Archive of SID

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
بوم‌شناسی جنگل‌های ایران

"مقاله پژوهشی"

ریزازدیادی گونه شاه‌بلوط (*Castanea sativa* Mill.) تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای

مهرسده تفضلی[۱]، سید محمد حسینی‌نصر[۲]، حمید جلیلوند[۳] و محیا تفضلی[۱]

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
(نویسنده مسوول: mehr_tafazoli@yahoo.com)
۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استاد، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۸
صفحه: ۱۱۴ تا ۱۲۲

چکیده

گونه شاه‌بلوط به‌عنوان یک گونه جنگلی بومی و ارزشمند در برخی از رویشگاه‌های جنگلی استان گیلان ظاهر می‌شود که به‌دلیل فقدان زادآوری طبیعی و وجود مشکلات اقتصادی- اجتماعی و همچنین بیماری‌های زنگ‌زدگی و سوختگی، مساحت توده‌های آن در حال کاهش است؛ لذا ازدیاد غیرجنسی آن از طریق روش‌های کشت بافت می‌تواند در حفاظت از این گونه مؤثر بوده و از انقراض آن جلوگیری نماید. مطالعه حاضر با هدف استفاده از روش ریزازدیادی جهت تولید گیاهچه کامل شاه‌بلوط و شناسایی بهترین ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد گیاهی انجام شد. بدین منظور ابتدا بذور از رویشگاه ویسرود جمع‌آوری، ضدعفونی و در آب جوش خیسانده شد و در محیط کشت B_5 کشت و پس از سبز شدن از بذور جوانه‌زده ریزنمونه تهیه شد. ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای شاه‌بلوط تحت القاء سیتوکینین‌ها (TDZ و BA) با غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۲، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و اکسین‌ها (IBA، NAA و IAA) با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت B_5 قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بهترین واکنش از ریزنمونه‌ی برگ حاصل شده و TDZ (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌ترتیب بیشترین درصد تولید کالوس- شاخه (۳۲/٤ درصد) و ریشه‌زایی (۸۰ درصد) را داشتند. زنده‌مانی گیاهچه‌های بدست آمده در محیط بیرون از آزمایشگاه ۸۰ درصد بود. با توجه به اهمیّت گونه شاه‌بلوط از نظر اقتصادی و زیست‌محیطی، نتایج این مطالعه می‌تواند در راستای کاربرد مدیریت احیایی جهت حفاظت، توسعه و جلوگیری از انقراض این گونه مؤثر واقع شود.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده رشد گیاهی، تولید کالوس- شاخه، ریزازدیادی، ریشه‌زایی شاه‌بلوط

مقدمه

جنگل‌ها با داشتن ارزش‌های متعدد اقتصادی و زیست محیطی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین نظام‌های حیات‌بخش، جایگاه انکارناپذیری در تأمین رفاه و آسایش جوامع بشری دارند. با این حال، افزایش روز افزون تقاضای چوب منجر به افزایش نگرانی‌ها درباره سوءاستفاده از جنگل و کاهش تنوع زیستی می‌شود. جنگل‌کاری‌های فراوانی جهت جلوگیری از انقراض و تخریب جنگل‌های جهان صورت پذیرفته است که با توجه به زمان‌بر بودن رشد درختان، این میزان تلاش نمی‌تواند از انقراض برخی گونه‌ها جلوگیری به‌عمل آورد (۱۸). لذا تجهیز علوم جنگل به روش‌های جدید بخصوص علم زیست‌فناوری با فراهم نمودن ابزارهایی جهت انتخاب و اصلاح درختان برتر با سرعت و کارایی بیشتری نیاز است (۴۱،۲۳،۱).

شاه‌بلوط (*Castanea sativa* Mill.) گیاهی از جنس *Castanea*، از خانواده *Fagaceae*، به‌عنوان یک گونه جنگلی بومی و ارزشمند در برخی از رویشگاه‌های جنگلی استان گیلان (ویسرود، سیاه مزگی، قلعه رودخان و شفارود) به‌طور طبیعی ظاهر می‌شود. رویشگاه‌های مذکور فاقد زادآوری طبیعی بوده و با وجود مشکلات اقتصادی- اجتماعی نظیر چرای دام در معرض تخریب هستند به‌طوری‌که مساحت توده‌های شاه‌بلوط رو به کاهش است (۱۶). این گونه از دو بیماری اصلی به نام‌های زنگ‌زدگی و سوختگی که به‌ترتیب در اثر قارچ‌های *Phytophthora ssp.* و *Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr.* ایجاد می‌شوند (۳۱) رنج می‌برد که در استان گیلان مشهود بوده (۱۶) و از مهم‌ترین معضلات این درختان محسوب می‌شود (۱۴). همچنین انعطاف‌پذیری پایین خصوصیات مورفولوژیک برگ در مقابل شرایط نوری می‌تواند از دلایل آسیب‌پذیری زیاد گونه شاه‌بلوط باشد (۴۳).

اغلب ازدیاد شاه‌بلوط، به‌عنوان یک گونه چوبی سرسخت، از طریق بذر یا تکثیر غیرجنسی مانند پیوند یا قلمه با مشکل مواجه می‌شود (۷،۲۷). زخم ایجاد شده در اثر پیوند مدخل ورود عوامل بیماری‌زا است و مشکل ناسازگاری بین درخت پایه و پیوند نیز وجود دارد (۲۷). همچنین عدم ریشه‌زایی به‌دلیل وجود بازدارنده‌های رشد در قلمه گزارش شده است (۷). با توجه به اهمیت درختان شاه‌بلوط در تولید چوب و میوه (۲۳،۵،۲) و همچنین تولید بیوچار از میوه آن (۱۹)، ازدیاد غیرجنسی آن از طریق روش‌های کشت بافت می‌تواند در حفاظت و جلوگیری از انقراض این گونه مؤثر باشد.

موفقیت روش‌های کشت بافت برای گونه‌های شاه‌بلوط آمریکایی (*Castanea dentate* (Marsh.) Borkh.) (۲۸)، شاه‌بلوط ژاپنی (*Castanea crenata* Seib. et Zucc.) (۳۶) و همچنین هیبرید شاه‌بلوط (*C. sativa* × *Castanea crenata*) (۱۵) گزارش شده‌است. نراقی (۲۵) پس از برداشت جوانه‌های انتهایی گونه شاه‌بلوط در جنگل‌های شفارود استان گیلان، آنها را با تیمارهای متفاوت سترون‌سازی و در محیط‌های کشت QL[1]، DKW[2] و ۱/۲MS[3] (۲۴) کشت کرد و بهترین شاخه‌زایی در محیط کشت DKW با ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA[4] و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA[5] بدست

1- Quoirin and Lepoivre
2- Driverand Kuniyuki Walnut Medium
3- Murashige and Skoog Medium
4- Benzylaminopurine
5- indole-3-butyric acid

www.SID.ir

Downloaded from ifej.sanru.ac.ir at 14:46 +0430 on Sunday August 1st 2021

Archive of SID

Downloaded from ifej.sanru.ac.ir at 14:46 +0430 on Sunday August 1st 2021

آمد. بیشترین درصد ریشه‌زایی از طریق قرار دادن شاخه‌های به ارتفاع ۲ سانتی‌متر در ۵۰ میلی‌گرم در لیتر IBA سترون به‌مدت ۲۴ ساعت و بازگشت مجدد آنها در محیط کشت ۱/۳GD فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و حاوی زغال فعال حاصل شد. در مطالعه‌ای دیگر ریزنمونه‌های گره از گیاهچه-های درون شیشه‌ای گونه شاه‌بلوط در محیط کشت ۱/۲MS حاوی ۵ سیتوکینین مختلف (FCF،BA[1]، KIN[2]، 2iP[3]، TDZ[4]) در سه غلظت متفاوت کشت شد که BA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تعداد شاخه و گره و IAA[5] با غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر ریشه‌زایی بهتری داشت (۲۹).

زمانی که یک گونه از بین می‌رود، نه تنها بر هم خوردن تعادل بوم‌نظام رخ می‌دهد بلکه گونه‌های وابسته با آن نیز از بین می‌روند، بنابراین تلاش جهت حفظ و توسعه درختان جنگلی امری ضروری است. از آنجایی که فنون کشت بافت به‌منظور باززایی و تولید تجاری انواع درختان، بخصوص آنهایی که بذر سرسخت دارند پیشرفت قابل ملاحظه‌ای نموده است (۶)، این روش‌ها می‌توانند جایگزین اکثر شیوه‌های سنتی تکثیر شوند. لذا هدف از انجام این مطالعه، بررسی مناسب‌ترین ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت به‌منظور ازدیاد درون شیشه‌ای، تولید کالوس- شاخه، ریشه‌زایی از شاخه‌های تولید شده و در نهایت تولید گیاهچه کامل شاه‌بلوط با استفاده از روش ریزازدیادی به‌عنوان یکی از روش‌های کشت بافت، جهت کاربرد در برنامه‌های توسعه و حفاظت جنگل‌ها بود.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

بذور مورد استفاده در این مطالعه از رویشگاه ویسرود واقع در استان گیلان با مساحت ۳۵۰ هکتار در ارتفاع ۲۰۰ تا ۶۰۰ متر از سطح دریا، جمع‌آوری شدند. بدین منظور پس از جنگل‌گردشی پنج درخت سالم انتخاب و بذور از آنها تهیه شد. فاصله این رویشگاه تا شهرستان شفت ۱۰ کیلومتر و تا شهر رشت ۳۰ کیلومتر بوده و در عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۱۰ دقیقه تا ۳۷ درجه و ۱۵ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۴۹ درجه و ۱۵ دقیقه تا ۴۹ درجه و ۱۰ دقیقه شرقی در حوضه آبخیز شماره ۱۷ قرار دارد (۱۶).

ضدعفونی و کشت بذور

به‌منظور ضدعفونی بذور جهت کشت در شرایط درون شیشه‌ای، ابتدا بذور چندین بار با تیپول (ماده شوینده) و آب مقطر شستشو داده شدند تا گرد و غبار موجود در روی پوسته بذر گرفته شود. سپس به‌مدت ۹۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد نگهداری و به‌مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم با غلظت چهار درصد قرار گرفتند. در هر مرحله پس از انجام عملیات ضدعفونی، بذور سه بار با آب مقطر سترون شسته شدند.

به‌منظور دستیابی به جوانه‌زنی بذور در محیط درون شیشه‌ای از تیمار خیساندن بذور در آب جوش (۲۶) و نگهداری در همان آب به‌مدت ۶ ساعت استفاده شد. خیساندن باعث جذب آب بیشتر توسط بذر (۱۱،۳۳)، کاهش بازدارنده‌های موجود در آن و افزایش درصد جوانه‌زنی می‌شود (۴،۳۰). سپس بذور در محیط کشت B_5[6] (۱۲) با pH حدود ۵/۵ کشت شدند. پس از کشت، شیشه‌های حاوی بذور به اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت ۷۰-۶۰ درصد انتقال داده شدند.

کشت ریزنمونه‌های حاصل از بذور

پس از جوانه‌زنی بذور در شرایط درون شیشه‌ای، ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه از گیاهچه‌ها تهیه و در محیط کشت تولید کالوس- شاخه یعنی B_5 حاوی سیتوکینین‌های BA و TDZ با غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۲، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. جهت ریشه‌دار شدن شاخه‌های تولید شده از بهترین ریزنمونه، این شاخه‌ها به محیط کشت ریشه‌زایی یعنی B_5 حاوی اکسین‌های IBA، IAA و NAA[7] با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند (۱۰ تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد). پس از ریشه‌زایی، گیاهچه‌ها از لوله‌های آزمایش خارج شده، محیط کشت باقی‌مانده بر روی ریشه با آب شسته شد. گیاهچه‌ها در گلدان‌های حاوی ترکیبی از خاک برگ، شن و خاک معمولی استریل، کاشته و در گلخانه با دمای ۲۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل و یک روز در میان آبیاری شدند و در نهایت در محیط بیرون از گلخانه قرار داده شدند (۹).

صفات مورد بررسی

درصد کالوس- شاخه و درصد ریشه‌زایی با توجه به تعداد تکرارهایی که به تولید کالوس- شاخه و ریشه‌زایی پاسخ مثبت داشتند، به‌دست آمد. درصد کالوس- شاخه، درصد ریشه‌زایی و طول شاخه و ریشه (استفاده از خط‌کش و با دقت میلی‌متر) در تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها با آزمون لون مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. در مرحله تولید کالوس- شاخه فاکتور اول نوع ریزنمونه در سه سطح (برگ، ساقه و ریشه) و فاکتور دوم غلظت سیتوکینین (TDZ و BA) در چهار سطح غلظتی (۰/۰۲، ۰/۲، یک و دو میلی‌گرم در لیتر) و در مرحله ریشه‌زایی، فاکتور اول نوع اکسین در سه سطح (IBA، IAA و NAA) و فاکتور دوم غلظت آنها در چهار سطح (۰/۱، ۰/۲، یک و دو میلی‌گرم در لیتر) بود. کلیه داده‌ها شامل درصد کالوس- شاخه، درصد ریشه‌زایی و طول شاخه و ریشه در تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، با نرم‌افزار SAS آنالیز شدند. مقایسه گروهی میانگین‌ها با آزمون SNK انجام و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

تأثیر سیتوکینین‌ها بر تولید کالوس- شاخه

جدول ۱ نشان می‌دهد که هر دو عامل نوع ریزنمونه و غلظت‌های TDZ و BA بر تولید کالوس- شاخه از قطعات برگ، ساقه و ریشه در سطح احتمال ۹۵ درصد تأثیر

1- Forchlorfenuron
2- Kinetin
3- Isopentyladenine
4- Thidiazuron
5- Indole-3-acetic acid
6- Gamborg's B_5
7- Naphthylacetic Acid

www.SID.ir

Archive of SID

معنی‌داری داشتند. همچنین اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت سیتوکینین نیز معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و غلظت سیتوکینین‌ها بر درصد کالوس- شاخه

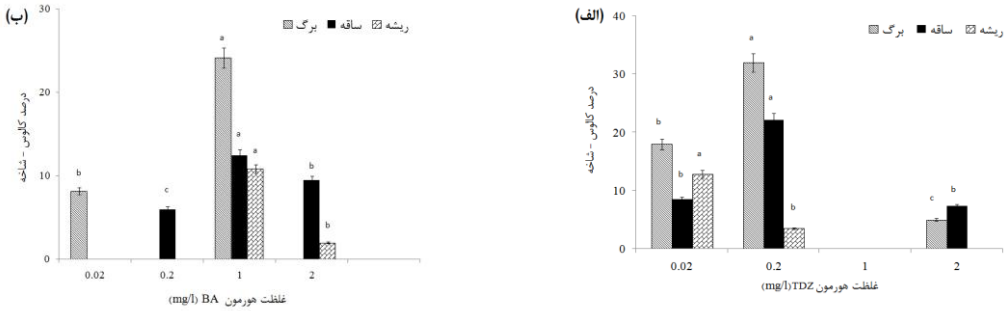
Table 1. Analysis of variance of explants type and cytokinins' concentration on the callus-shooting percentage

سیتوکینین	منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F
TDZ	نوع ریزنمونه	۲	۵۶۳/۴	۱۶۴/۰۹ *
	غلظت سیتوکینین	۳	۱۳۵۷/۵	۳۹۵/۴ *
	ریزنمونه × غلظت سیتوکینین	۶	۳۰۴/۶۴	۸۸/۷۳ *
BA	نوع ریزنمونه	۲	۱۵۷/۳	۸۳/۱۴ *
	غلظت سیتوکینین	۳	۷۶۸/۶	۴۰۶/۳ *
	ریزنمونه × غلظت سیتوکینین	۶	۱۷۱/۸	۹۰/۸ *

*: اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪

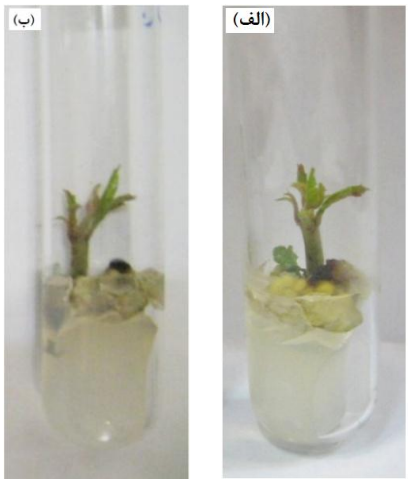
نتایج نشان داد که قطعات برگ در محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ نسبت به سایر غلظت‌ها و همچنین نسبت به قطعات ساقه و ریشه درصد کالوس- شاخه (۳۲/۴ درصد) بیشتری داشت. قطعات ساقه در حضور ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ (۲۳/۳۳ درصد) و قطعات ریشه در حضور ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ (۱۳/۶۶ درصد) بیشترین تولید کالوس- شاخه را داشتند و در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر، فقط کالوس تولید شد و شاخه مشاهده نشد (اشکال ۱ الف و ۲ الف).

قطعات برگ در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA نسبت به سایر غلظت‌ها و نسبت به قطعات ساقه و ریشه درصد کالوس- شاخه بیشتری (۲۴/۸ درصد) داشت. همچنین ریزنمونه‌های ساقه و ریشه در همین غلظت بیشترین تولید کالوس- شاخه (به‌ترتیب ۱۲/۵۲ و ۱۱/۲۱ درصد) را داشتند (اشکال ۱ ب و ۲ ب). سیتوکینین BA از طریق کاهش غالبیت رأسی در ریزنمونه باعث تحریک تقسیم سلولی، ازدیاد شاخه و شکل‌گیری جوانه جانبی می‌شود و از تشکیل ریشه جلوگیری می‌کند (۳۵). اختلاف درصد تولید کالوس- شاخه در غلظت‌های مختلف TDZ و BA در محیط کشت B_5 به قدرت یونی متفاوت این دو مربوط می‌شود (۴۲).



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف سیتوکینین بر درصد تولید کالوس- شاخه از ریزنمونه‌های مختلف الف) TDZ، ب) BA

Figure 1. Effect of different concentrations of cytokinins on the callus-shooting percentage from different explants. (a) TDZ, (b) BA



شکل ۲- تولید کالوس- شاخه از برگ در محیط کشت B_5 الف) ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ ب) یک میلی‌گرم در لیتر BA

Figure 2. Callus-shooting from leaf in B_5 medium with (a) 0.2 mg/l TDZ, (b) 1 mg/l BA

Downloaded from ifej.sanru.ac.ir at 14:46 +0430 on Sunday August 1st 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ifej.sanru.ac.ir at 14:46 +0430 on Sunday August 1st 2021

با مقایسه کالوس‌زایی و شاخه‌زایی ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای می‌توان بیان کرد که ریزنمونه برگ بیشترین درصد کالوس- شاخه را داشت. یکی از دلایل این امر می‌تواند بزرگتر بودن زخم ایجاد شده در هنگام کشت باشد، به‌طوری‌که برگ از چهار جهت خود دارای زخم بوده در حالی‌که ساقه و ریشه از دو جهت قابلیت ایجاد کالوس را داشتند. بنابراین افزایش سطح زخم منجر به جذب عناصر غذایی و تنظیم کننده‌های رشد شد (۳). همچنین از دلایل دیگر، وجود اختلافات فیزیولوژیکی و ساختار ژنتیکی سلول‌ها (۲۹) و پاسخ‌های متفاوت ریزنمونه‌های مختلف، نسبت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی درون‌زای آنهاست (۴۰).

به‌طور کلی، TDZ نسبت به BA منجر به تولید بیشتر کالوس- شاخه شده است. TDZ از مشتقات تیدیازول اوره می‌باشد که حدود ده‌هزار برابر از دی‌فنیل اوره و حتی از سیتوکینین‌های طبیعی نوع آدنین مانند زآتین فعال‌تر هستند. TDZ به‌واسطه فعالیت بیولوژیکی مشابه با سیتوکینین یا به‌واسطه القای سنتز و تجمع یک سیتوکینین درونی مستقیماً رشد را ترغیب می‌کند، در گونه‌های چوبی سطوح کم آن، ازدیاد جوانه‌های کناری را القاء می‌کند (۳۸)، اما سطوح زیادتر آن ممکن است از ازدیاد جوانه کناری جلوگیری کند، به‌عبارت دیگر سطوح زیاد TDZ کالوس‌زایی و تشکیل جنین سوماتیکی را تحریک می‌کند (۳۱) و از طویل شدن شاخه جلوگیری به‌عمل می‌آورد (۲۲،۲۱). ذبیحی و همکاران (۴۲) ۰/۰۱ تا ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ را در شاخه‌زایی و باززایی گونه ملج (*Ulmus glabra* Hudson) مناسب دانستند.

تأثیر سیتوکینین‌ها بر رشد طولی شاخه

بین نوع ریزنمونه‌های مختلف از نظر طول شاخه‌های تولید شده اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). غلظت‌های مختلف به‌کار رفته نیز دارای اثر معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بر رشد طولی شاخه بودند (جدول ۲).

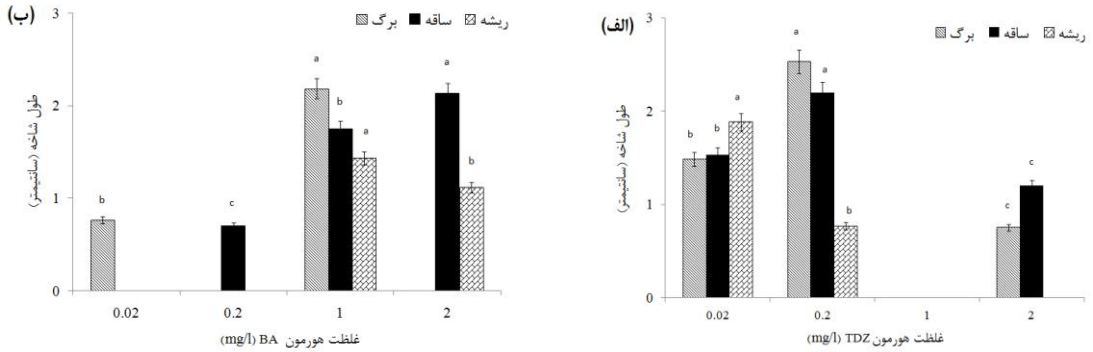
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و غلظت سیتوکینین‌ها بر طول شاخه

Table 2. Analysis of variance of explants type and cytokinins' concentration on shoot length

سیتوکینین	منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F
	نوع ریزنمونه	۲	۲/۴۳	۹۲/۸*
TDZ	غلظت سیتوکینین	۳	۱۳/۳	۵۰۷/۳*
	ریزنمونه × غلظت سیتوکینین	۶	۱/۸	۶۸/۰۳*
	نوع ریزنمونه	۲	۱/۷۴	۳۸/۲۳*
BA	غلظت سیتوکینین	۳	۱۰/۰۱	۲۲۰/۱*
	ریزنمونه × غلظت سیتوکینین	۶	۲/۷	۵۹/۳*

*، اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪

با توجه به شکل ۳ (الف)، طول شاخه‌های تولید شده از قطعات برگ در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ نسبت به سایر غلظت‌ها و همچنین نسبت به قطعات ساقه و ریشه بیشتر بوده است (۲/۵ سانتی‌متر). قطعات ساقه در حضور ۰/۲ و ریشه در حضور ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ دارای بیشترین طول شاخه بودند (به‌ترتیب ۲/۲۳ و ۱/۹۴ سانتی‌متر). در حضور یک میلی‌گرم در لیتر شاخه‌ای تولید نشد، بنابراین طولی برای آن موجود نبود. تأثیر BA بر طول شاخه حاصل از قطعات برگ در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر نسبت به سایر غلظت‌ها و همچنین نسبت به قطعات ساقه و ریشه بیشتر بوده است (۲/۱۳ سانتی‌متر). ریزنمونه‌های ساقه و ریشه به‌ترتیب در غلظت دو و یک میلی‌گرم در لیتر دارای بیشترین طول شاخه بودند (به‌ترتیب ۲/۰۹ و ۱/۵۱ سانتی‌متر) (شکل ۳ ب). به‌طور کلی، تولید کالوس- شاخه در محیط کشت حاوی TDZ بهتر از BA بود.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف سیتوکینین بر طول شاخه حاصل از ریزنمونه‌های مختلف الف) TDZ، ب) BA

Figure 3. Effect of different concentrations of cytokinin on the shoot length from different explants.(a) TDZ, (b) BA

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ifej.sanru.ac.ir at 14:46 +0430 on Sunday August 1st 2021

تأثیر اکسین‌ها بر ریشه‌زایی قطعات شاخه

با توجه به اینکه در مرحله تولید کالوس- شاخه، برگ و TDZ به‌ترتیب به‌عنوان بهترین ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد گیاهی مشخص شدند، در مرحله ریشه‌زایی از شاخه‌های حاصل از ریزنمونه برگ گیاهچه‌های درون شیشه‌ای در محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ استفاده شد. هر دو عامل نوع و غلظت اکسین و همچنین اثر متقابل آنها معنی‌دار شد (جدول ۳).

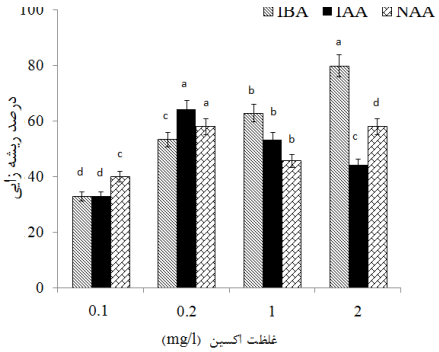
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر نوع و غلظت‌های مختلف اکسین‌ها بر ریشه‌زایی

Table 3. Analysis of variance of type and different concentrations of auxins on rooting

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F
نوع اکسین	۲	۹۷۳/۴	۱۰۷/۹۴ **
غلظت اکسین	۳	۱۸۸۵/۸۱	۲۰۹/۲ *
نوع × غلظت اکسین	۶	۱۰۱۴/۵۳	۱۱۲/۵۲ *

**: اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪؛ *، اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪

بررسی نتایج تأثیر اکسین‌های مختلف نشان‌داد که شاخه‌های کشت شده بدون ایجاد کالوس، ریشه تولید کردند. مطابق با شکل ۴، اکسین IBA نسبت به NAA و IAA تأثیر بیشتری بر ریشه‌زایی شاخه‌های تولید شده در مرحله قبل داشت. غلظت دو میلی‌گرم در لیتر آن بیشترین درصد ریشه‌زایی را حاصل نمود (۸۰ درصد). اکسین NAA در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر (۵۸/۴ درصد) و اکسین IAA در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بیشترین درصد ریشه‌زایی را داشتند. در این راستا، نراقی (۲۵) و سانچز و همکاران (۳۲) به نتایج مشابهی دست یافتند. اکسین‌های IBA و NAA به دلیل ناپایداری، اغلب مؤثرتر از IAA هستند و اکسین IBA از دو اکسین دیگر فعال‌تر است (۱۳).



شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین‌ها بر ریشه‌زایی شاخه‌های تولید شده از برگ

Figure 4. Effect of different concentrations of auxins on rooting of shoots from explants

تأثیر اکسین‌ها بر رشد طولی ریشه

همانطور که در جدول ۴ آمده است، نوع و غلظت اکسین و اثر متقابل آن‌ها اثر معنی‌داری بر رشد طولی ریشه داشت ($p<۰/۰۵$). کوتاه‌ترین و بلندترین طول ریشه به‌ترتیب در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد (شکل ۵). وارانگ و همکاران (۳۹) بیان کردند استفاده از IBA در افزایش ریشه‌زایی شاخه‌ها و همچنین رشد طولی شاخه اکالیپتوس گرندیس (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maid.) مؤثر بوده است. ویتز و ویتز (۳۷) در آزمایشی با ساقه‌های جانبی شاه‌بلوط دریافتند که IBA ریشه‌های بلندتر، ظریف‌تر و فیبری‌تری نسبت به NAA تولید کرد. جوشی و همکاران (۲۰) و هو و همکاران (۱۷) نیز نتایج مشابهی را گزارش کردند. با پیدایش ریشه (شکل ۶) جهت ایجاد سازگاری تدریجی، گلدان‌ها به محیط بیرون منتقل شدند که ۸۰ درصد زنده‌مانی حاصل شد.

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر نوع و غلظت‌های مختلف اکسین‌ها بر طول ریشه

Table 4. Analysis of variance of type and different concentrations of auxins on root length

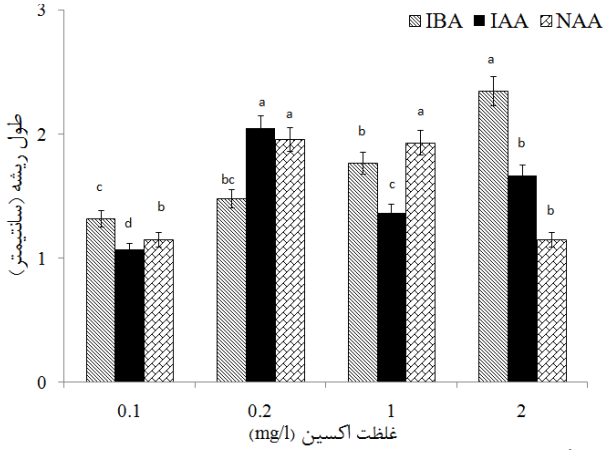
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F
نوع اکسین	۲	۰/۳	۴/۷ *
غلظت اکسین	۳	۱/۵۳	۲۵/۹ *
نوع × غلظت اکسین	۶	۱/۰۲	۱۷/۲۴ *

*: اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ifej.sanru.ac.ir at 14:46 +0430 on Sunday August 1st 2021



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین‌ها بر طول ریشه حاصل از شاخه‌های تولید شده
Figure 5. Effect of different concentrations of auxins on root length obtained from shoots

شکل ۶- گیاهچه کامل شاه‌بلوط از ریزنمونه برگ در محیط کشت B_5 (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ + ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA)
Figure 6. Chestnut plantlet from leaf explant in B_5 medium (0.2 mg/l TDZ + 2 mg/l IBA)

در اکثر مطالعات کشت بافت گیاهی، ابتدا تولید کالوس- شاخه انجام می‌شود و سپس شاخه‌های تمایز یافته برای ریشه‌زایی به محیط کشت دیگری منتقل تا در نهایت گیاهچه کامل از آنها به‌دست آید. در این مطالعه نیز با کشت ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه در تیمارهای مختلف ابتدا کالوس تشکیل و سپس شاخه‌زایی غیرمستقیم شکل گرفت. انتخاب این قطعات به‌عنوان ریزنمونه به‌دلیل جوانی سلول‌ها و پتانسیل بالای آنها در تمایزیابی است. این بافت‌ها و اندام‌های نابالغ در کشت درون‌شیشه‌ای از نظر مورفولوژیکی و داشتن سلول‌های فعال میتوزی نسبت به بافت‌ها و اندام‌های بالغ انعطاف‌پذیرترند (۱۰). اندام‌زایی عمدتاً به منبع ریزنمونه بستگی دارد، اما می‌توان این فرایند را با دخالت در مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت، به‌خصوص تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی تا حدودی به‌صورت دلخواه هدایت نمود. اسکوگ و میلر (۳۴) حضور اکسین و سیتوکینین را در تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلول‌های گیاهی کشت شده لازم دانستند به‌طوری‌که نسبت کم اکسین به سیتوکینین باعث شکل‌گیری ریشه، نسبت مساوی آن باعث تولید کالوس و نسبت بیشتر آن منجر به ریشه‌زایی می‌شود (۸).

بر اساس نتایج به‌دست آمده، سیتوکینین TDZ نسبت به BA و همچنین اکسین IBA نسبت به NAA و IAA در اندام‌زایی ریزنمونه‌های مختلف از گیاهچه درون شیشه‌ای تأثیر بیشتری داشتند. با مقایسه نتایج حاصل از ریزنمونه‌ها، اندام برگ بهترین واکنش را نشان‌داد. با توجه به اهمیت گونه شاه‌بلوط از نظر اقتصادی و زیست‌محیطی، روش ریزازدیادی با هدف تولید انبوه نهال‌های این گونه بدون محدودیت زمان و مکان، روشی مناسب در تکثیر این گونه محسوب می‌شود. از آنجا که تکثیر غیرجنسی شاه‌بلوط برای کاربرد مدیریت احیایی جهت حفاظت، توسعه و جلوگیری از انقراض این گونه با حداقل هزینه حائز اهمیت است، لذا پیشنهاد می‌شود که برای کشت بافت گونه شاه‌بلوط از اندام برگ گیاهچه‌های درون شیشه‌ای حاصل از بذر در محیط کشت B_5 حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و دو میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده شود.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ifej.sanru.ac.ir at 14:46 +0430 on Sunday August 1st 2021

منابع

1. Aldaghi, M., K. Espahbodi, A. Salimi and R. Khaksar. 2015. Selecting appropriate tissue sample and optimal maintenance conditions for enzymatic investigations on velvet Maple (*Acer velutinum* Boiss.). Ecology of Iranian Forests, 3(5): 11-19 (In Persian).
2. Arrobas, M., S. Afonso and M.A. Rodrigues. 2018. Diagnosing the nutritional condition of chestnut groves by soil and leaf analyses. Scientia Horticulturae, 228: 113-121.
3. Asnaashari, M. and M. ZokaeiKhosroshahi. 2010. Comprehensive guide to plant tissue culture. Bu-Ali Sina University Press, Hamedan, Iran. 467 pp (In Persian).
4. Baskin, C.C., S.E. Meyer and J.M. Baskin. 1995. Two type morphophysiological dormancy in seeds of two genera *Osmorhiza* and *Erythronium* with an Arcto-Tertiary distribution pattern. American Journal of Botany, 82: 293-298.
5. Bounous, G. 2005. The chestnut: a multipurpose resource for the millennium. Acta horticulturae, 693: 33-40.
6. Corredoira, E., A.M. Vieitez and A. Ballester. 2001. Somatic embryogenesis from leaf explants of chestnut. Abstract Cost G4, Monte Verita, Switzerland, 63 pp.
7. Dirr, M.A. and Jr. Heuser Charles. 1987. The reference manual of woody plant propagation, 239 pp.
8. Dodds, J.H. 1984. Experiments in plant tissue culture. Cambridge university press, 36-50.
9. Emam, M., A. Ghamarizare, K. Espahbodi, T.S. Naraghi and S.H. Shahrzad. 2012. Micropropagation of forest tree of *Sorbus aucuparia*.L by bud culture of mature plants. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 19(2): 263-273 (In Persian).
10. Farsi. M., J. Zolali. 2004. Principles of plant biotechnology. 1st edn, Ferdowsi University of Mashhad Press, Mashhad, Iran, 554 pp.
11. Fathi, Gh and B. Esmaeilpour. 2001. Plant growth regulator, principles and application (translation). 1st edn., University of Mashhad Press, Mashhad, Iran. 228 pp.
12. Gamborg, O.L., R.A. Muller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50: 151-158
13. Gasper, T. and M. Coumans. 1987. Root formation. In: JM Bonga and DJ Durzan (eds) Cell and tissue culture in forestry. Vol 2, Specific principles and methods: Growth and developments, Martinus Nijhoff Publishers, 202-217.
14. Ghezi, E., S.A. Khodaparast and M. Niknejad Kazempoor. 2010. Study on the morphological and virulence variability of *Cryphonectria Parasitica* causal agent of chestnut blight in Guilan province. Iranian Journal of plant pathology, 1(45): 25-35 (In Persian).
15. Goncalves, J.C., G. Diogo and S. Amancio. 1998. In vitro propagation of chestnut (*Castanea sativa* × *C. crenata*): effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. Scientia Horticulturae, 72: 265–275.
16. Hedayti, M.A. 2004. Investigation of Chestnut tree silviculture (*Castanea sativa* Mill.) on Guilan province and its propagation and cultivation. Ph.D. dissertation in Forestry, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran, 200 pp (In Persian).
17. Hou, J.W., S.J. Guo and G.Y. Wang. 2010. Effects of *in vitro* subculture on the physiological characteristics of adventitious root formation in microshoots of *Castanea mollissima* cv. 'yanshanhong'. Journal of Forestry Research, 21(2): 155-160.
18. Iranmanesh, Y., S. Aliahmad Korori, F. Emadian, D. Azadfar and K. Espahbodi. 2005. The role of biotechnology science in forestry management, conservation of forests in sustainable management conference, Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, Iran.
19. Jiang, K. M., C.G. Cheng, M. Ran, M, Y.G. Lu and Q.L. Wu. 2018. Preparation of a biochar with a high calorific value from chestnut shells. New Carbon Materials, 33(2): 183-187.
20. Joshi, J., P. Bishit and K. Sharma. 2003. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucallyptus grandis* * *E. terticornis*, Silvae Genetica, 52: 110-113.
21. Ledbetter, D.L. and J.E. Preece. 2004. Thidiazuron stimulates adventitious shoot production from Hydrangea quercifolia Bartr. leaf explants. Sci. Hortic, 101: 121–126
22. Lee, S.W. 2005. Thidiazuron in the improvement of bananamicropropagation. Acta Hortic, 692: 67–74.
23. Mota, M., T. Pinto, A. Vilela, T. Marques, A. Borges, J. Caço, J. Ferreira-Cardoso, F. Raimundo and J. Gomes-Laranjo. 2018. Irrigation positively affects the chestnut's quality: The chemical composition, fruit size and sensory attributes. Scientia Horticulturae, 238: 177-186.
24. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, Physiologia Plantarum, 15: 473-497
25. Naraghi, T.S. 2003. Micropropagation of Chestnut (Castanea sativa) by shoot culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 10(10): 69-89 (In Persian).
26. Norouzi Haroni, N. and M. Tabari Kouchsaraei. 2014. The effect of hydropriming, halopriming and boiling water on seed germination of black locust (*Robinia pesudoacasia* L.). Ecology of Iranian Forests, 2(3): 76-88 (In Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

27. Osterc, G., M. Zavrl Fras, T. Vodenik and Z. Luthar. 2005. The propagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) nodal explants. Acta agriculturae Slovenica, 85(2): 411-418.
28. Robichaud, R.L., V.C. Lessard and S.A. Merkle. 2004. Treatments affecting maturation and germination of American chestnut somatic embryos. Journal of plant physiology, 161(8): 957-969.
29. Roussos, P., A. Archimandriti and I. Beldekou. 2016. Improving in vitro multiplication of juvenile European chestnut (*Castanea sativa* Mill) explants by the use of growth retardants. Scientia Horticulturae, 198: 254-256.
30. Rowse, H.R. 1995. Drum priming - A non-osmotic method of priming seeds. Seed Sci. Technol, 24: 281-294.
31. San, B., M. Sezgin, H. Dumanoglu and A.I. Koksal. 2007. Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledons of Some European Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Cultivars. Turk J Agric For, 31: 175-179.
32. Sanchez, M.C., M.C. San Jose, E. Ferro, A. Ballester and A.M. Vieitez. 1997. Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut. Journal of Horticultural Science, 72 (3): 433-443.
33. Singh, K., K.P. Singh and L. Susheel Kumar. 1984. Seedling growth and vigor responses of some Indian medical plants to certain physical and chemical treatments. Indian journal of plant physiology, 27: 295-299
34. Skoog, F. and C.O. Miller. 1967. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues culture *in vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology, 11: 118-140.
35. Sutter, E.G. 1996. General laboratory requirements, media and sterilization methods. In: Trigiano, R.N. and D.J. Gray. (eds.) plant tissue culture concepts and laboratory exercises. 11-25 pp. New York, USA.
36. Tetsumura, T. and K. Yamashita. 2004. Micropropagation of Japanese chestnut (*Castanea crenata* Seib. et Zucc.) seedlings. Hortscience, 39: 1684-1687.
37. Vieitez, A.M. and M.L. Vieitez. 1983. *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated In vitro. Scientia Horticulturae, 18(4): 343-35.
38. Wang, H.M., H.M. Liu, W.J. Wang and Y.G. Zu. 2008. Effects of Thidiazuron, basal medium and light quality on adventitious shoot regeneration from in vitro cultured stem of *Populus alba- P. berolinensis*. Journal of Forest Research, 19: 257-259.
39. Warrang, E.I., M.S. Lesney and D.L. Rockwood. 1990. Micropropagation of field tested superior E. garndis hybrids. New forests, 4: 67-79.
40. Williams, E. G. and G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. Ann Bot, 57: 443-462
41. Wimp, G.M., W.P. Young, S.A. Woolbright, P. Keim and T.G. Whitham. 2004. Conserving plant genetic diversity for dependent animal communities. Ecology Letters, 7: 776-780.
42. Zabihi, H., S.M. Hosseini Nasr, N. Babaeyan Jelodar and H. Jalilvand. 2008. Tissue culture of *Ulmus glabra* Hudson: The effects of culture media, explants and their harvest times. Journal of Agricultural Science and Natural Resources, 15(4): 15-21 (In Persian).
43. Zarafshar, M., M. Akbarinia, A. Sattarian, H. Yousefzade and M. Taieby. 2017. Effect of light conditions on chestnut (*Castanea Sativa*) leaf morphology. Journal of Environmental sciences and technology, 18(2): 95-106 (In Persian).

Downloaded from ifej.sanru.ac.ir at 14:46 +0430 on Sunday August 1st 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Micropropagation of Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Affected by Plant Growth Regulators under *In Vitro* Conditions

Mehrcedeh Tafazoli[1], Seyed Mohammad Hosseini Nasr[2], Hamid Jalilvand[3] and Mahya Tafazoli[1]

1- PhD, Department of Forest Sciences and Engineering, Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University (Corresponding author: mehr_tafazoli@yahoo.com)
2- Associate Professor, Department of Forest Sciences and Engineering, Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University
3- Professor, Department of Forest Sciences and Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Received: January 10, 2019 Accepted: March 9, 2019

Abstract

Chestnut as an indigenous and valuable forest species exists in some forests of Guilan province, which the area of its stands is decreasing due to the lack of natural regeneration and socioeconomic problems as well as ink and blight diseases; therefore, chestnut's asexual propagation through tissue culture methods can be effective in protecting this species and preventing its extinction. The aim of this study was to use the micropropagation method in order to produce complete chestnut plantlets by identifying the best explants and plant growth regulators. For this purpose, seeds were collected from Visroud site, sterilized, soaked in boiling water and cultured on B_5 medium, and then explants were taken from germinated seeds. Leaf, stem and root explants from *in vitro* seedlings of chestnut were cultured on B_5 containing cytokinins (TDZ and BA) with concentrations of 0.02, 0.2, 1 and 2 mg/l and auxins (IBA, NAA, and IAA) with concentrations of 0.1, 0.2, 1 and 2 mg/l. Results showed that the best response was obtained from the leaf explants and TDZ (0.2 mg/l) and IBA (2 mg/l) had the highest percentage of callus- shooting (32.4%) and rooting (80%), respectively. The survival of seedlings outside the laboratory was 80%. Considering the importance of chestnut species in economic and environmental terms, the present study can be useful for the implementation of reclamation management to protect, develop and prevent extinction of this species.

Keywords: Callus- shooting, Chestnut, Micropropagation, Plant growth regulator, Rooting

Downloaded from ifej.sanru.ac.ir at 14:46 +0430 on Sunday August 1st 2021

www.SID.ir