علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۵، شمارۀ ۴، زمستان ۱۳۹۳ (ص ۴۸۴-۴۷۵)

معرفی پروتکل تجاری به‌منظور ازدیاد درون‌شیشه‌ای کلم زینتی *Brassica oleracea* var. acephala

مینا تقی‌زاده[1*] و موسی سلگی[2]
۱ و ۲. استادیاران، دانشکدۀ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۱/۱۲)

چکیده

طی سالیان اخیر کلم زینتی به‌دلیل داشتن اندام‌های هوایی رنگی بادوام و مقاومت خوب به شرایط محیطی در فضای سبز بسیار استفاده می‌شود. بنابراین، ازدیاد درون‌شیشه‌ای کلم زینتی در چند آزمایش مطالعه شد. غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (۰/۱mg/L، ۰/۵ و ۱)، 2,4-D (۰/۱mg/L، ۰/۵)، نیترات نقره (۲و۴ mg/L) و نوع رقم (بنفش و سفید) در مرحلۀ استقرار به‌کار گرفته شد. همچنین تیمارهای مرحلۀ پرآوری شامل بنزیل آدنین (۰/۱mg/L و ۰/۵) و ایندول بوتیریک اسید (۰/۱mg/L و ۰/۵) بود. سازگاری گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای در مرحلۀ سازگاری با استفاده از غلظت‌های مختلف MS و عصارۀ ورمی کمپوست (کامل و یک دوم) اجرا شد. نتایج نشان داد کاربرد ۰/۱ mg/L بنزیل آدنین به همراه ۱ mg/ L 2,4-D بازززایی قابل قبولی را در این گیاه زینتی فراهم می‌آورد. محیط کشت پرآوری تکمیل‌شده با۰/۵ mg/L از بنزیل آدنین و ایندول بوتیریک اسید سبب توسعۀ شاخساره‌ها شد. سرانجام گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای با انتقال به محیط کشت MS تقلیل‌یافته به‌طور موفقیت‌آمیزی سازگار شدند. به‌طورکلی، در این پژوهش با استفاده از محیط کشت نسبتاً کم‌هزینه، در دسترس و حداقل غلظت تنظیم‌کننده‌های بازززایی موفقیت‌آمیز کلم زینتی به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: بازززایی درون‌شیشه‌ای، تنظیم‌کننده‌های رشد، کلم زینتی.

مقدمه

یکی از جنبه‌های مهم تکنیک‌های بیوتکنولوژی گیاهی، کشت سلول، بافت و اندام‌های گیاهی در محیط درون‌شیشه‌ای است. فن‌آوری کشت درون‌شیشه‌ای با تکمیل‌کردن روش اصلاح سنتی به‌منظور دست‌ورزی و بهبود گیاهان بسیار استقبال شده است (Gaspar *et al.*, 1996). همچنین کشت‌های سلول و بافت گیاهی ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردی بوده است و کاربردهای تجاری زیادی دارند. ریزازدیادی از طریق کشت درون‌شیشه‌ای جنبۀ مهمی از کاربردهای این تکنیک بوده است که امروزه در سطح وسیعی برای گونه‌های جنگلی، باغی و به‌ویژه گیاهان زینتی استفاده می‌شود (Rajagopalan, 2000).

جنس کلم (*Brassica*) که شامل بسیاری از گونه‌های گیاهی مهم اقتصادی است امروزه مصارف گسترده‌ای در زمینه‌های مختلف دارند (Warwick, 2011). کلم خوراکی به‌منزلۀ یکی از جنس‌های مهم در خانوادۀ کلم‌ها به‌دلیل تنوع زیاد در کل دنیا پرورش یافته است. این دسته سبزیجات متعلق به جنس *Brassica* و گونۀ *oleracea* هستند که از این گروه می‌توان به کلم بروکلی، کلم قمری، انواع کلم‌پیچ، گل کلم و همچنین واریته‌ای زینتی از این جنس به نام کلم زینتی *Brassica oleracea* var. acephala اشاره کرد. در ایران نیز طی سالیان اخیر کلم زینتی به‌دلیل داشتن اندام‌های هوایی رنگی و بادوام و مقاومت خوب به شرایط بد محیطی به‌ویژه سرما به‌منزلۀ یک گیاه زینتی در فضای سبز بیشتر

* تلفن: ۰۹۱۲۴۶۶۶۱۴۳
E-mail: m-taghizadeh@araku.ac.ir

شهرها مورد توجه زیادی قرار گرفته است. براساس مطالعات انجام‌شده تا کنون در ایران هیچ‌گونه پژوهشی مبنی به بررسی کشت و باززایی درون‌شیشه‌ای کلم زینتی انجام نشده است ولی در سایر کشورها پژوهش‌هایی مبنی بر کشت درون‌شیشه‌ای جنس براسیکا و به‌طور معدودتری کشت گونهٔ کلم زینتی در دسترس است.

رویان‌زایی سوماتیکی یکی از موضوعات مورد توجه پژوهشگران در کشت درون‌شیشه‌ای جنس براسیکا بوده است، میکروسپور یا پرچم به‌منزلهٔ ریزنمونه در روش رویان‌زایی سوماتیکی در بیشتر گونه‌های براسیکا استفاده شده است (Lichter, 1989; Sato *et al*., 1989; Aslam *et al*., 1990; Baillie *et al*., 1992). گزارش‌های اندکی در مورد استفادهٔ سایر ریزنمونه‌ها وجود دارد اما به‌هرحال رویان‌های رویشی از ریزنمونه‌هایی مانند هیپوکوتیل (Kohlenbach *et al*., 1982)، پروتوپلاست (Kranz, 1988) و کوتیلدون‌های نابالغ (Turgut *et al*., 1998) در *B. napus* گزارش شده است. در کلم چینی، رویان‌زایی سوماتیکی از ریزنمونه‌های کوتیلدونی القا شده است (Choi *et al*., 1996). رویان‌های رویشی در گل کلم با استفاده از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل به دست آمده است (Deane *et al*., 1997; Leroy *et al*., 2000). تولید گیاهان هاپلوئید از طریق کشت گرده یا بساک یکی از کاربردهای مهم کشت بافت در به‌نژادی گیاهان ازجمله جنس براسیکاست. Krzyżanowska *et al*. (2006) یک روش کارآمد باززایی گیاه از رویان‌زایی پرچم در کلم پیچ با استفاده از محیط کشت B5 ارائه دادند. در مطالعه‌ای، نمو و توانایی نرزایی ۱۸ ژنوتیپ از کلم زینتی طی کشت پرچم بررسی شده است که در بین آن‌ها شش ژنوتیپ با بیشترین نرخ تولید رویان شناسایی شدند (Kieffer *et al*., 1993). اثر محیط کشت جامد، مرحلهٔ نمو، سن رویان، تیمار سرما و مکمل‌های محیط کشت بر روی باززایی گیاهان حاصل از کشت رویان‌های مشتق‌شده از میکروسپور در چهار هیبرید F1 کلم زینتی نیز مطالعه شد. نتایج نشان داد که تمامی ژنوتیپ‌ها زمانی که در محیط جامد B5 با یک‌درصد آگار کشت شدند، پاسخ خوبی داشتند. همچنین تیمار سرمای چهار درجه به‌طور معناداری نرخ باززایی گیاهان را تا ۷۹ درصد افزایش داد (Wang *et al*., 2011). در آزمایشی دیگر کشت میکروسپور ۲۹ ژنوتیپ از کلم زینتی بررسی شد که نتایج نشان‌دهندهٔ آن بود که تنها در شش ژنوتیپ رویان‌زایی در محیط کشت NLN القا شد (Wei *et al*., 2008).

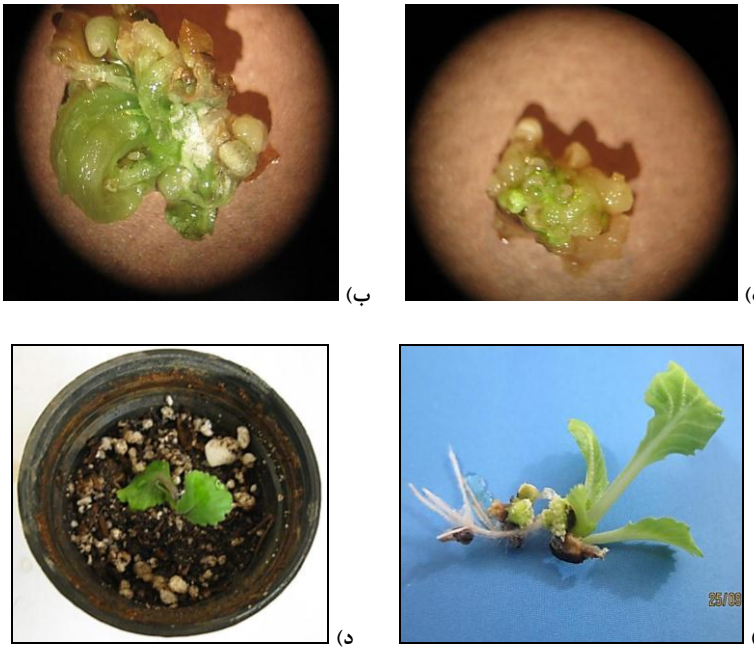
تقریباً تمامی گیاهان تراریخته در فرایندهای کشت بافت ایجاد می‌شوند، بنابراین بهینه‌سازی کشت بافت در گونه‌های گیاهی نقش کلیدی در موفقیت روش‌های انتقال ژن و مطالعات سلولی دارد. امروزه ژنوتیپ‌های متنوعی از کلم زینتی در فضای سبز استفاده می‌شوند. به‌دلیل ارزش اقتصادی این گونه، به‌منظور تسریع برنامه‌های اصلاحی آن یک روش آسان و سریع نیازمند بوده است تا بتوان ارقام جدید را به تقاضاهای بازار برساند. با توجه به اینکه کلم زینتی گیاهی وارداتی و بذر F1 هیبرید آن گران است، بهینه‌کردن شرایط کشت درون‌شیشه‌ای این گیاه زینتی می‌تواند زمینهٔ خوبی را برای تولید انبوه، یکنواخت و پیش‌نیازی برای برنامه‌های به‌نژادی این گیاه زینتی فراهم آورد. درحالی‌که روش‌های ازدیاد درون‌شیشه‌ای نقش مهمی در تجاری‌سازی گیاهان دارد ولی به‌دلیل هزینهٔ زیاد مواد شیمیایی مورد نیاز، توسعه و پژوهش در این زمینه به‌ویژه در کشور ما محدود شده است. بنابراین، در این پژوهش سعی شده است علاوه بر بهینه‌کردن شرایط ازدیاد درون‌شیشه‌ای کلم زینتی، یک روش کارآمد با حداقل هزینه و زمان باززایی معرفی شود.

مواد و روش‌ها

در این طرح از کلم‌های زینتی *Brassica oleracea* var. acephala با نام‌های تجاری Fringed purple (دارای برگ‌های بنفش و چین‌خورده) و Fringed white (دارای برگ‌های سفید ابلق و چین‌خورده) که در اواخر ماه مهر در محل اصلی و فضای باز نشا شده بودند استفاده شد. در نیمهٔ دوم اسفند زمانی که گل‌آذین تازه شکفته شده بود، گل‌آذین‌هایی به طول ۱/۵ـ۲ سانتی‌متر برای نمونه‌گیری انتخاب و به آزمایشگاه برده شد. ابتدا مجموعهٔ گل‌آذین در داخل بشر در زیر آب جاری به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه شست‌وشوی اولیه شدند. سپس در زیر دستگاه لامینار ایرفلو و تحت شرایط استریل با محلول تجاری هیپوکلریت سدیم دارای پنج‌درصد مادهٔ فعال (وایتکس گلرنگ) به غلظت ۱۰۰ درصد و به مدت

زمان ۱۰ دقیقه و سه بار شست‌وشو با آب‌مقطر استریل گندزدایی انجام شد.

در این پژوهش از محیط کشت تجاری MS (شرکت سیگما)، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هشت گرم در لیتر آگار استفاده شد. محیط‌های کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. ریزنمونه‌ها نیز به‌صورت غنچه‌هایی به طول ۲ـ۳ میلی‌متر به همراه قسمت کوتاهی از دمگل برش داده شد و در محیط کشت به‌صورت افقی کشت داده شد و در داخل اتاقک رشد کنترل‌شده با دمای ۲۴±۰/۱ درجهٔ سانتی‌گراد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و شدت نوری معادل ۳ هزار لوکس نگهداری شدند. تیمارهای اعمال‌شده در این پژوهش استفاده از انواع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد و نیترات نقره در مراحل مختلف انگیزش و باززایی کلم زینتی بود. تیمارهای استفاده‌شده در مرحلهٔ اول یا استقرار شامل بنزیل آدنین در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر، 2,4-D در غلظت‌های ۰/۱ و یک میلی‌گرم در لیتر، نیترات نقره در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر و دو نوع رقم تجاری (بنفش و سفید) بود. در مرحلهٔ دوم یا پرآوری تیمارهای بنزیل آدنین در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، ایندول بوتیریک اسید ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اعمال شد. در حدود شش هفته پس از واکشت شاخساره‌های انگیزش‌یافته در محیط کشت پرآوری، آن‌ها به محیط کشت سازگاری منتقل شدند. در مرحلهٔ سوم یا سازگاری گیاهچه‌های تکامل‌یافتهٔ درون‌شیشه‌ای، پرلایت استریل به‌منزلهٔ بستر کشت و محیط MS کامل، یک دوم MS، عصارهٔ کامل ورمی کمپوست و عصارهٔ یک دوم ورمی کمپوست بدون هیچ‌گونه تنظیم‌کنندهٔ رشد بررسی شد. به‌منظور تهیهٔ عصارهٔ ورمی کمپوست نیز ابتدا ورمی کمپوست جامد را به نسبت ۱:۸ با آب‌مقطر ترکیب کردند، به مدت ۲۴ ساعت هوادهی، سپس محلول را از صافی عبور دادند و در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ درصد آن را آماده کردند. گیاهچه‌هایی که در این محیط زنده مانده بودند پس از گذشت سه هفته به‌تدریج با بازکردن درب شیشه‌های کشت به شرایط بیرون سازگار شدند. پس از این مرحله گیاهچه‌ها به‌آرامی از درون ظروف بیرون آورده و ریشه‌های آن‌ها با آب‌مقطر شست‌وشو داده شدند و در بستر کشت خاک باغچه، ورمی کمپوست و پرلایت به نسبت حجمی ۱:۱:۱ منتقل شدند (شکل ۱).



شکل ۱. مراحل باززایی کلم زینتی تحت شرایط درون‌شیشه‌ای

الف) انگیزش کالوس اندام‌زا از ریز نمونه‌های غنچه در محیط کشت MS، ب) تکامل شاخساره‌های انگیزش‌یافته طی مرحلهٔ پرآوری، ج) توسعهٔ گیاهچه‌های کامل درون‌شیشه‌ای، د) انتقال گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای سازگارشده به بستر خاکی

آزمایش‌های بخش استقرار و پرآوری در قالب فاکتوریل بر پایهٔ طرح کاملاً تصادفی (CRD) چندمشاهده‌ای انجام شد که هر تیمار چهار تکرار داشت. تیمارهای مرحلهٔ اول یا استقرار شامل چهار فاکتور بنزیل آدنین (۰/۱mg/L، ۰/۵ و ۱)، 2,4-D (۰/۱mg/L، ۰/۵)، نیترات نقره (۲و۴ mg/L) و نوع رقم (بنفش و سفید) بود. در مرحلهٔ دوم یا پرآوری تیمارها نیز شامل دو فاکتور بنزیل آدنین (۰/۱mg/L و ۰/۵) و ایندول بوتیریک اسید (۰/۱mg/L و ۰/۵) بود. آزمایش بخش سازگاری نیز در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار انجام شد. پس از کشت و اعمال تیمارهای مختلف، میزان نکروزشدن ریزنمونه‌ها، میزان شاخساره‌زایی، کالوس‌زایی، نوع کالوس‌زایی و ریشه‌زایی برای هر تیمار ثبت شد. داده‌ها ابتدا به درصد تبدیل شدند و پس از نرمال‌کردن داده‌های غیرنرمال با استفاده از روش لگاریتم با ANOVA و با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه شدند. آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) برای تعیین معناداربودن تفاوت آماری بین میانگین تیمارها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC انجام شد.

نتایج و بحث

مرحلهٔ استقرار

طی این پژوهش پس از ۱۰ـ۱۲ روز کشت غنچهٔ کلم زینتی در مرحلهٔ استقرار در محیط کشت دارای غلظت‌های مختلف 2,4-D به‌همراه بنزیل آدنین و نیترات نقره، ابتدا انگیزش کالوس در ریزنمونه‌ها از قسمت غنچهٔ گل مشاهده شد که این کالوس‌ها از نظر شکل ظاهری، رنگ و توان باززایی کاملاً از یکدیگر متمایز بودند. این کالوس‌ها به دو دستهٔ کالوس‌های اندام‌زا[1] و کالوس‌های معمولی یا غیراندام‌زا[2] تقسیم‌بندی شدند. کالوس‌های اندام‌زا بافت متراکم و دانه‌ای سفید متمایل به کرم داشتند (شکل۱-الف). کالوس‌های غیراندام‌زا نیز از نظر ظاهری یا به شکل کالوس‌های متراکم سفید یا به شکل کالوس‌های آبکی رنگ‌پریده، شیشه‌ای مشاهده شدند. در کالوس‌های غیرشاخساره‌زا در برخی موارد انگیزش ریشه‌های موئین نیز مشاهده شد. در برخی از تیمارها علاوه بر انگیزش کالوس، رشد و تورم اندام مادگی نیز اتفاق افتاد. همچنین مرگ و نکروزشدن ریزنمونه‌های کشت‌شده در مرحلهٔ استقرار در یک‌سری از تیمارها مشاهده شد.

نتایج جدول تجزیهٔ واریانس در مرحلهٔ انگیزش نشان داد که اثرات متقابل عوامل چهارگانه رقم، غلظت بنزیل آدنین، غلظت 2,4-D، و غلظت نیترات نقره بر صفات کالوس‌زایی، اندام‌زایی، ریشه‌زایی، نکروز و رشد ریزنمونه‌های کلم زینتی معنادار بود که نتایج مقایسهٔ میانگین این فاکتورها در جدول ۱ نشان داده شده است. بیشترین کالوس‌زایی بر ریزنمونه‌ها در هر دو رقم با کاربرد ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین در ترکیب با یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در محیط کشت MS مشاهده شد (۹۷/۹ و ۱۰۰ درصد). البته در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به‌همراه یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در رقم بنفش نیز ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی رخ داد. به‌طورکلی، نتایج کاربرد بنزیل آدنین و 2,4-D در غلظت‌های مختلف بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های کلم زینتی نشان داد، زمانی که غلظت 2,4-D نسبت به بنزیل آدنین در حدود ۲ الی ۱۰ برابر بیشتر بود، در حدود ۷۲ـ۱۰۰ درصد انگیزش کالوس بر روی ریزنمونه‌ها اتفاق افتاد و در نسبت‌های کمتر و یا حتی مساوی این دو تنظیم‌کنندهٔ رشد میزان کالوس‌زایی کاهش یافت.

براساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان گفت که میزان نکروزشدن ریزنمونه‌ها در ارقام استفاده‌شده کلم زینتی متفاوت بود به گونه‌ای‌که در رقم بنفش نکروزشدن ریزنمونه‌ها کمتر از رقم سفید رخ داد و به همین دلیل میزان متفاوتی از باززایی و کالوس‌زایی در ارقام مطالعه‌شده در این پژوهش مشاهده شد. عنوان شده است که باززایی در جنس براسیکا به میزان زیادی وابسته به ژنوتیپ است و این مورد در چند گونه براسیکا گزارش شده است. برای مثال در کلزا[3] تنوع گسترده‌ای در باززایی ارقام مطالعه‌شده وجود داشت (Ono *et al.*, 1994; Phogat *et al.*, 2000). همچنین در خردل هندی[4] نیز مشاهده شد که ارقام هندی نرخ باززایی

1. Organogenic callus
2. None- organogenic callus
3. *B. napus*
4. *B. juncea*

بهتری نسبت به ارقام استرالیایی داشتند (Pental *et al*., 1990). Lelu & Bollon (1990) اظهار داشتند که استعداد باززایی در کلم پیچ[1] و دکمه‌ای[2] بستگی به ژنوتیپ دارد. Wei *et al*. (2008) با مطالعه بر روی کشت میکروسپور ۲۹ ژنوتیپ کلم زینتی، عامل ژنوتیپ را به‌شدت بر پتانسیل جنین‌زایی مؤثر دانست که چنین دستاوردهایی با نتایج ما مشابهت داشت. احتمالاً توان ژنتیکی متفاوت در استعداد باززایی که به میزان متفاوت هورمون‌های درون‌زا در ارقام مختلف مربوط است، یکی از دلایل نقش رقم و ژنوتیپ در پاسخ‌های درون‌شیشه‌ای باشد.

در برخی پژوهش‌ها گزارش شده است که یک‌سری عوامل کمکی مانند مواد بازدارندهٔ اتیلن نظیر نیترات نقره در باززایی جنس براسیکا مؤثرند (Pental *et al*., 1990; Palmer, 1992; Pua & Chi, 1993; Zhang *et al*., 1998; Khan *et al*., 2003). احتمالاً اثر تحریکی نیترات نقره در پاسخ گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای به گونه و غلظت استفاده‌شده بستگی دارد. از طرف دیگر هرچند که براساس مطالعات غیرمستقیم (کاربرد بازدارنده‌های اتیلن) نتیجه‌گیری شده است که اتیلن اثر منفی بر جنین‌زایی دارد (Biddington, 1992) ولی در آزمایشی گزارش شده است که اتیلن ممکن است رشد کالوس را تحریک کند (Songstad *et al*., 1991). عدم تأثیر کاربرد نیترات نقره در باززایی درون‌شیشه‌ای کلم زینتی در این آزمایش احتمالاً به‌دلیل غلظت کم این ماده و تفاوت در گونه و واریته است.

در بین تنظیم‌کننده‌های رشد، اکسین‌ها و سایتوکنین‌ها به‌طور گسترده برای القای کالوس استفاده می‌شوند. اکسین‌ها در تقسیم سلولی، طویل‌شدن سلولی، تمایزیابی و ریشه‌زایی نقش دارند. متداول‌ترین نوع اکسین که برای القای کالوس در محیط کشت استفاده می‌شود 2,4-D و در مواردی هم NAA و IAA است (George *et al*., 2008). در آزمایش حاضر نیز هم کالوس و هم شاخساره نابجا در مرحلهٔ استقرار القا شدند. هرچند که در اغلب گزارش‌ها محیط کشت NLN برای باززایی کلم زینتی استفاده شده است (Tuncer & Yanmaz, 2011; Wei *et al*., 2008). اما Chamandoosti & Afshari Azad (2012) با کشت هیپوکتیل در محیط MS دارای بنزیل آدنین و ایندول بوتیریک اسید به‌گونه‌ای مشابه با نتایج به‌دست‌آمده در این آزمایش، توانستند به‌طور مستقیم باززایی شاخسارهٔ نابجا را در گیاه روغنی کلزا داشته باشند. همچنین Wang *et al*. (2011) موفق به باززایی جنین‌های کوتیلودونی کلم زینتی در محیط کشت‌های B5 و MS شدند که البته میزان باززایی در محیط B5 بیشتر بود. Kim & Botella (2002) نیز با کشت هیپوکتیل در محیط MS تکمیل‌شده با بنزیل آدنین توانستند کالوس را در کلم بروکلی القا کنند که تا حدودی با نتایج ما مشابهت داشت.

در این آزمایش افزایش غلظت بنزیل آدنین در محیط کشت سبب کاهش انگیزش کالوس و به‌گونه‌ای عکس افزایش غلظت 2,4-D سبب تحریک انگیزش کالوس در ریزنمونه‌ها شد. به‌طورکلی، سایتوکینین‌ها در تحریک رشد و نمو و تقسیم سلولی در گیاهان بسیار نقش دارند. زمانی که به میزان بسیار کم به همراه اکسین در محیط کشت به‌کار روند در تقسیم سلولی و رشد کالوس اثر دارند (Pierik, 1987). ریشه‌زایی و کالوس‌زایی در سلول‌های گیاهی نیز در پاسخ به دستکاری سطوح تنظیم‌کننده‌های خارجی رخ می‌دهد (Skoog & Miller, 1957). گزارش شده است که بنزیل آدنین خارجی ممکن است یا مستقیم بر روی سلول‌های گیاهی عمل کند و یا از طریق کنترل تجمع یکسری ترکیبات سایتوکنینی عمل کند. اکسین در تقسیم، توسعه و تمایزیابی سلول‌ها نقش دارد. بنابراین، گفته می‌شود که سایتوکنین‌ها در ترکیب با اکسین برای تقسیم سلولی گیاهی در کشت‌های درون‌شیشه‌ای ضروری‌اند. به‌گونه‌ای مشابه در سایر پژوهش‌ها کاربرد بنزیل آدنین به همراه اکسین در محیط کشت درون‌شیشه‌ای گونه‌های براسیکا سبب القای کالوس و باززایی شاخساره شده است. برای نمونه Chamandoosti1& Afshari Azad (2012) عنوان کردند که افزایش غلظت بنزیل آدنین به‌همراه ایندول بوتیریک اسید در محیط کشت سبب افزایش کالوس‌زایی و شاخساره‌زایی در ریزنمونه‌های کانولا شد ولی افزایش غلظت بنزیل آدنین در محیط کشت تنها باززایی شاخساره‌ها را تحریک کرد. Tavakkol Afshari

1. *Brassica oleracea* var. *gemmifera*
2. *Brassica oleracea* var. *capitata*

et al. (2011) نشان دادند کاربرد 2,4-D به‌همراه سیتوکنین در محیط کشت در تحریک القای کالوس گیاه کانولا مؤثر بود. بدین ترتیب نقش تحریکی بنزیل آدنین در شاخساره‌زایی و 2,4-D در کالوس‌زایی ریزنمونه‌های کلم زینتی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای مشخص می‌شود.

جدول ۱. اثر متقابل رقم، غلظت بنزیل آدنین، 2,4-D و نیترات نقره بر صفات ارزیابی‌شدهٔ کشت درون‌شیشه‌ای کلم زینتی*

رقم	غلظت BA (mg/L)	غلظت 2,4-D (mg/L)	غلظت AgNO3 (mg/L)	کالوس‌زایی	شاخساره‌زایی	ریشه‌زایی	نکروز	رشد ریزنمونه
سفید	۰/۱	۰/۱	۲	۶۱/۲^{bcd}	۶۱/۲^{a}	۱۶/۷^{b}	۲۰/۸^{bc}	۰^{c}
			۴	۳۱/۵^{defg}	۲۴/۱^{bc}	۰^{c}	۲۶/۴^{b}	۰^{c}
		۱	۲	۱۰۰^{a}	۱۶/۷^{bc}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{c}
			۴	۹۷/۹^{a}	۱۱/۱^{c}	۰^{c}	۱/۴^{c}	۰^{c}
	۰/۵	۰/۱	۲	۵۲/۷^{bcdef}	۱۱/۷^{c}	۰^{c}	۱۵^{bc}	۱۰^{e}
			۴	۴۰^{cdefg}	۳/۳^{c}	۰^{c}	۴۸/۹^{a}	۲۶/۱^{bcde}
		۱	۲	۳۰/۳^{defg}	۰^{c}	۰^{c}	۱۲/۶^{bc}	۵۵/۴^{b}
			۴	۱۹^{fg}	۰^{c}	۰^{c}	۱۸^{bc}	۵۵/۹^{b}
	۱	۰/۱	۲	۳۸/۲^{defg}	۲۸/۵^{bc}	۰^{c}	۱۳/۶^{bc}	۲۳/۵^{bcde}
			۴	۳۴/۶^{defg}	۹/۸^{c}	۰^{c}	۱۴/۲^{bc}	۴۹/۳^{bc}
		۱	۲	۱۴/۸^{g}	۰^{c}	۰^{c}	۵۰/۲^{a}	۱۸/۳^{cde}
			۴	۳۰/۵^{defg}	۰^{c}	۰^{c}	۲^{c}	۴۶/۴^{bcd}
بنفش	۰/۱	۰/۱	۲	۸/۳^{g}	۸/۳^{c}	۰^{c}	۰^{c}	۹۱/۷^{a}
			۴	۳۶/۶^{defg}	۸/۷^{c}	۰^{c}	۱۹/۴^{bc}	۳۵/۱^{bcde}
		۱	۲	۷۲/۶^{abc}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{c}	۱۳^{de}
			۴	۱۰۰^{a}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{c}
	۰/۵	۰/۱	۲	۲۳/۳^{efg}	۶۱/۷^{a}	۰^{c}	۵^{c}	۰^{c}
			۴	۳۰^{defg}	۶۱/۹^{a}	۴/۴^{c}	۸/۱^{bc}	۰^{c}
		۱	۲	۱۰۰^{a}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{c}
			۴	۸۳/۳^{ab}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{c}	۱۶/۷^{cde}
	۱	۰/۱	۲	۲۰/۲^{fg}	۵^{c}	۰^{c}	۴۸/۷^{a}	۱۸/۳^{cde}
			۴	۱۰/۹^{g}	۴۳/۸^{ab}	۲۴/۸^{a}	۱۱/۳^{bc}	۳۴/۹^{bcde}
		۱	۲	۵۷/۷^{bcde}	۰^{c}	۰^{c}	۲۶/۳^{b}	۱۱^{e}
			۴	۳۷/۶^{defg}	۰^{c}	۰^{c}	۵/۵^{bc}	۵۵/۴^{b}

*: در هر ستون حروف مشابه تفاوت معناداری در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

مرحلهٔ پرآوری

در مرحلهٔ پرآوری پس از واکشت توده‌های کالوس‌های اندام‌زا در محیط کشت دارای غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و ایندول بوتیریک، پاسخ‌های درون‌شیشه‌ای متفاوتی در کلم زینتی مشاهده شد. در کالوس‌های اندام‌زا، رشد و توسعهٔ شاخساره‌های نابجا مشاهده شد (شکل۱-ب). برخی از توده‌ها نیز به سمت کالوسی‌شدن پیش رفتند. شاخساره‌های نابجا پس از رشد طی شش هفته در همین محیط کشت، گیاهچه‌های کاملی به‌همراه انگیزش ریشه‌های نابجا را توسعه دادند (شکل۱-ج).

نتایج تجزیهٔ واریانس در مرحلهٔ پرآوری نشان داد اثرات متقابل غلظت بنزیل آدنین و ایندول بوتیریک اسید بر میزان کالوس‌زایی و شاخساره‌زایی کلم زینتی نیز در سطح پنج و یک درصد به‌ترتیب معنادار بود. شایان ذکر است که هیچ‌کدام از عوامل بر روی صفت ریشه‌زایی نمونه‌ها تأثیر معناداری نداشت. اثرات متقابل غلظت بنزیل آدنین و ایندول بوتیریک اسید بر روی میزان کالوس‌زایی در مرحلهٔ پرآوری نشان داد که بیشترین شاخساره‌زایی در غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول

بوتیریک اسید و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید رخ داد که با سایر تیمارها تفاوت معناداری داشتند. بیشترین کالوس‌زایی نیز در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ایندول بوتریک اسید مشاهده شد که با سایر تیمارها تفاوت معناداری داشت (جدول۲).

جدول ۲. اثر متقابل غلظت بنزیل آدنین و ایندول بوتیریک اسید بر صفات ارزیابی‌شده کشت درون‌شیشه‌ای کلم زینتی در مرحلهٔ استقرار*

غلظت بنزیل آدنین (mg/l)	غلظت ایندول بوتیریک اسید (mg/l)	شاخساره‌زایی (٪)	کالوس‌زایی (٪)
۰/۱	۰/۱	^{b}۹/۸	^{b}۳/۷
	۰/۵	^{a}۵۰	^{b}۱۰
۰/۵	۰/۱	^{a}۵۸/۳	^{b}۱۶/۶
	۰/۵	^{b}۱۳/۳	^{a}۳۵

*: در هر ستون حروف مشابه تفاوت معناداری در سطح احتمال پنج‌درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

بر اساس نتایج مشاهده‌شده در بخش پرآوری می‌توان عنوان کرد که شاخساره‌های القاشده بر روی ریزنمونه‌های کلم زینتی به‌دلیل داشتن پریموردیا اندام‌های هوایی طی واکشت با حضور غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و اکسین ضعیف ایندول بوتیریک اسید، باززایی شاخساره‌ها را به‌طور کامل داشت و در سایر غلظت‌ها به میزان جزئی کالوس‌زایی نیز رخ داد. در مرحلهٔ پرآوری تنظیم‌کنندهٔ اکسینی ایندول بوتیریک اسید به‌تنهایی تأثیری در میزان باززایی کلم زینتی نداشت و ترکیب آن با بنزیل آدنین در میزان کالوس‌زایی و شاخساره‌زایی مؤثر بود. به‌طورکلی، ایندول بوتیریک اسید یک اکسین به نسبت ضعیف در مقایسه با سایر اکسین‌هاست و احتمالاً کاربرد اکسین‌های قوی‌تری مانند نفتالین استیک اسید یا 2,4-D در کشت ریزنمونه‌های کلم زینتی پاسخ درون‌شیشه‌ای بهتری می‌داد. همچنین افزایش غلظت بنزیل آدنین هرچند در کالوس تأثیری نداشت ولی رشد و توسعهٔ شاخسارهٔ نابجا را در شاخساره‌های القاشده کاهش داد. این نتیجه نشان‌دهندهٔ آن است که احتمالاً میزان سطح داخلی سایتوکنین در چنین شاخساره‌هایی به حدی زیاد است که کاربرد خارجی بنزیل آدنین سبب کاهش شاخساره‌زایی شده است.

مرحلهٔ سازگاری

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که اثر نوع محیط بر میزان زنده‌مانی شاخساره‌ها در سطح یک‌درصد معنادار بود. به‌طوری که در بستر پرلایت حاوی محیط کشت MS کامل بدون هورمون، ۷۰ درصد زنده‌مانی و توسعهٔ ریشه مشاهده شد و در محیط پرلایت حاوی عصارهٔ ورمی کمپوست کامل تمامی گیاهچه‌ها از بین رفتند (جدول۳).

جدول ۳. اثر سادهٔ نوع محیط کشت بر زنده‌مانی گیاهچه‌های کلم زینتی در مرحلهٔ سازگاری*

نوع محیط کشت	زنده‌مانی گیاهچه (٪)
MS کامل	۷۰^{a}
۱/۲MS	۵۳/۳^{ab}
عصارهٔ ورمی کمپوست کامل	۰^{c}
۱/۲ عصارهٔ ورمی کمپوست	۲۳/۳^{bc}

*: در هر ستون حروف مشابه تفاوت معناداری در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

تاکنون پژوهشی مبنی بر مقایسهٔ اثر عصارهٔ ورمی‌کمپوست در مرحلهٔ سازگاری و ریشه‌زایی در کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان وجود ندارد و در اغلب مطالعات از محیط MS کامل برای مراحل ابتدایی سازگاری گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای استفاده می‌شود. در این آزمایش استفاده از عصارهٔ ورمی‌کمپوست به‌منزلهٔ محیط کشت سازگاری گیاهچه‌های کلم زینتی سبب مرگ و پوسیدگی بیشتر نسبت به محیط MS کامل شد که دلیل آن نیز می‌تواند وجود فعالیت میکروبی بیشتر در آن به‌ویژه در عصارهٔ کامل باشد، ولی استفاده از عصارهٔ تقلیل‌یافته، تفاوت معناداری با MS تقلیل‌یافته نداشت. بنابراین، باتوجه به ویژگی‌های مفید عصارهٔ ورمی‌کمپوست مانند داشتن عناصر غذایی، اسیدهای

آلی، تنظیم‌کننده‌های رشد (Dominguez, 2004; Chaoui *et al*., 2003; Muscolo *et al*., 1999; Atiyeh *et al*., 2002; Tomati *et al*., 1987) و هزینهٔ کم می‌تواند با بهینه‌کردن غلظت و چگونگی کاربرد آن در محیط کشت قابلیت کاربرد برای سازگاری گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای را داشته باشد.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اگر هدف از کشت درون‌شیشه‌ای کلم زینتی انگیزش کالوس باشد می‌توان در مرحلهٔ استقرار غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به همراه یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در محیط کشت MS را توصیه کرد. ولی اگر هدف ریزازدیادی به روش اندام‌زایی باشد، کاربرد ۰/۱ میلی‌گرم از بنزیل آدنین به‌همراه 2,4-D در محیط کشت، باززایی قابل قبولی را در این گیاه زینتی فراهم می‌کند. در روش اندام‌زایی مستقیم با کشت کالوس‌های اندام‌زا در محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید شاخساره‌ها را پرآوری کرد. پس از رشد و نمو شاخساره‌ها انتقال آن‌ها به بستر پرلایت استریل دارای محیط کشت MS تقلیل‌یافته به نصف، بدون تنظیم‌کنندهٔ رشد، آگار و ساکارز سبب ریشه‌زایی و تکمیل مراحل رشدی گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای می‌شود. از ویژگی‌های برجستهٔ این پژوهش می‌توان به این نکته اشاره کرد که در اغلب مطالعات درون‌شیشه‌ای با استفاده از محیط کشت NLN باززایی در کلم‌ها امکان‌پذیر شده است ولی در این آزمایش باززایی کلم زینتی با استفاده از محیط کشت MS انجام شد. محیط کشت NLN با اینکه محیط کشت اختصاصی تیره براسیکاسه محسوب می‌شود ولی به‌دلیل داشتن بیشتر ویتامین‌ها علاوه بر عناصر غذایی، هزینهٔ بالایی نیز دارد. همچنین در بیشتر تکنیک‌های باززایی کلم‌ها از کشت پیچیدهٔ میکروسپور استفاده می‌شد که اجرای این روش در بر گیرندهٔ یکسری مشکلات مانند تهیهٔ محیط سوسپانسیون و مایع، نیاز به مش‌های نایلونی خاص، سانتریفیوژ، محیط گران‌قیمت NLN، تعیین تراکم سوسپانسیون، استفاده از محیط کشت‌های چندگانه، ایجاد شرایط محیطی چندگانه و غیره (Zhang *et al*., 2008; Tuncer & Yanmaz, 2011; Wang *et al*., 2011; Wei *et al*., 2008) است. ولی در این پژوهش با استفاده از محیط کشت نسبتاً کم‌هزینهٔ MS و در دسترس، حداقل غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و کشت ریزنمونه‌های غنچه، امکان باززایی موفقیت‌آمیز کلم زینتی با حداقل زمان فراهم شد. همچنین مرحلهٔ ریشه‌زایی هم‌زمان در مرحلهٔ پرآوری صورت گرفت و مراحل سازگاری نیز کوتاه‌تر و مقرون به صرفه‌تر با معرفی محیط عصارهٔ ورمی کمپوست اجرا شد. بنابراین، نتایج حاصل از بهینه‌کردن شرایط کشت درون‌شیشه‌ای کلم زینتی با استفاده از پروتکل ارائه‌شده طی این طرح می‌تواند در جنبه‌های پژوهشی و حتی تولید تجاری کلم زینتی مانند امکان تولید تجاری انبوه گیاهان یکنواخت با قیمت مقرون به صرفه برای تقاضای بازار کاربرد داشته باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح پژوهشی شمارهٔ ۹۱/۱۳۶۶۱ با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه اراک انجام گرفت.

REFERENCES

1. Aslam, F.N., MacDonald, M.V., Loudon, P. & Ingram, D.S. (1990). Rapid-cycling Brassica species: inbreeding and selection of *B. campestris* for aonther culture ability. *Annal Botany*, 65, 557-566.
2. Atiyeh, R., Lee, S., Edwards, C., Arancon, Q. & Metzger, J. (2002). The influence of humic acids drived from earthworm proessed organic wastes on plant growth. *Bioresour Technol*ogy, 84(1), 7-14.
3. Baillie, A.M.R., D. Epp, J., Hucheson, D. & Keller, W.A. (1992). In vitro culture of isolated microspores and regeneration of plants in Brassica campestris. *Plant Cell Report*, 11, 234-237.
4. Biddington, N.L. (1992). The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulations*, 11, 173-187.
5. Chamandoosti, F. & Afshari Azad, H. (2012). Somaclonal variation in resistance of canola (*Brassica napus* L.) to sclerotinai stem root. *International journal of Agronomy and Plant Production*, 3(12), 613-617.
6. Chaoui, H.I., Zibilske, L.M. & Ohno, T. (2003). Effects of earthworm casts and compost on soil microbial activity and plant nutrient availability. *Journal Soil Boil Biochem*, 35, 295-302.

7. Choi, P.S., Soh, W.Y. & Liu, J.R. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotyledonary explant cultures of Chinese cabbage. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 44, 253-256.
8. Deane, C.R., Fuller, M.P. & Dix, P.J. (1997). Somatic embryogenesis in cauliflower *(Brassica oleracea var. botrytis). Cruciferae Newsletter*, 19, 43-44.
9. Dominguez, J. (2004). State of the art and new perspectives on vermicompost research. In: Edwards CA(ed) earthworm Ecology, 2nd ed. CRC press, *Boca Raton, FL, USA*. 401-424.
10. Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M. & Trevor, A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 32, 272-289.
11. George, E.F., Hall, M.A. & De Klerk, G.J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition, Vol. 1. Springer, Dordrecht, the Netherlands. 501.
12. Khan, M. R., Rashid, H., Ansar, M. & Chaudry, Z. (2003). High frequency shoot regeneration and agrobacterium-mediated DNA transfer in canola *(Brassica napus)*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 75, 223-231.
13. Kieffer, M., Fuller, M.P., Chauvin, J.E. & Schlesser, A. (1993). Another culture of kale (*Brassica oleracea* L. convar, acephala (DC.) Alef.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33(3), 303-313.
14. Kim, J.H. & Botella, J.R. (2002). Callus Induction and Plant Regeneration from Broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) for Transformation. *Journal of Plant Biology*, 45(3), 177-181.
15. Kohlenbach, H. W., Wenzel, G. & Hoffmann, F. (1982). Regeneration of Brassica napus plantlets in cultures from isolated protoplasts of haploid stem embryos as compared with leaf protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol*, 105,131-142.
16. Kranz, E. (1988). Somatic embryogenesis in stationary phase suspension cultures derived from hypocotyl protoplasts of *Brassica napus* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12, 141-146.
17. Krzyżanowska, D., Górecka, K., Kiszczak, W. & Kowalska, U. (2006). The effect of genotype and medium on plant regeneration from androgenic embryos. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14(1), 121-127.
18. Lelu, M.A. & Bollon, H. (1990). Cabbage Brassica oleracea var. capitata and Brussels Sprout *Brassica oleracea* var. gemmifera: In vitro Production of Haploids. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 12, 358-373.
19. Leroy, X.J., Leon, K., Charles, G. & Branchard, M. (2000).Cauliflower somatic embryogenesis and analysis of regenerant stability by ISSRs. *Plant Cell Report*, 19, 1102-1107.
20. Lichter, R. (1989). Efficient yield of embryo by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species. *Plant Breed*, 103, 119-123.
21. Muscolo, A., Bovalo, F. & Nardi, S. (1999). Earthworm humic matter produces auxin-like effects on Daucus Carota cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 1303-1311.
22. Ono, Y., Takahata, Y. & Kaizuma, N. (1994). Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Cell Report*, 14, 13-17.
23. Palmer, C. E. (1992). Enhanced shoot regeneration from Brassica campestris by silver nitrate. *Plant Cell Report*, 11, 541-545.
24. Pental, D., Pradhan, A.K., Sodhi, Y.S. & Mukhopadhyay, A. (1990). Variation amongst Brassica juncea cultivars for regeneration from hypocotyl explants and optimization of conditions for Agrobacterium-mediated genetic transformation. *Plant Cell Report*, 12, 462-467.
25. Phogat, S.K., Burma, P.K. & Pental, D. (2000). High frequency regeneration of Brassica napus varieties and genetic transformation of stocks containing fertility restorer genes of two cytoplasmic male sterility systems. *Journal Plant Biochemestry and Biotechnology*, 9, 73-79.
26. Pierik, R.L.M. (1987). In Vitro culture of higher plants. *Marinus Nijhoff Publishers, Boston*. 747.
27. Pua, E.C. & Chi, G.L. (1993). De novo shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brassica juncea*) in vitro in relation to ethylene. *Physiology Plant*, 88, 467-474.
28. Rajagopalan, C. (2000). Export potential of Indian floriculture and need of policy environment. *Floric Today*, 9, 29-33.
29. Sato, T., Nishio, T. & Hirai, M. (1989). Plant regeneration from isolated microspore cultures of Chinese cabbage (*Brassica campestris ssp. Pekinensis*). *Plant Cell Report*, 8, 486-488.
30. Skoog, F. & Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118-131.
31. Songstad, D.D., Armstrong, C. L. & Petersen, W. L. (1991). AgNO3 increases Type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives. Plant Cell Report. 9, 699-702.
32. Tavakkol Afshari, R., Angoshtari, R. & Kalantari, S. (2011). Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *Plant Omics Journal*, 4(2), 60-67.
33. Tomati, U., Grappelli, A. & Galli, E. (1987). The presence of growth regulators in earthworm-worked wastes. In: Bonvicini Paglioi A.M., Omodeo P. (Eds.), On Earthworms. Proceeding of *International Symposium on Earthworms. Selected Symposia and Monographs*. Unione Zoologica Italiana, 2, Mucchi, Modena, pp. 423-435.

34. Tuncer, B. & Yanmaz, R. (2011). Effects of Colchicine and High Temperature Treatments on Isolated Microspore Culture in Various Cabbage (*Brassica oleraceae*) Types. *Journal of Agriculture & Biology*, 13(5), 819-822.
35. Turgut, K., Barghchi, M. & Scott, R. (1998). Efficient shoot regeneration and somatic embryogenesis from immature cotyledons of *Brassica napus* L. *Plant Breeding*, 117, 503-504.
36. Wang, Y., Tong, Y., Li, Y., Zhang, Y., Zhang, J., Feng, J. & Feng, H. (2011). High frequency plant regeneration from microspore-derived embryos of ornamental kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala). *Scientia Horticulturae*, 130, 296-302.
37. Warwick, S. I. (2011). Brassicaceae in Agriculture. In: R. Schmidt & I. Bancroft (Eds). *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*. (9, 33-66). Springer Verlag, New York.
38. Wei, Z., Qiang, F., Xigang D. & Manzhu, B. (2008). The culture of isolated microspores of ornamental kale (Brassica oleracea var.acephala) and the importance of genotype to embryo regeneration. *Scientia Horticulturae*, 117, 69-72.
39. Zhang, F.L., Takahata, Y. & Xu, J.B. (1998). Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. pekinensis). *Plant Cell Report*, 17, 780-786.
40. Zhang, W., Fu, Q., Dai, X.G. & Bao, M.Z. (2008). The culture isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. acephala) and the importance of genotype to embryo regeneration. *Scientia Horticulturae*, 117, 69-72.