جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

رویان‌زایی بدنی در میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) با استفاده از ریزنمونه گلبرگ

امید کرمی[۱]، علی دلجو[۲]، عقیل محمودی پور[۳] و بهزاد آغه‌ویسی

چکیده

در این پژوهش، شرایط لازم برای باززایی گیاه به روش رویان‌زایی بدنی از ریزنمونه گلبرگ در دو رقم میخک (Sagres وSpirit) بررسی شده است. پینه‌های رویان‌زا روی محیط کشت MS حاوی ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D تولید شدند و بیش‌ترین پینه (۳۷ درصد) از محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D به‌دست آمد. پس از انتقال پینه‌های رویان‌زا به محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد و محیط‌های کشت حاوی ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم پیکلورام رویان‌های بدنی تولید شدند. بیشترین رویان‌زایی (۲۵۱ رویان) روی محیط کشت حاوی ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام به‌دست آمد. رقم‌های پینه‌زایی و رویان‌زایی پاسخ‌های مختلفی را نشان دادند. وقتی که رویان‌های لپه‌ای به محیط کشت ۱/۲MS بدون تنظیم کننده رشد انتقال داده شدند، تولید گیاهچه نمودند. گیاهچه‌های به‌دست آمده پس از سازگاری در شرایط گلخانه به‌طور عادی مراحل رشد خود را ادامه دادند.

واژه‌های کلیدی: 2, 4-D، باززایی، پیکلورام، رویان‌زایی بدنی، میخک

۱. مربی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۳. مربی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات گلکاری دنیا می‌باشد که هم به جهت زیبایی و گوناگونی رنگ و هم از نظر اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (بارچ و همکاران، ۱۹۹۶). محدودیت‌های موجود در روش‌های به‌نژادی سنتی (تلاقی و گزینش) و هتروزیگوتی بالای گیاه میخک، باعث شده است که کاربرد فنون جدید مهندسی ژنتیک برای به‌نژادی ویژگی‌های اقتصادی این گیاه ضرورت پیدا کند. کاربردی شدن فنون مهندسی ژنتیک خود نیازمند گسترش روش‌های مختلف کشت بافت است.

رویان‌زایی بدنی[1] از مسیر پینه در مقایسه با دیگر روش‌های کشت بافت، برای تکثیر انبوه گیاه ارجعیت دارد، زیرا که کاربرد تجاری تکثیر انبوه گیاه را به‌طور مطلوب‌تری ترقی داده است به گونه‌ای که می‌توان ده‌ها هزار رویان بدنی دارای دو مریستم انتهایی ساقه و ریشه، در یک لیتر محیط مایع ایجاد نمود و در زمان کوتاهی آنها را به گیاهچه تبدیل کرد (جمیز، ۲۰۰۱).

فری و همکاران (۱۹۹۲) برای اولین بار ایجاد رویان بدنی روی پینه‌های[2] تولید شده شده از ریزنمونه‌های ساقه گیاه میخک در محیط کشت حاوی 2, 4-D را گزارش کردند. در نتایج این بررسی اشاره شده که بازده باززایی[3] رویان‌ها پایین است. یان چوا و همکاران (۱۹۹۸) و پاریک و کاسری (۲۰۰۳) ایجاد رویان بدنی به‌طور مستقیم (بدون پینه) از ریز نمونه‌های برگ گیاه میخک در محیط کشت مایع را گزارش کرده‌اند. کرمی و همکاران (۲۰۰۶) اثر غلظت‌های مختلف ساکارز را بر روی رویان‌زایی بدنی گیاه میخک گزارش کردند. کرمی و همکاران (۲۰۰۸) اثر 2, 4-D روی رویان زایی بدنی ثانویه را در گیاه گیاه میخک گزارش کردند. در این بررسی ایجاد رویان بدنی و باززایی گیاه از پینه‌های رویان‌زای تولید شده از ریزنمونه گلبرگ گیاه میخک با روش جدیدی شرح داده شده است. هدف این پژوهش دستیابی به شرایط بهینه باززایی گیاه میخک از طریق رویان‌زایی بدنی در دو رقم Sagres وSpirit با استفاده از غلظت‌های مختلف 2, 4-D در محیط کشت القا پینه و بررسی اثر غلظت‌های مختلف پیکلورام روی تولید رویان‌های بدنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

سرشاخه‌های جوان و جوانه‌های گل نارس از دو رقم میخک Sagres وSpirit که در گلخانه شهرستان محلات رشد داده شده بودند، برداشت شد و به مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سطح خارجی سرشاخه‌ها و جوانه‌ها با قرار دادن در محلول ۲٪ هیپوکلریت سدیم حاوی ۵/۲۵ درصد کلر فعال به مدت ۲۰ دقیقه گندزدایی شده و سپس سه بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند. کاسبرگ‌ها، نهنج و گلبرگ‌ها از جوانه‌ها، برگ‌ها و ساقه‌ها از سرشاخه‌ها به قطعاتی به طول تقریبی ۴- ۳ میلی‌متر بریده شده و سپس روی محیط کشت قرار داده شدند.

ترکیبات محیط کشت و شرایط نگهداری

برای تشکیل پینه ریزنمونه‌های مختلف شامل کاسبرگ، نهنج، گلبرگ، برگ و ساقه روی محیط‌های کشت موراشیک و اسکوگ[4] (MS) دارای ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ یا ۶ میلی‌گرم در لیتر ۲، ۴- دی کلروفنوکسی استیک اسید[5] (2, 4-D) کشت شدند. پس از ۹ هفته درصد ریزنمونه‌های گلبرگ که روی آنها پینه رویان‌زا ایجاد شده بودند، شمارش شدند. پانزده ریزنمونه در هر تکرار برای این مرحله از آزمایش منظور شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل رقم (دو سطح) و غلظت 2, 4-D (۶ سطح) با چهار تکرار اجرا گردید و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.. برای تشکیل رویان، پینه‌های ایجاد شده در محیط اولیه به محیط‌های کشت MS دارای ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲ یا ۴ میلی‌گرم در لیتر تنظیم

1. Somatic embryogenesis
2. Callus
3. Regeneration
4. Murashige and Skoog
5. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کننده رشد - آمینو- ۳، ۵، ۶– تری کلرو ۲- پیریدین کاربوکسیلیک اسید[1] (پیکلورام) و ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲ یا ۴ میلی‌گرم در لیتر ۶- بنزیل آدنین[2] (BA) به تنهایی منتقل شدند. پس از ۵ هفته تعداد رویان‌های ایجاد شده روی هر ریزنمونه شمارش شدند. حدود ۲۰۰ میلی‌گرم پینه در هر تکرار این مرحله از آزمایش منظور شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل رقم (دو سطح) و غلظت پیکلورام (۵ سطح) با چهار تکرار اجرا گردید و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. به منظور نمو رویان‌ها، رویان‌های لپه‌ای به محیط کشت ۱/۲MS بدون تنظیم کننده رشد منتقل شدند. پس از چهار هفته، تعداد رویان‌های باززایی شده شمارش شدند. همه کشت‌ها در شرایط محیطی ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با شدت ۳۰ $\mu mol/m^2/s$ نگهداری شدند. Ph همه محیط‌های کشت پیش از اتوکلاو نمودن روی ۵/۸ تنظیم گردید و از آگار به مقدار ۷ گرم در لیتر جهت نیمه جامد محیط‌های کشت استفاده شد.

انتقال گیاهچه‌ها به خاک

گیاهچه‌های با طول تقریبی ۷ سانتی‌متر از محیط کشت نمو رویان‌ها برداشته شد و پس از شستشوی ریشه با آب مقطر گندزدایی شده به گلدان‌های حاوی پیت، ماسه و خاک باغچه با نسبت حجمی ۱:۱:۱ منتقل گردیدند و در شرایط محیطی ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت ۳۰ $\mu mol/m^2/s$ نگه‌داری شدند و سپس برای ادامه رشد به گلخانه منتقل شدند.

نتایج و بحث

تشکیل پینه

در هر دو رقم برحسب رنگ، بافت و شروع زمان پینه‌زایی، 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 ۳-۲ هفته پس از کشت روی همه محیط‌های کشت از همه ریزنمونه‌ها با فراوانی بالا (۱۰۰-۹۵ درصد) ایجاد شدند. پینه‌های نوع دوم دارای بافتی سفت، گرانوله و به رنگ سفید کرمی بودند (شکل ۱. B). این پینه‌ها ۸-۶ هفته پس از کشت در محیط کشت اول تنها روی محیط کشت دارای 2, 4-D ایجاد شدند. از میان ریزنمونه‌های آزمایش شده پینه‌های نوع دوم تنها روی ریزنمونه گلبرگ ایجاد شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تشکیل پینه نوع دوم به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت 2, 4-D، رقم و اثر متقابل آن‌ها قرار دارد (جدول ۱). تفاوت‌های میانگین‌ها بین اثر غلظت‌های مختلف 2, 4-D بر درصد پاسخ ریزنمونه گلبرگ دارای پینه نوع دوم در جدول ۲ نشان داده شده است. بیش‌ترین درصد پاسخ ریزنمونه روی محیط‌های کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D دیده شد. در غلظت‌های پایین (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) 2, 4-D تشکیل پینه‌های نوع دوم مشاهده نشد. در محیط کشت پینه‌زایی روی هیچ‌کدام از پینه‌ها، رویان بدنی دیده نشد.

پاسخ رقم‌ها برای ایجاد پینه‌های رویان‌زا از ریزنمونه گلبرگ متفاوت بود و بیش‌ترین میزان پینه رویان‌زا (۳۷ درصد) در رقم Spirit به‌دست آمد (جدول ۲).

به‌طور معمول در گیاهان، پینه‌های رویان‌زا توسط اکسین‌ها به ویژه 2, 4-D ایجاد می‌شوند (کارمن، ۱۹۹۰). اگرچه هنوز نقش واقعی 2, 4-D در انگیزش سلول‌های رویانی مشخص نشده است، اما پیشنهاد شده که 2, 4-D با متیله کردن مولکول DNA، الگوی بیان ژن سلول‌های گیاه را به الگوی بیان رویان‌زایی تغییر می‌دهد و آن‌ها را به سلول‌های رویانی تبدیل می‌کند (لوس چی وا و همکاران، ۱۹۸۹). به هر حال اکسین‌ها به‌عنوان اصلی‌ترین عامل انگیزش رویان‌زایی در گیاهان شناخته شده‌اند (مرکل و همکاران،۱۹۹۵). در این بررسی پینه‌های رویان‌زا (پینه‌های نوع دوم) از ریزنمونه‌های گلبرگ روی محیط کشت حاوی 2, 4-D ایجاد شدند. فری و همکاران (۱۹۹۲) ایجاد رویان از پینه‌ها را در گیاه میخک گزارش کردند، اما یاچوا و همکاران (۱۹۹۸)

1. 4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid
2. 6-benzylaminopurine

در گزارش خود اشاره کرده‌اند که گزارش فری و همکاران رویان‌زایی بدنی از طریق پینه در میخک قابل اسناد نمی‌کند. کرمی و همکاران (۲۰۰۶) ایجاد پینه‌های رویان زا روی محیط کشت حاوی 2, 4-D از گزارش کرده‌اند در این پژوهش پینه‌های رویان‌زا در میخک با استفاده از 2, 4-D حاصل شد. در این بررسی اثر غلظت‌های مختلف 2, 4-D روی تولید پینه‌های رویان‌زا (پینه‌های سفت و گرانوله) در میخک نشان داده شده که تا کنون این نتایج برای گیاه میخک گزارش نشده است.

جدول ۱: نتایج جدول تجریه واریانس اثر غلظت های مختلف 2,4-D روی ایجاد پینه‌های نوع دوم در دو رقم میخک

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آزمون فیشر
رقم	۱۱	۵۱۱/۵۵	۵۵/۸۱**
غلظت 2,4-D	۳	۷۶/۳۳	۷۳,۳**
رقم × غلظت 2,4-D	۲	۲۲,۴۱۶	۷۳,۲۴۹**
تکرار	۴	۱۶/۰۰	۳/۲۰
خطا	۲۴	۲۰/۰۰	

** معنی دار در سطح احتمال ۰/۵ درصد

جدول ۲: اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D روی ایجاد پینه‌های نوع دوم از ریزنمونه گلبرگ در در دو رقم میخک، ۹ هفته پس از کشت

2,4-D (میلی‌گرم در لیتر)	درصد ریزنمونه‌ها دارای پینه‌های نوع دوم	
	'Spirit'	'Sagres'
./۵	۴± /۳d	۶ ± ./۳e
۱	۲۰±/۲ b	۱۷ ±۲/۳c
۲	۳۷±۳/۲ a	۲۹±۳ a
۴	۱۹±۱/۶ b	۲۲± ۱/۸b
۶	۱۶± ۱/۳c	۱۱±۱/۳ d
میانگین ژنوتیپ	۱۹/۲±۲a	۱۷±۱/۶ b

میانگین‌های دارای حداقل یک حروف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند ($P<0.05$).

از میان ریزنمونه‌های مختلف آزمایش شده در این بررسی پینه رویان‌زا تنها از ریزنمونه گلبرگ حاصل شد. پاسخ‌های متفاوت رویان‌زایی بدنی ریزنمونه‌های مختلف در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده است. در برخی از بررسی‌ها نشان داده شده که پاسخ‌های متفاوت رویان‌زایی بدنی ریزنمونه‌های مختلف یک گیاه، در نتیجه اختلافات در حالات ویژه درون سلولی ریزنمونه از قبیل بیان ژن و سطوح هورمون‌های درون‌زاد ریزنمونه است (ونگ و همکاران، ۱۹۹۰ ویلیام و مسوران، ۱۹۸۶). بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که پاسخ متفاوت ریزنمونه گلبرگ در مقایسه با سایر ریزنمونه‌های آزمایش شده در این پژوهش ممکن است در نتیجه حالات ویژه درون سلولی ریزنمونه گلبرگ باشد. بررسی مطالعه الگوی بیان و سطوح هورمون‌های درون‌زاد ریزنمونه گلبرگ مقاسیه آن سایر ریزنمونه گیاه میخک جهت پیش نهاد می‌شود.

تشکیل رویان بدنی

دو هفته پس از انتقال پینه‌ها به محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد و محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف پیکلورام، رویان بدنی کروی شکل روی پینه‌های نوع دوم (پینه‌های رویان‌زا) مشاهده شد (شکل C۱). روی پینه‌های نوع اول هیچ ساختار رویانی دیده نشد و ظاهری مانند پینه‌های غیررویان‌زا داشتند. پس از سه هفته، بیشتر رویان‌های کروی ایجاد شده از

پینه نوع دوم به صورت رویان‌های لپه‌ای نمو یافتند (شکل۱. D). روی محیط‌های کشت دارای غلظت‌های بالای پیکلورام نمو رویان‌ها در مرحله کروی و قلبی شکل متوقف شد و یا این‌که رویان‌ها به شکل‌های غیرنرمال توسعه می‌یافتند.

نتایج تجریه واریانس نشان داد که ایجاد رویان به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت پیکلورام، رقم و اثر متقابل آن‌ها قرار دارد (جدول ۳). جدول ۴ اثر مقادیر مختلف پیکلورام بر تعداد رویان ایجاد شده از پینه‌های رویان‌زا را نشان می‌دهد. چنانچه مشاهده می‌شود با افزودن پیکلورام به محیط کشت تعداد رویان‌های کروی ایجاد شده روی پینه‌های نوع دوم به‌طور رضایت بخشی افزایش نشان می‌دهند. بیش‌ترین تعداد رویان روی محیط‌های کشت حاوی ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده شد. اگرچه با طولانی شدن زمان کشت تعداد رویان‌های ایجاد بر پینه‌ها افزایش نشان داد اما در محیط‌های کشت غلظت‌های بالای پیکلورام (۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر) با طولانی شدن زمان بسیاری از رویان مجداً به پینه تبدیل شدند. روی پینه‌های نوع اول و نوع دوم منتقل شده به محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف BA ایجاد رویان بدنی مشاهده نشد اما پینه‌های نوع دوم به‌صورت اندام هوایی (شاخساره نابجا) نمو یافتند.

جدول ۳: نتایج جدول تجریه واریانس اثر غلظت های مختلف پیکلورام روی تعداد رویان‌های ایجاد شده پینه‌های نوع دوم در دو رقم میخک

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آرمون فیشر
رقم	۱۱	۵۲۷۵۱/۲۲	۸۰,۴**
غلظت پیکلورام	۳	۲۴۱۴/۵۵	۳۶/۸**
رقم × غلظت پیکلورام	۲	۴۳۵۲۵/۷۲	۲۳۵/۴۶**
تکرار	۴	۴۹۸۳/۹۴	۸/۶۳
خطا	۲۴	۲۳۱۱/۳۳	

** معنی دار در سطح احتمال ۰/۵ درصد

در گندم دوروم (هه و لزری، ۲۰۰۱) و ارزن (پری تی و کاسری، ۲۰۰۴) افزایش بازده رویان‌زایی بدنی با استفاده از پیکلورام گزارش شده است. اگر چه با استفاده 2,4-D ایجاد رویان و رویان ثانویه در گیاه گزارش شده است (کرمی و همکاران (۲۰۰۸)، فری و همکاران (۱۹۹۲)، پاریک و کاسری (۲۰۰۳)، یان چوا و همکاران (۱۹۹۸)) اما تاکنون ایجاد رویان بدنی از پینه‌های میخک با استفاده از پیکلورام در گیاه میخک گزارش نشده است. در نتایج این بررسی افزایش بازده رویان‌زایی بدنی با استفاده پیکلورام نشان داده شده است. با توجه به این نتایج می‌توان پیکلورام را به‌عنوان یک اکسین رویان‌زای مطلوب برای میخک پیشنهاد نمود.

در نتایج این بررسی اشاره شد که توسعه رویان‌زایی بدنی روی محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های بالای پیکلورام متوقف می‌شود. این نتایج با یافته‌های کارمن (۱۹۹۰) که نشان داده است توسعه رویان بدنی متاثر از میزان غلظت اکسین در محیط کشت می‌باشد، مطابقت دارد. در گزارشات قبلی گیاه میخک از محیط‌ها کشت حاوی تنظیم کننده رشد کم و یا محیط‌ها کشت بدون هورمون برای توسعه رویان‌ها بدنی استفاده شده است (کرمی و همکاران (۲۰۰۶)، فری و همکاران (۱۹۹۲)، یان چوا و همکاران (۱۹۹۸)). در بسیار از گیاهان گزارش شده که سطح بالای اکسین‌ها از توسعه رویان بدنی جلوگیری می‌کند و اثرات نامطلوبی را روی سایر فرآیندهای فیزیولوژیک رویان به‌ویژه ذخایر غذایی آن دارد و بازده باززایی آن را کاهش می‌دهد (مرکل و همکاران، ۱۹۹۵). بنابراین سطح بالای پیکلورام برای ایجاد رویان در رقم‌ها تحت آزمایش برای میخک توصیه نمی‌شود.

در این پژوهش رقم‌های Sagres و Spirit پاسخ‌های رویان‌زایی مختلفی را نشان دادند (جدول ۴). یان‌چوا و همکاران (۱۹۹۸) پاسخ متفاوت ارقام میخک در رویان‌زایی مستقیم را گزارش کرده‌اند. کرمی و همکاران پاسخ متفاوت ارقام میخک در رویان‌زایی از مسیر پینه را گزارش کرده‌اند. در بسیاری از گونه‌های گیاهی نشان داده شده که ژنوتیپ‌های درون یک گونه ظرفیت رویان‌زایی متنوعی برخوردارند (مرکل و همکاران، ۱۹۹۵). به هرحال این قبیل از تفاوت‌ها ممکن است به میزان توانایی عناصر کلیدی در میسر رویان‌زایی ارتباط داشته باشد که در بین رقم‌ها متفاوت است.

جدول ۴: روی تعداد رویان‌های ایجاد شده از پینه‌های رویان‌زا در دو رقم میخک در غلظت‌های مختلف پیکلورام (۵ هفته پس از کشت)

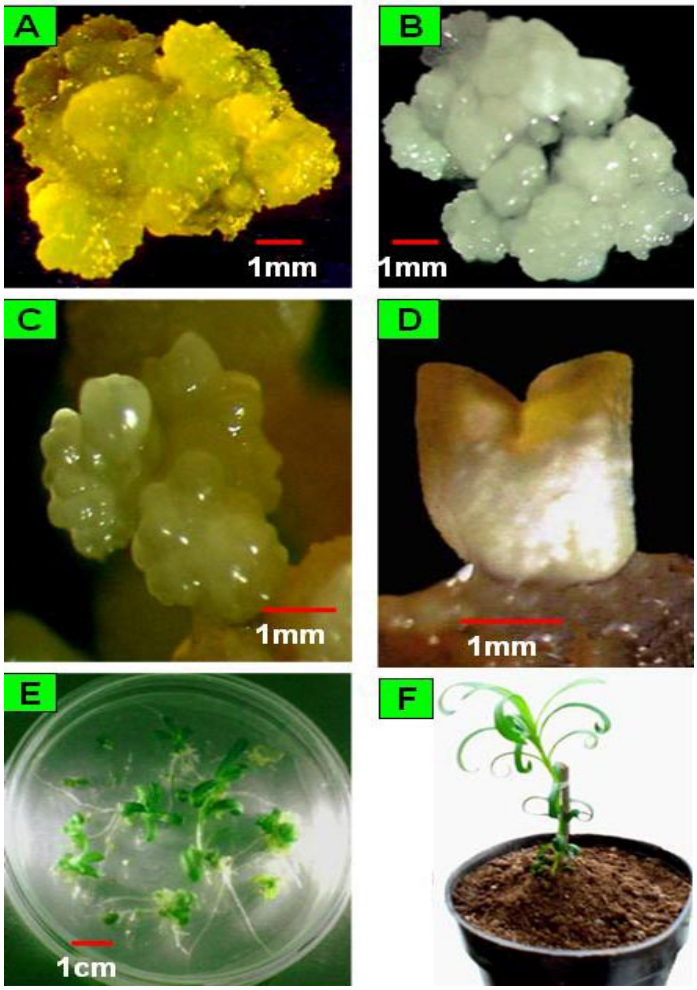
پیکلورام (میلی‌گرم در لیتر)	تعداد رویان‌های ایجاد شده روی پینه‌های رویان‌زا	
	Spirit	Sagres
۰	۵۸±۴/۷ c	۷۵ ± ۶/۵ e
۰/۲	۱۳۴± ۸/۳b	۱۶ ± ۶/۷c
۰/۵	۲۰۶ ± ۹a	۲۳۰±۸/۶ b
۱	۲۱۰± ۹/۲a	۲۵۱±۸/۹ a
۲	۱۲۶ ± ۶/۶b	۱۳۶±۵/۶۶ d
۴	۶۶±۴/۴ c	۷۱± ۵/۴ e
میانگین ژنوتیپ	۱۳۳± ۷/۷b	۱۵۹±۸/۴ a

میانگین‌های دارای حداقل یک حروف مشترک اختلاف معنی داری ندارند ($P<0.05$)

بازرایی

دو هفته پس از انتقال رویان‌های لپه‌ای به محیط کشت MS۱/۲، رویان‌ها به‌صورت گیاهچه بازرا شدند (شکل۱. E). در هر دو رقم رویان‌های بدنی با فراوانی نسبتاً بالا (حدود ۸۵ درصد) به‌صورت گیاهچه کامل بازرا شدند. حدود ۸۰ گیاه از گیاهچه‌های منتقل شده به گلدان‌های حاوی پیت، ماسه و خاک باغچه تولید شد (شکل۱. F). گیاهچه ها منتقل شده به گلدان به راحتی با شرایط گلدان و گلخانه سازگار شدند. گیاهچه‌هایی ضعیف در درون شیشه پس از انتقال به گلدان و گلخانه رشد ضعیفی را از خود نشان دادند بر عکس گیاهچه‌های طبیعی در درون شیشه پس از انتقال به گلدان و گلخانه، رشد و گل‌دهی طبیعی را نشان دادند و در مقایسه با گیاهان شاهد هیچ تغییرات مورفولوژیک در آن‌ها دیده نشد.

به‌طور خلاصه، در این پژوهش یک روش باززایی مطلوب گیاه میخک از طریق رویان‌زایی شرح داده شده است و از این نتایج می‌تواند برای ریزازدیادی، تولید بذر مصنوعی و دست‌ورزی‌های ژنتیکی گیاه میخک استفاده کرد. جهت تکثیر تجاری گیاه میخک از مسیر رویان‌زایی بدنی، بررسی ایجاد رویان بدنی از طریق محیط کشت مایع در مقایس‌های بالا پیشنهاد می‌شود.



شکل۱: (A) پینه‌های غیررویان‌زا ۴ هفته بعد ازکشت روی محیط کشت MS محتوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D. (B): پینه‌های رویان‌زا ۷ هفته بعد ازکشت روی محیط کشت MS محتوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D. (C) رویان بدنی کروی بعد از ۲ هفته روی محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام (D): رویان بدنی لپه ای بعد از ۴ هفته روی محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام (E): باززای رویان بدنی دو هفته بعد از کشت در محیط کشت MS ۱/۲ فاقد تنظیم کننده رشد. (F): توسعه گیاهچه در گلدان بعد از ۵ هفته

منابع

Burich, G. A., Mercun, P., Benedtti, L. and Giovannini, A. 1996. Transformation method applicable to ornamental plants. Plant. Tissu. Cut. Biotech. 12: 94-104.

Carman, J. G. 1990. Embryogenic cell in plant tissue culture occurrence and behavior. *In Vitro* Cell Devel. Biol. 26: 746-753.

Frey, L., Y. Saranga and J. Bjanik. 1992. Somatic embryogenesis in carnation. HortScience. 27: 63-65.

He, G. Y. and Lazzeri, P. A. 2001. Improvement of somatic embryogenesis and plant regeneration from durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum* Desf.) scutellum and inflorescence cultures. Euphytica 119: 369-376.

Jimemeze, V. M. 2001. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. R. Bras. Fisiol. Veg. 13: 196-223.

Karami, O., Deljou, A., Esna-Ashari. M. and Ostad-Ahmadi, P. 2006. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Scientia Horticul. 110: 340-344.

Karami, O., Deljou, A. and Karami-Kordestani. G. 2008. Secondary somatic embryogenesis of carnation (Dianthus caryophyllus.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 92: 273-280

Loschiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuit-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R. Orselli S. and Terzi, M.1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell culture and its variation as caused by mutation differentiation hormones and hypomethyalating, Theory Apply Genet. 77: 325-331.

Merkle, S. A., Parrott, W. A. and Flin. B. S. 1995. Morphgenic aspect of somatic emberyogenesis. In: pp 155-203 Thorpetaed in vitro embryogenesis in plant. Klauwer Academhc Publishers DordrechtBosta London.

Pareek, A. and Kothari. S. L. 2003. Direct somatic emberyogenesis and plant regeneration from ornamental spacies of *Dianthos.* Scientia Horticul. 98: 449-459.

Preeti, K. and Kothari, S.L. 2004. In vitro culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on tissue initiation and regeneration. Plant Cell Tissue Org Cult. 77: 73-79.

Wang, L., Huang, B., He, M. and Hao. S. 1990. Somatic embryogenesis and its hormonal regulators in tissue culture of Freesia refracta, Annals Bot. 65: 271-276

Williams, E. G. and Maheswaran, G.. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group, Annals Bot. 57: 443-462.

Yantcheva, A., Vlahova, M. and Antanassov, A. 1998. Direct somatic emberyogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthos caryophyllus*). Plant Cell Rep. 18:148-153.

Somatic Embryogenesis in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by Petal Explant

Karami[1], O., Deljou[2], A., Mahmoudi Pou[3], A. and Vaisi, B.

Abstract

In this study, plant regeneration through somatic embryogenesis was achieved for petal explants in two cultivars of carnation (Sagres and Spirit). Embryogenic calli were obtained on MS basal medium containing 0.5, 1, 2, 4 and 6 mg/lit of 2,4-D and maximum callus (% 37) was obtained with 2 mg 1^{-1} 2,4-D. After transfer of embryogenic calli to growth regulator free MS medium or media containing 0.2, 0.5, 1, 2, and 4 picloram mg/lit somatic embryogenesis was produced. Maximum embryogenesis (251 embryos) was obtained on medium containing 0.5 and 1 mg 1^{-1} picloram. The cultivars were shown different response than induction of calls and embryo. Cotyledonary somatic embryos were developed into plantlets, when they were transferred on the half-strength MS culture medium without growth regulator. The plantlets were also continued to grow under greenhouse condition.

Keywords: 2,4-D, Picloram, Regeneration, Somatic embryogenesis, Carnation

1. Instructor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan
2. Assistant professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan
3. Former Graduate Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan
4. Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan

---