DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2012.6698

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۹، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۷۳-۲۶۳ (۱۳۹۰)

ریزازدیادی درخت جنگلی تیس (*Sorbus aucuparia*) از طریق کشت ریزنمونه جوانه گیاه بالغ

میترا امام*[۱]، عباس قمری زارع[۲]، کامبیز اسپهبدی[۳]، طیبه سهیلا نراقی[٤] و شکوفه شهرزاد[٤]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، مربی پژوهش، 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 ساری، مازندران
٤- کارشناس خبره، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۳/۲۹

چکیده

ریزازدیادی گونه درختی کُندرشد تیس (*Sorbus aucuparia*) به دلیل تجدید حیات جنگل در مناطق صخره‌ای بالابند کوهستانی و ارزش دارویی، صنعتی و زینتی آن از اهمیت بالایی برخوردار است. در معرض انقراض بودن پایه‌های تیس در جنگل‌های شمال ایران، ریزازدیادی پایه‌های مسن این گونه را از طریق کشت جوانه ضروری نموده است. به‌طوری که برای دستیابی به روش مناسب ریزازدیادی از طریق کشت جوانه انتهایی و جوانه جانبی حاصل از قلمه شاخه از پایه‌های بالغ تیس منطقه سنگده و فریم در شهرستان ساری استفاده شد. پیش سترون‌سازی، شستشو و برس‌کشی نمونه‌ها با مایع ظرفشویی و بعد با محلول اتانل ۷۰ درصد و در نهایت غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول قارچ‌کش تیرام ۲ گرم در لیتر برای ۲٤ ساعت انجام شد. محلول ۰/۱ درصد کلرید جیوه به مدت ۷ دقیقه در خصوص نمونه‌های تهیه شده در انتهای فصل پاییز مناسب‌ترین تیمار سترون‌سازی بود. محیط کشت DKW با هورمون‌های BA، TDZ و IBA در غلظت‌های به ترتیب ۰/۵، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر مناسب‌ترین محیط کشت شاخه‌زایی و تکثیر شاخه بود. کشت جوانه جانبی از قلمه ساقه در محیط کشت MS حاوی ورمیکولیت نسبتاً موفقیت‌آمیز بود. پیش تیمار ریشه‌زایی در محیط کشت پایه بدون هورمون به مدت یک ماه و بعد ریشه‌زایی در محیط کشت تغییر یافته MCM با هورمون IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و در شرایط تاریکی انجام شد. در ضمن گیاهان کشت بافتی حاصل در گلخانه مراحل سازگاری خود را با موفقیت طی نمودند.

واژه‌های کلیدی: تیس، ریزازدیادی، جوانه انتهایی، جوانه جانبی و کشت بافت.

مقدمه

تیس با نام علمی *Sorbus aucuparia* از گونه‌های مهم جنس *Sorbus* و از اعضای خانواده Rosaceae شامل ۱۰۰ گونه از درختان و بوته‌های خزان‌کننده است که در زمین‌های کم ارتفاع تا ارتفاعات بالای جنگل‌های کوهستانی در بخش شمالی اروپا، آسیا، شمال آمریکا و آفریقای شمالی گسترش یافته است. این درخت در ایران شش گونه دارد و در جنگل‌های شمال از ارتفاع ۱۷۰۰ تا ۲٦۰۰ متر از سطح دریا دیده می‌شود و نام محلی آن در ارتفاعات نور و مازندران، تیس است (Sabeti, 1965).

این گیاه از سازگارترین درختان جنگلی سخت چوب می‌باشد و در احیای مجدد جنگل در بخشهایی از کوهستان که این گیاه از بین رفته است قابل استفاده است. چوب آن برای صنایع با ارزش تجاری مثل مبلمان سازی، روکش و کاغذسازی استفاده می‌شود. مشکلاتی که تکثیر گیاه از طریق سایر روش‌های غیرجنسی نظیر قلمه و پیوند دارد و نیز این مسئله که تکثیر از طریق بذر گیاه منجر به تفرق صفات ژنتیکی آن می‌شود، منجر به رویکرد محققان به ازدیاد آن از طریق روش‌های مختلف ریزازدیادی (نظیر کشت جوانه انتهایی، جانبی و کشت جنین) شده است و در این راستا، نیاز مبرم به شناسائی پایه‌های مادری موجود در جنگل‌های شمال و اقدام در جهت حفاظت و تکثیر این پایه‌ها، احساس می‌گردد. از طرف دیگر تکثیر پایه‌های نخبه مورد نظر از طریق کشت بافت، می‌تواند در جهت احیای جنگل‌های مخروبه مفید باشد.

بطورکلی بررسی‌های مربوط به کشت بافت گونه بارانک و تیس محدود بوده و بیشتر بر کشت جنین، کالوس و امتزاج پروتوپلاستی متمرکز شده است. در این خصوص Chalupa (1981-1990) در طی تحقیقاتی برکشت بافت گونه‌های درختی *Sorbus*، با کشت گره در محیط کشت MS (Murashige & Skoog medium, 1962) با مقادیر کم از BAموفق به تولید شاخساره شد. او با کاربرد تلفیقی دو هورمون اکسین IBA و NAA این شاخه‌ها را ریشه‌دار نمود و در نهایت موفق به تولید گیاهچه و نهال شد. وی در سال ۱۹۸۷ در ادامه تحقیقات خود به بررسی اثر BA و TDZ بر شاخه‌زایی تیس پرداخت و متوجه شد که BA در غلظت ۱-۰/۲ میلی‌گرم در لیتر و TDZ در غلظت ۰/۵ تا ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر بهترین نتیجه را می‌دهد.

همچنین Chalupa (2002) تکثیر سریع شاخه در تیس را با کشت ریزنمونه‌های جوانه انجام داد. در این تحقیق محیط کشت DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) دارای آنتی‌اکسیدانت PVP در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر با هورمون‌های BA، TDZ و IBA در غلظت‌های به‌ترتیب ۰/۵، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر در مرحله شاخه‌زایی و تکثیر حاصل از رشد جوانه انتهایی و جانبی، به‌عنوان ترکیب بهینه انتخاب شد. این پژوهش با هدف تولید نهال از پایه‌های نخبه به‌منظور جنگل‌کاری با حفظ تنوع ژنتیکی در ارتفاعات و منطقه بالابند جنگل‌های شمال کشور و همچنین در صورت نیاز احداث جنگل‌های یکنواخت با هدف تولید مواد اولیه یکسان برای استحصال مواد مؤثره دارویی انجام گردید.

مواد و روشها

یکی از رویشگاه‌های تیس در ایران منطقه سنگده و فریم شهرستان ساری تا جنوبی‌ترین مناطق استان سمنان می‌باشد. نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش از سه ژنوتیپ با شماره‌های ۲۳، ٢٤ و ۲۵ در ارتفاع ۱۸۰۰ متری از سطح دریا با درختان دارای قطر ٤٠-٢٠ سانتی‌متر و ارتفاع ۳-۲ متر و میانگین سن از ۲۰-۱۵ سال بدست آمد. سرشاخه‌های هر پایه مجزا شد و بعد از تقسیم به قطعات ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متری جدا شده و نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی و در یخدان به آزمایشگاه منتقل و در کوتاهترین زمان ممکن سترون‌سازی و کشت شدند.

پیش‌تیمار سترون‌سازی: از روش‌هایی نظیر الف: برس‌کشی با مایع ظرفشویی، ب: برس‌کشی با محلول الکلی ۷۰ درصد، ج: استفاده از محلول قارچ‌کش تیرام

(Tyram) ۰/۲ درصد و د: پوسته‌برداری از جوانه‌ها و قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۳۰ تا ٦۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد، جهت کاهش آلودگی‌های سطحی استفاده شد.

تیمارهای سترون‌سازی: از این مرحله، کار در زیر هود مخصوص کشت بافت انجام شد. برای سترون کردن جوانه‌ها از محلول سترون‌سازی کلرید جیوه ۰/۱ درصد و محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد در زمان‌های از ۲ تا ۹ دقیقه با توجه به فصل نمونه‌برداری استفاده شد. همچنین، چند قطره مایع ظرفشوئی یا صابون مایع به‌عنوان عامل مرطوب کننده و برای نفوذپذیری بیشتر محلول سترون‌سازی به آن افزوده شد. برای حذف این محلول‌ها در هر مرحله، جوانه‌ها ۳ بار با آب مقطر سترون شده، شستشو داده شدند. ریزنمونه‌ها معمولاً حاوی یک یا دو جوانه و یک پایه به ابعاد ۰/۵ تا ۱/۵ سانتی‌متر بودند. قبل از قرار دادن ریزنمونه در محیط کشت، ۱ تا ۲ میلی‌متر از انتهای قاعده آن قطع گردید. نمک‌های معدنی و ویتامین‌های DKW با ساکارز ۳ درصد و PVP به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌عنوان محیط کشت پایه برای کشت جوانه به‌کار گرفته شد. ریزنمونه‌ها در محیط غذایی DKW شامل سیتوکنین‌های 2iP، BA و TDZ به همراه اکسین IBA کشت شدند (جدول ۱). محیط‌های کشت با ۰/٦۸ درصد آگار جامد و برای مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. کشت‌ها در شرایط نوری ۱٦ ساعت نور (۵۰۰۰-۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ -۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و پس از استقرار و رشد جوانه‌ها سه واکشت با فاصله ٤ هفته انجام شد و تعداد تکرارها در هر تیمار ۲۵ عدد بود (۵ شیشه و در هر یک ۵ نمونه). در این تحقیق برای آزمون آماری، اعداد مربوط به ضریب ازدیاد (متوسط تعداد جوانه و شاخه در هر تکرار) و رشد طولی شاخه‌ها انتخاب شد. نتایج با نرم‌افزار SPSS و در قالب آزمایش فاکتوریل GLM بر پایه طرح کاملاً تصادفی تجزیه و میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شدند.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی مورد استفاده در مرحله شاخه‌زایی (غلظت هورمون‌ها برحسب میلی‌گرم در لیتر می‌باشد).

تیمار هورمونی	IBA	TDZ	BA	2iP
T1	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۵	-
T2	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۵	۰/۵
T3	۰/۱	۰/۰۵	۰/۵	-

ریشه‌زایی

ابتدا انتقال شاخه‌های به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر به محیط کشت DKW بدون هورمون برای یک ماه به‌عنوان پیش‌تیمار ریشه‌زایی انجام شد. بعد نمونه‌ها به محیط کشت MCM (McCown's Woody plant Medium, 1981) با غلظت نصف از املاح نیترات و حاوی هورمون ریشه‌زایی اکسین (IBA و NAA) در غلظت‌های مختلف (جدول ۲) منتقل شدند.

جدول ۲- تیمارهای هورمونی مورد استفاده در مرحله ریشه‌زایی

تیمار هورمونی (mg/L)	IBA	NAA
T1	۰/۳	۰/۳
T2	۰/۵	-
T3	۱	-
T4	-	۰/۵
T5	-	۱

گیاهان حاصل در مخلوط خاک پیت، پرلیت، ورمیکولیت به ترتیب با نسبت ۲، ۰/۵، ۲ سترون‌سازی در گلدان‌های سرپوش‌دار و گلخانه تحقیقاتی به مدت ۲ ماه نگهداری گردید و پس از طی مراحل سازگاری به خارج از گلخانه منتقل شد.

کشت جوانه جانبی از قلمه ساقه

تعدادی از شاخه‌های ژنوتیپ ٢٦ منطقه فریم – سنگده به طول ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر پس از شستشو با آب و مایع ظرفشویی در داخل آب در گلدان و در درون محیط آزمایشگاه و نور معمولی اطاق برای مدت یک هفته قرار گرفت تا جوانه‌زنی کند. بعد مراحل سترون‌سازی جوانه‌های جانبی حاصل به شرح زیرانجام شد. ابتدا شستشو با برس و مایع ظرفشویی و بعد قرارگیری در محلول قارچ‌کش تیرام ٤ گرم در لیتر برای مدت ۳ ساعت انجام شد. آنگاه سترون‌سازی نمونه‌ها در دو تیمار ۱- با محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد برای مدت ۵ دقیقه و ۲- شستشو با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد برای ۱۵ دقیقه انجام شد. بعد نمونه‌های ضدعفونی شده در محیط کشت پایه MS فاقد ساکارز و آگار و دارای نصف غلظت از املاح نیترات و ورمیکولیت (۲۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) به‌همراه هورمون اکسین NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفت. در ضمن تعداد نمونه‌ها ۲۵ عدد (۵ ظرف مگنتا G7 و در هر یک ۵ نمونه) بود.

نتایج

با توجه به آلودگی‌های داخلی و سطحی گیاهان مورد بررسی، برای استقرار جوانه از آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (Cefotaxim) با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب محیط کشت استفاده شد.

در مرحله سترون سازی جوانه‌ها، مناسب‌ترین پیش تیمار شامل شستشوی مکرر نمونه‌ها با مایع ظرفشویی و آب جاری و برس‌کشی با مایع و محلول اتانل ۷۰ درصد و بعد پوسته‌برداری نمونه‌ها و آنگاه غوطه‌وری آنها در محلول قارچ‌کش تیرام ۲ گرم در لیتر برای ٢٤ ساعت بود.

در مورد نمونه‌های سه ژنوتیپ رویشگاه فریم، بیشترین استقرار نمونه‌ها در انتهای فصل پاییز برای ژنوتیپ ۲۳ و با تیمار سترون‌سازی شستشوی نمونه‌ها با محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت زمان ۷ دقیقه (جدول ۳) بود. در ضمن کاربرد شستشو با محلول قارچ‌کش تیرام ۲ گرم در لیتر در ضدعفونی نمونه‌های ژنوتیپ ۲۳ با تیمار مشابه به طور معنی‌داری مؤثر بود (جدول ٤).

جدول ۳- بررسی تأثیر تیمارهای مختلف سترون‌سازی بر استقرار نمونه ژنوتیپ‌های فریم در پاییز

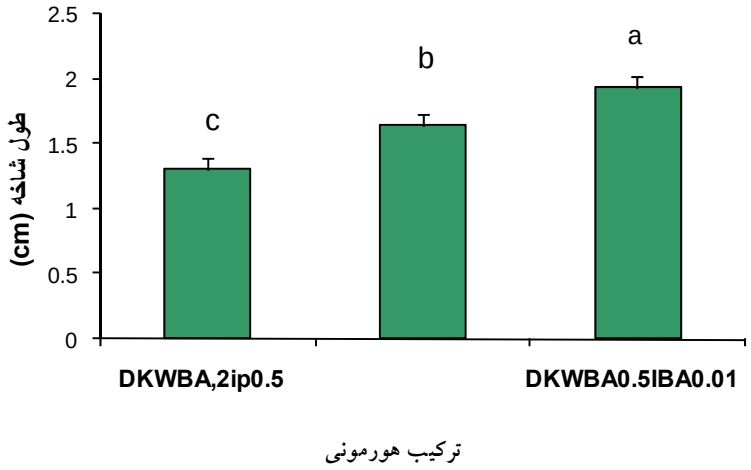
تیمار ضدعفونی	درصد استقرار نمونه	درصد آلودگی باکتریایی
ژنوتیپ ۲۳، تیمار ۱	٥٤a	٤٦c
ژنوتیپ ۲۳، تیمار ۲	۰d	۱۰۰a
ژنوتیپ ۲٤، تیمار ۱	۳۳b	٦۷b
ژنوتیپ ۲٤، تیمار ۲	۰ d	۱۰۰a
ژنوتیپ ۲۵، تیمار ۱	۰ d	۱۰۰a
ژنوتیپ ۲۵، تیمار ۲	٦ c	۹٤ab

تیمار ۱ = ۷ دقیقه غوطه‌وری در محلول کلریدجیوه ۰/۱درصد، تیمار ۲ = ۹ دقیقه غوطه‌وری در محلول کلریدجیوه ۰/۱ درصد

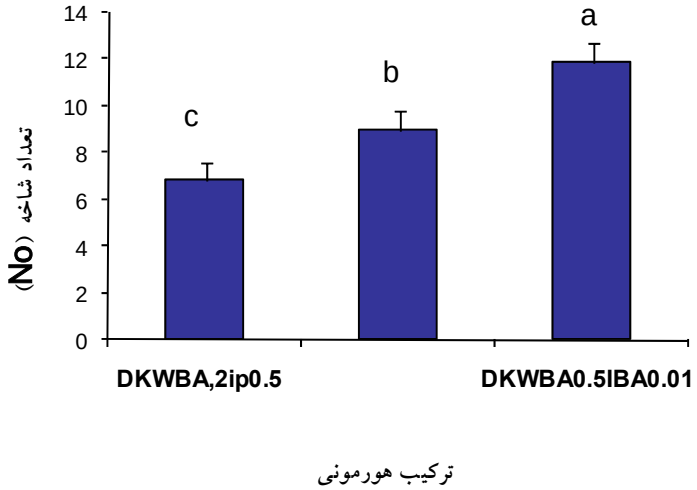
جدول ٤- بررسی تأثیر تیمارهای شستشو با قارچ‌کش تیرام و بدون آن بر نمونه‌های ژنوتیپ ۲۳ فریم

تیمار ضدعفونی	درصد استقرار نمونه	درصد آلودگی باکتریایی
تیمار ۱، قارچ کش	۲۲a	۷۸c
تیمار ۲، قارچ کش	۱٤b	۸٦b
تیمار ۱	۰c	۱۰۰a
تیمار ۲	۰c	۱۰۰a

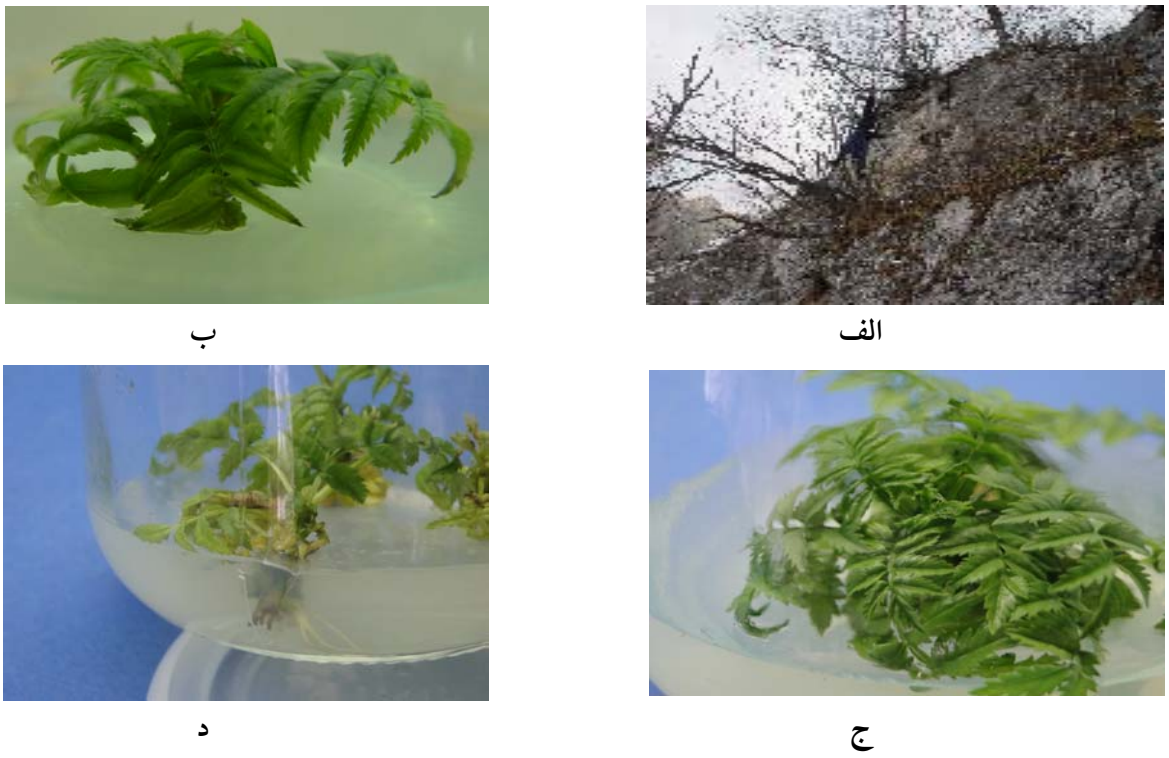
تیمار ۱= ۱۰ دقیقه غوطه‌وری در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد، تیمار۲= ۲۰ دقیقه غوطه‌وری در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد



شکل ۱- ضریب ازدیاد شاخه تیس در تیمارهای مختلف هورمونی



شکل ۲- رشد طولی شاخه تیس در تیمارهای مختلف هورمونی



شکل ۳- مراحل مختلف ریزازدیادی گونه تیس از طریق کشت جوانه (الف: پایه بالغ تیس، ب: رشد جوانه، ج: تکثیر متعدد شاخه، د: ریشه‌زایی گیاه کشت بافتی).

میانگین‌های عوامل رشد (ضریب ازدیاد و رشد طولی) تحت تأثیر هورمون و تأثیر متقابل هورمون و تکرار در سطح ۵ درصد معنی‌دار بوده و شکل‌های (۳- ب و ۳- ج) نشان داد که محیط کشت DKW به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ بیشترین تعداد شاخه را تولید نمود و میانگین رشد طولی نیز در همان غلظت دارای بیشترین مقدار بود. همچنین در مورد تأثیر غلظت اکسین بر میزان شاخه‌زایی و رشد طولی، مشخص گردید که IBA در غلظت ۰/۰۱ نسبت به ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر آن، مؤثرتر بوده است.

در مرحله ریشه‌زایی، بیشترین میزان ریشه‌دار شدن نمونه‌ها در تیمار مربوط به IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد (جدول ۵ و شکل۳- د) و از نظر میزان سازگاری، گیاهان کشت بافتی پس از انتقال به خاک گلدان و در شرایط گلخانه‌ای حدود ۶۰ درصد سازگاری از خود نشان دادند.

کشت جوانه جانبی از قلمه ساقه: نمونه‌های سترون‌سازی شده با محلول هیپو کلریت سدیم، ۱۰۰ درصد دچار آلودگی قارچی شده و از بین رفتند. در تیمار سترون‌سازی با محلول کلرید جیوه، نمونه‌ها دچار آلودگی میکروبی بودند که در مرحله بعد این نمونه‌ها با محلول آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر ضدعفونی و شستشو شده و بعد به محیط کشت MS دارای آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و آسکوربیک‌اسید (به ترتیب با غلظت ۲۰۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند، که از تعداد ۱۵ ریزنمونه این تیمار تنها ۱۲ درصد آنها سبز و فعال بود که به محیط بهینه شاخه‌زایی (تیمار ۱) منتقل شد.

جدول ۵- میانگین درصد ریشه‌زایی نمونه‌های بالغ تیس در تیمارهای مختلف هورمونی اکسین در محیط کشت MCM

هورمون	NAA		IBA		NAA + IBA
غلظت (mg/L)	0.5	1	0.5	1	0.3 + 0.3
درصد ریشه‌زایی	۱۱/۱c	۰d	۲۲/۲b	۳۳/۳a	۰d
درصد نکروزگی	۳۳/۳d	٦٦/٦a	۵۵/۵b	۵۵/۵b	٤٤/٤c

بحث

تکثیر درختان از طریق کشت بافت در آینده می‌تواند با سرعتی متناسب با سرعت تخریب، برای کشت و تجدید حیات دوباره جنگل‌ها مورد استفاده قرار بگیرد. آنچه باعث برتری این روش بر سایر روش‌ها می‌باشد، سرعت تکثیر و امکان کاربرد آن در مورد گیاهان بالغ مسن است. در روش‌های سنتی برای اصلاح درختان فقط یک یا چند خصوصیت ویژه، اما در این روش کلیه خصوصیات درخت انتقال می‌یابد. اندام‌زایی از طریق کشت جوانه موفق‌ترین و آسان‌ترین روش ممکن می‌باشد. زیرا جوانه بالقوه توانایی تکثیر و تولید اندام‌های جدید را دارد و به همین دلیل این اندام از ثبات ژنتیکی کافی برخوردار بوده و کمترین مقدار تغییرات ژنتیکی در تکثیر به این روش دیده می‌شود (Bonga & derkas, 1992). با توجه به خطر رو به انقراض بودن بیشتر گونه‌های جنس سوربوس از جمله بارانک و تیس، تکثیر غیرجنسی پایه‌های سالم این گونه از طریق کشت بافت می‌تواند منجر به حفاظت از این منابع ژنتیکی با ارزش، شود. نتایج آزمایش‌های انجام

شده نشان داد که در مورد گونه‌های پهن برگ نظیر تیس، وجود لایه‌های محافظ پوششی (فلس مانند) بر روی جوانه‌ها و وضعیت فیزیولوژیکی حاکم بر بافت‌ها و خفتگی جوانه‌ها بخصوص در اواخر فصل پاییز و ابتدای فصل زمستان، امکان کاربرد غلظت‌های بالاتر مواد سترون کننده را فراهم می‌کند، در حالی‌که در بهار و تابستان به دلیل رشد فعال جوانه‌ها و نبود پوسته محافظ در اطرافشان، سرعت نفوذ محلول‌های ضدعفونی کننده در بافت زیاد بوده و غلظت‌های زیاد محلول به پوسیدگی و مرگ بافت منجر شده و غلظت کم آنها تأثیری بر حذف آلودگی‌های نمونه ندارد. در بررسی اخیر سترون‌سازی و استقرار مناسب نمونه‌ها در این فصل بدست آمد (جدول۳). برس‌کشی سطح جوانه‌ها با مایع ظرفشوئی و اتانل در حذف زوائد سطح جوانه مؤثر بود و آلودگی‌های سطحی را تا حد امکان به‌حداقل رسانید. اتانل نیز با حذف لایه مومی سطح کوتیکول به محلول اصلی ضدعفونی اجازه می‌دهد که قدرت نفوذ و تأثیر بهتری را بر بافت نمونه داشته باشد (Enjarlic,1988). کاربرد محلول کلریدجیوه به‌عنوان ضدعفونی‌کننده اصلی بدین علت بود که مقادیر ضعیف این محلول در زمان‌های کوتاه مدت تأثیر قوی و ماندگاری بر حذف آلودگی‌های میکروبی داشته و باعث مرگ و قهوه‌ای شدن نمونه‌ها نیز نمی‌شود. مشابه تحقیق اخیر در ریزازدیادی گونه اکالیپتوس گرندیس (*E. grandis*)، ضدعفونی جوانه‌ها در فصل تابستان و با تیمار کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۷ دقیقه به‌عنوان بهترین تیمار سترون‌سازی سطحی استفاده شد (Emam, *et al.*, 2009). در این تحقیق، با توجه به وجود ترکیبات فنلی در درون بافت‌های گونه مورد بررسی، از محلول PVP و اسید آسکوربیک جهت حذف این مواد و تحریک شاخه‌ها به رشد استفاده شد. Emam (2009) گزارش کرد که افزودن PVP موجب فرونشانی ترکیب‌های فنلی از ریزنمونه‌های اکالیپتوس گرندیس می‌شود. Chalupa (1987) نیز با مطالعه ریزنمونه‌های انتخاب شده از جنس‌های سخت چوب درختان بالغ نظیر *Acer* و *Fagus* که به طریق ریزازدیادی تکثیر می‌شوند، نتیجه گرفت که درباره موارد مذکور، ریزازدیادی با ریزنمونه‌های گرفته شده از درختان بالغ با مشکل روبروست و علت آن را می‌توان در وجود مواد بازدارنده رشد در نمونه‌های بالغ دانست. در توضیح رشد محدود جوانه‌های قلمه درختان بالغ تیس می‌توان به گزارش Vietz (1987) اشاره نمود که متوجه کاهش ریشه‌زایی قلمه‌های گرفته شده از پایه بالغ نسبت به نهال بذری این گونه شد. در بین تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در مرحله شاخه‌زایی، بیشترین میانگین ضریب ازدیاد و رشد طولی شاخه در محیط کشت DKW و با ترکیب هورمونی BA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد. در مقایسه میانگین‌های عوامل رشد (میانگین ضریب ازدیاد و رشد طولی) تحت تأثیر تنظیم کننده‌های رشد و نیز اثر متقابل هورمون و تکرار به نظر می‌رسد که تیمار هورمونی BA به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و IBA ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نسبت به سایر تیمارهای مورد بررسی به طور معنی‌داری مؤثرتر بوده است. Bonga و Aderkas (1992) نیز نتیجه گرفتند که تیمار سیتوکنین به‌همراه اکسین در غلظت‌های ضعیف در ایجاد شاخه‌های نابجا، بخصوص در آغاز شاخه‌زایی مؤثر بوده است.

به طور کلی در مورد تحریک جوانه‌های جانبی شاخه تیس به رشد در محیط کشت سوسپانسیون MS واجد

ورمیکولیت، ۱۲ درصد موفقیت بدست آمد. البته بـه نظـر می‌رسد تحریک رشد رویشی جوانه بـا فراینـد بـازجوانی قلمه گرفته شده از ساقه منشا بالغ در ارتباط بوده است. از طرفی استفاده از محیط کشت سوسپانسـیون فاقـد آگـار و دارای ورمیکولیت با ایجاد تخلخـل و مبادلـه هـوا کـه در رشد سلول‌های بافت ریزنمونه مؤثر و نیز کاهش امـلاح و ساکارز محیط کشت که محرکی مناسب برای ریشـه‌زایـی نمونه است، ازجمله عوامـل مـؤثر در موفقیـت ایـن نـوع کشـت بـود. ایـن نتیجـه بـا تحقیـق عصـاره و همکـاران (Assare, *et al*., 2007) بر گونه‌های مختلـف اکـالیپتوس همخـوانی داشـت. آنهـا نیـز از محـیط کشـت تلفیقـی سوسپانسیون و ورمیکولیت برای ریشه‌دار نمـودن گیاهـان کشت بافتی خود استفاده نمودند.

برای تحریک شاخه‌ها به ریشه‌زایی، اعمال پیش تیمـار محیط کشت بدون هورمون کاملاً ضروری می‌باشد. القـای تشکیل ریشه بوسیله اکسین به تجمـع فلاونوئیـدها منجـر شده که این اتفاق در حضور سیتوکنین صورت نمی‌گیـرد (Curir, 1990)، بنابراین حداقل یکماه قبل از تیمار اکسین برای القای ریشه، شاخه‌ها در محیط کشت بدون هورمـون کشت شدند. لازم به یادآوریست که ریشه‌زایی مناسب در محیط کشت دارای IBA به مقدار یک میلی‌گرم در لیتـر و در تاریکی حاصل شد. باید اضافه کرد که ریشه‌زایی آسان گیاه ملچ در محیط کشت بدون هورمون یا حاوی IBA به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتـر توسـط Cheng, Shi (1995) گزارش شده است.

سپاسگزاری

از همکاران محترم در سـتاد مؤسسـه، از جملـه خـانم مهندس اسدی‌کرم و در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ساری – استان مازندران، آقایـان مهنـدس قاسـمی، مهندس خرنکه، مهندس خرمی و سایر افـرادی کـه در آن مرکز به‌نحـوی در اجـرای طـرح مزبـور بـا مـا همکـاری داشته‌اند، کمال تشکر و سپاسگزاری را می‌نماییم.

منابع مورد استفاده

– Emam, M., Assare, M.H., Shahrzad, Sh., Khojir, K., 2009. Asexual regeneration of *Eucalyptus grandis* by tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 18: 35-43.
– Sabeti, H., 1965. Plants and Plantlets of Iran. Tehran University Publications, 784p.
– Assare,M.H., Sardabi, H., 2007. Introduction of micropropagation protocols of some *Eucalyptus* species. 567-604. In: Eucalyptus, Vol 1, Research Institute of Forestry and Rangelands Publications. 672 p.
– 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, European mountain ash (*Sorbus aucuparia L*) and black locust. Biologia Plantarum, 25 : 305-315
– Chalupa,V., 1987. Effect of benzyl amino purine and Thydiazuron on *in vitro* shoot proliferation of *Tilia cordata Mill*., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudo acaciae* L. Biologia Plantarum, 29: 425-429.
– Chalupa,V., 1988. *In vitro* propagation of small – leaved linden, black locust and mountain ash (*Sorbus aucuparia* L) and growth of tree cultivated *in vitro*. Lesnictvi, 34 : 705-720
– Chalupa,V., 1992. Micropropagation of mountain ash (*Sorbus aucuparia* L) and wild service tree (*Sorbus torminalis* L.): 211-225. In: Bajaj, Y.P.S.(Eds) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol: 18. High- tech and Micropropagation Springer- Verlag, Berlin, 509 p.
– Chalupa,V., 2002. *In vitro* propagation of mature trees of *Sorbus aucuparia* L and field performance of micropropagated trees. Journal of forest science, 48: 529-535.
– Cheng, Z.M. and Shi,N,Q., 1995. Micropropagation of mature Siberian elm. Plant cell tissue and organ culture, 41: 197-199.
– Curir, P., Sumerect, V., Termini, A., 1990. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious root formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. Plant Physiology, 92: 1148-1153.

– Driver,J. A., and Kuniyuki, H., 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut root stocks (*J. hindsii* J. regia*). Hort Science, 19:507-509.
– Enjarlic, F., and Lardet, L., 1988. Contamination of primary culture in tropical areas. Acta Hort, 225: 57-65.
– McCown, B.H., and Sellmer, J.C., 1982. Media and physical environment. In: Bonga, J.M and D.J. Durzan, (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.
– Sanjose, M.G, 1988. Factors affecting *in vitro* propagation of *Quercus.robur* L .Tree Physiol, 4: 281-290.
– Vieitez, J and Vieitez, E, 1987. Identification of two compounds correlated with the lack of rooting capacity of chestnut cuttings. Tree Physiology, 3: 247-255.

Micropropagation of forest tree of *Sorbus aucuparia*.L by bud culture of mature plants

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

1*- Corresponding author, M.Sc., Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, I.R.Iran
E-Mail: memam@rifr-ac.ir
2- Assis. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, I.R.Iran
3- Assis. Prof., Agriculture and Natural Resources Research Center, Mazandaran, Sari, I.R.Iran
4- B.Sc., Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, I.R.Iran

Received: 04.12.2010 Accepted: 19.06.2011

Abstract

Sorbus aucuparia is an important slow growing forest tree with medicinal, industrial, and ornamental uses which is used for reforestation in high altitudes of mountainous areas. The species was endangered at northern forests of Iran. Therefore, micropropagation of adult trees through bud culture can help in conservation purposes of the species. For investigation of micropropagation of the species, apical and lateral buds from micro-cutting shoots of the adult trees were collected from Farim and Sangdeh, Sari Province. Pretreatments of sterilizing were cleaning and brushing of the buds with detergent and ethanol 70% solution and then dipping in 0.2 % fungicide of Tyram for 24 hours. Cleaning of buds with % 0.1 HgCl2 solution for 7 minutes for the samples of the end of fall season was the best treatment. The best medium for shoot regeneration was DKW medium with BA (0.5 mg/l), IBA (0.01 mg/l) and TDZ (0.05 mg/l). Lateral buds culture from shoot cutting was relatively successful in MS medium mixed with vermiculite. Pre-treatment for rooting of shoots was done in free hormone medium and rooting of shoots was done in modified MCM medium supplemented with 1 mg/l of IBA in dark treatment. The plantlets were successfully acclimated in green house.

Key words : *Sorbus aucuparia* , Micropropagation, Terminal bud, Latheral bud and Tissue culture.