

Optimization of direct somatic embryogenesis induction and plantlet regeneration in European Pear

Atefe Ameri¹, Golamhossein Davarynejad^{2*}, Nasrin Moshtaghi³, Ali Tehranifar²

¹ Department of Horticultural Science and Landscape, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Department of Horticultural Science and Landscape, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

³ Department of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

To evaluate somatic embryogenesis (SE) induction, mature, immature cotyledon and endosperm explants of Natanzi, Ghosi, Dar Gazi, and Williams cultivars obtained from 40-100 days after pollination, were cultured into the White, SH, and MS media containing 2.3, 9 and 18 μM of 2, 4-D. Then, to enhance the efficiency of direct SE, Ghosi cultivar endosperm as the preferable explant from previous experiment, was cultured in MS medium containing 0 to 2 μM of 2,4-D and 0 to 9 μM of TDZ. To germinate and plant recovery, MS medium with different treatments consisted of control, 150 mg/L Fe-EDDHA, 2 mg/L AgNO_3 , and 1mg/L GA_3 were used. Finally, for plant adaptation, two successive experiments consisted of using mycorrhizae (*Glomus mosseae*) treatment at 0 and 0.25 g/Kg levels, and then applying two fertigation procedures, were separately carried out. The results revealed, the only endosperm of Ghosi cultivar in MS medium produced direct somatic embryos. 0.5 μM of 2,4-D had the highest frequency of somatic embryos production (12.66%). The highest frequency of normal embryo obtained in 0.5 μM 2,4-D (71%) and 0.5 μM 2,4-D + 4.5 μM TDZ (70%). The highest germination (9.66%) and plant recovery (12%) obtained in Fe-EDDHA. In the adaptation phase, the usage of mycorrhizae and the second procedure of fertigation were known preferable. Overall, the method presented in this study can be used in molecular studies of this cultivar.

Keywords: 2, 4-D, Fe-EDDHA, Ghosi cultivar, Mycorrhizae.

* Corresponding Author: davarynej@um.ac.ir

بهینه‌سازی القای جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم و باززایی گیاهچه در گلابی اروپایی

عاطفه عامری^۱، غلامحسین داوری‌نژاد^{۲*}، نسرین مشتاقی^۳، علی تهرانی‌فر^۲

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲ گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۳ گروه بیوتکنولوژی و اصلاح گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

به منظور بررسی القای جنین‌زایی سوماتیکی، ریزنمونه‌های کوتیلدون بالغ، نابالغ و آندوسپرم ارقام نطنزی، قوسی، درگزی و ویلامز حاصل از میوه‌های برداشت‌شده طی ۴۰ تا ۱۰۰ روز پس از گرده‌افشانی در محیط کشت‌های MS، SH و White حاوی غلظت‌های مختلف (۲/۳، ۹ و ۱۸ میکرومولار) 2,4-D کشت شدند؛ سپس به منظور افزایش بازدهی جنین‌زایی، آندوسپرم رقم قوسی به‌عنوان ریزنمونه برگزیده از آزمایش پیش در محیط کشت MS با تیمارهای هورمونی 2,4-D (۲-۰ میکرومولار) و تیدیاورون (۹-۰ میکرومولار) کشت شد. از تیمارهای شاهد، ۱۵۰ میلی‌گرم برلیتر سکوسترین آهن، ۲ میلی‌گرم برلیتر نترات نقره و ۱ میلی‌گرم برلیتر جیبرلیک‌اسید برای جوانه‌زنی و باززایی گیاه استفاده شد؛ در نهایت، دو آزمایش متوالی شامل تأثیر مایکوریزا (*Glomus mosseae*) (صفر و ۰/۲۵ گرم بر کیلوگرم بستر کشت) و سپس دو رویه کودآبیاری برای بررسی سازگاری گیاهان استفاده شدند. نتایج آزمایش‌ها نشان دادند تنها آندوسپرم رقم قوسی حاصل از میوه‌های برداشت‌شده در ۵۰ روز پس از گرده‌افشانی در محیط کشت MS، جنین‌های سوماتیکی مستقیم ایجاد می‌کند. تیمار ۰/۵ میکرومولار 2,4-D بیشترین فراوانی تولید جنین‌های سوماتیکی (۱۲/۶۶ درصد) را در پی داشت و بیشترین فراوانی تولید جنین هنجار در همین تیمار (۷۱ درصد) و تیمار ۰/۵ میکرومولار 2,4-D به‌اضافه ۴/۵ میکرومولار تیدیاورون (۷۰ درصد) به دست آمد. بیشترین میزان جوانه‌زنی (۹/۶۶ درصد) و باززایی گیاه (۱۲ درصد) در سکوسترین آهن به دست آمد. در مرحله سازگاری، استفاده از مایکوریزا و رویه دوم کودآبیاری بهترین روش شناخته شدند. در مجموع، روش ارائه‌شده در پژوهش حاضر می‌تواند در مطالعه‌های مولکولی رقم قوسی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: 2,4-D، سکوسترین آهن، رقم قوسی، مایکوریزا

* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: davarynej@um.ac.ir، شماره تماس: ۰۹۱۵۱۱۳۲۰۱۱

مقدمه

معمولاً گلابی در تمام مناطق معتدله جهان پرورش می‌یابد و مهم‌ترین محصول این مناطق پس از انگور و سیب است. گونه *Pyrus communis*، گلابی غالب در اروپا، آمریکای شمالی، آمریکای جنوبی، آفریقا و استرالیا محسوب می‌شود و گونه *P. pyrifolia* در مناطق مرکزی و جنوبی ژاپن، چین و جنوب آسیا چنین جایگاهی را دارد (Hancock and Lobos, 2008). در گونه‌های درختی که هتروزیگوتی و دوره جوانی طولانی سبب می‌شود بهبود ژنتیکی با استفاده از روش‌های مرسوم با مشکل مواجه شود، توسعه سیستم‌های کارا برای تغییر شکل و دگرگونی این گونه‌ها سبب تسریع فرایند اصلاح می‌شود. موفقیت این روش‌ها به در دسترس بودن روش کارا و تکرارپذیر برای القای شاخه‌های نابجا بستگی دارد و در بسیاری از موارد، نبود سیستم‌های باززایی مشکلی عمده برای کاربرد فناوری انتقال ژن در گونه‌های درختان میوه‌دار محسوب می‌شود (Caboni et al., 2002). پاسخ به تیمارهای باززایی عموماً به ژنوتیپ وابسته است و این امر، استقرار روش باززایی برای ژنوتیپ‌های جدید را به فرایندی زمان‌بر تبدیل می‌کند (Caboni et al., 2002)؛ بنابراین، لازم است روش مناسب باززایی بهینه شود. جنین‌زایی سوماتیکی ابزاری کارا برای مطالعه‌های تغییر شکل ژنتیکی شناخته (Ashwani et al., 2017) و به‌عنوان روشی پایه در علم زیست‌فناوری گونه‌های چوبی استفاده می‌شود (Silvestri et al., 2016). Farhadi Kolahkaj و همکاران (۲۰۱۸) جنین‌زایی سوماتیکی در خرما (رقم خضراوی) را وابسته به

ریزنمونه برگ و میوه نارس و تنظیم غلظت اکسین و سیتوکینین دانسته‌اند. Sabooni و Shekafandeh (۲۰۱۷) جنین‌زایی سوماتیکی را در Blackberry متعلق به خانواده Rosaceae گزارش کرده‌اند. آنها بهترین شرایط برای جوانه‌زنی جنین‌ها و رشد طبیعی گیاهچه را استفاده از 1/2MS (Murashige and Skoog, 1962) تکمیل‌شده با بنزیل‌آدنین، جیبرلیک‌اسید و نفتالین‌استیک‌اسید دانسته‌اند. Pesce و Rugini (۲۰۰۴) افزایش میزان کلات آهن در محیط کشت را سبب افزایش تعداد جنین سوماتیکی در پایه Colt (گیلاس) دانسته‌اند. Pooler و Cheong (۲۰۰۴) در مطالعه جنین‌زایی سوماتیکی روی *Prunus incise* نتیجه گرفته‌اند هورمون‌های بنزیل‌آدنین، جیبرلیک‌اسید و تیدیاورون بازدارنده‌اند و در مقابل، غلظت ۲-۳ درصد ساکارز و گلوکز مفیدند. مشکلی که در جنین‌زایی سوماتیکی عمده گونه‌ها گزارش شده است، به بلوغ طبیعی آنها مربوط است (Sabooni and Shekafandeh, 2017). تولید اتیلن یکی از موانع رشد و نمو جنین سوماتیکی است (Kapoor et al., 2018; Zhu et al., 2018). از سوی دیگر، در محیط کشت MS آهن به شکل کلات آهن در اختیار ریزنمونه قرار می‌گیرد؛ این شکل از آهن پایا نیست و بسیار زود از دسترس خارج می‌شود؛ زیرا به فسفات آهن تبدیل می‌شود (Dalton et al., 1983). بسیاری از مسیرهای متابولیکی از جمله زنجیره انتقال الکترون فتوسنتز و تنفس، بیوستز DNA، لیپید، تنظیم‌کننده‌های رشدی مانند اکسین و اتیلن و تثبیت نیتروژن به آهن وابسته‌اند (Curie et al., 2009). جایگزینی کلات آهن با سکوسترین

شود؛ از این رو، در حال حاضر به دست آوردن سیستم بهینه با توان تولید جنین و گیاهچه باززایی شده برای جنین‌زایی گلابی گامی در راستای افزایش سرعت تکثیر و فائق آمدن بر مشکل بهبود ژنتیکی در این گونه است. هدف مطالعه حاضر، بهینه‌سازی شرایط کشت بافت در باززایی گیاه گلابی به روش جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم از طریق استفاده از ریزنمونه مستعد و کاربرد تنظیم‌کننده‌ها در مرحله القا و همچنین بررسی اثر بازدارنده عمل اتیلن در مرحله باززایی و جوانه‌زنی جنین سوماتیکی است؛ در نهایت، سازگاری و رشد بعدی گیاهان باززایی شده بررسی می‌شود. بهینه‌سازی این دستورعمل برای موفقیت‌های بعدی در امر انتقال ژن این گیاه بسیار مهم است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: آندوسپرم، کوتیلدون نابالغ و بالغ ریزنمونه‌های انتخابی در مطالعه حاضر بودند. میوه‌های گلابی اروپایی شامل ژنوتیپ‌های قوسی، نطنزی، درگری (سه رقم گلابی بومی ایران) و ویلیامز (مهم‌ترین رقم گلابی جهان)، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۱۰۰ روز پس از گرده‌افشانی جمع‌آوری شدند.

روش ضدعفونی و انتخاب زمان مناسب برای

تهیه ریزنمونه: میوه‌ها پس از برداشت به مدت سه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، درون دستمال مرطوب و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. پس از سه روز، میوه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه زیر آب جاری قرار داده شدند و سپس به تیمارهای ضدعفونی (جدول ۱) منتقل شدند. در نهایت، زیر هود لامینار

آهن (Fe-EDDHA) بر ریزازدیادی اثر مثبت دارد (Antonopoulos *et al.*, 2007) و Fe-EDDHA در تشکیل شاخه نابجا، ریشه‌زایی شاخه‌ها و در فرایند جنین‌زایی مؤثر است (Trejgell *et al.*, 2012). 2,4-D اکسینی است که اغلب در جنین‌زایی سوماتیکی استفاده می‌شود. 2,4-D در القای جنین‌زایی سوماتیکی نقش کلیدی دارد؛ زیرا این تنظیم‌کننده رشد موجب بیان ژن‌های مربوط به تنش می‌شود و سایر محرک‌های جنین‌زایی را تحریک می‌کند. 2,4-D از طریق فعالیت اکسینی قوی خود با نفوذ و تأثیرگذاری بر متابولیسم درونی سایر فیتوهورمون‌ها، جنین‌زایی سوماتیکی را به طور مستقیم یا غیرمستقیم تنظیم می‌کند (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). همچنین مطالعه‌ها مفید بودن تیدیاژورون در جنین‌زایی سوماتیکی را نشان می‌دهند (Landi and Mezzetti, 2006)؛ علاوه بر فعالیت شبه‌سایتوکینینی تیدیاژورون، این ماده متعادل‌کننده میزان اکسین درونی معرفی شده است؛ به طوری که شواهد آزمایشگاهی نشان می‌دهند سنتز مجدد اکسین را از طریق افزایش میزان ایندول‌استیک‌اسید و پیش‌ماده آن، تریتوفان، تحریک می‌کند (Landi and Mezzetti, 2006). تاکنون مطالعه‌های کاملی انجام نشده‌اند که به تولید گیاه به روش جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم در گیاه گلابی (*Pyrus communis*) منجر شوند. تنها مطالعه‌های انجام‌شده را Jaidka و Mehra (۱۹۸۵) و Qingrong و همکاران (۲۰۰۳) انجام داده‌اند که تنها درصد تشکیل جنین سوماتیکی غیرمستقیم را گزارش کرده‌اند و سیستم کارایی را معرفی نکرده‌اند که به تولید گیاه در گلابی اروپایی منجر

$$\text{BCR} = \sum \frac{Ni}{Di} \quad \text{رابطه ۱}$$

BCR: سرعت آلودگی باکتریایی، Ni: تعداد ریزنمونه‌های آلوده هر تیمار در هر روز، Di: شماره روز
به منظور انتخاب بهترین زمان برای تهیه ریزنمونه، وجود آندوسپرم و کوتیلدون نابالغ و بالغ در میوه‌های برداشت شده در دوره‌های مختلف و زنده‌مانی آنها در محیط استقرار بررسی شد.

سه بار با آب مقطر استریل به طور کامل شسته شدند. پس از آن، میوه‌ها برش زده و قسمت‌های کوتیلدون و آندوسپرم جدا شدند. ریزنمونه‌ها در محیط کشت استقرار با فرمولاسیون MS (Murashige and Skoog, 1962) و ۳ درصد ساکارز کشت شدند. در آزمایش ضد عفونی، درصد و سرعت آلودگی باکتریایی اندازه‌گیری شد.
سرعت آلودگی طبق رابطه ۱ محاسبه شد:

جدول ۱- تیمارهای ضد عفونی به کاررفته در آزمایش

شماره تیمار	تیمارهای ضد عفونی
۱	هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه بدون استفاده از کلرید جیوه
۲	هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، کلرید جیوه (۰/۱ درصد) به مدت ۲ دقیقه
۳	هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، کلرید جیوه (۰/۱ درصد) به مدت ۵ دقیقه
۴	هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، کلرید جیوه (۰/۱ درصد) به مدت ۸ دقیقه
۵	شاهد
۶	کلرید جیوه (۰/۱ درصد) به مدت ۲ دقیقه
۷	کلرید جیوه (۰/۱ درصد) به مدت ۵ دقیقه
۸	کلرید جیوه (۰/۱ درصد) به مدت ۸ دقیقه
۹	۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۲ دقیقه بدون استفاده از کلرید جیوه
۱۰	۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۲ دقیقه، کلرید جیوه (۰/۱ درصد) به مدت ۲ دقیقه

ساکارز ۳ درصد، کازئین هیدرولیزات ۰/۱ درصد و آگار ۰/۶ درصد تکمیل شده بودند در پتری دیش‌های ۶ سانتی متری کشت داده شدند. تیمارهای تنظیم کننده رشدی شامل 2,4-D با غلظت‌های (۲/۳، ۹ و ۱۸ میکرومولار) بودند. اسیدیتة محیط پیش از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم و محیط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد. کشت‌ها در دمای 23 ± 1 درجه سانتی گراد و شرایط تاریکی نگهداری شدند؛ در این مرحله از آزمایش، درصد جنین‌زایی سوماتیکی پس از ۳۰ روز ثبت شد.

انتخاب ریزنمونه مستعد و محیط کشت در القای جنین‌زایی مستقیم: آندوسپرم، کوتیلدون نابالغ (۵۰ روز پس از گرده‌افشانی) و بالغ (۱۰۰ روز پس از گرده‌افشانی) چهار رقم گلابی اروپایی شامل نطنزی، قوسی، درگزی و ویلیامز به منظور شناسایی ریزنمونه مستعد جنین‌زایی مستقیم پس از ضد عفونی در بهترین تیمار ضد عفونی مشخص شده در آزمایش پیش، در محیط کشت‌های MS (Schenk SH, (Murashige and Skoog, 1962) (White, White and Hildebrandt, 1972) (1954) که با تیمارهای تنظیم کننده رشدی،

جیبرلیک‌اسید و نیترات‌نقره استریل و پس از اتوکلاوشدن به محیط کشت اضافه شدند. پتری‌دیش‌ها به شرایطی با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. میزان شدت نور روی ۴۰ میکروانیشتن بر مترمربع در ثانیه تنظیم شد. دو هفته بعد، جوانه‌زنی جنین‌ها اتفاق افتاد و برای رشد بهتر به لوله آزمایش منتقل شدند. شاخص‌های درصد جوانه‌زنی، درصد باززایی گیاه و وضعیت عمومی گیاه (به شکل چشمی) در این آزمایش مطالعه شدند.

سازگاری گیاهان باززایی‌شده: گیاهان

باززایی‌شده پس از دو ماه رشد در محیط کشت باززایی به بستر کشت‌های حاوی مخلوط کوکوپیت:پرلیت (۲:۱) (v/v) منتقل شدند. پیش از انتقال، ریشه‌های گیاهان زیر شیر آب شسته شدند تا محیط کشت روی ریشه‌ها باقی نماند و باعث آلودگی نشود. در این مرحله، دو آزمایش متوالی شامل تأثیر مایکوریزا (صفر و ۰/۲۵ گرم‌بر کیلوگرم بستر کشت) و سپس دو رویه کودآبیاری به‌طور جداگانه بررسی شدند. به‌منظور بررسی اثر مایکوریزا بر سازگارشدن گیاه، در زمان انتقال و پس از شستشوی ریشه‌ها، ۰/۲۵ گرم مایکوریزا (*Glomus mosseae*) به‌ازای هر کیلوگرم بستر کشت کوکوپیت:پرلیت در تماس با ریشه قرار گرفت و در تیمار شاهد از مایکوریزا استفاده نشد. گیاهان به مدت یک هفته، سه روز یک‌بار با ۲۰ میلی‌لیتر آب شیر آبیاری شدند و سپس از کودآبیاری استفاده شد. به‌منظور آزمایش کودآبیاری، گیاهانی که در مدت یک هفته بهتر

بهبودسازی تنظیم‌کننده رشدی در القای

جنین‌زایی مستقیم: آزمایش بار دیگر بر اساس بهترین ریزنمونه و محیط کشت مشخص شده از آزمایش پیش با تیمارهای تنظیم‌کننده رشدی تکرار شد. به این منظور، ریزنمونه آندوسپرم رقم قوسی در محیط کشت MS دارای تیمارهای تنظیم‌کننده رشدی شامل 2,4-D (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میکرومولار) و تیدیا‌زورون (صفر، ۴/۵، ۵/۵ و ۹ میکرومولار) کشت شد. تیدیا‌زورون استریل و پس از اتوکلاو به محیط کشت اضافه شد. کشت‌ها در دمای 23 ± 1 درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی نگهداری شدند. شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده در این آزمایش شامل درصد جنین‌زایی مستقیم و درصد تولید جنین هنجار پس از ۳۰ روز ثبت شدند (ساختارهایی که نکروزه نشده و توسعه یافته بودند، جنین هنجار در نظر گرفته شدند).

باززایی گیاه از جنین‌های سوماتیکی: پس از

القای جنین‌های سوماتیکی مستقیم، آنها به محیط کشت جوانه‌زنی و باززایی منتقل شدند. محیط MS (Murashige and Skoog, 1962)، محیط کشت جوانه‌زنی و باززایی گیاه بود که با تیمارهای باززایی، ساکارز ۳ درصد و آگار ۰/۸ درصد تکمیل شد. تیمارهای باززایی شامل ۱۵۰ میلی‌گرم برلیتر سکوسترین آهن، ۲ میلی‌گرم برلیتر نیترات‌نقره، ۱ میلی‌گرم برلیتر جیبرلیک‌اسید و همچنین MS بدون تیمار (شاهد) بودند. این تیمارها بر اساس مطالعه‌های گذشته (Pesce and Rugini, 2004; Montero-Cortés et al., 2010; Sadeghi et al., 2015) انتخاب شدند.

نتایج و بحث

روش ضدعفونی: طبق جدول ۲، استفاده از ۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه و سپس به کاربردن ۰/۱ درصد کلرید جیوه به مدت ۸ دقیقه بهترین تیمار ضدعفونی بود. در این تیمار، کمترین میزان آلودگی باکتریایی و سرعت آلودگی مشاهده شد. آلودگی قارچی در هیچ‌یک از تیمارها مشاهده نشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین بین تیمارهای ضدعفونی در صفت‌های درصد آلودگی باکتریایی و سرعت آلودگی

شماره تیمار	آلودگی باکتریایی (درصد)	سرعت آلودگی
۱	۳۴/۴۶±۰/۶۲ ^g	۰/۱۶ ± ۰/۰۰۳ ^d
۲	۲۲/۷۹±۰/۴۶ ⁱ	۰/۰۸ ± ۰/۰۰۳ ^f
۳	۴۷/۵۰ ± ۰/۳۸ ^c	۰/۲۷ ± ۰/۰۰۷ ^b
۴	۱۶/۵۴ ± ۰/۱ ^j	۰/۰۴۳ ± ۰/۰۰۳ ^g
۵	۹۰ ± ۰ ^a	۵ ± ۰ ^a
۶	۵۳/۵۶ ± ۰/۵۳ ^b	۰/۲۱ ± ۰/۰۲۰ ^c
۷	۳۹/۸۳ ± ۰/۸۹ ^f	۰/۱۱ ± ۰/۰۰۷ ^e
۸	۴۲/۳۴ ± ۰/۵۱ ^e	۰/۲۱ ± ۰/۰۰۶ ^c
۹	۴۵/۰۲ ± ۵E-۱۵ ^d	۰/۲۰ ± ۰/۰۰۶ ^c
۱۰	۲۸/۸۹ ± ۰/۲۳ ^h	۰/۰۵۳ ± ۰/۰۰۳ ^g

مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد هستند. حرف‌های متفاوت، تفاوت معنادار با آزمون دانکن در سطح $P < 0.05$ را نشان می‌دهند.

انتخاب زمان مناسب برای تهیه ریزنمونه: ابتدا

زمان‌های مختلف برداشت میوه برای تهیه ریزنمونه از نظر وجود آندوسپرم و کوتیلدون نابالغ و بالغ بررسی شدند، سپس برای انتخاب زمان دقیق تهیه ریزنمونه، زنده‌مانی کوتیلدون نابالغ، بالغ و آندوسپرم در محیط کشت مطالعه شد. نتایج تجزیه واریانس نشان دادند زمان‌های مختلف برداشت بر

رشد کرده بودند (برگ‌ها شاداب‌تر و سبزتر بودند و برگ‌های جدید رشد کرده بودند) انتخاب و به دو گروه تقسیم شدند. هر گروه شامل ۱۰ گیاه بود. دو رویه در این آزمایش به کار گرفته شد: رویه اول شامل کودآبیاری با 1/4MS؛ رویه دوم شامل کودآبیاری به مدت دو هفته با کودی با فرمولاسیون (N: P₂O₅: K₂O) (10: 52: 10) و پس از دو هفته، کودآبیاری با کودی با فرمولاسیون 20 N-20 P₂O₅-20 K₂O در آزمایش اول، تعداد برگ‌های جدید رشد یافته و میزان رشد جدید (میلی متر) و در آزمایش دوم، درصد سازگاری وضعیت عمومی گیاه و میزان رشد جدید (میلی متر) بررسی شد.

طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل داده‌ها:

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های t- student و F استفاده شد. آزمون t- student برای مقایسه میانگین در آزمایش انتخاب ریزنمونه مستعد و محیط کشت و آزمایش‌های مربوط به سازگاری گیاهان باززایی شده (تأثیر مایکوریزا و کودآبیاری) با نرم‌افزار SPSS.16 انجام شد. آزمون F برای تجزیه واریانس آزمایش‌های انتخاب زمان مناسب برای تهیه ریزنمونه، ضدعفونی، بهینه‌سازی تنظیم‌کننده‌های رشدی در القای جنین‌زایی و باززایی گیاه در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار با نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. مقایسه میانگین داده‌های تحلیل شده با آزمون F به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن (LSR) انجام شد. \sqrt{x} arcsin برای نرمال کردن داده‌هایی استفاده شد که به شکل درصد بودند.

سوی دیگر، آندوسپرم و کوتیلدون نابالغ در این زمان به‌خوبی در محیط کشت رشد کردند؛ به‌طوری‌که به‌خوبی متورم شدند و کمترین میزان مواد فنولی را داشتند. ۳۳/۶۶ درصد ریزنمونه بالغ کوتیلدونی که در ۱۰۰ روز پس از گرده‌افشانی برداشت شده بود، در محیط استقرار زنده ماند؛ بنابراین، ریزنمونه بالغ کوتیلدونی از میوه‌های برداشت‌شده در ۱۰۰ روز پس از گرده‌افشانی انتخاب شد.

زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در محیط اختلاف معناداری دارند ($P < 0.01$). در زمان‌های ۴۰ و ۸۰ روز پس از گرده‌افشانی، پاسخی در هیچ کدام از ریزنمونه‌ها مشاهده نشد؛ بنابراین، این زمان‌ها در تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده نشدند (جدول ۳). در بین زمان‌های مورد مطالعه، ۵۰ روز پس از گرده‌افشانی بهترین زمان برای نمونه‌گیری بود (جدول ۳)؛ زیرا تشریح میوه‌ها مشخص کرد در این مرحله از رشد میوه، آندوسپرم بخش عمده بذر را تشکیل می‌دهد. از

جدول ۳- ارزیابی پاسخ‌های مورد بررسی در انتخاب زمان مناسب برای تهیه ریزنمونه

ویژگی‌های بررسی شده	تعداد روز پس از گرده‌افشانی			
	۱۰۰	۷۰	۶۰	۵۰
وجود آندوسپرم در بذر	-	-	+	+
وجود کوتیلدون نابالغ در بذر	-	+	+	+
وجود کوتیلدون بالغ در بذر	+	-	-	-
زنده‌مانی کوتیلدون نابالغ در محیط (درصد)	۰	۰ ^c	۶۳ ^b	۹۵ ^a
زنده‌مانی کوتیلدون بالغ در محیط (درصد)	۳۳/۶۶ ^a	۰ ^b	۰ ^b	۰ ^b
زنده‌مانی آندوسپرم در محیط (درصد)	۰	۰ ^b	۰ ^b	۹۶/۶۶ ^a

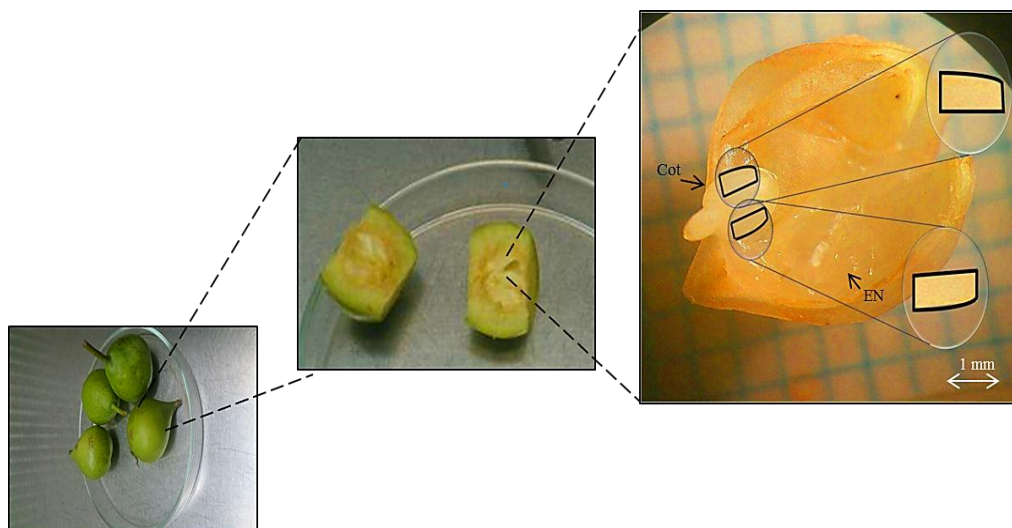
پاسخ مربوط به داده‌های کیفی به شکل مثبت (وجود بافت) یا منفی (وجود نداشتن بافت) در نظر گرفته شده است. حرف‌های متفاوت، تفاوت معنادار با آزمون دانکن در سطح $P < 0.05$ را نشان می‌دهند.

نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در آزمایش‌های ابتدایی کشت تکه‌های کوتیلدونی مشخص شد زمانی که تکه‌های کوتیلدونی از هر قسمتی از کوتیلدون به‌طور تصادفی برداشت شوند، پاسخی متفاوتی در تکرارهای یک تیمار مشاهده می‌شوند؛ بنابراین برای کاهش میزان خطا در کشت ریزنمونه کوتیلدونی (همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است) از قسمت‌های تعیین شده استفاده شد. علت پاسخ متفاوت تکه‌های کوتیلدونی به وجود قطبیت در گیاه نسبت داده می‌شود. قطبیت گیاهی به توزیع نامتقارن استعداد سلولی در امتداد محوری خاص در

در کشت کوتیلدون‌های نابالغ از میوه‌های برداشت‌شده در ۵۰ روز پس از گرده‌افشانی استفاده شد. در دولپه‌ای‌ها، آندوسپرم پایدار نیست و با بلوغ بذر جذب کوتیلدون‌ها می‌شود؛ در نتیجه، بذر نابالغ برای کشت آندوسپرم در دولپه‌ای‌ها از جمله دانه‌داران استفاده می‌شود. این مسئله در بسیاری از مطالعه‌ها از جمله گیاهان *Azadirachta indica* (Chaturvedi et al., 2003) و *Malus domestica* (Wallin et al., 1995) عنوان شده است. ۵۰ روز پس از گرده‌افشانی، آندوسپرم قسمت اعظم بذر سبب است (Wallin et al., 1995)؛ این نتیجه با

آنچه انتشار قطبی اکسین را سبب می‌شود، وجود حامل‌های انتشار اکسین از خانواده پروتئین PIN است و ورود اکسین نیز با پروتئین‌های AUX1/LAX تسهیل می‌شود.

سلول اشاره می‌کند و برای بسیاری از فرایندها نظیر ارتباط‌های درون‌سلولی، تقسیم سلولی، ریخت‌زایی سلولی و تمایز ضروریست (Dettmer and Friml, 2011). پدیده قطبیت در گیاه به توزیع نامتقارن پروتئین داخل یا روی غشای پلاسمایی برمی‌گردد.



شکل ۱- ریزنمونه‌های به‌دست آمده از میوه‌های برداشت‌شده در ۵۰ روز پس از گرده‌افشانی شامل Cot. قسمت‌های کوتیلدون انتخابی، EN. آندوسپرم

میکرومولار 2,4-D استفاده شد و دیگر ارقام، ریزنمونه‌ها و تیمارهای هورمونی به‌علت پاسخ‌ندادن در نظر گرفته نشدند (جدول ۴). این ریزنمونه در محیط کشت MS تکمیل شده با تیمار هورمونی ۲/۳ میکرومولار 2,4-D، پتانسیل جنین‌زایی (۲/۲۳ درصد) را از خود نشان داد. هیچ پاسخ جنین‌زایی در دیگر محیط کشت‌های استفاده‌شده و غلظت‌های بیشتر 2,4-D مشاهده نشد. انتخاب ریزنمونه با پتانسیل ژنتیکی برای جنین‌زایی نخستین گام در مسیر جنین‌زایی سوماتیکی است. در مطالعه حاضر، ریزنمونه‌های کوتیلدون بالغ، نابالغ و نیز آندوسپرم برای شناسایی ریزنمونه مستعد جنین‌زایی استفاده شدند. گرچه پاسخ کوتیلدون بالغ در محیط استقرار

توزیع نامتقارن اکسین در غشای پلاسمایی به تجمع آن در آپوپلاست منجر می‌شود. وجود پروتئین‌های حساس به اکسین (ABPI) با فعال شدن Rho-GTPase همراه است و آنها نقش مخالفی در تنظیم ریخت‌زایی در سلول‌های مجاور دارند؛ به‌این ترتیب، پروتئین‌های یادشده قطبیت را در گیاه ایجاد می‌کنند (Dettmer and Friml, 2011).

انتخاب ریزنمونه مستعد و محیط کشت در القای

جنین‌زایی مستقیم: نتایج آزمون T معناداری اثر محیط کشت ($P < 0.01$) را بر جنین‌زایی مستقیم نشان دادند. در تجزیه و تحلیل داده‌ها تنها از پاسخ‌های ریزنمونه آندوسپرم رقم قوسی به محیط کشت‌های مختلف تکمیل شده با ۲/۳

رقم قوسی به‌عنوان ریزنمونه مستعد در محیط کشت MS تکمیل شده با تیمارهای القای جنین‌زایی مستقیم کشت داده شد. پاسخ جنین‌زایی تنها در تیمارهای 2,4-D (۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار) به‌تنهایی و ۰/۵ میکرومولار 2,4-D در ترکیب با ۴/۵ میکرومولار تیدیاورون مشاهده شد و بنابراین در تجزیه و تحلیل داده‌ها از تیمارهای هورمونی بدون پاسخ استفاده نشد. سه هفته پس از کشت در محیط کشت‌های القا، تورم در ریزنمونه‌های کشت‌شده مشاهده شد. پس از آن، ساختارهای مات و کروی‌شکلی بدون واسطه کالوس در محیط کشت‌های تکمیل شده با 2,4-D (۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار) به‌تنهایی و ۰/۵ میکرومولار 2,4-D در ترکیب با ۴/۵ میکرومولار تیدیاورون مشاهده شدند (شکل ۲، شکل ۳-ا و b). ساختارهای ایجادشده روی ریزنمونه به‌تدریج رشد یافتند و به مرحله کوتیلدون رسيدند که این مرحله از رشد جنین در تیمارهای 2,4-D (۰/۵ و ۱ میکرومولار) و نیز ترکیب ۰/۵ میکرومولار 2,4-D و ۴/۵ میکرومولار تیدیاورون مشاهده شد (شکل ۲). ساختارهایی که رشد یافتند و بزرگ شدند به‌عنوان جنین هنجار ثبت شدند؛ اما جنین‌های تولیدشده در ۲ میکرومولار 2,4-D به بلوغ نرسیدند، نکروزه شدند و از بین رفتند. ساختارهای جنینی مشاهده‌شده در مطالعه حاضر (شکل ۳-ا و b) مطابق با تعریف ارائه‌شده Raemakers و همکاران (۱۹۹۵) بودند. این پژوهشگران در مطالعه خود بیان کردند جنین‌ها در جنین‌زایی مستقیم حدوداً از مرحله بلوغ و در جنین‌زایی غیرمستقیم حدوداً از مرحله‌ای پیش از گلوبولی شکل توسعه می‌یابند.

کم بود، بررسی جنین‌زایی آن ضروری بود. از بین ریزنمونه‌های استفاده‌شده در ارقام موردبررسی، توانایی القای جنین مستقیم سوماتیکی فقط در آندوسپرم رقم قوسی مشاهده شد؛ از این رو، تنها این ریزنمونه مستعد جنین‌زایی مستقیم شناخته شد، زیرا توانست سیگنال‌های خارجی محرک جنین‌زایی را دریافت کند و پاسخ دهد. پیش‌ازاین، باززایی گیاهچه از آندوسپرم در چندین گیاه شامل قهوه (Raghuramulu, 1989)، کیوی (Kin et al., 1990) *Morus alba* (Thomas et al., 2000) و گونه‌های دیگر انجام شده است. Pierik (۱۹۹۷) بخش‌هایی از گل، جنین زیگوتی، بساک، دانه‌گرده و بافت آندوسپرم را شروع‌کننده مناسبی برای جنین‌زایی سوماتیکی دانسته است؛ نتایج آزمایش حاضر با مطالعه‌های یادشده مطابقت دارند.

جدول ۴- مقایسه دو محیط کشت بر القای جنین‌زایی مستقیم از آندوسپرم گلابی رقم قوسی با آزمون t- student

محیط کشت	جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم (درصد)
MS	۲/۲۳ ± ۰/۱۲۰*
SH	۰/۰۸۸ ± ۰/۰۰۶

مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد هستند. * معنادار در سطح $P < 0.01$ در قیاس با SH

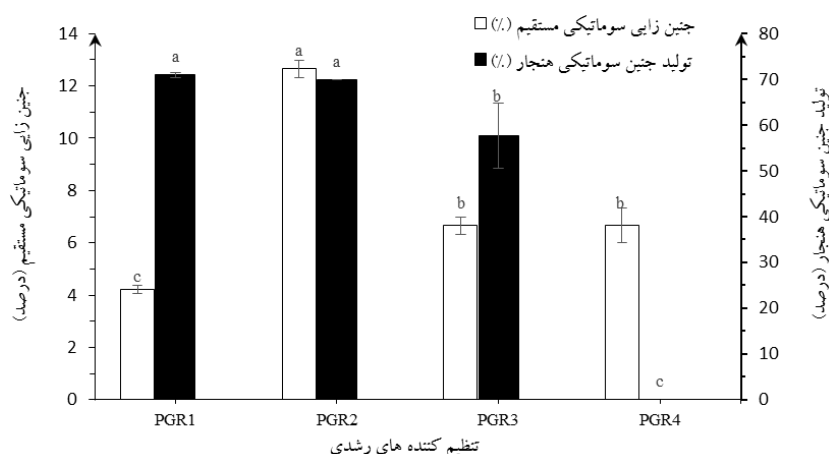
بهینه‌سازی تنظیم‌کننده رشدی در القای

جنین‌زایی مستقیم: نتایج تجزیه واریانس معناداری اثر تنظیم‌کننده رشدی ($P < 0.01$) را بر جنین‌زایی مستقیم و تولید جنین مستقیم هنجار نشان دادند (جدول ۵). به‌منظور افزایش بازدهی جنین‌زایی سوماتیکی بر اساس نتایج به‌دست آمده از مرحله اول، ریزنمونه مستعد جنین‌زایی مستقیم و محیط کشت مناسب برای آن انتخاب شد؛ بر این اساس، آندوسپرم

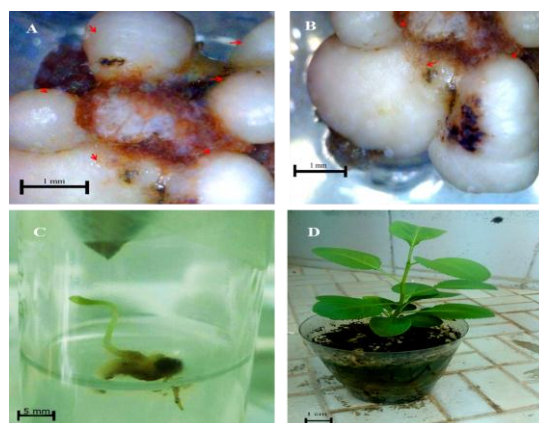
جدول ۵- تجزیه واریانس میانگین مربعات جنین‌زایی مستقیم و جنین مستقیم هنجار رقم قوسی در آزمایش تنظیم‌کننده رشدی

منبع تغییرات	درجه آزادی	جنین‌زایی مستقیم	جنین مستقیم هنجار
تنظیم‌کننده رشدی	۳	۳۸/۹۶**	۳۳۹۹/۳۳**
خطا	۸	۰/۵۱۷	۳۸/۸۳

*معنادار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد، ns بدون تفاوت معنادار



شکل ۲- مقایسه میانگین تنظیم‌کننده‌های رشدی بر جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم (درصد) و تولید جنین سوماتیکی هنجار (درصد)؛ مقادیر، میانگین \pm تکرار \pm خطای استاندارد هستند. حرف‌های متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنادار با آزمون دانکن در سطح $P < 0.05$ هستند. PGR1: TDZ (4.5 μ M); PGR2: 2, 4-D (0.5 μ M); PGR3: 2, 4-D (1 μ M); PGR4: 2, 4-D (2 μ M)



شکل ۳- القای جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم و باززایی گیاه؛ A و B. القای جنین سوماتیکی و رسیدن به مرحله بلوغ (دارای شاخص متریک ۱ میلی‌متر)، C. جوانه‌زنی جنین سوماتیکی گیاه (دارای شاخص متریک ۵ میلی‌متر)، D. باززایی گیاه (دارای شاخص متریک ۱ سانتی‌متر)

(۲۰۱۶) و Hazra و همکاران (۱۹۸۹) مطابقت دارند. نتایج Bai و Mahendran (۲۰۱۶) نشان می‌دهند غلظت‌های کم 2,4-D جنین‌زایی بهتری را در گیاه

تاکنون نقش 2,4-D در القای جنین‌زایی به خوبی اثبات شده است (Hazra et al., 1989). نتایج آزمایش حاضر با یافته‌های Bai و Mahendran

Malaxis densiflora القا می‌کنند. در بادام‌زمینی نیز افزایش غلظت 2,4-D سبب کاهش جنین‌زایی می‌شود (Hazra et al., 1989). 2,4-D از طریق فعالیت اکسینی قوی خود با نفوذ و تأثیرگذاری در متابولیسم درونی سایر فیتوهورمون‌ها، جنین‌زایی سوماتیکی را به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم تنظیم می‌کند (Quiroz-Figueroa et al., 2006). نقش مثبت تیدیاورون در فرایند جنین‌زایی سوماتیکی گزارش شده است (Landi and Mezzetti, 2006) که در راستای نتایج مطالعه حاضر است.

باززایی گیاه از جنین‌های سوماتیکی: نتایج تجزیه واریانس معناداری اثر تیمارهای باززایی ($P < 0.01$) را بر جوانه‌زنی جنین مستقیم و باززایی گیاه نشان دادند (جدول ۶). تیمارهای مختلفی برای جوانه‌زنی جنین‌ها استفاده شدند. کاربرد سکوسترین آهن (۱۵۰ میلی گرم بر لیتر) بیشترین درصد جوانه‌زنی (۹/۶۶ درصد) را در پی داشت؛ اما استفاده از

نیترا نقره (۲ میلی گرم بر لیتر) و جیبرلیک اسید (۱ میلی گرم بر لیتر) بدون پاسخ بود. جنین‌ها در محیط کشت MS نیز به میزان ۴/۸۳ درصد جوانه‌زنی داشتند (شکل ۳C). استفاده از جیبرلیک اسید (۱ میلی گرم بر لیتر) و نیترا نقره (۲ میلی گرم بر لیتر) برای رشد و باززایی جنین‌های جوانه‌زده اثر مثبتی در پی نداشت؛ به‌طوری که کاربرد این تیمارها سبب از بین رفتن گیاهان جوانه‌زده شد (جدول ۷). در تیمار نیترا نقره به تدریج برگ گیاهچه قهوه‌ای شد و در نهایت، گیاهچه از بین رفت. در باززایی با تیمار جیبرلیک اسید نیز رشد گیاهچه‌ها متوقف شد و گیاهچه‌ها به شکل سبز خشک شدند (جدول ۷). تیمار سکوسترین آهن (۱۵۰ میلی گرم بر لیتر) بهترین تیمار برای رشد و باززایی گیاهان جوانه‌زده در این آزمایش بود؛ به‌طوری که ۱۲ درصد گیاهان جوانه‌زده در این تیمار رشد کردند (جدول ۷).

جدول ۶- تجزیه واریانس آثار تیمارهای جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی مستقیم بر فاکتورهای بررسی شده

منبع تغییرات	درجه آزادی	جوانه‌زنی جنین سوماتیکی مستقیم	باززایی گیاه از جنین مستقیم
تیمار	۳	۶۴/۲۴ **	۱۰۶/۸۳**
خطا	۸	۰/۱۰۴۱	۱/۰۰۲

* معنادار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد، ns بدون تفاوت معنادار

جدول ۷- مقایسه میانگین تیمارهای مختلف روی جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی و باززایی گیاه

تیمار	جوانه‌زنی جنین سوماتیکی (درصد)	گیاه باززایی شده (درصد)	وضعیت عمومی گیاه
شاهد	۴/۸۳±۰/۱۶۶ ^b	۰/۲±۰/۰۵۷ ^b	برگ‌ها سبز و شاداب
Fe-EDDHA	۹/۶۶±۰/۳۳۳ ^a	۱۲±۱/۱۵۴ ^a	برگ‌ها سبز و شاداب
نیترا نقره	۰±۰ ^c	۰±۰ ^b	برگ‌ها قهوه‌ای شدند و گیاه از بین رفت
جیبرلیک اسید	۰±۰ ^c	۰±۰ ^b	برگ‌ها سبز خشک شدند و گیاه از بین رفت

غلظت ترکیبات استفاده شده: ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر Fe-EDDHA، ۲ میلی گرم بر لیتر نیترا نقره، ۱ میلی گرم بر لیتر جیبرلیک اسید؛ مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد هستند. حرف‌های متفاوت تفاوت معنادار با آزمون دانکن در سطح $P < 0.05$ را بیان می‌کنند.

کمتر نیز همین پاسخ را داشتند (در مطالعه حاضر در نظر گرفته نشدند). نقش تحریک‌کنندگی اتیلن در چندین گونه از جمله *Pinus sylvestris* (Lu et al., 2011) و *Coffea canephora* (Hatanaka et al., 1995) مشاهده شده است که مطابق نتایج آزمایش حاضر است. کاربرد سکوسترین آهن نتایج خوبی در جوانه‌زنی و باززایی گیاهچه در پی داشت. Trejgell و همکاران (۲۰۱۲) استفاده از این نوع آهن را در جنین‌زایی مفید دانسته‌اند که در راستای نتایج آزمایش حاضر است. بر اساس نتایج یادشده، آندوسپرم رقم قوسی ریزنمونه مستعد در مطالعه حاضر است و بنابراین می‌توان گفت اتیلن در ژنوتیپ قوسی به‌عنوان بازدارنده توسعه جنین سوماتیکی مطرح نیست؛ زیرا با به‌کاربردن بازدارنده آن جنین‌ها از بین رفتند. جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم در مقایسه با غیرمستقیم روش مطلوب‌تری برای دست‌یافتن به باززایی گیاه است؛ زیرا جنین مستقیماً از خود ریزنمونه منشأ می‌گیرد و در نتیجه، شبیه به سلول مادری خواهد بود.

سازگاری گیاهان باززایی‌شده: مطالعه سازگاری

گیاهان جایگاه خاصی در کشت بافت دارد و در پژوهش حاضر، طی دو آزمایش متوالی و جداگانه به مطالعه آن پرداخته شد. مایکوریزا اثر مثبت و معناداری بر میزان رشد جدید ($P < 0.01$) و تعداد برگ جدید ($P < 0.05$) گیاهان انتقال‌یافته به کوکویت و پرلیت داشت؛ به‌طوری‌که میزان رشد جدید (۳۲/۳۱ میلی‌متر) گیاهانی که در زمان انتقال آنها از مایکوریزا استفاده شد بیشتر از گیاهانی بود که در زمان انتقالشان از این قارچ همزیست استفاده نشد (جدول ۸).

میزان جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم در *Rosa hybrid* ۲۵ درصد و میزان باززایی گیاه از این جنین‌ها ۲۰ درصد گزارش شده است (Kim et al., 2003). میزان جوانه‌زنی در جنین‌های سوماتیکی بلوط ۶ تا ۱۱ درصد (Chalupa, 1990) و در *Pinus patula* وابسته به ژنوتیپ معرفی شده است؛ به‌طوری‌که در سه ژنوتیپ مطالعه‌شده ۱۸، ۲۹ و ۴۳ درصد گزارش شده است (Malabadi and Van Staden, 2005). گزارش‌های یادشده فراوانی کم جنین‌زایی سوماتیکی را در بسیاری از مطالعه‌ها تأیید می‌کنند که در راستای نتایج مطالعه حاضر است. در پژوهش حاضر، بهترین نتیجه در محیط‌های بدون هورمون حاصل شد که مطابق با نتایج Hazra و همکاران (۱۹۸۹) است؛ آنها گزارش کرده‌اند جوانه‌زنی جنین سوماتیکی در گیاه بادام‌زمینی در محیط بدون هورمون اتفاق می‌افتد. Rai و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کرده‌اند پروتئین‌های ذخیره‌ای تجمع‌یافته در جنین‌های سوماتیکی به نمو جنین به گیاه در گونه *Psidium guajava* کمک می‌کنند (Rai et al., 2008). شاید به‌علت وجود این پروتئین‌های ذخیره‌ای در جنین سوماتیکی است که در مرحله جوانه‌زنی و باززایی گیاه از جنین سوماتیکی به هورمون نیازی نیست. معمولاً این نظریه مطرح است که تولید اتیلن یکی از موانع رشدونمو جنین سوماتیکی است (Kapoor et al., 2018; Zhu et al., 2018)؛ از این‌رو، یکی از بازدارنده‌های عمل اتیلن به نام نیترات‌نقره در پژوهش حاضر به کار گرفته شد. در مطالعه حاضر، کاربرد ۲ میلی‌گرم برلیتر نیترات‌نقره به‌عنوان بازدارنده عمل اتیلن مؤثر نبود؛ البته غلظت‌های

جیبرلین است؛ همچنین آنها قادر به کاهش غلظت آبسبزیک‌اسید هستند (Liu et al., 2000).

اثر مثبت میکوریزا در مطالعه حاضر را می‌توان به نقش‌های یادشده نسبت داد. آزمایش کودآبیاری پس از سنجش نقش میکوریزا در سازگاری گیاهان کشت بافتی انجام شد. نتایج آزمون T نشان دادند کودآبیاری اثر معناداری بر میزان رشد جدید ($P < 0.01$) گیاهان دارد. یک هفته پس از انتقال، کودآبیاری با دو رویه مختلف انجام شد: رویه اول شامل کودآبیاری با 1/4MS باعث نکروزه شدن برگ‌ها و مریستم گیاه، توقف رشد و ازبین رفتن گیاه شد؛ رویه دوم شامل استفاده از کودی با فرمولاسیون (N: P₂O₅: K₂O) 10: 52: 10 به مدت دو هفته و سپس کودآبیاری با فرمولاسیون 20 N-20 P₂O₅-20 K₂O بود که با توجه به حساسیت گیاهان در مرحله سازگاری بهترین نتیجه را در پی داشت؛ به طوری که میزان رشد جدید به ۴۵/۶۶ میلی‌متر رسید و برگ گیاهان سبز و شاداب بودند (جدول ۹، شکل ۳D).

جدول ۸- مقایسه میانگین سطوح میکوریزا (*Glomus mosseae*) بر رشد گیاهان سازگار شده با آزمون t- student

میکوریزا (گرم بر کیلو گرم)	میزان رشد دوباره (میلی متر)	تعداد برگ‌های جدید
۰/۲۵	۳۲/۳۱±۲/۵۷*	۳/۳۳±۰/۳۳*
صفر (شاهد)	۱۷/۵۹±۱/۱۸	۱/۳۳±۰/۳۳

مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد هستند. * معنادار در سطح احتمال $P < 0.05$ در قیاس با شاهد

قارچ‌های میکوریزا باعث افزایش جذب عناصر غذایی (عمدتاً فسفر) (Smith et al., 2010; Orujei et al., 2013)، تغییر ریخت‌شناسی ریشه، افزایش جذب آب و جلوگیری از بروز برخی بیماری‌های ریشه می‌شوند (Auge, 2001). نقش میکوریزا در افزایش جذب به این مسئله برمی‌گردد که هیف‌های قارچ میکوریزا به منافذ بسیار ریزی وارد می‌شوند که حتی تارهای کشنده قادر به نفوذ در آنها نیستند و باعث افزایش میزان جذب آب می‌شوند (Tisdall, 1991)؛ از دیگر نقش‌های قارچ‌های میکوریزایی بر رشد گیاه، تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه مانند اکسین‌ها و

جدول ۹. مقایسه میانگین رویه‌های مختلف کودآبیاری بر گیاهان سازگار شده با آزمون t- student

رویه‌های کودآبیاری	میزان رشد جدید (میلی متر)	درصد سازگاری	وضعیت عمومی گیاه
رویه اول	۰±۰	۰	برگ‌ها نکروزه و گیاه بدون رشد
رویه دوم	۴۵/۶۶±۴/۰۵*	۶۲±۱*	برگ‌ها سبز و شاداب بودند و گیاه رشد جدید داشت

رویه اول: کودآبیاری با 1/4MS، رویه دوم: ابتدا استفاده از کودی با فرمولاسیون (N: P₂O₅: K₂O) 10: 52: 10 به مدت دو هفته و سپس، کودآبیاری با فرمولاسیون 20 N-20 P₂O₅-20 K₂O؛ مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد هستند. * معنادار در سطح احتمال $P < 0.05$ در قیاس با رویه اول

جمع بندی

تأمل و بحث برانگیز است، پژوهش درباره بلوغ و جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی و تمرکز بر آنست. آنچه از یافته‌های مطالعه‌های جنین‌زایی در سایر

انتخاب ریزنمونه مستعد در روش القای مستقیم جنین‌زایی اهمیت دارد. آنچه در این فرایند درخور

- Ashwani, S., Ravishankar, G. A. and Giridhar, P. (2017) Silver nitrate and 2-(N-morpholine) ethane sulphonic acid in culture medium promotes rapid shoot regeneration from the proximal zone of the leaf of *Capsicum frutescens* Mill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 129(1): 175-180.
- Auge, R. M. (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 3: 11-42.
- Caboni, E., D'angeli, S., Chiappetta, A., Innocenti, A. M., Van Onckelen, H. and Damiano, C. (2002) Adventitious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in the morphogenetic process. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70(2): 199-206.
- Chalupa, V. (1990) Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). *Plant Cell Reports* 9(7): 398-401.
- Chaturvedi, R., Razdan, M. K. and Bhojwani, S. S. (2003) An efficient protocol for the production of triploid plants from endosperm callus of neem, *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of Plant Physiology* 160(5): 557-564.
- Cheong, E. J. and Pooler, M. R. (2004) Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February Pink. *Plant Cell Reports* 22(11): 810-815.
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P. and Mari, S. (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany* 103: 1-11.
- Dalton, C. C., Iqbal K. and Turver, D. A. (1983) Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. *Physiologia Plantarum* 57: 472-476.
- Dettmer, J. and Friml, J. (2011) Cell polarity in plants: when two do the same, it is not the same ... *Current Opinion in Cell Biology* 23(6): 686-696.

گونه‌های گیاهی درک می‌شود، عبارتست از: نقش پررنگ اتیلن در توسعه و نمو جنین‌های سوماتیکی که در برخی گونه‌ها بازدارنده و در دیگر گونه‌های گیاهی محرک است و توصیه به حذف اکسین در مراحل پس از ظهور جنین. در مطالعه حاضر مشخص شد کاربرد بازدارنده اتیلن نقشی در توسعه جنین سوماتیکی ندارد، بلکه باعث ازبین‌رفتن و زوال آن می‌شود. با توجه به نقش منفی نیترا ت نقره نتیجه‌گیری می‌شود اتیلن در جنین‌زایی سوماتیکی گلابی نقش مثبت دارد. از آنجا که پژوهش حاضر فرضیه‌های کلی و مطرح‌شده در جنین‌زایی سایر گونه‌های گیاهی را در گیاه گلابی بررسی کرد، برخی تیمارهای آزمایشی بازدهی کمی داشتند یا بدون پاسخ بودند؛ در نتیجه، پژوهش‌های بیشتری درباره نقش اتیلن در افزایش بازدهی جنین‌زایی گلابی نیاز است. به‌طور کلی، در جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم گلابی رقم قوسی به هورمون اکسین (۵/۰ میکرومولار -2,4-D) تا مرحله القا نیاز بود و پس از آن، جوانه‌زنی با حذف اکسین و در محیط کشت MS بدون هورمون انجام شد؛ البته با به‌کاربردن ۱۵۰ میلی‌گرم برلیتر سکوسترین آهن فراوانی جوانه‌زنی دو برابر شد و باززایی گیاه بهبود یافت. در سازگاری گیاهان، استفاده از مایکوریزا در زمان انتقال گیاه و کودآبیاری با فرمولاسیون کودی دارای فسفر بیشتر برای رشد ریشه (10 N:52 P₂O₅:10 K₂O) و سپس 20 N-20 P₂O₅-20 K₂O توصیه می‌شود.

Referenes

- Antonopoulos, C., Dimassi, K., Therios, I., Chatzissavvidis, C. and Papadakis, I. (2007) The effect of Fe-EDDHA and of ascorbic acid on *in vitro* rooting of the peach rootstock GF-677 explants. *Acta Physiologiae Plantarum* 29: 559-561.

- Farhadi Kolahkaj, F., Pour Mohammadi, P., Farkhari, F. and Alami Saied, Kh. (2018) Callus and somatic embryo induction in date palm cv. Khazravi using leaves, immature fruit and endosperm explants. *Iranian Journal of Plant Biology* 10(2): 88-101 (in Persian).
- Hancock, J. F. and Lobos, G. A. (2008) Pears. In: *Temperate fruit crop breeding* (Ed. Hancock, J. F.) 299-336. Springer, New York.
- Hatanaka, T., Sawabe, E., Azuma, T., Uchida N. and Yasuda, T. (1995) The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. *Plant Science* 107(2): 199-204.
- Hazra, S., Sathaye, S. S. and Mascarenhas, A. F. (1989) Direct somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogea*). *Nature Biotechnology* 7(9): 949-951.
- Kapoor, K., Mira, M. M., Ayele, B. T., Nguyen, T. N., Hill, R. D. and Stasolla, C. (2018) Phytoglobins regulate nitric oxide-dependent abscisic acid synthesis and ethylene-induced program cell death in developing maize somatic embryos. *Planta* 1-15.
- Kim, S. W., Oh, S. C. and Liu, J. R. (2003) Control of direct and indirect somatic embryogenesis by exogenous growth regulators in immature zygotic embryo cultures of rose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74(1): 61-66.
- Kin, M. S., Fraser, L. G. and Harvey, C. F. (1990) Initiation of callus and regeneration of plantlets from endosperm of *Actinidia* interspecific hybrids. *Scientia Horticulturae* 44: 107-117.
- Landi, L. and Mezzetti, B. (2006) TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. *Plant Cell Reports* 25(4): 281-288.
- Liu, R., Li, M. and Meng, X. (2000) Effects of AM fungi on endogenous hormones in corn and cotton plants. *Mycosystem* 19: 91-96.
- Lu, J., Vahala, J. and Pappinen, A. (2011) Involvement of ethylene in somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107(1): 25.
- Mahendran, G. and Bai, V. N. (2016) Direct somatic embryogenesis of *Malaxis densiflora* (A. Rich.) Kuntze. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 14(1): 77-81.
- Malabadi, R. B. and Van Staden, J. (2005) Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. *Tree Physiology* 25(1): 11-16.
- Mehra, P. N. and Jaidka, K. (1985) Experimental induction of embryogenesis in pear. *Phytomorphology* 35: 1-10.
- Montero-Cortés, M., Sáenz, L., Córdova, I., Quiroz, A., Verdeil, J. L. and Oropeza, C. (2010) GA₃ stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Cell Reports* 29(9): 1049-1059.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- Orujei, Y., Shabani, M., Sharifi Tehrani, M., Aghababaei, F. and Enteshari Sh. (2013) Dual effects of two mycorrhizal fungi on production of glycyrrhizin total phenolic and total flavonoids compounds in roots of *Glycyrrhiza glabra* L. *Iranian Journal of Plant Biology* 10: 75-89 (in Persian).
- Pesce, P. G. and Rugini, E. (2004) Influence of plant growth regulators, carbon sources and iron on the cyclic secondary somatic embryogenesis and plant regeneration of transgenic cherry rootstock Colt' (*Prunus avium* × *P. pseudocerasus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79(2): 223-232.
- Pierik, R. L. M. (1997) *In vitro* culture of higher plants. Kluwer academic

- publishers, Dordrecht.
- Qingrong, S., Qingzhong, L. and Ruihua, Z. (2003) Somatic embryo genesis from in vitro leaves of pear. *Acta Horticulturae Sinica* 30(1): 85-86.
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M. and Loyola-Vargas, V. M. (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86(3): 285.
- Raemakers, C. J. J. M., Jacobsen, E. and Visser, R. G. F. (1995) Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81(1): 93-107.
- Raghuramulu, Y. (1989) Anther and endosperm culture of coffee. *Journal of Coffee Research* 19: 71-81.
- Rai, M. K., Jaiswal, V. S. and Jaiswal, U. (2008) Effect of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae* 117(3): 302-305.
- Sabooni, N. and Shekafandeh, A. (2017) Somatic embryogenesis and plant regeneration of blackberry using the thin cell layer technique. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 130(2): 313-321.
- Sadeghi, F., Yadollahi, A., Kermani, M. J. and Eftekhari, M. (2015) Optimizing culture media for in vitro proliferation and rooting of Tetra (*Prunus empyrean* 3) rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 13(1): 19-23.
- Schenk, R. U. and Hildebrandt, A. C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50(1): 199-204.
- Silvestri, C., Cristofori, V., Ceccarelli, M., Caceres, M. E., Escribà-Lacuesta, J. and Rugini, E. (2016) Adventitious shoot organogenesis from leaf and petiole explants of European hazelnut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 126(1): 59-65.
- Smith, S. E., Facelli, E., Pope, S. and Smith, F. A. (2010) Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* 326: 3-20.
- Thomas, T. D., Bhatnagar, A. K. and Bhojwani, S. S. (2000) Production of triploid plants of mulberry (*Morus alba* L.) by endosperm culture. *Plant Cell Reports* 19(4): 395-399.
- Tisdall, J. M. (1991) Fungal hyphae and structural stability of soil. *Soil Research* 29(6): 729-743.
- Trejgell, A., Libront, I. and Tretyn, A. (2012) The effect of Fe-EDDHA on shoot multiplication and in vitro rooting of *Carlina onopordifolia* Besser. *Acta Physiologia Plantarum* 34(5): 2051-2055.
- Wallin, A., Nyman, M. and Svensson, M. (1995) Somatic embryogenesis in apple (*Malus*). In: *Somatic embryogenesis in woody plants* (Eds. Jain, S., Gupta, P. and Newton, R.) 445-460. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- White, R. P. (1954) *The cultivation of animal and plant cells*. The Ronald Press Co., New York.
- Zhu, H. G., Cheng, W. H., Tian, W. G., Li, Y. J., Liu, F., Xue, F., Zhu, Q. H., Sun, Y. Q. and Sun, J. (2018) iTRAQ-based comparative proteomic analysis provides insights into somatic embryogenesis in *Gossypium hirsutum* L. *Plant Molecular Biology* 96: 89-102.