DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2011.6651

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۷، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۶۰-۱۴۷ (۱۳۹۰)

انگیزش پینه، جنین‌زایی بدنی و باززایی گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)

الهام افشاری[1*]، غلامعلی رنجبر[2]، سیدکمال کاظمی‌تبار[2]، مهرناز ریاست[3] و حسین کاظمی پشت‌مساری[4]

۱*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد اصلاح نباتات، عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز

پست الکترونیک: afshari_e1385@yahoo.com

۲ - استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- مربی پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس

٤- عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۸۸ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۸۹

چکیده

به منظور مطالعه پینه‌زایی، جنین‌زایی بدنی و باززایی گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)، آزمایشی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۱۳۸۷ انجام شد. در این مطالعه از دو محیط کشت پایه MS و B5، چهار ریزنمونه ساقه، برگچه حاوی دمبرگ، جنین و هیپوکوتیل و ۵ نوع هورمون شامل: 2,4-D (در سه سطح)، Kin (در چهار سطح)، NAA (در چهار سطح)، BAP (در چهار سطح) و IBA (در سه سطح) استفاده شد. نتایج نشان داد در بررسی اثر متقابل دو هورمون 2,4-D و Kin، محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin، بهترین ترکیب هورمونی جهت القاء پینه در هر دو محیط کشت B5 و MS است. بهترین ریزنمونه‌ها از نظر بیشترین وزن کالوس القایی در محیط MS، جنین و در محیط B5، برگچه حاوی دمبرگ و جنین بود. در مطالعه جنین‌زایی بدنی، ترکیب هورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، با بالاترین درصد جنین‌زایی، به‌عنوان ترکیب برتر در هر دو محیط کشت شناخته شد. از بین ریزنمونه‌ها، ریزنمونه جنین، بیشترین میزان جنین‌زایی را نشان داد. باززایی از طریق جنین‌زایی بدنی و 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 القاء اندام هوایی در هر دو محیط کشت بود. نتایج نشان داد که مناسبترین ترکیب هورمونی جهت القاء ریشه در محیط کشت MS، محیط حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون IBA بود.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، پینه، جنین‌زایی بدنی، باززایی، شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.).

مقدمه

شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)، گیاهی یک‌ساله، علفی، از خانواده لگومینوز به‌عنوان یک گیاه دارویی، زراعی، مرتعی، آرایشی و بهداشتی حائز اهمیت فراوان است (نجف‌پور نوایی، ۱۳۷۳). ۳۳ گونه مختلف از جنس *Trigonella* در ایران گزارش شده که مهمترین آن گونه *T. foenum-graecum* است (مظفریان، ۱۳۷۵).

این گیاه با مزاج بسیار گرم، همواره از زمان‌های قدیم تا به امروز از نظر غذایی، به‌خصوص به‌عنوان یک سبزی و ادویه معطر خوراکی مهم بوده و مورد مصرف قرار می‌گیرد. مواد با اهمیت در برگ شنبلیله عبارت از کلسیم، آهن، کاروتن، اسیدآسکوربیک، پروتئین، تیامین و ریبوفلاوین است. جوانه‌های آن سرشار از ویتامین A و فسفر هستند. از مهمترین ترکیب‌های شیمیایی موجود در دانه شنبلیله، ساپوژنین‌های استروئیدی به‌ویژه دیوسژنین است که به‌عنوان هسته اولیه در سنتز استروئیدهای دارویی ازجمله هورمون پروژسترون، هیدروکورتیزون و تستسترون کاربرد فراوان دارد. هورمون‌های استروئیدی و مشتقات نیمه‌صنعتی آنها از نظر اقتصادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و در قالب قرص‌های ضد بارداری مصرف می‌شوند و گیاه شنبلیله به دلیل داشتن دیوسژنین از گیاهان با اهمیت در این زمینه به‌شمار می‌رود. محققین از طریق به‌نژادی و ایجاد موتان‌ها و دورگ‌های مختلف توانسته‌اند میزان دیوسژنین موجود در دانه را به ۳/۱٪ برسانند (نجف‌پور نوایی، ۱۳۷۳). همچنین تکنیک کشت بافت و افزودن مقادیر مشخصی کلسترول و حتی اسید اندول استیک (اکسین) توانسته است میزان دیوسژنین دانه را افزایش دهد (نجف‌پور نوایی، ۱۳۷۳).

شنبلیله از نظر دارویی حائز اهمیت فراوان است و در درمان بسیاری از بیماریها ازجمله دیابت، آترواسکلروز (آترو به معنی تجمع چربی و اسکلروز به معنای سفت و سخت شدن جدار شریان‌ها می‌باشد)، هپاتومگالی (بزرگی کبد)، اسپلتومگالی (بزرگ شدن طحال)، زخم معده، التهاب گلو و یبوست مورد استفاده قرار می‌گیرد. چای شنبلیله به‌عنوان یک ماده خون‌ساز و آرام‌بخش اعصاب، استفاده فراوان دارد. پودر دانه شنبلیله به علت دارا بودن تریگونلین برای درمان بیماری پارکینسون مفید است (نیکنام و کیانی، ۱۳۸۳).

کشت بافت گیاهی جنبه‌های کاربردی زیادی در مطالعات علوم پایه گیاه‌شناسی، متابولیسم و فیزیولوژی گیاهی، شاخه‌های متفاوت کشاورزی (باغبانی، اصلاح نباتات، بیوتکنولوژی و بیماری‌شناسی گیاهی) و مهندسی ژنتیک دارد. ونسه (۱۳۷٤) بیان کرد که بهترین شرایط برای ایجاد پینه شنبلیله در محیط کشت MS، استفاده از 2,4-D و کینتین (Kin) به صورت همزمان می‌باشد. Lu و همکاران (۱۹۸۲) بالاترین میزان جنین‌زایی بدنی در مزوفیل برگ *T. corniculata* را، در محیط کشت MS تکمیل‌شده با ۲ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین(BAP) مشاهده کردند. Apte و همکاران (۱۹۸۷) جهت تولید پینه از این گیاه، از سه ریزنمونه ریشه‌چه، کوتیلدون و برگهای جوان و محیط کشت گامبورگ تغییریافته (Modified Gamborgs medium) (1-B5) استفاده کردند. Provorov و همکاران (۱۹۹٦) با استفاده از هورمون‌های 2,4-D، Kin و BAP موفق به تولید پینه در زیرگونه‌های گیاه شنبلیله شدند. در مطالعه دیگری با استفاده از محیط کشت

پایه MS، B5 و وایت به همراه ۳ میکرومولار NAA، ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مالت و ۱۵۰ میلی‌لیتر شیره نارگیل، تولید دیوسژنین در پینه حاصل از برگ، ساقه و ریشه *T. foenum-graecum* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دیوسژنین تولید شده در پینه برگ نسبت به پینه ریشه و ساقه بیشتر می‌باشد (Oncina *et al.*, 2000).

Khawar و همکاران (۲۰۰۴) کشت بافت شنبلیله را به هدف انتقال ژن *gus* توسط *Agrobacterium tumefaciens* از نژاد A281 انجام دادند. در این تحقیق از محیط کشت MS تکمیل‌شده با ۳٪ ساکاروز و ۰/۸٪ آگار و از ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه استفاده شد. Niknam و همکاران (۲۰۰۶) تأثیر غلظت کلرید سدیم بر مقدار پروتئین، پرولین، فعالیت‌های آنزیمی گیاهچه و پینه حاصل از بذر و هیپوکتیل *T. foenum–graecum* را در محیط MS بررسی کردند. ایشان اظهار داشتند که مقدار پروتئین در تمام غلظت‌های کلرید سدیم، در گیاهچه بیشتر از پینه است، در حالی‌که مقدار پرولین در پینه بیشتر از گیاهچه است. به‌طور کلی تحقیقات پیشین محدود به مطالعه پینه‌زایی این گیاه است. بنابراین هدف از این پژوهش بهینه‌سازی پینه‌زایی، مطالعه جنین‌زایی بدنی و بررسی امکان باززایی جنین‌های بدست آمده می‌باشد.

مواد و روشها

مطالعه کشت بافت گیاه شنبلیله در سال ۱۳۸۷، در آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. بذر گیاه شنبلیله از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. در این پژوهش از چهار ریزنمونه جنین، هیپوکوتیل، برگچه حاوی دمبرگ و ساقه استفاده گردید.

بذرها به مدت ۲۰ دقیقه با آب جاری و یک ماده شوینده ملایم شستشو شدند و پس از انتقال به اتاقک کشت، تحت شرایط کاملاً استریل و زیر هود لامینار ایرفلو ابتدا با محلول اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و سپس با محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ همراه با ۲ قطره توئین ۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه همراه با تکان دادن ضدعفونی شدند. در مرحله آخر ۳ بار با آب مقطر استریل کاملاً شستشو شدند. جنین به کمک پنس و اسکالپل از بذر جدا شده و به پتری‌دیش حاوی محیط کشت انتقال یافت. جهت تهیه هیپوکوتیل، بذرهای ضدعفونی شده به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت در پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی استریل شده مرطوب، در تاریکی قرار گرفتند. پس از جوانه‌زنی، پتری‌دیش‌ها به انکوباتور با قابلیت تنظیم روشنایی منتقل و نهایتاً هیپوکوتیل‌ها برش و به محیط کشت انتقال یافتند. جهت تهیه برگچه حاوی دمبرگ و ساقه، پس از کشت بذرها در گلخانه، از گیاهان ۲۰ روزه اقدام به جداسازی ریزنمونه‌های مورد نظر شد. پس از جمع‌آوری از گلخانه و انتقال به آزمایشگاه، برای حذف خاک و مواد زاید، ابتدا با آب و یک ماده شوینده ملایم شستشو شده و بعد جهت ضدعفونی از محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ استفاده شد.

در این تحقیق از دو محیط کشت پایه MS و B5 استفاده شد. جهت القاء پینه از ۱۲ ترکیب هورمونی شامل 2,4-D (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. پس از کشت ریزنمونه‌ها، پتری‌دیش‌ها با پارافیلم مسدود شده و در انکوباتور با دمای ۱°C± ۲۵ در تاریکی مطلق قرار داده شدند. به منظور جنین‌زایی بدنی از ۱۶ ترکیب هورمونی متفاوت، شامل NAA (۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده

شد. پس از انتقال کالوس‌ها، پتری‌دیش‌ها با پارافیلم مسدود شده و در انکوباتور با دمای ۲ ± ۲۵ °C و در ۱۶ ساعت روشنایی ۸ تاریکی قرار داده شدند. بعد از مشاهده جنین‌زایی بدنی در برخی از تیمارها، جنین‌ها به‌منظور تولید اندام هوایی به همان محیط‌های قبلی به همراه ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات واکشت شدند. در مرحله ریشه‌زایی علاوه بر محیط MS فاقد هورمون، جهت تسریع این عمل از ترکیب‌های هورمونی IBA (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰، ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. عمل واکشت در کلیه مراحل کشت بافت، هر ۳ هفته یک‌بار انجام گرفت.

به‌منظور سازگاری، ساقه‌های ریشه‌دار شده را به آرامی از ظروف کشت خارج نموده و گیاهچه‌ها در لیوان‌های یک‌بار مصرف حاوی جیفی‌پات مرطوب، با درپوش پلاستیکی شفاف در انکوباتور با دوره نوری ۱۶–۸، روشنایی–تاریکی، درجه حرارت ۲۳–۲۴ °C و رطوبت ۵۰ تا ۶۰ درصد قرار داده شدند. بعد از گذشت سه تا چهار هفته، گیاهچه‌ها به ظروف حاوی خاک استریل منتقل شدند.

این بررسی به صورت آزمایشهای فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در ٤ تکرار انجام گرفت. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SAS و MSTATC انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و جهت رسم نمودار از صفحه گستر Excel استفاده گردید.

نتایج

پینه‌زایی

در محیط کشت MS هر یک از عوامل هورمونی، ریزنمونه‌ها و اثر متقابل بین آنها، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ نشان دادند. در محیط کشت B5 نیز تمام منابع تغییرات غیر از ریزنمونه (۵٪)، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ نشان دادند. جدول ۱، مقایسه میانگین اثرهای ساده هورمون‌های 2,4-D و کینتین بر میانگین وزن تر پینه را نشان می‌دهد.

در محیط MS، ریزنمونه جنین و در محیط B5، ریزنمونه برگچه حاوی دمبرگ و جنین، بیشترین وزن پینه را دارا بودند.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثرهای ساده هورمون‌های 2,4-D و کینتین بر میانگین وزن تر پینه

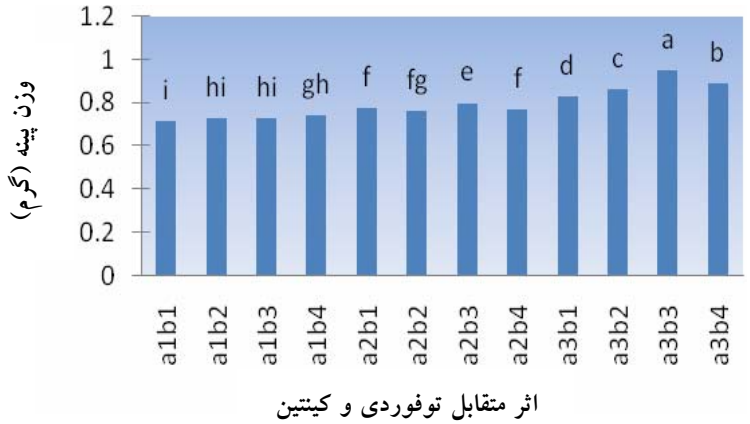
هورمون	میانگین وزن تر پینه (gr)	
	MS	B5
A1	۰/۷۳ c	۰/۷۸ c
A2	۰/۷۸ b	۰/۷۹ b
A3	۰/۸۸ a	۰/۹ a
B1	۰/۷۷ d	۰/۸ c
B2	۰/۷۸ c	۰/۸ c
B3	۰/۸۳ a	۰/۸٤ a
B4	۰/۸ b	۰/۸۲ b

A1، A2، A3: هورمون 2,4-D به‌ترتیب با غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم درلیتر

B1، B2، B3 و B4: هورمون کینتین به‌ترتیب باغلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن)

در بررسی اثر متقابل هورمون 2,4-D و کینتین، با توجه به شکل ۱ و ۲ مشاهده شد که در هر دو محیط MS و B5، محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین، بیشترین وزن تر پینه را دارا بودند. پس از آن محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین قرار داشت.



شکل ۱- اثر متقابل هورمون 2,4-D و کینتین بر وزن تر پینه در محیط MS

a1، a2، a3: به‌ترتیب ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

b1، b2، b3 و b4: به‌ترتیب ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین

شکل ۲- اثر متقابل هورمون 2,4-D و کینتین بر وزن تر پینه در محیط B5

a1، a2، a3: به‌ترتیب ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

b1، b2، b3 و b4: به‌ترتیب ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین

در بررسی اثر متقابل سه عامل 2,4-D در کینتین در ریزنمونه، نتایج زیر در محیط کشت MS حاصل شد: ریزنمونه‌های ساقه و هیپوکوتیل، بهترین پاسخ به القاء پینه را در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵

میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ریزنمونه‌های برگچه و جنین در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین نشان دادند.

در محیط کشت B5، بالاترین وزن پینه در هر یک از ریزنمونه‌های ساقه، برگچه، جنین و هیپوکوتیل به‌ترتیب در محیط‌های حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کینتین، ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدون کینتین، ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی گرم بر لیتر کینتین، ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین بدون 2,4-D مشاهده شد.

جنین‌زایی بدنی

در هر دو محیط کشت MS و B5، هر یک از عوامل هورمونی، ریزنمونه و اثر متقابل بین آنها، اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ نشان دادند. جدول ۲، مقایسه میانگین اثرهای ساده هورمون‌های NAA و BAP بر درصد جنین‌زایی بدنی را نشان می‌دهد.

در محیط MS، تنها دو ریزنمونه برگچه حاوی دمبرگ (۵/۷۸٪) و جنین (۱٤/٤٪) وارد فاز جنین‌زایی شدند که ریزنمونه جنین، به‌عنوان بهترین ریزنمونه شناخته شد و در دو ریزنمونه ساقه و هیپوکوتیل، جنین‌زایی مشاهده نگردید. در محیط کشت B5 هم تنها ریزنمونه جنین، ۹/٤٤٪ جنین‌زایی را نشان داد.

پس از انجام مقایسه میانگین‌ها، در محیط کشت MS، ترکیب‌های هورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌ترتیب با ۱٦/٤۲ و ۱۳/۲ درصد جنین‌زایی، به‌عنوان بهترین ترکیب‌های هورمونی شناخته شدند. در محیط کشتB5، نیز همین ترکیب‌های هورمونی به‌ترتیب با ۱۲/۰۹ و ۹/۷۵ درصد جنین‌زایی، بیشترین جنین‌زایی را تولید نمودند (شکل‌های ۳ و ٤).

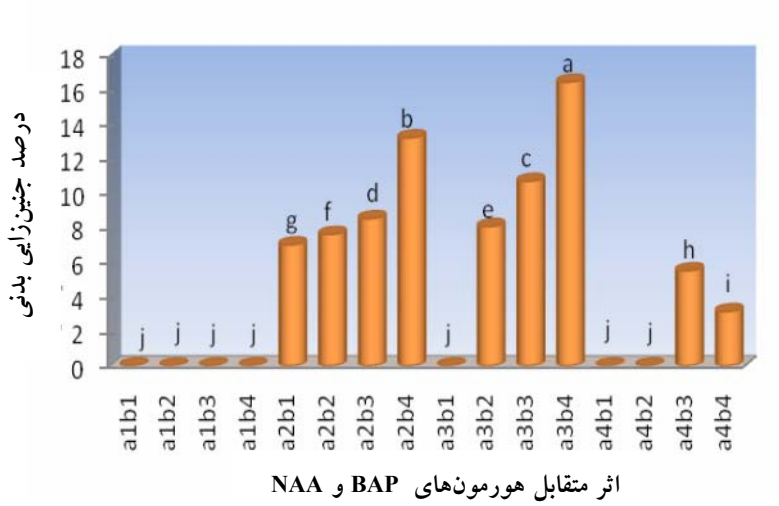
جدول ۲- مقایسه میانگین اثرهای ساده هورمون‌های NAA و BAP بر درصد جنین‌زایی بدنی

هورمون	جنین‌زایی بدنی(٪)	
	MS	B5
A1	۰ c	۰ c
A2	۹/۱۲ a	٤/۳۱ b
A3	۸/۷۸ a	۵/۲ a
A4	۲/۳۸ b	۰ c
B1	۲/۰٤ d	۰ c
B2	٤/۰۹ c	۰ c
B3	٦/۲۷ b	٤/۱۷ b
B4	۸/۱۱ a	۵/۵ a

A1، A2، A3 و A4: هورمون نفتالین استیک اسید به‌ترتیب با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم درلیتر

B1، B2، B3 و B4: بنزیل آمینو پورین به‌ترتیب با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر

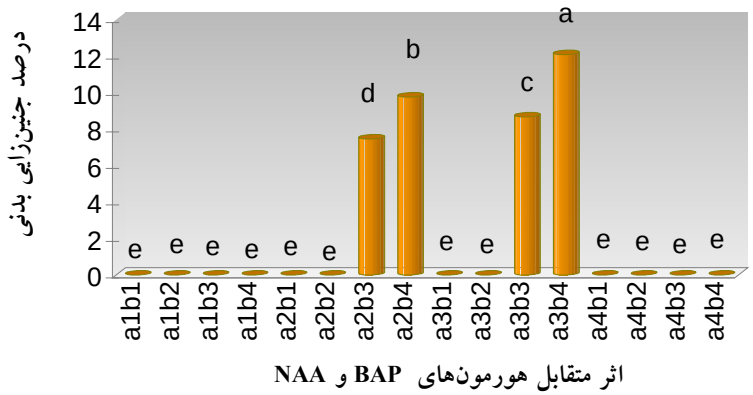
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن)



شکل ۳- اثر متقابل هورمون‌های NAA و BAP بر درصد جنین‌زایی بدنی در محیط MS

a1، a2، a3 و a4: به‌ترتیب ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

b1، b2، b3 و b4: به‌ترتیب ۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA



شکل ٤- اثر متقابل هورمون‌های NAA و BAP بر درصد جنین‌زایی بدنی در محیط B5

a1، a2، a3 و a4: به‌ترتیب ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

b1، b2، b3 و b4: به‌ترتیب ۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP

با بررسی اثرهای متقابل سه‌گانه NAA در BAP در ریزنمونه مشاهده شد که در محیط کشت MS، بهترین ریزنمونه جهت القاء جنین‌زایی، ریزنمونه جنین با استفاده از ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود، که ۷۷/٦۹٪ جنین‌زایی را نشان داد. ریزنمونه برگچه حاوی دمبرگ نیز در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۳٤/٦٤٪ جنین‌زایی را نشان داد. در محیط کشت B5، جنین‌زایی تنها در ریزنمونه جنین مشاهده شد و بالاترین درصد جنین‌زایی به میزان ۵۵/۰٦٪ در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP نشان داد.

تولید اندام هوایی در محیط کشت MS

از بین دو ریزنمونه جنین و برگچه حاوی دمبرگ، تنها پینه‌های جنین‌زای حاصل از ریزنمونه جنین، وارد مرحله باززایی شدند (٦/٤٪). در حالی‌که جنین‌زایی در ریزنمونه برگچه، در مرحله جنین‌های کروی متوقف شد که می‌تواند به علت خصوصیات ژنتیکی خود ریزنمونه و یا عدم وجود شرایط مناسب جهت پیشرفت مراحل جنین‌زایی مانند نامناسب بودن میزان نور، نوع هورمون‌های مورد استفاده و یا غلظت ساکاروز باشد. جدول ۳، مقایسه میانگین اثرهای ساده هورمون‌های NAA و BAP را بر درصد تولید اندام هوایی در محیط MS نشان می‌دهد.

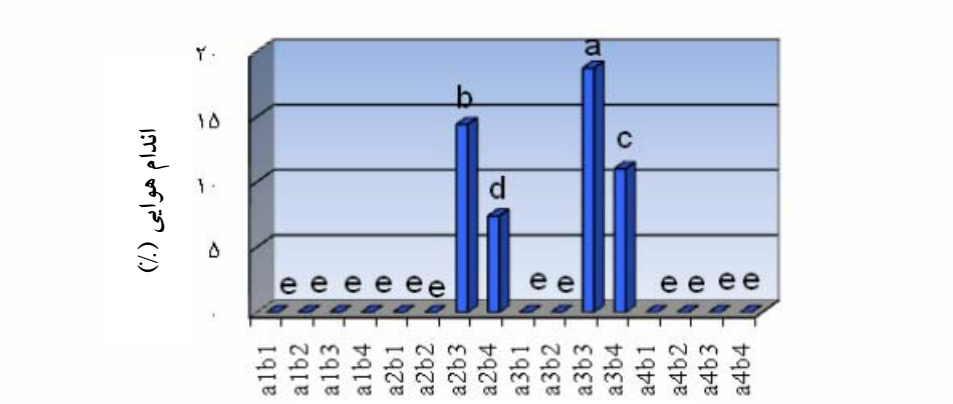
جدول ۳- مقایسه میانگین اثرهای ساده NAA و BAP بر درصد تولید اندام هوایی در محیط MS

هورمون	اندام هوایی(٪)
A1	۰ c
A2	۵/۵ b
A3	۷/۳۸ a
A4	۰ c
B1	۰ c
B2	۰ c
B3	۸/۲۲ a
B4	٤/۷٦ b

A1، A2، A3 و A4: هورمون نفتالین استیک اسید به‌ترتیب با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم درلیتر

B1، B2، B3 و B4: بنزیل آمینو پورین به‌ترتیب با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن)



اثر متقابل هورمون‌های NAA و BAP

شکل ۵- اثر متقابل هورمون‌های NAA و BAP بر درصد تولید اندام هوایی در محیط MS

a1، a2، a3 و a4: به‌ترتیب ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

b1، b2، b3 و b4: به‌ترتیب ۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP

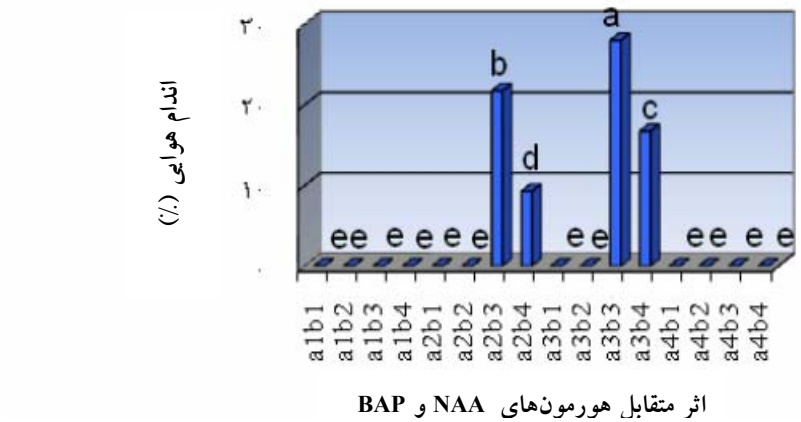
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن)

پس از بررسی اثر متقابل هورمون‌های NAA و BAP بر درصد تولید اندام هوایی و انجام مقایسه میانگین‌ها، ترکیب هورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP با ۱۸/۷۲٪ باززایی، بهترین ترکیب هورمونی شناخته شد (شکل ۵).

پس از بررسی اثرهای متقابل سه‌طرفه NAA در BAP در ریزنمونه، مشاهده شد که بیشترین درصد باززایی (۳۹/۷٪) در پینه‌های جنین‌زای حاصل از ریزنمونه جنین و در ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP القاء شده است.

تولید اندام هوایی در محیط کشت B5

با توجه به اینکه در محیط کشت B5، جنین‌زایی بدنی تنها در ریزنمونه جنین مشاهده شد، در نتیجه فقط این ریزنمونه به این مرحله انتقال یافت و سه ریزنمونه دیگر مرحله باززایی انتقال داده نشدند، چرا که واکشت‌های متعدد تنها منجر به افزایش حجم پینه در آنها شد. بهترین غلظت هورمون NAA و BAP جهت تولید اندام هوایی به‌ترتیب عبارت بودند از: ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر. پس از بررسی اثر متقابل هورمون NAA و BAP بر تولید اندام هوایی نتایجی مشابه نتایج حاصل از محیط کشت MS بدست آمد. ترکیب هورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP با ۲۹/۵۷٪ باززایی، بهترین ترکیب هورمونی جهت باززایی از جنین شناخته شد. فقدان هورمون NAA و غلظت‌های پایین هورمون BAP مانع از باززایی بود که این امر بیانگر ضرورت وجود غلظت‌های مناسب از هر دو هورمون جهت باززایی می‌باشد (شکل ٦).



شکل ٦- اثر متقابل هورمون‌های NAA و BAP بر درصد تولید اندام هوایی در محیط B5

a1، a2، a3 و a4: به‌ترتیب ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

b1، b2، b3 و b4: به‌ترتیب ۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

ریشه‌زایی

ریشه‌زایی تنها در محیط MS بررسی شد. نتایج جدول ٤، نشان می‌دهد که محیط‌های حاوی ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر IBA و فاقد BAP بهترین محیط‌های ریشه‌زایی هستند.

جدول ٤- مقایسه میانگین اثر ساده IBA و BAP بر درصد ریشه زایی

هورمون	ریشه‌زایی (٪)
A1	٤/٧٦ b
A2	١٨/٠٦ a
A3	٢٣/١ a
B1	٢٠/٠٦ a
B2	١٠/٣٧ b

A1، A2 و A3: ایندول بوتیریک اسید به‌ترتیب با غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر

B1 و B2: بنزیل آمینو پورین به‌ترتیب با غلظت‌های ۰ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن)

بررسی اثر متقابل هورمون‌های IBA و BAP نشان داد که افزایش غلظت هورمون IBA منجر به افزایش ریشه‌زایی شد و بعکس هورمون BAP ریشه‌زایی را کاهش داد (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل IBA و BAP بر درصد ریشه‌زایی

تیمار	ریشه‌زایی (٪)
A1B1	٧/٠٠٢ e
A1B2	٢/٥٦ f
A2B1	٢٤/٣ b
A2B2	١١/٩٤ d
A3B1	٢٩/٥٧ a
A3B2	١٦/٧٧ c

A1، A2 و A3: هورمون ایندول بوتیریک اسید به‌ترتیب با غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر

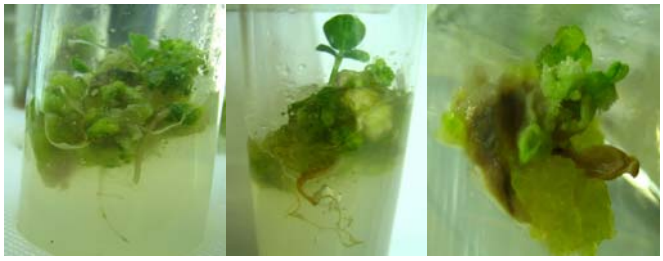
B1 و B2: هورمون بنزیل آمینوپورین به‌ترتیب با غلظت‌های ۰ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن)

سازگاری

بعد از انجام مراحل سازگاری، میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها پس از انتقال به خاک ۱۰٪ محاسبه شد.

شکل ۷- جنین‌زایی در ریزنمونه جنین



شکل ۸- تولید جوانه‌های برگ، ساقه و ریشه از پینه جنین‌زا

شکل ۹- سازگاری گیاه

بحث

پینه‌زایی

براساس مطالعات ونسه (۱۳۷٤)، بهترین شرایط برای القاء پینه در شنبلیله، محیط کشت MS با استفاده از هورمون 2,4-D و کینتین به صورت همزمان است. Oncina و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از دو محیط کشت پایه MS و B5 و ریزنمونه‌های برگ و ساقه این گیاه موفق به تولید پینه شدند. Khawar و همکاران (۲۰۰٤) و Niknam و همکاران (۲۰۰٦) جهت مطالعه کشت بافت این گیاه از محیط پایه MS و Apte و همکاران (۱۹۸۷) جهت تولید پینه از محیط کشت B5 استفاده کردند که نتایج بدست‌آمده در این آزمایش، با تمامی نتایج قبلی مطابقت دارد. Hoori و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه کشت بافت دو گونه یونجه، از برهم‌کنش دو هورمون 2,4-D و کینتین به‌عنوان بهترین ترکیب برای انگیزش پینه گزارش کردند که نتایج تحقیق حاضر با نتایج آنها مطابقت دارد.

جنین‌زایی

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 (کرمی و همکاران، ۱۳۸۷)، بنابراین پاسخ متفاوت ریزنمونه‌ها به جنین‌زایی در این تحقیق ممکن است به این دلیل باشد. Hoori و همکاران (۲۰۰۷) حضور اکسین و سیتوکنین را در کنار هم، برای جنین‌زایی بدنی در دو گونه یونجه ضروری دانستند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. زیرا همان‌طور که در شکل ۳ و ٤ مشاهده می‌شود زمانی که غلظت هر یک از هورمون‌های NAA و BAP به صفر کاهش یافت، جنین‌زایی مشاهده نشد. در محیط B5، غیر از ریزنمونه جنین، در دیگر ریزنمونه‌ها جنین‌زایی بدنی مشاهده نشد که این امر مؤید اهمیت نوع محیط کشت و

اثر آن در القاء جنین‌زایی است. رفیعی (۱۳۸۳)، پس از مطالعه جنین‌زایی سه رقم یونجه ایرانی، اعلام کرد که محیط هورمونی MS بهتر از B5 عمل کرده است که نتیجه بدست آمده از این پژوهش با نتایج ایشان مطابقت دارد.

تولید اندام هوایی

Rybczynski (۱۹۹۷) جهت ادامه رشد بهتر جنین‌های بدنی گونه‌ای شبدر و Luo و Jia (۱۹۹۸)، جهت تولید بالاترین فراوانی اندام هوایی در یک لگوم علوفه‌ای، از محیط پایه MS به همراه دو هورمونBAP و NAA استفاده کردند که نتایج ما با نتایج آنها مطابقت دارد. با توجه به نمودار ۵، با افزایش سطح هورمون NAA از ۰/۱ به ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، درصد باززایی افزایش‌یافته، در حالی‌که غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA نقش بازدارنده در باززایی داشت. زمانی که غلظت BAP به صفر و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت، باززایی مشاهده نشد. با افزایش هورمون BAP از ۱/۵ به ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر، کاهش درصد باززایی مشاهده شد. که این امر اهمیت وجود همزمان و متناسب این دو هورمون را، جهت باززایی مشخص می‌کند، که با نتایج McKersie و Bowley (۱۹۹۳) که عنوان کردند حضور اکسین یا سیتوکنین به تنهایی نمی‌تواند در باززایی موثر باشد، مطابقت دارد. Balarama و Padmaja (۲۰۰۳) بر نقش قطعی BAP در تولید اندام هوایی در لوبیا تأکید کردند. Meijer و Broughton (۱۹۸۱) با مطالعه کشت بافت یک لگوم مرتعی، اظهار داشتند که بهترین ترکیب فیتوهورمونی جهت القاء اندام هوایی عبارت است از: ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۱ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید، در حالی‌که در این پژوهش، در چنین غلظت‌هایی کاهش درصد باززایی مشاهده شد.

ریشه‌زایی

گرچه بدون تنظیم‌کننده‌های رشد ریشه‌زایی انجام شد، اما دیده شد که وجود اکسین می‌تواند در سرعت ریشه‌زایی مؤثر باشد که این نتیجه را تعدادی از محققان نیز گزارش کرده بودند (شرفی، ۱۳۸۵). بهترین اثر متقابل دو هورمون IBA و BAP جهت حداکثر ریشه‌زایی (۲۹/۶٪) عبارت بود از: محیط حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بدون هورمون BAP. این نتیجه با نتایج هدایت و خوشخوی (۱۳۸٤)، که هورمون BAP را بازدارنده ریشه‌زایی معرفی کردند، مطابقت دارد. Geetha و همکاران (۱۹۹۸) نیز بهترین تیمار جهت ریشه‌زایی لوبیای سودانی را هورمون IBA در محیط MS معرفی کردند. همچنین Uranbey و همکاران (۲۰۰۵)، بالاترین میزان ریشه‌زایی در شبدر ایرانی را با استفاده از هورمون IBA بدست آوردند.

به‌طور کلی در این آزمایش بهترین ریزنمونه‌ها از نظر بیشترین وزن کالوس القایی در محیط MS، جنین و در محیط B5، برگچه حاوی دمبرگ و جنین بود. ترکیب هورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، با بالاترین درصد جنین‌زایی، به عنوان ترکیب برتر در هر دو محیط کشت شناخته شد و ریزنمونه جنین، بیشترین میزان جنین‌زایی را نشان داد. ترکیب هورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، بهترین ترکیب هورمونی جهت القاء اندام هوایی در هر دو محیط کشت بود. نتایج نشان داد که مناسبترین ترکیب هورمونی جهت القاء ریشه در محیط کشت MS، محیط حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون IBA بود. با توجه به خواص دارویی متعدد و متابولیت‌های ثانویه فراوان این گیاه، مطالعات گسترده‌تر به

منظور ارزیابی میزان تغییرات متابولیت‌ها طی مراحل مختلف کشت بافت و مقایسه با گیاه زراعی، بررسی و بهینه‌سازی کشت سوسپانسیون سلولی با هدف تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه باارزش، پیشنهاد می‌شود.

منابع مورد استفاده

- رفیعی، گ.، ۱۳۸۳. بررسی پاسخ به کشت بافت و رفتار سیتوژنتیکی در چند رقم یونجه (*Medicago sativa* L.). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- شرفی، ع.، ۱۳۸۵. مطالعه کشت بافت و انتقال ژن gus به گیاه دارویی *Artemisia sieberi* پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندران.
- کرمی، ا.، دلجو، ع. و محمودی‌پور، ع.، ۱۳۸۷. رویان‌زایی بدنی مستقیم و باززایی گیاه در میخک (*Dianthus caryophyllus* L.). علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۲(۴۳): ۱۶-۱۱.
- مظفریان، و.، ۱۳۷۵. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، ۷۵۶ صفحه.
- نجف‌پور نوایی، م.، ۱۳۷۳. مطالبی پیرامون گیاه دارویی شنبلیله. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، ۱۸ صفحه.
- نیکنام، و. و کیانی، آ.، ۱۳۸۳. بررسی اثر تنش‌های شوری و خشکی بر برخی پارامتر های بیوشیمیایی شنبلیله در شیشه. خلاصه مقالات دومین همایش گیاهان دارویی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه شاهد، تهران، ۸-۷ بهمن: ۱۴۹
- ونسه، ق.، ۱۳۷٤. بررسی کشت کالوس گیاه شنبلیله و تولید متابولیت‌های ثانویه در آن. پایان‌نامه دکتری، دانشکده داروسازی، دانشگاه اصفهان.
- هدایت، م. و خوشخوی، م.، ۱۳۸٤. اثر محیط‌های کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزافزایی پیرتروم (*Tanacetum cinerariaefolium* (Trevir) Schultz-Bip). علوم و فنون باغبانی ایران، ٦(٤): ۱۸۲-۱۷۱.
- Apte, S.S., Kokate, C.K. and Rambhau, D., 1987. Relation between electro kinetic potentials and growth in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum*. Journal of Biosciences, 12(4): 393-397.
- Balarama S.Y.P. and Padmaja, V., 2003. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from leaf segments of pigeonpea. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73(2): 197-200.
- Geetha, N., Venkatachalam, P., Prakash, V. and Lakshmi Sita, G., 1998. High frequency induction of multiple shoots and plant regeneration from seedling explants of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). Current Science, 75(10): 1036-1041.
- Hoori, F., Ehsanpour, A.A. and Mostajeran, A., 2007. Comparison of somatic embryogenesis in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. Pakistan Journal of Biological Science, 10(3): 481-485.
- 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 *Trigonella foenum-graecum*. Biologia Plantarum, 48(3):441-444.
- Lu, D.Y., Davey, M.R. and Cocking, E.C., 1982. Somatic embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Trigonella corniculata* (leguminosae). Plant Cell Reports, 1(6): 278-280.
- Luo, J.P. and Jia, J.F., 1998. Callus induction and plant regeneration from hypocotyl explants of the forage legume *Astragalus adsurgens*. Plant Cell Reports, 17(6-7): 567-570.
- McKersie, B.D. and Bowley, S.R., 1993. Synthetic seeds in alfalfa. 231-255, In: Redenbaugh, K. (Ed.), Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement. CRC Press, Science, Boca Raton, 481p.
- Meijer, E.G.M. and Broughton, W.J., 1981. Regeneration of whole plants from hypocotyls, root and leaf derived tissue cultures of the pasture legume Stylosanthes guyanensis. Physiologia Plantarum, 52(2): 280-284.
- Niknam, V., Razavi, N., Ebrahimzadeh, H. and Sharifizadeh, B., 2006. Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents and antioxidant enzymes in seedlings and calli of two Trigonella species. Biologia Plantarum, 50(4): 591-596.
- Oncina, R., Botia, J.M., Del Rio, J.A. and Ortuno, A., 2000. Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. Food Chemistry, 70(4):489-492.
- Provorov, N.A., Soskov, Y.D., Lutova, L.A., Sokolova, O.A. and Bairamov, S.S., 1996. Investigation of the fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) genotypes for fresh weight, seed productivity, symbiotic activity, callus formation and accumulation of steroids. Euphytica, 88(2): 129-138.
- Rybczynski, J.J., 1997. Plant regeneration from highly embryogenic callus, cell suspension and protoplast cultures of *Trifolium fragiferum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51(3): 159-170.
- Uranbey, S., Sevimay, C.S. and Ozcan, S., 2005. Development of high frequency multiple shoot formation in Persian clover. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80(2): 229-232.

Callus induction, Somatic embryogenesis and plant regeneration in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)

E. Afshari[1*], G.A. Ranjbar[2], S.K. Kazemitabar[2], M. Riasat[3] and H. Kazemi Poshtmasari[4]

1*- Corresponding author, Member of Young Researchers Club of Islamic Azad University of Shiraz Branch, Shiraz, Iran, E-mail: afshari_e1385@yahoo.com
2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Agriculture and Natural Resources of Sari University, Iran
3- Research Center of Agriculture and Natural Resources, Fars, Shiraz
4- Member of Young Researchers Club of Islamic Azad University of Rasht Branch, Iran

Received: April 2010 Revised: July 2010 Accepted: August 2010

Abstract

In order to study callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) an experiment was conducted in Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University during 2008. In the current experiment, different explants including stem segments, embryos, hypocotyls, etc. were cultured on two basal culture media viz. B5 and MS. Moreover, 2, 4-D, Kin, NAA, BAP and IBA were used as plant growth regulators. Result showed that the medium containing $2mgl^{-1}$ 2, 4-D in combination with $0.5mgl^{-1}$Kinetin was the best treatment for callus induction in both MS and B5 media. Combination of $0.5mgl^{-1}$ NAA and $2.5mgl^{-1}$ BAP was the best treatment for somatic embryogenesis in both basal media. Also, combination of $1.5mgl^{-1}$ BAP and $0.5mgl^{-1}$ NAA was the best hormonal treatment to shoot regeneration in both basal media. According to the results, the treatment containing 1 mgl^{-1} IBA was optimum for root induction from regenerated shoots on MS medium.

Key words: Tissue culture, calli, somatic embryogenesis, plant regeneration, fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.).