10.22092/im.2018.116114

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۰۹/۰۲
تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۱۱/۱۵

نامه‌علمی

راهکارهای کلیدی برون‌رفت از مشکلات «ریزازدیادی» درختان جنگلی

میترا امام*

چکیده

جنگل‌ها، سرمایه‌های ملی هر کشور محسوب می‌شوند که حفاظت و استفاده صحیح از آنها، علاوه‌بر کسب درآمد، بقای محیط‌زیست را نیز تضمین می‌کند. گونه‌های گیاهی بومی، ذخایر توارثی ژنتیکی منحصربه‌فرد، بااهمیت و ارزشمند هر کشوری هستند که دلیل آن، دارا بودن بعضی از صفات مرفولوژیکی برتر و سازگار به شرایط محیطی، مخصوصاً مقاومت آنها در مقابل آفات و امراض و عوامل نامساعد محیطی است. این امر تکثیر و حفاظت گونه‌های در معرض خطر را به یک امر حیاتی تبدیل کرده و لزوم استفاده از روش‌هایی که با سرعتی بیش از روش‌های سنتی، پاسخگوی نیاز روزافزون کشت و تکثیر است، احساس می‌شود. درختان بالغی که در طول سالیان دراز عمر خود توانسته‌اند بقای خود را در شرایط مختلف جوی، حمله آفات و امراض و شرایط نامناسب محیطی تحمل کنند، گنجینه‌های گران‌بهایی از ذخایر ژنتیکی محسوب می‌شوند. کشت بافت ابزاری است که می‌تواند گونه‌های درختان جنگلی در معرض انقراض را که در شرایط طبیعی قادر به تکثیر نیستند، از خطر نابودی نجات دهد. با استفاده از این روش بیوتکنولوژیکی می‌توان با تکثیر انبوه گیاهان در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاه و سپس کشت آنها در عرصه‌های طبیعی، در حفظ گونه‌های جنگلی در حال زوال مؤثر بود؛ به‌طوری‌که در آزمایشگاه کشت بافت گروه زیست‌فناوری مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور در طی سه دهه اخیر حدود ۳۱ گونه جنگلی در معرض خطر، از طریق ریزازدیادی تکثیر انبوه شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: درخت جنگلی، در معرض خطر، ریزازدیادی، راه حل

Key solutions for the problems of forest trees micropropagation

M. Emam*

Abstract

Forests are the national capital of each country, whose protection and proper use of them, in addition to earning money, ensures the survival of environment. The endemic plant species are unique genetic reserves of each country due to the having some superior morphological traits adapted to environmental conditions, particularly their resistance to pests and diseases and unfavorable environmental factors. This makes the proliferation and protection of endangered species a vital issue; therefore, the need to use the methods that could meet the growing need for cultivation and proliferation is felt. Mature trees that have been able to withstand their survival in various atmospheric conditions, pests and diseases attack, and inadequate environmental conditions over the years are valuable treasures of genetic reserves. Tissue culture is a tool that can save the endangered tree species, which are not capable of reproduction. This biotechnological method could be effective in preserving endangered forest species through proliferation of species under laboratory controlled conditions and then cultivation in natural arenas. During the three late decades, around 31 endangered forest species have been propagated through micropropagation in the tissue culture laboratory of biotechnology department of Research Institute of Forests and Range lands.

Keywords: Forest tree, endangered, micropropagation, solution

* استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
پست الکترونیک: memam@rifr-ac.ir

* Corresponing author, Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, Email: memam@rifr-ac.ir

مقدمه

تکثیر کلونی (سلول‌های مشابه که از طریق غیرجنسی به‌وجود آمده‌اند) در شرایط درون‌شیشه‌ای را «ریزازدیادی» می‌گویند. تکثیر کلونی مشکلات خاصی دارد، اما این کار در تمام طول سال انجام‌شده و هزینه آن در درازمدت مقرون‌به‌صرفه است و انتقال گیاهان از محلی به محل دیگر در شرایط درون شیشه‌ای راحت‌تر صورت می‌پذیرد. ازجمله مزایای دیگر کشت بافت می‌توان به صرفه‌جویی در هزینه‌های سوخت، فضای گلخانه‌ای، بسترهای تکثیر، امکان دست‌ورزی ژنتیکی و باززایی گیاهان، فراهم آوردن بانک‌های ژن گیاهی، تولید فراورده‌های ثانویه، نیاز به مقادیر کم مواد اولیه در ابتدای کشت و تولید گیاهان عاری از بیماری (ویروس، باکتری و قارچ) اشاره کرد. عاری بودن نهال از بیماری‌ها (ویروس، باکتری و قارچ) و اثرات باقی‌مانده مواد تنظیم‌کننده رشد در بافت‌های نهال به سرعت رشد آنها کمک کرده و هزینه‌های قرق جنگل در مقابل وحوش و دام را کاهش می‌دهد.

با توجه به تغییرات اقلیمی نظیر گرمایش زمین و خشکسالی‌های پیاپی به همراه دخالت‌های بی‌رویه انسان در تخریب همه‌جانبه طبیعت که منجر به از دست رفتن عرصه‌های زیادی از منابع طبیعی کشور شده است، تعداد زیادی از گونه‌های ارزشمند جنگلی و مرتعی در آستانه انقراض قرار گرفته‌اند و لزوم تکثیر و احیای این گیاهان در اسرع وقت و با سودمندترین تکنیک احساس می‌شود. یکی از این روش‌ها، تکثیر انبوه درختان جنگلی در معرض خطر از طریق ریزازدیادی است.

ازجمله چالش‌های ریزازدیادی در عرصه‌های طبیعی، کلون‌سازی و انتقال آن به جنگل است. این کار نباید به قیمت زیر پا گذاشتن قوانین حاکم بر توازن طبیعی موجود در بین اجزای اکوسیستم جنگل باشد. برای این منظور باید ژنوتیپ‌های مختلف از پایه‌های گیاه موردنظر از مناطق و ژنوتیپ‌های مختلف و متنوع چندین منطقه رویشگاهی، از طریق کشت بافت تکثیر شده و با حفظ تنوع ژنتیکی در حد ممکن و قابل قبول، به عرصه انتقال یابد. علاوه‌بر آن که در مورد گیاهان در معرض خطر و در حال انقراض که دارای پایه‌های محدود در عرصه هستند، ایجاد کلون از آن درختان، برای حفاظت و احیای پایه‌های موجود این گونه‌ها، بسیار ارزشمند است. همچنین گونه‌های نادر و کمیاب که مشکل تکثیر از طریق سایر روش‌ها را داشته یا فاقد بذر هستند و اکوتیپ‌های خاص مثل گیاهان دارویی یا گونه‌های برتر و دارای اهمیت اقتصادی مثل گیاهان سریع‌الرشد (صنوبر و اوکالیپتوس) از این قاعده مستثنی هستند. ریزازدیادی فرصتی برای احیا و حفاظت از این گونه‌ها فراهم ساخته و صرف هزینه‌های بالا و سایر اشکالات احتمالی برای انجام تکثیر اجباری از طریق کشت بافت را توجیه می‌کند.

اقدامات و یافته‌ها

از نظر تکنیکی، ریزازدیادی دارای ۵ مرحله است که عبارتند از:

مرحله صفر ریزازدیادی یا سترون‌سازی سطحی: در این مرحله برداشت قطعاتی از اندام‌های رویشی گیاه نظیر جوانه، سرشاخه، گره، برگ و... صورت می‌گیرد. با توجه به قرار گرفتن این درختان در عرصه (جنگل، مرتع و غیره) و آلودگی سطحی اندام‌ها به انواع پاتوژن‌های محیطی، هدف این مرحله، حذف آلودگی‌های نمونه بدون صدمه زدن به بافت گیاه است. برای این منظور استفاده صحیح و به‌موقع از محلول‌های سترون‌کننده مختلف مانند انواع قارچ‌کش‌ها، ترکیبات کلردار نظیر کلرید جیوه، هیپوکلریت سدیم و غیره به‌گونه‌ای که بدون صدمه زدن به بافت گیاه، نمونه را از هرگونه آلودگی سطحی پاک کرده و آماده استقرار در محیط کشت کند، ضروری است (Enjarlic,1988). قابل ذکر است که سن و سال پایه مادری، محل قرارگیری نمونه روی پایه، فصل برداشت نمونه و مختصات جغرافیایی و اکولوژیکی رویشگاه گیاه موردنظر، می‌تواند در نحوه اجرای مراحل سترون‌سازی مؤثر باشد.

از مشکلات این مرحله می‌توان به درگیر بودن نمونه‌های کشت‌شده با آلودگی نهان یا داخلی و نیز قهوه‌ای شدن (Browning) نمونه‌ها بر اثر ترشح مواد فنولی از آن اشاره کرد. آلودگی نهان یا داخلی با تیمار شیمیایی برطرف نشده و منجر به رشد ضعیف یا کلروز بافت‌ها می‌شود. این آلودگی‌ها اغلب بر اثر باکتری‌های میله‌ای‌شکل ایجاد می‌شود. دو راه برای مبارزه با این آلودگی پیشنهاد می‌شود: استفاده از آنتی‌بیوتیک در محیط کشت و کشت مریستم. لازم به ذکر است که به کار بردن آنتی‌بیوتیک به‌دلیل ایجاد مقاومت در باکتری‌ها، هزینه زیاد و ایجاد سمیت گیاهی، در بیشتر موارد توصیه نمی‌شود (Meynier, 1989). برای حذف مواد فنولی استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌های مختلف نظیر اسیدآسکوربیک، زغال فعال، PVP و اسیدسیتریک در ترکیب محیط و بازکشت مکرر نمونه و استفاده از محیط کشت مایع می‌توانند راه‌حل‌های مناسبی باشند (Driver, 1984).

عاری بودن نهال از بیماری‌ها (ویروس، باکتری و قارچ) و اثرات باقی‌مانده مواد تنظیم‌کننده رشد در بافت‌های نهال به سرعت رشد آنها کمک کرده و هزینه‌های قرق جنگل در مقابل وحوش و دام را کاهش می‌دهد.

در مورد نمونه‌های گرفته شده از نهال‌های جوان، میزان آلودگی سطحی کمتر از درختان مسن است. از طرفی هرچه منطقه اقلیمی گیاهان دارای رطوبت بیشتری باشد، درجه آلودگی بالاتر خواهد بود (Enjarlic,1988). زمان برداشت مواد نیز بر میزان آلودگی مؤثر است، به‌طوری‌که در فصل زمستان بیشترین میزان آلودگی روی سطح درختان وجود دارد. گاهی برای رفع آلودگی نمونه‌های گیاهی به آفات و بیماری‌ها (حشرات و قارچ‌ها)، نیازمند کاربرد حشره‌کش یا قارچ‌کش خواهیم بود، ولی مطمئن‌ترین راه برای حذف تمامی عوامل بیماری به‌خصوص ویروس‌ها، کشت مریستم انتهایی گیاه است. برای نمونه، در

شکل ۱- مراحل ریزازدیادی گیاه *Amygdalus scoparia* تا انتقال به خاک

مورد بذری که با لایه فلس احاطه شده است، استفاده از روش‌های سترون کردن نظیر شعله‌دهی، پوسته‌برداری و نیز استفاده از محلول پراکسید هیدروژن یا کلرید جیوه برای حذف آلودگی‌ها بدون صدمه زدن به بافت گیاه، معمول است. ولی برای بافت‌های حساس و بدون لایه محافظ، مثل برگ یا ساقه، استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم یا کلسیم رقیق شده با آب مقطر به‌دنبال شست‌وشوی الکلی نمونه‌ها توصیه می‌شود. اتانول، موم‌های هیدروفوبیک و رزین‌ها را که محافظ میکروارگانیسم‌ها هستند حذف کرده و خود نیز در نقش یک ضدعفونی‌کننده در حذف آلودگی‌ها مؤثر است (Enjarlic,1988). گاهی از روش‌های تلفیقی کاربرد دو محلول سترون‌کننده به‌دنبال یکدیگر برای حذف آلودگی‌ها استفاده می‌شود. برای مثال شاخه‌های *Pseudotsuga menziesii* بالغ با دو محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد و کلرید جیوه ۰/۰۵ درصد در پی یکدیگر ضدعفونی شدند (Gupta & Durzan, 1985). گاهی استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم در حین ضدعفونی نمونه‌ها به بافت نمونه صدمه می‌زند. در این مواقع ضدعفونی‌کننده دیگری مانند محلول کلرید جیوه توصیه می‌شود. این محلول در حذف نمونه‌های پاتوژن به‌طور مؤثرتری عمل می‌کند و علت آن، جذب راحت‌تر توسط بافت گیاه نسبت به سایر محلول‌های ضدعفونی است (Paranjothy, 1987). امام و همکاران (۱۳۹۰) برای حذف آلودگی‌های سطحی شاخه‌های گیاه جنگلی تیس (شکل۵) که از آلودگی زیادی برخوردار است، در تمام فصول سال از این محلول استفاده کردند.

برای حذف حباب‌های هوا و نفوذ بهتر محلول‌های ضدعفونی بر بافت گیاه تمام مراحل سترون‌سازی باید به‌طور منظم و با هم‌زدن صورت گیرد. در فواصل مراحل ضدعفونی، شست‌وشوی مداوم نمونه‌ها با آب سترون صورت می‌گیرد تا ضمن حذف آلودگی‌ها، بقایای مواد سترون‌کننده را نیز از بافت نمونه خارج سازد. گاهی برای تکمیل سترون از محلول‌های قارچ‌کش نظیر بنومیل یا آنتی بیوتیک‌های گیاهی نظیر سفوتاکسیم یا ریفامپیسین استفاده می‌شود (Haldeman, 1987). آلودگی‌های درون‌زا که معمولاً در بافت‌های درختان جنگلی مسن‌تر وجود دارد با کاربرد آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر سفوتاکسیم در ساختار محیط کشت قابل حذف هستند. در کشت جوانه درختان بالغ گردوی ایرانی (*Juglans regia*) این روش به همراه واکشت مکرر در حذف پاتوژن‌های درونی مؤثر بود (امام و همکاران، ۱۳۷۴). البته این روش پرهزینه بوده و استفاده از محیط کشت مایع به جای جامد، مقرون‌به‌صرفه‌تر است. آنتی‌بیوتیک‌ها در حذف میکروارگانیسم‌های غیرمضر تأثیر منفی دارند.

برای بافت‌های حساس و بدون لایه محافظ، مثل برگ یا ساقه، استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم یا کلسیم رقیق شده با آب مقطر به‌دنبال شست‌وشوی الکلی نمونه‌ها توصیه می‌شود.

برش‌دهی و انتقال بافت‌ها به محیط کشت: ریزنمونه می‌تواند جنین، جوانه، لپه، شاخه و سرشاخه باشد. قطعات سترون‌شده گیاه با اسکالپل تیز، برش‌دهی و روی پتری دیش

شکل۲- مراحل ریزازدیادی گیاه *Ulmus carpinifolia* تا انتقال به خاک

شکل۳- مراحل ریزازدیادی گیاه *Eucalyptus grandis* تا انتقال به خاک

یا کاغذ صافی سترون و سپس روی محیط کشت قرار می‌گیرد. قابل توجه است که ابزار مورد استفاده در حین کشت همگی سترون بوده و عملیات در درون دستگاه هود لامینار انجام می‌شود. ابزار نباید داغ باشند تا نمونه‌های گیاهی دچار سوختگی نشوند. به‌دلیل خطرات آتش و آتش‌سوزی، به‌جای شعله‌دهی روی چراغ الکلی، بهتر است از دستگاه Beat strilyzer استفاده شود. قهوه‌ای شدن بافت در حین برش‌دهی پیش می‌آید (به‌دلیل ترشح پلی‌فنول اکسیداز از بافت صدمه‌دیده) که با استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها در ترکیب محیط کشت و نیز غوطه‌وری نمونه در محلول تا زمان انتقال آن به محیط، می‌توان این مشکل را حل کرد. کاهش میزان شکر محیط، افزودن گلوتامین به محیط یا نگهداری کشت‌ها در تاریکی تا حدودی پدیده قهوه‌ای شدن را کنترل می‌کند (Cormier, 1990). نحوه قراردهی ریزنمونه در محیط کشت بر رشد و تکثیر آن، اثر قابل توجهی دارد، به‌طوری‌که کشت مایل شاخه و قراردهی معکوس جنین در محیط کشت بر تحریک شاخه‌زایی مؤثر خواهد بود (Aitken, 1988). قهوه‌ای شدن بافت در کشت کالوس همراه با افزایش سنتز پروتئین و نشاسته و کاهش تولید اتیلن پیش می‌آید (Lindfors, 1990). زغال فعال با جذب ترشحات فنولی در حذف این پدیده مؤثر بوده ولی تأثیر منفی آن بر جذب هورمون‌های رشد است. روش متداول دیگر برای حذف این ترشحات، بازکشت‌های مکرر و متوالی ریزنمونه‌ها در محیط کشت است. در کشت جوانه درختان بالغ (*Eucalyptus globulus*)، امام و همکاران (۱۳۸۹) از این روش برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن نمونه‌ها (شکل ۴) استفاده کردند. در مورد گیاه بادام کوهی (*Amygdalus scoparia*) استفاده از ترکیب PVP به‌عنوان آنتی‌اکسیدان برای جذب ترشحات فنولی گیاه (شکل ۱) در محیط کشت مؤثر بود (امام و همکاران، ۱۳۸۴).

مرحله اول ریزازدیادی یا استقرار نمونه در محیط، همراه با شروع رشد و تکثیر نمونه در محیط کشت مناسب، واجد تنظیم‌کننده‌های رشد است. بدیهی است در این مرحله استفاده از تجارب سایر محققان در گونه‌های مشابه با گیاه مورد تحقیق می‌تواند ایده اولیه روش تکثیر را به محقق ارائه کند.

مرحله دوم، هدایت مراحل رشد نمونه برای رسیدن به اهداف موردنظر شامل ایجاد شاخه و رشد طولی مناسب آن و درنهایت تکثیر شاخه‌های متعدد است. این امر با کاربرد متوازن هورمون‌های رشد در محیط کشت مناسب محقق می‌شود؛ به‌نحوی که نسبت بالاتر سیتوکنین به اکسین در محیط کشت، بافت را به‌سمت شاخه‌زایی و نسبت عکس آن به‌سمت ریشه‌زایی هدایت می‌کند.

در این مرحله مشکلات مرسومی نظیر شیشه‌ای شدن (Vitrification)، پرپشت یا رزتی شدن شاخه (Rossete) و نزدیکی گره‌های ساقه به یکدیگر وجود دارد. شاخصه شیشه‌ای شدن یک ظاهر آبکی، شفاف و متورم ساقه و شاخه‌های گیاهک‌ها است. برگ‌های شیشه‌ای، فاقد بافت نردبانی سالم ولی با مزوفیل دارای فضاهای بین سلولی بزرگ هستند. موم سطح کوتیکول نازک شده و روزنه‌ها به تعداد کم و دارای عملکرد ناقص‌اند. شاخه‌های شیشه‌ای همیشه مشکل انتقال به خاک را دارند. برای رفع این مشکل کاهش نمک‌های کلرید، آمونیوم و نیترات تا نصف غلظت عادی در محیط، کاهش تنظیم‌کننده‌های رشد به‌ویژه BA در محیط، کاهش بخار آب و اتیلن در

شکل۴- مراحل ریزازدیادی گیاه *Eucalyptus globulus* تا انتقال به خاک

اتمسفر بالای کشت، جایگزینی گلوتامین با کلسیم نیترات و افزودن ژل‌رایت به جای آگار در محیط کشت ازجمله روش‌های مثبت است. امام و همکاران (۱۳۷۹) در ریزازدیادی اوجا (*Ulmus carpinifolia*)، برای رفع مشکل شیشه‌ای شدن شاخه‌های کشت بافتی، از کاهش غلظت نیترات‌های محیط کشت تا نصف میزان عادی و کاهش غلظت هورمون BA (شکل ۲) استفاده کردند.

در مورد رزتی شدن، تغییر محیط کشت و تعویض هورمون‌های سیتوکنینی و استفاده از هورمون ژیبرلیک اسید ازجمله راه حل‌ها است (Evers, 1988). در مورد گیاه کیکم (*Acer cineracens*) نیز مشکل رزتی شدن شاخه با کاربرد هورمون GA در تلفیق با سایر هورمون‌های سیتوکنینی برطرف شد (امام و همکاران، ۱۳۸۵).

مرحله سوم، تحریک شاخه‌های با رشد طولی مناسب برای ریشه‌دار شدن و وصل شدن به ریشه‌هایی با آناتومی صحیح از لحاظ تارهای کشنده و فعال بودن آن است. گاهی لازم است در مورد بعضی گیاهان تحریک ریشه‌دهی گیاه با تزریق CO_2 بیشتر برای ماده‌سازی گیاه از طریق فتوسنتز و درنتیجه تلاش برای جذب بیشتر آب از اندام تحتانی و توسعه ریشه آن صورت گیرد. سیستم اتوتروف به انجام این هدف کمک می‌کند. چالش این مرحله مقاومت گیاه در برابر ریشه‌دهی یا نبود ریشه‌دهی مناسب گیاه کشت بافتی (Mcclealand, 1990) است. راه‌حل‌های این مشکل عبارتند از: دست‌ورزی در ترکیب محیط کشت نظیر کاهش ماکروالمان‌ها مثل ماکرونیترات‌ها (Curir, 1990)، کاهش یا حذف سوکروز، استفاده از زغال فعال یا دوره تاریکی کوتاه‌مدت تا شروع ریشه‌زنی، حذف آگار و استفاده از نگهدارنده‌های فیزیکی مناسب در محیط کشت مایع مثل پل کاغذ صافی یا ترکیب خاک سترون، استفاده از سیستم اتوتروف با افزایش غلظت CO_2 در انکوباتورهای (اطاقک) رشد، استفاده از محیط کشت بدون هورمون قبل از تیمار ریشه‌زایی برای حذف تأثیر سیتوکنین‌های مرحله شاخه‌زایی و نیز تیمارهای غوطه‌وری کوتاه‌مدت در محلول غلیظ اکسین و انتقال به محیط بدون هورمون. در مورد گیاه تیس (*Sorbus aucoparia*) مشکل ریشه‌دهی سخت گیاه با کاربرد سیستم اتوتروف (شکل۵) و افزایش غلظت CO_2 در انکوباتورهای رشد به همراه استفاده از محیط کشت سوسپانسیون تلفیقی با ورمیکولایت برطرف شد (امام و همکاران، ۱۳۹۱).

مرحله چهارم، پس از وصول به گیاهچه کشت بافتی مناسب، مرحله انتقال گیاه از شرایط درون‌شیشه (*In vitro*) به خارج از شیشه (*Ex vitro*) و طی مراحل سازگاری تدریجی گیاه با شرایط محیط بیرون از شیشه تا انتقال آن به شرایط گلخانه و درنهایت عرصه است. این مرحله حساس و بحرانی بیشترین تلفات گیاه را به همراه دارد و تعیین‌کننده نهایی موفق بودن پروتکل ریزازدیادی گیاه است.

ازجمله چالش‌های این مرحله، فقدان سازگاری مناسب گیاه کشت بافتی با شرایط خارج از شیشه است. گیاهچه‌های حاصل از تکثیر در شرایط درون‌شیشه‌ای، در یک جو اشباع از بخار آب بوده و زمانی که به گلخانه طبیعی یا شرایط مزرعه منتقل می‌شوند، به‌سرعت پژمرده می‌شوند. آب از طریق برگ‌های گیاه، از دست رفته (به‌دلیل فقدان موم پی‌کوتیکولی) و آب در دسترس ریشه‌ها نیز به‌دلیل صدمه‌ای که در حین انتقال گیاه پیش می‌آید، محدود می‌شود. روزنه‌ها تحریک‌پذیر نبوده و کاهش رسوب سلولز و لیگنین در این گیاهچه‌ها باعث کاهش فشار دیواره سلولی شده که خود منجر به افزایش آب در سلول‌ها و تورژسانس مصنوعی در برگ‌ها و روزنه‌ها می‌شود. سوکروز محیط کشت (به‌عنوان منبع غذایی) منجر به رشد سریع گیاه و درنتیجه کاهش فتوسنتز در برگ‌ها می‌شود. زیرا گیاه با دسترسی آسان به قند در درون محیط کشت، برای غذاسازی از طریق فتوسنتز خود را به زحمت نمی‌اندازد. مشکل دیگر در حین انتقال گیاه از درون محیط کشت به خارج آن، به دلیل وجود آگار در محیط کشت جامد است که در لابه‌لای تارهای کشنده ریشه جای گرفته و در درازمدت منجر به غیرفعال کردن ریشه در جذب آب از خاک می‌شود. بنابراین باید به محض تندش ریشه در درون محیط کشت و پیش از طویل شدن آن، عملیات انتقال گیاه به خارج از ریشه صورت گیرد. این مرحله با احتیاط کامل و شست‌وشوی ریشه با آب برای زدودن آگار از لابه‌لای تارهای

شکل۵- مراحل ریزازدیادی گیاه *Sorbus aucoparia* تا انتقال به خاک

جدول ۱- فهرست درختان جنگلی ریزازدیادشده توسط محققان گروه مستقل تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

ردیف	نام علمی گونه	نام فارسی گونه	نام مجری	مرحله ریزازدیادی
۱	*Ulmus carpinifolia*	اوجا	امام (۸۶)	انتقال گیاه به عرصه
۲	*Eucalyptus grandis*	اوکالیپتوس گرندیس	امام (۸۸)	انتقال گیاه به عرصه
۳	*Eucalyptus globulus*	اوکالیپتوس گلوبولوس	امام (۸۹)	انتقال گیاه به عرصه
۴	*Populus caspica*	سفیدپلت	امام (۷۹)	انتقال گیاه به عرصه
۵	*Juglans regia*	گردوی ایرانی	امام (۸۳)	انتقال گیاه به گلخانه
۶	*Capparis decidua*	کلیر	نراقی (۹۱)	انتقال گیاه به عرصه
۷	*Eucalyptus gongylocarpa*	اوکالیپتوس گانجیلوکارپا	اکبری (۸۶)	انتقال گیاه به گلخانه
۸	*Sorbus aucoparia*	تیس	امام (۹۰)	انتقال گیاه به عرصه
۹	*Thuja orientalis*	نوش	امام (۸۲)	انتقال گیاه به گلخانه
۱۰	*Ulmus glabra*	ملج	ایزدپناه (۸۲)	انتقال گیاه به عرصه
۱۱	*Prunus avium*	آلوکک	ایزدپناه (۷۲)	انتقال گیاه به عرصه
۱۲	*Populus euphratica*	پده	شهرزاد (۷۹)	انتقال گیاه به عرصه
۱۳	*Populus tremula*	صنوبر لرزان	نراقی (۷۲)	انتقال گیاه به عرصه
۱۴	*Castanea sativa*	شاه‌بلوط	نراقی (۸۱)	انتقال گیاه به گلخانه
۱۵	*Sequoia sempervirens*	سکویا	شهرزاد (۷۴)	انتقال گیاه به گلخانه
۱۶	*Tilia begonifolia*	نمدار	شهرزاد (۷۴)	انتقال گیاه به گلخانه
۱۷	*Quercus castanifolia*	بلندمازو	زمانی (۹۱)	انتقال گیاه به گلخانه
۱۸	*Acer cinerasens*	کیکم	امام (۸۵)	انتقال گیاه به گلخانه
۱۹	*Eucalyptus maculata*	اوکالیپتوس ماکولاتا	عصاره (۸۷)	انتقال گیاه به گلخانه
۲۰	*Celtis caucasica*	تا	دادور (۸۸)	انتقال گیاه به گلخانه
۲۱	*Moringa pregrina*	گز روغنی	اسدی کرم (۸۸)	انتقال گیاه به گلخانه
۲۲	*Taxus baccata*	سرخدار	نراقی (۸۲)	انتقال گیاه به گلخانه
۲۳	*Populus euphratica* p. alba*	دورگ پده ❊ کبوده	شهرزاد (۸۲)	انتقال گیاه به گلخانه
۲۴	*Amygdalus scoparia*	بادام کوهی	امام (۹۱)	انتقال گیاه به گلخانه
۲۵	*Olea europea*	زیتون	نصیری (۷۴)	انتقال گیاه به گلخانه
۲۶	*Sorbus persica*	دیو آلبالو	آبروش (منتشرنشده)	انتقال گیاه به گلخانه
۲۷	*Eucalyptus microtheca*	اوکالیپتوس میکروتکا	شبان‌نژاد (۸۲)	انتقال گیاه به گلخانه
۲۸	*Simmondsia chinensis*	هوهوبا	حسنلو (۸۵)	انتقال گیاه به گلخانه
۲۹	*Eucalyptus microcarpa*	اوکالیپتوس	وطن‌پور (۸۸)	انتقال گیاه به گلخانه
۳۰	*Eucalyptus microcarpa*	اوکالیپتوس	آبروش (۹۲)	انتقال گیاه به گلخانه
۳۱	*Eucalyptus occidentalis*	اوکالیپتوس	آبروش (۹۲)	انتقال گیاه به گلخانه

کشنده گیاه صورت می‌گیرد.

راه‌حل دیگر این چالش، با عبور از یک مرحله ۲ تا ۴ هفته‌ای به‌منظور سازش بیشتر گیاهچه‌ها با شرایط محیط مرطوب به‌دست می‌آید. با کاهش رطوبت در درون شیشه، به‌تدریج تولید موم اپی‌کوتیکولی و عملکرد روزنه‌ای از نظر فیزیولوژی بهتر انجام می‌شود. استفاده از ترکیب پاکلوبوترازول و به تأخیر اندازنده‌های رشد، منجر به متناسب شدن فیزیولوژی روزنه‌ای، افزایش رسوب موم اپی‌کوتیکولی، افزایش کلروفیل در واحد سطح برگ، تمایز بهتر مزوفیل نرده‌ای و کاهش پژمردگی در شرایط محیط خارج از شیشه می‌شود. کاهش صدمه به سیستم ریشه‌ای و مقاومت در برابر پژمردگی با استفاده از رسوب سلولزی در گیاهچه‌هایی که در شرایط درون شیشه ریشه داده و به خاک منتقل شده‌اند، افزایش می یابد. Mourashig (1962) پیشنهاد داد که ریشه‌دهی می‌تواند تا بعد از انتقال به خاک به تعویق بیفتد. گیاهچه‌ها می‌توانند به‌وسیله قرار گرفتن ظروف کشت روی یک قفسه گرم‌کننده مقاوم شده و رطوبت ظروف کشت کاهش یابد. این وضعیت منجر به کاهش آب از دست رفته از شاخه‌ها و سازش بهتر گیاهچه‌ها با شرایط محیط می‌شود. خاک مورد استفاده متشکل از ترکیب پیت و پرلیت به‌همراه تغذیه کافی خاک با محلول‌های غذایی نظیر هوگلند است. خاک گلدان باید مرطوب و کاملاً از آب اشباع شده و سطح گلدان‌ها با سرپوش پلاستیکی پوشیده شود. پس از ۷ تا ۱۰ روز به‌تدریج بر سرپوش‌ها منافذی ایجاد تا میزان رطوبت زیر سرپوش به‌تدریج کاهش یافته و سازگاری گیاه با شرایط طبیعی محیط انجام شود. ریشه‌دهی گیاه در فاصله زمانی از ۲ هفته تا ۲ ماه صورت می‌گیرد. رطوبت گلخانه در حد متعادل بوده و آبیاری گیاهان منتقل شده به خاک از روش آبیاری قطره‌ای یا از طریق بشقاب زیر گلدانی گیاه انجام می‌شود. گیاهان سازگار شده در فصل مناسب به خاک عرصه منتقل می‌شوند.

طی سه دهه گذشته همکاران گروه مستقل تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور براساس پیشنهادات پژوهشگران بخش تحقیقات جنگل مؤسسه متبوع و کارشناسان خبره سازمان جنگل‌ها، مراتع و آبخیزداری، تعداد زیادی از گونه‌های درختان جنگلی به‌خصوص گونه‌های در معرض خطر یا در حال انقراض را برای ریزازدیادی و تکثیر مورد پژوهش قرار داده‌اند که در مورد تعدادی از این گونه‌ها، نتایج مثبت و ارزنده‌ای به‌دست آمده است. مشکلاتی که در رابطه با استقرار نمونه‌های درختان بالغ جنگلی پیش می‌آید و راه‌های برون‌رفت از آن در متن مقاله اشاره شد. همین مشکلات کم‌وبیش در مورد اکثر گونه‌های مورد بررسی با توجه به ساختار ژنتیکی و رویشگاهی آنها که توسط سایر همکاران ستاد مؤسسه انجام شده نیز وجود داشته و دارد.

ازجمله درختان جنگلی که در گروه مستقل تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مراحل ریزازدیادی تا انتقال به گلخانه یا رویشگاه اصلی را با موفقیت پشت سر گذاشته‌اند، در جدول ۱ ارائه شده است.

شکل‌های ۱ تا ۵ تعدادی از گیاهان ریزازدیاد شده در گروه مستقل تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور را نشان می‌دهند.

جنگل‌ها و مراتع کشور، از منابع طبیعی تجدیدشونده هستند و برای حل مشکلات این منابع باید به‌گونه‌ای عمل کرد که موجب به بار آمدن ضایعات محیط‌زیستی نشود.

● نتیجه‌گیری و پیشنهادات

با توجه به وسعت زیاد جنگل‌ها و مراتع کشور و اهمیت حیاتی این منابع، هر گونه تحقیقی که منجر به افزایش تولید یا دفع ضایعات از این عرصه‌ها شود، منجر به بازده کلان اقتصادی خواهد شد. جنگل‌ها و مراتع کشور، از منابع طبیعی تجدیدشونده هستند و برای حل مشکلات این منابع باید به‌گونه‌ای عمل کرد که موجب به بار آمدن ضایعات محیط‌زیستی نشود و با حداقل سرمایه‌گذاری بتوان به حداکثر بهره‌برداری رسید. کاربرد بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک با هدف افزایش بازده از یک‌سو و جلوگیری از خسارات و ضایعات از سوی دیگر، این امکان را به‌وجود می‌آورد تا با حداقل ضایعات محیط‌زیستی و صرف حداقل سرمایه، تولید در سطح کلان افزایش یافته و توسعه پایدار محقق شود. علاوه‌بر این، در صورت توجه بیشتر به بیوتکنولوژی جنگل، امکان اشتغال‌زایی مناسبی به‌وجود می‌آید (نادری‌شهاب، م.،۱۳۷۷).

منابع

امام، م.، ایزدپناه، م.، و جعفری مفیدآبادی، ع.، ۱۳۷۹. تأثیر محیط کشت، هورمون و ژنوتیپ بر ریزازدیادی سفید پلت. فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲: ۹۹-۸۱.

امام، م.، ۱۳۸۲. اثر ژنوتیپ و ترکیب محیط کشت بر تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاهان نوش (*Thuja orientalis*). فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۱(۴): ۴۱۲-۳۹۹.

امام، م.، ۱۳۸۳. بررسی تکثیر غیرجنسی گردوی بالغ ایرانی (*Juglans regia*) با کشت سرشاخه‌های انتهایی. مجله پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی، ۶۳: ۱۵- ۱۰.

امام، م.، شهرزاد، ش.، نراقی، ط.س.، خان‌حسنی، م.، و حمزه‌پور، ی.، ۱۳۸۵. تکثیر گونه کیکم (*Acer cinerasens*) به روش کشت جنین بذری. فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۴(۳): ۱۴-۳.

امام، م.، شهرزاد، ش.، و نراقی، ط.س.، ۱۳۸۶. تکثیر درون‌شیشه‌ای گونه اوجا از طریق کشت جوانه. فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، (۴)۱۵: ۳۰۴-۲۹۶.

امام، م.، عصاره، م.، شهرزاد، ش. و خجیر، ک.، ۱۳۸۹. تکثیر درون‌شیشه‌ای گونه بالغ اوکالیپتوس گرندیس از طریق کشت بافت. فصلنامه پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۱(۱): ۸۶-۷۷.

امام، م.، و عصاره، م.، ۱۳۸۹. ریزازدیادی گونه اوکالیپتوس گلوبولوس از طریق کشت جوانه با دو منشأ بالغ و دانهال. مجله جنگل ایران، ۲(۲): ۱۴۹-۱۳۹.

امام،م.، قمری‌زارع، ع.، اسدی کرم، ف.، و لوکی انارکی، ک.، ۱۳۹۱. ریزازدیادی گونه بادام

کوهی (*Amygdalus scoparia*) از طریق کشت جوانه و جنین. فصلنامه تحقیقات ژنتیک واصلاح گیاهان جنگلی و مرتعی ایران، ۲۱(۱): ۸۶-۷۷.
امام، م.، قمری‌زارع، ع.، اسپهبدی، ک.، نراقی، ط.س.، شهرزاد، ش.، ۱۳۹۰. ریزازدیادی درخت جنگلی تیس (*Sorbus aucuparia*) از طریق کشت ریزنمونه جوانه گیاه بالغ. دوفصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی، ۱۹(۲): ۲۷۳-۲۶۳.
آبروش، ز.، عصاره، م. و امام، م.، ۱۳۹۲. ریزازدیادی *Eucalyptus occidentalis*، فصلنامه پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، جلد ۳۱.
اسدی‌کرم، ف. ، میرزایی ندوشن، ح. و امام، م.، ۱۳۸۸. توانمندی ژنتیکی در القای کالوس و رشد جنین نارس در جمعیت‌هایی از گز روغنی. فصلنامه پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۷: ۳۷-۲۹.
اکبری، م.، عصاره، م. و امام، م.، ۱۳۸۶. ریزازدیادی گونه *Eucalyptus gongylocarpa* blakely. فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۵-۲.
ایزدپناه، م.، ۱۳۸۲. تکثیر ملچ از طریق کشت درون‌شیشه‌ای. مجله پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی. شماره ۵۸. جلد ۱۶، شماره ۱، ۷۴-۶۶.
ایزدپناه، م.، نصیری، م.، نراقی، ط.س. و امام، م.، ۱۳۷۵. تکثیر غیرجنسی آلوکک از طریق کشت بافت، قلمه و ریز پیوندی. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی خاتمه‌یافته مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.
حسنلو، ط.، حاج‌نجاری، ح.، فهیمی، ح. و نصیری، م.، ۱۳۸۵. بررسی تعادل یونی و ضریب ازدیاد گیاه جوجوبا در شرایط درون شیشه. فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۴. جلد ۱۴ (۲): ۱۱۳-۱۰۵.
دادور، ف.، عصاره، م.، رستمی، ت.، امام، م. و شیروانی، الف.، ۱۳۸۸. تکثیر غیرجنسی گونه درختی تا (*Celtis caucasica*) به دو روش کشت درون‌شیشه‌ای و قلمه. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان.
زمانی، س.م.، امام، م.، گل‌تپه، الف.، صفایی، ن.، قمری‌زارع، ع. و فارسی، م.، ۱۳۹۱. تکثیر آزمایشگاهی بلوط بلندمازو. تحقیقات ژنتیک واصلاح گیاهان مرتعی وجنگلی ایران، ۲۰: ۲۵۲-۲۴۰.
شهرزاد، ش. و امام، م.، ۱۳۷۹. تکثیر غیرجنسی پده *(Populus euphratica)* به روش کشت بافت. فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۳: ۳۶-۱۱.
شبان‌نژاد ممقانی، م.، عصاره، م.، قمری‌زارع، ع. و شهرزاد، ش.، ۱۳۸۲. مقایسه باززایی مستقیم و غیرمستقیم در *Eucalyptus microtheca*، فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، شماره ۳۲. جلد ۱۶ (۲): ۲۳۷-۲۲۹.
شهرزاد، ش.، جعفری مفیدآبادی، ع.، امام، م. و قمری‌زارع، ع.، تکثیر غیرجنسی هیبرید (پده × کبوده) به روش کشت بافت. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی خاتمه‌یافته. ۱۳۸۵. مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.
شهرزاد، ش.، نراقی، ط.، امام، م. و ایزدپناه، م.، ۱۳۷۹. تکثیر سرخدار و سکویا از طریق کشت بافت. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی خاتمه‌یافته مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.
عصاره، م.، قمری‌زارع، ع.، کیارستمی، خ.، امام، م. و صداقتی، م.، ۱۳۸۷. مقایسه رشد گیاهچه‌های ریزازدیاد شده اوکالیپتوس ماکولاتا در شرایط فتو و شبه‌اتوتروف. مجله پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی، ۲۱(۴): ۱۳۲-۱۲۶.
کیانی، ب.، ۱۳۸۳. ژنتیک جنگل (توسعه درخت و جنگل)، انتشارات حق‌شناس، ص۹۳.
نادری‌شهاب، م.، ۱۳۷۷. تحقیقات بیوتکنولوژی در راستای افزایش بازده جنگل‌ها و مراتع. مجله رهیافت، شماره ۱۹: ۵۸ -۵۴.
نراقی، ط.س.، ۱۳۸۱. بررسی تکثیر غیرجنسی شاه‌بلوط (*Castanea sativa*) از طریق کشت‌بافت. فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان جنگلی و مرتعی ایران، ۱۱-۶.
نراقی، ط.س.، ۱۳۸۲. تکثیر درون‌شیشه‌ای درخت سرخدار *(Taxus baccata)* از طریق کشت سرشاخه. فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان جنگلی و مرتعی ایران، (۳) ۱۱: ۳۳۵-۳۲۴.
نراقی، ط.، امام، م.، قمری‌زارع، ع.، دمی‌زاده، غ. و شریعت، الف.، ۱۳۹۱. ریزازدیادی گونه کلیر *(Capparis decidua)* از طریق کشت سرشاخه درختان برگزیده و دانهال‌های کلیر. فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان جنگلی و مرتعی ایران، ۳۳۵-۳۲۴.
نراقی، ط.س.، ایزدپناه، م.، امام، م. و شهرزاد، ش. ۱۳۷۵. تکثیر غیرجنسی صنوبر لرزان از طریق کشت بافت. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی خاتمه‌یافته مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.
نصیری، م.، امام، م. و حاج‌نجاری، ح. ریزازدیادی زیتون. ۱۳۷۶. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی خاتمه‌یافته مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.
وطن‌پور، ز.، عصاره، م.، قمری‌زارع،ع. و کیارستمی، خ.، ۱۳۸۸. جنین‌زایی بدنی دو گونه اوکالیپتوس *Eucalyptus Microcarpa, E.elliodora* فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان جنگلی و مرتعی ایران، جلد ۱۷ (۲): ۳۲۲-۳۱۳.

Aitken-Christie, J., Jones, C., 1985. Wet and waxy shoots in radiata pine micropropagation. Acta horticulture, 166: 93-100.
Arrilaga, I., Marzo, T., and Segura, J., 1991. Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica*. Plant cell, Tissue and Organ culture, 27: 341-348..
Cormier, F., Crevier, H.A., DoC, B., 1990. Effect of sucrose concentration on the accumulation of antho cyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. Canadian journal of Botany, 68: 1822-1825.
Curir, P., Sumerect, V., Termini, A., 1990. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious root formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. Plant Physiology, 92: 1148-1153.
Driver, J. A., and Kuniyuki, H., 1984. In vitro propagation of Paradox walnut root stocks (*Juglans hindsii* J. regia*) Hort Science, 19:507-509.
Enjarlic, F., and Lardet, L., 1988. Contamination of primary culture in tropical areas. Acta Horticulture, 225: 57-65.
Evers , P W., Donkers, J., Prat, A., Vermeer, E., 1988. Micropropagation of forest trees through tissue culture. Centre for agricultural publishing and documentation (pudoc), Wageningen. In: In vitro culture of trees , 1992, J.M. Bonga & Aderkas P., pp: 98
Gupta, P.K. and Durzan, D.J., 1985. Shoot multiplication from mature trees of Duglas fir (Pseudo tsuga menziessi) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports, 4: 177-179.
Lindfors, A., Kuusela, H., Kupila, S., 1990. Molecular correlates of tissue browning and deter unation in Scots Pine calli. Biology Plant, 32: 171-180.
McCown, B.H., and Sellmer, J.C., 1982. Media and physical environment. In: Cell and tissue culture in forestry, Vol 2, Martinus nijhoff pub, Bonga (eds): 246-260.
Mcclelland, M.T., Smith, MAL., Carothers, Z.B.,1990.The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on the subsequent micro cutting root quality in three woody plants. Plant Cell Tissue Organ Culture, 23: 115-123.
Meynier, V., 1985. Contribution de la culture de meristems. Class oxford, 176, 1: 77-85.
Murashige, T., and Skooge, F., 1962. A revised Medium for rapid growth and bio- assays with tobacco Tissue Culture. Physiologia plantarum, 15: 473-597.
Paranjothy. K., 1987. Hevea tissue culture. In: J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds) Cell and Tissue Culture in Forestry Vol 3, Martinus Nijhoff Publishers: 326-337.
Thorpe. T., 1982. Carbohydrate utilization and metabolism. In: J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds), Cell and Tissue Culture in Forestry Vol 3, Martinus Nijhoff Publishers: 325-368.