ریخت‌شناسی و تشریح رویان‌زائی بدنی در میخک (*Dianthus caryophyllus* L.)

امید کرمی*[۱]، علی دلجو[۱] و لیلا بارانچی[۲]

[۱] همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

[۲] همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی

تاریخ دریافت: ۸۵/۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱/۳۱

چکیده

رویان‌زائی بدنی(Somatic embryogenesis) مدل خوبی برای مطالعه نمو رویان در گیاهان است. در این بررسی جنبه‌های ریخت‌شناسی (Morphology) و تشریح(Anatomy) رویان‌زائی بدنی غیر مستقیم در میخک شرح داده شده است. پینه (Callus) های روی محیط کشت موراسیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog=MS) دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۲ میلی گرم در لیتر ٤،۲- دی کلروفنوکسی استیک اسید(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)، و ۰/۲ میلی گرم در لیتر ٦- بنزیل آدنین(6-benzylaminopurine) حاصل شد. بررسیهای بافت‌شناسی(Histology) بر روی پینه‌ها انجام شد. رویان‌های بدنی زمانی بدست آمد که پینه‌های رویان‌زا به محیطهای کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ٦۰ گرم در لیتر مانیتول انتقال یافت. بررسیهای بافت‌شناسی روی فرآیند توسعه رویان انجام شد. وقتی که رویان لپه‌ای به محیط کشت MS ۱/۲ بدون تنظیم کننده رشد انتقال داده شد گیاهچه باززا ایجاد شد.

واژه‌های کلیدی: میخک، رویان بدنی، پینه

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: hiva@basu.ac.ir

مقدمه

میخک (*Dianthus caryophyllus*) یکی از مهم ترین محصولات گلکاری دنیا می‌باشد که هم بجهت زیبایی و گوناگونی رنگ و هم از نظر اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخودار است (۳).

رویان‌زائی بدنی عبارت از تشکیل رویان از یاخته های رویشی در شرایط کشت درون شیشه‌ای *(In vitro)* ، بطوری که این رویانها شبیه به رویان معمولی درون بذر می‌باشد و قادر است بصورت گیاه کامل نمو پیدا کنند. از این روش کشت بافت بصورت ابزاری می‌توان برای بررسیهای پایه نظیر بیوشیمی، فیزیولوژی، ریخت‌شناسی و تشریح و بسیاری از دستاوردهای بیوتکنولوژی از قبیل انتقال ژن(Gene transfer) ، حفظ ژرم پلاسم (Germplasm)، تولید بذر مصنوعی(Artificial (seed ، تولید متابولیتهای ثانوی(Secondary metabolites) ، ایجاد گوناگونی ژنتیکی(Genetic varieties) و حذف ویروس (Free of virus) از گیاه، استفاده کرد (۱۲).

در گیاهان عالی جنین بذری بطور طبیعی مراحل رشد خود را درون بافتهای مادری از قبیل گل و میوه‌های نارس انجام می‌دهد بهمین خاطر امکان مطالعه آن بسیار دشوار است(۱۵). رویان بدنی بعلت نداشتن بافتهای پوششی می‌تواند مدل خوبی برای مطالعه رویان شناسی در گیاهان باشد و بیشتر تحقیقات برای درک رخدادهای رویان‌زائی در گیاهان روی آن متمرکز شده است (۱۵). فری و همکاران (۱۹۹۲) ایجاد رویان بدنی روی پینه‌های (کالوس) تولید شده از ریزنمونه‌های ساقه گیاه میخک را گزارش کردند. جزئیات ریخت‌شناسی و تشریح نشان داده

Archive of SID
www.SID.ir

شده در گزارش فری و همکاران (۱۹۹۲) اسنادی برای رویان‌زائی بدنی گیاه میخک از مسیر پینه نیست (١٤). در این بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و تشریح پینه‌های غیررویان‌زا و پینه‌های رویان‌زا بدست آمده از ریزنمونه‌های گلبرگ و رویانهای بدنی گیاه میخک شرح داده شده است.

مواد و روشها

مواد گیاهی: این تحقیق روی یک رقم میخک (Nelson) وارد شده از کشور هلند، که در شهرستان محلات کشت می‌شود انجام گرفت. جوانه‌های گل نارس بطول ۱/۵-۱ سانتیمتر از گیاهان در حال رشد از گلخانه برداشت، و بمدت سه هفته در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سطح خارجی جوانه‌ها با قرار دادن در محلول ۲ درصد سدیم هیپوکلریت (سفید کننده تجارتی وایتکس) بمدت ۲۰ دقیقه گندزدایی، و سپس سه بار با آب مقطر سترون شستشو شد. کاسبرگها و نهنج از جوانه‌ها حذف و گلبرگها به قطعاتی بطول تقریبی ٤- ۳ میلی متر بریده و سپس روی محیط کشت قرار گرفت.

ترکیبات محیط کشت و شرایط نگهداری:

۱- تشکیل پینه : برای تشکیل پینه ریزنمونه‌های مختلف روی محیط کشت MS (۷) محتوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA کشت شدند.

۲- تشکیل رویان: برای تشکیل رویان، پینه‌های ایجاد شده در محیط اولیه به محیطهای کشت MS محتوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ٦۰ گرم در لیتر مانیتول منتقل شد.

۳- جوانه‌زنی: برای جوانه زنی، رویانهای لپه‌ای به محیط کشت ۱/۲MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز فاقد تنظیم کننده رشد منتقل شد. همه محیطهای کشت در شرایط محیطی ۲±۲۳ درجه سانتی گراد و ١٦ ساعت دوره نوری نگهداری شد. pH همه محیطهای کشت پیش از اتوکلاو نمودن با استفاده از NaOH یک نرمال تا حد ۵/۸ تنظیم گردید. در محیطهای کشت نیمه جامد از آگار(Agar) به میزان ۷ گرم در لیتر استفاده شد.

آزمایش بافت‌شناسی: برای بررسی‌های بافت‌شناسی پینه‌های رویان‌زا و غیررویان‌زا و رویانهای بدنی در محلول فرمالین (۹٦ درصد)- استیک اسید (۱ نرمال) – اتانول (۹٦ درجه)(Formalin - acetic acid – ethanol) با نسبت حجمی۲:۱:۱۷ برای ٢٤ ساعت تثبیت شد. بعد از مرحله تثبیت بافتهای فوق بوسیله غلظتهای مختلف اتانول (۲۵، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ در صد) آبگیری و سپس در پارافین (Paraffin) قرار گرفت. برش‌ها با ضخامت ۷ میکرومتر در بافتهای قرار داده شده در پارافیلم ایجاد شد و سپس برشها با هماتوکسیلین(Hematoxylin) رنگ آمیزی شدند.

نتایج و بحث

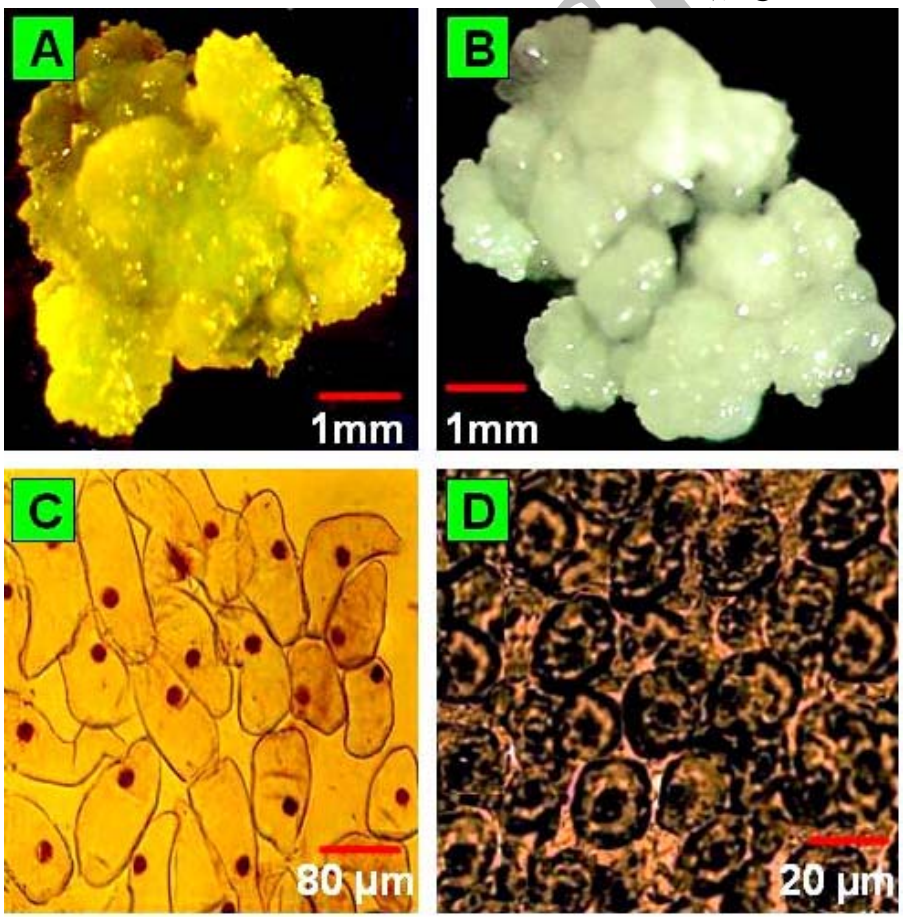
تشکیل پینه: براساس رنگ، بافت و زمان شروع ایجاد، دو نوع پینه روی ریزنمونه‌های گلبرگ تشخیص داده شد.

پینه‌ها نوع اول دارای بافتی نرم، آبکی و به رنگ زرد مایل به سبز بود (شکل۱. A). این پینه‌ها ۳-۲ هفته بعد از کشت با فراوانی بالا (۱۰۰-۹۵ درصد) روی ریزنمونه‌های ایجاد شد. بررسی بافت‌شناسی پینه نوع اول نشان داد که یاخته‌ها در این نوع پینه اشکال مختلف و بی نظمی دارند و اندازه هسته در مقایسه با سیتوپلاسم بسیار کوچک‌تر است (شکل۱. C). بعد از انتقال پینه‌های نوع اول به محیط رویان‌زائی هیچ ساختار رویانی روی آنها تشکیل نشد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که پینه‌های نوع اول در میخک ظاهراً غیررویان‌زا بوده و بطور مشابه در بسیاری از گونه‌های گیاهی دیگر نشان داده شده است که پینه‌هایی با خصوصیات مشابه پینه نوع اول غیررویان‌زا می باشند (۹).

Archive of SID

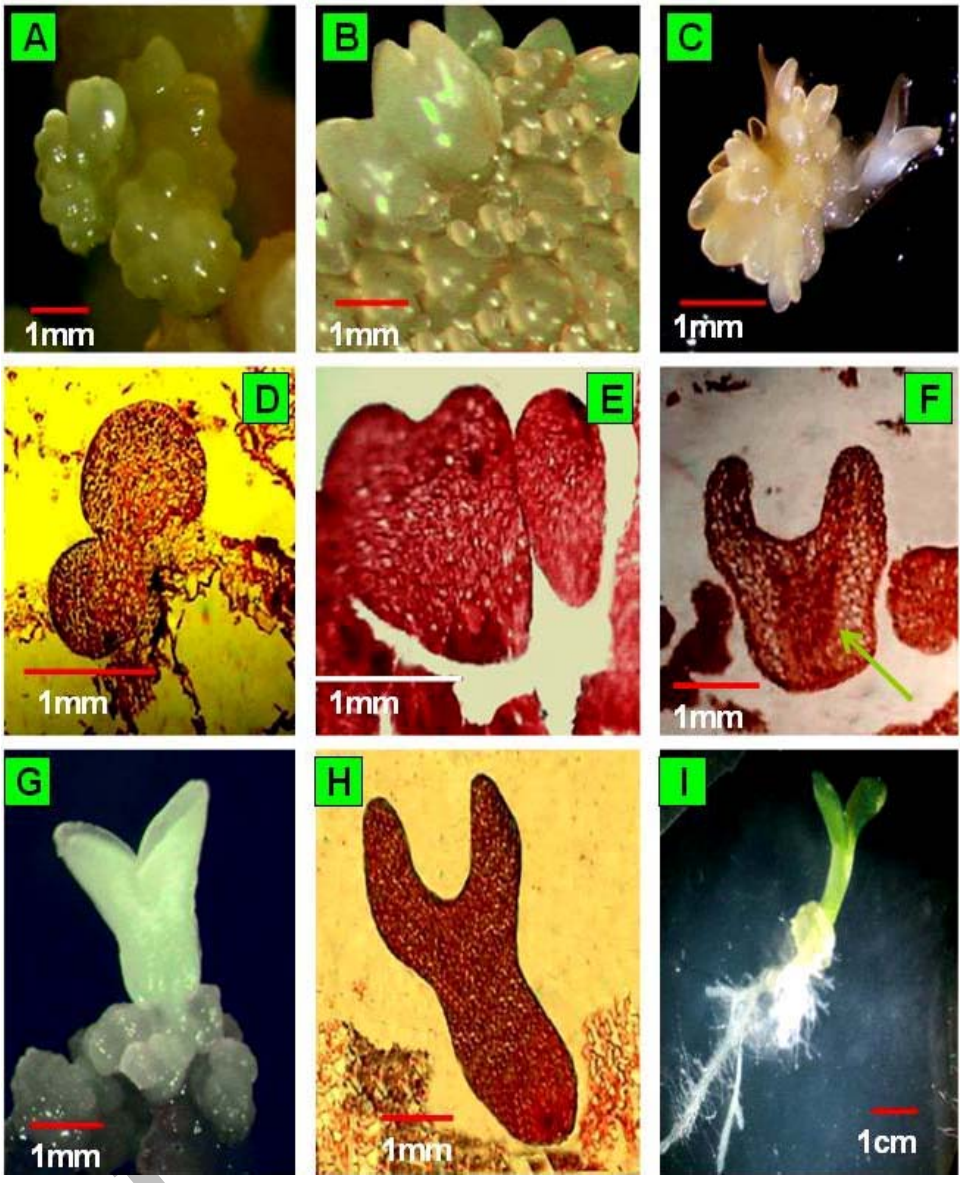
www.SID.ir

پینه‌های نوع دوم دارای بافتی سفت، گرانوله و به رنگ سفید کرمی می باشند (شکل ۱. B). این پینه‌ها ۸-٦ هفته بعد از کشت با فراوانی پائین (۱۵-۱۰ درصد) روی ریزنمونه‌ها ایجاد شد. آزمایش بافت‌شناسی پینه نوع دوم نشان داد که یاخته‌های موجود در این نوع پینه کروی شکل بوده و اندازه هسته در مقایسه با سیتوپلاسم بسیار برزگ‌تر است و در مقایسه با پینه‌های نوع اول داری سیتوپلاسم فشرده و دیواره یاخته ای ضخیم‌تری هستند (شکل۱. D). پینه‌ها نوع دوم بعد از انتقال به محیط رویانزائی، بطور پربازده به رویان بدنی تبدیل شدند. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که پینه‌های نوع دوم در این مطالعه توده ای از یاخته‌های رویانزا هستند. خصوصیات ریخت‌شناسی و تشریح ذکر شده برای پینه‌های نوع دوم اغلب برای پینه‌های رویانزا در *Freesia refracta* (۱۳)، *Allium ampeloprasum* (۲)، *Gladiolus hort* (۸) و *Agapanthus praecox* (۹) گزارش شده است. اگرچه فری و همکاران (۱۹۹۲) ایجاد رویان از پینه بدست آمده از ریزنمونه‌های ساقه در گیاه میخک را گزارش کرده‌اند اما ایجاد پینه‌هائی که خصوصیات ریخت‌شناسی و تشریح مشابه پینه نوع دوم (پینه‌های رویانزا) را داشته باشد تا کنون برای گیاه میخک گزارش نشده است.



شکل۱: (A) تشکیل پینه‌های غیررویانزا ٤ هفته بعد از کشت روی محیط کشت MS محتوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA. (B): تشکیل پینه‌های رویانزا ۷ هفته بعد ازکشت روی محیط کشت MS محتوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA. (C) بافت شناسی پینه های غیررویانزا. (D) بافت شناسی پینه های رویانزا.

www.SID.ir



شکل۲: ایجاد، توسعه و جوانه زنی رویان بدنی در میخک. (A): تشکیل رویانهای کروی شکل ۲ هفته بعد ازکشت. (B): تشکیل رویانهای قلبی شکل ۳ هفته بعد از کشت. (C): تشکیل رویان اژدری شکل ٤-۳ هفته بعد کشت. (D): بافت‌شناسی رویانهای کروی شکل. (E): بافت‌شناسی رویانهای قلبی شکل. (F): بافت‌شناسی رویانهای اژدری شکل. (G) : تشکیل رویان لپه‌ای شکل ٤ هفته بعد از کشت. (H): بافت‌شناسی رویانهای لپه‌ای شکل. (I): .جوانه زنی رویان لپه‌ای دو هفته بعد از کشت.

تشکیل رویان بدنی: در گیاهان دولپه، تشکیل رویان بدنی با تمایز یاخته‌های رویان‌زا بصورت ساختارهای کروی (Globular) شکل آغاز و سپس رویانهای کروی شکل بصورت رویانهای قلبی(Heart) ، اژدری(Torpedo) و لپه‌ای(Cotyledonary) شکل توسعه می‌یابند (٦). فری و همکاران (۱۹۹۲) خصوصیات ریخت‌شناسی رویان بدنی در مرحله کروی در گیاه میخک را نشان داده‌اند اما به توسعه رویانهای کروی بصورت قلبی، اژدری و لپه اشاره نکرده‌اند. یان چوا و همکاران (۱۹۹۸) بیان می کنند که گزارش فری و همکاران (۱۹۹۲) اسنادی برای ریخت‌شناسی و تشریح رویان‌زائی بدنی در گیاه میخک از

www.SID.ir

مسیر پینه نمی‌باشد(٤،١٤). در این مطالعه، دو هفته بعد از انتقال پینه‌ها به محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ٦۰ گرم در لیتر مانیتول رویان بدنی کروی شکل روی پینه‌های نوع دوم (پینه‌های رویان‌زا) مشاهده شد (شکل ۲ A). آزمایشهای بافت‌شناسی ایجاد رویان کروی بر روی پینه‌های نوع دوم را نشان می‌دهد (شکل ۲. D). پس از یک هفته بیشتر رویان‌های کروی شکل ایجاد شده از پینه نوع دوم بصورت رویانهای قلبی شکل توسعه یافت (شکل.۲ B). بررسیهای بافت‌شناسی ایجاد رویانهای قلبی شکل را نشان می‌دهد (شکل ۲. E). بعد از ٥-٤ روز بیشتر رویانهای قلبی بصورت رویانهای اژدری شکل توسعه یافتند (شکل ۲. C). آزمایشهای بافت‌شناسی ایجاد رویانهای اژدری شکل را نشان می‌دهد (شکل ۲. F) که می‌توان تشکیل بافت پریکامبیوم (فلش) را در آن تشخیص داد. بعد از یک هفته بیشتر رویانهای اژدری ایجاد شده بصورت رویانهای لپه‌ای توسعه یافت (شکل.۲ G). آزمایشهای بافت‌شناسی توسعه رویانهای لپه‌ای شکل را نشان می‌دهد (شکل ۲. H) که مناطق هیپوکوتیل و اپیکوتیل و برگهای اولیه رویان در آن قابل تشخیص است.

در بسیاری از گونه‌های گیاهی عدم ارتباط آوندی رویان بدنی و رویان بذری با بافت منشا اثبات شده است (۱). عدم ارتباط آوندی رویان بدنی با بافت منشاء تا کنون برای گیاه میخک گزارش نشده است. در این بررسی آزمایشهای بافت‌شناسی عدم تماس آوندی رویان اژدری (شکل ۲. F) و لپه ای شکل (شکل۲. H) با بافت منشاء را نشان می‌دهد.

در این بررسی اضافه کردن مانیتول به محیط کشت نمو طبیعی رویانها را باعث می شود. بطور مشابه در گیاه صنوبر نشان داده اند که بکاربردن مانیتول در محیط کشت، نمو طبیعی رویانهای بدنی را باعث می شود (۱۱). در برخی از گیاهان نشان داده شده که نمو طبیعی رویانها بدنی با تغییرات اسمز ناشی از حضور کربوهیدراتها، ارتباط دارد (۵، ٦ و ۱۰). مرکل و همکاران (٦) پیشنهاد کرده اند که تغییرات اسمزی جهت نمو طبیعی رویان‌زایی بدنی در شرایط درون شیشه تقلیدی از تغییرات اسمزی محیط طبیعی اطراف رویان بذری در داخل بذر است که در زمان توسعه و بلوغ آن رخ دهد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که نمو طبیعی رویانهای بدنی گیاه میخک در حضور مانتیول ممکن است با تغییرات اسمزی ناشی از آن در ارتباط باشد.

جوانه‌زنی

جوانه‌زنی، مرحله نهائی فرآیند رویان‌زایی بدنی است که در آن رویان ذخائر غذایی خود را هضم کرده و بدون وقفه زمانی، مریستمهای ریشه چه و ساقه چه خود را ضمن شروع فتوسنتز برگهای لپه‌ای، فعال می‌کند. در این بررسی دو هفته بعد از انتقال رویانهای لپه‌ای به محیط کشت MS ۱/۲، شروع فعالیت فتوسنتری برگهای لپه‌ای و ایجاد ریشه چه و ساقه چه در رویانها مشاهده شد (شکل۲ I).

نتیجه گیری کلی

درک ایجاد و نمو رویان بدنی جهت کنترل بهتر این فرآیند از اهمیت خاصی برخوردار است. بررسیهای بافت‌شناسی و ریخت‌شناسی رویان‌زائی بدنی یکی از راههای اصلی درک فرآیند رویان‌زائی در گیاهان است. در این بررسی ایجاد پینه‌های رویان‌زا و غیررویان‌زا و ایجاد و نمو رویان بدنی از طریق بررسیهای ریخت‌شناسی و بافت‌شناسی شرح داده شده است. نتایج بدست آمده از این بررسی می‌تواند کمکی برای درک بیشتر رویان‌زائی بدنی گیاه میخک از مسیر پینه باشد. همچنین از نتایج این تحقیق می‌توان برای کاربردهای دیگری از قبیل تولید دورگه‌های بدنی و دست ورزیهای ژنتیکی گیاه میخک استفاده نمود.

منابع

Archive of SID

www.SID.ir

1. Ammirato, P. V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. In: Green, C. E., Somers, D. A., Hacket, W. P. and Biesboer D.D. (Eds.), Plant tissue and cell culture Plant biology, Alan R. L, New York, pp. 57-81

2. Buiteveld. J,. Fransz, P. F. and Creemers-Molenaar, J. 1994. Induction and characterization of emberyogenic callus type for the initiation of suspension culture of leek (*Allium ampeloprasum* .L), Plant Science. 100: 195-202

3. Burich, G. A., Mercun, P., Benedtti, L. and Giovannini, A. 1996. Transformation method applicable to ornamental plant. Plant. Tissu. Cuit. Biotech. 12: 94-104.

4. Frey, L., Saranga, Y and Bjanik, J. 1992. Somatic embryogenesis in carnation. HortScience. 27: 63-65.

5. Ikeda-Iwai, M., M. Umehara., S. Satoh and H. Kamada. 2002. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissue of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal. 34: 107-111.

6 Merkle, S. A., Parrott, W. A. and B. S. Flin. 1995. Morphgenic aspect of somatic emberyogenesis. In: Thorpetaed *in vitro* embryogenesis in plant. Klauwer Academhc Publishers DordrechtBosta London. pp :155-203

7. Murashige, T. and. Skoog, F. A. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 154: 73–479.

8. Stefaiank, B. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration of Gladiolus (*Galdiolus hort*.), Plant. Cell. Rep. 13: 386- 389.

9. Suzuki, S., Oota, M. and Nakano, M. 2002. Embryogenic callus induction from leaf of the Liliaceous ornamental plant *Agapanthus praecox* spp. Orientals Leighton Histological study and response to selective agents, Scientia Horticulea. 95; 123-132

10. Ricci, A.P., F.A.M. Filho, B.M. Januzzi, and S.M.S. Piedade. 2002. Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulate* and *C. nobilis* × *C. deliciosa.* Scinentia Agricola. 59: 41-46.

11. Robert., D. R. 1991. Abscisic asid and mannitol promote early development; maturation and storage protein accumulation in somatic ebryogenesis of interior spruce. Plant Physiology. 83: 247-252

12. Vicient, M. C. and Martinez, F. X. 1998. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. R. Bras. Fisiol. Veg. 10: 1-12.

13. Wang, L., Huang, B., He, M. and Hao, S. 1990. Somatic embryogenesis and its hormonal regulators in tissue culture of *Freesia refracta*. Annals Botany. 65: 271-276

14. Yantcheva, A., Vlahova, M. and Antanassov, A. 1998. Direct somatic emberyogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus*). Plant Cell Report. 18: 148-153.

15 Zimmerman, J. I. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. Plant Cell. 5: 1411-1423

Archive of SID

www.SID.ir

Morphology and anatomy of somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)

Karami O.[1], Deljoo A.[1], and Baranchi L.[2]

[1] Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina, Hamedan, I.R. of IRAN
[2] Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina, Hamedan, I.R. of IRAN

Abstract

Somatic embryogenesis is a good model for embryo development studies. The morphological and anatomical aspects of indirect somatic embryogenesis in carnation were described. Calli were produced on MS culture medium containing sucrose 30 g/l^{-1} supplemented with 2 mg/l 2,4-D and 0.2 mg/l BA. Histocytological analysis carried out on calli. Somatic embryos formed when embryogenic calli were transferred to MS medium containing 30 g/l^{-1} sucrose and 60 g/l^{-1} mannitol. Histocytological analysis carried out on developmental process of somatic embryos. Cotyledonary somatic embryos converted into plantlets when they were transferred onto the half-strength MS culture medium.

Keywords: carnation, somatic embryo, callus

Archive of SID

www.SID.ir