ریزازدیادی سفیدپلت (*Populus caspica*)از طریق کشت میانگره

میترا امام[۱] ، علی جعفری مفید آبادی [۱]

چکیده

سرشاخه‌های سفیدپلت از رویشگاه اصلی گیاه (استان گیلان، منطقه صفرابسته) جمع آوری و پس از سترون سازی در محیط کشت MS با نصف غلظت نیترات و افزودن هورمون BA (۰/۵ mg/lit) به همراه IBA (۰/.۱mg/lit) مستقر گردیدند. پس از وصول به شاخه‌های متعدد در بهترین محیط کشت و غلظت هورمونی مناسب، قطعات میانگره از شاخه‌های مزبور به طول ۱ تا ۱/۵ سانتیمتر در دو نوع محیط کشت ½ MS و MS به همراه سه نوع غلظت هورمونی BA (۱، ۰/۵ و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر)، انتقال و کشت گردیدند. میزان شاخه زایی و رشد طولی با تیمارهای مذکور طی یک آزمایش فاکتوریل با سه تکرار انجام و مقایسه میانگینها براساس آزمون دانکن (۰۵ /۰= α) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که قطعات میانگره در محیط کشت MS ۲/ ۱ با حضور BA به غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر بیشترین پرآوری و تکثیر شاخه‌ها را به همراه داشته است . ریشه‌زایی شاخه‌های حاصل در محیط کشت MS ۱/۲ با هورمون IBA در ۰/۵میلی گرم بر لیتر صورت گرفت.

کلمات کلیدی: سفید پلت، تکثیر رویشی، کشت میانگره

مقدمه

صنوبرها از جنس *Populus* و تیره Salicaceae می‌باشند که درختانی دو پایه، سریع‌الرشد و با گل آذینهای نر و ماده بوده و بر پایه‌های مجزا واقع شده‌اند. سفیدپلت

[۱] - اعضای هیات علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران صندوق پستی ۱۱۶- ۱۳۱۸۵

از sub section ترپیده و section لوسه می‌باشد که بومی ایران بوده و در جنگلهای شمال به صورت خودرو تا ارتفاع ۱٤۰۰ متر بالاتر از سطح دریا گسترش یافته است. این گیاهان از نظر سرعت رشد و نمو، دوره کوتاه زندگی و توانایی استقرار در خاکهای غنی و آبرفتی حائز اهمیت می‌باشند. چوب این درخت جنگلی در صنایع کاغذسازی، کبریت و جعبه سازی در تمام جهان استفاده می‌شود. صنوبرها به وسیله قلمه‌های ساقه تکثیر می‌گردند، ولی صنوبرهای لوسه از جمله سفیدپلت به دلیل فقدان آغازه‌های ریشه با قلمه‌های چوبی ساقه به سختی ریشه‌دار می‌شوند و روشهای دیگر از جمله ریشه جوش و پیوند برای تکثیر آنها توصیه می‌گردد. این روشها به دلیل محدودیت در دسترس بودن ژنوتیپهای ویژه به عنوان منبع اولیه گیاهی واجد محدودیتهایی در کاربرد تجارتی هستند. ناگزیر تکنیکهای کشت بافت که دارای ویژگی تکثیر انبوه و سریع از ژنوتیپهای برگزیده می‌باشد، اهمیت خاصی می‌یابد. از جمله روشهای تکثیر موفق صنوبر، کشت میانگره‌ها می‌باشد و تحقیق زیر برای مقایسه نحوه تکثیر گیاه با روش فوق و کشت جوانه صورت گرفت.

Venverloo (۱۹۷۳) از نمونه‌های میانگره‌ای ساقه صنوبر سیاه در محیط MS با هورمونهای 2.4-D و NAA شاخه نابه‌جا بدست آورد. Douglas (۱۹۸٤) میانگره‌های خواب صنوبر دلتوئیدس(*Populus deltoides*) را بر محیط MS کشت داد و تشکیل جوانه‌های نابه‌جا را بر ریزنمونه‌ها بعد از ۱۰ روز مشاهده نمود.

Coleman و Ernest (۱۹۹۰) از نمونه‌های میانگره‌ای ساقه در ٤ ژنوتیپ مختلف صنوبر دلتوئیدس و در محیط WPM تغییر یافته با یکی از سه نوع سیتوکنین (BA ,Zeatin 2ip)شاخه جانبی بدست آورد. به طوری که زاتین ۵ / ۰ میلی گرم بر لیتر در محیط مفروض بهترین شاخه زایی را به همراه داشت. Gupta و Agrawal (۱۹۹۱) رشد درون شیشه‌ای گیاهچه‌ها از قطعات شاخه حاوی میانگره صنوبر اورامریکانا *(Populus euramericana)* را نشان داد.

مواد و روشها

سرشاخه‌های سفیدپلت از پایه‌های برگزیده در استان گیلان، منطقه صفرابسته، جمع آوری شد. پس از سترون سازی و استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS با نصف غلظت نیترات حاوی هورمون, IBA ۰/۰۱ میلی‌گرم و BA،۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر (امام ۱۳۷۹)، میانگره‌ها از پایه درون شیشه‌ای گیاه مزبور جدا گردید. میانگین ابعاد ریزنمونه‌ها در حدود ۵ – ۱۰ میلیمتر و فاقد زواید جانبی بوده و به صورت عمودی در محیط کشتهای MS و ۱/۲MS با غلظتهای متفاوت از هورمون BA (۰/۱ – ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر) با ٦ تکرار و در قالب طرح آماری بلوکهای کاملا تصادفی کشت گردید، یادداشت برداری بر اساس درصد شاخه زایی (تعداد جوانه فعال و شاخه‌های تازه ایجاد شده) و طول شاخه‌ها پس از سه بازکشت متوالی انجام شد. ریشه زایی شاخه‌های حاصله در محیط کشت MS ۱/۲ با هورمون ریشه زایی ۰/۵ میلی گرم IBA بر لیتر صورت گرفت.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج امام (۱۳۷۹) ریزنمونه‌ها در فصل بهار به عنوان بهترین زمان برداشت و استقرار جوانه در محیط کشت تهیه شد. روش سترون سازی آنها با فلس برداری نمونه‌ها و شستشو به مدت ۳۰ ثانیه در محلول اتانل ۷۰ درصد و بعد غوطه وری نمونه‌ها در محلول کلرورمرکوریک ۱/ ۰ درصد به مدت ۳ دقیقه صورت گرفت که این روش به عنوان مناسبترین روش بدست آمده توسط امام (۱۳۷۹) بکار گرفته شده بود (جدول شماره ۱). درمورد شاخه زایی میانگره‌ها، نتایج حاکی از آن است که از شش تیمار هورمونی بکار گرفته شده، در طی دو بازکاشت اول و سوم مناسب ترین ریزازدیادی و رشد طولی شاخه‌ها در محیط MS ۱/۲ با غلظت ۵/ ۰ میلی‌گرم بر لیتر BAبدست آمد (تصاویر شماره ۱و۲). برای تعیین بهترین ترکیب هورمونی در میزان

شاخه زایی، مقایسه میانگینها (جدول شماره ۲) بر اساس آزمون دانکن نشان داد که محیط MS ۱/۲ با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA موجب بیشترین میزان شاخه زایی شده است. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها در مورد میزان شاخه زایی از جدا کشت میانگره‌ها حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در میان تیمارهای هورمونی بکار رفته برای شاخه زایی، جوانه زنی و رشد طولی شاخه‌ها در محدوده ۰/۰۱ =α می‌باشد. ایجاد و رشد جوانه‌های نابه‌جا بر قطعات میانگره کشت شده در حضور فیتو هورمونهای خارجی بسیار سریع و قابل توجه می‌باشد و میانگره‌های نزدیک راس ساقه تولید جوانه‌های نابه‌جا را در میزان کمتری انجام می‌دهند و با افزایش فاصله از راس فیزیولوژیکی نمونه، ظرفیت تشکیل جوانه بیشتر شده است. در ضمن مقایسه نحوه ریزازدیادی و رشد ریزنمونه‌ها بر محیط کشتهای MS وMS ۱/۲، بیانگر این است که استفاده از محیط کشت با نصف غلظت املاح ماکروالمان ، نتایج بهتری را در بر خواهد داشت. در مورد ریشه زایی، نتایج مشابه طرح ریزازدیادی سفیدپلت (امام ۱۳۷۹) می‌باشد.

بحث

به نظر می‌رسد که علاوه بر آنکه وضعیت ریزنمونه از نظر نوع و اندازه، در سهولت توسعه و نمو اندام زایی موثر می‌باشد ، شرایط کشت و محیط نیز به همان نسبت اهمیت دارد و میان این عوامل یک وابستگی وجود دارد. اجزاء محیط یک عامل کلیدی بوده و فرمول نمکهای معدنی مختلف و اجزاء متفاوت املاح (مثل نصف شدن یا دو برابر شدن قدرت محیط) می‌تواند تحریکات مختلفی را در رشد گیاهکهای درون شیشه‌ای باعث شود. سطوح و انواع قندها و کاهش نیتروژن محیط می‌تواند ریخت زایی را تحت تاثیر قرار دهد، فیتوهورمونها نیز در تنظیم توسعه اندام زایی درون شیشه‌ای موثرند (Gupta و Agrawal، ۱۹۹۰).

میانگره‌های ساقه دارای سیتوکنینهای درونزای کافی در زمان پر آوری برای تولید شاخه نا به‌جا بر روی محیط فاقد هورمون بوده و این تحریک به گونه و ژنوتیپ گیاه نیز وابسته است. جوانه‌های نابه‌جا از لبه بافت پارانشیمی که بعد از ۵ روز از کشت اولیه میانگره‌ها تشکیل می‌شود رشد می‌نمایند وظهور این بافت منشاء یافته از سلولهای آبکش و کامبیومی ریزنمونه کشت شده می‌باشند (Douglas، ۱۹۸٤).

با توجه به نتایج آماری بدست آمده، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر BA مناسبترین ریزازدیادی و رشد طولی شاخه‌ها را به همراه داشته است و این مساله، مشابه نتیجه حاصل از تحقیقات Coleman , Ernest (۱۹۸۹) بر میانگره‌های صنوبر دلتوئیدس می‌باشد با این تفاوت که نتایج گزارش شده با استفاده از هورمون زآتین بوده در حالی که در این تحقیق BA با غلظت مشابه بکار گرفته شده است. در مورد ریشه زایی، استفاده از هورمون IBA , NAA در غلظت ۰/۵میلی گرم بر لیتر بر روی شاخه‌های *Aspen (Populus tremoloides)* توسط Ahuja (۱۹۸۳) نیز انجام گردیده بود.

جدول شماره ۱ : روشها و تیمارهای مورد استفاده در سترون سازی جوانه‌ها.

فصل برداشت	روش پیش سترون*	روش سترون	درصد آلودگی قارچی	درصدآلودگ میکروبی	درصد نکروزگی	درصد جوانه فعال
بهار	c(30)″ b(30)′	O(12)′	٦٠	٣٠	–	١٠
		O′(7)′	٥٥	١٥	١٠	٢٠
		K(2)′	٣٥	٢٠	٢٠	٢٥
		M(2)′	–	–	٦٠	٤٠
		M(3)′	–	–	٨٠	٢٠
تابستان	c(30)″	M(2)′	–	–	١٠٠	–
		M(2)′	–	–	١٠٠	–
		M(3)′	–	–	١٠٠	–
		K(3)′	–	–	١٠٠	–
پائیز	فلس برداری′c(30)	M(3)′	٥	٥	–	٩٠
		L(30)′ +M(1)′	٧٠	٣٠	–	–
	بدون فلس برداری c(30)′	M(3)′	٣٨	١٢	–	٤٨

* : b = قارچ کش بنومیل در غلظت ۰/۵ درصد، c = شستشو با اتانل ۷۰ ٪ o =محلول هیپوکلریت سدیم با کلر فعال ۰/۵درصد، o′ = محلول هیپوکلریت سدیم با کلر فعال ۰/۷۵ درصد، k = محلول هیپوکلریت سدیم با کلر فعال ۰/۱ درصد، L = محلول هیپوکلریت سدیم با کلر فعال ۲ درصد، M = محلول کلرور مرکوریک با غلظت ۰/۱ درصد.

جدول شماره۲ : نتایج جدول تجزیه‌واریانس صفات شاخه زایی، جوانه‌زنی و رشد طولی

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		شاخه زایی	جوانه زنی	رشدطولی
تکرار	۵	۰/۴۹۱ ns	۲/ ۳۸۲ ns	۱/ ٦٨٤ ns
تیمار	۵	۱/ ۹۰۸ *	۳/۸۷۲ *	۰/ ٦٧٦ *
خطا	۲۵	۰/ ۱۵۷ *	۰/ ۵۲۸ *	۰/ ۱۷۸ *

* = اختلاف معنی‌دار درسطح α= 0.01 ns = اختلاف غیر معنی‌دار

جدول شماره ۳ : مقایسه میانگینهای شاخه زایی، جوانه زنی و رشد طولی نمونه‌ها در برابر تیمارهای مختلف هورمونی در دو محیط کشت مورد استفاده. a.b.c نسبت به یکدیگر تفاوت ندارند.

محیط MS			غلظت هورمونی (mg/lit)	محیط MS ۱/۲		
شاخه زایی (No)	جوانه زنی (No)	رشد طولی (Cm)		شاخه زایی (تعداد)	جوانه زنی (تعداد)	رشد طولی (Cm)
۱/۲۳ abc	۳ ab	۱ b	BA 0.1	۱/ ۹ bc	٤/٧٦ ab	۱/۸۳ ab
۲/۲۳ abc	۳/٦ ab	۱/۵۳ a	BA 0.5	۳/ ٤ a	۵/۹۳ a	۲/۲۸ a
۱/٧٦ bc	۳/٤ ab	۱/۱ b	BA 1	۲/۹۳ ab	۵ ab	۱/٤٨ ab

تصویر شماره ۱ : شاخه زایی میانگره‌های سفیدپلت بر محیط کشت مناسب

تصویر شماره ۲ : مقایسه تیمارهای مختلف هورمونی بر میزان شاخه زایی و تکثیر میانگره‌ها (از چپ به راست BA:۱ و BA: /۵ و BA:۰/۱)

سپاسگزاری: از کلیه همکاران و عزیزانی که درگروه کشت بافت بخش ژنتیک و فیزیولوژی در انجام این تحقیق ما را یاری نموده‌اند کمال تشکر را داریم.

منابع

امام، میترا، ۱۳۷۹. تاثیر محیط کشت، هورمون و ژنوتیپ بر ریزازدیادی سفیدپلت (*Populus caspica*). مجموعه مقالات تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۲: ۸۹-۸۰.

Ahuja, M.R. 1983. A commercially feasible micropropagation methods for aspen. Silvae Genetica. 33 : 174-176 .

Coleman, G.G. and S.G. Ernest, 1989. *In vitro* shoot regeneration of p. *deltoides* effect of cytokinin and genotype. Plant Cell Reports. 8: 459-462.

Douglas, G.C. 1984. Formation on adventitious buds in stem internodes of *Populus spp* cultures in vitro on basal medium. Plant Physioligy , 116 : 313 – 321.

Gupta and Agrawal, 1990. *In vitro* plantlet development from explant 15-years old trees of *P. euramericana* a hybrid poplar. Plant science , 8 : 99-105.

Venverloo , C.J. 1973. The formation of adventitious organs. Acta. Bot. Neerl, 22: 390 – 398.

Micropropagation of *Populus caspica* by internode culture

Emam, M.[1] and A. Jafari-Mofidabadi[1]

Abstract

Shoot tips of elite adult trees of *Populus caspica* in northern forest of Iran (Gillan, Safrabaste) were collected. After sterilization the materials, these explants were cultured in ½ MS medium with 0.5 mg / lit BA + 0.01 mg / lit IBA.

Enough proliferated shoots were obtained. Internodes with length of 0.5 to 1 cm , were cultured in MS and ½ MS with 3 hormone treatments (BA : 0.1, 0.5 and 1 mg/lit) with three replications. The differences of proliferation and shoot length growth between treatments were investigated with a factorial experiment and Duncan's test. Results showed that the best medium for internodes' micropropagation of *P. caspica*, was MS with 0.5 mg / lit BA. Rooting of shoots were obtained in ½ MS with IBA in 0.5 mg/lit.

Key words: Internode culture, Vegatative propagation, *Populus caspica*

1 - Research Institute of Forests and Rangelands, P.O.Box 13185-116, Tehran