بررسی مقایسه‌ای ویژگیهای تشریحی نمونه‌های کشت شده در شیشه با گیاهان روئیده در محیط طبیعی سفیدپلت (*Populus caspica*)

میترا امام[1]

چکیده

به منظور آگاهی از تغییرات احتمالی در ریخت و ساختار گیاه سفیدپلت در طی فرآیند ریزازدیادی و خودداری از تکثیر نمونه‌های جهش یافته ، بررسیهای تشریحی به طور مقایسه ای بین نمونه‌های کشت شده در شیشه و پایه‌های مادری آنها با استفاده از روشهای مختلف بافت شناختی به عمل آمد. روش کار، عبارت از انجام بررسیهای تشریحی با برشگیری از برگ و دمبرگ، رنگ آمیزی، تثبیت و مطالعه میکروسکوپی برشها برای پی بردن به تفاوتهای ریخت شناسی بین پایه مادری و نمونه‌های کشت بافتی آنها می‌باشد. نتایج نشانگر آن است که نمونه‌های مربوط به رویشگاه طبیعی سفیدپلت (ژنوتیپهای ۱و۲) در مقایسه با نمونه‌های کاشته شده در باغ گیاهشناسی تهران (ژنوتیپ ۳) دارای ضخامت کمتر کوتیکول در سطح اپیدرم بوده‌اند. در مورد تمام نمونه‌های بالغ (ژنوتیپ ۱و۲و۳) دسته‌های متعدد آوندی چوب و آبکش با غلاف اسکلرانشیمی محیط بر آبکش دیده شد، ولی در نمونه‌های کشت شده در شیشه که واجد کوتیکول کمی بر سطح اپیدرمند دسته‌های آوندی نیز کوچک، محدود و فاقد غلاف اسکلرانشیمی بودند.

روزنه‌های تمام نمونه‌ها برجسته و انموسیتیک بوده و رسوب کریستالهای ستاره‌ای شکل اکسالات کلسیم در درون سلولهای کلانشیمی برگ و دمبرگ و پارانشیم مغزی

۱- عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

دمبرگ تمام نمونه‌ها دیده شد. این نتایج، تاکیدی بر عدم وجود تفاوتهای معنی دار از نظرخواص مورفولوژیکی تعیین کننده در بین نمونه‌های کشت بافتی با پایه‌های مادری آنها بوده است.

واژه‌های کلیدی : تشریح، بافت شناسی، سفیدپلت، ریزازدیادی، کشت مریستم

مقدمه :

صنوبر سفیدپلت، درختی نسبتا بزرگ با ارتفاع ۲۵ تا ۳۰ متر،خزان کننده با تاج وسیع و گسترده شبیه سپیدار می‌باشد. شاخه‌های یکساله پوشیده از کرکهای نمدی یکنواخت و نقره ای فام و برگها طویل، پالماته و در سطح زیرین پوشیده از کرکهای سفید است. جوانه‌ها طویل، کرکدار و با فلسهای همپوشان می‌باشند. گیاه دو پایه، گل ریز و مجتمع در شاتون می‌باشد (۲). چوب آن برای اهداف صنعتی مناسب است و تجزیه شیمیائی آن، از نظر وزن مخصوص تر و خشک، طول الیاف، درصد سلولز و لیگنین و قطر و بلندی متفاوت می‌باشند (۱).

در نمونه مورد بررسی نیز در ژنوتیپ ۳ (منطقه کاسپین تهران) در سلولهای برگ به دلیل گرم و خشک بودن منطقه پارانشیم نردبانی، مشاهده گردید. نیز در تمامی نمونه‌های بالغ سفیدپلت، آثاری از کریستالهای اکسالات کلسیم در سلولهای پارانشیمی و کلانشیمی برگ دیده شد.

تکثیر رویشی برای انتخاب و حفظ اثرات ژنی واجد توانائی است و برای ازدیاد ژنوتیپهای موردنظر مورداستفاده قرار می‌گیرد. درمقایسه با صنوبرهای دیگر، تکثیر از طریق قلمه زنی به سهولت انجام نمی گیرد و بنابراین از روش کشت بافت برای تکثیر گونه‌های برگزیده آن استفاده می‌شود.

کشت مریستم، از جمله روشهای موفق و مطمئن ریزازدیادی بخصوص در مورد گونه‌های جنگلی می‌باشد، زیرا علاوه بر ایجاد کلونهائی با خواص ثابت ژنتیکی و کاهش امکان جهشهای مورفولوژیکی در طول انجام ریزازدیادی، تکثیر گیاهان از این طریق سریعتر بوده و در مدت زمان کوتاهی می‌توان به تعداد زیادی گیاهچه دست یافت. به همین دلیل در بررسی اخیر برای اطمینان بیشتر از عدم بروز جهشهای مورفولوژیکی در گیاهان حاصل از کشت در شیشه، بر روی این نمونه‌ها و گیاهان مادری آنها یک بررسی مقایسه ای از دید عوامل تشریحی صورت گرفت.

بررسیهای اجمالی تشریحی در مورد بعضی از گونه‌های صنوبر از جمله *p. tricocarpa* توسط Brown (۱۹۷۱) و بر روی سلولهای ترشحی گیاه انجام گرفته است. بر طبق مشاهدات او در در این گونه ، سلولهای ترشحی غیر مشخص بوده و در آبکش و مغز آن تانن متراکم وجود دارد. در بعضی گونه‌های صنوبر در بافت چوبی وجود رسوباتی از اکسالات کلسیم گزارش شده است (۷).

Herman (۱۹۷۴) پس از مطالعه گونه‌های گزروفیت *P. deltoides* اعلام نموده است که وضعیت ساقه‌های آنها گوشه دار و مغز آن ستاره ای شکل بوده و دارای سه لایه سلولهای نردبانی شکل به سمت بیرون و دو لایه به سمت اپیدرم زیرین می‌باشند (۷).

مواد و روش‌ها

در این تحقیق بررسیهای تشریحی بر روی برگ و دمبرگ گیاه سفیدپلت متعلق به سه منطقه مختلف رویشگاهی و نمونه‌های حاصل از کشت در شیشه انجام گرفت. نمونه‌ها در اتانل ۷۰ درصد ذخیره شده و پس از شستشو با آب مقطر بمدت ۳ تا ۴ ساعت، با FAA (۱۷ سی سی اتانل ۹۶ درجه ، ۲ سی سی فرمالدئید ۳۷ درصد و ۰/۵ تا ۱ سی سی اسید استیک خالص) به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت، تثبیت شدند. پس از

آن ۴ تـا ۵ سـاعت بـا آب جـاری شستشـو وسپس آبگیری آنها با اتانل دارای درجه الکـلی رو بـه افزایش تا رسیدن به الکل مطلق در طی مراحل تدریجی انجام شد. سپس نمونـه‌هـا در مخـلوط الکـل – گزیلن به نسبتهای الکل ۱۰۰ (۳/۴)، گزیلن (۱/۴)-الکل ۱۰۰ (۱/۲)، گزیـلن (۱/۲ – الکـل ۱۰۰ (۱/۴)، گزیـلن (۳/۴)- ؛گزیـلن خـالص (۱)و گزیـلن خـالص (۲) از هـریک ۱۰ تـا ۱۵ دقیقـه قرار گرفت. در مرحله نهایی تثبیت از مخـلوط گزیـلن – پارافین مذاب استفاده شد. برای این منظور از گزیلن (۳/۴)، پارافین (۱/۴)- گزیلن (۱/۲)، پار افین (۱/۲)- گزیلن (۱/۴)، پارافین (۳/۴)- و از هریک بمدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه استفاده شد و سپس نمونه‌ها در مخلوط پارافین خالص (۱) به مدت ۳۰ تـا ۴۰ دقیقـه و پـارافین خـالص (۲) تـا یـک ساعت قرار گرفت. مرحله قالب گیری با ریخـتن پـارافین مذاب در قالب و قراردهی نمونه‌ها در آن و در جهت دلخواه صورت گرفت.

بـرش گیری نمونه‌ها توسط میکروتوم با قراردهی پیرامید بر پایه مخصوص انجام شـد. سپس برشهای مذکور با چسب ژلاتین بر روی لام چسبانیده شدند. حرارت دهی لام بـرای بـاز شـدن چین و چروک نمونه‌ها صورت گرفت و آنگاه نمونه‌ها در حرارت آزمایشگاه خشک گردید.

رنـگ آمیـزی لامهـا بـا رنگ آبی تولوئیدین در غلظت ۵ درصد برای ۲ دقیقه انجام شـد.پس از آن لامها با آب مقطر شسته شده و پارافین زدائی توسط گزیلول انجام و بعد برشها با چسب انتالن و لامل دائمی شدند و با میکروسکوپ نوری مطالعه گردیدند.

بـرش گیـری دستی : پس از تهیه برشهای دستی از برگ و دمبرگ توسط تیغ، برشها بمـدت ۵ دقیقـه در آب ژاول قـرار گرفتند تا بی رنگ شوند.سپس برشها با آب مقطر شسـته شـده و بـا محـلول ۰/۵ درصد سبز متیل بمدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی و بعد از چـند بار شستشو با آب مقطر در محلول کارمن زاجی برای نیم ساعت گذاشته شدند. و پـس از شستشـوی با آب مقطر برشها در یک قطره گلیسیرین و آب مقطر بر روی لام

تمیز قرار داده شده و با لامل در زیر عدسی با بزرگنمائی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج :

بررسیهای تشریحی :در برشهای برگی نمونه‌های بالغ (ژنوتیپهای ۱، ۲ و ۳) دستجات آوندی به صورت حلقه کامل چوب ، آبکش با غلاف اسکلرانشیمی درآمده بود، ولی در نمونه‌های کشت شده در شیشه دستجات آوندی کوچک، محدود و فاقد غلاف اسکلرانشیمی مشاهده شدند. نوع آوندها کلاترال است یعنی آبکش، چوب را احاطه نموده است (تصویر۲،۱و۳).

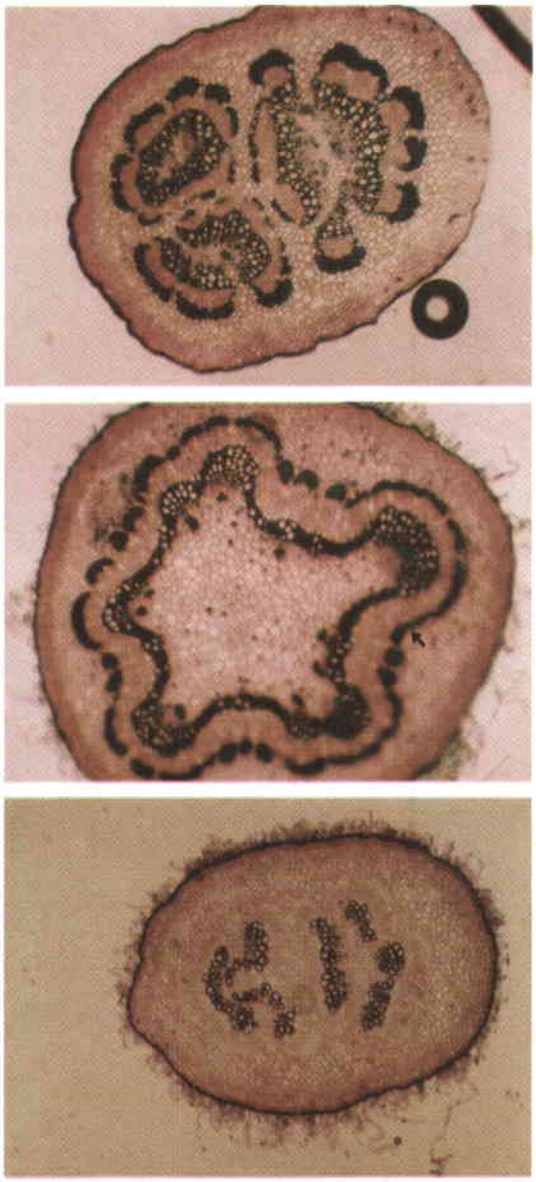
روزنه‌ها در تمام نمونه‌ها برجسته و انموسیتیک بوده و تعداد آنها در سطح تحتانی برگ بیشتر از سطح فوقانی بود(تصویر ۴و۵). کرک در سطح سلولهای اپیدرمی برگ و دمبرگ تمام نمونه‌ها از نوع ساده، تک سلولی و با دیواره نازک بود. کوتیکول در سطح سلولهای اپیدرمی نمونه‌ها ی بالغ مشاهده شد،ولی در نمونه‌های کشت شده در شیشه به مقدار کمی وجود داشت. پارانشیم نردبانی در رگبرگهای فرعی برگ نمونه‌های بالغ دیده شد . کریستالهای ستاره ای شکل اکسالات کلسیم در سلولهای پارانشیمی مغز دمبرگ و سلولهای کلانشیمی برگ و دمبرگ تمام نمونه‌ها دیده شد(تصویر ۶).

بحث و نتیجه گیری :

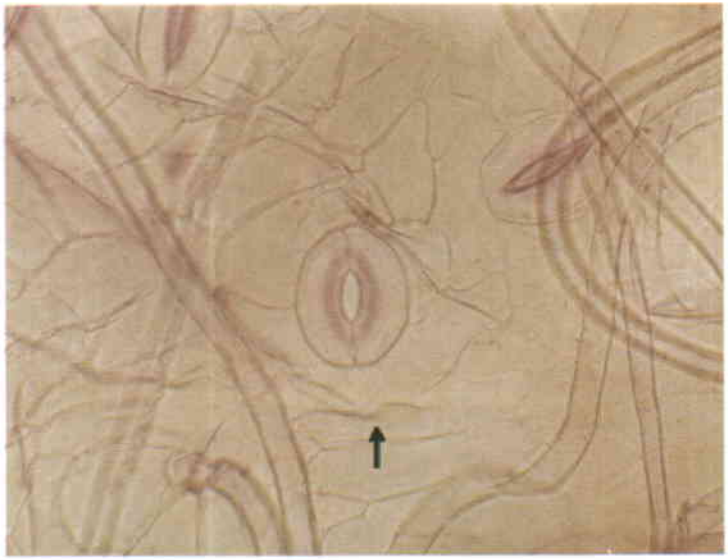
در بررسیهای تشریحی در تمام ژنوتیپهای مورد بررسی وجود کرک در سطح بیرونی اپیدرم برگ مشاهده شد، که میزان آن در نمونه ژنوتیپ ۳ بطور نسبی بیش از ژنوتیپهای ۲و۱ بود نیز ضخامت کوتیکول در سطح اپیدرم ژنوتیپ ۳ بیشتر از نمونه‌های دیگر بوده و بافت پارانشیم نرده ای نیز در سلولهای برگ گیاهان این ژنوتیپ بیش از

سایر ژنوتیپهاست،علت آن است که نمونه ۳ از پایه منطقه کاسپین تهران است که جزء اقلیم گرم و خشک می‌باشد.

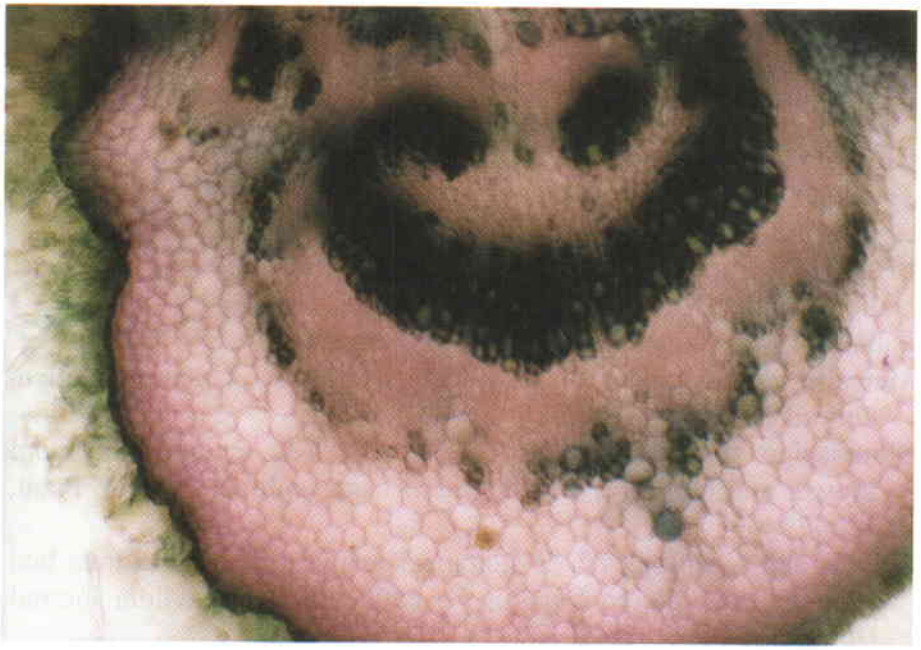
دستجات آوندی متعدد با غلاف اسکلرانشیمی در رگبرگ فرعی و اصلی برگ در نمونه‌های بالغ دیده شد، ولی در نمونه‌های کشت شده در شیشه آوندها کوچک، محدود و فاقد غلاف اسکلرانشیمی می‌باشند.که تفاوت مشاهده شده، به علت ریزازدیادی نمونه‌های فوق در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی و عدم تکامل بافت چوبی آنها می‌باشد. طبیعی است که نمونه‌های ریزازدیادی شده در شیشه پس از گذراندن مراحل سازگاری با شرایط محیط، از لحاظ وضعیت تکامل آوندهای چوبی نیز به حد مطلوب، رسیده‌اند(مطابق نتایج گزارش شده در طرح تکثیر غیرجنسی سفیدپلت به روش کشت بافت توسط نگارنده (۱۳۷۶-۱۳۷۲).



تصویر ۱، ۲ و ۳- حضور غلاف اسکلرانشیمی به دور دستجات آوندی در دمبرگ ژنوتیپهای بالغ ۱ و۳ و عدم حضور آن در دمبرگ نمونه کشت بافتی



تصویر ۴و۵- تیپ انموسیتیک سلول روزنه و تفاوت دو سطح برگ از نظر تعداد سلول روزنه و کرک در سفید پلت



تصویر ۶- نمائی از رسوب کریستالهای اکسالات کلسیم در سلولهای کلانشیم
در برش برگ سفید پلت

منابع :

جلیلوند، حمید، ۱۳۶۷. بررسی انتشار جغرافیائی و شرائط اکولوژیکی گونه سفیدپلت در جنگلهای شمال ایران، پایان نامه فوق لیسانس، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

قهرمان، احمد. فلور ایران، شماره انتشار ۹۷۱.

Christie, C.B. (1978. Rapid propagation of aspen and silver poplar using tissue culture techniques. Pro. Int. Plant Propagation Soc, 28: 255-260.

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

FAO 1979 Poplar and willows in wood production and land use. Forestry Ser. No 10 , Rome , Italy , P: 15-20.

Fahn. A 1974. Plant anatomy , Oxford. Pergamon Press, 611p.

Metcalfe , C.R. and Chalk.L. 1971 Anatomy of plant kew garden. Oxford : Clarendon Press. Vol 1

Mourashige. T. and Skooge. F. 1962 Advised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue culture. Physiol. Plant, 15: 473- 497.

Tehech and Cheng, 1987. Histological analysis of adventitious bud formation in cultured *Douglas Fir* cotyledon. Amesterdom Journal Botany, 65 : 845 - 849.

سپاسگزاری :

از خانمها،مهندس معصومه ایزدپناه و مهندس زهره فرزانه که از راهنمائیهای علمی آنها بهره مند بوده ام و نیز از خانمها ی مهندس فریبا شاهمیر، زهره فاکر باهر و شکوفه شهرزاد صمیمانه سپاسگزارم. همچنین از آقای دکتر جعفری مفیدآبادی مسئول گروه کشت بافت متشکرم.

Comparison of anatomic characteristics between *in vitro* cultured plantlets and naturally grown parental plants in *Populus caspica*

EMAM. M.[1]

Abstract

Anatomic charactristics of elite adult trees of *P. caspica* and *in vitro* derived plants were compared .

Results showed that plants from natural environment (Genotype 1,2)are different from Genotype 3 , because of less cuticole and tricomes on epidermis cells in the former(s).

All of the plants showed oxalate calcium crystals in both collenchymatic cells of leaves and parenchymatic cells of petioles. Adult plants showed vascular bundles with a scleranshima ring around the phloem , but tissue cultured explants showed less cuticoles and tricomes on epidermis, small and restricted vessels without scleranshima ring.Also stomata were anemositic and bulgy in all of the test samples.method of search is the microtomic sectioned from leaves and petioles , stained them , fixationed and microscopic studied between adult trees and tissue cultured species.

Key words: Anatomic – Hystology- Micropropagation _ Meristem culture –*Populus caspica*

1 Research Institute of Forests & Rangelands