دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

تولید بذر مصنوعی از طریق کپسوله کردن نوک شاخه‌ها در دو هیبرید ایرانی آفتابگردان (*Helianthus annuus* hyb. Azargol and Farrokh)

سهیلا مرادی[۱]، محمدرضا عظیمی[۲]، سعید پورداد[۳] و حیدر ذوالنوریان[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه زنجان، (نویسنده مسوول moradi_s998@ymail.com)
۲- استادیار، دانشگاه زنجان
۳- دانشیار، معاونت تحقیقات دیم سرارود، کرمانشاه
۴- کارشناس، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه
تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۷

چکیده

تولید بذر مصنوعی می‌تواند ابزاری برای استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی در بهبودکیفیت و افزایش میزان تولید آفتابگردان به‌کار رود. ریز نمونه نوک شاخه جدا شده از شاخه‌های تکثیر یافته آفتابگردان (هیبرید آذرگل و فرخ) در شرایط درون شیشه‌ای، در دانه‌های آلژینات کلسیم کپسوله شدند. بهترین ترکیب ژلی با استفاده از آلژینات سدیم ۳٪ و ۱۰۰ mM $CaCl_2.2H_2O$ به دست آمد. حداکثر درصد تبدیل نوک شاخه‌های کپسوله شده به گیاهچه ۴ هفته پس از کشت روی محیط MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد ۱۰۰٪ بود. توانایی رشد نوک شاخه‌های کپسوله شده تحت تأثیر غلظت آلژینات سدیم و حضور یا عدم حضور مواد غذایی MS (عناصر ماکرو و میکرو همراه با ساکارز) و تنظیم‌کننده‌های رشد در دانه‌های آلژینات سدیم قرار گرفت. گیاهچه‌هایی که ساقه و ریشه آن‌ها به خوبی توسعه پیدا کرده بود به گلدان‌های حاوی مخلوط کوکوپیت، پرلیت و پیت ماس (۱:۱:۱) اتوکلاو شده منتقل شدند. کپسوله کردن ریزنمونه‌های رویشی در دانه‌های آلژینات کلسیم می‌تواند جایگزین استفاده از جنین‌های سوماتیکی برای تولید بذرهای مصنوعی شود.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، بذرهای مصنوعی، دانه‌های آلژینات، کپسوله کردن، نوک شاخه

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دانه روغنی به‌شمار می‌رود (۱). افزایش محتوای روغن همراه با افزایش مقاومت به بیماری‌ها از اهداف اصلاحی این محصول محسوب می‌شود. به دلیل محدودیت تنوع طبیعی، اصلاح ژنتیکی آفتابگردان برای صفات زراعی عموماً روی توانایی انتقال ژن‌های مطلوب از خویشاوندان وحشی از طریق روش‌های اصلاحی متداول پایه‌گذاری شده است (۲۱). صفات مهم مقاومت به آفات و بیماری‌ها و هم‌چنین تحمل به خشکی و شوری موجود در خویشاوندان وحشی آفتابگردان می‌تواند منبع با ارزشی برای اصلاح ارقام زراعی در نظر گرفته شود (۲۸). اما متأسفانه استفاده از خیلی از گونه‌های وحشی به دلیل وجود موانع طبیعی تلاقی محدود شده است (۳۳). برای اصلاح ژنتیکی صفات مختلف می‌توان از روش‌های جدید بیوتکنولوژی گیاهی از جمله امتزاج پروتوپلاستی یا انتقال ژن، مکمل روش‌های کلاسیک، استفاده نمود. کارایی تمام روش‌های جدید، مشروط به موفقیت در باززایی گیاه از ریزنمونه‌های مختلف است (۱). در دو دهه اخیر روش‌های گوناگونی نظیر اندام‌زایی (۳۳،۱۶،۸،۷) و جنین‌زایی سوماتیکی (۳۲،۲۵،۱۴) برای باززایی آفتابگردان استفاده شده است. در همه این روش‌ها، نسبت پایین باززایی گیاه، مورفوژنز غیرطبیعی، ناتوانی برای بلوغ هم‌زمان جنین‌ها و گل‌دهی نابهنگام از مهم‌ترین مشکلات به‌شمار می‌روند (۲۱،۱۹). فراوانی باززایی در آفتابگردان بستگی به ژنوتیپ دارد و اغلب ژنوتیپ‌های گزارش‌شده سرسخت هستند (۲۳،۱۳). تکنولوژی بذر مصنوعی امروزه کمک با ارزشی برای ازدیاد کلون‌های گیاهی در مقیاس وسیع است (۴۰،۳۹،۳۸،۲۷). در سال‌های اخیر کپسوله کردن ریزنمونه‌های رویشی تکثیرشده در شرایط درون شیشه‌ای به جای استفاده از جنین‌های سوماتیکی برای توسعه بذرهای مصنوعی به‌کار می‌رود (۴۲،۳۷). کپسوله کردن ریزنمونه‌های رویشی تکثیر شده یک سیستم ارزشمند و کارا برای تکثیر کلونی‌های گیاهی است. این ریزنمونه‌های رویشی تکثیر شده را می‌توان برای نگهداری ژرم پلاسم و تبادل مواد گیاهی فاقد آلودگی بین آزمایشگاه‌ها به‌کار برد (۴۵).

بذرهای مصنوعی را می‌توان به‌صورت جداکشت‌های کپسوله شده از جمله نوک شاخه‌ها، جوانه‌های جانبی یا جنین‌های سوماتیکی با استفاده از ژل آلژینات، اتیلن گلیکول، دی متیل سولفوکسید و سایر موادی تعریف کرد که باعث توسعه و تبدیل جداکشت‌ها به گیاه

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.183]

می‌شود، تعریف کرد (۲۴). برای تهیه بذرهای مصنوعی لازم است که جدا کشت‌ها کپسوله شوند. این کار از طریق به کار بردن هیدروژل‌های محلول در آب می‌تواند انجام پذیرد. پوشش باید دارای مواد تغذیه‌ای، تنظیم‌کننده‌های رشد و سایر اجزایی باشد که برای جوانه‌زنی و تبدیل لازم هستند و باید به وسیله‌ی ماشین‌های کشاورزی حاضر قابل کشت باشد (۴)، آلژینات برای کپسوله‌کردن از همه بهتر است. دلیل این امر، سهولت کاربرد و عدم سمیت آن است (۱۰). نتایج تحقیقات نشان داده است که برای کنترل رشد و سهولت جوانه‌زنی، آندوسپرم مصنوعی مشابه آندوسپرم با منشأ جنسی می‌تواند حاوی یک یا چند ترکیب مثل مواد مغذی، تنظیم‌کننده‌های رشد، آنتی‌پاتوژن‌ها، علف‌کش‌ها، کنترل‌کننده‌های زیستی و کودهای زیستی به‌منظور اطمینان از تبدیل به گیاه و توسعه آن در مزرعه باشد که رشد را کنترل کرده و جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی را تسهیل می‌بخشد (۲۹،۲۶،۱۵).

تکنولوژی بذر مصنوعی می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مفید بوده و اجازه تکثیر خیلی از ژنوتیپ‌ها را در زمان کوتاه فراهم سازد. تولید گیاهان هیبرید که ژنوتیپ‌های ناپایدار هستند، نگهداری ژرم پلاسم و استفاده در اهداف تحقیقی و تجزیه‌ای مختلف مثل مطالعه نقش آندوسپرم، بررسی دقیق نقش موادی مثل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، آفت‌کش‌ها و غیره روی مکانیسم‌های گیاهی از جمله کاربردهای بذرهای مصنوعی می‌باشد. با وجود این مزایا گزارشات کمی از کپسوله کردن اندام‌های رویشی وجود دارد (۴۰،۳۸،۳۰،۲۷،۲). با توجه به مشاهده هتروزیس و اهمیت تولید ارقام هیبرید در آفتابگردان از یک سو، هزینه بالای تولید و نیاز به تهیه هر ساله این ارقام از سویی دیگر و نیز اهمیت کاربرد کشت بافت گیاهی ابزاری در برای استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای بهبود و افزایش تولید آفتابگردان در نظر گرفته می‌شود، تولید بذر مصنوعی در ارقام هیبرید با ارزش تجاری می‌تواند روش مناسبی برای تکثیر این بذرها باشد.

مواد و روش‌ها

ضدعفونی مواد گیاهی و تکثیر ریزنمونه‌ها

در این آزمایش از بذر دو هیبرید به نام‌های آذرگل و فرخ استفاده گردید. بذرها در شهریورماه ۱۳۹۱ از بخش دانه‌های روغنی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال بذر کرج تهیه گردید. بذرهای بالغ به مدت ده دقیقه در محلول قارچ کش بنومیل (۱/۵ گرم در هزار میلی‌لیتر آب مقطر) حاوی سه قطره توین ۲۰ قرار گرفته و بعد از آبکشی با آب مقطر به زیر هود منتقل شدند. در زیر هود نمونه‌ها به مدت دو دقیقه در الکل اتانول ۷۰ درصد شسته شده و به مدت پنج دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. سپس بذرها در هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد استریل سطحی شده و سه بار با آب مقطر استریل هر بار ۵ دقیقه آبکشی شدند. برای ظهور گیاهچه‌ها، بذرها در محیط MS حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار کشت شدند. pH محیط قبل از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۲/۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه روی ۵/۷ تنظیم شد. بذرها در لوله‌های حاوی ده میلی‌لیتر از محیط جوانه‌زنی در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶/۸ تاریکی/ روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نوک شاخه‌ها از گیاهچه‌های (۲۱ روزه) رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای جدا شده و ریزنمونه‌ای برای تکثیر شاخه‌ها استفاده شدند. نوک شاخه‌ها روی محیط MS حاوی ۰/۵ mg/l BA برای تکثیر شاخه‌های جانبی قرار گرفتند. pH محیط قبل از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم شد. ظروف ارلن مایر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط‌های تکثیر و سه ریزنمونه در اتاق رشد با شرایط مذکور قرار داده شدند.

کپسوله کردن نوک شاخه‌ها

برای تعیین غلظت مناسب سدیم آلژینات و کلرید کلسیم با توجه به آزمایش‌های انجام گرفته روی سایر گیاهان سه غلظت مختلف (۲، ۳ و ۴ درصد) برای آلژینات سدیم و غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار برای کلرید کلسیم انتخاب شد. نوک شاخه‌ها با استفاده از پنس و اسکالپل جدا شده و در آلژینات کلسیم کپسوله شدند. پس از کپسوله کردن نوک شاخه‌ها، میزان جوانه‌زنی آنها پس از ده روز مقایسه و بهترین غلظت سدیم آلژینات و کلرید کلسیم انتخاب شد. نوک شاخه‌های حاصل از محیط تکثیر برای تولید بذر مصنوعی استفاده گردید. به این ترتیب که ابتدا با آلژینات سدیم مخلوط شده سپس به همراه دو میلی‌لیتر از آلژینات از طریق سمپلر برداشته شده و به آرامی داخل کلرید کلسیم چکانده شدند. کپسول‌ها برای پلیمریزاسیون به مدت ۲۰ دقیقه در محلول کلرید کلسیم نگهداری شدند. بذرهای مصنوعی به‌دست آمده (نوک شاخه‌های کپسوله شده) به مدت پنج دقیقه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. کپسول‌ها سپس با پنس برداشته شده و روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند تا خشک شوند. برای کپسوله کردن نوک شاخه‌ها در تهیه ژل آلژینات سدیم، از سه ماتریکس آب مقطر، محیط MS مایع و محیط MS مایع به همراه دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و دو میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA استفاده شد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.183]

تبدیل نوک شاخه‌های کپسوله شده به گیاهچه‌های کامل

برای تبدیل به گیاهچه‌های کامل تحت شرایط درون شیشه‌ای، بذرهای مصنوعی (نوک شاخه‌های کپسوله شده) و نوک شاخه‌های کپسوله نشده بلافاصله بعد از کپسوله کردن به محیط MS جامد فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل شده و میزان باززایی آنها بررسی شد.

انتقال گیاهچه‌ها به گلدان

گیاهچه‌های دارای شاخه و ریشه توسعه‌یافته پس از شستشوی ملایم زیر آب برای حذف محیط چسبیده به آن به گلدان‌های (با قطر هفت سانتی‌متر) حاوی کوکوپیت، پرلیت و پیت ماس (۱:۱:۱) استریل شده با اتوکلاو منتقل شدند. گیاهچه‌ها با کلاهک‌های پلی‌اتیلنی شفاف برای اطمینان از حفظ رطوبت در دو هفته اول پوشانده شده و به تدریج برای سازگاری با شرایط بیرون باز شدند. گلدان‌ها با محلول غذایی سه در هزار فوسامکو محلول پاشی شده و در اتاق سازگاری با شرایط دمایی ۲۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد نگهداری شدند. بعد از ۴ هفته گیاهچه‌ها با موفقیت سازگار شده و به گلدان‌های بزرگ‌تر (با قطر ۳۰ سانتی‌متر) حاوی ماسه، خاک باغچه و کود دامی استریل (۱:۱:۱) منتقل شدند. گیاهچه‌های داخل خاک گلدان به مدت ۴ هفته در شرایط اتاق سازگاری باقی مانده و در نهایت، برای رشد و توسعه بیشتر به گلخانه منتقل شدند.

طرح آزمایشی و تجزیه داده‌ها

درصد تبدیل نوک شاخه‌های کپسوله شده و کپسوله نشده به گیاهچه ۴ هفته پس از کشت اندازه‌گیری شد. تبدیل نوک شاخه‌های کپسوله شده با ظهور ساقه و برگ‌های جدید و ریشه تعیین شده و اندازه‌گیری شاخص‌های رشدی به‌صورت هفتگی صورت گرفت.

آزمایش تعیین درصد مناسب مواد برای کپسوله کردن نوک شاخه‌ها در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورهای مربوط به آزمایش تعیین درصد مناسب مواد کپسوله کننده شامل آلژینات سدیم در سه سطح و کلرید کلسیم در سه سطح بود. این آزمایش‌ها با پنج تکرار و چهار ریز نمونه در هر تکرار انجام شد.

آزمایش تولید بذر مصنوعی در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار انجام شد. فاکتورها شامل هیبرید در دو سطح (آذرگل و فرخ) و نوع تهیه ماتریکس آلژینات سدیم در ۳ سطح (آلژینات تهیه شده با آب مقطر، آلژینات تهیه شده با محیط MS مایع ، آلژینات تهیه شده با محیط MS مایع به همراه دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و دو میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA) و نوک شاخه‌های کپسوله نشده شاهد در نظر گرفته شد. در این آزمایش تعداد ۴ ریز نمونه برای هر تکرار در لوله‌های آزمایش قرار گرفت. در مواردی که داده‌ها به‌صورت درصدی و حاصل از شمارش بودند با استفاده از فرمول تبدیل زاویه‌ای $\text{Arcsin}\sqrt{x}$ تبدیل شده و در صورت وجود صفر بین داده‌ها از فرمول ۰/۵+ $\text{Arcsin}\sqrt{x}$ برای تبدیل داده‌ها استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و SAS و آزمون دانکن در سطح احتمال α= ۰/۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

خصوصیات دانه‌های آلژینات کلسیم

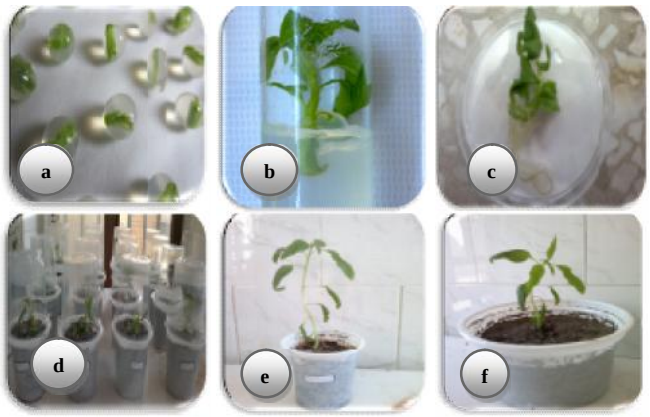
با شمارش تعداد بذرهای مصنوعی جوانه‌زده و محاسبه درصد جوانه‌زنی و نیز مقایسه کپسوله‌های شکل‌گرفته از لحاظ شکل، قطر کپسول و سخت، نرم یا متعادل بودن کپسول‌ها، بهترین غلظت آلژینات سدیم و کلرید کلسیم انتخاب گردید. جدول ۱ خصوصیات ظاهری و درصد جوانه‌زنی نوک شاخه‌های کپسوله شده را در هر یک از تیمارها نشان می‌دهد.

با توجه به اهمیت میزان جوانه‌زنی و قطر کپسول‌های حاصل از غلظت‌های متفاوت مواد کپسوله‌کننده برای این صفات تجزیه واریانس انجام شد که نتایج حاصل از این تجزیه (جدول ۲) نشان داد که غلظت‌های مختلف آلژینات سدیم و کلرید کلسیم تأثیر بسیار معنی‌داری (در سطح ۱٪) روی میزان جوانه‌زنی کپسول‌ها داشت. اثر غلظت‌های مختلف آلژینات سدیم و کلرید و هم‌چنین اثر متقابل آن‌ها روی قطر کپسول‌ها در هر دو ریز نمونه بسیار معنی‌دار بود.

برای تعیین بهترین غلظت آلژینات سدیم و کلرید کلسیم، مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین (شکل‌های ۱، ۲ و جدول ۲) نشان داد از بین غلظت‌های به‌کار گرفته شده برای آلژینات سدیم و کلریدکلسیم بیشترین میزان جوانه‌زنی مربوط به تیمار آلژینات سدیم سه درصد و کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار بوده است و ترکیب این دو غلظت باعث شد که دانه‌های آلژینات با بیشترین قطر تولید شود که این کپسول‌ها ریزنمونه را به خوبی پوشش می‌دادند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.183]



a: بذرهای مصنوعی حاصل از کپسوله کردن نوک شاخه‌ها در آلژینات سدیم ۳٪ و کلرید کلسیم ۱۰۰mM، b: جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی روی محیط MS، c: شستن محیط روی ریشه، d: کاشت گیاهچه‌ها در گلدان، e: برداشتن کلاهک‌ها از روی گلدان، f: انتقال گیاهچه‌ها به گلدان حاوی خاک.

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی میزان جوانه‌زنی و قطر کپسول‌ها

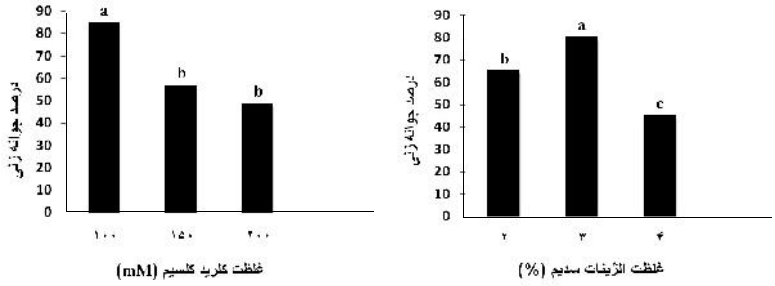
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد جوانه‌زنی	قطر بذر
آلژینات سدیم	۲	۰/۲۹۰۵**	۱۲/۵۴۵۹**
کلرید کلسیم	۲	۰/۲۷۰۶**	۱۱/۵۷۳۷**
آلژینات × کلرید	۴	۰/۰۱۴۰^{ns}	۳/۶۸۰۶**
اشتباه آزمایشی	۳۶	۰/۰۱۴۵	۰/۴۲۰۴

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

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی خصوصیات ظاهری و درصد جوانه‌زنی کپسول‌ها

نوع ریزنمونه	آلژینات سدیم (٪)	کلرید کلسیم (mM)	قطر کپسول (mm)	درصد جوانه‌زنی	خصوصیات ظاهری کپسول‌ها
نوک شاخه‌ها	۲	۱۰۰	۸/۱۷۴^{b}	۹۵^{a}	گرد، نرم، جابجایی سخت، شفاف
	۲	۱۵۰	۶/۱۸۲^{c}	۵۰^{cd}	گرد، نرم، جابجایی سخت، شفاف
	۲	۲۰۰	۶/۳۴^{c}	۵۰^{cd}	تقریباً گرد، نرم، جابجایی سخت، شفاف
	۳	۱۰۰	۹/۲۲۶^{a}	۱۰۰^{a}	گرد، مناسب، قابل جابجایی، شفاف
	۳	۱۵۰	۸/۰۴۴^{b}	۸۰^{ab}	گرد، سخت، تأخیر جوانه‌زنی، شفاف
	۳	۲۰۰	۶/۰۶۶^{c}	۶۰^{bc}	دنباله‌دار، سخت، تأخیر جوانه‌زنی، شفاف
	۴	۱۰۰	۶/۰۶۲^{c}	۶۰^{bc}	دنباله‌دار، سخت، تأخیر جوانه‌زنی، کدر
	۴	۱۵۰	۵/۹۴۲^{c}	۴۰^{d}	دنباله‌دار، سخت، تأخیر جوانه‌زنی، کدر
	۴	۲۰۰	۵/۸۴۶^{c}	۳۵^{d}	دنباله‌دار، سخت، تأخیر جوانه‌زنی، کدر

در هر ستون حروف مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار می باشد.



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی درصد جوانه‌زنی کپسول‌ها.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.183]

دانه‌های آلژینات سدیم از لحاظ بافت، شکل، نفوذپذیری و میزان سختی ویژگی‌های متفاوتی داشتند. بهترین غلظت برای کمپلکس کردن، آلژینات سدیم سه درصد و کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار بود که دانه‌های گرد، شفاف و هم قطر تولید کرد. غلظت پایین‌تر آلژینات سدیم نه تنها زمان پلیمریزاسیون را افزایش داد بلکه منجر به تولید دانه‌های نرمی شد که کار کردن با آنها طی انتقال به محیط کشت سخت بود. کاهش توانایی ژلاتینه شدن غلظت‌های پایین آلژینات سدیم بعد از قرارگیری در معرض دمای بالا طی اتوکلاو قبلاً نیز از سوی سینگ و همکاران (۴۱) گزارش شده بود. در عوض غلظت‌های بالای دو ماده شیمیایی کپسوله کننده باعث تولید دانه‌های تقریباً هم قطر اما سختی شد که به طور قابل‌توجهی جوانه‌زنی را به تأخیر می‌انداخت. این نتایج با یافته‌های دانسو و فورد- لویود (۱۸)، سینگ و همکاران (۳۹،۳۸)، احمد و آنیس (۲)، چانگ و همکاران (۱۷) و عواطف بدر- الدن (۶) مطابقت داشت.

بافت، شکل، قطر و شفافیت کپسول‌ها از دیدگاه مورفولوژی بستگی به ترکیبات مختلف آلژینات سدیم و کلرید کلسیم دارد (۳۰). غلظت پلیمر، غلظت آلژینات سدیم استفاده شده، غلظت کلرید کلسیم و زمان تیمار پارامترهای مهم در تعیین نفوذپذیری، مقاومت و سختی دانه‌های حاصل می‌باشد (۱۲). هانگ و ترومن (۲۳) نیز در مطالعه غلظت‌های مختلف آلژینات و مدت زمان قرارگیری در کلرید کلسیم، عنوان کردند آلژینات سدیم سه درصد و قرارگیری در محلول $mM\ CaCl_2.2H_2O$ ۱۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه، دانه‌های یک فرم، گرد، شفاف و سفتی ایجاد می‌کند. رائی و همکاران (۳۴) عنوان کردند که کپسول‌های حاصل از ۲ درصد آلژینات سدیم شکننده بوده و شکل نامرتبی دارند درحالی‌که در غلظت ۴ درصد کپسول‌ها هم اندازه بوده ولی خیلی سفت بودند، در غلظت ۳ درصد آلژینات سدیم بهترین نتایج به دست آمد.

مالابادی و وان- استادن (۲۹) و بلاک (۱۲) گزارش دادند که درصد جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی کپسوله شده به‌طور معنی‌داری تحت‌تأثیر غلظت آلژینات سدیم و مدت زمان قرارگیری در کلرید کلسیم قرار دارند. سینگ و همکاران (۴۱) نیز غلظت ۳ درصد آلژینات سدیم را برای کپسوله کردن اندام‌های هوایی *Rhododendro maddeni* پیشنهاد دادند.

غلظت بالای کلریدکلسیم باعث سفتی بیش از حد کپسول‌ها می‌شود. سرکار و نیک (۳۷) برای کپسوله کردن *Solanum tubersom*، نیک و چاند (۳۰) برای *Punica granatum*، سینگ و همکاران (۳۸) برای *Phylianthus amarus* غلظت صد میلی‌مول کلرید کلسیم را بهترین غلظت برای ایجاد کپسول‌های یکنواخت و شفاف معرفی کردند.

تأثیر کاربرد مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس ژل آلژینات‌سدیم روی میزان باززایی ریزنمونه‌های کپسوله شده

با استفاده از غلظت‌های به‌دست آمده از آزمایش قبلی، اقدام به تولید بذر مصنوعی از طریق کپسوله کردن نوک شاخه‌ها شد. برای کپسوله کردن ریزنمونه‌های رویشی در تهیه ژل آلژینات سدیم، از سه ماتریکس آب مقطر، محیط MS مایع و محیط MS مایع به همراه دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و دو میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA استفاده شد.

جدول ۳ تأثیر ماتریکس‌های مختلف روی میزان باززایی و برخی از پارامترهای رشد در بذرهای مصنوعی حاصل از کپسوله کردن نوک شاخه‌ها را در دو هیبرید مورد ارزیابی، چهار هفته پس از کشت روی محیط MS نشان می‌دهد. به غیر از اثر هیبرید و اثر متقابل هیبرید و ماتریکس روی تعداد شاخه‌های جانبی و درصد ریشه‌دهی تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری را برای اثر هیبرید، اثر ماتریکس و اثر متقابل هیبرید و ماتریکس در تمام صفات در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد. به‌منظور تعیین بهترین هیبرید و ماتریکس صفات با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند که نتایج در شکل ۵ ارائه گردید.

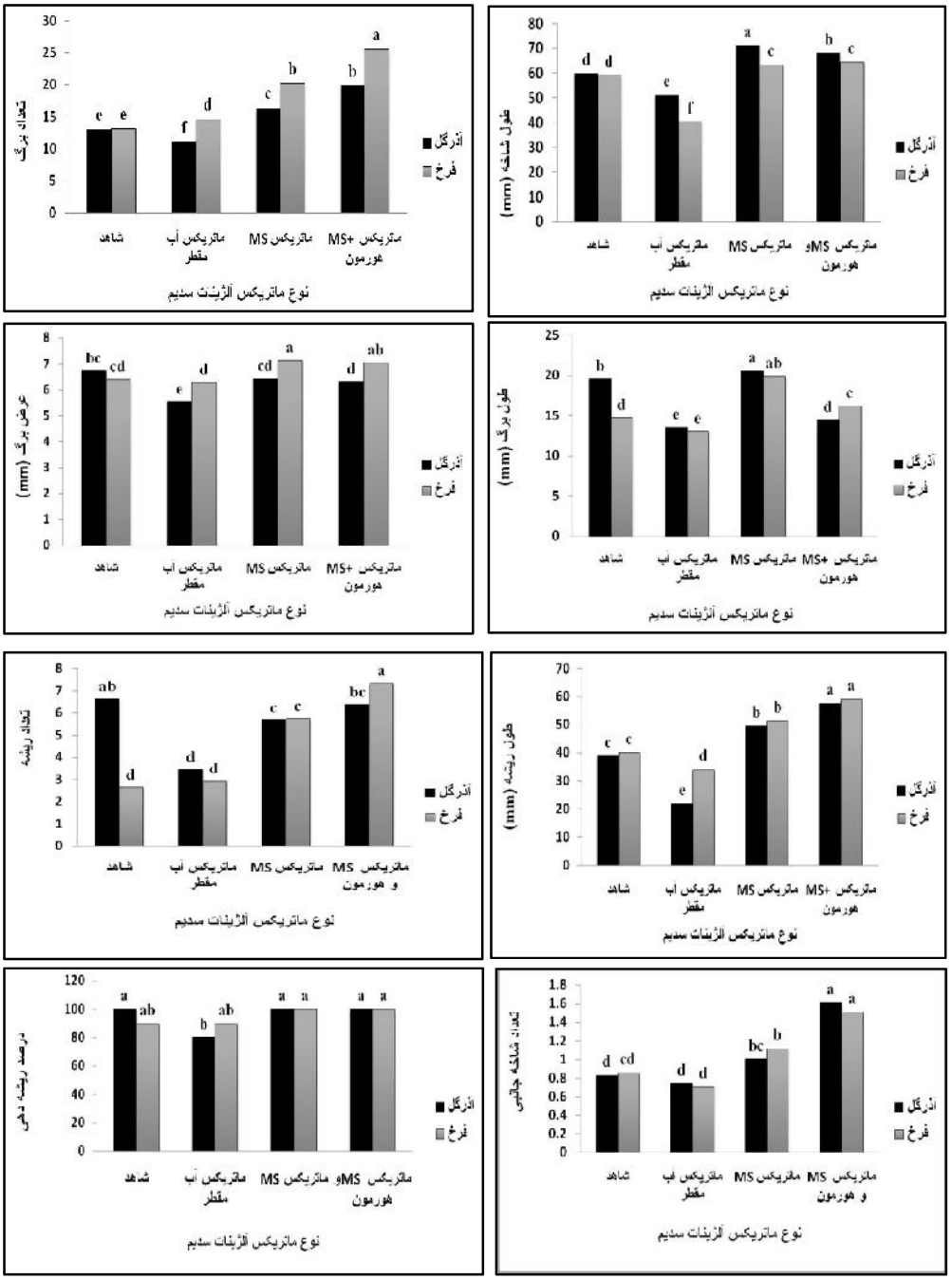
جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر هیبرید و ماتریکس چهار هفته پس از کاشت بذرهای مصنوعی نوک شاخه‌ها روی میزان ریشه‌دهی و برخی پارامترهای رشد

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		طول شاخه	تعداد برگ	طول برگ	عرض برگ	طول ریشه	تعداد شاخه جانبی	تعداد ریشه	درصد ریشه‌دهی
هیبرید	۱	۳۰۰/۹**	۱۱۰/۵۵**	۱۱/۲۲**	۲/۱۷**	۱۶۸/۷۱**	۰/۰۰۰۰۴^{ns}	۷/۶۵**	۱۵/۶۲^{ns}
ماتریکس	۳	۹۷۱/۷**	۲۱۸/۱۶**	۸۷/۷۶**	۱/۵۶**	۱۷۲۸/۳۸**	۱/۳۷۱۰**	۲۴/۵۱**	۵۱۵/۶۲**
هیبرید × ماتریکس	۳	۵۴/۵۱**	۱۳/۸۶**	۱۸/۷۵**	۰/۶۹۰۳**	۷۰/۹۶**	۰/۰۲۰۵^{ns}	۱۱/۷۴**	۹۸/۹۵^{ns}
اشتباه آزمایشی	۳۲	۳/۵۱	۰/۷۵۸۵	۰/۳۹۳۹	۰/۰۷۳۵	۹/۱۹	۰/۰۱۳۷	۰/۴۳۵۹	۷۸/۱۲

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.183]



شکل ۵- تأثیر نوع هیبرید و ماتریکس آلژینات سدیم روی طول شاخه، تعداد برگ، طول برگ، عرض برگ، طول ریشه، تعداد ریشه، تعداد شاخه جانبی و درصد ریشه‌دهی در نوک شاخه‌های کپسوله شده آفتابگردان (میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری باهم ندارند).

جوانه‌زنی در نمونه‌های کپسوله شده به‌دلیل نیاز به شکافتن کپسول‌ها نسبت به ریزنمونه‌های کپسوله نشده دیرتر رخ داد ریشه‌ها در هفته دوم ظاهر شده و وجود مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس کپسوله‌کننده باعث افزایش میزان ریشه‌دهی شد. همان‌طورکه در شکل ۵ مشخص است در اغلب پارامترهای مورد ارزیابی بیشترین مقادیر متعلق به ماتریکس حاوی مواد غذایی MS و ماتریکس MS به

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.183]

همراه تنظیم‌کننده‌های رشد می‌باشد. از آن‌جاکه حضور تنظیم‌کننده‌های رشد باعث تولید شاخه‌های جانبی و تعداد برگ بیشتر شد، در این ماتریکس نسبت به محیط حاوی مواد غذایی طول شاخه و اندازه برگ‌ها کمتر بود. کمترین مقدار در بین پارامترهای مورد ارزیابی مربوط به ماتریکس آب مقطر بود که دلیل این کاهش را به عدم دسترسی نمونه‌های کپسوله شده به مواد غذایی می‌توان نسبت داد. استفاده از مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد در آندوسپرم مصنوعی سبب بهبود تمام پارامترهای رشدی نسبت به ریزنمونه‌های کپسوله نشده شد. تمام پارامترها با گذشت زمان افزایش پیدا کردند اما وجود مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد روند افزایش صفات را بهبود بخشید.

ریزنمونه‌های رویشی تولیدشده در شرایط درون شیشه‌ای تحت شرایط کنترل شده می‌توانند مستقیماً تبدیل به گیاهچه شوند. اما اگر این ریزنمونه‌ها از طریق کپسوله کردن با پوشش مصنوعی تبدیل به بذر مصنوعی شوند تطابق‌پذیری آن‌ها بیشتر شده و شبیه بذر واقعی می‌شوند (۳۵). پوشش مصنوعی مورد استفاده برای کپسوله کردن یک محافظ فیزیکی برای جنین‌ها فراهم کرده که آندوسپرم مصنوعی می‌تواند حاوی منبع کربن، تنظیم‌کننده‌های رشد، آنتی‌بیوتیک‌ها، قارچ کش‌ها و مواد دیگر باشد که جوانه‌زنی را بهتر کند بدون اینکه موجب القا تغییرات نامطلوب شود (۱۱). در منابع مختلف افزودنی‌های متفاوتی برای جلوگیری از آلودگی و افزایش میزان بقا و جوانه‌زنی با ژل کپسوله‌کننده تلفیق شده است.

استفاده از مواد غذایی MS و تنظیم‌کننده‌های رشد در ماتریکس آلژینات و استریل کردن هر دو ماده کپسوله‌کننده باعث افزایش قدرت زیست ریزنمونه‌های کپسوله شده شد. بهبود رشد را می‌توان به مواد غذایی موجود در آندوسپرم مصنوعی نسبت داد که عمل منبع کربن را دارد. افزایش میزان رشد گیاهان با افزودن مواد غذایی و کربوهیدرات به ماتریکس کپسوله‌کننده از سوی محققان دیگر نیز گزارش شده است (۴۴،۴۳،۳۵،۳۴،۲۳،۲۲،۲۰،۹،۳) رائوت و همکاران (۳۶). در *Plumbago zeylanica*، دانسو و فورد-لاید (۱۸) در *Cassava* و آرون کومار در برنج نیز گزارش دادند که حضور تنظیم‌کننده‌های در ماتریکس آلژینات توسعه شاخه‌های اولیه از ریزنمونه‌های کپسوله شده را افزایش می‌دهد. ترکیب ماتریکس آلژینات یک فاکتور مهم باززایی محسوب می‌شود. بذرهای مصنوعی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. افزودن ترکیبات کمکی به محلول آلژینات باعث بهبود پارامترهای رشد می‌شود. نیاز به دسترسی به عناصر معین در ماتریکس ژلی اهمیت ویژه‌ای دارد، بنابراین پیشنهاد می‌شود در آینده توجه ویژه‌ای به آن شود.

سازگاری و انتقال گیاهچه‌های حاصل از بذرهای مصنوعی به گلخانه

قدرت بقای گیاهچه‌ها در اتاق سازگاری بسته به نوع ماتریکسی که در تهیه ژل آلژینات سدیم به‌کار گرفته شده بود متفاوت بود، به‌طوری‌که گیاهچه‌های حاصل از ماتریکس‌های ژلی آب مقطر و ماتریکس‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد، نسبت به گیاهچه‌های حاصل از ریزنمونه‌های کپسوله نشده و ریزنمونه‌های کپسوله شده در ماتریکس آلژینات حاوی محیط MS قدرت بقای کمتری داشتند. دلیل این امر را می‌توان به وقوع بیشتر پدیده شیشه‌ای شدن در این دو ماتریکس (ماتریکس آب مقطر و ماتریکس حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد) نسبت داد.

گیاهچه‌های شیشه‌ای شده به محض انتقال به محیط بیرون به سرعت رطوبت از دست داده و از بین رفتند. در سایر گیاهچه‌ها نیز تعدادی از برگ‌ها از بین رفتند اما بعد از استقرار گیاه برگ‌های جدیدی روی گیاهچه‌ها ظاهر شد. چهار هفته بعد از انتقال، گیاهچه‌های سازگار شده، به گلدان‌های بزرگ‌تر حاوی مخلوط خاک باغچه و کود دامی استریل (۱:۱:۱) منتقل شدند. گیاهچه‌های داخل خاک گلدان به مدت چهار هفته در شرایط اتاق سازگاری باقی مانده و در نهایت برای رشد و توسعه بیشتر به گلخانه منتقل شدند.

منابع

1. Abdoli, M., A. Moieni and H. Dehghani. 2003. Effects of genotype and cotyledon section on organogenesis in sunflower. Iranian Journal of Biotechnology, 1: 234-238 (In Persian).
2. Ahmad, N. and A. Anis. 2010. Direct plant regeneration from encapsulated nodal segments of *Vitex negundo*. Biologia Plantarum, 54: 748-752.
3. Anand, Y. and Y.K. Bansal. 2002. Synthetic Seeds: A Novel Approach of in Vitro Plantlet Formation in Vasaka (*Adhatoda vasica* Nees.). Biotechnology, 19: 159-162.
4. Ara, H., U. Jaiswal and V.S. Jaiswal. 2000. Synthetic seed: Prospectusand limitations. Current Science, 78: 1438-1444.
5. Arun Kumar, M.B., V. Vakeswaran and V. Krishnasamy. 2005. Enhancement of synthetic seed conversion to seedlings in hybrid rice. Plant cell tissue and organ culture, 81: 97-100.
6. Awatef, M.B. 2013. An Effective Protocol for in vitro Storage and ex vitro Re-Growth of Strawberry Capsules. Atlas Journal of Chemistry & Biochemistry, 1: 30-38.
7. Azadi, P., A. Moieni and M.R. Ahmadi. 2002. Shoot organogenesis from cotyledons of sunflower. Helia, 25: 19-26.
8. Baker, C.M., N. Munoz-Fernandez and C.D. Carter. 1999. Improved shoot development and rooting from mature cotyledons of sunflower. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 58: 39-49.
9. Bapat, V.A. and P.S. Rao. 1990. In vitro growth of encapsulated axillary buds of mulberry (*Morus indica* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 20: 69-70.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.183]

10. Bekheet, Sh.A. 2006. A synthetic seed method through encapsulation of in vitro proliferated bulblet of garlic. Arab Journal of Biotechnology, 9: 415-426.
11. Bhattacharya, R. and S. Bhattacharya.1998. High frequency in vitro propagation of *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn by culture. Indian Journal of Experimental Biology, 39: 1184-1187.
12. Biradar, S. 2008. Development and evaluation of synthetic seed in sugarcane. Thesis submitted to the University of Agricultural Sciences Dharwad.
13. Block, W. 2003. Water status and thermal analysis of alginate beads used in cryopreservation of plant germplasm. Cryobiology, 47: 59-72.
14. Bronner, R., G. Jeannin and G. Hahan. 1993. Early cellular events during organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic early cellular embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.). American Journal of Botany, 72: 239-248.
15. Castillo, B., M.A.L. Smith and U.L. Yadava. 1998. Pant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. Plant Cell Reports, 17: 172-176.
16. Chraibi, B.K.M., J.C. Castelle, A. Latch, J.P. Roustan and J. Fallot. 1992. Enhancement of shoot regeneration potential by liquid medium culture from mature cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Cell Reports, 10: 617-620.
17. Chung, I., N. Praveen and M. Thiruvengadam. 2012. Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Momordica dioica* for short term storage and germplasm exchange and distribution POJ. 5: 266-270.
18. Danso, K.E. and B.V. Ford-Lloyd. 2003. Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of *cassava* germplasm. Plant Cell Reports, 21: 718-725.
19. Fiore, M.C., T. Trabace and F. Sunseri. 1997. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. Plant Cell Reports, 16: 295-298.
20. Ganapathi, T.R., L. Srinivas, P. Suprasanna and V.A. Bapat. 2001. Regeneration of plants from alginate-encapsulated somatic embryos of banana cv. Rasthali (*musa spp.* Aab group). In Vitro Cell. Developmental Biology of Plant, 37: 178-181.
21. Gurel, E. and K. Kazan. 1998. Development of an efficient plant regeneration system in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Turkish Journal of Botany, 22: 381-387.
22. Halmagyi, A. and C. Deliu. 2007. Cryopreservation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot tips by encapsulation-vitrification. Science Horticulture, 113: 300-306.
23. Hung, C. and M. trueman. 2012. Alginate encapsulation of shoot tips and nodal segments for short-term storage and distribution of the eucalypt *Corymbia torelliana* 3 C. citriodora. Acta PhysiologicaPlant, 34: 117-128.
24. Hussain, A., J. Uma and V.S. Jaiswal. 2000. Synthetic seed: Prospects and limitations. Current Science, 78: 25.
25. Jeannine, G., R. Bronner and G. Hahan. 1995. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated in vitro: role of the sugar. Plant Cell Reports, 15: 200-204.
26. Kumar, M., V. Vakeswaran and V. Krishnasamy. 2004. Enhancement of synthetic seed conversion to seedlings in hybrid rice. Plant cell tissue and organ culture, 81: 97-100.
27. Lata, H., S. Chandra, I.A. Khan and M.A. Elsohly. 2009. Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. an important medicinal Plant. Physiological, Molecular and Biological Plants, 15: 79-86.
28. Leclercq, P. 1983. Study of various causes of cytoplasmic male sterility in sunflower Agronomic, 3: 185-187.
29. Malabadi, R. and J. Van-Staden. 2005. Storability and germination of sodium alginate encapsulated somatic embryos derived from the vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. Plant cell tissue and organ culture, 82: 259-265.
30. Naik, S.K. and P.K. Chand. 2006. Nutrient-alginate encapsulation of in vitro nodal segments of pomegranate (*Punica granatum* L.) for germplasm distribution and exchange Science Horticulture, 108: 247-252.
31. Nyende, A.B., S. Schittenelm, G. Mix-Wagner and J.M. Greef. 2003. Production, storability, and regeneration of shoot tips of potato (*Solanum tuberosum* L.) encapsulated in calcium alginate hollow beads. In Vitro Cell Development of Plant, 39: 540-544.
32. Pelissier, B., O. Bouchfra, R. Pepin and G. Freyssient. 1990. Production of isolated somatic embryos from sunflower thin layers. Plant Cell Reports, 9: 47-50.
33. Pugliesi, C., F. Cecconi, A. Mandolfo and S. Baroncelli. 1990. Plant regeneration and genetic variability from tissue culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Breeding, 106: 114-121.
34. Rai, M.K., V.S. Jaiswal and U. Jaiswal. 2008. Encapsulation of shoot tips of guava (*Psidium guajava* L.) for short-term storage and germplasm exchange. Science Horticulture, 118: 33-38.
35. Redenbaugh, K. 1993. Introduction In: Redenbaugh, K. (ed). Synthetic Seeds: Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement. Current Science, pp: 3-10.
36. Rout, G.R., G. Das, S. Samantaray and P. Das. 2001. Micropropagation of *Plumbago zeylanica* L. by encapsulated nodal explants. Horticulture Science Biotechnology, 76: 24-29.
37. Sarkar, D. and P.S. Naik. 1998. Synseeds in potato. An investigation using nutrient encapsulated in vitro nodal segments. Science Horticulture, 73: 179-184.
38. Singh, A.K., R. Varshney, M. Sharma, S.S. Agarwal and K.C. Bansal. 2006. Regeneration of plants from alginate-encapsulated shoot tips of *Withaniasom nifera* L. Dunal, a medicinally important plant species. Journal of Plant Physiology, 163: 220-223.
39. Singh, S., K. Manoj, P. Rai, V.S. Sarita Pandey and U.J. Jaiswal. 2010. Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Spilanthes acmella* L. Murr, a medicinally important and herbal pesticidal plant species. Acta physiologiae plantarum, 31: 649-653.
40. Singh, S.K., M.K. Rai, P. Asthana, S. Pandey, V.S. Jaiswal and U. Jaiswal. 2009. Plant regeneration from alginate encapsulated shoot tips of *Spilanthes acmella* L. Murr. A medicinally important and herbal pesticidal plant species. Acta physiologiae plantarum, 31: 649-653.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.183]

41. Singh, S.K., M.K. Rai, P. Asthana and L. Sahoo. 2009. Alginate- encapsulation of nodal segments for propagation, shortterm conservation and germplasm exchange and distribution of *Eclipta alba* L. Acta physiologiae plantarum, 32: 607-610.
42. Standardi, A. and P. Piccioni. 1998. Recent perspectives on synthetic seed technology using nonembryogenic in vitro-derived explants. International Journal of Plant Science, 156: 968-978.
43. Suprasanna, P., T.R. Ganapathi and P.S. Rao. 1996. Artificial seeds in rice (*Oryza sativa* L.): encapsulation of somatic embryos from mature embryo callus cultures. Asia Pacific journal of Molecular Biology and Biotechnology, 4: 90-93.
44. Tsvetkov, I., L. Jouve and J.F. Hausman. 2006. Effect of alginate matrix composition on regrowth of in vitro-derived encapsulated apical microcuttings of hybrid aspen. Biologia Plant Arum, 50: 722-724.
45. West, T.P., M.B. Ravindra and J.E. Preece. 2006. Encapsulation, cold storage, and growth of *Hibiscus moscheutos* nodal segments. Plant cell tissue and organ culture, 87: 223-231.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.183]

Synthetic Seed Production via Alginate Encapsulation of Shoot Tips in Two Iranian Sunflower Hybrids (*Helianthus annuus* hyb. Azargol and Farrokh)

Soheila Moradi[1], Mohamad Reza Azimi[2], Saeid Pourdad[3] and Haidar Zolnorian[4]

1- M.Sc. Student, University of Zanjan, (Corresponding author: soheila moradi)
2- Assistant Professor, University of Zanjan
3- Associate Professor, Dryland Agricultural Research Institute, Sararood, Kermanshah
4- Expert, Agricultural and Natural Research Center, Kermanshah
Received: September 28, 2013 Accepted: December 8, 2013

Abstract

Synthetic seeds can use as tool for applied biotechnology methods for improve the quality and increase the production of sunflower. Shoot tips excised from *in vitro* proliferated shoots were encapsulated in calcium alginate beads. The best gel complexation was achieved using 3% sodium alginate and 100 mM $CaCl_2.2H_2O$. Maximum percentage response for conversion of encapsulated shoot tips into plantlets was 100% after 4 wk of culture on Murashige and Skoog (MS) medium without plant growth regulators. The regrowth ability of encapsulated shoot tips was affected by the concentration of sodium alginate and the presence or absence of MS nutrients and plant growth regulator in calcium alginate beads. Plantlets with well-developed shoot and roots were transferred to pots containing an autoclaved mixture of cocopeate, perlite and peat moss (1:1:1). Encapsulation of vegetative propagules in calcium alginate beads can be used as an alternative to synthetic seeds derived from somatic embryos.

Keywords: Alginate Beads, Encapsulation, *Helianthus annuus*, Sunflower, Synthetic Seeds

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.183]