تکثیر درخت سفید پلت از طریق کشت تخمدان بالغ (*Populus caspica*)

علی جعفری مفیدآبادی[1]

چکیده

به‌منظور تکثیر انبوه گونه در حال انقراض سفید پلت *Populus caspica*، روش کشت درون شیشه‌ایی تخمدان بالغ مورد استفاده قرار گرفت. جهت جوانه زنی جنین، تخمدانها پس از ١٤ روز از کپسولهای توسعه یافته حاصل از گرده‌افشانی طبیعی و گرده‌افشانی مصنوعی در قالب روش ترکه و آب ایزوله و به محیط‌های کشت MS، half-MS و SS فاقد هورمونهای رشد گیاهی منتقل شدند. مقایسه میانگین اثرات محیط کشت در جوانه زنی جنین نشان داد که اختلاف معنی‌داری میان محیط‌های کشت و نوع گرده‌افشانی برای جوانه زنی جنین در سطح یک درصد وجود دارد. بیشترین جوانه زنی جنین در کشت تخمدان ١٤ روزه سفید پلت در محیط کشت half-MS (محیط کشت نیمه قدرت) اتفاق افتاد (٢٧/٧٤ عدد از هر کپسول). تعداد متوسط نهالهای بدست آمده‌از کشت تخمدانهای با گرده‌افشانی طبیعی کمتر از تخمدانهای حاصل از گرده‌افشانی مصنوعی بود (به‌ترتیب ١٩/٤٦ و ٢٤/٧٧ گیاهچه در هر تخمدان کشت شده) و اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد میان آنها مشاهده شد. گیاهچه‌ها در ارتفاع ٣ الی ٥ سانتیمتری قبل از انتقال به گلدان، در داخل شیشه‌های مربا که حاوی محیط کشت مشابه بازکشت شدند. تعداد زیادی گیاهچه پس از انجام موفق سازگاری تدریجی ابتدا به گلدان و بعد به عرصه منتقل شدند.

واژه‌های کلیدی: کشت تخمدان، تکثیر جنسی، جنین و تکثیر انبوه.

١- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، صندوق پستی ١١٦- ١٣١٨٥
E.mail: Mofidabad@yahoo.com

مقدمه

درخت سفید پلت (*Populus caspica*) از گونه‌های بومی در حال انقراض جنگلهای شمال است که از ارسباران و طالش و آستارا تا گرگان و اطراف بجنورد انتشار دارد. گاهی در بعضی از دره‌ها همراه درخت توسکا و در جنگلهای جلگه‌ای چمستان نور و در حوالی نوشهر، آستانه‌اشرفیه گیلان در کنار سفیدرود نیز دیده می‌شود (جلیلوند، ۱۳٦۷؛ Jalili و Jamzad، ۱۹۹۹). سفید پلت (*Populus caspica*) بهمراه درخت سپیدار ((سفیدار)) (*Populus alba* L.) زیر بخش (Albide) بوده (Zobel، ۱۹۸٤؛ Jalili و Jamzad، ۱۹۹۹و Stettler، ۱۹۸۰) که بعضی آن دو را با هم استفاده می‌کنند. اگر چه شباهتهایی میان آنها وجود دارد، لیکن در شکل ظاهری ساقه و به‌ویژه ساقه درختان کهنسال و انشعابهای ساقه‌ها و مورفولوژی گلها میان دو درخت سپیدار و سفید پلت اختلاف زیادی وجود دارد (ثابتی، ۱۳٥٤). این گونه، از صنوبرهای بومی ناحیه هیرکانیان می‌باشد. تنها گونه از خانواده صنوبرها است که توان گسترش در نواحی جنگلی را دارد. این گونه تا کنون به‌دلیل شکل سینوسی ساقه در محل یقه کمتر مورد استفاده صنعتی قرار گرفته است و بیشترین فشار بهره برداری روی آن به‌خاطر تهیه و مصرف ذغال بوده است (ثابتی، ۱۳۵۵). انشعابهای باز، تاج پهن، تنه موج دار، قائم نبودن کامل تنه، نمو قطری قاعده درختان از میانسال به بعد غیر منظم و سینوسی تنه از جمله صفاتی است که می‌بایست برای افزایش استفاده صنعتی از این گونه اصلاح گردند. ضرورت اصلاح صفات کمی و کیفی این نوع به‌ویژه برطرف کردن شکل سینوسی ساقه در محل یقه، شاخه دوانی زیاد برای مصارف صنعتی احساس می‌شوند. لازمه شروع فعالیتهای اصلاحی روی آنها، دستیابی مطمئن به روش تکثیر جنسی، تنوع ژنتیکی و افزایش بازده گزینش است. یکی از دلایل کمی و یا عدم جوانه زنی بذر در شرایط طبیعی، تکامل ضعیف (نیم رس) و یا عدم تکامل بافت اندوسپرم (نارس) در ساختار بذر می‌باشد (Driver و Kuniyuki، ۱۹۷۸) که موجب کاهش درصد جوانه‌زنی

جنین بالغ و استقرار نهال در خاک به‌ویژه در عرصه‌های طبیعی، می‌گردد. Gaget *et al.*، ۱۹۸٤؛ Guries و Stettler، ۱۹۷٦؛ Heslop Harrrison، ۱۹۷۵؛ Jafari *et al.*، ۱۹۹۸ و Jafari و Modir-rahmati، ۲۰۰۰). بدین منظور، جهت کمک به جوانه زنی بذرها، تغذیه مصنوعی جنین در قالب کشت تخمدان جهت افزایش بازده جوانه زنی و تولید انبوه نهال بکار گرفته شد (Knox *et al.*، ۱۹۷۲؛ Kouider *et al.* ، ۱۹۸٤؛ Li و Li ، ۱۹۸۵؛ Noh *et al.*، ۱۹۸٦ و Raquin و Troussard، ۱۹۹۳).

مواد و روشها

کپسولهای بالغ حاصل از هر دو نوع گرده‌افشانی طبیعی و مصنوعی مورد استفاده قرار گرفت. برای گرده‌افشانی مصنوعی شاخه‌های گلدار گل ماده و گل نر سفید پلت به‌طور جداگانه از والد ماده و نر استان گلستان (دره زرین گل) جمع‌آوری شد. جهت تهیه دانه گرده، شاخه‌های نر سفید پلت به گلخانه انتقال و وادار به ریزش دانه گرده شدند. گرده‌افشانی مصنوعی، به شیوه ترکه و آب روی شاخه‌های گلدار گل ماده به‌صورت گرد و غبار شدید در داخل اطاقکهای ایزوله صورت گرفت و بعد در همانجا نگهداری شدند. شاتونهای گرده‌افشانی شده از شاخه‌های گلدار در بعد از ١٤ روزه جمع‌آوری شدند. کپسولهای بسته چسبیده به محور شاتون با استفاده از اتانول ۷۰٪ به‌مدت یک دقیقه و محلول هیپو کلریت سدیم به‌مدت ۱۰ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل هر بار ۵ دقیقه مورد ضدعفونی سطحی قرار گرفت. جهت تغذیه جنین‌های بارور شده، تخمدانهای ضدعفونی شده به ظرف آزمایشگاهی (ویالهای کوچک) حاوی محیط‌های کشت MS و half-MS و SS (sucrose solution) (به عنوان منبع هیدروکربور) جامد منتقل شدند. در بازکشتهای متوالی جهت ایجاد فضای بیشتر در ظرفهای ۲۰۰ میلی‌لیتری (شیشه‌های مربا) انجام شد. محیط‌های تغذیه‌ای

مختلف مذکور فاقد هورمونهای رشد گیاهی برای جوانه زنی جنین و تولید گیاه مورد آزمون قرار گرفت. pH محیط‌های کشت روی ۵/۷ قبل از انجام اتوکلاو تنظیم شد. محیط‌های کشت مورد استفاده پس از ریختن در ویالهای شیشه‌ای ۲۰ میلی‌لیتری به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد اتوکلاو شدند. کشتها در اطاق رشد با شرایط نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و با شدت نور ۵۰۰۰-٤٥۰۰ لوکس و با دمای ۱ ± ۲۵ نگهداری شدند. گیاهچه‌های حاصل جهت انجام فرایند سازگاری تدریجی به گلدانهای محتوی خاک سترون با ترکیب ۱:۱:۱ پیت، شلتوک و خاک زراعی منتقل گردیدند.

نتایج و بحث

جوانه زنی جنین بعد از دو هفته از انتقال کپسولهای ایزوله شده در هر دو نوع گرده‌افشانی (طبیعی و مصنوعی) به محیط‌های کشت جامد مشاهده شد (شکل شماره ۱). بیشترین جوانه زنی جنین در کشت تخمدان ١٤ روزه سفید پلت در محیط کشت half-MS (محیط کشت نیمه قدرت) اتفاق افتاد (٢٧/٧٤ عدد در هر کپسول). مقایسه میانگین اثرات محیط کشت بر جوانه زنی جنین نشان داد که اختلاف معنی‌داری میان محیط‌های کشت و نوع گرده‌افشانی برای جوانه زنی جنین در سطح یک درصد وجود دارد (جدول شماره ۱). استفاده‌از محیط تغذیه‌ای (SS)، به‌رغم داشتن توان جوانه زنی تعداد کمی از جنین‌ها، لیکن به‌دلیل فقدان عناصر غذایی پر نیاز، کم نیاز و مکملهای مورد نیاز رشد گیاه در این نوع محیط غذایی پس از مدتی گیاهچه‌های حاصله فاسد و از میان رفتند. استفاده از هورمونهای رشد گیاهی در محیط‌های کشت جنین در قالب کشت تخمدان و تخمک در مطالعات Knox و همکاران (۱۹۷۲)، Kouider و همکاران (١٩٨٤)، Li و همکاران (۱۹۸۳) و Li و Li (۱۹۸۵) با مقداری کالزایی همراه بود که

به‌نظر می‌رسد رشد نرمال جنین زایگوت را تحت تأثیر قرار داده است. بر خلاف گزارش Eaton و Bukovac (۱۹۸۹) هیچ گونه رشد غیرنرمال تخمدان و گیاهان باززایی شده در محیط‌های کشت مشاهده نشد.

روش گرده‌افشانی مصنوعی به‌خاطر گرده‌افشانی کامل روی تعداد بیشتری از گلها در محور خوشه، موجب تولید بیشترین تعداد نهال از هر یک از تخمدانهای کشت شده گردید (متوسط ۲٤/۷۷ عدد گیاه از هر تخمدان) و اختلاف معنی‌داری را در سطح یک درصد بر اساس آزمون مقایسه میانگین به روش کی- اسکوئر در مقایسه با گرده‌افشانی طبیعی نشان داد (جدول شماره ۱).

تکامل جنین در تولید گیاهچه از تخمدانهای کشت صنوبر اهمیت زیادی دارد. کشت تخمدانها با جنین نارس (کمتر از ۱۰ روز) اغلب موجب فاسد شدن و از میان رفتن جدا کشتها بود. انتخاب سن ۱٤ روزه برای جداسازی و کشت تخمدانها بر اساس مطالعات Jafari و همکاران (۱۹۹۹ و ۲۰۰۰) انجام شد. سن جنین (تعداد روزهای پس از گرده‌افشانی) به‌دلیل اینکه مدت زمان مورد نیاز برای بلوغ جنین از مرحله کروی تا کوتیلدونی را شامل می‌شود، تأثیر بسزایی در بالغ و یا نارس بودن جنین در زمان ایزوله کردن تخمدانها و جوانه زنی آنها دارد. در این خصوص، جعفری و همکاران (۱۹۹۹ و ۲۰۰۰) اختلاف معنی‌دار زمان ایزوله و کشت تخمدان و تخمک را در جوانه زنی جنین برای کپسولهای حاصل از تلاقی میان گونه‌ای و درون گونه‌ای صنوبر را نیز گزارش نموده‌اند.

سن بیشتر از ۱٤ روزه برای جوانه زنی جنین در صنوبر سفید پلت و کبوده موجب شکل‌گیری بافتهای رشته‌ای شکل سفید رنگ اطراف تخمک می‌شود که مانع تماس تخمکها با سطح محیط کشت است و عامل اصلی در کاهش جوانه زنی جنین محسوب می‌شود. گیاهان حاصل پس از سازگاری تدریجی، ابتدا به گلخانه و بعد به عرصه منتقل

شدند. تنوع مورفولوژیکی زیادی میان گیاهان باززایی شده مشاهده شد که می‌تواند زمینه گزینش کلنهای برتر را فراهم آورد.

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین اثرات محیط کشت و نوع گرده‌افشانی بر روی تعداد نهالهای حاصل از کشت تخمدان در تکثیر صنوبر پده.

متغیرها محیط‌های کشت	میانگین تعداد نهالها از کشت یک تخمدان انفرادی و بیان اختلافات معنی دار
MS	۲٦/۹٥**
Half-MS	۲۷/۷٤
SS	۱۱/٦٦
نوع گرده‌افشانی روی گلهای والد مادری	میانگین تعداد نهالها از کشت یک تخمدان انفرادی و بیان اختلافات معنی‌دار
گرده‌افشانی مصنوعی	۲٤/ ۷۷**
گرده‌افشانی طبیعی	۱۹/٤٦

شکل شماره۱: تکثیر انبوه از طریق جوانه زنی جنین *Populus caspica* دو هفته پس از کشت در محیط MS

منابع

۱. ثابتی، ح.، ۱۳۵٤. صنوبر در ایران. شارات سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی.

۲. ثابتی، ح.، ۱۳۵۵. درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی.

۳. جلیلوند، ح.، ۱۳٦۷. بررسی انتشار جغرافیایی و شرایط اکولوژیکی گونه سفید ت در جنگلهای شمال، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس دانشگاه مازندران.

4. Driver, J.A. and Kuniyuki, H., 1978. In vitro propagation of paradox walnut root stocks (Jugland hindsii x J.regia). Hortscience 19:507-509.
5. Eaton, G.W. and Jamont, A.M., 1992. Embryo sac development in the apricot .*Prunus armeniaca* L. cv. *Constan*. Journal of Horticultural Science 86: 95-101.
6. Furokawa, Y. and Bukovac, M.J.1989. Embryo sac development in sour cherry during the pollination period as related to fruit set..Hort Science 24: 1005-1013.
7. Gaget, M., Said, C., Dumas, C. and Knox, R.B., 1984. Pollen Pistil interaction in interspecific crosses of *Populus* (section Aigerios and Leuce), pollen adhesion hydration and cellose responses. J. Cell Sci. 72:184-192.
8. Guries, R.P. and Stettler, R.F., 1976. Pre-Fertilization Barriers to hybridization in the poplars. Silvae Genetic 25:37-44.
9. Heslop Harrrison, J.: Incompatibility and the Pollen-Stigma interaction. A. Rev. PL. Physiol 1975
10. Jafari, M.A., Modir-rahmati, A., Tavesoli, A., 1998. Application of ovary and ovule culture in *P. alba* L x *Populus euphratica* OLIV hybridization. Silvae Genet. 47:5-6.
11. Jafari, M. A., and Modir-rahmati, A., 2000. Production of *Populus euphratica* OLIV. x *P. alba* L. hybrid poplars through ovary and ovule cultures. Plant Genetic Newsletter. 122:13-15.
12. Jalili, A. and Jamzad, Z., 1999. Red data book of Iran. Pp. 748.

13. Knox ،R. B., Willing, R. R. and Pryor, L. D., 1972. Interspecific Hybridization of poplars using recognition pollen. Silva Genet. 21:125-128.
14. Kouider, M., Skirvin, R. and Saladin, K. P., 1984. A method to culture immature embryo of *Populus deltoides* in vitro. Can. J. For . Res 14:956-958.
15. Li, W. and Li, J., 1985. *In vitro* culture of Hybrid ovules in *populus*. Sci. Silv. Sin. 21:339-346.
16. Li, W., Wang, R. and Zhu, X., 1983. On the embryo development and ovule culture of interspecific hybrids between *Populus simonii* and *P.pyrasrmidalis* Borkh. Acta Bot. Sin. 25: 409-417.
17. Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-479.
18. Noh, E.R., Kao, Y. B. and Lee, S. K., 1986. Hybridization between incompatible poplar Species through ovary and embryo culture. Res. Rep. Inst. For. Genet. 22:9-14.
19. Raquin, C. and Troussard, L., 1993. In-ovary embryo culture as tool for poplar hybridization. Can. J. Bot . .71: 1271-1275.
20. Savka, M. A., Dawson, J. O., Jokela, J. J. and Skirvin, R. M., 1987. A liquid culture method for rescuing immature embryos of eastern cottonwood. Plant Cell Tissue Organ Cult. 10: 221-226 1987.
21. Schreiner, E., 1965. Maximum Genetic improvement of fores trees through synthetic multiclonal hybrid varieties, Proc. 13 th Northeast Forest tree Impr. Conf., Albany N. Y., pp.7-13.
22. Stettler, R.F., 1980. Interspecific crossability studies in poplars. Theor. Appl. Genet. 58:273-282.
23. Wright, J.W., 1976. Introduction to forest genetic. Academic Press New York, pp: 463.
24. Zobel, B.J., 1984. Applied forest tree improvement. John Wiely and Sons New York pp: 505.