مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵، ۱۲۱-۱۲۹

بررسی مقایسه‌ای تولید بذر مصنوعی دو گونه سرخ ولیک (زالزالک) از راه های کشت مریستم و رویان‌های پیکری

احمد مجد .Ph.D *، نرگس زندی.M.Sc ، صدیقه اربابیان.Ph.D ، فریبا شریف نیا.Ph.D

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ahmad_majd2005@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۶

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش تولید گیاهان سالم و مطلوب دو گونه زالزالک از طریق کشت مریستم و رویان‌زایی پیکری و تهیه بذر مصنوعی که از نتایج زیست فناوری است، می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بذرها، قطعات اندام‌های رویشی - زایشی و جوانه‌های دو گونه زالزالک به‌حالت سترون در محیط MS جامد همراه هورمون‌های اکسینی (2,4D، NAA، IAA)، سیتو کینینی (BAP،KIN, Zeatin) و GA3 در شرایط استریل به مدت؟؟؟ و در چند تکرار؟؟؟کشت شدند. کپسولی کردن نمونه‌ها با آلژینات سدیم و کلرور کلسیم انجام شد.

نتایج: بهترین جدا کشت‌های کالوس زا، جدا کشت‌های برگی و مریستم جوانه‌ها در محیط MS جامد همراه با غلظت‌هایی از اکسین‌ها و سیتو کینین‌ها بودند. رویان نماها و به‌ویژه رویان‌ها اغلب از جدا کشت‌های برگی و با واکشت کالوس‌های رویان زا در محیط MS جامد همراه با هورمون‌های اکسین – سیتوکینین و حضور مختصر NaCl ایجاد شدند. جوانه‌های جانبی از اوایل پاییز و اواخر اسفند برای تولید بذرهای مصنوعی مناسب‌تر بودند. برای تولید بذرهای مصنوعی از پوشش ۳ درصد آلژینات سدیم و ۱ درصد کلرور کلسیم استفاده شد. برای ذخیره سازی دانه های مصنوعی دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و برای رویش این بذرها دمای ۱± ۲۴ درجه سانتی‌گراد مناسب بودند.

نتیجه‌گیری: مشکلاتی برای رویان‌زایی پیکری گونه‌های مورد مطالعه وجود دارد. نوع و مقدار هورمون‌ها بر کالزایی و تشکیل رویان نماها و رویان‌ها بسیار موثر است. زمان برداشت جوانه‌ها برای تولید بذرهای مصنوعی نیز اهمیت زیادی دارد. همراه کردن جوانه‌ها با محیط MS و کپسولی کردن آن‌ها با آلژینات سدیم مناسب است.

واژگان کلیدی: زالزالک، کشت در شیشه، رویان‌زایی پیکری، بذر مصنوعی

هدف: هدف از این پژوهش تولید گیاهان سالم و مطلوب از جمله زالزالک‌ها با استفاده از رویان‌زایی پیکری و تهیه بذر مصنوعی که از نتایج زیست فناوری است، می‌باشد.

مقدمه

سرخ ولیک (زالزالک) با نام علمی Crataegus از خانواده گل سرخیان (Rosaceae) در ایران دارای ۲۷ گونه است. نام آن در تهران زالزالک، در فارس و در سردشت گوژ زرده است (۱). سرخ ولیک‌ها (زالزالک‌ها) درختچه‌ها و درختانی تا ارتفاع ۷/۵ متر با شاخه‌های خاردار، برگ‌های لُب دار و گل‌های سفید مایل به گلی و بسیار معطرند، میوه‌های آن‌ها شفت و خوراکی هستند (۲).

مهم‌ترین ترکیبات دارویی این گیاهان ۱ تا ۳ درصد آنتوسیانیدین‌ها و پرو آنتوسیانیدین‌ها هستند که جزء ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشند. اثرات مهم این گیاهان مربوط به فلاونوئیدها و پروآنتوسیانیدین‌ها است که به مقدار زیاد در آن‌ها وجود دارند (۳). این مواد از آنتی اکسیدانت های قوی هستند. میوه ها و دانه های سرخ ولیک قادر به کاهش اسید اوریک و درمان نقرس می باشند. سرخ ولیک در کاهش فشارخون و حمله های قلبی،کاهش کلسترول سرم و تقویت حرکات قلب بسیار موثر است و به‌طور گسترده‌ای در اروپا برای کاهش فشار خون و به‌عنوان مقوی قلب مصرف می‌شود. از نظر کلینیکی داروی مناسبی برای فشار خون، تصلب شرائین و احتقان قلب، ضعف عضلات قلب و نارسایی کرونر است (۴). تحقیقات نشان داده اند که ترکیبات و اثرات گونه‌های متفاوت سرخ ولیک تا حد زیادی مشابهند مهم‌ترین گونه‌هایی که در تهیه دارو از آن‌ها استفاده می‌شود Crataegus oxyacanth، Crataegus laevigata، Crataegus monogyna هستند (۴).

رویان‌زایی پیکری و تولید بذر مصنوعی از دست آوردهای زیست فناوری است که برای تولید گیاهان مطلوب و مورد نظر، عاری از پاتوژن‌ها، دارای ژنوم مشخص با کاربردهای متفاوت به‌کار گرفته می‌شود (۵). بذر مصنوعی شامل کپسولی است که با پوشش دادن ماده گیاهی قابل کشت و مواد غذایی توسط یک پوشش مصنوعی تهیه می‌شود. ماده گیاهی قابل کشت قطعه‌ای از بافت یا اندامی است که می‌تواند به پیکر اصلی گیاه کامل تبدیل شود. در سال‌های اخیر نمونه‌های متفاوتی شامل رویان‌های پیکری، رویان‌های طبیعی، مریستم‌ها، جوانه‌های انتهایی و جانبی برای تولید بذر مصنوعی به‌کار گرفته می‌شوند (۶).

با توجه به خواص دارویی و متنوع گیاهان سرخ ولیک (زالزالک‌ها)، وجود آلاینده‌های قارچی فراوان آن‌ها در سال‌های اخیر که موجب کاهش بهره وری شدید آن‌ها شده است و نیز دست‌یابی به پروتوکلی مناسب برای بهینه سازی کشت در شیشه و تولید بذر مصنوعی این گیاهان، پژوهش حاضر تدوین و انجام شده است.

مواد و روش‌ها

سر شاخه‌ها،میوه‌ها و بذرهای گیاهان سرخ ولیک از پارک قیطریه تهران، پارک نیاوران و پارک جمشیدیه و نیز از ارتفاعات کوه سماموس، جاده منتهی به جواهرده در ماه‌های متفاوت سال ۹۲-۹۱ جمع آوری شدند. جوانه‌ها، میوه‌های نارس و رسیده از سرشاخه‌ها جدا شدند. سپس برگ‌های فلسی روی آن‌ها که به‌رنگ قهوه‌ای بودند حذف شدند.

سترون کردن میوه‌ها، بذرها و جوانه‌ها در زیر هود لامینار با استفاده از شستشو در وایتکس ۵ تا ۱۰ درصد، اتانول ۸۰ درصد و برای تعدادی از بذرها و جوانه‌ها به‌کارگیری کلرور جیوه ۱ در ۱۰۰۰ انجام شد.

تعدادی از بذرها به‌طور کامل و تعدادی پس از شکستن و برداشتن پوست آن‌ها در شرایط سترون در محیط MS کشت شدند. از قطعات اندام‌های رویشی دانه رست‌ها (پهنک و دمبرگ برگ‌ها) و نیز گیاهان نورسته حاصل از رشد جوانه‌ها (ساقه، پهنک و دمبرگ برگ‌ها)، همچنین قطعاتی از دمگل، جوانه‌های زایشی در شروع گل‌دهی و میوه‌ها برای تهیه جدا کشت‌ها استفاده شد. جدا کشت‌ها در محیط پایه MS با تنوع زیادی از نظر مقدار و نوع هورمون‌های اکسینی(IAA,NAA,2,4,D)، سیتوکینینی (Kinetin, Zeatin ,BAP)، جیبریک اسید (GA3) (به‌منظور سهولت دریافت نتایج، ترکیب شیمیایی این محیط‌ها ضمن شرح نتایج آورده شده است) و مقادیر صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۱ و ۲ گرم در لیتر NaCl در ظرف‌های پتری در شرایط سترون کشت شدند. برخی محیط‌های کشت دارای میواینوزیتول (۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بودند. غلظت آگار محیط‌های کشت ۸ گرم بر لیتر بود. سترون کردن محیط‌های کشت با استفاده از اتوکلاو انجام شد. برای هر آزمایش حداقل سه ظرف پتری (سه تکرار) و در هر ظرف ۳ تا ۵ نمونه در نظر گرفته شد.

برای تولید بذرهای مصنوعی نیاز به پوشش آلژیناتی است. برای تهیه این پوشش ابتدا محیط کشت بدون آگار تهیه شد و به‌جای آگار از سدیم آلژینات ۳ درصد استفاده شد. از این محلول پس از استریل شدن در اتوکلاو و سپس سرد شدن استفاده شد. مریستم جوانه‌های استریل شده در پوشش آلژیناتی قرار گرفتند و با استفاده از یک پی پت استریل، به‌همراه محلول آلژیناتی به‌درون محلول کلرید کلسیم ۱ درصد چکانده شدند، کپسول‌های حاصل چند بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. تعدادی از بذرها بر روی آگار ۲ درصد، تعدادی برروی MS بدون

هورمون و تعدادی بر روی محیط MS همراه هورمون‌ها قرار گرفتند.

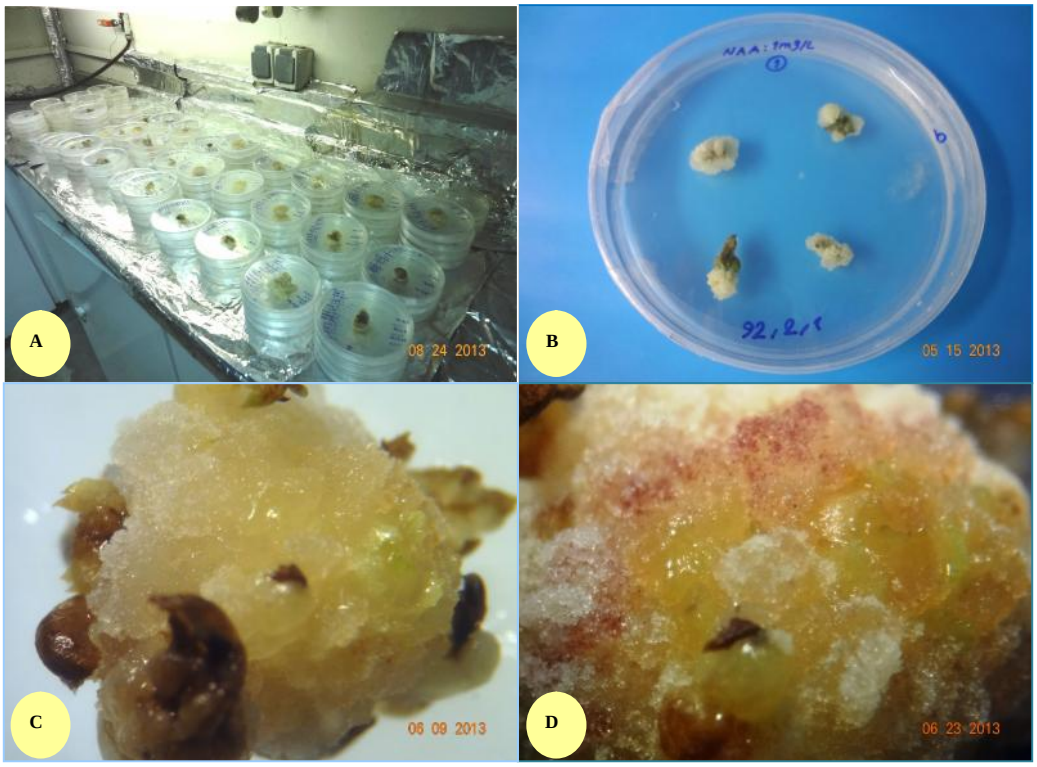
در هر سری از آزمایش‌ها، کپسول‌های تهیه شده به سه دسته تقسیم شدند: تعدادی در دمای اتاق کشت (۲۴ تا ۳۴ درجه سانتی‌گراد)تعدادی در یخچال (حدود ۴- درجه سانتی‌گراد) و تعدادی در قسمت سردتر یخچال(Extra Cold) (حدود ۱۸- درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند ضمن این که تاریکی مطلق و دوره‌های روشنایی / تاریکی (۸ تا ۱۶ ساعت) نیز در آزمایش‌های متفاوت مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز آماری

در موارد ضروری بررسی‌های آماری با مقایسه میانگین نتایج داده‌ها انجام شد.

نتایج

از ۱۴ نوع محیط کشت مورد آزمایش، محیط‌ها و جدا کشت‌های بهینه برای تولید کالوس‌ها انتخاب شدند که نتایج حاصل در جدول ۱ و شکل ۱ آورده شده‌اند.



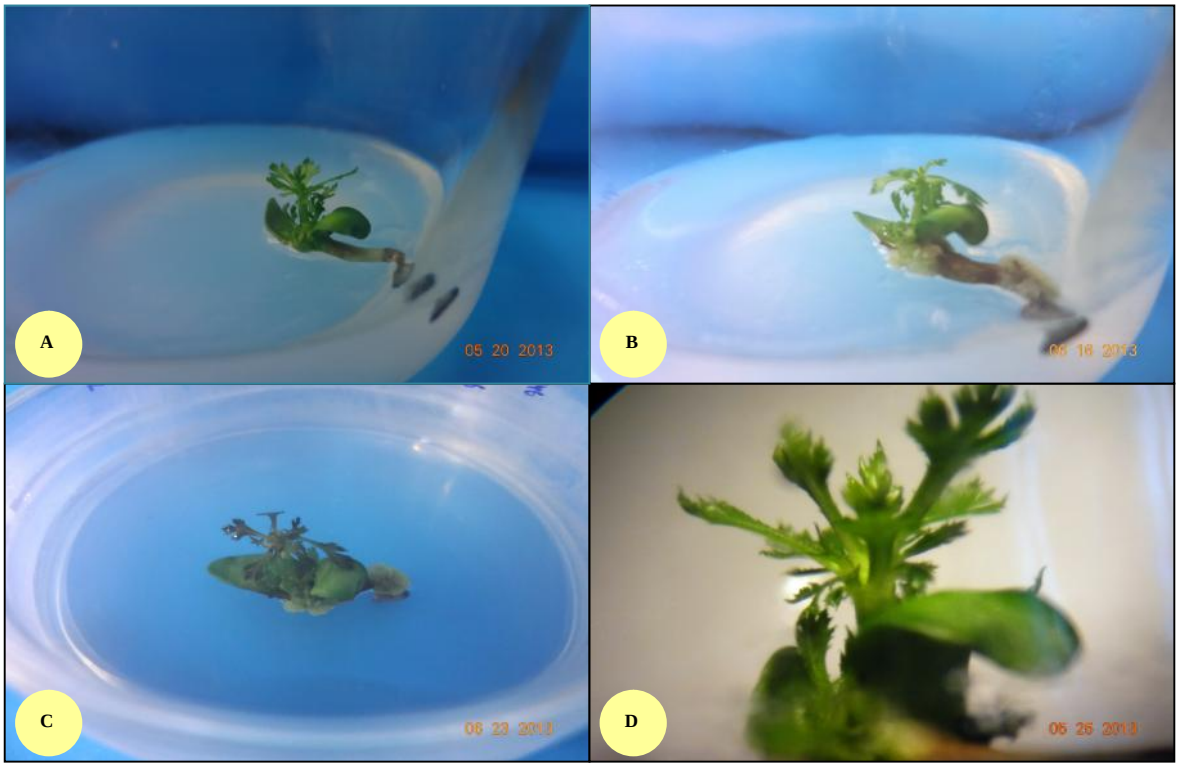
شکل ۱: A: بخشی از محیط های کشت و جدا کشت‌های کشت شده، B: جدا کشت‌های برگی در محیط کشت و شروع کالزایی،C: کالوس کم و بیش صاف، D: کالوس ناهموار با بخش‌های ارغوانی.

جدول ۱: شرایط بهینه تولید کالوس ها

محیط کشت پایه	هورمون ها mg $^{-1L}$		جداکشت	زمان پیدایش کالوس ها	نوع کالوس ها
MS همراه با ۸g $^{-1L}$ آگار	BAP:4 NAA:1	2,4-D:1	قطعات پهنک برگ	۷ تا ۳۰ روز	آبدار و صاف موفقیت حدود ۳۰ درصد
		IAA:1	قطعات پهنک برگ	۷ تا ۳۰ روز	کوچک، آبدار و صاف موفقیت حدود ۳۰ درصد
		NAA:1	قطعات پهنک برگ	۷ تا ۳۰ روز	حجیم و گره دار موفقیت حدود ۳۰ درصد
	BAP:5 NAA:2	IAA:1	مریستم انتهای شاخه جوان همراه با آخرین جفت برگ ها	۷ تا ۳۰ روز	آبدار و صاف موفقیت حدود ۴۰ درصد
		NAA:1	مریستم جوانه‌های جانبی همراه با آخرین جفت برگ ها	۷ تا ۳۰ روز	حجیم، گره دار با بخشهای انتهایی سفید، بخشی از کالوس ها ارغوانی رنگ موفقیت حدود ۴۰ درصد

تغییر هورمون IAA با NAA در محیط‌های کشت تفاوت قابل ملاحظه‌ای در نتایج کالزایی نمونه‌ها ایجاد نکرد؛ جدا کشت‌های دمبرگی، ساقه ای، دمگلی، قطعات میوه و رویان‌های طبیعی خارج شده از بذرها موفقیت چندانی برای کالزایی نداشتند.

تعدادی از کالوس‌های ایجاد شده در هر یک از محیط‌های کشت مذکور پس از ۱۰ تا ۱۵ روز کالوس‌زایی برای اندامزایی به محیط‌های واکشت انتقال داده شدند. نتایج واکشت‌ها در جدول ۲ و شکل ۲ آورده شده‌اند.



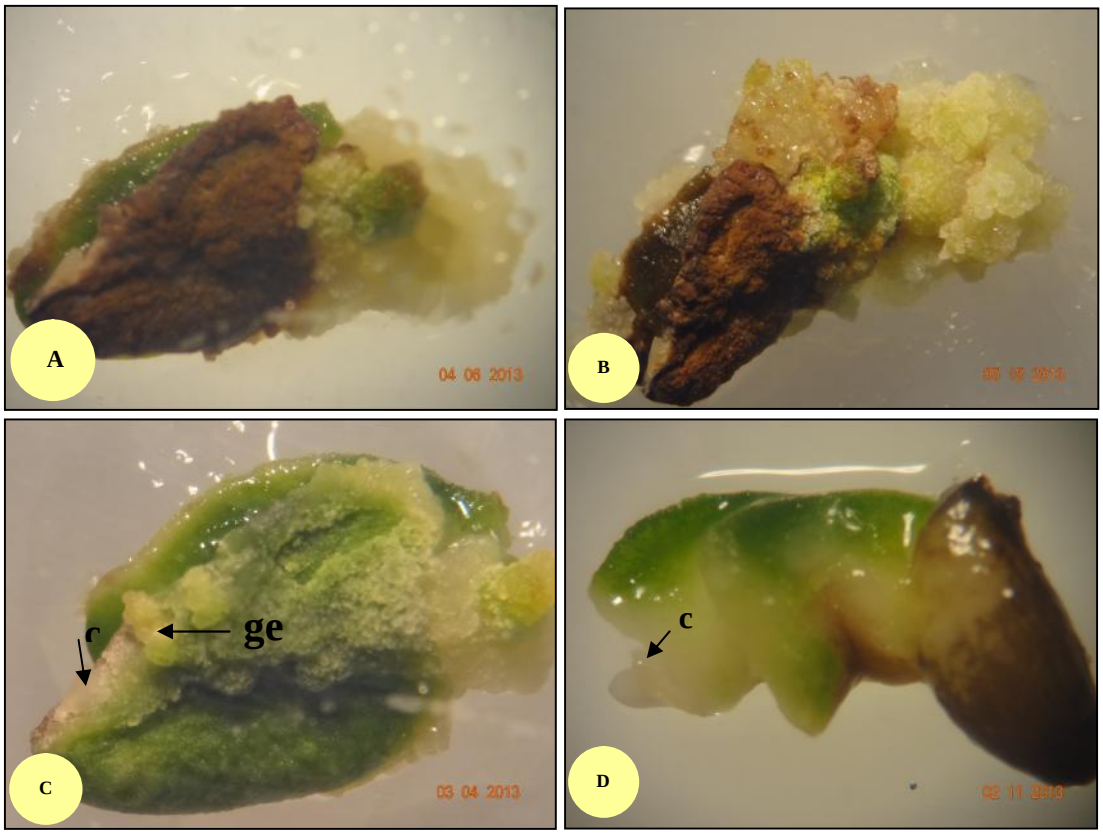
شکل۲: A تا D: واکشت بخش‌های کالوسی و مراحل متفاوتی از برگ‌زایی آن‌ها.

جدول ۲: شرایط واکشت مناسب برای اندامزایی (برگ زایی) کالوس‌ها

محیط کشت پایه	هورمون ها mg^{-1L}	زمان انتقال به محیط کشت از: جدا کشت اولیه کالوس‌زا	زمان انتقال به محیط کشت از: شروع کال‌زایی	نتیجه
MS همراه با ۸g $^{-1L}$ آگار	-	مریستم جوانه‌های جانبی همراه با آخرین جفت برگ‌ها	۱۰ تا ۱۵ روز	تشکیل برگ‌ها پس از ۲۰ روز موفقیت حدود ۳۰ درصد
	NAA:1	مریستم جوانه‌های جانبی همراه با آخرین جفت برگ‌ها	۱۰ تا ۱۵ روز	تشکیل برگ‌ها پس از ۲۱ روز موفقیت حدود ۳۰ درصد
	Zeatin:4 GA3:1 BAP:1	مریستم انتهای شاخه جوان همراه با آخرین جفت برگ‌ها	۱۰ تا ۱۵ روز	تشکیل برگ‌ها پس از ۲۸ روز موفقیت حدود ۲۰ درصد

همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهند واکشت کالوس‌ها در محیط کشت پایه بدون هورمون یا دارای هورمون‌های رشد کمتر، از محیط کشت دارای تنوع هورمون‌ها برای اندامزایی مناسب‌تر بوده‌اند.

از آنجا که تولید رویان‌های پیکری برای تولید بذرهای مصنوعی از اهداف پژوهش حاضر بوده است، محیط‌های کشت و واکشت متنوعی برای تولید این رویان‌ها به‌کار گرفته شدند. به تعدادی از محیط‌های کشت ساکارز (غلظت ۳۰،۲۰،۱۰و ۴۰ گرم در لیتر) و به برخی NaCl (۱ و ۲ گرم در لیتر) افزوده شد. مناسبترین محیط‌هایی که در آن‌ها کالوس‌های رویان‌زا، رویان‌نماها و رویان‌ها تشکیل شدند در جدول ۳ و شکل ۳ مشخص شده‌اند.



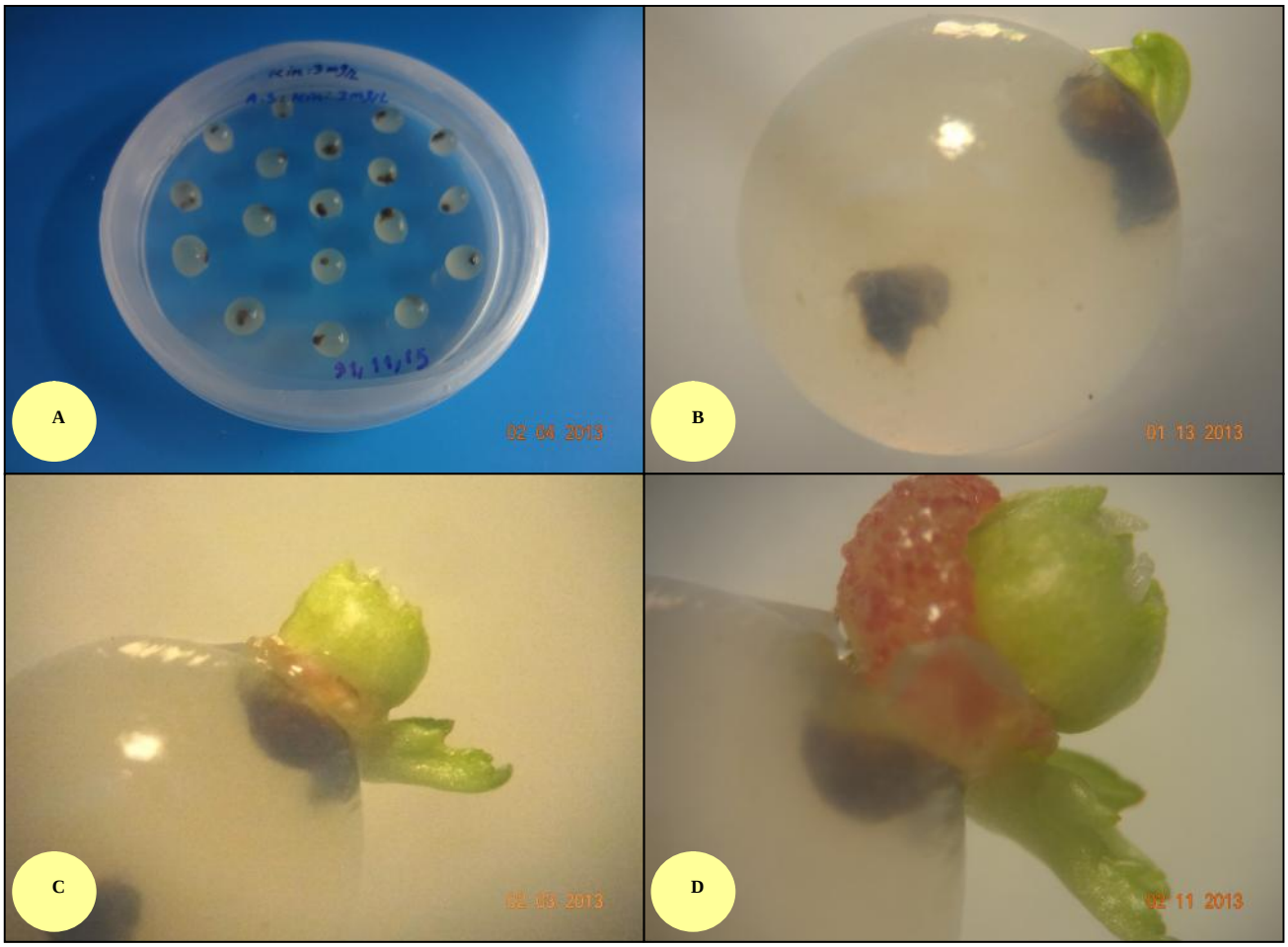
شکل ۳: A و B: کالوس‌های رویان‌زا با توده‌های رویان‌نما، C: تشکیل رویان‌های کروی(ge) و لپه دار (ce)، D: کالوس با رویان لپه‌ای (ce).

جدول ۳: شرایط مناسب برای تشکیل کالوس‌های رویان زا، رویان نماها و رویان‌های پیکری

محیط کشت	هورمون‌ها mg^{-1L}	جدا کشت	زمان شروع واکشت	محیط واکشت	هورمون‌ها mg/l	نتیجه
MS همراه با $8g^{-1L}$ آگار	BAP:5 NAA:2	مریستم جوانه‌های جانبی	پس از ۳۰ روز	MS همراه با $8g^{-1L}$ آگار	Zeatin:4 GA_3:1 BAP:1	پس از ۴۰ روز تولید رویان نماها. رویان نماها بالغ نشدند. (حدود ۱۰ درصد)
	BAP:3 NAA:1	مریستم جوانه‌های جانبی	پس از ۳۰ روز	MS همراه با $8g^{-1L}$ آگار	NAA:2 BAP:5	پس از ۴۰ روز تولید رویان نماهارویان نماها بالغ نشدند. (حدود ۲۵ درصد)
	BAP:4 NAA:1	مریستم جوانه‌های جانبی	پس از ۲۰ تا ۳۰ روز	MS همراه با $8g^{-1L}$ آگار	2,4-D:2 BAP:2 NAA:2	پس از حدود ۳۰ تا ۳۵ روز تشکیل رویان‌های کروی. (حدود ۱۰ درصد)
	BAP:3 NAA:1	قطعات برگ	پس از ۲۰ تا ۳۰ روز	MS همراه با $8g^{-1L}$ آگار	2,4-D:0.5 NAA:0.5 BAP:1.5 *	پس از حدود ۳۰ تا ۳۵ روز تشکیل رویان‌های کروی. (حدود ۱۵ درصد)
	NAA:3	قطعات برگ	پس از ۲۰ تا ۳۰ روز	MS همراه با $8g^{-1L}$ آگار	2,4-D:2 BAP:2 NAA:2 *	پس از حدود ۳۰ تا ۳۵ روز تشکیل رویان (به احتمال لپه‌ای) حدود ۱۵ درصد

** علامت ستاره نشان دهنده حضور ۱ گرم بر لیتر NaCl در محیط‌های واکشت می‌باشد.*

از آنجا که با همه تغییرات هورمون‌ها و محیط های کشت تعداد اندکی رویان‌های پیکری و آن هم به‌طور ناهمزمان بر روی برخی کالوس‌ها پدیدار شدند و امکان تهیه بذر مصنوعی از آن‌ها فراهم نشد، بذرهای مصنوعی با استفاده از جوانه انتهایی شاخه‌های جوان و نیز جوانه‌های جانبی مجاور برگ‌ها، پس از حذف برگ‌های پوشاننده آن‌ها (جز دو برگ بسیار جوان انتهایی) همراه با مقداری محیط کشت پایه MS به‌عنوان ذخیره غذایی در کپسول‌های آلژیناتی (روش تهیه آن‌ها در بخش مواد و روش‌ها شرح داده شد) کپسولی شدند (شکل ۴).



شکل ۴: A: تعدادی از بذرهای مصنوعی حاصل از کپسولی کردن جوانه‌ها روی محیط کشت MS با ۲درصد آگار، B تا D: مراحل متفاوتی از آغاز رویش بذرهای مصنوعی تا تشکیل برگ.

تعدادی از این بذرهای مصنوعی بلافاصله و تعدادی پس از قرار گرفتن به زمان‌های متفاوت یک هفته تا یک ماه در دماهای متفاوت حدود ۴-، ۱۸- و ۲۴+ تا ۳۴+ درجه سانتی‌گراد، روی محیط کشت MS با ۲ درصد آگار کشت شدند. تعدادی از نمونه‌ها در تاریکی مطلق و تعدادی در دوره نوری / تاریکی (۸ تا ۱۶ ساعت) قرار گرفتند. نتایج این بخش از آزمایش‌ها نشان می‌دهند که دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد موجب حفظ توان رویش بذرها و جوانه زنی آن‌ها (حدود ۶ درصد) پس از ۱۷ تا ۶۷ روز با موفقیت شد. (شکل ۴) در دمای حدود ۱۸- درجه سانتی‌گراد توان زیستی بذرهای مصنوعی حفظ نشد. بذرهای مصنوعی در دمای حدود ۴- درجه سانتی‌گراد مدت طولانی‌تری از سرمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد (حدود ۲ تا ۳ هفته) زنده ماندند.

بحث

گیاه زالزالک Crataegus که به‌نام‌های ولیک، سرخ ولیک و یا سیاه ولیک هم نامیده می‌شود. ۲۷ گونه از آن در نواحی دارای شرایط اقلیمی متفاوت کشور می‌رویند. در پژوهش حاضر نتایج آزمایش‌ها نشان دادند که فصل برداشت جوانه‌ها به‌منظور استفاده از آن‌ها به‌عنوان جداکشت تاثیر قابل توجهی بر نتایج آزمایش‌ها دارد و جوانه‌های اواخر مهرماه (شروع به خواب رفتن درختان) و اوایل اسفند ماه (آغاز بیداری گیاهان سرخ ولیک از خواب زمستانی) می‌تواند در القای کالوس‌زایی مفید و موثر باشد و این در حالی است که جوانه‌های برداشت شده در آذرماه و دی ماه رشد و یا کالوس‌زایی را در هیچ یک از انواع محیط‌ها و شرایط به‌کار گرفته شده نشان ندادند. اهمیت فصل برداشت نمونه‌ها در نتایج آزمایش‌ها به‌وسیله محققان زیادی از جمله مجد (۷)، ایران بخش و عبادی (۸)، Smith (۹)، Kozai و

همکاران (۱۰، ۱۱ و ۱۲) نیز گزارش شده است.
از عوامل دیگری که بر نتایج آزمایش‌ها تاثیرگذار بوده اند محل برداشت نمونه‌ها هستند به‌طوری‌که نمونه‌های برداشت شده از ارتفاعات کوه سماموس، جاده منتهی به جواهرده نمونه‌هایی بهینه برای کشت و تهیه بذرهای مصنوعی بودند در حالی‌که نمونه‌های برداشت شده از پارک قیطریه، نیاوران و جمشیدیه توان رویش یا کالوس‌زایی زیادی نشان ندادند. این تفاوت‌ها می‌توانند به‌دلیل تفاوت شرایط اقلیمی در محل‌های مذکور و به‌ویژه تفاوت دما و میزان آلاینده‌ها باشند. تاثیر عوامل اقلیمی بر تغییرات سلولی- مولکولی و تکوینی موجودات زنده از سال‌ها قبل به‌خوبی مشخص شده و یکی از موضوعات مورد توجه در بوم‌شناسی و مسائل محیط زیست است که در سال‌های اخیر بیش از پیش مورد توجه پژوهشگران است. شریف نیا و همکاران (۱۳)، معصومی و همکاران (۱۴ و ۱۵)، Ray & Rossin (۱۶)، Prado و همکاران (۱۷).
به‌کارگیری محیط‌های کشت متفاوت در آزمایش‌های پژوهش حاضر موجب نتایج متفاوت جداکشت‌ها، القای کالوس‌ها و تولید رویان نماها و رویان‌ها شد. نقش محیط‌های کشت متفاوت، عناصر پر مصرف و کم مصرف، قندهای موجود در محیط و شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط‌های کشت از نکات بنیادی در کشت بافت است. ضرورت وجود عناصر پر مصرف و کم مصرف به‌منظور تامین عناصر لازم برای بقا، رشد و تکوین گیاهان و بر پایه مقایسه با نیازهای گیاهان طبیعی بوده است. قندها نیز به‌منظور تامین انرژی، تامین کربن و هم فشار اسمزی مناسب ضرورت دارند. نمک‌هایی مثل NaCl می‌توانند به‌عنوان عامل یون ساز و نیز اسمولاریته مناسب مطرح باشند.
اهمیت ترکیبات محیط کشت به‌وسیله محققان زیادی از جمله مجد و چمن دوستی (۱۸) که چندین محیط کشت را در آزمایش‌های خود به‌کار گرفتند و Wang و همکاران (۱۹) که اهمیت وجود قند ساکارز را برای رویان‌زایی گیاهانی از غلات مفید گزارش کرده اند Farahani and Majd (۲۰) مورد تاکید بوده است.
استفاده از واکشت‌های متفاوت در پژوهش حاضر بر نتایج آزمایشها تاثیر چندانی نداشت، این وضعیت با گزارش‌های Triqui و همکاران (۲۱)، MIGUEL P. GUERRA (۲۲) و CAO و همکاران (۲۳) که واکشت‌های مکرر را برای حفاظت بهتر کالوس‌ها، القای اندام‌زایی و رویان‌زایی موثر دانسته اند هم‌سویی ندارد. این تفاوت‌ها می‌تواند مربوط به شرایط آزمایش‌ها و نوع ژنوتیپ گیاهان مورد آزمایش باشد. MIGUEL P. GUERRAو همکاران (۲۲)، قائمی و همکاران (۲۴) اهمیت ژنوتیپ در پاسخ نمونه‌ها به شرایط کشت برای رویان‌زایی را مورد تاکید قرار داده‌اند. به‌طور کلی واکشت‌ها علاوه بر این که نقش نوعی تنش را دارند، می‌توانند در رفع کمبود مواد غذایی مورد نیاز و خروج مواد اضافی (دفعی) حاصل از فعالیت‌های زیستی نمونه‌های کشت شده موثر باشند. می‌توان تصور کرد که فعالیت زیستی کند نمونه‌های کشت شده در پژوهش حاضر کمبودی در مواد غذایی ضروری و یا افزایش چندانی در مواد اضافی (دفعی) را به‌همراه نداشته است و به‌همین دلیل واکشت‌ها ضرورت زیادی نداشته و اثر چندانی در تغییرات وضع نمونه‌ها نداشته‌اند.
به‌دلیل عدم تکوین تعداد کافی از رویان نماها به از رویان‌ها، امکان تولید بذر مصنوعی از رویان‌ها فراهم نشد. این نتایج با گزارش‌های رجایی (۲۵)، Mariani و همکاران (۲۶)، غلامی و همکاران (۲۷) مشابه است.
بررسی اثر عوامل محیطی بر توان زیست بذرهای مصنوعی و پی بردن به شرایط مناسب برای حفظ سلامت این بذرها از نکات حساس و قابل توجه در تولید بذرهای مصنوعی است. یکی از این شرایط که نقش بنیادی در بقای بذرهای مصنوعی دارد دمای محیط نگه‌داری آن‌ها است. محققان زیادی از جمله Tabassum و همکاران (۲۸)، Priscila Cartes و همکاران (۲۹)، Ipekci و همکاران (۳۰)، Rai و همکاران (۳۱)، Thobunluepop (۳۲) و همچنین غلامی و همکاران (۲۶) نقش دماهای متفاوت برای بقای بذرهای مصنوعی را مورد آزمایش قرار داده اند و نتایج متفاوتی را به‌حسب گونه‌های مورد آزمایش‌های خود گزارش کرده‌اند.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر دمای محیط (اتاق کشت ۲۴ تا ۳۴ درجه سانتی‌گراد) و نیز دمای ۴ تا ۸ درجه سانتی‌گراد برای بقای بذرهای مصنوعی مورد آزمایش قرار گرفت. مجموع بررسی‌ها و پژوهش‌ها نشان می‌دهند که دمای حدود ۴- درجه سانتی‌گراد برای نگه‌داری و سلامت بذرهای مصنوعی مناسب‌تر از سرمای شدید ۱۸- درجه سانتی‌گراد است، دلیل این امر می‌تواند ادامه آرام فعالیت‌های متابولیکی و آسیب‌های آنزیمی کمتر ساختارهای سلولی و بافتی باشد.

تشکر و قدردانی

از حوزه معاونت محترم پژوهشی واحد تهران شمال دانشگاه آزاد اسلامی که هزینه لازم برای اجرای این طرح را تامین کرده اند و همکاری‌های پرسنل محترم آزمایشگاه محمودیه به‌ویژه سرکار خانم فلور مظهر سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع

1. Sabeti, H, Forest, Tree & Shrub of IRAN. 3th Ed, Iran, Yazd university Publisher; 2008.
2. Ghahreman A, Flor of Iran, Research Institute of Forests & Rangelands. 2006; 14-17.
3. Radpooya AA. The plants food etonments, Naghshe mehr Publisher. 1996; 34-38.
4. Salehi Sormaghi MH. Medical plants and phytotherapy, Food world Publisher. 2008; 43(2): 178-183.
5. Majd A, ChamanDoosti F, Mehrabian S, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Canola (Brassica napus L.), Iranian Journal Of Biology. 2007; 4: 344-352.
6. Ara H, Jaiswel U, Jaiswel VS. Synthetic seed: prospects and limitations. Current Science. 2000; 78: 1438-1444.
7. Majd A. The cours of plant tissue culture, 2012; 4(2): 42-47.
8. Iranbakhsh A. Ebadi M. Plant cell and tissue culture, Islamic Azad University Aliabad Katoul Branch Publisher. 2009; 27-31.
9. Smith HR. Translators: Bagheri, H. Azadi , P. Plant tissue culture techniques and experiments, ACECR Mashhad Publisher. 2009.
10. Kozai T. Fujiwara K, Watanabe I. Fundamental studies of environments in plant tissue culture vessels. (1) Relation between the culture medium composition and water potential of liquid culture media. J. Agr. Meteorol. 1986; 42(1):1-6. (JE)
11. Kozai T, Fujiwara K, WatanabeI. Fundamental studies of environments in plant tissue culture vessels. (2) Effects of stoppers and vessels on gas exchange rates between inside and outside of vessels closed with stoppers. J. Agr. Meteorol. 1986; 42(2): 119-127. (JE)
12. Kozai T, Hayashi M. Hirosawa Y, Kodama T, et al. Environmental control for acclimatization of in vitro cultured plantlets. (1) Development of the acclimatization unit. J.Agr.Meteorol. 1987; 42(4): 349-358.
13. Sharifnia F, Seyedipour N, Salimpour F. Biosystematic study of four species of Crataegus L. In central of Iran, Biology Journal, Islamic Azad University Garmsar Branch. 2009; 45-52.
14. Maassoumi AA, Mahmoodi M, hamzehie B. Geographic distribution of Astragalus in Iran, Botanical Journal of Iran. 2009; 10(1): 112-132.
15. Maassomi AA, Farhangisabet M, Majd A, Nejadsattari T, ET AL. MEGAGAMETOPHYTE AND EMBRYO DEVELOPMENT IN FIVE SPECIES OF ASTRAGALUS (FABACEAE), The Iranian Journal of Botany. 2012; 17(2): 167-174.
16. Rossin CB, Rey MEC. Effect of explant source and auxin on somatic embryogenesis of selected cassava (Manihot esculenta Crantz) cultivars. South African Journal of Botany. SAJB-00550. 2010; 7(1): 75-80.
17. Prado MJ, Grueiro MP, Gonzalez MV.Testillano, P.S. Dominguez, C. Lopez, M. Rey, M. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from anthers and ovaries of six autochthonous grapevine cultivars from Galicia (Spain). Scientia Horticulturae. 2010; 125: 342-352.
18. Majd A, ChamanDoosti F, Mehrabian S, Shaidai M. The Regeneration of Brassica napusl. and indirecte Caulogenesis used Hypostyle explant of invitro culture, QUARTERLY JOURNAL OF SCIENCE (KHARAZMI UNIVERSITY). 2005; 344-352.
19. Wang N, Fisher DB. Sucrose Concentration Gradients along the Post-Phloem Transport Pathway in the Maternal Tissues of Developing Wheat Grains, Plant Physiol. 1995 Oct. 109(2); 587–592
20. Farahani F, Majd A. Comparison of liquid culture methods and effect of temporary immersion bioreactor on growth and multiplication of banana (Musa, cv. Dwarf Cavendish). African Journal of Biotechnology. 2011; 11(33): pp. 8302-8308.
21. Triqui ZEA, Guedira A, Chlyah A, Chlyah H, et al. Effect of genotype, gelling agent , and auxin on the induction of somatic embryogenesis in sweet potato (Ipomoea batatas Lam.). C.R.biological. 2008; 331: 198-205.
22. Miguel P, Guerra Lirio L. Dal Vesco, JEAN Perre H.J.Ducroquet,. Somatic embryogenesis in Goiabeira serrana. genotype rssponse , auxinic shock and synthetic seed.. R. Bras. Fisiol. Veg. 2001; 13(2): 117-128
23. CAO JL. ZHANG XL. JIN, Shuang-X. YANG, XY. et al. An Efficient Culture System for Synchronization Control of Somatic Embryogenesis in Cotton (Gossypium hirsutum L.). ACTA AGRONOMICA SINICA. 2008; 34(2): 224-231.
24. Ghaemi M, Majd A. Fallahian F. Ghasemi Bezdi, K. Comparison of callus induction and somatic embryogenesis of some Iranian cottons (Gossypium Spp.) with Coker 312 and histology of somatic embryogenesis. African Journal of biotechnology. 2011; 10(15): 2915-2922.
25. Rajaee S, Majd A. Somatic embryogenesis and artificial seed production of Canola (Brassica napus L.) , Science and Research Branch Islamic Azad University. 2013; 73-77.
26. Mariani, TS, Latif S, Ginting G, Miyake H. Somatic embryogenesis of oil palm (Elaeis guineensis Jacp.) for synthetic seed production. ASIAN JOURNAL OF APPLIED SCIENCES. 2014; 2(3): 626-629.
27. Gholami AA, Alavi SV, Majd A, Fallahian F. Plant regeneration and cold preservation of Eureka lemon (Citrus limon [L.] Burm. f. [‘Eureka’]) by using sodium alginate-encapsulated shoot tips. Annals of Biological Research. 2013; 4 (5): 279-

285.
28. Tabassum B, Nasir IA, Farooq AM, Rehman Z, et al. Viability assessment of in vitro produced synthetic seeds of cucumber. African Journal of Biotechnology. 2010; l.9(42): 7026-7032.
29. Priscila Cartes R, Hermes Castellanos B, Darcy Ríos L, Katia Sáez C, et al. ENCAPSULATED SOMATIC EMBRYOS AND ZYGOTIC EMBRYOS FOR OBTAINING ARTIFICIAL SEEDS OF RAULI-BEECH (Nothofagus alpine (Poepp. & Endl.) Oerst.). Chilean Journal of Agricultural Research. 2009; 69(1): 112-118.
30. Ipekci Z, Gozukirmizi N. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from Paulownia elongata. Plant Cell Rep. 2003; 22: 16-24.
31. Rai MK, Akhtar N, Jaiswal VS. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Psidium guajava L. cv. Banarasi local. Scientia Horticulturae. 2007; 113(2): 129-133.
32. Thobunluepop P. The somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo of sweet corn inbred line. Journal of Plant Breeding and Crop Science. 2009; 1(10): 330-335.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2016; 7(2): 121-129

Original Article

The comparative study of synthetic seed production of two *Crataegus* species by meristem culture and somatic embryos methods

Majd A. Ph.D.*, Zandi N. M.Sc., Arbabian S. Ph.D., Sharifnia F. Ph.D.

Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, North-Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
* Email corresponding author: ahmad_majd2005@yahoo.com

Received: 8 Mar. 2015 Accepted: 26 Apr. 2015

Abstract

Aims: The aim of this study is healthy and desirable plants production of two *Crataegus* species using meristem culture and somatic embryogenesis and synthetic seed preparation that is a biotechnological result.

Material and methods: Strile seeds, vegetative - generative organs pieces and the buds of two *Crataegus* species (*Crataegus pseudoheterophylla* and *C. microphylla*) were cultured on solid MS medium with auxin hormones (IAA, NAA and 2, 4- D), cytokinins (KIN, BAP, Zeatin) and GA_3 under sterile conditions. Samples were capsulated by sodium aglinate and calcium chloride.

Results: Leaves, apical meristems and axillary bud meristems explants were the best for callus production in solid MS medium with some concentration of auxins and cytokinins. Embryoids and especially embryos were almost obtained from leaf explants or sub culturing of embryogenic callus in solid MS medium contains auxins, cytokinins and a little of NaCl. Early autumn and late winter axillary buds were suitable for synthetic seed production. Sodium alginate %3 and calcium chloride %1 were used as a capsule for synthetic seed production. For artificial seed storage 4°C and for germination of these seeds 24 ± 2°C were suitable.

Conclusion: There are some difficulties for somatic embryogenesis in two studied *Crataegus*. Hormones type and dosage are very important and effective on callus, embryoids and embryos production. Buds harvesting time is also important for synthetic seed production. The supplements of buds with MS medium and capsulation those with sodium alginate are favorable.

Keywords: *Crataegus*, *In vitro* culture, somatic embryogenesis, synthetic seed