دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دانشکده علوم زراعی

پایان نامه

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی کشاورزی - علوم باغبانی

عنوان:

بررسی تاثیراسید سالیسیلیک بر جنین زایی رویشی دمبرگ و آبکش ثانویه هویج در محیط کشت B_5 و NL

پژوهش و نگارش:

سیده سمیرا حسینی

استاد راهنما:

دکتر کامبیز مشایخی

اساتید مشاور:

دکتر عظیم قاسم نژاد

دکتر پونه ابراهیمی

شهریور۱۳۸۸

تشکر و قدردانی

سپاس و ستایش پروردگار بی‌همتایی که ذات بی‌کرانش از علم و دانش است و چه با سخاوت از این خوان بی‌همتا بشر را موهبتی شگرف ارزانی داشت.

گذراندن مراحل اجرایی و تدوین این پایان‌نامه پس از الطاف و عنایات الهی مدیون راهنمایی و مساعدت و همفکری بزرگوارانی است که بی‌تردید بدون همراهی آنان طی این طریق با مشکلات فراوان همراه بوده، لذا برخود لازم می‌دانم از کلیه سرورانی که در مراحل مختلف این پژوهش مرا یاری نمودند تشکر و قدردانی کنم.

از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر کامبیز مشایخی که در سمت استاد راهنما مرهون کمک‌های بی‌دریغ و راهنمایی‌های ارزشمندشان می‌باشم، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم. از اساتید مشاور جناب دکتر عظیم قاسم نژاد و دکتر پونه ابراهیمی که در مراحل انجام و نگارش این تحقیق با دقت نظر مرا راهنمایی فرمودند، کمال تشکر را دارم. از زحمات داوران ارجمند جناب آقای دکتر مهدی علیزاده و خانم دکتر مهناز اقدسی صمیمانه قدردانی می‌نمایم. از همراهی و مساعدت نماینده تحصیلات تکمیلی آقای دکتر فرهاد خرمالی تشکر و قدردانی می‌نمایم.

برخود لازم می‌دانم از جناب آقای مهندس کلاتی کارشناس آزمایشگاه باغبانی، سر کار خانم رستگار کارشناس آزمایشگاه مرکزی و مهندس موسوی قدردانی و تشکر نمایم.

از دوستان ارجمندم سرکار خانم مهندس قدیر زاده، پاشایی، رزم آذر، عزیزی و جواهری که مرا در پیشبرد این تحقیق یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

سیده سمیرا حسینی

پاییز ۱۳۸۸

بررسی تاثیر اسید سالیسیلیک بر میزان جنین زایی رویشی دمبرگ و آبکش ثانویه ریشه هویج در محیط کشت B_5 و NL

چکیده :

سالیسیلیک اسید به عنوان یک ترکیب شبه هورمونی در بسیاری از فرآیندهای درونی گیاه نقش ایفا می کند. بر این اساس در این تحقیق تاثیر این ماده برتشکیل و تمایز جنین های رویشی در ریزنمونه های بدست آمده از اندام های مختلف گیاه هویج در محیط های کشت B_5 و NL مورد بررسی قرار گرفت. طرح آماری استفاده شده در این بررسی طرح کاملا" تصادفی با آرایش فاکتوریل می باشد. تیمارهای سالیسیلیک اسید در دو سطح میکرو مولار و میلی مولار به غلظت (۰ ، ۲۵ ،۵۰ ، ۷۵ ، ۱۰۰ میکرومولار) و (۰، ۰/۵ ، ۱/۵ ، ۲ ، ۳ میلی مولار) درچهار تکرار به طور جداگانه در دو فاز اعمال شدند. پس از طی مرحله القا و اعمال تیمارها در این مرحله، سلولها قابلیت جنین زایی بدست آوردند و با حذف اکسین وارد مرحله ظهور جنین ها شدند. پس از طی مرحله ظهور جنین ها مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری در سطح % بین غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید وجود دارد. به طوریکه بیشترین جنین زایی در غلظت های ۵۰ و ۷۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید در مرحله ظهور انجام شده بود. نکته جالب توجه اینکه در تیمار ۱۰۰ میکرومولار از جنین زایی رویشی ممانعت شده بود. در این تحقیق علاوه بر جنین زایی، میزان اتیلن با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC) و کلروژنیک اسید با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC) که در طی جنین زایی سنتز شده و رابطه بین این دو ترکیب بر جنین زایی رویشی بررسی شد. نتایج نشان دهنده اختلاف معنی دار بین غلظت های سالیسیلیک اسید بر سنتز اتیلن می باشد. سالیسیلیک اسید از طریق تاثیری که بر سنتز اتیلن می گذاردباعث تغییر در روند جنین زایی می گردد. علاوه بر اتیلن تاثیرسالیسیلیک اسید بر تولید کلروژنیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تجمع این ترکیب پلی فنلی در غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید در سطح % متفاوت بود، به طوریکه بیشترین تجمع کلروژنیک اسید در تیمارهای ۱۰۰ میکرو مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد. یافته ها نشان داد اسید سالیسیلیک سبب بروز استرس های شدید در بافت های کشت شده می شود که تحت این استرس تجمع ترکیبات ثانویه افزایش می یابد از طرف دیگر این ترکیبات فنلی در غلظت های بالا به دلیل فنلی کردن نمونه ها از جنین زایی رویشی جلوگیری می کنند. از آنجائیکه جنین زایی رویشی زائده استرس است، لذا بررسی واکنش سلول های جنین زا به استرس و عوامل استرس زا همچون سالیسیلیک اسید و نقش ترکیبات واسطه و ثانویه حاصل از تنش های سلولی می تواند در نوع خود جالب توجه بوده و برای بهینه سازی جنین زایی گیاهان مختلف از جمله گیاهانی ارزشمند که توانمندی جنین زایی پایینی دارند استفاده کرد.

کلمات کلیدی: کشت بافت، جنین زایی رویشی، سالیسیلیک اسید، کلروژنیک اسید، اتیلن، GC،HPLC.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول	۱
۱-۱- مقدمه	۲
۱-۲- تاثیرات سالیسیلیک اسید در محیط کشت بافت	٤
۱-۲-۱- تاثیرات سالیسیلیک اسید بر جنین زایی رویشی	٤
۱-۳- گیاه هویج	۵
۱-۳-۱- خاستگاه هویج	۵
۱-۳-۲- گیاهشناسی	۵
۱-۳-۳- آب و هوا	٦
۱-۳-٤- اهمیت غذایی و دارویی هویج	۷
۱-۳-۵- طریقه مصرف	۸
۱-۳-٦- بیوتکنولوزی هویج و کاربرد آن	۸
۱-٤- اهداف جنین زایی دمبرگ هویج در این تحقیق	۹
فصل دوم	۱۰
۲-۱- کشت بافت	۱۱
۲-۲- جنین زایی رویشی (سوماتیکی)	۱۱
۲-۳- پتانسیل جنین زایی رویشی در سلول	۱۲
۲-٤- القای جنین‌زایی رویشی	۱۲
۲-۵- ظهور جنین‌های رویشی	۱۳
۲-۵-۱- چگونگی تکامل جنین‌های رویشی از مرحله گلبولار تا جنین‌های بالغ و کامل	۱٤
۲-۵-۲- تمایز و تکامل جنین‌های رویشی از بدو تشکیل در محیط رئالیزاسیون	۱۵
۲-٦- عوامل داخلی مؤثر بر جنین‌زایی رویشی	۱٦
۲-۷- عوامل خارجی مؤثر بر جنین‌زایی رویشی	۱۸
۲-۷-۱- ازت و ترکیبات مختلف آن	۱۹
۲-۷-۲-کربوهیدارت	۲۰
۲-۷-۳- میواینوزیت	۲۱
۲-۷-٤- شرایط کشت جنین زایی رویشی از جنبه تاثیر تنظیم کننده های رشد	۲۲
۲-۷-٤-۱- اکسین	۲۳
۲-۷-٤-۲- سیتوکنین	۲٤
۲-۷-٤-۳- آبسیزیک اسید	۲۵
۲-۷-٤-٤- جیبرلین ها	۲۷
۲-۷-٤-۵- اتیلن	۲۷
۲-۷-۵- اکسین‌ها در مرحله القای جنین‌زایی رویشی	۲۹
۲-۷-٦- اکسین‌ها در مرحله ظهور جنین‌های رویشی(رئالیزاسیون)	۳۱
۲-۷-۷- مکانیسم عمل اکسین	۳۱
۲-۷-۸- اثر متقابل هورمون‌ها و پروتئین‌ها در جنین‌زایی رویشی	۳۳
۲-۷-۹- رابطه جنین‌زایی رویشی با متابولیسم کربوهیدرات‌ها	۳٤
۲-۸- سالیسیلیک اسید	۳۵
۲-۸-۱- تاریخچه	۳۵
۲-۸-۲- فرمول ومسیر بیوسنتزی	۳٦

۲-۸-۳- سالیسیلیک اسید و نقش آن در گیاه ۳۸
۲-۸-٤- تاثیرات سالیسیلیک اسید بر روی جنین زایی رویشی ۳۸
۲-۸-٥- تاثیرات سالیسیلیک اسید روی متابولیت های ثانویه گیاه ۳۹
۲-۸-٦- آنتی اکسیدانها ٤۰
۲-۸-۷- رنگدانه ها ٤۱
۲-۸-۸- ترکیبات فنلی ٤٤
فصل سوم ٤٥
۳- مواد و روش ها ٤٥
۳-۱- منبع گیاهی مورد استفاده ٤٦
۳-۲- محیط کشت ٤۸
۳-۳- تهیه محلول‌های پایه ٤۹
۳-٤- تهیه محیط کشت ٤۹
۳-٥- ضد عفونی وسایل مورد نیاز ٤۹
۳-٦- آماده‌سازی لامینار ایرفلو ٥۰
۳-۷- مراحل مربوط با جنین‌زایی رویشی ٥۰
۳-۷-۱- مراحل مقدماتی فراهم‌سازی منبع گیاهی نونهال ٥۰
۳-۷-۲-آماده سازی محیط کشت ٥۰
۳-۷-۳- آماده‌سازی بذور ٥۰
۳-۷-٤-شرایط نگهداری ٥۱
۳-۸- عملیات مربوط به فاز القا ٥۱
۳-۸-۱- آماده سازی محیط کشت برای فاز القا ٥۱
۳-۸-۲- تهیه ریزنمونه های دمبرگ هویج از گیاهچه درون شیشه ٥۱
۳-۸-۳- کشت آوند آبکش ثانویه ریشه هویج ٥۲
۳-۸-٤- دستگاه آکسوفیتون و شرایط نگهداری کشت ها ٥۳
۳-۸-٥- دستگاه شیکر و شرایط نگهداری کشت ها ٥۳
۳-۹- مرحله رئالیزاسیون ٥٤
۳-۹-۱- آماده سازی محیط کشت در فاز رئالیزاسیون ٥٤
۳-۹-۲- واکشت ریزنمونه ها ی دمبرگ و آوند آبکش ثانویه هویج به فاز رئالیزاسیون ٥٤
۳-۱۰- اندازه گیری اتیلن تولید شده طی روند جنین زایی رویشی ٥٥
۳-۱۰-۱- تهیه نمودار کالیبراسیون ٥۷
۳-۱۱- شمارش جنین ها و ثبت داده های دمبرگ و آوند آبکش ثانویه هویج ٥۸
۳-۱۲- اندازه گیری کلروژنیک اسید با HPLC ٥۸
۳-۱۲-۱- استخراج کلروژنیک اسید ٥۹
۳-۱۲-۲- آنالیز کلروژنیک اسید ترسط HPLC ٥۹
۳-۱۲-۳- تهیه نمودار کالیبراسیون برای کلروژنیک اسید ٦۰
۳-۱۳- اندازه گیری آنتوسیانین ٦۱
۳-۱٤- استخراج کلروفیل و کارتنوئید ٦۱
۳-۱٥- تجزیه و تحلیل داده ها ٦۲
فصل چهارم ٦۳
٤- نتایج و بحث ٦٤
٤-۱- مراحل تشکیل جنین‌های رویشی ٦٤

٤-٢- القای مستقیم ٦٤
٤-٣- جنین زایی رویشی هویج ٦٤
٤-٣-١- تاثیر غلظت های میکرو مولار سالیسیلیک اسید بر میزان جنین زایی رویشی ٦٥
٤-٣-٢- تاثیر غلظت های میلی مولار سالیسیلیک اسید بر میزان جنین زایی رویشی ٦٦
٤-٣-٣- اثر محیط کشت بر تشکیل جنین رویشی ٧٠
٤-٣-٤- اثر اندام کشت شده بر جنین‌زایی رویشی ٧٤
٤-٣-٥- تاثیر تیمارسالیسیلیک اسید بر میزان جنین زایی رویشی ٧٦
٤-٣-٥-١- تاثیرات سالیسیلیک اسید روی سنتز اتیلن ٧٩
٤-٣-٥-١-١- اثرات متقابل بین بین محیط ، تیمار ، ریزنمونه بر میزان اتیلن ٨٣
٤-٣-٥-١-٢- تاثیرات بین فازها بر میزان اتیلن سنتز شده ٨٦
٤-٣-٥-٢- تاثیرات سالیسیلیک اسید روی ترکیبات فنلی ٨٧
٤-٣-٥-٢-١- تاثیر ریزنمونه کشت شده بر میزان کلروژنیک اسید ٨٧
٤-٣-٥-٢-٢- تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان کلروژنیک اسید ٨٨
٤-٣-٥-٢-٣- تاثیر کلروژنیک اسید بر جنین زایی رویشی ٩٠
٤-٣-٥-٢-٤- مقایسه میانگین اثرات متقابل بر میزان کلروژنیک اسید ٩٢
٤-٣-٥-٢-٥- تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید در فاز القا و ظهور بر میزان کلروژنیک اسید ٩٣
٤-٣-٦- مقایسه میانگین جنین زایی رویشی اثر متقابل محیط کشت با اندام‌های مختلف مورد کشت ٩٤
٤-٣-٧- مقایسه میانگین اثر متقابل محیط درتیمار سالیسیلیک اسید ٩٥
٤-٣-٨- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار سالیسیلیک اسید با ریزنمونه ٩٦
٤-٣-٩- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار سالیسیلیک اسید با ریزنمونه و محیط کشت ٩٨
٤-٣-١٠- تاثیرتیمارهای اعمال شده در دو فاز القا وظهور ٩٩
٤-٤- دیگر خصوصیات مورفولوژیکی (ریشه زایی و نئومورف) ١٠١
٤-٤-١ تاثیر محیط کشت بر میزان جنین نئومورف و ریشه زایی ١٠٢
٤-٤-٢- تاثیر ریزنمونه بر میزان نئومورف و ریشه زایی ١٠٣
٤-٤-٣- تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان نئومورف و ریشه زایی ١٠٤
٤-٤-٤- دلایل ایجاد نئومورف در محیط کشت ١٠٥
٤-٤-٥- دلایل ریشه زایی ریزنمونه ها در محیط کشت ١٠٨
٤-٤-٦- مقایسه میانگین اثرات متقابل (محیط،ریزنمونه،تیمار) بر میزان ریشه زایی ونئومورف ١١٠
٤-٥- تاثیر غلظت های میلی مولار سالیسیلیک اسید بر میزان رنگدانه های تشکیل شده در طی جنین زایی رویشی ١١١
٤-٥-١- تاثیر سالیسیلیک اسید بر میزان کلروفیل ١١٤
٤-٥-٢- تاثیر سالیسیلیک اسید بر میزان کارتنوئید ١١٦
٤-٥-٣- تاثیر سالیسیلیک اسید بر میزان آنتوسیانین ١١٧
٤-٥-٤- تاثیر متقابل بین محییط کشت، ریزنمونه، تیمار سالیسیلیک اسید ١١٩
نتیجه گیری کلی ١٢٠
فهرست منابع ١٢٤

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول۳-۱- محیط کشت مورد استفاده برای یک لیتر محط کشت گامبورکB5 وNL	٤٦
جدول ۳-۲- محلول های پایه مورد استفاده در محیطهای کشت MS، B5 وNL	٤٧
جدول٤-۱ جدول٤-۱ تجزیه واریانس مراحل مختلف تکامل جنین زایی دمبرگ و فلوئم هویج بر اساس میانگین مربعات در تیمارهای میکرومولار سالیسیلیک اسید (مرحله رئالیزاسیون)	٦٥
جدول٤-۲- تجزیه واریانس مراحل مختلف تکامل جنین زایی دمبرگ و فلوئم هویج بر اساس میانگین مربعات درتیمارهای میلی مولار سالیسیلیک اسید	٦٧
جدول٤-۳- مقایسه میانگین تعداد جنین تولید شده در مراحل مختلف تکامل جنین زایی رویشی در محیط کشتB_5 وNL تیمار شده با سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومولار(مرحله رئالیزاسیون)	٧٠
جدول ٤-٤- مقایسه میانگین تعداد جنین های تولید شده در مراحل مختلف تکامل ریزنمونه های مختلف هویج در مرحله ظهور(رئالیزاسیون) برای غلظت میکرومولارسالیسیلیک اسید در محیط کشت B_5 وNL	٧٤
جدول ٤-٥- مقایسه میانگین تعداد جنین های تولید شده در مراحل مختلف تکامل ریزنمونه های مختلف هویج در مرحله ظهور(رئالیزاسیون) برای غلظت میلی مولار سالیسیلیک اسید	٧٥
جدول٤-٦- مقایسه میانگین جنین های ایجاد شده در مراحل مختلف جنین زایی تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت میکرومولار	٧٧
جدول٤-٧- مقایسه میانگین جنین های ایجاد شده در مراحل مختلف جنین زایی تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید(با غلظت میلی مولار)	٧٨
جدول٤-٨- تجزیه واریانس تاثیرات سالیسیلیک اسید بر تولید نانومول اتیلن تولید شده در طی جنین زایی بر اساس میانگین مربعات	٧٩
جدول٤-٩- مقایسه میانگین جنین های ایجاد شده در مراحل مختلف جنین زایی تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومولار	٨٠
جدول٤-١٠- مقایسه میانگین اتیلن تولید شده در طی جنین زایی رویشی در تیمارهای میکرمولار سالیسیلیک اسید اعمال شده در فاز القا و ظهور	٨٦
جدول٤-١١- تجزیه واریانس تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومولار بر درصد کلروژنیک اسید سنتز شده در طی جنین زایی رویشی	٨٧
جدول ٤-١٢- مقایسه میانگین تاثیر تاثیر سالیسیلیک اسید بر درصد کلروژنیک اسید سنتز شده در طی جنین زایی	٨٨
جدول٤-١٣- مقایسه میانگین %کلروژنیک اسید تولید شده تحت تیمار میکرومولار سالیسیلیک اسید فاز های جنین زایی	٩٣
جدول٤-١٤- تجزیه واریانس مراحل مختلف جنین زایی رویشی هویج تحت تیمار میکرومولار سالیسیلیک اسید اعمال شده در دو فاز القا و ظهور بر اساس میانگین مربعات (مرحله رئالیزاسیون)	١٠٠
جدول٤-١٥- مقایسه میانگین تعداد جنین های تولید شده در مراحل مختلف تکامل جنین زایی رویشی هویج تحت تیمار میکرومولار سالیسیلیک اسید اعمال شده در دو فاز القاو ظهور(مرحله رئالیزاسیون)	١٠١
جدول ٤-١٦- تجزیه واریانس ریزنمونه های ریشه دار شده و نئومورف در محیط کشت B_5 و NL تیمار شده با سالیسیلیک اسید بر حسب میکرو مولار (مرحله رئالیزاسیون)	١٠٢
جدول ٤-١٧- مقایسه میانگین تعداد جنین های نئومورف و ریشه زایی در محیط کشتB_5 وNL تیمار شده با سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومولار	١٠٣
جدول ٤- ١٨- مقایسه میانگین تعداد جنین های نئومورف و ریشه زایی در ریزنمونه های دمبرگ و فلوئم تیمار شده با سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومولار	١٠٣
جدول٤-١٩- مقایسه میانگین مربوط به تاثیر غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومولار بر میزان ریشه زایی و جنین نئومورف	١٠٤
جدول٤-٢٠- تجزیه واریانس تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر حسب میلی مولار بر میزان رنگدانه های درون جنین ها	١١٢
جدول٤-٢١- نتایج مقایسه میانگین محیط کشت، تیمارالیسیلیک اسید میلی مولار ، نوع ریزنمونه بر میزان رنگیزه های داخلی با استفاده از	١١٣

آزمونLSD در سطح ۱%.(فاز رئالیزاسیون)

فهرست تصاویر

عنوان	صفحه
شکل۱-۱- مراحل استخراج سالیسیلیک اسید و آسپرین از بید	۳۶
شکل۱-۲- فرمول ساختاری و فضایی سالیسیلیک اسید	۳۷
شکل۱-۳- مسیر بیوسنتزی سالیسیلیک اسید	۳۸
شکل۱-٤- ساختار کلروژنیک اسید	٤۲
شکل٤-۱- تاثیر سالیسیلیک اسید در غلظت های میلی مولار سالیسیلیک اسید	٦۹
شکل٤-۲- جنین های ناشی از ریزنمونه های دمبرگ هویج در محیط کشت B_5 و NL	۷۲
شکل٤-۳- کشت ریزنمونه های فلوئم هویج در محیط کشت B_5 و NL به منظور جنین زایی رویشی	۷۳
شکل(٤-٤)جنین زایی در ریزنمونه های دمبرگ و آبکش ثانویه هویج	۷٦
شکل(٤-٥) مقایسه اثر متقابل محیط کشت و تیمار سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومولار بر میزان اتیلن در فاز رئالیزاسیون در سطح۱%	۸۳
شکل(٤-٦) مقایسه اثر متقابل محیط × ریزنمونه بر میزان اتیلن سنتز شده بر حسب نانومول در طی جنین زایی رویشی در فاز رئالیزاسیون در سطح ۵%.	۸٤
شکل(٤-۷) مقایسه اثر متقابل محیط × ریزنمونه × تیمار میکرومولار سالیسیلیک اسید بر میزان اتیلن سنتز شده در طی جنین زایی رویشی در فاز رئالیزاسیون در سطح ۱%.	۸٤
شکل٤-۸- اثر متقابل ریزنمونه و تیمار میکرومولار سالیسیلیک اسید در سنتز %کلروژنیک اسید در طی جنین زایی رویشی	۹۳
شکل٤-۹- مقایسه اثرات متقابل محیط و ریزنمونه بر میزان کل جنین در تیمار های میکرومولار سالیسیلیک اسید.	۹۵
شکل٤-۱۰- مقایسه اثرات متقابل بین محیط و تیمار سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومولار بر میزان کل جنین	۹٦
شکل٤-۱۱- مقایسه اثرات متقابل بین نوع ریزنمونه و تیمار سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومولار بر میزان جنین زایی رویشی(غلظت میکرو مولار)	۹۷
شکل٤-۱۲- مقایسه اثرات متقابل بین نوع ریزنمونه و تیمارسالیسیلیک اسید بر میزان جنین زایی رویشی(غلظت میلی مولار)	۹۸
شکل٤-۱۳- مقایسه اثرات متقابل محیط، نوع ریزنمونه، تیمار سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومولار بر میزان جنین زایی رویشی	۹۹
شکل٤-۱٤- تشکیل نئومورف از ریزنمونه های دمبرگ و فلوئم هویج تیمار شده با سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومولار	۱۰۷
شکل٤- ۱۵ ریشه زایی در محیط های مختلف	۱۰۸
شکل٤-۱٦- اندام زایی در ریزنمونه دمبرگ و آبکش ثانویه هویج تیمارشده با سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومول	۱۰۹
شکل٤-۱۷- مقایسه بین اثرات متقابل ریزنمونه و محیط کشت بر میزان جنین نئومورف و ریشه زایی در نمونه های تیمار شده با سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومولار	۱۱۱
شکل٤-۱۸- تشکیل کلروفیل در ریزنمونه های کشت شده دمبرگ تیمار شده با سالیسیلیک اسید بر حسب میلی مولار.	۱۱۵
شکل٤-۱۹- تشکیل رنگیزه کارتنوئید در جنین ها رویشی	۱۱٦
شکل٤-۲۰- تشکیل آنتوسیانین در نمونه های کشت شده دمبرگ تیمار شده با سالیسیلیک اسید بر حسب میکرومولار	۱۱۹
شکل٤-۲۱- اثرات مقابل محیط و تیمار میلی مولار سالیسیلیک اسید بر سنتز کلروفیل	۱۲۰
شکل٤-۲۲- اثر متقابل ریزنمونه و تیمار میلی مولار سالیسیلیک اسید بر سنتز کارتنوئید	۱۲۱

۱-۱- مقدمه

زندگی انسانها همیشه وابسته به گیاهان و تولیدات بدست آمده از آنها می باشد. با توجه به افزایش روز افزون جمعیت بشر نیاز به تولیدات گیاهی بیشتر شده است. تامین این نیازها اغلب خارج از توان وظرفیت طبیعت می باشد. امروزه دانشمندان برای رفع این معضل بر آن شده اند که جهت تکثیر گیاهان روش های جدید و کارآمدتری را جایگزین روشهای قدیمی نمایند. در حال حاضر مناسب ترین راه برای افزایش سریع در مقیاس زیاد گیاهان، استفاده از روشهای بیوتکنولوژی می باشد. امروزه در سراسر جهان استفاده از روشهای مذکور در تولید مواد گیاهی که پایه و اساس آن بر روشهای کشت بافت استوار است به طور چشمگیری در حال توسعه می باشد. هدف این تکنیک تولید انبوه و سریع تعداد زیادی از گیاهان با ژنتیک مشخص از یک گیاه مادری با ارزش یا گیاهان تک جنسی[1] نر یا ماده است. می توان گیاهان حاصله از این روش را به طور مستقیم به فروش رساند و یا اینکه برای اهداف اصلاحی یا مطالعات ژنتیکی و پایه ای استفاده کرد (هالپرین، ۱۹۹۵) .

کشت‌بافت تکنیکی است که امکان تولید گیاه در محیط درون شیشه‌ای را فراهم می‌کند. اساس این تکنیک توانمند بودن[2] سلول‌های گیاهی است. زیرا سلول گیاهی تمامی اطلاعات ژنتیکی لازم برای تبدیل شدن به یک گیاه کامل را دارد. بنابراین کشت سلول، بافت یا اندام این امکان را فراهم می‌کند که با کشت یکی از اجزای گیاه، سایر قسمت‌های آن نیز تشکیل شود. کشت بافت گیاهی از زمان شروع آن در سال ۱۹۳۰، زمانی که دانشمندان این تکنیک را برای رشد سلول‌ها در کشت استفاده

1- Monosexual
2-Totipotency

نمودند، به میزان زیادی پیشرفت داشته است. این تکنیک به طور رایج برای اهداف بسیار متفاوتی مثل: القای کالوس، کشت بساک، کشت پروتوپلاست، جنین‌زایی رویشی و غیره استفاده می‌شود (حسندخت و ابراهیمی، ۱۳۸۵).

جنین زایی رویشی نیز فرآیندی است که در آن سلولهای رویشی به جنین های رویشی تغییر می یابند، این جنین ها اندام های گیاهی دو قطبی بوده و از لحاظ مورفولوژیکی، شبیه جنین های جنسی[1] می باشند. این تکنیک برای تولید انبوه در ازدیاد رویشی گیاهان به کار می رود و می توان برای تمام گونه های گیاهی به کار برد به طوری که در ٤٠ سال گذشته این عمل در بسیاری از گونه های گیاهی توسعه یافته است (جورج و همکاران، ۲۰۰۸) .

گیاهان، منبع بسیاری از مواد شیمیایی هستند که به‌عنوان ترکیب دارویی مصرف می‌شوند. فرآورده‌های حاصل از متابولیسم ثانویه گیاهی جزء گرانبهاترین ترکیب شیمیایی گیاهی[2] هستند. با استفاده از کشت بافت می‌توان متابولیت‌های ثانویه را در شرایط آزمایشگاهی تولید کرد (امید بیگی، ۱۳۷۹).

راهکارهای افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاهی از طریق کشت بافت:

۱ - استفاده از محرک‌های[3] زنده و غیر زنده‌ای که می‌توانند مسیرهای متابولیکی سنتز متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار داده و میزان تولید آنها را افزایش دهند. لازم به ذکر است که این محرک‌ها در شرایط طبیعی نیز بر گیاه تأثیر گذاشته و باعث تولید یک متابولیت خاص می‌شوند (خاوری نژاد و اسدی، ۱۳۸۳).

۲ - افزودن ترکیب اولیه[4] مناسب به محیط کشت، با این دیدگاه که تولید محصول نهایی در نتیجه وجود این ترکیبات در محیط کشت، القاء شود.

1-Zygotic
2-Phytochemical
3- Elicitors
4- Precursor

۳- افزایش تولید یک متابولیت ثانویه در اثر ایجاد ژنوتیپ‌های جدیدی که از طریق امتزاج پروتوپلاست یا مهندسی ژنتیک، به دست می‌آیند.

٤- استفاده از مواد موتاژن[1] جهت ایجاد واریته‌های پربازده.

۵- کشت اندام های خاص به طور مثال بنا به عقیده ساسن ریشه، نسبت به بافت‌های گیاهی دیگر، پتانسیل بیشتری جهت تولید متابولیت‌های ثانویه دارد. (ساسن، ۱۹۹۱).

۱-۲- تاثیر سالیسیلیک اسید[2] در محیط کشت بافت

حضور سالیسیلیک اسید به عنوان ماده اولیه باعث تغییراتی بر روی ترکیبات محیط کشت می شود. که از این طریق می تواند تاثیرات مثبتی بر روی جنین زایی رویشی و متابولیت های ثانویه درون اندام و یا سلول های گیاهی ایجاد نماید.

۱-۲-۱- تاثیر سالیسیلیک اسید بر جنین زایی رویشی

ترکیب محیط های کشت جنین زایی رویشی دارای چندین بخش عمده می باشد که هر کدام از آنها درسرنوشت جنین زایی رویشی نقش تعیین کننده ای دارند. مواد تشکیل دهنده محیط های کشت رایج در جنین زایی رویشی نقش تعیین کننده دارند. مواد تشکیل دهنده محیط های کشت رایج در جنین زایی شامل نمک های معدنی، ویتامین ها، اسیدهای آمینه، ساکارز و مواد آلی دیگر است که به صورت تعریف شده در محیط کشت پایه وجود دارند، اما در عمل این محیط های کشت بنا به دلایل مختلف مانند نوع گیاه، هدف محقق و یا سایر اهداف تغییرمی یابد که در این صورت به آنها محیط های کشت تغییر یافته گفته می شود. هورمون ها به عنوان اساسی ترین ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت به منظور جنین زایی رویشی دارای اهمیت زیادی هستند.

1-Mutagen
2- Salicylic Acid

وجود انواعی از اکسین های قوی مانند 2,4-D و اکسین های ناپایداری مانند ایندول استیک اسید می تواند تاثیرات هورمون ها را در محیط القایی به طور واضح نشان دهند. لذا دستیابی به روندی برای افزودن جنین ها و یا سهولت در امر جنین زایی به طور مستقیم تحت تاثیر حضور این هورمونها می باشد.

وجود سالیسیلیک اسید به عنوان یک ترکیب افزودنی به محیط کشت که سبب افزایش ترکیبات فنلی می گردد(مونیر و همکاران، ۲۰۰٤)، سبب شده تاحدودی ناپایداری اکسین در محیط کاهش پیدا کند و این هورمون تاثیرات خود را در مرحله القایی با فاصله زمانی بیشتری بگذارد و از این طریق میزان جنین زایی رویشی را افزایش بدهد.

همچنین تاثیراتی که سالیسیلیک اسید روی سایر هورمون ها مانند اتیلن می گذارد احتمالا"سبب ایجاد تغییراتی در روند جنین زایی رویشی می شود(راستان وهمکاران، ۱۹۸۹).

۱-۳- گیاه هویج

هویج با نام علمی *Daucus carota* یکی از سبزی های ارزشمند است که در سر تا سر جهان کشت می شود. ارزش فوق العاده این سبزی نه تنها مربوط به مصرف تازه خوری وسالادی آن همانند سایر سبزی هاست بلکه بدلیل دارا بودن مواد با ارزشی مانند کارتنوئید که پیش ساز ویتامین A دارای اهمیت بسیاری است.

۱-۳-۱- خاستگاه هویج

اجداد وحشی هویج در مناطقی از افغانستان یافت می شوند. کولتیوار های هویج (Carrot) به دو کلاس عظیم هویج شرقی[1] و هویج غربی[2] تقسیم می شوند.

انواع شرقی از مناطق آسیای مرکزی و احتمالا" افغانستان در قرن دهم منشا گرفتند. گونه های امروزی باقی مانده از آنها دارای رنگ های ارغوانی و یا زرد با ریشه های منشعب شده فراوان می باشند. رنگ ارغوانی این هویج ها دلالت بر اندوخته بالای آنتوسیانین در این گروه از هویج ها می باشد.

1- Eastern carrots
2- Western carrots

انواع غربی که منشا گرفته از هلند در سده شانزدهم می باشند که بیشتر هویج های نارنجی در این گروه قرار می گیرند. وجود رنگیزه های بالای بتا کارتن عامل رنگ نارنجی در این هـویج هـا می باشد(قنادها،۱۳۸۲).

۱-۳-۲- گیاهشناسی

هویج از خانواده چتریان [1]می باشد. در این خانواده سبزیجاتی نظیـر کـرفس، جعفـری و غیـره وجود دارند. این خانواده بزرگ دارای رده بندی کاملی است. همه گونه هـای جـنس داکـوس[2] و کولتیوارهای هویج شکلی از هویج وحشی اند. این کولتیوار ها بر اسـاس شـکل و انـدازه ریشـه طبقه بندی می شوند. طبقه بندی دیگر آنها بر اسـاس فصـل برداشـت و رنـگ ریشـه مـی باشـد (ناصری و تهرانی فر،۱۳۷٤).

تقریبا"۸۰ گونه در این جنس شناخته شده کـه نیمـی از آنهـا زیـر گونـه یـا کولتیـواری از گونـه *Daucus carota* هستند. تقریبا" تمامی این گونه ها دیپلوئید می باشند و تعداد کرومزوم هـا در ۲۵ گونه آن شناسایی شده است که در آن n از ۷ تا ۱۱ متغیر است. هویج گیـاهی دوسـاله، دارای برگ های روزت و ریشه گوشتی می باشد. در طی اولین سال، رشد رویشی داشته و در سال دوم ساقه گلدهنده و بذر می دهد. ریشه های هویج باید یک دوره سرما را طی کنند تـا در سـال دوم، ساقه گلدهنده ظاهر شود .

گل های هویج به صورت چتر مرکب در انتهای شاخه تشکیل می شود. اولین چتر گل در انتهـای ساقه اصلی است. چتر اصلی درشت بوده که در اطراف آن ۳،۲ تا ٤ چتر کوچکتر از شاخه هـای فرعی ایجاد می شود. گلها کوچک و دارای گلبرگ های سفید، ۵ گلبرگ، ۵ پرچم و یک تخمدان تحتانی می باشند. بذرهای آن مریکارپ و میوه ها خشک و ناشکوفا دارای دو برچه محتوی یـک تخمک است (مشایخی، ۲۰۰۱). گیاه هویج دگرگشن می باشد، زیرا بین گرده یک گل بـا مـادگی آن به دلیل عـدم همزمـانی در رسـیدن آنهـا ناسـازگاری وجـود دارد و در اثـر خودگشـنی در آن تضعیف حاصل می شود (قنادها، ۱۳۸۲؛ ناصری و تهرانی فر، ۱۳۷٤).

1- Apiaceae
2- Daucus

۱-۳-۳- آب و هوا

هویج گیاه منطقه معتدله بوده و دمای مناسب رشد آن ۱۵-۲۰ درجه سانتی گراد است. بذر این گیاه را در مناطق معتدله در فصل بهار، تابستان و پاییز ودر مناطق نیه گرمسیری در زمستان کشت می کنند (قنادها،۱۳۸۲).

۱-۳-٤- اهمیت غذایی و دارویی هویج

هیچ سبزی یا میوه ای به اندازه هویج دارای کارتن نیست، منبعی از ویتامین A که در واقع همان کارتن است که در بدن به ویتامین A تبدیل می شود . هویج محتوی ۷۸%آب، غنی از نمک و ویتامین های B ، C ، D ، E است. این گیاه به دو صورت خام وپخته قابل مصرف است. در حالت خام دارای ویتامین A ، K ، C ، B_6 ، تیامین، اسید فولیک ومنیزیم می باشد. در حالت پخته هر چند مقدار ونسبت این عناصر در حد خام نمی باشد، ولی باز هم میزان آنها قابل توجه است. هویج مقدار کمی ترکیبات فرار، کربوهیدرات و ترکیبات نیتروزنی دارد. غنی از آنتی اکسیدان هایی مانند بتا کارتن، آلفا کارتن، مواد فیتوشیمیایی و گلوتاتیون، کلسیم وپتاسیم و ویتامین های A , B_1 , B_2 , C , E است. این آنتی اکسیدانها از محافظان پوست و بدن به شمار می روند. شکل کلسیم موجود در هویج به راحتی توسط بدن جذب می شود. میزان بالای Cu, Fe, Mg, Mn, P, S هویج این سبزی را به عنوان یک داروی اعجاب انگیزمعرفی کرده است.

بتا کارتن: مهمترین ترکیب درونی هویج می باشد. رنگ نارنجی منحصر به فرد هویج به واسطه همین رنگیزه به وجود آمده است. این رنگیزه در واقع یکی از ۵۰۰ ترکیب مشابه ای است که در واقع در گروه رنگیزه های کارتنوئیدی قرار دارد. کارتنوئیدها در اکثر سبزیجات و میوه ها وجود دارند که بعد از مصرف در بدن تبدیل به ویتامین A می شوند. همچنین در نقش یک آنتی اکسیدان سبب تقویت سیستم ایمنی بدن و مانع تشکیل سلول های سرطانی می شوند. آنتی اکسیدانها با رادیکالهای آزاد مقابله می کنند و از آسیب غشاء، موتاسیون DNA، اکسید چربی ها که تمامی اینها منجر به ایجاد فساد و مرگ سلولها ی بدن می شوند جلوگیری می کنند. رادیکالهای آزاد تحت شرایطی مانند امواج مضر خورشیدی، آلودگی هوا، دود سیگار و... ایجاد می شوند، که در طی سالیان مسبب بیماری هایی

از قبیل سرطان، آب مرواریدچشم، ورم مفاصل، بیماری های قلبی و آسم می شود. بتا کارتن در سبزیجات با رنگ های سبز تیره، قرمز، زرد، نارنجی وجود دارد (هالی ول و گاتریج، ۲۰۰۷).

۱-۳-۵- طریقه مصرف

مساله ای که در مورد سبزیجات مطرح است نحوه مصرف آنها است. بیشتر سبزیجات برای حفظ مواد غذایی آنها به صورت خام مصرف شود. اما در مورد هویج طی بررسی های انجام شده توسط محققان آرکانساس قدرت آنتی اکسیدانی تحت شرایط پخته شدن و کنسرو وحتی بریده شدن افزایش پیدا می کند. گرم کردن سبزیجات سبب کاهش فعالیت آنزیم های مخرب و تغییر دهنده رنگ، طعم و ساختار و... می شود هر چند این تغییرات می تواند بر علیه مواد مفید و تبدیل شدن این مواد به سایر ترکیبات شیمیایی هم شود .

۱-۳-٦- بیوتکنولوژی هویج و کاربرد آن

سهولت تولید از طریق کشت بافت در هویج، استفاده گسترده تکنیک های بیوتکنولوژی را در اصلاح آن میسر ساخته است (سیمون و همکاران، ۱۹۹۰). به طور مثال در تحقیقات اخیر بر روی کشت بافت، ژنهایی کشف شده است که با جنین زایی در هویج در ارتباط می باشد (ویلد و همکاران، ۱۹۸۸؛ قنادها، ۱۳۸۲). هویج دارای DNA هسته ای نسبتا" کوچک می باشد. به علت سهولت باززایی کشت های سلولی هویج، سیستم های متعددی برای انتقال ژن در هویج توسعه یافته است. در کشت های سوسپانسیونی (اسکوت و دراپر،۱۹۸۷) وکشت های کالوس به راحتی می توان عمل انتقال ژنها را توسط اگروباکتریوم[1] را انجام داد (وان اسلویز، ۱۹۸۷) .

تمرکز برنامه های اصلاحی هویج بیشتربر روی صفات چون میزان تولید ریشه ، ظاهرو کیفیت آن، مقاومت در برابر آفات و بیماریها و جنبه های تولید بذر می باشد (قنادها، ۱۳۸۲) .

1- *Agrobacterium tumefaciens*

۱-٤- اهداف این تحقیق

۱- بررسی غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید بر میزان جنین زایی رویشی بافت آبکش ثانویه هویج و دمبرگ هویج.

۲- بررسی تاثیر سالیسیلیک اسید بر میزان متابولیت های ثانویه شامل رنگدانه ها و کلروژنیک اسید.

۳- بررسی تاثیر سالیسیلیک اسید بر میزان اتیلن تولید شده توسط ریزنمونه در طی جنین زایی رویشی.

۲-۱- کشت بافت

در سال ۱۸۳۸ شوان و شلیدن برای اولین بار تئوری توتیپوتنسی را ارائه نمودند، براساس این تئوری، هر سلول، قادر به تولید یک گیاه کامل است. در واقع تئوری آنها پایه و اساس کشت بافت و سلول گیاهی می باشد. اولین تلاش در زمینه کشت بافت به وسیله هابرلانت در سال ۱۹۰۲ انجام شد که ناموفق بود. در سالهای ۱۹۰۷ و ۱۹۰۹ هاریون، باروز و کارل، موفق به کشت این ویتروی بافتهای حیوانی و انسانی شدند. در سال۱۹۲۵ کاربرد کشت جنین در تلاقی های بین گونه ای کتان توسط لی باچ انجام گرفت. در سال ۱۹۳٤ کشت موفقیت آمیز ریشه های گوجه فرنگی توسط وایت انجام شد. در سال۱۹۳٦ کشت بافت بازدانگان مختلف به وسیله دارو صورت گرفت. در ۱۹٥٤ موير وهمکاران توانستند اولین گیاه کامل را از یک سلول ساده تولید کنند. مشاهده تنظیم تشکیل ارگانها (ریشه و ساقه) به وسیله تغییر نسبتهای سیتوکنین و اکسین در سال ۱۹٥۷ توسط استوک ومیلر صورت گرفت. در سال ۱۹٥۸باززایی پیش جنین، از توده های کالوس و سوسپانسیون سلولی گونه هویج[1] توسط راینرت و استوارد انجام گرفت. به این ترتیب علم کشت بافت توسط این افراد پایه گذاری گردید (باقری و همکاران، ۱۳۷٦).

۲-۲- جنین زایی رویشی (سوماتیکی)[2]

فرآیندی است که طی آن سلولهای رویشی که می توانند هاپلوئید یا دیپلوئید باشد توسعه یافته و به ساختارهای زایشی تبدیل گردند، بدون اینکه هیچ ارتباط آوندی با بافت والد داشته باشند و یا ازامتزاج

1- *Daucus carota*
2-Somatic embryogensis

گامتها به وجود آمده باشند (آمیراتو، ۱۹۸۵؛ هالپرین، ۱۹۹۵؛ جیمنز، ۲۰۰۱).
جنین های گیاهی از یک سلول منشاء گرفته و از شروع زمان تکامل، دارای شکل دوقطبی می باشند (هاکسیوس، ۱۹۷۸؛ وترال، ۱۹٦۷).

۲-۳- پتانسیل جنین زایی رویشی در سلول

بدست آوردن قابلیت جنین زایی رویشی برای تمام گیاهان و سلولهای یک گیاه یکسان نبوده بلکه بنا به عقیده آمیراتو یک استعداد ذاتی است، که فقط تحت شرایط خاص یعنی شرایط القا به حقیقت می پیوندد (بونت و همکاران، ۱۹۹۸؛ آمیراتو، ۱۹۸۵). یک شرط اساسی برای کسب قابلیت جنین زایی رویشی توسط توانمند بودن سلولهای گیاهی آنها می باشد و تنها در مراحل بعدی است که خصوصیات ژنوتیپی گیاه بر روی جنین زایی سوماتیکی نقش تعیین کننده ای دارد. در نهایت هر دو جنبه توانمند بودن و خصوصیات بارز ژنتیکی تواما" مشخص کننده میزان پتانسیل موجود در سلولها القا جنین زایی رویشی در آنها می باشد. علاوه بر این موارد عوامل دیگری مانند موقعیت میزان تکامل گیاهانی که قطعاتی از اندامهای آنها به عنوان نمونه مورد کشت جدا می شوند و همچنین موقعیت سلولها در بافت گیاهی کشت شده نیز به مقدار زیاد تعیین کننده قابلیت و توان تولید جنین رویشی در سلولها می باشند. (مشایخی، ۱۳۸٦).

۲-٤- القای جنین‌زایی رویشی

طبق نظریه کولنباخ و همکاران (۱۹۸۵)، سلول‌هایی قادر به تولید جنین غیر جنسی هستند که می‌توانند از حالت رویشی به یک حالت مشخص جنین‌زا تبدیل شوند. این سلول‌ها این امکان را دارند که به یک عامل محرک واکنش نشان دهند. این بدان معنی است که این سلول‌ها جهت تولید جنین رویشی القا می‌گردند. از جمله عواملی که سبب القای جنین‌های رویشی می‌شود، حضور اکسین‌ها در طی این مرحله (مرحله القا جنین‌زایی) می‌باشد که باعث ایجاد توانایی تمایز و ایجاد قدرت تولید جنین رویشی در ریزنمونه‌های مورد کشت می‌گردد. تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی از قبیل 2,4-D (۲،٤-دی کلروفنوکسی استیک اسید)، NAA (نفتالین استیک اسید)، IBA (ایندول تری بوتریک اسید)، IAA (ایندول تری استیک اسید)، به‌عنوان مهم‌ترین و اساسی‌ترین مواد مؤثر برای ایجاد

سلول‌های جنین‌زا به‌کار می‌روند. به‌طور کلی دو راه اصلی جهت تمایز و شکل‌گیری جنین‌های رویشی وجود دارد که به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم می‌باشد.

الف) تشکیل جنین رویشی به شکل مستقیم: در این حالت جنین‌های رویشی مستقیماً از بافت‌های گیاهی بدون اینکه آنها تولید کالوس نمایند به‌وجود می‌آیند. در این حالت سلول‌ها در ریزنمونه‌های کشت شده به‌صورت سلول‌های جنین‌زا وجود دارند، که تنها برای تظاهر توانایی خود جهت تولید جنین، نیاز به تنظیم‌کننده‌های رشد و یا شرایط مناسب محیط کشت دارند که بنا بر نظریه کریکوریان (۱۹۸۸)، این شرایط محیط کشت فقط باعث شروع روند تقسیم سلولی در جهت تشکیل و ظهور جنین‌های رویشی می‌گردد.

ب) تشکیل جنین رویشی به شکل غیرمستقیم: در این نوع جنین‌زایی عمل القا در ابتدا باعث جلوگیری از ادامه متمایز شدن سلول‌ها در این‌گونه بافت‌های تخصصی، شده و سپس باعث تسریع در غیرتخصصی شدن آنها می‌گردد. نتیجتاً این سلول‌های غیر تخصصی شده ضمن اینکه کالوس به‌وجود می‌آورند قابلیت تولید جنین رویشی نیز در آنها ایجاد می‌گردد (سید و همکاران، ۲۰۰٤).

در مدل هویج که توسط کومامین و همکاران (۱۹۹۲) توصیف شده است، مشخص شد که سلول‌های شایسته منفرد، خوشه‌های سلولی جنین‌زا را در حضور اکسین تشکیل می‌دهند. این سلول‌های منفرد از پیش برای جنین‌زایی تعیین شده‌اند. در طول این مرحله خوشه‌های سلولی، توانایی توسعه و تبدیل شدن به جنین را زمانی به‌دست می‌آورند، که اکسین از محیط خارج شود.

۲-۵- ظهور جنین‌های رویشی

ظهور جنین‌های رویشی بستگی به فاکتورهای مختلفی داشته که وابسته به گونه، ژنوتیپ، شرایط فیزیولوژیکی گیاه دهنده ریزنمونه و بسیاری از عوامل دیگر می‌باشد. اگرچه معمولی‌ترین روش تولید جنین‌های رویشی شامل حذف یا کاهش غلظت اکسین (اصولاً 2,4-D) از محیط کشت القا می‌باشد (ویکتور، ۲۰۰۱).

سلول‌های جنین‌زا پس از انتقال به محیط فاقد توفوردی یعنی در مرحله ظهور جنین‌ها شروع به تقسیم می‌نمایند. برخلاف تقسیم سلولی در محیط القایی که فقط تعداد سلول‌ها زیاد می‌گردند در محیط رئالیزاسیون (محیط ظهور جنین‌ها) سلول‌های جنین‌زا شروع به تقسیم اما در جهت تمایز