Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 47, No 4, Winter 2017 (701-707)
DOI: 10.22059/ijfcs.2017.126609.653888

علوم گیاهان زراعی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۴، زمستان ۱۳۹۵ (ص ۷۰۷-۷۰۱)

رویان‌زایی بدنی مستقیم از رویان‌های نابالغ در دورگ‌های آفتابگردان

سهیلا مرادی[۱]، محمدرضا عظیمی [۲*]، سید سعید پورداد [۳] و فریبرز حبیبی [٤]
۱، ۲ و ٤. دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکدۀ کشاورزی، دانشگاه زنجان
۳. دانشیار، معاونت مؤسسۀ تحقیقات کشاورزی دیم، کرمانشاه
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/٤/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۲۱)

چکیده

در این پژوهش تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر رویان (جنین)زایی بدنی (Somatic embryogenesis) مستقیم از رویان‌های نابالغ در دو دورگ (هیبرید)های ایرانی آفتابگردان (آذر گل و فرخ)، برای باززایی گیاه بررسی شد. بدین منظور پس از گل‌دهی، رویان‌های نابالغ ده روز پس از گرده‌افشانی به‌عنوان ریزنمونه استفاده شدند. رویان‌های نابالغ پس از ضدعفونی به محیط رویان‌زایی شامل محیط کشت پایۀ MS و ویتامین‌های B_5 ۱۲۰گرم در لیتر ساکاروز و میزان متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد (BA در دو سطح ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با NAA یا 2,4-D در سه سطح ۰/۱، ۰/۲۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و 2,4-D در دو سطح ۰/۳۳ و ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌تنهایی) منتقل شدند. نتایج به‌دست‌آمده از تجزیۀ واریانس نشان داد که بین دورگ‌ها و ترکیب‌های مختلف هورمونی و همچنین اثر متقابل این دو عامل اختلاف معنی‌داری وجود دارد. نخستین رویان‌های بدنی ده روز پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط حاوی ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر ساکاروز مشاهده شدند، بدون اینکه مرحلۀ حد واسط پینه (کالوس) تشکیل شود. رویان‌های بدنی در هر دو دورگ آفتابگردان به‌صورت مستقیم در محیط حاوی ۲ mg/l BA و ۰/۲۵ mg/l NAA با سرعت بیشتری ظاهر شدند.

واژه‌های کلیدی: باززایی، دورگ‌های آفتابگردان، رویان بدنی، رویان نابالغ.

Direct somatic embryogenesis from immature embryos of sunflower hybrids

Soheila Moradi[1], Mohammadreza Azimi[2*], Sayed Saeed Pourdad[3] and Fariborz Habibi[4]
1, 2, 4. M.Sc. Student, Assistant Proressor and Former M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Zanjan, Iran
3. Associate Proressor, Dryland Agricultural Research Institute, Sararood, Kermanshah, Iran
(Received: Jun. 22, 2015 - Accepted: Apr. 9, 2016)

ABSTRACT

In the present study, the effect of plant growth regulators on direct somatic embryogenesis and plant regeneration of two Iranian sunflower hybrids (Azargol and Farrokh) were examined. After the flowering, immature embryos ten day after pollination were used as explants. Immature embryos were surface sterilized and subsequently transferred to embryogenesis medium containing MS medium elements and B_5 vitamins, 120 g/l sucrose and different combinations of plant growth regulators (BA in two levels,1 and 2 mg/l in combination with NAA or 2,4-D in three levels 0.1, 0.25 and 1 mg/l and 2,4-D in two levels, 0.33 and 1 mg/l. Analysis of variance showed significant differences between hybrids, hormones and hybrids×hormones interaction. The somatic embryos were first observed 10 days after culture on medium containing 120 g/l sucrose and a callus intermediate was not formed. Somatic embryos of two sunflower hybrids directly obtained on a medium supplemented with 2 mg/l BA and 0.25 mg/l NAA with more number and speed.

Kaywords: Immature embryos, regeneration, somatic embryogenesis, sunflower hybrids.

* Corresponding author E-mail: azimi@znu.ac.ir Tel: +98 912 542 3112

مقدمه

آفتابگردان یکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی در جهان است، برای گسترش کشت آن در سراسر جهان، اصلاح ژنتیکی آفتابگردان از نظر ویژگی‌های مهم زراعی ضروری است (Honda *et al.*, 2005). استفاده از روش‌های زیست‌فناوری (بیوتکنولوژی) برای اصلاح این گیاه به‌وسیلهٔ عامل‌های مختلفی از جمله نیاز به یک سامانهٔ باززایی کارآمد که پیش‌نیاز بررسی‌های انتقال ژنتیکی است، محدود شده است (Sujathata & Prabacaran, 2001). در شرایط درون شیشه‌ای به دو روش اندام‌زایی (Azadi *et al.*, 2002) یا رویان (جنین)زایی بدنی[1] (Bronner *et al.*, 1993) می‌توان بافت‌های مختلف، گیاهچه‌های آفتابگردان را باززایی کرد.

رویان‌زایی بدنی روش مطلوبی برای باززایی گیاه است. رویان‌های بدنی به‌آسانی جوانه زده و بدون نیاز به مرحلهٔ ریشه‌دار کردن تولید گیاهچه می‌کنند. پیدا کردن شرایط مناسب برای القا رویان‌زایی بدنی در گونه‌ها، جنس‌ها و رقم‌های مختلف، هنوز به‌طور عمده بر پایهٔ آزمون و خطا و بررسی شرایط و محیط‌های کشت مختلف، به‌ویژه نوع و سطح تنظیم‌کننده‌های رشد است (Jacobsen, 1991; Henry *et al.*, 1994). باززایی گیاهان، ایجاد تنوع رویشی یا همسانی بدنی (سوماکلونال)، بررسی پدیدهٔ گزینش درون شیشه‌ای و فراهم‌سازی بستری برای تراریختی گیاهان و انتقال ژن‌های کنترل‌کنندهٔ ویژگی‌های مطلوب در گیاهان از سودمندی عملی رویان‌زایی بدنی به‌شمار می‌آید. تولید بذرهای مصنوعی با شرایط مطلوب، بدون آلودگی‌های ویروسی، قارچی و باکتریایی و حفظ دقیق ذخائر توارثی (ژرم‌پلاسم) گیاهان از برتری‌های دیگر رویان‌های بدنی است.

بسته به غلظت ساکاروز در محیط در شرایط درون شیشه‌ای می‌توان از رویان‌های زایوگه (زیگوتی) نابالغ آفتابگردان رویان‌های بدنی یا ساقه‌ها را باززا کرد، اما القای هرکدام از این رویدادهای ریخت‌زایی وابسته به تنظیم‌کننده‌های رشد است. Sujatha & Prabakaran (2001) در تحقیقی مواد موردنیاز برای القا و تشکیل رویان‌های بدنی از رویان‌های زایوگه نابالغ آفتابگردان را تعیین کردند و بیشترین میزان رویان‌زایی را در محیط پایهٔ Gamborg، ۱۲۰ تا ۲۱۰ گرم در لیتر ساکاروز، ۰/۸ تا ۱ درصد آگار، رویان‌های با اندازهٔ کوچک‌تر (۲-۰/۵ mm) و دمای ۲۸ تا ۳۲ درجهٔ سلسیوس به‌دست آوردند که رویان‌های بدنی پس از انتقال به محیط بدون تنظیم‌کننده‌های رشد به گیاهچه توسعه پیدا کردند.

Aurori (2011) برخی عامل‌های مؤثر در اندام‌زایی و رویان‌زایی بدنی در آفتابگردان را بررسی کرد. وی در آزمایش خود تأثیر عامل‌هایی مانند سن و نوع ریزنمونه روی باززایی و تأثیر اکسین‌های مختلف و غلظت‌های متفاوت ساکاروز را روی رویان‌زایی بدنی بررسی کرد. نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان داد که محور رویانی به‌دست‌آمده از رویان‌های بالغ جوانه‌زده قابلیت بهتری برای باززایی داشته و بیشترین میزان رویان‌زایی در حضور 2,4-D و Dicamba و ساکاروز با درصد بالا (۱۲ درصد) روی رویان‌های نابالغ ۲۰۰ تا ۳۰۰ میکرومتری رخ می‌دهد.

Desai *et al.* (2005) یک دستور کار رویان‌زایی مستقیم بدون تولید کالوس با استفاده از قطعه‌های گل‌آذین نابالغ را در نیشکر ارائه کردند. آن‌ها ریز نمونه‌ها را در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و ۴ درصد ساکاروز کشت کردند و میزان رویان‌زایی بالایی (حدود ۵۴ درصد با میانگین هشت رویان در هر ریزنمونه) را گزارش کردند. رویان‌ها طی چهار هفته تشکیل و پس از انتقال به محیط کشت MS بدون هورمون طی یک هفته جوانه زدند. گیاهان تولیدشده به گلخانه منتقل و رشد نرمالی در شرایط گلخانه داشتند. غلظت‌های بالای ساکاروز و آبسزیک اسید به‌طور معنی‌داری پاسخ رویان‌زایی را در گیاه دارویی *Clitoria ternatea* تحت تأثیر قرار داد. بیشترین پاسخ رویان‌زایی در محیط حاوی ۲ mg/l BA، ۰/۲ mg/l NAA و ۳ mg/l ABA مشاهده شد (Kumar & Thomas, 2012).

با توجه به اهمیت تنظیم‌کننده‌های رشد و میزان

1. Somatic embryogenesis

ساکاروز روی رویان‌زایی بدنی هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر این عامل‌ها روی رویان‌زایی بدنی مستقیم در دو دورگ تجاری آفتابگردان بود.

مواد و روش‌ها

بذرهای دو دورگ ایرانی آفتابگردان (آذرگل و فرخ) از بخش دانه‌های روغنی مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج تهیه و در گلخانهٔ مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه از شهریور تا آبان کشت شدند. پس از گل‌دهی، رویان‌های نابالغ ده روز پس از گرده‌افشانی به‌عنوان ریز نمونه استفاده شد. بذرهای نابالغ در آغاز به مدت نیم ساعت زیر جریان آب قرار گرفته، آنگاه به مدت ده دقیقه در محلول قارچ‌کش بنومیل (۱/۵ گرم در هزار میلی‌لیتر آب مقطر) قرار داده شد و پس از آبکشی با آب مقطر به زیر هود منتقل شدند. در زیر هود نمونه‌ها به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد شسته شده، سپس بذرها به مدت پانزده دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد سترون (استریل) سطحی شده و سه بار با آب مقطر سترون هر بار پنج دقیقه آبکشی شدند. در نهایت پوستهٔ بذرها جدا شده و رویان‌های نابالغ روی محیط رویان‌زایی درون پتری‌دیش قرار گرفتند. محیط رویان‌زایی شامل عنصرهای پرمصرف (ماکرو) و کم‌مصرف (میکرو) در محیط MS همراه با ویتامین‌های B_5، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، ۰/۵ گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات، ۱۲۰گرم در لیتر ساکاروز و میزان متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد (BA در دو سطح ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با NAA یا 2,4-D در سه سطح ۰/۱، ۰/۲۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و 2,4-D در دو سطح ۰/۳۳ و ۱ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی) بود. محیط با آگار ۰/۸ درصد جامد شده و pH محیط پیش از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت بیست دقیقه روی ۵/۶ تنظیم شد. محیط‌های رویان‌زایی در پتری‌دیش‌های یک‌بار مصرف سترون‌شده به میزان ۲۵ میلی‌لیتر در هر پتری‌دیش توزیع شد. پتری‌دیش‌های حاوی چهار رویان نابالغ ضدعفونی شده برای القای رویان‌زایی در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس و دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

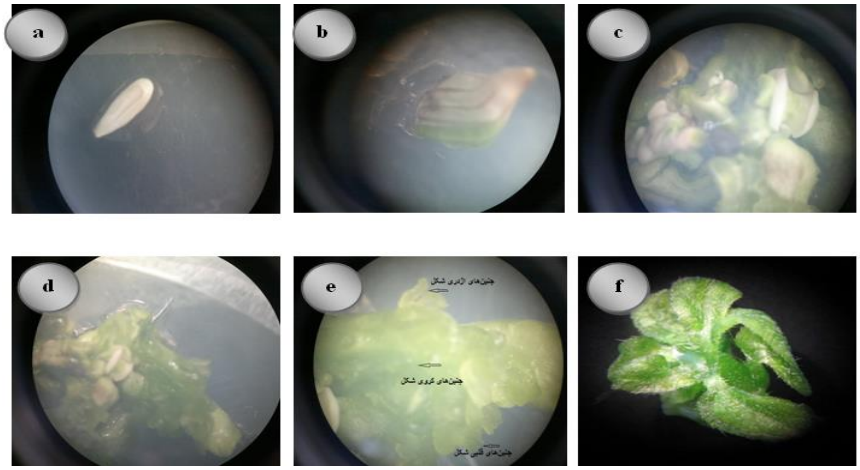
آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایهٔ طرح بلوک کاملاً تصادفی در پنج تکرار انجام شد. هر تکرار شامل یک پتری‌دیش بوده و شمار چهار ریز نمونه در هر پتری‌دیش (۱۰۰ میلی‌متری) قرار گرفت. عامل‌های آزمایشی شامل دورگ آفتابگردان در دو سطح (آذرگل و فرخ) و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در ده سطح بود. شمار رویان‌های بدنی در هفتهٔ ششم یادداشت‌برداری شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و SAS9.1 و آزمون دانکن در سطح احتمال α=۰/۰۵ ارزیابی و نمودارها با نرم‌افزار اکسل رسم شدند.

نتایج و بحث

یک هفته پس از قرارگیری رویان‌های نابالغ روی محیط MS حاوی ۱۲ درصد ساکاروز و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، نمونه‌ها متورم شده و پس از ده روز ساختارهای پیش رویانی مشاهده شد. ساختارهای پیش‌رویانی به مدت دو هفته گسترش یافته و در هفتهٔ سوم نخستین رویان‌های کروی روی ساختارهای پیش رویانی شکل گرفتند. نکتهٔ شایان‌توجه در بین ریزنمونه‌ها این بود که همهٔ رویان‌ها در یک مرحلهٔ رویان‌زایی نبوده و به‌طور تقریبی همهٔ مراحل رویان‌زایی به‌طور همزمان وجود داشت (شکل ۱).

رویان‌های زایوگه که روی محیط حاوی 2,4-D قرارگرفته بودند تولید ساختار پیش رویانی کردند اما ظهور رویان‌های کروی و دیگر مراحل رشدی رویان‌ها تنها پس از انتقال به محیط بدون هورمون مشاهده شد. نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر غلظت‌های مختلف هورمونی روی القا رویان‌های بدنی در فاصلهٔ ۷، ۲۱، ۲۸ و ۴۲ روز پس از کشت در جدول ۱ و شکل ۲ نشان داده شده است.

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ واریانس برای تیمارهای هورمونی که منجر به رویان‌زایی در هر دو دورگ شدند (جدول ۲) نشان داد که بین دو دورگ آفتابگردان و همچنین بین تیمارهای هورمونی اختلاف بسیار معنی‌داری در سطح احتمال ۱درصد وجود داشت، همچنین اثر متقابل دورگ و تیمار هورمونی در سطح احتمال ۵درصد معنی‌دار بود.



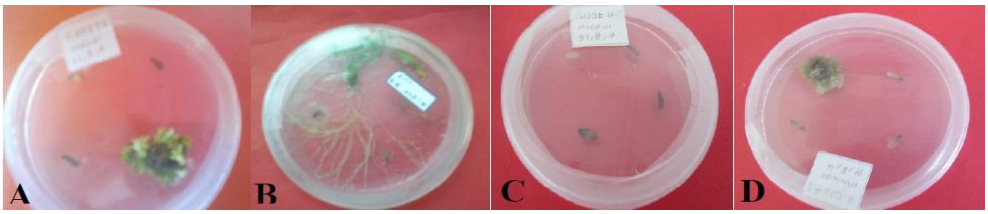
شکل ۱. مراحل مختلف رویان‌زایی از رویان‌های نابالغ آفتابگردان در محیط حاوی ۱۲۰ گرم در لیتر ساکاروز. a) رویان نابالغ ده روز پس از گرده‌افشانی، b) متورم شدن نمونه‌ها هفت روز پس از قرارگیری در محیط، c) تشکیل ساختارهای پیش رویانی، d) تبدیل ساختارهای پیش رویانی به رویان‌های بدنی، e) مراحل مختلف رویان زایی در یک نمونه به‌صورت همزمان، f) تبدیل رویان‌های بدنی به گیاهچه

Figure1. The various stages of embryogenesis from immature sunflower embryos in medium containing 120 g/ lit of sucrose. a) Immature embryos, 10 days after pollination, b) Swell sample 7 days after exposure to the environment, c) Pre-embryo structures, d) A pre-embryonic structures are somatic embryos, e) Various stages of embryogenesis in a sample simultaneously, f) Conversion somatic embryos into seedlings

جدول ۱. تأثیر تیمارهای هورمونی مختلف روی القای رویان‌زایی بدنی مستقیم در رویان‌های زایوگۀ نابالغ دو دورگ آفتابگردان

Table1. The effect of various hormonal treatments on direct somatic embryogenesis in immature zygotic embryos of two hybrids of sunflower

Hormonal treatment	hybrid Type	Type of response				The average number of somatic embryos induced
		Days after culture				
		7	21	28	42	
1mg/l BA+ 0.1 mg/l	Azargol	Non- response	Organogenesis	Organogenesis	Organogenesis	0
NAA	Farrokh	Non- response	Non- response	Non- response	Embryogenesis	9.6 e
1mg/l BA+ 0.25 mg/l	Azargol	Non- response	Organogenesis	Organogenesis	Organogenesis	0
NAA	Farrokh	Non- response	Non- response	Non- response	Non- response	0
2mg/l BA+ 0.1 mg/l	Azargol	Non- response	Non- response	Non- response	callus formation	0
NAA	Farrokh	Non- response	Non- response	Non- response	Non- response	0
2mg/l BA+ 0.25 mg/l	Azargol	Non- response	Non- response	Organogenesis	Embryogenesis	17.8 b
NAA	Farrokh	Non- response	Non- response	Embryogenesis	Embryogenesis	25.6 a
1mg/l BA+ 0.1 mg/l	Azargol	Non- response	Non- response	Non- response	Embryogenesis	8.4 e
2,4-D	Farrokh	Non- response	Non- response	callus formation	callus formation	0
1mg/l BA+ 0.25 mg/l	Azargol	Non- response	Non- response	callus formation	Brown callus	0
2,4-D	Farrokh	Non- response	Non- response	callus formation	Green callus	0
2mg/l BA+ 0.1 mg/l	Azargol	Non- response	Non- response	callus formation	Green callus	0
2,4-D	Farrokh	Non- response	Non- response	callus formation	Green callus	0
2mg/l BA+ 0.25 mg/l	Azargol	Non- response	Non- response	callus formation	callus formation	0
2,4-D	Farrokh	Non- response	Non- response	callus formation	callus formation	0
0.33 mg/l	Azargol	Non- response	Non- response	Non- response	callus formation	0
2,4-D	Farrokh	Non- response	Non- response	Non- response	Organogenesis	0
1 mg/l	Azargol	Non- response	Non- response	Non- response	Embryogenesis	10.6 d
2,4-D	Farrokh	Non- response	Non- response	Non- response	Embryogenesis	13.8 c



شکل ۲. پاسخ رویان‌های زایوگۀ نابالغ به تیمارهای مختلف رویان‌زایی در آفتابگردان.

A) رویان‌زایی بدنی مستقیم B) اندام‌زایی C) بدون پاسخ D) کالوس‌زایی

Figure 2. Immature zygotes embryo response to different treatments embryogenesis in sunflower.
A) Direct somatic embryogenesis B) Organogenesis C) Non-response D) Callus formation

جدول ۲. تجزیهٔ واریانس میزان رویان‌زایی تحت تیمارهای هورمون در دورگ‌های آفتابگردان

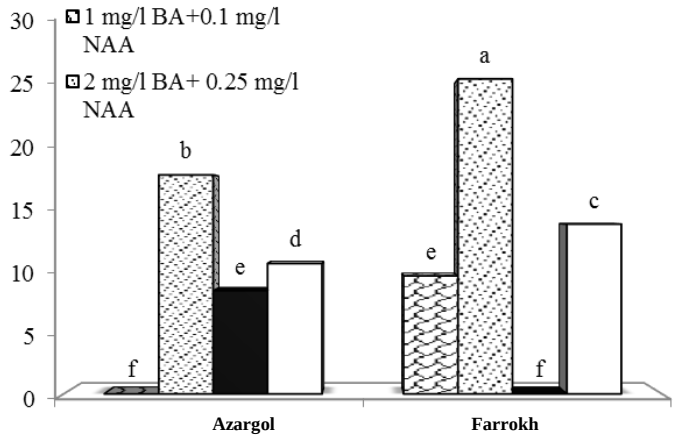
Table 2. Analysis of variance for amount of embryogenesis under hormonal treatments in sunflower hybrids

S.O.V	df	Mean Square
Hybrid	1	93.0250**
Hormon	3	667.6916**
Hybrid × Hormon	3	163.8250**
Error	32	1.6225
C.V %	10.47	-

**, *: Significant at 1% and 5% probability levels, respectively.

** و * به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

نتایج به‌دست‌آمده از مقایسهٔ میانگین‌ها (شکل۳) نشان داد که بیشترین میزان رویان‌زایی در دورگ فرخ و در محیط رویان‌زایی حاوی ۲ mg/l BA و ۰/۲۵mg/l NAA با میانگین ۲۵/۶ مشاهده شد و پس از آن در دورگ آذرگل و در همین تیمار هورمونی بیشترین شمار رویان‌های بدنی مشاهده شد. افزون بر این در این ترکیب هورمونی رویان‌ها زودتر پدیدار شده و سرعت رویان‌زایی بیشتر بود. محیط حاوی ۱ mg/l 2,4-D باعث رویان‌زایی در هر دو دورگ و محیط حاوی ۱ mg/l BA+۰/۱ mg/l NAA موجب رویان‌زایی در دورگ فرخ و محیط حاوی ۰/۱ mg/l 2,4-D + mg/l ۱BA موجب رویان‌زایی در دورگ آذرگل شد.



شکل ۳. مقایسهٔ اثر متقابل دورگ و تیمار هورمونی روی رویان‌زایی بدنی در دورگ‌های آفتابگردان

Figure 3. Comparison of the hybrid interactions and hormonal treatments on somatic embryogenesis in sunflower hybrids

رویان‌زایی بدنی فرآیندی پیوسته و متشکل از مراحل مختلف است رویان‌های بدنی از لحاظ ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) همسان رویان‌های زایشی هستند، بنابراین رویان‌های زایشی و بدنی مراحل یکسانی را شامل مرحلهٔ کروی (Globular shape)، قلبی شکل (Heart shape) و اژدری شکل (Torpedo shape) پشت سر می‌گذارند (Narasimhulu *et al.*, 1992; Natalija & Kupriene, 2005; Devandra *et al.*, 2011). در این بررسی نیز، همهٔ رویان‌ها در یک مرحلهٔ نموی نبوده و مراحل مختلفی از رشد به‌طور همزمان وجود داشت. علت این موضوع را می‌توان پاسخ متفاوت ریزنمونه‌ها در سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده دانست.

عامل مهمی که باید برای القای رویان‌زایی مدنظر قرار گیرد انتخاب ریزنمونهٔ مناسب از گیاه موردنظر است. بررسی‌ها نشان داده است که هرچقدر بافت ریزنمونه جوان‌تر، فعال‌تر و ژاتاکی (مریستمی) باشد توانایی بیشتری برای القای رویان‌زایی دارد (Zeynali *et al.*, 2013). Finer (1987) و Charriere & Hahne (1998) نیز با استفاده از رویان‌های زایوگهٔ نابالغ رویان‌زایی بدنی مستقیم در آفتابگردان را گزارش کردند. در گیاهان دیگری هم از جمله آلسترومریا (Schaik *et al.*, 1996)، بادام‌هندی (Gogate & Nadgauda, 2003) و کلزا (Natalija & Kupriene, 2005) از رویان‌های نابالغ برای رویان‌زایی بدنی مستقیم استفاده شده است.

در شرایط طبیعی عامل‌های چندی در آغاز رویان‌زایی و ادامهٔ آن تا تشکیل رویان کامل نقش ایفاء می‌کنند. اما آنچه مسلم است نوع گیاه برای ایجاد رویان‌زایی بدنی اهمیت ویژه‌ای دارد. به‌طوری‌که گونه‌های متعلق به هر جنس یا ژنوتیپ‌های متعلق به هرگونه به میزان زیادی از لحاظ توان رویان‌زایی بدنی با هم متفاوت هستند. همچنین هر ژنوتیپ ممکن است توانایی منحصربه‌فردی در باززایی رویان از خود نشان دهد (Merkle *et al.*, 1995; Portillo *et al.*, 2007). دورگ‌های مورد بررسی در این آزمایش از نظر میزان رویان‌زایی و پاسخ به رویان‌زایی در حضور میزان‌های معین اکسین و سیتوکینین متفاوت بودند و میزان رویان‌زایی در دورگ فرخ بیشتر از دورگ آذرگل بود. رویان‌زایی بدنی به‌شدت توسط ژنوتیپ تحت تأثیر قرار می‌گیرد که این امر توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (Chen *et al.*, 1989; Andersen *et al.*, 1990; Tokuhara & Masahiro, 2003; Jonoubi*et al.*, 2004). ازآنجایی‌که در یک گیاه یاخته‌ها می‌توانند سطوح درون‌زایی متفاوتی از تنظیم‌کننده‌های رشد یا تنوع بیشتری در نزدیکی یاخته‌های پذیرنده و یا اینکه حساسیت بیشتری به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی داشته باشند، منطقی خواهد بود که انتظار داشته باشیم پاسخ‌های درون شیشه‌ای در گونه‌های مختلف متفاوت باشد.

در این بررسی pH محیط رویان‌زایی روی ۵/۶ تنظیم شده و غلظت بالای ساکاروز استفاده شد که رویان‌زایی بدنی مستقیم تحت چنین شرایطی پیشتر نیز توسط Sujatha & Prabakaran (2001) و Aurori (2011) در آفتابگردان گزارش شده است. غلظت بالای ساکاروز موجب تنش اسمزی و آغاز رویان‌زایی بدنی می‌شود. مشخص‌شده که کاربرد غلظت بالای قند در محیط برای رویان‌زایی بدنی ممکن است میزان اسمولیت‌های یاخته را تحت تأثیر قرار دهد. این تأثیر مثبت، همسان تغییر اسمولیت‌های یاخته در محیط اطراف رویان‌های زایوگهٔ درون بذر است (Merkle *et al.*, 1995). تنظیم‌کننده‌های رشد که به‌صورت خارجی استفاده می‌شوند نقش اساسی در آسانگری تغییرپذیری ریخت‌شناختی مورد نیاز برای تولید رویان بدنی ایفا می‌کنند. از میان تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین‌ها نقش بارزی در القای رویان بدنی در گیاهان مختلف دارند. همچنین 2,4-D به‌عنوان یک اکسین مصنوعی، مهم‌ترین اکسین برای القای رویان‌زایی بدنی شناخته شده است (Ammirato, 1983). غلظت‌هایی از این اکسین به تنهایی یا در ترکیب با دیگر تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی یا غیر اکسینی مانند سیتوکینین‌ها برای ایجاد رویان بدنی استفاده می‌شود (Kao & Michayluk, 1981; Gingeas & Linberger, 1989; Schuller *et al.*, 1989). در این بررسی نیز رویان‌زایی در حضور ترکیب اکسین و سیتوکینین رخ داد که این نتیجه با نتایج Mandal *et al.* (1995) و Sujatha & Prabakaran (2001) در آفتابگردان همخوانی دارد. رویان‌های بدنی برای تبدیل به گیاهچه و رشد بیشتر به محیط بدون تنظیم‌کننده‌های رشد و حاوی ساکاروز کم‌تر (۳ درصد) منتقل شدند.

نتیجه‌گیری کلی

محیط‌های رویان‌زایی حاوی ۰/۲۵ mg/l NAA+ ۲mg/l BA و ۱ mg/l 2,4-D باعث رویان‌زایی در هر دو دورگ شدند اما از دو دورگ مورد استفاده در این آزمایش دورگ فرخ به رویان‌زایی پاسخ بهتری داشته و در بین تنظیم‌کننده‌های رشد بیشترین میزان رویان‌زایی مربوط به ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. همچنین محیط حاوی ۱ mg/l BA+۰/۱ mg/l NAA موجب رویان‌زایی در دورگ فرخ و محیط حاوی ۱ mg/l 2,4-D +۰/۱ mg/l BA۱ موجب رویان‌زایی در دورگ آذرگل شد.

REFERENCES

1. Ammirato, P. V. (1983). Embryogenesis. In "Handbook of Plant Cell Culture" Evans. D.A., W. R. Sharp. Ammirato PV, Yamada Y (eds). *Macmillian Publishing Company*. NewYork. USA.
2. Andersen, S. B., Christiansen, I. & Farestveit, B. (1990). Carrot (*Daucus carota* L.). In vitro production of haploids and field trials. *Biotechnology of Agriculture and Forestry*, 12, 393-402.

3. Aurori, A. C. (2011). *Studies regarding some factors involved in sunflower protoplast and tissue explants organogensis and somatic embryogenesis*. Ph.D. Boliyai University, Clug-napoca Facility of biology. Department of Experimental Biology.
4. Azadi, P., Moieni, A. & Ahmadi, M. R. (2002). Shoot organogenesis from cotyledons of sunflower. *Helia*, 25, 19-26.
5. Bronner, R., Jeannin, G. & Hahan, G. (1993). Early cellular events during organogenesis and somaticembryogenesis induced on immature zygotic early cellular embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *American Journal of Botany*, 72, 239-248.
6. Charriere, F. & Hahne, G. (1998). Induction of embryogenesis versus caulogenesis on in vitro cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.). Immature zygotic embryos, role of plant growth regulators. *Plant Science*, 137, 63-71.
7. Chen, J. T., Chang, C. & Chang, W. C. (1999). Direct somatic embryogenesis on leaf explants of Oncidium Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 1, 143-149.
8. Desai, N. S., Suprasanna, R., Choudhary, R. S. & Bapat, V. A. (2005). Embryogenesis by Plant Growth Regulators in Sugarcane, *Society for Sugar Reserch and Promotion*, 7, 123-128.
9. Devendra, B. N., Srinivas, N. & Naik, G. R. (2011). Direct Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed Production from *Tylophora indica* (Burm.f.) Merrill an Endangered, Medicinally Important Plant. *International Journal of Botany*, 7, 216-222.
10. Finer, J. J. (1987). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on high sucrose-containing medium *Plant Cell Reports*, 6, 372-374.
11. Gingeas, V. M. & Lineberger, R. D. (1989). Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 17, 191-203.
12. Gogate, S. S. & Nadguada, R. S. (2003). Direct induction of somatic embryogenesis from immature embryo of cashewnut (*Anacardium* occidentale). *Horticultural Science*, 97, 75-82.
13. Henry, Y., Vain, P. & Debuyser, J. (1994). Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Euphytica*, 79, 45-58.
14. Honda, Y., Mukasa, Y. & Suzuk, T. (2005). Traits of NuSun^{TM} varieties of sunflower in Hokkaido Japan. *Plant Product Science*, 8, 461-464.
15. Jacobsen, H. J. (1991). Biochemical and molecular studies on plant development in vitro. In: Bisw A.S. and Harris. J. R. (Eds.) Sub cellular Biochemistry. *Plant Gen. Eng. New York. Plenum Press*, 17, 265-277.
16. Jonoubi, P., Mousavi, A., Majd, A. & Daneshian, D. (2004). Improved (*Brassica napus* L.) regeneration from hypocotyls using thidiazuron and benzyladenine as cytokinin sources. *Pakistan Journal of Botany*, 36, 321-329.
17. Kao, A. N. & Michayluk, M. R. (1981). Embryoid formation in alfalfa cell suspension cultures from different plants. *In Vitro*, 17, 645-648.
18. Kumar, G. K. & Thomas, T. D. (2012). High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Clitoria ternatea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110,141-151.
19. Mandal, A. K. A., Chatterji, A. K. & Dutte Gupta, S. (1995). Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledonary leaves of safflower. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43, 287-289.
20. Merkle, S. A., Parrott, W. A. & Flin, B. S. (1995). Morphogenic aspect of somatic embryogenesis. In: *Torpedoed in vitro embryogenesis in plant*. (Pp: 155–203). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Boston, London.
21. Narasimhulu, S., Kiti, B., Shymprakash, P. B. & Chopra, V. L. (1992). Somatic embryogenesis in (*Brassica nigra* Koch). *Journal of Experimental Botany*, 43, 1203-1207.
22. Natalija, B. & Kupriene, R. (2005). Induction of somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of spring (*Brassica napus*). *Acta Universitatis Latviensis*, 691, 137-143.
23. Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutierrez-Mora, A. & Rodriguez-Garay B. (2007). Somatic embryogenesis in (*Agave tequilana*) Weber cultivar azul. *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 43, 569-575.
24. Schaik, C. E., Posthuma, A., De Jeu, M. J. & Jacobsen, E. (1996). Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on immature embryos of *Alstroemeria* spp. L. *Plant Cell Reports*, 15, 377-380.
25. Schuller, A., Reuther, G. & Geiger, T. (1989). Somatic embryogenesis for seeds explant of *Abies alba. Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 17, 53-58.
26. Sujatha, M. & Prabakaran, A. J. (2001). High frequency embryogenesis in immature zygotic embryos of sunflower. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65, 23-29.
27. Tokuhara, K. & Masahiro, M. (2003). Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of (*Phalaenopsis orchid*s) by adjusting carbohydrate sources. *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 39, 635-639.
28. Zeynali, M., Maleki zanjani, B., Saba, J. Niaazkhani, M., Ghaderian, M., Eivazi, A. & Mousavi-Anzabi, S.H. (2013). *In vitro* plant regeneration from alginate-encapsulated somatic embryos of rapeseed (*Brassica napus* cv. Tallayeh). *International Journal of Traditional Herb and Medicenal*, 1, 13-1.