دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
دانشکده منابع طبیعی

موضوع:

بررسی ریزازدیادی و القای ریشه گونه شاه بلوط

(*Castanea sativa* Mill.)

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد
رشته مهندسی منابع طبیعی گرایش جنگلداری

استاد راهنما:
دکتر سید محمد حسینی نصر

اساتید مشاور:
دکتر حمید جلیلوند
مهندس داریوش بیات

نگارش:
مهرسده تفضلی

شهریور 1390

تقدیر و تشکر

حمد و سپاس نامتناهی از آن خدایی است که پروردگار عالمیان، بخشنده مهربان، مالک و زمامدار دادستان و پاداش دهنده نیکوکاران است.

در ابتدا بر خود لازم می‌دانم از استاد محترم و گرانقدر جناب آقای دکتر حسینی نصر که در انجام پایان‌نامه حاضر مرا با راهنمایی بی‌دریغ خود یاری نمودند، و جناب آقای دکتر جلیلوند و جناب آقای مهندس بیات به پاس زحمات بی‌شائبه ایشان، قدردانی کرده و برای ایشان آرزوی سلامتی و موفقیت روزافزون دارم. از اساتید محترم ناظر جناب آقای دکتر حجتی و جناب آقای دکتر رنجبر که قبول زحمت فرموده و داوری پایان‌نامه را بر عهده داشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از کیله اساتید محترم گروه جنگلداری، آقای مهندس مسلمی و سرکار خانم مهندس کیانی سوادکوهی، صمیمانه تشکر می‌نمایم و از خداوند بزرگ، موفقیت و کامیابی هر چه بیشترشان را خواستارم.

در پایان از تمام کسانی که در دوران تحصیل بنده را راهنمایی فرمودند، دوستان عزیز و خانواده ارجمندم به پاس همراهیشان بی‌نهایت سپاسگزارم.

با احترام فراوان،

تقدیم به

پدر، مادر و برادر عزیزم

چکیده

شاه‌بلوط (*Castanea sativa* Mill.) از گونه‌های بومی رویشگاه‌های جنگلی استان گیلان می‌باشد، که به دلیل چرای دام و عدم زادآوری طبیعی، تعداد در هکتار این گونه در کل رویشگاه کاسته شده است، بنابراین حفاظت از آن امری ضروری تلقی می‌شود. بذور از رویشگاه ویسرود جمع‌آوری و درون ماسه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت بررسی اثر اندازه بذر و عمق کاشت، بذرها به سه طبقه وزنی (6>، 9-6 و 9< گرم) طبقه-بندی شدند. پس از جوانه‌زنی بذور، از ماسه خارج و در گلدان‌های پلاستیکی در عمق‌های دو، پنج و 10 سانتی-متر کاشته شدند. بیشترین درصد و سرعت جوانه‌زنی از بذور سنگین‌تر از 9 گرم و عمق کاشت دو سانتی‌متر بدست آمد. به منظور مطالعه جوانه‌زنی بذور در محیط درون شیشه‌ای، پس از ضدعفونی، تحت تأثیر تیمارهای مختلف جوانه‌زنی (خیساندن در اسید سولفوریک غلیظ به مدت 15 دقیقه؛ خیساندن در آب جوش و نگهداری در همان آب به مدت 6 ساعت؛ خیساندن در آب به مدت 24 ساعت؛ کشت آندوسپرم (حذف پوسته سخت بذر)؛ حذف 1/3 انتهایی بذر) قرار گرفتند. تفاوت آماری معنی‌داری بین تیمارها وجود داشت ($p<0/01$). بیشترین درصد و سرعت جوانه‌زنی مربوط به تیمار خیساندن در آب جوش و نگهداری در همان آب به مدت 6 ساعت بوده است. سپس مراحل مختلف ریزازدیادی با استفاده از قطعات برگ، ساقه و ریشه گرفته شده از نهال‌های به دست آمده از شرایط گلخانه و درون شیشه‌ای بررسی شدند. جهت شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها در محیط کشت B_5 از سیتوکنین‌های BA و TDZ (با غلظت 0/02، 0/2، یک و دو میلی‌گرم در لیتر) و برای ریشه‌زایی، شاخه‌های تولید شده از اکسین‌های IBA، NAA و IAA (با غلظت 0/1، 0/2، یک و دو میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. نتایج نشان داد بیشترین میزان تولید کالوس- شاخه از قطعات برگ تحت تأثیر TDZ با غلظت 0/02 میلی‌گرم در لیتر برای نهال‌های گلخانه (25/6 درصد) و 0/2 میلی‌گرم در لیتر برای گیاهچه‌های درون شیشه‌ای (32/4 درصد) و بیشترین میزان ریشه‌زایی تحت تأثیر IBA با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر برای هر دو نوع نهال بوده است. به منظور تولید گیاهچه از جنین، قطعات جنین گرفته شده از بذور با وزن‌های مختلف در محیط کشت B_5 و محیط کشت تغییر یافته B_5 با استفاده از 100 میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات، 100 میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک، یک گرم در لیتر عصاره مخمر و پنج گرم در لیتر زغال فعال کشت شدند. نتایج نشان داد که درصد جوانه‌زنی جنین‌های بذور سنگین‌تر از 9 گرم در محیط کشت تغییر یافته B_5 بیشتر بود (66/7 درصد). گیاهچه‌ها پس از طی مراحل مختلف سازگاری به خاک گلدان منتقل شدند.

کلمات کلیدی: شاه بلوط، ریزازدیادی، جوانه‌زنی، اندازه بذر، کشت جنین.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات

1-1. مقدمه 2
1-2.بیان مسأله 3
1-3. ضرورت انجام تحقیق 4
1-4. فرضیه 5
1-5. اهداف 5
1-6. معرفی گونه شاه بلوط 6
1-6-1. پراکنش در جهان 6
1-6-2.پراکنش در ایران 7
1-6-3. درخت‌شناسی 7
1-6-4. ویژگی‌های بوم‌شناختی 7
1-6-5.ویژگی‌های جنگلشناسی 8
1-6-6. بیماری‌ها 8
1-6-7. موارد مصرف 8
1-7. کشت بافت 9
1-7-1. انواع کشت بافت 9
1-8. ریزازدیادی 10
1-8-1. موارد استفاده ریزازدیادی 11
1-8-2. اندام‌زایی 12
1-8-3. جنین‌زایی غیرجنسی 12
1-8-4. استراتژی ریزازدیادی 14
1-9. کشت جنین 15
1-9-1. روش‌های کشت جنین 15
1-9-2. اهمیت و کاربردهای کشت جنین 16

فصل دوم: پیشینه تحقیق

2-1. جوانه‌زنی بذور 19
2-2. ریزازدیادی 21

2-3- کشت جنین 27
فصل سوم: مواد و روش‌ها
3-1. تهیه بذر 31
3-2. انتخاب بذر 31
3-3. تهیه مواد گیاهی 32
3-4. ترکیب محیط کشت 32
3-5. روش تهیه محیط کشت مورد استفاده 36
3-6. ضدعفونی نمودن وسایل و تجهیزات آزمایشگاهی 37
3-7. ضدعفونی نمودن محیط کشت 38
3-8. ضدعفونی نمودن بذور و ریزنمونه‌ها 38
3-9. تیمار جوانه‌زنی بذور 39
3-10. کشت جنین 41
3-11- انتقال ریزنمونه به محیط کشت 41
3-12. صفات مورد بررسی 42
3-13. روش آماری مورد استفاده 43
فصل چهارم: نتایج
4-1. بررسی جوانه‌زنی بذور 45
4-2. بررسی زنده‌مانی ریزنمونه‌های نهال گلخانه در تیمارهای مختلف ضدعفونی 47
4-3. تأثیر هورمون TDZ بر ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه 50
4-4. تأثیر هورمون TDZ بر رشد طولی شاخه 53
4-5. تأثیر هورمون BA بر ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه 55
4-6. تأثیر هورمون BA بر رشد طولی شاخه 57
4-7. تأثیر اکسین‌های IBA، IAA و NAA بر ریشه‌زایی قطعات شاخه 60
4-8. تأثیر اکسین‌های IBA، IAA و NAA بر رشد طولی ریشه 62
4-9. تولید گیاه کامل 63
4-10. بررسی کشت جنین 65
فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری
5-1. بررسی جوانه‌زنی بذور 69
5-2. بررسی شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گونه شاه بلوط 71
5-2-1. بررسی تأثیر TDZ بر شاخه‌زایی 72
5-2-2- بررسی تأثیر BA بر شاخه‌زایی 73

5-2-3- تأثیر IBA، IAA و NAA بر ریشه‌زایی 77
5-3. بررسی کشت جنین 78
5-4- نتیجه‌گیری 79
5-5. پیشنهادات 80
منابع و مآخذ 83

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول 3-1- عناصر تشکیل دهنده محیط کشت B_5 34
جدول 3-2- تیمارهای سترون‌سازی ریزنمونه‌های نهال‌های گلخانه 39
جدول 3-3- تیمارهای جوانه‌زنی بذور در محیط درون شیشه‌ای 40
جدول 4-1- تجزیه واریانس اثر اندازه بذر و عمق کاشت در کاشت گلخانه 45
جدول 4-2- تجزیه واریانس اثر اندازه بذر و تیمارهای مختلف جوانه‌زنی در کشت درون شیشه‌ای 48
جدول 4-3- تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و غلظت TDZ بر درصد کالوس - شاخه 51
جدول 4-4- تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و غلظت TDZ بر طول شاخه 54
جدول 4-5- تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و غلظت BA بر درصد کالوس - شاخه 56
جدول 4-6- تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و غلظت BA بر طول شاخه 59
جدول 4-7- تجزیه واریانس اثر نوع اکسین و غلظت‌های مختلف بر ریشه‌زایی 60
جدول 4-8- تجزیه واریانس اثر نوع اکسین و غلظت‌های مختلف بر طول ریشه 63
جدول 4-9- تجزیه واریانس اثر اندازه بذر و نوع محیط کشت در کشت جنین 66

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل 3-1- بذور شاه بلوط با وزن‌های متفاوت 33
شکل 3-2- مواد گیاهی تهیه شده از نهال‌های گلخانه 33
شکل 3-3- تهیه ریزنمونه‌هایی با ابعاد 0/5×0/5 سانتی‌متر از برگ در هنگام کشت..... 33
شکل 4-1- مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی بذور با وزن‌های مختلف در سه عمق کاشت..... 46
شکل 4-2- مقایسه میانگین سرعت جوانه‌زنی بذور با وزن‌های مختلف در سه عمق کاشت..... 46
شکل4-3- رشد نهال حاصل از بذور سنگین‌تر از 9 گرم در اعماق کاشت متفاوت 49
شکل4-4- مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی بذور با وزن‌های مختلف در تیمارهای مختلف جوانه‌زنی کشت درون شیشه‌ای.... 49
شکل 4-5- مقایسه میانگین سرعت جوانه‌زنی بذور با وزن‌های مختلف در تیمارهای مختلف جوانه‌زنی کشت درون شیشه‌ای 48
شکل 4-6- رشد نهال حاصل از بذور با اندازه‌های مختلف در شرایط درون شیشه‌ای 48
شکل 4-7- مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های نهال گلخانه در تیمارهای مختلف ضدعفونی..... 50
شکل 4-8- تأثیر غلظت‌های مختلف TDZ بر درصد کالوس - شاخه بر ریزنمونه‌های مختلف نهال‌های گلخانه..... 52
شکل 4-9- تولید کالوس- شاخه تحت تأثیر 0/02 میلی‌گرم در لیتر TDZ از برگ نهال‌های گلخانه..... 52
شکل 4-10- تولید کالوس از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای تحت تأثیر TDZ..... 52
شکل 4-11- تولید کالوس - شاخه از برگ گیاهچه‌های درون شیشه‌ای تحت تأثیر 0/2 میلی‌گرم در لیتر TDZ..... 52
شکل 4-12- تأثیر غلظت‌های مختلف TDZ بر درصد کالوس - شاخه بر ریزنمونه‌های مختلف گیاهچه‌های درون شیشه‌ای... 53
شکل 4-13- تأثیر غلظت‌های مختلف TDZ بر طول شاخه حاصل از ریزنمونه‌های مختلف نهال‌های گلخانه..... 54
شکل4-14- تأثیر غلظت‌های مختلف TDZ بر طول شاخه حاصل از ریزنمونه‌های مختلف گیاهچه‌های درون شیشه‌ای..... 55
شکل 4-15- تأثیر غلظت‌های مختلف BA بر درصد کالوس- شاخه بر ریزنمونه‌های مختلف نهال‌های گلخانه..... 56
شکل 4-16- تولید کالوس- شاخه تحت تأثیر یک میلی‌گرم در لیتر BA از برگ نهال‌های گلخانه..... 58
شکل 4-17- تولید کالوس از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای تحت تأثیر یک میلی‌گرم در لیتر BA..... 58
شکل 4-18- تولید کالوس - شاخه تحت تأثیر یک میلی‌گرم در لیتر BA از برگ گیاهچه‌های درون شیشه‌ای..... 58
شکل 4-19- تأثیر غلظت‌های مختلف BA بر درصد کالوس - شاخه بر ریزنمونه‌های مختلف گیاهچه‌های درون شیشه‌ای.... 58
شکل 4-20- تأثیر غلظت‌های مختلف BA بر طول شاخه حاصل از ریزنمونه‌های مختلف نهال‌های گلخانه..... 59
شکل 4-21- تأثیر غلظت‌های مختلف BA بر طول شاخه حاصل از ریزنمونه‌های مختلف گیاهچه‌های درون شیشه‌ای..... 61
شکل 4-22- تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین‌های متفاوت بر ریشه‌زایی شاخه‌های تولید شده از نهال‌های گلخانه..... 61
شکل 4-23- تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین‌های متفاوت بر ریشه‌زایی شاخه‌های تولید شده از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای 62
شکل4-24- تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین‌های متفاوت بر طول ریشه حاصل از شاخه‌های تولید شده از نهال گلخانه‌ای..... 64
شکل4-25-تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین‌های متفاوت بر طول ریشه حاصل از شاخه‌های تولید شده ازگیاهچه‌درون شیشه 64

شکل 4-26- گیاهچه کامل شاه بلوط از برگ گیاهچه‌های درون شیشه‌ای 65
شکل 4-27- انتقال گیاهچه کامل به خاک گلدان 65
شکل 4-28- مقایسه میانگین درصد جوانه زنی در تیمارهای مختلف کشت جنین 66
شکل 4-29- مقایسه میانگین سرعت جوانه زنی در تیمارهای مختلف کشت جنین 67
شکل 4-30- گیاهچه‌های حاصل از کشت جنین بذور سنگین‌تر از 9 گرم در محیط کشت 67
شکل 4-31- انتقال گیاهچه حاصل از رشد جنین در محیط کشت B_5 حاوی مکمل غذایی به خاک گلدان 67

اختصارات

تنظیم کننده‌های رشد	علامت اختصاری
2-4- دیکلروفنوکسی استیک اسید	2,4-D
6- بنزیل آمینوپورین	BA
ایندول 3- بوتریک اسید	IBA
ایندول 3- استیک اسید	IAA
نفتالین استیک اسید	NAA
6- فورفوریل آمینوپورین	Kinetin
تایدیازرون	TDZ
ترانس – 6- (4هیدروکسیل- 3 متیل بوت-2- انیل) آمینوپورین	Zeatin

محیط‌های کشت	علامت اختصاری
Gamborg	B_5
The Driver/ Kuniyuki Walnut Medium	DKW
Murashige and Skoog	MS
Gresshoff and Doy	GD
Teasdale	P24
Quoirin and Lepoivre	QL

1-1- مقدمه

جنگل‌ها به عنوان یکی از مهم‌ترین نظام‌های حیات‌بخش، جایگاه انکارناپذیری در تأمین رفاه و آسایش و سعادتمندی جوامع بشری دارند. وجود ارزش‌های متعدد و متنوع اقتصادی و زیست محیطی در پیکره این منابع ارزشمند، تکیه‌گاه مطمئن و استواری برای تداوم و ارتقای زیست جانوران و به ویژه انسان و متضمن شکوفایی حیات بشر و توسعه پایدار است (اسدی اتویی، 1382). افزایش روز افزون تقاضا برای چوب فشار زیادی به جنگل وارد می‌کند و باعث افزایش نگرانی‌ها درباره سوءاستفاده از جنگل و کاهش تنوع زیستی می‌شود. انقراض در مقابل پایداری تولید و خدمات جنگل اثر متضادی دارد که در مدیریت جنگل تأثیر بسزایی می‌گذارد. جهت جلوگیری از انقراض و تخریب‌هایی که به علل مختلف در جنگل‌های جهان اتفاق افتاده است، بسیاری از کشورها اقدام به کاشت درختان جنگلی نموده‌اند. با توجه به روند سریع تخریب جنگل‌ها، این میزان تلاش نتوانست از انقراض برخی گونه‌ها جلوگیری به عمل آورد (ایرانمنش و همکاران، 1383). لذا جهت کاهش این نوع فشارها به جنگل‌ها و جلوگیری از انقراض گونه-های نادر و ارزشمند، تجهیز علوم جنگل به روش‌های جدید بخصوص علم زیست فناوری نیاز می‌باشد (ویمپ و همکاران، 2004). اصلاح درختان به روش‌های ازدیاد سنتی فرایندی کند و دشوار است که مدت زمان طولانی را در بر می‌گیرد. زیست فناوری به عنوان علمی جدید، ابزارهایی فراهم نموده که امکان انتخاب و اصلاح درختان برتر را با سرعت و کارایی بیشتری ارائه می‌دهد (مرکل و دین، 2000).

درخت شاه بلوط در برخی از رویشگاه‌های طبیعی استان گیلان ظاهر می‌شود. این رویشگاه‌ها فاقد زادآوری طبیعی و با مشکلات اجتماعی- اقتصادی نظیر چرای دام مواجه می‌باشند به طوری که تیپ خالص شاه بلوط به حداقل مقدار سطح کاهش یافته و از تعداد در هکتار این گونه در کل رویشگاه کاسته می‌شود (هدایتی، 1382). به دلیل اهمیت درختان شاه بلوط در تولید چوب و میوه و استفاده در چشم-

اندازها ازدیاد غیرجنسی آن از طریق روش‌های کشت بافت می‌تواند در حفاظت از این گونه مؤثر بوده و از انقراض آن جلوگیری به عمل آورد.

1-2- بیان مسأله

شاه بلوط (*Castanea sativa* Mill.) گیاهی از جنس *Castanea*، از خانواده *Fagaceae* و راسته *Fagales* می‌باشد. این گونه بومی آمریکا و جنوب اروپا است و از پرتغال تا قفقاز انتشار دارد (ثابتی، 1381). شاه بلوط از نظر اقتصادی و زیست محیطی ارزشمند می‌باشد، چرا که به عنوان منبعی از چوب و میوه و همچنین برای چشم انداز استفاده می‌شود (بونوس[1]، 2005). درخت شاه بلوط به عنوان یک گونه جنگلی بومی، ارزشمند و نادر در برخی از رویشگاه‌های جنگلی استان گیلان به طور طبیعی ظاهر می‌شود. شاه بلوط در استان گیلان دارای چهار رویشگاه اصلی به نام‌های ویسرد به مساحت 350 هکتار (اصلی‌ترین رویشگاه)، رویشگاه‌های پراکنده سیاه مزگی، قلعه رودخان و شفارود می‌باشد که تقریباً در فاصله نزدیک به هم قرار دارند. رویشگاه‌های مذکور در حقیقت فاقد زادآوری طبیعی و در معرض تخریب می‌باشند. تاکنون حداقل 9 درصد از درختان در رویشگاه اصلی به صورت سرپا خشک و نابود شده‌اند. کلیه رویشگاه‌ها با چرای دام و تخریب رویشگاه مواجه بوده و به مرور از تعداد در هکتار این گونه در کل رویشگاه کاسته شده است. نتایج حاصله از آماربرداری‌ها نشان می‌دهد که درخت شاه بلوط در حال کاهش و گونه‌های مهاجم در حال افزایش هستند و به تدریج با تخریب رویشگاه بر تنوع گونه‌های علفی افزوده می‌شود (هدایتی، 1382). بنابراین تلاش برای حفظ و توسعه آن امری ضروری است و احیاء درختان شاه بلوط باید در توسعه جنگل‌های تخریب یافته مدنظر قرار گیرد.

ازدیاد شاه بلوط و دیگر گونه‌های خانواده *Fagaceae* از جمله راش و بلوط بسیار مشکل است ، زیرا شاه بلوط یک گونه چوبی سرسخت می‌باشد که به طور معمول ازدیاد آن از طریق بذر یا ازدیاد

[1] Bounous

غیرجنسی مانند پیوند یا قلمه با مشکل مواجه می‌شود (استرک و همکاران[1]، 2005). مهمترین روش ازدیاد شاه بلوط پیوند می‌باشد، اما دارای معایب فراوانی است. زخمی که در هنگام پیوند روی درخت پایه ایجاد می‌شود می‌تواند مدخل ورود عوامل بیماری‌زایی مانند شته (*Cryphonectria parasite* (Murr.) Barr.) باشد. به علاوه مشکل ناسازگاری بین درخت پایه و پیوند نیز وجود دارد. موفقیت در پیوند تنها در صورت ترکیب با درختان مادری جوان امکان‌پذیر است (استرک و همکاران، 2005). قابل ذکر است که قلمه از درختان مسن به سختی ریشه می‌دهد، که به دلیل وجود بازدارنده‌های رشد در قلمه می‌باشد (دیر و هوسر[2]، 1987).

روش ریزازدیادی[3]، روشی سریع و مناسب برای تولید تعداد زیادی از گیاه در شرایط آزمایشگاهی است که از نظر ریخت و ژنتیکی همسان هستند. از دیگر مزایای آن این که در کوتاه ترین زمان به نتیجه می‌رسد و در نهایت امکان ازدیاد گیاهان را در هر زمانی از سال فراهم می‌کند. چنانچه مناسب‌ترین تیمار برای رویاندن بذر شناسایی شود، از نهال‌های تولید شده می‌توان ریز نمونه‌هایی انتخاب کرد و تحت القاء هورمون‌های گیاهی (اکسین و سیتوکنین) به طور مستقیم یا غیر مستقیم به تولید انبوه دست یافت، که همگی نهال‌های تولید شده غیر جنسی دارای بیشترین شباهت‌ها با هم باشند. این روش می‌تواند زیر بنای تولید نهال برای جنگل‌کاری و توسعه این گونه در همه فصول سال باشد، ضمناً می‌تواند این گونه را از خطر انقراض نجات دهد.

1-3- ضرورت انجام تحقیق

در طی صد سال گذشته گونه‌های شاه بلوط و شاه بلوط آمریکایی از ناحیه ریشه به دلیل ابتلا به بیماری Ink دچار پوسیدگی شدند که توسط قارچ *Phytophthora einnamami* ایجاد می‌شود. در

[1] Osterc, *et al.*
[2] Dirr and Heuser
[3] Micropropagation

اواخر قرن اخیر این بیماری در آمریکا با بیماری مرگ شاه بلوط (Blight) که توسط قارچ - *Endothia parasitica* Murr ایجاد می‌شود، همراه شد و در اواخر دهه 1990 تقریباً تمام شاه بلوط‌های آمریکایی خشک شدند. همچنین بیماری مرگ شاه بلوط به اروپا نیز انتقال یافت و شاه بلوط اروپایی را نیز تحت تأثیر قرار داد. با توجه به این بیماری‌ها و همچنین خطر انقراض شاه بلوط و اهمیت آن در تولید چوب، میوه و چشم‌انداز، محققان بر آن شدند تا از طریق قلمه شاه بلوط را ازدیاد دهند، اما از آن‌جایی که شاه بلوط یک گونه با ریشه‌زایی سخت می‌باشد (استرک و همکاران، 2005)، لذا این عمل چندان موفقیت-آمیز نبوده است. دلیل عدم موفقیت وجود بازدارنده رشد در قلمه‌ها می‌باشد. علاوه بر روش قلمه‌گیری، روش‌های دیگری نیز بررسی شدند ولی هیچ کدام رضایت‌بخش نبود (دیر و هوسر، 1987). بنابراین روش کشت بافت درون شیشه‌ای با اندام‌های مختلف، جنین سوماتیکی یا پروتوپلاست به کار گرفته شد. با استفاده از این روش می‌توان از مقدار کمی از بافت‌های گیاه مادری، تعداد زیادی گیاهچه در زمان و فضای کمتری نسبت به قلمه‌گیری و پیوند تولیدکرد. با توجه به این مسائل به نظر می‌رسد که کشت بافت و اندام‌زایی مناسب‌ترین روش برای ازدیاد رویشی شاه بلوط می‌باشد.

1-4- فرضیه‌ها

1. ازدیاد غیر جنسی گونه شاه بلوط از طریق القاء هورمون‌های TDZ و BAP امکان پذیر است.
2. اکسین IAA نسبت به اکسین IBA در ریشه‌زایی شاخه‌های شاه بلوط مؤثرتر است.
3. تأثیر سیتوکنین TDZ در شاخه‌زایی این گونه بیشتر از BAP است.
4. جنین شاه بلوط در محیط کشت B_5[1] بدون مکمل غذایی قابلیت روییدن دارد.

1-5- اهداف

1. تولید گیاه کامل شاه بلوط توسط تکنیک‌های ریزازدیادی

[1] Gamborg *et al*

2. تولید ریشه از شاخه‌های تولید شده آزمایشگاهی گونه شاه بلوط در کوتاه‌ترین زمان ممکن با بیشترین درصد ریشه‌زایی
3. بررسی مناسب‌ترین ترکیب هورمونی محیط کشت برای ازدیاد درون شیشه‌ای گونه شاه بلوط
4. تدوین سیستمی بر اساس تولید گیاه شاه بلوط از ریز نمونه در تمام فصول سال

1-6- معرفی گونه شاه بلوط

جنس *Castanea* از خانواده *Fagaceae* در دنیا دارای حدود 12 گونه می‌باشد که گونه .Mill *Castanea sativa* از سایر گونه‌ها معروف‌تر بوده (ریبیرو[1] و همکاران، 2007) و در ایران یافت می‌شود (ثابتی، 1381).

1-6-1- پراکنش در جهان

انتشار شاه بلوط در جهان مختص قاره اروپا، شمال آفریقا و قسمتی از قاره آسیا است (ساندر[2]،1974؛ هوانگ و همکاران[3]، 1994). کشورهایی که این گونه در آن حضور دارد، دارای مناطق معتدل مدیترانه‌ای هستند و عمدتاً مناطق جنوبی اروپا و در عرض جغرافیایی 33 تا 45 درجه شمالی شامل فرانسه، اسپانیا، ایتالیا، یونان، پرتغال، بلغارستان، شرق و جنوب کشور کرواسی، ترکیه، قفقاز، ایران، شمال قبرس، الجزیره، مراکش و سوریه می‌باشد. در این نواحی به علت شرایط اعتدال آب و هوایی، دارای رشد خوب و میوه‌دهی مناسب بوده، اما تا عرض 50 درجه شمالی، درخت شاه بلوط در محدوده‌های اکولوژیکی مناسب رشد می‌کند و این عرض جغرافیایی مرز میوه‌دهی محسوب و سپس بعد از آن اگرچه این درخت می‌روید ولی قادر به میوه‌دهی نخواهد بود (هدایتی، 1382).

[1] Ribeiro *et al.*
[2] Sander
[3] Huang *et al.*

1-6-2- پراکنش در ایران

رویشگاه‌های طبیعی این درخت در ایران مختص استان گیلان می‌باشد که در شرایط ادافیک و اکولوژیک خاص گسترش یافته است. شفارود، قلعه رودخان، سیاه مزگی و ویسرود رویشگاه‌های این گونه محسوب می‌شوند. در حال حاضر بیشترین فراوانی درختی در این رویشگاه‌ها مربوط به ممرز، شاه بلوط، کلهو و لیلکی می‌باشد (هدایتی، 1382).

1-6-3- درخت‌شناسی

به صورت درخت با ارتفاع 25 الی 30 متر، پوست آن در آغاز صاف است که بعدها شکاف‌دار می‌شوند، جوانه‌ها از تعداد معدودی فلس تشکیل شده‌اند، برگ‌ها خزانی، ساده، متناوب و متراکم‌اند، گل‌ها تک پایه، بی گلبرگ، گل‌های نر به صورت شاتون استوانه‌ای افراشته، گل‌های ماده معمولاًبه صورت سه تایی در گریبان پای شاتون نر مجتمع‌اند (ساندر، 1974)، میوه درشت، به رنگ قهوه‌ای (برون و کرکمن[1]، 1990)، معمولاً به تعداد یک تا سه و ندرتاً پنج تا 7 عدد در گریبانی قرار دارند که با دو تا چهار دریچه گشوده می‌شود و دارای خارهای کوچک است (ساندر، 1974). جوانه‌ها درشت و نوک تیز و بدون کرک، برگ‌ها به شکل مستطیلی- خنجری هستند. از سن 16 سالگی به بعد دارای رشد سریع می‌شود و بین 50-40 سالگی دارای رشد کمتری می‌شود و بعد از این بر میزان رویش قطری آن افزوده شده و در سن 800 تا 1000 سالگی ممکن است قطر برابر سینه آن به چند متر برسد (هدایتی، 1382). چوب آن قهوه‌ای با حلقه‌های رویشی مشخص، بدون پرمگس و حاوی آوندهای نامتساوی می‌باشد (کریمی و طلایی، 1386).

1-6-4- ویژگی‌های بوم‌شناختی

شاه بلوط درختی نورپسند، خزان کننده و آهک گریز است (ثابتی، 1381)، دارای ریشه‌های سطحی و عمودی، طالب آب و هوای مدیترانه‌ای معتدل و مرطوب با زمستان‌های ملایم و تابستان‌های نسبتاً گرم

[1] Brown and Kirkman

است و به همین جهت بیشتر در دشت‌ها و تپه‌های کم ارتفاع می‌روید و از نظر ارتفاعی در قشلاق جایگزین است. به خاک مرطوب با عمق کافی و زهکشی مناسب نیازمند است (هدایتی، 1382).

1-6-5- ویژگی‌های جنگل‌شناسی

اصولاً درخت شاه بلوط دارای تاج گسترده و شاخه‌های فراوان بوده و درختان با تنه بدون شاخه کمتر مشاهده می‌شود. یکی از خصوصیات بارز این درخت خاصیت جست‌دهی آن می‌باشد. درختان کهنسال آن دارای گورچه‌های فراوان و عمدتاً پوست آن قهوه‌ای تیره و با شبکه‌های طولی و گاهاً مارپیچی می-باشد (هدایتی، 1382).

1-6-6- بیماری‌ها

این درخت دارای دو بیماری اصلی شامل بیماری زنگ زدگی (Ink) و سوختگی است که به ترتیب در اثر قارچ‌های *Phytophthora ssp.* و *Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr.* ایجاد می‌شوند (سان و همکاران[1]، 2007). حدود 30 سال است که بیماری سوختگی در رویشگاه ویسرود در استان گیلان مشهود است (هدایتی، 1382). در سال‌های اخیر گسترش این بیماری در استان گیلان از مهم-ترین معضلات این درختان محسوب می‌شود (قزی و دیگران، 1388).

1-6-7- موارد مصرف

درخت شاه بلوط از جنبه چشم‌انداز و تولیدات چندگانه[2] ارزش اقتصادی بسیاری دارد. بذر آن خوراکی بوده و دارای عناصر غذایی فراوانی است (یلدز و همکارن[3]، 2009). علاوه بر نقش اصلی آنها در تولید بذر به عنوان محصول اصلی، به دلیل قابلیت ایجاد جست، در نهالستان‌ها جهت تولید الوار به صورت

[1] San
[2] Multiple use
[3] Yildiz

توده‌های شاخه‌زاد اداره می‌شوند. چوب آن مقاومت زیادی به پوسیدگی دارد، لذا در ساختمان‌سازی و ساخت لوازم خانه کاربرد فراوان دارد (سور و ویلهلم[1]، 2005).

1-7- کشت بافت[2]

تعریف عمومی کشت بافت را می‌توان تولید گیاه کامل از کشت قسمت‌های مختلف گیاه با استفاده از محیط غذایی مصنوعی و عوامل محیطی قابل کنترل در شرایط کاملاً استریل آزمایشگاهی نامید. به عبارت دیگر کشت بافت شامل مجموعه روش‌های آزمایشگاهی است که با تکیه بر خاصیت توانمندی از یک اندام، بافت، سلول و یا حتی قسمتی از یک سلول می‌توان گیاه کامل منطبق بر هدف مورد نظر را تولید نمود (پیری و نظریان فیروزآبادی، 1380).

1-7-1- انواع کشت بافت

هر گیاه شامل اندام‌های متفاوتی است که هر یک از تعدادی بافت تشکیل شده‌اند و بافت‌ها نیز به نوبه خود از سلول‌های اختصاصی به وجود آمده‌اند. از آنجا که گیاه از مواد ساختمانی بسیار متفاوتی تشکیل شده است که هر کدام از آنها می‌توانند به عنوان ریزنمونه در شرایط درون شیشه‌ای[3] کشت شوند، لذا انواع متنوعی از کشت بافت وجود دارد:

1-7-1-1- **کشت گیاه کامل:** بذر در واقع یک گیاه فشرده است که می‌تواند در شرایط درون شیشه‌ای کشت شود و یک گیاهچه و نهایتاً یک گیاه کامل تولید نماید.

1-7-1-2- **کشت جنین[4]:** در این کشت جنین رسیده یا نارس، پس از حذف پوسته بذر کشت می‌شود.

[1] Sauer and Wilhelm
[2] Tissue culture
[3] *In vitro* culture
[4] Embryo culture

1-7-1-3- کشت اندام گیاهی[1]: یک اندام جدا شده قادر به رشد در شرایط درون شیشه‌ای است. در کشت اندام، انواع مختلفی مثل کشت مریستم، نوک ساقه، ریشه، پرچم، بساک و غیره مطرح می‌باشد.

1-7-1-4- کشت کالوس[2]: اگر یک بافت تمایز یافته و در شرایط درون شیشه‌ای یک توده سلولی تمایز نیافته به نام کالوس تولید نماید، این حالت ر اکشت کالوس گویند.

1-7-1-5- کشت سلول[3]: کشت سلول‌های منفرد که به کمک آنزیم‌ها یا به روش‌های مکانیکی از یک بافت گیاهی، کالوس یا سوسپانسیون سلولی به دست می‌آیند، کشت سلول نامیده می‌شود.

1-7-1-6- کشت پروتوپلاست[4]: اگر دیواره سلول‌های گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای توسط آنزیم هضم شوند، پروتوپلاست حاصل می‌شود (اثنی عشری و زکایی خسروشاهی، 1388).

1-8- ریزازدیادی

ریزازدیادی یکی از روش‌های کشت بافت است که از آن برای ایجاد تعداد زیادی گیاه مشابه از یک گیاه مادری استفاده می‌شود. در این روش معمولاً از کالوس تولید شده در حضور هورمون‌های گیاهی، شاخه تولید شده و سپس به منظور ریشه‌زایی شاخه‌ها را جدا کرده به محیط ویژه ریشه‌زایی انتقال می‌دهند که در نهایت گیاهچه کامل به وجود می‌آید. مزیت مهم روش ریزازدیادی این است که از طریق آن می‌توان بسیار سریع‌تر از روش‌های ازدیاد سنتی تعداد زیادی گیاه مشابه تولید کرد. استفاده از این روش در شرایطی خاص مفید است. اولاً در گونه‌هایی که ازدیاد رویشی در آنها مشکل است و یا بذر سرسخت دارند. مورد دوم در مواقعی است که آمیزش گیاهان و ازدیاد از طریق بذر، سرعت ازدیاد گیاه را

[1] Tissue culture
[2] Callus culture
[3] Cell culture
[4] Protoplast culture