بهینه‌سازی شرایط کشت بافت در رقم گچساران عدس(*Lens culinaris* Medik.) جهت القای شاخه‌زایی مؤثر

فاطمه ذاکر تولایی[۱]، عبدالرضا باقری[۱]، بهزاد قره یاضی[۲] ، کایران شارما[۳]

چکیده

بهینه‌سازی باززایی در عدس با استفاده از تکنیک کشت بافت در اصلاح این گیاه از طریق روش‌های جدید ضروری بنظر می رسد. اولین قدم در باززایی، شاخه‌زایی کارا و موثر با استفاده از ریزنمونه مناسب است. در این مطالعه با مقایسه درصد شاخه‌زایی در ریزنمونه‌های مختلف، بهترین نوع ریزنمونه انتخاب شد. سپس اثر وجود BAP در محیط کشت جوانه‌زنی و تولید گیاهچه‌ها، سن ریزنمونه و pHهای متفاوت محیط کشت شاخه‌زایی بر روی درصد شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها بررسی شد. پس از آن تاثیر غلظت‌ها و ترکیبات مختلف سیتوکینین‌های 2ip، Kin و TDZ روی القای شاخه‌زایی مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که ریزنمونه لپه به همراه قسمت بسیار جزئی از محور جنینی مناسب‌ترین ریزنمونه برای باززایی عدس می‌باشد. تاثیر مثبتBAP در محیط جوانه‌زنی و تولید گیاهچه روی القای شاخه‌زایی نیز تایید شد. بعلاوه نتایج نشان داد که بهترین ترکیب محیط کشت برای القای شاخه‌های چندگانه، محیط کشت MS غنی شده با ۷/۵ میکرومولار 2ip، ۴ میکرومولار Kin و ۲ میکرومولار TDZ می‌باشد، به نحوی که تا بیش از ۹۶ درصد القای شاخه‌زایی و در بعضی موارد، از هر ریزنمونه تا ۴۰ شاخه طویل شده بدست آمد. سن گیاهچه در زمان تهیه ریزنمونه و همچنین pH محیط کشت نیز، در القای شاخه‌زایی مؤثر بود. بررسی مقدماتی انتقال ژن با استفاده از این روش شاخه‌زایی نشان داد که می‌توان از این روش برای بهینه‌سازی شرایط جهت باززایی و انتقال ژن به عدس استفاده کرد.

واژه های کلیدی: عدس، شاخه‌زایی، تنظیم کننده های رشد گیاهی، ریزنمونه.

مقدمه

عدس با داشتن درصد بالایی از پروتئین، کیفیت و ارزش غذایی خوب و هضم آسان از اهمیت خاصی برخوردار بوده و به عنوان یکی از مهمترین منابع پروتئین در تغذیه مردم استفاده می‌شود. در ایران در استان‌های خراسان شمالی و رضوی، اردبیل، کرمانشاه و آذربایجان در سطح نسبتا وسیعی کشت می‌شود. سطح زیر کشت عدس در ایران در سال ۲۰۰۷ بالغ بر ۲۲۵۰۰۰ هکتار و تولید آن ۱۱۵۰۰۰ تن می‌باشد(۱۸).

موفقیت انتقال ژن در عدس به دلیل مشکل بودن کشت بافت آن با محدودیت‌هایی مواجه است. از این رو بهینه‌سازی شرایط کشت بافت جهت باززایی آن برای برنامه‌های اصلاحی با استفاده از روش‌های نوین از اهمیت زیادی برخوردار است. اولین و مهمترین قدم در انجام این امر، بهینه‌سازی شرایط کشت بافت جهت شاخه‌زایی مؤثر با استفاده از ریزنمونه‌های مناسب است که قابلیت بهتری نیز در انتقال ژن داشته باشند. اولین تلاش برای باززایی در عدس توسط بجاج و دانجو(۵) انجام شد. آنها باززایی گیاه در محیط این ویترو را با استفاده از نواحی مریستمی انجام دادند. بعد از آن ویلیامز و مک هاگن(۱۷) روی باززایی عدس از هیپوکوتیل و سلول های کالوس مشتق شده از اپی کوتیل مطالعاتی انجام دادند. سکسینا و کینگ(۱۴) نیز روی باززایی از محورهای جنینی با استفاده از محیط موراشی و اسکوگ(MS)[٤] غنی شده با بنزیل آدنین(BA)[٥] و نفتالین

۱- به ترتیب دانشجوی دکترا و عضو هیئت علمی دانشگاه فردوسی مشهد، ۲- عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج، ۳- عضو هیئت علمی انستیتوی بین‌المللی تحقیقاتی ایکریست، هند.

٤ - Murashige and Skoog, 1962

٥- Benzyl Adenine

استیک اسید(NAA)[1] موفقیت هایی بدست آوردند، پلانکو و همکاران(۱۱)، تشکیل شاخه‌های چندگانه را از ریزنمونه‌های نوک ساقه، گره اول، و اولین جفت برگ های تشکیل شده با استفاده از محیط غنی شده با BA یا BA و NAA گزارش کردند. مالک و رشید (۹) نیز شاخه‌های چندگانه را از گره‌های لپه‌ای روی محیط غنی شده با BA بدست آوردند. سینگ و راگووانسی (۱۵) امکان باززایی مستقیم گیاهان را از قطعات گرهی و نوک ساقه، مورد بررسی قرار دادند. مالک و ساکسینا (۹) تشکیل شاخه‌های چندگانه را از طریق کشت بذر روی محیط MS غنی شده با TDZ و وارکنتین و مک هاگن (۱۶) نیز تشکیل شاخه‌های چندگانه را از گره‌های لپه‌ای با استفاده از BA گزارش کردند. پلانکو و همکاران (۱۱)، روی باززایی چهار رقم عدس با استفاده از ریزنمونه بذر نابالغ مطالعه کرده و موفق به شاخه‌زایی شدند. یی و همکاران(۱۹) نیز فرایند شاخه‌زایی را با استفاده از بذر در محیط کشت دنبال کردند. سارکر و همکاران (۱۳) جهت باززایی، ریزنمونه‌های گره لپه ای و جنین سربرداری شده را مناسب معرفی کردند. آنها از ۶- بنزیل آمینو پورین (BAP)[2] و کاینتین (Kin)[3] برای القای شاخه‌زایی استفاده کردند.خوار و همکاران (۶) اثر TDZ را روی باززایی شاخه از ریزنمونه‌های مختلف از طریق ارگانوژنز در عدس مورد بررسی قرار دادند. طالب بیدختی و همکاران (۱) به منظور بهینه نمودن شرایط کشت بافت در ارقام عدس، با استفاده از ریزنمونه‌های انتهای ساقه، گره لپه ای، اپی کوتیل، و هیپوکوتیل، باززایی عدس را با استفاده از روش غیر مستقیم انجام دادند. در بررسی آنها با استفاده از BA شاخه‌زایی نسبتا خوبی در ریزنمونه گره لپه‌ای مشاهده شد. قاسمی عمران و همکاران (۲)، نیز جنین سربرداری شده تحت تاثیر BAP را به عنوان ریزنمونه موفق در شاخه‌زایی معرفی کردند.

با وجود تلاش‌های انجام شده برای بهینه‌سازی باززایی در عدس، شواهد نشان می‌دهد که این ریزنمونه‌ها به دلیل این که باززایی شاخه‌های چندگانه از مریستم‌هایی صورت می‌گیرد که در لایه داخلی ریزنمونه که در ناحیه دور از دسترس آگروباکتریوم وجود دارند، صورت می‌گیرد، غالبا برای تراریزش[4] با اگروباکتریوم که برای انتقال ژن به حبوبات دیگر با موفقیت استفاده شده، مناسب نیستند(۱۰). از طرفی شاخه‌زایی و همچنین ریشه‌زایی بالا و خوبی نیز در این گزارش‌ها به چشم نمی‌خورد. لذا بنظر می‌رسد، لازم است، تلاش در جهت باززایی عدس با استفاده از ریزنمونه‌هایی صورت گیرد که برای تراریزش نیز مناسب باشند و درصد شاخه‌زایی و ریشه‌زایی بالایی داشته باشند. بنابراین، این مطالعه با هدف بهینه‌سازی شرایط کشت بافت جهت انتخاب مناسب ترین ریزنمونه و درصد شاخه‌زایی بالا در رقم گچساران بوده است تا بتوان ریزنمونه و شرایط مناسب را برای تراریزش فراهم نمود.

مواد و روش

تعیین نوع ریز نمونه: جهت تعیین ریز نمونه مناسب، بذر رقم گچساران پس از شستشو، ابتدا با الکل ۷۰٪ به مدت یک دقیقه تیمار شده و سپس با استفاده از مخلوط کلرید جیوه ۰/۱٪ و ۲ قطره از توین ۲۰ به مدت هفت دقیقه ضدعفونی شدند. پس از پنج تا هفت بار شستشو با آب مقطر دو بار استریل، برای مدت دو تا سه ساعت در آب مقطر دوبار استریل خیسانده شدند. سپس پوسته بذرها جدا شده و بذور بدون پوسته در محیط کشت MS غنی شده با ۴ میکرو مولار BAP به مدت یک هفته تا ۱۰ روز کشت داده شد. سپس از گیاهچه‌های بدست آمده ریزنمونه‌های مختلف شامل برگچه(L)، ساقه(S)، لپه بدون محور جنینی(C) و لپه به همراه قسمت بسیار جزئی از محور جنینی(CEA)[5] تهیه شد. از هر یک از ریزنمونه‌ها ۸۰ عدد (هر ۸ ریزنمونه در یک پتری‌دیش) در محیط کشت پیش فرض شاخه‌زایی یعنی MS غنی شده با ۱۰ میکرومولار 2ip کشت داده شد. پس از ۷ تا ۱۰ روز، ریزنمونه‌های شاخه‌دار شده شمارش شده و با استفاده از نسبت ریزنمونه شاخه دار شده به ریزنمونه‌های بدون شاخه، درصد شاخه‌زایی تعیین شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 8.0، در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن

1 -Naphthalene Acetic Acid 2- 6-benzyl Amino Purine 3- Kinetin 4 -Transformation
5- cotyledon with slight part of embryo axes(CEA)

انجام شد.

تعیین اثر افزودن سیتوکینین در محیط جوانه زنی بذر و تولید گیاهچه بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها: پس از تعیین نوع ریزنمونه، تاثیر احتمالی افزودن هورمون سیتوکینین بر محیط جوانه زنی بذر و تولید گیاهچه از نظر درصد القای شاخه زایی در ریزنمونه‌های حاصل از آنها مطالعه شد. بدین ترتیب که ابتدا، ۵۰ بذر پوست گرفته شده در هر یک از دو محیط کشت MS و MS غنی شده با ۴ میکرومولار BAP کشت گردید. پس از یک هفته از گیاهچه‌های رشد یافته در هر محیط، ۶۰ ریزنمونه CEA تهیه شده و برای تعیین درصد القای شاخه‌زایی، در هر پتری دیش حاوی محیط پیش فرض شاخه‌زایی ۶ عدد ریزنمونه کشت گردید. پس از ۸ روز تعداد ریزنمونه‌های شاخه‌دار شده شمارش و داده‌های جفت شده بر اساس آزمون T و با استفاده از نرم افزار MSTATC تجزیه شد.

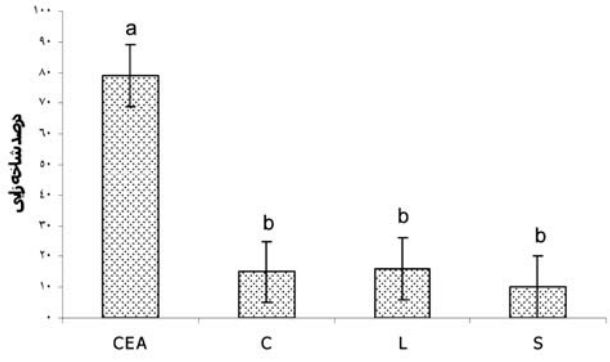
اثر سن ریز نمونه بر القای شاخه‌زایی: پس از تعیین بهترین ترکیب محیط کشت جهت شاخه زایی، تاثیر سن ریزنمونه نیز بررسی گردید. به این ترتیب که ریزنمونه های CEA از گیاهچه‌های ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ روزه تهیه و در محیط پیش فرض شاخه‌زایی(۱۰ میکرومولار 2ip)، کشت گردید. پس از ۸ روز ریزنمونه‌های شاخه‌دار شده شمارش و درصد شاخه‌زایی آنها تعیین شد. داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل شد.

اثر کاربرد غلظت‌ها و ترکیبات مختلف انواع سیتوکینین بر القای شاخه‌زایی: اثر کاربرد غلظت‌های مختلف BAP، 2ip، Kin، TDZ و ترکیبات آنها بر روی درصد القای شاخه‌زایی و همچنین تعداد شاخه‌های بدست آمده از هر ریزنمونه مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که ابتدا تاثیر BAP و 2ip بر شاخه‌زایی ریزنمونه منتخب مقایسه گردید. پس از اینکه برتری 2ip بر BAP محرز شد، غلظت‌های مختلف از 2ip از نظر القای شاخه‌زایی در ریزنمونه، مورد مقایسه قرار گرفتند. سپس غلظت متوسط از 2ip از بین دامنه‌ای از غلظت‌ها که تاثیر نسبتا خوبی در شاخه‌زایی ریزنمونه داشتند، انتخاب شده و تأثیر آن در ترکیب با غلظت‌های مختلف از Kin و TDZ روی شاخه‌زایی، مورد مقایسه قرار گرفت. ترکیبات هورمونی مختلف بصورت S1، S2، ...تا Sn نامگذاری شدند. S حرف اول عبارت shoot induction media می‌باشد و لذا از این حرف برای نامگذاری محیط کشت القای شاخه استفاده شد. ترکیبات محیط کشت‌ها در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. در مرحله بعدی، تاثیر ترکیب دامنه‌ای از غلظت‌های قابل قبول از 2ip در مرحله دوم، با غلظت‌های منتخب Kin و TDZ در مرحله سوم، روی شاخه‌زایی مورد مقایسه قرار گرفت. نحوه انجام آزمون‌ها به این صورت بود که هر ۵۰ ریزنمونه از ریزنمونه‌های CEA، جهت شاخه‌زایی روی یک ترکیب محیط کشت قرار داده شد (هر ۱۰ ریزنمونه در یک پتری دیش). پس از ۷ تا ۱۰ روز تعداد ریزنمونه‌های شاخه‌دار شده شمارش شده و درصد شاخه‌زایی مشخص شد و داده‌ها مانند آزمون‌های قبلی تجزیه تحلیل شد. سپس ریزنمونه‌های شاخه‌دار شده، از نظر تعداد شاخه در هر ریزنمونه آزمون شدند. بدین ترتیب که این ریزنمونه‌ها، مجددا در همان محیط شاخه‌زایی قبلی واکشت شدند و پس از دو واکشت، تعداد شاخه‌های بدست آمده از هر ریزنمونه شمارش گردید. لازم به ذکر است که مقایسه تعداد شاخه فقط برای مرحله سوم و چهارم از این آزمون انجام شد و برای مراحل اول و دوم فقط تعداد ریزنمونه‌های شاخه‌دار شده شمارش و مقایسه گردید. داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد تا بهترین ترکیب از این تنظیم کننده‌های رشد گیاهی جهت شاخه‌زایی انتخاب گردد.

اثر pH بر القای شاخه‌زایی: در این آزمایش تعداد ۳۰ ریزنمونه در هر یک از محیط های القای شاخه‌زایی با pH های، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶ و ۶/۵ کشت داده شدند. نتایج شاخه‌زایی مانند آزمون‌های قبلی با استفاده از نرم افزار در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه شد.

نتایج و بحث

تعیین بهترین نوع ریزنمونه: همان گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، درصد شاخه‌زایی در ریزنمونه لپه همراه با قسمت بسیار جزئی از محور جنینی(شکل ۱- الف)، نسبت به سایر ریزنمونه‌ها برتری معنی داری($P< 0.01$) داشته است. در این مطالعه ریزنمونه CEA برای اولین بار استفاده شد و در هیچ کدام از مطالعات قبلی که بر روی شاخه‌زایی

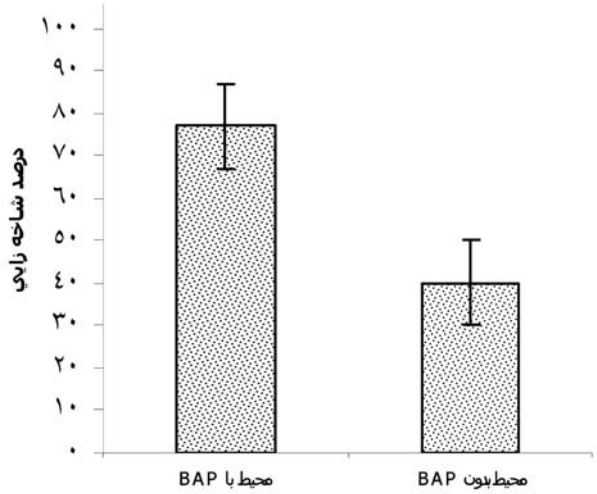


نمودار ۱: مقایسه چهار نوع ریزنمونه (CEA= لپه به همراه قسمت بسیار جزئی از محور جنینی، C = لپه بدون محور جنینی، L = برگچه و S = ساقه) از نظر قابلیت شاخه‌زایی.

عدس صورت گرفته، استفاده نشده است. مطالعه مقدماتی تراریزش عدس توسط نگارنده نشان داد که این ریزنمونه با اندکی تغییر قابلیت بسیار خوبی در تراریزش نیز دارد (نتایج منتشر نشده). در مطالعات دیگران غالبا از ریزنمونه‌های گره لپه‌ای (۱، ۶، ۱۰، ۱۲ و ۱۳)، محور جنینی(۱۱)، جنین سربرداری شده (۱۰ و ۲)، اپی کوتیل(۱ و ۱۴)، هیپوکوتیل (۱)، نوک مریستم (۲)، نوک ساقه (۱، ۸ و ۱۲)، بذر نابالغ(۹) و بذر کامل(۵ و ۱۵) استفاده شده است. این ریزنمونه‌ها با اینکه تا حدی شاخه‌زایی داشته اند، اما نتایج بررسی های انجام شده (۱۰) نشان داده است که این ریزنمونه‌ها برای انتقال ژن از کارآمدی لازم برخوردار نبوده اند.

تعیین اثر افزودن سیتوکینین در محیط جوانه‌زنی و تولید گیاهچه بر شاخه‌زایی ریزنمونه: با توجه به نمودار ۲، درصد شاخه‌زایی در ریزنمونه‌های تهیه شده از گیاهچه‌های رشدیافته در محیط دارای ۴ میکرومولار BAP به طور معنی داری($P< 0.05$) نسبت به ریزنمونه‌های حاصل از محیط بدون هورمون افزایش نشان داده است.

به نظر می‌رسد وقتی گیاهچه قبل از تهیه ریزنمونه در محیط حاوی سیتوکینین رشد نماید، محتوای سیتوکینین آن باعث می‌شود که اولا گیاهچه‌ها توان خود را در جهت تولید ریشه صرف ننماید و سریعتر برای تهیه ریزنمونه آماده شود و همچنین وجود سطحی از سیتوکینین خارجی در ریزنمونه باعث بهبود روند القای شاخه‌زایی در مرحله بعدی می‌شود. لازم به ذکر است که در مطالعه های قبلی باززایی



نمودار ۲: اثر افزودن سیتوکینین در محیط تولید گیاهچه روی القای شاخه در ریزنمونه.

عدس گزارشی در این زمینه منتشر نشده است. اما جایاباند و همکاران (۵) در باززایی نخود از این تکنیک برای افزایش القای شاخه‌زایی استفاده کرده و نتایج مثبتی بدست آوردند.

اثر کاربرد غلظت‌ها و ترکیبات مختلف انواع سیتوکینین بر القای شاخه زایی: نتایج مرحله اول این آزمون شامل: مقایسه تاثیر BAP و 2ip و مرحله دوم شامل: مقایسه تاثیر غلظت‌های ۲ تا ۱۵ میکرومولار 2ip بدلیل این که به عنوان ازمون‌های مقدماتی انجام شده بودند، نشان داده نشده است. اما نتایج کلی این آزمایش‌ها، نشان داد که اولا 2ip در القای شاخه‌زایی از BAP مؤثرتر است و ثانیا، غلظت‌های ۵ تا ۱۵ میکرومولار 2ip نسبت به غلظت‌های پایین‌تر و بالاتر این هورمون، تأثیر بیشتری در القای شاخه‌زایی دارند. لذا ابتدا غلظت متوسط از 2ip یعنی ۷/۵ میکرومولار انتخاب شده و تاثیر ترکیب ۷/۵ میکرومولار 2ip با غلظت‌های مختلف از Kin و TDZ مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج این آزمون در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که در جدول مشاهده می‌شود، مقایسه محیط کشت S1 با سایر محیط کشت ها، نشان می‌دهد که کاربرد 2ip در ترکیب با TDZ یا Kin و یا هر دوی آنها نتیجه بهتری از استفاده از آن به تنهایی دارد. مقایسه بین S2 تا S4 و S8 تا S16 برتری غلظت ۴ میکرومولار Kin را بر غلظت ۲ و ۱۰ میکرومولار آن نشان می‌دهد. همچنین با مقایسه S5 تا S7 و S8 تا S16 متوجه می‌شویم افزایش غلظت TDZ گاهی باعث افزایش

جدول ۱: مقایسه تاثیر ترکیب غلظت های مختلف Kin و TDZ با مقدار ثابت ۷/۵ میکرومولار 2ip، روی القای شاخه‌های چندگانه در عدس(رقم گچساران) با استفاده از ریزنمونه CEA.

نوع محیط کشت	TDZ (µM)	Kin (µM)	متوسط تعداد شاخه در هر ریزنمونه	تعداد ریزنمونه شاخه‌دار شده از ۵۰ ریزنمونه کاشته شده	درصد ریزنمونه‌های شاخه‌دار شده
S1	-	-	ef* ۱۸/۴±۱/۱	۳۰	۶۰
S2	-	۲	d۲۰/۸±۰/۹	۱۱	۶۲
S3	-	۴	dg ۲۱/۰±۰/۴	۳۳	۶۶
S4	-	۱۰	h ۱۶/۰±۰/۶	۲۹	۵۸
S5	۲	-	hi ۱۴/۸±۰/۹	۲۱	۴۲
S6	۴	-	hi ۱۵/۲±۱/۰	۲۵	۵۰
S7	۱۰	-	hi ۲۳/۰±۰/۷	۲۳	۴۶
S8	۲	۲	ef ۱۸/۸±۰/۶	۳۵	۷۰
S9	۴	۲	cd ۲۵/۶±۱/۵	۳۳	۶۶
S10	۱۰	۲	ef ۱۸/۰±۱/۵	۳۸	۷۶
S11	۲	۴	a ۲۹/۰±۰/۶	۴۴	۸۸
S12	۴	۴	a ۲۸/۸±۰/۶	۳۷	۷۴
S13	۱۰	۴	c ۲۳/۸±۱/۵	۲۸	۵۶
S14	۲	۱۰	c ۲۳/۰±۱/۴	۳۱	۶۲
S15	۴	۱۰	ef ۲۰/۰±۱/۶	۴۴	۶۸
S16	۱۰	۱۰	fg ۱۷/۸±۲/۰	۳۱	۶۲

* میانگین های دارای حداقل یک حرف مشابه، براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد تفاوت معنی داری ندارند ($P < ۰/۰۱$).

شاخه‌زایی شده است. از مقایسه محیط کشت‌های S1 تا S7 با S8 تا S16 نتیجه می‌شود که استفاده همزمان از سه سیتوکینین مورد استفاده در محیط شاخه‌زایی نتیجه بهتری از کاربرد 2ip با یکی از آنها دارد. در نهایت، در این مطالعه، تیمار S11 حاوی MS غنی شده با ۷/۵ میکرو مولار 2ip، ۴ میکرو مولار Kin و ۲ میکرومولار TDZ بیشترین درصد شاخه‌زایی را نشان داد.

با توجه به این که غلظت‌های ۵ تا ۱۵ میکرومولار 2ip به تنهایی در مرحله دوم آزمون، تفاوت چندانی نداشتند، تاثیر این دامنه از غلظت 2ip، مجددا در ترکیب با غلظت‌های ۴ میکرومولار Kin و ۲ میکرومولار TDZ روی شاخه‌زایی بررسی شد. با توجه به اطلاعات بدست آمده از مقایسه محیط کشت های S17 تا S21 می‌توان چنین نتیجه گرفت که افزایش غلظت 2ip از ۵ میکرومولار به ۷/۵ میکرومولار باعث القای تعداد بیشتری شاخه شده است، اما غلظت‌های بالاتر از ۷/۵ این ماده در ترکیب با دو سیتوکینین دیگر تاثیر مثبتی روی القای شاخه‌زایی نشان نمی دهند. لذا مجددا برتری ترکیب ۷/۵ میکرو مولار 2ip همراه با ۴ میکرو مولار Kin و ۲ میکرومولار TDZ تأیید گردید. با این ترکیب، تا ۹۶ درصد شاخه‌زایی مشاهده شد. در این مرحله فاصله واکشت‌ها مهم بود و فاصله چهار روز نتایج بسیار بهتری از هشت روز داشت. شاخه‌های چندگانه تشکیل شده پس از ۱۵ روز قرار گرفتن در محیط کشت شاخه‌زایی در شکل ۱- ب نشان داده شده است. در مجموع نتایج این مطالعه تاثیر معنی‌دار ترکیب این سه سیتوکینین روی فراوانی ریزنمونه‌های شاخه‌دار شده و همچنین تعداد شاخه‌های بدست آمده از هر ریزنمونه را نشان می‌دهد. اگر چه گاهی افزایش غلظت TDZ افزایش شاخه‌زایی را در پی داشت، اما با توجه به نتایج کلی در ترکیب با دو سیتوکینین دیگر و همچنین مشاهده تاثیر منفی استفاده غلظت زیاد TDZ در مراحل بعدی باعث شد که غلظت پایین آن مورد استفاده قرار گیرد. در مواردی که TDZ تا مدت زمان ۳ هفته استفاده می‌شد، تعداد شاخه‌های تشکیل شده در بعضی موارد از ۴۰ شاخه در ریزنمونه هم تجاوز می‌کرد، اما تاثیر منفی استفاده

جدول ۲: مقایسه تاثیر ترکیب غلظت‌های مختلف 2ip با غلظت‌های ثابت ۴ میکرومولار Kin و ۲ میکرومولار TDZ، روی القای شاخه‌های چندگانه در عدس(رقم گچساران) با استفاده از ریزنمونه CEA.

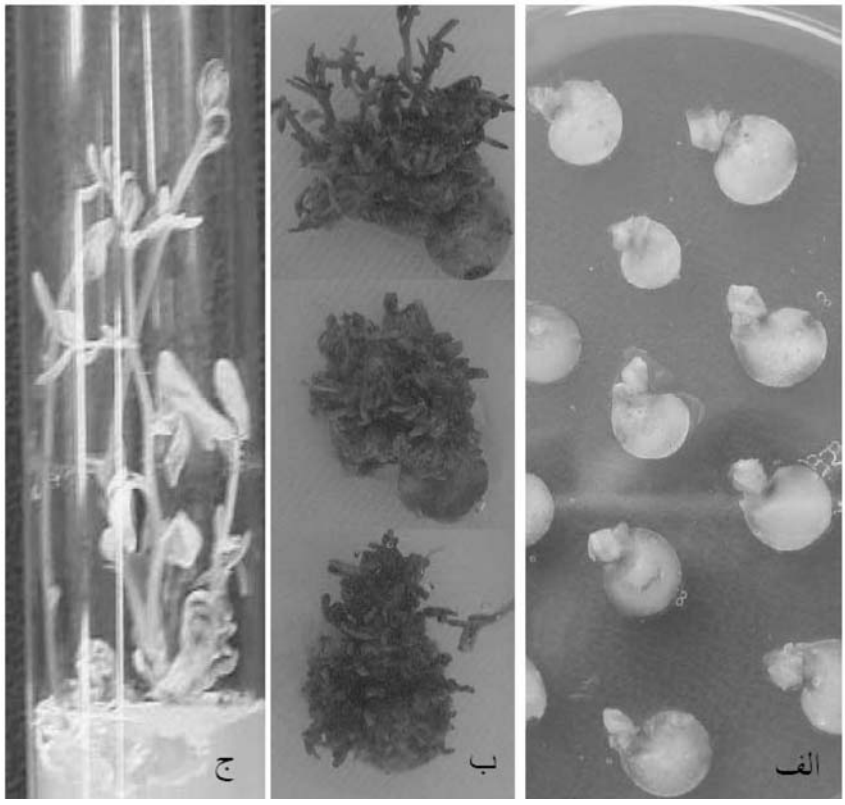
نوع محیط کشت	2ip (µM)	متوسط تعداد شاخه در هر ریز قلمه	تعداد ریزقلمه‌های شاخه‌دار شده از ۵۰ ریزنمونه کاشته شده	درصد ریزقلمه‌های شاخه‌دارشده
S17	۵	۲۰/۰±۰/۷ ed	۴۸	۹۶
S18	۷/۵	۲۸/۰±۰/۹ a	۴۸	۹۶
S19	۱۰	۲۵/۱±۰/۷ b	۴۴	۸۸
S20	۱۲/۵	۱۶/۰±۰/۷ hg	۴۰	۸۰
S21	۱۵	۱۳/۶±۲/۵ ji	۳۸	۷۶

* میانگین های دارای حداقل یک حرف مشابه، براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد تفاوت معنی داری ندارند ($P < ۰/۰۱$).

از غلظت زیاد و یا استفاده طولانی مدت آن در مرحله طویل شدن به صورت بدشکلی شاخه و برگ و اختلال در مرحله طویل شدن، به روشنی قابل مشاهده بود. لذا استفاده از آن به ۴ تا ۷ روز با غلظت ۲ میکرو مولار محدود شد.

در مطالعات قبلی از ترکیبات Kin (۱ و ۱۳)، TDZ (۶ و ۸)، BAP (۱ و ۲)، BA به تنهایی(۹، ۱۱، ۱۴ و ۱۶) و در ترکیب با NAA (۱۱) استفاده شده است. تا کنون از 2ip در هیچیک از مطالعات شاخه‌زایی عدس استفاده نشده است. این سیتوکینین شایستگی خود را در ترکیب با Kin و TDZ در شاخه‌زایی در گیاه نخود نشان داده است (۵).

اثر سن ریز نمونه بر القای شاخه زایی: درصد شاخه‌زایی در ریزنمونه‌های تهیه شده از گیاهچه های ۷ تا ۱۳ روزه



شکل ۱: الف) ریزنمونه لپه به اضافه قسمت بسیار جزئی از محور جنینی، ب) ریزنمونه‌های دارای شاخه‌های چندگانه ۱۵ روز پس از قرار گرفتن در محیط القای شاخه، ج) مرحله طویل شدن شاخه‌ها.

افزایش نشان داد. ولی این افزایش معنی‌دار نبود. ریزنمونه ۷ روزه قابلیت بهتری از نظر القای شاخه زایی نسبت به سایر ریزنمونه‌ها نشان داد. لذا از گیاهچه های ۷ روزه برای تهیه ریزنمونه استفاده شد. لازم به ذکر است که در مطالعات قبلی باززایی عدس در مورد سن ریزنمونه

گزارشی منتشر نشده است اما گولاتی و همکاران (۴) در مطالعه خود در ماش سبز نشان دادند که سن ریزنمونه روی شاخه‌زایی موثر بوده است.

تاثیر pH محیط کشت بر درصد القای شاخه زایی: داده های این آزمون نشان می‌دهد که درصد شاخه‌زایی در محیط کشت با pH ۴ تا ۶ تفاوت معنی داری نشان نمی دهد($P<0.01$). اما pH پایین تر از ۴ و بالاتر از ۶ باعث کاهش درصد شاخه‌زایی شدند. در فرایند کار، عملا pH برابر با ۵/۲۵ (قبل از اتوکلاو) برای محیط القای شاخه‌زایی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. در مطالعات قبلی در این زمینه هم مقایسه‌ای انجام نگرفته و مطالبی منتشر نشده است. جایایاند و همکاران (۲۰۰۳) نیز pH محیط کشت را روی درصد شاخه‌زایی نخود از ریزنمونه محور جنینی مؤثر دانستند.

بنظر می‌رسد ریزنمونه‌های معرفی شده در مطالعات قبلی شامل گره لپه ای (۱، ۹، ۱۵، ۱۶ و ۱۳)، محور جنینی (۱۴)، جنین سربرداری شده (۲ و ۱۳)، اپی کوتیل (۱ و ۱۷)، هیپوکوتیل(۱)، نوک مریستمی (۳)، نوک ساقه (۱، ۱۱ و ۱۵)، بذر نابالغ (۱۲) و بذر کامل (۸ و ۱۸) به دلیل دور از دسترس قرار گرفتن نواحی مریستمی از باکتری، کارایی مؤثری جهت استفاده در انتقال ژن با واسطه اگروباکتریوم را ندارند(۱۳ و ۱۸).

در این مطالعه ریزنمونه‌ای معرفی شد که با اندکی تغییرات، دارای قابلیت بالایی در تراریزش است (مشاهدات نگارنده در مطالعات مقدماتی تراریزش عدس)، علاوه بر آن درصد بالای شاخه‌زایی(تا ۹۶٪) و تعداد خیلی زیاد شاخه‌های تولید شده(در بعضی موارد تا ۴۰ شاخه بر ریزنمونه) از امتیازات آن به شمار می‌رود. به نظر می‌رسد نتایج این تحقیق بتواند به عنوان گامی مهم برای باززایی و همچنین انتقال ژن در عدس مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

۱- طالب بیدختی، س؛ ع، صفرنژاد؛ م.، لاهوتی و ع.، باقری. ۱۳۸۲. اثر ژنوتیپ، ریزنمونه و هورمون های رشد در کشت بافت عدس (*Lens culinaris* M.). مجموعه مقالات سومین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. دانشگاه فردوسی مشهد. ۳۳۹ – ۳۳۶ .

۲- قاسمی عمران، و؛ باقری، ع. و مشتاقی، ن. ۱۳۸٦. بهینه سازی شرایط کشت بافت به منظور ساقه زایی گیاه عدس در شرایط این ویترو. مجله علوم کشاورزی. شماره ۱۱: ۱٤۷ – ۱۳۹.

3-Bajaj, Y.P.S. and M.S., Dhanju. 1979. Regeneration of plants from apical meristem tips of some legumes. Current Science 84: 906-907.

4-Gulati, A.; and K.J., Pawan.1990. Culture conditions effecting plant regeneration from cotyledons of *Vigna radiata* L.) Wilczek. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 23: 1-7.

5-Jayanand, B.; Sudarsanam, G. and Sharma, K. K. 2003. An efficient protocol for the regeneration of whole plants of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by using axillary meristem explants derived from *in vitro*_ germinated seedling. *In Vitro* Cell Development Biology Plant 39: 171-179.

6-Khawar, K. M.; C., Sancak, S., Uranbey, and S. Özcan. 2004. Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* M.) via organogenesis. Turk Journal Botany 28: 421-426.

7-Khawar, K. M. and S., Özcan. 2002. Effect of Indole-3-Butyric Acid on *in vitro* root development in lentil (*Lens culinaris* M.). Turk Journal Botany 26: 109-111.

8-Malik, K.A. and P.K., Saxena.1992. Thidiazuron induces high-frequency shoot regeneration in intact seedlings of pea *(Pisum sativum*); chickpea *(Cicer arietinum*) and lentil *(Lens culinaris*). Australian Journal Plant Physiology 19: 731–740.

9-Malik, M.A. and A., Rashid. 1989. Induction of multiple-shoots from cotyledonary node of grain legumes: pea and lentil. Biologia Planta 31: 230–232.

10-Murashige, T. and F., Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15: 473–497.

11-Polanco, M. C.; M. I., Pelaez; M. L., Ruiz. 1988. Factors affecting callus and shoot formation in *in vitro* cultures of *Lens culinaris* M. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 15:175–182.

12-Polanko, M.C. and M.L., Ruiz. 2001. Factors that affect plant regeneration from invitro culture of immature seeds in

four lentil cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 66: 133-139.
13-Sarker, R. H.; B. M., Mustafa; A. Biswas; S., Mahbub; M., Nahar; R., Hashem and M. I., Hoque. 2003. *In vitro* regeneration in lentil (*Lens culinaris* M.). Plant Tissue Culture 13: 155-163.
14-Saxena, P.K. and J., King. 1987. Morphogenesis in lentil plant regeneration from callus cultures of *Lens culinaris* M. via somatic embryogenesis. Plant Science Irish Republic 52: 223-227.
15-Singh, R. K. and S. S., Raghuvanshi. 1989. Plantlet regeneration from nodal segment and shoot tip derived explants of lentil. Lens Newsletter 6: 33–35.
16-Warkentin, T. D. and A., McHughen. 1993. Regeneration from lentil cotyledonary nodes and potential of this explant for transformation by *Agrobacterium tumefaciens.* Lens Newsletter 20:26–28.
17-Williams, D.J. and A., McHughen. 1986. Plant regeneration of the legume *Lens culinaris* M.(lentil) *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 7: 149-153.
18-Yadav, S. S.; A. H., Rizvi; M., Manohar; A. K., Verma; R., Shrestha; C., Chen; G., Bejiga; W.,Chen; M., Yadav and P. N., Bahl. 2007. Lentil growers and production systems around the world. Lentil: An ancient crop for modern times. pp: 415 – 442.
19-Ye, G.; D. L., Mcneil; A. J., Conner and G. D., Hill. 2002. Multiple shoot formation in lentil (*Lens culinaris M.*) seeds. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 30: 1–8.

Optimization of tissue culture condition in lentil (*Lens culinaris* Medik. cv. Gachsaran) to induce effective multiple shoot induction

F. Zaker Tavallaie[1], A. Bagheri[1], B. Ghareyazie[2], K. K. Sharma[3]

Abstract

Optimization of regeneration in lentil is necessary to improve this plant by novel methods. First stage of regeneration is efficient multiple shoot induction using proper explants. In this research, four explants of leaflet, stem, cotyledon without embryo axes and cotyledon with embryo axes were tested to determine the best explant. Probably effect of BAP in germination media of seedling tested on shoot induction of explants. There was comparison between effect of different level and combination of various cytokinins on multiple shoot induction. Effect of explant age and pH of media also tested on shoot induction. Results showed that, cotyledon with embryo axes is the best explant. Existence of BAP in germination media was very useful. There was highest shoot induction percentage (until to 96%) in MS media complemented with 7.5µM 2ip, 4µM Kin and 2 µM TDZ. Using this media produced more than 40 shoots per explant in some samples. Age of explant and pH of media was effective on multiple shoot induction. Results of primary research in gene transformation of lentil indicated efficient ability of this protocol to use in gene transformation.

Keywords: Lentil (*Lens culinaris* M.), multiple shoot induction, hormones, explants.

1, 2, 3- Contribution from College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Research Center of Biotechnology, Karaj and ICRIST, India, respectively.