اثر ژنوتیپ و ترکیب محیط کشت بر تکثیر درون شیشه‌ای گیاه نوش (*Thuja orientalis*)

میترا امام[1]

چکیده

با توجه به آنکه روشهای مختلف تکثیر غیرجنسی از جمله ریزازدیادی برای درختان بالغ نوش مورد توجه محققان قرارگرفته، این پژوهش در راستای بررسی مقایسه‌ای تکثیر درون شیشه‌ای ژنوتیپهای برتر این گیاهان، صورت پذیرفت. در این تحقیق، سرشاخه‌های پایه‌های بالغ و برگزیده نوش در گلستان (ژنوتیپ اول) و قزوین (ژنوتیپ دوم) پس از جمع‌آوری در فصل پاییز، مورد سترون‌سازی قرار گرفتند. شستشو با آب و مایع ظرفشویی و برس‌کشی با محلول اتانل ۷۰ ٪ به عنوان پیش‌تیمار سترون‌سازی و غوطه‌وری نمونه‌ها در اتانل ۷۰ ٪ به مدت ۱ دقیقه و آنگاه شستشو با محلول کلرور مرکوریک ۰/۱٪ در زمانهای مختلف (۷ دقیقه در مورد نمونه‌های ژنوتیپ اول و ۹ دقیقه در مورد نمونه‌های ژنوتیپ دوم) به عنوان بهترین تیمار سترون‌سازی، انتخاب گردید. جوانه‌ها در محیط کشت MS دارای هورمون 2ip در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، استقرار یافتند. سپس برای مرحله شاخه‌زایی و تکثیر از دو محیط کشت MS و DKW با ترکیب هورمونی از ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و 2ip به طور مجزا و به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم درلیتر IBA استفاده گردید.

محیط کشت MS حاوی هورمونهای 2ip و IBA به ترتیب با غلظت ۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر، بیشترین مقدار شاخه‌زایی را برای ژنوتیپ اول نشان داد. میزان تکثیر و رشد طولی شاخه برای ژنوتیپ اول بیشتر از دوم بوده و میانگین رشد طولی نمونه‌ها در محیط کشت DKW بهتر از MS بود.

واژه‌های کلیدی: کشت سرشاخه‌ای، نوش، تکثیر درون‌شیشه‌ای، کشت بافت، ژنوتیپ.

۱- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، صندوق پستی ۱۱۶ –۱۳۱۸۵

E-mail:memam@rifr-ac.ir

مقدمه

درخت نوش (*Thuja orientalis*) یا سرو خمره‌ای، واریته Arborvitae از جمله سوزنی برگان موجود در ایران است که به خاطر ظاهر زیبا و تزیینی‌بودن، در فضای سبز شهری و پارکها به فراوانی کشت شده و نیز به دلیل چوب محکم و مقاوم در برابر فساد آن، دارای اهمیت خاصی در بین درختان جنگلی می‌باشد. از طرفی به خاطر انتشار محدود و حفظ ارزشهای ژنتیکی این گونه در زیستگاهها، نیاز به حمایت همه جانبه دارد.

این گیاه، از مخروطیان همیشه سبز، معطر و دارای رزین با شاخه‌های منشعب کوتاه و فشرده مسطح و پوست نازک فلسی بوده و به تیره کوپرساسه (Cupressaceae) منتسب می‌باشد. درخت نوش، بومی آسیای معتدل و چین است. در ایران، بیشه‌ای از آن در محل سورکش دره علی‌آباد کتول گلستان (با ارتفاع ۹۰۰ تا ۹۵۰ متر) و چندین پایه نیز در جنگلهای اطراف سنگده مازندران (در ارتفاع ۱۲۰۰ متر) دیده شده است (ثابتی، ١٣٤٤). علاوه بر آن دو پایه کهنسال آن در دشت قزوین دیده شده که بالای ۱۵۰ سال سن دارند (کروری، ١٣٧٦).

این گونه، با ارزش و دارای اهمیت اقتصادی می‌باشد، به طوری که از چوب نوش که بسیار سبک و مقاوم به پوسیدگی است، برای قایق و ساختمان‌سازی استفاده می‌شود (ثابتی، ١٣٤٤). درخت نوش در تمام خاکها رشد می‌نماید و در شرایط نامساعد، انشعاباتش کبود رنگ می‌گردد. نوش، درختی بسیار قوی با رشد رویشی سریع می‌باشد. انشعابات آن بادبزنی و دوتایی است و به راحتی هرس می‌شود و می‌توان آن را به شکل پرچین پرپشتی درآورد. تولید غیرجنسی طبیعی آن با ریشه‌دهی از قاعده شاخه‌ها صورت می‌گیرد (Aboel -Nil، ١٩٨٧).

Konar و Oberoi (۱۹٦٥) تشکیل ساختارهای جنین مانند را بر لپه‌های *T. orientalis* گزارش کردند. آنها از محیط White به همراه 2,4-D وIAA، شیر نارگیل و کازیین هیدرولیزات، عصاره مخمر و نگهداری کشتها در شرایط حرارت ۲۰ ـ ۲۵ درجه سانتیگراد و ۸ ساعت طول روز، بعد از ٦ هفته ایجاد شاخه‌زایی نمودند. حدود ۱۰ سال بعد Thomas و همکاران (۱۹۷۷) ریزنمونه‌های (جوانه‌های انتهایی، لپه و قطعات هیپوکوتیل) جدا شده از نهالهای بذری ۲ تا ٤ هفته‌ای را با کاربرد مخلوط اکسینها و سیتوکنینهای مختلف در محیط MS برای تولید اندام‌زایی، استفاده نمودند. در همه تیمارهای واجد اکسین، کالوس تشکیل گردید.

قلمه‌های ساقه و برگ دارای توانایی بالای ریشه‌دهی می‌باشد که با بالا رفتن سن درخت کاهش می‌یابد (Coleman وThorpe، ۱۹۷۷)، بنابراین تکثیر غیرجنسی پایه‌های مسن جنگلی از طریق کشت بافت می‌تواند بسیار ارزشمند باشد. این تحقیق به منظور بررسی مقایسه‌ای تکثیر و ازدیاد شاخه درون شیشه‌ای دو ژنوتیپ بالغ و برگزیده نوش *Thuja orientalis* صورت پذیرفته است.

قابل ذکر است که مراحل کامل ریزازدیادی گونه مزبور تا ایجاد گیاه کامل از کشت جوانه، توسط نگارنده در مقاله تحقیقاتی چاپ شده در فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شماره (۱)۱۱ سال ۱۳۸۲ ارائه گردیده و این تحقیق صرفاً در جهت مقایسه تاثیر متقابل ژنوتیپ، هورمون و محیط کشت بر مراحل استقرار، شاخه‌زایی و تکثیر گیاهچه‌های حاصل در درون شیشه، صورت پذیرفته است.

مواد و روشها

پس از انتخاب یک پایه بالغ برگزیده در منطقه شرق گرگان واقع در دره علی‌آباد کتول در محلی به نام سورکش (به عنوان ژنوتیپ اول) برداشت از سرشاخه‌های آن در فصل پاییز صورت گرفت. علاوه بر آن از سرشاخه‌های پایه نوش بالغ ۱۵۰ ساله در منطقه قزوین به عنوان ژنوتیپ دوم، استفاده گردید. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه کشت بافت، مراحل پیش سترون و سترون‌سازی صورت گرفت. برای تیمار پیش سترون‌سازی، شستشو با آب و مایع ظرفشویی به همراه برس‌کشی بر تمام سطوح و به دنبال آن شستشو و برس‌کشی با محلول الکل (اتانل ۷۰٪) انجام پذیرفت. برای سترون‌سازی، تقسیم سرشاخه‌ها به قطعات کوچکتر واجد جوانه و سپس شستشو با محلول الکلی (اتانل ۷۰٪) برای مدت یک دقیقه و آنگاه سه بار شستشو با آب مقطر استریل انجام گرفت. سپس از محلول کلرور مرکوریک ۰/۱٪ در زمانهای ۵ تا ۱۶ دقیقه برای نمونه‌های پاییزه به همراه سه بار شستشو با آب مقطر استریل استفاده گردید.

جوانه‌های سترون گشته در محیط کشت DKW[1] حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون 2ip مستقر شدند. نمونه‌ها پس از سه بار بازکشت ماهانه بر محیط مذکور، به شاخه‌هایی با رشد طولی مناسب و دارای جوانه‌های جانبی فعال تبدیل گشتند که پس از وصول به تعداد مناسب شاخه، آزمون شاخه‌زایی در دو محیط کشت MS[2] و DKW با هورمونهای BA[3] و 2ipبا دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و IBA به غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر، صورت پذیرفت. آزمایشها سه بار تکرار گردید. داده‌های حاصل مورد تجزیه واریانس سه عاملی

1- DKW: Driver and Kuniyuki Walnut Medium (Driver, Kuniyuki ،۱۹۸٤)
2- MS: Murashige and Skoog (۱۹٦۲)
3- BA: 6-Benzil Amino Purine

قرار گرفتند و نتایج میانگینها با استفاده از نرم افزار Excel به صورت نمودار ستونی ترسیم گشته و مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج

در مورد نمونه‌های پاییزه سرشاخه‌های درختان کهنسال، سترون‌سازی به مدت ۷ دقیقه (برای ژنوتیپ اول) و ۹ دقیقه (برای ژنوتیپ دوم) در محلول کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد، بهترین جواب را به همراه داشت (جدول شماره ۱). نمونه‌های سترون شده در محیط کشت DKW مستقر شدند. پس از استقرار موفقیت‌آمیز جوانه‌ها و رشد آنها در محیط کشت، شاخه‌زایی بر روی دو محیط کشت MS وDKW حاوی هورمونهای BA و 2ip به طور انفرادی، به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر از IBA صورت گرفت (شکلهای شماره ۱ و ۲).

مقایسه تیمارهای محیط کشت، هورمون و ژنوتیپ بر روی صفات ضریب ازدیاد شاخه و جوانه و نیز رشد طولی شاخه بیانگر آن است که اندازه این صفات برای ژنوتیپ اول بیشتر از دوم بوده است (صرفنظر از تیمارهای محیط کشت و هورمون) ولی برای تیمارهای محیط کشت، هورمون و تاثیر متقابل این عوامل، معنی‌دار نبوده است (جدول شماره ۲)، به‌جز در مورد تاثیر متقابل محیط کشت و ژنوتیپ بر روی میزان رشد طولی شاخه‌ها، که این میانگینها معنی‌دار بوده و برای محیط DKW و ژنوتیپ اول در بالاترین میزان خود می‌باشد (شکل شماره٤). در مورد این ژنوتیپ، کمترین میزان تکثیر و شاخه‌زنی در محیط DKW و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد (شکل شماره ۳). در مورد صفت شاخه‌زنی، بالاترین میزان تکثیر برای ژنوتیپ اول و در محیط کشت MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر 2ip حاصل گشت و برای ژنوتیپ دوم محیط DKW و2ip در میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بالاترین حد رشد را از خود بروز داد.

بحث

در مورد ژنوتیپهای مورد بررسی، مدت زمان تیمار اصلی سترون‌سازی برای ژنوتیپ دوم کمی بیشتر از ژنوتیپ اول بوده (جدول شماره ۱)، که می‌توان این مسئله را به بالاتر بودن سن پایه متعلق به ژنوتیپ دوم نسبت به اول مربوط نمود.

استفاده از پیش تیمار حذف مکانیکی زواید سطح نمونه با برس‌کشی به همراه مایع ظرفشویی و اتانل ۷۰ درصد، با حذف رزینها و مومهای آب گریز سطح کوتیکول، که مانع تماس مواد سترون کننده با میکروارگانیسمها می باشد، به نفوذ هرچه بیشتر این مواد به داخل بافت، کمک می‌نماید. اتانل با خاصیت میکروب‌کشی خود بایستی در زمان محدودی بر بافت اثر بگذارد تا تنها نقش از بین برنده باکتری را داشته باشد و یاخته‌های نمونه را نکشد (Enjarlic و Lardet، ۱۹۸۸). استفاده از محلول کلرورمرکوریک برای سترون‌سازی نمونه‌ها، این خاصیت را دارا بوده که مقادیر کم این محلول در زمانهای کوتاه مدت تاثیر قوی و ماندگاری را بر جوانه‌ها داشته و در عین حذف آلودگیهای میکروبی از آنها باعث قهوه‌ای شدن یا مرگ آنها نیز نمی‌گردد.

در مورد ژنوتیپ اول، تاثیر 2ip بر ایجاد شاخه‌های متعدد و جوانه‌های نابجا بر شاخه به مراتب بیشتر از تاثیر هورمون BA بوده است (شکل شماره ۳). در بین سیتوکنینهای مورد استفاده در مرحله تکثیر و ازدیاد شاخه‌ها، 6-BAP از قویترین مواد تحریک کننده رشد و تکثیر شاخه‌ها بوده که تاثیر قوی و ماندگاری بر ریزنمونه‌ها داشته است. 2ip از جمله سیتوکنینهای طبیعی بوده که تاثیر آن بر تشکیل شاخه‌های نابجا در *Pinus strobus* کمتر از BA می‌باشد (Flinn و همکاران، ۱۹۸٦).

برای ژنوتیپ دوم، برخلاف ژنوتیپ اول، بیشترین میزان شاخه‌زنی و رشد طولی شاخه‌ها بر محیط کشت DKW به دست آمد. بعضی از مخروطیان بر محیط دارای نصف میزان نمکهای پرمصرف، رشد خوب و مناسبی دارند مثل *Thuja occidentalis* بر محیط QL[1] ۱/۲ (Harry و همکاران ۱۹۸۷). در تحقیق اخیر از محیط ۱/۲MS استفاده شد و نتایج، نمایانگر رشد مناسب نمونه‌ها در این محیط بود. Coleman و Ernest (۱۹۸۹) در بررسی تاثیر ژنوتیپ بر شاخه‌زایی جداکشتهای میانگره‌ای ۱٦ ژنوتیپ مختلف گونه صنوبر *P.deltoides* شاهد تفاوت این شاخه‌زایی و تکثیر برحسب ژنوتیپ بودند.

Ahuja (۱۹۸۲) نیز در حین بررسی تکثیر سریع ژنوتیپهای مختلف سخت ریشه‌زا در مورد ٤۸ کلون صنوبر دریافت که پاسخ رشد و تمایز جداکشتها تحت تاثیر محیط کشت و ژنوتیپ می‌باشد.

1- QL: Quoirin & Lepoivre medium (Quoirin, lepoivre ،۱۹۷۷)

جدول شماره ۱- تاثیر تیمارهای سترون‌سازی بر میزان آلودگی و زنده‌مانی جوانه‌ها

ردیف	محل برداشت نمونه از پایه	تاریخ برداشت نمونه	اندازه نمونه (Cm)	پیش سترون سازی	سترون سازی (دقیقه)	آلودگی جوانه (درصد)	مرگ و میر جوانه (درصد)	جوانه‌های فعال وزنده (درصد)
۱	گرگان	۸۱/۷/۷	۰/۵	A,B,C	M(5)′	-	۳۵	٦٥
۲	گرگان	۸۱/۷/۷	۰/۵	A,B,C	M(7)′	-	۱۲	۸۸
۳	گرگان	۸۱/۷/۷	۰/۵	A,B,C	M(9)′	-	۲۰	۸۰
٤	گرگان	۸۱/۷/۷	۰/۵	A,B,C	M(12)′	-	۳۰	۷۰
٥	گرگان	۸۱/۷/۷	۰/۵	A,B,C	M(14)′	-	۱٦	۸٤
٦	گرگان	۸۱/۷/۷	۰/۵	A,B,C	M(16)′	۳	۲٥	۷۲
۷	قزوین	۸۱/۷/۷	۰/۵	A,B,C	M(5)′	۱۰	٤۱	٤۹
۸	قزوین	۸۱/۷/۷	۰/۵	A,B,C	M(7)′	-	٤۷	۳۳
۹	قزوین	۸۱/۷/۷	۰/۵	A,B,C	M(9)′	-	۱٥	۸٥
۱۰	قزوین	۸۱/۷/۷	۰/۵	A,B,C	M(11)′	۹	٤۰	٥۱
۱۱	قزوین	۸۱/۷/۷	۰/۵	A,B,C	M(14)′	٤	۳۰	٦٦
۱۲	قزوین	۸۱/۷/۷	۰/۵	A,B,C	M(16)′	۲	۲٦	۷۲

A: شستشو و برس‌کشی با مایع ظرفشویی

B: برس‌کشی با محلول اتانل ۷۰ ٪ حجمی C : غوطه‌وری در محلول اتانل ۷۰ ٪ برای یک دقیقه

M: غوطه‌وری در محلول کلرورمرکوریک ۰/۱ ٪ دقیقه

جدول شماره ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات شاخه‌زایی، جوانه‌زنی و رشدطولی

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		شاخه‌زایی	جوانه‌زنی	رشد طولی شاخه
محیط کشت (A)	۳	۱/۲۸۸ ns	۰/۵۰۱ ns	۱/۸۷۷*
هورمون (B)	۱	۰/۰۹۲ ns	۰/۱۲۰ ns	۲/۳۳ ns
ژنوتیپ × محیط کشت (AC)	۳	۱/۷۰۶ ns	۲/۱۳۵ ns	۱/٤۲۲ *
ژنوتیپ (c)	۱	۹/۳٦۳ **	۲٤/۱۹۷ **	۱/۳۵ ns
خطا	۳۲	-	-	-

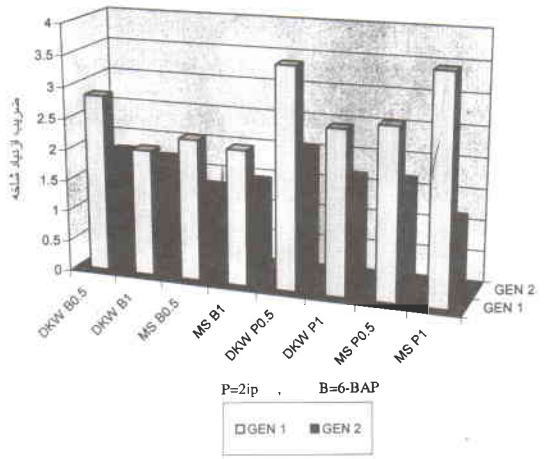
ns عدم اختلاف معنی‌دار

* اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ ٪

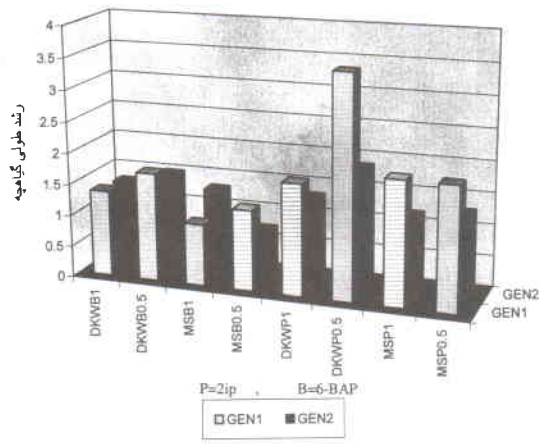
** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ ٪

شکل شماره ۱- شاخه‌زایی و تکثیر متعدد شاخه ژنوتیپ اول در محیط کشت MS واجد ۱ میلی‌گرم در لیتر 2ip و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

شکل شماره ۲- شاخه‌زایی و تکثیر متعدد شاخه‌های ژنوتیپ دوم در محیط کشت DKW واجد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیترIBA



شکل شماره ۳- تاثیر عوامل محیط کشت، هورمون و ژنوتیپ بر ضریب ازدیاد شاخه



شکل شماره ٤- تاثیر تیمارهای ژنوتیپ، محیط کشت و هورمون بر صفت رشدطولی شاخه

سپاسگزاری

در انجام این پژوهش از آقای دکتر قمری زارع ریاست محترم بخش ژنتیک و فیزیولوژی و از آقای دکتر جعفری مفیدآبادی و خانمهای مهندس، شکوفه شهرزاد و طیبه سهیلا نراقی به مناسبت همکاری عملی در اجرای این تحقیق و از خانم مهندس آزاده سلیمانی به مناسبت یاری در ترسیم نمودارهای آماری مقاله متشکرم.

منابع

۱- امام، م.، ۱۳۸۲. تکثیر درون شیشه ای درخت نوش (*Thuja orientalis*) از طریق سرشاخه‌های آن. مجله تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان جنگلی و مرتعی ایران، ۱۱(۱): ۱-۱۵.

۲- ثابتی، ح، ۱۳٤٤. درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات دانشگاه تهران، ۷۸٤ صفحه.

۳- کروری، س، ۱۳۷٦. درختان دیرزیست استان قزوین. مجله جنگل و مرتع، شماره ٤۳: ٤٤-٤٥

4- Aboel-Nil, M. M., 1987. Tissue culture of Douglas fir and Western North American conifers: 80-100. In: Bonga, JM. (ed), Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 3, Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms, Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht: 416.

5- Ahuja, M.R., 1982. Isolation, culture and fusion of protoplasts, problems prospects. Silvae Genetica,31: 66-77

6- Coleman, G. G. and Ernest, S. G., 1989. In vitro shoot regeneration of *P. deltoides* effect of cytokinin and genotype. Plant Cell Reports, 8 :459462.

7- Coleman,W.A. and Thorpe, T., 1977. In vitro culture of western red sedar (*Thuja plicata Donn*): 1. Plantlet formation. Ot Gaz, 11138: 2298-2304.

8- Driver, J. A. and Kuniyuki, H., 1984. In vitro propagation of Paradox walnut root stocks (J. *hindsii* × *J. regia*). Horticulture. Science, 19:507-509.

9- Enjarlic, F. and Lardet, L., 1988. Contamination of primary culture in tropical areas, Acta Horticulture, 225: 57-65.
10- Flinn, B. S., Webb, D.T. and Georgis, W., 1986. In vitro control of caulogenesis by growth regulators and media components in embryonic explants of eastern white pine (*Pinus strobus*). Canadian Journal of Botany, 64 :1948-1956.
11- Harry, I.S., Thompson, M.R., Lu, C.Y. and Thorpe, T., 1987. In vitro plantlet formation from embryonic explants of eastern white sedar (*Thuja occidentalis*). Tree Physiology, 3:273-283.
12- Konar, R.N, Oberoi, Y.P., 1965. In vitro development of embryoids on the cotyledons of Biota orientalis. Phytomorphology, 15:137140. In: Bajaj, Y.P.S (eds). Biotechnology in Agriculture and Forestry 18, Springer-Verlarg, India: 509.
13- Quoirin, M. and Lepoivre, P., 1977. Etude de milieux adaptex aux cultures in vitro de Prunus. Acta. Horticulturae, 78:437-442.
14- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum, 15: 473-479.
15- Thomas, M. J, Duhoux, E ., and Vazart, J., 1977. In vitro organ initiation in tissue cultures of Biota orientalis and other species of the Cupressaceae. Plant Sci Lett, 8:395-400. In: Bajaj, Y.P.S (eds). Biotechnology in agriculture and Forestry 18, Springer-Verlag, India :509.