نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل
جلد بیست و پنجم، شماره چهارم، ۱۳۹۷
http://jwfst.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jwfst.2019.15248.1756

بررسی اثر انواع محیط کشت بر ریزازدیادی سرو کهنسال ابرکوه (*Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis*)

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

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، ایران،
[۲]استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، ایران،
[۳]استادیار گروه علوم خاکشناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۱

چکیده

سابقه و هدف: سرو ابرکوه (*Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis* (Mill) Gord) از کهنسال‌ترین درختان دنیا می‌باشد. از آنجا که این گیاه طی زندگی طولانی خود، شرایط محیطی نامساعد زیادی را تحمل نموده است، لذا در صورت ازدیاد این گنجینه ارزشمند، می‌توان جمعیت گیاهی زیادی را با توانایی مقاومت به شرایط نامساعد محیطی تولید نمود. یکی از بهترین روش‌های نگهداری، حفظ و ازدیاد گیاهان در حال انقراض و کمیابی همچون این گیاه، کشت بافت آن است. پژوهش حاضر به‌منظور تعیین بهترین محیط کشت و غلظت بنزیل آدنین (BA) در تکثیر درون شیشه‌ای سرو ابرکوه انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، هفت محیط کشت‌ها شامل موراشیک و اسکوگ (MS) و انواع محیط کشت MS تغییریافته شامل ½ MS، ¾ MS، MS بدون نیترات آمونیوم (NH_4NO_3)، MS با نصف مقدار منابع نیتروژن (KNO_3, NH_4NO_3)، MS با ویتامین تغییریافته گروه ۱ و ۲ همراه با سه غلظت BA (صفر، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) در مرحله استقرار و پنج غلظت (صفر، ۱، ۱/۵، ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) در مرحله پرآوری استفاده گردید. آزمایش‌ها در هر دو مرحله به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در مرحله استقرار، بیشترین رشد طولی و کمترین درصد قهوه‌ای (۱٤/۵۳ درصد) شدن در محیط کشت ½ MS به‌دست آمد. همه محیط‌های کشت مورد استفاده در مرحله استقرار به‌جز MS با نصف مقدار منابع نیتروژنی منجر به حفظ سبزینگی ریزنمونه‌ها شدند. با افزایش غلظت BA، طول شاخساره به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به‌طوری که بیشترین رشد طولی در محیط‌های کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد. در تمام محیط‌های کشتی که میزان نیتروژن تغییر یافته یا حذف شده بود، میزان رشد طولی و تولید شاخساره به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر محیط‌های کشت کاهش یافت. در مرحله پرآوری، بیشترین تعداد شاخه و رشد طولی در محیط کشت ½ MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و بیشترین درجه سبزینگی در ریزنمونه‌های کشت شده در محیط‌های کشت MS و ½

*مسئول مکاتبه: mdehestani@ardakan.ac.ir

MS حاصل شد. بر اساس نتایج مشخص شد که با افزایش غلظت BA در مرحله پرآوری، طول و تعداد شاخساره به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، در حالی‌که درجه سبزینگی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.
نتیجه‌گیری: به‌طور کلی، میزان پرآوری، طول و تعداد شاخساره به میزان قابل توجهی به مقدار مواد غذایی دریافتی و نوع محیط کشت وابسته است. بنابر نتایج حاصل از این پژوهش، جهت ریزازدیادی سرو ابرکوه محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در مرحله استقرار و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA در مرحله پرآوری، توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آنین، شاخساره، قهوه‌ای شدن، کشت درون شیشه‌ای، MS تغییر یافته

مقدمه

درختان کهنسال در زندگی طولانی خود در برابر انواع تنش‌های محیط زیستی پایداری نشان داده‌اند، لذا شناسایی، حفظ و تکثیر این درختان به‌عنوان مهمترین ذخایر ژنتیکی هر کشور بسیار مهم و ارزشمند است (۱۳). درختان کهنسال طی زندگی گاها چند هزار ساله خود، با انجام موتاسیون‌های مختلف در برابر تنش‌های محیطی از جمله اقلیمی و حتی اثرات ناشی از جنگ‌های متعدد، مقاومت کرده و به زندگی طبیعی خود ادامه داده‌اند (۱۳). با ایجاد ذخیره‌گاه‌های ژنتیکی، می‌توان این ذخایر با ارزش را حفظ نمود. یکی از نامدارترین درختان ایران، سرو کهن‌سال ابرکوه است که نه‌تنها در ایران بلکه در بین درختان کهنسال بسیاری از کشورهای جهان، نامدار است (۱۳). سرو ابرکوه گونه‌ای سوزنی برگ با نام علمی *Cupressus semprvirens* var. *horizontalis* (Mill) Gord از خانواده سروها (Cupressaceae) از جمله گونه‌های مدیترانه‌ای است (۱۲). به‌دلیل ویژگی‌های خاص و اهمیت فوق‌العاده این درخت سرو، تکثیر آن با تأکید بر حفظ خصوصیات ژنتیکی، از اولویت‌های مهم است. تکنینک‌های تکثیر رویشی نقش مهمی در استقرار باغ‌های همگروه بازی می‌کنند. در دهه گذشته از تکثیر درون شیشه‌ای، عمدتا ریزازدیادی، جهت تکثیر انبوه بسیاری از گونه‌های جنگلی مهم و دارای ارزش اقتصادی زیاد استفاده شده است (۱۰). ریزازدیادی موجب حفاظت از گونه‌های جنگلی، امکان تسریع جوان‌سازی فیزیولوژیک گیاه و نجات ژرم‌پلاسم را بدون توجه به وجود بذر فراهم می‌سازد (۲). این مسئله خصوصا در مورد گونه‌های گیاهی نادر و کهن‌سال مانند سرو ابرکوه بسیار حائز اهمیت می‌باشد. یکی از عوامل مؤثر در کشت بافت گیاهی، انتخاب محیط کشت مناسب برای تکثیر گیاه مورد نظر است. انتخاب محیط کشت مناسب برای موفقیت در کشت بافت امری ضروری است. اسپانوس و همکاران (۱۹۹۷) شاخساره دانهال‌های ۱۸ ماهه *C. sempervirens* و *Chamaecyparis lawsoniana* (A. Murray bis) Parl. را در محیط کشت MS تغییر یافته کشت کردند. پرآوری شاخه‌ها بدون افزودن BA صورت گرفت، هر چند افزایش معنی‌دار در تعداد شاخساره با افزودن ۰/۰۰۱ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. ۹۵ درصد از شاخساره‌های *C. sempervirens* در محیط کشت MS ½ حاوی یک درصد ساکارز و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌دار شدند (۲۲).

الرامنه و همکاران (۲۰۱۷) اثر انواع محیط کشت‌های (OM) (۱۹)، OM ½، موراشیک و اسکوگ (۱٦) (MS) و MS ½، همچنین انواع تنظیم کننده‌های رشد را در ریزازدیادی گیاه *Juniperus*

phoenicea L. بررسی کردند. محیط کشت OM حاوی ۲، ۳، ۵- تیدیودوبنزویک اسید (2,3,5-tidiodobenzoic acid) به‌طور معنی‌داری تمایز یابی برگ با ٤٠ درصد ریشه‌زایی نشان داد. در صورتی‌که بیشترین تعداد شاخه‌های جانبی در محیط‌های کشت OM و MS ½ حاصل شد (۳). بهجت ساسان و همکاران (۲۰۱٤) اثر انواع محیط کشت MS تغییر یافته را بر میزان تولید کالوس در *Taxus baccata* L. بررسی کردند. بیشترین القای کالوس (۹٦/٦۷ درصد) در محیط کشت MS ½ حاوی ¼ نیتروژن (KNO_3, NH_4NO_3) دارای گلوتامین، ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین حاصل شد (۵). امیدی و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر انواع محیط کشت MS و MS تغییر یافته در میزان نمک‌ها، نیتروژن (KNO_3, NH_4NO_3) و گلوتامین را بر ریز ازدیادی سرخدار (*T. baccaata*) مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که بیشترین درصد تشکیل کالوس (۹٦/٦۷ درصد) در محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin از جدا کشت ساقه به‌دست آمد (۱۷). عباسیان و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که از میان هفت محیط کشت مورد بررسی جهت القای جوانه و نمو شاخساره از شاخه‌های بالغ درخت *T. baccata*، محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دلیل انگیزش بیشترین تعداد شاخساره جدید، مؤثرتر بود (۱).

با توجه به این‌که تکثیر رویشی با روش‌های سنتی همانند قلمه، زمان‌بر بوده و نیازمند مواد گیاهی فراوان جهت تکثیر می‌باشد، روش کشت بافت می‌تواند جهت تکثیر، حفظ و نگهداری این ذخیره ژنتیکی با ارزش به‌کار رود. در پژوهش حاضر اثر محیط‌های کشت MS و MS تغییریافته با غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشدی بنزیل آدنین بر رشد طولی شاخه، تعداد شاخه جدید، سبزینگی و درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های سرو کهن‌سال ابرکوه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و منبع ریزنمونه‌ها: این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان طی سال‌های ۱۳۹٦-۱۳۹۵ انجام شد. مواد گیاهی با اخذ مجوز از اداره حفاظت محیط زیست استان یزد از سرو کهنسال (٤۰۰۰ ساله) ابرکوه در بخش جنوبی شهرستان ابرکوه با مختصات جغرافیایی ۵۲ درجه و ۵۸ دقیقه شرقی و ۳۰ درجه و ٤٦ دقیقه شمالی در استان یزد گرفته شد. ارتفاع کنونی این درخت حدود ۲۵ متر، ارتفاع ناحیه فعلی تشکیل تاج از سطح زمین ۲/۱۰ متر، محیط یقه (تنه روی سطح زمین) ۹/٦۲ متر، قطر تنه برابر سینه ۳/۱٤ متر، قطر متوسط تاج ۱۸/۵۰ متر و سطح تاج پوشش آن برابر ۲۱۰ مترمربع می‌باشد (۱۲). ریزنمونه‌ها از قسمت‌های انتهایی شاخه‌های پایینی درخت تهیه شد.

تهیه و ضدعفونی مواد گیاهی: ریزنمونه‌ها به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر از سرشاخه‌ها تهیه شدند و با آب شهری به‌مدت دو دقیقه شسته شدند. به‌منظور ضدعفونی، زیر هود لامینار و تحت شرایط کاملاً استریل، ابتدا به‌مدت سه دقیقه درون محلول ۰/۰۵ درصد اسید سیتریک تحت تیمار قرار گرفتند. سپس به‌مدت چهار دقیقه درون محلول حاوی ۰/۰۵ درصد اسید سیتریک و ۰/۱۰ درصد کلرید جیوه قرار گرفتند. پس از آن، مجددا سه مرتبه هر کدام به‌مدت سه دقیقه توسط محلول ۰/۰۵ درصد اسید سیتریک آب کشی شدند. برای افزایش اثر ماده ضدعفونی کننده ماده و ریزنمونه‌ها شدیداً تکان داده شدند تا تماس کافی بین آن‌ها برقرار شود.

محیط کشت: جهت استقرار و پرآوری ریزنمونه‌ها محیط‌های کشت زیر مورد بررسی قرار گرفتند.

۱- محیط کشت MS: محیط پایه موراشیک و اسکوگ (۱۹٦۲) (۱). ۲- محیط کشت MS ½: میزان عناصر پرمصرف در این محیط کشت، به میزان نصف عناصر پرمصرف محیط کشت پایه MS بود.۳- محیط کشت 3/4MS: در این محیط کشت، میزان عناصر پرمصرف مورد استفاده در ساخت محیط کشت ۳/٤ مقدار آن در محیط پایه‌ای بود. ٤- محیط کشت MS بدون نیترات آمونیوم: در این محیط کشت، نیترات آمونیوم (NH_4NO_3) صفر در نظر گرفته شد. ٥- محیط کشت MS با نصف منابع نیتروژنی: جهت ساخت این محیط کشت، میزان نیتروژن محیط کشت (KNO_3, NH_4NO_3) به میزان نصف مقدار معمولی جهت ساخت محیط کشت پایه‌ای MS به‌کار برده شد. سایر مواد معدنی که شامل کلرید کلسیم و سولفات منیزیم بود، به‌همان میزانی که در ساخت محیط پایه‌ای MS به کار می‌روند، توزین شدند.٦- محیط کشت MS با ویتامین‌های تغییر یافته ۱: استوک‌های این محیط کشت همانند محیط کشت پایه‌ای MS تهیه و به محیط اضافه شد؛ به‌جز استوک ویتامین‌ها که در ساخت این استوک ۲ میلی‌گرم بر لیتر گلایسین، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر نیکوتینیک اسید، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر پیریدوکسین و ۱ میلی‌گرم بر لیتر تیامین استفاده شد. ۷- محیط کشت MS با ویتامین‌های تغییر یافته ۲: جهت ساخت این محیط کشت، به‌جای ویتامین‌های محیط کشت MS، از ویتامین‌های گامبورگ B5 شامل ۱ میلی‌گرم بر لیتر نیکوتینیک اسید، ۱ میلی‌گرم بر لیتر پیریدوکسین و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تیامین استفاده شد.

مقادیر مختلف بنزیل آدنین (BA) در سه سطح صفر، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر در مرحله استقرار و پنج سطح صفر، ۱، ۱/۵، ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر در مرحله پرآوری بررسی شد. پس از تهیه محیط‌های کشت، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۷/۵ گرم بر لیتر آگار افزوده شد. قبل از اضافه کردن آگار به محیط‌های کشت، pH روی ۵/۷ تنظیم شد. سپس به‌مدت ۱۲ دقیقه درون اتوکلاو تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر جهت ضدعفونی قرار گرفتند. کشت ریزنمونه‌ها پس از ضدعفونی، تحت شرایط کاملاً استریل زیر هود لامینار درون محیط‌های کشت ساخته شده انجام شد. نمونه‌ها پس از کشت در اتاقک رشد با دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ 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 (۱).

طرح پژوهشی و آنالیز داده‌ها: آزمایشات به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار برای هر مرحله انجام شد. در مرحله استقرار از هفت نوع محیط کشت شامل MS، ½ MS، ¾ MS، MS بدون نیترات آمونیوم، MS با نصف منابع نیتروژنی، MS با ویتامین‌های تغییر یافته ۱ و ۲ و سه سطح BA شامل صفر، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر و در مرحله پرآوری هفت نوع محیط کشت مورد استفاده در مرحله استقرار و پنج سطح BA شامل صفر، ۱، ۱/۵، ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. داده برداری از ریزنمونه‌ها، چهار هفته پس از کشت آن‌ها در محیط‌های کشت انجام شد. در پایان آزمایش، شادابی (نمره‌دهی ۱ تا ٤)، میزان قهوه‌ای شدن (درصد)، تعداد شاخه جدید و میزان رشد طولی (میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. میزان سبزینگی بین صفر تا چهار نمره‌دهی شد که صفر نمایانگر خشکی و نکروزگی کامل برگ‌ها، یک، دو و سه به‌ترتیب نشان‌دهنده ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد خشکی و نکروزگی برگ‌ها، و چهار

نمایانگر رنگ سبز و شادابی برگ‌ها بود (۱۱). داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 تجزیه و تحلیل 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 و بحث

مرحله استقرار: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر محیط کشت بر درجه سبزینگی در سطح احتمال پنج درصد و بر میزان قهوه‌ای شدن، تعداد و رشد طولی شاخساره در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). سطوح مختلف BA و نیز اثر متقابل محیط کشت و غلظت BA بر درجه سبزینگی، میزان قهوه‌ای شدن و تعداد شاخه جدید معنی‌دار نبودند و تنها بر رشد طولی شاخساره در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌دار نشان دادند (جدول ۱).

پیشرفت‌های اخیر در زمینه ریزازدیادی گونه‌های درختان جنگلی، موقعیت مناسبی برای تکثیر انبوه ژنوتیپ‌های ارزشمند فراهم نموده است. نتایج امیدوارکننده همواره در نتیجه انتخاب صحیح ریزنمونه‌های گیاهی، ترکیب محیط کشت، غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و روش ریزازدیادی حاصل شده است (۹).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت، غلظت‌های مختلف BA و اثرات متقابل آن‌ها در مرحله استقرار بر تعداد و طول شاخساره‌های جدید، درصد قهوه‌ای شدن و درجه سبزینگی ریزنمونه‌های سرو ابرکوه در محیط درون شیشه‌ای.

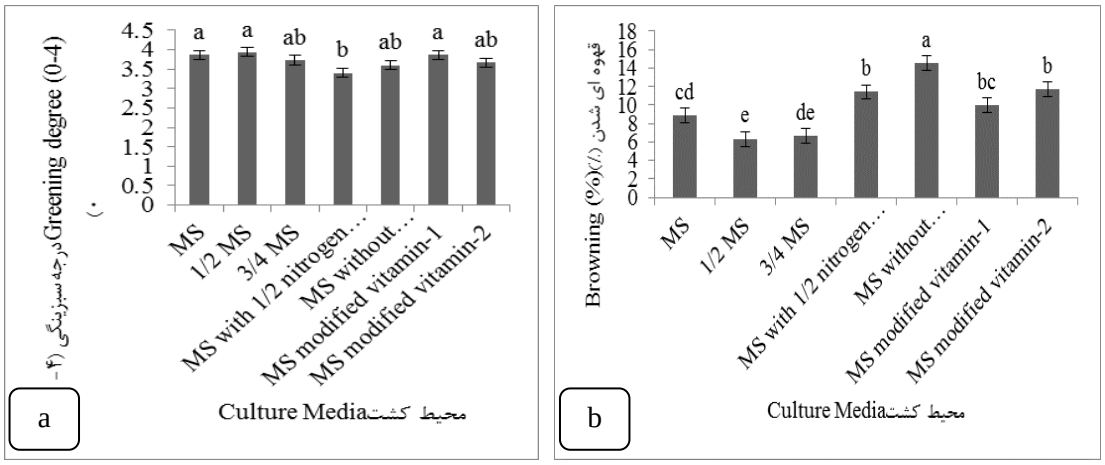
Table 1. Analysis of variance the effect of type of culture medium, different concentrations of BA and their interaction in establishment phase on length and number of new shoots, browning percentage and greening index of Abarkooh cypress explants in in vitro condition.

منابع تغییرات Variation Source	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Means of Square			
		درجه سبزینگی Greening Degree	قهوه‌ای شدن Browning	تعداد شاخساره جدید Number of New shoots	طول شاخساره Length of shoot
محیط کشت Culture Media	6	52.00*	72.12**	38.40**	41.17**
غلظت BA BA concentration	12	35.00ns	86.60ns	37.00ns	82.40**
محیط کشت * غلظت BA BA Concentration* Culture Media	12	03.00ns	97.40ns	18.0ns	84.10*
خطا Error	84	2.00	51.90	49.00	88.0
CV		08.12	14.31	4.61	16.30

** و * به‌ترتیب معنی‌داری در سطح ۱ درصد و ۵ درصد، ns غیر معنی‌دار.

** and * Significant at 1 and 5% respectively, ns: non-significant.

بر اساس نتایج به‌دست آمده، همه محیط‌های کشت مورد استفاده به‌جز MS با نصف مقدار منابع نیتروژنی منجر به حفظ سبزینگی ریزنمونه‌ها شدند (شکل ۱-a). بیشترین درصد قهوه‌ای شدن (۱٤/۵۳ درصد) ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS بدون نیترات آمونیوم و کمترین میزان آن (٦/۳۳ درصد) در محیط کشت MS ½ مشاهده شد (شکل ۱-b).



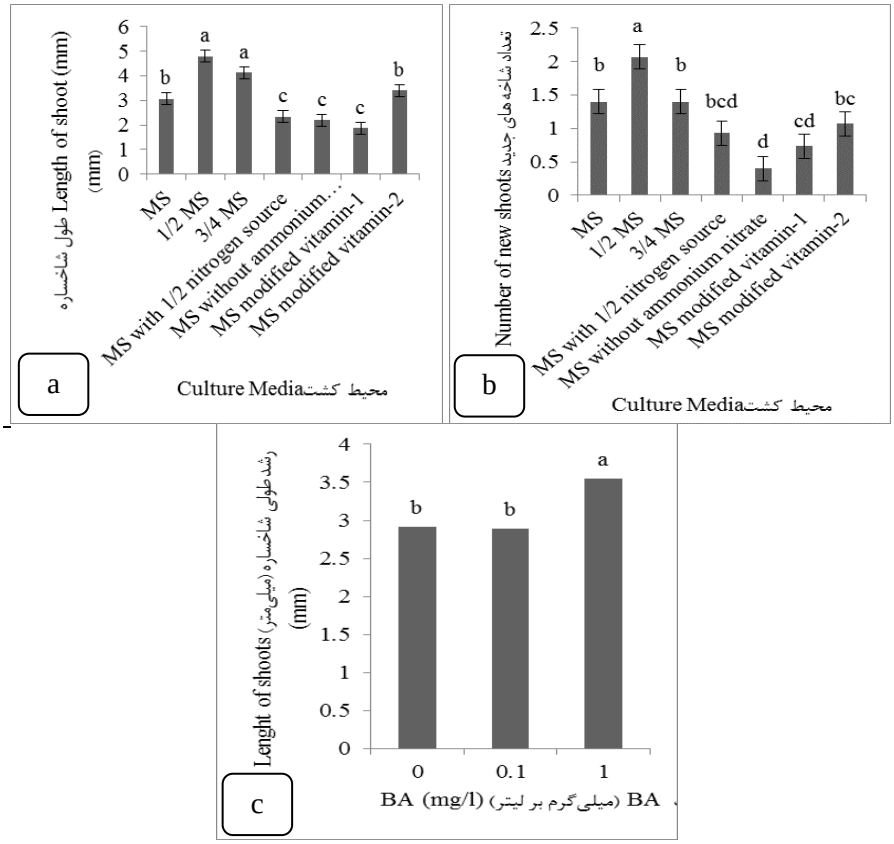
شکل ۱- مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت در مرحله استقرار بر a) درجه سبزینگی و b) درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های سرو ابرکوه. در هر ستون میانگین‌هایی که دست کم در یک حرف مشترک هستند تفاوت معنی‌داری در سطح 5 درصد آزمون LSD ندارند.

Figure 1. Mean comparision of culture medium effect in establishment phase on a) greening degree and b) browning percentage of Abarkooh cypress explants. Means in each column with at least one similar letters are not significantly different at the 5% probability level using LSD multiple range test.

بیشترین رشد طولی شاخساره (٤/۸ و ٤/۱ میلی‌متر)، در محیط کشت MS ½ و MS ¾ مشاهده گردید (شکل ۲-a). کمترین رشد طولی شاخساره نیز در محیط‌های با نیتروژن تغییر یافته و MS با ویتامین تغییر یافته گروه ۱ حاصل شد (شکل ۲-a). بیشترین تعداد شاخه جدید (۲ عدد) در محیط کشت 1/2 MS و کمترین میزان (۰/٤ عدد) در محیط کشت MS بدون نیترات آمونیوم حاصل شد (شکل ۲-b). با افزایش غلظت BA رشد طولی شاخساره به‌طور معنی‌داری افزایش یافت به نحوی که بیشترین رشد طولی (۳/٥٤ میلی‌متر) در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و کمترین مقدار (۲/۹۱ میلی‌متر) در صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد (شکل ۲-c).

در کشت بسیاری از گونه‌های چوبی محیط کشت پایه MS یک عامل بازدارنده رشد است و می‌توان با کاهش غلظت آمونیوم و حذف کامل نیتروژن، این مشکل را حل کرد (۷). بر اساس نتایج به‌دست آمده، کمترین درجه سبزینگی در محیط کشت MS حاوی یک دوم میزان منبع نیتروژنی و بیشترین میزان قهوه‌ای شدن و کمترین تعداد شاخه جدید در محیط کشت MS فاقد نیترات آمونیوم حاصل شد. نیتروژن علاوه‌بر ایفای نقش در تشکیل پروتئین‌ها، یک جزء لازم در ملکول کلروفیل می‌باشد که کمبود آن باعث زردی گیاه می‌شود. عرضه کافی نیتروژن با رشد رویشی زیاد و رنگ سبز تیره ارتباط دارد (۲۱). در پژوهش حاضر نیز مشخص شد که تولید کلروفیل (درجه سبزینگی) در محیط‌هایی که میزان نیتروژن آن‌ها از حد معمول کمتر باشد، کاهش می‌یابد. محیط کشت‌هایی که فاقد نمک آمونیوم هستند، غالباً با گذشت زمان حالت قلیایی پیدا می‌کنند و این حالت قلیایی می‌تواند در جذب مواد توسط ریزنمونه اختلال ایجاد نماید و 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 (٦). در اثر کاربرد هم‌زمان منابع نیتروژنی نیترات و آمونیوم، سامانه آنزیمی فعال می‌شود. این سامانه، شرایط را برای تشکیل موادی فراهم می‌کند که طی فرآیند ساخت یا در اثر به‌وجود آمدن آن‌ها،

هورمون‌های گیاهی و یا نسبت آن‌ها به یکدیگر تغییر می‌کند. نسبت آمونیوم به نیترات به‌عنوان یک عامل کلیدی در رشد گیاهان مختلف مطرح است (۱٤). گزارش‌های متناقضی در ارتباط با نسبت آمونیوم به نیترات بر میزان پرآوری وجود دارد، به‌طوری‌که برخی محققان گزارش کرده‌اند که با کاهش میزان آمونیوم در محیط کشت می‌توان میزان پرآوری را افزایش داد؛ در حالی که نتایج پژوهش سایر محققان نشان می‌دهد که بهترین محیط کشت جهت پرآوری، محیط کشت پایه MS بدون تغییر در نسبت آمونیوم به نیترات است (۸). لاپنا و همکاران (۱۹۹۲) گزارش کردند که کاهش نسبت آمونیوم به نیترات در محیط کشت توانایی تشکیل جوانه را افزایش می‌دهد. کشت اندام‌های سوزنی‌شکل درخت سیتکا (*Picea sitchensis* Bong.) روی محیط کشت حاوی نیترات ولی بدون آمونیوم اندام‌زایی کمی را نشان داد (۱٤). همچنین کشت جوانه‌های درخت نوئل کانادایی (*Picea glauca* Moench. voss) در محیط کشت فاقد آمونیوم واکنش مناسبی نشان نداد (۲۰). که با نتایج آزمایش حاضر مطابقت داشت.

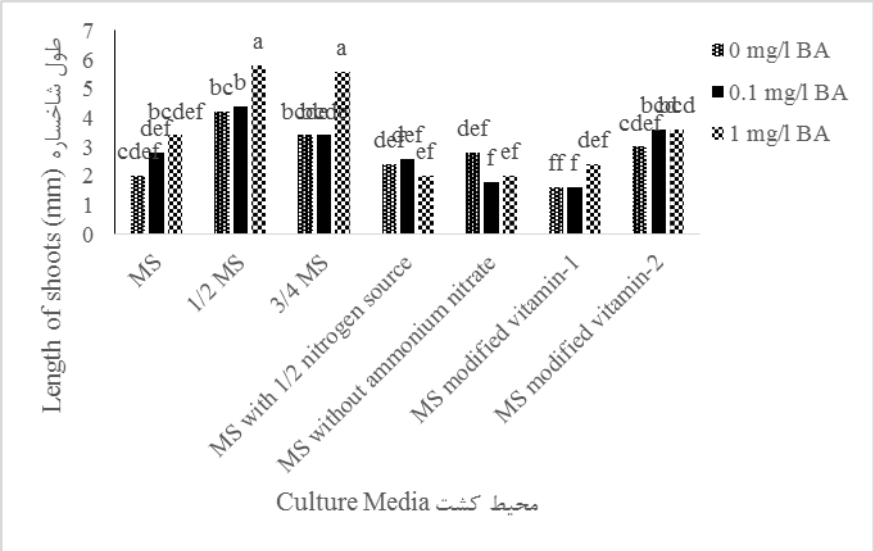


شکل ۲- مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت بر a) رشد طولی و b) تعداد شاخه جدید و c) اثر غلظت BA بر رشد طولی شاخساره ریزنمونه‌های سرو ابرکوه در محیط درون شیشه‌ای. در هر ستون میانگین‌هایی که دست کم در یک حرف مشترک هستند تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

Figure 2. Mean comparision of the effect of culture medium in establishment phase on a) length and b) number of new shoot and c) effect of BA concentration on length of shoots of Abarkooh cypress explants. Means in each column with at least one similar letters are not significantly different at the 5% probability level using LSD multiple range test.

مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف BA و محیط‌های کشت مختلف بر رشد طولی نشان داد که بیشترین میزان رشد طولی ریزنمونه‌ها (۵/۸ و ۵/٦ میلی‌متر) در محیط کشت‌های MS ½ و MS ¾ حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA صورت گرفته است (شکل ۳). در حالی‌که کمترین میزان رشد طولی ریزنمونه‌ها (۱/٦ میلی‌متر) در محیط‌کشت MS با ویتامین تغییر یافته گروه ۱ و با غلظت صفر و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد (شکل ۳).

میهالجویک (۲۰۰۲) بیان کردند که افزایش فشار اسمزی محیط کشت با غلظت بالای ساکارز و یا غلظت بالای نمک‌های غیر آلی موجب کاهش تقسیمات سلولی می‌شود (۱۵). نتایج حاصل از این پژوهش نیز موید این مطلب است. به‌طور کلی، نرخ تکثیر شاخساره بسیار به تغذیه ریزنمونه‌ها و شرایط محیطی وابسته است. به هرحال جوان بودن ریزنمونه‌ها بر نرخ تکثیر و طویل شدن شاخساره‌ها اثر دارند. نتایج حاصل از این پژوهش نتایج عباسیان و همکاران (۲۰۱۰) را که بیان کردند که محیط‌های کشت پایه با نصف میزان نمک‌ها در مقایسه با محیط کامل جهت نمو جوانه گونه‌های *Taxus*، مناسب بود، مطابقت داشت (۱). اگرچه قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها به‌علت اکسیداسیون فنل‌ها از معضلات مهم در ریزازدیادی سرو ابرکوه بود. در برخی از گیاهان، غلظت‌های تقلیل یافته محیط کشت MS بهتر از محیط کامل جواب داده است. نتایج پژوهش نشان داد که محیط کشت MS ½ بیشترین تعداد شاخه را در تمام غلظت‌های تنظیم‌کننده BA (صفر، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) در مرحله استقرار ایجاد نمود. همچنین درصد کمتر قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS ½ در ارتباط با غلظت پایین‌تر نمک‌ها در این محیط می‌باشد. غلظت بالای نمک‌ها باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی و در نتیجه افزایش قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها می‌شود (۱).



شکل ۳- اثر متقابل محیط کشت و غلظت BA در مرحله استقرار بر میزان رشد طولی ریزنمونه‌های سرو ابرکوه. در هر ستون میانگین‌هایی که دست کم در یک حرف مشترک هستند تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

Figure 3. The interaction effect of culture medium and BA concentrations in establishment phase on length of shoots of Abarkooh cypress explants. Means in each column with at least one similar letters are not significantly different at the 5% probability level using LSD multiple range test.

مرحله پرآوری: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر نوع محیط کشت و غلظت‌های مختلف BA بر سبزینگی، تعداد و طول شاخساره جدید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود و اثر متقابل آن‌ها تنها بر رشد طولی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت، غلظت‌های مختلف BA و اثرات متقابل آن‌ها در مرحله پرآوری بر درجه سبزینگی، تعداد شاخه جدید و رشد طولی ریزنمونه‌های سرو ابرکوه در محیط درون شیشه‌ای.

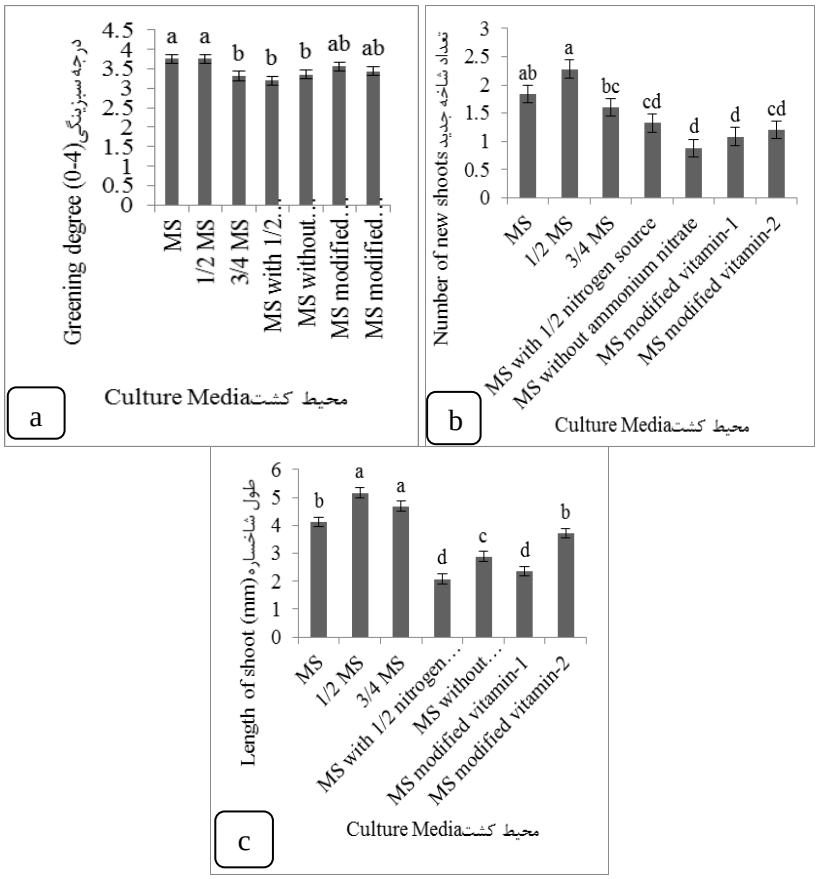
Table 3. Analysis of variance the effect of type of culture medium, different concentrations of BA and their interaction in proliferation phase on length and number of new shoots and greening index of Abarkooh cypress explants in *in vitro* condition.

منابع تغییرات Variation Source	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Means of Square		
		طول شاخساره Length of shoot	تعداد شاخساره جدید Number of New shoots	درجه سبزینگی Greening Degree
محیط کشت Culture Media	6	34.35^{**}	5.85^{**}	1.17^{**}
غلظت BA BA concentration	4	14.77^{**}	4.72^{**}	3.50^{**}
محیط کشت * غلظت BA BA Concentration* Culture Media	24	1.70^{**}	0.34^{ns}	140^{ns}
خطا Error	140	0.80	0.62	0.33
CV		25.05	24.30	16.50

** و * به‌ترتیب معنی‌داری در سطح ۱ درصد و ۵ درصد، ns غیر معنی‌دار.

** and *: Significant at 1 and 5% respectively, ns: non-significant.

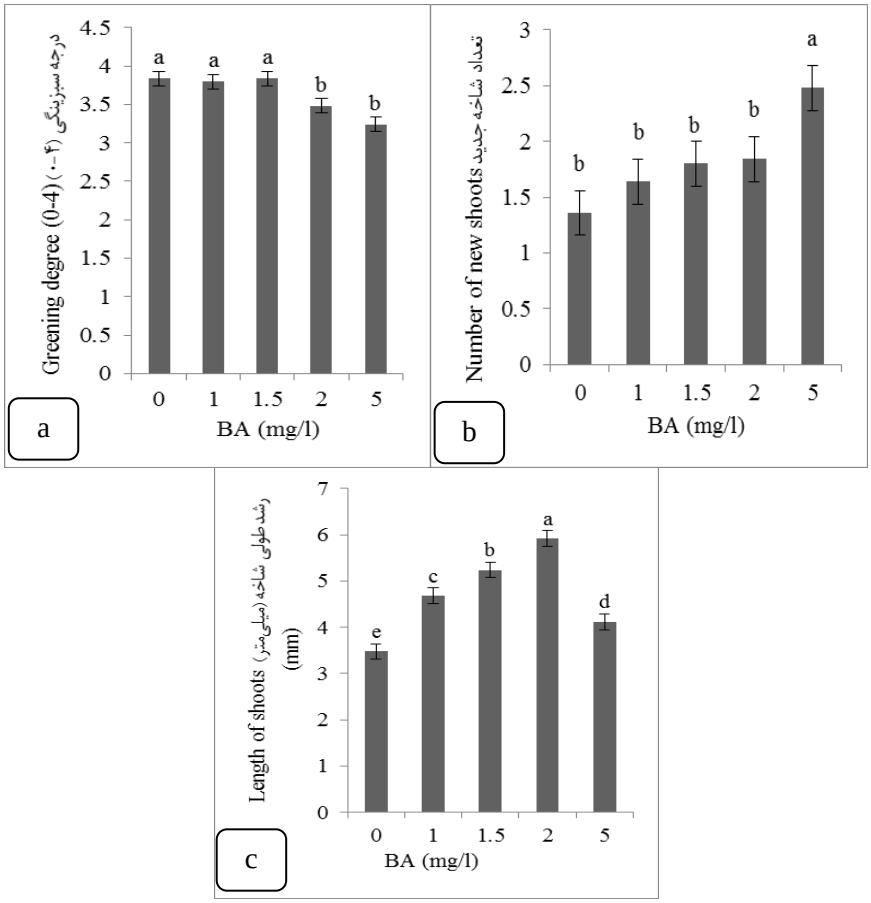
بر اساس نتایج مقایسه میانگین، در محیط‌های کشت MS و MS ½، بیشترین درجه سبزینگی (۳/۷) حاصل شد، در حالی‌که کمترین میزان (۳/۲ و ۳/۳) در محیط‌های کشت MS ¾ و با نیتروژن تغییر یافته به‌دست آمد (شکل ٤-a)، بیشترین تعداد شاخه جدید (۲/۲ عدد) مربوط به ریزنمونه‌ها در محیط کشت ½ MS و کمترین آن (۰/۸۸ عدد) در محیط بدون نیترات آمونیوم بود (شکل ٤-b). بیشترین میزان رشد طولی (۵/۱ و ٤/٦ میلی‌متر) ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت MS ½ و MS ¾ و کمترین مقدار (۲ و ۲/۳ میلی‌متر) در محیط‌های MS با نصف مقدار منبع نیتروژن و با ویتامین تغییر یافته گروه یک حاصل شد (شکل ٤-c).



شکل ٤- مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت در مرحله پرآوری بر a) درجه سبزینگی، b) تعداد شاخه جدید و c) رشد طولی ریزنمونه‌های سرو ابرکوه. در هر ستون میانگین‌هایی که دست کم در یک حرف مشترک هستند تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

Figure 4. Mean comparision of the effect of culture medium in proliferation phase on a) greening degree, b) number and c) length of new shoots of Abarkooh cypress explants. Means in each column with at least one similar letters are not significantly different at the 5% probability level using LSD multiple range test.

نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد BA بر درجه سبزینگی بیانگر این بود که با افزایش غلظت BA، درجه سبزینگی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ٥-a)، به‌طوری که بیشترین درجه سبزینگی (۳/۸) ریزنمونه‌ها در تیمار بدون BA و کمترین مقدار آن (۳) با ۵ میلی‌گرم بر لیتر BA حاصل شد (شکل ٥-a). بر اساس نتایج با افزایش غلظت BA تعداد شاخه افزایش یافت، به طوری‌که بیشترین تعداد شاخه (۱/۷۱ و ۱/۹۷ عدد) در غلظت ۲ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر BA حاصل شد و سایر سطوح با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نشان ندادند (شکل ٥-b). با افزایش غلظت BA تا ۲ میلی‌گرم در لیتر، رشد طولی شاخساره به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (٤/٥٧ میلی‌متر) و پس از آن با افزایش غلظت به ۵ میلی‌گرم در لیتر طول شاخساره نیز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (۳/۰۸ میلی‌متر) (شکل ٥-c).



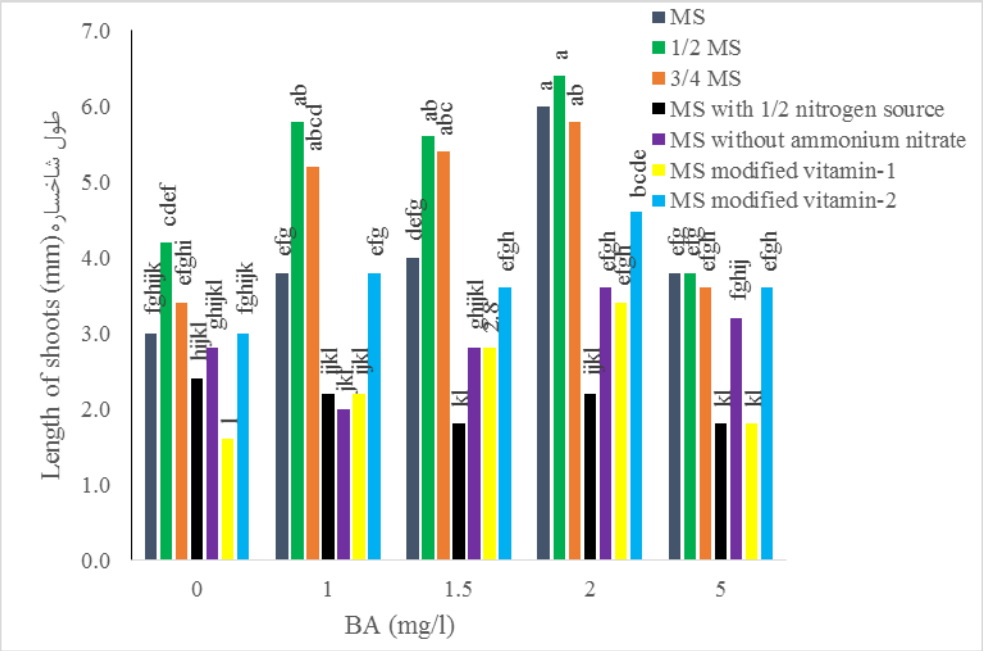
شکل ۵- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف BA در مرحله پرآوری بر a) درجه سبزینگی، b) تعداد شاخه جدید و c) رشد طولی ریزنمونه‌های سرو ابرکوه. در هر ستون میانگین‌هایی که دست کم در یک حرف مشترک هستند تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

Figure 5. Mean comparision of the effect of different BA concentrations in proliferation phase on a) greening degree, b) number and c) length of new shoots of Abarkooh cypress explants. Means in each column with at least one similar letters are not significantly different at the 5% probability level using LSD multiple range test.

در بررسی مقایسه میانگین اثر متقابل انواع محیط کشت و غلظت‌های مختلف BA بر رشد طولی، نتایج نشان داد که بیشترین میزان رشد طولی ریزنمونه‌ها (٦/٤ میلی‌متر) مربوط به محیط کشت MS ½ دارای غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA بود که با محیط کشت MS با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر BA از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نداشت (شکل ۷-c و d) و کمترین آن مربوط به غلظت صفر BA در محیط کشت MS با بود (شکل ٦).

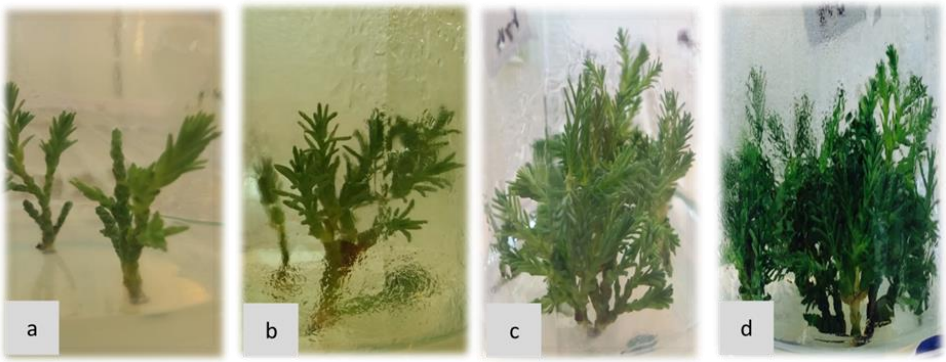
بیشترین میزان پرآوری شاخساره در اکثر گیاهان، اغلب در نتیجه استفاده از سطوح اندک سیتوکنین‌ها در محیط کشت رخ داده است (۱۸). استفاده از غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA در مرحله استقرار و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA در مرحله پرآوری در محیط کشت ½ MS به‌عنوان سیتوکنین در این پژوهش منجر به افزایش شاخساره شد. نتایج به‌دست آمده مشابه با عباسیان و همکاران (۲۰۱۰) روی *T. baccata* (۱) و الورزه و همکاران (۲۰۰۹) روی *T. brevifolia* Nutt. (٤) بود. کاربرد سیتوکینین بیرونی ممکن است سبب تحریک و تقویت دوباره جوانه‌های بالغ و تمایز جوانه‌های جوان شود. همچنین سیتوکینین باعث افزایش رشد طولی شاخه‌ها می‌شود (۲۳). نقش و اثر

BA در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخساره‌های جدید است، بنابراین با افزایش غلظت BA در محیط کشت، شاخساره‌های بیشتری تولید می‌شود که نتایج آزمایش انجام شده نیز موید این واقعیت بود. دلیل رشد طولی کمتر شاخه در محیط کشت MS با نصف مقدار نیتروژن را می‌توان 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.



شکل ٦- اثر متقابل غلظت‌های مختلف BA و نوع محیط کشت در مرحله پرآوری بر میزان رشد طولی ریزنمونه‌های سرو ابرکوه. در هر ستون میانگین‌هایی که دست کم در یک حرف مشترک هستند تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

Figure 6. Interaction effect of different concentration of BA and Media culture in proliferation phase on length of shoots of Abarkooh cypress explants. Means in each column with at least one similar letters are not significantly different at the 5% probability level using LSD multiple range test.



شکل ۷- مراحل کشت درون شیشه‌ای سرو ابرکوه a) کشت ریزنمونه‌ها درون محیط کشت MS ½، b) واکشت ریزنمونه‌ها درون محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، c) واکشت ریزنمونه‌ها درون محیط کشت MS ½ حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA، d) واکشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر BA.

Figure 7. Different stages of *in vitro* culture of Abarkooh cypress a) culture of explants in ½ MS culture medium, b) subculture of explants in ½ MS culture medium contained 1 mg/l BA, c) subculture of explants in ½ MS culture medium contained 2 mg/l BA d) subculture of explants in ½ MS culture medium contained 5 mg/l BA.

نتیجه‌گیری کلی

تکثیر درون شیشه‌ای درختان بالغ به‌علت مشکلاتی مانند چوبی بودن بافت، آلودگی و سن ریزنمونه بسیار دشوار است. به‌هر حال، تحقیق حاضر یک روش ساده و موفق جهت پرآوری گیاه ارزشمند سرو ابرکوه فراهم نمود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که محیط کشت MS ½ در هر دو مرحله استقرار و پرآوری بهترین محیط برای کشت سرو بود. همچنین غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در مرحله استقرار و ۲ میلی‌گرم در لیتر آن در مرحله پرآوری جهت افزایش طول و تعداد شاخساره مناسب تشخیص داده شد. بنابراین جهت ریزازدیادی این گیاه محیط کشت MS ½ همراه با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA توصیه می‌گردد.

منابع

1. Abbasian, Z., Zamani, S., Movahedi, S., and Sayed Tabatabaei, B.E. 2010. *In vitro* micropropagation of Yew (*Taxus Baccata*) and production of plantlets. Biotechnology. 9 (1): 48-54.
2. Aguiar, A.V., de Valderes, A.S., Fritzsons, E., and Junior, J.A.P. 2011. Programa de melhoramento de Pinus da Embrapa Florestas. *Embrapa Florestas*.
3. 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.
4. Alvarez, J.M., Majada, J., and Ordas, R.J. 2009. An improved micropropagation protocol for maritime pine (*Pinus pinaster*) isolated cotyledons. Forestry. 10: 175-184.
5. 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.
6. Bhojwani, S.S., and Dantu, P.K. 2013. Plant tissue culture: an introductory text. India: Springer. Pp: 245-274.
7. Bonga, J.M., and aderkas, P.V. 1992. *In vitro* culture of tree. Kluwer Academic Publishers, Dordereht, 232p.
8. Carrier, D.J., Cosentino, G., Neufeld, R., Rho, D., and Weber, M. 1990. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture. Plant Cell Report. 8: 635-638.
9. Chalupa, V. 2002. *In vitro* propagation of mature trees of *Sorbus aucoparia* L. and field performance of micropropagated trees. Journal of Forest Science. 48: 529-535.
10. Conde, P., Sousa, A., Costa, A., and Santos, C. 2008. A protocol for *Ulmus minor* mill. micropropagation and acclimatization. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 92 (1): 113-119.
11. Ghamari Zare, A., Sedaghati, M., Imam, M., Assareh, M., and Kiarostami, Kh. 2013. Eucalyptus micromicropropagation from adult rootstock via *in vitro* culture. Journal of Forest and Poplar Research. 21 (3): 593-581. (In Persian)
12. 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. 308p. (In Persian).
13. Khoshnevis, M., Matinizade, M., Shirvani, A., and Taimouri, M. 2017. Iran treasure of ancient trees. Nature of Iran, 2 (3): 42-55. (In Persian).
14. Lapeña, L., Pérez-Bermúdez, P., and Segura, J. 1992. Factors affecting shoot proliferation and vitrification in *Digitalis obscura* cultures. *In Vitro*–Plant. 28(3): 121-124.

15. 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.
16. Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15: 473-497.
17. Omidi, M., Behjat Sasan, B., Naghavi, M., Kalate Jari, S., and Etminan, A. 2011. Effect of growth regulators, medium and explant on callus induction in *Taxus baccata* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 27 (2): 316-325. doi: 10.22092/ijmapr.2011.6447. (In Persian)
18. Roshan-Zamir, N.A., Shan, S.T., Muhammad, T., and Shan, S.A. 2007. *In vitro* regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from shoot tip of mature tree. Pakistanian Journal of Botany. 39: 2395-2398.
19. 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. Sci Hort. 24: 123-134.
20. Selby, C., and Harvey, B.M.R. 1990. The influence of composition of the basal medium on the growth and morphogenesis of cultured sitka spruce (*Picea sitchensis*) tissues. Annals of Botany. 65(4): 395-407.
21. 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): 235-246. (in Persian)
22. Spanos, K.A., Pirrie, A., and Woodward, S. 1997. Micropropagation of *Cupressus sempervirens* L. and *Chamaecyparis lawsoniana* (A. MURR.) PAR. Silvae Genetica. 46 (5): 291-295.
23. Zhang, H., Horgan, K.J., Reynolds, P.H., and Jameson, P.E. 2010. 6-Benzyladenine metabolism during reinvigoration of mature *Pinus radiata* buds *in vitro*. Tree physiology. 30(4): 514-526.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Wood & Forest Science and Technology, Vol. 25 (4), 2018
http://jwfst.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jwfst.2019.15248.1756

Investigation the effects of different culture media on micropropagation of Abarkooh cypress plant (*Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis*)

E. Zamani[1], *M. Dehestani-Ardakani[2] and K. Kamali Aliabad[3]
[1]M.Sc. Student, Dept., of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran, [2]Assistant Prof., Dept., of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran, [3]Assistant Prof., Dept., of Soil Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Yazd University, Yazd, Iran
Received: 06/13/2018; Accepted: 01/01/2019

Abstract

Background and objectives: Abarkooh cypress (Cupressus sempervirens L. var. horizontalis (Mill) Gord) is one of the oldest trees in the world. Because of its prolonged life, the plant has tolerated many adverse environmental conditions, so if this valuable treasure is propagated, it can produce a large plant population with the ability to withstand extreme environmental conditions Tissue culture is one of the best methods for protection and propagation of in danger and rare plants such as this plant.

Materials and methods: This study was conducted to determine the best culture media and concentration of BA in micropropagation of Abarkooh cypress plant. In this research, different culture media such as Murashige & Skoog (MS) and modified MS contained ½ MS, ¾ MS, MS without ammonium nitrate, MS with ½ nitrogen, source MS with modified vitamin-1 and 2 group by three concentrations of BA (0, 0.1 and 1 mg/l) in establishment phase and five concentrations (0, 1, 1.5, 2 and 5 mg/l) in proliferation phase were used. Experiments were performed in factorial and completely randomized design with five replications.

Results: In establishment phase the highest length and number of shoots as well as the lowest percentage of browning were obtained in ½ MS culture medium. All culture media except MS with ½ nitrogen source, maintained greening degree. By increasing the BA concentration in establishment stage, length of shoots significantly, increased. However, the highest length of shoots was obtained in culture media supplemented by 1 mg/l BA. In all media with modified nitrogen source or without it, length and number of new shoots significantly decreased in compare other culture media. In proliferation phase, the highest number and length of shoots were obtained in ½ MS culture medium supplemented by 2 mg/l BA and the highest greening degree was recorded in cultured explants ½ MS and ¾ MS culture media. According to the results, by increasing BA concentration in proliferation stage, length and number of shoots significantly increased, but the greening degree significantly decreased.

Conclusion: Generally, proliferation rate, length and number of shoots greatly depended on nutrition of explants and kind of culture medium. According to the results of this study, ½ MS culture medium supplemented by 1 mg/l BA in establishment stage and 2 mg/l BA in proliferation stage, is recommended.

Keywords: Benzyl-adenine, Shoot, Browning, *In vitro* culture, Modified MS

*Corresponding author: mdehestani@ardakan.ac.ir