مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد هفدهم، شماره اول، ۱۳۸۹
www.gau.ac.ir/journals

بررسی تأثیر عناصر و مواد غذایی تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت بر جنین‌زایی رویشی دم‌برگ هویج (*Daucus carota* L.)

*سیدجواد موسوی‌زاده[۱]، کامبیز مشایخی[۲]، خدایار همتی[۳] و بهنام کامکار[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۴]استادیار گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۱

چکیده

جنین‌زایی رویشی، روش جدیدی برای ازدیاد انبوه گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد. این تکنیک تحت‌تأثیر عوامل مختلفی از جمله ترکیب مواد و عناصر غذایی موجود در محیط‌های کشت قرار دارد. به این منظور برای بررسی نقش و میزان تأثیر این بخش مهم تشکیل‌دهنده محیط کشت بر میزان جنین‌زایی رویشی گیاه هویج، آزمایشی در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی با ۱۲ تیمار در ٤ تکرار انجام شد. برای انجام آزمایش قطعات ۱ سانتی‌متری از دم‌برگ هویج در سه محیط کشت MS، B5 و NL در فاز القایی کشت و بعد از ۳ هفته اندام‌های القا شده به فاز ظهور جنین منتقل شدند. ٦ هفته بعد از مرحله ظهور جنین، شمارش جنین‌ها در مراحل مختلف جنین‌زایی انجام شد. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین سه محیط کشت یادشده از لحاظ تشکیل جنین‌های رویشی گیاه هویج وجود دارد ($P<۰/۰۱$). در محیط‌های کشت B5 و MS به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد جنین کروی، قلبی، اژدری و گیاهچه تشکیل شد. نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل رگرسیون گام‌به‌گام بیانگر آن بود که عنصر کلسیم بیش‌ترین میزان تأثیر را در القا و مراحل تکامل جنین‌زایی داشته و بعد از آن به‌ترتیب فسفر و پتاسیم اثر خود را نشان داده‌اند. نتایج همبستگی نشان داد که پتاسیم همبستگی

* مسئول مکاتبه: sj.mousavizadeh@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مثبت و آمونیوم، فسفر و کلسیم همبستگی منفی معنی‌دار با تعداد جنین دارند. همچنین در این پژوهش مشخص شد که از دلایل پایین بودن تعداد جنین در محیط کشت MS، استفاده نکردن ازکازئین هیدرولیزات در این محیط کشت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: هویج، کشت بافت، محیط کشت، جنین‌زایی رویشی، عناصر غذایی

مقدمه

ترکیبات مختلفی که به‌عنوان محیط‌های کشت جنین‌زایی رویشی ارایه می‌گردند، دارای چندین بخش عمده می‌باشند که عبارتند از: مواد تنظیم‌کننده رشد، نمک‌های معدنی، اسیدهای آمینه، ساکارز و مواد آلی دیگر (مشایخی، ۲۰۰۷). در پژوهش‌های محققان پیش‌رو برروی جنین‌زایی رویشی گیاهان، اهمیت حضور هورمون اکسین به‌خصوص توفوردی[1] در محیط کشت جهت القای جنین‌زایی رویشی مشخص گردیده است. همچنین این اصل که برای ظهور، ادامه تکامل و در نهایت تبدیل جنین‌ها به یک گیاه کامل غلظت اکسین‌ها در محیط کشت باید کاهش یافته و یا کاملاً حذف گردند نیز شناخته شده است (مشایخی، ۲۰۰۱؛ راگاوان، ۲۰۰٤؛ میزوکامی و همکاران، ۲۰۰۸؛ هالپرین، ۱۹٦٦؛ راینرت و تازاوا، ۱۹٦۹؛ کاستیلو و همکاران، ۲۰۰۷؛ رای و همکاران، ۲۰۰۷؛ استروز و همکاران، ۲۰۰٦؛ زوینی و هدرامی، ۲۰۰۷). اما در کنار ضرورت استفاده از اکسین، اهمیت حضور شکل‌های مختلف نیتروژن در ترکیب محیط‌های کشت جهت القای جنین‌زایی رویشی نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (اینوسنته و همکاران، ۲۰۰۷). این در حالی است که شکل‌های مختلف نیتروژن که بر جنین‌زایی اثر می‌گذارند شامل سایر مواد نیتروژن‌دار مانند اسیدهای آمینه نیز می‌گردد. نتایج محققان نشان داده که اضافه نمودن اسیدهای آمینه مختلف به‌ویژه آلفا آلانین، گلوتامین، اسید گلوتامیک به یک محیط کشت جنین‌زا، با تأثیر مثبت بر ظهور جنین، باعث افزایش تعداد جنین رویشی می‌شوند (نوتیرونچی و همکاران، ۱۹۸٤؛ ژائو و همکاران، ۱۹۹۸؛ اینوسنته و همکاران، ۲۰۰۷؛ زوینی و هدرامی، ۲۰۰۷). علاوه‌بر موارد بالا، نوع و میزان عناصر معدنی موجود در محیط‌های کشت بر توان جنین‌زایی رویشی اثرات متفاوتی دارند. در برخی از پژوهش‌ها به وجود ارتباط بین پتاسیم و نوع نیتروژن و تأثیر پتاسیم بر ایجاد فشار اسمزی در سیتوپلاسم و محیط کشت که منجر به تکامل جنین‌ها می‌شود، اشاره شده

1- 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D)

Archive of SID

www.SID.ir

است (راینرت و تازاوا، ۱۹٦۹؛ پاکیوز و همکاران، ۱۹۹۵؛ مارشنر، ۱۹۹۵؛ ساتل‌ماشر و هورست، ۲۰۰۷؛ گوئرا و همکاران، ۲۰۰۰). نومورا و کومامین (۱۹۸٦)، نیومن (۱۹۹۵)، تاکدا و همکاران (۲۰۰۳) و میزوکامی و همکاران (۲۰۰۸) به نقش کلسیم به‌عنوان پیامی[1] برای شروع جنین‌زایی و ایجاد قطبیت در تقسیم سلولی در مراحل اولیه جنین‌زایی اشاره کرده‌اند. در همین راستا مشایخی (۲۰۰۱) و همچنین مشایخی و نیومن (۲۰۰٦) با حذف بور از محیط کشت سبب القای جنین رویشی در هویج شدند. وحدت‌پور (۲۰۰۸) اثر عناصر بور و روی را در جنین‌زایی هویج و خیار مورد مطالعه قرار داد. پیری‌زیرکوهی (۲۰۰۸) نیز نقش عناصر غذایی را طی اندام‌زایی و جنین‌زایی رویشی گوجه‌فرنگی بررسی کرد. از سوی دیگر، با توجه به این‌که ریزنمونه‌های جداشده از گیاه مادری، پس از کشت دیگر خودپرور[2] نیستند، بنابراین افزودن کربوهیدرات‌ها، به محیط کشت از اهمیت خاصی برخوردار است. بنابراین نوع، مقدار و غلظت کربوهیدرات محیط کشت می‌تواند بر چگونگی رشد ریزنمونه‌ها و رفتار آن‌ها از لحاظ جنین‌زایی رویشی اثر داشته باشد (بورل و همکاران، ۲۰۰٦؛ رای و همکاران، ۲۰۰۷؛ کیم و همکاران، ۲۰۰٤؛ رودریگرز و همکاران، ۲۰۰۰؛ گرام و همکاران، ۱۹۹٦؛ مجد و همکاران، ۲۰۰٦).

اغلب دو مرحله مختلف برای جنین‌زایی رویشی در گیاهان دنبال می‌شود که مرحله اول آن فاز القا می‌باشد. در این مرحله سلول‌های موجود در محیط کشت ابتدا پتانسیل جنین‌زایی را به‌دست آورده و شروع به تقسیم شدن می‌کنند. سپس در مرحله ظهور جنین‌ها[3]، جنین‌های رویشی ظاهر می‌شوند (مشایخی، ۲۰۰۷). در مرحله ظهور جنین‌ها اثر تغییرات محیط کشت بر تمایز و تکامل جنین‌ها را می‌توان به‌طور مستقیم ملاحظه نمود، در صورتی‌که در مورد چگونگی اثر محیط کشت برروی القای جنین‌زایی رویشی که در آغاز کشت اتفاق می‌افتد، اطلاعات کمی در دسترس می‌باشد، زیرا نتیجه تأثیر محیط کشت بر جنین‌زایی رویشی به‌طور مستقیم و بلافاصله مقدور نبوده و تنها در مراحل بعدی تکامل است که اثر خود را به‌صورت غیرمستقیم نشان می‌دهد. بنابراین هدف از این پژوهش صرف‌نظر از اثر هورمون‌ها، بررسی اثر مواد و عناصر غذایی مختلف استفاده شده در سه محیط کشت MS (موراشینگ و اسکوگ، ۱۹٦۲)، B5 (گامبورگ و همکاران، ۱۹٦۸) و NL (نیومن، ۱۹٦٦) بر جنین‌زایی رویشی دم‌برگ هویج در مراحل مختلف تکامل جنین‌زایی می‌باشد.

1- Signal
2- Autotrophe
3- Realization Phase

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۸٦ و ۱۳۸۷ اجرا شد. برای شروع آزمایش ابتدا بذور هویج رقم نانتس توسط الکل ۷۰ درصد (۳۰ ثانیه) تیمار شدند. سپس ضدعفونی توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به همراه ۲ قطره توین ۸۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. بذور پس از شستشو با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار برروی محیط کشت جوانه‌زنی B5 حاوی ۰/۸ درصد آگار و ۱ درصد ساکارز به تعداد ۱۵-۱۲ عدد بذر در شیشه‌های مربایی کشت شدند. پس از گذشت ٤ هفته ریزنمونه‌های دمبرگ از بذرهای جوانه‌زده هویج جدا، و به قطعات ۱ سانتی‌متری تقسیم گردیدند. از محیط‌های کشت پایه MS، B5 و NL به‌صورت مایع برای کشت ریزنمونه‌ها استفاده شد. به این منظور ابتدا غلظت عناصر و مواد غذایی محیط‌های یادشده بر حسب میلی‌مولار محاسبه و برای ساخت محلول‌های محیط‌های کشت در نظر گرفته شدند (جدول ۱). از هورمون اکسین توفوردی با غلظت‌های صفر، ۰/۲۲٦، ۰/٤٥۲ و ۰/۹۰٤ میکرومول در محیط B5 و صفر، ۲، ۵ و ۹ میکرومول در محیط MS استفاده، و به محیط کشت NL اکسین ایندول استیک اسید با غلظت ۳، ٦ و ۹ میکرومول افزوده شد. pH محیط‌های کشت با استفاده از دستگاه pH متر[1] و با کاربرد سود یا اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال برای محیط کشت MS در محدوده ۵/۵ و برای محیط‌های کشت B5 و NL در محدوده ۵/۷ تنظیم، و بعد از آن محیط‌های کشت به‌مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱/۱ بار و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در دستگاه اتوکلاو[2] ضدعفونی شدند. تعداد ۵ ریزنمونه دمبرگ هویج در فاز القای جنین‌زایی، در محیط‌های یادشده در بالن‌های T شکل حاوی ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت، مستقر گشته و سپس بالن‌ها به دستگاه آکسوفیتون استوارد[3] با دوران ۱/۹ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و نور دایم (۲۰۰۰ لوکس) منتقل شدند. عمل واکشت[4] ریزنمونه‌ها در محیط‌های قبل، اما با هدف ظهور جنین‌ها ۳ هفته پس از کشت در حالی که اکسین از آن‌ها حذف شده بود، انجام گرفت. جهت حذف کامل اکسین، ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت ضدعفونی شده بدون اکسین، در سه مرحله به فاصله‌های ۵،

1- Labtron, pH Meter-Thermometer, pHT 110, IRAN
2- Reyhan Teb, RT-2, IRAN
3- Auxophyton Steward
4- Subculture

Archive of SID

www.SID.ir

۱۰ و ۱۵ دقیقه شستشو شدند (مشایخی، ۲۰۰۱؛ مشایخی، ۲۰۰۷). پس از گذشت ٦ هفته در مرحله ظهور جنین‌ها، تعداد جنین‌های رویشی تولیدشده در مراحل کروی‌شکل، قلبی‌شکل، اژدری‌شکل و گیاهچه، با استفاده از دستگاه استرئوسکوپ[1] متصل به کامپیوتر در دو بزرگ‌نمایی ۲۰ و ٤۰ میکرون، شمارش و عکس‌برداری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌ها با استفاده از تبدیل جذری $\sqrt{X+۰/۵}$ نرمال شدند. سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۲ تیمار در ٤ تکرار صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (۲۰۰۱) انجام شد. با استفاده از اطلاعات جدول ۱، جهت مشخص شدن تأثیر هر یک از عناصر و مواد غذایی تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت بر مراحل مختلف جنین‌زایی رویشی دم‌برگ هویج، از ضرایب همبستگی ساده[2] و برای تعیین مهم‌ترین عامل آن، از ضرایب رگرسیون گام‌به‌گام[3] استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین محیط‌های کشت B5، NL و MS از نظر تشکیل جنین در مراحل مختلف جنین‌زایی وجود دارد (جدول ۲). طبق نتایج ارایه شده در جدول ۳، تغییر در میزان اکسین سبب تغییر در تشکیل تعداد جنین شده و بیش‌ترین تعداد جنین با اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) در تمام مراحل جنین‌زایی در محیط کشت B5 مشاهده گردید (جدول ۳). پیرو نتایج به‌دست آمده، استروز و همکاران (۲۰۰٦) و همچنین رای و همکاران (۲۰۰۷) به‌ترتیب در جنین‌زایی موز[4] و گواوا[5] اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف توفوردی مشاهده کردند.

1- Striyo, Sunny. Monitoring, Sony
2- Corr Procedure
3- Forward Stepwise Regression Procedure
4- *Musa spp*
5- Guava (*Psidium Guajava* L. cv. Banra)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- غلظت عناصر غذایی موجود در محیط‌های کشت MS، B5 و NL (میلی‌مولار).

عناصر غذایی	B5	MS	NL
NO_3^-	۲۶/۶۷	۳۹/۴۰۲	۱۲/۷۵۶
NH_4^+	۲/۰۲۸	۲۰/۶۱۲	۰/۰۰
N	۳۱/۶۹۷	۵۹/۹۹۸	۱۲/۷۵۵
K^+	۲۹/۶۸۵	۲۰/۰۳۸	۸/۶۲۸
P	۰/۹۶۱	۱/۲۴۶	۱/۴۹۹
Mg^{++}	۳/۰۵	۱/۵	۴/۳۸۱
Ca^{++}	۱/۰۲	۲/۹۹۲	۲/۰۶۶
S	۴/۱۳۵	۱/۶۳۲	۵/۱۷۱
CL^-	۲/۰۴	۵/۹۷۹	۰/۰۰
Na	۰/۹۶۳	۰/۰۰۲	۳/۰۲۳
Mn^{++}	۰/۰۵۹	۰/۱۰۰۴	۰/۰۲۱۲
B	۰/۰۴۸	۰/۰۹۹۹	۰/۰۲۴
Zn^{++}	۰/۰۱	۰/۰۳۰۵	۰/۰۰۵۳
Mo	۰/۰۰۱	۱/۰۳۱۸	۰/۰۰۱۳
Cu^{++}	۰/۰۰۰۰۹	۰/۰۰۰۰۹	۰/۰۰۲۴
Fe^{++}	۰/۰۵۳۷	۰/۰۵۳۷	۰/۰۵۳۷
Co	۰/۰۰	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰
I	۰/۰۰۴۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۴۵
کازئین هیدرولیزات	۰/۴	۰/۰۰	۰/۳۲
میواینوزیتول	۰/۲۷۷	۰/۰۵۵	۰/۲۷۷
گلایسین	۰/۰۰	۰/۰۳۹	۰/۰۰
ساکارز	۵۸/۴۲۸	۸۷/۶۴۲	۵۸/۴۲۸

جدول ۲- تجزیه واریانس مراحل مختلف تکامل جنین‌زایی دمبرگ هویج در محیط‌های کشت B5، NL و MS براساس میانگین مربعات.

منابع تغییر	درجه آزادی	جنین کروی	جنین قلبی	جنین اژدری	گیاهچه	کل جنین
بلوک	۳	۰/۱۰۷^{ns}	۰/۰۴۹^{ns}	۰/۰۶۳^{ns}	۰/۰۰۶^{ns}	۰/۰۸۷^{ns}
محیط	۱۱	۲/۹۱**	۱/۵۶**	۱/۰۰**	۱/۸۰**	۴/۴۴**
خطا	۳۳	۰/۰۷	۰/۰۲۵	۰/۰۳۶	۰/۰۵۱	۰/۰۷۷
ضریب تغییرات (درصد)		۱۷/۱۴	۱۴/۸۶	۱۸/۳۹	۱۸/۳۲	۱۵/۸۵

** ($P<۰/۰۱$)، ^{ns} ($P>۰/۰۵$).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- مقایسه میانگین تعداد جنین تشکیل شده در مراحل مختلف تکامل جنین‌زایی رویشی دم‌برگ هویج در محیط‌های کشت B5، NL و MS در مرحله ظهور جنین‌ها.

محیط کشت	نوع هورمون	غلظت هورمون (میکرومول)	جنین کروی‌شکل	جنین قلبی‌شکل	جنین اژدری‌شکل	گیاهچه	کل جنین
MS	توفوردی	صفر	۰/۷^{d*}	۰/۷^{b**}	۰/۷^{c}	۰/۷^{d}	۰/۷^{e}
		۲	۰/۷^{d}	۰/۷^{b}	۰/۷^{c}	۰/۷^{d}	۰/۷^{e}
		۵	۰/۷^{d}	۰/۷^{b}	۰/۷^{c}	۰/۷^{d}	۰/۷^{e}
		۹	۲/۵۳^{c}	۰/۹۶^{b}	۱/۵۶^{b}	۲/۲۷^{c}	۷/۱۶٤^{b}
B5	توفوردی	صفر	۰/۷^{d}	۰/۷^{b}	۰/۷^{c}	۰/۷^{d}	۰/۷^{e}
		۰/۲۲٦	۵/۱٤^{b}	۱/۰۵^{b}	۰/۷^{c}	۰/۸۳^{d}	٦/۱۵۲^{bc}
		۰/٤۵۲	۵/۱۷^{b}	۰/۷^{b}	۰/۷^{c}	۰/۷^{d}	۵/۱۷^{cbd}
		۰/۹۰٤	۱۳/۱۹^{a}	۹/۳۲^{a}	٦/٦۹^{a}	۹/۰۲^{a}	۳۸/۲۵^{a}
NL	ایندول استیک اسید	صفر	۰/۷^{d}	۰/۷^{b}	۰/۷^{c}	۰/۷^{d}	۰/۷^{e}
		۳	۲/۵۷^{c}	۰/۷^{b}	۰/۷^{c}	۰/۷^{d}	۲/۵۷^{cde}
		٦	۲/٦^{c}	۱/۱٦^{b}	۱/۵۷^{b}	٤/۲۲^{b}	۸/۳۳٦^{b}
		۹	٤/۰۲^{b}	۰/۷^{b}	۰/۹۲^{bc}	۲/۲٤^{c}	٦/٦٦۷^{bc}
LSD ۰/۰۵			۱/۷۲	۰/۹۸	۰/۸٤	۱/۳٦	٤/۳٦

* اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

** اعداد داخل جدول جذر اعداد اصلی به‌علاوه ۰/۵ می‌باشند.

تأثیر نوع و غلظت اکسین در جنین‌زایی رویشی دم‌برگ هویج: نتایج این پژوهش نشان داد که در محیط‌های بدون هورمون، جنینی تشکیل نشد، اما با افزودن هورمون اکسین، جنین‌های رویشی شکل گرفتند (جدول ۳). نتایج محققان کشت بافت گیاهی در مورد بافت‌های جنین‌زا این عقیده کلی را تقویت و تأیید می‌نماید که ارسال علایم مورد نیاز و ایجاد شرایط اصلی جهت شروع القای جنین‌زایی به عهده هورمون‌ها و تنش وارده به سلول‌های نمونه مورد کشت می‌باشد (نومورا و کومامین، ۱۹۸٦؛ مشایخی، ۲۰۰۱؛ راگاوان، ۲۰۰٤؛ میزوکامی و همکاران، ۲۰۰۸؛ هالپرین، ۱۹٦٦؛ راینرت و تازاوا، ۱۹٦۹؛ کاستیلو و همکاران، ۲۰۰۷؛ رای و همکاران، ۲۰۰۷؛ استروز و همکاران، ۲۰۰٦؛ زوینی و هدرامی، ۲۰۰۷). بنابراین با افزودن اکسین‌ها و به‌خصوص توفوردی به محیط کشت می‌توان روند تمایز سلول‌های سوماتیکی را تغییر داده و آن‌ها را که توتی‌پوتنت[1] هستند، جنین‌زا نمود. با توجه به

1- Totipotent

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج این پژوهش، افزایش غلظت هورمون و یا تغییر نوع اکسین در بیشتر تیمارها، سبب اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها از نظر جنین‌زایی نشد. مثلاً در محیط MS با توجه به این‌که غلظت بالاتری از توفوردی نسبت به محیط B5 استفاده شد، اما میزان جنین رویشی تشکیل شده در بالاترین غلظت توفوردی (۹ میکرومول در لیتر) در محیط MS با اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۱) کم‌تر از حداقل غلظت توفوردی (۰/۲۲٦ میکرومول در لیتر) در محیط B5 در مرحله جنین کروی‌شکل به‌دست آمد و در محیط MS بین غلظت‌های ۲ و ۵ میکرومول در لیتر توفوردی از نظر تشکیل جنین رویشی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در محیط NL و در تمام مراحل تکامل جنین‌زایی هویج میزان جنین تشکیل شده در غلظت ۹ میکرومول در لیتر ایندول استیک اسید با اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۱) کم‌تر از میزان جنین تشکیل شده در غلظت ۰/۹۰٤ میکرومول در لیتر توفوردی در محیط B5 بود (جدول ۳). به‌نظر می‌رسد عواملی غیر از نوع و غلظت اکسین، جنین‌زایی رویشی هویج را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند. از میان این عوامل می‌توان به مواد مورد استفاده در این محیط‌های کشت اشاره کرد. محیط کشت‌های مختلف هم به‌دلیل اختلاف در میزان و نوع مواد موجود در آن‌ها واکنش‌های متفاوتی به تشکیل جنین رویشی می‌دهند. مثلاً بورل و همکاران (۲۰۰٦) به اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۰۰۱) بین دو محیط کشت B5 و MS از لحاظ جنین‌زایی رویشی گل سرخ دست یافتند و B5 را به‌دلیل غلظت املاح معدنی و میزان نیتروژن آن به‌عنوان محیط پایه مناسب جنین‌زایی رویشی پیشنهاد کردند.

تأثیر نیتروژن بر جنین‌زایی رویشی دم‌برگ: محیط کشت MS از آمونیوم و نیترات بیش‌تری نسبت به NL و B5 برخودار می‌باشد و NL در کل بدون (جدول ۱) آمونیوم است. اما هر سه محیط، مقدار مشخصی نیتروژن دارند. در این پژوهش آمونیوم همبستگی منفی و معنی‌داری با جنین کروی شکل، گیاهچه و کل جنین نشان داد (جدول ٤). البته تأثیر نیتروژن و آمونیوم و به‌ویژه تأثیر منفی آن‌ها برروی تعداد جنین را نباید با تأثیر آن‌ها بر القای جنین‌زایی اشتباه کرد، زیرا نتایج ارایه شده، پس از گذراندن فاز القا می‌باشد. بنابراین تأثیر منفی این مواد به‌علت جلوگیری از تشکیل جنین در سلول‌های جنین‌زا در فاز ظهور جنین‌ها بوده و از طرفی چون غلظت بیشتر مواد استفاده شده در محیط کشت MS مانند نیترات و آمونیوم نسبت به محیط‌های NL و B5 بالا می‌باشد و میزان تشکیل جنین نیز در این محیط کم‌تر از دو محیط دیگر بود، بیشتر همبستگی‌ها، منفی به‌دست آمد. با این وجود پژوهش‌های انجام شده نشان داده که وجود آمونیوم در مرحله القای جنین‌زایی رویشی و در مرحله پیش‌گلبولار ضروری است (هالپرین، ۱۹٦٦). در این بررسی همبستگی معنی‌داری بین نیترات با مراحل مختلف جنین‌زایی

Archive of SID

www.SID.ir

به‌دست نیامد و در کل بنا به عقیده هالپرین (۱۹٦٦) حضور نیتروژن احیاء شده، شرط اساسی برای القای جنین‌زایی رویشی است.

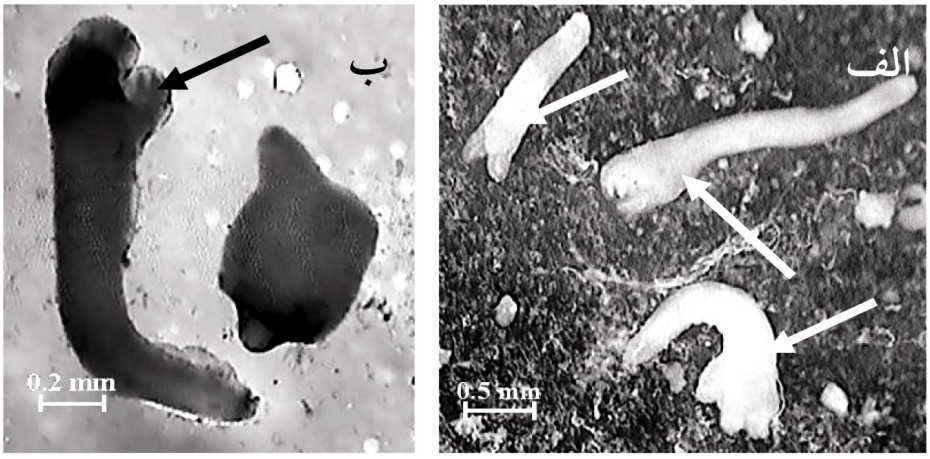
جدول ٤- ضرایب همبستگی بین مراحل مختلف تکامل جنین‌زایی رویشی و با عناصر غذایی اجزای دیگر محیط کشت در دم‌برگ هویج در محیط‌های کشت MS، NL و B5.

عناصر	مراحل تکامل جنین‌زایی رویشی				
	کروی شکل	قلبی‌شکل	اژدری‌شکل	گیاهچه	کل جنین
NO_3^-	−۰/۲۳	۰/۰۰۰۷	−۰/۰۰۳	−۰/٤٦	−۰/۱۹
NH_4^+	−۰/٦٤*	−۰/٤٤	−۰/٤٤	−۰/۸۱**	−۰/٦۰*
N	−۰/۳۷	−۰/۱۳	−۰/۱٤	−۰/۵۸*	−۰/۳۲
K^+	۰/٦٦*	۰/۸۲**	۰/۸۲**	۰/٤٦	۰/۷۰*
P	−۰/۷۲**	−۰/۸۷**	−۰/۸٦**	−۰/۵۳	−۰/۷۵**
Mg^{++}	۰/۳۰	۰/۰٦	۰/۰۷	۰/۵۲	۰/۲۵
Ca^{++}	−۰/۹۷**	−۰/۸۹**	−۰/۸۹**	−۰/۹۹**	−۰/۹٦**
CL^-	−۰/٤۳	−۰/۲۰	−۰/۲۰	−۰/٦۳*	۰/۳۸
Na^{++}	۰/۰٦	−۰/۱۸	−۰/۱۷	۰/۳۰	۰/۰۱
Mn^{++}	−۰/۲۸	−۰/۰۵۱	−۰/۰۵۵	−۰/۵۱	−۰/۲٤
B	−۰/٤۵	−۰/۲۳۱	−۰/۲۳٦	−۰/٦٦*	−۰/٤۱
Zn^{++}	−۰/۵۷*	−۰/۳٦۳	−۰/۳٦۷	−۰/۷۵**	−۰/۵۳
Mo	−۰/۷۱**	−۰/۵۲۱	−۰/۵۲۵	−۰/۸٦**	−۰/٦۷*
Cu^{++}	−۰/۲۵	−۰/٤۷۸	−۰/٤۷٤	−۰/۰۰۹	−۰/۳
Co	−۰/۷۱**	−۰/۵۲۱	−۰/۵۲۵	−۰/۸٦**	−۰/٦۷*
I	−۰/۷۱**	−۰/۵۲۱	−۰/۵۲۵	−۰/۸٦**	−۰/٦۷*
S	۰/٤۸	۰/۲۵	۰/۲٦	۰/٦۸*	۰/٤۳
کازئین هیدرولیزات	۰/۸۳**	۰/٦۷*	۰/٦۷*	۰/۹٤**	۰/۸۰**
میواینوزیتول	۰/۷۱**	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۸٦**	۰/٦۷*
گلایسین	−۰/۷۱**	−۰/۵۲	−/۵۲	−۰/۸٦**	−۰/٦۷*
ساکارز	−۰/۷۱**	−۰/۵۲	−۰/۵۲	۰/۸٦**	−۰/٦۷*

** (P<۰/۰۱)، * (P<۰/۰۵).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- (الف) مراحل ابتدایی تشکیل گیاهچه و جنین اژدری‌شکل در محیط کشت B5 حاوی ۰/۹۰٤ میکرومول توفوردی (بزرگ‌نمایی ۲۰ میکرون). (ب) جنین اژدری‌شکل تشکیل شده در محیط کشت MS حاوی ۹ میکرومول توفوردی (بزرگ‌نمایی ٤۰ میکرون). فلش‌ها نشان‌دهنده جنین‌های اژدری‌شکل می‌باشند.

نکته قابل‌توجه این است که محیط NL با نیتروژن احیاشده کمی که دارد، سبب تولید جنین شده و با توجه به این‌که MS بالاترین میزان آمونیوم را دارد، اما کم‌ترین تعداد جنین را در تمام مراحل جنین‌زایی دارد (جدول ۳). به عقیده راینرت و تازاوا (۱۹٦۹) و همچنین مشایخی (۲۰۰۱) فقط غلظت نیتروژن موجود در محیط کشت در جنین‌زایی رویشی نقش تعیین‌کننده دارد و نه خصوصیاتی نظیر احیا و یا غیراحیا بودن آن. در واقع آن‌ها شرط اساسی و لازم جهت تشکیل جنین رویشی را حضور درون سلولی میزان مشخصی از نیتروژن به‌صورت آمونیوم دانسته‌اند. همچنین اشکال مختلف نیتروژن که بر جنین‌زایی اثر می‌گذارند، فقط محدود به نیترات و آمونیوم نبود، بلکه شامل سایر مواد نیتروژن‌دار مانند اسیدهای آمینه نیز می‌شوند. به‌طور مثال ژائو و همکاران (۱۹۹۸) بیان کردند که برای جنین‌زایی درون شیشه‌ای برنج[1] باید ۱٤ اسید آمینه مختلف به محیط کشت اضاف شود. بنابراین با توجه به نوع مواد مورد استفاده در محیط‌های کشت این پژوهش می‌توان به دلایل اختلاف در تشکیل جنین‌های این محیط‌ها پی برد. برای مثال MS بدون کازئین هیدرولیزات، ولی NL و B5 دارای آن می‌باشند، بنابراین محیط‌های NL و B5 از حضور اسیدهای آمینه موجود در کازئین هیدرولیزات برای القای

1- *Oryza Sativa*

Archive of SID

www.SID.ir

جنین‌زایی استفاده می‌کنند، اما در محیط کشت MS فقط از اسید آمینه گلیسین به‌عنوان یک منبع دارای نیتروژن که به شکل احیا شده است، استفاده می‌گردد. در کازئین هیدرولیزات اسیدهای آمینه لازم برای جنین‌زایی مانند گلوتامین، پرولین، آلانین، سرین و گلیسین وجود دارد (مشایخی، ۲۰۰۷). براساس گزارش محققان، افزودن گلوتامین و گلوتامیک اسید به محیط کشت فی‌جوا[1] (اینوسنته و همکاران، ۲۰۰۷) و افزودن گلوتامین به محیط کشت خرما[2] (زوینی و هدرامی، ۲۰۰۷) سبب افزایش تعداد جنین رویشی می‌شود. نوتیرونچی و همکاران (۱۹۸٤) بیان کردند اسیدهای آمینه پرولین و سرین از طریق افزایش میزان هورمون‌های داخلی باعث افزایش فعالیت‌های میتوزی سلول‌ها شده و به این وسیله تشکیل توده‌های سلولی پیش‌جنین‌زا را افزایش می‌دهند. از سوی دیگر راینرت و تازاوا (۱۹٦۹) مشاهده نمودند که در محیط کشتی که فقط دارای آمونیم می‌باشد، این میزان پتاسیم درون سلول‌ها[3] است که می‌تواند به‌عنوان عاملی محدودکننده برروی جنین‌زایی رویشی عمل نماید.

تأثیر پتاسیم، قند و گوگرد بر جنین‌زایی رویشی دم‌برگ هویج: در این پژوهش پتاسیم همبستگی مثبت و معنی‌داری با تعداد کل جنین و مراحل مختلف جنین‌زایی نشان داد (جدول ٤). نتایج آنالیز رگرسیون گام‌به‌گام (جدول ٥) نشان داد که پتاسیم از مجموع عناصر غذایی مورد بررسی در این پژوهش ۰/۹۹۹ تغییرات مربوط به تعداد کل جنین را توجیه می‌کند (R^2=۰/۹۹۹). پیری‌زیرکوهی (۲۰۰۸) نتیجه گرفت که پتاسیم در جنین‌زایی رویشی گوجه‌فرنگی نقش مثبتی دارد و سبب افزایش جنین رویشی می‌گردد. کاستیلو و همکاران (۲۰۰۷) نیز در پژوهش خود برروی جنین‌زایی رویشی فلفل[4] نتیجه گرفتند که با حذف نیترات و سیترات پتاسیم از محیط کشت مایع MS شکل‌گیری جنین رویشی متوقف می‌شود. به‌نظر می‌رسد نحوه اثر پتاسیم در جنین‌زایی رویشی مربوط به ایجاد فشار اسمزی در محیط کشت باشد، زیرا افزایش فشار اسمزی محیط کشت سبب تکامل جنین‌ها می‌شود (پاکیوز و همکاران، ۱۹۹۵؛ مشایخی، ۲۰۰۷). به این صورت که پتاسیم در سیتوپلاسم و کلروپلاست به ایجاد فشار اسمزی کمک می‌کند (مارشنر، ۱۹۹۵) و این افزایش فشار اسمزی باعث تجمع مواد ذخیره‌ای (پروتئین، کربوهیدرات و چربی) درون جنین‌های رویشی گردیده که خود به کاهش رشد و

1- Feijoa (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret)
2- *Phoenix Dactylifera*
3- Intra Cellulare K+
4- *Capsicum Chinensis* cv. Rux-02

Archive of SID

www.SID.ir

در نتیجه بلوغ جنین‌ها منجر می‌شود (مشایخی، ۲۰۰۷). در واقع فشار اسمزی ایجاد شده باعث آب‌گیری از جنین‌ها و تسریع در تکامل آن‌ها می‌گردد. آب‌گیری از طریق حفظ سلول‌های سیتوپلاسمی ناحیه مریستمی جنین و جلوگیری از شیشه‌ای شدن[1] محور زیرلپه آن که هنگام جوانه‌زنی از رشد آن جلوگیری می‌کند، سبب تکامل جنین‌ها می‌شود. بنابراین یکی از دلایل بالا بودن تعداد جنین در مراحل مختلف آن در محیط کشت B5 در این پژوهش (جدول ۳)، بالا بودن میزان پتاسیم در این محیط نسبت به محیط‌های MS و B5 است (جدول ۱).

جدول ۵- نتایج آنالیز رگرسیون گام‌به‌گام و ضرائب تبیین در مورد تأثیر عناصر محیط‌های کشت MS، B5 و NL بر مراحل مختلف تکامل جنین‌زایی رویشی دم‌برگ هویج.

عناصر	مراحل تکامل جنین‌زایی				
	جنین کروی‌شکل	جنین قلبی‌شکل	جنین اژدری‌شکل	گیاهچه	کل جنین
کلسیم	۰/۹۵۱۵***	۰/۷۹۹۷***	۰/۸۰۳***	۰/۹۹۷۵***	۰/۹۲۸۹***
فسفر	۰/۹۹۹۹***	۰/۹۹۹۵***	۰/۹۹۹***	–	–
پتاسیم	–	–	–	–	۰/۹۹۹۹***

*** (P<۰/۰۰۰۱).

از سوی دیگر میزان قند و ساکارز برای جوانه‌زنی جنین‌های رویشی لازم هستند (مشایخی، ۲۰۰۷). رای و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که حتی استفاده نکردن از ساکارز در محیط جنین‌زای گواوا باعث جلوگیری از تشکیل جنین رویشی می‌شود. به عقیده نیومن (۱۹۹۵) مناسب‌ترین هیدروکربن برای محیط کشت جنین‌زا ساکارز می‌باشد و استفاده از ساکارز نسبت به گلوکز اثر تحریک‌کنندگی بیش‌تری روی توسعه جنین رویشی گل سرخ[2] دارد (بورل و همکاران، ۲۰۰۶). کاستیلو و همکاران (۲۰۰۷) در فلفل، کیم و همکاران (۲۰۰٤) در گل سرخ، مجد و همکاران (۲۰۰٦) و همچنین گوئرا و همکاران (۲۰۰۰) در کاج اروکاریا *Araucaria excelsα* میزان ۳-۲ درصد ساکارز را برای جوانه‌زنی و تکامل جنین‌های رویشی پیشنهاد کردند. بنابراین غلظت ۲ تا ۳ درصد ساکارز برای محیط کشت جنین‌زا کافی به‌نظر می‌رسد.

1- Vitrification
2- *Rosa Hybrida* L.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج به‌دست آمده از ضرایب همبستگی نشان داد که میزان گوگرد محیط کشت، همبستگی مثبت و معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) با تعداد گیاهچه دارد (جدول ٤). گوگرد جزء ساختمان اسیدهای آمینه سیستئین و متیونین و در نتیجه جزو ساختمان پروتئین‌هاست. میزان گوگرد بیش‌تر موجود در محیط کشت NL و همچنین وجود منیزیم بالاتر در این محیط کشت نسبت به B5 و MS که نقش مهمی در ساخت کلروفیل دارد سبب شده که فتوسنتز و متابولیسم کربوهیدرات‌ها در این محیط بالاتر رفته و در نتیجه میزان قند و تجمع آن در ریزنمونه‌های کشت شده در این محیط افزایش یابد و در نهایت باعث ظهور جنین‌هایی با رنگ‌دانه‌های قرمز در گیاهچه‌های تولید شده گردد (شکل ۲- الف). به عقیده جان و همکاران (۱۹۹۵) علایم تجمع قند در جنین و گیاهچه‌های به‌دست آمده از آن به‌صورت رنگ‌دانه‌های قرمز در آن‌ها مشخص می‌گردد. همچنین در محیط کشت NL همزمان با القای جنین، از ریزنمونه‌های کشت شده دم‌برگ هویج، ریشه‌هایی ظاهر شدند (شکل ۲- ب)، که علت تشکیل ریشه استفاده از هورمون ایندول استیک اسید در این محیط کشت می‌باشد (مشایخی، ۲۰۰۷).

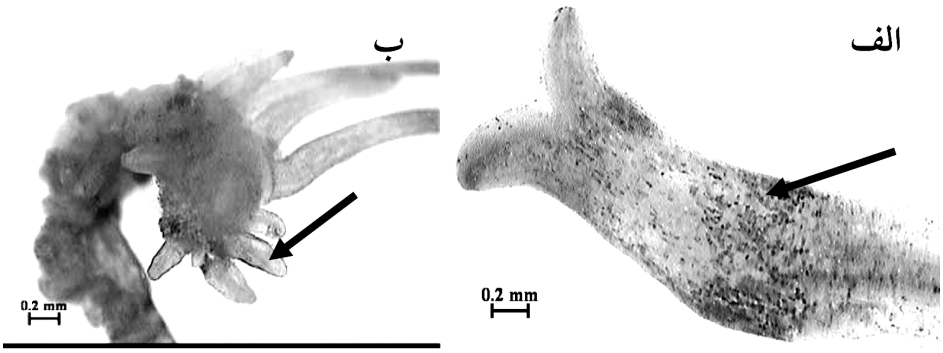
تأثیر فسفر و میواینوزینول بر جنین‌زایی رویشی دم‌برگ هویج: نتایج نشان داد که بین میزان فسفر محیط کشت با تعداد جنین در مراحل مختلف تکامل جنین‌زایی رویشی همبستگی منفی معنی‌داری وجود دارد (جدول ٤). همچنین نتایج تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام (جدول ٥) نیز به‌خوبی آشکار ساخت که فسفر به‌میزان ۰/۹۹۹ تغییرات مربوط به تعداد جنین‌های کروی، قلبی و اژدری‌شکل را در محیط کشت توجیه می‌کند (R^2=۰/۹۹۹). آشکارترین نقش فسفر، به‌عنوان جزیی از ساختمان مولکول‌های درشت اسید نوکلئیک بوده که عامل ایجاد پیوندهای میان واحدهای ریبونوکلئوزید در DNA و RNA و ساختمان مولکول‌های درشت می‌باشد (مارشنر، ۱۹۹۵). در همین راستا در جنین‌های رویشی که در مراحل ابتدایی تکامل قرار دارند سلول‌های غنی از اسیدهای نوکلئیک حضور دارند (رودریگرز و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین ATP یک فسفات پرانرژی بوده که عامل اساسی لازم برای ساختن نشاسته است (مارشنر، ۱۹۹۵) و یکی از علایم سلول‌های جنین‌زا، محتوای نشاسته زیاد درون آن‌ها است (مشایخی، ۲۰۰۷). براساس گزارش گرام و همکاران (۱۹۹٦) محتوای نشاسته پروتوپلاست سلول‌های جنین‌زا در نخود[1] در طی ۳ روز اول کشت و قبل از این‌که تقسیم در آن‌ها شروع شود به سرعت زیاد می‌گردد. با این حال با ادامه تمایز در سلول‌های جنین‌زا و شکل‌گیری جنین‌های گلبولی شکل، از

1- *Pisum Sativum* var. Belman

Archive of SID

www.SID.ir

محتوای نشاسته آن‌ها کاسته می‌شود (گرام و همکاران، ۱۹۹٦؛ رودریگرز و همکاران، ۲۰۰۰). بنابراین حضور فسفر در مرحله القا در محیط کشت برای ساختن نشاسته در سلول‌های جنین‌زا الزامی است. همچنین فسفر در ساختمان فسفولیپیدها نقش دارد و در این بین میواینوزیتول[1] نیز از اجزای تشکیل‌دهنده فسفولیپیدهای دیواره سلول است و برروی مراحل تشکیل دیواره سلول اثر دارد (مشایخی، ۲۰۰۷). نقش اصلی میواینوزیتول در اتصال آن با هورمون ایندول استیک اسید و در نتیجه جلوگیری از تخریب این هورمون، در داخل بافت گیاه می‌باشد. محیط‌های کشت NL و B5 دارای محتوای ۵ برابری میواینوزیتول بیش‌تر نسبت به MS می‌باشند. پس احتمالاً یکی از دلایل دیگر کاهش تعداد جنین در MS می‌تواند با کم بودن میواینوزیتول در این محیط کشت مرتبط باشد. علاوه بر این، میواینوزیتول بر سیستم پیامی کلسیم[2] نیز تأثیر دارد و از این طریق نیز بر رشد و نمو سلول‌های نمونه مورد کشت مؤثر است (نیومن، ۱۹۹۵). در هر حال یک رابطه بین آزاد شدن کلسیم از محل‌های ذخیره‌ای درون سلولی و متابولیزم اینوزیتول ۱،٤،۵- تری‌فسفات وجود دارد و اکسین نیز در برقراری این رابطه بین فسفو اینوزیتول و کلسیم، نقش دارد (دودیتس و همکاران، ۱۹۹۵).



شکل ۲- (الف) جنین رویشی در مرحله گیاهچه‌ای دارای رنگدانه‌های قرمز، تشکیل شده از دم‌برگ هویج در محیط کشت NL حاوی ٦ میکرومول در لیتر ایندول استیک اسید (بزرگ‌نمایی ٤۰ میکرون). (ب) ریشه‌های شکل گرفته از ریزنمونه‌های دم‌برگ هویج در محیط کشت جنین‌زای NL حاوی ٦ میکرومول در لیتر ایندول استیک اسید (بزرگ‌نمایی ٤۰ میکرون).

1- Meso-Inositol
2- Calcium-Signal System

Archive of SID

www.SID.ir

تأثیر کلسیم بر جنین‌زایی رویشی دم‌برگ هویج: نتایج نشان داد که بین میزان کلسیم محیط کشت با مراحل مختلف جنین‌زایی رویشی همبستگی منفی معنی‌داری ($P<0/01$) وجود دارد (جدول ٤). همچنین نتایج تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام (جدول ٥) نیز تأثیر کلسیم در تغییرات مربوط به مراحل مختلف تکامل جنین‌زایی در محیط کشت را به‌خوبی توجیه می‌کند. این مسأله قابل قبول است، زیرا افزایش اکسالات کلسیم سلول‌ها و سیتوسولیک کلسیم سلول‌ها، از علایم بارز سلول‌های جنین‌زا می‌باشد (تاکدا و همکاران، ۲۰۰۳)، به‌طوری‌که کلسیم سبب افزایش غلظت سیتوسولیک کلسیم شده و به‌عنوان پیامی برای آغاز باززایی جنین‌ها عمل می‌کند (تاکدا و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین افزودن کلسیم به محیط کشت جنین‌زا باعث بهبود تمایزیابی جنین‌ها در مرحله بعد از القا می‌شود (میزوکامی و همکاران، ۲۰۰۸). از سوی دیگر عمل اکسین و کلسیم به یکدیگر وابسته است، به‌طوری‌که حرکت کلسیم و اکسین در جهت مخالف یکدیگر از درون غشای سیتوپلاسم با جابه‌جایی فعال اکسین انجام می‌گیرد که بر پایه آن اکسین سبب باز کردن گذرگاه‌هایی برای ورود کلسیم در جهت شیب الکتروشیمیایی می‌شود (حتل، ۱۹۸۳؛ دودیتس و همکاران، ۱۹۹۵)، به این طریق که افزایش خروج پروتون به‌وسیله اکسین که پیش‌نیاز فرآیند سست شدن دیواره سلول می‌باشد، به بودن کلسیم در بیرون سلول نیاز دارد. به‌طور هم‌زمان، کلسیم نیز باعث پایداری دیواره سلولی می‌شود و این عمل مخالف تحریک اکسین در رشد و بزرگ شدن سلول است (مارشنر، ۱۹۹۵؛ ساتل‌ماشر و هورست، ۲۰۰۷). عمل دیگری که کلسیم در جنین‌زایی رویشی انجام می‌دهد ایجاد قطبیت طی تقسیم سلولی در مراحل اولیه جنین‌زایی است (نومورا و کومامین، ۱۹۸٦). یعنی در محیطی که جنین در آن قرار دارد حالت قطبیت به‌وجود می‌آید که کلسیم در ایجاد آن نقش دارد، زیرا در حالی‌که جنین از یک طرف به بند ناف[1] متصل است، از انتهای دیگرش در درون کیسه جنینی و یا آندوسپرم آزاد می‌باشد. در نتیجه جنین در محیط قطبی شده‌ای قرار می‌گیرد، که از یک سو مواد مشتق از کیسه جنینی که سبب رشد آن می‌شوند و از سوی دیگر موادی که توسط بند ناف به آن می‌رسد را در برمی‌گیرد و با این شکل قرارگیری، نگهداری می‌شود (لیندون، ۱۹۹۰؛ نومورا و کومامین، ۱۹۸٦). بنابراین حضور کلسیم در مرحله القا و مرحله پیش گلبولار ضروری است.

تأثیر مولیبدن، روی و بور بر جنین‌زایی رویشی دم‌برگ هویج: عناصر دیگری نیز در این پژوهش همبستگی معنی‌داری با جنین‌زایی رویشی هویج نشان دادند. از جمله این عناصر مولیبدن است که در ساختمان آنزیم‌های نیتروژناز و نیترات ردوکتاز قرار دارد و از این‌رو حضور مولیبدن برای احیا نیترات

1- Suspensor

Archive of SID

www.SID.ir

و تثبیت نیتروژن مولکولی مهم می‌باشد (مارشنر، ۱۹۹۵؛ ساتل‌ماشر و هورست، ۲۰۰۷). براساس نتایج پیری‌زیرکوهی (۲۰۰۸) حضور مولیبدن برای جنین‌زایی گوجه‌فرنگی ضروری است و همبستگی مثبت و معنی‌داری با تعداد جنین رویشی دارد. عناصر دیگر بور و روی می‌باشند (جدول ٤). وجود روی برای فعال کردن آنزیم‌های DNA و RNA پلی‌مراز و ترانس فسفوریلازها ضروری است و از سوی دیگر روی، پیش‌ساز تریپتوفان و در نتیجه پیش‌ساز ایندول استیک اسید است (مارشنر، ۱۹۹۵؛ ساتل‌ماشر و هورست، ۲۰۰۷). در همین راستا براساس نتایج وحدت‌پور (۲۰۰۸)، حذف روی از محیط کشت سبب تشکیل جنین‌های ناقص در هویج گردید، اما اضافه کردن آن به محیط کشت سبب تکامل جنین‌ها تا مرحله گیاهچه‌ای شد. بور نیز عنصری است که در سرنوشت جنین‌زایی تأثیر مستقیم دارد. به این صورت که با حضور در دیواره سلولی باعث پایداری غشا سیتوپلاسم و از سوی دیگر باعث اکسیداسیون ایندول استیک اسید می‌شود (مارشنر، ۱۹۹۵؛ ساتل‌ماشر و هورست، ۲۰۰۷). براساس غلظت‌های محاسبه شده عناصر در محیط‌های کشت مورد استفاده در این پژوهش، میزان بور موجود در محیط کشت MS تقریباً ۲ برابر محیط B5 و ٤ برابر محیط NL است و احتمالاً یکی از دلایل کاهش تولید جنین رویشی در محیط MS، بالا بودن میزان بور در این محیط می‌باشد. اما برای بالا بردن تعداد جنین نمی‌توان بور را کاملاً از محیط کشت حذف کرد، چون برای تقسیم و طویل شدن سلول حضور بور لازم است و از طرفی حذف بور سبب کاهش میزان اسید نوکلئیک و RNA می‌شود (مارشنر، ۱۹۹۵؛ ساتل‌ماشر و هورست، ۲۰۰۷). اما در پژوهش مشایخی و نیومن (۲۰۰٦) و همچنین وحدت‌پور (۲۰۰۸)، حذف بور از محیط کشت B5 سبب القای جنین رویشی هویج (البته در محیط بدون اکسین خارجی) گردید، ولی در نهایت تعداد جنین تشکیل شده کاهش یافته بود. به‌نظر می‌رسد مرحله‌ای که عناصر روی و بور در آن‌ها اثر می‌گذارند دارای اهمیت است. به این صورت که عنصر بور با کاهش اکسین داخلی در مرحله القا و عنصر روی با افزایش اکسین در مرحله ظهور جنین، باعث کاهش جنین‌ها می‌شوند (مشایخی، ۲۰۰۱). با توجه به جدول ۱، میزان هر دو عنصر روی و بور در محیط MS بیش‌تر از B5 و NL می‌باشد.

نتیجه‌گیری

یکی از عوامل مهم و مؤثر بر جنین‌زایی رویشی هویج در شرایط درون شیشه‌ای، ترکیب محیط کشت استفاده شده می‌باشد. هر چند که تغییر در میزان و نوع اکسین، سبب تغییر در تشکیل تعداد جنین شد و در محیط‌های بدون هورمون، جنینی تشکیل نشد، اما با افزایش هورمون اکسین در

Archive of SID

www.SID.ir

محیط‌های MS و NL، تعداد جنین به نسبت افـزایش هورمـون، افـزوده نـشد. در محـیط کـشت B5 بیش‌ترین و در محیط کشت MS کم‌ترین تعداد جنین تشکیل شد. نتایج به‌دسـت آمـده از رگرسـیون گام‌به‌گام بیانگر آن بود که به‌ترتیب کلسیم، فسفر و پتاسیم بیش‌ترین تأثیر را بـر جنـین‌زایـی رویـشی داشتند. همبستگی مثبت و معنی‌داری نیز با تعداد کل جنین و مراحل مختلف جنین‌زایی نـشان داد. بـا توجه به این‌که محیط کشت MS بالاترین میزان آمونیوم را داشت، اما کم‌ترین تعداد جنین را در تمـام مراحل جنین‌زایی تشکیل داد، زیرا MS بدون کازئین هیـدرولیزات، ولـی NL و B5 دارای آن بودنـد، بنابراین محیط‌های NL وB5 از اسیدهای آمینه موجود در کازئین هیدرولیزات برای القای جنـین‌زایـی استفاده کردند. میزان گوگرد موجود در محیط کشت NL و همچنین وجود منیزیم بالاتر در این محیط کشت نسبت به B5 و MS که نقش مهمی در ساخت کلروفیل دارد سبب شد که فتوسنتز و متابولیسم کربوهیدرات‌ها در این محیط بالاتر رفته و در نتیجه میزان قند و تجمع آن در ریزنمونه‌های کشت شده در این محیط افزایش یافته و در نهایت باعث ظهور جنین‌هایی با رنگ‌دانه‌های قرمـز در گیاهچـه‌هـای حاصل گردید. در نهایت نتایج به‌دست آمده در این پـژوهش را مـی‌تـوان بـرای افـزایش جنـین‌زایـی رویشی، از طریق تغییر در نوع و میزان مواد و عناصر غذایی مورد استفاده در محیط‌های کشت، به‌کـار گرفت.

منابع

1.Burrell, A.M., Lineberger, R.D., Rathore, K.S., and Byrne, D.H. 2006. Genetic variation in somatic embryogenesis of Rose. HortScience, 41: 5. 1165-1168.

2.Castillo, P.Y.Z., Flick, A.C., Puc, G.L., Ruiz, A.S., Perez, F.B., Buzzy, N.S., and Andra, L.I. 2007. Somatic embryogenesis in Habanero Peper (C. *chinense* Jacq.) from cell suspension. HortScience, 42: 2. 329-333.

3.Dudits, D., Gyorgyey, J., Bogre, L., and Bako, L. 1995. Molecular Biology of Somatic Embryogenesis. In Thorpe, (ed.), InVitro Embryogenesis in Plants, P 267-308. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Printed in the Netherlands.

4.Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.

5.Gram, T., Mattsson, O., and Joersbo, M. 1996. Division frequency of pea protoplasts in relation to starch accumulation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45: 3. 179-183.

Archive of SID

www.SID.ir

6.Guerra, M.P., Silveira, V., dos Santos, A.L.W., Astarita, L.V., and Nodari, R.O. 2000. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (BERT) O .KTZE. In Jan, M.S., Gupta, P.K., and Newton, R.J. (ed.), Somatic Embryogenesis in woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 6: 457-478.
7.Halperin, W. 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspension. American J. Bot. 53: 443-453.
8.Hetel, R. 1983. The mechanism of auxin transport as a model for auxin action. Z. Pflanzen Physiol. 112: 53-67.
9.Inocente, G.C.C., Vesco, L.L.D., Steinmacher, D., Torres, A.C., and Guerra, M.P. 2007. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds. 2007. Scientia Horticulture. 111: 228-234.
10.John, A., Drake, P., and Selby, C. 1995. Somatic embryogenesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). In: Jan, M.S., Gupta, P.K., and R.J. Newton (eds.), Somatic Embryogenesis in woody Plants, Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 3: 125-143.
11.Kim, C.K., Oh, J.Y., Chung, J.D., Burrel, A.M., and Byrne, D.H. 2004. Somatic embryogenesis and plant regeneration from in-vitro-grown leaf explant of rose. HortScience, 39: 6. 1378-1380.
12.Lyndon, R.F. 1990. Plant development: the cellular basis. Unwin Hyman Ltd. London, UK, 320p.
13.Majd, A., Chamandosti, F., Mehrabia, S., and Sheidai, M. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* L. Biological Science, 9: 4. 729-734.
14.Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London, 889p.
15.Mashayekhi, K. 2001. The protein synthesis spectrum during the induction phase of somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota* L.) cultures and the role of nitrogen forms for embryo development. A Thesis of Doctor of Science in Agriculture. Justus Liebig University, Giessen, 95p. (In Persian)
16.Mashayekhi, K., and Neumann, K.H. 2006. Effects of boron on somatic embryogenesis of Daucus carota. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 84: 279-283. (In Persian)
17.Mashyekhi, K. 2007. Plant Somatic Embryogenesis. Makhtomgholi Fraghi (Sarli) Press. 488p. (In Persian)
18.Mizukami, M., Takeda, T., Satonaka, H., and Matsuoka, H. 2008. Improvement of propagation frequency with two-step direct somatic embryogenesis from carrot hypocotyls. Biochemical Eng. 38: 1. 55-60.
19.Murashinge, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant, 15: 473.

Archive of SID

www.SID.ir

20.Neumann, K.H. 1966. Wurzelbildung und Nukleinsauregehalt bei phloem Gewebekulturen der karrotenwurzel auf synthetischen Nahrmedium verschiedener Hormonkombina-tionen. Lees Phytohormones ET Organogenese, 38: 95-102.
21.Neumann, K.H. 1995. Pflanzliche Zell und Gewebekulturen. Verlag Eugen Ulmer, 304p.
22.Nomura, K., and Komamin, A. 1986. Somatic embryogenesis in cultured carrot cells. Develop. Growth and Differ, 28: 6. 511-517.
23.Nutironchi, V., Caligo, M.A., Nozzolini, M., and Luccarini, G. 1984. Stimulation of carrot somatic embryogenesis by proline and serine. Plant Cell Rep. 3: 210-214.
24.Paques, M., Bercetche, J., and Palada, M. 1995. Prospects and Limits of Somatic Embryogenesis of *Picea abies*, P 399-414. In: Jain, M.S., Gupta P.K., and Newton, R.J. (ed.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, History, Molecular and Biochemical Aspects, and Applications. Vol. 1. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
25.Piri Zirkouhi, M. 2008. The Investigation of organogenesis and somatic embryogenesis in two of wild and commercial cultivars of tomato in three media MS, B5, NL. M.Sc Thesis Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resoures, Iran, 97p. (In Persian)
26.Raghavan, V. 2004. Role of 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidobsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4- D. American J. Bot. 9: 11. 1743-1756.
27.Rai, M.K., Akhtar, N., and Jaiswal, V.S. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. Scientia Horticulture, 113: 2. 129-133.
28.Reinert, J., and Tazawa, M. 1969. Wirkung von Stickstoffverbindungen und von Auxin auf die Embryogenese in Gewebekulturen. Planta. 87: 239-248.
29.Rodriguez, R., Berros, B., Centeno, M.L., Rovira, M., Rodrigues, A., and Radojevic, L. 2000 Applied and basic studies on somatic embryogenesis in hazelnut (*Corylus avellana* L.), In: Jan, M.S., Gupta, P., and Newton, R.J. (eds.), Somatic Embryogenesis in woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht-The Netherland Vol. 6. 291-359.
30.SAS. 2001. SAS/STAT user´s guide. Version 9. SAS Institute, Cary, N.C. USA.
31.Sattelmacher, B., and Horst, J.W. 2007. The Apoplast of higher plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions. University of Honnover, Germany. Springer, 323p.
32.Strosse, H., Schoofs, H., Panis, B., Andre, E., Reyniers, K., and Swennen, R. 2006. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp). Plant Science, 170: 104-112.

Archive of SID

www.SID.ir

33. Takeda, T., Inose, H., and Matsuoda, H. 2003. Stimulation of somatic embryogenesis in carrot cells by the addition of the calcium. Biochemical Engineering Journal, 14: 143-148.
34. Vahdatpour, F. 2008. The investigation of zinc and boron elements effects in somatic embryogenesis of carrot (*Daucuse carota* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.). M.Sc. Thesis Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resoures, Iran, 128p. (In Persian)
35. Zhao, J., Zhou, C., and Yang, H.Y. 1998 In vitro development of early proembryos and plant regeneration via microculture in *Oryza sativa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 55: 3. 167-174.
36. Zouine, J., and Hadrami, I.E. 2007. Effect of 2,4 -D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticulture, 112: 221-226.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 17(1), 2010
www.gau.ac.ir/journals

Evaluation of media elements and materials on petiole somatic embryogenesis of Carrot (*Daucus carota* L.)

***S.J. Musavizadeh[1], K. Mashayekhi[2], Kh. Hemmati[3] and B. Kamkar[4]**

[1]M.Sc. Student, Dept. of Horticultural Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associated Prof., Dept. of Horticultural Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Assistant Prof., Dept. of Horticultural Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [4]Assistant Prof., Dept. of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

Somatic embryogenesis is a new approache to plant mass *in vitro* propagation. This method influences by elements and their components in medium. In order to investigate the effects of different media and it's role on somatic embryogenesis of Carrot, a CBD experiment with four replications (including 12 treatments) was conducted. To do this, Carrot Petioles (with 1 cm dimension) in induction phase were cultured in three different media including MS, B5 and NL. After three weeks, induced organs were transported to realization phase and embryo counting was begun six weeks after realization phase during different embryogenesis stages. Results indicated that studied media had significant differences in respect to somatic embryogenesis ($P<0.01$). The B5 and MS had the highest and the lowest number of globular, heart, torpedo and seeding, respectively. Results of stepwise regression revealed that the calcium was the most determinant element on induction and embryogenesis evaluation. The Phosphorus and Potassium also were placed in next two priorities. Correlation results show that, Potassium was positively, but Ammonia, Phosphorus and Calcium were negatively correlated with embryo number. Also, results stated that low embryo number in MS media stewed from lacking of casein hydrolysate in media.

Keywords: Carrot, Tissue culture, Medium, Somatic Embryogenesis, Nutrition

* Corresponding Author; Email: sj.mousavizadeh@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir