Journal of
Plant Environmental Physiology
Print ISSN: 2423-7671
Online ISSN: 2783-4689
Islamic Azad University
Gorgan Branch
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran

Investigating the type of seed explant and carbon source on optimization of *in vitro* production of *Festuca araundinacea* callus

Matin Dolati[1], Mostafa K. Sarmast[2*], Seyyed Javad Mousavizadeh[3]

[1] Department of Horticultural Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, Email: dolatimatin@gmail.com
[2] Department of Horticultural Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, Email: mkhsarmast@gau.ac.ir
[3] Department of Horticultural Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, Email: mosavizadeh@gau.ac.ir

Article type:
Research Article

Article history
Received: 03.11.2021
Revised: 20.05.2021
Accepted: 21.05.2021
Published:22.02.2023

Keywords
Embryo
Lawn
Tissue culture
Maltose

Abstract

Tall fescue is an open pollinated cool season turf grass. Micropropagation and genetic transformation of monocot species have always experienced low genetic transformation efficiency. Therefore, evaluation of explant types and carbon source in media, likely through callus optimization would lead to the genetic transformation improvement which is the goal of this experiment. After surface sterilization of tall fescue seeds, different seed explants with or without embryo, have used to evaluate callus induction ability. Normal sugar, maltose and equal amount of sugar and maltose were also used as a different source of carbon in a completely randomized design with three replications. Finally, embryogenic calli, induced to produce shoots in MS media supplemented with 10 mg/L 2,4-D and 0.05 mg/L BA. The presence of embryo on explant is a necessity for callus induction. Explant without embryos which were cut differently failed to produce callus. The assessment of three carbon source during the course of multiplication under in vitro culture indicated that sucrose and maltose significantly improved total chlorophyll and carotenoid content in regenerated shoots while MS media with equal amount of both aforesaid carbon sources were not effective. The results gained in the present experiment indicated that embryo-contained cross section of seeds and using maltose was the best explant and the best carbon source for callus induction and shoot proliferation respectively.

Cite this article as: Dolati, M., K. Sarmast, M., Mousavizadeh, S.J. (2022). Investigating the type of seed explant and carbon source on optimization of in vitro production of *Festuca araundinacea* callus. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 68(4): 82-94.

©The author(s)
Doi: 10.30495/iper.2022.688803
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.68.5.4

فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۷۶۷۱
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان

بررسی نوع ریزنمونه بذری و منبع کربن در بهینه‌سازی تولید پینه‌های مناسب فستوکای بلند در شرایط درون شیشه‌ای

متین دولتی[۱]، مصطفی خوشحال سرمست[۲*]، سیدجواد موسوی‌زاده[۳]

۱گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، رایانامه: dolatimatin@gmail.com
۲ گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، رایانامه: mkhsarmast@gau.ac.ir
۳ گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، رایانامه: mosavizadeh@gau.ac.ir

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱٤
تاریخ بازنگری: ۱٤۰۰/۰۲/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۰۳/۰۱
تاریخ چاپ:۱٤۰۱/۱۲/۰۳

واژه‌های کلیدی:
جنین
چمن
کشت بافت
مالتوز

چکیده

فستوکای بلند (*Festuca arundinacea* Schreb.) یک چمن پوششی فصل خنک و چندساله است که دارای گرده‌افشانی آزاد می‌باشد. ریزافزایی و انتقال ژن به گونه‌های تک‌لپه مانند فستوکای بلند همواره با راندمان پایینی همراه بوده است. بنابراین بررسی اثر نوع ریزنمونه بذری و منبع کربن به کار رفته در محیط کشت که می‌تواند از طریق بهینه‌سازی تولید پینه مناسب، برای انتقال ژن به این گیاه سودمند باشد از جمله اهداف این پژوهش است. پس از گندزدایی سطحی بذر فستوکای بلند با الکل و کلراکس، انواع ریز نمونه‌های بذری دارای جنین و فاقد جنین برای ارزیابی قدرت تولید پینه در محیط MS کشت شدند. همچنین استفاده از شکر معمولی، مالتوز و نسبت برابری از مالتوز و شکر معمولی نیز به عنوان منبع کربن در قالب یک طرح آزمایشی کاملا تصادفی با ۳ تکرار به عنوان تیمارهای منبع کربن مورد بررسی قرار گرفتند. در پایان، پینه‌های جنین‌زای القاء شده روی محیط دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر BA مورد باززایی قرار گرفتند. نتایج بررسی نوع ریزنمونه بذری به طور آشکار حاکی از ضرورت وجود جنین در ریزنمونه برای القاء پینه دارد. ریزنمونه‌های فاقد جنین که به صورت طولی و عرضی برش خورده بودند قادر به القاء پینه نبودند. بررسی سه منبع کربن متفاوت در محیط کشت درون شیشه‌ای نشان می‌دهد که مالتوز و شکر معمولی به طور جداگانه میزان کلروفیل کل و کارتنوئید را در برگ گیاهان باززایی شده به طور معنی‌داری بهبود می‌بخشند در حالی که استفاده همزمان از شکر معمولی و مالتوز چنین اثری را نشان نداد. بر اساس نتایج بدست آمده از این آزمایش، استفاده از روش برش عرضی بذر به همراه جنین در بذر فستوکای بلند و استفاده از مالتوز تنها در محیط کشت بافت این گیاه به ترتیب بهترین ریزنمونه برای کشت بافت و بهترین منبع کربن برای القاء تولید پینه و پرآوری شاخساره در این گیاه است.

استناد: دولتی، متین؛ خوشحال سرمست، مصطفی؛ موسوی‌زاده، سیدجواد. (۱٤۰۱). بررسی نوع ریزنمونه بذری و منبع کربن در بهینه‌سازی تولید پینه‌های مناسب فستوکای بلند در شرایط درون شیشه‌ای. *فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ٦۸ (٤)، ۹٤-۸۲.

Doi: 10.30495/iper.2022.1956943.1790
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.68.9.8

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

تیره غلات بالغ بر ۹۰۰۰ گونه گیاهی را در خود جای داده است که بالغ بر ۵۰ نوع آن به‌عنوان پوشش مناسب چمن کاربردهای گوناگونی دارند (Turgeon, 2008). گیاهان باریک برگ چندساله نقش غیرقابل-انکاری در طبیعت به‌عنوان یک پوشش مناسب برای حفظ خاک، حیات جانوران خاکزی، تولید علوفه، تولید اکسیژن و تلطیف روح و روان انسان دارند. فستوکای بلند با نام علمی *Festuca arundinacea* Schreb.، از جمله چمن‌های است که به دلیل مقاومت بالا به سرما و خشکی طور گسترده در جنوب اروپا و ایالات متحده کشت و کار می‌شود (Sarmast et al., 2015). جالب است که در جنس فستوکا، بالغ بر ۸۰ گونه گیاهی ارزشمند مناسب برای اهداف کشاورزی وجود دارد. این گونه آزاد گرده‌افشان هگزاپلوئید، به دلیل ریشه‌های گسترده و عمیق و توانایی تبخیر بالای آب، در مقایسه با دیگر گونه‌های فصل سرد، به خوبی تنش خشکی را تحمل می‌کند (Cross et al., 2013). متاسفانه نظر به اینکه ایران از نظر جغرافیایی در نقاط کم‌آب دنیا قرار گرفته (FAO, 2018) و با دانش به اینکه که ارقام مقاوم به خشکی از لحاظ تنوع، دارای محدودیت می‌باشند، بنابراین تولید چمن‌های متحمل به کم‌آبی به وسیله روش‌های دستکاری ژنتیکی اهمیت زیادی دارد که خود مستلزم تهیه یک دستورالعمل مناسب برای باززایی بهینه گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای است. کشت بافت گونه‌های چمنی تاکنون به کمک ریزنمونه‌های بذری میسر شده است و استفاده از ریزنمونه‌های دیگر به تقریب ناموفق بوده است (Dong and Qu, 2005; Hu et al., 2005).

در گزارشی استفاده از جنین‌های بریده شده بذرهای بالغ *Festuca rubra* L. در محیط MS دارای ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D تولید پینه نمودند، ولی برای القاء جنین، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از تنظیم کننده رشد 2,4-D و بنزیل آدنین لازم بود (Ha et al. 1992; Gao et al., 2008). در مطالعه‌ای دیگر که بر روی ۲۰ نوع متفاوت فستوکای بلند انجام شد، تولید پینه در ۹ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D القاء شد و برای باززایی گیاه، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین لازم بود. میزان القاء پینه در گزارش آنها از ٤/٤ تا ۵۱/۹ درصد متغییر بود و درصد میزان گیاهان باززایی شده از این پینه‌ها بین ۲ تا ۲۲ درصد بود (Wang and Gee, 2004). تا حد زیادی میزان باززایی گیاه از پینه با ژنوتیپ گیاه در ارتباط است. همچنین برش طولی بذر فستوکای بلند به دو قسمت مساوی به صورت طولی، منجر به تولید پینه‌هایی شد که در محیط کشت MS دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین تولید گیاه نمودند (Bai and Qu, 2001; Sarmast et al., 2018). فقدان ژرم‌پلاسم‌های مناسب مقاوم به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در این گونه گیاهی از جمله دلایل استفاده از روش انتقال ژن در این گونه‌ها برای تولید گونه‌های مقاوم به بیماری و آفت است (Hosseini et al., 2019; Hu et al., 2021). بهینه‌سازی کشت بافت گیاه، اولین گام در انتقال ژن پایدار است. انتخاب ریز نمونه مناسب با توان تولید پینه‌های مناسب و با قدرت باززایی بالا، برای تراریختی حائز اهمیت زیادی است. راندمان باززایی سلول‌های تراریخته، تحت تاثیر روش انتقال ژن (آلودگی با باکتری یا تیمار سلول با تفنگ ژنی)، حضور عامل گزینشگر (آنتی‌بیوتیک) و دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده برای کنترل رشد اضافی اگروباکتریوم در محیط کشت است. جدا از راندمان باززایی، روش باززایی در تولید گیاهان تراریخت نیز حائز اهمیت است. بنابراین هدف این تحقیق بررسی تاثیر نوع ریز نمونه بذری و همچنین نقش منابع کربن ارزان قیمت در تولید پینه به‌منظور باززایی چمن فستوکای بلند می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: این پژوهش بر روی رقم Asterix چمن فستوکای بلند (*Festuca arundinacea* Schreb) در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی و فضای سبز دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. بذرها از شرکت کشاورزی آنلاین در شهرستان گرگان خریداری شد.

آزمون جوانه زنی استاندارد و آزمون تترازولیوم: برای سنجش اولیه توانایی جوانه‌زنی و قوه نامیه بذرهای چمن فستوکای بلند از دو روش آزمون استاندارد جوانه‌زنی و تست غوطه‌ورسازی در محلول تترازولیوم استفاده شد. برای محاسبه درصد جوانه‌زنی، ابتدا ۱۵۰ عدد از بذرهای سالم، درشت و عاری از هرگونه بیماری را از منبع اصلی بذر جدا نموده و در سه پتری دیش تمیز (هر پتری ۵۰ عدد بذر) حاوی کاغذ صافی استریل قرار دادیم. سه میلی لیترآب مقطر به پتری دیش‌ها افزوده شد و پتری دیش‌ها در شرایط اتاق برای ۱۵ روز نگه‌داری شدند. در آزمایش دوم، بذرها پس از انجام برش طولی با استفاده از اسکالپل، در محلول تترازولیوم ۰.۵٪ به مدت ۲ ساعت غوطه‌ور شدند.

گندزدایی سطحی بذرها، تهیه ریزنمونه و اعمال تیمار: پس از ارزیابی اولیه درصد جوانه‌زنی بذرها، تیمار اولیه بذرها با اسیدسولفوریک ۵۰ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه در زیر هود دارای فشار منفی انجام شد. این تیمار جهت نرم نمودن پوسته خارجی بذر انجام شد. سپس برای حذف بقایای اسید روی بذر، به مدت یک شبانه روز در زیر آب جاری قرار داده شدند و پس از شستشو مجدد نمونه‌ها با آب مقطر، نمونه‌ها به زیر هود کشت بافت برای تیمار گندزدایی سطحی منتقل شدند. در ادامه بذرها ابتدا با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و سپس با هیپوکلریت سدیم خالص (حاوی ۵ گرم کلر فعال) به مدت ۳۰ دقیقه گندزدایی سطحی شدند. بذرها سپس ٦ مرتبه با آب مقطر استریل آبکشی و پس از جدا نمودن پوسته به کمک پنس و اسکالپل در زیر بیناکولار، برش داده شدند. تیمار برش بذر شامل برش کامل بذر به دو نیمه به صورت طولی بدون جنین، برش کامل بذر به دو نیمه به صورت عرضی بدون جنین، برش کامل بذر به دو نیمه به صورت طولی به همراه جنین و در نهایت برش کامل بذر به دو نیمه به صورت عرضی به همراه جنین بود. ریز نمونه ها بر روی محیط کشت استاندارد MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت شدند. در این آزمایش از غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D برای تمام نمونه‌ها و ۳۰ گرم در لیتر شکر استفاده شد.

پس از انجام آزمایش اول و مشاهده نتایج، در آزمایشی دوم از منابع کربن متفاوت مانند شکر معمولی (۳۰ گرم در لیتر)، مالتوز (۳۰ گرم در لیتر) و نسبت برابری از مالتوز (شرکت سیگما) و شکر معمولی (هر کدام ۱۵ گرم در لیتر) برای ارزیابی اثر منبع کربن در تولید پینه مرغوب استفاده شد. در این آزمایش از ریز نمونه بذری که به صورت طولی به همراه جنین برش داده شده بود به عنوان ریز نمونه استفاده شد.

برای آماده‌سازی تمامی محیط‌های کشت از ۵ محلول استاندارد پایه محیط کشت MS استفاده شد. این محلول‌های پایه بر اساس منبع نیتروژن، عناصر ماکرو، میکرو و آهن برای جلوگیری از رسوب تفکیک می‌شوند و در زمان تهیه محیط کشت مقادیر مشخصی از هر کدام از محلول‌های پایه برداشت شده و با هم مخلوط می‌شود. بذرهای چمن در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های ۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با منبع کربن متفاوت برای القاء پینه قرار گرفت. در ادامه، برای باززایی گیاه از پینه از ترکیب ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر از BA و ۵ میلی‌گرم در لیتر

2,4-D استفاده شد (Zhou et al., 2016). پس از اضافه کردن منبع کربن مشخص، pH تمام محیط‌ها با استفاده از NaOH و HCl ۰/۱ نرمال روی ۵/۸ پیش از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع تنظیم شد. کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور مناسب در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

۸ هفته پس از شروع آزمایش دوم و زمانی که گیاهک‌های باززایی شده از پینه‌ها تولید شدند، میزان کلروفیل و کارتنوئید برگ با استفاده از روش Hiscox (Hiscox, 1979) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۵میلی‌گرم از برگ تازه و بالغ فستوکای بلند در ۵ میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفواکساید (DMSO) غوطه‌ور شد و به مدت ٤ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس جذب نوری کلرفیل عصاره‌های برگی در طول موج‌های ٦٦٣ و ٦٤٥ نانومتر و سنجش کاروتنوئید در طول موج ٤٨٠ نانومتر قرائت شد و با قرارگیری اعداد به‌دست آمده در فرمول زیر، محتوای نسبی کلروفیل و کاروتنوئید برگ فستوکای‌بلند محاسبه شد.

رابطه (۱)

$$CLTotal\ (mg/g\ FW) = 20.2\ (A645) - 8.02\ (A663) \times (V/1000\ W)$$

رابطه (۲)

$$Chl\ a\ (mg/g\ FW) = 12.7\ (A663) - 2.69\ (A645) \times (V/1000\ W)$$

رابطه (۳)

$$Chl\ b\ (mg/g\ FW) = 22.9\ (A645) - 4.68\ (A663) \times (V/1000\ W)$$

رابطه (٤)

$$Carotenoid\ (mg/g\ FW) = 7.6\ (A470) - 1.49\ (A510) \times (V/1000\ W)$$

در این رابطه، A: بیانگر جذب طول موج ویژه،V: حجم نهایی حلال مصرفی، W: وزن‌تر بافت است.

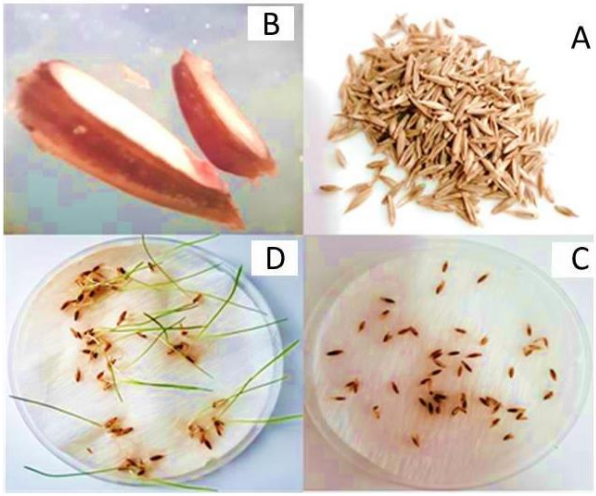
درصد و وزن پینه‌ها به کمک خط‌کش و ترازوی حساس اندازه‌گیری شد. از لحاظ کیفی رنگ و فرم پینه‌های تولید شده در روی محیط کشت دارای منابع مختلف کربن ارزیابی شد. میزان پرآوری شاخساره نیز در محیط دارای منابع مختلف کربن نیز مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

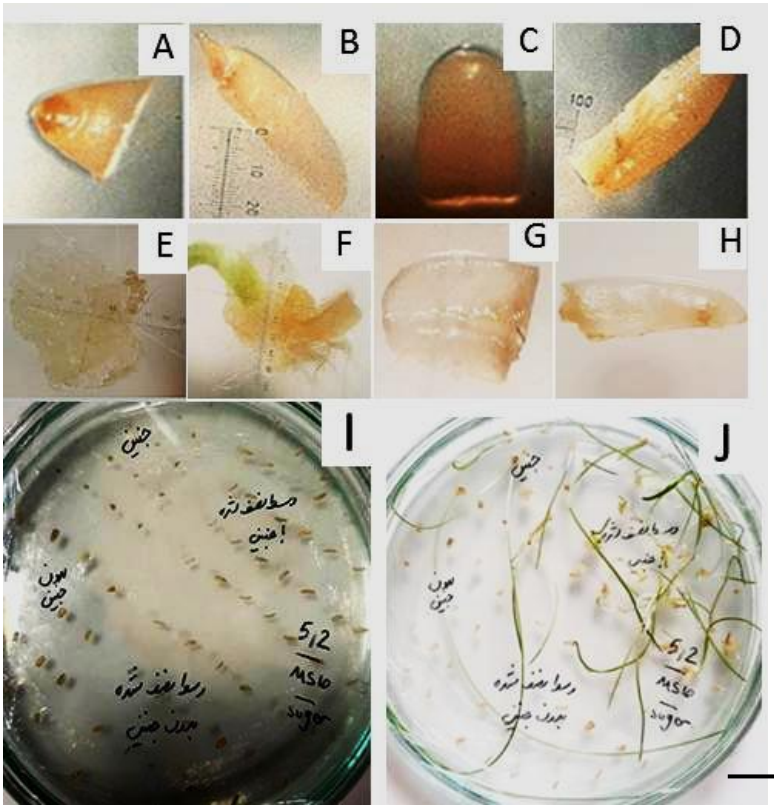
این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. در آزمایش اول درصد پینه‌های تولید شده با توجه به نوع ریز نمونه استفاده شده مشخص شد. در آزمایشات مربوط به اثر منبع کربن وزن تر، قطر و رنگ پینه همچنین میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل، کارتنوئید، تعداد و طول شاخساره‌های باززایی شده نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با استفاده از نرم‌افزار R تجزیه و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

نتایج

نتایج آزمون تترازولیوم به طور آشکار در گام اول، محل و سلامت جنین و توانایی رشد و بقاء آن را با رنگ‌گیری زود هنگام جنین تایید کرد (شکل ۱). همچنین جهت تایید بیشتر، آزمون استاندارد جوانه‌زنی نشان داد که قوه نامیه بذر ها بیش از ۹۲٪ بود. در راستای ارزیابی اولیه نمونه‌های اولیه استفاده شده برای گندزدایی سطحی و استقرار در مرحله اول ریز افزایی، آگاهی از زنده بودن درصد بالایی از نمونه‌های بذری اهمیت بالایی در مراحل باززایی خواهد داشت، بنابراین انجام آزمون استاندارد جوانه‌زنی در شرایط استاندارد آزمایشگاهی به همراه آزمون هیستوشیمیایی تترازولیوم برای اطمینان از وجود قوه نامیه قابل قبول در بذرهای فستوکای بلند ضروری به نظر می‌رسد.



شکل ۱: A: بذر فستوکای بلند رقم Asterix B: تغییر رنگ جنین به رنگ قرمز پس از تیمار با تترازولیوم. C: کشت بذرها در پتری دیش D: جوانه زنی و تولید ریشه چه و ساقه چه پس از ۱۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.



شکل ۲: ریز نمونه‌های متفاوت استفاده شده در این آزمایش. A: برش عرضی با جنین B: برش طولی با جنین C: برش عرضی بدون جنین D: برش طولی بدون جنین. E: پینه حاصل از ریز نمونه A، F: پینه حاصل از ریز نمونه B. G: ریز نمونه حاصل از C و بدون تغییر H: ریز نمونه حاصل از D و بدون تغییر. I: ریز نمونه‌های مختلف کشت شده در محیط J MS: پاسخ ریز نمونه‌های مختلف کشت شده در محیط MS پس از ۲۰ روز.

اثر نوع ریز نمونه بذری در باززایی پینه: بررسی نتایج این تحقیق بر روی ریزنمونه‌های متفاوت تهیه شده از بذر (شکل۲)، به روشنی نشان داد که ریز نمونه‌های فاقد جنین (شکل ۲، G و H)، قدرت تولید

پینه و باززایی در مقایسه با ریز نمونه‌های بذری (شکل ۲، E و F) دارای جنین (برش طولی دارای جنین و برش عرضی دارای جنین) را ندارند (جدول ۱). بدون توجه به نوع برش، ریز نمونه‌های دارای جنین هم توانایی تولید پینه و هم توانایی تولید ساقه‌چه را دارا هستند. از آنجا که نوع و اندازه ریز نمونه، سهم بالایی در پاسخ آنها به شرایط کشت بافت و در ادامه باززایی آنها خواهد داشت لذا به همین منظور چهار نوع متفاوت ریز نمونه تهیه شده از بذر فستوکای بلند در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (۱۹۶۲) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصله نیز تایید کننده این مطلب بود.

کمی‌سازی نتایج بدست آمده در شکل ۲ نشان داد که ریز نمونه‌های دارای جنین قادر به تولید پینه بودند و از میان دو ریز نمونه دارای جنین که به‌طور عرضی و طولی برش خورده بودند، ریزنمونه‌های دارای جنین که به صورت عرضی برش خورده بودند از نظر اندازه پینه میانگین بالاتری داشتند (جدول ۱).

جدول ۱: اندازه پینه تولید شده در ریز نمونه‌های مختلف بذری در سه محیط کشت مختلف

تیمار	برش طولی به همرا جنین (میلی‌متر)	برش عرضی بذر به همراه جنین (میلی‌متر)	برش طولی بذر بدون جنین (میلی‌متر)	برش عرضی بذر بدون جنین (میلی‌متر)
مالتوز	۰/٤٦^{a}	۰/٦۳^{c}	۰	۰
شکر و مالتوز	۰/۵۳^{a}	۱/۲^{a}	۰	۰
شکر	۰/٤^{a}	۰/٤۳^{b}	۰	۰
میانگین کل	۰/٤٦	۰/۷۵	۰	۰

ستون‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۵ با استفاده از آزمون LSD ندارند.

اثر منبع کربن روی کیفیت و درصد پینه: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که درصد تولید پینه و قطر پینه تحت تاثیر منبع کربن محیط قرار گرفت و همچنین خصوصیات کیفی پینه مانند سفتی پینه، رنگ زرد و شیشه‌ای شدن نیز متاثر از منبع کربن بود (جدول ۲).

جدول ۲: جدول تجزیه واریانس مربوط به صفات کمی و کیفی پینه رشد یافته در محیط کشت حاوی منابع متفاوت کربن

	df	میانگین مربعات							
		پینه (٪)	قطر پینه (cm)	زرد	سفید	قهوه ای	فشردگی	نرمی	شیشه‌ای شدن
تیمار	۲	۲۱۷/٦٤***	۰/۰٤٦**	۰/۰۳٦۱***	۰/۰۳۷^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}	۰/۰۳۳***	۰/۰۳٦^{ns}	۰/۰۳۱***
خطا	۱۲	۳/۷۲	۰/۰۰۵۳	۰/۰۰۱۲	۰/۰۱۰	۰/۰۱	۰/۰۰۰۹۸	۰/۰۰۹۹	۰/۰۱٦
CV		٦/۲۱	۱٤/۲۸	۱٤/٦۷	۱۹/۳	۵۳/٦	۱۳/۰۲	۱۸/۸	۱۵/۷٤

***،**، * و ns به‌ترتیب معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۰۵ و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهند.

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که محیط دارای مالتوز به تنهایی درصد القاء پینه در ریز نمونه‌ها را افزایش داد (جدول ٤) که تا حدی این عامل می‌تواند مربوط به نقش این منبع کربن در تنظیم اسمزی سلول باشد. نتایج حاصل از این آزمایش بیانگر این است که محیط دارای مالتوز، پینه‌های سفت تر و زرد رنگ بیشتری در مقایسه با محیط‌های دیگر تولید می‌کند که برای انتقال ژن نیز این محیط قابل توصیه است (جدول ۳). با وجود اینکه محیط دارای مالتوز به تنهایی با محیط دارای مالتوز و شکر معمولی به طور

همزمان از نظر تعداد و طول شاخساره اختلاف معنی‌داری نداشته است (جدول ۷) اما محیط دارای مالتوز، پینه‌های زرد متراکم و با قابلیت باززایی بالاتری را تولید می‌کند که بیشتر از محیط‌های دیگر قابل توصیه خواهد بود.

جدول ۳: جدول مقایسه میانگین مربوط به صفات کیفی پینه رشد یافته در منابع کربن متفاوت

تیمار	زرد	سفید	قهوه‌ای	فشرده	نرم	شیشه‌ای
مالتوز	۰/۳٤±۰/۰٤۷^{a}	۰/٤۲±۰/۱٤۷^{b}	۰/۲۱±۰/۰۵۳^{a}	۰/۳٤±۰/۰۲٤^{a}	۰/٤۲±۰/۰٤۷^{a}	۰/۲۳±۰/۰۵۳^{b}
مالتوز و شکر معمولی	۰/۱٦±۰/۰۳۵^{b}	۰/٦۱±۰/۰۳٤^{a}	۰/۲٤±۰/۱۰^{a}	۰/۱۸±۰/۰۲٤^{b}	۰/٦۱±۰/۰۳٤^{a}	۰/۲۰±۰/۱۰ ^{b}
شکر معمولی	۰/۱۹±۰/۰٤۲^{b}	۰/۵٤±۰/۱٦^{ab}	۰/۲۵±۰/۱۸ ^{a}	۰/۱۹±۰/۰٤۲^{b}	۰/۵٤±۰/۱٦ ^{a}	۰/۳۷±۰/۱۸ ^{a}

***،**، * و ns به‌ترتیب معنی‌داری در سطح۰/۰۰۱، ۰/۰۱ ، ۰/۰۵ و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهند.

بر اساس جدول مقایسه میانگین (جدول ٤)، مالتوز بر روی وزن‌تر پینه به شکل معنی‌داری تاثیر گذار بوده و همچنین میزان کارتنوئید در این محیط نیز به شکل معنی‌داری بیشتر از محیط کشت‌های دیگر بود. ولی محیط دارای مالتوز بر روی کلروفیل a ، کلروفیل b و کلروفیل کل پینه تاثیر معنی‌داری نداشت (داده‌ها نشان داده نشده است)

جدول ٤: جدول مقایسه میانگین مربوط به صفات کمی پینه رشد یافته در محیط کشت دارای منابع متفاوت کربن

تیمار	درصد القاء پینه	قطر پینه (سانتی متر)	وزن تر پینه (گرم)	کارتنوئید (میلی‌گرم در گرم وزن تر)
مالتوز	٤۰^{a}	۰/۵٦^{a}	۰/۰۵۹ ^{a}	۵/٤۹ ^{a}
مالتوز و شکر معمولی	۲٦^{b}	۰/٦^{a}	۰/۰٤۸ ^{b}	۰ ^{c}
شکر معمولی	۲٦^{b}	۰/٤^{b}	۰/ ۰٤۵ ^{b}	۲/۳۹ ^{b}

ستون‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۵ با استفاده از آزمون LSD ندارند.

بیش‌ترین میزان وزن تر پینه (۰/۰۵۹ گرم) مربوط به تیمار مالتوز و کم‌ترین میزان آن (۰/۰٤۵ گرم) مربوط به تیمار شکر معمولی بود که البته از لحاظ آماری با تیمار مالتوز و شکر معمولی اختلاف معنی‌داری نداشت. هم‌چنین نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیش‌ترین میزان کارتنوئید (۵/٤۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر) مربوط به تیمار مالتوز و کم‌ترین میزان آن (صفر) مربوط به تیمار مالتوز و شکر معمولی بود.

اثر منبع کربن در تغییر میزان کلروفیل و کارتنوئید شاخساره‌های باززایی شده فستوکای بلند: نتایج بررسی اثر سه منبع کربن در کشت درون شیشه‌ای فستوکای بلند نشان دهنده این است که کلروفیل a، کلروفیل کل و میزان کارتنوئید شاخساره‌های باززایی شده فستوکای بلند از نوع منبع کربن بکار رفته در محیط کشت متاثر بودند (جدول ۵).

جدول ۵: تجزیه واریانس داده‌های فیزیولوژیک بدست آمده از شاخساره‌های باززایی شده فستوکای بلند در محیط کشت MS حاوی منابع متفاوت کربن.

منابع تغییرات	df	میانگین مربعات					
		کلروفیل a	کلروفیل b	نسبت‌کلروفیل a/b	کلروفیل کل	کارتنویید	تعداد شاخساره	طول شاخساره
تیمار	۲	۲۹/۰۵۸**	۰/۵۵^{ns}	۳/۹۲^{ns}	۱۵۸/۶۹*	۷۹۶۷۱۸**	۰/۰۰۱۳^{ns}	۰/۴۳^{ns}
خطا	۹	۱/۳۹	۰/۲۲	۱۵/۲۸	۲۰/۵۷	۳۷۹۹۳	۰/۰۰۱۹	۱/۸۸
CV		۴/۳۵	۲۵/۵۶	۲۵/۳۶	۱۱/۳۸	۸/۷۳	۲۱/۴۵	۱۵/۹۶

**، * و ns به‌ترتیب معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ ، ۰/۰۵ و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهند.

جدول مقایسه میانگین (جدول ٦) نشان می‌دهد که محیط حاوی مالتوز به همراه شکر معمولی از نظر میزان کلروفیل و کارتنوئید برگ به شکل معنی‌داری کمتر از محیط حاوی مالتوز و و محیط حاوی شکر معمولی می‌باشند. هر چند که بررسی طول و تعداد شاخساره‌های تولید شده در این سه محیط کشت تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان نمی‌دهد (جدول ٦) اما وجود مقادیر مناسبی از کلروفیل و حتی کارتنوئید به عنوان یک ترکیب موثر در کاهش تنش وارد شده به گیاهک‌های کشت بافتی در محیط کشت دارای مالتوز به ویژه در مرحله سازگاری گیاهان کشت بافتی می‌تواند حائز اهمیت باشد.

جدول ٦: مقادیر برخی از عامل‌های مرتبط با رنگیزه‌های فتوسنتزی در محیط دارای سه منبع کربن متفاوت

تیمار	کلروفیل a mg Chl g^{-1}f.w	کلروفیل b mg Chl g^{-1}f.w	کلروفیل a/b mg Chl g^{-1}f.w	کلروفیل کل mg Chl g^{-1}f.w	کارتنوئید µg Chl g^{-1}f.w
مالتوز	۲۸/۳ ±۱ /۷۷a	۱۵/۳ ± ۳/٤ a	۱/۹ ± ۰/۳۳ a	٤۳/٦ ± ٤/۸ a	۲٤٤۲/۸ ± ۱۷٦/٤ a
مالتوز+ شکر معمولی	۲٤ ±۰/۵۵ b	۱٦/۳ ± ۱/۹ a	۱/٤۹ ± ۱/۱۹ a	۳۲/۵۵ ± ۱/۰٦ b	۱۷۲۱/٤ ± ۷۹/٦ b
شکر معمولی	۲۹ ± ۰/٤۸ a	۱٤/۳ ± ۵/٤ a	۲/۲ ± ۰/۷۲ a	٤۳/۳ ± ٦/۱۲ a	۲۵۳۷/۸ ± ۲۷٦/٦ a

ستون‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی دار در سطح $P<$۰/۰۵ با استفاده از آزمون LSD ندارند.

جدول ۷: اثر نوع منبع کربن بر روی تعداد و طول شاخساره های باززایی شده از پینه فستوکای بلند

تیمار	تعداد شاخساره	طول شاخساره (سانتی متر)
مالتوز	۰/۲۲±۰/۰۵ a	۸/۲۹ ± ۱/۱٦ a
مالتوز+ شکر معمولی	۰/۲٤± ۰/۳ a	۸/۹٤ ± ۱/٤۸ a
شکر معمولی	۰/۱٤ ± ۰/۰٤ b	۸/۵۲ ± ۱/٤٤ a

ستون های دارای حروف مشترک تفاوت معنی دار در سطح P< ۰/۰۵ با استفاده از آزمون LSD ندارند.

بحث

یکی از کلیدی ترین عوامل موفقیت در انتقال ژن با واسطه گری اگروباکتریوم در گونه‌های گیاهی، بهینه‌سازی توان باززایی در ریز نمونه مناسب و بهینه‌سازی شرایط کشت است. نظر به پایین بودن راندمان باززایی گیاهان تراریخت در تمامی فنون انتقال ژن در گیاهان، بالا بردن راندمان باززایی گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای بسیار حائز اهمیت است. باززایی درون‌شیشه‌ای گونه‌های باریک برگ مانند چمن‌ها به طور عمده به وسیله ریز نمونه بذری

صورت می‌گیرد. در تمامی بررسی‌های انجام شده در رابطه با کشت بافت و انتقال ژن در گونه‌های چمن به ویژه فستوکای بلند، از ریز نمونه بذر برای القاء پینه استفاده شده است (Wu et al., 2005; Dong and Qu, 2005; Hu et al., 2005).

استفاده از ریز نمونه بذر کامل در مقایسه با بذرهایی که به‌طور طولی برش داده شده‌اند، به مراتب قدرت تولید پینه کمتری دارند (Sarmast et al., 2018). اما نقش جنین در رابطه با القاء و میزان تولید پینه پیشتر گزارش نشده است. بررسی‌های پیشین انجام شده بیانگر این است که پینه‌های سفت و زرد رنگ در بیشتر موارد از قدرت باززایی بالاتری نسبت به پینه‌های سفید و نرم برخوردارند. این موضوع به ویژه در انتخاب بهترین ریزنمونه برای همکشتی با اگروباکتریوم در فرایند انتقال ژن اهمیت دارد. نظر به اینکه برای انتقال ژن به پینه فستوکای بلند، نیاز به القاء پینه‌های فشرده جنین‌زا می‌باشد (Morris et al., 2017)، بنابراین استفاده از ریز نمونه‌های دارای جنین که به صورت عرضی برش خورده‌اند منجر به تولید بیشترین ریز نمونه‌های قادر به تولید پینه خواهد شد. نتایج حاصل از این آزمایش بیانگر این است که ریز نمونه‌های فاقد جنین (برش طولی و عرضی) از قابلیت تولید پینه برخوردار نمی‌باشند و بذرهایی که به طور مستقیم و بدون برش در روی محیط MS دارای هورمون کشت می‌شوند به سرعت جوانه زده و سبز می‌شوند و از قابلیت تولید پینه بالایی برخوردار نیستند. از طرفی برش طولی بذرهایی که دارای جنین باشد با دشواری زیادی همراه است و نتایج غیر قابل تکراری در درصد تولید پینه‌های جنین زا بوجود می‌آید. جستجو در منابع نشان دهنده این است که از ریز نمونه‌های بذری مختلفی در کشت بافت استفاده شده است. به عنوان مثال بذرهای بالغ (Lee et al., 2012) و نابالغ کامل، بذرهای بدون پوسته که تنها به طور طولی برش خورده‌اند (Sarmast et al., 2018) و جنین‌های جدا شده (Gao et al., 2008) از جمله ریز نمونه‌های استفاده شده در کشت بافت و انتقال ژن به فستوکای بلند بوده‌اند. به هر حال گزارش جامعی که انواع این ریز نمونه‌ها را در یک آزمایش ثابت مقایسه نموده و مورد بررسی قرار دهد موجود نیست. در بررسی‌های پیشین در رابطه با ریزافزایی و انتقال ژن به فستوکای بلند از ریزنمونه‌های بالغ بذری که به صورت طولی برش خورده‌اند استفاده شده است (Bai and Qu., 2001)، اما از آنجایی که در زمان انجام برش طولی، احتمال برش دقیقی که بذر را به دو قسمت مساوی تقسیم نماید و هم دارای جنین باشد دشوار و غیر محتمل است، بنابراین بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، استفاده از ریز نمونه‌های برش خورده به صورت عرضی که دارای جنین می‌باشند توصیه می‌شود.

یکی از دلایل احتمالی نقش جنین در بهبود القاء پینه می‌تواند مربوط به نقش کلیدی باشد که جنین در تولید هورمون‌های گیاهی و انتقال آن به لایه آلورن در تک لپه‌ای‌ها دارد (Hartmann et al., 2011). از جمله این هورمون‌ها که در زمان جذب آب به وسیله بذر به میزان زیادی تولید می‌شود، اسید جیبرلیک است. این هورمون با برهمکنش با تنظیم‌کننده‌هایی که به طور مصنوعی به محیط کشت اضافه می‌شوند، در القاء تولید پینه موثر عمل می‌نماید. به طور حتم نمونه‌های فاقد جنین از قدرت تولید هورمون پایین‌تری برخوردار بوده و از قدرت جذب کمتری برای جذب سوکروز برخوردار خواهند بود که به‌طور توام می‌تواند توانایی تولید پینه را تحت تاثیر قرار دهد. متاسفانه دانش ما در رابطه با نقش جنین در القاء تولید پینه و چگونگی آن ناقص است. فهم این مهم مستلزم

استفاده از بازدارنده‌های جیبرلیک اسید و سایتوکنین می‌باشد که خود نیازمند تحقیقی مستقل است.

ترکیبات موجود در محیط کشت به شدت موفقیت کشت بافت را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Yaseen et al., 2013). در این میان وجود کربن در محیط‌های مورد استفاده در شرایط کشت بافتی، به دلیل هترتروف بودن ریز نمونه‌ها، بسیار حیاتی است. هترتروفی نتیجه فعالیت فتوسنتزی پایین ریز نمونه‌های استفاده شده در شروع کشت است. وجود این منبع کربن تا قسمتی مربوط به اثر تغذیه‌ای روی رشد و مورفوژنز و قسمتی مربوط به اثر اسمزی آن است که تقسیم سلولی و تا حدی مورفوژنز سلول را متاثر می‌نماید. کربن نقش اجتناب ناپذیری در ساخت بسیاری از مولکول‌های درشت سلولی و بسیاری از فرایندهای نموی سلول دارد. حتی بیان بسیاری از ژن‌ها به‌طور مستقیم تحت تاثیر میزان منبع کربن سلول است. بنابراین وجود کربوهیدرات در محیط کشت بافت برای گیاه ضروری است اما میزان و نوع آن بسته به گونه گیاهی متفاوت است (Thomson and Thrpe, 1987; Yaseen et al., 2013). اگرچه که سوکروز در دسترس و پرکاربرد بوده و به عنوان اصلی‌ترین قند قابل انتقال در سیستم آوندی گیاهان مطرح است اما همیشه بهترین منبع کربوهیدرات در کشت بافت نیست (Blanc et al., 1999). برخی از منابع دیگرکربن قابل استفاده برای گیاه شامل مونوساکاریدهای هگزوز (گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز و مانوز)، پنتوزها (آرابینوز، ریبوز و زایلوز)، دی‌ساکاریدها (مالتوز، لاکتوز، سلوبیوز و تریهالوز) و تری ساکاریدها (رافینوز) می‌باشند (George et al., 2008). بررسی‌های زیادی اثر بارز منبع کربوهیدرات روی رشد و مورفوژنز گیاهان را آشکار نموده است. برای مثال سوربیتول روی نمو شاخساره گیاهان تیره گل رز اثر چشمگیری دارد (Ahmad et al., 2007). در باززایی بسیاری از پایه‌های گیلاس و گلابی، سوربیتول، گلوکز و فروکتوز به مراتب بهتر از سوکروز عمل می‌کند (Ruzic´ et al., 2008). در برخی از گونه‌های گیاهی، سوکروزِ ۳٪ و در برخی گونه‌های دارویی، سوکروزِ ۲٪ برای نمو شاخساره بهتر بودند. Hazarika و همکاران (۲۰۰۲) گزارش نمودند که بین افزودن سوکروز در محیط کشت و محتوای کلروفیل، نشاسته و قندهای احیایی ارتباط وجود دارد. شکر معمولی با غلظت ۲ تا ٤٪ برای ریز افزایی بیشتر گونه‌های گیاهی ایده‌آل است. برخی از محققین از عصاره ۵ تا ۱۰٪ نیشکر برای کشت درون شیشه‌ای موز استفاده نمودند (Buah et al., 2011). در گزارش Rahman و همکاران (۲۰۱۰)، از مقایسه سه منبع کربن سوکروز، گلوکز و مالتوز به این نتیجه رسیدند که برای پرآوری، مالتوز از دو منبع دیگر کربن در باززایی درون شیشه‌ای سیب زمینی بهتر عمل می‌کند. حتی مالتوز در مقایسه با سوکروز در کشت پرچم گوجه فرنگی موثرتر عمل نمود (Batty and Dunwell, 1989) که نتایج آنها همراستا با نتایج مطالعه حاضر است که نشان داد محیط دارای مالتوز تعداد و طول شاخساره‌های به مراتب بیشتری نسبت به محیط دارای شکر معمولی تولید می‌نماید. اثر مثبت استفاده از مالتوز در فرآیند انتقال ژن و باززایی، تا حد زیادی مربوط به اثر اسمزی این منبع کربن بر روی پینه‌های درحال باززایی است (Patel et al., 2013). مشخص شده است که مالتوز مسیرهای متابولیکی مشترک با ABA را فعال می‌کند. نظر به اینکه استفاده همزمان دو نوع کربوهیدرات در محیط کشت به اندازه استفاده جداگانه انها موثر عمل نکرد می‌تواند دلایلی متفاوتی از جمله نقش متفاوتی باشد که این منابع کربن در تمایز آوندی دارند یا حتی می‌تواند مربوط به تفاوت آنزیمی متابولیسم آنها یا حتی مربوط به محتوای درونی قند احیاء (گلوکز و فروکتوز) در بافت‌های کشت شده و یا حتی

حساسیت متفاوتی باشد که بافت ها در زمان شکستن آن قند با آن مواجه می شوند (Yaseen et al., 2013).

نتیجه‌گیری نهایی

بررسی نوع ریزنمونه و منبع کربن در کشت بافت و انتقال ژن در گیاهان اهمیت زیادی دارد. نتایج ارزیابی اولیه آزمایش حاضر نشان از ضرورت وجود جنین در ریزنمونه‌های فستوکای بلند برای القاء پینه داشت. استفاده همزمان از شکر معمولی و مالتوز به مراتب نتایج ضعیف‌تری در رابطه با مقدار کلروفیل کل و کارتنوئید داشت. نتایج این آزمایش بیانگر این بود که محیط دارای مالتوز، پینه‌های سفت‌تر و زرد رنگ بیشتری در مقایسه با محیط های دیگر تولید کرد و همچنین درصد القاء پینه‌های بالاتری نیز در محیط حاوی این منبع کربن در مقایسه با سایر منابع کربن مورد مطالعه مشاهده شد و میزان تولید شاخساره و کلروفیل کل و کارتنوئید بالاتری در گیاهان رشد یافته در محیط دارای این منبع کربن دیده شد در مجموع نتایج حاصله از این آزمایش نشان داد که استفاده از ریزنمونه‌های بذری برش خورده دارای جنین و استفاده از محیط کشت MS دارای منبع کربن مالتوز برای تولید پینه‌های مناسب و باززایی شاخساره‌های فستوکای بلند بهتر بود، لذا در مطالعات آتی انتقال ژن در این گیاه، به منظورتولید پینه و باززایی گیاه از آن، استفاده از این ریزنمونه و مالتوز به عنوان منبع کربن پیشنهاد می شود.

References

Ahmad, T., Akhtar Abbasi, N., Ahmad Hafiz, I. and Ansar, A. (2007). Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy source in morphogenesis of peach rootstock GF-677. Pakestanian. Journal Botany, 39(4):1264–1275.

Bai, Y. and Qu, R. (2001). Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue. Plant Breed, 120: 239-242

Batty, N. and Dunwell J. (1989). Effect of maltose on the response of potato anthers in culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 18:221–226

Blanc, G., Michaux-Ferrière, N., Teisson, C. Lardet, T. and Carron, M.P. (1999). Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in Hevea brasiliensis. Plant Cell, Tissue Organ Cult, 59(2):103–112

Buah, J., Tachie-Menson, J.W., Addae, G. and Asare, P. (2011). Sugarcane juice as an alternative carbon source for in vitro culture of plantains and bananas. American Journal of Food Technology, 6(8):685–694

Cross, J.W., Bonos, S.A., Huang, B. and Meyer, W.A. (2013). Evaluation of heat and drought as components of summer stress on tall fescue genotypes. Hort Science 48:1562–1567.

Dong S. and Qu R. (2005). High efficiency transformation of tall fescue with Agrobacterium tumefaciens. Plant Science, 168: 1453–1458.

Gao, C., Long, D., Lenk, I. and Nielsen, K.K. (2008). Comparative analysis of transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation and particle bombardment. Plant Cell Reports, 27: 1601–1609.

George, E.F., Hall, M.A. and Klerk, G.J.D. (2008). The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. Plant Propagation by Tissue Culture, 5: 65–113

Ha, S.B., Wu, F.S., Thorne, T.K. (1992). Transgenic turf-type tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.) plants regenerated from protoplasts. Plant Cell Reports, 11: 601– 604.

Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T. and Geneve, R.L. (2002). Plant propagation, principles and practices (p. 880). Upper Saddle River, NJ: Pearson Education, Inc.

Hiscox, J.D. and Israelstam, G.F. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Canadian Journal of Botany, 57: 1332-1334.

Hosseini, H.R., Salehi, H. and Alichi, M. (2019). Acquirement of CRY8DB Transgenic Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) by *Agrobacterium* tumefaciens to Develop Resistance Against Pentodon idiota Herbest. Molecular Biotechnology, 61:528-540.

Hu, Y., Jia, W., Wang, J., Zhang, Y., Yang, L. and Lin, Z. (2005). Transgenic tall fescue containing the Agrobacterium tumefaciens ipt gene shows enhanced cold tolerance. Plant Cell Reports, 23:705–709

Hu, T., Wang, T., Wang, G., Bi, A., Wassie, M., Xie, Y., Xu, H. and Chen, L. (2021). Overexpression of FaHSP17.8-CII improves cadmium accumulation and tolerance in tall fescue shoots by promoting chloroplast stability and photosynthetic electron transfer of PSII. Journal of Hazardous Materials, 417:125932

Lee, K-W., Choi, G., Kim, K., Ji, H., Park, H., Seo, S., Kim, M.J. and Lee, S-H. (2012). Comparison of callus induction and plant regeneration from twenty tall fescue varieties. African Journal of Biotechnology, 11: 3553-3557

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physioly Plant, 15:473–497

Morris, P., Dalton, S., Langdon, T. Hauck, B. and de Buanafina, M.M.O. (2017). Expression of a fungal ferulic acid esterase in suspension cultures of tall fescue (Festuca arundinacea) decreases cell wall feruloylation and increases rates of cell wall digestion. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 129:181–193.

Patel, M., Dewey, R.E. and Qu, R. (2013). Enhancing Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation efficiency of perennial ryegrass and rice using heat and high maltose treatments during bacterial infection. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 114, 19–29.

Rahman, M.H. and Islam, M. (2010). Role of sucrose, glucose and maltose on conventional potato micropropagation. Journal Agriculture. Technoly, 6(4): 733-739

Ruzic´, Lazic, T. and Cerovic, R. (2008). Micropropagation of some Prunus and Pyrus genotypes in vitro as affected by different carbon sources. Acta Hortic, 795:413–418

Sarmast, M.K., Salehi, H. and Zarei, M. (2018). A preliminary experiment on Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the P5CS1 gene in tall fescue. Journal of Ornamental Plants, 8:79:86

Sarmast, M.K., Salehi, H. and Niazi A. (2015). Biochemical differences underlie varying drought tolerance in four Festuca arundinacea Schreb. genotypes subjected to short water scarcity. Acta Physiol Plant. 37:192

Thomson M. and Thorpe T. (1987). Metabolic and non metabolic roles of carbohydrates. In: Bong JM, Durzan DJ (eds.) Cell and tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff Publisher, Dardrecht,

Turgeon, AL. (2008). Turfgrass Management. 8th ed. Prentice-Hall, Englewood. NJ.

Wang Z.Y. and Gee Y. (2004). Agrobacterium-mediated high efficiency transformation of tall fescue (Festuca arundinacea). Journal Plant Physioly, 162: 103-113.

Wu, Y., Chen, Q., Chen, M., Chen, J. and Wang, X. (2005). Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (Lolium perenne L.). obtained by Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the vacuolar Na+/H+ antiporter gene. Plant Science, 169: 65–73.

Yaseen, M., Ahmad T., Sablok, G., Standardi, A. and Ahmad Hafiz, I. (2013). Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. Molecular Biology, 40: 2837–2849.

Zhou, B., Luo, H. and Qu, R. (2016). Expression of the shrimp antimicrobial peptide penaeidin 4-1 confers resistance against brown patch disease in tall fescue. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 125:599–603.