دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۷، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۱۸۱-۱۷٦ (۱۳۸۸)

گرده‌افشانی مصنوعی و جوانه‌زنی درون شیشه‌ای تخمدان‌های بارور شده در بید (*Salix alba*)

علی جعفری مفیدآبادی
دانشیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات پنبه کشور، گرگان، پست الکترونیک: mofidabad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/٤/۲۸ تاریخ پذیرش:۱۳۸۸/۹/۱

چکیده

به منظور دستیابی به روش تکثیر جنسی در درخت بید با تکثیر غیرجنسی فعال برای ایجاد تنوع ژنتیکی و گزینش پایه‌های برتر، گرده‌افشانی کنترل شده و جوانه‌زنی درون شیشه‌ای تخمدان بارور شده آن انجام شد. با انتقال شاخه‌های گلدار پایه نر به گلخانه، دانه گرده جمع‌آوری شد. گرده‌افشانی مصنوعی بر روی شاخه‌های گلدار پایه مادری در قالب روش ترکه و آب در اتاقک ایزوله در گلخانه انجام شد. برای جوانه‌زنی جنین تخمدان‌های ۱۰، ١٤ و ۲۱ روزه پس از سترون‌سازی به محیط‌کشت MS و Half-MS (نصف عناصر پرمصرف پیشنهادی در یک لیتر محیط‌کشت MS) منتقل شدند. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل نشان داد که از نظر جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری بین سنین مختلف جنین وجود دارد و بیشترین درصد جوانه‌زنی متعلق به جنین با سن ١٤ روزه مشاهده شد (۷۲/۵٪). علیرغم عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین محیط‌های کشت MS و Half-MS در تحریک جوانه‌زنی جنین، بیشترین درصد جوانه‌زنی جنین در محیط‌کشت MS بدست آمد (٦۳/۳٪). تنوع مورفولوژیکی زیادی در میان گیاهان حاصل از کشت تخمدان دیده شد. سی وهفت گیاه پس از انجام موفق سازگاری تدریجی در گلخانه و در مزرعه مستقر شدند.

واژه‌های کلیدی: بید، کشت تخمدان و جنین، تنوع ژنتیکی، تکثیر جنسی و گرده‌افشانی مصنوعی.

مقدمه

صنوبر و بید به خانواده سالیکاسه (Salicaceae) تعلق دارند و برای تأمین سوخت و چوب آلات مورد کشت و کار قرار می‌گیرند (Zsuffa, 1975). تکثیر جنسی از طریق بذر، یک روش اساسی برای ایجاد تنوع ژنتیکی و گزینش پایه‌های مطلوب در این خانواده به شمار می‌رود (Schreiner, 1974 و Jafari & Modir Rahmati, 2000). جمعیت حاصل از ایجاد تنوع ژنتیکی به‌عنوان یک منبع ژنتیکی بسیار مهم برای گزینش کلن‌های جدید مورد استفاده قرار می‌گیرد (Confalonieri *et al.*, 2003 و Argus, 1974). گونه‌های متعلق به این جنس سالیان متمادی است که از طریق تکثیر غیرجنسی (قلمه) زیاد می‌شوند. بنابراین گزینش کلن‌های جدید در بید با مشکل مواجه بوده و یا غیرممکن است. به‌دلیل مرگ و میر زود هنگام بذر، امکان تکثیر جنسی به شیوه سنتی با مشکلات زیاد همراه و یا غیرعملی است (Jafari *et al.*, 1998). روش کشت جنین از طریق کشت تخمدان گرده‌افشانی شده و به‌عنوان ابزار جدید امکان تکثیر جنسی (تکثیر از طریق بذر) و دورگ‌گیری درون و بین گونه‌ای در بید (Ahmedi *et al.* 2008) و صنوبر برای ایجاد تنوع ژنتیکی

استفاده شده است (Sout *et al.*, 1927; Kouider *et al.*, 1984, Li & Li, 1985; Noh *et al.*, 1986; Raquin & Trousard, 1993; Savaka *et al.*, 1987). امکان ایجاد تنوع ژنتیکی، به‌دلیل دو پایه بودن و خصلت چندین جنینی بودن تخمدان گیاهان خانواده سالیکاسه (صنوبر و بید) و الزام عمل برش در کشت تخمدان بالغ در کشت درون شیشه‌ای آن، بسیار بالاست. دلیل ایجاد تنوع ناشی از عمل برش، در واقع قطع سلول راسی جنین منفرد در حال تقسیم است که در کشت درون شیشه‌ای بعضی از گونه‌های گیاهی دیگر نیز مشاهده شده است (Singh, 1978). از آنجایی که پدیده چندین جنینی، از باروری همزمان چندین سلول تخم در داخل یک تخمک ناشی می‌شود بنابراین باید با باروری یک سلول تخم ناشی از لقاح با دانه گرده خاص به لحاظ ساختار ژنتیکی، تفاوت داشته باشد. بنابراین در این تحقیق سعی در ایجاد روش مناسب برای گرده‌افشانی تحت کنترل، شاخه‌های حاوی گلهای ماده (والد مادری) با دانه‌های گرده والد پدری از همان پایه و جوانه‌زنی درون شیشه‌ای جنین‌های بالغ آنها شد.

مواد و روشها

شاخه‌های گلدار حاوی گل‌های نر و ماده بید (*Salix alba*) با سن تقریبی ۳۰ سال از جوامع طبیعی آن در منطقه زرین گل علی‌آباد گرگان واقع در جنگل‌های شمال کشور انتخاب و جمع‌آوری شد. به‌منظور تهیه دانه‌های گرده برای گرده‌افشانی مصنوعی، شاخه‌های گلدار والد نر، در داخل گلخانه وادار به ریزش دانه گرده شدند.

برای انجام گرده‌افشانی مصنوعی، شیوه ترکه و آب براساس روش Jafari و همکاران (1998 و2000) اجرا شد. جهت جلوگیری از گرده‌افشانی با دانه‌های گرده ناخواسته، جوانه شاخه‌های گلدار گل ماده در اطاقک‌های جداگانه در گلخانه نگهداری شدند و گرده‌افشانی مصنوعی با مالیدن گرده‌های مورد نظر روی خوشه‌های گلدار با قلم‌مو انجام شد. خوشه‌های حاوی گلهای (شاتون) تلقیح شده از شاخه‌های گلدار ماده در فواصل ۱۰، ۱٤ و ۲۱ روز جمع‌آوری شدند. کپسول‌های بسته چسبیده به محور گل‌آذین با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و محلول هیپرکلریت سدیم به‌مدت ۱۰ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب‌مقطر ضدعفونی شده هر بار ۵ دقیقه مورد ضدعفونی سطحی قرار گرفتند.

پس از ضدعفونی تخمدان‌های بارور شده جهت تغذیه و رشد این تخمدان‌ها به ظروف آزمایشگاهی (ویال‌های کوچک) حاوی محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) جامد منتقل و تا قبل از انتقال به گلدان برای انجام سازگاری تدریجی در آن نگهداری شدند. اثرهای سنین جنین (۱۰، ۱٤ و ۲۱ روز پس از گرده‌افشانی) و دو نوع محیط‌کشت (MS و Half-MS) بر روی جوانه‌زنی جنین، به‌صورت مقایسه میانگین به روش کی اسکوئر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اسیدیته محیط‌کشت قبل از انجام اتوکلاو روی ۵/۷ تنظیم شد. محیط‌کشت‌های مورد استفاده در ویال‌های شیشه‌ای ۲۰ میلی‌لیتری به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو ضدعفونی شدند. کشت‌ها در اطاق رشد با شرایط نوری ۱٦ ساعت روشنایی و با شدت نور۵۰۰۰-٤۵۰۰ لوکس و با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. گیاهچه‌های بوجود آمده پس از انجام موفق فرایند سازگاری تدریجی در گلدان‌های حاوی خاک سترون با ترکیب ۱:۱:۱ پیت، شلتوک و خاک زراعی ابتدا به گلخانه (به‌مدت ٤ هفته) و بعد به مزرعه انتقال یافتند.

نتایج و بحث

جوانه‌زنی جنین در دو هفته پس از انتقال کپسول‌های ایزوله شده به محیط‌های کشت جامد مشاهده شد (شکل شماره ۱). مشابه این نتایج در آزمایش‌ها برای جوانه‌زنی تخمدان در تلاقی بین جنسی بید و صنوبر (Ahmedi *et al.*, 2008) و در تلاقی بین‌گونه‌ای صنوبر (Jafari *et al.*, 1998, 2006 و Raqiun Trousard, 1993) مشاهده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از اثرهای سن جنین و نوع محیط‌کشت در جوانه‌زنی جنین نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین سن جنین برای جوانه‌زنی جنین در سطح ۵ درصد وجود دارد (جدول ۱). بنابراین سن جنین در جوانه‌زنی آن و تولید گیاه مؤثر است. سن جنین (تعداد روزها پس از گرده‌افشانی) به‌دلیل این‌که دوره تکاملی جنین از مرحله کروی تا کوتیلدونی را شامل می‌شود تأثیر بسزایی در بالغ و یا نارس بودن جنین در زمان ایزوله کردن تخمدان‌ها و جوانه‌زنی آنها دارد. اثر سن جنین در جوانه‌زنی درون‌شیشه‌ای تخمدان‌های کشت شده بید Ahmedi و همکاران، (2008) و گونه‌های مختلف صنوبر (جنس دیگر از این خانواده) توسط Jafari و همکاران (2006)، Kelagry، و همکاران، (2003) و نیز Jafari و Modir Rahmati (2000) نیز گزارش شده است. مقایسه میانگین جوانه‌زنی جنین در سنین مختلف به روش آزمون Chi-square نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ بین آنها وجود دارد. بیشترین درصد جوانه‌زنی جنین، ۷۲/۵ و ٦۲/۵ درصد به‌ترتیب در کشت تخمدان ١٤ و ۲۱ روزه اتفاق افتاد (جدول ۱). نتیجه مشابهی در خصوص زمان لازم (تعداد روزها پس از گرده‌افشانی) برای جوانه‌زنی جنین دورگ بین گونه‌ای صنوبر توسط Raqiun Trousard (1993) نیز گزارش شده است. کمترین مقدار جوانه‌زنی جنین (٤٥ درصد) در کشت تخمدان ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی بدست آمد (جدول ۱). این نتایج بر خلاف نتایج Jafari و همکاران (1999 و 2000) در خصوص تلاقی صنوبر کبوده با صنوبر پده، گونه دیگری از همین جنس است که بهترین مقدار جوانه‌زنی جنین در کشت تخمدان ۲۱ روزه اتفاق افتاد. شکل‌گیری بافت‌های رشته‌ای شکل سفید رنگ که در اواخر تکامل تخمدان در اطراف تخمک صنوبرها بوجود می‌آید، به‌عنوان عامل اصلی کاهش جوانه‌زنی جنین بیان شد. رشته‌های مذکور مانع تماس تخمک‌ها با سطح محیط‌کشت و در نتیجه موجب کاهش جوانه‌زنی جنین می‌گردند.

مقایسه میانگین داده‌های حاصل از اثرهای محیط‌های کشت بکار گرفته شده برای درصد جوانه‌زنی جنین نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین آنها وجود ندارد (جدول ۱). عدم وجود اثرهای معنی‌دار محیط‌های کشت در جوانه‌زنی جنین گونه‌های باغی توسط Confalonieri (۲۰۰۳) و در صنوبر توسط Li و Li (1985) و Kouider و همکاران (1984) و Li و همکاران (1983) نیز گزارش شد. عدم وجود اختلاف معنی‌دار برای بیان تأثیر متقابل سن جنین و محیط‌کشت، نشان می‌دهد که سن جنین اثر مستقل خود را بر روی جوانه‌زنی گذاشته و نوع محیط‌کشت تأثیر چندانی در جوانه‌زنی آن نداشته است. تنوع فنوتیپی در میان گیاهان باززایی شده به لحاظ مورفولوژی برگها بیانگر ایجاد تنوع مورد انتظار در میان گیاهان باززایی شده می‌باشد. دویست هفتاد و چهار عدد گیاهچه پس از انجام سازگاری تدریجی موفق در خاک سترون به گلخانه و بعد به مزرعه منتقل شدند که از میان آنها تعداد ۳۷ عدد نهال در مزرعه مستقر شدند.

جدول ۱- اثر فاکتورهای مستقل محیط‌کشت و سن جنین بر روی جوانه‌زنی جنین بید حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای تخمدان بارور شده

منابع تغییر	سطح معنی‌دار بودن	سطوح اثرها	میانگین (٪)
محیط‌کشت	ns	MS	٦٣/ ٣٣
		Half-MS	٥٦/٦٦
سن جنین (تعداد روز پس از گرده‌افشانی)	*	١٠	٤٥
		١٤	٧٢/٥
		٢١	٦٢/٥
اثر متقابل محیط‌کشت * سن جنین	ns	جنین ١٠ روزه * MS	٥٤/١٦
		جنین ١٤ روزه * MS	٦٧/٩١
		جنین ٢١ روزه * MS	٦٢/٩١
		جنین ١٠ روزه * Half-MS	٥٠/٨٣
		جنین ١٤ روزه * Half-MS	٦٤/٥٨
		جنین ٢١ روزه * Half-MS	٥٩/٥٨

*= اختلاف معنی‌دار در سطح ٥٪ و ns= عدم وجود اختلاف معنی‌دار

شکل ۱- جوانه‌زنی جنین در کشت تخمدان‌ها با سن ١٤ روزه در محیط‌کشت MS

منابع مورد استفاده

–Ahmedi, A., Azad-fer, D. and Jafari- Mofidabadi, A., 2008. Embryo-rescue as a tool in inter generic in *Salix* family (*Salix alba* x *Populus caspica*) hybridization. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 6:149-157

–Argus, G. W., 1974. An experimental study of hybridization and pollination in *Salix* (willow). Can. J. Bot., 52:1613-1619.

–Confalonieri, M., Balestrazzi, A., Bisoffi, S. and Carbonera, D., 2003. *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus* spp: synergy for forest tree improvement. Journal of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer Netherlands, 72:109-138.

–Jafari Mofidabadi, A., Modir Rahmati, A., Tavassoli, A., Kelagry, M. and Asadi, F., 1999. Application of embryo-rescue in inter-specific hybridization of poplar (*Populus alba* . × *P. euphratica* Oliv. and *Populus euphratica* Oliv. X (*Populus alba*). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 43: 38-41.

–Jafari Mofidabadi, A., Zarin-Ball, A., Atemad, A., and Shariet, S. 2006. Inter-specific hybrid of poplar *(Populus caspica* × *Populus alba L.)* using ovary culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 6: 6-9.

–Jafari Mofidabadi. A. and Modir Rahmati, A., 2000. Production of *Populus euphratica Olive. X p. alba L.* hybrid poplars through ovary and ovule cultures. Plant Genetic Newsletter. 122: 13-15.

–Jafari mofidabadi, A., Modir Rahmati, A. and Tavassoli, A., 1998. Application of ovary and ovule culture in *Populus alba L. X. P. euphratica* Olive. hybridization. Silvae Genetica, 47: 332-334.

–Kelagry, M., Jafari-Mofidabadi, A., Taberi, M., and Hosseni, S.M., 2003. Inter-specific hybridization of *P.euphratica* Oliv. through embryo rescue. Pajoohesh & Sazandegi, 61:6-9.

–Kouider M., Skirvin, R. M. and Saladin, K. P., 1984. Culture immature embryo of *Populus deltoides In Vitro*. Can. J. For. Res. 14: 965-958.

–Li W. and Li, J., 1985. *In vitro* culture of hybrid ovules in *Populus.* Sci. Sliv. 21: 339-346.

–Li, W., Wang, R. and Zhu, X., 1983. On the embryo development and ovule culture of interspecific hybrids between *Populus simonii* and *P. pyramidalis* Barkh. Acta Bot. Sin. 25: 409-417.

–Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Phisiol. Plant. 15: 473-479.

–Noh, E. R., Kao, Y. B. and Lee, S. K., 1986. Hybridization between incompatible popular species through ovary and embryo culture. Res. Rep. Inst for. Genet. 22: 9-14.

–Raqiun C. and Trousard, L., 1993. *In vitro* ovary embryo culture as a tool for poplar hybridization. Can. J. Bot., 71 : 1271-1275

–Savaka, M. A., Dawson, J. O., Jokela, J. J. and Skirvin, R. M., 1987. A liquid culture method for rescuing immature embryos of eastern cottonwood. Plant Cell Tissue Organ Cult. 10: 221-226.

–Schreiner, E. J., 1974. *Populus L.* Poplars. In Seeds of Woody Plants in the United States. Edited by C. S. Schopmeyer. Agricultural Handbook No. 450, forest Service,USDA, Washington, DC. Pp. 645-655.

–Singh, H., 1978. Embryology of gymnosperms. Gebruder Borntrager, Berlin-Stuttgart 320 p.

–Sout, A. B., Mckee, R. and Shreiner, F., 1927. The breeding of forest trees for pulpwood. N. Y. Bot. Gar. 28: 49-63.

–Zsuffa, L., 1975. A summary review of inter specific breeding in the genus *Populus L.* In Proceedings 14th Meeting of the Canadian Tree Improvement Association, part 2. Dept. Environment, Canadian Forestry Service, Ottawa. Pp. 107-123.

Artificial pollination and *in vitro* ovule-embryo germination of *Salix alba*

A. Jafari-Mofidabadi

Assoc. Prof., Cotton Research Institute, Gorgan, I.R.Iran E-Mail: mofidabad@yahoo.com

Received 19.07.2009 Accepted: 22.11.2009

Abstract

In order to find a reliable sexual reproduction system of *Salix alba*, and induction of genetic variation of such a highly vegetative propagated tree, controlled pollination and *in vitro* germination of isolated ovaries were conducted. Collected pollen grains in green-house were used for pollination. Artificial pollination was performed by high dusting on female flower using twig and pot system. For embryo germination isolated 10, 14 and 21 days old capsules were transferred to the MS and Half- MS medium. Analysis of recorded data showed that there were significant differences between the different ages of embryos for embryo germination. Highest embryo-germination was observed on 14 days old (Days after pollination) embryos (72/5%). In spite of no significant differences between the studied culture media, the highest embryo germination was observed on MS medium (63/3%). Morphological variation was observed in generated plants from ovary-embryo culture. Thirty seven single plants are left to be developed in the field after successful acclimatization in green-house.

Keywords: *Salix alba*, Ovule-embryo culture, Genetic variation, Artificial pollination and Sexual reproduction