نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و سوم، شماره سوم، ۱۳۹۵
http://jopp.gau.ac.ir

بهینه‌سازی پینه‌زایی و جنین‌زایی رویشی در دو ژنوتیپ گیاه دارویی چویل (*Ferulago angulata* L.)

الهام سربی[۱]، *علی مرادی[۲]، اسد معصومی اصل[۲] و حمیدرضا بلوچی[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه زراعت، دانشگاه یاسوج، [۲]استادیار، گروه زراعت، دانشگاه یاسوج،
[۳]دانشیار، گروه زراعت، دانشگاه یاسوج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/٦/٥

چکیده

سابقه و هدف: جنین‌زایی رویشی در راستای تولید بذر مصنوعی یکی از روش‌های مؤثر جهت غلبه بر مشکلات کشت، تکثیر و حفاظت برخی گیاهان دارویی معرفی شده است. بدین منظور پینه‌زایی، جنین‌زایی و تعداد جنین رویشی چویل (*Ferulago angulata* L.) در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ رقیق شده (یک‌چهارم MS) در قالب سه آزمایش جداگانه بررسی شدند.

مواد و روش‌ها: آزمایش اول (پینه‌زایی) به‌صورت فاکتوریل دو عاملی شامل ترکیب هورمونی (در ۱۰ ترکیب غلظت نفتالین استیک اسید (NAA) و بنزیل آمینوپورین (BAP)) و ژنوتیپ (دو ژنوتیپ کوه‌گل و چهل چشمه) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج انجام شد. عامل‌های آزمایشی در آزمایش دوم (جنین‌زایی رویشی) شامل ژنوتیپ، ریزنمونه و نور (نور کامل و تاریکی) بودند. در آزمایش بررسی تعداد جنین رویشی (آزمایش سوم) بعد از مشاهده علائم ظهور جنین اژدری تعداد جنین‌های کروی، قلبی و اژدری تشکیل شده بر سطح پینه جنین‌زا در هر ژنوتیپ شمارش و با استفاده از آزمون T مقایسه شدند.

یافته‌ها: در آزمایش پینه‌زایی، ژنوتیپ و ترکیب هورمونی در ترکیب با یکدیگر تأثیر زیادی بر میزان پینه‌زایی نشان دادند، به‌طوری که برهمکنش این دو تیمار در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. ریزنمونه‌های حاصل از

*مسئول مکاتبه: amoradi@yu.ac.ir

ریشه‌چه و ساقه‌چه در هر دو رقم چویل در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP تشکیل پینه دادند. در این شرایط کمترین میزان درصد پینه‌زایی (صفر) مربوط به تیمار شاهد (فاقد هورمون) و ترکیباتی بود که یا از غلظت بالای اکسین در مقابل غلظت سیتوکینین استفاده شد و یا یکی از هورمون‌ها در محیط کشت حضور نداشت. در آزمایش جنین‌زایی رویشی (آزمایش دوم) ریزنمونه ساقه‌چه در کوه‌گل و ریز نمونه ریشه‌چه در چهل‌چشمه تشکیل جنین کروی دادند؛ نتایج این آزمایش همچنین نشان داد که ریزنمونه ساقه‌چه در رقم کوه‌گل و ریزنمونه ریشه‌چه در رقم چهل‌چشمه تحت روشنایی با کاهش غلظت اکسن پینه‌های سفید رنگ با بافت ترد و شکننده و دارای خاصیت جنین‌زایی تولید کردند. با انتقال پینه‌های حاوی جنین کروی به محیطی فاقد هورمون ادامه نمو جنین‌های کروی به مرحله اژدری طی شد. در آزمایش بررسی تعداد جنین رویشی (آزمایش سوم) چون شرایط تشکیل پینه جنین‌زا یکسان بود، بنابراین فقط دو ژنوتیپ از لحاظ تعداد جنین رویشی مقایسه شد هر دو ژنوتیپ پاسخ یکسانی را به تشکیل جنین رویشی نشان دادند.

نتیجه‌گیری: در مجموع یافته‌های این آزمایش نشان داد که نوع ریزنمونه به ژنوتیپ بستگی دارد و می‌توان از طریق پینه‌های با بافت ترد و شکننده جنین رویشی تولید و برای تهیه بذر مصنوعی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: پیش‌جنین، پینه‌زایی، جنین‌زایی رویشی، چویل، محیط کشت

مقدمه

چویل گیاهی است چند ساله با نام علمی *Ferulago angulata* متعلق به تیره چتریان[1] که دارای کاربرد دارویی و ادویه‌ای می‌باشد (٦). میزان اسانس موجود در بافت‌های رویشی گیاه در حال رشد حدود ۱/۸ درصد از وزن خشک گیاه می‌باشد، که دارای خاصیت ضدعفونی‌کنندگی، تقویت‌کنندگی و تسکین‌دهندگی بوده و در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود (۱۸). متأسفانه نسل گیاه چویل به‌دلیل برداشت بی‌رویه و عدم وجود برنامه‌های حفاظتی و احیاء رو به نابودی است (٦). تکثیر گیاه چویل در طبیعت از طریق بذر صورت می‌گیرد، اما بذر این گیاه دارای دوره خواب طولانی است که عامل محدودکننده‌ای در تکثیر آن می‌باشد (۱۵).

جنین‌زایی رویشی عبارت از تشکیل جنین از سلول غیرجنسی در شرایط آزمایشگاهی است که مشابه با جنین بذری قادر به نمو به‌صورت گیاهچه کامل است، جنین‌زایی رویشی مانند جنین‌زایی بذری شامل مراحل مختلف ایجاد پیش‌جنین، جنین گویچه‌ای، جنین قلبی شکل، جنین اژدری و لپه‌ای می‌باشد که از مسیر غیرجنسی رخ می‌دهد (۳). جنین‌زایی رویشی به‌عنوان یک روند آزمایشگاهی به صورت‌های مستقیم و غیرمستقیم انجام می‌پذیرد. در روش مستقیم، جنین‌های رویشی، بدون تولید پینه، از سلول‌های جنین‌زای از پیش تعیین شده[2] در ریزنمونه اولیه، منشأ می‌گیرند. جنین‌زایی غیرمستقیم از سلول‌های جنین‌زای معین القایی[3] در یک ژنوتیپ پینه تمایز نیافته ناشی می‌شود (۱۱).

تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، نقش کلیدی در القاء جنین‌زایی رویشی بازی می‌کنند. اکسین‌ها به‌عنوان واسطی برای گذار از سلول رویشی به جنین‌زا شناخته شده‌اند. هورمون سیتوکینین به‌طور معمول در دوره آغاز مرحله تقسیم سلولی جنین رویشی مهم است ولی در تمایز جنین نقشی ندارد (۱۹). در پژوهشی که امیری و همکاران (۲۰۱۱) روی جنین‌زایی گیاه هویج انجام دادند، مشاهده کردند که جنین‌زایی رویشی با غلظت کم هورمون اکسین (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) نسبت به سیتوکینین رخ داد (۲). در آزمایشی که جهت جنین‌زایی رویشی دو ژنوتیپ پنبه صورت گرفت، ریزنمونه ساقه‌چه در ژنوتیپ CCRI521 در حضور ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D[4] و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA[5] پینه‌هایی قهوه‌ای رنگ با بافت ترد و شکننده تولید کرد که ۱۰۰

1- Apiaceae
2- *Pre-Embryogenic-Determined cells*
3- *Induced Embryogenic-Determied cells*
4- *2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*
5- *Indole-3-butyric acid*

درصد جنین‌زا بودند، در صورتی‌که ژنوتیپ Zhangzhi86-6 در حضور ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA[1] پینه‌هایی حنائی رنگ، با بافت ترد و شکننده که ۱۰۰ درصد جنین‌زا بودند تولید کرد که این خود نشان‌دهنده پاسخ جنین‌زایی متفاوت ژنوتیپ‌ها در حضور ترکیبات هورمونی مختلف است (۲٤).

برای هر گونه معین، نوع خاصی از ریزنمونه می‌تواند برای تشکیل جنین رویشی به‌کار برده شود. به‌عبارتی، پاسخ ریزنمونه به جنین‌زایی به ژنوتیپ نیز بستگی دارد، سازوکارهای ژنتیکی که برای جنین‌های غیرزیگوتی وجود دارند مشابه آن‌هایی هستند که در جنین زیگوتی مشاهده شده است (۲۱). جنین‌زایی رویشی کاملاً به ژنوتیپ گیاه و تنوع تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده و همچنین ریزنمونه بستگی دارد (٤). جنین‌های رویشی در دو ژنوتیپ یونجه، بررسی شده و مشخص شد که ژنوتیپ رنجلند نسبت به ژنوتیپ کاریساری از تعداد جنین بیشتری در هر پینه برخوردار بود که نشان‌دهنده استعداد ژنتیکی این ژنوتیپ است (۱۳). عبدالهی و همکاران (۲۰۰۳) جنین رویشی را در سه ژنوتیپ کلزا (گلوبال، پی‌اف و آپشن) بررسی کرده و مشاهده کردند که ارقام به لحاظ توان جنین‌زایی میکروسپورها دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد بودند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که ژنوتیپ پی‌اف و ژنوتیپ آپشن به‌ترتیب با تولید ۳٤۱۲/۲۵ و ۳۰۷۹/۵ جنین، بیشترین تعداد جنین را تولید کردند (۱).

پینه می‌تواند هم در تاریکی و هم در روشنایی تولید شود و برای رشد نیز به تاریکی یا روشنایی یا ترکیبی از هر دو نیاز دارد. رشد در تاریکی برای جلوگیری از راه‌اندازی فرآیندهای زیستی گیاه که توسط نور صورت می‌گیرند و ممکن است روی رشد سلول جنین‌زا اثر بگذارند، لازم است، به‌علاوه رشد در تاریکی تمایز بافت‌های ناخواسته از بافت ریزنمونه را متوقف می‌کند (۲۱). وربراک و همکاران (۱۹۹٤) جهت تشکیل پینه جنین‌زا، برگچه یونجه را به‌عنوان ریزنمونه در دمای محیط تحت دوره نوری ۱۲–۱٦ ساعت در معرض ۵۰ $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ نور فلوروسنت قرار دادند، بعد از ۲۸–۲۱ روز، پینه‌های جنین‌زا تشکیل شدند (۲۲). در صورت فراهم بودن شرایط مناسب برای جنین‌زایی رویشی، معمولاً بیش از یک جنین از سلول‌های پینه منشأ می‌گیرد و هر چقدر تعداد جنین در هر پینه بیشتر باشد جهت تولید گیاهچه کامل مناسب‌تر است (۱۰).

با توجه به مطالعات انجام شده روی چویل (۱٤ و ۱۵) و سایر گیاهان دارویی چتریان، دست‌یابی به روش‌های بهینه مانند جنین‌زایی رویشی و تولید بذر مصنوعی برای از بین بردن مشکلات

1- *indole-3-acetic acid*

این‌گونه‌های گیاهی، حذف خواب در آن‌ها و تولید گیاهچه‌های سالم و قوی ضروری به‌نظر می‌رسد. جنین‌زایی رویشی به‌دلیل امکان تولید بیشتر و تکثیر مداوم ژنوتیپ جنین‌زا، روشی مناسب برای تکثیر این گیاهان است (۸). این پژوهش به‌منظور تعیین بهترین ژنوتیپ، ریزنمونه، ترکیب هورمونی و نور جهت تولید پینه جنین‌زا و نیز تعیین تعداد جنین‌های رویشی تشکیل شده روی پینه‌های جنین‌زا در چویل به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج در سال ۱۳۹۲ در قالب سه آزمایش جداگانه انجام شد. بذرهای چویل مورد استفاده شامل دو ژنوتیپ کوه‌گل که هم‌زمان با رسیدگی کامل از مناطق کوهستانی شهرستان سی‌سخت در استان کهگیلویه و بویر احمد و ژنوتیپ چهل چشمه از منطقه چهل‌چشمه در استان فارس اواخر شهریور ماه ۱۳۸۹ جمع‌آوری شدند. بذرها ابتدا با استفاده از مایع ظرفشویی رقیق شده با آب دو بار تقطیر، شسته شدند و سپس با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه ضدعفونی گردیده و جهت نرم شدن پوسته اطراف جنین، بذرها به‌مدت ۲-۱ روز درون آب ۲ بار تقطیر نگهداری شدند. بعد از این مدت بذرها به زیر هود برده شدند و با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه و در نهایت اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه مجدداً ضدعفونی شدند. بعد از هر بار ضدعفونی، دو برابر مدت زمانی که از مواد ضدعفونی کننده استفاده شد، با آب ۲ بار تقطیر شستشو شدند تا اینکه اثر مواد ضدعفونی کننده کاملاً پاک شود.

آزمایش پینه‌زایی (آزمایش اول) به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در محیط پایه یک چهارم MS[1] جهت تعیین مناسب‌ترین ژنوتیپ و ترکیب هورمونی انجام شد. در این آزمایش پس از انجام مراحل ضدعفونی، زیر دستگاه لامینارایرفلو و در شرایط کاملاً استریل پوسته بذرها با اسکالپل حذف شده و جنین‌ها با کمک پنس و اسکالپل خارج گردیده و روی محیط کشت یک چهارم MS جامد کشت داده شدند. پس از سه هفته، ریزنمونه‌های ساقه و ریشه در ابعاد ۱-۰/۵ سانتی‌متر از گیاهچه‌های حاصل از کشت جنین جهت بررسی پینه‌زایی تهیه شدند. ریزنمونه‌ها بر روی محیط یک چهارم MS حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۷ گرم بر لیتر آگار به‌همراه هورمون‌های

1- *Murashige and Skoog*

نفتالین استیک اسید[1] (NAA) و بنزیل آمینوپورین[2] (BAP) با غلظت‌هایی مطابق جدول ۱ کشت شدند (۱٤).

هر دو هفته یک بار به‌منظور تجدید عناصر غذایی، واکشت نمونه‌ها روی همان محیط‌های قبلی صورت گرفت. ۱۲ هفته بعد از تشکیل پینه‌ها، پیش‌جنین‌ها (شکل ۱) در پینه‌هایی که با غلظت مساوی NAA و BAP (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) تیمار شده بودند، تشکیل شدند، اما به‌دلیل قهوه‌ای شدن پینه‌ها و عدم نمو جنین‌ها روی این پینه‌ها، جنین‌زایی ادامه پیدا نکرد. پینه‌های تشکیل شده اعم از جنین‌زا و غیرجنین‌زا از لحاظ صفات پینه‌زایی بررسی شدند، بدین ترتیب از هر تکرار سه پینه به تصادف انتخاب شد و از لحاظ صفات کمی و کیفی بررسی شدند.

جدول ۱- ترکیب هورمونی و ریزنمونه به‌کار رفته جهت پینه‌زایی گیاه چویل.

Table 1. Hormone combination and explants used for callus induction in chavil plant.

NAA ($mg\ l^{-1}$)	BAP ($mg\ l^{-1}$)	منبع ریزنمونه Explant Source
0	0*	ریشه‌چه Root
0	0.5	
0.5	0.5	
0	1	
0.5	1	
1	1	
1.5	1	
1.5	1.5	
1	2	
1.5	2	
0	0	ساقه‌چه Stem
1.5	0	
2	0	
1.5	0.5	
2	0.5	
2	1	
2.5	1	
1.5	1.5	
2	1.5	
2.5	1.5	

*تیمارهای شاهد بدون افزودن هر نوع هورمونی برای هر دو ریزنمونه ساقه‌چه و ریشه‌چه بودند.

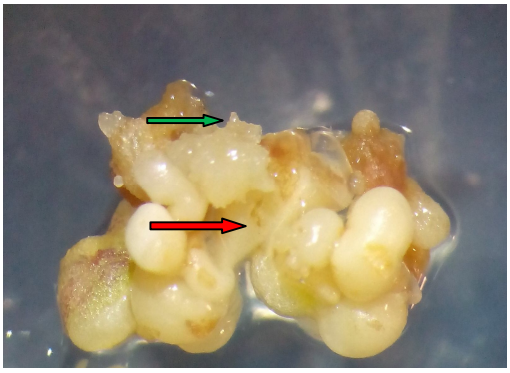
*Control treatment were without adding any type of hormonal treatments for both root and shoot explants.

1- Naphthaleneacetic
2- 6-Benzylaminopurine

شکل ۱- پینه حاوی پیش جنین حاصل از ریزنمونه ریشه‌چه در ژنوتیپ چهل‌چشمه.

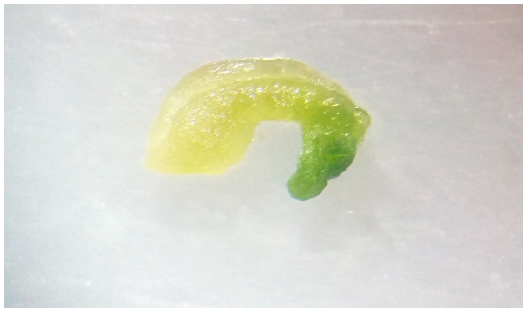
Figure 1. Callus with pro-embryo derived from root explant in Chehel-cheshmeh genotype.

آزمایش جنین‌زایی (آزمایش دوم) به‌منظور تعیین مناسب‌ترین ژنوتیپ، ریزنمونه و روشنایی جهت تشکیل جنین‌های رویشی و نمو آن‌ها بر سطح پینه‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در محیط یک چهارم MS اجرا شد. به‌این دلیل که در آزمایش دوم پینه‌های حاوی پیش‌جنین در حضور غلظت مساوی NAA و BAP (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) شکل گرفتند، آزمایش جنین‌زایی رویشی در این تیمار هورمونی انجام گرفت. بدین ترتیب به‌منظور تحریک جنین‌زایی، پینه‌ها یک ماه پس از تشکیل در محیطی با غلظت مساوی NAA و BAP (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر)، به محیطی با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D منتقل شدند و سپس پتری‌دیش‌ها در اتاق تاریک در دمای ۲±۲٤ درجه سانتی‌گراد و در روشنایی مطلق در قفسه‌های اتاق کشت در دمای ۲±۱۸ و با میزان نور ۱۵۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه به‌مدت یک ماه نگهداری شدند (۱۷). بررسی پینه‌ها به‌منظور مشاهده جنین‌های رویشی هر ۳-۲ روز یکبار توسط بینی کولار صورت گرفت. با مشاهده جنین‌های کروی (شکل ۲) بر سطح پینه‌ها، اکسین از محیط کشت حذف شد و جنین‌های کروی پس از انتقال به محیط کشت تکامل جنین (محیط کشت یک چهارم MS فاقد هورمون)، مراحل نموی را که شامل جنین قلبی شکل (شکل ۲) و اژدری شکل (شکل ۳) بود را طی دو هفته کامل کردند. در این آزمایش برای ادامه نمو جنین‌های کروی به مرحله قلبی و اژدری پینه‌ها به محیطی فاقد هورمون منتقل شدند. این نتایج بیان کننده تمایل ژنوتیپ‌های سلولی پیش‌جنینی به تکامل رشد تحت تأثیر روشنایی می‌باشد که این خود نوعی تأثیر بر تمایز ابتدائی در تکامل جنین است (۱۹). در این آزمایش نیز پینه‌های تشکیل شده اعم از جنین‌زا و غیرجنین‌زا از لحاظ صفات پینه‌زایی بررسی شدند، بدین ترتیب از هر تکرار سه پینه به تصادف انتخاب شد و از لحاظ صفات کمی و کیفی مورد ارزیابی قرار گرفتند.



شکل ۲- جنین کروی با پیکان قرمز و جنین قلبی با پیکان سبز در گیاه چویل نشان داده شده است.

Figure 2. Globular embryo with red arrow and heart embryo with green arrow is shown in chavil plant.



شکل ۳- جنین اژدری جدا شده از سطح پینه جنین‌زا در ژنوتیپ چهل‌چشمه.

Figure 3. Torpedo embryo isolated from the embryogenic callus in Chehel-cheshmeh genotype.

بعد از مشاهده جنین‌های اژدری تعداد جنین‌های کروی، قلبی و اژدری تشکیل شده بر سطح سه پینه جنین‌زا از هر ظرف در هر ژنوتیپ شمارش شد (آزمایش سوم). این آزمایش، به‌منظور تعیین بهترین ژنوتیپ با بیشترین تعداد جنین‌های کروی، قلبی و اژدری در پینه‌های جنین‌زا با کمک آزمون T با سه تکرار اجرا گردید. در این پژوهش تعداد جنین‌های رویشی تشکیل شده بر سطح پینه‌های جنین‌زا توسط بینی‌کولار شمارش شدند.

تجزیه‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گردید. مقایسه میانگین اثرهای اصلی به روش LSD در سطح ۱ درصد و در صورت معنی‌دار بودن برهمکنش‌ها، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از رویه L.S. Means در سطح ۵ درصد انجام شد. همچنین مقایسه گروهی بین

دو گروه مشاهدات شامل ژنوتیپ کوه‌گل و چهل‌چشمه با آزمون T صورت گرفت. در رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ و ترکیب هورمونی بر صفات مرتبط با پینه‌زایی در ریزنمونه ریشه‌چه چویل (آزمایش اول) در جدول ۲ آمده است. نتایج حاصله نشان داد که اثر اصلی ژنوتیپ در مورد صفت درصد پینه‌زایی معنی‌دار نشد. سایر اثرهای اصلی و برهمکنش‌های دوگانه برای درصد پینه‌زایی و وزن خشک پینه در ریزنمونه ریشه‌چه‌چه معنی‌دار شد. بر اساس این نتایج ژنوتیپ و ترکیب هورمونی در ترکیب با یکدیگر تأثیر زیادی بر میزان پینه‌زایی نشان دادند، به‌طوری که برهمکنش این دو تیمار در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. در این آزمایش مشاهده شد که حدود دو هفته پس از کاشت تشکیل بافت پینه روی ریزنمونه‌های ریشه‌چه و ساقه‌چه (حاصل از کشت جنین ژنوتیپ‌های چویل) در محیط هورمون‌دار (محیط پینه‌زایی) آغاز شد.

جدول ۲- میانگین مربعات منابع تغییر برای صفات مورد ارزیابی در مرحله تشکیل پینه جنین‌زا در ریزنمونه ریشه‌چه گیاه چویل.

Table 2. Mean square of source of variation for evaluated traits in embryogenic callus formation stage in the root explant of chavil plant.

وزن خشک پینه ریشه‌چه Dry weight in root callus	پینه‌زایی ریشه‌چه (درصد) Root callus induction(%)	درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییر Source of variation
0.0007**	0.003 ns	1	ژنوتیپ Genotype
0.001**	0.967**	9	ترکیب هورمون Hormone combination
0.0004**	0.152**	9	ژنوتیپ × ترکیب هورمون Genotype× Hormone combination
0.0000008	0.002	40	خطا Error
8.94	11.27		ضریب تغییرات (درصد) Cv(%)

** نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد و ns غیر معنی‌دار می‌باشد.

** indicate significance at the 1% and ns is non- significant .

مقایسه میانگین برهمکنش ژنوتیپ و ترکیب هورمونی در ریزنمونه ریشه‌چه (جدول ۳) نشان داد که بیشترین درصد پینه‌زایی (۱۰۰ درصد) در ژنوتیپ کوه‌گل در تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA +۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و نیز ترکیب هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP رخ داد. در ژنوتیپ چهل‌چشمه بیشترین مقدار این صفت در ترکیب‌های هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و همچنین ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. کمترین میزان درصد پینه‌زایی (صفر) مربوط به تیمار شاهد (فاقد هورمون) و ترکیباتی بود که یا از غلظت بالای اکسین در مقابل غلظت سیتوکینین استفاده شد و یا یکی از هورمون‌ها در محیط کشت حضور نداشت. بیشترین وزن خشک پینه (۰/۰۴۹۳ گرم) مربوط به ژنوتیپ کوه‌گل در ترکیب هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

جدول ۳- مقایسه میانگین برهمکنش ژنوتیپ و ترکیب هورمونی برای صفات مورد ارزیابی در مرحله تشکیل پینه جنین‌زا در ریزنمونه ریشه‌چه گیاه چویل.

Table 3. Mean comparision interaction of genotype and hormone combination for traits in the embryogenic callus production stage in root explant in chavil plant.

وزن خشک پینه ریشه‌چه Root callus dry weight (gr)	پینه‌زایی ریشه‌چه (درصد) Root callus induction (%)	تیمار Treatment NAA	BAP ($mg\ l^{-1}$)	ژنوتیپ Genotype
0 g	0 f	0	0*	کوه‌گل Koohgol
0 g	0 f	0	0.5	
0.033 et	37 d	0.5	0.5	
0 g	0 f	0	1	
0.0040 det	41 d	0.5	1	
0.0046 de	100 a	1	1	
0 g	0 f	1.5	1	
0.0493 a	100 a	1.5	1.5	
0.0031 f	70 b	1	2	
0.0007 g	26 e	1.5	2	
0 g	0 f	0	0	چهل‌چشمه Chehel-cheshmeh
0 g	0 f	1.5	0	
0.0432 b	100 a	2	0	
0 g	0 f	1.5	0.5	
0.0414 c	52 c	2	0.5	
0.0048 d	100 a	2	1	
0 g	0 f	2.5	1	
0.0432 b	100 a	1.5	1.5	
0 g	0 f	2	1.5	
0.0007 g	37 d	2.5	1.5	

در هرستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند، از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means in each column, followed by the similar letters are not significantly differernt at the 5% probability level.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی در ریزنمونه ساقه‌چه (جدول ٤) نشان داد که کلیه اثرهای اصلی و برهمکنش‌های دوگانه برای درصد پینه‌زایی و وزن خشک پینه معنی‌دار شد. این نتایج بیانگر متفاوت بودن تأثیر ژنوتیپ و ترکیبات مختلف هورمونی بر صفات مرتبط با پینه‌زایی است. نقش ژنوتیپ و ریزنمونه به‌عنوان دو عامل اصلی در جنین‌زایی رویشی کاملاً مشخص است. مشایخی (۲۰۰۷) نیز بیان می‌کند که به‌دست آوردن توانایی جنین‌زایی رویشی به غیر از نوع گیاه (ژنوتیپ) به عوامل دیگری مانند نوع بافت و شرایط محیط کشت نیز بستگی دارد (۱۰).

جدول ٤- میانگین مربعات منابع تغییر برای صفات مورد ارزیابی در مرحله تشکیل پینه جنین‌زا در ریزنمونه ساقه‌چه گیاه چویل.

Table 4. Mean square source of variation for traits in the embryogenic callus formation stage in stem explant of chavil plant.

وزن خشک پینه ساقه‌چه Root callus dry weight	پینه‌زایی ساقه‌چه (درصد) Shoot callus induction (%)	درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییر Source of variation
0.0001^{**}	0.007^{*}	1	ژنوتیپ Genotype
0.002^{**}	0.982^{**}	9	ترکیب هورمون Hormone combination
0.0003^{**}	0.056^{**}	9	ژنوتیپ × ترکیب هورمون Genotype× hormone combination
0.0000009	0.001	40	خطا Error
8.12	8.06		ضریب تغییرات (درصد) CV(%)

* و ** به‌ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی‌دار می‌باشد.

* and ** indicate significance at the 5 and 1% and ^{ns} is non- significant.

مقایسه میانگین برهمکنش ژنوتیپ و ترکیب هورمونی در ریزنمونه ساقه‌چه (جدول ۵) نشان داد که بیشترین درصد پینه‌زایی (۱۰۰ درصد) در ژنوتیپ چهل‌چشمه در تیمارهای هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و همچنین ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP رخ داد. این در حالی

است که در ژنوتیپ کوه‌گل در تیمارهای هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. مشابه ریزنمونه ریشه‌چه کمترین میزان درصد پینه‌زایی (صفر) مربوط به تیمار شاهد (فاقد هورمون) و ترکیباتی بود که یکی از هورمون‌ها در محیط کشت حضور نداشت. بیشترین وزن خشک پینه (۰/۰۸۸۲ گرم) مربوط به ژنوتیپ چهل‌چشمه در ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

از آنجایی که هدف اصلی آزمایش پینه‌زایی (آزمایش اول) تشکیل پینه جنین‌زا بود، ریزنمونه‌های ریشه‌چه و ساقه‌چه در هر دو ژنوتیپ در ترکیب هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای رسیدن به‌این نتیجه مطلوب بودند (جدول ٦). در بررسی صفات کیفی پینه‌زایی مشاهده شد که پینه‌های تشکیل شده در غلظت مساوی (۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) از هر دو هورمون NAA و BAP قادر به تشکیل پیش‌جنین شدند، ولی در سایر تیمارها علائم جنین‌زایی مشاهده نشد. پینه‌های جنین‌زا به رنگ زرد روشن و یا سفید با بافتی ترد و شکننده و یا نرم و آبدار بودند. تمامی پینه‌های زرد روشن و یا سفید رنگی که دارای بافت سخت بودند غیرجنین‌زا شدند. در این پژوهش همچنین پینه‌هایی مشاهده شد که علیرغم داشتن پیش‌جنین قهوه‌ای شدند و نمو جنین‌ها مشاهده نشد. همان‌طور که امیری و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که فرآیند القاء جنین‌زایی اغلب در محیط کشت محتوی غلظت‌های بالای اکسین (خصوصاً 2,4-D) در ترکیب با غلظت‌های پایین‌تر سیتوکینین (اغلب BA)، اتفاق می‌افتد، اما لازمه تبدیل پینه به جنین رویشی، کاهش غلظت اکسین است (۲). مشابه نتایج مشاهده شده در آزمایش حاضر در گزارش یانجی (۲۰۰۳) با کاربرد غلظت یکسانی از اکسین و سیتوکینین در ریزنمونه برگ تنباکو، بالاترین درصد پینه‌زایی مشاهده شد (۲۳).

جدول ۵- مقایسه میانگین برهمکنش ژنوتیپ و ترکیب هورمونی برای صفات مورد ارزیابی در مرحله تشکیل پینه جنین‌زا در ریزنمونه ساقه‌چه گیاه چویل.

Table 5. Mean comparision interaction of genotype and hormone combination for traits in the embryogenic callus formation stage in shoot explant in chavil plant.

وزن خشک پینه ساقه‌چه Stem callus Dry weight (g)	پینه‌زایی ساقه‌چه (درصد) Shoot callus induction (%)	تیمار Treatment NAA (میلی‌گرم/ لیتر) ($mg\ l^{-1}$)	BAP	ژنوتیپ Genotype
0 g	0 f	0	0	کوه‌گل Koohgol
0 g	0 f	1.5	0	
0 g	0 f	2	0	
0 g	59 cd	1.5	0.5	
0.0420 b	63 bc	2	0.5	
0.0414 b	67 b	2	1	
0.0084 d	37 e	2.5	1	
0.0074 d	100 a	1.5	1.5	
0.0030 ef	33 e	2	1.5	
0.0022 f	100 a	2.5	1.5	
0 g	0 f	0	0	چهل‌چشمه Chehel-cheshmeh
0 g	0 f	1.5	0	
0 g	0 f	2	0	
0 g	55 d	1.5	0.5	
0.0882 a	100 a	2	0.5	
0.0321 c	67 b	2	1	
0 g	0 f	2.5	1	
0.0039 e	100 a	1.5	1.5	
0.0087 d	59 cd	2	1.5	
0.0033 ef	100 a	2.5	1.5	

در هرستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند، از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means in each column, followed by the similar letters are not significantly differernt at the 5% probability.

جدول ٦- مقایسه ژنوتیپ‌های چویل، ریزنمونه‌ها و ترکیب‌های هورمونی از نظر صفات کیفی پینه‌های جنین‌زا.

Table 6. Comparision of chavil genotypes, explants and hormone combination for the quality of embryogenic calluses.

ژنوتیپ Genotype	ریزنمونه Explant	تیمار Treatment BAP (میلی‌گرم در لیتر) (mg/l)	NAA	مشخصات مورفولوژیکی Morphologic characteristics
کوه‌گل Koohgol	ریشه‌چه Root	0	0	-
		0.5	0	-
		0.5	0.5	پینه زرد روشن با بافت سخت و غیرجنین‌زا Light yellow callus with hard texture and non-embryonic
		1	0	-
		1	0.5	پینه زرد روشن با بافت سخت و غیرجنین‌زا Light yellow callus with hard texture and non-embryonic
		1	1	پینه سفید با بافت نرم و آبدار و غیرجنین‌زا White callus with soft and juicy texture and non-embryonic
		1	1.5	-
		1.5	1.5	پینه زرد روشن با بافت ترد و شکننده و تشکیل پیش‌جنین Light yellow callus with brittle texture and embryonic
		2	1	پینه سفید با بافت سخت و غیرجنین‌زا White callus with hard texture and non-embryonic
		2	1.5	پینه زرد روشن با بافت سخت و غیرجنین‌زا Light yellow callus with hard texture and non-embryonic
	ساقه‌چه Shoot	0	0	-
		0	1.5	-
		0	2	-
		0.5	1.5	پینه سفید با بافت سخت و غیرجنین‌زا White callus with hard texture and non-embryonic
		0.5	2	پینه زرد روشن با بافت سخت و غیرجنین‌زا Light yellow callus with hard texture and non-embryonic
		1	2	پینه زرد روشن با بافت سخت و غیرجنین‌زا Light yellow callus with hard texture and non-embryonic
		1	2.5	پینه سفید با بافت سخت و غیرجنین‌زا White callus with hard texture and non-embryonic
		1.5	1.5	پینه سفید با بافت نرم و آبدار و تشکیل پیش‌جنین White callus with soft and juicy texture and embryonic
		1.5	2	پینه زرد روشن با بافت سخت و غیرجنین‌زا Light yellow callus with hard texture and non-embryonic
		1.5	2.5	پینه سفید با بافت نرم و آبدار و غیرجنین‌زا White callus with soft and juicy texture and non-embryonic

ادامه جدول ٦-

ژنوتیپ Genotype	ریزنمونه Explant	تیمار Treatment BAP (میلی‌گرم در لیتر) ($mg\ l^{-1}$)	NAA	مشخصات مورفولوژیکی Morphologic characteristics
چهل‌چشمه Chehel-cheshmeh	ریشه‌چه Root	0	0	-
		0.5	0	-
		0.5	0.5	پینه زرد روشن با بافت سخت و غیرجنین‌زا Light yellow callus with hard texture and non-embryonic
		1	0	-
		1	0.5	پینه زرد روشن با بافت سخت و غیرجنین‌زا Light yellow callus with hard texture and non-embryonic
		1	1	پینه سفید با بافت نرم و آبدار و غیرجنین‌زا White callus with soft and juicy texture and non-embryonic
		1	1.5	-
		1.5	1.5	پینه زرد روشن با بافت ترد و شکننده و تشکیل پیش‌جنین Light yellow callus with soft and juicy texture and embryonic
		2	1	پینه سفید با بافت سخت و غیرجنین‌زا White callus hard texture and non-embryonic
		2	1.5	-
	ساقه‌چه Shoot	0	0	-
		0	1.5	-
		0	2	-
		0.5	1.5	پینه سفید با بافت سخت و غیرجنین‌زا White callus with hard texture and non-embryonic
		0.5	2	پینه زرد روشن با بافت سخت و غیرجنین‌زا Light yellow callus with hard texture and non-embryonic
		1	2	پینه زرد روشن با بافت سخت و غیرجنین‌زا Light yellow callus with hard texture and non-embryonic
		1	2.5	-
		1.5	1.5	پینه سفید با بافت نرم و آبدار و تشکیل پیش‌جنین White callus with soft and juicy texture and embryonic
		1.5	2	پینه زرد روشن با بافت سخت و غیرجنین‌زا Light yellow callus with hard texture and non-embryonic
		1.5	2.5	پینه سفید با بافت نرم و آبدار و غیرجنین‌زا White callus with soft and juicy texture and non-embryonic

نتایج تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ، ریزنمونه و روشنایی بر تشکیل پینه جنین‌زا (آزمایش دوم) در جدول ۷ آمده است. در این آزمایش مشاهده شد که در همه ریزنمونه‌های کشت شده پینه‌زایی به‌طور کامل انجام (۱۰۰ درصد پینه‌زایی) شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفت وزن خشک پینه نشان داد که برهمکنش ژنوتیپ، ریزنمونه و روشنایی در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. این نتیجه بیانگر متفاوت بودن تأثیر ژنوتیپ، ریزنمونه و نور بر صفات مرتبط با تشکیل پینه جنین‌زا است. برهمکنش دوگانه ریزنمونه و روشنایی و هم‌چنین ژنوتیپ و ریزنمونه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شدند، ولی برهمکنش دوگانه ژنوتیپ و روشنایی و اثر اصلی ریزنمونه معنی‌دار نشد.

جدول ۷- میانگین مربعات منابع تغییر برای صفت وزن خشک پینه در در دو ژنوتیپ چهل چشمه و کوه‌گل گیاه چویل.

Table 7. Source of variation mean square for callus dry weight in both genotype in chavil plant.

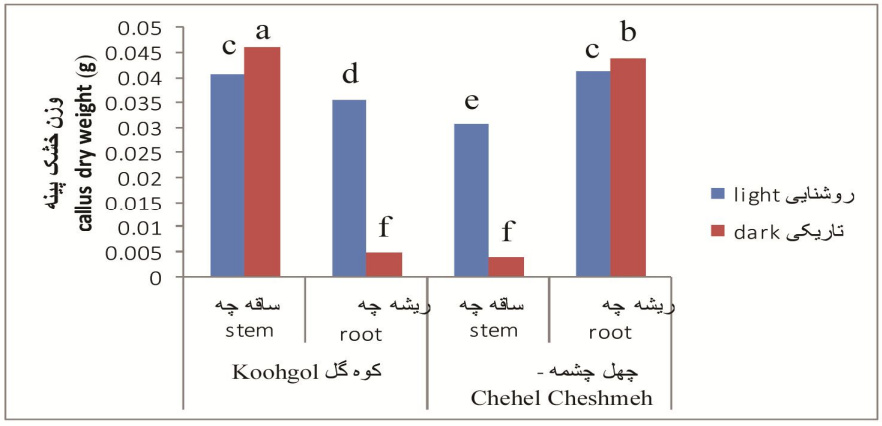
وزن خشک پینه Callus dry weight	درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییر Source of variation
0.00002**	1	ژنوتیپ Genotype
0.000005 ns	1	ریزنمونه Explant
0.00093**	1	روشنایی Light
0.00354**	1	ژنوتیپ × ریزنمونه Genotype × Explant
0.00000 ns	1	ژنوتیپ × روشنایی Genotype × Light
0.00002**	1	ریزنمونه × روشنایی Explant × Light
0.000161**	1	ژنوتیپ × ریزنمونه × روشنایی Genotype×Explant×Light
0.000001	16	خطا Error
4.07		ضریب تغییرات (درصد) Cv(%)

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

** Indicate significance at 1% and ns is non- significant.

نتایج به‌دست آمده نشان داد که در تمام تیمارهای به‌کار رفته میزان پینه‌زایی ۱۰۰ درصد بود. مقایسه میانگین برهمکنش ژنوتیپ، ریزنمونه و روشنایی نشان داد که بیشترین وزن خشک پینه

(۰/۰٤٦۲ گرم) مربوط به ژنوتیپ کوه‌گل با ریزنمونه ساقه‌چه در تاریکی و کمترین وزن خشک پینه مربوط به ژنوتیپ کوه‌گل با ریزنمونه ریشه‌چه در تاریکی (۰/۰۰٤۷ گرم) بود و برای ژنوتیپ چهل‌چشمه، ریزنمونه ساقه‌چه در تاریکی کمترین وزن خشک پینه (۰/۰۰۳۹ گرم) را تولید کرد (شکل ۳). در این آزمایش ژنوتیپ‌های چویل و ریزنمونه‌های به‌کار رفته تحت شرایط نور و تاریکی، پاسخ‌های متفاوتی را درمورد پینه‌زایی و جنین‌زایی نشان دادند و این نشان می‌دهد که عوامل مختلفی بر پینه‌زایی و تشکیل پینه جنین‌زا نقش مؤثری دارند. جیمنز (۲۰۰۱) نیز در تحقیقات خود به نقش عوامل مختلفی نظیر ژنوتیپ، شرایط محیطی و هورمون در جنین‌زایی پینه‌ها اشاره کرده است (۷). مهاجر و همکاران (۲۰۱۲) در گیاه اسپرس مشاهده نمودند که ریزنمونه ریشه‌چه سریع‌تر از ریزنمونه برگ و ساقه مراحل اژدری و کوتیلدونی را نشان داد. آن‌ها همچنین گزارش نمودند که اغلب پینه‌های حاصل از ریزنمونه ریشه‌چه کرم رنگ، ترد و شکننده بودند، در حالی‌که پینه‌های حاصل از برگ و ساقه به‌هم فشرده و سبز روشن بودند (۱۲). تشکیل پینه جنین‌زا و تکمیل مرحله جنین‌زایی در شرایط نور در گیاه صبر زرد توسط زرین‌پنجه و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش شده است (۲۵). در پژوهش حاضر نیز با استفاده از تیمار روشنایی و کاهش غلظت اکسین نمو جنین‌های رویشی مشاهده شد. بر خلاف آنچه که در آزمایش حاضر مشاهده شد طی تحقیقی، محور جنینی گیاه نخود در محیط القاء جنین‌زایی (۳ میلی‌گرم بر لیتر اکسین 2,4,5 T) در شرایط تاریکی وارد فاز جنین‌زایی شد (۱٦).



شکل ۳- مقایسه میانگین برهمکنش توده، ریزنمونه و نور برای صفت وزن خشک پینه در مرحله تشکیل پینه جنین‌زا در گیاه چویل.

Figure 3. Mean comparision interaction of cultivar, explant and light for callus dry weight trait in the embryogenic callus formation stage of chavil plant.

در آزمایش تشکیل پینه جنین‌زا علاوه‌بر صفات کمی اندازه‌گیری شده، صفات رنگ، نوع بافت و جنین‌زایی پینه‌ها نیز اندازه‌گیری شدند (جدول ۸). با بررسی پینه‌های حاصل از ریزنمونه‌های هر دو ژنوتیپ تحت شرایط تاریکی و نور، مشخص شد که تحت شرایط نور، ریزنمونه ساقه‌چه در ژنوتیپ کوه‌گل و ریزنمونه ریشه‌چه در ژنوتیپ چهل‌چشمه، دارای پینه‌هایی سفید رنگ با بافت ترد و شکننده و جنین‌زا شدند. سایر پینه‌ها نیز رنگ سفید و زرد و بافت ترد و شکننده و نرم و آبدار و یا سخت بودن را نشان دادند، ولی هیچ یک جنین‌زا نبودند. در گیاه تنباکو نیز پینه‌های کشت شده در روشنایی ساختار محکم‌تر و شکل منظم‌تر و رنگ روشن را نشان دادند، در حالی که در تاریکی شکل پینه‌ها نامنظم و رنگ آن‌ها زرد مایل به قرمز بود (۲۳). از آنجایی که در این آزمایش جنین‌زا بودن پینه‌ها دارای اهمیت بود می‌توان نتیجه گرفت که پینه‌های سفید رنگ با بافت ترد و شکننده جنین‌زایی را بسته به ژنوتیپ، ریزنمونه و شرایط تاریکی و روشنایی نشان خواهند داد.

جدول ۸- مقایسه ژنوتیپ‌های چویل، ریزنمونه‌ها و شرایط روشنایی از نظر صفات کیفی پینه‌های جنین‌زا.

Table 8. Comparision of chavil genotypes, explants and light for the quality of embryogenic calluses.

مشخصات مورفولوژیکی Morphologic characteristics	تیمار Treatment		
	روشنایی Light	ریزنمونه Explant	ژنوتیپ Genotype
پینه سفیدرنگ با بافت تردوشکننده و غیرجنین‌زا White callus with brittle texture and non-embryonic	تاریکی Dark	ساقه‌چه Shoot	کوه‌گل Koohgol
پینه سفید رنگ با بافت تردوشکننده و جنین‌زا (حاوی جنین‌های کروی) White callus with brittle texture and embryonic (contain globular embryo)	نور Light		
پینه زردروشن با بافت نرم و آبدار و غیرجنین‌زا Light yellow callus with soft and juicy texture and non-embryonic	تاریکی Dark	ریشه‌چه Root	
پینه سفیدرنگ با بافت سخت و غیرجنین‌زا White callus with hard texture and non-embryonic	نور Light		
پینه سفیدرنگ با بافت نرم و آبدار و غیرجنین‌زا White callus with soft and juicy texture and non-embryonic	تاریکی Dark	ساقه‌چه Shoot	چهل‌چشمه Chehel-cheshmeh
پینه سفیدرنگ با بافت سخت و غیرجنین‌زا White callus with hard texture and non-embryonic	نور Light		
پینه زردروشن با بافت تردوشکننده و غیرجنین‌زا White callus with brittle texture and non-embryonic	تاریکی Dark	ریشه‌چه Root	
پینه سفید رنگ با بافت تردوشکننده و جنین‌زا (حاوی جنین‌های کروی) White callus with brittle texture and embryonic (contain globular embryo)	نور Light		

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ برای تعداد جنین کروی، قلبی و اژدری تشکیل شده در پینه جنین‌زا (آزمایش سوم؛ جدول ۹) نشان داد که بین دو ژنوتیپ تفاوتی مشاهده نشده و هر دو ژنوتیپ در مورد تعداد جنین کروی، قلبی و اژدری در سطح احتمال ۵ درصد پاسخ یکسانی را نشان دادند.

جدول ۹- مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ برای تعداد جنین کروی، قلبی و اژدری تشکیل شده در پینه جنین‌زا گیاه چویل.

Table 9. Mean comparison of genotype effect on number of globular, heart and torpedo embryo in embryogenic callus of chavil plant.

Prob>|T|	T	خطای معیار Standard error	میانگین Mean	منابع تغییر Source of variation
0.183	2	0.333	0.666	تعداد جنین کروی کوه‌گل- تعداد جنین کروی چهل‌چشمه Number of globular embryo in koohgol- Number of globular embryo in Chehel-cheshmeh
0.183	−2	0.333	−0.666	تعداد جنین قلبی کوه‌گل- تعداد جنین قلبی چهل‌چشمه Number of heart embryo in koohgol- Number of heart embryo in Chehel-cheshmeh
0.423	1	0.333	0.333	تعداد جنین اژدری کوه‌گل- تعداد جنین اژدری چهل‌چشمه Number of torpedo embryo in koohgol- Number of torpedo embryo in Chehel-cheshmeh

در صورت فراهم بودن شرایط مناسب برای جنین‌زایی رویشی، معمولاً بیش از یک جنین از سلول‌های پینه منشأ می‌گیرد و هر چقدر تعداد جنین در هر پینه بیشتر باشد، احتمال تشکیل گیاهچه کامل بیشتر است. در این تحقیق، چون شرایط تشکیل پینه جنین‌زا یکسان بود، بنابراین فقط دو ژنوتیپ از لحاظ تعداد جنین رویشی مقایسه شد و مشاهده شد که هر دو ژنوتیپ پاسخ یکسانی را به تشکیل تعداد جنین رویشی نشان دادند. در این پژوهش بین دو ژنوتیپ از لحاظ تعدادجنین رویشی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، این نتایج با نتایج هدی و همکاران (۲۰۰۷) مغایرت دارد. این محققین در بررسی روی گیاه بادمجان به‌این نتیجه رسیدند که مهمترین عامل تأثیرگذار بر جنین‌زایی رویشی، ژنوتیپ است (۵). تیلر و کاجی (۱۹۹۱) در مورد گیاه رازیانه گزارش کرده‌اند که اثر ژنوتیپ بر جنین‌زایی رویشی به وضوح قابل مشاهده است (۲۰). کیانی ابری و همکاران (۲۰۱۰) در مقایسه توانایی جنین‌زایی رویشی در دو ژنوتیپ خودرو و اصلاح‌شده‌ی خیار نشان دادند که نوع ژنوتیپ اثر معنی‌داری بر جنین‌زایی رویشی دارد (۹).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمایش حاضر نشان داد که ریزنمونه‌های حاصل از ریشه‌چه و ساقه‌چه در هر دو رقم چویل در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP تشکیل پینه دادند. در این شرایط کمترین میزان درصد پینه‌زایی (صفر) مربوط به تیمار شاهد (فاقد هورمون) و ترکیباتی بود که یا از غلظت بالای اکسین در مقابل غلظت سیتوکینین استفاده شد و یا یکی از هورمون‌ها در محیط کشت حضور نداشت. بر اساس بررسی صورت گرفته بر جنین‌زایی مشخص شد که ریزنمونه ساقه‌چه در رقم کوه‌گل و ریزنمونه ریشه‌چه در رقم چهل‌چشمه تحت روشنایی با کاهش غلظت اکسن پینه‌های سفید رنگ با بافت ترد و شکننده و دارای خاصیت جنین‌زایی تولید کردند. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، مشخص شد که ژنوتیپ، نوع ریز نمونه و شرایط کشت تأثیر زیادی بر تشکیل پینه و جنین‌زایی در گیاه چویل دارند.

منابع

1. Abdolahi, M., Moini, A., Haddadi, P., and Jalali Javaran, M. 2003. Embryogenesis of microspore isolates cultured in different cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.). Pajouhesh and Sazandegi. J. 60: 52-48. (In Persian)
2. Amiri, S., Kazemitabaar, S.K., Ranjbar, G.A., and Azadbakht, M. 2011. The effect of different carbon sources and concentrations, and growth regulators on anther culture and embryogenesis of *Datura stramonium* L. J. Plant Prod. 18: 2.77-92. (In Persian)
3. Ghasemian, K.H., Nazari, S., Chehregani Rod, A., and Mirzayi Asl, A. 2011. Stage of somatic embryogenesis derived from seed embryo in Vosha (*Dorema ammoniacum* L.). J. Cells Tiss. Sci. Res. 3: 1.21-27.
4. Goran, A., Mozafari, A.A., and Ghaderi, N. 2012. Somatic embryogenesis in ivy and leaves in varieties of "Rasha" and "Khoshnave" in grape (*Vitis vinifera* L.). Iranian Conference of Grapes and Raisins Uni. of Malayer. Pp: 1-6. (In Persian)
5. Huda, A.K.M.N., Rahman, M., and Bari, M.A. 2007. Effect of carbon source in alginate bead on synthetic seed germination in eggplant (*Solanum melongena* L.). J. Plant Sci. 2: 5.538-544.
6. Jahantab, A., Sepehri, A., Myrdeilami, G., Ghasemi-Arian, A., and Nouri, S. 2011. Aut-Ecology evaluation of medicinal plant *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss. In Central Zagros (Zone of kohgiloye). J. Plant. Sci. Res. 24: 4.1-8. (In Persian)

7. Jimenes, V. 2001. Regulation of *in-vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13: 2. 196–223.
8. Khosravi, S., Azghandi, A.V., Hadad, R., and Mojtahedi, N. 2007. In vitro micropropagation of *Lilium longiflorum*. J. Agr. Res: Seed Plant. 23: 159- 168. (In Persian)
9. Kiani Abari, M., Mashayekhi, K., and Kamkar, B. 2010. Comparison of somatic embryogenesis compatibility in some organs of two breeded and native cucumber cultivars in B5 medium. Quintuplicate new View National Congress in Agriculture. Pp: 1-4.
10. Mashayekhi, K. 2007. Somatic embryogenesis in plants. Makhtoumghuly faraghi Press. 483p.
11. Merkle, S.A., Parrott, W.A., and Flinn, B.S. 1995. Morphogenetic aspects of somatic embryogenesis, in In Vitro Embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, London, Pp: 155-203.
12. Mohajer, S., Taha, R., Khorasani, A., and Yaacob, J. 2012. Induction of different types of callus and somatic embryogenesis in various explants of Sainfoin (*Onobrychis sativa*). Australian. J. Crop Sci. 6: 8. 1305-1313.
13. Mohammadi Nasab, A., Matlabi Azar, A.R., and Parandin, R. 2011. The effect of different concentrations of 2,4-D on somatic embryogenesis using cell culture hypocotyl thin layer of hay, Varities Karysary and Rangelander. J. Plant. Bio. 3: 7.73-84.
14. Mortazavi, R. 2013. Determination of the best component of hormone for embryo plant, micropropagation and callus induction in herbal plant chavil (*Ferulago angulata*). Thesis of M.Sc. Yasouj Uni. 70p. (In Persian)
15. Movahedi Dehnavi, M. 2011. Effect of seed dormancy breaking treatments on germination and vigor of plants Chavilan, Iranian caraway, lemon balm, cumin and coneflower. The final report of the research Project, Yasouj Uni. 69p. (In Persian)
16. Suhasini, K., Sagare, A.P., and Krishnamurthy, K.V. 1994. Direct Somatic embryogenesis from mature embryo axes in chickpea (*Cicer arietinum* L.). J. Plant Sci. 102: 189-194.
17. Takeda, T., Inose, H., and Matsuoda, H. 2003. Stimulation of somatic embryogenesis in carrot cells by the addition of the calcium. J. Biochem. Eng. J. 14: 2. 143-148. (In Persian)
18. Taran, M., Ghasempour, H.R., and Shirinpour, E. 2010. Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago angulata* subsp. Carduchorum. Jundishapur J. Microbiol. 3: 1. 10-21.
19. Tavakoli, M., Mashayekhi, K., and Ghaderi-Far, F. 2014. The effect of molybdenum in B5 medium containing nitrate and ammonium on somatic embryogenesis of carrot petiole. J. Plant Prod. Res. 21: 3. 117-134. (In Persian)

20. Theiler, H., and Kagi, A. 1991. Cloning in vitro and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare* (fennel) of zeta fino and zefa tard. J. Acta Hort. 300: 1. 287-291.
21. Trigiano, R., and Gray, D. 2000. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, 430p.
22. Werbrouck, S., Debergh, U., and Debergh, P. 1994. Plant cell culture: a practical approach. Socond edition Oxford university press, Oxford, England. Pp: 127-145.
23. Yanjie, C.H. 2003. Callus induction and plant regeneration from leaf explants of tobacco. J. Huazhong Agri. Uni. 2: 1-3.
24. Yan-xia, W., Xing-fen, W., Zhi-ying, M., Gui-yin, Z., and Gai-ying, H. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from two recalcitrant genotypes of *Gossypium hirsutum* L. Agricultural Sciences in China. 5: 5.323-329.
25. Zarinpanje, N., Oladzade Abassabadi, A., and Omidi, M. 2012. Effect of plant growth regulators and vitamin on callus induction, somatic embryogenesis and plantlet production of medicinal plant Aloe vera (*Aloe vera* L.). Iranian J. Rangeland and Forest Plant Breeding and Genetic Research. 20: 2. 191-181. (In Persian)