نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶، ص. ۱۸۹-۱۸۰
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 1, Spring 2017, P. 180-189
ISSN: 2008 - 4730

بهینه‌سازی کالوس‌زایی و باززایی دو توده بومی گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenum– graecum*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

حسن حسنی جیفرودی[۱]- مهدی محب‌الدینی[۲*]- بهروز اسماعیل‌پور[۳]- اسماعیل چمنی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۱۲

چکیده

شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum– graecum* گیاهی یکساله از تیره بقولات است. ریشه، برگ و بذر آن دارای ترکیبات دارویی مهمی می‌باشد. تحقیق حاضر به منظور تعیین مناسبترین غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای تولید گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل دو ژنوتیپ ایرانی (اردستانی و نیشابوری) شنبلیله انجام گرفت. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی IBAو TDZ جهت القای کالوس و باززایی مستقیم کشت گردیدند. در این آزمایش از دو ترکیب TDZ + IBAاستفاده شد. در ترکیب اول، IBA دارای ۴ سطح (۰، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و TDZ دارای ۵ سطح (۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر) و در ترکیب دوم، IBA دارای ۴ سطح (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) و TDZ دارای ۷ سطح (۰، ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۳۵، ۰/۴، ۰/۴۵ میلی‌گرم در لیتر) بودند. آزمایش‌ها بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های اردستانی و نیشابوری کالوس‌زایی کردند، در حالیکه باززایی مستقیم تنها در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ‌ها مشاهده شد. بیشترین درصد کالوس‌زایی ریزنمونه-های کوتیلدون (۷۵ درصد) در ژنوتیپ نیشابوری و در محیط کشت MS حاوی l^{-1} IBAmg ۰/۵ + l^{-1} TDZmg ۰/۴ بدست آمد. همچنین بیشترین درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (۷۵ درصد) در ژنوتیپ اردستانی مشاهده شد که در محیط کشت MS حاوی l^{-1} IBAmg ۰/۵ + TDZmg l^{-1} ۰/۸ بدست آمد. بیشترین درصد باززایی مستقیم (۳۷/۵ درصد) در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری در محیط کشت MS حاوی l^{-1} IBAmg ۰/۰۵ + l^{-1} TDZmg ۰/۳۵ حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: بقولات، ریزنمونه، کوتیلدون، محیط کشت MS، هیپوکوتیل

مقدمه

شنبلیله (*Trigonella foenum–graecum*)، گیاهی یکساله، علفی و از تیره بقولات می‌باشد که بعنوان یک گیاه دارویی، زراعی، مرتعی، آرایشی و بهداشتی حائز اهمیت فراوان است (۱). مواد با اهمیت در برگ شنبلیله عبارت از کلسیم، آهن، کاروتن، اسیدآسکوربیک، پروتئین، تیامین و ریبوفلاوین است. برگ‌های جوان منبع خوبی از پروتئین، مواد معدنی و ویتامین A و C می‌باشد (۸ و ۵). حدود ۴۰ تا ۶۵ درصد بذور را مواد قندی که عمدتاً مربوط به موسیلاژ روی بذور است، تشکیل می‌دهد. بذور این گیاه حاوی پلی‌ساکارید گالاکتومنان‌ها[۵] و ساپونین‌هایی از قبیل دیوسژنین[۶]، یاموژنین[۷]، گیتوژنین[۸]، تیگوژنین[۹] و نئوتیگوژنس[۱۰] و فلاوونوییدهایی از جمله ویتکسین و همچنین مقداری آلکالوئید از جمله تری‌گونلین، ژنتیانین و کارپائین می‌باشد (۱۸ و ۱).

یکی از بخش‌های مهم بیوتکنولوژی، کشت بافت می‌باشد که جنبه‌های کاربردی زیادی در مطالعات علوم پایه گیاهشناسی، متابولیسم و فیزیولوژی گیاهی، شاخه‌های متفاوت کشاورزی و مهندسی ژنتیک دارد (۱۷). دلیل توجه به جنبه‌های مختلف کشت بافت گیاهان دارویی، بهینه نمودن این روش‌ها به عنوان ابزار مهم

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیاران گروه علوم باغبانی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی
(*- نویسنده مسئول: (Email: Mohebodini@uma.ac.ir
DOI: 10.22067/jhorts4.v0i0.49180

5- Galactomannan
6- Diosgenin
7-Yamogenin
8-Gitogenin
9-Tigogenin
10-Neotigogens

جهت مهندسی ژنتیک این گیاهان و همچنین کاربرد آنها در اصلاح گیاهان دارویی می‌باشد، به گونه‌ای که ایجاد یک سیستم باززایی موثر و کارا شرط اولیه انتقال ژن به گیاهان است (۹). بررسی کشت بافت گیاه مورد بررسی نقطه شروعی برای جداسازی متابولیت‌های ثانویه در کشت کالوس نیز است. تولید متابولیت‌های ثانویه با خصوصیات دارویی در شرایط آزمایشگاهی فواید زیادی در مقایسه با استخراج این ترکیبات از گیاهان تحت شرایط طبیعی دارد و کنترل دقیق پارامترهای مختلف سبب می‌شود که کیفیت مواد حاصل در طول زمان تغییر نکند. در حالی که در شرایط طبیعی بطور مداوم تحت تاثیر شرایط آب و هوایی و آفات است. در نتیجه تلاش به منظور تحت کنترل درآوردن عوامل محیطی ضروری به نظر می‌رسد. پیش نیاز اصلی و اولین گام برای موارد فوق بهینه‌سازی یک سیستم کشت بافت مناسب می‌باشد.

در تحقیقی پروورو و همکاران (۱۵) ۳۱ ژنوتیپ شنبلیله را از نظر تولید کالوس مورد بررسی قرار دادند. آنها با استفاده از هورمون‌های [۱] 2,4-D و Kin[۲] و BAP[۳] موفق به تولید کالوس در زیرگونه‌های گیاه گیاه شنبلیله شدند. در مطالعه دیگری با استفاده از محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ[۴] (MS)، به همراه ۳ میکرومولار NAA[۵]، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مالت و ۱۵۰ میلی‌لیتر شیره‌ی نارگیل، تولید دیوسژنین در کالوس حاصل از برگ، ساقه و ریشه شنبلیله مورد بررسی قرار گرفت. نتایج داده‌های آماری آنها نشان داد که دیوسژنین تولید شده در کالوس برگ نسبت به کالوس ریشه و ساقه بیشتر می‌باشد (۱۳). در تحقیق دیگری، نیکنام و همکاران (۱۲) تاثیر غلظت کلریدسدیم بر رشد، مقدار پروتئین، پرولین و میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در گیاهچه‌ها و کالوس‌های حاصله از دو گونه‌ی شنبلیله را مورد بررسی قرار دادند. آپتی[۶] و همکاران (۳) تحقیقی با هدف تعیین رابطه بین پتانسیل‌های الکتروکینتیک[۷] و رشد در کشت‌های کالوس گیاه شنبلیله انجام دادند. جهت تولید کالوس از این گیاه، از سه ریزنمونه ریشه‌چه، کوتیلدون و برگ‌های جوان و محیط کشت گامبورگ تغییریافته[۸] استفاده کردند. آنها توده‌های کالوس را با تحریک مکانیکی از هم جدا کردند و در نتیجه سلول‌های مجزای بدست آمده به منظور اندازه‌گیری پتانسیل الکتروکینتیک نیز مورد استفاده قرار گرفت. مطالعات مربوط به اثرات افزایش سن روی پتانسیل الکتروکینتیک و شاخص رشد نشان داد که یک ارتباطی ما بین این دو پارامتر وجود دارد و میزان تغییر پتانسیل الکتروکینتیک با افزایش سن می‌تواند به عنوان یک پارامتر جهت مطالعه روند رشد سلول‌ها در کشت‌های کالوس مورد استفاده قرار گیرد.

از آنجاییکه تاکنون پاسخ توده‌های بومی گیاه دارویی شنبلیله به تنظیم کننده‌های رشد گیاهی جهت کالوس‌زایی و باززایی درون‌شیشه‌ای بصورت محدودی مورد بررسی قرار گرفته و همچنین کالوس‌زایی و باززایی دو توده‌ی اردستانی و نیشابوری مورد بررسی قرار نگرفته، از این رو هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی دستورالعمل کالوس‌زایی و باززایی مناسب برای دو توده بومی گیاه دارویی شنبلیله می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ضدعفونی بذور

در این مطالعه از دو ژنوتیپ شنبلیله شامل توده بومی اردستانی و نیشابوری استفاده گردید. برای ضدعفونی بذور، ابتدا بذور در داخل بشر حاوی توری قرار داده شده و همراه با چند قطره مایع ظرفشویی به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند. سپس جهت از بین بردن آلودگی‌های میکروارگانیسمی (قارچ و باکتری) و ضدعفونی سطحی، از الکل اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و آبکشی با آب مقطر استریل شده و سپس استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد و ۵ درصد به مدت ۵ دقیقه به ترتیب برای بذور توده‌ی اردستانی و نیشابوری استفاده شد. همچنین در تمامی تیمارهای ضدعفونی از ماده توئین ۲۰، به مقدار ۱ الی ۲ قطره، به منظور تماس بهتر ماده ضدعفونی با پوشش بذر استفاده گردید. پس از ضدعفونی کردن بذور با محلول هیپوکلریت سدیم با آب مقطر استریل شسته شدند. عمل شستشو به نحوی بود که از آب مقطر استریل در سه نوبت شستشو استفاده شد.

کشت بذور

بذرهای استریل (اردستانی و نیشابوری) به تعداد ۱۰ تا ۱۲ عدد در شیشه‌های حاوی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) کشت شدند. سپس بذرهای کشت شده در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (شدت نور ۲۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد قرار داده شدند.

کشت ریزنمونه

برای هر کدام از توده‌ها جهت تهیه ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل از گیاهچه‌های ۸ روزه استفاده شد (شکل ۱). جهت

1- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
2- Kinetin
3- 6-Benzylaminopurine
4- Murashige and Skoog
5- 1-Naphthaleneacetic acid
6- Apte
7- Electrokinetic
8- Gamborgs medium modified

کالوس‌زایی و باززایی شاخه، ریزنمونه‌های توده‌های اردستانی و نیشابوری در ۴ تکرار در محیط کشت MS حاوی ترکیب غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی کشت شدند. در این پژوهش از دو ترکیب هورمونی (TDZ[2] + IBA[1]) نیز استفاده شد. از ترکیب هورمونی اول در آزمایش اول و از ترکیب هورمونی دوم در آزمایش دوم استفاده شد. در ترکیب اول،IBA دارای ۴ سطح (۰، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و TDZدارای ۵ سطح (۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر) بودند. در ترکیب دوم، IBA دارای ۴ سطح (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) و TDZدارای ۷ سطح (۰، ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۳۵، ۰/۴، ۰/۴۵ میلی‌گرم در لیتر) بودند. در آزمایش اول، ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل توده‌های اردستانی و نیشابوری، و در آزمایش دوم ریزنمونه هیپوکوتیل توده‌ی نیشابوری مورد استفاده شد. داخل هر پتری دیش ۸ ریزنمونه کشت گردید. بعد از استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، اطراف پتری دیش‌ها با پارافیلم بسته شد و در دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (شدت نور ۲۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد قرار داده شدند. پس از انتقال ریزنمونه‌های کشت شده به اتاقک رشد، کنترل روزانه به منظور بررسی تغییرات در رشد و نمو، کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌ها و همچنین حذف کشت‌های آلوده انجام گرفت. در این آزمایش صفاتی از قبیل درصد تشکیل کالوس، وزن ترکالوس و درصد گیاهان باززایی شده، پس از گذشت ۴ هفته اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سپس با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16، داده‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه شدند و سپس مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن[3] در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل دو ژنوتیپ اردستانی و نیشابوری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی ژنوتیپ، غلظت‌های مختلف هورمون‌های IBA و TDZ و همچنین اثرات متقابل آنها برای صفت درصد کالوس‌زایی در هر ریزنمونه کوتیلدون در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند (جدول ۱). با توجه به نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیماری، بیشترین وزن کالوس ریزنمونه‌های کوتیلدون ۱/۱۲ گرم بود که در ژنوتیپ نیشابوری و در محیط کشت MS حاوی $IBAmg\ l^{-1}$ ۰/۵ + $TDZmg\ l^{-1}$ ۰/۴ مشاهده شد (جدول ۲).

به معنی‌دار بودن اثر متقابل سه‌گانه ژنوتیپ ×TDZ×IBA مقایسه میانگین ترکیبات تیماری با استفاده از روش مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. در ژنوتیپ اردستانی ریزنمونه‌های کوتیلدون در محیط کشت‌های فاقد هورمون TDZ کالوس‌زایی نکردند اما در ژنوتیپ نیشابوری در محیط کشت فاقد هورمون TDZ کالوس‌زایی صورت گرفت. در ژنوتیپ نیشابوری در محیط کشت‌هایی که هورمون IBA وجود نداشت کالوس‌زایی هم صورت نگرفت اما در ژنوتیپ اردستانی در محیط‌های فاقد هورمون IBA کالوس‌زایی انجام گرفت. در هر دو ژنوتیپ اردستانی و نیشابوری ریزنمونه‌های کوتیلدون در محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (شاهد) نیز کالوس‌زایی نکردند. بیشترین درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون در ژنوتیپ نیشابوری مشاهده شد که در محیط کشت MS حاوی $IBAmg\ l^{-1}$ ۰/۵ + $TDZmg\ l^{-1}$ ۰/۴ بدست آمد (جدول ۲).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی ژنوتیپ و غلظت‌های مختلف هورمون‌های IBA و TDZ و اثرات متقابل ژنوتیپ ×TDZو×IBA×TDZبرای صفت درصد کالوس‌زایی در هر ریزنمونه هیپوکوتیل در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند.همچنین اثر متقابل ژنوتیپ × TDZ×IBA بر درصد کالوس-زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده‌های آزمایش نشان داد که در هر دو ژنوتیپ اردستانی و نیشابوری، ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در محیط کشت‌های MS فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی IBA و TDZ کالوس‌زایی نکردند. در ژنوتیپ اردستانی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در محیط کشت‌هایی که فاقد اکسین (IBA) بودند کالوس‌زایی نکردند اما در ژنوتیپ نیشابوری در محیط کشت فاقد اکسین هم کالوس‌زایی مشاهده شد. بیشترین درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در ژنوتیپ اردستانی مشاهده شد که در محیط کشت MS حاوی $IBAmg\ l^{-1}$ ۰/۵ + $TDZmg\ l^{-1}$ ۰/۸ با ۷۵ درصد بدست آمده بود (جدول ۲).

وزن کالوس ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل دو ژنوتیپ اردستانی و نیشابوری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی ژنوتیپ، غلظت‌های مختلف هورمون‌های IBA و TDZ و همچنین اثرات متقابل آنها بر وزن کالوس در هر ریزنمونه کوتیلدون در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). با توجه به نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیماری، بیشترین وزن کالوس ریزنمونه‌های کوتیلدون ۱/۱۲ گرم بود که در ژنوتیپ نیشابوری و در محیط کشت MS حاوی $IBAmg\ l^{-1}$ ۰/۵ + $TDZmg\ l^{-1}$ ۰/۴ مشاهده شد (جدول ۲).

1- Indole-3-butyric acid
2-Thidiazuron
3-Duncan

شکل ۱- گیاهچه‌های ۸ روزه جهت تهیه ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل

Figure 1- 8-day-old seedlings for providing cotyledon and hypocotyl explants

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر ترکیب اول IBA و TDZ بر صفات مورد اندازه‌گیری ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل ژنوتیپ اردستانی و نیشابوری

Table 1- ANOVA of the IBA and TDZ effect in first combination on measured traits in Ardestani and Neyshabouri genotypes with cotyledon and hypocotyl explants

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Means of Squares				
		ریزنمونه هیپوکوتیل Hypocotyl Explant			ریزنمونه کوتیلدون Cotyledon Explant	
		باززایی Regeneration	وزن کالوس Callus weight	کالوس‌زایی Callus induction	وزن کالوس Callus weight	کالوس‌زایی Callus induction
ژنوتیپ Genotype	1	$^{ns}3.90$	0.25^{**}	6246.25^{**}	1.91^{**}	6566.40^{**}
TDZ	4	$^{ns}15.62$	0.45^{**}	5935.46^{**}	0.33^{**}	2525.39^{**}
IBA	3	$^{ns}31.25$	1.17^{**}	17527.77^{**}	0.75^{**}	3756.51^{**}
ژنوتیپ×TDZ TDZ × Genotype	4	$^{ns}3.90$	0.21^{**}	2060.89^{**}	0.16^{**}	599.60^{**}
ژنوتیپ× IBA IBA × Genotype	3	$^{ns}14.32$	0.11^{*}	780.75^{ns}	0.46^{**}	1584.36^{**}
TDZ × IBA	12	$^{ns}18.22$	0.14^{**}	1258.78^{**}	0.09^{**}	507.81^{**}
ژنوتیپ× TDZ × IBA TDZ × IBA × Genotype	12	$^{ns}27.34$	0.08^{*}	625.16^{*}	0.08^{**}	464.84^{**}
اشتباه آزمایشی Error	120	0.13	0.003	62.01	0.002	14.37
ضریب تغییرات C.V(٪)		28.96	23.71	17.32	27.26	23.55

ns، * و ** به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, * and **: Non-significant and significant at probability level of 5 and 1 %, respectively.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی ژنوتیپ، غلظت‌های مختلف هورمون‌های IBA و TDZ و اثرات متقابل ژنوتیپ ×TDZ و TDZ×IBA برای صفت وزن کالوس ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بودند، همچنین اثر متقابل ژنوتیپ × IBA و ژنوتیپ × TDZ×IBA در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیماری نشان داد که بیشترین وزن کالوس ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در ژنوتیپ اردستانی مشاهده شد که در محیط کشت MS حاوی $IBAmg\ l^{-1}$ ۰/۵ + $TDZmg\ l^{-1}$ ۰/۸ با ۰/۸۲ گرم بدست آمد (جدول ۲).

درصد باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل دو ژنوتیپ اردستانی و نیشابوری

در هر دو ژنوتیپ اردستانی و نیشابوری ریزنمونه‌های کوتیلدون در محیط کشت‌های حاوی سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی IBA و TDZ باززایی نکردند. همچنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های هیپوکوتیل نشان داد که اثرات اصلی ژنوتیپ و غلظت‌های مختلف هورمون‌های IBA و TDZ و اثرات متقابل آنها برای صفت درصد باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۱). با وجود عدم معنی‌داری هیچ یک از اثرات، مقایسه میانگین ترکیبات تیماری سه‌گانه تفاوت معنی‌داری را بین میانگین‌ها نشان داد. بیشترین درصد باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در ژنوتیپ نیشابوری مشاهده شد که در محیط کشت MS حاوی $IBAmg\ l^{-1}$ ۰/۱ + $TDZmg\ l^{-1}$ ۰/۴ با ۹/۳۷ درصد باززایی صورت گرفت.ترکیبات تیماری $IBAmg\ l^{-1}$ ۰ + $TDZmgl^{-1}$ ۰/۶ و $IBAmgl^{-1}$ ۰/۱+ $TDZmgl^{-1}$ ۰ و $IBAmg\ l^{-1}$ ۰/۱ + $TDZmg\ l^{-1}$ ۰/۸ برای ژنوتیپ اردستانی و $IBAmg\ l^{-1}$ ۰ + $TDZmg\ l^{-1}$ ۰/۴، $IBAmg\ l^{-1}$ ۰/۱ + $TDZmg\ l^{-1}$ ۰/۸، $IBAmg\ l^{-1}$ ۰/۳ + $TDZmg\ l^{-1}$ ۰/۲، $IBAmgl^{-1}$ ۰/۳ + $TDZmgl^{-1}$ ۰/۶، $IBAmgl^{-1}$ ۰/۵+ $TDZmgl^{-1}$ ۰ و $IBAmgl^{-1}$ ۰/۵ + $TDZmgl^{-1}$ ۰/۲ برای ژنوتیپ نیشابوری با ۳/۱۲ درصد باززایی و همچنین ترکیبات تیماری $IBAmg\ l^{-1}$ ۰ + $TDZmgl^{-1}$ ۰/۴ و $IBAmgl^{-1}$ ۰/۱ + $TDZmg\ l^{-1}$ ۰/۲ برای ژنوتیپ اردستانی با ۶/۲۵ درصد باززایی، اختلاف معنی‌داری با ترکیب تیماری $IBAmg\ l^{-1}$ ۰/۱ + $TDZmg\ l^{-1}$ ۰/۴ برای ژنوتیپ نیشابوری با بیشترین درصد باززایی نداشتند (جدول ۲).

بررسی تاثیر غلظت‌های دیگری از ترکیب هورمونی IBA و TDZ بر صفات مورد ارزیابی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری

از نتایج آزمایش‌هایی که در مرحله قبل انجام گرفت مشخص گردید ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری کشت شده در محیط کشت MSحاوی ترکیب هورمونی IBA + TDZ واکنش بهتری نسبت به باززایی نشان می‌دهند (در هر دو ژنوتیپ اردستانی و نیشابوری ریزنمونه‌های کوتیلدون باززایی نکردند). به همین منظور در آزمایشی غلظت‌های دیگری از ترکیب هورمونی IBA و TDZ (جدول ۴) جهت افزایش میزان باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری مورد استفاده قرار گرفت.

درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی و اثر متقابل غلظت‌های مختلف ترکیب هورمون‌های IBA و TDZ برای صفت درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در محیط‌های کشت فاقد اکسین (IBA) کالوس‌زایی نکردند. طبق نتایج مقایسه میانگین داده‌ها بیشترین درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (۹۶/۸۷ درصد) در محیط کشت MS حاوی $IBAmgl^{-1}$ ۰/۱۵ + $TDZmgl^{-1}$ ۰/۴۵ مشاهده شد (جدول ۴).

وزن کالوس ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل و اثرات اصلی غلظت‌های مختلف ترکیب هورمون‌های IBA و TDZ بر وزن کالوس ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳). بیشترین وزن کالوس ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری (۰/۸۳ گرم) در محیط کشت MS حاوی $IBAmg\ l^{-1}$ ۰/۱۵ + $TDZmgl^{-1}$ ۰/۲ مشاهده شد (جدول ۴).

درصد باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل و اثرات اصلی غلظت‌های مختلف ترکیب هورمون‌های IBA و TDZ بر درصد باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳). بیشترین درصد باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری در محیط کشت MS حاوی $IBAmgl^{-1}$ ۰/۰۵ + $TDZmg\ l^{-1}$ ۰/۳۵ با ۳۷/۵ درصد باززایی صورت گرفت (جدول ۴). بطور کلی میزان باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری در محیط‌های کشت حاوی ترکیب دوم تیمارهای هورمونی IBA و TDZ (جدول ۴) به مراتب بیشتر از ترکیب اول تیمارهای هورمونی IBA و TDZ (جدول ۲) بود. همچنین ریزنمونه‌هایی که در محیط کشت حاوی ترکیب دوم تیمارهای هورمونی IBA و TDZ باززایی کرده بودند از رشد بیشتری برخوردار بودند.

جدول ۲-مقایسه میانگین تاثیر ترکیب اول IBA و TDZ بر صفات مورد اندازه‌گیری ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل ژنوتیپ اردستانی و نیشابوری

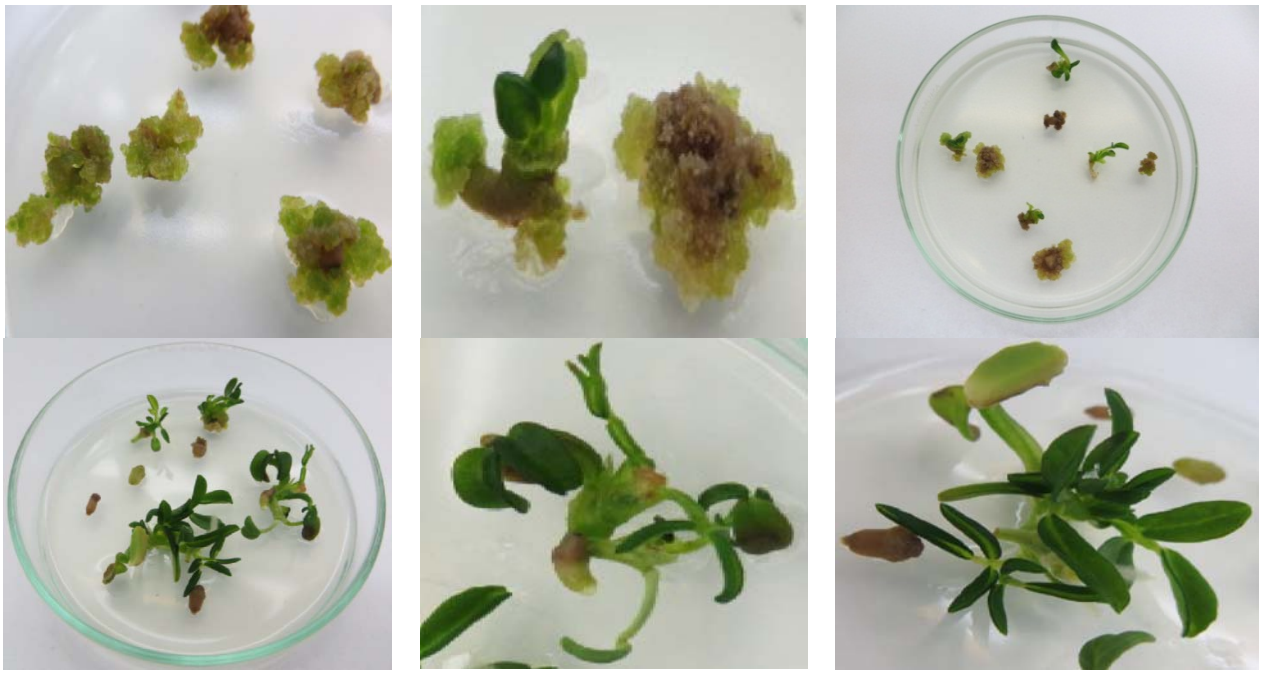
Table 2- Mean comparison of the effect of IBA and TDZ in first combination on measured traits in Ardestani and Neyshabouri genotypes with cotyledon and hypocotyl explants

ژنوتیپ Genotype	غلظت‌های مختلف هورمون different concentration of hormone (mg l^{-1})	ریزنمونه هیپوکوتیل Hypocoty Explant		ریزنمونه کوتیلدون Cotyledon Explant		
		باززایی Regeneration (%)	وزن کالوس Callus weight (g)	کالوس‌زایی Callus Production (%)	وزن کالوس Callus weight (g)	کالوس‌زایی Callus Production (%)
اردستانی Ardestani	0 IBA + 0 TDZ	b0	j0	i0	e0	g0
اردستانی Ardestani	0 IBA + 0.2 TDZ	b0	j0	i0	de0.05	fg9.37
اردستانی Ardestani	0 IBA + 0.4 TDZ	ab6.25	j0	i0	de0.07	efg15.62
اردستانی Ardestani	0 IBA + 0.6 TDZ	ab3.12	j0	i0	e0	g0
اردستانی Ardestani	0 IBA + 0.8 TDZ	b0	j0	i0	e0	g0
اردستانی Ardestani	0.1 IBA + 0 TDZ	ab3.12	j0	i0	e0	g0
اردستانی Ardestani	0.1 IBA + 0.2 TDZ	ab6.25	bcdef0.47	efghi21.87	de0.06	efg 18.75
اردستانی Ardestani	0.1 IBA + 0.4 TDZ	b0	efghij0.21	fghi18.75	de0.02	fg6.25
اردستانی Ardestani	0.1 IBA + 0.6 TDZ	b0	ij0.02	hi6.25	e0.006	fg6.25
اردستانی Ardestani	0.1 IBA + 0.8 TDZ	ab3.12	bcdef0.46	abcd56.25	de0.09	fg12.50
اردستانی Ardestani	0.3 IBA + 0 TDZ	b0	ij0.06	ghi12.50	e0	g0
اردستانی Ardestani	0.3 IBA + 0.2 TDZ	b0	cdefgh0.38	abcd56.25	de0.07	fg12.50
اردستانی Ardestani	0.3 IBA + 0.4 TDZ	b0	hij0.06	hi6.25	de0.03	fg9.37
اردستانی Ardestani	0.3 IBA + 0.6 TDZ	b0	efghij0.31	abcd53.12	de0.14	def21.87
اردستانی Ardestani	0.3 IBA + 0.8 TDZ	b0	efghij0.24	ab68.75	de0.13	def21.87
اردستانی Ardestani	0.5 IBA + 0 TDZ	b0	efghij0.24	cdefg37.55	e0	g0
اردستانی Ardestani	0.5 IBA + 0.2 TDZ	b0	ij0.03	ghi12.50	e0.01	fg6.25
اردستانی Ardestani	0.5 IBA + 0.4 TDZ	b0	fghij0.16	defgh31.25	de0.12	efg15.62
اردستانی Ardestani	0.5 IBA + 0.6 TDZ	b0	defghi0.34	defghi28.12	de0.07	fg12.50
اردستانی Ardestani	0.5 IBA + 0.8 TDZ	b0	a0.82	a75	d0.25	cdef25
نیشابوری Neyshabouri	0 IBA + 0 TDZ	b0	j0	i0	e0	g0
نیشابوری Neyshabouri	0 IBA + 0.2 TDZ	b0	j0.008	hi3.12	e0	g0
نیشابوری Neyshabouri	0 IBA + 0.4 TDZ	ab3.12	ij0.02	hi3.12	e0	g0
نیشابوری Neyshabouri	0 IBA + 0.6 TDZ	b0	j0	i0	e0	g0
نیشابوری Neyshabouri	0 IBA + 0.8 TDZ	b0	j0	i0	e0	g0
نیشابوری Neyshabouri	0.1 IBA + 0 TDZ	b0	j0.01	hi6.25	e0	g0
نیشابوری Neyshabouri	0.1 IBA + 0.2 TDZ	b0	ghij0.11	cdefg37.50	de0.08	efg15.62
نیشابوری Neyshabouri	0.1 IBA + 0.4 TDZ	a9.37	efghij0.29	bcdef43.75	de0.20	def21.87
نیشابوری Neyshabouri	0.1 IBA + 0.6 TDZ	b0	efghij0.31	68.75ab	d0.26	bcde34.37
نیشابوری Neyshabouri	0.1 IBA + 0.8 TDZ	ab3.12	efghij0.29	abcd53.12	bc0.54	bc43.75
نیشابوری Neyshabouri	0.3 IBA + 0 TDZ	b0	j0	i0	e0	g0
نیشابوری Neyshabouri	0.3 IBA + 0.2 TDZ	ab3.12	efghij0.22	abcde50	d0.25	cdef25
نیشابوری Neyshabouri	0.3 IBA + 0.4 TDZ	b0	abcd0.62	abc65.62	bc0.56	b53.12
نیشابوری Neyshabouri	0.3 IBA + 0.6 TDZ	ab3.12	abc0.68	abc65.62	c0.45	bcd40.62
نیشابوری Neyshabouri	0.3 IBA + 0.8 TDZ	b0	cdefg0.40	abc65.62	de0.23	bcde34.37
نیشابوری Neyshabouri	0.5 IBA + 0 TDZ	ab3.12	ghij0.08	defgh31.25	de0.04	fg12.50
نیشابوری Neyshabouri	0.5 IBA + 0.2 TDZ	ab3.12	cdefg0.40	bcdef43.75	b0.68	bcde34.37
نیشابوری Neyshabouri	0.5 IBA + 0.4 TDZ	b0	bcde0.50	abc62	a1.12	a75
نیشابوری Neyshabouri	0.5 IBA + 0.6 TDZ	b0	ab0.75	abc65.62	bc0.50	cdef25
نیشابوری Neyshabouri	0.5 IBA + 0.8 TDZ	b0	abc0.70	ab68.75	bc0.59	bcde34.37

میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p<0.05$)اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ندارند.

Means with similar letters in each column are not significantly differentbase on Duncan multiple range test ($p<0.05$).

از جمله عواملی که در تولید کالوس و باززایی موثرند، ژنوتیپ، تنظیم کننده‌های رشد، محیط کشت، نوع ریزنمونه، سن ریزنمونه و شرایط محیطی می‌باشد (۶). نتایج نشان داده است که وابستگی القای کالوس و باززایی گیاه به ژنوتیپ اجتناب ناپذیر است و القای کالوس و باززایی گیاه با ژنوتیپ گیاه تغییر می‌کند. در بسیاری از مطالعات نشان داده شده که پاسخ‌های متفاوت ریزنمونه‌های مختلف یک گیاه به هورمون در یک محیط کشت در نتیجه اختلاف در خصوصیات ویژه درون سلولی ریزنمونه‌ها از قبیل بیان ژن و سطوح هورمون‌های درون‌زاد ریزنمونه است (۶).



شکل ۲- القای کالوس و باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری

Figure 2-Callus induction and shoot regeneration from hypocotyl explants in Neyshabouri genotype

جدول ۳- تجزیه واریانس تاثیر ترکیب دوم IBA و TDZ بر صفات مورد اندازه‌گیری ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری

Table 3- ANOVA of the IBA and TDZ effect in second combination on measured traits in Neyshabouri genotype with hypocotyl explant

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Means of Squares		
		وزن کالوس Callus weight	باززایی Regeneration	کالوس‌زایی Callus induction
IBA	3	1.21**	829.61**	25258.09**
TDZ	6	0.17**	517.11**	5175.31**
IBA × TDZ	18	0.10**	234.99**	1844.46**
اشتباه آزمایشی Error	84	0.004	1.62	63.67
ضریب تغییرات C.V (٪)	-	25.09	19.03	18.38

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪

**: Significant at probability level of 1 %

جدول ٤- مقایسه میانگین تاثیر ترکیب دوم IBA و TDZ بر صفات مورد اندازه‌گیری ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری

Table 4- Mean comparison of the effect of IBA and TDZ in second combination on measured traits in Neyshabouri genotype with hypocotyl explant

غلظت‌های مختلف هورمون Different concentrations of hormone (mg l^{-1})	وزن کالوس Callus weight (g)	باززایی Regeneration (%)	کالوس‌زایی Callus induction (%)
0 IBA + 0 TDZ	$^{h}0$	$^{d}0$	$^{i}0$
0 IBA + 0.2TDZ	$^{h}0$	$^{d}0$	$^{i}0$
0 IBA + 0.25 TDZ	$^{h}0$	$^{d}0$	$^{i}0$
0 IBA + 0.3TDZ	$^{h}0$	$^{d}0$	$^{i}0$
0 IBA + 0.35TDZ	$^{h}0$	$^{d}0$	$^{i}0$
0 IBA + 0.4 TDZ	$^{h}0$	$^{d}0$	$^{i}0$
0 IBA + 0.45 TDZ	$^{gh}0.04$	$^{d}6.25$	$^{hi}12.50$
0.05 IBA + 0TDZ	$^{gh}0.04$	$^{d}0$	$^{hi}15.62$
0.05 IBA + 0.2 TDZ	$^{gh}0.05$	$^{d}6.25$	$^{ghi}21.87$
0.05 IBA + 0.25TDZ	$^{h}0$	$^{d}0$	$^{i}0$
0.05 IBA + 0.3 TDZ	$^{efgh}0.19$	$^{b}21.87$	$^{fgh}34.37$
0.05 IBA + 0.35 TDZ	$^{bcd}0.44$	$^{a}37.5$	$^{abc}84.37$
0.05 IBA + 0.4 TDZ	$^{efg}0.23$	$^{b}21.87$	$^{abcd}78.12$
0.05 IBA + 0.45 TDZ	$^{cde}0.35$	$^{d}6.25$	$^{bcde}68.75$
0.1 IBA + 0TDZ	$^{h}0$	$^{d}0$	$^{i}0$
0.1 IBA + 0.2 TDZ	$^{def}0.32$	$^{d}0$	$^{bcde}62.50$
0.1 IBA + 0.25TDZ	$^{b}0.59$	$^{d}0$	$^{ab}87.50$
0.1 IBA + 0.3 TDZ	$^{efgh}0.19$	$^{cd}9.37$	$^{def}56.25$
0.1 IBA + 0.35 TDZ	$^{bcd}0.46$	$^{d}3.12$	$^{bcde}68.75$
0.1 IBA + 0.4 TDZ	$^{bcd}0.48$	$^{d}0$	$^{abcd}81.25$
0.1 IBA + 0.45 TDZ	$^{fgh}0.13$	$^{bc}15.62$	$^{efg}43.75$
0.15 IBA + 0TDZ	$^{gh}0.07$	$^{d}0$	$^{hi}18.75$
0.15 IBA + 0.2TDZ	$^{a}0.83$	$^{d}0$	$^{ab}87.50$
0.15 IBA + 0.25 TDZ	$^{bcd}0.47$	$^{cd}9.37$	$^{abcd}71.87$
0.15 IBA + 0.3 TDZ	$^{bc}0.54$	$^{cd}9.37$	$^{cde}59.37$
0.15 IBA + 0.35 TDZ	$^{bcd}0.50$	$^{b}18.75$	$^{abc}84.37$
0.15 IBA + 0.4 TDZ	$^{bcd}0.51$	$^{d}3.12$	$^{abcd}81.25$
0.15 IBA + 0.45 TDZ	$^{b}0.57$	$^{b}18.75$	$^{a}96.87$

میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p<0.05$) اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ندارند.

Means with similar letters in each column are not significantly different base on Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

در این تحقیق ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل دو ژنوتیپ بومی اردستانی و نیشابوری کشت شده در محیط‌های کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی IBA + TDZ بعد از گذشت دو هفته در اکثر محیط‌های کشت به القای کالوس واکنش نشان دادند. نتایج نشان داد که جهت کالوس‌زایی وجود هورمون ضروری است به گونه‌ای که ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های اردستانی و نیشابوری در محیط‌های کشت فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهیIBA و TDZ(شاهد) کالوس‌زایی نکردند. در هر دو ژنوتیپ اردستانی و نیشابوری ریزنمونه‌های هیپوکوتیل به مراتب از درصد کالوس‌زایی بالاتری نسبت به ریزنمونه‌های کوتیلدون نیز برخوردار بودند. رشد کالوس در یک گونه گیاهی بر اساس نوع ریزنمونه آن گیاه متفاوت بوده است (۱۱). باززایی در شرایط درون‌شیشه‌ای به استفاده از هورمون‌های گیاهی و همچنین به توانایی بافت‌ها برای پاسخ به این تغییرات هورمونی در طول کشت وابسته است. به طور کلی کنترل فرآیندهای تمایزیابی بستگی به حضور اکسین و سایتوکنین داشته و توازن بین آن‌ها تولید اندام هوایی و ریشه را سبب می‌شود. گرچه میزان تنظیم کننده‌های رشد خارجی به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه بستگی دارد (۴). در بسیاری از گونه‌های گیاهی، هورمون TDZ نسبت به سایر سایتوکنین‌ها دارای تاثیر بیشتری جهت القای باززایی درون‌شیشه‌ای می‌باشد (۹). تاثیر TDZ بر القای جوانه‌های نابجا و باززایی بستگی به سطح هورمون داخلی دارد و این تنظیم کننده رشد منجر به تنظیم سطح اکسین در گیاه می‌شود (۷).

ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های اردستانی و نیشابوری کشت شده در محیط‌های کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی IBA و TDZ پس از گذشت ۲ هفته شروع به باززایی کردند. بطور کلی مقدار باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری به مراتب بیشتر از ژنوتیپ اردستانی بود.میزان تولید باززایی به میزان تنظیم کننده‌های رشد خارجی وابسته است و میزان تنظیم کننده‌های رشد خارجی نیز به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه بستگی دارد (۱۴). طبق نتایج، بیشترین درصد باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری در

محیط کشت MS حاوی $IBAmgl^{-1}$ ۰/۰۵ + $TDZmgl^{-1}$ ۰/۳۵ با ۳۷/۵ درصد باززایی صورت گرفت. بطور کلی میزان باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری در محیط‌های کشت حاوی ترکیب دوم تیمارهای هورمونی IBA و TDZ به مراتب بیشتر از ترکیب اول تیمارهای هورمونی IBA و TDZ بود. همچنین ریزنمونه‌هایی که در محیط کشت حاوی ترکیب دوم تیمارهای هورمونی IBA و TDZ باززایی کرده بودند از رشد بیشتری برخوردار بودند. عکس‌العمل ریزنمونه‌های مختلف بسته به نوع، مقدار و روابط هورمونی داخل اندام مورد کشت متفاوت می‌باشد. می‌توان نتیجه گرفت عکس‌العمل گیاهان مختلف، ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان و نوع ریزنمونه به دلیل برخورداری از ساختار ژنتیکی متفاوت و خاص گیاه و اثرات شرایط مختلف محیطی در بیان و تظاهر عمل ژن‌های خاص، متفاوت می‌باشد و مجموعه برآیند عوامل تاثیرگذار ذکر شده، باعث عکس‌العمل خاص گیاه جهت رشد و نمو بهینه می‌شود (۱۴). آسیم و همکاران (۱)، باززایی درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های کوتیلدون شنبلیله را با استفاده از سایتوکنین‌های مختلف بررسی کردند. محیط کشت‌های MS به ۳ دسته تقسیم شده بودند. در دسته‌ی اول، محیط کشت تنها حاوی ۰/۰۵ تا ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر Kin و دسته‌ی دوم، محیط کشت حاوی ۰/۲۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA یا فاقد آن و در دسته‌ی سوم محیط کشت حاوی ۰/۰۵ تا ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر TDZ با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA یا فاقد آن بود. بیشترین درصد باززایی مستقیم ریزنمونه‌های کوتیلدون (۲۲/۲۲ درصد) را در محیط کشت MS حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ و فاقد IBA گزارش کردند. متفاوت بودن واکنش ریزنمونه‌های کوتیلدون برای باززایی مستقیم در ترکیب هورمونی IBA و TDZ در این آزمایش با گزارش آسیم و همکاران احتمالا به دلیل تفاوت در ژنوتیپ گیاه شنبلیله باشد.در تحقیق دیگری رضائیان و همکاران (۱۶)، کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های مختلف گیاه شنبلیله شامل مریستم انتهایی ریشه، مریستم انتهایی ساقه و برگ در محیط کشتMS حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-Dدر شرایط تاریکی و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به هدف تعیین بهترین غلظت هورمونی و بهترین ریزنمونه برای ایجاد بیشترین کالوس‌زایی را مورد بررسی قرار دادند. نتایجآنهانشان داد که اثر هورمون 2,4-D در تغییرات وزن تر، وزن خشک و نسبت کالوس‌زایی از لحاظ آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود. نتایج حاصل از بررسی وزن تر و خشک نشان داد که با افزایش غلظت هورمون 2,4-Dاز صفر به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، افزایش معنی‌داری در وزن تر و خشک ایجاد شد که نشان دهنده‌ی اثر مشخص هورمون بر وزن تر و خشک بود. بیشترین میزان وزن تر و خشکدر غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون2,4-D و کمترین میزان در شاهد بود. اما با افزایشغلظت هورمون به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر در میزان وزن تر و خشک تا حدودی کاهش مشاهده شد. به طور کلی مشخص گردید که بهترین کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها در محیط MS با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D انجام شد. بهترین ریزنمونه برای تشکیل کالوس مریستم انتهایی ساقه بود و شرایط بهینه برای کالوس‌زایی، قرار گرفتن کالوس‌ها در تاریکی بود، بطوری که کالوس‌هایی که در شرایط تاریکی قرار داشتند، سفید رنگ بوده و رشد خوبی نسبت به شرایط معمولی داشتند. در مقابل کالوس‌هایی که در روشنایی رشد کردند بعد از مدتی سبز رنگ شدند و میزان رشد آنها کمتر از شرایط معمولی بود.

در پژوهشی دیگر افشاری و همکاران (۲)، به منظور مطالعه کالوس‌زایی، جنین‌زاییسوماتیکیو باززایی گیاه شنبلیله، آزمایشی انجام دادند. آنها از دو محیط کشت پایه MS و B_5، چهار ریزنمونه ساقه، برگچه حاوی دمبرگ، جنین و هیپوکوتیل و ۵ نوع هورمون شامل: 2,4-D در ۳ سطح (۰، ۱، ۲ میلی‌گرم در لیتر)، Kin در ۴ سطح (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ میلی‌گرم در لیتر)، NAA در ۴ سطح (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱ میلی‌گرم در لیتر)، BAP در ۴ سطح (۰، ۰/۵، ۱/۵، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) و IBA در ۳ سطح (۰، ۰/۵، ۱ میلی‌گرم در لیتر) استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که در بررسی اثر متقابل دو هورمون 2,4-D و Kin، محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-Dو ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin، بهترین ترکیب هورمونی جهت القای کالوس در هر دو محیط کشت B_5و MS بوده است. بهترین ریزنمونه‌ها از نظر بیشترین وزن کالوس‌القایی در محیط MS، جنین و در محیط B_5، برگچه حاوی دمبرگ و جنین بود. در مطالعه جنین‌زایی سوماتیکی، ترکیب هورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، با بالاترین درصد جنین‌زایی، بعنوان ترکیب برتر در هر دو محیط کشت شناخته شد. از بین ریزنمونه‌ها، ریزنمونه جنین، بیشترین میزان جنین‌زایی را نشان داد. باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی تنها در ریزنمونه جنین مشاهده شد. ترکیب هورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، بهترین ترکیب هورمونی جهت القای اندام هوایی در هر دو محیط کشت بود. در تحقیق دیگری لیو[1] و همکاران (۱۰) بالاترین میزان جنین‌زایی سوماتیکی در مزوفیل برگ شنبلیله را، در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) غنی شده با ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده کردند.

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر عوامل ژنوتیپ، ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد تاثیر بارزی در واکنش به القای کالوس و باززایی گیاه شنبلیله

1- Lu

داشته‌اند. بطور کلی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ نیشابوری واکنش بهتری نسبت به باززایی نشان دادند. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان پیشنهاد کرد که تیمارهای اعمال شده در این تحقیق بر روی ژنوتیپ‌های بومی دیگر شنبلیه در کشور اعمال شود و بهترین ژنوتیپ‌های پاسخ دهنده به کشت بافت جهت استفاده در مطالعات بعدی تعیین شود.

منابع

1- Aasim M., Hussain N., Umer E.M., Zubair M., Hussain S.B., Saeed S.H., Rafique T.S., and Sancak C. 2010. *In-vitro* shoot regeneration of fenugreek (*Trigonellafoenum-graecum* L.) using different cytokinins. African Journal of Biotechnology, 42: 7174-7179.

2- Afshari E., Ranjbar G.A., Kazemitabar S.K., Riasat M., and Kazemi H. 2011. Callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in fenugreek (*Trigonellafoenum-graecum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27(1):147-160. (In Persian with English abstract)

3- Apte S.S., Kokate C.K., and Rambhau D. 1987. Relation between electro kinetic potentials and growth in callus cultures of *Trigonellafoenum-graecum*. Journal of Biosciences, 12(4): 393-397.

4- Bhaskaran S., and Smith R.H. 1990. Regeneration in cereal tissue cultural. Crop Sciences, 30: 1329-1336.

5- Chhibba I.M., Nayyar V.K., Kanwar J.S. 2007. Influence of mode and source of applied iron on fenugreek (*Trigonellacorniculata* L.) in a typicustochrept in punjab, India. African Journal of Biotechnology, 9: 254-256.

6- Han Y., Jin X., Wu F., and Zhang G. 2011. Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley, *Hordeumvulgare L.* Journal of Zhejiang University Science, 5: 399-407.

7- Hutchinson M.J., and Saxena P.K. 1996. Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium tissue culture. Plant Cell Reproduction, 15: 512-515.

8- Khan M.B., Khan M.A., and Sheikh M. 2005. Effect of phosphorus levels on growth and yield of fenugreek. African Journal of Biotechnology, 7: 504-507.

9- Khawar K.M., Gulbitti- Onarici S., Coecue S., Erisen S., Sancak C., and Ozcan S. 2004. In vitro crown galls induced by *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 (pTiBo542) in *Trigonellafoenum-graecum*. Biologia Plant arum, 48(3):441-444.

10- Lu D.Y., Davey M.R., and Cooking E.C. 1982. Somatic embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Trigonella corniculata* (leguminosae). Plant Cell Reports, 1(6):278-280.

11- Magyar-Tabori K., Dobranszki J., Teixeira da., and Silva, JA. 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell Tissue culture, 101: 251-267

12- Niknam V., Razavi N., Ebrahimzadeh H., and Sharifizadeh B. 2006. Effect of Nacl on biomass, protein and proline contents and antioxidant enzymes in seedling and calli of two Trigonella species. Biologia Plant arum, 50(4): 591-596.

13- Oncina R., DelRio J.A, Gomez P., and Ortuno A. 2000. Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum*. Journal of food Chemistry, 70(4): 489-492

14- Pattnaik S., and Chand P.K. 1996. *In vitro* propagation of the medicinal herbs *Ocimum americanum* L. syn. *O. canum Sims*. (hoary basil) and *Ocimum sanctum* L. (holy basil). Plant Cell Reproduction, 15: 846-850.

15- Provorov N.A., Soskov Y.D., Lutova L.A., Sokolova O.A., and Bairamov S.S. 1996. Investigation of the fenugreek genotypes for fresh weight, seed productivity, symbiotic activity, callus formation and accumulation of steroids. Euphytica, 88(2): 129-138.

16- Rezaeian SH., Lahoty M., and Mahmoodzadeh H. 2010. Investigation of different concentrations of 2,4-D and light conditions on *in-vitro* callus induction of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Quarterly Biological Sciences Islamic Azad University, 3(3):107-114. (in Persian)

17-Tripathi L., and Tripath J.N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243-253.

18- Zargari A. 1989. Medicinal plants.Tehran university press.pp: 176. (in persion)