بررسی پینه‌زایی در گیاه دارویی چویل (*Ferulago angulata* B.) با استفاده از انواع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد

Study of Callus Induction of Medicinal Chavil Plant (*Ferulago angulata* B.) Using Types of Explants and Growth Regulators

راضیه مرتضوی[۱]، مسعود دهداری[۲*] و اسد معصومی اصل[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۲

چکیده

چویل با نام علمی *Ferulago angulata* B. از گیاهان دارویی مهم و متعلق به خانواده چتریان می‌باشد. جهت تعیین مناسب‌ترین نوع ریزنمونه و ترکیب هورمونی برای پینه‌زایی در این گیاه، آزمایشی در دانشگاه یاسوج با استفاده از ریزنمونه‌های ریشه، ساقه، برگ (حاصل از کشت جنین) و جنین برش خورده و تیمارهای هورمونی NAA همراه با BAP هرکدام در پنج سطح (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و هم چنین 2,4-D در پنج سطح (۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) همراه با BAP در پنج سطح (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در محیط‌کشت ۱/۴MS به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی و آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که کلیه اثرهای اصلی، برهمکنش‌های دوگانه و برهمکنش ریزنمونه، NAA و BAP برای درصد پینه‌زایی، وزن تر پینه، وزن خشک پینه، طول پینه، قطر پینه و حجم پینه معنی‌دار شد. در آزمایش دیگر نیز نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که کلیه اثرهای اصلی، برهمکنش‌های دوگانه و برهمکنش ریزنمونه و 2,4-D و BAP برای درصد پینه‌زایی، وزن تر پینه، وزن خشک پینه، طول پینه، قطر پینه و حجم پینه معنی‌دار شد. براساس مقایسه میانگین‌ها، ریزنمونه ریشه در تمام غلظت‌های NAA صرف‌نظر از غلظت‌های مختلف BAP جهت تولید پینه موثرتر بود. همچنین در تیمارهای هورمونی 2,4-D همراه با BAP نیز، ریزنمونه ریشه در ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مناسب‌ترین ریزنمونه و ترکیب هورمونی از نظر ویژگی‌های درصد پینه‌زایی، وزن تر پینه، وزن خشک پینه، طول پینه، قطر پینه و حجم پینه بودند. نظر به واکنش خوب چویل به پینه‌زایی می‌توان از این نتایج برای اهداف مختلف اصلاحی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: درصد پینه، کشت درون شیشه‌ای، محیط‌کشت MS

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج

۲ و ۳. به ترتیب دانشیار و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج

*: نویسنده مسوول Email: adehdari@yu.ac.ir

مقدمه

گیاه دارویی چویل با نام علمی *Ferulago angulata* گیاهی چندساله و متعلق به خانواده چتریان می‌باشد. اسانس حاصل از بذر و سرشاخه‌های هوایی این گیاه در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی با ارزش است. در صنایع دارویی به‌خاطر خاصیت ضدعفونی‌کنندگی، اثر تقویت‌کنندگی و تسکین‌دهندگی و درمان بیماری‌های گوارشی و کرم‌های روده‌ای مورد استفاده واقع می‌شود. هم‌چنین از گل‌های باز شده و برگ‌های جوان آن برای خوش‌بو و خوش‌طعم کردن دوغ، ماست و کره استفاده می‌شود ولی علوفه آن خوش‌خوراک نیست *ابرازه* (Abrazeh 2003). پینه در اصل بافت غده‌ای کم و بیش تمایز نیافته‌ای است که معمول در محل زخم بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته، ایجاد می‌شود. پینه‌زایی در کشت بافت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از تولید پینه و باززایی آن، برای تکثیرانبوه، گزینش درون شیشه‌ای برای افزایش مقاومت نسبت به تنش های محیطی زنده و غیرزنده (از طریق استفاده از تنوع موجود و یا تنوع سوماکلونی) و در مهندسی ژنتیک به‌منظور انتقال ژن مـــوردنظر از منبـــعی بیگانه به گیاه زراعی استفاده می‌شـــود *ارزانی و میراجاق*؛ *کریستو* و همکاران (Arzani and Mirodjagh, 1999; Christou *et al.*, 1991). تولید پینه به‌عوامل متعددی بستگی دارد که مهم‌ترین آنها ژنوتیپ، ریزنمونه و شرایط فیزیولوژیک آن، نوع محیط‌کشت و عناصر غذایی، عوامل فیزیکی و شرایط محیطی از قبیل نور، دما، pH، تنظیم‌کننده‌های رشد و ویتامین‌ها می‌باشد *امیدی و فرزین* (Omidi and Farzin, 2009). برای انتخاب ریزنمونه باید اندام‌های مریستمی نظیر نوک ساقه، جوانه جانبی، گل‌آذین، ساقه، برگ، دمبرگ و ریشه، بر سایر بافت‌ها ترجیح داده شوند، چرا که این بافت‌ها دارای خصوصیات ارزشمندی نظیر خصوصیات انبوه، بقاء کشت، سرعت رشد و خاصیت توتی‌پوتنسی در کشت‌های درون‌شیشه‌ای می‌باشند *فارسی و ذوالاله* (Farsi and Zolala, 2003). سن ریزنمونه‌ها و نحوه قرار گرفتن آن‌ها روی محیط‌کشت نیز، در برخی گیاهان حائز اهمیت است *نیکام و شیتول* (Nikam and Shitole, 1999). غلظت مواد تنظیم‌کننده رشد در محیط‌کشت نیز، جهت پینه‌زایی بسیار مهم است. اکسین با غلظت متوسط تا زیاد، اولین هورمون مورد استفاده برای تولید پینه است. در بعضی گونه‌ها غلظت زیاد اکسین و غلظت کم سیتوکینین در محیط‌کشت، روند تولید پینه را ترقی می‌دهند (*فارسی و ذوالاله*، 2003). هورمون‌هایی که باعث القا و رشد پینه می‌شوند، از طریق فاکتورهای مخصوصی باعث رشد قطعات ریزنمونه با الگوی منظمی می‌شوند. بنابراین بافت‌های گیاهی دارای گیرنده‌های مخصوص، در غشاء و یا درون سیتوپلاسم برای هورمون هستند. هورمون‌ها با این جایگاه‌ها برهمکنش کرده و غلظت گیرنده در سطح بافت هدف، نوع پاسخ را تعیین می‌کند *موکویکیت و آنیسموین* (Mockeviciute and Anisimoviene, 1999). جایگاه‌های ویژه اتصال اکسین‌ها شناسایی شده‌اند. پروتئین‌هایی به‌نام پروتئین‌های گسترش-دهنده دیواره، قادرند پیوند هیدروژنی بین ترکیبات پلی‌ساکاریدی دیواره سلول را بشکنند *کوسگروو* (Cosgrove, 2001). کاهش pH سلولی، باعث افزایش سطح کلسیم داخل سلول می‌شود *شیشووا* و همکاران (Shishova *et al.*, 1999). این تغییر pH سیتوپلاسمی و یون‌های کلسیم به‌عنوان پیام‌رسان‌های ثانویه در عمل اکسین عمل می‌کنند *ژانگ و لو* (Zhang and Lu, 2003). یون‌های کلسیم در طی پیوند با کالمودولین باعث فعال شدن پروتئین‌های کیناز ویژه شده و در نتیجه فاکتورهای بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به اکسین تنظیم می‌شوند و این باعث فعال شدن چرخه سلولی و تحریک تقسیم سلولی پینه می‌گردد *ظهری و میترا* (Johri and Mitra, 2001). از نظر ویژگی‌های کیفی پینه، پینه‌های شکننده که بافت آن‌ها به سهولت قابل قطعه قطعه شدن است را پینه‌های نرم می‌نامند. در مقابل، پینه‌های فشرده که بافت آن‌ها براحتی از هم جدا نمی‌شوند را پینه‌های سفت می‌نامند، *نوری قنبلانی* (Nori-Ghanballani, 1992). از آنجا که ریزنمونه‌های مختلف تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد، میزان متفاوتی پینه تشکیل می‌دهند، بنابراین انتخاب یک ریزنمونه در مرحله رشدی مطلوب به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب، تأثیر چشمگیری بر تولید پینه و رشد آن دارد، *خاور* و همکاران (Khawar *et al.*, 2005).

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج به اجرا درآمد. بذور چویل از مناطق کوهستانی شهرستان دنا در استان کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری گردیدند. ضدعفونی بذور تحت شرایط استریل و زیر هود به‌وسیله اتانول ۷۰٪ به‌مدت ۱ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به‌مدت ۲۵ دقیقه و سه بار شستشو با آب دوبار تقطیر استریل شده صورت گرفت. پس از ضدعفونی بذور، محور جنینی درون محیط‌کشت غذایی ۱/۴MS کشت گردید. پس از تولید گیاهچه، ریزنمونه‌هایی شامل ریشه، ساقه و برگ تهیه و به درون محیط‌های کشت حاوی تیمارهای آزمایش منتقل

شدند. علاوه‌بر ریزنمونه‌های ذکر شده از خود محور جنینی به‌صورت برش خورده نیز استفاده گردید. غلظت ساکارز مورد استفاده در آزمایش معادل ۳۰ گرم در لیتر و غلظت آگار مورد استفاده معادل ۷ گرم در لیتر بودند. pH محیط برای جوانه‌زنی معادل ۵/۸ تنظیم شد. سپس محیط‌کشت غذایی درون ظروف کشت ریخته و به‌منظور استریل شدن در دستگاه اتوکلاو، به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱°C و فشار ۲ اتمسفر قرار داده شدند. پس از اتمام اتوکلاو، ظروف حاوی محیط‌کشت به زیر دستگاه لامینار ایرفلو در شرایط کاملاً استریل انتقال داده شدند. قبل از شروع کار، دستگاه لامینار ایرفلو، وسایل و فضای اتاق کشت، توسط اتانول ۷۰٪ ضدعفونی و چراغ UV دستگاه به‌مدت ۲۰-۱۵ دقیقه جهت اطمینان از ضدعفونی شدن فضای درونی دستگاه روشن گردید. دو آزمایش مجزا به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای به‌کار رفته در این مرحله از آزمایش به شرح زیر بودند:

- نوع ریزنمونه در چهار سطح ریشه، ساقه، برگ و جنین برش یافته
- اکسین NAA در پنج سطح (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با سیتوکینین BAP در پنج سطح (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)
- اکسین 2,4-D در پنج سطح (۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با سیتوکینین BAP در پنج سطح (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)

پس از کاشت ریزنمونه‌ها در پتری‌دیش، اطراف پتری‌دیش‌ها با نوار پارافیلم کاملاً بسته و در اتاق تاریک در دمای ۲۴ ±۲°C نگه‌داری گردیدند. ۱۰ هفته پس از کاشت ریزنمونه‌ها، صفات کمی از قبیل درصد پینه‌زایی، طول پینه (میلی‌متر)، قطر پینه (میلی‌متر)، حجم پینه (میلی‌متر مکعب)، وزن تر و وزن خشک پینه (گرم) و دو صفت کیفی بافت پینه و رنگ پینه اندازه‌گیری و ثبت گردید. اندازه‌گیری صفات طول و قطر پینه با استفاده از کولیس، حجم پینه با استفاده از استوانه مدرج ۵ سی‌سی، وزن تر پینه با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم و وزن خشک پینه پس از خشک شدن در دستگاه آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. صفت کیفی بافت پینه براساس سفت و نرم بودن پینه و صفت رنگ پینه هم براساس رنگ‌های سبز، زرد، شیری و سفید ارزیابی شدند. تجزیه واریانس مشاهدات براساس طرح‌های آماری به‌کار رفته و مقایسه میانگین‌ها به روش LSmeans در سطح ۵ درصد به کمک نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

تأثیر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP بر پینه‌زایی ریزنمونه‌ها

حدود ۱۰ الی ۱۲ روز پس از کاشت ریزنمونه‌های ریشه، ساقه، برگ (حاصل از کشت جنین) و جنین برش خورده، تشکیل پینه مشاهده گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی نشان داد که کلیه اثرهای اصلی، برهمکنش‌های دوگانه و برهمکنش ریزنمونه، NAA و BAP برای درصد پینه‌زایی، وزن تر پینه، وزن خشک پینه، طول پینه، قطر پینه و حجم پینه معنی‌دار شد (جدول ۱). این نتیجه بیانگر متفاوت بودن تأثیر نوع ریزنمونه و ترکیبات مختلف هورمونی بر صفات مرتبط با پینه‌زایی است. به‌دلیل زیاد بودن تعداد تیمارهای پینه‌زایی (۱۰۰ تیمار)، جهت مقایسه میانگین برهمکنش ریزنمونه، BAP و NAA برای صفات اندازه‌گیری شده، تنها تعدادی از بهترین و ضعیف‌ترین ترکیبات هورمونی همراه با نوع ریزنمونه ذکر شده‌اند (جدول ۲). بیشترین درصد پینه‌زایی (۱۰۰ درصد) مربوط به ریزنمونه‌های ریشه، جنین برش خورده و ساقه در ترکیبات هورمونی مشخص شده در جدول ۲ می‌باشد. در تمام تیمارهای ذکر شده در جدول، اکسین NAA، به میزان‌های متفاوت ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌صورت ترکیب با سیتوکینین BAP و یا به تنهایی در محیط‌کشت وجود داشت. تمام ترکیبات هورمونی فاقد اکسین NAA برای تمام ریزنمونه‌ها و تعداد کمی ترکیب هورمونی دارای اکسین و سیتوکینین (ذکر شده در جدول ۲) فاقد پینه‌زایی (صفر درصد) بود. به‌طورکلی درصد پینه‌زایی در تیمارهای با ترکیب هورمونی اکسین و سیتوکینین نسبت به تیمارهای فاقد اکسین بیشتر بود. نتیجه حاصل از این آزمایش نشان داد که برش ایجاد شده در قسمت‌های انتهایی ریزنمونه‌ها، توانسته است القای پینه را تحریک نماید و لزوم ایجاد یک تماس مستقیم از ناحیه برش یافته با محیط حاوی هورمون جهت تحریک پینه‌زایی اثبات می‌شود. با توجه به اینکه القای پینه از نواحی برش یافته ریزنمونه آغاز شده، بنابراین توصیه شده که سطوح ریزنمونه‌ها قبل از کشت، زخمی شوند *شلتز* و همکاران (Schultz *et al.*, 1990). چون در محیط‌های فاقد اکسین NAA هیچ‌گونه پینه‌ای تشکیل نشد، بنابراین می‌توان گفت که در این گیاه، وجود اکسین جهت پینه‌زایی ضروری به‌نظر می‌رسد. ریزنمونه هر گونه گیاهی در کشت درون‌شیشه‌ای

به‌منظور تولید پینه، ترکیب هورمونی خاصی را نیاز دارد. بعضی گونه‌ها فقط با هورمون سیتوکینین یا اکسین تولید پینه می‌کنند و بعضی دیگر به ترکیب هر دو نوع هورمون نیاز دارند، *سرابادانی تفرشی* و همکاران (Sarabadani Tafreshi *et al.*, 2008). بیشترین وزن تر پینه مربوط به ریزنمونه جنین برش خورده در محیط‌کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. با توجه به تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از صفت وزن تر پینه می‌توان گفت که ریزنمونه جنین برش خورده به‌دلیل جوان بودن ریزنمونه نسبت به سایر ریزنمونه‌ها، عکس‌العمل بهتری به محیط‌کشت نشان داد و ریزنمونه‌های ساقه، برگ و ریشه به‌ترتیب در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند (جدول ۲). از ریزنمونه جنین برش خورده به‌منظور تولید پینه، در بسیاری از گیاهان ازجمله زیره پارسی، *ولیزاده* و همکاران (Valizadeh *et al.*, 2008)، زیره سبز، *ابراهیمی* و همکاران (Ebrahimie *et al.*, 2003) و باریجه، *سرابادانی تفرشی* (2008) استفاده شده است. ریزنمونه جنین در محیط‌کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون BAP، و هم‌چنین ریزنمونه برگ در ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین وزن خشک پینه را به خود اختصاص دادند. بیشترین طول پینه و قطر پینه باز هم مربوط به ریزنمونه جنین برش خورده در محیط‌کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون BAP بود. ریزنمونه‌های ساقه و ریشه نیز به‌ترتیب برای صفت طول پینه در ترکیبات هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند. برای صفت قطر پینه، ریزنمونه ریشه در ترکیب هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون BAP، بعد از جنین برش خورده بیشترین قطر پینه را به خود اختصاص داد. بالاخره از نظر صفت حجم پینه، ریزنمونه جنین برش خورده به‌ترتیب در ترکیبات هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین مقادیر را به‌خود اختصاص دادند. ریزنمونه ریشه نیز در ترکیبات هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین حجم پینه را بعد از جنین برش خورده به خود اختصاص داد.

جدول ۱: میانگین مربعات منابع تغییر برای صفات اندازه‌گیری شده در مرحله پینه‌زایی با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP

Table 1: Mean Squares of Sources of Variation for measured traits at callus induction stage using NAA and BAP growth regulators

حجم پینه Callus volum	قطر پینه Callus diameter	طول پینه Callus length	وزن خشک پینه Callus dry weight	وزن تر پینه Callus fresh weight	درصد پینه‌زایی Callus induction percentage	درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییر Sources of variation
0.15**	36.61**	220.18**	0.020**	12.22**	39720.76**	4	NAA
0.02**	7.62**	44.20**	0.006**	9.28**	4914.91**	4	BAP
0.13**	30.83**	138.26**	0.020**	17.66**	24348.31**	3	ریزنمونه Explant
0.02**	5.27**	23.17**	0.005**	3**	2685.39**	16	BAP×NAA
0.02**	4.15**	21.70**	0.002**	3.09**	3057.40**	12	ریزنمونه×NAA Explant×NAA
0.0003**	0.38**	3.24**	0.003**	1.55**	384.70**	12	ریزنمونه×BAP Explant×BAP
0.007**	1.78**	8.62**	0.003**	2.05**	916.29**	48	ریزنمونه× NAA×BAP Explant×BAP×NAA
0.0005	0.14	0.66	0.0001	0.022	129.63	200	خطا Error

** نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد

** significant at 1 percentage probability level

جدول ۲: مقایسه میانگین برهمکنش ریزنمونه ،BAP وNAA برای صفات اندازه‌گیری شده

Table 2: Means comparission of explant×BAP×NAA interaction for the measured traits

حجم پینه (میلی‌متر مکعب) Callus volum (mm^3)	قطر پینه (میلی‌متر) Callus diameter (mm)	طول پینه (میلی‌متر) Callus length (mm)	وزن خشک پینه (میلی‌گرم) Callus dry weight (mg)	وزن تر پینه (میلی‌گرم) Callus fresh weight (mg)	درصد پینه‌زایی Callus induction percentage	تیمار Treat: ریزنمونه Explant	Treat: BAP(mg/l)	Treat: NAA (mg/l)
0.25^{b}	03.55^{b-e}	7.44^{def}	9.6^{j-n}	49^{h-l}	100^{a}	ریشه Root	0.5	0.5
0.25^{b}	3.33^{c-g}	7.66^{c-f}	2.1^{h-l}	48^{j-m}	100^{a}	ریشه Root	1.5	0.5
0.21^{cde}	3.66^{bcd}	7.22^{efg}	2.6^{fgh}	56^{f-i}	100^{a}	جنین برش خورده Fragment embryo	2	0.5
0.18^{e-h}	2.66^{j-m}	6.66^{f-i}	2.9^{ef}	47^{klm}	100^{a}	ریشه Root	2	0.5
0.18^{e-h}	2.33^{k-p}	8.83^{bcd}	1^{s-x}	47^{klm}	100^{a}	ریشه Root	0.5	1
0.146^{h-i}	2.88^{f-k}	5.55^{i-l}	2.1^{h-l}	52^{-k}	100^{a}	جنین برش خورده Fragment embryo	1	1
0.15^{h-k}	2.66^{j-m}	7.66^{c-f}	1.9^{j-o}	43^{-n}	100^{a}	ریشه Root	1	1
0.19^{d-g}	3.16^{c-i}	7.83^{b-f}	2.83^{ef}	49^{i-l}	100^{a}	ریشه Root	1.5	1
0.18^{e-h}	3.05^{d-j}	7.5^{def}	2.8^{efg}	58^{g-k}	100^{a}	ریشه Root	2	1
0.23^{bc}	3.44^{b-f}	8.99^{b}	3.1^{e}	50^{h-l}	100^{a}	ساقه Shoot	2	1
0.38^{a}	5.49^{a}	11.33^{a}	6.4^{a}	253^{a}	100^{a}	جنین برش خورده Fragment embryo	0	1.5
0.1^{n-r}	3^{e-j}	8.66^{bcd}	1.8^{k-p}	109^{b}	66.6^{cd}	ساقه Shoot	0	2
0.16^{g-j}	2.5^{j-o}	7^{fgh}	6.2^{a}	57^{f-h}	77.73^{bc}	برگ Leaf	2	1
0.14^{h-m}	3.72^{bc}	7.66^{c-f}	2^{i-m}	53^{g-k}	100^{a}	ریشه Root	0	1.5
.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.		.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.
0a1	0e1	0z	0z	0t	0i	برگ Leaf	1	0.5
0a1	0e1	0z	0z	0t	0i	ساقه Shoot	1.5	0.5
0a1	0e1	0z	0z	0t	0i	برگ Leaf	1.5	0.5
0a1	0e1	0z	0z	0t	0i	ساقه Shoot	1	1
0a1	0e1	0z	0z	0t	0t	برگ Leaf	2	0.5
0a1	0e1	0z	0z	0t	0i	برگ Leaf	0	1
0a1	0e1	0z	0z	0t	0i	ریشه Root	1	2
0a1	0e1	0z	0z	0t	0i	برگ Leaf	1	2

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Mean followed by the same letter in each column, are not significantly different using LSmeans test at $p<0.05$.

علاوه‌بر صفات کمی اندازه‌گیری شده، دو صفت کیفی بافت و رنگ پینه نیز اندازه‌گیری شدند. با بررسی پینه‌های حاصل از ریزنمونه‌های مورد استفاده در آزمایش از نظر صفت بافت پینه مشخص شد که، ریزنمونه جنین برش خورده، دارای بافتی نرم، شل و آبکی بوده که براحتی از هم پاشیده می‌شدند و سایر ریزنمونه‌ها یعنی ریشه، ساقه و برگ به‌ترتیب دارای بافتی تقریباً سفت و فشرده بودند. مهم‌ترین ویژگی پینه این است که این توده سلولی دارای استعداد لازم برای اندام‌زایی، جنین‌زایی و تولید گیاه کامل باشد. بافت برخی از پینه‌های رشد کرده به شدت چوبی شده و سخت و فشرده می‌گردند، درحالی‌که بافت برخی دیگر از پینه‌ها، نرم بوده و به سهولت از هم پاشیده می‌شوند. به‌طورکلی با بررسی‌های انجام شده می‌توان گفت که چون پینه‌های حاصل از ریزنمونه‌های ریشه، ساقه و برگ فشرده‌تر بوده، بنابراین دارای کیفیت بالاتری نسبت به پینه‌های با منشأ جنین برش یافته هستند. از بین سه ریزنمونه ریشه، ساقه و برگ، پینه‌های حاصل از ریزنمونه ریشه از کیفیت مطلوب‌تری برخوردار بودند. پینه‌های حاصل از ریزنمونه‌های مورد استفاده در آزمایش از نظر صفت رنگ پینه، به‌خاطر قرار

گرفتن در وضعیت تاریکی، به رنگ‌های زرد، شیری و سفید درآمدند. از بین ریزنمونه‌های مورد استفاده در آزمایش، پینه‌های حاصل از ریزنمونه جنین برش خورده، شیری رنگ و سایر ریزنمونه‌ها (ریشه، ساقه و برگ) به رنگ زرد و سفید مشاهده شدند. چنانچه پینه‌های تولید شده در شرایط تاریکی، در معرض نور قرار می‌گرفتند، رنگ آن‌ها به‌صورت سبز درمی‌آمد. دلیل اصلی قرار دادن ریزنمونه‌ها در تاریکی این بود که تنها پینه تولید شود و با در معرض نور قرار گرفتن، باززایی از پینه رخ ندهد. گزارشات زیادی مبنی بر اثر ممانعتی نور بر پینه‌زایی گیاهان وجود دارد. در یک پژوهش گزارش شد که در حضور نور، فعالیت ایندول‌استیک‌اسید اکسیداز (IAA اکسیداز) افزایش یافته که سبب تغییر در تعادل اندوژنی بین اکسین و سیتوکینین گشته و تحریک پینه‌زایی را کاهش و به تأخیر می‌اندازد *گاسپر* و همکاران (Gasper *et al.*, 1982).

به‌طورکلی استفاده از ریزنمونه ریشه در تمام غلظت‌های اکسین NAA (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، صرف‌نظر از غلظت‌های سیتوکینین BAP به‌کار برده شده، جهت پینه‌زایی در این گیاه توصیه می‌شود (شکل ۱). در گیاه دارویی آنغوزه به‌منظور تولید پینه از ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و کوتیلدون حاصل از گیاهچه به‌دست آمده از کشت بافت، آزمایشی انجام شد و نتایج نشان داد که فراوانی القاء پینه در ریزنمونه ریشه به‌میزان قابل توجهی بیشتر از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون می‌باشد، همچنین از بین تیمارهای به‌کار رفته، هورمون NAA در ترکیب با BAP جهت تشکیل پینه مؤثرتر بود *زارعی* و همکاران (Zare *et al.*, 2010). در گیاه دارویی زیره پارسی، پینه‌زایی با استفاده از ریزنمونه جنین برش خورده صورت گرفت و بهترین تیمار پینه‌زایی، محیط‌کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و۲ میلی‌گرم در لیتر Kin معرفی گردید، *ولیزاده* و همکاران (2006). در گیاه زیره سفید نیز با استفاده از ریزنمونه جنین برش یافته، محیط‌کشت B5 حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، مناسب‌ترین ترکیب هورمونی معرفی شد، *صفرنژاد*، (Safarnejad, 2011). در گیاه باریجه ریزنمونه‌های ریشه (حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای جنین) و جنین برش یافته در محیط‌کشت ۱/۴MS حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین نتیجه را برای پینه‌زایی داشتند (*سرابادانی تفرشی*، 2008).

تأثیر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BAP بر پینه‌زایی ریزنمونه‌ها

حدود نه الی ده روز پس از کاشت ریزنمونه‌های ریشه، ساقه، برگ (حاصل از کشت جنین) و جنین برش خورده، تشکیل پینه مشاهده گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی نشان داد که کلیه اثرهای اصلی، برهمکنش‌های دوگانه و برهمکنش ریزنمونه و 2,4-D و BAP برای درصد پینه‌زایی، وزن تر پینه، وزن خشک پینه، طول پینه، قطر پینه و حجم پینه معنی‌دار شد (جدول ۳). این نتیجه نیز بیانگر متفاوت بودن تأثیر انواع ریزنمونه و ترکیبات مختلف هورمونی بر صفات مرتبط با پینه‌زایی است. در این مرحله از آزمایش نیز، به‌دلیل زیاد بودن تعداد تیمارهای پینه‌زایی (۱۰۰ تیمار)، تنها تعدادی از بهترین و ضعیف‌ترین ترکیبات هورمونی همراه با نوع ریزنمونه ذکر شده‌اند (جدول ۴). مقایسه میانگین برهمکنش ریزنمونه، 2,4-D و BAP نشان داد که بیشترین درصد پینه‌زایی مربوط به ریزنمونه‌های ریشه و برگ به‌ترتیب در ترکیبات هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. کمترین میزان درصد پینه‌زایی (صفر) نیز، مربوط به تمام ترکیبات هورمونی فاقد اکسین 2,4-D (در جدول ذکر نشده‌اند) و هم‌چنین تیمارهای مشخص شده در جدول (سطوح بالای اکسین 2,4-D) بود. با اینکه معمولاً 2,4-D به‌عنوان قویترین اکسین مطرح است و مشخص شده است که استفاده از مقادیر بالای اکسین بزرگ شدن طولی سلول و افزایش تقسیم سلول را سبب می‌شود *شهادتی مقدم*، (Shahadati-Moghadam, 2001)، اما در این آزمایش مشخص شد که افزایش در غلظت این هورمون نه تنها افزایش تولید پینه را به دنبال نداشت، بلکه خود عاملی در جهت تخریب سریع ریزنمونه بود. اغلب مطالعات نشان می‌دهد به‌طور معمول از میان اکسین‌ها، 2,4-D برای تمایززدایی و تولید پینه موثرتر می‌باشد و BAP نیز نسبت به دیگر سیتوکینین‌ها در تولید پینه کارآیی بالاتری دارد *دیکسوناند گونزالز* (Dixonand Gonzales, 1996). بیشترین میزان وزن تر پینه و وزن خشک پینه مربوط به ریزنمونه ریشه در ترکیب هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. ریزنمونه ریشه در دو ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۱ میلی‌گرم در لیترBAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین طول پینه را به خود اختصاص داد. بیشترین قطر پینه را نیز ریزنمونه ریشه در سه ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با

۰/۵میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۱/۵میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۱/۵میلی‌گرم در لیتر BAP به خود اختصاص داد. بالاخره از نظر صفت حجم پینه، ریزنمونه ریشه در ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین حجم پینه را به‌خود اختصاص داده است.

جدول ۳: میانگین مربعات منابع تغییر برای صفات مورد ارزیابی با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BAP

Table 3: Mean Squares of Sources of Variation for the measured traits using 2,4-D and BAP growth regulators

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی Degree of freedom	درصد پینه‌زایی Callus induction percentage	وزن تر پینه Callus fresh weight	وزن خشک پینه Callus dry weight	طول پینه Callus length	قطر پینه Callus diameter	حجم پینه Callus volum
2,4-D	4	25925.09**	8.15**	0.03**	181.62**	35.92**	0.07**
BAP	4	4837.50**	2.06**	0.004**	23.75**	5.63**	0.01**
ریزنمونه Explant	3	10878.37**	3.86**	0.01**	54.94**	15.48**	0.03**
2,4-D×BAP	16	687.70**	0.44**	0.001**	5.59**	1.05**	0.006**
ریزنمونه×2,4-D Explant×2,4-D	12	1953.64**	0.54**	0.003**	14.31**	3.42**	0.009**
ریزنمونه×BAP Explant× BAP	12	745.22**	0.30**	0.0005**	4.73**	1.30**	0.004**
ریزنمونه×2,4-D×BAP Explant× BAP ×2,4-D	48	1090.62**	0.52**	0.001**	6.14**	1.46**	0.005**
خطا Error	200	37.56	0.008	0.00006	0.12	0.04	0.00006

** نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد

** significant at 1 percentage probability level

نتایج حاصل از بررسی دو صفت کیفی بافت و رنگ پینه همانند آزمایش قبل بود، به‌گونه‌ای که پینه‌های حاصل از ریزنمونه‌های ریشه، ساقه و برگ دارای بافتی سفت و فشرده بودند و پینه حاصل از ریزنمونه جنین برش خورده بافتی شل و آبکی داشتند. از نظر صفت رنگ پینه نیز، پینه‌های حاصل از ریزنمونه ریشه، ساقه و برگ بیشتر به رنگ‌های زرد و سفید بودند، درحالی‌که پینه‌های به‌دست آمده از جنین برش خورده، شیری رنگ بودند.

به‌طورکلی، می‌توان گفت که ریزنمونه ریشه در ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP تقریباً از نظر تمام صفات، نتایج مطلوبی داشت (شکل ۲). با مطالعه‌ای بر روی دو جمعیت از گیاه رازیانه، محیط‌کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر Kin بهترین نتیجه برای پینه‌زایی معرفی گردید، *تیلر و کاگی* (Theiler & Kagi, 1991). در گیاه بادرنجبویه استفاده از ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای ریزنمونه‌های برگ در شرایط تاریکی پس از مدت ده روز، تولید پینه در نواحی برش خورده را به‌دنبال داشت، *سلطانی‌پور* (Soltanipoul *et al.*, 2011). به‌منظور بررسی تأثیر تیمارهای هورمونی بر کالوس‌زایی گیاه دارویی رازیانه، پنج ریزنمونه برگ، هیپوکوتیل، مریستم انتهایی، ریشه و طوقه با استفاده از تیمارهای هورمونی مختلف مورد آزمایش قرار گرفت، *سارخیل* (Sarkheil *et al.*, 2009). نتایج حاصل از آزمایش آنها نشان داد که تیمارهای ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، بهترین ترکیب هورمونی و هیپوکوتیل و مریستم انتهایی بهترین ریزنمونه‌ها جهت پینه‌زایی بودند. القای پینه در گیاه جعفری نیز با استفاده از ریشه‌چه‌های حاصل از کشت درون شیشه‌ای در محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل شد، *حجابی* (Hejabi *et al.*, 2009).

مقایسه ترکیبات هورمونی 2,4-D و BAP با NAA و BAP از نظر پینه‌زایی ریزنمونه‌ها

به‌طورکلی، القای پینه در ترکیبات هورمونی 2,4-D همراه با BAP کمتر از محیط‌های حاوی هورمون‌های NAA و BAP بود. دلیل این امر را می‌توان به اثر تخریب‌کنندگی غلظت‌های بالای 2,4-D بر روی ریزنمونه‌ها دانست. استفاده از هورمون NAA منجر به تولید پینه بیشتری نسبت به اکسین 2,4-D در گیاه زیره نیز گردیده است، *شریفی* (Sharifi, 1995). بنابراین

جهت پینه‌زایی در گیاه چویل، استفاده از اکسین NAA توصیه می‌شود، به این دلیل‌که اولاً تشکیل پینه در تمام غلظت‌های این اکسین مشاهده شد و ثانیاً این‌که در بعضی موارد جهت القاء پینه، نیازی به حضور سیتوکینین نبود و بدون حضور سیتوکینین نیز پینه تشکیل شد.

جدول ۴: مقایسه میانگین برهمکنش ریزنمونه، BAP و 2,4-D برای صفات اندازه‌گیری شده

Table 4: Means comparission of explant×BAP×2,4-D interaction for measured traits

حجم پینه (میلی‌متر مکعب) Callus volum (mm^3)	قطر پینه (میلی‌متر) Callus diameter (mm)	طول پینه (میلی‌متر) Callus length (mm)	وزن خشک پینه (میلی‌گرم) Callus dry weight (mg)	وزن تر پینه (میلی‌گرم) Callus fresh weight (mg)	درصد پینه‌زایی Callus induction percentage	تیمار Treat		
						ریزنمونه Explant	BAP(mg/l)	2,4-D (mg/l)
88.66^{a}	4^{a}	6.33^{bcd}	2.2^{ef}	49^{d}	88.66^{a}	ریشه Root	1.5	3
88.66^{a}	2.943^{b}	6.60^{bc}	3.86^{b}	45.3^{def}	88.66^{a}	برگ Leaf	1.5	1
77.73^{b}	2^{a}	6.22^{cd}	2.1^{fg}	45.3^{def}	77.73^{b}	ریشه Root	0.5	1
77.73^{b}	2.83^{b}	7.77^{a}	3.86^{b}	37^{hi}	77.73^{b}	ریشه Root	1	1
77.73^{b}	3.99^{a}	7.44^{a}	4.7^{a}	74^{a}	77.73^{b}	ریشه Root	1.5	1
74.95^{bc}	2.41^{c}	5.58^{ef}	2.2^{ef}	20^{op}	74.95^{bc}	ریشه Root	2	1
66.6^{c}	1.27^{jkl}	2.71^{op}	2.9^{cd}	63^{c}	66.6^{c}	جنین برش خورده Fragment embryo	0	1
66.6^{c}	2^{def}	4.5^{hij}	1.4^{jkl}	36^{hi}	66.6^{c}	ریشه Root	0	1
66.6^{c}	2.73^{b}	6.10^{cde}	2.3^{ef}	49.6^{def}	66.6^{c}	ساقه Shoot	0	1
66.6^{c}	2.83^{b}	5.33^{fg}	30^{c}	68^{b}	66.6^{c}	برگ Leaf	0	1
66.6^{c}	2.73^{b}	4.88^{ghi}	1.3^{j-m}	33.6^{ijk}	66.6^{c}	جنین برش خورده Fragment embryo	0.5	1
.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.
0^{o}	0^{o}	0^{t}	0^{q}	0^{t}	0^{g}	ساقه Shoot	1	4
0^{o}	0^{o}	0^{t}	0^{q}	0^{t}	0^{g}	ریشه Root	1.5	4
0^{o}	0^{o}	0^{t}	0^{q}	0^{t}	0^{g}	ساقه Shoot	1.5	4
0^{o}	0^{o}	0^{t}	0^{q}	0^{t}	0^{g}	جنین برش خورده Fragment embryo	1.5	4
0^{o}	0^{o}	0^{t}	0^{q}	0^{t}	0^{g}	ریشه Root	2	4
0^{o}	0^{o}	0^{t}	0^{q}	0^{t}	0^{g}	ساقه Shoot	2	4
0^{o}	0^{o}	0^{t}	0^{q}	0^{t}	0^{g}	برگ Leaf	2	4

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت ندارند

Mean followed by the same letter in each column, are not significantly different using LSmeans test at $p<0.05$

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۲۰-۲۱ متن انگلیسی مراجعه شود.