تولید جنیـــن‌های ســـــوماتیکی در اندام‌های مختـــلف دو رقـــم نخـــود زراعـــی (*Cicer arietinum* L.)

Somatic Embryogenesis in Different Organs of Two Cultivars Chickpea *(Cicer arietinum* L.)

علی‌اکبر مظفری[1*]، کژال کمانگر[2] و لیا شوشتری[3]

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۹/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۹/۲۵

چکیده

عدم‌وجود سیستم مؤثر و کارآ برای باززایی گیاه نخود در شرایط درون‌شیشه‌ای، یکی از محدودیت‌های اصلی در رابطه با دست‌ورزی سلولی و ژنتیکی نخود می‌باشد. از طریق تکنولوژی کشت بافت، ارتقاء و بهبود این محصول جهت ایجاد و توسعه ارقام مقاوم به بیماری و واریته‌های پرعملکرد فراهم می‌گردد. در دو دهه اخیر برای تولید گیاهان تراریخته و انتقال ژن با استفاده از تکنیک‌های جدید مانند جنین‌زایی سوماتیکی و تولید کالوس مطالعات وسیعی در دست اجراست. در این مطالعه برای انگیزش جنین‌زایی سوماتیکی در نخود زراعی از ارقام پیروز و کاکا استفاده شد. برای انجام آزمایش از ریزنمونه‌های مختلف (برگ، هیپوکوتیل و اپی‌کوتیل) و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد (زآتین (Zea)، بنزیل‌آدنین (BA)، نفتالیناستیک اسید (NAA) و ۲،۴ – دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید (2,4-D)) استفاده شد. آزمایشات شامل دو مرحله بود؛ مرحله اول انگیزش کالوس جنین‌زا و مرحله دوم جنین‌زایی سوماتیکی کالوس‌های جنین‌زا روی محیط‌کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی چهار غلظت (۲، ۳، ۴ و۵ میلی‌گرم در لیتر) 2,4-D و NAA تولید شدند. حداکثر کالوس جنین‌زا در رقم کاکا از ریزنمونه هیپوکوتیل (۹۶/۳٪) روی محیط‌کشت حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌دست آمد. برای تولید جنین‌های سوماتیکی، کالوس‌های جنین‌زا به محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و 2,4-D، محیط‌کشت MS ½ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر Zea و محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D انتقال داده شدند. بالاترین فراوانی جنین سوماتیکی مرحله قلبی (۵۸/۳۳٪) در رقم کاکا از ریزنمونه‌های برگ روی محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و 2,4-D حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: نخود، جنین‌زایی، القاءکالوس، تنظیم‌کننده رشد

۱. استادیار گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، سنندج

۲. دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، کرمانشاه

۳. استادیار گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، کرمانشاه

*: نویسنده مسوول Email: a.mozafari@uok.ac.ir

مقدمه

نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) گیاهی دیپلوئید از خانواده بقولات است. جنس *Cicer* دارای ۴۳ گونه، شامل نه گونه نخود یک‌ساله، ۳۳ گونه چندساله و یک گونه نامشخص می‌باشد (آقایی و کانونی، ۱۳۸۳). اگرچه نخود دارای گونه‌های وحشی زیادی است که دارای صفات مطلوبی هستند، اما تلاقی آن‌ها با گونه زراعی از طریق روش‌های مرسوم اصلاح نباتات، موفقیت‌آمیز نبوده است. برای همین استفاده از تکنیک‌های جدید مانند مهندسی ژنتیک برای انتقال ژن‌های ایجادکننده مقاومت به آن، احساس می‌شود *کریشناموراتی* و همکاران (Krishnamurthy *et al*., 2000). جنین‌زایی سوماتیکی نه فقط برای تولید گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه مهم است، بلکه برای ایجاد گیاهان تراریخته، دارای اهمیت ویژه‌ای است *مشایخی و نظام‌آبادی* (Mashayekhi and Nezamabadi, 2000).

در کنار استفاده از روش‌های کلاسیک اصلاحی و تکنیک‌های بیوتکنولوژی همچون مهندسی ژنتیک، استفاده از روش‌های کشت‌بافت به‌عنوان ابزاری کارآمد در اکثر مواقع ضروری است *مرکل و نیام* (Merkle and Nairn, 2005). استفاده موثر از تکنیک‌های کشت‌بافت برای اصلاح نخود نیاز به استانداردسازی دستورالعمل‌های مربوط به باززایی قابل‌تکرار این گیاه دارد *ناز* (Naz, 1995). لذا دست‌یابی به روش‌های مناسب کشت‌بافت و بهینه‌سازی جنین‌زایی سوماتیکی و تولید بذر مصنوعی در بهبود تولید این محصول در آینده لازم به نظر می‌رسد. از آنجا که جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی از این طریق، روشی مؤثر برای انتقال ژن به گیاهان می‌باشد، بررسی و بهینه‌سازی جنین‌زایی و باززایی در گیاه نخود، زمینه را برای اصلاح آن از طریق مهندسی ژنتیک فراهم خواهد کرد.

نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و وضعیت فیزیولوژیکی ریزنمونه، مهم‌ترین فاکتورهایی هستند که در جنین‌زایی مستقیم و غیرمستقیم نقش دارند. در میان سیگنال‌هایی که به‌طور مستقیم در تنظیم مراحل مختلف جنین‌زایی شرکت می‌کنند، هورمون‌های گیاهی مهم‌ترین نقش را دارند جیمنز و *توماس* (Jimenez and Thomas, 2005). غلظت بالای اکسین به‌طور پیوسته پس از مرحله کروی در تمام مراحل بعدی توسعه جنین را کاهش می‌دهد *توکوجی و کوریاما* (Tokuji and Kuriyama 2003). دو، چهار- دی‌کلروفنوکسی‌استیک (2,4-D) نقش کلیدی در القاء جنین‌زایی سوماتیکی دارد زیرا موجب بیان ژن‌های مربوط به تنش می‌شود، و سایر تحریک‌کننده‌های جنین‌زایی را نیز فعال می‌کند *کیتامیا؛ فیروز- فیگرا* و همکاران (Kitamiya *et al*., 2000; Quiroz-Figueroa *et al*., 2006).

نتایج *راو* (Rao, 1990) نشان داد که کوتیلدون، اپی‌کوتیل، قطعات ریشه دارای سه میلی‌متر طول، اولین برگچه و مریستم انتهایی نخود به‌عنوان ریزنمونه جهت جنین‌زایی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. *بارنا و واکلو* (Barna and Wakhlu, 1993) با کشت کالوس حاصل از برگچه نخود توانستند در سطح کالوس تعداد زیادی جنین کروی ایجاد نمایند. با حذف 2,4-D از محیط‌کشت این جنین‌های کروی به جنین‌های سوماتیکی بالغ تبدیل شدند. آنها توانستند دو درصد از جنین‌ها را به گیاهان با ویژگی‌های مورفولوژی نرمال تبدیل نمایند. *ناز* و همکاران (Naz *et al*., 2008) توانستند از کالوس حاصل از ریزنمونه کوتیلیدون نخود جنین‌های سوماتیکی به‌دست آورند که با انتقال جنین‌های گلبولار به محیط‌کشت دارای زآتین و ایندول‌استیک‌اسید (IAA)، جنین کوتیلیدونی ایجاد کنند. طبق نتایج *ناز* و همکاران (2008) حدود ۴۵ درصد جنین‌های کروی حاصل از کشت کوتیلیدون نارس و برگ‌های جوان نخود در محیط‌کشت حاوی 2,4-D و بنزیل‌آمینوپورین (BAP) تکامل یافتند. *کیران* و همکاران (Kiran *et al*., 2010) توانستند از کوتیلیدون نارس دو رقم نخود Annigeri و ICCV-10 جنین‌های سوماتیکی کروی ایجاد نمایند با انتقال این جنین‌ها به محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسایزیک‌اسید (ABA)، ۳۶/۶ درصد از جنین‌ها به مرحله کوتیلدونی رسیدند. در نهایت درصد زنده ماندن گیاهچه‌ها بعد از انتقال به خاک ۴۰ درصد برآورد گردید.

نظر به این‌که انتقال صفات مطلوب زراعی از گونه‌های وحشی نخود از طریق روش‌های مرسوم اصلاح نباتات، موفقیت‌آمیز نبوده است و امروزه برای انتقال ژن‌های ایجادکننده مقاومت به نخود زراعی نیاز به تولید جنین‌های سوماتیکی و استفاده از تکنیک‌های جدید مانند مهندسی ژنتیک دارد، هدف از انجام این پژوهش تعیین مناسب‌ترین ریزنمونه و بهترین محیط‌کشت برای تولید جنین‌های سوماتیکی و توسعه آن جهت کاربرد در تکنیک انتقال ژن در ارقام مورد مطالعه بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال‌های ۱۳۸۸تا ۱۳۸۹در دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان انجام شد. برای انجام این تحقیق از بذر دو

رقم نخود پیروز و کاکا جهت تهیه هیپوکوتیل، اپی‌کوتیل و برگ‌های جوان به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد.

استریل‌نمودن مواد گیاهی

برای تهیه ریزنمونه عاری از پاتوژن، ابتدا بذور مورد استفاده با اتانول ۹۶٪ به‌مدت دو دقیقه و بعد در هیپوکلریت‌سدیم دو درصد (کلرفعال) به‌مدت ۲۵ دقیقه ضدعفونی شدند، و در پایان برای حذف اثر مواد استریل‌کننده سه تا چهار بار بذور با آب مقطر استریل و هر بار حدود ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند.

تهیه محیط‌کشت

محیط‌کشت بر اساس فرمول پیشنهادی *موراشیگ و اسکوگ* (Murashige and Skoog, 1962) تهیه و سپس pH محلول روی ۵/۸ تنظیم و در نهایت هشت گرم آگار به آن اضافه شد. هنگام توزیع مقدار۴۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت در شیشه‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته و در اتوکلاو به‌مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. محیط‌های کشت پس از سرد شدن تا زمان کشت در یخچال در دمای چهار تا پنج درجه سانتی‌گراد *امیر اسلام* و همکاران (Amir Islam *et al.*, 2005) نگهداری شدند.

تهیه ریزنمونه

برای تهیه ریزنمونه و شروع آزمایش ابتدا بذور استریل شده بر روی محیط‌کشت پایه MS ½ فاقد ساکارز و تنظیم‌کننده رشد قرار داده شدند. پس از گذشت سه الی چهار روز بذرها در هر دو رقم جوانه زدند. ریزنمونه‌های موردنظر در شرایط استریل از بذر جدا و به قطعات کوچک‌تر (هیپوکوتیل و اپی‌کوتیل هرکدام به طول یک سانتی‌متر و برگ‌های جوان به مساحت تقریباً ۰/۵ سانتی‌مترمربع) تقسیم شدند و سپس روی محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد NAA در غلظت‌های سه، چهار و پنج میلی‌گرم در لیتر جهت القای کالوس‌زایی قرار داده شدند. برای کالوس‌زایی ابتدا ریزنمونه‌های کشت شده به مدت دو هفته در شرایط تاریکی و در دمای ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از گذشت این مدت کلیه تیمارها در همان شرایط دمای، در فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و شدت نور $\mu mol/m^{-2}s^{-1}$ ۳۸ قرار داده شدند تا کالوس‌زایی صورت گیرد. تمامی تیمارهای مرحله کالوس‌زایی با سه تکرار و در هر تکرار شش ریزنمونه تعیین گردیدند. در مرحله جنین‌زایی از 2,4-D در غلظت‌های دو، سه ، چهار و پنج میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. کلیه تیمارهای مرحله جنین-زایی در سه تکرار و در هر تکرار پنج ریزنمونه در نظر گرفته شد. در این مرحله نیز تمامی تکرارها برای مدت دو هفته در شرایط تاریکی قرار داده شدند و سپس در فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و شدت نور $\mu mol/ m^{-2}s^{-1}$ ۳۸ قرار داده شدند تا جنین‌زایی آغاز گردد. در مرحله توسعه جنین‌های سوماتیکی یعنی تبدیل جنین‌های گلبولار به جنین‌های قلبی و سپس لپه‌ای از محیط‌کشت MS ½ حاوی زآتین۱ میلی‌گرم در لیتر، محیط‌کشت MS حاوی BA و 2,4-D هر کدام به‌غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و محیط‌کشت MS حاوی BA و 2,4-D هر کدام به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. کلیه تیمارهای مرحله توسعه جنین در سه تکرار و در هر تکرار چهار ریزنمونه (کالوس دارای جنین گلبولار) و هرکالوس به وزن ۲۳۵ تا ۲۶۵ میلی‌گرم انتخاب شدند. صفات مورد بررسی در این پژوهش تعداد جنین‌های کروی شکل، قلبی شکل و لپه‌ای در هر ریزنمونه و درصد تبدیل جنین‌های کروی به قلبی و جنین‌های قلبی به لپه‌ای بودند.

ریشه‌زایی شاخساره‌ها

وقتی که اندازه شاخساره‌های حاصل از نمو جنین‌ها به حدود چهار تا پنج سانتی‌متر رسیدند برای ریشه‌زایی به محیط‌کشت MS ½ حاوی دو درصد ساکارز و بدون تنظیم‌کننده رشد، *ناز* و همکاران (2008) منتقل شدند تا ریشه‌زایی در آنها صورت گیرد.

آدابته کردن گیاهچه‌ها

بعد از مرحله ریشه‌زایی و به‌منظور سازگاری، گیاهچه‌های دارای ریشه‌های سه تا پنج سانتی‌متری از داخل ظروف کشت خارج و برای حذف بقایای محیط‌کشت، ریشه‌ها با آب معمولی شستشو داده شدند. سپس ریشه‌ها و برگ‌های اضافی حذف و در گلدان‌های سه لیتری محتوی پرلیت، پیت و خاک زراعی به نسبت ۱:۱:۱ قرار داده شدند. برای حذف آفات و امراض خاکزی خاک گلدان‌ها با استفاده از محلول آب داغ پرمنگنات پتاسیم یک درصد استریل شدند. پس از قرار دادن گیاهچه‌ها در خاک، کلیه گلدان‌ها در شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰ درصد در فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در زیر پوشش شفاف نایلونی قرار داده شدند. پس از ظهور اولین برگ‌های جدید و آغاز ریشه‌زایی به تدریج طی سه روز پوشش به‌طور کامل از روی گیاهچه‌ها برداشته و گیاهان باززایی شده در شرایط طبیعی قرار گرفتند.

تجزیه‌های آماری

داده‌های حاصل از یادداشت‌برداری صفات مختلف براساس روش آماری فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه-وتحلیل گردیدند. تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن(Duncan)، در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ انجام گرفت.

نتایج و بحث

در این تحقیق ریزنمونه‌های برگ، اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل حاصل از کشت بذر دو رقم نخود پیروز و کاکا در محیط‌کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و 2,4-D در غلظت‌های مختلف کشت گردیدند. در محیط‌های کشت حاوی 2,4-D در غلظت‌های دو، سه، چهار و پنج میلی‌گرم در لیتر، ریزنمونه‌ها در هر دو رقم نخود تولید کالوس جنین‌زا نمودند هر چند که به لحاظ میزان و نوع کالوس از هم متفاوت بودند. این ریزنمونه‌ها همچنین در محیط‌کشت حاوی NAA در غلظت‌های سه، چهار و پنج میلی‌گرم در لیتر ایجاد کالوس نمودند، اما کالوس‌ها غیرجنین‌زا بودند (شکل ۱).

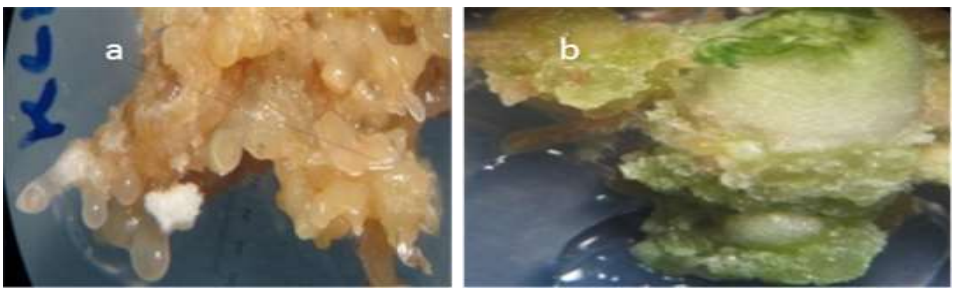
جدول ۱: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف NAA بر درصد تشکیل کالوس ریزنمونه اندام‌های مختلف نخود

Table 1: Analysis of variation for the effect of different concentration of NAA on the callogenesis in different explants of chickpea

منبع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی Degree of Freedom	میانگین مربعات (MS) Mean of Squres
ژنوتیپ (A) Genotype	1	1849.18**
محیط‌کشت (B) media	2	10674.05**
ریزنمونه (C) explant	2	6240.72**
A×B	2	2101.68**
A×C	2	475.12**
B×C	4	158.19**
A×B×C	4	302.87*
خطا Error	36	58.25
CV(%)	-	13

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

*and**Significant at %5 and 1% level respectively



شکل ۱: تولید کالوس با خصوصیات مرفو- فیزیولوژیکی متفاوت تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف: a- کالوس غیرجنین‌زا تحت تأثیرNAA؛ b- کالوس جنین‌زا تحت تأثیر 2,4-D

Fig. 1: Effect of different growth regulators on induction of calluswith different morpho- physiological traits (a): non embryogenic calli in NAA medium (b): embryogenic calli in 2,4-D medium

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که درصد تشکیل کالوس در سطوح مختلف NAA و ریزنمونه‌های مختلف در هر دو رقم تفاوت معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) وجود دارد. همچنین اثر متقابل بین رقم، محیط‌کشت و ریزنمونه در سطح ۵٪ معنی‌دار شد. اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر ایجاد کالوس‌های جنین‌زا در ریزنمونه هر سه اندام نشان داد که با

افزایش غلظت 2,4-D تعداد جنین‌های کروی در ریزنمونه‌ها افزایش می‌یابد (جدول ۲). یعنی تا غلظت پنج میلی‌گرم در لیتر که در این پژوهش مورد آزمایش قرار گرفت، بین غلظت این تنظیم‌کننده رشد و تعداد جنین‌های کروی شکل رابطه مستقیمی وجود داشت. نتایج *کهریزی* و *سورنی* (Kahrizi and Soorni, 2013) روی جنین‌زایی زیره سبز نشان داده است که با افزایش غلظت 2,4-D فراوانی جنین‌های سوماتیکی افزایش می یابد. براساس نتایج اگرچه هر سه ریزنمونه تحت اثر 2,4-D تولید جنین نموده‌اند، اما نوع ریزنمونه در تشکیل تعداد جنین تاثیرگذار بود، به‌طوری‌که تعداد جنین‌های کروی تشکیل شده در هیپوکوتیل بیشتر از برگ و اپی‌کوتیل بود (جدول ۲). این بررسی مشخص نمود که عامل ژنوتیپ، ریزنمونه و محیط کشت در القاء جنین‌زایی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. *بارنا و اخلو* (Barna and Ekhlo, 1993) که از ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌های مختلف نخود استفاده کرده بودند نتایج مشابهی را ارائه داده‌اند. به‌نظر می‌رسد نحوه‌ی قرار دادن ریزنمونه بر روی محیط‌کشت بر شکل و نحوه کالوس‌دهی مؤثر باشد، اما در این پژوهش روی این موضوع بررسی خاصی صورت نگرفت.

افزایش غلظت NAA سبب افزایش درصد کالوس‌زایی در همه ریزنمونه‌ها شد، به‌نحوی‌که حداکثر کالوس‌زایی در غلظت پنج میلی‌گرم در لیتر حاصل گردید (شکل ۲). مقایسه این دو نوع اکسین نشان می‌دهد که اکسین‌ها در تولید کالوس تأثیرگذار هستند، اما نوع تأثیرات آنها با هم متفاوت است. کالوس‌های حاصل از NAA فاقد جنین بودند درحالی‌که 2,4-D در گیاه نخود کالوس‌های جنین‌زا تولید نمود (شکل ۱). NAA در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر نتوانست در ریزنمونه‌ها ایجاد کالوس نماید، لذا از آوردن آن در نمودار صرف‌نظر شد.

در آزمایش کالوس‌زایی (آزمایش اول) بعد از گذشت چهار تا پنج هفته دو نوع کالوس قابل تشخیص بود. نوع اول، کالوس‌های زرد رنگ و کاملاً فشرده که به سختی از بافت جدا می‌شدند. این نوع کالوس‌ها تولید جنین نمودند و نوع دوم، کالوس‌هایی به رنگ سبز کم رنگ و حالت پنبه‌ای داشته، که به‌راحتی از بافت جدا می‌شدند، در این نوع کالوس‌ها هیچ نوع جنین‌زایی مشاهده نشد (شکل ۱). *جیمنز و بانگرد* (Jimenez and Bangerth, 2001) بیان داشتند که فقط کالوس‌های کروی و با سطح فشرده قابلیت جنین‌زایی داشته و کالوس‌های زبر و شکننده و نیمه‌شفاف قابلیت جنین‌زایی ندارند. در بین اندام‌های مختلف ریزنمونه برگ نسبت به دو ریزنمونه دیگر زودتر شروع به تشکیل کالوس نمود، هیپوکوتیل حدود هفت روز دیرتر از برگ وارد فاز تولید کالوس شد. اما اختلاف محسوسی از لحاظ آغاز تشکیل کالوس در بین ارقام مشاهده نشد. به لحاظ مورفولوژیکی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ بزرگ‌تر و نرم‌تر از کالوس‌های هیپوکوتیل و اپی‌کوتیل بودند. تفاوت در کالوس‌زایی اندام‌های مختلف می‌تواند ناشی از شرایط فیزیولوژیکی و آناتومی اندام‌ها باشد. تحقیقات گردکانه و همکاران (۱۳۸۹) نیز تفاوت شروع تشکیل کالوس در بین ریزنمونه اندام‌های مختلف توت‌فرنگی را گزارش نموده‌اند.

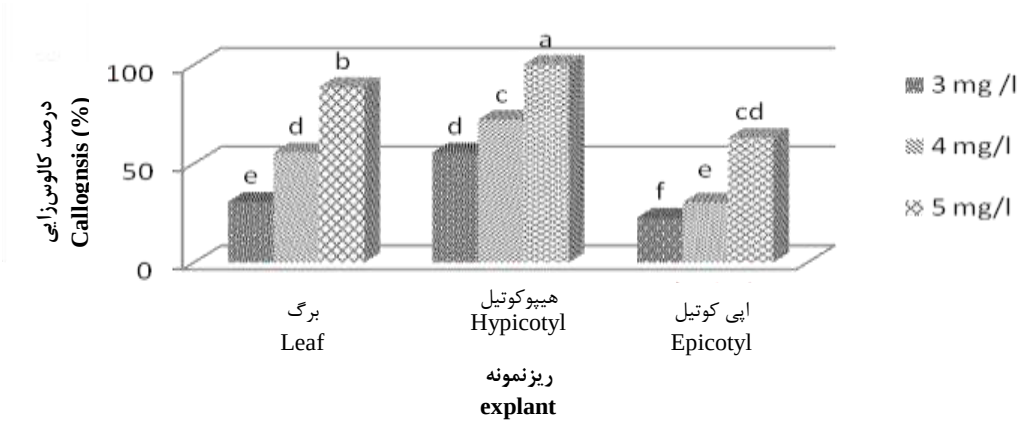
جدول ۲: مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر تعداد جنین های کروی شکل در ریزنمونه‌های مختلف ارقام کاکا و پیروز نخود

Table 2: Mean comparison of the effect of 2,4-D different concentrations on number of globular embryos from different explants in Cvs. Kaka & Pirooz cultivars of chickpea.

میانگین تعداد جنین کروی در هر ریزنمونه Means of numerous globular embryo in each explants			
هیپوکوتیل Hypocotyl	اپی‌کوتیل Epicotyl	برگ Leaf	2,4-D(mg/l)
41.1ed	16.3g	21.4f	2
55.7d	22.2f	30.7e	3
72.2c	30.3f	55.7d	4
100.1a	63.00cd	88.7b	5

*: اعداد ستون‌ها و ردیف‌های با حروف مشابه نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن اختلاف بین تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح آماری ۱ درصد می‌باشند

*: Means followed by the same letter within each columns and rows are not significantly different at the 0.01 level, according to the Duncan's multiple range test



شکل ۲: مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف NAA بر درصد کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های مختلف ارقام نخود کاکا و پیروز

Fig. 2: Mean comparison of the effect of NAA different concentrations on percentage callogenesis from different explants of 2 cv. Kaka & Pirooz chickpea

*: حروف مشابه در روی هر یک از ستون‌ها نشان‌دهنده معنی دار نبودن بین تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح آماری ۱ درصد می‌باشند

*: Means followed by the same letter within each columns are not significantly different at the 0.01 level, according to the Duncan's multiple range test

در آزمایش دوم برای ادامه رشد و توسعه جنین‌های کروی، کالوس‌های جنین‌زا به محیط‌کشت MS فاقد تنظیم‌کننده رشد (شاهد) انتقال داده شدند اما هیچ‌گونه تغییری در جنین‌های کروی مشاهده نشد فقط برخی از کالوس‌ها ریشه‌دار شدند. همچنین در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA جنین‌ها از حالت کروی خارج نشده و کالوس‌ها بعد از گذشت یک هفته قهوه‌ای رنگ شدند. در سه محیط‌کشت دیگر (یعنی BA به‌همراه 2,4-D هر کدام به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و نیز BA همراه با 2,4-D هر کدام به غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و محیط‌کشت حاوی زآتین یک میلی‌گرم در لیتر نتایج قابل قبولی به‌دست آمد (جدول ۳ و شکل ۳).

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که محیط‌های کشت مختلف اثرات متنوعی بر نمو و بلوغ جنین‌های سوماتیکی و رسیدن آن‌ها به مرحله لپه‌ای دارند. نوع رقم و ریزنمونه و اثر متقابل آنها در توسعه و بلوغ جنین‌های سوماتیکی به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) تأثیرگذار بودند. در چندین سیستم کشت از جمله محورهای جنین گردو *فرناندز* و همکاران (Fernendez *et al.*, 2000)، گیاهچه بادام‌زمینی *ویکتور* و همکاران (Victor *et al.*, 1999) و جنین‌های زیگوتی آفتابگردان *توماس* و همکاران (Thomas *et al.*, 2004) مسیر اندام‌زایی شاخساره یا جنین‌زایی سوماتیکی، تنها از طریق تغییر تنظیم‌کننده‌های رشد تفاوت پیدا می‌کند.

غلظت‌های کم تنظیم‌کننده‌های رشد در توسعه جنین‌های کروی به جنین قلبی و کوتیلیدونی مؤثرتر بودند، یعنی اضافه‌نمودن ۰/۵میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر2,4-D به محیط‌کشت در مقایسه با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد تعداد جنین‌های سوماتیکی مرحله قلبی و لپه‌ای را به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) افزایش داد (جداول ۳ و ۴). احتمالاً 2,4-D می‌تواند از طریق فعالیت اکسینی قوی با نفوذ و تأثیرگذاری در متابولیسم درونی سایر فیتوهورمون‌ها، جنین‌زایی سوماتیکی را به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم تنظیم کند. از طرف دیگر 2,4-D می‌تواند به‌عنوان یک عامل تنش‌زای قوی منجر به جنین‌زایی سوماتیکی شود. این فرضیه با توجه به این واقعیت که جنین‌زایی سوماتیکی توسط چندین تیمار تنش‌زا می‌تواند شروع شود *گاج* (Gaj, 2004)، تقویت می‌گردد. در بیشتر پروتکل‌ها اکسین به‌عنوان یک القاءکننده کارآمد جنین‌زایی سوماتیکی عمل می‌کند *زارع* و همکاران (Zare *et al.*, 2010)؛ گردکانه و همکاران (۱۳۸۹). نتایج تحقیق حاضر اثر مثبت تنظیم‌کننده رشد BA همراه با 2,4-D بر توسعه جنین نخود را نشان داد. در بیشتر مواردی که سیتوکینین‌ها جنین‌زایی سوماتیکی را القاء می‌کنند، این عمل همراه با اکسین انجام گرفته است *گاج* (2004). با این حال، در برخی از موارد، اضافه کردن سیتوکینین‌ها به‌عنوان منبع اصلی تنظیم‌کننده‌های رشد برای ایجاد جنین سوماتیکی کافی است *اینتاچیوا* و همکاران؛ *برونر* و همکاران(Iantcheva *et al.*, 1999; Bronner *et al.*, 1994).

براساس نتایج میزان توسعه جنین‌ها در ارقام مختلف نخود متفاوت بود و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در بین آن‌ها

مشاهده گردید. مقایسه میانگین‌های اثر متقابل رقم با محیط-کشت و نوع ریزنمونه حاکی از آن است که درصد تشکیل جنین قلبی و لپه‌ای در بین دو رقم و سه ریزنمونه در محیط-کشت پایه MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف، تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای ($p>0/01$) مشاهده شد (جدول ۳). ریزنمونه برگ متعلق به رقم کاکا در بین ریزنمونه‌های مورد مطالعه بیشترین درصد تبدیل جنین به مراحل قلبی (جدول ۳) و لپه‌ای (جدول ۴) را در سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد را داشته و در مقایسه میانگین به روش آزمون دانکن در رتبه اول قرار گرفت. هیپوکوتیل در رتبه دوم و اپی‌کوتیل پایین‌ترین رتبه را به خود اختصاص داد. در مورد نقش نوع بافت در جنین‌زایی سوماتیکی، تحقیقات متعددی انجام گرفته که بر پایه این تحقیقات تفاوت‌های زیادی میان ریزنمونه‌های پاسخ‌دهنده و غیرپاسخ‌دهنده وجود دارد *علی* و همکاران (Ali *et al.*, 2007)؛ *جیمنز و بانگرد* (2001). که امر از مشارکت هورمون‌های درونی گیاهی در توانمندی جنین‌زائی حکایت دارد.

جدول ۳: اثرات متقابل رقم، نوع ریزنمونه و محیط‌کشت بر درصد تبدیل جنین کروی به قلبی شکل

Table 3: The interaction effects of cultivars, explants and mediums on percentage of development of globular embryos to heart shape embryos

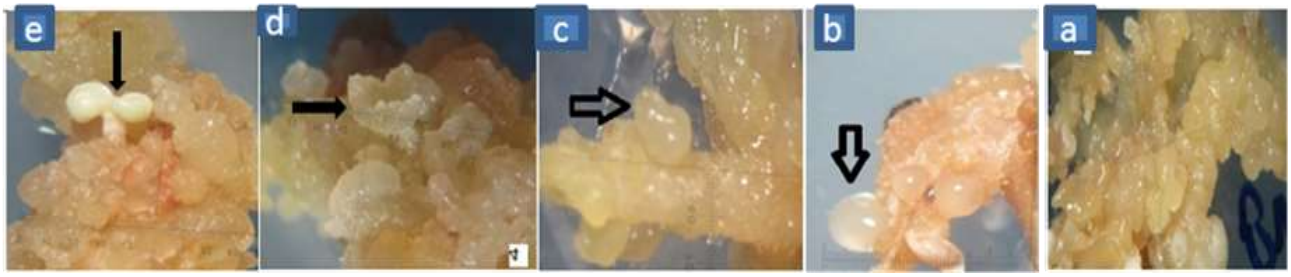
نوع محیط‌کشت mediums	تبدیل جنین کروی به جنین قلبی شکل (درصد) Exchange of globular embryo to heart shape(%)		
	برگ Leaf	اپی‌کوتیل Epicotyl	هیپوکوتیل Hypocotyl
رقم کاکا** Kaka Cultivar			
1	40.0b	22.7efgh	32.7 cd
2	58.3 a	32.7cd	43.7b
3	33.3c	19.3ghij	26.0ef
رقم پیروز** Pirooz Cultivar			
1	29.3de	15.3jkl	21.7efghi
2	41.7b	25.0efg	16.7ijk
3	23.3efg	8.3m	3.3m

*: حروف مشابه در روی هر یک از ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن بین تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح آماری ۱ درصد می‌باشند

*: Means followed by the same letter within each columns are not significantly different at the 0.01 level, according to the Duncan's multiple range test.

**:۱- محیط‌کشت MS ½ حاوی تنظیم‌کننده رشد زآتین ۱ میلی‌گرم در لیتر؛ ۲- محیط‌کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد BA و 2,4-D هر کدام به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر؛ ۳- محیط‌کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد BA و 2,4-D هر کدام به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر

**: 1. half-strength MS medium containing 1 mg/l Zeatin; 2. MS medium containing 0.5 mg/l BA and 2,4-D; 3. MS medium containing 1 mg/l BA and 2,4-D



شکل۳: اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر مراحل مختلف جنین‌زایی سوماتیکی؛ a. کالوس جنین‌زا ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی ۳ میلی گرم در لیتر 2,4-D؛ b. جنین کروی شکل در همان محیط‌کشت؛ c. جنین مرحله قلبی شکل در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر2,4-D؛ d. جنین مرحله لپه‌ای؛ e. جنین لپه‌ای

Fig. 3: The Effect of growth regulators Source and Concentration on different stages of somatic embryogenesis: (a) embryogenic callus from leaf explants on media containing 3 mg/l 2,4-D ; (b) Globular embryo formed on same medium; (c) Heart shaped embryo on media containing 0/5 mg/l BA and 2,4-D; (d) Cotyledonary shaped embryo; (e) Cotyledonary shaped embryo

شکل ۴: مقاوم‌سازی و انتقال گیاهچه نخود به محیط طبیعی (گلخانه)
Fig. 4: hardening and translation of chickpea plantlet to *in vivo* (greenhouse)

جدول ۴: اثرات متقابل رقم با نوع ریزنمونه و محیط‌کشت بر درصد تبدیل جنین قلبی شکل به جنین لپه‌ای (کوتیلیدونی)
Table 4: The interaction effects of cultivars, explants and mediums on percentage of development heart shape to cotyledonary shape embryos.

نوع محیط کشت Medium	تبدیل جنین قلبی شکل به جنین لپه‌ای (درصد) Exchange of heart shape to torpedo embryo (%)		
	برگ Leaf	اپی‌کوتیل Epicotyl	هیپوکوتیل Hypocotyl
رقم کاکا** Kaka Cultivar			
1	30.3b	10.3hi	20.0cde
2	36.7a	22.6cd	31.0b
3	17.3efg	3.3 lmno	7.3ijk
رقم پیروز** Piruz Cultivar			
1	19.0cdef	6.3jkl	8.7hij
2	22.7cd	2.6lmno	5.0jklm
3	11.3h	4.0klmn	1.3mnop

*: حروف مشابه در روی هر یک از ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار نبودن بین تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح آماری ۱ درصد می‌باشند

*: Means followed by the same letter within each columns are not significantly different at the 0.01 level, according to the Duncan's multiple range test

**:۱. محیط‌کشت MS ½ حاوی تنظیم‌کننده رشد زآتین ۱ میلی‌گرم در لیتر؛ ۲. محیط‌کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد BA و 2,4-D هر کدام به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر؛ ۳. محیط‌کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد BA و 2,4-D هر کدام به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر

**:1. half-strength MS medium containing 1 mg/l Zeatin; 2. MS medium containing 0.5 mg/l BA and 2,4-D, 3. MS medium containing 1 mg/l BA and 2,4-D

پس از رشدونمو جنین‌های سوماتیکی و باززایی کامل گیاهچه‌های به‌دست آمده از محیط‌کشت جدا و به گلدان‌های حاوی پرلایت، پیت و خاک زراعی به نسبت ۱:۱:۱ انتقال داده شدند. درصد زنده ماندن گیاهچه‌ها ۷۰ تا ۸۰ درصد بوده و رشد طبیعی داشتند. نهایتاً این گیاهچه‌ها به گلخانه انتقال تا رشد طبیعی خود را ادامه دهند (شکل ۴).

به‌طورکلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که برای افزایش کارآیی جنین‌زایی سوماتیکی، شناسایی و انتخاب کالوس‌های جنین‌زا براساس خصوصیات مرفو- فیزیولوژیکی آنها لازم است. القا جنین سوماتیکی در گیاه نخود به فاکتورهای مختلفی نظیر رقم، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه بستگی دارد. 2,4-D به‌عنوان یک القاءکننده کارآمد جنین‌زایی عمل می‌کند. توسعه جنین سوماتیکی از طریق کاهش و یا حذف اکسین از محیط‌کشت امکان‌پذیر است. تنظیم‌کننده‌های رشد به‌عنوان القاءکننده‌های جنین‌زایی سوماتیکی عمل می‌کنند و برای حصول جنین‌زایی مطلوب، ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد مهم‌ترین نقش را ایفا می‌کنند.

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۳-۴ متن انگلیسی مراجعه شود.