دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و چهارم، شماره اول، ۱۳۹٦
http://jopp.gau.ac.ir

اثر فرم‌های مختلف نیتروژن بر pH محیط کشت جنین‌زایی رویشی گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicon* L.)

***آیدا شمالی[1]، کامبیز مشایخی[2] و محمدهادی پهلوانی[3]**

[1]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[2]دانشیار گروه باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[3]دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۹/۱۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۲۲

چکیده

سابقه و هدف: یکی از عوامل بسیار مؤثر در تشکیل و تکامل جنین‌های رویشی ترکیب مواد موجود در محیط کشت از جمله نیتروژن می‌باشد. پژوهشگران پیشین تا حدودی اثر فرم‌های مختلف نیتروژن را بر جنین‌زایی رویشی و کشت سلولی بررسی کرده‌اند اما به بررسی انواع فرم‌ها به‌صورت جداگانه و در ترکیب با یکدیگر و در نسبت‌های متفاوت نپرداخته‌اند. از این‌رو پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر فرم‌های قابل‌جذب نیتروژن به‌صورت جداگانه و در ترکیب با نسبت‌های مختلف از سایر فرم‌ها بر جنین‌زایی رویشی گیاه گوجه‌فرنگی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی اثر فرم‌های قابل‌جذب نیتروژن بر جنین‌زایی رویشی گیاه گوجه‌فرنگی، آزمایشی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۸ تیمار و ٤ تکرار در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان انجام گردید. تیمارها شامل محیط کشت B5 کامل حاوی تنها یکی از فرم‌های نیتروژن از جمله نیترات، آمونیوم یا کازئین هیدرولیزات، محیط کشت B5 حاوی دو نوع نیتروژن شامل آمونیوم با نیترات، آمونیوم با کازئین هیدرولیزات و یا نیترات با کازئین هیدرولیزات و محیط کشت بدون نیتروژن بوده است. محیط کشت B5 استاندارد حاوی تمامی فرم‌های نیتروژن مذکور به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در این آزمایش به‌منظور القای جنین‌زایی قطعات یک سانتی‌متری از محور زیرلپه گیاه گوجه‌فرنگی در محیط کشت B5 تغییر یافته که همگی حاوی توفوردی بودند کشت شدند و پس از ۲۵ روز به‌منظور ظهور جنین‌ها، ریزنمونه‌ها به محیط B5 تغییریافته بدون توفوردی منتقل‌شدند. ۳۵ روز پس از مرحله تظاهر جنینی، صفاتی مانند تعداد جنین‌های رویشی تشکیل شده، pH ثانوری محیط کشت در انتهای هر دو مرحله القا و ظهور جنین‌ها و محتوای کلروفیل مواد گیاهی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که فرم‌های متفاوت و مقادیر مختلف نیتروژن آثار متفاوتی بر جنین‌زایی رویشی بر جای می‌گذارد. به‌طوری‌که در این بررسی کم‌ترین میزان pH در مرحله القا (۳/۹٦) و مرحله ظهور (۳/۷۲) مربوط به محیط کشت حاوی آمونیوم به‌عنوان تنها فرم نیتروژن و بیش‌ترین میزان آن در مرحله القا (۵/۸٦) مربوط به محیط کشت حاوی نیترات به تنهایی و در مرحله

* مسئول مکاتبه: shomali.aida@gmail.com

ظهور جنین‌ها (۵/۹۲) مربوط به محیط کشت حاوی نیترات با کازئین هیدرولیزات بود. نتایج نشان داد که در تیمارهای مختلف بین جنین‌های تشکیل‌شده از نظر تعداد و مرحله تکاملی اختلاف معنی‌داری وجود دارد، به‌طوری‌که بیش‌ترین تعداد جنین (٦۲/۲) در محیط B5 کامل و بیش‌ترین نسبت جنین‌های اژدری به کل جنین‌ها (۰/۵۱) در محیط B5 حاوی کازنین هیدرولیزات و نیترات تشکیل شد. همچنین نتایج به‌دست آمده نشان داد که تیمارهای نیتروژنی مختلف بر روی محتوای کلروفیل مواد گیاهی موجود در محیط کشت اثر معنی‌داری داشتند به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان کلروفیل کل (۹/۷) و کلروفیل a (٦/۹٦) و b (۱٤/۰۸) به‌ترتیب در محیط کشت حاوی نیترات و کازئین هیدرولیزات و محیط کشت B5 کامل مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: فرم‌های مختلف نیتروژن در ترکیب با سایر فرم‌ها و در نسبت‌های مختلف موجب افزایش درجه تکامل و تعداد کل جنین‌های رویشی تشکیل‌شده از محور زیرلپه گوجه‌فرنگی می‌شود، به‌طوری‌که با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت با حضور هر سه فرم نیتروژن معادل محیط B5 استاندارد تعداد کل جنین‌های رویشی تشکیل شده افزایش یافت و حضور نیترات و کازئین هیدرولیزات در غیاب آمونیوم جنین‌های رویشی را به‌سمت تکامل سوق داد. همچنین محتوای کلروفیل مواد گیاهی موجود در محیط کشت و pH محیط کشت تحت‌تأثیر انواع نیتروژن قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: آمونیوم، جنین‌های رویشی، کازئین هیدرولیزات، نیترات، pH

مقدمه

گیاه گوجه‌فرنگی با نام علمی (*Solanum lycopersicon* L.) متعلق به خانواده سولاناسه می‌باشد که کشت آن در ایران سابقه ۱۵۰ ساله دارد (۱٦). این گیاه یکی از محصولات مهم باغی می‌باشد (۱۵) و تقریباً در تمام نقاط جهان کشت می‌شود (۱۳). طی ده سال اخیر تولید گوجه‌فرنگی ٤۲ درصد و سطح زیرکشت آن ۳۷ درصد افزایش یافته است (۱۳). طبق آمار FAO در سال ۲۰۰۸ تولید جهانی این سبزی حدود ۱۳۰ میلیون تن بوده است. با توجه به اهمیت گوجه‌فرنگی و با توجه به این‌که جنین‌زایی رویشی یکی از روش‌های مطالعه سیتولوژیک گیاهان می‌باشد، در این مطالعه سعی شد رفتار این گیاه در پاسخ به فرم‌های مختلف نیتروژن طی جنین‌زایی رویشی مورد مطالعه قرار گیرد.

با توجه به این‌که منشا هر جنین رویشی یک سلول است، بنابراین در مواردی چون دست‌کاری‌های ژنتیکی و یا تکثیر انواع خاص این روش بسیار کارآمد می‌باشد، علاوه بر آن با توجه به کارهای اصلاحی زیادی که بر روی این گیاه صورت می‌گیرد این روش به‌عنوان تکمیل‌کننده فرآیندهای اصلاحی از اهمیت زیادی برخوردار است. طبق گزارش فوجیمورا (۲۰۱٤) عواملی متعددی مانند خصوصیات ژنتیکی گیاه، اندازه توده سلولی باززایی‌شده، دسترسی محدود به آمونیوم و تراکم سلول‌های موجود در کشت تعلیقی تأثیر زیادی بر جنین‌زایی رویشی می‌گذارد (۷). ترکیبات غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نیز اثر به‌سزایی بر جنین‌زایی رویشی می‌گذارند که از میان آن‌ها نیتروژن به‌عنوان عنصر پرمصرف تأثیر عمیقی بر تشکیل و تکامل جنین‌های رویشی دارد (۷). طبق گزارش‌های پژوهشگران پیشرو در این زمینه، اسیدهای آمینه به‌عنوان نیتروژن آلی اثر مثبتی بر ظهور جنین‌های رویشی دارند (۱۱ و ۲۱). در آزمایش مشایخی (۲۰۰۰) مشخص شد که کازئین هیدرولیزات، تکامل جنین‌های رویشی هویج را در مرحله اژدری شکل متوقف می‌سازد (۱۳). با توجه به پژوهش‌های انجام شده بر روی گیاه میخک، مشخص شد که کازئین هیدرولیزات با غلظت ۱ گرم بر لیتر، موجب

تسریع تکامل جنین‌ها در محیط MS شد (۱۹). تأثیر نسبت‌های مختلف نیتروژن آمونیومی و نیتراتی و همچنین نیترات آلی به فرم کازئین هیدرولیزات بر روی جنین‌زایی رویشی گیاه پیسهآ (*Picea abies*) بررسی شد و مشخص‌شد که رشد کالوس سبزرنگ در مقایسه با کالوس سفیدرنگ در محیط بدون نیتروژن آلی و دارای نیتروژن معدنی افزایش یافت (۱۸). همچنین در گیاه هویج نشان داده شد که وجود آمونیوم برای شکل‌گیری مرحله پیش- کروی ضروری می‌باشد (۸). همچنین محیط‌های کشت حاوی کازئین هیدرولیزات در مقایسه با سایر محیط‌های کشت حاوی سایر فرم‌های نیتروژن منجر به تشکیل جنین‌های بزرگ‌تر و از لحاظ تکاملی هم‌زمان‌تر شد (۱۷). در بررسی‌های دیگری که بر روی خیار انجام شده، مشخص گردید نسبت فرم‌های مختلف نیتروژن آمونیومی به نیتراتی نقش مؤثری بر تشکیل و تکامل جنین‌زایی رویشی این گیاه دارد (۲۲). بر اساس گزارش‌های ارائه‌شده توسط هالپرین و وترل (۱۹٦٥) حضور آمونیوم در محیط کشت ضروری می‌باشد و طبق مشاهده هالپرین در سال ۱۹۹۵ در صورت حذف آمونیوم از محیط جنین‌زایی تنها سلول‌های ریشه‌دار حاصل می‌شوند.

یکی از اثرات مهم نیتروژن تغییر pH محیط کشت می‌باشد که بسته به نوع آن موجب افزایش و یا کاهش pH محیط کشت در طول زمان می‌شود (۱۳). تغییرات pH محیط کشت به نوبه خود و مستقل از اثر نوع نیتروژن اثرات مستقیمی بر جذب عناصر و میزان فعالیت متابولیکی ریزنمونه‌ها بر جای می‌گذارد، به بیان دیگر در pH پایین فعالیت‌های متابولیکی و جذب عناصر متوقف می‌شود (۱۳) به‌طور مثال در جنین‌زایی کدو گزارش‌شده که در pH ۳/۲ رشد بافت و جنین‌زایی متوقف گردید و ریزنمونه‌ها به رنگ سفید درآمدند (۱٤). فرم‌های مختلف نیتروژن بر محتوای کلروفیل مواد گیاهی موجود در محیط کشت نیز اثر متفاوتی بر جای می‌گذارد. با توجه به این‌که نیتروژن یکی از مهم‌ترین عناصر ساختاری کلروفیل می‌باشد (۱۰)، میزان جذب و در دسترس بودن این عنصر بر محتوای کلروفیل اثر مهمی بر جای می‌گذارد.

هدف از پژوهش حاضر بررسی نقش نیتروژن اکسیدشونده، احیاشونده و نیتروژن آلی به‌صورت جداگانه و در ترکیب با یکدیگر و همچنین بررسی اثر به‌کار بردن نسبت‌های مختلف نیتروژن در حالی‌که مقدار کلی آن ثابت و معادل مقادیر استاندارد محیط B5 می‌باشد، است. از این‌رو نقش اختصاصی هر فرم نیتروژن و اثر متقابل آن با سایر فرم‌ها در ارتباط با فرایند جنین‌زایی رویشی مورد بررسی قرار گرفته است و از این جهت نسبت به پژوهش‌های پیشین جامع‌تر است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و هشت تیمار در سال ۱۳۹٤ در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد.

تهیه ریزنمونه: ابتدا بذور گوجه‌فرنگی رقم وای در اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه قرار داده شدند، سپس توسط هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی گردید و پس از آبکشی با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار بر روی محیط کشت MS حاوی ۸ درصد آگار و ۳ درصد ساکارز در ظروف شیشه‌ای کشت شدند. پس از دو هفته از هیپوکوتیل دانهال‌های رشدیافته، ریزنمونه‌هایی به طول یک سانتی‌متر تهیه شدند و جهت القای جنین‌زایی در ظروف کشت تی‌شکل حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت B5 تغییریافته بر اساس تیمارهای آزمایش (جدول ۱)، حاوی یک میلی‌گرم برلیتر توفوردی

کشت شدند. در این بررسی در محیط کشت‌هایی که آمونیوم و نیترات از آن‌ها حذف شد، یون‌های پتاسیم و سولفور حذف‌شده با اضافه کردن نسبت مولی مساوی با K_2SO_4 جایگزین شدند. سه هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها، به‌منظور حذف توفوردی، همه آن‌ها پس از سه بار شستشوی مکرر توسط محیط کشت استریل بدون هورمون به‌مدت ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه به محیط ظهور جنین منتقل شدند. محیط کشت مرحله ظهور جنین‌ها مشابه با مرحله القا بود با این تفاوت که توفودی استفاده نشد.

جدول ۱- انواع تیمارهای مورد آزمایش در محیط کشت B5.

Table 1. Different types of studied treatment for B5 tissue culture medium.

	تیمار Treatments	فرم نیتروژن Form of nitrogen	کل مقدار نیتروژن موجود در محیط کشت (پی‌پی‌ام) Total amount of nitrogen in culture medium (ppm)
1	محیط کشت B5 بدون نیتروژن B5 medium without nitrogen	-	0
2	محیط کشت B5 حاوی آمونیوم به‌عنوان تنها فرم نیتروژن B5 medium contains nitrate as sole nitrogen form	$(NH_4)_2SO_4$	476
3	محیط کشت B5 حاوی نیترات به‌عنوان تنها فرم نیتروژن B5 medium contains ammonium as sole nitrogen form	KNO_3	476
4	محیط کشت B5 حاوی کازئین هیدرولیزات به‌عنوان تنها فرم نیتروژن B5 medium contains casein hydrolysate as sole nitrogen form	Casein hydrolysate	476
5	محیط کشت B5 حاوی آمونیوم و نیترات B5 medium contains ammonium and nitrate	KNO_3+ $(NH_4)_2SO_4$	476
6	محیط کشت B5 حاوی آمونیوم و کازئین هیدرولیزات B5 medium contains ammonium and casein hydrolysate	$(NH_4)_2SO_4$+ Casein hydrolysate	476
7	محیط کشت B5 حاوی نیترات و کازئین هیدرولیزات B5 medium contains nitrate and casein hydrolysate	+ Casein hydrolysate KNO_3	476
8	محیط کشت B5 کامل استاندارد (حاوی تمامی فرم‌های نیتروژن) Complete B5 medium	KNO_3+ Casein hydrolysate +$(NH_4)_2SO_4$	476

شمارش جنین‌ها: چهار هفته پس از شروع مرحله ظهور جنین‌ها، مواد گیاهی به‌ویژه جنین‌های شکل‌گرفته، توسط استرئوسکوپ با بزرگنمایی ۲۰X و ٤۰X، عکس‌برداری شدند و جنین‌های تشکیل‌شده شمارش شدند.

اندازه‌گیری pH محیط کشت: ابتدا pH اولیه تمامی محیط‌های کشت بر روی ۵/۷ تنظیم شدند در نهایت پس از اتمام مرحله القا و ظهور pH نهایی محیط‌های کشت بر اساس گزارش مشایخی (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شدند (۱۳).

اندازه‌گیری کلروفیل: محتوای کلروفیل تمامی مواد گیاهی موجود در محیط کشت بر اساس روش بارنس و همکاران (۱۹۹۲)، اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد و شامل تجزیه واریانس، همبستگی بین پارامترها و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد بود. همچنین لازم به ذکر است طی تجزیه تعداد کل جنین‌ها به‌علت عدم تشکیل جنین در برخی از تیمارها، آن‌ها از فرآیند تجزیه و تحلیل داده‌ها حذف شده و درجه آزادی تیمار از ۷ به ٤ تقلیل یافت.

نتایج و بحث

نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر مشخص کرد که فرم‌های مختلف نیتروژن موجود در محیط کشت بافت، اختلاف معنی‌داری را در سطح یک درصد بر pH محیط کشت در هر دو مرحله القا و ظهور جنین‌ها ایجاد کرده است (جدول ۲). به‌طوری‌که در این بررسی کم‌ترین میزان pH در مرحله القا (۳/۹۶) و مرحله ظهور (۳/۷۲) مربوط به محیط کشت حاوی آمونیوم به‌عنوان تنها فرم نیتروژن و بیش‌ترین میزان آن در مرحله القا (۵/۸۶) مربوط به محیط کشت حاوی نیترات به تنهایی و در مرحله ظهور جنین‌ها (۵/۹۲) مربوط به محیط کشت حاوی نیترات با کازئین هیدرولیزات بود. با توجه به نتایج پژوهش‌های اخیر این تغییر در pH محیط را می‌توان بدین‌دلیل دانست که طی سوخت‌وساز آمونیوم مقادیر زیادی H^+ در محیط آزاد می‌شود که در نهایت موجب اسیدی‌شدن محیط کشت می‌گردد (۱۳) به‌طوری‌که نتایج به‌دست آمده نشان داد که آمونیوم در پایان کار، pH محیط مرحله القا را به ۳/۹۶ و مرحله ظهور را به ۳/۷۲ کاهش داد (جدول ۳).

در پژوهش حاضر کم‌ترین تغییر pH نسبت به pH اولیه مربوط به محیط کشت حاوی هر سه فرم نیتروژن (مرحله القا: ٤/٧٨، مرحله ظهور: ٤/٧١) بود از این‌رو به‌نظر می‌رسد علت آن تعادل بین جذب و آزاد شدن یون هیدروژن و در مقابل خاصیت بافری کازئین هیدرولیزات می‌باشد (۱۳). همچنین با توجه به نتایج این پژوهش در محیط کشت‌هایی که از نیترات به‌عنوان تنها فرم نیتروژن استفاده شد، pH محیط در هر دو مرحله القا و ظهور افزایش یافت و به‌ترتیب به ٥/٨٦ و ٥/٩١ رسید. بنابر گزارش مشایخی (۲۰۰۷) احیای نیترات توسط آنزیم‌های نیتریت ردوکتاز و نیترات ردوکتاز با جذب یون هیدروژن همراه بوده که در نهایت منجر به افزایش pH می‌شود (١٤). از طرف دیگر پژوهش‌های پیشین مشخص کردند که علی‌رغم این‌که نیترات در نهایت برای این‌که مورد استفاده بافت قرار گیرد باید به آمونیوم و در نهایت به آمینواسیدها تبدیل شود اما استفاده مستقیم از آمونیوم کارآیی لازم را ندارد (۹) که این امر ممکن است به‌علت سمیت این ماده در غلظت‌های بالا، محدودکنندگی اسیدهای چرخه TCA و یا اثر منفی آن بر pH محیط کشت باشد (٥).

جدول ۲- میانگین مربعات اثر تیمارهای نیتروژنی بر pH در مرحله القا و ظهور طی جنین‌زایی محور زیرلپه در گیاه گوجه‌فرنگی.

Table 2. Mean squares of pH value in induction and realization phases of somatic embryogenesis of tomato hypocotyle.

منابع تغییرات S.O.V	میانگین مربعات pH محیط کشت در مرحله القا Mean squares of pH of culture medium in induction phase		میانگین مربعات pH محیط کشت در مرحله تظاهر Mean squares of pH of culture medium in realization phase	
	درجه آزادی Df	میانگین مربعات MS	درجه آزادی Df	میانگین مربعات MS
تیمار Treatment	7	1.76**	7	2.42**
خطا Error	24	0.01	24	0.047
کل Total	31		31	
ضریب تغییرات CV (%)	2.52		4.09	

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

** Significant at 1% probability level.

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های اثر سطوح مختلف تیمارهای نیتروژنی بر pH مراحل القا و ظهور جنین‌زایی رویشی محور زیرلپه در گیاه گوجه‌فرنگی.

Table 3. Means comparison of effect of different amount of nitrogenous treatments on pH value of induction and realization phases of tomato hypocotyl embryogenesis.

pH ثانویه مرحله ظهور Secondary pH of realization phase	pH ثانویه مرحله القا Secondary pH of induction phase	pH اولیه در مرحله القا و ظهور Primary pH of induction and realization phase	محیط کشت Culture medium
5.22[b]	5.53 [bc]	5.7± 0.1	محیط کشت B5 بدون نیتروژن B5 medium without nitrogen
5.91[a]	5.86[a]	5.7± 0.1	محیط کشت B5 حاوی نیترات به‌عنوان تنها فرم نیتروژن B5 medium contains ammonium as sole nitrogen form
3.72[d]	3.96[e]	5.7± 0.1	محیط کشت B5 حاوی آمونیوم به‌عنوان تنها فرم نیتروژن B5 medium contains nitrate as sole nitrogen form
5.77[a]	5.72[ab]	5.7± 0.1	محیط کشت B5 حاوی کازئین هیدرولیزات به‌عنوان تنها فرم نیتروژن B5 medium contains casein hydrolysate as sole nitrogen form
5.92[a]	5.79[a]	5.7± 0.1	محیط کشت B5 حاوی آمونیوم و نیترات B5 medium contains ammonium and nitrate
5.92[a]	5.82[a]	5.7± 0.1	محیط کشت B5 حاوی آمونیوم و کازئین هیدرولیزات B5 medium contains ammonium and casein hydrolysate
5.28[b]	5.34[c]	5.7± 0.1	محیط کشت B5 حاوی نیترات و کازئین هیدرولیزات B5 medium contains nitrate and casein hydrolysate
4.71[c]	4.78[d]	5.7± 0.1	محیط کشت B5 کامل استاندارد (حاوی تمامی فرم‌های نیتروژن) Complete B5 medium

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to LSD test.

تعداد جنین‌ها: نتایج نشان داد که فرم‌های مختلف نیتروژن بر تعداد جنین‌های تشکیل شده اثر معنی‌داری دارد (جدول ٤) به‌طوری‌که نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد بیش‌ترین تعداد جنین‌های رویشی (٦٢/٢) در محیط B5 استاندارد که حاوی هر سه نوع نیتروژن بود تشکیل شد در حالی‌که در محیط کشت‌های حاوی آمونیوم یا نیترات به‌عنوان تنها فرم نیتروژن و در محیط کشت بدون نیتروژن هیچ جنینی تشکیل نشد (جدول ٥).

به‌نظر می‌رسد زیاد بودن تعداد جنین‌ها در محیط B5 استاندارد به‌علت حضور هر سه نوع اکسیدکننده، احیاکننده و نیتروژن آلی در محیط کشت می‌باشد. علاوه بر ضرورت وجود فرم‌های غیرآلی، اثر مثبت نیتروژن آلی به‌صورت آمینواسیدها و یا کازئین هیدرولیزات که مخلوطی از آمینواسیدها با درصد بالایی از گلوتامین می‌باشد، در پژوهش‌های پیشین به اثبات رسید (۱۸). نتایج این آزمایش مطابق با نتایج پژوهش‌های پیشین بر روی اثر کازئین هیدرولیزات بر افزایش تعداد جنین‌های رویشی میخک (۱۹) و برنج (۲۰) می‌باشد. به‌علاوه طی پژوهش‌های به عمل آمده بر روی جنین‌زایی رویشی دمبرگ هویج، برتری محیط کشت B5 نسبت به محیط کشت MS برای جنین‌زایی رویشی این گیاه گزارش شد که بنابر عقیده پژوهش‌گر مذکور این برتری به‌علت حضور کازئین هیدرولیزات در محیط کشت B5 می‌باشد (۱۵). همچنین نتایج این بررسی مطابق با نتایج پژوهش‌های پیشین بر روی جنین‌زایی رویشی گیاه هویج (۱۷) نشان داد که تشکیل و تکامل جنین‌های رویشی در حضور تمامی فرم‌های احیا و اکسید و نیتروژن آلی در صورتی که در نسبت‌های متعادل وجود داشته باشند

به بهترین نحو صورت می‌گیرد. البته بخشی از این مسأله مانند نیاز به نیترات هنوز مشخص نیست اما به‌نظر می‌رسد که در طی متابولیسم این فرم نیتروژن چرخه‌های متابولیکی خاصی فعال می‌شود که برای تشکیل جنین‌های رویشی ضروری می‌باشد.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که تعداد جنین‌های رویشی تشکیل‌شده در محیط‌های حاوی نیترات و آمونیوم کم‌تر (۱۹/۵۵) از محیط B5 کامل (٦٢/٢) بود اما نسبت به محیط‌های حاوی یک فرم نیتروژن تعداد بیش‌تری جنین رویشی تشکیل شد. روبلسکی و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند طی جنین‌زایی رویشی خیار تراکم سوسپانسیون سلولی زمانی که میزان نیترات ۱۰ برابر میزان آمونیوم در محیط کشت بیش‌تر از تراکم سلول‌ها در محیط حاوی نیترات یا آمونیوم به تنهایی بود (۱۸). به‌نظر می‌رسد زیاد بودن میزان نیترات در محیط کشت منجر به تعدیل pH شده است و با توجه به رقابت موجود بین جذب آمونیوم و نیترات، حضور نیترات مانع جذب بیش از حد و در نتیجه مانع ایجاد سمیت در سلول شده است (۱۸) اما غیاب کازئین هیدرولیزات مانع دست‌یابی به بیش‌ترین پتانسل جنین‌زایی شد.

در پژوهش حاضر عدم تشکیل جنین‌های رویشی در محیط‌های حاوی فقط نیترات و محیط حاوی آمونیوم به‌عنوان تنها فرم نیتروژن (جدول ۵) مشاهده شد. گامبورگ و شایلوک (۱۹۷۰) مشاهده نمودند که نیترات به تنهایی قادر به القای جنین‌زایی در سویا نبود و با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. علی‌رغم این‌که پژوهش‌گران پیشین معتقد بودند که آمونیوم تنها فرم مناسب نیتروژن برای القای جنین‌زایی رویشی می‌باشد (۹) برخی دیگر از پژوهش‌گران گزارش کردند که آمونیوم روند ظهور جنین‌ها را کند و یا متوقف می‌کند به‌طور مثال بیوکالکا و موویتونا (۱۹۹٦) مشاهده کردند که در غلظت‌های دو برابر آمونیوم نسبت به نیترات تعداد جنین‌های سوماتیک تشکیل‌شده به‌شدت کاهش یافت. با توجه به نتایج حاصل از پژوهش‌های پیشین می‌توان این‌طور برداشت نمود که این اثر آمونیوم مربوط به اثر محدودکننده غلظت‌های غیرمناسب آن در تشکیل اسیدهای چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید (TCA) می‌باشد که برای سنتز آمینو اسیدها ضروری است (۹) و دلیل دیگر آن ایجاد سمیت شدید این ماده در غلظت‌های زیادتر از حد بهینه می‌باشد (۹). جهت روشن شدن این رفتار آمونیوم دوگال و ورما (۱۹۸۷)، با تیتراسیون مکرر محیط کشت، موفق به کشت سلول‌های جنین‌زا در محیط حاوی این ماده به‌عنوان تنها فرم نیتروژن شدند (٤).

جدول ٤- میانگین مربعات تعداد کل جنین‌های رویشی تشکیل‌شده از محور زیرلپه گوجه‌فرنگی و نسبت جنین‌های اژدری به کل جنین‌ها.

Table 4. Mean squares of total number of formed somatic embryo of tomato hypocotyl and ratio of torpedo shaped embryos to all formed embryos.

منبع تغییرات S.O.V	تعداد کل جنین‌ها Total number of embryos		نسبت جنین‌های اژدری به کل جنین‌ها Ratio of torpedo embryos to all formed embryos	
	درجه آزادی Df	میانگین مربعات MS	درجه آزادی Df	میانگین مربعات MS
تیمار Treatment	4	7.94**	6	0.125**
خطا Error	15	0.18	19	0.0095
کل Total	19		25	

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

** Significant at 1% probability level.

جدول ۵- مقایسه میانگین سطوح مختلف تیمارهای نیتروژنی برای تعداد کل جنین‌ها و جنین‌های اژدری تشکیل‌شده از محور زیرلپه گوجه‌فرنگی.

Table 5. Mean comparison of different levels of nitrogenous treatments for number of total embryo and torpedo shaped embryo of tomato hypocotyl.

تعداد جنین‌های اژدری Number of torpedo shaped embryos	تعداد کل جنین‌ها Total number of embryo	تیمار Treatment
29.10[a]	62.2[4a]	محیط کشت B5 کامل استاندارد (حاوی تمامی فرم‌های نیتروژن) Complete B5 medium
†	†	محیط کشت B5 حاوی آمونیوم به‌عنوان تنها فرم نیتروژن B5 medium contains ammonium as sole nitrogen form
†	†	محیط کشت B5 حاوی نیترات به‌عنوان تنها فرم نیتروژن B5 medium contains nitrate as sole nitrogen form
1	2.78[c]	محیط کشت B5 حاوی کازئین هیدرولیزات به‌عنوان تنها فرم نیتروژن B5 medium contains casein hydrolysate as sole nitrogen form
1.99[b]	19.55[b]	محیط کشت B5 حاوی آمونیوم و نیترات B5 medium contains ammonium and nitrate
38.18[a]	55.19[a]	محیط کشت B5 حاوی نیترات و کازئین هیدرولیزات B5 medium contains nitrate and casein hydrolysate
2.21[b]	5.74[b]	محیط کشت B5 حاوی آمونیوم و کازئین هیدرولیزات B5 medium contains ammonium and casein hydrolysate
†	†	محیط کشت B5 بدون نیتروژن B5 cmedium without nitrogen

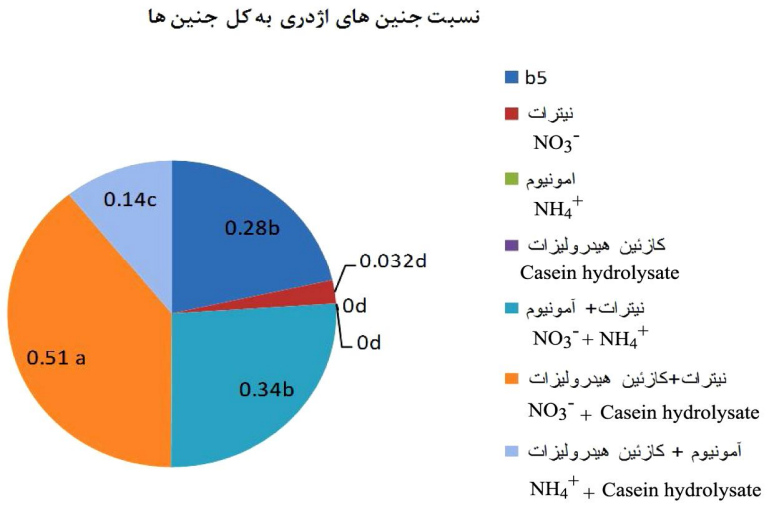
در هر ستون میانگین‌هایی که در یک حرف مشترک هستند براساس آزمون LSD بدون تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشند.

Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to LSD test.

† در این تیمارها تعداد جنین‌ها ناچیز بوده و یا جنینی تشکیل نشده است بنابراین تجزیه داده‌ها صورت نگرفته است.

† There are no or a few embryos in related treatment in the experiment, so analysis was not done for these valuable.

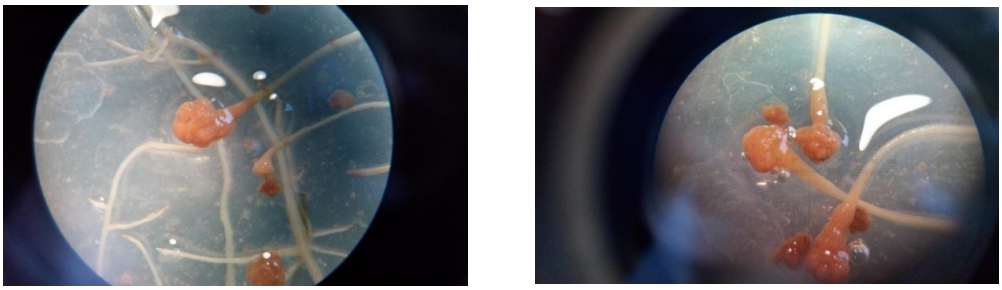
همچنین با بررسی مراحل تکاملی جنین‌های رویشی مشخص شد، بیش‌ترین نسبت جنین‌های اژدری نسبت به کل جنین‌های رویشی تشکیل‌شده (۰/۵۱) مربوط به محیط کشت حاوی نیترات و کازئین هیدرولیزات می‌باشد (شکل ۱)، از این می‌توان بیان نمود که نیترات موجب افزایش تقسیم سلولی و در نتیجه افزایش سلول‌های جنین‌زای حاضر در محیط کشت شده و در ادامه کازئین هیدرولیزات با ممانعت از تقسیم سلولی موجب تکامل این سلول‌ها به حالت جنینی گردیده است (٤)، علاوه بر آن موجب ایجاد رکود جنین‌ها در مرحله اژدری‌شکل می‌شود (مشایخی، ۲۰۰۰).



شکل ۱- نسبت جنین‌های اژدری به کل جنین‌های رویشی تشکیل‌شده از محور زیرلپه گوجه‌فرنگی در محیط کشت‌های حاوی فرم‌های مختلف نیتروژن.

Figure 1. Ratio of number of torpedo shaped embryos to all formed embryo of tomato hypocotyl under the effect of different forms of nitrogen.

با توجه به بررسی جنین‌ها از نظر ظاهری مشخص شد در محیط‌های کشت حاوی مقادیر بالای نیترات علاوه بر جنین‌های رویشی تعداد زیادی توده‌های سلولی ریشه‌دار تشکیل شده است و در محیطی که نیترات به‌عنوان تنها فرم نیتروژن مورد استفاده قرار گرفت، تنها سلول‌های ریشه‌دار حضور داشتند در حالی‌که هیچ جنینی در آن‌ها تشکیل نگردید (شکل ۲)، به احتمال زیاد این امر به سبب بالا بودن مقادیر بیش‌تر از حد بهینه نیتروژن می‌باشد، همان‌طور که مشایخی (۲۰۰۷)، کم بودن تعداد جنین‌ها و تشکیل سلول‌های ریشه‌دار در محیط NL را به‌علت بالا بودن نیتروژن نیتراتی و نبود نیتروژن آمونیومی در این محیط نسبت دادند (۱۳).



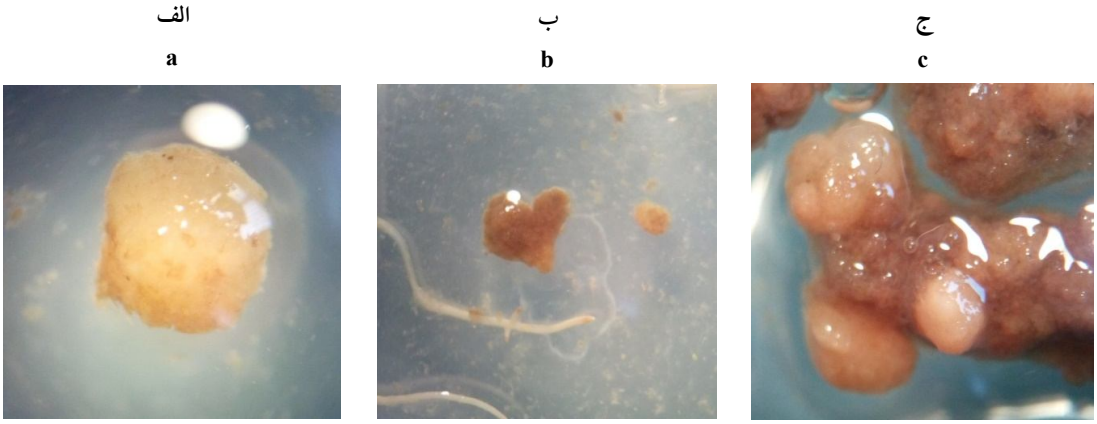
شکل ۲- سلول‌های ریشه‌دار شده (امبریوئید) آزاد شده از محور زیرلپه گوجه‌فرنگی در محیط کشت‌های B5 حاوی مقادیر زیاد نیتروژن نیتراتی (بزرگنمایی ٤٠X).

Figure 2. Rooted cells released from tomato hypocotyl in medium contained high amount of nitrate.

نتایج پژوهش حاضر مشخص کرد که جنین‌های تشکیل‌شده در محیط حاوی نیترات و کازئین هیدرولیزات در مقایسه با محیط‌های حاوی سایر فرم‌های نیتروژن دارای اندازه بزرگ‌تری بودند که این ویژگی مربوط به حضور کازئین هیدرولیزات در این محیط می‌باشد، زیرا در سایر محیط‌های حاوی نیترات بدون کازئین هیدرولیزات این پدیده مشاهده نگردید یعنی اندازه جنین‌ها اختلاف چندانی نداشت. همچنین

توکلی و همکاران (۲۰۱۲) طی پژوهش‌های خود بر روی جنین‌زایی رویشی هویج دریافتند محیط‌های حاوی کازئین هیدرولیزات منجر به تشکیل جنین‌های بزرگ‌تر و از لحاظ تکاملی هم‌زمان‌تر شدند (۱۷) که با نتایج این بررسی هم‌خوانی داشته و اثر این فرم نیتروژن را به‌خوبی مشخص می‌کند.

بزرگ بودن اندازه جنین‌ها تحت‌تأثیر کازئین هیدرولیزات در جنین‌زایی رویشی هویج نیز گزارش شد (۱۷) علاوه بر آن تعداد زیادی جنین‌های کروی در لایه زیر اپیدرمی بر روی ریزنمونه مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳- جنین کروی (الف) و قلبی‌شکل (ب) در محیط حاوی کازئین هیدرولیزات و نیترات. جنین‌های کروی تشکیل‌شده بر روی محور زیرلپه گوجه‌فرنگی (ج).

Figure 3. Huge globular (a) and heart embryo (b) in medium contained nitrate with casein hydrolysat. Globular embryos formed on subepidermal layer of tomato hypocotyl (c).

محتوای کلروفیل در مواد گیاهی موجود در محیط جنین‌زایی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد بین تیمارهای مختلف نیتروژنی از نظر سنتز کلروفیل اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ٦). بیش‌ترین میزان کلروفیل a (٦/٩٦) و b (١٤/٠٨) در محیط حاوی هر سه فرم نیتروژن و بیش‌ترین نسبت کلروفیل a به b (٠/٢٩) در محیط بدون نیتروژن مشاهده شد (جدول ۷) که نشان‌دهنده این امر است که در محیط بدون نیتروژن کلروفیل a در اولویت می‌باشد. همچنین محیط کشت‌های حاوی کازئین هیدرولیزات با آمونیوم دارای بیش‌ترین مقدار (۹/۷) کلروفیل کل بودند (جدول ۷). کم‌ترین میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل نیز در محیط کشت‌های حاوی آمونیوم به‌عنوان تنها فرم نیتروژن مشاهده شد (جدول ۷). در این محیط به‌علت کاهش شدید pH نه تنها کلروفیل تشکیل نشد بلکه سایر فعالیت‌های متابولیکی نیز متوقف شد که بیانگر نتایج به‌دست آمده از پژوهش‌های توکلی و همکاران (۲۰۱۲) می‌باشد. یکی دیگر از دلایل عدم تشکیل کلروفیل در این محیط بدون نیترات می‌باشد، زیرا به عقیده مارشنر (۲۰۱۱)، جذب مس که یکی از مهم‌ترین عناصر ساختاری کلروفیل است، ارتباط مستقیمی با محتوای نیترات موجود دارد (۱۲). از طرفی به‌نظر می‌رسد چون متابولیسم آمونیوم نیاز به انرژی زیستی چه از نوع ATP و یا NADPH ندارد (۱۷) بنابراین قندهای موجود شکسته‌نشده و به تبع عدم نیاز به سنتز قندهای جدید، عدم تشکیل کلروفیل را در گیاه القا می‌کند، از طرفی به عقیده هلدت (۲۰۰۵) سنتز هیدروژن‌های احیاکننده منجر به افزایش تشکیل کلروفیل a از پروتوکلروفیل می‌شود که با نتایج

پژوهش حاضر هم‌خوانی ندارد. در این محیط ریزنمونه‌ها در مرحله القا به‌تدریج به رنگ سبز روشن و پس از آن به رنگ سفید متمایل شدند (۱۰). با توجه به این‌که نیتروژن یکی از اجزای مهم ساختار کلروفیل می‌باشد (۱۰)، حضور این عنصر برای گیاه بسیار دارای اهمیت می‌باشد. در تیمارهای حاوی نیترات و یا به همراه سایر فرم‌های نیتروژنی مقدار قابل‌قبولی از کلروفیل ساخته شد که این حالت ناشی از در دسترس بودن عوامل اکسید و احیا و نیاز گیاه به انرژی می‌باشد (۱۷).

جدول ٦- میانگین مربعات محتوای کلروفیل مواد گیاهی موجود در محیط کشت‌های حاوی فرم‌های مختلف نیتروژن.

Table 6. Means squares of chlorophyll content of plant materials in culture mediums contained different forms of nitrogen.

منابع تغییرات	درجه آزادی df	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	نسبت کلروفیل a به b Ratio of chlorophyll a to b	کلروفیل کل Total chlorophyll
تیمار Treatment	7	2.79**	101.95**	0.128**	78.06**
خطا Error	2	0.29	1.08	0.012	1.71
کل Total	31				
ضریب تغییرات CV (%)		12.90	12.97	16.23	17.64

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

** Significant at 1% probability level.

جدول ۷- مقایسه میانگین محتوای کلروفیل مواد گیاهی موجود در محیط کشت‌های حاوی فرم‌های مختلف نیتروژن.

Table 7. Means comparison of chlorophyll content of plant materials in culture mediums contained different forms of nitrogen.

تیمار Treatment	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	نسبت کلروفیل a به b Ratio of chlorophyll a to b	کلروفیل کل Total chlorophyll
محیط کشت B5 بدون نیتروژن B5 medium without nitrogen	0.20^{d}	0.29^{f}	0.29^{a}	6.39^{ab}
محیط کشت B5 حاوی آمونیوم به‌عنوان تنها فرم نیتروژن B5 medium contains ammonium as sole nitrogen form	5.81^{b}	11.84^{b}	0.49^{ab}	9.73^{ab}
محیط کشت B5 حاوی نیترات به‌عنوان تنها فرم نیتروژن B5 medium contains nitrate as sole nitrogen form	0.85^{c}	1.26^{f}	0.65^{ab}	1.12^{c}
محیط کشت B5 حاوی کازئین هیدرولیزات به‌عنوان تنها فرم نیتروژن B5 medium contains casein hydrolysate as sole nitrogen form	3.21^{c}	5.16^{e}	0.61^{ab}	5.37^{b}
محیط کشت B5 حاوی آمونیوم و نیترات B5 medium contains ammonium and nitrate	6.05^{ab}	9.13^{d}	0.66^{ab}	8.68^{ab}
محیط کشت B5 حاوی آمونیوم و کازئین هیدرولیزات B5 medium contains ammonium and casein hydrolysate	6.09^{ab}	10.39^{cd}	0.59^{ab}	9.7^{a}
محیط کشت B5 حاوی نیترات و کازئین هیدرولیزات B5 medium contains nitrate and casein hydrolysate	3.49^{c}	10.84^{bc}	0.32^{b}	9.44^{a}
محیط کشت B5 کامل استاندارد (حاوی تمامی فرم‌های نیتروژن) Complete B5 medium	6.96^{a}	14.08^{a}	0.49^{ab}	0.30^{c}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to LSD test.

جدول ۸- همبستگی محتوای کلروفیل مواد گیاهی موجود در محیط‌های کشت حاوی فرم‌های مختلف نیتروژن با pH محیط کشت مرحله‌های القا و ظهور.

Table 8. Correlation between chlorophyll content of plant materials in different culture mediums contained different forms of nitrogen with pH of induction and realization culture medium.

	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	نسبت کلروفیل a به b Ratio of chlorophyll a to b	کلروفیل کل Total chlorophyll	pH محیط کشت القای جنین pH of induction medium	pH محیط کشت ظهور جنین pH of realization medium
کلروفیل a Chlorophyll a	1					
کلروفیل b Chlorophyll b	0.8**	1				
نسبت کلروفیل a به b Ratio of chlorophyll a to b	0.02^{ns}	-0.38**	1			
کلروفیل کل Total chlorophyll	0.78**	0.80**	-0.2^{ns}	1		
pH محیط کشت القای جنین pH of induction medium	0.53**	0.52**	-0.34**	0.57**	1	
pH محیط کشت ظهور جنین pH of realization medium	0.54**	0.48**	0.027^{ns}	0.56**	0.43**	1

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد و ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار.

** Significant at 1% probability level and ns Non-significant differences.

نتایج همبستگی بین pH و کلروفیل مشخص کرد که بین نسبت کلروفیل a به b و pH مرحله القا همبستگی منفی وجود دارد. به این معنا که با کاهش pH در مرحله القا سنتز کلروفیل a به b افزایش می‌یابد. با توجه به این‌که به‌طور معمول تولید کروموفرهای کلروفیل در pHهای پایین کاهش می‌یابد، این افزایش نسبی کلروفیل a به b را می‌توان به تجزیه کلروفیل b و یا تولید کلروفیل a نسبت داد که این امر در صورتی می‌تواند صحیح باشد که دلایلی دال بر تجزیه پروتئین‌ها نیز موجود باشد، زیرا کروموفرهای کلروفیل در حالت اتصال به پروتئین (رنگدانه) در غشای لیپیدی قرار دارند و واکنش اندکی به pH محیط نشان می‌دهند (۱۰)، این در حالی است که pH محیط کشت مرحله ظهور جنین‌ها همبستگی معنی‌داری با نسبت کلروفیل a به b نشان نمی‌دهد، در صورتی که محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل همبستگی معنی‌داری با pH هر دو مرحله القا و ظهور جنین‌ها نشان می‌دهند (جدول ۸)، بنابراین پژوهش حاضر پیشنهاد می‌کند که به‌علت فراهمی مواد غذایی و ایجاد پدیده تنبلی که یکی از ویژگی‌های گیاهان درون‌شیشه‌ای می‌باشد (۱۸)، همبستگی بین pH محیط کشت و کلروفیل ناشی از ساخت کروموفرهای کلروفیل می‌باشد که در پیوند با غشا قرار نگرفتند. همچنین افزایش محتوای کلروفیل کل می‌تواند منوط به افزایش کلروفیل c باشد که به‌علت نبود زنجیره آبگریز فیتول محصور در لیپید نمی‌باشد (۱۰).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهد بیش‌ترین تعداد جنین‌ها در محیط B5 کامل تشکیل شدند که بیانگر لزوم حضور هر سه فرم نیتروژن آلی، اکسید و احیا می‌باشد و مشاهده بیش‌ترین تعداد جنین‌های تکامل‌یافته در محیط کشت حاوی نیترات و کازئین هیدرولیزات، نقش مؤثر این دو ماده را در تکامل جنین‌ها خاطر نشان می‌کند. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که فرم‌های مختلف نیتروژن بر pH محیط کشت و روند تشکیل و تکامل جنین‌های رویشی اثر زیادی دارد، به‌طوری‌که در محیط کشت حاوی هر سه فرم نیتروژن و محیط کشت حاوی کازئین هیدرولیزات و نیترات تغییرات pH جزئی بوده و تشکیل و تکامل جنین‌های رویشی نسبت به سایر محیط‌های کشت به بهترین صورت انجام شد. از این‌رو با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش پیشنهاد می‌شود که برای دست‌یابی به تعداد زیادی جنین‌های تکامل‌یافته، محیط کشت‌های حاوی هر سه نوع نیتروژن اما با مقادیر بالای کازئین هیدرولیزات استفاده شود. همچنین این مطالعه بررسی دقیق‌تر اثر pH بر جنبه‌های تکاملی سلولی و تأثیر فرم‌های مختلف ازت بر pH درون سلولی را توصیه می‌نماید.

منابع

1.Barnes, J.D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S. and Davison, A.A. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for extraction and determination of chlorophyll a and b in lichens and higher plants. Environ. Exp. Bot. 32: 85-100.

2.Behrend, J. and Mateles, R.I. 1975. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. Plant Physiol. 56: 584-589.

3.Buyukalaca, S. and Mavituna, F. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. PCTOC. 46: 227-235.

4.Dougall, D.K. and Verma, D.C. 1978. Growth and embryo formation in wild-carrot suspension cultures with ammonium ion as a sole nitrogen source. In vitro. Cell Dev. Diol. 14: 2. 180-182.

5.Fujimura, T. 2014. Carrot somatic embryogenesis. A dream come true?. Plant Biotechnol. Rep. 8: 23-28.

6.Gamborg, O.L. and Shyluk, J.P. 1970. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. J. Plant Prod. 45: 5. 598-600.

7.George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. 2008. The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients (pp. 65-113). Springer Netherlands Press.

8.Halperin, W. 1995. In vitro embryogenesis: som historical issues and unresolved problems. In: T.A. Throp (ed.). In vitro embryogenesis in plant. Kluwer Academic publishers. Netherlands.

9.Halperin, W. and Wetherell, D.F. 1965. Ammonium requirement for embryogenesis in vitro. Nature, 201: 519-520.

10.Heldt, H.W. and Heldt, F. 1997. J. Plant Bioch. Biotech.

11.Inocente, G.C.C., Vesco, L.L.D., Steinmacher, D., Torres, A.C. and Guerra, M.P. 2007. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (Accasellowiana (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds. J. Sci. Hort. 111: 228-234.

12.Marschner, H. 2011. Marschner's mineral nutrition of higher plants. Academic press the effect of molybdenum on metabolism of different nitrogen in B5 medium during carrot somatic embryogenesis. Academic Press.

13.Mashayekhi, K. 2000. The protein synthesis spectrum during the induction phase of somatic emberyogenesis in carrot (*Duscus carrota* L.) cultures and the role of nitrogene form in emberyo development. Ph.D. Thesis. Justus Liebig University, Giessen, Germany.

14.Mashayekhi, K. 2007. Plant somatic embryogenesis. Makhtoumgholi faraghi (Sarly) Press, 483p. (In Persian)
15.Mousavizade, S.J., Mashayekhi, K., Hemmati, K. and Kamkar, B. 2010. Evaluation of media elements and materials on petiole somatic embryogenesis of Carrot (*Daucus carota* L.). J. Plant Prod. 17: 1. (In Persian)
16.Peyvast, Gh. 2009. Vegetable production. Guilan University Press. Rasht, Iran. (In Persian)
17.Tavakoli, M., Masahayekhi, K. and Ghaderifar, F. 1391. The effect of molybdenium on metabolism of different nitrogen in B5 medium during carrot somatic embryogenesis. M.Sc. Thesis. Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources. (In Persian)
18.Wroblewski, T., Filipecki, M.K. and Malepszy, S. 1995. factor influencing cucumber somatice emberyogenesis, the crucial role of PH and nitrogen in suspension culture. Acta Soci bot poloniae. 64: 3. 223-231.
19.Yantcheva, A., Vlahova, M. and Antnassov. 1998. direct somatic emberyogenesiss and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). J. Plant Cell Rep. 18: 1-2. 148-153.
20.Zhao, J., Zhou, C. and Yang, H.Y. 1998. In vitro development of early proembryos and plant regeneration via micro culture in *Oryza sativa*. PCTOC. 55: 3. 167-174.
21.Zouine, J. and Hadrami, I.E. 2007. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). J. Sci Hort. 112: 221-226.