جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم و تولید بذر مصنوعی در بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.) با استفاده از هورمون 2,4-D

الهام فیضی، علی مرادی* و اسد معصومی اصل

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

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۵

چکیده

بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.) از اصلی‌ترین گونه‌های درختی جنگل‌های زاگرس در ایران است. برای حفظ بقای این‌گونه استفاده از روش‌های آزمایشگاهی مثل کشت بافت و جنین‌زایی رویشی مناسب است، به همین منظور دو آزمایش مجزا بصورت جنین‌زایی سوماتیکی و پوشش‌دار کردن این جنین‌ها طراحی و اجرا شد. آزمایش جنین‌زایی سوماتیکی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد، دراین آزمایش جنین زیگوتی نابالغ بعنوان منبع ریز نمونه و هورمون 2,4-D در چهار سطح (۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. آزمایش کپسوله کردن جنین‌های سوماتیکی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد، فاکتور اول شامل سه غلظت آلژینات سدیم (۳/۵، ۴ و ۴/۵ درصد) و فاکتور دوم دو غلظت کلرید کلسیم (۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار) بود. نتایج نشان داد که در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بیشترین تعداد و درصد جنین‌زایی (۶۶/۶ درصد) مشاهده شد. نتایج آزمایش پوشش‌دار کردن نشان داد که برهم‌کنش آلژینات سدیم و کلرید کلسیم برای تمام ترکیبات در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد، غلظت ۳/۵ درصد آلژینات سدیم همراه با ۵۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم بهترین تیمار برای پوشش‌دار کردن بود که بیشترین درصد جوانه‌زنی (۱۰۰٪) در این ترکیب مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: بذر مصنوعی، بلوط ایرانی، جنین‌زایی، 2,4-D

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۷۷۴۱۲۱۴، پست الکترونیکی: amoradi@yu.ac.ir

مقدمه

جنگل‌های زاگرس با سطحی بیش از ۵ میلیون هکتار حدود ۴۱ درصد از جنگل‌های ایران را به خود اختصاص داده‌اند (۴). بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.) از خانواده راش یا پیاله‌داران (Fagaceae)، جزء مهم‌ترین و فراوان‌ترین گونه‌های چوبی پهن‌برگ اکوسیستم‌های جنگلی ایران می‌باشد. از دیدگاه زیست‌محیطی و نیز اقتصادی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است (۱ و ۱۹). جنگل‌های بلوط به دلایل متعددی ازجمله برداشت بی‌رویه، وقوع خکشسالی‌های متعدد و فراوان، بیماری‌ها و آفات در معرض خطر جدی است.

با توجه به وجود مشکلات بسیار برای تکثیر جنسی، تکثیر غیرجنسی که جنین‌زایی سوماتیکی از انواع آن است و تولید بذر مصنوعی می‌تواند راه‌حل مناسبی باشد. جنین‌زایی سوماتیکی به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم است.

در الگوی جنین‌زایی مستقیم، جنین از سلول‌هایی تشکیل می‌شود که از قبل برای جنین‌زایی تعیین‌شده‌اند (PEDC) (Pre-embryogenic –determined- cell)، جنین‌زایی در این سلول‌ها به شرایط درون شیشه‌ای نیازمند است تا سلول‌ها را به‌طرف تقسیم سلولی مورد نیاز هدایت کند (۴). در این نوع جنین‌زایی، سلول‌هایی که قابلیت

جنین‌زایی دارند تحت شرایط محیطی خاص مانند دما و یا شرایط محیط کشت جنین‌زا می‌شوند (۱۴ و ۲۲). این نوع جنین‌زایی در گونه‌های مختلفی ازجمله یونجه (۳۰)، بروکلی (۳۸)، درخت کافور (۱۰ و ۳۷)، قهوه (۱۱)، اکالیپتوس از ریزنمونه‌های جنین زیگوتی بالغ و نابالغ (۲۷)، پنبه (۳۹) و نیشکر (۳۴) گزارش شده است.

یکی از مهم‌ترین کاربردهای جنین‌های سوماتیکی استفاده در تولید بذر مصنوعی است. بذر مصنوعی، جنین سوماتیکی، جوانه ساقه، توده سلولی و یا هر بافت دیگر قابل‌کشت است که بصورت مصنوعی کپسوله شود و برای کشت تحت شرایط درون شیشه‌ای یا بیرون شیشه‌ای استفاده شود، بطوری‌که بتواند این پتانسیل را بعد از انبارداری هم حفظ کند (۸). برای تولید بذر مصنوعی از غلظت‌های مختلف آلژینات سدیم در ترکیب با کلرید کلسیم استفاده می‌شود (۹، ۲۷ و ۳۶). پینتوس (۲۷) از آلژینات سدیم در غلظت‌های ۳ تا ۵ درصد و کلرید کلسیم ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار برای پوشش‌دار کردن جنین‌های سوماتیکی بلوط چوب‌پنبه (*Quercus suber*) استفاده کردند و آلژینات سدیم ۵ درصد همراه با کلرید کلسیم ۵۰ میلی‌مولار را بهترین ترکیب جهت پوشش‌دار کردن جنین‌های سوماتیکی معرفی کردند. تولید بذر مصنوعی و ایجاد آندوسپرم مصنوعی از جنین‌های سوماتیکی لپه‌ای بلوط قرمز اروپایی *Q. robur* L. صورت گرفت، جنین‌های این‌گونه توسط آلژینات سدیم 4 درصد و کلرید کلسیم ۵۰ میلی مولار پوشش‌دار شدند (۲۹). باز زایی گیاهچه‌های *Q. serrate* L. توسط پوشش‌دار کردن جنین‌های سوماتیکی با آلژینات سدیم (۴۰ گرم بر لیتر) و کلرید کلسیم (۱/۴ درصد) انجام شد و سپس توانایی زنده‌مانی گیاهچه‌ها توسط مارکر RAPD ارزیابی شد (۱۶). همچنین تولید بذر مصنوعی در کاج (*Pinus patula*) (۲۱) و درخت جگ (*Dalbergia sissoo*) (۳۳) نیز بررسی‌شده است.

باتوجه به این‌که امکان تکثیر جنسی بلوط به دلایل متعددی ازجمله طولانی بودن مدت‌زمان لازم برای رسیدن بذرها به بلوغ فیزیولوژیکی، نامنظم بودن الگوی ظهور بذرها در سال‌های مختلف، متفاوت بودن کمیت و کیفیت این بذرها در سال‌های مختلف، پایین بودن قوه نامیه بذرهای تولیدشده و مشکل ذخیره‌سازی، کمبود یا فقدان درختان مادری، فرسایش شدید خاک بستر، چرای مفرط دام و جمع‌آوری بذرها با محدودیت‌هایی مواجه است (۱، ۲۵ و ۲۶). لذا این آزمایش باهدف تولیدمثل غیرجنسی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی و تولید بذر مصنوعی بلوط طراحی و اجرا شد.

مواد و روشها

تحقیق حاضر بمنظور بررسی جنین‌زایی سوماتیکی و تولید بذر مصنوعی بلوط ایرانی در آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج ایران در سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ در قالب دو آزمایش مجزا طراحی و اجرا شد.

آزمایش اول: تولید جنین سوماتیکی: این آزمایش بمنظور بررسی جنین‌زایی سوماتیکی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار طراحی و اجرا شد. بذرهای نابالغ بلوط ایرانی ۴ ماه بعد از گرده‌افشانی در مردادماه ۱۳۹۴ از جنگل‌های آبشار شهر یاسوج جمع‌آوری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده پس از انتقال به آزمایشگاه ابتدا بمدت ۳۰ دقیقه توسط آب مقطر بصورت سطحی شستشو شدند، سپس برای ضدعفونی به زیر هود لامینارایرفلو که از قبل استریل شده است منتقل شدند. بذرهای نابالغ ابتدا بمدت ۱۵ دقیقه در اتانول ۹۶ درصد قرارگرفتند، سپس بمدت ۱۰ دقیقه در وایتکس ۳ درصد قرارگرفتند، پس از این مراحل سه بار و هر بار بمدت ۱۰ دقیقه توسط آب دو بار تقطیر شستشو شدند، سپس پوسته‌های داخلی و خارجی بذرهای ضدعفونی شده برداشته شده و جنین‌های نابالغ همراه با قسمتی از آندوسپرم جدا شد (شکل ۱) و بمدت یک ماه درون پتری دیش بر روی محیط کشت MS حاوی هورمون 2,4-D در چهار سطح (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌گرم

بر لیتر) کشت شدند، سپس برای بلوغ به محیط SH بدون هورمون منتقل شدند. هر تیمار در مجموع از ۱۲ جنین زیگوتی (سه جنین در هر تکرار) تشکیل‌شده بود. جنین‌های کشت‌شده در فتوپریود ۱۶ ساعت و دمای ۲۵ درجه سلسیوس در اتاقک نوری نگهداری شدند. پس از یک ماه تعداد جنین‌های کروی، قلبی و اژدری شکل، تعداد کل جنین‌ها و درصد جنین‌زایی در هر تکرار اندازه‌گیری شد. در هر تکرار درصد جنین‌زایی از تقسیم تعداد جنین‌های زیگوتی که جنین سوماتیکی تولید نموده بودند بر کل جنین‌های زیگوتی نابالغ کشت‌شده در آن تکرار (سه ریز نمونه) محاسبه شد و در عدد ۱۰۰ ضرب شد.

شکل ۱- جنین زیگوتی برش خورده همراه با قطعاتی از آندوسپرم

آزمایش دوم: کپسوله کردن جنین‌های سوماتیکی: این آزمایش بصورت فاکتوریل دوعاملی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد، عامل اول شامل آلژینات سدیم در سه سطح (۳/۵، ۴ و ۴/۵ درصد) و عامل دوم کلرید کلسیم در دو سطح (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) بودند. جنین‌های سوماتیکی پس از بالغ شدن در محیط کشت SH (Schenk and Hildbrandt)، در لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ سی‌سی آب دو بار تقطیر استریل قرار گرفتند، سپس بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس در تاریکی قرارگرفتند. پس از آبنوشی جنین‌های سوماتیکی با محلول آلژینات سدیم ترکیب شده و توسط یک پیپت در محلول کلرید کلسیم چکانیده شدند (شکل ۲) جنین‌های پوشش‌دار شده روی شیکر با ۱۰۰ دور در دقیقه بمدت ۲۰ دقیقه قرارگرفتند، سپس بذرهای شکل‌گرفته بمنظور حذف یون‌های اضافی سه بار توسط آب مقطر استریل شستشو شدند. پس از خشک‌کردن بذرها توسط کاغذ صافی استریل، در محیط کشت MS کشت شدند. یک هفته پس از کشت، شمارش جوانه‌زنی بذرها شروع شده و پس از یک ماه درصد جوانه‌زنی و درصد تبدیل بذرها به گیاهچه اندازه‌گیری شد.

شکل ۲- پوشش‌دار کردن جنین‌های سوماتیکی

آنالیز داده‌های حاصل از آزمایش توسط نرم‌افزار (۹/۲) SAS انجام شد، برای مقایسه میانگین‌ها از رویه LS MEANS استفاده شد. رسم نمودارها توسط Excel 2013 انجام شد.

نتایج

آزمایش اول: جنین‌زایی سوماتیکی: نتایج تجزیه واریانس تأثیر هورمون 2,4-D روی جنین‌زایی نشان داد که تأثیر سطوح مختلف این هورمون برای تمام صفات مورد مطالعه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). دراین آزمایش جنین‌های سوماتیکی سه هفته پس از کشت تشکیل شد.

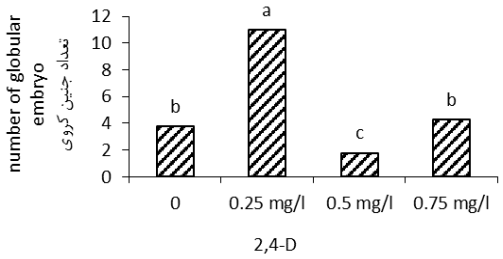
نتایج مقایسه میانگین اثر هورمون 2,4-D روی جنین‌زایی مستقیم و تعداد جنین‌های کروی نشان داد که در ترکیب هورمونی ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بیشترین تعداد جنین کروی (۱۱ جنین کروی) تشکیل شد که نسبت به تیمار شاهد تعداد ۷ جنین بیشتر بود و کمترین تعداد جنین

کروی شکل در هر پتری دیش، به تیمار با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D اختصاص داشت (شکل ۳).

جدول ۱- نتایج میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر هورمون 2,4-D بر جنین‌زایی مستقیم در بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.)

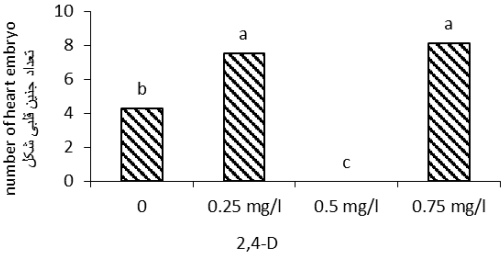
منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Degree of freedom	جنین کروی Globular embryo	جنین قلبی Heart embryo	جنین اژدری Torpedo embryo	درصد جنین‌زایی Embryogenesis percentage
ترکیب هورمونی Hormone compound	3	64.72**	55.59**	48.84**	1921.29**
خطا Error	12	0.52	2.41	0.35	69.44
ضریب تغییرات (٪) CV (%)		13.91	31.13	19.79	17.39

**معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد را نشان می‌دهد.



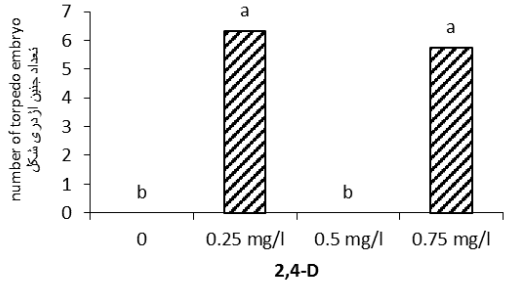
شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر سطوح هورمون 2,4-D بر تعداد جنین‌های کروی شکل‌گرفته در طی جنین‌زایی مستقیم در بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.).

نتایج مقایسه میانگین اثر هورمون 2,4-D روی تعداد جنین‌های قلبی شکل نشان داد که در تیمار ریز نمونه‌های جنین زیگوتی نابالغ با ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر و ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بیشترین تعداد جنین‌های قلبی شکل تولید شد و در تیمار با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D جنین قلبی شکل نگرفت (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه میانگین سطوح هورمون 2,4-D برای تعداد جنین‌های قلبی شکل‌گرفته در طی جنین‌زایی مستقیم در بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.).

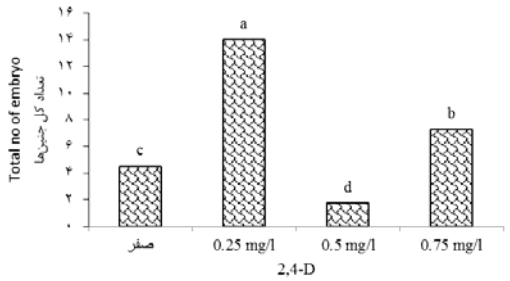
نتایج مقایسه میانگین اثر هورمون 2,4-D روی تعداد جنین‌های اژدری شکل حاکی از آن بود که بیشترین تعداد جنین‌های اژدری شکل (۶ جنین اژدری شکل) در تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که با ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین جنین اژدری شکل در تیمار با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و تیمار شاهد است که هیچ‌گونه جنین اژدری شکل در این تیمارها مشاهده نشد (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه میانگین سطوح هورمون 2,4-D برای تعداد جنین‌های اژدری شکل‌گرفته در طی جنین‌زایی مستقیم در بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.).

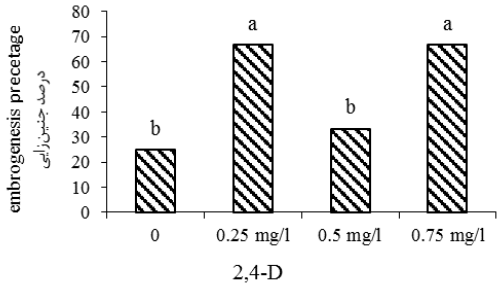
نتایج مقایسه میانگین اثر هورمون 2,4-D روی تعداد کل جنین‌های شکل‌گرفته نشان‌دهنده بیشترین تأثیر 2,4-D در غلظت پایین (۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) روی جنین‌زایی سوماتیکی بود، بطوری که بیشترین تعداد جنین (۱۴ جنین سوماتیکی) در این غلظت مشاهده شد که نسبت به غلظت

صفر این هورمون تعداد ۱۰ جنین تولیدشده سه برابر بود، این در حالی است که غلظت ۰/۵ این هورمون باعث کاهش تعداد جنین‌ها نسبت به تیمار شاهد شد (شکل ۶).

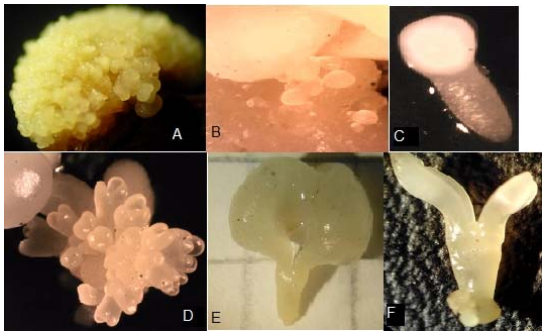


شکل ۶- مقایسه میانگین سطوح هورمون 2,4-D برای مجموع جنین شکل‌گرفته در طی جنین‌زایی مستقیم در بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.).

درصد جنین‌زایی در این آزمایش براساس تعداد جنین‌های زیگوتی نابالغ که جنین سوماتیکی تولید کردند نسبت به تمام جنین‌های زیگوتی کشت شده، اندازه‌گیری شد. نتایج مقایسه میانگین اثر هورمون 2,4-D روی درصد جنین‌زایی نشان داد که در تیمار ریز نمونه‌های جنین زیگوتی نابالغ با ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بیشترین درصد جنین‌زایی سوماتیکی (۶۶ درصد) مشاهده شد که در مقایسه با تیمار شاهد (۳۳ درصد) روند افزایشی داشت. کمترین درصد جنین‌زایی سوماتیکی در غلظت صفر هورمون مشاهده شد (شکل ۷). جنین‌های سوماتیکی شکل‌گرفته در شکل ۸ قابل مشاهده است.



شکل ۷- مقایسه میانگین سطوح هورمون 2,4-D برای درصد جنین‌زایی در طی جنین‌زایی مستقیم در بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.).



شکل ۸- A. توده پیش جنینی، B. و C، جنین کروی، D، جنین قلبی، E. جنین بالغ، F. جنین اژدری

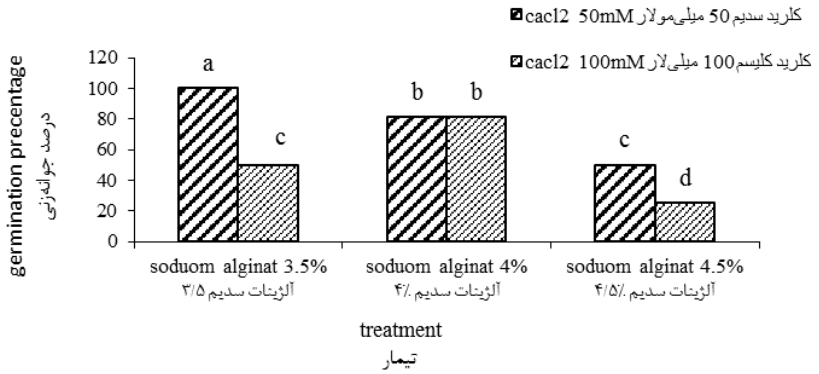
آزمایش دوم: پوشش‌دار کردن جنین‌های سوماتیکی: نتایج تجزیه واریانس تأثیر آلژینات سدیم و محلول کلرید کلسیم روی درصد جوانه‌زنی و درصد تبدیل به گیاهچه نشان داد که برهمکنش آلژینات سدیم و کلرید کلسیم برای هر دو صفت اندازه‌گیری شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲) و این بیانگر متفاوت بودن اثر آلژینات سدیم، کلرید کلسیم روی صفات مورد اندازه‌گیری بود.

نتایج مقایسه میانگین تأثیر آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی درصد جوانه‌زنی نشان داد با افزایش غلظت آلژینات سدیم درصد جوانه‌زنی روند کاهشی داشت، بطوریکه بیشترین درصد جوانه‌زنی (۱۰۰ درصد) در آلژینات سدیم ۳/۵ درصد و کلرید کلسیم ۵۰ میلی مولار مشاهده شد و کمترین درصد جوانه‌زنی در آلژینات سدیم ۴/۵ درصد به همراه کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد، با افزایش غلظت آلژینات سدیم درصد جوانه‌زنی روند کاهشی داشت. برای این صفت کلرید کلسیم ۵۰ میلی‌مولار مناسب‌تر بوده و در این غلظت بالاترین درصد جوانه‌زنی مشاهده شد (شکل ۹). شکل۱۱- (الف) جنین سوماتیکی پوشش‌دار شده، (ب) و (ج) بذر مصنوعی جوانه‌زده در محیط کشت MS (د) گیاهچه منتقل‌شده به خاک را نشان می‌دهند.

جدول ۲- نتایج میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر آلژینات سدیم و کلرید کلسیم بر درصد جوانه‌زنی و تبدیل به گیاهچه در بذر مصنوعی بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.)

منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	درصد تبدیل به گیاهچه Conversion to plantlet percentage
آلژینات سدیم Sodium alginate	2	4479.16**	2193.75**
کلرید کلسیم $CaCl_2$	1	3750.00**	90.42*
آلژینات سدیم×کلرید کلسیم Sodium alginate× $CaCl_2$	2	1250.00**	2594.90**
خطا Error	18	52.08	11.68
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		11.17	6.28

*و ** به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد را نشان می‌دهد.



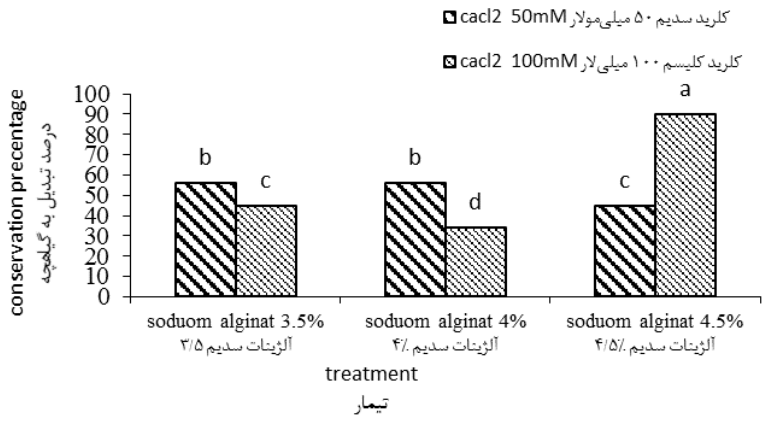
شکل ۹- مقایسه میانگین برهمکنش آلژینات سدیم و کلرید کلسیم بر درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.)

نتایج مقایسه میانگین تأثیر آلژینات سدیم و کلرید کلسیم نشان داد که با افزایش غلظت آلژینات سدیم درصد تبدیل به گیاهچه روند کاهشی داشت. برای درصد تبدیل بذر مصنوعی به گیاهچه آلژینات سدیم ۴/۵ درصد به همراه کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به دیگر تیمارها مناسب‌تر بوده و با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. در این غلظت بالاترین درصد تبدیل به گیاهچه مشاهده شد، کمترین درصد تبدیل به گیاهچه در آلژینات سدیم ۴ درصد به‌همراه کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۱۰). در این آزمایش غلظت ۴/۵ درصد آلژینات سدیم همراه با کلرید کلیسم ۱۰۰ میلی‌مولار کم‌ترین درصد جوانه‌زنی را داشت (۱ تا ۲ بذر در هر پتری دیش). پس از بررسی مشاهده شد که در این غلظت‌ها درصد تبدیل به گیاهچه بالا بود.

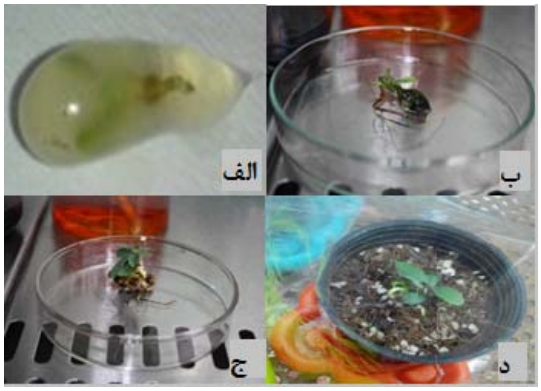
بحث

نتایج آزمایش حاکی از تأثیر مثبت اکسین در بهبود جنین‌زایی و بلوغ جنین بلوط ایرانی بود. بیشترین میزان تعداد جنین متشکل از انواع کروی، قلبی در سطح ۰/۲۵ هورمون 2,4-D مشاهده شد، میزان جنین اژدری در این سطح هورمونی با غلظت ۰/۷۵ این هورمون تفاوت معنی‌داری نشان نداد. بعلاوه این تیمار توانست میزان بلوغ جنین را نیز بهبود دهد. هورمون 2,4-D یک اکسین قوی

است و در بسیاری از موارد برای جنین‌زایی سوماتیکی در گونه‌های علفی و چوبی استفاده شده است. مشابه آنچه که در آزمایش حاضر مشاهده شد، نقش اکسین خارجی به‌ویژه 2,4-D در محیط کشت برای القای جنین‌زایی سوماتیکی در گیاهان چوبی در چندین گونه اثبات‌شده است (۶، ۷، ۲۷ و ۳۱).



شکل ۱۰- مقایسه میانگین برهمکنش آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی درصد تبدیل بذر مصنوعی به گیاهچه در بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.).



شکل ۱۱ – الف) جنین سوماتیکی پوشش‌دار شده (بذر مصنوعی)، ب) بذر مصنوعی جوانه‌زده، ج) گیاهچه حاصل از بذر مصنوعی، د) گیاهچه کشت شده در خاک

ریز نمونه‌های جنین زیگوتی نابالغ کاج (*Pinus radiate*) توسط آکوا و همکاران (۶) در محیط کشت دارای هورمون‌های 2,4-D (۲و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) و BA (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسیدآمینه گلوتامین کشت شدند، ۶-۴ هفته پس از کشت کالوس‌های جنین‌زا تولید کردند. همچنین ریز نمونه‌های یک ژنوتیپ نارون در محیط کشت 1/2MS حاوی ترکیبات مختلف ازجمله هورمون 2,4-D همراه با شرایط نوری و تاریکی کشت شدند، جنین‌های کروی به‌طور مستقیم روی ریزنمونه‌ها شکل گرفتند، در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون 2,4-D بالاترین درصد جنین‌زایی سوماتیکی (۶۸/۴۰) مشاهده شد (۵).

تنظیم‌کننده‌های رشد تکمیل کننده محیط کشت، مولکول‌های پیام‌رسانی مهمی هستند که رشد و نمو سلول گیاهی را تنظیم می‌کنند و اکسین درون‌زا اولین پیام برای القای جنین‌زایی سوماتیکی است (۳۷)، تأثیر اکسین در جنین‌زایی سوماتیکی روی تنظیم متیلاسیون DNA با اثرات تحریک‌کنندگی روی تقسیم سلولی و تمایز است (۳۵). پینتوس و همکاران (۲۷) جنین‌های زیگوتی نابالغ را در بلوط چوب‌پنبه را محیط کشت MS حاوی ۲/۳ میکرومولار هورمون 2,4-D کشت نموده و جنین سوماتیکی از روش مستقیم تولید کردند. گزارش‌شده است که در گیاه بلوط، اکسین در کنار دیگر فاکتورهای محیط کشت، تعدیل محتوی درون‌سلولی از طریق مهار بیان ژن و تغییر سطح متیلاسیون DNA درگیر است (۱۲، ۱۳، ۱۷، ۱۸ و ۱۹). باتوجه به تأثیر اکسین‌ها بویژه 2,4-D در بیان ژن

می‌توان گفت احتمالاً کاربرد 2,4-D در کنار دیگر شرایط مساعد برای جنین‌زایی، مناسب بوده و باعث القای جنین‌زایی سوماتیکی در ریزنمونه‌ها می‌شود.

نتایج بخش جنین‌زایی آزمایش حاکی از مناسب بودن غلظت پایین آلژینات سدیم (۳/۵ درصد) به همراه کلرید کلسیم ۵۰ میلی مولار در دستیابی به بذر مصنوعی هیدراته بود. در مطالعه‌ای مشابه ویلهلم و همکاران (۳۶) در مطالعه‌ای روی بلوط قرمز اروپایی *Quercus robur* L. جنین‌های سوماتیکی را با ۴ غلظت آلژینات سدیم پوشش‌دار کردند که مناسب‌ترین غلظت آلژینات سدیم ۳ درصد گزارش شد. ایپیکسی و همکاران (۱۵) روی پوشش‌دار کردن بذر *Paulownia elongate* از غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۳ درصد آلژینات سدیم و ۵۰، ۶۰ و ۸۰ میلی مولار محلول کلرید کلسیم استفاده نمودند که پس از پایان آزمایش بیشترین بقا و درصد جوانه‌زنی در آلژینات سدیم ۳ درصد و کلرید کلسیم ۵۰ میلی مولار مشاهده شد. در مطالعه‌ای دیگر سربی و مرادی (۳) در مطالعه‌ای جنین‌های سوماتیکی دو رقم چویل (کوه‌گل و چهل چشمه) را توسط دو غلظت آلژینات سدیم پوشش‌دار کردند و بیشترین درصد جوانه‌زنی برای رقم کوه‌گل در آلژینات سدیم ۳ درصد و کلرید کلسیم ۵۰ میلی‌مولار و رقم چهل چشمه آلژینات سدیم ۲ درصد و کلرید کلسیم ۲۵ میلی‌مولار مشاهده نمودند. در مطالعه‌ای نیرالا و همکاران (۲۳) روی درخت انگور جنین‌های سوماتیکی را توسط آلژینات سدیم ۲ درصد و محلول کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار کپسوله کردند و در محیط کشت‌های مختلف کشت نمودند بیشترین درصد جوانه‌زنی (۶۹/۲) را در محیط MS ¼ مشاهده نمودند.

افزایش غلظت آلژینات سدیم منجر به کاهش جوانه‌زنی بذرهای پوشش‌دار شده شد. در مطالعه‌ای مشابه پینتوس و همکاران (۲۷) برای پوشش‌دار کردن جنین‌های سوماتیکی بلوط چوب‌پنبه، از آلژینات سدیم با غلظت ۵ درصد و کلرید کلسیم ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم استفاده کردند که برای درصد تبدیل به گیاهچه بین غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم تفاوت معنی‌داری دیده نشد و حدود ۴۰ درصد تبدیل به گیاهچه دراین مطالعه مشاهده شد. و آلژینات سدیم ۵ درصد در ترکیب با کلرید کلسیم ۱۰۰–۷۵ میلی مولار بافت خیلی سختی را ایجاد کرد که مانع از جوانه‌زنی قطعه‌های قابل تکثیرها شد.

عامل اصلی ایجاد ذرات آلژینات کلسیم، تمایل گروه‌های عاملی و بویژه گروه‌های کربوکسیلاتی زنجیرهای پلیمر آلژینات سدیم برای ایجاد پیوند با یون کلسیم و تشکیل ساختار کمپلکس با این یون است ذرات آلژینات کلسیم به دلیل ماهیت الکتروستاتیکی و پیوند یونی بسیار قوی، همواره بعنوان ذراتی با چسبندگی زیاد به یکدیگر شناخته می‌شوند (۲). در غلظت ۴/۵ درصد آلژینات سدیم و کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار بذرهای سختی تشکیل شد و جوانه‌زنی بسیار کند داشتند. باتوجه به اینکه غلظت محیط کشت MS در این آزمایش‌ها برای کپسوله کردن جنین‌های سوماتیکی بکار رفته برابر بود بنابراین عامل دیگری مثل پیوندها تعیین‌کننده درصد جوانه‌زنی است. استفاده از غلظت‌های بالاتر کلرید کلسیم باعث تشکیل پیوند قوی‌تری می‌شود و سختی پوسته را افزایش می‌دهد شاید یکی از دلایل جوانه‌زنی پایین بذرهای کپسوله شده در غلظت کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار این موضوع باشد. از طرفی در آزمایشاتی که روی پوشش‌دار کردن قطعه‌های قابل تکثیرهای آکاسیا صورت گرفت، از آلژینات سدیم در غلظت‌های ۲ تا ۵ درصد و کلرید کلسیم در غلظت‌های ۱۰۰–۷۵ میلی‌مولار استفاده شد. در غلظت ۲ درصد آلژینات سدیم مهره‌ها به‌اندازه کافی سخت و محکم نبودند تا براحتی بوسیله‌ی پنس به محیط کشت جهت ارزیابی جوانه‌زنی انتقال داده شوند (۲۴).

نتیجه‌گیری

نتایج کلی آزمایش‌ها نشان داد که بیشترین جنین کروی و اژدری در بلوط ایرانی با استفاده از ریز نمونه جنین زیگوتی نابالغ و هورمون 2,4-D با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. نتایج همچنین نشان‌دهنده این موضوع بود که با افزایش غلظت آلژینات سدیم میزان جوانه‌زنی بذرهای پوشش‌دار شده کاهش یافتند. برای پوشش‌دار کردن جنین‌های سوماتیکی مناسب‌ترین ترکیب آلژینات سدیم ۳/۵ درصد و کلرید کلسیم ۵۰ میلی‌مولار بود، که بیشترین درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی در این ترکیب تیماری مشاهده شد.

منابع

۱- جزیره‌ای، م. ح.، و ابراهیمی رستاقی، م.، ۱۳۹۲. جنگل‌شناسی زاگرس، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، ۵۶۰ صفحه.

۲- دائمی، ح.، باریکانی، م.، و برمر، م.، ۱۳۹۱. اثر متغیرهای غلظت یون‌های کلسیم و آلژینات بر خواص نانو ذرات کلسیم آلژینات، مجله علوم و تکنولوژی پلیمر، ۲۶ (۱)، صفحات۳۲-۲۵.

۳- سربی، ا.، و مرادی، ع.، ۱۳۹۷. تولید بذر مصنوعی هیدراته در گیاه دارویی چویل (*Ferulago angulata* L.) از طریق کپسوله کردن جنین‌های رویشی. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۳۱(۱)، صفحات ۲۴۱-۲۳۲.

۴- طالبی، م.، ثاقب طالبی، خ.، و جهانبازی گوجانی، ح.، ۱۳۸۵. بررسی نیاز رویشگاهی و برخی خصوصیات کمی و کیفی بلوط ایران، فصلنامه‌ی علمی پژوهشی تحقیقات جنگل‌ها و صنوبر، (۱۴)، صفحات ۷۹-۶۷.

5- Aida, T. M., Yamagata, T., Watanabe, M., and Smith, J. R. L., 2010. Depolymerization of Sodium Alginate under Hydrothermal Conditions. Journal of Carbohydrate Polymers, Elsevier, 80 (1), PP: 296-302.

6- Aquea, F., Poupin, M. J., Matus, J. T., Gebauer, M., Medina, C., and Arce-Johnson, P., 2008. Synthetic seed production from somatic embryos of *Pinus radiate*. Journal of Biotechnology Letters, 30, PP: 1847–1852.

7- Balaraju, K., Saravanan, S., Agastian, P., and Ignacimuthu, S., 2011. A rapid system for micropropagation of *Swertia chirata* Buch. - Ham. Ex Wall. An endangered medicinal herb via direct somatic embryogenesis. Journal of Acta Physiologiae Plantarum, 33, PP: 1123–1133.

8- Capuana, M., Petrini, G., Marco, A. D., and Giannini, R., 2007. Plant regeneration of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) by somatic embryogenesis. In Vitro Cellular and Developmental Biology –Plant, 43, PP: 101–110.

9- Das, D. K., Rahman, A., Kumari, D., and Kumari, N., 2016. Synthetic Seed Preparation, Germination and Plantlet Regeneration of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). American Journal of Plant Sciences, 7, PP: 1395-1406.

10- Du, L., Zhou, S., and Bao, M. Z., 2007. Effect of plant growth regulators on direct somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.) from immature zygotic embryos and embryogenic calli induction. Forestry Studies in China, 9, PP: 267–271.

11- Ducos, J. P., Lambot, C., and Petiard, V., 2007. Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. International Journal of Plant Developmental Biology, 1, PP: 1–12.

12- Feher, A., 2008. The initiation phase of SE: what we know and what we don't. Journal of Acta Biologyca Szegediensis, 52(1), PP: 53–56.

13- Feher, A., Pasternak, T. P., and Dudits, D., 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Journal of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 74, PP: 201–228.

14- Ikeda-Iwai, M., Satoh, S., and Kamada, H., 2002. Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos. Journal of Experimental Botany, 53, PP: 1575–1580.

15- Ipekci, Z., and N., Gozukirmizi, 2003. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from Paulownia elongate. Journal of Plant Cell Reports, 22, PP: 16–24.

16- Ikeda-Iwai, M., S. Satoh, and H. Kamada, 2002. Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos. Journal of Experimental Botany. 53, 1575–1580.

17- Jimenez, V. M., 2001. Regulation of in vitro SE with emphasis on to the role of endogenous hormones. Revista Brasileria de Fisioterapia, 3, PP: 196–223.

18- Jimenez, V. M., 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro SE. journal of Plant Growth Regulation, 47(2–3), PP: 91–110.

19- Jimenez, V. M., and Thomas, C., 2005. Participation of plant hormones in determination and progression of SE. In: Mujib A, Samaj J (Eds) SE, plant cell monographs (2). Springer, Berlin, PP: 103–118.

20- Johnson, P. S., Shifley, S. R., and Rogers, R., 2002. The ecology and silviculture of oaks. CABI Publishing, New York, NY, 503 p.

21- Malabadi, R., and Van, S. J., 2006. Cold-enhanced induction and maturation of somatic embryos from intact megagametophyte explants in *Pinus patula* is mediated by calcium. Journal of Botany, 72 (4), PP: 613-618.

22- Montalbán, I., DeDiego, N., and Moncaleán, P., 2012. Enhancing initiation and proliferation in radiate pine *(Pinus radiate D. Don)* somatic embryogenesis through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments. *Acta Physiol. Plant* 34, PP: 451–460.

23- Nirala, N. K., Das, D. K., Reddy, M. K., Srivastava, P. S., Sopory, S. K., and Upadhyaya, K. C., 2010. Encapsulated somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.): An efficient way for storage, transport and multiplication of pathogen free plant material. Plant Tissue and Agribiotechnology, 18 (1), PP: 159-162.

24- Nor Asmah, H., Nor Hasnida, H., Nashatul Zaimah, N. A., Noraliza, A., and Nadiah Salmi, N., 2011. Synthetic seed technology for encapsulation and regrowth of in vitro-derived Acacia hybrid shoot and axillary buds. African Journal of Biotechnology, 10(40), PP: 7820-7824.

25- Ostrolucka, M. G., Gajdosova, A., and Libiakova, G., 2007. Protocol for micropropagation of Quercus spp.: 85–91. In: Jain, S.M. and Haggman, H., (Eds.). Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer, Dordrecht, 562 p.

26- Pijut, P. M., Lawson, S. S., and Michler, C. H., 2011. Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 47, PP: 123-147.

27- Pintos, B., Bueno, M. A., Cuenca, B., and Manzanera, J. A., 2008. Synthetic seed production from encapsulated somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.) and automated growth monitoring. Journal of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 95, PP: 217–225.

28- Prakash, M. G., and Gurumurthi, K., 2010. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 100, PP: 13–20.

29- Prewein, C., and Wilhelm, E., 2003. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 39, PP: 613–617.

30- Rudus, I., Weiler, E., and Kepczynska, E., 2009. Do stress-related phytohormones, abscisic acid and jasmonic acid play a role in the regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis? Plant Growth Regulation, 59, PP: 159–169.

31- San José, M. C., Couselo, J. L., Martínez, M. T., Mansilla, P., and Corredoira, E., 2016. Somatic Embryogenesis in *Camellia japonica* L. Challenges and Future Prospects, Estación Fitopatolóxica do Areeiro, EFA, 122 p.

32- Shi, X., Dai, X., Liu, G., and Bao, M., 2009. Enhancement of somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.): Osmotic stress and other factors affecting somatic embryo formation on hormone-free medium. Trees Structure and Function, 23, PP: 1033–1042.

33- Singh, A. K., and Chand, S., 2010. Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Dalbergia sissoo* Roxb. Indian Journal of Biotechnology. 9, PP: 319-324.

34- Snyman, S. J., Meyer, G. M., Richards, J. M., Haricharan, N., Ramgareeb, S., and Huckett, B. I., 2006. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: Effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. Plant Cell Reports, 25, PP: 1016–1023.

35- Von Aderkas, P., and Bonga, J. M., 2000. Influencing micropropagation and SE in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. Tree Physiol. 20, PP: 921–928.

36- Wilhelm, E., Endemann, M., and Hristoforoglu, K., 1999. Somatic embryogenesis in oak

(*Quercus robur* L.) and production of artificial seeds. In: Espinel S, Ritter E (ed) Proceedings of the application of biotechnology to forest genetics, Biofor 99, Vitoria (Spain), PP: 213–225.

37- Wiweger, M., 2003. Signal molecules in embryogenesis of Norway spruce. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, PP: 1–53. ISSN 1401-6230.

38- Yang, Y., Guan, S., Zhai, H., He, S., and Liu, Q., 2009. Development and evaluation of a storage root-bearing sweet potato somatic hybrid between *Ipomoea batatas* (L.) Lam. and *I. triloba* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 99, PP: 83–89.

39- Zhang, B. H., Wang, Q. L., Liu, F., Wang, K. B., and Frazier, T. P., 2009. Highly efficient plant regeneration through somatic embryogenesis in 20 elites commercial cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. Plant Omics, 2, PP: 259–268.

Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production of persian oak (*Quercus brantii* L.) using 2,4-D hormone

Feyzi E., Moradi A. and Maasoumiasl A.

Dept. of Agriculture and Plant Breeding, Agriculture College, Yasuj University, Yasuj, I.R. of Iran

Astract

Persian oak (*Quercus brantii* L.) is the most important Zagros forest tree in Iran. Therefore, in order to maintain the survival of this specie, use the laboratory methods such as tissue culture and somatic embryogenesis is suitable. So, two separate experiments were designed includes somatic embryogenesis and encapsulation of somatic embryos. Somatic embryogenesis experiment was done in CRD with 4 replications. In this experiment immature zygotic embryos as explant source and 2,4-D in 4 level (0, 0.25, 0.5 and 0.75 mg l^{-1}) were used. Encapsulation test was done in factorial based on CRD with 4 replications; factors include sodium alginate in 3 concentrations (3.5, 4 and 4.5 %) and $CaCl_2$ in two concentrations (50 and 100 Mm). Results of somatic embryogenesis showed that the maximum number of somatic embryos and the highest somatic embryogenesis percentage (66.6%) were observed in 0.25 mg l^{-1} 2,4-D. Results of encapsulation showed that, sodium alginate 3.5% with $CaCl_2$ 50 mM was the best treatment for encapsulation of somatic embryos and had highest germination percentage (100%).

Key words: Synthetic seed, Persian Oak, Embryogenesis and 2,4-D