تأثیر غلظتهای مختلف 2,4-D بر جنین‌زایی رویشی چند ژنوتیپ هویج ایرانی

مصطفی ناصری، حمیدرضا بلوچی*، اسد معصومی اصل و علی مرادی

یاسوج، ، دانشگاه یاسوج، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۹

چکیده

با توجه به توانایی تولید جنین از سلولهای رویشی، جنین‌زایی رویشی می‌تواند مقدمه تولید بذر مصنوعی باشد. لذا تحقیق حاضر با هدف تعیین مناسب‌ترین ژنوتیپ و تنظیم کننده رشد گیاهی جهت تولید پینه‌های جنین‌زا به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در محیط پایه ۲۵ درصد MS، اجرا گردید. عامل اول شامل نه ژنوتیپ هویج ایرانی و عامل دوم، تنظیم کننده رشد گیاهی در چهار سطح (شاهد، ۲ ،۴ و ۶ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D) بود. از کشت درون شیشه‌ای بذرها جهت تولید گیاهچه و از هیپوکوتیل گیاهچه‌های تولید شده برای تولید پینه جنین‌زا استفاده شد. ۱۲ هفته بعد از کاشت ریزنمونه‌ها، صفات درصد پینه‌زایی، طول و قطر پینه، وزن تر و خشک پینه و نیز نوع بافت، رنگ و وضعیت جنین‌زایی پینه‌ها ارزیابی گردیدند. همچنین تعداد جنینهای کروی، قلبی و اژدری شکل در پینه‌های جنین‌زا شمارش شدند. نتایج نشان داد که بیشترین درصد پینه‌زایی (۱۰۰ درصد) در ژنوتیپهای ۲۶-۹۹ (بدون حضور تنظیم کننده رشد گیاهی) و ۳۱-۹۹ (در حضور ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D) بدست آمد؛ تشکیل پینه جنین‌زا در ژنوتیپهای ۱۶-۹۹، ۲۷-۹۹ ۶۴-۹۹ و ۴۰-۹۹ در حضور ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ژنوتیپهای ۵۶-۹۹ و ۳۱-۹۹ در حضور ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده شد. ژنوتیپ ۶۴-۹۹ بیشترین تعداد جنین کروی (۱۳ عدد)، قلبی (۵/۳۳ عدد) و اژدری (۳/۳۳ عدد) را تولید کرد. لذا ژنوتیپ ۶۴-۹۹ و غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D برای تولید بیشترین تعداد جنین رویشی مناسب می‌باشد. درکل ژنوتیپهای هویج ایرانی پاسخ متفاوتی به پینه‌زایی و جنین‌زایی نشان دادند.

واژه های کلیدی: پینه، ژنوتیپ، جنین‌زایی رویشی، تنظیم کننده رشد گیاهی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۷۱۸۹۲۰۴۰ ، پست الکترونیکی: balouchi@yu.ac.ir

مقدمه

هویج (*Daucus carota*) گیاهی خوراکی، دوساله از خانواده چتریان بوده و حاوی ویتامینهای آ، ب و ث، بتاکاروتن و مواد معدنی مختلف است. یکی از مشکلات عمده گیاهان خانواده چتریان، تولید اندک بذر توسط گیاه مادری می‌باشد که این امر به فاکتورهایی مثل نقص در گرده‌افشانی و باروری، فراوانی گلهای نر و گلهای توسعه نیافته مربوط می‌شود (۱). از دیگر مشکلات بذر هویج می‌توان به خواب بذر و داشتن جنینهای ناقص اشاره کرد. به دلیل مشکلات تولید بذر از هویجهای بومی کشور، امروزه تمامی بذور گونه‌های هویج زراعی کشور، وارداتی می‌باشند. در گیاهان خوراکی از قبیل هویج تولید بذرهایی که عاری از مشکلاتی نظیر خواب جنین باشند، از طریق پینه‌زایی و جنین‌زایی امکان‌پذیر است (۴). پیوندی و همکاران (۱۳۸۹) دریافتند که در گیاهان خوراکی از قبیل هویج تولید بذرهایی که عاری از مشکلاتی نظیر خواب جنین باشند، از طریق پینه‌زایی و جنین‌زایی امکان‌پذیر است (۴).

جنین‌زایی رویشی، عبارت است از تشکیل رویان از سلول غیرجنسی در شرایط آزمایشگاهی، که مشابه با جنین بذری قادر به نمو بوده و به صورت گیاهچه کامل نمو پیدا می‌کند.

جنین‌زایی رویشی به دلیل امکان تولید بیشتر و تکثیر مداوم توده جنین‌زا، روشی مناسب برای تکثیر بوده و در برخی موارد به دلیل فراهم نمودن امکان تکثیر انبوه گیاهان، نسبت به سایر روشهای تکثیر غیرجنسی برتری دارد (۱۸). در گیاه اصلی، جنین از تقسیم سریع یک سلول تخم تلقیح شده ایجاد می‌شود که به وسیله بند ناف به گیاه مادری متصل است. در طی رشد، سلول تخم از راه تقسیم میتوز تکثیر شده و توده سلولی اولیه را تشکیل می‌دهد. این تودهٔ سلولی با تشکیل مرحلهٔ قلبی شکل تمایز ظاهری پیدا می‌کنند و سپس قطبی می‌شود و مرحله اژدری شکل را در دو لپه‌ایها و استوانه‌ای را در تک‌لپه‌ایها تشکیل می‌دهد. جنین رویشی به طور طبیعی در تعدادی از گونه‌های گیاهی از راه بافتهای خورش، سلولهای قرینه یا سلولهای حاشیهٔ برگها به وجود می‌آیند ولی سرچشمهٔ جنینهای رویشی حاصل از کشت‌بافت که روی پینه یا توده‌های سلولی موجود در کشتهای تعلیقی (سوسپانسیون سلولی) ایجاد می‌شوند، چندان روشن نیست (۲).

در جنین‌زایی مستقیم، جنین مستقیماً از بافت ریزنمونه و بدون رشد پینه منشأء می‌گیرد (۳). میزوکامی و همکاران (۲۰۰۸) به باززایی گیاهان ارزشمند از طریق جنین‌زایی رویشی مستقیم پرداخته‌اند (۱۸). جنین‌زایی رویشی مستقیم، رویکرد مطلوب برای به دست آوردن گیاهان با ثبات ژنتیکی است، ولی پینه‌زایی موجب تنوع بدنی (سوماکلونال) می‌شود.

در اغلب موارد، جنین‌زایی یک روش غیرمستقیم می‌باشد. در جنین‌زایی غیرمستقیم، جنین از بافت پینه‌ای که از تکثیر سلول‌های ریزنمونه تولید می‌شود، منشاء می‌گیرد. سلولهایی که به تولید جنین می‌پردازند، سلول‌های تعیین شده برای جنین‌زایی نام دارند که با هدف تولید جنین القاء می‌شوند و آنها را سلولهای معین جنین‌زایی القایی می‌نامند. از جمله این سلول‌ها می‌توان سلول‌های آبکش ثانویه در هویج، بافتهای برگی قهوه، گل اطلسی و مارچوبه را نام برد. در این فرآیند، به مقادیر هورمونی مشخص و ایجاد شرایط کشت ویژه برای شروع رشد پینه و آماده‌سازی مجدد این بافت برای ورود به مرحله جنین‌زایی نیاز می‌باشد. این سلولها با قطبیت تقلیدی از الگویی که شبیه الگوی عمومی تولید جنین در تخمک است، به پیش‌جنین تبدیل می‌شوند. آغازینهای پیش‌جنین ممکن است یک سلول منفرد و یا یک توده سلولی باشند. با مساعد شدن شرایط، جنینها جوانه‌زده و به تولید گیاهچه می‌پردازند (۹).

به طورکلی القای جنینهای رویشی در کشت بافت با تنظیم مقدار ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی کنترل می‌شود. در اغلب موارد، با انتقال سلولها از محیط کشت حاوی یک نوع اکسین به محیط کشت بدون اکسین، و یا محیط کشت حاوی مقادیر اندک اکسین، جنین‌زایی رویشی تحریک می‌شود. ترکیب بهینه تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای القای جنین‌زایی در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت است و تحقیقات زیادی برای تعیین این ترکیب لازم است. تنظیم‌کننده‌های رشد که به صورت خارجی استفاده می‌شوند، نقش اساسی در تسهیل تغییرات مورفولوژیک مورد نیاز برای تولید جنین رویشی ایفاء می‌کنند. از میان تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، اکسینها و به‌خصوص 2,4-D نقش بارزی در القای جنین رویشی به عنوان یک اکسین مصنوعی در گیاهان مختلف دارند. غلظتهایی از این اکسین به تنهایی یا در ترکیب با سایر هورمونهای اکسینی یا غیراکسینی مانند سایتوکینین‌ها جهت ایجاد جنین رویشی استفاده می‌شود (۱۹). تاکدا و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که اگر سطح اکسین به شدت کم یا زیاد شود و یا بعد از تشکیل جنین، غلظت اکسین کم نشود، گرادیان مورد نیاز داخلی ایجاد نمی‌شود و در نتیجه جنین رویشی القاء و تولید نمی‌شود (۱۹). هورمون سیتوکینین به طور معمول در دوره آغاز مرحله تقسیم سلولی جنین رویشی مهم است. اما برای مراحل بعدی بلوغ مؤثر نیست. سیتوکینین ممکن است در تقسیم سلولی نقش داشته باشد، ولی در تمایز جنین نقشی ندارد. در بسیاری از دولپه‌ایها، سیتوکینین برای

شروع مرحله القای جنین‌زایی لازم است، در تعداد کمی از گونه‌ها فقط سیتوکینین برای نمو جنینهای رویشی مورد نیاز است، بنزیل آدنین (BA) معمول‌ترین سیتوکینین مورد استفاده می‌باشد (۱۶). فوجی مورا و کومامین (۱۹۸۰) پیشنهاد کردند که زآتین، جنین‌زایی رویشی در سلولهای هویج که به صورت سوسپانسیون کشت شده اند را بهبود می‌دهد (۱۵). امیدی و ایزدی دربندی (۱۳۸۸) اظهار داشت که اگرچه اسید آبسیزیک در بیشتر موارد به‌صورت ممانعت کنندهٔ تقسیم سلولی مورد نظر قرار می‌گیرد، در برخی موارد نقش ریخت‌زایی نیز دارد (۲). مصرف این تنظیم کنندهٔ رشد در تحریک ایجاد جنین رویشی مؤثر است. حسندخت و ابراهیمی (۱۳۸۵) بیان داشتند که افزودن آبسیزیک اسید به محیط کشت باعث بهبود یکنواختی و تحریک نمو طبیعی جنین رویشی می‌شود (۱۵). رضانژاد امیردهی و همکاران (۱۳۸۸) جهت جنین‌زایی رویشی در زنجبیل پینه‌های حاصل از سطوح هورمونی NAA، BAP و KIN را به محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D انتقال دادند و به مدت ۲۵ روز در شرایط روشنایی ۳۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه با مدت روشنایی ۱۶ ساعت قرار دادند، بعد از ۲۷-۲۴ روز پینه‌ها شروع به جنین‌زایی رویشی کردند (۷). جنین‌زایی رویشی کاملاً به ژنوتیپ گیاه و تنوع تنظیم-کننده‌های رشد مورد استفاده و همچنین ریزنمونه بستگی دارد (۱۲).

با توجه به اینکه گزارشی در مورد جنین‌زایی رویشی در ژنوتیپهای هویج ایرانی وجود ندارد و این کار می‌تواند مقدمه تولید بذر مصنوعی باشد، لذا تحقیق حاضر با هدف تعیین بهترین ژنوتیپ و ترکیب تنظیم کننده رشد گیاهی جهت تولید پینه جنین‌زا و تولید جنینهای رویشی از پینه-های حاصل از گیاه هویج طراحی و اجرا گردید.

مواد و روشها

این آزمایش به منظور تعیین مناسب‌ترین ژنوتیپ و ترکیب تنظیم کننده رشد گیاهی جهت تولید پینه‌های جنین‌زا به صورت دو فاکتوره در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در محیط پایه ۲۵ درصد MS، در آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج اجرا گردید. عامل اول، ژنوتیپهای هویج ایرانی در نه سطح ۱۶-۹۹ (توده مازندران)، ۲۷-۹۹ (توده آذربایجان غربی)، ۲۶-۹۹ (توده آذربایجان غربی)، ۶۴-۹۹ (توده آذربایجان غربی)، ۵۶-۹۹ (توده مرکزی)، ۴۵-۹۹ (توده لرستان)، ۳۱-۹۹ (توده خراسان)، ۳-۹۹ (توده یزد) و ۴۰-۹۹ (توده مرکزی) و عامل دوم، ترکیب تنظیم کننده رشد گیاهی در چهار سطح (شاهد، ۲، ۴ و ۶ میلی گرم بر لیتر 2,4-D) بود. بذرهای ۹ توده بومی هویج از بانک ژن ایران تهیه شدند. از کشت درون شیشه‌ای بذرها جهت تولید گیاهچه و از هیپوکوتیل گیاهچه‌های تولید شده برای تولید پینه جنین‌زا استفاده شد. ابتدا بذرها با استفاده از مایع ظرفشویی رقیق شده با آب دو بار تقطیر شسته شدند، سپس با استفاده از هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی گردیدند، سپس بذرهای ضدعفونی شده به مدت چهار ساعت درون آب مقطر دو بار استریل در بشرهای استریل که با پارافیلم کاملاً مسدود شده بودند، در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. این سرمادهی مرطوب، در جوانه‌زنی بهتر توده‌های بومی هویج مؤثر بود. بعد از این مدت بذرها به زیر هود برده شدند و با استفاده از هیپوکلریت سدیم یک درصد همراه با دو قطره توئین ۲۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در نهایت اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی شدند.

ریزنمونه هیپوکوتیل به طول ۱-۰/۵ سانتیمتر از گیاهچه‌های حاصل از کشت بذر در شرایط درون شیشه‌ای تهیه شد. پس از کاشت ریزنمونه، پتری دیشها در اتاق تاریک در دمای ۲±۲۴ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند و هر دو هفته یک بار عمل واکشت صورت گرفته و ریزنمونه‌ها به محیط جدید با همان شرایط قبلی منتقل شدند. ۱۲ هفته بعد از کاشت ریزنمونه‌ها، صفات کمی از قبیل درصد پینه‌زایی، طول پینه (سانتیمتر)، قطر پینه

(سانتیمتر)، وزن تر و خشک پینه (گرم) و صفات کیفی شامل بافت، رنگ و وضعیت جنین‌زایی پینه‌ها اندازه‌گیری و ثبت گردیدند. اندازه‌گیری صفات طول و قطر پینه با استفاده از کولیس و وزن تر و خشک پینه با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم صورت گرفت. صفات بافت پینه شامل سفت و نرم بودن بافت، رنگ پینه و وضعیت جنین‌زایی پینه براساس مشاهده جنین در مراحل مختلف کروی، قلبی و اژدری در زیر بینی‌کولار ارزیابی شدند.

بعد از گذشت ۱۲ هفته، پینه‌های حاوی جنینهای کروی به محیط کشت ۲۵ درصد MS فاقد تنظیم کننده رشد گیاهی منتقل شدند. به منظور تعیین تعداد جنینهای کروی، قلبی و اژدری شکل در پینه‌های جنین‌زا، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا گردید. در این پژوهش، تعداد جنینهای رویشی تشکیل شده بر سطح پینه‌های جنین‌زا توسط بینی‌کولار شمارش شدند. تیمار این آزمایش، شش ژنوتیپ هویج ایرانی ۴۰-۹۹، ۱۶-۹۹، ۶۴-۹۹، ۲۷-۹۹، ۳۱-۹۹ و ۵۶-۹۹ بودند که در آزمایش قبلی بهترین پاسخ را به پینه‌زایی داده بودند.

تجزیه‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گردید. مقایسه میانگین اثرهای اصلی و برهمکنشها با آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که کلیه اثرهای اصلی و برهمکنشهای دوگانه برای صفات درصد پینه‌زایی، طول پینه، قطر پینه و وزن خشک پینه معنی‌دار شد. این نتیجه بیانگر متفاوت بودن تأثیر ژنوتیپ و ترکیب تنظیم کننده رشد گیاهی بر صفات مرتبط با پینه‌زایی است.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر ژنوتیپ و تنظیم کننده رشد گیاهی برای صفات مورد ارزیابی در مرحله تشکیل پینه جنین‌زا در ژنوتیپهای هویج ایرانی

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصدپینه‌زایی	طول پینه	قطر پینه	وزن خشک پینه
ژنوتیپ	۸	۲۵۱۴/۸۱**	۰/۶۶۸**	۰/۳۶۰**	۰/۰۰۰۰۰۴**
تنظیم کننده رشد گیاهی	۳	۵۴۳۵/۸۰**	۲/۷۷۶**	۱/۰۲۵**	۰/۰۰۰۰۲۶**
ژنوتیپ × تنظیم کننده رشد گیاهی	۲۴	۲۹۹۱/۳۶**	۰/۵۳۷**	۰/۳۰۲**	۰/۰۰۰۰۰۷**
خطا	۷۲	۲۲/۲۲	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۰۰۰۱
ضریب تغییرات (٪)		۲۲/۱۳	۱۸/۰۳	۲۵/۲۸	۲۹/۸۷

** نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

حدود ۱۲ هفته پس از کاشت ریزنمونه‌ها، پینه‌زایی شروع شد. در این مدت به‌منظور تجدید موادغذایی، هر دو هفته یکبار واکشت انجام شد. در پایان این آزمایش، انواع پینه‌های نرم و سخت، به رنگ سفید تا زرد، جنین‌زا و غیرجنین‌زا مشاهده شدند. مقایسه میانگین برهمکنش ژنوتیپ و تنظیم کننده رشد گیاهی (جدول ۲) نشان داد که بیشترین درصد پینه‌زایی (۱۰۰ درصد) در ژنوتیپهای ۲۶-۹۹ بدون حضور تنظیم کننده رشد گیاهی و ۳۱-۹۹ در حضور ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D رخ داد.

پاسخ ژنوتیپهای مختلف در حضور تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مختلف متفاوت بود، اما در کل عدم پینه‌زایی فقط مربوط به ژنوتیپ ۳-۹۹ بود. بیشترین میزان طول پینه (۱/۳۹ سانتیمتر) مربوط به ژنوتیپ ۱۶-۹۹ در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بود. بیشترین میزان قطر پینه نیز در همین ژنوتیپ و با همان ترکیب تنظیم کننده رشد گیاهی مشاهده شد. ژنوتیپ ۶۴-۹۹ در حضور ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بیشترین وزن خشک پینه (۰/۰۰۵۲ گرم) را به خود اختصاص داد. در این آزمایش تشکیل پینه

جنین‌زا در ژنوتیپهای ۱۶-۹۹، ۲۷-۹۹ ۶۴-۹۹ و ۴۰-۹۹ ۳۱-۹۹ در حضور ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده شد. در حضور ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ژنوتیپهای ۵۶-۹۹ و

جدول ۲- مقایسه میانگین برهمکنش ژنوتیپ و تنظیم کننده رشد گیاهی مورد استفاده برای صفات مورد ارزیابی در مرحله تشکیل پینه جنین‌زا در ژنوتیپهای هویج ایرانی*

ژنوتیپ	2,4-D میلی گرم بر لیتر	درصد پینه زایی	طول پینه (سانتی‌متر)	قطر پینه (سانتی متر)	وزن خشک پینه (گرم)
۹۹-۱۶	۰	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۲	۶۶/۶۷^{c}	۱/۳۹^{a}	۱/۲۴^{a}	۰/۰۰۲۱^{d}
	۴	۳۳/۳۳^{ef}	۱/۲۳^{b}	۱/۱۸^{a}	۰/۰۰۲۵^{d}
	۶	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
۹۹-۲۷	۰	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۲	۲۶/۶۷^{f}	۱/۱۸^{b}	۰/۹۲^{b}	۰/۰۰۱۳^{e}
	۴	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۶	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
۹۹-۲۶	۰	۱۰۰^{a}	۰/۷۹^{de}	۰/۵۲^{cde}	۰/۰۰۲۰^{d}
	۲	۶۰^{c}	۰/۸۸^{de}	۰/۴۵^{ef}	۰/۰۰۲۳^{d}
	۴	۴۶/۶۷^{d}	۱/۲۴^{b}	۰/۳۷^{f}	۰/۰۰۲۳^{d}
	۶	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
۹۹-۶۴	۰	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۲	۶۰^{c}	۱/۱۷^{b}	۰/۶۰^{cd}	۰/۰۰۲۰^{d}
	۴	۴۰^{de}	۰/۹۸^{c}	۰/۴۳^{ef}	۰/۰۰۵۲^{a}
	۶	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
۹۹-۵۶	۰	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۲	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۴	۸۰^{b}	۰/۸۶^{d}	۰/۵۰^{e}	۰/۰۰۴۲^{b}
	۶	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
۹۹-۴۵	۰	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۲	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۴	۲۶/۶۷^{f}	۰/۷۲^{e}	۰/۴۷^{ef}	۰/۰۰۲۴^{d}
	۶	۶۶/۶۷^{c}	۰/۷۱^{e}	۰/۶۲^{c}	۰/۰۰۳۵^{c}
۹۹-۳۱	۰	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۲	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۴	۱۰۰^{a}	۱/۰۱^{c}	۰/۵۲^{cde}	۰/۰۰۴۷^{ab}
	۶	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
۹۹-۳	۰	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۲	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۴	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۶	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
۹۹-۴۰	۰	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۲	۶۰^{c}	۰/۸۰^{de}	۰/۵۱^{de}	۰/۰۰۴۶^{ab}
	۴	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}
	۶	۰^{g}	۰^{f}	۰^{g}	۰^{f}

*درهرستون میانگینهایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

پینه‌های جنین‌زا در کلیه ارقام به رنگ زرد روشن با بافتی ترد و شکننده بودند. با این نتایج می‌توان ژنوتیپ ۱۶-۹۹ را در حضور ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ژنوتیپهای ۳۱-۹۹ و ۶۴-۹۹ را در حضور ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D جهت پینه‌زایی و تشکیل پینه جنین‌زا مطلوب دانست، اما غلظت بالای 2,4-D و همچنین فقدان تنظیم کننده رشد گیاهی جهت پینه‌زایی در این ژنوتیپ مطلوب نمی‌باشد (جدول ۳).

جدول ۳- بررسی صفات کیفی پینه‌های تشکیل شده از ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپهای هویج ایرانی

ژنوتیپ	2,4-D میلی گرم بر لیتر			
	۰	۲	۴	۶
۹۹-۱۶	–	پینه جنین‌زا با رنگ زرد روشن و بافت ترد و شکننده	پینه غیرجنین‌زا با رنگ زرد روشن و بافت ترد و شکننده	–
۹۹-۲۷	–	پینه جنین‌زا با رنگ زرد روشن و بافت ترد و شکننده	–	–
۹۹-۲۶	پینه غیرجنین‌زا با رنگ سفید و بافت ترد وشکننده	پینه غیرجنین‌زا با رنگ زرد روشن و بافت ترد وشکننده	پینه غیرجنین‌زا با رنگ زرد روشن و بافت ترد وشکننده	–
۹۹-۶۴	–	پینه جنین‌زا با رنگ زرد روشن و بافت ترد وشکننده	پینه غیرجنین‌زا با رنگ زرد روشن و بافت ترد وشکننده	–
۹۹-۵۶	–	–	پینه جنین‌زا با رنگ زرد روشن و بافت ترد و شکننده	–
۹۹-۴۵	–	–	پینه غیرجنین‌زا با رنگ سبز مایل به زرد و بافت ترد و شکننده	پینه غیرجنین‌زا با رنگ زرد روشن و بافت ترد و شکننده
۹۹-۳۱	–	–	پینه جنین‌زا با رنگ زرد روشن و بافت ترد و شکننده	–
۹۹-۳	–	–	–	–
۹۹-۴۰	–	پینه جنین‌زا با رنگ زرد روشن و بافت ترد و شکننده	–	–

القای جنین‌زایی در ریزنمونه‌ها به مقدار زیادی تابع شرایط محیط کشت از نقطه نظر غذایی و نوع تنظیم کننده رشد گیاهی می‌باشد. تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از عوامل مهم در القای جنین‌زایی رویشی می‌باشند. در بین تنظیم کننده‌های رشد گیاه، اکسین به عنوان مهم‌ترین عامل القای جنین‌زایی رویشی معرفی شده است، ولی نمی‌توان اثر دیگر عوامل را بر روی این پدیده نادیده گرفت. تاکدا و همکاران (۲۰۰۳) از هورمون اکسین در غلظتهای ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر و غلظتهای مختلف عنصر کلسیم جهت تولید پینه‌های جنین‌زا در هویج استفاده کردند و مشاهده نمودند که تعداد جنینهای رویشی در پینه‌های جنین‌زا در غلظت بالای 2,4-D کاهش یافت (۱۹). در آزمایشی که میزوکامی و همکاران (۲۰۰۸) بر القای جنین‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل هویج انجام دادند به این نتیجه رسیدند که با کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، سلولهای هیپوکوتیل بعد از ۱۴ روز وارد وضعیت جنینی شدند (۱۸). کامادا و همکاران (۱۹۸۹) با استفاده از مریستم انتهایی گیاهچه‌های هویج در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و حضور غلظتهای مختلف ساکارز موفق به القای جنین‌زایی رویشی شدند، که با نتایج این آزمایش مغایرت داشت (۱۷). در آزمایشی که محمدی نسب و همکاران (۱۳۹۰) بر تشکیل پینه جنین‌زا در دو رقم یونجه انجام

دادند، مشاهده کردند که پاسخ ارقام مختلف در غلظتهای مختلف 2,4-D متفاوت است و کمترین پاسخ به جنین‌زایی در شرایط فقدان تنظیم کننده‌های رشد گیاهی صورت گرفت و بیشترین پاسخ در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D رخ داد (۱۳). در گزارش یانجی (۲۰۰۳) نیز با کاربرد غلظت یکسانی از اکسین و سیتوکینین در ریزنمونه برگ تنباکو بالاترین درصد پینه‌زایی مشاهده شد که با نتایج این آزمایش مطابقت داشت (۲۱). سلیمانی و همکاران (۱۳۹۳) نشان دادند که ترکیب دو هورمون در غلظتهای 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA و همچنین 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L BA بهترین تیمارها برای القای کالوس در گیاه دارویی باباآدم بودند (۸). نتایج تحقیق کرمزاد و همکاران (۱۳۹۴) نیز نشان داد که بیشترین درصد کالزایی (۷۵ درصد) در ریزنمونه برگ در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و در ریز نمونه میانگره (۸۷ درصد) در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود (۱۰). یان ژیا و همکاران (۲۰۰۶) با بررسی جنین‌زایی رویشی در ارقام مختلف پنبه به این نتیجه رسیدند که پینه‌های زرد براق با بافت ترد و شکننده که در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین تشکیل شده‌اند، نسبت به سایر پینه‌ها پتانسیل بالاتری برای تشکیل جنینهای رویشی و نمو جنینها نشان دادند (۲۲).

در ادامه تعداد جنینهای کروی، قلبی، اژدری شکل در پینه‌های جنین‌زا حاصل از ژنوتیپهای هویج ایرانی مشخص شدند. ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپهای مختلف هویج که تحت تیمارهای تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مختلف پینه جنین‌زا تشکیل دادند. در مرحله کروی به منظور سپری کردن مرحله نمو، از محیط هورمون‌دار به محیط فاقد هورمون منتقل شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس تعداد جنینهای کروی، قلبی، اژدری تشکیل شده در طول این مدت در ژنوتیپهای مختلف هویج (جدول ۴) نشان داد که اثر ژنوتیپ بر تعداد جنین کروی و قلبی در سطح احتمال ۱ درصد و بر تعداد جنین اژدری تشکیل شده در پینه جنین‌زا در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود.

جدول۴- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر ژنوتیپ بر تعداد جنین کروی، قلبی، اژدری تشکیل شده در پینه جنین‌زای حاصل از ژنوتیپهای هویج ایرانی

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعدادجنین کروی	تعداد جنین قلبی	تعداد جنین اژدری
ژنوتیپ	۵	۱۸/۹۸۹**	۶/۰۸۹**	۰/۱۸۹*
خطا	۱۲	۰/۶۶	۰/۶۶	۰/۰۶۸
ضریب تغییرات (٪)		۱۰/۲۷	۲۲/۹۶	۱۸/۹۰۱

*و **: به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ بر تعداد جنین کروی تشکیل شده در پینه جنین‌زا (جدول ۵) نشان داد که ژنوتیپ ۶۴-۹۹ بیشترین تعداد جنین کروی (۱۳ عدد) (شکل ۱ الف)، قلبی (۵/۳۳ عدد) (شکل ۱ ب) و اژدری (۳/۳۳ عدد) (شکل ۱ ج) را داشته است و ژنوتیپ ۵۶-۹۹ دارای کمترین تعدادجنین کروی (۶/۳۳ عدد) بود، هرچند که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با ژنوتیپهای ۳۱-۹۹ و ۲۷-۹۹ از نظر تعداد جنین قلبی نداشت. کمترین میزان جنین قلبی (۲ عدد) مربوط به ژنوتیپهای ۱۶-۹۹ و ۵۶-۹۹ بود. از لحاظ تعداد جنین اژدری، کمترین میزان جنین اژدری (۱/۳۳عدد) را ژنوتیپهای ۵۶-۹۹ و ۴۰-۹۹ نشان دادند. جنین زایی رویشی کاملاً به ژنوتیپ گیاه و نوع تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده و همچنین ریزنمونه بستگی دارد (۱۲). در این آزمایش ژنوتیپهای مختلف پاسخهای متفاوتی را به جنین‌زایی رویشی نشان دادند و نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که ژنوتیپ ۱۶-

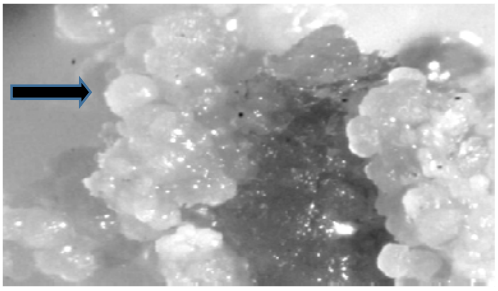
۹۹ دارای بیشترین تعداد جنین رویشی بود، که این خود بیان کننده این مطلب است که می‌توان از این ژنوتیپ جهت جنین‌زایی رویشی استفاده کرد. هدف از انجام کشت بافت، تولید گیاهچه‌های کامل و بیشتر در هر فصل از سال است و این رقم محققان را در رسیدن به این هدف یاری می‌کند، زیرا تعداد جنین رویشی بیشتر شانس تولید تعداد بیشتری گیاهچه را بالا می‌برد.

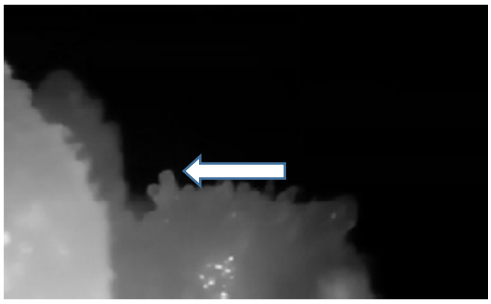
جدول۵- مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ برای تعداد جنینهای کروی، قلبی و اژدری تشکیل شده در پینه توده‌های بومی هویج

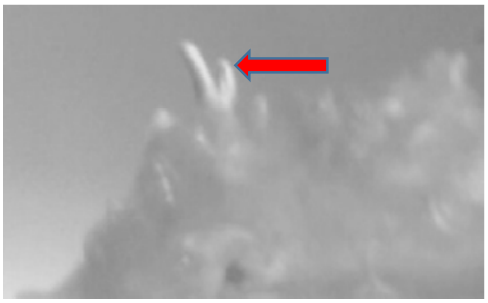
ژنوتیپ	تعدادجنین کروی	تعداد جنین قلبی	تعداد جنین اژدری
۹۹-۴۰	۷^{b}	۳^{bc}	۱/۳۳^{b}
۹۹-۱۶	۷/۶۶^{b}	۲^{c}	۲/۰۰^{b}
۹۹-۲۷	۶/۶۶^{b}	۴/۶۶^{a}	۲/۰۰^{b}
۹۹-۳۱	۷^{b}	۴/۳۳^{ab}	۲/۰۰^{b}
۹۹-۵۶	۶/۳۳^{b}	۲^{c}	۱/۳۳^{b}
۹۹-۶۴	۱۳^{a}	۵/۳۳^{a}	۳/۳۳^{a}

در هر ستون میانگینهایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند از نظر آماری در سطح ۵ در صد تفاوت معنی‌داری ندارند.

کامپتون و گری (۱۹۹۶) جنین‌زایی رویشی در چهار ژنوتیپ مختلف از هندوانه را گزارش کرده و به این نتیجه رسیدند که استفاده از غلظت بالاتر 2,4-D تعداد جنینهای رویشی در پینه‌های جنین‌زا را کاهش داده و پاسخ ارقام مختلف به جنین‌زایی متفاوت بود (۱۴). نتایج گروسی و همکاران (۱۳۸۶) در متفاوت بودن پاسخ سه رقم پنبه به جنین‌زایی رویشی با نتایج این آزمایش مطابقت داشت (۱۱). محمدی نسب و همکاران (۱۳۹۰) نیز به این نتیجه رسیدند که پاسخ ارقام مختلف یونجه به جنین‌زایی رویشی و تشکیل تعداد جنینهای رویشی، متفاوت بود (۱۳). دلجو و همکاران (۱۳۸۴) نیز در بررسی تعداد جنینهای رویشی در چهار رقم میخک به نتایج مشابهی دست یافتند (۶). نتایج حاصل از آزمایش تیلر و کاجی (۱۹۹۱) روی تولید جنینهای رویشی در ارقام رازیانه نیز نشان دادند که ژنوتیپهای مختلف پاسخهای متفاوتی نسبت به جنین‌زایی نشان می‌دهند (۲۰).


الف


ب


ج

شکل ۱- جنین کروی (الف)، جنین قلبی (ب) و جنین اژدری شکل (ج) تشکیل شده روی پینه جنین‌زای هویج

نتیجه گیری نهایی

نتایج حاصل از بررسی تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر پینه‌زایی ژنوتیپهای بومی هویج ایرانی نشان داد که پینه‌زایی ژنوتیپهای ۱۶-۹۹، ۲۷-۹۹ ۶۴-۹۹ و ۴۰-۹۹ در حضور ۲ میلی‌گرم بر لیتر تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D و ژنوتیپهای ۵۶-۹۹ و ۳۱-۹۹ در حضور ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مناسب می‌باشند. نتایج حاصل از بررسی ژنوتیپهای هویج ایرانی از لحاظ تعداد جنینهای رویشی تشکیل شده بر سطح پینه‌های جنین‌زا نشان داد که ژنوتیپ ۶۴-۹۹ با بیشترین تعداد جنین کروی (۱۳ عدد)، قلبی (۵/۳۳ عدد) و اژدری (۳/۳۳ عدد) مناسب‌ترین ژنوتیپ به منظور تولید بیشترین تعداد جنین رویشی می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از بانک ژن ایران برای ارسال ژنوتیپهای هویج ایرانی مورد استفاده در این پژوهش کمال تشکر و سپاسگزاری را دارند.

منابع

۱. احیایی، ح و خواجه حسینی، م. ۱۳۹۰. ارزیابی ویژگی‌های جوانه‌زنی و خواب در سی توده بذری گیاهان دارویی. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران، ۹(۴): ۶۵۸-۶۵۱.

۲. امیدی، م. و ایزدی دربندی، ع. ۱۳۸۸. ژنتیک. انتشارات دانشگاه تهران، ۵۳۹ ص.

۳. باقری، ه. و آزادی، پ. ۱۳۸۱. کشت بافت گیاهی، تکنیک‌ها و آزمایش‌ها. انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه مشهد، ۱۵۴ ص.

۴. پیوندی، م.، مرادتهرانی، م. و مجد، ا. ۱۳۸۹. پینه‌زایی و اندام‌زایی گیاه داودی. فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، ۳(۲): ۵۳-۵۹.

۵. حسندخت، م.ر. و ابراهیمی، ر. ۱۳۸۵. مبانی کشت بافت گیاهی. چاپ اول. انتشارات مرز دانش، ۳۲۸ ص.

۶. دلجو، ع.، استاد احمدی، پ.، محمودی پور، ع. و احمدی، ح. ۱۳۸۴. نقش قند در ایجاد جنین سوماتیکی بر روی کالوس‌های جنین‌زای میخک (*Dianthus caryopyllus* L.). چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران

۷. رضانژادامیردهی، س.، بابازاده بدوستانی، ا. و بابازاده بدوستانی، ع. ر. ۱۳۸۸. بررسی افزایش سنتز RNA در سلولهای القایی جنین زایی سوماتیکی زنجبیل. ویژه نامه دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران. ص ۱-۵.

۸. سلیمانی، ط.، کیهانفر، م.، پیری، خ. و حسنلو، ط. ۱۳۹۳. القاء کالوس در گیاه دارویی بابا آدم (*Arctium lappa* L.). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۷(۲): ۲۵۹-۲۵۲.

۹. فارسی، م. و ذوالعلی، ج. ۱۳۸۳. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۴۹۵ ص.

۱۰. کرمزاد، ژ.، فرشادفر، م.، زبرجدی، ع.ر. و ذوالنوریان، ح. ۱۳۹۴. بررسی اثر غلظتهای مختلف توفوردی و کینیتین بر کالزایی گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) واریته آگریا. پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۸(۲): ۳۲۵-۳۱۶.

۱۱. گروسی، ش.، توحیدفر، م.، کاظمی تبار، س.، رحیمیان، ح.، و نعمت زاده، ق. ۱۳۸۶. جنین زایی سوماتیکی در سه رقم پنبه (*Gossypium hirsutum* L.). مجله علوم زراعی ایران، ۹(۴): ۳۰۲-۳۱۴.

۱۲. گوران، ع.، مظفری، ع.ا. و قادری، ن. ۱۳۹۲. بررسی جنین زایی سوماتیکی در توده فرخی انگور (*Vitis vinifera* L.). اولین همایش ملی الکترونیکی مباحث نوین در علوم باغبانی. دانشگاه جهرم. ص ۱-۴.

۱۳. محمدی نسب، ع.، مطلبی آذر، ع.ر. و پرندین، ر. ۱۳۹۰. تأثیر غلظتهای مختلف 2,4-D بر جنین‌زایی سوماتیک با استفاده از کشت لایه نازک سلولی هیپوکوتیل یونجه، رقم‌های Rangelander و Karysary. مجله زیست شناسی گیاهی ایران، ۳(۷): ۷۳-۸۴.

14. Compton, M., and Gray, D. 1996. Effects of sucrose and methylglyoxal bis (guanylhydrazone) on controlling grape somatic Embryogenesis. Plant Science, 35(1): 1-6.

15. Fujimura, T. and Komamine, A. 1980. Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension

culture. Zeitschrift für PflanzenpHysiologie, 99: 1–8.

16. Jimenes, V. 2001. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13(2): 196–223.

17. Kamada, H., Kobayashi, K., Kiyosue, T. and Harada, H. 1989. Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. In vitro Cellular and developmental Biology, 25(12): 1163-1166.

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

19. Takeda, T., Inose, H. and Matsuoda, H. 2003. Stimulation of somatic embryogenesis in carrot cells by the addition of the calcium. Biochemical Engineering Journal, 14(2): 143-148.

20. Theiler, H. and Kagi, A. 1991. Cloning in vitro and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare* (fennel) of zeta fino and zefa tard. Acta Hotriculture, 300(1): 287-291.

21. Yanjie, CH. 2003. Callus induction and plant regeneration from leaf explants of tobacco. Journal of Huazhong Agricultural University, 2: 1-3.

22. Yan-xia, W., Xing-fen, W., Zhi-ying, M., Gui-yin, Z. and Gai-ying, H. 2006. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Two Recalcitrant Genotypes of *Gossypium hirsutum* L. Agricultural Sciences in China, 5(5): 323-329.

Effect of different concentration of 2,4-D on somatic embryogenesis in some Iranian carrot genotypes

Naseri M., Balouchi H.R., Masoumiasl A. and Moradi A.

Agronomy and Plant Breeding Dept., Yasouj University, Yasouj, I.R. of Iran

Abstract

In respect to the ability of embryo production from somatic cells, somatic embryogenesis could be the preliminary step of artificial seed production. So at present research was conducted for identifying the most suitable genotype and hormonal combination for embryogenic callus as complete randomized design in three replications on 25 percent MS medium. First factor Iranian carrot genotype in 9 levels and second factor is hormonal combinations in 4 levels (control, 2, 4 and 6 $mg.L^{-1}$ 2,4-D). Plantlet was produced by in vitro seed culture and hypocotyle of those planlets was used for produce embryogenic callus. 12 weeks after explants culture, callogenesis percent, callus length and diameter, callus dry and fresh weight and also callus tissue type, color and embryogenesis situation was evaluated. Also, globular, heart and turpedo shape embryos were numerated. Results showed that maximum callogenesis (100 percent) was obtained in 99-26 (without plant growth regulator) and 99-31 (in 4 $mg.L^{-1}$ 2,4-D) genotypes. Embryogenic callus production was observed in 99-16, 99-27, 99-64 and 99-40 genotypes in present of 2 $mg.L^{-1}$ 2,4-D and in 99-56 ad 99-31 genotypes in present of 4 $mg.L^{-1}$ 2,4-D. 99-64 was produced maximum globular (13), heart (5.33) and torpedo (3.33) embryos. Genotype 99-64 and 2 $mg.L^{-1}$ 2,4-D are suitable for producing the maximum number of somatic embryo. In general Iranian carrot genotypes showed different responses to Callus Induction and embryogenesis.

Keywords: Callus, Genotype, Somatic Embryogenesis, Plant growth regulator