

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

علی دلجو^۱، امید کرمی^۱ و محمود اثنی عشری^۲

چکیده

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

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

مقدمه

هتروزیگوتی بالا در گیاه میخک باعث شده است که کاربرد فنون جدید سلولی مولکولی جهت اصلاح خصوصیات اقتصادی این گیاه ضرورت پیدا کند. کاربردی شدن فنون مولکولی خود نیازمند توسعه روش‌های مختلف کشت بافت است. رویان بدنی (Somatic embryogenesis) عبارت از تشکیل

میخک (*Dianthus caryophyllus*) یکی از مهم‌ترین محصولات گلکاری دنیا می‌باشد که هم به جهت زیبایی و گوناگونی رنگ و هم از نظر اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (۱). محدودیت‌های موجود در روش‌های به‌نژادی سنتی (تلاقی و گزینش) و داشتن ویژگی‌های

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

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

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

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

ترکیبات محیط کشت و شرایط نگهداری

۱. تشکیل پینه (Callus formation)

برای تشکیل پینه ریزنمونه‌های گلبرگ برای ۸ هفته بر روی محیط کشت MS (۱۵) محتوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۲،۴-دی‌کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)) و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA (۶-بنزیل آدنین (6-Benzyladenine)) کشت شدند.

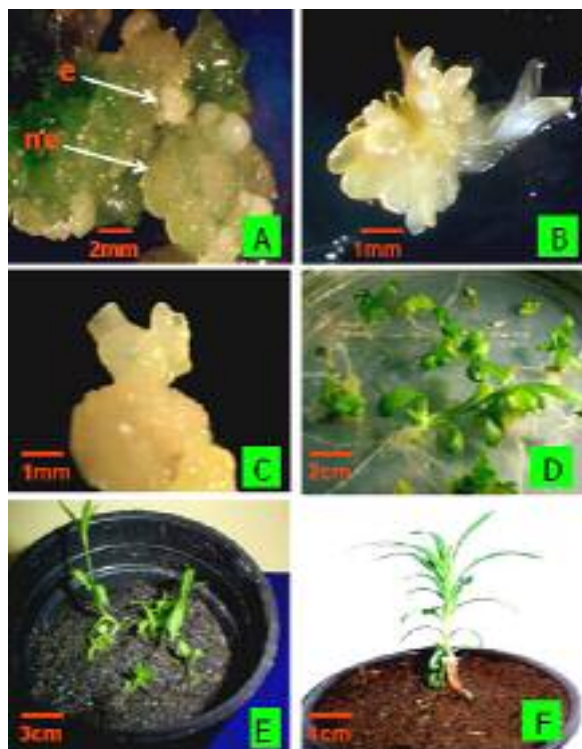
۲. رویان‌زایی (Embryogenesis)

پس از ۸-۹ هفته بعد از شروع کشت، انواع پینه‌های ایجاد شده روی محیط کشت اولیه برداشته شدند و به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف مانیتول (Mannitol) (۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ گرم در لیتر) بدون تنظیم کننده رشد منتقل گردیدند. بعد از ۶ هفته، تعداد رویان‌های تشکیل شده شمارش شدند. به منظور بررسی اثر ارقام و مقادیر مختلف مانیتول روی ایجاد رویان از پینه‌های رویان‌زا، این آزمایش در قالب طرح فاکتریل اجرا گردید و 200 ± 40 میلی‌گرم پینه رویان‌زا برای هر تیمار و هر یک در سه تکرار منظور شد. تجربه داده‌ها با استفاده

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

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

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



شکل ۱. مراحل مختلف رویان‌زایی بدنی و باززایی آن در گیاه میخک (*D.caryophyllus*). (A): تشکیل پینه‌های غیررویان‌زا (ne) و پینه‌های رویان‌زا (e) ۸ هفته بعد از کشت در محیط کشت MS محتوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA. (B): تشکیل و توسعه رویان بدنی بعد از ۵ هفته بر روی محیط کشت MS حاوی ۶۰ گرم در لیتر مانتول. (C): رویان‌زایی بدنی ثانویه روی محیط کشت حاوی ۳۰ گرم در لیتر مانتول. (D): جوانه زنی رویان بدنی دو هفته بعد از کشت در محیط MS کشت ۱/۲ فاقد تنظیم کننده رشد. (E): توسعه گیاهچه در گلدان حاوی ماسه بعد از دو هفته (F): توسعه گیاهچه در گلدان حاوی خاک بعد از ۴ هفته

جوانه‌زنی برداشته شده و پس از شستشوی ریشه آنها توسط آب مقطر استریل به گلدان‌های پلاستیکی حاوی ماسه استریل انتقال یافته و در شرایط محیطی 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت فتو پریرود نگهداری شدند. گیاهچه‌های سازگار شده در گلدان‌های حاوی ماسه به گلدان‌های پلاستیکی حاوی مخلوطی از پیت و ماسه و خاک باغچه با نسبت حجمی ۱:۱:۱ منتقل گردیدند و سپس برای ادامه رشد در گلخانه نگهداری شدند.

نتایج و بحث

تشکیل پینه

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

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

۳. جوانه زنی (Germination)

برای جوانه زنی، رویان‌های لپه‌ای به محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر سوکروز و فاقد تنظیم کننده رشد منتقل شدند. پس از چهار هفته، تعداد رویان‌های باززایی شد شمارش شدند. pH همه محیط‌های کشت پیش از اتوکلاو نمودن با استفاده از NaOH یک نرمال تا حد ۵/۸ تنظیم گردید و برای نیمه جامد محیط‌های کشت از آگار (Agar-Agar Merck) به میزان ۷ گرم در لیتر استفاده شد.

انتقال گیاهچه‌ها به خاک

گیاهچه‌های با طول تقریبی ۵۰ میلی متر از محیط کشت

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

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

*: حروف مشابه در هر ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف‌هاست ($P < 0/05$).

سایر غلظت‌ها پایین‌تر بود. هم‌چنین برای تشکیل رویان بین غلظت مانیتول و نوع رقم اثر متقابل یافت شد (جدول ۲) با طولانی شدن زمان کشت، تعداد رویان‌های تشکیل شده روی پینه‌های رویان‌زا در همه محیط‌ها افزایش یافت. روبرت نتایج مشابهی گزارش کرد به طوری که در مطالعه آنها با اضافه نمودن مانیتول به محیط کشت تعداد رویان‌های بدنی ایجاد شده در کشت‌های رویان‌زای صنوبر در مقایسه با محیط بدون مانیتول به میزان قابل توجهی افزایش یافت. برای تشکیل رویان بدنی بین ارقام تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد ($P < 0/05$). بیشترین رویان‌زایی در رقم Nelson مشاهده شد اما در بین ارقام Impulse و Sagres تفاوت معنی‌داری دیده نشد (جدول ۱). در بسیاری از گونه‌های گیاهی، نشان داده شده که ژنوتیپ‌ها فردی درون یک گونه ظرفیت رویان‌زایی متنوعی دارند (۱۲). این قبیل از تفاوت‌ها در ظرفیت رویان‌زایی ممکن است به میزان توانایی عناصر کلیدی در میسر رویان‌زایی ارتباط داشته باشد. اختلاف بین ارقام میخک، در رویان‌زایی مستقیم گزارش شده است (۳۲).

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

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

تشکیل رویان بدنی

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

جدول ۱ اثر مقادیر مختلف مانیتول بر تعداد رویان ایجاد شده را در همه ارقام نشان می‌دهد. چنانچه مشاهده می‌شود با افزودن مانیتول به محیط کشت، تعداد رویان‌های تشکیل شده روی پینه‌های رویان‌زا به طور قابل ملاحظه‌ای ($P < 0/05$) افزایش یافتند. روی محیط‌های کشت حاوی ۶۰ تا ۱۲۰ گرم در لیتر مانیتول بیشترین تعداد رویان بدنی تشکیل شد. در مقادیر بالای مانیتول (۱۵۰ گرم در لیتر) و هم‌چنین در غلظت پایین آن (۱۵ گرم در لیتر) تعداد رویان‌های تشکیل شده در مقایسه با

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

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

*: حروف مشابه در هر ستر و ستون نشانگر معنی دار نبودن اختلاف‌هاست ($P < 0.05$).

بذری در داخل بذر است که در زمان توسعه و بلوغ آن اتفاق می‌افتد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که توسعه نرمال رویان‌های بدنی گیاه میخک در حضور غلظت‌های بالای مانتیول ممکن است با تغییرات اسمزی ناشی از آن در ارتباط باشد.

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

جوانه زنی

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

دقیق مانتیول روی افزایش تعداد رویان‌ها از کالوس‌های رویان‌زای میخک مشخص نیست اما با توجه به اینکه وجود سوکروز در محیط حاوی مانتیول برای رویان‌زایی ضروری است می‌توان نتیجه گرفت که اثر مانتیول روی افزایش تعداد رویان‌ها به عنوان منبع تأمین کربن مؤثر نبوده بلکه احتمالاً با تغییرات پتانسیل اسمزی ناشی از حضور مانتیول در ارتباط است به طوری که در برخی از گزارش‌ها نشان داده شده است که پتانسیل اسمزی ناشی از حضور مانتیول در محیط کشت رویان‌زایی سوماتیکی را تحریک می‌کند (۶، ۷ و ۲۳).

در محیط‌های فاقد مانتیول و یا حاوی آن با غلظت‌های کم (۱۵ و ۳۰ گرم در لیتر)، رویان‌های بدنی نرمال نبودند اما در محیط کشت حاوی مانتیول زیاد (۶۰، ۱۲۰، ۹۰ و ۱۵۰ گرم در لیتر) رویان‌ها نرمال بودند. در بسیاری از گزارش‌ها نشان داده شده که از غلظت‌های بالای کربوهیدرات برای توسعه نرمال رویان‌های بدنی استفاده شده است و در بیشتر این گزارش‌ها اشاره شده که توسعه نرمال رویان‌ها با تغییرات اسمزی ناشی از حضور غلظت بالای کربوهیدرات در ارتباط است (۲۲، ۲۳، ۲۵ و ۲۶). مرکل و همکاران (۱۲) پیشنهاد کرده‌اند که تغییرات اسمزی جهت توسعه نرمال رویان‌زایی بدنی در شرایط درون شیشه‌ای تقلیدی از تغییرات اسمزی محیط طبیعی اطراف رویان

گیاهچه‌ها از رشد ضعیف‌تری برخوردار بودند و بسیاری از آنها پس از انتقال به گلدان‌های حاوی خاک معمولی از بین رفتند.

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

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

گیاهچه‌های منتقل شده به گلدان‌های حاوی ماسه استریل به طور نرمال توسعه یافتند (شکل ۱ E) و بعد از انتقال به گلدان‌های حاوی خاک حدود ۸۰ درصد از آنها به گیاه کامل تبدیل شدند (شکل F۱). گیاهچه‌های حاصل از رویان‌هایی که به طور غیر نرمال توسعه یافته بودند در مقایسه با سایر

منابع مورد استفاده

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

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