانبی و همچنین تشکیل ساقهٔ نابجا و عقب افتادن پیری می‌شوند (Van Staden, 2008; Farshadfar & Bakhshi-Khaniki, 2011; Mansseri-Lamrioui *et al*., 2011). اکسین‌ها یکی از پرکاربردترین تنظیم‌کننده‌های رشدی در کشت بافت گیاهی هستند که در اغلب دستورکارها به تنهایی یا در ترکیب با سیتوکینین‌ها استفاده می‌شوند (Machakova *et al*., 2008). اکسین‌ها در گیاهان در تحریک تقسیم یاخته‌ای، طویل شدن یاخته، القای ریشه‌دهی، نورگرایی (فتوتروپیسم)، غالبیت انتهایی، تمایز بافت‌های آوندی و گسترش دیوارهٔ یاخته‌ای نقش داشته و در کشت‌های درون‌شیشه‌ای رشد پینه و اندام‌ها را تحریک کرده و مسیر ریخت‌زایی را کنترل می‌کنند (Srivastava, 2002; Machakova *et al*., 2008). از سوی دیگر، سطوح هورمون درونی ریزنمونه‌ها متفاوت بوده و می‌تواند در پاسخ آن‌ها به غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی مؤثر باشد. برای مثال، مرسیتم‌های انتهایی و جانبی از نظر اکسین، سیتوکینین و جیبرلیک اسید غنی هستند. درحالی‌که، برگ‌های بالغ، ساقه و ریشه مقادیر پایینی از این هورمون‌ها را دارند (Srivastava, 2002). با افزایش غلظت اکسین، از تقسیم یاخته‌های مریستمی جلوگیری شده و بدین ترتیب، واکنش ریزنمونه‌ها کاهش می‌یابد (Wernicke, 1986). در غلظت بالای سایتوکینین‌ها نیز، نبود رشد مناسب طولی، شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها (Li *et al*., 2009; Tatari Varnousfaderani *et al*., 2012) و بدون ریشه‌زایی (Mahdavian *et al*., 2010; Malekiband *et al*., 2013) به وجود می‌آید. اضافه کردن غلظت پایینی از اکسین به محیط کشت باززایی، تأثیر بازدارندهٔ مقادیر زیاد سیتوکینین بر رشد طولی ساقه‌های جانبی را خنثی کرده و باعث رشد ساقه‌ها می‌شود (Shahzad &

www.SID.ir

Archive of SID

Siddiqui, 2000). سیتوکینین‌ها جز مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد برای باززایی به‌شمار می‌آیند. در بین آن‌ها BAP مؤثرترین سیتوکینین مورداستفاده است و کاینتین و 2ip در درجه‌های بعدی قرار دارند (Skala & Wysokinska, 2006).

بر پایهٔ بررسی روی گیاه یونجه (*Medicago sativa*)، بیشترین باززایی ساقهٔ چندگانه از ریزنمونهٔ مریستم انتهایی در محیط پایهٔ MS به همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ بود (Sobhanian *et al*., 2012). تولید ساقهٔ چندگانه در نخود (*Cicer arietinum* L.) با استفاده از ریزنمونهٔ بذر در محیط کشت MS حاوی BA گزارش شده است (Polisetty, 1997). بررسی باززایی گیاه *Vicia faba* L. نشان داده که ریزنمونهٔ محور جنینی از نوک ساقه، کارایی باززایی بیشتری دارد (Metry *et al*., 2006). باززایی شاخسارهٔ یونجه (*M. sativa* L.) با استفاده از ریزنمونهٔ گرهٔ ساقه، در محیط MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر $AgNO_3$ و ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش شده است (Malekiband, 2013). تشکیل ساقه‌های چندگانهٔ عدس (*Lens culinarys* M.) از ریزنمونه‌های نوک ساقه و گرهٔ اول در محیط MS غنی‌شده با BA یا BA و NAA گزارش شده است (Polanco *et al*., 1988). افزون بر این، کشت درون شیشه‌ای دو رقم کلزا با ریزنمونه‌های لپه‌ای (کوتیلدونی) نشان داده که محیط کشت MS با غلظت ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین باززایی را دارد ولی با افزایش غلظت BAP میزان پینه‌زایی در انتهای دم برگ افزایش یافته است (Goleyjani Moghaddaam *et al*., 2012). ریزنمونه‌های نوک ساقهٔ توت‌فرنگی در محیط کشت MS تغییریافته دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA بیشترین میزان باززایی را داشتند (Madani *et al*., 2013).

برای اغلب روش‌های انتقال ژن و مهندسی ژنتیک گیاهی که امروزه استفاده می‌شوند، وجود سامانهٔ کشت‌بافتی موفق یک پیش‌نیاز به شمار می‌آید (Hansen & Wright, 1999; Jauhar, 2006; Zare *et al*., 2009). از سوی دیگر، نوع، غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورداستفاده از جمله عامل‌های مهم مؤثر در رشد ریزنمونه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ایی است که برای هر گیاه یا حتی برای هر رقم و ژنوتیپ باید بهینه‌سازی شود (Han *et al*., 2011). بنابراین، در این تحقیق تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف بر رشد درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های نوک ساقهٔ اسپرس، تولید ساقه‌های چندگانه و محیط بهینه برای رشد و افزایش آن گزارش شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ضدعفونی بذرها

در این تحقیق از بذرهای رقم خوانسار و شهرکرد اسپرس در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی استفاده شد. ضدعفونی بذرها از روش غوطه‌ورسازی آن‌ها در اتانول ۷۰ درصد به مدت چهل ثانیه و تیمار با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت دوازده دقیقه انجام گرفت. سپس، بذرهای ضدعفونی‌شده در زیر هود سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. به منظور جوانه‌زنی، بذرها مابین کاغذ صافی ضدعفونی‌شده به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شده و به دمای ۴ درجهٔ سلسیوس به مدت ۷-۴ روز انتقال یافتند (Gulati & Jaiwal, 1994; Li *et al*., 2009). ریزنمونه‌های نوک ساقه با حذف برگ‌های لپه‌ای و محور زیرلپه، تهیه شده و به پتری‌دیش‌های دارای محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف انتقال داده شدند.

ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی

به‌منظور بهینه‌سازی محیط باززایی، از ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی اکسین و سیتوکینین در محیط کشت پایهٔ MS جامد استفاده شد. تنظیم‌کننده‌های رشدی اکسین شامل NAA یا IBA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با سیتوکینین‌های BAP و TDZ و زآتین (Zeatin) با دو سطح غلظت ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر استفاده شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشدی به‌عنوان شاهد استفاده شد. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای شبانه‌روزی ۲±۲۵ درجهٔ سلسیوس و دورهٔ نوری شانزده ساعت زیر نور فلئورسنت (با شدت ۱۶۰ تا ۱۸۰ $\mu Em^{-2}s^{-1}$) نگهداری شدند. صفات درصد پینه‌زایی، درصد شاخه‌زایی، درصد ساقه‌های چندگانه (درصد ریزنمونه‌های با ساقه‌های چندگانه)، میانگین شمار ساقه در هر ریزنمونه، طول بلندترین ساقه در هر ریزنمونه (طول ساقه)، درصد ریزنمونه‌های شیشه‌ای شده، درصد ریشه‌زایی، طول بلندترین ریشه در هر ریزنمونه (طول ریشه) در بازهٔ زمانی سی الی چهل روز پس از کشت یادداشت شدند.

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایهٔ طرح کامل تصادفی با سه تکرار با دست‌کم پانزده ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (Ver 9.1) انجام شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون نافراسنجه‌ای (غیرپارامتری) کولموگروف- اسمیرنوف و نرم‌افزار آماری SPSS (Ver16) ارزیابی شد. داده‌های مربوط به صفات درصد پینه‌زایی، درصد ریزنمونه‌های شیشه‌ای‌شده، درصد ریشه‌زایی و میانگین طول بلندترین ریشه تبدیل جذری (Yazdi Samadi *et al.*, 2001) انجام شده و سپس تجزیه‌وتحلیل شد. با توجه به اینکه در همهٔ تیمارهای دارای TDZ ریشه‌زایی صفر بود، در تجزیهٔ واریانس ریشه‌زایی از بین تیمارها حذف شد. مقایسهٔ میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel (2010) استفاده شد. به منظور مقایسه بین تیمار شاهد با دیگر تیمارها، یک تجزیهٔ واریانس جداگانه به‌صورت طرح کامل تصادفی انجام شد.

نتایج و بحث

پینه‌زایی

برخی از ریزنمونه‌ها از محل برش در پایهٔ نوک ساقه چند روز پس از کشت متورم شده و تولید پینه کردند (شکل ۱- D). تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان داد که درصد پینه‌زایی ریزنمونه‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر رقم، نوع و غلظت سیتوکینین و همچنین اثر متقابل رقم × اکسین، رقم × سیتوکینین و اکسین × سیتوکینین قرار گرفت ولی بین نوع اکسین (NAA و IBA) و اثر متقابل رقم × اکسین × سیتوکینین تفاوت معنی‌داری از نظر درصد پینه‌زایی وجود نداشت (جدول۱). درصد پینه‌زایی ریزنمونه‌ها در رقم شهرکرد به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم خوانسار بود (شکل ۲- A). از بین سیتوکینین‌ها، ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ بیشترین تأثیر را بر تولید پینه نشان دادند (شکل ۳). نتایج مقایسهٔ میانگین ترکیب تیماری رقم و اکسین نشان داد که بالاترین درصد پینه‌زایی در رقم شهرکرد و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (شکل ۲- B). بیشترین درصد پینه‌زایی در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ با میانگین ۳۹/۹۵ درصد و کمترین میزان تولید پینه در محیط کشت شاهد (بدون تنظیم‌کننده‌های رشدی) با میانگین صفر درصد مشاهده شد. درصد پینه‌زایی در همهٔ تیمارها نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۴).

با توجه به اینکه انتقال اکسین و تجمع آن در بافت‌ها و یاخته‌های زخمی افزایش می‌یابد (Srivastava, 2002)، تشکیل پینه در انتهای بریده‌شدهٔ ریزنمونه‌ها می‌تواند به دلیل تجمع اکسین‌ها در یاخته‌های زخمی باشد، به‌ویژه هنگامی‌که در ترکیب با سایتوکینین‌ها استفاده شود. افزون بر این، پینه‌زایی ریزنمونه‌ها در کشت درون شیشه‌ای بستگی به نوع اکسین مورداستفاده نیز دارد (Marks & Simpson, 1994). Lakshmanan & Taji (2000) در تحقیقی روی یونجه، هر دو گروه تنظیم‌کننده‌های رشدی اکسین و سیتوکینین را در تشکیل و رشد درون‌شیشه‌ای پینه مؤثر گزارش کرده‌اند. ایشان همچنین، 2-4-D را یکی از اکسین‌های مهم و تأثیرگذار در پینه‌زایی لگوم‌ها معرفی کرده‌اند. در گیاهان *Digitalis purpurea* و *D. lanata* نیز، اکسین NAA عامل اصلی القای پینه معرفی شده که حضور سیتوکینین‌ها باعث تقویت آن می‌شود (Palazon *et al.*, 1995; Fatima *et al.*, 2009). در

www.SID.ir

Archive of SID

گیاه *Salvia canariensis* L. با ریزنمونه‌های ساقه و دم برگ، تنظیم‌کنندهٔ رشدی NAA به تنهایی و یا در ترکیب با BAP در القاء پینه در هر دو محیط کشت MS و B5 مؤثر بود (Molina, 2004). محیط MS حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰ یا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین محیط‌ها برای پینه‌زایی گیاه گاودانه (*Vicia ervilia* L.) از لپه‌های نارس گزارش شده است (Etedali, 2007).

شکل ۱. کشت درون شیشه‌ای نوک ساقهٔ اسپرس؛ A (۱ و ۲): ریزنمونهٔ نوک ساقهٔ تازه تهیه‌شده؛ A (۳ و ۴): رشد ریزنمونه دو روز پس از کشت؛ B (۱، ۲، ۳ و ۴): مراحل رشد ریزنمونهٔ نوک ساقه در محیط کشت (Khansar+MS+0.1 mgL^{-1} IBA+3 mgL^{-1} BAP[1])؛ C: ریزنمونه‌های رشد کرده دو هفته پس از کشت (Shahrkord+MS+0.1 mgL^{-1} IBA+1 mgL^{-1} TDZ)؛ D: تشکیل پینه از انتهای برش‌یافتهٔ ریزنمونه‌ها (Shahrkord+MS+0.1 mgL^{-1} IBA+1 mgL^{-1} TDZ)؛ E و F: تولید ساقه‌های چندگانه (Khansar+MS+0.1 mgL^{-1} NAA+3 mgL^{-1} Zeatin)، (Khansar+MS+0.1 mgL^{-1} IBA+1 mgL^{-1} TDZ)؛ G: ریزنمونه‌های شیشه‌ای‌شده (Shahrkord+MS+0.1 mgL^{-1} NAA+3 mgL^{-1} Zeatin)؛ H و I: ریزنمونه‌های ریشه دادهٔ رقم خوانسار و شهرکرد در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشدی.

Figure 1. *In vitro* culture of sainfoin shoot apex; A (1 and 2): shoot apex explants; A (3 and 4): explants growth 2 days after culture; B (1, 2, 3 and 4): shoot apex explants growth stages on medium culture (Khansar+MS+0.1 mgL^{-1} IBA+3 mgL^{-1} BAP); C: explants growth 2 weeks after culture (Shahrkord+MS+0.1 mgL^{-1} IBA+1 mgL^{-1} TDZ); D: callus induction fro cut ends of explants (Shahrkord+MS+0.1 mgL^{-1} IBA+1 mgL^{-1} TDZ); E and F: multiple shoots formation (Khansar+MS+0.1 mgL^{-1} NAA+3 mgL^{-1} Zeatin, Khansar+MS+0.1 mgL^{-1} IBA+1 mgL^{-1} TDZ); G: vitrified explants (Shahrkord+MS+0.1 mgL^{-1} NAA+3 mgL^{-1} Zeatin); H and I: rooted explants of Khansar and Shahrkord cultivar on growth regulators free medium.

www.SID.ir

Archive of SID

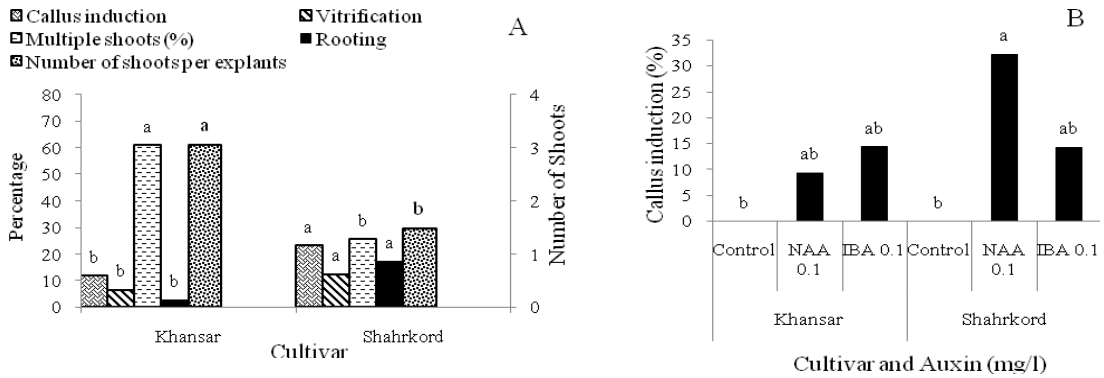
جدول ۱. تجزیهٔ واریانس تأثیر ژنوتیپ گیاهی و تنظیم‌کننده‌های رشدی بر رشد، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای ریزنمونه نوک ساقهٔ اسپرس

Table 1. Variance analysis of cultivar and plant growth regulators effect on *in vitro* growth, shooting and rooting of shoot apex sainfoin

SOV	df	MS						df	MS	
		Percentage of callus induction	Percentage of shooting	Percentage of multiple shoots	Number of shoots per explants	Shoot length	Percentage of explants vitrification		Percentage of rooting	Root length
Cultivar (A)	1	32.20^{**}	157.86^{ns}	22614.26^{**}	44.18^{**}	0.22^{ns}	16.79^{*}	1	38.74^{**}	0.25^{ns}
Auxin (B)	1	7.62^{ns}	467.01^{*}	814.06^{*}	0.96^{ns}	0.0007^{ns}	16.24^{*}	1	2.31^{ns}	0.07^{ns}
Cytokinin (C)	5	13.53^{**}	210.46^{ns}	1725.43^{**}	1.25^{*}	3.1^{**}	6.38^{ns}	3	32.48^{**}	0.76^{**}
A × B	1	21.22^{**}	0.11^{ns}	2987.39^{**}	4.29^{**}	0.46^{ns}	19.23^{*}	1	0.82^{ns}	0.000008^{ns}
A × C	5	48.62^{**}	182.62^{ns}	1735.68^{**}	1.57^{**}	1.62^{**}	20.15^{**}	3	22.82^{**}	0.64^{**}
B × C	5	11.75^{**}	825.07^{**}	190.88^{ns}	0.97^{ns}	0.96^{**}	6.24^{ns}	3	0.93^{ns}	0.07^{ns}
A × B × C	5	2.72^{ns}	32.8^{ns}	399.56^{*}	1.1^{*}	0.87^{*}	0.58^{ns}	3	4.29^{*}	0.19^{ns}
Error	48	1.96	102.3	185.29	0.42	0.27	2.99	32	1.38	0.13
CV %		42.9	11.9	31.46	28.53	26.9	77.38		52.44	35.52

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

ns, * and **: Nonsignificant and significance at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively.



شکل ۲. پاسخ درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های نوک ساقهٔ دو رقم اسپرس (A) و تأثیر نوع اکسین بر درصد پینه‌زایی (B)

Figure 2. *In vitro* response of shoot apex explants of the two cultivars of sainfoin (A) and the effect of auxin type on the percentage of callus induction (B)

شاخه‌زایی

در شکل ۱- A و B ریزنمونهٔ نوک ساقهٔ تازه تهیه‌شده و مراحل رشد آن روی محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های گیاهی مشاهده می‌شود. بنا بر نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ واریانس داده‌ها، درصد شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع اکسین و همچنین اثر متقابل اکسین × سیتوکینین قرار گرفت. درحالی‌که، تفاوت معنی‌داری بین رقم‌ها و همچنین نوع و غلظت‌های متفاوت سیتوکینین وجود نداشت. بااین‌حال، درصد ساقه‌های چندگانه و شمار ساقه در هر ریزنمونه به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر رقم، نوع اکسین، نوع و غلظت سیتوکینین و اثر متقابل رقم، اکسین و سیتوکینین قرار گرفت. درحالی‌که، اکسین تأثیر معنی‌داری روی شمار ساقه در هر ریزنمونه نداشت. از سوی دیگر، میزان رشد ساقه‌ها (میانگین طول بلندترین ساقه‌ها در هر ریزنمونه) به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع و غلظت‌های متفاوت سیتوکینین و تأثیر متقابل رقم، اکسین و سیتوکینین بود (جدول۱). بنابر نتایج به‌دست‌آمده، درصد شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها بسته به نوع اکسین مورداستفاده متفاوت بود. به‌طوری‌که، درصد شاخه‌زایی در محیط کشت‌های حاوی IBA بیشتر از NAA بود (جدول ۲). بیشترین درصد شاخه‌زایی در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در ترکیب ۳ میلی‌گرم در لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

BAP یا ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و کمترین آن در محیط ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر زآتین مشاهده شد. درحالی‌که، در تیمار شاهد (بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی) نیز ۸۱/۳۵ درصد (شکل ۴) ریزنمونه‌ها رشد کرده و ساقه تولید کردند. از نظر صفات درصد ساقه‌های چندگانه (درصد ریزنمونه‌های دارای ساقهٔ چندگانه) و میانگین شمار ساقه در هر ریزنمونه در مقایسه با درصد شاخه‌زایی بین تیمارها تفاوت بسیار زیادی وجود داشت. به‌طوری‌که، درصد ساقه‌های چندگانه از ۰ تا ۸۹/۱۷ درصد و میانگین شمار ساقه در هر ریزنمونه از ۱ تا ۵/۰۳ متغیر بود (شکل F-E-۱ و جدول ۳). مقایسهٔ میانگین داده‌ها نشان داد که به‌طورکلی، درصد ساقه‌های چندگانه و شمار ساقه در هر ریزنمونه در رقم خوانسار به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم شهرکرد است (شکل ۲- A). مقایسهٔ میانگین درصد ساقه‌های چندگانه در سطوح مختلف سیتوکینین نشان داد که غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP یا TDZ در مقایسه با دیگر سیتوکینین‌ها و غلظت‌ها در افزایش تولید ساقه‌های چندگانه مؤثر هستند (شکل ۳). بااین‌حال، معنی‌دار بودن اثرهای متقابل رقم، اکسین و سیتوکینین نشان‌دهندهٔ پاسخ متفاوت رقم‌های اسپرس به ترکیب هورمونی مورداستفاده است. بنابراین، نیاز است که برای به دست آوردن بیشترین درصد ساقه‌های چندگانه و شمار ساقه در هر ریزنمونه، در هر رقم ترکیب هورمونی بهینه استفاده شود. در رقم شهرکرد در محیط کشت بدون هورمون و محیط کشت‌های حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر زآتین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۱ یا ۳ میلی‌گرم در لیتر زآتین ساقه‌های چندگانه تولید نشد. درحالی‌که، در رقم خوانسار در این محیط‌های کشت، ۴۲/۵۴ تا ۸۶/۳ درصد (جدول ۳)، ساقهٔ چندگانه به‌دست آمد. بیشترین درصد ساقه‌های چندگانه برای رقم خوانسار (۸۹/۱۷ درصد) در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP یا ۳ میلی‌گرم در لیتر زآتین به دست آمد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از درصد ساقه‌های چندگانهٔ رقم شهرکرد در این محیط کشت است. برای رقم شهرکرد نیز بیشترین درصد ساقه‌های چندگانه (۵۴/۱۷ درصد) در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌دست آمد (جدول ۳). این افزایش درصد ساقه‌زایی چندگانه در محیط کشت‌های حاوی سطوح بالای BAP و TDZ را می‌توان به نقش سیتوکینین‌ها در کاهش یا حذف غالبیت انتهایی (Srivastava, 2002; Machakova *et al.*, 2008) نسبت داد. به‌طوری‌که، Skala & Wysokinska (2006) با بررسی روی کشت درون‌شیشه‌ای *Salvia nemorosa* L. با ریزنمونه‌های نوک ساقه و برگی نیز بیان کردند در هنگامی‌که هدف افزایش شاخساره است، غلظت پایین اکسین اغلب در هماهنگی با سطوح بالای سیتوکینین سودمند خواهد بود. بیشترین شمار ساقه در هر ریزنمونه برای رقم خوانسار در ترکیب محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر زآتین یا BAP به‌دست آمد (جدول۳). همان‌طوری که در جدول ۳ نشان داده شده، درصد ساقه‌های چندگانه نیز در این محیط‌های کشت نسبت به دیگران بیشتر بود. به نظر می‌رسد با افزایش غلظت سیتوکینین‌ها درصد ساقه‌های چندگانه نیز افزایش می‌یابد. برعکس، میزان رشد ساقه‌ها با افزایش غلظت سیتوکینین کاهش نشان می‌دهد (شکل ۳ و جدول ۳). به‌طوری‌که، میانگین طول ساقه در هر دو رقم در محیط کشت بدون هورمون نسبت به اغلب محیط کشت‌های سیتوکینین بیشتر داشت. افزون بر این، در همهٔ تیمارها با افزایش غلظت سیتوکینین از ۱ میلی‌گرم در لیتر به ۳ میلی‌گرم در لیتر میزان رشد ساقه‌ها (طول بلندترین ساقه) کاهش نشان داده است (شکل ۳ و جدول ۳).

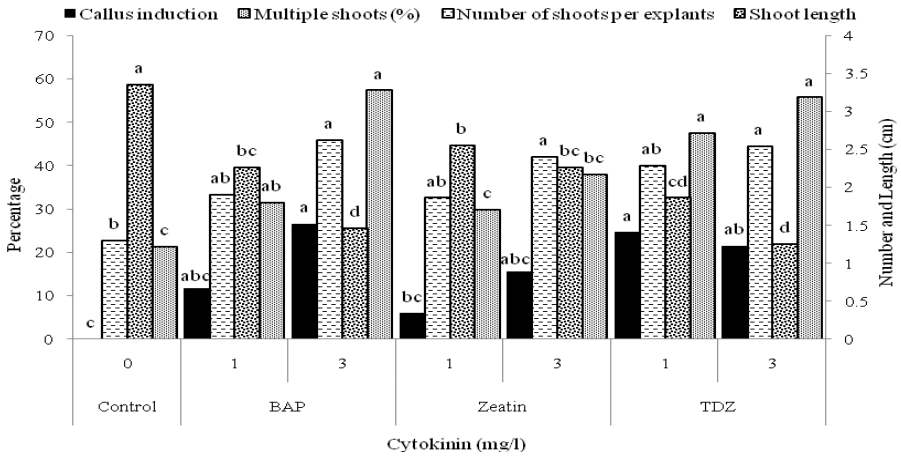
جدول ۲. تأثیر هورمون اکسین بر شاخه‌زایی و ساقه‌های شیشه‌ای‌شده در ریزنمونهٔ نوک ساقهٔ اسپرس

Table 2. The effect of auxin on shooting and shoot the glass induction in shoot apex sainfoin

Auxin (mgL^{-1})	Percentage of shooting	Multiple shoots (%)	Vitrification (%)
Control	81.25^{b}	21.27^{b}	0^{b}
NAA (0.1)	82.48^{b}	39.91^{ab}	13.03^{a}
IBA (0.1)	87.57^{a}	46.63^{a}	5.99^{ab}

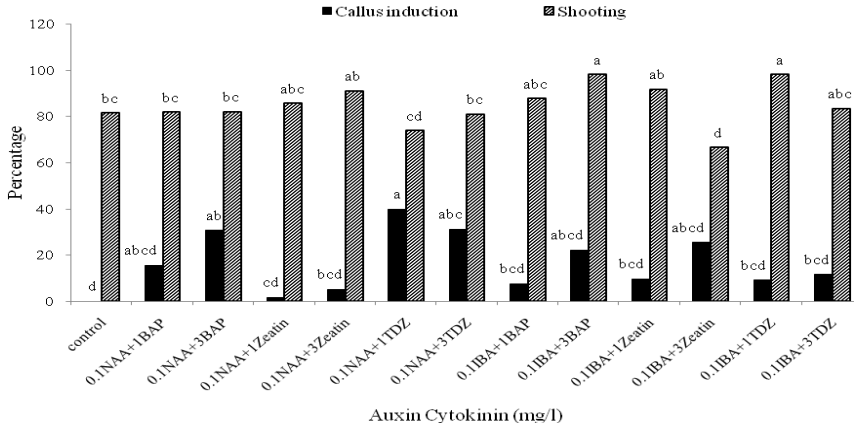
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. تأثیر نوع و غلظت سیتوکینین بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌های نوک ساقهٔ اسپرس در شرایط درون‌شیشه‌ای

Figure 3. The effect of cytokinin type and concentration on in vitro shooting from sainfoin shoot apex explants



شکل ۴. تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر درصد پینه‌زایی و شاخه‌زایی ریزنمونه‌های نوک ساقه در اسپرس

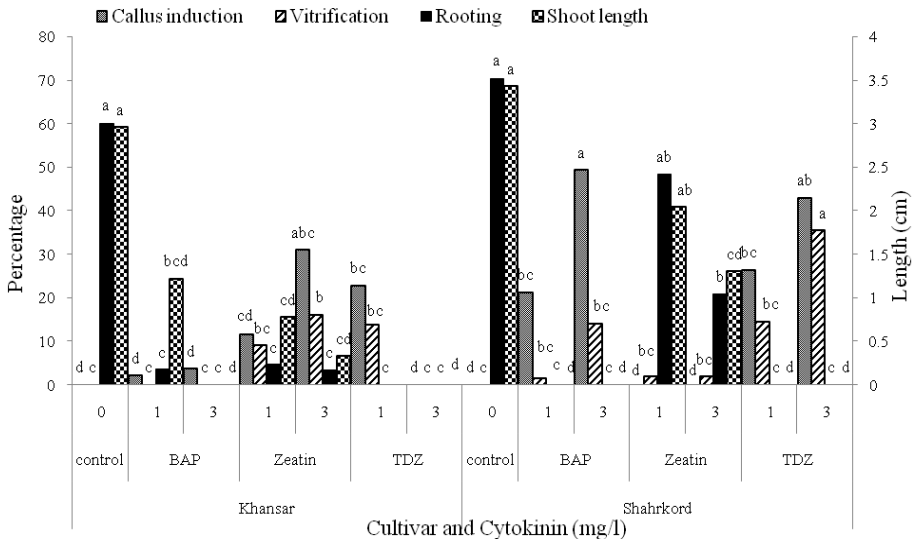
Figure 4. The effects of plant growth regulators on the percentage of callus induction and shooting from shoot apex explants of sainfoin

به‌طورکلی، فرآیندهای رشد و تمایزیابی گیاهان تحت کنترل اکسین، سایتوکینین و توازن بین آن‌ها قرار می‌گیرد (Srivastava, 2002). از سوی دیگر، تأثیر تنظیم‌کننده‌های خارجی به‌شدت به ژنوتیپ و میزان هورمون درونی بافت گیاه و ریزنمونه بستگی دارد (Bhaskaran & Smith, 1990). به‌طوری‌که، در اغلب تحقیقات، یک سامانهٔ باززایی موفق در ترکیب اکسین با سیتوکینین به دست می‌آید (Diettrich *et al.*, 1990). نوع سایتوکینین استفاده‌شده در محیط کشت در میزان باززایی و توان رشدی گیاهان باززاشدهٔ توت‌فرنگی بسیار مهم بوده و از اساسی‌ترین عامل‌های مؤثر بر میزان موفقیت در کشت بافت است (Madani *et al.*, 2013). افزون بر این، گزارش شده که سیتوکینین BAP به تنهایی به تشکیل جوانهٔ نابجا کمک می‌کند، اما اضافه کردن اکسین به‌طور معنی‌داری باعث افزایش ظرفیت تشکیل جوانه در ریزنمونه‌های برگی در *D. minor* L. می‌شود (Sales *et al.*, 2002). Celiktas *et al* (2006) نشان دادند که ترکیب هورمونی NAA و BAP برای باززایی ریزنمونه‌های محور انتهایی مریستم، برگ‌های جوان، گرهٔ ساقه و دم برگ‌های اسپرس (*O. viciifolia* Scop.) مناسب است. افزون بر این، Saglam (2010) با ارزیابی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی بر کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه گرهٔ لپه‌ای اسپرس (*O. sativa*

www.SID.ir

Archive of SID

.L) نشان داد که بیشترین شمار ساقه و ساقه‌های با بهترین گسترش برگ سبز در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد. همچنین، محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به تنهایی بازدارنده بود و کمترین شمار ساقه را در هر ریزنمونه داشت (Saglam, 2010). در آزمایشی قابلیت باززایی بافت‌های مختلف گیاه اسپرس (*O. viciifolia* Scop.) در حضورBAP و NAA بررسی و گزارش شده که ریزنمونهٔ ساقه نتیجهٔ بهتری در حضور هورمون BAP در تولید قسمت‌های هوایی داشت (Ozcan *et al*., 1996). در بررسی سامانهٔ باززایی ساقهٔ نابجا از ریزنمونه‌های برگچه، دم برگ و ساقهٔ اسپرس (*O. sativa* Lam.) بیان کرده‌اند که بیشترین فراوانی باززایی گیاه از قطعات ساقه در محیط حاوی ۲۰ میکرومولار BA و ۰/۵ میکرومولار NAA به‌دست آمد (Ozgen *et al*., 1998). درحالی‌که، Sancak (1999) با بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت سیتوکینین و اکسین بر ریزازدیادی درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های بذر اسپرس (*O. viciifolia* Scop) نشان داده که بیشترین افزایش ساقه در محیط‌های حاوی ۲ میلی‌گرم در لیترBAP به همراه ۰/۱ یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۰۵، ۰/۱ یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و نیز در محیط حاوی ۸ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست می‌آید. ولی، بر پایهٔ نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق، میانگین درصد شاخه‌زایی و درصد ساقه‌های چندگانه در محیط کشت‌های حاوی IBA به‌طور معنی‌داری بیشتر از محیط‌های حاوی NAA است (جدول‌های ۲ و ۳). در بررسی باززایی ساقه با استفاده از ریزنمونه‌های لپه و محور جنینی نارس اسپرس (*O. viciifolia* Scop) اعلام کرده‌اند که بالاترین فراوانی باززایی ساقه به دنبال رشد پینه اولیه در محیطMS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA رخ داد (Ozcan *et al*., 1996). در گیاه اسپرس (*O. sativa* Lam.) بیشترین باززایی ساقهٔ نابجا از ریز نمونهٔ برگچه در محیط MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش شده است (Cetin, 2008). باززایی یونجه (*M. sativa* L.) از نوک ساقه در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA گزارش شده است (Kumar *et al*., 2013). بالاترین باززایی ساقهٔ چندگانه و شمار ساقه در هر ریزنمونه در محیط MS غنی‌شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با ریزنمونه‌های نوک ساقه و گرهٔ لپه‌ای در نخود (*C. arietinum* L.) مشاهده شده است (Ugandhar *et al*., 2012).



شکل ۵. تأثیر سیتوکینین بر پینه‌زایی، ریزنمونه‌های شیشه‌ای‌شده، ریشه‌زایی و طول ریشهٔ ناشی از ریزنمونه نوک ساقه در اسپرس

Figure 5. The effect of cytokinin on callus induction, vitrification, rooting and root length from the shoot apex explants of sainfoin

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر شاخه‌زایی و ریشه‌زایی درون شیشه‌ای ریزنمونه نوک ساقهٔ اسپرس

Table 3. The effect of plant growth regulators on shooting and rooting *in vitro* shoot apex sainfoin

Cultivar	Auxin (mg/l)	Cytokinin (mg/l)	Multiple Shoots (%)	Number of shoots per explant	Shoot length (cm)	Root induction (%)
Khansar	0	0	42.54 ^{efghi}	1.6^{fghi}	3.35^{a}	60.16^{ab}
Khansar	NAA (0.1)	BAP (1)	44.44 ^{defghi}	2.75^{cdef}	2.7^{abcd}	3.7^{c}
Khansar	NAA (0.1)	BAP (3)	61.57 ^{bcdefg}	2.83^{cde}	1.3^{fgh}	0^{c}
Khansar	NAA (0.1)	Zeatin (1)	45.19 ^{defghi}	2.62^{cdefg}	1.8^{defgh}	0^{c}
Khansar	NAA (0.1)	Zeatin (3)	57.78 ^{cdefg}	2.51^{cdefgh}	1.43^{efgh}	6.67^{c}
Khansar	NAA (0.1)	TDZ (1)	34.81 ^{fghi}	2.35^{cdefgh}	2.14^{bcdef}	-
Khansar	NAA (0.1)	TDZ (3)	63.33 ^{abcdef}	3.09^{cd}	1.48^{efgh}	-
Khansar	IBA (0.1)	BAP (1)	34.81 ^{fghi}	2.04^{defghi}	1.06^{gh}	3.33^{c}
Khansar	IBA (0.1)	BAP (3)	89.17 ^{a}	4.3^{ab}	1.76^{defgh}	0^{c}
Khansar	IBA (0.1)	Zeatin (1)	74.08 ^{abc}	2.84^{cde}	3.06^{abc}	9.26^{c}
Khansar	IBA (0.1)	Zeatin (3)	86.3 ^{ab}	5.03^{a}	2.08^{cdefg}	0^{c}
Khansar	IBA (0.1)	TDZ (1)	68.52 ^{abcde}	2.91^{cde}	2.6^{abcd}	-
Khansar	IBA (0.1)	TDZ (3)	71.9 ^{abcd}	3.35^{bc}	1.26^{fgh}	-
Sharkord	0	0	0 ^{k}	1^{i}	3.35^{a}	70.48^{a}
Sharkord	NAA (0.1)	BAP (1)	18.52 ^{ijk}	1.33^{hi}	2.62^{abcd}	0^{c}
Sharkord	NAA (0.1)	BAP (3)	41.67 ^{efghi}	1.83^{efghi}	1.31^{fgh}	0^{c}
Sharkord	NAA (0.1)	Zeatin (1)	0 ^{k}	1^{i}	2.58^{abcd}	48.15^{ab}
Sharkord	NAA (0.1)	Zeatin (3)	7.41 ^{jk}	1.08^{i}	3.15^{ab}	11.11^{c}
Sharkord	NAA (0.1)	TDZ (1)	50 ^{cdefgh}	2.31^{cdefgh}	1.31^{fgh}	-
Sharkord	NAA (0.1)	TDZ (3)	54.17 ^{cdefgh}	2.11^{defghi}	1.48^{efgh}	-
Sharkord	IBA (0.1)	BAP (1)	28.15 ^{hij}	1.5^{ghi}	2.7^{abcd}	0^{c}
Sharkord	IBA (0.1)	BAP (3)	37.03 ^{fghi}	1.5^{ghi}	1.47^{efgh}	0^{c}
Sharkord	IBA (0.1)	Zeatin (1)	0 ^{k}	1^{i}	2.82^{abcd}	48.52^{ab}
Sharkord	IBA (0.1)	Zeatin (3)	0 ^{k}	1^{i}	2.4^{abcde}	30.74^{b}
Sharkord	IBA (0.1)	TDZ (1)	36.32 ^{fghi}	1.56^{fghi}	1.39^{efgh}	-
Sharkord	IBA (0.1)	TDZ (3)	33.33 ^{ghij}	1.61^{fghi}	0.79^{h}	-

شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها

برخی ریزنمونه‌ها و همچنین ساقه‌های رشدکرده، پس از مدتی حالت شیشه‌ای پیدا کردند که باعث کم یا متوقف شدن رشد آن‌ها شد (شکل ۱- G). بااین‌حال، بنا بر نتایج تجزیهٔ واریانس، درصد شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و نو ساقه‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر رقم، نوع اکسین، اثر متقابل رقم × اکسین و رقم × سیتوکینین قرار گرفت (جدول ۱). به‌طوری‌که، درصد شیشه‌ای شدن رقم شهرکرد به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم خوانسار بود (شکل ۲- الف). افزون بر این، درصد شیشه‌ای شدن در محیط کشت‌های حاوی NAA در مقایسه با IBA به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (جدول ۲). بیشترین درصد شیشه‌ای شدن در رقم شهرکرد با ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌دست آمد (شکل ۵). با در نظر گرفتن نتایج مقایسهٔ میانگین، تنظیم‌کننده‌های رشدی TDZ و زآتین باعث افزایش ریزنمونه‌های شیشه‌ای شدند و این امر باعث کاهش درصد شاخه‌زایی شد (شکل ۵). شیشه‌ای شدن (Glassiness or vitrification) یک ناهنجاری فیزیولوژیکی است در نتیجهٔ آن برگ‌ها پهن، ضخیم و نیمه شفاف شده و به حالت چین‌خورده و شکننده در می‌آیند. این ناهنجاری به‌طورمعمول رشد ریزنمونه‌ها یا گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای را به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (Gaspar *et al*., 1987; Ziv, 1991; Rojas-Martínez *et al*., 2010). بنابراین، در این تحقیق یکی از دلایل بالا بودن باززایی ساقه تحت تأثیر هورمون BAP، می‌تواند به دلیل وجود کمترین میزان ساقه‌های شیشه‌ای در محیط حاوی آن باشد. بررسی‌های چندی نشان داده که شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای تحت تأثیر عامل‌های مختلف مانند ژنوتیپ گیاه مادری، غلظت و نوع آگار مورداستفاده، غلظت و نوع سایتوکنین مورداستفاده و ... قرار می‌گیرد (Hakkaart & Versluijs, 1983; Ziv, 1991; Bhojwani & Razdan, 1996; Rojas-Martínez *et al*., 2010). برای مثال، گزارش شده که در برخی رقم‌ها گیاه میخک صدپر مانند *Doranja* و *Polarthur* شیشه‌ای شدن بافت‌ها بسیار شایع بوده ولی در رقم‌های مانند *Eolo* به‌ندرت رخ می‌دهد (Hakkaart & Versluijs, 1983).

ریشه‌زایی

هم‌زمان با شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها، ریشه‌زایی آن‌ها نیز

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی شد (شکل ۱- H و I). تأثیر رقم، نوع و غلظت سیتوکینین و اثر متقابل رقم، اکسین و سیتوکینین بر درصد ریشه‌زایی معنی‌دار بود ولی بین دو نوع اکسین مورداستفاده تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. میانگین طول ریشه در هر ریزنمونه نیز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع و غلظت سیتوکینین و اثر متقابل رقم و سیتوکینین قرار گرفت (جدول ۱). به‌طورکلی، میانگین درصد ریشه‌زایی رقم شهرکرد نسبت به رقم خوانسار بیشتر بود (شکل ۲- A). از بین تیمارهای مورداستفاده نیز بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (شاهد) مشاهده شد (شکل ۵). افزون بر این، در رقم شهرکرد، ۳۰-۴۸/۵ درصد از ریزنمونه‌ها و نو ساقه‌ها در محیط کشت‌های حاوی ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر زآتین ریشه-زایی نشان دادند. درحالی‌که، در رقم خوانسار در این محیط کشت‌ها ریشه‌زایی صفر یا نزدیک به آن بود. این امر نشان‌دهندهٔ واکنش متفاوت این دو رقم نسبت به انواع سیتوکینین‌ها از نظر ریشه‌زایی است (جدول ۳). بیشترین رشد ریشه در هر دو رقم خوانسار و شهرکرد در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشدی و کوتاه‌ترین آن در خوانسار به همراه محیط حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و شهرکرد به همراه محیط حاوی ۱ یا ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد (شکل ۵).

ریشه‌زایی تحت تأثیر عامل‌های ژنتیکی، فیزیولوژیکی و شرایط محیطی قرار می‌گیرد (Sorin *et al*., 2005). میزان هورمون‌های درونی مانند IAA و سایتوکینین‌ها و اسید آبسیزیک در تشکیل ریشه و جوانه مهم است؛ به‌طور مثال در ژنوتیپی از ارکیده که ۶۰ درصد وزن خشک آن را ریشه تشکیل می‌داد، تجمع اکسین در اندام هایش بیست برابر بود (Peres *et al*., 2001). ریشه‌زایی در محیط بدون تنظیم‌کننده‌های رشدی در گیاهان دیگری مانند شبدر سفید (Voisey *et al*., 1994)، توت فرنگی (Madani *et al*., 2013)، یونجه (*Medicago sativa* L.) (Li *et al*., 2009)، ماش (*Vigna radiata* L.) (Gulati & Jaiwal, 1994) و *V. mungo* L. (Ignacimuthu & Franklin, 1999) نیز گزارش شده است. به عبارت دیگر، محیط MS بدون هورمون نیز این امکان را به گیاه می‌دهد که خود، تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد نیاز برای ریشه‌زایی را ایجاد کند. بنابراین، برای تحریک ریشه‌دهی، محیط مناسب و مقرون به صرفه‌تری است (Madani *et al*., 2013). با این‌حال، Sancak (1999) برای ریشه‌زایی ساقهٔ باززاشده اسپرس (*O. viciifolia* Scop.) با ریزنمونهٔ محور جنینی، از محیط $^1/_2$MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده کرده و گزارش کردند که ریشه‌های تولیدشده در محیط حاوی IBA نسبت به محیط حاوی NAA بلندتر و قوی‌تر بودند.

نتیجه‌گیری کلی

بهترین ترکیب تیماری بهینه برای شاخه‌زایی و تولید ساقه‌های چندگانه با رشد مطلوب و بیشترین شمار ساقه در هر ریزنمونه در رقم خوانسار، محیط MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP یا زآتین بود، که این خود نه تنها از جنبه ریزازدیادی و کشت درون شیشه‌ای، بلکه به‌عنوان پیش زمینهٔ بسیار مناسب برای هدف‌های اصلاحی و انتقال ژن به این گیاه با ارزش مورد توجه است. درکل، در این تحقیق یک شیوهٔ کارآمد با استفاده از ریزنمونهٔ نوک ساقه برای باززایی درون شیشه‌ای اسپرس ارایه شد که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی آن به منظور افزایش درون شیشه‌ای استوک‌های ژنتیکی و همچنین معرفی ژن‌ها و صفات جدید مطلوب از طریق مهندسی ژنتیک استفاده شود.

REFERENCES

1. Bhaskaran, S. & Smith, R.H. (1990). Regeneration in cereal tissue culture: A review. *Crop Science*, 30, 1329-1336.
2. Bhojwahi, S.S. & Razdan, M.K. (1996). *Plant tissue culture: theory and practice*. Amsterdam, Elsevier.
3. Celiktas, N., Can, E., Hatipoglu, R. & Avci, S. (2006). Somatic embryogenesis, callus production, and plantlet growth in sainfoin *(Onobrychis viciifolia* Scop.). *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 49, 383-388.

www.SID.ir

Archive of SID

4. Cetin, C. (2008). *Production of insect-resistant transgenic sainfoin (Onobrychis sativa Lam.) plants*. Ph.D. Thesis. Ankara University, Turkey.
5. Cousins, Y.L., Lyon, B.R. & Lewelly, D.J. (1991). Transformation of an Australian cotton cultivar: prospects for cotton improvement through genetic engineering. *Australian Journal of Plant Physiology*, 18, 481-494.
6. Delgado, I., Salvia, J., Buil, I. & Andres, C. (2008). The agronomic variability of a collection of sainfoin accessions. *Spanish Journal Agricultural Research*, 3, 401-407.
7. Diettrich, B., Mertinat, H. & Luckner. M. (1990). Formation of *Digitalis lanata* clone lines by shoot tip culture. *Planta Medica*, 56, 53-58.
8. Ehsanpour, A. & Amini, F. (2002). *Plant Tissue and Cell Culture*. Jahad Daneshgahi Isfehan Press, Isfehan, 11pp.
9. Etedali, F. & Baghban kohne rouz, B. (2007). Callus Induction and Plant Regeneration from an ancient and forgotten crop plant *Vicia ervilia L. (WILLD).* The 5th National Biotechnology Congress of Iran, 24-26 Nov., Summit Meeting Conference Hall, Tehran, Iran.
10. Farshadfar, M. & Bakhshi-Khaniki, G. R. (2011). *Basics of biotechnology and plant tissue culture*. Tehran: Payame Noor University Publications, College of Agricultural Sciences, 231pp. (in Farsi)
11. Fatima, Z., Mojib, A., Fatima, S., Arshi, A. & Umar, S. (2009). Callus induction, biomass growth and regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh: influence of plant growth regulators and carbohydrates. *Journal of Biotechnology*, 33, 1-13.
12. Firoozabady, E. & DeBoer, D. L. (1993). Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 29, 166-173.
13. Fontana, G., Santini, L., Caretto, S., Furgis, G. & Mariotti, D. (1993). Genetic transformation in the grain legume chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell Reports*, 12, 194-198.
14. Hakkaart, F.A. & Versluijs, J.M.A. (1983). Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 89, 47-53.
15. Han, Y., Jin, X., Wu, F. & Zhang, G. (2011). Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 12, 399-407.
16. Hansen, G. & Wright, M. (1999). Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science*, 4, 226-231.
17. Ignacimuthu, S. & Franklin, G. (1999). Regeneration of plantlets from cotyledon and embryonal axis explants of *Vigna mungo* L. Hepper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55, 75-78.
18. Jauhar, P. P. (2006). Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: the prospects and challenges. *Crop Science*, 46, 1841-1859.
19. Kumar, S., Tiwari, R., Chandra, A., Sharma, A. & Bhatnagar, R.K. (2013). *In vitro* direct plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Grass and Forage Science*, 68, 459-468.
20. Lakshmanan, P. & Taji, A. (2000) Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biology*, 2, 136-148.
21. Li, J.J., Wu, Y.M., Wang, T. & Liu, J.X. (2009). *In vitro* direct organogenesis and regeneration of *Medicago sativa* L. *Biologia Plantarum*, 53, 325-328.
22. Gaspar, T. H., Kevers, C., Debergh, P., Maene, L., Paques, M. & Boxus, P. (1987). Vitrification: Morphological, Physiological, and Ecological Aspects. *Cell and Tissue Culture in Forestry*, 24-26, 152-166.
23. Goleyjani Moghaddaam, R., Motallebi, M., Zamani, M. R. & Rezanejad, H. (2012). Optimization of regeneration and transformation of canola Hyola 308 and RGS003 lines. *Journal of Plant Biology*, 11, 47-61.
24. Gulati, A. & Jaiwal, P.K. (1994). Plant regeneration from cotyledonary node explants of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant Cell Reports*, 13, 523-527.
25. Madani, G., Ghobadi, S., Seyed-Tabatabaei, B.E., Talebi, M. & Yamchi, V. (2013). Effect of plant growth regulators and explant types on regeneration and micropropagation of a commercial strawberry cultivar (Fragaria×ananassa cv. Selva). *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture*, 15, 111-122. (in Farsi)
26. Mahdavian, M., Bouzari, N. & Abdollahi, H. (2010). Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative mahlab rootstock (SL-64). *Seed and Plant Improvement Journal*, 26, 15-26. (in Farsi)
27. Machakova, I., Zazimalova, E. & George, E. F. (2008). Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In: E. F. George, M. A. Hall & G. J. De Klerk (Ed), *Plant Propagation by Tissue Culture. Part I: The Technology.* 3rdedn. (pp. 175-205). Springer, Verlag, Berlin, Germany.

www.SID.ir

Archive of SID

28. Malekiband, S., Jafari, M., Ghadimzadeh, M. & Bernosi, E. (2013). Plant Regeneration via direct organogenesis in three alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars using stem nodal explant. *Seed and Plant Improvement Institute*, 1, 65-80.
29. Mansseri-Lamrioui, A., Louerguioui, A., Bonaly, J., Yakoub-Bougdal, S. & Gana-Kebbouche, S. (2011). Proliferation and rooting of wild cherry: The influence of cytokinin and auxin types and their concentration. *African Journal of Biotechnology*, 10, 8613-8624.
30. Marks, T. R. & Simpson, S. E. (1994). Factors affecting shoot development in apically dominant Acer cultivars. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 69, 543-552.
31. Metry, E.A., Ismail, R.M., Hussien, G.M., Nasr El-Din, T.M. & El-Itriby, H.A. (2006). Regeneration and microprojectile -mediated transformation in *Vicia faba* L. *Arab Journal of Biotechnology*, 1, 23-36.
32. Miller, D. A. (1984). Other legumes. In: *Forage crops*. University of Illinois, McGraw-Hill, Inc. pp, 351-367.
33. Molina, S. M. (2004). *In vitro* callus induction and plants from stem and petiole explants of *Salvia canariensis* L. *Plant Tissue Culture*, 14, 167-172.
34. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
35. Nasir, A., Yusuf Zafar, S. & Malik, A. (1997). A simple procedure of Gossypium meristem tip culture. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 51, 201-207.
36. Ozcan, S., Sevimay, C. S., Yildiz, M., Sancak, C. & Ozgen, M., (1996). Prolific shoot regeneration from immature embryo explants of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop). *Plant Cell Reports*, 16, 200-203.
37. Ozgen, M., Ozcan, S., Sevimay, C. S., Sancak, C. & Yildiz, M. (1998). High frequency adventitious shoot regeneration in sainfoin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52, 205-208.
38. Palazon, J., Bonfill, M. Cusido, R. M., Pinol, M. T. & Morales. C. (1995). Effect of auxin and Phenobarbital on morphogenesis and production of digitoxin in *Digitalis* callus. *Plant and Cell Physiology*, 36, 247-252.
39. Peres, L.E.P., Majerowicz, N., Gilberto, E. & Kerbauy, B. (2001). *Dry Matter Partitioning Differences between Shoots and Roots in Two Contrasting Genotypes of Orchids and their Relationship with Endogenous Levels od Auxines, Cytokinins and Abscisic Acid.* Departamento de Botanica, universidade de São Paulo usp caixa postal 11461. 05422-970. São Paulo. Sp. Brazil.
40. Polanco, M. C., Pelaez, M. I. & Ruiz, M. L., (1988). Factors affecting callus and shoot formation in *in vitro* cultures of *Lens culinaris* Medik. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 15, 175-182.
41. Polisetty, R., Paul, V., Deveshwar, J. J., Khetarpal, S., Suresh, K. & Chandra, R. (1997). Multiple shoot induction by benzyladenine and complete plant regeneration from seed explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell Reports*, 16, 565-571.
42. Rajasekaran, K., Grula, J. W., Hudspeth, R. L., Pofelis, S. & Anderson, D. M. (1996). Herbicide-resistant Acala and Coker cottons transformed with a native gene encoding mutant forms of acetohydroxy acid synthase. *Molecular Breeding*, 2, 307-319.
43. Rojas-Martínez, L., Visser, R.G.F. & Klerk, G.J. (2010). The hyperhydricity syndrome: Waterlogging of plant tissues as a major cause. *Propagation of Ornamental Plants*, 10, 169-175.
44. Rubiales, D., Fondevilla, S., Chen, W., Gentzbittel, L., Higgins, T.J.V., Castillejo, M.A., Singh, K.B. & Rispail, N. (2015). Achievements and challenges in legume breeding for pest and disease resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *34*, 195-236.
45. Saini, R. & Jaiwal, K.P. (2005). Transformation of a recalcitrant grain legume, *Vigna mungo* L. Hepper, using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to shoot apical meristem cultures. *Plant Cell Reports*, 24, 164-171.
46. Saglam, S. (2010). Growth regulators effects on *in vitro* shoot regenerayion of sainfoin (*Onobrychis sativa* Lam.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 24, 2077-2079.
47. Sales, E., Nebaer, S.G., Arrillaga I. & Segura. J. (2002). Plant hormones and *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139 induce efficient plant regeneration in the cardenolide- producing plant *Digitalis minor*. *Journal of Plant Physiology*, 159, 9-16.
48. Sancak, C. (1999). *In vitro* micropropagation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). *Turkish Journal of Botany*, 23, 133-136.
49. Shahzad, A. & Siddiqui, S.A. (2000). *In vitro* organogenesis in *Ocimum sanctum* L. -A multipurpose heb. *Phytomorphology*, Delhi. 50, 27-35.
50. Shigaki, T., Gray, F.A., Delaney, R.H. & Koch, D.W. (1998). Evaluation of host resistance for management of the northern root-Knot nematode in sainfoin, *Onobrychis viciifolia*. *Journal of Sustainable Agriculture*, 12, 23-39.
51. Skala, A. & Wysokinska, A. (2006). *In viro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40, 596-602.

www.SID.ir

Archive of SID

52. Srivastava, L. M. (2002). *Plant Growth and Development-Hormones and Environment*. Amsterdam, Sydney, Academic Press, 772pp.
53. Soares, M.I.M., Kakhimov, S. & Shakirov, Z. (2000). *Productivity of the Desert Legume" Onobrychis"*. Dryland Biotechnology. Vol.6.
54. Sobhanian, N., Habashy, A.A., Farshad Far, E. & Tohid Far, M. (2012). Optimizing regeneration and reporter gene (*gus*) transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Annals of Biological Research*, 3, 2419-2427.
55. Sorin, C., Bussell, J., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., Sandberg, G. & Bellini, C. (2005). Auxine and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require Argonaut 1. *The Plant Cell*, 17, 1343-1359.
56. Srivatanakul, M., Park, S. H., Sanders, J.R., Salas, M.G. & Smith, M.G. (2000). Multiple shoot regeneration of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from a shoot apex culture system. *Plant Cell Reports*, 19, 1165-1170.
57. Sticklen, M. & Oraby, H.F. (2005). Shoot apical meristem: A sustainable explants for genetic transformation of cereal crops. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41, 187-200.
58. Tatari Varnousfaderani, M., Mousavi, S.A. & Bouzari, N. (2012). Micropropagation of some clonal rootstocks of stone fruits. *Seed and Plant Improvement Journal*, 28, 53-66 (in Farsi).
59. Tohidfar, M., Zare, N., Salhi, G. & Eftghari, M., (2013). *Agrobacterium*-mediated transformation of alfalfa (*Medicago sativa*) using a synthetic *cry3a* gene to enhance resistance against alfalfa weevil. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 113, 227-235.
60. Trolinder, N.L. & Goodin, J.R. (1987). Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*, 14, 758-76.
61. Ugandhar, T., Venkateshwarlu, M., Sammailah, D. & Jagan Mohan Reddy, K. (2012). Rapid *in vitro* Micro Propagation of Chick pea (*Cicer arietinum* L.) From Shoot tip and Cotyledonary node explants. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 2, 1-6.
62. Ullah, H., Chen, J., Temple, B., Boyes, D., Alonso, J., Davis, K., Ecker, J. & Jones A. (2003). The B-subunit of the *Arabidopsis* G. protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple development processes. *The Plant Cell*, 15, 393-409.
63. Umbeck, P., Swain, W. & Yang, N.S. (1989). Inheritance and expression of genes for kanamycin and chloramphenicol resistance in transgenic cotton plants. *Crop Science*, 29, 196-201.
64. Van Staden, J., Zazimalova, E. & George, E.F. (2008). *Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists*. 205-226. In: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. Plant propagation by tissue culture. Vol. 1: The Background. Netherlands: Ed.
65. Voisey, C.R., White, D.W., Dudas, B., Appleby, R.D., Ealing, P.M. & Scott, A.G. (1994). *Agrobacterium*-mediated transformation of white clover using direct shoot organogenesis. *Plant Cell Reports*, 13, 309-314.
66. Wernicke, W., Grost, J. & Molkovits, L. (1986). The ambiguous role of 2-4-dichlorophenoxyacetic acid in wheat tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 68, 597-602.
67. Zapata, C., Park, S. H., El-Zik, K. M. & Smith, H. (1999). Transformation of Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 252-256.
68. Zare, N., Valizadeh, M., Tohidfar, M., Mohammadi, S.A., Malboobi, M.A. & Habashi, A.A. (2009). Selection of regenerative genotypes from Iranian alfalfa cultivars. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7, 567-572.
69. Zarei, M., Nezami, E., Hosseini, E., Ahmadi, J. & Garousi, G. (2013). The effect of medium, carbon source, light spectrum and style treatment of auxin on shoot and root regeneration of Gisela 6 root stock. *Cell & Tissue Journal*, 2, 169-185. (in Farsi)
70. Zhang, He., Huang, Q. & Su, J. (2010). Development of alfalfa (*Medicago sativa* L.) regeneration system and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Agricultural Sciences in China*, 9, 170-178.
71. Ziv, M. (1991). *Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants.* In: Micropropagation Technology and Applications. In: P.C. Debergh & R.H. Zimmerman. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, (pp. 45-69).
72. Yazdi Samadi, B., Rezai, A. & Valizadeh, M. (2001). *Statistical Design in Agricultural Research*. Publishing and Printing Institute of Tehran University, Tehran, 397pp.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Filed Crop Science, Vol. 47, No. 2, Summer 2016

In vitro regeneration of sainfoin (*Onobrychis sativa*) via shoot apex explant

Leyli Honarmand[1], Nasser Zare[2*], Rasool Asghari-Zakaria[3] and Parisa Sheikhzade-Mosadegh[4]
1, 2, 3, 4. Former M.Sc. Student, Associate Professors and Assistant Professor, Agricultural Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
(Received: Mar. 17, 2015 - Accepted: Dec. 16, 2015)

ABSTRACT

The growing demand for animal products has made importance of the utilization of biotechnological techniques in improvement of forage crops such as sainfoin. In this research, the effects of different levels of auxin (NAA and IBA) and cytokinin (BAP, Zeatin and TDZ) on *in vitro* growth response of shoot apex explants of Shahrkord and Khansar cultivars of sainfoin were investigated. For this, shoot apex explants were prepared from 4-7 days old seedling grown and cultured on solidified MS medium containing different levels of auxin and cytokinin. The results indicated that the percentage of multiple shoots, number of shoots per explants and shoot length were significantly influenced by cultivar, plant growth regulators combination and its interaction. The percentage of multiple shoots and number of shoots per explants were varied from 0 to 89.7% and 1 to 5.03, respectively. Generally, the percentage of callus induction, multiple shoots and number of shoots per explant in the Khansar cultivar was significantly higher than those of Shahrkord cultivar. The highest percentage of shoots (98.15%), multiple shoots (89.17%) and number of shoots per explant (4.3) were obtained in the Khansar cultivar with MS medium containing 0.1 mgL^{-1} IBA and 3 mgL^{-1} BAP. Root induction and appropriate growth of roots were observed on MS medium without plant growth regulators. These results are highly valuable for *in vitro* culture and micropropagation of sainfoin as well as in breeding programs and transformation of this plant.

Keywords: *In vitro* propagation, *Onobrychis sativa*, tissue culture.

* Corresponding author E-mail: zarenasser@yahoo.com, nzare@uma.ac.ir Tel: +98 45 33510140

www.SID.ir