

باززایی درون شیشه‌ای اسپرس (*Onobrychis sativa*) با استفاده از ریزنمونه نوک ساقهلیلی هنرمند^۱، ناصر زارع^{۲*}، رسول اصغری زکریا^۳ و پریسا شیخزاده مصدق^۴

۱، ۲، ۳ و ۴. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشیاران و استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات،

دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۹/۲۵)

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، ZATIN و TDZ) بر پاسخ رشدی درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های نوک ساقه رقم‌های خوانسار و شهرکرد اسپرس بررسی شد. برای این منظور، ریزنمونه‌های نوک ساقه از بذرها ضدعفونی شده و جوانه‌زده ۴-۷ 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. به‌طور کلی، 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 (۴/۳) 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 جنبه ریزازدیادی و کشت درون شیشه‌ای، بلکه به‌عنوان پیش‌زمینه 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 چندساله خانواده 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

تنظیم‌کننده‌های اکسین و سیتوکینین در تقسیم و ریخت‌زایی یاخه‌ها نقش بسیار مهم را دارند (Srivastava, 2002). سیتوکینین‌ها باعث تحریک رشد و نمو، افزایش رشد و تقسیم یاخه‌ای می‌شوند. این گروه از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از راه کم کردن غالبیت انتهایی باعث تحریک رشد جوانه‌های جانبی و همچنین تشکیل ساقه 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 یاخه‌ای، طویل شدن یاخه، القای ریشه‌دهی، نورگرایی (فتوتروپیسم)، غالبیت انتهایی، تمایز بافت‌های آوندی و گسترش دیواره یاخه‌ای 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، مرسیم‌های 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 یاخه‌های مریستمی جلوگیری شده و بدین ترتیب، واکنش ریزنمونه‌ها کاهش می‌یابد (Wernicke, 1986). در غلظت بالای سیتوکینین‌ها نیز، نبود رشد مناسب طولی، شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها (Li *et al.*, 2009; Tatarski *et al.*, 2012; Varnousfaderani *et al.*, 2010; Mahdavian *et al.*, 2010; Malekiband *et al.*, 2013) به وجود می‌آید. اضافه کردن غلظت پایینی از اکسین به محیط کشت باززایی، تأثیر بازدارنده‌ی مقادیر زیاد سیتوکینین بر رشد طولی ساقه‌های جانبی را خنثی کرده و باعث رشد ساقه‌ها می‌شود (Shahzad &

Tohidfar *et al.*, 2013). از این‌رو 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 همه ژنوتیپ‌ها و رقم‌ها امکان‌پذیر نیست (Fontana *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2010). از سوی دیگر، گیاهان باززاده از جنین‌زایی بدنی یا ریخت‌زایی ممکن است تنوع همسانه بدنی (سوماکلونال) دارند (Trolinder & Goodin, 1987; Cousins *et al.*, 1991; Rajasekaran *et al.*, 1996). همچنین، باززایی درون‌شیشه‌ای بعضی ریزنمونه‌ها مانند محور زیرلپه (Umbeck *et al.*, 1993; 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 سامانه 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 همسانه بدنی بسیار کمتری دارند یا ندارند (Zapata *et al.*, 1999; Srivatanakul *et al.*, 2000). سامانه باززایی نوک ساقه روشی ساده و سریع را فراهم کرده که می‌توان با استفاده از آن در مدت‌زمان کمتری با حذف مرحله 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 سامانه تراریختی با استفاده از نوک ساقه امکان دستکاری ژنتیکی دامنه گسترده‌ای از رقم‌ها را فراهم خواهد کرد (Saini & Jaiwal, 2005; Sticklen & Oraby, 2005).

(Hansen & Wright, 1999; Jauhar, 2006; Zare et al., 2009). از سوی دیگر، نوع، غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده از جمله عامل‌های مهم مؤثر در رشد ریزنمونه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای 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 ساقه 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 بذره‌های رقم خوانسار و شهرکرد اسپرس در دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی استفاده شد. ضدعفونی بذرها از روش غوطه‌ورسازی آن‌ها در اتانول ۷۰ درصد به مدت چهار ثانیه و تیمار با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت دوازده دقیقه انجام گرفت. سپس، بذره‌های ضدعفونی شده در زیر هود سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. به منظور جوانه‌زنی، بذرها مابین کاغذ صافی ضدعفونی شده به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شده و به دمای ۴ درجه 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

به منظور بهینه‌سازی محیط باززایی، از ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی اکسین و سیتوکینین در محیط کشت پایه 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 زاتین (Zeatin) با دو سطح غلظت ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر استفاده شدند.

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

بر پایه بررسی روی گیاه یونجه (*Medicago sativa*)، بیشترین باززایی ساقه چندگانه از ریزنمونه مریستم انتهایی در محیط پایه MS به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ بود (Sobhanian et al., 2012). تولید ساقه چندگانه در نخود (*Cicer arietinum* L.) با استفاده از ریزنمونه بذر در محیط کشت MS حاوی BA گزارش شده است (Polisetty, 1997). بررسی باززایی گیاه *Vicia faba* L. نشان داده که ریزنمونه محور جنینی از نوک ساقه، کارایی باززایی بیشتری دارد (Metry et al., 2006). باززایی شاخساره یونجه (*M. sativa* L.) با استفاده از ریزنمونه گره 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 چندگانه عدس (*Lens culinaris* M.) از ریزنمونه‌های نوک ساقه و گره اول در محیط MS غنی شده 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 (کوتیلدون) 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 ساقه توت‌فرنگی در محیط کشت MS تغییر یافته 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 سامانه کشت‌بافتی موفق یک پیش‌نیاز به‌شمار می‌آید

(شکل ۱- D). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که درصد پینه‌زایی ریزنمونه‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر رقم، نوع و غلظت سیتوکینین و همچنین اثر متقابل رقم \times اکسین، رقم \times سیتوکینین و اکسین \times سیتوکینین قرار گرفت ولی بین نوع اکسین (NAA و IBA) و اثر متقابل رقم \times اکسین \times سیتوکینین تفاوت معنی‌داری از نظر درصد پینه‌زایی وجود نداشت (جدول ۱). 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 مقایسه 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 همه 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 بریده‌شده ریزنمونه‌ها می‌تواند به دلیل تجمع اکسین‌ها در یاخته‌های زخمی باشد، به‌ویژه هنگامی که در ترکیب با سیتوکینین‌ها استفاده شود. افزون بر این، پینه‌زایی ریزنمونه‌ها در کشت درون شیشه‌ای بستگی به نوع اکسین مورد استفاده 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).

محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشدی به‌عنوان شاهد استفاده شد. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای شبانه‌روزی 25 ± 2 درجه سلسیوس و دوره نوری شانزده ساعت زیر نور فلئورسنت (با شدت ۱۶۰ تا $180 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) 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 بازه زمانی سی الی چهل روز پس از کشت یادداشت شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی با سه تکرار با دست‌کم پانزده ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل 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 (Ver 16) 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 تجزیه و تحلیل شد. با توجه به اینکه در همه تیمارهای دارای TDZ ریشه‌زایی صفر بود، در تجزیه واریانس ریشه‌زایی از بین تیمارها حذف شد. مقایسه 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 تجزیه واریانس جداگانه به‌صورت طرح کامل تصادفی انجام شد.

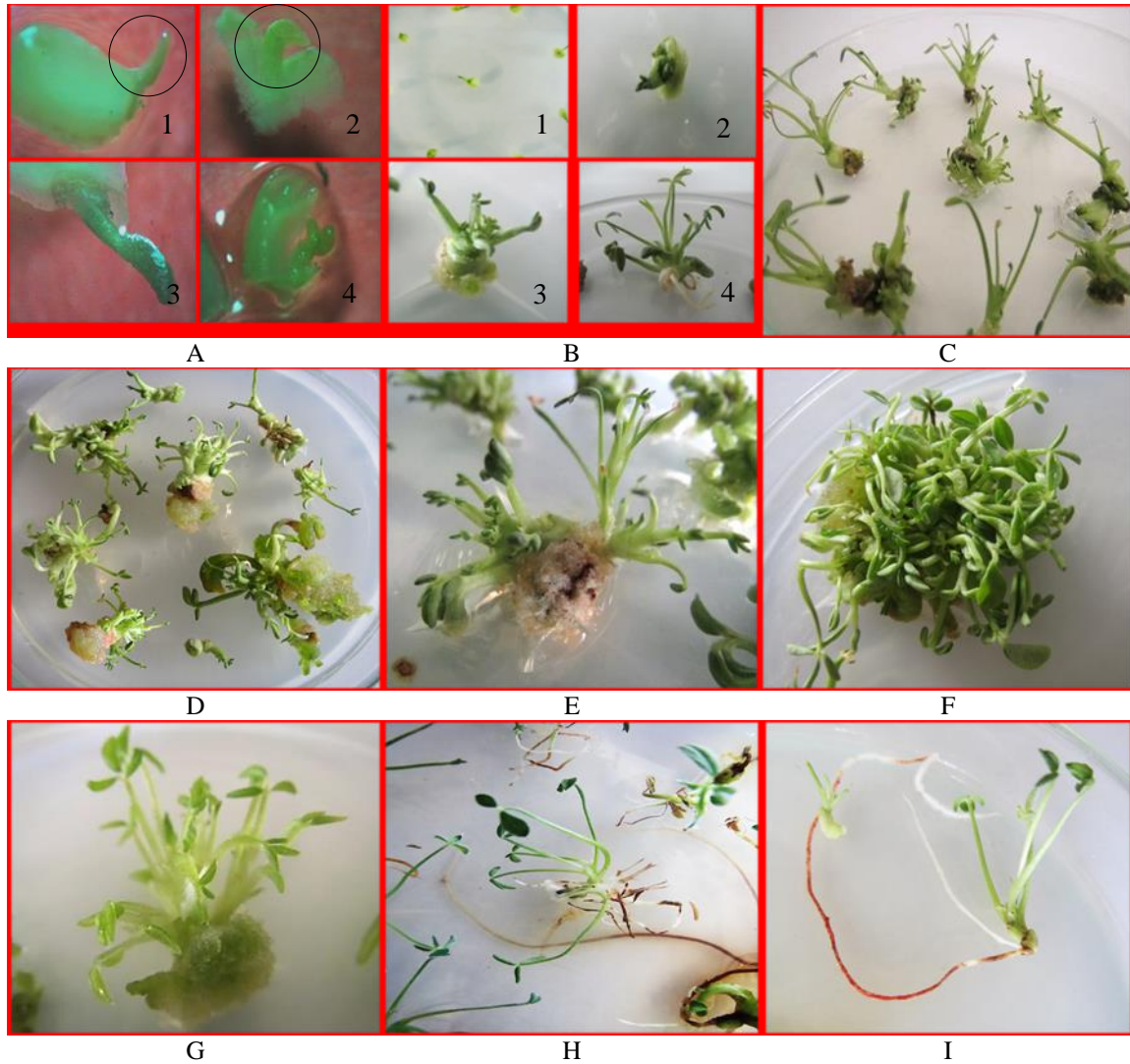
نتایج و بحث

پینه‌زایی

برخی از ریزنمونه‌ها از محل برش در پایه نوک ساقه چند روز پس از کشت متورم شده و تولید پینه کردند

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).

گیاه *Salvia canariensis* L. با ریزنمونه‌های ساقه و دم برگ، تنظیم‌کننده 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



شکل ۱. کشت درون شیشه‌ای نوک ساقه اسپرس؛ A (۱ و ۲): ریزنمونه نوک ساقه تازه تهیه شده؛ A (۳ و ۴): رشد ریزنمونه دو روز پس از کشت؛ B (۱، ۲، ۳ و ۴): مراحل رشد ریزنمونه نوک ساقه در محیط کشت ($\text{Khansar} + \text{MS} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ IBA} + 3 \text{ mgL}^{-1} \text{ BAP}$)؛ C: ریزنمونه‌های رشد کرده دو هفته پس از کشت ($\text{Shahrkord} + \text{MS} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ IBA} + 1 \text{ mgL}^{-1} \text{ TDZ}$)؛ D: تشکیل پینه از انتهای برش‌یافته ریزنمونه‌ها ($\text{Shahrkord} + \text{MS} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ IBA} + 1 \text{ mgL}^{-1} \text{ TDZ}$)؛ E و F: تولید ساقه‌های چندگانه ریزنمونه‌های ($\text{Khansar} + \text{MS} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ NAA} + 3 \text{ mgL}^{-1} \text{ Zeatin}$)، ($\text{Khansar} + \text{MS} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ IBA} + 1 \text{ mgL}^{-1} \text{ TDZ}$)؛ G: ریزنمونه‌های شیشه‌ای شده ($\text{Shahrkord} + \text{MS} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ NAA} + 3 \text{ mgL}^{-1} \text{ Zeatin}$)؛ H و I: ریزنمونه‌های ریشه داده 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 ($\text{Khansar} + \text{MS} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ IBA} + 3 \text{ mgL}^{-1} \text{ BAP}$); C: explants growth 2 weeks after culture ($\text{Shahrkord} + \text{MS} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ IBA} + 1 \text{ mgL}^{-1} \text{ TDZ}$); D: callus induction from cut ends of explants ($\text{Shahrkord} + \text{MS} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ IBA} + 1 \text{ mgL}^{-1} \text{ TDZ}$); E and F: multiple shoots formation ($\text{Khansar} + \text{MS} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ NAA} + 3 \text{ mgL}^{-1} \text{ Zeatin}$, $\text{Khansar} + \text{MS} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ IBA} + 1 \text{ mgL}^{-1} \text{ TDZ}$); G: vitrified explants ($\text{Shahrkord} + \text{MS} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ NAA} + 3 \text{ mgL}^{-1} \text{ Zeatin}$); H and I: rooted explants of Khansar and Shahrkord cultivar on growth regulators free medium.

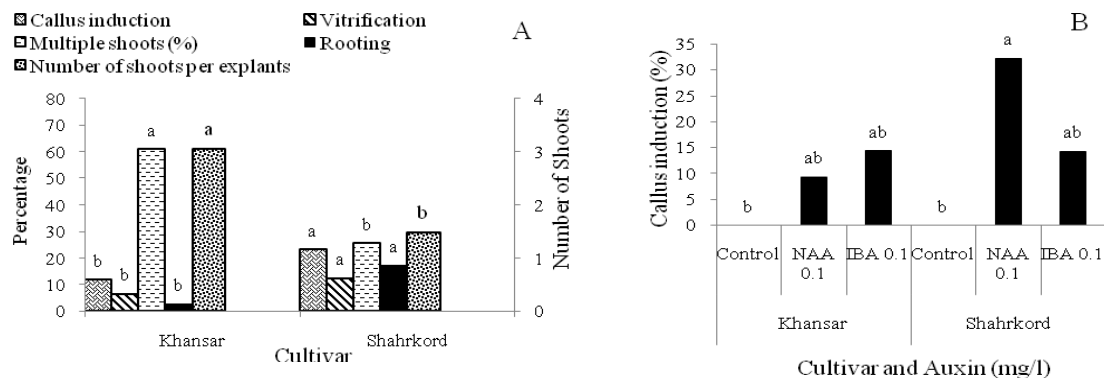
جدول ۱. تجزیه واریانس تأثیر ژنوتیپ گیاهی و تنظیم‌کننده‌های رشدی بر رشد، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای ریزنمونه نوک ساقه اسپرس

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					MS			
		Percentage of callus induction	Percentage of shooting	Percentage of multiple shoots	Number of shoots per explants	Shoot length	Percentage of explants vitrification	df	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 ساقه 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)

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 (جدول ۱). بنابر نتایج به‌دست‌آمده، درصد شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها بسته به نوع اکسین مورد استفاده 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

شاخه‌زایی

در شکل ۱- A و B ریزنمونه نوک ساقه تازه تهیه‌شده و مراحل رشد آن روی محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های گیاهی مشاهده می‌شود. بنا بر نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه 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. باین‌حال، درصد ساقه‌های چندگانه و شمار ساقه در هر ریزنمونه به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر رقم، نوع اکسین، نوع و غلظت سیتوکینین و اثر متقابل رقم،

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 به دست 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, 2008; Machakova *et al.*, 2002) نسبت داد. به طوری که، Skala & Wysokinska (2006) با بررسی روی کشت درون‌شیشه‌ای *Salvia nemorosa* L. ریزنمونه‌های نوک ساقه و برگ‌ها نیز بیان کردند در هنگامی که 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 زاتین یا BAP به دست آمد (جدول ۳). همان طوری 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). به طوری که، میانگین طول ساقه در هر دو رقم در محیط کشت بدون هورمون نسبت به اغلب محیط کشت‌های سیتوکینین بیشتر داشت. افزون بر این، در همه 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).

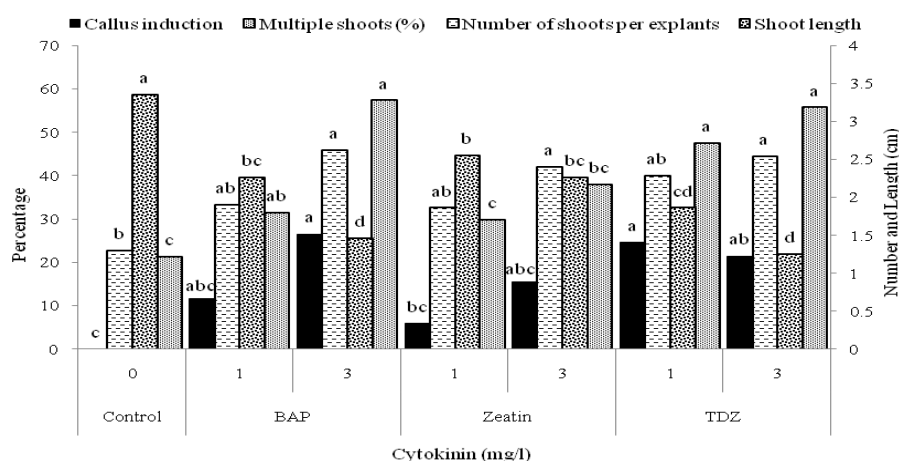
جدول ۲. تأثیر هورمون اکسین بر شاخه‌زایی و ساقه‌های

شیشه‌ای شده در ریزنمونه نوک ساقه اسپرس

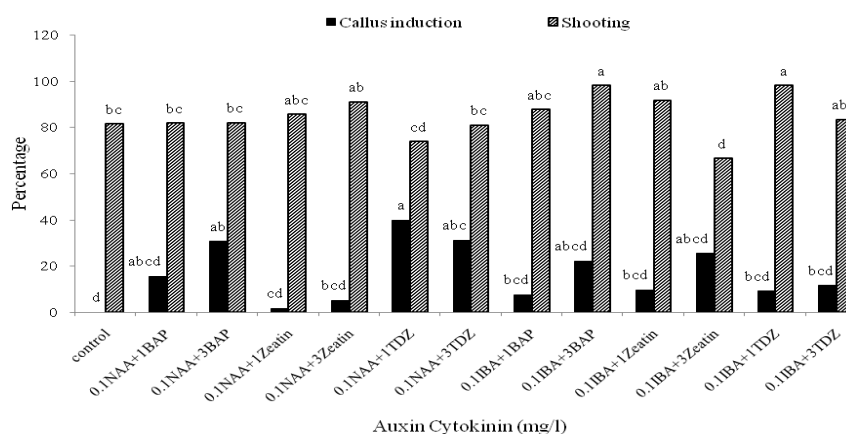
Table 2. The effect of auxin on shooting and shoot the glass induction in shoot apex sainfoin

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}

BAP یا ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و کمترین آن در محیط ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر زاتین 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 ساقه چندگانه) و میانگین شمار ساقه در هر ریزنمونه در مقایسه با درصد شاخه‌زایی بین تیمارها تفاوت بسیار زیادی وجود داشت. به طوری که، درصد ساقه‌های چندگانه از ۰ تا ۸۹/۱۷ درصد و میانگین شمار ساقه در هر ریزنمونه از ۱ تا ۵/۰۳ متغیر بود (شکل ۱-F-E-۱ و جدول ۳). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که به طور کلی، درصد ساقه‌های چندگانه و شمار ساقه در هر ریزنمونه در رقم خوانسار به طور معنی‌داری بیشتر از رقم شهرکرد است (شکل ۲-A). مقایسه 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). با این حال، معنی‌دار بودن اثرهای متقابل رقم، اکسین و سیتوکینین نشان‌دهنده پاسخ متفاوت رقم‌های اسپرس به ترکیب هورمونی مورد استفاده 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 زاتین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۱ یا ۳ میلی‌گرم در لیتر زاتین ساقه‌های چندگانه تولید نشد. درحالی‌که، در رقم خوانسار در این محیط‌های کشت، ۴۲/۵۴ تا ۸۶/۳ درصد (جدول ۳)، ساقه چندگانه به دست 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 زاتین به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از درصد ساقه‌های چندگانه



شکل ۳. تأثیر نوع و غلظت سیتوکینین بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌های نوک ساقه اسپرس در شرایط درون‌شیشه‌ای
Figure 3. The effect of cytokinin type and concentration on in vitro shooting from sainfoin shoot apex explants



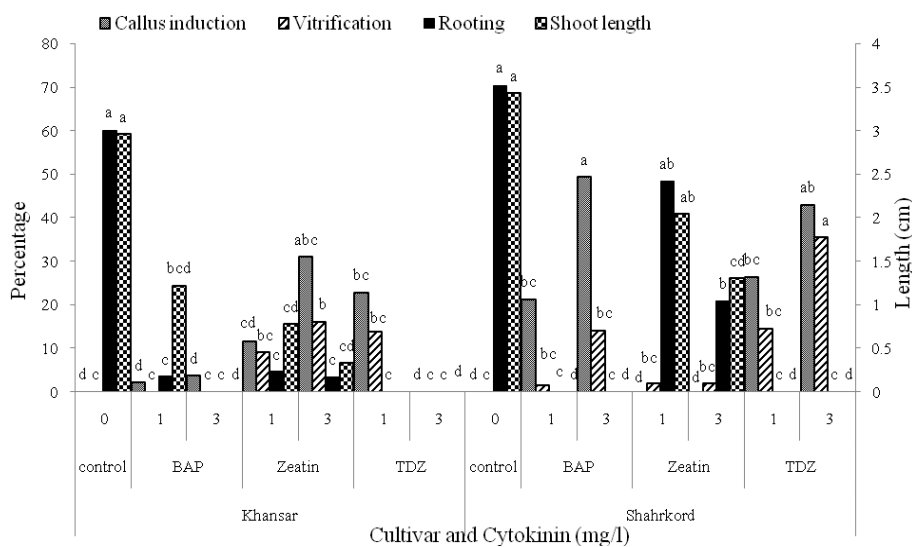
شکل ۴. تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر درصد پینه‌زایی و شاخه‌زایی ریزنمونه‌های نوک ساقه در اسپرس
Figure 4. The effects of plant growth regulators on the percentage of callus induction and shooting from shoot apex explants of sainfoin

به‌طورکلی، فرآیندهای رشد و تمایز گیاهان تحت کنترل اکسین، سیتوکینین 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 سامانه باززایی موفق در ترکیب اکسین با سیتوکینین به دست می‌آید (Dietrich *et al.*, 1990). نوع سیتوکینین استفاده‌شده در محیط کشت در میزان باززایی و توان رشدی گیاهان باززاشده 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 جوانه نابجا کمک می‌کند، اما اضافه کردن اکسین به‌طور معنی‌داری باعث افزایش ظرفیت تشکیل جوانه در ریزنمونه‌های برگ‌گی 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، گره ساقه و دم برگ‌های اسپرس (*O. viciifolia* Scop.) مناسب است. افزون بر این، Saglam (2010) با ارزیابی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی بر کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه گره لپه‌ای اسپرس (*O. sativa*)

افزون بر این، گزارش شده که سیتوکینین BAP به تنهایی به تشکیل جوانه نابجا کمک می‌کند، اما اضافه کردن اکسین به‌طور معنی‌داری باعث افزایش ظرفیت تشکیل جوانه در ریزنمونه‌های برگ‌گی 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، گره ساقه و دم برگ‌های اسپرس (*O. viciifolia* Scop.) مناسب است. افزون بر این، Saglam (2010) با ارزیابی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی بر کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه گره لپه‌ای اسپرس (*O. sativa*)

۸ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست می‌آید. ولی، بر پایه 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 محیط MS 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 ساقه نابجا از ریزنمونه 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 ساقه چندگانه و شمار ساقه در هر ریزنمونه در محیط MS غنی‌شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با ریزنمونه‌های نوک ساقه و گره لپه‌ای در نخود (*C. arietinum* L.) مشاهده شده است (Ugandhar et al., 2012).

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 حضور BAP و NAA بررسی و گزارش شده که ریزنمونه ساقه نتیجه بهتری در حضور هورمون BAP در تولید قسمت‌های هوایی داشت (Ozcan et al., 1996). در بررسی سامانه باززایی ساقه نابجا از ریزنمونه‌های برگچه، دم برگ و ساقه 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). در حالی که، 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 لیتر BAP 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



شکل ۵. تأثیر سیتوکینین بر پینه‌زایی، ریزنمونه‌های شیشه‌ای‌شده، ریشه‌زایی و طول ریشه 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

جدول ۳. تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر شاخه‌زایی و ریشه‌زایی درون شیشه‌ای ریزنمونه نوک ساقه 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 ^{elghi}	1.61 ^{ghi}	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	-

می‌آیند. این ناهنجاری به‌طور معمول 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 مورد استفاده، غلظت و نوع سایتوکینین مورد استفاده و ... قرار می‌گیرد (Hakkaart & Versluijs, 1983; Ziv, 1991; Bhojwani & Razdan, 1996; Rojas-Martínez *et al.*, 2010). مثال، گزارش شده که در برخی رقم‌ها گیاه میخک صدپر مانند *Doranjia* 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

شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها

برخی ریزنمونه‌ها و همچنین ساقه‌های رشد کرده، پس از مدتی حالت شیشه‌ای پیدا کردند که باعث کم یا متوقف شدن رشد آن‌ها شد (شکل ۱-G). باین‌حال، بنا بر نتایج تجزیه 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 مقایسه 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 نتیجه آن برگ‌ها پهن، ضخیم و نیمه شفاف شده و به حالت چین‌خورده و شکننده در

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 این حال، Sancar (1999) برای ریشه‌زایی ساقه‌باززاشده اسپرس (*O. viciifolia* Scop.) با ریزنمونه‌ی محور جنینی، از محیط MS^{1/2} 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 پیش‌زمینه بسیار مناسب برای هدف‌های اصلاحی و انتقال ژن به این گیاه با ارزش مورد توجه است. در کل، در این تحقیق یک شیوه کارآمد با استفاده از ریزنمونه‌ی 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.

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 مورد استفاده 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). به‌طور کلی، میانگین درصد ریشه‌زایی رقم شهرکرد نسبت به رقم خوانسار بیشتر بود (شکل ۲- A). از بین تیمارهای مورد استفاده نیز بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (شاهد) مشاهده شد (شکل ۵). افزون بر این، در رقم شهرکرد، ۴۸/۵-۳۰ درصد از ریزنمونه‌ها و نو ساقه‌ها در محیط کشت‌های حاوی ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر زآتین ریشه‌زایی نشان دادند. در حالی که، در رقم خوانسار در این محیط کشت‌ها ریشه‌زایی صفر یا نزدیک به آن بود. این امر نشان‌دهنده 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 سیتوکینین‌ها و اسید آبسزیک در تشکیل ریشه و جوانه مهم است؛ به‌طور مثال در ژنوتیپی از ارکید که ۶۰ درصد وزن خشک آن را ریشه تشکیل می‌داد، تجمع اکسین در اندام‌های بیست برابر بود (Peres *et al.*, 2001). ریشه‌زایی در محیط بدون تنظیم‌کننده‌های رشدی در گیاهان

REFERENCES

- Bhaskaran, S. & Smith, R.H. (1990). Regeneration in cereal tissue culture: A review. *Crop Science*, 30, 1329-1336.
- Bhojwahi, S.S. & Razdan, M.K. (1996). *Plant tissue culture: theory and practice*. Amsterdam, Elsevier.
- 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.

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 Isfahan Press, Isfahan, 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.

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 of 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 herb. *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 vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40, 596-602.

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.

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

Leyli Honarmand¹, Nasser Zare^{2*}, Rasool Asghari-Zakaria³ and Parisa Sheikhzade-Mosadegh⁴

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.