DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijfpr.2012.107495

**فصلنامهٔ علمی - پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران**
**جلد ۲۰ شمارهٔ ٤، صفحهٔ ٦٩٠-٦٧٩، (۱۳۹۱)**

# تأثیر نوع محیط کشت و گونه بر القای بافت جنین‌زا در جنین‌زایی رویشی جنس کاج (*Pinus* L.)

**الهه ناصری[۱*]، سیامک کلانتری[۲] و روح‌انگیز نادری[۳]**

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی کارشناسی‌ارشد باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج. پست الکترونیک: Naseri_elahe@yahoo.com
۲- استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج.
۳- دانشیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.
تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۱۲

## چکیده

امروزه تولید گیاهچه از طریق جنین‌زایی رویشی به‌عنوان روشی پربازده و امیدبخش به‌منظور همگروه‌سازی ژنوتیپ‌های منتخب و کاربرد آن در برنامه‌های اصلاحی سوزنی‌برگان مورد توجه قرار گرفته است. اگرچه هم‌اکنون این روش در کشور ما جنبه پژوهشی دارد، ولی انتظار می‌رود به زودی جایگزین روش‌های سنتی گردد. هدف از تحقیق حاضر، تعیین محیط کشت مناسب و انتخاب گونه‌های برتر از نظر تولید بافت جنین‌زاست. بنابراین با استفاده از دو محیط کشت متفاوت، امکان جنین‌زایی رویشی در ۵ گونهٔ متفاوت کاج مورد بررسی قرار گرفت. مرحله القای بافت جنین‌زا با استفاده از ریزنمونه جنین زایشی بالغ و محیط کشت‌های DCR و HLM-1 در گونه‌های *Pinus eldarica*، *P. brutia*، *P. nigra*، *P. radiata* و *P. sylvestris* انجام شد. سطح مقطع بافت جنین‌زا در دو مرحله (۳ و ٦ هفته پس از کشت اولیه) اندازه‌گیری شد. طبق نتایج بدست آمده، اثر نوع محیط کشت و گونه بر مقدار القای بافت جنین‌زا معنی‌دار بوده و بهترین نتایج در گونهٔ *Pinus eldarica* و محیط DCR حاصل شد. به‌منظور پرآوری بافت‌های جنین‌زا، واکشت بافت‌ها به‌مدت ۱۰ هفته و هر دو هفته یک‌بار در محیط کشت تازه انجام شد. سپس بافت‌های جنین‌زا به‌مدت ۲ هفته در معرض دو پیش‌تیمار محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد و محیط کشت محتوی ۱۰ میکرومول در لیتر 2,4-D و ۵ میکرومول در لیتر BA قرار گرفتند و درنهایت به‌منظور بلوغ جنین رویشی از بافت جنین‌زا، قطعه‌های بافت جنین‌زا با وزن تقریبی ۷۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم به محیط کشت DCR حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر آبسیزیک اسید، ٦۰ گرم در لیتر ساکارز و ٤ گرم در لیتر ژلرایت انتقال یافتند. محیط کشت DCR با همین ترکیب ولی بدون آبسیزیک اسید به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. با وجود مشاهده ساختارهای پیش‌جنینی در بافت جنین‌زا، تبدیل پیش‌جنین به جنین کامل انجام نشد و تنها در تعداد معدودی از بافت‌های گونهٔ *P. eldarica* ساختارهای جنینی غیرطبیعی (طویل و شیشه‌ای) مشاهده شد.

**واژه‌های کلیدی:** جنین زایشی بالغ، پیش‌تیمار، تنظیم‌کننده رشد، ساختار پیش‌جنینی.

## مقدمه

سوزنی‌برگان در میان اجتماع گیاهی جایگاه ویژه‌ای دارند. این گیاهان از نظر ارزش اقتصادی و جنبه زیبایی دارای اهمیت بسزایی می‌باشند. تعدادی از گونه‌های سوزنی‌برگ به‌خصوص کاج‌ها مانند کاج رادیاتا به‌علت سرعت رشد و بازده بیشتر در تولید چوب مرغوب، از امتیازهای تکنولوژیکی ویژه و اولویت‌های خاصی نسبت به دیگر گونه‌های پهن‌برگ برخوردار هستند. ازدیاد سوزنی‌برگان از طریق روش‌های سنتی بذر و قلمه دارای محدودیت‌های فراوان و حتی گاهی غیرممکن است. روش‌های نوین کشت بافت، به‌خصوص استفاده از جنین‌زایی رویشی، جایگزین مناسب و مطمئن برای ازدیاد این گیاهان به نظر می‌رسد. با استفاده از جنین‌زایی رویشی، می‌توان به تولید انبوه کلون‌های منتخب و یکنواخت دست

یافت (Tang & Newton, 2007). امروزه ایجاد نهالستان-های جنگلی با تولید کلون‌های منتخب با استفاده از سیستم جنین‌زایی رویشی، در سه گونهٔ کاج *P. banksiana*، *P. taeda* و *P. radiata* امکان‌پذیر است (Häggman *et al*., 2005). جنین‌زایی رویشی در سوزنی برگان پدیده‌ای جدید بوده و ازدیاد سوزنی‌برگان از این طریق دارای فواید دیگری مانند نگهداری لاین‌های سلولی بافت جنین‌زا به‌عنوان ذخیره ژرم‌پلاسم و استفاده از جنین‌های پوشش‌دار به‌عنوان بذر مصنوعی نیز است. انگیزه اولین تلاش‌ها در جنین‌زایی رویشی سوزنی‌برگان در اواخر دهه ۱۹۷۰ و اوایل دهه ۱۹۸۰ اتفاق افتاد و ساختارهای شبه‌جنینی از کشت سلول‌های *Pinus banksiana* و *Picea glauca* تولید شد؛ اگرچه این ساختارها قادر به تولید گیاهچه نشدند ولی چند سال پس از آن، تولید جنین‌های رویشی بالغ که توانایی تبدیل شدن به گیاهچه کامل را داشتند، با استفاده از جنین نابالغ *Picea abies* با موفقیت انجام شد (Stasolla *et al*., 2002). بعدها جنین‌های زایشی بالغ (Tautorus *et al*., 1990) و گیاهچه‌های جوانه‌زده ۱۲ تا ۳۰ روزه (Attree *et al*., 1990) هم به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. به طور کلی از سال ۱۹۸۵ به بعد، تأکید بر تغییر ازدیاد سوزنی‌برگان از اندام‌زایی درون شیشه‌ای به جنین‌زایی رویشی بوده است (Wilson & Thorpe, 1995). اگرچه تکثیر از طریق جنین‌زایی رویشی در تعداد زیادی از سوزنی‌برگان گزارش شده است، ازدیاد از طریق اندام‌زایی از کشت کالوس تنها در تعداد معدودی از سوزنی‌برگان بدست آمده است (Norgaard & Krogstrup, 1991; Tang *et al*., 2007). ریزازدیادی از طریق اندام‌زایی به تولید ۴۰ گیاهچه از هر گیاهچه در طول دوره‌ای بیش از ۶ ماه محدود می‌شود، درحالی‌که جنین‌زایی رویشی قابلیت تولید هزاران جنین از هر گرم بافت جنین‌زا را دارد (Becwar *et al*., 1987). جنین‌زایی رویشی در سوزنی-برگان برخلاف گیاهان گلدار، در بسیاری از جنس‌ها با مسائل فراوانی مواجه است و در شرایط درون شیشه‌ای سرسختی نشان می‌دهد و در بیشتر موارد موفقیت در تولید گیاهچه زمانی رخ می‌دهد که ریزنمونه از بافت‌های جوان مانند جنین نابالغ و یا جنین بالغ زایشی انتخاب گردد، بنابراین امروزه بیشتر تحقیق‌ها برای تعیین محیط کشت مناسب به‌منظور تولید جنین رویشی با توانایی بالا در تولید گیاهچه مرغوب، انجام می‌شود (Stasolla *et al*., 2002). هدف از تحقیق حاضر، تعیین محیط کشت مناسب و معرفی گونه‌های برتر جنس کاج به‌منظور تولید بافت جنین‌زا و جنین رویشی است.

## مواد و روشها

### تهیه مواد گیاهی

این تحقیق در سال ۱۳۸۸ و در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. بذرهای مورد نظر کاج از مرکز بذر جنگلی خزر واقع در شمال کشور تهیه شد. این بذرها به‌مدت ۲ سال در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند. ضدعفونی بذرها در دو مرحله، مرحله اول قبل از جدا کردن پوسته سخت بذر و مرحله دوم پس از جدا کردن پوسته بذر، انجام شد. به‌منظور ضدعفونی بذرها ابتدا آنها را به مدت ۱۰ دقیقه در زیر آب روان شستشو داده (پس از مرحله شستشوی بذر، تمامی مراحل ضدعفونی در داخل هود مخصوص کشت بافت انجام شد)، سپس در اتانول ۷۰ درصد (V/V) غوطه‌ور کرده و پس از پنج دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده و این بار با استفاده از وایتکس (دارای ۵/۲۵ درصد کلر فعال) ۲۰ درصد (V/V) و مدت زمان ۱۰ دقیقه عمل استریل انجام شد. پس از ضدعفونی بذرها سه مرتبه در آب مقطر استریل شستشو داده شده و به مدت ٤ ساعت در آب مقطر استریل خیسانده شدند. پس از آن پوسته بذر را جدا

کرده و این بار ابتدا در اتانول ۷۰ درصد (V/V) به‌مدت دو دقیقه و سپس در وایتکس ۱۰ درصد (V/V) به مدت پنج دقیقه ضدعفونی کرده و مجدداً سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. به‌منظور کاهش کشش سطحی و تماس بهتر مواد ضدعفونی کننده با ریزنمونه، به محلول‌های ضدعفونی کننده چند قطره توئین۲۰ (Tween20) اضافه شد. ریزنمونه‌های گیاهی شامل مگاگامتوفیت‌های حاوی جنین بوده که با استفاده از پنس و تیغ اسکالپل باز شده و جنین‌های سالم با لپه‌های کامل به‌صورت افقی روی محیط کشت قرار گرفتند. در هر پتری‌دیش (۱۰×۱۵ mm) شش جنین کشت شد و پتری‌ها با سلفون کاملاً بسته شدند. پتری‌دیش‌ها در اتاقک رشد با میانگین دمای روزانه $^{\circ C}$۱±۲۵ (۱٦ ساعت روشنایی) و میانگین دمای شب $^{\circ C}$۱±۱۹ (۸ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. نمونه‌ها در مرحله القا و پرآوری بافت جنین‌زا در تاریکی و در مرحله جنین‌زایی در معرض نور بسیار اندک قرار گرفتند.

**تهیه محیط کشت**

محیط کشت‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل محیط HLM-1 (Tremblay, 1990) و محیط DCR بود. به هر کدام از این دو محیط ۸ گرم در لیتر آگار-آگار، ۰/۵ گرم در لیتر ال-گلوتامین، ۱۰ میکرومول در لیتر 2,4-D و ۵ میکرومول در لیتر BA افزوده شد. به محیط HLM-1، ۱۰ گرم ساکارز و ۱ گرم کازئین هیدرولیزات در لیتر و به محیط DCR ۳۰ گرم ساکارز و ۰/۵ گرم کازئین هیدرولیزات در لیتر اضافه شد. همچنین برای مرحله جنین‌زایی، محیط کشت DCR حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر ABA، ٦۰ گرم ساکارز و چهار گرم ژلرایت، ۱ گرم ال-گلوتامین و ۱ گرم کازئین هیدرولیزات بکار رفت. pH محیط کشت روی ۵/۸ تنظیم شد و در نهایت محیط داخل اتوکلاو با شرایط فشار یک اتمسفر، دمای $^{\circ C}$۱۲۱ و به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. برای هر پتری‌دیش ۲۵ میلی-لیتر محیط کشت در نظر گرفته شد. قابل ذکر است که محلول ذخیره ال-گلوتامین و ABA با استفاده از فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرومتری ضدعفونی شده و پس از رسیدن دمای محیط کشت به حدود $^{\circ C}$٦۰-۵۰، به محیط اضافه شدند.

**مرحله القا و پرآوری بافت جنین‌زا**

برای ارزیابی مقدار القای بافت جنین‌زا از جنین زایشی بالغ، از دو محیط کشت جامد DCR و HLM-1 و ۵ گونهٔ مختلف کاج *P. eldarica*، *P. brutia*، *P. nigra*، *P. radiata* و *P. sylvestris* استفاده شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی چندمشاهده-ای و با سه تکرار انجام شد. هر تکرار شامل سه مشاهده (پتری‌دیش) و هر مشاهده شامل ٦ نمونه (جنین کشت شده) بود. اندازه‌گیری بافت‌های جنین‌زا در دو نوبت، سه هفته و شش هفته پس از کشت اولیه انجام شد. به‌منظور ارزیابی القای بافت جنین‌زا، بزرگترین قطر بافت اندازه-گیری و با واحد میلی‌متر به‌عنوان اندازه واقعی، یادداشت-برداری شد. ارتفاع بافت در چهار سطح فرضی (۰، ۱، ۲ و ۳) اندازه‌گیری شد و حاصل‌ضرب این دو داده به‌عنوان بزرگترین سطح مقطع بافت در نظر گرفته شد. این داده‌ها در دو زمان ذکر شده اندازه‌گیری شدند و تفاضل بین دو داده بزرگترین سطح مقطع بافت، به‌عنوان سرعت رشد در بازه زمانی ۳ هفته معرفی شد. ٦ هفته پس از زمان کشت، بافت‌های القا شده از ریزنمونه‌ها جدا شده و با ابعاد ۱۰×۱۰ میلی‌متری در همان محیط کشت‌های قبلی و با همان ترکیب واکشت شدند. واکشت بافت‌های جنین‌زا هر دو هفته یکبار انجام شد. پس از گذشت ۸ هفته از زمان اولین واکشت، بافت‌ها قبل از انتقال به محیط جنین‌زایی، به مدت دو هفته در معرض پیش‌تیمار قرار گرفتند. بدین ترتیب که نیمی از بافت‌ها به محیط‌های کشت DCR و

HLM-1 محتوی ۱۰ میکرومول در لیتر 2,4-D و ۵ میکرومول در لیتر BA و نیمی دیگر به دو محیط کشت ذکر شده بدون تنظیم‌کننده رشد منتقل شدند.

**مرحله جنین‌زایی و بلوغ جنین رویشی از بافت جنین‌زا**

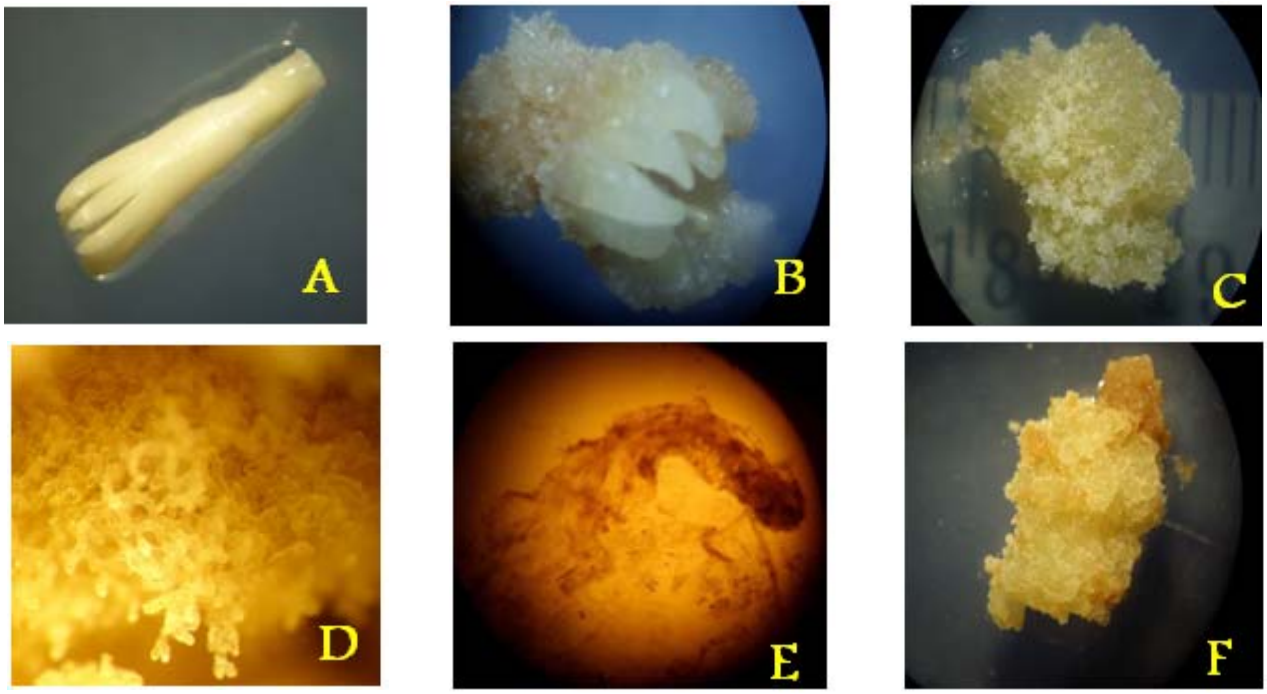
بافت‌های القا شده از ۵ گونهٔ مختلف کاج که دو هفته در معرض پیش‌تیمار (DCR±PGR و HLM-1±PGR) قرار گرفته بودند، به محیط کشت جنین‌زایی محتوی ABA انتقال یافتند. محیط کشت فاقد ABA به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در این مرحله ۱۰ قطعه از بافت جنین‌زا با وزن ۷۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در هر پتری‌دیش کشت شد. پس از یک ماه بافت‌ها به محیط کشت جدید با همان ترکیب قبلی ولی بدون ABA منتقل شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. نتایج ۸ هفته پس از انتقال به محیط جنین‌زایی، ارزیابی شد.

## نتایج

**مرحله القای بافت جنین‌زا**

پس از گذشت ۱۰ تا ۱٤ روز از زمان کشت اولیه، القای بافت جنین‌زا از هیپوکتیل و لپه‌های جنینی، در برخی گونه‌ها آغاز شد. ابتدا جنین گونه‌های *P. eldarica* و *P. brutia* شروع به القای بافت جنین‌زا کردند و پس از گذشت چهار هفته از زمان کشت اولیه، القای بافت در جنین گونه‌های *P. radiata*، *P. nigra* و *P. sylvestris* نیز ادامه یافت. پس از قرار گرفتن جنین‌های بالغ روی محیط کشت، ابتدا بافت آبکی و لزج قهوه‌ای رنگی در انتهای جنین ایجاد شد. سپس هیپوکتیل و لپه‌های جنینی کمی طویل و متورم شدند و بافت نرم، نیمه‌شفاف و ژله‌ای مانند را به‌وجود آوردند. حالت تورم در جنین‌هایی که در آنها بافتی تولید نشد، مشاهده نشد و با گذشت زمان از تاریخ کشت اولیه، جنین‌ها بدون تغییر رنگ قابل ملاحظه‌ای خشک شده و از بین رفتند. القای بافت در اغلب گونه‌ها ابتدا از هیپوکتیل انجام شد ولی پس از آن اپی‌کتیل و لپه‌های جنینی نیز شروع به تولید بافت جنین‌زا کردند. لازم به ذکر است در کشت جنین‌های ناقص و آسیب‌دیده از نظر تولید بافت موفقیتی حاصل نشد و تنها جنین‌های زایشی سالم و دارای لپه‌های کامل قابلیت تولید بافت جنین‌زا را داشتند. بررسی‌های میکروسکوپی که برای مشخص کردن شکل بافت یا توده جنین‌زا انجام شد، نشان داد که شکل بافت جنین‌زا در گونه‌های متفاوت، تقریباً یکسان است. این بافت مجموعه‌ای از بافت‌های رشته‌ای و طویل درهم‌رفته را تشکیل می‌دهد.

بافت جنین‌زا در حقیقت از مجموعه‌ای از توده‌های پیش‌جنین تشکیل یافته است. توده پیش‌جنینی از سلول‌های مریستمی به‌هم فشرده را در رأس توده و سلول‌های طویل سوسپانسور به‌دنبال آن، تشکیل شده است که پس از قرار گرفتن بافت جنین‌زا در محیط کشت جنین‌زایی، ساختارهای پیش‌جنینی به جنین کامل تبدیل شده و لپه‌ها در آن شکل می‌گیرند. در کنار بافت جنین‌زا، بافت غیرجنین‌زا نیز تولید شد که کاملاً با بافت جنین‌زا متفاوت بوده و به‌راحتی قابل تشخیص است. از ویژگی‌های بافت غیرجنین‌زا می‌توان به تراکم بیش از اندازه و سختی بافت و رنگ زرد متمایل به قهوه‌ای آن، اشاره کرد. همچنین ساختار رشته‌ای مانند در این بافت دیده نشد و پس از چند بار واکشت از بین رفتند (شکل۱).



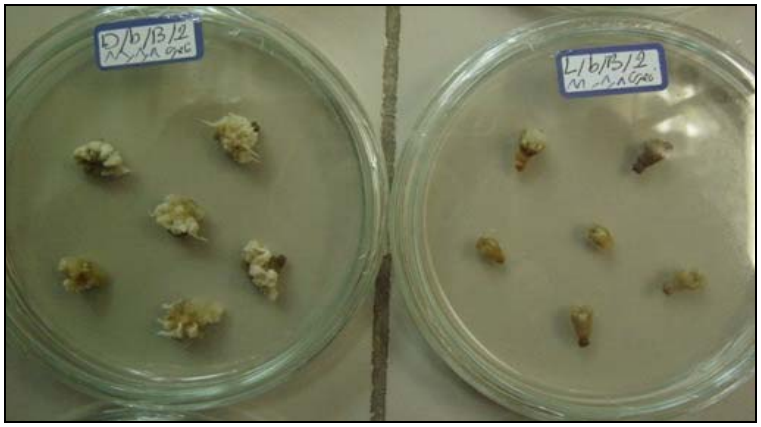

**شکل۱- مراحل القای بافت جنین‌زا از جنین زایشی بالغ کاج بروسیا (A: جنین زایشی بالغ کشت شده روی محیط جامد، B: القای بافت جنین‌زا از هیپوکتیل، C: بافت نرم و نیمه شفاف جنین‌زا، D: حالت رشته‌ای و میله‌مانند بافت جنین‌زا (بزرگ‌نمایی ۵۰X)، E: تصویر میکروسکوپی توده جنین‌زا (بزرگ‌نمایی ٤۰۰X) و F: توده سخت و متراکم بافت غیرجنین‌زا)**

نتایج تجزیه واریانس داده‌برداری از تولید بافت جنین‌زا نشان داد که عامل محیط کشت و گونه دارای اثر معنی‌داری بر شاخص‌های اندازه‌گیری مقدار تولید بافت بودند (جدول۱).

**جدول۱- تجزیه واریانس اثر محیط کشت و گونه بر القای بافت جنین‌زا**

| منبع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات صفات | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | قطر بافت (میلی‌متر) | ارتفاع بافت (نمره‌دهی) | سطح مقطع بافت (پس از ۳ هفته) (تخمینی) | سطح مقطع بافت (پس از ٦ هفته) (تخمینی) | سرعت رشد بافت (در مدت ۳ هفته) (تخمینی) |
| بلوک | ۲ | ۳/٤۰$^{*}$ | ۰/۱۰$^{ns}$ | ٤/۲۳$^{ns}$ | ۲/۷٦$^{ns}$ | ۲/۳٥$^{ns}$ |
| محیط کشت | ۱ | ۱٥/۳۸$^{**}$ | ۱/٦۰$^{**}$ | ۱۲۸/۱٦$^{**}$ | ۱۸۲٤/۳۰$^{**}$ | ۹۸٥/۳۹$^{**}$ |
| گونه | ٤ | ۱۲۷/۱۷$^{**}$ | ۱۲/٦۲$^{**}$ | ۹۱۲/٦۱$^{**}$ | ۲۱۷٦/٦٦$^{**}$ | ۳۱۳/۸۳$^{**}$ |
| محیط کشت×گونه | ٤ | ٦/٤۸$^{**}$ | ۰/۸۷$^{**}$ | ٦۲/۷۳$^{**}$ | ۲۳٥/٥۹$^{**}$ | ۸۲/۱۰$^{**}$ |
| خطا | ۱۸ | ۰/۷٤ | ۰/۰۷ | ٥/٦۰ | ۳/۸۹ | ۱/٦٤ |
| خطای نمونه برداری | ٦۰ | ۰/۳۲ | ۰/۰٤ | ۱/۷۷ | ۲/۰٤ | ۰/۸۸ |
| CV | | ۱۱/۸٦ | ۱۲/۷۱ | ۱۲/۹۹ | ۷/٦۲ | ۱۱/۰۱ |

**: معنی‌دار بودن اثر تیمار هورمونی و گونه در سطح ۱ درصد و ns: عدم معنی‌داری



**شکل۲- اثر محیط کشت بر القای بافت جنین‌زا در گونهٔ کاج بروسیا**
**(محیط کشت HLM-1 سمت راست و محیط کشت DCR سمت چپ)**

در مقایسه بین دو محیط کشت (شکل۲)، مقدار القای بافت جنین‌زا از جنین‌هایی که در محیط DCR قرار گرفته بودند، نسبت به محیط کشت HLM-1، در تمامی صفات به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (جدول۲).

**جدول۲- اثر نوع محیط کشت بر القای بافت جنین‌زا**

| محیط کشت | قطر بافت (میلی‌متر) | ارتفاع بافت (نمره‌دهی) | سطح مقطع بافت (پس از ۳ هفته) (تخمینی) | سطح مقطع بافت (پس از ٦ هفته) (تخمینی) | سرعت رشد بافت (در مدت ۳ هفته) (تخمینی) |
|---|---|---|---|---|---|
| DCR | ٥/١٦ a | ١/٦٧ a | ١١/٤٣ a | ٢٣/٢٧ a | ١١/٨٤ a |
| HLM-1 | ٤/٣٤ b | ١/٤٠ b | ٩/٠٤ b | ١٤/٢٧ b | ٥/٢٣ b |

حروف غیرمشترک در هر ستون اختلاف آماری معنی‌داری با هم دارند.

مقایسه میانگین اثر اصلی گونه بر القای بافت نشان داد که در بین گونه‌های مورد آزمون، گونهٔ *Pinus eldarica* در تمامی صفات مورد اندازه‌گیری و گونهٔ *P. brutia* در اندازه قطر و سرعت رشد بافت نسبت به دیگر گونه‌ها، برتری دارند. گونهٔ *P. radiata* از نظر مقدار تولید بافت و گونهٔ *P. sylvestris* از نظر سرعت رشد، در مقایسه با دیگر گونه‌ها دارای کمترین مقادیر می‌باشند (جدول۳).

**جدول۳- اثر گونه بر القای بافت جنین‌زا**

| گونه | قطر بافت (میلی‌متر) | ارتفاع بافت (نمره‌دهی) | سطح مقطع بافت (پس از ۳ هفته) (تخمینی) | سطح مقطع بافت (پس از ٦ هفته) (تخمینی) | سرعت رشد بافت (در مدت ۳ هفته) (تخمینی) |
|---|---|---|---|---|---|
| *P. brutia* | ٧/٢١ a | ٢/٢٢ b | ١٦/٤٠ b | ٢٩/١٧ b | ١٢/٧٧ a |
| *P. eldarica* | ٧/٣٢ a | ٢/٤٦ a | ١٨/٣٣ a | ٣١/٦٤ a | ١٣/٣١ a |
| *P. nigra* | ٤/٩٠ b | ١/٥٠ c | ٩/٣٧ c | ١٥/٢٣ c | ٥/٨٧ b |
| *P. radiata* | ١/١٢ d | ٠/٣٩ e | ١/٤٦ e | ٧/٧٨ e | ٦/٣٢ b |
| *P. sylvestris* | ٣/٢٠ c | ١/١٢ d | ٥/٦١ d | ١٠/٠٢ d | ٤/٤١ c |

حروف غیرمشترک در هر ستون اختلاف آماری معنی‌داری با هم دارند.

برطبق اثر اصلی محیط کشت بر القای بافت (جدول۲)، محیط DCR به‌طور معنی‌داری مقدار تولید و سرعت رشد بافت بیشتری نسبت به محیط HLM-1 داشت، ولی بررسی اثر متقابل بین محیط کشت و گونه (جدول٤) نشان می‌دهد که این اثر در همه گونه‌ها بجز گونهٔ *P. nigra* صدق می‌کند و گونهٔ *P. nigra* در محیط HLM-1 به‌طور معنی‌داری مقدار تولید بافت بیشتری نسبت به محیط DCR دارد، اما در مورد سرعت رشد این گونه، مطابق اثر اصلی، محیط DCR نسبت به محیط HLM-1 برتری معنی‌داری نشان داد. همچنین برخلاف نتایج اثر اصلی، در مورد ارتفاع بافت در گونهٔ *P. brutia* بین دو محیط کشت تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در بررسی اندازه قطر بافت، در محیط HLM-1 نتایج اثر متقابل با نتایج اثر اصلی تطابق داشته در حالی که در محیط DCR برخلاف آنچه در اثر اصلی مشاهده می‌شود، دو گونهٔ *P. nigra* و *P. sylvestris* از نظر اندازه قطر با هم تفاوت معنی‌داری ندارند. نتایج حاصل از اندازه ارتفاع بافت و سطح مقطع اولیه مشابه هم بوده و با هم بررسی می‌شوند. در محیط HLM-1 گونه‌های *P. eldarica* و *P. brutia* برخلاف نتایج اثر اصلی، با هم تفاوت معنی‌داری ندارند و در محیط DCR برخلاف آنچه در اثر اصلی مشاهده می‌شود، دو گونهٔ *P. nigra* و *P. sylvestris* با هم تفاوت معنی‌داری ندارند. از نظر اندازه سطح مقطع ثانویه بافت، برخلاف نتایج اثر اصلی، در محیط HLM-1 بین گونه‌های *P. eldarica* و *P. brutia* و در محیط DCR بین گونه‌های *P. nigra*، *P. radiata* و *P. sylvestris* اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. در بررسی سرعت رشد بافت، در محیط HLM-1 گونهٔ *P. nigra* نسبت به گونهٔ *P. sylvestris* و گونهٔ *P. sylvestris* نسبت به گونهٔ *P. radiata* به‌طور معنی‌داری سرعت رشد بیشتری داشته و این نتایج مغایر با نتایج اثر اصلی گونه در سرعت رشد است. در محیط DCR نیز از نظر سرعت رشد بافت، گونهٔ *P. radiata* نسبت به گونهٔ *P. nigra* دارای برتری معنی‌دار بوده ولی بین دو گونهٔ *P. nigra* و *P. sylvestris* اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود، در حالی که در نتایج اثر اصلی گونه، سرعت رشد بافت در گونه‌های *P. nigra* و *P. radiata* با هم تفاوت معنی‌داری نداشته ولی نسبت به گونهٔ *P. sylvestris* برتری دارند (جدول۳). به‌طور کلی با بررسی اثر متقابل محیط کشت و گونه می‌توان گفت بهترین نتیجه هم از نظر مقدار تولید و هم از نظر سرعت رشد بافت جنین‌زا، در گونهٔ *P. eldarica* و در محیط کشت DCR حاصل شد و کمترین مقدار تولید بافت و سرعت رشد در گونهٔ *P. radiata* و در محیط HLM-1 مشاهده شد (جدول٤).

**مرحله جنین‌زایی و بلوغ جنین رویشی از بافت جنین‌زا**

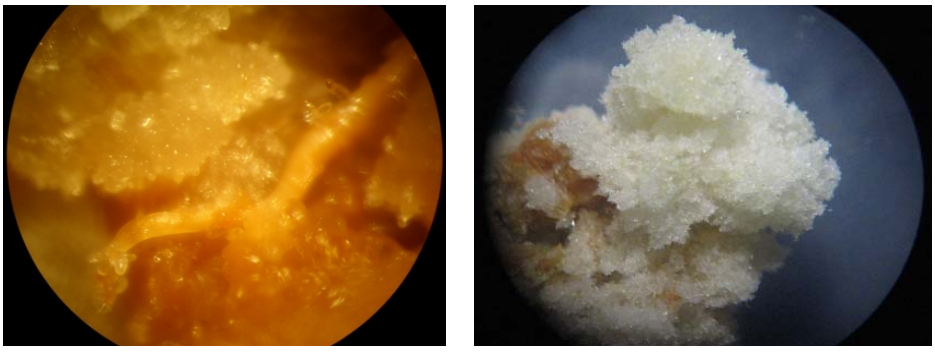
نتایج نشان داد بدون در نظر گرفتن گونه یا نوع محیط کشت پیشین، تفاوتی بین دو پیش‌تیمار بدون تنظیم‌کننده رشد و حاوی تنظیم‌کننده رشد، از نظر مقدار رشد و یا تغییر بافت، ملاحظه نشد. اگرچه اختلاف بین گونه‌ها پس از قرار گرفتن در معرض محیط کشت جنین‌زایی کاملاً مشخص بود و در گونه‌های *P. brutia* و *P. eldarica* زمانی که به محیط جنین‌زایی انتقال یافتند بین دو پیش‌تیمار قبلی (محیط‌های کشت DCR±PGR و HLM-1±PGR در مرحله پرآوری) از نظر مقدار رشد و دوام بافت اختلافی مشاهده نشد و هر دو گروه در هر گونه دارای ویژگی‌های تقریباً یکسان بودند، ولی این موضوع در مورد گونه‌های *P. radiata*، *P. nigra* و *P. sylvestris* صادق نبوده و در این سه گونه، بافت‌هایی که قبلاً در محیط پرآوری DCR قرار داشتند نسبت به نمونه‌هایی که در محیط پرآوری HLM-1 بودند، واکنش بهتری به محیط جنین‌زایی نشان داده و از دوام بیشتری برخوردار بودند. این موضوع احتمالاً به‌دلیل حساسیت این سه گونه به تعویض نوع محیط کشت و تغییر ترکیب آن است.

همچنین مشاهده شد که بافت‌های نمونه‌های شاهد (بدون ABA)، نسبت به نمونه‌هایی که در محیط کشت دارای ABA بودند، دوام بیشتری داشته و پس از مدت زمان بیشتری از بین رفتند. به‌طور کلی، بافت‌های جنین‌زا زمانی که در معرض تیمار جنین‌زایی قرار گرفتند، با حفظ ظاهر رشته مانند خود، از حالت آبکی و نرم و شفاف خارج شده و به بافتی سفیدرنگ، متراکم و فشرده تبدیل شدند (شکل۳). با وجود ساختارهای پیش‌جنینی در بافت جنین‌زا، تبدیل پیش‌جنین به جنین کامل انجام نشد و تنها در تعداد معدودی از بافت‌های گونهٔ *P. eldarica* ساختارهای جنینی غیرطبیعی (طویل و شیشه‌ای) مشاهده شد (شکل۳).

**جدول٤- اثر متقابل محیط کشت و گونه بر القای بافت جنین‌زا**

| محیط کشت | گونه | قطر بافت (میلی‌متر) | ارتفاع بافت (نمره‌دهی) | سطح مقطع بافت (پس از ۳ هفته) (تخمینی) | سطح مقطع بافت (پس از ٦ هفته) (تخمینی) | سرعت رشد بافت (در مدت ۳ هفته) (تخمینی) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DCR | *P. brutia* | ۷/۷۱ a | ۲/۳۱ b | ۱۸/۱۳ b | ۳۵/٤۷ b | ۱۷/۳۳ a |
| DCR | *P. eldarica* | ۸/۰٤ a | ۲/٦۰ a | ۲۱/۲۰ a | ۳۹/٦۲ a | ۱۸/٤۲ a |
| DCR | *P. nigra* | ٤/۳۱ d | ۱/۲۹ d | ۷/۳۸ e | ۱٤/۰٤ e | ٦/٦۷ d |
| DCR | *P. radiata* | ۲/۱۱ e | ۰/۷۳ e | ۲/۷۸ f | ۱٤/۰۰ e | ۱۱/۲۲ b |
| DCR | *P. sylvestris* | ۳/٦٤ d | ۱/٤۲ d | ۷/٦٤ e | ۱۳/۲۲ e | ۵/۵۸ de |
| HLM-1 | *P. brutia* | ٦/۷۱ b | ۲/۱۳ b | ۱٤/٦۷ c | ۲۲/۸۷ c | ۸/۲۰ c |
| HLM-1 | *P. eldarica* | ٦/٦۰ b | ۲/۳۱ b | ۱۵/٤۷ c | ۲۳/٦۷ c | ۸/۲۰ c |
| HLM-1 | *P. nigra* | ۵/٤۹ c | ۱/۷۱ c | ۱۱/۳٦ d | ۱٦/٤۲ d | ۵/۰۷ e |
| HLM-1 | *P. radiata* | ۰/۱۳ f | ۰/۰٤ f | ۰/۱۳ g | ۱/۵٦ g | ۱/٤۲ g |
| HLM-1 | *P. sylvestris* | ۲/۷٦ e | ۰/۸۲ e | ۳/۵۸ f | ٦/۸۲ f | ۳/۲٤ f |

حروف غیرمشترک در هر ستون اختلاف آماری معنی‌داری با هم دارند.



**شکل۳- بافت متراکم و سفیدرنگ جنین‌زا در محیط جنین‌زایی (جنین غیرطبیعی سمت چپ)**

## بحث

در بیشتر گونه‌های جنس کاج تولید بافت جنین‌زا با

استفاده از جنین زایشی نابالغ و یا بالغ میسر است، اگرچه از نظر مقدار القا و سرعت رشد بافت جنین‌زا بین گونه‌ها تفاوت‌هایی وجود دارد. Salajova *et al.* (1999) القای بافت جنین‌زا در *P. nigra* را با استفاده از جنین بالغ، پس از شش تا هفت هفته گزارش کردند. گزارش آنها حکایت از آن دارد که ابتدا بافت شبه کالوس نکروزه، در انتهای ریشه‌چه جنین تشکیل شده، سپس هیپوکتیل و لپه‌ها طویل می‌شوند و بافت نرم و سفیدرنگی با ساختارهای میله‌ای شکل تولید می‌نمایند. آنها همچنین بافت پودری و شکننده‌ای را نیز در آزمایش‌های خود مشاهده کردند که در حقیقت بافت غیرجنین‌زا بود و در واکشت‌های بعدی از بین می‌رفت. بررسی‌های میکروسکوپی آنها حضور سلول‌های طویل را تایید کرد. تولید بافت جنین‌زا از جنین زایشی بالغ در *Picea rubens* پس از چهار تا هشت هفته در تاریکی و در دمای ۲۵ تا ۲٦ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، منشأ این بافت به‌طور عمده نواحی هیپوکتیل و اپی-کتیل گزارش شد (Isabel & Tremblay, 1995). Tremblay (1990) در مورد *Picea glauca* گزارش کرد که بافت جنین‌زا از سلول‌های طویلی که ساختارهای سوسپانسوری را ایجاد می‌کنند و مراکز مریستمی فعال که توده جنین اولیه را به‌وجود می‌آورد، تشکیل شده است. طبق نتایج او ویژگی بافت‌های غیرجنین‌زا، سخت بودن بافت بوده که در صورتی که به‌طور منظم واکشت شوند، ۵ تا ۱۰ درصد از بافت‌های غیرجنین‌زا در طول دوره سه ماهه به بافت جنین‌زا تبدیل می‌شوند. Salajova & Salaj (2005) القای بافت جنین‌زا در *P. nigra* را با استفاده از جنین بالغ، پس از شش هفته از لپه‌های جنینی گزارش کردند. آنها بافت‌های تولید شده از هیپوکتیل و ریشه‌چه را که با دو بار واکشت کردن در محیط تازه، سیاه شده و از بین می‌رفتند را غیرجنین‌زا دانستند. با توجه به نتایج بدست آمده از مقدار القای بافت جنین‌زا، اهمیت نوع و ترکیب محیط کشت و گونه به‌عنوان عوامل اصلی در مقدار القای بافت جنین‌زا، مشخص می‌شود. دانستن این موضوع که چه عوامل و برهم‌کنش‌هایی در مقدار القای بافت جنین‌زا تأثیرگذار هستند، بسیار مهم است، زیرا به پاسخ بهتر و القای بیشتر بافت منجر خواهد شد. از دیگر عوامل تأثیرگذار در مقدار القای بافت جنین‌زا می‌توان به تاریخ جمع‌آوری بذر، ژنوتیپ، نوع ریزنمونه و تیمارهای هورمونی مختلف اشاره کرد. اگرچه یک محیط کشت مشخص به‌عنوان محیط کشت پایه برای همه گونه‌های سوزنی‌برگان مناسب به‌نظر نمی‌رسد و هر یک از گونه-های مختلف سوزنی‌برگان واکنش متفاوتی به انواع محیط کشت نشان می‌دهند، ولی محیط کشت‌هایی مانند DCR، LM، MS و LP اغلب به‌عنوان محیط کشت پایه در بیشتر سوزنی‌برگان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Stasolla *et al.*, 2002). Park *et al.* (2006) مقدار القا را در چهار گونهٔ مختلف کاج (*P. banksiana*، *P. strobus*، *P. pinaster*، *P. sylvestris*) با استفاده از جنین نابالغ و سه نوع محیط کشت (mLV، DCR و WV5) و تیمارهای مختلف هورمونی در ژنوتیپ‌های متفاوت، طی سه سال و در سه آزمایشگاه مختلف بررسی کردند. آنها اثرهای محیط کشت و ژنوتیپ را در آزمایش‌های خود معنی‌دار گزارش کردند. بالاترین مقدار القای بافت جنین‌زا در بهترین شرایط، ۳/۹ درصد برای گونهٔ *P. banksiana*، ٥٤/٦ درصد برای *P. strobus*، ٧٦/٢ درصد برای *P. pinaster* و ۱۹/۷ درصد برای گونهٔ *P. sylvestris* بدست آمد و همچنین بالاترین مقدار القا در محیط کشت mLV مشاهده شد. Ishii *et al.* (2001) اثر دو نوع محیط کشت (SM1 و LPm) را در دو گونهٔ کاج *P. densiflora* و *P. thunberghii* و دو گونهٔ شبه‌سرو (*Chamaecyparis pisifera* و *C. obtuse*) و گونهٔ *Cryptomeria japonica* با استفاده از جنین نابالغ بررسی کردند. بر طبق نتایج آنها اگرچه مقدار القای بافت جنین‌زا در گونه‌های مختلف، متفاوت بود ولی نوع محیط کشت در مقدار القا تأثیری

نداشت. بیشترین مقدار القای بافت جنین‌زا در گونهٔ *C. obtusa* (۲۰ درصد) و کمترین مقدار القا در گونه‌های کاج *P. densiflora* (۱ درصد) و *P. thunberghii* (۳ درصد) گزارش شد. آنها عامل مهم موفقیت در القا بافت جنین‌زا را استفاده از جنین نابالغ در مرحله خاص (پیش از تشکیل لپه‌ها) بیان کردند. Niskanen *et al*. (2004) تأثیر ژنوتیپ و محیط کشت را در جنین‌زایی رویشی گونهٔ *Pinus sylvestris* بررسی کردند، گزارش آنها مبنی بر این است که بالاترین مقدار القای بافت جنین‌زا از محیط کشت DCR (۲٤ درصد) حاصل شد. همچنین از ٤۹ ژنوتیپ منتخب، ٤۷ ژنوتیپ به القا پاسخ مثبت داده و تولید بافت کردند، ولی مقدار القا در ژنوتیپ‌های مختلف، متفاوت و از ۱ درصد تا ٤۲ درصد متغیر بود. Garin *et al*. (1998) با بررسی ژنوتیپ‌های مختلف گونهٔ کاج *P. strobus* و محیط کشت‌های DCR و HLM تنها اثر ژنوتیپ را معنی‌دار گزارش کردند و بین دو محیط کشت از نظر القای بافت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. Mather *et al*. (2000) با استفاده از سه محیط کشت DCR و LP و BM1 در القای بافت جنین‌زای کاج *P. roxburghii*، DCR را به‌عنوان بهترین محیط کشت معرفی کردند. در کل مقدار القای بافت جنین‌زا در گونه‌های مختلف کاج، دارای دامنه گسترده‌ای است. مقدار القا از ۰/٤ درصد در گونهٔ *P. banksiana*، ۱/۵ درصد در گونهٔ *P. armandii*، تا ۱۷/۹ درصد در گونهٔ *P. taeda* و ۵۳ درصد در گونهٔ *P. strobus* متغیر است (Maruyama *et al*., 2007). علاوه بر محیط کشت و گونه، عوامل بسیاری در مقدار القای بافت جنین‌زا نقش دارند که از آن جمله می‌توان به مقادیر مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد، نوع ریزنمونه و مراحل نموی مختلف ریزنمونه و غیره اشاره کرد.

با توجه به اینکه بحرانی‌ترین مرحله در جنین‌زایی رویشی، گذر از مرحله پیش‌جنینی و تبدیل آن به جنین لپه‌دار است، می‌توان گفت که عوامل گوناگونی در عدم موفقیت در بلوغ جنین تکامل یافته نقش دارند. نقش ژنوتیپ و ریزنمونه به‌عنوان دو عامل اصلی در جنین‌زایی رویشی کاملاً مشخص است. همچنین این احتمال وجود دارد که به‌دلیل کشت مداوم بافت‌های جنین‌زا در محیط‌های نگهداری محتوی تنظیم‌کننده‌های رشد به مدت طولانی، سطح تنظیم‌کننده‌های رشد در بافت زیاد شده و بافت‌های جنین‌زا توانایی خود را برای تبدیل به جنین از دست داده باشند. در جنین‌زایی رویشی اختلاف برجسته‌ای بین دو جنس مهم گروه سوزنی‌برگان وجود دارد. در مقایسه با موفقیت در القای جنین و تولید گیاهچه در گونه‌های *Picea*، سرسختی در تولید جنین و گیاهچه در گونه‌های *Pinus* کاملا آشکار است (Tautorus *et al*., 1991). امروزه بیشترین پژوهش‌های جنین‌زایی رویشی در گونه‌های *Picea* انجام می‌گیرد و این امر به‌دلیل سهولت نسبی در القا و تولید گیاهچه‌های جنینی از طریق جنین‌زایی رویشی، در مقایسه با دیگر جنس‌های خانواده Pinaceae است. دلیل دیگر را می‌توان اهمیت اقتصادی این جنس در صنعت جنگل‌کاری ذکر کرد .با توجه به این موضوع که این تحقیق برای اولین بار در ایران انجام شده است، اگرچه موفقیت‌هایی در مرحله القای توده جنین‌زا و ساختارهای پیش‌جنین حاصل شد، هنوز بررسی‌های زیادی لازم است تا به جنین رویشی بالغ با لپه‌های توسعه یافته و گیاهچه حاصل از جنین رویشی دست یافت.

## منابع مورد استفاده

**References**

- Attree, S.M., Budimir, S. and Fowke, L.C., 1990. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured shoots and cotyledons of seedling from stored seed of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). Canadian Journal of Botany, 68: 30-34.
- Becwar, M.R., Noland, T.L. and Wann, S.R., 1987.

Somatic embryo development and plant regeneration from embryogenic Norway spruce callus. Tappi Journal, 70: 155-160.
- Garin, E., Isabel, N. and Plourde, A., 1998. Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos. Plant Cell Reports, 18: 37-43.
- Häggman, H., Vuoska, J., Sarjala, T., Jokela, A. and Niemi, K., 2005. Somatic embryogenesis of pine species: from functional genomics to plantation forestry: 119-140. In: Mujib, A. and Samaj, J., (Eds.). Somatic Embryogenesis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 369 p.
- Isabel, N. and Tremblay, F.M., 1995. Somatic embryogenesis in red spruce (*Picea rubens* Sarg.): 111-123. In: Jain, S., Gupta, P. and Newton, R., (Eds.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Kluwer Academic, Netherlands, 388 p.
- Ishii, K., Maruyama, E. and Hosoi, Y., 2001. Somatic embryogenesis of Japanese conifers. Molecular Breeding of Woody Plants, Proceedings of the International Wood Biotechnology Symposium (IWBS), 18: 297-305.
- Maruyama, E., Hosoi, Y. and Ishii, K., 2007. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in yakutanegoyon, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endemic and endangered species in Japan. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 43: 28-34.
- Mathur, G., von Arnold, S. and Nadgauda, R., 2000. Studies on somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of chir pine (*Pinus roxburghii* Sarg.). Research Communications Current Science, 79(7): 999-1004.
- Niskanen, A.M., Lu, J., Seitz, S., Keinonen, K., Weissenberg, K.V. and Pappinen, A., 2004. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). Heron Publishing-Victoria, Canada, 24: 1259-1265.
- Norgaard, J. and Krogstrup, P., 1991. Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies nordmanniana* L., Plant Cell Reports, 9: 509-513.
- Park, Y.S., Lelu-Walter, M.A., Harvengt, L., Trontin, J.F., MacEacheron, I., Klimaszewska, K. and Bonga, J.M., 2006. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 86: 87-101.
- Salajova, T. and Salaj, J., 2005. Somatic embryogenesis in *Pinus nigra*: embryogenic tissue initiation, maturation and regeneration ability of established cell lines. Biologia Plantarum, 3: 333-339.
- Salajova, T., Salaj, J. and Kormutak, A., 1999. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. Plant Science, 145: 33-35.
- Stasolla, C., Kong, L., Yeung, E.C. and Thorpe, T.A., 2002. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 38: 93-105.
- Tang, W. and Newton, R.J., 2007. Micropropagation via organogenesis in slash pine: 15-22. In: Jain, S.M. and Häggman, H., (Eds.). Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Springer, 559 p.
- Tautorus, T.E., Attree, S.M., Fowke, L.C. and Dunstan, D.I., 1990. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and embryo regeneration from protoplasts in black spruce (*Picea mariana* Mill). Plant Science, 67: 115-124.
- Tremblay, F.M., 1990. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from embryos isolated from stored seed of *Picea glauca*. Canadian Journal of Botany, 68: 236-242.
- Wilson, S.M. and Thorpe , T.A., 1995. Somatic embryogenesis in *Picea glauca* (white spruce), *P. engelmannii* (engelmann spruce) and *P. glauca engelmannii* complex (interior spruce): 37-53. In: Jain, S., Gupta, P. and Newton, R., (Eds.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Kluwer Academic, Netherlands, 388 p.

# The effect of culture media type and species on embryogenic tissue induction in somatic embryogenesis of pine genus

**E. Nasseri [1]*, S. Kalantari [2] and R. Naderi [3]**

1*- Corresponding author, MSc. Student, Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, I.R. Iran. E-mail: Naseri_elahe@yahoo.com

2- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, I.R. Iran.

3- Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, I.R. Iran.

Received: 26.09.2011 Accepted: 01.12.2012

## Abstract

Nowadays, plantlet production via somatic embryogenesis is considered as an efficient technique in clonal propagation of selected genotypes and breeding programs of conifers. Although it is in the phase of research in our country, but it is expected that traditional methods will be replaced by this technique soon. The main purpose of this survey is determination of suitable culture medium and selection of superior species with respect to embryogenic tissue production. The possibility of somatic embryogenesis has been studied in five different pine species, using two different culture mediums. The embryogenic tissue induction phase was performed using mature zygotic embryo explant and culture mediums DCR and HLM-1 in species *Pinus eldarica*, *P. brutia*, *P. nigra*, *P. radiata* and *P. sylvestris*. Cross section of embryogenic tissue was measured in two phase 3 and 6 weeks after the initial culture. The obtained results showed a significant effect of culture medium type and species on the amount of embryogenic tissue induction and the best results was obtained from *P. eldarica* in DCR medium. In order to proliferation of embryogenic tissues, subculture of tissues was performed every two weeks in new culture medium for ten weeks. Then, embryogenic tissues were exposed to two pretreatments of culture medium without growth regulator and culture medium with growth regulators BA and 2,4-D. Finally, in order to maturation of somatic embryo from embryogenic tissue, the segments of embryogenic tissue with an approximate weight of 75-100 mg were transferred to DCR culture medium containing 25 mg/l of ABA, 60 g/l of sucrose and 4 g/l of gelrite. The DCR culture medium with the same combination but without ABA was considered as control. In spite of pre-embryonic structures in embryogenic tissue, transformation of pre-embryo to the complete embryo did not accomplished and just in a small number of *P. eldarica* tissues, unnatural embryonic structures (long and vitreous) were observed.

**Key words:** Mature zygotic embryo, pre-treatment, growth regulator, pre-embryonic structure