مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد پانزدهم، شماره چهارم، ۱۳۸۷
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

کشت بافت ملج: اثر محیط کشت، نوع ریزنمونه و زمان برداشت آنها

هادی ذبیحی[۱]، سیدمحمد حسینی نصر[۲]، نادعلی بابائیان جلودار[۳] و حمید جلیلوند[۴]

[۱]کارشناسی‌ارشد گروه جنگلداری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، [۲]استادیار گروه جنگلداری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، [۳]استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، [۴]دانشیار گروه جنگلداری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۸۶/۷/۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۶/۲

چکیده

گونه ملج (*Ulmus glabra* Hudson) در چند دهه اخیر بر اثر شیوع بیماری مرگ نارون دچار آسیب شدیدی شده است. در این تحقیق از گره، برگ و جوانه ملج به‌منظور تهیه ریزنمونه جهت کشت بافت استفاده شد. درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها با استفاده از ضدعفونی کننده‌هایی مانند هیپوکلریت سدیم و کلرور جیوه تعیین گردید. نتایج آزمون‌های سترون‌سازی نشان داد که بافت جوانه مناسب‌ترین اندام برای کشت می‌باشد. اختلاف میزان درصد زنده‌مانی جوانه‌های آخر پاییز تحت تأثیر هیپوکلریت سدیم ۲ درصد و کلرور جیوه ۰/۱ درصد معنی‌دار نبود، اما این آزمون روی جوانه‌های برداشت شده در آخر زمستان اختلاف معنی‌داری نشان داد. شاخه‌زایی جوانه‌ها در محیط کشت DKW حاوی TDZ به همراه IBA و یا BAP به همراه IBA انجام گرفت. کالوس‌زایی گره‌های شاخساره در محیط‌های کشت MS و یا DKW حاوی یکی از سیتوکینین‌های TDZ و BAP به همراه NAA نیز مورد آزمون قرار گرفت. غلظت ۰/٤٤ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در کالوس‌زایی موثرتر بود. واکشت کالوس طی ۵ مرحله در ۵ ماه انجام شد. نتایج نشان داد بهترین محیط کشت جهت باززایی گیاه از کالوس، محیط DKW حاوی ۰/۰۲۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بود.

واژه‌های کلیدی: ملج، سترون، کشت بافت، کالوس، باززایی

مقدمه

نارون از جمله گونه‌های با ارزش جنگلی است و از سال ۱۹۱۹ میلادی تا امروز میلیون‌ها اصله از آن در اثر بیماری مرگ نارون[۱] از بین رفته است. تکنیک کشت بافت گیاهی یکی از ابزارهای مناسب برای ایجاد پایه‌های مقاوم و رهایی از این بیماری است.

سترون‌سازی ریزنمونه‌ها یکی از مراحل مهم کشت درون شیشه‌ای محسوب می‌شود. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که باید با روش‌های مختلفی این مرحله را تحت کنترل قرار داد. باهات و دهار (۲۰۰٤) برای ریز ازدیادی *Myrica esculenta* نتیجه گرفتند که ریزنمونه‌های تهیه شده در زمستان، بیشترین زنده‌مانی و استقرار را در محیط کشت نشان می‌دهند. دهار و آپرتی

1- Dutch Elm Disease

*- مسئول مکاتبه: zabihi6@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

(۱۹۹۹) درصد بالای آلودگی قارچی و باکتریایی ریزنمونه‌های تهیه شده در فصول بهار و تابستان را گزارش کردند. کورچئت و همکاران (۱۹۹۳) به‌منظور کنترل آلودگی ریزنمونه‌های *Ulmus pumila* از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۰/۹ درصد به مدت ۱۵ دقیقه استفاده کردند و برای جلوگیری از آلودگی *U. procera* شستشو با قارچ‌کش بنومیل ۱ درصد را به‌کار گرفته و همچنین به‌مدت ۱۰ دقیقه از هیپوکلریت سدیم ۱ درصد استفاده نمودند. چئنگ و شی (۱۹۹۵) اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۲ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه برای سترون‌سازی نوک شاخه گیاه بالغ گونه *U. pumila* استفاده کردند. بولیارد و همکاران (۱۹۹۱) غلظت از میکرومول TDZ[1] را به‌عنوان بهترین تیمار برای شاخه‌زایی معرفی کردند و به منظور باززایی شاخه از ریزنمونه‌های برگ نارون چینی و آمریکایی از پایه نارونی که در گلخانه پرورش داده شده بود استفاده کردند، که عمل باززایی با محلول پایه MS[2] به‌علاوه از میکرومول TDZ با چند تکرار صورت گرفت و از هر ریزنمونه حدوداً به تعداد ۵ شاخه تولید شد. دارکوویک (۲۰۰۳) از محلول پایه WPM[3] و هورمون BAP[4] با غلظت‌های ۰-۱ میلی‌گرم در لیتر به همراه NAA[5] در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر برای تکثیر درخت بالغ و جوان افرا *Acer caudatifolium* استفاده کرد. تحریک اندام‌های گیاهی در کشت درون شیشه‌ای با کمک هورمون‌ها جهت تولید توده سلولی تمایز نیافته (کالوس)، واکشت‌های متوالی کالوس‌ها و باززایی کالوس‌ها موجب جهش ژنی خواهد شد. کوردیرو و همکاران (۲۰۰۲) برای جنین‌زایی غیرجنسی گونه‌های *U. glabra* و *U. minor* از غلظت پائین 2,4-D[6] استفاده کردند و پس از ٤ هفته به منظور تسریع در رشد کالوس، به محیط MS به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA[7] انتقال داده شدند. هوئتمن و همکاران (۱۹۹۳) هورمون TDZ را بعنوان هورمون اختصاصی گیاهان چوبی، عامل موثر در باززایی دانستند.

با توجه به اینکه بیماری مرگ نارون سبب کاهش شدید درختان گونه ملج در جنگل‌های دنیا و از جمله جنگل‌های شمال ایران گردید، در این تحقیق سعی بر این است روش بهینه کنترل آلودگی ریزنمونه‌ها تعیین شده و مناسب‌ترین ریزنمونه و محیط کشت برای تکثیر (شاخه‌زایی، کالوس‌زایی و باززایی) مشخص شود.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از اندام‌هایی مانند برگ، گره و جوانه درخت ملج به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. ریزنمونه‌های برگ و گره در تابستان، تعدادی جوانه از پایه‌های جنگلی (جنگل‌های شمال – دارابکلای ساری) در آخر پائیز و تعدادی جوانه از پایه‌های غیرجنگلی (باغ گیاه‌شناسی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور) در دو زمان آخر پاییز و زمستان تهیه شدند. سه پایه از درختان جوان ملج در جنگل‌های شمال و سه پایه از منطقه غیرجنگلی برای این تحقیق انتخاب شدند، ریز نمونه‌ها از جهات و ارتفاعات مختلف پایه مادری انتخاب شدند. این نمونه‌ها در کیسه‌ای ریخته شده و به‌طور تصادفی از بین آنها نمونه‌های مورد آزمایش انتخاب گردیدند. جهت سترون‌سازی ریز نمونه‌های ملج، در هر تیمار از یک ضدعفونی کننده با غلظت مشخص استفاده شد.

جهت کنترل آلودگی برگ از کلرور جیوه با غلظت ۰/۱ و ۰/۰۵ درصد به مدت ۱، ۳ و ٦ دقیقه و در

1- Thidiazuron
2- Murashige and Skoog
3- Woody Plant Medium
4. Banzil Amino Purin
5- α-Naphthalene Acetic Acid

6- 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid
7- 6-benzyl Adenine

Archive of SID

www.SID.ir

تیمارهای دیگر از هیپوکلریت سدیم با غلظت ۱ و ۲ درصد به‌مدت ۵ و ۱۰ دقیقه استفاده شد. برای سترون‌سازی گره، کلرور جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۳ و ٦ دقیقه و در تیمارهای دیگر از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه استفاده شد. برای سترون‌سازی جوانه‌های ملج، ابتدا آنها را به قطعات ۳-۲ سانتی‌متری تقسیم کرده و پس از آن به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه زیر جریان آب معمولی قرار داده شدند. بعد از عمل برس‌کشی و فلس‌کنی کامل لایه‌ها، نمونه‌ها در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه نگهداری شدند. سپس ریزنمونه‌ها تحت تأثیر هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه یا کلرور جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۳ و ٦ دقیقه قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها در هر مرحله پس از انجام عملیات ضد عفونی، با آب مقطر سترون شده شستشو داده شدند.

در این آزمایش برای شاخه‌زایی جوانه‌ها از محلول پایه DKW[1] و هورمون BAP با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA[2] استفاده شد و در تیمارهای دیگر TDZ با غلظت‌های ۰/۰۲۲ و ۰/۰۱۱ میلی‌گرم در لیتر و هورمون IBA به مقدار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به آن اضافه شد. در بررسی شاخه‌زایی جوانه‌ها از ۵ تیمار و ٤ تکرار استفاده شد. برای کنترل PH از محلول اسید کلریدریک یک نرمال و محلول سود یک نرمال استفاده شد. جهت القای کالوس، ریزنمونه محلول‌های پایه MS و DKW به همراه هورمون‌های TDZ, BAP, NAA, IBA در ۱۲ تیمار با ٤ تکرار طوری تنظیم شدند که سلول‌های ریزنمونه در محیط کشت، ضمن تمایززدایی (کالوس‌زایی) به سرعت تکثیر یافتند. تمام کالوس‌هایی که برای باززایی مورد استفاده قرار گرفتند، بعد از ۵ مرحله واکشت طی ۵ ماه در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و یک میلی‌گرم در لیتر NAA تهیه شدند. به جز کالوس‌های استفاده شده در تیمار R25 (DKW حاوی ۰/۰۲۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) که یک دوره قبل از باززایی تحت تیمار کالوس‌زایی با محلول پایه DKW و ۰/٤٤ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (تیمار کالوس‌زایی C10) قرار گرفتند. باززایی گیاه از کالوس با ۲۵ تیمار در ٤ تکرار انجام گرفت. مقایسه گروهی میانگین‌ها در مراحل مختلف به روش توکی انجام گرفت و تمام آنالیزهای آماری با نرم‌افزار SAS[3] انجام شد.

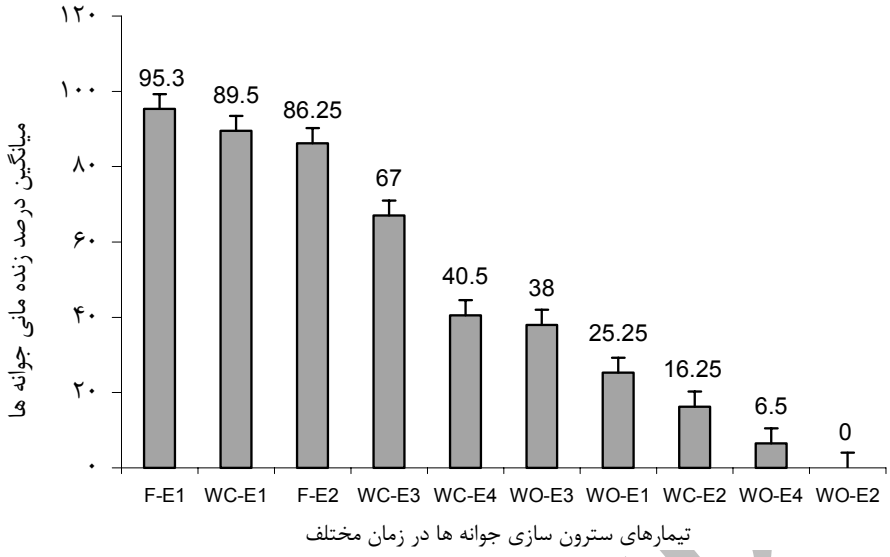
نتایج

برگ ملج به تیمارهای سترون‌سازی با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد، به مدت بیش از ۵ دقیقه و همچنین نسبت به کلرور جیوه ۰/۰۵ درصد به مدت ۳ دقیقه حساسیت نشان داد. در کنترل آلودگی گره اگرچه، به‌کارگیری هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه، سبب از بین رفتن ریزنمونه‌ها شد؛ ولی با مصرف همان ماده به میزان ۱ درصد و با مدت زمان مشابه آلودگی قارچی از بین نرفت. کلرور جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۳ دقیقه نیز نتوانست آلودگی قارچی را کنترل نماید. جوانه‌های تهیه شده از درختان ملج جنگل‌های شمال که تحت تیمار هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند قهوه‌ای شده و از بین رفتند. مواد ضدعفونی کنندهٔ بکار رفته در این آزمایش در دیگر سطوح و مدت زمان نیز نتوانست آلودگی‌ها را کنترل نماید. اما در این آزمایش آلودگی جوانه‌های تهیه شده از پایه‌های خارج جنگلی در اواخر پاییز و زمستان طی تیمارهای سترون‌سازی تا حدی کنترل شد (شکل ۱).

1- Driver and Kuniyuki
2- Indole-3-Butyric Acid
3- Statistical Analysis System

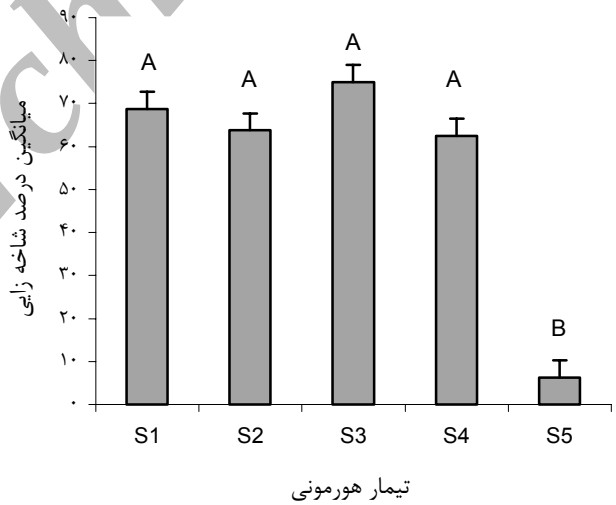
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- میانگین درصد زنده‌مانی جوانه‌ها (پایه مادری خارج از جنگل) در تیمارهای سترون‌سازی با مدت زمان‌های متفاوت.
E1 ، کلرور جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۳ دقیقه؛ **E2**، هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت ۳ دقیقه؛
E3، کلرور جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ٦ دقیقه؛ **E4**، هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه؛
F، پاییز؛ **WO**، جوانه زمستانهٔ باز؛ **WC**، جوانه زمستانه بسته.

نتایج نشان داد جوانه‌های پاییزه (F-E1) با تیمار سترون‌سازی کلرور جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه بهترین سازگاری را داشتند، که ۹۵ درصد زنده‌مانی در آنها دیده می‌شود. درصد شاخه‌زایی در حضور TDZ و BAP با مقدار ثابت IBA بالا بود، اما در تیمار شاهد (S5) پاسخ شاخه‌زایی بسیار ضعیف بود. میانگین درصد شاخه‌زایی در تیمارهای مختلف هورمونی در سطح احتمال ۱ درصد با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد شاخه‌زایی در محیط‌های کشت مختلف

S1= DKW + 0.1 mg/l IBA + 2 mg/l BAP **S2= DKW+ 0.1 mg/l IBA + 1 mg/l BAP**
S3= DKW + 0.1 mg/l IBA + 0.022 mg/l TDZ **S4= DKW + 0.1 mg/l IBA + 0.011 mg/l TDZ**
S5= DKW

Archive of SID

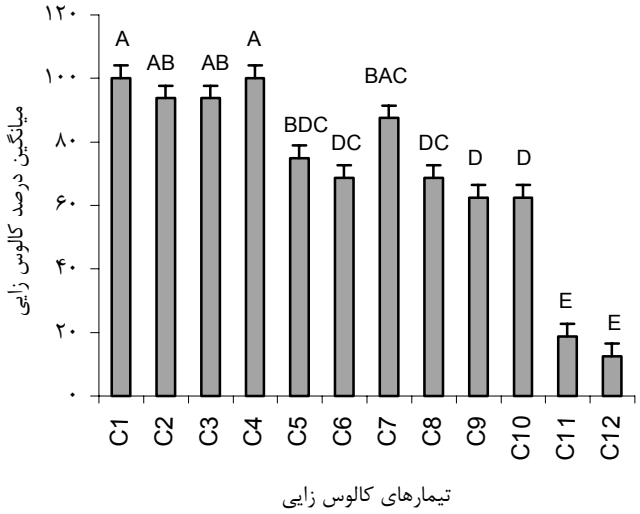
www.SID.ir

در بررسی رشد طولی شاخساره‌ها مشخص شد، میزان رشد در غلظت پایین سیتوکینین‌ها بیشتر از غلظت بالای آن است، اما این اختلاف معنی‌دار نبود.

در آزمون کالوس‌زایی تمامی نسبت‌های هورمونی سیتوکینین و اکسین به‌کار رفته در این مطالعه نسبت به کالوس‌زایی پاسخ مثبت نشان دادند، ولی مشخص شد که درصد کالوس‌زایی در محلول پایه MS نسبت به محلول پایه DKW در مقادیر هورمونی یکسان، بیشتر بود. افزایش کالوس‌زایی با افزایش غلظت سیتوکینین (هورمون TDZ تا ۰/٤٤ میلی‌گرم در لیتر و هورمون BAP تا ۳ میلی‌گرم در لیتر) رابطه مستقیم داشت. ریز نمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت بالای سیتوکینین (C1 و C4) و NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌منظور کالوس‌زایی بیشتر تحریک شدند (شکل ۳).

با وجود اینکه از تیمارهای مختلفی برای بررسی باززایی گیاه از کالوس استفاده شد، اما فقط در تعداد کمی از این تیمارها باززایی صورت گرفت (شکل ٤). درصد فراوانی گیاه باززایی شده نسبت به کل کالوس‌های کشت شده در هر تکرار از تیمارها نشان داد که محلول پایه DKW بهتر از محلول پایه MS است.

تیمار R25 بیشترین درصد باززایی گیاه از کالوس را نشان داد، که اختلاف ۵ درصدی آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود. این آزمون تأثیر محیط کشت کالوس‌زایی را بر میزان باززایی گیاه از کالوس، نشان داد؛ زیرا کالوس‌هایی که در تمام تیمارهای باززایی (R1 الی R24) مورد استفاده قرار گرفتند از محیط کالوس‌زایی C1 (محلول پایه MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌علاوه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA)، و کالوس‌های کشت شده در تیمار R25، از محیط کالوس‌زایی C10 تهیه شدند. استفاده از هورمون TDZ در غلظت بالا (۰/۲۲ و ۰/۱۱ میلی‌گرم در لیتر) نتوانست کالوس را برای باززایی گیاه تحریک کند؛ اما هورمون TDZ در محلول پایه DKW با غلظت ۰/۰۲۲ میلی‌گرم در لیتر تا ۷ درصد باززایی داشت. تیمار هورمونی R18 با ٦ درصد باززایی با R17 اختلاف معنی‌داری داشت، که تاثیر مثبت هورمون NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر را نشان داد. عدم باززایی گیاه از کالوس‌های حاصل از شاخساره ملج در محیط‌های کشت MS و DKW حاوی BAP به مقدار ۰/۵ الی ۲ میلی‌گرم در لیتر، به علاوه NAA با غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نشان دهنده نامناسب بودن این هورمون است (شکل ٤).

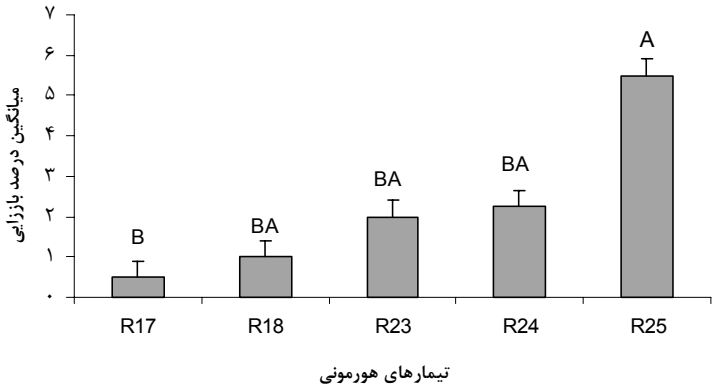


شکل ۳- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی در محیط‌های کشت مختلف.

C1= MS + 3 mg/l BAP + 1 mg/l NAA
C2= MS + 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA
C3= MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA
C4= MS + 0.44 mg/l TDZ + 1 mg/l NAA
C5= MS + 0.22 mg/l TDZ + 1 mg/l NAA
C6= MS + 0.11 mg/l TDZ + 1 mg/l NAA
C7= DKW + 3 mg/l BAP + 1 mg/l NAA
C8= DKW + 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA
C9= DKW + 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA
C10= DKW + 0.44 mg/l TDZ + 1 mg/l NAA
C11= DKW + 0.22 mg/l TDZ + 1 mg/l NAA
C12= DKW + 0.11 mg/l TDZ + 1 mg/l NAA

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ٤- میانگین درصد باززایی شاخساره از کالوس.

R17=MS + 0.022 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA R18=MS + 0.022 mg/l TDZ + 0.05 mg/l NAA

R23=DKW + 0.022 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA R24=DKW + 0.022 mg/l TDZ + 0.05 mg/l NAA

R25= DKW+ TDZ + 0.022 mg/l + 0.05 mg/l NAA**

**** محیط کشت کالوس‌زایی (C10) بود.**

بحث و نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد اگر مدت قرار گرفتن ریزنمونه‌ها در ضدعفونی کننده‌های مورد استفاده افزایش یابد، کنترل آلودگی قارچی میسر می‌گردد. قهوه‌ای شدن و از بین رفتن ریزنمونه‌ها موید آن است، که ضدعفونی کننده‌ها بیش از ظرفیت پایداری بافت ریزنمونه بر آنها تأثیر گذاشته‌اند نسبت به ضدعفونی‌کننده‌ها و پدیدار شدن آلودگی ریزنمونه‌ها چند روز پس از سترون‌سازی، نشان‌دهنده از بین نرفتن آلودگی درونی بافت است. جوانه‌های زمستانه با پوشش فلس که پس از تیمار سترون‌سازی تا ۹۵ درصد زنده‌مانی نشان دادند، مناسب‌ترین اندام برای کشت درون شیشه‌ای ملج تعیین شد. ایزدپناه (۲۰۰٤) روش فلس کنی شدید و استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه و پس از آن هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۳۰ دقیقه را برای سترون‌سازی جوانه‌های ملج به‌کار برد، که ٤۷ درصد زنده‌مانی را داشت. علاوه‌بر زمان انتخاب ریزنمونه، محل و پایه انتخاب شده نیز در میزان آلودگی و روش کنترل آلودگی بسیار موثرند.

در این آزمون میزان شاخه‌زایی در محیط‌های کشت حاوی هورمون‌ها حدود ۷۰ درصد ارزیابی شد، که در مقایسه با تیمار شاهد تأثیر مثبت میزان هورمون تعیین شده را نشان می‌دهد. تحقیقات بیروکوا و همکاران (۲۰۰٤) از کشت درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های ملج نشان داد که رشد شاخساره‌ها در محیطی با ترکیب دو هورمون TDZ و BAP رشد می‌کنند. فنینگ و همکاران (۱۹۹۳) برای تکثیر *Ulmus procera* از ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده کردند، همچنین ایزدپناه (۲۰۰٤) برای تکثیر *U. glabra* از محیط کشت DKW همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم IBA استفاده کرد، اما نتایج تحقیق نشان می‌دهد که شاخه‌زایی تحقیق ما بیش از این دو تحقیق است.

کالوس‌زایی زیاد در غلظت بالای سیتوکنین‌ها با میزان ثابت اکسین نشان‌دهنده پاسخ مثبت تکثیر سلولی به میزان بالای سیتوکنین می‌باشد. اختلاف درصد کالوس‌زایی در غلظت‌های برابر TDZ و BAP موجود در هر یک از محلول‌های پایه MS و DKW به‌ویژه در غلظت پایین TDZ به قدرت یونی متفاوت این دو محلول پایه مربوط می‌شود. نتایج تحقیقات جعفری مفید آبادی و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی اثرات هورمون‌های رشد برروی توان کالوس‌زایی بساک‌های صنوبر پده (*Populus euphratica*) نشان داد که افزایش و کاهش میزان دو هورمون 2,4–D از مقدار ۲ میلی‌گرم در لیتر و کینتین ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، که بیشترین درصد کالوس‌زایی را داشت، اختلاف معنی‌داری حاصل می‌کنند. همچنین پینتو و همکاران (۲۰۰۲) کالوس‌زایی از برگ اکالیپتوس (*Eucalyptus globules*) در محیط کشت MS، به اضافه ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۰۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP میلی‌گرم در لیتر را مثبت

Archive of SID

www.SID.ir

گزارش کردند، نتیجه ایـن تحقیـق نیـز در راسـتای نتـایج تحقیق، می‌باشد که غلظت بالاتر سیتوکنین‌ها، کالوس‌زایی ملج را افزایش می‌دهد.

باززایی گیاه از کالوس ملج با میزان نیترات محیط کشت ارتباط معکوس دارد؛ یعنی باززایی در محلول پایه DKW، بیشتر از محیط حاوی محلول پایه MS است. ایکسی و هونگ (۲۰۰۱) برای باززایی گیاه از کالوس گونه *Acasia sinuata* از محیط کشت $\frac{۱}{۲}$ MS حاوی ۱۳/۳ میکرومول BA و ۲/۵ میکرومول زآتین استفاده کردند. ون هو دای و همکاران (۲۰۰۳) کالوس‌های حاصل از هیبریدهای صنوبر در محیط کشت MS و WPM حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر زآتین و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ را برای باززایی بررسی کرده و نتیجه گرفتند که محلول پایه WPM مناسب‌تر است. نتایج تحقیق آنها نشان دهنده تاثیر نیترات بر درصد باززایی است که آزمایش ما نیز آن را تایید کرد. محیط کشت کالوس‌زایی و قدرت یونی بیشتر محلول پایه DKW و همچنین هورمون TDZ به‌عنوان هورمون اختصاصی گیاهان چوبی از عوامل موثر درصد بالای باززایی در تیمار R25 بودند. بهترین زمان و ریزنمونه برای کشت بافت ملج، فصل زمستان و جوانه‌های پوشیده از فلس می‌باشد، هورمون TDZ با میزان نسبتاً کم در محیط کشت (۰/۰۱۱ الی ۰/۰۲۲ میلی‌گرم در لیتر) در شاخه‌زایی و باززایی بسیار موثر می‌باشد.

سپاسگزاری

از همکـاری صـمیمانه گـروه اصـلاح نباتـات و بیوتکنولـوژی دانـشکده کـشاورزی دانـشگاه مازنـدران، مسئولین محترم موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کـشور و از همکاران محترم مهنـدس نـادعلی بـاقری و مهنـدس نصرالله نژادی که در اجرای این پروژه ما را یاری نمودنـد کمال تشکر را داریم.

منابع

10.Bhatt, I.D., and Dhar, U. 2004 Factors Controlling Micropropagation of *Myrica esculenta* buch.-Ham. exD. Don: A high value wild edible of Kumaun Himalaya. African Journal of Biotechnology Vol. 3 (10), Pp. 534-540.
2.Biroikova, M., Spiakova, K., Liptak, S., Pichler, V., and Urkovi, J. 2004. Micropropagation of mature wych elm. Plant Cell Reports. 22: 640-644.
3.Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Cheng, J.P., and Sticklen, M. 1991. Shoot regeneration from leaf explants of American and Chinese elm. HortScience. 26(12):1554-1555.
4.Cheng, Z.M., and Shi, N.P. 1995. Micropropagation of mature Siberian elm. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 41:197-199.
5.Corchete, M.P., Dles, J.J., and Valle, T. 1993. Micropropagation of Ulmus pumila L. from mature trees. Plant Cell Rep. 12:534-536.
6.Corredoirao, E.M., Vieitezo, A., and Ballester, A. 2002. Somatic Embryo genesis in Elm. Annals of Botany. 89:637-644.
7.Dhar, U., and Upreti, J. 1999. In vitro Regeneration of a mature leguminous liana (*Bauhinia vahlii* Wight & Arnott). Plant Cell Rep. 18: 664-669.
8.Durkovic, J. 2003. Regeneration of Acer cadatifolium Hayata plantlets from juvenile explants. Plant Cell Rep. 21: 1060-1064.
9.Eyzadpanah, M. 2004. Micropropagation of Matter *Ulmus glabra*. Pajouhesh and Sazandegy. 58: 75-66.
10.Fenning, T.M., Gartland, K.A., and Bjrasier, C.M. 1993. Micropropagation and regeneration of English elm Ulmus procera. J. Exp. Bot. 26:1211-1217.
11.Huetteman, C.A., and Preece, J.E. 1993. Thidiiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 33:103-119.
12.Jafari mofidabai, A., Jorabshi, A., and Mahmodi kordi, F. 2002. New Genotype development of Populus euphratica Oliv by Gametoclonal Variation. Pajouhesh and Sazandegy. 52: 87-90
13.Pinto, G., Santos, C., Neves, L., and Araujo, C. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Eucalyptus globulus Labill. Plant Cell Rep. 21:208-213.
14.Xie, D.Y., and Hong, Y. 2001. Regeneration of Acacia mangium through somatic embryogenesis. Plant Cell Rep. 20: 34-40.
15.Wenhao, D., Zong, M., and Wayne, S. 2003. Plant Regeneration and Agrobactrerium Mediation Transition of two elite Aspen hybrid clones from in vitro leaf tissue. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant Journal. 39(1):28-33.

Archive of SID

www.SID.ir

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 15(4), 2008
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Tissue Culture of *Ulmus glabra* Hudson: The Effects of Culture media, Explants and their Harvest Times

***H. Zabihi[1], S.M. Hossini nasr[2], N. Babaeyan Jelodar[3] and H. Jalilvand[4]**
[1]M.Sc., student Dept. of Forestry of Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [2]Assistant Prof., Dept. of Forestry of Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [3]Professor Dept. of Agronomy and Plant Breeding of Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [4]Associate Prof., Dept. of Forestry of Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

Abstract

Elm (*Ulmus glabra* Hudson) species have been severely damaged by Dutch elm disease in recent decades. In this research node, leaf, and buds of *U. glabra* were sampled as explants for tissue culture. Percentage of explant survival was recorded following sterilization with sodium hypochlorite and mercuric chloride. The results showed that the best organs for tissue culture were buds. Survival percentage of the later fall bud explants treated with 2% sodium hypochlorite and 0.1% mercuric chloride was significantly different at 1% level when compared with the end winter buds. Shooting of buds performed in DKW basal medium with TDZ including IBA and DKW medium with BAP including IBA. We tested callus regeneration from shoot nodes in both MS and DKW media containing TDZ and BAP including NAA. Concentration of 0.44 mg l^{-1} TDZ and 3 mg l^{-1} BAP were affective in callus production. For increasing probability of callus regeneration, thay were subcultureed for 5 times during 5 mounths. The results showed that the best medium for regenerating plants from callus was DKW containing 0.022 mg l^{-1} TDZ plus 0.05 mg l^{-1} NAA.

Keywords: Callus; Elm; Regeneration; Sterile; Tissue Culture

*- Corresponding Author; Email: zabihi6@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir