نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۷، شماره ۱، صفحه ۱۰۷-۹۸ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 0.22092/ijrfpbgr.2019.123801.1320
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.27.116.53.1.1575.41

اثر نوع ریزنمونه، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشدگیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم نخودشیرین (*Lathyrus odoratus* L.)

مهدی بذرافکن[۱]، محمدحسین دانشور[۲] و محمدرضا صالحی سلمی[۳*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

۲- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

۳*- نویسنده و مسئول مکاتبات: دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

پست الکترونیک: mrsalehisalmi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵

چکیده

نخود شیرین (*Lathyrus odoratus* L.) متعلق به خانواده بقولات و یک گیاه زینتی علفی و رونده با گل‌های معطر است. این گیاه به‌عنوان یک منبع ژنتیکی برای صفات مهم مثل مقاومت در برابر تنش‌ها ازجمله تنش گرمایی محسوب می‌شود. همچنین به‌منظور حفظ ساختار ژنتیکی آن، تکثیر این گیاه از طریق کشت بافت می‌تواند مؤثر باشد. به‌منظور یافتن پروتکل کارآمد شاخه‌زایی از کالوس؛ اثر نوع ریزنمونه، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و شاخه‌زایی نخود شیرین بررسی شد. نتایج نشان داد که ریزنمونه میان‌گره نسبت به ریشه کالوس بیشتری تولید کرد (۰/۷۷ گرم کالوس برای هر ریزنمونه) و محیط کشت MS نسبت به محیط کشت B_5 تأثیر بیشتری در کالوس‌زایی داشت (۰/۷۸ گرم کالوس برای هر ریزنمونه). درمجموع بیشترین کالوس‌زایی (۱/۹ گرم کالوس برای هر ریزنمونه) هنگامی‌که ریزنمونه‌های میان‌گره در محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم ۶- بنزیل آمینو پورین (BAP) و ۲ میلی‌گرم در لیتر ۱- نفتالین استیک اسید (NAA) کشت شد، به‌دست آمد. بیشترین باززایی شاخه (۵/۳۳ عدد شاخه برای هر ریزنمونه) از کالوس‌های کشت‌شده در محیط کشت MS همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون (TDZ) به‌دست آمد. این پروتکل می‌تواند پایه و اساس تحقیقات آینده در ارتباط با بهبود ژنتیکی و تولید انبوه نخود شیرین در کشور باشد.

واژه‌های کلیدی: تولید انبوه، تیدیازورون، درون شیشه‌ای، میان‌گره، نفتالین استیک اسید.

مقدمه

نخودشیرین (*Lathyrus odoratus* L.) گیاهی یکساله، زینتی-دارویی، بالارونده با ارتفاع ۱ تا ۲ متر و از تیره بقولات است. این گیاه بومی ناحیه شرق مدیترانه و همچنین ایران است (Ochatt *et al*., 2010). این گیاه در قرن هفدهم میلادی به‌عنوان گیاه زینتی مطرح شده است و امروزه ارقام آن به‌صورت تجاری قابل‌دسترس می‌باشد. بهترین ویژگی آن عطر دلپذیر و شیرینی است که سرتاسر فضای اطراف خود را معطر می‌کند (Parsons, 2000). ترکیب سمی خاصی بنام بتاآمینوپروپیونیتریل در آن وجود دارد که منجر به عارضه اوستئولاتیریسم می‌شود و این ترکیب در پیوند پوست مورداستفاده قرار می‌گیرد (Mera *et al*., 2000).

جنس *Lathyrus* دارای چندگونه وحشی است و باوجود قابلیت بالا از نظر منبع ژنتیکی برای صفات مهمی ازجمله

مقاومت به تنش‌ها، نادیده گرفته‌شده است. بااین‌حال، گونه‌های تجاری مهمی در این جنس وجود دارد، ازجمله نخودشیرین که ارزش زینتی بالایی دارد. از سویی در کشورمان (ایران) توده‌های بومی زیادی از این گیاه وجود دارد که تابه‌حال بررسی چندانی روی آنها انجام نشده و بررسی هرچه بیشتر آن ضرورت دارد. در ایران انواعی از نخودشیرین وجود دارد که برای گل شاخه بریده، کاشت در باغچه، گلدان‌های آویز، کاشت در مجاورت پنجره‌ها، دیوارها و یا نرده‌ها استفاده می‌شود (Ochatt *et al*., 2010).

گیاه نخود شیرین به‌وسیله بذر تکثیر می‌شود، باوجوداین در برخی از توده‌های جمع‌آوری‌شده، بذر دارای پوشش ضخیمی است و جوانه‌زنی را با مشکل روبه‌رو می‌کند. کشت بافت گیاهی نقش مهمی در تولید گیاهان باغبانی به‌ویژه گیاهان زینتی، به‌منظور بهبود عملکرد و کیفیت ایفا می‌کند. تحقیقات در زمینه کشت بافت یک دانش چندبعدی است که جنبه‌های مهمی را در آینده اصلاح گیاهان ارائه می‌کند. در سال‌های اخیر روش‌های کشت بافت گیاهی به یک ابزار بسیار قوی برای تکثیر و به‌نژادی بسیاری از گونه‌های گیاهی تبدیل شده است (Razdan *et al*., 1980).

پژوهش‌های اندکی در زمینه کشت بافت نخودشیرین انجام شده است. یکی از نخستین گزارش‌های منتشرشده، جداسازی پروتوپلاست مزوفیل برگ گونه *odoratus* و کالوس‌زایی می‌باشد (Razdan *et al*., 1980). در این پژوهش از محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای اولین بار کالوس تشکیل شد. Sinha و همکاران (۱۹۸۲) با کشت ریزنمونه‌های تهیه‌شده از ساقه ۶ رقم از نخود (*L. sativus*) موفق به تولید کالوس شدند، ولی فقط در یک رقم توانستند جوانه شاخه تولید کنند. Zambrea و همکاران (۲۰۰۲) با کشت ریزنمونه‌های برگ و ساقه نخود در محیط کشت BM حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ موفق به تشکیل کالوس شدند. آنان با انتقال کالوس به محیط کشت BM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IAA شاخه تولید کردند. Ochatt و همکاران (۲۰۱۰) موفق به ازدیاد درون‌شیشه‌ای نخودشیرین به‌وسیله شاخه‌های جانبی شدند و گیاهک کامل تولید کردند. همچنین آنان تعداد زیادی از پروتوپلاست‌های برگ نخودشیرین و نخود علوفه‌ای را به‌وسیله امتزاج الکتریکی و امتزاج شیمیایی ترکیب کردند، ولی نتوانستند باززایی انجام دهند.

در این پژوهش پارامترهای مؤثر بر کالوس‌زایی با استفاده از غلظت‌های بالاتری از هورمون‌های NAA و 2,4-D نسبت به تحقیقات پیشین در دو نوع محیط کشت انجام شد، همچنین باززایی این گیاه برای اولین بار در ایران موردبررسی قرارگرفته است و بهترین تیمار هورمونی، نوع ریزنمونه و محیط کشت به‌منظور کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌دهی تعیین شده است.

مواد و روش‌ها

مکان پژوهش و تهیه ریزنمونه: این پژوهش در سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. بذرهای نخودشیرین بومی جمع‌آوری شده از استان فارس پس از ۳۰ دقیقه شست‌وشو با آب جاری، به‌مدت ۴۵ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰٪ و بعد به‌مدت ۱۲ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ (دارای ۵/۲۴٪ کلر فعال) قرار گرفت و ۳ بار با آب‌مقطر استریل شستشو گردید. بذرهای گندزدایی‌شده به ظروف کشت استریل با طول ۱۵ سانتی‌متر حاوی ۱۰ میلی‌متر محیط کشت موراشیگ و اسکوگ یک‌پنجم غلظت با آگار ۰/۸٪ و ساکارز ۳٪ منتقل شدند و در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی برای جوانه‌زنی قرار گرفتند. دو هفته پس از جوانه‌زنی، از گیاهچه‌ها ریزنمونه تهیه گردید.

کالوس‌زایی: برای کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های میان‌گره و ریشه نخودشیرین استفاده شد. ریزنمونه‌ها در قطعات ۱۰ میلی‌متری تهیه و در محیط‌های کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) و B_5 (Gamborg *et al*., 1968) با ترکیبات مختلف هورمونی (۱۰ تیمار) قرار گرفتند. ترکیبات هورمونی شامل NAA با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP؛ NAA با غلظت های ۱

و ۲ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN؛ 2,4-D با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP؛ شاهد (بدون تنظیم‌کننده رشد) استفاده شد. سپس ریزنمونه‌ها در شرایط تاریکی کامل قرار گرفته و پس از گذشت ۲۵ روز وزن کالوس‌ها اندازه‌گیری شد.

اندام‌زایی غیرمستقیم: کالوس به‌دست آمده از بهترین تیمار کالوس‌زایی، در محیط‌های کشت MS حاوی BAP با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ KIN با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ TDZ با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر؛ شاهد (بدون تنظیم‌کننده رشد) قرار گرفتند. سپس شیشه‌های کشت در شرایط روشنایی با شدت نور ۵۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از گذشت ۶ هفته تعداد شاخساره و طول بلندترین شاخساره اندازه‌گیری شد. **ریشه‌زایی:** ساقه‌های به‌دست آمده در مرحله اندام‌زایی به‌طول ۲ تا ۳ سانتی‌متر به محیط‌های کشت MS نیم‌غلظت و کامل، حاوی NAA با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر؛ IBA با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر؛ شاهد (بدون تنظیم‌کننده رشد) منتقل شدند. پس از ۱۰ روز که در محیط کشت ریشه‌زایی قرار گرفتند، برای ادامه ریشه‌زایی به محیط کشت MS عاری از هورمون واکشت شدند و پس از گذشت ۴ هفته از کشت، تعداد و طول ریشه اندازه‌گیری شد.

سازگاری: برای حذف آگار و باقی‌مانده کالوس گیاهچه‌های ریشه‌دار با آب‌مقطر استریل شسته شده و بعد گیاهچه‌ها به گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۷ سانتیمتر حاوی ۳ نوع محیط رشد ریشه استریل شده شامل: کوکوپیت، پرلایت، کوکوپیت و پرلایت (به نسبت مساوی) منتقل و برای حفظ رطوبت نسبی گلدان‌ها با پوشش پلی‌اتیلن شفاف پوشانده شده و در اتاق رشد نگه‌داری شدند. پس از گذشت ۳ هفته به گلخانه با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰٪ منتقل و درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها محاسبه گردید. **طرح آزمایشی و واکاوی داده‌ها:** تمامی آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و هر تکرار ۱۰ ریزنمونه استفاده شد. واکاوی داده‌ها با نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. لازم به ذکر است برای تنظیم pH محیط‌های کشت بر ۵/۸ از هیدروکسید پتاسیم و اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال استفاده شد. همچنین شیشه‌های حاوی محیط کشت با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند.

نتایج و بحث

اثر نوع ریزنمونه، نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر نوع ریزنمونه، نوع محیط کشت، غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و اثر متقابل آنها بر وزن کالوس در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). ریزنمونه‌های میان‌گره پس از ۲ هفته در محیط‌های کشت متورم گردیده و شروع به تولید کالوس نمودند، که نسبت به ریزنمونه‌های ریشه تولید کالوس بیشتری (۱۳۰٪) داشتند. در این پژوهش برای کالوس‌زایی، از دو محیط کشت MS و B_5 استفاده شد که نتایج نشان داد محیط کشت MS دارای وزن کالوس بیشتری بود (۰/۷۸ گرم). همچنین نتایج نشان داد بیشترین وزن کالوس (۱/۹۰ گرم) در تیمار محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP از ریزنمونه میان‌گره به‌دست آمد، که به‌طور معنی‌داری بیشتر از وزن کالوس در سایر تیمارها بود (جدول ۲). هورمون NAA نسبت به 2,4-D تأثیر بیشتری در تولید کالوس داشت. به‌طوری‌که با افزایش غلظت NAA مقدار تولید کالوس افزایش یافت.

برای تحریک کالوس‌زایی، افزودن تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (نوع، غلظت و نسبت اکسین به سیتوکینین) تا حد زیادی بستگی به ژنوتیپ و نوع محیط کشت دارد. در ارتباط با سازوکار عمل تنظیم‌کننده‌های رشد (اکسین و سیتوکینین) در کالوس‌زایی گزارش شده است که این ترکیبات با تحریک تقسیم سلولی و طویل‌شدن سلول، تشکیل و تکثیر کالوس را

در شرایط درون‌شیشه‌ای تسریع می‌کنند (Stefaniak, 1994). Roy و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردند که برای کالوس‌زایی از ریزنمونه میان‌گره گیاه *L. sativus* در شرایط درون‌شیشه‌ای، افزودن ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به محیط کشت لازم است.

جدول ۱- تجزیه واریانس فاکتوریلی اثر نوع محیط کشت، نوع ریزنمونه، نوع هورمون و برهم‌کنش آنها بر وزن کالوس نخود شیرین

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع محیط کشت	۱	۱/۲۶**
نوع ریزنمونه	۱	۰/۹۵**
نوع هورمون	۹	۱/۸۶**
محیط کشت × ریزنمونه	۱	۰/۲۱**
محیط کشت × هورمون	۹	۰/۱۷**
ریزنمونه × هورمون	۹	۰/۰۸**
محیط کشت × ریزنمونه × هورمون	۹	۰/۰۲**
خطای آزمایش	۸۰	۰/۰۵
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱۰/۴۰

**: معنی‌دار در سطح ۱٪

Piwowarczyk و Pindel (۲۰۱۴) ریزنمونه‌های ریشه گیاه *L.sativus* را در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین به همراه ۰/۵ گرم در لیتر زغال‌فعال کشت کردند که منجر به تشکیل کالوس شد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش با این گزارش‌ها همسویی داشت. به‌طوری‌که ترکیبات مغذی در هر محیط کشت بر القای کالوس‌زایی مؤثرند. در این بررسی مشاهده شد که وضعیت ظاهری کالوس‌های تولیدشده کاملاً متفاوت بود، به‌طوری‌که ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط کشت MS کالوس‌های متراکم تولید کرده، درحالی‌که کالوس‌های کشت‌شده در محیط کشت B_5 آبکی بود. علاوه‌براین، به‌وضوح مشاهده شد که کالوس‌های جداشده از محیط کشت B_5 کوچک‌تر و کمتر بودند. Naik و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که ریزنمونه‌های کشت‌شده ناز باتلاقی (*Bacopa monneri*) در محیط کشت MS نسبت به محیط‌کشت‌های B_5، NN و N6 کالوس شاداب‌تری و تردتری تولید کرده و رنگ سفید مایل به زرد داشتند.

اندام‌زایی غیرمستقیم

بهترین کالوس به‌دست‌آمده از ۲ نوع ریزنمونه میانگره ساقه و ریشه (محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP)، به محیط‌های کشت اندام‌زایی منتقل گردیدند. نتایج نشان داد نوع ریزنمونه، نوع محیط کشت اندام‌زایی و همچنین اثرهای برهم‌کنش آنها بر تعداد شاخساره در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). به‌طوری‌که بیشترین تعداد شاخساره (۵/۳۳ شاخساره) در تیمار کالوس تولیدشده از ریزنمونه میان‌گره در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده گردید و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (شکل ۱). بلندترین شاخساره (۵/۲۳ سانتیمتر) از کالوس تهیه‌شده از ریزنمونه میان‌گره در محیط کشت اندام‌زایی حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. درحالی‌که کمترین طول شاخساره مربوط به کالوس‌های به‌دست آمده از ریزنمونه ریشه در تمامی محیط‌های کشت باززایی بود (شکل ۱). سیتوکینین در سنتز DNA و mRNA نقش دارد، بنابراین در تقسیم سلولی نقش مهمی ایفا می‌کند، همچنین در تحریک ساخت پروتئین بر فعالیت بعضی آنزیم‌ها ازجمله tRNA synthetase دخالت دارد. تقسیم سلولی درنتیجه عمل توأم اکسین و سیتوکینین تنظیم می‌شود که هریک تأثیر خاصی بر چرخه سلولی دارند. اکسین به‌کاربرده شده بر تکثیر DNA اثر دارد، درحالی‌که سیتوکینین بر مسیر ساخت میتوز دخالت دارد. پس در محیط کشت حاوی اکسین، تنها کالوس تشکیل می‌شود و سلول‌ها نمی‌توانند وارد مرحله میتوز شوند، مگر اینکه سیتوکینین فراهم باشد (George *et al*., 2007). در پژوهش Roy و همکاران (۱۹۹۲) بیشترین کالوس از ریزنمونه ریشه گیاه *L. sativus* در محیط کشت MS حاوی ۱۰/۷ میکرومولار NAA به‌همراه ۰/۹ میکرومولار کینتین به‌دست آمد و با افزایش غلظت کینتین موفق به تولید شاخه از کالوس شدند.

جدول ۲- اثر محیط کشت، ریزنمونه، هورمون و برهم‌کنش آنها بر وزن کالوس (گرم) در گیاه نخودشیرین

محیط کشت	غلظت هورمون (میلی‌گرم در لیتر)	ریزنمونه		میانگین کل محیط کشت
		میان‌گره ساقه	ریشه	
MS	بدون هورمون (شاهد)	۰/۰۶q	۰/۰۳q	۰/۷۸ A
	0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP	۰/۵۳j-m	۰/۶۰ijk	
	1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP	۰/۷۶gh	۰/۵۶i-l	
	2.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP	۱/۹۰a	۱/۵b	
	3.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP	۱/۴۶b	۱/۲c	
	1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l KIN	۰/۶۳ij	۰/۴۶k-n	
	2.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l KIN	۱/۱۳c	۰/۸۶fg	
	0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP	۰/۹۰ef	۱/۱cd	
	1.0 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP	۰/۵۶i-l	۰/۵۶i-l	
	2.0 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP	۰/۴۰mn	۰/۵۶i-l	
B5	بدون هورمون (شاهد)	۰/۰۳q	۰/۰۱q	۰/۵۸ B
	0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP	۰/۳۶no	۰/۲۶op	
	1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP	۰/۷۶gh	۰/۵۳j-m	
	2.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP	۱/۲۰c	۰/۷۰hi	
	3.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP	**۱/۵۳b**	۱/۰de	
	1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l KIN	۰/۶۶ijh	۰/۴۶k-n	
	2.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l KIN	۰/۹۳ef	۰/۵۳j-m	
	0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP	۰/۶۶hij	۰/۴۳lmn	
	1.0 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP	۰/۵۶i-l	۰/۳۳nop	
	2.0 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP	۰/۴۶k-n	۰/۲۳p	
میانگین نوع ریزنمونه		۰/۷۷ A	۰/۵۹ B	

اعدادی با حروف مشترک (حروف کوچک: مربوط به برهم‌کنش؛ حروف بزرگ در ردیف یا ستون: مربوط به میانگین فاکتورهای اصلی) در سطح ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

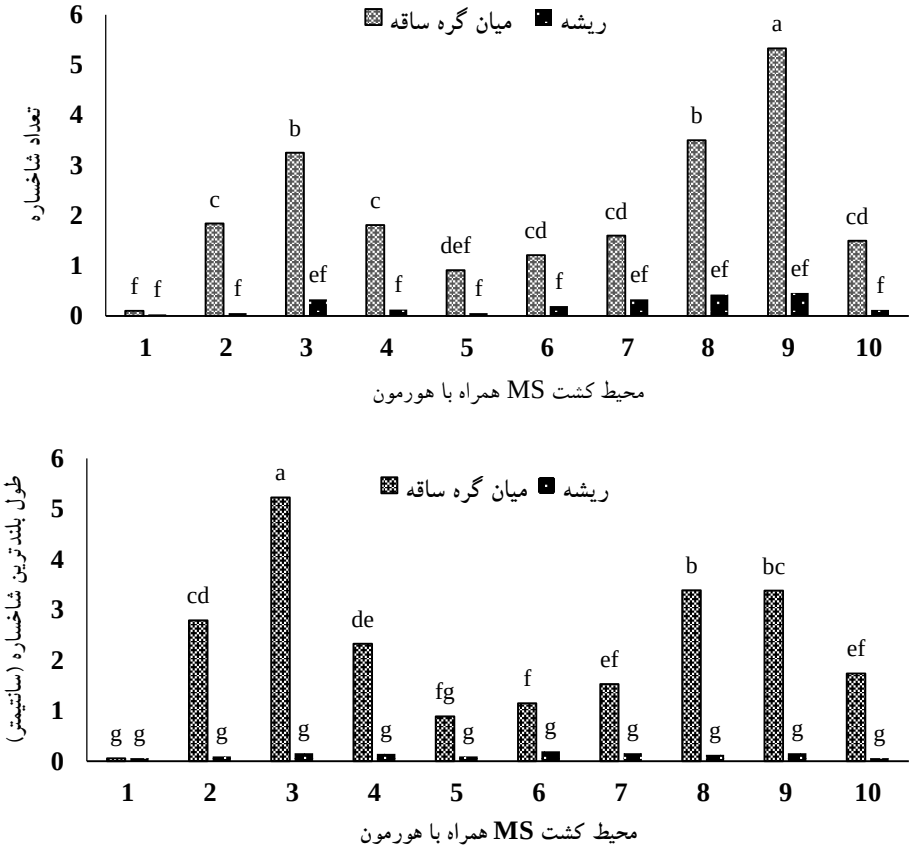
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت، نوع ریزنمونه و برهم‌کنش آنها بر تعداد و طول شاخساره در اندام‌زایی غیرمستقیم نخود شیرین

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد شاخساره	طول شاخساره
محیط کشت اندام‌زایی	۹	۱۶/۵۲**	۱۴/۹۲**
ریزنمونه	۱	۲۱۱/۸۷**	۲۸۳/۴۰**
محیط کشت اندام‌زایی× ریزنمونه	۹	۱۱/۵۶**	۱۴/۲۵**
خطای آزمایش	۴۹	۰/۱۲	۰/۰۱
درصد ضریب تغییرات	-	۲۰/۲۸	۱۱/۳۱

**: معنی‌دار در سطح ۱٪

براساس گزارش Magyar-Tabori و همکاران (۲۰۱۰) غلظت‌های بالای سیتوکینین باعث جلوگیری از طولانی شدن شاخه و کوتاهی میان‌گره‌ها می‌شود که با نتایج این بررسی همسویی دارد. Bainade و همکاران (۲۰۱۴) اثر اتیل متان

سولفانیت (EMS) را روی باززایی از کالوس در گیاه *L. sativus* بررسی کردند و مشاهده کردند که کالوس فقط در تیمارهای شاهد، ۰/۱ و ۰/۲ درصد EMS به‌مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه به رشد خود ادامه داد و باززایی شاخه فقط در تیمارهای شاهد و ۰/۱ درصد EMS به‌مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه انجام شد. نتایج نشان داد که کیفیت کالوس نیز بر شاخه‌زایی اثر داشت. در پژوهش Yan و همکاران (۲۰۰۹) مشخص شد که کالوس‌های محکم و ترد، نسبت به کالوس‌های آبکی قابلیت بالاتری در شاخه‌زایی داشتند. نتایج این پژوهش با یافته‌های آنان همسویی داشت.



شکل ۱- اثر نوع ریزنمونه و هورمون‌های مختلف بر تعداد شاخساره (شکل بالا) و طول شاخساره (شکل پایین) در باززایی غیرمستقیم در محیط کشت MS.

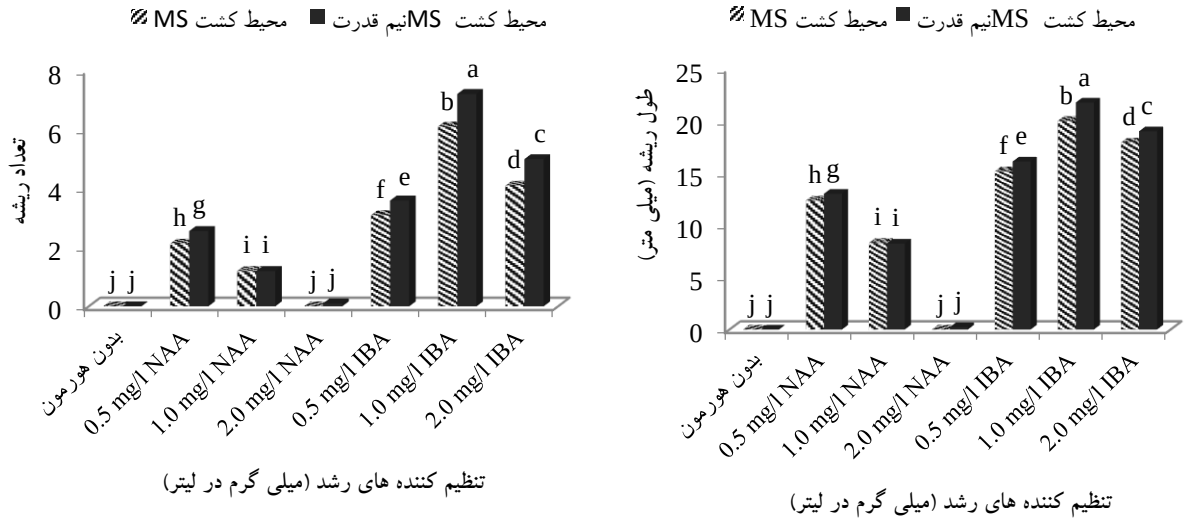
در هر شکل، ستون‌های با حروف مشترک در سطح ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

تیمارهای هورمونی ۱: بدون هورمون، **۲: 0.5 mg/l BAP+0.1 mg/l NAA، ۳: 1.0 mg/l BAP+0.1 mg/l NAA، ۴: 1.5 mg/l BAP+0.1 mg/l NAA، ۵: 0.5 mg/l KIN+0.1 mg/l NAA، ۶: 1.0 mg/l KIN+ 0.1 mg/l NAA، ۷: 1.5 mg/l BAP+0.1 mg/l NAA، ۸: 0.5 mg/l TDZ، ۹: 1.0 mg/l TDZ، ۱۰: 1.5 mg/l TDZ**

ریشه‌زایی از ساقه‌های باززایی شده

پس از آنکه شاخساره‌ها به اندازه لازم (۳-۲ سانتی‌متر) برای ریشه‌دار شدن رسیدند، در محیط کشت‌های MS نیم-قدرت و MS کامل حاوی غلظت‌های مختلف NAA و IBA

انتقال یافتند. بیشترین تعداد ریشه (۷/۲ عدد) و بیشترین طول ریشه (۲۱/۷۶ میلی‌متر) در تیمار محیط کشت MS نیم‌قدرت همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد (شکل ۲). همچنین نتایج نشان داد با افزایش غلظت هورمون NAA، تعداد ریشه کاهش و به سمت تولید پینه تمایل پیدا کرد. درحالی‌که با افزایش غلظت IBA تا ۱ میلی‌گرم در لیتر تعداد ریشه افزایش یافت ولی با افزایش غلظت تعداد ریشه کاهش یافت. این نتایج با بررسی Ochatt و همکاران (۲۰۱۰) در ارتباط با ریشه‌زایی شاخساره تولیدشده از گیاه نخود شیرین در شرایط درون شیشه‌ای همسویی داشت. هورمون NAA در محیط کشت نسبت به سایر اکسین‌ها پایدارتر است (Nissen & Sutter, 1990)، همچنین اثرهای جانبی بازدارنده‌ای دارد و ریشه‌های کمتری نسبت به دیگر اکسین‌ها از قبیل IBA القاء می‌کند. ثبات و دوام NAA به شکل آزاد در بافت گیاه باعث توقف رشد ریشه می‌شود و از افزایش طول ریشه جلوگیری می‌کند (Koetle *et al*., 2010).



شکل ۲- اثر برهم‌کنش غلظت محیط کشت MS و غلظت هورمون بر تعداد ریشه (شکل راست) و طول ریشه در گیاه نخودشیرین
در هر نمودار، ستون‌های با حروف مشترک در سطح ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

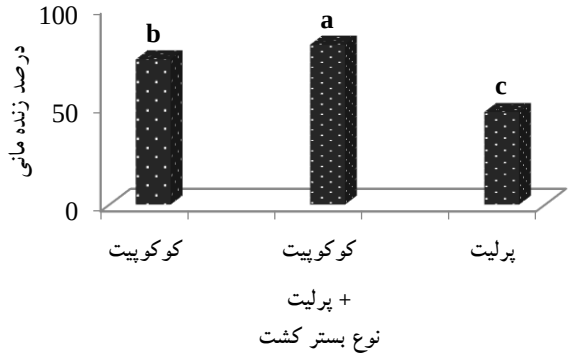
سازگاری

موفقیت در انتقال گیاهک تولیدشده در شرایط کشت بافت، به شرایط محیطی و سیستم ریشه بستگی دارد. یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که در ارتباط با اثر محیط سازگاری بر شاخص درصد زنده‌مانی، بیشترین درصد زنده ماندن با میانگین ۸۱٪ در محیط پرلیت به‌همراه کوکوپیت مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از درصد زنده‌مانی در سایر تیمارها بود (شکل ۳). بنابراین به نظر می‌رسد که این بستر ترکیبی به دلیل داشتن مزایای هر دو محیط کشت نتایج بهتری نشان داد. البته کوکوپیت با ظرفیت نگهداری آب بیشتر و پرلیت به دلیل تخلخل بیشتر، محیط مناسب‌تری را برای رشد گیاهک‌های کشت بافتی فراهم نمود. Fascella و Zizzo (۲۰۰۵) گزارش کردند که گیاهان رشد کرده در ترکیب کوکوپیت و پرلیت ساقه‌های بلندتر و ضخیم‌تری نسبت به سایر ترکیب‌ها تولید کردند و درصد زنده‌مانی بیشتری داشتند که با نتایج این آزمایش همسویی داشت. به دلیل ارتباط آوندی ضعیف بین شاخه و ریشه و همچنین بازدهی فتوسنتزی پایین در گیاهان کشت بافتی، درصد زنده‌مانی آنها پس از انتقال به محیط گلخانه کاهش می‌یابد (Memon, 2012). Ochatt و همکاران (۲۰۱۰) به‌منظور سازگاری گیاهان *L. odoratus* تولیدشده در شرایط کشت بافت به گلخانه، ابتدا گیاهان را به‌مدت ۲۴ ساعت روی سکوی آزمایشگاه در دمای

اتاق و نور معمولی قرار دادند. سپس گیاهان را از لوله آزمایش خارج کرده و ریشه آنها را با آب شست‌وشو داده تا آگار از روی ریشه پاک شود. سپس گیاهان را در گلدان‌های حاوی پرلایت و خاک (۱:۱) و یا کمپوست کاشتند و در محیط گلخانه‌ای نگهداری کردند تا کم‌کم با شرایط طبیعی سازگار شود. پس از گذشت ۱۰ روز، زمان سازگاری به‌طور کامل طی شد.

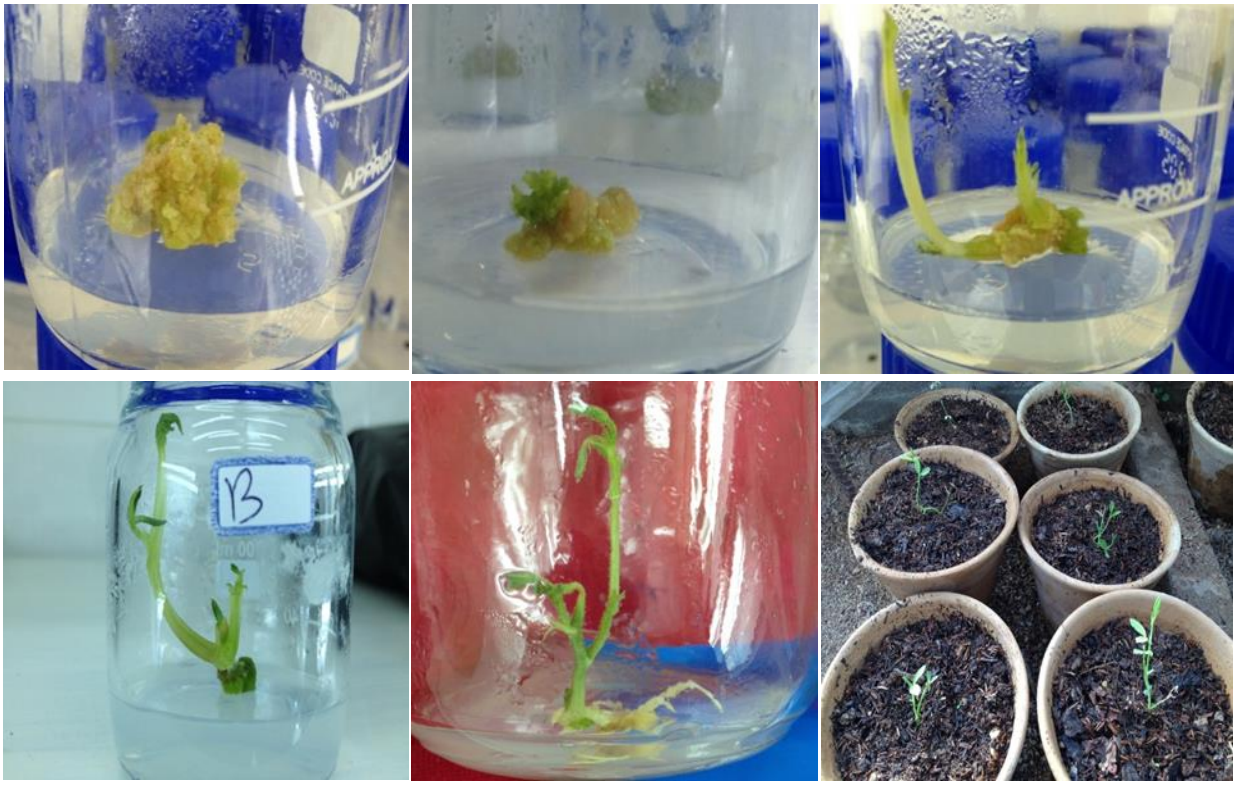
نتیجه‌گیری کلی

این بررسی یک پروتکل تولید کالوس، شاخه‌زایی غیرمستقیم، ریشه‌زایی نابه‌جا و همچنین سازگاری گیاه نخودشیرین می‌باشد که بر اساس نتایج این پژوهش استفاده از غلظت‌های تعیین شده تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای ریزازدیادی نخودشیرین پیشنهاد می‌شود. روش ارائه‌شده در این پژوهش علاوه بر تکثیر گیاه می‌تواند برای حفظ ژرم‌پلاسم، انتقال ژن و استخراج ترکیبات دارویی مثل بتا اگزالیل آمینو آلانین اسید (BOAA) از کالوس مورداستفاده قرار گیرد.



شکل ۳- اثر بستر کشت سازگاری بر درصد زنده‌مانی گیاهان تولیدشده در شرایط کشت درون شیشه‌ای

ستون‌های با حروف غیرمشترک در سطح ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری با هم دارند.



شکل ۴- مراحل اندام‌زایی غیرمستقیم نخودشیرین (از چپ به راست)

منابع مورداستفاده

– Bainade, P.S., Patil, S.R., Deshmukh, S.G. and Sawant, P.V., 2014. *In vitro* Regeneration of Lathyrus (*Lathyrus sativus* L.) as influenced by mutagen treatment. Journal of Cell and Tissue Research, 14: 4113-4116.
– Fascella, G. and Zizzo, G.V., 2005. Effect of growing media on yield and quality of soilless cultivated rose. Acta Horticulturae, 697: 133-138.
– Gamborg, O., Miller, R. and Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158.
– George, E.F., Hall, M.A. and Klerk, G.D., 2007. Plant propagation by tissue culture (Vol 1). Springer, 508 p.
– Koetle, M.J., Finnie, J.F. and van Staden, J. 2010. *In vitro* propagation in *Dierama erectum* Hilliard. Plant cell tissue organ culture, 103: 23-31.
– Magyar-Tabori, K., Dobranszki, J., Teixeira da Silva, J.A., Bulley, S.M. and Hudak, I., 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 101: 251- 267.
– Memon, N., 2012. *In vitro* propagation of Gladiolus plantlets and cormlets. Journal of Horticultural Science and ornamental plants, 4: 280-291.
– Mera, M., Montenegro, A., Espinoza, A. and Guete, N., 2000. Research backs grass pea exports by small Chilean farmers. Lathyrus Lathyrism Newsletter, 1: 31-36.
– Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-476.
– Naik P.M., Godbole, M., Nagella, P. and Murthy, H.N., 2018. Influence of different media, medium strength and carbon sources on adventitious shoot cultures and production of bacoside A in *Bacopa monnieri* (L.). Ceylon Journal of Science, 46: 97-104.
– Nissen, S.J and Sutter, E.G., 1990. Stability of IAA and IBA in nutrient medium of several tissue culture procedures. Horticultural Science, 25: 800-802.
– Ochatt, S.J., Abirached-Darmency, M., Marget, P. and Aubert, G., 2007. The Lathyrus paradox: “poor men’s diet” or a remarkable genetic resource for protein legume breeding: 41-60. In: Ochatt, S.J. and Mohan, J. S. (Eds.) Underutilised and neglected crops, herbs and spices. Science press, Enfield, CT, 192 p.
– Ochatt, S.J., Conreux, C. and Jaca, L., 2010. *In vitro* production of sweet peas (*Lathyrus odoratus* L.) via axillary shoots: 293-302. In: Jain, S.M. and Ochatt, S.J. (Eds.). Protocols for *In Vitro* Propagation of Ornamental Plants. Springer protocols. Humana Press. 655 pp.
– Parsons, R., 2000. Early History of the Sweet Pea. 5-19. In: Ball, C. (Ed). National Sweet Pea Society Centenary Celebration. National Sweet Pea Society. Stockbridge, UK, 176 p.
– Piwowarczyk, B. and Pindel, A., 2014. Early stages of somatic embryogenesis in root callus of grass pea (*Lathyrus sativus* L.). Journal of Central European Agriculture, 15: 209-218.
– Razdan, M.K., Cocking, E.C. and Power, J.B. 1980. Callus regeneration from mesophyll protoplasts of sweet pea (*Lathyrus odoratus* L.). Zeitschrift für flanzenphysiologie, 96: 181-183.
– Roy, P.K., Ali, K., Gupta, A., Barat, G.K. and Mehta, S.L., 1993. β-N-Oxalyl-L-α, β-diaminopropionic acid in somaclones derived from internode explants of *Lathyrus sativus*. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2: 9-13.
– Roy, P.K., Barat, G.K. and Mehta, S.L. 1992. *In vitro* plant regeneration from callus derived from root explants of *Lathyrus sativus.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 29: 135-138.
– Sinha, R.R., Das, K. and Sen, S.K., 1982. Plant regeneration from stem-derived callus of the seed legume *Lathyrus sativus* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2: 67-76.
– Stefaniak, B., 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration of Gladiolus (*Gladiolus* Hort.). Plant cell Reports, 13: 386-389.
– Yan, M., Xu, Ch., Kim, Ch., Um, Y., Bah, A.A. and Guo, D., 2009. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). Scientia Horticulturae, 123: 124-128.
– Zambrea, M., Chowdhuryb, B., Kuob, Y., Montagua, M.V., Angenond, G. and Lambein, F., 2002. Prolific regeneration of fertile plants from green nodular callus induced from meristematic tissues in *Lathyrus sativus* L. (grass pea). Plant Science, 163: 1107-1112.

Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of sweet pea (*Lathyrus odoratus* L.)

M. Bazr-Afkan[1], M. Hosein Daneshvar[2], M.R. Salehi Salmi[3]

1- M.Sc., Department of Horticulture Science, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Ahvaz, I.R. Iran.
2- Prof., Department of Horticulture Science, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Ahvaz, I.R. Iran.
3- Corresponding author, Assoc. Prof., Department of Horticulture Science, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Ahvaz, I.R. Iran. E-mail: mrsalehisalmi@gmail.com

Received: 19.10.2018 Accepted: 16.03.2019

Abstract

Sweet pea (*Lathyrus odoratus* L.), belongs to Fabaceae family, is an ornamental herbaceous plant with fragrant flowers and climber. This plant is as a source of genetic for important traits such as resistance to edaphic stresses. In order to keep genetic sources, plant propagation through tissue culture can be effective. To establish an efficient protocol of shoot regeneration from callus, effects of explant type, culture media and plant growth regulators on callus induction and shoot regeneration of sweet pea were evaluated. The results showed that internode was the best explant for callus induction (0.77 g callus per each explant) and MS was the best medium to induce callus formation with 0.78 g callus per each explant. The highest callus induction (1.9 g callus per each explant) was achieved planting internode on MS medium supplemented with 0.5 $mg.l^{-1}$ 6-benzylaminopurine (BAP) and 2.0 $mg.l^{-1}$ 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) after 25 days of culture. Shoots regenerated at the highest frequency with 5.33 shoots when calli were cultured on MS medium with 1.0 $mg.l^{-1}$ Thidiazuron (TDZ). This protocol provides a basis for future studies on genetic improvement and could be applied to large-scale multiplication systems for commercial nurseries of *Lathyrus odoratus* L.

Key words: *In vitro*, Internode, Mass production, Naphthaleneacetic acid, Thidiazuron.