فصلنامه علمی - پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران
شناسه دیجیتال (DOI):10022092/ijfpr.2018.116751
جلد ۲۶ شماره ۲، صفحه ۲۳۹-۲۲۸، (۱۳۹۷)

ارزیابی اثر عامل‌های مختلف بر ریزازدیادی زربین (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* Mill.) چهارهزارساله ابرکوه

مهدیه خاموشی [۱]، مریم دهستانی اردکانی [۲]، کاظم کمالی علی‌آباد [۳*] و جلال غلام‌نژاد [۴]

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

۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران

۳*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه یزد، یزد، ایران. پست الکترونیک: kkamali@yazd.ac.ir

۴- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۰۸

چکیده

پژوهش پیش‌رو به‌منظور حفظ ذخیره ژنتیکی و تکثیر زربین (*Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis* (Milll.) Gord.) ۴۰۰۰ساله ابرکوه به روش کشت بافت انجام شد. در آزمایش اول، اثر زمان نمونه‌گیری (چهار فصل)، دو نوع محیط کشت Murashige & Skoog (MS) و Woody Plant Medium (WPM) و غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین (BA) (صفر، ۰/۱ و یک میلی‌گرم در لیتر) بر پرآوری ریزنمونه‌های زربین بررسی شد. در آزمایش دوم و سوم، اثر محیط کشت (MS و WPM)، غلظت‌های BA (صفر، ۰/۱، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر) به‌تنهایی و در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA) و نوع ریزنمونه (سرشاخه‌های اولیه و ثانویه) بر پرآوری گیاه به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شد. در آزمایش اول، بیشترین تعداد شاخساره در ریزنمونه‌های تهیه‌شده در فصل بهار و تابستان که به‌ترتیب در محیط کشت‌های MS و WPM کشت شده بودند، به‌دست آمد. در آزمایش دوم، بیشترین شاخه‌زایی و افزایش طول در محیط کشت WPM و در سرشاخه‌های ثانویه مشاهده شد. بیشترین طول شاخساره در ریزنمونه اولیه کشت‌شده در محیط کشت WPM با غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و همچنین ریزنمونه اولیه در محیط کشت MS بدون BA به‌دست آمد. در آزمایش سوم، بیشترین تعداد شاخساره (میانگین سه) مربوط به ریزنمونه‌های ثانویه در محیط کشت WPM حاوی صفر میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. به‌طور کلی، بهترین زمان نمونه‌برداری، محیط کشت و نوع ریزنمونه به‌ترتیب فصل بهار، محیط WPM و سرشاخه ثانویه بود.

واژه‌های کلیدی: ایندول‌بوتیریک‌اسید، بنزیل‌آدنین، شاخساره، محیط کشت.

مقدمه

امروزه اهمیت جنگل‌کاری به‌منظور تعدیل آب‌وهوا، افزایش نزولات آسمانی، جلوگیری از فرسایش، ایجاد محصولات چوبی صنعتی و نیز ایجاد تفرج‌گاه‌های جنگلی بر کسی پوشیده نیست و در چنین شرایطی است که می‌توان با حفظ گونه‌های موجود و وارد کردن گونه‌های جدید اقدام

به جنگل‌کاری کرد (Aghbash *et al*., 2006). از آنجا که درختان کهن‌سال در زندگی طولانی خود در برابر انواع تنش‌های محیط زیستی پایداری نشان داده‌اند، شناسایی، حفظ و تکثیر آن‌ها به‌عنوان مهم‌ترین ذخایر ژنتیکی هر کشور بسیار مهم و ارزشمند است (Khoshnevis *et al*., 2017). سرو/زربین ابرکوه (*Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis* (Milll.) Gord.) گونه‌ای سوزنی‌برگ از خانواده سرو (Cupressaceae) و ازجمله گونه‌های مدیترانه‌ای است (Irannejad Parizi *et al*., 2016). سن این درخت حدود ۴۰۰۰ سال است و از قدیمی‌ترین سروها در جهان به‌شمار می‌رود. با توجه به اهمیت این درخت و لزوم تولید نتایج مشابه پایه مادری، استفاده از کشت بافت بهترین راه ازدیاد این گیاه ارزشمند است. از این‌رو، تکثیر این گیاه از طریق کشت بافت به‌منظور تولید انبوه بسیار کارا است (Giovanelli & De Carlo, 2007). فصل، سن و ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه، نوع محیط کشت و ترکیب مناسب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در موفقیت اندام‌زایی کشت‌های سلولی نقش دارند (Hussain *et al*., 2013). ریزنمونه‌هایی نظیر برگ‌های بالغ، ریشه، ساقه، دمبرگ و اجزای دیگر می‌توانند با موفقیت برای تولید گیاهچه به‌روش اندام‌زایی در گیاهان مختلف استفاده شوند (Hussain *et al*., 2013).

پژوهش Razavi (۲۰۱۳) نشان داد که در ارس (*Juniperus polycarpos*)، شاخه‌زایی در سرشاخه‌های ابتدایی پایه نر نسبت به سرشاخه‌های ابتدایی پایه ماده بیشتر بود و افزایش شاخه از نظر طول و تعداد، در سرشاخه‌های ابتدایی پایه نر نسبت به سرشاخه‌های انتهایی آن بهتر و بیشتر ایجاد می‌شد. ریشه‌زایی در سرشاخه‌های انتهایی پایه ماده نسبت به سرشاخه‌های انتهایی پایه نر بیشتر مشاهده شد. همچنین، افزایش ریشه از نظر طول و تعداد در سرشاخه‌های انتهایی پایه ماده نسبت به سرشاخه‌های ابتدایی آن بهتر و بیشتر بود. Taghipoor و همکاران (۲۰۱۵) دو محیط کشت (Woody Plant medium) WPM و (Thayer-Martin medium) TE را بهترین محیط‌های کشت برای صفات بررسی‌شده در باززایی کاج مطبق معرفی کردند. همچنین، از بین سیتوکینین‌های ارزیابی‌شده، 2ip (۲- ایزوپنتیل‌آدنین) بیشترین تأثیر را در مورد صفات بررسی‌شده داشت. در مورد ریشه‌زایی این گیاه نیز بهترین پاسخ را هورمون BAP نشان داد.

پژوهش Capuana و Giannini (۱۹۹۷) در مورد ریزازدیادی *C. sempervirens* جوان و بالغ نشان داد که القای جوانه‌های زربین در محیط کشت SH حاوی پنج میکرومولار BA (بنزیل‌آدنین) و ۰/۱ میلی‌مولار NAA (یک- نفتالین‌استیک‌اسید) انجام شد. همچنین، سن درختانی که ریزنمونه‌های اولیه از آن‌ها جمع‌آوری شده بود، به‌شدت در سرعت تکثیر و پرآوری و موفقیت در رشد و ریشه‌دهی نمونه‌ها مؤثر بود. پژوهش‌های پیشین حاکی از آن است که BA برای تحریک رشد جوانه‌های جانبی در زربین جوان و در دیگر مخروطیان ضروری است (Morte *et al*., 1992; Thomas *et al*., 1997). Rahmati و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که بیشترین درصد کالوس‌زایی (۵۷ درصد) ریزنمونه‌های ساقه دو گونه سرخدار (*Taxus baccata* و *T. berevifolia*) در محیط کشت WPM حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (دو و چهار- دی‌کلروفنوکسی‌استیک‌اسید) و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین انجام شد. همچنین، استفاده از غلظت‌های کم تنظیم‌کننده‌های رشد نسبت به غلظت‌های بیشتر، تأثیر بیشتری بر متغیر کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های ساقه دو گونه سرخدار فوق داشت.

تکثیر زربین ۴۰۰۰ ساله ابرکوه با روش‌های سنتی مانند بذر و قلمه زمان‌بر است و به مواد گیاهی زیادی نیاز دارد. همچنین، در صورت تکثیر با بذر به‌دلیل تفرق صفات، گیاهان به‌دست آمده ازنظر ژنتیکی مشابه والد خود نخواهند بود. از سوی دیگر، برای پی بردن به راز ماندگاری و عمر طولانی این درخت، استفاده از روش‌های جدید زیست‌فناوری مانند کشت بافت بسیار مفید خواهد بود. در پژوهش پیش‌رو اثر نوع ریزنمونه، زمان نمونه‌برداری و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در ریزازدیادی زربین چهار هزار ساله ابرکوه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی با مجوز اداره محیط زیست استان یزد از زربین کهن‌سال (۴۰۰۰ ساله) ابرکوه در بخش جنوبی شهرستان ابرکوه با مختصات جغرافیایی ′۵۸ °۵۲ شرقی و ′۴۶ °۳۰ شمالی تهیه شد. ارتفاع کنونی این درخت حدود ۲۵ متر، ارتفاع ناحیه تشکیل تاج از سطح زمین ۲/۱۰ متر، محیط یقه ۹/۶۲ متر، قطر برابر سینه ۳/۱۴ متر، قطر متوسط تاج ۱۸/۵ متر و سطح تاج آن ۲۱۰ متر مربع است (Irannejad Parizi *et al.*, 2016). نمونه‌های گیاهی در کیسه پلاستیکی درون یخ قرار داده شد و بلافاصله به آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه اردکان منتقل شد. در این پژوهش به‌منظور مقایسه دو ریزنمونه شاخه‌های اولیه و ثانویه پس از انتخاب شاخه‌های اولیه (اولین انشعاب نیمه‌سبز از نمونه گرفته‌شده از شاخه) و ثانویه (دومین انشعاب پس از انشعاب انعطاف‌پذیر و نیمه‌سبز اولیه) از قسمت سرشاخه‌ها نمونه‌هایی به طول یک تا دو سانتی‌متر تهیه شد. به‌منظور ضدعفونی کردن، نمونه‌ها ابتدا در آب مقطر استریل به‌مدت سه دقیقه شسته شده و سپس در محلول اسیدسیتریک ۰/۰۵ درصد به‌اضافه کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت سه تا چهار دقیقه استریل شدند. درنهایت، با محلول اسیدسیتریک ۰/۰۵ درصد، سه مرتبه آب‌کشی شدند. در زمان ضدعفونی، محلول به‌خوبی تکان داده شد تا به‌طور کامل با ریزنمونه‌ها تماس برقرار کند.

در آزمایش اول، اثر زمان نمونه‌گیری، نوع محیط کشت و غلظت‌های BA بر پرآوری ریزنمونه‌های سرو بررسی شد. نمونه‌گیری در چهار فصل مختلف در ماه‌های تیر و مرداد (تابستان)، مهر و آبان (پاییز)، دی (زمستان) و خرداد (بهار) از سرشاخه‌های اولیه انجام شد. ریزنمونه‌هایی به طول یک تا دو سانتی‌متر در محیط کشت‌های MS (Murashige & Skoog, 1962) و WPM (McCown & Lloyd, 1981) حاوی تنظیم‌کننده رشد BA با سه غلظت (صفر، ۰/۱ و یک میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. پس از تهیه محیط کشت، ۷/۵ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به آن افزوده شد. سپس، pH محیط کشت روی ۵/۷ تنظیم شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد استریل شد. برای کشت نمونه‌ها از شیشه‌های مربایی به ارتفاع ۱۰ و قطر شش سانتی‌متر استفاده شد. درون هر شیشه، سه عدد ریزنمونه قرار گرفت. نمونه‌ها پس از کشت در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی به هشت ساعت تاریکی، دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد در دوره روشنایی و ۲±۱۸ درجه سانتیگراد در دوره تاریکی و شدت نور ۲۵۰۰ تا ۳۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. در آزمایش دوم، اثر نوع ریزنمونه (اولیه و ثانویه) غلظت‌های مختلف (صفر، ۰/۱، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر) BA در محیط‌های کشت MS و WPM بر مقدار پرآوری بررسی شد. در آزمایش سوم، اثر نوع ریزنمونه (اولیه و ثانویه)، ترکیب چهار غلظت مختلف (صفر، ۰/۱، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر) BA با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در محیط‌های کشت MS و WPM بر مقدار پرآوری بررسی شد. تنها تفاوت آزمایش دوم و سوم در ترکیب هورمونی مورد استفاده بود و موارد دیگر، یکسان درنظر گرفته شد. در آزمایش دوم از چهار سطح BA استفاده شد و در آزمایش سوم از ترکیب چهار سطح BA با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده شد. نحوه تهیه محیط کشت، کشت و نگهداری ریزنمونه‌ها مانند آزمایش اول بود. آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. پس از چهار هفته، اطلاعات مربوط به طول و تعداد شاخساره یادداشت شد. داده‌ها با استفاده از آزمون Anova در نرم‌افزار SAS تجزیه شدند. آزمون چنددامنه‌ای دانکن برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت آماری بین میانگین تیمارها در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

آزمایش اول

در مورد ریزنمونه‌های اولیه، نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس نشان داد که اثر فصل نمونه‌گیری، نوع محیط کشت

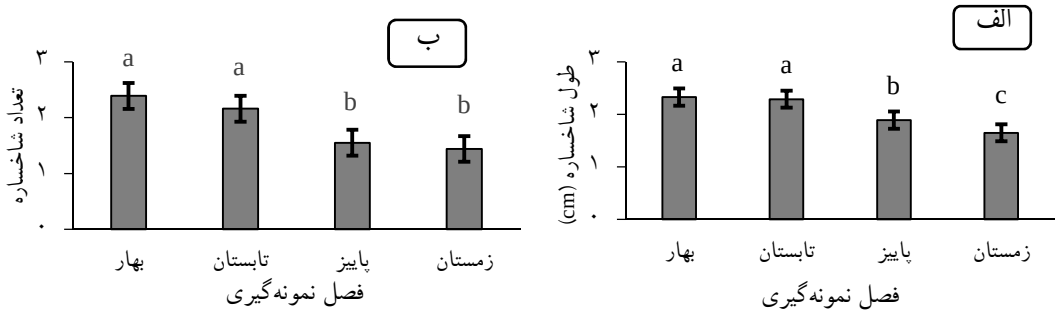
و سطوح مختلف BA بر طول شاخساره در مرحله پرآوری در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). همچنین، اثر فصل نمونه‌گیری، سطوح مختلف BA، اثر متقابل فصل نمونه‌گیری و نوع محیط کشت، اثر متقابل نوع محیط کشت و سطوح مختلف BA بر تعداد شاخساره در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار بود.

جدول ۱- تجزیه واریانس مربوط به اثر فصل نمونه‌گیری، نوع محیط کشت و سطوح مختلف BA بر طول و تعداد شاخساره در ریزنمونه اولیه گیاه سرو در شرایط درون شیشه

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		طول شاخه	تعداد شاخه
فصل نمونه‌گیری (a)	۳	۱/۹۱**	۳/۸۱**
نوع محیط کشت (b)	۱	۲/۲۳**	۰/۰۵ns
سطح BA (c)	۲	۲/۹۲**	۱/۸۴**
a × b	۳	۰/۱۵ns	۰/۷۵**
a × c	۶	۰/۱۹ns	۰/۱۶ns
b × c	۲	۰/۱۹ns	۱/۴۳**
a × b × c	۶	۱/۰۷ns	۰/۱۸ns
خطای آزمایش	۴۸	۰/۰۹	۰/۲۲
ضریب تغییرات (درصد)		۱۵/۰۱	۲۴/۹۵

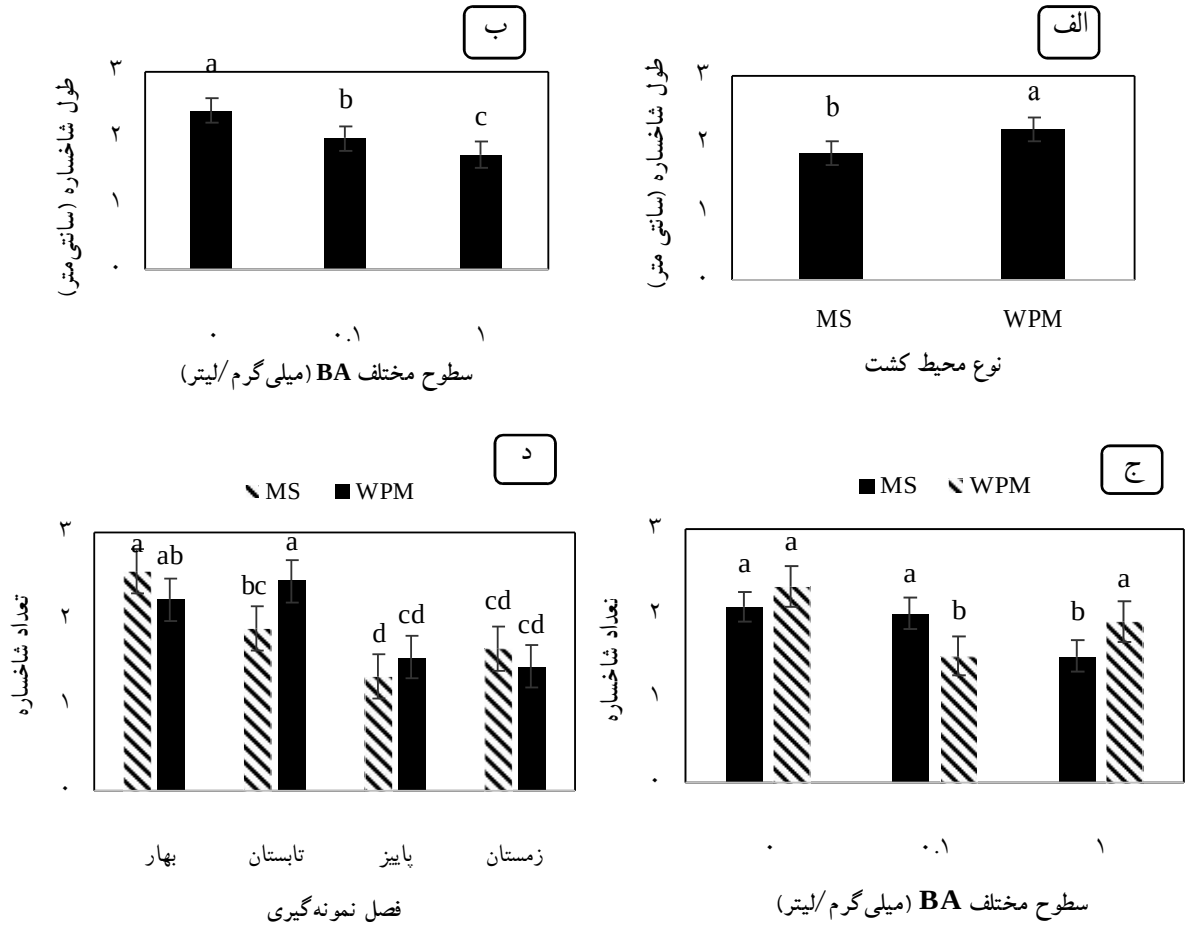
**اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹ درصد؛ ns غیرمعنی‌دار

نتایج مقایسه میانگین اثر فصل نمونه‌گیری در ریزنمونه‌های اولیه بر طول شاخساره نشان داد که بیشترین طول (۲/۳۳ و ۲/۲۹ سانتی‌متر) (شکل ۱- الف) و تعداد شاخساره (۲/۳۹ و ۲/۱۶) (شکل ۱- ب) مربوط به فصل‌های بهار و تابستان بود. همچنین، کمترین طول (۱/۶۵ سانتی‌متر) (شکل ۱- الف) در نمونه‌های فصل زمستان و کمترین تعداد شاخساره (۱/۵۵ و ۱/۴۴) (شکل ۱- ب) در نمونه‌های متعلق به فصل‌های پاییز و زمستان مشاهده شد.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر فصل نمونه‌گیری در ریزنمونه‌های اولیه بر طول (الف) و تعداد شاخساره (ب) سرو ابرکوه در شرایط درون شیشه

نتایج مقایسه میانگین مربوط به اثر نوع محیط کشت ریزنمونه‌های اولیه بر طول شاخساره نشان داد که طول شاخساره در محیط کشت WPM (۲/۲۲ سانتی‌متر) نسبت به MS (۱/۸۶ سانتی‌متر) بیشتر بود (شکل ۲- الف). یافته‌های مربوط به مقایسه میانگین اثر سطح BA بر طول شاخساره نشان داد که بیشترین طول شاخساره مربوط به تیمار شاهد و کمترین آن متعلق به غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BA بود (شکل ۲- ب). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل نوع محیط کشت و سطوح مختلف BA بر تعداد شاخساره نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره در ریزنمونه‌های اولیه کشت‌شده در محیط کشت MS حاوی صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA و نیز ریزنمونه‌های اولیه کشت‌شده در محیط کشت WPM حاوی صفر و یک میلی‌گرم بر لیتر BA به‌دست آمد (شکل ۲- ج). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل فصل نمونه‌گیری و نوع محیط کشت بر تعداد شاخساره نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره (۲/۴۴ و ۲/۲۲) مربوط به ریزنمونه‌های تهیه‌شده در فصل تابستان و بهار بود که به‌ترتیب در محیط کشت‌های MS و WPM کشت شده بودند و کمترین تعداد شاخساره (۱/۳۳) در ریزنمونه تهیه‌شده در فصل پاییز و کشت‌شده در محیط کشت MS مشاهده شد (شکل ۲- د).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر الف) نوع محیط کشت، ب) غلظت BA، ج) اثر متقابل محیط کشت و BA و د) اثر متقابل فصل نمونه‌گیری و محیط کشت بر طول و تعداد شاخساره گیاه سرو در شرایط درون شیشه

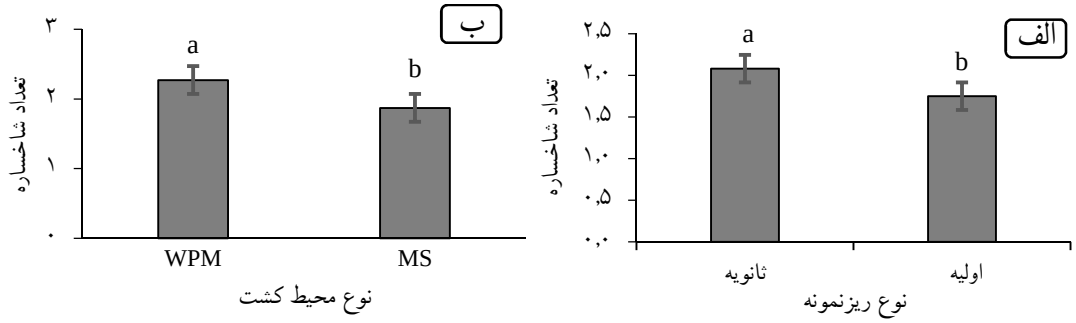
آزمایش دوم

نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس نشان داد که اثر نوع محیط کشت بر طول و تعداد شاخساره در مرحله پرآوری در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). اثر سطوح مختلف BA بر تعداد و طول شاخساره اختلاف معنی‌دار نشان نداد (جدول ۲). اثر نوع ریزنمونه (اولیه و ثانویه) بر تعداد شاخساره در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار بود، اما بر طول شاخساره معنی‌دار نبود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره در ریزنمونه سرشاخه ثانویه و کمترین تعداد مربوط به ریزنمونه سرشاخه اولیه بود (شکل ۳- الف). همچنین، بیشترین تعداد شاخساره (۲/۰۸) در محیط کشت WPM و کمترین تعداد شاخساره (۱/۷۵) در محیط کشت MS مشاهده شد (شکل ۳- ب).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت، سطوح مختلف BA و نوع ریزنمونه بر طول و تعداد شاخساره دو ریزنمونه اولیه و ثانویه گیاه سرو در شرایط درون شیشه در آزمایش دوم و سوم

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		آزمایش دوم		آزمایش سوم	
		طول شاخه	تعداد شاخه	طول شاخه	تعداد شاخه
نوع محیط کشت (a)	۱	۱/۹۶ **	۱/۳۳ **	۰/۰۱ ns	۰/۰۲ ns
سطح BA (b)	۳	۰/۵۴ ns	۰/۳۸ ns	۰/۹۹ **	۰/۷۹ **
نوع ریزنمونه (c)	۱	۰/۱۸ ns	۱/۳۳ **	۰/۲۱ ns	۰/۰۲ ns
a × b	۳	۰/۷۶ ns	۰/۲۷ ns	۰/۳۲ **	۰/۰۷ ns
a × c	۱	۰/۰۰۲ ns	۰/۳۳ ns	۴/۲ **	۱/۰۲ ns
b × c	۳	۰/۰۵ ns	۰/۰۵ ns	۰/۱۶ ns	۰/۴ ns
a × b × c	۳	۱/۰۷ **	۰/۳۳ ns	۰/۵۱ **	۰/۷۴ **
خطای آزمایشی	۳۲	۰/۳۶	۰/۳۱	۰/۰۸	۰/۲۹
ضریب تغییرات (درصد)		۲۴/۸۱	۲۹/۱۶	۱۱/۲	۱۳/۰۴

**اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹ درصد؛ ns غیرمعنی‌دار



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر نوع الف) ریزنمونه و ب) محیط کشت بر طول شاخساره ریزنمونه اولیه و ثانویه گیاه سرو در شرایط درون شیشه

نتایج مقایسه میانگین اثر سه‌گانه نوع محیط کشت، سطوح مختلف BA و نوع ریزنمونه بر طول شاخساره نشان داد که بیشترین طول شاخساره مربوط به ریزنمونه اولیه کشت‌شده در محیط کشت WPM با غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و همچنین ریزنمونه اولیه در محیط کشت MS بدون BA بود (جدول ۳). کمترین طول شاخساره در ریزنمونه اولیه و ثانویه در محیط کشت MS با غلظت ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. سطوح دیگر BA، انواع ریزنمونه و محیط‌های کشت تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر سه‌گانه سطوح مختلف BA، نوع محیط کشت و ریزنمونه بر طول شاخساره گیاه سرو در آزمایش دوم

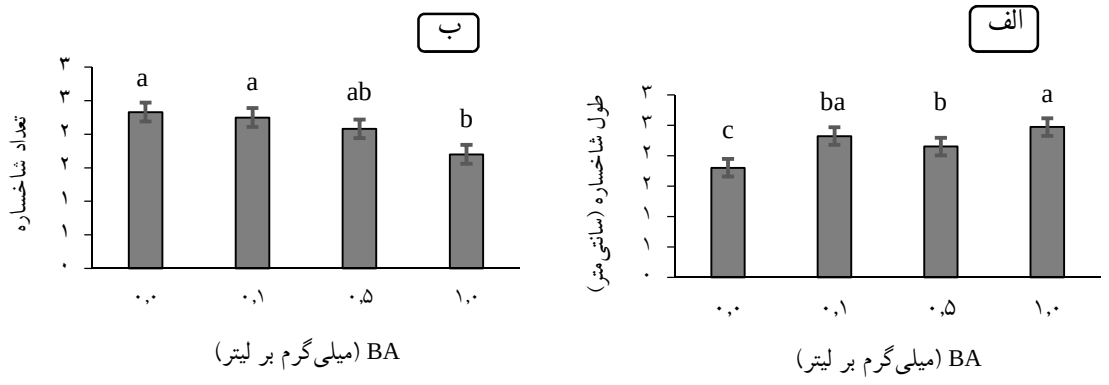
محیط کشت	سطح BA (mg/l)	ریزنمونه	طول شاخه (cm)	محیط کشت	سطح BA (mg/l)	ریزنمونه	طول شاخه (cm)
MS	۰	اولیه	۲/۷۷ ^{a} ±۱/۶۶	WPM	۰	اولیه	۱/۷۷ ^{ab} ±۰/۲۵
		ثانویه	۱/۷۹ ^{ab} ±۰/۰۹			ثانویه	۱/۷۹ ^{ab} ±۰/۴۱
	۰/۱	اولیه	۱/۷۷ ^{ab} ±۰/۳۴		۰/۱	اولیه	۲/۷۷ ^{a} ±۰/۱۶
		ثانویه	۱/۹۹ ^{ab} ±۰/۰۹			ثانویه	۲/۶۱ ^{ab} ±۰/۵۱
	۰/۵	اولیه	۱/۴۴ ^{b} ±۰/۲۵		۰/۵	اولیه	۲/۹۴ ^{a} ±۰/۰۹
		ثانویه	۱/۹۲ ^{ab} ±۰/۱۶			ثانویه	۲/۰۵ ^{ab} ±۰/۰۹
	۱	اولیه	۱/۷۷ ^{ab} ±۰/۳۳		۱	اولیه	۱/۸۸ ^{ab} ±۰/۲۵
		ثانویه	۱/۴۹ ^{b} ±۰/۲۵			ثانویه	۱/۹۴ ^{ab} ±۰/۲۸

بر اساس آزمون دانکن، میانگین‌های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.

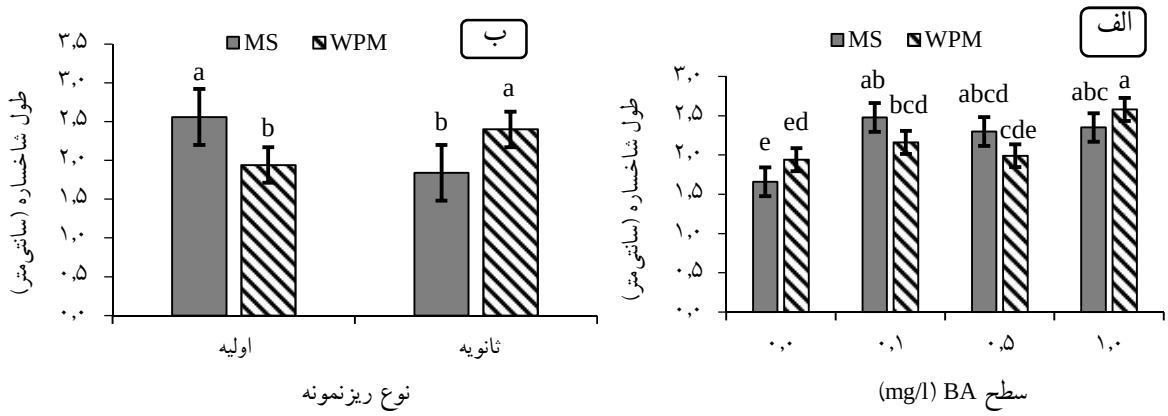
آزمایش سوم

نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت، سطوح مختلف BA + ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و نوع ریزنمونه نشان داد که اثر سطوح مختلف BA + ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بر طول و تعداد شاخساره و اثر سه‌گانه نوع محیط کشت، سطوح مختلف BA + ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و نوع ریزنمونه بر طول و تعداد شاخساره در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). همچنین، اثر متقابل نوع محیط کشت و سطوح مختلف BA و نیز اثر متقابل محیط کشت و نوع ریزنمونه در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). بر اساس نتایج، با افزایش سطح BA، طول شاخساره افزایش یافت، به‌طوری که بیشترین طول شاخساره (۲/۴۷ سانتی‌متر) با یک میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد (شکل ۴- الف). در حالی‌که با افزایش سطح BA، تعداد شاخساره به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۴- ب). کمترین تعداد شاخساره در ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد.

بررسی اثر متقابل سطوح مختلف BA و محیط کشت نشان داد که بیشترین طول شاخساره (۲/۵۸ سانتی‌متر) در ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط کشت WPM حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BA + ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد (شکل ۵- الف). کمترین طول شاخساره در هر دو محیط کشت در شاهد (بدون BA) به‌دست آمد. ریزنمونه‌های اولیه کشت‌شده در محیط MS و ثانویه در محیط WPM بیشترین طول شاخساره را داشتند (شکل ۵- ب).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر سطوح BA بر الف) طول شاخساره و ب) تعداد شاخساره گیاه سرو در شرایط درون شیشه



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر الف) متقابل سطوح مختلف BA و محیط کشت و ب) نوع ریزنمونه و محیط کشت بر طول شاخساره در ریزنمونه گیاه سرو در شرایط درون شیشه

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین طول شاخساره در ریزنمونه‌های اولیه کشت‌شده در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ریزنمونه ثانویه کشت‌شده در محیط کشت WPM حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود (جدول ۴). همچنین، بیشترین تعداد شاخساره با میانگین سه مربوط به ریزنمونه‌های ثانویه کشت‌شده در محیط کشت WPM حاوی صفر میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود (جدول ۴).

بحث

فصل، سن، ترکیب محیط کشت، ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب در موفقیت اندام‌زایی از کشت‌های درون‌شیشه‌ای نقش دارند (Hussain *et al*., 2013). بر اساس نتایج پژوهش پیش‌رو، بهترین فصل‌های نمونه‌گیری بهار و تابستان بود که با نتایج پژوهش‌های Yari و همکاران (۲۰۱۱) در مورد گردوی ایرانی و Zabihi و همکاران (۲۰۰۸) در مورد ملج مطابقت داشت. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که نمونه‌های تهیه‌شده در شروع فصل به‌دلیل فعال بودن بیشتر سلول‌ها و زیاد بودن سطح هورمون‌های درون‌زا در بافت‌ها، بهترین پاسخ را به کشت بافت نشان دادند. به‌طور کلی، در درختان با ورود از فاز نوجوانی به فاز باروری و بزرگ‌سالی، اندام‌زایی و باززایی کاهش می‌یابد و شانس تکثیر گیاهان جوان نسبت به درختان کهن‌سال بسیار زیاد است (Fossi *et al*., 1981).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر سه‌گانه سطوح مختلف BA همراه با ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA، محیط کشت و نوع ریزنمونه بر طول و تعداد شاخساره در سرشاخه ریزنمونه اولیه و ثانویه گیاه سرو در شرایط درون شیشه

محیط کشت	BA+IBA (mg/l)	ریزنمونه	طول شاخه (cm)	تعداد شاخه	محیط کشت	BA+IBA (mg/l)	ریزنمونه	طول شاخه (cm)	تعداد شاخه
MS	۰	اولیه	۱/۷۷^{cd}±۰/۰۹	۲^{ab}±۰	WPM	۰	اولیه	۱/۷۷^{cd}±۰/۱۹	۱/۶۶^{b}±۰/۵۷
		ثانویه	۱/۵۵^{d}±۰/۰۹	۱/۶۶^{b}±۰/۵۷			ثانویه	۲/۱۱^{bc}±۰/۱۹	۳^{a}±۰/۵۷
	۰/۱	اولیه	۳/۱۶^{a}±۰/۱۶	۱/۶۶^{b}±۰		۰/۱	اولیه	۱/۹۴^{bcd}±۰/۳۴	۲^{ab}±۰/۵۷
		ثانویه	۱/۸۱^{cd}±۰/۰۹	۱/۶۶^{b}±۰/۵۷			ثانویه	۲/۳۸^{b}±۰/۳	۲/۶۶^{ab}±۰/۵۷
	۰/۵	اولیه	۲/۳۸^{b}±۰/۳۴	۱/۶۶^{b}±۰/۵۷		۰/۵	اولیه	۱/۸۸^{bcd}±۰/۲۵	۲^{ab}±۰/۵۷
		ثانویه	۲/۲۲^{bc}±۰/۱۹	۲/۳۳^{ab}±۱/۰۴			ثانویه	۲/۱۰^{bc}±۰/۳۴	۲/۳۳^{ab}±۰/۵۷
	۱	اولیه	۲/۹۴^{a}±۰/۳۴	۲/۳۳^{ab}±۰/۵۷		۱	اولیه	۲/۱۶^{bc}±۰/۵	۲^{ab}±۰/۵۷
		ثانویه	۱/۷۷^{cd}±۰	۲/۳۳^{ab}±۰			ثانویه	۳^{a}±۰/۳۴	۲/۳۳^{ab}±۰/۵۷

بر اساس آزمون دانکن، میانگین‌های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.

همچنین، باززایی نمونه‌های بالغ مخروطیان کم است (Misson, 1988). در پژوهش پیش‌رو نیز به‌دلیل سن زیاد و قدمت زیاد درخت، باززایی درخت بسیار دشوار بود، به‌طوری که جوان‌سازی گیاه شش ماه به‌طول انجامید.

نتایج به‌دست‌آمده از کشت ریزنمونه‌های اولیه و ثانویه در محیط کشت MS و WPM حاوی سطوح مختلف BA نشان داد که محیط کشت WPM در بیشتر موارد، بهترین محیط برای شاخه‌زایی و افزایش طول بود. این تفاوت در شاخه‌زایی و طول شاخساره ناشی از تفاوت در عناصر تشکیل‌دهنده این دو محیط کشت بود. نتایج به‌دست‌آمده با یافته‌های Bolandi و همکاران (۲۰۱۶) در مورد پایه رویشی GF677 مطابقت داشت. Zaidi و همکاران (۲۰۱۲) نیز با بررسی انواع محیط کشت به‌منظور ریزازدیادی سرو کوهی، بیشترین القاء کالوس را در محیط کشت WPM با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با BAP گزارش کردند. Mahdinejad و همکاران (۲۰۱۵) با کشت ریزنمونه برگ سرخدار در محیط کشت پایه WPM به‌همراه هورمون‌های 2,4-D و NAA، موفق به تولید بیشترین مقدار کالوس (۷۸ درصد) شدند. محیط کشت 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 است. مقدار آمونیوم آن نیز کمتر از محیط کشت MS است و در کل، نمک‌های پرمصرف کمتری دارد. به همین دلیل، این محیط کشت بیشتر در کشت بافت درختان چوبی استفاده می‌شود (Bolandi *et al*., 2016). در محیط کشت WPM در مقایسه با محیط MS، نیترات پتاسیم حذف شده و سولفات پتاسیم جایگزین می‌شود. ضمن اینکه مقدار یون سولفات در محیط کشت WPM نسبت به MS بیشتر است. وجود سولفات، امکان جذب برخی عناصر را در محیط کشت افزایش می‌دهد. از تفاوت‌های دیگر دو محیط کشت مورد مطالعه، مقدار نیترات و آمونیم آن‌ها است که به‌عنوان منبع اصلی تأمین نیتروژن به محیط کشت اضافه می‌شود (Bolandi *et al*., 2016).

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی که در غلظت بسیار کم در گیاه تولید می‌شوند، یکی از مهم‌ترین عامل‌های مؤثر بر تنظیم تقسیم، رشد و تمایزیابی سلول گیاهی هستند. اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها به‌تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر،

پرکاربردترین تنظیم‌کننده‌های رشـد گیـاهی در کشت سلول، بافت و اندام گیاهی هستند و نقش بسیار مهمی در استقرار و رشد درون شیشه‌ای ریزنمونه‌ها دارند (Bhojwani & Razdan, 1996). نتایج به‌دست آمده از کشت ریزنمونه‌های اولیه و ثانویه در محیط کشت WPM با سطوح مختلف BA و BA به‌همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA نشان داد که بیشترین طول و تعداد شاخساره مربوط به سرشاخه‌های ثانویه بود. Taghipoor و همکاران (۲۰۱۶) نیز قسمت میانی ساقه و سپس قسمت پایین آن را به‌عنوان بهترین ریزنمونه در کشت درون‌شیشه‌ای کاج مطبق معرفی کردند و بیان کردند که قسمت نزدیک به مریستم، کمترین درصد جوانه‌زنی را داشت. در تکثیر درون‌شیشه‌ای *Araucaria cunninghamii* و دیگر گونه‌های آروکاریاسه، ریزنمونه‌های مریستم‌های جانبی در تولید جوانه‌های عمودگرا موفق بودند (Burrows *et al*., 1998)، بنابراین به‌نظر می‌رسد که سرشاخه‌ها به‌دلیل رشد زیاد و نزدیکی به محل مریستم فعال، ریزنمونه مناسب‌تری بود. انتخاب یک ریزنمونه در مرحله رشد مطلوب، نقش اساسی در موفقیت کشت بافت در شرایط درون شیشه دارد. پیچیدگی ریخت‌شناسی یک ریزنمونه به‌همراه انتخاب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب، تأثیری چشمگیر بر باززایی نوساقه‌ها و القاء کالوس دارد (Khawar *et al*., 2005)، هرچند که سن ریزنمونه‌ها و نحوه قرار گرفتن آن‌ها روی محیط کشت نیز حایز اهمیت است (Neibaur *et al*., 2008). به‌طور کلی، واکنش متفاوت گیاهان در جوانه‌های جانبی و انتهایی در محیط کشت به‌خاطر تولید مقدار اکسین داخلی در مریستم انتهایی و ایجاد اثرات بازدارندگی در این جوانه‌ها است، بنابراین در این گیاهان چون حرکت اکسین، قطبی و به سمت پایین است، مقدار آن در جوانه جانبی متعادل می‌شود و این گیاهان در محیط کشت با جوانه‌های جانبی، بهتر تکثیر می‌شوند (Sepahvand *et al*., 2012). نتایج مقایسه ریزنمونه‌های سرشاخه‌های اولیه و ثانویه در محیط کشت MS و WPM حاوی سطوح مختلف BA به‌علاوه ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA نشان داد که با افزایش غلظت BA تعداد شاخساره افزایش یافت. BA باعث شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخساره‌های جدید شده و در شرایط درون‌شیشه‌ای، افزایش غلظت سیتوکنین منجر به افزایش شاخه‌زایی در ارقام مختلف می‌شود (Karimpour *et al*., 2013)، بنابراین به‌نظر می‌رسد که سیتوکنین BA با غلبه بر غالبیت انتهایی باعث افزایش تعداد شاخساره‌های جانبی شد.

درمجموع، بیشترین طول شاخساره و باززایی ریزنمونه‌های کشت‌شده در مرحله پرآوری در محیط کشت WPM از ریزنمونه‌های ثانویه در فصل بهار بود و تنظیم‌کننده‌های سیتوکنین BA باعث افزایش شاخه‌زایی و طول شاخساره شدند. به‌منظور بهینه‌سازی پرآوری گیاه لازم است که اثرات تنظیم‌کننده‌های دیگر رشد و نیز انواع محیط کشت نیز بررسی شود تا بتوان شیوه‌نامه بهینه را معرفی کرد.

References

- Aghbash, F.Gh., Jalali, Gh.A., Teymourzadeh, A. and Hosseini, M., 2006. A quantitative and qualitative study of *Picea excelsa* and *Pinus nigra* in Fandoghloo forest reserve. Journal of Forest and Wood Products (Iranian Journal of Natural Resources), 59(1): 131-138 (In Persian).
- Zaidi, M.A., Khan, S., Jahan, N., Yousafzai, A. and Mansoor, A., 2012. Micropropagation and conservation of three *Juniperus* specices (Cuperssaceae). Pakistan Journal of Botany, 44: 301-304.
- Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K., 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier, Amsterdam, 767p.
- Bolandi, A.R., 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 Researches, 29(1): 1-14 (In Persian).
- Burrows, G.E., Doley, D.D., Haines, R.J. and Nikles, D.G., 1988. In vitro propagation of *Araucaria cunninghamii* and other species of the Araucariaceae via axillary meristems. Australian Journal of Botany, 36(6): 665-676.
- Capuana, M. and Giannini, R., 1997. Micropropagation of young and adult plants of cypress (*Cupressus sempervirens* L.). Journal of Horticultural Science, 72(3): 453-460.

- Fossi, D., Di Paola Lipucci, M. and Tognoni, F., 1981. Induzione in vitro di gemme ascellari della specie "*Cupressus sempervirens*" (L.). Rivista di Ortoflorofrutticoltura Italiana, 65(4): 293-299.
- Giovanelli, A., De Carlo, A., 2007. Micropropagation of Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.): 93-105. In: Mohan Jain, S. and Häggman, H., (Eds.). Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Springer, Netherlands, 559p.
- Hussain, A., Qarshi, I.A., Nazir, H., Uliah, I., Rashid, M. and Shinwari, Z.Kh., 2013. In vitro callogenesis and organogenesis in *Taxus wallichiana* Zucc. the Himalayan yew. Pakistan Journal of Botany, 45(5): 1755-1759.
- Irannejad Parizi, M.H., Akbari, H., Khoshnevis, M., Shams, M.R., Abedini, T., Rad, M.H., Rasouli, S.A.R., Taheri, A. and Mahdavi, M.R., 2016. National Monument of Abarkooh Cypress. Yazd University Press, Yazd, 308p (In Persian).
- Karimpour, S., Davarynejad, G.H., Bagheri, A. and Tehranifar, A., 2013. In vitro establishment and clonal propagation of Sebri pear cultivar. Journal of Agricultural Science and Technology, 15: 1209-1217.
- Khawar, K.M., Sarihan, E.O., Sevimay, C.S., Çöçü, S., Parmaksiz, I., Uranbey, S., Ipek, A., Kaya, M.D., Sancak, C. and Özcan, S., 2005. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L. Periodicum Biologorum, 107(1): 113-116.
- Khoshnevis, M., Matinizadeh, M., Shirvany, A. and Teimouri, M., 2017. Iran, the treasure of long-lived trees. Iran Nature, 2(4): 42-55 (In Persian).
- Mahdinejad, N., Fakheri, B.A. and Ghanbari, S., 2015. Effect of growth regulators on in vitro callogenesis *Taxus baccata* L. Biological Forum - An International Journal, 7(1): 142-145.
- McCown, B.H. and Lloyd, G., 1981. Woody plant medium (WPM) - A mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species. HortScience, 16: 453-453.
- Misson, J.P., 1988. Multiplication du *Thuja plicata* par culture in vitro de tissus juvéniles et âgés. Canadian Journal of Forest Research, 18(4): 473-477.
- Morte, M.A., Honrubia, M. and Piqueras, A., 1992. Micropropagation of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Cupressaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 28: 231-233.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Neibaur, I., Gallo, M. and Altpeter, F., 2008. The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 44: 480-486.
- Rahmati, Z., Payam Nour, V., Ghasemi Bezdi, K. and Ebrahimi, P., 2017. Optimization of culture medium for in vitro callogenesis in *Taxus baccata* L. and *T. berevifolia* Nutt. Journal of Forest and Wood Products (Iranian Journal of Natural Resources), 70(3): 381-391 (In Persian).
- Razavi, R.S., 2013. Proliferation induction of shoot and root in in vitro for micropropagation of *Juniperus polycarpos* C. Koch. M.Sc. thesis, Faculty of Agricultural Science, Payame Noor University, Tehran, 113p (In Persian).
- Sepahvand, S., Ebadi, A., Kamali, K. and Ghaemmaghami, S.A., 2012. Effect of myo-inositol and thiamine on micropropagation of Gf677 (Peach × Almond Hybrid). Journal of Agricultural Science, 4(2): 275-280.
- 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 (In Persian).
- Thomas, M.J., Duhoux, E. and Vazart, J., 1977. In vitro organ initiation in tissue culture of *Biota orientalis* and other species of the Cupressaceae. Plant Science Letters, 8(4): 395-400.
- Yari, M., Gholami, M. and AsnaAshari, M., 2011. Effect of sampling time, explant type, culture orientation and antioxidant type on in-vitro explant establishment and growth of Persian Walnut. Iranian Journal of Horticultural Science, 42(2): 141-149 (In Persian).
- Zabihi, H., Hosseni Nasr, S.M., Babaeyan Jelodar, N. and Jalilvand, H., 2008. Tissue culture of *Ulmus glabra* Hudson: The effects of culture media, explants and their harvest times. Journal of Agricultural Science and Natural Resources, 15(4): 15-21 (In Persian).

Effect of different factors on micropropagation of Abarkooh 4000-year-old horizontal cypress (*Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis* (Mill.) Gord.)

M. Khamushi [1], M. Dehestani-Ardakani [2], K. Kamali Aliabad [3*] and J. Ghlamnejad [4]

1- M.Sc. Student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran
2- Assistant Prof., Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran
3*- Corresponding author, Assistant Prof., Department of Soil Science, Faculty of Natural Resources, Yazd University, Yazd, Iran
E-mail: kkamali@yazd.ac.ir
4- Assistant Prof., Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran

Received: 21.02.2018 Accepted: 28.04.2018

Abstract

This study was conducted to protect the genetic properties and propagation of 4000-year-old Abarkooh horizontal cypress (*Cupressus semprvirens* L. var. *horizontalis* (Mill.) Gord.) by tissue culture technique. In the first experiment, the effect of preparation time of explant (four seasons), medium culture (MS and WPM) and concentrations of BA (0, 0.1 and 1 mg/l) on proliferation of horizontal cypress explants was investigated. In second and third experiments the effect of culture media (MS and WPM), concentrations of BA (0, 0.1, 0.5 and 1 mg/l) was studied alone or in combination with 0.01 mg/l IBA and type of explant (primary or secondary shoots) in a factorial experiment and completely randomized design with three replications. In first experiment, the maximum shoots number was obtained from spring and summer explants that were cultured in MS and WPM culture media, respectively. In second experiment, the maximum number and length of shoots was obtained in WPM culture medium and secondary shoots. The highest length of shoots was found in first shoots cultured in WPM medium containing 0.1 and 0.5 mg/l BA, followed by primary shoots cultured in MS medium culture without BA. In the third experiment, the maximum number of shoots (3) was observed in secondary shoots by using WPM medium containing 0 mg/l BA + 0.01 mg/l IBA. Conclusively the best time of preparing explant, type of culture media and explant were found to be spring, WPM medium and secondary shoots, respectively.

Keywords: Benzyl adenin, Indolebutyric acid, medium culture, shoot.