Plant Prod., 43(1) (2020) 25-38 ISSN (P): 2588-543X
DOI: 10.22055/ppd.2019.26639.1635 ISSN (E): 2588-5979

Optimization of *in vitro* Callus Induction and Somatic Embryogenesis of Horseradish (*Armoracia rusticana*) Supplemented with 2,4-D and IAA

Sara Ahmadi[1], Kambiz Mashayekhi[2]* and Seyyed Javad Mousavizadeh[3]

1- M.Sc. Student of Vegetables, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2- ***Corresponding Author**: Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran (kambizm@yahoo.com)
3- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: 29 September, 2018 Accepted: 21 November, 2019

Abstract

Background and Objectives
Horseradish has a male sterility that produces a small amount of seed with a low germination. It then propagates with root cuttings, which is also subject to a limited number of mother rootstocks. Therefore, the mass proliferation of this plant is important through tissue culture, especially somatic embryogenesis protocols. Somatic embryogenesis is a method to develop embryo via plant somatic cells during *in vitro* culture. The purpose of the present experiment is to find the best method for callus and somatic embryogenesis inducing horseradish, which is carried out in two B5 and NL media in both solid and liquid phases.

Materials and Methods
This research was carry out in the tissue culture lab of the department of horticultural sciences at gorgan university agricultural sciences and natural resources from 2016 to 2019. Calli are developed on callus induction media (B5 + 1 µM 2,4-D + 2 µM kin, NL + 1 µM IAA + 2 µM kin), and then transferred to somatic embryo induction phase (B5 + 3 µM 2,4-D + 4 µM kin, NL + 3 µM IAA + 4 µM kin) for 8 weeks. Elimination of IAA, 2,4-D and kin from induced calli done onto realization phase, and globular, heart and torpedo embryos observed 4 weeks later.

Results
Based on the results, the best surface sterilization was achieved by 70% ethanol for 30 seconds and 70% aqueous sodium hypochlorite (v/v) for 60 minutes. The callus and somatic embryo were observed in both solid and liquid B5 and NL media. In the study of callus induction, according to the measurement of appearance quality and the process of callus formation, the growth and increase of callus in solid phase are higher than that of liquid phase. The highest callus induction record is seen in solid B5 medium containing 2 µM Kin and 1 µM 2,4-D. Generally, calli on embryo induction phase are bright green to yellowish and compact consisting of separate clusters of somatic embryonic cells. The results of somatic embryogenesis revealed that globular, heart, torpedo and total embryos in B5 containing 1 µM 2,4-D are more than NL containing 1 µM IAA.

Discussion

Optimizing the growth of somatic embryos is important for mass propagation of plants that face problems in seed germination or have a long growth period. Due to the success of the production of horseradish somatic embryos, the results of this experiment can provide the possibility of production and propagation of horseradish plants in a short time. Further studies are required to determine the somaclonal variation of horseradish mature somatic embryos and plantlets.

Keywords: Kin, Medium, Somatic embryo induction

بهینه‌سازی کالوس‌زایی و رویان‌زایی رویشی درون شیشه‌ای گیاه ترب اسبی (*Armoracia rusticana*) با کاربرد اکسین‌های 2,4-D و IAA

سارا احمدی[۱]، کامبیز مشایخی[۲]* و سید جواد موسوی‌زاده[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد سبزیکاری، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲-***نویسنده مسئول:** دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران (kambizm@yahoo.com)

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۳۰

چکیده

ترب اسبی به‌دلیل داشتن نرعقیمی، بذر کمی تولید کرده که بذرهای تولیدی نیز دارای جوانه‌زنی پایینی هستند. از این‌رو ازدیاد آن با قلمه ریشه انجام می‌شود که آن نیز با محدودیت تعداد پایه مادری مناسب روبرو است. بنابراین ازدیاد انبوه این گیاه از طریق کشت بافت اهمیت ویژه‌ای دارد. این آزمایش با هدف دست‌یابی به بهترین روش برای القای کالوس و تولید رویان‌های رویشی در دو محیط کشت B5 و NL، در دو فاز جامد و مایع طی سال‌های ۹۷-۱۳۹۵ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شده است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در هر دو فاز محیط کشت جامد و مایع B5 و NL، کالوس و رویان رویشی تولید شد. در بررسی کالوس‌زایی این پژوهش با توجه به سنجش از نظر کیفیت ظاهری و بررسی روند تشکیل کالوس، رشد و افزایش کالوس در کشت جامد نسبت به کشت مایع بیشتر بود. در محیط کشت جامد B5 حاوی دو میکرومولار kin (کنیتین) و یک میکرومولار 2,4-D (توفوردی) بهترین نتیجه در کالوس‌زایی به‌دست‌آمد. نتایج حاصل از رویان‌زایی ترب اسبی نشان داد که تعداد رویان‌ها در مراحل کروی، قلبی، اژدری و درنهایت تعداد کل رویان‌ها در محیط کشت B5 حاوی یک میکرومولار 2,4-D نسبت به محیط کشت NL حاوی یک میکرومولار IAA (ایندول استیک اسید) بیشتر بود. بهینه‌سازی رشد رویان‌های رویشی، در گیاهانی که از لحاظ جوانه‌زنی بذر با مشکل مواجه‌اند و یا دوره رشد طولانی دارند، در راستای ازدیاد بسیار مهم است. با توجه به موفقیت تولید رویان‌های رویشی ترب اسبی، نتایج این تحقیق می‌تواند نویدبخش امکان تولید و ازدیاد آسان این گیاه در مدت زمان کوتاه‌تر باشد.

کلیدواژه‌ها: القای رویان رویشی، کنیتین، محیط کشت

مقدمه

ترب اسبی با نام علمی *Armoracia rusticana* و نام لاتین Horseradish، گیاهی چند ساله، مقاوم به سرما و از خانواده شب‌بو است (Tucker and Debaggio, 2009). قسمت خوراکی ترب اسبی از نظر گیاه‌شناسی ریزوم است (Courter and Rhodes, 1969). ازدیاد ترب اسبی از طریق قلمه، تقسیم تاج و بذر است. این گیاه به دلیل داشتن نر عقیمی، بذر کمی تولید کرده که آن‌ها

نیز دارای قدرت باروری و جوانه‌زنی پایینی هستند (Courter and Rhodes, 1969)، در نتیجه ازدیاد آن با قلمه ریشه انجام می‌شود (Miller and Gross, 2011). افزایش ترب اسبی از طریق قلمه ریشه با محدودیت تعداد پایه مادری مناسب و همچنین محدودیت تعداد گیاهچه‌های تولیدشده روبرو است. بنابراین ازدیاد انبوه این گیاه از طریق کشت درون شیشه‌ای از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌گردد. در *A. lapathifolia* که گونه نزدیک به ترب اسبی است، در کشت بافت برگی در محیط کشت MS موفق عمل‌شده است (Balen et al., 2011). همچنین طی آزمون‌های آزمایشگاهی و مزرعه‌ای نتایج جالب توجه‌ای در ارتباط با نجات جنین ترب اسبی ارایه شده است (Ozgur et al., 2004). در سال‌های پیشین نیز از طریق کشت ریشه‌های مویین ترب اسبی در محیط کشت MS موفق به تولید بذر مصنوعی شدند (Uozumi et al., 1992).

علیرغم وجود گزارش‌ها در کشت بافت گونه‌های نزدیک به ترب اسبی، اطلاعات به نسبت کمی درباره چگونگی کشت درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های ترب اسبی موجود است. در تحقیقات محققان پیشرو جهت القای کالوس و جنین‌زایی رویشی گیاهان، اهمیت حضور هورمون اکسین در محیط کشت مشخص گردیده است. همچنین این اصل که برای ظهور، ادامه تکامل و درنهایت تبدیل جنین‌ها به یک گیاه کامل غلظت اکسین‌ها در محیط کشت می‌بایستی کاهش‌یافته و یا کاملاً حذف گردند نیز شناخته شده است (Mousavizadeh et al., 2017; Mashayekhi and Neumann, 2006; Neumann, 1966; Mousavizadeh et al., 2012). لذا در این تحقیق سعی شده است که علاوه بر روش ضدعفونی، کالوس‌زایی و در مرحله بعدی جنین‌زایی رویشی ترب اسبی در حضور تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر طی سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۵ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شده است. ریشه گیاه ترب اسبی موردنیاز در این تحقیق از کشور انگلستان تهیه شد (شکل ۱).

تیمارهای ضدعفونی

در این آزمایش ابتدا ریشه‌ها سه بار با مایع ظرفشویی شسته و بعد از آن با قارچکش بنومیل دو در هزار به مدت ۶۰ دقیقه و همچنین با الکل ۷۰ درصد (۶۰ ثانیه) تیمار شدند. ضدعفونی نمونه‌ها با هیپوکلریت سدیم ۷۰ درصد به مدت زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۶۰ دقیقه (Parvin et al., 2019)، آب اکسیژنه ۱۰ درصد به مدت زمان‌های ۵، ۷ و ۱۰ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۱ درصد (Balapoor et al., 2019) به مدت زمان‌های ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه انجام شدند و در محیط کشت جامد B5 (Gamborg et al., 1968) حاوی ۰/۸ درصد آگار و سه درصد ساکارز و یک میکرومولار توفوردی کشت شدند (Mousavizadeh et al., 2012).

Figure 1. Horseradish root prepared for experiment (https://nl.wikipedia.org)

تهیه محیط کشت B5 به منظور کالوس‌زایی

محیط کشت B5 به‌صورت جامد و مایع حاوی سه درصد ساکارز و یک میکرومولار توفوردی تهیه شدند. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت در شیشه‌های مکارتی توزین شدند. به منظور واکشت در هر دو فاز محیط کشت B5 یک میکرومولار توفوردی و دو میکرومولار کنیتین در شرایط مشابه استفاده شد.

تهیه محیط کشت NL به منظور کالوس‌زایی

ابتدا محیط کشت NL (Neumann, 1966) به صورت جامد حاوی ۰/۸ درصد آگار، سه درصد ساکارز و یک میکرومولار هورمون ایندول استیک اسید تهیه شد. سپس ۲۵ میلی‌لیتر از محیط مذکور در شیشه‌های مکارتی توزین شدند. به منظور واکشت یک میکرومولار ایندول استیک اسید و دو میکرومولار کنیتین در شرایط مشابه استفاده شد. در تهیه محیط کشت NL به صورت مایع نیز هورمون‌های مشابه کشت جامد پس از تنظیم اسیدیته، در شیشه‌های تی شکل توزین شدند.

تهیه محیط‌های کشت B5 و NL به منظور رویان‌زایی

ابتدا کالوس ایجادشده توسط تیغ اسکالپل سترون به قطعات یک سانتی‌متری در ظرف حاوی آب‌مقطر سترون‌شده تقسیم‌شده و به ظروف تی شکل حاوی محیط کشت مایع منتقل شدند. از محیط‌های کشت B5 و NL به‌صورت مایع و هورمون اکسین توفوردی با غلظت‌های صفر و یک میکرومولار در محیط B5 و همچنین در محیط کشت NL اکسین ایندول استیک اسید با غلظت‌های صفر و یک میکرومولار برای کشت ریزنمونه‌ها برای اولین کشت استفاده شد. تعداد سه ریزنمونه کالوس‌زایی‌شده، در فاز القای رویان‌زایی، در محیط‌های مذکور در شیشه‌های تی شکل حاوی ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت، قرار گرفت و سپس شیشه‌ها به دستگاه آکسوفیتون (Caplin and Steward, 1949) منتقل شدند. عمل واکشت ریزنمونه‌ها چهار هفته پس از کشت در محیط‌های قبلی درحالی‌که اکسین آن‌ها دو میکرومولار همراه سه میکرومولار کنیتین بود انجام گرفت. برای واکشت دوم نیز غلظت اکسین سه میکرومولار همراه چهار میکرومولار کنیتین بود. عمل واکشت چهار هفته بعد در محیط‌های قبلی درحالی‌که 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، ۱۰ و ۱۵ دقیقه شستشو شدند (Mashayekhi and Neumann, 2006; Mashayekhi et al., 2012). ظروف حاوی کشت به اتاق رشد با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲±۲۷ درجه سلسیوس منتقل شدند.

شمارش رویان‌ها و ثبت داده‌ها

تجزیه آماری تعداد رویان‌های به‌دست‌آمده بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و سه مشاهده در هر تکرار در نرم‌افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح پنج درصد انجام شد. پس از گذشت چهار هفته از شروع فاز ظهور، به منظور بررسی تشکیل رویان‌های رویشی محتویات محیط کشت توسط استرئوسکوپ مشاهده‌شده و تعداد رویان‌های رویشی در هریک از مراحل کروی، قلبی، اژدری و تعداد کل رویان‌ها شمارش و ثبت شدند. همزمان با شمارش رویان‌ها عکس‌برداری صورت گرفت.

نتایج و بحث

در این بررسی غده گیاه ترب اسبی در دو محیط کشت پایه NL و B5 کشت شد و سپس میزان کالوس‌زایی و رویان‌زایی آن‌ها مورد بررسی قرا گرفت. نتایج بررسی، معرفی بهترین مواد ضدعفونی به علت بروز آلودگی زیاد در ریشه این گیاه در اثر تماس با خاک، اثر نوع محیط کشت بر رویان‌زایی در ادامه آمده است.

اثر مواد ضدعفونی‌کننده

برای کاهش آلودگی و بهینه‌سازی روش ضدعفونی‌کننده از تیمارهای مختلف برای به دست آوردن بهترین روش ضدعفونی استفاده شد (جدول ۱). مهم‌ترین ماده

ضدعفونی‌کننده‌ای که در اغلب پژوهش‌های کشت بافت استفاده شده است، هیپوکلریت سدیم می‌باشد (Mousavizadeh et al., 2017; Mashayekhi and Neumann, 2006). بنابراین در این تحقیق نیز ابتدا از هیپوکلریت سدیم برای گندزدایی ریزنمونه‌ها استفاده شد. نتایج نشان داد که ریزنمونه‌های تیمارشده در غلظت ۷۰ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه، آلودگی زیادی داشتند و فقط ۱۰ درصد ریزنمونه سالم ماندند (جدول ۲). بنابراین برای کاهش آلودگی، زمان ضدعفونی افزایش یافت. بدین صورت که از هیپوکلریت سدیم ۷۰ درصد به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه استفاده گردید. در کشت درون شیشه‌ای زیره سیاه، افزایش زمان ضدعفونی از ۲۰ دقیقه به ۴۰ دقیقه در کاهش آلودگی مؤثر بوده است (Bagheri et al., 2013). برای حل مسئله آلودگی نمونه‌های توت‌فرنگی، زمان ضدعفونی ریزنمونه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به ۴۰ دقیقه افزایش داده شد، که درنهایت در این غلظت و زمان ضدعفونی، آلودگی از بین رفت (Mousavizadeh et al., 2012).

در تیمار کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه شش روز پس از کشت و در تیمار هیپوکلریت سدیم ۷۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه هشت روز پس از کشت و در تیمار آب اکسیژنه ۱۰ درصد به‌مدت ۵ دقیقه در روز نهم آلودگی در محیط‌های کشت ظاهر شد. ۴۰ روز پس از کشت، نمونه‌های سالم شمارش شدند و واکشت این نمونه‌ها به منظور کالوس‌زایی انجام شد. بهترین تیمار ضدعفونی در این آزمایش هیپوکلریت سدیم ۷۰ درصد به مدت ۶۰ دقیقه بود و پس از آن آب اکسیژنه ۱۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه بیشترین سطح کنترل کنندگی آلودگی در نمونه‌ها را نشان دادند (جدول ۲). در تیمارهای کلرید جیوه هیچ ریزنمونه‌ای سالم نماند و همه آلوده شدند. گزارش شده است که کاربرد کلریدجیوه ۰/۱ درصد برای گندزدایی سطحی ریزنمونه‌های توت‌فرنگی به مدت ۱۰ دقیقه موفق نبوده و در این تیمار تمام محیط‌های NL و B5 آلوده شدند (Mousavizadeh et al., 2012).

Table 1. Treatments used for sterilization of explants

Treatments	Time (min)	%
Sodium hypochlorite	10	70
	30	70
	60	70
Hydrogen peroxide	5	10
	7	10
	10	10
Mercury chloride	2	0.1
	5	0.1
	10	0.1

Table 2. The effect of treatments used for sterilization of explants

Treatments	Time (min)	%	Sterilized explants (%)
Sodium hypochlorite	10	70	10
	30	70	30
	60	70	50
Hydrogen peroxide	5	10	20
	7	10	30
	10	10	40
Mercury chloride	2	0.1	0
	5	0.1	0
	10	0.1	0

کالوس‌زایی در محیط کشت B5

مطالعه تشکیل کالوس ترب اسبی به صورت کشت ریزنمونه‌های ریشه در دو فاز مایع و جامد در محیط کشت B5 انجام شد. نتایج نشان داد که گیاه پتانسیل کالوس‌زایی در هر دو محیط مایع و جامد را دارا است. در ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط جامد حاوی یک میکرومولار توفوردی پس از گذشت دو هفته کالوس‌ها در سطح ریزنمونه‌ها ظاهر شدند. رنگ این کالوس‌ها سفید مایل به زرد بود. یک هفته پس از واکشت در محیط حاوی دو میکرومولار کنیتین و یک میکرومولار توفوردی کالوس‌ها رشد قابل توجهی کردند و در پایان هفته دوم تغییر رنگ از زرد به سبز روشن مشاهده شد. در ریزنمونه‌های کشت‌شده روی محیط مایع حاوی یک میکرومولار توفوردی پس از گذشت دو هفته کالوس‌زایی به مقدار کم مشاهده شد. رنگ این کالوس‌ها در ابتدا سفید مایل به زرد روشن بودند. دو هفته پس از واکشت در محیط حاوی دو میکرومولار کنیتین و یک میکرومولار توفوردی رشد کالوس‌ها بیشتر شد و در پایان هفته دوم تغییر رنگ از زرد روشن به سبز روشن مشاهده شد (شکل ۲ و جدول ۳). علت تغییر رنگ کالوس از زرد روشن به سبز روش را می‌توان به تغییر از حالت هتروتروف به اتوتروف نسبت داد که با تولید کلروفیل در کالوس همراه است. در پژوهش نشان داده شده است که کالوس‌های تولیدی در تمامی غلظت‌های توفوردی به رنگ قهوه‌ای تا سبز متمایل به زرد، محکم و سخت بودند (Malik et al., 2007). در آزمایشی کالوس‌های به‌دست‌آمده در محیط کشت دارای NAA و BA دارای رنگ سبز روشن و بافت ترد بودند و در محیط حاوی توفوردی و BA دارای بافت متراکم به رنگ مایل به زرد بودند (Mousavizadeh et al., 2017) که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد.

لازم به ذکر است که طبق مشاهدات این بررسی گیاه ترب اسبی به‌راحتی تولید کالوس نکرد و نیاز به سایتوکینین‌ها در محیط کشت مشاهده شد. زمانی که Zhang (2001) از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر زآتین در ریزنمونه‌های پنبه استفاده کرد، میزان تولید کالوس در همه ریزنمونه‌ها ۱۰۰ درصد شد که نشان‌دهنده تأثیر مطلوب توفوردی همراه با نوعی سایتوکینین در تولید کالوس این گیاه است. تحقیقات در گیاه داوودی نشان داد که افزایش غلظت توفوردی و کنیتین در حد یک میلی‌گرم در لیتر تولید کالوس را افزایش داد (Shinoyama et al., 2004) که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. کشت در محیط جامد حاوی دو میکرومولار کنیتین و یک میکرومولار توفوردی نسبت به کشت مایع حاوی دو میکرومولار کنیتین و یک میکرومولار توفوردی کالوس‌های بهتر و بیشتری تولید می‌کند. در پایان هفته چهارم پس از واکشت، کالوس‌ها از نظر وزن تر و کیفیت ظاهری با هم مقایسه شدند. در محیط جامد ۱۰۰ درصد و در محیط مایع ۹۰ درصد کالوس‌زایی مشاهده شد. میانگین وزن تر کالوس نیز در محیط جامد بیشتر از محیط مایع به‌دست‌آمد (شکل ۲ و جدول ۳).

کالوس‌زایی در محیط کشت NL

در این آزمایش کالوس‌زایی ریشه ترب اسبی در هر دو فاز مایع و جامد در محیط کشت NL انجام شد. ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط جامد حاوی یک میکرومولار ایندول استیک اسید پس از گذشت چهار هفته کالوس‌ها تشکیل دادند. رنگ این کالوس‌ها سفید مایل به زرد بود. یک هفته پس از واکشت، رشد بیشتری از کالوس‌ها در محیط حاوی دو میکرومولار کنیتین و یک میکرومولار ایندول استیک اسید دیده شد. در پایان هفته دوم تغییر رنگ از زرد به سبز روشن مشاهده شد. در کشت مایع حاوی یک میکرومولار ایندول استیک اسید پس از گذشت دو هفته، کالوس‌زایی کمتری نسبت به کشت جامد دیده شد. در ادامه نمونه‌های کشت‌شده در فاز مایع حاوی دو میکرومولار کنیتین و یک میکرومولار ایندول استیک اسید واکشت شدند که در هفته دوم افزایش رشد کالوس‌ها مشاهده شد. در این محیط رنگ

کالوس‌ها از ابتدا سفید مایل به کرم بودند اما در هفته سوم پس از واکشت تغییر رنگ از کرم به سبز روشن تغییر کردند (شکل ۳ و جدول ۴). در تحقیق Nabi et al.(2002)، محیط ترکیبی BA یک میلی‌گرم در لیتر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA کالوس‌های نرم به رنگ سبز روشن تولید شد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. بررسی کالوس‌دهی و تکثیر درون شیشه‌ای مارچوبه نشان داد که بیشترین میزان تشکیل کالوس از کشت ریز نمونه‌ها با تیمار ۱/۰۷ میکرومولار NAA و ۰/۸۸ میکرومولار BA در محیط کشت MS به‌دست‌آمد (Mousavizadeh et al., 2017) که اهمیت استفاده همزمان از هورمون‌های اکسین و سایتوکینین را نشان می‌دهد که نتایج این تحقیق سازگار با آزمایش آن‌ها است. در این راستا به منظور کالوس‌زایی در گیاه استویا با اضافه‌کردن بنزیل آدنین به محیط کشت‌های حاوی اکسین پس از ۳۰ روز تولید کالوس افزایش پیدا کرد (Ahmad et al., 2011). در این آزمایش نیز با افزایش غلظت سایتوکینین همراه با اکسین توفوردی سبب افزایش رشد کالوس‌ها شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت درصد کشت‌های نمویافته به کالوس، بافت، رنگ و درجه تشکیل کالوس به ترکیبات محیط کشت وابسته است.

Table 3. Horseradish callus induction in solid and liquid phases in B5 medium

Trait	Solid medium	Liquid medium
Callus mean fresh weight (g)	0.86	0.70
Callus colour	Yellow to bright green	Bright yellow to bright green
Callus induction %	100%	90%

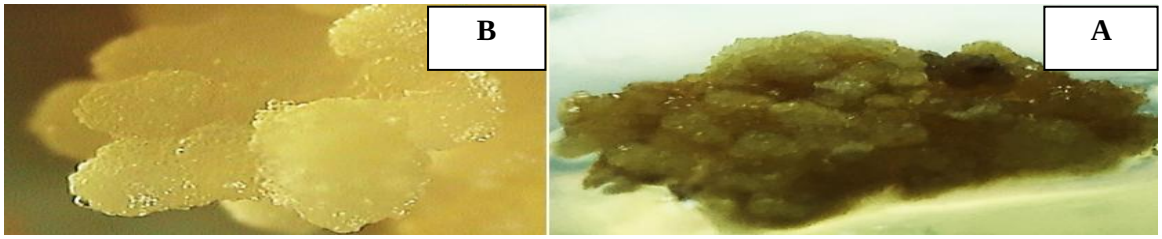

Figure 2. Callus induction in B5 medium
A) Callus induction in solid B5 medium supplement with 1 µM 2,4-D and 2 µM kin
B) Callus induction in liquid B5 medium supplement with 1 µM 2,4-D and 2 µM kin

Table 4. Horseradish callus induction in solid and liquid phases in NL medium

Trait	Solid medium	Liquid medium
Callus mean fresh weight (g)	0.75	0.65
Callus colour	Yellow to bright green	Bright yellow to bright green
Callus induction %	90%	70%

Figure 3. Callus induction in NL medium
A) Callus induction in solid B5 medium supplement with 1 µM IAA and 2 µM kin
B) Callus induction in liquid B5 medium supplement with 1 µM IAA and 2 µM kin

در این تحقیق با توجه به اندازه‌گیری‌ها و سنجش از نظر کیفیت ظاهری و بررسی روند افزایش رشد کالوس در هر دو حالت کشت جامد و مایع محیط کشت NL می‌توان نتیجه گرفت کشت در محیط جامد حاوی دو میکرومولار کنیتین و یک میکرومولار ایندول استیک اسید نسبت به کشت مایع حاوی دو میکرومولار کنیتین و یک میکرومولار ایندول استیک اسیدکالوس‌های بهتر و بیشتری تولید می‌کند. در پایان هفته چهارم پس از واکشت، کالوس‌ها از نظر وزن تر و کیفیت ظاهری با هم مقایسه شدند. در محیط جامد ۹۰ درصد از نمونه‌های کشت‌شده و در محیط مایع ۷۰ درصد از نمونه‌های کشت‌شده کالوس‌زایی مشاهده شد. میانگین وزن تر کالوس نیز در محیط جامد بیشتر از محیط مایع به‌دست‌آمد (شکل ۳ و جدول ۴). در تحقیقی بهترین کالوس‌زایی در محیط کشت با ترکیب توفوردی و سایتوکینین مشاهده شد و تشکیل کالوس ترد و تازه در دوره زمانی کوتاه ۲۰ تا ۲۵ روز شروع شد (Roy et al., 2008) که کالوس‌زایی در این آزمایش نیز مشابه این تحقیق صورت گرفت. در آزمایشی دیگر بالاترین درصد کالوس‌زایی در کشت درون شیشه‌ای جوانه انتهایی کنجد مربوط به غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و از لحاظ وزن تر کالوس، بیشترین مقدار مربوط به ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی به همراه ۰/۱۶ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود (Ghanbari and Kazemitabar, 2016).

بروز تمایز از کالوس به رویان رویشی

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان داد که نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده، اثر معنی‌داری بر رویان‌زایی رویشی ترب اسبی دارند. البته نتایج حاکی از آن بود که در محیط کشت NL رویان‌زایی کمتری نسبت به B5 تشکیل شده است (شکل ۴). در این بررسی محیط کشت B5 حاوی تنظیم‌کننده رشد توفوردی و محیط کشت NL حاوی ایندول استیک اسید بود و رویان‌زایی رویشی در هر دو محیط کشت صورت گرفت (شکل‌های ۴، ۵، ۶ و ۷). اثبات شد با افزودن اکسین‌ها به خصوص توفوردی به محیط کشت می‌توان روند تمایز سلول‌های سوماتیکی را تغییر داد و از آنجا که این سلول‌ها دارای خاصیت توتی پتنت (Totipotent) هستند آن‌ها را رویان‌زا نمود. به‌عنوان مثال Trolinder and Goodin (1988) نظریه خود را که واکنش تمام گیاهان به توفوردی یکسان نیست و غلظت مورد استفاده از این اکسین به نوع گیاه و رقم آن وابسته است بیان نمودند. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد در محیط‌های حاوی توفوردی رویان‌زایی صورت گرفت که با مطالب بیان‌شده (Neumann, 2006) مطابقت دارد.

نتایج نشان داد تعداد رویان‌ها در مراحل کروی، قلبی، اژدری و درنهایت تعداد کل رویان‌ها در محیط کشت B5 حاوی یک میکرومولار توفوردی نسبت به محیط کشت NL حاوی یک میکرومولار ایندول استیک اسید بیشتر بود و همچنین رویان‌زایی در محیط‌های بدون تنظیم‌کننده رشد مشاهده نشد (شکل ۴). همان‌طور که نشان داده شد در محیط کشت NL حاوی ایندول استیک اسید رویان‌زایی صورت گرفت که با نتایج Jayasree et al. (2001) در رویان‌زایی سیب‌زمینی مطابقت نداشت زیرا در بررسی‌های آن‌ها در محیط کشت NL رویان‌زایی دیده نشد. اما در آزمایشی دیگر رویان‌زایی دمبرگ هویج در هر سه محیط کشت NL، B5 و MS انجام شد (Mousavizadeh and Mashayekhi, 2011). همچنین گزارش شده است که جنین‌های رویشی کروی از آبکش ثانویه ریشه هویج در محیط کشت NL در حضور IAA انجام گرفته است (Mousavizadeh et al., 2010). این نتایج همگی با نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق مطابقت داشته و دلیلی برای وقوع پدیده‌های مشاهده‌شده در آزمایش حاضر می‌باشند.

Table 5. Analysis of variance of the medium effect on different stages of horseradish somatic embryogenesis

S.O.V.	df	Globular	Heart	Torpedo	Total embryo
Treatment	3	55.85**	96.74**	18.97**	621.19**
Error	8	0.91	0.5	0.16	0.66
C.V. (%)		26.71	16.63	23.32	7.47

**: significant at p = 0.01

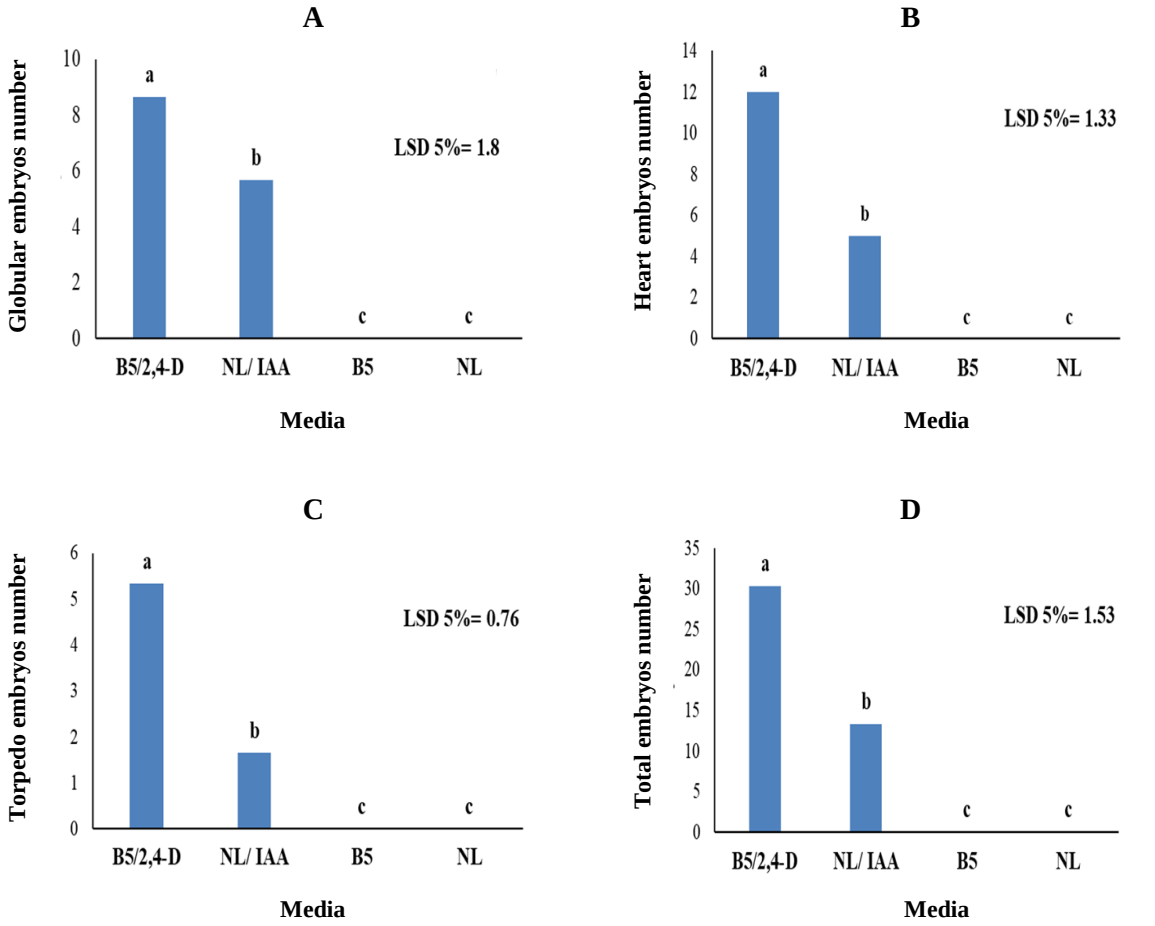

Figure 4. Comparison of the number of horseradish globular (a), heart (b), torpedo (c) and total embryos (d) in NL and B5 media

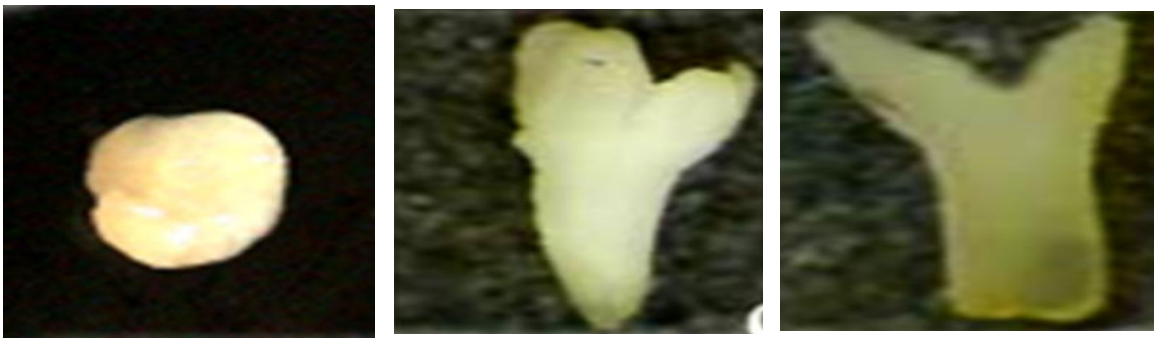

Figure 5. Globular, heart and torpedo embryo (left to right) 4 weeks after culture in B5 medium in presence of 1 µM 2,4-D

Figure 6. Embryogenesis in B5 medium (Globular embryos are well seen in the image), 4 weeks after culture in B5 medium in presence of 1 µM 2, 4-D

Figure 7. Globular, heart and torpedo embryo (left to right) 4 weeks after culture in NL medium in presence of 1 µM IAA

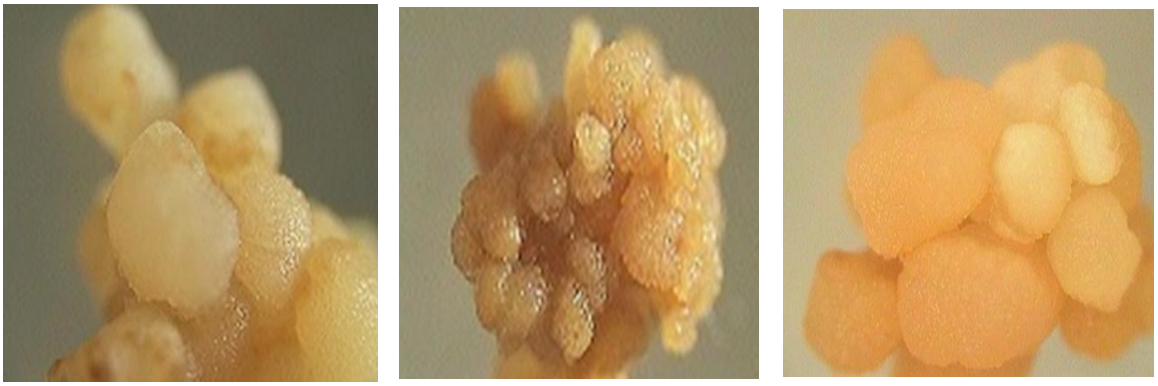

Figure 8. Embryogenesis in NL medium (Globular embryos are well seen in the image), 4 weeks after culture in NL medium in presence of 1 µM IAA

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان بیان داشت که ترب اسبی پتانسیل کالوس‌زایی و رویان‌زایی را در هر دو محیط کشت B5 و NL دارا است. همچنین با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها، محیط کشت و نوع تنظیم‌کننده بر تعداد رویان و تسریع در تکامل رویان‌ها اثر گذار است و در بین گروه‌های تنظیم‌کننده رشد، اکسین‌ها بیشترین کاربرد را در انتقال سلول‌ها از فرم رویشی به رویانی دارند. در بررسی کالوس‌زایی این پژوهش با توجه به اندازه‌گیری‌ها و سنجش از نظر

کیفیت ظاهری و بررسی روند تشکیل کالوس، رشد و افزایش کالوس در کشت جامد نسبت به کشت مایع بیشتر بود. همچنین با مقایسه دو محیط کشت B5 و NL مشخص شد که محیط کشت B5 برای کالوس‌زایی، محیطی مناسب‌تر است. در این آزمایش محیط کشت جامد B5 حاوی دو میکرومولار کنیتین و یک میکرومولار توفوردی بهترین نتیجه در کالوس‌زایی ترب اسبی را به‌همراه داشت. نتایج حاصل از رویان‌زایی ترب اسبی نشان داد در محیط کشت بدون هورمون رویانی تشکیل نشد و نیز با مقایسه دو محیط کشت مشخص شد محیط کشت B5 حاوی یک میکرومولار توفوردی نسبت به محیط کشت NL حاوی یک میکرومولار ایندول استیک اسید رویان‌های بیشتری تشکیل می‌دهد. همچنین با افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سایتوکینین رشد رویان‌ها بیشتر شد. در پژوهش حاضر از ریشه گیاه به‌عنوان ریز نمونه در آزمایش‌ها استفاده شد که انتظار می‌رود تفاوت در اندام‌های مختلف این گیاه نیز وجود داشته باشد که نیازمند بررسی در آینده است.

سپاس‌گزاری

مقاله حاضر با حمایت مالی و معنوی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به انجام رسیده است که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

References

Ahmad, N., Fazal, H., Zamir, R., Khalil, S. and Abbasi, B. H. (2011). Callogenesis, shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Sugar Technology*, 13(2), 174-177.

Bagheri, A., Moshiri, F. and Khosravinia, S. (2013). Investigation on reaction of explants and plant growth regulators on callus induction, rooting and *in vitro* regeneration of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. *Crop Biotechnology*, 3(5), 53-61. [In Farsi]

Balapoor, Z., Hosseini-Moghaddam, H., Zarei, M. and Mollashahi, M. (2019). Micro Propagation of Penta Rootstock (*Prunus domestica*) in the two culture media (MS and B5). *Plant Productions*, 42(4), 441-454. [In Farsi]

Balen, B., Peharec, P., Tkalec, M. and Krsnik-Rasol, M. (2011). Oxidative stress in horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib) tissues grown *In Vitro*. *Food technology and Biotechnology*, 49(1), 32-39.

Caplin, S. M. and Steward, F. C. (1949). A technique for the controlled growth of excised plant tissue in liquid media under aseptic conditions. *Nature, Lond*, 163(1), 920-921.

Courter, J. W. and Rhodes, A. M. (1969). Historical notes on horseradish. *Economic Botany*, 23(2), 156-64.

Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-158.

Ghanbari, S. and Kazemitabar, S. K. (2016). Effects of Plant Growth Regulators on Callus Induction via Shoot Bud Meristems of Single Branch NazCultivar of Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Journal of Crop Breeding*, 8(17), 231-237. [In Farsi]

Jayasree, T., Pavan, U., Ramesh, M., Rao, A. V., Reddy, K. J. M. and Sadanandam, A. (2001). Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(1), 13-17.

Malik, S., Zia, M. and Chaudhary, M. F. (2007). *In vitro* plant regeneration from direct and indirect organogenesis of Memordica charantia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(22), 4118-4122.

Mashayekhi, K. and Neumann, K. H. (2006). Effects of boron on somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 84(3), 279-283.

Mashayekhi, K., Sharifani, M., Shahsavand, M. and Kalati, H. (2012). Induction of somatic embryogenesis in absence of exogenous auxin in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *International Journal of Plant Production*, 2(2), 163-166.

Miller, A. J. and Gross, B. L. (2011). From forest to field: Perennial fruit crop domestication. *American Journal of Botany*, 98(9), 1389-1414.

Mousavizadeh, S. J. and Mashayekhi, K. (2011). Histological changes of carrot (*Daucus carota* L.) petiole somatic embryogenesis in some Media. *Journal of Horticultural Sciences*, 25(1), 94-100.

Mousavizadeh, S. J., Mashayekhi, K. and Asna-Ashari, M. (2012). The investigation of callogenesis and somatic embryogenesis of strawberry. *Plant Production Technology*, 1(1), 55-68. [In Farsi]

Mousavizadeh, S. J., Mashayekhi, K. and Hassandokht, M. R. (2017). Indirect somatic embryogenesis on rare octoploid *Asparagus breslerianus* plants. *Scientia Horticulturae*, 226(1), 184-190.

Mousavizadeh, S. J., Mashayekhi, K., Akbarpoor, V., Kallati, H. R. and Ghasemi, Y. (2010). Effect of IAA and 2,4-D on somatic embryogenesis and pigments synthesis of carrot root secondary phloem. *Australian Journal of Agricultural Engineering*, 1(4), 126-131.

Nabi, S. A., Rashid, M. M., Al-Amin, M. and Rasul, M.G. (2002). Organogenesis in teasle gourd (*Momordica dioica* Roxb). *Plant Tissue Culture*, 12(2), 173-180.

Neumann, K. (2006). *Some studies on somatic embryogenesis: A tool in plant biotechnology*. Indian Science congress Jan. 2000 in Pune, India.

Neumann, K. H. (1966). Wurzelbildung und Nukleinsauregehalt bei phloem Gewebekulturen der karrotenwurzel auf synthetischen Nahrmedium verschiedener Hormonkombina-tionen. *Lees Phytohormones ET Organogenese*, 38(1), 95-102.

Ozgur, M., Shehata, A. M., Skirvin, R.M., Norton, M. A., Mulwa, R. M., Uchanski, M., Hamblin, A. M. and Babadoost, M. (2004). An *in vitro* method to rescue embryos of horseradish, a reputedly sterile plant. *Journal of Vegetable Crop Production*, 10(2), 99-105.

Parvin, S., Daneshvar, M. and lotfi jalal-abadi, A. (2019). *In vitro* regeneration of ornamental crocus (*Crocus vernus* L.) by using plant growth regulators. *Plant Productions*, 42(4), 429-440. [In Farsi]

Roy, A., Ghosh, S., Chaudhuri, M. and Saha, P. K. (2008). Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* R. Br. (Asclepiadaceae). *African Journal of Biotechnology*, 7(13), 2209-2211.

Shinoyama, H., Nomura, Y., Tsuchiya, T. and Kazuma, T. (2004). A Simple and Efficient Method for Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaves of Chrysanthemum [Dendranthema × grandiflorum (Ramat.) Kitamura]. *Plant Biotechnology*, 21(1), 25-33.

Trolinder, N. L. and Goodin, J. R. (1988). Somatic embryogenesis in cotton (Gossypium) I. Effects of source of explant and hormone regime. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12(1), 31-42.

Tucker, A. O. and Debaggio, T. (2009). *The encyclopedia of herbs: A comprehensive reference to herbs of flavor and fragrance* (2nd ed.). Portland: Timber Press.

Uozumi, N., Nakashimada, Y., Kato, Y. and Kobayashi, T. (1992). Production of artificial seed from horseradish hairy root. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(1), 21-26.

Zhang, B. H. (2001). High frequency somatic embryogenesis and Plant regeneration of an elite cotton variety. *Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei*, 42(1), 9-16.

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)