اثر مانیتول بر رشد رویان‌های بدنی تولید شده از پینه رویان‌زای میخک (*Dianthus caryophyllus* L.)

علی دلجو[۱]، امید کرمی[۱] و محمود اثنی عشری[۲]

چکیده

شرایط لازم برای باززایی مطلوب چهار رقم میخک (Nelson، Impulse، Sagres و Spirit) به روش رویان‌زایی بدنی بررسی شد. بدین منظور محیط کشت (موراشیگ و اسکوگ) دارای ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA برای‌ایجاد کالوس رویان‌زا استفاده شد. رویان‌های بدنی زمانی به‌دست آمد که پینه‌های رویان‌زا به محیط کشتMS فاقد تنظیم کننده رشد و دارای ۳۰ گرم در لیتر سوکروز به تنهائی و یا همراه با غلظت‌های مختلف مانیتول (۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ گرم در لیتر) انتقال یافتند. در محیط کشت حاوی مانیتول بدون سوکروز رویان سوماتیکی ایجاد نشد. با افزودن مانیتول به محیط کشت،ایجاد رویان‌های بدنی روی پینه‌های رویان‌زا به میزان قابل توجهی افزایش یافت. رویان‌های‌ایجاد شده بر روی محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های بالای مانیتول (۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ گرم در لیتر) به طور نرمال توسعه یافتند. رویان‌های بدنی به محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز انتقال داده شدند و حدود ۹۵٪ از آنها به صورت گیاهچه کامل باززا گردیدند. گیاهچه‌های به‌دست آمده در شرایط گلخانه نیز به طور عادی مراحل رشد خود را ادامه دادند.

واژه‌های کلیدی: میخک، پینه رویان‌زا، رویان بدنی، مانیتول

مقدمه

میخک (*Dianthus caryophyllus*) یکی از مهم ترین محصولات گلکاری دنیا می‌باشد که هم به جهت زیبایی و گوناگونی رنگ و هم از نظر اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (۱). محدودیت‌های موجود در روش‌های بهنژادی سنتی (تلاقی و گزینش) و داشتن ویژگی‌های هتروزیگوتی بالا در گیاه میخک باعث شده است که کاربرد فنون جدید سلولی مولکولی جهت اصلاح خصوصیات اقتصادی این گیاه ضرورت پیدا کند. کاربردی شدن فنون مولکولی خود نیازمند توسعه روش‌های مختلف کشت بافت است.

رویان بدنی (Somatic embryogenesis) عبارت از تشکیل

۱. به ترتیب استادیار و مربی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲. استادیار باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.14.6]

رویان از سلول‌های رویشی(Somatic celles) در شرایط کشت درون شیشه‌ای است به طوری که این رویان‌ها شبیه به رویان معمولی درون بذر می‌باشند و قادرند به صورت گیاه کامل نمو پیدا کنند. از این روش کشت بافت به صورت ابزاری می‌توان برای بررسی‌های پایه نظیر بیوشیمی، فیزیولوژی، مرفولوژیکی و تشریح که در بسیاری از دستاوردهای بیوتکنولوژی مانند انتقال ژن (Gene transf ormation)، حفظ ژرم پلاسم (Germplasm conservation)، تولید بذر مصنوعی (Artificial seed)، تولید متابولیت‌های ثانویه (Secondary metabolites)، ایجاد گوناگونی ژنتیکی (Genetic varietion) و حذف ویروس (Virus elemination) از گیاه استفاده می‌شود (۳۰).

گزارش‌های بسیار نشان داده‌اند که گیاه میخک از طریق تشکیل شاخساره نابجا (Adventitious shoot) روی ریز نمونه‌های مختلف مانند ساقه، برگ، گلبرگ، نهنج، تخمدان و تخمک باززایی (Regeneration) شده است (۲، ۳، ۶، ۱۳، ۱۴، ۱۷، ۱۸، ۲۰، ۲۱، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۱)، در حالی که گزارش‌های اندکی در مورد باززایی این گیاه از طریق رویان‌زایی سوماتیکی انتشار یافته است (۴، ۲۴ و ۳۲).

از میان ترکیب‌های مختلف موجود در محیط کشت، کربوهیدارت‌ها نقش بسیار مهمی در فرایند رویان‌زایی بدنی‌ایفا می‌کنند (۲۱). برخی از گزارش‌ها حاکی از آن است که میزان رویان‌زایی بدنی تحت تأثیر نوع و میزان کربوهیدارت‌های به‌کار رفته در محیط کشت قرار می‌گیرد (۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۶). هم‌چنین برخی از تحقیقات نشان داده‌اند به‌کاربردن مانیتول در محیط کشت، ایجاد و توسعه نرمال رویان‌های سوماتیکی را در پی خواهد داشت (۳، ۵ و ۷). تاکنون هیچ مطالعه‌ای در رابطه با اثر مانیتول بر رویان‌زایی بدنی گیاه میخک انجام نشده است. در این بررسی اثر غلظت‌های مختلف مانیتول برروی میزان رویان‌های بدنی تولید شده از پینه‌های رویان‌زایی گیاه میخک شرح داده شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این تحقیق روی چهار رقم میخک (Nelson، Impulse، Sagres و Spirit) که از کشور هلند وارد شده‌اند و در شهرستان محلات کشت و کار می‌شوند انجام گرفت. جوانه‌های گل نارس به طول ۱/۵-۱ سانتی‌متر از گیاهان در حال رشد در گلخانه برداشت شده و به مدت سه هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سطح خارجی جوانه‌ها با قرار دادن در محلول ۲٪ هیپوکلریت سدیم (سفید کننده تجارتی وایتکس) حاوی ۵/۲۵ ٪ کلر فعال به مدت ۲۰ دقیقه گندزدایی شدند و سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو گردیدند. کاسبرگ‌ها و نهنج از جوانه‌ها حذف شدند و گلبرگ‌ها به قطعاتی به طول تقریبی ۴- ۳ میلی‌متر بریده و سپس روی محیط کشت قرار داده شدند.

ترکیبات محیط کشت و شرایط نگه‌داری

۱. تشکیل پینه (Callus formation)

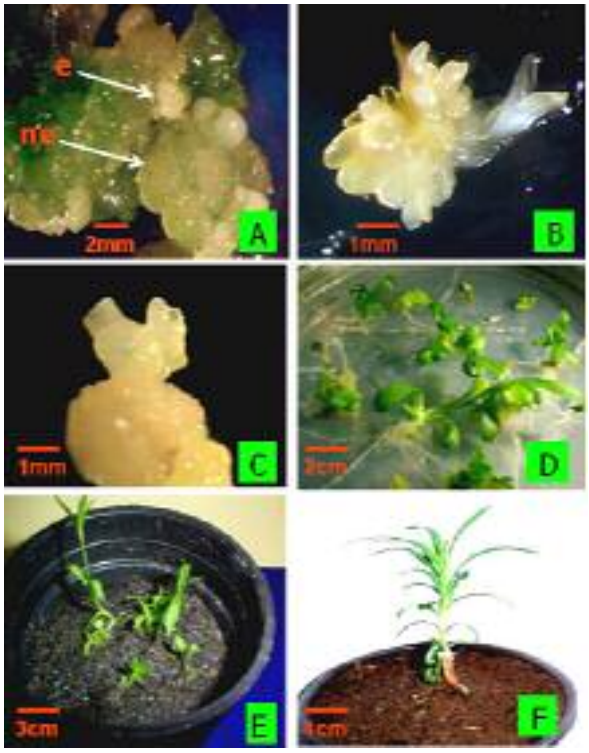
برای تشکیل پینه ریزنمونه‌های گلبرگ برای 8 هفته بر روی محیط کشت MS (۱۵) محتوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۲،۴-دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)) و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA (۶-بنزیل آدنین (6-Benzyladenine)) کشت شدند.

۲. رویان‌زایی (Embryogenesis)

پس از ۹-۸ هفته بعد از شروع کشت، انواع پینه‌های ایجاد شده روی محیط کشت اولیه برداشته شدند و به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف مانیتول (Mannitol) (۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ گرم در لیتر) بدون تنظیم کننده رشد منتقل گردیدند. بعد از ۶ هفته، تعداد رویان‌های تشکیل شده شمارش شدند. به منظور بررسی اثر ارقام و مقادیر مختلف مانیتول روی ایجاد رویان از پینه‌های رویان‌زا، این آزمایش در قالب طرح فاکتریل اجرا گردید و ۴۰±۲۰۰ میلی‌گرم پینه رویان‌زا برای هر تیمار و هر یک در سه تکرار منظور شد. تجریه داده‌ها با استفاده

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.14.6]



شکل ۱. مراحل مختلف رویان‌زایی بدنی و باززایی آن در گیاه میخک (D.caryophyllus). (A): تشکیل پینه‌های غیررویان‌زا (ne) و پینه‌های رویان‌زا (e) ۸ هفته بعد ازکشت در محیط کشت MS محتوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA. (B): تشکیل و توسعه رویان بدنی بعد از ۵ هفته بر روی محیط کشت MS حاوی ۶۰ گرم در لیتر مانیتول. (C): رویان‌زایی بدنی ثانویه روی محیط کشت حاوی ۳۰ گرم در لیتر مانیتول. (D): جوانه زنی رویان بدنی دو هفته بعد از کشت در محیطMS کشت ۱/۲فاقد تنظیم کننده رشد. (E): توسعه گیاهچه در گلدان حاوی ماسه بعد از دو هفته (F): توسعه گیاهچه در گلدان حاوی خاک بعد از ۴ هفته

از نرم افزار SAS صورت پذیرفت و در پایان میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

۳. جوانه زنی (Germination)

برای جوانه زنی، رویان‌های لپه‌ای به محیط کشت MS۱/۲ حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر سوکروز و فاقد تنظیم کننده رشد منتقل شدند. پس از چهار هفته، تعداد رویان‌های باززایی شد شمارش شدند. pH همه محیط‌های کشت پیش از اتوکلاو نمودن با استفاده از NaOH یک نرمال تا حد ۵/۸ تنظیم گردید و برای نیمه جامد محیط‌های کشت از آگار (Agar-Agar Merck) به میزان ۷ گرم در لیتر استفاده شد.

انتقال گیاهچه‌ها به خاک

گیاهچه‌های با طول تقریبی ۵۰ میلی متر از محیط کشت جوانه‌زنی برداشته شده و پس از شستشوی ریشه آنها توسط آب مقطر استریل به گلدان‌های پلاستیکی حاوی ماسه استریل انتقال یافته و در شرایط محیطی ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت فتو پریود نگه‌داری شدند. گیاهچه‌های سازگار شده در گلدان‌های حاوی ماسه به گلدان‌های پلاستیکی حاوی مخلوطی از پیت و ماسه و خاک باغچه با نسبت حجمی ۱:۱:۱ منتقل گردیدند و سپس برای ادامه رشد در گلخانه نگه‌داری شدند.

نتایج و بحث

تشکیل پینه

در سه هفته اول کشت، پینه‌های زرد مایل به سبز روی حاشیه ریزنمونه‌های گلبرگ ایجاد شدند (شکل ۱ A.ne).این پینه‌ها دارای بافتی نرم بوده و سرعت رشد بالایی داشتند. شش تا

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.14.6]

جدول ۱. اثر نوع رقم و مقادیر مختلف مانیتول روی تعداد رویان‌های بدنی تشکیل شده در ۶ هفته

نوع رقم	تعداد رویان ایجاد شده						
	Spirit	Sagres	Nelson		Impulse		
	۲۱۰/۸۵ b	۱۸۰ c	۲۴۴/۳۸ a		۱۸۱/۴۲ c		
مانیتول (گرم در لیتر)	۰	۱۵	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰
	۵۹/۸۳ f	۱۴۰/۹۱ e	۲۵۶ c	۲۸۶/۷۲ a	۲۷۱/۱۶ b	۲۵۶ c	۱۶۰/۵۰ d

*: حروف مشابه در هر ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف‌هاست (P<۰/۰۵).

هشت هفته بعد از کشت، روی پینه‌های اولیه پینه‌های شیری رنگ ایجاد شدند. این پینه‌ها دارای بافت سفت، گرانوله و کم رشد بودند (شکل ۱ A.e).

تشکیل رویان بدنی

دو هفته بعد از انتقال پینه‌های شیری رنگ به محیط کشت MS حاوی سوکروز و یا مانیتول همراه با سوکروز، ساختارهای رویانی کروی بر روی آنها تشکیل شدند. بعد از ۳-۲ هفته، رویان‌های کروی به صورت رویان‌های اژدری و لپه‌ای توسعه یافتند (شکل ۱ B). پینه‌های زرد مایل به سبز به محیط‌های کشت مشابه پینه‌های شیری منتقل شدند اما هیچ نوع ساختار رویانی بر روی آنها تشکیل نشد. و با توجه به نتایج فوق، پینه‌های رزد مایل سبز به عنوان پینه غیر رویان‌زا و پینه‌های شیری به عنوان پینه رویان‌زا شناخته شدند.

جدول ۱ اثر مقادیر مختلف مانیتول بر تعداد رویان ایجاد شده را در همه ارقام نشان می‌دهد. چنانچه مشاهده می‌شود با افزودن مانیتول به محیط کشت، تعداد رویان‌های تشکیل شده روی پینه‌های رویان‌زا به طورقابل ملاحظه‌ای (P<۰/۰۵) افزایش یافتند. روی محیط‌های کشت حاوی ۶۰ تا ۱۲۰ گرم در لیتر مانیتول بیشترین تعداد رویان بدنی تشکیل شد. در مقادیر بالای مانیتول (۱۵۰ گرم در لیتر) و هم‌چنین در غلظت پایین آن (۱۵ گرم در لیتر) تعداد رویان‌های تشکیل شده در مقایسه با سایر غلظت‌ها پایین‌تر بود. هم‌چنین برای تشکیل رویان بین غلظت مانیتول و نوع رقم اثر متقابل یافت شد (جدول ۲) با طولانی شدن زمان کشت، تعداد رویان‌های تشکیل شده روی پینه‌های رویان‌زا در همه محیط‌ها افزایش یافت. روبرت نتایج مشابهی گزارش کرد به طوری‌که در مطالعه آنها با اضافه نمودن مانیتول به محیط کشت تعداد رویان‌های بدنی‌ایجاد شده در کشت‌های رویان‌زای صنوبر در مقایسه با محیط بدون مانیتول به میزان قابل توجهی افزایش یافت. برای تشکیل رویان بدنی بین ارقام تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد (P<۰/۰۵). بیشترین رویان‌زایی در رقم Nelson مشاهده شد اما در بین ارقام Impulse وSagres تفاوت معنی‌داری دیده نشد (جدول ۱). در بسیاری از گونه‌های گیاهی، نشان داده شده که ژنوتیپ‌ها فردی درون یک گونه ظرفیت رویان‌زایی متنوعی دارند (۱۲). این قبیل از تفاوت‌ها در ظرفیت رویان‌زایی ممکن است به میزان توانایی عناصر کلیدی در میسر رویان‌زایی ارتباط داشته باشد. اختلاف بین ارقام میخک، در رویان‌زایی مستقیم گزارش شده است (۳۲).

در محیط کشت حاوی مانیتول بدون سوکروز هیچ نوع ساختار رویانی روی پینه‌های رویان‌زا ایجاد نشد و بعد از مدتی پینه‌ها به رنگ سبز و بافت نرم مشابه کالوس‌های غیر رویان‌زا تبدیل شدند. در رویان‌زایی بدنی گیاه هویج (۷) و خیار (۱۰) گزارش شده است که در محیط کشت حاوی مانیتول بدون سوکروز هیچ نوع ساختار رویانی ایجاد نمی‌شود. اگرچه نقش

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.14.6]

جدول ۲. اثر متقابل نوع رقم و مقادیر مختلف مانیتول روی تعداد رویان‌های بدنی تشکیل شده در ۶ هفته

Impulse	Nelson	Sagres	Spirit	
تعداد رویان ایجاد شده		مانیتول (گرم درلیتر)		
۵۲ l	۸۰ k	۵۹/۳۳ lk	۴۷ l	۰
۱۱۸ j	۱۶۰ hi	۱۱۸ j	۱۶۷ hi	۱۵
۲۰۲ g	۳۰۰c	۲۳۷ f	۲۶۹ d	۳۰
۲۵۵ de	۳۳۸ a	۲۵۱ de	۳۰۹ bc	۶۰
۲۵۱ de	۳۲۸ a	۲۳۹ ef	۲۶۶ de	۹۰
۲۴۰ ef	۳۰۰ c	۲۴۵ f	۲۳۵ f	۱۲۰
۱۵۱ i	۲۰۰ g	۱۱۰ j	۱۸۱ hg	۱۵۰

*: حروف مشابه در هر ستر و ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف‌هاست (P<۰/۰۵).

دقیق مانتیول روی افزایش تعداد رویان‌ها از کالوس‌های رویان‌زای میخک مشخص نیست اما با توجه به اینکه وجود سوکروز در محیط حاوی مانتیول برای رویان‌زایی ضروری است می‌توان نتیجه گرفت که اثر مانیتول روی افزایش تعداد رویان‌ها به عنوان منبع تأمین کربن مؤثر نبوده بلکه احتمالاً با تغییرات پتانسیل اسمزی ناشی از حضور مانیتول در ارتباط است به طوری‌که در برخی از گزارش‌ها نشان داده شده است که پتانسیل اسمزی ناشی از حضور مانیتول در محیط کشت رویان‌زایی سوماتیکی را تحریک می‌کند (۶، ۷ و۲۳).

در محیط‌های فاقد مانیتول و یا حاوی آن با غلظت‌های کم (۱۵ و۳۰ گرم در لیتر)، رویان‌های بدنی نرمال نبودند اما در محیط کشت حاوی مانیتول زیاد (۶۰، ۹۰،۱۲۰ و۱۵۰ گرم در لیتر) رویان‌ها نرمال بودند. در بسیاری از گزارش‌ها نشان داده شده که از غلظت‌های بالای کربوهیدرات برای توسعه نرمال رویان‌های بدنی استفاده شده است و در بیشتر این گزارش‌ها اشاره شده که توسعه نرمال رویان‌ها با تغییرات اسمز ناشی از حضور غلظت بالای کربوهیدرات در ارتباط است (۲۲، ۲۳، ۲۵ و ۲۶). مرکل و همکاران (۱۲) پیشنهاد کرده‌اند که تغییرات اسمزی جهت توسعه نرمال رویان‌زایی بدنی در شرایط درون شیشه‌ای تقلیدی از تغییرات اسمزی محیط طبیعی اطراف رویان بذری در داخل بذر است که در زمان توسعه و بلوغ آن اتفاق می‌افتد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که توسعه نرمال رویان‌های بدنی گیاه میخک در حضور غلظت‌های بالای مانتیول ممکن است با تغییرات اسمزی ناشی از آن در ارتباط باشد.

در محیط کشت‌های حاوی مانیتول بر روی برخی از رویان‌های اولیه، رویان‌های ثانویه‌ایجاد شد (شکل ۱ C). تأثیر مانیتول در تحریک رویان‌زایی بدنی ثانویه در گیاه یونجه نیز گزارش شده است (۱۹).

جوانه زنی

دو هفته بعد از انتقال رویان‌های بدنی به محیط کشت MS ۱/۲ رویان‌ها و به گیاهچه تبدیل گشتند . در همه ارقام رویان‌های بدنی با فراوانی بالا (حدود ۹۵٪) به گیاهچه تبدیل شدند (شکل ۱ D). درگزارش‌های قبلی رویان‌زایی بدنی میخک (۴ و ۲۴) که رویان بدنی در محیط کشت حاوی اکسین‌ایجاد گردید اشاره شده که نرخ باززایی آنها بسیار پایین است، اما دراین بررسی که رویان‌های بدنی در محیط کشت بدون اکسین ایجاد شدند بازده باززایی بسیار بالا بود. این نتایج می‌تواند روشن کننده این موضوع باشد که در میخک ایجاد رویان روی محیط حاوی اکسین روی ظرفیت باززایی آن اثر سوء دارد. در گیاه

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.14.6]

مدل هویج نیز گزارش شده است که بازده جوانه زنی رویان‌های ایجاد شده روی محیط کشت فاقد اکسین در مقایسه با محیط کشت حاوی آن بسیار بالاتر است (۸).

گیاهچه‌های منتقل شده به گلدان‌های حاوی ماسه استریل به طور نرمال توسعه یافتند (شکل۱ E) و بعد از انتقال به گلدان‌های حاوی خاک حدود ۸۰ درصد از آنها به گیاه کامل تبدیل شدند (شکل۱F). گیاهچه‌های حاصل از رویان‌هایی که به طور غیر نرمال توسعه یافته بودند در مقایسه با سایر گیاهچه‌ها از رشد ضعیف‌تری برخوردار بودند و بسیاری از آنها پس از انتقال به گلدان‌های حاوی خاک معمولی از بین رفتند.

در این تحقیق گیاه میخک به طور پر بازده از طریق رویان‌زایی بدنی باززا شده است. نتایج این آزمایش می‌تواند در پژوهش‌های دیگری مانند ریز ازدیادی، تولید بذر مصنوعی و تولید دورگه‌های بدنی و دست ورزی‌های ژنتیکی گیاه مورد استفاده قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

1. Burich, G.A., P. Mercun, L. Benedtti and A. Giovannini. 1996. Transformation method applicable to ornamental plant. Plant. Tissu. Cuit. Biotech. 12: 94-104.
2. Edtington, U. K., F. Gimelli, G. Ginatta, R. Venturo, S. Positano and M. Buiatti. 1984. Plantlet regeneration from petal and floral induction *in vitro* in the Mediterranean carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Riv. Orntoflorofrut. Ital. 68: 107-121.
3. Fisher, M., M. Zin and A. Vainstein. 1993. An efficient method for adventitious shoot regeneration from culture carnation petals. Sci. Hort. 53: 231-137.
4. Frey, L., Y. Saranga and J. Bjanik. 1992. Somatic embryogenesis in carnation. HortScience 27: 63-65.
5. Ikeda-Iwai, M., M. Umehara, S. Satoh and H. Kamada. 2002. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissue of *Arabidopsis thaliana*. Plant. J. 34: 107-111.
6. Kakehi, M. 1979. Studies on the tissue culture of carnation .V. induction of redifferentiated plant from the petal tissue. Hiroshima Agric. Coll. 6: 156-166.
7. Kamada, H., K. Ishikawa, H. Saga and H. Harada. 1993. Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. Plant. Tissue. Cul. Lett. 10: 38-44
8. Kamada, H., K. Kobayashi, T. Kiyosue and H. Harada. 1989. Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. 25: 1163-1166.
9. Litze, R. E 1986. Effects of osmotic stress on somatic embryogenesis in Carioca suspension culture. HortScience 111: 969-972
10. Lou, H. and S. Kako. 1995. Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. Sci. Hort. 64:11-20.
11. Luo, H., P. Obara-Okeyo, M. Tamaki and S. Kako. 1996. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explant. J. Am. Soc. HortScience 71: 497-502.
12. Merkele, S. A., W. A. Parrott and B. S. Flin. 1995. Morphgenic aspect of somatic emberyogenesis. PP. 155-203. *In:* Thorpetaed *In Vitro* Embryogenesis in Plant. Klauwer Academhc Publishers, DordrechtBosta, London.
13. Messeguer, J., M.C. Arconada and E. Mele. 1993. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). HortScience 54: 153-163.
14. Miller, R.M., V. Kaul, J. Hutchinson and D. Richard. 1991. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* .L) from axillary bud explant. Ann. Bot. 67: 35-42.
15. Murashige, T. and F. A. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 154: 73–479.
16. Nakagvwa, H., T. Saijyo, N. Yamauchi, M. Shigyo, S. Kako and A. Ito. 2001. Effect of sugar and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. Sci. Hort. 90: 85-92.
17. Nakano, M. and M. Mii. 1992. Protoplast culture and plant regeneration of several species in the genus Dianthus. Plant Cell Rep. 11: 225-228.
18. Nakano, M., Y. Hoshio and M. Mii. 1994. Adventitious shoot regeneration from cultured petal expelant of carnation. Plant Cell Tissue and Org. Cult. 36: 15-19.
19. Neves, L. O., S. R. L. Duque de, ·J. S. Almeida and P. S. Fevereiro. 1999. Repetitive somatic embryogenesis in

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.14.6]

Medicago truncatula ssp. Narbonensis and *M. truncatula* Gaertn cv. Jemalong. Plant Cell Rep. 18: 398–405
20. Nontvaswatsri, C., S. Fukai. T. Touma and M. Gol. 2002. Comparison of adventitious shoot formation from node and leaf explant of various carnation *Dianthus caryophyllus* L. cultivars. J. HortScience and Biotech. 77: 520-525
21. Nugent, G., T. T Ricnardoson W and C. Y. Ul. 1991. Pant Regeneration from stem and petal of carnation. Plant Cell Tissue Org. Cult.10: 477-480.
22. Ricci, A.P., F.A.M. Filho, B.M. Januzzi and S.M.S. Piedade. 2002. Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulate* and *C. nobilis* × *C. deliciosa.* Scinentia Agric. 59: 41-46.
23. Robert., D. R. 1991. Abscisic asid and mannitol promote early development; maturation and storage protein accumulation in somatic ebryogenesis of interior spruce. Physiol Plant 83: 247-252
24. Sankhla, D., T. D. Vavis, N. Shankla and A. Upadya. 1995. *In vitro* of plant regeneration carnation through organognesis and somatic emberyogenesis. Gartenbouwissenschaft 6: 227-233.
25. Tremblay, L. and M. Tremblay. 1994. Maturation of black spruce somatic embryos: Sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. Plant Cell Tissue and Org. Cult. 42: 39-46
26. Tremblay, L. and M. Tremblay. 1991. Carbohydrates requirement for the development of a black spruce (*Picea mariana* Mill B.S.P) and red spruce (*P.rubens* Sarg) somatic embryo. Plant Cell Tissue Org. Cult. 27: 95-99.
27. Van Altvorst, A. C., H. J. J. Koehorst., T.Bruinsma and J. J. M. Dos. 1994. Improvement of adventitious shoot formation from carnation leaf explant. Plant Cell Tissue Org. Cult. Cultu. 37: 87-90
28. Van Altvorst, A. C., H. J.J. Koehorst, T. Beuinsma, J. Jansent, J. B. M. Custers, J. De Jons and J. J. M. Dons. 1992. Adventitious shoot formation *in vitro* leaf explant of carnation engineering for cut- flower (*Dianthus caryophyllus*). Sci. Hort. 51: 223-235.
29. Von Altvorst, A.C., A. Yancheva and H. Dons. 1995. Cell within the nodal region of carnation shoots exhibits a high potential for adventitious shoot formation. Plant Cell Tissue and Org. Cult. 45: 151-157.
30. Vicient, M.C. and F.X. Martinez .1998. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. R. Bras. Fisiol. Veg. 10: 1-12.
31. Watad, A. A., A. Ahroni, A. Zuuker, H. Hshejtman, M. Nissm and A. Varinsten. 1996. Adventitious shoot formation carnation stem segments: a comparison of different culture procedures. Sci. Hort. 65: 313-320.
32. Yantcheva, A., M. Vlahova and A. Antanassov. 1998. Direct somatic emberyogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthos caryophyllus*). Plant Cell Rep. 18:148-153.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.14.6]