نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۸، شماره ۱، فروردین - اردیبهشت ۱۳۸۹، ص ۹۷-۹۰

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 8, No. 1, Mar. – Apr. 2010, p. 90-97

بهینه سازی ریشه زایی دو ژنوتیپ عدس(*Lens culinaris* Medik.) در شرایط این ویترو

ولی اله قاسمی عمران[۱] - عبدالرضا باقری[۲*]

تاریخ دریافت:۸۷/۱۲/۷
تاریخ پذیرش:۸۸/۴/۱۰

چکیده

باززایی موثر و با کارایی بالا از پیش نیازهای اساسی انتقال ژن به گیاهان بشمار می‌رود. گیاه عدس به دلیل مشکلات در القاء ریشه زایی به عنوان یکی از بقولات سرسخت در باززایی کامل گیاه محسوب می‌شود. به این منظور از دو روش این ویترو و روش این ویوو به دنبال این ویترو جهت ریشه زایی ساقه‌های باززایی شده در این گیاه استفاده شد. روش ریشه زایی این‌ویترو- این‌ویوو روش مناسب تری نسبت به روش این ویترو جهت ریشه زایی ساقه‌های باززایی شده تشخیص داده شد. ساقه‌های باززایی شده از محیط حاوی ۲ میلی گرم در لیترBAP، دارای ریشه زایی بیشتری (۷۰٪) نسبت به ساقه‌های باززایی شده از محیط‌های حاوی ۳ و ۴ میلی گرم در لیتر BAP می‌باشند که نشان دهنده اثر بازدارندگی سیتوکینین‌ها در ریشه زایی می‌باشد. هورمون IBA در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به صورت پیش تیمار ۲۴ ساعته، درصد ریشه زایی بیشتری را نسبت به پیش تیمار سه شبانه روزه القاء نمود. در حالی که هورمون NAA با همان غلظت به صورت پیش تیمار سه شبانه روز، بیشترین درصد ریشه (۸۰ درصد) را تولید نمود. بین دو ژنوتیپ مورد استفاده تفاوت معنی داری در درصد، تعداد و طول ریشه زایی ساقه‌ها وجود نداشت.

واژه‌های کلیدی: عدس، ریشه زایی، اکسین، ریزنمونه و این‌ویترو

مقدمه

عدس (*Lens culinaris* Medik.) به عنوان یک محصول زراعی مهم، در مناطق نیمه خشک مدیترانه‌ای (آفریقا، خاورمیانه)، جنوب آسیا، شبه قاره هند، آمریکای جنوبی ، غرب کانادا و ایران کشت می‌گردد. بذر این گیاه به عنوان منبع با ارزشی از پروتئین (۲۰ تا ۳۶ درصد در مقایسه با ۱۲-۸ درصدی غلات) نقش حیاتی درتغذیه مردم بویژه در کشورهای در حال توسعه دارد (۳). همچنین این گیاه با تثبیت نیتروژن، حاصلخیزی خاک را بهبود می بخشد لذا می تواند به عنوان یک گیاه مناسب جهت تناوب با غلات کشت گردد.

وجود یک روش باززایی موثر و با کارایی بالا از پیش نیازهای اساسی انتقال ژن به این گیاه بشمار می‌رود و سرسختی آن به باززایی در کشت این‌ویترو توسط محققان مختلف گزارش شده و از تکنیک‌های زیادی برای رفع این مشکل استفاده شده است. باززایی موفقیت آمیز بقولات به تعیین پارامترهای مهم باززایی نظیر منبع ریزنمونه، ژنوتیپ و اجزای تشکیل دهنده محیط کشت و دما وابسته است (۱۱). با این وجود در عدس، ریشه دار کردن ساقه‌های باززایی شده به عنوان یک مشکل در روش‌های مختلف باززایی گیاه مطرح بوده و گزارش‌های ضد و نقیضی در مورد ریشه زایی این گیاه وجود دارد. این گیاه به دلیل مشکلات در القاء ریشه زایی به عنوان یکی از بقولات سرسخت در باززایی کامل گیاه محسوب می‌شود (۵). ویلیامز و مک هاگن و ساین و رانوانشی ساقه زایی عدس را در محیط حاوی Kinگزارش نمودند. در مورد ریشه زایی ساقه‌های تولیدی در گزارش اول با انتقال ساقه‌های باززایی شده به ماسه تنها ۱۱ درصد ریشه زایی بدست آمد و در مورد گزارش دوم با انتقال ساقه‌های تولیدی به محیط بدون هورمون، تعداد کمی ریشه بدست آمد. در مقایسه با این دو تحقیق که از کینیتین استفاده نمودند، درصد ریشه‌زایی در محیط کشت‌های حاوی BAP بالاتر بود (۱۶ و ۱۸). پولانکو و همکاران و مالک و ساکسینا جهت ریشه زایی از محیط کشت‌های حاوی NAA استفاده نمودند. در این تحقیقات ریشه زایی به طور اتفاقی و با درصد پایینی صورت گرفت (۱۳). وارکنتین و مک هاگن حدود ۵۰٪ ریشه زایی را در ساقه‌های باززایی شده از ریزنمونه گره لپه ای گزارش نمودند (۱۷). اثر بازدارندگی BA روی تشکیل ریشه در عدس در شرایط این‌ویترو و این‌ویوو به وسیله پولانکو و روئیز گزارش شده است. آنها تا ۴۰ درصد ریشه زایی را در ساقه‌های باززایی شده،

۱و۲- به ترتیب دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی و استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: abagheri@um.ac.ir

مشاهده نمودند (۱۲). خاور و همکاران محیط کشت MS (۹) حاوی۰/۲۵ میلی گرم در لیترIBA را به عنوان بهترین محیط کشت ریشه زایی ساقه‌های جدا شده از گیاهچه‌های ۱۰ روزه عدس گزارش نمودند. با این حال درصد ریشه زایی در این محیط کشت بسیار پایین (حدود ۲۵ درصد) بود (۸). این درصد پایین ریشه زایی در محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف IBA توسط سارکر و همکاران(۲۰۰۳) و خاور و همکاران نیز گزارش شده است (۷ و ۱۵). پولانکو و روئیز، ساقه‌های باززایی شده را به محیط کشت حاوی ۱۱/۴ میکرومولار IAA و۱ میکرومولار NAA جهت ریشه زایی منتقل نمودند. به نظر آنها IAA نسبت به IBA و NAA هورمون مناسب تری می‌باشد (۱۴). در مطالعه ای که توسط فرانتینی و روئیز صورت گرفت، در بین ساقه‌های تولیدی تحت تاثیر چهار نوع سیتوکینین مختلف، بالاترین درصد ریشه زایی در ساقه‌های باززایی شده در محیط کشت حاوی ۱/۲۵ میکرومولار زآتین، مشاهده شد. TDZ و BA ممانعت بیشتری در تحریک ریشه زایی نسبت بهZEA وKin از خود نشان دادند (۵). یی و همکاران NAA را نسبت به IBA هورمون موثرتری جهت ریشه زایی معرفی کردند. اگرچه با افزایش غلظت NAA، در محل تشکیل ریشه، کالوس تشکیل می‌گردد (۱۹).

طالب بیدختی ساقه‌های حاصل از روش ریزازدیادی گیاه عدس را از طریق کشت هیدروپونیک و تیمار با NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) ریشه دار نمود (۱). در مجموع نتایج تحقیقات مختلف حاکی از ریشه‌زایی اندک این گیاه در شرایط این ویترو و نیز اثر ممانعت کننده سیتوکینین‌ها می باشد. از روش‌های دیگری نیز برای ریشه زایی گیاه عدس استفاده شده است. گولاتی و همکاران جهت غلبه بر مشکل ریشه زایی روش ریزپیوندزنی[1] را برگزیدند. به این صورت که در این روش جوانه‌های باززایی شده از ریزنمونه‌های گرهٔ لپه‌ای در محیط کشت MS حاویBAP، روی گیاهان پایه پیوند زده شدند و تا مرحله بلوغ با موفقیت کامل رشد داده شدند (۶). فرانتینی و روئیز فرایند ریشه‌زایی در عدس و سایر بقولات را بر اساس جهت ریزنمونه‌ها، بررسی نمودند. به این منظور آنها قطعات گره‌ای عدس را با یک جوانه محوری در جهت وارونه (انتهای Apical روی محیط کشت) کشت دادند. با این کار آنها توانستند فراوانی ریشه‌زایی را بالاتر از حالت دارای جهت نرمال (انتهای Basal روی محیط کشت) مشاهده نمایند (۴). نول و همکاران نظریه فرانتینی و روئیز مبنی بر اثر جهت ریزنمونه روی ریشه زایی ساقه‌های باززایی شده عدس را رد کردند. آنها فرضیه اثر هوادهی در ریشه زایی ریزقلمه‌های عدس را، مطرح نمودند. به عقیده این محققان، کمبود اکسیژن محیط کشت به عنوان عامل محدود کننده در فرآیند ریشه زایی می‌باشد (۱۰). در مجموع گزارش‌های ضد و نقیضی در مورد ریشه زایی عدس وجود دارد.

در این مطالعه از روش‌های مختلف ریشه زایی در دو ژنوتیپ عدس استفاده شد تا با مشخص نمودن بهترین محیط ریشه زایی، مقدمات لازم جهت باززایی کامل این گیاه به عنوان پیش نیاز انتقال ژن به این گیاه فراهم گردد.

مواد و روش ها

نمونه گیاهی

به منظور تولید گیاهچه‌های سالم و تهیه ریزنمونه از آنها، بذرهای سالم و یکنواخت لاین‌های گچساران و Flip.92-12L (تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه) انتخاب شد. ضدعفونی بذرها با قرار دادن آنها در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱۰ ثانیه و متعاقب آن غوطه‌وری به مدت ۱۵ دقیقه در محلول وایتکس ۲ درصد انجام شد. پس از آن برای حذف اثر مواد ضد عفونی‌کننده، بذرها سه بار با آب مقطر استریل به مدت ۱۵ دقیقه شستشو گردیدند. در مرحله بعد بذرهای ضدعفونی شده در محیط کشت آب آگار ۰/۴درصد (w/v) کشت شده و به منظور جوانه‌زنی در دمای ۲±۲۳ درجه سانتیگراد در تاریکی نگهداری شدند. به این ترتیب تعدادی گیاه به عنوان مواد اولیه برای جدا کردن ریزنمونه‌های مورد آزمایش بدست آمد. سپس ریزنمونه جنین سربرداری شده، با استفاده از اسکالپل در شرایط استریل، از لپه‌های گیاهچه‌های سه روزه جدا شد و در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

محیط کشت ساقه زایی و شرایط رشد

جهت باززایی ساقه ها، ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS تغییر یافته حاوی ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP ، ۳ درصد ساکارز، ۰/۷۵ درصد آگار و pH= ۵/۸ در ویال کشت شدند. ظروف کشت در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با تناوب نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۳۰ میکرومول بر متر مربع نگهداری شدند تا ساقه زایی مناسب صورت پذیرد (۱). به منظور افزایش طول ساقه‌ها و بوجود آمدن ساقه‌های طبیعی تر و مناسب، ساقه‌های تولیدی بعد از گذشت دو هفته کشت در محیط حاویBAP ، به محیط کشت MS تغییر یافته بدون هورمون واکشت شدند عمل واکشت ساقه‌های موجود در محیط کشت جدید هر دو هفته یکبار انجام شد.

ریشه زایی

جهت القاء ریشه در ساقه‌های باززایی شده از دو روش ریشه زایی به ترتیب زیراستفاده شد: ۱- استفاده از محیط کشت MS جامد ۲- روش این ویوو به دنبال این ویترو. در مورد محیط ریشه زاییMS،

1- Micrografting

ساقه‌های باززایی شده یک هفته پس از آخرین واکشت، به قطعات ۴-۲ سانتی‌متری بریده شده و جهت ریشه زایی به محیط کشت‌های تغییر یافته MS کامل ،۱/۲MS و ۱/۴MS، با ۲ و ۳٪ ساکارز و ۰/۷۵ درصد آگار همراه با ترکیبات هورمونی متنوع شامل IAA، IBA و NAA در pH=۵/۸ در داخل ویال‌های استریل منتقل شدند. سپس نمونه‌ها در اتاق رشد با دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی گراد با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۳۰ میکرومول بر متر مربع نگهداری شدند.

در مورد محیط ریشه زایی این ویترو– این ویوو ساقه‌های باززایی شده یک هفته پس از آخرین واکشت، به قطعات ۴-۲ سانتی‌متری بریده شده و جهت القاء ریشه زایی ابتدا به مدت یک و چهار شبانه روز در محیط کشت MS تغییر یافته حاوی غلظت‌های مختلف هورمون NAA وIBA کشت گردیدند (شکل۱). سپس این ساقه‌ها به محیط این ویوو، شامل پیت اسفنجی و ماسه بادی و پرلیت – در گلدان‌های کوچک سرپوشیده– که به نسبت مساوی تهیه شده بود، منتقل گردیدند.

تجزیه آماری

تجزیه داده‌های بدست آمده از آزمایش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۶ تکرار انجام شد. در مورد روش ریشه زایی در محیط کشت MS فاکتورها شامل نوع محیط کشت مورد استفاده در سه سطح (MS کامل ،۱/۲MS و۱/۴MS)، هورمون‌های مختلف اکسین شامل IBA، NAA و IAA به عنوان سه سطح، غلظت هر کدام از هورمون‌های فوق در پنج سطح (۰/۵/۳، ۰، ۱، ۲ و۳) و غلظت ساکارز در دو سطح (۲ و ۳ درصد) بود.

در مورد ریشه زایی در محیط این ویوو ، چهار آزمایش مجزا انجام گرفت. در آزمایش اول، که با هدف مقایسه ریشه زایی ساقه‌های تولیدی از ریزنمونه‌های جنین سربرداری شده لاین گچساران، در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف هورمونBAP انجام شد، ساقه‌های تولیدی، پس از یک روز قرارگیری در محیط MS حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیترIBA، به محیط این ویوو منتقل گردیدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۶ تکرار با تیمار محیط کشت القاء ساقه در سه سطح (۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیترBAP) انجام شد. آزمایشات بعدی روی ساقه‌های باززایی شده در ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP صورت پذیرفت. در آزمایش دوم جهت بررسی اثر میزان هورمونIBA در ریشه زایی ساقه ها، آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با دو تیمار ۳ و ۱۰ میلی‌گرم در لیترهورمون IBA با ۵ تکرار انجام شد. در آزمایش سوم جهت بررسی اثر ژنوتیپ مورد استفاده و نوع هورمون بکار رفته در ریشه زایی ساقه‌ها، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با پنج تکرار انجام شد. فاکتورها شامل ژنوتیپ در دو سطح (فیلیپ و گچساران)، نوع هورمون مورد استفاده در ریشه زایی در دو سطح (۱۰ میلی گرم در لیترIBA و NAA) بود. در آزمایش چهارم جهت بررسی اثر مدت زمان پیش تیمار با اکسین بر درصد ریشه زایی ساقه ها، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. فاکتورها شامل مدت زمان پیش تیمار قبل از انتقال به محیط این ویوو (یک و سه شبانه روز)، نوع هورمون مورد استفاده در ریشه زایی در دو سطح (۱۰ میلی گرم در لیترIBA و NAA) و لاین مورد استفاده در دو سطح (گچساران و فیلیپ) بود.

سازگاری

پس از ریشه دار شدن قلمه‌ها در محیط کشت حاوی آگار، ساقه‌ها جهت توسعه سیستم ریشه ای و رشد بعدی گیاهچه‌ها به گلدان‌های کوچک، شامل پیت اسفنجی و ماسه بادی و پرلیت منتقل گردیدند. در مورد ساقه‌های ریشه دار شده در محیط این ویوو این مرحله حذف شد. جهت سازگاری گیاهان با شرایط بیرون، روی گلدان‌ها جهت حفظ شرایط رطوبتی بالا و نزدیک به محیط این‌ویترو با پلاستیک شفاف پوشانده شد.

الف ب ج

شکل۱- انواع محیط‌های ریشه زایی: الف) محیط ریشه زایی حاوی آگار؛ ب) محیط ریشه زایی این ویوو؛ ج)سازگاری

برای آبیاری از آب مقطر استفاده شد و جهت تغذیه گیاهچه‌ها از محیط کشت ۱/۲MS به صورت محلول پاشی استفاده شد.

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری JMP و رسم نمودارها از طریق نرم افزارEXCEL 2003 انجام شد.

نتایج و بحث

محیط کشت ریشه زایی MS

در مورد ساقه‌های قرار داده شده در محیط کشت‌های مختلف حاوی آگار (MS کامل ،۱/۲MS و ۱/۴MS) و هورمون‌های مختلف اکسین در تمام سطوح هورمونی مورد استفاده ریشه زایی بسیار اندکی رخ داد. به طوری که ساقه‌ها در تمامی این محیط کشت‌ها تنها بین ۱۰ تا ۱۵ درصد ریشه دار شدند و اختلاف معنی داری بین بکارگیری سطوح مختلف هورمونی و استفاده از محیط کشت‌های MS کامل تغییر یافته، ۱/۲MS و ۱/۴MS و استفاده از غلظت‌های مختلف ساکارز وجود نداشت. بعد از ۱۰ روز کشت ساقه‌ها در محیط کشت‌های ریشه زایی حاوی اکسین‌های مختلف، انتهای اکثر ساقه‌ها متورم شده و بافت‌های غده ای شبه ریشه در مورد اکثر تیمارها مشاهده شد که البته در تیمارهای بدون هورمون چنین پدیده ای دیده نشد (شکل۲). این بافت‌های شبه ریشه ای به رنگ‌های سفید تا کرمی شکل بوده و اندازه آنها حدود ۵ تا ۲۰ میلی متر می‌رسید. با گذشت زمان از این اندام‌ها هیچ ریشه زایی مشاهده نشد. حتی واکشت این ساقه‌ها در محیط کشت‌های بدون هورمون نیز تأثیری در ریشه زایی نداشت.

این درصد پایین ریشه زایی در محیط کشت‌های حاوی آگار و هورمون اکسین توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (۳، ۱۱ و۱۳). یی و همکاران و خاور و همکاران نیز در تحقیق خود شکل گیری کالوس را در محل تشکیل ریشه گزارش نمودند (۷ و ۱۹).

۱۰ تا ۱۵ درصد از گیاهچه‌ها نیز تولید ریشه‌های نرمال در انتهای پایینی ساقه نمودند. این ساقه‌های ریشه دار شده جهت سازگاری با محیط خارج ابتدا به گلدان‌های کوچک حاوی پرلیت و ماسه منتقل شدند. روی این گلدان‌ها جهت جلوگیری از خشک شدن و حفظ رطوبت با لیوان یا پلاستیک شفاف پوشانده شد. با گذشت زمان با رشد بیشتر، گیاهچه‌ها در گلدان‌های بزرگ تر کشت و به گلخانه منتقل گردیدند.

ویلیامز و مک هاگن و ساین و رانوانشی نیز در بررسی ریشه‌زایی ساقه‌های تولیدی در گزارش خود تنها ۱۱ درصد ریشه زایی را گزارش نمودند. خاور و همکاران نیز که از محیط‌های MS حاوی غلظت‌های مختلف IBA جهت ریشه زایی ساقه‌های های جدا شده از گیاهچه‌های ۱۰ روزه عدس استفاده نمودند، با درصدپایین ساقه زایی مواجه شدند. در بهترین حالت درصد ریشه زایی در این تحقیق حدود ۲۵ درصد بود. سارکر و همکاران ابتدا جهت ریشه زایی از محیط کشت‌های MS کامل و ۱/۲MS حاوی غلظت‌های پایینIBA و IAA استفاده نمودند اما نشانه ای از آغازش ریشه در ریزنمونه‌ها و واریته‌های مختلف عدس مشاهده نکردند. لذا با کشت ساقه‌ها در محیط حاوی غلظت بالای IBA (۲۵ میلی گرم در لیتر) مشاهده نمودند که حدود ۳۰ درصد نمونه‌ها ریشه دار گردیدند. خاور و همکاران ساقه‌های باززایی شده حاصل از القاء غلظت‌های مختلف هورمون TDZ، را جهت ریشه‌زایی به محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA منتقل نمودند. اما ریشه زایی موفقی صورت نگرفت و تنها در ۲۵ درصد ساقه‌ها ریشه تولید شد که با تشکیل کالوس در انتهای بریده شده همراه بود. فرانتینی و روئیز که فرایند ریشه‌زایی را در عدس و سایر حبوبات را بررسی نمودند بیان کردند که پاسخ ریشه‌زایی قسمت‌های گره‌ای عدس بستگی به جهت ریزنمونه‌ها، غلظت هورمون ها، نمک و غلظت‌های کربوهیدرات موجود در محیط کشت دارد.

شکل۲- بافت شبه ریشه ای تشکیل شده در انتهای ساقه کشت شده در محیط ریشه زایی آگار دار

شکل۳- القاء ریشه در انتهای ساقه: الف) ریشه زایی در محیط کشت MS کامل حاوی آگار؛ ب) ریشه زایی در محیط این ویوو

آنها توانستند فراوانی ریشه‌زایی بالایی (۹۵/۳۵ درصد) را با کشت قطعات گره‌ای عدس در جهت وارونه (انتهای Apical روی محیط کشت) بدست آورند. به عقیده این محققان، تفاوت در پاسخ ریشه زایی، بین ریزنمونه‌های کشت شده در جهت عادی و معکوس یا وارونه می‌تواند به این دلیل باشد که در طول کشت این‌ویترو، گرادیان فاکتورهای رشدی و ترکیبات مغذی که در ریزنمونه‌های معکوس شده به وجود می‌آید، مشابه با گرادیان موجود در شرایط طبیعی در داخل گیاه می‌باشد.

نول و همکاران نظریه فرانتینی و روئیز مبنی بر اثر جهت ریزنمونه روی ریشه زایی ساقه‌های باززایی شده عدس را رد کردند و فرضیه اثر هوادهی در ریشه زایی ریزبرش یافته‌های عدس را، مطرح نمودند. به عقیده این محققان کمبود اکسیژن محیط کشت به عنوان عامل محدودکننده در فرایند ریشه زایی می‌باشد. به این معنی که کمبود اکسیژن در ناحیه انتهایی ساقه نه تنها از آغازش ریشه جلوگیری می‌کند بلکه حتی محدود کننده طویل‌شدن ریشه نیز می‌باشد. به عقیده این محققان، در محیط آگار، اتیلن تولیدی از قسمت بریده شده ساقه نمی تواند از محیط خارج گردد و از طرفی قرارگرفتن ریزنمونه به مدت طولانی در معرض NAA یا IAA، فرایند ریشه زایی را کند می‌کند. لذا در معرض غلظت بالای اکسین قرار دادن ریزنمونه‌ها به مدت زمان کمتر، می‌تواند راهکار خوبی برای القاء ریشه باشد.

ریشه زایی در محیط این ویوو

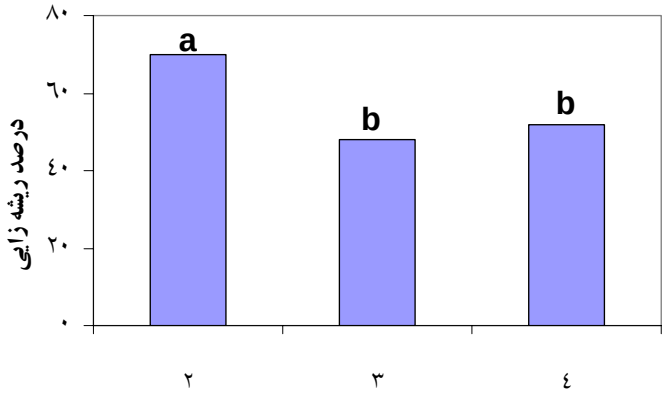
در محیط این ویوو بر خلاف محیط این ویترو ریشه هایی با فراوانی بسیار بالاتری تولید گردید. کیفیت، طول و تعداد ریشه‌های تولیدی نیز برتری قابل توجهی نسبت به ریشه‌های تولیدی در محیط‌های حاوی آگار داشت (شکل۳). لذا به منظور بهینه سازی ریشه زایی در روش این‌ویترو- این‌ویوو چهار آزمایش مجزا انجام شد که نتایج آن به تفضیل در ذیل آمده است.

اثر محیط کشت‌های مختلف القاء ساقه بر روی درصد ریشه زایی

نتایج بررسی اثر محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف هورمونBAP در درصد ریشه زایی ساقه‌های تولیدی عدس رقم گچساران در این محیط کشت ها، نشان داد که بین غلظت‌های مختلف هورمونBAP بکار رفته در محیط کشت‌های ساقه زایی، اختلاف معنی داری وجود دارد ($p<0/05$). به این ترتیب که ساقه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیترBAP، دارای درصد ریشه زایی بیشتری نسبت به ساقه‌های رشد یافته در محیط کشت‌های حاوی ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیترBAP بودند (۷۰ درصد). با این وجود تفاوت معنی داری بین استفاده از غلظت‌های ۳ و ۴ میلی‌گرمBAP در محیط القاء ساقه بر روی ریشه زایی وجود نداشت (شکل۴).

بررسی اثر غلظت‌های مختلف هورمونی بر روی تعداد ریشه‌های تولیدی به ازای هر ریزنمونه تفاوت معنی داری را بین تیمارهای هورمونی بکاررفته در محیط ساقه زایی نشان نداد. طول ریشه‌های تولیدی نیز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف هورمونBAP مورد استفاده در ساقه زایی قرار نگرفت.

در تحقیقات انجام شده توسط محققان مختلف، اثر بازدارنده سیتوکینین‌ها روی ریشه زایی ریزنمونه‌های کشت شده در این محیط کشت‌ها گزارش شده است. به عنوان مثال، پولانکو و همکاران که از هورمون TDZ در محیط ساقه زایی استفاده کرده بودند، نتایج مشابهی را در مورد اثر بازدارنده این هورمون بر ریشه زایی گزارش نمودند. آنها جهت ریشه دار کردن ساقه‌های رشد یافته عدس در محیط کشت MS حاوی TDZ، آنها را به محیط کشت MS حاوی هورمون NAA منتقل نمودند. در این تحقیقات ریشه زایی به طور اتفاقی و با درصد پایینی صورت گرفت (۸). پلانکو و روئیز اثرBAP را روی ریشه زایی عدس در شرایط این‌ویترو و این‌ویوو بررسی نمودند.



شکل٤- اثر غلظت‌های مختلف هورمونBAP بکاررفته در محیط کشت ساقه زایی بر روی ریشه زایی

ریشه زایی در شرایط این‌ویترو به میزان ۴/۵ تا ۴۰ درصد در محیط حاوی ۲ میلی گرم در لیتر IAA صورت گرفت. در این شرایط درصد ریشه زایی بستگی به غلظت سیتوکینین مورد استفاده و مدت زمان قرارگیری ریزنمونه در معرض سیتوکینین جهت ساقه زایی داشت. مطالعات ریشه زایی در این ویوو حاکی از اثر ممانعت کننده شدید BAP در رشد ریشه بود که با کاهش شدیدی در شاخص میتوزی مریستم ریشه همراه بود (۷). در تحقیق حاضر، به دلیل اینکه مدت زمانی که ساقه‌ها در معرض سیتوکینین قرار گرفتند، نسبت به سایر آزمایشات کمتر بود (حدود دو هفته) لذا به دلیل کمتر شدن غلظت این هورمون در گیاه اثر بازدارنده آن کمتر دیده شده و بنابراین تفاوت چندانی بین استفاده از غلظت‌های هورمونی ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیترBAP دیده نشد. از طرف دیگر به دلیل استفاده از محیط این ویوو بجای بکارگیری محیط کشت حاوی آگار جهت ریشه زایی ساقه‌های باززایی شده، درصد ریشه زایی بیشتری نسبت به تحقیقات ذکر شده انجام گرفت. این آزمایش فرضیه اثر هوادهی در ریشه زایی را که توسط نول و همکاران در مورد ریزقلمه‌های عدس ارائه نمودند، تائید می نماید (۵).

اثر غلظت‌های مختلف هورمونIBA بر روی ریشه زایی ساقه ها

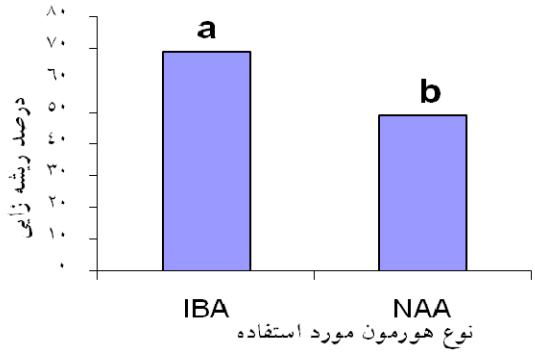
نتایج حاصل از آزمایش بررسی تاثیر استفاده از دو غلظت مختلف ۳ و ۱۰ میلی‌گرم در لیترIBA در محیط کشت‌های ریشه زایی، جهت ریشه دار نمودن ساقه‌های تولیدی در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیترBAP، نشان داد که تفاوت معنی داری بین استفاده از۳ میلی‌گرم در لیترIBA و استفاده از ۱۰میلی‌گرم در لیترIBA وجود ندارد. به عبارت دیگر می توان در این گیاه جهت ریشه زایی به جای استفاده از ۱۰ میلی‌گرم در لیترIBA، از ۳ میلی‌گرم در لیترIBA جهت تحریک اولیه ریشه زایی استفاده نمود. مشاهده این پدیده حاکی از آن است که استفاده از غلظت بالای اکسین، که توسط نول و همکاران (۲۰۰۶) در مورد ریشه دار نمودن ریزقلمه‌های عدس پیشنهاد شده است، ضروری نبوده و اثرهوادهی در ریشه زایی ساقه‌ها نسبت به تیمار غلظت بالای اکسین محسوس تر می‌باشد. به طوری که استفاده از محیط این ویوو به جای محیط MS حاوی آگار به دلیل هوارسانی بیشتر به انتهای ساقه‌ها دارای نتایج بهتری در ریشه زایی ساقه‌های تولیدی می‌باشد.

اثر ژنوتیپ و نوع هورمون بکار رفته بر روی ریشه زایی ساقه‌ها در محیط این ویوو

نتایج حاصل از بررسی اثر دو ژنوتیپ مختلف در ساقه زایی ساقه‌های باززایی شده از این ژنوتیپ‌ها نشان داد که اختلاف معنی داری بین ژنوتیپ‌های گچساران و فیلیپ وجود نداشت. هر دو ژنوتیپ ریشه زایی مشابهی (حدود ۶۰ درصد) در محیط این ویوو با پیش تیمار یک روز قرار گرفتن نمونه‌ها در محیط MS تغییر یافته حاوی ۱۰ میلی گرم در لیتر IBA از خود نشان دادند. تعداد ریشه‌های تولیدی نیز در هر دو ژنوتیپ مورد استفاده مشابه هم بود (حدود ۲/۳ سانتیمتر). همین نتایج نیز در مورد طول ریشه‌های تولیدی مشاهده شد (۱/۹۶ سانتیمتر).

بررسی اثر دو هورمون مختلف IBA و NAA با غلظت ۱۰

میلی‌گرم در لیتر بر روی درصد ریشه زایی ساقه‌های باززایی شده نشان داد که اثر معنی داری بین استفاده از IBA و NAA در میزان ریشه زایی ساقه‌ها وجود دارد. به این صورت که هورمون IBA، درصد ریشه بیشتری (۶۹ درصد) نسبت به NAA (۴۹ درصد) تولید می‌نماید. تعداد و طول ریشه‌های تولیدی نیز تحت تاثیر نوع هورمون بکار رفته در ریشه زایی قرار نگرفت (شکل۵). بررسی اثر متقابل نوع ژنوتیپ مورد استفاده و هورمون بکار رفته در ریشه زایی ساقه‌های باززایی شده، تفاوت معنی داری را آشکار نساخت.



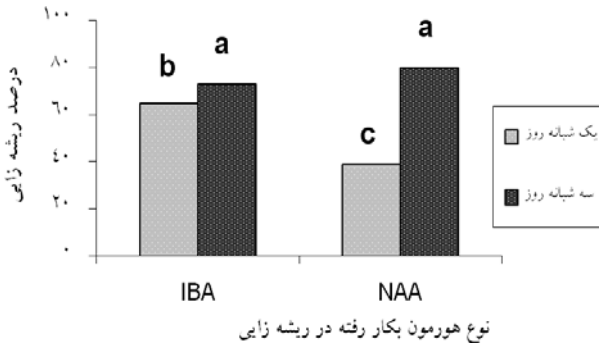
شکل۵- اثر نوع هورمون مورد استفاده با غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر بر روی درصد ریشه‌های تولیدی

اثر مدت زمان پیش تیمار با اکسین بر درصد ریشه زایی ساقه ها

داده‌های حاصل از بررسی اثر مدت زمان یک و سه شبانه روز پیش تیمار دو هورمون IBA و NAA، نشان داد که اختلاف معنی داری بین این دو تیمار وجود دارد. بطوری که قرار دادن ساقه‌ها به مدت سه شبانه روز در محیط پیش تیمار MS حاوی ۱۰ میلی گرم در لیتر از هر دو نوع هورمون، درصد ریشه زایی بیشتری (۷۶/۵ درصد) نسبت به تیمار یک شبانه روز در ساقه‌های مذکور تولید نمود (۵۲ درصد). همچنین نتایج نشان داد که تعداد ریشه‌های تولیدی نیز تحت تاثیر تیمار مدت زمان پیش تیمار اکسین قرار می‌گیرد. به طوری که این تیمار تعداد ریشه‌های بیشتری (۳/۲ عدد) نسبت به تیمار یک شبانه روز (۲/۱ عدد) تولید نمود. اما طول ریشه‌های تولیدی تحت تاثیر این پیش تیمار قرار نگرفت.

بررسی اثر متقابل زمان پیش تیمار و نوع هورمون مورد استفاده، اختلاف معنی داری را نشان نداد. بیشترین درصد ریشه زایی مربوط به پیش تیمار سه شبانه روز با ۱۰ میلی گرم در لیتر NAA بود (۸۰ درصد) و کمترین درصد ریشه زایی مربوط به پیش تیمار یک شبانه روز ۱۰ میلی گرم در لیتر NAA بود (۴۰ درصد) (شکل۶).

نول و همکاران (۲۰۰۶) نیز درصد بالای ریشه زایی را در مورد کاشت ریزقلمه‌های عدس در محیط IVS گزارش نمودند. با این تفاوت که ریز قلمه‌های مورد استفاده در این تحقیق از قطعات گره ای گیاهچه‌های عدس تهیه شده و در معرض سیتوکینین قرار نگرفتند.



شکل٦- اثر مدت زمان پیش تیمار با اکسین بر روی درصد ریشه زایی ساقه ها

در مجموع نتایج آزمایش‌های فوق نشان داد که محیط ریشه زایی این ویوو، محیط مناسب تری نسبت به محیط کشت جامد MS جهت ریشه زایی ساقه‌های باززایی شده از ریزنمونه محور جنینی می‌باشد. علاوه بر آن مزایای دیگر استفاده از این سیستم ریشه زایی عبارت است از:

تنها دو مرحله از ریزازدیادی (ریشه‌زایی و ساقه‌زایی) وجود خواهد داشت.

ریشه زایی و سازگاری[1] همزمان با هم انجام می شود و گیاهان از نظر فتوسنتزی با سرعت بیشتری به خودکفایی می رسند.

تلفات حاصل از انطباق گیاهان با شرایط بیرون از محیط کشت بافت به حداقل می رسد.

منجر به کاهش هزینه‌های ریزازدیادی (هزینه‌های محیط ریشه زایی و مصرف انرژی در طول این مرحله) خواهد شد و گیاهان جهت کشت در گلخانه یا مزرعه در مدت زمان کوتاهتری آماده خواهند شد.

بعلاوه با این روش مشکلات مربوط به تشکیل کالوس بین ریشه و ساقه و نیز آسیب‌های وارده به ریشه در طول انتقال گیاهچه به خاک و همچنین بیماری‌های خاکزاد که قابلیت حیات گیاهچه‌ها را کاهش می‌دهند، برطرف می‌گردد.

1- acclimatization

منابع

۱- طالب بیدختی، س. ۱۳۷۸. بررسی تاثیر برخی از هورمونهای رشد بر کشت این ویتروی ارقام عدس. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی گیاهی گرایش فیزیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲- قاسمی عمران، و.، و ع. باقری. ۱۳۸۶. بهینه سازی شرایط کشت به منظور ساقه زایی گیاه عدس در شرایط این ویترو. مجله علمی- پژوهشی علوم کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی. صفحه ۱۴۷-۱۳۹.

3- Christou, P. 1993. Biotechnology of crop legumes. Euphytica. 74:165-185.

4- Fratini, R. and M. L. Ruiz. 2003. A rooting procedure for lentil (*Lens culinaris* Medik.) and other hypogeous legumes (pea, chickpea and lathyrus) based on explant polarity. Plant Cell Reports. 21:726-32.

5- Fratini, R. and M. L. Ruiz. 2001. Comparative study of different cytokinins in the induction of morphogenesis in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *In vitro* Cellular and Developmental Biology. 38: 46-51.

6- Gulati, A., P. Schryer and A. McHughen. 2001. Regeneration and micrografting of Lentil shoots. *In Vitro* Cellular and Development Biology. 37:798-802.

7- Khawar, Kh. M., C. Sancak, S. Uranbey and S. Ozcan. 2003. Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis. Turk Journal of Botany. 28:421-426.

8- Khawar, Kh. M. and S. Ozcan. 2001. Effect of Indole-3-Butyric acid on *In vitro* root development in lentil (*Lens culinaris* Medik.). Turk Journal of Botany. 26:109-111.

9- Murashige, T. and F. Skoog.1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiological Plant 15:473-97.

10- Newell, C., D. Growns and J. McComb. 2006. Aeration is more important than shoot orientation when rooting lentil (*Lens culinaris* Medik.) cv. `Digger" microcuttings *in vitro*. *In vitro* Cellular and Development Biology. 42: 197-200.

11- Parrott, W. A., E. G. Williams, D. F. Hildebrand, G. B. Collins, and E.G. Williams.1988. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. Plant Cell Tissue and Organ Culture 16: 15-21.

12- Polanco, M. C. and M. L. Ruiz .1997. Effect of benzylaminopurine on *In vitro* and in *vivo* root development in lentil (*Lens culinaris* Medik.). Plant Cell Reports. 17:22–26.

13- Polanco, M., C.M. I. Peláez and M.L. Ruiz. 1988. Factors affecting callus and shoot formation from *In vitro* cultures of *Lens culinaris* Medik. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 15:175-182.

14- Polanco, M. and M. L., Ruiz. 2001. Factors that affect plant regeneration from *In vitro* culture of immature seeds in four lentil cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 66: 133-139.

15- Sarker, R. H., M. M. Barkat; B. Ashapurno, M. Shirin, N. Mouful, H. Rehana and M. L. Hoque. 2003. *In vitro* regeneration in lentil. Plant Tissue Culture. 13: 155-164.

16- Singh, R. K. and S. S. Raghuvanshi. 1989. Plantlet regeneration from nodal segment and shoot tip derived explants of lentil. Lens Newsletters. 16: 33–35.

17- 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.

18- Williams, D. J. and A. McHughen. 1986. Plant regeneration of the legume *Lens culinaris* Medik. (lentil) *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 7: 149–153.

19- Ye, G., D. L. Mcneil, A. J. Conner and G. D. Hill. 2002. Multiple shoot formation in lentil (*Lens culinaris*) seeds. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 30:1-8.