القای تشکیل شاخساره بر روی رویان‌های جداکشت کاج تهران (*Pinus eldarica*)

علی موافقی*، محبوبه علی اصغر پور، مجتبی هادی، فاطمه اعتدالی
تبریز گروه زیست شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، ایران
* مسئول مکاتبات- آدرس الکترونیکی: *movafeghi@tabrizu.ac.ir*
(دریافت: ۸۶/۲/۴ ؛ پذیرش: ۸۷/۲/۳۱)

چکیده

اثر محیط‌های کشت و غلظت‌های متفاوت بنزیل آمینوپورین (BAP) در تشکیل مستقیم شاخساره نابجا بر روی رویان‌های جداکشت کاج تهران (*Pinus eldarica*) مورد مطالعه قرار گرفت. تجزیه آماری داده‌های بدست آمده اثر معنی‌دار نوع محیط کشت و غلظت BAP را در القای مریستم‌های شاخساره نشان داد. در میان محیط‌های کشت مورد استفاده، محیط کشت له‌پویوره (LP) دارای پنج میلی‌گرم در لیتر BAP مناسب‌ترین اثر را در تشکیل شاخساره‌های نابجا داشت. تولید شاخساره بدون گذر از تشکیل بافت کالوس حدواسط، مستقیماً بر روی جنین و عمدتاً در پای برگ‌های لپه‌ای مشاهده شد. مطالعات بافت‌شناختی نشان دادند که تولید شاخساره با تشکیل مستقیم مریستم شاخساره و یا گرهک‌های شاخه‌زا در سطح رویان‌ها صورت می‌گیرد. ساختارهای مریستمی تشکیل شده دارای سازمان بافتی متعارف و قابل مقایسه با مریستم کاج‌ها در شرایط طبیعی بودند. روش آزمایشگاهی بدست آمده می‌تواند برای مطالعات باززایی کاج تهران مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: کاج تهران، کشت رویان، تشکیل شاخساره، بنزیل آمینوپورین، محیط کشت

مقدمه

کاج تهران (*Pinus eldarica* Med.) از درختان بازدانه با رشد سریع مناطق نیمه خشک است که اهمیت زینتی و صنعتی قابل توجهی در ایران دارد. تکثیر رویشی این گونه همانند سایر بازدانگان به دشواری صورت می‌گیرد. روش‌های تکثیر درون‌شیشه‌ای نظیر تولید کالوس، باززایی گیاه از قطعات جداکشت، رویان‌زایی بدنی، جداسازی پروتوپلاست و کشت در محیط‌های مایع که برای بسیاری از گونه‌های گیاهی روش‌های آزمایشگاهی متعارف به شمار می‌روند، هنوز در مورد این گونه درختی همانند اکثر گونه‌های کاج با مشکلات تکنیکی و کاربردی متعددی روبرو هستند (Bergmann & Stomp 1992, Stasolla & Yeung 2003).

تولید شاخساره‌های نابجا در محیط‌های کشت یکی از مراحل مهم و دشوار در باززایی بازدانگان به شمار می‌رود. در این مطالعات بافت‌های جداکشت متفاوتی نظیر قطعات هیپوکوتیل، برگ‌های لپه‌ای و جوانه‌های انتهایی و جانبی گونه‌های کاج برای القای شاخساره مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Moncalean *et al.* 2005 ، Prehn *et al.* 2003, Parasharmi *et al.* 2003) . در اکثر این آزمایشات قطعات جداکشت تحت تاثیر تیمارهای هورمونی کالوس تولید کرده‌اند و سپس بر روی کالوس‌ها شاخساره ایجاد گردیده است. با اینحال، تولید و نگهداری کالوس‌های مناسب و ایجاد فعالیت مریستمی در آنها بهینه نبوده و تکرار پذیری نتایج نیز نسبتاً پایین بوده است (Ramarosandratana & Staden 2003, Stasolla *et al.* 2007, Tang *et al.* 2006) .

بدلیل مشکلاتی که در انتخاب ریزنمونه مناسب وجود دارد در سالهای اخیر در بیشتر مطالعات انجام شده در زمینه کشت بافت بازدانگان ترجیح داده می‌شود که از جنین رسیده بعنوان قطعه جداکشت استفاده شود. با این وجود، هنوز در مورد محیط کشت جنین کاج‌ها اتفاق نظر وجود ندارد. برخی گزارشها حاکی از این است که جنین سوزنی‌برگان در محیط‌های کشت با نصف غلظت رشد بهتری دارند (Schestibratov *et al.* 2003, Bergmann & Stomp 1992). اثرات بازدارنده آمونیوم و اثر تحریک کننده منگنز نیز روی رشد جنین برخی کاج‌ها مشاهده شده است (Kaul & Hoffman 1993, Stang *et al.* 1999). از طرف دیگر تاثیر تیمارهای هورمونی بر روی رشد جنین سوزنی برگان نیز از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است (Valdes *et al.* 2001, Pullman *et al.* 2005). مطالعه مقایسه‌ای بر روی رویان‌های جداکشت کاج‌ها نشان داده است که برخی از گونه‌ها نظیر *Pinus radiata* D.Don و *Pinus eldarica* دارای قابلیت بیشتری در جهت تولید بافت مریستمی قابل واکشت هستند (Bergmann & Stomp 1992). اخیرا

Archive of SID

www.SID.ir

تولید گیاهک با استفاده از جنین‌های جداکشت برای گونه‌های دیگری نظیر *Pinus virginia* Mill.، *Pinus taeda* L. و *Pinus strobus* L. گزارش گردیده است (Tang & Newton 2004; Tang *et al.* 2001, 2005).

رویان‌های جداکشت در بازدانگان می‌توانند همانند سایر گونه‌ها به دو طریق شاخه‌های نابجا تولید کنند. در اکثر مطالعات تشکیل گرهک‌های شاخه‌زا بطور غیر مستقیم، یعنی پس از تشکیل کالوس و بر روی آن، صورت می‌گیرد (Schestibratov *et al.* 2003; Tang & Newton 2005; Tang *et al.* 2006). بدیهی است که در این شرایط امکان تنوع سوماکلونی بالا است و این آزمایشات برای تکثیر رویشی ژنوتیپ‌های معین چندان مناسب نمی‌باشد. از طرف دیگر برای تولید کالوس معمولا مدت زمان نسبتاً طولانی در حدود چند ماه مورد نیاز است. طریقه دوم که در شرایط آزمایشگاهی دشوارتر است، تشکیل مستقیم مریستم‌های شاخساره بر روی رویان‌های جداکشت می‌باشد. تولید شاخساره مستقیم با سرعت بالاتری صورت می‌گیرد و با توجه به پایین بودن تغییرات سوماکلونال برای ریزازدیادی بسیار با ارزش است (Tang *et al.* 2004).

در این پژوهش روش‌های تشکیل مستقیم مریستم‌های شاخساره بر روی رویان‌های بالغ جداکشت کاج تهران در محیط‌های کشت و تیمارهای هورمونی متفاوت مورد بررسی قرارگرفته است. همچنین نحوه تشکیل و ساختار مریستم‌های نابجا با استفاده از روش‌های بافت شناختی مطالعه شده‌اند.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت آزمایشگاهی: بذرهای کاج تهران با استفاده از اتانل ۹۶ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه سترون گردیدند و سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند. پس از شکستن پوسته بذرها، آندوسپرم آنها برش داده شد و رویان‌های بالغ پس از جداسازی روی محیط‌های کشت قرار گرفتند. محیط‌های کشت مورد استفاده در این بررسی موراشیج و اسکوگ (Murashige and Skoog) MS، MS/2 (MS با نصف غلظت)، لپه پویوره (Le Poivre) LP، LP/2 (محیط کشت LP با نصف غلظت) و گامبورگ (Gamborg) تغییر یافته MB5 بودند (۲۴). با توجه به موثر بودن ۶-بنزیل آمینوپورین (BAP) در ایجاد شاخساره در سایر بازدانگان (Bergmann & Stomp 1992)، این هورمون به عنوان سیتوکینین در هر یک از محیط‌های کشت با غلظتهای ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر در کنار تیمار شاهد بدون هورمون بکار گرفته شد. pH محیط کشت روی ۰/۰۵ ± ۵/۷ تنظیم گردید و عمل سترون کردن در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۱۸ دقیقه انجام پذیرفت. حجم ۱۰ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت در ۴ تکرار در پتری‌دیش‌های یکبار مصرف سترون با ابعاد ۱/۲ × ۶ سانتی‌متر توزیع شدند و در هر ظرف ۳ جنین بالغ قرار داده شد. نمونه‌ها در اطاقک رشد در شرایط نوری حدود ۲۴۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

ارزیابی آماری نتایج: بعد از گذشت چهار هفته از شروع کشت، نمونه ها زیر لوپ مطالعه شدند و برای هر محیط کشت میانگین میزان تولید شاخساره از ۰-۴ تعیین گردید. میزان صفر زمانی بود که القای شاخساره صورت نگرفت و سپس به ازای هر ۴ شاخساره تشکیل شده یک واحد به آن افزوده شد. محاسبه شاخص شاخساره با استفاده از فرمول زیر انجام پذیرفت (Wakhlu & Barna 1989).

$$\text{شاخص شاخسار} = \frac{\text{میانگین میزان تولید شاخساره} \times \text{تعداد قطعات شاخه داده}}{\text{تعداد کل}} \times ۱۰۰$$

تجزیه واریانس اثرات فاکتورهای رشد روی شاخص شاخساره به صورت آزمایش فاکتوریل ۵×۵ (نوع محیط کشت × غلظت BAP) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی از طریق نرم افزارهای SAS و MSTATC صورت گرفت. در صورت معنی دار بودن اثرات متقابل، این اثرات به اثرات ساده هر فاکتور در سطوح فاکتور دیگر تجزیه شده و میانگین آنها دو به دو مورد مقایسه قرار گرفت.

مطالعات بافت‌شناختی: رویان‌های رشد یافته در محیط کشت LP دارای ۵ میلی گرم در لیتر BAP انتخاب شدند و پس از تهیه برش‌های دستی، به رنگ‌آمیزی آنها با استفاده از معرف کارمن و سبزمتیل مبادرت گردید. در مطالعات تکمیلی، تثبیت نمونه‌ها با استفاده از محلول فیکساتیو FAA به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. عمل آبگیری در چند مرحله با استفاده از محلول‌های اتانل با غلظت‌های فزاینده صورت گرفت و پس از جایگزین نمودن اتانل با گزیلول، پارافین‌دهی و قالب‌گیری انجام شد. پس از تهیه مقاطع میکروسکوپی به ضخامت ۸ میکرومتر با استفاده از میکروتوم برقی، رنگ آمیزی آنها با روش سافرانین سبز تند انجام شد و نمونه‌ها توسط میکروسکوپ Nikon E-1000 مورد مطالعه قرار گرفتند.

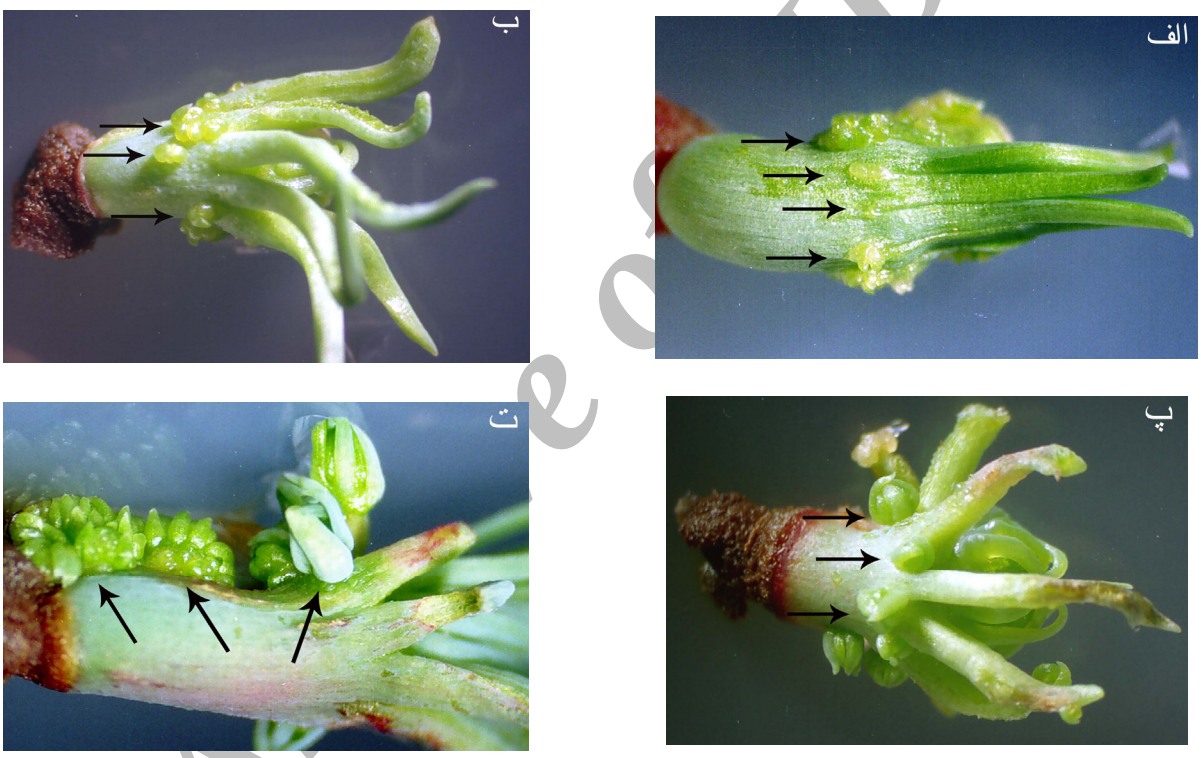
Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

اثر نوع محیط کشت و غلظت BAP روی رویان‌های جداکشت

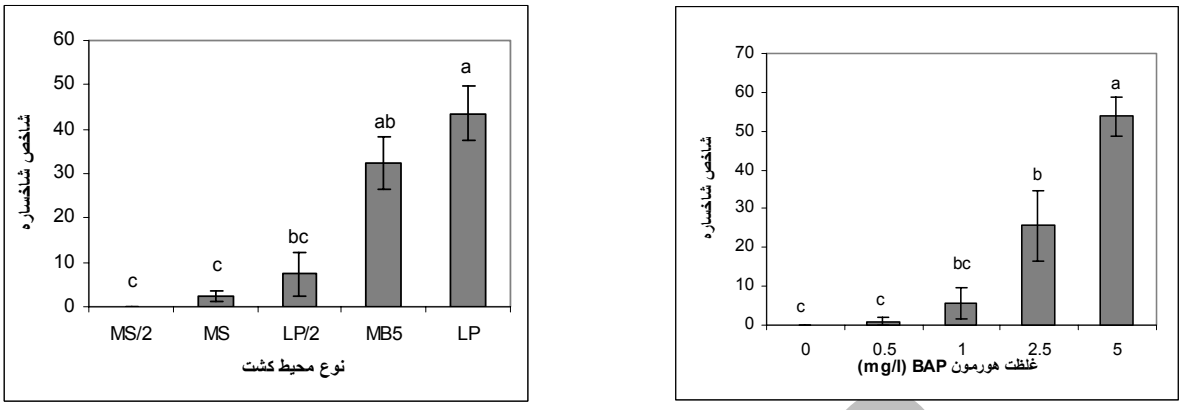
در تمامی محیط‌های کشت بکار رفته و در حضور منحصراً BAP هیچگونه کالزایی در ناحیه محور زیرلپه، محور روی لپه و برگهای لپه‌ای مشاهده نگردید. فقط در منطقه ریشه‌چه برخی از رویان‌ها توده سلولی قهوه‌ای رنگی با رشد محدود پس از سه هفته قابل ملاحظه بود. در تیمارهای شاهد یعنی در محیط های فاقد هورمون، رویان‌ها در ناحیه هیپوکوتیل رشد طولی قابل ملاحظه‌ای نشان دادند و بر طول برگ‌های لپه‌ای نیز افزوده شد. با افزایش غلظت BAP رشد طولی رویان‌ها کمتر شده و در ناحیه هیپوکوتیل تورم نسبی مشاهده شد. پس از هفته دوم در محیط کشت LP و به مقدار کمتر MB5 در تیمارهای دارای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP تشکیل گرهک‌های سبز در سطح هیپوکوتیل و غالبا در پایه برگ‌های لپه‌ای مشاهده گردید (شکل ۱-الف و ۱-ب). این گرهک‌ها بطور مستقیم بر روی رویان‌ها و بدون گذشتن از مرحله کالوس بوجود آمدند. در برخی از رویان‌های جداکشت تعدادی از ساختارهای مشابه نیز در بخش راسی برگ‌های لپه‌ای مشاهده شد. پس از گذشت چهار هفته اندازه گرهک‌ها افزایش یافته و تمایز برگ‌های سوزنی شکل قابل مشاهده بود که پس از این مدت و با واکشت رویان‌ها نیز رشد آنها ادامه می‌یافت (شکل ۱-پ و ۱-ت).



شکل۱- الف و ب: تشکیل گرهک پس از دو هفته بر روی رویان‌های جداکشت در پای برگ‌های لپه‌ای در محیط کشت LP، پ و ت: تمایزیابی برگ‌های سوزنی پس از چهار هفته در ناحیه گرهک‌ها.

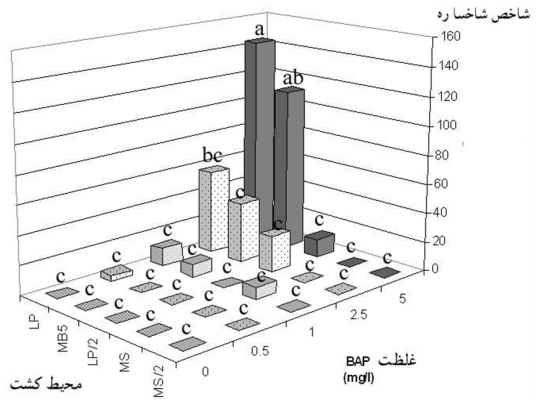
محاسبه میانگین شاخص شاخساره و تجزیه واریانس آن معنی‌دار بودن اثر نوع محیط کشت و غلظت هورمون سیتوکینین بکار رفته شده و همچنین اثرات متقابل آنها را بر روی این شاخص نشان داد (جدول ۱). در واقع سطوح مختلف هورمونی در محیط‌های کشت متفاوت، اثر معنی‌داری روی شاخص شاخساره در سطح احتمال ۰/۰۵ داشتند و بنابراین اثرات ساده هر فاکتور در سطوح فاکتور دیگر تجزیه شدند. با مقایسه میانگین مربوط به محیط‌های کشت در مشخص گردید که بیشترین میانگین شاخص شاخساره در محیط کشت LP و کمترین مقدار آن در محیط‌های کشت MS و MS/2 دیده می‌شود (شکل ۲). بررسی اثرات غلظت‌های BAP نیز نشان داد که تیمار واجد ۵ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون بکار رفته دارای بیشترین میانگین محاسبه شده است (شکل ۲).

www.SID.ir



شکل ۲- اثر محیط‌های کشت و سطوح هورمون BAP بر شاخص شاخساره. غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط کشت LP بیشترین مقدار شاخص را القا نموده‌اند.

با بررسی نتایج حاصل از ترکیب تیماری نوع محیط کشت و غلظت سیتوکینین نیز مشخص گردید که محیط کشت LP دارای ۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بالاترین مقدار شاخص شاخساره را بخود اختصاص داده است. به عبارت دیگر بیشترین القای تشکیل شاخساره در این محیط کشت انجام پذیرفته است (شکل ۳).



شکل ۳- اثر سطوح مختلف BAP در محیط‌های کشت مختلف بر میانگین شاخص شاخساره.

ویژگی‌های بافت‌های مریستمی: به منظور تعیین نوع و ساختار تشریحی گرهک‌های شکل گرفته روی جنین به بررسی بافت‌شناختی این بخش‌ها مبادرت گردید. مطالعات نشان دادند که در سطح رویان‌ها دو گروه از بافتها از همدیگر قابل تشخیص هستند. گروه اول مریستم‌های فعال شاخساره هستند که مستقیماً در سطح رویان و عمدتاً در محل هیپوکوتیل پای برگهای لپه‌ای بوجود می‌آیند (شکل ۴-الف و ۴-ب). گروه دوم گرهک‌هایی هستند که ساختار نسبتا کروی دارند و با گذشت زمان، پس از چهار هفته، در سطح آنها تعداد زیادی مریستم‌های شاخه‌زا بطور متراکم ظاهر می‌گردند (شکل ۴-پ و ۴-ت). به نظر می‌رسد مریستم‌های متعددی که در سطح گرهک‌های کروی ظاهر می‌شوند منشاء سطحی دارند زیرا هیچگونه ارتباطی با بافت‌های زیرین نشان نمی‌دهند. به عبارت دیگر اپیدرم گرهک و لایه های سلولی که بلافاصله در زیر آن قرار می‌گیرند، با تقسیمات خود منجر به تشکیل مریستم‌های فعال ساقه‌ای می‌گردند که با تقسیمات متعدد در اطراف خود پریموردیوم‌های برگی فراوانی تولید می‌کنند (شکل ۴-ث).

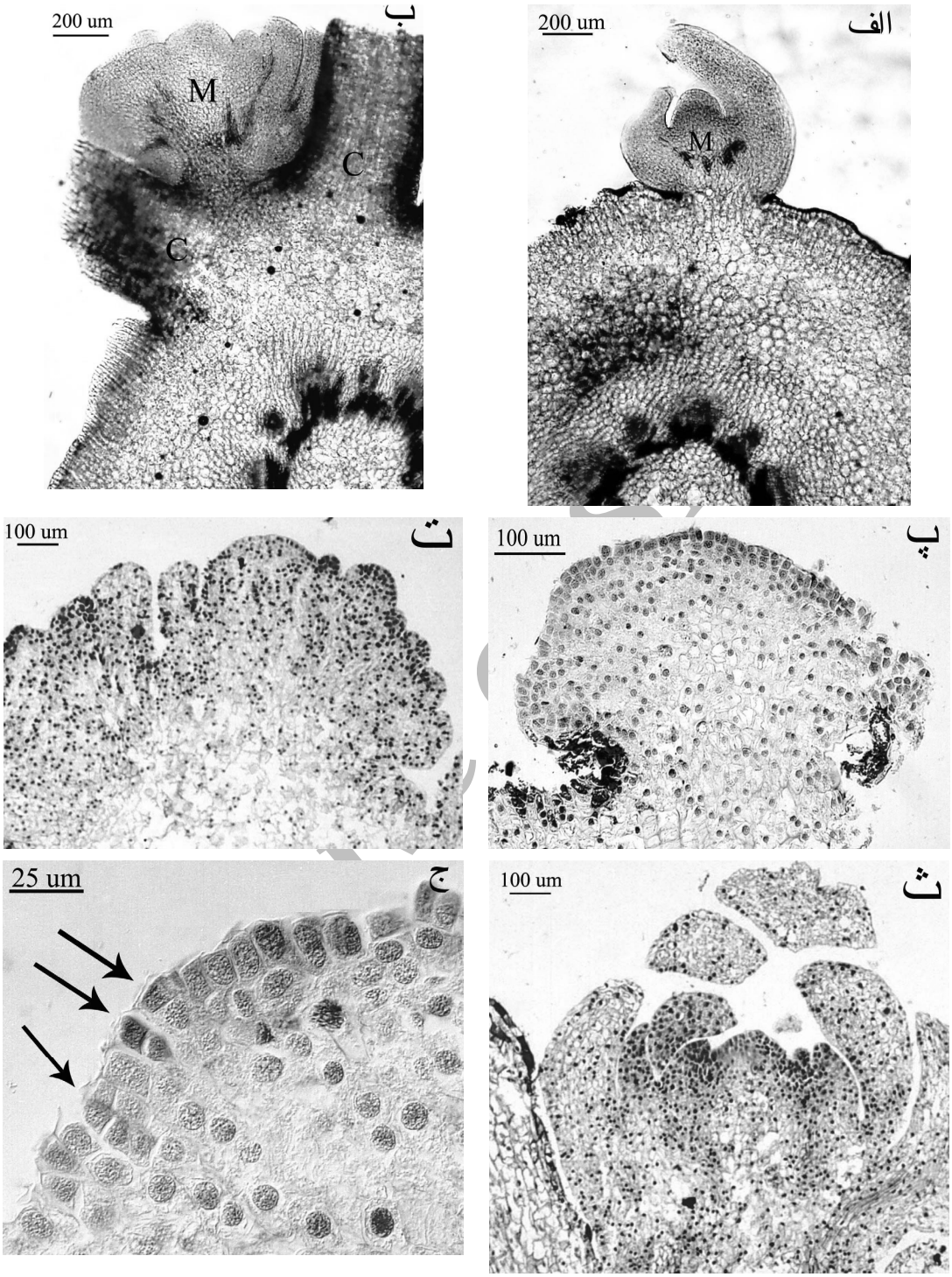
مطالعه بافت شناختی مریستم‌ها نشان دهنده وجود یک لایه تونیکا و چندین لایه کورپوس در زیر آن بود. سلول‌های تونیکا علاوه بر تقسیمات آنتی‌کلینال متعارف خود، به تعداد کمتر تقسیمات پری‌کلینال نیز نشان می‌دادند (شکل ۴-ج). وجود این نوع تقسیمات از ویژگی‌های مریستم‌های بازدانگان به شمار می‌رود و در مریستم‌های نابجای القا شده نیز بطور قابل مقایسه با بافت‌های مریستمی انتهای شاخه‌ها مشاهده گردید.

بحث

پژوهش‌های متعددی به بررسی اثر محیط کشت و هورمون‌های گیاهی در القای تشکیل مریستم‌های هوایی بر روی رویان‌های جداکشت بازدانگان پرداخته‌اند (Bergmann & Stomp 1992, Bonga 2004). با اینحال، با توجه به تعدد گونه‌ها و متفاوت بودن پاسخ گونه‌های مختلف به محیط‌های مورد استفاده، وجود تحقیقات بیشتر برای بدست آوردن شرایط بهینه همچنان ضروری می‌نماید.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴- بررسی بافت شناختی مریستمهای نوپدید، الف- مریستم شاخساره تشکیل شده پس از دو هفته مستقیماً بر روی محور زیرلپه جنین جداکشت، ب- مریستم شاخساره تشکیل شده در پای برگ‌های لپه‌ای با پریموردیوم‌های برگی متعدد، پ- برش عرضی گرهک تشکیل شده با اختصاصات مریستمی پس ازدو هفته بر روی محور زیر لپه جنین، ت- تشکیل مریستم‌های شاخساره متعدد در سطح گرهک پس از چهار هفته، ث- برش طولی از مریستم شاخساره رشد یافته با پریموردیوم‌های برگی در اطراف آن، ج- تقسیمات آنتی‌کلینال و پری‌کلینال (پیکان‌ها) در ناحیه تونیکای مریستم.
M: مریستم شاخساره، C : برگ‌های لپه‌ای.

www.SID.ir

در برخی از آزمایشات محیط کشت MS یا MS تغییر یافته (دارای نصف غلظت عناصرماکرو) بکار گرفته شده (Gladfelter & Phillips 1987) و در برخی دیگر محیط کشت اختصاصی نظیر LP و LP/2 برای کشت جنین برخی از کاجها نظیر *Pinus radiata* و *Pinus pinea* پیشنهاد گردیده است (Valdes *et al.* 2001, Schestibratov *et al.* 2003). در پژوهش حاضر با استفاده از محیطهای کشت مختلف و تیمارهای هورمونی تشکیل شده از منحصرا غلظتهای مختلف BAP، به عنوان یک سیتوکینین مقاوم به حرارت مورد نیاز برای سترون کردن، شرایط مناسب برای مهار تشکیل کالوس و القای مستقیم و سریع تعداد زیادی از مریستمهای رویشی بر روی رویان‌های بالغ کاج تهران در محیط کشت LP دارای پنج میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد. با توجه به تمایل زیاد رویان‌های جداکشت کاجها به تشکیل کالوس، معمولا تشکیل شاخساره با گذر از مرحله کالوس و بطور غیر مستقیم گزارش گردیده است که مستلزم واکشت‌های متعدد و مدت زمان نسبتا طولانی است (Schestibratov *et al.* 2003, Tang & Newton 2005). بر اساس گزارشاتی که در زمینه تولید شاخساره از کالوس‌های بدست آمده از قطعات هوایی دانه‌رست‌های کاج تهران وجود دارد، منحصراً کالوس‌های با عمر ۱۰ تا ۱۷ ماه بهترین پاسخ را به تیمارهای سیتوکینینی داده‌اند (Gladfelter & Phillips 1987). علت امر بر اساس مطالعات بافت شناختی کالوس‌های تولید شده، نیاز به مدت حداقل شش ماه برای تمایززدایی قطعات جداکشت و تولید سلول‌های نسبتا یکنواخت با ویژگی های مریستمی ذکر شده است. با افزایش سن کالوس‌ها تا ۳۶ ماه سلول‌های آنها سازمان‌یابی یکنواخت‌تری نشان می‌دهند اما قدرت تقسیم آنها کاهش می‌یابد. با توجه به اینکه یکی از اهداف کشت بافت بازدانگان و شاخه‌زایی کوتاه‌تر کردن زمان و تسریع عمل تکثیر آنها می‌باشد، تولید مریستم هوایی از کالوس روش چندان مطلوبی به نظر نمی‌رسد. از طرف دیگر واکشت-های مکرر انجام یافته که جهت مقابله با قهوه‌ای شدن و کند شدن تقسیمات سلولی و نیز تولید کالوس قابل واکشت به مدت طولانی در فواصل منظم انجام می‌گیرد امکان تنوع سوماکلونی را افزایش می‌دهد (Butorina *et al.* 1980, Rutledge & Douglas 1988). مواردی از چنین ناهنجاری‌های مشخص ژنتیکی، در کشت بافت سوزنی‌برگان گزارش شده است (Patel & Berlin 1982). با توجه به تمام این مشکلات، نتایج بدست آمده که شرایط تشکیل مریستمهای رویشی روی رویان‌های جداکشت کاج تهران را در مدت زمان بسیار کوتاه (کمتر از سه هفته) ارائه می‌نماید از نقطه نظر تکثیر آزمایشگاهی سریع این گونه حائز توجه می‌باشد.

قبلا در مطالعه مشابهی روی قطعات جداکشت برگ‌های لپه‌ای *Pinus pinea* تولید بطور متوسط ۱۶ جوانه نابجا بر پس از نه هفته و با دو بار واکشت در محیطهای کشت LP/2 دارای مقادیر متفاوتی سیتوکینین گزارش گردیده است (Gonzalez *et al.* 1998, Valdez *et al.* 2001). علی رغم وجود تفاوت در محیط کشت بهینه پیشنهادی، این داده‌ها با نتایج گزارش حاضر تا حدودی همسو می‌نماید، اما روش ارائه شده برای کاج تهران سریعتر و ساده‌تر است و در آن نیازی به واکشت‌های مکرر نبوده و تعداد نواحی مریستمی تولید شده نیز در شرایط بهینه بیشتر (تا بیش از سی عدد برای هر جنین) می‌باشد.

در آزمایشات مربوط به تولید کالوس‌های شاخه‌زا، همواره تشکیل تعداد محدودی ناحیه مریستمی بر روی بافت کالوس گزارش گردیده است و وجود تعداد کم نواحی مریستمی از مشکلات اصلی در این زمینه به شمار می‌رود. تصاویر مربوط به برش‌های بافت‌شناختی تهیه شده از آنها نیز نشانگر تعداد کم مریستم‌های هوایی با رشد کند بود که پس از گذشت دو ماه یک تا سه عدد پریموردیوم برگی در اطراف خود داشتند (Wagley *et al.* 1987). در پژوهش حاضر، پس از سه هفته تعداد مریستمهای رویشی القا شده بر روی جنین، بویژه بر روی گرهک‌ها، به مقدار قابل توجهی بیشتر و رشد آنها نیز قابل ملاحظه بود. این مطلب دال بر اثر مناسب محیط‌های بکار رفته برای القای تشکیل مریستمهای فعال بر روی رویان‌ها در مقایسه با مریستمهای القا شده بر روی کالوس‌ها می‌باشد. بنابراین می‌توان روش‌های بکار رفته جهت تولید مریستمهای رویشی بر روی جنین را برای تولید تعداد بالای شاخساره در آزمایشات مربوط به ریزازدیادی کاج تهران پیشنهاد نمود.

منابع:

Bergmann B., Stomp A. 1992: Influence of taxonomic relatedness and medium composition on meristematic nodule and adventitious shoot formation in nine pin species. *Can. J. For. Res*. **22:** 750-755.

Bonga J.M. 2004: The effect of various culture media on formation of embryo-like structures in cultures derived from explants taken from mature *Larix deciduas. Plant Cell Tiss. Org. Cult*. **77:** 43- 48.

Archive of SID

www.SID.ir

Butorina A.K., Muraya L.S., Isokov Y.N. 1980: Spontaneeous mutagenesis in the common pine (*Pinus sylvestris* L.): The first case of detection of a mutant with circular and supplementary chromosomes. *Doklady. Biol. Sci*. **248:** 1096-1099.

Gladfelter H.J., Phillips G.C. 1987: De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. In vitro: Reproducible regeneration from longterm callus cultures. *Plant Cell Rep*. **6:** 163-166.

Gonzalez M.V., Rey M., Tavazza M., La Malfa S., Guozzo L., Ancora G. 1998: Improvement of in vitro adventitious shoot formation on cotyledons of *Pinus pinea* L. *Hortscience*. **33:** 749-750.

Kaul K., Hoffman S.A. 1993: Ammonium ion inhibition of *Pinus strobus* L. callus growth. *Plant Sci*. **88:** 169-173.

Moncalean P., Alonso P., Centeno M.L., Cortizo M., Rodriguez A., Fernandez B., Ordas R.J. 2005: Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. *Tree Physiol*. **25:** 1-9.

Parasharmi V.A., Poonawala I.S., Nadgauda R.S. 2003: Bud break and plantlet regeneration in vitro from mature trees of *Pinus roxburghii* Sarg.. *Current Sci*. **84:** 203-208.

Patel K.R., Berlin G.P. 1982: Genetic instability of multiple buds of *Pinus coulteri* regenerated from tissue culture. *Can. J. For. Res*. **12:** 93-101.

Prehn D., Serrano C., Mercado A., Stang C., Barrales L., Arce-Johnson P. 2003: Regeneration of whole plants from apical meristems of *Pinus radiata. Plant Cell Tiss. Org. Cult*. **74:** 249-255.

Pullman G.S., Mein J., Johnson S., Zhang Y. 2005: Gibberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Rep*. **23:** 596-605.

Ramarosandratana A.V., Staden J.V. 2003: Tissue position, explant orientation and naphthaleneacetic acid (NAA) affect initiation of somatic embryos and callus proliferation in Norway spruse (*Picea abies*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. **74:** 249-255.

Rutledge C.B., Douglas G.C. 1988: Culture of meristem tips and micropropagation of poplar in vitro. *Physiol. Plant*. **72:** 367-373.

Schestibratov K.A., Mikhailov R.V., Dolgov S.V. 2003: Plantlet regeneration from subculturable nodular callus of *Pinus radiata*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. **74:**249-255.

Stang C., Prehn D., Gebauer M., Arce-Johnson P. 1999:Optimization of in vitro culture conditions for *Pinus radiata* embryos and histological characterization of regenerated shoots. *Bio. Res*. **32:**19-28.

Stasolla C., Loukanina N., Ashihara H., Yeung E.C., Thorpe T.A. 2007:Comparative studies on pyrimidine metabolism in excised cotyledons of *Pinus radiata* during shoot formation in vitro. *J. Plant Physiol*. **164:**429-441.

Stasolla C., Yeung E.C. 2003:Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. **74:**15-35.

Tang W., Harris L.C., Outhavoung V., Newton R.J. 2004:The effect of different plant growth regulators on adventitious schoot formation from virginiana pine (*Pinus virginiana*) zygotic embryo explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. **78:**237-240.

Tang W., Newton R.J. 2004:Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in virginiana pin (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Sci*. **167:**621-628.

Tang W., Newton R.J. 2005: Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Rep*. **24:**1-9.

Tang W., Newton R.J., Charles T.M. 2006: Plant regeneration through multiple adventitios shoot differentiation from callus cultures of slash pine (*Pinus elliottii*). *J. Plant Physiol*. **163:**98-101.

Tang W., Whetten R., Sedroff R. 2001: Genotypic control of high frequency adventitious shoot regeneration in loblolly pine. *Plant Sci*. **161:** 267-272.

Valdes A.E., Ordas R.J., Fernandez B., Centeno M.L. 2001: Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. *Plant Physiol. Biochem*. **39:** 377-384.

Wagley L.M., Gladfelter H.J., Phillips G.C. 1987: De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. In vitro: Macro- and micro-photographic evidence of de novo regeneration. *Plant Cell Rep*. **6:** 167-171.

Wakhlu A.K., Barna K.S. 1989: Callus initiation, growth and plant regeneration in *Plantago ovata* Forsk. cv.GI-2. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. **17:**235-241.

Archive of SID

www.SID.ir