Archive of SID

مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۳۱، شماره ۱، سال ۱۳۹۴

اثر ترکیب ماتریکس آلژینات بر میزان رشد بذرهای مصنوعی حاصل از کپسوله کردن جنین‌های سوماتیکی در دو هیبرید ایرانی آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.)

Effect of Alginate Matrix Composition on Growth of Synthetic Seeds Derived from Encapsulation of Somatic Embryos in Two Iranian Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Hybrids

سهیلا مرادی[۱]، سیدسعید پورداد[۲]، محمدرضا عظیمی[۳]، فریبرز حبیبی[۴]
وحیدر ذوالنوریان[۵]

۱، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
۲- دانشیار، معاونت موسسه تحقیقات کشاورزی دیم، کرمانشاه
۵- مربی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۸

چکیده

مرادی، س.، پورداد، س. س.، عظیمی، م. ر.، حبیبی، ف. و ذوالنوریان، ح. ۱۳۹۴. اثر ترکیب ماتریکس آلژینات بر میزان رشد بذرهای مصنوعی حاصل از کپسوله کردن جنین‌های سوماتیکی در دو هیبرید ایرانی آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.). مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۳۱: ۲۱ - ۵۷.

در حال حاضر تولید بذر مصنوعی یک تکنیک برجسته برای تکثیر و حفاظت گیاهان بوده و برای خیلی از گیاهان به کار می‌رود. این آزمایش به منظور بررسی اثر کاربرد مواد غذایی و تنظیم کننده‌های رشد در ماتریکس کپسوله کننده روی باززایی و رشد بذرهای مصنوعی در دو هیبرید ایرانی آفتابگردان انجام شد. جنین‌های سوماتیکی حاصل از کاشت جنین‌های زیگوتی نابالغ آفتابگردان برای تولید بذر مصنوعی به وسیله آلژینات سدیم ۳درصد و کلریدکلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار کپسوله شدند. در تهیه ژل آلژینات سدیم از آب مقطر، محیط MS و تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شد، سپس میزان رشد بذرهای مصنوعی حاصل طی چهار هفته پس از کشت روی محیط MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد تعیین شد. نتایج حاصل نشان داد که باززایی گیاه از جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده در شرایط درون شیشه‌ای و همچنین استقرار گیاهچه‌های حاصل بعد از انتقال به شرایط بیرون شیشه‌ای تحت تأثیر غلظت آلژینات سدیم و حضور یا عدم حضور مواد غذایی MS (عناصر ماکرو و میکرو همراه با ساکارز) و تنظیم‌کننده‌های رشد در دانه‌های آلژینات سدیم قرار گرفت. حضور مواد غذایی باعث تولید گیاهچه‌های قوی‌تر و وجود تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس کپسوله کننده باعث ایجاد تعداد شاخه و برگ بیشتر و همچنین سیستم ریشه‌ای گسترده‌تر در گیاهچه‌های حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، بذرهای مصنوعی، جنین‌های سوماتیکی، ماتریکس آلژینات.

نویسنده مسئول: s.spourdad@areo.ir تلفن: ۰۸۳۱۲۳۳۳۴۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

به دلیل اهمیت زیاد دانه‌های روغنی در تغذیه و صنعت، تولید و کاشت آن‌ها از دیر باز بخش مهمی از کشاورزی را در کشورهای مختلف و از جمله ایران به خود اختصاص داده است. آفتابگردان زراعی (*Helianthus annuus* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات روغنی است که در جهان از نظر میزان تولید روغن جایگاه چهارم را پس از سویا، کلزا و بادام زمینی به خود اختصاص داده است (Honda *et al*., 2005؛ Fernandez-Martinez *et al*., 2007). به منظور توسعه سطح زیر کشت آفتابگردان در جهان، اصلاح ژنتیکی آن برای صفات مهم زراعی ضروری است (Fiore *et al*, 1997). برای اصلاح ژنتیکی صفات مختلف می‌توان از روش‌های بیوتکنولوژی گیاهی از جمله امتزاج پروتوپلاستی یا روش انتقال ژن‌ها، به عنوان مکمل روش‌های سنتی استفاده کرد. برقراری یک سیستم انتقال ژن کاربردی ابتدا نیاز به یک سیستم باززایی کارآمد از سلول‌های هدف جهت فرایند انتقال دارد (Gurel and Kazan, 1998). جنین‌زایی سوماتیکی روش مطلوبی برای باززایی گیاه است (Williams and Maheswaran, 1986). جنین‌های سوماتیکی را می‌توان در یک ماتریکس محافظ برای تولید بذر مصنوعی غوطه‌ور ساخت، تولید بذر مصنوعی در شرایط درون شیشه‌ای روش مناسبی برای ازدیاد کلونی گونه‌های گیاهی منتخب است که تکثیر آن‌ها در محیط طبیعی مشکل است (Sakamoto *et al*., 1992؛ Zeynali *et al*., 2013). افزودن قارچ‌کش، آفت‌کش، میکروارگانیسم‌ها، زغال فعال، کودها، مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد به محیط کپسوله کردن، برای محافظت ریزنمونه‌های کپسوله شده از میکروارگانیسم‌ها، کاهش آزاد سازی ترکیبات سمی و افزایش ظرفیت جوانه‌زنی بذرها مفید است (Antonietta *et al*., 2007؛ Pattnaik and Chand, 2000). هدا و همکاران (Huda *et al*., 2007) حضور ساکارز به عنوان تأمین‌کننده کربن را برای ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای ضروری دانسته و عنوان کردند حضور این مواد در ماتریکس ژلی باززایی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بدر- الدن (Badr-Elden, 2013) با استفاده از آلژینات سدیم سه درصد و نیترات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار دانه‌های آلژینات گرد و یک دستی را در توت‌فرنگی به دست آورد. وی بیش‌ترین درصد ظهور شاخه را در کپسول‌های حاوی محیط MS و BA $۰/۵ mgl^{-1}$ گزارش کرد. میشلی و همکاران (Micheli *et al*., 1998) گزارش دادند که استفاده از مواد غذایی در کپسول‌های آلژینات جوانه‌های حاصل از شاخه‌های تکثیر شده در شرایط درون شیشه‌ای زیتون یک مسئله مهم در ارتباط با حفاظت ژرم‌پلاسم و تکنولوژی بذر

www.SID.ir

Archive of SID

مصنوعی است.

برخی کاربردهای بذرهای مصنوعی شامل ثبات ژنتیکی، تکثیر در مقیاس وسیع، ازدیاد سریع گیاهان، سهولت نگهداری و توانایی نگهداری طولانی مدت بدون کاهش بنیه برای بذرهائی است که دوره رشد طولانی داشته و یا نگهداری طولانی مدت آن‌ها امکان‌پذیر نیست. همچنین تولید بذر مصنوعی در گیاهان دگرگشن مانع از تفرق صفات در آن‌ها می‌شود. 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 به عنوان ابزاری در جهت استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی مثل امتزاج پروتوپلاست و انتقال ژن برای بهبود و افزایش تولید آفتابگردان، تولید بذر مصنوعی در ارقام هیبرید باارزش تجاری می‌تواند روش مناسبی برای تکثیر این هیبریدها باشد.

در این تحقیق تأثیرکپسوله کردن و افزودن مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد به مواد کپسوله کننده روی میزان باززایی و رشد بذرهای مصنوعی حاصل از کپسوله کردن جنین‌های سوماتیکی در دو هیبرید پر محصول ایرانی آفتابگردان بررسی شد. بررسی منابع علمی و گزارش‌های تحقیقاتی نشان داده است که تاکنون در کشور از جنین‌های سوماتیکی برای تولید بذر مصنوعی در گیاه آفتابگردان استفاده نشده و این اولین گزارش در این رابطه است.

مواد و روش‌ها

در این بررسی از بذرهای دو هیبرید داخلی آفتابگردان به نام‌های آذرگل و فرخ برای تهیه بذر مصنوعی و اجرای آزمایش در سال ۱۳۹۱ استفاده شد. مراحل تولید جنین‌های سوماتیکی، تولید بذر مصنوعی و بررسی سازگاری گیاهچه‌های حاصل به شرح زیر انجام شد:

ضدعفونی و تولید جنین‌های سوماتیکی

برای تهیه جنین‌های زیگوتیک نابالغ، بذرها در گلدان‌های حاوی شن، ماسه و کود پوسیده دامی گوسفندی با نسبت مساوی (۱:۱:۱) کاشته شدند. ده روز بعد از شروع گرده‌افشانی بذرهای نابالغ از روی طبق جدا شده و به آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه منتقل شدند. بذرهای نابالغ ابتدا به مدت نیم ساعت زیر جریان آب قرار گرفته سپس به مدت ده دقیقه در محلول قارچ کش بنومیل (۱/۵ گرم در هزار میلی‌لیتر آب مقطر) قرار گرفته و بعد از آبکشی با آب مقطر به زیر هود لامینار منتقل شدند. در زیر هود نمونه‌ها به مدت یک دقیقه در الکل اتانول ۷۰ درصد شسته شده و به مدت پنج دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. سپس بذرها در هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد استریل سطحی شده و سه بار با آب مقطر استریل هر بار ۵ دقیقه آبکشی شدند. در نهایت پوسته بذرها جدا شده و جنین‌های نابالغ روی

www.SID.ir

Archive of SID

محیط جنین‌زایی درون تشتک پتری قرار گرفتند. محیط جنین‌زایی شامل عناصر ماکرو و میکرو محیط Murashige and Skooge و ویتامین‌های محیط B_5 (Finer, 1987)، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، ۰/۵ گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات، ۱۲۰گرم در لیتر ساکارز، ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بود (مطابق روش مرسوم آزمایش). محیط با آگار ۰/۸ درصد جامد شده و pH محیط قبل از اتوکلاو با شرایط دما ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه روی ۵/۶ تنظیم شد (Finer, 1987). محیط‌های جنین‌زایی در تشتک‌های پتری یک‌بار مصرف استریل به میزان ۲۵ میلی‌لیتر در هر تشتک پتری توزیع شد. تشتک‌های پتری حاوی چهار جنین نابالغ ضدعفونی شده برای القای جنین‌زایی در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

تولید بذر مصنوعی

از آلژینات سدیم ۳ درصد و کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار برای کپسوله کردن جنین‌های سوماتیکی استفاده شد. برای تولید بذر مصنوعی با استفاده از اسکالپل جنین‌های سوماتیکی جدا شده و داخل آلژینات سدیم انداخته شدند. در تهیه ژل آلژینات سدیم، از سه ماتریکس آب مقطر، محیط MS مایع و محیط MS مایع به همراه دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و دو میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA استفاده شد. جنین‌ها حدود پنج دقیقه داخل ژل باقی ماندند. بعد از این مدت با استفاده از سمپلر جنین‌ها به همراه تقریباً دو میلی‌لیتر از ژل برداشته‌شده و به آرامی داخل کلرید کلسیم رهاسازی شدند. کپسوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه داخل کلرید کلسیم جهت پلیمریزاسیون و سفت شدن کپسوله‌ها باقی ماندند (Redenbaugh *et al.*, 1984). برای ارزیابی تأثیر ترکیب ماتریکس آلژینات روی رشد بذرهای مصنوعی، جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده و کپسوله نشده، بلافاصله پس از تولید، روی محیط کشت جامد MS کشت شدند و درصد جوانه‌زنی (تعداد بذرهای مصنوعی جوانه‌زده نسبت به تعداد کل بذرهای تولید شده برای هر ماتریکس)، درصد ریشه‌دهی (تعداد بذرهای مصنوعی ریشه‌دار شده نسبت به تعداد کل بذرهای تولید شده برای هر ماتریکس)، تعداد شاخه‌های جانبی، طول ریشه (بر حسب میلی‌متر)، تعداد برگ، طول و عرض برگ و طول شاخه (بر حسب میلی‌متر) آن‌ها طی چهار هفته پس از قرار گیری روی محیط مذکور ارزیابی شد.

سازگاری و انتقال گیاهچه‌ها به گلخانه

گیاهچه‌های حاصل از بذرهای مصنوعی پس از شستشوی ملایم زیر آب به منظور حذف محیط چسبیده به آن به گلدان‌های (با قطر هفت

www.SID.ir

Archive of SID

سانتی‌متر در بالا وپنج سانتی‌متر در پایین و ارتفاع هشت و نیم سانتی‌متر) حاوی کوکوپیت، پرلیت و پیت ماس (۱:۱:۱) استریل شده در اتوکلاو منتقل شدند. گیاهچه‌ها با کلاهک‌های پلی‌اتیلنی شفاف برای اطمینان از حفظ رطوبت در دو هفته اول پوشانده شدند و سپس کلاهک به تدریج برای سازگاری با شرایط بیرون برداشته شدند. گلدان‌ها با محلول غذایی سه در هزار فوسامکو محلول پاشی شده و در اتاق سازگاری با شرایط دمایی ۲۱ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد نگهداری شدند. بعد از چهار هفته گیاهچه‌ها با موفقیت سازگار شده و به گلدان‌های بزرگ‌تر (با قطر ۳۰ سانتی‌متر در بالا و ۱۵ سانتی‌متر در پایین و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر) حاوی ماسه، خاک باغچه و کود دامی استریل (۱:۱:۱) منتقل شدند. گیاهچه‌های داخل خاک گلدان به مدت چهار هفته در شرایط اتاق سازگاری باقی مانده و در نهایت برای رشد و توسعه بیش‌تر به گلخانه منتقل شدند (Singh *et al.*, 2006). بعد از گذشت چهار هفته صفاتی مانند درصد سازگاری (نسبت تعداد گیاهچه‌هایی که زنده مانده و رشد کردند به تعداد گیاهچه‌های منتقل شده)، وزن تر، تعداد ریشه، طول ریشه (بر حسب میلی‌متر)، تعداد برگ، طول و عرض برگ و طول شاخه (بر حسب میلی‌متر) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تیمارها در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار اعمال شدند. فاکتورهای این آزمایش عبارت بودند از هیبرید در دو سطح، ماتریکس تهیه ژل آلژینات سدیم در سه سطح (همراه با ریزنمونه‌های کپسوله نشده به عنوان شاهد) و زمان در چهار سطح شامل هفته اول، دوم ، سوم و چهارم پس از کشت روی محیط MS.

در مواردی که داده‌ها به صورت درصدی و حاصل از شمارش بودند با استفاده از فرمول تبدیل زاویه‌ای $\sqrt{x}$Arcsin نرمال‌سازی شده و در صورت وجود صفر بین داده‌ها فرمول $\arcsin\sqrt{x+0.5}$ برای تبدیل داده‌ها استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS ورژن ۹/۱ تجزیه شده و سپس با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و آزمون دانکن در سطح احتمال α= ۰/۰۵ مقایسه شدند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که نوع ماتریکس آلژینات سدیم بر تمام صفات مورد ارزیابی اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد داشت، همچنین اثر دو هیبرید بر روی تمامی صفات (مذکور در جدول مقایسه میانگین‌ها) به‌جز صفت طول شاخه معنی‌دار بود. بین زمان‌های مختلف نیز از نظر تمامی صفات اختلاف معنی‌داری ملاحظه وجود داشت. اثر متقابل دوگانه و سه‌گانه نیز از نظر تمام صفات به‌جز صفت درصد ریشه‌دهی در اثر متقابل زمان× ماتریکس و اثر متقابل سه‌گانه

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مختلف آفتابگردان تحت تاثیر هیبرید و ماتریکس طی چهار هفته پس از کشت بذرهای مصنوعی جنین‌های سوماتیکی روی محیط کشت MS

Table 1. Analysis of variance of different traits of sunflower as affected by hybrid and matrix during four weeks afted culture of somatic embryos of synthetic seeds on MS medium

			میانگین مربعات MS							
S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	درصد ریشه‌دهی Rooting percent	درصد جوانه‌زنی Germination percent	تعداد شاخه جانبی Number of axillary shoot	طول ریشه Root length	عرض برگ Leaf width	طول برگ Leaf length	تعداد برگ Leaf number	طول شاخه Shoot height
Time (T)	زمان	3	8510.41**	3441.41**	10.94**	10895.14**	352.50**	1630.95**	1394.23**	33711.97**
Hybrid (H)	هیبرید	1	562.50**	316.40**	1.17**	219.25**	70.9543**	50.3048**	70.8890**	0.0420^{ns}
Matrix (M)	ماتریکس	3	1833.33**	472.65**	1.57**	2746.43**	15.4469**	154.39**	110.24**	2021.86**
T × H	زمان × هیبرید	3	343.75**	420.57**	1.51**	344.57**	19.6402**	6.1773**	15.6213**	338.25**
H × M	هیبرید × ماتریکس	3	1059.02**	410.15**	1.36**	280.87**	3.1079**	19.5146**	30.9147**	551.20**
T × M	زمان × ماتریکس	9	125.00^{ns}	201.82**	0.77**	77.42**	2.7228**	27.2061**	14.0109**	24.7930**
T × H × M	زمان × هیبرید × ماتریکس	9	100.69^{ns}	275.21**	1.03**	125.59**	2.7047**	55.7579**	5.8043**	150.0854*
Error	اشتباه آزمایشی	128	56.64	42.96	0.15	1.5935	0.1607	0.7413	0.4541	1.7063
C.V. (%)	درصد ضریب تغییرات		8.47	6.88	4.09	4.02	7.83	7.76	8.59	3.41

ns، * و ** : به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

ns,* and **: Not significant, significant at 5% and 1% levels of probability, respectively.

www.SID.ir

Archive of SID

اختلاف معنی‌داری را برای تمام صفات نشان دادند. این امر نشان می‌دهد که ترکیبات آلژینات سدیم در زمان‌های مختلف و نیز در دو هیبرید آفتابگردان مورد بررسی اثر متفاوتی بر اکثر صفات اندازه گیری شده داشته است.

همان‌طور که از نتایج مقایسه میانگین‌ها مشخص است (جدول ۲) جنین‌های سوماتیکی کپسوله نشده به دلیل تماس مستقیم با محیط کشت زودتر جوانه زدند (جوانه‌زنی ۱۰۰ درصدی در هفته اول کشت) اما در جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده به دلیل نیاز به شکافتن ژل کپسوله کننده جوانه‌زنی با تأخیر رخ داد. در این خصوص کم‌ترین مقدار در بین پارامترهای مورد ارزیابی مربوط به ماتریکس آب مقطر بود که دلیل این کاهش را به عدم دسترسی ریزنمونه‌های کپسوله شده به مواد غذایی می‌توان نسبت داد. استفاده از مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد در آندوسپرم مصنوعی سبب بهبود تمام پارامترهای رشدی نسبت به ریزنمونه‌های کپسوله نشده شد. تولید شاخه‌های جانبی از هفته سوم و در ماتریکس‌های حاوی مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد شروع شده و حضور تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس آلژینات باعث تولید بیش‌ترین تعداد شاخه‌های جانبی در جنین‌های سوماتیکی شد (با میانگین تعداد ۱/۹۵ شاخه جانبی در هیبرید آذرگل و ۲/۷ در هیبرید فرخ). هر چند تعداد شاخه‌های جانبی و تعداد برگ در جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده با ژل آلژینات حاوی تنظیم کننده‌های رشد نسبت به جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده با آلژینات حاوی مواد غذایی بیشتر بود اما در این جنین‌ها طول شاخه و اندازه برگ‌ها کمتر بود. تمام پارامترها با گذشت زمان افزایش پیدا کردند اما وجود مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد روند افزایش صفات را بهبود بخشید. رشد طولی ریشه (۶۴/۲ میلی‌متر) و طول شاخه (۹۵/۵۲ میلی‌متر) در هفته چهارم پس از کاشت، در ریزنمونه‌های کپسوله شده هیبرید آذرگل در ماتریکس ژلی حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد بیش‌تر بود اما تعداد برگ (با میانگین ۱۹/۴۵ برگ)، طول (۲۰/۳۱ میلی‌متر) و عرض برگ (۱۱/۴۳ میلی‌متر) و همچنین تعداد شاخه‌های جانبی (با میانگین ۲/۷ شاخه جانبی) در هیبرید فرخ و به هنگام استفاده از مواد غذایی در تهیه ماتریکس آلژینات سدیم بیش‌تر بود. تسوتکوف و همکاران (Tsvetkov *et al*., 2006) و سینگ و همکاران (Singh *et al*. 2009) نیز عنوان کردند که افزودن مواد غذایی MS به ماتریکس ژلی، رشد گیاه را به ترتیب در هیبرید Aspen (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Mincs.) و گونه *Spilanthes acmella* بهبود می‌بخشد. ماتریکس ژلی تهیه شده با مواد غذایی MS به عنوان آندوسپرم مصنوعی به کار رفته و مواد غذایی را برای رشد ریزنمونه‌های کپسوله شده فراهم می‌کند (Bapat and Rao, 1992؛ Singh *et al*., 2006؛ Castillo *et al*., 1998). بذرهای مصنوعی دارای آندوسپرم مصنوعی

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ – مقایسه میانگین صفات مختلف آفتابگردان تحت تاثیر هیبرید و ماتریکس طی چهار هفته پس از کشت بذرهای مصنوعی جنین‌های سوماتیکی روی محیط کشت MS

Table 2. Mean comparison of different traits of sunflower as affected by hybrid and matrix during four weeks after culture of somatic embryos of synthetic seeds on MS medium

Tratments	تیمار		Mean of traits	میانگین صفات						
زمان Time	هیبرید Hybrid	ماتریکس Matrix		درصد ریشه‌دهی Rooting percent (%)	درصد جوانه‌زنی Germination percent (%)	تعداد شاخه جانبی Number of axillary shoot	طول ریشه Root length (mm)	عرض برگ Leaf width (mm)	طول برگ Leaf length (mm)	تعداد برگ Leaf Number	طول شاخه Shoot height (mm)
هفته اول First week	آذرگل Azargol	Control شاهد		75cd	100a	0.00h	18.53m	1.62lm	2.65lm	2.0n	1.42tu
		DDW آب مقطر		30f	50f	0.00h	2.05r	0.70n	1.02n	1.0o	3.06w
		MS		70d	70e	0.00h	8.72p	1.22m	1.95mn	1.4no	7.53v
		MS + PGR	MS + هورمون	80cd	80cd	0.00h	10.17op	1.27m	1.98mn	1.6no	8.20v
	فرخ Farrokh	Control شاهد		100a	100a	0.00h	14.20n	1.87kl	3.35l	2.0n	14.10st
		DDW آب مقطر		454e	90ab	0.00h	2.32r	1.87lm	2.79lm	1.8no	10.83u
		MS		85bc	85bc	0.00h	18.50m	1.50lm	3.12lm	1.7no	12.87t
		MS + PGR	MS + هورمون	75cd	75de	0.00h	10.81o	1.50lm	2.61lm	1.5no	12.93t
هفته دوم Secound week	آذرگل Azargol	Control شاهد		100a	100a	0.00h	24.75kl	3.25j	6.61k	3.65m	17.82q
		DDW آب مقطر		95ab	100a	0.00h	5.55q	2.16k	3.56l	4.43m	14.84s
		MS		100a	100a	0.00h	30.45i	5.28gh	16.44f	4.0m	16.75qr
		MS + PGR	MS + هورمون	100a	100a	0.00h	26.00k	4.50i	10.95i	3.9m	14.19st
	فرخ Farrokh	Control شاهد		100a	100a	0.00h	49.65d	6.00ef	8.40f	4.0m	21.08p
		DDW آب مقطر		95ab	100a	0.00h	15.26	3.48j	8.40j	3.2m	15.42rs
		MS		100a	100a	0.00h	33.54	4.41i	9.06j	3.8m	21.30p
		MS + PGR	MS + هورمون	100a	100a	0.00h	40.06	5.01h	9.55j	5.8i	25.66o

میانگین‌های با حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است

Means with different letters are significantly different at 5% level of probability according to Duncan´s multiple rang test.

www.SID.ir

Archive of SID

Table 2. Continued

ادامه جدول ۲

Time زمان	Hybrid هیبرید	Matrix ماتریکس		Rooting percent (%) درصد ریشه‌دهی	germination percent (%) درصد جوانه‌زنی	Number of axillary shoot تعداد شاخه جانبی	Root length (mm) طول ریشه	Leaf width (mm) عرض برگ	Leaf length (mm) طول برگ	Leaf Number تعداد برگ	Shoot height (mm) طول شاخه
				Tratments تیمار			Mean of traits میانگین صفات				
هفته سوم Third week	آذرگل Azargol	Control	شاهد	100a	100a	0.00h	36.54g	6.41de	18.16cde	9.2jk	53.99j
		DDW	آب مقطر	95ab	100a	0.00h	23.69l	5.74fg	14.08gh	8.4k	45.54m
		MS		100a	100a	0.4.fg	44.41f	6.60d	17.08ef	12.2ef	60.11g
		MS + PGR	MS + هورمون	100a	100a	1.45c	49.76d	6.50de	13.55gh	13.5d	60.71g
	فرخ Farrokh	Control	شاهد	100a	100a	0.00h	37.48g	6.30de	14.16g	9.7ij	52.32k
		DDW	آب مقطر	100a	100a	0.00h	31.16i	6.30de	12.87h	11.0gh	32.12n
		MS		100a	100a	0.30fg	44.41f	7.45c	18.29cd	13.5d	56.02hi
		MS + PGR	MS + هورمون	100a	100a	2.00b	49.92d	7.60c	17.84de	19.1a	54.89ij
هفته چهارم Forth week	آذرگل Azargol	Control	شاهد	100a	100a	0.30g	53.12c	5.59ef	13.32gh	12.0f	64.07f
		DDW	آب مقطر	95ab	100a	0.30g	43.90h	5.49fgh	13.53gh	10.4hi5	47.74l
		MS		100a	100a	0.70e	50.72d	7.73c	19.76ab	13.0de	95.52a
		MS + PGR	MS + هورمون	100a	100a	1.95b	64.20a	6.70d	13.73gh	15.1c	89.42b
	فرخ Farrokh	Control	شاهد	100a	100a	0.55ef	45.97f	10.99a	17.19def	11.6fg	66.35e
		DDW	آب مقطر	100a	100a	0.4fg	37.07g	8.59b	11.56i	11.4fg	57.33h
		MS		100a	100a	0.95d	47.69e	11.43a	20.31a	16.5b	82.79c
		MS + PGR	MS + هورمون	100a	100a	2.70a	55.01b	8.51b	19.04bc	19.4a	75.14d

میانگین‌های با حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است

Means with different letters are significantly different at 5% level of probability according to Duncan´s multiple rang test.

www.SID.ir

Archive of SID

حاوی عناصر غذایی MS، ساکارز (۳ درصد)، IAA (۰/۵ میلی گرم بر لیتر) و NAA (۰/۵ میلی گرم بر لیتر)، BA (۰/۵ میلی گرم بر لیتر) و زغال فعال (۱/۲۵ درصد) حداکثر جوانه‌زنی (۳۰ درصد) و تبدیل به گیاهچه (۲۷ درصد) را در هیبرید برنج نشان دادند (Arun Kumare *et al*., 2005).

به منظور مقایسه تأثیر کپسوله کردن و استفاده از مواد مختلف در ماتریکس آلژینات، مقایسات مستقل گروهی تیمارها انجام شد (جدول ۳). نتایج به دست آمده از این مقایسات نشان داد که کپسوله کردن روی تمام صفات تأثیر معنی‌داری داشته و با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها می توان گفت، کپسوله کردن باعث بهبود صفات مورد ارزیابی در مقایسه با ریزنمونه‌های کپسوله نشده، شد. سینگ و همکاران (Singh *et al*., 2009) نیز عنوان کردند که نوک شاخه‌های کپسوله شده *Spilanthes acmella* نسبت به نوک شاخه‌های کپسوله نشده به میزان بیشتری تبدیل به گیاهچه شدند. استفاده از مواد غذایی در ماتریکس آلژینات تأثیر معنی‌داری روی صفات داشت به غیر از درصد جوانه‌زنی که میزان جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی تحت تأثیر وجود یا عدم وجود مواد غذایی قرار نگرفت، حضور مواد غذایی در ماتریکس ژلی باعث بهبود تمام صفات دیگر شد. استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس آلژینات نیز اثر مشابهی داشت اما میزان جوانه‌زنی و ریشه‌دهی ریزنمونه‌های کپسوله شده را تحت تأثیر قرار نداد (شکل ۱). روت و همکاران (Rout *et al*., 2001) گزارش دادند که رشد بذرهای مصنوعی *Plumbago zeylanica* L. در دانه‌های آلژینات تهیه شده با محیط MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد نسبت به محیط MS دارای تنظیم‌کننده‌های رشد، آهسته‌تر صورت انجام می‌شود. همچنین دانسو و فوردلوید (Danso and Ford-Loyed, 2003) نشان دادند که حضور سیتوکینین (BAP) و اکسین (NAA) در ماتریکس آلژینات توسعه اولیه شاخه از قطعات گره کپسوله شده *Manihot eseulenta* را افزایش داد.

ژل آلژینات سدیم علاوه بر محافظت ریزنمونه‌ها از آسیب مکانیکی، می‌تواند حاوی مواد غذایی، تنظیم‌کننده‌های رشد، آنتی‌بیوتیک‌ها، قارچ‌کش‌ها و سایر موادی باشد که بدون تأثیر نامطلوب روی ریزنمونه‌های کپسوله شده جوانه‌زنی، رشد و بقا آن‌ها را افزایش دهد. در منابع مختلف افزودنی‌های متفاوتی جهت افزایش میزان جوانه‌زنی و بقا و همچنین جلوگیری از آلودگی با ژل کپسوله کننده تلفیق شده است. میزان باززایی و بقای بذرهای مصنوعی تحت تأثیر ترکیب ماتریکس آلژینات قرار گرفته و افزودن ترکیبات کمکی باعث بهبود رشد ریزنمونه‌های کپسوله شده می‌شود (Badr-Elden, 2013).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- میانگین مربعات مقایسات مستقل جهت بررسی تأثیر کپسوله کردن و استفاده از مواد مختلف در ماتریکس کپسول‌ها در بذرهای مصنوعی جنین‌های سوماتیکی

Table 3. Mean squares of orthogonal comparisons to study effect of encapsulation and alginate matrix compositions in somatic embryos of sunflower synthetic seeds

		میانگین مربعات MS							
مقایسات Comparisons	درجه آزادی df.	درصد ریشه‌دهی Rooting percent	درصد جوانه‌زنی Germination percent	تعداد شاخه جانبی Number of axillary shoot	طول ریشه Root length	عرض برگ Leaf width	طول برگ Leaf length	تعداد برگ Leaf number	طول شاخه Shoot height
1	1	1333.33**	1251.30**	3.89**	704.86**	2.48**	6.81**	61.27**	9.91**
2	1	41.66**	166.66^{ns}	8.62**	4649.47**	8.37**	368.53**	209.06**	6012.35**
3	1	0.00^{ns}	0.00^{ns}	10.15**	48.65**	5.47**	87.83**	60.37**	43.31**

** و ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و غیر معنی‌دار.

** and ns: Significant at 1% probability level and not significant, respectively.

۱: جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده در مقایسه با شاهد (جنین‌های سوماتیکی کپسوله نشده)

۲: استفاده از مواد غذایی MS در ماتریکس آلژینات در مقایسه با عدم وجود مواد غذایی MS

۳: استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس آلژینات در مقایسه با عدم وجود تنظیم‌کننده‌های رشد

1. Encapsulated somatic embryos vs. control (non-encapsulated somatic embryos).
2. Presence of MS nutrients vs. absence of MS nutrients in alginate matrix.
3. Presence of plant growth regulators vs. absence of plant growth regulators in alginate matrix.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱- a)جنین‌زایی سوماتیکی در بذرهای نابالغ آفتابگردان، b)کپسوله کردن جنین‌های سوماتیکی در آلژینات سدیم، c)جوانه‌زنی و رشد بذرهای مصنوعی، d) مقایسه تأثیر ماتریکس آلژینات بر میزان رشد بذرهای مصنوعی (به ترتیب از راست به چپ، جنینی‌های سواتیکی کپسوله نشده، جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده در ماتریکس آلژینات حاوی آب مقطر، جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده در ماتریکس آلژینات حاوی محیط MS و جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده در ماتریکس آلژینات حاوی محیط MS و هورمون‌های گیاهی)، e)انتقال گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی به شرایط بیرون شیشه‌ای، f)برداشتن کلاهک و انتقال به گلدان‌های بزرگ‌تر

Fig. 1. a) somatic embryogenesis in immature sunflower seeds, b) somatic embryos encapsulated in sodium alginate, c) seed germination and growth of artificial seeds, d) the effect of alginate matrix on the development of artificial seeds (in order from left to right, not encapsulated somatic embryos, somatic embryos encapsulated in alginate matrix containing distilled water, somatic embryos encapsulated in alginate matrix containing MS medium and somatic embryos encapsulated in alginate matrix containing MS medium and plant hormones), e) transfer of seedlings from germination of synthetic seed to exvitro conditions, f) remove the cap and transfer to larger pots.

سازگاری و انتقال به گلخانه

تجزیه واریانس میزان سازگاری و قدرت رشد گیاهچه‌ها (جدول ۴) نشان داد که درصد سازگاری گیاهچه‌های حاصل از جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده فقط تحت تأثیر نوع ماتریکس قرار داشت و اختلاف بین هیبریدها و نیز اثر متقابل هیبرید × ماتریکس از نظر درصد سازگاری غیر معنی‌دار بود.

اختلاف بین هیبریدها از نظر هفت صفت دیگر به جز تعداد ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اختلاف بین ماتریکس‌ها از نظر تمامی صفات مورد بررسی نیز در سطح

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- تجزیه واریانس هیبریدها و ماتریکس‌های آلژینات سدیم از نظر میزان سازگاری و صفات مختلف در جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده و کپسوله نشده آفتابگردان

Table 4. Analysis of variance of hybrid and matrix in encapsulated and non-encapsulated somatic embryos of sunflower for compatibility percent and different traits

			میانگین مربعات MS							
S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	درصد سازگاری Compatibility percent	وزن تر Fresh weight	تعداد ریشه Root number	طول ریشه Root length	عرض برگ Leaf width	طول برگ Leaf length	تعداد برگ Leaf number	طول شاخه Shoot height
Hybrid (H)	هیبرید	1	1.1993^{ns}	6.5407^{**}	0.2083^{ns}	4028.85^{**}	37.77^{**}	244.83^{**}	12.10^{**}	1539.08^{**}
Matrix (M)	ماتریکس	3	6.8443^{**}	15.8143^{**}	2.1187^{**}	6928.79^{**}	209.93^{**}	821.70^{**}	71.80^{**}	5616.51^{**}
H × M	هیبرید × ماتریکس	3	0.775^{ns}	0.7527^{**}	0.1601^{*}	1197.78^{**}	0.9956^{ns}	88.24^{**}	13.36^{**}	1271.39^{**}
Error	اشتباه آزمایشی	32	0.8112	0.0005	0.0506	5.67	1.2068	2.47	1.25	6.94
C. V. (%)	درصد ضریب تغییرات		9.57	0.97	0.07	2.66	6.23	4.24	7.16	2.06

ns، * و ** : به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

ns,* and **: Not significant, significant at 5% and 1% levels of probability, respectively.

www.SID.ir

Archive of SID

احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل هیبرید × ماتریکس نیز از نظر هفت صفت مورد بررسی به جز عرض برگ معنی‌دار بود. گیاهچه‌های حاصل از جنین‌های سوماتیکی کپسوله نشده و جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده در ماتریکس حاوی مواد غذایی MS بعد از انتقال به اتاق سازگاری به طور کامل استقرار یافتند.

میزان سازگاری (جدول ۴) به هنگام استفاده از آب مقطر در تهیه ژل آلژینات سدیم کاهش پیدا کرد (۶۰ درصد در هیبرید آذرگل و ۸۰ درصد در هیبرید فرخ)، به طوری که تعداد زیادی از گیاهچه‌ها بعد از انتقال به شرایط بیرون شیشه‌ای از بین رفتند که می‌توان دلیل آن را عدم وجود مواد غذایی برای ایجاد گیاهچه‌های قوی و سیستم ریشه‌ای مناسب عنوان کرد، به علاوه در این ماتریکس تا حدی شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها مشاهده شد. این گیاهچه‌ها بعد از انتقال به محیط بیرون شیشه‌ای به علت کاهش شدید میزان رطوبت، از بین رفتند. در سایر گیاهچه‌ها نیز تعدادی از برگ‌ها از بین رفتند اما بعد از استقرار گیاه برگ‌های جدیدی روی گیاهچه‌ها ظاهر شد.

گیاهچه‌هایی که در شرایط درون شیشه‌ای رشد خوبی داشته و قوی‌تر بودند پس از انتقال به شرایط بیرون شیشه‌ای نیز رشد بهتری داشتند. برگ‌های گسترش‌یافته و بزرگ‌تر در ریزنمونه‌های کپسوله شده در ماتریکس حاوی مواد غذایی در مقایسه با برگ‌های بیش‌تر اما کوچک‌تر حاصل از ریزنمونه‌های کپسوله شده در آلژینات سدیم حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد، در شرایط بیرون شیشه‌ای پایدارتر بوده و از گیاهچه تا ظهور برگ‌های جدید حمایت کردند، در مقابل سیستم ریشه‌ای گسترده‌تر و قوی‌تر گیاهچه‌های حاصل از ماتریکس ژلی حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد نیز به جذب مواد غذایی، استقرار و رشد گیاهچه‌ها در شرایط بیرون شیشه‌ای کمک کرد. در این آزمایش میانگین استقرار گیاهچه‌ها پس از انتقال به محیط بیرون شیشه‌ای ۸۹/۳ درصد بود. سینگ و همکاران (Singh *et al.*, 2006) استقرار ۹۰ درصدی و شارما و شهزاد (Sharma and Shahzad, 2012) نیز استقرار ۸۰ درصدی را پس از انتقال گیاهچه‌های حاصل از بذرهای مصنوعی به محیط بیرون شیشه‌ای، به ترتیب در *Phyllanthus amarus* و *Decaepis hamilttoni* گزارش کردند.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها (جدول۵) نیز نشان داد که حضور مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس آلژینات سدیم باعث تولید گیاهچه‌های با ویژگی‌های رشد بهتر شد. این گیاهچه‌ها پس از انتقال به محیط بیرون شیشه‌ای میزان رشد در آن‌ها بیش‌تر بود. هرچند قدرت بقا و سازگاری در گیاهچه‌های حاصل از کپسول‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد کم‌تر بود (۸۵ درصد در هیبرید آذرگل و ۹۰ درصد در هیبرید فرخ) اما حضور تنظیم‌کننده‌های رشد

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل هیبرید و ماتریکس بر استقرار و رشد گیاهچه‌های آفتابگردان حاصل از جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده و کپسوله نشده بعد از انتقال به شرایط بیرون شیشه‌ای

Table 5. Mean comparison of interaction of hybrid and matrix on eatablishment and growth of encapsulated and non-encapsulated somatic embryos after transferred to *ex vitro*

Treatment تیمار			Mean میانگین صفات							
Hybrid هیبرید	Matrix	ماتریکس	درصد سازگاری compatibility percent	وزن تر Fresh weight	تعداد ریشه Root number	طول ریشه Root length	عرض برگ Leaf width	طول برگ Leaf length	تعداد برگ Leaf number	طول شاخه Shoot height
آذرگل Azargol	Control	شاهد	100a	1.89e	4.8c	97.44c	17.45d	46.05a	15.0cd	122.47d
	DDW	آب مقطر	60b	0.97g	4.4c	60.21f	10.33f	24.90e	3.8d	94.19f
	MS		100a	4.27a	7.0b	117.95b	21.56b	46.38a	18.8bc	152.05b
	MS + PGR	MS + هورمون	85a	3.62b	8.4a	123.30a	17.26d	41.82bc	17.0a	165.69a
فرخ Farrokh	Control	شاهد	100a	1.47f	4.6c	73.15e	19.13c	31.77d	13.8d	118.91e
	DDW	آب مقطر	80a	0.72h	2.4d	50.17g	12.24e	23.44e	11.0e	95.30f
	MS		100a	3.01c	7.0b	77.75d	22.91a	42.50b	16.2bc	134.56c
	MS + PGR	MS + هورمون	90a	2.32d	8.4a	117.75b	20.09c	40.47c	19.2c	136.37c

میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است

Means with different letters in each column are significantly different at 5% level of probability according to Duncan's multiple rang test.

www.SID.ir

Archive of SID

باعث تولید گیاهچه‌های با خصوصیات رشدی بهتر شد، چون این گیاهچه‌ها دارای سیستم ریشه‌ای گسترده‌تری بودند که باعث بهبود استقرار آن‌ها و افزایش جذب مواد غذایی شد (با میانگین تعداد ۸/۴ ریشه در بوته در دو هیبرید و ریشه‌هایی به طول ۱۲۳/۳ میلی‌متر در هیبرید آذرگل و ۱۱۷/۷ میلی‌متر در هیبرید فرخ).

یکی از مهم‌ترین موضوعات در تولید بذر مصنوعی تهیه آندوسپرم مصنوعی مناسب است که به عنوان منبع انرژی در طی کاشت و نگهداری به کار می‌رود. نتایج تحقیقات نشان داده است که برای کنترل رشد و سهولت جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی، مواد کپسوله کننده، مشابه آندوسپرم با منشأ جنسی می‌تواند حاوی یک یا چندین ترکیب باشد. این مواد می‌تواند شامل مواد مغذی، تنظیم‌کننده‌های رشد، آنتی پاتوژن‌ها، علف‌کش‌ها، کنترل‌کننده‌های زیستی، بیوکودها و مواد دیگر به منظور اطمینان از تبدیل جنین به گیاه و توسعه آن در مزرعه باشد. وجود این مواد رشد را کنترل کرده و جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی را تسهیل می‌کند. در مطالعه حاضر نیز حضور مواد غذایی MS و تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس ژلی جوانه‌زنی و رشد بذرهای مصنوعی را بهبود داد، حضور مواد غذایی منجر به تولید گیاهچه‌های قوی با برگ‌های گسترده شد که این گیاهچه‌ها قدرت استقرار بهتری در شرایط بیرون شیشه‌ای داشتند در حالی که حضور تنظیم‌کننده‌های رشد باعث افزایش شاخه‌زایی جانبی و تولید سیستم ریشه‌ای بهتر در گیاهچه‌ها شد. در مجموع استفاده از مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد بسته به هدف کاربرد گیاهچه‌های حاصل توصیه می‌شود. در شرایطی که تولید تعدادی زیاد گیاهچه در مدت زمان کمتر مد نظر باشد استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس ژلی توصیه می‌شود اما هنگامی که هدف تحویل گیاهچه‌ها به شرایط بیرون شیشه‌ای باشد استفاده از مواد غذایی MS در ماتریکس ژلی گیاهچه‌های قوی تولید خواهد کرد. نتایج حاصل از این آزمایش و باززایی موفقیت آمیز گیاه از جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده می‌تواند برای توسعه روش ت ولید بذر مصنوعی به عنوان یک روش باززایی موفقیت آمیز در راستای کاربرد روش‌های بیوتکنولوژی برای اصلاح، تکثیر و نگهداری ژنوتیپ‌های نادر گیاه روغنی آفتابگردان مفید باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

Antonietta, G. M., Micheli, M., Pulcni, L., and Standardi, A. 2007. Perspectives of the encapsulation technology in the nursery activity of *Citrus*. Caryologia 60: 192-195.

Arun Kumar, M. B., 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.

Badr-Elden, M. A. 2013. An effective protocol for invitro storage and *ex vitro* re-growth of strawberry capsules. Atlas Journal of Chemistry & Biochemistry 1: 30-38.

Bapat, V. A., and Rao, P. S. 1990. *In vivo* growth of encapsulated axillary buds of mulbury (*Morus indica* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20: 67-70.

Castillo, B., Smith, M. A. L., and Yadava, U. L. 1998. Pant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. Plant Cell Reports 17: 172-176.

Danso, K. E., and Ford-Lloyd, B. V. 2003. Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of cassava germplasm. Plant Cell Reports 21: 718-725.

Fernandez-Martinez, J. M., Perez-Vich, B., Velaso, L., and Dominguez, J. 2007. Breeding for specialty oil types in sunflower. Helia 30: 75-84.

Finer, J. J. 1987. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on high sucrose- containing medium. Plant Cell Reports 6: 372-374.

Fiore, M. C., Tabacc, T., and Sunseri, F. 1997. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 16: 295-298.

Gurel, E., and Kazan, K. 1998. Development of an efficient plant regeneration system in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Turk Journal of Botanical Science 22: 381-387.

Honda, Y., Mukasa, Y., and Suzuk, T. 2005. Traits of NuSunTM varieties of sunflower in Hokkaido. Japanese. Plant Production Science 8: 461-464.

Huda, A. K. M. N., and Bari, M. A. 2007. Production of synthetic seed by encapsulating asexual embryo in eggplant (*Solanum melongena* L.). International Journal of Agricultural Research 2: 832-837.

Micheli, M., Mencuccini, M., and Standardi, A. 1998. Encapsulation of *in-vitro* proliferated buds of olive. Advance in Horticultural Sciences 12: 163-168.

www.SID.ir

Archive of SID

Pattnaik, S. K., and Chand, P .K. 2000. Morphogenic response of the alginate encapsulated axillary buds from *in vitro* shoot cultures of six mulberries. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 177-185.

Redenbaugh, K., Nichol, J., Kossler, M. E., and Paasch, B. 1984. Encapsulation of somatic embryos of hybrid for artificial seed production. *In vitro* 20: 256-257.

Rout, G. R., Das, D., Samantaray, S., and Das, P. 2001. Micropropagation of *Plumbago zeylanica* L. by encapsulated nodal explants. Horticultural Science and Biotechnology 76: 24-29.

Sakamoto, Y., Mashiko, T., Suzuki, A., and Kawata, H. 1992. Development of encapsulation technology for synthetic seeds. Acta Horticulturae 319: 71-76.

Sharma, S. H., and Shahzad, A. 2012. Encapsulation technology for short- term storage and conservation of woody climber *Decaepis hamilttoni* Wight and Arn. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 111: 191-198.

Singh, S. K., Rai, M. K., Asthana, P., Pandey, S., Jaiswal, V. S., and Jaiswal, U. 2009. Plant regeneration from alginateencapsulated shoot tips of *Spilanthes acmella* L. Murr. A medicinally important and herbal pesticidal plant species. Acta Physiologiae Plantarum 31: 649-653.

Singh, A. K., Sharma, M., Varshney, R., Agarwal, S. S., and Bansal, K. C. 2006. Plant regeneration from alginate- encapsulated shoot tips of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn, a medicinally important plant species. *In Vitro* Cell Development-Plant l42: 109-115.

Tsvetkov, I., Jouve, L., and Hausman, J. E. 2006. Effect of alginate matrix composition on regrowth of *in vitro* derived encapsulated apical microcuttings of hybrid aspen. Biology of Plant 50: 722-724.

Williams, E. G., and Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Annals of Botany 57: 443-462.

Zeynali, M., Maleki Zanjani, B., Saba, J., Niaazkhani, M., Ghaderian, M., Eivazi, A., and Mousavi-Anzabi, S. H. 2013. *In vitro* plant regeneration from alginate-encapsulated somatic embryos of rapeseed (*Brassica napus* cv. Tallayeh). International Journal of Traditional and Herbal Medicine 1: 13-18.

www.SID.ir