نشریهٔ پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۷ شمارهٔ۱، صفحهٔ ۳۶-۲۵، نیمهٔ اول ۱۳۹۵

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 7, No. 1, 2016, p. 25-36

اثر فتوپریود بر جنین‌زایی رویشی در اندام‌های مختلف نخود (*Cicer arietinum* L.)

علی‌اکبر مظفری[1*] و کژال کمانگر[2]

۱- استادیار گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، سنندج

۲- دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۱۰

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی قابلیت جنین‌زایی‌رویشی اندام‌های برگ، اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل دو رقم نخود "پیروز" و "کاکا" روی محیط‌کشت پایهٔ موراشیگ و اسکوگ(MS) در شرایط تاریکی و روشنایی انجام شد. جهت ایجاد کالوس‌جنین‌زا، از محیط‌کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد، ۲،۴-دی‌کلرواستیک‌اسید (2,4-D) و نفتالین‌استیک‌اسید(NAA) هر کدام در غلظت‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر و همچنین تیدیازورون(TDZ) و پیکلورام در غلظت‌های ۱، ۱/۵، ۲و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. صفات موردمطالعه عبارت بودند از: کالوس‌زایی، جنین‌زایی، فراوانی جنین‌های کروی‌شکل، قلبی‌شکل و لپه‌ای و درصد جنین‌های نمویافته در هر ریزنمونه. داده‌ها بر اساس روش آماری فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل گردیدند. نتایج نشان‌داد اکسین‌ها نسبت به سیتوکنین‌ها روی کالوس‌زایی تأثیر بیشتری داشتند. بیشترین فراوانی جنین‌زایی در محیط‌کشت ۲میلی‌گرم در لیتر 2,4-D از ریزنمونه هیپوکوتیل در رقم کاکا در شرایط تاریکی مداوم حاصل شد. برای توسعه و بلوغ جنین، کالوس‌های دارای جنین‌های کروی به محیط‌کشت پایهٔ MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف انتقال داده‌شدند. فراوانی جنین‌زایی و شرایط تاریکی بیش‌تر از شرایط نوری بود. بالاترین درصد توسعه جنین کروی به جنین قلبی و سپس به لپه‌ای از ریزنمونه برگ رقم کاکا در محیط‌کشت حاوی تنظیم‌کننده‌رشد ۰/۵میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۵میلی‌گرم در لیتر2,4-D حاصل شد. غلظت ۲میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در هر دو شرایط نوری و تاریکی بالاترین جنین‌زایی را ایجاد نمود و همراه با افزایش غلظت2,4-D فراوانی جنین‌زایی کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: تاریکی، تنظیم‌کننده‌رشد، درون‌شیشه‌ای، رقم

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.) گیاهی دیپلوئید (2n=2x=16) و خودگشن است که از طریق بذر تکثیر می‌شود. عدم وجود سیستم مؤثر و کارآ برای باززایی این گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای یکی از محدودیت‌های اصلی در رابطه با دستورزی سلولی و ژنتیکی نخود می‌باشد (Barna & Wakhlu, 1993). انتخاب صحیح ریزنمونه و دامنه مناسبی از اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها می‌تواند منجر به تولید و توسعه جنین رویشی گردد (Shagufta Naz *et al*., 2008).

ریزازدیادی از طریق جنین‌زایی‌رویشی، روشی کارآمد برای تولید انبوه گیاهان تراریخت و تولید بذرمصنوعی است (Kiran *et al*., 2005). مطالعات انجام‌شده بر روی گیاه نخود نشان‌داده است که بلوغ جنین‌ها به‌طور معنی‌داری توسط pH، فتوپریود، آبسزیک‌اسید و نوع ژنوتیپ تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Barna & Wakhlu, 1993). جنین‌زایی مستقیم تحت تأثیر نور، غلظت ساکارز، نوع محیط‌کشت و ژنوتیپ قرار می‌گیرد (May & Trigiano, 1991). در گیاه *Quercus rubra* L. شرایط تاریکی برای جنین‌زایی‌رویشی مؤثرتر از شرایط روشنایی بوده است (Vengadesan *et al*., 2009). اثر نور بر روی جنین‌زایی‌سوماتیکی در برگ گیاه *Dentranthema grandiflora* نشان‌داده است که جنین‌زایی در شرایط تاریکی مداوم اتفاق می‌افتد، اما زمانی‌که ریزنمونه‌ها به‌شرایط نوری منتقل می‌شوند، جنین‌زایی به‌شدت کاهش می‌یابد (May & Trigiano, 1991). فراوانی جنین‌های رویشی تولیدشده در شرایط تاریکی به‌مراتب بیش‌تر از شرایط نوری است (Angoshtari *et al*., 2009). جنین‌زایی‌رویشی در شرایط

*نویسندهٔ مسئول: سنندج، خیابان پاسداران، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، صندوق پستی: ۴۱۶، کد پستی: ۶۶۱۷۷-۱۵۱۷۵، همراه: ۰۹۱۸۸۷۲۸۴۵۴، تلفن: ۰۸۷۱-۶۶۲۰۵۵۲، a.mozafari@uok.ac.ir

تاریکی با سرعت بیش‌تری نسبت به روشنایی اتفاق می‌افتد (Mozsar & Viczian, 1996). تاریکی یکی از فاکتورهای مهم و مؤثر در جنین‌زایی‌رویشی است. اثر این فاکتور بر روی بعضی از گیاهان موردبررسی قرارگرفته و نتایج مفیدی حاصل‌شده است. اگرچه جنین‌زایی‌رویشی در گیاه نخود قبلاً توسط محققان مختلفی مطالعه‌شده است، اما اثر تاریکی به‌عنوان یک فاکتور مؤثر چندان مورد مطالعه قرارنگرفته است. لذا در این تحقیق سعی‌شده است ضمن بررسی اثر دوره نوری بر جنین‌زایی‌رویشی در گیاه نخود، فاکتورهایی مانند نوع، غلظت و نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد، ژنوتیپ و اندام نیز به‌عنوان یک عامل مؤثردر جنین‌زایی مورد مطالعه قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، اپی‌کوتیل و برگ‌های جوان حاصل از کشت بذور دو رقم نخود "پیروز" و"کاکا" استفاده شد. برای تهیه ریزنمونه عاری از آلودگی، بذور موردنیاز پس از ضدعفونی سطحی بر روی محیط‌کشت پایه MS ½ فاقد تنظیم‌کننده‌رشد قرارداده شدند. برای استریل‌کردن بذر ابتدا بذور به‌مدت ۶۰ثانیه در الکل‌اتیلیک ۹۶درصد قرارداده شدند. پس از آن به‌مدت ۱۵دقیقه در هیپوکلریدسدیم ۲درصد کلرفعال ضدعفونی گردیدند. سپس سه‌بار در آب‌مقطر استریل و هر بار به‌مدت پنج‌دقیقه بذرها روی شیکر شستشو داده شدند. بذور قرارداده‌شده روی محیط‌کشت بعد از گذشت سه تا چهار روز جوانه زدند. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، اپی‌کوتیل و برگ‌های جوان تولیدشده از بذور به‌قطعات کوچک‌تر تقسیم و روی محیط‌کشتMS حاوی ۴درصد ساکارز و تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف شامل 2,4-D، NAA و TDZ و پیکلورام (از شرکت مرک آلمان) جهت القای کالوس‌جنین‌زا قرارداده شدند.

کشت بذور در ظروف‌شیشه‌ای ۱۰۰میلی‌لیتری و کشت ریزنمونه در پتری‌دیش‌های یک‌بار مصرف استریل ۱۰×۱۰سانتی‌متر انجام گرفت.

برای تولید جنین کروی ۱۶تیمار شامل 2,4-D و NAA هرکدام در غلظت‌های ۲، ۳، ۴ و ۵میلی‌گرم در لیتر و TDZ و پیکلورام هر کدام در غلظت‌های ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵میلی‌گرم در لیتر در شرایط تاریکی مداوم و روشنایی (۱۶ساعت روشنایی و ۸ساعت تاریکی) و در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد مورد استفاده قرار گرفتند. برای توسعه مراحل جنین‌زایی سه ترکیب مختلف شامل MS ½ حاوی ۱میلی‌گرم در لیتر زآتین؛ MS حاوی ۰/۵میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۵میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و MS حاوی ۰/۵میلی‌گرم در لیتر BA+۱میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مورداستفاده قرار گرفتند.

صفات موردمطالعه شامل کالوس‌زایی، جنین‌زایی، فراوانی جنین‌های کروی، قلبی و لپه‌ای (تعداد جنین در هر ریزنمونه) و درصد جنین‌های نمویافته در هر نوع ریزنمونه بودند. آزمایش جنین‌زایی در سه‌تکرار انجام و هشت‌ریزنمونه به هر واحد آزمایشی اختصاص‌داده شد. در آزمایش نمو جنین سه‌تکرار و شش‌ریزنمونه به هر واحد آزمایشی اختصاص یافت. تجزیه و تحلیل آماری بااستفاده از نرم‌افزار SAS ver. 9.1 صورت گرفت. جهت ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها بااستفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال یک‌درصد و یا با توجه به انحراف از میانگین داده‌ها (Error Bar) انجام شد.

نتایج و بحث

اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده بر کالوس‌زایی در شرایط نور و تاریکی

ریزنمونه‌های برگ، اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل دو رقم نخود "پیروز" و "کاکا" به‌منظور تولید کالوس‌جنین‌زا روی محیط‌کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد پیکلورام، TDZ، NAA و 2,4-D در غلظت‌های مختلف کشت گردیدند. هر سه‌نوع ریزنمونه فقط روی محیط‌های کشت حاوی NAA و 2,4-D هر کدام در غلظت‌های ۲، ۳، ۴ و ۵میلی‌گرم در لیتر تولید کالوس نمودند (جدول ۱). گیاهان از نظر نیاز فیزیکی (نور و درجه‌حرارت) برای القای کالوس با یکدیگر متفاوت‌اند، به‌طوری‌که بعضی از گیاهان در نور و بعضی در تاریکی، کالوس بیش‌تری تولید می‌کنند (Suhasini *et al.*, 1994) و این احتمالاً به ساختار ژنتیکی گیاه بستگی دارد.

ریزنمونه‌های هر دو رقم پیروز و کاکا در تیمار تاریکی کالوس بیش‌تری تولید کردند. کالوس‌های تولیدشده تحت تأثیر شرایط مختلف محیطی دارای تفاوت‌های مورفولوژیک بودند. در راستای نتایج Mozsar & Viczian, (1996) رنگ کالوس‌های تولیدشده در شرایط تاریکی کرم‌رنگ، فشرده و نرم‌تر از کالوس‌های تولیدشده در شرایط روشنایی بودند. کالوس‌های ایجادشده در تیمار روشنایی شیری‌رنگ بودند.

جدول ۱- وضعیت کالوس‌زایی دراندام‌های مختلف نخود تحت شرایط نور و تاریکی

Table 1. Status of callogenesis in different organs of chickpea under light and darkness conditions

تنظیم‌کننده‌رشد Growth regulators	غلظت Concentration (mg/l)	کالوس زایی* Callogenesis*					
		تاریکی Darkness			روشنایی Light		
		برگ Leaf	محور زیر لپه Hypocotyl	محور رو لپه Epicotyl	برگ Leaf	محور زیر لپه Hypocotyl	محور رو لپه Epicotyl
NAA	0.0	-	-	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-	-	-
	3.0	+	+	+	+	+	+
	4.0	+	+	+	+	+	+
	5.0	+	+	+	+	+	+
2,4-D	0.0	-	-	-	-	-	-
	2.0	+	+	+	+	+	+
	3.0	+	+	+	+	+	+
	4.0	+	+	+	+	+	+
	5.0	+	+	+	+	+	+
TDZ	0.0	-	-	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-	-
Picloram	0.0	-	-	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-	-

*: Callus induction (+), No callus induction (-)

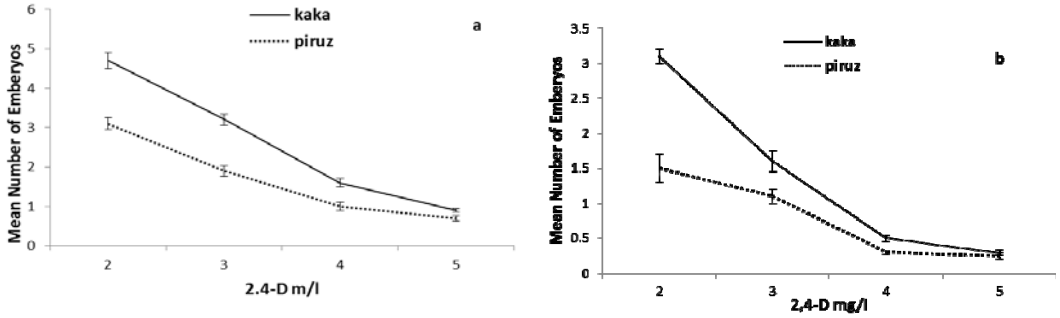
*: تولید کالوس(+)، عدم تولید کالوس(-)

اثر ژنوتیپ بر جنین‌زایی‌سوماتیکی در شرایط روشنایی و تاریکی

نتایج نشان‌داد که هر دو رقم کاکا و پیروز تحت تأثیر 2,4-D تولید کالوس‌جنین‌زا نمودند (شکل۱a و b). به‌لحاظ زمان شروع جنین‌زایی، رقم کاکا بعد از ۳۰روز و رقم پیروز پس از ۳۵روز جنین‌زا شدند. میانگین تعداد جنین‌های کروی‌شکل هر دو رقم تفاوت معنی‌داری ($p<0/01$) نشان‌دادند. این نتیجه نشان‌داد که جنین‌زایی‌سوماتیکی به‌شدت تحت تأثیر ژنوتیپ می‌باشد. اهمیت این‌امر زمانی آشکار می‌گردد که برای انتقال ژن نیاز به ژنوتیپی باشد که بیش‌ترین میزان جنین‌زایی را از خود نشان دهد، تا امکان انتقال ژن به نحو مؤثرتری صورت گیرد. میزان جنین‌زایی با افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد رابطه معکوسی داشت، به‌طوری‌که در هر دو رقم با افزایش غلظت 2,4-D از ۲میلی‌گرم در لیتر به ۵میلی‌گرم در لیتر در هر دو شرایط تاریکی و روشنایی فراوانی جنین‌زایی کاهش پیدا کرد (شکل۱ aوb) که این‌نتیجه با آزمایش‌های Suhasini *et al*, (1994) مطابقت داشت. با افزایش غلظت 2,4-D اختلاف‌آماری بین دو رقم از نظر فراوانی جنین تولیدشده کاهش‌یافت، به‌طوری‌که اختلاف بین دو رقم در شرایط نوری در غلظت ۵میلی‌گرم در لیتر معنی‌دار نبود (شکل۱ a وb).

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر جنین‌زایی‌رویشی در شرایط روشنایی و تاریکی

از میان محیط‌های کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد NAA، TDZ ، پیکلورام و 2,4-D که مورد آزمایش قرار گرفتند، هیچ‌کدام از ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد TDZ و پیکلورام (هرکدام در غلظت‌های ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵میلی‌گرم در لیتر) تولید کالوس نکردند و بدون تشکیل کالوس وارد فاز رشد رویشی شدند (شکل۲ a و b). اگرچه در محیط‌های کشت NAA و 2,4-D کالوس تولید شد (جدول ۱)، اما فقط 2,4-D توانست در اندام‌های مختلف هر دو رقم نخود در شرایط نوری و تاریکی جنین رویشی کروی‌شکل تولید نماید (جدول۲).



شکل ۱- جنین‌زایی‌رویشی ارقام نخود "پیروز" و "کاکا" تحت تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D در شرایط تاریکی و روشنایی
a: تاریکی، b: روشنایی

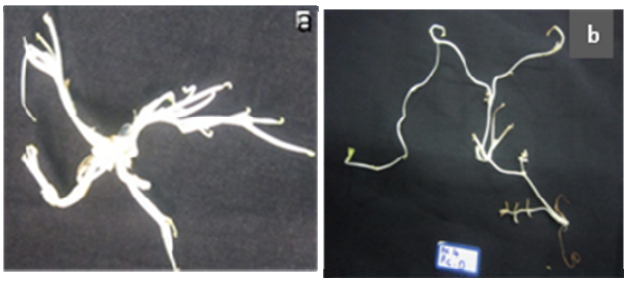
Fig. 1. Somatic embryogenesis in chickpea cultivars "Piruz" and "Kaka" affected by different concentrations of 2,4-D in darkness and light conditions, a: darkness, b: light

2,4-D نقش کلیدی در القاء جنین‌زایی‌رویشی دارد، زیرا این تنظیم‌کننده‌رشد موجب بیان ژن‌های مربوط به تنش می‌شود، و سایر تحریک‌کننده‌های جنین‌زایی را نیز تحریک می‌کند (Kitamiya *et al*, 2000; Quiroz-Figueroa, 2006). 2,4-D می‌تواند از طریق فعالیت اکسینی قوی با نفوذ و تأثیرگذاری بر متابولیسم درونی سایر فیتوهورمون‌ها، جنین‌زایی‌رویشی را به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم تنظیم کند (Quiroz-Figueroa, 2006). القاء جنین‌زایی‌سوماتیکی در محیط‌کشت حاوی NAA بهتر از سایر اکسین‌ها صورت می‌گیرد (Kiran *et al*., 2010). اکسین‌ها به‌عنوان عوامل اصلی در القاء جنین‌زایی و ایجاد قطبیت و تقسیم نامساوی در سلول‌ها، شناخته می‌شوند (Karkonen, 2001). هورمون‌های گیاهی وظیفه توزیع مواد در داخل گیاه را برعهده دارند (Pintos, 2002). رشد نخی‌شکل ریزنمونه در حضور تنظیم‌کننده‌های رشد گروه سیتوکنین‌ها (شکل ۲) به‌دلیل انتقال مواد به بخش‌های هوایی گیاه است. در چنین‌شرایطی ریشه‌ها نمی‌توانند رشد داشته‌باشند، اما در مقابل اندام‌های‌هوایی رشد سریعی می‌کنند (Karkonen, 2001).

اثر نوع ریزنمونه بر جنین‌زایی‌رویشی

نوع ریزنمونه اثر مستقیمی بر میزان جنین‌زایی داشت. هر سه ریزنمونه (برگ‌های جوان، اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل) در محیط‌کشت پایهٔ MS حاوی 2,4-D تولید کالوس‌جنین‌زا نمودند. در بررسی‌های آماری مشخص شد که بین سه‌ریزنمونه اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) از لحاظ فراوانی جنین‌های کروی‌شکل وجود دارد. در این تحقیق بیشترین تعداد جنین کروی‌شکل مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل در رقم کاکا در شرایط تاریکی (شکل۳a) و کم‌ترین تعداد جنین کروی مربوط به ریزنمونه اپی‌کوتیل در رقم پیروز در شرایط روشنایی بود (شکل۳b).

جنین‌زایی‌سوماتیکی می‌تواند نتیجه برایند هورمون‌های درون‌زا و عوامل محیطی از جمله تنظیم‌کننده‌های رشد باشد. غلظت هورمون‌های درون‌زا در اندام‌های مختلف در شرایط یکسان می‌تواند متفاوت باشد.



شکل ۲- رشد رویشی ریزنمونه برگ روی محیط‌کشت پایهٔ MS حاوی a: ۲میلی‌گرم در لیتر پیکلورام، b: ۲میلی‌گرم در لیتر TDZ

Fig. 2. Vegetative growth of leaf explant on MS basal medium containing; a: 2mg/l Picloram; b: 2 mg/l TDZ

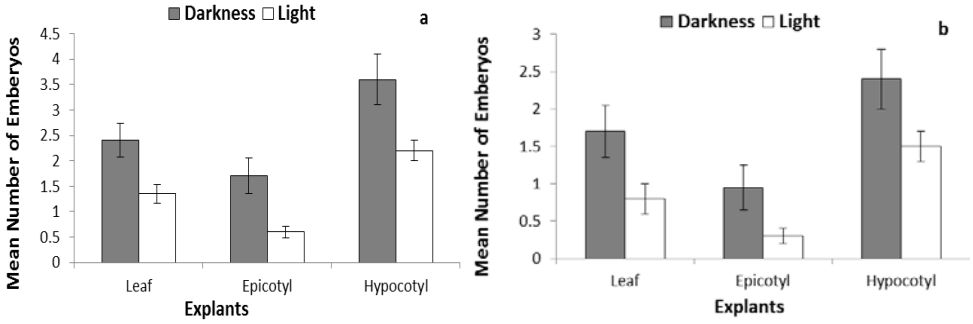
جدول ۲ - تولید کالوس‌جنین‌زا در اندام‌های مختلف نخود ارقام "پیروز" و "کاکا" در شرایط تاریکی و روشنایی

Table 2. Embryogenic callus induction in different organs of "Piruz" and "Kaka" chickpea cultivars in darkness and light conditions

تنظیم‌کننده‌رشد Growth regulators		غلظت Concentration (mg/l)	کالوس‌جنین‌زا* Embryogenic callus *				
			تاریکی Darkness			روشنایی Light	
		برگ Leaf	محور زیر لپه Hypocotyl	محور رو لپه Epicotyl	برگLeaf	محور زیر لپه Hypocotyl	محور رو لپه Epicotyl
NAA	2.0	-	-	-	-	-	-
	3.0	-	-	-	-	-	-
	4.0	-	-	-	-	-	-
	5.0	-	-	-	-	-	-
2,4-D	2.0	++++	++++	++++	+++	+++	+++
	3.0	+++	+++	+++	++	++	++
	4.0	++	++	++	+	+	+
	5.0	++	++	++	+	+	+
TDZ	1.0	-	-	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-	-
Picloram	1.0	-	-	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-	-

*: عدم‌وجود کالوس جنین‌زا (-)، ناچیز(+)، متوسط (++)، خوب(+++)، خیلی خوب(++++)

* No embryogenic callus (-), Rare (+), Medium (++), Good (+++), Very good (++++)



شکل۳- فراوانی جنین کرویشکل در ریزنمونه‌های برگ، هیپوکوتیل و اپی‌کوتیل در دو رقم نخود در شرایط نور و تاریکی روی محیط‌کشت پایهٔ MS حاوی 2,4-D؛ a: رقم کاکا، b: رقم پیروز

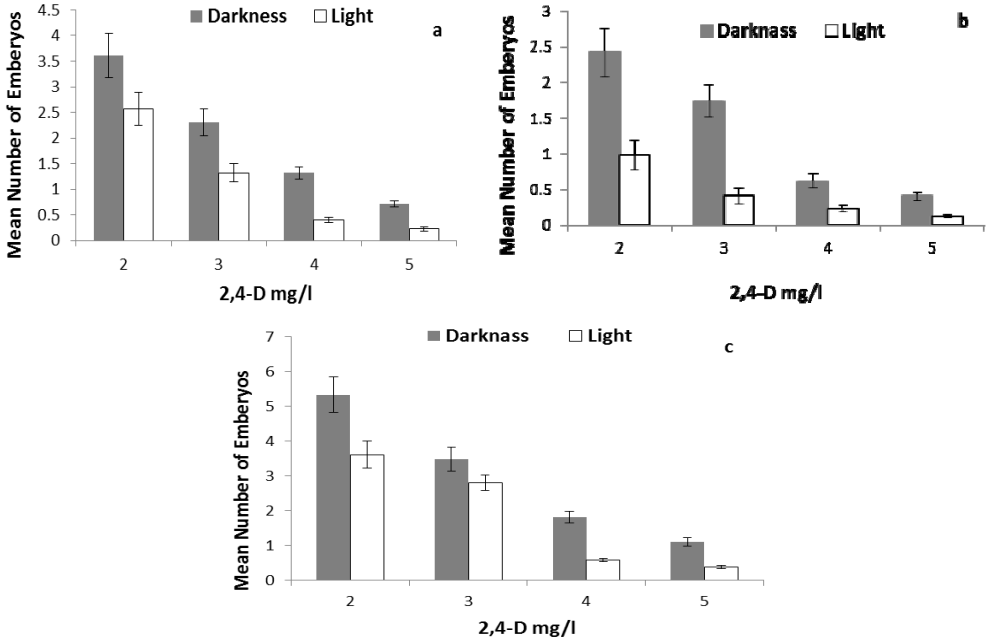
Fig. 3. Frequency of produced globular embryo of Leaves, Hypocotyl and Epicotyl explants in two cultivars of chickpea under darkness and light in MS basal medium containing 2,4-D; a: Kaka, b: Piruz

لازمه القای جنین‌سوماتیکی، بازسازمان‌دهی کامل وضعیت سلول از لحاظ فیزیولوژیکی، متابولیسمی و بیان ژن است (Feher *et al.*, 2002). تخمین‌زده می‌شود که برای تکمیل نمو جنین وجود بیش از ۳۵۰۰ژن مختلف ضروری است (Von Arnoild *et al.*, 2002).

اثرات تاریکی بر جنین‌زایی‌رویشی در اندام‌های مختلف

در دو تیمار تاریکی و روشنایی بعد از گذشت ۵ تا ۶هفته ریزنمونه‌ها توانستند جنین‌های کروی تولید کنند، اما از لحاظ فراوانی جنین‌های رویشی تولیدشده، بین اندام‌های مختلف تفاوت معنی‌داری($p\leq$۰/۰۱) وجود داشت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها به‌خوبی مشخص کرد که محیط‌کشت حاوی 2,4-D با غلظت ۲میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه هیپوکوتیل در شرایط تاریکی، بیش‌ترین میزان جنین‌زایی را داشت (شکل۴ c) درحالی‌که کمترین آن مربوط به محیط‌کشت حاوی 2,4-D با غلظت ۵میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه اپی‌کوتیل در شرایط روشنایی (شکل۴ b) بود. نتایج نشان‌داد که در هر سه ریزنمونه فراوانی جنین‌های رویشی در

تمام غلظت‌های هورمونی در شرایط تاریکی بیشتر از شرایط نوری می‌باشد. (شکل۴ a، b و c). در بعضی از گونه‌ها ممکن‌است فقط اندام‌های خاصی از گیاه بتوانند در محیط‌کشت مصنوعی فرایند جنین‌زایی‌رویشی بهتری داشته‌باشند. عکس‌العمل بافت یا اندام خاصی از گیاه در جنین‌زایی‌رویشی نتیجه برآیند هورمون‌های درون‌زا و تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی است و این عکس‌العمل می‌تواند از نظر فیزیولوژیکی بسته به نوع ریزنمونه متفاوت باشد.



شکل۴- فراوانی جنین‌زایی‌رویشی در ریزنمونه‌های اندام‌های مختلف دو رقم نخود پیروز و کاکا در شرایط نوری و تاریکی
a: برگ، b: اپی کوتیل، c: هیپوکوتیل

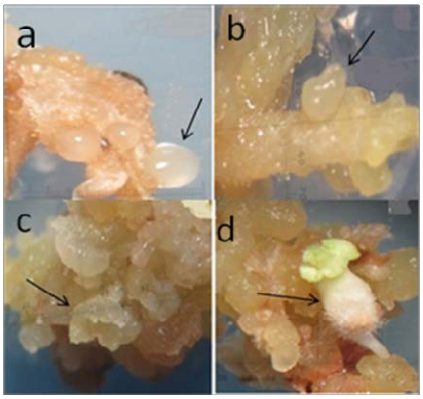
Fig .4. Frequency of produced somatic embryogenesis in explants of different organ in two cultivars of "Piruz" and "Kaka" under darkness and light; a: Leaves, b: Epicotyl , c: Hypocoty

هرچند که در هر دو شرایط روشنایی و تاریکی کالوس‌جنین‌زا تولید شد، اما می‌توان گفت عدم حضور نور برای تشکیل خوشه‌های سلولی جنین‌زا از سلول‌های منفرد مؤثرتر است که احتمالاً به‌دلیل تجمع گروه‌های سلولی جنین‌زا در شرایط تاریکی است (Durzan, 2012). به‌علاوه در شرایط تاریکی و دمای ثابت، هورمون‌های لازم برای تحریک جنین‌زایی افزایش می‌یابد (Durzan, 2012). این نتایج با مطالعات Suhasini *et al*, (1994) و Mashayekhi (2000) هم‌سویی داشت.

توسعه و بلوغ جنین‌ها

نتایج تجزیه واریانس(ANOVA) نشان‌داد که محیط‌های کشت مختلف، اثرات‌متنوعی بر نمو و بلوغ جنین‌های رویشی و رسیدن آن‌ها به مرحلۀ لپه‌ای دارند. برای رسیدن به مرحله باززایی، جنین‌زایی باید مراحل مختلف جنین کروی‌شکل، قلبی‌شکل و لپه‌ای را طی کند و برای رسیدن به آن نیاز به استفاده از تیمارهای مختلف و هم‌چنین نیاز به دو تا چهار بار واکشت دارد. تمام این مراحل به‌شدت تحت تأثیر ژنوتیپ، نوع محیط‌کشت، pH، میزان نور، نوع ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد قرار دارند (شکل۵ a-d). در این‌بررسی جنین‌های کروی‌شکل به‌دست‌آمده از مرحله قبل به محیط‌های کشت جدید انتقال داده شدند تا مراحل مختلف نمو را طی نمایند.

غلظت کم تنظیم‌کننده‌های‌رشد (۰/۵میلی‌گرم در لیتر BA+ ۰/۵میلی‌گرم در لیتر2,4 -D) توسعه جنین مرحله کروی‌شکل به جنین مرحله قلبی‌شکل و لپه‌ای را به‌طور معنی‌داری افزایش‌داد (جداول ۳ و ۴). در بیشتر پروتکل‌هایی که اکسین به‌عنوان یک القاءکننده کارآمد جنین‌زایی‌رویشی عمل می‌کند، توسعه جنین رویشی از طریق کاهش و یا حذف اکسین از محیط‌کشت به‌دست می‌آید (Khosravi *et al*., 2007; Gerdakaneh *et a*l., 2009).



شکل۵- مراحل جنین‌زایی‌رویشی تحت تأثیر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد

a: مرحله کروی در محیط‌کشت حاوی ۲میلی‌گرم در لیتر 2,4-D؛ b: مرحله قلبی‌شکل در محیط‌کشت حاوی ۰/۵میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۵میلی‌گرم در لیتر 2,4-D؛ c: مرحله لپه‌ای (جنین تاجی‌شکل) در محیط‌کشت (b)؛ d: اندام‌زایی در محیط‌کشت (b)

Fig. 5. Status of somatic embryogenesis development using different plant growth regulators

a: globular stage on medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D; b: heart-shaped stage on medium supplemented with 0.5 mg/l BA+ 0.5 mg/l 2,4-D; c: torpedo shaped (crown shaped embryonic) in the(b) medium, d: organogenesis in the (b) medium

بنابراین پیشنهادشده است که در طول جنین‌زایی‌رویشی از قرارگرفتن مستمر ریزنمونه در معرض سطوح بالای اکسین جلوگیری شود (Jimenez & Thomas, 2005; Tokuji & Kuriyama, 2003). نتایج این‌تحقیق، اثر مثبت تنظیم‌کننده‌رشد BA همراه با 2,4-D بر توسعه جنین نخود را نشان‌داد. در بیش‌تر مواردی‌که سیتوکینین‌ها جنین‌زایی‌رویشی را القاء می‌کنند، این‌عمل همراه با اکسین انجام‌گرفته است (Gaj, 2004). بااین‌حال، در برخی از موارد، اضافه‌کردن سیتوکینین‌ها به‌عنوان منبع اصلی تنظیم‌کننده‌های‌رشد برای ایجاد جنین رویشی کافی است (Iantcheva *et al.*, 1999). اضافه‌نمودن ۰/۵میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵میلی‌گرم در لیتر2,4-D به محیط‌کشت در مقایسه با سایر تنظیم‌کننده‌های‌رشد فراوانی جنین‌های رویشی مرحله قلبی‌شکل و لپه‌ای را به‌طور معنی‌داری($p<۰/۰۱$) افزایش داد (جداول ۳ و ۴). در بسیاری از گونه‌های گیاهی ژنوتیپ‌های درون یک‌گونه دارای ظرفیت جنین‌زایی متنوعی هستند. این تفاوت‌ها ممکن است به‌میزان توانایی فاکتورهای کلیدی در مسیر جنین‌زایی ارتباط داشته‌باشد (Karami *et al.*, 2006; Karimi *et al.*, 2008). تنظیم‌کننده‌های‌رشد به‌عنوان القاءکننده‌های جنین‌زایی‌رویشی عمل می‌کنند و برای حصول جنین‌زایی مطلوب، ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد مهم‌ترین نقش را ایفاء می‌کنند. در چندین سیستم کشت از جمله محورهای جنین گردو (Fernendez *et al.*, 2000)، گیاهچه بادام زمینی (Victor *et al.*, 1999) و جنین‌های زیگوتی آفتابگردان (Thomas *et al.*, 2004) مسیر اندام‌زایی شاخساره یا جنین‌زایی‌رویشی، تنها از طریق تغییر تنظیم‌کننده‌های‌رشد محیط‌کشت تغییر می‌کند. این اختلاف در سایر گیاهان نیز توسط دیگر محققان گزارش‌شده است (Mashayekhi, 2000; Saelim *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2007; Zare *et al.*, 2010).

در این تحقیق، میزان توسعه جنین‌ها در ارقام مختلف نخود متفاوت بود و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری($p<۰/۰۱$) در بین آن‌ها مشاهده گردید (جداول ۳ و۴). مقایسه میانگین اثرات‌متقابل رقم با محیط‌کشت و نوع ریزنمونه حاکی از آن است که درصد تشکیل جنین قلبی‌شکل و لپه‌ای در بین دو رقم و سه ریزنمونه در محیط‌کشت پایۀ MS حاوی تنظیم‌کننده‌های‌رشد مختلف، تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای ($p>۰/۰۱$) دیده‌می‌شود. ریزنمونه برگ در مقایسه با سایر ریزنمونه‌های موردمطالعه بیش‌ترین درصد تبدیل جنین کروی‌شکل به مراحل قلبی‌شکل و لپه‌ای در سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های‌رشد را داشت و با اختلاف معنی‌داری ($p>۰/۰۱$) در رتبه اول قرار گرفت. هیپوکوتیل در رتبه دوم و اپی‌کوتیل پایین‌ترین رتبه را به‌خود اختصاص‌داد (جداول ۳ و ۴). برای جنین‌زایی‌رویشی نوع بافت، تفاوت‌های قابل‌ملاحظه‌ای میان ریزنمونه‌های پاسخ‌دهنده و غیرپاسخ‌دهنده ایجاد می‌کند. این نشان‌دهنده مشارکت هورمون‌های درون‌زای گیاهی در توانمندی جنین‌زایی است (Jimenez & Thomas, 2005).

جدول۳- اثرات متقابل رقم با نوع ریزنمونه و محیط‌کشت بر روی درصد تبدیل جنین کروی به قلبی‌شکل در گیاه نخود

Table 3. The effect of cultivar, explant and medium interaction on percentage of globular embryo conversion to heart-shaped embryo

نوع محیط‌کشت*	درصد تبدیل جنین کروی به جنین قلبی‌شکل Percentage of globular embryo conversion to heart-shaped embryo		
Medium*	برگ Leaf	محور رو لپه Epicotyl	محور زیر لپه Hypocotyl
رقم کاکا Kaka cultivar			
A	40.00b	22.62efgh	32.71cd
B	58.41a	32.29cd	43.56b
C	33.25c	19.30ghij	26.00ef
رقم پیروز Piruz cultivar			
A	29.30de	15.37jkl	21.64efghi
B	41.73b	25.00efg	16.59ijk
C	23.36efg	8.28m	3.81m

*: A. محیط‌کشتMS ½ حاوی ۱میلی‌گرم در لیتر زآتین، B. محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۵میلی‌گرم در لیترD-2,4، C. محیط‌کشتMS حاوی ۰/۵میلی‌گرم در لیتر BA + ۱میلی‌گرم در لیترD-2,4

*: A. ½ MS medium supplemented with 1 mg/l Zeatin, B. MS medium supplemented with BA 0.5 mg/l + 0.5 mg/l 2,4-D, C. MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA + 1 mg/l 2,4-D

جدول ۴- اثرات متقابل رقم با نوع ریزنمونه و محیط‌کشت بر روی درصد تبدیل جنین قلبی‌شکل به جنین لپه‌ای در گیاه نخود

Table 4. The effect of cultivar, explant and medium interaction on percentage of heart-shaped embryo conversion to cotyledon embryo in chickpea

نوع محیط‌کشت*	درصد تبدیل جنین قلبی‌شکل به جنین لپه‌ای Percentage of heart-shaped embryo conversion to cotyledonary		
Medium*	برگ Leaf	محور رو لپه Epicotyl	محور زیر لپه Hypocotyl
رقم کاکا Kaka cultivar			
A	30.30b	10.30hi	20.00cde
B	36.63a	22.60cd	31.00b
C	17.30efg	3.30lmno	7.30ijk
رقم پیروز Piruz cultivar			
A	19.00cdef	6.34jkl	8.65hij
B	22.65cd	2.60lmno	5.00jklm
C	11.36h	4.00klmn	1.32mnop

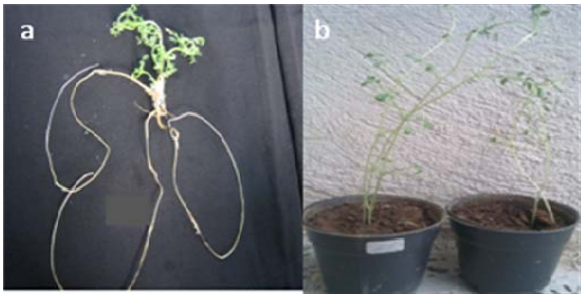
*:A. محیط‌کشت MS ½ حاوی تنظیم‌کننده‌رشد زآتین ۱میلی‌گرم در لیتر B. محیط‌کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌رشد BA ۰/۵میلی‌گرم در لیتر و 2,4-D ۰/۵میلی‌گرم در لیتر C. محیط‌کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌رشد BA ۰/۵میلی‌گرم در لیتر و 2,4-D۱میلی‌گرم در لیتر

*: A. ½ MS medium supplemented with 1 mg/l Zeatin, B. MS medium supplemented with BA 0.5 mg/l + 0.5 mg/l 2,4-D, C. MS medium supplemented with0.5 mg/l BA + 1 mg/l 2,4-D

از آنجاکه جنین‌زایی‌سوماتیکی در مراحل اولیه توسط اکسین خارجی یا آنتی‌اکسین کنترل می‌گردد، به‌نظر می‌رسد که جلوگیری از توزیع قطبی اکسین داخلی در خوشه‌های سلولی توسط اکسین خارجی، از تشکیل جنین ممانعت می‌کند (Karkonen, 2001).

مقاوم‌سازی گیاهچه‌های باززایی‌شده

گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از جنین‌های کوتیلدونی پس از رشد از محیط‌کشت جدا (شکل ۶ a) و به سینی کاشت حاوی پرلایت و کوکوپیت به نسبت ۱:۱ انتقال داده‌شدند و این گیاهچه‌ها به‌مدت دو هفته در اتاقک رشد در دمای ۱±۲۰درجه سانتی‌گراد، با شدت نور ۲۰۰۰لوکس و فتوپریود ۱۶ساعت روشنایی، در رطوبت‌نسبی ۹۰درصد نگه‌داری شدند. در ارقام موردمطالعه درصد زنده‌ماندن گیاهچه‌ها ۷۰ تا ۸۰درصد بود و به‌صورت طبیعی رشد نمودند. بقیه گیاهچه‌ها پژمرده‌شده و از بین رفتند.



شکل ۶- گیاهچه باززایی شده از جنین رویشی در گیاه نخود

a: گیاهچه به‌دست‌آمده از جنین‌های کوتیلدونی؛ b: گیاهچه آدابته‌شده به‌شرایط محیطی بیرون

Fig. 6. Regenerated plant from somatic embryo in chickpea

a: Regenerated plant from cotyledon embryo; b: Adaptation plant to environmental conditions

انتقال گیاهچه‌ها به گلخانه

گیاهچه‌های آدابته‌شده به گلدان‌های کوچک پلاستیکی سیاه‌رنگ حاوی خاک‌باغچه و ماسه استریل به نسبت ۱:۱ انتقال و در گلخانه با رطوبت‌نسبی ۷۵ تا ۸۰درصد نگه‌داری شدند و برای جلوگیری از دست‌دادن سریع رطوبت، سطح گیاهان با کیسه پلی‌اتیلن شفاف پوشانده‌شد و بعد از دو هفته گوشه بالایی کیسه بریده‌شد. هم‌چنین رطوبت‌نسبی گلخانه تا ۶۰درصد کاهش‌یافت تا گیاهان به‌تدریج به‌شرایط محیطی بیرون آدابته شوند. پس از چهار هفته ۶۰درصد گیاهچه‌ها زنده ماندند و به‌صورت طبیعی رشد نمودند (شکل۶b). بنابراین می‌توان نتیجه‌گرفت که القای جنین رویشی به فاکتورهای مختلفی نظیر رقم، نوع، غلظت و نسبت تنظیم‌کننده‌های‌رشد و نوع ریزنمونه بستگی دارد. فراوانی جنین‌های رویشی بسته به نوع ریزنمونه‌ها و نوع ژنوتیپ متفاوت است. جنین‌زایی‌رویشی در شرایط تاریکی بهتر از شرایط نوری اتفاق می‌افتد. رقم کاکا نسبت به پیروز به‌لحاظ توسعه جنین رویشی توانمندتر است. عکس‌العمل بافت یا اندام خاصی از گیاه در جنین‌زایی‌رویشی نتیجه برآیند هورمون‌های درون‌زا و تنظیم‌کننده‌های‌رشد خارجی است و این عکس‌العمل می‌تواند از نظر فیزیولوژیکی بسته به نوع ریزنمونه متفاوت باشد.

منابع

1. Ali, A., Naz, S., and Iqbal, J. 2007. Effect of different explants and media compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane. Pakistan Botanical Society 39(6): 1961-1977.
2. Angoshtari, R., Tavakkol, R., Afshari, K.S., and Omidi, M. 2009. Effects of abscisic acid on somatic embryogenesis and induction of desiccation tolerance in *Brassica napus*. Asian Journal of Plant Sciences 8: 276-284.
3. Barna, K.S., and Wakhlu, A.K., 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Report 12: 521-524.
4. Durzan, D.J. 2012. Interpolated apomictic somatic embryogenesis, and sporogenesis, asexual heterospory, mito sporogenesis and genomic silencing in a gymnosperm artificial sporangium. Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management. June 25-28, 2012. Brno, Czech Republic. pp. 3-36.
5. Fehér, A., Pasternak, T., Otvos, K., Miskolczi, P., and Dudits, D. 2002. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. Biológia 57: 5-12.
6. Fernandez, H., Perez, C., and Sanchez-Tam, R. 2000. Modulation of the morphogenic potential of the embryonic axis of *Juglans regia* L. by cultural conditions. Plant Growth Regulators 30: 125-131.
7. Gaj, M.D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* L. Plant Growth Regulators 43: 27-47.
8. Gerdakaneh, M., Mozafari, A., Khalighi, A., and Sioseh-mardah, A. 2009. The effects of carbohydrate source and concentration on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences 6(1): 76-80.
9. Iantcheva, A., Vllahova, M., Bakalova, E., Kondorosi, E., Elliott, M.C., and Atanassov, A. 1999. Regeneration of diploid annual medics via direct somatic embryogenesis promoted by thidiazuron and benzylaminopurine. Plant Cell Reports 18: 904-910.

10. Jimenez, V.M., and Thomas, C. 2005. Participation of Plant Hormones in Determination and Progression of Somatic Embryogenesis. In: A. Mujid and J. Samaj (Eds.). Somatic Embryogenesis Plant Cell Monographs. DOI 10.1007/7089_034/ Introduction to the Electronic Age. E-Published online. pp 103-118.availble at Web site molbiol.ru/forums/uploads/.../ Somatic_Embryogenesis.txt
11. Karami, O., Deljou, A., Esna-Ashari, M., and Ostad-Ahmadi, P. 2006. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Scientia Horticulturae 110: 340-344.
12. Karimi, K.G., and Karami, O. 2008. Picloram-induced somatic embryogenesis in leaves of strawberry (*Fragaria ananassa* L.). Acta Biologica Cracoviensia Series Botanic 50(1): 69-72.
13. Karkonen, A. 2001. Plant tissue cultures as models for tree physiology: Somatic embryogenesis of *Tilia cordata* and Lignin biosynthesis in *Picea abies* suspension cultures as case studies. Department of Biosciences Division of Plant Physiology University of Helsinki. 89 pp.
14. Kiran, G., Sujata, M., Srinathrao, P.B., and Kishor, K. 2010. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature explants of chickpea. Biological Plantarum 54(1): 121-125.
15. Kiran, C.P., Kaviraj, G., Jogeswar, P.B., Kavi, K., and Srinath, R. 2005. Direct and high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyls of chickpea (*Cicer arietinum* L.) a grain legume. Current Science 89: 1012-1018.
16. Kitamiya, E., Suzuki, S., Sano, T., and Nagata, T. 2000. Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. Plant Cell Reports 19: 551-557.
17. Khosravi, S., Vatanpour Azghandi, A., Hadad, R., and Mojtahedi, N. 2007. *In vitro* propagation of a commercial cultivar of Lilium (*Lilium longiflorum* var: Ceb-Dazzel) throught direct somatic embryogenesis. Seed and Plant Improvement Journal 23(3): 159-168.
18. Mashayekhi, K. 2000. The protein synthesis spectrum during the induction phase of somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota* L.) culture and the role of nitrogen forms for embryo development. Institute of Plant Nutrition Department of Tissue Culture Justus Liebig University, Giessen, Germany.199 pp.
19. May, R.A., and Trigiano, R.N. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. Journal of the American Society for Horticultural Science 116(2): 366-371.
20. Mozsar, J., and Viczian, O. 1996. Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis* spp. Vitis 35(4): 155-157.
21. Pintos, B., Martin, J.P., Centeno, M.L., Villalobos, N., Guerra, H., and Martin, L. 2002. Endogenous cytokinin levels in embryogenic and non-embryogenic calli of *Medicago arborea* L. Plant Science 163: 955-960.
22. Quiroz-igueroa, F.R., Rojas, R., Herrera, R.M., and Galaz-Avalos,V.M. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 86: 285-301.
23. Saelim, L., Phansiri, S., Supatcharee, N., Malinee, U., and Jarunya, N. 2006. Optimization of *in vitro* cyclic somatic emhryogenesis and regeneration of the Asian cultivars of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) for genetic manipulation system global. Journal of Biotechnology & Biochemistry 1(1): 07-15.
24. Shagufta, Naz, A.A., Fayyaz, A.S., and Javed, I. 2008. Somatic embryogenesis from immature cotyledons and leaf calli of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pakistan Journal of Botany 40(2): 523-531.
25. Suhasini, K., Sagare, A.P., and Krishnamurthy, K.V. 1994. Direct somatic embryogenes is from mature embryo axes in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Science 102: 189-194.
26. Thomas, C., Meyer, D., Himber, C., and Steinmetz, A. 2004. Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. Plant Physiology & Biochemistry 42: 35-42.
27. Tokuji, Y., and Kuriyama, K. 2003. Involvement of gibberellins and cytokinin in the formation of embryogenic cell clumps in carrot (*Daucus carota*). Journal of Plant Physiology 160: 133-141.
28. Vengadesan, G., Paula, Æ., and Pijut, M. 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 97: 141-149.
29. Victor, J.M.R., Murch, S.J., Krishna, Raj, S., and Saxena, P.K. 1999. Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: The role of thidiazuron and N6-benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis. Plant Growth Regulation 28: 9-15.
30. Von, Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., and Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 233-249.
31. Zare, A.R., Solouki, M., Omidi, M., and Irvani, N. 2010. Callus induction and plant regeneration in Ferula *Assa Foetida* L. Trakia Journal of Sciences 8(1): 11-18.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 7, No. 1, 2016, p. 25-36

Effect of photoperiod on somatic embryogenesis in different organs of chickpea (*Cicer arietinum* L.)

Mozafari[1*], A.A. & Kamangar[2], K.

1. Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2. Former MSc. Student, Department of Horticulture, Islamic Azad University of Saveh, Saveh, Iran

Received: 23 April 2014
Accepted: 1 August 2015

Introduction

Somatic embryogenesis is an efficient platform for the generation of transgenic plants and synthetic seeds (Kiran *et al*., 2005). Somatic embryo's growth and development were influenced by different factors, including photoperiod, genotype as well as acidity, plant growth regulators (PGRs) and nutrient content of tissue culture media (May & Trigiano, 1991). Darkness is one of the important and vital affecting variables on somatic embryogenesis (Angoshtari *et al*., 2009). In some studies, positive effects of darkness on some plant species have been reported. This study was carried out to investigate the potential of somatic embryogenesis from leaf, hypocotyl and epicotyl explants of two chickpea cultivars (Piruz and Kaka) on basal Murashige and Skoog (MS) medium in darkness and light conditions.

Materials and Methods

In this study, hypocotyl, epicotyl and young leaf segments of two chickpea cultivars "Piruz" and "Kaka" were used as explant. Surface sterilization was performed by soaking chickpea seeds in 96% ethanol solution for 60 Seconds and immediate immersion in 2% sodium hypochlorite solution for 15 minutes. Following rinsing three times in sterile double-distilled water, the seeds were aseptically cultured on free-PGRs ½ MS medium (Murashige & Skoog, 1962). After 3-4 days, explants were excised from germinated seedlings and implanted on MS medium supplemented with different concentration of 2,4-D and NAA (2, 3, 4 and 5 mg/l) as well as different levels of TDZ and Picloram (1, 1.5, 2 and 2.5 mg/l) to the initiation of embryogenic callus. To produce globular embryos, 16 hormonal treatments were then incubated at 25±1 ºC under continuous darkness and photoperiod (16-h light and 8-h darkness) at a light intensity of 36 µmol m^{-2} s^{-1}. In order to develop the embryogenesis, another three treatments were used under similar condition. For embryonic callus induction the following characteristics were studied: embryogenesis frequency, the frequency of globular, heart shape and cotyledonary embryos. Regenerated plantlets from mature embryos were washed thoroughly with sterile water and then transplanted to plug tray and fertilized with Hogland solution two times per week. Plants were transferred to the pot and kept under greenhouse condition. Plants were finally transferred to open-field condition. This study was conducted as the factorial design based on completely a randomized design with five replicate (jar) and four shoots per each jar. The collected data were analyzed by SAS ver. 9.1 software. Mean comparisons were carried out by Duncan test at the 1% level of significancy.

Results and Discussion

The results showed that auxins were more effective than cytokinins in terms of callus induction. The highest frequency of embryogenesis was achieved with hypocotyl explants in 2 mg/l 2,4-D in Kaka cultivar under constant darkness. For the development of embryos, callus with globular embryo were transferred to MS medium supplemented with different PGRs. The frequency of embryogenesis was higher in dark condition than that of in the light condition. During callogenesis, plant species require different physical (light

* **Corresponding author:** a.mozafari@uok.ac.ir, Mobile: +98 9188728454

and temperature) conditions e.g. some plant produces more callus in darkness while in the other species, callus induction and proliferation took place in a normal photoperiod (Suhasini *et al*., 1994). It probably depends on the genetic structure of the plant. The highest percentage of globular embryo development of the heart shape embryo and then to cotyledonary embryo was obtained from Kaka leaf explants growing on medium supplemented with 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l of 2,4-D. 2mg/l of 2,4-D in both dark and light conditions was induced the highest rate of embryogenesis. For the initiation of embryogenesis, 2, 4-D play an undeniable role because of this synthetic auxin can lead to overexpression of different genes during stress as well as genes involved in initiation of somatic embryogenesis (Kitamiya *et al*., 2000; Quiroz-Figueroa, 2006). 2,4-D by its strong auxin activity, can influence metabolism of other phytohormones which in turn affect somatic embryogenesis directly or indirectly (Quiroz-Figueroa, 2006). A prerequisite to induce somatic embryo is a reorganization of cell physiology, metabolism and gene expression (Fehret *et al*., 2002). In this study, with increasing concentrations of the 2,4-D, embryogenesis was reduced. Additionally increasing of 2,4-D concentration could reduce frequency of embryogenesis.

Conclusion

Somatic embryo induction depends on various factors including cultivar, type, concentration and combination of PGRs as well as explant type. By comparison to the light condition, darkness is in favor of somatic embryo biogenesis. Between two cultivars, Kaka showed better ability in formation of somatic embryos. Response of a plant tissue or specific organ in somatic embryogenesis process is the outcome of endogenous hormones and exogenous growth regulators, and this response can be physiologically varied depending on the type of explant.

Key words: Cultivar, Darkness, Growth regulators, *In vitro*