نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴، ص. ۶۳۰-۶۲۱
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 29, No. 4, Winter 2016, P. 621-630
ISSN: 2008 - 4730

بررسی کالزایی و باززایی گیاه دارویی کاسنی (*Cichorium intybus* L.) با استفاده از ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ

حمیرا هادیزاده[۱] - مهدی محب‌الدینی[۲*] - بهروز اسماعیل‌پور[۳] - اسماعیل چمنی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۱۸

چکیده

کاسنی (*Cichorium intybus* L.) گیاه دارویی مهمی می‌باشد که به دلیل داشتن انواع مختلف ترکیبات دارویی حائز اهمیت می‌باشد. این تحقیق به منظور بهینه‌سازی کالوس‌زایی و باززایی گیاه کاسنی با استفاده از ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید.در این آزمایش از غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید (NAA) (۰، ۰/۳/۱، ۰/۶، ۱ میلی‌گرم در لیتر)، بنزیل آدنین (BA) (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و کینتین (KIN)(۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده گردید. صفات درصد کالوس‌زایی، درصد باززایی، تعداد نوساقه‌های باززایی شده در هر ریز نمونه بررسی شد. در ترکیب هورمونی نفتالین استیک اسیدو بنزیل آدنین در هر دو ریز نمونه برگ و دمبرگ در همه ترکیب‌های هورمونی کالوس‌زایی مشاهده شد. در ترکیب هورمونی نفتالین استیک اسید و کینتین بیشترین درصد کالوس‌زایی در ریز نمونه برگ در محیط کشت حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید در ترکیب با هورمون کینتین با غلظت ۱ و یا ۱/۵ میلی گرم در لیتر مشاهده شد و در ریز نمونه دمبرگ بیشترین درصد کالوس‌زایی در محیط کشت حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین حاصل شد. در ترکیب هورمونی نفتالین استیک اسیدو بنزیل آدنین در هر دو ریز نمونه برگ و دمبرگ بیشترین باززایی از لحاظ درصد و تعداد نوساقه در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنینبدست آمد. در ترکیب هورمونی نفتالین استیک اسید وکینتیندر ریز نمونه برگ بیشترین باززایی از لحاظ درصد و تعداد نوساقه در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و در ریز نمونه دمبرگ در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیترنفتالین استیک اسید و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آدنین، کینتین، محیط کشت، نفتالین استیک اسید، نو ساقه

مقدمه

امروزه تقاضا برای ترکیبات دارویی افزایش یافته است، اما برخی از این گیاهان،زیستگاه‌های طبیعی محدود دارند و بسته به شرایط محیطی و جغرافیایی محل رویش گیاه، جمع‌آوری آنها بامشکلاتی مواجه است. غلظت پایین این ترکیبات درگیاه، محدودیت منابع طبیعی، تخریب روز افزون جنگل‌ها، مراتع و فضای سبز، نابودی گونه‌های متنوع گیاهی وجانوری، مشکلات مرتبط با اهلی نمودن و کشت زراعی این گیاهان، توجه محققین رابه استفاده از راهکارهای بیوتکنولوژی جهت افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی معطوف نموده است. بیوتکنولوژی با بهره‌گیری ازعلوم مختلف مانند بیولوژی، بیوشیمی، ژنتیک وغیره و بااستفاده ازراهکارهای کشت سلول ها،اندام‌ها و بافت‌ها، مهندسی ژنتیک و نشانگرهای مولکولی قادر است کارآیی گیاهان رابه عنوان منابع تجدید پذیر جهت تولید دارو افزایش دهد (۵).کاسنی با نام علمی *Cichorium intybus* L. از تیره Asteraceae می‌باشد. گیاهی علفی، پایا با ریشه مخروطی شکل و دراز (۰/۵-۱متر) به رنگ قهوه‌ای، ساقه راست و شاخه‌دار، برگها زمینی که به صورت متناوب، سر نیزه‌ای بدون دمبرگ و گلها به رنگ آبی بوده و ارتفاع گیاه بین ۰/۵ - ۱ متر است (۲۴). منشاء اصلی این گیاه اروپای مرکزی مناطق غربی و مرکزی آسیا و شمال آفریقا است. پراکندگی وسیعی در نواحی مختلف ایران به خصوص شمال ایران،

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیاران علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی
(*- نویسنده مسئول: Email: Mohebodini@uma.ac.ir)

آذربایجان و مناطق کوهستانی خراسان دارد (۱۰). ریشه، برگ و بذر آن دارای تعداد زیادی ترکیبات دارویی از قبیل اینولین، سسکویی‌ترپن[1]، لاکتون[2]، کومارین[3]، فلاونوئیدها[4] و ویتامین می‌باشد که به عنوان ضد هپاتیت، ضد سرطان، اشتها آور، ضد نفخ و ضد التهاب استفاده می‌شود خواص ضد باکتریایی نیز برای عصاره ریشه کاسنی گزارش شده است (۱۴). ازجمله عواملی که درتولید کالوس و باززایی مؤثرند، ژنوتیپ، تنظیم کننده‌های رشد، محیط کشت، نوع ریز نمونه، سن ریز نمونه وشرایط محیطی می‌باشد (۴). نتایج نشان داده است که وابستگی القای کالوس وباززایی گیاه به ژنوتیپ اجتناب ناپذیراست والقای کالوس و باززایی گیاه باژنوتیپ گیاه تغییر می‌کند (۴).

مطالعه‌ای توسط پارک و همکاران (۱۵) برای باززایی ۴ ژنوتیپ مختلف گیاه کاسنی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ[5] (MS) با تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ایندول استیک اسید[6] (IAA) و بنزیل آمینو پورین[7] (BAP) در غلظت‌های مختلف با دو ریز نمونه برگ و دمبرگ صورت گرفته است که از بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی، در ژنوتیپ گویلیو[8] بیشترین باززایی را در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید و ۱میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین گزارش کردند. رحمان و همکاران (۱۶) به منظور کالوس‌زایی و باززایی از ریز نمونه برگ گیاه کاسنی در شرایط درون‌شیشه‌ای در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ ترکیب‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ایندول استیک اسید، بنزیل آدنین[9] (BA) و کینتین[10] (KIN) در غلظت‌های مختلف استفاده نمودند که در ترکیب هورمونی ایندول استیک اسید و کینتین بیشترین درصد کالوس‌زایی (۸۴/۴ درصد) در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ۰/۳۵میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید و ۱/۰۷ میلی‌گرم در لیتر کینتین و بیشترین درصد باززایی (۸۴/۴درصد) و بیشترین تعداد نوساقه (۵/۹۲ عدد) در محیط کشت حاوی۰/۰۸۷میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید و ۱/۰۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین گزارش کردند. همچنین در ترکیب هورمونی ایندول استیک اسید و بنزیل آدنین بیشترین درصد کالوس‌زایی (۷۰ درصد) و بیشترین درصد باززایی (۶۱درصد) و بیشترین تعداد نوساقه (۳/۹ عدد) در محیط کشت حاوی ۰/۰۸۷میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید و ۱/۰۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین توسط رحمان و همکاران (۱۶) گزارش شد.

جن وون و همکاران (۳) باززایی از ریز نمونه‌های کوتیلدون دو ژنوتیپ مختلف کاسنی رادشیو[11] و ایتالیانا[12] با استفاده از ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ایندول استیک اسید و بنزیل آمینو پورین در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد بیشترین تعداد شاخه (۵/۶ عدد) در ژنوتیپ رادشیو درمحیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر‌ایندول استیک اسیدو ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین و بیشترین تعداد شاخه(۵ عدد) در ژنوتیپ ایتالیانا درمحیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید و۱ میلی‌گرم در لیتربنزیل آمینو پورین مشاهده شد. هیون جونگ و همکاران (۷) به منظور باززایی از ریز نمونه کوتیلدون کاسنی از ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ایندول استیک اسید و بنزیل آمینو پورین در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ استفاده کردند. نتایج آزمایش آنها نشان داد که در محیط کشت حاوی ۱/۵میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین و۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید بیشترین باززایی صورت گرفته است.

بیوتکنولوژی گیاهی فرصت‌های فوق‌العاده‌ای را برای رشد سریع و پیشرفت علم فراهم آورده است و از میان موضوعات مختلف بیوتکنولوژی، کشت بافت گیاهی از اهمیت بسیار زیادی بر خوردار است (۲۰). فنون کشت بافت گیاهی به ابزاری قدرتمند برای تکثیر گونه‌های گیاهی تبدیل شده است (۱۹). این تکنیک‌ها در گیاهان دارویی به سمت تولید متابولیت‌های ثانویه ویژه، حفاظت ژرم‌پلاسم یا توسعه اصول ریز ازدیادی گیاه سوق داده می‌شود (۱۲ و ۱۸). علاوه بر این، کشت بافت در بهبود ژنتیکی گیاهان با استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک نیز نقش بسیار مهمی دارد. پیش نیاز اصلی و اولین گام برای موارد فوق بهینه‌سازی یک سیستم کشت بافت مناسب است. بنابراین با توجه به اینکه مطالعاتی در رابطه با کشت بافت کاسنی بومی ایران گزارش نشده است، این تحقیق به منظور بهینه‌سازی روش باززایی مناسب با استفاده ازغلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد NAA،BA،KIN و ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ این گیاه (ژنوتیپ بومی اصفهان) انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه و ضدعفونی بذور

بذر گیاه کاسنی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. جهت ضدعفونی، بذور ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری شستشو داده شدند. سپس زیر هود لامینار ابتدا در الکل اتانول ۷۰٪ به مدت ۹۰

1- Sesquiterpene
2- Lacoten
3- Kumarin
4- Flavonoid
5- Skoog &Murashige
6- Indole Acetic Acid
7- BenzylAmino Pourin
8- Guilio
9- BenzylAdenine
10- Kinetin
11- Radcchio
12- Italiana

ثانیه غوطه‌ور شدند و سپس با محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۲۵ دقیقه ضدعفونی گردیدند. در نهایت ۳ بار با آب مقطر استریل بهمدت ۱، ۵ و ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند.

کشت بذور

بذور ضدعفونی شده در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) (۱۳) کشت گردیدند. داخل هر پتری دیش ۱۵ عدد بذر قرار گرفت. بذور جهت جوانه‌زنی به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. بعد از جوانه‌زنی کشت‌ها جهت رشد و نمو در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

کشت ریز نمونه‌ها

چهار هفته بعد از رشد گیاهچه‌ها از آنها ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ تهیه شد. ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ به طول ۵ میلی‌متر برش داده شدند و در محیط کشت MS حاوی ترکیب غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشدگیاهی کشت گردیدند. در هر تکرار ۸ ریز نمونه کشت گردید. بعد از استقرار ریز نمونه‌هادرمحیط کشت، اطراف پتری دیش‌ها با پارافیلم بسته شد و در دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (شدت نور ۲۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

صفات مورد اندازه‌گیری

صفات مورد اندازه‌گیری در این تحقیق شامل درصد کالوس‌زایی، درصد باززایی، میانگین تعداد نوساقه در هر ریز نمونه بود که بعد از چهار هفته از کشت ریز نمونه‌ها یادداشت برداری صورت گرفت.

تیمارهای هورمونی

ریز نمونه‌ها جهت باززایی در محیط کشت MS در غلظت‌های (۰، ۰/۱، ۰/۳/۰۶، ۱ میلی‌گرم در لیتر) نفتالین استیک اسید (NAA)، (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بنزیل آدنین (BA) و (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) کنتین (KIN) مورد بررسی قرار گرفتند. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی جهت باززایی ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ انجام شد. محیط کشت MS در آزمایش اول حاوی ترکیب غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (BA و NAA) در ۲۵ ترکیب هورمونی (جدول ۱) در ۳ تکرار و در داخل هر تکرار ۸ ریزنمونه و محیط کشت MS در آزمایش دوم حاوی ترکیب غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (KIN و NAA) در ۴ تکرار و در داخل هر تکرار ۸ ریزنمونه و ۲۰ ترکیب هورمونی (جدول ۲) بودند.

تجزیه و تحیل آماری

داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. قبل از انجام تجزیه واریانس نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

جدول ۱- غلظتهای مختلف NAA و BA در محیط‌های کشت برای القای کالوس و باززایی در ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ

Table 1- Different combinations of NAA and BA in MS medium used for callus induction and regeneration from leaf and petiole explants

ترکیبات تیماری ($mg\ l^{-1}$) Treatment combinations($mg\ l^{-1}$)	محیط کشت Medium	ترکیبات تیماری($mg\ l^{-1}$) Treatment combinations ($mg\ l^{-1}$)	محیط کشت Medium
0.3NAA + 1BA	M14	0NAA + 0BA	M1
0.3NAA + 1.5BA	M15	0NAA + 0.1BA	M2
0.6NAA + 0BA	M16	0NAA + 0.5BA	M3
0.6NAA + 0.1BA	M17	0NAA + 1BA	M4
0.6NAA + 0.5BA	M18	0NAA + 1.5BA	M5
0.6NAA + 1BA	M19	0.1NAA + 0BA	M6
0.6NAA + 1.5BA	M20	0.1NAA + 0.1BA	M7
1NAA + 0BA	M21	0.1NAA + 0.5BA	M8
1NAA + 0.1BA	M22	0.1NAA + 1BA	M9
1NAA + 0.5BA	M23	0.1NAA + 1.5BA	M10
1NAA + 1BA	M24	0.3NAA + 0BA	M11
1NAA + 1.5BA	M25	0.3NAA + 0.1BA	M12
		0.3NAA + 0.5BA	M13

جدول ۲- غلظتهای مختلف NAA و KIN در محیط‌های کشت برای القای کالوس و باززایی در ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ
Table 2- Different combinations of NAA and KINin MS medium used for callus induction and regeneration of leaf and petiole explants

ترکیبات تیماری($mg\ l^{-1}$) Treatment combinations ($mg\ l^{-1}$)	محیط کشت Medium	ترکیبات تیماری($mg\ l^{-1}$) Treatment combinations ($mg\ l^{-1}$)	محیط کشت Medium
0.3NAA + 1 KIN	R11	0 NAA + 0 KIN	R1
0.3 NAA + 1.5 KIN	R12	0 NAA + 0.5 KIN	R2
0.6 NAA + 0 KIN	R13	0 NAA + 1 KIN	R3
0.6 NAA + 0.5 KIN	R14	0 NAA + 1.5 KIN	R4
0.6 NAA + 1KIN	R15	0.1 NAA + 0 KIN	R5
0.6 NAA + 1.5 KIN	R16	0.1 NAA + 0.5 KIN	R6
1 NAA + 0 KIN	R17	0.1NAA + 1 KIN	R7
1 NAA + 0.5 KIN	R18	0.1NAA + 1.5 KIN	R8
1 NAA + 1KIN	R19	0.3 NAA + 0KIN	R9
1 NAA + 1.5KIN	R20	0.3 NAA + 0.5 KIN	R10

نتایج و بحث

نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که اثرات اصلی و اثرات متقابل غلظت‌های مختلف ترکیب هورمون‌های NAA وBA بر صفات درصد باززایی و میانگین تعداد نوساقه در هر ریز نمونه، در ریز نمونه برگ و دمبرگ در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۳). همچنین نتایج تجزیه آماری نشان داد که اثرات اصلی و اثرات متقابل غلظت‌های مختلف ترکیب هورمون‌هایKIN و NAA بر صفات درصد کالوس‌زایی، درصد باززایی و میانگین تعداد نوساقه در هر ریز نمونه، در ریز نمونه برگ و دمبرگ در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۴). در این تحقیق ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ کشت شده در محیط کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی NAA وBA بعد از گذشت دو هفته در اکثر محیط‌های کشت به القای کالوس واکنش نشان دادند. درصد کالوس‌زایی در همه محیط‌های کشت با سطوح مختلف اکسین و سایتوکنین (NAA وBA) به غیر از شاهد (فاقد هورمون) و محیط‌های کشت فاقد اکسین (BA به تنهایی) در هر دو ریز نمونه برگ و دمبرگ (۱۰۰ درصد) بود. نتایج مقایسه میانگین مربوط به اثرات متقابل هورمون‌های NAAوKIN برای صفت کالوس‌زایی نشان داد از بین تیمارهای مورد بررسی با غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و KIN بیشترین درصد کالوس‌زایی برای ریز نمونه برگ در محیط کشت R11 حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN و محیط کشت R12 حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیترNAAو ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN (۷۱/۸ درصد) مشاهده شد. بیشترین درصد کالوس‌زایی برای ریز نمونه دمبرگ در محیط کشت R11 حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN (۸۱/۲۵ درصد) حاصل شد. در محیط کشت شاهد (فاقد هورمون) و محیط‌های کشتی که فاقد هورمون اکسین بودند کالوس‌زایی مشاهده نشد. نتایج نشان داد جهت تولید کالوس وجود هورمون ضروری است و در محیط کشت فاقد هورمون کالوس تولید نگردید. نتایج مشابهی نیز در این رابطه توسط دانشمندان دیگر در چند گونه گیاهی ثبت شده است (۱، ۲، ۸، ۲۲) تحقیقات نشان داده است که در محیط کشت دارای اکسین و فاقد سایتوکنین، کالوس تولید می گردد اما بدون حضوراکسین کالوس تولید نمی‌شود (۵). در گزارشی درلپه های گیاه گردو نیز بدون وجود اکسین درمحیط کشت،کالوس تولید نگردید (۱۷). سایر محققان کالوس‌زایی ریز نمونه‌های این گیاه را با ترکیب هورمونیNAAو BA گزارش نکرده‌اند. رحمان و همکاران (۱۶) IAA را در ترکیب باBA برای کالوس‌زایی ریز نمونه برگ گیاه کاسنی استفاده کردند، که بیشترین کالوس‌زایی را در محیط کشت حاوی ۰/۰۸۷ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱/۰۵ میلی‌گرم در لیتر BA (۷۰ درصد) گزارش کردند. لیم و همکاران (۱۱) کالوس‌زایی ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ گیاه کاسنی را با ترکیب‌های هورمونی (BAP و NAA) و (BAP و IAA) در غلظت‌های مختلف مورد مطالعه قرار دادند که ترکیب NAA با BAP در همه تیمارها منجر به ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی شدند و درصد کالوس‌زایی را در ترکیب اکسین IAA با سایتوکنین BAP از ۲۰ تا ۹۵ درصد متغییر گزارش کردند. ولایوتام و همکاران (۲۱) کالوس‌زایی ریز نمونه برگ گیاه کاسنی را با اکسین‌های مختلف IAA، NAA ، IBA و 2-4-D در ترکیب با سایتوکنین BAP بررسی کردند که بیشترین درصد کالوس‌زایی را در ترکیب هورمونی BAP و NAAنسبت به سایر ترکیب‌های هورمونی گزارش کردند.

نتایج مقایسه میانگین مربوط به اثرات متقابل هورمون‌هایNAAو BA نشان داد که ترکیبات تیماری مختلف اثرات متفاوتی بر روی باززایی داشتند. بررسی اثر ترکیب‌های مختلف

هورمونیNAA و BA (از لحاظ درصد و میانگین باززایی در هر تیمار) در ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ نشان داد بیشترین درصد بـاززایی در ریز نمونه برگ (۷۱ درصد) و بیشترین میانگین تعـداد نوسـاقه در هـر ریز نمونه برگ (۲/۷ عدد) و بیشـترین درصـد بـاززایی در ریـز نمونـه دمبرگ (۷۳ درصد) و بیشترین میانگین تعداد نوساقه در هر ریز نمونـه دمبرگ (۲/۷۳ عدد) در محیط کشت M12 حـاوی ۰/۳ میلـی‌گـرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدسـت آمـد. محـیط کشـت M7 حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA با ۵۸ درصد باززایی و ۲ عدد میانگین تعداد نوساقه در هر ریـز نمونـه، در ریز نمونه برگ باززایی بهتری نشان داد.

جدول ۳- تجزیه واریانس تاثیر ترکیبات هورمونیNAA و BA بر صفات مورد ارزیابی در ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ

Table 3- Analysis of variance for the effect of different combinations of NAA and BA on some characteristics in leaf and petiole explants

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean squares			
		ریز نمونه برگ Leaf explant		ریز نمونه دمبرگ Petiole explant	
		درصد باززایی Regeneration percent	میانگین تعداد نوساقه Mean number of shoots	درصد باززایی Regeneration percent	میانگین تعداد نو ساقه Mean number of shoots
NAA	4	48.2**	0.623**	34.3**	0.374**
BA	4	36.1**	0.436**	25.3**	0.338**
NAA×BA	16	9.9**	0.144**	7.38**	0.1**
اشتباه آزمایشی (Error)	50	0.467	0.039	0.36	0.041
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of variations	–	21.3	22.1	23.3	23.7

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

**: Significant at probability level of 1 %

جدول ٤- تجزیه واریانس تاثیر ترکیبات هورمونیNAAوKIN بر صفات مورد ارزیابی ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ

Table 4- Analysis of variance for the effects of different combinations of NAA and KIN on some characteristics in leaf and petiole explants

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean squares					
		ریز نمونه برگ Leaf explant			ریز نمونه دمبرگ Petiole explant		
		درصد باززایی Regeneration percent	میانگین تعداد نوساقه Mean number of shoots	درصد کالوس‌زایی Callusinduction percent	درصد باززایی Regeneration percent	میانگین تعداد نوساقه Mean number ofshoots	درصد کالوس‌زایی Callusinduction percent
NAA	4	67.8**	0.35**	93**	22.9**	0.038**	87.7**
KIN	3	31.7**	0.152**	62.4**	15.7**	0.027**	77.7**
NAA×KIN	12	9.5**	0.072**	12.3**	8.5**	0.021**	15.4**
اشتباه آزمایشی (Error)	60	0.479	0.02	0.283	0.228	0.004	0.707
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of variations		27	17.2	16.4	23.8	8.4	25.8

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

**: Significant at probability level of 1 %

جدول ۵- مقایسه میانگین تاثیر ترکیب هورمونی NAA و BA بر صفات مورد ارزیابی در ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ

Table 5- Compare means for different combinations of NAA and BA in leaf and petiole explants

محیط کشت Medium	ریز نمونه دمبرگ Petiole explant			ریز نمونه برگ Leaf explant		
	کالوس‌زایی Callus induction	میانگین تعداد نوساقه Mean number of shoots	درصد باززایی Regeneration percent	کالوس‌زایی Callus induction	میانگین تعداد نوساقه Mean number of shoots	درصد باززایی Regeneration percent
M1	-	0^{d}	0^{e}	-	0^{e}	0^{g}
M2	-	0^{d}	0^{e}	-	0^{e}	0^{g}
M3	-	0^{d}	0^{e}	-	0^{e}	0^{g}
M4	-	0^{d}	0^{e}	-	0^{e}	0^{g}
M5	-	0^{d}	0^{e}	-	0^{e}	0^{g}
M6	-	0^{d}	0^{e}	-	0^{e}	0^{g}
M7	+	$0.8b^{cd}$	38^{c}	+	2^{a}	58^{ab}
M8	+	$0.56b^{cd}$	18.6^{d}	+	1.66^{ab}	41^{cd}
M9	+	0.17^{d}	14^{d}	+	0.83^{bc}	36^{cd}
M10	+	0^{d}	0^{e}	+	0.2^{cd}	8.3^{f}
M11	+	0^{d}	0^{e}	+	0^{e}	0^{g}
M12	+	2.73^{a}	73^{a}	+	2.7^{a}	71^{a}
M13	+	1.4^{b}	47^{b}	+	1.66^{ab}	48.3^{bc}
M14	+	$0.76b^{cd}$	33.3^{c}	+	0.33^{cd}	36.6^{cd}
M15	+	0.07^{d}	9.3^{d}	+	0.16^{cd}	9^{f}
M16	+	0^{d}	0^{e}	+	0^{e}	0^{g}
M17	+	0.93^{bc}	42^{b}	+	0.33^{cd}	37^{cd}
M18	+	0.43^{bcd}	21^{cd}	+	0.26^{cd}	37^{cd}
M19	+	0.09^{d}	11.7^{d}	+	0.13^{cd}	16.6^{e}
M20	+	0.09^{d}	9.3^{d}	+	0.13^{cd}	15.3^{e}
M21	+	0^{d}	0^{e}	+	0^{e}	0^{g}
M22	+	0^{d}	0^{e}	+	0^{e}	0^{g}
M23	+	0^{d}	0^{e}	+	0^{e}	0^{g}
M24	+	0.09^{d}	9^{d}	+	0.16^{cd}	15.3^{e}
M25	+	0.2^{cd}	14^{d}	+	0.13^{cd}	19.6^{e}

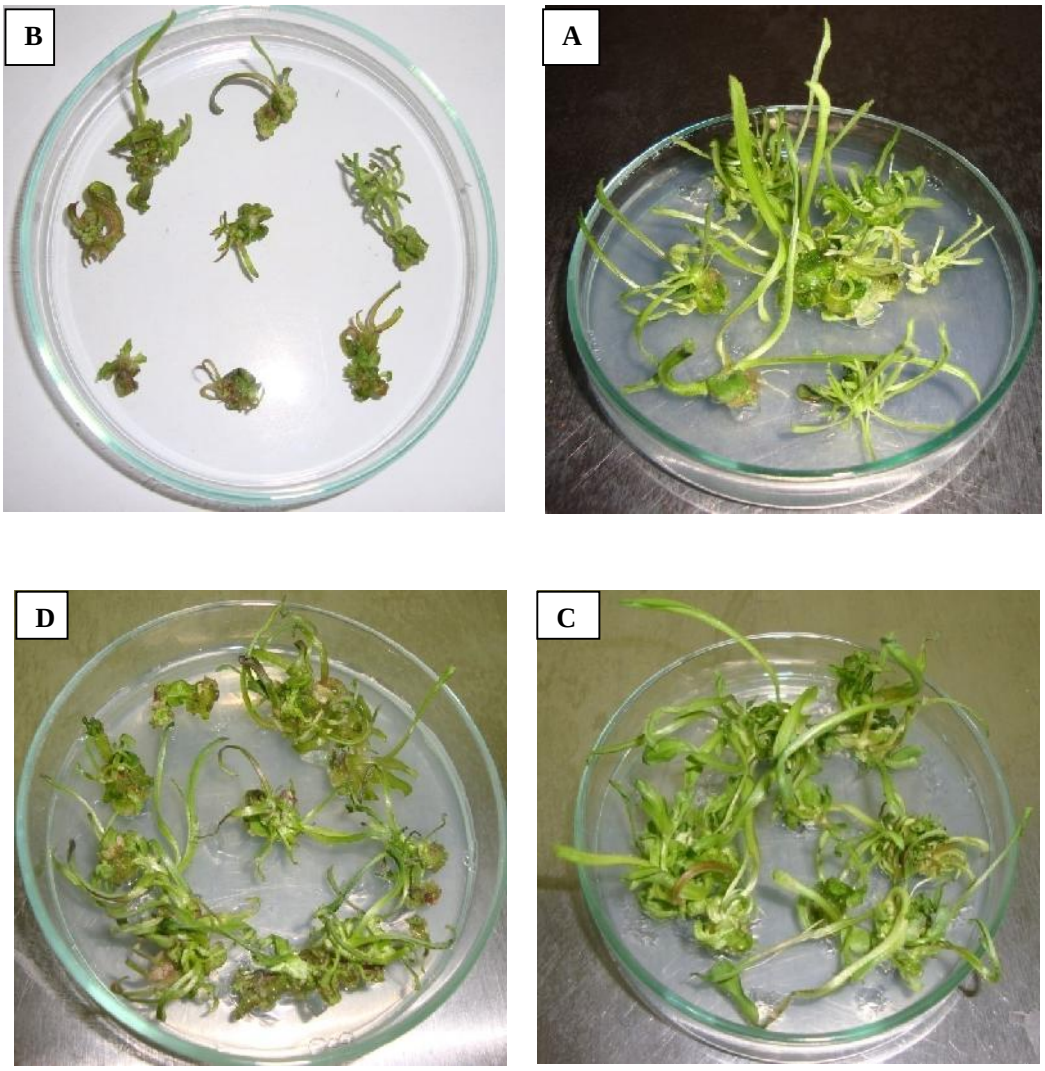
میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ندارند

Means with similar letters in each column are not significantly different

کمترین باززایی (صفر) در تیمار شاهد و تیمارهای بکار رفته هر یک از هورمون‌ها به تنهایی و همچنین در غلظت‌های ۱ میلی‌گرم در لیتر NAAبعلاوه ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیترBA باززایی مشاهده شد. با افزایش غلظت هورمون BA درصد باززایی کاهش یافت و بیشترین باززایی در غلظت‌های پایین BAبدست آمد (جدول۵). کاناموتو وهمکاران (۹) در آزمایشی برای باززایی ریز نمونه برگ گیاه کاهو بیشترین باززایی را در غلظت‌های پایین NAAو BA(۰/۱میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیترBA) گزارش کردند. هانتر و بوریت (۶) نیز بیشترین میزان نوساقه را در ریز نمونه کوتیلدون گیاه کاهو در غلظت‌های پایین NAAو BA (۰/۵۴ میکرومولار NAA و ۰/۴۴ میکرومولار BA) بدست آوردند که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت.

نتایج مقایسه میانگین مربوط به اثرات متقابل هورمون‌های NAA و KIN نشان داد از بین تیمارهای مورد بررسی با غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و KIN، در ریز نمونه برگ بیشترین درصد باززایی (۶۵/۶ درصد) و بیشترین میانگین تعداد نوساقه در هر ریز نمونه (۱/۳۷ عدد) در محیط کشت R7 حاوی ۰/۱میلی‌گرم در لیترNAA و۱ میلی‌گرم در لیترKIN مشاهده شد و در ریز نمونه دمبرگ بیشترین درصد باززایی (۴۰/۶ درصد) و بیشترین میانگین تعداد نوساقه در هر ریز نمونه (۰/۵ عدد) در محیط کشت R10 حاوی

۰/۳میلی‌گرمدر لیترNAA و ۰/۵میلی‌گرمدر لیترKIN بدست آمد. نتایج آزمایش نشان داد در هر دو ریز نمونه برگ و دمبرگ از بین غلظت‌های مختلف هورمون NAA، غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با غلظت‌های به کار رفته هورمونKINباززایی مشاهده نشد (جدول ۶).



شکل ۱- اثر ترکیبات مختلف NAA و سیتوکنین های مختلف بر باززایی از ریزنمونه های برگ و دمبرگ.الف: NAAو BA درریز نمونه برگ، ب: NAAو BA درریز نمونه دمبرگ، ج: NAAو KIN درریز نمونه برگ، د: NAAو KIN درریز نمونه دمبرگ

Figure 1- Effect of different combinations of NAA and different cytokinins on regeneration from leaf and petiole explants.A:NAA and BA on leaf explant. B: NAA and BA on petiole explant. C: NAA and KIN on leaf explant. D: NAA and KIN on petiole explant

یوسسان و همکاران (۲۳) در آزمایشی با غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAAو KIN در محیط کشت MSMO بیشترین باززایی و بیشترین میانگین تعداد نوساقه را در ریز نمونه برگ گیاه کاسنی در محیط کشت حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیترNAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN به ترتیب (۵۵ درصد و ۱/۴ عدد) گزارش کردند. لیم و همکاران (۱۱) در آزمایشی جهت باززایی ریز نمونه برگ و دمبرگ گیاه کاسنی با ترکیب‌های هورمونیNAA وBAP، IAA و BAPبیشترین درصد باززایی را در ریز نمونه برگ و دمبرگ در

محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرمدر لیتر BAP به ترتیب (۷۸ درصد و ۵۵ درصد) و در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در هر دو ریز نمونه برگ و دمبرگ باززایی را (۱۰۰ درصد) گزارش کردند.پارک و همکاران (۱۵) بیشترین درصد باززایی را در ریز نمونه برگ گیاه کاسنی در در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP گزارش کردند. جن وون و همکاران (۳) در آزمایشی با غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونیIAA و BAP جهت باززایی ریز نمونه کوتیلدون دو ژنوتیپ رادشیو و ایتالیانا گیاه کاسنی بیشترین تعداد شاخه در ژنوتیپ رادشیو در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP (۵/۶ عدد) و بیشترین تعداد شاخه در ژنوتیپ ایتالیانادر محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP (۵ عدد) گزارش کردند.

نتایج همبستگی بین صفات مورد ارزیابی در ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ

بررسی همبستگی بین صفات درصد باززایی و میانگین تعداد نوساقه در ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ در غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و BA (جدول ۷) نشان داد که همبستگی بین درصد باززایی و میانگین تعداد نوساقه در هر دو ریز نمونه برگ و دمبرگ مثبت و معنی‌دار بود.

جدول ٦- مقایسه میانگین تاثیر ترکیب هورمونی NAA و KIN بر صفات مورد ارزیابی در ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ

Table 6- Compare means for different combinations of NAA and KIN in leaf and petiole explants

محیط کشت Medium	ریز نمونه دمبرگ Petiole explant			ریز نمونه برگ Leaf explant		
	کالوس‌زایی Callusinduction	میانگین تعداد نوساقه Mean number of shoots	درصد باززایی Regeneration percent	کالوس‌زایی Callusinduction	میانگین تعداد نوساقه Mean number of shoots	درصد باززایی Regeneration percent
R1	0^{f}	0^{d}	0^{d}	0^{f}	0^{e}	0^{e}
R2	0^{f}	0^{d}	0^{d}	0^{f}	0^{e}	0^{e}
R3	0^{f}	0^{d}	0^{d}	0^{f}	0^{e}	0^{e}
R4	0^{f}	0^{d}	0^{d}	0^{f}	0^{e}	0^{e}
R5	0^{f}	0^{d}	0^{d}	0^{f}	0^{e}	0^{e}
R6	0^{f}	0.03^{cd}	3.12^{d}	0^{f}	0.56^{bc}	37.5^{b}
R7	0^{f}	0.25^{b}	25^{b}	0^{f}	1.37^{a}	65.6^{a}
R8	12.5^{e}	0.21^{b}	15.62^{c}	0^{f}	0.5^{bc}	37.5^{b}
R9	0^{f}	0^{d}	0^{d}	0^{f}	0^{e}	0^{e}
R10	12.5^{e}	0.5^{a}	40.6^{a}	34.3^{c}	0.24^{cde}	19^{c}
R11	81.25^{a}	0.18^{bc}	18.75^{c}	71.8^{a}	012^{de}	9.5^{d}
R12	62.5^{a}	0.03^{cd}	3.1^{d}	71.8^{a}	0.03^{e}	3.1^{de}
R13	0^{f}	0^{d}	0^{d}	0^{f}	0^{e}	0^{e}
R14	43.75^{b}	0.15^{bcd}	18.75^{c}	31.2^{cd}	0.74^{b}	31.2^{b}
R15	68.75^{a}	0.12^{cd}	12.5^{c}	53.1^{b}	0.46^{bcd}	40^{b}
R16	78.1^{a}	0.15^{bcd}	25^{b}	62.5^{ab}	0.78^{b}	50^{b}
R17	0^{f}	0^{d}	0^{d}	0^{f}	0^{e}	0^{e}
R18	15.62^{de}	0^{d}	0^{d}	25^{de}	0^{e}	0^{e}
R19	25^{cd}	0^{d}	0^{d}	31.2^{cd}	0^{e}	0^{e}
R20	37.5^{bc}	0^{d}	0^{d}	37.5^{c}	0^{e}	0^{e}

میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ندارند

Means with similar letters in each column are not significantly different

جدول ۷- همبستگی بین درصد باززایی و میانگین تعداد نوساقه در ترکیبات هورمونی NAAوBAدر ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ

Table 7- Correlation between regeneration and mean number of shoots for treatments of NAA and BA in leaf and petiole explants

	ریز نمونه دمبرگ Petiole explant	ریز نمونه برگ Leaf explant
	میانگین تعداد نوساقه Mean number of shoots	میانگین تعداد نوساقه Mean number of shoots
درصد باززایی Regeneration percent	0.774**	0.784**

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪

: Significant at probability level of 1 %

جدول ۸- همبستگی بین درصدکالوس‌زایی، درصد باززایی و میانگین تعداد نوساقه در ترکیبات هورمونیNAA وKINدر ریز نمونه‌هایبرگ و دمبرگ

Table 8- Correlation among callus induction, regeneration and mean number of shoots for treatments of NAA and KIN in leaf and petiole explants

	ریز نمونه دمبرگ Petiole explant		ریزنمونه برگ Leaf explant	
	میانگین تعداد نوساقه Mean number of shoots	درصدکالوس‌زایی Callus induction percent	میانگین تعداد نوساقه Mean number of shoots	درصدکالوس‌زایی Callus induction percent
درصد باززایی Regeneration percent	0.827**	0.38**	0.84**	0.17ns
میانگین تعداد نوساقه Mean number of shoots	1	0.208**	1	0.096 ns

ns، **: به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪

ns, **: Non-significantand significant at probability level of 1 %, respectively

همچنین در غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و KIN، بررسی همبستگی بین درصد کالوس‌زایی، درصد باززایی و میانگین تعداد نوساقه (جدول ۸) نشان داد که در ریز نمونه برگ همبستگی بین درصد باززایی و میانگین تعداد نوساقه مثبت و معنی‌دار بود. همچنین بررسی همبستگی در ریز نمونه دمبرگ نشان داد همبستگی بین درصد باززایی و میانگین تعداد نوساقه و درصدکالوس‌زایی مثبت و معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج بدست آمده از آزمایش بررسی اثر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونیNAAو BA بر کالوس‌زایی و باززایی ریز نمونه برگ و دمبرگ نشان داد در هر دو ریز نمونه برگ و دمبرگ در همه ترکیب‌های هورمونی کالوس‌زایی مشاهده شد. از لحاظ باززایی بیشترین باززایی در هر دو ریز نمونه برگ و دمبرگ در غلظت‌های پایین BA مشاهده شد و با افزایش غلظت BA میزان باززایی کاهش یافت. همچنین آزمایش بررسی اثر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونیNAA و KIN بر باززایی ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ نشان داد. در ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با غلظت‌های مختلف بکار رفته KINباززایی صورت نگرفت.طبق نتایج بدست آمده از هر دو آزمایش در ریز نمونه برگ نسبت به ریز نمونه دمبرگ کالوس زایی و باززایی بهتری مشاهده شد. با توجه به نتایج حاصل از کشت بافت در این تحقیق می‌توان پیشنهاد کرد که تیمارهای اعمال شده در این تحقیق بر روی ژنوتیپ‌های بومی دیگر کشور اعمال شود و بهترین ژنوتیپ‌های پاسخ دهنده به کشت بافت تعیین شوند.

منابع

1- Abd Elaleem K.G., Modawi R.S., and Khalafalla M.M. 2009.Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanumtuberosum*L.) cultivar Diamant. African Journal of Biotechnology, 11: 2529-2534.

2- Ahmad N., Fazal H., and Zamir R. 2011.Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana*(Bert.). Sugar Technology, 2: 174 - 177.

3- Geun-Won CH., Dae-Sung K., Hyeon-Jeong H., Won Byoung CH., and Youn-Hyung L. 2009. Plant regeneration from cotyledon explants in leaf chicory (*Cichoriumintybus* L. var. *foliosum*). Horticulture, Environment and Biotechnology, 1: 40 - 44.

4- Han Y., Jin X., Wu F., and Zhang G. 2011.Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley, *Hordeumvulgare* L., Journal of Zhejiang University Science, 5: 399-407.

5- Hohtola A. 1988. Seasonal changes in explant viabilityand contamination of tissue culture from mature scotpine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 15: 211-222.

6- Hunter D.C., and Burritt D.J. 2002. Improved adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.). ScientiaHorticulturae, 95: 269–276.

7- Hyeon-Jeon, H., Hea-Jung, J., Geun-Won, CH. 2009. Shoot regeneration from cotyledon explants in root chicory affected by culture temperature and medium composition,Korean Journal of Horticultural Science and Technology, 4: 662-667.

8- Jayasree T., Pavan U., Ramesh M., and Rao A.V. 2001.Somatic embryogenesis from leaf culture of potato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 64: 13-17.

9- Kanamoto H., Yamashita A., Asao H., Okumura S., Takase H., Hattori M., Yokota A., and Tomizawa K.I. 2006. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. Transgenic Research, 15: 205-217.

10- Karimi H. 1975.Plant of Iran.Jahad University Press publisher.pp: 772-773. (In persion)

11- Lim T.L., Park E.J., Lee J.Y., Chun I.J., and An G.H. 2003. High plant regeneration and ectopic expression of OsMADS1 gene in root chicory (*Cichorium* with*intybous*L. var. *sativus*).Journal of Plant Biotechnology, 4: 215-219.

12- Lima S.S., Esqulibl, M. A., Henreiques A.B., Silva F.O., Silva P.H.B., and Lage C.L.S. 2001.Monoclonal culture of erva-de-bicho (*polygonum acreHBK* var. *aquatile*) for commercial scale production of a phyto- therapeutic medicine. Brazilian Journal Medicinal Plant, 4: 51-55.

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

14- Nandagopal S., and RavjithaKumari B.D.2006.Adeninsulphate induced high frequency shoot organogenesis in callus and *in vitro* flowering of *Cichoriumintybus*. L.cv .Focus-apotent medicinal plant.Actaagriculturaeslovenica, 2: 415-425.

15- Park E., and Lim H. 1999. Establishment of an efficient *in vitro* plant regeneration system in chicory (*Cichoriumintybus* L. var. *sativus*).ActaHorticulturae, 483: 367- 370.

16- Rehman R.U., Israr P.S., Srivastava P.S., Bansal K.C., and Abdin M.Z. 2003.*In vitro* regeneration of witloof chicory(*Cichoriumintybous*L.) from leaf explantand accumulation of esculin.*In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant, 39:142-146.

17- Rodriguez R. 1982. Callus initiation and root formation from *in vitro* culture of walnut cotyledon. HortScience, 17: 195-196.

18- Rout G.R., Samantarary S., and Das, P. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnology Advances, 18: 91-120.

19- Sebastina M.M. 2004.*In vitro* callus induction and plants from stem and petiole explants of *salvia canariensis* L. Journal of plant Tissue culture, 14: 167-172.

20- Tripathi L., and Tripath J.N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243-253.

21- Velayutham P., Ranjithakumari B.D., andBaskaran P. 2006. An efficient *in vitro* plat regeneration system for *Cichoriumintybus*L. an important medicinal plant. Journal of Agricultural Technology, 2: 287-298.

22- Yasmin S., Nasiruddin K.M., Begum R., and Talukder S.K. 2003.Regeneration and establishment of potato plantlets through callus formation with BAP and NAA, Asian Journal of Plant Sciences, 12: 936-940.

23- Yucesan B., Turker A.U., andGurelE. 2007.TDZ-induced high frequency plant regeneration throughmultiple shoot formation in witloof chicory(*Cichoriumintybus*L.). Plant Cell, tissue and organ Culture, 91: 243-250.

24- Zargari A. 1989.Medicinal plants.Tehran university press.pp: 176. (In persion)