دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۸، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۸۲-۷٤ (۱۳۸۹)

ریزازدیادی گیاه دم‌گاوی (*Smirnovia turkestana* Bunge)

شکوفه ناصر[۱]، عباس قمری‌زارع [۲*]، شکوفه شهرزاد [۳] و غلامرضا بخشی‌خانیکی [٤]

۱- کارشناس ارشد، بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، کرج
۲- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
پست الکترونیک:ghamari-zare@rifr-ac.ir
۳ - کارشناس، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
٤- استاد، دانشگاه پیام نور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/٦/۱٤ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱٦

چکیده

گیاه دم‌گاوی (*Smirnovia turkestana* Bunge) یکی از گونه‌های گیاهی باارزش ماسه‌زارهای ایران می‌باشد. نظر به اهمیت این گونه در امر بیابان‌زدایی، مشکلات زادآوری طبیعی، نیاز به حفظ ذخایر ژنتیکی در شرایط فراسرد و ریزازدیادی آن مورد بررسی قرار گرفت. بذرهای خراش داده شده با محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۲۵٪ w/v به مدت ۱۵ دقیقه سترون شدند و بعد در محیط پایه MS (۱/۲) کشت گردیدند. گیاهچه‌های بدست آمده پس از ۳ هفته از محل یقه قطع و در ۸ تیمار در محیط پایه MS با ترکیبات متفاوتی از هورمون‌های BAP، 2ip، Kin و IBA با ٤ تکرار برای شاخه‌زایی استقرار یافتند. براساس نتایج به دست آمده، محیط کشت پایه MS حاوی هورمون‌های 2ip و BAP (هر کدام به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و IBA به میزان ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر، به‌عنوان بهترین محیط شاخه‌زایی و محیط کشت MS تغییریافته بدون هورمون، به‌عنوان برترین محیط ریشه‌زایی تعیین گردید. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده پس از انتقال به گلدان‌های حاوی خاک عرصه به گلخانه منتقل و مراحل سازگاری طی ده روز انجام شد.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، بیابان‌زدایی، دم‌گاوی (***Smirnovia turkestana***)، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی.

مقدمه

حفظ و احیاء پوشش گیاهی در منابع طبیعی از اهمیت بسزایی برخوردار است. برای دستیابی به این هدف، گیاهانی که با شرایط اکولوژیک یک منطقه سازگار می‌باشند، مورد توجه قرار می‌گیرند. گیاهان مناطق خشک و بیابانی به دلیل قدرت سازگاری با شرایط فوق‌العاده دشوار محیطی نظیر کمبود رطوبت، دمای بالا، تجمع املاح در خاک، کمبود مواد آلی، نوسان‌های شدید دمایی در طول شبانه‌روز، وزش بادهای شدید و فرسایش بادی و آبی، از گونه‌های بسیار مهم بوده و به همین دلیل این گونه‌ها جزء ذخایر ارزشمند ژنتیکی محسوب می‌شوند (Azarnivand *et al.*, 2007). گونه دم‌گاوی (*Smirnovia turkestana* Bunge) از گونه‌های ارزشمند بومی و سازگار در شنزارهای مناطق مرکزی ایران است که از نظر تولید علوفه،

حفاظت خاک و ارزش دارویی بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Sabeti, 1994). این گیاه، درختچه‌ای به ارتفاع ۱/۵-۱ متر متعلق به خانواده پروانه‌آسا (Papilionaceae) بوده (Rechinger, 1984) و دارای دو نوع ریشه افقی و عمودی است. ریشه‌های عمودی بسیار عمیق بوده و ریشه‌های افقی به وسعت حدود ۳۰ متر گسترده‌اند. دم‌گاوی از طریق ریشه‌های افقی خود بفواصل یک متر، نهال‌های جوانی تولید می‌نماید (Loghman, 1984). بنابراین سیستم ریشه‌ای این گیاه به گونه‌ای است که هم در جذب مواد غذایی و رطوبت و هم در نگهداشتن گیاه در خاک نقش اساسی داشته و به شکل بسیار جالبی ذرات شن را تثبیت می‌نماید. این گیاه با داشتن گل‌های معطر و زیبا، طولانی بودن دوره فعالیت و کوتاه بودن دوره خواب، یکی از گزینه‌های برتر گیاهی در امر بیابان‌زدایی و ایجاد فضای سبز در اطراف شهرهای کویری می‌باشد تا به وسیله آن از هجوم ماسه‌ها به نقاط مسکونی و کشاورزی جلوگیری نماید (Majid, 1996).

دم گاوی در طبیعت از طریق بذر تکثیر می‌یابد ولی از حمله ماسه‌های روان و طوفان‌های کویری در امان نیست. از طرفی به علت وجود آفات چوبخوار و بذرخوار دم گاوی، رویشگاه این درختچه مورد تهدید قرار گرفته است (Majid, 1996). نتایج مطالعات حاکی از آن است که در زمان تشکیل میوه روی پایه مادری (اواخر اردیبهشت ماه)، میزان بذرهای معیوب ۶۰-۵۰ درصد بوده که با تکامل رشد میوه‌ها و رسیدن بذرها در اواخر تیر ماه این میزان به ۹۰-۷۰ درصد و در بعضی نقاط به بیش از ۹۵ درصد می‌رسد. بنابراین به دلیل مقدار بسیار کم بذرهای سالم و همچنین شانس کم شکستن طبیعی پوسته بذر و سبزشدن و استقرار نهال در عرصه‌های شنی که دائماً در حال تغییر و حرکتند، احتمال تکثیر جنسی و گسترده دم گاوی بسیار ناچیز است (Azarnivand *et al.*, 2007). بنابراین با توجه به اهمیت این گونه بهتر است نهال‌های جوانی تهیه و بعد به تپه‌های اقلیم خاص آن منتقل گردد (Loghman, 1984). بدین منظور ریزازدیادی، روشی مناسب برای تکثیر سریع و تولید انبوه نهال برای انتقال به عرصه و ایجاد کمربند سبز در اطراف شهرهای کویری می‌باشد. همچنین برای اصلاح و حفظ ذخایر ژنتیکی در شرایط فراسرد دستیابی به این روش امری ضروریست.

مواد و روشها

بذرهای دم‌گاوی از رویشگاه طبیعی آن واقع در تپه‌های ریگ بلند شهرستان آران و بیدگل، کاشان جمع‌آوری گردید. برای شکستن خواب بذر، از تیمار خراش‌دهی استفاده شد (Modarres Hashemi, 1992). سترون‌سازی بذرها با هیپوکلریت سدیم ۱/۲۵٪ (۷/۷) به مدت ۱۵ دقیقه انجام گردید. سه هفته پس از کاشت بذر در محیط MS (۱/۲ ساکارز)، گیاهچه‌های عاری از هر گونه آلودگی از محل یقه قطع و شاخه‌های منفرد در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ترکیبات مختلفی از هورمون‌های BA (Benzylaminopurine)، Kin (Kinetin)، 2ip

(Isopentenyladenosine) و IBA (Indol-3-butyricacid) و ویتامین (بیوتین، کلسیم پانتوتنات، ریبولاوین و اسید فولیک با غلظت ppm ۰/۵) و اسیدآمینه (آسپاراژین، آرژنین و گلوتامین با غلظت ۵۰ppm) کشت شدند (جدول ۱). آزمون اثر تیمارهای مختلف شاخه‌زایی در قالب طرح کامل تصادفی در ۸ تیمار با نرم افزار SAS انجام و بهترین تیمار محیط کشت شاخه‌زایی بر اساس درصد شاخه‌زایی (تعداد جوانه فعال وشاخه‌های جدید) و طول شاخه تعیین گردید. تولید شاخه در محیط شاخه‌زایی برتر به میزان کافی انجام شد. سپس شاخه‌های ۳-۲/۵ سانتی‌متری در محیط کشت MS پایه و MS تغییر یافته با ۳ غلظت مختلف از هورمون‌های IBA، NAA (α-Naphthalenacetic acid) و 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) برای ریشه‌زایی مستقر شدند (جدول ۲). بهترین تیمار محیط کشت ریشه‌زایی براساس درصد ریشه‌زایی تعیین گردید. در نهایت شاخه‌های ریشه‌دارشده، به منظور طی مراحل سازگاری، درون گلدان‌های حاوی خاک عرصه و پیت (۱:۱) به گلخانه منتقل شدند.

نتایج

یک هفته پس از کاشت شاخه‌ها، جوانه‌های جانبی فعال شدند. تجزیه واریانس میانگین مربعات شاخه‌زایی و رشد طولی پس از سه هفته، بیانگر اختلاف معنی‌دار تیمارهای مختلف محیط کشت در صفت شاخه‌زایی و عدم تفاوت معنی‌دار در صفت رشد طولی بود (جدول ۳). مقایسه میانگین رشد طولی و شاخه‌زایی (شکل ۱) نشان داد که بیشترین و کمترین میزان شاخه‌زایی با ۵/۰۸ و ۱ جوانه فعال به‌ترتیب در محیط کشت T_7 و T_8 حاصل شد (شکل ۲).

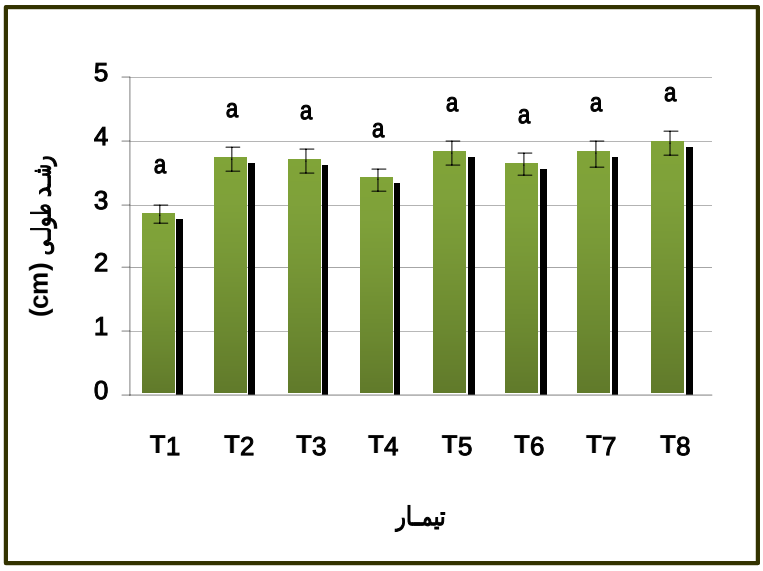
جدول ۱- تیمارهای هورمونی برای شاخه‌زایی دم‌گاوی

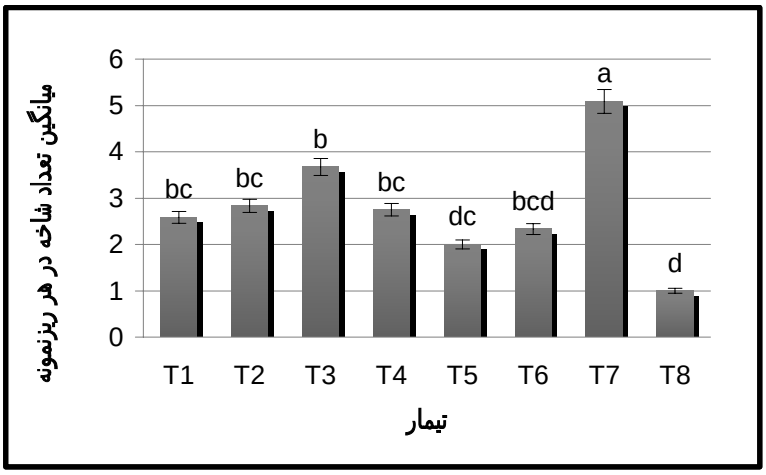
تیمار	محیط پایه	نوع و مقدار هورمون (میلی‌گرم بر لیتر)
T_1	MS	(۰/۰۱) IBA،(۰/۵) BA
T_2	MS	(۰/۰۱) IBA،(۰/۵) Kin
T_3	MS	(۰/۰۱) IBA،(۰/۵) 2ip
T_4	MS	Vit,AAG،(۰/۰۱) IBA،(۰/۵) 2ip
T_5	MS	(۰/۰۱) IBA،(۰/۲) 2ip
T_6	MS	(۰/۰۱) IBA،(1) 2ip
T_7	MS	(۰/۰۱) IBA،(۰/۵) BA،(۰/۵) 2ip
T_8	MS (۱/۲ ساکارز)	(۰/۰۱) IBA،(۰/۵) 2ip

جدول ۲- تیمارهای هورمونی برای ریشه‌زایی دم‌گاوی

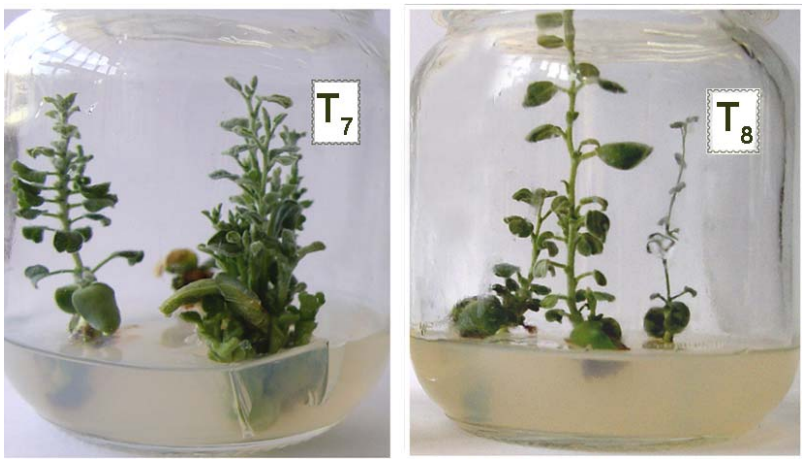
تیمار	محیط پایه *	نوع و مقدار هورمون (میلی‌گرم بر لیتر)
H1	MS	-
H2	MS	(۰/۱) IBA
H3	MS	(۰/۵) IBA
H4	MS	(۱) IBA
H5	MS	(۰/۱) NAA
H6	MS	(۰/۵) NAA
H7	MS	(۱) NAA
H8	MS تغییریافته	-
H9	MS تغییریافته	(۰/۱) NAA
H10	MS تغییریافته	(۰/۵) NAA
H11	MS تغییریافته	(۱) NAA

*در تمامی تیمارها محیط پایه دارای نصف میزان استاندارد ساکارز (۱۵ میلی‌گرم بر لیتر) بود.



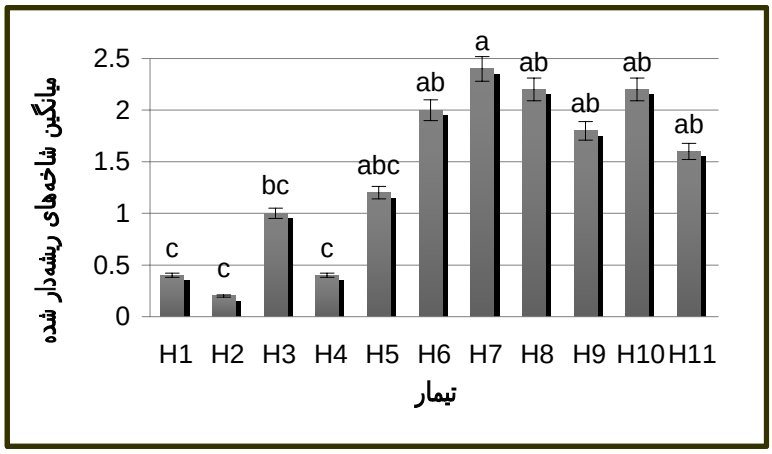


شکل ۱- مقایسه میانگین رشد طولی (بالا) و شاخه‌زایی (پائین) دم‌گاوی تحت تیمارهای مختلف هورمونی (ذکر شده در جدول ۱).



شکل ۲- تیمارهای بهینه شاخه‌زایی (T_7) و رشد طولی (T_8) شاخه‌های دم‌گاوی

تولید ریشه ۱۰ روز پس از انتقال شاخه‌ها به محیط ریشه‌زایی آغاز شد. تجزیه واریانس میانگین مربعات ریشه‌زایی بیانگر اختلاف معنی‌دار تیمارهای ریشه‌زایی بود (جدول ۳). بررسی میانگین ریشه‌زایی شاخه‌ها (شکل ۳) پس از یک ماه نشان داد که بیشترین میزان تولید ریشه مربوط به تیمار H_7 و ریشه‌های کاملاً طبیعی متعلق به تیمارهای بدون هورمون یا حاوی هورمون IBA بودند. علی‌رغم اینکه بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط‌های حاوی هورمون NAA انجام شد، اما در مقادیر بالای این هورمون، ریشه‌ها قطور، ترد و شکننده بودند و در مقادیر کمتر، با تولید کالوس همراه بودند. بنابراین محیط کشت MS تغییریافته بدون هورمون با ایجاد ۷۳/۳٪ ریشه طبیعی و بدون اختلاف معنی‌دار با محیط‌های حاوی NAA، از نظر میزان تولید ریشه، بهترین محیط کشت ریشه‌زایی بود (شکل ٤). گیاهچه‌های ریشه‌دار شده پس از انتقال به گلدان‌های حاوی خاک عرصه به گلخانه منتقل و مراحل سازگاری طی ده روز انجام شد.



شکل ۳- مقایسه میانگین ریشه‌زایی دم‌گاوی تحت تیمارهای مختلف هورمونی

شکل ٤- ریشه‌زایی شاخه‌های دم‌گاوی تحت تأثیر محیط MS تغییریافته بدون هورمون

جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی مختلف بر رشد طولی شاخه، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی دم‌گاوی

صفات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F value
اثر هورمون بر رشد طولی	۷	۰/٤۸	۰/٦۷^{ns}
اثر هورمون بر شاخه‌زایی	۷	۵/۸	٦/٤**
اثر هورمون بر ریشه‌زایی	۱۳	٤/۳	۷/۹۷**

**: میانگین‌ها در سطح P ≤۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار دارند. ns: میانگین‌ها در سطح P ≤۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار ندارند.

بحث

پژوهش در مورد گونه دم گاوی در ایران و جهان منحصر به تحقیقات اندکی در زمینه ویژگی‌های اکولوژیکی و کاربردی این گیاه می‌باشد. بنابراین، این اولین مطالعه در مورد ریزازدیادی دم‌گاوی است.

بذرهای دم‌گاوی به‌دلیل وجود پوسته ضخیم و غیرقابل نفوذ، قادر به جذب سریع رطوبت و جوانه‌زنی نبوده و حتی ۳۰-۲۰ روز خیس‌کردن بذرها در آب نیز موجب جوانه‌زنی آنها نمی‌شود و برای سبزشدن، نیازمند خراش‌دهی پوسته خارجی است (Azarnivand *et al.*, 2007). محققی به نام Modarres Hashemi (۱۹۹۲) از این طریق توانست درصد جوانه‌زنی این گونه را به ۸۷/۹۷ درصد افزایش دهد. افزایش میزان جوانه‌زنی بذرها (۱۰۰٪) در این پژوهش احتمالاً مربوط به اثر هیپوکلریت سدیم و تفاوت در مدت زمان نگهداری بذرها قبل از کاشت است. انواع قندها و سطوح آنها و کاهش نیتروژن محیط می‌توانند ریخت‌زایی را تحت تأثیر قرار دهند (Emam & Jafari-MofidAbadi, 2003). برای جلوگیری از شیشه‌ای‌شدن گیاهچه‌ها، ابتدا محیط MS با نصف میزان نیترات بکار برده شد؛ اما گیاهچه‌های به دست آمده بتدریج زرد شده و علائم کمبود نیتروژن در آنها پدیدار گشت. سپس نیترات محیط کامل و برای کاهش پتانسیل اسمزی، سوکروز آن نصف گردید. کاهش میزان سوکروز رشد طولی گیاهچه‌ها را به شکل کاملاً محسوسی افزایش داد.

اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها نشان داد که در میان سیتوکینین‌ها، 2ip با غلظت (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بیشترین تأثیر را بر تولید شاخه دم‌گاوی دارد. در حالی که Jha و همکاران (۲۰۰٤) و Monteuuis (۲۰۰٤) بیشترین شاخه‌زایی را در حضور BA و به‌ترتیب در گونه‌های *Sesbania rostrata* و *Acacia mangium* به‌دست آوردند. به‌طوری‌که در این پژوهش 2ip در تلفیق با BA بهترین تیمار شاخه‌زایی بود. در این خصوص Kolahdozan (۲۰۰۸) نیز در گونه *Medicago rigidula* بیشترین شاخه‌زایی را از تلفیق این دو سیتوکینین به دست آورد. کاربرد BA به تنهایی رشد طولی شاخه‌های دم‌گاوی را کاهش داد. Baraldi (۱۹۸۸) نیز در بررسی اثر BA بر روی گونه *Prunus irsittia* نتیجه مشابهی گزارش کرد. میزان سوکروز در رشد طولی و شاخه‌زایی دم‌گاوی بسیار تأثیرگذار بود. کاهش سوکروز به نصف میزان استاندارد، علی‌رغم ایجاد کمترین

شاخه‌زایی، رشد طولی شاخه‌ها را به‌دلیل کاهش پتانسیل اسمزی، به میزان زیادی افزایش داد. نتایج حاکی از آن است که میزان سرسبزی گیاه وابسته به کامل‌بودن نیترات در محیط کشت بوده و افزودن ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه در محیط (T_4)، بر سرسبزی آن تأثیرگذار نبود.

در میان اکسین‌ها، NAA بیشترین تأثیر را بر القاء ریشه دم‌گاوی داشت. این در حالی است که اکثر گیاهان خانواده بقولات، بیشترین ریشه‌زایی را نسبت به IBA نشان می‌دهند. از جمله گونه *Mucuna pruriens* حداکثر ریشه‌زایی را در محیط کشت MS ۱/۲ همراه با ۰/٤ میلی‌گرم بر لیتر IBA نشان داد (Faisal *et al.*, 2006). علی‌رغم ایجاد ریشه‌های طبیعی در محیط کشت MS (۱/۲ سوکروز) بدون هورمون و محیط حاوی هورمون IBA، میزان ریشه‌زایی آنها بسیار اندک بود و هورمون IBA تأثیر قابل توجهی بر ریشه‌زایی شاخه‌های دم‌گاوی نداشت. با توجه به عدم دسترسی به نتیجه مطلوب برای ریشه‌زایی با استفاده از هورمون‌های مختلف اکسین، تغییر در مواد معدنی محیط کشت انجام گردید. بدین ترتیب سولفات‌ها و نیترات‌ها به ۱/۲ و هالیدها، آهن و کلسیم کلراید به ۱/۲ میزان استاندارد کاهش‌یافتند. در گیاه *Stevia rebaudiana* نیز کاهش نیترات آمونیوم، نیترات پتاسیم، کلسیم کلراید و سولفات منیزیم به نصف میزان استاندارد، میانگین ریشه‌زایی را افزایش داد (Ibrahim *et al.*, 2008). کاهش غلظت مواد معدنی باعث کاهش پتانسیل اسمزی محیط می‌شود. به نحوی که در این شرایط، جذب املاح و مواد معدنی توسط گیاه، مستلزم ایجاد ریشه و تارهای کشنده است.

بنابراین روش‌های مورد استفاده در این پژوهش مبین امکان ریزازدیادی در این گونه گیاهی با ارزش موجود در ماسه‌زارهای ایران می‌باشد. بنابراین موفقیت ریزازدیادی انجام سایر پژوهش‌ها را ممکن ساخته است.

سپاسگزاری

این پژوهش در گروه مستقل تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام گردید. از این رو، از مسؤلان مؤسسه و همکاران گروه مذکور که در این پژوهش ما را همراهی نمودند سپاسگزاریم.

منابع مورد استفاده

– Azarnivand, H., Jonidi Jafari, H. and Jafari, M., 2007. Investigation on habitat characteristics in *Smirnovia iranica* and determination of distribution patterns in sand–dunes case study: Band-e-rig Kashan, Pajohesh va Sazandegi in Natural Resources, 77:62-68.
– Baraldi, R., 1988. *In vitro* shoot development of prunus GF-665-2: Interaction between light and benzyladenine. Physiol. Plant, 74:440-443.
– Emam, M. and Jafari-MofidAbadi, A., 2003. Microprpagation of *Populus caspica*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 9:3-121.
– Faisal, M., Siddique, I. and Anis, M., 2006. An efficient plant regeneration system for *Mucuna pruriens* L. (DC.) using cotyledonary node explants. *In vitro* Cellular & Developmental Biology – plant, 42:59-64.
– Ibrahim I.A., Nasr M.I., Mohammedm B.R. and El-Zefzafi M.M., 2008. Nutrient factors affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. Sugar Tect., 10(3): 248-253.
– Jha A.K., Prakast S., Jain N., Nanda K. and Gupta S.C., 2004. Micropropagation of *Sesbania rostrata* from The cotyledonary node. Biologia Plantarum, 48(4):289-292.
– Kolahdozan, M., 2008. Study of cryopereservation posibility on *Medicago rigidula* buds and seeds. M.Sc. theses, The , Al-Zahra University, Thehran, Iran.

– Loghman, H., 1983. Sandy salt desert and its scientific rehabitation methods. The Publications of the Forests and Ranglands Organization of Iran.
– Majid, M., 1996. Some ecological characters study of *Smirnovia turkestana*. Natural Resources and Animal Huasbandary Research Center of Esfahan Provience, Isfahan, Iran.
– Modarres Hashemi, S.M., 1992. Seed germination of *Smirnovia iranica*. Natural Resources and Animal Huasbandary Research Center of Esfahan Provience.
– Monteuuis, O., 2004. *In vitro* micropropagation and rooting of *Acacia mangium* microstoots from juvenile and mature origins. *In vitro* cellular and developmental biology-plant, 40(1):102-107.
– Murashige T., and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture, Ptysiol. Plant, 15: 473-497.
– Rechinger, K.H., 1984. Flora Iranica-Papiloinaceae No. II., 157:167
– Sabeti, H., 1994. The Iranian's Forests, Trees and Shrubs. The Publications of the University of Yazd, Yazd, Iran.

Micropropagation of *Smirnovia turkestana*

S. Naser[1], A. Ghamari Zare[2*], S. Shahrzad[3] and G. Bakhshi-Khaniki[3]

1- M.Sc.,Biotechnalogy, Payame-Noor University, Karaj, I.R. Iran.
2*- Corresponding author, Assis. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran.
E-mail: ghamari-zare@rifr-ac.ir
3- B.Sc., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran.
4– Prof., Payame-Noor University, Tehran, I.R. Iran

Received: 05.09.2009 Accepted: 05.02.2010

Abstract

Smirnovia turkestana is an endemic plant species of sandy deserts of Iran. This shrub and psamophyte plant belongs to the Papilionaceae family. It is an important species for protecting sandy soil, forage production and medicinal value. The aim of micropropagation of *S. turkestana* is for using it for desertification, overcome on its propagation, cryopreservation and … . Seeds were collected from sandy dunes of Kashan, Isfahan province. Seeds were scarified and sterilized by NaOCl (1.25% v/v) for 15 min; washed in distilled water and cultured on MS (half sucrose) medium. Shoots were isolated after 3 weeks and cultured on 8 medium treatments. The best treatment for shooting was MS basal medium supplemented with BA (0.5 mg/l), 2ip (0.5 mg/l) and IBA (0.01 mg/l). The best treatment for rooting achieved in modified MS medium without hormone. Rooted plantlets were transferred to pots containing field soil and grew well under greenhouse conditions.

Key words: Micropropagation, Desert elimination, *Smirnovia turkestana*, Shooting and Rooting.