دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

تأثیر امواج فراصوت بر باززایی ساقه‌های چندگانه از نوک ساقه اسپرس (*Onobrychis sativa*)

لیلی هنرمند[۱]، ناصر زارع[۲]، رسول اصغری زکریا[۳]، پریسا شیخ‌زاده مصدق[۴] و علی‌اصغر عسکری[۱]

۱، ۳ و ۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد و استادیار، دانشگاه محقق اردبیلی
۲- دانشیار، دانشگاه محقق اردبیلی، (نویسنده مسوول: zarenasser@yahoo.com)
تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۲۴

چکیده

امواج فراصوت دارای کابردهای متعددی در صنعت، پزشکی و فناوری زیستی است. امواج فراصوت کم انرژی، نفوذپذیری غشای سلولی را افزایش داده و منجر به اثرات بیولوژیکی متعددی در سلول‌های گیاهی می‌شود. این تحقیق با هدف بررسی تأثیر تیمار امواج فراصوت بر زنده‌مانی و رشد ریزنمونه‌های نوک ساقه گیاه اسپرس انجام گرفت. برای این منظور، ریز نمونه‌های نوک ساقه تحت تأثیر تیمار امواج فراصوت (فرکانس ۳۷ کیلوهرتز) با زمان‌های صفر (شاهد)، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰ و ۳۰۰ ثانیه در حمام اولتراسونیک قرار گرفته و سپس روی محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP کشت گردیدند. نتایج نشان داد که درصد ساقه‌دهی ریزنمونه‌ها به‌طور معنی‌داری در اثر تیمار امواج فراصوت کاهش یافته ولی درصد ساقه‌های چندگانه، تعداد ساقه در هر ریزنمونه و درصد کالوس‌زایی به طور معنی‌داری افزایش یافته است. تیمار شاهد (بدون امواج فراصوت) بیشترین درصد ساقه‌دهی به همراه پایین‌ترین میزان کالوس‌زایی و شیشه‌ای شدن را نشان داد. بیشترین درصد کالوس‌زایی (۶۰/۹۸٪ و ۶۱/۱۱٪) در دوره‌های زمانی بالاتر (۱۸۰ و ۲۴۰ ثانیه) امواج فراصوت مشاهده گردید. بیشترین درصد ساقه‌های چندگانه، تعداد ساقه در هر ریز نمونه و درصد ریز نمونه‌های شیشه‌ای شده در تیمار ۳۰ ثانیه امواج فراصوت بدست آمد. افزایش دوره‌های زمانی تیمار با امواج فراصوت باعث کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌ها و بافت‌های گیاهی و در نتیجه کاهش ساقه‌دهی ریزنمونه‌ها گردید.

واژه‌های کلیدی: اسپرس، امواج فراصوت، باززایی، کشت درون شیشه‌ای

مقدمه

اسپرس گیاهی از خانواده Fabaceae، جنس *Onobrychis*، چندساله، اتوتتراپلوییید و ضد نفخ است. مرکز تنوع آن در شرق مدیترانه و آسیای شرقی است. در ایران حداقل ۶۰ گونه از این گیاه یافت می‌شود (۳۴). اسپرس با ریشه عمیق به خوبی با خاک‌های فقیر و مناطق خشک سازگار می‌گردد و در برابر سرما و زمستان سخت، مقاومت بالایی دارد (۳۱). ارزش غذایی آن بسیار بالا بوده و در مقایسه با یونجه دارای الیاف کمتری می‌باشد (۳۴). علوفه اسپرس نسبت به یونجه بسیار خوش خوراک و مغذی بوده و قابلیت هضم بیشتری برای دام دارد و به بسیاری از آفات یونجه مقاوم است (۲۶،۴). سوارز و همکاران (۳۶)، اسپرس را به عنوان گیاهی بیابانی، مقاوم به خشکی و شوری، پر محصول و با ارزش علوفه‌ای در حد یونجه و مناسب برای اکوسیستم‌های خشک و بیابانی معرفی کرده‌اند. افزایش کیفیت تغذیه‌ای و افزایش عملکرد از طریق ایجاد گیاهان مقاوم به علف‌کش، آفات و بیماری‌ها در جهت پاسخ به نیازهای روزافزون جمعیت بشری به پروتئین‌های حیوانی از اهداف مهم زیست‌فناوری گیاهان علوفه‌ای محسوب می‌شود (۱۳،۲۰). بکارگیری مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری مؤثرترین راهبردها برای تأمین غذای نسل در حال رشد را فراهم می‌کند. با کاربرد ابزارهای زیست فناوری، به نحو سریع‌تری می‌توان به اهداف اصلاحی برای فائق آمدن بر نارسایی‌های اسپرس زراعی، افزایش مقاومت آن به تنش‌های محیطی و بیماری‌ها و افزایش عملکرد کمی و کیفی دست یافت (۴۱،۱۲). امواج فراصوت محدوده‌ای از امواج می‌باشند که از طیف شنوایی انسان خارج هستند و یک فناوری غیرحرارتی، محرکی فیزیکی و منبع انرژی ایمن و بی‌خطر محسوب می‌شوند (۷). امواج فراصوت کاربردهای فراوانی در کشاورزی دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به ارزیابی کیفیت محصولات زراعی، تیماردهی بذور گیاهان برای کاهش فاصله رشدی، کاهش و حذف آفات و بیماری‌ها و استفاده از آن در مهندسی ژنتیک و انتقال ژن اشاره کرد (۲). توانایی امواج فراصوت برای بارگذاری سلول‌ها با مولکول‌های بزرگ، انتقال DNA و بیان محصول ژن خارجی در شرایط درون شیشه‌ای و زنده (*In vivo*)، آن را به یک ابزار قدرتمند در علوم گیاهی تبدیل کرده (۱۹،۲۹) و به طور گسترده برای انتقال ژن در سلول‌ها یا بافت‌های حیوانی و گیاهی استفاده می‌شود. ساز و کار تأثیر امواج فراصوت در اثر جذب انرژی در بافت است که در اثر آن ذرات حول موقعیت تقریبی خود دچار نوسان می‌شوند. این نوسان یا انرژی صوتی به انرژی گرمایی تبدیل شده که میزان آن با شدت امواج فراصوت متناسب است. اگر تمام این گرما به وسیله عوامل فیزیولوژیکی طبیعی جابجا نشود، گرمای موضعی افزایش می‌یابد و اثرات گرمایی در بافت ظاهر می‌شود. افزایش دما نمی‌تواند اثر امواج فراصوت در زیست‌فناوری باشد اما بخش مهمی از آن را توجیه می‌کند. اگر مقدار گرمای جابجا شده برابر گرمای تولید شده باشد، هیچ حرارتی در بافت ایجاد نشده و اثر ظاهر شده در بافت مربوط به اثرات غیرحرارتی امواج است. اثرات غیرحرارتی با استفاده از شدت‌های کم و یا منقطع کردن خروجی امواج فراصوت

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]
[DOI: 10.29252/jcb.9.22.73]

بدست می‌آید. اثر غیرحرارتی مکانیسم مهم دناتوره شدن آنزیم‌ها است (۲۵). بزرگترین اثر غیرحرارتی تولید شده توسط امواج فراصوت، پدیده ایجاد حفره‌های صوتی (کاویتیشن[1]) می‌باشد (۸). حفره‌های صوتی به صورت‌های پایدار و ناپایدار اتفاق می‌افتند (۲۵). کاویتیشن ناشی از امواج فراصوت، نیروی برشی ایجاد می‌کند که منجر به نرم شدن دیواره سلولی و ایجاد منافذی در آن شده و انتقال مواد به داخل سلول را بهبود می‌بخشد. به طور کلی، تغییر در خواص مکانیکی می‌تواند ناشی از تشکیل حباب‌های بسیار ریزی باشد که تحت اثر انقباض و انبساط، به صورت لحظه‌ای و نقطه‌ای حرارت و فشار فوق‌العاده زیاد در محیط مایع ایجاد می‌شوند (۱۵). بسامد و میزان انرژی مورد نیاز برای تأثیر تیمار امواج فراصوت بین گونه‌ها و ارقام مختلف متفاوت است. به‌طوری‌که ممکن است انرژی امواج فراصوت، رشد بعضی گونه‌ها را افزایش و برخی را کاهش دهد. برای مثال تیمار امواج فراصوت، باززایی ریزنمونه‌ها را کاهش داده است (۱). تیمار از طریق امواج فراصوت، کارایی تراریختی را بهبود می‌بخشد و حضور حباب‌های ریز داخل سلول‌ها، فراوانی تراریختی را افزایش می‌دهد. استفاده از امواج فراصوت برای زخم‌زنی و آماده‌سازی بافت مورد نظر جهت افزایش تراریختی با آگروباکتریوم تومه *فشینس* نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۴۶،۲۲). انتقال DNA با استفاده از تیمار اولتراسونیک در مقایسه با بمباران ذره‌ای، الکتروپوریشن، ریزتزریقی و سایر روش‌ها می‌تواند به آسانی انجام گیرد. تیمار با امواج فراصوت اگرچه ممکن است سلول‌ها را زخمی یا پاره کند ولی با این حال، نفوذپذیری کوتاه و موقتی را در دیواره‌ی سلولی و غشای پلاسمایی ایجاد کرده و جذب مواد را تسهیل می‌کند (۲۵،۲۳). فرایند جذب بدون آسیب جدی در سلول‌ها به فرکانس و طول مدت تیمار با امواج فراصوت وابسته است (۱۹،۶). امواج فراصوت به طور معنی‌داری روی سنتز پروتئین در سلول‌ها و پروتوپلاست‌های گیاهی و نفوذپذیری غشای سلولی (۲۱،۹) تأثیرگذار است. تیمار امواج فراصوت در گیاهان میزان جوانه‌زنی بذور و رشد گیاهچه را افزایش می‌دهد. دوزهای پایین آن، باعث آسیب پوسته بذر گیاه *Orchis papilionacea* شده و جوانه‌زنی درون شیشه‌ای و تولید مینی‌تیوبر این گیاه را افزایش داده است (۳۰). یکی از عوامل مؤثر در باززایی بالای گیاهی، انتخاب ریزنمونه مناسب است (۳۳). بعضی ریزنمونه‌ها مانند محور زیرلپه (۱۰) و لپه (۴۳) کارایی باززایی پایین و وابسته به ژنوتیپ دارند، اما نوک ساقه[2] یک ساختار میکروسکوپی است که در جوانه‌ی انتهایی احاطه شده و تمام مجموعه ساقه، برگ‌ها و گل‌ها را تولید می‌کند (۴۰). در شرایط درون شیشه‌ای توانایی رشد سریع، مستقل از ژنوتیپ و نگهداری به مدت طولانی داشته و به همین دلیل یک ریزنمونه‌ی مناسب برای دستکاری ژنتیکی محسوب می‌گردد (۴۰،۴۴،۴۵). نوک ساقه شامل مریستم انتهایی ساقه (SAM[3]) است که بافت‌های مریستمی را تولید می‌نماید و اندام‌های هوایی از جمله ساقه از آن رشد می‌کنند (۳۹).

در طی آزمایشات مربوط به بهبود کارایی تراریختی مشخص شده است که مدت زمان و شدت امواج فراصوت در این امر نقش کلیدی را دارند که در تحقیقات لیو و همکاران (۲۵) نیز گزارش گردیده است. بر اساس اطلاعات ما، تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی کشت بافت گیاه اسپرس به همراه امواج فراصوت به‌عنوان یک فناوری فیزیکی محرک انجام نشده است. بنابراین، آزمایش حاضر با هدف بهینه‌سازی مدت زمان اعمال تیمار امواج فراصوت در جهت حداقل آسیب به سلول‌ها از نظر رشد ریزنمونه‌های نوک ساقه و تولید ساقه‌های چندگانه گیاه اسپرس به همراه حداقل میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها انجام گرفت تا نتایج آن در آزمایشات آتی مربوط به تراریختی اسپرس مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

۱- غلاف‌زدایی و ضدعفونی بذور

در این تحقیق بذور اسپرس (*Onobrychis sativa*) واریته خوانسار در دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۹۱ مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به این‌که غلاف بذر باعث افزایش آلودگی بذور جوانه‌زده، کاهش درصد جوانه زنی و افزایش دوره زمان جوانه‌زنی می‌گردد، برای بالا بردن پتانسیل جوانه‌زنی، غلاف به روش مکانیکی از بذر جدا گردید. به منظور ضدعفونی بذور، غلظت‌های مختلفی از محلول هیپوکلریت سدیم مورد استفاده قرار گرفت. غلظت ۲/۵٪ هیپوکلریت سدیم با بیشترین درصد جوانه‌زنی بدون هیچ گونه آلودگی برای مرحله‌ی جوانه‌زنی انتخاب شد. ضدعفونی سطحی به صورت زیر انجام گرفت: بذور ۴۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ غوطه‌ور شده و سپس، به مدت ۱۲ دقیقه با محلول ۲/۵٪ هیپوکلریت سدیم تیمار شدند. سپس، بذور سه بار با آب مقطر اتوکلاو شده آبکشی گردیدند. جوانه‌زنی بذور روی کاغذ صافی مرطوب ضدعفونی شده داخل پتری‌دیش انجام گرفت. بذور مابین کاغذ صافی به مدت ۶۰ تا ۷۲ ساعت در تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از جوانه‌زنی به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند.

۲- تهیه‌ی ریزنمونه و تیمار با امواج فراصوت

بذور جوانه‌زده ۴ تا ۶ روزه برای تهیه ریزنمونه نوک ساقه مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور، پوسته‌ی بذر و لپه‌ها در شرایط استریل حذف شده و نوک ساقه جدا گردید. به منظور بررسی تأثیر امواج فراصوت برای باززایی ریزنمونه‌های نوک ساقه، ریزنمونه‌ها در فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت MS با ۲۱٪ ساکارز (۲۱) غوطه‌ور شده و با امواج فراصوت (فرکانس ۳۷ کیلوهرتز) در حمام اولتراسونیک (Sonirex Digitec, Binder, Germany) با دوره‌های زمانی ۲۰، ۳۰، ۴۰،۵۰ ۶۰ و ۹۰ ثانیه و ۲، ۳، ۴ و ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. سپس، ریزنمونه‌ها روی محیط کشت بهینه برای رشد نوک ساقه‌های اسپرس (محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP) کشت شدند (۱۷). از ریزنمونه‌های تیمار نشده با امواج فراصوت به عنوان شاهد استفاده شد. برای هر تیمار حداقل ۱۰ ریزنمونه با سه تکرار در نظر گرفته شد. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی

1- Cavitation
2- Shoot apex
3- Shoot Apical Meristem

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]
[DOI: 10.29252/jcb.9.22.73]

زیر نور فلورسنت (شدت نور ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس) و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. درصد کالوس‌زایی، درصد ساقه‌دهی، درصد ریزنمونه‌های با ساقه‌ی چندگانه، تعداد ساقه در هر ریزنمونه و درصد ریزنمونه‌های شیشه‌ای شده در بازه‌ی زمانی ۳۰ الی ۴۰ روز پس از کشت یادداشت شدند.

۳- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و حداقل ۱۰ ریزنمونه در هر تکرار انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (Ver 9.1) و نرمال بودن آن‌ها با SPSS (Ver 16) صورت گرفت. با توجه به بالا بودن نسبی ضریب تغییرات، تبدیل داده به روش جذر و arctan داده‌ها انجام گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

نتایج و بحث

۱- کالوس‌زایی

برخی از ریزنمونه‌ها ۴ تا ۷ روز پس از کشت روی محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در ناحیه برش کالوس تولید کردند (شکل ۱- الف، ب و ج). بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، بین دوره‌های زمانی مورد استفاده در تیمار امواج فراصوت از نظر درصد کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱).



شکل ۱- تأثیر تیمار امواج فراصوت بر کشت درون شیشه‌ای نوک ساقه اسپرس، الف: عدم تولید کالوس در ریزنمونه شاهد (بدون امواج فراصوت)، ب و ج: تولید کالوس در ریزنمونه‌های تیمار شده با ۶۰ و ۹۰ ثانیه امواج فراصوت، د: قهوه‌ای شدن، شیشه‌ای شدن و از بین رفتن نوک ساقه در تیمار ۱۲۰ ثانیه امواج فراصوت، ه: رشد ریزنمونه‌ها در تیمار ۳۰ ثانیه امواج فراصوت، و ز: ساقه‌های چندگانه رشد کرده در تیمارهای ۲۰ و ۳۰ ثانیه امواج فراصوت، ح: شیشه‌ای شدن برخی از ریزنمونه و ساقه‌ها (که در اغلب تیمارهای حاوی امواج فراصوت مشاهده گردید.)

Figure 1. The effects of ultrasound on *in vitro* culture of sainfoin shoot apex. A: No callus formation in control example (without ultrasound treatment), B and C: Callus formation in 60 and 90 seconds of ultrasound treatments, D: Browning, glassiness and dying of shoot apexes in 120 seconds of ultrasound treatment, E: Growth of explants in 30 seconds ultrasound treatment; F and G: Multiple shoots produced in 20 and 30 seconds of ultrasound treatments, H: Explants and shoot glassiness which was observed in the most treatments containing ultrasound.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.73]

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر امواج فراصوت بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های نوک ساقه اسپرس
Table 1. Vvariance analysis of the effect of ultrasound on callus induction from sainfoin shoot apex explants

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
		درصد کالوس‌زایی
مدت زمان اعمال امواج فراصوت	۱۰	۴/۸۸*
خطا	۲۲	۱/۶۰
ضریب تغییرات (درصد)		۲۰/۴۲

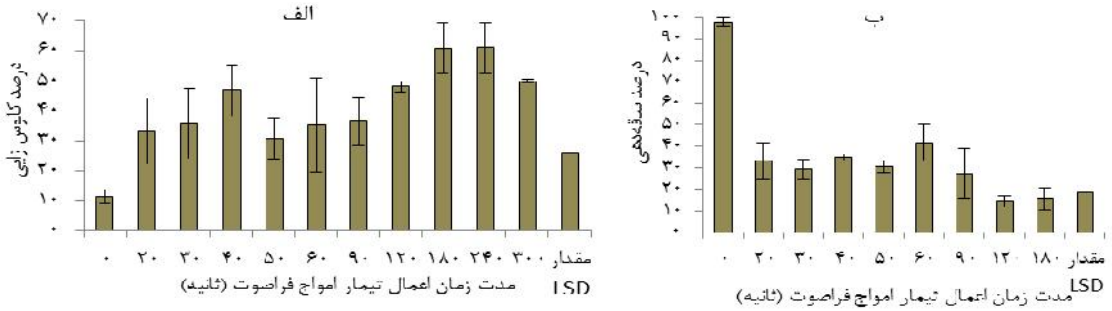
* : معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد را نشان می‌دهد.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر امواج فراصوت بر رشد درون شیشه‌ای نوک ساقه اسپرس
Table 2. Vvariance analysis of the effect of ultrasound on in vitro growth of sainfoin shoot apex explants

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		درصد ساقه‌دهی	درصد ساقه‌های چندگانه	تعداد ساقه در هر ریزنمونه	درصد ریزنمونه‌های شیشه‌ای شده
مدت زمان اعمال امواج فراصوت	۸	۰/۰۰۱۵*	۰/۷۸**	۰/۰۹**	۱۸/۳۳**
خطا	۱۸	۰/۰۰۰۴	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۵۴
ضریب تغییرات (درصد)		۱/۳۱	۱۷/۵۷	۱۴/۳۹	۱۰/۳۳

* و **: به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد را نشان می‌دهد.

همان‌طوری‌که در شکل ۲ دیده می‌شود، با افزایش مدت زمان اعمال تیمار امواج فراصوت درصد کالوس‌زایی نیز افزایش یافته است که می‌تواند به زخمی شدن بافت گیاهی در اثر امواج فراصوت نسبت داده شود. چرا که دوزهای بالای امواج فراصوت باعث بزرگتر و بیشتر شدن زخم‌های کوچک گردیده (۳۲) و ریزنمونه‌ها کالوس بیشتری تولید کردند. بیشترین میزان کالوس‌زایی در دوره‌های زمانی بالاتر (۳ و ۴ دقیقه) به ترتیب با میانگین ۶۰/۹۸٪ و ۶۱/۱۱٪ و کمترین میزان در تیمار شاهد (بدون امواج فراصوت) مشاهده گردید (شکل ۱- الف، ب و ج و شکل ۲- الف). در تیمارهای بالاتر از ۴ دقیقه، درصد کالوس‌زایی کاهش نشان داده است و همان طوری‌که در شکل ۱- د دیده می‌شود، تعداد زیادی از ریزنمونه‌ها قبل از رسیدن به مرحله تولید کالوس در اثر آسیب‌های ناشی از دوز بالای امواج فراصوت از بین رفتند. به طور کلی، تیمار امواج فراصوت باعث افزایش تدریجی کالوس‌زایی ریزنمونه‌های نوک ساقه شده ولی در دوزهای بالا (بیشتر از ۴ دقیقه) دوباره از میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها کاسته شده است. تشکیل کالوس در بافت‌های در حال تکثیر در انتهای برش داده شده ریزنمونه‌ها می‌تواند به دلیل تجمع اکسین‌ها در سلول‌های در حال تکثیر باشد، خصوصاً هنگامی که در ترکیب با سایتوکینین‌ها استفاده شوند (۲۷). از آنجایی که تا به حال تحقیقی در رابطه با تأثیر امواج فراصوت بر کالوس‌زایی اسپرس انجام نگرفته است، بنابراین، هیچ گزارش تجربی برای این امر وجود ندارد. ولی بر اساس مطالعه لیو و همکاران (۲۵) روی انتقال ژن به لپه‌های نابالغ گیاه سویا و اسکن میکروسکوپ الکترونی (SEM)، شکل‌گیری تعداد زیادی از زخم‌های کوچک روی بافت گیاهی گزارش شده است. در حالی‌که سطح بافت‌های تیمار نشده صاف و دست نخورده باقی مانده بود. اندازه‌ی این منافذ با طولانی شدن زمان تیمار از کمتر از یک میکرومتر تا یک میلی‌متر تغییر یافت (۳۲). تیمارهای طولانی مدت با امواج فراصوت می‌تواند برای ریزنمونه‌ها کشنده باشد (۲۷). علاوه‌براین، در گیاهان انتقال و تجمع هورمون‌ها در سلول‌های بافت‌های زخمی افزایش یافته و ترمیم آن را تسریع و تسهیل می‌کنند. به نظر می‌رسد که ایجاد زخم در سلول‌ها در اثر امواج فراصوت نیز باعث هدایت هورمون‌های داخلی (به ویژه اکسین‌ها) بافت ریزنمونه به سمت این سلول‌ها شده و میزان کالوس‌زایی را افزایش داده است (۳۸).



شکل ۲- تأثیر تیمار امواج فراصوت بر درصد کالوس‌زایی (الف) و ساقه‌دهی (ب) ریزنمونه نوک ساقه گیاه اسپرس. ستون مربوط به LSD نشان‌دهنده مقدار LSD در سطح احتمال ۵٪ است.
Figure 2. The effect of ultrasound on callus induction (A) and shooting (B) from sainfoin shoot apex explants. The LSD column represents the LSD value at the 5% probability level.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]
[DOI: 10.29252/jcb.9.22.73]

۲- ساقه‌دهی

از آنجایی‌که در زمان‌های ۴ و ۵ دقیقه تیمار امواج فراصوت، تعداد زیادی از ریزنمونه‌ها آسیب دیده و ساقه تولید نکردند، به همین دلیل در بررسی ساقه‌دهی، داده‌های این زمان‌ها وارد نشدند. امواج فراصوت روی درصد ساقه‌دهی، درصد ریزنمونه‌های دارای ساقه‌های چندگانه و تعداد ساقه در هر ریزنمونه تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۲). با اعمال تیمار امواج فراصوت، درصد ساقه‌دهی ریزنمونه‌های نوک ساقه اسپرس به طور معنی‌داری نسبت به عدم اعمال تیمار (شاهد) کاهش یافت (شکل ۱- ه). بیشترین درصد ساقه‌دهی در محیط شاهد با میزان ۹۷/۷۸٪ مشاهده گردید. سپس در تیمار ۲۰ ثانیه امواج فراصوت به شدت کاهش یافته و تا زمان ۶۰ ثانیه نسبتاً ثابت مانده ولی از آن زمان به بعد دوباره درصد ساقه‌دهی روند نزولی پیدا کرد. به طوری‌که در تیمار ۲ دقیقه امواج فراصوت درصد ساقه‌دهی به ۱۴/۵۴٪ رسید (شکل ۲- ب). در صفت درصد ساقه‌های چندگانه نیز، تا زمان ۳۰ ثانیه، درصد ساقه‌های چندگانه به طور تدریجی افزایش یافته، اما بعد از ۳۰ ثانیه این روند به صورت نزولی ادامه یافت (جدول ۳). بیشترین درصد ریزنمونه‌های دارای ساقه‌های چندگانه در مدت زمان ۳۰ ثانیه از امواج فراصوت با میانگین ۳۴/۱۹٪ بدست آمد (شکل ۱-و و ز). در زمان‌های ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثانیه هیچ ریزنمونه‌ای با ساقه چندگانه مشاهده نشد. بیشترین تعداد ساقه در هر ریزنمونه در تیمار ۳۰ ثانیه با میانگین ۳/۵ ساقه در هر ریزنمونه بدست آمد. سایر تیمارها با شاهد (بدون اعمال امواج فراصوت) اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (جدول ۳). در مدت زمان‌های بالای امواج فراصوت، تعداد زیادی از ریزنمونه‌ها یا ساقه‌ها شیشه‌ای شدند که باعث کم یا متوقف شدن رشد ساقه‌ها گردیده و هم‌چنین تعداد زیادی از ریزنمونه‌ها از بین رفتند (شکل ۱- د). در نتیجه امواج فراصوت بر ساقه‌دهی ریزنمونه‌ها تأثیر مثبتی نداشت اما بر تولید ساقه چندگانه و تعداد ساقه در هر ریزنمونه در دوره زمانی ۳۰ ثانیه مؤثر بود. این نتایج نشان می‌دهد که برای باززایی، شدت و مدت زمان امواج فراصوت باید به دقت ارزیابی گردد.

جدول ۳- میانگین رشد و ساقه‌دهی ریزنمونه نوک ساقه گیاه اسپرس تحت تأثیر تیمار امواج فراصوت

Table 3. Average growth and shooting from sainfoin shoot apex explants under ultrasound treatment

مدت زمان اعمال تیمار امواج فراصوت (ثانیه)	ساقه‌های چندگانه (درصد)	تعداد ساقه در هر ریزنمونه	شیشه‌ای شدن (درصد)
۰	۸/۸۹	۱/۰۹	۰
۲۰	۱۲/۵	۱/۸۳	۴۵/۸۳
۳۰	۳۴/۱۹	۳/۵	۷۵/۳۳
۴۰	۱۸/۹۸	۲/۲۲	۵۷/۴۱
۵۰	۱۹/۴۴	۲/۲۲	۶۹/۴۵
۶۰	۲۱/۲۹	۱/۷۸	۵۸/۳۴
۹۰	۰	۱/۴۲	۶۵/۵۶
۱۲۰	۰	۱	۶۸/۰۶
۱۸۰	۰	۱	۶۵/۹۱
LSD	۱۲/۲۷	۱/۲۵	۲۰/۰۷

کاهش رشد و ساقه‌دهی ریزنمونه‌های نوک ساقه اسپرس با افزایش دوزهای زمانی امواج فراصوت می‌تواند ناشی از ایجاد زخم‌های کوچک زیاد روی بافت گیاهی و در نتیجه از بین رفتن ریزنمونه‌ها باشد. آنانتاکریشنان و همکاران (۱) بر اساس عکس‌های SEM بیان کردند که مکانیسم فعالیت امواج فراصوت از طریق سائیدگی کوتیکول است. به طوری‌که در کاهش باززایی و رشد درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های کوتیلدونی کدو یک عامل بازدارنده مثل موم، نقش داشته و خراش سطح بازدارنده باعث تحریک باززایی ساقه می‌شود. بنابراین آسیب سطحی با امواج فراصوت باعث افزایش ورود آب، مواد غذایی و مواد رشدی می‌شود. در دوزهای بالای امواج فراصوت فرسایش بیش از اندازه سطح، باعث ورود بیشتر آب شده و سبب شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها می‌گردد. به طوری‌که گزارش شده تیمارهای کوتاه مدت امواج فراصوت، به بافت گیاهی آسیب سطحی وارد می‌کند (۱۱). افزایش زمان تیمار امواج فراصوت، زخم‌های بزرگتری را تولید کرده (۱۴،۳۲) و باعث مرگ ریزنمونه‌ها می‌شود (۲۸،۳۲). تحقیقات نشان داده است که با افزایش زمان تیمار امواج فراصوت تا ۳۰ ثانیه، توانایی تشکیل جوانه در گیاه لوبیا چشم بلبلی کاهش می‌یابد (۳) و بیانگر این مطلب است که تیمار ریزنمونه‌ها با امواج فراصوت به مدت طولانی، زنده‌مانی سلول‌ها را به خطر می‌اندازد. برنووا و همکاران (۵) نشان دادند که زنده‌مانی ریزنمونه‌های محور زیرلپه در گیاه کتان با افزایش تیمار امواج فراصوت کاهش می‌یابد. علاوه‌براین، دوزهای بالاتر امواج فراصوت از رشد و گسترش گیاهان باززا شده جلوگیری می‌کند. گسترش ساقه در برخی ارقام سویا با امواج فراصوت کاهش نشان داده است (۲۸). از آنجایی‌که سایتوکینین‌ها نقش ویژه‌ای در رشد و گسترش گیاهان بازی می‌کنند (۳۵،۱۸) پس می‌توان به تأثیر امواج فراصوت روی سایتوکینین‌ها نیز اشاره کرد. تیمار گیاهچه‌های بادام زمینی با امواج صوتی کاهش معنی‌دار فعالیت سایتوکینین را در مقایسه با شاهد نشان داده است (۱۶). در این گزارش، تأثیر بازدارندگی افزایش زمان امواج فراصوت به تخریب سایتوکینین‌ها، تأثیر روی بیوسنتز سایتوکینین‌ها یا تبدیل سایتوکینین‌ها به فرم‌های غیرفعال آن‌ها نسبت داده شده است. هم‌چنین دوره زمانی ۱۵ دقیقه امواج فراصوت، محتوای اسید جیبرلیک را افزایش داده و با بالا رفتن زمان (۶۰ دقیقه)، میزان آن کاهش یافته است (۱۶). بر اساس مطالعه

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.73]

کریشنامورتی و همکاران (۲۴)، امواج فراصوت درصد جوانه‌زنی *Vigna sinesis* را به طور معنی‌داری کاهش داد. آن‌ها، این کاهش درصد جوانه‌زنی را به دلیل تنش‌های وارد بر غشای سلولی در اثر امواج فراصوت می‌دانند که پتانسیل اسمزی سلولی را کاهش داده و این امر مستقیماً باعث مرگ سلول گردیده است. برنووا و همکاران (۵) گزارش کردند که تیمار ۱۰ ثانیه‌ای با امواج فراصوت باعث ایجاد حفره‌های ریز روی لپه گیاه کتان می‌شود. در حالی‌که، دوره‌های ۳۰ ثانیه‌ای آسیب جدی به محور زیرلپه وارد می‌کند. زخم‌های کوچک تولید شده توسط امواج فراصوت می‌تواند موانع سطحی بازدارنده باززایی سلول‌های عمیق‌تر در بافت گیاه کدو را مختل کرده یا از بین ببرد (۱). بنابراین دوزهای مناسب امواج فراصوت در برخی از گیاهان تشکیل جوانه و باززایی گیاه را تحریک می‌کند (۱،۵،۱۱). امواج فراصوت هم‌چنین می‌تواند در باززایی گونه‌های ریکال سیترانت مثل لگوم‌ها و کدو برای کشت بافت مورد استفاده قرار گیرند (۳۷). تیمار امواج فراصوت، باززایی ریزنمونه‌های کدو را کاهش داده است. از طرف دیگر، تولید ساقه‌های چندگانه در شرایط درون شیشه‌ای از ریزنمونه‌های کوتیلدونی کدو با تیمار امواج فراصوت به مقدار قابل توجهی افزایش یافته است که بدون این تیمار قادر به ایجاد ساقه چندگانه نبودند (۱). امروزه تیمار امواج فراصوت برای افزایش کارایی تراریختی در گونه‌های مختلف گیاهی با انتقال مستقیم DNA به داخل پروتوپلاست (۲۱،۴۶) و یا روش تراریختی با آگروباکتریوم و امواج فراصوت (SAAT) (۱۴،۴۲،۱۱) به کار گرفته شده است. تراریختی با روش SAAT از طریق زخم‌های کوچکی انجام می‌شود و افزایش دوزهای امواج فراصوت باعث بزرگتر و بیشتر شدن زخم‌های ریز می‌گردد (۱۴،۳۲).

۳- شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و ساقه‌ها

برخی از ریزنمونه‌ها و ساقه‌ها، پس از مدتی شیشه‌ای شده و از رشد مطلوبی برخوردار نبودند (شکل ۱- ح). بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، بین دوره‌های زمانی مختلف تیمار امواج فراصوت از نظر درصد ریزنمونه‌های شیشه‌ای شده تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول ۲). تیمار امواج فراصوت باعث افزایش معنی‌دار شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و ساقه‌های رشد کرده گردید. کمترین میزان شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها با در تیمار شاهد (بدون امواج فراصوت) مشاهده شد، که بیشترین تعداد ریزنمونه باززا شده را داشت. در ۳۰ ثانیه امواج فراصوت با وجود تولید بالای ساقه چندگانه و تعداد ساقه در هر ریزنمونه، بیشترین شیشه‌ای شدگی ریزنمونه‌ها هم اتفاق افتاد (جدول ۳). بر اساس نتایج آنانتاکریشنان و همکاران (۱)، زمان تیمار با امواج فراصوت بر میزان باززایی گیاه کدو تأثیری نداشته است، اما میزان شیشه‌ای شدن به شدت به این عامل بستگی دارد. بر اساس گزارش آن‌ها، تیمار امواج فراصوت (۲ دقیقه)، لایه‌های کوتیکول پوششی ریزنمونه را حذف کرده و تولید ساقه چندگانه را تحریک می‌نماید. بر اساس مشاهدات SEM آسیب زیادی در ناحیه باززا مشاهده نشده است (۱۴،۴۲،۱). افزایش زمان تیمار (۱۰ دقیقه) در ریزنمونه‌های کدو، علاوه‌بر تحریک باززایی ساقه چندگانه، باعث شیشه‌ای شدن می‌گردد که در این تیمار لایه مومی به طور کامل از بین رفته است. درصد بالای شیشه‌ای شدن، باززایی ساقه چندگانه را کاهش می‌دهد (۱). در گیاه کتان نشان داده شده که دوره‌های طولانی مدت امواج فراصوت باعث هیدراتاسیون گیاهان باززا شده و زنده‌مانی بافت را کاهش می‌دهد (۵).

٤- نتیجه‌گیری کلی

تیمار امواج فراصوت در مقایسه با تیمار شاهد تأثیر منفی بر رشد و ساقه‌دهی درون شیشه‌ای گیاه اسپرس داشت. این تیمارها باعث از بین رفتن و افزایش ریزنمونه‌های شیشه‌ای شده گردید. به عبارت دیگر، اگر هدف بررسی رشد درون شیشه‌ای و ریزازدیادی گیاه اسپرس باشد، توصیه می‌شود از ترکیبات هورمونی مختلف برای افزایش میزان باززایی استفاده گردد. چرا که تیمار شاهد با کمترین میزان کالوس‌زایی، بیشترین درصد ساقه‌دهی به همراه پایین‌ترین درصد ریز نمونه‌های شیشه‌ای شده را داشت. استفاده از امواج فراصوت می‌تواند برای تولید کالوس مناسب باشد. با بالا رفتن زمان امواج فراصوت زخم‌های سطحی و عمیق‌تر افزایش یافته و این خود دلیل افزایش کارایی ریزنمونه‌ها در تولید کالوس است. بهترین نتیجه از لحاظ تولید بیشترین درصد ساقه‌های چندگانه و تعداد ساقه در هر ریزنمونه در تیمار ۳۰ ثانیه امواج فراصوت بدست آمد. از طرف دیگر، زخم‌زنی ریزنمونه‌ها باعث افزایش هیدراتاسیون گیاه نسبت به تیمار بدون امواج فراصوت شد. بنابراین، بهتر است زمان‌های پایین‌تر از ۲۰ ثانیه امواج فراصوت نیز آزمایش شود که می‌تواند درصد ساقه‌دهی را تحت تأثیر قرار دهد. امواج فراصوت به‌عنوان یک روش مکانیکی با ایجاد زخم‌هایی کوچک در بافت گیاهی می‌تواند کارایی انتقال ژن به گیاه به ویژه با استفاده از نوک ساقه را افزایش دهد. بنابراین علی‌رغم کاهش درصد ساقه‌دهی با توجه به این‌که درصد ریزنمونه‌های حاوی ساقه چندگانه در اثر امواج فراصوت افزایش یافته است، استفاده از زمان‌های پایین (تا ۳۰ ثانیه) امواج فراصوت می‌تواند به منظور بهبود تراریختی ریزنمونه‌های نوک ساقه اسپرس مورد آزمون قرار گیرد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.73]

منابع

1. Ananthakrishnan, G., X. Xiaodi, S. Amutha, S. Singer, M. Muruganantham, S. Yablonsky, E. Fischer and V. Gaba. 2007. Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants. Plant Cell Reports, 26: 267-276.
2. Ansory, A., H. Shahgoly, M. Gholipour and A.R. Fallah. 2013. The effect of ultrasound and growth promoting bacteria on germination and growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Soil Biology, 2: 123-132.
3. Bakshi, S., A. Ayan Sadhukhan, S. Mishra and L. Lingaraj Sahoo. 2011. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of cowpea via sonication and vacuum infiltration. Plant Cell Reports, 30: 2281-2292.
4. Behroz, P., S. Aharizad, S.A. Mohamadi, F. Normal Moayed and P. Hazegh Jafari. 2010. Investigation of genetic diversity in sainfoin ecotypes based on important characteristics using multivariate statistical analysis. Journal of Crop Breeding, 2(6): 53-66. (In Persian)
5. Beranova, M., S. Rakousky, Z. Vavrova and T. Skalicky. 2008. Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linux usitatissimum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 94: 253-259.
6. Choudgary, M.L. and C.K. Chin. 1995. Ultrasound mediated delivery of compounds into petunia protoplasts and cells. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 4: 37-9.
7. DiCosmo, F and M. Misawa. 1985. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. Trends in Biotechnology, 3: 318-322.
8. Doktycz, S.J. and K.S. Suslick. 1990. Interparticle collisions driven by ultrasound. Science, 247: 1067-1069.
9. Dong, L., W. Yong, L. Lin and J. Wu. 2002. Enhancement of shikonin production in single and two phase suspension cultures of *Lithos permum erythrorhizon* cells using low energy ultrasound. Biotechnology and Bioengineering, 78: 81-88.
10. Firoozabady, E. and D.L. DeBoer. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 29: 166-173.
11. Gaba, V., K. Kathiravan, S. Amutha, S. Singer, X. Xiaodi and G. Ananthakrishnan. 2006. The uses of ultrasound in plant tissue culture. In: Dutta, G.S. and Y. Ibaraki (eds.) Focus on biotechnology, 417-426.
12. Ghanavati, F., H. Eskandari, G. Bakhshi Khaniki, B. Sorkhi and H. Amirabadizadeh. 2010. Karyotypic study of sect. Hymenobrychis of Onobrychis in Iran. Seed and Plant Improvement Journal, 26: 545-560 (In Persian).
13. Gould, J. and M. Magallanes-Cedeno. 1998. Adaptation of cotton shoots apex culture to *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Molecular Biology Reporter, 16: 1-10.
14. Harold, N., H.N. Trick and J.J. Finer. 1997. sonicated-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. Transgenic Research, 6: 329-336.
15. Hedayati, K., B. Emadi, M. Khojastehpour and S.h. Beiraghi-Toosi. 2013. The effect of ultrasonic waves on sugar extraction and mechanical properties of sugar beet. Journal of Agricultural Machinery, 2: 144-153.
16. Hegazy, H.S., S.M. Ghazi and H.E. Daif. 2002. Studies of the effect of ultrasonic waves on: Iv-germination, growth regulator and nucleic acid contents of plant seedling. Journal of King Abdulaziz University - Science, 14: 25-38.
17. Honarmand, L., N. Zare, R. Zakaria-Asghari and P. Sheikhzadeh-Mosadegh. 2016. In vitro regeneration of sainfoin (*Onobrychis sativa*) via shoot apex explant. Iranian Journal of Filed Crop Science, 47: 315-328 (In Persian).
18. Horgan, R. 1984. Cytokinins. In: wilkins, M.b. (eds) In advanced plant physiology. Pitman, London, 90-116 pp.
19. Huber, P.E.P. and P. Fisterer. 2000. *In vitro* and *in vivo* transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound. Gene Therapy, 7: 1516-1525.
20. Jafarimanesh, M.A. 2009. Gene transfer techniques in genetic engineering and production of transgenic plants. Regional Food and Biotechnology Conference, 13- 14 pp.
21. Joersbo, M. and J. Brunstedt. 1990. Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication. Plant Cell Reports, 9: 207-210.
22. Joersbo, M. and J. Brunstedt. 1992. Sonication: a new method for gene transfer to plants. Physiologia Plantarum, 85: 230-234.
23. Koohi L., N. Zare, A. Amani and P. SheikhZadeh-Mosaddegh. 2016. The effect of ultrasound on viability of tobacco cells. Journal of Plant researches (Iranian Journal of Biology), 29(2): 441-451 (In Persian).
24. Krishnamurty, E., A. Satyavati and V. Vidyavati. 1980. Effect of ultrasonic irradiation on *Vigna sinensis* (L) (*Papilionaceae*). Journal of Pure and Applied Ultrasonics, 2: 56-58.
25. Liu, Y., H. Yang and A. Sakanishi. 2005. Ultrasound: Mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. Biotechnology Advances, 16 pp.
26. Majidi, M.M. and A. Arzani. 2004. Study of induced mutation via Ethy l- Methan Sulfonat (EMS) in Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Journal of Agricultural Science and Technology, 18: 167-180 (In Persian).
27. Marks, T.R. and S.E. Simpson. 1994. Factors affecting shoot development in apically dominant Acer cultivars *in vitro*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 69: 543-552.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.73]

28. Meurer, C.A., R.D. Dinkins and G.B. Collins. 1998. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. Plant Cell Reports, 18: 180-186.
29. Miller, D.L., S. Bao, R.A. Gies and B.D. Thrall. 1999. Ultrasonic enhancement of gene transfection in murine melanoma tumors. Ultrasound in Medicine and Biology, 25: 1425-1430.
30. Pedroso, M.C. and M.C. Pais. 1992. Minituber production from immature seed suspension culture of *Orchis papilionacea*. *In vitro* Cellular Developmental Biology-Plant, 28: 183-186.
31. Saglam, S. 2010. Growth regulators effects on *In vitro* shoot regeneration of sainfoin (*Onobrychis sativa* Lam.). Biotechnology and Biotechnological Equipment, 24: 2077-2079.
32. Santarem, E.R., H.N. Trick, J.S. Essig and J.J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. Plant Cell Reports, 17: 752-759.
33. Sefidkon, F. and M. Najafpour Navaii. 2001. Chemical Composition of the oil of *Prangos uloptera* DC. Journal of Essential Oil Research, 13: 84-85.
34. Seyed-Sharify, R. and S. Hokmalipour. 2010. Forage crops. Amidi publications, pp: 87-95.
35. Shoog, F. and R.Y. Schmitz. 1979. Biochemistry and physiology in cytokinins. In: Litwak, G. (eds.) Biochemical actions in hormones, pp: 315-413.
36. Soares, M.I.M., S. Kakhimov and Z. Shakirov. 2000. Productivity of the desert legume" *Onobrychis*". Dryland Biotechnoloies, 6 pp.
37. Somers, P.A., D.A. Samac and P.M. Olhoft. 2003. Recent advances in legume transformation. Plant Physiology, 131: 892-899.
38. Srivastava, L.M. 2002. Plant Growth and Development: Hormones and Environment. Academic Press, Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, 772 pp.
39. Steeves, T.A. and I.M. Sussex. 1989. Patterns in Plant Development. Cambridge, Cambridge University Press, 388 pp.
40. Sticklen, M. and H.F. Oraby. 2005. Shoot apical meristem: A sustainable explants for genetic transformation of cereal crops. *In vitro* Cellular Developmental Biology-Plant, 41: 187-200.
41. Tohidfar, M., N. Zare, G. Jouzani, S. Eftekhari. 2013. Agrobacterium-mediated transformation of alfalfa (*Medicago sativa*) using a synthetic cry3a gene to enhance resistance against alfalfa weevil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 113: 227-235.
42. Trick, H.N. and J.J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.) Merrill embryogenic suspension culture tissue. Plant Cell Reports, 17: 482-488.
43. Umbeck, P., W. Swain and N.S. Yang. 1989. Inheritance and expression of genes for kanamycin and chloramphenicol resistance in transgenic cotton plants. Crop Science, 29: 196-201.
44. Zapata, C., S.H. Park, K.M. El-Zik and R.H. Smith. 1999. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex. Theoretical and Applied Genetics, 98: 252-256.
45. Zamanifar, M., F. Nazarian and A. Ismaili. 2016. Comparative study of two different cytokinins on direct regeneration of different sugar beet explants in tissue culture condition. Journal of Crop Breeding, 8(19): 203-208 (In Persian).
46. Zhang, L.J., L.M. Cheng, N. Xu, N.M. Zhao, C.G. Li, Y. Jing and S.R. Jia. 1991. Efficient transformation of tobacco by ultrasonication. Biology and Technology, 9: 996-997.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.73]

The Effects of Ultrasound on Multiple Shoot Regeneration from Sainfoin (*Onobrychis sativa*) Shoot Apex

Leyli Honarmand[1], Nasser Zare[2], Rasool Asghari-Zakaria[3], Parisa Sheikhzade Mosadegh[4] and Ali Asghar Askari[1]

1, 3 and 4- Graduated M.Sc., Professor and Assistant Professor, University of Mohaghegh Ardabili
2- Associate Professor, University of Mohaghegh Ardabili, (Corresponding author: zarenasser@yahoo.com)
Received: October 19, 2015 Accepted: April 12, 2016

Abstract

Ultrasound has multiple industrial, medical and biotechnological applications. Ultrasound increases membrane permeability and causes several biological effects in plant cells. In this research, the effects of ultrasound on survival and growth of the sainfoin shoot apex explants were investigated. For this, shoot apex explants were exposed to ultrasonic waves (Frequency 37 kHz) for 0, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180, 240 and 300 seconds in a ultrasonic bath and then cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/l IBA and 3 mg/l BAP. Results showed that the percentage of shooting (explants with shoot growth) significantly reduced by ultrasound treatment, but percentage of multiple shoots, number of shoots per explants and percentage of callusing significantly increased. Control treatment (without ultrasound) showed the highest percentage of shooting with the lowest callus induction and percentage of explants vitrification. The highest percentage of callus induction (60.98% and 61.11%) was observed in higher sonication dosages (180 and 240 seconds). While, the highest percentage of multiple shoots, number of shoots per explants and percentage of explants vitrification were obtained in 30 seconds ultrasound treatment. Increasing ultrasound treatment duration decreased viability of plant cells and tissues, and as a result reduced shooting of explants.

Keywords: *In vitro* culture, Regeneration, Sainfoin, Ultrasound

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.73]