جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۳، شماره ۱، صفحه ۹۲-۷۷ (۱۳۹۴)

باززایی درون‌شیشه‌ای گیاه دارویی عدس‌الملک (*Securigera securidaca*) از طریق جنین‌زایی سوماتیکی

افشین حیدری[۱]، مراد جعفری*[۲]، بهمن حسینی[۳]، مریم احساسات وطن[۴] و شاهین فریدوند[۵]

۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران، واحد شرق

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

پست الکترونیک: m.jafari@urmia.ac.ir

۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۵- دانشجوی دکترای تخصصی اکولوژی گیاهان زراعی، مرکز آموزش کشاورزی شهید باکری، ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۰۹

چکیده

جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی گیاه کامل در کشت‌های کالوس حاصل از ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه جدا شده از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای گیاه دارویی عدس‌الملک (*Securigera securidaca*) به‌دست آمد. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS با ویتامین‌های B5 غنی شده با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد BAP یا TDZ در ترکیب با غلظت‌های مختلف NAA کشت شدند و آزمایش‌های فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار و ۱۲ ریزنمونه در هر تکرار اجرا شدند. بر اساس نتایج حاصل، در نمونه‌های شاهد هیچ کالوسی القا نشد، در حالی‌که القای کالوس و ساختارهای جنینی به‌خوبی در هر دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل کشت شده در محیط کشت حاوی BAP یا TDZ مشاهده شد. اگرچه TDZ در ترکیب با NAA منجر به القای کالوس و جنین‌زایی در هر سه نوع ریزنمونه شد، با اینحال این سیتوکینین در القای کالوس و جنین‌زایی در ریزنمونه ریشه بسیار مؤثر بود. به‌طوری‌که دستورالعمل توصیف شده در این مطالعه می‌تواند در تولید انبوه گیاهان شبیه به اصل و تولید متابولیت‌های با ارزش دارویی گیاه عدس‌الملک مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده رشد، جنین‌زایی سوماتیکی، ریزنمونه، عدس‌الملک، کال‌زایی.

مقدمه

عدس‌الملوک با نام علمی *Securigera securidaca* از خانواده Fabaceae، گیاهی دولپه، یکساله، علفی و دگرگرده‌افشان (Costa *et al.*, 2014) است که در غرب آسیا، اروپا و همچنین آفریقا می‌روید و در ایران به‌خصوص در استان‌های خوزستان، آذربایجان‌شرقی و فارس پراکنش دارد (Rechinger, 1984; Gharaman, 1993). بذرهای این گیاه در طب سنتی ایران و مصر برای درمان بیماری‌های مختلف ازجمله دیابت، فشار خون، چربی بالای خون، عفونت‌های انگلی مانند مالاریا،

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بیماری‌های گوارشی و صرع استفاده شده است (Hosseinzadeh *et al.*, 2002; Ghorbani, 2013). مطالعات فیتوشیمی وجود چندین گروه از ترکیبات ازجمله ساپونین‌های نوع تری‌ترپنوئید استروئیدی و پنتاسیکلیک، کاردنولیدها و فلاونوئیدها را در بذرهای *S. securidaca* اثبات کرده‌اند (Zatula *et al.*, 1966; Behbahani *et al.*, 2014). علاوه بر خصوصیات دارویی فوق‌الذکر، عصاره بذر این گیاه خواص ادرارآور و پایین‌آورنده سطح پتاسیم خون دارد (Ali *et al.*, 1998) و اخیرا اثرات ضد ویروسی مانند ضد ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۲ (Sayedipour *et al.*, 2012)، ضد ویروس اچ‌آی‌وی-۱ (Behbahani *et al.*, 2014) و خواص ضدسرطانی فلاونوئیدهای گلیکوزیدی آن بر روی رده‌های سلولی سرطان‌های پستان، کلون و کولورکتال گزارش شده است (Tofighi *et al.*, 2014).

بیشتر گیاهان دارویی به‌طور وحشی در طبیعت می‌رویند. بهره‌برداری غیرصحیح و بی‌رویه از زیستگاه‌های طبیعی علاوه بر اینکه میزان تولید سنتی آنها را پایین آورده است، این منابع با ارزش گیاهی را بیشتر در معرض خطر انقراض قرار داده است. از طرفی بیشتر گیاهان دارویی با استفاده از روش‌های مرسوم قابل تولید نمی باشند، بنابراین استفاده از روش‌های بیوتکنولوژیک ازجمله کشت بافت و سلول گیاهی به‌منظور تکثیر انبوه و همچنین امکان افزایش توان ژنتیکی آنها برای تولید ترکیبات دارویی مهم، تولید گیاهان یکنواخت از لحاظ ژنتیکی و حفظ ذخایر ژنتیکی با ارزش و در حال انقراض می‌تواند بسیار مفید و از لحاظ تجاری بسیار سودمند باشد (Rout *et al.*, 2000; Sood & Chauhan, 2009).

به طور کلی دو مسیر اصلی باززایی گیاه کامل که پیش‌شرط لازم برای استفاده از روش‌های درون شیشه‌ای در اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک گیاهان است، جنین‌زایی سوماتیکی و اندام‌زایی شاخساره می‌باشد (Phillips, 2004). جنین‌زایی سوماتیکی روشی برای تولید گیاهان در سطح انبوه در شرایط درون شیشه‌ای است که با القای توانایی تولید جنین در سلول‌های سوماتیک منجر به تولید گیاه کامل می‌شود (Gram *et al.*, 1996). تولید جنین سوماتیکی برای اولین بار از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه هویج گزارش شد (Steward *et al.*, 1958). جنین‌زایی سوماتیکی در مقایسه با روش‌های اصلاحی مرسوم دارای مزایای بسیاری می‌باشد، به‌ویژه در رابطه با تکثیر ژنوتیپ‌های موردنظر با استفاده از بیورآکتورها. علاوه بر این، جنین‌های سوماتیکی می‌توانند برای تولید بذرهای مصنوعی مورد استفاده قرار گیرند، که در آن جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده و جوانه‌زنی آنها مانند بذرها طبیعی می‌باشد (Norgaard *et al.*, 1993; Ravi & Anand, 2012). این سیستم روشی کارآمد برای تولید انبوه گیاهان شبیه به اصل از یک گیاه مهم و پر ارزش از نظر اقتصادی است. همچنین جنین‌زایی سوماتیکی می‌تواند به‌عنوان مدلی مناسب برای مطالعات پایه ژنتیکی مرتبط با فرایند جنین‌زایی زیگوتی در گیاهان، به‌ویژه در رابطه با تغییرات بیوشیمایی و مورفولوژیک که به‌دلیل تغییر در الگوی بیان ژن‌های درگیر در این فرایند اتفاق می‌افتد، مورد استفاده قرار گیرد (Santos *et al.*, 2005; Lelu-Walter *et al.*, 2013).

بر اساس منابع علمی قابل دسترس، تاکنون گزارشی در مورد کشت درون شیشه‌ای و باززایی در گیاه عدس‌الملوک انجام نشده است، بنابراین این مطالعه اولین گزارش در مورد باززایی درون شیشه‌ای آن از طریق جنین‌زایی سوماتیکی است. با توجه به این که میزان باززایی به‌عوامل مختلفی ازجمله ژنوتیپ، نوع و منشأ ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد بستگی دارد (Leshem *et al.*, 1982; Komamine *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 2005; Prakash and Gurumurthi; 2010)، بنابراین در این تحقیق تأثیر نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد و نوع ریزنمونه بر جنین‌زایی مورد بررسی قرار گرفت.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ضدعفونی بذر

بذرهای گیاه عدس‌الملوک (*Securigera securidaca*) از مراتع اطراف شیراز جمع‌آوری شد و درستی نمونه در هرباریوم گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان‌غربی تأیید شد. بذرها پس از حذف ناخالصی‌ها با آب معمولی شستشو داده شدند، سپس به‌مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و پس از آن به‌مدت ۸ دقیقه در هیپوکلریت سدیم (حاوی ۵ درصد کلر فعال) همراه با ۲۰ میکرولیتر توین قرار گرفتند و پس از سه بار آب‌کشی با آب مقطر استریل، هر بار به‌مدت ۵ دقیقه در محیط کشت پایه MS (Murashige & Skoog, 1962) همراه با ویتامین‌های محیط B5 (Gamborg *et al.*, 1968) حاوی ساکارز ۳ درصد و آگار ۰/۸ درصد کشت شدند. برای تهیه ریزنمونه کوتیلدون کشت‌ها در اتاقک رشد با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با میزان نور ۱۶۰ $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ و دمای ۲۲±۲°C نگهداری شدند و برای تهیه ریزنمونه ریشه و هیپوکوتیل کشت‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C قرار داده شدند تا گیاهچه‌ها اتیوله شوند. بعد از ۱۴ روز، از گیاهچه‌های دارای رشد مناسب به‌عنوان منبع تهیه ریزنمونه استفاده شد.

القای کالوس و جنین‌زایی

پس از تهیه ریزنمونه‌های کوتیلدون، ریشه و هیپوکوتیل، نمونه‌ها برای القای کالوس در پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت پایه MS غنی‌شده با ویتامین‌های B5، ساکارز ۳ درصد و آگار ۰/۸ درصد شامل غلظت‌های مختلف BAP (۰، ۲/۲۲، ۴/۴۴، ۶/۶۶ و ۸/۸۸ میکرومولار) یا TDZ (۰، ۲/۲۷، ۴/۵۴، ۶/۸۱ و ۹/۰۸ میکرومولار) در ترکیب با غلظت‌های مختلف NAA (۰، ۲/۶۸، ۴/۰۳ و ۵/۳۷ میکرومولار) در اتاقک رشد با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با میزان نور ۱۶۰ $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ و دمای ۲۲±۲°C به‌مدت یک ماه کشت شدند. به‌منظور تمایز و رشد جنین‌ها، یک ماه پس از رشد کالوس‌ها، توده‌های کالوس در محیط کشت MS حاوی همان ترکیب از تنظیم‌کننده‌های رشد انجام شد. گیاهچه‌های جنینی حاصل از کالوس‌های جنین‌زا به‌منظور رشد بیشتر به محیط کشت پایه MS با ویتامین‌های B5 حاوی ساکارز ۳ درصد و آگار ۰/۸ درصد و بدون تنظیم‌کننده رشد انتقال داده شدند.

القای ریشه نابجا و سازگاری گیاهچه‌ها

به‌منظور توسعه سیستم ریشه‌ای قوی، گیاهچه‌ها پس از رشد نسبی، در محیط کشت ریشه‌زایی شامل محیط کشت پایه MS و ½ MS حاوی سطوح مختلف NAA یا IBA (جدول ۳) کشت گردیدند. گیاهچه‌های با سیستم ریشه‌ای قوی برای سازگاری به محیط غیر استریل (گلخانه) به گلدان‌های حاوی بسترهای مختلف کشت، پیت:پرلیت:خاک زراعی با نسبت (۱:۱:۱ و ۲:۱:۱) و با رطوبت نسبی ۹۶ درصد و دمای ۲۴±۲°C منتقل شدند.

یادداشت‌برداری داده‌ها و تجزیه و تحلیل‌های آماری

مطالعه تأثیر ترکیب غلظت‌های مختلف BAP و TDZ با NAA بر کال‌زایی، جنین‌زایی و باززایی گیاه به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی در ۴ تکرار و ۱۲ ریزنمونه در هر تکرار برای هر یک از ریزنمونه‌ها (کوتیلدون، ریشه و هیپوکوتیل) انجام شد و صفات درصد کال‌زایی (تعداد توده کالوس تولید شده نسبت به تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده) و وزن توده کالوس (میلی‌گرم) و تعداد گیاهچه‌های باززا شده به ازای هر قطعه کالوس یادداشت‌برداری شدند. همچنین آزمایشی به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح پایه کاملا تصادفی برای بررسی اکسین‌های NAA و IBA و غلظت نمک‌های محیط کشت MS بر توسعه سیستم ریشه گیاهچه‌های باززاشده پیاده شد و صفات درصد افزایش ریشه‌زایی و طول ریشه یادداشت‌برداری شد. برای تجزیه و تحلیل

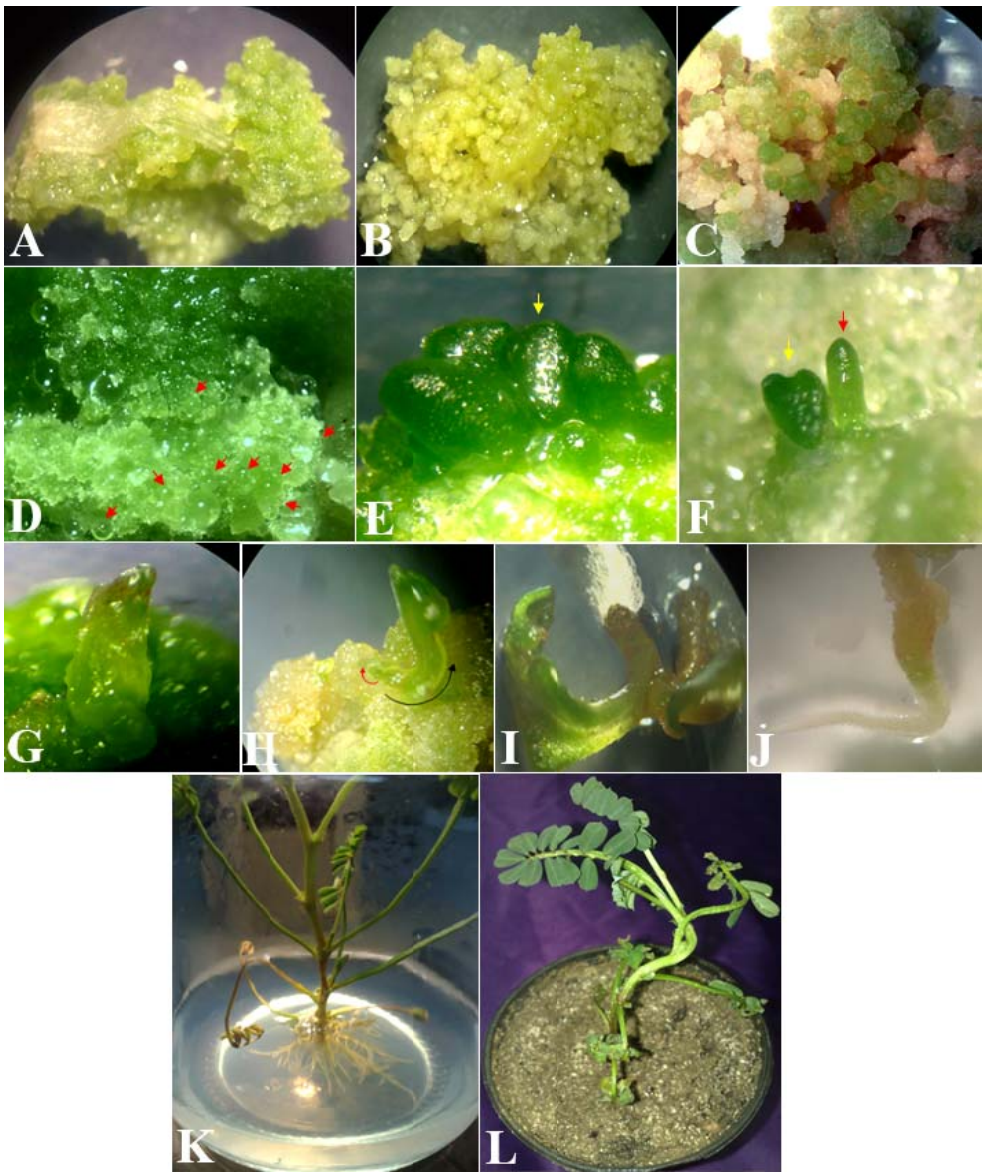
آماری داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9.1 استفاده شد. قبل از تجزیه داده‌ها آزمون نرمال‌بودن انجام شد و برای داده‌های حاصل از درصدگیری، شمارش تبدیل داده مناسب انجام گردید. با توجه به معنی‌دار بودن آزمون F، مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار فیشر (FLSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

تأثیر BAP و NAA بر کال‌زایی، جنین‌زایی و تولید گیاهچه

در همه ریزنمونه‌های مورد مطالعه و در تمام تیمارهای مورد استفاده کال‌زایی مشاهده شد، ولی در تیمار شاهد کالوسی القا نشد. شکل ۱ فرایند القای کالوس، جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی گیاه کامل را نشان می‌دهد. در آزمایش مربوط به تأثیر BAP و NAA بر درصد کال‌زایی و وزن کالوس در ریزنمونه کوتیلدون نتایج تجزیه آماری و مقایسه میانگین (جدول ۱) نشان داد که بین تیمارها از نظر صفت درصد کال‌زایی اختلاف معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) وجود دارد. به‌طورکلی بیشترین میزان کال‌زایی (۹۰ درصد) در ریزنمونه کوتیلدون در بالاترین غلظت BAP (۸/۸ میکرومولار) در ترکیب با پایین‌ترین غلظت NAA (۲/۲ میکرومولار) به‌دست آمد. در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه کال‌زایی در تمام غلظت‌های NAA و BAP مشاهده شد. در مورد صفت وزن کالوس در همه ریزنمونه‌های مورد مطالعه بین تیمارها اختلاف معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) وجود داشت. پاسخ ریزنمونه‌ها از نظر صفت وزن کالوس هم نسبت به تیمارها متفاوت بود، به‌طوری‌که میانگین بیشترین وزن کالوس در ریزنمونه کوتیلدون (۲۲۰/۷۵ میلی‌گرم) در غلظت ۴/۰۳ میکرومولار NAA در ترکیب با ۶/۶۶ میکرومولار BAP به‌دست آمد، در حالی‌که این مقدار بیشینه برای ریزنمونه هیپوکوتیل (۲۶۷/۵ میلی‌گرم) و ریشه (۱۶۸/۳۳) به‌ترتیب در تیمار ۵/۳۳ میکرومولار NAA + ۴/۰۳ میکرومولار BAP و تیمار ۲/۲۲ میکرومولار NAA + ۴/۴۴ میکرومولار BAP مشاهد شد. در غلظت بالای NAA و BAP برای ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه و در مقابل، در غلظت پایین آنها برای ریزنمونه کوتیلدون کمترین وزن برای کالوس‌های تولید شده ثبت شد.

به‌منظور تشکیل کالوس جنین‌زا (شکل ۱b)، کالوس‌ها پس از یک ماه رشد دوباره در همان ترکیب تیماری از تنظیم‌کننده‌های رشد واکشت شدند. در هر سه نوع ریزنمونه در تمام تیمارهای اعمال شده (بجز تیمار شاهد) ساختارهای جنینی تشکیل شد (شکل ۱، G-H). بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها، در هر سه نوع ریزنمونه بین سطوح مختلف BAP و NAA از نظر صفات جنین‌زایی و باززایی گیاهچه اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) وجود داشت (شکل‌های ۲ تا ۴). به‌طوری‌که بیشترین تعداد جنین سوماتیکی مراحل پیشرفته (۹/۴۰ جنین مرحله پیشرفته در هر قطعه کالوس) و همچنین بیشترین تعداد گیاهچه کامل باززا شده (۵/۷۳ گیاهچه در هر قطعه کالوس) در ریزنمونه کوتیلدون در محیط کشت MS حاوی ۴/۴۴ میکرومولار BAP و ۲/۶۸ میکرومولار NAA مشاهده شد (شکل ۲)، در حالی‌که تحت تأثیر ۸/۸۸ میکرومولار BAP در ترکیب با ۵/۳۷ میکرومولار NAA کمترین تعداد جنین سوماتیکی (۲/۳۳ جنین) و کمترین تعداد گیاهچه باززا شده (۱/۴۷ گیاهچه) حاصل شد.



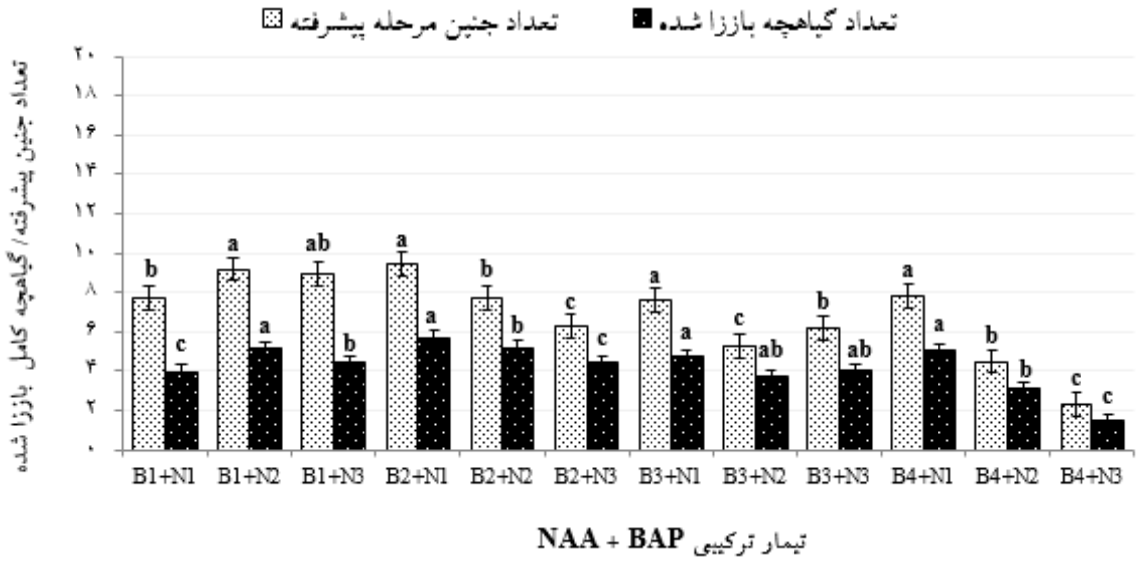
شکل ۱- فرایند جنین‌زایی سوماتیکی در عدس‌الملک با استفاده از ریزنمونه کوتیلدون؛ A: القای کالوس در ریزنمونه کوتیلدون، B: کالوس جنین‌زا با ساختار دانه‌ای، C: تشکیل ساختارهای جنینی کروی شکل، D: خوشه‌ای از جنین‌های کروی شکل (علامت پیکان)، E: ساختارهای جنینی در حال توسعه ازجمله ساختار سه گوش یا اوایل مرحله قلبی شکل (پیکان زرد)، F: جنین در مرحله ۸ سلولی یا اوایل کروی شکل (پیکان قرمز) و جنین قلبی شکل (پیکان زرد)، G: جنین ادژری شکل، H: جنبن دولپه‌ای حاوی قطب شاخساره (پیکان سیاه) و قطب ریشه (پیکان قرمز)، I: گیاهچه کامل حاصل از جنین سوماتیکی، J: جنین بدون بخش هوایی و دارای سیستم ریشه، K: گیاهچه حاصل از جنین‌زایی سوماتیکی با بخش هوایی و ریشه توسعه یافته، L: گیاه گلدانی و سازگار یافته حاصل از جنین‌زایی سوماتیکی

جدول ۱- تأثیر ترکیبی غلظت‌های مختلف BAP و NAA بر درصد کال‌زایی و وزن کالوس در ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه

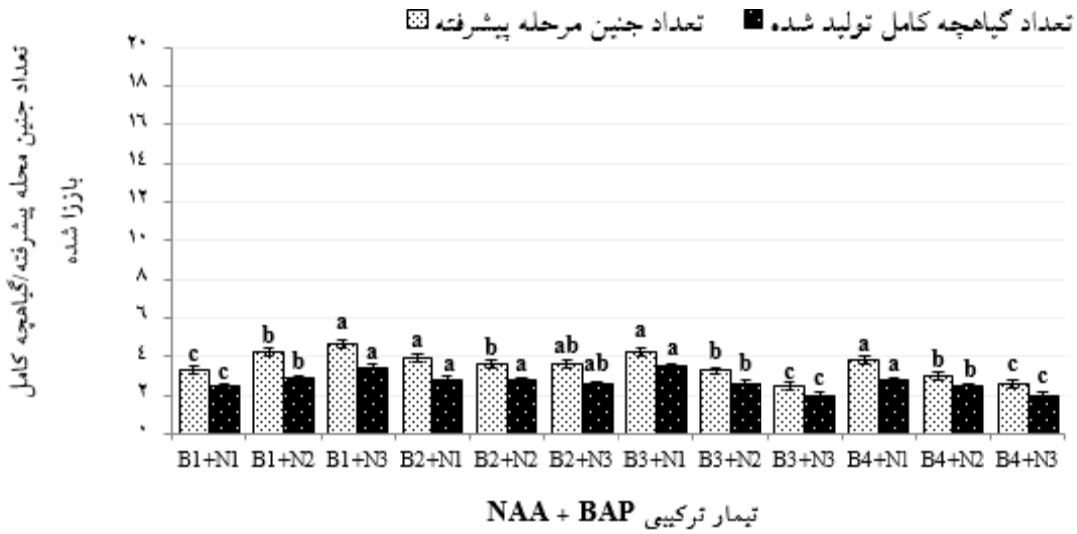
کد تیمار	ترکیب هورمونی (میکرومولار)		درصد کالزایی			وزن کالوس (میلی‌گرم)		
	NAA	BAP	کوتیلدون	هیپوکوتیل	ریشه	کوتیلدون	هیپوکوتیل	ریشه
†B0+N0	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
B1+N1	۲/۶۸	۲/۲۲	۳۴/۲۸f	۱۰۰	۱۰۰	۳۱/۷۵h	۷۷/۵f	۴۹e
B1+N2	۴/۰۳	۲/۲۲	۴۱/۵۵de	۱۰۰	۱۰۰	۷۰g	۱۴۵/۸۳d	۴۰e
B1+N3	۵/۳۷	۲/۲۲	۳۶/۴۱ef	۱۰۰	۱۰۰	۶۱g	۲۶۷/۵۰a	۱۴۲/۵۰b
B2+N1	۲/۶۸	۴/۴۴	۶۹/۵۱bc	۱۰۰	۱۰۰	۷۲/۵g	۱۱۲/۵۰e	۱۴۰b
B2+N2	۴/۰۳	۴/۴۴	۴۳/۲۶de	۱۰۰	۱۰۰	۹۱/۵f	۱۴۸/۳۳d	۱۶۸/۳۳a
B2+N3	۵/۳۷	۴/۴۴	۵۴/۰۴d	۱۰۰	۱۰۰	۱۳۸/۲۵d	۱۱۷/۵۰e	۱۱۷/۵۰c
B3+N1	۲/۶۸	۶/۶۶	۷۵bc	۱۰۰	۱۰۰	۱۵۶/۲۵c	۲۰۷/۵۰b	۹۴/۱۷d
B3+N2	۴/۰۳	۶/۶۶	۸۲/۱۶a	۱۰۰	۱۰۰	۲۲۰/۷۵a	۷۰f	۴۲/۵۰e
B3+N3	۵/۳۷	۶/۶۶	۸۵/۴۷a	۱۰۰	۱۰۰	۱۲۶/۲۵e	۵۳/۳۳g	۱۹/۱۶f
B4+N1	۲/۶۸	۸/۸۸	۹۰a	۱۰۰	۱۰۰	۲۰۵/۵۰b	۱۸۰/۸۳c	۱۱۸/۳۳c
B4+N2	۴/۰۳	۸/۸۸	۶۳/۱۴c	۱۰۰	۱۰۰	۱۴۶/۵۷cd	۷۰f	۴۴/۱۶e
B4+N3	۵/۳۷	۸/۸۸	۳۶/۴f	۱۰۰	۱۰۰	۱۴۰/۲۵d	۴۹/۱۶g	۷/۵۸g

† شاهد، میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در هر ستون بر اساس آزمون FLSD اختلاف معنی‌دار آماری (P <۰/۰۵) دارند.

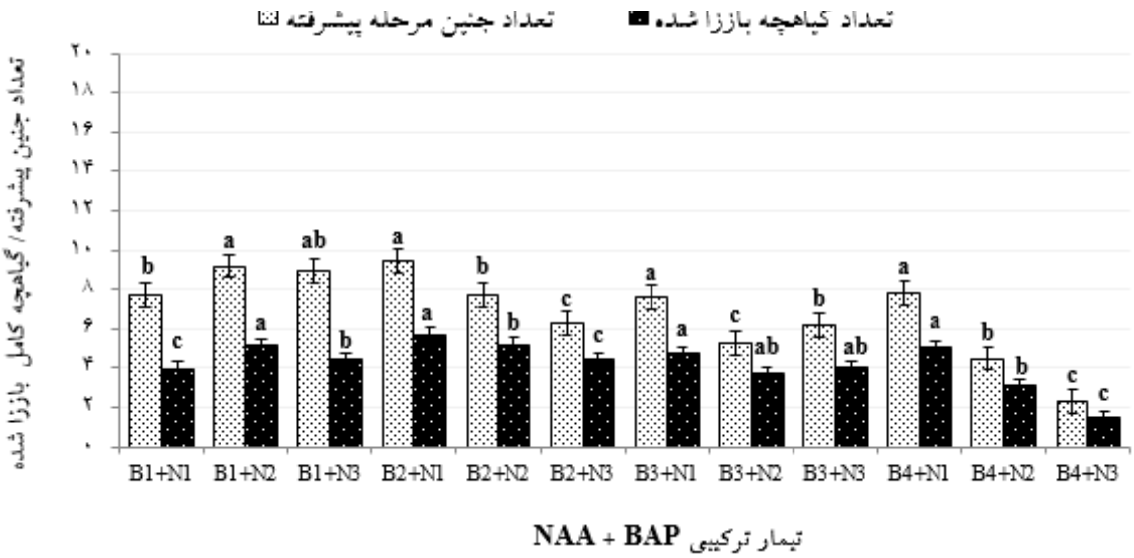
بیشترین تعداد جنین (۴/۶۵ جنین در هر قطعه کالوس) و تعداد گیاهچه باززا شده (۳/۴۵ گیاهچه در هر قطعه کالوس) برای ریزنمونه هیپوکوتیل در تیمار ترکیب غلظت پایین BAP با غلظت بالای NAA و یا بعکس مشاهده شد و در ریزنمونه ریشه تقریبا وضعیت به همین منوال بود و مقادیر بیشینه صفات (۹/۴۰ جنین و ۵/۷۱ گیاهچه باززا شده) در ترکیب غلظت بالای NAA با غلظت پایین BAP ثبت شد (شکل‌های ۴ و ۳). به‌طورکلی در هر دو ریزنمونه کمترین مقادیر صفات در غلظت‌های بالای هر دو تنظیم‌کننده رشد (۸/۸۸ میکرومولار BAP + ۵/۳۷ میکرومولار NAA) مشاهده شد.



شکل ۲- تأثیر ترکیب غلظت‌های مختلف **BAP** و **NAA** بر میزان جنین‌زایی و باززایی گیاه در ریزنمونه کوتیلدون ستون‌ها، **SE** ± میانگین صفت را نشان می‌دهند. میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک بر اساس آزمون **FLSD** اختلاف معنی‌دار آماری ($P < ۰/۰۵$) دارند.



شکل ۳- تأثیر ترکیب غلظت‌های مختلف **BAP** و **NAA** بر میزان جنین‌زایی و باززایی گیاه در ریزنمونه هیپوکوتیل ستون‌ها، **SE** ± میانگین صفت را نشان می‌دهند. میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک بر اساس آزمون **FLSD** اختلاف معنی‌دار آماری ($P < ۰/۰۵$) دارند.



شکل ۴- تأثیر ترکیب غلظت‌های مختلف BAP و NAA بر میزان جنین‌زایی و باززایی گیاه در ریزنمونه ریشه

ستون‌ها، SE ± میانگین صفت را نشان می‌دهند. اعداد دارای حروف غیر مشترک بر اساس آزمون FLSD اختلاف معنی‌دار آماری ($P < ۰/۰۵$) دارند.

تأثیر TDZ و NAA بر کال‌زایی، جنین‌زایی و باززایی گیاهچه

بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل آماری و مقایسات میانگین آزمایش دوم، در هر سه نوع ریزنمونه بین سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد TDZ و NAA از نظر اثر بر روی کال‌زایی و وزن کالوس اختلاف معنی‌داری (P ۰/۰۵ >) وجود داشت (جدول ۲). در ریزنمونه کوتیلدون بیشترین درصد کال‌زایی (۸۴/۲۶ درصد) در تیمار ۴/۵۴ میکرومولار TDZ + ۵/۳۷ میکرومولار NAA و کمترین درصد کال‌زایی (۳۲/۸۳ درصد) در تیمار ۹/۰۸ میکرومولار TDZ + ۵/۳۷ میکرومولار NAA مشاهده شد. افزایش غلظت TDZ از ۲/۲۷ به ۴/۵۴ میکرومولار و افزایش غلظت NAA از ۲/۶۸ به ۵/۳۷ میکرومولار باعث افزایش درصد کال‌زایی شد، با این حال با افزایش غلظت TDZ درصد کالوس‌زایی کاهش یافت. به‌طوری که در غلظت‌های بالای TDZ (۹/۰۸ میکرومولار) حداقل کال زایی مشاهده شد. در مورد ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه، در تمام تیمارها کال‌زایی به‌صورت ۱۰۰ درصد مشاهده شد و در هر سه ریزنمونه در تیمار شاهد کال‌زایی مشاهد نشد.

در بین تیمارهای مختلف TDZ + NAA، بیشترین وزن کالوس (۲۶۸/۸۳ میلی‌گرم) در سطح ۲/۶۸ میکرومولار TDZ + ۴/۵۴ میکرومولار NAA در ریزنمونه ریشه مشاهده شد و مقدار بیشینه در ریزنمونه‌های کوتیلدون (۲۲۰/۷۵ میلی‌گرم) و هیپوکوتیل (۱۱۶ میلی‌گرم) در غلظت ۴/۰۳ میکرولار NAA در ترکیب با ۶/۸۱ میکرومولار TDZ به‌دست آمد. در غلظت بالای هر دو تنظیم‌کننده رشد کمترین وزن کالوس برای ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (۲۹/۱۶ میلی‌گرم) و ریشه (۳۲/۵۸ میلی‌گرم) ثبت شد، در حالی‌که در ریزنمونه کوتیلدون غلظت-های بالای تنظیم‌کننده‌های رشد مقدار متوسط و در غلظت‌های متوسط بیشینه وزن کالوس حاصل شد (جدول ۲).

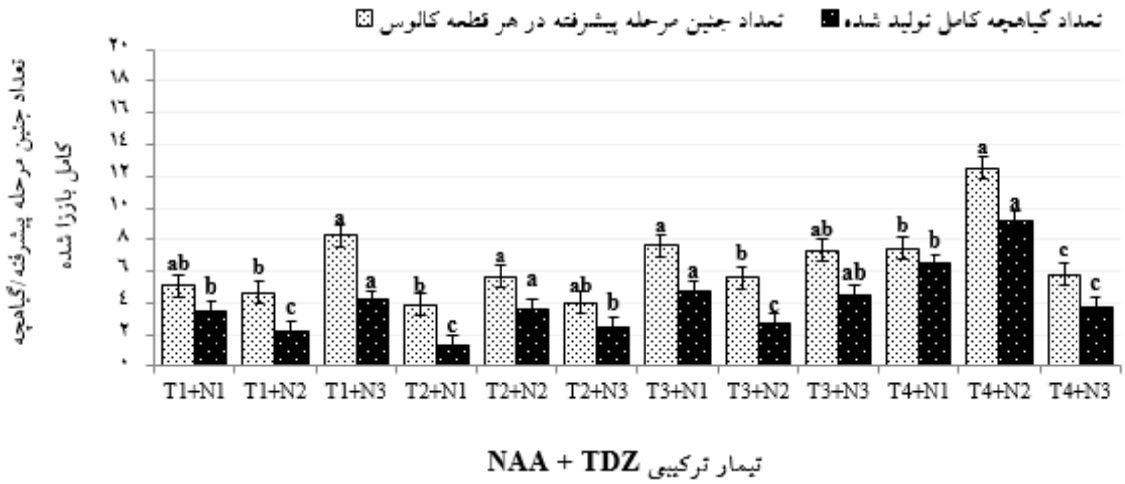
بر اساس نتایج حاصل از تجزیه آماری و مقایسات میانگین (شکل‌های ۷-۵)، بین سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد TDZ و NAA در هر سه نوع ریزنمونه مورد استفاده از نظر صفات میزان جنین‌زایی و باززایی گیاهچه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود داشت. در ریزنمونه هیپوکوتیل بیشترین میزان جنین‌زایی (۱۸/۷۱ جنین مرحله پیشرفته) در محیط کشت MS حاوی ۲/۲۷ میکرومولار TDZ + ۴/۰۳ میکرومولار NAA مشاهده شد (شکل ۵). در ریزنمونه

کوتیلدون بیشترین میزان جنین‌زایی (۱۲/۵۳ جنین مرحله پیشرفته) و بیشترین تعداد گیاهچه باززا شده (۹/۱۷ گیاهچه) در محیط کشت MS حاوی ۹/۰۸ میکرومولار TDZ + ۴/۰۳ میکرومولار NAA به‌دست آمد (شکل ۶). در ریزنمونه ریشه بیشترین میزان جنین‌زایی (۱۰/۲۲ جینن پیشرفته) و بیشترین تعداد گیاهچه کامل باززا شده (۹/۱۶ گیاهچه) در غلظت‌های بالای TDZ (۹/۰۸ میکرومولار) و NAA (۵/۳۷ میکرومولار) به‌دست آمد (شکل ۷).

جدول ۲- تأثیر ترکیبات هورمونی NAA+TDZ بر روی درصد و وزن کالوس در ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه

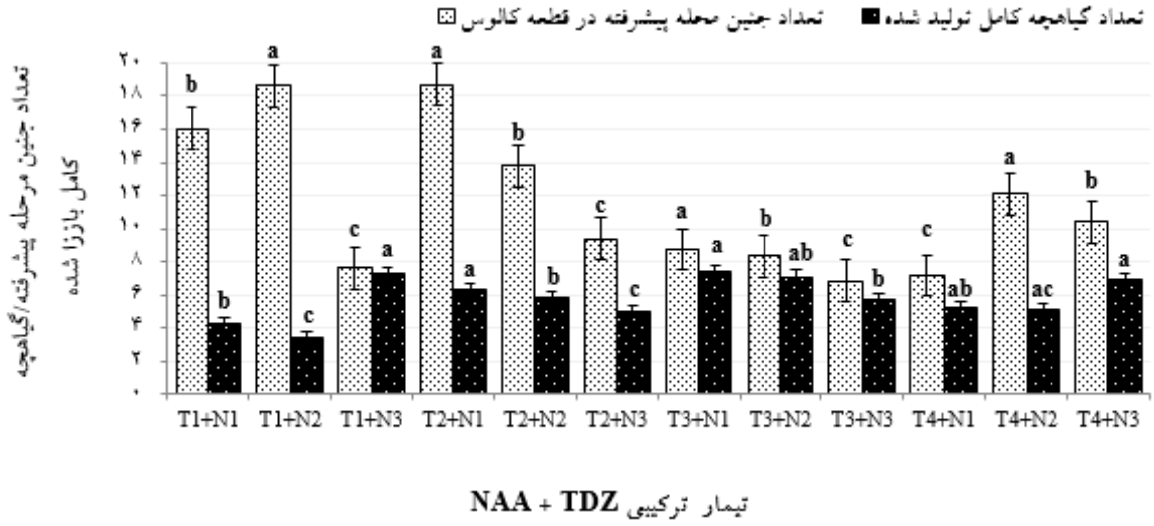
کد تیمار	ترکیب هورمونی (میکرومولار)		درصد کالزایی			وزن کالوس (میلی‌گرم)		
	NAA	TDZ	کوتیلدون	هیپوکوتیل	ریشه	کوتیلدون	هیپوکوتیل	ریشه
†T0+N0	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
T1+N1	۲/۶۸	۲/۲۷	۳۲/۹۱e	۱۰۰	۱۰۰	۳۱/۷۵f	۴۲/۵۲e	۴۳/۵۳g
T1+N2	۴/۰۳	۲/۲۷	۴۹/۰۷d	۱۰۰	۱۰۰	۷۰e	۴۵/۵۰e	۲۰۵/۹۱c
T1+N3	۵/۳۷	۲/۲۷	۴۳/۵۵d	۱۰۰	۱۰۰	۶۱e	۸۴/۲۵c	۱۴۵/۴۱c
T2+N1	۲/۶۸	۴/۵۴	۶۲/۲۷c	۱۰۰	۱۰۰	۷۲/۵e	۸۵/۵۰c	۲۶۸/۸۳a
T2+N2	۴/۰۳	۴/۵۴	۳۷/۸۹de	۱۰۰	۱۰۰	۹۱/۵d	۷۰/۷۵cd	۲۵۱b
T2+N3	۵/۳۷	۴/۵۴	۸۴/۲۶a	۱۰۰	۱۰۰	۱۳۸/۲۵bc	۵۰/۷۵d	۵۳/۲۵f
T3+N1	۲/۶۸	۶/۸۱	۷۳/۸۴a	۱۰۰	۱۰۰	۱۵۶/۲۵b	۱۰۲/۵b	۵۴/۸۳f
T3+N2	۴/۰۳	۶/۸۱	۶۹/۲۹ab	۱۰۰	۱۰۰	۲۲۰/۷۵a	۱۱۶a	۷۱/۵e
T3+N3	۵/۳۷	۶/۸۱	۳۸/۸۸b	۱۰۰	۱۰۰	۱۲۶/۲۵c	۹۱/۷۵c	۵۶/۰۸f
T4+N1	۲/۶۸	۹/۰۸	۴۷/۱۸d	۱۰۰	۱۰۰	۲۰۵/۵۰a	۸۶/۵۰c	۷۰/۴۱e
T4+N2	۴/۰۳	۹/۰۸	۳۴/۱۳de	۱۰۰	۱۰۰	۱۴۶/۵۷b	۷۹/۵۰cd	۹۱/۴۱d
T4+N3	۵/۳۷	۹/۰۸	۳۲/۸۳e	۱۰۰	۱۰۰	۱۴۰/۲۵bc	۲۹/۱۶f	۳۲/۵۸h

† شاهد، میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در هر ستون بر اساس آزمون FLSD اختلاف معنی‌دار آماری ($P < ۰/۰۵$) دارند.



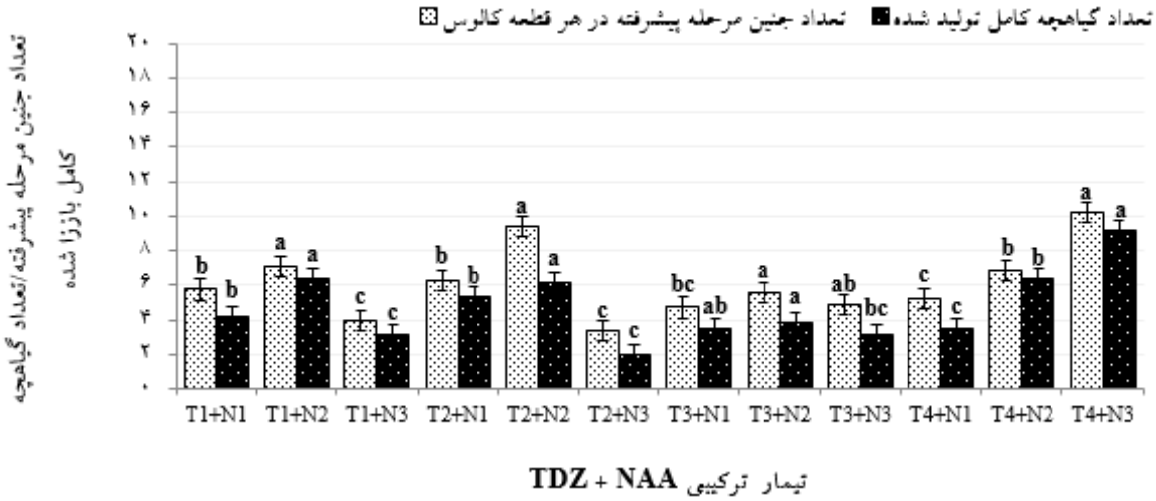
شکل ۵- تأثیر ترکیب غلظت‌های مختلف TDZ و NAA بر میزان جنین‌زایی و باززایی گیاه در ریزنمونه کوتیلدون

ستون‌ها، SE ± میانگین صفت را نشان می‌دهند. میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک بر اساس آزمون FLSD اختلاف معنی‌دار آماری ($P < ۰/۰۵$) دارند.



شکل ۶- تأثیر ترکیب غلظت‌های مختلف **TDZ** و **NAA** بر میزان جنین‌زایی و باززایی گیاه در ریزنمونه هیپوکوتیل

ستون‌ها، **SE** ± میانگین صفت را نشان می‌دهند. میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک بر اساس آزمون **FLSD** اختلاف معنی‌دار آماری (***P*** < ۰/۰۵) دارند.



شکل ۷- تأثیر ترکیب غلظت‌های مختلف **TDZ** و **NAA** بر میزان جنین‌زایی و باززایی گیاه در ریزنمونه ریشه

ستون‌ها، **SE** ± میانگین صفت را نشان می‌دهند. میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک بر اساس آزمون **FLSD** اختلاف معنی‌دار آماری (***P*** < ۰/۰۵) دارند.

تأثیر IBA و NAA بر توسعه سیستم ریشه

هرچند در گیاهچه‌های حاصل از جینن‌زایی سوماتیکی، به‌طور طبیعی سیستم ریشه وجود داشت، اما با این حال برای توسعه سیستم ریشه مناسب در کوتاه‌ترین زمان، گیاهچه‌های باززا شده در محیط حاوی اکسین NAA یا IBA در دو نوع غلظت نمک محیط کشت MS کشت شدند. محیط کشت‌های القای ریشه حاوی سطوح مختلف IBA یا NAA (جدول ۳) از نظر اثر بر میزان القای ریشه نابجا و طول ریشه‌های نابجا تفاوت معنی‌داری (*P* < ۰/۰۵) نشان دادند. در مقایسه تیمار بدون اکسین، سیستم ریشه گیاهچه-

های باززا شده در تیمار با هر دو اکسین (NAA و IBA) در مدت زمان تقریبا دو هفته‌ای به‌خوبی توسعه پیدا کرد، در حالی‌که در محیط بدون اکسین مناسبترین سیستم ریشه در مدت ۳۰ روزه (در محیط MS ½) یا ۴۵ روزه (در محیط MS کامل) به‌دست آمد. به‌طوری‌که بیشترین درصد ریشه القایی جدید (۶۰/۲۴ درصد) و بیشترین میانگین طول ریشه (۵/۵ سانتی‌متر) در تیمار ۱/۵ میکرومولار NAA در محیط MS ½ و کمترین درصد افزایش ریشه‌زایی (۲۷/۲۲ درصد) و کمترین میانگین طول ریشه (۲/۴ سانتی‌متر) در تیمار ۱ میکرومولار IBA در محیط کشت MS مشاهده شد.

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده برای سازگاری به محیط غیراستریل به گلدان‌های حاوی بسترهای مختلف کشت، پیت،پرلیت و خاک زراعی با نسبت (۱/۱/۱ و ۲/۱/۱) منتقل شدند (شکل 1L). گیاهان باززا شده با ۱۰۰ درصد زنده‌مانی به شرایط گلخانه‌ای سازگار شدند و از نظر خصوصیات مورفولوژیکی مانند گیاه والدینی بودند.

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف NAA یا IBA و غلظت نمک‌های محیط کشت MS طی دو هفته بر صفات درصد افزایش ریشه‌زایی و طول ریشه در گیاهچه‌های حاصل از جنین‌زایی سوماتیکی

ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد (میکرومولار)		درصد افزایش ریشه‌زایی		میانگین طول ریشه (cm)	
NAA	IBA	MS	½ MS	MS	½ MS
۱	-	۶۵/۳۷a	۴۷/۸۸b	۲/۵۰b	۴/۰۶b
۱/۵	-	۴۴/۰۴b	۶۰/۲۴a	۲/۹۶a	۵/۵۰a
-	۱	۲۷/۲۲c	۳۷/۲۲c	۲/۴۰b	۳/۳۳c
-	۱/۵	۳۶/۲۴b	۳۹/۲۳c	۳/۱۰a	۳/۳۷c

میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک بر اساس آزمون FLSD اختلاف معنی‌دار آماری ($P < ۰/۰۵$) دارند.

بحث

انتخاب نوع ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد برای موفقیت در القای جنین‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای دارای اهمیت زیادی است و توانایی ریزنمونه‌های مختلف از لحاظ موفقیت در کشت درون شیشه‌ای متفاوت می‌باشد (Pedroso *et al.*, 1995). برای تولید و تکثیر کالوس جنین-زا، نوع و غلظت اکسین بسیار مهم است (Jimemeze, 2001). نقش اکسین در تقسیم، طویل شدن سلول‌ها و تمایز در گیاهان زیادی گزارش شده است (Bennett *et al.*, 1998). در میان اکسین‌ها، NAA در کالوس‌زایی و جنین-زایی بسیار مؤثر بوده و استفاده موفق از آن در بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی گزارش شده است (Yang *et al.*, 2010). حضور سیتوکنین در محیط کشت، تقسیم سلولی را افزایش داده و در نتیجه سلول‌های ریزنمونه قادر به باززایی می‌شوند. استفاده از ترکیب اکسین با سیتوکنین منجر به برگشت سلول‌های تمایز یافته به حالت اولیه و سازماندهی مجدد سلول‌ها برای اندام‌زایی می‌شود (Wang *et al.*, 2008). در برخی از گونه‌های گیاهی BAP که معمولاً در ترکیب با یک اکسین استفاده می‌شود، در آغاز القای جنین سوماتیکی نیز مؤثر می‌باشد (Dunstan *et al.*, 1995). همچنین، نسبت اکسین به سیتوکنین در جنین‌زایی، تسریع بلوغ جنین و باززایی گیاهچه نیز حائز اهمیت می‌باشد. مطابق با نتایج این پژوهش، ترکیب BAP و NAA در هر سه ریزنمونه (کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه) قابلیت تولید کالوس، جنین‌زایی و باززایی گیاهچه نشان دادند. نتایج مشابهی در مطالعه بر روی تأثیر NAA و BAP در کال‌زایی در *Eclipta alba* L. گزارش شده است (Devendra *et al.*, 2011). در مطالعه‌ای دیگر، کال‌زایی در برگ‌های گیاه *F. moschata* در محیط MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد (Infante *et*

al., 1998). همچنین باززایی از صفحات برگ توت‌فرنگی در حضور ۲/۶۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش شده است (Hammoudeh *et al.*, 1998).

در تحقیق حاضر بیشترین وزن کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیل با استفاده از غلظت‌های پایین BAP در ترکیب با غلظت بالای NAA به‌دست آمد. همچنین بیشترین تعداد جنین مرحله پیشرفته و بیشترین تعداد گیاهچه کامل باززا شده در غلظت‌های متوسط BAP و NAA در ریزنمونه کوتیلدون مشاهده شد. این نتایج نشان‌دهنده این است که ایجاد کالوس، وزن کالوس، جنین‌زایی و باززایی گیاهچه تحت تأثیر نوع ریزنمونه و غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP می‌باشد.

تنظیم‌کننده رشد TDZ از مؤثرترین تنظیم‌کننده‌های رشد شبه سیتوکنینی است که تأثیر قابل توجهی در القا و باززایی درون شیشه‌ای بسیاری از گونه‌ها در مقایسه با سایر سیتوکینین‌ها دارد (Khawar *et al.*, 2004). در تحقیقات قبلی تأثیر TDZ به‌تنهایی و یا در ترکیب با NAA در القای کالوس و تولید جنین سوماتیکی در طیف وسیعی از گونه-های گیاهی مانند لگوم‌ها، گیاهان علوفه‌ای و گونه‌های چوبی گزارش شده است (Malik & Saxena, 1992; Nhut *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007; Parveen & Shahzad, 2010). نوع ریزنمونه نیز می‌تواند غلظت مؤثر TDZ برای تقویت پاسخ مورفوژنیک را تحت تأثیر قرار دهد (Prakash *et al.*, 2001). در این مطالعه، در تیمار هورمونی TDZ در ترکیب با NAA نیز بیشترین وزن کالوس در غلظت‌های متوسط TDZ در ترکیب با غلظت‌های پایین NAA در ریزنمونه ریشه به‌دست آمد. به‌طوری‌که بیشترین درصد جنین‌زایی در غلظت‌های پایین TDZ در ترکیب با غلظت بالای NAA در ریزنمونه هیپوکوتیل و بیشترین درصد باززایی گیاهچه در سطوح بالای TDZ و NAA در ریزنمونه کوتیلدون مشاهده شد. در مطالعه‌ای روی گیاه دارویی *Ochna integerrima* ریزنمونه‌های برگ و قطعات ساقه در ترکیب غلظت‌های مختلف BA و TDZ با NAA و 2,4-D کشت شدند و بر اساس نتایج حاصل، غلظت‌های بالای TDZ در ریزنمونه‌های برگ باعث القای کالوس و تولید جنین‌های رویشی شد (Ma *et al.*, 2010). در تحقیق حاضر نیز غلظت بالای TDZ در القای جنین‌های سوماتیکی در ریزنمونه‌های کوتیلدون و ریشه و همچنین در باززایی گیاهچه از هر سه نوع ریزنمونه مورد آزمایش مؤثر بود. به‌طور کلی، ترکیب اکسین با سیتوکنین نقش مؤثری در کال‌زایی، جنین‌زایی و باززایی گیاهچه در *S. securidaca* داشت و بر اساس نتایج حاصل، تأثیر ترکیب NAA با TDZ در جنین‌زایی و باززایی گیاهچه‌ها در هر سه نوع ریزنمونه بیشتر از تأثیر ترکیب هورمونی NAA با BAP بود.

در تحقیق حاضر، در همه غلظت‌های IBA و NAA و در هر دو محیط کشت MS و MS ½ سیستم ریشه به‌خوبی توسعه یافت، با این حال محیط کشت MS ½ برتری داشت. در مقایسه با محیط کشت شاهد، در محیط کشت حاوی اکسین در مدت زمان کوتاه دوهفته‌ای ریشه توسعه یافته‌تری مشاهد شد. اگرچه در غلظت بالای هر دو اکسین در محیط MS ½ ریشه‌زایی و رشد ریشه بیشتر بود، اما با این حال NAA در ریشه‌زایی مؤثرتر از IBA بود. در مطالعه روی *Litchi chinesis* (Puchooa *et al.*, 2004)، *Chlorophytum arundinacenm* (Lattoo *et al.*, 2006)، *Solanum trilobatum* (Choudhary *et al.*, 2009) و *Dorema ammoniacum* (Irvani *et al.*, 2010) بیشترین میزان ریشه‌زایی با استفاده از غلظت‌های بالای IBA گزارش شده است.

نتیجه‌گیری

این تحقیق، اولین گزارش در مورد کشت درون شیشه‌ای و باززایی گیاه در عدس‌الملوک است. در این مطالعه، یک دستورالعمل ساده و کارآمد برای القای کالوس جنین‌زا و جنین‌زایی سوماتیکی تحت تأثیر ترکیبات و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد با استفاده از سه ریزنمونه متفاوت در گیاه عدس‌الملوک ارائه شد. نتایج این مطالعه نشان داد که در تمام ریزنمونه‌های مورد استفاده (کوتیلدون،

هیپوکوتیل و ریشه) در هر دو نوع ترکیب اکسین + سیتوکینین (BAP+NAA و TDZ+NAA) کالزایی، جنین-زایی و باززایی انجام می‌گیرد و به‌طور کلی واکنش گیاه عدس‌الملوک به القای کالوس جنین‌زا و تولید جنین‌های سوماتیکی و باززایی گیاهچه‌ها با موفقیت همراه بود، با این حال هیپوکوتیل ریزنمونه‌ای مستعد و محیط کشت MS حاوی غلظت پایین TDZ و NAA مؤثرتر از سایر ترکیبات برای جنین‌زایی و باززایی در این گیاه بود. بنابراین با توجه به اهمیت دارویی گیاه عدس‌الملک، استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی ازجمله کشت بافت و سلول به‌منظور تکثیر انبوه و همچنین برای تولید متابولیت‌های ثانویه مهم آن می-تواند سودمند باشد.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم پژوهشکده علوم و زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه به دلیل در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Ali, A.A., Mohamed, M.H., Kamel, M.S., Fouad, M.A. and Spring, O., 1998. Studies on *Securigera securidacea* (L.) Deg. et Dorfl. (Fabaceae) seeds, an antidiabetic Egyptian folk medicine. Pharmazie, 53: 710-715.
- Behbahani, M., Sayedipour, S., Pourazar, A. and Shanehsazzadeh, M., 2014. *In vitro* anti-HIV-1 activities of kaempferol and kaempferol-7-Oglucoside isolated from *Securigera securidaca*. Research in Pharmaceutical Sciences, 9: 463-469.
- Bennett, M.J., Marchant, A., May, S.T. and Swarup, R., 1998. Going the distance with auxin: unraveling the molecular basis of auxin transport. Home Royal Society of London B, 353: 1511-1515.
- Choudhary, K., Singh, M., Rathore, M.S. and Shekhawat, N.S., 2009. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration in moth bean [*Vigna aconitifolia* (Jacq.) Marechal]: a recalcitrant grain legume. Plant Biotechnology Reports, 3: 205-211.
- Costa, M.F.B., Paulino, J.V., Marinho, C.R., Leite, V.G., Pedersoli, G.D. and Teixeira, S.P., 2014. Stigma diversity in tropical legumes with considerations on stigma classification. Botanical Review, 80: 1-29.
Devendra, B.N., Srinivas, N. and Reddy, A.S., 2011. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in nodal explant cultures of *Eclipta alba* L. Hassk. Annals of Biological Research, 2: 143-149.
- Dunstan, D.I., Tautorus, T.E. and Thorpe, T.A., 1995. Somatic embryogenesis in woody plants. 471-538. In: Thorpe, T.A., (Ed). *In vitro* embryogenesis in plants. Springer, Dordrecht, 558p
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151–158.
- Gharaman, A., 1993. Flore de Iranen couleurs naturel. Tehran University Press, Tehran, Vol 12: 1478.
- Ghorbani, A., 2013. Best herbs for managing diabetes: a review of clinical studies. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 49: 413–422.
- Gram, T., Mattson, O. and Joerson, M., 1996. Division frequently of pea protoplast in relation to starch accumulation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45: 179-187.
- Hammoudeh, H.Y., Suwwan, M.A., Abu, Quoud, H.A. and Shibli, R.A., 1998. Micropropagation and regeneration of Honeoye strawberry. Dirasat Agricultural Sciences, 25: 170-178.
- Hosseinzadeh, H., Ramezani, M. and Danaei, A.R., 2002. Antihyperglycaemic effect and acute toxicity of *Securigera securidaca* L. seed extracts in mice. Phytotherapy Research, 16: 745-747.
- Infante, R., Mazzara, M. and Rosati, P., 1998. Growth estimation of *in vitro* cultured callus and plant regeneration from leaf disk and petiole of musk strawberry (*Fragaria moschata* Duch.) sucultured for 18 months. Japanese Society for Horticultural Science, 67: 39-43.
- Irvani, N., Solouki, M., Omidi, M., Zare, A.R., and Shahnazi,S., 2010. Callus induction and plant regeneration in *Dorem ammoniacum* D., an endangered medicinal plant, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 100:293-299.
- Jimemeze, V.M., 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13: 196–223.
- Jones, M.P., Cao, J., O'Brien, R., Murch, S.J. and Saxena, P.K., 2007. The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines, and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L. Plant Cell Reports, 26: 1481-1490.
- Khawar, K.M., Sancak, C., Uranbey, S. and Zca, S., 2004. Effect of thidiazuron on shoot regeneration

controlling somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43: 147-154.
- Phillips, G.C., 2004. *In vitro* morphogenesis in plants-recent advances. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 40: 342-345.
- Prakash, E., Valli Khan, S., Meru, E. and Rao, K.R., 2001. Somatic embryogenesis in *Pimpinella tirupatiensis* Bal. and Subr., an endangered medicinal plant of *Tirumala hills*. Current Science, 9: 1239-1242.
- Prakash, M.G. and Gurumurthi, K., 2010. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 100: 13-20.
- Puchooa, D., 2004. *In vitro* regeneration of lychee *(Litchi chinensis* Sonn.). African Journal of Biotechnology, 3: 576-584.
- Ravi, D. and Anand, P., 2012. Production and applications of artificial seeds: a review. International Research Journal of Biological Sciences, 1: 74-78.
- Rechinger, K.H. 1984. Flora Iranica. No. 157: Papilionaceae II. Akademische Druck and Verlagsanstalt, Graz, 343pp
- Rout, G.R., Samantaray, S. and Das, P., 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnology Advances, 18: 91-120.
- Santos, M.O., Romano, E., Yotoko, K.S.C., Tinoco, M.L.P., Dias, B.B.A., and Aragao, F.J.L., 2005. Characterization of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogeesis. Plant Science, 168:723-729.
- Sayedipour, S., Behbahani, M., and Moshtaghian, S., 2012. Evaluation of anti-herpes simplex virus type 2 (HSV-2) activity of methanol extract of *Securigera securidaca* by cell culture method. Genetics in the 3rd Millennium, 10: 2802-2809.
- Sood, H. and Chauhan, R.S., 2009. High frequency callus induction and plantlet regeneration from different explants of *Picrorhiza kurroa*-a medicinal herb of Himalayas, African Journal of Biotechnology, 8: 1965-1972.
- Steward, F.C., 1958. Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. American Journal of Botany, 45: 709-713.
- Thomas, C. and Jimenze, M., 2005. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. Plant Cell Monographs, 2: 103-117.
- Tofighi, Z., Asgharian, P., Goodarzi, S., from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik) via organogenesis. Turkish Journal of Botany, 28: 421-426.
- Komamine, A., Kawahara, R., Matsumoto, M., Sunabori, S., Toya, T., Fujiwara, A., Tsukahara, M., Smith, J., Ito, M., Fukuda, H., Nomura, K. and Fujimura, T., 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 28: 11-14.
- Lattoo, S.K., Bamotra, S., Sapru Dhar, R., Khan, S. and Dhar, A.K., 2006. Rapid plant regeneration and analysis of genetic fidelity of *in vitro* derived plants of *Chlorophytum arundinaceum* Baker an endangered medicinal herb. Cell biology and Morphogenesis, 25: 499-506.
- Lelu-Walter, M.A., Thompson, D., Harvengt, L., Sanchez, L., Toribio, M. and Pˆaques, L.E., 2013. Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. Tree Genetics and Genomes, 9: 883-899.
- Ma, G.H., He, C.X., Ren, H., Zhang, Q.M., Li, S.J., Zhang, X.H., and Bunn, E., 2010. Direct somatic embryogenesis and shoot organogenesis from leaf explants of *Primulina tabacum*. Biologia Plantarum, 54: 361-365.
- Malik, A.K. and Saxena, P.K., 1992. Thidiazuron induces high-frequency shoot regeneration in intact seedlings of pea (*Pisum sativum*), chickpea (*Cicer arietinum*) and lentil (*Lens culinaris*), Australian Journal of Plant Physiology, 19: 731-40.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-476.
- Nhut, D.T., Hahn, N.T.M., Tuan, P.Q., Nguyet, T.M., Tram, N.T.H., Chinh, N.C., Nguyen, N.H. and Vinh, D.N., 2006. Liquid culture as a positive condition to induce and enhance quality and quantity of somatic embryogenesis of *Lilium longiflorum*. Science Horticulture, 110: 93-97.
- Norgaard, J., Duran, V., Johnsen, O., Krogstrup, P., Baldurson, S., and Von Arnold, S., 1993. Variations in cryotolerance of embryogenic *Picea abies* cell lines and the associations to genetic, morphological and physiological factors. Canadian Journal of Forest Research, 23: 2560-2567.
- Parveen, S. and Shahzad, A., 2010. TDZ-induced high frequency shoot regeneration in *Cassia sophera* Linn. via cotyledonary node explants. Physiology and Molecular Biology of Plants, 16: 201-206.
- Pedroso, M.C. and Pais, M.S., 1995. Factors

- Yang, J.L., Zhao, B., Seong, E.S., Kim, M.J., Kang, W.H., Kim, N.Y., Yu, C.Y. and Li, C.H., 2010. Callus induction and high-efficiency plant regeneration via somatic embryogenesis in *Papaver nudicaule* L. an ornamental medicinal plant. Plant Biotechnology Reports, 4: 261-267.
- Zatula, V.V., Chernobrovaya, N.V. and Kolesnikov, D.G., 1966. A chemical study of the structure of securigenin and its bioside securidaside. Chemistry of Natural Compounds, 2: 359-360.

Hadjiakhoondi, A., Ostad, S.N. and Yassa N., 2014. Potent cytotoxic flavonoids from Iranian *Securigera securidaca*. Medicinal Chemistry Research, 23: 1718-1724.
- Wang, W., Zhao, X., Zhuang, G., Wang, S. and Chen, F., 2008. Simple hormonal regulation of somatic embryogenesis and/or shoot organogenesis in caryopsis cultures of *Pogonatherum paniceum* (Poaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 95: 57-67.

In vitro plant regeneration via somatic embryogenesis of *Securigera securidaca*

A. Heidari[1], M. Jafari[*2], B. Hosseini[3], M. Ehsasat Vatan[4] and S. Faredvand[5]

1- M.Sc., Faculty of Agriculture, Payame Noor University, Urmia, Tehran, I.R.Iran
2*- Corresponding author Assist. Prof., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, I.R.Iran, Email: m.jafari@urmia.ac.ir
3- Assoc. Prof., Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R.Iran
4- M.Sc., Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, I.R.Iran
5- Ph.D. student, Agricultural and Natural Resources Research Center of West Azerbaijan, Urmia, I.R.Iran

Received: 07.10.2014 Accepted: 28.02.2015

Abstract

Somatic embryogenesis and whole plant regeneration were achieved in callus cultures derived from cotyledon, hypocotyl and root explants excised from *in vitro* seedlings of *Securigera securidaca*. The explants were cultured in MS medium supplemented with various concentrations of BAP or TDZ in combination with various concentrations of NAA in a factorial experiments based on a completely randomized design with four replicates. Twelve explants per replicate were studied. No callus was produced on control (hormone-free medium) treatment, while well developed calli with proembryogenic structures were obtained using BAP or TDZ in both cotyledon and hypocotyl explants. Although, TDZ in combination with NAA was the most effective on somatic embryo regeneration in calli derived from all studied explants, however, it was more efficient on callus production in root explants and subsequently embryo regeneration. The protocol described in the present study can be used for the production of a large number of true-to-type plants and production of secondary metabolites of pharmaceutical values of *S. securidaca*.

Keywords: Callogenesis, explant, plant growth regulators, *Securigera securidaca*, somatic embryogenesis.