

## تأثیر نوع محیط کشت بر رویان‌زایی بدنی زیتون رقم کروناکی

مریم پیوندی\*<sup>۱</sup>، هلال نعمت‌فرحزادی<sup>۲</sup>، صدیقه اربابیان<sup>۳</sup> و مهدی حسینی مزینانی<sup>۴</sup>

\*۱- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران - شمال، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

پست الکترونیک: m\_peyvandi@iau-tnb.ac.ir

۲- کارشناس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران - شمال، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

۳- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران - شمال، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

۴- دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۳/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۴/۲

### چکیده

در این آزمایش، تأثیر محیط زیرکشت بر رویان‌زایی رویشی و ریشه‌زایی از بخش‌های مختلف رویان‌های بالغ زیتون رقم کروناکی بررسی شد. ریشه‌چه و بخش نزدیک لپه‌های رویان در محیط کشت OMc دارای هورمون‌های IBA (۵ mg/l) و 2-ip (۰/۵ mg/l) کشت شدند. کالوس‌های ۲۱ روزه در محیط‌های کشت OM یا OMc زیرکشت و به تاریکی منتقل شدند. تمایز در کالوس‌ها به نوع ریزنمونه و محیط زیرکشت بستگی داشت. پس از سومین زیرکشت، کالوس‌های حاصل از ریشه‌چه و بخش نزدیک لپه توانایی رویان‌زایی رویشی را داشتند. در هر دو محیط کشت، توانایی رویان‌زایی در کالوس‌های ریشه‌چه بیشتر از کالوس‌های بخش نزدیک لپه بود. همچنین رویان‌زایی در محیط کشت OM افزایش معنی‌داری را نشان داد. ریشه‌زایی در کالوس‌های هر دو ریزنمونه و در محیط‌های زیرکشت مختلف پس از زیرکشت دوم مشاهده شد. تفاوت در میانگین‌های ریشه‌زایی در تیمارهای مختلف معنی‌دار بود به طوری که در هر دو محیط کشت توانایی ریشه‌زایی در کالوس‌های حاصل از بخش نزدیک لپه بسیار بیشتر از ریشه‌چه بود و در هر دو نوع کالوس، ریشه‌زایی در محیط کشت OM بیشتر از محیط کشت OMc بود.

واژه‌های کلیدی: زیتون، رقم کروناکی، رویان‌زایی بدنی، ریشه‌زایی، محیط زیرکشت.

### مقدمه

عمر زیاد و سازگاری با شرایط آب و هوایی متفاوت در نقاط مختلف جهان قابل کشت است.

رویان‌زایی بدنی مسیری است که سلول‌های بدنی در روند نموی مشابه با رویان‌های تخم قرار می‌گیرند (Mariani et al., 2002). این روش تکنیک مهمی در ریزازدیادی گیاه می‌باشد (Merkle et al., 1990) و یک

زیتون (*Olea europaea* L.)، یک گونه درختی کوچک و همیشه سبز از تیره زیتونیان (*Oleaceae*) است. این گیاه بومی نواحی ساحلی مدیترانه شرقی از جمله لبنان و قسمت‌های ساحلی آسیای صغیر است. همچنین در شمال ایران و در جنوب دریای خزر نیز یافت می‌شود و به دلیل

ترکیب و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد برای تنظیم محیط در مراحل مختلف رویان‌زایی بدنی (از تحریک کالوس تا رشد رویان بدنی و باززایی) بررسی شده است (پیوندی و همکاران، ۱۳۷۹؛ Lambardi & Rugini, 2003). شرایط تاریکی مطلق و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی / ۸ ساعت تاریکی، هر دو در تحریک تشکیل کالوس و رویان‌زایی بدنی، مؤثر است (Rugini, 1988; Shibli et al., 2001). Brhadha و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده کردند محیط کشت مایع برای القاء تولید کالوس و محیط کشت جامد برای نمو کالوس و باززایی گیاهچه‌ها از رویان‌زایی رویشی مفید می‌باشد. بدست آوردن رویان‌های بدنی از بافت‌ها هنوز مشکل است، اگرچه با دو رقم کانینو و مورایلو با استفاده از روندی به نام "سیستم باززایی دوتایی" این کار انجام گردید (Caricato & Rugini, 1995; Muganu & Rugini, 1998). به این صورت که در مرحله اول، از کشت جوانه‌های واقع در محل دم‌برگ در شیشه، ساقه‌های باززایی شده بدست آمد. سپس برگچه‌ها در محیط کشت مناسب تا زمانی که توده‌های پیش - رویانی ظاهر شوند، زیرکشت شدند. در رویان اولیه، بدست آوردن چرخه رویان‌زایی بدنی از اپیدرم یا از لایه زیر اپیدرم آسان است (Lambardi et al., 1999; Peyvandi et al., 2001). وقتی رویان بدست می‌آید، چرخه رویان‌زایی بدنی را می‌توان به طور نامحدودی حفظ کرد (Rugini & Caricato 1995; Shibli et al., 2001; Rugini et al., 2005).

### مواد و روشها

میوه‌های رقم کرونا یکی زیتون که کمیت و کیفیت روغن آن مطلوب است، انتخاب شدند و از باغ تحقیقاتی

ابزار ضروری برای تحقیقات بنیادی در نمو رویان (Merkle et al., 1990) و دیگر جنبه‌های فیزیولوژی گیاهان (Jacobsen, 1991) است.

در ارقام مختلف زیتون، بدست آوردن رویان‌های بدنی از طریق کشت بخش‌های مختلف رویان‌های نابالغ (پیوندی و همکاران، ۱۳۷۸؛ Leva et al., 2006)، رویان‌های بالغ (پیوندی و همکاران، ۱۳۷۹) و دم‌برگ‌های برگ (Rugini et al., 1995) موفقیت‌آمیز بوده است. علاوه بر سن رویان، عوامل دیگری نیز مانند نور و کیفیت تنظیم‌کننده‌های رشد در این امر دخیل هستند (Rugini, 1998; Leva et al., 1995).

اولین گزارش ایجاد رویان‌زایی بدنی در زیتون از ریشه‌چه ارائه شده است که کالوس تولید شده در منطقه زخم روی ریشه‌چه، رویان تولید کرد که به گیاهچه تبدیل شدند (Tarini & Rugini, 1986). گزارش‌ها نشان داده است کالوس حاصل از قطعات رویان‌های بالغ (Orinos, 1991; Mitrakos et al., 1992; Mitrakos & 1991) توانایی ریشه‌زایی دارند. Leva و همکاران (۱۹۹۵) مشاهده کردند که فقط ریزنمونه‌های لپه‌های رویان‌های نابالغ (رقم‌های پیکولین، فرانگیونتو، فرانتیو) که بین ۶۰ تا ۹۰ روز بعد از گلدهی برداشت شدند، برای تحریک تشکیل کالوس رویان‌زا مناسب بودند. تفاوت در میزان رویان‌زایی به منشأ ریزنمونه (در بخش نزدیک، میانی، دور رویان تخمی) و به آخرین زمان بقاء ریزنمونه‌ها برای القاء کالوس در محیط کشت وابسته است (Peyvandi et al., 2001 و 2008). مطالعات مختلف نشان داده است که رویان‌های بدنی منفرد در مقایسه با رویان‌های مجتمع راحت‌تر به گیاهان کامل و سالم مبدل می‌شوند.

## نتایج

### رویانزایی

کالوس‌های ۲۱ روزه حاصل از ریشه‌چه و بخش نزدیک لپه‌ها، در محیط کشت OMC و OM بدون هورمون، پس از زیرکشت سوم، رویان‌های بدنی تولید کردند. مشاهدات نشان داد که رویان‌های بدنی ایجاد شده بر روی یک کالوس همگی در یک مرحله نمودی نبوده، به طوری که حتی پس از گذشت یک ماه رویان‌هایی در مراحل متفاوت نمودی (کروی، ابتدای قلبی شکل، قلبی پیشرفته، اژدری و رویان بالغ) بر روی ریزنمونه‌ها دیده می‌شد (شکل ۱).

در کالوس‌های رویان‌زا سه تیپ رویان بدنی مشاهده شد: (۱) رویان‌های منفرد که گیاهچه‌های کاملاً طبیعی تولید می‌نمودند؛ (۲) رویان‌هایی که از محل محور رویان به یکدیگر متصل بودند. در صورتی که قبل از مرحله لپه‌ای می‌توانستیم آنها را از یکدیگر جدا کنیم و در محیط کشت قرار دهیم و قادر به تولید گیاهچه‌های طبیعی بودند و (۳) رویان‌هایی با لپه‌های رشد یافته که گیاهچه‌هایی با لپه‌هایی توسعه یافته تولید می‌نمایند (شکل ۱)

نتایج نشان داد که کالوس بدست آمده از ریشه‌چه، در مقایسه با کالوس تولید شده از بخش نزدیک لپه، در هر دو محیط کشت توانایی بیشتری در رویان‌زایی بدنی دارد. همچنین نتایج نشان دادند که میزان رویان‌زایی بدنی هم در کالوس‌های ریشه‌چه و هم در کالوس‌های بخش نزدیک لپه در محیط زیر کشت OM بیشتر از محیط OMC است (جدول ۱).

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که تفاوت‌های مشاهده شده در میانگین‌های رویان‌زایی بدنی از بخش ریشه‌چه رویان‌های تخمی در محیط کشت OM،

زیتون در سازمان کشاورزی استان گلستان در مهرماه جمع‌آوری و در یخچال (دمای °C ۴) نگهداری شدند. پس از جدا کردن بخش گوشتی میوه‌ها، بذرها با آب و صابون شسته شده و در دمای معمولی اتاق خشک شدند. درست قبل از شروع هر آزمایش درون‌بر سخت و چوبی بذرها، به صورت مکانیکی شکسته شده و بذر فاقد پوسته (رویان همراه آندوسپرم) با هیپوکلریت سدیم (v/v) ۰.۵٪ به مدت ۲۰ دقیقه (پیوندی و همکاران، ۱۳۷۸) سترون و با آب مقطر سترون (۵ بار) شست‌شوشدند. سپس نمونه‌های سترون، در پتری‌دیش‌های دارای دو لایه کاغذ صافی سترون قرار داده شده و حدود ۵ml آب مقطر سترون به آنها اضافه گردید. پتری‌دیش‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای °C ۲ ± ۲ در تاریکی نگهداری شدند. سپس توسط اسکالپل رویان از آندوسپرم جدا شد و قطعات ریشه‌چه و بخش نزدیک لپه رویان‌ها در محیط کشت گردیدند. در هر پتری‌دیش ۵ ریزنمونه قرار داده شد.

ریشه‌چه و بخش نزدیک لپه‌های رویان‌های تخمی در محیط کشت پایه OMC (Canas et al., 1987) دارای IBA (۵ mg/l) و 2-ip (۰/۵ mg/l) کشت شدند. زیرکشت کالوس‌های ۲۱ روزه در محیط‌های کشت OMC و یا OM (Rugini, 1984) بدون هورمون انجام گردید. محیط‌ها در تاریکی و دمای °C ۲۴ ± ۲ نگهداری شدند. زیر کشت‌ها هر ۲۱ روز یکبار انجام و هر هفته نتایج رویان‌زایی و ریشه‌زایی یادداشت شد. رویان‌های بدست آمده به محیط کشت OM به همراه BAP (۲ mg/l) انتقال داده شدند و در فیتوترون با دمای °C ۲۴ ± ۲ و در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

هورمون، ریشه تولید کردند.

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که تفاوت‌های مشاهده شده در میانگین‌های ریشه‌زایی معنی‌دار است، به طوری که ریشه‌زایی در کالوس‌های بخش ریشه‌چه نسبت به بخش نزدیک لپه، در هر دو محیط کشت کاهش معنی‌داری را نشان داد. همچنین این توانایی در کالوس‌های بخش نزدیک لپه در محیط OM بیشتر از OMc بود.

بیشترین میزان را داشته و تفاوت معنی‌داری با رویان‌زایی بدنی ریشه‌چه در محیط OMc دارد. همچنین تفاوت میان میانگین رویان‌زایی از بخش نزدیک رویان دو محیط کشت OM و OMc معنی‌دار نبود (جدول ۱).

### ریشه‌زایی

کالوس‌های ۲۱ روزه حاصل از ریشه‌چه و بخش‌های نزدیک لپه‌ها در محیط کشت OM و OMc بدون

جدول ۱- درصد رویان‌زایی و ریشه‌زایی ریشه‌چه و بخش نزدیک لپه در هر دو محیط واکشت OM و OMc

ریشه‌زایی		رویان‌زایی		ریزنمونه
OMc	OM	OMc	OM	
۶/۶۶(c)	۸/۸۸(c)	۳۱/۱۱(b)	۵۵/۵۵(a)	ریشه‌چه
۵۳/۳۳(b)	۷۵/۵۵(a)	۴/۴۴(c)	۸/۸۸(c)	بخش نزدیک لپه

جدول ۲- تجزیه واریانس رویان‌زایی و ریشه‌زایی از کالوس حاصل از بخش‌های مختلف رویان،

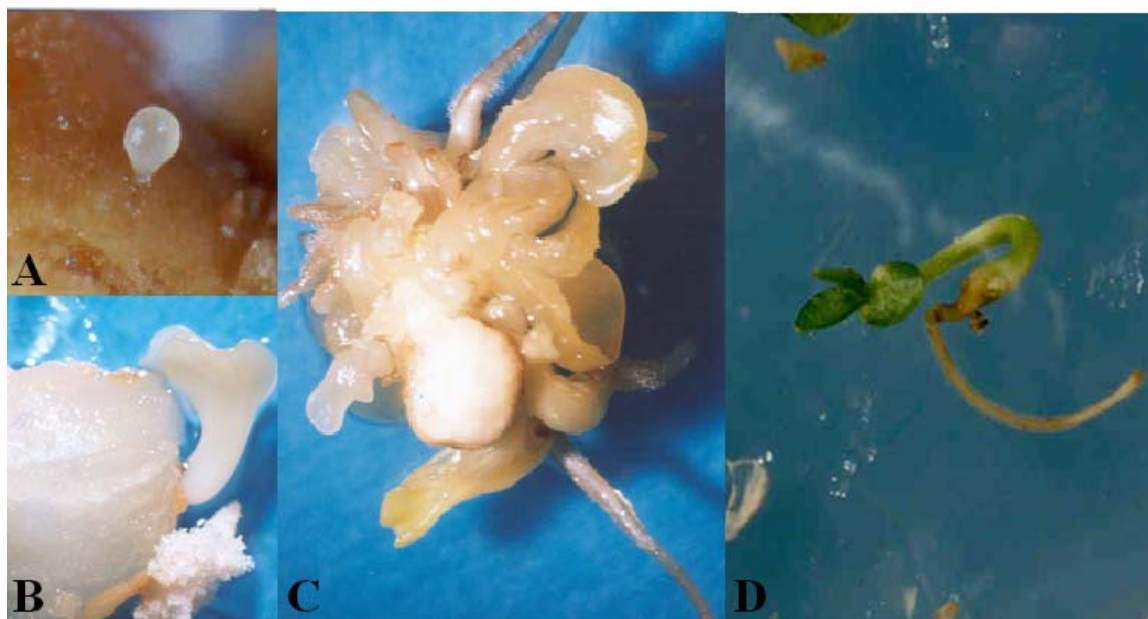
### در محیط‌های واکشت OM و OMc

MS	درجه آزادی	منابع تغییر	
**۲/۴۸۰	۳	بین گروهی	رویان‌زایی
۰/۱۴۹	۱۷۶	درون گروهی	
	۱۷۹	کل	
**۵/۱۹۱	۳	بین گروهی	ریشه‌زایی
۰/۱۴۷	۱۷۶	درون گروهی	
	۱۷۹	کل	

### بحث

آبدار، ناهموار، کریستاله و غیرمشخص در محیط کشت نمایان می‌شوند که با مشاهدات کالوس‌های رویان‌زا و غیر رویان‌زا در این تحقیق تطابق داشت. در کالوس‌های رویان‌زا سه تیپ رویان بدنی مشاهده شد که با نتایج Peyvandi و همکاران (۲۰۰۱) در گیاه زیتون و همچنین Ricci و همکاران (۲۰۰۲) در گیاه پرتقال تطابق داشت.

چندین محقق از جمله Sun و همکاران (۲۰۰۳) و Yang و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند کالوس‌های رویان‌زا به صورت متراکم، سفید متمایل به زرد با ساختمان گره‌دار و کندرشد می‌باشند، در حالی که کالوس‌های غیررویان‌زا به صورت نیمه شفاف، زرد متمایل به قهوه‌ای با ظاهری



شکل ۱- مراحل رویان‌زایی بدنی از کالوس ریشه‌چه (A- رویان رویشی در مرحله کروی، B- رویان رویشی در مرحله لپه‌ای، C- تعدادی رویان در مراحل مختلف تکوین، D- رویان رویش یافته).

اکسین برای تولید کالوس‌های رویان‌زا از رویان‌های تخمی بالغ، ۲۱ روز است و کاربرد آن در زمان طولانی‌تر موجب سرکوب رویان‌زایی می‌شود.

در این بررسی رویان‌های بدنی در مراحل نمودی متفاوت بر روی یک کالوس مشاهده شد. این وضعیت بی‌تردید به موقعیت مکانی (جایگاه رویان‌ها بر روی بخش‌های متفاوت ریزنمونه و متفاوت بودن شیب غلظت هورمونی در این قسمت‌ها) و زمان پیدایش رویان‌ها (رویان‌ها همگی در یک زمان پدیدار نشدند) و اثرات متقابل آنها بستگی دارد. Koh و Loh (۲۰۰۰) عواملی نظیر ایجاد زخم و برش روی ریزنمونه را در القای ایجاد رویان‌های بدنی مؤثر دانستند. به اعتقاد آنها ایجاد زخم موجب تحریک رویان‌زایی بدنی می‌شود. بنابراین می‌توان تصور کرد در ریزنمونه‌های تهیه شده از رویان مقدار این مواد در دو سر ریزنمونه یا محل‌های برش با قسمت‌های میانی آن متفاوت باشد. این تفاوت سبب متفاوت بودن

کشت بخش‌های ریشه‌چه و بخش نزدیک لپه نشان داد که بخش ریشه‌چه توانایی بیشتری را در رویان‌زایی بدنی دارد. این نتایج با تحقیقات سایرین مطابقت دارد (Rugini, 1988; Peyvandi *et al.*, 2001). این بررسی‌ها نشان می‌دهد که هرچه از رأس رویان دور می‌شویم، توانایی رویان‌زایی کاهش می‌یابد، علت این امر آن است که سرنوشت سلول‌ها در بافت و پتانسیل آنها در ایجاد بافت‌های جدید با یکدیگر متفاوت است. زیرا سلول‌ها از لحاظ ژنتیکی به طور متفاوتی عمل می‌کنند.

نقش اکسین نیز در رویان‌زایی بدنی گیاهان مختلف نشان داده شده است (وطن‌پور و همکاران، ۱۳۸۸). زیرکشت کالوس‌های ۲۱ روزه رویان‌های بالغ زیتون در محیط دارای اکسین باعث سرکوب رویان‌زایی و حذف اکسین در محیط زیرکشت، باعث تحریک رویان‌زایی می‌شود (پیوندی و همکاران، ۱۳۷۹). Mitrakos و همکاران (۱۹۹۲) مشاهده نمودند حداکثر زمان کاربرد

آنزیم‌ها وجود رطوبت مناسب است) شوند و مجموعه این تغییرات می‌تواند دلیل کاهش فعالیت‌های رویان‌زایی باشد (مجد و همکاران، ۱۳۸۶).

Ricci و همکاران (۲۰۰۲) بیان کردند تغییر در میزان ساکارز برای جوانه‌زنی رویان‌ها و تشکیل گیاهچه‌ها در واریته‌های مختلف پرتقال مؤثر است.

با توجه به این که غلظت ساکارز در محیط کشت OMC (۲۰g/l) و در محیط کشت OM (۳۰g/l) متفاوت بود، یکی از دلایل افزایش رویان‌زایی در محیط کشت OM را می‌توان به این صورت نتیجه‌گیری کرد.

یکی دیگر از تفاوت‌ها در این دو محیط کشت، حضور اسیدآمینو گلوتامین در محیط کشت OM است. تحقیقات نشان می‌دهد کاربرد نیتروژن آلی در مقایسه با منابع غیر آلی آن موجب تحریک در رویان‌زایی بدنی می‌شود. از این رو افزودن اسیدهای آمینو خارجی به محیط کشت نقش مهمی در کشت بافت گیاهی بازی می‌کنند (Kim & Moon, 2007)، به طوری که در برخی دستورالعمل‌های محیط کشت، آمینواسیدهای نظیر گلوتامین استفاده می‌شود (Benson, 2000; Hamasaki et al., 2005; Grewel et al., 2006; Han et al., 2009).

Asad و همکاران (۲۰۰۹) در رویان‌زایی بدنی نیشکر نشان دادند آمینو اسیدهای اضافه شده به محیط کشت با تأثیر بر ساختن دیواره سلولی، در تقسیم و تمایز کالوس‌ها به رویان‌های بدنی دخالت دارند.

یکی دیگر از تفاوت‌های این دو محیط کشت وجود کازئین هیدرولیزات در محیط کشت OMC است. افزودن کازئین هیدرولیزات به محیط کشت در برخی گونه‌ها مانند *Picea glaura* برای تبدیل رویان بدنی به گیاهچه (Grain et al., 2000) و رویش رویان‌های بالغ سکویا

قسمت‌های مختلف ریزنمونه از لحاظ توان و استعداد رویان‌زایی بدنی می‌شود.

کشت بخش‌های مختلف رویان روی محیط OMC دارای IBA (۵ mg/l) و 2-ip (۰/۵ mg/l) و زیرکشت در محیط‌های OMC و OM بدون هورمون، نشان داد که کالوس حاصل از بخش ریشه‌چه و نزدیک رویان توانایی ریشه‌زایی دارند، اما این توانایی بتدریج با درو شدن از رأس رویان، افزایش یافت. این نتایج قابل مقایسه با نتایج پیوندی و همکاران (۱۳۷۹) می‌باشد.

با توجه به اینکه برای زیرکشت از دو محیط کشت OMC و OM استفاده گردید که تنها در میزان مواد در ماکروالمان‌ها و مواد آلی اختلاف داشتند، پاسخ متفاوتی از نظر رویان‌زایی و ریشه‌زایی مشاهده شد. که نشان‌دهنده اثر متفاوت محیط کشت بر روی ریزنمونه‌هاست. به طوری که برخی از آنها مراحل نموی رشد ریشه را در کشت درون‌شیشه‌ای تحریک می‌کنند و از سوی دیگر تأثیری در برگ‌زایی از کالوس دارند (Caricato & Rugini, 1995؛ عرب و همکاران، ۱۳۸۲).

Brhadha و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که ساختار ژنتیکی در تعیین انتخاب محیط کشت مورد استفاده تأثیرگذار است. به این مفهوم که نیاز به مواد معدنی در ژنوتیپ‌های مختلف با یکدیگر متفاوت است

نوع و غلظت کربوهیدرات در اندام‌زایی و رویان‌زایی نقش دارد (Thomas, 2006; Grain et al., 2000). مقادیر زیاد ساکارز می‌تواند با تأثیر بر مقدار جذب آب، تغییر فشار اسمزی محیط کشت و سلول‌ها موجب تغییر مقدار جذب آب و مواد محلول موجود در محیط گردد. این تغییرات هم می‌توانند سبب برهم زدن توازن متابولیسمی رویان و تغییر در عملکرد آنزیم‌ها (یکی از شرایط عمل

- L.). African Journal of Biotechnology, 8(7): 1214-1218.
- Benson, E.F., 2000. *In vitro* plant recalcitrance, an introduction. In *Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 36: 141-148.
- Brhadda, N., Abousalim, A. and Walali Loudiyi, D.E., 2003. Effect du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europaea*) CV. Picholine Marocaine Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 7(3-4): 177-182.
- Brhadda, N., Walali, L. and Abousalim, A., 2007. Histological study of the somatic embryogenesis of Moroccan picholine olive tree *Olea europaea*, fruits, 62:115-124.
- Canas, L.A., Carramolina, L. and Vieents, M., 1987. Vegetative propagation of olive tree from *In vitro* cultured embryos. *Plants Science*, 50: 85-90.
- Grain, E., Bernier-Cardou, M., Isabel, N. and Klimaszewska, A., 2000. Effects of sugars, amino acids and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobes* on medium with two gellen gum concentrations. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 62: 27-37.
- Grewel, D., Gill, R. and Gosal, S., 2006. Role of cysteine in enhancing androgenesis and regeneration of indica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation*, 49:43-47.
- Hamasaki, R.M., Purgatto, E. and Mercier, H., 2005. Glutamine enhances competence for organogenesis in pine apple leaves cultivated. *In vitro Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(4): 383-389.
- Han, G.Y., Wang, X.F., Zang, G.Y. and Ma, Y.Z., 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration of recalcitrant cottons (*Gossypium hisutum*). *African Journal of Biotechnology*, 8(3): 432-437.
- Jacobsen, H.Y., 1991. Somatic embryogenesis in seed legumes: the possible role of soluble auxin receptors. *Israel Journal Botany*, 40: 139.
- Kim, Y.W. and Moon, H.K., 2007. Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese Larch (*Lerix leptolepis*). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 88: 2 41-245.
- Koh, W.L. and Loh, C.S., 2000. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration and *In vitro* rapid-cycling *Brassica napus*. *Plant Cell Reports*, 19:1177-1183.
- Lambardi, M., Caccavale, A., Rugini, E. and Caricato, G., 1999. Histological observations on somatic embryos of olive (*Olea europaea* L.). *Acta Horticulturæ*, 474: 67-70.
- Lambardi, M. and Rugini, E., 2003. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). In: S. M. Jain and K. Ishi. (eds). *Micropropagation of woody trees and fruits*. Kluwer Academic Pub., Netherlands: 621-646.
- (جعفری مفیدآبادی و همکاران، ۱۳۸۲) استفاده شده است.
- در هر دو محیط کشت مورد استفاده، میزان عناصر غذایی پرمصرف تفاوت داشت از جمله میزان  $MgSO_4$  در محیط OM نسبت به OMc بیشتر بود. Minyaka و همکاران (۲۰۰۸) در گیاه *Theobroma cacao* مشاهده کردند افزایش میزان  $MgSO_4$ ، میزان رویانزایی را افزایش می‌دهد. در واقع سولفات بیرونی ممکن است برای ساختن سیستم ضروری باشد.

### منابع مورد استفاده

- پیوندی، م.، ابراهیم‌زاده، ح. و مجد، ا.، ۱۳۷۸. رویان زایی رویشی از رویان‌های نابالغ زیتون (رقم زرد). *مجله علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، بهار و تابستان، ۳۱ و ۳۲*: ۲۲۶۸-۲۲۶۱.
- پیوندی، م.، ابراهیم‌زاده، ح. و مجد، ا.، ۱۳۷۹. توانایی‌های بخش‌های مختلف رویان بالغ زیتون در اندام زایی و رویان‌زایی بدنی. *مجله زیست‌شناسی، ۹ (۴-۱)*: ۹۷-۱۰۷.
- عرب، ر.، جعفری مفیدآبادی، ع.، مجد، ا. و دهقانی شورکی، ی.، ۱۳۸۲. ازدیاد گیاهچه‌های حاصل از کشت درون شیشه‌ای رویان در رقم خرماي مضافتی (*Phoenix dactylifera* L.). *تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، شماره ۱۱ (۲)*: ۱۷۹-۱۷۱.
- وطن‌پور، ز.، عصاره، م.ح.، قمری‌زارع، ع. و کیارستمی، خ.، ۱۳۸۸. جنین‌زایی بدنی در دو گونه از اکالیپتوس (*Eucalyptus microcarpa* و *E. melliodora*). *تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۷ شماره (۲)*: ۳۲۳-۳۱۳.
- مجد، ا.، چمن‌دوستی، ف.، مهراییان، ص. و شیدایی، م.، ۱۳۸۶. بررسی رویان‌زایی رویشی و تولید گیاهچه‌های نو پدید در کلزا (*Brassica napus*). *مجله زیست‌شناسی ایران، شماره ۲۰ (۴)*: ۳۴۴-۳۵۲.
- Asad, S., Arshad, M., Mansoor, S. and Zafar, Y., 2009. Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum*

- Rugini, E., 1984. *In vitro* propagation of some olive cultivars with different root-ability and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulture*, 24:123-134.
- Rugini, E., 1986. Olive, in: Bajaj, Y.P.S. (Ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. 10: 253-267.
- Rugini, E. and Tarini, P., 1986. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In: Moet Hennessy (Ed.), *Proceedings Conference Fruit Tree Biotechnology - Paris*, PP: 62-70.
- Rugini, E., 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14: 207-214.
- Rugini, E. and Caricato, G., 1995. Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) "Canino" and "Moraiolo". *Plant Cell Reports*, 14: 257-260.
- Rugini, E. and Muganu, M., 1998. A novel strategy for the induction and maintenance of shoot regeneration from callus derived from established shoots of apple (*Malus x domestica* BorkH.) cv. golden delicious. *Plant Cell Reports*, 17: 581-585.
- Rugini, E., Mencuccini, M., Biasi, R., Altamura, M.M., 2005. Olive (*Olea europea* L.) in *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, (S. Mohan Jain and Pramod K. Gupta eds) Springer, Netherlands, 77: 345-360.
- Shibli, R.A., Shatnawi, M., Al-Juboory, K.M. and Abu, E., 2001. Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of Nabali olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulture*, 88: 243-256.
- Sun, Y., Zhang, X., Jin, S., Liang, S. and Nie, Y., 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium klotzschiaum*). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 75: 247-253.
- Thomas, T.D., 2006. Effects of sugars, gibberlic acid and abscisic acid on somatic embryogenesis in *Tylophora indica* (Burm.f.) Merrill. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22: 465-471.
- Yang, Y.G., Guo, Y. M., Guo, Y., Guo, Z.C. and Lin, J.X., 2003. Regeneration and large -scale propagation of *Phragmites commmunis* through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 75: 287-290.
- Leva, A.R., Muleo, R. and Petrucelli, R., 1995. Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons. *Journal of Horticultural Science*, 70: 417-421.
- Leva, A.R., Petrucelli, R. and Polsinelli, L., 2004. *In vitro* propagation: from the laboratory to the production line. *Olive Science and Technology*, 101: 18-26.
- Leva, A., Cantos, M., Linan, Y., Troncoso, Y., Garcio, M. and Troncoso, A., 2006. Morphological aspects of the *In vitro* formation of cv. Manzanillo olive somatic embryos and plant obtaining, *Second International Seminar, Italy*: 445-448.
- Mariani, T., Miyake, H. and Takeokay, H., 2002. Direct somatic embryogenesis in Rice (*Oryza sativa* L.): Structural and developmental patterns. *Journal Matematika dan sains*, 7(2): 53-56.
- Merkle, S.A, Parrot, W.A. and Williams, E.G., 1990. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning dalam plant tissue culture: Applications and Limitations (Ed.) SS. Bhojawani, Elsevier, Amsterdam, 67-101
- Minyaka, E., Niemenak, N., Abdourahmane, S. and Omokolo, D.N., 2008. Effect of MgSO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on somatic embryo differentiation in *Theobroma cacao* L. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 94:149-160.
- Mitrakos, K., Alexaki, A. and Papadimitriou, P., 1992. Dependence of olive morphogenesis on callus origin and age. *Journal of Plant Physiology*, 139: 269-273.
- Orinos, T. and Mitrakos, K., 1991. Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europaea* var *sylvestris* (Miller) Lehr) mature zygotic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 27:183-187.
- Peyvandi, M., Dadashian, A., Ebrahimizadeh, H. and Majd, A., 2001. Embryogenesis and Rhizogenesis in mature zygotic embryos of olive (*Olea europaea* L.) cultivar: mission and kroneiki. *Journal of sciences Islamic Republic of Iran*, 112 (1):9-15.
- Peyvandi, M., Ebrahimizadeh, H. and Majd, A., 2008. Histological studies of somatic embryogenesis at different maturity stages in two olive cultivars, *Proc. V<sup>th</sup> IS on olive. Acta Horticulturae*, 791: 213-216.
- Racuson, R.H. and Schiavone, F.M., 1990. Positional cues and differential gene experection in somatic embryos of higher plants. *Cell Difference development*, 30: 159.
- Ricci, A., Filho, F., Mendes, B. and Piedade, S., 2002. Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. *Scientia Agricola*, 59(1): 41-46.



**Effects of medium on somatic embryogenesis of *Olea europaea* L. (cv. Kroneiki)****M. Peivandi<sup>\*1</sup>, H. Farahzadi<sup>2</sup>, S. Arbabian<sup>3</sup> and M. Hosseini-Mazinani<sup>4</sup>**

1\*- Corresponding author, Assist. Prof., Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, North-Tehran Branch, Tehran, I.R.Iran E-Mail: m\_peyvandi@iau-tnb.ac.ir

2- Faculty of Sciences, Islamic Azad University, North-Tehran Branch, Tehran, I.R.Iran

3- Assist. Prof., Faculty of Sciences, Islamic Azad University, North-Tehran Branch, Tehran, I.R.Iran

4- Assoc. Prof., National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

Received: 23.06.2009

Accepted: 13.06.2010

**Abstract**

Effects of subculture media on somatic embryogenesis and rhizogenesis in different parts of mature embryo of *Olea europaea* L. (cv. Kroneiki) was studied. Radicle and proximal part of cotyledon were cultured in OMc medium containing IBA (5 mg/l) and 2ip (0.5 mg/l). twenty one days old calli were subcultured on OMc or OM media without any hormones. Cultures were maintained in darkness. Differentiation in the calli depended on kind of explants and subculture media. After the third subculture calli of radicle and proximal part of cotyledon had the potential of somatic embryogenesis. In both media, the potentiality of embryogenesis in calli from radicle was more than calli from proximal. In addition, somatic embryogenesis in OM medium showed significant increase. After the second subculture rhizogenesis occurred in both explants and different subculture media. Differences between rhizogenesis were significant. In both subculture media the potentiality of rhizogenesis in calli from proximal part of cotyledon was much more than calli of radicle and in the both explants rhizogenesis in OM medium were more than OMc medium.

**Key words:** Olive (*Olea europaea* L.), cv. *Kroneiki*, somatic embryogenesis, rhizogenesis, subculture media.