تولید بذر مصنوعی هیدراته در گیاه دارویی چویل (*Ferulago angulata* L.) از طریق کپسوله کردن جنین‌های رویشی

الهام سربی و علی مرادی*

یاسوج، دانشگاه یاسوج، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۳

چکیده

تولید بذر مصنوعی می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسبی برای غلبه بر مشکلات کشت، تکثیر و حفاظت برخی گیاهان دارویی باشد. بدین‌منظور تولید بذر مصنوعی با استفاده از جنین‌های رویشی در دو ژنوتیپ (کوه‌گل و چهل چشمه) چویل (*Ferulago angulata* L.) در قالب دو آزمایش جداگانه بررسی شد. در آزمایش بررسی تعداد جنین رویشی (آزمایش اول) بعد از مشاهده جنین اژدری، تعداد جنین‌های کروی، قلبی و اژدری تشکیل شده بر سطح پینه جنین‌زا در هر ژنوتیپ شمارش شد که بین دو ژنوتیپ تفاوت معنی‌داری از لحاظ تعداد جنین رویشی مشاهده نشد. در آزمایش تولید بذر مصنوعی (آزمایش دوم) جنین‌های رویشی تولید شده با استفاده از کپسول‌های آلژینات کلسیم پوشش‌دار شدند. بدین صورت که جنین‌های رویشی به محیط کشت موراشیگ و اسکوگ کامل (MS) و مایع منتقل شدند و در آلژینات سدیم ۲ و ۳ درصد مخلوط شدند و در محلول کلرید کلسیم چکانده شدند و طی مدت ۱۰ و ۳۰ دقیقه تشکیل کپسول‌های آلژینات کلسیم دادند. یافته‌های این آزمایش نشان داد که در رقم چهل‌چشمه آلژینات سدیم ۲ درصد و کلرید کلسیم ۲۵ میلی مولار و مدت ۳۰ دقیقه و در رقم کوه‌گل آلژینات سدیم ۳ درصد، کلرید کلسیم ۵۰ میلی مولار و زمان ۳۰ دقیقه برای تولید بذر مصنوعی با حداکثر جوانه‌زنی مطلوب بود.

واژه‌های کلیدی: آلژینات سدیم، بذر مصنوعی ، جنین رویشی، کپسول آلژینات کلسیم، محیط کشت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۷۴۳۱۰۰۴۰۶۴ ، پست الکترونیکی: amoradi@yu.ac.ir

مقدمه

گیاه دارویی چویل با نام علمی *Ferulago angulata* متعلق به تیره چتریان (Apiaceae) می‌باشد که در کشورهای ترکیه، سوریه، لبنان، عراق و ایران پراکنش دارد. این گیاه در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی با ارزش است. اسانس آن دارای خاصیت ضدعفونی‌کنندگی، تقویت‌کنندگی و تسکین‌دهندگی است و در درمان بیماری‌های گوارشی، کرم‌های روده و هموروئید مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹). تکثیر گیاه چویل در طبیعت از طریق بذر انجام می‌شود، اما بذر این گیاه دارای دوره خواب طولانی است که عامل محدودکننده‌ای در تکثیر آن می‌باشد (۶).

تکنیک‌های کشت‌بافت پتانسیل بالایی برای تکثیر، ذخیره و دستورزی گیاهان فراهم کرده است (۲). باززایی و تولید گیاهان توسط کشت بافت به دو روش انجام‌پذیر است؛ جنین‌زایی رویشی، که یکی از اهداف آن تولید بذر مصنوعی است، و اندام‌زایی که در این روش گیاه بدون جنین‌زایی به اندام‌زایی می‌رود (۲۰). جنین‌زایی رویشی مانند جنین‌زایی بذری شامل مراحل مختلف ایجاد پیش‌جنین، جنین گویچه‌ای، جنین قلبی شکل، جنین اژدری و لپه‌ای می‌باشد که از مسیر غیرجنسی رخ می‌دهد (۳). در صورت فراهم بودن شرایط مناسب برای جنین‌زایی رویشی، معمولاً بیش از یک جنین از سلول‌های پینه منشأ

می‌گیرد و هر چقدر تعداد جنین در هر پینه بیشتر باشد برای تولید گیاهچه کامل مناسب‌تر است (۵). به عقیده نیومن (۱۵)، شرایطی که گیاهان برای به‌دست آوردن توانایی تمایز و تشکیل جنین رویشی از سلول‌های بدنی خود نیاز دارند، ناشناخته بوده و یا فراهم نمودن آن بسیار مشکل‌تر از آن‌هایی است که به راحتی جنین‌زا می‌باشند. هدی و همکاران (۱۱) در بررسی روی گیاه بادمجان به این نتیجه رسیدند که مهمترین عامل تأثیرگذار بر جنین‌زایی رویشی، ژنوتیپ است.

جنین‌های رویشی به‌دلیل نداشتن هیچ پوشش بذری، به‌وسیله خاصی برای جابه‌جایی در طی انبارداری و کشت مکانیکی نیاز دارند (۱۷). ایجاد حالت رکود (از طریق پسآبش) و کپسول‌دار کردن، روش‌هایی برای دستیابی به این اهداف‌اند (۱۵). کیتو و ژانیک (۱۳) برای اولین بار یک لایه نازک اطراف جنین‌های رویشی هویج با استفاده از پلی اکسی اتیلن که به آسانی محلول در آب است برای تولید بذر مصنوعی ایجاد کردند. ردنباگ و همکاران (۱۶) کاربرد هیدروژل آلژینات سدیم برای تولید بذر مصنوعی را مورد بررسی قرار دادند و قادر به تولید بذر مصنوعی هیدراته یونجه و گیاهی از تیره گندمیان شدند که البته بذرهای مصنوعی تولید شده دارای قابلیت تبدیل شدن به گیاهچه خیلی کمی بودند. آلژینات از علف دریایی قهوه‌ای استخراج می‌شود. ژل آلژینات از طریق جایگزینی یون تک ظرفیتی سدیم با یون دو ظرفیتی کلسیم و در نهایت تشکیل پیوند یونی در شبکه پلیمری پلی‌ساکارید تشکیل می‌شود. استفاده از آلژینات سدیم برای تولید بذرهای مصنوعی از مزایایی مانند عدم سمیت و مستقل بودن از نیاز حرارتی برای فرایند ژل شدن برخوردار است. این فرایند شامل مخلوط کردن واحدهای تکثیری (جنین‌های رویشی) به داخل محلول کلریدکلسیم (۵۰ تا ۳۰۰ میلی‌مولار) است. در نتیجه دانه‌های کوچکی تشکیل می‌شود که در طی ۱۵ دقیقه تا یک ساعت در کلریدکلسیم محکم و سفت می‌شوند. جنین‌هایی که توسط آلژینات پوشش‌دار شده‌اند می‌توانند شرایط نامساعد زمین را بدون خشک شدن تحمل کنند. این بذرها سپس نمو می‌یابند و همانند بذرهای حقیقی می‌توانند به‌طور مستقیم در گلخانه یا زمین کشت شوند (۱۷). بذرهای مصنوعی باید مشابه با بذرهای طبیعی باشند و از قدرت جوانه‌زنی خوب و همچنین ذخیره طولانی مدت در رطوبت پایین برخوردار باشند. به‌طور معمول در کشاورزی و باغبانی برای ازدیاد گیاهان از بذر استفاده می‌شود. تولید بذر مصنوعی می‌تواند جایگزینی برای بذر معمولی باشد (۲).

این پژوهش به‌منظور تعیین تعداد جنین‌های رویشی تشکیل شده روی پینه‌های جنین‌زا و تعیین بهترین درصد آلژینات سدیم، کلرید کلسیم و زمان برای پوشش‌دار کردن جنین‌های رویشی برای تولید بذر مصنوعی در ژنوتیپ‌های چویل اجرا شد.

مواد و روشها

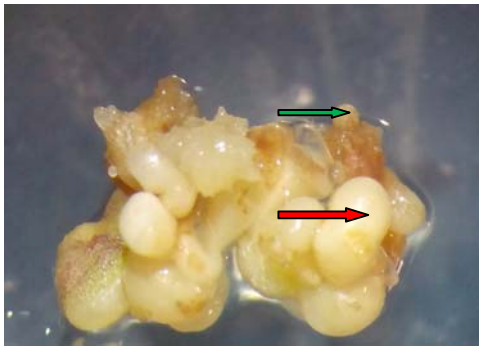
این پژوهش در آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج در سال ۱۳۹۲ در قالب دو آزمایش جداگانه انجام شد. بذرهای مورد استفاده دو ژنوتیپ چویل شامل کوه‌گل که هم‌زمان با رسیدگی کامل از مناطق کوهستانی شهرستان دنا در استان کهگیلویه و بویر احمد و ژنوتیپ چهل چشمه از منطقه چهل‌چشمه در استان فارس اواخر شهریور ماه ۱۳۸۹ جمع‌آوری شدند، بود.

آزمایش اول به‌منظور تعیین بهترین ژنوتیپ با بیشترین تعداد جنین‌های کروی، قلبی و اژدری در پینه‌های جنین‌زا با استفاده از آزمون T با سه تکرار اجرا شد. به‌منظور تحریک جنین‌زایی، ابتدا بذرها با استفاده از مایع ظرفشویی رقیق شده با آب دو بار تقطیر، شسته شدند و بعد با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی گردیده و برای نرم شدن پوسته اطراف جنین، بذرها به مدت ۲-۱ روز درون آب ۲ بار تقطیر نگهداری شدند. بعد از این مدت بذرها به زیر هود منتقل شدند و با

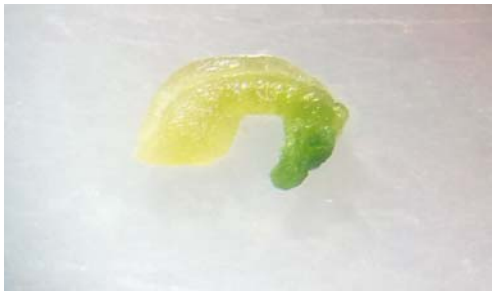
استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه و در نهایت اتانول ۷۰٪ به مدت یک دقیقه دوباره ضدعفونی شدند. بعد از هر بار ضدعفونی، دو برابر مدت زمانی که از مواد ضدعفونی کننده استفاده شد، با آب دو بار تقطیر شستشو شدند تا اینکه اثر مواد ضدعفونی کننده کاملاً پاک شود. پس از انجام مراحل ضدعفونی، زیر دستگاه لامینارایرفلو و در شرایط کاملاً استریل پوسته بذرها با اسکالپل حذف شده و جنین‌ها با کمک پنس و اسکالپل خارج گردیده و روی محیط کشت 1/4MS جامد کشت داده شدند. پس از گذشت سه هفته ریزنمونه‌های ساقه‌چه و ریشه‌چه در ابعاد ۱-۰/۵ سانتی‌متر از گیاهچه‌های حاصل از کشت جنین تهیه شدند و به‌منظور تولید پینه به محیط 1/4MS حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۷ گرم بر لیتر آگار به همراه ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون‌های نفتالین استیک اسید (NAA) و بنزیل آمینوپورین (BAP) منتقل شدند (۵، ۲۹). سپس ظروف کشت در قفسه‌های اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۴±۲ و با میزان نور ۱۵۰ $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ قرار داده شدند. هر دو هفته یکبار به‌منظور تجدید عناصر غذایی، واکشت نمونه‌ها بر روی همان محیط‌های قبلی انجام شد. ۱۲ هفته بعد از تشکیل پینه‌ها، ظهور پیش‌جنین‌ها (شکل ۱) مشاهده شد (۱۴).

شکل ۱- پینه حاوی پیش جنین حاصل از ریزنمونه ریشه‌چه در ژنوتیپ چهل‌چشمه

به‌منظور تحریک جنین‌زایی، پیش‌جنین‌ها به محیطی با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D منتقل شدند و ظروف کشت در قفسه‌های اتاق کشت در دمای ۲±۱۸ و در روشنایی مطلق با میزان نور ۱۵۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه نگهداری شدند (۱۸). بررسی پینه‌ها به‌منظور مشاهده جنین‌های رویشی هر ۳-۲ روز یکبار توسط بینوکولار انجام گردید. با مشاهده جنین‌های کروی (شکل ۲) بر سطح پینه‌های حاصل از ریزنمونه ساقه‌چه در ژنوتیپ کوه‌گل و ریزنمونه ریشه‌چه در ژنوتیپ چهل‌چشمه، اکسین از محیط کشت حذف شد. جنین‌های کروی پس از انتقال به محیط کشت تکامل جنین (محیط کشت 1/4MS فاقد هورمون)، مراحل نموی را که شامل جنین قلبی شکل (شکل۲) و اژدری شکل (شکل۳) بود طی دو هفته کامل کردند. بعد از مشاهده جنین‌های اژدری تعداد جنین‌های کروی، قلبی و اژدری تشکیل شده بر سطح سه پینه جنین‌زا از هر ظرف در هر ژنوتیپ شمارش شد.



شکل ۲- جنین کروی با پیکان قرمز و جنین قلبی با پیکان سبز در گیاه چویل نشان داده شده است.



شکل ۳- جنین اژدری جدا شده از سطح پینه جنین‌زا در ژنوتیپ چهل‌چشمه

برای تولید بذر مصنوعی (آزمایش دوم) در زیر هود لامینارایرفلو ۳۰ میلی‌لیتر محیط MS اتوکلاو شده فاقد هورمون و آگار داخل ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و پینه‌های جنین‌زا حاوی جنین اژدری به این محیط مایع منتقل شدند. دهانه ارلن‌ها به خوبی مهر و موم شد و برای جدا شدن جنین‌های رویشی از سطح پینه‌ها، ارلن‌ها به انکوباتور شیکر مجهز به روشنایی با ۱۰۰ دور در دقیقه انتقال داده شدند. بعد از سه روز محیط حاوی جنین‌ها ابتدا از الک شمارهٔ ۲۰ (از جنس فولاد ضد زنگ قابل اتوکلاو با مش ۸۴۱ میکرومتر) عبور داده شد، سپس مخلوط حاصل از الک شمارهٔ ۴۰ (مش ۴۰۰ میکرومتر) گذرانده شد تا جنین‌ها به طور کامل جدا شوند. جنین‌های باقی مانده بر روی الک ۴۰ با آلژینات سدیم دو و سه درصد (w/v) ترکیب شدند. برای تهیه آلژینات سدیم ۳ درصد، شش گرم پودر آلژینات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و به‌وسیله اتوکلاو استریل گردید. بعد از اتوکلاو نمودن، به‌منظور تأمین مواد غذایی بذرهایی که توسط این ترکیب پوشش‌دار خواهند شد، تحت شرایط استریل، ۱۰۰ میلی‌لیتر MS کامل فاقد آگار (مایع) را با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول آلژینات سدیم شش درصد مخلوط نموده تا ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول آلژینات سدیم سه درصد حاصل شود، برای تهیه آلژینات سدیم ۲ درصد تمام مراحل بالا با ۴ گرم پودر آلژینات سدیم تکرار شد (۱). آلژینات سدیم ۲ و ۳ درصد حاوی جنین، توسط قطره چکان به صورت قطره قطره در محلول کلرید کلسیم ۲۵ و ۵۰ میلی مولار (اتوکلاو و سرد شده) چکانده شد. تشکیل بذرهای مصنوعی در مدت زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه در این محلول بررسی شد. بعد از این مدت، برای شسته شدن یون‌های اضافی از سطح بذرها، سه بار آب‌کشی با آب مقطر استریل انجام شد. با استفاده از کاغذ صافی استریل آب اضافی سطحی خشک گردید و در نهایت تعداد پنج بذر مصنوعی در ظروف کشت حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط 1/4MS جامد کشت شد و ظرف‌های کشت به قفسه‌های اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و با میزان نور ۱۵۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه قرار داده شدند. بعد از چهار هفته صفت درصد جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی با مشاهده رشد ساقه‌چه و ریشه‌چه اندازه‌گیری شد.

آزمایش تولید بذر مصنوعی هیدراته با حداکثر درصد جوانه‌زنی (آزمایش دوم)، به‌منظور تعیین مناسب‌ترین درصد آلژینات سدیم، کلرید کلسیم و زمان برای پوشش‌دار کردن جنین‌های رویشی به صورت فاکتوریل سه عاملی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بر روی بستر کشت محیط پایه 1/4MS اجرا گردید. عامل‌های آزمایش شامل آلژینات سدیم در دو سطح ۲ و ۳ درصد، کلرید کلسیم در دو سطح ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار و زمان در دو سطح ۱۰ و ۳۰ دقیقه بودند. تجزیه‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گردید. به‌منظور ارزیابی نرمال بودن داده‌ها از نرم افزار Minitab و برای نرمال نمودن داده‌ها از تبدیل زاویه‌ای (Arc SinX) استفاده شد. مقایسه میانگین اثرهای اصلی به روش LSD در سطح ۱ درصد و در صورت معنی‌دار بودن برهم‌کنش‌ها، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از رویه L.S. Means در سطح ۵ درصد انجام شد. در رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ برای تعداد جنین کروی، قلبی و اژدری تشکیل شده در پینه جنین‌زا (جدول ۱) نشان داد که در مورد تعداد جنین کروی، قلبی

و اژدری شکل هر دو ژنوتیپ در سطح احتمال ۵٪ پاسخ یکسانی نشان دادند و ژنوتیپ‌ها از لحاظ تعداد جنین‌های کروی، قلبی و اژدری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند.

نتایج تجزیه واریانس برای تأثیر تیمارها بر درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی در ژنوتیپ چهل‌چشمه (جدول ۲) نشان داد که کلیه اثرهای اصلی، برهم‌کنش دوگانه و برهم‌کنش آلژینات سدیم، کلرید کلسیم و زمان در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد.

جدول ۱- نتایج آزمون t مقایسه دو ژنوتیپ چویل برای تعداد جنین کروی، قلبی و اژدری تشکیل شده در پینه جنین‌زا

منابع تغییر	اختلاف میانگین	خطای معیار	T	Prob>T
تعدادجنین کروی کوه‌گل-تعدادجنین کروی چهل‌چشمه Number of globular embryo in Koohgol- Number of globular embryo in Chehel-cheshmeh	0.666	0.333	2	0.183^{ns}
تعدادجنین قلبی کوه‌گل-تعدادجنین قلبی چهل‌چشمه Number of heart embryo in Koohgol- Number of heart embryo in Chehel-cheshmeh	-0.666	0.333	-2	0.183^{ns}
تعدادجنین اژدری کوه‌گل-تعدادجنین اژدری چهل‌چشمه Number of torpedo embryo in Koohgol- Number of torpedo embryo in Chehel-cheshmeh	0.333	0.333	1	0.423^{ns}

جدول۲- میانگین مربعات منابع تغییر برای درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی ژنوتیپ‌های چویل

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی چهل چشمه	درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی کوه‌گل
آلژینات سدیم sodium alginate	1	4161.85^{**}	3037.5^{**}
کلرید کلسیم calcium chloride	1	1215.87**	3037.5^{**}
زمان Time	1	12669.99*	11636^{**}
آلژینات سدیم × کلریدکلسیم calcium chloride× Sodium alginate	1	173.69**	5.54^{ns}
آلژینات سدیم × زمان time×sodium alginate	1	4161.85**	3037^{**}
کلریدکلسیم × زمان time×calcium chloride	1	173.69*	3037^{**}
آلژینات سدیم × کلریدکلسیم × زمان calcium chloride×sodium alginate time×	1	266.67**	5.54^{ns}
خطا	16	29.40	11.09
ضریب تغییرات(٪) CV(%)		23.60	15.12

*و** به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی دار می‌باشد.

این نتایج بیانگر متفاوت بودن اثر آلژینات سدیم، کلرید کلسیم و زمان بر درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی در ژنوتیپ چهل‌چشمه است. نتایج تجزیه واریانس برای تأثیر تیمارها بر درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی در ژنوتیپ کوه‌گل (جدول۲) نشان داد که برهم‌کنش آلژینات سدیم، کلرید کلسیم و زمان و برهم‌کنش دوگانه آلژینات سدیم و کلرید کلسیم معنی‌دار نشد، اما کلیه اثرهای اصلی و سایر برهم‌کنش‌های دوگانه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد.

مقایسه میانگین برهم‌کنش آلژینات سدیم، کلرید کلسیم و زمان در رقم چهل‌چشمه (جدول ۳) نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی (۹۳/۳۳ درصد) مربوط به آلژینات سدیم دو درصد، کلرید کلسیم ۲۵ میلی مولار و زمان ۳۰ دقیقه بود و تیمار آلژینات سدیم دو درصد، کلرید کلسیم ۵۰ میلی مولار و زمان ۳۰ دقیقه با ۸۰ درصد جوانه‌زنی در جایگاه بعدی قرار داشت. در این ژنوتیپ گیاهچه‌هایی بدشکل و غیر طبیعی حاصل جوانه‌زنی جنین‌های رویشی پوشش‌دار شده، مشاهده شد (شکل ۳). در میان سطوح فاکتورهای مختلف تیمارهای ترکیبی با زمان ۱۰ دقیقه جوانه‌زنی از خود نشان ندادند و جنین‌های رویشی داخل پوشش قهوه‌ای شدند (شکل ۴).

شکل۴- جنین بذری جوانه‌زده (چپ) و گیاهچه حاصل از بذرمصنوعی (راست) در ژنوتیپ چهل‌چشمه

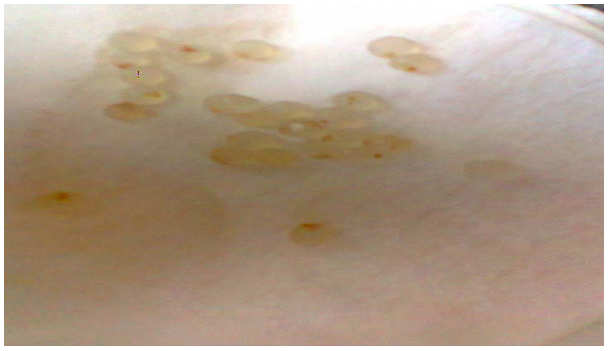
جدول ۳- مقایسه میانگین برهمکنش آلژینات سدیم، کلرید کلسیم و زمان بر درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی ژنوتیپ چهل چشمه چویل

تیمار treatment			درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی چهل چشمه Percentage of artificial seed germination in Chehlcheshmeh
آلژینات سدیم sodium alginate	کلرید کلسیم calcium chloride	زمان Time	
2درصد	25میلی‌مولار	۱۰دقیقه 10min	0^{d}
		۳۰دقیقه 30min	93.33^{a}
	50میلی‌مولار	۱۰دقیقه 10min	0^{d}
		۳۰دقیقه 30min	80^{b}
3درصد	25میلی‌مولار	۱۰دقیقه 10min	0^{d}
		۳۰دقیقه 30min	40^{c}
	50میلی‌مولار	۱۰دقیقه 10min	0^{d}
		۳۰دقیقه 30min	0^{d}

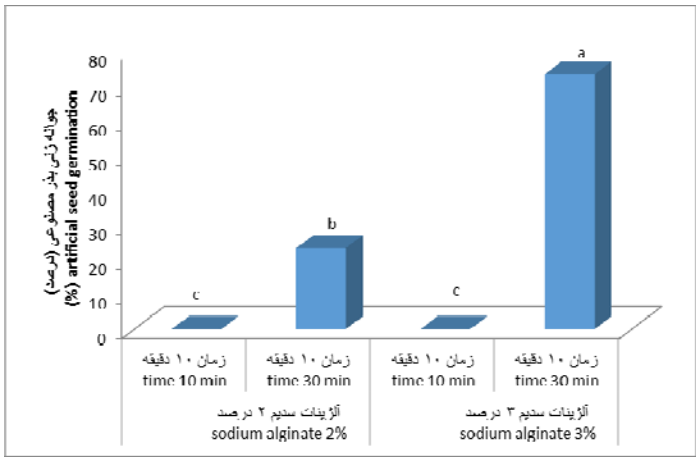
در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند از نظر آماری در سطح ۵ در صد تفاوت معنی‌داری ندارند.

بذرهای مصنوعی تشکیل شده در ژنوتیپ کوه‌گل در حضور آلژینات سدیم سه درصد در زمان ۳۰ دقیقه حداکثر جوانه‌زنی (۷۳/۳۳ درصد) را نشان دادند، اما در زمان ۱۰ دقیقه هیچ‌گونه جوانه‌زنی بذر مصنوعی در این ژنوتیپ نیز مشاهده نشد (شکل ۵).

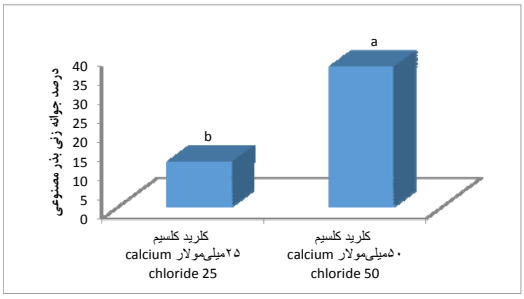
مقایسه اثرات ساده سطوح کلرید کلسیم نشان داد که افزایش غلظت این ترکیب به میزان زیادی بر جوانه‌زنی ژنوتیپ کوه گل مؤثر بوده و بذرهای پوشش دار شده با کلرید کلسیم ۵۰ میلی مولار جوانه‌زنی (۷۳/۳۳ درصد) بیش از دو برابر بذرهای پوشش دار شده با غلظت ۲۵ میلی مولار داشتند (شکل ۶).



شکل۵- بذر مصنوعی فاقد جوانه‌زنی به دلیل سختی پوسته بذر



شکل ۶- مقایسه میانگین برهم کنش درصدآلژینات سدیم و زمان بر جوانه‌زنی بذر مصنوعی ژنوتیپ کوه‌گل چویل



شکل۷ – مقایسه میانگین اثر غلظت کلرید کلسیم بر درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی ژنوتیپ کوه‌گل چویل

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اثر سطوح مختلف تیمارهای پوششی بر جوانه‌زنی بذرهای دو ژنوتیپ چویل متفاوت بود. برخی سطوح غلظت‌های مختلف ترکیبات پوششی و نیز زمان مورد نیاز برای تشکیل پوشش مناسب بر جوانه‌زنی بذرهای هیدراته حاصل شده نیز مؤثر بود. نتایج همچنین نشان داد که در صورت فراهم بودن شرایط مناسب برای جنین‌زایی رویشی، معمولاً بیش از یک جنین از سلول‌های پینه منشأ می‌گیرد و هر چقدر تعداد جنین در هر پینه بیشتر باشد احتمال تشکیل گیاهچه کامل بیشتر است.

مشایخی (۵) گزارش کرد که به‌دست آوردن توانایی جنین‌زایی رویشی و پیچیده بودن شرایط مورد نیاز آن به غیر از نوع گیاه به عوامل دیگری مانند نوع بافت و شرایط محیط کشت نیز بستگی دارد. در این تحقیق مشاهده شد که هر دو ژنوتیپ پاسخ یکسانی به تشکیل تعداد جنین رویشی نشان دادند که با گزارش هانالت و ماتار (۱۲) در مورد ارقام رازیانه مطابقت دارد. این در حالی است که در گزارش‌های دیگری بیان شده است که تعداد جنین‌های رویشی در پاسخ به ژنوتیپ متفاوت خواهد بود (۱۰). میرعباسی و همکاران (۷) در گیاه نارون ملج گزارش نمودندکه اثر ژنوتیپ بر جنین‌زایی رویشی به وضوح قابل مشاهده است. گردکانه و ارجی (۴) در مقایسه توانایی جنین‌زایی رویشی در سه رقم توت فرنگی نشان دادند که رقم و نوع ریزنمونه اثر معنی‌داری بر جنین‌زایی رویشی دارد. مشایخی (۵) بیان می‌کند که به‌دست آوردن توانایی جنین‌زایی رویشی و پیچیده بودن شرایط مورد نیاز آن به غیر از نوع گیاه به عوامل دیگری مانند نوع بافت و شرایط محیط کشت نیز بستگی دارد.

نتایج همچنین نشان داد که استفاده از آلژینات سدیم دو یا سه درصد برای بررسی درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی به زمان قرارگیری جنین‌های رویشی ترکیب شده با آلژینات سدیم در کلرید کلسیم بستگی دارد. کمترین درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی (صفر درصد) مربوط به زمان ۱۰ دقیقه بود که این خود بیانگر مناسب نبودن مدت زمان لازم برای قرار گرفتن در معرض کلرید کلسیم برای سخت شدن کپسول‌های آلژینات کلسیم برای این ژنوتیپ بود (۹). تیمبرت و همکاران (۲۱) بذر مصنوعی هویج را در غلظت ۱ درصد آلژینات سدیم، کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار و مدت زمان ۲۰ دقیقه تولید کردند. این در حالی است که در گزارشی در مورد تولید بذر مصنوعی در گیاه سیر منتشر شده است و زمان ۳۰ دقیقه بهترین مدت زمان برای قرار گرفتن در معرض کلرید کلسیم برای سخت شدن کپسول‌های آلژینات کلسیم بود (۹).

در این پژوهش از محیط کشت MS آماده استفاده شد و امکان حذف کلرید کلسیم از این محیط وجود نداشت، ولی فرایند تعویض یون‌ها به خوبی انجام شد و یون‌های سدیم به وسیله یون‌های کلسیم جایگزین و کپسول‌های آلژینات کلسیم تشکیل شدند و جنین‌های رویشی چویل را احاطه کردند. ردنباگ و همکاران (۱۷) گزارش کردند که برای تشکیل کپسول آلژینات کلسیم و انجام فرایند تعویض یونی حذف Ca^{2+} از محیط MS ضروریست، اما در پژوهش موجود بدون حذف یون کلسیم کپسول آلژینات کلسیم تشکیل شد.

نتایج همچنین نشان داد که پاسخ جوانه‌زنی به سطوح مختلف فاکتور آلژینات سدیم به ژنوتیپ بستگی دارد، به‌طوری‌که ژنوتیپ چهل چشمه در غلظت آلژینات سدیم ۲ درصد و ژنوتیپ کوه‌گل در غلظت ۳ درصد جوانه‌زنی بهتری داشتند. نتایج حاصل از تأثیر غلظت آلژینات سدیم و کلرید کلسیم و مدت زمان در جوانه‌زنی کپسول‌های توت فرنگی نشان داد که در غلظت کمتر آلژینات سدیم (۲٪) کپسول‌ها ضعیف بودند و نوک ساقه‌چه خشکید و قهوه‌ای شد. در سطوح بالاتر آلژینات سدیم (۴٪) کپسول‌ها سخت شدند و از رشد پروپاگول‌ها جلوگیری کرد. بنابراین

غلظت سه درصد آلژینات سدیم را مطلوب گزارش کردند (۸). سلیمی و همکاران (۱) جنین‌های رویشی گیاه بریش را در محیط MS فاقد کلرید کلسیم، دارای آلژینات سدیم یک درصد قرار دادند و مخلوط را در محلول ۵۰ میلی مولار کلرید کلسیم چکاندند و پس از ۳۰ دقیقه موفق به تولید بذر مصنوعی شدند که بعد از ۷-۶ هفته بذرها روی محیط 1/2 MS جامد به گیاهچه کامل تبدیل شدند. معنی دار نبودن اثر متقابل آلژینات سدیم و کلریدکلسیم نشان می‌دهد که این دو عامل به صورت مستقل از هم بر درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی ژنوتیپ کوه‌گل اثر می‌گذارند که خود مؤید نقش ژنوتیپ در پاسخ به تیمارهای مختلف پوشش دار کردن جنین است.

در این پژوهش بذرهای مصنوعی چویل در کلیه تیمارها تشکیل شدند، اما به دلیل آلودگی باکتریایی به دلیل آبدار بودن بذرهای مصنوعی به‌ویژه در تیمار زمان ۱۰ دقیقه که بذرهای مصنوعی به خوبی سفت نشدند و آبدار بودند، درصد جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی کاهش یافت. در این پژوهش برای کنترل آلودگی باکتریایی جهت بررسی جوانه‌زنی بذر مصنوعی هر دو روز یکبار محیط کشت بذرهای مصنوعی عوض شد و بذرها به محیط 1/4 MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک (آموکسی سیلین) منتقل شدند. بعد از کشت بذرهای مصنوعی کنترل آلودگی آنها بسیار دشوار بود و به‌همین دلیل امکان انتقال گیاهچه‌های کامل تشکیل شده به خاک وجود نداشت، زیرا بعد از مدتی که محیط آنها عوض شد گیاهچه‌ها زرد شدند و از بین رفتند. مواد شیمیایی محافظ برای حفاظت بذر مصنوعی از آلودگی قارچی و باکتریایی به‌کار برده می‌شود. برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی گاناپاتی و لیو (۱۲) ترکیبی شامل ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپیکین (rifampicin)، ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفاتوکسیم (cefatoxime) و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر تتراسایکلین (tetracycline-HCl) را در پنج میلی‌لیتر دی متیل سولفات (dimethylsulphate) حل کردند و به‌عنوان ترکیب آنتی بیوتیک (۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) به ژل ماتریکس افزودند.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش پاسخ هر دو ژنوتیپ چویل به تشکیل جنین رویشی یکسان ولی پاسخ به سطوح تیمارهای مختلف پوششی تقریباً متفاوت بود. در ژنوتیپ چهل‌چشمه گیاه چویل ثابت شد و آلژینات سدیم ۲ درصد و کلرید کلسیم ۲۵ میلی مولار و مدت ۳۰ دقیقه و در ژنوتیپ کوه‌گل آلژینات سدیم ۳ درصد، کلرید کلسیم ۵۰ میلی مولار و زمان ۳۰ دقیقه برای تولید بذر مصنوعی مطلوب بود. با توجه به اینکه هدف از تولید بذر مصنوعی ایجاد جایگزینی به‌عنوان بذر حقیقی که دارای مشکلات جوانه‌زنی هستند، می‌باشد. بنابراین باید تلاش در جهت یافتن راه حلی برای افزایش کیفیت جنین و نسبت رشد مناسب در شرایط درون شیشه و مزرعه انجام شود.

منابع

۱. سلیمی، ز.، شریف زاده، ف.، امیدی، م.، زارع، ا. و اولادزاد، ا. (۱۳۹۰). تولید بذر مصنوعی گیاه بریش برای اولین بار در دنیا. دومین همایش ملی علوم و تکنولوژی بذر. ص ۲۲۳۳-۲۲۳۵.

۲. شریفی، ا.، مشتاقی، ن. و باقری، ع. (۱۳۸۹). کشت بافت گیاهی کاربردی برخی از محصولات زراعی، باغی و زینتی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۴۷۹ صفحه.

۳. قاسمیان، خ.، ناظری، س.، چهرگانی راد، ع. و میرزایی اصل، ا. (۱۳۹۰). مراحل رویان‌زایی سوماتیکی حاصل از رویان بذری درگیاه وشا (*Dorema ammoniacum* L.). مجله علمی – پژوهشی سلول و بافت ، ۳(۱): ۲۷-۲۱.

۴. گردکانه، م. و ارجی، ع. (۱۳۹۳). اثر NAA و ریزنمونه اندام‌های مختلف بر جنین‌زایی ثانویه توت فرنگی (*Fragaria ananassa* Duch.) . مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۷ (۳): ۵۰۱-۵۱۰.

۵. مشایخی، ک. (۱۳۸۶). جنین زایی رویشی گیاهی. انتشارات مختومقلی فراغی. ۴۸۳ صفحه.

۶. موحدی دهنوی، م. (۱۳۹۰). تأثیر تیمارهای شکستن خواب بذر بر جوانه‌زنی و بنیه گیاهان دارویی چویل، کرفس کوهی، زیره سیاه ایرانی، بادرنجبویه، سرخارگل و زیره سبز. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. دانشگاه یاسوج. ۶۹ صفحه.

۷. میرعباسی، س.م.، حسین پور، ب.، قائم مقامی، س.ع. و سنجابی، م.ر. القای جنین های سوماتیکی اولیه از جداکشت برگ در نارون ملج (*Ulmus glabra*) . مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۸ (۴): ۸۸۵-۸۹۴.

8. Badr-Elden, A. (2013). An Effective Protocol for in vitro Storage and ex vitro Re-Growth of Strawberry Capsules. Atlas. J. of Chemis and Biochemist, 1(2): 30–38.

9. Bekheet, S.H. (2006). A synthetic seed method through encapsulation of in vitro proliferated bulblets of garlic (*Allium sativum* L.). Arab. J. Biotech, 9(3): 415-426.

10. Ganapathy, S., and Liu, R.S.H. (1992). Photoisomerization of sixteen isomers of retinal initial product distribution in direct and sensitized irradiation. Photochemist and Photobio, 56(6): 959-964.

11. Huda, A.K.M.N., Rahman, M., and Bari, M.A. (2007). Effect of carbon source in alginate bead on synthetic seed germination in eggplant (*Solanum melongena* L.). Plant Sci, 2(5): 538-544.

12. Hunault, G., and Maatar, A. (1995). Enhancement of somatic embryogenesis frequency by gibberellic acid in fennel. Plant Cell Tissue and Organ Cult, 41(2):171-176.

13. Kitto, S., and Janick, J. 1982. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. Hort sci, 17:488.

14. Mohanraj, R., Anthan, R., and Bai, V.N. (2009). Production and Storage of Synthetic Seeds in *Coelogyne breviscapa* Lindl. Asian. J. of Biotech, 1(3): 124-128.

15. Neumann, K.H. (1995). Pflanzliche Zell und Gewebekulturen. Verlag Eugen Ulmer, 304p.

16. Redenbaugh, K., Nichol, J.W., Kossler, M.E., and Paasch, B.D. (1984). Encapsulation of somatic embryos and for artificial seed production. In Vitro Cell Development Bio—Plant, 20:256–7.

17. Redenbaugh, K., Slade, D., Viss, P., and Fujii, J.A. (1987). Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats, HortScience. 22:803–809.

18. Suprasanna, P., Ganapathi, T.R., and Bapat. V.A. (2006). Synthetic seeds technology. In: Basra, A. S. (ed), Handbook of seed science and technology. Food product press, an Imprint of the Haworth press, 227-267p.

19. Tabassum, B., Ahmad Nasir, I., Munim Farooq, A., Rehman, Z., Latif, Z., and Husnain, T. (2010). Viability assessment of in vitro produced synthetic seeds of cucumber. African. J. of Biotech, 9(42): 7026-7032.

20. Theiler, H., and Kagi, A. (1991). Cloning in vitro and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare* (fennel) of zeta fino and zefa tard. Acta Hort, 300(1):287-291.

21. Timbert, R., Barbotin, J.N., and Thomas, D. (1996). Effect of sole and combined pre-treatments on reserve accumulation, survival and germination of encapsulated and dehydrated carrot somatic embryos. Plant Sci, 120: 223-231.

Synthetic hydrated seed production in medicinal plant of Chavil (*Ferulago angulata* L.) through encapsulation of somatic embryos

Sorbi E. and Moradi A.

Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, I.R. of Iran

Abstract

Artificial seed production can be considered as an alternative method to overcome the problems of cultivation, propagation and conservation of medicinal plants. For this purpose, artificial seed production using somatic embryos of two genotypes of Chavyl (*Ferulago angulata* L.) (Chehlcheshme and Koohgol) was evaluated in two separate experiments. In the experiment of investigation of the number of somatic embryos (the first experiment), after observing the torpedo embryos, number of globular, heart and torpedo embryos formed on the surface of embryogenic callus were counted that the significant difference was not observed between the two genotypes in the number of somatic embryos. In the artificial seed production experiment (second experiment) produced somatic embryos were sealed using calcium alginate capsules. In this way that somatic embryos were transferred to liquid full Murashige and Skoog growth medium (MS) and mixed with sodium alginate 2 and 3% and were dropped in calcium chloride solution, calcium alginate capsules were formed within 10 and 30 minutes. The results of this experiment showed that for Chehlcheshme variety complex treatment of sodium alginate 2% and calcium chloride 25 mM for 30 minutes and for Koohgol variety complex treatment of sodium alginate 3%, calcium chloride 50 mM for 30 minutes were good to produce artificial seeds with maximum germination.

Key words: Sodium alginate, synthetic seed, somatic embryo, calcium alginate capsule, growth medium