# رویان زایی پیکری و باززایی گیاه از تخمک گسترش نیافته پرتقال (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)

**عالم آرا غلامی*[۱]، احمد مجد[۲]، سید وحید علوی[۳]، فتح الله فلاحیان[۱]**

۱. استاد گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات، تهران، ایران

۲. استاد گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۳. استادیار بخش آفات و بیماری‌های گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، ایران

**تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰٤/۲۷** **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۸/۰٦**

**چکیده**

در این پژوهش، اثر محیط‌های کشت مختلف برتشکیل کالوس‌های رویان زا و رویان‌های پیکری از تخمک گسترش نیافته پرتقال (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) مورد مطالعه قرار گرفت. در بررسی رویان زایی و باززایی گیاهچه‌ها، تفاوت معنی‌دار ترکیب محیط کشت در القای کالوس‌های رویان‌زا و بلوغ رویان‌ها مشاهده شد. بهترین محیط کشت جهت القای کالوس‌های رویان‌زا (۸۰ درصد) و بلوغ رویان‌ها، محیط کشت MS دارای ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مالت و ۵۰ گرم در لیتر ساکارز و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP (٦ بنزیل آمینو پورین) بود. در این محیط، کالوس‌های نرم و کرم رنگ تشکیل شد و رویان‌های پیکری در مراحل مختلف تکوینی شامل کروی، قلبی، اژدری و لپه‌دار مشاهده شد. کمترین میزان کالوس رویان زا (۲۷ درصد) و عدم بلوغ رویان‌ها در محیط کشت MS دارای ۵۰۰ میلی‌گرم در لیترعصاره مالت و ۳۰ گرم در لیترساکارز بدست آمد. کالوس‌های ایجاد شده در این محیط متراکم و به رنگ سبز روشن بودند و رویان‌های بالغ در این محیط شکل نگرفت. ۲ ماه پس از انتقال رویان‌های لپه‌ای به محیط جوانه‌زنی بدون تنظیم کننده‌های رشد و با ساکارز ۵۰ گرم در لیتر، گیاهچه ها باززایی شدند.

**واژگان کلیدی**: باززایی گیاه، تخمک گسترش نیافته، پرتقال، رویان زایی

**مقدمه**

مرکبات *Citrus SPP* جزء مهمترین محصولات کشاورزی بوده و براساس گزارشات FAO در سال ۲۰۰۵، به طوروسیعی در مناطق گرمسیری و در مناطق نیمه گرمسیری و در بیش از ۹۰ کشور جهان کشت می‌شوند. جنس مرکبات دارای گونه‌های زیادی می‌باشند پژوهش‌های به نژادی در مرکبات از طریق رویان زایی پیکری و به منظور تولید گیاهچه‌های عاری از ویروس و نیز حفاظت از تغییرات ژرم پلاسم مرکبات، کوتاه کردن دوره‌های جوانی (دوره بدون میوه) صورت می‌گیرد (Carimi, 2001; Benelli et al., 2010).

رویان زایی پیکری فرآیندی است که در آن سلول‌های پیکری دیپلوئید یا هاپلوئید به صورت ساختارهای شبیه رویان زیگوتی نمو پیدا می‌کنند. در کشت در شیشه



www.SID.ir

Email:aragh_61@yahoo.com

رویان‌های پیکری یا از بافت‌های رویشی مانند اپیدرم برگ، هیپوکوتیل، آبکش ثانویه ریشه یا از بافت‌های مرتبط با رویان زایی جنسی مثل خورش یا تخمک لقاح نیافته یا کلاله و خامه ایجاد می‌شود. از مزایای استفاده از رویان زایی پیکری در گیاهان می‌توان به دست یافتن به گیاهان تراریخت، حفاظت ژرم پلاسم، محدود کردن آلودگی ویروسی، تولید دورگه‌های پیکری و تولید بذر مصنوعی اشاره کرد (Gaj, 2004; Deo et al., 2010).

برای القای رویان زایی پیکری در گیاهان در محیط در شیشه از محیط غذایی مصنوعی یا شرایط هورمونی استفاده می‌کنند تا با کمک این محرک‌ها رویان‌زایی صورت بگیرد. تنظیم کننده‌های رشد اغلب به عنوان محرک برای رویان زایی به کار می‌روند و هر کدام از آنها می‌توانند در مسیر رویان زایی تغییراتی را ایجاد کنند. البته میزان تاثیرات تنظیم کننده‌های رشد خارجی بر رویان زایی به تعادل هورمونی موجود در درون گیاه و جداکشت مورد استفاده برای القای رویان زایی بستگی دارد (Quiroz-Figueroa et al., 2006). از میان تنظیم کننده‌های رشد اکسین ها به عنوان محرک کالوس زایی و سیتوکینین ها به عنوان تشدید کننده تقسیم سلولی و تکثیر شناخته می‌شوند. البته محققینی مانند Wu و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش دادند که القای رویان‌های پیکری در محیط فاقد تنظیم کننده‌های رشد صورت می‌گیرد و انواعی از عصاره ها نظیر کازئین هیدرولیزات، عصاره مالت یا شیر نارگیل در القای تشکیل رویان در گونه‌های مختلف موثر می‌باشند.

Quiroz-Figueroa و همکاران در سال ۲۰۰۶ بیان کردند می‌توان از رویان زایی پیکری به عنوان الگویی برای مطالعه و درک چگونگی انجام فرآیندهای ریختی و فیزیولوژیکی رویان‌های زیگوتی استفاده کرد زیرا رویان‌های زیگوتی در داخل گیاه قرار داشته و امکان دسترسی و ردیابی فرآیندهای آنها مشکل است اما می‌توان شرایط کشت رویان‌های پیکری را در خارج از پیکر گیاه ردیابی و دستکاری کرد. رویان زایی از تخمک گسترش نیافته در مرکبات توسط یکسری از محققین گزارش شده است (Carimi et al., 1998; El-Sawy et al., 2005). در مرکبات یکی از ترکیباتی که موجب تسهیل و بهبود رویان زایی پیکری می‌شود عصاره مالت می‌باشد (Carimi, 1998). القای رویان زایی پیکری در مرکبات تا حد زیادی وابسته به ژنوتیپ گیاه است و به همین دلیل امکان دست ورزی مرکبات تا حدی مشکل می‌باشد (Benelli et al., 2010).

هدف از پژوهش حاضر بدست آوردن شرایط مناسب هورمونی و غذایی برای القای رویان‌های پیکری در شرایط در شیشه و بررسی روند بلوغ رویان ها و میزان باززایی گیاهچه‌های پرتقال می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

این پژوهش روی پرتقال (*Citrus sinensis* (L.) osbeck) صورت گرفت. میوه‌های پرتقال ۶ الی ۷ ماه بعد از گرده افشانی جمع آوری شدند. سطح میوه‌ها با قرار گرفتن در محلول اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس قرار گرفتن در محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به مدت ۲۰ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل ضدعفونی شدند. پس از ضدعفونی کردن سطحی، در زیر هود لامینار و تحت شرایط استریل میوه ها با کمک تیغه‌های اسکارپل استریل بریده شده و با کمک پنس تخمک‌های گسترش نیافته جدا شدند و بر روی محیط‌های کشت قرار گرفتند.

### ترکیبات محیط کشت

تخمک‌های گسترش نیافته به منظور تشکیل رویان ها بر روی محیط‌های کشت با غلظت‌های مختلف ساکارز و هورمون قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در همه محیط‌ها از عصاره مالت با نسبت یکسان استفاده شد.



Archive of SID
www.SID.ir

محیط $B_1$ : محیط کشت پایه MS + ۵۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره مالت + ۳۰ گرم در لیتر ساکارز

محیط $B_2$: محیط کشت پایه MS + ۵۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره مالت + ۵۰ گرم در لیتر ساکارز

محیط $B_3$: محیط کشت پایه MS + ۵۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره مالت + ۳۰ گرم در لیتر ساکارز+ ۳ گرم در لیتر BAP (٦بنزیل آمینو پورین)

**جوانه زنی**

برای جوانه زنی، رویان‌های لپه ای بر روی محیط کشت پایه MS با ساکارز ۵۰ گرم در لیتر و فاقد تنظیم کننده رشد کشت شدند.

**شرایط کشت**

تمامی محیط‌های کشت در اتاقک رشد تحت شرایط ١٦ ساعت روشنایی حاصل از لامپ‌های فلوئورسنت سفید با شدت ۳۰۰۰ لوکس در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. کالوس‌های رویان زا به طور مداوم هر ۲۱ روز واکشت شدند و تأخیر در این زمان سبب قهوه ای شدن کالوس‌های رویان زا می‌گردید.

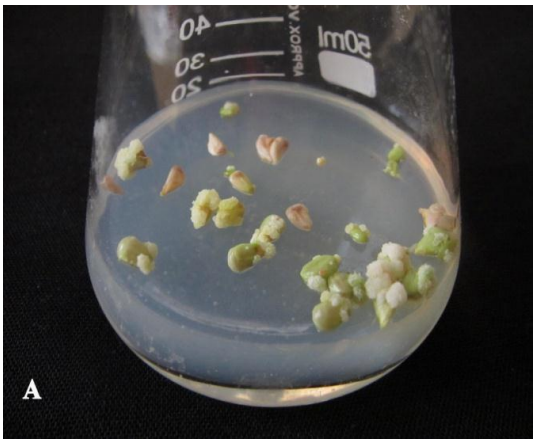
**آنالیز آماری**

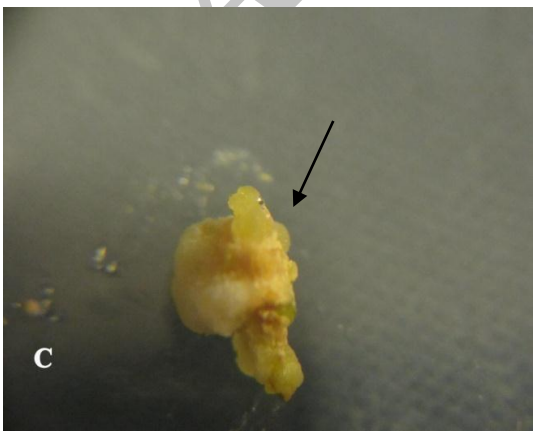
تعداد رویان‌های ایجاد شده در مراحل مختلف رویانی بر روی کالوس‌های رویان زا تا زمان تشکیل گیاهچه هر ٤ هفته شمارش شدند. آزمایش ها در غالب طرح کاملاً تصادفی با ٦ بار تکرار برای هر تیمار و ۱۰ تخمک گسترش نیافته در هر تکرار انجام شد. تجزیه داده ها توسط نرم افزار آماری SPSS و مقایسه میانگین ها با آزمون چند دامنه ای جدید دانکن در سطح ۰/۰۵ صورت گرفت.

## نتایج

بعد از گذشت ۳ هفته از کشت تخمک‌های گسترش نیافته، تشکیل کالوس‌های رویان زا آغاز شد (شکل ۱- A). حدود ۱۰ روز بعد از تشکیل کالوس ها، رویان‌های کروی بر روی سطح کالوس ها ایجاد شدند. بعد از حدود ۳ ماه میزان رویان زایی شدت گرفت و توسعه رویان‌های کروی به صورت رویان‌های قلبی، اژدری، لپه ای صورت گرفت (شکل ۱-B- D).

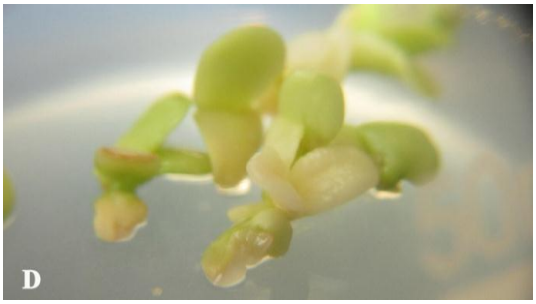
رنگ کالوس‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت‌های مختلف متفاوت بود. تفاوت در شکل و رنگ کالوس ها در میزان رویان زایی و بلوغ رویان ها در مراحل بعد موثر بود (جدول۱).








www.SID.ir



**شکل ۱.** تشکیل کالوس‌های رویان زا و توسعه رویان‌های بدنی و ایجاد گیاهچه

(**A**) ایجاد کالوس‌های رویان زا از تخمک‌های گسترش نیافته پرتقال ۳ هفته بعد از کشت.

(**B**) تشکیل رویان کروی بر روی کالوس‌های رویان زا.

(**C**) رویان پیکری در مرحله ابتدایی اژدری.

(**D**) تشکیل رویان‌های لپه ای حدود ۳ماه بعد از کشت.

(**E**) گیاهچه حاصل از انتقال رویان لپه ای به محیط جوانه زنی.

اختلاف‌های معنی دار ($P<۰/۰۵$) بین تیمارهای مختلف و اثر این تیمار ها بر درصد تشکیل کالوس‌های رویان زا و پیشرفت مراحل رویانی و تبدیل رویان‌های لپه ای به گیاهچه در جدول ۲ نشان داده شده است. طبق جدول ۲ محیط $B_3$ بیشترین درصد رویان زایی و بلوغ رویان را داشته و در گروه a قرار گرفته و محیط‌های $B_2$ و $B_1$ به ترتیب در گروه‌های پایین b و c قرار می‌گیرند.

شکل۲ مقایسه میزان توسعه و تکوین رویان ها ومیزان تبدیل رویان‌های پیکری به گیاهچه را در هر ۳ محیط نشان می‌دهد. بیشترین میزان تشکیل گیاهچه (حدود ۵۲٪) در محیط $B_3$ مشاهده شد. میزان کمتری از تبدیل گیاهچه در محیط B۲ مشاهده شد و هیچ یک از رویان‌های حاصل از تخمک‌های گسترش نیافته کشت شده در محیط B۱ تبدیل به گیاهچه نشدند.

**جدول۱.** وضعیت‌های مختلف کالوس‌های رویان زای بدست آمده از تخمک‌های گسترش نیافته پرتقال ۳ هفته بعد از کشت

| وضعیت کالوس | رویان زایی و بلوغ رویان | نوع محیط کشت |
|---|---|---|
| متراکم و به رنگ سبز روشن | + | $B_1$ (MS + ۵۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره مالت +۳۰ گرم در لیتر ساکارز) |
| نرم و به رنگ سبز روشن | ++ | $B_2$ (MS + ۵۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره مالت +50گرم در لیتر ساکارز) |
| نرم و به رنگ کرم یا زرد روشن | +++ | $B_3$ (MS + ۵۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره مالت + ۵۰ گرم در لیتر ساکارز+ BAP) |

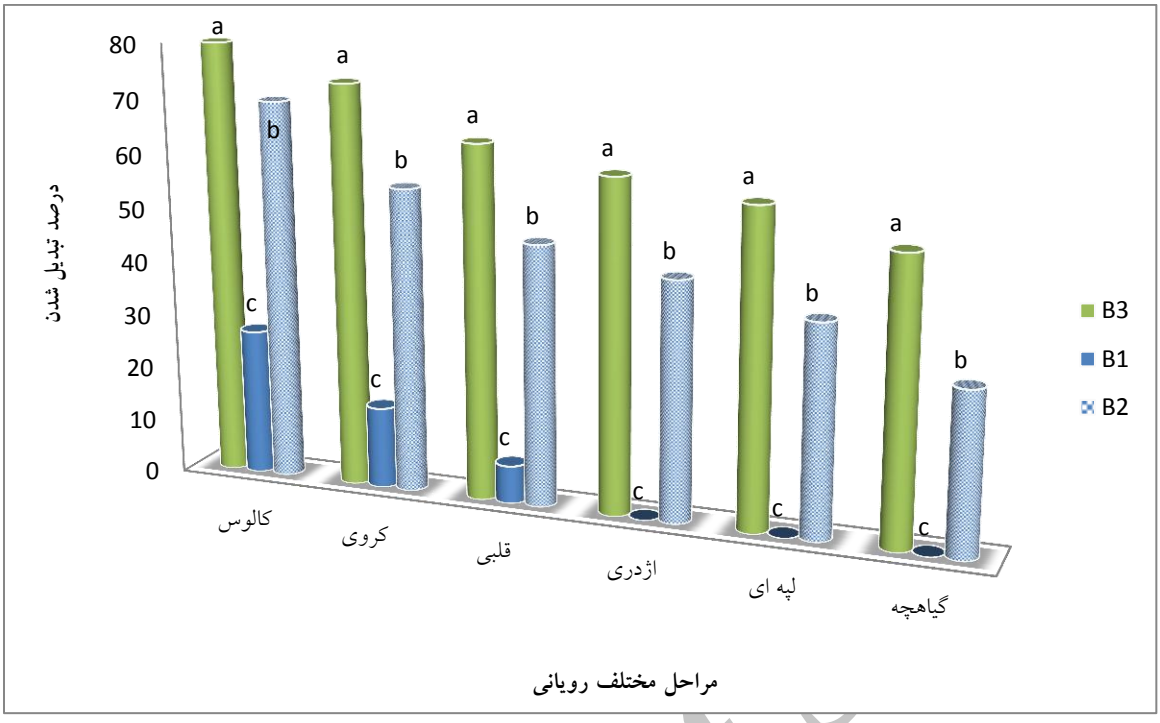
**جدول ۲.** اثر محیط‌های کشت مختلف برتکوین رویان‌های پیکری پرتقال در مراحل مختلف رویانی، ٤ ماه پس از کشت

| محیط کشت | کالوس زایی | رویان کروی | رویان قلبی | رویان اژدری | رویان لپه ای | گیاهچه |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $B_1$ | ۲۷/۰۰±٤/۷۰۲c | ۱۵/۰۰±۱/۳۷٦c | ۷/۰۰±۱/۱۲٤c | ۰۰±۰۰۰ c | ۰۰±۰۰۰ c | ۰۰±۰۰۰ c |
| $B_2$ | ۷۰/۰۰±۵/۱۳b | ۵٦/۰۰±٤/۵۸۸b | ٤۸/۰۰±۱/۹٤b | ٤٤/۰۰±۱/۷۱۷b | ۳۹/۰۰±۱/٦۲۲ b | ۳۰/۰۰±۲/۰۷۷ b |
| $B_3$ | ۸۰/۰۰±۲/۷۷۲a | ۷٤/۰۰±۱/۵۵٦a | ٦۵/۰۰±۳/۲٤٤a | ٦۱/۰۰±۳/۳۸۷a | ۵۸/۰۰±۱/۲۹۸a | ۵۲/۰۰±۱/٤۵۱ a |

* حروف مشابه در هر سطر نشانه معنی دار نبودن اختلاف ها است ($P < ۰/۰۵$)



Archive of SID
www.SID.ir




**شکل ۲**. مقایسه مراحل مختلف تکوینی رویان ها ومیزان تبدیل شدن به گیاهچه در محیط‌های کشت مختلف

محیط $B_1$ دارای محیط کشت پایه MS + ۵۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره مالت +۳۰ گرم در لیتر ساکارز؛ محیط $B_2$ دارای محیط کشت پایه MS + ۵۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره مالت +۵۰ گرم در لیتر ساکارز؛ محیط $B_3$ دارای محیط کشت پایه MS + ۵۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره مالت +۳۰ گرم در لیتر ساکارز+۳ گرم در لیتر BAP (٦بنزیل آمینو پورین)

* میانگین‌هایی با حروف مشابه از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد.

در محیط B۱ (باعصاره مالت وغلظت کم ساکارز و بدون هیچ تنظیم کننده رشد) کمترین میزان تشکیل کالوس رویان زا (حدود ۲۷٪) مشاهده شد و رویان‌های بدست آمده از این محیط هم تا مراحل اولیه رویان قلبی توسعه پیدا کردند. در محیط $B_2$ و $B_3$ رویان‌های کروی حاصل از کالوس‌های رویان زا به رویان‌های لپه ای توسعه پیدا کردند و این رویان‌های لپه ای پس از انتقال به محیط جوانه زنی تبدیل به گیاهچه شدند. در محیط $B_2$ (باعصاره مالت وغلظت بالای ساکارزو بدون تنظیم کننده رشد) درصد تشکیل کالوس‌های رویانزا (حدود ۷۰٪) و رویان‌های لپه‌ای (حدود ۳۹٪) دارای اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) با در صد تشکیل کالوس‌های رویانزا (حدود ۸۰٪) و رویان‌های لپه‌ای (حدود ۵۸٪) در محیط $B_3$ (با عصاره مالت و غلظت بالای ساکارز و با هورمون BAP) می‌باشند. ۲ ماه پس از انتقال رویان‌های لپه‌ای به محیط جوانه‌زنی (MS بدون تنظیم کننده رشد و با غلظت بالای ساکارز) گیاهچه ها از رویان‌های لپه ای باززایی شدند (شکل E.۱).

## بحث

نتایج حاصل از تجزیه آماری مربوط به رویان زایی و باززایی گیاهچه‌های حاصل از این رویان ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های کشت با ترکیبات مختلف برای هر دو صفت رویانزایی و تولید گیاهچه وجود دارد. وضعیت‌های مختلف کالوس‌ها می‌تواند نشان دهنده توانایی کالوس برای القای رویان و بلوغ رویان‌های حاصل از این کالوس‌ها باشد. نتایج ما با نتایج Lincy و همکاران در سال ۲۰۰۹ که بیان کردند، کالوس‌های رویانزا و غیررویانزا از نظر شکل ظاهری و رنگ متفاوت می‌باشند همسو می‌باشد. نتایج ما نشان داد که



Archive of SID
www.SID.ir

کالوس‌های نرم وترد با رنگ کرم تـا زرد روشـن توانـایی بالایی برای القـای بلـوغ رویـان داشـتند (محـیط $B_3$). در مقابل کالوس‌هـای متـراکم کـه دارای رنـگ سـبز روشـن بودند، توانایی توسعه رویان به مراحل پیشرفته‌تـر (اژدری و لپه‌ای) را نداشتند (محیط $B_1$).

وجود یک عامل استرس زا بـرای القـای کـالوس‌هـای رویان زا و تشکیل رویان پیکری ضروری به نظر می‌رسد. نتایج ما نشان داد که ساکارز به عنوان یک عامل استرس زا می‌تواند سبب القـای کـالوس رویـان زا و تکـوین رویـان پیکری شود. این نتایج با نتایج Lincy و همکاران در سـال ۲۰۰۹ همسو مـی‌باشـد. Deo و همکـاران در سـال ۲۰۱۰ بیان کردند که افزایش غلظت ساکارز سبب ایجاد تغییرات اسـمزی مـی‌شـود و ایـن تغییـرات اسـمزی ناشـی از غلظت‌های بالای ساکارز نقش زیادی در بلوغ رویان‌هـای پیکری دارد. این تغییرات اسمزی در رویـان‌هـای پیکـری مشابه با تغییرات اسمزی است که در شرایط طبیعـی طـی بلوغ رویان زیگوتی رخ می‌دهد.

افزایش غلظت ساکارز از ۳۰ گرم در لیتر بـه ۵۰ گـرم در لیتر، القای کالوس رویان زا و توسعه رویان‌های قلبی و بلوغ رویان‌ها را به طور معنـی داری ($P < ۰/۰۵$) افـزایش داده است. این نتایج با نتایجی که Carimi (۲۰۰۱) بدست آورد مشابه می‌باشد. نامبرده اظهار داشت که غلظت بـالای سـاکارز نقـش مهمـی در القـای رویـان زایـی پیکـری در مرکبات دارد. در مقابل Tomaz و همکاران در سال ۲۰۰۱ در پرتقال گزارش کردند که ساکارز نقش بسیار انـدکی در رویان‌زایی پیکری دارد و نقش سایر کربوهیدرات ها نظیر گالاکتوز و لاکتوز در این فرآیند پررنگ تر است.

Miah و همکاران در سال ۲۰۰۲ بیان کردند که محیط MS با عصاره مالت و ساکارز کم به خـوبی سـبب القـای کالوس رویان زا از بافـت خـورش مرکبـات شـده و ایـن کالوس‌های رویان زا با انتقـال بـر روی محـیط MS فاقـد هورمون می‌توانند رویان‌ها را در مراحل مختلف نموی القا کنند که نتایج ما با این نتایج همسو نمی‌باشد. در پـژوهش حاضر مشخص شد که محیط MS با غلظت ساکارز کم و عصاره مالت ($B_1$) توانایی القـای کـالوس کمـی داشـته و بلوغ رویان‌ها (توسعه به رویـان اژدری و لپـه‌ای) در ایـن محیط صورت نگرفـت و در مقابـل محـیط دارای غلظـت بالای ساکارز و عصاره مالت ($B_2$) توانـایی قابـل تـوجهی برای القای کالوس و بلوغ رویان ها داشـت. نتـایج مـا بـا نتـایج Ikram-ul-Haq و Memon در سـال ۲۰۱۲ و نتـایج Wu و همکـاران در سـال ۲۰۰۷ کـه بیـان کردنـد وجـود ساکارز و کازئین هیدرولیزات و شیره نارگیل برای رویـان زایی پیکری گیاه ضروری است، همسو می‌باشد.

بلوغ رویان ها هم به غلظت ساکارز در محـیط و هـم وجود BAP (٦بنزیل آمینـو پـورین) بسـتگی دارد. همـراه شدن BAP (٦بنزیل آمینو پورین) با غلظت بالای سـاکارز اثرات مثبت زیادی روی بلوغ رویان ها دارد، بـه طوریکـه بلوغ رویان‌ها در محیط $B_2$ که دارای ساکارز با غلظت بالا ولی فاقد BAP (٦بنزیـل آمینـو پـورین) بودنـد بـه طـور معنی‌داری نسبت به محیط $B_3$ کـه هـم دارای سـاکارز بـا غلظت بالا و هم BAP (٦بنزیل آمینو پورین) بـود کـاهش نشان داد. نتایج ما با با نتایج El-sawy و همکاران در سال ۲۰۰۵ که بر روی رویان زایی تخمک گسـترش نیافتـه ۱۱ گونه مرکبات انجام دادند همسو می‌باشد.

Carimi و همکاران در سال ۱۹۹۸ توانستد با اسـتفاده از کلاله و خامه مرکبات رویان‌هـای پیکـری ایجـاد کننـد وآنها را به مرحله بلوغ برسانند و بهتـرین نتـایج را زمـانی بدست آوردند که از BAP (٦بنزیل آمینو پورین) به همراه عصاره مالت و غلظت بالای ساکارز استفاده کردند. که این نتایج مشابه با نتایج ما می‌باشد. از این یافتـه هـا مـی‌تـوان چنین نتیجه گیـری کـرد کـه سـلول‌هـای بافـت خـورش تخمک گسترش نیافته از قبل بـرای رویـانی شـدن تعیـین سرنوشت شده اند و وجود تنظیم کننـده‌هـایی مثـل BAP (٦بنزیل آمینو پورین) تولید رویان‌های پیکـری را در ایـن سـلول هـا تحریـک مـی‌کنـد و آنهـا را تـا مرحلـه بلـوغ می‌رساند.



Archive of SID

www.SID.ir

همسو با گزارشات Iqbal و همکاران در سا ۲۰۱۱ گیاه بادام زمینی (*Arachis hypogaea*)، نتایج ما دراین تحقیق نشان داد رویان‌های پیکری در مراحل مختلف رویانی بر روی کالوس‌های رویان زا مشاهده شدند، که این وضعیت به سبب عدم انطباق زمانی سلول‌ها در زمان پیدایش رویان‌ها و نیز متفاوت بودن جایگاه رویان‌ها بر روی جداکشت و در نتیجه اختلاف در شیب غلظت هورمونی این قسمت ها بوجود می‌آید.

در پژوهش حاضر جوانه زنی و تولید گیاهچه از رویان‌های پیکری در محیط MS بدون هورمون و با غلظت بالای ساکارز انجام شد. نتایج ما با نتایج Carra و همکاران در سال ۲۰۰۶ همسو می‌باشد. Carra و همکاران در سال ۲۰۰۶ ابتدا رویان‌های پیکری را در محیط هایی که دارای سیتوکینین‌های مختلف (TDZ و BAP) بودند، ایجاد کردند و سپس آنها را به محیط MS بدون هورمون با غلظت بالای ساکارز منتقل کردند تا گیاهچه‌ها باززایی شدند.

## نتیجه گیری نهایی

بهترین محیط برای القای کالوس‌های رویان‌زا و بلوغ رویان ها و باززایی گیاهچه ها از رویان‌های لپه ای بالغ از تخمک گسترش نیافته پرتقال، محیط دارای عصاره مالت و غلظت بالای ساکارز (۵۰ گرم در لیتر) به همراه BAP (۶ بنزیل آمینو پورین) می‌باشد. بالا رفتن غلظت ساکارز، فرآیند تکوین رویان‌های پیکری را در مرکبات را بهبود بخشید. رویان‌های حاصل از این روش می‌توانند به عنوان ماده اولیه برای تولید بذر مصنوعی از این گیاه استفاده شوند.

## منابع


**Benelli, C., Germana, M.A., Ganino, T., Beghe, D. and Fabbri, A. (2010).** Morphological and anatomical observations of abnormal somatic embryos from anther cultures of Citrus reticulata. Biologia Plantarum. 54 (2): 224-230

**Carimi, F., Tortorici, M.C., De Pasquale, F. and Crescimanno, F.G. (1998).** Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules and stigma/style explants of sweet orange navel group (*Citrus sinentsis* (L.) Osb.). Plant Cell Tissue and Organ Culture. 54: 183-189.

**Carimi, F. (2001).** Somatic embryogenesis and organogenesis in Citrus for sanitation and in vitro conservation. Méditerranéennes Série B. 33:115-128.

**Carra, A., De Pasquale, F., Ricci, A. and Carimi, F. (2006).** Diphenylurea derivatives induced somatic embryogenesis in citrus. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 87:41-48

**Deo, P.C., Tyagi, A.P., Taylor, M., Harding, R. and Becker, D. (2010).** Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences. 28(1):27-40.

**El-Sawy, A., Gomaa, A., Reda, A. and Danial, N. (2006).** Somatic embryogenesis and plant regenerationfrom undeveloped ovules of citrus. Arab Journal Biotechnology. 9:189-202.

**FAO. (2005).** Food and agricultural organization of the united nationa. Httpt://www.fao.org.

**Gaj, M.D. (2004).** Factores infeluencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regulator. 43:27-47.

**Ikram-ul-Haq. and Memon, S. (2012).** Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivar CPF-237. African Journal of Biotechnology. 11(15): 3704-3708.

**Iqbal, M.M., Nazir, F.,Iqbal, J., Tehrim, S. and Zafar, Y. (2011).** In vitro micropropagation of peanut (*Arachis hypogaea*) through direct somatic embryogenesis and callus culture. International Journal of Agriculture and Biology. 13: 811–814.

**Lincy, A.K., Remashree, A.B. and Sasikumar, B. (2009).** Indirect and direct somatic embryogenesis from aerial stem explants of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Acta Botanica Croatica. 68 (1): 93–103.




Archive of SID

www.SID.ir

**Miah, M.N., Islam, S. and Hadiuzzaman, S. (2002).** Regeneration of plantlets through somatic embryogenesis from nucellus tissue of *Citrus macroptera* Mont. var. *anammensis* ('Sat Kara'). Plant Tissue Culture. 12(2): 167-172.

**Quiroz-Figuero, F.R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R.M. and Loyola-Vargas, V.M. (2006).** Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tissue Organ Culture. 86: 285–301.

**Tomaz, M.L., Mendes, B.M.J., Assis, F., Filho, F., Demetrio, C.G.B., Jansakul, N. and Rodrogues, A.P.M. (2001).** Somatic embryogenesis in *citrus spp*:carbohydrate stimulation and histodifferentiation. Invitro Cellular & Developmental Biology Plant. 37: 446-452 .

**Wu, H.C., Toit, E.S. and Reinhardt, C.F. (2007).** A protocol for direct somatic embryogenesis of *Protea cynaroides* L. using zygotic embryos and cotyledon tissues. Plant Cell Tissue and Organ Calture. 89: 217-224.

Archive of SID



www.SID.ir