زیست‌شناسی گیاهی، سال پنجم، شماره پانزدهم، بهار ۱۳۹۲، صفحه ۱-۱۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۹/۱۹
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۳/۰۱
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۵/۰۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۷/۲۶

بهینه‌سازی شرایط باززایی گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.)

مهناز کرمی، محمدباقر باقریه‌نجار * و مهناز اقدسی
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

چکیده

لوبیا یکی از مهم‌ترین اعضای تیره باقلائیان (Fabaceae) است که دارای اهمیت اقتصادی درخور توجهی در تغذیه انسان است. باززایی از طریق کشت بافت یکی از روش‌های مناسب و مؤثر برای حفظ و تکثیر گیاهان به شمار می‌رود. در پژوهش حاضر، وضعیت کالوس‌زایی، ساقه‌زایی و ریشه‌زایی در گیاه لوبیا رقم گلی تحت اثر هورمون‌های بنزیل آمینو پورین و آلفا-نفتالین استیک اسید بررسی شده است. ابتدا بذرها به صورت سطحی استریل و برای به دست آوردن گیاهچه استریل به داخل محیط کشت مناسب منتقل شدند. پس از ۱۰ روز، قطعات جداکشت (هیپوکوتیل، ریشه و برگ) به دست آمده از گیاهچه استریل در ۲۵ تیمار هورمونی مختلف بررسی شدند. برای انجام فرآیندهای باززایی قطعات جداکشت به محیط کشت موراشیگ و اسکوگ جامد متشکل از سوکروز ۳ درصد، ویتامین B5 و هورمون‌های آلفا-نفتالین استیک اسید (با غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر) و بنزیل آمینو پورین (با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) انتقال یافتند. طبق نتایج حاصل، بهترین غلظت برای کالوس‌دهی در ترکیبی از این دو هورمون به میزان ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون آلفا-نفتالین استیک اسید و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آمینو پورین به دست آمد. در فرآیند ساقه‌زایی با افزایش غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین درصد ساقه‌زایی تا غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر افزایش و پس از آن کاهش یافت. در فرآیند ریشه‌زایی با افزایش غلظت هورمون آلفا-نفتالین استیک اسید ریشه‌زایی افزایش یافت. پس از مراحل بالا گیاهچه کامل تشکیل و به خاک انتقال یافت.

واژه‌های کلیدی: آلفا-نفتالین استیک اسید، بنزیل آمینو پورین، کشت بافت، لوبیا

مقدمه

تیره باقلائیان، تیره بسیار بزرگی با حدود ۱۸۰۰۰ گونه مانند *Glycine max*، *Phaseolus vulgaris* و *Vigna unguiculata* است (Lavin *et al*., 1990; Pollhil, 1994). مقدار پروتئین موجود در بذر حبوبات ۲ تا ۳ برابر بیشتر از پروتئین موجود در دانه غلات و ۱۰ تا ۲۰ برابر بیشتر از پروتئین موجود در گیاهان غده‌ای و نشاسته‌ای است (Broughton *et*

* نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: mb.bagherieh@gu.ac.ir، شماره تماس: ۰۱۷۱۲۳۲۲۸۰۶

(*al*., 2003. لوبیا با حدود ۱۸-۳۵ درصد پروتئین از منابع غذایی مهم برای انسان به شمار می‌رود (Varisia *et al*., 2006). ترکیب مناسبی از پروتئین لوبیا به همراه پروتئین غلات موجب برطرف شدن کمبود اسید آمینه و سوءتغذیه است (ون شونهوون و ویسست، ۱۳۸۰). کم‌آبی و شوری از عوامل محدود کننده عملکرد لوبیا محسوب می‌شوند (واعظی راد و همکاران، ۱۳۸۷). باززایی لوبیا در شرایط آزمایشگاه چه به صورت غیر مستقیم از طریق کالوس‌زایی و چه به صورت مستقیم از طریق اندام‌زایی و یا جنین‌زایی رویشی (Somatic embryogenesis) به سختی انجام می‌شود، به همین دلیل انتقال ژن با سرعت پایینی انجام می‌گیرد (McClean and Grafton, 1989; Veltecheva *et al*., 2005). کشت بافت یکی از مراحل ضروری و لازم برای انجام مراحل انتقال ژن است (Angelini and Allavena, 1989). در بیشتر آزمایش‌ها در این زمینه کشت در محیط پایه موراشیگ و اسکوگ (Morashige and Skoog, 1962) همراه با نسبت‌های مختلفی از هورمون‌های گیاهی انجام شده است. در بیشتر تحقیقات، در هنگام برش قطعات جداکشت به علت میزان بالای فنل گیاه و وقوع واکنش قهوه‌ای شدن (browning) باززایی مختل شده، به همین علت کشت در تاریکی انجام می‌شود (Bhat and Chandel, 1991; Laukkanen *et al*., 1999). تاکنون، آزمایش‌هایی روی اندام‌های مختلف گیاه لوبیا از جمله برگ (Veltecheva *et al*., 2005)، ساقه، بساک (Hoddon and Northcote, 1976)، پروتوپلاست (Pelcher *et al*., 1974) و جنین انجام شده است که موفقیت‌آمیزترین آنها روی برگ و ساقه بوده است. باززایی از طریق جنین‌زایی رویشی نیز در کشت بافت لوبیا مشاهده شده است (Allavena and Rossetti, 1983؛ Saunders *et al*., 1984؛ Martins and Sondahl, 1987). Saam و همکاران (۱۹۸۷) تحقیقاتی را روی کشت بافت لوبیا در زمینه تأثیر هورمون‌های سیتوکینین و اکسین انجام دادند و مشاهده کردند که محدوده بالایی از غلظت هورمون BA (بنزیل آدنین) ساقه‌زایی را در گیاه لوبیا القا می‌کند (Saam *et al*., 1987). القای جوانه‌زنی در لوبیا به غلظت هورمون‌هایی مانند بنزیل آدنین (6-Benzyladenine)، دی متیل آلیل آمینو پورین (6-γ-γ- Dimethylallylamino-purine (2ip)) و جیبرلیک اسید وابسته است (Saam *et al*., 1987; Zambre .Benedicic *et al*., 1997). و همکارانش (۲۰۰۱) بیشترین درصد تشکیل ساقه در کالوس‌ها را در محیط‌کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP مشاهده کردند. بسیاری از گونه‌های تیره باقلائیان مانند لوبیا تمایل بیشتری به تشکیل ریشه نسبت به ساقه دارند (Westhuizen *et al*., 1990).

Ahmed و همکاران (۲۰۰۲) در پژوهشی، بهترین کالوس‌ها را در محیط‌کشت MS حاوی هورمون بنزیل آدنین با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و نفتالین استیک اسید با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در قطعه جدا کشت گرهک لپه‌ای به دست آوردند. در این کشت نتایجی که به دست آمد مشابه نتایج به دست آمده از آزمایش‌های Malik و Saxena (۱۹۹۱) بود. بر اساس نتایج حاصل سلول‌های جوان‌تر پاسخ بهتری به محرک‌های هورمونی می‌دهند (Ahmed *et al*.,

(2002. تحقیقات امیری و فهیمی (۱۳۸۲) نشان داد بهترین تیمار هورمونی برای رشد کالوس‌ها در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون ۲ و ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: 2,4-D) و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون کینتین (kinetin) در قطعه جدا کشت محور زیر لپه (hypocotil) است. فرآیند ریشه‌زایی در قطعات جدا کشت برگ لپه‌ای در تیمار هورمونی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون ۲ و ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون کینتین مشاهده شد (امیری و فهیمی، ۱۳۸۲).

باززایی از طریق کشت بافت یکی از روش‌های مناسب و مؤثر برای حفظ و تکثیر گیاهان به شمار می‌رود و بهینه‌سازی روش‌های کلی انتقال ژن متناسب با نوع گونه مورد نظر با توجه به پیچیدگی‌های ساختاری گونه‌های مختلف از دیرباز مورد توجه دانشمندان بوده است. نظر به اهمیّت لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) به عنوان مهم‌ترین گیاه زراعی در تیره باقلائیان و حساسیت آن به خشکی و شوری خاک، با بهینه‌سازی کشت بافت این گیاه می‌توان زمینه را برای وارد کردن ژن‌های مناسب برای افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی مهیا ساخت. تاکنون با استفاده از هورمون‌های مختلف باززایی در گیاه لوبیا به مراتب انجام گرفته و هدف بیشتر آنها مطالعه کالوس‌ها و سنجش عناصر مختلف در آن بوده است. بنابراین، از غلظت بالای هورمونی استفاده کرده‌اند که برای تولید گیاه تراریخت توصیه نمی‌شود. اهداف پژوهش حاضر عبارت است از: ۱) یافتن بهترین تیمار هورمونی برای باززایی رقم گلی گیاه لوبیا در شرایط *in vitro* با کمینه غلظت؛ ۲) یافتن بهترین قطعه جداکشت با آزمون باززایی در بخش‌های مختلف گیاه در کمینه غلظت هورمونی؛ ۳) دست یافتن به عوامل تأثیرگذار در فرآیند باززایی در شرایط *in vitro* برای کاهش غلظت هورمون‌های استفاده شده؛ ۴) دست یافتن به گیاهچه کامل و سازگاری رشد گیاهچه با خاک. در این مطالعه، غلظت‌های هورمونی به مراتب کمتر از غلظت‌های پیشنهادی مطالعات قبلی استفاده شد و شرایط بهینه کالوس‌زایی در روشنایی بدون تولید ترکیبات فنلی شرح داده شده است. به‌علاوه، شرایط بهینه دستیابی به گیاه کامل از کشت کالوس به عنوان یکی از مراحل لازم برای انتقال ژن به گیاه بیان شده است و در مجموع، همه مراحل باززایی گیاه لوبیای رقم ایرانی گلی با توجه به شرایط آزمایشگاهی کشور به‌گونه‌ای بومی‌سازی شده است که برای تولید لوبیای تراریخت مناسب باشد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان

ابتدا بذرهای رقم گلی و اختر لوبیا قرمز (*Phaseolus vulgaris* L.) از مرکز تحقیقات خمین تهیه شد. برای به دست آوردن گیاهچه استریل، بذرهای رقم گلی و اختر پس از شستشو، ابتدا برای استریل سطحی با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳ دقیقه تیمار و سپس با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی شدند. پس از ۳-۴ بار شستشو با آب مقطر استریل، بذرها برای کشت آماده شدند. به علت جوانه‌زنی پایین رقم اختر آزمایش‌های بعدی روی رقم گلی انجام شد. بذرهای استریل در

داخل محیط کشت جامد حاوی آب و آگار ۰/۸ درصد به مدت یک هفته تا ۱۰ روز کشت شدند. سپس، نمونه‌های کشت شده به اتاقک کشت با شرایط کاملاً تنظیم شده از نظر دما (۲ ± ۲۵ درجه سانتیگراد)، رطوبت، جریان هوا، کیفیت و طول مدت روشنایی (فتوپریود ۸ ± ۱۶) قرار داده شدند.

انجام مراحل باززایی

از گیاهچه‌های استریل، قطعات جدا کشت مختلف شامل هیپوکوتیل، ریشه و برگ تهیه شد. برای انجام مراحل باززایی در گیاه، قطعات جدا کشت به محیط کشت MS جامد حاوی غلظت‌های مختلف هورمونی، سوکروز ۳ درصد و ویتامین B5 انتقال یافتند. آزمایش‌ها در ۲۵ تیمار هورمونی مختلف از دو هورمون NAA (α- نفتالین استیک اسید) و BAP (بنزیل آمینو پورین) مطابق جدول ۱، به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی هر کدام با ۳ تکرار انجام شد. از هر یک از قطعات جدا کشت، ۵ عدد در هر پتری‌دیش کشت و به اتاقک کشت منتقل شد. در بیشتر تحقیقات، کشت گیاهچه استریل و قطعات جدا کشت به علت فنل بالای این گیاه و پدیده قهوه‌ای شدن در تاریکی انجام می‌شد، اما در پژوهش حاضر، همه مراحل کشت در روشنایی و شرایط اتاقک کشت انجام شد.

جدول ۱- غلظت هورمون‌های استفاده شده در آزمایش

هورمون	غلظت (میلی‌گرم در لیتر)				
نفتالین استیک اسید (NAA)	۰	۰/۱	۰/۲	۰/۴	۰/۸
بنزیل‌آمینوپورین (BAP)	۰	۰/۵	۱	۲	۴

سپس، مشاهدات حاصل از فرآیندهای تشکیل کالوس، ساقه، برگ و ریشه ثبت و عکس‌برداری از نمونه‌ها انجام شد. در این تحقیق، ساقه‌زایی، مشاهده ساقه بیش از یک سانتی‌متر با داشتن کمینه دو برگ و ریشه‌زایی، مشاهده ریشه بیش از یک سانتی‌متر در نظر گرفته شده است.

تحلیل داده‌ها

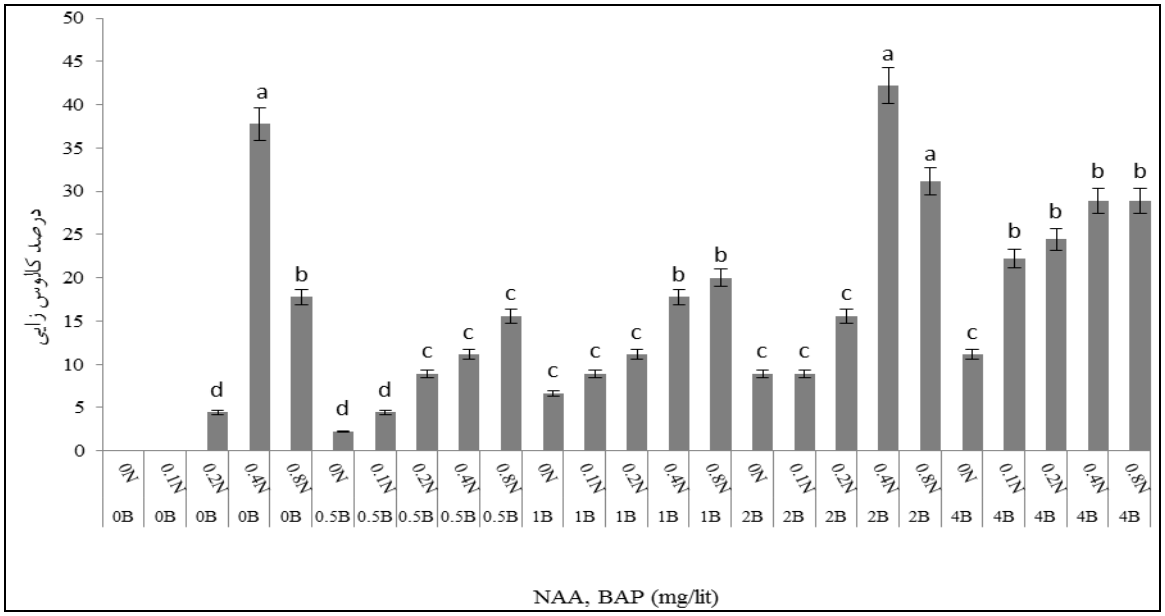
همه آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد که در آن آثار اصلی شامل تیمارهای هورمونی و انواع قطعات جدا کشت بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون LSmeans (LSD) آزمون دانکن ۱ در سطح احتمال ۵ درصد با نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها و جدول‌ها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

بررسی فرآیند کالوس‌زایی

در این بررسی قطعات جداکشت (هیپوکوتیل، ریشه و برگ) روی محیط کشت پایه MS جامد حاوی سوکروز ۳ درصد، ویتامین B5 و غلظت‌های مختلفی از دو هورمون NAA و BAP قرار گرفتند. در این آزمایش، از ۲۵ غلظت ترکیبی از دو هورمون NAA و BAP استفاده شد. اولین واکنش‌های به تشکیل کالوس در قطعات جدا کشت پس از گذشت ۴ روز مشاهده مربوط بود و این فرآیند پس از گذشت ۱۴ روز کامل شد (شکل ۷). کالوس‌های مورد نظر برای انجام فرآیند باززایی (تشکیل ساقه و ریشه) در مراحل بعدی آزمایش استفاده شدند. پس از بررسی‌های آماری، نتایج نشان داد که هر دو هورمون NAA و BAP باعث القای فرآیند کالوس‌زایی در قطعات جدا کشت می‌شوند. تشکیل کالوس در بیشتر غلظت‌ها در قطعات جدا کشت

مشاهده شد. بیشترین درصد تشکیل کالوس (۹۵ درصد) در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل و فقط حدود ۵ درصد در قطعات جدا کشت ریشه مشاهده شد. در قطعات جدا کشت برگ هیچ گونه کالوسی تشکیل نشد. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود بیشترین تولید کالوس در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA است (۴۲ درصد). در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA بدون حضور هورمون BAP کالوس‌زایی در حدود ۳۷ درصد مشاهده می‌شود. نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس و آزمون دانکن نشان می‌دهد که تیمارهای هورمونی (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP)، (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA بدون حضور هورمون BAP) و (۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP) در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند (شکل ۱). بنابراین، برای تشکیل کالوس در قطعات جدا کشت توصیه می‌شود در محیط‌های حاوی تیمارهای هورمونی (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP)، (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA بدون حضور هورمون BAP) و (۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP) کشت شوند.

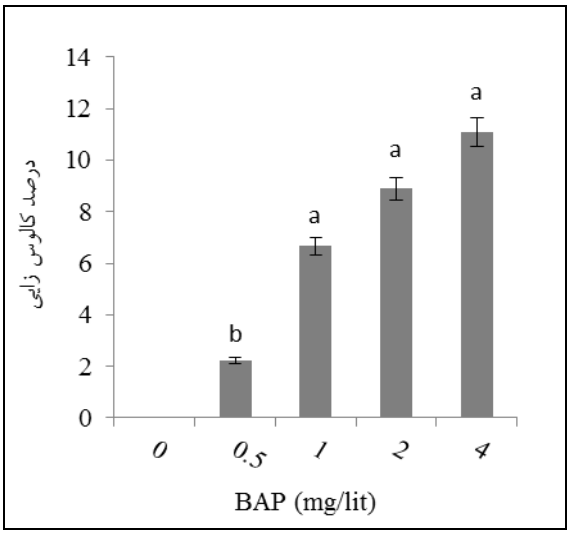


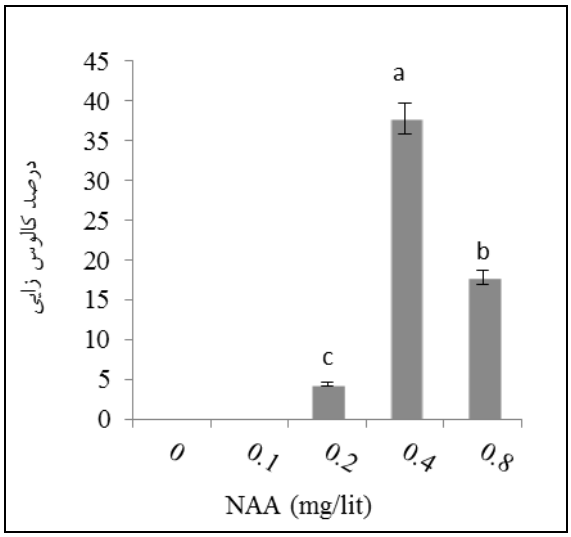
شکل ۱- بررسی برهم‌کنش هورمون‌های NAA و BAP بر درصد کالوس‌زایی در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل گیاه لوبیا رقم گلی بر اساس آزمون LSD. N: هورمون NAA، B: هورمون BAP. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

بررسی تأثیر هر یک از هورمون‌ها به صورت مجزا در کالوس‌زایی

در تأثیر هورمون BAP به تنهایی در تشکیل کالوس، بیشترین میزان کالوس‌زایی حدود ۱۱ درصد در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر مشاهده می‌شود (شکل ۲ الف). از نظر آماری غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵ درصد از خود نشان نمی‌دهند. اما در بررسی تأثیر

هورمون NAA به تنهایی، تشکیل کالوس در دو غلظت صفر و ۰/۱ مشاهده نمی‌شود (شکل ۲ ب). بیشترین تولید کالوس در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA مشاهده می‌شود (۳۸ درصد). از نظر آماری غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵ درصد با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA نشان می‌دهد. مقایسه شکل ۲ (الف و ب) نشان می‌دهد که هورمون NAA به تنهایی در القای فرآیند کالوس‌زایی نسبت به هورمون BAP بهتر عمل می‌کند. اما هورمون BAP هنگامی که به صورت ترکیبی به همراه هورمون NAA استفاده شود، فرآیند کالوس‌زایی را تشدید می‌کند. برای مثال، درصد کالوس‌زایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP بدون حضور هورمون NAA فقط در حدود ۹ درصد است، در حالی که در همین غلظت در حالت ترکیبی با هورمون NAA این فرآیند تا حدود ۴۲ درصد افزایش یافته است. در حالی که استفاده از هورمون NAA به تنهایی در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش کالوس‌زایی تا حدود ۳۸ درصد شده است.



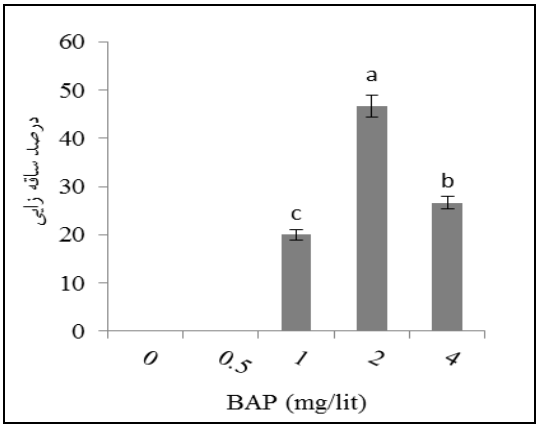


شکل ۲- الف) بررسی تأثیر هورمون BAP به تنهایی بر درصد کالوس‌زایی در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل، ب) بررسی تأثیر هورمون NAA به تنهایی بر درصد کالوس‌زایی در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

بررسی تأثیر هورمون BAP در ساقه‌زایی

در این بررسی، به منظور القای فرآیند باززایی در مسیر مستقیم قطعات جدا کشت (هیپوکوتیل، ریشه و برگ) و در مسیر غیرمستقیم کالوس‌های تشکیل شده در مرحله پیشین به محیط کشت MS جامد حاوی سوکروز ۳ درصد، ویتامین B5 و غلظت‌های مختلف هورمون BAP انتقال یافتند. آزمایش‌ها در ۵ غلظت صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر هر کدام با ۳ تکرار انجام شد. پس از گذشت ۱۰ روز نخستین واکنش‌های مربوط به تشکیل ساقه در کالوس‌ها مشاهده شد. واکشت کالوس‌ها و انتقال آنها به محیط کشت جدید، هر ۵ روز یک بار انجام شد. در مسیر مستقیم، ساقه‌ها پس از گذشت ۸ روز در قطعات جدا کشت و در مسیر غیر مستقیم پس از گذشت ۱۵ روز در کالوس‌ها تشکیل شدند (شکل ۷).

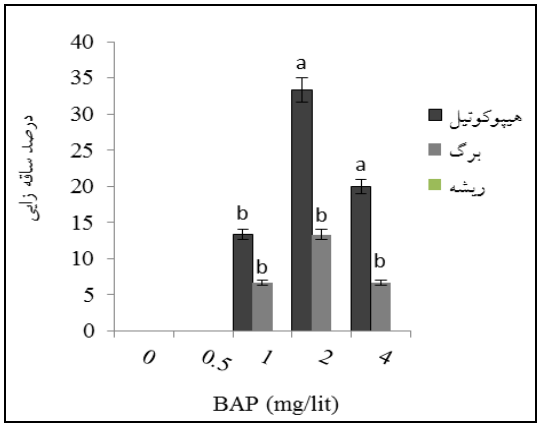
همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت هورمون BAP ساقه‌زایی تا غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر افزایش و پس از آن کاهش یافته است. در دو غلظت صفر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP فرآیند ساقه‌زایی اصلاً مشاهده نمی‌شود. بهترین غلظت برای القای فرآیند ساقه‌زایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP مشاهده می‌شود (۴۶ درصد). نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس و آزمون دانکن اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر درصد ساقه‌زایی، نشان می‌دهد که غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵ درصد با غلظت‌های دیگر دارد (شکل ۳).



شکل ۳- بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر درصد ساقه‌زایی در حالت کلی و بدون در نظر گرفتن قطعات جدا کشت.

بررسی تأثیر قطعات مختلف جدا کشت در ساقه‌زایی

در این قسمت از تحقیق، تأثیر هر یک از قطعات مختلف هیپوکوتیل، برگ و ریشه در ساقه‌زایی بررسی شده است. همان طور که شکل ۴ نشان می‌دهد بیشترین میزان ساقه‌زایی در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP مشاهده می‌شود. این در حالی است که ساقه‌زایی در قطعات جدا کشت برگ نیز با افزایش هورمون BAP افزایش یافت و در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP به بیشترین میزان در حدود ۱۳ درصد رسیده است. در قطعات جدا کشت ریشه هیچ گونه ساقه‌زایی مشاهده نمی‌شود. بنابراین، بهترین قطعه جدا کشت در پاسخ به فرآیند ساقه‌زایی هیپوکوتیل است. نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس و آزمون دانکن آثار متقابل قطعات جدا کشت هیپوکوتیل و غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر درصد ساقه‌زایی نشان می‌دهد که غلظت‌های هورمونی ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵ درصد ندارند. اما ساقه‌زایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل و برگ اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵ درصد نشان می‌دهند. در قطعات جدا کشت برگ در غلظت‌های مختلف هورمون BAP اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده نمی‌شود (شکل ۴).

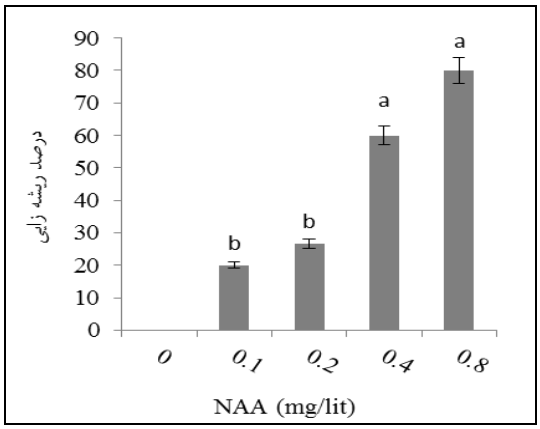


شکل ۴- بررسی آثار متقابل قطعات مختلف جدا کشت و غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر درصد ساقه‌زایی.

بررسی تأثیر هورمون NAA در ریشه‌زایی

در این بررسی، ابتدا قطعات جداکشت هیپوکوتیل، ریشه و برگ در محیط کشت MS جامد حاوی

سوکروز ۳ درصد، ویتامین B5 و غلظت‌های مختلف صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA قرار گرفتند. سپس، بهترین غلظت‌هایی که ریشه‌زایی در آنها اتفاق افتاد، به دست آمد. طبق شکل ۵ با افزایش غلظت هورمون NAA، ریشه‌زایی نیز افزایش یافته است. بیشترین ریشه‌زایی در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA مشاهده می‌شود (۸۰ درصد). نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس و آزمون دانکن نشان می‌دهد که غلظت‌های ۰/۸ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند. پس از به دست آوردن بهترین تیمار هورمونی برای ایجاد ریشه در ساقه‌های متشکل از مرحله پیشین و تشکیل گیاهچه کامل، ساقه‌ها در سه تیمار هورمونی: ۱) ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA بدون BAP، ۲) ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، ۳) ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP قرار گرفتند. طبق مشاهدات نخستین، در محیط کشت حاوی غلظت هورمونی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA بدون حضور BAP ساقه‌ها نکروزه شدند و از بین رفتند. در غلظت هورمونی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP مدت زمان تشکیل ریشه خیلی طولانی شد. بهترین وضعیت تشکیل ریشه‌ها در تیمار هورمونی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP مشاهده شد. واکشت ساقه‌ها و انتقال آنها به محیط کشت جدید، هر سه روز یک بار انجام شد. القای فرآیند ریشه‌زایی در ساقه‌ها و تشکیل گیاهچه‌های کامل ۸-۱۲ روز به طول انجامید. سپس، گیاهچه‌های کامل به خاک جنگل حاوی خزه و ورمیکولیت با نسبت (۱ : ۱ : ۵) انتقال داده شدند (شکل ۷).

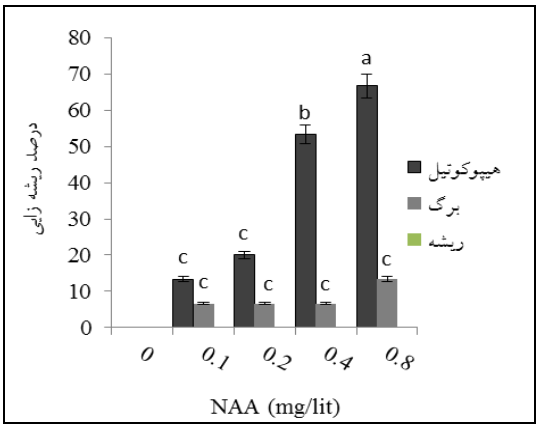


شکل ۵- بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون NAA بر درصد ریشه‌زایی در حالت کلی و بدون در نظر گرفتن قطعات جدا کشت.

بررسی تأثیر قطعات مختلف جدا کشت در ریشه‌زایی

در این بخش، تأثیر هر یک از قطعات مختلف هیپوکوتیل، برگ و ریشه در ریشه‌زایی بررسی شد. همان طور که شکل ۶ نشان می‌دهد بیشترین میزان ریشه‌زایی در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل مشاهده می‌شود. در قطعات جدا کشت برگ، ریشه‌زایی به مقدار محدودی در حدود ۱۳ درصد در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA مشاهده می‌شود، در حالی که در قطعات جدا کشت ریشه هیچ گونه پاسخی از القای فرآیند ریشه‌زایی مشاهده نمی‌شود. نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس و آزمون دانکن آثار متقابل قطعات جدا کشت هیپوکوتیل و غلظت‌های مختلف هورمونی NAA بر درصد ریشه‌زایی نشان می‌دهد که غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر

اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد دارند. همچنین، در غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل و برگ اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده می‌شود. در غلظت‌های پایین‌تر هورمون NAA اختلاف معنی‌دار بین قطعات جدا کشت هیپوکوتیل و برگ مشاهده نمی‌شود.



شکل ۶- بررسی آثار متقابل قطعات مختلف جدا کشت و غلظت‌های مختلف هورمون NAA بر درصد ریشه‌زایی.

بحث

برای انجام باززایی در شرایط *in vitro* پس از به دست آوردن گیاهچه استریل قطعات ریشه، برگ و هیپوکوتیل در محیط کشت MS حاوی سوکروز ۳ درصد و ویتامین B5 با غلظت‌های هورمونی متفاوت کشت شدند. آزمایش‌ها در ۲۵ غلظت هورمونی از ترکیب دو هورمون NAA و BAP هر کدام با ۳ تکرار انجام شد. در ۲۳ غلظت تشکیل کالوس مشاهده شد. کالوس‌های تشکیل شده در بیشتر غلظت‌ها کرم‌رنگ و در برخی بی‌رنگ و از نظر ساختار فیزیکی نرم بودند (شکل ۷ الف و ب). بیشترین درصد تشکیل کالوس به ترتیب در تیمارهای هورمونی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر از هورمون NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BAP (۴۲ درصد)، ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA بدون حضور هورمون BAP (۳۸ درصد) و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP (۳۱ درصد) مشاهده شد (شکل ۱). در نتایجی غیر مشابه Ahmed و همکارانش (۲۰۰۲) بهترین کالوس‌ها را در محیط کشت MS حاوی هورمون بنزیل آدنین با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و α-نفتالین استیک اسید با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آوردند. بیشترین تولید کالوس هم در پژوهش Ahmed و همکارانش (۲۰۰۲) و هم در پژوهش حاضر حاصل برهم‌کنش دو هورمون اکسینی و سیتوکینینی است. ظاهراً به نظر می‌رسد به علت این که قطعات جدا کشت مورد استفاده در دو آزمایش متفاوت بوده است، غلظت‌های بهینه هورمون‌های به‌کار برده شده نیز متفاوت است. البته احتمال این که گونه‌های مختلف استفاده شده و شرایط آزمایشگاهی متفاوت علت اصلی تفاوت مشاهده شده در غلظت‌های بهینه هورمون‌هاست را نیز نمی‌توان از نظر دور داشت. امیری و فهیمی (۱۳۸۲) در نتایجی غیر مشابه بهترین کالوس‌ها را در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل رقم ناز در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون Kin به دست آوردند. قابل تأمل این که هورمون‌های NAA و BAP نسبت به هورمون‌های 2,4-D و Kin، هورمون‌های ضعیف‌تری محسوب می‌شوند. در بیشتر مطالعات مانند مطالعه حاضر، بهترین کالوس‌ها در تیمار هورمونی متشکل از دو هورمون اکسینی و سیتوکینینی ایجاد می‌شوند. قطعات جدا کشت هیپوکوتیل، ریشه و برگ نتایج مختلفی را در

فرآیند تشکیل کالوس در غلظت‌های مختلف هورمونی از خود نشان دادند.

نتایج کشت قطعات جدا کشت برگ نشان داد که آنها در هیچ یک از غلظت‌ها قادر به کالوس‌زایی نیستند و پس از مدت زمان کوتاهی نکروزه شده و از بین می‌روند. این فرآیند به خوبی در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل در حدود ۹۵ درصد مشاهده شد. تشکیل کالوس در قطعات جدا کشت ریشه فقط در حدود ۵ درصد در تیمار هورمونی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر از هورمون NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BAP مشاهده شد. بهترین قطعات جدا کشت برای تشکیل کالوس طبق تحقیقات Malik و Saxena (۱۹۹۱) برگ، امیری و فهیمی (۱۳۸۲) هیپوکوتیل، Ahmed و همکاران (۲۰۰۲) گرهک لپه‌ای، El-Shemy و همکاران (۲۰۰۲) اپی‌کوتیل و Veltecheva و همکاران (۲۰۰۵) برگ، در گونه‌های مختلف لوبیا معرفی شده‌اند.

در القای فرآیند ساقه‌زایی با افزایش غلظت هورمون BAP ساقه‌زایی تا غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر افزایش و پس از آن کاهش یافته است (شکل ۳). شایان ذکر است که در غلظت‌های پایین این هورمون یعنی در غلظت‌های صفر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر فرآیند ساقه‌زایی اصلاً مشاهده نمی‌شود. بیشترین تشکیل ساقه و برگ در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP مشاهده می‌شود (۴۶ درصد). در بررسی تأثیر هر یک از قطعات مختلف هیپوکوتیل، برگ و ریشه در ساقه‌زایی بیشترین میزان ساقه‌زایی در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP مشاهده می‌شود. در قطعات جدا کشت برگ نیز ساقه‌زایی با افزایش میزان هورمون BAP افزایش یافته و در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP بیشترین میزان ساقه‌زایی یعنی در حدود ۱۳ درصد مشاهده می‌شود. در قطعات جدا کشت ریشه هیچ گونه ساقه‌زایی مشاهده نمی‌شود (شکل ۴). همان طور که Saam و همکاران (۱۹۸۷) مشاهده کردند محدوده بالایی از غلظت هورمون‌های سیتوکینینی مانند BA (بنزیل آدنین) ساقه‌زایی را در گیاه لوبیا القا می‌کند، نتایج آزمایش حاضر نیز این مهم را به اثبات می‌رساند. نتایج تحقیقات انجام شده توسط Delgado-Sanchez و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که غلظت‌های بسیار بالای BAP باعث تشکیل ساقه در کالوس‌ها می‌شود. آنها همچنین، ساقه‌زایی را در ۴ غلظت صفر، ۰/۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP بررسی کردند. ساقه‌زایی در غلظت‌های صفر و ۰/۱ مشاهده نشد، در حالی که در غلظت‌های ۵ و ۱۰ به خوبی مشاهده شد. نتایج این گروه نیز گویای این است که در غلظت‌های پایین BAP ساقه‌زایی اتفاق نمی‌افتد. در پژوهشی دیگر توسط Zambre و همکاران (۲۰۰۱) القای فرآیند ساقه‌زایی در کالوس‌ها در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP مشاهده شد. بنابراین، نتایج تحقیق حاضر در القای فرآیند ساقه‌زایی با نتایج بیشتر تحقیقات در این زمینه مغایرت دارد که برای القای فرآیند ساقه‌زایی به غلظت‌های بالایی از هورمون‌های سیتوکینینی نیاز است.

در فرآیند ریشه‌زایی با افزایش غلظت هورمون NAA ریشه‌زایی افزایش یافته است. بهترین ریشه‌زایی‌ها در تیمارهای هورمونی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA (۸۰ درصد) و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA (۶۰ درصد) مشاهده می‌شود (شکل

۵). در بررسی تأثیر هر یک از قطعات مختلف هیپوکوتیل، برگ و ریشه در ریشه‌زایی، بیشترین میزان ریشه‌زایی در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل مشاهده می‌شود. در قطعات جدا کشت برگ نیز ریشه‌زایی به مقدار محدودی در حدود ۱۳ درصد در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA مشاهده می‌شود، در حالی که در قطعات جدا کشت ریشه هیچ گونه پاسخی از القای فرآیند ریشه‌زایی مشاهده نمی‌شود (شکل ۶). در پژوهش‌های امیری و فهیمی (۱۳۸۲) ریشه‌زایی در غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D با طول بسیار کوتاه مشاهده شده است، در حالی که در پژوهش حاضر در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA طول ریشه‌ها بیش از ۱۰ سانتی‌متر نیز مشاهده می‌شود (شکل ۷). قابل تأمل است که هورمون NAA نسبت به هورمون 2,4-D هورمون ضعیف‌تری محسوب می‌شود. Zambre و همکارانش (۱۹۹۸) بهترین ریشه‌ها را در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA (Indole-3-Acetic Acid) مشاهده کردند. نتایج مطالعه حاضر در القای فرآیند ریشه‌زایی با نتایج بیشتر تحقیقات در این زمینه مغایرت دارد. طبق نتایج Westhuizen و همکاران (۱۹۹۰) بسیاری از گونه‌های تیره باقلائیان مانند لوبیا تمایل بیشتری به تشکیل ریشه نسبت به ساقه دارند که نتایج حاصل از پژوهش حاضر این مهم را به اثبات می‌رساند.

نتیجه‌گیری

باززایی در رقم گلی گیاه لوبیا در حضور هورمون‌های NAA و BAP به خوبی انجام می‌شود. سلول‌های جوان‌تر گیاه پاسخ بهتری به محرک‌های هورمونی می‌دهند. بهترین کالوس‌ها در تیماری از ترکیب دو هورمون NAA و BAP به دست آمد. هورمون NAA نقش بسزایی در ایجاد کالوس و ریشه دارد. همه فرآیندهای تشکیل کالوس، ساقه و ریشه به خوبی در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل مشاهده شد.

شکل ۷- مراحل باززایی در رقم گلی گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Goli). الف و ب) کالوس‌زایی در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP پس از گذشت ۱۴ روز؛ پ و ت) تشکیل ساقه و برگ در کالوس‌ها در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP پس از گذشت ۱۵ روز؛ ث و ج) ساقه‌زایی در مسیر مستقیم باززایی در قطعات جدا کشت هیپوکوتیل و برگ در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP پس از گذشت ۸ روز؛ چ) ریشه‌زایی در قطعه جدا کشت برگ در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA پس از گذشت ۵ روز و یافتن بهترین غلظت برای القای فرآیند ریشه‌زایی؛ ح) انتقال ساقه‌ها به محیط کشت حاوی هورمون NAA برای ریشه‌زایی و تشکیل گیاهچه کامل پس از گذشت ۱۲ روز؛ خ) انتقال گیاهچه به خاک جنگل حاوی خزه و ورمیکولیت با نسبت (۱: ۱: ۵).

سپاسگزاری

نویسندگان از زحمات سرکار خانم معصومه چخماقی و سرکار خانم دکتر مهناز خلفی برای مساعدت در تحلیل‌های آماری قدردانی می‌کنند. همچنین، از دانشگاه گلستان برای حمایت مالی پژوهشی قدردانی می‌شود.

منابع

امیری، ح. و فهیمی، ح. (۱۳۸۲) بررسی اثر غلظت‌های مختلف پتاسیم در مقاومت به شوری گیاه لوبیا در کشت بافت. مجله علوم دانشگاه تهران ۲۹: ۳۱۷-۳۲۶.

واعظی راد، س.، شکاری، ف.، شیرانی راد، ا. و زنگانی، ا. (۱۳۸۷) اثر تنش کم آبی در مراحل مختلف رشد بر عملکرد دانه در لوبیای قرمز. مجله دانش نوین کشاورزی ۱۰: ۸۵-۹۴.

ون شونهوون، ا. و ویسست، ا. (۱۳۸۰) زراعت و اصلاح لوبیا. ترجمه باقری، ع.، محمودی، ع. ا. و دین قزلی، ف. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد.

Allavena, A. and Rossetti, L. (1983) Efforts in somatic embryogenesis of *Phaseolus vulgaris* L. Acta Horticulturae 131: 239-246.

Angelini, R. R. and Allavena, A. (1989) Plant regeneration from immature cotyledon explant cultures of bean (*Phaseolus coccineus* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture 19: 167-174.

Benedicic, D., Ravanikar, M. and Gogala, N. (1997) The regeneration of bean plants from meristem culture. Phyton (Horn, Austria) 37: 151-160.

Bhat, S. R. and Chandel, K. P. S. (1991) A novel technique to overcome browning in tissue culture. Plant Cell Reports 7: 358-361.

Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. and Vanderleyden, J. (2003) Beans model food legumes. Plant and Soil 252: 55-128.

Delgado-Sanchez, P., Saucedo-Ruiz, M., Guzman-Maldonado, S. H., Villordo-Pineda, E., Gonzalez-Chavira, M., Fraire-Vaelazquez, S., Acosta-Gallegos, J. A. and Mora-Aviles, A. (2006) An organic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science 170: 822-827.

Eissa Ahmed, E., Bisztray,G. Y. D. and Velich, I. (2002) Plant regeneration from seedling explant of common bean. Acta Biologica Szegediensis 46: 27-28.

El-Shemy, A. H., Khalafalla, M., Wakasa, K. and Ishimoto, M. (2002) Reproducible transformation in two grain legumes soybean and azuki bean using different systems. Cellular and Molecular Biology 7: 709-719.

Hoddon, L. and Northcote, D. H. (1976) The effect of growth conditions and origin of tissue on the ploidy and morphogenetic potentional of tissue cultures of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Experimental Botany 27: 1031-1051.

Laukkaen, H., Haggman, H., Kontunen, S. and Hohtola, A. (1999) Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: role of peroxidase and polyphenol oxidase. Physiologia Plantarum 3: 337-343.

Lavin, M., Doyle, J. J. and Palmer. J. D. (1990) Evolutionary significance of the loss of the chloroplast-DNA inverted repeat in the Leguminosae subfamily Papilionoideae. Evolution 44: 390-402.

Malik, K. A., and Saxena, P. K. (1991) Regeneration in *Phaseolus vulgaris* promotive role of N6-benzylaminopurine in

culture from juvenile leaves. Planta 184: 148-150.

Martins, I. S. and Sondahl, M. R. (1984) Early stages of somatic embryo differentiation from callus cells of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in liquid medium. Journal of Physiology 117: 97-103.

McClean, P. and Grafton, K. F. (1989) Regeneration of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. Plant Science 60: 117-122.

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

Pelcher, L. E., Gamburg, O. L. and Kao, K. N. (1974) Bean mesophyll protoplast: production, culture and callus formation. Plant Science Letters 3: 107-111.

Polhill, R. M. (1994) Classification of the Leguminosae. In: Phytocemical Dictionary of the Leguminosae (eds. Bisby, F. A., Buckingham, J. and Harborne, J. B.) 16-35. Chapman and Hall, London.

Saam, M. M., Hosfield, G. L. and Saunders, J. W. (1987) *In vitro* propagation of dry bean from seedling shoot tips. American Society for Horticultural Science 112: 852-855.

Saunders, J. W., Hosfield, G. L. and Levi, A. (1987) Morphogenetic effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaf explants in vitro. Plant Cell Reports 6: 46-49.

Varisia, M. S., Sung, J. M., Jeng, T. L. and Wang, C. S. (2006) Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6-benzylaminopurine and thidiazuron. Plant Cell Tissue and Organ Culture 2: 187-199.

Veltecheva, M., Svetleva, D., Pet kova, S. P. and Perl, A. (2005) *In vitro* regeneration and genetic transformation of common bean. Scientia Horticulturae 107: 2-10.

Westhuizen,V. A., Groenewald, E. G. and Westhuizen, A. J. (1990) Root formation and attempts to establish morphogenesis callus tissues of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). South African Journal of Botany 56: 271-273.

Zambre, M., Geerts, P., Maquet, A., Van Montagu, M., Dellen, W. and Angenon, G. (2001) Regeneration of fertile plants from callus in *Phaseolus polyanthus* greenman (Year bean). Annals of Botany 88: 371-377.

Zambre, M. A., De Clercq, J., Varanova, E., Van Montagu, M., Angenon, G. and Dillen, W. (1998) Plant regeneration from embryo-derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P.acutifolius* A. Gray (tepary bean). Plant Cell Reports 17: 626-630.

Optimization of conditions suitable for bean (*Phaseolus vulgaris* L.) regeneration

Mahnaz Karami, Mohammad Bagher Bagherieh-Najjar [1]* and Mahnaz Aghdasi

Department of Biology, Faculty of Sciences, Golestan University, Gorgan, Iran

Abstract

Common bean belongs to *Fabaceae* and the subfamily of Lotoideae. It is the most important species of the grain family with noticeable economic importance in human's nutrition. Regeneration from tissue culture is one of the most suitable and effective procedures for preservation and reproduction of the plants. In this investigation, induction of callus, shoot and root has been studied in common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Goli) under different concentrations of α-Naphthaleneacetic acid and Benzyl amino purine. First, the seeds were surface sterilized and transferred to suitable medium to achieve sterile seedlings. After 10 days, explants (hypocotyl, root and leaf) from sterile seedlings were tested in 25 various hormone treatments. For induction of organogenesis, explants were transferred to solid Morashige and Skoog medium supplemented with 30 g/lit sucrose, B5 vitamins and different concentrations of α-Naphthaleneacetic acid (0, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 mg/lit) and Benzyl amino purine (0, 0.5, 1, 2 and 4 mg/lit). Our data showed callus induction achieved in combination of two hormons: (0.4 mg/lit α-Naphthaleneacetic acid and 2 mg/lit Benzyl amino purine). Induction of shoot increased with increasing concentrations of Benzyl amino purine to 2 mg/lit and then decreased. Induction of roots increased with increasing α-Naphthaleneacetic acid concentrations. Furthermore, the level of internal auxin in common bean was high because the explants rooted in the minimum concentration of α-Naphthaleneacetic acid. Subsequently, complete seedlings were transferred to the soil for further investigations.

Key words: α-Naphthaleneacetic acid, Benzyl amino purine, Tissue culture, *Phaseolus vulgaris*

* Corresponding Author: mb.bagherieh@gu.ac.ir