DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2013.3485

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۰، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۵۲-۲٤۰ (۱۳۹۱)

تکثیر آزمایشگاهی بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia*)

سیده معصومه زمانی[۱]، میترا امام[۲]، ابراهیم محمدی گل‌تپه[۳]، ناصر صفایی[*٤]، عباس قمری‌زارع[۵] و محمدجعفر فارسی[٦]

۱- دانشجوی دکترا، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- مربی پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

۳- استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

٤*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

پست‌الکترونیک: nsafaie@ modares.ac.ir

۵- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

٦- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰٤/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۸/۲۱

چکیده

تولید انبوه گونه‌های درختی سخت‌چوبِ اقتصادی مانند گونه بلوط *Quercus castaneifolia* به دلیل فراهم آوردن ذخایر گیاهی سالم و گاهی اصلاح شده، جزء جدایی‌ناپذیر برنامه‌های جنگل‌کاری تجاری و نیز اصلاح جنگل‌های آسیب‌دیده می‌باشد. در این بین بکارگیری تکنیک‌های آزمایشگاهی کشت بافت و ریزازدیادی گامی مهم در جهت تولید انبوه ژنوتیپ‌های برگزیده و یا ژنوتیپ‌های اصلاح شده‌ی ژنتیکی (مانند ژنوتیپ‌های مقاوم شده به آفات یا بیماری‌ها) خواهد بود. این تحقیق به‌منظور یافتن دستورالعملی کارآمد برای ریزازدیادی آزمایشگاهی بلوط *Q. castaneifolia* با استفاده از بخش‌های گره‌دار و جوانه‌دار سرشاخه‌های این گیاه انجام شد. سرشاخه‌ها از سه منبع گیاهی مختلف شامل درختان بالغ استان گیلان، استان مازندران و نهال‌های واقع در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور جداسازی شدند. این نمونه‌ها پس از ضدعفونی درون محیط‌های کشت تکمیل شده با هورمون‌های رشد قرار داده شدند. بالاترین میانگین استقرار و تکثیر مربوط به ریزنمونه‌هایی بود که از نهال‌های موجود در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور بدست آمده بودند. در این مرحله مشخص شد که محیط‌های کشت MS (با نصف غلظت از عناصر پرمصرف) و WPM به همراه ۰/۳ mg/L از سیتوکینین BAP و ۰/۰۱ mg/L از اکسین IBA هر دو محیط مناسبی برای استقرار ریزنمونه‌ها می‌باشند. بهترین ریزازدیادی سرشاخه‌های رشد یافته در محیط کشت WPM به همراه BAP (۰/۳ mg/L) صورت گرفت. بالاترین رشد ریشه روی محیط کشت WPM ۱/۲ به همراه اکسین IBA (۰/۳ mg/L) به تنهایی و یا همراه با NAA (۰/۱ mg/L) بدست آمد. ریشه‌ها در حدود ۷۰ درصد از گیاهان در طول شش هفته شکل گرفتند.

واژه‌های کلیدی: سرشاخه، گره، جوانه، ریزازدیادی و بلوط *Quercus castaneifolia*.

مقدمه

درختان بلوط از مهمترین و فراوانترین گونه‌های چوبی پهن‌برگ اکوسیستم‌های جنگلی، ازجمله جنگلهای ایران می‌باشند که از دیدگاه زیست‌محیطی و نیز اقتصادی از اهمیت بسیار بالایی برخوردارند (Johnson *et al.*, 2002). این گونه به‌عنوان گیاهی بسیار ارزشمند و قابل بهره‌وری در بخش‌های صنعتی از قبیل صنایع چوب، کاغذسازی، شیمی، رنگسازی و داروسازی مطرح می‌باشد (Johnson *et al.*, 2002; Merkle and Narin 2005). این جنس در نواحی شمالی البرز و در رشته‌کوه زاگرس در غرب ایران گسترش دارد (Fattahi, 1994).

مهمترین روش زادآوری بلوط استفاده از بذرهای آن است که روشی مناسب برای فراهم نمودن تنوع ژنتیکی این گونه‌ها در اکوسیستم‌های جنگلی می‌باشد (Ostrolucka *et al.*, 2007). اما امکان تکثیر جنسی بلوط به دلایل متعددی با محدودیت‌هایی مواجه است؛ ازجمله این دلایل می‌توان به طولانی بودن مدت زمان لازم برای رسیدن بذرها به بلوغ فیزیولوژیکی، نامنظم بودن الگوی ظهور بذرها در سالهای مختلف، متفاوت بودن کمیت و کیفیت این بذرها در سالهای مختلف، پایین بودن قوه‌ی نامیه‌ی بذرهای تولید شده و مشکل بودن ذخیره‌سازی این بذرها اشاره نمود (Ostrolucka *et al.*, 2007; Pijut *et al.*, 2011). بعلاوه، بذرهای گونه‌های *Quercus* درجات متفاوتی از جوانه‌زنی را از خود نشان می‌دهند و نیز به دلیل حساسیت بالای آنها به خشک شدن و از دست دادن آب، تنها برای مدت کوتاهی قابل ذخیره شدن می‌باشند (Chalupa 1995). از سوی دیگر، روش تکثیر غیرجنسی درختان بالغ بلوط از طریق قلمه‌زنی گاهی به دلیل مشکل بودن ریشه‌زایی قلمه‌های آن چندان میسر و موفقیت‌آمیز نمی‌باشد (Bhardwaj *et al.*, 1996). البته مشکلات یاد شده در تکثیر درختان بالغ یا جوان بلوط را می‌توان با بکارگیری تکنیک‌های آزمایشگاهی (*in vitro*) مرتفع ساخت (Bisht *et al.*, 1998; Ostrolucka *et al.*, 2007; Pijut *et al.*, 2011). بطور مثال تکثیر آزمایشگاهی بلوط از طریق جمع‌آوری و بکارگیری جوانه‌های انتهایی یا جانبی آن دارای کاربردهای مهم ازجمله جنگل‌کاریهای تجاری می‌باشد که این مهم از طریق تکثیر انبوه ژنوتیپ‌های خاص و برگزیده که دارای چوب با کیفیت بالا هستند و یا ژنوتیپ‌های مقاوم یا متحمل به بیماریها، آفات و یا آلودگی‌های زیست‌محیطی می‌باشند، میسر است (Ostrolucka *et al.*, 2007; Ostrolucka and Bezo 1994). همچنین جمع‌آوری ریزنمونه‌های اولیه از درختان بلوط با ژنوتیپ‌های متفاوت و وارد نمودن آنها به یک سیستم کشت بافت پایدار (*in vitro*) امکان ایجاد تنوع ژنتیکی که جزء جدایی‌ناپذیر اکوسیستم‌های جنگلی است را فراهم می‌سازد (Pijut *et al.*, 2011).

از سوی دیگر علاوه بر آنکه تکنولوژی کشت بافت گیاهی موجب افزایش میزان و سرعت تولید گیاهان مهم و برگزیده‌ی مورد نظر ما شده است و نیز می‌تواند بستر مناسبی جهت حفظ و نگهداری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادر و یا در حال انقراض طبیعت به‌عنوان منابع با ارزش ژرم‌پلاسم محسوب شود؛ این تکنولوژی در سال‌های اخیر به گونه‌ای توسعه یافته است، و هم اکنون از آن برای انتقال ژن‌های مطلوب، به‌ویژه ژن‌های ایجاد کنندهٔ مقاومت نسبت به آفات و بیماری‌های گیاهی، در سطح گسترده استفاده می‌شود. همچنین بدیهی است اقدامات آزمایشگاهی برای ایجاد موتاسیون و سپس انتخاب موتانت‌های گیاهی مناسب ابزار قدرتمندی برای تکمیل

روش‌های اصلاح نبات سنتی می‌باشند (Williams & Maheswaran 1986)، زیرا اصلاح گیاهان به روش‌های سنتی، علاوه بر وقت‌گیر بودن، در بسیاری از موارد امکان‌پذیر نیست، در حالی که تکنولوژی جدید کشت بافت گیاهی این راه را به خوبی هموار ساخته و به پیش می‌برد (Hassandokht & Ebrahimi, 2006). گونه‌های *Quercus* برای تلاقی دادن و اصلاح به طریق سنتی نیاز به زمان طولانی دارند، در نتیجه تکنولوژی کشت بافت می‌تواند گامی مؤثر در جهت کوتاه نمودن زمان زادآوری آنها باشد.

اگرچه بهینه‌سازی تکنیک ریزازدیادی گونه‌های مختلف بلوط ازجمله *Q. acutissima* (Kim 2000)، *Q. robur* (Chalupa 1993; Vieitez *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 1996)، *Q. rubra* (Sánchez *et al.*, 1996; Vengadesan and Pijut 2007; Vieitez *et al.*, 2009)، *Q. suber* (Romano *et al.*, 1992)، *Q. petraea* (José *et al.*, 1990; Chalupa 1993; Vieitez *et al.*, 2009) و *Q. bicolor* (Vieitez *et al.*, 2009) در سایر کشورها صورت گرفته است. اما در ایران این تکنیک تاکنون برای تکثیر بلوط بهینه‌سازی نشده است. بلوط بلندمازو (*Q. castaneifolia*) از مهمترین گونه‌های صنعتی بومی شمال ایران و قفقاز است. پوست تنه درخت بلندمازو و حتی برگ آن دارای مقدار زیادی تانن است که می‌توان از آن استخراج نمود و در چرم‌سازی استفاده کرد. چوب بلندمازو سخت، محکم و غیر قابل نفوذ است و در صنعت چوب و تخته‌سازی کاربرد فراوان دارد (Mirkazemi, 1997). نظر به اهمیت اکولولوژیکی و نیز ارزش بالای اقتصادی و زیست‌محیطی این گونه، در این تحقیق دستورالعملی برای کشت بافت بلوط گونه *Q. castaneifolia* از طریق جوانه‌های جانبی، انتهایی و نیز میانگره‌های آن به‌دست آمد.

مواد و روش‌ها

۱) جمع‌آوری ریزنمونه‌ها: در این تحقیق سرشاخه‌های درختان *Q. castaneifolia* همراه با جوانه‌های جانبی، انتهایی و نیز میانگره‌ها از استانهای گیلان (درختان واقع در مؤسسه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان)، مازندران (شهرستان نور) و نیز نهال‌های بلوط مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور به‌عنوان منبع ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. این سرشاخه‌ها در اواخر اسفندماه از جهات و ارتفاعات مختلف پایه مادری (درختانی که از نظر ظاهری سالم و شاداب بنظر می‌رسیدند) جدا شده و برای انجام مراحل بعدی، به آزمایشگاه منتقل شدند.

۲) جداسازی ریزنمونه‌ها، ضد عفونی و کشت آنها: در آزمایشگاه سرشاخه‌های دارای جوانه و میانگره به قطعات حدوداً ده سانتی‌متری تقسیم و تحت جریان آب معمولی به مدت یک ساعت قرار داده شدند؛ سپس بخوبی به همراه مایع ظرفشویی برس‌کشی شدند تا کلیه آلودگی‌های سطحی پاک گردد. پس از این مرحله‌ی پیش‌سترون‌سازی، سرشاخه‌ها به قطعات حدوداً ۳ تا ٤ سانتی‌متری که حاوی جوانه یا گره بودند برش داده شدند. این قطعات درون آب مقطر به اتاقک کشت منتقل شدند تا بقیه مراحل تحت شرایط سترون انجام گیرد. در اتاقک کشت نمونه‌ها در محلول سترون‌کننده کلرور جیوه (۰/۱ درصد) در زمان‌های مختلف تیمار شدند تا بهترین زمان ضدعفونی برای این نمونه‌ها مشخص گردد(جدول ٤). پس از این مرحله از ضدعفونی، نمونه‌ها درون آب مقطر سترون سه مرتبه و هربار به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور

شدند. از این قطعات ریزنمونه‌های حاوی یک جوانه و یا یک میانگره توسط تیغ سترون بصورت افقی برش داده شد و توسط پنس سترون درون لوله‌های کشت حاوی ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) با نصف غلظت از عناصر پرمصرف یا WPM: Woody Plant Medium(Lloyd & Mc Cown, 1980) منتقل شد. بر اساس نتایج بدست‌آمده از تحقیقات پیشین (Ostrolucka *et al.*, 2007) به این محیط‌ها تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه BAP (6-Benzylaminopurine) به میزان ۰/۳ mg/L و IBA (3-Indolebutyric acid) به میزان ۰/۰۱ mg/L اضافه شده بود؛ همچنین به‌منظور ممانعت از تولید ترکیبات فنلی Polyvinylpyrrolidone (PVP) به میزان ۰/۲ mg/L درون محیط‌ها استفاده شده بود. در تمام آزمایش‌ها pH محیط با استفاده از HCl و KOH روی ۵/۸ –۵/۷ تنظیم و بعد محیط‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. کشت‌ها در اتاقک‌های رشد تحت دمای ۲۵ –۲۳ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور (۵۰۰۰ –۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. نگهداری کشت‌ها در شرایط مذکور تا زمان ایجاد و رشد جوانه‌ای از ریزنمونه‌ها صورت گرفت، سپس کشت‌ها بطور مداوم هر ٤ تا ۵ هفته به محیط جدید (WPM به همراه ۰/۳ mg/L از BAP و ۰/۰۱ mg/L از IBA) منتقل شدند. آنگاه آزمایش‌های مربوط به مرحله‌ی شاخه‌زایی پس از سه مرتبه بازکشت نمودن شاخه‌های اولیه‌ی حاصل از ریزنمونه‌ها محاسبه گردید.

۳) بررسی تأثیر ترکیبات معدنی روی میزان باززایی شاخه‌ها: در این آزمون محیط کشت مناسب جهت واکشت جوانه‌های مستقر شده به‌منظور شاخه‌زایی و تکثیر بر روی دو محیط کشت متفاوت MS و WPM در قالب دو تیمار ساخته شد و ریزنمونه‌ها (حاصل از سه مرتبه بازکشت نمودن شاخه‌های اولیه) در طرح کاملاً تصادفی کشت شدند، و شرایط نگهداری کشت‌ها در هر تیمار همانند آزمایش قبل بود. همچنین به محیط‌ها ۰/۳ mg/L از BAP، ۰/۰۱ mg/L از IBA و ۰/۲ mg/L از PVP اضافه شده بود. تعداد تکرارها در هر تیمار ٦۰ عدد بود (۱۲ شیشه و در هریک ۵ نمونه). به‌منظور آزمون آماری، اعداد مربوط به ضریب ازدیاد شاخه، ضریب ازدیاد جوانه، رشد طولی و سبزینگی شاخه‌ها بعد از ٦ هفته در هر تکرار محاسبه شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و به صورت آزمایش فاکتوریل GLM بر پایه طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شد.

٤) بررسی تأثیر ترکیبات سیتوکینین روی میزان باززایی شاخه‌ها: پس از دستیابی به بهترین محیط شاخه‌زایی، تأثیر ترکیبات سیتوکینینی روی میزان شاخه‌زایی گونه *Q. castaneifolia* در آزمایشی که بر پایه محیط کشت WPM بود و در آن تیمارهای سیتوکینینی تغییر می‌کردند مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). این آزمون در ۵ تیمار هورمونی اجرا شد و ریزنمونه‌ها در ۳ تکرار (در هر تکرار ۳۰ ریزنمونه) کشت شدند. بعد از ٦ هفته، فاکتورهای مورد بررسی در هر تکرار همانند آزمون قبل بود. نتایج با نرم‌افزار SPSS و به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی تجزیه و میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شدند. لازم به ذکر است که ۰/۰۱ mg/L از IBA و ۰/۲g/L از PVP در هر ۵ تیمار اضافه شده بود.

جدول ۱- تیمارهای سیتوکینینی مختلف جهت بهینه‌سازی شاخه‌زایی

تیمار	محیط	سیتوکینین
۱	WPM	BAP از ۰/۳ mg/L
۲		BAP از ۰/۵ mg/L
۳		2ip از ۰/۳ mg/L
٤		kin از ۰/۳ mg/L
۵		-

۵) بررسی تأثیر ترکیبات جیبرلین روی میزان باززایی و رشد طولی شاخه‌ها: به‌منظور بهینه سازی تولید شاخه و رشد طولی آن، در این آزمون تأثیر اضافه نمودن اسید جیبرلیک (GA_3: Gibberellic acid) به محیط‌های شاخه‌زایی در قالب دو تیمار جیبرلینی (اضافه نمودن ۰/۱ mg/L از GA_3 یا اضافه نکردن آن) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). تعداد تکرارها در هر تیمار ۳۰ عدد بود و بعد از ٦ هفته، فاکتورهای مورد بررسی در هر تکرار و نحوه‌ی تجزیه و تحلیل آنها همانند آزمون ۳ بود. البته ۰/۰۱ mg/L از IBA و ۰/۲ g/L از PVP در هر ٤ تیمار به محیط پایه WPM اضافه شده بود.

جدول ۲- تیمارهای مختلف BAP و GA_3 جهت بهینه‌سازی رشد شاخه‌ها

تیمار	سیتوکینین	جیبرلین
۱	BAP ۰/۳ mg/L	GA_3 ۰/۱ mg/L
۲		GA_3 0 mg/L
۳	BAP ۰/۵ mg/L	GA_3 ۰/۱ mg/L
٤		GA_3 0 mg/L

٦) بررسی تأثیر ترکیبات اکسینی روی ریشه‌زایی شاخه‌ها: شاخه‌های با طول تقریبی ۳- ۲ سانتی‌متر وارد مرحله‌ی ریشه‌زایی شدند؛ بدین‌ترتیب که ابتدا کلیه شاخه‌ها به شیشه‌های کشت (٤۰۰ میلی‌لیتری) حاوی ۵۰-٤۰ میلی‌لیتر محیط پایه WPM فاقد هورمون به‌عنوان پیش‌تیمار ریشه‌زایی منتقل شدند. پس از یک‌ماه، نمونه‌ها به محیط کشت WPM با ۱/۲ غلظت از عناصر پرمصرف، ۱/۲ غلظت از املاح نیترات، مقدار کامل عناصر کم‌مصرف، g/L ۳ زغال فعال (activated charcoal) و حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی (IBA و NAA: Naphthalene Acetic Acid) در غلظت‌های مختلف منتقل شدند (جدول ۳). نتایج مربوط به محیط‌های ریشه‌زایی (تعداد و طول ریشه اصلی، تعداد و طول ریشه فرعی) نیز همانند محیط‌های پرآوری در پایان هفته ششم مورد ارزیابی قرار گرفت و یادداشت‌برداری‌های لازم انجام شد. تجزیه نتایج با نرم‌افزار SPSS و به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت و میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شدند.

جدول ۳- تیمارهای هورمونی جهت بهینه‌سازی ریشه‌زایی

تیمار	IBA	NAA
۱	۰/۱ mg/L	–
۲	۰/۳ mg/L	–
۳	–	۰/۱ mg/L
٤	–	۰/۳ mg/L
٥	۰/۳ mg/L	۰/۱ mg/L

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلدان‌های کوچک پلاستیکی که محتوی مخلوط خاک سترون‌شده‌ی پیت، پرلیت، ورمیکولیت با نسبت‌های ۲: ۰:۲/۵ بودند منتقل و در گلخانه تحقیقاتی قرار داده شدند تا مراحل سازگارسازی را طیکنند؛ بدین‌ترتیب که گیاهچه‌ها به همراه گلدان‌های مربوطه در داخل کیسه‌های پلاستیکی شفاف برای حفظ رطوبت نگهداری شدند و بعد از گذشت ده روز از انتقال، سازگاری با هوادهی روزانه به تدریج شروع شد.

نتایج

– **ضدعفونی و کشت ریزنمونه ها:** نتایج آزمایش نشان داد که بالاترین درصد زنده‌مانی مربوط به ریزنمونه‌هایی بود که از نهال‌های مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور بدست آمده بودند (شکل ۱) و استقرار نمونه‌های مربوط به درختان بالغ استانهای گیلان و مازندران چندان میسر نبود. در واقع این پایه‌های بالغ بلوط دارای آلودگی‌های قارچی و باکتریایی درونی بودند که این آلودگی‌ها با ضدعفونی سطحی از بین نرفته و در زمان کشت به روی محیط کشت آمدند (جدول ٤، تیمارهای ۱ تا ۱۲). با بررسی تیمارهای مورد استفاده برای سترون‌سازی ریزنمونه‌های مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور مشخص شد که استفاده از کلرور جیوه روشی مناسب برای کنترل آلودگی‌ها می‌باشد؛ اما با افزایش زمان سترون‌سازی درصد سوختگی ریزنمونه‌ها نیز افزایش یافت (جدول ٤، تیمارهای ۱۳ تا ۱۸). بهترین تیمار برای سترون‌سازی ریزنمونه‌های مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور استفاده از کلرور جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه بود که با استفاده از آن به‌ترتیب ٦٤ و ٥۳ درصد ریزنمونه سالم و جوانه‌زده در محیط‌های کشت WPM و MS ۱/۲ بدست آمد (جدول ٤، تیمارهای ۱۳ و ۱٦). همچنین در این مرحله مشخص شد که ریزنمونه‌های سالم و سترون هم در محیط MS (با نصف غلظت از عناصر پرمصرف) و هم در محیط WPM به همراه BAP ۰/۳ mg/L و IBA۰/۰۱ mg/L استقرار یافتند؛ بنابراین هردوی اینها محیط مناسبی برای استقرار ریزنمونه‌ها می‌باشند (جدول ٤، تیمارهای ۱۳ تا ۱۸).

جدول ٤- تیمارهای مختلف سترون‌سازی جهت ضدعفونی ریزنمونه‌ها

تیمار	محل نمونه‌برداری	کلرور جیوه ۰/۱ درصد	محیط	درصد آلودگی	درصد سوختگی	درصد زنده‌مانی در سلامت
۱	استان گیلان	٤ دقیقه	WPM	۹٤	٦	۰
۲		٦ دقیقه		۸۹	۱۱	۰
۳		۸ دقیقه		۸٦	۱۳	۱
٤		٤ دقیقه	MS	۱۰۰	۰	۰
۵		٦ دقیقه		۹۱	۹	۰
٦		۸ دقیقه		٦۱	۳۹	۰
۷	استان مازندران	٤ دقیقه	WPM	۱۰۰	۰	۰
۸		٦ دقیقه		۷٤	۲٤	۲
۹		۸ دقیقه		۸۵	۱۵	۰
۱۰		٤ دقیقه	MS	۹۱	۸	۱
۱۱		٦ دقیقه		۹۵	۵	۰
۱۲		۸ دقیقه		۷۹	۲۱	۰
۱۳	مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور	۲ دقیقه	WPM	۱۱	۲۵	٦٤
۱٤		٤ دقیقه		۰	۳٤	۵٦
۱۵		٦ دقیقه		٤	۸٤	۱۲
۱٦		۲ دقیقه	MS	۱	٤٦	۵۳
۱۷		٤ دقیقه		۹	٤۲	٤۹
۱۸		٦ دقیقه		۰	۷٦	۲٤

- بررسی تأثیر ترکیبات معدنی روی میزان باززایی شاخه‌ها: در این آزمون تأثیر نوع محیط روی شاخه‌زایی و نیز سبزینگی شاخه‌ها معنی‌دار بود. نتایج این آزمون نشان داد که ترکیب محیط کشت WPM بهترین محیط برای پرآوری (افزایش تولید) شاخه‌ها بوده و موجب سبزینگی بالاتر در آنها می‌گردد (شکل ۱).

- بررسی تأثیر ترکیبات سیتوکینین روی میزان باززایی شاخه‌ها: نتایج تجزیه‌واریانس داده‌های مربوط به تأثیر ترکیبات سیتوکینینی روی شاخه‌زایی بلندمازو نشان داد که تیمارهای سیتوکینینی تأثیر معنی‌داری روی ضریب ازدیاد شاخه و جوانه، رشد طولی و سبزینگی شاخه‌ها دارند.

مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون دانکن نشان داد که اضافه نمودن سیتوکینین BAP به میزان ۰/۵ mg/L به محیط کشت WPM، بیشترین تعداد شاخه را تولید نموده و میانگین ضریب ازدیاد جوانه و رشد طولی نیز در همین تیمار به همراه تیمار BAP ۰/۳ mg/L دارای بیشترین

مقدار بوده است. همچنین استفاده از سیتوکینین BAP به میزان ۰/۳ mg/L بیشترین سبزینگی شاخه‌ها را به دنبال داشت (جدول۵).

جدول ۵- مقایسه میانگین‌های عوامل رشد و ازدیاد شاخه تحت تأثیر ترکیبات سیتوکینینی مختلف

تیمار	میانگین ضریب ازدیاد شاخه	میانگین ضریب ازدیاد جوانه	میانگین رشد طولی	میانگین سبزینگی
BAP ۰/۳ mg/L	۱/۷۰ ab	۵/۵٤ a	۱/٦۲ a	۳/۹۱ a
BAP ۰/۵ mg/L	۲/۰٤ a	۵/۰٤ a	۱/٤۷ ab	۳/٦۷ ab
2ip ۰/۳ mg/L	۱/۰٤ b	٤/٤۵ ab	۱/۳۳ ab	۳/۰۳ c
kin ۰/۳ mg/L	۱/۰۸ b	۳/۳۹ b	۱/۰۱ b	۳/۳۲ bc
فاقد سیتوکینین	۱/۱۲ b	٤/۲۰ ab	۱/۵۷ a	۲/٤۹ d

حروف مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف غیرمعنی‌دار می‌باشد.

- بررسی تأثیر ترکیبات جیبرلین روی میزان باززایی و رشد طولی شاخه‌ها: پس از تجزیه آماری نتایج این آزمون مشخص شد که اضافه نمودن هورمون جیبرلین به میزان ۰/۱ mg/L به محیط کشت WPM، به تنهایی تأثیر بیشتری نسبت به BAP و تلفیق این دو هورمون بر افزایش تولید شاخه و رشد طولی آن داشته است.

- بررسی تأثیر ترکیبات اکسینی روی ریشه‌زایی شاخه‌ها: در حدود ۷۰ درصد از شاخه‌های ریزازدیاد شده پس از انتقال به محیط کشت WPM ۱/۲ ریشه‌دار شدند (شکل ۱). پس از بررسی تأثیر تیمارهای اکسینی روی ریشه‌زایی مشخص شد میانگین‌های عوامل رشد ریشه تحت تأثیر این هورمون‌ها می‌باشند؛ به‌طوری‌که افزودن هورمون IBA به میزان ۰/۳ mg/L به محیط WPM ۱/۲ به تنهایی و یا همراه با اضافه نمودن NAA به میزان ۰/۱ mg/L بالاترین تأثیر را روی افزایش رشد ریشه‌های اصلی و فرعی بلندمازو داشته‌است (جدول ٦). گیاهچه‌های حاصل، مراحل سازگارسازی تدریجی را در گلخانه همراه با سرپوش‌های پلاستیکی گذراندند و در نهایت پس از گذشت حدود ده هفته مراحل سازگارسازی تکمیل شد. از نظر میزان سازگاری، حدود ٦۰ درصد گیاهان کشت‌بافتی پس از انتقال به خاک گلدان در شرایط گلخانه‌ای از خود سازگاری نشان دادند (شکل ۱).

جدول ٦- مقایسه میانگین‌های عوامل تولید و رشد ریشه تحت تأثیر ترکیبات اکسینی مختلف

تیمار	میانگین طول ریشه اصلی	میانگین طول ریشه فرعی
IBA ۰/۱ mg/L	٤/۲۳ ab	۰/٦۷ ab
IBA ۰/۳ mg/L	۸/۳۳ a	۰/۹٤ a
NAA ۰/۱ mg/L	٦/۰ ab	۰/٦٦ ab
NAA ۰/۳ mg/L	۳/۳٥ b	۰/۳۲ b
IBA ۰/۳ mg/L و NAA ۰/۱ mg/L	٦/۳۳ ab	۱/۱۱ a

حروف مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف غیرمعنی‌دار می‌باشد.

شکل ۱- مراحل مختلف ریزازدیادی بلوط *Quercus castaneifolia* (الف: رشد جوانه، ب: تکثیر متعدد شاخه، ج: ریشه‌زایی گیاه کشت‌بافتی، د: سازگارسازی در گلخانه)

بحث

نخستین بار هدف از کشت بافت بلوط، تولید انبوه و سریع ژنوتیپ‌هایی با خصوصیات مطلوب و تجاری و ایجاد گیاهچه‌هایی که تمام ویژگی‌های والد خود را بدون تفرق صفات کسب می‌کنند، بود. با این راهکار کمبود تولید بذر در درختان بلوط که در برخی سالها اتفاق می‌افتد، مشکلات ذخیره‌سازی بذرها و ظرفیت پایین ریشه‌دهی قلمه‌های بلوط مرتفع می‌گردد (Ostrolucka *et al.*, 2007; Vieitez *et al.*, 2009).

با کشت ابتدایی ریزنمونه‌ها مشخص شد که

ریزنمونه‌های نهال‌های مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور نسبت به نمونه‌های درختان بالغ استان‌های گیلان و مازندران درصد زنده‌مانی بالاتری دارند. نتایج مطالعات نشان می‌دهند که استفاده از ریزنمونه‌های نهال‌ها برای ریزازدیادی عموماً روش مناسب‌تری نسبت به بکارگیری ریزنمونه‌های درختان بالغ می‌باشد؛ زیرا درختان بالغ گاهی دارای آلودگی‌های درونی می‌باشند و برخی قسمت‌های آنها قابلیت خود را برای باززایی از دست داده‌اند (Bonga *et al.*, 2008). مطابق با نتایج سایر محققان (ازجمله Emam & Shahrzad 2001; Ostrolucka *et al.*, 2007) استفاده از کلرور جیوه (۰/۱ درصد) تیمار مناسبی برای حذف آلودگی‌های سطحی بود، اما از آنجاکه ترکیبی بسیار سمی است با طولانی‌تر شدن زمان سترون‌سازی، گیاه‌سوزی ریزنمونه‌ها افزایش خواهد یافت (جدول ٤، تیمار ۱۵ و ۱۸).

نتایج ریزازدیادی گونه‌های مختلف بلوط نشان می‌دهد که از همان ابتدای بکارگیری این تکنیک در مورد بلوط، محیط کشت WPM یکی از مناسب‌ترین محیط‌ها برای این منظور است (Chalupa 1988, 1993; Evers *et al.*, 1993)؛ به‌طوری‌که Vieitez و همکاران (۱۹۸۵) گزارش نموده‌اند از میان هفت محیط مورد بررسی آنها، بهترین نتایج در محیط کشت WPM بدست آمده است. این محققان نشان داده‌اند که استفاده از محیط کشت MS موجب توسعه ضعیف جوانه‌های جانبی، کوچک شدن برگ‌ها و ایجاد نکروز می‌گردد؛ به‌طوری‌که از دست رفتن سبزینگی از نوک شاخه‌ها آغاز و درنهایت به تمام گیاهچه انتشار می‌یابد. در این تحقیق نیز مشخص شد تأثیر محیط‌های کشت روی شاخه‌زایی و سبزینگی آن معنی‌دار است، به‌طوری‌که محیط WPM برخلاف محیط MS بطور معنی‌داری ضریب ازدیاد شاخه و نیز سبزینگی شاخه‌ها را افزایش داد.

مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن نشان داد که استفاده از سیتوکینین BAP مؤثرترین تیمار روی ضریب ازدیاد شاخه بوده و میانگین ضریب ازدیاد جوانه، رشد طولی و سبزینگی شاخه‌ها نیز در حضور این هورمون دارای بیشترین مقادیر بود (جدول۵). براساس نتایج سایر مطالعات نیز مهمترین و عمومی‌ترین تنظیم‌کننده رشد گیاهی که در مرحله تکثیر شاخه بلوط تاکنون بکار گرفته شده است، BAP می‌باشد. به‌طوری‌که محققان مختلف غلظت‌های متفاوتی از آن را به‌عنوان غلظت بهینه معرفی نموده و به تنهایی (Vieitez *et al.*, 1985; Chalupa 1993; Vengadesan & Pijut 2007) یا همراه با مقادیر پایینی از اکسین IBA (Sánchez *et al.*, 1996; Puddephat *et al.*, 1999) در محیط کشت شاخه بلوط استفاده کرده‌اند.

محیط مناسب برای طویل شدن شاخه‌های بلوط قدری با محیط پرآوری شاخه‌ها متفاوت است؛ در محیط طویل شدن شاخه باید BAP را حذف و از محیط بدون هورمون استفاده کرد و یا اگر خواهان وقوع همزمان شاخه‌زایی و طویل شدن شاخه هستیم از غلظت‌های پایین BAP استفاده نماییم (Chalupa 1993; Vieitez *et al.*, 2009). در این تحقیق نیز غلظت پایین BAP (جدول ۵، تیمار ۱) و یا عدم بکارگیری آن (جدول ۵، تیمار ۵) بالاترین تأثیر را در رشد طولی شاخه‌ها داشت. برخی از محققان نیز (مانند Vengadesan & Pijut 2007) به‌منظور طویل شدن شاخه‌های بلوط از اضافه نمودن هورمون GA_3 به محیط شاخه‌زایی استفاده نموده‌اند؛ در این تحقیق نیز افزودن جیبرلین رشد طولی شاخه‌ها را بطور معنی‌داری افزایش داد.

القاء ریشه‌زایی گونه‌های بلوط با قراردادن شاخه‌های ۱/۵ تا ۳ سانتی‌متری در محیط فاقد هورمون و بعد انتقال شاخه‌ها به محیط کشت حاوی اکسین IBA یا NAA و یا تلفیقی از اینها صورت می‌گیرد (Chalupa 1993; Juncker & Favre 1989; Vieitez *et al.*, 1994; Puddephat *et al.*, 1999). در تحقیق حاضر استفاده از این الگو موجب ریشه‌زایی بیش از ۷۰ درصد گیاهچه‌های بلوط شد.

مطابق با یافته‌های سایر محققان، با مقایسه میانگین‌های عوامل تولید و رشد ریشه تحت تأثیر ترکیبات اکسینی مختلف مشخص شد که استفاده از اکسین IBA (۰/۳ mg/L) به تنهایی و یا همراه با NAA (۰/۱ mg/L) مؤثرترین تیمار روی رشد طولی ریشه‌های اصلی و فرعی بوده است (جدول ٦). از سوی دیگر نتایج بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که بهترین ظرفیت ریشه‌دهی با کشت شاخه‌ها در محیط حاوی زغال فعال صورت می‌گیرد. به‌طوری‌که برای تمام گونه‌های بلوط مورد بررسی گزارش شده است که افزودن زغال فعال هم روی کیفیت شاخه‌زایی و هم روی توسعه سیستم ریشه‌ای تأثیر مثبتی داشته است؛ به‌طوری‌که تشکیل ریشه‌های اصلی و فرعی در حضور این ترکیب به سرعت افزایش می‌یابد (Sánchez *et al.*, 1996; Vieitez *et al.*, 2009). در تحقیق حاضر در تمام تیمارها (صرف‌نظر از نوع اکسین افزوده شده به محیط‌ها) اغلب گیاهچه‌های بلوط دارای تعداد زیادی ریشه اصلی و فرعی بودند و این مسئله را طبق نتایج بدست‌آمده از سایر مطالعات می‌توان به افزودن زغال فعال به محیط‌های ریشه‌زایی نسبت داد؛ زیرا پس از مقایسه میانگین‌های تعداد ریشه اصلی و تعداد ریشه فرعی مشخص شد که تفاوت معنی‌داری میان تیمارهای مختلف (افزودن هورمون‌های مختلف اکسینی) در تأثیر بر تشکیل ریشه وجود ندارد (جدول ٦). همچنین الگوی معمول در سازگار نمودن گیاهچه‌های بلوط با شرایط خارج آزمایشگاهی منتقل نمودن گیاهچه‌ها در بستری از پیت و پرلیت و قرار دادن گلدان‌ها در پوشش پلاستیکی می‌باشد (Meier-Dinkel *et al.*, 1993) که این الگو با اندکی تغییرات در تحقیق حاضر اجرا شد و در نهایت منجر به سازگارسازی گیاهچه‌های بلوط پس از ۱۰ هفته گردید.

در مجموع، نتایج بدست‌آمده از این تحقیق نشان‌دهنده ظرفیت مناسب تکنیک کشت بافت برای بکارگیری آن در تولید انبوه بلوط *Q. castaneifolia* جهت جنگل‌کاری‌ها و احیاء جنگل‌های آسیب‌دیده و نیز تولید آزمایشگاهی این گیاهچه‌ها برای آزمون‌های ژنتیکی (ازجمله ایجاد موتاسیون، انتقال ژن و غیره) می‌باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق در گروه تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام گردید؛ ازاین‌رو از مسئولان مؤسسه و گروه مذکور که در این پژوهش ما را یاری نمودند سپاسگزاریم.

منابع مورد استفاده

– Bhardwaj, D.R., Mishra, V.K. and Shamet, G.S., 1996. Rooting response of *Quercus leucotrichophora* Linn. cuttings to chemical treatments and physio-chemical status. Journal of Tree Sciences, 15: 49–51.
– Bisht, M.S., Vyas, P., Bag, N. and Palni, L.M.S., 1998. Micropropagation of some plants of Indian Himalayan region: 126– 170. In: Srivastava, P.S., (Ed.). Plant Tissue Culture and Molecular Biology–Applications and Prospects. Narosa Publishing House, New Delhi.
– Bonga, J.M., MacDonald, J.E. and von Aderkas, P., 2008. Cloning conifers, with emphasis on mature trees: 475-490. In: Rao, G.P., Zhao, Y., Radchuck, V.V. and Batnagar, S.K., (Eds.). Advances in Plant Biotechnology. Studium Press LLC, Houston, USA.
– Chalupa, V., 1988. Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and

tissue culture. Physiology of Plants, 15:437-442.
– Ostrolucka, M.G. and Bezo, M., 1994. Utilization of meristem cultures in propagation of oak (*Quercus* spp.). Genetic Polonica, 35: 161–169.
– Ostrolucka, M.G., Gajdosova, A. and Libiakova, G., 2007. Protocol for micropropagation of *Quercus* spp.: 85–91. In: Jain, S.M. and Haggman, H., (Eds.). Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer, Dordrecht, 562 p.
– Pijut, P.M., Lawson, S.S. and Michler, C.H., 2011. Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 47:123-147.
– Puddephat, I.J., Alderson, P.G. and Wright, N.A., 1999. *In vitro* root induction in axillary microshoots of *Quercus robur* L. Annals of Applied Biology, 134:233-239.
– Romano, A., Noronha, C. and Martins-Louçao, M.A., 1992. Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. Annals of Botany, 70:531-536.
– Sánchez, M.C., San-José, M.C., Ballester, A. and Vieitez, A.M., 1996. Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. Tree Physiology, 16:673-680.
– San-José, M.C., Vieitez, A.M. and Ballester, A., 1990. Clonal propagation of juvenile and adult trees of sessile oak by tissue culture. Silvae Genetica, 39:50-55.
– Vengadesan, G. and Pijut, P.M., 2007. *In vitro* propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 45:474-482.
– Vieitez, A.M., Corredoira, E., Ballester, A., Muñoz, F., Durán, J. and Ibarra, M., 2009. *In vitro* regeneration of important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. Plant Cell Tissue Organ Culture, 98:135-145.
– Vieitez, A.M., Sánchez, M.C., Amo-Marco, J.B. and Ballester, A., 1994. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. Plant Cell Tissue Organ Culture, 37:287-295.
– Vieitez, A.M., San-José, M.C. and Vieitez, E., 1985. *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. Journal of Horticultural Sciences, 60:99-106.
– Williams, E.G. and Maheswaran, G., 1986: Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Annals of Botany, 57: 443-462.
thidiazuron to stimulate shoot proliferation. Biology of Plants, 30:414-421.
– Chalupa, V., 1993. Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture. Annals of Forest Science 50 (Supplement), 1: 295-307.
– Chalupa, V., 1995. Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.): 67–87. In: Jain, S., Gupta, P. and Newton, R., (Eds.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol 2- Angiosperms. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
– Emam, M. and Shahrzad, Sh., 2001. Micropropagation of *Populus caspica*. Pajouhesh va Sazandegi in Natural Resources, 53:84-90.
– Evers, P., Vermeer, E. and van Eeden, S., 1993. Rejuvenation of *Quercus robur*. Annals of Forest Science 50 (Supplement), 1:330-335.
– Fattahi, M., 1994. Study of Western Iranian Oak Forests and Their Main Degradation Causes. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran, 63 p.
– Hassandokht, M.R. and Ebrahimi, R., 2006. Principals of Plant Tissue Culture. Marze Danesh Publication, Tehran, Iran, 328 p.
– Johnson, P.S., Shifley, S.R. and Rogers, R., 2002. The ecology and silviculture of oaks. CABI Publishing, New York, NY, 503 p.
– Juncker, B. and Favre, J.M., 1989. Clonal effects in propagating oak trees via *in vitro* culture. Plant Cell Tissue Organ Culture, 19:267-276.
– Kim, Y.W., 2000. Somatic embryogenesis in *Quercus acutissima*: 671-685. In: Jain, S.M., Gupta, P.K. and Newton, R.J., (Eds.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol. 6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
– Lioyd, G.B. and Mc Crown, B.H., 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain lourel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Proceedings of the International Plant Propagator's Society, 30:421-437.
– Meier-Dinkel, A., Becker, B. and Duckstein, D., 1993. Micropropagation and *ex vitro* rooting of several clones of late-flushing *Quercus robur* L. Annals of Forest Science 50 (Supplement), 1 :319-322.
– Merkle, S.A. and Nairn, C.J., 2005. Hardwood tree biotechnology. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 41: 602–619.
– Mirkazemi, S.Z., 1997. The seeding cycle of *Quercus castaneifolia* C.A.M in Hyrcanian forest. Technical Report of the Research Projects of the Iranian Ministry of Agriculture, 550 p.
– Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobaco

In vitro propagation of *Quercus castaneifolia*

S.M. Zamani[1], M. Emam[2], E. Mohammadi Goltappe[3], N. Safaie[★4] , A. Ghamarizare[5] and M.J. Farsi[6]

1- PhD student, Department of Plant Pathology, College Agricalture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran
2- M.Sc., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran
3- Prof., Department of Plant Pathology, College Agricalture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran
4*- Corresponding author, Assoc. Prof., Department of Plant Pathology, College Agricalture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran, E-mail: nsafaie@ modares.ac.ir
5- Assis. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran
6- Assis. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran

Received: 01.06.2012 Accepted: 11.11.2012

Abstract

Clonal reproduction of commercially important hardwood tree species, such as *Quercus castaneifolia*, is vital in a tree improvement program in order to provide improved planting stock for forestry. *In vitro* and conventional vegetative propagation methods will be required to produce clones of elite genotypes or genetically improved genotypes. Studies were carried out to produce a protocol for *in vitro* propagation of *Q. castaneifolia* using buds and nodal segments of shoot tips. The shoot tips and nodal explants excised from three different regions (mature oak trees of Guilan and Mazandaran provinces and juvenile trees of Research Institute of Forests and Rangelands) and placed on initiation media supplemented with growth hormones after sterilization. The highest average multiplication factor was observed in the explants taken from juvenile plants of Research Institute of Forests and Rangelands. Half-strength Murasighe and Skoog as well as McCown's Woody Plant media supplemented with 0.3 mg/l cytokinine BAP and 0.01 mg/l IBA found optimum for the culture establishment. Established shoots were best multiplied in the same media supplemented with BAP (0.3 mg/l). The highest degree of root growth was achieved on $^{1}/_{2}$ WPM media supplemented with auxins IBA (0.3 mg/l) alone or with NAA (0.1mg/l). The roots were formed in about 70% of the explants in 6-weeks.

Key words: Shoot tip, Nodal segment, Bud, Micropropagation and *Quercus castaneifolia*.