نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و دوم، شماره چهارم، ۱۳۹٤
http://jopp.gau.ac.ir

پینه‌زایی و باززایی گیاهچه از دو توده ایرانی گیاه داروئی هندوانه ابوجهل (*Citrullus colosynthis* L.) در شرایط درون‌شیشه‌ای

زینب قاسمی[۱] و *اسد معصومی اصل[۲]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه یاسوج، [۲]استادیار اصلاح نباتات، دانشگاه یاسوج

تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: هندوانه ابوجهل از گیاهان دارویی ضدسرطان است که تکثیر درون شیشه‌ای در سطح وسیع و نیز تولید ماده ضدسرطان آن ضروری می‌باشد. عوامل زیادی چون ژنوتیپ، نوع ریزنمونه انتخابی و شرایط آماده‌سازی آن روی میزان باززایی اثر می‌گذارند. اثر تنظیم‌کننده‌های رشد روی پینه‌زایی و باززایی غیرمستقیم هندوانه ابوجهل توده پارانگی‌پتایی بومی هند بررسی و روش ریزادیادی با استفاده از ریزنمونه ساقه آن ارائه شده است. نتایج آنها نشان داد که حداکثر مقدار پینه القا شده در محیط MS، همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های IAA و 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر 6-BA بدست می‌آید. با توجه به اینکه گزارشی در زمینه باززایی غیرمستقیم گیاهچه از توده‌های ایرانی این گیاه در دست نیست. لذا در این تحقیق پینه‌زایی و باززایی گیاهچه در دو توده ایرانی هندوانه ابوجهل بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: پس از ضدعفونی سطحی و جدا کردن پوسته‌های سخت بیرونی، مغز بذور این دو توده در محیط‌کشت MS کشت گردیدند و پس از حدود یک ماه، از گیاهچه‌های بدست آمده ریزنمونه‌های برگ و ساقه جهت تولید پینه در محیط کشت MS حاوی ترکیبات مختلف هورمون‌های BAP، NAA، 2,4-D و کینتین کشت گردیدند. جهت باززایی غیرمستقیم نیز از ترکیبات مختلف هورمون‌های BAP، NAA و نیز محیط‌های کشت MS، ½MS و ¼MS استفاده شد. گیاهچه‌های باززایی‌شده به گلدان‌های کوچک حاوی خاک استریل (نسبت ۳ به ۱ خاک و ماسه) منتقل شدند. این گیاهچه‌ها به گیاه کامل تبدیل شده و توانستند به خوبی مستقر شده و رشد کنند.

*مسئول مکاتبه: masoumiasl@yu.ac.ir

یافته‌ها: در هر دو توده، پینه‌زایی با ترکیبات مختلف هورمون‌های 2,4-D و کینتین کمتر از محیط‌های کشت حاوی ترکیبات مختلف هورمون‌های BAP و NAA بود. در ترکیب‌های مختلف هورمون‌های BAP و NAA در توده دهدشت، حدود ۱۰۰ درصد و در ترکیب‌های مختلف هورمون‌های کینتین و 2,4-D در توده گچساران، حدود ٦٦/٦ درصد پینه‌زایی بدست آمد. در هر دو توده، پنج هفته پس از کاشت قطعات پینه، تشکیل شاخساره شروع گردید. ریزنمونه برگ، با ترکیب هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت ½MS در توده دهدشت و ریزنمونه ساقه، با ترکیب‌های هورمونی ۳ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت MS در هر دو توده بهترین باززایی غیرمستقیم گیاهچه را نشان دادند. بهترین محیط ریشه‌زایی نیز محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. ریشه‌زایی در هردو توده با این ترکیب هورمونی انجام شد با این تفاوت که در توده گچساران درصد ریشه‌زایی کم‌تر از توده دهدشت بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که توده دهدشت نسبت به توده گچساران و ریزنمونه ساقه نسبت به ریزنمونه برگ به باززایی غیرمستقیم بهتر پاسخ می‌دهند. در مجموع هر دو توده ایرانی این گیاه به پینه‌زایی و باززایی غیرمستقیم گیاهچه پاسخ مناسبی نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: باززایی، پینه‌زایی، ژنوتیپ، هندوانه ابوجهل

مقدمه

هندوانه ابوجهل با نام علمی *Citrulus Colocynthis* L. گیاهی دارویی از خانواده کدوئیان است. این گیاه متعلق به نواحی گرمسیری بوده و به‌صورت خودرو رشد می‌کند (۷). در طب سنتی، عموماً از این گیاه برای درمان بیماری‌های گوناگون استفاده می‌شود. این گیاه جزء گیاهان دارویی سمی می‌باشد که علاوه بر مسهل (اسهال آور) بودن، به دلیل وجود ماده تلخی که در آن است، درصد قند خون انسان را کاهش می‌دهد و در درمان دیابت مؤثر می‌باشد (۸).

ساتیاوانی و همکاران (۲۰۱۱) اثر تنظیم‌کننده‌های رشد روی پینه‌زایی و باززایی غیرمستقیم هندوانه ابوجهل توده پارانگی‌پتایی در هند را بررسی و روش ریزادیادی با استفاده از ریزنمونه ساقه را ارائه کردند (۲۲). نتایج آنها نشان داد که حداکثر مقدار پینه القا شده در محیط MS، همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های IAA و 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر 6-BA بدست می‌آید. در همین مطالعه، بیشترین درصد ریشه‌زایی در غلظت ٤ میلی‌گرم در لیتر IBA با ٢٤ ریشه در هر شاخساره در محیط MS کشت و کمترین ریشه‌زایی در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش شد. بیشینه سرعت پینه‌زایی در هندوانه زراعی (*Citrullus lanatus* L.) نیز مربوط به غلظت هورمونی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بود (۳). نتایج مشابهی در گیاه هندوانه زراعی مبنی بر استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سیتوکینین جهت پینه‌زایی گزارش شده‌است (٢٦ و ۳). بررسی پینه‌زایی با استفاده از ریزنمونه ساقه در گیاه هندوانه ابوجهل نیز نشان داده که حداکثر تعداد پینه القا شده در محیط MS، همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA، 2,4-D و غلظت یک پی پی ام 6-BA بود (۲۲). در تحقیق دیگری، مینا و همکاران (۲۰۱۰) بیشترین باززایی هندوانه ابوجهل را در توده‌ای هندی، از ریزنمونه ساقه در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش کردند (١٦). بر اساس نتایج به‌دست آمده توسط خیرآبادی و همکاران (۲۰۱۱) نیز در شرایط درون‌شیشه‌ای در خربزه (*Cucumis melo* L.) که هم خانواده این گیاه می‌باشد، بیشترین اندام‌زایی در ریزنمونه بدست آمده از قطعات برگ لپه‌ای دانهال‌های هفت روزه، روی محیط کشت MS همراه با یک میلی‌گرم در لیتر BAP، مشاهده گردید (١٤).

عوامل زیادی چون ژنوتیپ، نوع ریزنمونه انتخابی و شرایط آماده‌سازی آن روی میزان باززایی هندوانه زراعی اثر می‌گذارند. در این گیاه اصولاً از محور زیرلپه برای تحریک شاخه‌زایی استفاده

می‌شود. اگرچه از ریزنمونه‌های نوک شاخه و جوانه جانبی نیز به‌طور موفقیت آمیزی برای ریزازدیادی هندوانه زراعی استفاده شده است، اما بهترین منبع برای تهیه ریزنمونه، بخش انتهایی محور جنینی است که از بذر نابالغ به‌دست می‌آیند. در اندام‌زایی هندوانه زراعی، شاخه‌ها مستقیماً از جوانه‌های القا شده در حواشی قطعات محور زیر لپه به وجود آمده و بیشترین میانگین تولید شاخه و درصد باززایی شاخه مربوط به دانهال‌های هفت روزه با یک میلی گرم در لیتر BAP (به‌ترتیب ۵ شاخه به ازای هر ریزنمونه و ٦٤ درصد) به‌دست آمد (۲۳).

با توجه به اهمیتی که این گیاه داروئی دارد، نیاز به اهلی‌کردن و کشت وسیع آن احساس می‌شود و از طرفی، با استفاده از کشت درون‌شیشه‌ای می‌توان نسبت به تولید انبوه و عاری از آلودگی این گیاه دارویی اقدام نمود. از طرفی، با توجه به این‌که گزارشی از ریزازدیادی توده‌های ایرانی گیاه داروئی هندوانه ابوجهل موجود نیست و ایجاد تنوع جدید با استفاده از تنوع سوماکلونال نیز ضروری است، لذا بررسی پاسخ به کشت بافت توده‌های ایرانی این گیاه، مطالعه‌ای بنیادی است که می‌تواند مقدمه تحقیقات آتی باشد.

مواد و روش‌ها

میوه‌های هندوانه ابوجهل در مردادماه ۱۳۹۱ هم‌زمان بارسیدگی کامل، از مناطق بیابانی اطراف شهرستان‌های گچساران و دهدشت واقع در استان کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری گردیدند. بذرهای هندوانه ابوجهل بعد از خشک شدن در آفتاب، جمع‌آوری شدند. بذرها ابتدا با استفاده از آب لوله‌کشی شستو داده شدند، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضدعفونی شدند و در نهایت با آب دو بار تقطیر سه بار شستشو داده شده و به‌مدت ٢٤ ساعت جهت نرم شدن پوسته در آب دو بار تقطیر استریل نگهداری شدند. در زمان کشت، بذور فوق به زیر هود لامینارایرفلو منتقل شدند و پوسته بذور با استفاده از پنس و چاقوی آزمایشگاهی جدا شده و برای بدست آوردن ریزنمونه، مغز بذور جهت کشت در محیط MS (۱۸) استفاده شدند. برای پینه‌زایی، از ریزنمونه‌های ساقه و برگ و محیط‌های کشت MS کامل با ترکیبات مختلف هورمون‌های BAP (صفر، ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳، ٤ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (صفر، ۰/۱، ۱، ۱/۵، ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و نیز ترکیبات مختلف هورمون‌های کینتین (صفر، ۱، ۲، ٤ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (صفر، ۱، ۲، ٦ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید.

پینه‌های ایجاد شده روی ریزنمونه‌های ساقه و برگ جهت تولید شاخساره به چندین قسمت برش داده شده و به محیط کشت‌های MSکامل، ½MS و ¼MS حاوی ترکیبات مختلف دو هورمون BAP و NAA (بر اساس غلظت‌های ذکر شده برای پینه‌زایی و طراحی تعداد بسیار زیادی ترکیبات که در نهایت ۱۱ ترکیب هورمونی انتخاب شد) انتقال داده شدند. سپس ظروف کشت به قفسه‌های اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۴ ±۲°C و با میزان نور $۱۵۰\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ منتقل و ٦ هفته پس از کاشت، ویژگی‌های پینه از قبیل درصد پینه‌زایی، وزن تر و خشک پینه، حجم و قطر پینه و نیز درصد شاخساره‌زایی، تعداد شاخساره، طول شاخساره (میلی‌متر) و وزن تر و خشک شاخساره (میلی‌گرم) اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری صفات فوق با استفاده از خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر و ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم صورت گرفت.

به‌منظور تعیین بهترین غلظت هورمونی جهت ریشه‌زایی، شاخساره‌های کاملاً رشدیافته حاصل از آزمایش‌های قبلی بر روی محیط‌های کشت MS کامل، ½MS و ¼MS حاوی ترکیبات مختلف هورمونی کشت گردیدند. هورمون‌های به‌کار رفته در این آزمایش عبارت بودند از: BAP (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳، ٤ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر). آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار پیاده گردید. پس از کاشت پینه‌های دارای شاخساره‌ها، ظروف به قفسه‌های اتاق کشت منتقل و ۳ هفته پس از تشکیل و رشد ریشه، صفات درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه (سانتی‌متر) اندازه‌گیری شدند. گیاهچه‌های باززایی شده به گلدان‌های کوچک حاوی خاک استریل (نسبت ۳ به ۱ خاک و ماسه) منتقل شدند. برای سازگاری تدریجی با شرایط طبیعی و حفظ رطوبت نسبی بالا و کنترل آلودگی، از درپوش‌های شیشه‌ای استفاده گردید. پس از سازگاری گیاهچه‌ها با شرایط طبیعی، درپوش‌ها برداشته شده و گیاهچه‌ها به گلدان‌های بزرگ‌تر منتقل و در اتاقک رشد با شرایط نوری ۱٦ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. این گیاهچه‌ها تبدیل به گیاه کامل گردیده و توانستند به خوبی مستقر شده و رشد کنند.

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گردید. لازم به‌ذکر است ترکیبات هورمونی که هیچ پاسخی ندادند، وارد تجزیه و تحلیل نشدند. مقایسه میانگین اثرات اصلی به روش LSD و در صورت معنی‌دار بودن برهمکنش‌ها، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از رویه LSmeans انجام شد. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

در آزمایشی که از دو هورمون BAP و NAA استفاده شد، پنج هفته پس از کاشت ریزنمونه‌های برگ و ساقه، تشکیل پینه در دو توده دهدشت و گچساران مشاهده گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات نشان داد که برهمکنش سه‌گانه ترکیب هورمونی، ژنوتیپ و ریزنمونه و نیز برهمکنش‌های ترکیب هورمونی با ریزنمونه و ترکیب هورمونی با ژنوتیپ برای تمامی صفات مورد بررسی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس برای صفات مورد ارزیابی در مرحله پینه‌زایی از دو توده دهدشت و گچساران با استفاده از هورمون‌های BAP و NAA.

Table 1. Mean squares obtained from analysis of variance for evaluated traits in callogenesis step from Dehdasht and Gachsaran accessios using BAP and NAA hormones

طول پینه Callus diameter	حجم پینه Callus volume	وزن خشک پینه Callus dry weight	درصد پینه‌زایی Callogenesis percent	درجه آزادی Degree of Freedom	منابع تغییر Source of Variance
9.8^{**}	4.82^{**}	10^{**}	1.08^{**}	3	ترکیب هورمونی (Hormonal combination)
0.03^{ns}	5.005^{**}	9^{**}	0.019^{**}	1	ژنوتیپ (Genotype)
0.85^{**}	2.38^{**}	8^{**}	0.58^{**}	1	ریزنمونه (Explant)
3.4^{**}	1.15^{**}	6^{**}	0.019^{**}	3	ترکیب هورمونی × ژنوتیپ (Hormonal combination × Genotype)
0.92^{**}	0.18^{*}	7^{**}	0.58^{**}	3	ترکیب هورمونی × ریزنمونه (Hormonal combination × Explant)
1.8^{**}	0.075^{ns}	4^{**}	0.019^{**}	1	ژنوتیپ× ریزنمونه (Genotype × Explant)
0.35^{**}	0.143^{*}	6^{**}	0.019^{**}	3	ترکیب هورمونی × ژنوتیپ × ریزنمونه (Hormonal combination ×Genotype × Explant)
0.004	0.045	0.00006	0.0012	32	خطا (Error)
15.18	21.25	15.94	1.83		ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of Variance (%)

*و** به‌ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشند و ns معنی‌دار نمی‌باشد.

*,**: Significant at 1% and 5% probability level, ns: Nonsignificant

معنی‌دار شدن برهمکنش‌ها بیانگر وجود برهمکنش بین نوع ریزنمونه، ترکیبات مختلف هورمونی و ژنوتیپ می‌باشد. جدول مقایسه میانگین‌ها برای صفات نشان داد که ریزنمونه‌های ساقه و برگ در هر دو توده و در محیط کشت MS حاوی ترکیبات مختلف هورمونی BAP و NAA، ۱۰۰ درصد پینه‌زایی داشتند. در محیط شاهد، ریزنمونه ساقه توده دهدشت و گچساران ۳۳/۳ درصد پینه‌زایی نشان دادند ولی ریزنمونه برگ پینه‌ای تولید نکرد (جدول ۲ و شکل ۱).

در آزمایش دوم که از هورمون‌های 2,4-D و کینتین استفاده شد، حدود ۷ هفته پس از کاشت ریزنمونه‌ها، فقط در توده دهدشت، تشکیل پینه مشاهده گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که برهمکنش سه‌گانه ریزنمونه، ژنوتیپ و ترکیب هورمونی فقط برای صفت قطر پینه معنی‌دار شد (جدول ۳). مقایسه میانگین برهمکنش ریزنمونه و ترکیب هورمونی نشان داد که بیشترین درصد پینه‌زایی (٦٦/٦ درصد)، مربوط به ریزنمونه ساقه بود. هیچگونه پینه‌زایی در ریزنمونه برگ مربوط به محیط شاهد و ترکیبات هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ٦ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین در ریزنمونه‌های ساقه و برگ مشاهده نشد (شکل ۲).

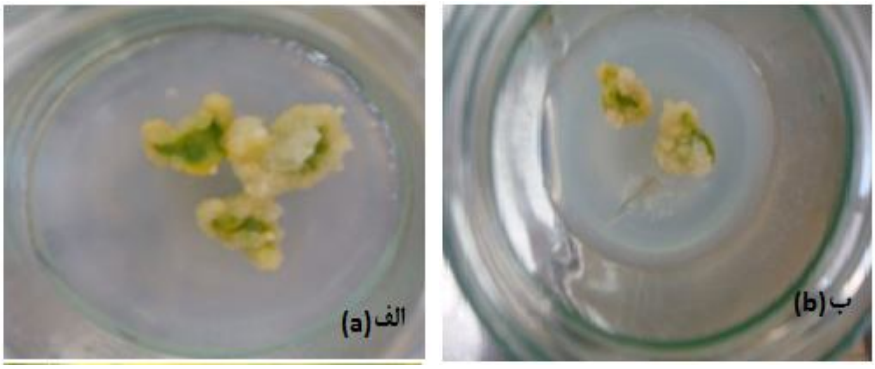
جدول ۲- مقایسه میانگین‌های حاصل از برهمکنش ژنوتیپ، ریزنمونه و ترکیب هورمونی برای صفات مورد ارزیابی در مرحله پینه‌زایی.

Table 2. Mean comparisons obtained from interaction of genotype, explant and hormonal combination for evaluated traits in callogenesis step.

قطر پینه (میلی‌متر) Callus diameter (mm)	حجم پینه (میلی‌مترمکعب) Callus volume (mm^3)	وزن خشک پینه (میلی‌گرم) Callus dry weight (mg)	درصد پینه‌زایی Callogenesis percent	BAP (میلی‌گرم در لیتر) (mg/liter)	NAA (میلی‌گرم در لیتر) (mg/liter)	ریزنمونه Explant	ژنوتیپ Genotype
4.6^{d}	1.5^{c}	70^{c}	100^{a}	0.01	1	ساقه (Stem)	دهدشت (Dehdasht)
4.3^{d}	2^{b}	80^{c}	100^{a}	0.1	5		
11.6^{a}	2.4^{a}	160^{a}	100^{a}	1	0.1		
1^{g}	0.3^{h}	20^{g}	33.3^{b}	0	0		
2^{et}	0.9^{ef}	30^{ef}	100^{a}	0.01	1	برگ (Leaf)	
3.6^{et}	1.1^{d}	30^{et}	100^{a}	0.1	5		
7.6^{b}	2.2^{ab}	90^{b}	100^{a}	1	0.1		
0^{h}	0^{ih}	0^{h}	0^{c}	0	0		
5.3^{c}	0.7^{fg}	30^{e}	100^{a}	0.01	1	ساقه (Stem)	گچساران (Gachsaran)
4.6^{d}	1.4^{c}	60^{d}	100^{a}	0.1	5		
6.3^{b}	1.1^{d}	40^{e}	100^{a}	1	0.1		
1^{t}	0.2^{h}	10^{g}	33.3^{b}	0	0		
7.6^{b}	0.7^{t}	50^{d}	100^{a}	0.01	1	برگ (Leaf)	
7.3^{b}	0.7^{t}	40^{e}	100^{a}	0.1	5		
4^{d}	0.5^{gh}	20^{fg}	100^{a}	1	0.1		
0^{h}	0^{h}	0^{h}	0^{c}	0	0		

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت ندارند.

In each column that means have one same letter at least are not statistically significantly different at the 5% level.



شکل ۱- پینه‌های ایجاد شده: (الف) در ترکیب هورمونی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و (ب) در ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ریزنمونه برگ

Figure 1. Produced calli: (a) in hormonal combination of 0.01 mg/liter BAP and 1 mg/liter NAA and (b) in hormonal combination of 0.1 mg/liter BAP and 5 mg/liter NAA in leaf explant

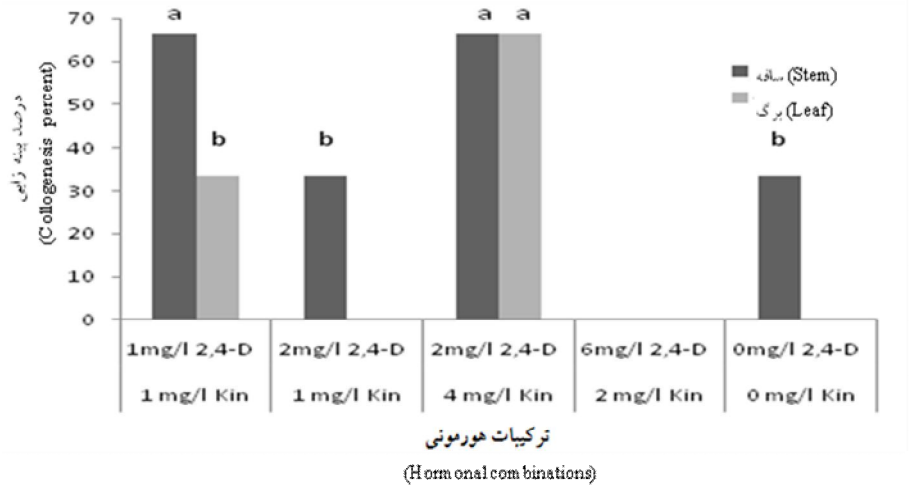
جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی در مرحله پینه‌زایی با استفاده از هورمون‌های کینتین و 2,4-D.

Table 3. Mean squares obtained from analysis of variance for evaluated traits in callogenesis step using Kinetin and 2,4-D hormones

قطر پینه Callus diameter	حجم پینه Callus volume	وزن خشک پینه Callus dry weight	درصد پینه‌زایی Callogenesis percent	درجه آزادی Degree of Freedom	منابع تغییر Source of Variance
0.05^{**}	0.084^{*}	4^{**}	0.607^{**}	4	ترکیب هورمونی (Hormonal combination)
0.01^{*}	0.074^{ns}	0.5^{ns}	0.001^{ns}	1	ژنوتیپ (Genotype)
0.32^{**}	0.189^{**}	4.8^{ns}	0.937^{**}	1	ریزنمونه (Explant)
0.033^{**}	0.007^{ns}	0.4^{ns}	0.009^{ns}	4	ترکیب هورمونی × ژنوتیپ (Hormonal combination × Genotype)
0.07^{**}	0.032^{ns}	0.9^{**}	0.232^{**}	4	ترکیب هورمونی × ریزنمونه (Hormonal combination × Explant)
0.01^{*}	0.006^{ns}	0.1^{ns}	0.001^{ns}	1	ژنوتیپ× ریزنمونه (Genotype × Explant)
0.03^{**}	0.25^{ns}	0.3^{ns}	0.009^{ns}	4	ترکیب هورمونی × ژنوتیپ × ریزنمونه (Hormonal combination × Genotype × Explant)
0.002	0.022	0.02	0.0006	40	خطا (Error)
1.5	13.57	1.52	5.84		ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of Variance (%)

* و ** به‌ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشند و ns معنی‌دار نمی‌باشد.

* ,**: Significant at 1% and 5% probability level, ns: Nonsignificant



شکل ۲- درصد پینه زایی در ترکیبات مختلف هورمون‌های کینتین و 2,4-D در دو نوع ریزنمونه.

Table 2. Callogenesis percent in different combinations of Kinetin and 2,4-D hormones in two types of explants.

به‌طورکلی، القای پینه در ترکیبات هورمونی 2,4-D و کینتین، در هر دو توده کمتر از محیط‌های حاوی هورمون‌های BAP و NAA بود که دلیل این امر را می‌توان به تخریب سلول‌ها در اثر غلظت‌های بالای 2,4-D روی ریزنمونه‌ها دانست. بنابراین، جهت پینه‌زایی در گیاه هندوانه ابوجهل، استفاده از NAA به‌همراه BAP توصیه می‌شود. بر اساس نتایج بدست آمده، در ترکیب هورمونی BAP و NAA، توده دهدشت تا حدود ۱۰۰ درصد و در ترکیب هورمونی کینتین و 2,4-D، توده گچساران تا حدود ٦٦/٦ درصد به پینه‌زایی پاسخ نشان دادند که دو هورمون اول پاسخ بهتری نشان داده است. حدود ۵ هفته پس از کاشت قطعات پینه، تشکیل شاخساره شروع گردید.

در این تحقیق از ریزنمونه ساقه و برگ استفاده شد، چراکه این بافت‌ها دارای خصوصیات ارزشمندی نظیر سرعت رشد و خاصیت پرتوانی در کشت‌های درون‌شیشه‌ای می‌باشند (۹). با توجه به نتیجه تحقیق حاضر، به‌نظر می‌رسد ریزنمونه ساقه بدون استفاده از هورمون هم قادر است حدود ۳۳ درصد پینه زایی انجام دهد در حالی‌که ریزنمونه برگ برای تولید پینه به هورمون نیاز دارد که به احتمال زیاد به خاطر نوع سلول و محتویات هورمون داخلی آن‌هاست. در این تحقیق ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در ریزنمونه ساقه توده دهدشت از نظر

صفات درصد پینه‌زایی، وزن خشک پینه، حجم پینه و قطر پینه نسبت به بقیه ترکیبات هورمونی برتری نشان داد که استفاده از این ترکیب هورمونی از لحاظ اقتصادی هم مقرون به صرفه می‌باشد. این ترکیب هورمونی برای ریزنمونه‌های ساقه و برگ توده دهدشت نسبت به توده گچساران پاسخ بهتری به پینه‌زایی نشان داد (حدود ۳۳ درصد بیشتر بود). در توده گچساران نیز ریزنمونه ساقه در ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۵ میلی‌گرم در لیتر NAA دارای بالاترین میزان وزن خشک و حجم پینه است. بنابراین، ریزنمونه هر گونه گیاهی به‌منظور تولید پینه به ترکیب هورمونی خاصی نیاز دارد. بعضی گونه‌ها فقط با هورمون سیتوکینین یا اکسین تولید پینه می‌کنند و بعضی دیگر به ترکیب هر دو نوع هورمون نیاز دارند (۲۱). عوامل زیادی در تشکیل پینه و افزایش میزان آن موثرند، که نوع ریزنمونه، نوع محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و عوامل محیطی از موارد بسیار مهم می‌باشند (۲۰). تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی که باعث القا و رشد پینه می‌شوند، از طریق عوامل به‌خصوصی باعث رشد قطعات ریزنمونه تحت الگوی منظمی می‌شوند. بافت‌های گیاهی دارای گیرنده‌های مخصوصی در غشاء و یا درون سیتوپلاسم برای تنظیم‌کننده‌های رشد هستند. تنظیم‌کننده‌های رشد با این جایگاه‌ها برهمکنش داده و غلظت گیرنده در سطح بافت هدف، نوع پاسخ را تعیین می‌کند (۱۷). از آنجا که ریزنمونه‌های مختلف تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد، میزان متفاوتی پینه تشکیل می‌دهند، بنابراین، انتخاب یک ریزنمونه در مرحله رشدی مطلوب به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب، تاثیر چشمگیری بر تولید پینه و رشد آن دارد. سن ریزنمونه‌ها و نحوه قرار گرفتن آن‌ها روی محیط کشت نیز در برخی گیاهان حائز اهمیت است (۱۹).

گزارش‌های متعددی در مورد پینه‌زایی در گیاهان دارویی وجود دارد. پاسخ بهتر ریزنمونه ساقه به پینه‌زایی در گیاه علف چای (*Hypericum perforatum* L.) (۲)، پروانش (*Catharanthus roseus*) (۱)، اسپرس زراعی (*Onobrychis sativa* Var. Chadegan) (۱۰)، هندوانه ابوجهل (۲۲) گزارش شده است. بیشینه سرعت پینه‌زایی در هندوانه زراعی مربوط به غلظت هورمونی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA گزارش شده است (۳). بررسی پینه‌زایی با استفاده از ریزنمونه ساقه در گیاه هندوانه ابوجهل نشان داده که حداکثر میزان تولید پینه در محیط MS، همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA و 2,4-D و یک پی‌پی‌ام 6-BA بود (۲۲). در این تحقیق مشخص شد که افزایش در غلظت این هورمون نه تنها افزایش تولید پینه را به دنبال نداشت، بلکه خود عاملی در جهت تخریب سریع ریزنمونه‌ها بود. در تمام صفات اندازه‌گیری شده، ریزنمونه ساقه نسبت

به ریزنمونه برگ، پاسخ بهتری به پینه‌زایی نشان داد (از لحاظ عددی برتری هر صفتی با صفت دیگر متفاوت بود که می‌توان در جدول ۲ آن‌ها را مشاهد نمود). در بین تمام ترکیبات هورمونی مورد مطالعه، ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ٤ میلی‌گرم در لیتر کینتین، بهترین تیمار هورمونی جهت پینه‌زایی بود. استفاده از تنظیم‌کننده‌های کینتین و 2,4-D جهت پینه‌زایی، در گیاه جعفری (*Petroselinum sativum*) (۱۱) و گیاه *Salsola arbuscula* pall (٤) گزارش شده است که این گزارش‌ها یافته‌های تحقیق حاضر را تایید می‌کنند. در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) نیز استفاده از ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای ریزنمونه برگ جهت تولید پینه گزارش شده است. در تحقیق حاضر نیز از این هورمون‌ها استفاده گردید ولی بخاطر تفاوت نوع گیاه غلظت‌های متفاوتی پاسخ لازم را نشان دادند، لذا علیرغم اشتراک در نوع هورمون باید بسته به نوع گیاه و ترکیبات احتمالی موجود در آن، مقدار بهینه هورمون‌ها را بدست آورد. در گزارش کریمی و همکاران (۲۰۱۳) نیز میزان تولید پینه و باززایی وابسته به میزان تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی گزارش شده که میزان تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی نیز به شدت به ژنوتیپ و مقدار تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی گیاه بستگی دارند (۱۳). در گزارش شریفی (۱۹۹۵) نیز استفاده از هورمون NAA منجر به تولید پینه بیشتری نسبت به 2,4-D در گیاه زیره (*Cuminum cyminum* L.) گردیده است (۲۳).

در آزمایش بررسی تولید شاخساره از پینه، نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که برهمکنش ریزنمونه، ژنوتیپ، محیط کشت و ترکیب هورمونی برای تمامی صفات در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار شدند (جدول ٤). این نتیجه بیانگر متفاوت بودن اثر ترکیب هورمونی، ژنوتیپ، ریزنمونه و محیط کشت بر صفات مرتبط با باززایی گیاهچه می‌باشد.

جدول٤- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی در مرحله باززایی گیاهچه از پینه با استفاده از هورمون‌های BAP و NAA.

Table 4. Mean squares obtained from analysis of variance for evaluated traits in plantlet regeneration from callus step using BAP and NAA hormones.

وزن خشک شاخساره Shoot dry weight	طول شاخساره Shoot height	تعداد شاخساره Shoot number	درصد شاخساره زایی Shooting percent	درجه آزادی Degree of Freedom	منابع تغییر Source of Variance
145**	60.6**	0.42**	0.26**	2	محیط کشت (Medium)
28**	27.3**	0.11**	0.058**	10	ترکیب هورمونی (Hormonal combination)
48*	31.1*	0.12*	0.032**	1	ژنوتیپ (Genotype)
36*	42**	0.0025^{ns}	0.014**	1	ریزنمونه (Explant)
28**	27.3**	0.115**	0.058**	20	محیط کشت×ترکیب هورمونی (Medium ×Hormonal combination)
48**	31.1**	0.123**	0.032**	2	محیط کشت×ژنوتیپ (Medium × Genotype)
36*	42**	0.0025^{ns}	0.014**	2	محیط کشت×ریزنمونه (Medium × Explant)
25**	19.8**	0.237^{ns}	0.009**	10	ترکیب هورمونی× ژنوتیپ (Hormonal combination × Genotype)
39**	29.1**	0.158**	0.083**	10	ترکیب هورمونی× ریزنمونه (Hormonal combination × Explant)
84**	21.8*	0.0227^{ns}	0.022**	1	ژنوتیپ × ریزنمونه (Genotype× Explant)
25**	19.8**	0.0237^{ns}	0.009**	20	محیط کشت× ترکیب هورمونی× ژنوتیپ (Medium ×Hormonal combination × Genotype
39**	29.1**	0.158**	0.083**	20	محیط کشت× ترکیب هورمونی× ریزنمونه (Medium ×Hormonal combination × Explant)
22**	20.7**	0.033^{ns}	0.010**	10	ترکیب هورمونی× ژنوتیپ× ریزنمونه (Hormonal combination × Genotype× Explant)
27**	20.8**	0.032*	0.011**	20	محیط کشت× ترکیب هورمونی×ژنوتیپ× ریزنمونه (Medium ×Hormonal combination × Genotype× Explant)
0.008	0.04	0.02	0.0006	264	خطا (Error)
9.17	21.4	16.57	2.54		ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of Variance (%)

* و ** به‌ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشند و ns معنی‌دار نمی‌باشد.

*,**: Significant at 1% and 5% probability level, ns: Nonsignificant

مقایسه میانگین‌های حاصل از برهمکنش ریزنمونه، محیط کشت، ترکیب هورمونی و ژنوتیپ در توده‌های دهدشت و گچساران (جدول ۵ و شکل ۳)، نشان داد که بیشترین درصد شاخساره‌زایی (۵۵/۵ درصد) مربوط به ریزنمونه ساقه در توده دهدشت و با ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP در محیط کشت ½MS بود. در تمام ترکیبات هورمونی برای ریزنمونه برگ (بجز ترکیب هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP) در توده دهدشت شاخساره زایی مشاهده نگردید. بر اساس نتایج این تحقیق، توده دهدشت نسبت به توده گچساران و ریزنمونه ساقه نسبت به ریزنمونه برگ به شاخساره‌زایی بهتر پاسخ می‌دهند. از این‌رو، در توده دهدشت استفاده از ریزنمونه ساقه در محیط کشت ½MS برای شاخساره زایی توصیه می‌گردد. لازم به‌ذکر است، به‌دلیل زیاد بودن ترکیبات هورمونی از ذکر مجدد آن‌ها خودداری و فقط ترکیبات هورمونی که پاسخ مناسبی دادند، ارائه گردیدند. در تحقیق حاضر، برای القای تولید پینه در مرحله پینه‌زایی از غلظت‌های بالای سیتوکینین استفاده شد که احتمال می‌رود غلظت این هورمون را در بافت‌های در حال رشد افزایش داد و در نتیجه در مرحله بعدی و در حضور سیتوکینین‌های اضافه شده جهت شاخساره‌زایی، تشکیل ساقه سریع‌تر انجام گرفت.

بر اساس گزارش کوهی و همکاران (۲۰۱۳)، در گیاه دارویی بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.)، بیشترین میزان باززایی ساقه نابجا در ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و کمترین میزان باززایی در ریزنمونه محور زیرلپه در محیط کشت حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد (۱۵)، در حالی‌که در هندوانه ابوجهل، باززایی گیاهچه فقط با استفاده از هورمون BAP انجام شد و علیرغم استفاده از NAA حضور آن برای باززایی گیاهچه خیلی ضروری تشخیص داده نشد، شاید این اختلاف ناشی از تفاوت نوع گیاه و نوع ترکیبات درونی آنها باشد. این نتایج با استناد به یافته‌های سیدو (۲۰۱۰)، بیانگر این مطلب است که استفاده از نسبت بالای سیتوکینین موجب تحریک و افزایش میزان ساقه‌زایی در ریزنمونه‌ها می‌گردد و BAP، موثرترین سیتوکینین در شاخه‌زایی این گیاه می باشد همچنان که در بسیاری از گیاهان نیز چنین نتایجی گزارش شده است (۲۵). اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر نوع و غلظت اکسین و سیتوکینین و هم‌چنین نوع ریزنمونه بر روی ساقه‌زایی گیاهان دارویی، متفاوت می‌باشد. به‌طور معمول، ساقه‌زایی به اعمال هم‌زمان هورمون‌های اکسین و سیتوکینین نیاز دارد. ترکیب سیتوکینین با اکسین، شرط لازم برای باززایی از ریزنمونه‌های مختلف در اکثر گیاهان است (۱۲). بر اساس نتایج کوهی و همکاران (۲۰۱۳)، تعادل اکسین/ سیتوکینین یکی از عوامل

تعیین‌کننده موثر به منظور افزایش تعداد شاخه‌های رویشی است. این ترکیبات باعث بـرهمکنش‌هـایی می‌شوند که روند پاسخ‌های ریخت‌زایی را تغییر می‌دهند (۱۵). این مطالب با نتایج بدست آمده در این تحقیق مغایر می‌باشد که ممکن است بدلیل این واقعیت باشد که در بـاززایی غیرمسـتقیم بـرای القـای تولید پینه در مرحله پینه‌زایی از غلظت‌های بالای سیتوکینین استفاده شـده و غلظـت ایـن هورمـون در بافت‌های در حال رشد افزایش یافته که احتمالا در مرحله بعدی در حضور سیتوکینین‌های اضافه شده جهت ساقه‌زایی، تشکیل ساقه سریع‌تر انجام گرفته است.

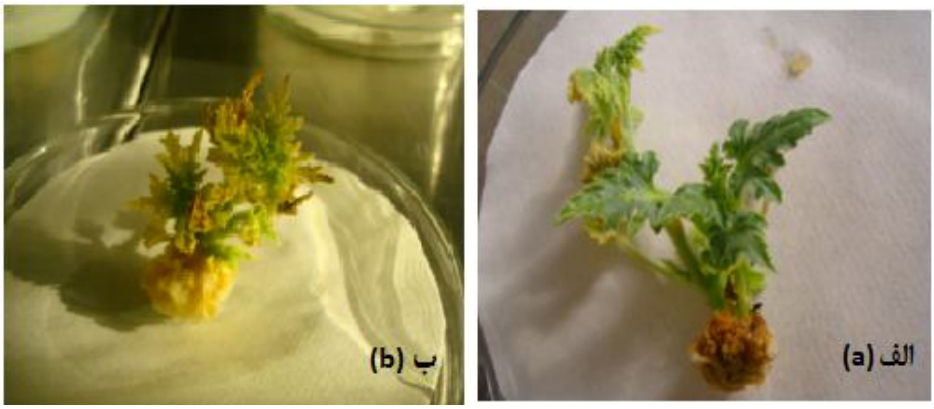
جدول ۵- مقایسه میانگین برهمکنش ریزنمونه، ژنوتیپ و ترکیب هورمونی در محیط کشت ½MS برای صفات مورد ارزیابی در مرحله باززایی گیاهچه از پینه.

Table 5. Mean comparisons for interaction of Explant, Genotype and Hormonal combination in ½MS medium for evaluated traits in plantlet regeneration from callus step

وزن خشک شاخساره (میلی‌گرم) Shoot dry weight (mg)	طول شاخساره (میلی‌متر) Shoot height (mm)	تعداد شاخساره Shoot Number	درصد شاخساره زایی Shooting percent	BAP (میلی‌گرم در لیتر) (mg/liter)	NAA (میلی‌گرم در لیتر) (mg/liter)	ریزنمونه Explant	ژنوتیپ Genotype
300[a]	38[a]	2.3[a]	55.5[a]	3	0	ساقه (Stem)	دهدشت (Dehdasht)
230[bc]	6.6[d]	1.3[d]	3.33[c]	1.5	2		
300[a]	25[b]	2[b]	44.6[b]	2	0		
62[c]	13[cd]	1.6[c]	33.3[c]	3	0	برگ (Leaf)	
0[d]	0[e]	0[e]	0[d]	1.5	2		
0[d]	0[e]	0[e]	0[d]	1	0		
55[c]	10.6[d]	1.3[d]	33.3[c]	2	0	ساقه (Stem)	گچساران (Gachsaran)
240[b]	16[c]	1.6[c]	44.4[b]	3	0		
0[d]	0[e]	0[e]	0[d]	1.5	2		
0[d]	0[e]	0[e]	0[d]	1.5	2	برگ (Leaf)	
0[d]	0[e]	0[e]	0[d]	1	0		
0[d]	0[e]	0[e]	0[d]	2	0		

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت ندارند.

In each column that means have one same letter at least are not statistically significantly different at the 5% level.



شکل ۳- (الف) باززایی گیاهچه از پینه حاصل از ریزنمونه ساقه در ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت ½MS و (ب) باززایی گیاهچه از پینه حاصل از ریزنمونه برگ در ترکیب هورمونی ۳ میلی‌گرم BAP در محیط کشت ½MS

Figure 3. (a) Plantlet regeneration from callus obtained from stem explant in hormonal combination of 2 mg/liter BAP in ½MS medium and (b) Plantlet regeneration from callus obtained from leaf explant in hormonal combination of 3 mg/liter BAP in ½MS medium

بعد از تولید شاخساره، نمونه‌ها به محیط کشت ریشه‌زایی منتقل شدند. در این مرحله، از بین تعداد زیاد ترکیبات هورمونی، تنها در محیط کشت با ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت MS ریشه‌زایی با هر دو ریزنمونه مشاهده گردید و در بقیه ترکیبات هورمونی ریشه‌زایی صورت نگرفت. این ترکیب هورمونی با ۷۳/۳۳ درصد ریشه‌زایی، ٦/٦٦ میانگین تعداد ریشه و ۳۵ میلی‌متر میانگین طول ریشه تنها تیمار موفق بود. ریشه‌زایی در توده گچساران نیز با همین ترکیب هورمونی انجام گرفت با این تفاوت که درصد ریشه‌زایی (٦٤/۳۳ درصد)، میانگین تعداد ریشه (٤/٦٥ عدد) و میانگین طول ریشه (۳۱ میلی‌متر) در آن کم‌تر از توده دهدشت بود. گیاهچه‌های حاصل از پینه پس از گذشت سه ماه، ریشه تولید کردند که علت احتمالی آن این است که برای القای تولید پینه در مرحله پینه‌زایی از غلظت‌های بالای سیتوکینین استفاده شد که باعث افزایش غلظت این هورمون در بافت‌های در حال رشد شده و در نتیجه در مرحله بعدی در حضور اکسین‌های اضافه شده جهت ریشه‌زایی، تشکیل ریشه به تاخیر افتاد.

در نهایت، گیاهچه‌های باززایی شده به گلدان‌های کوچک حاوی خاک استریل (نسبت ۳ به ۱ خاک و ماسه) منتقل شدند. برای سازگاری تدریجی با شرایط طبیعی (حفظ رطوبت نسبی بالا و کنترل

آلودگی) از درپوش‌های شیشه‌ای شفاف استفاده گردید. پس از سازگاری گیاهچه‌ها با شرایط طبیعی، درپوش‌ها برداشته شده و گیاهچه‌ها به گلدان‌های بزرگ‌تر منتقل و در اتاقک رشد با شرایط نوری ١٦ ساعت روشنایی، ٨ ساعت تاریکی و دمای ٢٤ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند. این گیاهچه‌ها تبدبل به گیاه کامل گردیده و توانستند به خوبی مستقر شده و رشد کنند (شکل ٤).

شکل ٤- مراحل سازگار کردن گیاهان باززایی شده

Figure 4. Hardening steps for regenerated plants

تایز و زایگر (٢٠١٠) نیز گزارش داده‌اند که ممکن است برای رشد ریشه‌ها به غلظت‌های کمتر اکسین نیاز باشد و رشد ریشه به شدت بوسیله سطوح بالای اکسین مهار شود، چون در سطوح بالا، اکسین موجب تولید اتیلن می‌گردد (٢٧). بیکر و وستئین (١٩٩٤) نیز گزارش کردند که غلظت‌های بالای اکسین باعث تجزیه متابولیت‌ها در بافت‌ها شده و فرآیند باززایی مختل می‌گردد (٥). تأثیر IBA و NAA بر ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها در محیط کشت ½MS در گیاه *Polyzygus tuberosus* (٦) نیز گزارش شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که بهترین ترکیب هورمونی جهت پینه‌زایی در توده دهدشت برای هر دو ریزنمونه برگ و ساقه ١ میلی‌گرم در لیتر BAP و ٠/١ میلی‌گرم در لیتر NAA و برای توده گچساران برای ریزنمونه ساقه ١ میلی‌گرم در لیتر BAP و ٥ میلی‌گرم در لیتر NAA و برای ریزنمونه

برگ ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بوده و هر دو ریزنمونه پاسخ مناسبی به پینه زایی نشان دادند. در مرحله باززایی غیرمستقیم نیز دیده شد که توده دهدشت نسبت به توده گچساران و ریزنمونه ساقه نسبت به ریزنمونه برگ به باززایی غیرمستقیم بهتر پاسخ می‌دهند و بیشترین درصد شاخساره‌زایی با ترکیب هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت ½MS بدست آمد. ریشه‌زایی در هر دو توده نیز با ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP انجام گرفت با این تفاوت که درصد ریشه‌زایی در توده گچساران کم‌تر از توده دهدشت بود.

منابع

1. Ahmadi, J., Mohammadi, R., Garoosi, G., and Mahannadi, R. 2012. Optimization of callogenesis and cell suspension culture of *Catharanthus roseus*. J. Agri. Biotechnol. 1:1-18. (In Persian)
2. Ali-Akbari, F., and Kazemitabar, K. 2012. Selection the suitable medium for callogenesis in *Hypericum perforatum* L. using leaf and stem explants. Proceeding of 12th Iranian Genetic Congress. Tehran, Iran. (In Persian)
3. Ameri, M., Lahooti, M., Bageri, A.R., and Sharifi, A. 2012. Comparative assessment of the IBA, NAA, Kin and BA hormones effects on direct regeneration of *Citrullus lanatus* L. *in vitro* condition. Proceeding of 2nd National congress of Agriculture Science and Technology. Tehran, Iran. (In Persian)
4. Amini, M., and Abedini, A. 2013. Evaluation of germination, growth and anatomy of *Salsola arbuscula* Pall plant in vitro salinity stress condition. J. Cell Tiss. 3:237-251. (In Persian)
5. Baker, C.M., and Wetzstein, H.Y. 1994. Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 36(3): 361-368.
6. Babu, T.P., and Sreenath K.P. 2012. Micro propagation and pollen studies of *Peucedanum dhana* var. dalzellii. Int. J. Sci. Nat. 3(1): 180-183.
7. Bankole, S.A., Osho, A., Joda, A.O., and Enikuomehin, A.O. 2005. Effect of drying methods on the quality and storability of ''Egusi'' Melon seeds (*colocynthis citrullus* L.). Afri. J. Biotechnol. 4: 799-803.
8. Davazdah-emami, S., and Majnoon-hosseini, N. 2008. Agronomy and production of some medicinal and aromatic plants. Tehran Univ. Press. 300p. (In Persian)
9. Farsi, A.R., and Zulali, J. 1993. Principles of plant biotechnology. Mashhad Ferdousi Univ. Press. First Edition. 495p. (Translated in Persian)

10.Garshasebi, H., Omidi, M., Torabi, S., and Davodi, D. 2010. The effect of plant hormone and explants on callogenesis and regeneration of *Onobrychis sativa* L. J. Iranian Agro. Sci. 2: 101-108. (In Persian)
11.Hejabi, H., Razavi, S.M., Gasemian, A.R., and Vatanpoor, Z. 2010. Callus induction in *Petroselinum sativum* medicinal plant. Proceeding of 12th Iranian Genetic Congress. Tehran, Iran. (In Persian)
12.Hosokawa, O., Shiro, I., Takeshi, S., Yukio, O., and Hiroshi, O. 1996. Establishment of protoplast Culture of *Solanum sisymbrii folium*. J. Fac. Agri. of Kyushu Univ. 51: 63-66.
13.Karimi, N., Naderi, R., Ebrahimi, M., and Mofid, M.R. 2013. Assessment of ornamental *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) propagation using tissue culture technique. J. Medic. Plant. 2(34): 38-45. (In Persian)
14.Kheirabadi, M.A., Lotfi, M., Toohidfar, M., and Sadagatfar, Sh. 2011. Assesment the effect of seedling age on direct stem regeneration in Iranian melon. Proceeding of 5th new idea in agriculture congress, Isfahan, Iran. (In Persian)
15.Koohi, L., Zare, N., Asgari-zakaria, R., Sheikhzadeh-Mosaddeg, P., and Daryani, P. 2013. Callogenesis and in vitro regeneration of Germany chamomile in response to different hormonal combinations. Proceeding of 12th Iranian Genetic congress. Tehran, Iran. (In Persian)
16.Meena, M., Meena, R., and Patni, V. 2010. High frequency plant regeneration from shoot tip explants of *Citrullus colocynthis* L. an important medicinal herb. Afri. J. Biotechnol. 9(31): 5037- 5041.
17.Mockeviciute, R., and Anisimoviene, N. 1999. Indole-3-acetic acid receptors in the cytosol Biology. Biologia. 4: 90-93.
18.Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Planta. 15: 473-497.
19.Nikam, T.D., and Shitole, M.G. 1999. *In vitro* culture of Safflower cv. Bhima: initiation, Growth optimization and organogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 5:15-22.
20.Rezaeian, Sh., Lahooti, M., and Mahmoodzadeh Akherat, H. 2011. Assessment the effect of 2, 4-D hormone concentrations and light condition on callogenesis rate of fenugreek in vitro condition. J. Season. Biol. Sci. Islamic Azad Univ. Zanjan. 3(3): 107-114. (In Persian)
21.Sarabadi-Tafreshi, R., Omidi, M., Bihamta, M.R., and Davazdah-emami, S. 2009. Assessment of in vitro embryo culture and effect of medium, different hormonal levels and explants in callogenesis and stem regeneration Galbanum. J. Medic. Plant. 5: 71-81. (In Persian)

22.Satyavani, K., Ramanathan, T., and Gurudeeban, S. 2011. Effect of plant Growth Regulators on Callus induction and Plantlet Regeneration of Bitter Apple (*Citrullus colosynthis* L.) from Stem Explant. Asian J. Biotechnol. 10:508-602.
23.Sharifi, M. 1995. Comparitive investigation of essences of *Bunium persicum* and *Cuminum cyminum* seed and explants fragment. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Tehran Univ. Tehran, Iran. (In Persian)
25.Sidhu. Y. 2010. *In vitro* micro propagation of medicinal plants by tissue culture. The Plymouth Stud. Sci. 4(1): 432-449.
26.Srivastava, L. 1989. Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. cv. Melitopolski). Plant Cell Rep. 8: 300- 302.
27.Taiz, L., and Zeiger, E. 2010. Plant Physiology, Sinauer Associate Press, Fifth Edition. 782p.