نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2019.122188.1307
جلد ۲۷، شماره ۲، صفحه ۲۵۱-۲۴۰ (۱۳۹۸) شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.27.241.54.2.1578.41

تعیین محیط بهینه کشت برای ریزازدیادی سرو کهنسال ابرکوه (*Cupressus sempervirens* var *horizontalis*)

الهه زمانی[۱]، مریم دهستانی اردکانی*[۲] و کاظم کمالی علی‌آباد[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان، یزد

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان، یزد

پست الکترونیک: mdehestani@ardakan.ac.ir

۳- استادیار، گروه علوم خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه یزد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۰

چکیده

این پژوهش به‌منظور حفظ ذخیره ژنتیکی و تکثیر سرو کهنسال ابرکوه (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* Mill.) به روش کشت بافت انجام شد. در این تحقیق، تأثیر محیط‌های کشت مختلف شامل WPM (Woody Plant medium)، WPM تغییریافته، LS، SH و QL همراه با تنظیم‌کننده بنزیل آدنین (BA) در مقادیر مختلف ۰، ۰/۰۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر در مرحله استقرار و ۰، ۱، ۱/۵، ۲ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر در مرحله پرآوری در کشت شیشه‌ای این گیاه بررسی شدند. ریشه‌زایی، با دو روش کشت درون و برون شیشه‌ای مطالعه شد. در کشت برون شیشه‌ای از ترکیب کوکوپیت و پرلایت با سه نسبت ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ استفاده شد. پس از تیمار انتهای گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت با چهار غلظت IBA (۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) درون بسترها کشت شدند. در کشت درون شیشه‌ای، ریزنمونه‌ها به‌منظور تولید ریشه در محیط کشت WPM حاوی مقادیر مختلف IBA (۱، ۲ و ۵ میلی-گرم بر لیتر) کشت گردیدند. طبق نتایج به‌دست‌آمده در هر دو مرحله استقرار و پرآوری، بیشترین رشد طولی ریزنمونه‌ها در محیط کشت WPM حاصل شد. در مرحله پرآوری، بیشترین تعداد شاخه در محیط کشت LS به‌دست آمد که با محیط‌های WPM و WPM تغییر یافته اختلاف معنی‌داری نشان نداد. با افزایش غلظت BA، تعداد و طول شاخساره به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به‌طوری‌که بیشترین تعداد و طول شاخه به‌ترتیب در غلظت ۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد. ریشه‌زایی تنها در ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت WPM حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر IBA انجام گردید.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، پرآوری، کشت بافت، ریزنمونه، ریشه‌زایی

مقدمه

سرو ابرکوه با نام علمی *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* یکی از گونه‌های جنس *Cupressus* از خانواده سروها (Cupressaceae) می‌باشد که حدود چهار هزار ساله بوده و از قدیمی‌ترین درختان جهان می‌باشد (Irannejad Parizi *et al*., 2016). درختان کهنسال طی زندگی طولانی خود در برابر انواع تنش‌های محیط‌زیستی پایداری نشان داده‌اند. ازاین‌رو شناسایی، حفظ و تکثیر این

درختان کهنسال این مرزوبوم در زمره مهمترین ذخایر ژنتیکی گیاهی کشور محسوب می‌شوند. به‌همین دلیل مطالعه و حفظ آنها ازجمله مهمترین وظایف محققان امر منابع طبیعی و محیط‌زیست کشور می‌باشد(Khoshnevis *et al*., 2017).

تکثیر سوزنی‌برگان به دو روش جنسی و غیرجنسی است. ازدیاد سوزنی‌برگان از طریق روش‌های سنتی بذر و قلمه دارای محدودیت‌های فراوان و حتی گاهی غیرممکن است. روش‌های نوین کشت بافت، جایگزین مناسبی برای ازدیاد این گیاهان به‌نظر می‌رسد (Tang & Newton, 2007). ریزازدیادی بهترین روش برای تکثیر این درخت است که با استفاده از مواد گیاهی اندک، در فضایی محدودتر و در مدت زمان کوتاه‌تر، تعداد زیادی گیاه شبیه به اصل و بدون هیچ‌گونه تفرقی ایجاد می‌نماید (Tang & Newton, 2007). با توجه به اهمیت سرو ابرکوه به‌عنوان یکی از کهنسال‌ترین موجودات زنده دنیا و لزوم تولید نتاج مشابه پایه مادری، استفاده از تکنیک کشت بافت بهترین راه ازدیاد این گیاه ارزشمند است. این درخت به‌عنوان یکی از مهمترین ذخایر ژنتیکی کشور از ابعاد مختلفی مانند روند تکاملی گیاهان و همچنین تحولات اقلیمی و بیوشیمیایی محیط‌زیست خود قابل بررسی می‌باشد (Khoshnevis *et al*., 2017). تکثیر این گیاه از طریق کشت بافت برای تولید انبوه بسیار کارا می‌باشد (Giovanelli & Carlo, 2007). ریزازدیادی درختان بالغ از اهمیت خاصی برخوردار است، زیرا امکان تکثیر ژنوتیپ‌های برتر را فراهم می‌نماید. مخروطیان به‌سختی به ریزازدیادی پاسخ مثبت نشان می‌دهند و این مشکل به‌طور کلی بر سر راه تکنولوژی کشت بافت گونه‌های چوبی وجود دارد (Andersone & Ievinsh, 2002). ریزازدیادی سوزنی‌برگان برای اولین بار توسط Sommer و همکاران (1975) با کشت جنین‌های کاج پالستریس (*Pinus palustris*) انجام شد (Chee, 1955).

کشت بافت می‌تواند جایگزین مناسبی برای تکثیر گونه‌های گیاهی ریکالسیترنت (بذرهای سخت و مقاوم) باشد. محیط کشت پایه نقش مهمی در موفقیت ریزازدیادی دارد. ریزازدیادی *Juniperus phoenicea* با استفاده از محیط کشت Murashige و Skoog (۱۹۶۲) (MS) بدون تنظیم‌کننده‌های رشد، کارا نبود و منجر به زرد و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها شد. در حالی‌که محیط کشت OM (Olive Medium) (Rugini, 1984) به‌تنهایی یا حاوی سیتوکنین‌ها (۰/۲ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kinetin (کینتین)، ۰/۱ تا ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA (6-Benzyl Adenine)، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ (Thidiazuron)) و اکسین (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (α-Naphthalene Acetic Acid)) بر خلاف MS موجب تحریک تمایز جوانه و نمو شاخه‌های جدید شد (Loureiro *et al*., 2007; Al-Ramamneh *et al*., 2012). در تحقیقی۴۰ درصد از شاخساره‌های کشت درون شیشه‌ای *Juniperus phoenicea* زمانی که در معرض ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به مدت پنج دقیقه قرار گرفتند و بعد به محیط کشت OM بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی انتقال یافتند، ریشه‌دار شدند (Loureiro *et al*., 2007).

Al-Ramamneh و همکاران (۲۰۱۷) اثر انواع محیط کشت‌های OM، ½ OM، MS و ½ MS، همچنین انواع تنظیم‌کننده‌های رشد را در ریزازدیادی گیاه *Juniperus phoenicea* بررسی کردند. در محیط کشت OM حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ۲، ۳، ۵-تیدیودوبنزویک اسید (2,3,5-tidiodobenzoic acid) یا دامینوزید (Daminozide) بیشترین تعداد شاخه‌های جانبی حاصل شد. Taghipoor و همکاران (2015) محیط کشت‌های WPM (Woody Plant medium) و TE (Thayer-Martin medium) را بهترین محیط کشت برای صفات بررسی شده در باززایی کاج مطبق (*Araucaria excelsa*) معرفی کردند.

القای جوانه‌های درخت سرو (*Cupressus sempervirens*) در محیط کشت SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) حاوی ۵ میکرومولار BA و ۰/۱ میلی‌مولار NAA با موفقیت انجام شد (Capuana and Giannini, 2015). همچنین سن درختانی که ریزنمونه‌های اولیه از آنها جمع‌آوری شده بود به شدت در سرعت تکثیر و

پرآوری و موفقیت در رشد و ریشه‌دهی نمونه‌ها مؤثر بود. Behjat sasan و همکاران (2014) با بررسی محیط‌های کشت مختلف MS، ½ MS، WPM و ½ WPM در تکثیر درون شیشه‌ای *Taxus baccata*، تنها محیط کشت WPM بدون تنظیم‌کننده‌های رشد را برای ریشه‌زایی مناسب معرفی کردند.

Emam (2003) برای شاخه‌زایی درخت نوش *Thuja orientalis* از سه محیط کشت MS، DKW و SH با غلظت‌های مختلف BA و 2ip به‌همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده کرد. در نهایت محیط کشت DKW حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، بیشترین مقدار شاخه‌زایی (۸۳ درصد) را نشان داد.

به‌دلیل اهمیت گیاه سرو چهار هزار ساله ابرکوه از لحاظ مقاومت به تنش‌های محیطی، پایداری آن طی قرون و منحصر به فرد بودن آن به‌عنوان یکی از مسن‌ترین موجودات زنده دنیا، این پژوهش به‌منظور تکثیر و حفظ ژرم‌پلاسم این گونه ارزشمند انجام شد. با توجه به اینکه تاکنون تحقیقی در زمینه تکثیر درون شیشه‌ای این گیاه ارزشمند انجام نشده است، در این پژوهش با بررسی انواع محیط کشت و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد BA، سعی شد تا در نهایت دستورالعمل مناسبی برای کشت درون شیشه‌ای این گنجینه مهم ژنتیکی در اختیار محققان و علاقمندان به ریزازدیادی و حفاظت از این گونه گیاهی در معرض خطر قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و ضدعفونی: با اخذ مجوز از سازمان حفاظت محیط‌زیست استان یزد، ریزنمونه‌ها از تک درخت سرو کهنسال ابرکوه در فصل تابستان گرفته شد. این درخت در بخش جنوبی شهرستان ابرکوه با مختصات جغرافیایی ۵۲ درجه و ۵۸ دقیقه شرقی و ۳۰ درجه و ۴۶ دقیقه شمالی در استان یزد قرار گرفته است. ارتفاع کنونی این درخت حدود ۲۵ متر، ارتفاع ناحیه فعلی تشکیل تاج از سطح زمین ۲/۱۰ متر، محیط یقه ۹/۶۲ متر، قطر تنه برابر ۳/۱۴ متر، قطر متوسط تاج ۱۸/۵۰ متر و سطح تاج پوشش آن برابر ۲۱۰ مترمربع می‌باشد (Irannejad Parizi *et al*., 2016). نمونه‌های گیاهی از جوانه‌های جانبی سرشاخه‌های پایینی درخت گرفته شد و بعد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه اردکان منتقل گردیدند. شاخه‌ها به وسیله اسکالپل ضدعفونی‌شده، ریزنمونه‌هایی به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر تهیه شد. ریزنمونه‌ها ابتدا به‌مدت سه دقیقه با آب لوله‌کشی شهری شست‌وشو شدند. ضدعفونی طی سه مرحله انجام شد. ابتدا ریزنمونه‌ها با محلول ۰/۰۵ درصد اسیدسیتریک به‌مدت سه دقیقه شسته شده، سپس در محلول ۰/۲ درصد کلرید جیوه و ۰/۰۵ درصد اسیدسیتریک به‌مدت زمان چهار دقیقه شست‌وشو و در نهایت سه مرتبه با محلول ۰/۰۵ درصد اسیدسیتریک آب‌کشی شدند.

استقرار و پرآوری: به‌منظور بررسی اثر نوع محیط کشت بر استقرار و پرآوری ریزنمونه‌ها، محیط‌های کشت WPM (McCown & Lioyd, 1981) و Modified WPM (WPM تغییر یافته) در مرحله استقرار و محیط‌های WPM، Modified WPM، LS (linsmaier & Skoog, 1965)، QL (Quoirin & Lepoivre, 1977) و SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) در مرحله پرآوری تهیه و بررسی شدند. زمانی‌که طول ریزنمونه‌ها حداقل سه سانتی‌متر افزایش یافت، به مرحله پرآوری وارد شدند. لازم به ذکر است که در محیط کشت تغییر یافته WPM، میزان نیترات آمونیوم و تیامین دو برابر شد و بقیه مواد مورد استفاده در ساخت محیط کشت، همانند محیط کشت WPM پایه بود. پس از تهیه محیط کشت، ۷/۵ گرم در لیتر دیفکو باکتو آگار (ساخت مرک) و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به آن افزوده شد. در مرحله استقرار سه غلظت BA شامل صفر، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر و در مرحله پرآوری پنج غلظت صفر، ۱، ۱/۵، ۲ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به محیط‌های کشت اضافه شد. سپس pH محیط کشت روی ۵/۷ تنظیم و به‌مدت ۱۵ دقیقه در

اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر استریل شد. برای کشت نمونه‌ها از شیشه‌های مربایی به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر ۶ سانتی‌متر استفاده گردید و درون هر شیشه سه عدد ریزنمونه قرار داده شد. پس از کشت نمونه‌ها درون اتاقک رشد در شرایط شدت نور ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ لوکس در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت در دوره تاریکی ۱۸ و در دوره روشنایی ۲۵ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. وقتی ریزنمونه‌ها رشد کرده و چندین شاخه جدید ایجاد نمودند، به مرحله ریشه‌زایی انتقال یافتند.

مرحله ریشه‌زایی: ریزنمونه‌هایی با طول حدود ۳-۱ سانتی‌متر که حداقل ۵-۴ شاخه فرعی تولید کرده بودند وارد مرحله ریشه‌زایی شدند. ریشه‌زایی به دو روش درون و برون شیشه‌ای بررسی شد. برای کشت برون شیشه‌ای، مخلوط کوکوپیت و پرلیت با نسبت‌های مختلف ۱:۱، ۲:۱ و ۳:۱ در نظر گرفته شد. مخلوط بسترهای کشت درون اتوکلاو به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند و پس از خنک شدن، ریزنمونه‌های رشد کرده و پرآوری شده در شرایط درون شیشه‌ای در آنها کشت شد. قبل از کشت ریزنمونه‌ها، انتهای ریزنمونه‌ها به‌مدت زمان‌های مختلف ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ دقیقه درون محلول IBA با غلظت‌های مختلف ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام قرار گرفتند. برای کشت درون شیشه‌ای، محیط کشت WPM حاوی مقادیر مختلف ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۷ گرم بر لیتر آگار بررسی شد. محیط‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه درون اتوکلاو با فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شدند. ریزنمونه‌ها ابتدا به‌مدت یک هفته در تاریکی و بعد به اتاقک رشد با شرایط ذکر شده در بالا منتقل شدند. نمونه‌ها هر چهار هفته یکبار کشت شدند.

طرح آماری و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها: آزمایش‌ها به‌صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با نه تکرار انجام شد. داده‌برداری از صفات پس از گذشت هشت هفته در هر مرحله انجام گردید. در پایان آزمایش، درجه سبزینگی (نمره‌دهی ۱ تا ۴)، درصد قهوه‌ای شدن، تعداد شاخه جدید و میزان رشد طولی (میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. میزان سبزینگی بین صفر تا ۴ نمره‌دهی شد که صفر نمایانگر خشکی و نکروزگی کامل برگ‌ها و ۴ نمایانگر رنگ سبز و شادابی برگ‌ها بود (Ghamari Zare *et al.*, 2013). داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 تجزیه وتحلیل شدند. برای بررسی و تعیین وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین داده‌ها، تیمارها با آزمون LSD با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

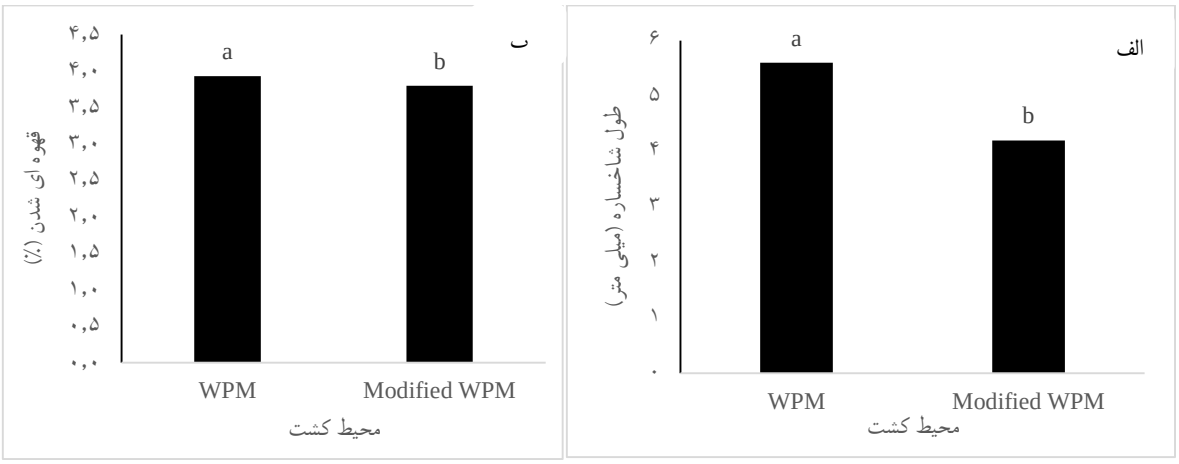
مرحله استقرار: نتایج جدول تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت و غلظت‌های مختلف BA نشان داد که در مرحله استقرار اثر محیط کشت بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در سطح احتمال پنج درصد و بر میزان طول شاخساره در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). در حالی‌که اثر تنظیم‌کننده رشد BA و نیز اثر متقابل محیط کشت و BA بر هیچ‌یک از صفات مورد بررسی معنی‌دار نبود (جدول ۱).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان طول شاخساره (۵/۶ میلی‌متر) و میزان قهوه‌ای شدن (۳/۹۳ درصد) ریزنمونه‌ها در مرحله استقرار، در محیط کشت WPM حاصل شد (شکل۱ الف و ب).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت، غلظت‌های مختلف BA و اثرهای متقابل آنها بر درجه سبزینگی، میزان قهوه‌ای شدن، تعداد شاخه جدید و رشد طولی ریزنمونه‌های سرو ابرکوه در مرحله استقرار

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات MS			
		شادابی	میزان قهوه‌ای شدن	تعداد شاخه جدید	طول شاخساره
محیط کشت	۱	۰/۱۳^{ns}	۷/۵*	۰/۸۳^{ns}	۱۳/۳۳**
غلظت BA	۲	۰/۲۳^{ns}	۲/۰۳^{ns}	۰/۸۳^{ns}	۱/۲۳^{ns}
محیط کشت ❊ BA	۲	۰/۰۳^{ns}	۰/۷^{ns}	۰/۴۳^{ns}	۰/۰۳^{ns}
خطا	۲۴	۰/۱۱	۱/۳۳	۰/۵۸	۰/۶۶
ضریب تغییرات CV	-	۸/۵۹	۱۹/۱۲	۵۳/۲۵	۱۶/۴۷

** و * به‌ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ و ^{ns}: عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر الف) طول شاخساره و ب) میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های سرو ابرکوه در مرحله استقرار

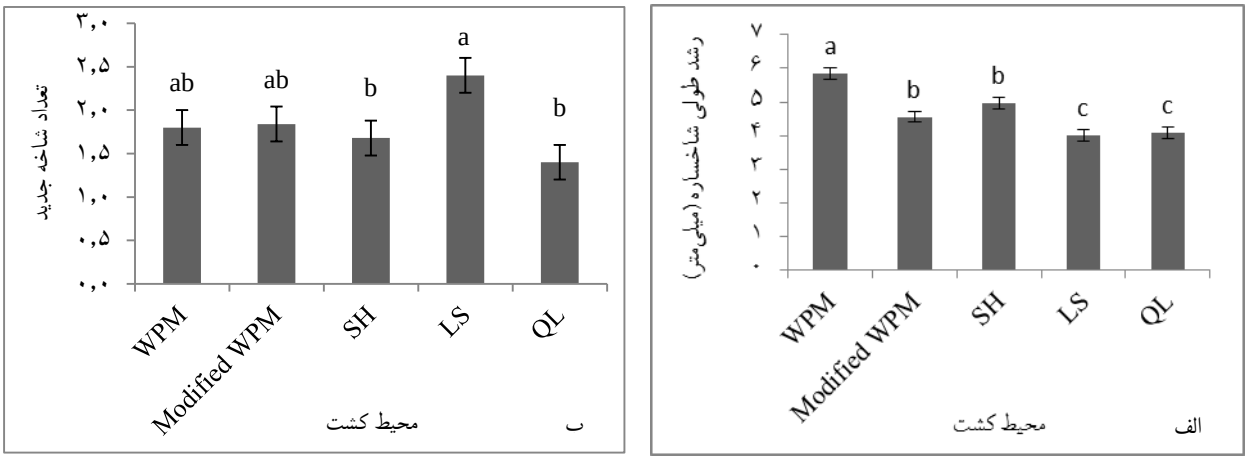
مرحله پرآوری: نتایج جدول تجزیه واریانس نوع محیط کشت و غلظت‌های مختلف BA نشان داد که در مرحله پرآوری اثر محیط کشت بر طول شاخساره در سطح احتمال یک درصد و بر تعداد شاخساره در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). اثر تنظیم‌کننده رشد BA بر هر سه مشخصه درجه سبزینگی، تعداد و طول شاخساره در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). اثر متقابل محیط کشت و سطوح BA بر طول شاخساره در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

بررسی مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر رشد طولی شاخساره نشان داد که بیشترین رشد طولی شاخه (۵/۸۴ میلی‌متر) در محیط کشت WPM به‌دست آمد (شکل۲الف)، همچنین بیشترین تعداد شاخه جدید (۲/۴ عدد) در محیط کشت LS حاصل شد که با محیط کشت WPM تغییر یافته و WPM از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۲ب).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت، غلظت‌های مختلف BA و اثرهای متقابل آنها بر درجه سبزینگی، تعداد شاخه جدید و رشد طولی ریزنمونه‌های سرو ابرکوه در مرحله پرآوری

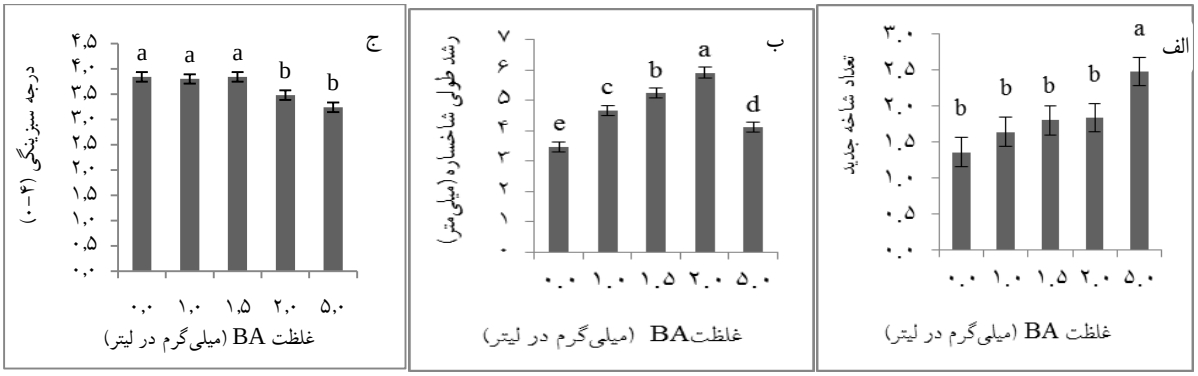
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعاتMS		
		درجه سبزینگی	تعداد شاخه جدید	طول شاخساره
محیط کشت	۴	۰/۲۲^{ns}	۳/۳۳*	۱۴/۱۲**
تنظیم‌کننده رشد BA	۴	۱/۸۲**	۴/۲۵**	۲۲/۵۲**
محیط کشت * BA	۱۶	۰/۱۶^{ns}	۰/۴۳^{ns}	۱/۶۱**
خطا	۱۰۰	۰/۲۲	۱/۰۰۸	۰/۷
ضریب تغییراتCV	-	۱۲/۸۸	۲۵/۱۶	۱۸/۱۸

** و * به‌ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ و ^{ns}: عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر محیط کشت در مرحله پرآوری بر (الف) رشد طولی و (ب) تعداد شاخساره ریزنمونه‌های سرو ابرکوه در محیط درون شیشه‌ای (**ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند در سطح معنی‌داری پنج درصد آزمون دانکن با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.**)

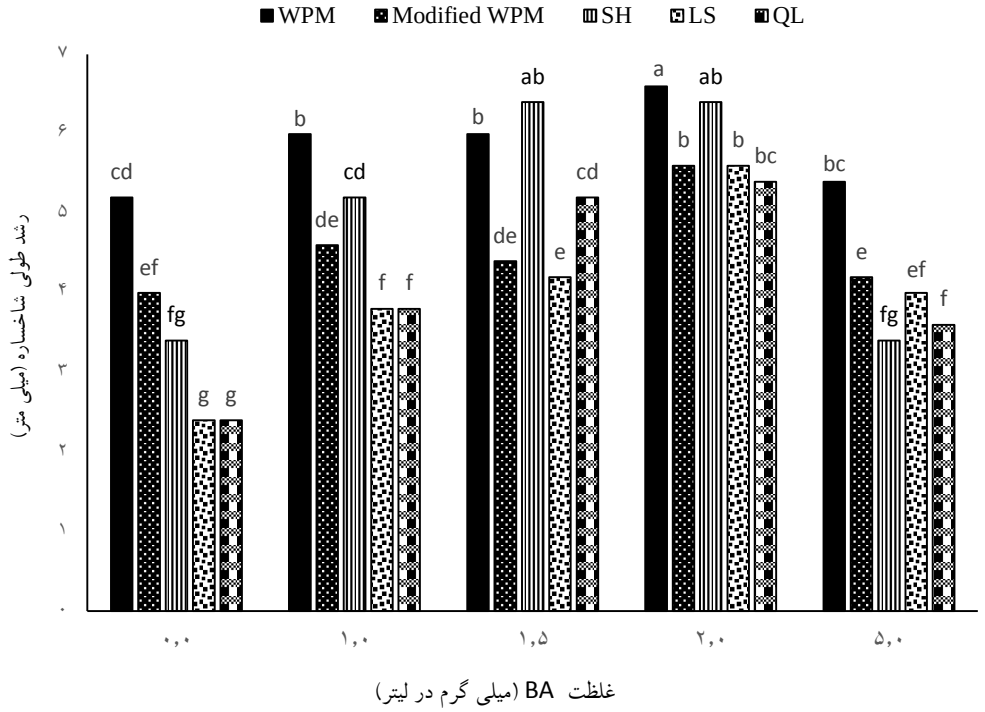
بر اساس نتایج حاصل، با افزایش غلظت BA، تعداد شاخساره افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین تعداد شاخه جدید (۲/۴۸ عدد) در در محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به‌دست آمد و سایر سطوح با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (شکل۳-الف). همین‌طور با افزایش غلظت BA، طول شاخساره تا غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین رشد طولی شاخساره‌ها (۵/۹۲ میلی‌متر) در محیط‌های دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA حاصل شد (شکل۳-ب). در حالی‌که با افزایش غلظت BA، درجه سبزینگی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. بیشترین درجه سبزینگی ریزنمونه‌ها (۳/۸۴) در محیط کشت‌های حاوی صفر، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد (شکل۳-ج).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت BA در مرحله پرآوری بر (الف) تعداد، (ب) رشد طولی شاخساره و (ج) درجه سبزینگی ریزنمونه‌های سرو ابرکوه در محیط درون شیشه‌ای

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند در سطح معنی‌داری پنج درصد آزمون دانکن با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

در بررسی مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل غلظت‌های مختلف BA و محیط کشت در مرحله پرآوری، نتایج نشان داد که بیشترین میزان رشد طولی (۶/۶۰ میلی‌متر) در محیط کشت WPM حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA حاصل شده است (شکل۴). در همه محیط‌های کشت در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA رشد طولی به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر غلظت‌های مورد بررسی بالاتر بود (شکل ۴). همچنین ریزنمونه‌های کشت شده در محیط‌های کشت WPM و SH حاوی ۱/۵ گرم در لیتر BA نیز رشد طولی زیادی را نشان دادند (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف BA و محیط کشت در مرحله پرآوری بر میزان رشد طولی ریزنمونه‌های سرو ابرکوه در محیط درون شیشه‌ای

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند در سطح معنی‌داری پنج درصد آزمون دانکن با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

شکل ۵- مراحل کشت درون شیشه‌ای سرو کهنسال ابرکوه: الف) استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت WPM حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، ب) واکشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت استقرار WPM حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، ج) پرآوری ریزنمونه‌ها در محیط کشت WPM حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA، د) واکشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت WPM حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ه) انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت WPM حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA برای ریشه‌زایی و القای ریشه

در رابطه با ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها، تیمارهای برون شیشه در ریشه‌زایی موفق نبودند. از بین تیمارهای درون شیشه‌ای، ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت WPM حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد (شکل ۵-ه).

بحث

در میان محیط‌های کشت مورد بررسی در این پژوهش بیشترین رشد طولی ریزنمونه‌ها در محیط کشت WPM حاصل شد. علت برتری محیط کشت WPM در میزان رشد ریزنمونه‌ها نسبت به سایر محیط‌های کشت را شاید بتوان در غلظت پایین‌تر نمک‌های ماکرو (پرمصرف) محیط کشت WPM نسبت به سایر محیط‌ها جست‌وجو نمود. در واقع هرچه غلظت نمک‌ها در محیط کشت کمتر باشد، به‌علت کاهش فشار اسمزی محیط کشت، امکان جذب آب و مواد غذایی بیشتری برای ریزنمونه فراهم و بدین‌ترتیب حفظ حالت شادابی ریزنمونه ممکن می‌شود و از این طریق به رشد آنها کمک می‌کند (Mihaljevic *et al.*, 2002). Asrar Zaidi و همکاران (۲۰۱۲) نیز با بررسی انواع محیط کشت برای ریزازدیادی سرو کوهی، بیشترین القاء کالوس (۹۰ درصد) را در محیط کشت WPM با غلظت نیم میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP گزارش کردند. Mahdinejad و همکاران (۲۰۱۵) با کشت ریزنمونه برگ *T. baccata* در محیط کشت پایه WPM به همراه 2,4-D و NAA موفق به تولید بیشترین میزان کالوس (۷۸ درصد) شدند. همچنین چندین گزارش روی گیاهان چوبی *Acer palmatum*، *Citrus*، *Vitis*، *Ulmus* و *Ficus* برتری محیط کشت WPM را نشان داده است (Fernandez-Lorenzo *et al* ., 2000; Thakur & Karnosky, 2007; Pasqual & Ferreira, 2007; Lu, 2005) که طبق نتایج این آزمایش نیز در تمام غلظت‌های هورمونی استفاده شده، محیط کشت WPM دارای اختلاف معنی‌داری با بقیه محیط‌های کشت در رابطه با صفت رشد طولی بود و نسبت به سایر محیط‌های کشت برتری نشان داد. محیط‌کشت WPM مختص درختان چوبی است. علت موفقیت در محیط کشت WPM ممکن است تناسب مواد و عناصر موجود در این محیط کشت با گیاه باشد. محیط کشت WPM فاقد نیترات پتاسیم بوده و مقدار آمونیوم آن کمتر از محیط کشت MS است و در کل نمک‌های پرمصرف کمتری دارد، به همین دلیل بیشتر در کشت بافت درختان چوبی استفاده می‌شود (Bolandi *et al.*, 2016). در محیط کشت WPM در مقایسه با سایر محیط‌های مورد بررسی،

نیترات پتاسیم حذف و سولفات پتاسیم جایگزین شده، ضمن اینکه مقدار یون سولفات در محیط کشت WPM نسبت به سایرین بیشتر است. وجود سولفات امکان جذب برخی عناصر را در محیط کشت افزایش می‌دهد. از تفاوت‌های دیگر محیط‌های کشت مورد مطالعه، مقادیر نیترات و آمونیم آنها بوده که به‌عنوان منبع اصلی تأمین نیتروژن به محیط کشت اضافه می‌گردد.

بر اساس نتایج حاصل از آزمایش، بیشترین میزان قهوه‌ای شدن نمونه‌ها در محیط کشت WPM رخ داد. محیط کشت‌هایی که فاقد نمک آمونیوم هستند، اغلب با گذشت زمان حالت قلیایی پیدا می‌کنند و این حالت قلیایی می‌تواند در جذب مواد توسط ریزنمونه اختلال ایجاد نماید، همچنین باعث افزایش قهوه‌ای شدن بافت‌ها گردد. همچنین آمونیوم به‌عنوان یک شوک مثبت در رشد اولیه نقش دارد و با حذف آن چون دوره رشد طولانی می‌شود، قهوه‌ای شدن افزایش خواهد یافت و آنزیم‌های اکسید کننده غالب خواهند شد (Bhojwani & Dantu, 2013). نیتروژن علاوه بر ایفای نقش در تشکیل پروتئین‌ها، یک جزء لازم در مولکول کلروفیل می‌باشد که کمبود آن باعث زردی گیاه می‌شود. عرضه کافی نیتروژن با رشد رویشی زیاد و رنگ سبز تیره ارتباط دارد (Shafea *et al*., 2011) که با نتایج این آزمایش هم‌خوانی دارد. همچنین غلظت بالای نمک‌ها باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی و در نتیجه افزایش قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها می‌شود. بیشترین رشد طولی شاخساره در محیط کشت WPM رخ داد که می‌توان آن را به نقش نیترات در رشد طولی مرتبط دانست. نیترات باعث رشد طولی شاخه‌ها می‌شود، بنابراین کاهش آن در محیط کشت می‌تواند باعث کاهش رشد طولی ریزنمونه‌ها گردد.

بر اساس نتایج حاصل، با افزایش غلظت BA، تعداد شاخساره افزایش یافت. اما طول شاخساره تا غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر افزایش و بعد کاهش یافت. Jafari Mofidabadi و همکاران (2018) بیشترین رشد طولی شاخساره گلابی وحشی را در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش کردند که با نتایج حاصل مطابقت نداشت. BA برای تحریک جوانه زدن جانبی در سروها ضروری می‌باشد (Thomas *et al*., 1997). افزایش میزان پرآوری شاخساره به ازای هر واحد افزایش در غلظت BA را می‌توان از طریق نقش سایتوکینین‌ها در تحریک تقسیم سلولی و رشد جوانه‌های جانبی تفسیر نمود. همچنین پرآوری شاخساره‌ها در محیط کشت غنی از سیتوکینین، اغلب نتیجه آزاد شدن جوانه‌های جانبی از تأثیر غالب بودن جوانه انتهایی است (Bagheri & Azadi, 2002) که با نتایج این آزمایش همخوانی دارد. افزایش میزان BA باعث تولید شاخه‌های نابه‌جای بیشتری در کشت گیاه نوئل (*Picea abies*) شد (Bornman & Vogelmann, 1984) که با نتایج حاصل مطابقت داشت. غلظت بیش از اندازه سیتوکینین اثرهای بازدارندگی بر رشد گیاه نشان داد که با نتایج Rong (1989) و Morley (2016) روی مخروطیان مطابقت داشت. کاهش طول شاخساره‌ها به ازای هر واحد افزایش در غلظت BA را باید در محدود بودن ظرفیت غذاسازی گیاهچه‌های درون شیشه‌ای جستجو کرد، به‌طوری‌که با افزایش تعداد شاخساره‌های پرآوری شده، مقدار ماده غذایی که به هر شاخساره می‌رسد، کاهش می‌یابد.

بر اساس نتایج، با افزایش غلظت BA، درجه سبزینگی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. به‌طوری‌که با افزایش میزان BA، تولید اتیلن در نمونه‌های گیاهی افزایش می‌یابد. علاوه‌براین چون تعادل نسبت سیتوکنین به اکسین از حد نرمال بسیار بیشتر خواهد شد، به گیاهان شوک وارد شده و در نهایت زرد و قهوه‌ای می‌شوند و از درجه شادابی آنها کاسته می‌گردد (Neumann *et al*., 2009).

روش‌های مورد استفاده در این پژوهش برای طویل شدن و افزایش تعداد شاخساره و نیز ریشه‌زایی درون شیشه‌ای سرو کهنسال و ارزشمند ابرکوه، می‌تواند مکمل سایر تحقیقات انجام شده در زمینه این گیاه باشد.

منابع مورد استفاده:

- Al-Ramamneh, E.A., Durra, S., and Daradkeh, N. 2012. Propagation physiology of *Juniperus phoenicea* L. from Jordan using seeds and *in vitro* culture techniques: baseline information for a conservation perspective. African Journal of Biotechnology, 11: 7684-7692.
- Asrar Zaidi, M. S., Khan, N., Jahan, A., Yousafzai and Mansoor, A., 2012. Micropropagation and Conservation of Three *Juniperus Specices* (cuperssaceae). Pakistan journal of Botany, 44: 301-304.
- Al-Ramamneh, E.A., Daradkeh, N., Rababah, T., Pacurar, D. and Al-Qudah, M. 2017. Effects of explant, media and growth regulators on *in vitro* regeneration and antioxidant activity of *Juniperus phoenicea.* Australian Journal of Crop Science, 11(7): 828-837.
- Andersone, U. and Ievinsh, G., 2002. Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds in vitro. Annals of botany, 90 (2): 293-298.
- Bagheri, H., and Azadi, P. 2002. Plant Tissue Culture, Techniques and Experiments. Mashhad jehad. Daneshgahi Press. 154p.(In Persian).
- Behjat Sasan, B., Omidi, M., Naghavi, M. R., Hariri Akbari, F., Kalate Jari, S., Shafiee, M., and Shafiee, M. 2014. Effect of explants, salts concentration medium and hormone treatments on *Taxus baccata in vitro* culture. International Journal of Biosciences. 5(6): 1-9.
- Bhojwani, S.S. and Dantu, P.K., 2013. Plant tissue culture: an introductory text (pp. 245-274). India: Springer.
- Bolandi, A., Hamidi, H. and Rezagholy, A. A., 2016. Effects of culture media and growth regulators on propagation of rootstock GF677 in tissue culture conditions, Journal of Plant Research, 29 (1): 1-14.
- Bornman, C.H. and Vogelmann, T.C. 1984. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. Physiologia Plantarum, 61 (3): 505-512
- Capuana, M. and Giannini, R. 2015. Micropropagation of young and adult plants of cypress (*Cupressus sempervirens* L.). Journal of Horticultural Science, 72 (3): 453-460.
- Chee, P.P. 1995. Organogenesis in *Taxus brevifolia* tissue cultures. Plant cell reports, 14(9): 560-565.
- Fernandez-Lorenzo, J.L., Iglesias-Díaz, M.I. and Gutiérrez-Araujo, O. 2000. September. Micropropagation of a selected rootstock of *Acer palmatum*. In XIVth International Symposium on Horticultural Economics. 536: 347-354.
- Emam, M. 2003. *In vitro* propagation of *Thuja orientalis* by shoot tip culture. Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 11(1): 1-16. (In Persian).
- George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 3rd ed, Vol. 1. 501p.
- Giovanelli, A. and De Carlo, A. 2007 Micropropagation of Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). In: Mohan Jain, S., Haggman, H., (eds) Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer, The Netherlands, pp 93–105.
- Ghamari Zare, A., Sedaghati, M., Imam, M., Assareh, M. and Kiarostami, Kh. 2013. Eucalyptus micropropagation from adult rootstock via *in vitro* culture. Journal of Forest and Poplar Research, 21 (3): 593-581. (In Persian)
- Irannejad Parizi, M., Akbari, H., Khoshnevis, M., Shams, J., Abedinin, T., Hadirad, M., Rasouli, A., Taheri, A. and Mahdavi, M. 2016. National Monument of Abarkooh cypress. Yazd university publication, 306p (In Persian).
- Jafari Mofidabadi, A., Kamandloo, M. and Nazari, A. 2018. Effect of juvenile tissue and plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of *Pronus avium* L. Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 26(1): 114-120. doi: 10.22092/ijrfpbgr.2018.116665 (In Persian).
- Khoshnevis, M., Matinizade, M., Shirvani, A. and Taimouri, M. 2017. Iran treasure of ancient trees. Nature of Iran, 2 (3): 42-55 (In Persian).
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirments of tobacco tissue culture. Physiology of Plant, 18: 100-127.
- Loureiro, J., Capelo, A., Brito, G., Rodriguez, E., Silva, S., Pinto, G., and Santos, C. 2007. Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry. Biol Plantarum. 51: 7-14.
- Lu, M.C. 2005. Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shoot tip culture. Scientia Horticulturae, 107(1): 64-69.
- Mahdinejad, N., Fakheri, B.A. and Ghanbari, S. 2015. Effect of growth regulators on *in vitro* callogensis *Taxus baccata* L. Biological Forum–An International Journal, 7(1): 142-145.
- Mihaljevic, S., Bjedou, I., Kovac, M., Levanic, D.L. and Jelaska, S. 2002. Effect of explants source and growth regulators on *in vitro* callus growth of *Taxus baccata* L. Washingtonii. Food Technology and Biotechnology, 40(4), 299-303.

Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures. Canadian Journal of Botany, 50: 199-204. http://dx.doi.org/10.1139/b72-026
– Shafea, L., Saffari, M., Emam, Y. and Mohammadinejad, G. 2011. Effect of nitrogen and zinc fertilizers on leaf zinc and chlorophyll contents, grain yield and chemical composition of two maize (*Zea mays* L.) hybrids. Seed and Plant Production Journal. 27-2 (2): 235 - 246.
– Sommer, H.E., Brown, C.L. and Kormanik, P.P. 1975. Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured *in vitro*. Botanical Gazette, 136(2): 196-200.
– Taghipoor, M., Haddad, R., and Ghannadnia, M. 2015. The effect of media, explants and cytokinin on micropropagation of *Araucaria excelsa* R. Journal of Applied Crop Breeding, 3(1): 1-12.
– Tang, W., and Newton, R.J. 2007. Micropropagation via organogenesis in slash pine. In Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits (pp. 15-22).
– Thakur, R.C. and Karnosky, D.F. 2007. Micropropagation and germplasm conservation of Central Park Splendor Chinese elm (*Ulmus parvifolia* Jacq.'A/Ross Central Park') trees. Plant cell reports, 26(8): 1171-1177.
– Thomas, M. J., Duhoux, E. and Azart, J.V. 1977. *In vitro* organ initiation in tissue culture of Biota orientalis and other species of the Cupressaceae. Plant Science Letters, 8: 395-400.
– McCown, B.H. and Lloyd, G. 1981. Woody plant medium (WPM) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. HortScience, 16: 453-453.
– Morley, P.S. 2016. David J. Pilbeam. Plant Nutrition, 121 p.
– Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3): 473-497.
– Neumann, K.H., Kumar, A., Imani, J. 2009. Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology, Basics and Application. Springer, Berlin, Heidelberg, 322 p.
– Pasqual, M. and Ferreira, E.A. 2007. Micropropagation of Fig tree (*Ficus carica* sp). In Protocols for micropropagation of woody trees and fruits (pp. 409-416).
– Quoirin, M. and Lepoivre, P. 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* species. Acta Horticultureae, 78: 437-442.
– Rong, H.H. 1989. Adventitious root and shoot regeneration in cultured explants of mature black spruce. Plant Sci, 62: 129-135.
– Rugini, E. 1984. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea* L. var. *sativa*) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. Scientia Horticulture. 24: 123-134.
– Schenk, R.U. and Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and Techniques for Induction and Growth of

Determination of optimized culture medium for micro-propagation of old cypress of Abarkuh, (*Cupressus semprvirens* var. *horizontalis*), in Iran

E. Zamani[1], M. Dehestani-Ardakani[2*] and K. Kamali Aliabad[3]

1- M.Sc. student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, I.R. Iran.
2- Assist. Prof., Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, I.R. Iran, Email: mdehestani@ardakan.ac.ir
3- Assist. Prof., Department of Soil Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Yazd University, Yazd, I.R. Iran.

Received: 09.06.2018 Accepted: 01.09.2019

Abstract

This study was conducted to preserve the genetic reserve and proliferation of old cypress of Abarkooh, (*Cupressus semprvirens* var. *horizontalis* Mill.) in Iran via tissue culture method. In this research, the effect of different culture media including WPM (woody plant medium), modified WPM, LS, SH and QL supplemented with Benzyl-adenine (BA) at different concentrations (0, 0.01 and 1 mg/l) at establishment stage and 0, 1, 1.5, 2 and 5 mg/l at proliferation phase were investigated through *in vitro* cultivation of this plant. Rooting was studied by two methods: *in vitro* and *in vivo* culture conditions. For *in vivo* culture method, three ratios of coccopeat and perlite containing 1:1, 1:2 and 1:3 were used. After treatment of the end of *in vitro* cutting explants with four concentrations of IBA (1000, 2000, 3000 and 4000 mg/l), cutting clones were cultured in the prepared media. Under *in vitro* culture conditions, explants were cultured in WPM medium supplemented by different concentrations of IBA (1, 2 and 5 mg/l) for root production. According to the results obtained at both phases of establishment and proliferation, the highest length of explants was obtained in WPM medium. In the proliferation phase, the maximum number of shoots was obtained in LS medium that had no significant differences with WPM and modified WPM media. By increasing the BA concentration, the number and length of shoots significantly increased. The maximum number and length of shoots were obtained at 5 and 2 mg/l BA, respectively. Only explants in WPM medium containing 5 mg/l IBA were successfully rooted.

Keywords: Plant growth regulators, Proliferation, Tissue culture, Explant, Rooting