تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۷ شماره ۱، بهار ۹۳

اثر نوع ریزنمونه و نوع هورمون اکسین بر روی تولید کالوس های جنین زا و القاء جنین زایی سوماتیکی در پایه M.۲٦ سیب

سیاوش همتی[1]*، مهدی محسنی آذر[2]، خدیجه آقایی[3]، محمدرضا دیلمقانی[4] و مریم معنوی فرد[5]

۱*- **نویسنده مسوول:** کارشناس ارشد جهاد دانشگاهی واحد آذربایجان غربی (syavash.hort@gmail.com)

۲و۳- بترتیب کارشناس ارشد و کارشناس گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۴و۵- کارشناسان ارشد جهاد دانشگاهی واحد آذربایجان غربی

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۱۵

چکیده

جنین زایی سوماتیکی یک روش جایگزین مناسب برای اصلاح ژنتیکی ارقام مهم تجاری و یکی از تکنیک های موثر برای تکثیر گیاهان میباشد. در این پژوهش اثرفاکتورهای مختلف بر روی تشکیل کالوسهای جنین زا از ریزنمونه های مختلف (گلبرگ، میله بساک، نهنج گل، برگ و شاخه) در پایه M.۲٦ سیب مطالعه شد. از محیط کشت پایه MS تکمیل شده با دو نوع هورمون نفتالین استیک اسید و توفور-دی با غلظت های مختلف (صفر، ۱، ۲، ۳ و ٤ میلی گرم در لیتر) برای القاء و تولید کالوسهای جنین زا استفاده شد. تیمارهای اکسین اثر معنی‌داری بر روی القا کالوس داشتند و درصد نمونه های القاشده در محیط های حاوی نفتالین استیک اسید بیشتر از محیط های حاوی توفور-دی بود. ریزنمونه گلبرگ با غلظت٤ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید بیشترین درصد کالوسهای جنین زا را داشت. بیشترین درصد القاء جنینهای گلوبولار در تیمار B۳ (MS +۱ TDZmg/l +۰/۵ GAmg/l۷ ABAmg/l) مشاهده گردید.

کلید واژه ها: پایه M.۲٦ سیب، جنین زایی سوماتیکی، کالوس، محیط کشت MS

مقدمه

سیب از جمله درختان میوه ای است که برنامه های اصلاحی و انتقال ژن زیادی بر روی آن انجام می گیرد و یکی از بهترین روشها برای این منظور استفاده از جنین های سوماتیکی میباشد. همچنین استفاده از جنین های سوماتیکی برای تولید بذور مصنوعی برای گیاهان تجاری که هتروزیگوتی در آنها مشاهده می شود و یا اینکه تکثیر آنها با روشهای معمول مشکل است مورد توجه قرار گرفته است.جنین زایی سوماتیکی پتانسیل زیادی به عنوان روش جایگزین برای تکثیر کلونی گیاهان دارد. سلول‌های جنین‌زا که از آنها جنین قابل رویت بوجود می‌آید، سلولهایی کوچک، دارای محتوی سیتوپلاسمی فشرده، هسته بزرگ، واکوئل کوچک و دانه‌های نشاسته‌ای فراوان هستند که مطالعات بافت‌شناسی و مولکولی، سنتز زیاد RNA و فعالیت شدید متابولیسمی را در این سلول‌ها تائید می‌کند (ویلیامز و ماهسواران[1]، ۱۹۸۶). عوامل و فاکتورهای موثر بر جنین زایی سوماتیکی عبارتند از: نوع ریزنمونه، ژنوتیپ، هورمونهای گیاهی و تنظیم کننده های رشد، منبع نیتروژن و غیره. در میان تنظیم کننده های رشد، اکسینها معمولترین مواد مورد استفاده برای تغییر انتقال سلول ها از مرحله سوماتیکی به مرحله جنینی هستند. در بیشتر از ۸۰ درصد از ۱۲۴ پروتکلی که اخیراً چاپ شده اند، القاء جنین زایی سوماتیکی نیاز به حضور اکسین به تنهایی یا

1-Williams & Maheswaran

در ترکیب با سیتوکنین ها دارد (گاج[1]، ۲۰۰۴). اکسینی که بیشتر برای القا جنین های سوماتیکی درون شیشه ای استفاده می شود، توفور-دی[2]است که اکسین مصنوعی بوده و به عنوان علف کش نیز شناخته شده است. نفتالین استیک اسید[3]، ایندول استیک اسید[4]، ایندول بوتیریک اسید[5]، پیکلورام و دی کامبا نیز برای جنین زایی استفاده شده اند (ریماکرز و همکاران[6]، ۱۹۹۵).

نخستین مشاهدات جنین زایی سوماتیکی درون شیشهای در هویج بدست آمده است (رینرت[7]، ۱۹۵۸؛ رینرت، ۱۹۵۹). سایر گیاهانی که این پدیده در آنها مطالعه شده است شامل پاولونیا (ایپکچی و گوزوکیرمیزی[8]، ۲۰۰۳)، رز (استابروکس و همکاران[9]، ۲۰۰۷)، انگور (داس و همکاران[10]، ۲۰۰۲)، پتوس (زانگ و همکاران[11]، ۲۰۰۵)، پنبه (ایکرام-ال-حق[12]، ۲۰۰۵)، گونه های مرکبات (گاویش و همکاران[13]، ۱۹۹۲) و قهوه (ناکامورا و همکاران[14]، ۱۹۹۲) می باشند. در مورد جنین زایی سوماتیکی در سیب تحقیقات اندکی صورت گرفته است و در اکثر آنها از ریز نمونه های کوتیلدونی و بذری استفاده شده است. دایجنی و همکاران[15] (۱۹۹۶) نشان دادند که بالاترین سرعت جنین زایی سوماتیکی ثانویه در سیب با ترکیبی از هورمونهای نفتالین استیک اسید (۵/۳ میکرومولار)، بنزیل آدنین[16] (۰/۹ میکرومولار) و کینتین (۰/۹ میکرومولار) و یا تیدیازرون[17] (۱۰ میکرومولار) به تنهایی بدست آمد. آنها همچنین نشان دادند که مناسب ترین جنین زایی سوماتیکی ثانویه از جنین های اولیه درشت و یا ساختارهایی شبیه کوتیلدون بوجود آمدند.

لیو و همکاران[18] (۱۹۸۳) جنین های سوماتیکی را از ریز نمونه های برگ سیب رقم گلدن دلیشس بر روی محیط کشت MS[19]حاوی ویتامین های B5، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار، ۱۰میلی گرم در لیتربنزیل آدنین و۳میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید تولید کردند. باززایی جنین های سوماتیکی از کوتیلدون های جنین های زیگوتی نابالغ زمانی که ریزنمونه ها ابتدا در محیط کشت القا با اکسین بالا (۶میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید) در تاریکی کشت شدند و سپس به محیط کشت نمو جنین حاوی سیتوکنین پایین (۰/۵میلی گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین[20]) و اکسین(۰/۰۵ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید) در روشنایی منتقل شدند، بیشتر بود (پاوول و همکاران[21]، ۱۹۹۴).

هدف از این کار پژوهشی بررسی اثر نوع ریزنمونه و هورمون اکسین بر روی تولید جنین های سوماتیکی در پایه M.۲۶ سیب میباشد.

مواد و روش ها

در این تحقیق از درختان بالغ پایه M.۲۶ سیب موجود در باغ کلکسیون گروه باغبانی دانشگاه ارومیه برای تهیه ریزنمونه استفاده گردید. بافتهای گلبرگ، نهنج گل، میله بساک، شاخه و برگهای بدست آمده از جوانه های کشت شده در محیط درون شیشه ای به عنوان ریزنمونه برای تولید کالوس استفاده شد. در فصل بهار هنگام گلدهی از گلهای موجود در سیخک های پایه های مادری M.۲۶ نمونه برداری شد. ریزنمونه ها در

1- Gaj
2- 2,4-D
3- NAA
4- IAA
5- IBA
6- Raemakers *et al.*
7- Reinert
8- Ipekci & Gozukirmizi
9- Estabrooks *et al.*
10- Das*et al.*
11- Zhang *et al.*
12- Ikram-ul-Haq
13- Gavish *et al.*
14- Nakamura *et al.*
15- Daigny *et al.*
16- BA
17- TDZ
18- Liu *et al.*
19- Murashige & Skoog
20- BAP
21- Paul *et al.*

مراحل مختلف باز شدن گل (در مرحله حبابی شکل، نیمه باز و کاملا باز شده) برداشت شدند. ریزنمونه ها برای ضدعفونی سطحی ابتدا با آب شستشو داده شده و سپس با الکل ۷۰ درصد (v/v) به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم با غلظت های مختلف نیم درصد و ۱درصد (v/v) و زمانهای متفاوت ۵، ۷/۵ و۱۰ دقیقه استریل شدند و بعد از ۳ بار آبکشی با آب مقطر استریل، بر روی محیط کشت بدون هورمون کشت گردیدند. بعد از دو هفته که ریزنمونه های آلوده مشخص شدند، نمونه های سالم بر روی محیط کشت حاوی ترکیبات هورمونی منتقل شدند. در این تحقیق از محیط کشت پایهMS استفاده گردید. ریزنمونه‌ها در محیط MS حاوی تیمارهای مختلف هورمونی شامل دو نوع اکسین تو فور-دی و نفتالین استیک اسید با غلظتهای مختلف بطور جداگانه کشت گردیدند. غلظت های مورد استفاده برای القای کالوس صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی گرم در لیتر از هر کدام از هورمونها بود. کالوسهای ایجاد شده بر روی تیمارهای مختلف بعد از حدود ۱۰ هفته از رشد بر روی محیط کشت و پس از اینکه به اندازه کافی رشد کردند بر روی محیط کشت بدون هورمون منتقل شدند. نمونه ها بعد از حدود ۸ هفته ماندن برروی محیط بدون هورمون برای باززایی به محیط های مختلف باززایی و نمو جنین منتقل گردیدند (جدول ۱). کالوس ها بعد از ۶ هفته به محیط جدید با همان ترکیب قبلی منتقل شدند. در مراحل مختلف آزمایش نمونه ها درون پتری هایی با قطر ۸ سانتیمتر کشت و در دمای ۱± ۲۵ درجه سانتیگراد و فتوپریود ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۵۰۰ تا ۴۵۰۰ لوکس نگهداری شدند.

در طول آزمایش صفاتی مانند درصد ریزنمونه های که کالوس تولید کردند، نوع بافت کالوس، رنگ کالوس، میزان رشد کالوس، میزان سیاه شدگی، درصد کالوسهای دارای پتانسیل جنین زائی و تعداد جنین های بالغ اندازه گیری شد.

در هر تیمار از ۴ پتری به عنوان تکرار استفاده شد و درون هر پتری ۴ ریزنمونه یا تکه کالوس قرار داده شد. برای بررسی اثر نوع ریزنمونه و هورمون اکسین به منظور تولید کالوسهای جنین زا از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و برای تولید جنین ها از کالوس ها از طرح کاملا تصادفی استفاده شد و از نرم افزار MSTAT-C برای آنالیز داده ها استفاده گردید. مقایسه میانگین ها نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

جدول ۱- محیط های کشت باززایی و نمو جنین

محیط کشت مورد استفاده	تیمار
MS + ۱ TDZmg/l	B۱
MS + ۲ TDZmg/l	B۲
MS + ۱ TDZmg/l + ۱ ABAmg/l + ۰/۵ GAmg/l$_{۷}$	B۳
MS + ۲ TDZmg/l + ۲ ABAmg/l + ۱ GAmg/l$_{۷}$	B۴
۱/۲ MS + ۱۵ sucroseg/l	B۵
۱/۲ MS + ۱۵ sucroseg/l + ۱ TDZmg/l + ۱ ABAmg/l + ۰/۵ GAmg/l$_{۷}$	B۶
۱/۲ MS + ۵ sorbitolg/l + ۱۰ sucroseg/l	B۷
۱/۲ MS + ۵ sorbitolg/l + ۱۰ sucroseg/l + ۱ TDZmg/l + ۱ ABAmg/l + ۰/۵ GAmg/l$_{۷}$	B۸

نتایج و بحث

ضدعفونی سطحی مواد گیاهی

برای ضدعفونی سطحی ریزنمونه ها از غلظت های مختلف هیپوکلریت در زمانهای متفاوت استفاده شد. نتایج نشان داد که تیمار ۳۰ ثانیه استریل سطحی با الکل ۷۰ درصد (v/v) و ۵ دقیقه استریل سطحی هیپوکلریت سدیم ۱ درصد (v/v) بهترین نتیجه را برای ریزنمونه های گلبرگ و نهنج گل داشت. ولی ریز نمونه های میله بساک در همه تیمارها از بین رفتند. بنابراین از ریزنمونه های گلبرک و نهنج گل استریل شده و برگ و شاخه های بدست آمده از نمونه های کشت بافت شده استفاده گردید.

القاء کالوس

هرکدام ازتیمارهای هورمونی اکسین، نوع ریزنمونه و اثرات متقابل آنها اثر معنی‌داری بر روی تشکیل و القا کالوس داشتند (جداول ۲ و ۳) در حالت کلی بیشترین درصد کالوسهای تشکیل شده در ریزنمونه های شاخه و القا کالوسهای جنین زا در ریزنمونه گلبرگ مشاهده شد و محیط های حاوی نفتالین استیک اسیدنسبت به محیط های حاوی توفور-دی بهتر اثر کردند. در این آزمایش نهنج گل تحت هیچ یک از تیمارهای هورمونی تولید کالوس ننمود (جدول ۴).

همانطوری که جدول ۴ نشان می دهد بیشترین درصد تشکیل کالوس به ترتیب در ریز نمونه شاخه در غلظت های ۴ میلی گرم در لیتر و ۳ میلی گرم در لیتر و ریزنمونه گلبرگ در غلظت ۴ میلی گرم در لیتر از هورمون نفتالین استیک اسید وجود داشت. ریزنمونه برگ کالوس کمتری نسبت به ریزنمونه های دیگر تولید کرد. ولی بیشترین کالوسهای جنین زا در ریزنمونه گلبرگ به ترتیب در غلظتهای ۴ میلی گرم در لیتر، ۳ میلی گرم در لیتر و ریز نمونه برگ در غلظت ۴ میلی گرم در لیتر هورمون نفتالین استیک اسید مشاهده شد.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر هورمون NAA روی درصد تشکیل کالوس و درصد کالوس های جنین زا

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد تشکیل کالوس	درصد کالوسهای جنین زا
ریز نمونه	۳	۷۵۵۰/۶۴۶ **	۷۳۵۳/۵۱۷**
NAA	۴	۴۲۷۰/۲۰۰ **	۴۶۳۳/۷۵۰ **
ریزنمونه×NAA	۱۲	۵۳۴/۵۸۳ **	۵۴۵/۳۵۰ **
خطا	۶۰	۱/۶۹۶	۱/۶۸۳
CV (درصد)	-	۴/۷۸	۴/۶۵

**،* وns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ و غیرمعنی‌دار

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر هورمون 2,4-D روی درصد تشکیل کالوس و درصد کالوس های جنین‌زا

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد تشکیل کالوس	درصد کالوسهای جنین زا
ریز نمونه	۳	۵۲۹۲/۲۶۷**	۵۵۸۶/۸۶۷ **
2,4-D	۴	۳۵۰۵/۷۰۰ **	۳۵۸۵/۰۰۰ **
ریزنمونه×2,4-D	۱۲	۴۷۳/۴۳۳ **	۴۲۳/۵۳۳ **
خطا	۶۰	۱/۵۳۳	۱/۳۳۳
CV (٪)	-	۵/۳۴	۴/۷۶

**،* وns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ و غیرمعنی‌دار

اختلاف معنی داری بین اثر متقابل سطوح مختلف هورمون توفور-دی و نوع ریز نمونه در سطح ۵ درصد برای درصد تشکیل کالوس و درصد کالوس های جنین زاوجود داشت (جدول ۴). بیشترین درصد تشکیل کالوس به ترتیب در ریزنمونه های شاخه و گلبرگ در غلظت ۴ میلی گرم در لیتر توفور-دی وجود داشت و کمترین آن به غیر از نمونه های شاهد در ریزنمونه های گلبرگ قرار گرفته بر روی محیط کشت دارای۱میلی گرم در لیتر توفور-دی مشاهده شد. بیشترین کالوس جنین زا نیز در ریز نمونه گلبرگ در غلظت ۴ میلی گرم در لیتر توفور-دی القا شد. بطور کلی با افزایش غلظت هورمون های نفتالین استیک اسید وتوفور-دی درصد تشکیل کالوس و کالوسهای جنین زا افزایش یافت و بیشترین آنها در غلظت ۴میلی گرم در لیترمشاهده شد. جدول ۵ اثر نوع ریزنمونه و هورمون را بر روی کالوس های تولید شده را نشان می دهد.

پاوول و همکاران (۱۹۹۴) بیشترین جنین های سوماتیکی را از کوتیلدونهای جنین های زیگوتی سیب در محیط کشت حاوی نفتالین استیک اسید با غلظت بالای۶ میلی گرم در لیتر پس از کشت در تاریکی بدست آوردند. نتایج مشابه توسط دایجنی و همکاران (۱۹۹۶) گزارش شده است. در همه هفت رقم کاساوا مورد آزمایش قرار گرفته توسط سوفیاری و همکاران[1] (۱۹۹۷) تنهاتوفور-دی قابلیت القا جنین های سوماتیکی اولیه را از ریزنمونه برگ داشت. ولی جنین های سوماتیکی ثانویه در محیط کشت دارای نفتالین استیک اسید بیشتر از محیط کشت حاوی توفور-دی تشکیل شدند. علاوه براین زمان مورد نیاز برای بلوغ جنین های سوماتیکی ثانویه در محیط کشت حاوی نفتالین استیک اسید کمتر از محیط توفور-دی بود.

سلول های با قابلیت جنینی، سلولهایی هستند که قادر به تمایز یابی به جنین در صورت دریافت محرک های تمایز یابی می باشند. قابلیت جنینی در بیشتر موارد (به عنوان مثال در طی جنین زایی سوماتیکی غیر مستقیم) خود نیاز به القاء دارد و سیگنال های القاء جنینی و شروع نمو جنینی به راحتی قابل تفکیک نیستند. قابلیت سلولی با تمایز زدایی سلولهای سوماتیکی که به آنها اجازه پاسخ گویی به سیگنالهای نموی جدید می دهد مرتبط می باشد. سلولهایی با قابلیت جنینی یا از بافت های جنینی/ مریستمی منشا می گیرند و یا می توانند از سلولهای طویل شده و واکوئل دار شده تحت شرایط خاص به عنوان مثال بعد از تیمار اکسینی تشکیل شوند. ولی هورمونهای دیگر (آبسیزیک اسید[2]، سیتوکینین) یا تیمارهای تنشی همچنین می توانند تشکیل سلولهای با قابلیت جنینی را تحریک کنند (فهر[3]، ۲۰۰۶).

شیوه ای که نفتالین استیک اسید و یا توفور-دی به وسیله آن جنین زایی را القا می کنند هنوز ناشناخته می باشد. ولی به نظر می رسد که توفور-دی جنین زایی را از یک سو از طریق تحت تاثیر قرار دادن متابولیسم درونی سایر هورمونها را تنظیم می کند و از سوی دیگر می تواند به عنوان یک تنش دهنده قوی که باعث جنین زایی سوماتیکی می شود عمل کند (فهر و همکاران[4]، ۲۰۰۳).

در بین ریزنمونه های مورد استفاده برای جنین زایی سوماتیکی اختلاف معنی داری از نظر پاسخ به هورمونهای اکسینی و تولید کالوسهای جنین زا وجود داشت. در این مطالعه از بین ریزنمونه های مختلف (گلبرگ، نهنج، برگ و شاخه) که تحت شرایط آزمایش یکسان قرار گرفتند بالا ترین درصد کالوسهای جنین زا در ریزنمونه های گلبرگ مشاهده گردید. همچنین بیشترین کالوسهای جنین زا در ریز نمونه گلبرگ در ترکیب با محیط کشت حاوی ۴ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید مشاهده گردید.

موفقیت در بدست آوردن کشت های باززا و جنین های سوماتیکی عمدتاً به انتخاب ریزنمونه مناسب به جای

1- Sofiari *et al.*

2- ABA
3- Feher
4- Feher *et al.*

جدول ٤- درصد تشکیل کالوس و درصد کالوس های جنین زای القا شده در غلظت های مختلف NAA و 2,4-D

نوع ریزنمونه	غلظت هورمون (میلی گرم در لیتر)	NAA		2,4-D	
		درصد تشکیل کالوس	درصد کالوس های جنین زا	درصد تشکیل کالوس	درصد کالوس های جنین زا
گلبرگ	۰	۰/۰^{J}	۰/۰^{H}	۰/۰^{K}	۰/۰^{I}
	۱	۳۸/۰^{G}	۴۰/۵^{D}	۱۷/۰^{J}	۳۵/۰^{F}
	۲	۴۲/۰^{F}	۵۱/۰^{C}	۲۷/۰^{H}	۴۴/۰^{D}
	۳	۵۰/۷۵^{D}	۵۷/۰^{B}	۴۵/۰^{DE}	۵۱/۰^{B}
	۴	۵۷/۰^{C}	۶۸/۰^{A}	۵۲/۰^{B}	۶۰/۰^{A}
برگ	۰	۰/۰^{J}	۰/۰^{H}	۰/۰^{K}	۰/۰^{I}
	۱	۲۴/۰^{I}	۳۳/۰^{F}	۲۰/۰^{I}	۲۹/۰^{G}
	۲	۳۰/۰^{H}	۴۲/۰^{D}	۳۰/۰^{G}	۳۵/۰^{F}
	۳	۳۹/۰^{G}	۴۹/۰^{C}	۳۹/۰^{F}	۴۳/۰^{D}
	۴	۴۴/۰^{E}	۵۸/۰^{B}	۴۴/۰^{E}	۴۹/۰^{B}
نهنج	۰	۰/۰^{J}	۰/۰^{H}	۰/۰^{K}	۰/۰^{I}
	۱	۰/۰^{J}	۰/۰^{H}	۰/۰^{K}	۰/۰^{I}
	۲	۰/۰^{J}	۰/۰^{H}	۰/۰^{K}	۰/۰^{I}
	۳	۰/۰^{J}	۰/۰^{H}	۰/۰^{K}	۰/۰^{I}
	۴	۰/۰^{J}	۰/۰^{H}	۰/۰^{K}	۰/۰^{I}
شاخه	۰	۰/۰^{J}	۰/۰^{H}	۰/۰^{K}	۰/۰^{I}
	۱	۴۴/۵^{E}	۲۸/۰^{G}	۳۹/۰^{F}	۲۴/۰^{H}
	۲	۵۰/۰^{D}	۳۸/۰^{E}	۴۷/۰^{CD}	۳۰/۰^{G}
	۳	۶۰/۰^{B}	۴۲/۰^{D}	۴۹/۰^{C}	۳۸/۰^{E}
	۴	۶۶/۰^{A}	۵۱/۰^{C}	۵۵/۰^{A}	۴۷/۰^{C}

حروف مشابه موجود در یک ستون از نظر آماری در سطح ۵ ٪ اختلاف معنی دار با هم ندارد.

تغییرات محیط کشت دارد. در بین بافت های سوماتیکی از لحاظ تولید کالوس و جنین های سوماتیکی نیز اختلاف وجود دارد. جنین های سوماتیکی می توانند بر روی تمام اندامهای گیاهچه در برخی ژنوتیپ های با قابلیت جنین زایی بالا مانند هویج و یونجه توسعه یابند. ولی در بیشتر گونه های گیاهی قابلیت جنین زایی به بافت خاص یک ژنوتیپ محدود می شود. تجربیات بدست آمده از طریق کشت بافت نشان می دهند که یک نوع شیب در پاسخ جنین زایی بین اندامهای مختلف وجود دارد. پتانسیل جنین زایی در بافتهایی با منشا جنینی بالا می باشد و به سمت هیپوکوتیل، دمبرگ، برگ و ریشه کاهش می یابد (فهر، ۲۰۰۶). بافتهایی که جوان تر و کمتر تمایز یافته تر هستند در مقایسه با شاخه و ساقه کاربردی تر هستند. برای مثال جنین های بذری می توانند به کالوسهایی که ممکن است گروهی از جنین ها را تولید کنند نمو کنند.

ثابت شده است که بافتهای تولید مثلی منابع فوق العاده ای برای جنین زایی هستند. همچنین گل آذین نابالغ نیز مناسب می باشد (مونیر[1]، ۱۹۹۰).

بازززایی و نمو جنین های سوماتیکی

جدول ۶ اثر تیمارهای بازززایی را بر روی درصد سیاه شدگی و درصد بازززایی و نمو جنین را نشان می دهد.کالوس های جنین زای القا شده توسط تیمار هورمونی اکسین به منظور تولید جنین های بالغ به محیط های بازززایی و نمو منتقل شدند. همانطور که در جدول ۷ نشان داده شده است تیمارهای مختلف اثر معنی داری بر تولید جنین های سوماتیکی داشتند. جنین های تولید شده

1- Monnier

جدول۵- اثر ریزنمونه و نوع هورمون بر روی کیفیت کالوس های تولید شده

نوع ریز نمونه	نوع هورمون	کالوس	
		رنگ	میزان رشد
گلبرگ	NAA	سبز کم رنگ+ کرم	زیاد
	2,4-D	سفید + کرم	متوسط
برگ	NAA	سبز کم رنگ+ کرم	متوسط
	2,4-D	سفید + کرم	متوسط
نهنج	NAA	کالوس مشاهده نشد	-
	2,4-D	کالوس مشاهده نشد	-
شاخه	NAA	سبز + کرم	متوسط
	2,4-D	سفید + کرم	کم

جدول ٦- نتایج تجزیه واریانس درصد سیاه شدگی کالوس و درصد باززایی و نمو جنین در محیط های کشت باززایی و نمو جنین

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد سیاه شدگی کالوس	درصد باززایی و نمو جنین
محیط کشت	۷	۲۳۹۶/۸۶۲ **	۴/۲۰۵ **
خطا	۲۴	۳/۰۰۰	۲/۰۰۰
CV (درصد)	-	۶/۳۰	۲۰/۴۸

**،* وns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ و غیرمعنی‌دار

تا مرحله گلوبولار رشد کردند و نتوانستند به جنین کامل تبدیل شوند. بیشترین درصد تولید جنین های گلوبولار در تیمار B۳ (۰/۵ GAmg/l۷ + MS + ۱ TDZmg/l + ۱ ABAmg/l) مشاهده گردید. همچنین با افزایش غلظت تیدیازرون تولید جنین های گلوبولار کاهش یافت. علاوه بر این افزودن آبسیزیک اسید باعث افزایش تعداد جنین های گلوبولار شد. کاهش غلظت نمکها، ویتامینها و ساکارز در محیط کشت MS به نصف غلظت های پایه اثر منفی در رشد داشت و باعث بازگشت و تبدیل کالوسهای جنین زا به کالوسهای غیر جنین زا و توقف رشد جنین های گلوبولار و مرگ و از بین رفتن آنها شد. گایری و راشید[1] (۲۰۰۴) بعد از تیمار کوتاه مدت ۳ روزه کاریوپسس[2] برنج با ۲۰ میکرو مولار توفور-دی آنها را به محیط حاوی تیدیازرون یا بنزیل آدنین منتقل کردند. بعد از ۱۵-۱۰ روز جنین های سوماتیکی و شاخساره در ۳۰ درصد کشت ها مشاهده شد و تیدیازرون بهتر از بنزیل آدنین برای القاء باززایی شاخساره بود. وحدتی و همکاران[3] (۲۰۰۸) اثرات آبسیزیک اسید و ساکارز را بر روی بلوغ و جوانه زنی جنین های سوماتیکی گردوی ایرانی بررسی کردند. جنین های سوماتیکی گلوبولار بر روی محیط کشت

1- Gairi & Rashid

2- Caryopses
3- Vahdati *et al.*

جدول ۷- اثر تیمارهای مختلف باززایی بر روی درصد سیاه شدگی کالوس و درصد باززایی و نمو جنین های سوماتیکی

ترکیبات مختلف هورمونی	درصد باززایی و نمو جنین	درصد سیاه شدگی کالوس در محیط کشت
B1	۰ B	۱۵ F
B2	۰ B	۲۰ E
B3	۳ A	۰ H
B4	۰ B	۱۰ G
B5	۰ B	۸۰ A
B6	۰ B	۳۰ C
B7	۰ B	۲۵ D
B8	۰ B	۴۰ B

حروف مشابه موجود در یک ستون از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار با هم ندارد.

بلوغ تکمیل شده با غلظت های مختلف آبسیزیک اسید و ساکارز رشد کردند. تعداد جنین های سوماتیکی جوانه زده تحت تاثیر غلظت آبسیزیک اسید در محیط بلوغ قرار داشت. بهترین تیمار برای جوانه زنی که در آن هم ساقه و هم ریشه تشکیل شدند، حاوی۲ میلی گرم در لیترآبسیزیک اسید بود که منجر به تبدیل ۴۱ درصد آنها به گیاهچه شد. با افزایش غلظت آبسیزیک اسید در محیط کشت باززایی کالوسها کاهش یافت.

توماس[1](۲۰۰۶) اثرات قند، جیبرلین و آبسیزیک اسید را بر روی جنین زایی سوماتیکی از کالوسهای بدست آمده از ریزنمونه های میان گره *Tylophoraindica* (Burm. f.) Merrill بررسی کرد. اختلاف معنی داری بین غلظت های قند و نوع قند مورد آزمایش در جنین زایی سوماتیکی داشت. ساکارز در ۲۰۰ میلی مول در لیتر با۶میکرو مول در لیتر کینتین بیشترین جنین زایی (۷۱ درصد) با میانگین ۴۹ جنین در هر ریز نمونه داشت. گلوکز همراه با۶ میکرو مول در لیتر کینتین و یا ترکیب گلوکز، ساکارز و ۶ میکرو مول در لیتر کینتین درصد جنین زایی و تعداد جنین در ریزنمونه را کاهش داد.

وجود جیبرلیک اسید[2]و آبسیزیک اسید در غلظتهای مناسب جنین زایی را افزایش داد. افزودن۱۰ میکرو مول در لیتر اسید جیبرلیک به محیط دارای ۲۰۰ میلی مول در لیتر ساکارز، ۹۸ درصد جنین زایی و ۵۱ جنین در هر ریزنمونه مشاهده شد. جنین زایی سوماتیکی بطور معنی داری با افزودن ۲ میکرو مول در لیتر آبسیزیک اسید به محیط دارای ۲۰۰ میلی مول در لیتر ساکارز افزایش یافت و در این محیط ۹۵ درصد جنین زایی و ۴۴ جنین در هر ریزنمونه مشاهده گردید.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده هورمون نفتالین استیک اسید با غلظت۴ میلی گرم در لیتر هورمون مناسبی برای تولید کالوسهای جنین زا از ریزنمونه گلبرگ در پایه M.۲۶ سیب می باشد. همچنین برای باززایی جنین های سوماتیکی گلوبولار محیط کشت ۰/۵ GAmg/l$_{۷}$ + MS + ۱ TDZmg/l + ۱ ABAmg/l مناسب می باشد.

1- Thomas
2- GA_3

منابع

1.Daigny, G., Paul, H., Sangwan, R.S., and Sangwan-Norreel, B.S. 1996. Factors influencing secondary somatic embryogenesis in *Malus* × *domestica*Borkh. (cv 'Gloster 69'). Plant Cell Reports, 16: 153-157.

2.Das, D.K., Reddy, M.K., Upadhyaya, K.C., and Sopory, S.K. 2002. An efficient leafdisc culture method for the regenerationvia somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitisvinifera* L.). Plant Cell Reports, 20: 999-1005.

3.Estabrooks T., Robin, B., and Zhongmin, D. 2007. 2, 4, 5- Trichlorophenoxyacetic acid promotes somaticembryogenesis in the rose cultivar 'Livin' Easy' (*Rosa* sp.). Plant Cell Reports, 26:153-160.

4.Feher, A. 2006. Why somatic plant cells start to form embryos? In: Mujib, A. andSamaj, J. (eds.). Somatic embryogenesis (Plant cell monographs, Vol. 2), Springer Publications,
pp: 85-101.

5.Feher, A., Pasternak, T.P., and Dudits, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 74: 201-228.

6.Gairi, A., and Rashid, A. 2004. TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76: 29-33.

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

8.Gavish, H., Vardi, A., and Fluhr, R. 1992. Suppression of somatic embryogenesis in citrus cell cultures by extracellular proteins. Planta, 186: 511-517.

9.Ikram-ul-Haq. 2005. Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypiumhirsutum* L.). African Journal of Biotechnology, 4: 206-209.

10.Ipekci, Z., and Gozukirmizi, N. 2003. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongate*.Plant Cell Reports, 22: 16-24.

11.Liu, J.R., Sink, K.C., and Dennis, F.G. 1983. Adventive embryogenesis from leaf explants of apple seedlings. Hortscience, 18: 871-873.

12.Monnier, M. 1990. Induction of embryogenesis in callus culture. In: Jerey W. P. and John M. W. (eds). Methods in Molecular Biology (Plant cell and tissue culture, Humana Press. 6: 141-148.

13.Nakamura, T., Taniguchi, T., and Maeda, E., 1992. Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. Japanese Journal of Crop Science, 61: 476-486.

14.Paul, H., Belaizi, M. and Sangwan-norreel, B.S. 1994. Somatic embryogenesis in apple. Journal of Plant Physiology, 143: 78-86.

15.Raemakers, C.J.J.M., Jacobsen, E., and Visser, R.G.F. 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. Euphytica, 81: 93-107.

16.Reinert, J. 1958. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten. Naturwissenchaften, 45: 344-345.

17.Reinert, J. 1959. Uber die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. Planta, 53: 318-333.

18.Sofiari, E., Raemakers, C.J.J.M., Kanju1, E., Danso1, K., van Lammeren, A.M., Jacobsen, E., and Visser, R.G.F. 1997. Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in cassava. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 50: 45-56.

19.Thomas, T. D. 2006. Effect of sugars, gibberellicacid and abscisicacid on somatic embryogenesis in *Tylophoraindica* (Burm. f.) Merrill. Chinese Journal of Biotechnology, 22: 465-471.

20.Vahdati, K., Bayat, S., Ebrahimzadeh, H., Jariteh, M., and Mirmasoumi, M. 2008. Effect of exogenous ABA on somatic embryo maturation and germination in Persian walnut (*Juglansregia* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 93: 163-171.

21.Williams E.G., and Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. Annuals of Botany, 57: 443-462.

22.Zhang, Q., Chen, J., and andHenny, R.J. 2005. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, petiole, and stemexplants of Golden Pothos. Plant Cell Reports, 23: 587–595.