University of Tehran

Journal of Forest and Wood Products

Online ISSN: 2383-0530

Home Page: https://jfwp.ut.ac.ir

Investigating the effects of growth regulators benzyladenine, thidiazuron and gibberellic acid on the regeneration of chestnut (*Castanea sativa* Mill.)

Leila Hamidoost[1] | Kambiz Taheri Abkenar[2] | Asad Asadi Abkenar[3] | Sahar Bohloli[4]

1. Corresponding Author, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, Guilan University, Sowmeh Sara, Iran. E-mail: leila-hamidoost@phd.guilan.ac.ir
2. Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, Guilan University, Sowmeh Sara, Iran. E-mail: taherikambiz@guilan.ac.ir
3. Faculty of Tissue Culture and Molecular Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of North Region, Rasht, Iran. E-mail: asadiabkenarasad@gmail.com
4. Faculty of Tissue Culture and Molecular Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of North Region, Rasht, Iran. E-mail: saharbohlouli@gmail.com

ARTICLE INFO

Article type:
Research Article

Article History:
Received: 27 December 2023
Revised: 18 February 2024
Accepted: 05 May 2024
Published online: 04 June 2024

Keywords:
Benzyladenine (BA),
Chestnut (Castanea sativa Mill.),
Cytokinin,
Tissue culture.

ABSTRACT

Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is one of the native species of Guilan province. Due to fungal diseases and animal grazing, as well as the high amount of unhealthy seeds, native chestnut *in vitro* culture is one of the effective methods for mass production of this endangered plant. The aim of this research is to determine the optimal culture medium for chestnut tree regeneration through tissue culture. The culture medium used in this research includes GD (Gresshoff & Doy), DKW (Driver and Kuniyuki Walnut) (1 mg/liter BA*) and (Murashige Skoog) MS (half nitrogen concentration) with three different hormone combinations (1 mg/liter + BA 0.1 mg per liter TDZ), (0.5 mg/liter TDZ), and (1 mg/liter + GA3 0.1 mg/liter BA). For *in vitro* culture of chestnut, lateral buds of one-year-old plants grown in the greenhouse were used. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to investigate the effect of culture media with plant growth regulators on explant length, number of leaves, and stems. The results showed that the length of explants has a significant difference in culture media. No significant difference was observed in the number of stems and leaves. The results of the comparison of means using Tukey's test showed a significant difference between the length of explants in DKW medium and other media. DKW medium with 1 mg/liter BA was found to be the best medium for regeneration and longitudinal growth of chestnut explants. In the present study, *in vitro* culture of Chestnut is introduced an effective method for mass production of this species.

Cite this article: Hamidoost, L., Taheri Abkenar, K., Asadi Abkenar, A., Bohloli, S. (2024). Investigating the effect of growth regulators benzyladenine, thidiazuron and gibberellic acid on the regeneration of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Journal of Forest and Wood Products*, 77 (1), 47-54. DOI: http//doi.org/10.22059/jfwp.2024.370173.1274

© The Author(s) **Publisher:** The University of Tehran Press.
DOI: http//doi.org/10.22059/jfwp.2024.370173.1274

دانشگاه تهران

نشریهٔ جنگل و فرآورده‌های چوب

سایت نشریه: https://jfwp.ut.ac.ir

شاپا الکترونیکی: ۰۵۳۰-۲۳۸۳

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل‌آدنین، تیدیازورون و جیبرلیک اسید بر باززایی گیاه شاه‌بلوط (*Castanea sativa* Mill.)

لیلا حامی‌دوست[۱*] | کامبیز طاهری آبکنار[۲] | اسد اسدی آبکنار[۳] | سحر بهلولی[۴]

۱. نویسنده مسئول، گروه جنگلداری، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه گیلان صومعه‌سرا، ایران. رایانامه: leila-hamidoost@phd.guilan.ac.ir

۲. گروه جنگلداری، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه گیلان صومعه‌سرا، ایران. رایانامه: taherikambiz@guilan.ac.ir

۳. بخش کشت بافت و بیولوژی مولکولی، پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی منطقهٔ شمال کشور، رشت، ایران. رایانامه: asadiabkenarasad@gmail.com

۴. بخش کشت بافت و بیولوژی مولکولی، پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی منطقهٔ شمال کشور، رشت، ایران. رایانامه: bohlouli@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخ‌های مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۱/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۶
تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۳/۱۵

کلیدواژه:
بنزیل‌آدنین (BA)،
سیتوکینین ،
شاه بلوط (Castanea sativa Mill.)،
کشت بافت.

چکیده

شاه‌بلوط (*Castanea sativa* Mill.) از گونه‌های بومی استان گیلان است. کشت درون شیشه‌ای شاه بلوط بومی به‌دلیل بیماری‌های قارچی و چرای دام و میزان زیاد بذرهای ناسالم، یکی از روش های مؤثر برای تولید انبوه این گیاه در معرض خطر انقراض است. هدف این پژوهش تعیین محیط کشت بهینه جهت باززایی درخت شاه‌بلوط از طریق کشت بافت است. محیط‌های کشت مورد استفاده این پژوهش شامل GD (Gresshoff & Doy)، DKW (Driver and Kuniyuki Walnut) (۱ میلی‌گرم در لیتر BA*) و MS (Murashige Skoog) (نصف غلظت نیتروژن) با سه ترکیب هورمونی مختلف (۱ میلی‌گرم در لیتر BA+۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ)؛ (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ) و (۱ میلی‌گرم در لیتر GA3+ ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA) بود. برای کشت درون شیشه‌ای شاه بلوط، از جوانه‌های جانبی گیاهان یک سالهٔ رشد یافته در گلخانه استفاده شد. تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای بررسی تأثیر محیط‌های کشت با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه بر طول، تعداد برگ و ساقه ریزنمونه انجام شد. نتایج نشان داد که طول ریزنمونه در محیط‌های کشت اختلاف معنی‌داری دارد. اما در تعداد ساقه و برگ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی، تفاوت معنی‌داری بین طول ریزنمونه در محیط کشت DKW با سایر محیط‌ها نشان داد. بنابراین محیط کشت DKW همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، بهترین محیط برای باززایی و رشد طولی ریزنمونه‌های شاه بلوط می‌باشد. در پژوهش حاضر، ازدیاد درون شیشه‌ای شاه‌بلوط به‌عنوان روشی کارآمد برای تولید این گونه معرفی شد.

استناد: حامی‌دوست، لیلا؛ طاهری آبکنار، کامبیز؛ اسدی آبکنار، اسد؛ بهلولی، سحر (۱۴۰۳). تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل‌آدنین، تیدیازورون و جیبرلیک اسید بر باززایی گیاه شاه‌بلوط (*Castanea sativa* Mill.). *نشریهٔ جنگل و فرآورده‌های چوب*، ۷۷ (۱)، ۵۴-۴۷. DOI:http//doi.org/10.22059/jfwp.2024.370173.1274

© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.
DOI: http//doi.org/10.22059/jfwp.2024.370173.1274

* اختصارات: بنزیل‌آدنین (BA)، جیبرلیک اسید (GA3)، تیدیازورون (TDZ)

۱. مقدمه

درخت شاه‌بلوط اروپایی (*Castanea sativa* Mill.) یکی از گونه‌های مهم درختان جنگلی هیرکانی متعلق به خانوادهٔ *Fagacea* (خانوادهٔ بلوط) است. درختان این خانواده از جمله درخت شاه‌بلوط، از اهمیت تجاری زیادی در جنگلداری و باغبانی برخوردار است، زیرا از چوب این درخت در صنایع چوب و از میوه‌های آن به‌عنوان آجیل خوراکی (نات)، به‌صورت خام و تفت داده شده اســتفاده می‌شــود. در ایران، این گونه بومی جنگل‌های مناطق ویسرود، سیاه‌مزگی، قلعه‌رودخان و شفارود در استان گیلان و در ارتفاعات ۶۰۰-۲۰۰ متر از سطح دریا مشاهده شده که به‌دلیل زوال تدریجی درختان آن از گونه‌های در معرض خطر محسوب می‌شود. شاه‌بلوط در استان گیلان به‌شدت تحت تأثیر یک نوع بیماری قارچی به نام سوختگی شاه‌بلوط یا بلایت شاه‌بلوط با نام علمی *Cryphonectria parasitica* (Murr.) قرار گرفته است که کاهش شدید درختان را در جمعیت‌های پراکندهٔ مناطق اشاره شده به‌دنبال داشته است. بیماری بلایت شاه‌بلوط، ابتدا باعث قهوه‌ای شدن شاخه‌ها و برگ‌های درخت و در نهایت سوختن آن‌ها می‌شود. ازدیاد شاه‌بلوط با استفاده از روش‌های متداول در باغبانی دشوار است. طبق گزارش Hamidust و همکاران (۲۰۲۲)، درصد زیادی از بذرهای جمع‌آوری شده از منطقهٔ ویسرود به‌دلیل آلودگی درونی (پوسیدگی سیاه‌رنگ) از جوانه‌زنی بسیار پایینی برخوردار بودند [۱]. ازدیاد به روش قلمه‌زنی نیز دشوار است، زیرا قلمه‌های چوبی آن بسیار سخت ریشه‌زا بوده و قلمه‌های نیمه‌خشبی آن به تجهیزات و تأسیسات پیشرفته مانند سیستم مه‌پاش نیاز دارد [۲]. همچنین تاکنون در ایران تحقیقی در مورد تعیین مناسب‌ترین زمان و روش پیوند این گیاه انجام نشده است.

در توسعهٔ جنگل‌کاری، ازدیاد انبوه و کاشت مجدد (واکاری) یک گونه در زیستگاه‌های طبیعی آن، راهکاری مؤثر برای افزایش جمعیت درگونه‌های رو به کاهش و در معرض خطر نظیر شاه‌بلوط محسوب می‌شود [۵-۳]. امروزه در تولید انبوه و تجاری بسیاری از گیاهان از روش‌های مختلف کشت بافت گیاهی استفاده می‌شود. روش‌های مختلف کشت بافت برای به‌دست آوردن گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زا نیز از کارآمدی بسیار بالایی برخوردار هستند. درکشت بافت، موفقیت در به‌دست آوردن یک دستورالعمل بهینه و تجاری به عوامل متعددی از جمله ماهیت طبیعی گونه و رقم گیاه، نوع ریز نمونه، زمان و محل جداسازی آن از گیاه، نوع تکنیک بکار رفته، سن گیاهی که از آن ریز نمونه گرفته می‌شود و محیطی که گیاه مادری در آن رشد می‌کند، وابسته است [۶]. برای ازدیاد شاه‌بلوط به روش کشت بافت، تاکنون تحقیقات زیادی انجام شده است. Vieitez و Vieitez (۱۹۸۳)، امکان تکثیر شاخه‌های جانبی را در گیاهان سه تا چهار ماههٔ شاه‌بلوط بررسی کردند [۷]. Pavese و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که محیط‌های GD MS3B و DKW همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای استقرار ریز نمونه‌ها کارآمد بودند و محیط DKW همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در مرحلهٔ پرآوری مؤثرتر بود [۸]. Algül و Dalkılıç (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای ریز ازدیادی سه ژنوتیپ مختلف شاه‌بلوط با مقایسهٔ محیط‌های کشت مختلف شامل محیط ترکیبی GD و MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیترBAP، محیط نیمه‌جامد MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ GA3، به این نتیجه رسیدند که تشکیل ساقه و برگ در محیط MS بیشتر از محیط ترکیبی GD و MS بود [۹]. Vieitez و همکاران (۱۹۸۳) دریافتند که رشد طولی ریزنمونه‌های درخت شاه‌بلوط بالغ در محیط کشت MS با نصف غلظت نیتروژن، بهتر از محیط کشت Lepoiver بود و اضافه نمودن BA در محیط کشت مانع رشد طولی شد ولی حذف کامل آن سبب سوختگی ریز نمونه‌ها گردید. طبق گزارش آنها محیط کشت MS با نصف غلظت نیتروژن، مناسب‌ترین محیط برای کشت اولیه و واکشت‌ها و همچنین رشد طولی ساقه و ریشه‌زایی شاه‌بلوط بود اما این محیط در مقایسه با دیگر محیط‌های آزمایش شده توسط آنها، شیشه‌ای شدن[۱] شدیدتری را ایجاد نمود [۱۰]. Liu و همکاران (۲۰۲۲) در ریز ازدیادی درخت شاه‌بلوط آمریکایی (*Castanea dentata* (Marsh.) Borkh)، بیشترین پرآوری (تکثیر) را در کشت‌های رشد یافته در محیط پایهٔ DKW در مقایسه با محیط‌های پایهٔ MS و WPM مشاهده کردند [۱۱]. Roussos و همکاران (۲۰۱۶)، اثر پنج سیتوکینین مختلف شامل بنزیل‌آدنین، ۲-ایزوپنتیل‌آدنین، کینتین، فورکلرفنورون و تیدیازورون را در سه غلظت متفاوت، بر روی ریز نمونه‌های شاه‌بلوط اروپایی بررسی کردند و نشان دادند که بنزیل‌آدنین در غلظت ۲ میکرومولار، موثرترین سیتوکینین بود و بیشترین شاخساره (ساقه+جوانهٔ جانبی و برگ‌ها) و تعداد گره را

[۱] هیپرهیدریسیتی یا شیشه‌ای شدن پدیده‌ای است که در آن بافت‌ها مقدار زیادی آب جذب می‌کنند. بافت‌ها پرآب و متورم و شاخه‌های آنها شیشه‌ای و نیمه‌شفاف می‌شوند.

به‌وجود آورد [۱۲]. موفقیت در استقرار ریز نمونه‌های شاه‌بلوط، به‌شدت تحت تأثیر عوامل مختلف مانند نوع محیط کشت و بنابراین نوع و غلظت مواد شیمیایی آن، نوع و نحوهٔ ضدعفونی ریز نمونه‌ها، تعداد و فاصلهٔ زمانی واکشت‌ها قرار می‌گیرد. این تحقیق به جهت اختلال بیماری برای درخت شاه‌بلوط از اهمیت زیادی برخوردار است. چون تجدید حیات طبیعی در این درخت تک پایه انجام نمی‌شود، به این علت تکثیر غیرجنسی (مطالعه برای تعدیل و بهره‌وری آن)، از اهداف این مطالعه است. از این‌رو، این پژوهش، به ارزیابی و تعیین مناسب‌ترین محیط کشت گیاهی برای استقرار ریز نمونه‌ها در تکثیر درون شیشه‌ای درخت شاه‌بلوط پرداخت.

۲. روش‌شناسی پژوهش

۲-۱. منطقهٔ مورد مطالعه

بذرهای استفاده شده در این تحقیق به‌صورت تصادفی از منابع مختلف از منطقهٔ ویسرود شفت تهیه شدند تا احتمال قرابت ژنتیکی به کمترین مقدار خود برسد. بذرها در دو سال متوالی، مطالعه و از لحاظ جوانه‌زنی و سلامت بذرها مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). ریز نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش از رشد جوانه‌های جانبی گیاهان بذری یکساله درخت شاه‌بلوط، پرورش یافته در شرایط استریل آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی منطقهٔ شمال کشور (گیلان، رشت) تهیه شدند

جدول ۱. وضعیت سلامت بذرها در دو سال مختلف مطالعه

تعداد بذرهای ناسالم	تعداد جوانه‌زده	میانگین وزن بذر (گرم)	تعداد بذر	وزن کل بذور
۱۴۰	۱۷۵	۶/۳۴	۳۱۵	۲ کیلوگرم
۱۱۳	۵۰	۶/۱۳	۱۶۳	۱کیلوگرم

محیط کشت‌های استفاده شده عبارت بودند از محیط MS با نصف غلظت نیتروژن با سه ترکیب هورمونی مختلف محیط DKW و GD هر یک همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آدنین (جدول ۲). هر سه محیط، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار و pH= ۵/۷ را شامل می‌شدند.

جدول ۲. محیط پایه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بکار رفته در آنها

محیط کشت پایه	نوع و غلظت تنظیم کننده رشد
MS	MSTB [BA (1mg/L) + TDZ (0.1 mg/L)] MSG [GA3 (1mg/L) + BA (0.1 mg/L)] MST [TDZ (0.5mg/L)]
DKW	BA (1mg/L)
GD	BA (1mg/L)

۲-۲. روش‌شناسی پژوهش

به‌منظور ضدعفونی کردن ریزنمونه‌ها، ابتدا آنها را به‌مدت ۴۵ دقیقه در زیر آب روان با چند قطره دترجنت شستشو داده، سپس ضدعفونی ریز نمونه‌ها در زیر هود در سه مرحله انجام پذیرفت. در اولین مرحله، ریزنمونه‌ها به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانول هفتاد درصد غوطه‌ور شدند، سپس ۱۵ دقیقه در محلول حاوی ۱ درصد سفید کنندهٔ تجاری (۵ درصد در لیتر کلر فعال) همراه با دو قطره توئین قرار گرفتند و در مرحلهٔ آخر، چهار بار با آب اتوکلاو شده هر بار به‌مدت سه دقیقه شستشو شدند. پس از ضدعفونی و آبکشی، ریز نمونه‌ها به محیط کشت‌های تهیه شده منتقل شدند. پس از سه هفته کشت در لوله‌های آزمایش، ریزنمونه‌ها برای رشد بیشتر ساقه‌ها در شیشه‌های دیگری حاوی همان محیط‌ها واکشت شدند. کشت‌های درون شیشه‌ای در یک اتاقک رشد در

دمای ۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد با دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. رشد شاخساره ریز نمونه‌های اولیه شش هفته پس از کشت مشاهده شد. پس از گذشت ۹ هفته، تعداد شاخه‌های ظهور یافته روی هر ریز نمونه و طول آنها و همچنین تعداد برگ‌ها ثبت شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار با تعداد ریزنمونهٔ متفاوت برای هر تیمار انجام پذیرفت. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف–اسمیرنوف و همگنی واریانس داده‌ها با آزمون لون مورد ارزیابی قرار گرفت. در برخی داده‌ها که نرمال نبودند از تبدیل داده استفاده شد. برای بررسی معنی‌داری از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای مقایسهٔ میانگین‌ها از آزمون توکی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۲ در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد.

۳. یافته‌های پژوهش و بحث

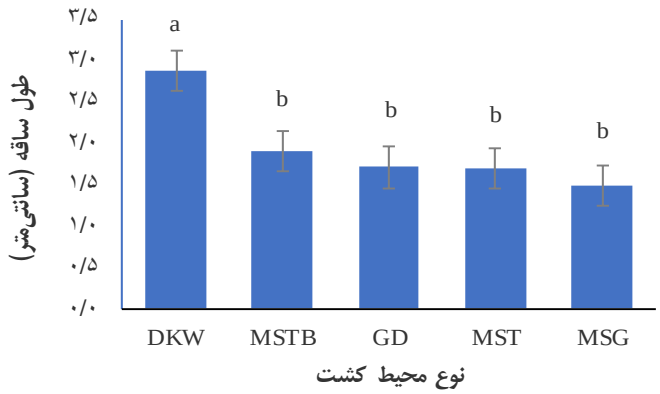
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌دار بین محیط‌های بکار رفته از نظر طول ساقه وجود دارد. اما تفاوت معنی‌داری در تعداد ساقه و تعداد برگ مشاهده نشد. بیشترین تعداد ساقه و برگ نیز در محیط DKW با یک میلی‌گرم BA مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۳. آنالیز واریانس صفات مورد بررسی

متغیرها	منبع تغییرات	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع مربعات	F	سطح معنی‌داری
طول ساقه	بین گروه‌ها	۳/۷۶۵	۴	۱۵/۰۶۱	۴/۰۱۹	۰/۰۰۵**
	درون گروه‌ها	۰/۷۹۳	۷۶	۶۰/۲۹۱		
تعداد برگ	بین گروه‌ها	۱۳/۴۲۰	۴	۵۳/۶۷۹	۲/۴۸۷	۰/ ۰۵ n.s
	درون گروه‌ها	۵/۶۷۰	۷۶	۴۳۰/۹۲۴		
تعداد ساقه	بین گروه‌ها	۰/۴۴۲	۴	۱/۷۷۰	۰/۷۶۴	۰/۵۵۲ n.s
	درون گروه‌ها	۰/۶۶۱	۷۶	۵۰/۲۳۰		

ns نبود اختلاف معنی‌دار و ** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

نتایج مقایسهٔ میانگین حاصل از محیط کشت پایه بر طول ساقه با استفاده از آزمون توکی در شکل ۱ ارائه شده است. براساس نتایج، بین محیط‌کشت‌ها اختلاف معنی‌داری در طول ساقه وجود داشت.



شکل ۱. نمودار مقایسه میانگین طول ساقه (میانگین‌های با حروف مشابه تفاوت معنی‌دار ندارند)

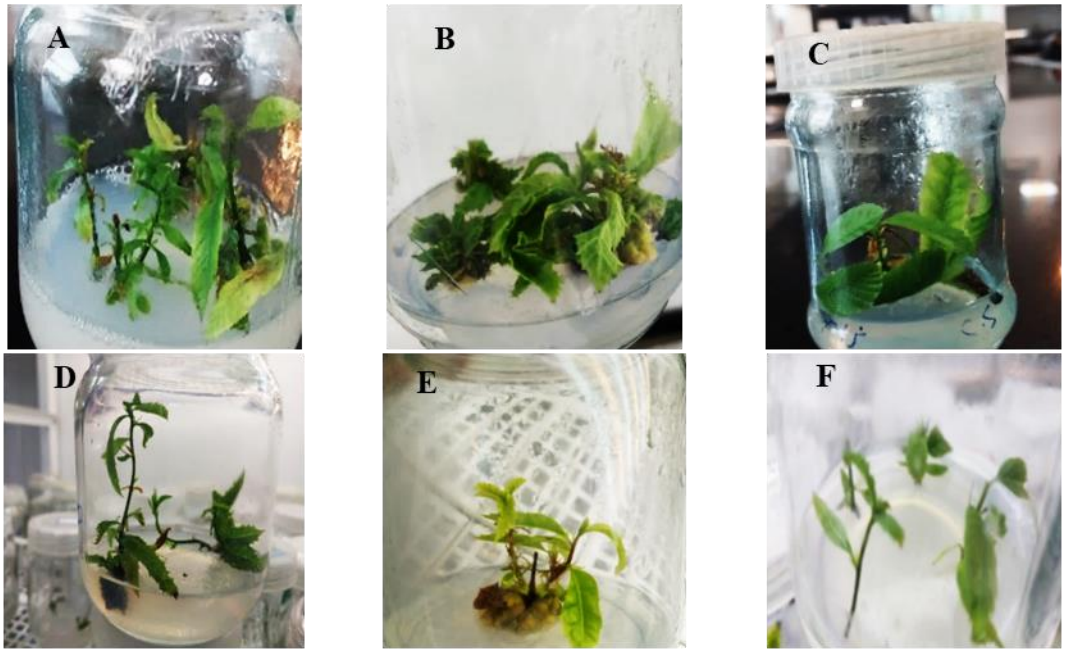
بیشترین مقدار طول ساقه با بکارگیری محیط کشت DKW (با میانگین ۲/۸۷ سانتی‌متر) مشاهده شد (جدول۴). بیشترین مقدار طول ساقه بعد از DKW به‌ترتیب در محیط کشت‌های MSTB (با میانگین ۱/۹۱ سانتی‌متر)، GD (با میانگین ۱/۷۱ سانتی‌متر)، MST (با میانگین ۱/۶۹ سانتی‌متر) و کوتاه‌ترین طول ساقه، در محیط کشت MSG (با میانگین ۱/۴۸ سانتی‌متر) به‌دست آمد. بیشترین تعداد ساقه (۱/۷۲) در محیط DKW و کمترین آن (۱/۲۵) در محیط MSTB مشاهده شد. بیشترین تعداد

برگ (۵/۰۶) در محیط DKW و کمترین آن (۲/۹۵) در محیط MSG مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ٤. آمارهای توصیفی متغیرهای طول ساقه تعداد برگ و ساقه

محیط کشت	انحراف معیار ± میانگین صفات مورد مطالعه		
	طول ساقه (سانتی‌متر)	تعداد برگ	تعداد ساقه
MSTB	۱/۹۱±۱/۰۵	۴/۶۰±۲/۳۹	۱/۲۵±۰/۵۵
MST	۱/۶۹ ±۰/۴۹	۳/۵۷±۲/۲۵	۱/۴۱±۱
MSG	۱/۴۸ ±۰/۶۰	۲/۹۵±۲/۴۳	۱/۴۵±۰/۸۸
GD	۱/۷۱±۰/۵۴	۴/۸۴±۲/۳۶	۱/۵۳±۰/۶۶
DKW	۲/۸۷ ±۱/۵۶	۵/۰۶±۲/۴۷	۱/۷۲±۰/۹۰

از آنجا که دستورالعمل‌های کشت بافت گیاهی براساس ژنوتیپ، گونه‌ها و ارقام تفاوت دارند و ریزنمونه‌های شاه‌بلوط در دستورالعمل‌های مختلف واکنش متفاوتی نشان می‌دهند، در نتیجه برای استقرار هر گونه و رقم، دستورالعمل خاصی مورد نیاز است. ترکیب نمک پایه از عوامل مهم و تأثیرگذار در رشد و تکثیر اندام هوایی است. بیشتر گونه‌های درختی نهاندانگان روی محیط کشت تغییریافته MS یا WPM با ترکیبات متفاوت سیتوکنین عمدتاً BA و اکسین‌ها کشت می‌شود [۱۳]. TDZ و BAP از پرکاربردترین سیتوکنین‌های مورد استفاده در مطالعات تکثیر هستند، استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در تکثیر گیاه شاه‌بلوط با مقایسهٔ شاخه‌زایی و تعداد برگ از گیاهچه‌های به‌دست آمده می‌توان بیان کرد که نوع محیط کشت و تنظیم‌کنندهٔ رشد از جمله عوامل مؤثر و تأثیرگذار در کشت درون شیشه‌ای این گیاه است. طبق مشاهدات، رشد شاخساره‌های شاه‌بلوط کشت شده در محیط فاقد تنظیم‌کنندهٔ رشد نسبت به ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد BA، TDZ یا GA3 کمتر بود و ریزنمونه بعد از کشت، تک شاخه و کوتاه ماند (شکل ۲).



شکل۲. نمایی از ریزنمونه‌های رشدیافته در محیط‌کشت MS شامل A) MSTB؛ B) MST؛ C) MSG
D) محیط کشت DKW؛ E) محیط کشت GD و F) محیط فاقد هورمون.

در این مطالعه، از سیتوکینین‌های بنزیل‌آدنین (BA) و به‌تنهایی TDZ و تنظیم کننده رشد GA3 و یا ترکیبی از آن‌ها استفاده شد (جدول ۲). سیتوکینین BA از طریق کاهش غالبیت رأسی (جوانهٔ انتهایی) در ریزنمونه، باعث تحریک تقسیم سلولی و ازدیاد

شاخه و شکل‌گیری جوانهٔ جانبی می‌شود. در مطالعهٔ حاضر، بیشترین طول ساقه به‌ترتیب مربوط به DKW با سیتوکینین BA، محیط کشت MS با ترکیب سیتوکینین‌های TDZ+ BA (MSTB) و GD با سیتوکینین BA بود. ریزنمونه‌ها در محیط MS (نصف غلظت نیتروژن) حاوی GA3، تفاوت‌های کیفی در ظاهر ساقه و برگ نشان دادند و برگ‌های بزرگ‌تر و سبزتری تولید نمودند، اما تفاوت کمّی در آن‌ها مشاهده نشد. کمترین اثربخشی در طول اندام هوایی نیز در محیط کشت MSG با ترکیب هورمونی BA+GA3 به‌دست آمد. این نتیجه در تقابل با نتایج Kane (۲۰۰۵) بود، که در آن افزودن اکسین یا GA3 به محیط کشت، طول شاخه را افزایش می‌داد، اما این اثر به عوامل دیگری مانند غلظت سیتوکینین در محیط کشت ارتباط داشت [۱۴]. دلیل این تضاد را می‌توان به تنوع گونه و ژنوتیپ، ترکیب محیط پایه و شرایط کشت این بررسی نسبت داد. همچنین کشت‌های تیمار شده با TDZ شکل‌گیری محدود شاخه‌ها را نشان دادند (شکل ۲) و شاخه‌ها تمایل به رشد برگ‌های غیرعادی[۲] نزدیک به جوانه‌های انتهایی ریزنمونه‌ها را داشتند [۱۱]. ریزنمونه‌ها در محیط کشت DKW نسبت به MS و GD وضع ظاهری بهتری داشتند (شکل ۲). این تفاوت در ظاهر ریزنمونه در DKW را می‌توان به میزان کمتر یون‌های آمونیوم و نیترات و غلظت کل یون نسبت داد [۱۵]. محیط کشت DKW از نظر یون کلسیم، سولفور و فسفات غنی‌تر از MS است. نسبت مولی قند به نیترات در DKW بالاتر از MS است [۱۶] George و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که نسبت پایین قند به نیترات در MS، مانع جذب نیتروژن می‌شود و این دلیل ایجاد گیاهچه‌های قوی‌تر محیط پایهٔ DKW است [۱۷]. واکنش بهتر گیاهان در DKW را شاید بتوان به‌میزان ویتامین بیشتر این محیط نسبت داد. غلظت بهینهٔ تیامین در محیط MS و GD به‌ترتیب ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر است که در غلظت‌های پایین، میزان رشد کم را نشان می‌دهد و موجب نکروز شدن ریزنمونه می‌شود. Page و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که در طولانی‌مدت گیاهان کشت شده در محیط MS دچار کمبود مواد غذایی و شیشه‌ای شدن می‌شوند [۱۸]. این بررسی با نتایج Pavese و همکاران (۲۰۲۲) که MS3B و DKW را به‌عنوان بهترین محیط کشت برای استقرار ارقام ایتالیایی *Castanea sativa*، *Marrone di Castel del Rio* و *Garrone Rosso* معرفی کردند، همخوانی بیشتری داشت. آنها همچنین دریافتند که DKW منجر به نرخ تکثیر بهتر در مرحلهٔ تکثیر می‌شود. همچنین این نتیجه توسط Liu و همکاران (۲۰۲۲) در شاه‌بلوط آمریکایی که بالاترین سرعت تکثیر شاخساره را در کشت‌های رشد یافته در محیط پایهٔ DKW در مقایسه با محیط‌های MS و WPM گزارش کرده‌اند، تأیید شده است و نراقی (۲۰۰۳) نیز در درخت شاه‌بلوط رقم ایرانی، بهترین نتایج شاخه‌زایی را در محیط کشت DKW در مقایسه با محیط‌های QL و MS گزارش کرده است [۱۹].

۴. نتیجه‌گیری و پیشنهادها

با توجه به میزان زیاد بذرهای ناسالم در شاه‌بلوط بومی شمال کشور به‌دلیل آلودگی درونی و عدم جوانه‌زنی مناسب بذرهای آن، می‌توان به ضرورت ازدیاد و استقرار درون شیشه‌ای شاه‌بلوط به‌عنوان روشی کارآمد برای به‌دست آوردن گیاهان عاری از بیماری تأکید نمود. از آنجا که دستورالعمل‌های کشت بافت گیاهی براساس ژنوتیپ، گونه‌ها و ارقام تفاوت دارند و ریزنمونه‌های شاه‌بلوط به دستورالعمل‌های مختلف، واکنش متفاوتی نشان می‌دهند، در نتیجه برای استقرار هر گونه و رقم دستورالعمل خاصی مورد نیاز است. محدودیت‌های عمده‌ای که اغلب در ریزازیادی شاه‌بلوط بروز می‌نماید عبارتند از: درصد کم بقای ریزنمونه، ترشحات فنلی زیاد که مانع رشد و تکثیر شده و سرانجام به مرگ سلول‌های مجاور می‌انجامد و نیز هیپرهیدریسیتی، پدیده‌ای است که در آن بافت‌ها مقدار زیادی آب جذب نموده و بافت‌ها پرآب و متورم شده و شاخه‌های حاصل از آنها شیشه‌ای و نیمه‌شفاف می‌شوند. در بیشتر مطالعات کشت بافتی انجام شده در گیاه شاه‌بلوط، به‌دلیل قدرت تمایزیابی بالا و درصد آلودگی کمتر، از گیاهان جوان‌تر به‌عنوان ریزنمونه استفاده می‌شود، ریز نمونه‌های تهیه شده از ساقهٔ درختان بالغ، به‌دلیل آلودگی زیاد، موفقیت چندانی در استقرار نداشته یا درصد زنده‌مانی آن‌ها پایین است. حتی در جوانه‌های گیاهان یکساله گلخانه‌ای هم آلودگی بروز می‌نماید. اما مقدار آلودگی کمتر، موفقیت کشت را امکان‌پذیر می‌نماید. ترکیب نمک پایه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه، از عوامل مهم و تأثیرگذار در رشد و تکثیر اندام هوایی است. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این بررسی توصیه می‌شود برای استقرار بهتر ریزنمونه‌های شاه بلوط بومی از محیط کشت DKW با یک میلی‌گرم در لیتر BA استفاده گردد.

۵. منابع

[1] Hamidust, l., Asadi Abkenar, A., & Taheri Abkenar, K. (2023). Evaluation of Germination and Seedling Growth in Two Groups of Seeds in European Chestnut (*Castanea sativa* Mill). *13th Iranian Horticultural Science Congress*. Sept.18-21 Gorgan, Iran, pp. 1904-1907. (In Persian)

[2] Osterc, G., Fras, M.Z., Vonedik, T., & Luthar, Z. (2005). The propagation of chestnut (Castanea sativa Mill.) nodal explants. *Acta Agriculturae. Slovenica*, 85(2), 411-418.

[3] Saxena, A., Shukla, M., & Saxena, P. (2019). Synthetic seeds: Relevance to endangered germplasm conservation in vitro Synthetic Seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects, (pp. 21-60).

[4] Bi, W., Saxena, A., Ayyanath, M.M., Harpur, C., Shukla, M.R., & Saxena, P.K. (2021). Conservation, propagation, and redistribution (CPR) of Hill's thistle: Paradigm for plant species at risk. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 145(1), 75-88.

[5] Saxena, A., Bi, W.L., Shukla, M.R., Cannings, S., Bennett, B., & Saxena, P.K. (2021). Micropropagation and cryopreservation of Yukon Draba (*Draba yukonensis*), a Special Concern Plant Species Endemic to Yukon Territory, Canada. *Plants*, 10(10), 2093.

[6] Cheong, E. J., & An, C. (2015). Effect of carbohydrates on in vitro shoot growth of various Prunus species. *Korean J. Plant Res*, 28(3), 357-362.

[7] Vieitez, A.M., & Vieitez, M.L. (1983). Castanea sativa plantlets proliferated from axillary buds cultivated in vitro. *Scientia Horticulturae*, 18(4), 343-351.

[8] Pavese, V., Ruffa, P., Abbà, S., Costa, R.L., Corredoira, E., Silvestri, C., Torello Marinoni, D. & Botta, R. (2022). An In Vitro Protocol for Propagating Castanea sativa Italian Cultivars. *Plants*, 11(23), 3308.

[9] Algül, B., & Dalkılıç, G. (2013). Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in semi-solid culture. In II European Congress on Chestnut, October, *Acta Horticulturae*, 1043(1043), 205-209.

[10] Vieitez, A. M., Ballester, A., Luisa Vieitez, M., & Vieitez, E. (1983). In vitro plantlet regeneration of mature chestnut. *Journal of Horticultural Science*, 58(4), 457-463.

[11] Liu, Z., Bi, W. L., Shukla, M.R., & Saxena, P.K. (2022). In vitro technologies for American chestnut (*Castanea dentata* (Marshall) Borkh) conservation. *Plants*, 11(3), 464.

[12] Roussos, P., Archimandriti, A., Beldekou, I. (2016), Improving in vitro multiplication of juvenile European chestnut (*Castanea sativa* Mill) explants by the use of growth retardants, *Scientia Horticulturae*, 198, 254-256.

[13] Bonga. J.M., & von Aderkas, P. (2008) Invitro culture of trees, Translated by, Bagheri, A., Ziaratnia, M., & Hosseini, M. Ferdowsi University of Mashhad Press, Mashhad.

[14] Kane, M.E. (2005). Shoot culture procedures. CRC Press LLC: Boca Raton, FL, USA

[15] Saadat, Y.A., Rasti, O., & Zamani, J. (2012). Effects of different growth regulators, nutrient media, gelling agents and carbohydrate sources on shoot multiplication of *Pyrus glabra* Boiss. Iranian *Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 20(1), 83-96. (In Persian)

[16] Halstead, M.A., Garfinkel, A.R., Marcus, T.C., Hayes, P.M., & Carrijo, D.R. (2022). Hemp Growth in Vitro and in Vivo: A Comparison of Growing Media and Growing Environments across 10 Accessions. *HortScience*, 57(9), 1041-1047.

[17] George, E.F., Hall, M.A., & De Klerk, G.J. (2007). *Plant propagation by tissue culture, 3rd edn Dordrecht, Springer.*

[18] Page, S.R., Monthony, A.S., & Jones, A.M.P. (2021). DKW basal salts improve micropropagation and callogenesis compared with MS basal salts in multiple commercial cultivars of *Cannabis sativa*. *Botany*, 99(5), 269-279.

[19] Naraghi, T.S. (2003). Asexual regeneration of *Castanea sativa* (chesnut) by shoot tip culture. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 10(1), 69-89. (In Persian)