باززایی گیاه نوئل نروژی (*Picea abies* (L.) H. Karst) به کمک اندام‌زایی

مهرناز زارعی[1*]، حسن صالحی[2]، ابوالفضل جوکار[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه شیراز، شیراز. ۲- استاد بخش علوم باغبانی، دانشگاه شیراز، شیراز. ۳- استادیار بخش علوم باغبانی، دانشگاه شیراز، شیراز.

*نویسنده مسئول: Zarei.mehr1391@yahoo.com

چکیده

باززایی از بافت‌های بالغ گیاهان برای ریزافزایی دارای فواید بسیاری برای رسیدن به همگروه است. همچنین تولید تجاری به این روش با هزینه کمتر و صرفه‌جویی در زمان و بدون محدودیت فصلی قابل اجراست. در این پژوهش به منظور تشکیل جوانه نابه جا بر روی ریزنمونه‌های جدا شده از شاخه‌های فصل رشد جدید در گیاهان بالغ نوئل نروژی در شرایط درون شیشه‌ای از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی 2iP و Z در ۲ دما (۲۲ و ۲۸ درجه سلسیوس) استفاده شد. در درجه حرارت ۲۲ درجه سلسیوس، بیشترین درصد ریز نمونه‌های پرآوری کرده(۶۸/۷۵ ٪) و نیز بیشترین تعداد جوانه نابه‌جا مربوط به غلظت ۱/۶ میکرومولار 2iP بود. هرچند تفاوت معنی‌داری در میزان طول شاخه‌های رشد یافته از روی جوانه‌های نابه‌جا بین غلظت‌های مختلف 2iP مشاهده نشد. برای تمام شاخص‌های اندازه‌گیری شده غلظت ۴ میکرومولار Z موثرترین تیمار پرآوری بود. در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در هیچ‌یک از ریزنمونه‌ها پرآوری مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: باززایی، پرآوری، زآتین، جوانه نا به جا، 2ip

مقدمه

نوئل نروژی درختی همیشه سبز، زیبا و دارای ارزش اقتصادی بالا در افزایش همگروهی درختان جنگلی می‌باشد. این گیاه از نروژ و شمال اروپا منشاء گرفته و گسترش آن در نواحی وسیعی از غرب و مرکز اوراسیا نشان دهنده سازگاری آن با شرایط آب و هوایی مختلف می‌باشد (Ellenberg, 1988; Källman, 2009; Schmidt Vogt, 1977). افزون بر این، زیبایی این گیاه باعث شده در فضای سبز و همچنین به عنوان درخت کریسمس مورد استفاده قرار گیرد.

در سال‌های گذشته پیشرفت‌های زیادی در فنون کشت بافت گیاهی برای افزایش هرچه سریع‌تر ارقام گزینش شده در کشاورزی و باغبانی صورت گرفته است، در نتیجه امروزه استفاده از این فنون در برنامه‌های بهنژادی درختان کاربرد گسترده‌ای دارد (Von Arnold and Eriksson 1979aMurashige 1974a ,). در برنامه‌های مربوط به بازسازی جنگل‌ها، بازجوان‌سازی نژادگان‌های برتر با هدف تولید پایه‌های نونهال که به روش رویشی افزایش می‌یابند، اهمیت زیادی دارد و به همین دلیل استفاده از کشت بافت گیاهی برای تولید شاخه‌های نابه‌جا از ریزنمونه‌های مربوط به درختان بالغ، نظر بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب نموده است (Silen 1978a). در بیشتر پژوهش‌های انجام شده بر روی نوئل نروژی، از بذر این گیاه به عنوان ماده آزمایشی کمک گرفته می شود. تا کنون در آزمایش های درون شیشه ای نوئل نروژی استفاده از بافت بالغ (به طور ویژه ریزشاخه) به منظور پرآوری شاخه نابه‌جا گزارشی منتشر نشده است. با توجه به مشکلات استفاده از بذر در تولید همگروهی و نیز ارزشمندی تولید گیاهچه‌های شبیه به اصل با به کار بردن بافت‌های بالغ به عنوان ریزنمونه این پژوهش با هدف یافتن بهترین تیمار پرآوری به کمک تنظیم‌کننده‌های رشد زآتین و 2ip انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای بررسی میزان پرآوری ریزنمونه‌ها، غلظت های ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸و ۱/۶ میکرو مولار 2ip و همچنین غلظت‌های ۰ ، ۲، ۴ و ۸ میکرومولار زآتین به همراه ۱ گرم در لیتر بافر MES به محیط کشت MS اضافه شد. پیش از اتوکلاو کردن محیط کشت (در فشار ۱/۵ بار و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه) pH همه محیط کشت‌ها با استفاده از NaOH ۱ نرمال و HCl ۰/۱ نرمال روی ۵/۸ تنظیم گردید. زآتین پس از اتوکلاو و در زیر دستگاه جریان هوا به محیط کشت MS (با دمای ۵۰ درجه سلسیوس) اضافه شد. آزمایش‌ها در ۲ دمای ۲۲ و۲۸ درجه سلسیوس انجام شد. پس از گذشت ۳ هفته ریز نمونه ها به محیط کشت MS بدون تنظیم کننده های رشد انتقال یافتند. نمونه‌ها در شدت نور ۳۰ میکرو مول بر متر مربع در ثانیه در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

یادداشت برداری و واکاوی داده‌ها

داده برداری شامل درصد پرآوری ، تعداد و طول شاخه‌های پرآوری کرده بود.آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح به طور کامل تصادفی انجام شد و برای هر تیمار ۴ تکرار و در هر تکرار ۵ ریزنمونه در نظر گرفته شد. واکاوی داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۰) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح ۱٪ صورت گرفت.

نتایج و بحث

در آزمایشی که از تنظیم کننده رشد 2iP استفاده شد، در درجه حرارت ۲۲ درجه سلسیوس، بیشترین درصد ریز نمونه های پرآوری کرده به میزان ۶۸/۷۵ ٪ مربوط به غلظت ۱/۶ میکرومولار 2iP بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری داشت. بیشترین تعداد جوانه نابه‌جای انگیزش یافته روی ریزشاخه ها نیز در همین غلظت از 2iP به دست آمد (جدول ۱). با افزایش غلظت 2ip به مقادیر ۶/۴ و ۱۲/۸ میکرومولار، علاوه بر اینکه درصد پرآوری ریزنمونه‌ها کاهش یافت از نظر کیفیت نیز شاخه‌های ایجاد شده دچار مشکلاتی مانند سوختگی برگ‌ها شدند (نگاره ۱). در مورد تنظیم کننده رشد Z در درجه حرارت ۲۲ درجه سلسیوس برای تمام شاخص‌های اندازه گیری شده غلظت ۴ میکرومولار Z موثرترین تیمار پرآوری بود (جدول ۲).

جدول ۱- اثر غلظت‌های گوناگون تنظیم کننده رشد 2iP بر میانگین شمار شاخه در ریزنمونه، طول شاخه و درصد ریزنمونه‌های پرآوری کرده گیاه نوئل نروژی در دمای ۲۲ درجه سلسیوس

2iP (میکرومولار)	درصد ریزنمونه‌های پرآوری کرده	شمار شاخه در ریزنمونه	طول شاخه (سانتی‌متر)
۰	۰^{d†}	۰^{d}	۰^{c}
۰/۲	۲۵^{bc}	۱^{c}	۰/۸۴^{a}
۰/۴	۱۲/۵^{cd}	۰/۵^{cd}	۰/۷۰^{a}
۰/۸	۳۷/۵^{b}	۱/۲۵^{bc}	۰/۸۱^{a}
۱/۶	۶۸/۷۵^{a}	۳/۲۵^{a}	۰/۶۸^{ab}
۳/۲	۲۷/۶۸^{bc}	۰/۹۷^{c}	۱/۱۷^{a}
۶/۴	۲۵^{bc}	۲^{b}	۰/۹۳^{a}
۱۲/۸	۱۲/۵^{cd}	۰/۷۵^{cd}	۰/۱۸^{bc}

† در هر ستون میانگین‌های دارای حرف یکسان تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD در سطح ۱٪ ندارند.

نگاره ۱: پرآوری ریزنمونه‌های نوئل نروژی. (الف) تیمار شاهد، (ب) تیمار ۱/۶ میکرومولار 2iP ، (پ) ایجاد سوختگی و (ت) بد شکلی در شاخه‌های باززایی کرده پس از تیمار ریزنمونه‌ها با غلظت‌های بیشتر از ۱/۶ میکرومولار 2iP.

جدول ۲- اثر غلظت‌های گوناگون تنظیم کننده رشد Z بر میانگین درصد ریزنمونه‌های پرآوری کرده، شمار شاخه در هر ریزنمونه و طول شاخه در گیاه نوئل نروژی در دمای ۲۲ درجه سلسیوس

زآتین (میکرومولار)	درصد ریزنمونه‌های پرآوری کرده	شمار شاخه در ریزنمونه	طول شاخه (سانتی‌متر)
۰	۰^{b}†	۰^{b}	۰^{c}
۲	۰^{b}	۰^{b}	۰^{c}
۴	۶۸/۷۵^{a}	۶/۲۵^{a}	۰/۲۶^{a}
۸	۱۲/۵^{b}	۰/۵^{b}	۰/۱^{b}

† در هر ستون میانگین‌های دارای حروف یکسان تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD در سطح ۱٪ ندارند.

در سایر پژوهش‌ها نیز برای انگیزش شاخه نابه‌جا در ریزنمونه‌های محور زیرلپه، رویان و برگ‌های سوزنی، دمای ۲۰ درجه سلسیوس به عنوان دمای بهینه پرآوری پیشنهاد شده است (Von Arnold and Eriksson, 1979). هرچند در برخی گونه‌های سوزنی برگ مانند سدر لبنانی و سدر اتلس دمای بالا (حدود ۳۰ درجه سلسیوس) برای پرآوری مناسب تر بوده است (Piola *et al.*, 1996).همچنین در راستای پژوهشی دیگر (Gomez, 1994) روی سوزنی برگان، کاربرد سایتوکینین‌ها به تنهایی برای انگیزش شاخه نابه‌جا کافی بود.

منابع

1. Coleman, W. K. & T. A. Thorpe. 1977. In vitro culture of western redcedar (*Thuja plicata* Donn). I. Plantlet formation. Botanical Gazette, 298-304.
2. Ellenberg, H. 1988. Vegetation ecology of central Europe. Cambridge University Press.

3. Gilman, E., I. Leone & F. Flower .1981. The adaptability of 19 woody species in vegetating a former sanitary landfill. Forest Science, 27**:** 13-18.
4. Gomez, M. & J. Segura. 1994. Factors controlling adventitious bud induction and plant regeneration in
5. Källman (2009) Adaptive evolution and demographic history of Norway spruce (*Picea abies*). Acta Uni Upsaliensis.
6. Leifert, C. & A. Cassells. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. In Vitro Cell Dev Bio-Plant, 37**:** 133-138.
7. Murashige, T.. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Annu. rev. plant physiol., 25**:** 135-166.
8. (1974b) Plant propagation through tissue cultures. Annual review of plant physiology, 25**:** 135-166.
9. Schmidt Vogt, H.. 1977. Die Fichte: ein Handbuch in zwei Banden. Band 1. Taxonomie: Verbreitung: Morphologie: Okologie: Waldgesellschaften. Hamburg: P. Parey xviii, 647p.-Illus., maps.. Icones, Maps. Geog**,** 1-7.
10. Silen, R. R.. 1978. Genetics of Douglas-fir. USDA For. Serv. Res.
11. .1978. Genetics of Douglas-fir. USDA Forest Service Research Paper, Washington, DC.
12. Stange, C., D. Prehn, M. Gebauer & P. Arce-Johnson. 1999. Optimization of in vitro culture conditions for *Pinus radiata* embryos and histological characterization of regenerated shoots. BIOLOGICAL RESEARCH, 32**:** 19-28.
13. Von Arnold, S. & T. Eriksson. 1979. Bud induction on isolated needles of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) grown in vitro. Plant Sci. Lett., 15**:** 363-372.
14. .1979. Bud induction on isolated needles of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) grown in vitro. Plant Science Letters, 15**:**363-372.

Regeneration of *Picea abies* (L.) H. Karst plants via organogenesis

M. Zarei[*1], H. Salehi[2] and A. Jowkar[3]

1- M. Sc of Horticultural Science, Shiraz University, Shiraz. 2- Professor, Dep. of Horticultural Science, Shiraz University, Shiraz. 3- Associate Professor, Dep. of Horticultural Science, Shiraz University, Shiraz.
*Corresponding Author: Zarei.mehr1391@yahoo.com

Abstract

There is great benefit in plant regeneration of mature tissue aims at clonal propagation, but microbial contaminations always been a basic dilemmas that plaguing their regeneration competency. Moreover, commercial production via aforesaid procedure can benefit from lower cost, no seasonal barrier and timesaving-ness. In this research the regulatory role of 2-iso-pentenyl adenine (2iP) and Zeatin along with two temperature regime on current season micro-cutting grown of mature *Picea abies* (L.) H. Karst was evaluated aims at adventitious shoot regeneration. The highest percentage in regenerated explants (68.75%) as well as the highest mean numbers of adventitious shoot per explant were gained in MS media supplemented with 1.6 µM 2iP. However there were no significant differences in adventitious originated shoot length of *P. abies* (L.) H. Karst in different concentration of 2iP. Among all measured factors 4 µm Zeatin resulted in highest regeneration rate. It was interesting that explants grown at 28˚C did not regenerate.

Key words: Contamination, AgNPs, H2O2, Norway spruce