علوم و تحقیقات بذر ایران
سال ششم/ شماره دوم/ ۱۳۹۸ (۲۲۷ - ۲۱۵)

DOI: 10.22124/jms.2019.3601

تاثیر انواع محیط کشت MS و N_6 و هورمون‌های اکسینی و سیتوکینینی بر باززایی لاین‌های گندم نان از ریزنمونه کولئوپتیلی

علی اکبر غلامی[1*]، علیرضا تاری‌نژاد[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۸

چکیده

بهینه‌سازی کشت بافت برای فرآیند انتقال ژن و تهیه گیاهان عاری از بیماری باکتریایی و ویروسی لازم و ضروری است. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان در سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. در گندم از ریزنمونه‌های مختلفی نظیر گل‌آذین، جنین نارس و جنین بالغ برای کشت بافت استفاده شده است. یکی از معایب مهم گیاهان تک‌لپه‌ای این است که وقتی از جنین بالغ به‌عنوان ریزنمونه استفاده می‌شوند فراوانی باززایی از کالوس در مقایسه با جنین‌های نابالغ کاهش می‌یابد. در این آزمایش برای باززایی گیاه گندم از دو نوع محیط کشت MS و N_6 و از هورمون‌های اکسینی و سیتوکینی متفاوت روی ریزنمونه‌های کولئوپتیلی استفاده شد. ارزیابی نتایج نشان داد که بهترین ژنوتیپ برای باززایی C-D-9 و در بین هورمون‌های سیتوکینی مختلف بهترین هورمون BAP حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر و در بین هورمون‌های مختلف اکسینی بیش‌ترین باززایی در محیط کشت حاوی ۱میلی‌گرم در لیتر IAA به‌همراه ۱میلی‌گرم در لیتر BA به دست آمد. در محیط کشت‌های مختلف MS، بالاترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت MS(3) و در محیط کشت مختلف N_6 بالاترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت N_6(3) بود. مقایسه محیط کشت MS با N_6 در باززایی لاین‌ها گندم نشان داد که محیط کشت MS نسبت به N_6 بهتر عمل می‌کند.

واژه‌های کلیدی: اکسین، باززایی، سیتوکینین، کولئوپتیل، MS، N_6

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
*نویسنده مسئول: Gholami.2359@gmail.com

مقدمه

گندم مهم‌ترین محصول ایران و جهان است. سطح زیر کشت این محصول در دنیا برابر ۲۳۰-۲۲۰ میلیون هکتار و در ایران حدود ۵/۶ میلیون هکتار است که از سایر غلات بیش‌تر و برابر ۲۲ درصد سطح زیر کشت کلیه غلات است (Kazemi Arbat, 2005). در سال‌های اخیر تولید غلات به‌دلیل تشدید تنش‌های زنده و غیر زنده متعدد کاهش یافته است، از این رو اصلاح ارقام غلات سازگار به تنش های متعدد زنده و غیر زنده یک ضرورت در اصلاح غلات می‌باشد. اصلاح غلات از طریق دست‌ورزی ژنتیکی به‌دلیل عدم دسترسی به روش‌های کشت بافت و باززایی کارآ و مطمئن محدود شده است. در گندم از ریزنمونه‌های مختلفی نظیر گل‌آذین نارس و جنین بالغ برای تولید کالوس استفاده شده است و تا به حال کشت جنین نارس گندم به‌عنوان بهترین ریزنمونه در مطالعات کشت کالوس در گندم شناخته شده است (Carman *et al*., 1988; Chowdhury *et al.,* 1991; Ozgen *et al.,* 1996; NouriDelavar and Arzani, 2000). اما استفاده از قطعات برگی حاصل از جوانه‌زنی بذرهای خشک دارای مزایای متعددی است که از جمله می‌توان به سهولت کار و قابل دسترس‌بودن آن در تمام طول سال اشاره کرد (Yu *et al.*, 2008). غالباً برای تولید بافت کالوس از محیط کشت MS استفاده می‌شود و ساکارز یا گلوکز به‌عنوان منبع قند به کار می‌رود (Farsi and Zolali, 2008). تولید کالوس در گیاهان تک‌لپه‌ای معمولاً مشکل‌تر از گیاهان دولپه‌ای صورت می‌گیرد، به‌همین دلیل برای القاء و تشکیل کالوس، نیاز به اضافه‌کردن هورمون‌های مصنوعی می‌باشد. باززایی گیاه از کالوس یک پدیده مرفوژنتیکی پیچیده می‌باشد که عوامل داخلی و خارجی فیزیولوژیک گیاه نقش مهمی در آن ایفا می‌کنند (Hagio *et al.,* 2002). میزان موفقیت در رشد کالوس و باززایی گیاه در غلات بستگی زیادی به نوع ریزنمونه جداشده دارد. علاوه بر عوامل فیزیولوژیک، بسیاری از ژن‌های کنترل‌کننده صفت باززایی در گندم، برنج، جو و سایر گونه‌های گیاهی بررسی شده است که بیانگر کنترل ژنتیکی صفات پاسخگو به کشت بافت می‌باشد (Ben Amer *et al.,* 1999). به‌طورکلی پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف گندم نسبت به توانایی باززایی از کالوس متفاوت می‌باشد. بسیاری از محققان وجود این امر را ناشی از تفاوت ترکیب و غلظت‌های هورمون‌های داخلی گیاه و تفاوت‌های حساسیت به هورمون‌های مصنوعی مورد استفاده و شرایط محیطی گیاه اعلام نموده‌اند (Luica *et al.,* 1997; Tarinejad *et al.,* 2007; Mendoza and Kaeppler, 2002). هورمون‌های نظیر ایندول-۳-استیک اسید (IAA) و بنزیل آدنین (BA) به عنوان بهترین منابع تنظیم‌کننده رشد برای باززایی در گندم شناخته‌شده است (Satyvathi *et al.*, 2004) و تعدادی ژن در کنترل باززایی ژنوتیپ‌های گندم، مؤثر است (Ben Amer *et al.,* 1999). در آزمایشی از کشت جنین رسیده برای کالوس‌زایی در گندم استفاده شد. که در این آزمایش بیش‌ترین میزان کالوس‌زایی ۸۸/۳۳ درصد در محیط کشت MS دارای۴ میلی‌گرم درلیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (Turhan and Baser, 2003). در پژوهشی دیگر کالوس‌زایی و بازایی ۴۷ ژنوتیپ گندم از ریزنمونه جنین‌رسیده مورد بررسی قرار گرفت. اختلاف معنی‌داری از نظر باززایی، کارایی کشت و ظرفیت باززایی بین ارقام وجود داشت (Zale *et al.,* 2004). در پژوهشی از جنین بالغ گندم به تنظیم کننده‌های رشد توفوردی و زآتین استفاده شد. بهترین محیط کشت برای القای کالوس‌زایی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی اعلام شد و بهترین محیط کشت برای شاخه‌زایی و ریشه‌زایی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی-گرم بر لیتر توفوردی به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر زآتین اعلام شد. باززایی در این تحقیق بسته به ژنوتیپ متفاوت بود بیش‌ترین میزان باززایی برای رقم Nebta حدود ۴۵ درصد و برای رقم Sasareeb حدود ۴۹ درصد و برای رقم Iman حدود ۴۲ درصد اعلام شد (Badr Eldin *et al.,* 2012). در مطالعه‌ای برای القای کالوس‌زایی و باززایی گیاه گندم از جنین بالغ به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. برای القای کالوس‌زایی از ۳ میلی‌گرم در لیتر توفوردی به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و برای باززایی از محیط کشت فاقد هورمون استفاده شد. آن‌ها گزارش کردند که ظرفیت تولید کالوس و باززایی وابسته به ژنوتیپ است. بیش‌ترین میزان کالوس‌زایی برای رقم Pavon-76 حدود ۶۸ درصد و برای رقم Kanchan ۶۴ درصد و برای رقم Akbar ۲۸ درصد اعلام شد و بیش‌ترین میزان باززایی برای رقم BARI gom 21 و25 by BARI gom حدود

۱۹ درصد و برای رقم Akbar حدود ۱۵ درصد و برای رقم Pavon-76 حدود ۱۳ درصد اعلام شد (Islam *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای برای القای کالوس‌زایی و باززایی گیاه گندم از جنین بالغ به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. در این آزمایش از ۴ رقم گندم و ۵ محیط کشت (M_1-M_2-M_3-M_4-M_5) استفاده شد. بیش‌ترین کالوس-زایی مربوط به محیط کشت M_1 حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی بود، بیش‌ترین میزان باززایی برای ریزنمونه جنین نابالغ در محیط کشت M_1 و M_4 به‌ترتیب ۶۰/۴۴ درصد و ۵۲/۵۵ درصد و برای ریزنمونه جنین بالغ در محیط کشت M_3 به میزان ۵۸/۲۳ درصد بود (Hakam *et al.*, 2015). آیدین و همکاران (Aydin *et al.*, 2013) گزارش نمودند که توانسته‌اند که ۹۵ درصد کالوس جنین‌زا، را از ریزنمونه جنین بالغ با حمایت آندوسپرم تولید کنند و ۵۰ درصد باززایی از کالوس جنین‌زا به دست آورند. در آزمایش‌های اخیر گزارش شده است که توانسته‌اند باززایی از کالوس در محیط کشت MS حاوی BA و IAA به‌دست آورند (Fahmy *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای که بر روی تاثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد توفوردی و دی‌کامبا بر روی القای کالوس و باززایی انجام شد. بهترین محیط کشت برای کالوس‌زایی و باززایی محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم بر لیتر دیکامبا برای جنین بالغ جو (Erkoyuncu *et al.*, 2016) و جنین نابالغ گندم، (Ren *et al*., 2010) گزارش شد. در مطالعه‌ای از سه نوع اکسین مختلف (توفوردی، دیکامبا و پیکلورام) استفاده شد. بیش‌ترین میزان القای کالوس (۹۳/۳ درصد) به‌دست آمد. همچنین آن‌ها گزارش نمودند که غلظت بالای اکسین دیکامبا (۱۰-۱۲ mg/l) تاثیر مثبتی در القای کالوس دارد (Aydin *et al*., 2015). این پژوهش‌ها نشان می‌دهد اکثر محققین از جنین بالغ به‌عنوان ریزنمونه در کشت بافت گندم استفاده نموده‌اند. ولی باززایی ارقام با استفاده از ریزنمونه جنین بالغ همیشه پایین بوده است. روی این اصل، در تحقیق حاضر واکنش چهار لاین گندم نان بـه کشـت قطعات برگی (کولئوپتیل) از نظر باززایی در سطوح مختلف هورمون‌های اکسینی و سیتوکینین مورد بررسی قرار گرفت. هدف از انجام این آزمایش، ارائه پروتکل کارآمد برای کشت بافت و ریزازدیادی چهار لاین گندم و فراهم‌کردن ابزار کارآمد برای مطالعه انتقال ژن و دست‌کاری ژنتیکی با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت بافت، در دورنمای آینده است.

مواد و روش‌ها

برای بررسی پاسخ به باززایی لاین‌های مختلف گندم، برای بررسی درصد باززایی لاین‌ها از آزمایش فاکتوریل با دو عامل لاین‌های گندم در چهار سطح و محیط کشت مختلف MS و N_6 هرکدام حاوی ۶ تنظیم‌کننده رشد Kin و IAA, NAA, BA BAP که در مجموع ۱۲ نوع محیط کشت متفاوت بود در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار استفاده شد.

بذور چهارلاین گندم به نام‌های (C-D-4, C-D-6, C-D-8, C-D-9) از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. بذوری که ظاهری سالم داشتند برای ضدعفونی و کشت انتخاب شدند. ضدعفونی با قراردادن بذور در الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه و سپس شستشوی بذور با شناورساختن آن‌ها در آب مقطر استریل آغاز شد. سپس بذور در زیر محفظه‌ی استریل هود لامینار در محلول هیپوکلریت سدیم ۴۵ درصد حجمی (۲/۲۵ درصد ماده مؤثره) همراه با ۱ قطره توین ۲۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. در مرحله آخر این بذور سه بار متوالی به مدت ۱، ۳ و ۵ دقیقه با آب مقطر دو بار استریل شستشو داده شدند. سپس روی کاغذ صافی استریل قرار داده شد تا آب سطحی آن‌ها کاملاً خشک شود زمانی که بذرهای مورد نظر استریلیزاسیون سطحی شدند برای جوانه‌زنی در محیط MS ½ قرار گرفتند. وقتی‌که اندازه گیاهچه به ۱۰-۵ سانتی‌متر رسید (شکل ۱)، کلئوپتیل به‌اندازه ۲-۱ سانتی‌متر از بخش ساقه جدا شد. این قسمت از برگ به قطعات ۲-۱ میلی‌متری تقسیم شد. سپس این قطعات در محیط ML_1G_1 (Ahmadabadi *et al.*, 2007)، (حاوی ویتامین‌ها و نمک‌های N6 و ۲ میلی‌گرم در لیتر گلایسین، ۲۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر L- پرولین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازوئین، ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز با اسیدیته ۵/۸) برای القا کالوس قرار گرفتند در هر پتری دیش که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت بود، تعداد ۹ ریزنمونه کشت گردید. سپس درب ظروف با پارافیلم بسته شد. نمونه‌ها جهت کالوس‌زایی در شرایط تاریکی و دمای ۱± ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۲ هفته قرار داده شدند. در مرحله‌ی بعد کالوس‌های تولید شده جهت رشد و تکثیر

و تولید کالوس‌های جنین‌زا به‌محیط کشت مشابه‌ای ML_1C_2 (Ahmadabadi *et al.,* 2007)، با این تفاوت که حاوی دو سطح ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره بود واکشت شدند. کالوس‌های زرد روشن، ناصاف و شکننده جنین‌زا و در مقابل کالوس‌های صاف، آب‌دار و شیری‌رنگ به‌عنوان غیرجنین‌زا تلقی شدند (شکل ۱). دو هفته پس از واکشت، کالوس‌های جنین‌زا برای باززایی گیاه به محیط باززایی ML_1R_3 (Ahmadabadi *et al.,* 2007)، انتقال داده شدند. محیط کشت‌های استفاده شده برای باززایی، محیط کشت MS و N_6 بودند. که هرکدام شامل شش محیط کشت متفاوت بودند (جدول ۱).

جدول ۱- انواع محیط کشت باززایی بر روی ریزنمونه قطعات برگی

Table 1. Type of regeneration media was used for wheat coleoptile segment explants

MS(1)	MS بدون هورمون	MS(4)	MS+2 mg/L KIN + 0.5 mg/L NAA	N6(1)	N6+0.5 mg/L BAP	N6(4)	N6+0.5 mg/L KIN
MS(2)	MS+1 mg/L IAA+ 1 mg/L BA	MS(5)	MS+2 mg/L BAP+ 0.5 mg/L IAA	N6(2)	N6+ 2 mg/L BAP	N6(5)	N6+2 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA
MS(3)	MS+1 mg/L IAA+ 0.5 mg/L BA	MS(6)	MS+2 mg/L BAP+ 1 mg/L NAA	N6(3)	N6+ 2 mg/L KIN+ 0.5 mg/L NAA	N6(6)	N6+1 mg/L IAA+1 mg/L BA

بعد از کشت کالوس‌ها در محیط باززایی، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱ هفته در شرایط تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس تیمار گردیدند. بعد از این مدت نمونه‌ها تحت تیمار ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفتند. پس از آغاز باززایی، کالوس‌های تغییر رنگ‌داده به لوله‌های آزمایش با محیط کشت مشابه منتقل شدند تا فضای کافی برای رشد گیاهچه وجود داشته باشد. شاخه‌های باززاشده به طول ۲ الی ۳ سانتی‌متر، جهت تولید و توسعه‌ی ریشه‌ها، به محیط کشت MS فاقد هورمون حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز انتقال داده شد. گیاهان ریشه‌دار شده از لوله‌ی آزمایش خارج شده و پس از کشت در خاک استریل به محیط سازگارسازی انتقال داده شدند (شکل ۱).

نتایج و بحث

مطالعه انواع محیط کشت بر روی باززایی گیاه

برای بررسی اثر انواع محیط کشت در توانایی باززایی از لاین‌ها C-D-8، C-D-6، C-D-4، C-D-9 ابتدا ریزنمونه‌های قطعات برگی آن در محیط کشت حاوی ۲/۵میلی‌گرم در لیتر توفوردی کشت شدند و بعد از تولید کالوس، کالوس‌ها را به ۱۲ نوع محیط کشت باززایی متفاوت منتقل شدند. بعد از شش هفته درصد شاخه‌زایی در محیط کشت ثبت گردید. با بررسی داده‌های به‌دست‌آمده از این ۱۲ نوع محیط کشت (جدول ۱) مشخص شد که بین محیط‌های کشت از نظر درصد شاخه‌زایی تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول۲).

محیط کشت N6(3) با ترکیب هورمونی ۲ میلی گرم بر لیتر Kin به‌همراه نیم میلی‌گرم بر لیتر NAA بیش‌ترین درصد باززایی به‌میزان (۲۰/۳۷ درصد) را نشان داد و محیط کشت N6 (4) با ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ کم‌ترین میزان درصد باززایی مشاهده شد (شکل ۲).

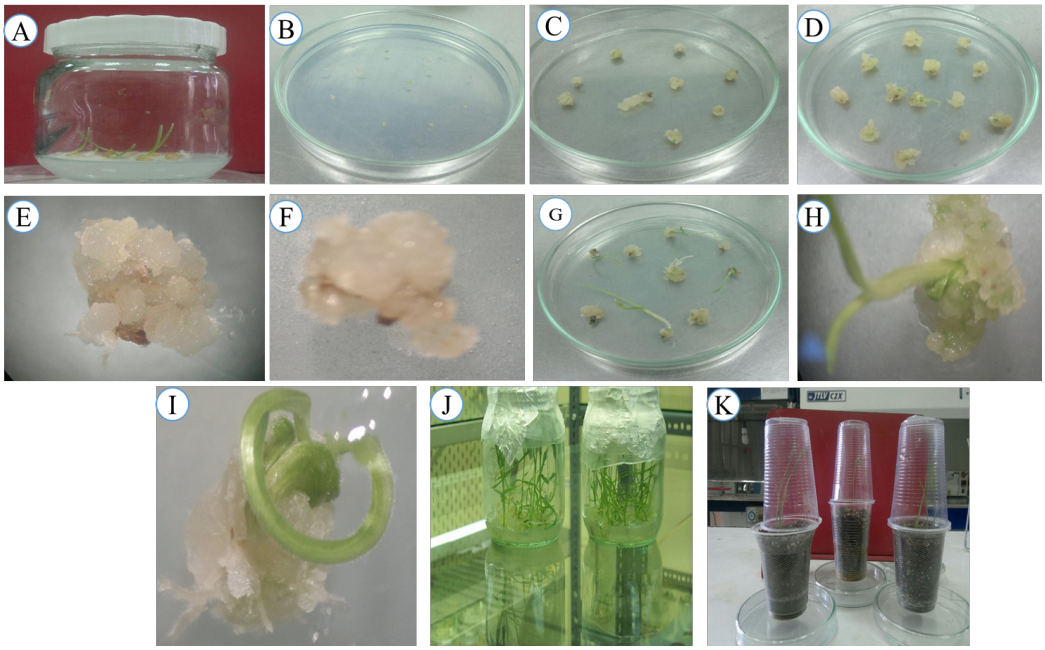
اثر میزان سیتوکینین در باززایی

حضور سیتوکینین‌ها در محیط کشت برای باززایی گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای ضروری است، زیرا این هورمون‌ها برای بیان ژن‌های مناسب برای تمایزیابی جوانه‌های ساقه ضروری هستند (Ho and Vasil, 1983). توانایی سیتوکینین‌های مختلف در القای شاخساره را می‌توان به فاکتورهایی از قبیل پایداری، تحرک و سرعت ترکیب و اکسیداسیون هورمون نسبت داد، بنابراین به‌نظر می‌رسد شرایط هورمونی فاکتور تعیین‌کننده برای افزایش موفقیت‌آمیز تشکیل جوانه های نابجا و پرآوری شاخساره باشد (Daffalla *et al.,* 2010). با مقایسه میانگین درصد شاخه‌زایی محیط کشت N_6(1) حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط کشت

(2) BAP N_6 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP مشخص شد که بین این دو محیط کشت در درصد شاخه‌زایی اختلاف معنی‌داری وجود دارد به‌طوری‌که حداکثر درصد شاخه‌زایی در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر (۱۸/۲ درصد) بیش‌تر از محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (۹/۲۵ درصد) بود (شکل ۳).

در مطالعه‌ای برای باززایی از محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP استفاده شد (Aydin *et al.*, 2011; Mendoza and Kaeppler, 2002). برای باززایی از کالوس‌های به‌دست‌آمده از جنین‌های بالغ حمایت شده با آندوسپرم از هورمون BAP به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA استفاده کردند که حداکثر تشکیل گیاهچه بعد از چهار هفته ۳۰ تا ۴۰ درصد بود (Rashid *et al.*, 1999).

برای کالوس‌زایی از جنین‌های بالغ ۳۱ گونه مختلف گندم از محیط کشت پایه MS حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین، ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسپاراژین، ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ۸ گرم در لیتر آگار در ترکیب با هورمون توفوردی به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده کردند و برای باززایی از همین محیط کشت پایه به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کاینتین و برای ریشه‌زایی از محیط کشت MS ۱/۲ به‌همراه ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار استفاده کردند. میانگین درصد القای کالوس ۹۱/۳۰ درصد و پایین‌ترین و بیش‌ترین درصد القای کالوس به‌ترتیب برابر ۴۰/۵۶ و ۱۰۰ درصد بود. میانگین باززایی ۱۴/۶۸ و کم‌ترین و بیش‌ترین درصد باززایی به‌ترتیب برابر ۲/۱۷ و ۵۰ درصد بود (Bi *et al.*, 2007).



شکل ۱- مراحل کشت و القا کالوس و باززایی لاین‌های گیاه گندم از ریزنمونه قطعات برگی

A: گیاهچه‌های رشد کرده در شرایط استریل روی محیط MS ½.B: برگ‌های زیر کلئوپتیل برای القا کالوس به قطعات ۲-۱ میلی‌متری تقسیم و کشت شدند. C: القا کالوس از قطعات برگ روی محیط ML_1G_1 پس از ۵ هفته کشت در تاریکی. D: تکثیر کالوس‌های جنین‌زایی به‌دست‌آمده از قطعات برگ روی محیط ML_1C_2. E: نمایی نزدیک از یک کالوس جنین‌زا. F: نمای نزدیک از یک کالوس غیر جنین‌زا. G: القا ساقه هوایی از کالوس‌های جنین‌زا به‌دست‌آمده از قطعات برگ در محیط ML_1R_3. H و I: نمایی نزدیک از یک ساقه هوایی حاصل از کالوس جنین‌زا. J: انتقال گیاهچه‌های حاصل از باززایی به محیط کشت ریشه‌زایی. K: انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به خاک و سازگاری گیاهان به شرایط طبیعی.

Figure 1. Different stage of culture, callus induction and regeneration from wheat lines coleoptile explants.
A) Growth of seedling under sterile condition on ½ MS media. B) Leaves under coleoptile divided into 1-2 mm segments for culture. C) callus induction from coleoptile segments on ML_1G_1 media after 5 weeks from culture. D) proliferation of embryogenic callus obtained from coleoptile segments on ML_1G_2 media. E) Magnification view from embryogenic callus. F) Magnification view from non embryogenic callus. G) Shoot induction from embryogenic callus on ML_1R_3 media. H&I) Magnification view of shoot resulted from embryogenic callus. J) plantlet transfer to shoot induction media. K) seedling transfer to sterile soil for accumulation to the environment.

جدول ۲- تجزیه واریانس فاکتوریل تأثیر محیط کشت‌های مختلف و لاین‌ها مختلف گندم بر روی باززایی بر روی ریزنمونه قطعات برگی

Table 2. Factorial analysis of variance. Effect of different crop and wheat lines on regeneration on explants of leaf parts

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی df	درصد باززایی Regeneration percentage
محیط کشت Environment (E)	11	5/33**
لاین lines(L)	3	3/54*
L*E	33	0/431^{ns}
خطاError	96	1/062
ضریب تغییرات (CV%)		17/65

^{ns} ، *و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دارس در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

ns, * and **: no significant and significant at $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively

اثر اکسین در میزان باززایی

در محیط کشت MS(2)، MS(3)، MS(4)، MS(5) و MS(6) و N6(3)، N6(5)، N6(6) از هورمون سیتوکینین به‌همراه هورمون اکسین برای شاخه‌زایی در کالوس‌ها استفاده شد. در این محیط کشت از هورمون‌های اکسین IAA و NAA به‌تنهایی یا در ترکیب با هم استفاده شد و مشخص گردید که استفاده از هورمون اکسین در محیط باززایی درصد باززایی را در اکثرلاین‌ها افزایش می‌دهد به‌طوری‌که بیش‌ترین درصد شاخه‌زایی ۲۹/۶۲ درصد برای لاین C-D-9 در محیط کشت N6(6) حاوی ۱میلی‌گرم در لیتر IAA به‌همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA به‌دست آمد. درحالی‌که در محیط کشتی که تنها از سیتوکینین در آن استفاده شده بود محیط کشت N6(1), N6(2)و N6(4) درصد شاخه‌زایی پایین بود و در بهترین حالت درصد شاخه‌زایی (۱۸/۲ درصد) به‌دست آمد (شکل ۳).

در مطالعه‌ای، میزان توفوردی مورد استفاده ثابت و برابر ۲ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفتند. کالوس‌های گندم عمدتاً در محیطی حاوی ایندول استیک اسید و بنزیل آمینو پورین از قابلیت باززایی خوبی برخوردارند (Kintzois *et al.,* 1996). ارقام گندم نان در محیط حاوی هر یک از هورمون‌های مذکور به‌تنهایی یا در ترکیب با هم باززا می‌شوند اما برای باززایی ارقام دوروم وجود هر دو هورمون به‌صورت ترکیبی ضروری است. این موضوع می‌تواند ناشی از تفاوت سطح داخلی هورمون‌ها در این دو گونه باشد. به‌منظور باززایی از کالوس به‌دست‌آمده از جنین‌های بالغ حمایت شده با آندوسپرم از هورمون ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد که حداکثر تکثیر گیاهچه بعد از چهار هفته کشت ۳۵ تا ۴۰ درصد به‌دست آمد (Rashid *et al.,* 1999). هورمون BAP به همراه IAA به‌عنوان بهترین تنظیم‌کننده رشد برای باززایی در گندم شناخته شده است (Satyvathi *et al*., 2004). در آزمایشی، میانگین درصد باززایی ۱۴/۶۸ درصد و کم‌ترین و بیش‌ترین درصد باززایی به‌ترتیب برابر ۲/۱۷ و ۵۰ درصد به دست آمد (Bi *et al.,* 2007).

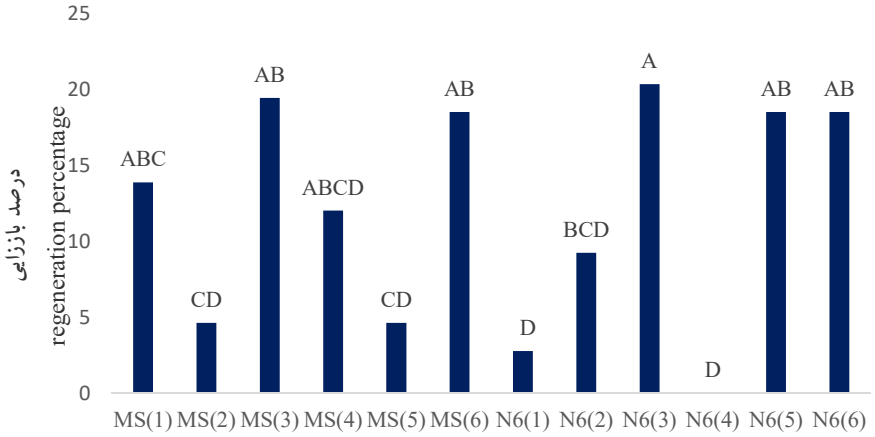
اثر متقابل لاین و محیط کشت در باززایی کالوس‌های حاصل از قطعات برگی

در این پژوهش برای باززایی از چهار لاین متفاوت و ۲ نوع محیط کشت متفاوت MS و N_6 استفاده شد که هرکدام شامل ۶ محیط کشت متفاوت بودند (جدول ۱). بعد از این‌که کالوس‌ها به محیط کشت باززایی انتقال داده شدند در اکثر محیط‌ها کالوس‌ها ابتدا شروع به سبزشدن کردند و به‌دنبال آن کالوس‌ها شروع به تکثیر و شاخه-ساری کردند.

تأثیر محیط کشت MS بر باززایی کالوس‌های جنین-زای لاین‌های مختلف

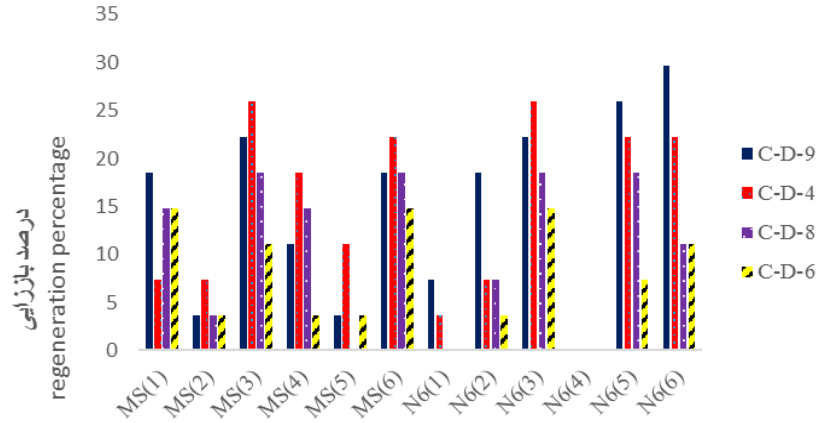
باززایی در این آزمایش بسته به ژنوتیپ و نسبت به محیط کشت متفاوت بود. بیش‌ترین میزان باززایی در محیط کشت MS مربوط به لاین C-D-4 (۱۹/۰۳ درصد) و کم‌ترین میزان باززایی مربوط به لاین C-D-6 (۱۰/۰۲ درصد) بود (شکل ۵). همچنین در محیط کشت مختلف بیش‌ترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت MS(3) با میانگین (۱۹/۴۴ درصد) و کم‌ترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت MS(5) با میانگین (۴/۶۲ درصد) بود (شکل ۴). بالاترین میزان باززایی لاین C-D-9 در محیط

کشت MS(3) (۲۲/۲۲ درصد) و کم‌ترین میزان باززایی لاین C-D-9 در محیط کشت MS(2, 5) (۳/۷ درصد) بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت MS(3) (۱۸/۵۱ درصد) و کم‌ترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت MS(2, 5) بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت MS(1, 6) (۱۴/۸۱ درصد) و کم‌ترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت MS(2, 4, 5) (۳/۷ درصد) بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت MS(3) (۲۵/۹۵ درصد) و کم‌ترین میزان باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت MS(1, 2) (۷/۴ درصد) بود (شکل ۶).



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد باززایی محیط‌های کشت متفاوت در باززایی لاین‌ها

Figure 2. Comparison of the average percentage of regeneration of different culture media in regeneration of lines

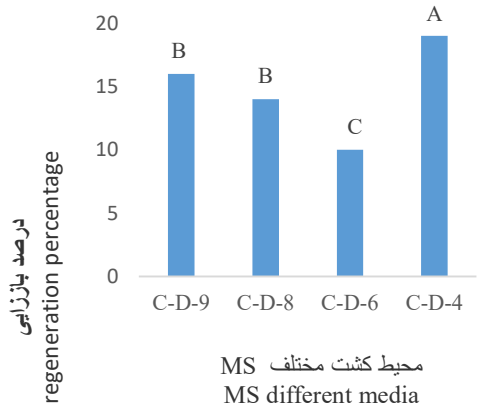


شکل ۳- مقایسه درصد باززایی لاین‌های مختلف گندم در محیط کشت‌های متفاوت

Figure 3. Comparison of regeneration percentage of different wheat lines in different culture media

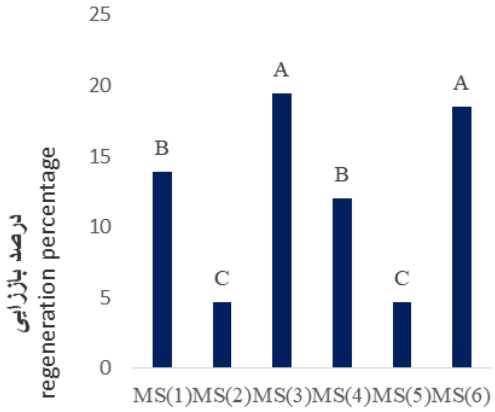
تأثیر محیط کشت N_6 بر باززایی لاین‌ها

باززایی در این آزمایش بسته به ژنوتیپ و نسبت به محیط کشت متفاوت بود که با نتایج سایر محققین نیز مطابقت دارد و بیش‌ترین میزان باززایی در محیط کشت N_6 مربوط به لاین C-D-9 (۲۰/۰۴ درصد) و کم‌ترین میزان باززایی مربوط به لاین C-D-6 (۷/۰۲ درصد) بود (شکل ۸). همچنین در محیط کشت مختلف بیش‌ترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت $N_6(3)$ با میانگین (۲۰/۰۴ درصد) و کم‌ترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت $N_6(4)$ بود (شکل ۷). بالاترین میزان باززایی لاین C-D-9 در محیط کشت $N_6(6)$ (۲۹/۶۲ درصد) و کم‌ترین میزان باززایی لاین C-D-9 در محیط کشت $N_6(4)$ بود.



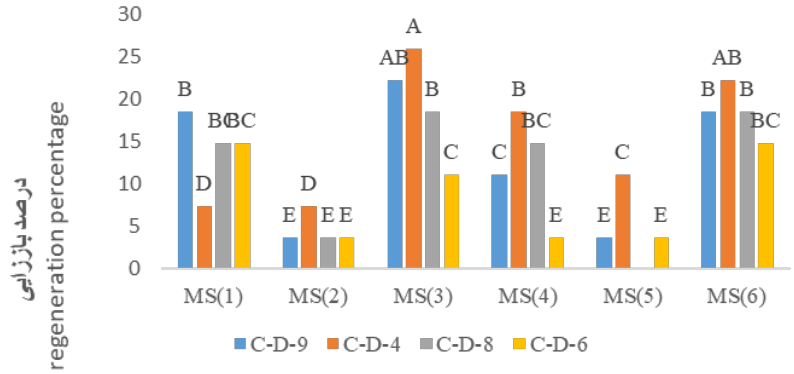
شکل ۵- مقایسه میانگین درصد باززایی لاین‌های گندم مورد مطالعه در محیط کشت MS

Figure 5. Comparison of the average regeneration percentage of wheat lines studied in MS medium



شکل ۴- مقایسه درصد باززایی لاین‌های گندم در محیط کشت‌های مختلف MS

Figure 4. Comparison of regeneration percentage of wheat lines in different MS medium



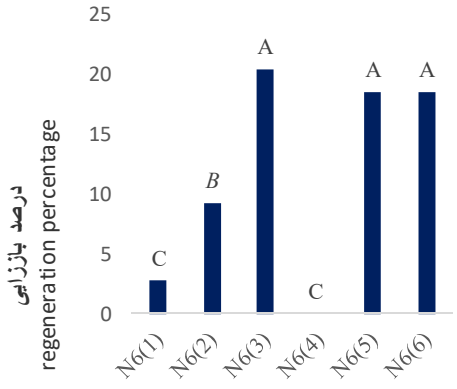
شکل ۶- مقایسه میانگین درصد باززایی لاین‌های مختلف گندم در محیط کشت مختلف

Figure 6. Comparison of average regeneration percentage of different wheat lines in different MS medium MS

بالاترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت $N_6(5, 3)$ (۱۸/۵۱ درصد) و کم‌ترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت $N_6(1, 4)$ بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت $N_6(3)$ (۱۴/۸۱ درصد) و کم‌ترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت$N_6(1,4)$ بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت $N_6(3)$ (۲۵/۹۵ درصد) و کم‌ترین میزان باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت $N_6(4)$ بود (شکل ۹).

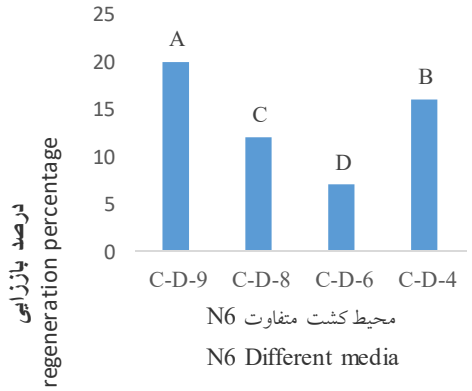
مقایسه محیط کشت MS با N6 در باززایی لاین‌ها

محیط کشت‌های MS(2) و $N_6(6)$ حاوی به‌ترتیب ۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و LAA و محیط کشت‌های MS(4) و $N_6(3)$ حاوی به‌ترتیب ۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA و محیط کشت‌های MS(6) و $N_6(5)$ حاوی ۲میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مقایسه میانگین درصد شاخه‌زایی انجام گرفت که محیط کشت‌های MS(2) و $N_6(6)$ و محیط کشت‌های MS(4) و $N_6(3)$ با هم از لحاظ درصد شاخه‌زایی معنی‌دار بودند. ولی در محیط کشت‌های MS(6) و $N_6(5)$ از لحاظ درصد شاخه‌زایی معنی‌دار نبودند. محیط کشت MS با محیط کشت N_6 نشان داد که محیط کشت N_6 نسبت به محیط کشت MS به‌صورت مقایسه جزءبه‌جزء بهتر می‌باشد (شکل ۱۰، ۱۱).



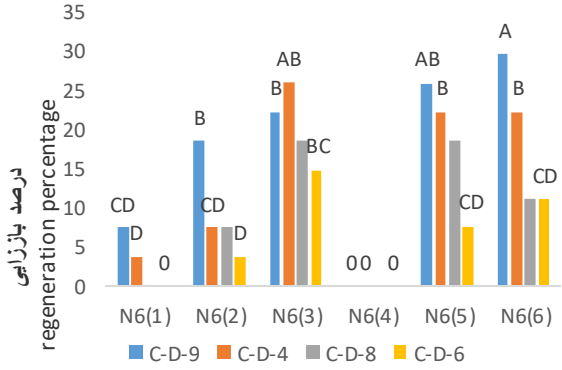
شکل ۷- مقایسه درصد باززایی لاین‌های گندم در محیط کشت‌های مختلف N_6 از قطعات برگی

Figure 7. Comparison of regeneration percentage of wheat lines in different N6 medium from leaf fragments



شکل ۸- مقایسه میانگین درصد باززایی لاین‌های گندم از قطعات برگی در محیط کشت N_6

Figure 8. Comparison of the average regeneration percentage of wheat lines from leaf pieces in N6 medium

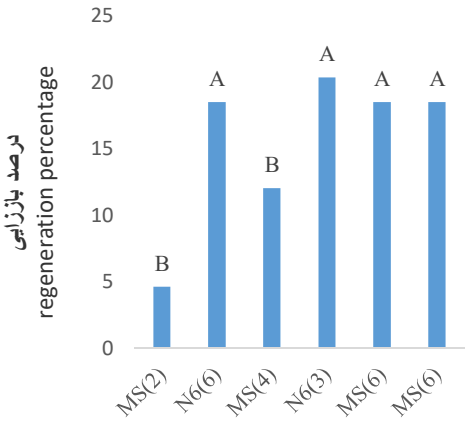


شکل ۹- مقایسه میانگین درصد باززایی از قطعات برگی لاین های مختلف گندم در محیط کشت مختلف N_6

Figure 9. Comparison of the average regeneration percent of leaf pieces of different wheat lines in different N6 media

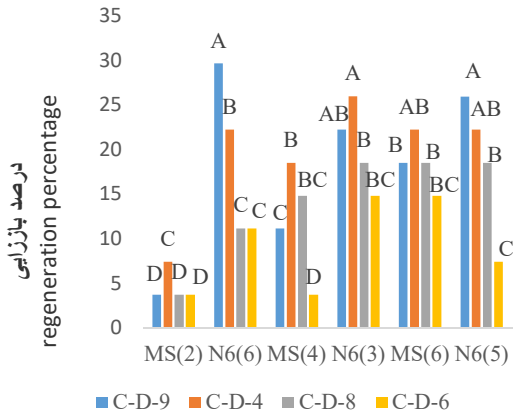
ولی از مجموع ریزنمونه‌های انتقال داده‌شده به محیط باززایی MS، ۷۳/۱۲ درصد باززایی صورت گرفته و از مجموع ریزنمونه‌های انتقال داده‌شده به محیط کشت باززایی N_6، ۶۹/۴۴ درصد باززایی‌های صورت گرفته است. در نتیجه محیط کشت MS نسبت به محیط کشت N_6 پاسخ بهتری به القای باززایی از خود نشان داده است (شکل ۱۲).

در مطالعه‌ای، جنین‌زایی و باززایی گیاهچه‌های سبز گندم را بر اساس قطعات برگی از گیاهچه‌های ۳-۳ روزه در بین ژنوتیپ‌های مختلف بررسی و نتیجه گرفتند در بین محیط کشت‌ها، محیط کشت MS نسبت به محیط N_6 و L_3 از نظر القاء کالوس و تولید گیاهچه بهتر عمل نمودند. همچنین این محققین نتیجه گرفتند فراوانی تشکیل کالوس به‌علاوه فراوانی باززایی گیاهی وابسته به ترکیب محیط کشت و غلظت توفوردی است. محیط کشت MS با ۴/۵۹ میکرو مول بر لیتر توفوردی برای کشت قطعات برگی گندم مطلوب بود. افزودن غلظت توفوردی از ۴/۵۹ به ۳۶ میکرو مول روی القاء کالوس اثر مثبت داشت ولی مانع باززایی گیاه می‌شد (Wang and Wei, 2004). پژوهشگران، اثرات ژنوتیپ، نوع محیط کشت پایه، غلظت هورمون‌های توفوردی BAP، همچنین غلظت‌های مختلف آگار (۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) را در القای کالوس و باززایی آن در کشت درون شیشه‌ای جنین بالغ ۵ لاین گندم را بررسی کردند.



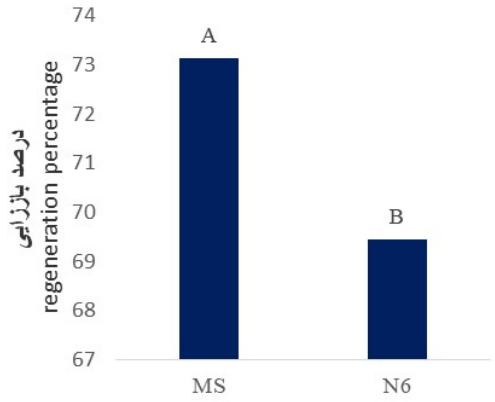
شکل ۱۰-مقایسه دوبه‌دو درصد باززایی در محیط کشت MS با N_6

Figure 10. Comparison of two and three percent regeneration in MS medium with N_6



شکل ۱۱-مقایسه میانگین دوبه‌دو درصد باززایی لاین های مختلف گندم در محیط کشت مختلف N_6 و MS

Figure 11. Comparison of two to two percent regeneration of different wheat lines in N6 and MS medium



شکل۱۲- مقایسه میانگین کل باززایی‌های صورت گرفته در محیط MS و محیط کشت N_6

Figure 12. Comparison of mean total regenerations in MS medium and N6 media

آن‌ها مشاهده کردند که محیط کشت پایه MS در تمامی لاین‌ها از محیط کشت LS پاسخ بهتری به القای کالوس و باززایی از آن می‌دهد و در غلظت‌های مختلف آگار (۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر)، تمامی لاین‌ها در غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر آگار، پاسخ بهتری به باززایی نشان دادند. در غلظت مختلف توفوردی بیش‌ترین درصد القای کالوس برای لاین‌ها متفاوت بوده و بین ژنوتیپ‌ها و غلظت هورمون اثرات متقابل وجود داشت. در مطالعه‌ای از دو نوع محیط کشت پایه MS و LS در کشت بافت گندم استفاده شد که محیط کشت پایه MS بهتر از LS به کشت بافت پاسخ داد (Mehmood *et al.*, 2013).

تشکر و قدردانی

نویسندگان، مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئول آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان جهت همکاری ابراز می‌دارند.

منابع

Ahmadabadi, M., Ruf, S. and Bock, R. 2007. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays L*). Transgenic Science, 16(4): 437-448. **(Journal)**

Aydin, M., Tosun, M. and Haliloglu, K. 2011. Pant regeneration in wheat mature embryo culture. African Journal of Biotechnology, 10: 15749-15755. **(Journal)**

Aydin, M., Tosun, M. and Haliloglu, K. 2013. Plant regeneration in wheat mature embryo culture. African Journal of Biotechnology, 10: 15749-15755. **(Journal)**

Aydin, M., Taspinar, M.S., Arslan, E., Sigmaz, B. and Agar, G. 2015. Auxin effects on somaclonal variation and plant regeneration from mature embryo of barley (*Hordeum vulgare* L.). Pakistan Journal of Botany, 47(5): 1749-1757. **(Journal)**

Badr Eldin, A., Saeed, E., Marmar, A., Siddig, E., Aisha Ohag, O., Adil, A. and Hussein, E. 2012. A simple and efficient protocol for callus induction and regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mature embryos. International Journal of Science and Research (IJSR)ISSN (Online): 2319-7064. **(Journal)**

Ben Amer, L.M., Korzum, V., Worland, A.J. and Borber, A. 1999. Genetic mapping of QTL controlling tissue-culture response on chromosome 2B of wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to major genes and RFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, 94: 1047-1052. **(Journal)**

Bi, R.M., Kou, M., Chen, L.G., Mao, S.R. and Wang, H.G. 2007. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. Plant Breeding, 126: 9- 12. **(Journal)**

Carman, J.G., Jefferson, N.E. and Campbell, W.F. 1988. Induction of embryogenic (*Triticum aestivum* L.) calli: I. Quantification of genotype and culture medium effects. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 10: 101-106. **(Journal)**

Chowdhury, S.H., Kato, K., Yamamoto, Y. and Hayashi, K. 1991. Varietal variation in plant regeneing, ration capacity from immature embryos among common wheat cultivars. Japanese Journal of Breeding, 41: 443-450. **(Journal)**

Daffalla, H., Abdellatef, E., Elhadi, A. and Khalafalla, M. 2011. Effect of growth regulators on *In Vitro* morphogenic response of Boscia senegalensis (Pers.) Lam. Poir. using mature zygotic embryos explants. Biotechnology Research International, 1-8. **(Journal)**

Erkoyuncu, M.T. and Yorgancilar, M. 2016. Efficient callus induction and plantlets regeneration from mature embryo culture of barley (*Hordeum vulgare* L.) Genotypes. International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering, 10(6): 347-353. **(Journal)**

Fahmy, A.H., Li, J., El-Wafa, W.A., El-Khodary, S.E. and El Shihy, O.M. 2012. Effects of different combinations of benzyl adenine and indole acetic acid concentrations on *In vitro* plant regeneration in hexaploid wheat. GM Crops and Food-Biotechnology in Agriculture and the Food Chain, 3(2):111-114. **(Journal)**

Farsi, M. and Zolali, J. 2008. Introduction to plant biotechnology. 4th Edition. Ferdowsi University of Mashhad. 495 pp. (In Persian)**(Book)**

Hagio, T., Ichiri, S.S. and Yamada, T. 2002. Efficient plant regeneration through morphogenesis in Japanese commercial variety of wheat. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 38: 1394. **(Journal)**

Hakam, N., Udupa, S.M., Rabha, A., Ibriz, M. and Iraq, D. 2015. Efficient callus induction and plantlets regeneration in bread wheat using immature and mature embryos. International Journal of Biotechnology Research, 3(1). 1-9. **(Journal)**

Ho, W.J. and Vasil, I.K. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Sacharrum officinarum* L.). I: The morphology and ontogeny of somatic embryos. Protoplasma, 118: 169-180. **(Journal)**

Islam, M.M., Remme, R.N., Biswas, D. and Yesmin, F. 2015. *In vitro* plant regeneration from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). International Journal of Multidisciplinary Research and Development, 2(4): 669-672. **(Journal)**

Kazemi Arbath, H. 2005. Cereal morphology and physiology. Tabriz University Press. (In Persian)(**Book**)

Kintzois, S., Triantafyllou, M. and Drossopoulos, J.B. 1996. Effect of genotype and different growth regulator treatments on callus induction: proliferation and plant regeneration from mature wheat embryos. Cereal Research Communications, 24: 147-153. **(Journal)**

Luica, A., Felix, F.I., Federizzi, L.C., Lange, C.E. and Handel, L. 1997. Genetics of regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. Brazilian Journal of Genetics, 15: 473-479. **(Journal)**

Mehmood, K., Arsshad, M., Muhammad, A.G. and Razzaq, A. 2013. Tissue culture responses of some wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars grown in Pakistan. Pakistan Journal of Botany, 45: 545-549. **(Journal)**

Mendoza, M.G. and Kaeppler, H.F. 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 38: 39-45. **(Journal)**

NouriDelavar, M.Z. and Arzani, A. 2000. Analysis of callus induction and plant regeneration from immature embryo of rice cultivars. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 4(4): 57-71. (In Persian)**(Journal)**

Ozgen, M., Turet, M., Ozcan, S. and Sancak, C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter wheat genotypes. Plant Breeding, 115: 4555-458. **(Journal)**

Rashid, A., Qureshi, R.H., Hollington, P.A. and Jones, R.G.W. 1999. Comparative response of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to salinity at seedling stage. Journal of Agronomy and Crop Science, 182: 199-207. **(Journal)**

Ren, J., Wang, X. and Yın, J. 2010. Dicamba and sugar effects on callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of wheat. Agricultural Sciences in China, 9(1): 31-37. **(Journal)**

Satyvathi, V.V., Jauhar, P.P., Elias, E.M. and Rao, M.B. 2004. Effects of growth regulators on *in vitro* plant regeneration in durum wheat. Crop Science, 44: 1839-1846. **(Journal)**

Tarinejad, A., Toorchi, M., Habashi, A. and Pellegrineschi, A. 2007. Optimization of gene transfer in Iranian bread wheat cultivars by biolistic bombardment. Journal of Food, Agriculture and Environment, 5(3 and 4): 237-241. **(Journal)**

Turhan, H. and Baser, I. 2003. Callus induction with mature embryo culture technique in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Indian Journal of Agricultural Sciences, 73: 399-401. **(Journal)**

Wang, C.T. and Wei, Z.M. 2004. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf base. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 77: 149-156. **(Journal)**

Yu, Y., Wang, J., Zhu, M.L. and Wei, Z.M. 2008. Optimization of mature embryo based high frequency callus induction and plant regeneration from elite wheat cultivars grown in China. Plant Breeding, 127: 249-255. **(Journal)**

Zale, M.J., Harmony, B.W., Kimberlee, K.K. and Camille, M.S. 2004. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76: 277-281. **(Journal)**

Effect of MS and N_6 media and auxin and cytokinin hormones on regeneration of bread wheat lines from coleoptile explants

Ali Akbar Gholami[1*], Alireza Tarinezhad[2]

Received: January 15, 2018 Accepted: May 29, 2018

Abstract

Optimizing tissue culture for the gene transfer process and the preparation of plants free from bacterial and viral diseases is necessary. This experiment was conducted as factorial in a completely randomized design with 3 replications in the Biotechnology Laboratory of the agricultural faculty of Azarbaijan Shahid Madani University in 2016. In wheat Various explants such as inflorescences, mature embryos and adult embryos have been used for tissue culture. One of the major disadvantages of monocots plants is that when the adult embryo is used as an explant, the frequency of regeneration of callus decreases in comparison with immature embryos. In this experiment, for wheat regeneration was used two different media: MS and N_6, and different auxin and cytokines hormones. The results showed that the best genotype for regeneration was CD-9 and among different cytokine hormones, the best was BAP hormone containing 2 mg / L, and among different hormones of auxin, the highest regeneration obtained in the medium containing 1 mg / L IAA with BA 1mg / L. In MS culture medium, the highest regeneration rate was observed for MS(3) medium and in N_6 medium, regeneration was highest for N_6(3). Comparison of MS medium with N6 in regeneration of wheat cultivars showed that MS medium is better.

Keywords: Auxin; Coleoptile explants; Cytokinin; MS; N_6; Regeneration

How to cite this article

Gholami, A.A. and Tarinejad, A. 2019. Effect of MS and N_6 media and auxin and cytokinin hormones on regeneration of bread wheat lines from coleoptile explants. Iranian Journal of Seed Science and Research, 6(2): 215-227. (In Persian)**(Journal)**

DOI: 10.22124/jms.2019.3601

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. MSc student, Department of Agriculture Biotechnology, University of Azarbaijan Shahid Madani, Tabriz, Iran

2. Associate Professor, Department of Agriculture Biotechnology, University of Azarbaijan Shahid Madani, Tabriz, Iran

*Corresponding author: Gholami.2359@gmail.com