القای جنین‌های سوماتیکی اولیه از جداکشت برگ در نارون ملج (*Ulmus glabra*)

سیده مریم میرعباسی[۱]، بتول حسین‌پور[۲*]، سیدعلی قائم‌مقامی[۳] و محمد رضا سنجابی[۲]

[۱] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

[۲] تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده کشاورزی، گروه تولیدات گیاهی و کشاورزی پایدار

[۳] تهران، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۲۵

چکیده

نارون ملج (*Ulmus glabra*) گونه ای جنگلی است که از لحاظ اقتصادی ارزش بالایی دارد اما به دلیل حساسیت به بیماری مرگ هلندی، نارون در معرض نابودی قرار گرفته است. به همین دلیل تکثیر درون شیشه این گیاه جهت اصلاح ژنتیکی آن حائز اهمیت است. در این تحقیق برای اولین بار جنین‌های سوماتیک کروی شکل بطور مستقیم از جداکشت برگ گیاهان درون شیشه ای به دست آمد. در آزمایش اول ریزنمونه های دو ژنوتیپ مختلف بر روی محیط MS حاوی BA یا Kin و یا TDZ در شرایط نوری کشت شدند. آزمایش دوم شامل محیط MS حاوی ۲۰۰ میلی گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات به همراه غلظت های متفاوتی از 2,4-D و Kin در شرایط تاریکی بود. در آزمایش سوم محیط MS ½ همراه با ۲۰۰ میلی گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات و سطوح پایین 2,4-D به همراه سطوح مختلف Kin در شرایط نور یا تاریکی آزمون شد. جنین های سوماتیک کروی شکل به صورت مستقیم در تیمارهای آزمایش سوم و در ژنوتیپ شماره دو تولید شد. درصد جنین زایی در اکثر تیمارهای آزمایش سوم صددرصد بود اما بالاترین میانگین تعداد جنین به ازای هر جداکشت مربوط به تیمار ۰/۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D (۶۰/۴۸) و تیمار ۰/۴ میلی گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin (۴۷/۷۶) می باشد. نتایج نشان داد که درصد جنین زایی و میانگین تعداد جنین به ازای هر جداکشت در شرایط تاریکی در مقایسه با شرایط نوری بسیار بالاتر بود.

واژه‌های کلیدی: *برگ، جنین‌زایی سوماتیکی، ملج*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۷۳۴۱۵۴۴ ، پست الکترونیکی: hosseinpour@irost.ir

مقدمه

گونه نارون ملج (*Ulmus glabra*) از گونه های بسیار با ارزش جنگلی است که به دلیل قطع بی رویه و کاهش جمعیت این گونه و از طرفی حساسیت به بیماری مرگ هلندی نارون در حال انقراض می‌باشد. به همین دلیل وجود یک روش تکثیر درون شیشه ای برای این گیاه جهت حفظ ذخایر ژنتیکی باقی مانده در این گونه و همچنین اصلاح مولکولی آن حائز اهمیت است. جنین زایی سوماتیکی یکی از روش های تکثیر درون شیشه ای است که نسبت به روشهای دیگر مزیت هایی از لحاظ کاهش دوره تکثیر و بالا بودن راندمان تولید دارد.

در ایران گونه نارون ملج در ارتفاعات متوسط و فوقانی جنگل های شمال از ارسباران و آستارا و طالش تا کجور مازندران و گرگان انتشار دارد. چوب درختان نارون به خصوص ملج در ردیف یکی از بهترین چوب های صنعتی است که حدود ۳/۵ تا ۴ درصد از میزان بهره برداری سالیانه کلیه چوب‌های جنگلی ایران را تشکیل می دهد. به طوری‌که حدود چهار درصد حجم تجارتی جنگل های شمال را درختانی از گونه های ملج و اوجا (*U. minor*)

تشکیل می‌دادند. اما امروزه به دلیل گسترش بیماری "مرگ هلندی نارون" و زوال، حدود کمتر از یک درصد از این حجم تجاری به گونه های ملج و اوجا تعلق دارد (۲۳).

امکان انتشار عامل بیماری به وسیله سوسک های پوستخوار خانواده Scolytidae، این بیماری را از خیلی از بیماری های مشابه متمایز می کند (۲). پاتوژن منتقل شده توسط این سوسکها قارچی است به نام *Ophiostoma novo-ulmi* که به صورت سیستمیک در گیاه پراکنده شده و باعث انسداد و ایجاد حفره در آوندهای چوبی و سرانجام علائم پژمردگی می شود (۲۳).

در ایران طی چهل سال گذشته حدود یک میلیون درخت نارون اوجا و ملج بر اثر این بیماری از بین رفته اند. با شیوع بیماری، اروپا و آمریکای شمالی اقدام به کنترل بیماری با استفاده از روشهای شیمیایی و بیولوژیکی کردند (۱۰). به طور کلی این روش ها پر زحمت و پر هزینه بوده و تأثیرات مثبت کمی داشته اند. برنامه اصلاحی و انتخاب نیز در کشورهای خارجی ازجمله باعث معرفی درختان متحمل به این بیماری با درجات متفاوت شده است اما مقاومتی که طی برنامه اصلاحی بوجود می آید احتمالا کمی بوده و از طرفی تکثیر سوماکلونال درختان باعث کاهش تنوع ژنتیکی و افزایش آسیب‌پذیری آنها می‌شود. در نتیجه حساسیت آنها به مسائل محیطی مثل آفات و بیماری های جدید افزایش می یابد. به علاوه اینکه روش‌های اصلاح درختان نیاز به زمان بسیار طولانی دارد.

ریزازدیادی در گونه های مختلف خانواده نارون گزارش شده است (۱۱). در نارون ملج ریزازدیادی با استفاده از جوانه های جانبی توسط بیروسیکوا و همکاران مطالعه شده است (۴). ذبیحی و همکاران (۲۰۰۸) کالوس زایی و باززایی از گره های درخت نارون ملج و همچنین شاخه زایی از جوانه های جانبی را گزارش کردند (۱). اما ریزازدیادی از طریق القای جنین سوماتیکی به دلیل دارا بودن همزمان ساختار دوقطبی ساقه و ریشه نیازی به تغییر محیط کشت و محرک های هورمونی متفاوت جهت اندام زایی ندارد و به لحاظ کاهش زمان مورد نیاز جهت تکثیر بیشتر مورد توجه اصلاحگران می‌باشد (۱۵). جنین زایی سوماتیکی به دو صورت غیرمستقیم (به واسطه کالوس) و یا مستقیم (بدون ایجاد کالوس) می تواند تشکیل شود که در حالت مستقیم ضمن صرف زمان کمتر و پایداری ژنتیکی، بسیار برتر می باشد (۱۹،۱۸،۱۷،۱۶). کاند و همکاران (۲۰۰۴) با استفاده از برگ گیاهان حاصل از تکثیر درون شیشه گونه نارون اوجا توانستند جنین غیرمستقیم تولید کنند (۶). کوریدورا و همکاران (۲۰۰۲) نیز با استفاده از بذرهای نارس نارون اوجا و ملج جنین های ناقص به دست آوردند (۸). اما جنین زایی از طریق بذر چندان مورد توجه اصلاحگران نیست، زیرا بذرهای متفاوت ژنوتیپهای متفاوتی خواهند داشت، ضمن اینکه از بین رفتن بذر مورد نظر معادل از بین رفتن یک ژنوتیپ خاص می باشد (۲۶ و ۲۷). تاکنون فقط جنین سوماتیکی غیرمستقیم در گونه های خانواده نارون گزارش شده است (۶). در این تحقیق برای اولین بار جنین های سوماتیک کروی شکل به طور مستقیم بر روی برگ های درخت ملج بدست آمد و نشان داده شد که القای جنین سوماتیک به طور مستقیم در این گونه امکان‌پذیر می باشد.

مواد و روشها

به منظور ریز ازدیادی، دو پایه قوی و چند ساله نارون در فصل بهار انتخاب شد. جوانه های جانبی از شاخه های یکساله به طول ۱۰ تا ۲۰ سانتیمتر و قطر ۰/۴ تا ۰/۷ سانتی متر از قسمت تاج درخت جدا شدند. جوانه ها ابتدا با مایع ظرفشویی و آب جاری به مدت نیم ساعت شستشو داده شده و با پرسیدین (پراستیک اسید(peraceticacid)) یک دهم درصد حاوی دو تا سه قطره توین به مدت ۱۵ – ۱۰ دقیقه ضد عفونی شدند. سپس با آب مقطر استریل حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر پودر اسید سیتریک و به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند. جوانه های فلس‌دار به مدت ۱۵

دقیقه و جوانه های جوانتر که فاقد فلس بودند و یا جوانه های انتهایی به مدت ۱۰ دقیقه با این روش ضدعفونی شدند. جوانه های فلس‌دار فلس‌برداری شده و به ریزنمونه های دو تا سه سانتیمتری که هر یک دارای حداکثر دو جوانه بودند، تقسیم شدند. در مرحله استقرار ریزنمونه های جوانه‌دار به شیشه های مک کارتی حاوی محیط WPM (Woody Plant Medium) و ۰/۴ میلی گرم در لیتر BAP (Banzil Amino Purin) منتقل شدند. در مرحله پرآوری جوانه هایی که پس از حدود چهار هفته تولید شاخساره به طول حدود سه سانتی متر کردند درون شیشه های مربایی حاوی محیط MS به همراه ۰/۲ میلی گرم در لیتر Topolin و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر آهن سکوسترین، ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۵/۷ گرم در لیتر آگار Duchefa (pH ۵/۷) واکشت شدند. ریزنمونه‌های برگی جهت آزمایش جنین زایی از سه برگ انتهایی نزدیک به مریستم و به ابعاد پنج میلی متر مربع جدا شده و با اسکالپل بر روی قطعات برگی زخم وارد شد. برای القای جنین زایی سه آزمایش انجام شد. در آزمایش اول از محیط MS (Murashige and Skoog) حاوی یکی از هورمون های BA (6-benzyl Adenine) یا Kinetin و یا TDZ (Thidiazuron) هریک با مقادیر ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و۱ میلی گرم در لیتر (در کل ۱۲ تیمار) استفاده گردید. قطعات برگ هر دو ژنوتیپ بر روی هر تیمار کشت شده و در روشنایی قرار داده شدند. هر تیمار شامل چهار تکرار بوده و هر تکرار نیز حاوی پنج قطعه برگ بود. آزمایش دوم بر روی محیط پایه MS حاوی ۲۰۰ میلی گرم کازئین هیدرولیزات ، ۳۰ گرم سوکروز و ۵/۷ گرم آگار (pH ۵/۷) و سطوح بالای 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid)(۰،۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با Kin (۰، ۰/۱، ۰/۲ میلی گرم در لیتر) انجام شد. مجموعا ۱۵ تیمار به ازای هر ژنوتیپ اختصاص یافت که هر تیمار شامل چهار تکرار و هر تکرار شامل پنج قطعه برگ بود. تیمارها در دمای ۲۵ درجه و در تاریکی قرار داده شدند. در آزمایش سوم محیط پایه½MS حاوی ۲۰۰ میلی گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات، ۱۵ گرم در لیتر سوکروز و ۵/۷ گرم در لیتر آگار (pH ۵/۷) و سطوح پایین 2,4-D و Kin مورد استفاده قرار گرفت. تیمارهای مورد آزمایش شامل موارد زیر بودند:

۰/۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D و Kin (۰، ۰/۰۵، ۰/۱ میلی گرم در لیتر)؛

۰/۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D و Kin (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ میلی گرم در لیتر)؛

۰/۳ میلی گرم 2,4-D و Kin (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، میلی گرم در لیتر)؛

۰/۴ میلی گرم در لیتر 2,4-D و Kin (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ میلی گرم در لیتر).

هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار شامل هفت قطعه برگ بود. در آزمایش سوم تأثیر تاریکی، روشنایی و تاریکی-روشنایی نیز بر روی هر تیمار بررسی شد. تیمارهای تاریکی-روشنایی پس از سه روز قرارگرفتن در تاریکی در معرض نور قرار گرفتند.

داده‌برداری یک ماه پس از کشت انجام شد. فاکتورهای مورد ارزیابی شامل درصد جنین زایی و تعداد جنین به ازای هر جداکشت بوده است. در تمام مراحل استقرار، ریزازدیادی، آزمایش اول و بخشی از آزمایش سوم که نمونه ها در معرض روشنایی قرار گرفتند تناوب نوری ۱۶ ساعتی و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس اعمال گردید، دما نیز در تمام آزمایش ها ۲۴±۲°C بود. تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار کامپیوتری SAS و با استفاده از روش ANOVA انجام شد. بدین‌ترتیب تجزیه واریانس اثر 2,4-D و Kin در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد و اثر نور و ترکیبات مختلف هورمونی به عنوان دو فاکتور در قالب طرح کاملا تصادفی فاکتوریل تجزیه گردیدند (جدول شماره ۱، آزمایش سوم). برای مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن در سطح یک درصد استفاده شد.

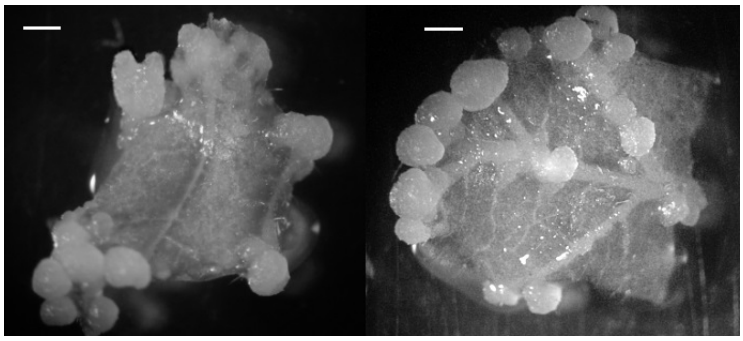
نتایج

نمونه های برگ ژنوتیپ یک در هر سه آزمایش و ژنوتیپ دو نیز در آزمایش اول و دوم تولید کالوس غیر جنین‌زا کردند که از ذکر نتایج آزمایشهای کالوس زایی و باززایی در اینجا صرف نظر می شود.

تنها نمونه های برگ ژنوتیپ دو در آزمایش سوم تولید جنین کروی شکل کردند. روند شکل‌گیری جنین ها در ژنوتیپ دو به این صورت بود که جداکشتهای برگ پس از حدود سه تا چهار روز متورم شده و پس از حدود دو هفته تشکیل جنین های سوماتیک کروی شکل آغاز شد. جنین ها مستقیما بدون تشکیل فاز کالوس بر روی برگ ها تشکیل شدند. جنین قلبی شکل نیز با فراوانی بسیار کم در تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی گرم در لیتر Kin مشاهده شد (شکل ۱).

جدول ۱- تغییرات مشاهده شده در برگ‌های جوان دو ژنوتیپ ملج در سه آزمایش طراحی شده برای القای جنین‌زایی

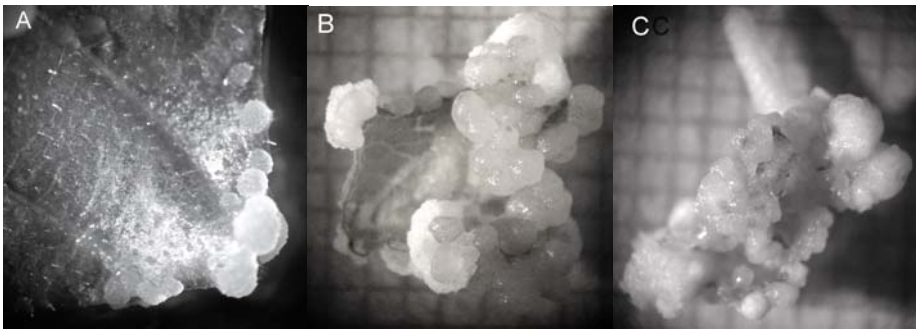
آزمایش	محیط کشت	سطوح هورمونی (میلی‌گرم در لیتر)	شرایط نوری	نتیجه
اول	MS	BA (۰,۱, ۰,۲, ۰,۵, ۱) TDZ (۰,۱, ۰,۲, ۰,۵, ۱) Kin (۰,۱, ۰,۲, ۰,۵, ۱)	روشنایی	تولید کالوس در هر دو ژنوتیپ
دوم	MS	2,4-D (۰,۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲) Kin (۰، ۰/۱، ۰/۲)	تاریکی	تولید کالوس در هر دو ژنوتیپ
سوم	1/2MS	2,4-D (0.1) Kin (۰, ۰/۰۵, 0.1) 2,4-D (۰,۲) Kin (۰, ۰/۰۵, ۰/۱, 0.2) 2,4-D (۰,۳) Kin (۰, ۰/۰۵, ۰/۱, ۰/۲, 0.3) 2,4-D (0.4) Kin (۰, ۰/۰۵, ۰/۱, ۰/۲, ۰/۳, 0.4)	تاریکی، روشنایی و تاریکی- روشنایی	تولید جنین کروی شکل در ژنوتیپ ۲



شکل ۱- تولید جنین‌های کروی شکل مسقیم از برگ. در بیشتر تیمارهای آزمایش سوم جنین‌های کروی شکل به طور مستقیم در محل رگبرگها و نواحی زخم شده برگ‌های ژنوتیپ دو تشکیل شده است. شکل سمت چپ جنین قلبی شکل را نشان می‌دهد که البته فراوانی بسیار کمی داشت (خط نشانه: یک میلی‌متر)

پس از ظهور جنین ها و در مراحل پایانی دوره کشت کالوس ها ظاهر شده و جنین ها را دربر گرفتند و در تعدادی نمونه نیز ریشه نابجا از کالوس خارج شد (شکل ۲).

طبق جدول دو، ۱۸ ترکیب مختلف بین دو هورمون 2,4-D و Kin تفاوت معنی داری نشان دادند. همچنین اثر شرایط نوری بر روی درصد جنین زایی و میانگین تعداد جنین های کروی شکل در هر جداکشت معنی دار بود.



شکل ۲- مراحل ظهور جنین‌های سوماتیکی. شکل a ابتدای ظهور جنین‌های کروی شکل به صورت مستقیم را نشان می‌دهد که تقریبا در اواخر هفته دوم است. شکل b در پایان هفته سوم و همزمان با ظهور کالوسهای برفی می‌باشد. شکل c در پایان هفته چهارم بوده و ظهور ریشه با منشأ کالوس را نشان می‌دهد.

جدول ۲- تجزیه واریانس مربوط به آزمایش اثر ترکیبات مختلف سطوح پایین 2,4-D و Kin در شرایط نوری مختلف بر درصد جنین‌زایی و میانگین تعداد جنین‌ها در هر برگ (ژنوتیپ دوم در آزمایش سوم)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		سطح احتمال	
		درصد جنین‌زایی	میانگین تعداد جنین‌ها	درصد جنین‌زایی	میانگین تعداد جنین‌ها
اثر نور	2	۱۴۸۶,۲	۷۹۱,۵	**0.0001	**0.0001
اثر هورمون	17	۱۵۸۷,۶	۱۲۲,۷	**0.0001	**0.0001
اثر متقابل نور و هورمون	34	۴۳۳,۶۳	۶۴,۶	**0.0001	**0.0001
خطای آزمایش	108	۱۲۷,۹	۱۸,۸	-	-

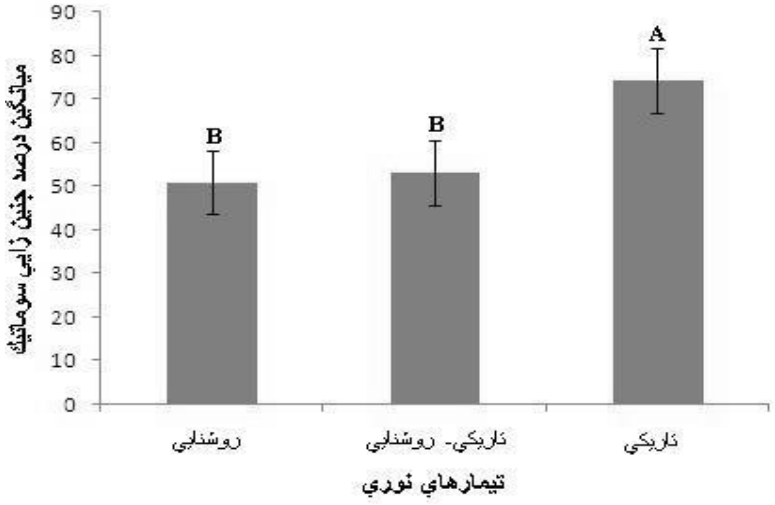
**: احتمال معنی‌دار شدن در سطح یک درصد

نتایج آزمایش تأثیر تیمارهای نوری بر روی جنین زایی نشان داد که در آزمایش ما نور اثر بازدارنده‌ای بر روی فرایند جنین زایی داشت، به‌طوری‌که میانگین درصد جنین زایی در تاریکی ۷۴/۲۵ و در دو تیمار روشنایی و روشنایی-تاریکی به ترتیب ۵۰/۹۸ و ۵۳/۱۸ بود. البته دو تیمار روشنایی و روشنایی-تاریکی از لحاظ آماری تفاوت معنی داری نداشتند (شکل ۳).

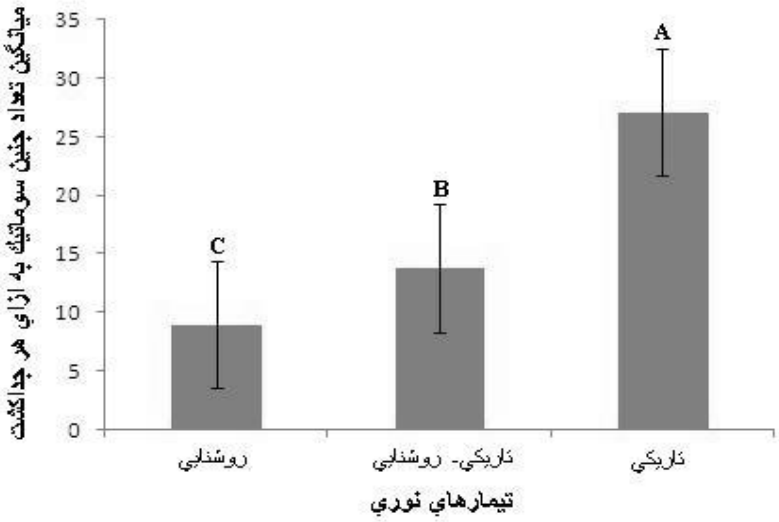
همچنین مقایسه اثر تیمارهای مختلف نوری بر روی میانگین تعداد جنین سوماتیک به ازای هر جداکشت نشان داد که از لحاظ آماری تاریکی تأثیر مثبت و نور تأثیر منفی داشت. میانگین تعداد جنین سوماتیک به ازای هر جداکشت در تیمارهای تاریکی ۲۷/۱۲ و در دو تیمار تاریکی-روشنایی و روشنایی به ترتیب ۱۳/۷۹ و ۹/۰۲ بود (شکل ۴).

با توجه به اثر مثبت تاریکی بر روی جنین زایی، در مقایسه اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر روی درصد جنین زایی و میانگین تعداد جنین ها به ازای هر جداکشت، تیمارها در شرایط تاریکی نگهداری شدند. در بررسی اثر ترکیب های مختلف هورمونی بر روی میانگین درصد جنین زایی مشخص شد که تمامی تیمارهایی که سطوح 2,4-D آنها ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی گرم در لیتر بود صرف‌نظر از ترکیبات مختلف Kin در این آزمایش به جنین زایی پاسخ مثبت دادند. اما در سطح ۰/۴ میلی گرم در لیتر 2,4-D، تیمارهای هورمونی C_{41}، C_{43} و C_{45} پاسخ به جنین زایی منفی بود. میانگین فراوانی جنین زایی تیمارهای C_{11}، C_{13}، C_{21}، C_{22}، C_{23}، C_{31}، C_{33}، C_{44} و C_{46} صددرصد بود

(شکل ۵).



شکل۳- مقایسه میانگین درصد جنین‌های سوماتیک کروی شکل مستقیم در تیمارهای مختلف نوری

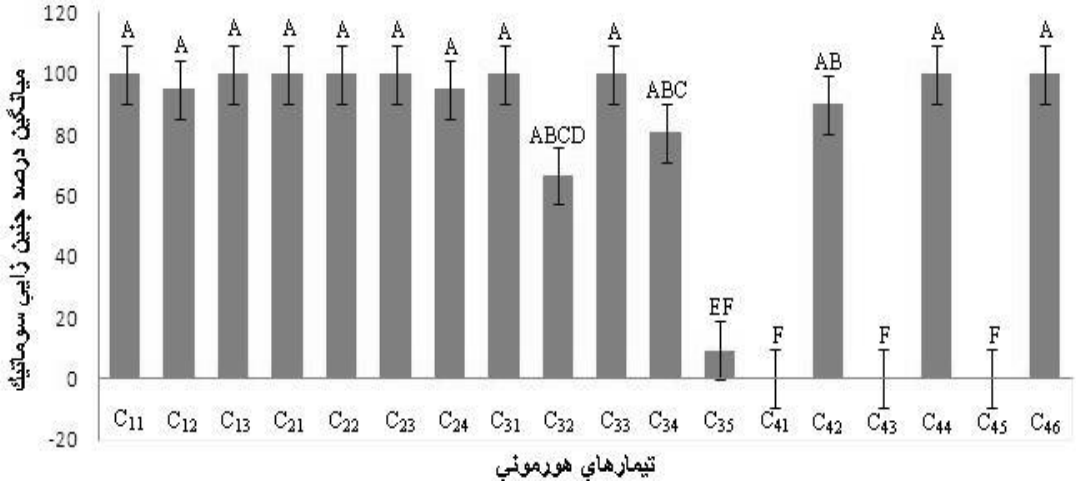


شکل۴- مقایسه میانگین تعداد جنین‌های سوماتیک کروی شکل مستقیم به ازای هر جداکشت برگ در تیمارهای مختلف نوری

بررسی اثر تیمارهای هورمونی مختلف بر روی میانگین تعداد جنین های کروی به ازای هر جداکشت نشان داد که به ترتیب تیمار C_{21} و بعد C_{44} و C_{42} بیشترین تعداد جنین به ازای هر جداکشت را داشتند که این میزان به ترتیب ۶۰/۴۸، ۴۷/۷۶ و ۴۶/۵۲ بوده است (شکل ۶). البته باید در نظر گرفت که طبق شکل ۵ درصد جنین زایی در تیمارهای C_{21} ، C_{42} و C_{44} به ترتیب ۱۰۰، ۹۰، ۱۰۰ بوده است، بنابراین بهترین تیمارها از نظر بالاترین فراوانی جنین زایی و بالاترین میانگین تعداد جنین در هر جداکشت C_{21} و C_{44} بودند.

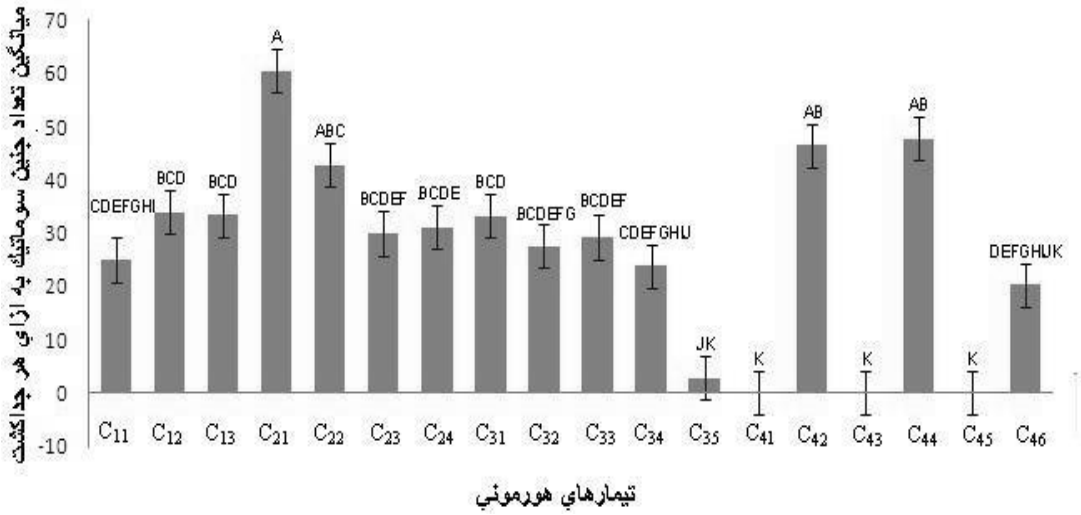
بحث

گونه های متعلق به خانواده نارون ازجمله نارون اوجا و ملج ارزش اقتصادی مهمی از نظر محیطزیست و همچنین صنعت چوب دارند، به طوری‌که حفظ، تکثیر و بهبود خواص تجاری آنها جز اهداف اصلاحی به‌نژادگران می باشد.



شکل ۵ – مقایسه میانگین درصد جنین‌زایی سوماتیکی در تیمارهای مختلف هورمونی

C_{11}= ½ MS + 0.1 mg/l 2,4-D+ 0.0 mg/l Kin
C_{12}= ½ MS + 0.1 mg/l 2,4-D+ 0.05 mg/l Kin
C_{13}= ½ MS + 0.1 mg/l 2,4-D+ 0.1 mg/l Kin
C_{21}= ½ MS + 0.2 mg/l 2,4-D+ 0.0 mg/l Kin
C_{22}= ½ MS + 0.2 mg/l 2,4-D+ 0.05 mg/l Kin
C_{23}= ½ MS + 0.2 mg/l 2,4-D+ 0.1 mg/l Kin
C_{24}= ½ MS + 0.2 mg/l 2,4-D+ 0.2 mg/l Kin
C_{31}= ½ MS + 0.3 mg/l 2,4-D+ 0.0 mg/l Kin
C_{32}= ½ MS + 0.3 mg/l 2,4-D+ 0.05 mg/l Kin
C_{33}= ½ MS + 0.3 mg/l 2,4-D+ 0.1 mg/l Kin
C_{34}= ½ MS + 0.3 mg/l 2,4-D+ 0.2 mg/l Kin
C_{35}= ½ MS + 0.3 mg/l 2,4-D+ 0.3 mg/l Kin
C_{41}= ½ MS + 0.4 mg/l 2,4-D+ 0.0 mg/l Kin
C_{42}= ½ MS + 0.4 mg/l 2,4-D+ 0.05 mg/l Kin
C_{43}= ½ MS + 0.4 mg/l 2,4-D+ 0.1 mg/l Kin
C_{44}= ½ MS + 0.4 mg/l 2,4-D+ 0.2 mg/l Kin
C_{45}= ½ MS + 0.4 mg/l 2,4-D+ 0.3 mg/l Kin
C_{46}= ½ MS + 0.4 mg/l 2,4-D+ 0.4 mg/l Kin



شکل ۶- مقایسه میانگین تعداد جنین‌های سوماتیک به ازای هر جداکشت در تیمارهای هورمونی مختلف

C_{11}= ½ MS + 0.1 mg/l 2,4-D+ 0.0 mg/l Kin
C_{12}= ½ MS + 0.1 mg/l 2,4-D+ 0.05 mg/lKin
C_{13}= ½ MS + 0.1 mg/l 2,4-D+ 0.1 mg/l Kin
C_{21}= ½ MS + 0.2 mg/l 2,4-D+ 0.0 mg/l Kin
C_{22}= ½ MS + 0.2 mg/l 2,4-D+ 0.05 mg/l Kin
C_{23}= ½ MS + 0.2 mg/l 2,4-D+ 0.1 mg/l Kin
C_{24}= ½ MS + 0.2 mg/l 2,4-D+ 0.2 mg/l Kin
C_{31}= ½ MS + 0.3 mg/l 2,4-D+ 0.0 mg/l Kin
C_{32}= ½ MS + 0.3 mg/l 2,4-D+ 0.05 mg/l Kin
C_{33}= ½ MS + 0.3 mg/l 2,4-D+ 0.1 mg/l Kin
C_{34}= ½ MS + 0.3 mg/l 2,4-D+ 0.2 mg/l Kin
C_{35}= ½ MS + 0.3 mg/l 2,4-D+ 0.3 mg/l Kin
C_{41}= ½ MS + 0.4 mg/l 2,4-D+ 0.0 mg/l Kin
C_{42}= ½ MS + 0.4 mg/l 2,4-D+ 0.05mg/l Kin
C_{43}= ½ MS + 0.4 mg/l 2,4-D+ 0.1 mg/l Kin
C_{44}= ½ MS + 0.4 mg/l 2,4-D+ 0.2 mg/l Kin
C_{45}= ½ MS + 0.4 mg/l 2,4-D+ 0.3 mg/l Kin
C_{46}= ½ MS + 0.4 mg/l 2,4-D+ 0.4 mg/l Kin

اولین گام در اصلاح ژنتیکی این درختان بهینه سازی یک روش مناسب جهت تکثیر آنها در شرایط درون شیشه است. اگرچه ریزازدیادی این دو گونه مهم با استفاده از جوانه‌های جانبی مطالعه شده است اما به دلیل فراوانی کم پرآوری و همچنین تولید شاخه های نابجا مطلوب نبوده است (۴ و ۷). البته یکی دیگر از دلایل مهم در این مورد آلوده بودن شدید پایه های این درختان برای تهیه جوانه های جانبی و ریزازدیادی است. در ایران نیز به دلیل آلودگی بسیار بالای گونه نارون مطالعه بر روی این درختان با مشکل مواجه بوده است (۱). بنابراین بهینه سازی یک روش مناسب دیگر برای تکثیر درون شیشه این درختان امر مهمی محسوب می گردد. کاند و همکاران با استفاده از برگ نارون اوجا توانستند کالوس های جنین زا تولید کرده و در نهایت از کالوس جنین های سوماتیکی بدست آوردند (۶).

تحقیق حاضر اولین گزارش مبنی بر امکان تولید جنین سوماتیک در خانواده نارون بدون فاز کالوس‌زایی است. حذف فاز کالوس طی جنین زایی علاوه بر کوتاه نمودن طول دوره تکثیر باعث می شود تا احتمال وقوع تنوع سوماکلونی بسیار کاهش یابد. برای القای جنین از 2,4-D به عنوان اکسین معمول جنین زایی و Kin به عنوان سیتوکنین استفاده شد. کوریدورا و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که برای القای جنین زایی سوماتیکی در جنین نارس نارون ملج وجود 2,4-D کاملا ضروریست (۸). همچنین نتایج نشان داد که جهت القای جنین زایی سوماتیکی در نارون مقادیر پایین 2,4-D نیاز است و این موضوع کاملا مطابق با گزارش کاند و همکاران (۲۰۰۴) و کوریدورا و همکاران (۲۰۰۲) بود (۶ و ۸). اما برخلاف نتایج کاند و همکاران (۲۰۰۴) در گونه اوجا نتایج این تحقیق نشان داد که وجود Kin برای تمایز جنین های سوماتیکی در نارون ملج ضروری نیست (شکل ۳ و ۴). علت آن می تواند به دلیل محتوای سایتوکنینی در گیاهان استفاده شده در این آزمایش باشد (۶). از طرفی در بین تیمارهایی که فاقد هورمون Kin بودند تیمار C_{21} بالاترین تعداد جنین در هر جداکشت را تولید کرد. این امر نشان‌دهنده اثر متقابل بسیار حساس جداکشت و اکسین در جنین زایی سوماتیکی مستقیم است. طبق گزارش گوئرا و همکاران (۱۹۸۸) القای جنین زایی مستقیم سوماتیکی در گیاه *Euterpe edulis* وابسته به مرحله رشدی جداکشت و اثر متقابل بسیار دقیق آن با هورمون 2,4-D در محیط کشت می باشد(۱۲). همچنین مطابق با نتایج کاند و همکاران (۲۰۰۴) افزایش سطح 2,4-D باعث کاهش تولید جنین و افزایش تولید کالوس در برگ های *Ulmus minor* شد(۶).

همچنین تأثیر استفاده از کازئین هیدرولیزات در جنین زایی سوماتیکی مطابق با مشاهدات کاند و همکاران (۲۰۰۴) در گونه اوجا به اثبات رسید (۶). برخلاف مشاهدات دم و همکاران (۲۰۱۰) بر روی گیاه *Limonium sinensis* نور تأثیر کاهنده ای بر فرایند جنین زایی سوماتیک در ملج داشت، ضمن اینکه محیط کشت MS حاوی هر یک از هورمون های TDZ، BA و NAA به صورت مجزا و در حضور نور تأثیری بر روی جنین زایی سوماتیک مستقیم نداشتند و تنها کالوس های غیر جنین زا تولید کردند (9). غلظت محیط پایه MS در این آزمایش نصف بود. غلظت عناصر پرمصرف در محیط کشت در رشد جنین های کروی شکل موثر بوده و گزارش های زیادی مبنی بر استفاده از محیط کشت 1/2MS طی جنین زایی وجود دارد (۱۳ و ۲۵). همچنین در این آزمایش از کازئین هیدرولیزات به عنوان منبع نیتروژن آلی استفاده شد. اسید امینه های آلی موجود در کازئین هیدرولیزات می توانند جایگزینی مناسب برای NH_4^+ معدنی و مکمل NO_3^- باشند (۲۰ و ۲۱). البته قبلا نیز گزارش شده است که وجود آمونیوم برای جنین زایی سوماتیکی لازم می باشد (۱۴ و ۲۴). همچنین جذب نیتروژن از طریق یک منبع آلی مثل کازئین هیدرولیزات بسیار آسانتر و سریع تر از منابع غیر آلی می باشد (۲۸).

در تحقیق اخیر اگرچه جنین های کروی شکل با فراوانی بسیار خوبی در ریزنمونه برگ تولید شدند اما جنین ها قادر به تکامل و تبدیل به جنین کامل نبودند. برای تکامل جنین های سوماتیکی در مراحل بعدی می توان تیمار هایی مانند استفاده از محیط کشت های متفاوت، تغییر ویتامین ها، استفاده از منبع کربنی فروکتوز به جای سوکروز، استفاده از انواع دیگری از سیتوکنین ها و اکسین ها اعمال کرد.

منابع

۱- ذبیحی، ه، حسینی نصر، س م، بابائیان جلودا، ن، جلیلوند، ح، ۱۳۸۷، کشت بافت ملج: اثر محیط کشت ریزنمونه و زمان برداشت آنها. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد پانزدهم. شماره چهارم

۲- بهداد، الف، ۱۳۶۶. آفات و بیماریهای درختان و درختچه های جنگلی و گیاهان زینتی ایران. چاپ نشاط، اصفهان. ۸۰۷ صفحه

3-Bairu, MW, Nova´k, O, Dolezˇal, K, Van Staden, J, (2011), Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis and cytokinin treatments, Plant Growth Regulators 63:105–114

4- Biroscikova, M, Spisakova, K, Liptak, S, Pichler, V, (2004), Micropropagation of mature wych elm(*Ulmus glabra* Huds.), Plant Cell Report 22:640-644

5- Bogaert, I, Van, CS, Werbrouck, SPO, Dolezˇal, K, (2006), New aromatic cytokinins can make the difference, Acta Horticulture 725:265–270

6- Conde, P, Loureiro, J, Santos, C, (2004), Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill, Plant Cell Report 22:632–639

7- Conde, P, Sousa, A, Costa, A, Santos, C, (2008), A protocol for *Ulmus minor* Mill. micropropagation and acclimatization, Plant Cell Report 92: 113-119

8- Corredoira E, Vieitz AM, Ballester, A, (2002), Somatic embryogenesis in elm, Annals of Botany 89:637–644

9- Dam, A, Paul, S, Bandyopadhyay, TK, (2010), Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Limonium sinensis* (Girard) Kuntze, Scientia Horticulturae 126: 253–260

10- Dunn, CP, (2000), The elms—breeding, conservation and disease management, Kluwer, Dordrecht Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.

11- Fenning, TM, Gartland, KMA, Brasier, CM, (1993), Micropropagation and regeneration of English Elm, *Ulmus procera* Salisbury, Journal of Experimental Botany 44:1211–1217

12-Guerra, M,P and Handro, W, (1988), Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of Euterpe edulis Mart. (Palmae). Plant Cell Rep. 7, 550-552.

13- Hamama, L, Baaziz, M, Letouze, R, (2001), Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of jojoba. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65: 109–113

14- Halperin, W, Wetherell, DF, (1965), Ammonium requirement for embryogenesis in vitro, Nature 205, 519-520.

15- Jain, SM and Gupta, PK, (2005), Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants, 497–504. Springer. Printed in the Netherlands.

16- Karp, A, (1991), On the current understanding of somaclonal variation. In: Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, Vol 7, pp. 1-58. (ed. Bol. Miflin). Oxford University Press.

17-Karp, A, (1994), Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: Plant Cell and Tissue Culture, pp. 139-151. (eds. I.K. Vasil and T.A. Thorpe). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

18-Karp, A, and Bright S,W,J, (1985), On the causes and origins of somaclonal variations. In: Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, Vol 2, pp. 199-234. (ed. B.J. Millin). Oxford University Press.

19-Larkin, P,J, and Scowcroft W,R, (1981), Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor Appl Genet. 67: 443-455.

20- Margara, J, (1969), Étude des facteurs de la néoformation de bourgeons et culture in vitro chez le chou-fleur (*Brassica oleracea* L. var. botrytis), Annals Physiology. Veg. 11: 95-112.

21- Margara, J, Leydecker, MT, (1978), Différents types d'organogenèse observés chez le Colza, *Brassica napus* L. var.leifera Metzg. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 287D:17-20

22-Newbanks D, BoschA, and Zimmermann MH (1983) Evidence for xylem dysfunction to Dutch elm disease. Neth J Pl Pathol 76: 196-204.

23- Rahnama, K, Taheri, A, H, (2004), Distribution of Dutch elm disease pathogens, aggressive and

non-aggressive isolates in Iran, Canadian Journal of Plant Pathology 26: 121-126

24- Reinert, J, Tazawa, M, Semenoff, S, (1967), Nitrogen compounds as factors of embryogenesis in vitro, Nature 216, 1215-1216

25- Singh, AK, Chand, S, (2002), Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of a timber-yielding leguminous tree, *Dalbergia sissooRoxb*, Plant Tissue Culture and Genetics Research Group, School of Life Sciences, Devi Ahilya University.

26-Tang, W, Ouyang, F, Guo, ZC (1997a), Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in slash pine. J. Plant Res. Environ. 6(2):8-11

27-Tang, W, Ouyang, F, Guo, ZC (1997b), Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in callus cultures derived from zygotic embryos of slash pine. J. For. Res. 8(2):83-86

28- Thom, M, Maretzki, A, Komor, E, Sakai, WS, (1981), Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle, Plant Cell Tissue Organ Culture1: 3-14

Induction of direct somatic embryogenesis in leaf explants of *Ulmus glabra*

Mirabbasi S.M.[1], Hosseinpour B.[2], Ghaemmaghami S.A.[3] and Sanjabi M.R.[2]

[1] Agricultural Biotechnology Dept., Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Plant Production & Sustainable Agriculture Dept., Institute of Agriculture, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, I.R. of Iran

[3] Agriculture Institute Dept., Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Ulmus glabra is an economical important tree species found in forests. However it is endangered due to high susceptibility to Dutch Elm Disease. Therefore, an efficient micropropagation method is important for breeding and genetic improvement of elm. This is the first report on induction of direct somatic embryogenesis from *in vitro* leaf explants in elm. The first experiment conducted with MS medium supplemented with different concentrations of BA or Kin or TDZ under light condition. Second experiment, carried out with MS basal media supplemented with 200 mg l^{-1} casein hydrolysate and different levels of 2,4-D and Kinetin in darkness. In third experiment 1/2 MS media supplemented with 200 mg l^{-1} casein hydrolysed and low levels of 2,4-D in combination with Kin were used, and the effects of light were investigated. Globular somatic embryos were achieved directly just on small leaves of genotype 2 in experiment 3. Non-embryogenic calli were induced in other experiments. The frequency of embryogenesis in most of the treatments of experiment 3 was 100%. However, high number of embryos per explants was achieved in presence of 0.2 mgl^{-1} 2,4-D without Kin (60.48) and 0.4 mgl^{-1} 2,4-D combined with 0.2 mgl^{-1} Kin (47.76). Additionally, the percentage of embryogenesis and the average number of embryos per explants were higher in dark compared to the light condition.

Key words*:* leaf, somatic embryogenesis, *Ulmus glabra*