بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه کردستان
دانشکده منابع طبیعی
گروه جنگلداری

عنوان:
باززایی گیاه از کالوس حاصل از کشت *درون‌شیشه‌ای* کوتیلدون لیلکی
(*Gleditsia caspica*)

پژوهشگر:

فاطمه زرین‌جویی

استاد راهنما:

دکتر نقی شعبانیان

استاد مشاور:

مهندس محمدشفیع رحمانی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی منابع طبیعی گرایش جنگلداری

اسفند ماه ۱۳۸۹

کلیه حقوق مادی و معنوی مترتب بر نتایــج مطالعات،

ابتکارات و نوآورهای ناشی از تحقیق موضوع

این پایان‌نامه (رســاله) متعلق به دانشــگاه کردستان است.

تعهدنامه

اینجانب فاطمه زرین‌جویی دانشجوی کارشناسی‌ارشد رشته مهندسی منابع طبیعی-گرایش جنگلداری دانشکده منابع طبیعی دانشگاه کردستان، تعهد می‌نمایم که محتوای این پایان‌نامه نتیجه تلاش و تحقیقات خود بوده و از جایی کپی‌برداری نشده و به پایان رسانیدن آن نتیجه تلاش و مطالعات مستمر اینجانب و راهنمایی و مشاوره اساتید بوده است.

با تقدیم احترام

فاطمه زرین‌جویی

۱۳۸۹/۱۲/۱۸

دانشگاه کردستان
دانشکده منابع طبیعی
گروه جنگلداری

پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته مهندسی منابع طبیعی-گرایش جنگلداری

عنوان:

باززایی گیاه از کالوس حاصل از کشت *درون‌شیشه‌ای* کوتیلدون لیلکی (*Gleditsia caspica*)

پژوهشگر:
فاطمه زرین‌جویی

در تاریخ ۱۳۸۹/۱۲/۱۸ توسط کمیته تخصصی وهیأت داوران زیر مورد بررسی قرار گرفت و با نمره و درجه به تصویب رسید.

هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱ـ استاد راهنما	**دکتر نقی شعبانیان**	استادیار	
۲ـ استاد مشاور	**مهندس محمدشفیع رحمانی**	کارشناسی‌ارشد	
۳ـ استاد داور خارجی	**دکتر علی‌اکبر مظفری**	استادیار	
٤ـ استاد داور داخلی	**دکتر لقمان قهرمانی**	استادیار	

مهر و امضاء گروه **مهر و امضاء معاون آموزشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده**

تقدیم به

خستگی مقدس دست‌های پدرم

و آبی زلال قلب مادرم

سپاسگزاری

همصدا با زمزمهٔ پاک و بی صدای ریشه‌ها و برگ‌ها، سپاس می‌گویم خداوند مهربانی را که با مهر او خاک مادر هزاران ریشه می‌شود و ریشه مادر هزاران بذر و انسان اجازه می‌یابد که پای در عالم اسرار زیر خاک و فراز آسمان نهد. به امید آنکه هر نگاه او گامی شود برای درک حضور جاودان او.

چه کوچک و شرمگین بی‌صدا می‌شوند واژه‌ها، آنگاه که می‌خواهند وسعت سپاسی را در خود بریزند و نمی‌توانند و به چه اوجی پر می‌گیرند واژه‌ها، آنگاه که مهربانانی و صبورانی معنای مهر و صبر می‌شوند در دفتر یادها.

سپاس‌گزارم ازپدر و مادرم که مهرشان بنایی شد برای تلاش پرشورم در کسب دانش، زیبایی حضور برادر و خواهرانم در کنارم که خستگی‌های این راه را به امید و روشنی راه تبدیل کرد.

از مهربان صبور، استاد راهنمای ارجمندم دکتر نقی شعبانیان و مهربان صبور، استاد مشاور گرانقدرم آقای مهندس رحمانی که ایشان تجسم باران بودند و آفتاب در رویش این پژوهش، با تمام وجود سپاسگزارشان هستم تا هماره.

از اساتید محترم و ارجمندم، دکتر لقمان قهرمانی، دکتر هدایت غضنفری، دکتر وحید حسینی، دکتر مهتاب پیرباوقار سپاسگزارم.

سپاس از محبت‌های بی دریغ دوستان " فاطمه رفیعی‌نیا، نجمه برجیان، فاطمه خوش‌رفتار، پریسا محمدی، مونا نصری، روناک صلواتی، نیلوفر سلطانی، چنور محمدی، کژال کمانگر، اقبال جعفری، ساسان وفایی و پیمان آقایی".

چکیده

لیلکی (*Gleditsia caspica* Desf.) به عنوان یکی از گونه‌های باارزش و در خطر انقراض جنگل‌های شمال ایران، نقش مهمی در حفظ و پایداری اکوسیستم این جنگل‌ها ایفا می‌کند. در این مطالعه، باززایی *درون‌شیشه‌ای* این گونه از طریق القاء کالوس از ریزنمونه‌های کوتیلدون انجام گرفت. به منظور القاء کالوس، قطعات کوتیلدون در محیط MS حاوی ۳٪ ساکارز، ۰/۸٪ آگار و غلظت‌های مختلف IBA، NAA و 2,4-D به تنهایی و یا در ترکیب با ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و KIN کشت شدند و پس از گذشت ۴ تا ۵ هفته، مشخص گردید که از میان ۷۵ تیمار هورمونی مختلف، محیط‌های کشت حاوی ٤ میلی‌گرم بر لیتر NAA به تنهایی، و یا در ترکیب با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در ترکیب با ۱ میلی‌گرم بر لیترBAP، ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در ترکیب با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ٤ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به تنهایی، با ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی، مؤثرترین محیط‌های کشت بودند. از بین دو سیتوکنین BAP و KIN مورد استفاده برای ارگان‌زایی شاخساره، غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP با میانگین ۱۳/۷ شاخساره از هر ریزنمونه مؤثرترین تیمار بود. حداکثر افزایش طول میانگره شاخساره‌های تشکیل شده در محیط حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 در ترکیب با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP (با میانگین ۲/۷ سانتی‌متر) حاصل شد. به منظور ریشه‌زایی، پس از انتقال شاخساره‌ها به محیط MS نیمه‌بنیه حاوی IBA و NAA (۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) به تنهایی و یا در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر KIN، مشخص گردید که محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر KIN بهترین محیط کشت برای ریشه‌زایی بود به طوریکه ۹۳/۷۵ درصد شاخساره‌ها با میانگین تشکیل ۳/۷۵ ریشه در هر شاخساره، ریشه‌دار شدند.

کلمات کلیدی: لیلکی ..*Gleditsia caspica* Desf. القاء کالوس. باززایی *درون‌شیشه‌ای*.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه ۱

بیان مسأله ۱

زمینهٔ مطالعه ٤

فرضیات تحقیق ٥

اهداف ٦

اهداف بلند مدت ٦

فصل اول ۷

۱- کلیات و سابقه تحقیق ۷

۱-۱-بیولوژی لیلکی ۷

۱-۱-۱-تعریف گونه ۷

۱-۱-۲- گونه‌های لیلکی ۸

۱-۱-۳- تکثیر و زادآوری لیلکی ۹

۱-۱-۳-۱- زادآوری از طریق بذر ۹

۱-۱-۳-۲- زادآوری بوسیله ریشه‌جوش ۱۰

۱-۱-۳-۳- زادآوری بوسیله پاجوش ۱۰

۱-۱-۴- آفات و بیماری‌های لیلکی ۱۰

۱-۲- تولید و پراکنش بذر لیلکی ۱۱

۱-۳- اهمیت بیوتکنولوژی در تکثیر و اصلاح درختان جنگلی ۱۱

۱-۴- اهمیت کشت بافت در درختان جنگلی ۱۳

۱-۴-۱- ریزازدیادی ۱٤

۱-۴-۲- اندام‌زایی از بافت کالوس ۱٥

۱-۴-۳- تشکیل اندام نابجا بطور مستقیم ۱٦

۱-۴-۴- جنین‌زایی سوماتیکی ۱٦

۱-۵- استخراج و کشت پروتوپلاست ۱۷

۱-۶- تراریزش ژنتیکی ۱۸

۱-۷- پیشینهٔ تحقیق ۱۹
۱-۷-۱- کشت بافت و باززایی گونه‌های لیلکی ۱۹
۱-۷-۲- کشت بافت و باززایی سایر گونه‌های جنگلی ۲۰
فصل دوم ۲۸
۲- مواد و روشها ۲۸
۲-۱- مواد و تجهیزات مورد استفاده ۲۸
۲-۱-۱- ویژگی‌های بتانیکی، مورفولوژیکی و اکولوژیکی گونهٔ لیلکی ۲۸
۲-۱-۲- تجهیزات و وسایل مورد استفاده ۲۹
۲-۱-۳- مواد مورد استفاده ۳۰
۲-۲- روش تحقیق ۳۰
۲-۲-۱- تهیهٔ ریزنمونه ۳۰
۲-۲-۲- ضد عفونی تجهیزات و وسایل مورد نیاز ۳۰
۲-۲-۳- محیط کشت مورد استفاده ۳۱
۲-۲-۴- تهیهٔ محلول‌های ذخیره محیط MS ۳۱
۲-۲-۵- تهیهٔ استوک هورمون‌های گیاهی مورد استفاده ۳۱
۲-۲-۶- تهیهٔ محیط کشت MS ۳۲
۲-۲-۷- ضدعفونی بذور و تهیهٔ ریزنمونه ۳۲
۲-۲-۸- تولید کالوس از ریزنمونه‌های کوتیلدون ۳۳
۲-۲-۹- باززایی شاخساره از کالوس ۳۳
۲-۲-۱۰- افزایش طول شاخه‌ها ۳٤
۲-۲-۱۱- ریشه‌زایی ۳٤
۲-۳- تجزیه و تحلیل آماری ۳۵
فصل سوم ۳٦
۳-نتایج ۳٦
۳-۱- القاء کالوس از ریزنمونه‌های کوتیلدون ۳٦
۳-۲- اندام‌زایی شاخساره از کالوس ٤٤
۳-۴- افزایش طول شاخه‌ها ٤۹

۳-۵- ریشه‌زایی ۵۱

فصل چهارم ۵۶

۴- بحث ۵۶

۴-۱- القاء کالوس از ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵۶

۴-۲- ارگان‌زایی شاخساره از کالوس ۵۸

۴-۳- افزایش طول شاخه‌ها ۵۹

۴-۳- ریشه‌زایی ۶۰

پیشنهادات ۶۱

منابع ۶۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱: میانگین و خطای معیار تعداد کالوس و درصد کالوس‌زائی مورد مطالعه در ۷۵ ترکیب تیماری ۳۷

جدول۳-۲: نتایج تجزیه واریانس اثر نوع اکسین، غلظت اکسین و نوع و غلظت سیتوکینین بر کالوس‌زایی لیلکی..... ٤٠

جدول۳-۳: مقایسهٔ میانگین اثر تأثیر نوع و غلظت سیتوکنین‌های مورد استفاده بر القاء کالوس ٤٣

جدول ۳-۴: میانگین و اشتباه معیار تعداد شاخه‌های اندام‌زایی شده از کشت کالوس در غلظت‌ها و ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد..... ٤٥

جدول۳-۵: نتایج تجزیه واریانس اثرات نوع سیتوکینین، غلظت سیتوکینین و غلظت NAA+2,4,D بر اندام‌زایی شاخساره از کالوس لیلکی ٤٦

جدول ۳-۶: میانگین و اشتباه معیار افزایش طول شاخه ٤٩

جدول۳-۷: نتایج تجزیهٔ واریانس اثرات غلظت GA_3 و BAP بر افزایش طول شاخه ٥٠

جدول ۳-۸: میانگین و اشتباه معیار برای صفت ریشه‌زائی..... ٥١

جدول۳-۹: نتایج تجزیهٔ واریانس اثرات کینتین و نوع و غلظت اکسین بر ریشه‌زایی لیلکی ٥٢

فهرست نمودارها و شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲–۱: ضدعفونی محیط کار و ظروف در زیر هود لامینار ایرفلو ۳۱

شکل ۳–۱: القاء کالوس نوع I و نوع II به ترتیب در محیط‌های کشت حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در ترکیب با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و حاوی ۴ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ترکیب با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP از کوتیلدون لیلکی ۳۶

نمودار ۳–۱: میانگین القاء کالوس در حضور اکسین‌های مختلف ۴۲

نمودار ۳–۲: درصد القاء کالوس در حضور اکسین‌های مختلف ۴۲

نمودار ۳–۳: میانگین القاء کالوس در حضور غلظت‌های اکسین ۴۲

نمودار ۳–۴: درصد القاء الوس در حضور غلظت‌های اکسین ۴۳

نمودار ۳–۵: میانگین القاء کالوس در حضور و عدم حضور سیتوکنین ۴۴

شکل ۳–۲: تشکیل آغازه‌های شاخساره از کالوس به ترتیب پس از سه بار واکشت در محیط MS حاوی ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D (الف) و سپس انتقال به محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP (ب). ۴۴

شکل ۳–۳: تشکیل شاخساره از کالوس در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP ۴۶

نمودار ۳–۶: میانگین تأثیر BAP و KIN بر اندام‌زایی شاخساره ۴۷

نمودار ۳–۷: میانگین شاخسارهٔ اندام‌زایی شده در حضور BAP و KIN ۴۸

نمودار ۳–۸: مقایسه میانگین استفاده و عدم استفاده از ۰/۵ میلیگرم بر لیتر NAA و 2,4-D بر اندام‌زایی شاخساره از کالوس ۴۸

شکل ۳–۴: افزایش طول میانگره شاخساره‌های تشکیل شده در محیط MS حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر GA3 در ترکیب با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP ۴۹

نمودار ۳–۹: میانگین افزایش طول شاخه‌ها در حضور GA_3 ..... ۵۰

شکل ۳–۵: ریشه‌زایی شاخساره‌ها در محیط MS حاوی به ترتیب ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA + ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر KIN؛ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر IBA + ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر KIN ۵۲

نمودار ۳–۱۰: میانگین تعداد ریشه در هر شاخه در حضور IBA و NAA ۵۳

نمودار ۳-۱۱: درصد ریشه‌زایی در هر شاخه در حضور IBA و NAA.....۵۳

نمودار ۳-۱۲: تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین‌های مورد استفاده بر ریشه‌زایی در شاخساره.....٥٤

نمودار ۳-۱۳: تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین‌های مورد استفاده بر درصد ریشه‌زایی در شاخساره ٥٤

نمودار ۳-۱۴: فراوانی تشکیل ریشه در حضور و عدم حضور KIN ۵۵

نمودار ۳-۱۵: درصد تشکیل ریشه در حضور و عدم حضور KIN.....۵۵

مقدمه

بیان مسأله

جنگل‌ها به عنوان یکی از مهمترین اکوسیستم‌های حیات‌بخش بشر، جایگاه انکارناپزیری در تأمین رفاه، آسایش و سعادتمندی جوامع بشری دارند. وجود ارزش‌های متعدد و متنوع اقتصادی و زیست‌محیطی از جمله تولید گرده‌بینه و الوار مورد نیاز بازارهای جهانی، حفاظت از زیستگاه حیات وحش، کنترل فرسایش خاک و محافظت از سواحل و آبخیزها بیانگر اهمیت جنگل‌ها به عنوان تکیه‌گاه مطمئن و استوار تداوم و ارتقای حیات جانداران به ویژه انسان، و متضمن شکوفایی حیات جوامع و توسعهٔ پایدار است (Pijut *et al*., 2007).

جنگل‌های شمال کشور، با تنوع گونه‌ای و تنوع ژنتیکی فراوان و ارزشمند خاص خود که به جنگل‌های خزری یا هیرکانی موسومند، بازمانده از دوران سوم زمین‌شناسی بوده و با قدمت ٤٠ میلیون سال، یکی از ارزشمندترین جنگل‌های جهان هستند (مروی مهاجر، ۱۳۸۵). ناحیه خزری به این دلیل ارزشمند است که از نظر کهنسالی، قدمت، پیدایش، تنوع ژنتیکی و تنوع گونه‌های درختی، درختچه‌ای، بوته‌ای، علفی و تنوع جانوری از حوادث دوران بین‌یخچالی دوران چهارم زمین‌شناسی مصون مانده و نتیجهٔ کنونی آن این است که گونه‌هایی از درختان و درختچه‌هایی در شمال ایران وجود دارند که منحصر بفردند و در اروپا و نقاط دیگر دنیا یافت نمی شوند. بنابراین جنگل‌های هیرکانی ایران یکی از مهم‌ترین ذخیره‌گاه‌های زیست‌کرهٔ بشر به شمار می‌آیند و از این نظر ثبت آن، در فهرست میراث طبیعی زمین ضمن جلب توجه جهانیان و اهمیت اکولوژیکی این جنگل‌ها باعث شده است تا تلاش‌ها برای حفاظت از آن تقویت شود (اسدی اتوئی و هدایتی، ۱۳۸۲). این جنگل‌ها از آستارا در شمال غرب تا گلیداغی در شمال شرق، در ۷ درجهٔ طول و ۲ درجهٔ عرض جغرافیایی و به شکل یک نوار باریک

به عرض حداکثر ۷۰ کیلومتر (منطقهٔ قائم‌شهر) و حداقل ۱۳ کیلومتر (منطقهٔ رامسر) و به طول تقریبی ۸۰۰ کیلومتر، در سه استان گیلان، مازندران و گلستان و تا ارتفاع تقریباً ۲۸۰۰ متر از سطح دریا گسترانیده شده‌اند. قدیمی‌ترین آماری که از مساحت جنگل‌های شمال ایران وجود دارد در حدود ۵۰ سال پیش برآورد شده و طبق این آمار مساحت این جنگل‌ها در آن زمان سه میلیون و چهارصد هزار هکتار بوده است که اکنون به حدود یک میلیون و هشتصد و چهل و هشت هزار هکتار کاهش یافته است و تنها جنگل‌های تجارتی ایران محسوب می شوند (مروی مهاجر، ۱۳۸۵).

جنگل‌های شمال ایران تنها جنگل کشور است که علاوه بر عملکردهای زیست محیطی، قابلیت تولید چوب‌های تجاری را دارند و از آن مهمتر به علّت دیرینگی یک بانک ژن طبیعی و عظیم نیز محسوب می‌شوند (اسدی اتوئی و هدایتی، ۱۳۸۲). با توجه به رهاوردهای پژوهشی، اکوسیستم‌های طبیعی ایران از دو جهت حائز اهمیت می‌باشند. ابتدا به دلیل وجود تعدد گونه‌های اندمیک (انحصاری) و ظهور مراحل اولیه توالی در بعضی مناطق، ایران یکی از کانون‌های گونه‌زایی آسیا محسوب می‌شود و از سوی دیگر وجود اکوسیستم‌های تکامل‌یافته‌تر مانند منطقهٔ خزری، ایران را به عنوان ذخیره‌گاهی ارزشمند معرفی می‌کند. علاوه بر این، قسمت اعظم سرزمین ایران در قلمرو اکوسیستم‌های مناطق خشک جهان قرار دارد. به همین دلیل مدیریت منابع طبیعی در این قلمرو بسیار حساس و مشکل است (کروری، ۱۳۸۲). در حال حاضر عدم برنامه‌ریزی آمایش سرزمین، فقدان سیاست‌های ملی- منطقه‌ای یکپارچه برای مدیریت پایدار بستر طبیعی، تدوین و اجرای طرح‌های جنگلداری با اهداف تجاری و تأمین خوراک صنایع چوب و کاغذ، عدم بخش‌نگری و برنامه‌ریزی کوتاه مدت، عدم سرمایه‌گذاری مؤثر حفاظتی و....، باعث نابودی یگانه جنگل‌های مرطوب هیرکانی و بر هم خوردن تعادل طبیعی بستر و ساختار زیستگاه‌های جوامع زیستی منطقه شده است (خطیبی، ۱۳۸۳).

از مشهورترین درختان این جنگل‌ها می‌توان، راش (*Fagus orientalis*)، بلوط (*Quercus* و *Q.castanefolia*)، توسکا (*A.glutinosa* و *Alnus subcordata*)، ممرز (*Carpinus betulus*)، افرا (*Acer macranthera*، *campester, A.cappadocicum, A.velutinum*)، انجیلی (*Parrotia persica*)، زبان‌گنجشک (*Fraxinus excelsior*)، گیلاس وحشی (*Cerasus avium*)، بارانک (*Sorbus torminalis*)، سرخدار (*Taxus baccata*)، نمدار (*Tilia begonifolia*)، شمشاد (*Buxus hyrcana*)، لرگ (*Pterocarya fraxinifolia*)، لیلکی (*Gleditsia caspica*)، خرمندی (*Diospyros lotus*)، آزاد (*Zelkova carpinifolia*) ، زربین (*Cupressus sempervirens*)

و... را نام برد. گونه‌هایی از قبیل انجیلی، لرگ، لیلکی و سفیدپلت مختص جنگل‌های خزری هستند. در صورتی که بعضی از این گونه‌ها در اروپا جزو فسیل‌های دوران سوم پیدا شده‌اند (مروی مهاجر، ۱۳۸۵). در حال حاضر متأسفانه بسیاری از گونه‌های طبیعی باارزش جنگل‌های ایران در خطر انقراض قرار دارند و برخی نیز باید به صورت ذخیره‌گاه حفظ شوند. فراموش نشود که در حقیقت یک گونه در حال انقراض مجموعه‌ای از ذخایر ژنتیکی را در بر دارد که میراثی هزاران ساله برای بشر محسوب می‌شود. وقتی صحبت از انقراض گونه‌ای می‌شود موضوع انقراض مجموعه‌ای از توانایی‌های ژنتیکی مطرح است. در واقع حذف یک گونه یا کلاس ژنتیکی خاص، منجر به برهم خوردن تعادل زنجیره غذایی و در نهایت تأثیر بر شبکه غذایی اکوسیستم شده و در کل بر چرخهٔ حیات و برهم‌کنش عوامل مختلف اکوسیستم تأثیر منفی می‌گذارد و در نتیجه حذف یک گونه گاه می‌تواند منجر به نابودی کل اکوسیستم گردد (کروری، ۱۳۸۲).

لیلکی (لالکی، للکی، لالیک و لیلک‌دار) با نام علمی *Gleditsia caspica* Desf. درختی است خزان‌کننده و خاردار از خانوادهٔ لگومینوز، کم‌توقع و سازگار به شرایط بد محیطی، و دارای ویژگی‌های مثبت و منفی زیادی می‌باشد که آن را از بسیاری از گونه‌های دیگر درختی متمایز می‌سازد. این گونه اندمیک و در خطر انقراض جنگل‌های هیرکانی است. دامنهٔ پراکنش آن محدود به جنگل‌های آستارا تا نور است و بیش از ۵۰۰ متر ارتفاع در جنگل بالا نمی‌رود (ثابتی، ۱۳۸۵؛ Schanble & Krutovskii, 2004). یکی از نگرانی‌ها برای گونه‌های در خطر انقراض، از دست دادن تنوع ژنتیکی است. تهدیدهای ژنتیکی که باعث به خطر افتادن گونه‌ها می‌شود به اشکال مختلفی ظاهر می‌شود، یکی از این تهدیدها، تهدید از جانب بشر است که باعث تکه تکه شدن جامعه و تقسیم اکوسیستم و ایجاد جمعیت‌های کوچکتر و ایزوله می‌گردد، که این امر سبب کاهش تنوع ژنتیکی، افزایش اینبریدینگ و در آخر باعث کاهش شایستگی (زوال صفات مطلوب در یک جمعیت) می‌شود (Ellstrand & Elam, 1993; Reed & Frankham, 2003).

اصولاً در طرح‌های جنگلداری بیشتر توجه به گونه‌هایی مانند راش، بلوط، ملج، اوجا، افراپلت و... شده است و اگر در توده‌ای گونه‌های دیگر وجود داشته باشد، جزء سایر گونه‌ها و فقط حجم و تعداد آنها به صورت درصد نوشته می‌شود. این نگرش موجب می‌شود تا گونه‌ای، اگر هم دارای جمعیت مناسبی باشد به حساب نیاید و عملاً در سال‌های بعد در اثر انتخاب از بین برود. گونه لیلکی یکی از گونه‌هایی است که به آن کمتر توجه شده است و در مورد این گونه، علاوه بر اینکه جنگلکاری صورت نگرفته است بلکه مناطق رویشی آن به منظور احیاء جنگل

و کاشت گونه‌های دیگر مانند افراپلت، توسکا و... دست‌خوش تغییر شده‌اند (برای مثال مناطقی همچون کرات‌چال تنکابن و یا اجرای طرح جنگل‌کاری در مسیر امامزاده عبداله آمل). بنابراین با توجه به اینکه درخت لیلکی امروزه عمدتاً به صورت پایه‌های منفرد یا به صورت جمعیت‌های کوچک در حاشیه مزارع، روستاها و گاوداری‌ها مشاهده می‌گردد، در خطر انقراض قرار دارد (اسدی، ۱۳۷۷).

با توجه محدودیتهایی که از نظر تولید بذر، وجود خواب بذر، جوانه‌زنی ضعیف و زنده‌مانی کم نهال‌ها در فیزیولوژی زادآوری لیلکی وجود دارد، استفاده از تکنیک‌های کشت بافت برای تولید گیاهچه، می‌تواند روش ایده‌آلی برای غلبه بر این مشکلات به عنوان مبنای برنامه های اصلاحی و تولید انبوه نهال در شرایط آزمایشگاهی باشد.

زمینهٔ مطالعه

لیلکی گونه اندمیک مناطق پست و مرطوب و دامنه‌های ساحل دریای خزر و از عناصر باقیمانده دوران سوم زمین‌شناسی است. دامنهٔ انتشار آن در ایران محدود به جنگل‌های آستارا تا نور است (مروی مهاجر، ۱۳۸۵). با توجه به مشکلات زادآوری طبیعی و پراکنش محدود این گونه در جنگل‌های شمال از یک طرف و عدم انجام مطالعه‌ای جامع و دقیق در این ارتباط از طرف دیگر و با تأکید به این نکته که این گونه سهم مهمی در حفظ و پایداری اکوسیستم و تنوع ژنتیکی این جنگل‌ها دارد، لذا انجام هر گونه مطالعه در راستای حفظ آن و حل مشکلات متعدد آن و توجه بیشتر به این گونهٔ مهم و در خطر انقراض جنگل‌های هیرکانی بسیار مهم و باارزش خواهد بود.

نابودی سریع جنگل‌ها و خطر انقراض گونه‌ها، بازسازی و حفاظت از جنگل‌ها را به یک امر حیاتی مبدل کرده است. اکوسیستم‌های طبیعی بویژه اکوسیستم‌های جنگلی از گنجینه‌های زیستی بشر محسوب می‌گردند که حفظ آنها برای نسل‌های آینده ضرورت دارد (Pijut *et al.*, 2007)، تعمق در بهره‌برداری‌های متعدد و وسیع و به دنبال آن ارزش حفاظتی و اقتصادی گونه‌های جنگلی، ما را بر آن می‌دارد تا در جهت افزایش تولید در جنگل‌ها از یک طرف و حفاظت از این ذخایر و اصلاح آنها از طرف دیگر، برنامه‌ریزی اصولی داشته باشیم. جهت کاهش فشارهای موجود بر حیات جنگل‌ها و مهم‌تر از آن حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های باارزش، توجه جهانی به اصلاح درختان جنگلی و قرار دادن آنها در برنامه‌های اصلاحی مدرن ضرورت دارد(Altman, 2003) که با بهره‌گیری از یافته‌های بنیادی در زمینهٔ کشت بافت به منظور تکثیر رویشی و تکنیک‌های انتقال ژن گیاهان کمک می‌کند. در

حال حاضر این یافته‌های جدید بسترهای نرم‌افزاری توسعه یافته‌ای برای بهبود ویژگی‌هایی هستند که قبلاً از طریق روش‌های سنتی و کلاسیک اصلاح می‌شدند. علاوه بر این، با توجه به نیاز روز افزون جهانی به محصولات جنگلی، بهینه کردن تولید این محصولات و ارتقاء شاخص‌های کمی و کیفی تولید ضروری است که این خود سرعت بخشیدن به اجرای برنامه‌های اصلاحی را می‌طلبد (Nehra *et al*., 2005; Burley & Kanowski, 2005). کشت بافت یکی از ابزارهای مهم در بیوتکنولوژی گیاهان چوبی و علفی بوده و تکنیک‌های آن به طور موثر و کارآمد می‌توانند زمان، نیروی انسانی و فضای مورد نیاز برای تولید یک واریته جدید و یا تکثیر واریته‌های هدف موجود را کاهش دهند. تکنیک‌های کشت بافت در آینده جایگاه مفید و ویژه‌ای در حفاظت و اصلاح درختان چوبی خواهند داشت. اصلاح‌نژادگرهای جنگل در تلاشند تا با تولید واریته‌های با عملکرد بیشتر، مقاوم به تنش های زنده (آفات و بیماری‌ها) و تنش‌های محیطی غیرزنده (مانند تنش‌های سرما و غرقابی) به تولید و پایداری بیشتری برسند (Merkle & Nairn, 2005). در سال‌های اخیر مطالعاتی در زمینهٔ کشت بافت برخی از گونه‌های جنگلی انجام شده است، اما مطالعه و یا استفاده از این تکنیک بر روی گونهٔ لیلکی تاکنون صورت نگرفته است. بنابراین با توجه به مطالب فوق، استفاده از روش‌های کشت بافت به عنوان مبنای برنامه های اصلاحی و حل مشکل زادآوری برای این گونه ضروری به نظر می‌رسد.

فرضیات تحقیق

H0: فراوانی و رشد کالوس به غلظت‌ها و ترکیبات مختلف اکسین‌های مورد استفاده بستگی ندارد.

H1: فراوانی و رشد کالوس به غلظت‌ها و ترکیبات مختلف اکسین‌های مورد استفاده بستگی دارد.

H0: فراوانی شاخساره‌های باززایی شده در کشت بافت لیلکی تحت تأثیر نوع و غلظت هورمون مورد استفاده قرار نمی‌گیرد.

H1: فراوانی شاخساره‌های باززایی شده در کشت بافت لیلکی تحت تأثیر نوع و غلظت هورمون مورد استفاده قرار می‌گیرد.

H0: ریشه‌زایی شاخساره‌ها و تولید گیاهچهٔ کامل به نوع هورمون و غلظت‌های مختلف آن بستگی ندارد.

H1: ریشه‌زایی شاخساره‌ها و تولید گیاهچهٔ کامل بسته به نوع هورمون و غلظت آن متفاوت است.

اهداف

این پژوهش بر توسعه و بهینه‌سازی تکنیک‌های مؤثر کشت بافت با استفاده از بذر درخت لیلکی که از جنگل‌های روستای مازولنگه شهرستان رامسر در استان مازندران با ارتفاع تقریبی ۲۰۰ متر از سطح دریا جمع‌آوری شد، تمرکز کرده است. اهداف عمدهٔ این تحقیق عبارتند از:

- توسعهٔ سیستمی مناسب جهت باززایی گیاه کامل از کشت کالوس حاصل از کوتیلدون،
- بهینه کردن مراحل مختلف کشت بافت لیلکی همچون القاء کالوس، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی آن در محیط درون شیشه‌ای، و
- پی بردن به مشکلات و موانع سر راه به کارگیری تکنیک‌های کشت بافت در لیلکی و مقایسه و تطبیق آنها با نتایج تحقیقات مشابه در گونه‌های نزدیک.

اهداف بلند مدت

با توجه به در حال انقراض بودن گونهٔ لیلکی و کمتر مورد توجه بودن آن در طرح‌های جنگلداری، هدف از این تحقیق معرفی سیستمی کارآمد جهت القاء کالوس، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی این گونه است، که می‌تواند توسط سایر محققین به منظور تحقیقات بیشتر در زمینهٔ جنین‌زایی سوماتیکی، تراریزش ژنتیکی و سایر تکنیک‌های بیوتکنولوژی به عنوان مبنای اصلاح نژاد این گونه و کمک به زادآوری آن به کار گرفته شود، امید است این مهم اتفاق بیافتد!