استفاده از روش کشت جنین در شکستن خواب بذر راش
Fagus orientalis Lipsky

علی جعفری مفیدآبادی[1] و منوچهر امانی[1]

چکیده

راش (*Fagus orientalis* Lipsky)، از گونه‌های گیاهی درختی تولید چوب در جنگلهای هیرکانی شمال ایران است، به‌منظور افزایش جوانه‌زنی بذرها و تولید نهال در این گونه، روش کشت درون شیشه‌ای جنین مورد استفاده قرار گرفت. قبل از جوانه‌زنی بذرها تحت تیمار سرمای چهار هفته‌ای (٤ درجه سانتیگراد به‌عنوان تیمار استرافیکاشن سرما) و تیمار بدون اعمال سرما (کنترل) مورد ضدعفونی سطحی قرار گرفت. جنین‌ها از بذرهای ضدعفونی شده پس از حذف لایه اندوکارپ ایزوله و جهت جوانه‌زنی به محیطهای کشت(MS, Half - MS) منتقل شد، نتایج بدست آمده نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمار سرما ٤ درجه سانتیگراد و تیمار بدون سرما (شاهد) برای درصد جوانه‌زنی جنین در سطح ٥٪ وجود ندارد (۷۲/۳۳٪ و ۷۷/۵٪ به‌ترتیب). بنابراین حذف لایه اندوکارپ و کشت جنین بدون اعمال تیمار سرما قادر به حذف دوره طولانی خواب بذر در این گونه می‌باشد.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها روی عناصر غذایی در جوانه‌زنی جنین نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح ٥ ٪ بین محیطهای کشت وجود ندارد. مقدار جوانه‌زنی در محیط کشت پایه MS و Half-MS به‌ترتیب ۳۷/۷۸ و ۷۲/۷۲٪ می‌باشد. گیاهچه‌های حاصل پس از ظهور اولین برگها به ارتفاع ۸ الی ۱۰ سانتیمتری و ظهور ریشه جهت انجام سازگاری تدریجی به خاک داخل گلدان منتقل شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: *Fagus orientalis* Lipsky، راش، کشت جنین، شکستن خواب بذر و جوانه‌زنی بذر

۱- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع- صندوق پستی ۱۱٦- ۱۳۱۸۵.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

راش (Oriental beech) گونه گیاهی متعلق به خانواده راش *Fagaceae* و از دسته راش اروپا به نام (*F. sylvatica* L.) می‌باشد (Gomory و همکاران ۱۹۹۵). بعضی از نویسندگان آن را به‌عنوان زیر گونه راش اروپایی (*F.sylvatica* sub. *Orientalis*) معرفی نموده‌اند. این گونه از درختان پهن برگ با ارزش و با تنه عمودی بلند و صاف و با چوب سخت و سنگین است. تجدید نسل (زادآوری) آن از طریق بذر (تکثیر جنسی) صورت می‌پذیرد. این گیاه یک پایه بوده و گلها به صورت تک جنسی ظاهر می‌گردند که گلهای نر آن به‌صورت کاتکین کروی شکل و آویزان و گلهای ماده آن مجتمع به‌شکل خوشه‌های ۲ الی ٤ تایی است. گلها حساس به دوره یخبندان دیررس (دیر هنگام) بهاری هستند که اغلب ممکن است موجب سال‌آوری بذر در این گونه گردد. میوه به‌صورت خوشه‌ایی بوده و کپسول میوه سه برچه‌ای می‌باشد که به‌وسیله درپوش باز می‌شود و بیش از یک عدد بذر در داخل آنها قرار دارد. اندوکارپ (لایه داخلی پریکارپ)، نرم به‌رنگ قهوه‌ای براق و ضخیم است. بذر آن از نوع بذرهای فاقد اندوسپرم با خواب نسبتاً طولانی است. خواب بذر به این مفهوم که بذرها زنده‌اند، اما برای جوانه‌زنی به عوامل بیشتری اضافه بر درجه حرارت، آب مورد نیاز قبل از شروع جوانه‌زنی محتاج هستند که تاکنون موجب مشکلاتی در بازده جوانه‌زنی بذرهای بسیاری از گونه‌های گیاهی شده است. عدم موفقیت جوانه‌زنی بذرها ناشی از خواب در همه عوامل زیر و یا یکی از آنها می‌باشد.

۱- موانع شیمیایی که از رشد و تکامل جنین جلوگیری می‌نمایند.

۲- موانع فیزیکی که مانع جذب و یا حرکت آب، گاز و یا مواد شیمیایی در بذر می‌گردند.

۳- جنین بذر که به‌طور کامل در زمان رسیدن میوه ویا ریزش بذر توسعه نمی‌یابد که نیازمند شرایط خاصی برای تکامل جنین می‌باشد (فرایند پس رسی).

Archive of SID

www.SID.ir

روشهای متعدد سنتی برای شکستن خواب بذر به‌وسیله تیمار سرمای مرطوب (استراتیفیکشن) و یا سرمادهی اولیه[1] مانند قراردادن بذرهای خیسانده شده در درجه حرارت ۲+ و ۵- سانتیگراد در محیط کشت و یا بدون محیط کشت مورد بررسی قرار گرفته است (Bewley و Black، ۱۹۹٤، Baskin و Baskin، ۱۹۹۸ و El-Antaby، ۱۹۷٦). مدت مورد نیاز برای شکستن خواب بذر به روش سنتی معمولاً طولانی بوده و دامنه آن بین ۵ الی ۸ هفته متغیر است (Muller و Massimbert، ۱۹۸۲). به رغم افزایش تقاضا، به‌دلیل مشکلات جوانه‌زنی بذرهای ناشی از دوره خواب و محدودیت تولید بذر ناشی از سرمازدگی گلها ناشی از سرمای دیررس بهاره، تعداد کمی نهال بذری تولید می‌گردد. به منظور شکستن خواب بذر در راش کشت جنین به‌عنوان یکی از روشهای مؤثر که در شکستن خواب بذرهای اغلب گونه‌های گیاهی تاکنون بکار گرفته شده است مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روشها

بذرها از منطقه طرح جنگلداری وطنا جمع‌آوری گردید. مقداری از آن تحت تیمار سرما (استراتیفیکشن) در شرایط ٤ درجه سانتیگراد (یک هفته) به‌عنوان پیش تیمار و مقداری نیز بدون تیمار سرما به‌عنوان تیمار شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. ضد عفونی بذرهای هر دو تیمار براساس یک روش سه مرحله‌ای انجام شد: ۱- قرار دادن بذرها به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰٪، ۲- استفاده از هیپوکلرید سدیم ۲۵٪ به مدت ۲۰ دقیقه همراه با تکان شدید دست، ۳- شستشو با آب مقطر سترون ٤ الی ۵ بار هر بار به مدت ۵ دقیقه. بذرهای ضد عفونی شده با استفاده از کاغذ صافی سترون شده خشک و همزمان لایه‌های اندوکارپ آنها حذف گردیدند. کشت جنین همراه لپه کامل و سالم با

1- Prechilling

Archive of SID

www.SID.ir

پوسته نازک تستا اطراف آن در محیطهای کشت MS و Half-MS فاقد هورمونهای رشد گیاهی انجام شد. سپس کشتها در اتاق رشد با شرایط نوری ١٦ ساعت روشنایی و با شدت نور ٤٥٠٠-٥٠٠٠٠ لوکس و با دمای ١±٢٥ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بازده جوانه‌زنی جنین (GC)[1] بر اساس فرمول GC=(n/N)*100 مورد ارزیابی قرار گرفت که در آن n تعداد جنین جوانه زده و N تعداد کل جنین کشت شده می‌باشد. میانگین عملکرد حاصل از تیمارهای مختلف به روش کای اسکوئر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

پس از گذشت ١٠ الی ١٢ روز لپه اکثر جنین‌های کشت شده متورم و به رنگ سبز در آمدند و همزمان شروع به باز شدن نموده و ریشه چه و محور زیر لپه از میان آنها ظاهر شدند. تعدادی از لپه‌ها به‌رغم متورم شدن و باز شدن آن در محیط کشت در هر دو تیمار مورد استفاده، قادر به جوانه‌زنی نبوده و پس از مدتی به رنگ قهوه‌ایی در آمده و پوسیده شدند. در توافق با این نتایج، گزارش Sun و Murthy (٢٠٠٠) نیز مبنی بر وجود درصدی جنین غیر زنده در بذر راش اروپایی می‌باشد. تجزیه داده‌های حاصل از جوانه‌زنی جنین تحت تیمارهای مختلف به روش کای اسکوئر نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین پیش تیمار سرما و تیمار کنترل (بدون پیش‌تیمار سرما) در جوانه‌زنی درون شیشه‌ای جنین وجود ندارد (جدول شمارهٔ ١). این ممکن است بدان معنی باشد که تیمار سرما برای جوانه‌زنی درون شیشه‌ای جنین الزامی نمی‌باشد. در تأیید این نتایج گزارش Derkx و Joustra (١٩٩٧) مبنی بر اینکه سطح خواب بذرها در بسته بذری گونه‌های متفاوت راش یکسان نبوده و بعضی از بذرهای بدون تیمار سرمای مرطوب و

1- Germination Capacity

Archive of SID

www.SID.ir

یا پیش‌تیمار یخزدگی جوانه می‌زنند و بعضی دیگر تنها با انجام تیمارهای خاصی (تیمار سرمای مرطوب و یا تیمار یخزدگی) قادر به جوانه‌زنی می‌باشند. جوانه‌زنی بذر راش به‌ویژه راش اروپایی در روشهای سنتی با استراتیفیکش سرما (دمای ۲+ الی ۵- سانتیگراد) موجب افزایش درصد جوانه‌زنی شده است (Muller و Bonnet-Masimbert، ۱۹۸۹ و Suzka و همکاران، ۱۹۹٦). حذف لایه اندوکارپ بذر قبل از کشت جنین ممکن است موجب حذف دورهٔ خواب بذر و تسریع در جوانه‌زنی آن شده باشد. این نتایج، با مطالعات Thomsen (۱۹۹۷) و Shen و Qden (۲۰۰۲) مبنی بر افزایش توان جوانه‌زنی بذرها از طریق شکستن خواب بذر با انجام استراتیفیکشن مکانیکی اندوکارپ (خراش لایه اندوکارپ) مطابقت دارد. این نتایج نشان داد که جنین بالغ این گونه فاقد دورهٔ خواب بوده و فقط پوسته و لایه اندوکارپ آن هستند که ممکن است دارای نقشی اساسی در دورهٔ خواب بذرهای درخت راش داشته باشند. برخلاف این نتایج، گزارش Muller و Bonnet-Masimbert (۱۹۸۹) در خصوص راش اروپایی بر وجود خواب عمیق در جنین که موجب از دست دادن تعداد بیشمار بذر و کاهش درصد نهالهای بذری در نهالستان شده است، اشاره دارد. (Muller و Bonnet-Masimbert، ۱۹۸۹). در بعضی از موارد خواب جنین مانع جوانه‌زنی جنین بالغ و زنده حتی در شرایط آرمانی رویشی شد (Bewley و Black، ۱۹۹٤ و Binaco و Le-Page-Dedivery ۲۰۰۰). Muller و Bonnet-Masimbert (۱۹۸۹) ضرورت یک دوره زمانی سرما دهی ۵ الی ۸ هفته و در بعضی از حالات تا ۱۲ هفته را برای بر طرف کردن خواب بذر این گونه گزارش نمودند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل روی محیطهای کشت در جوانه‌زنی جنین نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین محیطهای کشت بکار گرفته وجود ندارد (جدول شمارهٔ ۱). این موضوع می‌تواند بیانگر اتوتروف بودن جنین بالغ در جوانه‌زنی باشد. بیشترین مقدار جوانه‌زنی مربوط به محیط کشت پایه MS (۷۸/۳٪) است. گیاهچه‌های حاصل پس از ظهور اولین برگها به ارتفاع ۸ الی ۱۰

Archive of SID

www.SID.ir

سانتیمتر و ظهور ریشه‌ها پس از انجام سازگاری تدریجی موفق در گلدان به گلخانه منتقل شده‌اند (تصویر شمارهٔ ۱).

جدول شمارهٔ ۱- اثرات متوسط متغیرهای مستقل تیمار سرما و محیطهای کشت در جوانه‌زنی جنین

متغیرها	درصد جوانه‌زنی
تیمار پیش سرما + کشت جنین	۷۳/۳۳ns
تیمار بدون سرما + کشت جنین	۷۷/۵۰
محیط کشت MS	۷۸/۳۷ns
محیط کشت Half-MS	۷۲/۷۲

ns= عدم اختلاف معنی‌دار

شکل شمارهٔ ۱- سازگاری تدریجی نهالها سه هفته پس از انتقال به خاک گلدان

www.SID.ir

منابع مورد استفاده

1- Baskin, C. C. and Baskin, J, M, 1998. Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of dormancy and gerimination. Academic press, USA.

2- Beweley, J. D. and Black, M. 1994. Seeds: physiology of development and germination. Plenum Press, USA.

3- Bianco, J., Garello, G. and Le Page-Degivry, M.T. 1994. Release of dormancy in Sunflower embryos by dry storage: involvement of gibberellins and abscisic acid. Seed Science research 4: 57-62.

4- Derkx, M.P.M and Joustra, M. K. 1997. Dormancy breaking and Short-term storage of pretreated *Fagus sylvatica* Seeds. *In:*Ellis, R. H., Black, M., Murdoch A. J., Hong, T.D.(eds.) *Basic and applied aspects of seed biology.* Current plant science and Biotechnology in Agriculture No. 30: Kluwer Academic Publishers, 269-278.

5- El-Antably, H.M.M. 1976. Changes in auxin, germination inhibitors, gibberellins and cytokinins during the breaking of seed dormancy in *Fagus sylvatica.* Biochemie und physiologie der pflanzen, 170:51-58.

6- Gomory, D., vysny, J.and Paule, L. 1995. Genetic differentiation of population in the transition zone between *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. *In:* Madsen, S.F. (ed.) Genetic and Silviculture of beech.Proceedings from the 5th beech Symposium of the IUFRO Project Group P.1. 10-00, 19-24 September 1994. Mogenstrup. Forskningsserien n 11-1995, Danish Forest and Landscape Research Institue, Horsholm, Denmark, 238-241.

7- Muller, C. and Bonnet-masimbert, M. 1982. Long term storage of beechnuts: results of large scale trials. *In:* wang, B.S.P., Pitel, J.A., (eds.) Proceedings international Symposium on Forest seed storage: 23-27 Sep. 1980, Cannadian Forestry Service Publication, 178-183.

8- Muller, C. and Bonnet-masimbert, M. 1989. Breaking dormancy before storage: an Improvement to Processing of beechnuts (*Fagus sylvatica* L.). Seed science and technology. 17:15-26.

Archive of SID

www.SID.ir

9- Muller, C., Laroppe, E. & Bonnet-masimbert, M. 1999. Further developments in the redrying and storage of prechilled beechnuts (*Fagus sylvatica* L.): effects of seed moisture content and prechilling duration. *Annals of forest science*. 56: 49-57.

10- Murthy, U. M. N. and Sun, W.Q. 2000. Protein modification by Amadori and maillard reaction during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. *Journal of experimental botany.* 51: 1221-1228.

11- Shen, T.Y. and Oden, P.C. 2002. Relationships between seed vigour and fumarase activity in *Picea abies, Pinus contorta, Betula pendula and Fagus sylvatica. Seed science and technology* 30:177-186.

12- Suszka, B., Muller, C. & Bonnet-Masimbert, M. 1996. *Seeds of Forest Broadleaves- From Harvest to Sowing* (translated by Gordon, A.) INRA Edition, France.

13- Thomsen, K. A. 1997. The effect of harvest time and drying on dormancy and storrability in beechnuts *In:* Ellis, R. H., Black, M., Murdoch A. J., Hong, T.D.(eds) *Basic and applied aspests of seed biology.* Current plant Science and Biotechnology in Agriculture No. 30: Kluwer Academic Publishers, 45-51.

Archive of SID

www.SID.ir