به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی
دوره ٤ ■ شماره ١ ■ بهار و تابستان ١٣٩٥
صفحه‌های ٥٩-٤٩
انتشار الکترونیکی: بهار ١٣٩٨

کپسوله کردن نوک شاخه‌ها در دو هیبرید ایرانی آفتابگردان و مقایسه تبدیل و رشد بذرهای مصنوعی حاصل روی بستره‌های مختلف

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

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران.
۲. استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران.
۳. دانشیار، مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم، کرمانشاه، ایران.
۴. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۱/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۲۸

چکیده

این آزمایش به‌منظور تعیین میزان تبدیل و رشد بذرهای مصنوعی حاصل از کپسوله کردن نوک شاخه‌های آفتابگردان روی بستره‌های مختلف به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار در آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه در سال ۱۳۹۱ انجام شد. نوک شاخه‌های حاصل از گیاهچه‌های تکثیرشده آفتابگردان در شرایط درون شیشه‌ای در آلژینات سدیم سه درصد و ۱۰۰ میلی‌مولار $CaCl_2.2H_2O$ کپسوله شدند. جهت بررسی تأثیر کاربرد مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس کپسوله‌کننده، برای تهیه آلژینات سدیم از سه ماتریکس متفاوت شامل آب مقطر استریل، محیط MS مایع و محیط MS مایع همراه با دو میلی‌گرم در لیتر BA و دو میلی‌گرم در لیتر IAA استفاده شد. بذرهای مصنوعی حاصل جهت ارزیابی توانایی جوانه‌زنی و رشد مجدد به محیط MS فاقد هورمون و دو بستره تجاری مخلوط کوکوپیت و پرلیت (۱:۱) و مخلوط کوکوپیت، پرلیت و پیت ماس (۱:۱:۱) منتقل شدند. استفاده از مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس آلژینات به‌طور معنی‌داری رشد مجدد نوک شاخه‌های کپسوله‌شده را بهبود بخشید. بیش‌ترین میزان تبدیل بذرهای مصنوعی ۱۰۰ درصد بود که از کاشت در شرایط درون‌شیشه‌ای روی محیط MS به‌دست آمد و کاشت مستقیم در شرایط بیرون شیشه‌ای باعث کاهش توانایی تبدیل و رشد آن‌ها شد.

واژه‌های کلیدی: آلژینات سدیم، بستره تجاری، شرایط بیرون‌شیشه‌ای، ماتریکس کپسوله‌کننده، محیط MS.

* نویسنده مسئول
Email: moradi_s998@ymail.com

مقدمه

آفتابگردان زراعی (*Helianthus annuus* L.) چهارمین محصول بسیار مهم روغنی در جهان پس از سویا، کلزا و بادام‌زمینی و یکی از نباتات مهم روغنی در ایران است [۷]. برای گسترش سطح زیر کشت آفتابگردان اصلاح ژنتیکی آن از نظر خصوصیات مهم زراعی ضروری است [۲۸]. مقاومت به آفات و خصوصیات فیزیولوژیکی (مثل تحمل خشکی و شوری) موجود در خویشاوندان وحشی را می‌توان جهت بهبود خصوصیات زراعی از طریق دورگ‌گیری بین‌گونه‌ای یا انتقال ژنتیکی به جین‌پول[1] آفتابگردان وارد کرد [۲۷]. متأسفانه استفاده از ژن‌های مفید خیلی از گونه‌های وحشی به‌دلیل وجود موانع طبیعی تلاقی و کاربرد مهندسی ژنتیک (مثل هیبریداسیون ژنتیکی و انتقال ژن) برای آفتابگردان به‌دلیل سختی ایجاد یک روش باززایی کارا و قابل تجدید محدود شده است. میزان باززایی در آفتابگردان بستگی به ژنوتیپ دارد و اغلب ژنوتیپ‌های موردبررسی سرسخت گزارش شده‌اند [۹]. در تمام روش‌های موردبررسی نسبت پایین باززایی، مرفوژنز غیرنرمال، عدم توانایی برای بلوغ هم‌زمان جنین‌ها، شیشه‌ای شدن، ریشه‌دهی ضعیف و گلدهی زودهنگام از مهم‌ترین مشکلات هستند [٤]. به‌علاوه آفتابگردان گیاهی دگرگشن است لذا بقای واریته‌های منتخب از طریق بذر غیرممکن است به‌همین دلیل امروزه فنّاوری بذر مصنوعی کمک باارزشی برای ازدیاد کلون‌های گیاهی در مقیاس وسیع و تبادل ژرم‌پلاسم منتخب است [۱۰، ۲۰، ۲۲].

بذرهای مصنوعی را می‌توان به‌صورت جداکشت‌های کپسوله‌شده از جمله نوک ساقه‌ها، جوانه‌های جانبی یا جنین‌های سوماتیکی با استفاده از ژل آلژینات، اتیلن گلیکول، دی متیل سولفوکسید و سایر موادی که باعث توسعه و تبدیل جداکشت‌ها به گیاه می‌شود، تعریف کرد [۱۲]. پوشش بایستی دارای مواد تغذیه‌ای، تنظیم‌کننده‌های رشد و سایر اجزایی باشد که برای جوانه‌زنی و تبدیل لازم هستند و باید به وسیله ماشین‌های کشاورزی حاضر قابل کشت باشد [٣٤]. نگهداری ژرم‌پلاسم، توسعه گیاهان هیبرید، اهداف تحقیقی و تجزیه‌ای مختلف مثل مطالعه نقش آندوسپرم، تولید انبوه کلون از گونه مناسب و برتر با قیمت پایین و بررسی دقیق نقش موادی مثل تنظیم‌کننده‌های رشد و قارچ‌کش‌ها و غیره روی مکانیسم‌های گیاهی از جمله مزایای بذر مصنوعی است. این تکنولوژی یک روش عالی برای تکثیر هیبریدهای نادر، ژنوتیپ‌های منتخب و گیاهان تراریخت که بذور آن‌ها گران یا غیرقابل‌دسترس است، می‌باشد. با این وجود گزارش‌های کمی از کپسوله‌کردن اندام‌های رویشی وجود دارد [۱، ۱۷، ۲۹، ۳۰].

در یک مطالعه نوک شاخه‌های آفتابگردان در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA تکثیرشده، تأثیر کاربرد اسید سالسیلیک و مقادیر مختلف ساکارز روی قدرت باززایی نوک شاخه‌های کپسوله‌شده پس از نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد بررسی شد. در این مطالعه نوک شاخه‌های کپسوله‌نشده بعد از ٦٠ روز فاقد قدرت بقا بودند و استفاده از ۵۰ μM اسید سالسیلیک سبب جوانه‌زنی ۵۹ درصدی نوک شاخه‌های کپسوله‌شده بعد از ۹۰ روز نگهداری در دمای ٤ C° شد [۱۸]. بذرهای مصنوعی دارای آندوسپرم مصنوعی (در محیط کشت مصنوعی) حاوی مواد غذایی موراشیگ و اسکوگ (MS)، ساکارز (۳ درصد)، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA)، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید (NAA)، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) و زغال فعال (۱/۲۵ درصد) حداکثر جوانه‌زنی (۳۰ درصد) و

1. Gene pool

تبدیل (۲۷ درصد) را در برنج هیبرید، نشان دادند [۳]. در مطالعه‌ای نوک شاخه‌های حاصل از تکثیر *Phyllanthus amarus* در شرایط درون‌شیشه‌ای با استفاده از آلژینات سدیم سه درصد و ۷۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم کپسوله شده و حداکثر درصد تبدیل نوک شاخه‌های کپسوله‌شده به گیاهچه پنج هفته بعد از کشت، روی محیط MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (۹۰ درصد) به‌دست آمد. توانایی رشد نوک شاخه‌های کپسوله‌شده تحت تأثیر غلظت آلژینات سدیم، دوره نگهداری و حضور یا عدم حضور مواد غذایی MS در دانه‌های آلژینات سدیم قرار گرفت [۲۹].

لازم به ذکر است که بذرهای مصنوعی باید از قدرت رقابتی مناسبی در مقایسه با بذور طبیعی گیاه برخوردار باشند [۳۲]. جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی در شرایط مزرعه دشوار است اما به هنگام استفاده از خاک استریل‌شده و مواد غذایی MS، جوانه‌زنی ۳۰ درصدی در آن‌ها مشاهده شد. پروتکل مشابهی در چغندرقند استفاده شد که نشان داد کاشت مستقیم زمینه را برای تبدیل بذرها به یک ارگانیسم اتوتروف فراهم می‌کند. بذرهای مصنوعی در شرایط مزرعه جوانه نزدند اما در گلخانه و آزمایشگاه جوانه زدند [۲۰].

با توجه به مشاهده هتروزیس و اهمیت تولید ارقام هیبرید در آفتابگردان از یک سو، هزینه بالای تولید و نیاز به تهیه هر ساله این ارقام از سویی دیگر و همچنین اهمیت کاربرد کشت بافت گیاهی به‌عنوان ابزاری در جهت استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای بهبود و افزایش تولید آفتابگردان، تولید بذر مصنوعی در ارقام هیبرید باارزش تجاری می‌تواند روش مناسبی برای تکثیر این بذور باشد. این پژوهش به‌منظور تولید بذر مصنوعی با استفاده از کپسوله‌کردن نوک شاخه‌های آفتابگردان و تعیین ظرفیت بذرهای مصنوعی حاصل جهت رشد روی بستره‌های مختلف و بررسی تأثیر کاربرد مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد در آندوسپرم مصنوعی روی توانایی تبدیل و رشد بذرهای مصنوعی انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تکثیر ریزنمونه‌ها

در این بررسی از بذرهای دو هیبرید آفتابگردان به نام‌های آذرگل و فرخ (*H. annuus* hyb. Azargol and Farokh)، استفاده گردید. آزمایش‌ها در سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه انجام شد. بذور بالغ به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول قارچ‌کش 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 به‌مدت دو دقیقه در الکل اتانول ۷۰ درصد شسته شده و به‌مدت پنج دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. سپس بذور در هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد استریل سطحی شده و سه بار با آب مقطر استریل هر بار پنج دقیقه آبکشی شدند. برای ظهور گیاهچه‌ها، بذرها در محیط MS حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هشت گرم در لیتر آگار کشت شدند. pH محیط قبل از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه روی ۵/۷ تنظیم شد. بذرها در لوله‌های حاوی ده 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 به محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین جهت تکثیر نوک شاخه‌ها منتقل شدند. pH محیط قبل از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم شد. ظروف ارلن مایر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط‌های تکثیر و سه ریزنمونه میانگره‌ای در اتاق رشد با شرایط مذکور قرار داده شدند.

تولید بذر مصنوعی

نوک شاخه‌های حاصل از محیط تکثیر جهت تولید بذر مصنوعی استفاده گردید. کپسوله‌کردن از طریق اضافه نمودن نوک شاخه‌ها به محلول آلژینات سدیم و چکاندن آن درون محلول کلرید کلسیم انجام گرفت. کپسوله‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه داخل کلرید کلسیم باقی‌مانده سپس جهت حذف کلرید کلسیم اضافی سه مرتبه در آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. در تهیه ژل آلژینات سدیم، از سه ماتریکس آب مقطر، محیط MS مایع و محیط MS مایع به‌همراه دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و دو میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA استفاده شد.

کاشت بذرهای مصنوعی روی بستره‌های مختلف

تعدادی از بذرهای مصنوعی کپسوله‌شده با ماتریکس‌های مختلف به‌همراه نمونه‌های کپسوله‌نشده (نوک شاخه‌ها) پس از تولید، روی محیط کشت جامد MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد کشت شدند و تعدادی دیگر مستقیماً به دو نوع خاک (مخلوط کوکوپیت و پرلیت یا مخلوط کوکوپیت، پرلیت و پیت‌ماس به نسبت مساوی) استریل‌شده با اتوکلاو منتقل شدند. این نمونه‌ها با محلول MS ۱/۲ محلول‌پاشی‌شده و جهت حفظ رطوبت در دو هفته اول با لایه پلی‌اتیلنی شفاف پوشانده شدند. بعد از دو هفته لایه‌های پلی اتیلنی برداشته شد. نمونه‌های کشت‌شده روی محیط MS در اتاق رشد با شرایط دمایی ۲۵ °C و رطوبت نسبی ۷۵ درصد و نمونه‌های منتقل‌شده به خاک‌ها در اتاق سازگاری با شرایط دمایی ۲۱ °C و رطوبت نسبی ٦۰ درصد نگهداری شدند. بعد از گذشت چهار هفته میزان جوانه‌زنی و رشد نمونه‌ها در هر کدام از بستره‌های کشت مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه آماری

آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار اجرا شد. آنالیز واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. میانگین‌ها نیز با آزمون دانکن و در سطح احتمال $\alpha=$ ۰/۰۵ با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که نوع بستره کشت بر روی تمام صفات مورد ارزیابی واجد اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بود، اما اثر دو هیبرید تنها بر روی صفات تعداد برگ، طول ریشه (در سطح احتمال یک درصد) و طول شاخه (در سطح احتمال پنج درصد) دارای اختلاف معنی‌دار بود. رشد گیاهچه‌های حاصل به‌وسیله اثر متقابل هیبرید و بستره کشت تحت تأثیر قرار گرفت اما اثر آن بر روی درصد جوانه‌زنی و درصد ریشه‌دهی بذرهای مصنوعی اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین مربعات تأثیر هیبرید و بستره کشت طی چهار هفته پس از کاشت بذرهای مصنوعی آفتابگردان از نظر هفت صفت تحت بررسی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		طول شاخه	تعداد برگ	طول برگ	عرض برگ	طول ریشه	درصد جوانه‌زنی	درصد ریشه‌دهی
هیبرید	۱	۳۰/٦۹*	۳٤/٤٥**	۰/۲۳ns	۰/٦۰ns	۷٤۱/۹٤**	۳۱/۳٥ns	۱۹٥/۳۱ns
بستره کشت	۷	۱۳۱٥/۹۰**	۲۷۳/۹۱**	٥٦/۸۹**	۲/۱٦**	۱۱۷۹/۱۱**	۷۱۰۲/٦۷**	٦۷۳۱/۰۲**
هیبرید × بستره کشت	۷	۲٥۹/۳۱**	۱۸/۳٥**	۱۸/۰۲**	٤/۰٥**	٤۱/۸۸**	۳۱/۲٥ns	۱۰٦/۰۲ns
اشتباه آزمایشی	٦٤	٥/۰۲	۰/۷۸	۱/٥۲	۰/۲۸	۱۰/٥٥	۷۸/۱۲	۱۳٦/۷۱
ضریب تغییرات (٪)		٤/۳۲	٦/۸۹	۷/۸۷	۷/۹۷	۱۰/٦٥	۱۱/٦۸	۱٦/٤۸

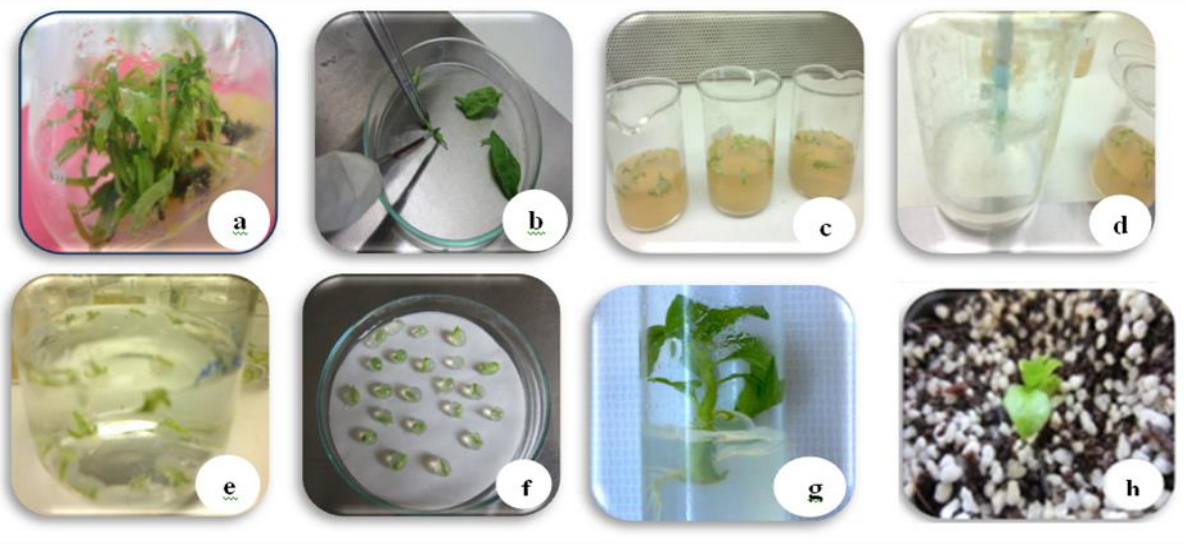
**، * و ns: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ٥ درصد و غیر معنی‌دار.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که جوانه‌زنی، ریشه‌دهی و رشد گیاهچه‌ها در نوک شاخه‌های کپسوله‌شده تحت تأثیر نوع بستره کشت قرار گرفته بذرهای مصنوعی در شرایط درون‌شیشه‌ای و در حضور مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشدی در ماتریکس آلژینات سدیم، درصد جوانه‌زنی و ریشه‌دهی بیشتری داشته و رشد بهتری داشتند (جدول ۲ و شکل ۱).

با مقایسه میزان جوانه‌زنی و رشد بذرهای مصنوعی در شرایط درون‌شیشه‌ای و بیرون‌شیشه‌ای (جدول ۱) مشخص شد که نوع بستره به‌کاربرده‌شده جهت کشت بذرهای مصنوعی تأثیر بسیار معنی‌داری روی میزان جوانه‌زنی و سایر پارامترهای رشد گیاهچه‌های حاصل داشت. فراهم کردن یک محیط کاملاً استریل با رطوبت بیشتر و تأمین مواد غذایی کافی برای رشد بذرهای مصنوعی دلیل این تأثیر معنی‌دار در محیط درون‌شیشه‌ای در مقایسه با محیط بیرون‌شیشه‌ای است.

در مطالعه حاضر باززایی بذرهای مصنوعی در شرایط درون‌شیشه‌ای بهتر از شرایط بیرون‌شیشه‌ای بود. در شرایط درون‌شیشه‌ای ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌های کپسوله نشده جوانه زدند درحالی‌که در شرایط بیرون‌شیشه‌ای نوک شاخه‌های کپسوله‌نشده یا به‌طور کامل فاقد قدرت بقا و جوانه‌زنی بودند و یا این‌که به مقدار بسیار کم جوانه زدند. فقدان اپی‌کوتیکول مومی در شاخه‌های کشت بافتی منجر به از دست دادن بیش از حد آب می‌شود. ازآنجاکه ذخایر پروتئین و نشاسته پس از جذب به‌سرعت هیدرولیز می‌شوند جوانه‌زنی ریزنمونه‌های کپسوله‌شده روی یک محیط غذایی تا حد زیادی توسعه گیاهچه را بهبود می‌بخشد [۱۵]. جوانه‌زنی و ریشه‌دهی بذرهای مصنوعی در خاک بیش از هر چیزی تحت تأثیر ماتریکس آلژینات سدیم قرار داشت، به‌طوری‌که عدم وجود مواد غذایی منجر به از بین رفتن ریزنمونه‌های رویشی شد.

بذرهای مصنوعی در شرایط درون‌شیشه‌ای و در حضور مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشدی در ماتریکس آلژینات سدیم، رشد بهتری داشتند (جدول ۲).



شکل ۱. a) تکثیر نوک شاخه‌های آفتابگردان در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، b) جداکردن نوک شاخه‌ها c، d و e (کپسوله‌کردن نوک شاخه‌ها در آلژینات سدیم و کلرید کلسیم، f) تولید بذر مصنوعی، g) جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی در محیط MS، h) جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی در بسترهای تجاری در شرایط بیرون‌شیشه‌ای

جدول ۲. مقایسه میانگین تأثیر هیبرید و بستره کشت طی چهار هفته پس از کاشت بذرهای مصنوعی نوک شاخه‌ها بر روی هفت صفت تحت بررسی آفتابگردان

		میانگین صفات						
	تیمار	طول شاخه	تعداد	طول برگ	عرض برگ	طول ریشه	جوانه‌زنی	ریشه‌دهی
هیبرید	ماتریکس	(mm)	برگ	(mm)	(mm)	(mm)	(٪)	(٪)
آذرگل	شاهد در شرایط درون‌شیشه‌ای	٦٤/٠٧ f	١٢/٠٠cd	٥/٩٩fg	٥/٩٩fg	٥٣/١٢c	١٠٠a	١٠٠a
	آب مقطر در شرایط درون‌شیشه‌ای	٤٧/٧٥ j	١٠/٤٥efg	٥/٤٩gh	٥/٤٩gh	٣٤/٩٠ j	١٠٠a	٩٥a
	MS در شرایط درون‌شیشه‌ای	٩٥/٥٢a	١٣/٠٠bc	٧/٧٣cd	٧/٧٣cd	٥٠/٧٢d	١٠٠a	١٠٠a
	MS + هورمون در شرایط درون‌شیشه‌ای	٨٩/٤٢b	١٣/٠٥b	٦/٧٠ef	٦/٧٠ef	٦٤/٢٠a	١٠٠a	١٠٠a
	MS در مخلوط کوکوپیت و پرلیت	٣٧/٠٨m	٦/٨٠ i	٤/٨٤h	٤/٨٤h	٣٦/٥٥ij	٥٠c	٥٠c
	MS+ هورمون در مخلوط کوکوپیت و پرلیت	٤٨/٤٦ij	٨/٨٠h	٦/٤٥ef	٦/٤٥ef	٤٥/٦٠gh	٦٠bc	٥٠c
	MS در مخلوط کوکوپیت و پرلیت و پیت ماس	٤٩/٩٣ i	٩/٠٠ h	٦/٥١ef	٦/٥١ef	٣٨/٣٧ i	٥٠c	٥٠c
	MS + هورمون در مخلوط کوکوپیت و پرلیت و پیت ماس	٦٨/٥٤e	١١/٦٠cde	٧/٥٦cd	٧/٥٦cd	٤٨/٤٦e	٧٠b	٦٠b
فرخ	شاهد در شرایط درون‌شیشه‌ای	٦٦/٥٨e	١١/٦٠cde	١٠/٩٩a	١٠/٩٩a	٤٥/٩٧fg	١٠٠a	١٠٠a
	آب مقطر در شرایط درون‌شیشه‌ای	٥٧/٣٤g	١١/٠٠def	٨/٥٩b	٨/٥٩b	٣٧/٠٧ i	١٠٠a	١٠٠a
	MS در شرایط درون‌شیشه‌ای	٨٢/٧٩c	١٣/٥٠b	١١/٤٣a	١١/٤٣a	٤٧/٦٩ef	١٠٠a	١٠٠a
	MS + هورمون در شرایط درون‌شیشه‌ای	٧٥/١٤d	١٩/٤٥a	٨/٥١b	٨/٥١b	٥٥/٠١b	١٠٠a	١٠٠a
	MS در مخلوط کوکوپیت و پرلیت	٣٧/٠٨ f	٩/٠٠h	٦/٧٢ef	٦/٧٢ef	٣٢/٣٥k	٥٠c	٥٠c
	MS + هورمون در مخلوط کوکوپیت و پرلیت	٣٢/٨٨n	١٠/٠٠Fgh	٥/٦٩g	٥/٦٩g	٣٥/١٠ j	٦٠bc	٥٠c
	MS در مخلوط کوکوپیت و پرلیت و پیت ماس	٥٣/٧٠h	١١/٢٠def	٨/٠٢bc	٨/٠٢bc	٤٣/٩٣h	٥٠c	٥٠c
	MS + هورمون در مخلوط کوکوپیت و پرلیت و پیت ماس	٤٢/٣٨k	٩/٤٠gh	٧/٢١de	٧/٢١de	٤٥/٥٣gh	٦٥b	٥٥bc

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

ریزنمونه‌های کپسوله‌شده درصورتی‌که حاوی مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد بودند از قدرت جوانه‌زنی و رشد بهتری هم در شرایط درون‌شیشه‌ای و هم در شرایط بیرون برخوردار بودند. اما فقدان مواد غذایی در ماتریکس کپسول‌ها منجر به کاهش قدرت جوانه‌زنی و به‌ویژه ریشه‌زایی در ریزنمونه‌ها شد که این کاهش در محیط بیرون بیش‌تر از شرایط درون‌شیشه‌ای بود. بهبود رشد را می‌توان به مواد غذایی موجود در آندوسپرم مصنوعی نسبت داد که به‌عنوان منبع کربن عمل می‌کند [۱۰]. حضور تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس آلژینات نیز توسعه و تشکیل شاخه را در ریزنمونه‌های کپسوله‌شده افزایش می‌بخشد [١٦]. در مجموع میزان جوانه‌زنی و رشد ریزنمونه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای بیش‌تر از شرایط بیرون‌شیشه‌ای و در ریزنمونه‌های کپسوله‌شده با ماتریکس ژلی حاوی مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد بیش‌تر از ریزنمونه‌های کپسوله‌نشده یا کپسوله‌شده با ماتریکس ژلی فاقد مواد غذایی بود. از بین دو بستره تجاری که در شرایط بیرون‌شیشه‌ای مورد استفاده قرار گرفت جوانه‌زنی و رشد بذرهای مصنوعی در مخلوط کوکوپیت، پرلیت و پیت‌ماس در هر دو هیبرید بیشتر از بذرهای کشت‌شده در مخلوط کوکوپیت و پرلیت بود (میانگین جوانه‌زنی ۵۲/۵ درصدی برای هیبرید آذرگل و

۵۷/۵ درصدی برای هیبرید فرخ). ازآنجاکه ریزنمونه‌های کشت بافتی فاقد پوسته هستند هیچ مانعی برای خروج آب وجود ندارد، در نتیجه آسیب‌های حاصل از خروج آب یکی از علل احتمالی ضعف قدرت گیاهچه‌های بذرهای مصنوعی است. محتمل‌ترین دلیل ضعف قدرت گیاهچه‌ها، رشد غیرطبیعی ساقه‌چه و ریشه‌چه است [۳۵].

ریزنمونه‌های رویشی تولیدشده در شرایط درون شیشه‌ای تحت شرایط کنترل‌شده می‌توانند مستقیماً تبدیل به گیاهچه شوند؛ اما اگر این ریزنمونه‌ها از طریق کپسوله کردن با پوشش مصنوعی تبدیل به بذر مصنوعی شوند تطابق‌پذیری آن‌ها بیش‌تر شده و شبیه بذر واقعی می‌شوند [٦، ۲۱]. در بذرهای مصنوعی پوشش مصنوعی مورد استفاده برای کپسوله‌کردن یک محافظ فیزیکی برای ریزنمونه‌ها فراهم کرده و به‌عنوان آندوسپرم مصنوعی می‌تواند حاوی منبع کربن، تنظیم‌کننده‌های رشد، آنتی بیوتیک‌ها، قارچ‌کش‌ها و مواد دیگر باشد که جوانه‌زنی را بهتر کند بدون این‌که موجب القای تغییرات نامطلوب شود [۳٦]. فراهم کردن یک آندوسپرم مصنوعی حاوی مواد غذایی (عناصر غذایی، ساکارز و تنظیم‌کننده‌های رشد) اهمیت خاصی برای نگهداری و کارایی تبدیل ریز افزونه‌های کپسوله شده دارد.

تأثیر مثبت افزودن ترکیبات کمکی به ماتریکس ژلی روی رشد هیبرید صنوبر و درخت صمغ نیز گزارش شده است [۱۱، ۳۳]. برای کپسوله کردن جوانه‌های شاخه آدولسا[1] (*Adhatoda vasica*) از محیط گامبورگ همراه با ٤/٦٥ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۵۰ میلی‌گرم درلیتر فلوروگلوسیتول استفاده شد [۲۵]. جهت کپسوله‌کردن نوک مریستم شاخه میخک قرمز (*Dianthus caryophyllus*) نیز محیط MS مایع انتخاب شد [۸]. در لیدورت وحشی[2] (*Plumbago zeylanica*) دانه‌های آلژینات تهیه‌شده با محیط MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد درصد کمی از دانه‌ها شکافته‌شده و رشد آرام‌تر از بذرهای مصنوعی حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد بود [٢٤]. حضور سیتوکینین (BAP) و اکسین (NAA) در ماتریکس آلژینات توسعه شاخه‌های اولیه از قطعات گره کپسوله‌شده کاساو[3] (*Monihote esuelenta*) را افزایش داد [۱۹].

ترکیب ماتریکس آلژینات به‌عنوان یک فاکتور مهم باززایی بذرهای مصنوعی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و افزودن ترکیبات کمکی به محلول آلژینات باعث بهبود پارامترهای رشد می‌شود. نیاز به دسترسی به عناصر معین در ماتریکس ژلی اهمیت ویژه‌ای دارد بنابراین پیشنهاد می‌شود در آینده توجه ویژه‌ای به آن شود.

نکته قابل‌توجه در گیاهچه‌های حاصل از کاشت مستقیم بذرهای مصنوعی در شرایط بیرون‌شیشه‌ای این بود که علی‌رغم میزان جوانه‌زنی و رشد کم‌تر، گیاهچه‌های حاصل، خصوصیات نامطلوب گیاهچه‌های کشت بافتی را نداشتند. این گیاهچه‌ها نسبت به گیاهچه‌های تولیدشده در شرایط درون‌شیشه‌ای برگ‌های نرمال‌تری تولید کرده و شیشه‌ای شدن و گل‌دهی پیش از بلوغ نیز در آن‌ها مشاهده نشد. به‌علاوه کاشت مستقیم بذرهای مصنوعی در شرایط بیرون‌شیشه‌ای نیاز به مرحله سخت سازگاری گیاهچه را برطرف می‌سازد و تحویل مستقیم ریزنمونه‌ها را ممکن می‌سازد.

سازگاری گیاهچه‌ها یکی از مراحل مهم در مطالعات کشت بافت است. گیاهچه‌های تشکیل‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای ظرفیت حفظ آب ضعیفی دارند به این دلیل که برگ‌های آن‌ها اپی‌کوتیل مومی کم‌تری داشته، عمل روزنه‌ها غیرعادی است (روزنه‌ها همیشه باز هستند) و

1. Adulsa

2. Wild leadwort
3. Cassava

برگ‌ها آناتومی داخلی غیرعادی دارند [١٤]. از طرفی دما و رطوبت دو فاکتور کلیدی هستند که میزان بقای گیاهچه‌ها را در گلخانه تعیین می‌کنند. فقدان اپی‌کوتیل مومی در گیاهچه‌های تولیدشده در شرایط درون‌شیشه‌ای و کاهش رطوبت از مقدار نزدیک به ١٠٠ درصد در ظروف کشت به مقادیر بسیار پایین‌تر در شرایط گلخانه و مزرعه منجر به کاهش شدید آب می‌شود [٣١]. به همین دلیل ریزنمونه‌های فاقد برگ کپسوله شده در آلژینات سدیم برای استقرار در شرایط بیرون‌شیشه‌ای مناسب هستند به این دلیل که اغلب یا همه برگ‌ها در شرایط گلخانه و یا مزرعه توسعه پیدا می‌کنند. با تشریح برگ‌هایی که از رشد قطعات گره کپسوله‌شده گل ختمی (*Hibiscus moscheutos*) در گلخانه به‌دست آمده بودند، مشاهده شد که ضخامت این برگ‌ها تقریباً مشابه ضخامت برگ‌های تولیدشده در شرایط درون‌شیشه‌ای بوده اما فضای بین سلولی کم‌تر از برگ‌های تولیدشده در شرایط درون شیشه‌ای بود و روزنه‌های روی برگ‌های ریزقطعات کپسوله‌شده، برخلاف برگ‌های تولیدشده در شرایط درون شیشه‌ای وقتی تحت تنش قرار گرفتند بسته شدند [٢٣]. علی‌رغم میزان جوانه‌زنی بهتر بذرهای مصنوعی در شرایط درون‌شیشه‌ای پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری روی امکان کاشت مستقیم بذرهای مصنوعی در شرایط بیرون‌شیشه‌ای صورت گیرد، به‌خصوص مطالعه تأثیر حضور مواد خاص در ماتریکس کپسوله‌کننده برای بهبود جوانه‌زنی و رشد بذرهای مصنوعی می‌تواند استفاده از این بذور را کاربردی‌تر کند.

ریزازدیادی از طریق بذر مصنوعی می‌توان نقش مهمی در تکثیر هیبریدها ایفا نماید. زیرا برای این گیاهان، تکثیر و ازدیاد از طریق روش غیرجنسی در مدت زمان کوتاه لازم است. برای مثال در مارچوبه و برخی کدوئیان تکنیک کشت بافت و بذور مصنوعی برای ازدیاد هیبریدهای نادر استفاده می‌شود [١٣]. ازآنجاکه هیبریداسیون برنج نیز عموماً نیاز به اخته‌کردن دستی بساک‌ها دارد و این مانعی برای تولید تجاری هیبریدهای برنج است، بذر مصنوعی برای تکثیر هیبریدهای دارای عملکرد بالا استفاده شده است [٣]. در مطالعه‌ای ریزشاخه‌های گل کلم در محلول آلژینات سدیم کپسوله شده و قدرت تبدیل آن‌ها به گیاهچه را تعیین شد. در این مطالعه امکان کاشت بذرهای مصنوعی در بستره‌های تجاری (کمپوست، ورمی‌کولیت، پرلیت و ماسه) محلول پاشی‌شده با محلول‌های مختلف شامل آب مقطر استریل، محیط MS فاقد هورمون و محیط MS حاوی یک یا دو میلی‌گرم در لیتر کینتین و یک یا دو میلی‌گرم در لیتر IBA یا NAA مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از دو میلی‌گرم در لیتر کینتین و دو میلی‌گرم در لیتر NAA در بستره‌های پرلیت و کمپوست بهترین پاسخ را در پی داشت [٢٦]. کاشت مستقیم بذرهای مصنوعی باهوپاترا[1] (*Phyllanthus amarus*) در سویلرایت محلول‌پاشی‌شده با محلول MS ١/٤ مناسب‌تر از کاشت آن‌ها در مخلوط خاک و مخلوط خاک و کمپوست بوده است [٢٩]. در بررسی تولید بذر مصنوعی در توت‌فرنگی عنوان شد افزودن موادغذایی، منبع کربن، تنظیم کننده‌های رشد و مواد ضدمیکروب به ماتریکس ژلی به عنوان آندوسپرم مصنوعی سبب بقا و بهبود رشد ریزنمونه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای و بیرون شیشه‌ای می‌شود [٥]. باززایی نوک شاخه‌های کپسوله‌شده چهار رقم سیب‌زمینی روی محیط MS و خاک بررسی شد. نوک شاخه‌های کپسوله‌شده که بعد از دو هفته پیش کشت روی محیط MS جامد و اضافه کردن قارچ‌کش (کاربندازیم) به ماتریکس کپسوله‌کننده، به خاک منتقل‌شده بودند به میزان ٩٣ تا ١٠٠ درصد باززا شدند [٢٢].

1. Bahupatra

نتیجه‌گیری کلی

جوانه‌زنی و رشد بذرهای مصنوعی حاصل از کپسوله کردن نوک شاخه‌ها تحت تأثیر بستره کشت قرار گرفته و در شرایط درون‌شیشه‌ای میزان جوانه‌زنی، ریشه‌دهی و رشد ریزنمونه‌ها بیش‌تر بود. کاربرد مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد، چه در شرایط درون‌شیشه‌ای و چه در شرایط بیرون شیشه‌ای سبب بهبود جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها شد که حضور مواد غذایی در شرایط بیرون شیشه‌ای ضروری‌تر بود به این دلیل که کاشت بذرها در یک محیط فاقد مواد غذایی نیاز به تأمین منبع انرژی جهت جوانه‌زنی و رشد ریزنمونه‌ها، در ماتریکس کپسوله‌کننده دارد.

منابع

1. Ahmad N and Anis A (2010) Direct plant regeneration from encapsulated nodal segments of *Vitex negundo* L. Biological Plant Aruma. 54(4): 748-752.
2. Aida A, Rizkalla AA, Badr-Elden AM, El-Sayed Ottai MI and Esmail MN (2012) Development of Artificial Seed Technology and Preservation in Sugar Beet. Sugar Technology. 14(3): 312-320.
3. Arun Kumar MB, Vakeswaran V and Krishnasamy V (2005) Enhancement of synthetic seed conversion to seedlings in hybrid rice. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 81: 97-100.
4. Aurori AC (2011) Studies regarding some factors involved in sunflower protoplast and tissue explants organogensis and somatic embryogenesis. Summary of doctoral thesis. University of Boliyai, Clug-napoca facility of biology. Department of Experimental Biology.
5. Badr-Elden MA (2013) An Effective Protocol for *in vitro* Storage and ex vitro regrowth of Strawberry Capsules. Atlas Journal of Chemistry & Biochemistry. 1(2): 30-38.
6. Chung IM, Praveen N and Thiruvengadam M (2012) Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Momordica dioica* for short term storage and germplasm exchange and distribution. Plant Omics: Journal of Plant Molecular Biology and Omics. 5(3): 266-270.
7. Fernandez-Martinez JM, Perez-Vich B, Velaso L and Dominguez J (2007) Breeding for specialty oil types in sunflower. Helia. 30: 75-84.
8. Halmagyi A and Deliu C (2007) Cryopreservation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot tips by encapsulation-vitrification. Horticultural Science. 113: 300-306.
9. Huang XQ, Nabipour A, Gentzbittel L and Sarrafi A (2007) Somatic embryogenesis from thin epidermal layers in sunflower and chromosomal regions controlling the response. Plant Science. 173: 247-252.
10. Huda AKMN and Bari MA (2007) Production of synthetic seed by encapsulating asexual embryo in eggplant (*Solanum melongena* L.). International Journal of Agriculture Research. 2: 832-837.
11. Hung CD and Truemane SG (2012) Alginate encapsulation of shoot tips and nodal segments for short-term storage and distribution of the *Corymbia eucalypt* torelliana 3 C. citriodora. Acta Physiology Plant. 34: 117-128.
12. Hung CD, Dung CD (2015) Production of chrysanthemum synthetic seeds under non-aseptic conditions for direct transfer to commercial greenhouses. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 122(3): 639-648.
13. Jalaja NC and Sreenivasan TV (2008) Utilization of tissue culture techniques in sugarcane improvement. Annual Report, Sugarcane Breeding Institute. Coimbatore. pp. 27-29.
14. Kavyashree R, Gayatri MC and Revanasiddaiah HM (2006) Propagation of *mulberry variety* –S 54 by synseeds of axillary buds. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 84: 245-249.
15. Kaya S, Turker M and Eray N (2015) Somatic Embryogenesis on Turkish Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Cultivars. Journal of Applied Biological Sciences. 9(3): 49-58.
16. Kumar GK and Thomas TD (2012) High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Clitoria ternatea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 110: 141-151.
17. Lata H, Ehandra S, Khan IA and Elsohly M A (2009) Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of (*Cannabis sativa* L.) an important medicinal Plant. Physiological, Molecular and Biological of Plants. 15(1): 79-86.
18. Majd A, Salehi Katouzi SSH, Fallahian F and Bernard F (2011) Encapsulation of shoot tips in alginate beads containing salicylic acid for cold preservation and plant regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Australian Journal of Crop Science. 5(11): 1469-1474.

19. Mallikarjuna B, Usha Nagalakshmi R and Rama Gopal G (2016) Providing an artificial endosperm for the effective conservation and exchange of the genetic material of *Glochidion velutinum* Wt., an important Ethno-medicinal plant. 1(1): 53-62.
20. Nieves N, Zambrano Y, Tapia R, Cid M, Pina D and Castillo R (2003) Field performance of artificial seed derived sugarcane plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture.75: 279-282.
21. Nor Asmah H, Nor Hasnida H, Nashatul Zaimah NA, 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 Biotechology. 10(40): 7820-7824.
22. Nyende AB, Schittenelm S, Mix-Wagner G and Greef JM (2003) Production, storability, and regeneration of shoot tips of potato (*Solanum tuberosum* L.) encapsulated in calcium alginate hollow beads. In Vitro Cell Development-Pl. 39:540-544.
23. Preece JE and West TP (2006) Greenhouse growth and acclimatization of encapsulated *Hibiscus moscheutos* nodal segments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture.87:127–138.
24. Ravi D and Anand P (2012) Production and applications of artificial seeds: A Review. International Research Journal of Biological Sciences. 1(5): 74-78.
25. Reddy MC, Murthy KSR and Pullaiah T (2012) Synthetic seeds: A review in agriculture and forestry. African Journal of Biotechnology. 11(78): 14254-14275.
26. Rihan Hail Z, Al-Issawi M, Burchet S and Fuller MP (2011) Encapsulation of cauliflower (*Brassica oleracea* var botrytis) microshoots as artificial seeds and their conversion and growth in commercial substrates. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 107: 243-250.
27. Shirish Wagh N, Lahu Chavhan R and Balasaheb Zore G (2015) Optimization of in vitro regeneration protocol for *Helianthus annuus* CV. Morden. Indian Journal of Plant Sciences. 4(2): 21-30.
28. Silva JAT (2012) Production of synseed for hybrid *Cymbidium* using protocorm-like bodies. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 20(2): 135-146.
29. Singh AK, Sharma M, Varshney R, Agarwal SS and Bansal KC (2006a) Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of (*Phyllanthus amarus* Schum and Thonn) a medicinally important plant species. In Vitro Cell Development-P. l42:109-115.
30. Singh AK, Varshney R, Sharma M, Agarwal SS and Bansal KC (2006b) Regeneration of plants from alginate-encapsulated shoot tips of (*Withaniasom nifera* Dunal) a medicinally important plant species. Journal of Plant Physiology. 163(2): 220-223.
31. Siong P, Taha R and Rahiman F (2011) Somatic embryogenesis and plant regeneration from Hypocotyl and leaf explants of *Brassica oleracea* var. Botrytis (Cauliflower). Acta Biologica Cracoviensia Botanica. 53(1): 26-31.
32. Suprasanna P, Ganapathi TR and Bapa VA (2006) Synthetic seeds technology. In: Basra, A.S. (ed), Handbook of seed science and technology. Food Product Prees, an Imprint of the Haworth Prees. Pp. 227-267.
33. Tsvetkov I, Jouve L and Hausman JE (2006) Effect of alginate matrix composition on regrowth of *in vitro*-derived encapsulated apical microcuttings of hybrid aspen. Biology of Plant. 50: 722-724.
34. Wee LS, Mei YK, Yong MO, Hui PL and Boon KY (2013) Effective Use of Synthetic Seed Technology in the Regeneration of *Dendrobium* White Fairy Orchid. Journal of Ornamental Plants. 4 (1): 1-7.
35. Vikram P, Husna I, Ripain A, Chiruvella KK and Arifullah M (2015) Rapid Induction of Somatic Embryos and Production of Synthetic Seeds from Hempedu Bumi (*Andrographis paniculata*) - A Malay Ethnomedicinal Plant. Journal of Tropical Resources and Sustainable Science. 3 (2015): 34-38.
36. Zeynali M, Maleki zanjani B, Saba J, Niaazkhani M, Ghaderian M, Eivazi A and Mousavi-Anzabi SH (2013) In vitro plant regeneration from alginate-encapsulated somatic embryos of rapeseed (*Brassica napus* cv. Tallayeh). International Journal of Traditional and Herbal Medicine. 1(1): 13-18.

Breeding of Agronomic and Horticultural Crop
(Journal of Agriculture, University of Tehran)

Vol. 4 ■ No. 1 ■ Spring & Summer 2016

Encapsulation of two Iranian sunflower hybrid shoot tips and compared conversion and growth of synthetic seeds produced on different substrates

Soheyla Moradi[1*], Mohammad Reza Azimi[2], Seyed Saeeid Pourdad[3] and Fariborez Habibi[4]

1. M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
3. Associate Professor, Dry-land Agricultural Research Institute (DARI), Kermanshah, Iran.
4. Former M.Sc. Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

Received: April 08, 2016 Accepted: May 17, 2016

Abstract

This investigation was carried out to determine the conversion and growth ability of artificial seeds derived from encapsulation of sunflower shoot tips in different substrates as factorial based completely randomized design with five replications, in tissue culture laboratory of Kermanshah Agriculture Research Center in 2013. Shoot tips excised from *in vitro* proliferated sunflower plantlets were encapsulated in three percent sodium alginate and 100 mM $CaCl_2.2H_2O$. Determination the effect of using nutrients and plant growth regulators, alginate matrix supplement with three different matrixes include distilled water, liquid MS medium and liquid MS medium whit tow mg/l BA and tow mg/l IAA. Synthetic seeds were transferred on hormone-free MS medium and two commercial substrates mixture of cocopeat, perlite (1:1) or cocopeat, perlite and peat moss (1:1:1) for generation and growth ability evaluation. Using of MS nutrients and plant growth regulators in calcium alginate beads significantly improved encapsulated explants growth. Maximum percentage response for conversion of synthetic seeds was 100 percent that was achieved from *in vitro* culture on MS medium and directly culture in *ex vitro* condition caused to decrease the conversion and growth them.

Keywords: Commercial substrates, Encapsulation matrix, *Ex vitro*, MS medium, Sodium alginate.

Corresponding author: moradi_s998@ymail.com