

استفاده از روش کشت تخمدان در تولید دورگ بین گونه‌ای سفید پلت (*Populus caspica* x *Populus alba* L.)

* علی جعفری مفیدآبادی^۱، الهه زرین بال^۲، وحید اعتماد^۳ و شمس‌ا... شریعت‌نژاد^۳

^۱مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، ^۲دانشکده منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، ^۳آسازمان جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

تاریخ دریافت: ۸۳/۸/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/۳/۱

چکیده

کشت درون تخمدان در تولید دورگ‌های بین گونه‌ای سفید پلت (*Populus caspica*) با کبوده *Populus alba* مورد استفاده قرار گرفت. گرده‌افشانی مصنوعی روی شاخه‌های گلدار ماده سفید پلت با دانه‌های گرده کبوده در قالب روش اصلاحی ترکه و آب انجام شد. روش گرده‌افشانی مصنوعی مشابه روی شاخه گلدار ماده صنوبر کبوده با دانه گرده سفید پلت برای انجام تلاقی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. جهت جوانه‌زنی جنین، تخمدان‌ها از کپسول‌های توسعه یافته ایزوله و به محیط کشت MS فاقد هورمون‌های رشد گیاهی منتقل شدند. اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های کشت برای تکامل و جوانه‌زنی جنین در خصوص تلاقی *Populus caspica* x *P. alba* L. مشاهده نشد. اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین سنین مختلف جنین در کشت برای هر دو نوع تلاقی وجود داشت. بیشترین درصد جوانه‌زنی جنین در هر دو نوع تلاقی (*Populus caspica* x *P. alba* L.) و (*Populus alba* L. x *P. caspica*) در ۱۴ روز پس از گرده‌افشانی (تعداد روزهای پس از گرده‌افشانی) مشاهده شد (بترتیب ۲۳/۹ و ۵۳/۱۲ درصد). گیاهچه‌ها در ارتفاع ۵ تا ۸ سانتی‌متر قبل از انتقال به گلدان بدرون شیشه‌های مربای حاوی محیط کشت مشابه منتقل شدند. دویست و هفتاد و چهار گیاهچه پس از انجام سازگاری تدریجی با موفقیت به عرصه منتقل شدند. تنوع مورفولوژیکی مشاهده شده در میان گیاهچه‌های حاصل در عرصه زمینه‌گزینش پایه‌های برتری را بوجود آورده است.

واژه‌های کلیدی: کشت تخمدان، نجات جنین، دورگ‌گیری بین گونه‌ای و *Populus caspica* x *P. alba* L.

مقدمه

گونه سفید پلت (*Populus caspica*) انحصاری حوزه کاسپین و جنگل‌های شمال است و از ارسباران، طالش، آستارا تا گرگان و اطراف بجنورد انتشار دارد. گاهی در بعضی از دره‌ها همراه درخت توسکا و در جنگل‌های جلگه‌ای چمستان نور و در حوالی نوشهر،

(جلیوند، ۱۳۶۷). سفید پلت (*Populus caspica*) و گونه کبوده (*Populus alba* L.) زیر بخش (Albide) بوده که بعضی آن دو را با هم یکی می‌پندارند. اگرچه شباهت‌های بین آنها وجود دارد ولی در شکل ظاهری ساقه بخصوص ساقه درختان کهنسال و انشعابات ساقه‌ها و مورفولوژی گل‌ها بین دو درخت کبوده و سفید پلت

اختلاف زیادی وجود دارد (ثابتی، ۱۳۵۴). این گونه، بدین منظور پس از انجام تلاقی دو طرفه بین سفید پلت و صنوبر کبوده، تغذیه مصنوعی جنین در قالب کشت تخمدان جهت افزایش بازده جوانه‌زنی جنین و رفع ناسازگاری بین‌گونه‌ای بکار گرفته شد.

مواد و روش‌ها

گرده‌افشانی مصنوعی بین سفید پلت و کبوده بصورت دو طرفه انجام شد. برای این منظور شاخه‌های گلدار گل ماده و گل نر سفید پلت و کبوده به ترتیب از فاضل آباد استان گلستان و مرکز تحقیقات منطقه البرز کرج جمع‌آوری شد. جهت تهیه دانه گرده، شاخه‌های نر صنوبر سفید پلت و کبوده به گلخانه منتقل و وادار به ریزش دانه گرده زودتر از موعد شدند. برای انجام گرده‌افشانی مصنوعی، شیوه ترکیه و آب براساس روش جعفری مفیدآبادی و همکاران (۱۹۹۸) مورد استفاده قرار گرفت. جوانه شاخه‌های گلدار گل ماده جهت جلوگیری از گرده‌افشانی با دانه‌های گرده ناخواسته در اطاقک‌های ایزوله جداگانه در گلخانه نگهداری شدند. گرده‌افشانی مصنوعی روی خوشه‌های گلدار به صورت گرد و غبار شدید با قلم‌مو صورت گرفت. کاتکین‌های تلقیح شده از شاخه‌های گلدار در فواصل ۱۰، ۱۴ و ۲۱ روز جمع‌آوری شدند. کپسول‌های بسته چسبیده به محور کاتکین با استفاده از اتانول ۷۰ درصد بمدت یک دقیقه و محلول هیپرکلریت سدیم بمدت ۱۰ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل هر بار ۵ دقیقه مورد ضدعفونی سطحی قرار گرفتند.

جهت تغذیه جنین‌های بارور شده، تخمدان‌های ضدعفونی شده به ظرف آزمایشگاهی (ویال‌های کوچک) حاوی محیط MS (موراشیگ و اسکوک، ۱۹۶۲) جامد منتقل و تا قبل از انتقال به گلدان برای انجام سازگاری تدریجی در آن نگهداری شدند. محیط‌های کشت (MS و Half-MS) برای جوانه‌زنی جنین و تولید گیاه مورد آزمون قرار گرفت. طرح آماری فاکتوریل با دو تیمار سن

آستانه اشرفیه گیلان در حاشیه سفیدرود دیده می‌شود به دلیل شکل سینوسی ساقه در محل یقه کمتر استفاده صنعتی دارد و بیشتر به مصرف تهیه ذغال می‌رسد (ثابتی، ۱۳۵۵). انشعابات باز، تاج پهن، تنه موج‌دار، قائم نبودن کامل تنه، نمو قطری قاعده درختان از میانسال به بعد غیرمنظم و سینوسی می‌شود. این صفت از جمله صفاتی است که می‌بایست برای افزایش استفاده از این‌گونه اصلاح گردد. از آنجاییکه این درخت جزء گونه‌های بومی ایران می‌باشد، ضرورت اصلاح صفات کمی و کیفی این گونه در حال انقراض بوسیله روش‌های اصلاحی بویژه برای برطرف کردن شکل سینوسی ساقه در محل یقه و شاخه دوانی زیاد احساس می‌شود.

مطالعات زیادی در تولید دورگ‌های صنوبر بین گونه‌های مختلف صنوبر در طول دو دهه گذشته انجام شد (گاگت و همکاران، ۱۹۸۴؛ ستلر، ۱۹۸۰؛ گوریز و ستلر، ۱۹۷۸؛ هاریسون، ۱۹۷۵؛ کونوکس و همکاران، ۱۹۷۲؛ جعفری مفیدآبادی و همکاران، ۱۹۹۸؛ جعفری مفیدآبادی و مدیر رحمتی، ۲۰۰۰). برای این منظور امکان تولید دورگ‌های بین گونه‌ای سفید پلت با صنوبر کبوده برای بهبود صفات کمی و کیفی مورد بررسی قرار گرفت. از شیوه‌های معمول در اصلاح صفات کیفی و کمی، دورگ‌گیری بین، درون گونه‌ای و بین جنسی است که به منظور ترکیب صفات مطلوب والدین در نتاج و استفاده از پدیده هتروسیس مورد استفاده قرار می‌گیرد (رایت، ۱۹۷۶؛ زویل، ۱۹۸۴) ولی دورگ‌گیری اغلب با مشکل انواع ناسازگاری روبرو می‌گردد (راکوئین و تروسارد، ۱۹۹۳). یکی از انواع ناسازگاری‌ها، تکامل ضعیف و یا عدم تکامل بافت اندوسپرم بخصوص در تلاقی گونه‌های دیپلوئید با تترا پلوئید می‌باشد که با کشت جنین بالغ و یا نارس در محیط تغذیه مصنوعی برطرف می‌شود (جعفری مفیدآبادی و همکاران، ۱۹۹۸؛ جعفری مفیدآبادی و مدیر رحمتی، ۲۰۰۰؛ لی و همکاران، ۱۹۸۳؛ کوییدر و همکاران، ۱۹۸۴؛ لی و لی، ۱۹۸۵؛ نوح و همکاران، ۱۹۸۶؛ ساوکا و همکاران، ۱۹۸۷؛ راکوئین و تروسارد، ۱۹۹۳).

جنین (در سه سطح به ترتیب ۱۰، ۱۴ و ۲۱ روز پس از گرده‌افشانی) و دو نوع محیط کشت (MS و Half-MS) با چهار تکرار در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. اسیدیته محیط کشت روی ۵/۷ قبل از انجام اتوکلاو تنظیم شد. محیط کشت‌های مورد استفاده پس از انتقال آن در ویال‌های شیشه‌ای ۲۰ میلی‌لیتری بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو نگهداری شدند. کشت‌ها در اطاق رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و با شدت نور ۴۵۰۰-۵۰۰۰ کولس و با دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. گیاهچه‌های بوجود آمده پس از انجام موفق فرآیند سازگاری تدریجی در گلدان‌های حاوی خاک سترون با ترکیب ۱:۱:۱ پیت، شلتوک و خاک زراعی ابتدا به گلخانه (بمدت ۴ هفته) و سپس به مزرعه انتقال یافته‌اند.

نتایج و بحث

جوانه‌زنی جنین در دو هفته پس از انتقال کپسول‌های ایزوله شده از هر دو نوع تلاقی (*Populus L.* و *Populus alba L. x P. caspica*) به محیط‌های کشت جامد مشاهده شده است (شکل ۱). تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از اثرات سن جنین و نوع محیط کشت در جوانه‌زنی جنین در تلاقی (*Populus caspica x P. alba L.*) نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین سن جنین برای جوانه‌زنی جنین در سطح ۵ درصد وجود دارد (جدول ۱). بنابراین سن جنین در تعداد جوانه‌زنی آن و تولید گیاه مؤثر بوده است. سن جنین (تعداد روزها پس از گرده‌افشانی) بدلیل 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. در این

خصوص، (جعفری و همکاران، ۱۹۹۸؛ جعفری مفیدآبادی و مدیر رحمتی، ۲۰۰۰) نیز اختلاف معنی‌دار زمان ایزوله و کشت تخمدان و تخمک را در جوانه‌زنی جنین برای تلاقی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای صنوبر گزارش نموده‌اند. مقایسه میانگین جوانه‌زنی جنین در سنین مختلف به روش آزمون دانکن نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد بین آنها وجود دارد. بیشترین درصد جوانه‌زنی جنین (۲۳/۹ درصد) در کشت تخمدان ۱۰ و ۱۴ روزه در هر دو نوع تلاقی اتفاق افتاد (جدول ۲). نتیجه مشابهی در خصوص زمان لازم (تعداد روزها پس از گرده‌افشانی) برای جوانه‌زنی جنین دورگ (*Populus alba x P. alba*) توسط راکوئین و تروسارد (۱۹۹۳) گزارش شده است. کمترین مقدار جوانه‌زنی جنین در کشت تخمدان ۲۱ روزه پس از گرده‌افشانی مشاهده شد (۱۵/۸۵ درصد). این نتایج مشابه نتایج جعفری و همکاران (۱۹۹۸)، در خصوص تلاقی صنوبر کبوده با صنوبر پده است که مقدار جوانه‌زنی جنین در کشت تخمدان ۲۱ روزه و بیشتر کاهش نشان داد. ممکن است بافت‌های رشته‌ای شکل سفید رنگ که در اطراف تخمک در اواخر تکامل تخمدان بوجود می‌آید و مانع تماس تخمک‌ها با سطح محیط کشت باشد به‌عنوان عامل اصلی در کاهش جوانه‌زنی جنین محسوب گردد. تجزیه واریانس روی داده‌های حاصل بین محیط‌های کشت بکار گرفته شده برای درصد جوانه‌زنی جنین نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین آنها در تلاقی صنوبر سفید پلت با صنوبر کبوده وجود ندارد (جدول ۱). عدم اثرات معنی‌دار محیط‌های کشت در جوانه‌زنی جنین گونه‌های باغی توسط ایتون و جامونت (۱۹۹۲) و فورکاوا و بوکاوا (۱۹۸۹) گزارش شد.



شکل ۱- جوانه‌زنی جنین دورگ *Populus caspica x P.alba L.* دو هفته پس از کشت در محیط MS.

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس اثرات سن جنین و محیط کشت در جوانه‌زنی جنین برای تلاقی (*Populus caspica x P.alba L.*)

F		درجه آزادی	منبع تغییرات
(<i>Populus alba L. x P.caspica</i>)	(<i>Populus caspica x P.alba L.</i>)		
7.3190*	3.8861*	۲	سن جنین
3.7241 ^{ns}	0.2554 ^{ns}	۱	محیط کشت
1.0086*	0.0541*	۲	سن جنین X محیط کشت
		۱۸	خطا

*= اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات سن جنین (تعداد روزها پس از گرده‌افشانی) در جوانه‌زنی جنین دورگ حاصل از تلاقی *Populus L. caspica x P.alba*

سنین مختلف جنین	تعداد تخمدان جوانه زده	در صد تخمدان‌های جوانه زده
۱۰ روزه	۱/۶۵۵	۲۰/۶۸a
۱۴ روزه	۱/۹۱۲	۲۳/۹a
۲۱ روزه	۱/۲۶۸	۱۵/۸۵b

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد

حاصل از تجزیه داده‌ها بر روی اثرات نوع محیط کشت و سن جنین روی مقدار جوانه‌زنی در تلاقی کبوده با سفید پلت نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین سن جنین در سطح ۵ درصد وجود دارد. مشابه تلاقی قبلی جنین ۱۴ روزه در این نوع تلاقی نیز موجب بیشترین درصد جوانه‌زنی (۵۳/۱۲ درصد) جنین شده است (جدول ۳). کمترین درصد جوانه‌زنی (۲۳/۴۳ درصد) در این تلاقی مربوط به جنین ۱۰ روزه بود. عدم اختلاف معنی‌دار در خصوص تأثیر متقابل محیط کشت با سن جنین بیانگر

در جوانه‌زنی تفاوت قابل ملاحظه‌ای در مقدار ترکیب‌پذیری در تلاقی صنوبر کبوده به عنوان والد مادری با دانه گرده سفید پلت و تلاقی صنوبر سفید پلت به عنوان والد مادری با دانه گرده کبوده به لحاظ جوانه‌زنی جنین وجود نداشت. از نکات قابل توجه تشابه زمان مورد نیاز تکامل جنین (۱۰ روز تا ۲۱ روزه) در هر دو گونه سفید پلت و کبوده وقتی که به‌عنوان والد مادری بکار گرفته شدند، می‌باشد که دلالت بر نزدیکی فواصل ژنتیکی بین دو گونه مزبور دارد. تجزیه و تحلیل‌های

اثرات مستقل سن جنین و محیط کشت بر روی بازده
 جوانه‌زنی جنین می‌باشد. دویست هفتاد و چهار عدد
 گیاهیچه پس از انجام سازگاری تدریجی موفق در خاک
 استرون به گلخانه و سپس به مزرعه منتقل شدند (شکل
 ۲).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات سن جنین (تعداد روزها پس از گرده‌افشانی) در جوانه‌زنی جنین دورگ حاصل از تلاقی
Populus alba L x P. caspica

سنین مختلف جنین	تعداد تخمدان جوانه زده	در صد تخمدان‌های جوانه زده
۱۰ روزه	۱/۸۷۵	۲۳/۴۳b
۱۴ روزه	۴/۲۵۰	۵۳/۱۲a
۲۱ روزه	۲/۶۲۵	۳۲/۸۱a

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد



شکل ۲- نهال یکساله دورگ سفید پلت پس از انتقال به مزرعه.

منابع

۱. ثابتی ح. ۱۳۵۴. صنوبر در ایران. انتشارات سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ۴۸ صفحه.
۲. ثابتی ح. ۱۳۵۵. درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ۴۸۰ صفحه.
۳. جلیل‌وند ح. ۱۳۶۷. بررسی انتشار جغرافیایی و شرایط اکولوژیکی گونه سفید پلت در جنگل‌های شمال، پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس دانشگاه مازندران صفحه ۲۱۸.
4. Gaget, M., Said, C., Dumas, C., and Knox, R.B. 1984. Pollen Pistil interaction in interspecific crosses of *Populus* (section *Aigerios* and *Leuce*), pollen adhesion hydration and cellose responses. *J. Cell Sci* 72:184-192.
5. Eaton, G.W., and Jamont, A.M. 1992. Embryo sac development in the apricot, *Prunus armeniaca L.* cv. *Constan*. *Journal of Horticultural Science* 86: 95-101.
6. Furokawa, Y., and Bukovac, M.J. 1989. Embryo sac development in sour cherry during the pollination period as related to fruit set. *Hort Science* 24: 1005-1013.
7. Guries, R.P., and Stettler, R.F. 1978. Pre-Fertilization Barriers to hybridization in the poplars. *Silvae Genetic*. 25:37-44.

- 8.Harrison, H.J. 1975. Incompatibility and the Pollen-Stigma interaction. A. Rev. PL. Physiol 26: 403-442.
- 9.Jafari, M.A., Modir-rahmati, A., and Tavesoli, A. 1998. Application of ovary and ovule culture in *P. alba* L x *Populus euphratica* OLIV hybridization. *Silvae Genet.* 47:5-6.
- 10.Jafari, M.A., and Modir-rahmati, A. 2000. Production of *Populus euphratica* OLIV. X *P. alba* L. hybrid poplars through ovary and ovule cultures. *Plant Genetic Newsletter.* 122:13-15.
- 11.Knox, R.B., Willing, R.R., and Pryor, L.D. 1972. Interspecific Hybridization of poplars using recognition pollen. *Silva Genet.*21:125-128.
- 12.Kouider, M., Skirvin, R., and Saladin, K.P. 1984. A method to culture immature embryo of *Populus deltoides* *in vitro*. *Can. J. For. Res* 14:956-958.
- 13.Li, W., and Li, J. 1985. *in vitro* culture of Hybrid ovules in populus. *Sci. Silv. Sin.* 21:339-346.
- 14.Li, W., Wang, R., and Zhu, X. 1983. On the embryo development and ovule culture of interspecific hybrids between *Populus simonii* and *P.pyrasmidalis* Borkh. *Acta Bot. Sin.* 25: 409-417.
- 15.Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- 16.Noh, E.R., Kao, Y.B., and Lee, S.K. 1986. Hybridization between incompatible poplar Species through ovary and embryo culture. *Res. Rep. Inst. For. Genet.* 22:9-14.
- 17.Raquin C., and Troussard, L. 1993. In-ovary embryo culture as tool for poplar hybridization. *Can. J. Bot.* 71: 1271-1275.
- 18.Savka, 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.
- 19.Schreiner, E. 1965. Maximum Genetic improvement of fores trees through synthetic multiclonal hybrid varieties, Proc. 13 Th Northeast Forest tree Impr. Conf., Albany N. Y., Pp:7-13.
- 20.Stettler, R.F. 1980. Interspecific crossability studies in poplars. *Theor. Appl. Genet.* 58:273-282.
- 21.Wright, J.W. 1976. Introduction to forest genetic. Academic Press New York Pp: 463.
- 22.Zobel, B.J. 1984. Applied forest tree improvement. John Wiely and Sons New York Pp: 505.

***Populus caspica* interspecific hybrid production using Ovary culture**

A. Jafari Mofidabadi¹, E. Zarin-Ball², V. Atemad² and Sh. Shriate-nejad³

¹Research Institute of Forests and Rangelands, ² Faculty of Natural Resources University of Teharn, Iran

Abstract

Ovary culture was used to develop interspecific hybrid plants between *Populus caspica* and *P. Alba*. Developed ovaries were isolated from female branches of *Populus caspica*, which were pollinated with *P. Alba* pollen grains using twig and pod breeding techniques. The same artificial pollination procedures have been done on female branches of *Populus Alba* with *P.caspica* pollen grains for reciprocal cross. Isolated ovaries were then transferred to growth regulator free half-concentrated MS agar medium for embryo germination in *Populus caspica x P.alba* cross. There were no significant differences between MS and Half-MS media for embryo development and germination. Highest embryo germination was observed in 14 days old embryos in (*Populus caspica x P.alba*) and (*Populus Alba x P.caspica*) crosses and showed significant differences at 0.05 level (23.9 and 53.12% respectively). Plantlets reached 5 or 8 cm height were then cultured in the same medium within jars, before being transferred to the potting soil. Two hundred seventy four plantlets from both crosses were successfully acclimatized in green-house and transplanted in the field.

Keywords: Ovary; embryo culture; Interspecific hybridization; *Populus caspica* and *P. alba*