بررسی تکثیر غیرجنسی شاه‌بلوط (*Castanea sativa*)
به روش کشت سر شاخه‌ای

طیبه سهیلا نراقی

چکیده

به‌منظور بررسی تکثیر غیرجنسی شاه‌بلوط جوانه‌های انتهایی از پایه‌های بالغ برگزیده در جنگلهای شفارود استان گیلان پس از برداشت در فصول مختلف سال، با تیمارهای متفاوت سترون سازی و در محیط‌های کشت، QL، DKWوMS (۱/۲ نیترات) مستقر شدند. جوانه‌های خواب پاییزه با استفاده از کلرورمرکوریک ۰/۱٪ به مدت ۷ دقیقه سترون گشته و در محیط کشت DKW حاوی هورمون BA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مستقر شدند.

در مرحله شاخه‌زایی، بهترین نتایج در محیط کشتDKW با ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰ ٪) از طریق قراردادن شاخه‌های به ارتفاع ۲ سانتیمتر درون‌شیشه‌ای، در محلول ۵۰ میلی‌گرم در لیتر IBA سترون به مدت ۲٤ ساعت و بازکشت مجدد آنها در محیط کشت GD (۱/۳ غلظت عناصر پر مصرف) فاقد هورمونهای گیاهی رشد و حاوی زغال فعال بدست آمد. گیاهچه‌های ریشه‌دار طی مراحل مختلف سازگاری به خاک گلدان انتقال یافتند.

واژه‌های کلیدی : شاه‌بلوط، کشت سر شاخه‌ای، جوانه انتهایی و ریزازدیادی

مقدمه

شاه‌بلوط درختی یک پایه از خانواده Fagaceae و از راسته Amentales می‌باشد. این درخت بومی آمریکا و جنوب اروپاست و از پرتقال تا جنوب قفقاز انتشار دارد .

رویشگاه‌های طبیعی آن در کرانه دریای خزر عبارتند از : الف – حوزه شفت فومن (دره ویسرود، دره سیامزگی و دره قلعه رودخان). ب – حوزه طالش (شفارود).

شاه‌بلوط درختی است، آهک گریز از این رو در ارتفاعات میان‌بند شمال و در اراضی غیر آهکی می‌روید. برگهای آن، ساده خزان کننده متناوب، نوک تیز و دندانه‌دار است. رگبرگها موازی و رنگ آن سبز چمنی می‌باشد. برگهای آن دارای مصارف پزشکی است میوه آن درشت و قهوه‌ای که معمولاً ۱ تا ۳ و بندرت ٤ تا ۷ تای آن در درون پوشینه خارداری که به وسیله ۲ تا ٤ شکاف گشوده می‌شود، جای دارد. ارتفاع شاه‌بلوط در منابع مختلف بین ۲۵ تا ۳۰ متر ذکر شده است (ثابتی ۱۳٤٤).

قسمتهای مختلف این درخت از دیرباز دارای مصارف متعددی بوده است از جمله: چوب آن در صنایع چوب و نجاری، میوه‌اش خوراکی و برگهای این درخت به علت داشتن تانن در داروسازی به‌عنوان داروی قابض بکار می‌رود (جزیره‌ای ۱۳٤۰). تکثیر این گونه از طریق بذر است و معمولاً بین ٤۰–۲۵ سالگی درخت تولید بذر می‌نماید. به‌دلیل ظهور تنوع ژنتیکی در ساختار تکثیر جنسی و همچنین طولانی بودن دوره بذردهی، تکثیر درختان نخبه شاه‌بلوط به طریق کشت بافت اهمیت زاید الوصفی می‌یابد.

هدف از این پژوهش، استفاده از تکنیک کشت بافت و ریز ازدیادی از طریق کشت جوانه جهت تکثیر رویشی درختان نخبه این گونه است. در این روش کمترین تغییرات ژنتیکی حاصل می‌شود، زیرا جوانه علاوه بر ثبات ژنتیکی لازم، توانایی تکثیر و تولید اندامهای جدید را دارد و تکثیر می‌تواند در تمام طول سال تداوم داشته باشد.

سابقه تحقیق

اولین تلاشها، جهت کشت بافت شاه‌بلوط توسط Jacquiot (۱۹۵۰) با استفاده از بافت کامبیوم فقط، به تشکیل کالوس منجر شد. بعد از آن، محققان بسیاری در مورد این جنس به پژوهش پرداختند و نتایج متفاوتی بدست آوردند. از آن جمله Vieitez

و همکاران (۱۹۷۸) با کشت لپه، توانستند ریشه تولید کنند Vieitez و Vieitez (۱۹۸۰) در تحقیقاتشان، با کشت جنین به گیاهچه کامل دست یافتند. Biondi و همکاران (۱۹۸۱) القاء تشکیل شاخه‌های متعدد را با استفاده از جوانه‌های برگرفته از قسمتهای تنه‌جوش[1] درختان بالغ ایجاد کردند. Rodriguez (۱۹۸۲) با کشت نوک مریستم دانه رستها[2] در محیط Cheng و Voqui (۱۹۷۷) حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA [3] و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA[4]، تولید شاخه و این شاخه‌های منفرد را در محیط نصف غلظت املاح به اضافه ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، ریشه‌دار نمودند. Vieitez و Vieitez (۱۹۸۲) بیشترین تعداد شاخه را با کشت جوانه‌های دانه رستها در محیط MS[5] حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA تولید کردند. ایجاد ریشه در همین محیط در حضور ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA انجام گرفت. اما در هیچ یک از این تحقیقات گزارشی از تشکیل جوانه‌های نابجا مشاهده نشده است. Sanjose و همکاران (۱۹۸٤) از قطعات محور زیر لپه و محور بالای لپه گیاهچه‌های ۵-۳ هفته شاه‌بلوط که از بذرهای رشد یافته در شرایط درون‌شیشه‌ای[6] حاصل گشته‌اند، برای تحریک تمایزیابی ریشه‌ها و جوانه‌های نابجا استفاده نمودند. Chever و همکاران (۱۹۸۳) در مقاله خود تحت عنوان" تکثیر شاه‌بلوط در درون‌شیشه" موفقیت شاخه‌زایی، رشد طولی، ریشه‌زایی و انتقال به خاک جوانه‌های جانبی دانه رستهای ۳ ماهه و نهالهای جوان[7] ۵ ساله را گزارش نموده‌اند. نامبردگان از محیط MS به همراه ۱ میلی‌گرم IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر Adenine به اضافه ۰/۵ درصد زغال فعال جهت رشد طولی شاخه‌ها استفاده

---

1 - Stump sprouts

2 - Seedling

3 6 - Benzylamino purine

4 Indole butyric acid

5 Murashige $ Skoog Medium

6 *In vitro* culture

7 Juvenile

نموده‌اند. سپس با قرار دادن شاخه‌ها در محلول ۱ گرم در لیتر IBA به مدت ۲۰ ثانیه و کشت آنها در محیط بدون هورمون MS (Murashing و Skoog، ۱۹۶۲) تعداد کمی ریشه تولید کرده‌اند. در تمامی این تحقیقات از مشکلات نحوه استقرار جوانه‌ها به‌دلیل اکسیداسیون مواد فنلیک موجود در بافتها سخن می‌رود. Sanchez و همکاران (۱۹۹۷) تکثیر از درختان بالغ را تنها با استفاده از کشت جوانه‌های گرفته شده از تنه جوش میسر می‌دانند.

مواد و روشها

نمونه‌ها از ۳ پایه که ویژگیهای یک درخت بالغ برگزیده را داشتند از جنگلهای شفارود استان گیلان تهیه گردیدند. به‌منظور بررسی اثر فصل در استقرار و ازدیاد، نمونه‌گیری در تمام طول سال انجام گرفت. در مرحله پیش سترون‌سازی پس از شستشو و برس‌کشی سطح نمونه‌ها با مایع ظرفشویی و محلول اتانول ۷۰ درصد و نیز بکارگیری محلول قارچ‌کش بنومیل (۲-۱) درصد برای ۱ ساعت، فلس برداری جوانه‌ها صورت گرفت. سپس نمونه‌ها در محلول اسید اسکوربیک جهت کاهش مواد فنولیک و محلول آنتی‌بیوتیکRifampicin ۱۰ میلی‌گرم در لیتر جهت حذف آلودگیها قرار گرفتند. در مرحله سترون سازی، جوانه‌ها با محلولهای ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم (۰/۵ تا ۱ درصد) یا کلرور مرکوریک (۰/۱ درصد) یا تلفیق مناسبی از آنها در زمانهای مختلف، سترون شدند. جهت حذف این محلولها در هر مرحله جوانه‌ها ۵-۳ بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. جوانه‌ها تا زمان کاشت در محلول اسید اسکوربیک ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نگهداری می‌شدند. بعد از استقرار جوانه‌ها در داخل محیطهای کشت DKW[1] MS (N/2) QL[2] حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر

1 - Driver & Kuniyukui Walnut Medium
2- Quoirin $ Lepoivre Medium

آنتی‌بیوتیک کربنی سیلین[1] و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر P.V.P [2] برای یافتن بهترین هورمونها و مناسب‌ترین ترکیب آنها از سیتوکینین‌ها و اکسینها نظیر BA در غلظتهای (۰/۲تا ۱) میلی‌گرم بر لیتر و IBA در غلظت (۰/۰۱ تا ۰/۱) میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. ظروف کشت در اتاق رشد با طول روز ۱۶ ساعت، دمای ۳ ± ۲۵ درجه سانتیگراد و شدت روشنایی ۵۰۰۰ - ۴۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. بازکشت جوانه‌ها در هفته اول روزانه و پس از آن هر هفته صورت می‌گرفت. در طی این مدت نمونه‌های آلوده و سوخته حذف گردیده و سایر جوانه‌ها بازکشت می‌شدند. برای بازکشت شاخه‌های منفردی که از نظر سبزینگی، طول و تعداد میانگره تا حد امکان همسان بودند انتخاب می‌گردیدند. به‌طور معمول پس از استقرار و شروع شاخه‌زایی ۳ بازکشت در فاصله ٤ هفته انجام می‌گرفت و در هر تیمار هورمونی ۳۰ تکرار (٦ ظرف کشت و در هر ظرف ۵ شاخه) در نظر گرفته شد. جهت آزمون آماری، اعداد مربوط به تعداد جوانه و شاخه و طول شاخه‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج در قالب طرح فاکتوریل دو عاملی بر پای طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و میانگینها با آزمون دانکن در سطح ۵٪ دسته‌بندی شدند.

ریشه‌زایی ریز شاخه‌ها به چند روش صورت گرفت:

الف: ریشه‌زایی در درون‌شیشه

۱ - کاشت شاخه‌ها در محیطهای کشت فوق به همراه غلظت‌های متفاوت از IBA و NAA.

۲ - فروبری قاعده شاخه‌ها در محلولهای ۱۰۰۰ و یا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر IBA به مدت ۱ دقیقه تا ۲٤ ساعت و کشت آنها در محیطهای سه‌گانه دارای زغال فعال و یا بدون آن.

1- α –carboxy benzyl penicillin (Carbenicilin)

2- Polyvinyl polypyrrolidone

۳ - فروبری قاعده شاخه‌ها در محلولهای ۱۰۰۰ و یا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر IBA به مدت ۱ دقیقه تا ۲٤ ساعت و کشت آنها در ظروف کشت محتوی مخلوط خاک سترون پرلیت، ورمیکولایت و پیت ماس به نسبت (۱:۱:۱) و محیط کشت GD[1] در ۱/۳ غلظت عناصر پرمصرف.

ب: ریشه‌زایی در خارج از شیشه [2]

کشت مستقیم شاخه‌ها در داخل خاک سترون شده ماسه - پرلیت به نسبت (۱:۱) با استفاده از قرار دادن انتهای شاخه‌ها در محلول ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر IBA به مدت ۱ دقیقه، صورت گرفت.

در مرحله سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دار به گلدانهای حاوی مخلوط خاک پیت، ورمیکولایت، ماسه به نسبت (۱:۱:۱) که به مدت ۱ ساعت در آون ٦۰ درجه سانتیگراد سترون گشته بود انتقال یافته و با سرپوش پلاستیکی پوشیده شدند. گلدانها در ژرمیناتور با دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و رطوبت ۵۰٪ قرار گرفتند. پس از دو هفته به تدریج شروع به سوراخ‌کردن پوشش گلدانها نموده تا حدود یک ماه بعد که پوشش به‌طور کامل حذف گردید.

نتایج

مقایسه نتایج درصد جوانه سبز در جدول شماره ۱، نشان می‌دهد که جوانه‌های برداشت شده از پایه ۳ که از قسمتهای تنه جوش و ریشه جوش[3] درخت گرفته شده بهتر سترون شده‌اند. تأثیر فصل نمونه‌گیری و نوع تیمارهای سترون سازی بر نحوه

1- Gresshoff $ Doy Medium

2- *In vivo* culture

3- Root sprouts

زنده ماندن جوانه‌ها حاکی از آن است که جوانه‌های خواب پاییزه با روشهای سترون‌سازی زیر منجر به استقرار ۸۸/۰۹ ٪ نمونه‌ها شده است (جدول شماره ۲).

استفاده از برس و مایع ظرفشویی

استفاده از برس الکلی

کاربرد سریع الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه

غوطه‌ور ساختن نمونه‌ها در محلول بنومیل ۲ درصد به مدت ۱ ساعت

گذاشتن نمونه‌ها در محلول آنتی‌بیوتیک به مدت ۳۰ دقیقه

گذاشتن نمونه‌ها در محلول اسید اسکوربیک به مدت ۲ ساعت

سترون سازی با محلول کلرور مرکوریک ۱ /۰ درصد به مدت ۷ دقیقه

مشکل آلودگیهای نهان باکتریایی در مرحله استقرار با اضافه نمودن کربنی‌سیلین Carbenicillin به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر طی ۳ تا ٤ بازکشت برطرف گردید. هم چنین جهت کنترل ترشحات مواد فنولیک از جوانه‌ها که سبب نکروزه شدن آنان می‌شد، با انجام بازکشت روزانه جوانه‌ها و استفاده از P.V.P به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت برطرف گردید. جوانه‌ها در محیط کشت DKW حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱میلی‌گرم در لیتر IBA پس از ۳ ماه فعال شده و رشد طبیعی خود را آغاز کردند (شکل شماره ۱).

در تجزیه و تحلیل آماری صفات مورد مطالعه محیط DKW اختلاف کاملاً معنی‌داری را با محیطهای دیگر نشان داد. (جدولهای شماره۳و٤)، که به‌عنوان محیط کشت بهینه جهت شاخه‌زایی و تکثیر معرفی می‌گردد. با وجود اینکه در بررسی تأثیر متقابل دو عامل تیمار هورمون و محیط کشت تفاوت معنی‌داری در بین صفات دیده نشد (جدول شماره ۳)، اما بیشترین تعداد شاخه، جوانه و رشد طولی در محیط DKW حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA دیده شد (جدول شماره ۵ و شکل شماره ۲).

نتایج بدست آمده از تیمارهای ریشه‌زایی در محیطهای کشت در جدول شماره ٦ مشاهده می‌شود. در تمامی تیمارها، ظروف کشت به مدت ٥ روز در تاریکی و ۷ روز در روشنایی قرارگرفتند، سپس شاخه‌ها به محیطهای فاقد هورمون انتقال یافتند در بهترین تیمار (محیط MS (N/2) حاوی ۳ میلی‌گرم درلیتر IBA)٤١ درصد شاخه‌ها ریشه‌دار گشتند. کشت شاخه‌ها در شرایط طبیعی نیز هیچگونه موفقیتی نداشت. به‌همین دلیل شاخه‌ها قبل از مرحله ریشه‌زایی به مدت ۲ ماه تحت تیمار هورمون 2-ip[1] در غلظت ۰/٥ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند و پس از آن به محیطهای حاوی هورمونهای ریشه‌زا منتقل شدند. با این روش ۸۳ درصد شاخه‌ها ریشه‌دار شد (جدول شماره ۷). بیشترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰ ٪) با فرو بری قاعده شاخه‌ها در محلول سترون، ٥۰ میلی‌گرم در لیتر IBA به مدت ٢٤ ساعت و کشت آن در محیط GD حاوی زغال فعال، مشاهده شده است (جدول شماره ۸ و شکل شماره ۳).

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده جهت انجام سازگاری تدریجی به گلدانهای خاک سترون شده حاوی مقادیر مساوی (ورمیکولایت، خاک برگ، پرلیت) انتقال یافتند. ٦۰ درصد نهالها پس از سازگاری تدریجی به گلخانه منتقل شدند (شکل شماره ٤).

بحث و نتیجه گیری

نتایج آزمایشهای انجام شده نشان داد که بهترین فصل برداشت نمونه، پاییز بوده است. درحالی‌که Reuveni و همکاران (۱۹۹۰)، نمونه‌های بهاره گیاهان چوبی را برای سترون سازی مناسب‌تر دانسته و بیشترین آلودگی را در جوانه‌های زمستانه ذکر کرده‌اند. آنچه در توضیح این تناقض می‌توان به آن اشاره کرد پوشش ضخیم سطح ساقه و فلسهای جوانه‌های خواب هستند که از بافتهای آسیب‌پذیر داخل جوانه محافظت کرده و امکان بکاربردن محلولهای سترون کننده را در غلظتهای بالاتر و مؤثرتر فراهم می‌سازد. این در حالیست که جوانه‌های بهاره اصلاً خشبی نبوده، و

1 - δ-γ-γ - Dimethy ally amino purine

پوششهای سبز و نرمی سطح جوانه و ساقه متصل به آن را می‌پوشاند که با ضعیف‌ترین تیمارهای سترون کننده، آسیب دیده و مواد فنولیک زیادی از خود ترشح می‌کنند و در نهایت از بین می‌روند. غوطه‌ور کردن ریز نمونه‌ها در آب سترون حاوی اسید اسکوربیک و افزودنP.V.P به محیط کشت در کاهش اکسیداسیون مواد فنلی و حذف آنها از نمونه‌ها بسیار مؤثر بود (مقایسه ردیفهای ۳ با ٤ و ۷ با ۸ جدول شماره ۲) Vieitez و همکاران (۱۹۸۳) وChevre و همکاران (۱۹۸۳) جهت کاهش تانن موجود در بافتهای شاه‌بلوط، نمونه‌ها را ۳ ساعت در آب سترون گذاشتند. Rugini و همکاران (۱۹۸٦) با اضافه کردن .گلوتامین به محیط کشت سبب کاهش قهوه‌ای شدن شاخه‌های *Pistacia vera* شدند. در طول بازکاشتهای سریع جوانه‌ها، قطع قسمتهای قهوه‌ای بافت مانع از تأثیرگذاری ترشحات سمی فنلی بر سلولهای سالم مجاور می‌شود که با یافته‌های McGranahan و همکارانش (۱۹۸۷) در پژوهش در مورد گردو همخوانی دارد. استفاده از محلول آنتی‌بیوتیک ریفامپسین در مرحله سترون‌سازی (جدول شماره ۲) و افزودن کربنی سیلین، اثر مثبتی در از بین بردن آلودگیهای اولیه و ثانویه (نهان) باکتریایی داشته است. Vieitez و Vieitez (۱۹۸۲)، اظهار داشتند که محیط کشت MS حاوی نصف نیترات مناسب‌ترین محیط جهت رشد و نمو شاخه‌های شاه‌بلوط می‌باشد، ولیکن در تحقیق حاضر تجزیه و تحلیلهای آماری صفات شاخه‌زایی، جوانه‌زنی و رشد طولی جوانه‌ها بیانگر این واقعیت است که محیط DKW به‌طور محسوسی بر دو محیط دیگر برتری دارد. این تفاوت از نظر آماری نیز معنی‌دار است (جدولهای شماره ۳ و ٤). یکی از عوامل تعیین‌کننده کارآیی محیط کشت، نوع املاح و مجموع قدرت یونی آن می‌باشد George وهمکاران (۱۹۸۸)، Bonga و Aderkas (۱۹۹۲). بنابراین قدرت یونی و ترکیب مواد موجود در محیط DKW برای رشد شاه‌بلوط مناسب تر بود (جدول شماره ۹).

با مقایسه ترکیبهای محیط DKW،MS (N/2) و QL موارد زیر قابل توجه است:

Kirby و همکارانش (۱۹۸۷)، اظهار داشته‌اند که نسبت یون آمونیم به نیترات در کنترل pH و تحریک اندام‌زایی مؤثر است. بطور کلی بافتها، یون NO_3 را بهتر از یون آمونیم جذب کرده و در محیط DKW این یون بیشتر است، همچنین مقدار ازتی که از طریق NO_3 و NH_4 به محیط کشت افزوده می‌شود، در این محیط از علل مهم شادابی، سبزینگی و ضریب ازدیاد شاخه‌ها می‌باشد.

معمولاً میزان یون کلسیم در محیطهای کشت به‌دلیل نامحلول بودن کم است اما در محیط DKW دو برابر دو محیط دیگر است و می‌تواند یکی از عوامل مهم در پیشگیری از نکروزه شدن نوک شاخه‌ها باشد. به علاوه بالا بودن یون Mg^+ نیز سبب ازدیاد شاخه‌ها و طویل شدن آنها می‌باشد. Chevre و همکاران (۱۹۸۳) گزارش نموده‌اند که با افزایش این دو یون در محیط MS و کاهش PH، میزان شاخه‌زایی دو برابر می‌شود.

یون Cu درمحیط DKW، ۱۰ برابر دو محیط کشت دیگر است، از آنجائی که آگار مصرفی در کشت بافت نیز حاوی Cu به صورت ناخالص می‌باشد معمولاً این عنصر بیش از آنچه پیشنهاد شده به محیط اضافه می‌شود از طرفی با وجود آنکه Bonga و Aderkas (۱۹۹۲) گزارش کرده‌اند که بافتها نیاز زیادی به Cu ندارند، لیکن بنظر می‌رسد میزان بالای Cu و Mn در محیط DKW تأثیر مثبت دارد .

در بهترین تیمار شاخه‌زایی BA در حد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردیده است. Biondi و همکاران (۱۹۸٤)، Sanjose و همکاران (۱۹۸٤) عنوان کرده‌اند که اگر چه مقادیر بالای BA شاخه‌زایی بیشتری را باعث می‌شود اما این شاخه‌ها بعداً تولید ریشه کمتری داشته‌اند. بعلاوه BA زیادتر باعث تولید شاخه‌های نابجا در شاخه‌های ایجاد شده از جوانه‌های جانبی می‌گردد، این شاخه‌های نابجا از این نظرکه گرایش بیشتری به بروز دادن تنوع سوماکلونی دارند، از مطلوبیت کمتری نسبت به شاخه‌های بوجود آمده از جوانه‌های جانبی برخوردار هستند همچنین BA بیشتر می‌تواند برای طویل شدن شاخه‌ها بازدارنده باشد لذا اعمال پیش تیمار محیط کشت بدون هورمون یا محیط با BA کم برای داشتن شاخه‌های مطلوب لازم می‌باشد. در این تحقیق ۳ ماه

قبل از مرحله ریشه‌زایی، شاخه‌ها در محیط حاوی هورمون 2ip و مقدار کمی BA قرار گرفتند. Curir و همکاران (۱۹۹۰) در تحقیقی بر روی گونه اکالیپتوس عنوان کردند که القای تشکیل ریشه به وسیله اکسین به تجمع فلاونوئیدها منجر می‌شود، در حالی که BA چنین اثری را ندارد، نمونه‌های کشت شده در محیط حاوی BA برای این که شاخه‌های حساس به القای ریشه تولید کنند باید حداقل ۱ ماه در محیط کشت حاوی سیتوکنین دیگری کشت شوند.

در بحث مربوط به درصد کم ریشه‌زایی در شاه‌بلوط باید گفت: شاخه‌های حاصل از نمونه‌های بالغ به سختی ریشه‌دار می‌شوند. در بررسی که توسط Vieitez و همکاران (۱۹۸۷) بر روی قلمه‌های گرفته شده از درختان بالغ انجام شد، مشخص گردید این قلمه‌ها حاوی مواد بازدارنده ریشه‌زایی بوده‌اند. در حالی که قلمه‌های دانه رستها ویا قلمه‌های برداشتی از پاجوش و تنه‌جوش فاقد این مواد هستند یا سطح مواد بازدارنده در آنها کمتر است Sanchez و همکاران (۱۹۹٦). در تحقیق حاضر جوانه‌ها از قسمت تنه‌جوش درخت گرفته شده بود.

جدول شماره ۱: مناسبترین روش‌های سترون‌سازی جهت پایه‌های مختلف مورد پژوهش در فصل‌های یکسان

پایه		پیش تیمار سترون سازی	تیمار سترون سازی	درصد آلودگی	درصد جوانه‌مرد و سوخته	درصد جوانه سبز
درخت‌بالغ	۱	A+C(30")+ B(20')+AS+R(10')	K(10)+M(1')	۹۳/۲٤	٦/۷٦	۰
	۲	A+C(30")+ B(20')+AS+R(10')	M(7')	٥۰	٤۳/۷٥	٦/۲٥
درخت بالغ	۳	A+C(30")+ B(20')+AS+R(10')	K(10')+M(1')	۷٤/٤	۲۳/۲	۲/٤
	٤	A+C(30")+ B(20')+AS+R(10')	M(7')	۳٤/٦	٥۷/٦	۷/٦۹
تنه جوش	٥	A+C(30")+ B(20')+AS+R(10')	K(10')+M(1')	٥۹/۰۹	۳۱/۸۲	۹/۰۹
	٦	A+C(30")+ B(20')+AS+R(10')	M(7')	۱٤/۸	٤٤/٤	٤۰/۷

شستشو با برس وآب ومایع ظرفشوئی = A	شستشو با برس الکلی = A
۶۰ دقیقه قرار داد ن در محلول بنومیل۲٪ = B	۳۰ دقیقه قراردادن در محلول بنومیل ۱٪ = D
قرار گرفتن در اتانول ۷۰ ٪ = C	As = Ascorbic acid
محلول هیپو کلریت سدیم ۱٪ = K	محلول هیپو کلریت سدیم ۲ ٪ = L
محلول کلرور مرکوریک ۱٪ = M	محلول Rifampicin 10 ppm = R
ثانیه = (") دقیقه = (')	ساعت = (h)

توضیح علائم اختصاری در جداول سترون‌سازی

جدول شماره۲: تاثیر فصل نمونه‌گیری و نوع تیمارهای سترون‌سازی بر نحوه زنده‌مانی جوانه‌ها

ردیف	فصل نمونه گیری	پیش تیمار سترون سازی	تیمار سترون سازی	درصد آلودگی	درصد جوانه سوخته	درصد جوانه‌های سبز
۱	اوایل بهار	A+C (30")+D (30')	M(2')	۷۷/۷۷	۲۲/۲۳	۰
۲	اوایل بهار	A+C(30")+D (30')	M(3')	۷۰	۱۵	۱۵
۳	اواسط بهار	A+C(30")+B(60')	M(2')	۱۷/۱۴	۸۰/۴۷	۰
۴	اواسط بهار	A+B(60')+C(30")+As(1h)	M(3')	۱۲/۳	۵۷/۱۶	۳۰/۵۴
۵	اوایل تابستان	A+B(60')+R(45')+C(30") +As (1h)	M(1')	۵۸/۸	۶	۳۵/۲
۶	اوایل تابستان	A+B(60')+As(30')+R(25') +C(30")	K(6')+M(1')	۳۵/۷	۳۵/۷	۲۸/۵
۷	اوایل پائیز	A+B(60')+C(30")+R(10')	K(10')+ M(1')	۶۵/۷۴	۱۱/۴۲	۲۲/۸۴
۸	اوایل پائیز	A+B(60')+C(30")+R(10') +As(60')	M(3')	۶۳/۶۶	۶/۰۶	۳۰/۲۸
۹	اوایل پائیز	A+B(60')+C(30")+R(10') +As(60')	M(5')	۴۴/۷۳	۶/۰۶	۴۹/۲۱
۱۰	اواخر پائیز	A+A+B(60')+C(30")+R(30') +As(2h)	M(5')	۲۶/۶	۰	۷۳/۳
۱۱	اواخر پائیز	A+A+B(60')+C(30")+R(30') +As(2h)	M(7')	۱۲/۳۸	۰	۸۸/۰۹

جدول شماره ۳ : نتایج تجزیه واریانس صفات ضریب ازدیاد ورشد طولی

منبع تغییرات	درجه آزادی	MS	
		ضریب ازدیاد	رشد طولی
A	۵	۰/۲۸۳^{ns}	۰/۱۳۸^{ns}
B	۲	۳/۱۹۳^{xx}	۰/۶۸۷^{xx}
A*B	۱۰	۰/۰۹۱^{ns}	۰/۰۴۶^{ns}
خطا	۳۶	۰/۲۱۴	۰/۱۲۳

A = تیمارهای هورمونی

B = محیط کشت

جدول شماره ٤ : مقایسه میانگین‌های عوامل رشد تحت تاثیر محیط کشت در سطح ۰/۰۱

محیط کشت	میانگین ضریب ازدیاد	میانگین رشد طولی	میانگین سبزینگی
DKW	۱/۸۳ a	۱/ ۹۱ a	۳/۶۸ a
QL	۱/۱۰ b	۱/۸ ab	۲/۰۹ b
MS N/2	**۱/۱۱ b**	۱/۵۳ b	۲/۶۸c
LSD	۰/۴۱۹۳	۰/۳۱۷۹	۰/۵۶۸۳

× حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می باشد.

جدول شماره ۵: مقایسه میانگین‌های عوامل رشد تحت تاثیر محیط و هورمون در سطح ۰/۰۱

ردیف	تیمار	میانگین ضریب ازدیاد	میانگین رشدطولی	میانگین سبزینگی
۱	DKW B 0.2 I 0.01	۱/٦۹ abc	۱/۸۵ abc	۳/۸۸a
۲	QL B 0.2 I 0.01	۰/۹۳cd	۱/۷abc	۲/۰۸b
۳	MS N/2 B0.2 I 0.01	۱/۰۸cd	۱/۷۲ab	۲/۵۳abc
٤	DKW B 0.2 I 0.1	۲/۱۱ab	۲/۰۲abc	۳/٦۵ab
۵	QL B 0.2 I 0.1	۱/۱٤ cd	۱/۹۷ abc	۲/۳۷ abc
٦	MS N/2 B 0.2 I 0.1	۱/۰۵cd	۱/۵۳ abc	۲/٦٦ abc
۷	DKW B 0.5 I 0.01	۲/۱۷ a	۲/۱۷ a	۳/٦٤ ab
۸	QL B 0.5 I 0.01	۱/۵۷bcd	۱/۲ abc	۱/۹۲ c
۹	MS N/2 B 0.5 I 0.01	۱/۲cd	۱/۸ abc	۲/۷۲ abc
۱۰	B 0.5 I 0.1 DKW	۱/۷۲abc	۱/۸۲ abc	۳/٤٦ abc
۱۱	QL B 0.5 I 0.1	۱/۰۵cd	۱/۷۲ abc	۲/۰۹ bc
۱۲	MS N/2 B 0.5 I 0.1	۱/۲۸abc	۱/۳۸ bc	۲/۵۹ abc
۱۳	DKW B 1 I 0.01	۱/۷٤abc	۱/۸۵ abc	۳/۹۱ a
۱٤	QL B 1 I 0.01	۱/۱٦cd	۱/۷۳ abc	۲/۱۲ bc
۱۵	MS N/2 B 1 I 0.01	۰/۹۱cd	۱/۳ c	۲/٦۱ abc
۱٦	DKW B 1 I 0.1	۱/٦٦abcd	۱/۷٦ abc	۳/۵۹ ab
۱۷	QL B 1 I 0.1	۰/۷۳d	۱/۸۵ abc	۱/٤ c
۱۸	MS N/2 B 1 I 0.1	۱/۱۲cd	۱/٤۷ bc	۲/۹۹ abc

×حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می باشد .

×× B هورمون BAP-٦ ، I هورمون IBA

جدول شماره ٦ : نتایج بدست آمده از تیمارهای ریشه‌زایی در محیط‌های کشت

محیط	تیمار هورمونی	درصد ریشه زایی	تعداد ریشه	طول بلندترین ریشه (mm)
DKW	I 0.5 N 0	۰	۰	۰
	I 0.5 N 0.1	۲/۲	½	۱۰± ۰/۱
	I 0.5 N 0.5	۵/۵	۲	۲۰ ±۰/ ٤
	I 1.5	۰	۰	۰
	I 3	۱۳/۳	۳	۳۰ ±۰/۵
	I 4	٤	۱/۵	۲۵ ±۰/۳
MS N/2	I 0.5 N 0	۰	۰	۰
	I 0.5 N 0.1	۰	۰	۰
	I 0.5 N 0.5	۵/۸	۱	۵ ±۰/۱
	I 1.5	۲۰	۲	۱۰ ± ۰/۵
	I 3	٤۱/۰۳	۸	۳۰
	I 4	۱۰	۱	۹ ± ۰/٤
MS (N/2/2)	I 0.5 N 0	۰	۰	۰
	I 0.5 N 0.1	۰	۰	۰
	I 0.5 N 0.5	۰	۰	۰
	I 1.5	۳۷/۵	٤/۵	٤۰
	I 3	۲۵	۲	۲۵
	I 4	۰	۰	۰

NAA = N IBA = I

جدول شماره ۷ : نتایج بدست آمده از تیمارهای ریشه‌زایی پس از کاهش هورمون BA

تیمار	درصد ریشه زایی	تعداد ریشه	طول بلندترین ریشه (mm)
MS N/2 I 3	۸۳	۸	٤٥
GD I 3	٦٨	٦	٤٠

جدول شماره ۸ : نتایج بدست آمده با استفاده از فروبری قاعده شاخه‌ها در محلول IBA ٥٠ mg / l

تیمار	درصد ریشه زایی	تعداد ریشه	طول بلندترین ریشه (mm)
GD – H	٦٨/٧٥	٤/٧	٤٨/٢
GD–H +AC	١٠٠	٥/٥	٥٥
GD + P.P.V	٠	٠	٠

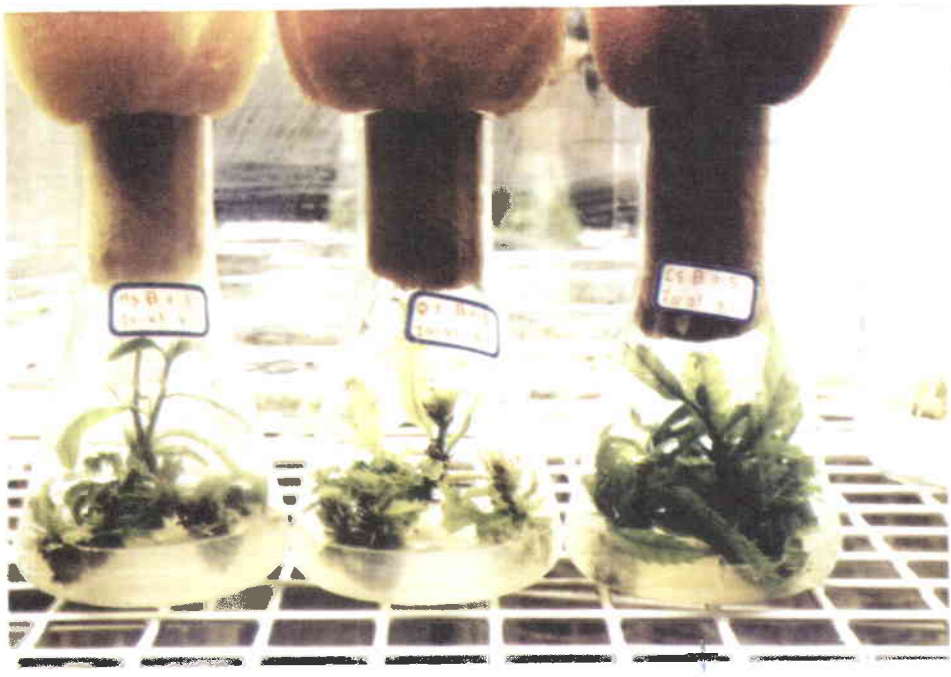
AC = زغال فعال P.P.V = مخلوط خاک سترون (پرلیت + پیت ماس + ورمیکولایت)

جدول شماره ۹ : مقایسه غلظت یونی نمکهای موجود در محیط‌های کشت

یون	DKW	QL	*MS N/2*	*GD*
NH_4^+ (mM)	١٧/٥	٥	١٠/٣٠٥	١٢/٥
K^+	٢٠	١٩/٨	١٠/٥٢	١٢/٩
Mg^{++}	٣	١/٥	١/٥	٠/١٤
Ca^{++}	٩/٣	٥/١	٢/٩٩	١/٥٥
Na^+	٠/٣	٠/٢	٠/٢٢٤	–
No_3^-	٣٤/٤	٣٣	١٩/٧	٢٣/٩٥
Po_4^{---}	٢	٢	١/٢٥	٢/٢
So_4^{--}	١٢/٣	١/٦٤	١/٧٦	٢/٦٧
Cl^-	٢	٠/٠٠٢	٦	٠/٨٧
I^- (µM)	–	٥	٥	٤/٨
Mn^{++}	١٩٨	٤/٥	١٣٢	٥٩
Zn^{++}	٥٧	٣٠	٢٩	١٠
B^{+++}	٧٨	١٠٠	١٠٠	٤٩
Mo^{+++}	١/٦	١	١/٠٣	١
Co^{++}	–	٠/١	٠/١٠٥	١
Cu^{++}	١	٠/١	٠/١	١
Ni^{++}	٠/٠٢	–	–	–
Fe^{++}	١٢٢	١٠٠	١٠٠	١٠٠
N(mM)	٤٢/٣	٣٨	٣٠/٠٠٥	٣٦/٤٥
NH_4NO_3(mM)	٠/٢٢	٠/١٥	٠/٥٢	٠/٥٢
قدرت یونی کل (mM)	٩٤/٠٧٤	٦٨/٥٨	٥٤/٩٢	٥٧/٠٥

× درمحیط MS N/2 مقادیر NH_4No_3 و KNO_3 به ١/٢ مقدار اصلی تقلیل یافته است .

شکل شماره ۱ - فعال شدن جوانه‌ها در محیط کشت



شکل شماره ۲- مقایسه شاخه‌زایی و رشد طولی شاخه‌ها در محیط کشت

شکل شماره ۳ - ریشه زایی شاخه‌های شاه‌بلوط در محیط بدون هورمون واجد زغال فعال

شکل شماره ٤ - گیاهچه سازگار شده شاه‌بلوط

سپاسگزاری

از همکاران گرامی خانمها مهندس معصومه ایزدپناه، مهندس میترا امام، مهندس شکوفه شهرزاد و آقای دکتر علی جعفری مفیدآبادی که از راهنمائیهای علمی و عملی آنها در طول اجرای این تحقیق بهره‌مند بوده‌ام تشکر و قدردانی می‌شود. از ریاست محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع وآقای دکتر میرزایی ندوشن ریاست محترم بخش ژنتیک و فیزیولوژی که امکان انجام این تحقیق را فراهم نموده‌اند سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

ثابتی، حبیب الله، ۱۳٤٤. درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات دانشگاه تهران. صفحه ۲۰۵ –۲۰٤

جزیره‌ای، محمدحسین، ۱۳٤۰. شاه بلوط درخت جنگلی ایران. سازمان جنگلبانی ایران. ۱۰ صفحه

Biondi, S., L.Canciani.G.De. Paoli. and N. Bagni,1981. Shoot formation from bud cultures of mature chestut. In Proc IUFRO Sect S2 015. Int workshop " *In Vitro* " Cultivation For Tree Species. Fontainebleau. Frances, pp 181-185

Biondi, S., L.Canciani and N.Bagni, 1984. Uptake and translocation of benzyladenine by elm shoots cultured *in vitro*. *Can. J. Bot.*62 : 2385 –2390

Bonga, J.M. and P.V. Aderkas, 1992. *In Vitro* Culture Of Trees. Kluwer Academic Publishers. 236 pp.

Canase, L.A. and A.Benbadis, 1988. *In vitro* plant regeneration from cotyledon fragments of the Olive tree (*Olea europaea L.*). Plant Science, 56 –74 , Elsevier Scientific Publishers Ireland Itd.

Cheng, T.Y. and T.H. Voqui, 1977. Regeneration of Douglas fir plantlets through tissue culture. *Science* 198 : 306 – 307

Chevre, A.M., S. Gilles., S.A. Moura and G. Salesses, 1983. *In vitro* vegetative multiplication of Chestnut. *Journal of Horticultural Science*. 58: 23- 29

Curir, P.C. F.VanSumere., A. Termini. , P. Barthe. , A. Marchesini. , and M. Dolci, 1990. Flavonoid accumulatiom is correlated with

adventitious root formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. *Plant Physiol.* 92: 1148 –1153.

George, E.F., D.J.M. Puttock. and H.J. George, 1987. Plant Culture Media, Vol 1 and 2, Exegetic ltd, Edington.

Gresshoff, P. M. and C. H. Doy, 1972. Develoment and differentiation of haploid *lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta,* 17 : 161-170

Jacquiot, C, 1950. Sur la culture in vitro de tissu cambial de Chataignier Castanea vessca Gaertn. Compte–rendus Hebdomadaires des Se'ances de l' Acade'mie des Sciences Naturelles. 231, 1080 1081

Kirby, E. G., T. Leustek. and M. S. Lee, 1987. Nitrogen nutrition. In : Bonga, J. M. and D. J. Durzan. Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol 1, General Principles and Biotechnology, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. pp 67-88

Mc Granahan, G.H. and J.A. Driver, 1987. Tissue culture of *Juglans*. In: Bonga, J. M. and D. J. Durzan. Cell and Tissue Culture in Forestry،vol 3, Case Histories: Gymnosperms Angiosperms and Palms, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. pp 261 -270

Murashige,T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiologia plantarum,* 15: 473-597

Reuveni, O. and D.R. Shlesinger. and U. Lavi, 1990. *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya. Plant Cell Tissue Organ Cult,*. 20: 41-46

Rodriques, R, 1982. *In vitro* propagation of *Castanea sativa* Mill. through Meritem – tip culture. *Hort Science*. 17 (6): 888 –889

Rugini, E, P. Tarini and F.Mari, 1986. *In vitro* control of shoot vitrification in almond (*P. dulcis*) and development of a technique to eliminate apex necrosis and shoot base photo – oxidation pistachio (*Pistachia vera*). *Hort Science,* 21: 804 -807

Sanchez. M.C., M.C. Sanjose., E. Ferro., A. Ballester، and A.M. Vieitez, 1997. Improving micropropagation conditions for adult – phase shoots of chestnut. *Journal of Horticultural Science,* 72 : 433- 443

Sanjose. M.C., A.M. Vieitez and E. Vieitez, 1984. *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds of chestnut. *Journal of Horticultural Science*. 59 : 359-365

Vieitez, A.M., A.L. Gonzalez. and E. Vieitez, 1978. *In vitro* culture of cotyledon tissue of Castanea sativa Mill. *Scientia Horticulturae*. 8 : 100-127

Vieitez, A.M. and E. Vieitez, 1980. Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown *in vitro*. *Physiologia plantarum,* 50: 127 130

Vieitez, A.M. and M.L. Vieitez, 1982. *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. *Scientia Horticulturae,* 18 : 343 –351

Vieitez, A.M., A. Ballester., M.L. Vieitez. and E. Vieitez,1983. *In vitro* plantlel regeneration of mature chestnut. *Journal of Horticultural Science,* 58 :457 –463

Vieitez. J., D. G. I. Kingston., A. Ballestet. and E. Vieitez, 1987. Identification of two compounds correlated with the lack of rooting capacity of chestnut cutting. *Tree Physiol,* 3 : 247 –255

Asexual regeneration of *Castanea sativa* (chesnut) by shoot tip culture

Naraghi, T. S.[1]

Abstract:

In order to investigate asexual propagation of *Castanea sativa* apical buds were cut in different seasons from selected mature trees at Shafarood Forest in Gillan. After different sterilizing treatments, they were cultured on DKW, QL and MS N /2 mediums.

Late autumn was the best season for isolation of buds. Using 0.1% mercuric chloride for 7 minutes proved to be the most effective sterilizing treatment.

DKW medium containing 0.5 mg l^{-1} BA + 0.1 mg l^{-1} IBA was the best treatment for establishment highest shoot proliferation and elongation was observed in DKW medium containing 0.5 mg l^{-1} BA + 0.01 mg l^{-1} IBA.

The shoots were treated as cuttings by dipping the basal ends in 50 mgl^{-1} IBA solution for 24 hours, then they were placed in an auxin - free GD medium (1/3 macroelement) plus 1% activated charcoal. After 4 weeks, with this technique rooting rates of up to 100%.

Rooted plantlets after acclimation transferred to soil under greenhouse condition.

Key words : *Castanea sativa* (chestnut), shoot –tip culture, apical bud and micropropagation

1 - Research Institute of Forests and Ranglands, Department Of Plant Genetics and Physilogy . P. O. Box: 13185 – 116, Tehran, Iran.