تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر القای بافت جنین‌زا در چهار گونهٔ کاج (*Pinus* L.)

الهه ناصری[*1]، سیامک کلانتری[2] و روح‌انگیز نادری[3]

[1] دانشجوی کارشناسی‌ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[2] استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[3] دانشیار گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

(تاریخ دریافت:۸۹/۸/۸ ، تاریخ تصویب: ۹۰/۸/۲)

چکیده

در این پژوهش، با استفاده از ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی میزان القای بافت جنین‌زا در چهار گونهٔ متفاوت کاج مورد مطالعه قرار گرفت. القای بافت جنین‌زا از ریزنمونه جنین زایشی بالغ روی محیط کشت DCR با استفاده از سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد BA و 2,4-D در گونه‌های *Pinus brutia* ، *P. nigra* ، *P. radiata* و *P. sylvestris* صورت گرفت. برای انجام آزمایش، پس از ضدعفونی بذرها، جنین زایشی از مگاگامتوفیت جدا گردید و درون پتری‌دیش حاوی محیط کشت جامد، قرار گرفت. پتری‌ها در دمای ۲۵ ^{o}C و در شرایط تاریکی نگه‌داری شدند. پس از دو هفته اولین نشانه‌های القای بافت از ناحیه هیپوکتیل جنین زایشی مشاهده شد. بافت جنین‌زا در دو مرحله (۳۰ و ۴۰ روز پس از کشت اولیه) اندازه‌گیری شد. اثر ترکیب تنظیم‌کننده رشد و گونه بر میزان القای بافت جنین‌زا معنی‌دار بوده و بهترین نتایج در گونه *P. brutia* و با استفاده از ترکیب هورمونی ۱۰ میکرومول 2,4-D و ۵ میکرومول BA حاصل گردید. به‌منظور پرآوری بافت‌های جنین‌زا، واکشت بافت‌ها به مدت ۶ هفته و هر دو هفته یک‌بار در محیط کشت تازه انجام شد. در نهایت به‌منظور تکامل جنین رویشی از بافت جنین‌زا، قطعات ۵×۵ میلی‌متری بافت جنین‌زا، به محیط کشت DCR انتقال یافت. پس از گذشت دو ماه اگرچه ساختارهای شبه‌جنینی و غیرطبیعی مشاهده شد ولی عبور از مرحلهٔ پیش‌جنین و تبدیل آن به جنین با لپه‌های توسعه یافته، با عدم موفقیت همراه بود.

واژه‌های کلیدی: جنین زایشی بالغ، تنظیم‌کنندهٔ رشد، محیط کشت، مگاگامتوفیت، کاج.

* نویسنده مسئول: ۰۲۶-۳۶۷۷۴۰۶۵ فاکس: ۹۸۲۶۳۲۲۴۸۷۲۱+ E-mail: Naseri_elahe@yahoo.com

مقدمه

سوزنی‌برگان درختانی همیشه سبز هستند که به لحاظ اقتصادی از اهمیت بالایی برخوردارند و مقدار زیادی از بهترین و با ارزش‌ترین منابع الواری جهان را تامین می‌کنند. هم‌چنین این گیاهان به‌عنوان عامل کنترل فرسایش و حفظ زیبایی در فضای سبز نقش عمده‌ای را ایفا می‌نمایند. با توجه به اهمیت قابل ملاحظه سوزنی‌برگان و مشکلات تکثیر آنها به روش سنتی، استفاده از فنون کشت بافت در این خصوص، امری اجتناب‌ناپذیر است. زیرا ازدیاد سوزنی‌برگان از طریق روش‌های سنتی کشت بذر و مخصوصا قلمه دارای محدودیت‌هایی می‌باشد. روش‌های نوین کشت بافت، به‌خصوص جنین‌زایی رویشی، افق روشنی پیش روی تولیدکنندگان تجاری سوزنی‌برگان قرار داده است. تا مدتی پیش، جنین‌زایی رویشی فقط برای چند گونهٔ معدود از درختان ممکن بود، ولی هم‌اکنون این تکنیک به‌سرعت در دنیا در حال گسترش است. درحال حاضر تولید گیاه از روش جنین‌زایی رویشی در برخی از سوزنی‌برگان به‌قدری پیشرفت نموده است که انتظار می‌رود کاربرد تجاری آن به‌زودی امکان‌پذیر گردد. البته در کشور ما در حال حاضر، کشت بافت سوزنی‌برگان تنها جنبهٔ پژوهشی داشته و استفاده از روش جنین‌زایی رویشی برای ازدیاد سوزنی‌برگان در ایران برای اولین بار در پژوهش حاضر مورد آزمایش قرار گرفته است.

با استفاده از جنین‌زایی رویشی، می‌توان به تولید انبوه کلون‌های منتخب و یکنواخت دست یافت (Tang *et al.*, 2007). 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). ازدیاد از طریق اندام‌زایی از کشت کالوس تنها در تعداد معدودی از سوزنی‌برگان انجام شده است درحالی‌که تکثیر از طریق جنین‌زایی رویشی در تعداد زیادی از سوزنی‌برگان گزارش شده است (Tang *et al.*, 2007).

انگیزه اولین تلاش‌ها در جنین‌زایی رویشی سوزنی‌برگان در اواخر دهه ۱۹۷۰ و اوایل دهه ۱۹۸۰ اتفاق افتاد و ساختارهای شبه‌جنینی از کشت سلول‌های *Pinus banksiana* و *Picea glauca* تولید شد. اگرچه این ساختارها قادر به تولید گیاه‌چه نشدند ولی چند سال پس از آن، تولید جنین‌های رویشی بالغ که توانایی تبدیل شدن به گیاه‌چه کامل را داشتند، با استفاده از جنین نابالغ *Picea abies* توسط Hakman *et al.* (1985) با موفقیت انجام شد (Stasolla *et al.*, 2002). بعدها جنین‌های زایشی بالغ (Tautorus *et al.*, 1990) و گیاهچه‌های جوانه‌زده ۱۲ تا ۳۰ روزه (Attree *et al.*, 1990) هم به عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند.

از آن پس پژوهش‌هایی توسط پژوهشگران جهت جنین‌زایی رویشی در جنس کاج انجام گردیده است. اگرچه بیشتر این پژوهش‌ها با استفاده از جنین نابالغ انجام شده است، ولی جنین‌زایی رویشی با استفاده از جنین بالغ نیز در برخی گونه‌ها مانند *P. nigra* (Salajova *et al.*, 1999)، *P. roxburghii* (Araya *et al.*, 2000)، *P. taeda* (Tang & Newton, 2005) و *P. armandii* (Maruyama *et al.*, 2007) گزارش شده است. در استفاده از جنین نابالغ به عنوان ریزنمونه اولیه نکته حایز اهمیت زمان جمع‌آوری مخروط‌های نارس و سبز رنگ است که باید موقعی انجام شود که جنین‌ها در مرحله پیش کوتیلدونی بوده و لپه‌ها تشکیل نشده باشند و این زمان برداشت در مناطق مختلف آب و هوایی با هم متفاوت است. چنین مشکلاتی در استفاده از جنین بالغ وجود ندارد، ولی درصد تولید بافت جنین‌زا و به دنبال آن تولید جنین و گیاهچه از جنین بالغ، در مقایسه با جنین نابالغ در جنس کاج مشکل‌تر است. این در حالی است که در جنس نوئل (*Picea*) چنین تفاوتی مشاهده نمی‌شود و درصد تولید بافت جنین‌زا و در نهایت تولید گیاه‌چه از جنین بالغ و نابالغ تقریبا با یکدیگر برابری می‌کند. با وجود پژوهش‌هایی که بر روی جنین‌زایی رویشی جنس کاج انجام گرفته است، گذر از مرحله تکامل جنین و

تبدیل آن به گیاه‌چه در بسیاری موارد موثر نبوده و نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد (Maruyama *et al*., 2007). جنین‌زایی رویشی شامل دو مرحله اساسی القای بافت جنین‌زا از ریزنمونه اولیه و تکامل جنین رویشی از بافت جنین‌زا می‌باشد. بافت جنین‌زا در حقیقت ترکیبی از توده‌های پیش‌جنینی است که پس از قرار گرفتن در محیط کشت جنین‌زایی، توانایی تبدیل شدن به جنین کامل را دارند. بنابراین می‌توان گفت مرحله القای بافت جنین‌زا، اساس جنین‌زایی رویشی را تشکیل می‌دهد که فاکتورهای متعددی در موفقیت آن دخیل هستند. یکی از فاکتورهای مهم جهت القای بافت جنین‌زا، ترکیب محیط کشت می‌باشد. رایج‌ترین محیط کشت مورد استفاده در کاج، محیط کشت‌های DCR ، Litvay و MSG هستند که اغلب ال-گلوتامین و کازئین هیدرولیزات به عنوان مکمل به آنها افزوده می‌شود. معمول‌ترین مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی که در القای بافت جنین‌زای سوزنی‌برگان به‌خصوص گونه‌های کاج و نوئل مورد استفاده قرار می‌گیرند، 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) و 6-benzyladenine (BA) هستند. به طور دقیق نمی‌توان مقدار مشخصی برای استفاده از این مواد در گونه‌های مختلف تعیین نمود زیرا مواد تنظیم-کننده رشد گیاهی در گونه‌های مختلف و در ترکیب با دیگر مواد موجود در محیط کشت واکنش‌های متفاوتی از خود نشان می‌دهد. به‌طور کلی می‌توان گفت در جنس کاج از مقادیر متفاوت 2,4-D (۲-۲۰ میکرومول) و BA (۲-۱۰ میکرومول) در یک لیتر محیط کشت استفاده می‌شود (Stasolla *et al*., 2002). با این وجود القای بافت جنین‌زا در *P. sylvestris* و *P. pinaster* بدون حضور تنظیم‌کننده‌های رشد رخ داده است (Lelu *et al*., 1999).

تکامل جنین به واسطه اسید آبسزیک (ABA) و همچنین موادی که موجب افزایش فشار اسمزی می‌شوند، امکان‌پذیر است. در گونه‌های کاج، کمترین و بیشترین غلظت اسید آبسزیک جهت تکامل جنین‌های رویشی مقدار ۶۰ تا ۱۲۰ میکرومول گزارش شده است (Lelu *et al*., 1999). به منظور افزایش فشار اسمزی بافت جنین‌زا، از موادی مانند پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG)، افزایش غلظت کربوهیدرات‌ها و مواد جامد کننده استفاده می‌گردد. در محیط کشت حاوی ۷/۵ تا ۱۰ درصد پلی‌اتیلن‌گلیکول بیشترین مقادیر جنین از بافت جنین‌زا در گونه‌های *P. taeda* و *P. patula* به‌دست آمده است، هم‌چنین افزایش کربوهیدرات‌هایی مانند ساکارز تا دو یا سه برابر غلظت موجود در محیط کشت القای بافت جنین‌زا، اغلب بیشترین تاثیر را در تکامل جنین از بافت جنین‌زای گونه‌های کاج را دارد (Yildirim *et al*., 2006). گزارش‌های معدودی در رابطه با استفاده از مالتوز به‌عنوان منبع کربوهیدرات وجود دارد. برای مثال افزایش ۶ تا ۹ درصد مالتوز در محیط کشت، بیشترین شمار تولید جنین‌های رویشی را در گونه *P. sylvestris* به همراه داشت (Salajova *et al*., 1999). هم‌چنین با افزایش غلظت ماده جامد کننده در محیط جنین‌زایی، تعداد جنین‌های رویشی در *P. strobus* به‌طور چشمگیری افزایش یافت (Yildirim *et al*., 2006).

به‌طور کلی می‌توان گفت موفقیت در جنین‌زایی رویشی به عوامل مختلفی مانند گونه، ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، زمان جمع‌آوری نمونه، ترکیب محیط کشت و میزان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بستگی دارد (Klimaszewska *et al*., 2001).

هدف از پژوهش حاضر، بررسی فرآیند جنین‌زایی رویشی شامل مراحل القای بافت جنین‌زا و تکامل جنین از ریزنمونه جنین بالغ چهار گونهٔ کاج *P. brutia*، *P. nigra*، *P. radiata* و *P. sylvestris* است. در این پژوهش غلظت مناسب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی جهت القای بافت جنین‌زا، هم‌چنین تاثیر عوامل مختلفی مانند غلظت ساکارز، نوع پلی‌اتیلن‌گلیکول و نوع ماده جامدکننده بر روی بلوغ جنین از بافت جنین‌زا، روی گونه‌های فوق مورد بررسی قرار خواهند گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در بازهٔ زمانی سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۸۸ و در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. بذرهای مورد نظر کاج از مرکز بذر جنگلی خزر واقع در

شمال کشور تهیه گردید. نظر به اینکه این پروژه برای اولین بار در ایران انجام گرفته است و بیشتر جنبه پژوهشی دارد، از بذرهای شناسنامه‌دار استفاده نشده است. این بذرها به مدت ۲ سال در دمای ^{o}C ۴ انبار نگه‌داری شده بودند. ضدعفونی بذرها براساس آزمایش‌های اولیه با نسبت‌های مختلف مواد ضدعفونی کننده، در دو مرحله انجام شد. مرحله اول قبل از جدا کردن پوسته سخت بذر و مرحلهٔ دوم پس از جدا نمودن پوسته بذر، انجام گرفت. به‌منظور ضدعفونی کردن بذرها ابتدا آنها را به مدت ۱۰ دقیقه در زیر آب روان شستشو داده سپس در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور کرده و پس از پنج دقیقه با آب مقطر استریل شستشو شدند و سپس با استفاده از هیپوکلریت‌سدیم ۲۰ درصد (دارای ۵/۲۵٪ کلر فعال) در مدت زمان ۱۰ دقیقه عمل استریل انجام شد. پس از ضدعفونی، بذرها سه مرتبه در آب مقطر استریل شستشو داده شده و به مدت ۴ ساعت در آب مقطر استریل خیسانده شدند. سپس پوسته بذر را جدا نموده و این بار ابتدا در اتانول ۷۰ درصد به مدت دو دقیقه و سپس در هیپوکلریت‌سدیم ۱۰ درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی نموده و مجددا سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. به منظور کاهش کشش سطحی و تماس بهتر مواد ضدعفونی کننده با ریزنمونه، به محلول‌های ضدعفونی کننده چند قطره توئین ۲۰[1] اضافه شد.

پس از ضدعفونی مرحلهٔ دوم، ریزنمونه‌های گیاهی شامل مگاگامتوفیت‌های حاوی جنین با استفاده از پنس و تیغ اسکالپل باز شده و جنین‌های سالم و با لپه‌های کامل برداشته شده و به صورت افقی روی محیط کشت قرار گرفتند. در هر پتری‌دیش (۱۰×۱۵mm) ۵ جنین کشت شد و پتری‌ها با پارافیلم کاملا بسته شدند. پتری‌دیش‌ها در اتاقک رشد با میانگین دمای روزانه ۱±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و میانگین دمای شب ۱±۱۹ درجهٔ سانتی‌گراد و در تاریکی نگه‌داری شدند.

محیط کشت مورد استفاده در این پژوهش محیط DCR (Douglas fir cotyledon revised medium) بود (Gupta & Durzan, 1985). برای مرحله القا و پرآوری به محیط ۸ گرم در لیتر آگار-آگار، ۳۰ گرم ساکارز، ۰/۵ گرم ال-گلوتامین[2] و ۰/۵ گرم کازئین هیدرولیزات اضافه گردید. از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 2,4-D و BA در سه سطح استفاده شد. تنظیم‌کننده‌های رشد به‌صورت تیمارهای A (0µM 2,4-D+0µM BA)، B (6µM 2,4-D+4µM BA) و C (10µM 2,4-D+5µM BA) در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفتند.

برای مرحلهٔ تکامل جنین (جنین‌زایی)، محیط کشت DCR حاوی ۱ گرم ال-گلوتامین و ۱ گرم کازئین هیدرولیزات انتخاب شد. به محیط کشت جنین‌زایی دو نوع پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ هرکدام به میزان ۵۰ گرم در لیتر، دو نوع ماده جامدکننده آگار-آگار (۱۰ گرم در لیتر) و ژلرایت (۴ گرم در لیتر) و ساکارز در دو سطح ۶۰ و ۹۰ گرم افزوده شد. pH محیط کشت روی ۵/۸ تنظیم شد و در نهایت محیط حاصل داخل اتوکلاو با شرایط فشار یک اتمسفر، دمای ^{o}C ۱۲۱ و به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. برای هر پتری دیش ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت در نظر گرفته شد. شایان ذکر است محلول ذخیره
ال-گلوتامین با استفاده از فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرومتری ضدعفونی شده و پس از رسیدن دمای محیط کشت به‌حدود ^{o}C ۵۰-۶۰، در شرایط سترون به محیط اضافه می‌شود.

- مرحلهٔ القا و پرآوری بافت جنین‌زا

جهت ارزیابی میزان القای بافت جنین‌زا از جنین زایشی بالغ، از سه ترکیب هورمونی و ۴ گونه مختلف کاج *P. brutia*، *P. nigra*، *P. radiata* و *P. sylvestris* استفاده گردید. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۴ تکرار انجام شد. اندازه‌گیری بافت‌های جنین‌زا در دو نوبت، ۳۰ و ۴۰ روز پس از کشت اولیه

[1] Tween 20

[2] L-glutamine

انجام شد. جهت ارزیابی القای بافت جنین‌زا، بزرگترین قطر بافت اندازه‌گیری و با واحد میلی‌متر به‌عنوان اندازه واقعی، یادداشت‌برداری شد. ارتفاع بافت با استفاده از چهار سطح (۰، ۱، ۲ و ۳) اندازه‌گیری شد و بر این اساس نمره‌دهی شدند و حاصل‌ضرب این دو داده به‌عنوان بزرگترین سطح مقطع بافت در نظر گرفته شد. چون اندازه‌گیری ارتفاع بر اساس نمره‌دهی انجام شد و داده‌ها دارای اندازه‌های واقعی نبودند، بنابراین سطح مقطع بافت با واحد برآوردی ارایه گردید. این داده‌ها در دو زمان ذکر شده اندازه‌گیری شدند و تفاضل بین دو داده بزرگترین سطح مقطع بافت، به‌عنوان سرعت رشد در بازه زمانی ۱۰ روز معرفی شد. ۴۰ روز پس از زمان کشت، بافت‌های القا شده از ریزنمونه‌ها جدا شده و با ابعاد ۱۰×۱۰ میلی‌متری در همان محیط کشت‌های قبلی و با همان ترکیب ولی با مقادیر ثابت هورمونی (10µM 2,4-D+5µM BA) واکشت شدند. واکشت بافت‌های جنین‌زا هر دو هفته یک‌بار انجام شد.

- مرحلهٔ جنین‌زایی و تکامل جنین رویشی از بافت جنین‌زا

پس از انجام دو بار واکشت بافت‌های القا شده از ۴ گونهٔ مختلف کاج به محیط کشت جنین‌زایی انتقال یافتند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار انجام شد. در هر پتری ۱۰ قطعه ۵×۵ میلی‌متری از بافت جنین‌زا کشت شد، در پتری‌ها با دو لایه پارافیلم بسته شده و نمونه‌ها در شرایط نوری بسیار کم (نور تاری که به واسطه قرار دادن پتری‌ها درون جعبه مقوایی و گذاشتن دو ورقه کاغذ سفید روی آنها ایجاد شده بود) نگهداری شدند. پس از دو ماه از تاریخ کشت و پس از ارزیابی، نیمی از نمونه‌ها برای القای تنش سرمایی به سردخانه (دمای ۵ ^{o}C) و شرایط تاریکی به مدت شش هفته، منتقل شدند. پس از این مدت تغییرات ایجاد شده در بافت‌ها و همچنین وجود یا عدم وجود جنین با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

- مرحلهٔ القای بافت جنین‌زا

پس از گذشت ۲ هفته از زمان کشت اولیه، اولین علائم القای بافت جنین‌زا از هیپوکتیل گونه *P. brutia* ظاهر شد و پس از آن القای بافت از جنین زایشی کشت شده دیگر گونه‌ها نیز انجام گرفت. پس از قرار گرفتن جنین‌های بالغ زایشی روی محیط کشت، ابتدا بافت آبکی و لزج قهوه‌ای رنگی در انتهای جنین ایجاد شد. سپس هیپوکتیل و لپه‌های جنینی کمی طویل و متورم شدند و بافت نرم، ژله‌ای مانند و نیمه شفافی را به‌وجود آوردند. حالت تورم در جنین‌هایی که تولید بافت در آنها صورت نگرفت، مشاهده نشد و با گذشت زمان از تاریخ کشت اولیه، جنین‌ها بدون تغییر رنگ قابل ملاحظه‌ای خشک شده و از بین رفتند. القای بافت در اغلب گونه‌ها ابتدا از هیپوکتیل صورت گرفت ولی پس از آن اپی‌کتیل و لپه‌های جنینی نیز شروع به القای بافت جنین‌زا نمودند. به‌طورکلی جنین‌های کشت شده دو نوع بافت تولید نمودند که این بافت‌ها از نظر ویژگی‌های ظاهری کاملا با هم متفاوت بودند. بر اساس مشاهده‌های میکروسکوپی و تطابق آن با نتایج دیگر پژوهشگران، می‌توان گفت که در حقیقت بافت جنین‌زا از مجموعه‌ای از توده‌های پیش‌جنینی تشکیل یافته بود و در صورت قرار گرفتن در معرض محیط کشت جنین‌زایی، توانایی تبدیل شدن به جنین کامل را دارا بودند. این توده‌های پیش‌جنینی از سلول‌های مریستمی به‌هم فشرده در راس توده و سلول‌های طویل سوسپانسور به‌دنبال آن تشکیل شده و در مجموع دارای ساختاری رشته‌ای و میله مانند بودند. نوع دیگر بافت که گاهی در کنار بافت جنین‌زا مشاهده می‌شد، بافت غیرجنین‌زا بود که کاملا با بافت جنین‌زا متفاوت و به‌راحتی قابل تشخیص بود. از ویژگی‌های بافت غیرجنین‌زا می‌توان به تراکم بیش از اندازه و سختی بافت و رنگ زرد متمایل به قهوه‌ای آن، اشاره کرد. هم‌چنین در مشاهده‌های میکروسکوپی ساختار رشته‌ای مانند در این

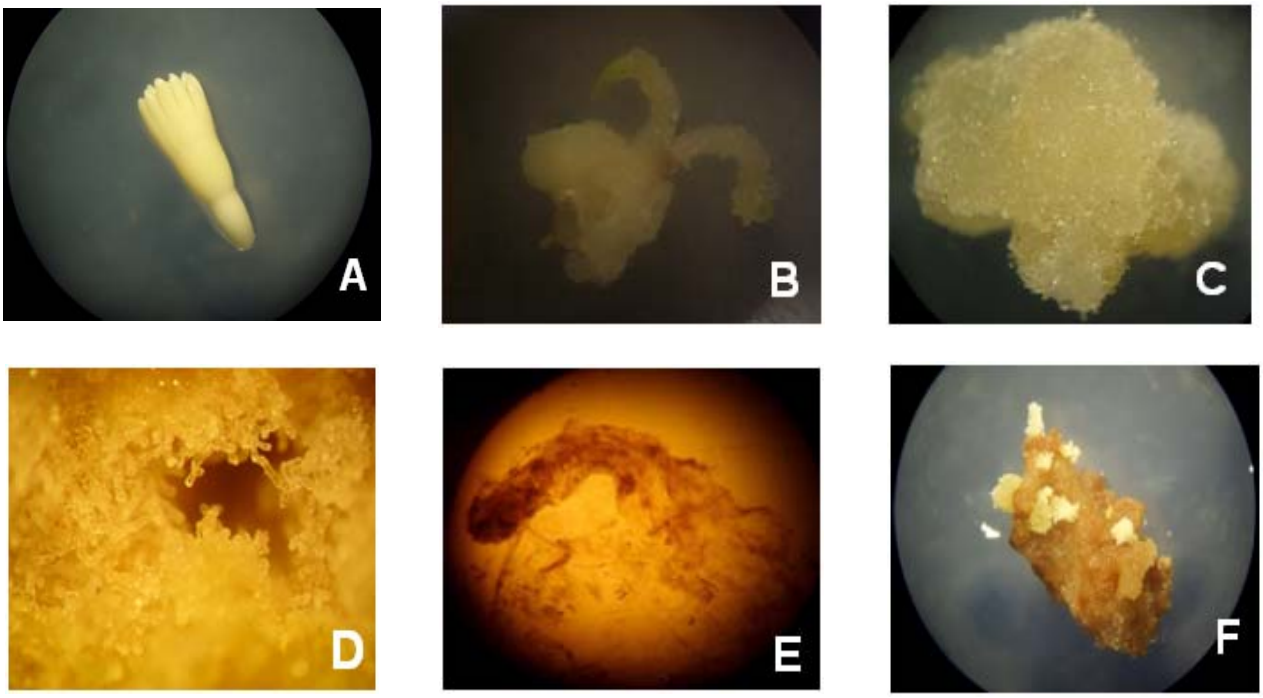
بافت دیده نشد و پس از چند بار واکشت از بین رفتند (شکل ۱).

مشاهده‌های میکروسکوپی که برای مشخص نمودن شکل بافت یا تودهٔ جنین‌زا انجام شد، شکل بافت جنین‌زا را در گونه‌های متفاوت، تقریبا یکسان نشان داد.

مشاهده‌های اولیه مشخص نمود نتایج ریزنمونه‌هایی که تحت تیمار هورمونی A قرار داشتند، با نتایج ریزنمونه های تحت تیمار B و C به‌طور کامل متفاوت بود. در تیمار A، محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد و به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود. جنین‌هایی که در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد قرار داشتند بدون هیچ‌گونه القای بافتی، شروع به رشد و طویل شدن نمودند و به سمت تولید گیاه‌چه پیش رفتند. برخی از این جنین‌ها ساقه‌چه و ریشه‌چه تولید کرده و برخی فقط از ناحیه لپه‌ها طویل شدند (شکل ۲). به‌نظر می‌رسید که محیط کشت مغذی در حکم گامتوفیت ماده، نقش تغذیه جنین را داشته و جنین را به سمت تولید گیاهچه سوق می‌داد (مانند آنچه در حالت طبیعی در بذر رخ می‌دهد).

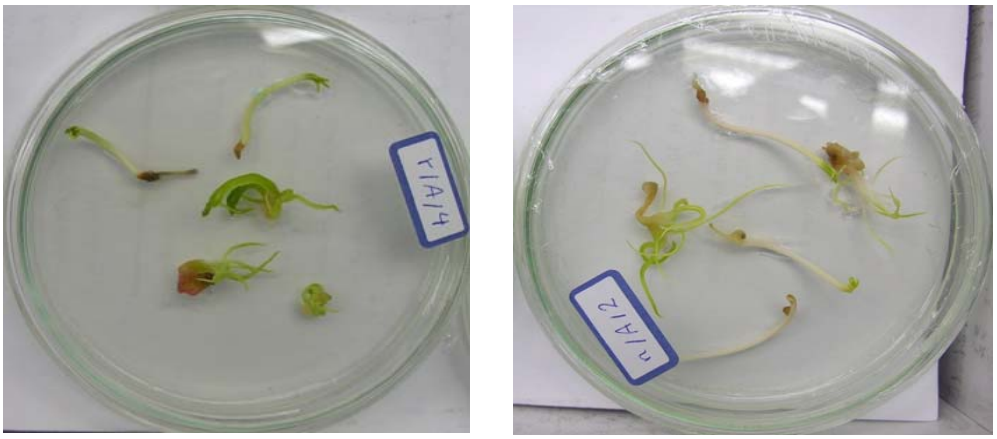
القای بافت جنین‌زا در جنین‌های کشت شده تحت تیمارهای B و C در تمامی گونه‌ها انجام شد. گرچه مقدار القای بافت در هر دو تیمار یاد شده رضایت‌بخش بود ولی تیمار هورمونی C از نظر مقدار القای بافت جنین‌زا بهتر از تیمار هورمونی B عمل نمود. القای بافت در گونه *P. brutia* سریع‌تر از دیگر گونه‌ها انجام شد، هم‌چنین مقدار القای بافت جنین‌زا در این گونه بیشتر از گونه‌های دیگر بود. بر اساس مشاهده‌ها، کمترین مقدار القای بافت جنین‌زا در گونه *P. sylvestris* انجام شد.

نتایج تجزیه واریانس داده برداری از مرحله القای بافت جنین‌زا نشان داد که فاکتورهای تیمار هورمونی و نوع گونه بر شاخص‌های اندازه‌گیری مقدار بافت جنین‌زا دارای اثر معنی‌داری بودند (جدول ۱).



شکل ۱- مراحل القای بافت جنین‌زا از جنین زایشی بالغ کاج بروسیا (*P. brutia*)

A) جنین بالغ (ریزنمونه اولیه) کشت شده روی محیط جامد
B) القای بافت جنین‌زا از هیپوکتیل
C) بافت نرم و نیمه شفاف جنین‌زا
D) حالت رشته‌ای و میله مانند بافت جنین‌زا (بزرگنمایی۵۰X)
E) تصویر میکروسکوپی تودهٔ جنین‌زا (بزرگنمایی۴۰۰X)
F) توده سخت و متراکم بافت غیرجنین‌زا



شکل ۲- رشد و طویل شدن جنین (بدون القای بافت جنین‌زا) در محیط فاقد تنظیم‌کننده رشد (شاهد)
کاج رادیاتا (*P. radiata*) سمت راست ،کاج سیاه (*P. nigra*) سمت چپ

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تیمار هورمونی و گونه بر القای بافت جنین‌زا

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات				
		قطر بافت (میلی‌متر)	ارتفاع بافت (نمره‌دهی)	سطح مقطع بافت (پس از ۳۰ روز) (تخمینی)	سطح مقطع بافت (پس از ۴۰ روز) (تخمینی)	سرعت رشد بافت (در مدت ۱۰ روز) (تخمینی)
گونه	۳	۳۳/۶۸**	۲/۰۱**	۳۷۳/۹۹**	۵۴۱/۵۸**	۳۲/۶۹**
هورمون	۲	۱۹۶/۹۱**	۱۸/۲۶**	۱۱۱۶/۷۶**	۲۰۰۰/۱۲**	۱۲۸/۰۴**
گونه×هورمون	۶	۸/۸۳**	۰/۵۲**	۹۳/۶۵**	۱۳۵/۷۲**	۸/۳۰**
خطا	۳۶	۰/۲۷	۰/۰۲	۱/۷۴	۱/۵۲	۰/۳۷
CV		۱۳/۱۴	۱۲/۷۶	۱۴/۰۴	۹/۷۴	۱۸/۶۵

**: معنی‌دار بودن اثر تیمار هورمونی و گونه در سطح ۱ درصد

هورمونی C نسبت به تیمار B به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ولی از نظر سرعت رشد بافت، تیمارهای B و C با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند.

در بررسی اثر متقابل بین گونه و تیمار هورمونی، بر خلاف نتیجه اثر اصلی (جدول ۳)، اندازه ارتفاع بافت در گونه‌های *P. brutia* و *P. radiata*. بین تیمارهای هورمونی B و C، اختلاف معنی‌داری نشان نداد. هم‌چنین در تیمار B در مقایسه بین گونه‌ها، بین *P. nigra* و *P. radiata* تفاوت معنی‌داری دیده نشد ولی گونه *P. radiata* نسبت به *P. sylvestris* دارای ارتفاع بافت بیشتری بود (جدول‌های ۲ و ۴).

مقایسه میانگین اثر اصلی گونه بر القای بافت نشان داد که در بین گونه‌های مورد آزمون، گونه *P. brutia* در تمامی صفات مورد اندازه‌گیری نسبت به دیگر گونه‌ها، برتری داشت و تنها گونه *P. radiata* از نظر سرعت رشد بافت با گونه *P. brutia* اختلاف معنی‌داری نشان نداد. هم‌چنین گونه *P. sylvestris* در مقایسه با دیگر گونه‌ها در تمامی صفات مورد اندازه‌گیری دارای کمترین مقادیر بافت جنین‌زا بود و گونه *P.radiata* تنها در مورد ارتفاع بافت با گونه یاد شده اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲). جنین‌ها در مواجه با تیمار هورمونی A قادر به القای بافت جنین‌زا نبوده و در این تیمار هیچ‌گونه بافتی تولید نشد (جدول ۳). مقدار القای بافت جنین‌زا در تیمار

جدول ۲- اثر نوع گونه بر القای بافت جنین‌زا

شاخص / گونه	قطر بافت (میلی‌متر)	ارتفاع بافت (نمره‌دهی)	سطح مقطع بافت (پس از ۳۰ روز) (تخمینی)	سطح مقطع بافت (پس از ۴۰ روز) (تخمینی)	سرعت رشد بافت (در مدت ۱۰ روز) (تخمینی)
P. brutia	۶/۴۰ a	۱/۸۲ a	۱۷/۵۷ a	۲۲/۰۵ a	۴/۴۸ a
P. nigra	۳/۴۳ b	۱/۱۷ b	۸/۰۰ b	۱۱/۲۳ b	۳/۲۳ b
P. radiata	۳/۵۷ b	۱/۰۲ c	۶/۹۷ b	۱۱/۳۵ b	۴/۳۸ a
P. sylvestris	۲/۵۳ c	۰/۹۰ c	۵/۰۵ c	۶/۰۷ c	۰/۹۳ c

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

جدول ۳- اثر نوع تیمار هورمونی بر القای بافت جنین‌زا

شاخص / ترکیب هورمونی	قطر بافت (میلی‌متر)	ارتفاع بافت (نمره‌دهی)	سطح مقطع بافت (پس از ۳۰ روز) (تخمینی)	سطح مقطع بافت (پس از ۴۰ روز) (تخمینی)	سرعت رشد بافت (بازه زمانی ۱۰ روز) (تخمینی)
A	۰ c	۰ c	۰ c	۰ c	۰ b
B	۵/۳۴ b	۱/۷۱ b	۱۲/۲۰ b	۱۶/۸۹ b	۴/۶۹ a
C	۶/۶۱ a	۱/۹۶ a	۱۵/۹۹ a	۲۱/۱۴ a	۵/۰۹ a

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

جدول ۴- اثر متقابل گونه و ترکیب هورمونی بر القای بافت جنین‌زا

گونه	ترکیب هورمونی	قطر بافت (میلی‌متر)	ارتفاع بافت (نمره‌دهی)	سطح مقطع بافت (پس از ۳۰ روز) (تخمینی)	سطح مقطع بافت (پس از ۴۰ روز) (تخمینی)	سرعت رشد بافت (بازه زمانی ۱۰ روز) (تخمینی)
P. brutia	A	۰ g	۰ e	۰ g	۰ g	۰ d
P. brutia	B	۹/۲۰ b	۲/۶۵ a	۲۴/۵۵ b	۳۰/۸۵ b	۶/۳۰ a
P. brutia	C	۱۰/۰۰ a	۲/۸۰ a	۲۸/۱۵ a	۳۵/۳۰ a	۷/۱۵ a
P. nigra	A	۰ g	۰ e	۰ g	۰ g	۰ d
P. nigra	B	۴/۷۰ e	۱/۶۰ c	۱۰/۳۰ d	۱۵/۱۵ d	۴/۸۵ b
P. nigra	C	۵/۶۰ d	۱/۹۰ b	۱۳/۷۰ c	۱۸/۵۵ c	۴/۸۵ b
P. radiata	A	۰ g	۰ e	۰ g	۰ g	۰ d
P. radiata	B	۴/۲۵ e	۱/۴۵ c	۸/۳۰ e	۱۴/۷۵ d	۶/۴۵ a
P. radiata	C	۶/۴۵ c	۱/۶۰ c	۱۲/۶۰ c	۱۹/۳۰ c	۶/۷۰ a
P. sylvestris	A	۰ g	۰ e	۰ g	۰ g	۰ d
P. sylvestris	B	۳/۲۰ f	۱/۱۵ d	۵/۶۵ f	۶/۸۰ f	۱/۱۵ c
P. sylvestris	C	۴/۴۰ e	۱/۵۵ c	۹/۵۰ de	۱۱/۴۰ e	۱/۶۵ c

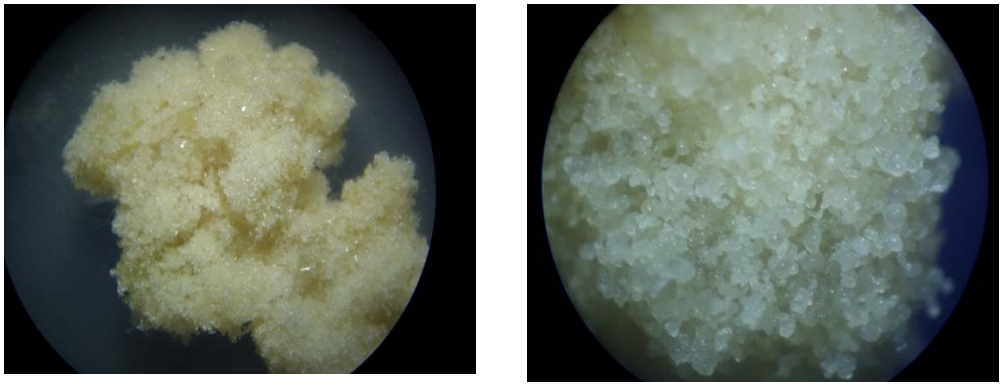
حروف غیرمشترک در هر ستون اختلاف آماری معنی‌داری با هم دارند.

جنین‌زایی قرار گرفتند، با حفظ ظاهر رشته مانند خود، از حالت آبکی و نرم و شفاف خارج شده و به بافتی سفیدرنگ، متراکم و فشرده تبدیل شدند (شکل ۳). میزان رشد و دوام بافت‌ها در تیمارهای مختلف، با هم متفاوت بود. به‌طوری‌که بافت‌ها در گونه *P. brutia* نسبت به *P. radiata* و نیز گونه *P. radiata* نسبت به گونه *P. nigra* از رشد و تداوم بیشتری برخوردار بودند. از نظر تاثیر نوع پلی‌اتیلن‌گلیکول اختلافی بین نمونه‌ها مشاهده نشد، درحالی‌که تاثیر نوع ماده جامد برخوردار بودند. از نظر تاثیر نوع پلی‌اتیلن‌گلیکول اختلافی بین نمونه‌ها مشاهده نشد، درحالی‌که تاثیر نوع ماده جامد کننده (ژلرایت و آگار) بسته به گونه، متفاوت بود. بر طبق نتایج به‌دست آمده، در گونه‌های *P. brutia* و *P. nigra*، عملکرد ژلرایت بهتر از آگار بوده، در حالی‌که در گونه *P. radiata*، نتایج حاصل از آگار بهتر از ژلرایت می‌باشد. در مورد غلظت ساکارز می‌توان گفت، میزان رشد در تمامی بافت‌ها در غلظت ۹ درصد بیشتر از غلظت ۶ درصد بود، ولی میزان دوام بافت در غلظت ۶ درصد بیشتر بوده و این بافت‌ها نسبت به بافت‌های قرار گرفته در غلظت ۹ درصد ساکارز، دیرتر از بین رفتند. انتقال نمونه‌ها به سردخانه، تنها سرعت رشد نمونه‌ها را به تعویق انداخته و تاثیری در تشکیل جنین نداشت.

در تیمار هورمونی C، گونه *P. radiata* نسبت به گونه *P. nigra* به‌طور معنی‌داری دارای اندازه قطر بافت بیشتری بود (جدول ۴) درصورتی‌که در اثر یک‌جانبه نوع گونه بر اندازه قطر بافت، این دو گونه با هم تفاوت معنی داری نداشتند (جدول ۲). در مورد سطح مقطع اولیه بافت جنین‌زا، نتایج اثر متقابل با نتایج اثر اصلی مطابقت داشته و فقط در تیمار هورمونی B، سطح مقطع بافت گونه *P. nigra* به‌صورت معنی‌داری بیشتر از گونه *P. radiata* بود. در بقیه موارد نیز نتایج اثرات متقابل گونه و تیمار هورمونی با نتایج اثرهای یک‌جانبه آنها مطابقت داشت. به‌طورکلی صرف نظر از تیمار هورمونی A که هیچ‌گونه بافتی تولید ننمود، بیشترین مقدار القا و سرعت رشد بافت جنین‌زا در گونه *P. brutia* و تیمار هورمونی C و کمترین مقدار در گونه *P. sylvestris* و تیمار هورمونی B مشاهده شد.

- مرحلهٔ تکامل جنین رویشی از بافت جنین‌زا

در این مرحله اگر چه ساختارهای شبه‌جنینی و غیرطبیعی به تعداد کم تولید شد ولی تولید جنین کامل از بافت جنین‌زا با عدم موفقیت همراه بود و با وجود تیمارهای متفاوت، عبور از مرحله پیش‌جنین و تبدیل آن به جنین کامل با لپه‌های توسعه یافته، موفقیت آمیز نبود. به‌طورکلی، بافت‌های جنین‌زا زمانی‌که در معرض تیمار



شکل ۳- بافت متراکم و سفیدرنگ جنین‌زا در محیط جنین‌زایی (راست بزرگنمایی ۲۰X و چپ بزرگنمایی ۵۰X)

بحث و نتیجه‌گیری

در اکثر گونه‌های جنس کاج القای بافت جنین‌زا با استفاده از جنین زایشی نابالغ و یا بالغ امکان‌پذیر است، اگرچه از نظر مقدار القا و سرعت رشد بافت جنین‌زا بین گونه‌ها تفاوت‌هایی وجود دارد. Tremblay (1990) در مورد *Picea glauca* گزارش نمود که بافت جنین‌زا از سلول‌های طویلی که ساختارهای سوسپانسوری را ایجاد می‌کنند و مراکز مریستمی فعال که تودهٔ جنین اولیه را به‌وجود می‌آورد، تشکیل شده است. طبق نتایج او ویژگی بافت‌های غیرجنین‌زا، سخت بودن بافت بوده که درصورتی‌که به‌طور منظم واکشت شوند، ۵ تا ۱۰ درصد از بافت‌های غیرجنین زا در طول دوره سه ماهه به بافت جنین‌زا تبدیل می‌شوند. Salajova *et al.* (1999) القای بافت جنین‌زا در *P. nigra* را با استفاده از جنین بالغ، پس از شش تا هفت هفته گزارش نمودند. گزارش آنها حاکی از این است که ابتدا بافت شبه کالوس نکروزه، در انتهای ریشه‌چه جنین تشکیل شده، سپس هیپوکتیل و لپه‌ها طویل می‌شوند و بافت نرم و سفیدرنگی با ساختارهای میله‌ای شکل تولید می‌نمایند. آنها هم‌چنین بافت پودری و شکننده‌ای را نیز در آزمایش‌های خود مشاهده نمودند که در حقیقت بافت غیرجنین‌زا بود و در واکشت‌های بعدی از بین می‌رفت. بررسی‌های میکروسکوپی آنها حضور سلول‌های طویل را تایید نمود. القای بافت جنین‌زا از جنین زایشی بالغ در *Picea rubens* پس از چهار تا هشت هفته در تاریکی و در دمای ۲۵ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت، منشا این بافت عمدتا نواحی هیپوکتیل و اپی‌کتیل گزارش شد (Isabel & Tremblay, 1995).

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی را در القای بافت جنین‌زا ایفا می‌کنند. فرآیند القای بافت جنین‌زا اغلب در محیط کشت محتوی غلظت‌های بالای اکسین (خصوصا 2,4-D) در ترکیب با سایتوکینین (اغلب BA) در غلظت‌های پایین‌تر، اتفاق می‌افتد اما لازمهٔ تبدیل بافت جنین‌زا به جنین رویشی، کاهش غلظت 2,4-D است (George *et al.*, 2008). بیرون کشیدن اکسین از محیط کشت القا، منجر به مرگ سلول‌ها در کشت‌های نوئل نروژی (*Picea abies*) شد (Bozhkov *et al.*, 2002). معمول‌ترین ترکیبات تنظیم‌کننده رشد در القای بافت جنین‌زا در جنس‌های کاج (*Pinus*) و نوئل (*Picea*)، 2,4-D (۹/۵-۱۵ میکرومول) و BA (۲/۲۵-۵ میکرومول) می‌باشند (Klimaszewska *et al.*, 2001).

Arya *et al.* (2000) با استفاده از تیمارهای هورمونی مختلف 2,4-D (۵-۲۵ میکرومول)، NAA (۱۰ میکرومول)، BA (۵ میکرومول) و چهار نوع محیط کشت DCR، MS، SH و B5، القای بافت جنین‌زا را در پنج مرحله مختلف نموی جنین نابالغ و جنین بالغ کاج *P. roxburghii* بررسی کردند. بیشترین مقدار القا در محیط DCR محتوی ۱۰ میکرومول 2,4-D و ۵ میکرومول BA، در مرحله پیش‌کوتیلدونی جنین نابالغ گزارش شد. Klimaszewska *et al.* (2001) جنین‌زایی رویشی را محیط MLV و غلظت‌های متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد، روی جنین نابالغ گونهٔ کاج *P. strobus* بررسی نمودند. در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد، هیچ‌گونه القای بافتی انجام نشد که از این نظر با نتایج ما مطابقت دارد. آنها بیشترین مقدار القای بافت را در محیط کشت محتوی مقادیر ۲/۲ میکرومول از هر کدام از دو تنظیم‌کننده رشد 2,4-D و BA، گزارش نمودند. Lelu *et al.* (1999) جنین‌زایی رویشی را با استفاده از جنین نابالغ در مراحل مختلف نموی در چند ژنوتیپ گونه‌های کاج *P. sylvestris* و *P. pinaster* و با استفاده از محیط کشت 1/2LM یکی بدون تنظیم‌کننده رشد و دیگری حاوی ۹ میکرومول 2,4-D و ۴/۵ میکرومول BA، گزارش نمودند. آنها اثرات ژنوتیپ و مرحله نموی جنین نابالغ را در آزمایش‌های خود معنی‌دار دانسته ولی اختلاف معنی‌داری بین دو محیط کشت با و بدون تنظیم‌کننده مشاهده نکردند و مقدار القا را در گونه *P. sylvestris* ۶۹٪ و ۴۲٪ و در گونه *P. pinaster* ۲۵٪ و ۱۴٪ در محیط محتوی تنظیم‌کننده رشد و بدون تنظیم‌کننده رشد (به‌ترتیب) گزارش کردند که این موضوع از این جهت که در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد، بافت جنین‌زا القا می‌شود،

با نتایج این پژوهش مغایرت دارد. با توجه به واکنش‌های متفاوت جنین زایشی به مقادیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌توان گفت که این واکنش تا حدود زیادی به مرحله نموی جنین زایشی کشت شده در محیط بستگی دارد، چرا که با کشت جنین زایشی نابالغ در مرحله نموی مناسب، بافت مگاگامتوفیت با تولید هورمون‌های درونی سبب القای بافت جنین‌زا می‌شود و نیازی به تنظیم‌کننده‌های رشد اضافی (اکسین و سایتوکینین) پیدا نخواهد کرد (Maruyama *et al*., 2007). بیشترین نتایج القای بافت جنین‌زا از جنین بالغ، با استفاده از ۱۰ میکرومول 2,4-D و ۵ میکرومول BA گزارش شده است (Garin *et al*., 1998; Dunstan *et al*., 1995; Tremblay & Tremblay, 1995). علاوه بر مقادیر مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع گونه، عوامل بسیاری در میزان القای بافت جنین‌زا نقش دارند که از آن جمله می‌توان به نوع محیط کشت، نوع ریزنمونه و مراحل نموی مختلف ریزنمونه و غیره اشاره کرد.

در مرحله جنین‌زایی عملکرد متفاوت مواد جامدکننده به‌دلیل پاسخ گونه‌های متفاوت به نوع ماده جامد کننده است، چون محیط کشت محتوی ۱ درصد آگار با محیط کشت محتوی ۰/۴ درصد ژلرایت دارای اثرات مشابهی هستند (Von Arnold, 1987). هم‌چنین به‌نظر می‌رسد که در غلظت ۹ درصد ساکارز، بافت‌ها از تغذیه و رشد بیشتری برخوردار بوده ولی در معرض پتانسیل اسمزی پایین‌تری (نسبت به غلظت ۶ درصد ساکارز) قرار گرفته و زودتر خشک شده و از بین می‌روند. این واکنش‌ها نقش ساکارز را به‌عنوان یک منبع کربن و هم‌چنین عامل اسموتیکی تایید می‌کند (George *et al*., 2008). با توجه به اینکه بحرانی‌ترین مرحله در جنین‌زایی رویشی، گذر از مرحله پیش‌جنینی و تکامل آن به جنین لپه‌دار می‌باشد، عوامل گوناگونی در عدم موفقیت در تکامل جنین نقش دارند.

نقش ژنوتیپ و ریزنمونه به‌عنوان دو عامل اصلی در جنین‌زایی رویشی کاملا مشخص است. هم‌چنین این احتمال وجود دارد که به دلیل کشت مداوم بافت‌های جنین‌زا در محیط‌های نگه‌داری محتوی تنظیم‌کننده‌های رشد به مدت طولانی، سطح تنظیم‌کننده‌های رشد در بافت زیاد شده و بافت‌های جنین‌زا توانایی خود را برای تبدیل به جنین از دست داده باشند. در جنین‌زایی رویشی اختلاف برجسته‌ای بین دو جنس مهم گروه سوزنی‌برگان وجود دارد. در مقایسه با موفقیت در القای جنین و تولید گیاهچه در گونه‌های *Picea*، سرسختی در تولید جنین و گیاهچه در گونه‌های *Pinus* کاملا آشکار است (Tautorus *et al*., 1991). امروزه بیشترین پژوهش‌های جنین‌زایی رویشی در گونه‌های *Picea* انجام می‌گیرد و این امر به دلیل سهولت نسبی در القا و تولید گیاهچه از طریق جنین‌زایی رویشی، در مقایسه با دیگر جنس‌های خانواده Pinaceae می‌باشد. دلیل دیگر را می‌توان اهمیت اقتصادی این جنس در صنعت جنگل‌کاری ذکر کرد (Klimaszewska & Cyr, 2002). با توجه به این موضوع که این پژوهش برای اولین بار در ایران صورت گرفت اگرچه موفقیت‌هایی در مرحله القای تودهٔ جنین‌زا و ساختارهای پیش‌جنین حاصل شد، هنوز تحقیقات زیادی لازم است تا به جنین رویشی بالغ با لپه‌های توسعه یافته و گیاهچه حاصل از جنین رویشی دست یافت.

References

- Arya, S. Kalia, R. K. and Arya, I. D. 2000. Induction of somatic embryogenesis of *Pinus roxburghii* Sarg., Plant Cell Reports. 19: 775-780.
- Attree, S. M. Budimir, S. and Fowke, L. C. 1990. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured shoots and cotyledons of seedling from stored seed of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). Canadian Journal of Botany. 68(1): 30-34.
- Bozhkov, P. Filonova, L. H. and von Arnold, S. 2002. A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. Biotechnology and Bioengineering. 77(6): 658-667.

- Garin, E. Isabel, N. and Plourde, A. 1998. Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos, Plant Cell Reports, 18: 37-43.
- George, E. F. Michael, A. H. and De Klerk, G. J. 2008. Plant propagation by tissue culture, 3th Ed., Springer, Netherlands, 501 pp.
- Gupta, P. K. and Durzan, D. J. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports. 4: 177-180.
- Klimaszewska, K. Park, Y. S. Overton, C. Maceacheron, I. and Bonga, J. M. 2001. Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L., In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 37: 392-399.
- Lelu, M. A. Bastien, C. Drugeault, A. Gouez, M. L. and Klimaszewska, K. 1999. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with or without growth regulators. Physiology Plant. 105: 719-728.
- Isabel, N. and Tremblay, F. M. 1995. Somatic embryogenesis in red spruce (*Picea rubens* Sarg.), In: Jain, S. Gupta, P. and Newton, R. (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Kluwer Academic, Netherlands, 3: 111-123 pp.
- Maruyama, E. Hosoi, Y. and Ishii, K. 2007. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in yakutanegoyon, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endemic and endangered species in Japan, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 43: 28-34 pp.
- Salajova, T. Salaj, J. and Kormutak, A. 1999. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. Plant Science. 145: 33-35.
- Stasolla, C. Kong, L. Yeung, E. C. and 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.
- Tang, W. and Newton, R. J. 2007. Micropropagation via organogenesis in slash pine, In: Jain, S. M. and Häggman, H. (eds.), Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits, Springer, 15-22.
- Tautorus, T. E. Attree, S. M. Fowke, L. C. and Dunstan, D. I. 1990. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and embryo regeneration from protoplasts in black spruce (*Picea mariana* Mill). Plant Science. 67: 115-124.
- Tremblay, F. M. 1990. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from embryos isolated from stored seed of *Picea glauca*. Canadian Journal of Botany. 68: 236-242.
- Wilson, S. M. and Thorpe, T. A. 1995. Somatic embryogenesis in *Picea glauca* (white spruce), *P. engelmannii* (engelmann spruce) and *P. glauca engelmannii* complex (interior spruce), In: Jain, S. Gupta, P. and Newton, R. (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Published by Kluwer Academic, Netherlands, 3: 37-53.
- Yildirim, T. Kaya, Z. and Isik, K. 2006. Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* TEN., Plant Cell Tissue Organ Culture, 87: 67-76.

The effect of plant growth regulator on embryogenic tissue induction in four pine species

Elahe Nasseri[1]*, Siamak Kalantari[2], Rouhangiz Naderi[3]
[1] Graduate Student, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, I.R. Iran
[2] Assistant Professor, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, I.R. Iran
[3] Associate Professor, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, I.R. Iran
(Received: 30 October 2010, Accepted: 24 October 2011)

Abstract

In this survey, the possibility of somatic embryogenesis in four different pine species was studied using different compositions of plant growth regulator. The embryogenic tissue induction phase was performed using mature zygotic embryo explant, culture medium DCR and using different levels of plant growth regulator in *Pinus brutia*, *P. nigra*, *P. radiata* and *P. sylvestris* species. The experiment was done through a completely randomized design with a simple factorial arrangement. Embryogenic tissue was measured in two phase, 30 and 40 days after the initial culture. After sterilizing of seeds kept at 4°C, and removing their coats, zygotic embryo was separated from megagametophyte and put into the Petri dish containing solid tissue culture. All the Petri dishes were maintained in darkness at 25°C. After 2 weeks the first signs of embryogenic tissue induction were observed. The results showed the significant effect of composition of plant growth regulator and specie on the amount of embryogenic tissue induction and the best result was obtained from *P. brutia* in hormon composition of 10µM 2,4-D+5µM BA. In order to proliferation of embryogenic tissues, subculture of tissues was performed every two weeks in new culture medium for six weeks. Finally, in order to maturation of somatic embryo from embryogenic tissue, the segments of embryogenic tissue with 5×5 mm dimensions were transferred to DCR culture medium. After two months, although quasi-embryo and abnormal structures got seen but the production of complete embryo from embryogenic tissue was unsuccessful and transition from preembryony phase and conversion to embryo with developed cotyledons failed.

Keywords: Mature Zygotic Embryo, Plant Growth Regulator, Culture Medium, Megagametophyte and *Pinus* L.

*Corresponding author: Tel: +98 2636774065 Fax: +982632248721 E-mail: Naseri_elahe@yahoo.com