دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و یکم، شماره سوم، ۱۳۹۳
http://jopp.gau.ac.ir

تأثیر مولیبدن در محیط کشت B5 حاوی نیترات و آمونیوم بر جنین‌زایی رویشی دمبرگ هویج

*مریم توکلی[۱]، کامبیز مشایخی[۲] و فرشید قادری‌فر[۳]
[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]دانشیار گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۹۲/٤/۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۱۸

چکیده

یکی از روش‌های مهم تکثیر گیاهان در مقیاس زیاد، دست‌کاری‌های ژنتیکی و تولید بذر مصنوعی، تکنیک جنین‌زایی رویشی است که تحت‌تأثیر عوامل مختلفی مانند ترکیب عناصر غذایی موجود در محیط کشت قرار دارد. بنابراین این پژوهش تأثیر مولیبدن بر میزان جنین‌زایی رویشی دمبرگ هویج را بررسی می‌کند. ابتدا قطعات دمبرگ در محیط کشت B5 تغییر یافته برای القای جنین‌زایی کشت شدند. تیمارهای آزمایش شامل محیط کشت دارای نیترات تنها و B5 شامل دو شکل نیترات و آمونیوم بود که عنصر مولیبدن با غلظت استاندارد ۰/۹۹ میلی‌گرم بر لیتر به دسته‌ای از آن‌ها اضافه و از دسته دیگر حذف گردید. بعد از یک ماه، ریزنمونه‌ها به محیط ظهور جنین‌ها با شرایط مشابه ولی بدون 2,4-D منتقل گردیدند. پس از گذشت ٦ هفته، تعداد ریشه‌ها و تعداد جنین‌های رویشی تولید شده مشخص گردیدند. نتایج نشان داد در تیمارهای شامل نیترات تنها، بیش‌ترین تعداد ریشه و جنین کروی تشکیل شد. طبق تجزیه آماری در این تیمارها، کاربرد مولیبدن بر تعداد ریشه و جنین کروی در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود. تشکیل بیش‌ترین جنین کل و تکامل‌یافته‌تر مربوط به زمانی بود که هر دو شکل نیترات و آمونیوم همراه مولیبدن در محیط کشت حضور داشتند. همچنین در محیط کشت شامل دو شکل مختلف نیتروژن، جنین‌ها دارای رشد قطری در قسمت هیپوکوتیل بودند. به‌علاوه نتایج نشان داد که در زمان نبود مولیبدن، در ظاهر رنگ سبز افزایش یافت که نشان‌دهنده تأثیر مثبت نیتروژن احیا نشده بر تولید کلرفیل از طریق افزایش احتمالی سیتوکنین‌ها است.

واژه‌های کلیدی: مولیبدن، نیترات، آمونیوم، جنین‌زایی رویشی

* مسئول مکاتبه: tavakoli.mary@gmail.com

مقدمه

کشت درون‌شیشه‌ای اندام‌های گیاهی که روش جدیدی برای ازدیاد انبوه گیاهان است، از کاربردهای فن‌آوری زیستی و تولید بذر مصنوعی می‌باشد. بنابراین لزوم پژوهش در زمینه جنین‌زایی رویشی و یافتن روش‌هایی برای تولید جنین‌های با کیفیت بیش‌تر آشکار می‌گردد. تغییر وضع سلول‌ها از حالت غیرجنین‌زا به جنین‌زا و ایجاد پتانسیل جدید در درون آن‌ها القای جنین‌زایی نامیده می‌شود. این پدیده را می‌توان به مقدار بسیار زیادی مربوط به ترکیب محیط کشت از نقطه نظر غذایی، هورمونی و یا محیطی دانست. گزارش‌های زیادی در زمینه القای موفق جنین‌زایی رویشی با دست‌کاری در محیط کشت در گونه‌های مختلف گیاهی وجود دارد (وحدت‌پور، ۲۰۰۸). به‌طور مثال مشایخی (۲۰۰۱) و مشایخی و نیومن (۲۰۰٦) با حذف بُر از محیط کشت سبب القای جنین رویشی در هویج شدند (موسوی‌زاده، ۲۰۰۹). وحدت‌پور (۲۰۰۸) اثر عناصر بُر و روی را در جنین‌زایی هویج و خیار مورد مطالعه قرار دادند. پیری‌زیرکوهی (۲۰۰۸) نیز نقش عناصر غذایی را طی اندام‌زایی و جنین‌زایی رویشی گوجه‌فرنگی بررسی کرد. موسوی‌زاده و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی تأثیر عناصر و مواد غذایی تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت بر جنین‌زایی رویشی دمبرگ هویج پرداختند. الخیری (۲۰۱۱) به مطالعه اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و کازئین هیدرولیزات بر جنین‌زایی خرما پرداختند و گزارش نمودند که عصاره مخمر در افزایش جنین‌زایی تأثیر زیادی دارد. موفقیت در کشت بافت گیاهی تا حدود زیادی به ترکیب مناسب محیط کشت بستگی دارد. (فروتن و وادیدار، ۲۰۰٦؛ آروین، ۲۰۰۲؛ پیری، ۲۰۰۱). نوع و میزان عناصر معدنی موجود در محیط‌های کشت بر توان جنین‌زایی رویشی اثرات متفاوتی دارند. از جمله عناصر مؤثر بر جنین‌زایی رویشی، نیتروژن است که حضور اشکال مختلف آن در ترکیب محیط‌های کشت برای القای جنین‌زایی رویشی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (موسوی‌زاده، ۲۰۱۰). پژوهش‌گرانی چون راینرت و تازاوا معتقدند که نیترات در القای جنین‌های رویشی نقش مثبتی را ایفا می‌نماید (راینرت و تازاوا، ۱۹٦۹). به عقیده برخی از آن‌ها نوع نیتروژن به‌صورت احیا یا غیراحیا در جنین‌زایی رویشی نقشی نداشته و تنها غلظت نیتروژن موجود در محیط کشت است که نقش تعیین‌کننده‌ای در جنین‌زایی رویشی دارد. در کل بنا به عقیده بیش‌تر پژوهش‌گران حضور نیتروژن احیا شده شرط اساسی برای تحقق جنین‌زایی رویشی می‌باشد (مشایخی، ۲۰۰۷). در صورتی که مشایخی (۲۰۰۰) در طی آزمایش‌های خود پی برد که نوع نیتروژن در ریخت‌شناسی جنین‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند.

از دیگر عناصر ضروری برای رشد گیاهان مولیبدن است که کمبود آن، دامنه تغییرات گوناگونی را در ساختار ترکیبات آلی و در فعالیت‌های برخی آنزیم‌ها پدید می‌آورد. وجود دو آنزیم دارای مولیبدن در گیاهان عالی یعنی نیتروژناز و نیترات ردکتاز به خوبی ثابت شده است. بعد از جذب نیترات به درون سلول، احیای آن به نیتریت توسط آنزیم نیترات ردکتاز صورت می‌گیرد. عنصر مولیبدن به‌عنوان کوآنزیم نیترات ردکتاز محسوب می‌شود (مارشنر، ۱۹۹۵). مارشنر (۱۹۹۵) معتقد است نشانه‌های کمبود نیتروژن در گیاهانی که کمبود مولیبدن دارند، غالب است.

در این پژوهش، با توجه به این‌که یکی از مهم‌ترین منابع تولید بذر مصنوعی، جنین‌های رویشی دارای شکل مناسب می‌باشد، به بررسی اثر همراهی مولیبدن با نیترات و آمونیوم بر شکل، ریخت‌شناسی و میزان تشکیل جنین‌های به‌دست آمده از دمبرگ هویج در محیط کشت B5، پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

این بررسی در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گردید. ابتدا بذور هویج رقم نانتس پس از ضدعفونی و شستشو با آب مقطر در شرایط استریل در محیط کشت جامد شامل نصف نمک‌های پایه محیط کشت MS (که یک محیط کشت عمومی و رایج است) کشت شدند. پس از گذشت ٤ هفته، محور زیرلپه آن‌ها به قطعه‌های ۱ سانتی‌متری تقسیم و به ظروف شامل محیط کشت B5 دارای 2,4-D (۱۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) منتقل شده و درون دستگاه آکسوفیتون برای القای جنین‌زایی قرار گرفتند (مشایخی، ۲۰۰۷). به‌منظور تهیه محلول‌های ذخیره، ترکیب مربوط به هر تیمار از بین عناصر غذایی آن محیط حذف و برای تأمین سایر عناصر موجود در ترکیب محیط کشت که مدنظر این بررسی نبوده و حذف شده بودند، معادل آن‌ها بر حسب وزن مولکولی به محیط کشت افزوده شد (جدول ۱). به‌عنوان مثال به‌جای حذف نیترات پتاسیم به همان اندازه نیتروژن و پتاسیم به شکل دیگر به محیط کشت اضافه گردید. کازئین هیدرولیزات به‌علت نبود اطلاع کافی از ترکیب آن به‌طورکلی و بدون جایگزینی به‌عنوان نیتروژن احیا شده حذف گردید. برای هر یک از مواد مورد بررسی محلول ذخیره جداگانه‌ای تهیه و در تیمار مربوطه به محیط کشت افزوده شد. یک ماه پس از آن، عمل واکشت در محیط‌های مشابه بدون اکسین یعنی مرحله رئالیزاسیون با هدف ظهور[1] جنین‌های القا شده زیر اپیدرم نمونه‌های گیاهی انجام گردید. پس از گذشت ٦ هفته از

1- Realization

شروع رئالیزاسیون، تعداد جنین‌های رویشی تولید شده و نیز تغییرات ظاهری ریزنمونه‌ها از جمله میزان ریشه‌زایی و کالوس‌زایی با استفاده از دستگاه استرئوسکوپ مدل سانی[1] متصل به کامپیوتر شمارش و از آن عکس‌برداری شد. داده‌ها با استفاده از تبدیل جذری[2] نرمال شدند. سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تیمار در ٤ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD و نرم‌افزار آماری SAS در سطح‌های ۱ و ۵ درصد انجام گردید (سلطانی، ۱۹۹۸).

جدول ۱- ترکیبات حذف شده از محیط B5 و مواد جایگزین شده به‌جای آن‌ها در طی آزمایش.

ردیف	تیمارها	ترکیبات حذف شده	ترکیبات جایگزین
۱	محیط شامل نیترات، آمونیوم و بدون مولیبدن	Casein hydrolysate $Na_2MoO_4.2H_2O$	$Na_2SO_4.10H_2O$
۲	محیط شامل نیترات، آمونیوم و دارای مولیبدن	Casein hydrolysate $(NH_4)_2SO_4$	– $MgSO_4$
۳	محیط شامل نیترات، بدون آمونیوم و بدون مولیبدن	$Na_2MoO_4.2H_2O$ Casein hydrolysate	$Na_2SO_4.10H_2O$ –
٤	محیط شامل نیترات، بدون آمونیوم و دارای مولیبدن	$(NH_4)_2SO_4$ Casein hydrolysate	$MgSO_4$ –

* مقدار معادل ترکیبات جایگزین، براساس وزن مولکولی عناصر و نمک مورد استفاده محاسبه و به محیط کشت افزوده شد.

** عنصر مولیبدن با غلظت استاندارد ۰/۹۹ میلی‌گرم بر لیتر به محیط کشت افزوده شد.

نتایج و بحث

نتایج به‌دست آمده نشان داد که اشکال مختلف نیتروژن بر تشکیل و اندازه ریشه در مواد گیاهی مورد کشت اثر معنی‌داری دارد (جدول ۲). این حالت نشان‌دهنده تمایل توده‌های سلولی پیش‌جنین‌زا[3] به تکامل ریشه و رشد آن‌ها تحت‌تأثیر نوع نیتروژن به‌کار رفته می‌باشد که آن هم نوعی تأثیر بر تمایز ابتدایی در تکامل جنینی یا شبه‌جنینی است.

1- Sunny

2- $\sqrt{X+0.5}$

3- Pro-Embryal Mass

جدول ۲- تجزیه واریانس تشکیل و اندازه ریشه، تحت اثر مولیبدن در محیط‌های کشت شامل نیترات و آمونیوم براساس میانگین مربعات.

منبع تغییرات	درجه آزادی	توده ریشه‌زا	تعداد ریشه	اندازه ریشه
تیمار	۳	۲۱۱/۷۳**	٤٤٦/۷۰*	۰/۰٦۷**
خطا	۱۲	۱۳/۷۳	۸٤/٦۹	۰/۰۰۳

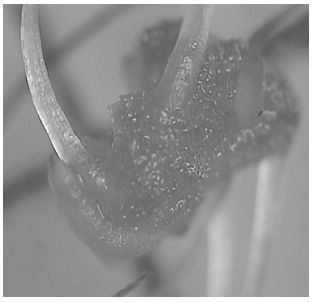
* معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و ** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۳- مقایسه میانگین تشکیل و اندازه ریشه، تحت اثر مولیبدن در محیط‌های کشت شامل نیترات و آمونیوم در مرحله رئالیزاسیون.

تیمار	کالوس و توده سلولی ریشه‌زا	تعداد ریشه	اندازه ریشه
(۱) محیط شامل نیترات، آمونیوم و بدون مولیبدن	۱/۵۷b	۲/۰۱b	۰/۸b
(۲) محیط شامل نیترات، آمونیوم و دارای مولیبدن	۰/۷b	۱/٤۷b	۰/۷٦b
(۳) محیط شامل نیترات، بدون آمونیوم و بدون مولیبدن	۱۵/۹۱a	۲۲/۱۷a	۰/۸b
(٤) محیط شامل نیترات، بدون آمونیوم و دارای مولیبدن	۱۰/ ۲۰a	۱۷/۲۳a	۱/۰۵a

* اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

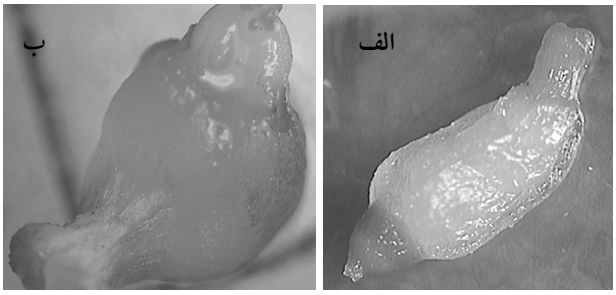
نکته قابل‌توجه در جدول ۳ این است که در محیط دارای دو شکل نیترات و آمونیوم تشکیل ریشه نسبت به محیط دارای نیترات تنها، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. این مسأله نشان‌دهنده تأثیر نیترات به تنهایی بر اندام‌زایی (ریشه‌های نابه‌جا) می‌باشد که خود پدیده‌ای درخور توجه است. شاید در این حالت سوخت‌وساز و مصرف نیترات به‌صورتی غیر از روش احیای معمول آن بوده به‌طوری‌که باعث بروز این پدیده شده است. این فرضیه نیاز به بررسی بیش‌تری دارد زیرا چنان‌چه مشاهده می‌شود، احیای آن توسط مولیبدن از این تأثیر بر ریشه‌زایی می‌کاهد. در این‌جا نیترات همانند اسید آبسیزیک باعث تسریع در ریشه‌زایی می‌گردد (شاکری و همکاران، ۲۰۰٦). بر خلاف این‌که گفته می‌شود در مقابل کربوهیدرات‌ها، نیتروژن از ریشه‌زایی جلوگیری می‌نماید اما در این بررسی مشاهده می‌گردد که نیترات تولید ریشه را افزایش می‌دهد (شکل ۱).



شکل ۱- تشکیل کالوس ریشه‌زا زمانی که نیترات به‌عنوان تنها منبع نیتروژن در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت.

به‌عبارت دیگر در اینجا حذف آمونیوم از محیط، شرایط را به‌سمت تولید توده سلولی ریشه‌زا هدایت می‌کند. به‌علاوه به احتمال زیاد آنزیم‌هایی که برای تولید ریشه لازم است در حضور هر دو شکل نیتروژن و یا حتی همراه با مولیبدن تغییر می‌یابد. روستا (۲۰۱۰) نیز طی پژوهش‌های خود پی برد که اگر آمونیوم به‌عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده گردد، نسبت ریشه به اندام‌های هوایی را کاهش می‌دهد، در صورتی که نتیجه معکوس در اثر استفاده از نیترات به‌دست می‌آید که به‌طور دقیق با نتایج این بررسی مطابقت می‌کند.

شایان ذکر است که در این بررسی جنین‌های به‌دست آمده در تیمار شامل هر دو شکل نیترات و آمونیوم دارای بیش‌ترین رشد قطری در ناحیه هیپوکوتیل بودند که حالتی شبیه به افزایش اکسین درونی می‌باشد (شکل ۲). به‌نظر می‌رسد در تیمار نام‌برده میزان کافی اسیدهای آمینه مورد نیاز برای ساخت آنزیم‌هایی مانند IAA- اکسیداز که فعالیت نداشتن آن‌ها باعث افزایش میزان اکسین درونی می‌گردد (منگل و کرکبی، ۲۰۰۱)، فراهم نمی‌باشد. بنابراین این امر می‌تواند توجیهی برای رشد همه جانبه هیپوکوتیل باشد. به‌علاوه با توجه به یافته‌های سان و همکاران (۲۰۰۹) که دریافتند حضور مولیبدن باعث افزایش اکسین داخلی می‌گردد، به‌نظر می‌رسد رشد قطری هیپوکوتیل نیز به این دلیل افزایش یافته است. از طرفی می‌توان نتیجه گرفت سامانه آنزیمی که در اثر کاربرد هم‌زمان نیترات و آمونیوم فعال می‌شود، شرایطی را برای تشکیل موادی فراهم می‌کند که طی فرآیند ساخت یا در اثر به‌وجود آمدن آن‌ها هورمون‌های گیاهی و یا نسبت آن‌ها به یکدیگر تغییر می‌کند و رشد قطری هیپوکوتیل که به‌میزان اکسین درونی بسیار حساس است را افزایش می‌دهد (مشایخی و نیومن، ۲۰۰۶).



شکل ۲- جنین اژدری در محیط دارای نیترات، آمونیوم به‌صورت هم‌زمان (رشد قطری هیپوکوتیل).
(الف) تیمار بدون مولیبدن و (ب) تیمار دارای مولیبدن (هرچه احیای نیتروژن بیش‌تر باشد، قطر هیپوکوتیل نیز افزایش می‌یابد).

در مقایسه‌ای که بین تیمار نیترات دارای مولیبدن با تیمار مشابه اما بدون مولیبدن انجام گردید، مشاهده شد بین آن‌ها از نظر تعداد اندام ریشه‌زا و تعداد ریشه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد اما از حیث اندازه ریشه اختلاف آن‌ها معنی‌دار بود، به‌طوری‌که اندازه ریشه در تیمار نیترات دارای مولیبدن بیش‌تر بود. همین بررسی در مورد دو تیماری که نیترات و آمونیوم به‌صورت هم‌زمان به‌کار برده شد، نشان داد که حذف مولیبدن تفاوت معنی‌داری از نظر تمامی صفات مربوط به ریشه ایجاد نکرده است. همان‌طورکه بیان شد احتمال می‌رود حذف آمونیوم از محیط کشت، باعث تولید ترکیبات نیتروژن‌دار مؤثر بر ریشه‌زایی می‌شود (به‌عنوان مثال غلظت خاصی از اکسین تولید می‌کند که منجر به ریشه‌زایی می‌گردد). اما مسیر بیوشیمیایی نیترات در حضور آمونیوم تغییر می‌کند و شاید باعث کاهش تولید سیتوکنین که اثر منفی بر ریشه‌زایی دارد، می‌شود (منگل و کرکبی، ۲۰۰۱). بنابراین در این‌جا فرضیه جدیدی به‌وجود می‌آید که اشکال مختلف نیتروژن به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر می‌توانند درون گیاه یک‌سری مسیرهای بیوشیمیایی خاص و متناسب با نوع محیط را فعال نموده و رفتار مواد گیاهی را در مسیری ویژه هدایت کند.

جدول ٤- تجزیه واریانس تعداد جنین‌های رویشی، تحت اثر مولیبدن در محیط‌های کشت شامل نیترات و آمونیوم براساس میانگین مربعات.

منبع تغییرات	درجه آزادی	کروی	قلبی	اژدری	گیاهچه	نئومورف	جنین کل
تیمار	۳	۱٦/۷۱**	۲۰۰/۳۳*	۱٦/٤۹**	۱/٦٦**	۱۷/۱٦**	۱۵۰۸/۵۱*
خطا	۱۲	۰/٤۹	۲۰/٤۲	۰/۹۰	۰/۰۰۵	۰/۰۸	۱۳۸/۷۹

* معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و ** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد.

نتایج جدول ٤ نشان می‌دهد که اشکال متفاوت نیتروژن بر مراحل مختلف جنینی از نظر تعداد جنین کروی، قلبی، اژدری، گیاهچه، نئومورف و تعداد جنین‌های کل نیز تأثیرگذار است.

جدول ٥- مقایسه میانگین تعداد جنین‌های رویشی تولید شده، تحت اثر مولیبدن در محیط‌های کشت شامل نیترات و آمونیوم در مرحله رئالیزاسیون.

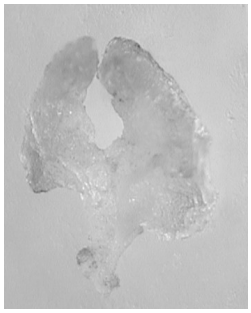
تیمار	کروی	قلبی	اژدری	گیاهچه	نئومورف	جنین کل
(۱) محیط شامل نیترات، آمونیوم و بدون مولیبدن	۲/۰۵^{b}	۹/٤٥^{b}	۵/۰۰^{a}	۰/۷۰^{b}	۲/۹۱^{b}	۲۸/۲۳^{b}
(۲) محیط شامل نیترات، آمونیوم و دارای مولیبدن	۰/۷۰^{c}	۱٦/۹۸^{a}	۳/۵۳^{a}	۱/۹۹^{a}	۵/۰۲^{a}	٤۸/۵۲^{a}
(۳) محیط شامل نیترات، بدون آمونیوم و بدون مولیبدن	٤/۳۵^{a}	۱/۹٤^{c}	۰/۷۰^{b}	۰/۷۰^{b}	۰/۷۰^{c}	۷/۱۲^{c}
(٤) محیط شامل نیترات، بدون آمونیوم و دارای مولیبدن	۵/۱٤^{a}	۲/٤۳^{bc}	۱/۱۲^{b}	۰/۷۰^{b}	۰/۷۰^{c}	۸/۸۳^{c}
LSD (۰/۰۵)	۱/۱۲	۷/۲۲	۱/۵۲	۰/۱۱	۰/٤۵	۱۸/۸٤

* اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

** اعداد داخل جدول جذر اعداد اصلی به‌علاوه ۰/۵ می‌باشند.

نتایج جدول ۵ نشان می‌دهد که مصرف نیترات و آمونیوم هر دو با هم جهت جنین‌زایی و به‌ویژه ایجاد تعادل ریخت‌شناسی در جنین‌ها لازم می‌باشد (تیمار ۲). به‌طوری‌که در این تیمار تعداد جنین‌های قلبی، اژدری و جنین کل نسبت به زمانی که نیتروژن تنها به شکل نیترات استفاده شد، چندین برابر افزایش یافته است. به‌عبارت دیگر در اینجا مشاهده می‌شود که فرم نیتروژن مورد استفاده، فقط جنین‌ها را تا مرحله خاصی از تکامل جنینی هدایت می‌کند و به نوعی درجه تکامل آن‌ها را مشخص می‌نماید. طبق یافته‌های والکر و ساتو (۱۹۸۱) وقتی به‌جای نیترات که باعث تمایز و تشکیل ریشه می‌گردد، آمونیوم به محیط غذایی اضافه شود جنین‌های رویشی ظاهر می‌گردند. این ترکیبات نیتروژن‌دار می‌توانند به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم بر جنین‌زایی رویشی از طریق اثر بر سوخت‌وساز تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند اسید ایندول استیک که یک اکسین طبیعی و غالب در گیاهان می‌باشد و وجود آن برای رشد و نمو گیاهان لازم است و یا بر سنتز سیتوکنین اثر نماید (مشایخی، ۲۰۰۷). به‌علاوه هالپرین و همکاران از نتایج حاصل پژوهش‌های انجام شده روی محیط کشت سلولی گیاه هویج، دریافتند که تنها نیتروژن به شکل احیا شده و به‌صورت آمونیوم برای القا جنین‌های رویشی لازم و ضروری می‌باشد (هالپرین و وترل، ۱۹٦۵؛ هالپرین، ۱۹٦٦). به گفته تورپ (۱۹۹۵)، جنین شکل‌یافته در کشت‌های هویج، تنها در حضور نیترات رشد می‌کند اما وجود مقدار مشخصی از

آمونیوم درون‌سلولی نیز برای بروز این پدیده ضروری است. برخلاف این‌که گفته می‌شود بدون وجود آمونیوم جنین‌زایی امکان ندارد اما در این بررسی مشاهده گشت که وقتی نمونه‌ها در محیطی کشت شدند که نیتروژن آن فقط به‌صورت نیترات بود، تعداد زیادی جنین گلبولی تشکیل شد که یافته‌های مشایخی (۲۰۰۰) را اثبات می‌کند (تیمارهای ۳ و ٤). نیترات با متیله کردن DNA باعث جنین‌زایی می‌گردد (نیومن، ۱۹۹۵) و احتمال می‌رود آمونیوم در این امر نقشی ندارد. همچنین در بررسی‌های پیری (۲۰۰۸) مشاهده شد که مقدار نیتروژن رابطه مستقیم با تعداد جنین‌های آزاد شده دارد. به‌علاوه در این بررسی تیمار شامل هر دو شکل نیتروژن بیش‌ترین گیاهچه تولیدی را به خود اختصاص داد که این امر بیان‌گر اثر مثبت و ضروری حضور هم‌زمان اشکال مختلف نیتروژن بر تکامل بهتر جنین‌های تولیدی می‌باشد. همچنین در محیط نام‌برده احیای بهتر و بیش‌تر نیتروژن به‌دلیل حضور مولیبدن دلیلی مضاعف برای این پدیده می‌باشد (شکل ۳).



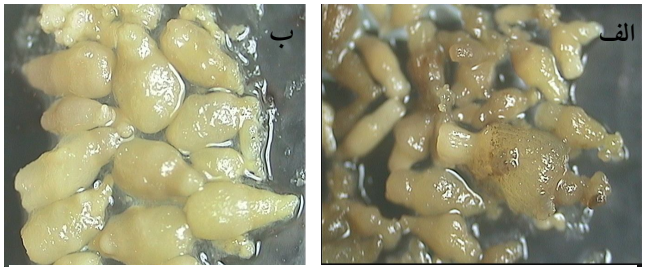
شکل ۳- گیاهچه تولیدی در محیط کشت B5 شامل هر دو شکل نیتروژن همراه با مولیبدن.

مشایخی نیز در سال ۲۰۰۰ این فرضیه را با استفاده از تیمارهای متفاوت در غلظت‌های مختلف سولفات آمونیوم[1] اثبات کرد. وی بیان نمود که نوع نیتروژن نه تنها تعداد جنین‌ها را مشخص می‌نماید، بلکه باعث تغییر ریخت‌شناسی عمیق در جنین‌های به‌وجود آمده نیز می‌گردد (مشایخی، ۲۰۰۰).

شایان ذکر است که مخلوط نیترات و آمونیوم آثار مفیدی بر رشد و نمو گیاه دارد، از جمله می‌تواند باعث ذخیره انرژی، به حداقل رساندن تغییرات pH و بهبود بخشیدن تولید ATP گردد (روستا، ۲۰۱۰). اهمیت میزان نسبت نیترات به آمونیوم در طول رشد و نمو گیاهان اثبات شده است.

1- $(NH_4)_2SO_4$

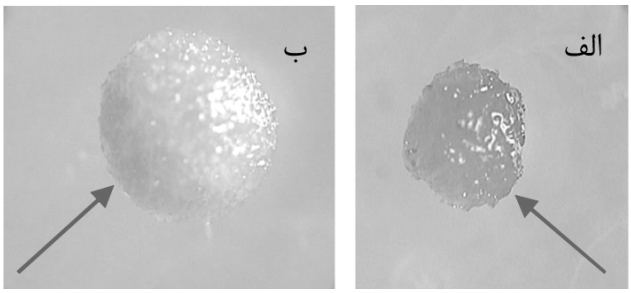
گریمز و هوگز (۱۹۹۰) دریافتند که رویدادهای اولیه سلولی که منجر به باززایی گیاه از کالوس جنینی در برنج هندی می‌شود، تحت‌تأثیر محیطی است که نیتروژن کل آن بین ۴۵-۲۵ میلی‌مولار و نسبت یون نیترات به یون آمونیوم بین ۸۵:۱۵-۵۰:۵۰ متغیر باشد (جورج و همکاران، ۱۹۹۳). جورج و همکاران (۱۹۹۳) گزارش نمودند که وقوع تمایز و رشد در گیاهان، تحت‌تأثیر نسبت نیترات به آمونیوم است، به‌طوری‌که نسبت تغییر آن بسیار کم باشد. یعنی در مراحل مختلف رشد و نمو این نسبت‌ها متغیر است و بر خلاف این‌که تغییر این نسبت ممکن است کم باشد ولی اثر زیادی بر پدیده تمایز می‌گذارد. البته از نظر بار الکتریکی نیز این پدیده اتفاق می‌افتد. نیترات یون مثبت و آمونیوم منفی است که منجر به تعادل یونی درون‌سلولی می‌شوند. یونی داخل سلول را باعث می‌شوند. بنابراین نتایج این بررسی تنها محدود به محیط‌های کشت بافت نمی‌گردد بلکه به محیط خارج و مزرعه نیز تعمیم‌یافته و این فرضیه و پیشنهاد را به‌وجود می‌آورد که کشاورزان برای تولید بهتر و بیش‌تر محصول باید ترکیبی از اشکال مختلف نیتروژن استفاده نمایند تا تمام جنبه‌های فیزیولوژیک انجام شده در گیاه وظیفه خود را به خوبی انجام دهند.



شکل ٤- جنین تشکیل شده در محیط کشت B5 همراه با نیترات و آمونیوم.
الف) بدون مولیبدن و ب) همراه با مولیبدن

قابل ذکر است که برخلاف تشکیل جنین در محیط کشت شامل نیترات تنها (تیمارهای ۳ و ٤)، بیش‌ترین جنین تشکیل شده مربوط به زمانی بود که هر دو شکل نیترات و آمونیوم در محیط کشت حضور داشت. به‌طوری‌که در هر تکرار تعداد آن‌ها به حدود ۱۲۰۰-۱۰۰۰ جنین می‌رسید (شکل ٤). جنین‌های تشکیل شده در این محیط‌های کشت نسبت به تیمارهای شامل نیترات تنها دارای دیواره سلولی منظم‌تری بودند (شکل ۵) که بیان‌گر لزوم وجود نیترات احیا شده و احیا نشده به‌صورت

هم‌زمان می‌باشد. وجود دیواره سلولی ناصاف و غیرمنسجم احاطه‌کننده جنین کروی نشان‌دهنده تمایل آن‌ها به بازگشت جنین به توده‌های سلولی پیش‌جنین‌زا است (مشایخی، ۲۰۰۷). بنابراین یکی از علایم تشکیل جنین‌های کروی تکامل‌یافته سطح صاف آن‌ها بوده که این امر می‌تواند به اثر قاطع مس بر تشکیل و ترکیب شیمیایی دیواره‌های سلولی مرتبط باشد (مارشنر، ۱۹۹۵). نقش بیش‌تر مس به‌عنوان ماده غذایی گیاه براساس اتصال آن با آنزیم‌ها در واکنش‌های اکسیداسیون و احیا می‌باشد (مارشنر، ۱۹۹۵). جذب مس به‌میزان نیترات موجود در محیط کشت وابسته است و جذب آن در محیط بدون نیترات کاهش می‌یابد (جورج و همکاران، ۱۹۹۳). از طرف دیگر، وجود نیتروژن احیا شده در جنین‌زایی مورد نیاز است. این ممکن است به شکل آمونیوم یا در قالب اسیدآمینه‌هایی مانند گلوتامین یا آلانین تأمین شود (جورج و همکاران، ۱۹۹۳). آمونیوم در فرآیند جذب نیترات، تثبیت نیتروژن، آمین‌زدایی اسیدهای آمینه و همچنین در مرحله ذخیره پروتئین و فسفریلاسیون تولید می‌شود. بنابراین در تیماری که در محیط کشت آن هر دو شکل نیترات و آمونیوم حضور دارد، به‌دلیل فراهم بودن میزان نیتروژن در اشکال مختلف و جذب بیش‌تر مس، تشکیل دیواره سلولی بهتر صورت می‌گیرد.



شکل ۵- مقایسه جنین کروی تولید شده در (الف) محیط کشت B5 شامل نیترات تنها و (ب) محیطی که شامل هر دو شکل نیترات و آمونیوم بود (تفاوت در منظم بودن دیواره جنین).

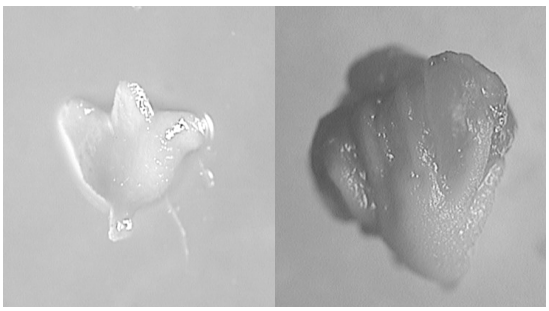
شیلینگ (۲۰۰۰) بیان داشت که فعال شدن آنزیم نیترات‌ردکتاز به مقدار نیترات جذب شده بستگی دارد و با حضور و یا افزایش آن، این آنزیم نیز تولید و یا فعالیت آن زیاد می‌گردد. به‌علاوه با توجه به گزارش مشایخی (۲۰۰۰) این حضور نیترات به تنهایی است که باعث افزایش فعالیت نیترات ردکتاز شده است. به‌عبارت دیگر میزان سوبسترای آنزیم را فعال می‌کند. همچنین تکامل جنینی به نوع نیترات

به‌کار برده شده بستگی دارد. حداکثر میزان رشد با ترکیب هر دو منبع نیتروژن یعنی آمونیوم و نیترات و نگهداری pH محیط در مقدار ٦/٥ به‌دست می‌آید (مارشنر، ۱۹۹۵). چنین تصور می‌شود که حتی میزان اندک نیترات باعث افزایش فعالیت آنزیم نیترات‌ردکتاز می‌شود و این آنزیم بدون میزان مناسب مولیبدن به‌عنوان فعال‌کننده آن، ممکن است دارای فعالیت‌های دیگر باشد که به درهم ریختگی سوخت و ساز منجر شود (مارشنر، ۱۹۹۵).

همچنین در اینجا مولیبدن نقش خود را در احیای نیتروژن به‌طور بارزی نشان می‌دهد به این صورت که طبق نتایج درج‌شده در این جدول بین تیمارهای ۲ و ٤ از نظر تعداد جنین کروی اختلاف معنی‌دار وجود دارد به‌طوری‌که تیمار شامل نیترات تنها در حضور مولیبدن بیش‌ترین میزان جنین گلبولی را تولید کرده است و همچنین تعداد جنین قلبی، گیاهچه‌ای و تعداد کل جنین‌ها در تیمار ۲ در مقایسه با تیمار ۱ افزایش ۲ برابری یافته است. اما این به آن معنی نیست که بدون حضور مولیبدن جنین تشکیل نمی‌شود بلکه شاید نبود آن زمینه ظهور آن‌ها را فراهم نمی‌کند. مشایخی (۲۰۰۷) اعلام نمود پروتئین‌هایی که برای تولید جنین تا مرحله گلبولی لازم است، در محیط القا و آنزیم‌هایی که باعث عبور جنین از این مرحله به مراحل بعدی می‌گردد، در محیط کشت رئالیزاسیون تشکیل می‌شوند. به‌علاوه از آن‌جایی‌که مولیبدن به‌عنوان کوفاکتور نیترات‌ردکتاز و آنزیم‌های دیگر، نقش ویژه‌ای در سوخت‌وساز نیتروژن و گوگرد در گیاهان دارد (گوپتا، ۱۹۹۷)، افزایش سریع در فعالیت این آنزیم باعث تسریع سوخت‌وساز نیترات و افزایش عملکرد می‌شود (بیگی و همکاران، ۲۰۱۱) وقتی گیاهان دچار کمبود مولیبدن و به‌دنبال آن کاهش در فعالیت نیترات ردکتاز می‌شوند، در بستری از نیترات که تجمع آن ایجاد سمیت کرده، رشد می‌کنند (بونگا و آدرکاس، ۱۹۹۲). بنابراین نبود این عنصر در محیط کشت شامل نیترات، مشابه حذف نیتروژن احیا شده در محیط کشت می‌باشد. نتایج سان و همکاران (۲۰۰۹) نشان می‌دهد که مولیبدن بیوسنتز اسید آبسیزیک و اسید ایندول استیک را به‌وسیله آنزیم آلدهیداکسیداز در گندم زمستانه تنظیم می‌کند و کاهش قابل‌توجه مقدار اسید آبسیزیک و اسید ایندول استیک در گندم زمستانه دارای کمبود مولیبدن، ممکن است بر تعادل هورمونی درون آن‌ها اثر گذارد (سان و همکاران، ۲۰۰۹). وجود اکسین در محیط کشت ممکن است منجر به تکامل غیرعادی در بافت جنینی گردد و یا حتی اگر غلظت آن به اندازه کافی زیاد باشد مانع از انجام مراحل تکاملی جنین‌های کروی و یا قلبی شکل نیز شود (مرکل و همکاران، ۱۹۹۵) که در بیش‌تر این موارد بروز این حالت منجر به تولید جنین‌زایی تکراری می‌گردد. در حالت عکس، اسید آبسیزیک، از

به‌وجود آمدن جنین‌های رویشی چندتایی و همچنین بروز بدشکلی و رشد نابهنجار در لپه‌ها، جلوگیری می‌کند (امیراتو، ۱۹۸۳). این نتایج نشان می‌دهد که مولیبدن نه تنها باعث احیا نیتروژن می‌گردد بلکه در شرایط حضور آن، فرآیند تولید آنزیم‌هایی صورت می‌پذیرد که حتی حضور آمونیوم در محیط کشت نیز نمی‌تواند آن‌ها را تولید نماید. بنابراین حدس زده می‌شود این تصور که احیا ازت از اول تا به انتها فقط یک روند را طی می‌کند کاملاً صحیح نبوده و به‌نظر می‌رسد برخی متابولیت‌های میانی نیز به‌وجود می‌آید که تأثیر به‌سزایی در رشد و نمو گیاه دارند. بنابراین به این دلیل حضور مولیبدن در محیط کشت باعث هم‌زمانی جنین‌های رویشی می‌گردد که در حالت عادی در مراحل و فازهای مختلف تکاملی قرار می‌گیرند. این حالت هم‌زمانی به‌ویژه در تولید بذر مصنوعی بسیار اهمیت دارد به‌طوری‌که بیش‌تر پژوهشگرانی که در این زمینه کار می‌کنند سعی دارند که این مشکل اساسی را حل نموده و جنین‌های هم‌زمان[1] تولید نمایند.

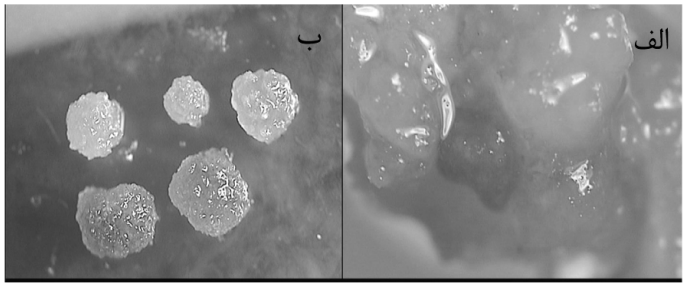
در طی این بررسی نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین‌ها (جدول ۵) نشان داد که در محیط‌های کشت B5 که شامل هر دو شکل نیترات و آمونیوم همراه با مولیبدن بودند، تشکیل تعداد جنین نئومورف یا به‌عبارت دیگر جنین‌های با تعداد لپه‌های بیش‌تر نسبت به سایرین افزایش می‌یابد (شکل ٦) که این پدیده را می‌توان به نبود تعادل در نسبت بین اکسین، سیتوکنین و آبسیزیک اسید داخلی، نسبت داد. در صورتی‌که مصرف هر کدام از آن‌ها به تنهایی تکامل جنینی را به یک سمت خاص مانند فقط تشکیل ریشه بدون لپه سوق می‌دهد (مشایخی، ۲۰۰۰).



شکل ٦- جنین نئومورف تشکیل شده در تیمارهایی که محیط کشت B5 شامل نیترات، آمونیوم و مولیبدن به‌صورت هم‌زمان بود. رشد نکردن ریشه، رشد زیاد و به‌هم پیوسته تعداد زیادی لپه به‌دلیل نبود تعادل در نسبت بین اکسین، سیتوکنین و آبسیزیک داخلی کاملاً مشهود است.

1- Synchronized

لازم به ذکر است که نیتروژن علاوه بر ایفای نقش در تشکیل پروتئین‌ها، یک جز لازم در مولکـول کلروفیل می‌باشد که کمبود آن باعث زردی در گیاه می‌شود. عرضه کافی نیتروژن با رشد رویشی زیـاد و رنگ سبز تیره ارتباط دارد (شافع و همکاران، ۲۰۱۱). در تیمارهای بدون مولیبدن تعـداد تـوده‌هـای سلولی سبز رنگ که از تکثیر سلول‌های پیش جنین‌زا به‌وجود می‌آیند بیش‌تر مشاهده گردید (شکل ۷). در تیمارهای بدون مولیبدن میزان ABA درونی کاهش می‌یابد. هورمون اسید آبسیزیک اثر بازداردنـده بر فعالیت محرک‌های رشد از جمله سیتوکنین دارد. از طرفـی چـون سـیتوکنین بـا افـزایش RNA و افزایش پروتئین‌ها در جهت تخصصی شدن سلول‌هـا و تشـکیل کلروپلاسـت رابطـه دارد (جـورج و همکاران، ۱۹۹۳)، بنابراین به‌نظر می‌رسد که در این بررسی حذف مولیبـدن محـیط از طریـق کـاهش ABA و به پیروی از آن افزایش سیتوکنین، افزایش سنتز کلروفیل را در تیمارهـای نـام‌بـرده بـه‌دنبـال داشته است. حضور سیتوکنین‌ها در محیط کشت دارای اثر منفی بر القای جنین‌زایی رویشی مـی‌باشـد (جورج و همکاران، ۱۹۹۳) که با نتایج این پژوهش مطابقت کامل دارد. این نتایج از یک طرف بیان‌گر نتایج مشایخی (۲۰۰۷) مبنی بر این‌که سیتوکنین‌ها در تسریع تقسیم سلول‌هـای واقـع در کشـت‌هـای تعلیقی سلولی و در نتیجه تکثیر توده‌های سلولی غیرپیش‌جنین‌زا اثر مثبتی دارند (مشـایخی، ۲۰۰۷) و از طرف دیگر به‌نظر می‌رسد مولیبدن در غلظت‌ها و یا شرایط خاصی نسبت هورمـون‌هـای درونـی را تغییر داده و در نتیجه جنین‌ها تولید کلروفیل بیش‌تر می‌نمایند. در محیط شامل هر دو شکل نیتـرات و آمونیوم و بدون مولیبدن، جنین‌های سبز رنگ تکامل‌نیافتـه بـیش‌تـری نسـبت بـه تیمـار مشـابه دارای مولیبدن آن رؤیت شد که در برخی از آن‌ها رنگ بخشی از توده‌های سلولی به نارنجی تغییر کرده بود. بروز این رنگ نشان‌دهنده سنتز آنتوسیانین‌ها می‌باشـد کـه علامتـی بـرای تجمـع قنـدهـا اسـت. ایـن مشاهده‌ها نشان می‌دهد که نه تنها احیا نیتروژن بلکه مصـرف قنـدها نیـز بسـتگی زیـادی بـه حضـور مولیبدن دارد و حضور و مقدار آن مصرف قندها را تغییر می‌دهد. بنابراین باید توجه داشت که احیـای ازت انرژی‌خواه است و این انرژی چه به‌صورت ATP چه به‌صورت NADPH باشـد، نیـاز بـه قنـد دارد. هم‌چنین میزان فعالیت نیترات ردکتاز می‌تواند به‌وسیله آمونیوم و برخی اسیدآمینه‌هـا یـا آمیـدهـا جلوگیری و یا کاملاً متوقف شود (مارشنر، ۱۹۹۵)، بنابراین عدم فعالیت نیترات ردکتاز باعـث تجمـع قندها در اندام‌های گیاهی می‌گردد. بنابراین نمی‌توان فقط بیان نمود که مولیبـدن بـه‌طـورکلی بـا احیـا نیتروژن در ارتباط می‌باشد بلکه سوخت‌وساز قندها را نیز به‌شدت تحت‌تأثیر قرار می‌دهـد کـه از ایـن جنبه باید مورد بررسی کامل قرار گیرد.



شکل ۷- تشکیل کلروفیل و آنتوسیانین در محیط کشت B5 شامل نیترات و آمونیوم.
(الف) و (ب) هر دو بدون مولیبدن می‌باشند.

در این آزمایش نتایج نشان داد که تولید جنین بیش‌تر نیازمند حضور هر دو شکل نیترات و آمونیوم در محیط کشت می‌باشد. در شرایط کمبود مولیبدن، به‌دلیل اختلال در فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها از جمله IAA- اکسیداز ریشه‌زایی تحریک می‌شود. از طرف دیگر، کاهش قابل‌توجهی در سطوح اسید آبسیزیک و اسید ایندول استیک در زمان کمبود مولیبدن و به پیروی از آن افزایش سیتوکنین، باعث افزایش سنتز کلروفیل در محیط می‌شود. به‌نظر می‌رسد طبق نتایج حاصل در شرایط تنش و کمبود مولیبدن، احیای نیتروژن در مسیری خارج از مسیر معمول بیوشیمیایی آن حرکت می‌کند.

در نهایت نتایج به‌دست آمده نشان داد که مصرف هر کدام از اشکال متفاوت نیتروژن به تنهایی باعث بروز پدیده یا شکل ظاهری خاصی می‌گردد. بنابراین نمی‌توان فقط به این اکتفا نمود که نیتروژن به‌کار رفته به چه میزان می‌باشد، بلکه برای حصول نتیجه کامل و تولید محصول بیش‌تر چه در محیط‌های کشت درون شیشه و چه در محیط مزرعه باید ترکیبی از انواع نیتروژن را استفاده نمود. موضوعی که نتیجه این بررسی کاملاً نشان داد و باید آن را به شرایط مزرعه نیز تعمیم و مورد آزمایش قرار داد.

منابع

1. Al-Khayri, J.M. 2011. Influence of yeast extract and casein hydrolysate on callus multiplication and somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Hort. Sci. 130: 531-535.
2. Ammirato, P.V. 1983. The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures; suspension culture techniques and hormone requirements. Bio. Tech. 3: 68-74.

3.Arvin, M. 2002. In vitro culture of trees. Shahid Bahonar University Press. Kerman. 279p. (Translated in Persian)
4.Beigi, S., Golchin, A., and Shafiei, S. 2011. The effects of different levels of nitrogen and molybdenum in nutrient solution on quantitative and qualitative traits and nitrate concentration of cucumber in hydroponic culture. J. Sci. Tech. Greenhouse Cul. 2: 6. 37-48. (In Persian)
5.Bonga, J.M., and Aderkas, P.V. 1992. In vitro Culture of Trees. Kluwer Academic Puplishers. 232p.
6.Foroutan, A., and Vadidar, R. 2006. Plant tissue culture. Sepehr Press. Tehran. Iran. (Translated in Persian)
7.George, E.F., Hall, M.A., and Klerk, G.J.D. 1993. Plant propagation by tissue culture. Springer. 504p.
8.Gupta, U.C. 1997. Molybdenum in Agriculture. University Press. 288p.
9.Halperin, W. 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspension. Amer. J. Bot. 53: 443-453.
10.Halperin, W., and Wetherell, D.F. 1965. Ammonium requirement for embryogenesis in vitro. Nature. 20: 519-520.
11.Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. 889p.
12.Mashayekhi, K. 2000. The protein synthesis spectrum during the induction phase of somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota* L.) cultures and the role of nitrogen forms for embryo development. Ph.D. Thesis, Justus liebig University, Giessen. 199p.
13.Mashayekhi, K. 2001. Untersuchungen zum Einfluss von Bor auf die somatische Embryogenese bei *Daucus carota* L. dissertation zur erlangung des Doktorgrades der Agrarwissenschaften der Justus liebing-Universitat Giessen.
14.Mashayekhi, K. 2007. Plant somatic embryogenesis. Makhtoumgholi Faraghi (Sarly) Press. 483p. (In Persian)
15.Mashayekhi, K., and Neumann, K.H. 2006. Effects of boron on somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 84: 279-283.
16.Mengel, K., and Kirkby, E.A. 2001. Principles of plant nutrition. Kluwer Academic Publishers. 849p.
17.Merkle, S.A., Parrott, W.A., and Flinn, B.S. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: In vitro embryogenesis in plants. Eds. Thorpe, T.A. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Pp: 1-16.
18.Mousavizadeh, S.J. 2009. The Investigation of strawberry and carrot petiole explants behavior has been excised in vitro. M.Sc. Thesis, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, 108p. (In Persian)
19.Mousavizadeh, S.J., Mashayekhi, K., Hemati, Kh., and Kamkar, B. 2010. Evaluation of media elements and materials on petiole somatic embryogenesis of carrot (*Daucuse carota* L.). J. Plant Prod. Res. 17: 1. 1-21. (In Persian)

20.Neumann, K.H. 1995. Pflanzliche Zell und Gewebekulturen. Verlag Eugen Vlmer, 304p.
21.Piri Zirkouhi, M. 2008. The Investigation of organogenesis and somatic embryogenesis in two of wild and commercial cultivars of tomato in three media MS, B5, NL. M.Sc. Thesis Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, 97p. (In Persian)
22.Piri, Kh. 2001. Plant tissue culture manual. Boali-sina Univ. Press. Hamedan. Iran. (In Persian)
23.Reinert, J., and Tazawa, M. 1969. Wirkung von Stickstoffverbindungen und von Auxin auf die Embryogenese in Gewebekulturen. Planta. 87: 239-248.
24.Rousta., H.R. 2010. The comparison of ammonium or nitrate-grown lettuce and spinach in a hydroponic system. Sci. Tech. Greenhouse Cult. 1: 1. 57-63. (In Persian)
25.Schilling, G. 2000. Pflanzenernährung und Düngunng. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 463p.
26.Shafea, L., Saffari, M., Emam, Y., and Mohammadinejad, G. 2011. Effect of nitrogen and zinc fertilizers on leaf zinc and chlorophyll contents, grain yield and chemical composition of two maize (*Zea mays* L.) hybrids. J. Seed Plant Prod. 27-2: 2. 235-246.
27.Shakeri, F., Masiha, S., and Esmaeilpour, B. 2006. The physiology of vegetable crops. Zanjan University Press. 662p.
28.Soltani, A. 1998. Application of SAS in Statistical Analysis (For Agriculture). Mashhad University Press. 166p. (In Persian)
29.Sun, X., Chengxiao, H., Qilin, T., Hongen, L., and Jinshan, L. 2009. Effects of molybdenum on endogenous hormone contents in winter wheat under low temperature stress. Inter. Plant Nutrition Colloquium XVI. University of California. 8p.
30.Thorpe, T.A. 1995. In Vitro Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers. 558p.
31.Vahdatpour, F. 2008. The investigation of zinc and boron elements effects in somatic embryogenesis of carrot (*Daucuse carota* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.). M.Sc. Thesis Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, 128p. (In Persian)
32.Walker, K.A., and Sato, S.J. 1981. Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ion in somatic embryogenesis. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 1: 109-121.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. Plant Prod. Res. Vol. 21 (3), 2014
http://jopp.gau.ac.ir

The effect of molybdenum in B5 medium containing nitrate and ammonium on somatic embryogenesis of carrot petiole

***M. Tavakoli[1], K. Mashayekhi[2] and F. Ghaderi-Far[3]**
[1]M.Sc. Student, Dept. Horticultural Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associate Prof., Dept. Horticultural Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Associate Prof., Dept. Agronomy, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
Received: 06/22/2013; Accepted: 08/09/2014

Abstract

One of the important methods of plant propagation in large scale so as genetic manipulation and artificial seed production is somatic embryogenesis technique. The obtained results from this methods related to different factors including condition of culture medium. Therefore, the aim of this study conduction were determining the role of molybdenum during carrot petiole somatic embryogenesis. At the first, sections of carrot petiole were cultured in modified B5 medium as embryogenesis induction phase. In this study different treatments on carrot petiole somatic embryogenesis were investigated. So as B5 medium containing nitrate alone, B5 medium containing nitrate and ammonium that molybdenum was added in standard concentration (0.99 mg/L) from some of them and remove from others. After one month, the explants subcultured in realization medium with same condition of induction medium but without 2,4-D. After six weeks of realization, the number of roots and embryos were determined. The result shows, the most roots and globular embryos were formed in the medium containing only nitrate (with and without molybdenum). According to the statistical analysis, molybdenum affect root and globular embryos insignificantly in these media ($P<0.05$). But, the most total embryos were produced and developed in medium containing both nitrate and ammonium with molybdenum. In medium containing both nitrate and ammonium, the embryos were developed with thick hypocotyls. The results showed that plants materials in medium without molybdenum apparent green color were increased that shows positive effect of reduced nitrogen on synthesis of chlorophyll the same as cytokines increases.

Keywords: Molybdenum, Nitrate, Ammonium, Somatic embryogenesis

---

* Corresponding Author; Email: tavakoli.mary@gmail.com