تاثیر نوع ریزنمونه در القای بافت جنین زای چهار گونه کاج (*Pinus* L.)

الهه ناصری (۱)، سیامک کلانتری (۲)، روح انگیز نادری (۳)
۱،۲و۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

در این تحقیق، با استفاده از سه ریزنمونه جنین زایشی بالغ، قطعات هیپوکتیل (ساقه چه) و کوتیلدون (لپه جنینی) گیاهچه های جوان، مقدار القای بافت جنین زا در چهار گونه *Pinus brutia*، *P. nigra*، *P. radiata* و *P. sylvestris* مورد مطالعه قرار گرفت. القای بافت جنین زا در محیط کشت DCR و با استفاده از تنظیم کننده های رشد BA و 2,4-D انجام شد. بافت جنین زا ٤۰ روز پس از کشت اولیه اندازه گیری شد. پس از کشت قطعات ۱۰ میلی متری انواع ریزنمونه ها درون پتری دیش حاوی محیط کشت جامد، پتری ها با پارافیلم بسته شده و در دمای ۲۵̊C و در شرایط تاریکی نگه داری شدند. پس از دو هفته اولین نشانه های القای بافت جنین زا مشاهده شد. اثر نوع ریزنمونه و گونه بر مقدار القای بافت جنین زا معنی دار بوده و بیشترین مقدار القای بافت جنین زا صرف نظر از نوع ریزنمونه در گونه *P. brutia* و کمترین مقدار در گونه *P. sylvestris* مشاهده شد. همچنین بیشترین مقدار القای بافت جنین زا با استفاده از ریزنمونه کوتیلدون حاصل گردید.

واژه‌های کلیدی: بافت جنین‌زا، جنین زایشی بالغ، ریزنمونه، محیط کشت و کاج

مقدمه:

ازدیاد سوزنی‌برگان از طریق روشهای سنتی بذر و قلمه دارای محدودیت‌های فراوان و حتی گاهی غیرممکن می‌باشد. روش-های نوین کشت بافت، به‌ویژه جنین‌زایی رویشی، جایگزین مناسب و مطمئن برای ازدیاد این گیاهان به‌نظر می‌رسد. با استفاده از جنین‌زایی رویشی، می‌توان به تولید انبوه کلون‌های منتخب و یکنواخت دست یافت. پتانسیل بالای جنین‌زایی رویشی در تکثیر کلونی سوزنی‌برگان از مدت‌ها پیش مورد توجه قرار گرفته و از سال ۱۹۸۵ به بعد تاکید بر تغییر ازدیاد سوزنی‌برگان از اندام‌زایی درون‌شیشه‌ای به جنین‌زایی رویشی بوده است (Wilson & Thorpe, 1995). برای اولین بار تولید جنین‌های رویشی بالغ که توانایی تبدیل شدن به گیاهچه کامل را داشتند، با استفاده از جنین نابالغ *Picea abies* توسط Hakman و همکاران (۱۹۸۵) با موفقیت انجام شد (Stasolla *et al*., 2002). بعدها جنین‌های زایشی بالغ و گیاهچه‌های جوانه زده ۱۲ تا ۳۰ روزه نیز به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند.

جنین‌زایی رویشی شامل دو مرحله اساسی القای بافت جنین‌زا از ریزنمونه اولیه و تکامل جنین رویشی از بافت جنین‌زاست. در القای بافت جنین‌زا که اساس جنین‌زایی رویشی را تشکیل می‌دهد، عوامل متعددی دخیل هستند. این عوامل شامل گونه، ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، زمان جمع‌آوری ریزنمونه، ترکیب محیط کشت و میزان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌باشند (Klimaszewska *et al*., 2001). هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر نوع ریزنمونه بر فرآیند القای بافت جنین‌زا در گونه-های *P. brutia*، *P. nigra*، *P. radiata* و *P. sylvestris* می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

ابتدا با استفاده از جنین‌های زایشی بالغ که در محیط کشت DCR (Gupta & Durzan, 1985) بدون تنظیم‌کننده رشد قرار گرفته بودند، گیاهچه‌هایی با لپه‌های توسعه یافته حاصل شد. پس از گذشت ۳۰ روز از کشت اولیه، محیط کشت پایه DCR با مقادیر هورمونی ۱۰ میکرومول در لیتر 2,4-D و پنج میکرومول BA انتخاب شد و قطعات ساقه و لپه با استفاده از تیغ اسکالپل به طول ۱۰ میلی‌متر جدا شد و به‌صورت جداگانه در هر پتری، هشت عدد از قطعات ساقه یا لپه و نیز هشت عدد جنین زایشی بالغ با اندازه‌های ۱۰ میلی‌متر کشت شد و در نهایت بافت القا شده از سه ریزنمونه مختلف (جنین، قطعات ساقه-چه و قطعات لپه گیاهچه ۳۰ روزه) با هم مقایسه شد. پتری‌دیش‌ها در اتاقک رشد با میانگین دمای روزانه ۱̊C±۲۵ و میانگین

دمای شب ۱°c±۱۹ و در تاریکی نگه‌داری شدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام شد. اندازه‌گیری بافت‌های جنین‌زا ٤۰ روز پس از کشت اولیه انجام شد. جهت ارزیابی القای بافت جنین‌زا، بزرگترین قطر بافت اندازه‌گیری و با واحد میلی‌متر به عنوان اندازه واقعی، یادداشت برداری شد. ارتفاع بافت با استفاده از چهار سطح (۰، ۱، ۲ و ۳) اندازه‌گیری و بر این اساس نمره‌دهی شدند و حاصل‌ضرب این دو داده به‌عنوان سطح مقطع بافت معرفی شد.

نتایج:

پس از گذشت ۲ هفته از زمان کشت ریزنمونه، اولین علائم القای بافت جنین‌زا از ریزنمونه گونه‌های *P. brutia* ظاهر گردید و پس از آن القای بافت در دیگر گونه‌ها نیز انجام گرفت. بر اساس مشاهدات میکروسکوپی و تطابق آن با نتایج دیگر محققین، می‌توان گفت که بافت جنین‌زا در حقیقت مجموعه‌ای از توده‌های پیش‌جنینی بود. این توده‌های پیش‌جنینی از تعدادی سلول مریستمی به‌هم فشرده در راس توده و سلول‌های طویل سوسپانسور به‌دنبال آن تشکیل شده و در مجموع دارای ساختاری رشته‌ای و میله مانند بودند (شکل ۱).

شکل۱- مراحل القای بافت جنین‌زا از جنین زایشی بالغ کاج بروسیا (*P. brutia*)

A) جنین بالغ کشت شده در محیط جامد، B) بافت نیمه شفاف جنین‌زا، C) تصویر میکروسکوپی توده جنین‌زا (بزرگنمایی٤۰۰X)

نتایج تجزیه واریانس القای بافت جنین‌زا با استفاده از ریزنمونه‌های متفاوت در گونه‌های مختلف، نشان داد که این فاکتورها بر مقدار القای بافت جنین‌زا، دارای اثر معنی‌داری بودند (جدول ۱). بدون درنظر گرفتن نوع ریزنمونه، از نظر القای بافت جنین‌زا می‌توان گفت گونه *P. brutia* بیشترین و گونه *P. sylvestris* کمترین مقدار القای بافت را داشتند (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و گونه بر القای بافت جنین‌زا

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات
گونه	۳	۵۸۰/۷۸**
ریزنمونه	۲	۱۰۱/۱۷**
گونه×ریزنمونه	٦	٦۳/۷۳**
خطا	۲٤	٤/۰٦
CV		۸/٦۱

**: معنی‌دار بودن اثر نوع ریزنمونه و گونه در سطح ۱ درصد

بررسی اثر نوع ریز نمونه بر القای بافت جنین‌زا نشان داد که قطعات کوتیلدون بیشترین توانایی را در تولید بافت داشته و جنین و قطعات هیپوکتیل بافت کمتری تولید نموده و از این جهت با هم تفاوت معنی‌داری ندارند (جدول ۳).

جدول ۲- اثر نوع گونه بر القای بافت جنین‌زا

شاخص / گونه	سطح مقطع تخمینی بافت
P. brutia	۳۳/۲۲ a
P. nigra	۱۹/۲۷ c
P. radiata	۲٦/۲۱ b
P. sylvestris	۱٤/۹۰ d

حروف غیرمشترک در هر ستون اختلاف آماری معنی‌داری با هم دارند.

جدول ۳- اثر نوع ریزنمونه بر القای بافت جنین‌زا

شاخص / ریزنمونه	سطح مقطع تخمینی بافت
Cotyledon	۲٦/٦۹ a
Embryo	۲۱/۲۰ b
Hypocotyl	۲۲/۳۲ b

حروف غیرمشترک در هر ستون اختلاف آماری معنی‌داری با هم دارند.

بحث:

به‌طور کلی، هرچه ریزنمونه جوان‌تر باشد، القای بافت جنین‌زا راحت‌تر صورت می‌گیرد، زیرا در بسیاری از سلول‌های ریزنمونه جوان، خاصیت جنین‌زایی وجود دارد ولی در ریزنمونه‌های تهیه شده از درختان بالغ، تعداد سلول‌های مستعد القای بافت جنین‌زا، کاهش می‌یابد. بیشتر موفقیت‌ها در جنین‌زایی رویشی خصوصا در جنس کاج، با استفاده از کشت جنین نابالغ گزارش شده است. Attree و همکاران (۱۹۹۰) گزارش نمودند در گیاهچه‌های *Picea glauca* و *P.mariana*، توانایی القای بافت جنین‌زا با افزایش سن گیاهچه کاهش می‌یابد. Lelu و همکاران (۱۹۹۰) با قرار دادن لپه‌های گیاهچه *Picea abies* به‌مدت یک هفته در معرض محیط کشت جوانه‌انگیزی قبل از قرار دادن آن‌ها در محیط کشت القای بافت جنین‌زا، مقدار القای بافت را تا ۱۰ برابر افزایش دادند. Ishii و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از قطعات ساقه‌چه گیاهچه *Chamaecyparis obtusa* موفق به تولید گیاه از طریق جنین‌زایی رویشی شدند. Ramarosandratanam و Van Staden (۲۰۰۵) جنین‌زایی رویشی را در *Picea abies* با استفاده از قطعات جنین زایشی بالغ بررسی و بیشترین مقادیر جنین‌زایی را از قطعات لپه گزارش نمودند.

منابع:

Ishii, K., Maruyama, E. & Hosoi, Y. (2001). Somatic embryogenesis of Japanese conifers, *Molecular Breeding of Woody Plants*, 297-305.

Klimaszewska, K., Park, Y. S., Overton, C., Maceacheron, I. & Bonga, J. M. (2001). Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant,* 37, 392-399.

Stasolla, C., Kong, L., Yeung, E. C. & Thorpe, T. A. (2002), Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant,* 38, 93-105.

The effect of explant on embryogenic tissue induction in four pine species (*Pinus* L.)

Abstract
In this survey, the amount of embryogenic tissue induction in species *Pinus brutia*, *P. nigra*, *P. radiata* and *P. sylvestris* has been studied using explants of mature zygotic embryo and pieces of cotyledons and hypocotyls of plantlets. The embryogenic tissue induction phase was performed using culture medium DCR and plant growth regulators (BA & 2,4-D). Embryogenic tissue was measured in 40^{th} day after the initial culture. After explants culturing into the Petri-dishes containing solid tissue culture, all of the Petri-dishes were maintained in darkness at 25°C. After two weeks, the first signs of embryogenic tissue induction were observed. The obtained results showed the significant effect of explant and specie on the amount of embryogenic tissue induction. Without considering the explant type, the best results were obtained from *P. brutia* and the least results from *P. sylvestris*. Also, the most amount of embryogenic tissue induction was obtained using cotyledon explants.
Keywords: Embryogenic Tissue, Mature Zygotic Embryo, Explant, Culture Medium and *Pinus* L.