

نقش نوع و غلظت قند در رویان زائی

سوماتیکی میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) رقم Nelson

امید کریمی* - علی دلجو - رضا بهمنی^۱

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۸۷/۴/۱

چکیده

در این تحقیق، اثر غلظت ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز روی ایجاد پینه‌های رویان‌زا و رویان‌های سوماتیکی در یک رقم میخک (Nelson) بررسی شده است. پینه‌های رویان‌زا روی محیط کشت MS دارای ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ گرم در لیتر ساکارز، ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی گرم در لیتر BA حاصل شدند. بیشترین فراوانی ایجاد پینه رویان در محیط کشت حاوی ۹۰ گرم در لیتر ساکارز حاصل شد. رویان‌های سوماتیکی زمانی بدست آمد که پینه‌های رویان‌زا به محیط‌های کشت MS حاوی ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ گرم در لیتر ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز بدون تنظیم کننده رشد انتقال یافتند. رویان‌های ایجاد شده روی محیط‌های کشت حاوی ۱۵ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز به صورت غیر نرمال توسعه یافتند. رویان‌های سوماتیکی که به محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز انتقال داده شدند حدود ۹۰٪ از آنها به صورت گیاهچه کامل باززا گردیدند. گیاهچه‌های بدست آمده در شرایط گلخانه به طور عادی مراحل رشد خود را ادامه دادند.

واژه‌های کلیدی: میخک، رویان سوماتیکی، پینه رویان‌زا، قند

مقدمه

است که کاربرد فنون جدید سلولی مولکولی جهت اصلاح خصوصیات اقتصادی این گیاه ضرورت پیدا کند. معذالک کاربردی شدن فنون مولکولی خود نیازمند توسعه روش‌های مختلف کشت بافت است.

رویان‌زائی سوماتیکی^۲ عبارت از تشکیل رویان از سلول‌های رویشی در شرایط کشت درون شیشه‌ای^۳، به طوری که این رویان‌ها شبیه به رویان معمولی درون بذر می‌باشند و قادر هستند به صورت گیاه کامل نمو پیدا کنند.

میخک (*Dianthus caryophyllus*) یکی از مهم ترین محصولات گلکاری دنیا می‌باشد که هم به جهت زیبایی و گوناگونی رنگ و هم از نظر اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (۳). محدودیت‌های موجود در روش‌های به‌نژادی سنتی (تلاقی و گزینش) و داشتن ویژگی‌های هتروزیگوتی بالا در گیاه میخک باعث شده

۱. به ترتیب مربی، استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی

دانشگاه بو علی سینا همدان

*. نویسنده مسئول

Email: okaramy@yahoo.com

2. Somatic embryogenesis

3. *In vitro*

۱۴، ۱۵، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۴) در حالی که گزارش‌ها اندکی در مورد باززایی این گیاه از طریق رویان‌زایی بدنی انتشار یافته است (۶ و ۲۶). تاکنون اثر قندها روی رویان‌زایی سوماتیکی گیاه میخک گزارش نشده است. در این بررسی اثر غلظت‌های مختلف ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز روی رویان‌زایی بدنی گیاه میخک شرح داده شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این تحقیق روی یک رقم میخک (Nelson) که از کشور هلند وارد شده و در شهرستان محلات کشت و کار می‌شوند انجام گرفت. جوانه‌های گل نارس به طول ۱/۵-۱ سانتی متر از گیاهان در حال رشد در گلخانه برداشت شده و به مدت سه هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سطح خارجی جوانه‌ها با قرار دادن در محلول ۲٪ هیپوکلریت سدیم (سفید کننده تجاری وایتکس) حاوی ۵/۲۵٪ کلر فعال به مدت ۲۰ دقیقه گند زودایی شدند و سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو گردیدند. کاسبرگ‌ها و نهنج از جوانه‌ها حذف شدند و گلبرگ‌ها به قطعاتی به طول تقریبی ۴-۳ میلی متر بریده و سپس روی محیط کشت قرار داده شدند.

ترکیبات محیط کشت و شرایط نگهداری

۱) تشکیل پینه^۹: برای تشکیل پینه ریزنمونه‌های گلبرگ روی محیط‌های کشت MS^{۱۰} (۱۶) محتوی ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D (۴،۲- دی کلروفنوکسی استیک اسید^{۱۱})، ۰/۲ میلی گرم در لیتر BA (۶- بنزیل آدنین^{۱۲}) و ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ گرم در لیتر از هر یک از قندهای ساکارز، مالتوز،

از این روش کشت بافت به صورت ابزاری برای بررسی‌های پایه نظیر بیوشیمی، فیزیولوژی، مورفولوژیکی و تشریح رویان‌زایی در گیاهان و در بسیاری از دستاوردهای بیوتکنولوژی از قبیل انتقال ژن^۱، حفظ ژرم پلاسما^۲، تولید بذر مصنوعی^۳، تولید متابولیت‌های ثانویه^۴، ایجاد گوناگونی ژنتیکی^۵ و حذف ویروس^۶ از گیاه استفاده شده است (۲۵).

از میان ترکیب‌های مختلف که برای تهیه محیط کشت گیاهان به کار برده می‌شوند، قندها نقش بسیار مهمی در فرآیند رویان‌زایی سوماتیکی ایفا می‌کنند (۲۱). برخی از گزارش‌ها حاکی از آن است که میزان رویان‌زایی سوماتیکی تحت تاثیر نوع و میزان قند به کار رفته در محیط کشت قرار می‌گیرد (۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۸). اگرچه ساکارز به عنوان اصلی‌ترین منبع کربن برای رویان‌زایی سوماتیکی استفاده می‌شود اما در بسیاری از گزارشات نشان داده شده که اثرات مفید دیگر قندها نسبت به ساکارز روی ایجاد رویان سوماتیکی نشان داده شده است. بلانس و همکاران (۲) نشان داده شده که مالتوز در مقایسه با ساکارز، گلوکز و فروکتوز تعداد رویان‌های بیشتری را در *Hevea brasiliensis* ایجاد می‌کند. در پرتقال (۸) ۴۰ میلی گرم در لیتر گلیسرول به عنوان موثرترین قند در رویان‌زایی سوماتیکی شناخته شده است. در خیار بیشترین تعداد رویان روی محیط حاوی فروکتوز و کمترین تعداد رویان روی محیط کشت حاوی متنیول گزارش شده است (۱۱).

گزارش‌های متعدد نشان داده‌اند که گیاه میخک از طریق تشکیل شاخساره نابجا^۷ روی ریزنمونه‌های مختلف از قبیل ساقه، برگ، گلبرگ، نهنج باززایی^۸ شده است (۴، ۵،

1. Gene transfer
2. Germplasm
3. Artificial seed
4. Secondary metabolites
5. Genetic varieties
6. Free of virus
7. Adventitious shoot
8. Regeneration

9. Callus

10. Morashige and Skoog

11. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

12. 6-benzylaminopurine

جوانه زنی برداشته شده و پس از شستشوی ریشه آنها توسط آب مقطر استریل به گلدان‌های حاوی مخلوطی از پیت، ماسه و خاک باغچه با نسبت حجمی ۱:۱:۱ منتقل گردیدند و در شرایط محیطی 23 ± 2 درجه سانتی گراد و ۱۶ ساعت فتوپریود نگهداری شدند و سپس برای ادامه رشد در گلخانه نگهداری شدند.

نتایج و بحث

تشکیل پینه

مطابق رنگ، بافت و شروع زمان ایجاد دو نوع پینه تشخیص داده شد. پینه‌های نوع اول دارای بافتی نرم، آبکی و به رنگ زرد مایل به سبز بودند (شکل ۱. A). این پینه‌ها ۲-۳ هفته بعد از کشت روی همه محیط‌های کشت ایجاد شدند. پینه‌های نوع اول با فراوانی بالا (۹۵-۹۰ درصد) روی ریزنمونه‌ها ایجاد شدند. پینه‌های نوع دوم دارای بافتی سفت، گرانوله و به رنگ سفید کرمی بودند (شکل ۱. B). این پینه‌ها ۸-۶ هفته بعد از کشت روی محیط کشت حاوی ساکارز ایجاد شدند. ایجاد پینه‌های نوع دوم روی محیط کشت حاوی مالتوز، فروکتوز و گلوکز مشاهده نشد.

اختلافات معنی داری ($P < 0.05$) بین غلظت‌های مختلف ساکارز و اثرات آنها روی درصد پاسخ ریزنمونه گلبرگ دارای پینه نوع دوم در جدول ۱ نشان داده شده است. بیشترین درصد پاسخ ریزنمونه روی محیط کشت حاوی ۹۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد. در غلظت‌های پائین (۱۵ گرم در لیتر) ساکارز تشکیل پینه‌های نوع دوم مشاهده نشد. با افزایش غلظت ساکارز درصد ریزنمونه‌ها دارای پینه نوع دوم افزایش نشان دادند اما در غلظت بسیار بالای ساکارز (۱۲۰ گرم در لیتر) فراوانی تشکیل پینه نوع دوم کاهش یافت. این نتایج اغلب با یافته‌های گری و همکاران (۷)، لو و کاکو (۱۱) و لوو همکاران (۱۲) که اثرات غلظت قند در ایجاد پینه‌های رویان‌زا را نشان داده اند مطابقت دارد.

گلوکز و فروکتوز کشت شدند. بعد از ۱۰ هفته درصد ریزنمونه‌های گلبرگ که روی آنها پینه رویان‌زا ایجاد شده بودند شمارش شدند. پانزده ریزنمونه در هر تکرار و چهار تکرار در هر تیمار برای این مرحله از آزمایش منظور شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با یک عامل غلظت ساکارز (۵ سطح) اجرا گردید و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

۲) تشکیل رویان: برای تشکیل رویان، پینه‌های ایجاد شده در محیط اولیه به محیط‌های کشت MS حاوی ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ در لیتر ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز بدون تنظیم کننده رشد منتقل شدند. بعد از ۵ هفته تعداد رویان‌های ایجاد شده روی پینه‌های رویان‌زا شمارش شدند. حدود ۲۵۰ میلی گرم پینه در هر تکرار و چهار تکرار در هر تیمار برای این مرحله از آزمایش منظور شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل نوع قند (۴ سطح) و غلظت قند (۵ سطح) با چهار تکرار اجرا گردید و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

۳) جوانه زنی: برای جوانه زنی، رویان‌های لپه‌ای به محیط کشت $1/2MS$ حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر ساکارز فاقد تنظیم کننده رشد منتقل شدند. پس از چهار هفته، تعداد رویان‌های باززایی شده شمارش شدند. همه محیط‌های کشت در شرایط محیطی 26 ± 2 درجه سانتی گراد و ۱۶ ساعت فتوپریود نگهداری شدند. pH همه محیط‌های کشت پیش از اتوکلاو نمودن با استفاده از NaOH یک نرمال تا حد ۵/۸ تنظیم گردید و برای بسته شدن محیط‌های کشت از آگار^۱ به میزان ۷ گرم در لیتر استفاده شد.

انتقال گیاهچه‌ها به خاک

گیاهچه‌های با طول تقریبی ۷۰ میلی متر از محیط کشت

جدول ۱: اثر غلظت‌های مختلف ساکارز روی ایجاد پینه‌های نوع دوم از ریزنمونه گلبرگ در رقم Nelson میخک، ۱۰ هفته بعد از کشت.

ساکارز (گرم در لیتر)	درصد ریزنمونه دارای پینه‌های نوع دوم
۱۵	d۳/۲
۳۰	c۲۳/۳
۶۰	b۳۰/۵
۹۰	a۴۴
۱۲۰	b۳۴/۴

* حروف مشابه در ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف‌ها است ($P < 0.05$).

تشکیل رویان سوماتیکی

دو هفته بعد از انتقال پینه‌های نوع دوم به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف از ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز رویان سوماتیکی روی پینه‌های نوع دوم (پینه‌های رویان‌زا) مشاهده شد (شکل ۱. C). روی پینه‌ها نوع اول هیچ ساختار رویانی مشاهده نشد این پینه‌ها ظاهراً پینه‌های غیر رویان‌زا هستند. بعد از سه هفته بیشتر رویان‌های ایجاد شده از پینه نوع دوم به صورت رویان‌های لپه‌ای توسعه یافتند (شکل ۱. D).

جدول ۲ اثر مقادیر مختلف ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز بر تعداد رویان ایجاد شده از پینه‌های رویان‌زا را نشان می‌دهد چنانچه مشاهده می‌شود با افزایش غلظت قند در محیط کشت تعداد رویان‌های ایجاد شده روی پینه‌های نوع دوم به طور رضایت بخشی ($P < 0.05$) افزایش نشان می‌دهند. در محیط‌های حاوی ساکارز بیشترین تعداد رویان روی محیط کشت با ۹۰ گرم در لیتر، در مالتوز و

گلوکز بیشترین تعداد رویان با ۶۰ و ۹۰ گرم در لیتر و در فروکتوز بیشترین تعداد رویان با ۹۰ و ۱۲۰ گرم در لیتر حاصل شد. در همه محیط‌های کشت با افزایش غلظت قند تعداد رویان ایجاد شده روی پینه‌های رویان‌زا افزایش نشان دادند اغلب نتایج مشابه برای برخی از گیاهان دیگر گزارش شده است (۱ و ۱۰). اگرچه در رویان‌زائی سوماتیکی، قندها بیشتر به عنوان منبع تامین کربن به کار می‌روند اما در برخی از تحقیقات نشان داده شده که افزایش رویان‌زائی سوماتیکی در نتیجه افزایش غلظت قند تنها به خاطر تامین کربن سلول گیاه نیست بلکه این افزایش با تغییرات اسمزی ناشی از قند نیز ارتباط دارد (۹، ۸ و ۱۳) بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که افزایش تعداد رویان‌های بدنی در نتیجه افزایش غلظت قند (در این مطالعه) علاوه بر تامین کربن مورد نیاز سلول ممکن است در نتیجه تغییرات پتانسیل اسمزی ناشی از افزایش قند در محیط باشد.

جدول ۲: اثر غلظت‌های مختلف ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز روی تعداد رویان‌های ایجاد شده از پینه‌های رویان‌زا، در رقم Nelson میخک، ۵ هفته بعد از کشت.

گرم در لیتر	ساکارز	مالتوز	گلوکز	فروکتوز
۱۵	d۴۹	d۸۵	d۴۰	d۱۵
۳۰	c۸۰	c۱۴۹	c۷۱	c۳۵
۶۰	b۱۵۶	a۲۲۸	a۱۸۶	b۸۳
۹۰	a۱۹۰	a۲۲۳	a۱۸۰	a۹۴
۱۲۰	b۱۵۰	b۱۸۰	b۱۲۵	a۹۲

* حروف مشابه در هر ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف‌ها است ($P < 0.05$).

میانگین تعداد رویان‌های ایجاد شده روی پینه‌های رویان‌زا

است. اثرات متفاوت نوع قند روی بازده رویان زائی سوماتیکی در بسیاری از گیاهان اثبات شده است (۱۱ و ۲۱). اثرات مفید مالتوز ممکن است به خاطر سطح پایین جذب آن توسط سلول گیاه باشد که به کاهش دسترسی سلول گیاه به قند منجر می شود. کاهش قند قابل دسترسی سلول گیاه ممکن است یک علامت برای تغییر نامنه توسعه گیاه باشد (۲).

قندهای مختلف ممکن است اثرات مختلفی روی رشد، تمایز و مورفولوژی گیاه داشته باشند (۱۱). در جدول ۳ اثرات متفاوت چهار قند ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز روی تعداد رویان های ایجاد شده از پینه های رویانزا نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می شود بیشترین تعداد رویان سوماتیکی روی محیط کشت حاوی مالتوز و کمترین تعداد رویان بدنی روی محیط کشت حاوی فروکتوز حاصل شده

جدول ۳: اثر ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز روی تعداد رویان های ایجاد شده از پینه های رویانزا، در رقم Nelson میخک، ۵ هفته بعد از کشت.

میانگین تعداد رویان های ایجاد شده روی پینه های رویانزا			
ساکارز	مالتوز	گلوکز	فروکتوز
b1۹۰	a2۲۸	b1۸۶	c۹۴

*حروف مشابه در ردیف نشانگر معنی دار نبودن اختلافها است. ($P < 0.05$)

ساکارز (۹۰ گرم در لیتر)، مالتوز (۶۰ گرم در لیتر)، گلوکز (۶۰ گرم در لیتر)، فروکتوز (۹۰ گرم در لیتر)

جوانه زنی

دو هفته بعد از انتقال، رویان های لپه ای در محیط کشت MS ۱/۲ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به صورت گیاهچه باززا شدند (شکل ۱ E). رویان های سوماتیکی با فراوانی نسبتا بالا (حدود ۹۰ درصد) باززا شدند. حدود ۸۰ درصد از گیاهچه های منتقل شده به گلدان های حاوی پیت، ماسه و خاک باغچه به گیاه کامل تبدیل شدند (شکل ۱ F).

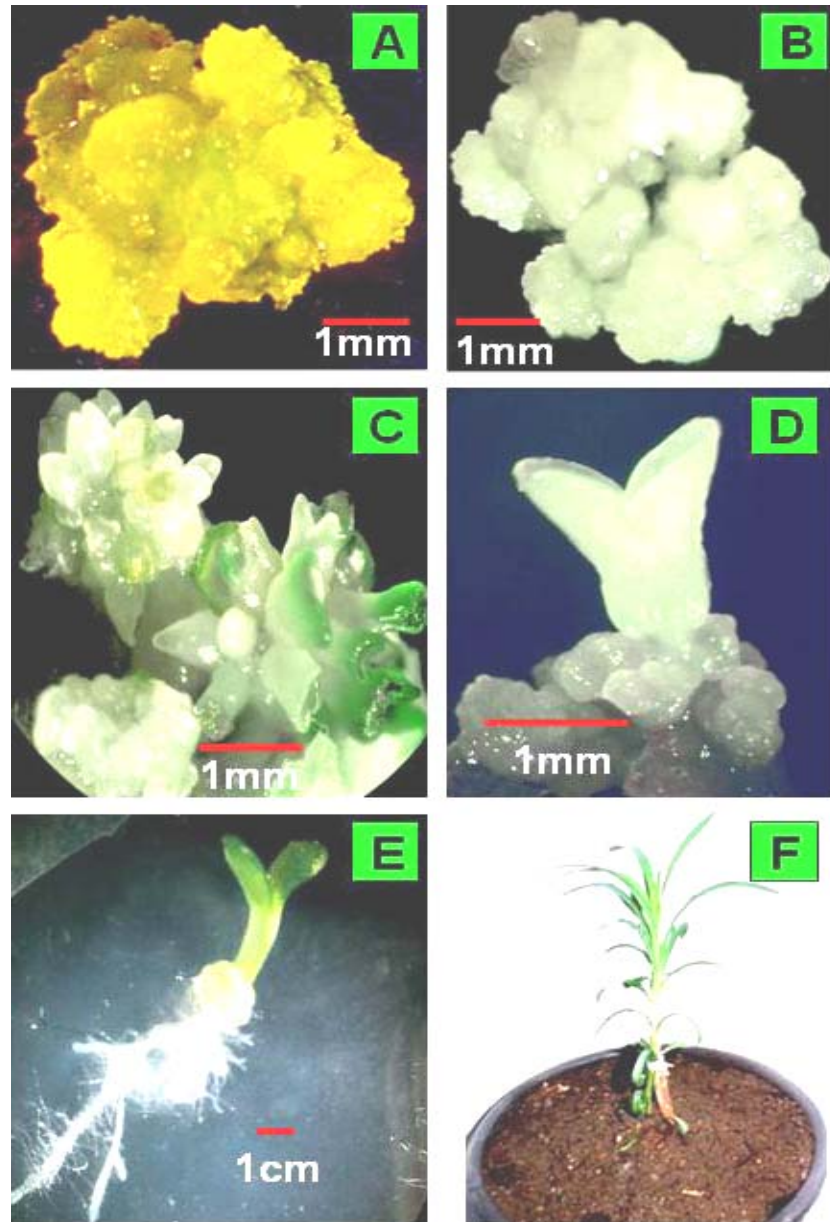
نتیجه گیری کلی

در این بررسی مشخص شد که بازده ایجاد پینه های رویانزا و رویان های سوماتیکی در گیاه میخک متاثر از نوع و غلظت قند به کار رفته در محیط کشت است. در بین قندها استفاده شده در این بررسی ساکارز تنها قند بود که پینه های رویانزا ایجاد کرد و بیشترین تعداد رویان روی محیط کشت حاوی مالتوز از پینه های رویانزا حاصل شد. در این تحقیق افزایش فراوانی ایجاد پینه های رویانزا و رویان سوماتیکی و نهایتا افزایش باززایی گیاه در مقاسیه با مطالعات قبلی رویان زائی سوماتیکی گیاه میخک حاصل شده است و

در محیط های حاوی غلظتهای کم ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز (۱۵ و ۳۰ گرم در لیتر)، بسیاری از رویان های به صورت غیر نرمال توسعه یافتند اما در محیط کشت حاوی قند بالا (۶۰، ۹۰، ۱۲۰ گرم در لیتر) همه رویان ها به صورت نرمال یافتند. در بسیاری از گزارش ها نشان داده شده که از غلظت های بالای کربوهیدرات برای توسعه نرمال رویان های سوماتیکی استفاده شده است و در بیشتر این گزارشات اشاره شده که توسعه نرمال رویان ها با تغییرات اسمزی ناشی از حضور غلظت بالای کربوهیدرات در ارتباط است (۲۱، ۲۲ و ۲۳). مرکل و همکاران (۱۴) پیشنهاد کرده اند که تغییرات اسمزی جهت توسعه نرمال رویان زایی سوماتیکی در شرایط درون شیشه ای تقلیدی از تغییرات اسمزی محیط طبیعی اطراف رویان بذری در داخل بذر است که در زمان توسعه و بلوغ آن اتفاق می افتد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که توسعه نرمال رویان های سوماتیکی گیاه میخک در حضور غلظت های بالای قند ممکن است با تغییرات اسمزی ناشی از آن در ارتباط باشد.

بررسی اثرات قند های مختلف روی رویان زائی سوماتیکی در شرایط محیط کشت مایع پیشنهاد می شود.

از این نتایج می تواند برای ریزازدیادی، تولید بذر مصنوعی و دست ورزی های ژنتیکی گیاه میخک استفاده کرد. جهت افزایش بازده باززائی و ازدیاد گیاه میخک در مقایس بالا



شکل ۱ (A) تشکیل پینه های غیر رویان زا ۴ هفته بعد از کشت روی محیط کشت MS محتوی ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D، ۰/۲ میلی گرم در لیتر BA و ۹۰ گرم در لیتر ساکارز (B): تشکیل پینه های رویان زا ۷ هفته بعد از کشت روی محیط کشت MS محتوی ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D، ۰/۲ میلی گرم در لیتر BA و ۹۰ گرم در لیتر ساکارز (C) تشکیل رویان بدنی در مراحل مختلف توسعه بعد از ۱ هفته روی محیط کشت MS حاوی ۹۰ گرم در لیتر ساکارز (D): رویان لپه ای بعد از ۳ هفته روی محیط کشت MS حاوی ۹۰ گرم در لیتر ساکارز (E): جوانه زنی رویان بدنی دو هفته بعد از کشت در محیط کشت MS ۱/۴ فاقد تنظیم کننده رشد. (F): توسعه گیاهچه در گلدان بعد از ۵ هفته.

- Biahoua, A. and Bonneau, L. 1999. Control of *in vitro* somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. *Plant Cell Rep* 19: 185-190
- Blanc, G., L. Lardet, A. Martin, J.L Jacob and M.P Oarron. 2002. Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) *Journal of Experimental Botany*, 53: 1453-1462
- Burich, G. A., P. Mercun., L. Benedtti and Giovannini, A. 1996. Transformation method applicable to ornamental plant. *Plant. Tissu. Cuit. Biotech.* 12: 94-104.
- Edtington, U. K., F. Gimelli., G. Ginatta., R. Venturo., S. Positano and Buiatti, M. 1984. Plantlet regeneration from petal and floral induction *in vitro* in the Mediterranean carnation (*Dianthus caryophyllus* L) *Riv. Ornrtoflorofrut. Ital.* 68: 107-121.
- Fisher, M., M. Zin and Vainstein, A. 1993. An efficient method for adventitious shoot regeneration from culture carnation petals. *Sci. Hort.* 53: 231-137.
- Frey, L., Y. Saranga and Bjanik. J. 1992. Somatic embryogenesis in carnation. *HortScience.* 27: 63-65.
- Gray, D.J., D.W. Mcolley, and Compton. M.E. 1993. High frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 118: 425-465.
- Kayim, M., and K. Kemal. 2006. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture *Scientia Horticulturae.* 109: 29-34.
- Litze, R. E. 1986. Effects of osmotic stress on somatic embryogenesis in Carioca suspension culture. *HortScience.* 111: 969-972
- Litze, R.E. 1986. Effects of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension culture. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 11: 969-972.
- Lou, H., and Kako, S. 1995. Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Sci Hort.* 64:11-20.
- Luo, H., P. Obara-Okeyo, M. Tamaki, and Kako, S. 1996. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explant. *J. Am. Soc. HortScience.* 71: 497-502.
- Merkle, S.A., W.A. Parrott and Flin, B.S. 1995. Morphgenic aspect of somatic embryogenesis. In: pp 155-203 Thorpetaed *in vitro* embryogenesis in plant. Klauwer Academhc Publishers DordrechtBosta London.
- Messeguer, J., M.C. Arconada and Mele, E. 1993. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* .L). *HortScience.* 54: 153-163.
- Miller, R.M., V. Kaul., J. Hutchinson and Richard, D. 1991. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* .L) from axillary bud explant. *Ann. Bot.* 67: 35-42.
- Murashige, T., and Skoog, F. A. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 154: 73-479.
- Nakagywa, H., T. Saijyo., N. Yamauchi., M. Shigyo., S. Kako and Ito, A. 2001. Effect of sugar and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. *Sci Hort.* 90: 85-92
- Nakano, M., Y. Hoshio and Mii, M. 1994. Adventitious shoot regeneration from cultured petal explant of carnation. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 36: 15-19.
- Nontvaswatsri, C., S. Fukai., T. Touma and Gol, M. 2002. Comparison of adventitious shoot formation from node and leaf explant of various carnation *Dianthus caryophyllus* L. cultivars. *J. HortScience and Biotech.* 77: 520-525
- Nugent, G., T. T. Ricnardoson W and Ul, C.Y. 1991. Pant Regeneration from stem and petal of carnation. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 10: 477-480.
- Ricci, A.P., F.A.M. Filho, B.M. Januzzi, and S.M.S. Piedade. 2002. Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulate* and *C. nobilis* × *C. deliciosa*. *Scinentia Agric.* 59: 41-46.

- Robert., D. R. 1991. Abscisic acid and mannitol promote early development; maturation and storage protein accumulation in somatic embryogenesis of interior spruce. *Physiol Plant*. 83: 247-252 .۲۲
- Tremblay, L. and Tremblay M.1994. Maturation of black spruce somatic embryos: Sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 42: 39-46 .۲۳
- Van Altvorst, A. C., H. J.J. Koehorst., T. Beuinsma., J. Jansent., J. B. M. Custers., J. De Jons and Dons, J.J.M. 1992. Adventitious shoot formation *in vitro* leaf explant of carnation engineering for cut- flower (*Dianthus caryophyllus*). *Sci Hort.* 51: 223-235. .۲۴
- Vicient, M.C and Martinez, F.X. 1998. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 10: 1-12. .۲۵
- Yantcheva, A., M. Vlahova and Antanassov, A. 1998. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Cell Rep.* 18:148-153. .۲۶

Type and concentration role of sugar in somatic embryogenesis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivar of Nelson

O. Karami* - A. deljou – R. Bahmani¹

Abstract

In this study, the effect of different concentrations of sucrose, maltose, glucose and fructose on induction of embryogenic callus and somatic embryos of one carnation cultivar (Nelson) were investigated. Embryogenic calli were produced on MS culture medium containing four concentrations of sucrose (30, 60, 90 and 120 g/l⁻¹) all supplemented with 2 mg/l 2,4-D and 0.2 mg/l BA. Maximum frequency of embryogenic callus was obtained from the media containing 9% sucrose. Somatic embryos were formed when embryogenic callus were transferred to MS medium without growth regulators containing 15, 30, 60, 90 and 120 g/l⁻¹ sucrose, maltose, glucose and fructose. Normal embryos were not developed in the media containing 15 and 30 g/l⁻¹ sucrose, maltose, glucose and fructose. Somatic embryos were transferred to half-strength hormone-free MS culture medium containing 30 g/l⁻¹ sucrose, were germinated into plantlets about %90. Plantlets also continued their growth under greenhouse conditions.

Keywords: Carnation, Somatic embryogenesis, Embryogenic callus, Sugar

*. Corresponding author Email: okaramy@yahoo.com

1. Faculty of Agriculture , Bu – Ali – Sina University , Hamadan, Iran