DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.6.9

پینه‌زایی و جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم تره ایرانی

(*Allium ampeloprasum* spp. *persicum*)

طاهره نظری، کامبیز مشایخی* و سید جواد موسوی زاده

[۱] **ایران، گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،گروه باغبانی.**

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۴

چکیده

تره‌ایرانی به علت پروتاندری، گیاهی دگرگشن و هتروزیگوت می‌باشد. جهت برنامه‌های اصلاح تره ایرانی، تکنیک جنین‌زایی رویشی جهت تسریع در روند تولید هیبرید کاربرد دارد. پژوهش حاضر با هدف پینه‌زایی و جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم ریزنمونه‌های تره‌ایرانی در شرایط درون شیشه‌ای انجام شده است. ابتدا بذرهای تره‌ایرانی در محیط جامد 1/2MS کشت شدند. در ادامه به طور مستقیم از ریزنمونه‌های یک سانتیمتری برگ و ریشه دانهال‌ها در محیط کشت مایع B5 و NL استفاده شد. از اسید ایندول استیک و 2,4-D (۲و۴- دی کلرو فنوکسی استیک اسید) در سه غلظت صفر، یک و دو میلی‌گرم بر لیتر جهت القای پینه و جنین رویشی استفاده شد. نتایج نشان داد که در ریزنمونه‌های برگ، پینه تشکیل نشد و در ریزنمونه‌های ریشه نیز مقدار کمی پینه تشکیل شد. اما پینه جنین‌زا به طور مستقیم در ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌های دانهالی پس از گذشت دو هفته ظاهر شد. پینه-ها زرد و دارای بافت متراکم، گره‌دار و کروی شکل بودند. بیشترین پینه جنین‌زا در B5 حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D تشکیل شد که بعد از گذشت هشت هفته و واکشت در فاز ظهور جنین (رئالیزاسیون)، جنین‌های رویشی ظاهر شدند. در محیط‌های کشت بدون اکسین و همچنین در محیط کشت NL، جنین رویشی تشکیل نشد. بعد از واکشت جنین‌ها در محیط B5 حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و دو میلی‌گرم کنیتین، رشد ریشه‌ها بیشتر شد. به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی، پینه زایی و جنین‌زایی رویشی تره ایرانی در B5 مایع دارای دو میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده شد. همچنین بیشترین درصد پینه جنین‌زا در دانهال‌ها به دست آمد.

واژه های کلیدی: القای جنین، تره ایرانی، 2,4-D، ظهور جنین، ریزنمونه.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۱۶۹۷۶۵ ، پست الکترونیکی: kkambizmashayekhi@gmail.com

مقدمه

تره ایرانی با نام علمی *Allium ampeloprasum* ssp. *persicum* از خانواده Alliaceae، گیاهی تک‌لپه، علفی و از نظر گیاهشناسی، گیاهی دوساله شناخته می‌شود. قسمت قابل استفاده این سبزی، برگ‌های سبز آن است (۴). ترکیبات گوگرددار از مهم‌ترین ترکیبات موجود در گیاهان این جنس است (۲۲). گیاهان این جنس خاصیت آنتی اکسیدانی و ارزش غذایی بالایی دارند. برگ‌های این گیاه مقادیر بالایی از آهن و ویتامین C دارد. علاوه بر آن تره ایرانی دارای فسفر، کلسیم، منگنز، سدیم، پتاسیم، ویتامین های A، B_1، B_2 و B_6 است (۱۵).

منشاء تره ایرانی از ایران بوده و پراکنش گسترده‌ای در نقاط مختلف ایران داشته و سال‌های طولانی در این کشور مورد کشت و مصرف قرار گرفته است (۴). این در حالی است که برنامه مدونی روی به‌نژادی و تولید بذر آن صورت نگرفته است. با وجودی که گل آن دوجنسی (هرمافرودیت) بوده ولی به علت داشتن پروتاندری، گیاهی دگرگشن و هتروزیگوت می‌باشد (۳). لذا جهت اجرای برنامه‌های اصلاحی در آینده، استفاده از تکنیک‌های درون

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.6.9

شیشه‌ای مانند جنین‌زایی رویشی جهت تسریع در روند تولید لاین و هیبریدها ضروری به‌نظر می‌رسد (۱۰). جنین-زایی رویشی از روش‌های مدرن تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان است. اساس این تکنیک به دست آوردن سلول بنیادی و تمایز آن به یک گیاه کامل است. در جنین‌زایی رویشی سلول‌های غیرجنسی تحت شرایط خاص به جنین های رویشی تغییر می‌یابند (۶). از عوامل موثر در جنین زایی رویشی می‌توان به ترکیبات محیط کشت، تنظیم‌کننده های رشد و نوع ریزنمونه استفاده شده اشاره کرد (۸). به‌منظور آغاز جنین‌زایی استفاده از یک اکسین خارجی، باعث القای تشکیل پینه‌های جنین‌زا و تحریک تولید جنین ها می‌گردد. در مرحله بعد کاهش و یا حذف اکسین از محیط، سبب رشد و توسعه جنین‌ها می‌شود (۱۳).

در منابع گزارش‌های کمی در زمینه القای موفق جنین‌زایی رویشی در تره ایرانی وجود دارد. به‌عنوان مثال پینه‌زایی و جنین‌زایی رویشی از ریزنمونه ریشه *A. schoenoprasum* که یک گونه نزدیک به تره ایرانی است با استفاده از مواد تنظیم کننده رشد 2,4-D، بنزیل آمینوپورین و کنیتین در محیط کشت MS انجام شده است (۲۴). در تحقیقی دیگر پرآوری تره‌فرنگی *A. ampeloprasum* L. در محیط کشت MS با مواد تنظیم کننده رشد اسید نفتالین استیک و کنیتین انجام شده است (۲۵). در تحقیقات داخل کشور، ماده‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای در هفت توده تره ایرانی با موفقیت انجام گفته است (۳). در تحقیقی دیگر پینه‌زایی از ریزنمونه‌های برگ و بذر تره ایرانی تحت مواد تنظیم کننده رشد 2,4-D و بنزیل آمینوپورین انجام شده است (۱۵).

روش جنین‌زایی رویشی به دلیل کاربرد فراوان و پیچیدگی دارای اهمیت بالایی است. این فرآیند یکی از روش‌های مناسب برای درک مکانیزم تمایزیابی در گیاه و میزان توانمندی سلول‌ها است. از طریق جنین‌زایی رویشی می-توان در حجم اندکی از محیط کشت تعداد زیادی جنین را تولید کرده و سپس تبدیل به گیاهچه نمود. با توجه به اهمیت روش‌های نوین ازدیاد گیاهی از قبیل کشت درون شیشه‌ای و مزایای آنها در تولید ارقام جدید، می‌توان از این تکنیک در اصلاح محصولات مهم کشاورزی نیز استفاده کرد. با توجه به کمبود اطلاعات در زمینه جنین‌زایی تره ایرانی، در این تحقیق پینه‌زایی و باززایی از طریق جنین زایی رویشی در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

پژوهش حاضر طی سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد.

تهیه مواد گیاهی: بذرهای تره ایرانی از منطقه نودیجه شهر گرگان (36°50′15″N 54°16′25″E) جمع‌آوری شده بود. در شروع آزمایش بذرها، به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند. پس از آن توسط هیپوکلریت سدیم دو درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند و در زیر هود لامینار سه مرتبه توسط آب مقطر شتشو شدند. به‌منظور تهیه ریزنمونه‌ها، ابتدا بذرها در محیط MS (۱۸)، با نصف غلظت (½ MS) کشت شد. محیط‌های کشت شده به اتاقک رشد با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲±۲۶ درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۶ ساعت انتقال یافتند. بعد از دو هفته از زمان کشت، دانهال‌های تره ایرانی به قطعات یک سانتی‌متری، از قسمت برگ و ریشه تقسیم شدند و برای آزمایش جنین‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین بذرها به‌طور مستقیم نیز در محیط القای جنین‌زایی قرار گرفتند.

شکل پینه: شکل پینه بر اساس بافت پینه (متراکم، سخت، نرم و ترد) و رنگ پینه بر اساس ظاهر بافت تعیین شدند (۱۲).

آماده سازی محیط‌های کشت برای القای جنین: ابتدا محیط‌های کشت پایه B5 (۹) و NL (۱۹) با توجه به

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.6.9

دستورالعمل تهیه شد. در این تحقیق از مواد تنظیم کننده رشد 2,4-D با غلظت‌های صفر، یک و دو میلی‌گرم در لیتر در محیط مایع B5 استفاده شد و همچنین در محیط مایع NL اکسین اسید ایندول استیک با غلظت‌های صفر، یک و دو میلی‌گرم در لیتر برای القای جنین رویشی به‌کار گرفته شد. pH محیط‌های کشت با استفاده از دستگاه pH متر و با کاربرد سود یا اسید کلریدریک در محدوده ۵/۷ تنظیم گردید. محیط‌های کشت شده در اتاقک رشد با نور ۳۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۶ ساعت نگهداری شدند. به‌منظور ظهور جنین‌ها، نمونه‌ها به محیط‌های مشابه مرحله القا ولی بدون حضور اکسین منتقل شدند. جهت حذف کامل اکسین، نمونه‌ها در محیط‌های کشت استریل شده بدون اکسین در سه مرحله به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه شست‌وشو شدند پس از گذشت سه هفته، عمل واکشت (Subculture) ریزنمونه‌ها در محیط قبل اما با هدف ظهور جنین‌ها در حالی‌که 2,4-D از آنها حذف شده، انجام گرفت (۱۶). در ادامه ریزنمونه‌ها در بالن‌های T شکل واکشت شدند و در دستگاه آکسوفیتون با دوران یک دور در دقیقه و نور دائم (۲۰۰۰ لوکس) قرار گرفتند. دستگاه آکسوفیتون دارای صفحات دوار با زاویه ۱۰ تا ۱۲ درجه نسبت به خط عمود می باشد. شیشه‌های T شکل بر روی این صفحات دوار قرار داده می‌شوند و با سرعت کنترل شده (یک دور در دقیقه) با حرکت دورانی می-چرخند و با چرخش خود سبب خارج شدن نمودن ریزنمونه از محلول غذایی شده و بدین وسیله هوادهی انجام می‌شود. این دستگاه دارای لامپ‌های مهتابی در اطراف صفحات دوار می‌باشد که به‌صورت بهینه نور مورد نیاز (۲۰۰۰ لوکس) را فراهم می‌کند. پس از گذشت چهار هفته در مرحله ظهور جنین‌ها، تعداد جنین‌های رویشی تولید شده در مراحل کروی شکل، قطبی و بالغ با استفاده از دستگاه استرئوسکوپ (Striyo, Sunny. Monitoring, Sony) متصل به کامپیوتر در دو بزرگنمایی ۲۰X و ۴۰X، شمارش و عکس‌برداری گردیدند.

محیط کشت باززایی جنین‌های رویشی: به‌منظور تکامل و باززایی جنین‌ها در محیط B5، مواد تنظیم کننده رشد کینتین با غلظت دو میلی‌گرم بر لیتر به محیط اضافه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار در چهار تکرار صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 انجام شد.

نتایج

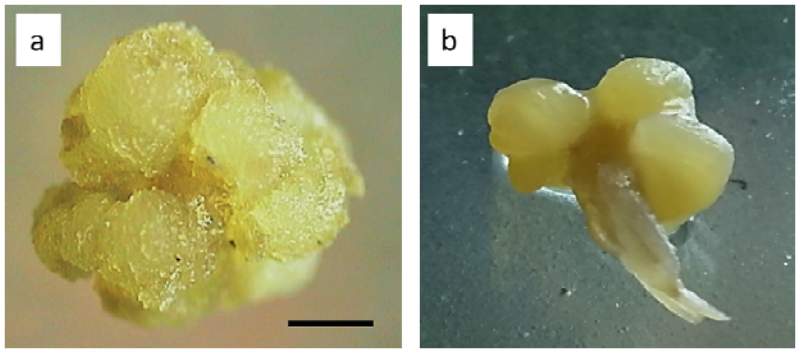
اثر نوع ریزنمونه و محیط کشت بر پینه‌زایی تره ایرانی: بررسی تشکیل پینه گیاه تره ایرانی به‌صورت کشت مایع در محیط B5 و NL انجام شد. در آزمایش اول، بذور تره ایرانی پس از ضدعفونی در محیط کشت MS ½ قرار داده شدند و پس از گذشت سه هفته، از دانهال‌های به‌دست آمده جهت تهیه ریزنمونه‌های برگ و ریشه استفاده شد. نتایج نشان داد که در ریزنمونه‌های برگ هیچ پینه‌ای تشکیل نشد ولی ریزنمونه‌های ریشه بعد از گذشت دو هفته متورم شده و مقدار کمی پینه روی ریزنمونه‌ها تشکیل گردید (شکل ۱ و جدول ۱). این در حالی است که در آزمایش دوم، بذور تره ایرانی پس از ضدعفونی به‌صورت مستقیم در محیط کشت مایع B5 قرار داده شد. نتایج این آزمایش نشان داد که پس از جوانه‌زنی بذور و گذشت دو هفته در دانهال‌ها، پینه در ۱۰۰ درصد نمونه‌ها ظاهر شد. این پینه‌ها زرد رنگ و دارای بافت متراکم و دارای ساختار گره‌دار و کروی شکل بودند (شکل ۱ و ۲، جدول ۱). در ادامه از این پینه‌ها جهت تولید جنین‌های رویشی استفاده شد.

بر اساس نتایج به دست آمده، تولید پینه جنین‌زا فقط در محیط B5 حاوی 2,4-D مشاهده شد و در محیط NL حاوی اسید ایندول استیک پینه جنین‌زایی مشاهده نشد.

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.6.9

جدول ۱- تأثیر نوع ریزنمونه بر کیفیت پینه و درصد پینه‌زایی تره ایرانی در محیط کشت مایع B5 حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D.

	ریز نمونه ریشه	نمونه دانهال بذری
میانگین وزن تر (gr)	۰/۲۵۳	۰/۶۴
کیفیت ظاهری پینه	سفید مایل به زرد، شکننده	زرد رنگ، بافت گره‌دار و جنین‌زا
درصد پینه‌زایی	۲۵ درصد	۹۶/۶ درصد



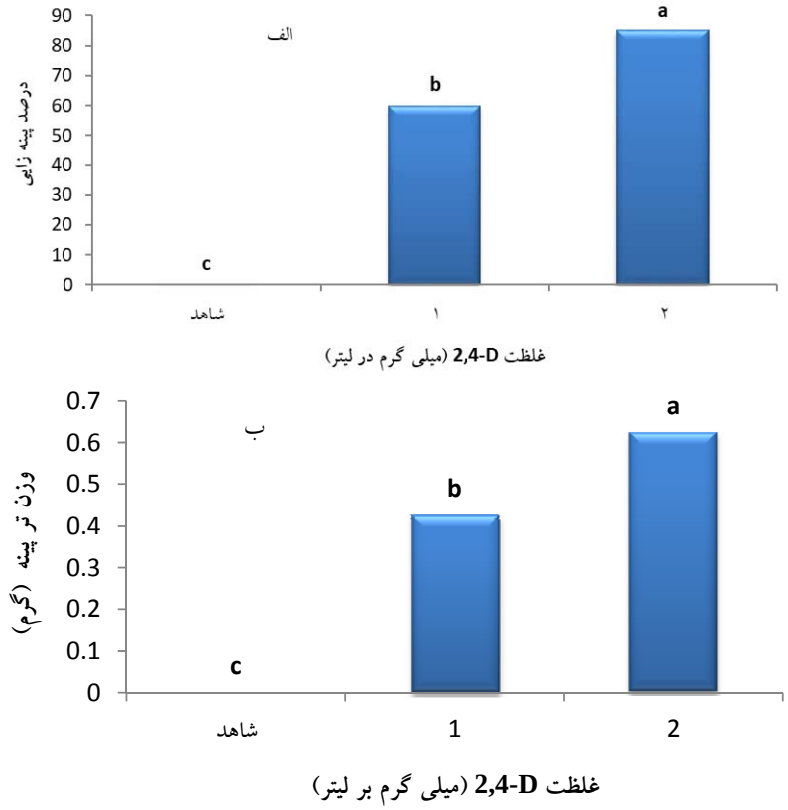
شکل ۱- پینه‌زایی تره ایرانی دو هفته بعد از کشت در محیط مایع B5 حاوی دو میلی گرم در لیتر 2,4-D. a) پینه‌زایی دانهال، b) پینه‌زایی ریزنمونه ریشه (مقیاس = ۱ میلی‌متر).

شکل ۲- پینه‌های تشکیل شده روی دانهال‌های تره ایرانی دو هفته بعد از کشت در محیط مایع B5 حاوی دو میلی گرم در لیتر 2,4-D.

نتایج نشان داد که در محیط فاقد اکسین، پینه‌ای تشکیل نشد و با توجه به اندازه‌گیری‌ها و سنجش از نظر کیفیت ظاهری و بررسی روند افزایش رشد پینه در محیط مایع B5، بیشترین درصد تولید پینه جنین‌زا در محیط حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌دست آمد. همچنین بیشترین وزن تر پینه (۰/۶۲۳ گرم) مربوط به تیمار دو میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بود (شکل ۳).

ظهور جنین‌های رویشی: در این تحقیق که با استفاده از دو محیط کشت B5 و NL انجام شد، جنین‌زایی فقط در ریزنمونه‌های کشت شده در محیط B5 مشاهده شد، که نشان‌دهنده اثر معنی‌دار نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر جنین‌زایی رویشی در تره ایرانی است. نتایج نشان داد که در محیط NL حاوی اسید ایندول استیک جنین رویشی تشکیل نشد که دلیل آن می‌تواند ضعیف بودن این نوع اکسین و یا مدت زمانی که ریزنمونه در مجاورت آن قرار داشته، باشد. بر این اساس در تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از محیط کشت NL صرف نظر شد. نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که تیمارهای مورد استفاده، اثر معنی‌داری بر جنین‌زایی رویشی تره ایرانی دارند. جنین‌های رویشی شش تا هشت هفته بعد از واکشت در مرحله ظهور (رئالیزاسیون) در مراحل مختلف جنینی مشاهده شدند (شکل ۵ و ۶). اولین جنین‌های کروی‌شکل، شش هفته بعد از واکشت پینه‌های جنین‌زا ظاهر شدند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیشترین درصد جنین‌زایی در محیط مایع B5 حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به دست آمده است (شکل ۴).

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.6.9

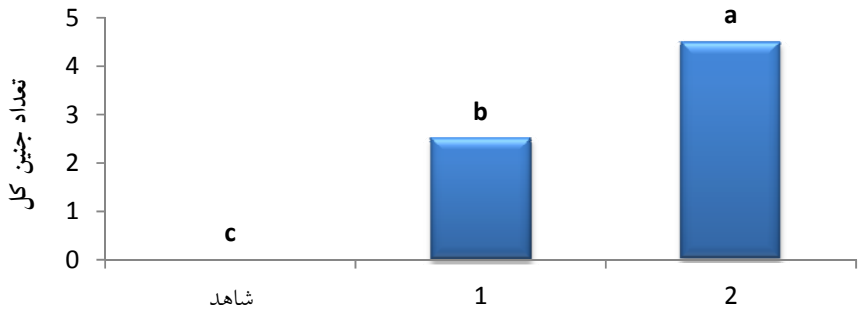


شکل ۳- اثر دو غلظت 2,4-D بر: الف) درصد پینه‌زایی و ب) وزن تر پینه دانهال تره ایرانی در محیط مایع B5.

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس اثر محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد بر جنین‌زایی رویشی تره ایرانی

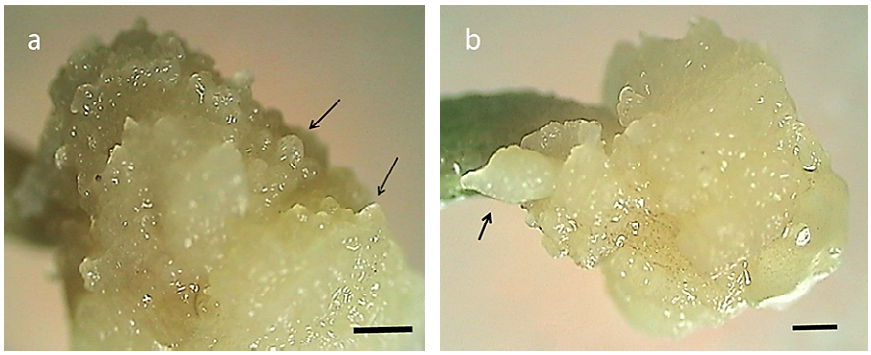
	میانگین مربعات				
منابع تغییر	درجه آزادی	مرحله کروی	مرحله قلبی	مرحله دوقطبی	تعداد کل جنین
تیمار	۶	۴۴/۹۵**	۹۶/۸۸**	۳۸/۸۷**	۵۳۰/۲۹**
خطا	۸	۰/۷۸	۰/۴۶	۰/۶۷	۰/۳۱
ضریب تغییرات		۱۸/۳۱	۱۶/۴۲	۲۱/۲۲	۸/۶۵

** معنی دار بودن در سطح یک درصد.

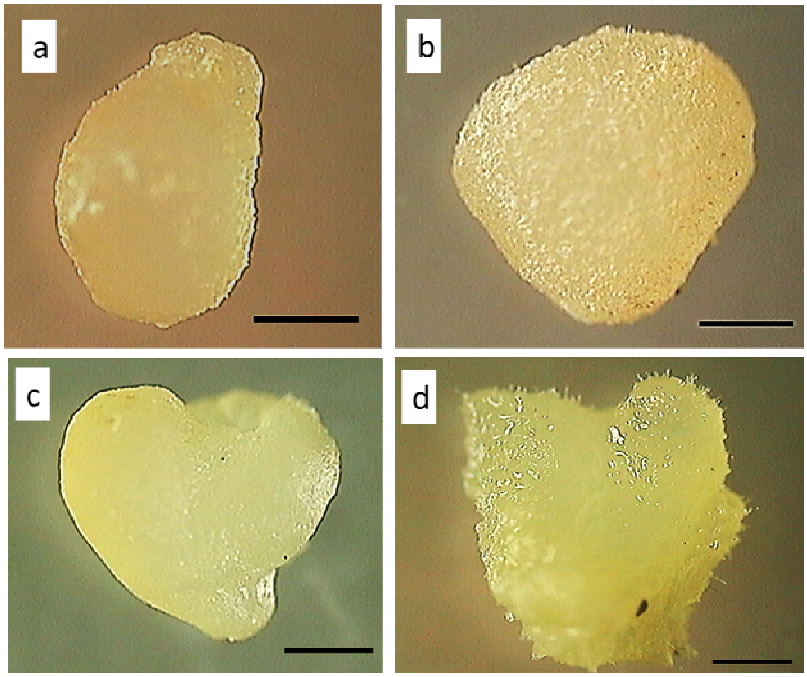


شکل ۴- مقایسه میانگین تعداد جنین‌های رویشی تره ایرانی در محیط مایع B5 حاوی 2,4-D. - میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند.

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.6.9



شکل ۵- توسعه پینه جنین‌زا روی دانهال تره ایرانی در محیط مایع B5 حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D . الف) جنین‌های کروی شکل شش هفته بعد از کشت و ب) جنین در مرحله دوقطبی هشت هفته بعد از کشت. (مقیاس = ۱ میلی‌متر).



شکل ۶- مراحل مختلف جنین‌زایی رویشی درون شیشه‌ای تره ایرانی در محیط مایع B5 حاوی دو میلی گرم بر لیتر 2,4-D. الف) جنین کروی شکل، شش هفته بعد از کشت، ب) جنین قلبی شکل، شش هفته بعد از کشت،ج) جنین دوقطبی، هشت هفته بعد از کشت، د) جنین در مرحله بلوغ، هشت هفته بعد از کشت. (مقیاس = ۱ میلی‌متر).

ریشه‌زایی در محیط B5 : در این آزمایش هر چهار هفته عمل واکشت نمونه‌ها در محیط جدید انجام شد. بررسی-های انجام شده در این آزمایش نشان داد که بعد از انتقال ریزنمونه‌ها از محیط حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به محیط حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه دو میلی‌گرم کنیتین رشد ریشه‌ها بعد از هشت هفته بیشتر شد (شکل ۷). در محیط حاوی سیتوکنین باززایی بیشتر و در مدت زمان کمتر اتفاق افتاد که خود نشان‌دهنده تأثیر سیتوکنین در قابلیت تحریک، تکثیر و تقسیم سلولی در بافت پینه است.

بحث

تحقیقات گذشته نشان داده است که پینه‌های زرد رنگ و دارای بافت متراکم و دارای ساختار گره‌دار و کروی شکل توانایی تولید جنین‌های رویشی را دارند (۱۷، ۲۳) که با نتایج حاصل از این آزمایش همسو بود (شکل ۱).

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.6.9

شکل ۷- ریشه‌زایی درون شیشه‌ای جنین‌های تره ایرانی هشت هفته بعد از کشت در محیط B5 حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و دو میلی‌گرم بر لیتر کنیتین.

در آزمایشی دیگر روی پیاز (*Allium cepa* L.)، پینه‌های به‌دست آمده در محیط MS به دو صورت گزارش شد. نوع اول پینه‌هایی که شکننده و به رنگ سفید مایل به زرد بوده و به راحتی به قطعات کوچک تقسیم می‌شدند و نوع دیگر پینه هایی که دارای بافت فشرده، زرد رنگ با سطح صاف و ساختار گره‌دار بودند (۲۱). در آزمایشی که روی ریزنمونه ریشه گیاه سیر (*A. sativum* L.) به‌منظور القای پینه و باززایی گیاه انجام شد، پس از ۸ هفته پینه‌های متراکم و گره‌دار در محیط MS حاوی 2,4-D (0.3- 0.4- 0.5- 0.6 mg/l) مشاهده شد که محیط مطلوب برای القای پینه، محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کنیتین بود (۱۴). گزارش شده است که بالاترین وزن تر کالوس گیاه مامیران در محیط MS تیمار شده با یک ۱ گرم بر لیتر 2,4-D در کنار یک و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP یا TDZ بدست آمد (۱). همچنین در آزمایشی که فقط از 2,4-D به‌منظور القای پینه استفاده شده بود اثر تفاوت غلظت این تنظیم کننده رشد حتی افزایش غلظت از ۰/۵ به ۱ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش القای پینه در گیاه سیر شد که با نتایج حاصل از این تحقیق همسو بود (۱۱). در گزارشی دیگر پرآوری تره‌فرنگی *A. ampeloprasum* L. در محیط کشت MS با ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر اسید نفتالین استیک و ۲ میلی‌گرم در لیتر کنیتین انجام شده است (۲۵). همچنین نشان داده شده است که بیشترین درصد تشکیل پینه و بالاترین تعداد جنین رویشی در گیاه مارچوبه در محیط MS حاوی چهار میکرومولار BAP به همراه دو میکرومولار 2,4-D به دست آمد (۵).

نتایج حاصل از آزمایش که روی پارانشیم ثانویه هویج انجام شد نشان داد که تفاوت معنی‌داری در جنین‌زایی در محیط کشت حاوی 2,4-D و محیط حاوی اسید ایندول استیک وجود دارد به‌طوری که اثر 2,4-D در جنین‌زایی بیشتر بود که می‌توان دلیل آن را به ثبات 2,4-D و ناپایداری اسید ایندول استیک در محیط نسبت داد (۶). مشخص شده که حتی در محیط کشت بدون ریزنمونه گیاهی نیز اسید ایندول استیک در اثر اکسیداسیون نوری از بین می‌رود. بنابراین شاید زمان کافی جهت القای جنین-زایی رویشی وقتی که از اسید ایندول استیک استفاده می شود، وجود نداشته باشد. با افزودن اسید ایندول استیک به محیط کشت القاء به‌عنوان تنظیم کننده رشد اکسینی که به‌تدریج اکسید می‌شود، می‌توان در شرایطی که سلول‌های ریزنمونه حساس بوده و دارای اکسین داخلی بالایی باشند، بدون انجام عمل بازگشت جنین رویشی به دست آورد. کشت ریزنمونه در محیط حاوی اسید ایندول استیک باعث می‌شود که به علت غلظت بالای این تنظیم کننده رشد عمل القاء انجام گیرد (۶).

در تحقیقی تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر جنین‌زایی رویشی گیاه *A. schoenoprasum* L. مورد بررسی قرار

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.6.9

گرفت و گزارش شد که جنین‌زایی رویشی و پینه‌های جنین‌زا به‌طور همزمان مشاهده نشد که نشان‌دهنده این نکته است که جنین‌زایی رویشی در این گیاه غیرهمزمان است (۲۴). در تحقیقی دیگر بیشترین درصد ماده‌زایی در توده گرگان تره ایرانی گزارش شده است (۳). نتایج این آزمایش نشان داد که در محیط بدون اکسین جنینی تشکیل نشد، اما در حضور اکسین جنین‌های رویشی شکل گرفت. در القا و تولید جنین‌های رویشی، 2,4-D در بین انواع اکسین‌ها به عنوان پرکاربردترین تنظیم کننده رشد گزارش شده است (۶، ۱۷). به‌منظور آغاز القای جنین‌زایی استفاده از یک اکسین خارجی که به‌طور معمول از 2,4-D برای این منظور استفاده می‌شود باعث القای پینه‌های جنین‌زا و سپس رشد و تکامل جنین‌ها می‌شود (۱۷). نتایج آزمایش روی ریزنمونه برگ گیاه *Fritillaria meleagris* L. از خانواده Liliaceae جهت جنین‌زایی رویشی نشان داد که بهترین تنظیم کننده رشد برای این منظور استفاده از 2,4-D با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بود (۲۰). گزراش شده است که 2,4-D در غلظت ۲۵/. میلی گرم در لیتر برای جنین زایی سوماتیکی بلوط مناسب هست (۲). همچنین 2,4-D در غلظت دو و چهار میلی گرم در لیتر به‌طور موفقیت-آمیزی برای ماده‌زایی تره ایرانی بکار گرفته شده است (۳). در آزمایشی دیگر با افزایش غلظت 2,4-D، درصد پینه جنین‌زا و تعداد جنین تشکیل شده افزایش یافت (۲۴) که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. بسیاری از محققها مشاهده کردند که کنترل فرآیندهای تمایزیابی وابسته به حضور اکسین و سیتوکنین است و توازن بین آنها منجر به تحریک تولید اندام هوایی و ریشه از پینه می‌شود. همچنین از سیتوکنین با توجه به توانایی در افزایش تقسیم سلولی می‌توان در تسریع بلوغ جنین‌ها به ویژه در مرحله رشد و نمو لپه‌ها و تبدیل آنها به گیاهچه بهره برد (۶). گزارش-هایی بر القای موفق جنین با کاربرد سیتوکنین وجود دارد، به عنوان نمونه بنزیل‌آدنین در القای ماده‌زایی از گل تره ایرانی بکار گرفته شده است (۳). همچنین افزودن کنیتین به میزان ۲/۵ میکرومولار در محیط MS سبب افزایش درصد بلوغ جنین‌های گیاهی شد (۷).

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، مشخص شد که تره ایرانی توانایی پینه‌زایی و جنین‌زایی رویشی در محیط مایع B5 را دارا است. همچنین با توجه به نتایج اثر نوع ریزنمونه، محیط کشت و تنظیم کننده رشد مورد استفاده در جنین‌زایی رویشی در گیاه تره ایرانی در سطح یک درصد معنی دار بوده که نشان می‌دهد نوع ریزنمونه مورد کشت بر تشکیل پینه، درصد و وزن تر پینه جنین‌زا اثر گذار است به طوری که بیشترین درصد تشکیل پینه در نمونه‌های دانهال این گیاه بود. در این آزمایش محیط کشت مایع B5 حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بهترین نتیجه را در پینه‌زایی تره ایرانی به همراه داشت. نتایج حاصل از جنین‌زایی رویشی تره ایرانی نشان داد که در محیط کشت بدون حضور تنظیم کننده رشد جنینی مشاهده نشد. مقایسه تیمارها نشان داد که محیط B5 حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بیشترین تعداد جنین رویشی را تولید کرد. در حالی که در محیط NL حاوی اسید ایندول استیک هیچ جنینی تشکیل نشد. نتایج مربوط به اندام‌زایی نیز نشان داد محیط B5 حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه دو میلی-گرم بر لیتر کنیتین، محیط مناسبی برای ریشه زایی تره ایرانی است. شاخه‌زایی تره ایرانی، سازگاری جنین‌های بالغ گیاهچه‌ای با محیط برون شیشه‌ای و همچنین خصوصیات مورفولوژیکی و فنوتیپی گیاه سازگار شده نیاز است که مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جهت حمایت های مادی و معنوی جهت اجرای پژوهش حاضر تقدیر می گردد.

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.6.9

منابع

۱- عزیزخواجه، آ.، دورانی، ا.، اهری زاد، س.، ۱۳۹۹. باززایی درون شیشه‌ای مامیران ایرانی (*Chelidonium majus* L.). مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۳(۲). صفحات ۴۴۵-۴۳۴.

۲- فیضی، ا.، مرادی، ع.، معصومی اصل، ا.، ۱۳۹۹. جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم و تولید بذر مصنوعی در بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.) با استفاده از هورمون D-۲،۴. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۳(۲). صفحات ۳۲۷-۳۱۶.

۳- قهرمانی، ز.، حسندخت، م.، کاشی، ع.، امیدی، م.، جعفرخانی کرمانی، م.، ۱۳۹۲. واکنش برخی توده های تره ایرانی به ماده‌زایی در محیط درون شیشه ای. علوم باغبانی ایران. ۴۴ (۱). ۸۰-۷۳.

۴- مشایخی، م.، شمالی، ا.، ۱۳۹۷. گیاهشناسی، فیزیولوژی و کشت سبزی. انتشارات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۵۰۲ صفحه.

5- Azad, M.A.K., and Amin, M.N., 2017. Regeneration of *Asparagus officinalis* L. Through Embryogenic Callus. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 27, PP: 21-31.

6- Bhojwani, S.S., and Dantu, P.K. 2013. Somatic embryogenesis. In Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer India. PP: 75-92.

7- Ceasar, S.A., and Ignacimuthu, S., 2010. Effects of cytokinins, carbohydrates and amino acids on induction and maturation of somatic embryos in kodo millet (*Paspalum scorbiculatum* Linn.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 102, PP: 153-162.

8- Deo, P.C., Tyagi, A.P., Taylor, M., Harding, R., and Becker, D., 2010. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. South Pacific Journal of Natural Science, 28, PP: 27-40.

9- Gamburg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50, PP: 151-158.

10- Gantait, S., Mandal, N., and Das, P.K., 2010. An Overview on in vitro Culture of Genus Allium. American Journal of Plant Physiology, 5, PP: 325-337.

11- Hassan, M., Haque, M., and Hassan, M., 2014. An efficient protocol for somatic embryogenesis of garlic (*Allium sativum* L.) using root tip as explant. Journal of Bangladesh Agricultural University, 12, PP: 1-6.

12- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., Iwase, A., 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. The Plant Cell, 25, PP: 3159-3173.

13- Kaur, R., and Kapoor, M. 2016. Plant regeneration through somatic embryogenesis in sugarcane. Sugar Technology, 18, PP: 93-99.

14- Khan, N., Chaudhary, M.F., Abbasi, A.M., Khan, S.A., Nazir, A., and Shah, G.M., 2017. Development of an Efficient Callus Derived Regeneration System for Garlic (*Allium sativum* L.) from Root Explant. Journal of Plant Biology and Agriculture Science, 1, PP: 1-12.

15- Monemi, M.B., Kazemitabar, S.K., Khaniki, G.B., Yasari, E., Sohrevardi, F., Pourbagher, R., 2014. Tissue culture study of the medicinal plant leek (*Allium Ampeloprasum* L). International Journal of Molecular and Cellular Medicine, 3, PP: 118–25.

16- 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. Australasian Journal of Agricultural Engineering, 1, PP: 126-131.

17- Mousavizadeh, S.J., Mashayekhi, K., and Hassandokht, M.R., 2017. Indirect somatic embryogenesis on rare octoploid Asparagus breslerianus plants. Scientia Horticulture, 226, PP: 184-190.

18- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology of Plant, 15, PP: 473-497.

19- Neumann, K.H., 1966. Wurzelbildung und Nukleinsauregehalt bei phloem Gewebekulturen der karrotenwurzel auf synthetischen Nahrmedium verschiedener Hormonkombinationen. Lees Phytohormones ET Organogenese, 38, PP: 95-102.

20- Petric, M., Subotic, A., Jevremovic, S., Trifunovic-Momcilov, M., Tadic, V., Grujic, M., and Vujcic, Z., 2017. Esterase and peroxidase isoforms during initial stages of somatic embryogenesis in Fritillaria meleagris L. leaf

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.6.9

base. Archives of Biological Sciences, 69, PP: 619-625.

21- Ramakrishnan, M., Ceasar, S.A., Duraipandiyan, V., Daniel, M.A., and Ignacimuthu, S., 2013. Efficacious somatic embryogenesis and fertile plant recovery from shoot apex explants of onion (*Allium cepa*. L.). *In Vitro* Cell Development Biology –Plant, 49, PP: 285-293.

22- Sobolewska, D., Michalska, K., Podolak, I., and Grabowska, K., 2016. Steroidal saponins from the genus Allium. Phytochemistry Reviews, 15, PP: 1-35.

23- Sujana, P., and Naidu, C.V., 2011. High frequency rapid plant regeneration from shoot tip and nodal explants of *Menhta piperita* L. - An important multipurpose medicinal plant. Journal of Phytology, 3, PP: 9-13.

24- Zdravkovic-Korac, S., Milojevic, J., Tubic, L., Calic-Dragosavac, D., Mitic, N., and Vinterhalter, B., 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration from root sections of *Allium schoenoprasum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 101, PP: 237-244.

25- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., Das, P.K., Mandal, N., Bhattacharyya, S., and Das, P.K., 2009. *In vitro* mass multiplication with genetic clonality in elephant garlic (*Allium ampeloprasum* L.). Journal of Crop Weed, 5, PP: 100-104.

Callogenesis and indirect somatic embryogenesis of Persian leek (*Allium ampeloprasum* spp. persicum)

Nazari T., Mashayekh K.*, Mousavizadeh S.J.

Dept. of Horticultural Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. of Iran.

Abtract

Persian leek is a cross-pollinate and heterozygote plant due to protandrous behavior. For implementation of Persian leek breeding programs, somatic embryogenesis can be used to accelerate the hybrid production process. The present study was carried out with the aim of studying of callogenesis and indirect somatic embryogenesis of Persian leek explants under *in vitro* conditions. For this purpose, Persian leek seeds were planted in 1/2MS semi-solid medium and the seedlings were planted directly, as well as one-centimeter pieces of leaves and roots cultured onto B5 and NL liquid media. In order to induction of callus and somatic embryo, the indole acetic acid and 2,4-D were used in three concentrations of 0, 1 and 2 mg/l. The results revealed that the callus was not formed in leaf explants, and a small amount of callus was formed in the root explants. However, embryonic callus appeared directly in 100% seedlings after two weeks. Calli were yellow and compact with have a friable texture and spherical structure. The highest embryonic callus was formed in B5 medium containing 2 mg/l 2,4-D, which somatic embryos were observed after eight weeks subculture in realization. In non-auxin media as well as in NL medium, somatic embryo was not formed. Growth of the roots was increased after subculture the embryos onto B5 medium with 1 mg/l 2,4-D and 2 mg/l kinetin. As a general conclusion, callus formation and somatic embryogenesis of Persian leek were carried out in liquid B5 containing 2 mg/L 2,4-D. Seedling had the highest percentage of embryonic callus.

Keywords: Embryo induction, Persian leek, 2,4-D, Realization, Explant.