Archive of SID

بررسی مقایسه‌ای ریزازدیادی به شیوه شبه فتواتوتروفیک و فتواتوتروفیک گیاه تیس (*Sorbus aucoparia* L.)

میترا امام*، عباس قمری‌زارع، لیلا میرجانی و آناهیتا شریعت

تهران، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۶

چکیده

گیاه تیس (*Sorbus aucoparia*) از گونه‌های مهم جنس Sorbus در خانواده Rosaceae است. اهمیت این گونه بیشتر به‌منظور تجدید حیات جنگل در مناطق کوهستانی و ارزش دارویی و صنعتی میوه و چوب آن است. با توجه به رو به انقراض بودن پایه‌های تیس در جنگل‌های شمال ایران، تکثیر غیرجنسی پایه‌های مسن از طریق کشت جوانه می‌تواند به تکثیر و حفاظت پایه‌های این گونه کمک کند. در این مطالعه، تکثیر گونه تیس با روش فتواتوتروفیک (تغذیه مصنوعی CO_2) و شبه یا نیمه فتواتوتروفیک (استفاده از CO_2 موجود در فضای اطراف ظروف در اتاقک رشد) انجام شد. به این منظور، شاخه‌های گیاهک‌های جوان حاصل از ریزازدیادی پایه بالغ گونه تیس، به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. ریزنمونه‌ها، در ظروف مگنتای با محیط کشت DKW دارا و فاقد سوکروز به همراه آگار یا ورمیکولیت قرار گرفتند. میزان تبادل گازی ظروف کشت با فضای بیرون و درون در دو شرایط فتواتوتروفیک و شبه‌فتواتوتروفیک بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های رشدی طول شاخه، تعداد شاخه و جوانه، سطح پهنک برگ، تعداد برگ، میزان کلروفیل کل، وزن خشک، ریشه‌زایی و سبزینگی گیاه نشان داد که در شرایط فتواتوتروفیک این شاخص‌ها نسبت به شرایط شبه‌فتواتوتروفیک دارای تفاوت معنی‌دار بوده است. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که استفاده از روش فتواتوتروفیک روشی کاربردی برای تکثیر غیرجنسی و انبوه این گونه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تیس، تکثیر غیرجنسی، میزان کلروفیل، ریشه‌زایی، فتواتوتروفیک.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۵ -۴۴۷۸۷۲۸۲-۰۲۱ ، پست الکترونیکی: mitraemam@yahoo.com

مقدمه

گونه تیس (*Sorbus aucoparia*) از گونه‌های نادر و رو به زوال در جنگلهای شمال ایران بوده و با توجه به اهمیت چوب آن در صنایع مختلف، مورد توجه قرار گرفته و قطع بی‌رویه بسیاری از پایه‌های مطلوب این گونه موجب از بین رفتن ذخیره ژنتیکی آن در کشور شده است. مشکلاتی که تکثیر گیاه از طریق سایر روش‌های غیرجنسی نظیر قلمه و پیوند دارد و نیز این مسئله که تکثیر از طریق بذر گیاه نیز منجر به تفرق صفات ژنتیکی آن می‌شود، منجر به رویکرد محققان به تکثیر این گیاه از طریق روش‌های مختلف کشت بافت (نظیر کشت جوانه، گره و میانگره) شده است. روش جدید ریزازدیادی فتواتوتروفیک عبارت است از: تکثیر درون شیشه‌ای گیاه در شرایط افزایش غلظت CO_2، شدت‌های بالای نور و محیط کشت فاقد سوکروز (۲). تفاوت روش فتواتوتروف و روش معمول (نیمه فتواتوتروف) در میزان غلظت CO_2 قابل دسترس گیاه بوده، به گونه‌ای‌که در روش اول این میزان تقریبا در حد اشباع می‌باشد.

شرایط فتواتوتروفیک نسبت به شرایط ریزازدیادی به روش معمول دارای مزایای بسیاری است، ازجمله: به دلیل بالابردن غلظت CO_2 در محیط، افزایش رشد همزمان با افزایش عمل فتوسنتز در گیاه صورت می‌گیرد، نیاز به

www.SID.ir

Archive of SID

افزودن تنظیم‌کننده‌های رشد و سایر مواد آلی در محیط کشت به علت تولید درونی این مواد در گیاهکها نمی‌باشد، میزان زنده‌مانی گیاهک‌ها به علت تسریع در ایجاد شرایط اتوتروف افزایش یافته، انجام فتوسنتز به علت عدم استفاده از سوکروز و وجود CO_2 اشباع در محیط صورت گرفته و تولید شاخه و ریشه به طور همزمان انجام می‌گیرد. از طرفی دلایل متعددی در مورد تلفات گیاهان تولید شده در مراحل مختلف کشت بافت به روش معمول توسط محققان گزارش شده است (۱۰). از دست رفتن ۲۰ تا ۵۰٪ گیاهان به دلیل عدم تحمل تنش‌های محیطی بعد از انتقال به خاک، پایین بودن میزان فتوسنتز به دلیل کاهش فعالیت روبیسکو و متابولیسم ناقص، تعرق شدید از لایه‌های نازک کوتیکول، فعالیت غیرطبیعی روزنه‌ها و ریشه‌زایی ناقص و غیرطبیعی به واسطه تحریک آن توسط اکسین‌ها ازجمله موارد ذکر شده در این گزارش است. شرایط بهینه گازی و ترکیب غذایی، برای تکثیر برخی گونه‌های اکالیپتوس در شرایط فتواتوتروفیک گزارش شد (۴). با مقایسه بسترهای مختلفی از ورمیکولیت، paper pulp و آگار در شرایط فتواتوتروفیک بر روی گیاه *Ipomoea batatas* مشخص گردید که در مخلوط ورمیکولیت و (۳۰٪) paper pulp، طویل‌ترین رشد حاصل شده است (۵).

در تحقیق حاضر امکان تکثیر گونه تیس در شرایط فتواتوتروفیک و شبه‌فتواتوتروفیک با وجود فیلتر تبادل هوا و تغذیه مستقیم و غیرمستقیم CO_2 برای اولین بار بررسی شد. دستیابی به روشی کاربردی برای تکثیر انبوه غیرجنسی این گونه در عین بهینه سازی شرایط کشت درون‌شیشه‌ای از دیگر اهداف این پژوهش است.

مواد و روشها

ریزنمونه‌های جوانه از پایه بالغ تیس مربوط به منطقه سنگده مازندران (ارتفاع ۱۷۰۰ متر بالاتر از سطح دریا) برداشت و پس از استریل در محلول ۰/۱ درصد کلریدجیوه برای زمان ۴ دقیقه، در محیط کشت DKW با هورمون‌های BA، TDZ و IBA در غلظت‌های به ترتیب ۰/۵ ، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر برای انجام مرحله شاخه‌زایی و تکثیر برده شد (۱) و بعد گیاهان کشت بافتی حاصل برای انجام تحقیق حاضر به‌کار گرفته شدند. از شاخه‌های درون شیشه‌ای تیس با طول متوسط ۲±۱۵ میلی‌متر به عنوان ریزنمونه استفاده شد. برای کشت از ظروف کشت پلاستیکی ویژه‌ای به نام Magenta (G7) با حجم ۳۴۰ میلی‌لیتر و برای بررسی اثر فیلتر بر روی ظروف کشت از فیلترهای غشایی با جنس پلی‌پروپیلن به قطر mm ۸ و با قطر منافذ ۰/۰۲ میکرومتر استفاده گردید.

در ریزازدیادی شبه فتواتوتروفیک با استفاده از CO_2 موجود در اتمسفر و بکارگیری محیط DKW دارای NAA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به بررسی اثر CO_2 بر روند رشد گیاهک‌های کشت بافتی پرداخته شد. در حالیکه در ریزازدیادی فتواتوتروفیک از CO_2 غنی شده برای تکثیر گیاه در شرایط درون شیشه‌ای استفاده گردید. در روش شبه فتواتوتروف غلظت CO_2 در اتاق رشد (قسمت در میلیون) ppm۱۰۰±۳۰۰ و در روش فتواتوتروف (قسمت در میلیون) ppm ۱۰۰±۳۰۰۰ بود. شدت روشنایی در شرایط فتواتوتروف ۵۰۰±۵۲۵۰ لوکس و در شرایط شبه اتوتروف ۳۰۰۰ لوکس با شرایط یکسان دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد در روز و ۲ ±۱۹ درجه سانتی‌گراد در شب با رطوبت نسبی ۵±۵۵ درصد و فتوپریود ۱۶ ساعت نور روزانه بوده است.

در هر دو روش سه نوع محیط کشت DKW ۱) فاقد سوکروز دارای اگار (جامد) و ۲) دارای سوکروز و ورمیکولیت و ۳) فاقد سوکروز و واجد ورمیکولیت به کار گرفته شد. پس از توزین ورمیکولیت به مقدار مورد نیاز که درون ظروف مگنتا ریخته شد، ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت مورد نظر به آن افزوده و درب ظروف بسته شد. هر تیمار در ۳ تکرار و هر تکرار با ۵ ریزنمونه به طول ۱/۵ سانتی‌متر و به مدت ۶ هفته در اتاق رشد نگهداری و مورد

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی قرار گرفت. در پایان یک ماه پارامترهای تعداد و طول شاخه، تعداد جوانه، تعداد برگ، اندازه سطح پهنک برگ و میزان کلروفیل کل مورد بررسی قرار گرفت و پس از ۶ هفته، طول گیاهچه، تعداد شاخه و جوانه، تعداد برگ، وزن تر و خشک، سطح برگ، میزان کلروفیل، درصد ریشه‌زایی، میانگین طول ریشه و سبزینگی شاخه‌ها اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن خشک، پس از توزین گیاهچه، نمونه‌ها در فویل آلومینیمی با وزن مشخص، پیچیده و به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ۴۸ ساعت نمونه توزین و تفاضل آن از وزن اولیه، وزن خشک نمونه بود. محاسبه سطح برگ با استفاده از دستگاه Leaf area meter انجام شد. اندازه‌گیری میزان کلروفیل کل سطح رویی و زیری پهنک برگ گیاهان با استفاده از دستگاه Chlorophyll content مدل EL-01 و با سه تکرار انجام گردید. درصد ریشه‌زایی (تعداد نمونه ریشه‌دارشده تکرارهای هر تیمار نسبت به تعداد کل نمونه‌های آن تیمار)، میانگین طول ریشه (میانگین طول ریشه تکرارهای هر تیمار نسبت به تعداد کل نمونه‌های آن تیمار) و میزان سبزینگی شاخه نیز در تیمارهای کشت بدست آمد. برای تعیین میزان سبزینگی پهنک برگهای ریزنمونه‌ها، تبدیل صفات کیفی به کمی انجام شد، به‌طوری‌که از اعداد صفر تا ۴ برای تفکیک رنگ برگها استفاده شد (عدد صفر برای رنگ زرد و عدد چهار برای سبز پررنگ) و بعد میانگین سبزینگی نمونه‌های تکرارهای هر تیمار نسبت به تعداد کل نمونه‌های آن تیمار بدست آمد. بررسی‌های آماری در دو مرحله مجزا (فتواتوتروفیک و شبه فتواتوتروفیک) و هر یک در آزمون فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی و با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS (version 16.1) انجام شد و مقایسه و دسته‌بندی میانگین‌ها به روش دانکن در سطح ۱٪ انجام گردید. نمونه‌های ریشه‌دار به خاک مخلوط پیت/ پرلیت/ ورمیکولیت استریل (به نسبت ۴،۱،۴) در گلدان‌های سرپوش‌دار انتقال یافته و با انجام سازگاری تدریجی گیاهان با شرایط محیط (افزایش منافذ و کاهش رطوبت زیر سرپوش تا برداشت کامل آن) آنها به گلدان‌های بزرگ دارای خاک برگ و خاک زراعی (به نسبت ۱ : ۱) در گلخانه منتقل شدند (۱).

نتایج

بر اساس نتایج حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های طول و تعداد شاخه، تعداد جوانه، سطح و تعداد برگ، وزن خشک و میزان کلروفیل در هر دو روش تفاوت بین این شاخص‌ها در شرایط فتواتوتروفیک نسبت به شرایط شبه‌فتواتوتروفیک معنی‌دار بود، ولی از نظر شاخص وزن تر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱ و ۳). این مقادیر برای شرایط فتواتوتروفیک بالاتر از شبه‌فتواتوتروفیک و نیز از نظر صفات طول شاخه، تعداد و سطح برگ، تفاوتها در سطح ۱٪ معنی‌دار و در تیمار محیط ورمیکولیت بدون سوکروز بالاتر از سایر تیمارها بود. در مورد مقادیر مربوط به صفات تعداد شاخه و جوانه در تیمار محیط کشت جامد بدون سوکروز و برای شرایط فتواتوتروف این نتایج مناسب‌تر از سایر تیمارهای اعمال شده بود (جدول های ۱ و ۲). مقادیر مربوط به صفات وزن خشک و میزان کلروفیل در شرایط فتواتوتروف بالاتر از شرایط شبه اتوتروف و این میانگین‌ها برای صفت وزن خشک در محیط بدون سوکروز با ورمیکولیت و در مورد میزان کلروفیل در محیط دارای سوکروز و ورمیکولیت بالاتر از سایر تیمارهای کشت بود (جدول ۴). از نظر میزان ریشه‌زایی و سبزینگی شاخه نیز گیاهان در تیمار محیط کشت بدون سوکروز با ورمیکولیت و شرایط اتوتروف، با تفاوت معنی‌دار در وضعیت مطلوبتری نسبت به سایر تیمارهای کشت قرار داشت (جدول ۵، شکل۱). گیاهان حاصل از هر دو دسته تیمار اتوتروف به خاک گلدان منتقل و در شرایط گلخانه‌ای قرار گرفتند. از نظر میزان سازگاری، گیاهان رشد یافته در شرایط فتو و شبه فتوتروف پس از انتقال به خاک گلدان و در شرایط گلخانه‌ای به ترتیب

www.SID.ir

Archive of SID

حدود ۹۰ و ۸۵ درصد سازگاری از خود نشان دادند (شکل ۲).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات شاخه‌زایی، جوانه‌زنی، رشد طولی و سطح برگ ریزنمونه‌های *Sorbus aucoparia* در شرایط فتواتوتروفیک و شبه‌فتواتوتروفیک

منبع	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		شاخه‌زایی	جوانه‌زایی	رشد طولی شاخه	سطح برگ
شرایط رشد	۵	۰/۱۳۷$^{\times}$	۱۱/۴۰$^{\times\times}$	۱/۴۳$^{\times\times}$	۱۱۹۶۷$^{\times\times}$
تکرار	۲	۰/۰۸۷ ^{ns}	۳/۲۴$^{\times}$	۰/۲۰^{ns}	۳۲/۸۸ ^{ns}
خطا	۱۰	۰/۰ ۶	۰/۶۵	۰/۱	۱۰/۶۸

* و **: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪ و ns: بدون معنی‌داری

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های تعداد شاخه، طول شاخه (cm)، تعداد جوانه و سطح برگ (cm^2) در ریزنمونه‌های *Sorbus aucoparia* در شرایط فتواتوتروفیک و شبه‌فتواتوتروفیک

شرایط رشد	محیط کشت	تعداد شاخه	طول شاخه (cm)	تعداد جوانه	سطح برگ (mm^2)
فتواتوتروفیک	جامد بدون سوکروز	۱/۵a	۲/۰۸ a	۷/۳۶ a	۲/۱۶a
	ورمیکولیت بدون سوکروز	۱/۰۶ b	۲/۳ a	۶/۱۳ a	۲/۱۸a
	ورمیکولیت و سوکروز	۱b	۱/۲ b	۴/۰۶ b	۱/۸۳b
شبه‌فتواتوتروفیک	ورمیکولیت و سوکروز	۱b	۱/۲۴ b	۳/۳ bc	۰/۶۸d
	ورمیکولیت بدون سوکروز	۱ b	۰/۴C	۱/۹۶c	۱/۰۸c
	جامد بدون سوکروز	۱b	۱/۱۶ b	۴/۰۶ b	۱/۱۲C

میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس صفات تعداد برگ، وزن تر (*g*)، وزن خشک (*g*) و میزان کلروفیل (میکروگرم در هر *g* بافت) در ریزنمونه‌های *Sorbus aucoparia* در شرایط فتواتوتروفیک و شبه‌فتواتوتروفیک

منبع	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		تعداد برگ	وزن تر گیاه	وزن خشک	میزان کلروفیل
شرایط رشد	۵	۱/۲۸$^{\times}$	۰/۰۰۷ ^{ns}	۰/۰$^{\times}$	۱۷۴۳۵۱/۲$^{\times}$
تکرار	۲	۳/۳۸$^{\times}$	۰/۰ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۴۴۸۷۰/ ۲^{ns}
خطا	۱۰	۰/۵۸	۰/۰	۰/۰۰۷	۴۴۴۲۸/۹

* و **: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪ و: ns بدون معنی‌داری

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های تعداد برگ، وزن تر (*g*)، وزن خشک (*g*) و میزان کلروفیل (میکروگرم در هر *g* بافت) در ریزنمونه‌های *Sorbus aucoparia* در شرایط فتو و شبه‌فتواتوتروفیک

شرایط رشد	محیط کشت	تعداد برگ	وزن تر گیاه	وزن خشک	میزان کلروفیل
فتواتوتروفیک	جامد بدون سوکروز	۷a	/۴۲ a	۰/۱۲ a	۱۹a
	ورمیکولیت بدون سوکروز	۷ ab	۰/۳۹ a	۰/۱۲ a	۲۰ a
	ورمیکولیت و سوکروز	۶ab	۰/۴ a	۰/۱ ab	۲۳/۳a

www.SID.ir

Archive of SID

شبه‌فتواتوتروفیک	ورمیکولیت و سوکروز	۶ab	۰/۴۳ a	۰/۱ ab	۶/۰۶b
	ورمیکولیت بدون سوکروز	۵/۳ b	۰/۵ a	۰/۰۹ ab	۱۴ a
	جامد بدون سوکروز	۶ab	۰/۵ a	۰/۱ b	۱۵/۴۳a

میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۵- درصد ریشه‌زایی، طول ریشه و سبزینگی شاخه در ریزنمونه‌های *Sorbus aucoparia* در شرایط فتو و شبه‌فتواتوتروفیک

شرایط رشد	محیط کشت	درصد ریشه‌زایی	میانگین طول ریشه (cm)	درصد سبزینگی شاخه
فتواتوتروفیک	جامد بدون سوکروز	۸۰b	۲/۵ b	۱۰۰a
	ورمیکولیت بدون سوکروز	۱۰۰a	۳/۱۶ a	۱۰۰a
	ورمیکولیت و سوکروز	۶۰c	۱/۵۶c	۹۰a
شبه‌فتواتوتروفیک	ورمیکولیت و سوکروز	۳۰d	۰/۵de	۶۸b
	ورمیکولیت بدون سوکروز	۳۰d	۰/۶d	۴۰c
	جامد بدون سوکروز	۱۰e	۰/۱e	۸۵a

شکل۱- گیاهان رشد یافته در ظروف فیلتردار در شرایط فتواتوتروفیک (سمت چپ) و شبه‌فتواتوتروفیک (سمت راست)

شکل ۲- گیاهان رشد یافته در شرایط فتواتوتروفیک (سمت راست) و شبه‌فتواتوتروفیک (سمت چپ) انتقالی به گلدان

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

بر اساس نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های رشدی (طول شاخه، وزن خشک، تعداد و سطح برگ، میزان کلروفیل و تعداد شاخه و جوانه) گیاهچه‌های حاصل در شرایط فتواتوتروفیک نسبت به شبه فتواتوتروفیک برتری داشتند. نتایج حاضر با نتایج Genoud-gourichon و همکاران (۱۹۹۶) همخوانی دارد (۸). آنان در مورد وزن تر و سطح برگ Rose هیبرید (*Rosa hybrida*) در شرایط فتواتوتروفیک با شرایط شبه فتواتوتروفیک تفاوت معنی‌داری را شاهد بودند. به گزارش Kirdmanee و همکاران (۱۹۹۵) نیز در وزن خشک *Eucalyptus. cammaldulensis* در شرایط فتواتوتروفیک و شبه فتواتوتروفیک تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (۱۱).

در این بررسی علاوه بر آن که شاخص‌های رشد در شرایط فتوتروف نسبت به شبه فتوتروف افزایش معنی‌دار داشته، بلکه نمونه‌ها پس از انتقال به شرایط *ex vitro* نیز رشد مناسب‌تری از خود نشان دادند. مشابه این بررسی، Assareh و همکاران (۱۹۹۸) در طی تحقیقی ریزازدیادی *Eucalyptus. microtheca* را در شرایط فتواتوتروفیک، شبه فتواتوتروفیک و هتروتروفیک مورد مقایسه قرار داده و نتیجه گرفتند که کلیه پارامترهای رشد در شرایط فتواتوتروفیک افزایش معنی‌داری نشان داد (۴). همچنین Couceiro و همکاران (۲۰۰۶) ریزازدیادی *Hypericum perforatum* L.را در شرایط فتواتوتروفیک و فتومیکسواتوتروفیک مقایسه و نتیجه گرفتند که گیاهان تولید شده در شرایط فتواتوتروفیک رشد و کیفیت بالایی داشته و بعد از انتقال به شرایط *ex vitro*، رشد سریعتری از خود نشان دادند (۵). در بین تیمارهای محیط کشت مورد بررسی در تحقیق اخیر، شاخه‌زایی مناسب گیاهان کشت یافتی در تیمار محیط کشت فاقد سوکروز و غنی از CO_2 بدست آمد. Teixeira و همکاران (۲۰۰۶) نیز بهترین رشد گیاهچه‌های *Spathiphyllum schott* را در محیط کشت مایع فاقد سوکروز تحت شرایط CO_2 غنی‌شده را داشتند که با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه همسو بود (۱۴). وجود قند در محیط کشت مانع از رشد گیاهچه‌ها شده و توسعه فتوتروفیک را محدود می‌کند. از طرفی به نظر می‌رسد کاهش حجم ماده خشک گیاهان در محیط کشت حاوی سوکروز نیز به دلیل بازدارندگی فتوسنتز توسط قند محیط می‌باشد (۹). در این تحقیق، با توجه به آنکه گیاهان رشد یافته در تیمار محیط کشت بدون سوکروز و با ورمیکولیت در شرایط فتواتوتروف، ریشه‌زایی مناسب با سبزینگی شاخه مطلوب داشتند، در نتیجه درصد استقرار این گیاهان در خاک و سازگاری آنها نیز نسبت به شرایط گلخانه‌ای بالا بود.

مشابه این تحقیق Kirdmanee و همکاران (a ۱۹۹۵) نیز درصد بالای رشد و زنده‌مانی گیاهچه‌های اکالیپتوس را در محیط حاوی ورمیکولیت با CO_2 غنی‌شده بدست آوردند(۱۰). علت این است که در ظروف کشت، گیاهان در معرض رطوبت بالا، نور کم و تبادلات گازی اندک قرار دارند. کاهش میزان CO_2 و حضور قند باعث کاهش توان فتوسنتزی گیاهچه‌ها شده و از طرفی تجمع گاز اتیلن در ظروف دربسته نیز تأثیر منفی بر رشد گیاهچه‌ها داشته و عملکرد نامناسب روزنه‌ها و عدم تشکیل موم کوتیکولی در اثر رطوبت بالای ظروف کشت نیز منجر به تشکیل گیاهانی با ظاهر غیرطبیعی شده و درصد استقرار آنها را در خاک کاهش می‌دهد (۳). در ریزازدیادی فتواتوتروفیک گیاهان تحت CO_2 غنی شده، شدتهای بالای نور و محیط کشت فاقد قند، رشد می‌کنند و میزان بالایی از فتوسنتز داشته و سیستم ریشه‌ای آنها نیز گسترده شده و درصد زنده‌مانی آنها در شرایط خارج از شیشه بالا می‌رود. از طرفی استفاده از ظروف فیلتردار نیز باعث افزایش رشد و نمو گیاهان با ظاهر طبیعی شده و درصد بالایی از این گیاهان پس از انتقال به خاک با درصد بالایی از موفقیت استقرار می‌یابند. این مسئله کلید موفقیت در ریزازدیادی تجاری است و کاهش دوره سازگاری با کاهش هزینه کارگر، ابزار و سایر

www.SID.ir

Archive of SID

هزینه‌های اجرایی را درپی دارد (۹). Kirdmanee و همکاران (1995a) در مطالعه‌ای بر روی اکالیپتوس *E. cammaldulensis* اثرات غنی سازی CO_2 بر افزایش وزن خشک ریشه، طول ریشه‌های اولیه، درصد ریشه‌زایی و میزان فتوسنتز خالص را مشاهده نمودند (۱۰). در ضمن در این بررسی میزان رشد در محیط کشت حاوی ورمیکولیت بیشتر بود. در روش شبه‌اتوتروفیک گیاهچه‌ها در ظروف فیلتردار در معرض CO_2 اتمسفر هوا قرار گرفته و با انجام فتوسنتز، بطور فتوتروف رشد کرده و از طرفی عدم استفاده از هیدراتهای کربن در محیط کشت نیز، فعالیت فیزیولوژیکی گیاهان را بهبود بخشیده و آلودگی میکروبی را به حداقل می‌رساند (۱۲). این روش تکثیر با توجه به تولید گیاهان طبیعی‌تر و کاهش هزینه آن می‌تواند جایگزین روش معمول ریزازدیادی باشد، هرچند که روش فتواتوتروفیک بر این روش برتری دارد. در ظروف فیلتردار غلظت بالای CO_2، تولید همزمان ریشه و ساقه، افزایش سرعت رشد و کاهش مصرف املاح محیط کشت، هزینه‌های ریزازدیادی را تا حد قابل ملاحظه‌ای کاهش داده و افزایش تولید را درپی دارد (۱۱). Galzy و همکاران (۱۹۹۲) گزارشی مبنی بر کاهش حجم ماده خشک گونه *Vitis vinifera* پس از کاشت در محیط کشت حاوی سوکروز منتشر کرده‌اند که این مسئله ناشی از بازدارندگی فتوسنتز توسط کربوهیدرات محیط کشت بوده است (۷). Kozai و همکاران (۱۹۸۷) نیز بیشترین وزن تر و خشک گیاهچه‌های میخک را در محیط کشت حاوی غلظت‌های پایین املاح و سوکروز بدست آوردند (۱۳).

نتیجه‌گیری کلی: در تحقیق حاضر امکان تکثیر گونه تیس در شرایط فتواتوتروفیک و شبه‌فتواتوتروفیک با وجود فیلتر تبادل هوا و تغذیه مستقیم و غیرمستقیم CO_2 بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های رشدی طول شاخه، تعداد شاخه و جوانه، سطح پهنک برگ، تعداد برگ، میزان کلروفیل کل و وزن خشک گیاه نشان داد که در شرایط فتواتوتروفیک این شاخص‌ها نسبت به شرایط شبه‌فتواتوتروفیک به صورت معنی‌داری بالاتر بوده است. در نتیجه حصول روشی کاربردی برای تکثیر غیرجنسی و انبوه این گونه از طریق روش مدرن فتواتوتروفیک، با بهینه‌سازی شرایط کشت درون‌شیشه‌ای، امکان سرعت بخشیدن به پروسه سازگاری گیاهان کشت بافتی و تولید گیاهانی با فیزیولوژی طبیعی‌تر و کاهش هزینه‌های تولید را دربرداشته است.

منابع

۱ – امام، م.، قمری زارع، ع.، اسپهبدی، ک.، سهیلا نراقی، ط.، شهرزاد، ش. ۱۳۹۰. ریزازدیادی درخت جنگلی تیس (*Sorbus aucuparia*) از طریق کشت ریزنمونه جوانه گیاه بالغ. دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، جلد ۱۹، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۷۳– ۲۶۳.

2- Assareh, M.H and Sabbagh zade,F.2003. Eucalyptus growth in photo and semiphototrophically conditions with CO_2 -enriched and non-enriched environments .Pajouhesh va Sazandegi, 59:80-87. (In Persian)

3- Assareh, M.H and Sardabi, H., 2007. Eucalyptus. Research Institute of Forest and Rangelands, 671 P. *(*In Persian).

4- Assareh, M.H and Hennerty, M.J., 1998, Effects of CO_2 -enriched and non-enriched environments on the growth rate of *Eucalyptus microtheca*. Research reports 1996/1997,UCD, P:140-141.

5- Couceiro, M.A., Afreen, F., Zobayed, S.M.A. & Kozai, T., 2006, Enhanced growth and quality of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic *in vitro* conditions. *In vitro* cellular and Development al Biology- Plant. 42(3):278-282.

6- Driver, J. A., and Kuniyuki, H., 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut root stocks (*J. hindsii*× *J. regia*). HortScience, 19:507-509.

7- Galzy,R. and Company, D. 1992. Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of Vitis plantlets cultured *in vitro*. Plant cell, Tissue and organ culture, 31: 239-244.

www.SID.ir

Archive of SID

8- Genoud-gourichon, C.H., Sallanon & Coudret, A., 1996, Effects of sucrose, agar, irradiance and CO_2 concentration during the rooting phase on the acclimation of Rose hybrida plantlets to *ex vitro* conditions. Photosyntetica. 32(2):264-270.

9- Kirdmanee, C., Kitaya, Y., Kozai, T. and Kitaya,Y. 1994, Effects of lighting cycle on daily Co2 exchange and dry weight increase of Potato plantlets *in vitro* cultured photoautotrophically. Ibid.

10- Kirdmanee, C., Kitaya, Y. & Kozai, T. 1995a, Effects of CO_2 enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of Eucalyptus plantlets *in vitro* and *ex vitro*. Anatomical comparisons. Acta Horticulturae, 393: 111-115.

11- Kirdmanee, C.,Yoshiaki, K. & Kozai, T. 1995b. Rapid acclimatization of Eucalyptus plantlet by controlling photocynthetic photon flux density and relative humidity. Environmental control in Biology, 33(2): 123-132.

12- Kozai, T., 1991, Photoautotrophic micropropagation. *In vitro* cellular and Development Biology. 27:47-51.

13- Kozai, T. Iwanami, Y. & Fujiwara, K. ,1987, Environmental control for mass propagation of tissue cultured plantlets (1) Effects of CO2 enrichment on the plantlet growth during the multiplication stage. Plant, Tissue Culture Letters. 4:22-26.

14- Teixeir, D., Silva, J.A., Giang, D.D.T. & Tanaka M. ,2006, Photoautotrophic micropropagation of *Spathiphyllum.* photosynthetica, 44(1):53-61.

Comparisonal study of micropropagated *Sorbus aucoparia* plantlets in photoautotrophic and semi-photoautotrophic conditions

Emam M., Ghamarizare A., Mirjani L. and Shariat A.

Biotechnology Dep, Research Institute of Forestry and Rangelands, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Sorbus aucoparia is an important forest tree from *Sorbus* genus in *Rosaceae* family. It is an important medicinal, industrial and ornamental plant. *Sorbus aucoparia* is potentially useful for reforestation in high altitudes. This species is one of the endangered species of the Northern forests of Iran. Micropropagation of the adult trees by bud culture helps conserve this valuable species. In this study, proliferation of *Sorbus aucoparia* in photoautotrophic (artificial CO_2 nutrition) and semi-photoautotrophic (by the use of available CO_2 in the space around the dishes in growth chamber) conditions was performed. Shoots of tissue cultured plantlets from mature trees, were used as explants. The explants were cultured on DKW media supplemented with and without sucrose with agar or vermiculite for six weeks, in Magenta (G7) containers. Gas exchange rate of culture containers under photoautotrophic and semi-photoautotrophic conditions were measured. The results showed that shoot height, shoot and bud numbers, dry weight, leaf number, leaf area, chlorophyll quantity, rooting percentage and leaf greenness under photoautotrophic condition have significant differences with semi-photoautotrophic condition. These findings suggested that, photoautotrophic technique is a more applicable method than semi-photoautotrophic technique for micropropagation of *Sorbus aucoparia*.

Key words*:* *Sorbus aucoparia*, micropropagation, Chlorophyll quantity, rooting, photoautotrophic.

www.SID.ir