Archive of SID

فصلنامهٔ علمی - پژوهشی پژوهش و توسعه جنگل
جلد ۴، شماره ۴، صفحه ۴۹۹-۴۸۹، (۱۳۹۷)

استفاده از مواد جایگزین آگار در کشت درون شیشه‌ای گیاه سرو (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis*)

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

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان، یزد، ایران. (elahezamani43@yahoo.com)
۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، یزد، ایران. (mdehestani@ardakan.ac.ir)
۳- استادیار، گروه علوم خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه یزد، ایران. (kkamali@yazd.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۲۹

چکیده

در این پژوهش امکان جایگزینی بذور گیاهی بالنگو، اسفرزه و تخم شربتی همچنین کتیرا (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ گرم در لیتر)، نشاسته گندم و نشاسته ذرت (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم در لیتر) به‌جای آگار (۶، ۷ و ۸ گرم در لیتر) در محیط کشت موراشیک و اسکوگ در ریزنمونه‌های سرو چهارهزارساله ابرکوه بررسی شد. سی روز پس از استقرار ریزنمونه‌های سرشاخه گیاه در محیط کشت، شاخص‌های درصد قهوه‌ای‌شدن، درجه سبزینگی و تعداد جوانه جدید مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، بیشترین و کمترین درصد قهوه‌ای‌شدن به‌ترتیب در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ گرم در لیتر تیمار تخم شربتی و آگار به‌دست آمد که با نشاسته ذرت، اسفرزه و بالنگو اختلاف معنی‌داری نشان نداد. همچنین با افزایش غلظت مواد درصد قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه‌ها کاهش یافت. بیشترین درجه سبزینگی در تیمارهای ۱۵۰ گرم در لیتر بالنگو و اسفرزه و ۲۰۰ گرم در لیتر نشاسته ذرت مشاهده شد که با آگار (۶ گرم در لیتر) اختلاف معنی‌دار نشان نداد. کمترین درجه سبزینگی در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ گرم در لیتر تیمار تخم شربتی به‌دست آمد. بیشترین تعداد جوانه نیز در شاهد آگار با غلظت‌های ۶ و ۷ گرم در لیتر مشاهده شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، نشاسته ذرت کاراترین جایگزین بوده و از نظر هزینه نیز نسبت به آگار مقرون‌به‌صرفه است.

واژه‌های کلیدی: اسفرزه، بالنگو، تخم شربتی، کتیرا، نشاسته.

* نویسنده مسئول شمارهٔ تماس: ۰۳۵۳۲۲۶۷۶۷

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرو ابرکوه (در استان یزد) حدود ٤٠٠٠ سال عمر دارد که قدیمی‌ترین سرو در دنیا است. سرو چهارهزارساله شهرستان ابرکوه، دومین درخت پیر دنیا است که در تمام جهان به‌عنوان نمادی از زندگی و زیبایی معرفی شده است (Irannejad Parizi *et al.*, 2016). سرو زربین با نام علمی *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* (Mill) Gord از خانواده سرو (Cupressaceae) است. این گیاه در زبان عربی به شجره‌الحیات معروف است (Irannejad Parizi *et al.*, 2016). ازآنجاکه زربین گونه خشکی‌پسند است و در شرایط خاک آهکی و دشوار رشد می‌کند، زادآوری آن از اهمیت بسیاری برخوردار است (Jourgholami *et al.*, 2017).

فنون کشت بافت گیاهی و ریزازدیادی نسبت به روش‌های معمول گیاه‌افزایی بسیار پرهزینه بوده و نیاز به نیروی کار ماهر و آموزش‌دیده دارد (Giovanelli and Carlo, 2007). ریزازدیادی در سطح وسیع یا در سطح تجاری باوجود دارابودن مزایای فراوان نسبت به روش‌های کلاسیک تکثیر، با مشکلات متعددی مانند هزینه‌های بالای تولید همراه است. در آزمایش‌های کشت بافتی معمولاً ساکارز ۸-۲ درصد و آگار ۰/۸-۰/۵ درصد و نیز تنظیم‌کننده‌های رشد با غلظت‌های مختلف هزینه‌های زیادی از تولید را به خود اختصاص می‌دهند (Asadi *et al.*, 2005).

آگار پلی‌ساکاریدی با وزن مولکولی بالا و ماده‌ای ژلاتینی است که حاوی پلی‌ساکاریدهای بدون شاخه است و از دیواره سلولی جلبک‌های قرمز و جلبک‌های دریایی به‌دست می‌آید (Yamasaki and Osuga, 1960) و به‌عنوان ماده مولد ژل در محیط‌های کشت به‌کار می‌رود و از مواد پرکاربرد و گران‌قیمت در بیوتکنولوژی گیاهی محسوب می‌شود (Montagne, 1837). آگاری که برای جامد کردن محیط کشت به‌کار می‌رود، ۱۸/۲۵ درصد هزینه ساخت محیط کشت را به خود اختصاص می‌دهد.

به‌جز آگار، امکان استفاده از دیگر منابع طبیعی به‌منظور تولید ژل در محیط‌های کشت وجود دارد (Piri and Nazarian Firoozabadi, 2001). از این مواد که می‌توان در تهیه محیط‌های کشت بافت گیاهی مورد استفاده قرار داد، بذور گیاهان دارویی با قابلیت تولید موسیلاژ است. گیاهان دارویی با قابلیت تولید مواد ژله ای، به‌عنوان منبع جدید، ارزان و متنوع برای ژله‌ای‌کردن محیط‌های کشت می‌توانند قابل ارزیابی و کاربرد باشند (Atrashi *et al.*, 2011). این بذور با دارا بودن ترکیبات ثانویه مؤثر، در رشد و توسعه نمونه‌های کشت بافتی می‌توانند نقش تعیین‌کننده‌ای داشته باشند. می‌توان از بذور گیاه اسفرزه (*Plantago ovate* Forsk) به‌عنوان عامل ژله‌ای کننده مؤثر در محیط کشت استفاده کرد. از نظر تجاری مهم‌ترین فرآورده حاصل از دانه‌های اسفرزه، غشای دانه است که در اثر هیدرولیز موسیلاژ، تولید دگزیلوزان، آرابینوز، د-گالاکتوز و د-گالاکتورونیک اسید می‌کند. همچنین دارای روغن ثابت، پروتئین و املاح معدنی است (Khazaei *et al.*, 2007). Atrashi و همکاران (2011) از بذور گیاهان دارویی در محیط کشت جوانه‌های گیاه استویا استفاده کردند. ریز-نمونه‌ها در محیط‌هایی که حاوی این بذور بودند (بذرک، اسفرزه و شاهی) رشد مطلوبی داشتند و می‌توان گفت در این محیط‌ها نه‌تنها رشد نمونه‌های گیاهی حمایت می‌شود، بلکه نتایج در برخی موارد حتی بهتر از استفاده از آگار بود. برای مثال با کاربرد اسفرزه در محیط کشت، ساقه‌ها قطورتر شدند و ریزنمونه‌ها برای تولید کالوس مستعدتر بودند. Arulanantham و همکاران (2012) از بذور حبوبات مانند لوبیا چشم‌بلبلی، ماش، ماش سیاه و سویا به‌عنوان جایگزین

www.SID.ir

Archive of SID

آگار در محیط کشت باکتری استفاده کردند. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که در مقایسه با محیط‌های کشت سنتی حاوی ناترینت آگار (Nutrient agar)، محیط کشت ساخته‌شده از این مواد ارزان‌تر بود و به‌منظور پژوهش‌های باکتریولوژیکی مناسب تشخیص داده شد. Jain و همکاران (2005) نیز بیان کردند که صمغ گوار که ۵۰ برابر ارزان‌تر از دیفکو–باکتو آگار (Difco-bacto agar) است، جایگزین مناسبی برای آن در محیط‌های کشت باکتریایی است.

جزء اصلی نشاسته ذرت، مالتوز است (Kinnersley and Henderson, 1988). گزارش شده است که مالتوز هم‌اندازه یا حتی بیشتر از ساکارز در پیدایش جنین در سلول‌های هویج وحشی نقش داشته (Verma and Dougall, 1977) و سبب تبدیل جنین‌های سوماتیکی به گیاهچه در یونجه (Strickland *et al*., 1987) و سیب‌زمینی (Batty and Dunwell, 1989) می‌شود. بااین‌حال تولید جنین‌های سوماتیکی کمتری نسبت به ساکارز در سیب‌زمینی (Batty and Dunwell, 1989) و توتون (*Datura metel*) (Babbar and Gupta, 1986) مشاهده شده است.

Zimmerman و همکاران (1995) با کشت *Erythroxylum coca* var. *coca* روی محیط کشت نشاسته ذرت–ژلرایت بیان کردند که به طرز چشمگیری رشد آن متفاوت از رشد روی محیط کشت دارای آگار بود. همچنین این پژوهشگران از مخلوط نشاسته و ژلرایت به‌جای آگار در کشت بافت شش رقم سیب و دو رقم تمشک بهره گرفتند که علاوه بر کاهش هزینه، موجب تولید گیاهان بیشتری شد. آن‌ها بیان کردند که یک مزیت عمده استفاده از نشاسته–ژلرایت کاهش هزینه عامل ژله‌ای کننده محیط کشت است. با خرید نشاسته ذرت بیش از ۵۰ درصد هزینه‌های محیط کشت کاهش پیدا می‌کند. علاوه بر مزیت هزینه، نشاسته ذرت–ژلرایت می‌تواند شاخه‌های بیشتری را تولید کند.

Sorvari and Schifder (1987) از نشاسته جو برای جامدکردن محیط کشت همراه با یک کربوهیدرات بی‌اثر در کشت بساک جو استفاده کردند که علاوه‌بر تولید تعداد زیاد گیاهک، درصد آلبینو نیز کاهش یافت. Jain and Babbar (1998) از لایه پوشاننده دانه بارهنگ به‌عنوان عامل ژلاتینی در محیط کشت بافت برخی گیاهان به‌جای آگار استفاده کردند و اختلاف معنی‌داری در گیاهان تولید شده بین دو محیط از نظر شاخص‌های رشدی مشاهده نکردند.

اگرچه گزارش‌های زیادی در مورد بهینه‌سازی محیط کشت، ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد و غلظت آن‌ها وجود دارد اما پژوهش‌های اندکی در مورد اثر پتانسیل آب بر رشد و جذب عناصر به‌ویژه برای درختان انجام شده است (Ghashghaie *et al*., 1991). باوجود اهمیت جذب مواد معدنی در شرایط محیط کشت بافت گیاهی که بخش مهمی برای رشد گیاهچه‌هاست، ولی تا به امروز کنترل جذب عناصر معدنی و جنبه‌های حمل‌ونقل یون‌ها و نقش پتانسیل آب محیط کشت کمتر موردتوجه بوده است (Gribble *et al*., 2002). می‌توان استنباط کرد که سرعت کم انتشار مواد معدنی ممکن است یک عامل محدودکننده برای حمل‌ونقل یون‌ها در محیط کشت باشد. انتشار مواد معدنی در محیط کشت به غلظت عناصر معدنی، غلظت آگار و آب در دسترس بستگی دارد؛ بنابراین، جذب مواد معدنی از محیط کشت توسط ریز نمونه به انتشار یون‌ها بستگی دارد (Amiri, 2010). جذب و انتشار عناصر غذایی در پتانسیل‌های مختلف محیط کشت بسیار پیچیده است و اطلاعات اندکی در این رابطه موجود است. همچنین غلظت بحرانی آگار برای جذب بهینه عناصر توسط ریز نمونه ضروری است.

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به هزینه‌های بالای آماده‌سازی محیط کشت بافت گیاهی و مشکلات مربوط به تحریم‌ها که گاهی مشکلاتی در زمینه عدم دسترسی به برخی مواد آزمایشگاهی برای محققان کشورمان ایجاد کرده است، در این پژوهش استفاده از جایگزین‌های آگار مانند بذور گیاهان دارویی، نشاسته و کتیرا با هدف کاهش هزینه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای بررسی امکان کاربرد بذور گیاهان دارویی، کتیرا و نشاسته گندم و ذرت به‌عنوان جایگزین آگار در تهیه محیط‌های کشت بافت گیاهی، آزمایشی در اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۶ در محل آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار با استفاده از بذور تخم شربتی (*Salvia hispanica*)، اسفرزه (*Plantago ovate* Forsk.)، بالنگو (*Lallemantia*) و کتیرا (صمغ گیاه گون *Astragalus*)، نشاسته گندم (*Triticum sativum*) و نشاسته ذرت (*Zea mays*) هرکدام در سه سطح مختلف به‌عنوان عوامل ژله‌ای کننده محیط کشت در مقایسه با شاهد (آگار) انجام شد.

در ابتدای کار ذرات اضافه، بذور شکسته و ناقص و همچنین تکه‌های چوب باقی‌مانده و گل‌آذین‌ها از لابه‌لای بذرها جدا شد. کتیرا توسط آسیاب مولینکس مدل AR10 آسیاب شده و به‌صورت پودر درآمد. همچنین نشاسته گندم با هاون خرد شد. بذور و کتیرا در سه غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ گرم در لیتر و نشاسته گندم و ذرت با غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم در لیتر به محیط کشت MS (Murashig and skoog, 1962) اضافه شدند. محیط کشت دارای آگار در سه سطح ٦، ۷ و ۸ گرم در لیتر به‌عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. pH محیط کشت قبل از اضافه کردن آگار و جایگزین‌ها روی ۵/۸– ۵/۷ تنظیم شد. پس از آن چهار میلی‌لیتر از محیط‌های کشت تهیه‌شده درون لوله‌های آزمایشی دربدار به حجم ۱۰ میلی‌لیتر توزیع شدند، سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد ضدعفونی شد. طی این فرآیند از انتقال آلودگی مواد به محیط کشت جلوگیری شد. بذور، کتیرا و نشاسته از عطاری تهیه شد و قیمت آن‌ها با گرفتن میانگین قیمت مواد از چهار عطاری مختلف برآورد شد (جدول ۳).

شاخه‌های درخت سرو به طول ۲۰ سانتی‌متر از درخت سرو چهارهزارساله ابرکوه برداشت شد و به آزمایشگاه انتقال داده شد. سپس ریزنمونه‌های ۱/۵–۱ سانتی‌متر از قسمت‌های انتهایی شاخه که شاداب و سرسبز بودند، برای کشت در محیط انتخاب شدند. به‌منظور ضدعفونی ابتدا ریزنمونه‌ها به مدت سه دقیقه درون محلول ۰/۰۵ درصد اسیدسیتریک به مدت سه دقیقه تکان داده شد. سپس از آن خارج شده و درون محلول ۰/۱ درصد کلرید جیوه و ۰/۰۵ درصد اسیدسیتریک ریخته شدند و مجدداً به مدت سه دقیقه تکان داده شدند. برای تماس بیشتر ریزنمونه‌ها با آب مقطر، شیشه حاوی آب مقطر و ریزنمونه‌ها، طی این مدت تکان داده شد. پس از آن، سه مرتبه با آب مقطر حاوی ۰/۰۵ درصد اسیدسیتریک، هرکدام به مدت سه دقیقه آب‌کشی شد. کلیه مراحل ضدعفونی ریز نمونه‌ها زیر هود لامینار و تحت شرایط کاملاً استریل بود.

پس از کشت، نمونه‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۳۰۰۰–۲۵۰۰ لوکس و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. گیاهچه‌های رشدیافته پس از گذشت چهار هفته مورد بررسی و داده‌برداری قرار گرفتند. در پایان دوره، صفاتی همچون درصد قهوه‌ای‌شدن، درجه

www.SID.ir

Archive of SID

سبزینگی و تعداد جوانه جدید ریزنمونه‌ها در محیط‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد قهوه‌ای‌شدن نسبت بین طول ریزنمونه سالم به‌کل طول ریزنمونه بود که با خط‌کش اندازه‌گیری شد و در آخر به‌صورت درصد بیان شد. مقدار سبزینگی بین صفر تا چهار کدگذاری شده، که صفر نمایانگر خشکی و نکروزگی کامل و چهار نمایانگر رنگ سبز و شادابی برگ‌ها بود (Ghamari Zare *et al*., 2014). تعداد جوانه‌های جدید نیز با شمارش تعداد جوانه روی ریز نمونه مشخص شد. برای ارزش‌گذاری اقتصادی، هزینه یک کیلوگرم از مواد ژله‌ای کننده برآورد شد، سپس بر اساس مقدار مورد استفاده، هزینه مواد در یک لیتر محیط کشت محاسبه شد.

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با پنج تکرار انجام شد. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9.1 و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که نوع و غلظت آگار و مواد جایگزین آن و همچنین اثرهای متقابل آن‌ها بر درصد قهوه‌ای شدن و درجه سبزینگی در سطح یک درصد معنی‌دار بود. اثر نوع ماده، فقط بر تعداد جوانه جدید در سطح یک درصد معنی‌دار بود و غلظت و اثر متقابل غلظت و نوع ماده بر تعداد جوانه جدید اثر معنی‌دار نداشت (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر مواد ژله‌ای‌کننده جایگزین آگار، غلظت و اثر متقابل آن‌ها بر شاخص‌های درصد قهوه‌ای‌شدن، درجه سبزینگی و تعداد جوانه جدید ریزنمونه‌های سرو ابرکوه

Table 1. ANOVA of the effect of kind of agar alternatives, concentration and their interaction on percentage of browning, degree of greening and the number of new buds of Abarkooh cypress explants

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares		
		قهوه‌ای شدن Browning	درجه سبزینگی Degree of greening	تعداد جوانه جدید The Number of new buds
مواد ژله‌ای‌کننده Gelling agents	6	0.45**	2.45**	8.17**
غلظت Concentration	2	0.05**	2.40**	0.27ns
تیمار * غلظت Treatment * Concentration	12	0.06**	1.04**	0.60ns
خطا Error		0.002	0.32	0.43

**، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد و عدم معنی‌دار شدن

* , **, and ns indicate significant at α= 0.05, α=0.01, and nonsignificant respectively

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل نوع و غلظت ماده جایگزین آگار نشان داد که بیشترین درصد قهوه‌ای‌شدن در تیمار تخم شربتی به‌ترتیب در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ گرم‌درلیتر و کمترین درصد قهوه‌ای شدن در تیمار ٦ گرم‌درلیتر آگار حاصل شد (جدول ۲) (شکل ۱). دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در

www.SID.ir

Archive of SID

مقدار قهوه‌ای‌شدن نشان ندادند (جدول ۲) (شکل ۱). بیشترین درجه سبزینگی در تیمارهای ۱۵۰ گرم‌درلیتر، اسفرزه و بالنگو، ۲۰۰ گرم در لیتر نشاسته ذرت و ٦ گرم‌درلیتر آگار مشاهده شد (جدول ۲) (شکل ۱). کمترین درجه سبزینگی در تیمار تخم شربتی در دو غلظت مختلف ۵۰ و ۱۰۰ گرم‌درلیتر حاصل شد (جدول ۲) (شکل ۱). بیشترین تعداد جوانه در شاهد آگار با غلظت ٦ و ۷ گرم‌درلیتر به‌دست آمد و کمترین آن در تخم شربتی با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ گرم‌درلیتر به‌دست آمد (جدول ۲ و شکل ۱). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده هزینه ٦ گرم آگار برای تهیه یک لیتر محیط کشت برابر با ۳۰۰۰۰ ریال بود درحالی‌که هزینه ۵۰ گرم بذور بالنگو، اسفرزه و تخم شربتی به‌ترتیب ۱۰۰۰۰ و ۱۲۵۰۰ ریال بود. هزینه ۵۰ گرم کتیرا برای تهیه یک لیتر محیط کشت نیز برابر با ۷۵۰۰۰ ریال بود (جدول ۳). همچنین هزینه ۱۰۰ گرم نشاسته ذرت و گندم برای تهیه یک لیتر محیط کشت به‌ترتیب برابر با ٤۰۰۰ و ٦۰۰۰ ریال بود (جدول ۳). بر اساس جدول ۳ به‌صرفه‌ترین ماده از نظر اقتصادی برای جایگزینی آگار، نشاسته ذرت است (جدول ۳).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل مواد جایگزین آگار و غلظت آن‌ها بر درصد قهوه‌ای‌شدن، درجه سبزینگی و تعداد جوانه جدید ریزنمونه‌های گیاه سرو ابرکوه

Table 2. Interaction between gelling agents and their concentration on percentage of browning, degree of greening and the number of new buds of Abarkooh cypress explants

ماده ژله‌ای کننده Gelling agent	غلظت مواد ژله‌ای‌کننده (گرم بر لیتر) Gelling agent's concentration (g/l)	درصد قهوه‌ای‌شدن Percentage of Browning	درجه سبزینگی Degree of greening	تعداد جوانه جدید The number of new buds
بذر بالنگو Sand plantain seed	50	0.13 de	2.80 abc	0.60 c
	100	0.12 de	3.40 ab	0.60 c
	150	0.12 de	3.60 a	0.80 bc
بذر اسفرزه Lallemantia seed	50	0.12 de	3.40 ab	0.60 c
	100	0.09 de	3.40 ab	0.80 bc
	150	0.12 de	3.60 a	1.00 bc
تخم شربتی Chia seed	50	0.83 a	1.80 d	0.20 c
	100	0.62 b	1.80 d	0.20 c
	150	0.28 c	3.00 abc	0.40 c
کتیرا Tragacnth	50	0.12 de	2.80 abc	0.60 c
	100	0.12 de	3.20 abc	0.80 bc
	150	0.12 de	3.40 ab	0.80 bc
نشاسته ذرت Starch of corn	100	0.13 de	2.60 bcd	0.40 c
	150	0.13 de	3.40 ab	0.60 c
	200	0.13 de	3.60 a	0.80 bc
نشاسته گندم Starch of wheat	100	0.16 d	2.40 cd	0.40 c
	150	0.13 de	3.20 abc	0.40 c
	200	0. 13 de	3.40 ab	0.40 c
آگار Agar	6	0.07 e	3.60 a	2.60 a
	7	0.09 de	3.40 ab	3.20 a
	8	0.12 de	2.40 cd	1.60 b

میانگین‌های دارای حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

Means with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$) based on Duncan test.

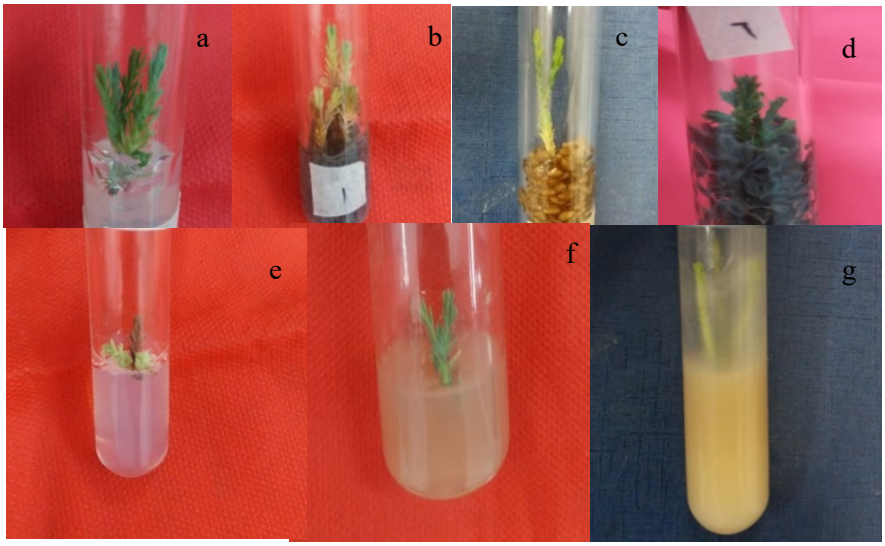
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- قیمت آگار و جایگزین‌های آن برای تهیه یک لیتر محیط کشت پایه MS

Table 3. Price of agar and its alternatives for preparation of one liter of MS culture medium

قیمت مواد مورد استفاده در یک لیتر محیط کشت (ریال) Price of materials in one litter of culture medium (Rial)	مقدار مورد استفاده برای یک لیتر محیط کشت (گرم) Concentration used for one liter of culture medium (g)	قیمت هر کیلوگرم (ریال) Price of one kilogram (Rial)	آگار و جایگزین‌های آن Agar and its alternatives
30.000 35.000 40.000	6 7 8	5.000.000	آگار Agar
10.000 20.000 30.000	50 100 150	200.000	بذر بالنگو Sand plantain seed
12.500 25.000 37.500	50 100 150	250.000	بذر اسفرزه Lallemantia seed
12.500 25.000 37.500	50 100 150	250.000	تخم شربتی Chia seed
75.000 150.000 225.000	50 100 150	1.500.500	کتیرا Tragacnth
4.000 6.000 8.000	100 150 200	40.000	نشاسته ذرت Starch of corn
6.000 9.000 12.000	100 150 200	60.000	نشاسته گندم Starch of wheat



شکل ۱- کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه سرشاخه سرو در محیط کشت پایه MS با مواد جامدکننده مختلف شامل: a- آگار b- تخم شربتی c- اسفرزه d- بالنگو e- کتیرا f- نشاسته ذرت g- نشاسته گندم.

Fig 1. *In vitro* culture of shoot explants of cypress in MS medium culture with different gelling agents consist of: a. Agar, b. Chia seed, c. Lallemantia seed, d. Sand plantain seed, e. Tragacnth, f. Starch of corn, g. Starch of wheat

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

بیشترین درصد قهوه‌ای‌شدن در این پژوهش مربوط به تیمار تخم شربتی بود که نتوانست موسیلاژ خوبی ایجاد کند. بیشترین درصد قهوه‌ای‌شدن در غلظت ۵۰ گرم‌در-لیتر و کمترین درصد آن در تیمار ٦ گرم‌درلیتر آگار مشاهده شد. Mashayekhi و همکاران (2016) نیز بیان کردند که با افزایش غلظت آگار درجه سبزینگی و تعداد جوانه کاهش و قهوه‌ای‌شدن افزایش یافت. آن‌ها رشد و جذب عناصر معدنی پایه GF677 در واکنش به پتانسیل آب در غلظت‌های مختلف آگار در محیط کشت بافت گیاهی را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که غلظت‌های مختلف آگار اختلاف معنی‌داری روی صفات رشد (وزن‌تر، وزن خشک، محتوای آب، تعداد شاخساره، ارتفاع شاخساره، تعداد برگ، درصد شیشه‌ای‌شدن و شاخص کلروفیل برگ) و جذب عناصر معدنی داشت. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، کمترین تعداد جوانه در تیمار تخم شربتی با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ گرم‌درلیتر حاصل شد که نتوانست استقرار خوبی را برای گیاه ایجاد کند. کاهش تعداد جوانه در آگار با غلظت بالاتر به‌دلیل کمتر بودن آب قابل‌دسترس است که سبب جذب کمتر مواد غذایی توسط ریز نمونه می شود (Amiri and Arzani, 2006). نتایج بررسی‌ها نشان داد که افزایش غلظت آگار سبب کاهش پتانسیل اسمزی محیط کشت می‌شود و تأثیر نامطلوبی بر جذب عناصر غذایی و هورمون‌های موجود در محیط کشت داشته و سبب کاهش رشد گیاهچه‌ها می‌شود (Bornman and Vogelmann, 1984). همچنین غلظت‌های بالای آگار سبب نامتعادل شدن پتانسیل آب در سیمپلاست و آپولاست می‌شود که منجر به کاهش رشد می‌شود (Gopal and Iwama, 2007).

طبق نتایج به‌دست‌آمده کاربرد نشاسته ذرت بهتر از نشاسته گندم موجب حفظ درجه سبزینگی گیاه شد. غلظت ۲۰۰ گرم در لیتر این ماده در محیط کشت برای ریزنمونه‌ها، همانند غلظت ٦ گرم در لیتر آگار عمل کرد. با توجه به هزینه مقدار نشاسته ذرت مورد استفاده برای یک لیتر محیط کشت که ۱۲/۰۰۰ ریال و آگار که ۳۰/۰۰۰ ریال است، برای کاهش هزینه‌های کشت درون‌شیشه‌ای، نشاسته ذرت در رابطه با این شاخص‌ها می‌تواند جایگزین مناسبی برای آگار باشد. نتایج به‌دست‌آمده با Arulanantham و همکاران (2012) مطابقت داشت. آن‌ها از بذور حبوبات مانند لوبیا چشم‌بلبلی، ماش، ماش سیاه و سویا به‌عنوان جایگزین آگار در محیط کشت باکتری استفاده کردند. نتایج حاصله نشان داد که در مقایسه با محیط‌های کشت سنتی حاوی ناترینت آگار (Nutrient agar)، محیط کشت ساخته‌شده از این مواد ارزان‌تر بود و برای پژوهش‌های باکتریولوژیکی مناسب تشخیص داده شد. Jain و همکاران (2005) نیز بیان کردند که صمغ گوار که ۵۰ برابر ارزان‌تر از دیفکو–باکتو آگار (Difco-bacto agar) است، جایگزین مناسبی برای آن در محیط‌های کشت باکتریایی است. این نتایج با نتایج Asadi و همکاران (2005) که به‌جای آگار از نشاسته گندم و نشاسته ذرت در ریزازدیادی سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) استفاده کردند، مطابقت داشت. نتایج آن‌ها نشان داد که کاربرد نشاسته ذرت بهتر از نشاسته گندم در رابطه با وزن و تعداد ریز غده در سیب‌زمینی بوده است، ولی هیچ‌کدام نمی‌توانند جایگزین مناسبی به‌جای آگار باشند. طبق نتایج Sorvari and Schifder (1987)، Zimmerman و همکاران (1995) و Babbar and Jain (1998) نیز به‌کارگیری نشاسته‌های ذرت و گندم نمی-توانند جایگزین‌های مناسبی برای آگار باشند. Dabai and Muhammad (2005) نیز بیان کردند که پودر نشاسته کاساوا می‌تواند عامل ژله‌ای کننده مناسب به-جای آگار–آگار در محیط‌های کشت میکروبیولوژی

www.SID.ir

Archive of SID

باشد. در این پژوهش، ۱۵۰ گرم‌درلیتر اسفرزه اختلاف معنی‌داری با ٦ گرم در لیتر آگار در دو شاخص درصد قهوه‌ای شدن و درجه سبزینگی نشان نداد. با توجه به هزینه تهیه اسفرزه برای یک لیتر محیط کشت که ۳۰/۰۰۰ ریال است و آگار که به همان مقدار است، کاربرد اسفرزه برای محیط کشت پیشنهاد نمی‌شود که با نتایج Atrashi و همکاران (2011) مطابقت نداشت.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی می‌توان چنین نتیجه گرفت که بذور گیاهان دارویی و موادی مثل نشاسته و کتیرا در برخی موارد با توجه به گونه گیاهی می‌توانند جایگزین مناسبی برای آگار باشند. از بین مواد استفاده‌شده به‌جای آگار، نشاسته ذرت دارای کمترین اختلاف در شاخص‌های سنجش شده با آگار بود و از نظر هزینه نیز نسبت به آگار مقرون‌به‌صرفه است؛ ولی دیگر مواد در مقایسه قیمت و کیفیت ریزنمونه‌های ایجادی، نمی‌توانند همانند آگار در ایجاد خصوصیات رشدی مطلوب گیاه اثرگذار باشند؛ بنابراین نتایج این پژوهش، استفاده از نشاسته ذرت به‌جای آگار برای ژله‌ای‌کردن محیط کشت سرو توصیه می‌شود.

References

- Amiri, M. E., 2010. Control of mineral uptake in vitro: mineral solubility and mineral movement in vitro. LAP Lambert Academic Press, 345 p.
- Amiri, M.E., & K. Arzani, 2006. Mineral availability and growth of banana (*Musa acuminate* var. Dwarf Cavendish) explant under various relative matric potential *in vitro*. *Journal of Food and Agriculture and Environment,* 4: 105-109.
- Arulanantham, R., S. Pathmanathan, N. Ravimannan & N. Kularajany, 2012. Alternative culture media for bacterial growth using different formulation of protein sources, *Journal of Natural Products and Plant Resources*, 2(6): 697-700.
- Asadi, S., M. Omidi & D. Davoodi, 2005. Micro-tubers propagation of potato by low cost alternative materials in *in vitro*, *Journal of Research and Building*, 71: 94-101. (In Persian)
- Atrashi, M., E. Tavakoli Dinani & A. Masoumi. 2011. Possibility the use of medicinal plant seeds in culture medium and determination of the optimum condition of their application as gelling agent instead of agar, *Journal of Herbal Drugs*, 3: 179-185.
- Babbar, S. B. & N. Jain, 1998. Isubgol as an alternative gelling agent in plant tissue culture media, *Plant Cell Reports*, 17(4): 318-322.
- Babbar, S. B. & S. C. Gupta, 1986. Effect of carbon source on *Datura metel* microspore embryogenesis and the growth of callus raised from microspore-derived embryos, *Biochemistry and Physiology, Pflanz,* 181(5): 331-338.
- Batty, N. & J. Dunwell, 1989. Effect of maltose on the response of potato anthers in culture, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 18(2): 221-226.
- Bornman, C. H. & T. C. Vogelmann, 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.
- Dabai, Y. U. & S. Muhammad, 2005. Cassava starch as an alternative to agar-agar in microbiological media, *African Journal of Biotechnology*, 4(6): 573-574.
- Ghamari Zare, A., M. Sedaghati, M. Emam, M. H. Assareh & Kh. Kiarostami, 2014. Micropropagation of Eucalyptus maculata from Mature Stock by tissue culture, *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 21(3): 581-593. (In Persian).
- Ghashghaie, J., F. Brenckmann & B. Saugier, 1991. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured in vitro, *Physiology of Plant*, 82(1): 73-78.
- Giovanelli, A. & A. De Carlo, 2007. Micropropagation of Mediterranian cypress (Cupressus sempervirens L.). In: Jain, S. M. & H. Haggman (Eds.), Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 93-105.
- Gopal, J. & K. Iwama, 2007. In vitro screening against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol, *Plant Cell Report*, 26(5): 693-700.

www.SID.ir

Archive of SID

- Gribble, K., J. P. Conroy, P. Holford & P. J. Milham, 2002. In vitro uptake of minerals by Gypsophila paniculata and hybrid eucalypts, and relevance to media mineral formulation, *Australian Journal of Botany*, 50(6): 713-723.
- Irannejad Parizi, M., H. Akbari, M. Khoshnevis, M. Shams, T. Abedini, M. Raad & A. Rasouli, 2016. Natural nation of Abarkooh cypress. Yazd University press. (In Persian).
- Jain, R., V. Anjaiah & S. B. Babbar, 2005. Guar gum: a cheap substitute for agar in microbial culture media, *Letters in Applied Microbiology*, 41(4): 345-349.
- Jourgholami, M., A. Deljouei, E. S. Hosseini Ala & Gh. Zahedi-Amiri, 2017. Effect of soil compaction on functional equilibrium and biomass allocation of *Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis, Journal of Forest Research and Development*, 3(2): 91-106.
- Khazaei, H. R., M. Sabet Teimouri & F. Najafi, 2007. Investigation on yield and quality of Isabgol (Plantago ovata L.), *Iranian Journal of Field Crop research*, 5(1): 77-85. (In Persian)
- Kinnersley, A. M. & W. E. Henderson, 1988. Alternative carbohydrates promote differentiation of plant cells, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 15(1): 3-16.
- Mashayekhi, M., M. Amiri & F. Habibi, 2016. Study of growth and mineral uptake of GF677 (peach and almond hybrid) rootstock in response to in vitro various relative matric potential, *Journal of plant production research*, 22(4): 1-16. (In Persian).
- Montagne, J. F. C., 1837. Centurie de plantes cellulaires exotiques nouvelles, *Annales des Sciences Naturelles. (a) Botanique),(2e Ser),* 8: 345-370.
- Murashige, T & F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum,* 15(3): 473-497.
- Piri, Kh. & F. Nazarian Firoozabadi, 2001. Plant tissue culture's guide. Abou Ali Sina University press. (In Persian)
- Sorvari, S. & O. Schifder, 1987. Influence of sucrose and melibiose on barley anther cultures in starch media, *Plant Breeding*, 99(2): 164-171.
- Strickland, S. G., J. W. Nichol, C. M. McCall & D. A. Stuart, 1987. Effect of carbohydrate source on alfalfa somatic embryogenesis, *Plant Science*, 48(2): 113-121.
- Verma, D. C. & D. K. Dougall, 1977. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures, *Plant Physiology*, 59(1): 81-85.
- Yamasaki, H. & G. Osuga, 1960. Studies on the propagation of Gelidiaceus algae on the ratio of cystocarposporophyte to tetrasporophyte in Gelidium mansii on the artificial, stone bed .Bull, *The Japanese Society of Fish*, 26: 9-12.
- Zimmerman, R. H., S. V. Bhardwaj, & I. M. Fordham, 1995. Use of starch-gelled medium for tissue culture of some fruit crops, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 43(3): 207-213.

www.SID.ir

Archive of SID

The use of agar alternatives in cypress *in vitro* culture (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis*)

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

1- M.Sc. Student of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, I.R. Iran. (elahezamani43@yahoo.com)
2- Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, I.R. Iran. (mdehestani@ardakan.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department of Soil Science, Faculty of Natural Resources, Yazd University, Yazd, I.R. Iran. (kkamali@yazd.ac.ir)

Received: 07.01.2018 Accepted: 18.02.2018

Abstract

In this article, possibility of using of plant seeds of Lallemantia, Sand plantain and chia also tragacnth (50, 100 and 150 g/l), starch of wheat and corn (100, 150 and 200 g/l) instead of agar (6, 7 and 8 g/l) in MS medium by 4000 years old of Abarkooh cypress explant (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis*) was investigated. After 30 days of shoot explant establishment in culture medium, percentage of browning, degree of greening and the number of new buds were evaluated. According to the results, the highest and the lowest percentage of browning were obtained in 50, 100 and 150 g/l of chia and agar treatment respectively and it did not show significant difference with starch of corn, sand plantain and lallemantia seeds treatments. With increasing the concentration of materials, percentage of browning decreased. The highest degree of greening was observed in 150 g/l lallemantia and sand plantain seeds and 200 g/l starch of corn treatments and it did not show significant difference with agar (6 g/l). The lowest degree of greening was obtained in two concentrations of 150 and 200 g/l of chia seeds treatments. The highest number of buds was observed in agar treatment by concentrations of 6 and 7 g/l. According to the results, among different investigated materials in this paper, starch of corn was the best and it is also cost-effective compared to the agar.

Keywords: Lallemantia, Sand plantain, Chia, Tragacnth, Starch.

[*] Corresponding author Tel: +98353226767

www.SID.ir