فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۵، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۲۴۲-۲۳۱ (۱۳۸۶)

بررسی کالوس‌زایی و باززایی گیاه در صنوبر پده (*Populus euphratica* Oliv.) با استفاده از کشت تخمدان

شهاب سادات[۱]، محمدحسن عصاره[۱]، علی جعفری‌مفیدآبادی[۱]، سیدرضا طبائی‌عقدایی[۱] و عباس قمری‌زارع[۱]

۱- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، ص.پ. ۱۱۶-۱۳۱۸۵. E-mail: shahab_302004@yahoo.com

چکیده

در این پژوهش، تخمدانهای نارس و بالغ صنوبر پده، از پایه‌های مادری حاشیه رودخانه کارون جمع‌آوری شدند. پنج تیمار سترون‌سازی در یک طرح کاملاً تصادفی با هشت تکرار شامل کلرور مرکوریک ۰/۱٪ به همراه اتانول ۷۰٪ هر یک به مدت ۳۰ ثانیه، اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه به همراه هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه و اتانول ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه به همراه هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه به‌ترتیب به‌عنوان تیمارهای مطلوب سترون‌سازی مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان کالوس‌زایی حاصل از بکارگیری چهار تیمار هورمونی، به روش تجزیه کوواریانس در یک طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار بررسی شد. IBA به میزان mg/l ۳ و BAP به مقدار mg/l ۰/۱ و نیز تیمار 2,4-D به میزان mg/l ۳ و kin به مقدار mg/l ۰/۱ در محیط پایهٔ MS به عنوان بهترین تیمارهای کالوس‌زایی معرفی گردیدند. همچنین معادله رگرسیونی سن ریزنمونه و میزان کالوس‌زایی آنها محاسبه گردید. منحنی رگرسیونی نشان داد که با افزایش سن ریزنمونه میزان کالوس‌زایی کاهش یافت. باززایی کالوسهای موجود در چهار تیمار شاخه‌زایی در یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوکهای کامل تصادفی با چهار تکرار بررسی شد. BAP به میزان mg/l ۲ و NAA به مقدار mg/l ۰/۵ در محیط پایه MS به‌عنوان بهترین تیمار مطلوب شاخه‌زایی از کالوسهای موجود پیشنهاد شد. جهت ریشه‌زایی نیز پنج تیمار با چهار تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی بررسی گردید و در نهایت NAA و IBA هر یک به میزان mg/l ۰/۱ در محیط پایهٔ MS با ۱/۲ نیترات به‌عنوان بهترین تیمار ریشه‌زایی معرفی شد. گیاهکهای باززایی شده پس از طی مراحل مختلف سازگاری در محیط خاک به مزرعه انتقال یافتند.

واژه‌های کلیدی: شاخه‌زایی، ریشه‌زایی، تخمدان، کالوس، محیط پایهٔ MS، باززایی و سازگاری.

مقدمه

یکی از جنبه‌های مهم فرایندهای بیوتکنولوژی گیاهی، کشت سلولها، بافتها و اندامها در محیط‌های آزمایشگاهی خاص و تحت شرایطی کاملاً استریل است. کاربرد کشت بافت و سلول گیاهی به دنبال موفقیتهای قابل توجه در اصلاح درختان در سرتاسر جهان از چند دههٔ گذشته آغاز شده است و نتایج تحقیقات انجام شده در دهه‌های اخیر گواه بر نقش انکارناپذیر این تکنیک به‌عنوان پایه‌گذار بسیاری از روشهای اصلاحی است (Pinon, 1993 & Antonetti). در میان گیاهان چوبی، صنوبرها در برنامه‌های اصلاحی مختلف به‌طور وسیعی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (McNabb, 1997).

چوب صنوبرها برای بسیاری از اهداف صنعتی مناسب بوده و در ساختمان نیز کاربرد فراوانی دارد (Ahuja,

(1984). پس از یک دورهٔ ۲۵ تا ۳۰ ساله تولید چوب صنوبر بالغ بر ۳۰۰ متر مکعب در هکتار می‌شود که در مقایسه با اوکالیپتوسها ٤ برابر و نسبت به سوزنی برگان ۸ برابر می‌باشد (Ahuja, 1984). از ۳۰ گونه موجود در صنوبر، صنوبر پده بعلت داشتن خصوصیات فیزیولوژیک خاص و ویژهٔ خود، قابل توجه است. مقاومت این گونه به استرسهای خشکی، شوری و حرارت از آن گیاهی بردبار و مقاوم به استرسها بوجود آورده است و به علت سازگاری این گونه به شرایط اقلیمی مختلف، می‌توان برای احیاء جنگلهای تخریب شده و پیشبرد پروژه‌های مهم و عظیمی‌چون بیابان‌زدایی نیز از کاشت این درخت استفاده کرد (Shiji *et al.*, 1995).

گونه‌های صنوبر به روشهای کشت درون شیشه‌ای سازگارند (Parsons & Sinkar, 1986) و ایجاد تنوعات سوماکلونال در مرحلهٔ کالوس‌زایی و باززایی از کالوسهای موجود در این گونه، جهت بهبود بعضی خصوصیات مورفولوژیک آن (رفع تنهٔ کج و چنگالی مانند) یکی از اهداف اصلاحی کشت بافت و سلول این گونه است (محمودی کردی، ۱۳۷۹). بنابراین مراحل مختلف سترون‌سازی، کالوس‌زایی و باززایی از کالوس‌های موجود، با استفاده از بافت تخمدان صنوبر پده به‌عنوان ریزنمونه مورد توجه قرار گرفت. معرفی تیمارهای مطلوب جهت کشت بافت و سلول گیاهی، اصلاح این گونه از صنوبر را تسهیل می‌نماید. با ارائه تیمارهای سترون‌سازی و کالوس‌زایی مناسب و باززایی گیاه از کالوسهای موجود با ترکیبی مطلوب از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی این فرصت به محققان داده می‌شود تا در مدت زمان کوتاه‌تری نسبت به اصلاح این گونه گیاهی اقدام کنند.

مواد و روشها

در اوایل اسفندماه تخمدانهای نارس از یک پایهٔ مادری پده (*P. euphratica* Oliv.) در حاشیه رودخانه کارون برداشت و در آزمایشگاه پس از مراحل سترون‌سازی به محیط کشت پایه MS منتقل شدند. ده روز پس از برداشت اولین تخمدانهای نارس، مجدداً تخمدانهای بالغ از پیش ایزوله شده برداشت و پس از مراحل سترون‌سازی به محیط کشت مشابه با تخمدانهای نارس منتقل گردید.

پنج تیمار سترون‌سازی با ۸ تکرار (هر تکرار عبارت از ۱ ظرف شیشه‌ای به ابعاد ۸ (طول) در ۷ (قطر) سانتیمتر بود که در آن ٤ ریزنمونه قرار داشت)، در قالب طرح کاملاً تصادفی پیاده گردید. دو مرحله پیش سترون‌سازی، ۱) ۲۰ دقیقه شستشو با آب معمولی به همراه ۱ تا ۲ قطره صابون مایع جهت افزایش سطح تماس ریزنمونه با آب و ۲) شستشو با آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه اعمال شد. همچنین تیمارهای سترون‌سازی مشتمل بر ۱) الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه به همراه هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه، ۲) الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه به همراه هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه، ۳- الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه به همراه کلرورمرکوریک ۰/۱٪ به مدت ۳۰ ثانیه، ٤) الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه به همراه کلرور مرکوریک ۰/۱٪ به مدت ۱ دقیقه و ۵) الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه به همراه کلرورمرکوریک ۰/۱٪ به مدت ۱/۵ دقیقه بودند. لازم به یادآوری است که بین مراحل مختلف هر تیمار سترون‌سازی ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل (هر بار به مدت ۳ دقیقه) اعمال گردید. پس از ۳ هفته ریزنمونه‌های سالم (عاری از آلودگی) و زنده (که در اثر سمیت مواد از بین نرفته‌اند) در هر تکرار شمارش گردیده و به‌عنوان صفت مورد ارزیابی جهت مقایسه تیمارهای

سترون سازی در نظر گرفته شد. تخمدانها پس از طی مراحل مختلف سترون‌سازی به محیطهای کشت کالوس‌زایی انتقال یافتند. محیط کشت کالوس‌زایی عبارت از محیط پایهٔ MS بوده که با غلظت‌های متفاوتی از اکسینها و سیتوکینینها تکمیل شده بود. محیط کشت MS حاوی ٤ تیمار هورمونی شامل ۱) محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیترBAP، ۲) محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر Kin، ۳) محیط حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیترBAP و ٤) محیط حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر Kin بودند. پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیطهای کشت، آنها به شرایط تاریکی در محدودهٔ دمایی۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تهویه مناسب منتقل شدند. پس از ۳ هفته میزان کالوس‌زایی از هر تیمار تعیین شد. داده‌ها پس از تصحیح (به منظور حذف اثر سن ریزنمونه) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای هر تیمار ٦ تکرار (٢٤ ریزنمونه) منظور گردید. از طرفی رابطهٔ بین سن ریزنمونه و مقدار کالوس‌زایی در محیط کشت مطلوب مورد بررسی قرار گرفت. برای هر سن ٢٤ عدد ریزنمونه منظور شده و تعداد کالوسهای به دست آمده از هر سن یادداشت و تجزیه رگرسیون برای آن انجام شد. به منظور باززایی، کالوسها به محیطهای کشت شاخه‌زایی انتقال یافتند. محیط پایهٔ MS و ترکیبی از سطوح مختلف دو فاکتور A (BAP در دو سطح ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و B (NAA در دو سطح ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، تیمارهای یاد شده را تشکیل دادند. این تیمارها شامل ۱) محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (a۱ b۱) ، ۲) محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (a۱ b۲)، ۳) محیط حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (a۲ b۱) و ٤) محیط حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (a۲ b۲)، بودند. آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با ٤ تکرار در نظر گرفته شد و ارزیابی روی تعداد کالوسهای شاخه‌زا صورت گرفت. کالوسهای کشت شده به اتاق رشد با دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی در محدودهٔ دمایی ۲ ± ۲۵ درجهٔ سانتیگراد انتقال یافتند. نمونه‌ها هر ٤ هفته یکبار روی همان محیط بازکشت شدند. پس از ٦ ماه، اولین نوشاخه‌ها مشاهده گردید. نوشاخه‌های باززایی شده پس از رشد مناسب حدود ۵ تا ٦ سانتیمتری به محیطهای کشت ریشه‌زایی انتقال یافتند. محیط کشت ریشه‌زایی، محیط کشت پایهٔ MS با نصف غلظت نیترات بوده که با مقادیر متفاوتی از اکسینهای NAA و IBA تکمیل شده بود. ۵ تیمار ریشه‌زایی در ٤ تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. این تیمارها شامل ۱) محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۲) محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳) محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ٤) محیط حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۵) محیط حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بودند. انتقال به اتاق رشد با دوره نوری ١٦ ساعت روشنائی و ٨ ساعت تاریکی در محدودهٔ دمایی ۲ ± ۲۵ درجهٔ سانتیگراد صورت گرفت. دو هفته پس از انتقال، آماربرداری جهت مشخص نمودن بهترین تیمار ریشه‌زایی از تیمارهای یاد شده انجام شد. صفت مورد ارزیابی، تعداد نوشاخه‌های ریشه‌دار شده در هر محیط کشت در نظر گرفته شد.

نتایج

مدل تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی برای تیمارهای سترون‌سازی پس از شمارش تعداد ریزنمونه‌های سالم و زنده در جدول ۱ ارائه شده است. بین تیمارها در سطح α = ۰/۰۱ اختلاف معنی‌داری وجود دارد، بنابراین به منظور مقایسهٔ میانگین تیمارهای سترون سازی، آزمون دانکن انجام گرفت (جدول ۲). مقایسه میانگینها نشان می‌دهد که تیمار ۳ با کلرورمرکوریک ۰/۱٪ به همراه اتانول ۷۰٪ (هر دو به مدت ۳۰ ثانیه)، تیمار ۱ با الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه همراه با هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه و تیمار ۲ با الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه به همراه هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه از لحاظ آماری با دیگر تیمارهای سترون سازی اختلاف معنی‌داری دارند و هر سه می‌توانند به عنوان تیمارهای سترون‌سازی تخمدانهای نارس و بالغ صنوبر پده (شکل ۵) بکار روند.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر ۵ تیمار سترون سازی روی بافتهای تخمدان گیاه صنوبر پده پس از تبدیل جذری $Y=\sqrt{x}+0/5$

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تیمار	٤	۱/۱۷	۷/٦۸**
خطای آزمایشی	۳۵	۰/۱۵	
کل تصحیح شده	۳۹	۱۰/۰٤	

ضریب تغییرات: ۲٤/۳، **: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱

جدول ۲- مقایسه تیمارهای مختلف سترون سازی تخمدان صنوبر پده، با استفاده از آزمون دانکن پس از تبدیل جذری $Y=\sqrt{x}+0/5$

تیمارهای سترون سازی	گروه بندی دانکن	میانگین تیمارها (تعداد ریزنمونه‌های سالم و زنده)
۳	a	۲/۰۲
۱	ab	۱/۸٤
۲	ab	۱/٦۸
٤	bc	۱/٤۰
۵	c	۱/۰۵

۱- الکل ۷۰٪ (۳۰ ثانیه) + هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ (۱۰ دقیقه)، ۲- الکل ۷۰٪ (۱ دقیقه) + هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ (۱۰ دقیقه)، ۳- الکل ۷۰٪ (۳۰ ثانیه) + کلرور مرکوریک ۰/۱٪ (۳۰ ثانیه)، ٤) الکل ۷۰٪ (۳۰ ثانیه) + کلرور مرکوریک ۰/۱٪ (۱ دقیقه) و ۵) الکل ۷۰٪ (۳۰ ثانیه) + کلرورمرکوریک ۰/۱٪ (۱/۵ دقیقه)

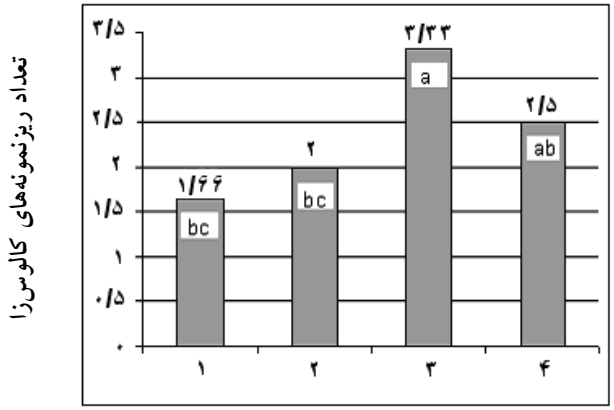
جهت مشخص نمودن بهترین محیط کشت کالوس‌زایی، تجزیه کوواریانس با ٤ تیمار و ٦ تکرار (هر تکرار= ۱ ظرف شیشه‌ای) انجام شد (جدول ۳). با توجه به معنی‌دار بودن F کواریت که بیانگر تأثیر سن ریزنمونه

بر کالوس‌زایی است، اثر کواریت که در خطای آزمایشی ادغام شده بود، جدا و اقدام به تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی با تیمارهای تصحیح شده گردید. با معنی‌دار شدن F تیمارهای تصحیح شده در سطح $\alpha = ۰/۰۱$، مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن صورت پذیرفت. شکل ۱، تیمارهای کالوس‌زایی، میانگینها و اختلافات بین آنها را با توجه به نتایج حاصل از آزمون دانکن ارائه نموده است.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر ترکیبات هورمونی روی کالوس‌زایی تخمدان گیاه صنوبر پده

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تیمار کالوس‌زایی تصحیح شده	۳	۳/۱۵	۲٤/۲۳ **
کواریت	۱	۱۵/٦۹	۱۲۰/۹۳**
خطای تصحیح شده	۱۹	۰/۱۳	
کل تصحیح شده	۲۳		

ضریب تغییرات:۸/۱۱ **: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱



۱) BAP=۰/۱ mg/lit + IBA= ۲ mg/lit

۲) Kin=۰/۱ mg/lit + 2,4-D= ۲ mg/lit

۳) BAP=۰/۱ mg/lit + IBA= ۳ mg/lit

٤) Kin=۰/۱ mg/lit + 2,4-D= ۳ mg/lit

شکل ۱- تیمارهای کالوس‌زایی، میانگین تعداد ریزنمونه‌های کالوس‌زا برای هر تیمار و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن (α=۰/۰۱)

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که تیمار ۳ با IBA به میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر و BAP به مقدار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و نیز تیمار ٤ با اکسین 2,4-D به میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر و سیتوکینین Kin به مقدار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر جهت کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های بافت تخمدان مناسب و توصیه پذیر هستند (شکل ٦). با توجه به معنی‌دار بودن F کواریت که نمایانگر تأثیر سن ریزنمونه بر کالوس‌زایی است، تجزیه رگرسیون بین این دو صفت نشان می‌دهد که

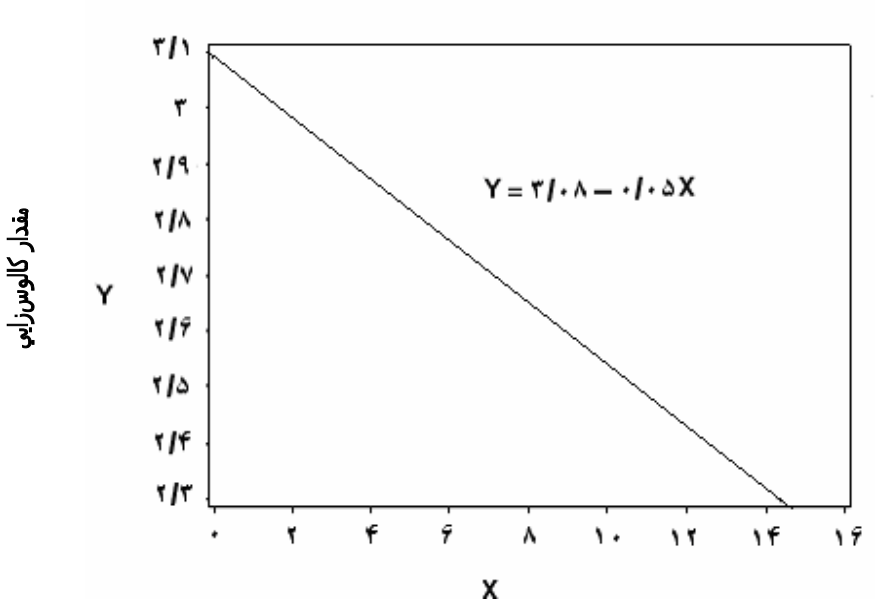
رابطهٔ رگرسیونی معنی‌داری بین این دو صفت موجود است (جدول ٤). شکل ۲ نیز رابطهٔ رگرسیونی سن ریزنمونه و مقدار کالوس‌زایی را که از معادلهٔ Y= ۳/۰۸ – ۰/۰۵ x تبعیت می‌کند نشان می‌دهد. عرض از مبدأ و شیب خط یاد شده از طریق t استیودنت آزمون گردید و نتایج نشان داد که هر دو در سطح $\alpha = ۰/۰۱$ معنی‌دار هستند.

جدول ٤- تجزیه رگرسیون سن ریزنمونه و مقدار کالوس‌زایی تخمدان گیاه صنوبر پده

پس از تبدیل لگاریتمی y= log x

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
رگرسیون	۱	۰/٤۸	۲۱۹/۸۸**
خطای آزمایشی	٤	۰/۰۰۲	
کل تصحیح شده	٥	۰/۰۹	

ضریب تغییرات:۱/۷۷، ضریب تبیین: ۰/۹۸ و** : معنی‌دار در سطح ۰/۰۱



شکل ۲- رابطه سن ریزنمونه (X) و مقدار کالوس‌زایی(Y) تخمدان صنوبر پده

پس از تبدیل لگاریتمی y= log x

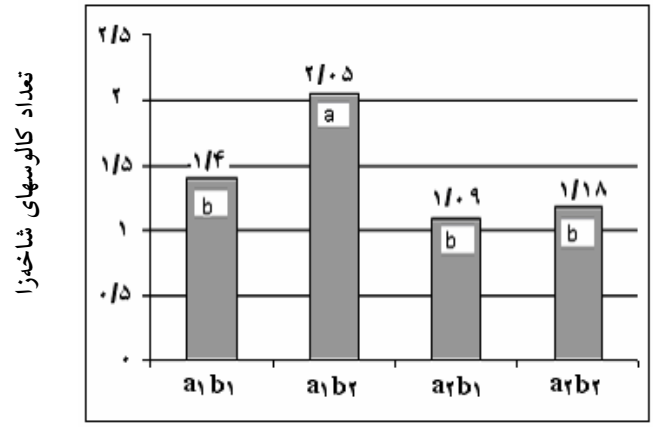
مدل تجزیه واریانس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی برای تیمارهای شاخه‌زایی نشان می‌دهد که F تیمارها در سطح $\alpha = ۰/۰۱$ معنی‌دار است (جدول ٥). نتایج آزمون مقایسه میانگین دانکن تیمارهای

شاخه‌زایی، میانگینها و اختلافات موجود بین تیمارها (شکل ۳) نشان داد که تیمار a۱b۲ با BAP به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر و NAA به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر با بقیهٔ تیمارها اختلاف معنی‌داری داشته و به عنوان تیمار مطلوب شاخه‌زایی از کالوسهای موجود پیشنهاد می‌گردد (شکل ۷).

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر ترکیبات هورمونی روی شاخه‌زایی کالوسهای حاصل از کشت بافت تخمدان صنوبر پده، پس از تبدیل جذری $Y=\sqrt{x}+0/5$

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تیمار شاخه‌زایی	۳	۰/۷۶	۱۰/۸۵**
بلوک	۳	۰/۰۴۲	۰/۵۹ ns
عامل A (BAP)	۱	۱/۴۱	۱۹/۶۳**
عامل B (NAA)	۱	۰/۵۵	۷/۷۸*
AB اثرمتقابل	۱	۰/۳۲	۴/۴۸ ns
خطای آزمایشی	۹	۰/۰۷	
کل تصحیح شده	۱۵	۱/۸	

ns: غیر معنی‌دار، **: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، * : معنی‌دار در سطح ۰/۰۵، ضریب تغییرات: ۱۲/۳۳



NAA=۰/۱ mg/lit + BAP= ۲ mg/lit (a۱b۱)

NAA=۰/۵ mg/lit + BAP= ۲ mg/lit (a۱b۲)

NAA=۰/۱ mg/lit + BAP= ۳ mg/lit (a۲b۱)

NAA=۰/۵ mg/lit + BAP= ۳ mg/lit (a۲b۲)

شکل ۳- تیمارهای شاخه‌زایی، میانگین تعداد کالوسهای شاخه‌زا برای هر تیمار و اختلافات بین آنها از طریق آزمون دانکن (α= ۰/۰۱)، پس از تبدیل جذری $Y=\sqrt{x}+0/5$

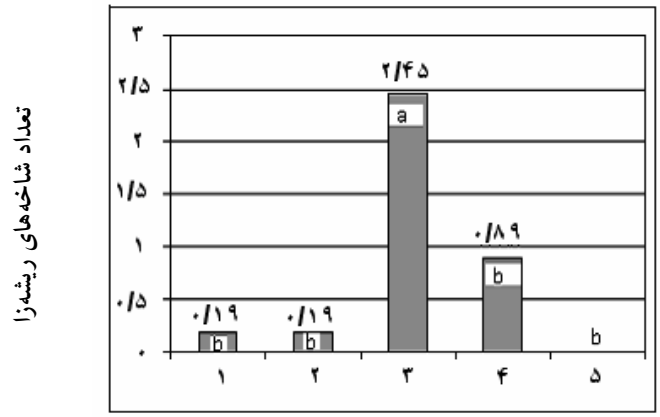
مدل تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار ریشه‌زایی و ٤ تکرار (جدول ٦) نشان می‌دهد که F تیمار در سطح α = ۰/۰۱ معنی‌دار است. محتوی میانگین تیمارهای ریشه‌زایی که نشانگر اختلافات معنی‌دار و غیر معنی‌دار تیمارها از طریق آزمون دانکن است (شکل ٤)، نشان می‌دهد که تیمار ۳ با بقیهٔ تیمارها اختلاف معنی‌داری دارد و به عنوان بهترین تیمار ریشه‌زایی معرفی می‌گردد (شکل ۸). این تیمار شامل تلفیقی از هورمون اکسین NAA و IBA هر دو به

میزان ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر است. گیاهکهای یاد شده پس از تولید ریشه‌هایی به طول تقریبی ۱/۵ سانتیمتر با تارهای کشنده کافی (شکل ۹)، به محیط خاک گلدان که حاوی نسبتهای مساوی خاک، پیت و پرلیت سترون بود انتقال یافته (شکل ۱۰) و با پشت سرگذاشتن مراحل مختلف سازگاری، به مزرعه منتقل شدند.

جدول ٦- تجزیه واریانس طرح کاملا تصادفی برای تیمارهای ریشه‌زایی پس از تبدیل جذری Y=√x+.۰/۵

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تیمار ریشه‌زایی	٤	۰/٦۹	۱۱/۷۵**
خطای آزمایشی	۱۵	۰/۰٦	
کل تصحیح شده	۱۹	۰/۱۹	

ضریب تغییرات: ۰٤ /۲٤، **: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱



۱) NAA= ۰/۱ mg/lit

۳) NAA=۰/۱ mg/lit + IBA= ۰/۱ mg/lit

٤) IBA= ۰/۰۱ mg/lit

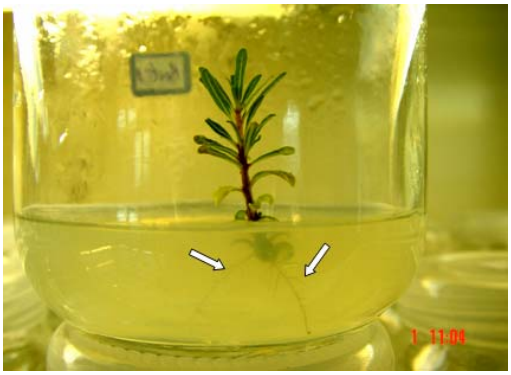
۵) NAA=۰/۰۱ mg/lit

شکل ٤- تیمارهای ریشه‌زایی، میانگین تعداد شاخه‌های ریشه‌زا برای هر تیمار و اختلافات بین آنها از طریق آزمون دانکن (α= ۰/۰۱) در گیاه صنوبر پده، پس از تبدیل جذری Y=√x+.۰/۵

بحث

نتایج بدست آمده پیرامون تیمارهای مطلوب سترون‌سازی با نتایج جعفری مفیدآبادی (۱۳۷۵) جهت ضدعفونی نمودن دمبرگهای *Populus nigra* با اتانول ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و تیمار با هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ به مدت ۲۰ دقیقه مطابقت نسبی دارد و تنها تفاوت در مدت زمان اعمال هیپوکلریت سدیم می‌باشد. همچنین، محمودی‌کردی (۱۳۷۹)، جوانه‌های زایشی باز نشدهٔ صنوبر پده را با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه سترون نمود و سپس از محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه استفاده نمود که نتایج این پژوهش به‌رغم تغییر در غلظت هیپوکلریت سدیم، با نتایج وی همخوانی دارد. به منظور تعیین بهترین محیط کشت کالوس‌زایی، با توجه به اینکه سن ریزنمونه در پروسهٔ کشت بافت می‌تواند بر روی کالوس‌زایی اثر گذار باشد

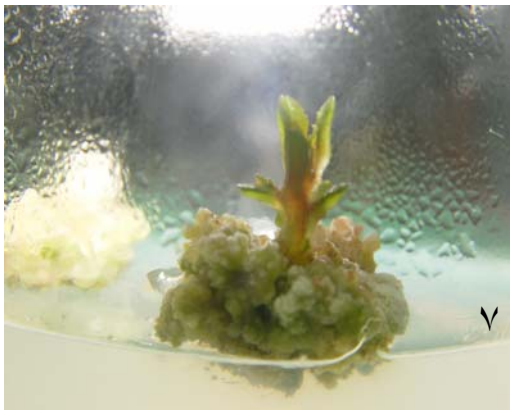
شکل ۵- تخمدانهای صنوبر پده پس از سترون سازی



شکل ۸- ریشه‌زایی نوشاخه و دستیابی به گیاهک کامل

شکل ٦- کالوس‌زایی تخمدانهای صنوبر پده

شکل ۹- رشد طولی مناسب ریشه و تارهای کشندهٔ کافی جهت انتقال به خاک



شکل ۷- باززایی از کالوس با ظهور نوشاخه

شکل ۱۰- گیاهک صنوبر پده پس از انتقال به خاک در مرحله سازگاری

(فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲)، تصمیم گرفته شد تا سن ریزنمونه را به عنوان کواریت در نظر گرفته، تا اثر آن بر روی کالوس‌زایی حذف گردد. با توجه به معنی‌دار بودن F کواریت، تجزیه واریانس با تیمارهای تصحیح شده انجام گرفت. نتایج بدست آمده با نتایج جورابچی (۱۳۷۹)، جهت دستیابی به کالوس از کشت گل‌آذین نارس گل نر، در صنوبر پده زمانی که گل‌آذین در مرحله سلولی مادری میکروسپور (۲n) بود، مطابقت کامل دارد. وی ترکیبی از IBA و BAP را به ترتیب با غلظت‌های ۳ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر پیشنهاد نمود. همچنین، معادله و منحنی رسم شده از تجزیه رگرسیون انجام گرفته بین دو صفت سن ریزنمونه و مقدار کالوس‌زایی نشان می‌دهد که با افزایش سن ریزنمونه مقدار کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها کاهش می‌یابد. نتایج بدست آمده از این بررسی آماری با نتایج فارسی و ذوالعلی(۱۳۸۲)، مبنی بر اینکه بافتها و اندامهای نابالغ در کشت درون شیشه‌ای از نظر مورفوژنتیکی نسبت به بافتها و اندامهای بالغ انعطاف پذیرترند، مطابقت کامل دارد. وی در توضیح این رویداد بیان می‌کند که معمولاً ریزنمونه‌های دارای سلولهای فعال میتوزی، برای تولید کالوس مناسب‌تر هستند.

در ارتباط با معرفی بهترین تیمارهای شاخه‌زایی از کالوسهای موجود، Redenbaugh و همکاران (۱۹۸۱)، نسبت اکسین پایین و سیتوکنین بالا را برای شاخه‌زایی لازم دانستند که مطابقت آن با نتایج این تحقیق آشکار است. محمودی‌کردی (۱۳۷۹)، نسبت مناسب سیتوکنین به اکسین را در کشت بساک هاپلوئید صنوبر پده، ۲۰ به ۱ می‌داند و جورابچی (۱۳۷۹)، این نسبت را در کشت گل‌آذین نارس صنوبر پده، در مرحله سلولی مادری میکروسپور (۲n) ٦ به ۱ می‌داند، در حالی‌که نتیجهٔ کسب شده در این تحقیق نسبت ٤ به ۱ را پیشنهاد می‌کند. در توضیح و تفسیر این تفاوتها می‌توان گفت که به‌رغم یکسان بودن جنس و گونهٔ گیاهی، نوع ریزنمونه استفاده شده و سطح پلوئیدی آن (سلولهای دیواره بافت تخمدان ۲n کروموزومی هستند)، از دلایل عمدهٔ اختلافات موجود در نتایج بدست آمده است. به عبارتی دیگر، نسبت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در بافتها و اندامهای مختلف گیاهی متفاوت بوده که می‌تواند بر روی کالوس‌زایی و باززایی از کالوسهای موجود اثرگذار باشد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲). در ارتباط با تعیین بهترین تیمار مطلوب ریشه‌زایی که در محیط MS با ۱/۲ نیترات به دست آمده است، Pieriek (۱۹۹۷)، کاهش غلظت مواد معدنی محیط پایهٔ MS را به مقدار نصف برای تشکیل ریشه در بیشتر گونه‌ها مفید می‌داند. همچنین Hyndman و همکاران (۱۹۸۲)، گزارش کردند که کاهش نیتروژن به طور برجسته‌ای ریشه‌دهی را در نو شاخه‌های حاصل از بعضی گونه‌های گیاهان چوبی افزایش می‌دهد. این نتایج با نتایج به دست آمده در معرفی تیمار مطلوب ریشه‌زایی در محیط پایهٔ MS با نصف غلظت نیترات همخوانی کامل دارد. در مورد نوع ترکیب هورمونی به کار رفته جهت ریشه‌زایی، این نتایج با نتایج جورابچی (۱۳۷۹)، در کشت گل‌آذین نر صنوبر پده مطابقت کامل دارد، لیکن با نتایج شهرزاد و امام (۱۳۷۹)، در دستیابی به ریشه از کشت سرشاخه‌های جوان صنوبر پده با IBA به میزان ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر همخوانی ندارد. نوع ریزنمونه استفاده شده که بیانگر نسبتهای متفاوت هورمونهای درون‌زای آنهاست می‌تواند از دلایل عمده اختلافات موجود در نتایج حاصل باشد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲).

منابع مورد استفاده

- جورابچی، ع.، ۱۳۷۹. تنوع سوماکلونال و گامتوکلونال در گیاهان باززایی شده از کشت سلول و کالوس گیاه صنوبر پده (*Populus euphratica* Oliv.)، پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشتهٔ زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه خاتم.
- فارسی، م. و ذوالعلی، ج. (چاولا، اچ. اس.)، ۱۳۸۲. اصول بیوتکنولوژی گیاهی، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. صفحات ۱۲-٤۳.
- شهرزاد، ش. و امام، م.، ۱۳۷۹. تکثیر غیرجنسی پده (*P. euphartica* Oliv.) به روش کشت بافت، سمینار ارائه شده در مجموعه مقالات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، شماره ۲۳۰، صفحات ۲۳-۱۱.
- محمودی‌کردی، ف.، ۱۳۷۹. کشت بساک و ایجاد گیاه هاپلوئید در صنوبر پده و بررسی مقایسه‌ای تشریحی گیاهان هاپلوئید ایجاد شده با دیپلوئید طبیعی، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم.
- Ahuja, M.R., 1984. A commercially feasible micropropagation method for aspen. Silvae Genetica, 33:174-176
- Antonetti, P.L.E. and Pinon, J., 1993. Somaclonal variation within poplars. Plant cell, tissue and organ culture, 35:99-106
- Hyndman, S.E., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A., 1982. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultured rose shoots. Plant cell, tissue and organ culture, 1:229-238
- McNabb, H.S., 1997. Micropropagation, genetic engineering and molecular biology of *Populus* in: Klopfenstein, N.B.,Y.W. Chun, M.S. Kim and M.R. Ahuja, (eds.).
- PP. 1-2, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station publisher, Colerado.
- Pierik, R.L.M. 1997. *In vitro* culture of higher plants. kluwer. Academic Publishers, Netherlands. , 195-196 pp.
- Parsons, T.J. and Sinkar, V.P., 1986. Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens*. Bio. Tech, 4:533-536.
- Redenbaugh, M.K., Westfall, R.O. and Karosky, D.F., 1981. Dihaploid callus production from *Ulmus Americana* anthers. Bot. Gaz, 142:19-26
- Shiji, W., Binghao, C. and Hgun, L., 1995. Euphrates poplar forest. China environmental science press, 38-43.

Study of callus induction and regeneration in *Populus euphratica* Oliv. *via* ovary culture

S. Sadat[1], M.H. Assareh[1], A. Jafari Mofid Abadi[1], S.R. Tabaei -Aghdaei[1] and A. Ghamari Zare [1]

1- Research Institute of Forest and Rangelands, P.O. Box 13185-116, Tehran, Iran. E-mail: shahab_302004@yahoo.com

Abstract

Immature and mature ovaries of *Populus euphratica* Oliv. were harvested from the female trees on the bank of Karun river. Five sterilization treatments were tested in a completely randomized design (CRD) with eight replications. 0.1% mercuric chloride and 70% ethanol both for 30 seconds, 70% ethanol for 30 seconds and 25% sodium hypochlorite for 10 minutes and also 70% ethanol for 1 minute and 25% sodium hypochlorite for 10 minutes were the best treatments. In order to Callus induction, four treatments were evaluated through a covariance analysis in a CRD design with six replications. MS basal medium supplemented with 3 mgl^{-1} IBA and 0.1 mgl^{-1} BAP and also 3 mgl^{-1} 2,4-D and 0.1 mgl^{-1} Kin were proposed for callus induction. In addition, the regression equation between the explants age and the amount of callus production was obtained. Regression curve demonstrated the decrease of callus induction as a result of increase in explants age. Regeneration was studied using four hormonal treatments in a factorial experiment with four replications based on a completely randomized block design. MS basal medium supplemented with 2 mgl^{-1} BAP and 0.5 mgl^{-1} NAA was suggested as the best treatment. Also, combination of NAA and IBA both 0.1 mgl^{-1} in half MS medium was suggested as the best treatments for root production. After the different stages of acclimatization in soil, the plantlets were transferred to field.

Key words: Ovaries, MS medium, callus, regeneration, rooting and acclimatization.