DOI: 10.22034/ijsst.2017.108296

**"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"**
**جلد پنجم، شماره ۲، پائیز و زمستان ۹۵**
**شماره صفحه: ۲۴۷- ۲۳۵**

# باززایی مستقیم گیاه آفتابگردان (*Helianthus annuus* hyb. Farrokh) از بذرهای مصنوعی در پاسخ به دوره‌های مختلف ذخیره سرمایی

سهیلا مرادی[1*]، محمدرضا عظیمی[2]، سعید پورداد[3] و فریبرز حبیبی[4]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۲- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۳- عضو هیئت علمی مؤسسه کشت دیم سرا رود، کرمانشاه

۴-کارشناس مرکز تحقیقات کشاورزی، کرمانشاه

۵- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

## چکیده

در این پژوهش، رشد مجدد نوک شاخه گیاهک‌های کپسوله شده آفتابگردان پس از نگهداری در دمای پایین مورد بررسی قرار گرفت. نوک شاخه‌های آفتابگردان (*Helianthus annuus* hyb. Farrokh) برای بررسی پاسخ به دوره‌های مختلف ذخیره سرمایی، در آلژینات سدیم ۳ ٪ و کلریدکلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار کپسوله شده و سپس بذور مصنوعی حاصل از کپسوله کردن نوک شاخه‌ها برای دوره‌های مختلف صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روزه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. توانایی رشد مجدد نوک شاخه‌های کپسوله شده تحت تأثیر طول دوره نگهداری و حضور یا عدم حضور مواد غذایی مدیا و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در دانه‌های آلژینات سدیم مورد بررسی قرار گرفت. حداکثر درصد جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی ۶۰ روز بعد از کشت بر روی محیط کشت فاقد تنظیم کننده‌های رشد در نوک شاخه‌های کپسوله نشده و نوک شاخه‌های کپسوله شده در آلژینات حاوی آب مقطر، محیط کشت استاندارد و محیط کشت استاندارد به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به ترتیب ۳۰، ۴۰، ۶۵ و ۷۰ ٪ بود. با افزایش مدت زمان نگهداری در سرما میزان باززایی ریزنمونه‌ها کاهش یافت که این کاهش در نوک شاخه‌های کپسوله نشده شدیدتر بود. افزودن مواد غذایی کشت استاندارد به کپسول‌های آلژینات به طور معنی‌داری جوانه‌زنی آن‌ها را پس از دوره‌های نگهداری بهبود بخشید.

**کلمات کلیدی:** بذر مصنوعی، ذخیره سرمایی، ماتریکس آلژینات، محیط کشت استاندارد، نوک شاخه‌های کپسوله شده

## مقدمه

امروزه تکنولوژی بذر مصنوعی ابزار کارامدی برای تکثیر کلونی گونه‌های گیاهی می‌باشد. ایده تولید بذر مصنوعی اولین بار توسط موراشیک در سال ۱۹۷۸ مطرح شد و اولین بذرهای مصنوعی از جنین‌های سوماتیکی بدست آمدند با این حال در سال‌های اخیر، ریز نمونه‌های دیگری از جمله جوانه‌های ساقه، نوک شاخه‌ها، کالوس‌های جنین‌زا یا اندام‌زا و غیره هم در تولید بذر مصنوعی به کار گرفته شده است (Ara *et al.*, 2000). در میان ریزنمونه‌های غیر جنسی، نوک شاخه‌ها به دلیل فعالیت‌های میتوزی شدید ریزنمونه‌های مناسب‌تری هستند (Hegazi, 2011). کپسوله کردن ریزنمونه‌های رویشی یک سیستم تکثیر کلونی باصرفه بوده و

*نویسنده مسئول : سهیلا مرادی؛ آدرس: زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات
E-mail: moradi_s998@ymail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۱
تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۰۵/۰۵

می‌تواند به عنوان جایگزینی برای بذرهای مصنوعی حاصل از جنین‌های سوماتیکی استفاده شود (Singh *et al.*, 2010). این نمونه‌های رویشی کپسوله شده را همچنین می‌توان برای نگهداری ژرم‌پلاسم گونه‌های گیاهی منتخب و تبادل مواد گیاهی استریل بین آزمایشگاه‌ها به کار برد (Rady and Hanaf, 2004). نگهداری ژرم پلاسم اغلب به شرایطی اشاره دارد که نسبت رشد بافت به حداقل کاهش می‌یابد. کپسوله‌کردن بافت‌ها در آلژینات تنفس آن‌ها را محدود کرده، بنابراین رشدشان را کاهش داده و از آن‌ها به عنوان استوک محافظت می‌کند (Bernard *et al.*, 2002). نگهداری در سرما، هزینه و فضای نگهداری ژرم پلاسم، سختی، عدم پایداری ژنتیکی و باززایی نابجای ناشی از واکشت‌های متعدد را کاهش می‌دهد (West *et al.*, 2006). پوشش مصنوعی مورد استفاده برای کپسوله کردن یک محافظ فیزیکی برای ریزنمونه‌ها فراهم کرده و به عنوان آندوسپرم مصنوعی می‌تواند حاوی منبع کربن، تنظیم‌کننده‌های رشد، آنتی بیوتیک‌ها، قارچ کش‌ها و مواد دیگر باشد که جوانه‌زنی را بهتر کند بدون اینکه موجب القا تغییرات نامطلوب شود (Antonietta *et al.*, 2007). در منابع مختلف افزودنی‌های متفاوتی جهت جلوگیری از آلودگی و افزایش میزان بقا و جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی کپسوله با ژل کپسوله کننده تلفیق شده است (Malabadi and Van Staden, 2005). ردی و همکاران (Reddy *et al.*, 2005) نشان دادند که بذرهای مصنوعی *Rauvolfia* حاصل از کپسوله کردن نوک شاخه‌های به دست آمده از گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای را می‌توان بیش از سه ماه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. احمد و همکاران (Ahmed *et al.*, 2007) نوک شاخه‌های به دست آمده از کشت در شرایط درون شیشه‌ای گلابی را در آلژینات سدیم سه درصد کپسوله کردند. آن‌ها در آزمایش خود تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد در غلظت‌های مختلف، نوع محیط، غلظت محیط کشت استاندارد، افزایش مقدار ساکارز، برخی کند کننده‌های رشد و مدت زمان نگهداری را روی توانایی جوانه‌زنی و رشد نوک شاخه‌های کپسوله شده بررسی کردند. حداکثر تبدیل نوک شاخه‌های کپسوله شده به گیاهچه پس از ۱۶ هفته، ۳۵ ٪ بود که روی محیط کشت استاندارد حاوی BA ۰/۷۵mg/l به دست آمد. زینالی و همکاران (Zeynali *et al.*, 2013) عنوان کردند با افزایش مدت نگهداری در دمای ۴°c، قدرت باززایی جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده کلزا (*Brassica napus*) کاهش پیدا می‌کند.

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) از خانواده Asteraceae یکی از مهمترین گیاهان روغنی به شمار می‌رود. افزایش درصد روغن و نیز مقاومت به بیماری‌ها از اصلی‌ترین اهداف برنامه‌های اصلاحی آفتابگردان می‌باشند. در سال‌های اخیر تکنیک‌های بیوتکنولوژی مثل کشت بافت و انتقال ژن برای اصلاح آفتابگردان مورد توجه قرار گرفته‌اند اما بهبود ژنتیکی این محصول از طریق ابزار بیوتکنولوژی به وسیله عوامل مختلفی از جمله سیستم باززایی کارا که پیش نیاز مطالعات انتقال ژن است، محدود شده است (Fiore *et al.*, 1997). در دو دهه اخیر روش‌های گوناگونی نظیر اندام‌زایی و جنین‌زایی سوماتیکی برای باززایی آفتابگردان انجام شده است (Bolandi *et al.*, 2000; Petitprez *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007). در همه این روش‌ها، نسبت پایین باززایی گیاه، ریخت‌زایی غیر نرمال، عدم توانایی برای بلوغ

همزمان جنین‌ها و گلدهی نابهنگام از مهمترین مشکلات هستند (Gray and Purohit, 1991; Fiore *et al.*, 1997). بنابراین تکنولوژی بذر مصنوعی امروزه کمک با ارزشی برای ازدیاد کلون‌های گیاهی در مقیاس وسیع است (Singh *et al.*, 2009b).

در این مطالعه توانایی استفاده از نوک شاخه‌های آفتابگردان برای تولید بذرهای مصنوعی بررسی شد. به علاوه بررسی تأثیر دوره‌های نگهداری و کاربرد مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد در آندوسپرم مصنوعی روی توانایی تبدیل و رشد بذرهای مصنوعی از اهداف اصلی این پژوهش بود.

## مواد و روش‌ها

در این بررسی از بذرهای آفتابگردان (هیبرید فرخ) برای تهیه بذر مصنوعی و اجرای آزمایش استفاده شد. بذرها از بخش دانه‌های روغنی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال بذر کرج تهیه گردید و آزمایش‌ها در آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه در سال ۱۳۹۱ انجام شد. مراحل تولید بذر مصنوعی و بررسی تأثیر نگهداری در دمای پایین روی باززایی آن‌ها به شرح ذیل صورت گرفت:

ضد عفونی مواد گیاهی و تکثیر ریزنمونه‌ها: بذور بالغ به مدت ۱۰ دقیقه در محلول قارچ کش بنومیل (۱/۵ گرم در هزار میلی‌لیتر آب مقطر) حاوی سه قطره توین ۲۰ قرار گرفته و بعد از آبکشی با آب مقطر به زیر هود منتقل شدند. در زیر هود نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه در الکل اتانول ۷۰ ٪ شسته شده و به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. سپس بذور در هیپوکلریت سدیم ۵۰ ٪ استریل سطحی شده و سه بار با آب مقطر استریل هر بار ۵ دقیقه آبکشی شدند. برای ظهور گیاهچه‌ها، بذرها در محیط کشت استاندارد حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار کشت شدند. pH محیط قبل از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه روی ۵/۷ تنظیم شد. بذرها در لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط جوانه‌زنی در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶/۸ تاریکی/روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. قطعات میانگره گیاهچه‌های حاصل از کشت بذور بالغ جهت تکثیر در محیط کشت استاندارد واکشت شدند.

کپسوله کردن نوک شاخه‌ها: نوک شاخه‌های حاصل از شرایط درون شیشه جهت تولید بذر مصنوعی استفاده گردید. ابتدا نوک شاخه‌ها زیر هود با استفاده از اسکالپل جدا شده و داخل آلژینات سدیم انداخته شدند. برای کپسوله کردن نوک شاخه‌ها در تهیه ژل آلژینات سدیم، از سه ماتریکس آب مقطر، محیط کشت استاندارد مایع و محیط کشت استاندارد مایع به همراه دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و دو میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA استفاده شد. نوک شاخه‌ها حدود پنج دقیقه داخل ژل باقی ماندند. بعد از این مدت با استفاده از سمپلر نوک شاخه‌ها به همراه تقریباً دو میلی‌لیتر از ژل برداشته‌شده و به آرامی داخل کلرید کلسیم رهاسازی شدند. کپسوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه داخل کلرید کلسیم جهت پلیمریزاسیون و سفت شدن کپسوله‌ها باقی ماندند. در آخر کپسوله‌ها با پنس برداشته‌شده و در پتری‌دیش‌های خالی و استریل قرار داده شدند. تأثیر دوره‌های نگهداری مختلف روی باززایی و رشد نوک شاخه‌های کپسوله شده و کپسوله نشده: دور پتری‌ها پارافیلم گرفته شده و پتری‌دیش‌ها داخل فویل آلومینیومی اتوکلاو شده و

نایلون فریزر و در یخچال چهار درجه سانتی‌گراد در دوره‌های صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ روزه نگهداری شدند. تعدادی از نوک شاخه‌ها نیز بدون کپسوله شدن (گروه شاهد) در همان شرایط نگهداری شدند. در پایان هر دوره سرمایی، بذور مصنوعی (نوک شاخه‌های کپسوله شده) و نوک شاخه‌های کپسوله نشده به محیط کشت استاندارد جامد فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل شده و میزان باززایی و رشد آن‌ها چهار هفته پس از کشت بررسی شد.

طرح آزمایشی و تجزیه داده‌ها: تیمارها در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار اجرا شد. فاکتورهای این آزمایش شامل ماتریکس تهیه ژل آلژینات سدیم در سه سطح (همراه با ریزنمونه‌های کپسوله نشده به عنوان شاهد) و دوره‌های نگهداری در سرما در ۵ سطح (شامل دوره‌های صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ روزه) بود. در مواردی که داده‌ها به صورت درصدی و حاصل از شمارش بودند با استفاده از فرمول تبدیل زاویه‌ای Arcsin√x تبدیل شده و در صورت وجود صفر بین داده‌ها از فرمول Arcsin√x +۰/۵ برای تبدیل داده‌ها استفاده شد. داده‌های حاصل از آزمایش از طریق تجزیه واریانس یک طرفه آنالیز شدند. میانگین‌ها نیز با آزمون دانکن و در سطح احتمال α=۰/۰۵ با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C مورد ارزیابی قرار گرفتند.

## نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که بین مدت زمان نگهداری نوک شاخه‌ها در سرما و نوع ماتریکس آلژینات سدیم و همچنین اثر متقابل این دو فاکتور از لحاظ تمام صفات اختلاف بسیار معنی‌داری در سطح یک درصد وجود دارد. برش‌دهی اثر متقابل نیز نشان داد که با افزایش طول دوره نگهداری در سرما تفاوت معنی‌داری بین نوع ماتریکس آلژینات سدیم وجود دارد. به نظر می‌رسد با افزایش مدت زمان نگهداری در دمای پایین وجود یک پوشش محافظ و نیز حضور مواد غذایی و تنظیم کننده‌های رشد جهت جوانه‌زنی و رشد بهتر ریزنمونه‌ها ضروری است.

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) برای صفات اندازه گیری شده در بذرهای مصنوعی نوک شاخه‌ها در آفتابگردان

Table 1- Analysis of variance (Mean Squares) for measured parameters in synthetic seed of shoot tip in sunflower

| منابع تغییرات S.O.V | درجه آزادی df | میانگین مربعات (Mean Squares) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | طول شاخه Shoot length | تعداد برگ Leaf number | طول برگ Leaf length | عرض برگ Leaf width | طول ریشه Root length | درصد جوانه‌زنی Germination percent | درصد ریشه‌دهی Rooting percent |
| دوره نگهداری maintenance period | 4 | 3276.07** | 254.47** | 103.99** | 4.70** | 2862.62** | 7896.87** | 11084.37** |
| ماتریکس Matrix | 3 | 2239.73** | 260.54** | 276.50** | 25.80** | 3613.83** | 1739.58** | 3422.91** |
| دوره نگهداری × ماتریکس maintenance period× Matrix | 12 | 200.67** | 8.99** | 24.97** | 3.56** | 59.19** | 359.37** | 334.37ns |
| Error | 80 | 1.77 | 1.68 | 0.84 | 0.15 | 4.66 | 128.12 | 209.37 |
| ضریب تغییرات CV (%) | | 3 | 10.10 | 6.26 | 6.52 | 6.70 | 14.60 | 21.30 |

** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ ٪ و غیر معنی‌دار

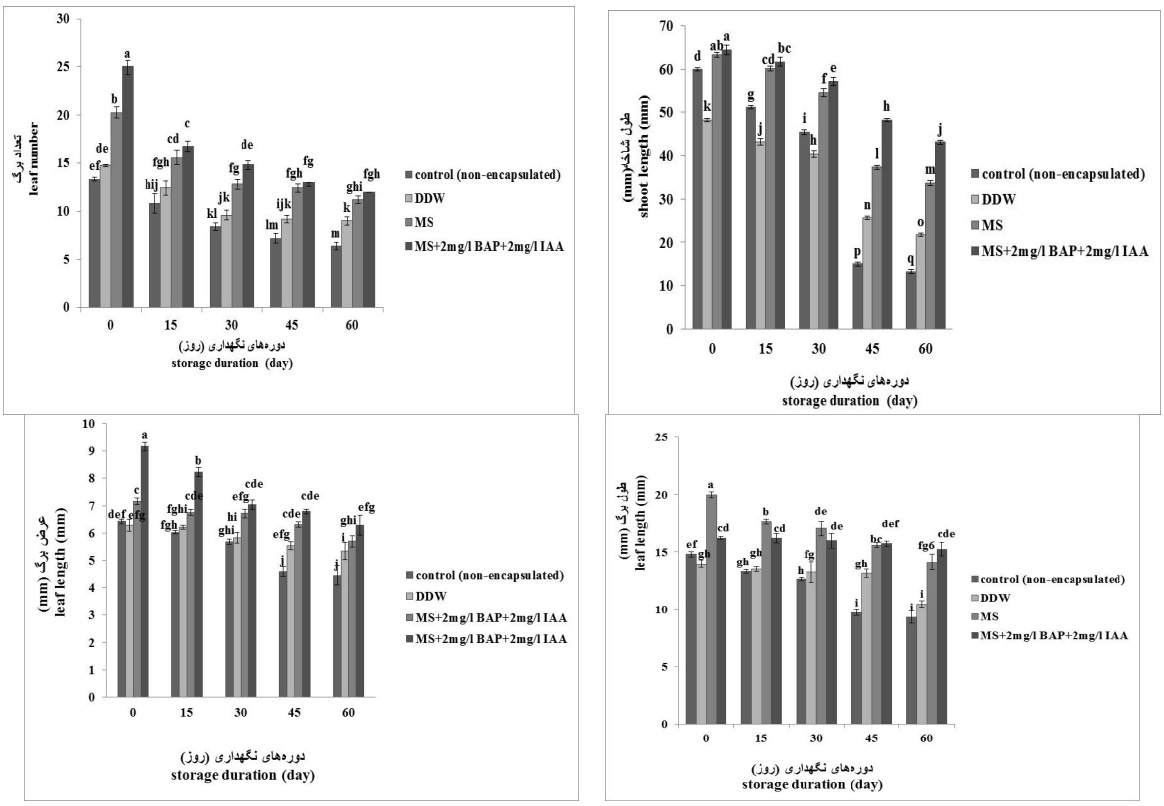
** and ns, significant 1% of probability and no significant, respectively

جدول ۲- برش‌دهی اثر متقابل دوره‌های نگهداری و ماتریکس آلژینات سدیم در دوره‌های نگهداری برای صفات اندازه گیری شده در بذرهای مصنوعی نوک شاخه‌های آفتابگردان

Table 2- Slicing of maintenance period × sodium alginate matrix in for measured parameters in synthetic seed of shoot tip in sunflower in maintenance period

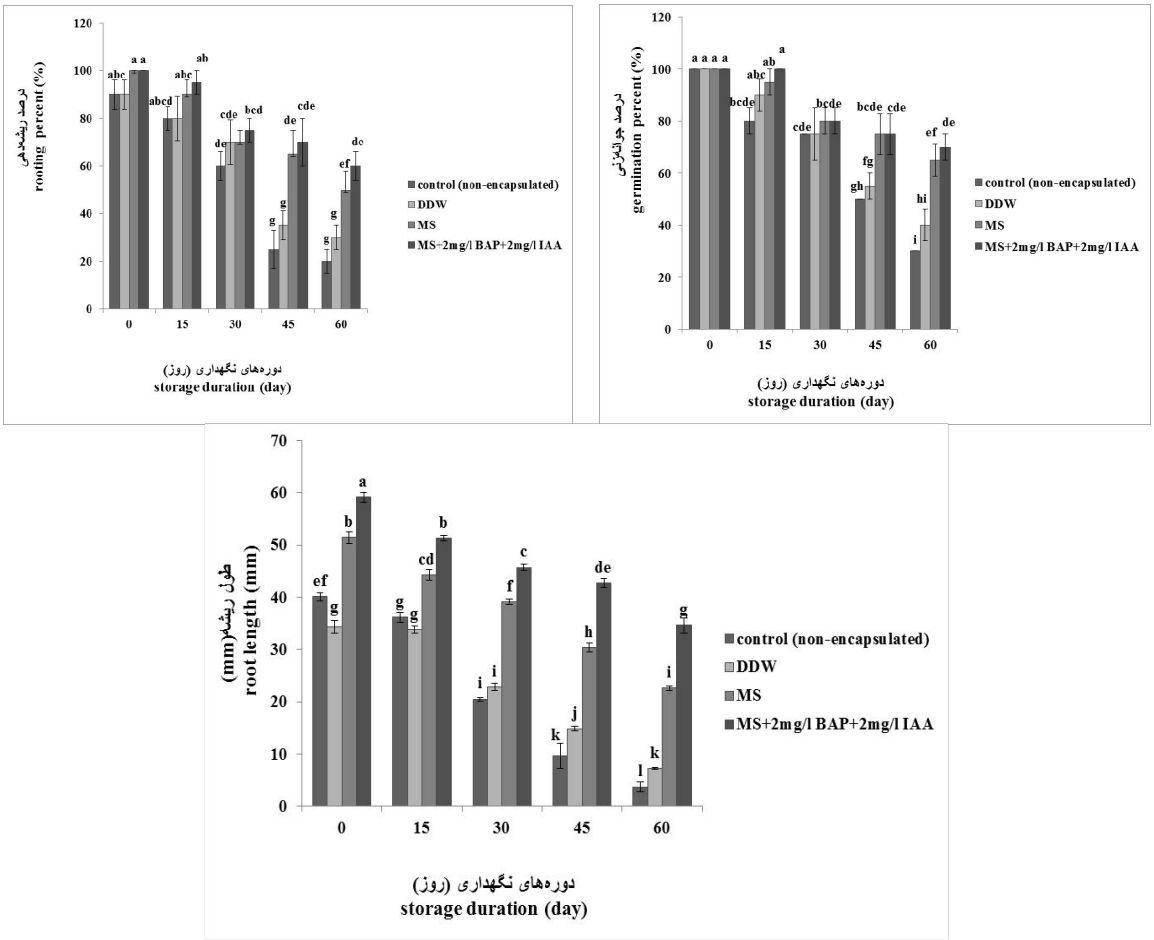
| | | میانگین مربعات (Mean Squares) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| دوره نگهداری maintenance period | درجه آزادی df | طول شاخه Shoot length | تعداد برگ Leaf number | طول برگ Leaf length | عرض برگ Leaf width | طول ریشه Root length | درصد جوانه‌زنی Germination percent | درصد ریشه‌دهی Rooting percent |
| 0 | 3 | 627.51$^{*}$ | 144.93$^{**}$ | 42.48$^{**}$ | 0.94$^{**}$ | 623.75$^{**}$ | 1.57$^{ns}$ | 166.66$^{ns}$ |
| 15 | 3 | 368.13$^{ns}$ | 38.60$^{**}$ | 24.30$^{**}$ | 0.79$^{*}$ | 316.05$^{**}$ | 364.58$^{*}$ | 281.25$^{ns}$ |
| 30 | 3 | 148.71$^{**}$ | 45.53$^{**}$ | 10.90$^{**}$ | 1.70$^{**}$ | 757.22$^{**}$ | 83.33$^{ns}$ | 197.91$^{ns}$ |
| 45 | 3 | 1033.64$^{**}$ | 35.91$^{**}$ | 48.81$^{**}$ | 17.95$^{**}$ | 1130.81$^{**}$ | 864.58$^{**}$ | 2447.91$^{**}$ |
| 60 | 3 | 864.40$^{**}$ | 31.51$^{**}$ | 48.49$^{**}$ | 13.11$^{**}$ | 1022.76$^{**}$ | 1864.58$^{**}$ | 1666.66$^{**}$ |

نگهداری در سرما نیز تأثیر معنی‌داری روی تمام صفات داشت و همان طور که در شکل‌های ۱ و ۲ مشاهده می‌شود سبب کاهش در تمام صفات مورد ارزیابی شد که این کاهش در ریزنمونه‌های کپسوله نشده و در عدم حضور مواد غذایی در ماتریکس کپسوله کننده بیش‌تر بود.




شکل ۱- تأثیر نگهداری در سرما بر برخی صفات در نوک شاخه‌های کپسوله شده در ماتریکس‌های مختلف

Figure 1- The effects of the cold on some traits in the encapsulated shoots tip in various matrices




ادامه شکل ۱- تأثیر نگهداری در سرما بر برخی صفات در نوک شاخه‌های کپسوله شده در ماتریکس‌های مختلف

Figure 1continued- The effects of the cold on some traits in the encapsulated shoots tip in various matrices

نتایج حاصل از مقایسه گروهی بین تیمارها نشان داد (جدول ۳) که بین ریزنمونه‌های کپسوله نشده که در دوره‌های مختلف سرمایی نگهداری شده بودند با ریزنمونه‌های کپسوله شده، همچنین بین کاربرد مواد غذایی و عدم کاربرد مواد غذایی در ماتریکس کپسوله کننده اختلاف بسیار معنی‌داری از لحاظ تمام صفات مورد ارزیابی در سطح احتمال ۱ ٪ وجود داشت. استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس آلژینات نیز به غیر از درصد ریشه‌دهی ریزنمونه‌های کپسوله شده سایر صفات مورد ارزیابی را تحت تأثیر قرار داد.

با افزایش مدت زمان نگهداری میزان شیشه‌ای شدن افزایش یافت که در ماتریکس‌های حاوی آب مقطر و تنظیم‌کننده‌های رشد این افزایش بیش‌تر بود. پدیده شیشه‌ای شدن از جمله مشکلات عمده کشت بافت آفتابگردان است. طور کلی عوامل متعددی باعث پیدایش چنین عارضه ای می شوند. از مهم ترین این عوامل می توان وضعیت فیزیولوژیکی گیاه، محیط کشت، میزان آگار در محیط کشت، نوع ظرف کشت، مقدار استفاده از تنظیم کننده‌های رشدی به ویژه سیتوکینین‌ها و همچنین محل نگهداری گیاه از نظر نور، درجه حرارت، رطوبت را نام برد.

جدول ۳- مقایسه گروهی تیمارها جهت ارزیابی تأثیر کپسوله کردن و استفاده از مواد مختلف در ماتریکس کپسول‌ها و نگهداری در دوره‌های سرمایی در بذرهای مصنوعی نوک شاخه‌ها در آفتابگردان

Table 3- Treatment group comparisons for evaluating effect of encapsulated and the use of different materials in the matrix capsules and maintenance during cold periods in synthetic seed of shoot tip in sunflower

| | میانگین مربعات (Mean Squares) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| مقایسات Comparison | درجه آزادی df | طول شاخه Shoot length(mm) | تعداد برگ Leaf number | طول برگ Leaf length(mm) | عرض برگ Leaf width(mm) | طول ریشه Root length(mm) | درصد جوانه‌زنی Germination percent | درصد ریشه‌دهی Rooting percent |
| 1 | 1 | 2814.41$^{**}$ | 442.04$^{**}$ | 137.26$^{**}$ | 18.97$^{**}$ | 704.86$^{**}$ | 5857.39** | 9600.0$^{**}$ |
| 2 | 1 | 9784.31$^{**}$ | 602.08$^{**}$ | 642.72$^{**}$ | 54.07$^{**}$ | 4649.47$^{**}$ | 3168.75** | 9918.75$^{**}$ |
| 3 | 1 | 369.52$^{**}$ | 80.1$^{**}$ | 22.51$^{**}$ | 4.36$^{**}$ | 48.65$^{**}$ | 56.25** | 306.25$^{ns}$ |
| 4 | 1 | 8138.51$^{**}$ | 987.9$^{**}$ | 172.59$^{**}$ | 10.68$^{**}$ | 369.52$^{**}$ | 23382.03** | 30938.28$^{**}$ |

** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ ٪ و غیر معنی‌دار

$^{**}$ and $^{ns}$, significant 1% of probability and no significant, respectively

۱= نوک شاخه‌های کپسوله شده در مقایسه با شاهد (نوک شاخه‌های کپسوله نشده)

1= Encapsulated shoot tip compared to the control (non-encapsulated shoots tip)

۲= استفاده از مواد غذایی کشت استاندارد در ماتریکس آلژینات در مقایسه با عدم وجود مواد غذایی کشت استاندارد

2= Using MS nutrient in alginate matrix compared to free MS nutrient

۳= استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس آلژینات در مقایسه با عدم وجود تنظیم‌کننده‌های رشد

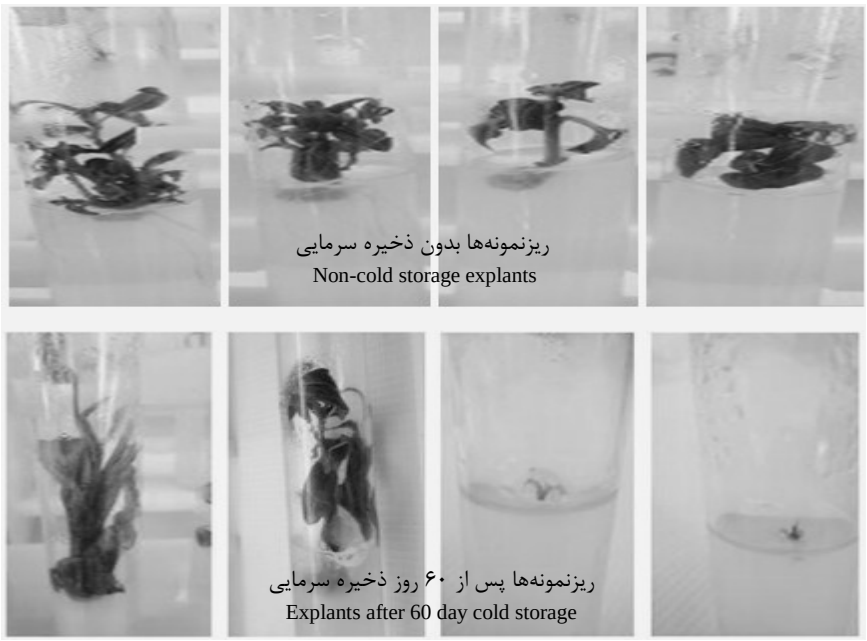
3= Using plant growth regulators in alginate matrix compared to free plant growth regulators

۴= نگهداری بذرهای مصنوعی در دوره‌های سرمایی در مقایسه با شاهد (عدم نگهداری در دوره‌های سرمایی)

4= Maintenance of synthetic seeds in during cold periods compared to control (not kept in cold periods)

گاسپر[1] (۱۹۸۶) حدس زد یک سری واکنش‌ها از جمله سطح اتیلن در این پدیده نقش دارند. ثابت شده است که افزودن کلرید کبالت باززایی شاخه را تحریک کرده و از تولید اتیلن جلوگیری می‌کند (Charaibi et al., 1991 and 1992). میزان شاخه‌زایی جانبی با افزایش مدت زمان نگهداری صرف‌نظر از نوع ماتریکس کاهش یافت و بعد از ۴۵ روز نگهداری در سرما هیچ‌گونه شاخه‌زایی جانبی در ریزنمونه‌ها مشاهده نشد. تنش سرمایی در دمای پایین باعث اختلال در رشد گیاه می‌شود. در ریزنمونه‌های رویشی کپسوله نشده که در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند با افزایش مدت نگهداری، پس از انتقال به محیط باززایی پدیده نامطلوب گلدهی پیش از بلوغ مشاهده شد (شکل ۳). گلدهی زودهنگام به عنوان یکی از پدیده‌های نامطلوب در کشت بافت آفتابگردان در نظر گرفته می‌شود به این دلیل که از شاخه‌های گل داده به سختی می‌توان بذر به دست آورد. عوامل مختلفی (ترکیبات نیترات در محیط، دمای پایین، کاهش طول روز، تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی و غیره) برای غلبه بر این مشکل در آفتابگردان پیشنهاد شده است. علت این پدیده ممکن است مکانیسم فرار برای مقابله با تنش اعمال شده روی گیاه باشد که در این حالت گیاه در یک واکنش غیر عادی با ورود سریع به فاز زایشی از تنش سرمایی ایجاد شده در دمای پایین فرار می‌کند (Charaibi et al., 1991 and 1992).

1- Gasper




شکل ۲- کاهش رشد ریزنمونه‌ها پس از نگهداری در دوره‌های سرمایی (به ترتیب از راست به چپ، نوک شاخه‌های کپسوله نشده، نوک شاخه‌های کپسوله شده در ماتریکس آلژینات حاوی آب مقطر، نوک شاخه‌های کپسوله شده در ماتریکس آلژینات حاوی محیط کشت استاندارد و نوک شاخه‌های کپسوله شده در ماتریکس حاوی محیط کشت استاندارد و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

Figure 2- Reduction of explants growth after maintenance in cold periods seeds (in order from right to left, not encapsulated shoot tips, shoot tips encapsulated in alginate matrix containing distilled water, shoot tips encapsulated in alginate matrix containing MS medium and shoot tips encapsulated in alginate matrix containing MS medium and plant growth regulators)

شکل ۳- پدیده نامطلوب گلدهی پیش از بلوغ درریزنمونه‌های رویشی کپسوله نشده

Figure 3- Undesirable phenomenon premature flowering in the encapsulated vegetative explants

قدرت بقا ریزنمونه‌های کپسوله شده و کپسوله نشده با افزایش مدت نگهداری کاهش پیدا کرد اما کاهش قوه نامیه ریزنمونه‌های کپسوله نشده نسبت به ریزنمونه‌های کپسوله شده شدیدتر بود که اختلاف جوانه‌زنی و رشد آن‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲) . ریزنمونه‌های کپسوله شده نسبت به ریزنمونه‌های کپسوله نشده زنده‌مانی خود را به میزان بیش‌تری حفظ کردند که می‌توان حدس زد که هیدروژل در این قابلیت بقا به میزان بیش‌تری نقش داشته باشد که ممکن است به دلیل حفاظت

ریزنمونه‌ها از خشک شدن توسط پوشش مصنوعی باشد (Naik and Chand, 2006; Antonietta *et al*., 2007). تأثیر مثبت کپسوله کردن ریزنمونه‌ها برای نگهداری در دوره‌های سرمایی توسط محققان دیگر نیز در توت فرنگی (Badr-Elden, 2013)، کلزا (Zeynali *et al*., 2013)، *Dalbergia sissoo* (Chand and Singh, 2004) و *Capparis orientalis* (Hegazi, 2011) نیز گزارش شده است.

نگهداری ریزنمونه‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد باعث اعمال تنش دمایی به آن‌ها می‌شود. قرار گرفتن گیاه در دمای پایین منجر به خروج آب از سلول‌ها و از دست رفتن آب سلول می‌گردد، بنابراین تحمل به دمای پایین همبستگی بالایی با تحمل به از دست دادن آب در اثر خشکی و شوری دارد. در شرایط تنش، گیاه جهت جلوگیری از آسیب به سلول‌ها و بافت‌ها با افزایش تولید اسمولیت‌ها سعی در تنظیم اسمولاریته دارد که ساخت این اسمولیت‌ها نیاز به صرف انرژی دارد. همچنین در شرایط تنش میزان ساخت و تولید رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد که صرف انرژی برای از بین بردن این تولیدات نامطلوب باعث کاهش رشد گیاه پس از رفع تنش و قرارگیری در شرایط مطلوب می‌شود (Ramezani Vishki, 2013). در شرایط تنش آماس سلول‌ها کاهش می‌یابد و این امر موجب کاهش رشد و تقسیم سلول‌ها و در نتیجه کاهش سرعت رشد و در نهایت کاهش ارتفاع شاخه‌ها و ریشه‌ها می‌شود. دلیل دیگر این امر را می‌توان به تولید ABA در شرایط تنش نسبت داد. ABA نقش عمده‌ای در واکنش‌های سازگاری گیاهان به تنش‌های محیطی دارد. ABA به سرعت به مناطق رشد گیاه منتقل شده و باعث کاهش توسعه سلولی می‌شود و متعاقب طولانی شدن تنش موجب کاهش در اندازه نهایی اندام‌هایی می‌شود که در آن‌ها تقسیم و توسعه سلولی انجام می‌گیرد (Ramezani Vishki, 2013).

آنونیتا و همکاران (Antonietta *et al*., 2007) نیز نتایج مشابهی را در مورد تأثیر نگهداری در سرما بر میزان باززایی و تمایز جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده در پرتقال به دست آوردند. علت این کاهش در میزان باززایی را می‌توان این طور تفسیر کرد که این کاهش به کمبود اکسیژن در ماتریکس و نیز به آزادسازی متابولیت‌های مضر با افزایش مدت ذخیره مربوط می‌شود (Redenbaugh *et al*., 1991). همچنین میزان باززایی از قطعات گره کپسوله شده انار نیز به دنبال ذخیره در دمای پایین برای مدت طولانی کاهش پیدا کرد (Naik and Chand, 2006). رائی و همکاران (Rai *et al*., 2008) در مطالعه‌ای که تحت عنوان کپسوله کردن نوک شاخه‌های *Psidium guajava* برای نگهداری کوتاه مدت و مبادله ژرم پلاسم انجام دادند، کپسول‌ها را در دمای چهار درجه سانتی‌گراد برای زمان‌های متفاوت ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز نگهداری کردند. بعد از این مدت باززایی کپسول‌ها روی محیط کشت استاندارد دارای سه درصد ساکارز بدون تنظیم‌کننده‌های رشد صورت گرفت که جهت ریشه‌زایی به محیط حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل شدند. کپسول‌ها به مدت ۳۰ روز با میزان زنده‌مانی ۲۵ ٪ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری بودند، اگرچه قدرت تبدیل آن‌ها به گیاهچه نسبت به شاهد (بدون نگهداری) ۴ برابر کاهش یافت. بعد از ۴۵ روز نگهداری در دمای پایین، کپسول‌ها به طور کامل فاقد قدرت باززایی بودند. رای و بهاتچاریا (Ray and Bhattacharya, 2008) نشان دادند که بذرهای مصنوعی *Rauvolfia*

حاصل از کپسوله کردن نوک شاخه‌های به دست آمده از گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای را می‌توان بیش از سه ماه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. حافیظ و همکاران (Hafize *et al*., 2007) جهت تهیه بذر مصنوعی، شاخه‌های به دست آمده از شرایط درون شیشه‌ای زیتون را در آلژینات سدیم کپسوله کرده، سپس بذور حاصل را در شرایط سرما (۴°C) و دمای اتاق (۲۵°C) با فواصل نگهداری صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ جهت برآورد و مقایسه توانایی تبدیل و رشد بذور مصنوعی نگهداری کردند. بذرهای مصنوعی نگهداری شده در سرما نسبت به بذرهایی که در دمای اتاق نگهداری شده بودند از لحاظ تمام پارامترهای رشد مورد مطالعه ظرفیت رشد و باززایی بهتری داشتند. مجد و همکاران (Majd *et al*., 2011) در مطالعه‌ای نوک شاخه‌های آفتابگردان را در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA تکثیر کرده، سپس نوک شاخه‌ها را در آلژینات سدیم سه درصد و کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار کپسوله کردند. آن‌ها تأثیر کاربرد اسید سالسیلیک و مقادیر مختلف ساکارز روی قدرت باززایی نوک شاخه‌های کپسوله شده پس از نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد را بررسی کرده و عنوان کردند افزایش غلظت ساکارز در ماتریکس آلژینات منجر به کاهش درصد جوانه‌زنی کپسوله‌ها می‌شود. در این مطالعه نوک شاخه‌های کپسوله نشده بعد از ۶۰ روز فاقد قدرت بقا بودند و استفاده از ۵۰ میکرومول اسید سالسیلیک سبب جوانه زنی ۵۹ درصدی نوک شاخه‌های کپسوله شده بعد از ۹۰ روز نگهداری در دمای ۴ °C شد. نور اسماء و همکاران (Nor Asmah *et al*., 2011) نشان دادند که میزان جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی *Acacia* پس از شش تا ۲۰ روز به ترتیب ۱۰۰ و ۷۳/۳ ٪ است.

فراهم کردن یک آندوسپرم مصنوعی حاوی مواد غذایی (عناصر غذایی، ساکارز و تنظیم‌کننده‌های رشد) اهمیت خاصی برای نگهداری و کارایی تبدیل ریزنمونه‌های کپسوله شده دارد. . در این آزمایش نیز بیشترین میزان بازایی و رشد گیاهچه ها پس از ۶۰ روز نگهداری در دمای پایین مربوط به ریزنمونه‌های کپسوله شده در ماتریکس حاوی مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد بود. بهترین مقدار باززایی گیاهچه‌های سیر از کپسوله‌های حاوی محیط کشت استاندارد همراه با دو میلی‌گرم در لیتر BA و دو میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد و با افزایش غلظت آلژینات سدیم از یک به سه درصد میزان زنده‌مانی و باززایی بیش‌تر شده و برای ذخیره طولانی هم مناسب هستند (Bekheet, 2006). افزودن ترکیبات کمکی به ماتریکس ژلی رشد گیاهان هیبرید صنوبر و درخت صمغ را افزایش داد (Tsvetkov *et al*., 2006; Hung and Truemane, 2012).

حضور تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس آلژینات توسعه و تشکیل شاخه را ریزنمونه‌های کپسوله شده افزایش داد. رائوت و همکاران (Rout *et al*., 2001) گزارش دادند که در دانه‌های آلژینات تهیه شده با محیط کشت استاندارد فاقد تنظیم کننده‌های رشد درصد کمی از دانه‌ها شکافته شده و رشد آرام‌تر از بذرهای مصنوعی حاوی تنظیم کننده های رشد بود. دانسو و فورد–لاید (Danso and Ford-Lloyd, 2003) نشان دادند که حضور سیتوکینین (BAP) و اکسین (NAA) در ماتریکس آلژینات توسعه شاخه‌های اولیه از قطعات گره کپسوله شده *Monihat eesuelenta* را افزایش داد. میشلی و

همکاران (Mhcheli *et al*., 1998) گزارش دادند که استفاده از مواد غذایی در کپسول‌های آلژینات جوانه‌های حاصل از شاخه‌های تکثیر شده در شرایط درون شیشه‌ای زیتون یک مسئله مهم در ارتباط با حفاظت ژرم‌پلاسم و تکنولوژی بذر مصنوعی است. کاستیلو و همکاران (Castillo *et al*., 1998) نشان دادند که استفاده از مواد غذایی کشت استاندارد ۱/۲ در ماتریکس ژلی جوانه‌زنی و میزان تبدیل را در *Carica papaya* افزایش می‌دهد. با استفاده از آلژینات سدیم سه درصد و نیترات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار دانه‌های آلژینات گرد و یکدستی در توت‌فرنگی به دست آمد و بیش‌ترین درصد ظهور شاخه در کپسول‌های حاوی محیط کشت استاندارد و mg/l ۰/۵BA گزارش شد (Badr-Elden, 2013).

## نتیجه‌گیری کلی

ویژگی مهم ریزنمونه‌های رویشی کپسوله شده ظرفیت آن‌ها برای حفظ قدرت زنده‌مانی و توانایی رشد مجدد بعد از ذخیره در دوره‌های سرمایی برای تبادل ژرم‌پلاسم بین آزمایشگاه‌ها است. کپسوله کردن در آلژینات تکنیکی است که توسط آن می‌توان ریزنمونه‌ها را خارج از فصل انتقال داد. ذخیره سرمایی قیمت نگهداری ژرم‌پلاسم را به دلیل کاهش نیاز به اعمال آزمایشگاهی به دلیل میزان واکشت کم‌تر کاهش می‌دهد. اگرچه با افزایش مدت زمان نگهداری در سرما میزان باززایی ریزنمونه‌ها کاهش پیدامی‌کنداما با استفاده از یک پوشش محافظ و افزودن مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد می‌توان به طور معنی‌داری جوانه‌زنی و رشد آن‌ها را پس از دوره‌های نگهداری بهبود بخشید. بر اساس نتایج به دست آمده از این آزمایش بهترین روش برای نگهداری ریزنمونه‌های رویشی آفتابگردان کپسوله کردن آن‌ها در ژل آلژینات سدیم سه درصد حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAPو دو میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA می‌باشد.

## منابع مورد استفاده

## References

**Ahmed, A.N., M.A. Enas and A.A. Rizkalla. 2007**. Synthetic Seeds of Pear (*Pyrus communis* L.). Rootstock Storage *In vitro.* Aust. J. Basic Appl. Sci. 1(3): 262-270.

**Antonietta, G.M., H.I. Ahmad, M. Maurizio and S. Alvaro. 2007.** Preliminary research on conversion of encapsulated somatic embryos of (*Citrus reticulate*).Blanco, cv. Mandarino Tardivo di Ciaculli. Plant Cell Tissue Organ Cult. 88:117-120.

**Ara, H., U. Jaiswal and V. S. Jaiswal. 2000.** Synthetic seed: Prospects and limitations. Curr. Sci. 78 (12): 1438-1444.

**Badr-Elden, M.A. 2013.** An Effective Protocol for *in vitro* Storage and *ex vitro* Re-Growth of Strawberry Capsules. Atlas J. Chem. Biochem. 1(2): 30-38.

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

**Bernard, F., H. Shaker-Bazarnov and B. kaviani. 2002.** Effects of salicylic acid on cold preservation and cryopreservation of encapsulated embryonic axes of Persian lilac (*Melia azedarach* L.). Euphytica. 123:85-88.

**Chand S., and A.K. Singh. 2004.** Plant regeneration from encapsulated nodal segments of *Dalbergia sissoo* Roxb. a timber-yielding leguminous tree. J. Plant Physiol. 161: 237-243.

**Chraibi, K. M. B., Castelle, J. C., Latche, A., Roustan, J. P. and Fallot, J. 1992.** A genotype-independent system of regeneration from cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). The role of ethylene. Plant Sci. 86: 215–221.

**Chraibi, K. M. B., Latche, A., Roustan, J. P. and Fallot, J. 1991.** Stimulation de la regeneration du tournesol (*Helianthus annuus* L.). par l'ion cobalt, un inhibiteur de la synthese de l'ethylène. C. R. Acad. Sci. Paris. t. 312(3): 183–187.

**Danso, K. E., and B.V. Ford-Lloyd. 2003.** Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of *cassava* germplasm. Plant Cell Rep. 21: 718-725.

**Fiore, M. C., T. Tabacc and F. Sunseri. 1997.** High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. Plant Cell Rep. 16: 295-298

**Gurel, E., and K. Kazan. 1998.** Development of an efficient plant regeneration system in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Turk. J. Bot. 22: 381-387.

**Hafize, A. I., M. Micheli and A. Standardi. 2007.** Encapsulation of *in vitro* drive explants of olive (*Olea europea L. cv. Moraiolo*). Effect of storage on capsule and derived shoots performance. Hortic. Sci. 113: 286-292.

**Hegazi, G. A. E. 2011.** Viability of encapsulated shoot tips of *(Capparis orientalis* Duh). Nat. Sci. 9 (8): 223-228.

**Hung, C.D., and S.G. Truemane. 2012.** Alginate encapsulation of shoot tips and nodal segments for short-term storage and distribution of the *Corymbia eucalypt* torelliana 3 C. citriodora. Physiol. Plant. 34:117–128.

**Majd, A., S. S.H. Salehi Katouzi, F. Fallahian and F. Bernard. 2011.** Encapsulation of shoot tips in alginate beads containing salicylic acid for cold preservation and plant regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Aust. J. Crop Sci. 5(11): 1469-1474.

**Malabadi R., and J. Van Staden. 2005.** Storability and germination of sodium alginate encapsulated somatic embryos derived from the vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. Plant Cell Tissue Organ Cult. 82: 259-265.

**Micheli, M., M. Mencuccini and A. Standardi. 1998.** Encapsulation of *in vitro* proliferated buds of olive. Adv. Hortic. Sci. 12(4): 163-168.

**Naik S.K., and P.K. Chand. 2006.** Nutrient-alginate encapsulation of *in vitro* nodal segments of pomegranate (*Punica granatum* L.) for germplasm distribution and exchange. Hortic. Sci. 108: 247–252.

**Nor Asmah, H., H. NorHasnida, N.A. Nashatul Zaimah, A. Noraliz and N. Nadiah Salmi. 2011.** Synthetic seed technology for encapsulation and regrowth of *in vitro*-derived *Acacia hyrid* shoot and axillary buds. Afr. J. Biotechnol. 10(40): 7820-7824.

**Petitprez, M., A. Sarrafi, E. Flores-Berrios, X. Xuhan, C. Briere and L. Gentzbittel . 2005.** Somatic embryogenesis by liquid culture of epidermal layers in sunflower: from genetic control to cell development. Plant Cell Tissue Organ Cult. 81: 331-337.

**Rady, M. R., and M.S. Hanaf. 2004.** Synthetic seed technology for encapsulation and regrowth of *in vitro*-derived *Gypsophila paniculata* L. shoot-tips. Arab. J. Biotechnol. 7: 251-264.

**Rai, M. K., V. S. Jaiswal and U. Jaiswal. 2008.** Encapsulation of shoot tips of guava (*Psidium guajava* L.) for short-term storage and germplasm exchange. Hortic. Sci. 118: 33-38.

**Ramezani vishki, F. 2013.** Oxidatine stress and plant reaction to it. J. Biol. 28 (4): 22-25.

**Ray, A., and S. Bhattacharya. 2008.** Storage and plant regeneration from encapsulated shoot tips of *Rauvolfia serpentine*- An effective way of conservation and mass propagation. Sci. Afr. Bot. 74: 776-779.

**Reddy, G. S., Kumar, D. D., Babu, R. S. and Madhavi, M. 2005,** Callus culture and synthetic seed production in *Rauvolfia serpentine*. Indian J. Hortic. 62(1): 102-103.

**Redenbaugh, K., J. A. Fujii, D. Slade, P. Viss and M. Kossler. 1991.** Artificial seeds encapsulated embryos. In Bajaj YPS (ed) High technology and micro propagation. Biotechnol. Agric. Forestry. 17: 395-416.

**Rout, G. R., D. Das, S. Samantaray and P. Das. 2001.** Micropropagation of *Plumbago zeylanica* L. by encapsulated nodal explants. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 76(1): 24-29.

**Singh, A. K., R. Varshney, M. Sharma, S.S. Agarwal and K.C. Bansal. 2006.** Regeneration of plants from alginate-encapsulated shoot tips of *Withaniasom nifera* L. Dunal, a medicinally important plant species. J. Plant. Physiol. 163(2): 220-223.

**Singh, S. K., M.K. Rai, P. Asthana, and L. Sahoo. 2009b.** Alginate- encapsulation of nodal segments for propagation, short term conservation and germplasm exchange and distribution of *Eclipta alba* L. Acta Physiol. Plant. 32(3): 607-610.

**Singh, S. K., M.K. Rai, P. Asthana, S. Pandey, V.S. Jaiswal and U. Jaiswal. 2009a.** Plant regeneration from alginate encapsulated shoot tips of *Spilanthes acmella* L. Murr. A medicinally important and herbal pesticidal plant species. Acta Physiol. Plant. 31(3): 649-653.

**Singh, S., K. Manoj, P. Rai Sarita, V.S. Pandey and U. Jaiswal. 2010.** Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Spilanthes acmella L.* Murr., a medicinally important and herbal pesticidal plant species. Acta Physiol. Plant. 31:649-653.

**Tsvetkov, I., L. Jouve and J. E. Hausman. 2006.** Effect of alginate matrix composition on regrowth of in vitro-derived encapsulated apical microcuttings of hybrid aspen. Biol. Plant. 50: 722-724.
**West, T.P., M.B. Ravindra and J.E. Preece. 2006.** Encapsulation, cold storage, and growth of *Hibiscus moscheutos* nodal segments. Plant Cell Tissue Organ Cult. 87(3): 223-231.
**Zeynali, M., B. Maleki zanjani, J. Saba, M. Niaazkhani, M. Ghaderian, A. Eivazi and S.H. Mousavi-Anzabi. 2013.** *In vitro* plant regeneration from alginate-encapsulated somatic embryos of rapeseed (*Brassica napus* cv. Tallayeh). Int. J. Traditional and Herbal Med. 1(1): 13-18.