نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، ص. ۱۰۰-۹۴
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 25, No. 1, Spring 2011, P. 94-100
ISSN: 2008 - 4730

تغییرات بافت شناسی رویان‌زایی رویشی دمبرگ هویج (*Daucus carota* L.) در چند محیط کشت بافت

سید جواد موسوی زاده[1*]- کامبیز مشایخی[2]

تاریخ دریافت:۸۸/۱۱/۱۳
تاریخ پذیرش:۹۰/۲/۶

چکیده

رویان‌زایی رویشی از روش‌های مدرن تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان است. اساس این تکنیک به دست آوردن سلول بنیادی گیاه و تمایز آن به یک گیاه کامل است. از عوامل مؤثر در این امر، ترکیب مواد محیط کشت می‌باشد. لذا، تغییرات بافت شناسی رویان‌زایی رویشی دمبرگ هویج در سه محیط کشت MS، B5 و NL مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، قطعات یک سانتیمتری از دمبرگ هویج در محیط‌های کشت مذکور در حالت مایع مستقر گردیدند. برای القای رویان رویشی، غلظت‌های مختلف هورمون توفوردی و ایندول استیک اسید به کار رفتند. جهت بررسی‌های بافت شناسی، بعد از مرحله القاء، نمونه‌گیری از دمبرگ‌های کشت شده انجام گرفت و سپس نمونه‌ها در محلول فیکساتور تثبیت شدند. در ادامه پس از طی مراحل آبگیری، پارافین‌دهی، قالب‌گیری، برش‌دهی و رنگ‌آمیزی، از نمونه‌ها عکس‌برداری شد. بر اساس نتایج به دست آمده، تفاوت معنی‌داری بین سه محیط کشت MS، B5 و NL از لحاظ تشکیل رویان‌های رویشی گیاه هویج مشاهده گردید ($P<۰/۰۱$). به‌طوری‌که بیشترین و کمترین تعداد رویان به ترتیب در محیط‌های کشت B5 و MS تشکیل شد. بیشترین تعداد رویان نیز با کاربرد ۰/۹۰۴ میکرومولار توفوردی در محیط کشت B5 به‌دست آمد ($P<۰/۰۱$). بررسی‌های بافت شناسی دمبرگ هویج در محیط B5، سلول‌های کوچک حاوی سیتوپلاسم زیاد و در محیط NL هسته‌های درشت به همراه فراوانی دانه‌های نشاسته که از علائم سلول رویان‌زا است، را نشان داد. همچنین در محیط MS، توده سلول‌های پیش رویان‌زای تمایز نیافته در زیر اپیدرم دمبرگ مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: هویج، رویان‌زایی رویشی، بافت شناسی، محیط کشت

مقدمه

رویان‌زایی رویشی[3] فرآیندی است که در آن سلول‌های بدنی به رویان‌های بدنی تغییر می‌یابند. این رویان‌ها دو قطبی بوده و می‌توانند جوانه بزنند و به گیاه کامل تبدیل شوند (۲). رویان‌زایی رویشی برای تولید انبوه در ازدیاد رویشی گیاهان به کار می‌رود و می‌توان آن را برای تمام گونه‌های گیاهی به کار برد. از اینرو گزارش‌های زیادی در زمینه القای موفق رویان‌زایی رویشی در گیاهان مختلف وجود دارد. به طوری که در ۴۰ سال گذشته این عمل در بسیاری از گونه‌های گیاهی توسعه یافته است (۷). غالباً برای رویان‌زایی رویشی در گیاهان دو مرحله مختلف دنبال می‌شود که مرحله اول آن فاز القا[4] می‌باشد. در این مرحله سلول‌های موجود در محیط کشت ابتدا پتانسیل رویان‌زایی را به دست آورده و شروع به تقسیم شدن می‌کنند. سپس در مرحله ظهور رویان‌ها[5]، رویان‌های رویشی ظاهر می‌شوند (۲). علایم مشخصه سلول‌های رویان‌زا عبارت از: سلول‌هایی با اندازه کوچک، فرم تقریباً گرد و منظم با سیتوپلاسم زیاد، هسته بزرگ، واکوئل کوچک، دانه‌های نشاسته زیاد و فعالیت متابولیسمی شدید می‌باشد (۱۴ و ۱۶). بررسی‌های بافت شناسی[6] روی دمبرگ هویج و گوجه‌فرنگی نیز وجود قابلیت رویان‌زایی رویشی در سلول‌های زیراپیدرمی را مشخص نموده است (۱، ۱۰ و ۱۵).

از عوامل مهم بر رویان‌زایی رویشی، ترکیب محیط‌های کشت

۱و۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(*- نویسنده مسئول: Email: sj.mousavizadeh@gmail.com)

3- Somatic embryogenesis
4- Induction phase
5- Realization phase
6- Histology

می‌باشد (۳). البته مشخص نمودن رابطه بین مواد تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت بافت و تغییراتی که در درون گیاه اتفاق می‌افتد، به راحتی میسر نیست. اما تحقیقات به عمل آمده در این زمینه نشان داده‌اند که مواد محیط‌های کشت می‌توانند به طور مستقیم و یا غیرمستقیم، میزان سنتز و یا تخریب تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی را تحت تأثیر قرار دهند (۱). امروزه با بررسی‌هایی که در زمینه شرایط مختلف محیط‌های کشت رویان‌زایی رویشی انجام شده است، پیشرفت‌هایی در زمینه نوع و مقدار هورمون جهت رویان‌زایی در گیاهان مختلف به دست آمده است (۳). اما در رویان‌زایی رویشی به علت القای قابلیت رویان‌زایی رویشی در سلول خاصی از گیاه، حالت مرفولوژی آن نیز تغییر نموده (مثلاً افزایش سیتوپلاسم) و با تمایز خود رویان‌های رویشی را به طور مستقیم تشکیل می‌دهد (۸). در این حالت رویان‌های رویشی مستقیماً از سلول بافت‌های گیاهی به‌وجود می‌آیند که فقط برای تظاهر توانایی خود جهت تولید جنین، به تنظیم‌کننده‌های رشد و یا شرایط مناسب محیط کشت نیاز دارند (۷). اما مشاهده اثرات محیط کشت بر رویان‌زایی رویشی به‌طور مستقیم مقدور نبوده و تنها در مراحل بعدی تکامل است که می‌توان اثرات غیرمستقیم آن را ردیابی کرد. همچنین با توجه به این‌که ریزنمونه‌های جداشده از گیاه مادری، پس از کشت دیگر تولید کننده[1] نیستند، لذا مواد موجود در محیط کشت برای رشد ریزنمونه‌ها از اهمیت خاصی برخوردار می‌گردند. بنابراین نوع و غلظت مواد محیط کشت می‌تواند بر چگونگی و رفتار ریزنمونه‌ها از لحاظ رویان‌زایی رویشی اثر داشته باشد (۴، ۹، ۱۹ و ۲۰). در مرحله ظهور رویان‌ها، اثر آنها بر تمایز و تکامل رویان‌ها را می‌توان به‌طور مستقیم ملاحظه نمود، در صورتی‌که در مورد چگونگی اثرات محیط کشت روی القای رویان‌زایی رویشی اطلاعات کمی در دسترس می‌باشد. لذا هدف از این تحقیق، بررسی تغییرات بافت شناسی رویان‌زایی رویشی دمبرگ هویج بعد از مرحله القا در سه محیط کشت MS (۱۳)، B5 (۶) و NL (۱۴) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

برای شروع آزمایش ابتدا بذرهای هویج رقم نانتس[2] پس از تیمار ۳۰ ثانیه‌ای با الکل ۷۰ درصد، با محلول هیپوکلرید سدیم (وایتکس) ۳٪ به همراه ۲ قطره توین ۸۰[3] به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. بذرها پس از ۳ مرحله شستشو با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار، روی محیط کشت جوانه‌زنی B5 حاوی ۰/۸٪ آگار و ۱ درصد ساکارز به تعداد ۱۵-۱۲ عدد در شیشه‌های مربایی کشت گردیدند. پس از گذشت ۴ هفته، ریزنمونه‌های دمبرگ به قطعات ۱ سانتیمتری تقسیم و برای آزمایشات رویانزایی استفاده شدند.

تهیه محیط‌های کشت

برای تهیه محیط‌های کشت رویان‌زا، از هورمون اکسین در محیط‌های کشت مایع MS، B5 و NL استفاده شد. بدین صورت که از توفوردی[4] با غلظت‌های صفر، ۰/۲۲۶، ۰/۴۵۲ و ۰/۹۰۴ میکرومولار در محیط B5 و صفر، ۲، ۵ و ۹ میکرومولار در محیط MS و ایندول استیک اسید[5] با غلظت صفر، ۳، ۶ و ۹ میکرومولار در محیط کشت NL استفاده شد (۲). عناصر و مواد غذایی محیط‌های کشت MS، B5 و NL طبق جدول ۱ تهیه گردید (۳). pH محیط‌های کشت با استفاده از دستگاه pH متر[6] و با کاربرد NaOH یا HCl ۰/۱ HCl نرمال برای محیط کشت MS در محدوده ۵/۵ و برای محیط‌های کشت B5 و NL در محدوده ۵/۷ تنظیم شد. مقدار ۲۵ میلی لیتر از محیط کشت در بالن‌های T شکل ریخته و درب آنها توسط ۳ لایه فویل آلومینیومی بسته شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱/۱ بار و دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد در دستگاه اتوکلاو[7] استریل شدند.

القای رویان‌زایی رویشی

برای القای رویان‌زایی رویشی تعداد ۵ ریزنمونه دمبرگ ۱ سانتیمتری در بالن‌های T شکل کشت شدند. سپس بالن‌ها به دستگاه آکسوفیتون[8] استوارد با دوران ۱/۹ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و نور دائم (۲۰۰۰ لوکس) منتقل گردیدند. واکشت[9] ریزنمونه‌ها در محیط‌های مشابه اما فاقد اکسین و با هدف ظهور رویان‌ها (رئالیزاسیون) سه هفته پس از کشت انجام گرفت. قبل از انتقال ریز نمونه‌ها به محیط ظهور رویان‌ها، جهت حذف کامل اکسین، ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت استریل بدون اکسین در سه مرحله به فواصل ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه شستشو شدند (۱۰). شش هفته پس از این مرحله، رویان‌های رویشی تولید شده در مراحل کروی

1- Autotrophe
2- Nantes
3- Tween 80

4- 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D)
5- Indole-3- Acetic Acid (IAA)
6- LABTRON, PH Meter-Thermometer, PHT 110, IRAN
7- REYHAN TEB, RT-2, IRAN
8- Auxophyton
9- Subculture

شکل[1]، قلبی شکل[2]، اژدری شکل[3] و گیاهچه‌ای[4] با استفاده از دستگاه دستگاه استرئوسکوپ[5] متصل به کامپیوتر در دو بزرگنمایی ۲۰ و ۴۰ میکرون، شمارش و عکس‌برداری شدند.

جدول ۱ – غلظت عناصر غذایی موجود در محیط های کشت MS، B5 و NL (میلی مولار)

عناصر غذایی	B5	MS	NL
NO_3^-	۲۶/۶۷	۳۹/۴۰۲	۱۲/۷۵۶
NH_4^+	۲/۰۲۸	۲۰/۶۱۲	۰/۰۰
N	۳۱/۶۹۷	۵۹/۹۹۸	۱۲/۷۵۵
K^+	۲۹/۶۸۵	۲۰/۰۳۸	۸/۶۲۸
P	۰/۹۶۱	۱/۲۴۶	۱/۴۹۹
Mg^{++}	۳/۰۵	۱/۵	۴/۳۸۱
Ca^{++}	۱/۰۲	۲/۹۹۲	۲/۰۶۶
S	۴/۱۳۵	۱/۶۳۲	۵/۱۷۱
CL^-	۲/۰۴	۵/۹۷۹	۰/۰۰
Na	۰/۹۶۳	۰/۰۰۲	۳/۰۲۳
Mn^{++}	۰/۰۵۹	۰/۱۰۰۴	۰/۰۲۱۲
B	۰/۰۴۸	۰/۰۹۹۹	۰/۰۲۴
Zn^{++}	۰/۰۱	۰/۰۳۰۵	۰/۰۰۵۳
Mo	۰/۰۰۱	۱/۰۳۱۸	۰/۰۰۱۳
Cu^{++}	۰/۰۰۰۰۹	۰/۰۰۰۰۹	۰/۰۰۲۴
Fe^{++}	۰/۰۵۳۷	۰/۰۵۳۷	۰/۰۵۳۷
Co	۰/۰۰	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰
I	۰/۰۰۴۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۴۵
کازئین هیدرولیزات	۰/۴	۰/۰۰	۰/۳۲
میواینوزیتول	۰/۲۷۷	۰/۰۵۵	۰/۲۷۷
گلایسین	۰/۰۰	۰/۰۳۹	۰/۰۰
ساکارز	۵۸/۴۲۸	۸۷/۶۴۲	۵۸/۴۲۸

بافت شناسی ریزنمونه‌های دمبرگ

برای مطالعات بافت شناسی، ریزنمونه‌های دمبرگ ۳۰ روز بعد از کشت، در محلول فیکساتور (FAA) شامل استیک اسید گلایسال- اتانول- فرمالین به نسبت ۵:۱۰:۵ تثبیت شدند. سپس طی ۱۲ مرحله، نفوذ پارافین مایع در بافت‌ها انجام گرفت. در ادامه بعد از قالب‌گیری با پارافین جامد، با استفاده از دستگاه میکروتوم[6] برش‌های عرضی به ضخامت ۱۴ میکرون تهیه و توسط زایلن عملیات پارافین‌زدایی انجام شد. برای رنگ‌آمیزی دوگانه از سافرانین[7] و فست‌گرین[8] استفاده گردید (۲۱). در نهایت مشاهده و عکس‌برداری از نمونه‌های تثبیت شده روی لام توسط میکروسکوپ نوری[9] مجهز به دوربین عکاسی[10] انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده با استفاده از تبدیل جذری $\sqrt{X+0.5}$ نرمال شدند. سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح بلوک- های کامل تصادفی با ۱۲ تیمار در ۴ تکرار صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (۲۲) انجام شد.

نتایج و بحث

رویان‌زایی رویشی دمبرگ هویج

بر اساس نتایج به دست آمده اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین محیط‌های کشت B5، NL و MS از لحاظ تشکیل رویان در مراحل مختلف رویان‌زایی مشخص گردید (جدول ۲). تغییر غلظت در اکسین کاربردی، تعداد رویان را تحت تأثیر قرار داد. به گونه‌ای که بیشترین تعداد رویان با اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) در محیط کشت B5 حاوی ۰/۹۰۴ میکرومولار توفوردی به دست آمد (جدول ۳). که با گزارش‌های اثرات غلظت‌های مختلف توفوردی در رویان- زایی موز[11] و گواوا[12] مطابقت دارد (۱۹ و ۲۳).

نتایج این تحقیق نشان داد که در محیط‌های بدون هورمون، رویانی تشکیل نشد، اما با افزودن هورمون اکسین، رویان‌های رویشی شکل گرفتند (جدول ۳). نتایج محققان کشت بافت گیاهی در مورد بافت‌های رویان‌زا این عقیده کلی را تقویت و تأیید می‌نماید که ارسال علائم مورد نیاز و ایجاد شرایط اصلی جهت شروع القای رویان‌زایی توسط هورمون‌ها و در نتیجه تنش‌های وارده به سلول‌های نمونه مورد کشت می‌باشد (۵، ۱۰، ۱۲، ۱۸، ۱۹، ۲۳ و ۲۴). بنابراین با افزودن اکسین‌ها و به‌خصوص توفوردی به محیط کشت می‌توان روند تمایز سلول‌های سوماتیکی را تغییر داده و آنها را وارد مرحله رویان‌زایی نمود. با توجه به نتایج این پژوهش، افزایش غلظت هورمون و یا تغییر نوع اکسین در اکثر تیمارها، تفاوت معنی‌داری را از لحاظ رویان‌زایی ایجاد نکرد. برای مثال در محیط MS با توجه به اینکه غلظت

1- Globular-shape
2- Heart-shape
3- Torpedo-shape
4- Plantlet
5- Striyo, Sunny. Monitoring, Sony
6- Model: HM 355 E

7- Safranin
8- Fast green
9- Olympus BX51
10- Olympus DB12
11- *Musa* spp
12- Guava (*Psidium guajava* L. cv. Banra)

بالاتری از توفوردی نسبت به محیط B5 استفاده شد، اما تعداد رویان-های کروی تشکیل شده در بالاترین غلظت توفوردی (۹ میکرومولار) در محیط MS با اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) کمتر از تعداد مربوطه در حداقل غلظت توفوردی (۰/۲۲۶ میکرومولار) در محیط B5 بود. همچنین در محیط MS تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۲ و ۵ میکرومولار توفوردی از لحاظ تشکیل رویان رویشی مشاهده نشد. بعلاوه در محیط NL در تمام مراحل رویان‌زایی، تعداد رویان تشکیل شده در غلظت ۹ میکرومولار ایندول استیک اسید به طرز معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) کمتر از تعداد رویان‌های تشکیل شده در غلظت ۰/۹۰۴ میکرومولار توفوردی در محیط B5 بود (جدول ۳).

به نظر، عواملی غیر از نوع و غلظت اکسین، رویان‌زایی رویشی دمبرگ هویج را تحت تأثیر قرار می‌دهند (جدول ۳). از میان این عوامل می‌توان به مواد مورد استفاده در این محیط‌های کشت اشاره کرد. محیط کشت‌های مختلف هم به دلیل تفاوت در میزان و نوع مواد موجود در آنها، اثرات متفاوتی در رویان‌زایی رویشی دارند. برای مثال به تفاوت معنی‌داری ($P<۰/۰۰۰۱$) بین دو محیط کشت B5 و MS از لحاظ رویان‌زایی رویشی گل رز اشاره شده و B5 به عنوان محیط پایه مناسب جهت رویان‌زایی رویشی پیشنهاد گردیده است (۴). همچنین در بررسی انجام شده برای رویان‌زایی رویشی گوجه فرنگی در سه محیط کشت B5، MS و NL، محیط کشت B5 مناسب‌ترین محیط برای رویان‌زایی رویشی تشخیص داده شد (۱).

بافت شناسی دمبرگ هویج

تحقیقات به‌عمل آمده طی چند سال اخیر در زمینه رویان‌زایی رویشی این امکان را فراهم نموده است که تعدادی زیادی از گیاهان را که قبلاً رویان‌زایی رویشی در آنها غیرممکن می‌نمود، از این طریق تکثیر نمایند (۷). نتایج اکثر این تحقیقات مشخص‌کننده شرایط خارجی مناسب و مطلوب جهت القاء، تمایز و تکامل رویان‌های رویشی در گونه‌های مختلف گیاهی می‌باشند. علیرغم وجود این گزارش‌ها، اطلاعات نسبتاً کمی درباره چگونگی رویان‌زایی رویشی از لحاظ شرایط درونی ریزنمونه مورد کشت موجود می‌باشد.

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری تعداد رویان‌های حاصل از دمبرگ هویج در محیط‌های کشت B5، NL و MS بر اساس میانگین مربعات

منبع تغییرات	درجه آزادی	رویان کروی	رویان قلبی	رویان اژدری	گیاهچه	کل رویان
بلوک	۳	۰/۱۰۷ ns	۰/۰۴۹ ns	۰/۰۶۳ ns	۰/۰۰۶ ns	۰/۰۸۷ ns
تیمار	۱۱	۲/۹۱ **	۱/۵۶ **	۱/۰۰ **	۱/۸۰ **	۴/۴۴ **
خطا	۳۳	۰/۰۷	۰/۰۲۵	۰/۰۳۶	۰/۰۵۱	۰/۰۷۷
ضریب تغییرات (درصد)		۱۷/۱۴	۱۴/۸۶	۱۸/۳۹	۱۸/۳۲	۱۵/۸۵

** ($P<۰/۰۱$)، ns ($P>۰/۰۵$)

جدول ۳- مقایسه میانگین تعداد رویان تشکیل شده در مراحل مختلف تکامل رویان‌زایی رویشی دمبرگ هویج در محیط‌های کشت B5، NL و MS در مرحله ظهور رویان‌ها

محیط کشت	نوع هورمون	غلظت هورمون (میکرو مولار)	رویان کروی شکل	رویان قلبی شکل	رویان اژدری کل	گیاهچه	کل رویان
MS	توفوردی	صفر	۰ d	۰ b	۰ c	۰ d	۰ c
		۲	۰ d	۰ b	۰ c	۰ d	۰ c
		۵	۰ d	۰ b	۰ c	۰ d	۰ c
		۹	۶ c	۰/۴۴ b	۱/۹۶ b	۴/۷ c	۱۳/۱ bc
B5	توفوردی	صفر	۰ d	۰ b	۰ c	۰ d	۰ c
		۰/۲۲۶	۲۶ b	۰/۶۲ b	۰ c	۰/۲۳ d	۲۶/۸۵ b
		۰/۴۵۲	۲۶/۳۲ b	۰ b	۰ c	۰ d	۲۶/۳۲ b
		۰/۹۰۴	۱۷۳/۵۴ a	۸۶/۳۸ a	۴۴/۲۹ a	۸۰/۹۱ a	۳۸۵/۱۲ a
NL	ایندول استیک اسید	صفر	۰ d	۰ b	۰ c	۰ d	۰ c
		۳	۶/۲ c	۰ b	۰ c	۰ d	۶/۲ c
		۶	۶/۳۳ c	۰/۸۷ b	۲ b	۱۷/۳۵ b	۲۶/۵۵ b
		۹	۱۵/۷۳ b	۰ b	۰/۳۸ bc	۴/۵۶ c	۲۰/۶۷ bc

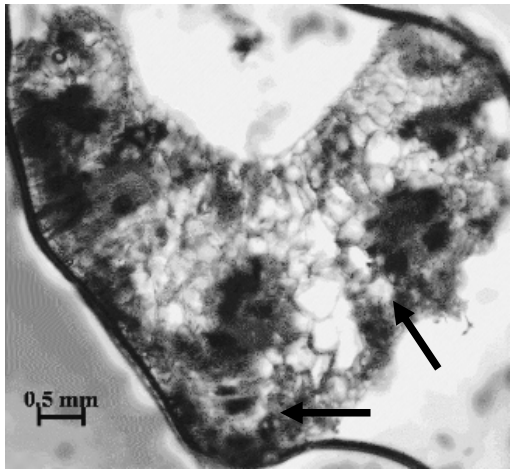
اعداد دارای حرف مشترک در هر ستون اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد ندارند.

تفاوت معنی‌دار مشاهده شده در تعداد رویان تشکیل شده در محیط‌های کشت MS، B5 و NL ، سبب شد تا اثر ترکیبات محیط‌های کشت مذکور بر رویان‌زایی رویشی بافت دمبرگ هویج از لحاظ بافت شناسی بررسی شود.

مشاهدات بافت شناسی دمبرگ هویج در محیط MS دال بر آن بود که در مرحله القای رویان‌زایی، توده‌ای از سلول‌های پیش رویان‌زا در قسمت اپیدرم و زیر اپیدرم که به طور کامل تمایز نیافته‌اند، تشکیل شده‌اند (شکل ۱). بروز تقسیمات متوالی در اپیدرم ریزنمونه‌های برگ پسته کشت شده در محیط MS در مرحله القای رویان‌زایی گزارش شده است (۱۶).

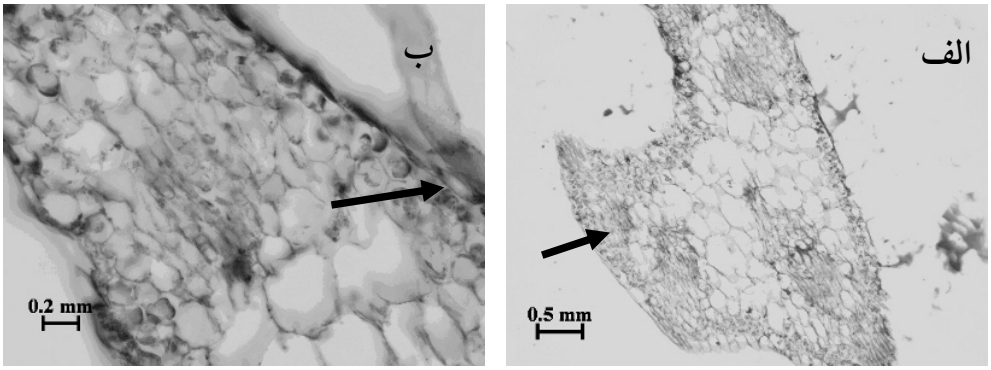
برش عرضی دمبرگ هویج در محیط B5 نشان داد که سلول‌های کوچک حاوی سیتوپلاسم فراوان تشکیل شده‌اند (شکل ۳ ب). افزایش سیتوپلاسم از علائم سلول‌های رویان‌زا می‌باشد (۱۱). با افزایش سیتوپلاسم، حالت مرفولوژی سلول تغییر نموده و به رویان‌های رویشی تمایز می‌یابد (۸). این سلول‌ها از لحاظ اندازه کوچکتر و فشرده‌تر هستند (۱۶). در محیط B5 ۳۰ روز بعد از کشت، توده‌های کروی شکل رویانی در لایه‌های سطحی قابل تشخیص بوده که همزمان پس از تقسیمات متوالی حالت قلبی شکل به‌خود گرفتند (شکل ۳ الف).

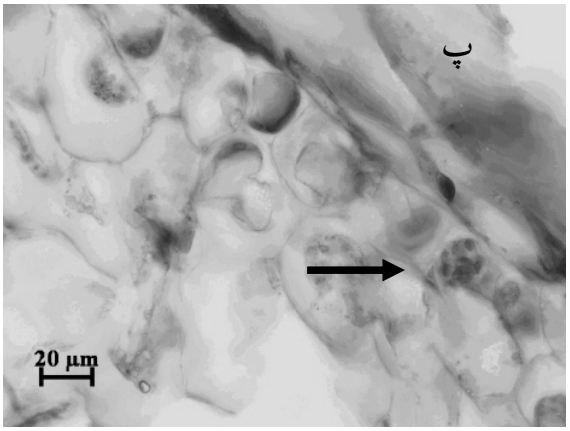
در شکل ۲ برش عرضی دمبرگ هویج در محیط NL نشان داده شده است که وجود دانه‌های نشاسته و هسته‌های درشت در سلول‌های مریستمی در آن قابل توجه است. دانه‌های زیاد نشاسته به صورت سطحی سلول رویان‌زا را احاطه کرده است. هسته‌های درشت در سلول‌های مریستمی و دانه‌های نشاسته از علائم سلول‌های رویان‌زا می‌باشد (۱۱ و ۲۰).



شکل ۱- برش عرضی دمبرگ هویج ۳۰ روز بعد از کشت در مرحله القای رویان‌زایی در محیط MS حاوی ۹ میکرومولار توفوردی

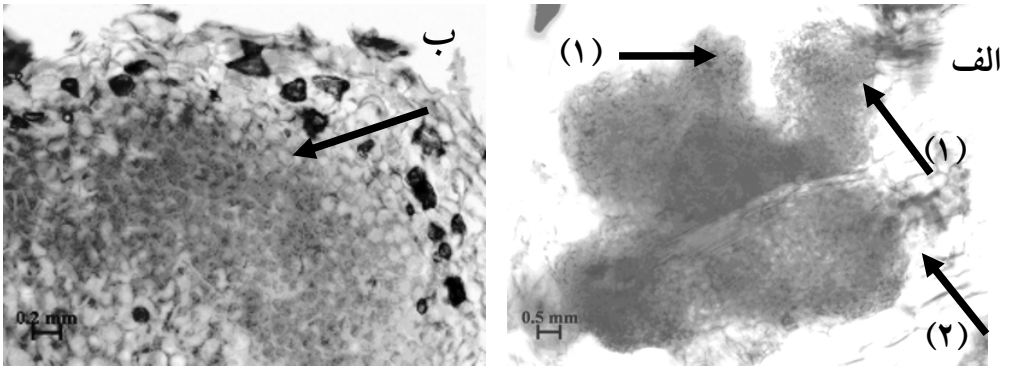
منطقه رویان‌زا با فلش نشان داده شده است. توده سلول‌های پیش رویان‌زا تشکیل شده‌اند اما به طور کامل تمایز نیافته‌اند.





شکل ۲- برش عرضی دمبرگ هویج ۳۰ روز بعد از کشت در مرحله القای رویان‌زایی در محیط NL حاوی ٦ میکرومولار ایندول استیک اسید

در تصاویر الف، ب و پ، هسته‌های درشت در سلول‌های مریستمی قابل توجه است که با فلش نشان داده شده است. (پ) دانه‌های زیاد نشاسته به صورت سطحی سلول رویان‌زا را احاطه کرده است. دانه‌های نشاسته به صورت نقاط تیره رنگ با فلش نشان داده شده است. هسته‌های درشت در سلول‌های مریستمی و دانه‌های نشاسته از علائم سلول‌های رویان‌زا می‌باشد.



شکل ۳- برش عرضی دمبرگ هویج ۳۰ روز بعد از کشت در مرحله القای رویان‌زایی در محیط B5 حاوی ۰/٤٥٢ میکرومولار توفوردی

(الف) ظهور توده رویانی پرسلولی در زیر اپیدرم دمبرگ که منجر به شکل‌گیری رویان شده است. (۱) رویان‌های کروی شکل و (۲) رویان اژدری با فلش نشان داده شده است. (ب) سلول‌های کوچک غنی از سیتوپلاسم در سلول‌های رویان‌زا ملاحظه می‌گردد که با فلش نشان داده شده است. سیتوپلاسم فراوان از علائم سلول‌های رویان‌زا می‌باشد.

بر اساس مشاهدات این تحقیق، رویان‌زایی به صورت مستقیم و بدون تشکیل کالوس انجام است. در القای مستقیم، سلول‌هایی که در اصل قابلیت رویان‌زایی را دارند تحت تأثیر هورمون‌ها و یا شرایط محیط کشت، رویان‌زا می‌شوند که در این حالت تغییر در قابلیت و توانایی رویان‌زایی در سلول‌ها در سطح ملکولی در سلول‌هایی مانند بافت‌های مریستمی و جوان صورت می‌گیرد (۲، ۷ و ۱۵).

نتایج حاصل از بررسی بافت شناسی بافت‌های رویان‌زای این تحقیق نیز نشان داد که رویان‌های رویشی از سلول‌هایی که در غشای زیر اپیدرم قرار دارند، منشأ گرفته‌اند (شکل ۱، ۲ و ۳). که با نتایج مطالعات بافت شناسی رویان‌زایی رویشی و گزارش وجود قابلیت رویان‌زایی رویشی در سلول‌های زیر اپیدرم دمبرگ گوجه‌فرنگی در محیط کشت MS (۱) و دمبرگ هویج در محیط کشت B5 (۱۰ و ۱۵) و برگ پسته در محیط کشت MS (۱۶) مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج این تحقیق، دو ناحیه سلولی قابل تمایز بعد از القای رویان‌زایی رویشی در دمبرگ هویج تشکیل می‌شود. بدین صورت که سلول‌های واقع در منطقه مرکزی دمبرگ، دارای واکوئل بزرگ و دیواره‌های سلولی ضخیم می‌باشند. این سلول‌ها دارای مقادیر کمی از نشاسته و یا حتی فاقد آن هستند. در صورتی‌که سلول‌های منطقه خارجی دمبرگ از سلول‌های کوچکتر با دیواره نازک و واکوئل‌های کم حجم با سیتوپلاسم زیاد و نشاسته زیاد تشکیل شده‌اند. بنابراین سلول‌های خارجی دمبرگ و ناحیه زیر اپیدرم، دارای خصوصیات

سلول‌های رویان‌زا هستند. اما تغییر وضع سلول از حالت غیر رویـان‌زا به رویان‌زا و ایجاد پتانسیل جدید در درون آن که همان القای رویان-زایی می‌باشد، به مقدار زیادی تابع شرایط محیط کشـت از نقطـه‌نظـر مواد غذایی و هورمونی می‌باشد.

منابع

۱- پیری ز.م. ۱۳۸۷. بررسی جنین‌زایی رویشی و اندام‌زایی دو رقم تجاری و خودروی گوجه‌فرنگی در سه محـیط کشـت B5، MS و NL. پایـان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۹۷ ص.

۲- مشایخی ک. ۱۳۸۶. جنین زایی رویشی گیاهی، انتشارات مختوم‌قلی‌فراغی (سارلی). ۴۸۳ ص.

۳- موسوی زاده س.ج. ۱۳۸۷. بررسی رفتارهای ریزنمونه‌های جدا شده از دمبرگ توت فرنگی و هویج در کشت درون لوله آزمـایش. پایـان نامـه کارشناسی ارشد علوم باغبانی. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۰۸ ص.

4- Burrell A.M., Lineberger R.D., Rathore K.S., and Byrne D.H. 2006. Genetic variation in somatic embryogenesis of Rose. HortScience. 41. 5:1165-1168.

5- Castillo P.Y.Z., Flick A.C., Puc G.L., Ruiz A.S., Perez F.B., Buzzy N,S., and Andra L.I. 2007. Somatic embryogenesis in Habanero Peper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspension. HortScience. 42. 2:329-333.

6- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Research. 50:151-158.

7- George E.F., Hall M.A., Klerk G.D. 2008. Plant propagation by tissue culture. Springer. 3rd Edition. 335-354 Pp.

8- Griga, M. 1998. Direct somatic embryogenesis from shoot apical meristems of pea and thidiazuron-induced high conversion rate of somatic embryos. Biologia Plantarum. 41.4: 481- 495.

9- Majd A., Chamandosti F., Mehrabia S., and Sheidai M. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* L. Biological Science. 9. 4:729-734.

10- Mashayekhi K. 2001. The protein synthesis spectrum during the induction phase of somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota* L.) cultures and the role of nitrogen forms for embryo development. A thesis of Doctor of Science in Agriculture. Justus Liebig University, Giessen. 95 p.

11- Mashayekhi K., and Neumann K.H. 2006. Effects of boron on somatic embryogenesis of *Daucus carota*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 84: 279-283.

12- Mizukami M., Takeda T., Satonaka H., and Matsuoka H. 2008. Improvement of propagation frequency with two-step direct somatic embryogenesis from carrot hypocotyls. Biochemical Engineering. 38. 1:55-60.

13- Murashinge T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant. 15:473.

14- Neumann K.H. 1966. Wurzelbildung und Nukleinsauregehalt bei phloem Gewebekulturen der karrotenwurzel auf synthetischen Nahrmedium verschiedener Hormonkombina-tionen. Lees Phytohormones ET Organogenese. 38:95-102.

15- Neumann K.H. 1995. Pflanzliche Zell und Gewebekulturen. Verlag Eugen Ulmer. 304 p.

16- Onay A. 2000. Histology of somatic embryogenesis in culture leaf explants of Pistachio (*Pistacia vera* L.). Turkish Journal of Botany. 24: 91-95.

17- Raghavan V. 2004. Role of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of Arabidobsis: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. American Journal of Botany. 9. 11:1743-1756.

18- Rai M.K., Akhtar N., and Jaiswal V.S. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. Scientia Horticulturae. 113. 2:129-133.

19- Rodriguez R., Berros B., Centeno M.L., Rovira M., Rodrigues A., and Radojevic L. 2000 Applied and basic studies on somatic embryogenesis in hazelnut (*Corylus avellana* L.). In: Jan, M. S. Gupta, P. and R. J. Newton (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Vol. 6. 291-359.

20- Ruzin S.E. 1999. Plant micro technique and microscopy. University of California. 61-95.

21- SAS Institute. 2001. SAS/STAT user´s guide. Version 9. SAS Institute, Cary, N.C.

22- Strosse H., Schoofs H., Panis B., Andre E., Reyniers K., and Swennen R. 2006. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp). Plant Science. 170:104-112.

23- Zouine J., and Hadrami I.E. 2007. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticulturae. 112:221-226.