مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران
جلد ۲۹ شماره ۴، صفحه ۳۶۲-۳۴۹، (۱۴۰۰)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijfpr.2022.357321.2036
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350883.1400.29.4.4.7

باززایی درون‌شیشه‌ای انارشیطان (*Tecomella undulata* (Sm.) Seem): بررسی پتانسیل رویان‌زایی سوماتیکی در ریزنمونه تخمدان

ساسان راستگو [۱*] و حمیدرضا نوریزدان [۲]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
پست الکترونیک: rastgoo@pgu.ac.ir

۲- استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۲

چکیده

انارشیطان (*Tecomella undulata* (Sm.) Seem) یک گونه چوبی چندمنظوره است که به‌دلیل زادآوری طبیعی ناکارآمد، جزء دسته گیاهان در معرض خطر قرار دارد. نرخ کم ریشه‌زایی نابجای قلمه‌ها، دلیل اصلی عدم موفقیت در ازدیاد رویشی آن بوده است. ازاین‌رو، پژوهش پیش‌رو به‌منظور ارزیابی پتانسیل این گونه برای رویان‌زایی سوماتیکی درون‌شیشه‌ای انجام شد. ریزنمونه تخمدان در محیط کشت اصلاح‌شده MS در ترکیب با اکسین‌ها و سیتوکینین‌های مختلف کشت شد. نتایج نشان‌دهنده برتری NAA در القای پینه رویان‌زا بود. بیشترین پینه‌های رویان‌زا در محیط کشت حاوی NAA با غلظت‌های ۰/۵، دو، سه و چهار میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که توده‌های پیش‌رویانی و رویان‌های سوماتیکی کروی نیز ایجاد کرد. کاربرد انفرادی سیتوکینین‌های TDZ و BA در غلظت‌های کم سبب پینه‌زایی قابل‌قبولی شد، اما این پینه‌ها، غیررویان‌زا بودند. بهترین پُرآوری پینه‌های رویان‌زا در محیط کشت بدون هورمون به‌دست آمد. محیط‌های حاوی ۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌تنهایی توانستند رویان‌های سوماتیکی را همراه با پرآوری پینه القا کنند. محیط حاوی BA با غلظت کم (۰/۱ و دو میلی‌گرم بر لیتر) و ساکارز با غلظت ۳۰ گرم بر لیتر سبب رویان‌زایی سوماتیکی دوباره شد. کاربرد BA و GA_3 و افزایش غلظت ساکارز محیط کشت نتوانستند رویان‌های سوماتیکی القاشده در مرحله‌های پینه‌زایی و پرآوری پینه را بالغ کنند. یافته‌های این پژوهش درزمینه تولید پینه رویان‌زا و رویان سوماتیکی انارشیطان می‌تواند پایه‌ای سودمند برای پژوهش‌های گسترده‌تر آینده در ریزازدیادی این گونه سخت‌کار باشد.

واژه‌های کلیدی: بنزیل‌آدنین، پینه رویان‌زا، توده‌های پیش‌رویانی، رویان قلبی، رویان کروی، نفتالین‌استیک‌اسید.

مقدمه

انارشیطان (*Tecomella undulata* (Sm.) Seem) یک گیاه چندساله چوبی، زینتی و همیشه‌سبز از خانواده Bignoniaceae است که در نواحی بیابانی با آب‌وهوای گرم خشک و نیمه‌خشک جنوب کشور رشد می‌کند. علاوه‌بر تاج زیبا، این درخت جنگلی از اسفندماه تا اواخر اردیبهشت‌ماه، گل‌های جذابی دارد که برای فضای سبز مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری بسیار مناسب است. این گونه چندمنظوره علاوه‌بر مقاومت به خشکی و باد، یک تولیدکننده زی‌توده باکیفیت نیز محسوب می‌شود. برگ، پوست، چوب و ریشه انارشیطان، خاصیت‌های دارویی زیادی دارند (Ahmad *et al.*, 1994; Chal *et al.*, 2011). به‌دلیل‌های متعددی ازجمله

بهره‌برداری بیش‌ازحد از چوب انارشیطان و تخریب توده‌های جنگلی کوچک آن طی توسعه شهری و صنعتی، این گونه در جنوب ایران روبه‌انقراض است. این درخت در هند نیز به‌عنوان یک گونه گیاهی در معرض خطر (Endangered) طبقه‌بندی شده است (Kalia *et al*., 2014). بااین‌حال، بزرگ‌ترین چالش درزمینه حفاظت از انارشیطان، عدم موفقیت این گونه در زادآوری بذری است. باززایی طبیعی این درخت ازطریق پاجوش‌ها انجام می‌گیرد که به‌تعداد کم و ناکافی در پایه‌های مسن تولید می‌شوند. ازطرف دیگر، سخت‌ریشه‌زا بودن آن در تکثیر با قلمه ساقه باعث شده است که روش ازدیاد رویشی برای تولید انبوه نهال‌های انارشیطان کارآمد نباشد.

افزایش درون‌شیشه‌ای، پیشرفتی را در تولید انبوه کلونال گونه‌های سخت‌کار (Recalcitrant) ارائه می‌دهد. گیاهان کامل به‌صورت بالقوه می‌توانند از سلول‌ها، بافت‌ها یا اندام‌های کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای ازطریق اندام‌زایی (Organogenesis) یا رویان‌زایی سوماتیکی (Somatic embryogenesis) باززایی شوند. از هر دو مسیر می‌توان گیاهان را به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم (باززایی به‌واسطه بافت پینه) باززایی کرد (Fehér, 2019). در انارشیطان، همه تلاش‌های گذشته در این زمینه مبتنی‌بر استفاده از اندام‌زایی بوده است که در آن قطعه‌های گره‌ای یا میان‌گره‌ای به‌دست‌آمده از پایه‌های بالغ یا از مواد افزایشی درون‌شیشه‌ای به‌عنوان ماده اولیه کشت استفاده شده‌اند (Aslam *et al*., 2009; Tyagi & Tomar, 2013; Chhajer & Kalia, 2017; Emam *et al*., 2020). بااین‌حال، این تلاش‌ها هنوز به یک پروتکل باززایی کارآمد منتج نشده است. مهم‌ترین مانع، توانایی بسیار اندک ریزشاخه‌های این گونه در ریشه‌زایی نابجا بوده است. رویان‌زایی سوماتیکی با تولید رویان‌های دوقطبی قابل‌نمو به گیاهان کامل از سلول‌های سوماتیکی، فرایندی جایگزین برای ازدیاد انبوه ژنوتیپ‌های برتر، در معرض انقراض و یا پرتقاضا محسوب می‌شود (Robert *et al*., 2015). این فرایند برای تعداد معدودی از گونه‌های چوبی ازجمله توسکای قشلاقی (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.)، *Terminalia chebula* Retz. و نوئل (*Picea* spp.) گزارش شده است (Corredoira *et al*., 2013; Anjaneyulu & Giri, 2018; Hazubska-Przybył *et al*., 2020). براساس دانش نویسندگانِ پژوهش پیش‌رو تاکنون گزارشی درمورد افزایش انارشیطان ازطریق رویان‌زایی سوماتیکی منتشر نشده است.

موفقیت در رویان‌زایی سوماتیکی به ژنوتیپ‌های معین، مراحل نموی گیاه و انواع ریزنمونه بستگی دارد (Fehér, 2019). یکی از پیش‌نیازهای کلیدی برای القای رویان سوماتیکی، وجود ریزنمونه‌ای با منبعی از سلول‌های بنیادی است (Fehér, 2019; Kalaipandian *et al*., 2021). پژوهش‌ها درمورد رویان‌زایی سوماتیکی در گونه‌های درختی اغلب بر استفاده از ریزنمونه‌های رویشی بالغ متمرکز بوده‌اند. بااین‌حال، توان بالقوه بیشتر در اندام‌های زایشی مانند تخمدان طی این فرایند نیز گزارش شده است (Martinelli *et al*., 2003; Gambino *et al*., 2021). القای بافت‌های رویان‌زا اغلب به استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت وابسته است. اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها، تنظیم‌کننده‌های اصلی رشد در این زمینه به‌شمار می‌آیند. ازجمله رایج‌ترین آن‌ها می‌توان به ۲،۴-دی‌کلروفنوکسی‌استیک‌اسید (2,4-D)، α-نفتالین‌استیک‌اسید (NAA)، ۶-بنزیل‌آدنین (BA) و تیدیازورون (TDZ) اشاره کرد که به‌صورت مکرر برای رویان‌زایی سوماتیکی و پُرآوری (Proliferation) بافت‌های رویان‌زا استفاده می‌شوند (Maruyama & Hosoi, 2019). ازاین‌رو، پژوهش پیش‌رو به‌منظور بررسی پاسخ ریخت‌زایی درون‌شیشه‌ای تخمدان به تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف و ارزیابی پتانسیل رویان‌زایی سوماتیکی در انارشیطان انجام شد. اثر غلظت ساکارز در محیط کشت بر پیشبرد نمو بافت‌ها و توده‌های باززایی‌شده نیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

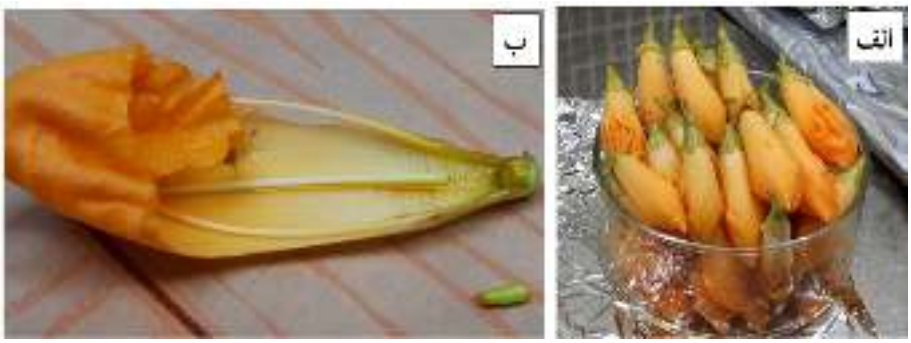
تهیه محیط کشت

پژوهش پیش‌رو در قالب چهار آزمایش و با استفاده از محیط کشت‌های تغییریافته MS (Murashigue & Skoog, 1962) و هفت تنظیم‌کننده رشد در غلظت‌ها و

ترکیب‌های گوناگون انجام گرفت. برای القای پینه رویان‌زا و نیز پرآوری پینه، محیط کشت تغییریافته شماره یک (نیم غلظت عناصر ماکرو MS، غلظت کامل عناصر میکرو و ویتامین‌ها) در سه آزمایش نخست به‌کار برده شد. در آزمایش اول از اکسین‌های NAA (۰/۱ تا پنج میلی‌گرم بر لیتر) و 2,4-D (۰/۱ تا پنج میلی‌گرم بر لیتر) و در آزمایش دوم از سیتوکینین‌های TDZ (۰/۱ تا دو میلی‌گرم بر لیتر) و BA (پنج تا ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر) در این محیط کشت استفاده شد. آزمایش سوم شامل پرآوری پینه‌های رویان‌زا با استفاده از اکسین‌های NAA (پنج تا ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)، ایندول-۳-بوتیریک اسید IBA (۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و ایندول-۳- استیک اسید IAA (۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر) در ترکیب‌های مختلف بود. یک محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. آزمایش چهارم شامل نمو و بالغ‌سازی رویان‌های سوماتیکی با استفاده از محیط کشت MS تغییریافته شماره دو (غلظت کامل عناصر ماکرو و میکرو محیط MS و ویتامین‌های Gamborg's B5) تکمیل‌شده با جیبرلیک‌اسید (GA_3) (صفر، ۰/۵ و یک میلی‌گرم بر لیتر) و BA (۰/۲، یک و پنج میلی‌گرم بر لیتر) بود. ساکارز با غلظت‌های ۳۰ و ۷۰ گرم بر لیتر در محیط‌های کشت حاوی GA_3 و در غلظت ۳۰ گرم بر لیتر در محیط کشت حاوی BA استفاده شد. پیش از استقرار کشت‌ها، محیط‌های آماده‌شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۱ اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند.

آماده‌سازی و کشت ریزنمونه

برای دو آزمایش اول، گل‌آذین‌هایی با گل‌های بازنشده و گرده‌افشانی‌نشده در مرحله بادکنکی از نیمه دوم اسفندماه تا نیمه دوم فروردین‌ماه سال ۱۳۹۹ از پایه‌های بالغ مسن در توده انارشیطان رویشگاه شبانکاره در شهرستان دشتستان استان بوشهر برداشت شدند. پس از انتقال آن‌ها به آزمایشگاه، گل‌های منفرد بازنشده جدا شدند و ازطریق غوطه‌ورسازی در اتانول ۹۶ درصد به‌مدت ۱۵ ثانیه گندزدایی شدند. سپس، مادگی گل‌ها درون یک دستگاه لامینار فعال جدا شد و خامه و کلاله آن، قطع و دور ریخته شد (شکل ۱). تخمدان‌های کامل به‌صورت افقی روی محیط‌های آماده‌شده کشت شدند. طی آزمایش سوم، برای پرآوری پینه رویان‌زا، پینه‌های رویان‌زای مشتق از محیط حاوی NAA از آزمایش اول به‌عنوان ریزنمونه‌های آغازین استفاده شدند. همچنین، آزمایش چهارم، با هدف به دست آوردن رویان‌های سوماتیکی بالغ، با استفاده از مواد پرآوری‌شده حاصل از آزمایش سوم انجام شد. در هر آزمایش، به ازای هر تیمار، پانزده ریزنمونه کشت شد. تعداد تکرار هر تیمار نیز سه‌بار بود.



شکل ۱- آماده‌سازی ریزنمونه‌های انارشیطان

الف) غنچه‌هایی که در مرحله بادکنکی گندزدایی سطحی شدند و ب) یک ریزنمونه تخمدان به طول چهار میلی‌متر که از یک غنچه گندزدایی‌شده استخراج شده است.

طرح آزمایشی، ثبت مشاهده‌ها و تجزیه آماری

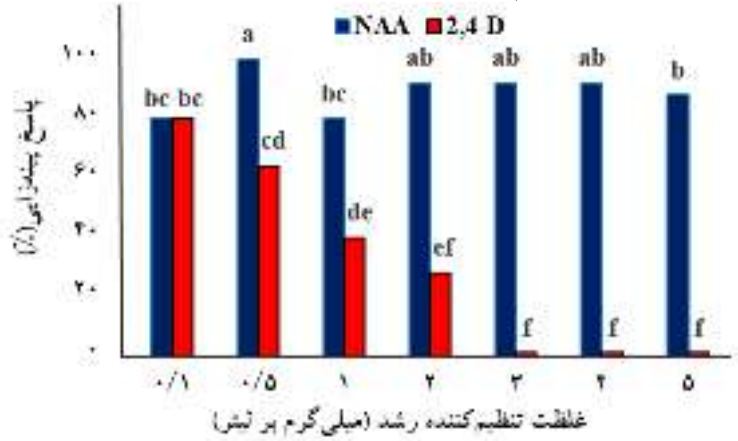
آزمایش‌ها در قالب طرح آماری کامل تصادفی با سه تکرار انجام شدند. هشت هفته پس از کشت، ریزنمونه‌ها ازنظر رشد، نمو و پرآوری پینه، اندام، توده‌های پیش‌رویانی (PEMs: pro-embryogenic masses) و رویان سوماتیکی بررسی شدند. داده‌های مربوط به درصد پینه‌زایی، زنده‌مانی ریزنمونه، ریزنمونه‌های پرآوری‌شده و پرآوری مجدد پینه با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه‌وتحلیل شدند. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای جدید دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. کیفیت، بافت و رنگ پینه نیز به‌صورت چشمی ارزیابی و به‌صورت توصیفی ثبت شدند.

نتایج

القای پینه رویان‌زا با استفاده از NAA و 2,4-D

در آزمایش اول، NAA برتری قابل‌توجهی را نسبت به 2,4-D در القای پینه نشان داد (شکل ۲). صددرصد پینه‌زایی با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌دست آمد، درحالی‌که پینه‌زایی با غلظت‌های دیگر NAA حداقل ۸۰ درصد بود. غلظت‌های دو، سه و چهار میلی‌گرم بر لیتر NAA سبب پینه‌زایی ریزنمونه‌ها به‌مقدار ۹۲ درصد شدند. مقدار پینه در ۰/۱ و یک میلی‌گرم بر لیتر NAA متوسط، در دو، چهار و پنج میلی‌گرم بر لیتر زیاد و در تیمار سه میلی‌گرم بر لیتر، بسیار زیاد ارزیابی شد. 2,4-D در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر توانست ۸۰ درصد پینه‌زایی را القا کند. افزایش غلظت 2,4-D به بیشتر از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر سبب کاهش چشمگیر پینه‌زایی شد. به‌طورکلی، مقدار پینه القاشده ناشی از 2,4-D در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر، کم بود. با افزایش غلظت آن تا دو میلی‌گرم بر لیتر، پینه به مقیاس خیلی کم افت کرد. در سه میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و بیشتر، تولید پینه متوقف شد.

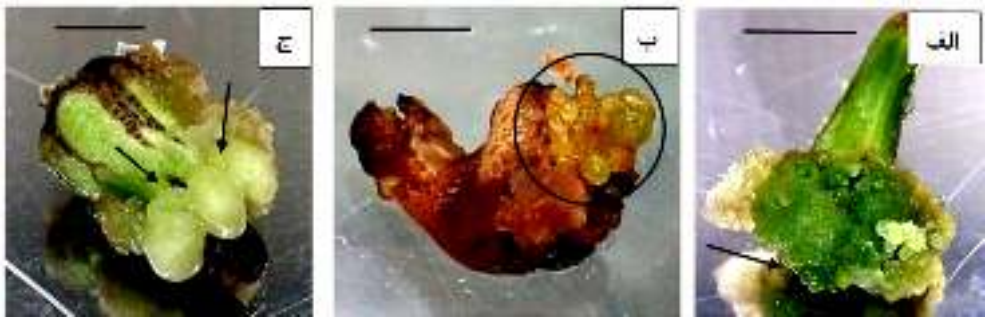
ازنظر بافت و رنگ پینه، همه غلظت‌های استفاده‌شده NAA و نیز 2,4-D در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر سبب ایجاد پینه ترد به‌رنگ سبز روشن شدند. چنین پینه‌هایی برای رویان‌زایی سوماتیکی، مستعد هستند (شکل ۳). سطح‌های القایی 2,4-D (بیشتر از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) که به تشکیل پینه‌های ترد قهوه‌ای رنگ منجر شدند، به‌طور معمول مواد نامناسبی برای نمو بیشتر به‌شمار می‌آیند. همراه با پینه‌زایی، برخی از مرحله‌های رویان‌زایی سوماتیکی نیز در محیط کشت‌های حاوی NAA رخ داد. NAA با غلظت‌های یک و دو میلی‌گرم بر لیتر توانست توده‌های پیش‌رویانی را به‌ترتیب به‌مقدار ۴۰ و ۲۰ درصد القا کند و تعداد کمی از رویان‌های سوماتیکی (کمتر از پنج رویان) را در مرحله رویان کروی نشان داد (شکل ۳-ج)، درحالی‌که NAA با غلظت چهار میلی‌گرم بر لیتر، توده‌های پیش‌رویانی را القا کرد که تعداد بیشتری از رویان‌های کروی را ایجاد کردند (شکل ۳-الف و ب).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف NAA و 2,4-D بر پینه‌زایی ریزنمونه تخمدان انارشیطان در محیط کشت MS شماره یک پس از گذشت هشت هفته از کشت

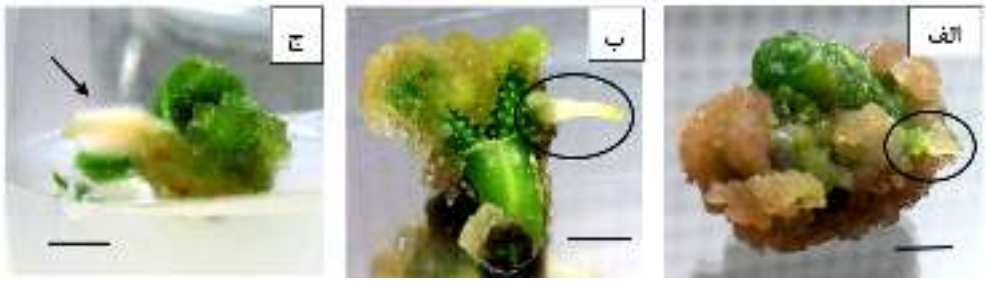
حرف‌های انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.

بیشترین غلظت NAA (پنج میلی‌گرم بر لیتر) سبب القای ریشه نابجا بدون ایجاد رویان سوماتیکی قابل‌مشاهده شد (شکل ۴). محیط‌های حاوی 2,4-D هیچ پیشرفتی، نه در اندام‌زایی و نه در رویان‌زایی سوماتیکی ایجاد نکردند. به‌طورکلی و با مقایسه دو اکسین استفاده‌شده، برجسته‌ترین نتایج برای NAA به‌دست آمد که می‌تواند سبب تولید رضایت‌بخش پینه‌های رویان‌زا همراه با شروع رویان‌زایی سوماتیکی شود.



شکل ۳- ریخت‌زایی ریزنمونه‌های تخمدان انارشیطان در محیط تکمیل‌شده با NAA

الف) باززایی شبه‌رویان‌های سوماتیکی از پینه رویان‌زای ترد تولیدشده در انتهای قاعده‌ای ریزنمونه در محیط کشت حاوی **NAA** با غلظت چهار میلی‌گرم بر لیتر، ب) خوشه‌ای از رویان‌های سوماتیکی کروی در انتهای قاعده‌ای تخمدان در محیط کشت حاوی **NAA** با غلظت چهار میلی‌گرم بر لیتر و ج) نمو پینه دانه‌ای در انتهای خامه‌ای تخمدان در محیط حاوی **NAA** با غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر (طول خط افقی مشکی‌رنگ، پنج میلی‌متر است.)



شکل ۴- ریشه‌زایی نابجا از بافت تخمدان انارشیطان در محیط تکمیل‌شده با NAA در غلظت پنج میلی‌گرم بر لیتر

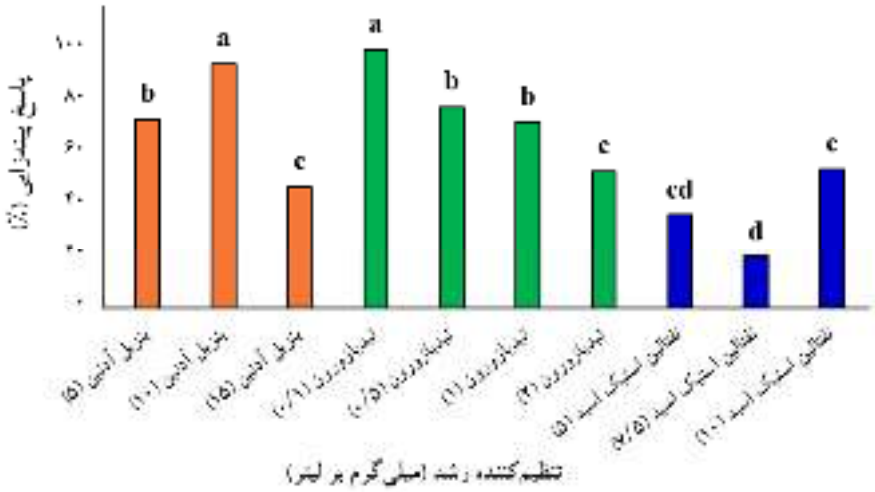
الف) تشکیل یک جفت ریشه بدون تار کشنده پس از گذشت چهار هفته از کشت، ب) یک جفت ریشه در حال نمو تارهای کشنده در شش هفته پس از کشت و ج) یک تک‌ریشه با تارهای انبوه پس از گذشت هشت هفته از کشت (طول خط افقی مشکی‌رنگ، پنج میلی‌متر است.)

القای پینه رویان‌زا با استفاده از BA، TDZ و غلظت زیاد NAA

محیط‌های حاوی BA، ۴۷ تا ۹۴ درصد پینه‌زایی را نشان دادند. بیشینه این مقدار (۹۴/۴ درصد) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد (شکل ۵). به‌طور مشابه، TDZ در همه غلظت‌های اعمال‌شده سبب پینه‌زایی شد. صددرصد پینه‌زایی برای غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ به‌دست آمد. با افزایش TDZ، درصد پینه‌زایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. به‌طوری‌که افزایش ۲۰ برابری غلظت TDZ (دو میلی‌گرم بر لیتر) سبب کاهش ۵۰ درصدی در پاسخ پینه‌زایی شد (فقط ۵۳/۳ درصد پینه‌زایی). به‌عبارت‌دیگر، مقدار پینه بر هر ریزنمونه پاسخ‌گو از بسیار زیاد در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ به کم در غلظت دو میلی‌گرم بر لیتر تنزیل یافت. کمیت پینه با افزایش سطح NAA به پنج میلی‌گرم بر لیتر و بیشتر، به مقیاس متوسط و حتی کم کاهش یافت. NAA اعمال‌شده در غلظت‌های بیشتر (پنج تا ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) ضعیف‌ترین القای پینه را در مقایسه با هر دو سیتوکینین استفاده‌شده به‌همراه داشت، درحالی‌که در آزمایش اول،

بیشترین مقدار پینه در محدوده دو تا چهار میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌دست آمد.

پینه‌های تولیدشده توسط BA، TDZ و NAA از نوع فشرده بودند. ویژگی مشترک هر سه تنظیم‌کننده رشد مذکور این بود که با افزایش غلظت آن‌ها در محیط کشت، رنگ پینه تیره‌تر شد. پینه‌های به‌دست‌آمده از BA، قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره، پینه‌های حاصل از TDZ به‌رنگ سبز مایل به قهوه‌ای و پینه‌های تولیدشده از محیط کشت با غلظت زیاد NAA به‌رنگ‌های قهوه‌ای روشن (در غلظت پنج میلی‌گرم بر لیتر) و سبز مایل به قهوه‌ای (در غلظت‌های ۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) بودند. درمجموع، محیط کشت تکمیل‌شده با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ به‌عنوان بهترین تیمار القایی برای پینه‌زایی در آزمایش دوم شناخته شد. بااین‌وجود، محیط‌های سیتوکینینی دیگر و محیط‌های حاوی مقدار زیادتر NAA نتوانستند پینه رویان‌زا القا کنند. زیرا نشانه‌ای از تشکیل توده‌های پیش‌رویانی مشاهده نشد.



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین، تیدیازورون و نفتالین استیک اسید بر پینه‌زایی ریزنمونه تخمدان انارشیطان در محیط کشت MS شماره یک پس از گذشت هشت هفته از کشت

حرف‌های انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.

پرآوری پینه رویان‌زا و تشکیل رویان‌های سوماتیکی

پینه‌های رویان‌زای ناشی از NAA به یک محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد و نیز به محیط‌های حاوی اکسین‌های مختلف منتقل شدند. بیشینه نرخ زنده‌مانی ریزنمونه (۸۰ درصد) در محیط بدون تنظیم‌کننده رشد و نیز در محیط‌های حاوی ۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA با و بدون ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA (به‌ترتیب ۷۷/۷ و ۶۶/۷ درصد) به‌دست آمد. بیشترین درصد ریزنمونه‌های پرآوری‌کرده در محیط کشت حاوی ۷/۵ و پنج میلی‌گرم بر لیتر NAA، هرکدام با ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA (به‌ترتیب ۷۷/۷ و ۵۶/۳ درصد) ثبت شدند. همچنین، بیشترین امتیاز برای کمیت پینه پرآوری‌شده مربوط به محیط کشت‌هایی با غلظت ۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و نیز NAA همراه با IBA (به‌ترتیب با غلظت‌های پنج و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بودند (جدول ۱).

علاوه‌بر پرآوری پینه، ساختارهای رویان‌زا نیز ایجاد شد. در محیط شاهد، چندین رویان سوماتیکی کروی و قلبی‌شکل در چند ریزنمونه به‌صورت برجسته مشاهده شد (شکل ۶- الف). همه محیط‌های حاوی فقط NAA، نمو توده‌های پیش‌رویانی را بروز دادند و رویان‌های سوماتیکی کروی و قلبی‌شکل متعددی را به‌نمایش گذاشتند (شکل ۶- ب). قوی‌ترین رویان‌زایی سوماتیکی در محیط حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر NAA مشاهده شد که تعداد زیادی رویان کروی و

قلبی‌شکل (تا ۳۴ رویان در هر ریزنمونه) را در ۸۵ درصد از کشت‌های زنده‌مانده و پرآوری‌کرده القا و ایجاد کرد. ترکیب IBA و IAA با NAA اثر بازدارندگی بر القا و نمو رویان‌های سوماتیکی در پینه‌های رویان‌زای پرآوری‌کرده داشت، بنابراین محتاطانه می‌توان استنباط کرد که تحت شرایط حاکم بر این آزمایش، اکسین‌های IBA و IAA ممکن است به تشکیل رویان سوماتیکی در انارشیطان آسیب زده باشند.

جدول ۱- پرآوری پینه از تخمدان‌های پینه‌داده انارشیطان در پاسخ به تیمارهای اکسینی مختلف در محیط کشت MS شماره یک پس از گذشت هشت هفته از کشت

NAA	IBA	IAA	درصد زنده‌مانی ریزنمونه	درصد ریزنمونه پرآوری‌کرده	کمیت پرآوری پینه	بافت و رنگ پینه	پاسخ رویان‌زایی
۰	۰	۰	a۸۰	bc۵۳/۲	متوسط	ترد، سبز روشن تا زرد روشن	۲۰ درصد ریزنمونه‌ها با توده‌های پیش‌رویانی، رویان‌های کروی و قلبی شکل متعدد
۵	۰	۰	۵۵/۵ bc	cd۲۷/۷	کم	ترد، سبز مایل به زرد لیمویی	۷۵ درصد ریزنمونه‌ها با توده‌های پیش‌رویانی و رویان‌های متعدد
۷/۵	۰	۰	۶۶/۷ ab	bcd۴۴	زیاد	فشرده، سبز مایل به زرد لیمویی	۷۵ درصد ریزنمونه‌ها با توده‌های پیش‌رویانی و رویان‌های متعدد
۱۰	۰	۰	۲۵ d	۲۵ d	متوسط	فشرده، سبز روشن تا مایل به قهوه‌ای	۸۵ درصد ریزنمونه‌ها با توده‌های پیش‌رویانی و رویان‌های کروی و قلبی‌شکل متعدد
۵	۲/۵	۰	۶۴/۵ b	۵۶/۳ ab	زیاد	فشرده، سبز روشن	-
۷/۵	۲/۵	۰	۷۷/۷ ab	a۷۷/۷	متوسط	فشرده، سبز روشن	-
۵	۲/۵	۲/۵	۴۴/۳ cd	۴۴/۳ bcd	متوسط	فشرده و گرانوله، سبز روشن	-

حرف‌های انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.

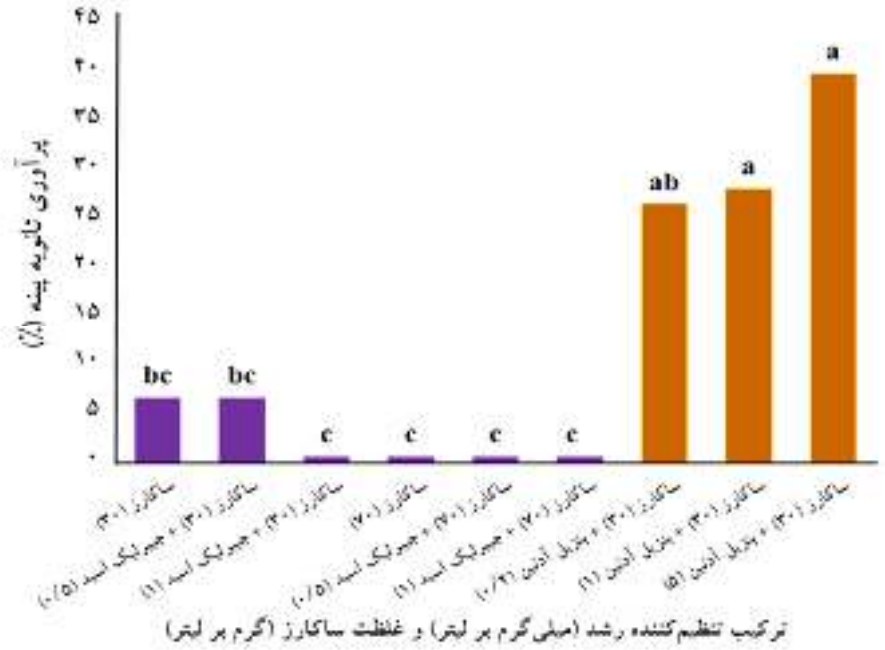
غلظت‌ها در سه ستون اول برحسب میلی‌گرم بر لیتر هستند.

شکل ۶- مراحل نموی گوناگون پینه‌های رویان‌زای مشتق از تخمدان انارشیطان در محیط کشت‌های پرآوری پینه با یا بدون اکسین

الف) تشکیل پیش‌رویان‌ها و رویان‌های کروی و قلبی‌شکل متعدد پس از گذشت هشت هفته از انتقال پینه رویان‌زا به محیط فاقد تنظیم‌کننده رشد، ب) تشکیل رویان‌های سوماتیکی کروی و قلبی‌شکل خوب‌نمویافته در محیط حاوی NAA با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر و ج) پرآوری و تشکیل پینه گرانوله فشرده در محیط حاوی NAA، IAA و IBA به‌ترتیب با غلظت‌های پنج، ۲/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر (طول خط افقی مشکی‌رنگ، پنج میلی‌متر است.)

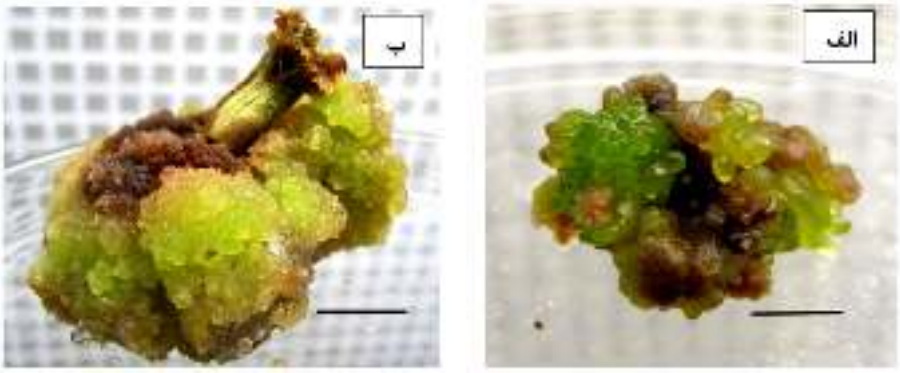
نمو و بالغ‌سازی توده‌های پیش‌رویانی و رویان‌های سوماتیکی

پینه‌های رویان‌زای پرآوری‌کرده در آزمایش سوم که حامل ساختارهای رویانی بودند، پس از انتقال به محیط فاقد تنظیم‌کننده رشد (شاهد) و نیز به محیط‌های تکمیل‌شده با GA_3 و BA در غلظت‌های مختلف به‌صورت جداگانه در آزمایش چهارم ارزیابی شدند. هنگامی‌که GA_3 به‌عنوان تنها منبع تنظیم‌کننده رشد در محیط کشت وجود داشت، اثر غلظت ساکارز نیز در دو سطح شامل دُز استاندارد و دز زیاد (به‌ترتیب ۳۰ و ۷۰ گرم بر لیتر) آزمایش شد. محیط‌های حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز هم بدون تنظیم‌کننده رشد و هم با GA_3 (۰/۵ و یک میلی‌گرم بر لیتر) نتوانستند مسیر رویان‌زایی سوماتیکی را پیش ببرند. پرآوری ثانویه پینه در محیط شاهد و محیط حاوی GA_3 با غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی‌گرم بر لیتر به‌ترتیب ۶/۷، ۶/۷ و نزدیک به صفر ثبت شد که تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (شکل ۷). این دو محیط سبب تولید پینه‌های فشرده به‌رنگ سبز روشن و به‌مقدار کم تا متوسط شدند. صرف‌نظر از غلظت GA_3، افزایش سطح ساکارز به ۷۰ گرم بر لیتر در محیط کشت نه‌تنها به نمو پینه رویان‌زا منجر نشد، بلکه پاسخ‌دهی ریزنمونه‌ها را به‌طور کامل فلج کرد و سبب زوال تدریجی آن‌ها شد. تقویت محیط کشت با غلظت‌های کم BA (۰/۲ و یک میلی‌گرم بر لیتر) سبب پرآوری ثانویه و القای رویان‌زایی در حدود ۲۵ درصد از پینه‌های رویان‌زا شد (شکل ۸- الف). اگرچه افزایش سطح BA به پنج میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش پرآوری پینه شد (شکل ۸- ب)، اما رویان‌زایی را مختل کرد. مقدار پینه ثانویه تولیدشده در محیط‌های حاوی ۰/۲، یک و پنج میلی‌گرم بر لیتر BA به‌ترتیب زیاد، خیلی زیاد و خیلی زیاد ارزیابی شد. بافت پینه‌های به‌دست‌آمده از BA در هر سه غلظت مورد استفاده فشرده بود. پینه‌ها نیز در دو غلظت کمتر BA به‌رنگ سبز روشن مایل به قهوه‌ای و در بیشترین غلظت آن (پنج میلی‌گرم بر لیتر)، سبز روشن بودند.



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین، جیبرلیک اسید و ساکارز بر پرآوری ثانویه پینه از پینه‌های رویان‌زا و توده‌های پیش‌رویانی در محیط کشت MS شماره دو پس از گذشت ده هفته از کشت

حرف‌های انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.



شکل ۸- الگوهای نموی گوناگون پینه رویان‌زا و توده‌های پیش‌رویانی مشتق از تخمدان انارشیطان پس از گذشت ده هفته از انتقال به محیط حاوی BA و ساکارز

الف) تشکیل پیش‌رویان‌ها و رویان‌های سوماتیکی ثانویه (کروی، قلبی‌شکل و اژدری) در محیط حاوی **BA** با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر، ب) پرآوری فراوان پینه رویان‌زای گرانوله فشرده در محیط **MS** شماره دو حاوی **BA** با غلظت پنج میلی‌گرم بر لیتر (طول خط افقی مشکی‌رنگ، پنج میلی‌متر است.)

بحث

اکسین‌ها، تنظیم‌کننده‌های کلیدی مؤثر بر رویش گیاهان هستند که ریخت‌زایی درون‌شیشه‌ای ازجمله رویان‌زایی سوماتیکی را کنترل می‌کنند (Hazubska-Przybył *et al.*, 2020). به‌طورکلی، رایج‌ترین روش برای القای رویان‌زایی سوماتیکی، قرارگیری اولیه ریزنمونه‌ها در محیطی حاوی دزهای بیشتر اکسین است که در اغلب موارد سبب تشکیل پینه رویان‌زا می‌شود. به‌دنبال آن، ریزنمونه‌ها به محیطی بدون اکسین، محیطی با کاهش شدید غلظت اکسین و یا محیطی تکمیل‌شده با غلظت‌های بهینه سیتوکینین‌ها منتقل می‌شوند (Fehér *et al.*, 2002; Isah, 2016). بااین‌وجود، برخی از گونه‌ها به رویان‌زایی سوماتیکی حتی در محیط حاوی اکسین (محیط القای رویان‌زایی) تمایل دارند (Isah, 2016; Adil *et al.*, 2018).

در پژوهش پیش‌رو از دو اکسین معروف (NAA و 2,4-D) و دو سیتوکینین پرمصرف (BA و TDZ) به‌عنوان مکمل‌های محیطی برای القای پینه رویان‌زا از ریزنمونه‌های تخمدان گرده‌افشانی‌نشده انارشیطان استفاده شد. نتایج نشان داد که NAA ازنظر القای پینه رویان‌زا، عملکرد بهتری نسبت به 2,4-D در محدوده غلظت استفاده‌شده داشت. NAA در غلظت‌های کم تا متوسط توانست پینه‌های رویان‌زایی را القا کند که حامل ساختارهای رویانی بودند. Patel و Patel (۲۰۱۳) با استفاده جداگانه از NAA و 2,4-D، پینه‌زایی قابل‌قبولی از ریزنمونه‌های میان‌گره‌ای انارشیطان گزارش کردند، اما در پژوهش آن‌ها، هیچ نشانه‌ای از رویان‌زایی سوماتیکی یافت نشد. به‌جز تفاوت‌های ژنوتیپی به‌نظر می‌رسد که نوع ریزنمونه مورد استفاده در پژوهش مذکور، نقش تعیین‌کننده‌ای در عدم تولید رویان داشت. برای مدت طولانی تصور می‌شد که اکسین فقط در اندام‌های جوان درحال‌رشد تولید می‌شود و به بافت‌ها و اندام‌های هدف منتقل می‌شود. بااین‌حال، Robert و همکاران (۲۰۱۵) نقش بیوسنتز موضعی اکسین را در فرایندهای نمو اندام زایشی و رویان برجسته کردند. براساس نتایج آن‌ها، بیوسنتز موضعی اکسین در سلول‌های بسیار کمی و در پنجره‌های نموی خاصی در پرچم، مادگی، تخمک و رویان رخ می‌دهد. این منابعِ به‌تازگی شناسایی‌شده اکسین بر جریان اکسین درون بافت‌های زایشی و رویان‌ها و سپس، تشکیل شیب‌های اکسینی که نقش کلیدی در ریخت‌زایی اندام دارند، تأثیر می‌گذارند. براین‌اساس، ریزنمونه‌های تخمدان در مقایسه با ریزنمونه‌های دیگر با منشأ بافت رویشی مانند ریزنمونه‌های قطعه‌های میان‌گره‌ای بالغ که توسط Patel و Patel (۲۰۱۳) استفاده شده‌اند، ممکن است ازنظر محتوای اکسین غنی‌تر باشند. پیش‌تر، NAA به‌عنوان

یک تنظیم‌کننده رشد و تقویت‌کننده رویان‌زایی سوماتیکی در گونه‌های دیگری مانند نوئل (*Picea abies* (L.) H.Karst.) و *Fraxinus mandshurica* Rupr. گزارش شده بود (Hazubska-Przybył *et al*., 2020; Liu *et al*., 2020). همچنین، نتایج Al-Shara و همکاران (۲۰۲۰) و Zhang و همکاران (۲۰۲۱) حاکی از اثرات مثبت 2,4-D بر القای رویان‌زایی سوماتیکی به‌ترتیب در گونه‌های چوبی *Carica papaya* L. و *Camellia oleifera* C.Abel هستند. اختلاف بین این نتایج و یافته‌های پژوهش پیش‌رو می‌تواند به‌دلیل عوامل متعددی مانند تفاوت در ساختار ژنتیکی گونه‌ها، نوع ریزنمونه‌ها، فصل جمع‌آوری آن‌ها، مرحله نموی پایه مادری و شرایط رشدی آن باشد که بر محتوای هورمون‌های گیاهی درون‌زای ریزنمونه تأثیر می‌گذارند. ظهور ریشه‌های نابجا در تخمدان‌های کشت‌شده، ریخت‌زایی غیرمنتظره‌ای بود که در محیط حاوی NAA با غلظت زیاد (پنج میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده شد. در پژوهش‌های گذشته نیز وقوع ریشه‌زایی نابجا طی القای رویان‌زایی سوماتیکی با استفاده از یک محیط تقویت‌شده با اکسین در چندین گونه چوبی مانند باران طلایی (*Koelreuteria paniculata* Laxm.) و زیتون (*Olea europaea* L.) گزارش شده بود (Yang *et al*., 2018; Pires *et al*., 2020)، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که غلظت(های) غیربهینه اکسین در محیط کشت می‌تواند مسیر رویان‌زایی سوماتیکی را در ریزنمونه منحرف کند.

سیتوکینین‌ها (BA و TDZ) و غلظت‌های زیاد NAA استفاده‌شده در آزمایش دوم نتوانستند پینه رویان‌زا القا کنند. رویان‌های سوماتیکی اغلب از پینه ترد و نرم یا پینه‌های دانه‌ای (Granular) به‌رنگ سفید یا زرد نشئت می‌گیرند (Gambino *et al*., 2021) که در این آزمایش مشاهده نشدند. Tyagi و Tomar (۲۰۱۳) و Chhajer و Kalia (۲۰۱۷) نیز با بررسی اندام‌زایی درون‌شیشه‌ای انارشیطان با استفاده از ریزنمونه‌های رویشی در محیط‌های حاوی BA گزارش کردند که پینه‌زایی فراوان با معدودی جوانه ساقه مشاهده شد. TDZ، یک ترکیب فنیل‌اوره جایگزین است که فعالیت شبه‌سیتوکینینی قوی دارد. در پژوهش‌های متعددی، استفاده از TDZ برای رویان‌زایی سوماتیکی در بسیاری از گونه‌های چوبی مانند چریش (*Azadirachta indica* A.Juss.) و بلوبری یا زغال اخته آبی (*Vaccinium corymbosum L.* ×*V. angustifolium* Ation) گزارش شده است (Murthy & Saxena, 1998; Ghosh *et al*., 2018). براساس نتایج Chhajer و Kalia (۲۰۱۷) به‌علت پرآوری بیش‌ازحد پینه توسط TDZ، استفاده از آن به‌منظور افزایش ریزشاخه در کشت درون‌شیشه‌ای انارشیطان توصیه نمی‌شود. این پاسخ ریخت‌زایی در پژوهش پیش‌رو نیز مشاهده شد. غلظت‌های بیشتر سیتوکینین‌ها باعث مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (Programmed cell death) در کشت‌های سلولی می‌شوند (Carimi *et al*., 2003)، بنابراین استفاده از آن‌ها در غلظت‌های به‌نسبت زیاد می‌تواند تأثیر منفی بر رویش در محیط کشت بگذارد.

نتایج دیگر پژوهش پیش‌رو نشان داد که محیط بدون تنظیم‌کننده رشد، بهترین انتخاب برای پرآوری پینه ترد است. این یافته با نتایج Adil و همکاران (۲۰۱۸) درمورد *Cnidium officinale* Makino مطابقت دارد، درحالی‌که Zhang و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که محیط بدون هورمون، بهترین محیط برای نمو رویان‌های کروی به رویان‌های مرحله لپه‌ای (و نه برای پرآوری پینه) در *Camellia oleifera* C.Abel است. بیشترین القای رویان‌زایی سوماتیکی در محیط حاوی NAA با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (جدول ۱). بااین‌وجود، محیط حاوی ۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA نیز نرخ قابل‌قبولی از بقای ریزنمونه و پرآوری پینه و درصد رضایت‌بخشی از نمو رویان را نشان داد. در پژوهش‌های پیشین نیز NAA به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد مناسب برای پرآوری بافت رویان‌زا در برخی گونه‌های دیگر گزارش شده بود (Hazubska-Przybył *et al*., 2020; Liu *et al*., 2020).

برای تکمیل فرایند رویان‌زایی سوماتیکی، رویان‌های سوماتیکی مراحل اولیه باید به مرحله لپه‌ای و سپس، مرحله بلوغ رویان نمو یابند. چنین رویان‌های بالغی اغلب بسته به ژنوتیپ می‌توانند در محیط بدون هورمون یا غنی‌شده با

هورمون جوانه بزنند. در آزمایش چهارم، استفاده از GA_3 در محیط کشت بر رشد ساختارهای رویانی تأثیر منفی گذاشت. نتایج بعضی از پژوهش‌ها حاکی از اثرات بازدارنده GA_3 بر تشکیل و نمو رویان سوماتیکی در برخی گونه‌های گیاهی دیگر است (Hutchinson *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2010). بااین‌وجود، اثر تحریکی GA_3 در القا، تشکیل یا جوانه‌زنی رویان سوماتیکی در گونه‌های دیگر مانند نارگیل (*Cocos nucifera* L.) گزارش شده است (Montero-Córtes *et al.*, 2010). به‌نظر می‌رسد که درنهایت، ماهیت ژنتیکی گونه‌ها و نیز تعادل هورمونی درون‌زای وابسته به نوع ریزنمونه به‌ویژه محتوای ذاتی جیبرلین‌ها، تعیین‌کننده نیاز یا عدم نیاز به استفاده از جیبرلین‌های برون‌زا در نموی رویان‌زایی سوماتیکی هستند. براساس نتایج پژوهش پیش‌رو، افزایش منبع کربوهیدراتی محیط کشت (ساکارز) به سطح ۷۰ گرم بر لیتر، رشدونمو توده‌های پیش‌رویانی و رویان‌های سوماتیکی مرحله‌های اولیه (کروی، قلبی‌شکل و اژدری) را سرکوب می‌کند.

برخلاف GA_3، محیط‌های تکمیل‌شده با غلظت‌های کم BA (تا یک میلی‌گرم بر لیتر) بر نمو پینه‌های رویان‌زا و توده‌های پیش‌رویانی، تأثیر مثبت گذاشتند، بنابراین محیط بهینه برای حفظ قابلیت رویان‌زایی سوماتیکی در پینه‌های رویان‌زا، محیطی است که شامل ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۰/۲ تا یک میلی‌گرم بر لیتر BA باشد. این یافته با نتایج به‌دست‌آمده توسط Corredoira و همکاران (۲۰۱۳) و Liu و همکاران (۲۰۲۰) به‌ترتیب درمورد توسکای قشلاقی و *Fraxinus mandshurica* Rupr. مطابقت دارد. برای برخی گونه‌هایی که به‌طور رضایت‌بخشی به ساکارز پاسخ نمی‌دهند، جایگزینی آن با منبع‌های کربوهیدراتی دیگر یا استفاده از عوامل اسمزکننده برای پیشبرد فرایند رویان‌زایی سوماتیکی و بلوغ رویان‌ها پیشنهاد شده است (Salaj *et al.*, 2020; Valencia-Lozano *et al.*, 2021).

درمجموع، نتایج پژوهش پیش‌رو نشان داد که NAA در غلظت‌های کم (۰/۵، دو، سه و چهار میلی‌گرم بر لیتر) بهترین القاکننده پینه رویان‌زا در ریزنمونه تخمدان است. NAA در غلظت ۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر، تیماری مناسب برای پرآوری پینه رویان‌زایی بود که توسط همین تنظیم‌کننده القا شد. این تیمار علاوه‌بر ۴۴ درصد پرآوری پینه، ۷۵ درصد از پینه‌ها را به تولید توده‌های پیش‌رویانی و رویان‌های کروی تحریک کرد. بااین‌وجود، محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد نیز با ۸۰ درصد زنده‌مانی ریزنمونه، ۵۳/۲ درصد پرآوری پینه همراه با ۲۰ درصد القای توده‌های پیش‌رویانی و رویان‌های کروی و قلبی‌شکل متعدد، عملکرد بسیار رضایت‌بخشی نشان داد. با وجود اینکه بیشینه درصد پرآوری پینه (۷۷/۷ درصد) در محیط کشت حاوی ۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌اضافه ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد، اما این محیط، هیچ‌گونه ریخت‌زایی از نمو رویان‌های سوماتیکی را نشان نداد. محیط کشت حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و BA در غلظت‌های ۰/۲ و یک میلی‌گرم بر لیتر، تأثیر مثبتی بر نمو پیش‌رویان‌ها داشت، اما این محیط، قادر به نمو آن‌ها به مرحله رویان لپه‌ای نبود. پژوهش پیش‌رو به‌عنوان اولین پژوهش درمورد رویان‌زایی سوماتیکی انارشیطان و توان تخمدان آن برای باززایی درون‌شیشه‌ای، یافته‌های امیدوارکننده‌ای را ارائه کرد. باززایی درون‌شیشه‌ای گونه‌های چوبی در مقایسه با گونه‌های علفی بسیار دشوارتر است و به زمان و هزینه بیشتری نیاز دارد. درنتیجه، بهینه‌سازی یک شیوه‌نامه جامع برای رویان‌زایی سوماتیکی انارشیطان به‌عنوان یک گونه باارزش و در خطر انقراض، مستلزم حمایت‌های مادی و معنوی سازمان‌های مرتبط است.

منابع مورد استفاده

- Adil, M., Kang, D.I. and Jeong, B.R., 2018. Data on recurrent somatic embryogenesis and *in vitro* micropropagation of *Cnidium officinale* Makino. Data in Brief, 19: 2311-2314.
- Ahmad, F., Khan, R.A. and Rasheed, S., 1994. Preliminary screening of methanolic extracts of *Celastrus paniculatus* and *Tecomella undulata* for analgesic and anti-inflammatory activities. Journal of Ethnopharmacology, 42(3): 193-198.
- Al-Shara, B., Taha, R.M., Mohamad, J., Elias, H. and Khan, A., 2020. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the *Carica papaya* L. cv. Eksotika.

changes of antioxidant properties in tissue cultures of half-high blueberry plants. Scientific Reports, 8: 16978.
- Hazubska-Przybył, T., Ratajczak, E., Obarska, A. and Pers-Kamczyc, E., 2020. Different roles of auxins in somatic embryogenesis efficiency in two *Picea* species. International Journal of Molecular Sciences, 21(9): 3394.
- Hutchinson, M.J., KrishnaRaj, S. and Saxena, P.K., 1997. Inhibitory effect of GA_3 on the development of thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium×hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. Plant Cell Reports, 16: 435-438.
- Isah, T., 2016. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. Acta Physiologiae Plantarum, 38: 118.
- Kalaipandian, S., Mu, Z., Kong, E.Y.Y., Biddle, J., Cave, R., Bazarafshan, A., ... and Adkins, S.W., 2021. Cloning coconut via somatic embryogenesis: A review of the current status and future prospects. Plants, 10(10): 2050.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Sharma, R. and Bhatt, R.K., 2014. Understanding *Tecomella undulata*: an endangered pharmaceutically important timber species of hot arid regions. Genetic Resources and Crop Evolution, 61: 1397-1421.
- Liu, Y., Wei, C., Wang, H., Ma, X., Shen, H. and Yang, L., 2020. Indirect somatic embryogenesis and regeneration of *Fraxinus mandshurica* plants via callus tissue. Journal of Forestry Research, 32: 1613-1625.
- Martinelli, L., Gribaudo, I., Semenzato, M. and Poletti, V., 2003. Ovary as valuable explant for somatic embryogenesis induction in grapes (*Vitis* spp.). Acta Horticulturae, 603: 499-504.
- Maruyama, T.E. and Hosoi, Y., 2019. Progress in somatic embryogenesis of Japanese pines. Frontiers in Plant Science, 10: 31.
- Montero-Córtes, M., Sáenz, L., Córdova, I., Quiroz, A., Verdeil, J.L. and Oropeza, C., 2010. GA_3 stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). Plant Cell Reports, 29: 1049-1059.
- Murashigue, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.
- Murthy, B.N.S. and Saxena, P.K., 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). Plant Cell Reports, 17: 469-475.
- Patel, M.B. and Patel, R.S., 2013. Impact of plant growth regulators (PGRs) on callus induction from internodal explants of *Tecomella undulata* (Sm.) Seem- A multipurpose medicinal plant. International Plants, 9(3): 360.
- Anjaneyulu, C. and Giri, C.C., 2018. Biochemical characterization of somatic embryogenesis and genetic transformation studies in *Terminalia chebula* Retz.: An immensely valuable medicinal tree. Annals of Phytomedicine, 7(1): 38-51.
- Aslam, M., Singh, R., Anandhan, S., Pande, V. and Ahmed, Z., 2009. Development of a transformation protocol for *Tecomella undulata* (Smith) Seem from cotyledonary node explants. Scientia Horticulturae, 121(1): 119-121.
- Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M. and Lo Schiavo, F., 2003. Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. Planta, 216(3): 413-421.
- Chal, J., Kumar, V. and Kaushik, S., 2011. A phytopharmacological overview on *Tecomella undulata* G. Don. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1(1): 11-12.
- Chen, A.H., Yang, J.L., Niu, Y.D., Yang, C.P., Liu, G.F., Yu, C.Y. and Li, C.H., 2010. High-frequency somatic embryogenesis from germinated zygotic embryos of *Schisandra chinensis* and evaluation of the effects of medium strength, sucrose, GA_3, and BA on somatic embryo development. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 102: 357-364.
- Chhajer, S. and Kalia, R.K., 2017. Seasonal and micro-environmental factors controlling clonal propagation of mature trees of marwar teak [*Tecomella undulata* (Sm.) Seem]. Acta Physiologiae Plantarum, 39: 60.
- Corredoira, E., Valladares, S., Martínez, M.T., Vieitez, A.M. and San José, M.C., 2013. Somatic embryogenesis in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Trees, 27: 1597-1608.
- Emam, M., Mirjani, L., Hesamzade Hejazi, M. and Soltanipoor, M.A., 2020. Influence of medium and plant growth regulators on *in vitro* growth indexes of *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 28(1): 67-78 (In Persian).
- Fehér, A. 2019. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? Frontiers in Plant Science, 10: 536.
- Fehér, A., Pasternak, T., Ötvös, K., Miskolczi, P.C. and Dudits, D., 2002. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. Biologia - Section Botany, 51(1): 5-12.
- Gambino, G., Moine, A., Boccacci, P., Perrone, I. and Pagliarani, C., 2021. Somatic embryogenesis is an effective strategy for dissecting chimerism phenomena in *Vitis vinifera* cv Nebbiolo. Plant Cell Reports, 40: 205-211.
- Ghosh, A., Igamberdiev, A.U. and Debnath, S.C., 2018. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis and

Journal of Scientific and Research Publications, 3(11): 1-3.
- Pires, R., Cardoso, H., Ribeiro, A., Peixe, A. and Cordeiro, A., 2020. Somatic embryogenesis from mature embryos of *Olea europaea* L. cv. 'Galega vulgar' and long-term management of calli morphogenic capacity. Plants, 9(6): 758.
- Robert, H.S., Khaitova, L.C., Mroue, S. and Benková, E., 2015. The importance of localized auxin production for morphogenesis of reproductive organs and embryos in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany, 66(16): 5029-5042.
- Salaj, T., Klubicová, K., Panis, B., Swennen, R. and Salaj, J., 2020. Physiological and structural aspects of *in vitro* somatic embryogenesis in *Abies alba* Mill. Forests, 11(11): 1210.
- Tyagi, H. and Tomar, U.K., 2013. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and rooting of mature *Tecomella undulata* (Sm.) Seem tree. Research in Plant Sciences, 1(2): 38-44.
- Valencia-Lozano, E., Ibarra, J.E., Herrera-Ubaldo, H., De Folter, S. and Cabrera-Ponce, J.L., 2021. Osmotic stress-induced somatic embryo maturation of coffee *Coffea arabica* L., shoot and root apical meristems development and robustness. Scientific Reports, 11: 9661.
- Yang, X., Yang, X., Guo, T., Gao, K., Zhao, T., Chen, Z. and An, X., 2018. High-efficiency somatic embryogenesis from seedlings of *Koelreuteria paniculata* Laxm. Forests, 9(12): 769.
- Zhang, M., Wang, A., Qin, M., Qin, X., Yang, S., Su, S. and Zhang, L., 2021. Direct and indirect somatic embryogenesis induction in *Camellia oleifera* Abel. Frontiers in Plant Science, 12: 644389.

In vitro regeneration of desert teak (*Tecomella undulata* (Sm.) Seem); Investigating somatic embryogenesis potential of ovary explant

S. Rastgoo [1*] and H.R. Nooryazdan [2]

1*- Corresponding author, Assistant Prof., Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran. E-mail: rastgoo@pgu.ac.ir
2- Assistant Prof., Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran

Received: 02.01.2022 Accepted: 22.01.2022

Abstract

Tecomella undulata (Sm.) Seem known as desert teak, a multipurpose woody species has fallen under the category of endangered plants mainly due to lack of an efficient natural reproduction system. Inherent low adventitious rooting of cuttings has been the principal cause of failure in its vegetative propagation. Hence, research was conducted to assess *in vitro* somatic embryogenesis potential in the species. Ovary explant was cultured in modified MS media fortified with various auxins and cytokinins. The results revealed that NAA was superior in the induction of embryogenic callus (EC). NAA at 0.5, 2, 3 and 4 mg L^{-1} induced the highest ECs exhibiting developing pro-embryogenic masses and globular somatic embryos. TDZ and BA, though induced good callogenesis at low concentrations but the formed calli were non-embryogenic. The proliferation of embryogenic calli was the best on a phytohormone-free medium. The media containing NAA at 7.5 and 10 mg L^{-1} NAA only, induced somatic embryos alongside callus proliferation. The media containing low concentrations of BA (0.2 and 1 mg L^{-1}) resulted in recurrent embryogenesis. Application of BA and GA_3, and elevating the sucrose concentration of the culture medium did not make advancement in the maturation of the somatic embryos formed during stages of callogenesis and callus proliferation. The findings achieved in this study in the field of induction of EC and somatic embryo can be a beneficial basis for future extensive studies on micropropagation of this recalcitrant species.

Keywords: Benzyl adenine, embryogenic callus, globular embryo, heart-shaped embryo, pro-embryogenic masses, α-naphthalene acetic acid.