دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۱، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۲۳-۱۳ (۱۳۹۲)

بررسی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در ریزازدیادی درخت تا (*Celtis caucasica* Willd.)

فرناز دادور*[۱]، تیمور رستمی شاهراجی[۲]، محمدحسن عصاره[۳]، میترا امام[٤] و انوشیروان شیروانی[٥]

۱*- کارشناس‌ارشد، جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، پست‌الکترونیک: fdadvar@gmail.com
۲- استادیار، جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان
۳- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
٤- مربی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
٥- استادیار، جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰٦/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۷/۲٤

Archive of SID

چکیده

گونه *Celtis caucasica* Willd یکی از درختان بومی جنس *Celtis* در ایران است. با توجه به اینکه درخت تا، گونه‌ای مقاوم به خشکی بوده و برخلاف جنس‌های دیگر خانواده نارون به بیماری مرگ نارون مقاوم است، بنابراین حفظ و تکثیر پایه‌های برتر آن به طریق غیرجنسی برای تولید در مقیاس انبوه برای جنگلکاری در مناطق خشک و انجام مطالعات بعدی حائز اهمیت است. در این تحقیق تکثیر غیرجنسی گونه مورد نظر به روش ریزازدیادی مرسوم با استفاده از کشت مریستم مورد بررسی قرار گرفت. بهترین تیمار سترون‌سازی کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۱ دقیقه برای جوانه‌های نهال حاصل از ریشه جوش ژنوتیپ بالغ در فصل زمستان و به مدت ۵ تا ۷ دقیقه برای پایه بالغ در فصل پاییز بود. در بررسی صفات شاخه‌زایی در تمامی موارد میان تیمارهای اعمال شده تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده شد که در این میان تیمار شاخه‌زایی محیط کشت DKW حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیترBAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip برای استقرار و شاخه‌زایی مناسب است. پیش‌تیمار ریشه‌زایی در محیط کشت پایه بدون هورمون به مدت دو هفته و بعد ریشه‌زایی در محیط کشت DKW با دو تیمار هورمونی اکسین ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به صورت مجزا و تلفیقی انجام شد. نتایج نشان داد که تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA با دارا بودن بیشترین میزان رشد طولی ریشه، مناسب‌ترین ترکیب برای ریشه‌زایی است. به‌طوری‌که گیاهچه‌های ریشه‌دار شده توسط ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA از بالاترین میزان سازگاری در حد ۹۹ درصد برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: درخت تا، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، ریزازدیادی، مریستم.

مقدمه

درخت تا با نام عمومیCaucasian hackberry و نام علمی.*Celtis caucasica* Willd یکی از گونه‌های بومی جنس *Celtis* در ایران است (Mozaffarian, 1998). این گونه درختی دوپایه و کوتاه است که حداکثر به ارتفاع ۱۵ متر و قطر ٦۰ سانتی‌متر می‌رسد (Jazirehi, 2001) و (Mozaffarian, 2005). چوب درخت تا به رنگ تیره و به قدری محکم است که بعضاً آن را چوب آهن می‌نامند

www.SID.ir

(Jazirehi, 2001). چوب آن دارای خاصیت ارتجاعی بوده و از دوام و کیفیت بالایی برخوردار است (Gamble, 1972). گونه‌ای مقاوم به خشکی و نورپسند است. این درخت کندرشد است و سن دیرزیستی آن ممکن است به ۱۰۰۰ سال برسد (Huxley, 1992). این درخت زیبا و خزان کننده در نواحی خشک و استپی کشور در کوه‌های زاگرس و البرز بین ارتفاعات ۸۰۰ تا ۲۶۰۰ متر از سطح دریا می‌روید (Sabeti, 1994). بررسی‌ها نشان داد که ظاهراً مطالعات انجام شده در زمینه کشت بافت جنس *Celtis* بسیار محدود است. تنها مورد به‌دست آمده مربوط به گونه *C. sinensis* است که Azuma و همکاران (۱۹۹۲) القای کالوس و اندام‌زایی ریشه را در این گونه بررسی نمودند. کالوس حاصل از جوانه‌های موجود در محیط کشت انتخابی MS با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. در تحقیقی Izadpanah (۲۰۰۳) به بررسی تکثیر غیرجنسی پایه‌های ملج *Ulmus glabra* پرداخت. نتایج نشان داد که محیط کشت DKW حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین محیط کشت برای شاخه‌زایی است. ریشه‌زایی نیز در محیط کشت حاوی مقادیر کم IBA و یا محیط کشت بدون هورمون به راحتی انجام شد. در مطالعه‌ای Emam (۲۰۰۷) موفق به تکثیر غیرجنسی گونه *U. carpinifolia* از پایه‌های بالغ از طریق کشت جوانه شد. شاخه‌زایی در محیط کشتDKW با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ریشه‌زایی نیز در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA انجام گردید. پرآوری جوانه‌های جانبی *U. glabra*، *U. laevis* و *U. compestris* بر روی محیط کشت‌های MS و WPM حاوی ۲- ۰/۷ میلی‌گرم بر لیترBAP توسط Chalupa (۱۹۸۷) نیز به‌دست آمد. در تحقیق دیگری Cheng و Shi (۱۹۹۵) نیز موفق به تکثیر *U. pumila* در شرایط درون شیشه‌ای شدند. مطالعه انجام شده توسط Biroscikova (۲۰۰٤) نیز منجر به ریزازدیادی پایه‌های بالغ *U. glabra* در محیط کشت WPM با سیتوکینین‌های BAP و TDZ شد. شاخه‌زایی مناسب ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل بذرهای *U. carpinifolia* در محیط کشت‌های WPM و MS با هورمون BAP به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و ریشه‌زایی با هورمون NAA با غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نیز توسط Mezzetti و همکاران (۲۰۰۷) گزارش گردید. کشت جوانه‌های جانبی *Zelkova serrata* توسط Ito و Kondo (۱۹۹۵) بر روی محیط کشت MS با نصف غلظت نیترات حاوی ۵-۱ میکرومول BAP انجام گردید و بیشترین شاخه تولید شده از جوانه‌های جانبی در محیط کشت حاوی ۵ میکرومول BAP حاصل شد.

بیماری مرگ نارون یکی از مشکلاتی است که در چند دهه اخیر موجب از بین رفتن تعداد زیادی از گونه‌های جنس نارون و آزاد شده است. با توجه به آنکه گونه بومی درخت تا در جنس *Celtis* برخلاف جنس‌های دیگر خانواده نارون هنوز به بیماری مرگ نارون مبتلا نشده است و همچنین درختی مقاوم به خشکی است، حفظ و تکثیر پایه‌های برتر آن به طریق غیرجنسی برای تولید در مقیاس انبوه برای جنگلکاری در مناطق خشک و همچنین انجام مطالعات بعدی، ازجمله بررسی دلایل مقاوم بودن آن به این بیماری مهلک از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. بنابراین آشنایی با شیوه تولید درون شیشه‌ای آن و به‌ویژه تولید کالوس در سطح انبوه می‌تواند پایه مطالعات زیستی باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

در روش ریزازدیادی از مریستم‌های موجود برای تهیه نمونه‌های گیاهی از جوانه‌های پایه بالغ و جست‌های حاصل از پایه مادری *C. caucasica* Willd. در منطقه البرز مرکزی استفاده شد. نمونه‌ها از منطقه البرز مرکزی در ارتفاع ۱۵۰۰ متری از سطح دریا در عرض جغرافیایی ´´۶۸´۵۵°۳۵ و طول جغرافیایی ´´۵۲۸´۰۲°۵۱ از پایه مادری و نهال حاصل از ریشه جوش ژنوتیپ بالغ برداشت گردید.

در ابتدا شستشوی ریزنمونه‌ها با آب جاری انجام گردید. آنگاه در مرحله بعد برای به حداقل رساندن آلودگی‌ها، برس‌کشی با مایع ظرفشویی و متعاقب آن شستشو با آب انجام شد. سپس برس‌کشی با محلول اتانول ۷۰ درصد انجام شد. سترون‌سازی نمونه‌ها در شرایط کاملاً سترون و در زیر هود مخصوص انجام شد. به‌منظور سترون‌سازی ریزنمونه‌ها از محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد در زمان‌های مختلف استفاده شد (جدول ۱). در پایان، ریزنمونه‌ها سه بار با آب مقطر دو بار تقطیر شستشو داده شدند.

جدول ۱- فصول و مدت زمان‌های سترون‌سازی ریزنمونه‌های پایه مادری (۱) و ریشه‌جوش آن (۲) در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد

فصل	ریزنمونه‌های پایه مادری و ریشه‌جوش آن	زمان سترون‌سازی (دقیقه)
بهار	۱	(٤)
	۲	(٤) و(۲)
تابستان	۱	(۱۰) و(۷) و(۵)
پاییز	۱	(۱۰) و(۷) و(۵)
زمستان	۱	(٦) و(۵) و(٤) و(۳) و(۲)
	۲	(۳) و(۲) و(۱)

سپس ریزنمونه‌های واجد یک جوانه جانبی به شیشه‌های ویال حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت DKW انتقال یافتند. هورمون‌های به کاربرده شده در این مرحله شامل ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. برای حذف آلودگی‌های درونی و به دست آوردن تعداد شاخه کافی برای انجام مراحل بعدی تحقیق، واکشت ریزنمونه‌ها هر ۲۰ تا ۳۰ روز انجام گردید (شکل ۱). در مرحله بعد شاخه‌های حاصل از کشت مریستم برای تعیین بهترین ترکیب هورمونی، به محیط شاخه‌زایی با ۱۲ تیمار متفاوت از اکسین و سیتوکینین‌ها انتقال یافتند. سیتوکینین‌های BAP و 2ip در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، اکسین IBA در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و هورمون GA_3 با غلظت ثابت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت DKW مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲). تمام تیمارها در ۵ تکرار و هر تکرار شامل ۵ ریزنمونه که هر کدام به طول ۱/۵ سانتی‌متر و دارای ۳ جوانه بود، اعمال گردیدند.

Archive of SID

www.SID.ir

سپس ظروف کشت به اتاق رشد انتقال یافتند و در پایان یک ماه، آماربرداری انجام شد و پارامترهایی مانند تعداد شاخه، طول شاخه، تعداد جوانه و سبزینگی برگ‌ها ثبت شد. میزان سبزینگی با اعداد ۱ تا ٤ کد گذاری گردید که در این کدگذاری ۱ نشانه زردی و پلاسیدگی و ٤ نشان‌دهنده رنگ سبز کاملاً تیره است. شاخه‌های حاصل از مرحله‌ی پرآوری شاخه به‌منظور ارزیابی ریشه‌زایی به محیط کشت القاء ریشه انتقال یافتند. برای حذف اثرات سیتوکینین، شاخه‌ها به مدت دو هفته به محیط کشت فاقد هورمون منتقل شدند. به‌منظور تحریک ریشه‌زایی در ریزشاخه‌ها از محیط کشت DKW حاوی اکسین‌های IBA و NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به صورت مجزا و تلفیقی استفاده شد. ظرف‌های محیط کشت در اتاق رشد با دمای ثابت ۳± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تمام تیمارهای ریشه‌زایی در ۳ تکرار و هر تکرار با ٤ ریزنمونه اعمال گردیدند. کل داده‌های شاخه‌زایی و ریشه‌زایی در محیط Excel وارد شد و با استفاده از نرم‌افزار $SPSS_{16}$، نرمال بودن داده‌ها تعیین شد و در نهایت داده‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی، تجزیه واریانس گردید. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در محیط گلخانه به گلدانهای سرپوش‌دار حاوی مخلوطی از خاک‌های پیت، پرلیت و ورمیکولایت به نسبت ٤:۱:٤ که در آون تحت دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت سترون‌سازی شده بودند انتقال یافتند. درجه حرارت کنترل شده گلخانه ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. پس از سازگاری تدریجی (افزایش منافذ و کاهش رطوبت زیر سرپوش تا برداشت کامل آن) نونهال‌ها به گلدان‌های بزرگتر منتقل شده و با شروع گرما در آغاز فصل بهار نونهال‌های رشد یافته به فضای آزاد انتقال یافتند.

جدول۲ - تیمارهای متفاوت شاخه‌زایی در محیط DKW

هورمون / تیمار	IBA (میلی‌گرم در لیتر)		BA (میلی‌گرم در لیتر)		2ip (میلی‌گرم در لیتر)	
	۰/۱	۰/۰۱	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۵
T۱	–	+	+	–	–	–
T۲	–	+	+	–	–	+
T۳	–	+	+	–	+	–
T٤	–	+	–	+	–	+
T۵	–	+	–	+	+	–
T٦	–	+	–	–	–	+
T۷	+	–	+	–	–	–
T۸	+	–	+	–	+	–
T۹	+	–	+	–	–	+
T۱۰	+	–	–	+	–	+
T۱۱	+	–	–	+	+	–
T۱۲	+	–	–	–	–	+

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- تأثیر فصل برداشت نمونه و مدت زمان سترون‌سازی با محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد بر درصد زنده‌مانی و آلودگی ریزنمونه‌های پایه مادری البرز مرکزی

فصل برداشت	مدت زمان سترون‌سازی با کلرید جیوه (دقیقه)	درصد زنده‌مانی	درصد آلودگی میکروبی	درصد آلودگی قارچی	درصد سوختگی
	۵	۰	۵/۱۷	۰	۹٤/۲۸
تابستان	۷	۰	۰	۰	۱۰۰
	۱۰	۰	۲/۷۳	۰	۹۷/۲٦
	۵	۱۰۰*	۰	۰	۰
پاییز	۷	۱۰۰*	۰	۰	۰
	۱۰	۱۰۰*	۰	۰	۰
	۲	۰	۰	۰	۱۰۰
	۳	۰	۰	۰	۱۰۰
زمستان	٤	۰	۳/۵۸	۰	۹٦/۱۵
	۵	۰	۰	۰	۱۰۰
	٦	۰	۱/٤٦	۰	۹۸/۳٦

*: بهترین تیمار سترون سازی در هر فصل

جدول ٤- تأثیر فصل برداشت نمونه و مدت زمان سترون‌سازی با محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد بر درصد زنده‌مانی و آلودگی ریزنمونه‌های ریشه‌جوش پایه مادری البرز مرکزی

فصل برداشت	مدت زمان سترون‌سازی با کلرید جیوه (دقیقه)	درصد زنده‌مانی	درصد آلودگی میکروبی	درصد آلودگی قارچی	درصد سوختگی
بهار	۲	۷۰/۵	۲۷/۵	۰	۲/۵
	٤	۷۰/۷۵*	۲۱/۳٤	۰	٦/۸۳
زمستان	۱	۷۲/۹۷*	۰	۲۷/۰۳	۰
	۲	٦۰/٦	۰	۳۹/۳۹	۰
	۳	٦۲/۸۷	۰	۳۷/۱۳	۰

*: بهترین تیمارسترون‌سازی در هر فصل

نتایج

در میان ریزنمونه‌های تهیه شده در فصول مختلف سال، ریزنمونه‌های سترون‌سازی شده پایه بالغ در فصل پاییز، فاقد هر گونه آلودگی بوده و تا مرحله استقرار و تولید تک شاخه پیش رفت، اما این شاخه‌ها در مراحل بعدی رشد نکروزه شده و از بین رفتند (جدول ۳). اعمال تیمار سترون‌سازی کلرید جیوه ۰/۱ درصد در مدت زمان ۱ دقیقه در فصل زمستان برای ریزنمونه‌های گرفته شده از

Archive of SID

www.SID.ir

ریشه جوش‌های پایه مادری با توجه به بالاترین درصد زنده‌مانی (۷۲/۹۷ درصد) نیز به‌عنوان بهترین تیمار سترون‌سازی انتخاب گردید (جدول ٤).

در مورد اثر متقابل بین تیمار هورمون اکسین و هورمون سیتوکینین بر شاخه‌زایی در محیط کشت DKW هیچ تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نگردید. البته نتایج آنالیز واریانس مشخص نمود که در صفت رشد طولی شاخه اختلاف بین تیمارها معنی‌دار است. تیمار هورمونی 2ip (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و همچنین در محیط کشت حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین وضعیت رشد طولی شاخه را نشان داد. تیمارهای هورمونی مختلف بر ضریب ازدیاد شاخه دارای اثر معنی‌دار بوده، بگونه‌ای که بهترین وضعیت با استفاده از ترکیب هورمونی 2ip (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و تیمار 2ip (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BA (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) در محیط حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip در هر دو مورد از کمترین میزان ضریب ازدیاد شاخه برخوردار شد. به‌طوری‌که میان تیمارها در بررسی صفت میزان سبزینگی در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. بالاترین میزان سبزینگی در تیمار هورمونی 2ip (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) در هر دو تیمار متفاوت اکسین ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد. حداقل میانگین در تیمار هورمونی 2ip (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) +BA (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) حاوی اکسین ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و تیمار هورمونی 2ip (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده گردید (شکل ۲ و جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه میانگین‌های تیمارهای متفاوت بر خصوصیات کمی شاخه‌زایی براساس مقایسه چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪

صفات	میانگین سبزینگی		میانگین رشد طولی شاخه		میانگین ضریب ازدیاد شاخه	
تیمار اکسین / تیمار سیتوکینین	IBA (میلی‌گرم در لیتر)					
	۰/۰۱	۰/۱	۰/۰۱	۰/۱	۰/۰۱	۰/۱
T3	۳/۸۵ ab	۳/٦۸ ab	۱/۰۵ b	۱/۰۱ c	۱/۵۲ c	۱/۹۹ C
T1	۳/۷۸ ab	۳/٦۹ ab	۲/۹۳ ab	۲/۷۲ b	۵/۵۲ ab	٦/٤۸ ab
T4	۳/۸۸ a	۳/۸۳ a	٤/۵٤ a	۲/٦۸ b	۷/٤۵ a	٦/٤۱ ab
T5	۳/۷۹ ab	۳/۵۱ b	۱/۹۹ b	۲/۳۹ b	٤/٦۲ b	٤/۹۷ b
T2	۳/۷۰ b	۳/٦۵ ab	۱/۸۰b	۳/۳۸ ab	٤/۰۷ b	٦/۹۷ a
T8	۳/۹٤ a	۳/۸۸ a	٤/٦۲ a	٤/۲۰ a	۷/۱۰ a	۸/۱۲ a

اختلاف میان میانگین‌های دارای حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱- مرحله استقرار ریزنمونه

شکل ۲- ازدیاد شاخه در محیط بهینه شاخه‌زایی

بررسی میانگین‌ها نشان داد که تیمارها در صفت رشد طولی ریشه اصلی دارای تفاوت معنی‌دار بودند و در این میان تیمار ریشه‌زایی NAA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از بالاترین میزان رشد طولی برخوردار شد. همچنین میان تیمارهای اکسین اعمال شده و تعداد ریزنمونه های ریشه‌دار شده رابطه آماری معنی‌داری مشاهده شد. به‌نحوی‌که بیشترین تعداد ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده در تیمار ریشه‌زایی NAA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر دیده شد (شکل ۳ و جدول ٦).

جدول ٦- مقایسه میانگین‌های تیمارهای متفاوت بر خصوصیات کمی ریشه‌زایی براساس مقایسه چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪

صفات / تیمار اکسین (mgl^{-1})	میانگین رشد طولی ریشه اصلی	میانگین تعداد ریشه اصلی	میانگین تعداد ریزنمونه ریشه‌دارشده
NAA (۰/۵)	۹/۰۰ a	۱/٦٦ a	۰/۸۷ a
IBA (۰/۵)	۱/٦۸ c	۰/۷۵ c	۰/۵۰ b
NAA (۰/۵) + **IBA** (۰/۵)	۲/۷۹ b	۱/۵۸ b	۰/٤۳ c

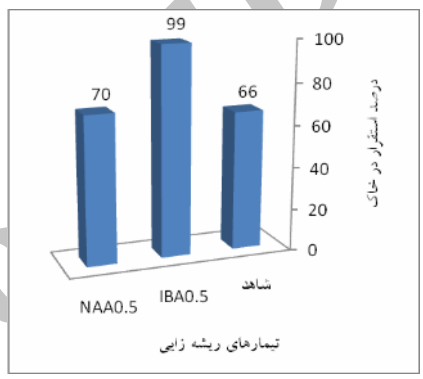
اختلاف میان میانگین‌های دارای حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

Archive of SID

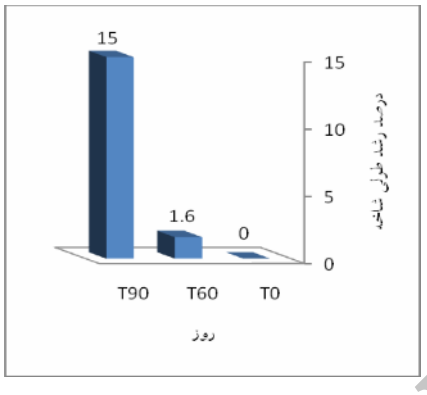
www.SID.ir

شکل ۳- ریشه‌زایی گیاه در درون شیشه

مرحله سازگاری با استفاده از مجموعه خاک پرلایت، پیت و ورمیکولایت صورت گرفت که میزان موفقیت آن در مورد گیاهان ریشه‌دار شده تحت تأثیر تیمار هورمونی IBA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۹۹٪ و در مورد تیمار هورمونی NAA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۷۰٪ است (شکل ٤). لازم به ذکر است که این گونه کند رشد، در فضای آزاد رشد بیشتری نسبت به شرایط کنترل شده گلخانه از خود نشان داد (شکل‌های ۵، ٦و۷).



شکل ٤- اثر اکسین بر درصد استقرار در مرحله سازگاری گیاهچه‌ها



شکل ۵- درصد رشد طولی در مرحله سازگاری گیاهچه‌های *C. caucasica* Willd

شکل ٦- مرحله سازگاری در گلخانه

شکل ۷- مقایسه رشد طولی در شرایط گلخانه و محیط

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

در مرحله پیش سترون‌سازی، برس‌کشی سطح جوانه‌ها با مایع ظرفشویی و الکل ۷۰ درصد در حذف کرک‌ها و ترشحات صمغی سطح جوانه‌ها مؤثر بوده و امکان وجود آلودگی‌های سطحی را به حداقل خود می‌رساند (Shahrzad & Emam., 2000). استفاده از محلول الکلی ۷۰ درصد موجب حذف لایه مومی سطح کوتیکول شده و موجب می‌گردد تا محلول سترون‌سازی کننده اصلی قدرت نفوذ و تأثیر بهتری بر بافت‌ها بگذارد (Enjarlic, 1988). محلول کلریدجیوه ۰/۱ درصد از سمی‌ترین محلول‌های سترون‌سازی است که باید در زمان کوتاه با غلظت پایین استفاده شود تا از انهدام بافت‌ها توسط آن جلوگیری شود. مناسب‌ترین مدت زمان استفاده از آن با توجه به نوع گونه و فصل برداشت نمونه متفاوت است.

کاربرد محلول کلریدجیوه به‌عنوان سترون‌ساز اصلی به این دلیل است که مقادیر ضعیف آن در تیمارهای کوتاه مدت، تأثیر قوی و ماندگار بر حذف آلودگی‌های میکروبی داشته و باعث مرگ و قهوه‌ای شدن نمونه‌ها نمی‌شود (Emam, 2007).

در مورد اثر ژنوتیپ بر میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در تیمارهای سترون‌سازی مشابه، پایه ریشه‌جوش درخت مادری البرز مرکزی بالاترین درصد استقرار را نشان داد. علت این امر را می‌توان ناشی از جوان‌تر بودن پایه ریشه‌جوش نسبت به پایه بالغ دانست. در سال ۲۰۰۷، Emam برای سترون‌سازی جوانه‌های *U. carpinifolia* در فصل زمستان، تیمار سترون‌سازی کلریدجیوه ۰/۱ درصد در مدت زمان ۲ تا۱۲ دقیقه در فصل بهار، و استفاده از این تیمار را در مدت زمان ۲ دقیقه مناسب دانسته است. برای پرآوری شاخه *U. campestries*، *U. glabra* و *U. pau*، Chalupa (1987) ثابت کرد که حضور غلظت پایین IBA به همراه سیتوکینین BAP در رشد و تکثیر جوانه‌های جانبی مفید است. بر این اساس در تحقیق حاضر از ترکیب این دو هورمون برای رشد و تکثیر استفاده شد و نتایج مطلوبی بدست آمد. مشاهدات نشان داد که شروع شاخه‌زایی در گونه *C. caucasica* کند و آهسته است، یکی از دلایل آن می‌تواند به دلیل کند رشد بودن خود گونه و یا سطوح هورمونی به کار رفته باشد. بهترین تیمار شاخه‌زایی اعمال شده بر گونه *C. caucasica* در محیط کشت DKW حاوی تیمار تلفیقی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد. هورمون BAP از قویترین مواد محرک رشد و تکثیر شاخه بوده و تأثیر ماندگاری بر ریزنمونه‌ها دارد. رشد چندشاخه‌ای گیاهان در غلظت‌های بالای BAP در محیط کشت به دست می‌آید که این مورد به دلیل ذخیره شدن این هورمون در جوانه‌های جانبی گیاه است (Evers *et al.*, 1988). در سال ۲۰۰۳، Izadpanah شاخه‌زایی *U. glabra* و Emam و همکاران (۲۰۰۷)، شاخه‌زایی گونه *U. carpinifolia* را در محیط کشت مشابه با تحقیق اخیر به‌دست آوردند.

ریشه‌زایی گیاه به طور معمول در مجاورت هورمون اکسین برانگیخته می‌شود. براساس نظر Chalupa (1987) مؤثرترین هورمون‌های اکسین بر ریشه‌زایی IBA و NAA و یا ترکیبی از این دو هورمون است. غلظت مناسب هورمون وابسته به گونه مورد نظر است. بر این اساس، در این تحقیق از این هورمون‌ها به صورت مجزا و همچنین تلفیقی استفاده شد. القاء تشکیل ریشه بوسیله اکسین به تجمع فلاوونوییدها منجر شده که این اتفاق در محیط کشت حاوی سیتوکینین صورت نمی‌گیرد. یک ماه قبل از تیمار اکسین برای القاء ریشه باید شاخه‌ها در محیط بدون هورمون کشت شوند

Archive of SID

www.SID.ir

(Emam, *et al.*, 2007).بنابراین قبل از اعمال تیمار ریشه‌زایی، شاخه‌ها در این محیط قرار داده شدند. با انجام تحقیقی دیگر توسط Curir و همکاران (۱۹۹۰) نیز تأثیر فلاوونوییدها اثبات شد. بالاترین میزان ریشه‌زایی در اعمال تیمار هورمون اکسین IBA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. به‌طوری‌که در محیط کشت بدون هورمون یا حاوی هورمون ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، Cheng و Shi (۱۹۹۵) موفق به ریشه‌دار کردن ملج شدند، که مشابه نتایج حاصل از ریشه‌زایی *C. caucasica* در محیط کشت بدون هورمون است. **در تحقیقی** Azuma و همکاران (۱۹۹۲) در گونه *Celtis sinensis* در عرض ٤ هفته در تاریکی با ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP ٦٧ درصد ریشه‌زایی از کالوس را به‌دست آوردند.

بنابراین، تحقیق اخیر با حفظ و تکثیر پایه‌های برتر گونه از طریق ریزازدیادی، مسیری را برای تولید انبوه گیاه گشود که این مسئله خود برای جنگلکاری در مناطق خشک و انجام مطالعات بعدی حائز اهمیت است.

سپاسگزاری

شایسته است مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاران گروه زیست‌فناوری مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور که در اجرای این تحقیق شرایط مناسب را فراهم نمودند، ابراز دارم.

منابع مورد استفاده

– Azuma, J., Ohmya. I., Tokimatsu Y.T. and Okamura, K. 1992. Induction of callus from Japanese Hackberry (*Celtis sinensis* Pers. var. *Japonica* Nakai) and its root organogenesis. Kyoto Univ. Forests (Bulletin of Universities and Institutes), 64: 203-208.
– Biroscikova, M. and Spisakova, K., 2004. Micropropagation of mature Wych elm (*Ulmus glabra*). Plant Cell Reports, 22: 640-644.
– Chalupa, V., 1987. European Hardwood. In: J M Bonga and D J Durzan (eds) Cell and Tissue Culture in Forestry, vol 3: Gymnosperms, Angiosperms, Palms, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 224-246.
– Cheng., Z.M. and Shi, N.Q.,1995. Micropropagation of mature *Siberian elm* in two steps cell. Tissue and Organ Culture, 41: 534-536.
– Curir, P., Sumerect, V. and Termini, A., 1990. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious root formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. Plant Physiol., 92: 1148-1153.
– Emam, M., 2007. Study of asexual propagation of *Ulmus carpinifoila* by using tissue culture. Research Institute of Forests and Rangelands, Research project final report, Tehran, Iran.
– Emam, M., Shahrzad, Sh. and Naraghi,T. S., 2007. *In vitro* propagation of *Ulmus carpinifolia* by bud culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research,15:296-304.
– Enjarlic, F. and Lardet, L., 1988. Contamination of primary culture in tropical areas. Acta Hort. 225: 57-65.
– Evers , P. W. , Donkers J , Prat A , and Vermeer E., 1988. Micropropagation of forest trees through tissue culture. Centre for agricultural publishing and documentation (pudoc), Wageningen. In: *In vitro* culture of trees, 1992, J.M.Bonga & Aderkas P.pp: 98.
– Gamble. J.S., 1972. A Manual of Indian Timbers. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, India.
– Huxley. A., 1992 The New RHS Dictionary of Gardening. MacMillan Press 1992 ISBN 0-333-47494-5.
– Ito , R. and Kondo, T., 1995. Tissue culture of axillary buds and seedlings of *Zelkova serrata*, Bulletin of national forest tree breeding center, No. 13:27-32.
– Izadpanah, M., 2003. Micropropagation of *Ulmus glabra* by *In vitro* culture. Pajoohesh va Sazandegi, 16: 66-74
– Jazirehi, M.H., 2001. Afforesting in arid environment. Tehran University, Publication, Tehran, 452 p.
– Mezzetti, B., Minotta, G., Navacchi, O. and Rosati, P., 2007. *In vitro* propagation of *Ulmus carpinifolia*. Acta Hort. 227: 396-398.
– Mozaffarian, V., 1998. A dictionary of Iranian plant names . Farhang Moaser Publication, Tehran, 751 p.
– Mozaffarian,V., 2005. Trees and Shrubs of Iran. Farhang Moaser Publication, Tehran, 990 p.
– Sabeti, H., 1994. Forests, Trees and Shrubs of Iran. Yazd University Publication, Yazd, 876 p.
– Shahrzad, Sh. and Emam, M., 2000. Micropropagation of *Populus euphratica* by using tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 2:11-24.

Archive of SID
www.SID.ir

Effects of different concentrations of plant regulators on *In vitro* micropropagation of *Celtis caucasica* Willd.

F. Dadvar[*1] ,T. Rostami Shahraji[2], M. H. Assare[3], M. Emam[4] and A. Shirvany[5]

1*- Corresponding author, M.Sc.,Guilan University, Guilan, I.R. Iran. E-mail: fdadvar@gmail.com
2- Assist., Prof. Guilan University, Guilan, I.R. Iran
3- Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran.
4- M.Sc, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran
5- Assist., Prof. Tehran University, Karaj, I.R. Iran.

Received: 09.12.2010 Accepted: 10.16.2011

Abstract

Celtis caucasica Willd is one of the native Iranian hard wood trees. The tree is resistant to drought and Dutch elm disease. Therefore, preserving and propagation of elite trees is so important for forest reclamation in semi arid zones. *In vitro* micropropagation of *C. caucasica* through bud culture was performed. The best sterilization treatment for shooting was 0.1% $HgCl_2$ solution for 1 min in explants obtained during winter and 5 to 7 min for adult tree obtained during autumn season. DKW medium containing 0.5 mgl^{-1} BAP, 0.5 mgl^{-1} 2ip was suitable for shoot establishment and multiplication. Plantlets were placed in hormone free medium for two weeks then transferred to main rooting treatments. The best root length growth observed in DKW medium with 0.5 mgl^{-1}NAA. Finally, root treatment of 0.5 mgl^{-1}NAA showed the highest percentage of vitality (99%) in acclimation step in greenhouse.

Key words: *Celtis caucasica* Willd, plant growth regulator, Micropropagation, meristem.

Archive of SID

www.SID.ir