بهینه‌سازی شرایط کالوس‌زایی و باززایی در هویج (*Daucus carota* L.)

کرامت ربیعی[۱و*]، محمود خدامباشی[۲] و منصور امیدی[۳]

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد
۲. دانشیار اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد
۳. استاد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ وصول: ۱۳۸۸/۱۲/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/٤

چکیده

آزمایشی جهت بهینه‌سازی شرایط تولید کالوس ریخت‌زا و باززایی هویج با استفاده از چهار رقم تحت کشت در ایران اجرا گردید. قطعات محور زیر لپه از گیاهچه‌ها جدا شده و در محیط حاوی 2,4-D با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر جهت کالوس‌دهی و تکثیر قرار گرفتند. سپس تکه‌های کوچکی از کالوس‌های تکثیریافته (حدود ۲۵ میلی‌گرم) جدا شده و به محیط جدید با غلظت‌های مختلف 2,4-D شامل ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر انتقال یافتند. نتایج نشان داد که غلظت پائین این تنظیم کننده رشد در تولید کالوس ریخت‌زا موثرتر بود هر چند که غلظت بالا باعث رشد بیشتر کالوس شد. کینتین (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) همچنین در میزان باززایی به خصوص از نظر میزان تولید جنین‌های سوماتیکی موثرتر از بنزیل آمینو پورین (۱ میلی‌گرم در لیتر) بود. دو محیط کشت MS و MSm برای تعیین تفاوت بین این دو محیط از نظر میزان تولید کالوس و باززایی مورد استفاده قرار گرفتند که نتایج بدست آمده نشان داد محیط MSm دارای تأثیر بیشتری است. در میان ارقام مورد استفاده نیز، رقم نانتس ایمپرود توانایی بیشتری در تولید گیاهچه‌های پایدار داشت.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آمینو پورین، توفوردی، کینتین، هویج

* نویسنده مسئول
E-mail: k_rabiei@yahoo.com

مقدمه

جهت حصول نتایج مناسب در هر آزمایش کشت بافت می‌بایست شرایط رشد و باززایی برای هر گیاه خاص و با توجه به هدف آزمایش بهینه شود. غلظت مواد تنظیم کننده رشد گیاهی در محیط کشت، از جمله اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها نقش اساسی در شروع کشت بافت یا سلول و هدایت این فرایند ایفا می‌کنند. در بسیاری از موارد ریزنمونه‌ها باید ابتدا تولید کالوس نمایند و پس از آن امکان تولید جنین‌ها و نیز شاخساره‌ها که اساس باززایی هستند بوجود می‌آید. داشتن اطلاعات کافی از این جهت که چه ترکیبی از محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد کالوس سبز، ترد و با قابلیت رشد سریع و به عبارت دیگر کالوس ریخت‌زا را تولید می‌کنند بسیار مهم می‌باشد. در حال حاضر راهی برای برآورد دقیق محیط کشت و نیز پروتکل رشد برای ایجاد نوع خاصی از کالوس موجود نمی‌باشد. این ویژگی‌ها باید از طریق یک آزمایش دقیق برای هر گونه خاص گیاهی و نیز برای هر رقم جدید مورد مطالعه و بررسی قرار گیرند. اساس هر آزمایش، محیط‌های کشت و پروتکل‌هایی که در دیگر گونه‌های گیاهی نتایج مطلوبی را داده‌اند می‌باشد (۱۰). تلاش‌های بسیاری نیز جهت تعیین روشی برای ایجاد کالوس و باززایی در گیاه هویج (*Daucus carota* L.) به انجام رسیده است (۲۸، ۱۹، ۲۰ و ۱۱).

اکسین‌ها در بسیاری از آزمایش‌ها برای القاء و تولید کالوس استفاده می‌شوند. یکی از این تنظیم‌کننده‌های رشد که به وفور برای شروع کالوس‌دهی استفاده می‌شود، توفوردی[1] (2,4-D) است. جهت تحقق اهداف اصلاحی تولید کالوس با توانایی تولید جنین‌های سوماتیکی امری ضروری است. فرایند تولید جنین‌های سوماتیکی اغلب در محیط حاوی اکسین (به خصوص 2,4-D) آغاز می‌شود، اما در صورتی که غلظت تنظیم کننده رشد در مراحل بعد کاهش نیابد، رشد جنین‌ها متوقف می‌شود (۷). مقدار تنظیم کننده رشد مورد استفاده میزان تولید کالوس‌های جنین‌زا را تحت تأثیر قرار می دهد. ادوین و همکاران (۲۰۰۸) بیان نمودند که القاء کالوس‌های جنین‌زا و تولید جنین تنها در غلظت‌های پائین اکسین روی می‌دهد. تأثیر تنظیم کننده رشد سیتوکینین نیز در کشت بافت بسیار قابل توجه است چرا که اغلب همراه با اکسین‌ها جهت تحریک تقسیم سلولی و کنترل ریخت‌زایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. گاهی مواقع افزودن سیتوکینین خاصی برای القاء جنین‌زایی در یک گیاه لازم می‌باشد (۸). از سیتوکینین‌هایی که به وفور در کشت بافت استفاده می‌شود کینتین[2] و بنزیل آمینو پورین[3] (BAP) می‌باشند. غلظت‌های اندک سیتوکینین (معمولاً بین ۰/۵ تا ۲/۵ میکرومولار) اغلب برای القاء تولید کالوس جنین‌زا به خصوص در گیاهان پهن‌برگ استفاده می‌شود (۷). استفاده از هورمون‌های کینتین و بنزیل‌آمینوپورین در باززایی گیاهچه‌های حاصل از محیط کشت کالوس در گزارش‌های دیگر نیز ذکر شده است (۲، ۲۷، ۲۹ و ۳۰).

این آزمایش جهت تعیین غلظت مناسب 2,4-D برای القاء و تولید کالوس و نیز بررسی اثر کینتین و BAP بر باززایی، به خصوص تولید جنین‌های سوماتیکی در دو سطح کشت و در چهار رقم هویج انجام شد.

مواد و روش ها

بذور چهار رقم هویج که در ایران مورد کشت قرار می‌گیرند شامل مونارچ، نانتس ایمپرود، تم تم و ویلمورن از موسسه تحقیقات سبزی و صیفی دزفول تهیه شدند. تمامی مراحل این تحقیق در گروه بیوتکنولوژی موسسه ملی تحقیقات سبزیجات روسیه (RAAS) واقع در شهر مسکو در سال ۲۰۰۹–۲۰۰۸ به انجام رسید. بذور ارقام مورد استفاده در خاک و در محیط گلدان کشت شدند. پس از ۳ هفته که گیاهچه‌ها رشد کافی نمودند، قسمت‌های محور زیر لپه گیاهچه‌ها جدا شده و تحت عمل گندزدایی قرار گرفتند. جهت این کار قطعات محور زیر لپه در اتانول

1- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
2- Kinetin 3- Benzylaminopurine

۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۱٪ هیپوکلریت سدیم غوطه‌ور شدند. در نهایت سه مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با استفاده از آب استریل شسته شدند. قطعاتی به طول ۰/۵ تا ۰/۷ سانتیمتر جدا شده و در محیط کشت MS[1] (۱٦) که حاوی 2,4-D با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر، ساکارز ۳۰ گرم در لیتر و آگار به میزان ۵ گرم در لیتر بود قرار داده شدند و تحت دمای ۲۵±۱°C، رطوبت ۷۰-۸۰٪، دوره نوری ۱٦/۸ (تاریکی/ روشنایی) و در شدت نور $1000\ \mu mol\ m^{-2}\ sec^{-1}$ نگهداری شدند. برای برآورد تأثیر 2,4-D در میزان رشد کالوس‌ها و نیز تأثیر آن در باززایی کالوس‌هایی که در محیط کشت MS حاوی 2,4-D با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر رشد و تکثیر پیدا کرده بودند به قطعات کوچکتر (حدود ۲۵ میلی‌گرم) تقسیم شده و سپس به محیط‌های جدید MS و MSm[2] (۱۵) که هر کدام شامل سه غلظت مختلف 2,4-D شامل ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بودند، انتقال پیدا کردند. ده قطعه کالوس در هر پتری دیش قرار داده شد و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از گذشت یک ماه، ویژگی‌هایی از کالوس شامل تغییر وزن، رنگ و استحکام مورد مشاهده و یادداشت برداری قرار گرفتند. تجزیه واریانس برای تغییر در مقدار وزن کالوس‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با استفاده از نرم افزار آماری SAS به انجام رسید. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) انجام شد.

جهت بررسی تأثیر BAP و کینتین در میزان ریخت‌زایی و باززایی در هویج، کالوس‌های تولید شده در مرحله قبل به محیط‌های جدید MS و MSm که به‌صورت جداگانه شامل تنظیم‌کننده‌های رشدی BAP با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و Kinetin با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بودند انتقال پیدا کردند. مشابه با آزمایش قبل، تعداد ده قطعه کالوس در هر پتری دیش قرار گرفت و هر تیمار ۳ مرتبه تکرار شد. پس از گذشت ۱ ماه تعداد جنین‌های سوماتیکی، شاخساره و ریشه شمارش گردید. برآورد درصد ریخت‌زایی و جنین‌زایی و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار Excel 2007 به انجام رسید.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس وزن کالوس نشان داد که میانگین وزن کالوس در دو محیط MS و MSm و بین غلظت‌های مختلف 2,4-D و نیز بین ارقام، دارای تفاوت معنی‌داری بودند (جدول۱). مقایسه میانگین‌ها (جدول۲) نشان می‌دهد که میانگین وزن کالوس در محیط کشت MSm (۴۲/۸ میلی‌گرم) از محیط کشت MS (۳۹/٦ میلی‌گرم) بیشتر است. تفاوت اصلی بین این دو محیط کشت، وجود کازئین هیدرولیز شده (به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت MSm است. کازئین هیدرولیز شده می‌تواند به عنوان یک منبع کلسیم، فسفات، ویتامین‌ها و مهمتر از همه ترکیبی شامل ۱۸ اسید آمینه مختلف باشد. کازئین هیدرولیز شده برای اصلاح وضعیت رشد در کشت تعلیقی، کشت کالوس، کشت شاخساره و جنین‌زایی سوماتیکی بسیار موثر است (۷). در محیط کشت MSm نه تنها شروع کالوس‌دهی و تکثیر آن بهتر از محیط MS بود بلکه درصد تولید کالوس ریخت‌زا در همه ارقام بیشتر بود (جدول ۳). مقدار رشد کالوس همچنین تحت تأثیر غلظت-های مختلف 2,4-D در محیط کشت می‌باشد. به طور کلی در این آزمایش استفاده از سطوح بالای 2,4-D منجر به تولید حجم بیشتری از کالوس شده است (٤٦/۵ میلی‌گرم)، اما بر اساس نتایجی که در جدول ۳ نشان داده شده است، تولید کالوس ریخت‌زا در این شرایط نسبت به غلظت‌های دیگر این ماده کمتر بود. میانگین وزن کالوس در محیط حاوی ۰/۲ میلی‌گرم2,4-D برابر ۳۷/۱ میلی‌گرم بود، که کمترین مقدار تولید کالوس در مقایسه با غلظت‌های دیگر این ماده است، اما درصد کالوس ریخت‌زا تولید شده

1- Murashige and Skoog
2- MS Masuda

جدول ۱- تجزیه واریانس وزن کالوس‌های تکثیر یافته در دو محیط کشت و تحت تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D در چهار رقم هویج

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
بلوک	۲	۹۴/۵*
محیط کشت	۱	۱۷۲/۰۵**
تنظیم کننده رشد	۲	۵۵۸/۶**
رقم	۳	۱۸۶/۵**
محیط کشت × تنظیم کننده رشد	۲	۱۶/۶ ns
محیط کشت × رقم	۳	۲۷ ns
تنظیم کننده رشد × رقم	۶	۳/۶۹ ns
محیط × تنظیم کننده رشد × رقم	۶	۲/۵ ns
اشتباه آزمایشی	۴۶	۳/۹

*و** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد، ns : غیر معنی‌دار

بیشترین مقدار بود. شرایط مشابهی برای مقدار کالوس ریخت‌زا در هر رقم وجود داشت. ریز نمونه‌هایی که از رقم نانتس ایمپرود در محیط کشت MSm حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D قرار داده شده بودند، بیشترین مقدار کالوس ریخت‌زا برابر با ۹۰ درصد را تولید نمودند (جدول ۳). این مقدار خیلی بیشتر از مقدار کالوس ریخت‌زا تولید شده در شرایط مشابه اما با غلظت 2,4-D برابر با ۱ میلی‌گرم در لیتر بود (۵۰ درصد). مقدار تکثیر کالوس به نوع رقم نیز وابسته بود. به عنوان مثال جدول ۲ نشان می‌دهد که ارقام ویلمورن و نانتس ایمپرود، به ترتیب حداکثر و حداقل مقدار کالوس را تولید نمودند (٤٤/٤ و ۳۷/۷ میلی‌گرم)، اما مقدار کالوس ریخت‌زا تولید شده در رقم نانتس ایمپرود در مقایسه با رقم ویلمورن در همه محیط‌ها بیشتر بود (جدول ۳). تفاوت‌های موجود بین ارقام از نظر میزان تولید کالوس در گیاهان دیگر نیز گزارش شده است (۲٦ و ۱۷).

اثر 2,4-D در تولید کالوس ریخت‌زا توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است. ریبینسکی و همکاران (۱۹۹٦) نشان داد که در گیاه هویج، استفاده از این تنظیم کننده رشد منجر به القاء ریخت‌زایی شد. ادوین و همکاران (۲۰۰۸) خاطر نشان کردند که در اثر کشت ریزنمونه‌های گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) در محیط کشت حاوی 2,4-D کالوس شروع به رشد و تکثیر نموده، اما توانایی ریخت‌زایی آنها در صورتی که به مدت زمان طولانی در این محیط نگهداری شوند از بین رفته و در نهایت پس از گذشت ۸-٦ ماه، توانایی باززایی به طور کامل از بین می‌رود. فوجیمارا و کومامین (۱۹۷۹) و دِوریس و همکاران (۱۹۸۸) گزارش نمودند که در گیاه هویج، سلول‌های جنین‌زا می‌توانند از ریزنمونه‌های محور زیر لپه در حضور 2,4-D بدست آیند. آزمایشی توسط دینگو (۱۹۹٤) با استفاده از غلظت‌های مختلف 2,4-D جهت بررسی اثر این ماده در تولید کالوس ریخت‌زا در برنج انجام شد. وقتی که از 2,4-D در محیط کشت استفاده نشد، پاسخی از طرف ریزنمونه‌ها مشاهده نشد. وقتی غلظت این ماده برابر ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بود، کالوس‌های غیر جنین‌زا تشکیل شدند و زمانی که غلظت آن برابر ۰/۲ یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بود، شرایط حد واسطی بین تولید جوانه‌ها و تولید کالوس مشاهده شد.

جدول ۲- مقایسه میانگین وزن کالوس (میلی‌گرم) برای محیط های کشت، غلظت‌های مختلف 2,4-D و چهار رقم هویج

رقم		2,4-D		محیط کشت	
نام رقم	وزن کالوس	غلظت	وزن کالوس	نوع	وزن کالوس
مونارچ	۳۹/۴ b	۰/۲	۳۷/۱ c	MS	۳۹/۶ b
نانتس ایمپرود	۳۷/۷ b	۰/۵	۴۰ b	MSm	۴۲/۸ a
تم تم	۴۳/۵ a	۱	۴۶/۵ a		
ویلمورن	۴۴/۴ a				

* اعداد هر ستون که دارای حرف مشابه باشند، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد (آزمون LSD) ندارند

جدول ۳- تولید کالوس ریخت‌زا در چهار رقم هویج در محیط in vitro

رقم	محیط کشت	غلظت 2,4-D (میلی‌گرم در لیتر)	کالوس مورفوژن
مونارچ	MS	۰/۲	۷۰ ± ۸/۴
		۰/۵	۴۳ ± ۹/۰
		۱	۴۰ ± ۸/۹
	MSm	۰/۲	۸۳ ± ۶/۸
		۰/۵	۵۰ ± ۹/۱
		۱	۴۷ ± ۹/۱
نانتس ایمپرود	MS	۰/۲	۷۷ ± ۷/۶
		۰/۵	۶۰ ± ۸/۹
		۱	۴۳ ± ۹/۰
	MSm	۰/۲	۹۰ ± ۵/۵
		۰/۵	۶۰ ± ۸/۹
		۱	۵۰ ± ۹/۱
تم تم	MS	۰/۲	۶۳ ± ۸/۸
		۰/۵	۵۰ ± ۹/۱
		۱	۳۴ ± ۸/۷
	MSm	۰/۲	۷۳ ± ۸/۱
		۰/۵	۵۳ ± ۹/۱
		۱	۴۰ ± ۸/۹
ویلمورن	MS	۰/۲	۴۷ ± ۹/۱
		۰/۵	۴۰ ± ۸/۹
		۱	۳۰ ± ۸/۴
	MSm	۰/۲	۶۷ ± ۸/۶
		۰/۵	۵۰ ± ۹/۱
		۱	۴۰ ± ۸/۹

LSD $_{۰/۰۱}$= ۱۸/۷ و LSD $_{۰/۰۵}$ = ۱۴/۰۴

اگما و همکاران (۲۰۰۷) همچنین گزارش نمودند که غلظت 2,4-D مورد استفاده در محیط کشت، به طور معنی‌داری تولید، نوع و کیفیت کالوس‌های تشکیل شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد. آنها متوجه شدند که غلظت مطلوب این تنظیم کننده رشد زمانی که در سطوح پائین استفاده می‌شود موثرتر است. رازکریشنان و همکاران (۲۰۰۱) همچنین اظهار نمودند که غلظت بالای 2,4-D به طور فعالی علائم کشندگی از خود نشان داده و بنابراین فرایند تولید کالوس را کاهش می‌دهد.

باززایی

نتایج بدست آمده نشان داد که بین محیط‌ها از نظر میزان ریخت‌زایی و جنین‌زایی در شرایط مختلف تفاوت معنی‌دار وجود دارد و محیط کشت MSm نسبت به محیط کشت MS از این نظر موثرتر بوده است (جدول ٤ و ٥). تقریباً در همه موارد، درصد کالوس ریخت‌زا که در محیط کشت MSm رشد کرده بود از محیط کشت MS بیشتر بود. شرایطی که کالوس‌ها در آن رشد می‌کنند، توانایی باززایی آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بیشترین مقدار ریخت‌زایی (۸۲/۸ درصد) زمانی بدست آمد که کالوس‌های تکثیر شده از رقم نانتس ایمپرود در محیط کشت MSm حاوی تنظیم کننده رشد 2,4-D (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) به محیط کشت MSm حاوی کینتین (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) انتقال پیدا نمودند. وقتی به جای استفاده از MSm از محیط کشت MS استفاده شد این مقدار به ٦٥ درصد کاهش یافت. با مقایسه تعداد اندام تولید شده در هر کالوس و درصد کالوس‌های

جدول٤ - تجزیه واریانس ریخت‌زایی ارقام هویج تحت تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D و دو نوع سیتوکنین در محیط‌های کشت مختلف

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
بلوک	۲	۰/۰۰۱ns
ژنوتیپ	۳	۰/۵۸**
محیط کشت	۱	۰/۶۱**
اکسین	۲	۱/۳۹**
سیتوکنین	۱	۷/۹۳**
ژنوتیپ × محیط	۳	۰/۰۵*
ژنوتیپ × اکسین	۶	۰/۰۴۶**
ژنوتیپ × سیتوکنین	۳	۰/۱۱**
محیط × اکسین	۲	۰/۰۱۲ns
محیط × سیتوکنین	۱	۰/۰۲۷ ns
سیتوکنین × اکسین	۲	۰/۴۳**
ژنوتیپ × محیط × اکسین	۶	۰/۰۵**
ژنوتیپ × محیط × سیتوکنین	۳	۰/۰۲۸ ns
ژنوتیپ × اکسین × سیتوکنین	۶	۰/۰۳ ns
محیط × اکسین × سیتوکنین	۲	۰/۰۰۸**
ژنوتیپ × محیط × اکسین × سیتوکنین	۶	۰/۰۴۳*
خطا	۹۴	۰/۰۱۴

جنین‌زا در این دو تیمار، تفاوت‌ها بیشتر آشکار شدند. تعداد اندام تولید شده در هر کالوس به طور متوسط ۳/۱۷ و ۲/۵۳ به ترتیب برای محیط های کشت MSm و MS بود. همچنین درصد کالوس‌های جنین‌زا برای این دو نمونه به ترتیب برابر ۷۳/۳ و ۵۳/۳ بود. نتایج مشابهی برای دیگر تیمارها و در ارقام دیگر وجود دارد. می‌توان نتیجه گرفت که محیط کشت MSm تأثیر مستقیمی بر افزایش پتانسیل ریخت‌زایی و جنین‌زایی در گیاه هویج به خاطر دارا بودن کازئین هیدرولیز شده دارد (جدول ۵ و ٦).

در تحقیقی توسط چاند و روی (۱۹۸۱) نشان داده شده است که افزودن کازئین هیدرولیز شده به محیط کشت MS، برای تشکیل شاخساره از کالوس‌ها ضروری است. کشت تعلیقی سلول‌های هویج در محیطی که حاوی کازئین هیدرولیز شده به عنوان تنها منبع نیتروژن بود باعث تولید جنین‌های سوماتیکی شد (۱). هرچند گزارش‌های بسیاری در مورد القاء جنین‌زایی با افزودن کازئین هیدرولیز شده به محیط کشت وجود دارد، در بیشتر موارد تشکیل کالوس جنین‌زا یا تشکیل جنین‌های سوماتیکی در غیاب این منبع اسید آمینه امکان پذیر نیست (۱۸ و ۲۲).

تأثیر مثبت استفاده از غلظت‌های پائین‌تر 2,4-D در مراحل اولیه کالوس‌دهی، بر میزان ریخت‌زایی و جنین‌زایی در مراحل بعد به وضوح در جدول ٤ و ۵ قابل مشاهده است. تقریباً در همه ارقام و محیط‌های کشت، وقتی 2,4-D با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر جهت تولید کالوس و کینتین با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در مرحله باززایی مورد استفاده قرار گرفتند درصد کالوس ریخت‌زا، جنین‌زا و تعداد اندام در کالوس بیشترین مقدار خود را دارا بودند. به طور کلی، غلظت‌های بالای 2,4-D در محیط کشت، باعث کاهش توانایی باززایی شد. علاوه بر این، BAP نسبت به کینتین از نظر القا جنین‌زایی دارای تأثیر کمتری بود. کمترین مقدار ریخت‌زایی (۱٦/۷ درصد) در رقم ویلمورن در شرایطی که 2,4-D با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و BAP با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفتند مشاهده شد. استفاده از کینتین به جای BAP در این تیمار، منجر به تولید کالوس ریخت‌زا با فراوانی ۵۳/۳ درصد و افزایش جنین‌زایی از ۳/۳ درصد به ۳۰ درصد شد. حداقل تعداد اندام تولید شده در هر کالوس (۰/۱) در رقم تم تم بود که در آن کالوس‌های تکثیر یافته در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به محیط کشت MS حاوی BAP انتقال یافتند. بیشترین تعداد اندام در کالوس (۳/۱۷) در رقم نانتس ایمپرود بدست آمد که در آن جهت شروع و تکثیر کالوس‌ها از تنظیم کننده رشد 2,4-D با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد و سپس کالوس‌ها به محیط جدید حاوی کینتین با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر انتقال یافتند.

استفاده از 2,4-D در غلظت پائین برای تولید کالوس و القاء جنین‌زایی و کینتین جهت باززایی، در هویج و دیگر گیاهان گزارش شده است. سیلورتند و همکاران (۱۹۹٦) بیان نمودند که در تره فرنگی (*Allium ampeloprassum* L.)

جدول ۵- مقایسه میانگین درصد ریخت‌زایی برای محیط‌های کشت، غلظت‌های مختلف 2,4-D، دو نوع سیتوکنین و چهار رقم هویج

رقم		2,4-D		محیط کشت		سیتوکنین	
نام رقم	درصد	غلظت	درصد	نوع	درصد	نوع	درصد
مونارچ	۳۵/۳ c	۰/۲	۵۱/۴ a	MS	۳۹/۷ b	BAP	۳۰/۵ b
نانتس ایمپرود	۵۲/۵ a	۰/۵	۴۱/۵ b	MSm	۴۸/۷ a	Kinetin	۵۳/۶ a
ویلمورن	۴۳/۳ b	۱	۳۱/۱ c				
تم تم	۳۳/۲ c						

* اعداد هر ستون که دارای حرف مشابه باشند، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد (آزمون LSD) ندارند

غلظت‌های بالای 2,4-D باعث تولید کالوس نرم و آبکی می‌شود در صورتی که غلظت‌های پائین، کالوس فشرده را تولید می نمایند. کومامین و همکاران (۱۹۹۰) تشریح نمودند که استفاده از غلظت ۰/۰۵ میکرومولار از 2,4-D در گیاه هویج به مدت ٦ روز برای القاء تولید سلول‌هایی با توانایی تولید جنین‌های سوماتیکی ضروری است و بیش از این مدت، نقش بازدارندگی دارد. ساتوه و همکاران (۱۹۸٦) محور زیر لپه‌های یک هفته‌ای هویج را برای تولید کالوس در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر از 2,4-D قرار دادند و سپس آنها را به محیط کشت جدید برای باززایی انتقال دادند. تشکیل جنین‌های سوماتیکی در غلظت ۱ میکرومولار از 2,4-D بیشتر از غلظت ۰/۱ میکرومولار کاهش یافت، و غلظت ۱۰ نانومولار از این ماده، عامل بازدارنده در تشکیل جنین‌ها نبود. اگما و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که در سیب زمینی شیرین، القاء کالوس با استفاده از غلظت‌های پائین تنظیم کننده رشد 2,4-D (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) موثر بود، اما استفاده از سطوح بالای این تنظیم کننده رشد (بالاتر از ۳ میلی‌گرم در لیتر) کمیت و کیفیت کالوس‌های جنین‌زا را به طور معنی‌داری کاهش داد.

نوع سیتوکنین و نقش آن در ریخت‌زایی اساساً به گونه گیاهی وابسته است. هالپرین و وترل (۱۹٦٤) نشان دادند که در کشت بافت هویج کینتین با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر می‌تواند در محیط‌های کشت مختلف برای تحریک جنین‌زایی مورد استفاده قرار گیرد. شاری و همکاران (۲۰۰٦) گزارش نمودند که در زیتون تلخ (*Melia azedarach*)، 2,4-D نقشی در تولید کالوس ریخت‌زا ندارد و BAP برای اندام‌زایی مناسب‌تر از تنظیم کننده رشد کینتین (که تنها باعث القاء کالوس‌های غیر اندام‌زا شد) می باشد. این نتیجه مشابه نتایج بدست آمده توسط دریو (۱۹۹٦) برای درخت چریش (*Azadirachta indica* Juss.) است. در این تحقیقات نیز کینتین فقط باعث تولید کالوس‌های غیر اندام‌زا شد. گزارشاتی نیز مبنی بر دخالت سیتوکینین‌ها در القاء یا شروع رشد ریشه وجود دارد (۱٦) در اغلب گزارشات، فقط مقادیر اندک سیتوکینین موثر بوده است. به عنوان مثال، شاخساره‌های چغندرقند می‌توانند در محیط کشت MS که حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین بود بدون استفاده از هیچگونه اکسینی تولید ریشه نمایند (۱۳).

در این آزمایش، تعداد ۲۷۱ گیاهچه سبز، زنده و سازگار به شرایط طبیعی باززایی شد (جدول ٦). ارقام نانتس ایمپرود، تم تم، ویلمورن و مونارچ به ترتیب ۳۳/۵، ۲۲/۵، ۲۲/۱ و ۱۸/۸ درصد از این گیاهچه ها را دارا بودند. همانطور که در مباحث قبل ذکر شد رقم نانتس ایمپرود دارای توانایی تولید بیشترین مقدار کالوس ریخت‌زا و نیز بیشترین توانایی باززائی بود. بنابراین می‌توان رقم نانتس ایمپرود را به عنوان یک رقم مناسب برای انجام تحقیقات دیگر در زمینه کشت بافت هویج معرفی نمود. هفتاد و چهار درصد از گیاهان باززایی شده از جنین‌ها حاصل شدند که در نتیجه استفاده از 2,4-D در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر و کینتین با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر برای حصول تعداد کافی از گیاهچه ها، طی فرایند جنین‌زایی سوماتیکی در آزمایش‌های کشت بافت هویج توصیه می‌شود.

جدول ٦- اثر نوع رقم، محیط کشت، هورمون های 2,4-D، BAP و Kinetin بر مورفوژنی و باززایی در هویج

رقم	محیط کشت	غلظت 2,4-D (میلی‌گرم در لیتر)	نوع سیتوکینین	ریخت‌زایی (٪)	تعداد اندام در کالوس	جنین‌زایی (٪)	تعداد گیاهچه‌های باززایی شده
تم تم	MS	۰/۲	BAP	۳۶/۷ ± ۸/۸	۰/۶۷	۶/۷۰ ± ۴/۶	۳
			Kinetin	۴۹/۴ ± ۹/۱	۱/۲۷	۳۸/۸ ± ۸/۹	۸
		۰/۵	BAP	۲۰/۰ ± ۷/۳	۰/۵۰	۰	۲
			Kinetin	۴۳/۳ ± ۹/۰	۰/۹۷	۳۰/۰ ± ۸/۴	۷
		۱	BAP	۶/۷۰ ± ۴/۶	۰/۱۰	۰	۰
			Kinetin	۴۰/۱ ± ۸/۹	۱/۰۰	۲۶/۷ ± ۸/۱	۶
	MSm	۰/۲	BAP	۴۰/۲ ± ۹/۰	۰/۹۷	۶/۷۰ ± ۴/۶	۷
			Kinetin	۷۰/۰ ± ۸/۴	۲/۱۰	۵۶/۷ ± ۹/۰	۱۲
		۰/۵	BAP	۳۲/۲ ± ۸/۵	۰/۵۷	۶/۷۰ ± ۴/۶	۳
			Kinetin	۵۶/۶ ± ۹/۰	۱/۵۳	۴۳/۳ ± ۹/۰	۸
		۱	BAP	۲۳/۳ ± ۷/۷	۰/۳۷	۳/۳۰ ± ۳/۳	۲
			Kinetin	۳۶/۷ ± ۸/۸	۰/۶۰	۲۳/۳ ± ۷/۷	۳
مونارچ	MS	۰/۲	BAP	۳۰/۰ ± ۸/۴	۰/۵۳	۶/۷۰ ± ۴/۶	۲
			Kinetin	۵۵/۰ ± ۹/۱	۲/۰۳	۴۴/۳ ± ۹/۱	۸
		۰/۵	BAP	۲۳/۳ ± ۷/۷	۰/۵۷	۳/۳۰ ± ۳/۳	۲
			Kinetin	۴۵/۶ ± ۹/۱	۱/۱۰	۳۰/۰ ± ۸/۴	۷
		۱	BAP	۱۳/۳ ± ۶/۲	۰/۳۰	۰	۱
			Kinetin	۳۶/۷ ± ۸/۸	۰/۹۰	۲۲/۴ ± ۷/۶	۳
	MSm	۰/۲	BAP	۳۳/۰ ± ۸/۶	۰/۵۳	۶/۷۰ ± ۴/۶	۳
			Kinetin	۶۹/۰ ± ۸/۴	۱/۴۷	۵۶/۶ ± ۹/۰	۸
		۰/۵	BAP	۲۸/۰ ± ۸/۲	۰/۷۷	۶/۷۰ ± ۴/۶	۳
			Kinetin	۵۵/۵ ± ۹/۱	۱/۳۳	۴۰/۰ ± ۸/۹	۶
		۱	BAP	۲۶/۷ ± ۸/۱	۰/۵۷	۳/۳۰ ± ۳/۳	۲
			Kinetin	۵۰/۰ ± ۹/۱	۱/۱۰	۳۰/۰ ± ۸/۴	۶
نانتس ایمپرود	MS	۰/۲	BAP	۴۶/۰ ± ۹/۱	۰/۸۰	۶/۷۰ ± ۴/۶	۵
			Kinetin	۶۵/۰ ± ۸/۷	۲/۵۳	۵۳/۳ ± ۹/۱	۱۰
		۰/۵	BAP	۴۳/۲ ± ۹/۰	۰/۷۳	۱۰/۰ ± ۵/۵	۵
			Kinetin	۵۲/۰ ± ۹/۱	۱/۴۷	۴۳/۳ ± ۹/۰	۷
		۱	BAP	۴۰/۳ ± ۹/۰	۰/۶۰	۳/۳۰ ± ۳/۳	۳
			Kinetin	۴۵/۴ ± ۹/۱	۱/۰۳	۳۶/۷ ± ۸/۸	۶
	MSm	۰/۲	BAP	۵۶/۷ ± ۹/۰	۱/۲۳	۱۰/۰ ± ۵/۵	۸
			Kinetin	۸۲/۸ ± ۶/۹	۳/۱۷	۷۳/۳ ± ۸/۱	۱۴
		۰/۵	BAP	۴۵/۵ ± ۹/۱	۱/۰۷	۶/۷۰ ± ۴/۶	۷
			Kinetin	۷۱/۳ ± ۸/۳	۱/۸۳	۶۲/۶ ± ۸/۸	۱۱
		۱	BAP	۳۹/۳ ± ۸/۹	۰/۷۰	۱۰/۰ ± ۵/۵	۵
			Kinetin	۶۰/۰ ± ۸/۹	۱/۸۷	۴۶/۷ ± ۹/۱	۱۰
ویلمورن	MS	۰/۲	BAP	۴۲/۵ ± ۹/۰	۰/۳۰	۶/۷۰ ± ۴/۶	۱
			Kinetin	۶۲/۳ ± ۸/۸	۱/۹۰	۳۶/۷ ± ۸/۸	۱۱
		۰/۵	BAP	۳۵/۰ ± ۸/۷	۰/۲۷	۳/۳۰ ± /۳/۳	۲
			Kinetin	۴۶/۷ ± ۹/۱	۱/۰۰	۲۸/۲ ± ۸/۲	۹
		۱	BAP	۳۴/۰ ± ۸/۶	۰/۲۳	۳/۳۰ ± ۳/۳	۱
			Kinetin	۴۰/۰ ± ۸/۹	۱/۰۰	۲۳/۳ ± ۷/۷	۷
	MSm	۰/۲	BAP	۴۷/۰ ± ۹/۱	۰/۷۳	۱۰/۰ ± ۵/۵	۶
			Kinetin	۷۱/۳ ± ۸/۳	۲/۳۳	۵۳/۳ ± ۹/۱	۱۲
		۰/۵	BAP	۴۰/۳ ± ۹/۰	۰/۳۳	۶/۶۰ ± ۴/۶	۱
			Kinetin	۶۲/۳ ± ۸/۸	۱/۴۳	۴۴/۴ ± ۹/۱	۹
		۱	BAP	۱۶/۷ ± ۶/۸	۰/۲۳	۳/۳۰ ± ۳/۳	۱
			Kinetin	۵۳/۳ ± ۹/۱	۱/۲۳	۳۰/۰ ± ۸/۴	۸
			LSD ./۰۵	۱۰/۲	۰/۱۹	۱۴/۱	
			LSD./۰۱	۱۲/۱	۰/۲۵	۱۷/۰۲	

منابع

1- Anderson, J. O., 1976. Embryogenesis in wild carrot cells. In Vitro, 12: 332-339.

2- Asemota O., R. E. Chukwuemeka and O.O. Joshua, 2007. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. African Journal of Biotechnology, 6: 2353-2357.

3- Chand S. and S. C. Roy, 1981. Induction of organogenesis in callus cultures of *Nigella sativa* L. Ann. Bot., 48: 1-4.

4- De Vries S. C., H. Booij, P. Meyerink, G. Huisman, D. H. Wilde, T. L. Thomas and A. Van Kamen, 1988. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension culture. Planta, 176: 196-204.

5- Dinghou L., 1994. Some regulations of somatic embryogenesis and organogenesis in indica rice. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2: 70-78.

6- Drew R., 1996. Clonal propagation of neem by tissue culture. In: Sing R. P. Chari M. S. Raheja A. K. Kraus W. (eds.), Neem and environment, Science Publishers, Inc., Lebanon, New Hampshire, 999-1005.

7- Edwin F. G., A. H. Micheal and D.K. Geert-Jan, 2008. Plant propagation by tissue culture. 3rd Edition, Volume 1, The Background. Springer, Netherland.

8- Fujimura T. and A. Komamine, 1979. Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Z. Pflanzenphysiol, 95: 13-19.

9- Halperin W. and D. F. Wetherell, 1964. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot (*Daucus carota* L). Am. J. Bot., 51: 274-283.

10- Harisha, S., 2001. Biothechnology procedures and experiments handbook, Infinity Science Press LLC, Hingham, Massachusetts.

11- Kalashnikova E. A., 2003. Cell selection of plants on resistance to fungous diseases. Authoref. of the doctor thesis, Moscow, 50 p.

12- Komamine A., M. Matsumoto, M. Tsukahara, A. Fujiwara, R. Kawahara, M. Ito, J. Smith, K. Nomura and T. Fujimura, 1990. Mechanism of somatic embryogenesis in cell cultures. in Physiology, Biochemistry and Molecular biology (eds. Nijkamp et al.): 307-313.

13- Konwar B. K. and R. H. A. Coutts, 1990. Rapid regeneration of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants from in vitro cultures. in Physiology, Biochemistry and Molecular biology (eds. Nijkamp et al.): 114-118.

14- Masuda K., Y. Kikuta, Y. Okazava, 1981. A revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension culture. J. Fac. Agr., 60: 183-193.

15- Murashige T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 473-497.

16- Nemeth G., 1979. Benzyladenine-stimulated rooting in fruit-tree rootstocks cultured in vitro. Z. Pflanzenphysiol, 95: 389-396.

17- Oggema J. N., M. G. Kinyua and J. P. Ouma, 2007. Optimum 2,4-D concentration suitable for embryogenic callus induction in local Kenyan sweet potato cultivars. Asian Journal of Plant Sciences, 6 (3): 484-489.

18- Osifo F. O., 1988. Somatic embryogenesis in Dioscorea. J. Plant Physiol., 133: 378-380.

19- Polyakov A. V. 2005. Regenerant obtaining of vegetable crops and its propagation in vitro. Methodical recommendation. Moscow: RAAS. 27 p.

20- Polyakov A. V. and O. F. Chikrizova, 2009. Cell selection of carrot (*Daucus carota* L.) on resistanse to biotic stresses. Research parers on vegetable crop production, Moscow: ARRIVC, pp. 484-488.

21- Radhakrishnan T., T. G. K. Murthy, K. Chandran and A. Banyopadhyay, 2001. Somatic Embryogenesis in Arachis hypogaea. Aust. J. Bot., 49: 753-759.

22- Radojevic L., 1988. Plant regeneration of Aesculus hippocastanum L. (*Horse chestnut*) through somatic embryogenesis. J. Plant Physiol., 132: 322-326.

23- Ribnicky D. M., N. Ilic, J. D. Cohen and T. J. Cooke, 1996. The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism, the implications for carrot somatic embryogenesis. Plant Physiol., 112: 549-558.

24- Satoh S, H. Kamada, H. Harada and T. Fujii 1986. Auxin-controlled glycoprotein release into the medium of embryogenic carrot cells. Plant Physiol., 81:931-933.

25- Sharry S., J. L. Cabrera Ponce, L. H. Estrella, R. M. Rangel Cano, S. Lede and W. Abedini, 2006. An alternative pathway for plant in vitro regeneration of chinaberry tree Melia azedarach L. derived from the induction of somatic embryogenesis. Electronic Journal of Biotechnology, 9(3) Special Issue.

26- Silvertand B., A. Rooyen, P. Van Lavrjsen, A. M. Harlem and E. Van Jacobsen 1996. Plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures derived from mature zygotic embryos of leek (*Allium ampeloprassum* L.). Euphytica, 71: 261-270.

27- Tiwari S. and R. Tuli 2007. Factors promoting efficient in vitro regeneration from de-embryonated cotyledon explants of Arachis hypogaea L. Plant CellT Tissue and Organ Culture, 92: 15-24.

28- Tukavin G. B. and N. A. Shmikova, 2000. Mothodical recommendations on double haploid production by androgenesis method. Moscow: Academy of agricultural sciences. 56 p.

29- Zhang C., Q. Li and L. Kong 2007. Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine (*Pinus bungeana*), Plant Cell Tissue and Organ Culture, 91: 273-280.

30- Zhao P., W. Wang Feng, F.SH. Wu, F. Yang and W. Wang 2007. High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in Dendrobium Candidum Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 90:131–139.

Optimization of conditions for morphogenic callus production and regeneration of carrot (*Daucus carota* L.)

K. rabiei[1,*], M. Khodambashi[1], and M. Omidi[2]

1. Department of Biotechnology and Plant Breeding, Shahrekord University
2. Associate Professor of Plant Breeding, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Shahrekord University
3. Professor Molecular Genetics and Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran

Received: 03/13/2010
Accepted: 12/25/2010

Abstract

Experiments were carried out for optimization of conditions for morphogenic callus production and regeneration of carrot (*Daucus carota* L.) using four cultivated cultivars in Iran. Hypocotyl segments were cultured on medium supplemented with 0.2 mg/l 2,4-D for callus initiation and proliferation. Small portions of calli (25 mg) were cut and transferred to new media with different concentrations of 2,4-D including 0.2, 0.5 and 1 mg/l. Results showed that low level of 2,4-D was more effective in morphogenic callus production although its high concentrations caused more callus growth. Kinetin in concentration of 0.1 mg/l was also more effective for regeneration than benzyl amino purine (1 mg/l), especially according to embryoid production. MS and MSm media were used in the experiments to identify the differences between these two media according to callus, embryoid and plantlet production. Obtained results showed that MSm is more useful than MS medium for callus production and regeneration of carrot plantlets. Among tested cultivars improved Nantes had more capability to produce viable plantlets.

Keywords: BAP, carrot (*Daucus carota*), kinetin, 2,4-D

∗ Corresponding author E-mail: k_rabiei@yahoo.com