

در منابع طبیعی

دو رگ گیری درون گونه ای در صنوبر پده *Populus euphratica* Oliv با استفاده از روش درون شیشه ای نجات رویان

- محسن کلاگری، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع
 - علی جعفری مفید آبادی، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع
 - مسعود طبری و • سید محسن حسینی، استادیاران دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس
- تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۱۳۸۲

چکیده

به منظور بررسی امکان دستیابی به نتایج برتر بین ژنوتیپ های بومی در گونه پده *Populus euphratica* Oliv در برخی مناطق جغرافیایی کشور این گونه به وسیله گرده افشانی مصنوعی روی شانون های گل ماده جدا شده و روش تغذیه درون شیشه ای رویان های دو رگ انجام گردید. به دلیل دوره تکامل طولانی رویان در گونه پده، کپسول های ۴۵ روزه جدا سازی شدند و سپس جهت جوانه زنی به محیط های کشت جامد (DKW, MS, Half-MS) به صورت جدا کشت تخمک و تخمدان منتقل شدند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده ها روی درصد جوانه زنی در جدا کشت تخمک و تخمدان نشان می دهد که درصد جوانه زنی کشت تخمک و تخمدان به ترتیب ۴۶/۴۷٪ و ۳۴/۰۳٪ بوده است که اختلاف معنی داری را در سطح ۰/۰۵ نشان می دهد. علی رغم وجود اختلاف معنی دار در درصد جوانه زنی رویان بین تخمک و تخمدان، به دلیل وجود تعداد تخمک های فراوان (۳۰-۱۵) بیشترین بازده تولید نهال در کشت تخمدان حاصل شده است. همچنین از میان محیط های کشت بکاررفته، بیشترین میانگین درصد جوانه زنی رویان در محیط کشت MS با ۴۳/۲۲٪ برای هر دو نوع جدا کشت بوده است. مبدا جغرافیایی دانه های گرده بر روی درصد باروری و جوانه زنی رویان اختلاف معنی داری را نشان نداده است. در مجموع از تلاقی های متعدد ۱۳۷ گیاه تولید گردید که پس از انجام سازگاری تدریجی به گلخانه منتقل شده اند.

کلمات کلیدی: پده، دورگ گیری درون گونه ای، نجات رویان، تنوع جغرافیایی، جوانه زنی تخمک و تخمدان

Pajouhesh & Sazandegi No: 61 pp: 6-9

Intraspecific hybridization in *Populus euphratica* Oliv. Using in vitro embryo rescue technique

M. Calagari and A. Jafari (Institute Research Forests and Rongelands)

M. Tabari and S. M. Hosseini, Natural Resources Faculty of Tarbiat Modarres University.

In order to investigate the effect of different geographical origin of pollen grain in intraspecific hybridization and to achieve hybrids vigor, artificial hybridization has been carried out between different local genotype of *Populus euphratica* Oliv. from some wild growing stands of Iran. Because of long period required for embryo development on maternal plant, 45 days old ovary and ovule were used for in vitro culture. The isolated ovary and ovule were then transferred to the different kind of media (MS, Half MS and DKW). Significant difference ($p=0.05$) were observed between efficiency of pollinated ovaries (34.03%) and ovals (47.47%) to produce plantlets. In spite of no significant difference between media used for embryo germination, the highest percentage of embryo germination was observed in MS medium (43.22%). Due to existing several number of ovals in each ovary (15-30), the highest number of plantlets was observed in ovary culture. No significant differences were observed between different origin of pollen grain (geographical regions) on percentage of embryo fertilization and germination. One hundred thirty seven plantlets were successfully acclimatized in a green house and transferred to the Field.

Keywords: *Populus euphratica*, Intraspecific hybridization, Embryo rescue, Geographical variation, Ovary and ovule germination.

مقدمه

گونه پده *P. euphratica Oliv.* درختی است دو پایه که در مناطق وسیعی از اقلیم خشک و نیمه خشک ایران به طور طبیعی گسترش دارد. دامنه پراکنش این گونه در کشور از مناطق گرم نظیر استان های خوزستان و سیستان تا مناطق سرد نظیر آذربایجان و زنجان می باشد (۱). از خصوصیات مهم اینگونه تحمل آن نسبت به دامنه زیاد درجه حرارت و شوری خاک است (۴). اختلافات جغرافیایی و اقلیمی در گستره انتشار این گونه سبب شده تا تفاوتی از نظر مورفولوژیکی و ژنتیکی در میان درختان آن دیده شود (۱۰).

علی رغم مقاومت به شوری و خشکی این درخت، عدم فرم مناسب در ساختار رویشی ساقه سبب شده است تا کاربرد محدودی برای استفاده از چوب آن در صنایع فراهم آید و از ارزش صنعتی آن کاسته شود. وجود اختلافات ژنتیکی که ناشی از عکس العمل این گونه نسبت به محیط جغرافیایی است سبب تشکیل جوامع گوناگونی به لحاظ فرم رویشی تنه و میزان رشد در مناطق تحت انتشار گردیده است. موارد قابل استنادی وجود دارد که دورگ های درون گونه ای میان درختان مناطق مختلف منجر به ایجاد نتایج متفاوتی نسبت به والدین که گاهی حتی برتر از والدین نیز بوده که این امر امکان گزینش پایه های برتر را از میان نتایج حاصل از تلاقی های درون گونه ای میسر می نماید. تلاشهای زیادی در خصوص اصلاح این گونه که دارای توان بالایی در تکثیر غیر جنسی از طریق پاجوش و قلمه می باشد از طریق روشهای دست ورزی ژنتیکی و تولید پایه های گامتوکلون و سوماکلون انجام گرفته است (۷).

به منظور آزمون دستیابی به نتایج متفاوت و افزایش راندمان گزینش، از طریق دو رگ گیری درون گونه ای تلاقی های مختلف بین ژنوتیپ های نواحی مختلف جغرافیایی کشور که این گونه به صورت طبیعی در آنجا گسترش دارد انجام شده است. به دلیل جلوگیری از نابرابری احتمالی رویان و افزایش راندمان تولید در پایه های مختلف روش نجات رویان مورد استفاده قرار گرفته است.

مواد و روشها

جهت دورگ گیری درون گونه ای، پایه هفت ساله درخت پده واقع در مجتمع تحقیقاتی البرز کرج که مبدأ جغرافیایی آن منطقه گتوند در شمال استان خوزستان و در حاشیه رودخانه کارون بوده، به عنوان پایه مادری انتخاب گردید. جوانه های حامل گل ماده به منظور جلوگیری از آلودگی گله با دانه های گرده درختان اطراف، قبل از عمل گرده افشانی جدا سازی شدند. گرده افشانی مصنوعی با دانه های گرده جمع آوری شده از ژنوتیپ های بومی مناطق مختلف بر روی پایه مادری بالغ که گلهای آن از قبل جدا شده بودند انجام شد. این مناطق شامل استان خراسان (منطقه سرخس، حاشیه رودخانه تجن)، استان تهران (حاشیه رودخانه جاجرود)، استان لرستان، (منطقه ملاوی، حاشیه رودخانه خرم آباد) و استان خوزستان (حاشیه رودخانه کارون در منطقه کوشکک) به عنوان شاهد بودند. جهت تهیه دانه گرده، شاخه های گلدار از پایه درخت نراز مناطق مذکور جمع آوری و در گلخانه تحت شرایط حرارتی مناسب (دمای ۲۵-

۲۰ درجه سانتیگراد) وادار به گرده دهی شدند. سپس دانه های گرده در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان گرده افشانی نگهداری شدند. گرده افشانی مصنوعی بر روی گلهای آماده جدا شده با استفاده از یک قلمو و به صورت گرد و غبار صورت گرفت. کپسولهای گرده افشانی شده ۱۰ روز قبل از باز شدن و در حالت چسبیده به محور گل آذین مورد ضد عفونی سطحی با محلول هیپوکلرید سدیم ۲۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر استریل (هر بار ۵ دقیقه) قرار گرفت. جهت تغذیه مصنوعی رویان های بارور شده، تخمدانها و تخمکهای ایزوله شده به لوله های آزمایش حاوی محیط کشت جامد MS (۹)، Half-MS (که غلظت آن به نصف کاهش یافته بود) DKW (۲) منتقل شدند. کشت ها در شرایط دمای ۲۴ درجه سانتیگراد تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی، تهیه شده بوسیله لامپهای فلوروسنس ۴۰ وات با شدت ۵۰۰۰-۴۰۰۰ لوکس نگهداری شدند.

گیاچه های تولید شده در اندازه ۱ تا ۲ سانتیمتری به محیط کشت مشابه منتقل گردیدند و به مدت دو ماه و تا قبل از انجام سازگاری تدریجی در آن نگهداری شدند. محیط کشت Half-MS با دو غلظت متفاوت ساکارز (۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر) و فاقد هورمونهای رشد گیاهی جهت جوانه زنی رویان و تولید گیاهچه مورد استفاده قرار گرفت. سترون نمودن محیط کشت ابتدا در اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد انجام و سپس در لوله های آزمایش به ابعاد ۵×۲/۵ سانتیمتر و شیشه های کشت به ترتیب به مقدار ۵ و ۲۰ میلی لیتر ریخته شد.

نتایج و بحث

جوانه زنی رویان در فاصله زمانی ۳ تا ۱۰ روز پس از کشت تخمدانها و تخمکها بسته به مبدأ والد پدری (مناطق رویشی آنها) بر روی محیط کشت جامد Half-MS و MS مشاهده شده است. کپسولهای کشت شده در شیشه کشت تخمدان ۳/۴۴٪ تولید گیاه نموده اند که این مقدار برای کشت تخمک ۴۷/۴۶٪ بوده است و دارای اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۵ می باشند (جدول شماره ۲۱). شکل گیری تخمکهای فراوان (حدود ۵۰ عدد) در درون تخمدانها در کشت تخمدان و از طرفی تولید تنها یک گیاه از کشت هر تخمک سبب شده تا شیوه کشت تخمدان بیشترین تعداد گیاه را نسبت به شیوه کشت تخمک حاصل نماید، اما نتایج نشان داده است که علی رغم تعداد کمتر گیاه در شیوه کشت تخمک، از نظر درصد جوانه زنی، کشت تخمک افزایشی معادل ۱۳/۴۳٪ را نسبت به کشت تخمدان داشته است. بیشترین تعداد گیاه در شیوه کشت تخمدان بدست آمد. اولین گزارش در مورد انجام گسترده دورگ گیری در صنوبر به وسیله Schreiner و Stout و همکاران (۱۱، ۱۲) گزارش شده است. وجود تخمکهای فراوان در درون تخمدان درخت پده و امکان جوانه زنی آنها در روش کشت های درون شیشه ای قبلا در دو رگ گیری بین گونه ای صنوبر کبوده و پده توسط جعفری و همکاران (۶، ۷) گزارش شده است. تعداد ۱۳/۷۵٪ از کپسولهای کشت شده در فاصله زمانی ۲ الی ۳ هفته پس از کشت در محیط های کشت بکار رفته بصورت غیر طبیعی و سپس نکروزه شده و از بین رفته اند. تعداد ۷/۸٪ گیاهچه های بدست آمده به حالت غیر طبیعی در کشت تخمک مشاهده شد. مشابه این نوع مشاهدات در کشت رویان های بین گونه ای در صنوبر کبوده با پده (۶، ۷) و درخت

جدول ۱- اثر تیمارهای مختلف در جوانه زنی دو رگ های درون گونه ای پده

متغیرها	میانگین جوانه زنی رویان (درصد)
جداکشت	
تخمک	۴۷/۴۶
تخمدان	۳۴/۰۳
محیط کشت	
MS	۴۳/۲۲
۱/۲MS	۴۱/۸۷
DKW	۳۹/۶۹
مبدا جغرافیایی دانه گرده	
تهران	۶۹/۰۹
لرستان	۵۳
خراسان	۵۹/۴۵
خوزستان	۶۲/۹۱

قرار گرفته است (جدول شماره ۲). نتایج حاصل از آزمون مربع کای وجود اختلاف معنی دار را در سطح ۰/۰۵ بین نوع جدا کشت نشان می دهد. بررسی اثرات مبدا (مناطق جغرافیایی) دانه گرده در میزان ترکیب پذیری و همچنین درصد جوانه زنی رویان دو رگ گیری به روش آزمون کای اسکوتر نشان داد که اختلاف معنی داری بین مناطق مختلف جغرافیایی به لحاظ توان ترکیب پذیری و جوانه زنی رویان وجود ندارد (جدول شماره ۲ و شکل شماره ۱). علی رغم عدم تفاوت معنی داری دانه های گرده با مبدا جغرافیایی، گیاهچه های حاصل از تلاقی در منطقه استان تهران با ۶۹/۰۹٪ بالاترین میانگین درصد جوانه زنی و نیز مناسب ترین رشد رویشی درون شیشه ای را داشته است (جدول شماره ۱). به دلیل دوره تکاملی رویان در درخت پده تنها رویان های حداقل ۴۵ روزه قادر به جوانه زنی بوده اند. مشابه این نتیجه در مورد رویان پده در تلاقی با صنوبر کبوده (۷) و نیز در مورد رویان حاصل از تلاقی صنوبر پده با صنوبر سیمونی *Populus simonii* به دلیل رفتار غیر طبیعی لوله دانه گرده و بلوغ نارس دانه گرده و کیسه جنینی، عمل لقاح انجام نشده است، بر عکس وقتی تلاقی بین گونه سیمونی به عنوان پایه مادری و پده به عنوان والد پدری انجام گرفت تعدادی بذور دورگ تشکیل شد (۸). علی رغم عدم اختلاف معنی داری مبدا جغرافیایی دانه های گرده بر روی درصد باروری و جوانه زنی رویان، رفتار مورفولوژیکی متفاوتی در گیاهان بوجود آمده دیده شده است، به طوریکه نهال های انتقال یافته از گلدان به زمین بعد از مدت چهار ماه رویش اختلافاتی به لحاظ فرم رویشی در آنها مشاهده شده است (عکس شماره ۱).

منابع مورد استفاده

- ۱- ثابتی، ح. ۱۳۵۵. جنگلها، درختان و درختچه های ایران. وزارت کشاورزی و منابع طبیعی، ۸۱۰ص.
- 2- Driver, J. A. and Kuniyuki, H. 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut root stocks (*J. hindisii* x

زردآلو (۳) و همچنین در درخت گیلاس (۵) گزارش شده است. از عوامل موثر در جوانه زنی رویان در روشهای درون شیشه ای، غلظت و عناصر تشکیل دهنده محیط های کشت می باشد. علی رغم عدم اختلاف معنی دار میان محیط های کشت به کار رفته در جوانه زنی رویان، بیشترین میانگین درصد جوانه زنی رویان در محیط کشت MS با ۴۳/۲۲٪ برای هر دو نوع جدا کشت تخمک و تخمدان مشاهده شده است. در حالی که تخمدانهای پده در تلاقی با صنوبر بیشترین میانگین درصد جوانه زنی را در محیط کشت Half-MS از خود نشان داده است (۷). مقایسه میانگین اثرات نوع جدا کشت، محیط کشت و اثرات مبدا جغرافیایی دانه گرده بر روی درصد جوانه زنی آنها به روش آزمون کای اسکوتر مورد تجزیه آماری



عکس شماره ۱- مقایسه رشد نهالهای حاصل از دورگ گیری درون گونه ای پده سمت راست- تلاقی پده استان خوزستان با استان خوزستان (شاهد) سمت چپ- تلاقی پده استان خوزستان با استان لرستان

جدول شماره ۲- آزمون مربع کای برای درصد جوانه زنی متغیرهای مستقل در دورگ گیری درون گونه ای پده

متغیرها	مقدار مربع کای محاسبه شده	درجه آزادی	احتمال معنی داری
جدا کشت	۳/۷۳۵	۱	×۰/۰۵۰
محیط کشت	۰/۲۶۱	۲	۰/۸۷۷ns
مبدا جغرافیایی دانه گرده	۵/۶۹۹	۳	۰/۱۲۷ns

* - اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ احتمال

ns - عدم اختلاف معنی دار

J. regia). Hort. Science. 19: 507-509p.

3- Eaton, G. W. and Jamond, A. M. 1992. Embryo sac development in the apricot, *Prunus armeniaca* L. cv. Constan. Journal of Horticultural Science 85: 95-101p.

4- FAO. 1979. Polar and willow in wood production and landuse, Rome, 328p.

5- Furokawa, Y. and Bukovac, M. J. 1989. Embryo sac development in sour cherry during the pollination period as related to fruit set. Hort Science. 24:1005-1013p.

6- Jafari Mofidabadi, A. ; Modir Rahmati, A. and Tavassoli, A. 1998. Application of ovary and ovule culture in *Populus alba* L.X. *P. euphratica* Oliv. Hybridization, Silvae Genetica, 47: 332-334p.

7- Jafari Mofidabadi, 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: 13-15p.

8- Li, W. ; Wang, R. and Zhu, X. 1983. On the embryo development and ovule culture of interspecific hybrids between *Populus simonii* and *P. Pyramidalis* Brkh. Acta Bot Sin. 25: 409-417p.

9- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-493p.

10- Rottenberg, A. ; Nevo, E and Zohary, D. 2000. Genetic variability in sexually dimorphic and monomorphic population of *Populus euphratica* (*Salicaceae*), Can. J. For. Res, 30: 482-486p.

11- Schreiner, E. 1965. Maimum Genetic improvement of forest trees through synthetic multiclonal hybrid varieties, Proc. 13th Northeast forest tree improvment conference, Albany N. Y. 7-13 p.

12- Stout, A. B. ; Mckee, R. and Shreiner, F. 1927. The breeding of forest trees for pulpwood. Jour. N. Y. Bot. Gar. 28: 49-63p.

.....
 Archival