تکثیر درون شیشه‌ای سرخدار (*Taxus baccata*) از طریق کشت جنین‌های جنسی

طیبه سهیلا نراقی[1]

چکیده

توده‌های سرخدار ایران انبوه‌ترین و قدیمی‌ترین جنگلهای سرخدار جهان بشمار می‌آیند. تحقیق حاضر جهت کاهش خفتگی و سرعت بخشیدن به سبز شدن بذرهای سرخدار صورت گرفته است.

بذرها از پایه‌های برگزیده در رویشگاههای طبیعی گیاه، واقع در جنگلهای آستارا در فصل پاییز جمع‌آوری شده و تحت تیمارهای مختلف با اسید کلریدریک غلیظ و شستشوی مداوم با آب قرار گرفتند. بذرها پس از آنکه به مدت ۱۵ روز در جریان آب مداوم قرار گرفتند، با استفاده از محلولهای هیپوکلریت سدیم ۳٪ به مدت ۱۵ دقیقه و کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه سترون شدند، جهت کشت پوسته بذرها با اسکالپل شکافته شده و جنین‌های داخل آنها به محیط کشت MS تغییر یافته انتقال یافتند. ٦۵٪ جنین‌ها پس از ٦ هفته جوانه زدند و دانه رستها تشکیل شدند. دانه رستها طی مراحل مختلف سازگاری به خاک گلدان منتقل گشتند.

واژه‌های کلیدی: سرخدار *Taxus baccata*، کشت درون شیشه‌ای و جنین‌های جنسی

۱- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، صندوق پستی ۱۱٦ – ۱۳۱۸۵. E-mail:tnaraghi@rifr-ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سرخدار *Taxus baccata* تقریباً در تمام نواحی جنگلی شمال ایران بین ارتفاعات ۹۰۰ تا ۱۸۰۰ متری از سطح دریا رویش دارد. به استثنای منطقه گرگان در بقیه نواحی به‌صورت تک درخت و گاهی در گروههای کوچک و به ندرت گروههای بزرگ در ارتفاعات فوق‌الذکر مشاهده شده است (لسانی، ۱۳۷۸). در توده‌های سرخدار زادآوری طبیعی ضعیف بوده و به ندرت دیده می‌شود و در جاهایی هم که زادآوری مشاهده می‌شود اغلب نهالها به دلایلی نظیر پایین افتادن سفره‌آبی در خاک، وضعیت نامناسب میکروبیولوژیکی خاک، سایه شدید و یا چرای دام، از بین می‌روند. این گیاه در ۳۰ سالگی به بلوغ می‌رسد و تعداد کروموزمهای آن ۲n=۲٤ است. چنانچه متوسط رشد قطری ۰/۵ میلیمتر در سال در نظر گرفته شود. با اطمینان می‌توان گفت که در ۲۰ سال اخیر سرخدار تجدید حیات نداشته است، زیرا درختان با قطر کمتر از ۱۵ سانتیمتر بسیار نادر است. بنابراین می‌توان گفت که جنگلهای سرخدار ایران همسال بوده و به اوج تعادل[1] رسیده‌اند. با در نظر گرفتن روند تکاملی این جنگلها می‌توان پیش‌بینی کرد که در آینده طی یک مرحله زمانی کوتاه کاهش فراوانی در تعداد پایه‌های سرخدار اتفاق خواهد افتاد که استقرار مجدد آن با توجه با شرایط موجود بسیار دشوار به نظر می‌رسد. Lepage-Degivery (۱۹۷۳) گزارش داد که جنین‌های نابالغ بذرهای خواب سرخدار جهت سبز شدن به تیمارهای سرمادهی، اسید جیبرلیک و خیساندن در آب احتیاج دارند. Flores و Sgrignoli (۱۹۹۱) عنوان کرده‌اند که جنین‌های برگرفته از بذرهای نارس سرخدار با آریل[2] سبز رنگ حداکثر میزان رشد حدود ۷۰٪ را داشته‌اند. Zhiri و همکاران (۱۹۹٤) با شکستن دوره خواب بذر *Taxus baccata* در شرایط درون شیشه مؤفق به استخراج Taxol از گیاهچه‌های ۲ ماهه این گونه شد. Chee

1- Climax
2- Aril

Archive of SID

www.SID.ir

(۱۹۹٤) گیاهچه‌های سرخدار را با کشت جنین‌های جنسی *T. brevifolia* در شرایط درون شیشه بدست آورد. Chee (۱۹۹۵) در ادامه تحقیقاتش موفق به اندام‌زایی از جنین‌های جنسی *T. brevifolia* شد و همچنین از طریق رویان‌زایی رویشی *T. brevifolia* به تولید گیاه دست یافت (Chee، ۱۹۹٦). Majada و همکاران (۲۰۰۰) با تکثیر انبوه گیاهچه‌های آزمایشگاهی سرخدار از جنین‌های جنسی به تولید بیشتری از تاکسول رسیدند. هدف از این بررسی شکستن دوره خواب بذر[1] و استقرار جنین حاصل از بذرهای کامل در شرایط درون شیشه‌ای جهت افزایش بازده تکثیر این گونه می‌باشد.

مواد و روشها

بذرها در ۳ مرحله رسیدگی متفاوت از درختان بالغ جمع‌آوری شد.

۱- مرحله اول بذرهای نارس روشن به طول تقریبی ۲ میلیمتر، رنگ آریل سبز و کاملاً سفت

۲- مرحله دوم بذرهای به طول تقریبی ٤ میلیمتر و رنگ آریل نارنجی

۳- مرحله سوم بذرهای رسیده به طول ٦ میلیمتر به رنگ قهوه‌ای و آریل نرم و قرمز رنگ

جهت کاهش مقاومت پوسته بذر، پس از حذف آریل، بذرها تحت تیمارهای مختلف به شرح زیر قرار گرفت.

الف- بذرها به مدت ۱۰ دقیقه در اسید کلریدریک غلیظ قرار داده شد، بعد جهت زدودن اسید از روی پوسته بذر آنها را ۵ بار با آب مقطر استریل شسته و به مدت ۲٤ ساعت در آب گذاشته شدند.

1- Dormancy

Archive of SID

www.SID.ir

ب- بذرها به مدت ۱۵ روز در معرض آب جاری قرار گرفتند.

پس از این مرحله بذرها به مدت ۱۵ دقیقه با محلول اتانول ۷۰٪ شستشو داده شدند و بعد با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۳٪ (سفید کننده تجارتی ٦۰٪ حجمی حاوی قطره‌ای مایع ظرفشویی) به مدت ۱۵ دقیقه و در انتها محلول کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه سترون گشتند.

در پایان این مرحله در زیر هود مخصوص کشت بافت و در زیر لوپ با بکارگیری دو پنس ظریف و اسکالپل تیز، پوسته بذرها را شکافته و در صورت مشاهده جنین در بافت مگاگامتوفیت جنین‌ها را با احتیاط خارج و روی محیطهای MS[1] تغییر یافته و B5[2] فاقد هورمون گیاهی کشت شدند.

محیط کشت MS حاوی کازئین هیدرولیز شده و اسید اسکوربیک از هر یک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، ۱ گرم در لیتر عصاره مخمر و ۵ گرم در لیتر ذغال فعال بود.

آزمایش فاکتوریل با دو تیمار پیش تیمار (اسید کلریدریک و آب جاری) و دو تیمار محیط کشت شامل محیط کشت MS و محیط کشت B5 بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سطح ۳ تکرار به اجرا درآمد، قبل از انجام تجزیه واریانس جهت دستیابی به پراکنش نرمال، کلیه داده‌ها (x) به صورت $\sqrt{(x + ۰/۵)}$ در نرم‌افزار MSTATC تبدیل و مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. مقایسه میانگین اثرات تیمارهای مختلف به روش دانکن جهت معرفی بهترین تیمار در جوانه‌زنی انجام شد.

1- Murashige & Skoog medium (1962)
2- Gamborg,s B5 medium (1968)

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

مراحل رشد و نموی جنین‌های مشتق شده تأثیر قابل توجهی در فراوانی جوانه‌زنی و رشد آنها دارد. بذرهای نارس با آریل سبز یا فاقد جنین بوده و یا جنین منتقل شده به محیط کشت قادر به ادامه رشد و نمو نبودند. اما جنین‌های کشت شده از بذرها (شکل شمارهٔ ۱) در مراحل دوم و سوم رسیدگی (بذرهای با آریل نارنجی و قرمز) دو هفته پس از کشت روی محیطهای تغییر یافته MS و B5 فاقد هورمونهای رشد، شروع به متورم شدن کردند. ظهور اولین ریشه‌چه‌ها ۳ هفته پس از کشت رویت شد. رشد ریشه‌چه‌ها همزمان صورت نگرفته و تغییرات زیادی از نظر مورفولوژی و اندازه داشتند. در اواخر هفته چهارم ساقه‌چه‌ها تشکیل و اولین برگها ظاهر شدند (شکل شمارهٔ ۲).

پس از انتقال آنها به محیط کشتهای جدید، رشد و نمو نهالها صورت گرفت (شکل شمارهٔ ۳). اکثر دانه‌رستها دارای یک ریشه اولیه همراه ریشه‌های ثانویه بودند.

در تجزیه و تحلیل آماری، تعداد ریشه‌چه‌ها و تعداد دانه رستها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین محیطهای کشت وجود ندارد. لیکن بین پیش تیمارهای کشت، برای تعداد ریشه‌چه‌ها و تعداد دانه‌رستها اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ مشاهده شده است. تیمار شستشوی با آب جاری بذرها به مدت ۱۵ روز سبب افزایش تعداد ریشه‌چه و همان‌طور تشکیل دانه رستها بود (جدولهای شمارهٔ ۱ و ۲). لازم به ذکر است که جهت تجزیه و تحلیل آماری صفات، به دلیل آنکه در بعضی از تیمارها، ریشه‌چه تشکیل نشده و یا اگر هم تشکیل شد. منجر به تولید دانه رست نگردید، تبدیل داده‌ها جهت دستیابی

Archive of SID

www.SID.ir

به پراکنش نرمال ضروری می‌باشد. تأثیر متقابل محیط کشت و پیش تیمار کشت نیز در جدول شمارهٔ ۱ کاملاً معنی‌دار است و تیمار شستشوی با آب جاری به عنوان تیمار بهینه معرفی می‌گردد.

در مقایسه میانگین‌های تعداد ریشه‌چه و دانه رست، تیمار آب جاری و محیط کشت MS در سطح ۰/۰۱ کاملاً معنی‌دار است، محیط کشت MS حاوی کازئین هیدرولیز و اسید اسکوربیک از هر یک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، ۱ گرم در لیتر عصاره مخمر و ۵ گرم در لیتر ذغال فعال از نظر تعداد دانه رست تشکیل شده به عنوان محیط بهینه جهت کشت جنین توصیه می‌گردد.

دانه رستهای رشد یافته پس از دو ماه جهت انجام سازگاری به گلدانهای حاوی مقادیر مساوی (۱:۱:۱) ورمیکولایت، خاک برگ و پرلیت سترون شده انتقال یافتند. گیاهچه‌های سازگار پس از یکماه به محیط گلخانه منتقل گشتند (شکل شمارهٔ ٤).

بحث

اعمال پیش تیمار شستشوی مداوم بذرها با آب جاری در شکستن دورهٔ خواب بذر سرخدار که معمولاً خفتگی دو ساله دارد، بسیار مؤثر بوده است. از اثرات قرارگیری بذرها در معرض آب جاری سرد، غلطیدن بذرها بر روی هم و کاهش مقاومت مکانیکی پوشش بذر است. علاوه بر آن، این تیمار به تغییر نسبت هورمون اسید آبسیزیک درونی بذر (عامل خواب بذر) به نفع جیبرلین منجر خواهد شد که خود پس از انتقال به لایه الورن با فعال سازی آنزیمهای تجزیه‌کننده ذخیره غذایی بذر، موجبات تغذیه جنین و در نهایت جوانه‌زنی بذر را فراهم می‌کند. فعال شدن سازوکار فرایندهای فیزیولوژیکی بذر تحت تأثیر عملکرد آب سرد تا حدودی به مثابه تیمار چینه سرمایی[1]

1- Stratification

Archive of SID

www.SID.ir

بوده است. Qrunfleh (۱۹۹۱) به این مطلب اشاره نموده است که با افزایش دوره سرما، درصد اسید آبسیزیک هم به صورت آزاد و هم به صورت مولکول پیوند شده با سلولهای بذر کاهش می‌یابد. Zhiri (۱۹۹٤) نیز در تحقیقی مشابه موفق به تولید نهال در نتیجه اعمال تیمار آب جاری شد. البته عامل مربوط به مرحله رسیدگی بذرها نیز در جوانه‌زنی آنها کاملاً مؤثر است. Flores و Sgrignoli (۱۹۹۱) عنوان کردند که جوانه‌زنی بذرها ارتباط مستقیمی به مرحله رسیدگی بذر ندارد. این محققان گزارش نمودند که ۱۰٪ بذرهای رسیده، موفق به جوانه‌زنی شده‌اند. در تناقص این گزارش و تحقیق حاضر می‌توان گفت که عامل محیط کشت و همچنین پیش‌تیمار انجام شده می‌تواند عامل مؤثر در ایجاد ریشه‌چه و تشکیل دانه‌رستها باشد.

محیط کشت MS تغییر یافته حاوی کازئین هیدرولیز شده و عصاره مخمر بود. این فرآورده‌ها جهت رسانیدن نیتروژن آلی به محیط کشت استفاده می‌شود که در واقع نقشی مشابه اسیدهای آمینه را بازی می‌کند. Aderkas و همکاران در سال ۱۹۹۰ در کشتهای رویان‌زایی *Larix decidua* و *Larix leptolepis* از این مواد استفاده نمودند و همین نتیجه را بر افزایش درصد رویان‌زایی کشتهای مزبور بدست آوردند.

جدول شمارهٔ ۱- نتایج تجزیه واریانس کشت جنین‌های جنسی سرخدار با تبدیل $\sqrt{(X+0/5)}$

منبع تغییرات	درجه آزادی	MS	
		ریشه‌چه	دانه رست
A	۱	۰/۲۰۳ ns	۰/۸۰٦ ns
B	۱	۸۳/٤۲٤ **	۸۵/۹۲۱ **
تأثیر متقابل A*B	۱	۱۱/۹۲۰ **	۱۱/۲۲۱ **
خطا	۸	۰/٦٦٤	۰/۷۱۱٤

A: محیط کشت، B: پیش تیمار کشت، **: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شمارهٔ ۲- مقایسه میانگین‌های تعداد ریشه‌چه و دانه رست تشکیل شده در سطح ۰/۰۱ تحت تأثیر پیش‌تیمار کشت و محیط با تبدیل $\sqrt{(X+0/5)}$

ردیف	تیمار	ریشه‌چه	دانه رست
۱	تیمار آب جاری و کشت در محیط B5	٦/٥٠٣ b	٥/٥٣٣b
۲	تیمار اسید کلریدریک غلیظ و کشت در محیط B5	۱/٥۲d	۰/۷۰۰c
۳	تیمار آب جاری و کشت در محیط MS	۸/۷۸۷ a	۸/۰۷۰a
٤	تیمار اسید کلریدریک و کشت در محیط MS	۳/۲٥۳c	۲/۲c

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

شکل شمارهٔ ۱- کاشت جنین در محیط کشت

شکل شمارهٔ ۳- رشد و نمو دانه رستها در محیط کشت

شکل شمارهٔ ۲- تشکیل ساقه‌چه و ظهور

شکل شمارهٔ ٤- انتقال دانه رستها به

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

از همکاران گرامی خانمها مهندس میترا امام، مهندس شکوفه شهرزاد و آقای مهندس بابا خانجانی شیراز که از راهنماییهای علمی و عملی آنها در طول اجرای تحقیق بهره‌مند شده‌ام تشکر و قدردانی می‌کنم.

منابع

۱- لسانی، م.ر.، ۱۳۷۸. سرخدار. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع ایران، ۱۸۱ صفحه.

2- Aderkas, P von., Klimaszewska, K. and Bonga, J.M., 1990. Diploid and haploid embryogensis in *Larix leptolepis, L. decidua* and their reciprocal hybrids. Can J Forestry Res, 20: 9 – 14.

3- Chee.P.P., 1994. *In vitro* culture of zygotic embryos of *Taxus* species. Hort Science, 29: 695 –697.

4- Chee.P.P., 1995. Organogensis in *Taxus brevifolia* tissue cultures. Plant Cell Reports, 16: 560 – 565.

5- Chee.P.P., 1996. Plant regeneration from somatic embryos of *Taxus brevifolia*. Plant cell Reports, 16-184 – 187.

6- Flores, H.E. and Sgrignoli, P.J., 1991 *In vitro* culture and precocious germination of *Taxus* embryos. *In vitro* Cellular Developmental Biol, 27: 139 – 142.

7- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res, 50: 148 – 151.

8- LePage- Degivery, M.T., 1973. Etude en culture *in vitro* de la dormance embryonnaire chez *Taxus baccata L.* BIOL. Plant, 15: 264 – 269.

Archive of SID

www.SID.ir

9- Majada, J.P., Sierra, M.I. and Sanchez.- Tames, R., 2000. One step more towards taxane production through enhanced *Taxus* propagation. Plant Cell Reports, 19: 825 – 830.

10- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised Medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473 –597.

11- Qrunfleh, M.M., 1991. Studies on the hawthorn (*Crataegus azarolus*) changes abscisic acid content during cold stratification in relation to seed germination. Journal of Horticultural Science, 66: 23 – 226.

12- Zhiri, M., Jaziri, A., Hames, J., Vanhaelen, M. and Shimomura, K., 1994. Factors affecting the *in vitro* rapid germination of *Taxus* embryos and the evaluation of Taxol content in the plantlets. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 39: 261 - 263.

Archive of SID

www.SID.ir