DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2013.2888

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۹، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۹۶-۸۵ (۱۳۹۱)

بررسی تأثیر محیط کشت، تنظیم‌کننده رشد و ژنوتیپ بر تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاه دارویی تیس (*Sorbus aucuparia* L.)

میترا امام[1*]، عباس قمری‌زارع[2]، کامبیز اسپهبدی[3]، طیبه سهیلا نراقی[4]، شکوفه شهرزاد[4]، حبیب زارع[5] و لیلا میرجانی[4]

۱*- نویسنده مسئول، مربی پژوهشی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، پست الکترونیک: memam@rifr-ac.ir
۲- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، ساری
٤- کارشناس، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
۵- مربی پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، نوشهر

تاریخ دریافت: دی ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۰

چکیده

گیاه دارویی تیس (*Sorbus aucuparia* L.) از گونه‌های مهم جنس Sorbus در خانواده Rosaceae است و ارزش دارویی آن به دلیل میوه و برگ آن می‌باشد. به‌منظور بررسی تأثیر عوامل محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاه تیس، برداشت جوانه از پایه‌های بالغ مناطق سنگده ساری، سیاه‌بیشه مازندران و فولادمحله سمنان در تمام فصول سال انجام و بهترین روش سترون‌سازی جوانه‌ها تعیین گردید. این روش عبارت از شستشو و برس‌کشی نمونه‌ها با مایع ظرفشویی و بعد با محلول اتانل ۷۰٪ بود. در مرحله سترون‌سازی، در ابتدای فصل زمستان تیمار استفاده از محلول ۰/۱٪ کلریدجیوه برای زمان ٤ دقیقه در مورد ژنوتیپ بالغ سنگده- فریم و زمان ۳ دقیقه برای ریزنمونه ژنوتیپ‌های سیاه‌بیشه مناسبتر از بقیه تیمارها بود. برای ریزنمونه ژنوتیپ‌های فولادمحله، این تیمار در فصل تابستان و در زمان ۵ دقیقه مناسب بود. محیط کشت DKW با هورمون‌های BA، TDZ و IBA در غلظت‌های به‌ترتیب ۰/۵، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در مرحله شاخه‌زایی و تکثیر و محیط MS با 2iP ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برای وصول به شاخه‌های با رشد طولی مناسب، تعیین گردید. ریشه‌زایی در محیط تغییریافته MCM مایع با ورمیکولیت و IBA در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و در شرایط تاریکی انجام شد.

واژه‌های کلیدی: تیس (*Sorbus aucuparia* L.)، ژنوتیپ، تکثیر درون‌شیشه‌ای، تنظیم‌کننده رشد گیاهی.

مقدمه

تیس (*Sorbus aucuparia*) از تیره گل سرخ (Rosaceae) و جنس *Sorbus* می‌باشد (خاتم‌ساز، ۱۳۷۱). این درخت به ناحیه خزری تعلق دارد و با فلور اروپا مشترک است، به این صورت که با گونه اروپایی و همنام خود شبیه بوده و اختلاف کوچکی در دندانه های برگ، آنها را از هم متمایز می کند (ثابتی، ۱۳٤٤). روستاییان از برگ این درخت برای تعلیف دام استفاده می کنند و چوب آن را به مصرف سوخت می‌رسانند که با توجه به کمیاب بودن پایه‌های آن، آثار مخربی در طبیعت برجای می‌گذارد.

این گیاه به‌عنوان درخت جنگلی در ارتفاعات فوقانی کوهستان، در جایی که درختان میوه نادرند، وجود دارد. قسمت مورد استفاده آن میوه می باشد و زنبورعسل نوش فراوان و خوبی از آن بدست می آورد. میوه آن به شکل توت قرمز و سرشار از ویتامین‌های A، C بوده و به‌عنوان غذای مناسبی برای پرندگان و حشرات می باشد. انسان ها برای درست‌کردن مربا و مارمالاد از آن استفاده می‌کنند. چوب آن سخت و محکم بوده و برای صنایع باارزش تجاری مثل مبلمان‌سازی، روکش و کاغذسازی بکار می رود. این درخت به آلودگی هوا حساس بوده و برای احیای مجدد جنگل در بخش‌هایی از کوهستان که این گیاه از بین رفته، کشت می‌شود و برای استفاده‌های زینتی و فضای سبز نیز مناسب است (Chalupa, 1992). از نظر خواص شیمیایی جوانه ها و پوست تیس دارای تانن و لوروسرازین و برگ آن دارای آمیگدالین و تانن است. گل آن دارای ماده‌ای به نام تری‌اتیل امین بوده و میوه آن دارای تانن، دکستروز، سوربیت و اسیدهای آلی و الکل‌های مختلف، اسید سوربی‌تانیک و اسید پرولیک است. دم‌کرده برگ آن اثر مسهلی ملایم داشته و در رفعژ ناراحتی های تنفسی مثل سرفه و برونشیت کاربرد دارد. میوه آن مدر و قاعده‌آور، ضدآسکوربوت و قابض است. از میوه آن در دفع ادرار و سنگ کلیه، دیسانتری و قولنج کلیوی استفاده می‌شود (زرگری، ۱۳٦۷).

تکثیر واریته‌های مهم جنگلی با کمک تکنولوژی درون‌شیشه‌ای در زمان کوتاه میسر می‌شود. اندام‌زایی از طریق کشت جوانه موفق‌ترین و آسانترین روش ممکن می‌باشد، زیرا جوانه بالقوه توانایی تکثیر و تولید اندام‌های جدید را داشته و به‌همین دلیل از ثبات ژنتیکی کافی نیز برخوردار است (Bonga & Aderkas, 1992). با توجه به خطر رو به انقراض بودن بیشتر گونه‌های این جنس ازجمله بارانک و تیس، تکثیر غیرجنسی پایه‌های سالم این گونه از طریق کشت بافت، می‌تواند منجر به حفاظت از این منابع ژنتیکی باارزش شود. به‌طورکلی بررسی‌های مربوط به کشت بافت گونه بارانک و تیس محدود بوده و بیشتر بر کشت جنین، کالوس و تفکیک پروتوپلاستی متمرکز شده‌است. Arrilaga و همکاران (۱۹۹۱) در بررسی کشت بافت گونه *S. dmestica* از منشأ گیاه بالغ و دانه‌رست، با کشت گره بر محیط تغییریافته SH، شاخه و ریشه گرفتند. Jorjensen (۱۹۸٤) موفق به باززایی کالوس از پروتوپلاست تیس شد. Suvorova و همکاران (۱۹۹۰) تکثیر کلونی از هیبریدهای سوربوس را در محیط تغییریافته MS (Murashige & Skoog Medium) انجام دادند. Chalupa (۱۹۸۳، ۱۹۸۷a، ۱۹۸۷b، ۱۹۹۲ و ۲۰۰۲) تکثیر سریع شاخه در تیس و بارانک را با کشت ریزنمونه‌های جوانه بدست آورد. در ایران تحقیق بر روی ریزازدیادی گونه بارانک (*Sorbus torminalis*) از طریق کشت جوانه تا شاخه‌زایی توسط نصیری (۱۳۸۰) انجام شد. در این بررسی مناسبترین زمان نمونه‌برداری از پایه ۱۳ و ۸٤ جنگل فریم، فصل پاییز بود و ۲۵٪ جوانه‌ها از این دو پایه با تیمار کلریدجیوه ۰/۱٪ در زمان ۱ دقیقه استریل و در محیط کشت MSN/2 حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر از BA (6-Benzy 1 amino purine) مستقر شدند.

مواد و روشها

در سه رویشگاه تیس: سنگده- فریم مازندران، فولادمحله سمنان و سیاه‌بیشه مازندران چند پایه با مشخصات زیر به‌عنوان پایه مادری انتخاب و علامت‌گذاری شدند.

۱- پایه‌های بالغ واقع در سنگده- فریم (۳ ژنوتیپ): ارتفاع منطقه ۱۸۰۰ متر، قطر درخت ۴۰-۲۰ سانتی‌متر، ارتفاع ۳-۲ متر، ۲۰-۱۵ سال

۲- پایه‌های بالغ واقع در فولادمحله سمنان (۳ ژنوتیپ): ارتفاع منطقه ۲۴۲۰ متر، قطر درخت ۳۵-۱۰ سانتی‌متر، ارتفاع درخت ٤-۲ متر،۲۰-۱۰ سال

۳- پایه‌های بالغ واقع در سیاه‌بیشه مازندران (٤ ژنوتیپ): ارتفاع منطقه ۱۷۰۰ متر، قطر درخت ۳۰-۱۰ سانتی‌متر، ارتفاع درخت ۳-۲ متر، ۲۵-۱۰ سال

سرشاخه‌های هر پایه مجزا و بعد از تقسیم شاخه به قطعات کوچک حاوی جوانه و حذف برگ‌های آن به‌منظور جلوگیری از دست رفتن آب، بسته‌بندی آنها در کیسه‌های پلاستیکی تمیز صورت گرفت و در داخل یخدان‌های حاوی قالب یخ به آزمایشگاه محل اجرای طرح حمل شد و در اسرع وقت و به این ترتیب مورد سترون‌سازی و کشت قرار گرفتند:

الف: برس‌کشی با مایع ظرفشویی، ب: برس‌کشی با محلول الکلی اتانول ۷۰٪، ج: غوطه‌وری در محلول قارچ‌کش تیرام ۲ گرم در لیتر برای ۱۸ تا ۲٤ ساعت، د: قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۳۰ تا ٦۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪

برای سترون کردن جوانه‌ها از محلول سترون‌سازی کلرید جیوه ۰/۱٪ و در زمان‌های مختلف باتوجه به فصل نمونه برداری استفاده شد. برای حذف این محلول‌ها در هر مرحله، جوانه ها ۳ بار با آب مقطر سترون شده، شستشو داده شدند. ریز نمونه ها معمولاً حاوی یک یا دو جوانه و یک پایه به ابعاد ۰/۵ تا ۱/۵ سانتی‌متر بودند. نمونه‌های استریل شده در محیط‌های کشت MS، DKW (Driver & Kuniyuki Walnut medium) و MS تغییریافته با غلظت‌های مختلف از هورمون‌های سیتوکنینی BA، 2ip (-γ,γ)-6 (Dimethylallylamino)-purine و TDZ (Thidiazuron=1, phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl)urea) و اکسین IBA (Indole butyric acid) در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر مستقرشدند و بازکشت نمونه‌ها به‌طور ماهیانه در همان محیط کشت انجام شد (جدول ۱ و ۲). پس از استقرار و رشد جوانه ها سه واکشت با فاصله ٤ هفته انجام شد و تعداد تکرارها در هر تیمار ۱۵ عدد بود (۵ شیشه و در هر یک ۳ نمونه). در این تحقیق برای آزمون آماری، اعداد مربوط به ضریب ازدیاد (متوسط تعداد جوانه و شاخه در هر تکرار) و رشد طولی شاخه ها انتخاب شد. نتایج در سیستم SPSS و در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه و دسته‌بندی میانگین‌ها به روش دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام و شکل آنها ترسیم شد.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی بکار گرفته شده در مرحله شاخه‌زایی (آزمون اول)

محیط کشت	هورمون			
	IBA	TDZ	BA	2ip
DKW	۰/۱	۰/۰۵	۰/۲	–
DKW	۰/۱	۰/۰۵	–	۰/۲
DKW	۰/۱	۰/۰۵	۰/۵	–
DKW	۰/۱	۰/۰۵	–	۰/۵
۱/۲ MS	۰/۱	۰/۰۵	۰/۲	–
۱/۲ MS	۰/۱	۰/۰۵	–	۰/۲
۱/۲ MS	۰/۱	۰/۰۵	۰/۵	–
۱/۲ MS	۰/۱	۰/۰۵	–	۰/۵

غلظت هورمون‌ها برحسب mgl^{-1} می‌باشد.

جدول ۲ – تیمارهای هورمونی بکار گرفته شده در مرحله شاخه‌زایی (آزمون دوم)

محیط	هورمون			
	IBA	TDZ	BA	2ip
DKW	۰/۱	۰/۰۵	۰/۵	–
DKW	۰/۱	۰/۰۵	–	۰/۵
DKW	۰/۱	۰/۰۵	۰/۲۵	۰/۲۵.
MS	۰/۱	۰/۰۵	۰/۵	–
MS	۰/۱	۰/۰۵	–	۰/۵
MS	۰/۱	۰/۰۵	۰/۲۵	۰/۲۵.
۱/۲ MS	۰/۱	۰/۰۵	۰/۵	–
۱/۲ MS	۰/۱	۰/۰۵	–	۰/۵
۱/۲ MS	۰/۱	۰/۰۵	۰/۲۵	۰/۲۵.

غلظت هورمون‌ها برحسب mgl^{-1} می باشد.

ریشه‌زایی

ابتدا انتقال شاخه‌ها به محیط کشت بدون هورمون برای یک ماه به‌عنوان پیش‌تیمار ریشه‌زایی انجام شد. سپس نمونه‌ها در دو نوع تیمار محیط کشت MCM (McCown's Woody plant) (۱/۲ نیترات) جامد (واجد آگار ٦٨٪) و MCM (۱/۲ نیترات) مایع واجد ورمیکولیت (۲۲g/۱۰۰ cc) با سوکروز ۱۰ گرم در لیتر و هورمون IBA در غلظت‌های متفاوت (۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر)، به تعداد ١٦ تکرار در هر تیمار (٤ ریزنمونه در ٤ شیشه کشت) منتقل شدند (جدول ۳). تمام تیمارها برای یک ماه در شرایط اطاق رشد و تاریکی قرار گرفتند.

جدول ۳- تیمارهای هورمونی بکار گرفته شده در مرحله ریشه‌زایی

هورمون IBA (mg/l)	محیط کشت	
	MCM جامد	MCM مایع
T1	۱	–
T2	۱/۵	–
T3	–	۱
T4	–	۱/۵

نتایج

در مرحله سترون‌سازی، شستشوی مکرر نمونه‌ها با مایع ظرفشویی و آب جاری و برس‌کشی با مایع و محلول اتانل ۷۰٪ و بعد پوسته‌برداری نمونه‌ها انجام شد. در مرحله تیمار اصلی جوانه، در مورد نمونه‌های سه ژنوتیپ رویشگاه فریم بیشترین استقرار نمونه‌ها در ابتدای فصل

زمستان برای ژنوتیپ ۱ و با تیمار استریل زیر حاصل شد که عبارت از شستشوی نمونه‌ها با محلول کلریدجیوه ۰/۱٪ برای زمان ۷ دقیقه (٥٤٪ استقرار، جدول ٤) بود. شستشو با محلول کلریدجیوه ۰/۱٪ برای زمان ۵ دقیقه در فصل تابستان و برای نمونه ژنوتیپ بالغ ۲ فولادمحله مناسب بود (۷۰٪ استقرار، جدول ۵).

در مورد نمونه‌های چهار ژنوتیپ رویشگاه سیاه‌بیشه، تیمار شستشو با محلول کلریدجیوه ۰/۱٪ برای زمان ۳ دقیقه و ژنوتیپ بالغ ۲، در انتهای فصل زمستان، مناسب بود (٤٧٪ استقرار، جدول ٦). در مجموع در مورد تأثیر ژنوتیپ بر درصد زنده‌مانی و فعالیت جوانه‌ها در تیمارهای استریل مشابه، پایه شماره ۲ در منطقه فولادمحله سمنان و در فصل تابستان، بالاترین درصد استقرار جوانه را نشان داد.

نتایج آنالیز واریانس آزمون اول صفات ضریب ازدیاد و رشد طولی شاخه معرف آنست که میزان این صفات در محیط DKW و هورمون BA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بیشتر از بقیه بوده‌است. میانگین ضریب ازدیاد شاخه و رشد طولی تحت تأثیر عوامل محیط کشت و هورمون و تأثیر متقابل آنها معنی‌دار بود (جدول ۷). قابل ذکر است که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در بین تیمارهای محیط کشت MS ۱/۲ نیز حداکثر میانگین‌های فوق را دارا بود (جدول ۸). در مورد نتایج آزمون دوم، تأثیر عامل محیط کشت بر میزان میانگین‌های ضریب ازدیاد شاخه و جوانه بی‌تفاوت بوده ولی در دو محیط کشت MS و DKW و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، میزان این صفات نزدیک به یکدیگر و بالاتر از بقیه تیمارها بود. تأثیر این عامل بر صفت رشد طولی شاخه معنی‌دار و در محیط MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2iP مناسب‌تر از سایر تیمارهای مورد بررسی بود (جدول ۹). تأثیر عامل هورمون بر صفت ضریب ازدیاد شاخه و جوانه معنی‌دار بوده و در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA نسبت به سایر تیمارهای هورمونی نقش فزاینده‌تری داشت (جدول ۱۰). تأثیر متقابل محیط کشت و هورمون بر صفت ضریب ازدیاد شاخه معنی‌دار و بر سایر صفات بدون معنی بود (جدول ۹). بنابراین در مجموع، بازنگری نتایج آزمون‌های بکار گرفته شده در تحقیق اخیر، محیط کشت DKW با هورمون BA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر را به‌عنوان محیط کشت بهینه شاخه‌زایی و تکثیر و محیط کشت MS با 2iP ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر را برای وصول به شاخه‌های با رشد طولی مناسب در گونه مورد بررسی، تعیین نمود. در مرحله ریشه‌زایی، بیشترین میزان ریشه‌دار شدن نمونه‌ها در تیمار مربوط به محیط کشت MCM مایع با ورمیکولیت و IBA در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و تاریکی بدست آمد (جدول ۱۱).

جدول ٤- بررسی تأثیر تیمارهای مختلف استریل بر استقرار نمونه ژنوتیپ‌های فریم در زمستان

تیمار ضدعفونی	درصد استقرار نمونه	درصد آلودگی باکتریایی
ژنوتیپ ۱، تیمار ۱	٥٤	٤٦
ژنوتیپ ۱، تیمار ۲	۰	۱۰۰
ژنوتیپ ۲، تیمار ۱	۳۳	٦٧
ژنوتیپ ۲، تیمار ۲	۰	۱۰۰
ژنوتیپ ۳، تیمار ۱	۰	۱۰۰
ژنوتیپ ۳، تیمار ۲	٦	٩٤

تیمار ۱: ۷ دقیقه غوطه‌وری در محلول کلریدجیوه ۰/۱٪، تیمار ۲: ۹ دقیقه غوطه‌وری در محلول کلریدجیوه ۰/۱٪

جدول ۵- بررسی تأثیر تیمارهای مختلف استریل بر استقرار نمونه‌های ژنوتیپ فولادمحله در فصل تابستان

تیمار ضدعفونی	درصد استقرار نمونه	درصد آلودگی باکتریایی
ژنوتیپ ۱، تیمار ۱	٦/٦	٥٣/٣
ژنوتیپ ۱، تیمار ۲	۰	٤٦
ژنوتیپ ۲، تیمار ۱	٧۰	١٣/٣
ژنوتیپ ۲، تیمار ۲	٣٦/٦	٣۰
ژنوتیپ ۳، تیمار ۱	٣۰	٤٣/٣
ژنوتیپ ۳، تیمار ۲	٢٦/٦	٣٦

تیمار۱: ۵ دقیقه در محلول کلریدجیوه ۰/۱٪، تیمار۲: ۷ دقیقه در محلول کلریدجیوه ۰/۱٪

جدول ٦- بررسی تأثیر تیمارهای مختلف استریل بر استقرار نمونه های ژنوتیپ سیاه‌بیشه در زمستان

تیمار ضدعفونی	درصد استقرار نمونه	درصد آلودگی باکتریایی
ژنوتیپ ۱، تیمار ۱	٥	٩٥
ژنوتیپ ۱، تیمار ۲	٥	٩٥
ژنوتیپ ۱، تیمار ۳	۰	١۰۰
ژنوتیپ ۲، تیمار ۱	٤٧	٥٣
ژنوتیپ ۲، تیمار ۲	٢٨	٧٢
ژنوتیپ ۲، تیمار ۳	١٣	٨٧
ژنوتیپ ۳، تیمار ۱	١۰	٩۰
ژنوتیپ ۳، تیمار ۲	٤	٩۰
ژنوتیپ ۳، تیمار ۳	٧	٩٣
ژنوتیپ ٤، تیمار ۱	١٥	٨٥
ژنوتیپ ٤، تیمار ۲	١٥	٨٥
ژنوتیپ ٤، تیمار ۳	۰	١۰۰

تیمار ۱: ۳ دقیقه در محلول کلریدجیوه ۰/۱٪

تیمار ۲: ۵ دقیقه در محلول کلریدجیوه ۰/۱٪

تیمار ۳: ۷ دقیقه در محلول کلریدجیوه ۰/۱٪

جدول ۷- نتایج تجزیه واریانس صفت ضریب ازدیاد و رشد طولی گیاهچه‌ها (آزمون اول)

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		ضریب ازدیاد	رشد طولی
محیط کشت	۱	١٨/٨٠٢ **	٥/٢٩٢ **
هورمون	٣	٤٧/٦٧٤ **	۰/٣٨۰ **
تأثیر متقابل محیط × هورمون	١٧	٤/٢١ **	۰/۰٨٨ ns
خطا	٩٦	١/٩١٤	۰/۰٩٦

A: محیط کشت، B: تیمارهای هورمونی، **: معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

جدول ۸- مقایسه میانگین‌های عوامل رشد شاخه‌زایی تحت تأثیر محیط کشت و هورمون (آزمون اول)

ردیف	تیمار	میانگین ضریب ازدیاد	میانگین رشد طولی
۱	MSN/2 B0.2	٤/۱ d	۰/۷۱ de
۲	MSN/2 B 0.5	٥/۹۳ c	۰/۹۲ d
۳	MSN/2 P0.2	٤/٤ de	۰/۷٦ de
٤	MSN/2 P0.5	٤/۳ de	۰/۷۹ de
٥	DB0.2	٦/۷ b	۱/۱٦ c
٦	DB0.5	۷/۹۳ a	۲/۷۹ b
۷	DP 0.2	۳/٤۹ e	۲/۹٤ a
۸	DP 0.5	٤/۲۲ de	۲/۸٦ ab

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

B: هورمون BAP-٦، I: هورمون IBA، P: هورمون2iP

جدول ۹- نتایج تجزیه واریانس صفت ضریب ازدیاد و رشد طولی گیاهچه‌ها (آزمون دوم)

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		ضریب ازدیاد جوانه	ضریب ازدیاد شاخه	رشد طولی
محیط کشت	۲	۰/٤۲۲ ns	۱/٤۳۰ ns	/٦۹۸ **
هورمون	۲	۲٦/٦ **	۲٦/٤۳ **	۰/۳٦۸ ns
تأثیر متقابل محیط × هورمون	۲۰	۳/۷٥۱ ns	٦/۲۳ **	۰/۳۱۷ ns
خطا	۱۰۸	۲/۸	۳/٤٦	۰/۱۹٥

A: محیط کشت، B: تیمارهای هورمونی، **: معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

جدول ۱۰- مقایسه میانگین‌های عوامل رشد شاخه‌زایی تحت تأثیر محیط کشت و هورمون (آزمون دوم)

ردیف	تیمار	میانگین ضریب ازدیاد شاخه	میانگین ضریب ازدیاد جوانه	میانگین رشد طولی
۱	MSN/2 B0.5	۸/۹۳	۷/۰٦	۱/۳٦
۲	MSN/2 P0.5	۷/۹۳	٥/۸٦	۱
۳	MSN/2 B,P0.25	۷/۹۳	٦/۰٦	۱/۱٤
٤	MSB0.5	۹/۹۳	۷/٤٦	۱/٤٦
٥	MSP0.5	۷/۳	٥/٤٦	۱/٤۸
٦	MS B,P0.25	۸	٦/۱۳	۱/۳
۷	DB0.5	۹/۰٦	۷/۰٦	۱/۳٦
۸	DP 0.5	۸	٥/٦	۱/۲۳
۹	DB,P 0.25	۸/۹۳	٦/۸	۱/۲٦

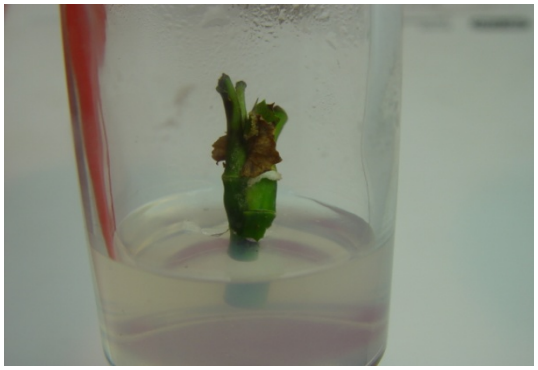
حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

B: هورمون BAP-٦، I: هورمون IBA، P: هورمون2iP

جدول ۱۱- درصد ریشه‌زایی نمونه‌های تیس در تیمارهای مختلف محیط کشت و هورمون

تیمار محیط و هورمون ریشه‌زایی	درصد ریشه‌دهی	درصد نکروزگی
MCM جامد، IBA ۱	۱۰	۱۵
MCM جامد، IBA ۱/۵	۱۷	۳۵
MCM مایع، IBA ۱	۳۱	۳۰
MCM مایع، IBA ۱/۵	۳۵	٤٥

شکل ۱- پایه بالغ الیت (ژنوتیپ۲) در منطقه فولادمحله سمنان در ارتفاع ۲۰۰۰ متری



شکل ۲- جوانه تیس در حال رشد

شکل ٤- شاخه‌زایی در محیط کشت بهینه

شکل ۳- تکثیر شاخه از جوانه تیس

شکل ٥- ریشه‌زایی تیس در محیط کشت

شکل ٦- گیاه تیس مستقر در خاک گلدان

بحث

ریزنمونه مورد استفاده در این تحقیق جوانه‌های انتهایی و جانبی گیاه تیس بود. Chalupa (۱۹۸۳، ۱۹۸۷a، ۱۹۸۷b، ۱۹۹۲ و ۲۰۰۲) تکثیر سریع شاخه در تیس و بارانک را با کشت ریزنمونه‌های مشابه بدست آورد. فواید اصلی این روش، تکثیر انبوه کشتی است که از نظر ژنتیکی ثابت بوده و برای انبوه‌سازی سریع تجاری مناسب است. در فصل تابستان، برای هر دو ژنوتیپ فریم و فولادمحله تیمار مناسب استریل عبارت از ۵ دقیقه شستشو با محلول کلریدجیوه ۰/۱٪ بود. در آخر زمستان برای هر دو ژنوتیپ سیاه‌بیشه و فریم، تیمار مناسب استریل، شستشو با محلول کلریدجیوه ۰/۱٪ برای ۳ دقیقه بود.

مؤثر بودن روش استریل به درجه نفوذ عامل گندزدا به درون بافت‌های آلوده گیاه بستگی دارد. نوع ماده استریل‌کننده، غلظت محلول تهیه شده از آن و مدت زمان کاربرد آن برای استریل نمونه‌ها، ازجمله عوامل مؤثر در میزان سترون‌سازی ریزنمونه‌ها است. محلول کلریدجیوه به‌عنوان ضدعفونی‌کننده اصلی در مقادیر ضعیف و زمان‌های کوتاه مدت، تأثیر قوی و ماندگاری بر حذف آلودگی‌های میکروبی داشته و باعث مرگ و قهوه‌ای شدن نمونه‌ها نیز نمی‌شد. Chalupa (۱۹۸۳، ۱۹۸۷a، ۱۹۸۷b، ۱۹۹۲ و ۲۰۰۲) برای استریل ریزنمونه‌های تیس از کلریدجیوه ۰/۱٪ برای زمان ۱۵ تا ٤۰ دقیقه استفاده نمود.

در مورد ژنوتیپ‌های مختلف رویشگاه سیاه‌بیشه، میزان استقرار نمونه‌های ژنوتیپ جوان ٤ نسبت به سایر ژنوتیپ های بالغ در تیمارهای مشابه بیشتر بوده‌است. به نظر می رسد که این موضوع به سن کمتر پایه مزبور نسبت به دیگر پایه ها مربوط باشد. Biondi و همکاران (۱۹۸٤) با استفاده از جوانه‌های گرفته شده از تنه‌جوش درختان بالغ نارون، باززایی شاخه‌های متعدد را در محیط کشت القا نمودند. در مجموع، در مورد تأثیر عامل ژنوتیپ بر میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌های هر سه رویشگاه در تیمارهای استریل مشابه، پایه شماره ٤ در منطقه فولادمحله سمنان و در فصل تابستان، بالاترین درصد استقرار جوانه را نشان داد. علت این مسئله را می‌توان ناشی از این امر دانست که پایه‌های این منطقه کمتر از دو منطقه دیگر درگیر بیماریهای قارچی و میکروبی درونی بودند؛ در حالی‌که نمونه های مناطق سیاه بیشه و فریم سترون شده با تیمارهای استریل مشابه در این فصل، علاوه بر آلودگی های قارچی و باکتریایی در سطح نمونه، دچار عفونت‌های درونی شدیدی نیز بودند که به‌رغم شستشو با محلول قارچ‌کش تیرام و نیز محلول آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و کشت نمونه ها در محیط کشت دارای این آنتی‌بیوتیک باز درصد کمتری از نمونه‌ها توانستند در محیط کشت مستقر شوند.

در تحقیق اخیر علاوه بر محیط کشت MS پایه و MS تغییریافته از محیط کشت DKW نیز برای تکثیر ریزنمونه‌ها استفاده شد. یکی از عوامل تعیین‌کننده کارآیی محیط کشت، نوع املاح و مجموع قدرت یونی آن می‌باشد (McCown & Sellmer, 1987). قدرت یونی کل در سه نوع محیط کشت عبارت بود از:

محیط کشت MS با قدرت یونی کل (mM) ٥٤/٩١٨، محیط کشت MSN/2 با قدرت یونی کل ٥٤/٩١٨ و محیط کشت DKW با قدرت یونی کل ٩٤/٠٧٤.

با مقایسه مقادیر مربوط به قدرت یونی کل در سه محیط کشت مورد استفاده این نتیجه بدست آمد که بیشترین این ارقام مربوط به محیط کشت DKW بود. وضعیت رشد و تکثیر شاخه‌ها در محیط‌های کشت نیز

نشان داد که آنها به محیط واجد قدرت یونی بالاتر پاسخ مناسبتری داده‌اند و علاوه بر رشد طولی و فعالیت جوانه‌های جانبی بر شاخه اصلی، اندام‌های هوایی نیز شادابی و سبزینگی خود را در طول بازکشت‌های مکرر و متعدد حفظ نموده‌اند. Chalupa (۱۹۸۳، ۱۹۸۷a، ۱۹۸۷b، ۱۹۹۲ و ۲۰۰۲) طی تحقیقات کشت بافت گونه‌های درختی سوربوس، با کشت گره در محیط MS با مقادیر کم از BA موفق به تولید شاخساره شد. Suvorova و همکاران (۱۹۹۰) تکثیر کلونی از هیبریدهای سوربوس را بر محیط تغییریافته MS انجام دادند. در بین تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در مرحله شاخه‌زایی، بیشترین میانگین ضریب ازدیاد و تکثیر شاخه در ترکیب هورمونی BA ۰/۵ و TDZ ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد، در حالی‌که رشد طولی مناسب شاخه‌ها با 2iP در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد.

6-BAP از قویترین مواد محرک رشد و تکثیر شاخه بوده و تأثیر قوی و ماندگاری بر ریزنمونه‌ها دارد. افزایش غلظت BA از ۱ میلی‌گرم در لیتر به بالا، نقش بازدارنده بر طول شاخه‌های رشدیافته از جوانه داشت. در این تحقیق رشد طولی مناسب شاخه، با تعویض هورمون BA با 2iP حاصل شد. Chalupa (۲۰۰۲) در ادامه تحقیقات خود به بررسی اثر BA و تیدیازورون بر شاخه‌زایی تیس پرداخت و متوجه شد که BA در غلظت ۰/۲–۱ و TDZ در غلظت ۰/۵ تا ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر بهترین نتیجه را داشت. وی با مطالعه بر TDZ نشان داد که این هورمون از فعالترین سیتوکنین‌ها در تحریک ایجاد و تکثیر شاخه‌های جانبی سوربوس می‌باشد.

در بین تیمارهای بکار رفته، ریشه‌زایی مناسب در محیط MCM (۱/۲ غلظت از نیترات و سوکروز) مایع با ورمیکولیت دارای IBA ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و در تاریکی حاصل شد. ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای ریزشاخه‌های جدا شده از محیط تکثیر، به گونه و کلون مورد بررسی، ترکیب محیط و غلظت اکسین مورد استفاده بستگی دارد. محیط کشت سوسپانسیون دارای ورمیکولیت با ایجاد تخلخل و مبادله هوا که در رشد سلول‌های بافت ریزنمونه مؤثر بوده و نیز کاهش املاح و سوکروز محیط کشت که محرکی مناسب برای ریشه‌زایی نمونه است، ازجمله عوامل مؤثر در موفقیت ریشه‌زایی گیاه بود. عصاره و سردابی (۱۳۸٦) نیز بر گونه‌های مختلف اکالیپتوس تحقیقی مشابه داشتند.

Chalupa (۲۰۰۲) با کاربرد تلفیقی دو هورمون اکسین NAA و IBA (۰/٦–۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) در محیط MCM (۱/۲ غلظت از املاح پُرمصرف) شاخه‌های تیس را ریشه‌دار نمود.

نتیجه‌گیری کلی این تحقیق آنست که با توجه به خطر رو به انقراض بودن این گونه، تکثیر غیرجنسی پایه‌های سالم آن از طریق کشت بافت، می‌تواند علاوه بر حفاظت از این منابع ژنتیکی با ارزش و نقش آن در احیا و بازسازی دوباره جنگلها، منبع غنی از ترکیب‌های ثانویه تانن، سوربیتول و ... را نیز در دسترس داروسازان و بهره‌برداران دارویی و غذایی قرار دهد.

منابع مورد استفاده

- ثابتی، ح.، ۱۳٤٤. درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ٤۳۰ صفحه.
- خاتم‌ساز، م.، ۱۳۷۱. فلور ایران، تیره گل سرخ، شماره ٦. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع ایران، تهران، ۳۵۲ صفحه.
- زرگری، ع.، ۱۳٦۷. گیاهان دارویی (جلد ۲). انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۹٤۲ صفحه.

- عصاره، م. و سردابی، ح.، ۱۳۸٦. اکالیپتوس (جلد ۱). انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع ایران، تهران، ٦۷۲ صفحه.
- نصیری، م.، ۱۳۸۰. ریز ازدیادی بارانک (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz) یک: مرحله استقرار و شاخه زایی. ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ٦: ۱۱۵-۱۲۹.
- Arrilaga, I., Marzo, T. and Segura, J., 1991. Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica*. Plant cell, Tissue and Organ culture, 27: 341-348.
- Biondi, S, Canciani, L. and Bagni, N., 1984. Uptake and translocation of benzyladenine by elm shoots cultured *in vitro*. Canadian Journal of Botany, 62(11): 2385-2390.
- Bonga, J.M. and Aderkas, P.V., 1992. *In vitro* Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers, 236p.
- Chalupa, V., 1983. *In vitro* propagation of willows (*Salix* spp.), European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.) and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). Biologia Plantarum, 25(4): 305-307.
- Chalupa, V., 1987a. Effect of benzylaminopurine and Thidiazuron on *in vitro* shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudoacaciae* L. Biologia Plantarum, 299(6): 425-429.
- Chalupa, V., 1987b. European hardwoods: 224-246. In: Bonga, J.M. and Durzan, D.J., (Eds.). Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 3. Martinus Nijhoff Publishers, 440p.
- Chalupa, V., 1992. Micropropagation of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.) and wild service tree (*Sorbus torminalis* L.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, 18: 211-226.
- Chalupa, V., 2002. *In vitro* propagation of mature trees of *Sorbus aucuparia* L. and field performance of micropropagated trees. Journal of Forest Science, 48(12): 529-535.
- Driver, J.A. and Kuniyuki, A.H., 1984. *In vitro* propagation of *Paradox walnut* rootstocks (*Juglans hindsii* × *J. regia*). Horticultural Science, 19: 507-509.
- Jorjensen, J. and Bindhung, H., 1984. Callus regeneration with protopolasts of *Sorbus aucoparia L.* Zeitschrift-fur- Pflanzenphysiologie, 113: 371-372.
- McCown, B.H. and Sellmer, J.C., 1987. Media and physical environment: 4-17. In: Bonga, J.M. and Durzan, D.J., (Eds.). Cell and Tissue Culture in Forestry (Vol 1), General principles and Biotechnology. Martinus Nijhoff Publishers, Pordrecht, 422p.
- Murashige, T. and Skooge, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco Tissue Culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-597.
- Suvorova, V.V., Kuznetsova, S.M., Udachina, E.G. and Slyusrenko, A.G., 1990. Mass clonal propagation of hybrid Sorbus. Byulleten-Glavnogo. Botanoches Kogosala. 156: 78-83.

Effect of medium, plant growth regulators and genotype on *In vitro* regeneration of *Sorbus aucuparia* L.

M. Emam[1*], A. Ghamarizare[2], K. Espahbodi[3], T.S. Naraghi[2], Sh. Shahrzad[2] H. Zare[4] and L. Mirjani[2]

1*- Corresponding author, Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, Iran, E-mail: memam@rifr-ac.ir
2- Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, Iran
3- Research Center for Agriculture and Natural Resources, Mazandaran, Sari, Iran
4- Research Center for Agriculture and Natural Resources, Mazandaran, Noshahr, Iran

Received: December 2010 Revised: August 2011 Accepted: October 2011

Abstract

Sorbus aucuparia is a medicinal species belonging to Rosaceae family. Its medicinal value is due to its fruit and leaves. To investigate the effect of medium, plant growth regulators and genotype on *In vitro* regeneration of *Sorbus aucuparia*, apical buds were collected from adult trees at different localities (Siabishe, Farim and Foolad mahalle) in all seasons. Cleaning and brushing of buds with tween and ethanol 70% solution was identified as the best method of buds sterilization. For sterilization phase, treatment solution of 0.1% HgCl2 for four minutes and three minutes were respectively identified as the best treatments for Farim and Siabishe at the beginning of the winter season. This treatment was useful for 5 minutes in summer for genotypes of Foolad mahalle. The best medium for shoot regeneration was DKW with BA 0.5 mg/lit, TDZ 0.05 mg/lit and IBA 0.1 mg/lit. Shoot growth was achieved in MS with 2ip 0.5 mg/lit. Shoots were rooted in MCM suspension medium supplimented with vermiculite and 1.5 mg/lit IBA under dark conditions.

Key words: *Sorbus aucuparia* L., Genotype, *In vitro* regeneration, plant growth regulator.