فصلنامهٔ علمی پژوهش و توسعه جنگل
جلد ۵، شماره ۱، صفحه ۲۶-۱۵، (۱۳۹۸)

بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی سرو کهن‌سال ابرکوه (*Cupressus sempervirens* L. (var. *horizontalis* (Mill) Gord

میترا قائدی[۱]، مریم دهستانی اردکانی*[۲] و کاظم کمالی علی‌آباد[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع‌طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران. (ghaedimitra@gmail.com)

۲- استادیار، گروه علوم‌باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع‌طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران. (mdehestani@ardakan.ac.ir)

۳- استادیار، گروه علوم خاکشناسی، دانشکده کشاورزی و منابع‌طبیعی، دانشگاه یزد، ایران. (amolikondori@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۱۲

چکیده

در این پژوهش قابلیت پرآوری سرو چهارهزارساله ابرکوه با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشدی اکسین و سیتوکنین در شرایط درون شیشه‌ای بررسی شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در شش تکرار و هر تکرار حاوی سه ریزنمونه اجرا شد. ریزنمونه‌های جوانه جانبی در محیط کشت اختصاصی گیاهان چوبی (WPM) در دو آزمایش مجزا با تیمارهای مختلف شامل تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنین‌های (Kin، BA، TDZ و 2ip) در پنج سطح (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و همچنین اثر ترکیبی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از سیتوکنین‌های Kin، BA، TDZ و 2ip با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که بیشترین تعداد شاخه در تیمار (۲/٦٦) در محیط‌کشت WPM حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و بیشترین طول شاخه (۱/۸۵ cm) در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنین و فاقد IBA حاصل‌شده است. برای ریشه‌زایی از محیط کشت‌های WPM، SH، LS حاوی چهار سطح (۰، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) IBA و NAA و نیز کینتین در چهار سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد که تنها در محیط کشت WPM حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین در برخی از نمونه‌ها ریشه حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، سیتوکنین، کشت بافت، محیط کشت.

* نویسنده مسئول شمارهٔ تماس: ۰۳۵۳۲۲٦۷٦۷

مقدمه

سرو ابرکوه با نام علمی *Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis* (Mill) Gord از خانوادهٔ سروها Cupressaceae است (Irannejad Parizi *et al*., 2016). دانشمندان و کارشناسان داخلی و خارجی، از این درخت به‌عنوان یکی از کهن‌سال‌ترین درختان جهان یاد می‌کنند (Irannejad Parizi *et al*., 2016)، از این‌رو باید راهکارهای مناسب به‌منظور حفظ، احیا و توسعه این‌گونه نادر مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به مشکل اساسی تکثیر سوزنی‌برگان از طریق قلمه‌زنی (ریشه‌دهی سخت آن‌ها) و نیز این واقعیت که ریشه‌زایی قلمه‌های ساقه و برگ با بالا رفتن سن درخت کاهش می‌یابد، اهمیت تکثیر درختان بالغ از طریق روش‌های ریزازدیادی برجسته‌تر می‌شود (Emam, 2003). ریزازدیادی شرایط را برای حفاظت از گیاهان بومی در معرض خطر، تولید انبوه گیاهان در شرایط آزمایشگاهی، حفاظت از منابع ژنتیکی زیستگاه‌های طبیعی فراهم می‌کند (Çördük and Aki, 2011). ریزازدیادی سوزنی‌برگان برای اولین بار با کشت جنین‌های کاج (*Pinus palustris*) انجام شد (Chee, 1995). این روش چندین برتری مانند شمار زیاد نهال، بی‌تأثیر بودن فصل روی روش افزایش، تولید گیاهان یکنواخت از نظر ژنتیکی یعنی همانند به پایهٔ مادری و تولید گیاه بدون بیماری و آفات دارد (Kriaa *et al*., 2007).

Spanos و همکاران (1997) گزارش کردند که محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) فاقد BA در مقایسه با محیط کشت دارای BA تأثیری در افزایش طول شاخه‌ها سرشاخه‌های گیاهان *Cupressus sempervirens* و *Chamaecyparis lausoniana* نداشته و همچنین غلظت پائین BA (کم‌تر از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) بسیار مؤثر بود.

Khosroshahi و همکاران (2006) بیان کردند که بیشترین درصد کال‌زایی ریزنمونه ساقه گیاه سرخدار به مقدار ۹۷/٤٦ درصد در محیط کشت B5 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین رخ داد. Salehi Shanjani and Mirza (2006) گزارش کرد که افزودن هورمون‌های سیتوکنین سبب افزایش رشد و درصد کال‌زایی در گیاه سرو کوهی می‌شود. Ashrafi و همکاران (2010) اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف *Taxus baccata* را بررسی و محیط کشت B5 دارای ٤ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین را مناسب‌ترین تیمار برای کالوس‌زایی گزارش کردند.

Zaidi و همکاران (2012) مریستم‌های نوک ساقه گیاه سرو کوهی را در محیط کشت MS و WPM با غلظت‌های متفاوت IAA، IBA و 2,4-D در ترکیب با BAP کشت کردند و به این نتیجه رسیدند که بیشترین مقدار کالوس در محیط کشت WPM با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP القا شد.

Taghipoor و همکاران (2015) تأثیر محیط کشت، ریزنمونه و سیتوکنین‌های مختلف در ریزازدیادی کاج‌مطبق (*Araucaria excels*) را مورد بررسی قرار دادند. به‌منظور بررسی تأثیر محیط‌های کشت و سیتوکنین طی فرآیند اندام‌زایی مستقیم برای القای جوانه‌های جانبی در ریزنمونه‌ها، از سه نوع سیتوکینین مختلف (TDZ، Kin و 2ip) استفاده شد. نتایج نشان داد که ریزنمونه ساقه میانی بهترین ریزنمونه، 2ip با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به‌منزلهٔ

بهترین تنظیم‌کنندهٔ رشد در القای جوانه‌های جانبی و همچنین محیط کشت WPM یکی از بهترین محیط‌ها برای ریزازدیادی کاج مطبق بود.

Omidi و همکاران (2011) تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت و زغال فعال را بر ریز ازدیادی سرخدار (*T. baccaata* L.) مورد بررسی قرار دادند. بیشترین تعداد برگ در محیط پایه MS پایه در ترکیب با سه میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آمد و بیشترین اندازهٔ طول شاخساره در محیط کشت MS پایه با سه میلی‌گرم در لیتر Kin و همچنین با سه میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با زغال فعال مشاهده شد. ریشه‌زایی در محیط کشت WPM پس از دو ماه به‌دست آمد.

ازآنجاکه تکثیر سرو چهارهزارساله ابرکوه با روش‌های سنتی مانند بذر و قلمه زمان‌بر بوده و نیازمند مواد گیاهی زیادی است و در صورت تکثیر با بذر به‌دلیل تفرق صفات گیاهان حاصله از نظر ژنتیکی مشابه والد خود نخواهند بود و از طرف دیگر برای پی‌بردن به راز ماندگاری و عمر طولانی این درخت استفاده از روش‌های جدید زیست فن‌آوری مانند کشت بافت کمک شایان توجهی خواهد کرد. در پژوهش حاضر اثر انواع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در ریزازدیادی سرو چهارهزارسالهٔ ابرکوه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۵ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان انجام شد. مواد گیاهی پژوهش شامل جوانه‌های جانبی و انتهایی جداشده از سرشاخه‌های تازه رشدیافتهٔ شاخه‌های انتهایی و میانی درخت سرو ابرکوه (به طول ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر) واقع در شهرستان ابرکوه استان یزد با اخذ مجوز از اداره حفاظت محیط‌زیست در اواخر اردیبهشت‌ماه تهیه شد و داخل کیسه‌های نایلونی و درون یخ به آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه اردکان منتقل شدند. برای کشت، ریزنمونه‌هایی به‌اندازه ۲-۱/۵ سانتی‌متر آماده شدند. سرو ابرکوه در بخش جنوبی شهرستان ابرکوه در مختصات جغرافیایی ۵۲ درجه و ۵۸ دقیقه شرقی و ۳۰ درجه و ٤٦ دقیقه شمالی در استان یزد و در کنار یک قنات قدیمی واقع شده است. 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 برابرسینه ۳/١٤ متر، قطر متوسط تاج ۱۸/۵۰ متر و سطح تاج‌پوشش آن برابر ۲۱۰ مترمربع است (Irannejad Parizi *et al*., 2016). برای ضدعفونی‌کردن نمونه‌ها، ابتدا در آب مقطر استریل به‌مدت سه دقیقه شستشو داده، سپس در محلول اسیدسیتریک ۰/۰۵ درصد + کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت سه تا چهار دقیقه ضدعفونی شدند و در نهایت با محلول اسیدسیتریک ۰/۰۵ درصد سه مرتبه آب‌کشی شدند. در زمان ضدعفونی محلول به‌خوبی تکان داده شد تا محلول به‌طور کامل با ریزنمونه‌ها تماس برقرار کند. برای استقرار، ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت شدند. پس از تهیه محیط کشت، ۷/۵ گرم در لیتر دیفکو باکتو آگار (ساخت مرک) و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به آن افزوده شد. سپس pH محیط کشت روی ۵/۷ تنظیم و به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. برای کشت نمونه‌ها از شیشه‌های مربایی به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر شش سانتی‌متر استفاده شد و درون هر شیشه سه عدد ریزنمونه قرار گرفت. پس از کشت نمونه‌ها درون اتاقک رشد تحت شرایط شدت نور ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ لوکس در ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و

درجه حرارت در دوره تاریکی ۱۸ و در دوره روشنایی ۲۵ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. واکشت نمونه‌ها هر چهار هفته یک‌بار انجام گرفت تا جوان‌سازی صورت گیرد و پس از واکشت ششم نمونه‌ها به محیط‌های شاخه‌زایی انتقال یافتند. در مرحله پرآوری به‌منظور ارزیابی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ریزنمونه‌ها در محیط کشت WPM (McCown, 1981) با انواع سیتوکنین‌های بنزیل آدنین (BA)، تیدیازورون (TDZ)، ۲- ایزوپنتیل آدنین (2IP) و کینتین (Kin) در پنج سطح ۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و شش تکرار و همچنین اثر متقابل سیتوکنین‌های BA، TDZ، 2IP، Kin هرکدام با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مورد بررسی قرار گرفتند. پس از چهار هفته از کشت صفات طول و تعداد شاخه‌ها اندازه‌گیری شد. در این آزمایش پس از چهار هفته که رشد طولی شاخه‌ها تااندازه‌ای کامل شد و قابل جدا شدن از یکدیگر شد تعداد شاخه‌های تولیدشده شمارش شد. از محیط‌های کشت WPM، SH (Shenck and Hildebrandt, 1972)، LS (Linsmaier and Skoog, 1965) و محیط خاکی برای ریشه‌زایی استفاده شد. pH کلیه محیط‌های ریشه‌زایی روی ۵/۲ تا ۵/۳ تنظیم شد. به تمام محیط کشت‌ها مقدار ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷/۲۵ آگار اضافه شد. در مرحله ریشه‌زایی نیز از تیمارهای مختلف شامل IBA در چهار سطح (۰، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) با NAA در چهار سطح (۰، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و کینتین در چهار سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) با شش تکرار استفاده شد. آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در شش تکرار و هر تکرار شامل یک شیشه مربایی حاوی سه ریزنمونه انجام گرفت. تمامی داده‌ها ازنظر نرمال‌بودن آزمون شده و تجزیه‌وتحلیل آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج

اثر انواع تنظیم‌کنندهٔ رشد سیتوکنینی بر شاخه‌زایی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد (BA, 2IP, Kin, TDZ) بر تعداد شاخه تولیدشده در هر تیمار در سطح احتمال یک درصد و بر طول شاخه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). درحالی‌که نوع‌تنظیم‌کننده‌های رشد بر تعداد و طول شاخه اثر معنی‌داری نشان ندادند. همچنین اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنین‌ها و سطوح آن‌ها روی صفات مورد بررسی معنی‌دار نبود (جدول ۱).

نتایج مقایسات میانگین اثر سطوح مختلف انواع تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنینی شامل BA, 2IP, Kin وTDZ بر تعداد شاخساره نشان داد که بیشترین تعداد شاخه در محیط کشت WPM حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده‌های سیتوکنین حاصل شد و با تعداد شاخه‌دهی در سطح هورمون ۰/۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۱). همچنین کمترین تعداد شاخه در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشدی (شاهد) حاصل شد (شکل ۱).

مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف انواع تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنین (BA, 2IP, Kin و TDZ) بر طول شاخساره نشان داد که بیشترین طول شاخساره (۱/۸۵ cm) در محیط کشت WPM حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنین (BA, 2iP, Kin و TDZ) حاصل شد و با ۲ میلی‌گرم در لیتر سیتوکنین تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۲). دیگر سطوح (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) تنظیم‌کننده‌های رشدی سیتوکنین (BA, 2iP, Kin و

TDZ) در یک گروه قرار گرفتند و کمترین طول شاخه را نشان دادند.

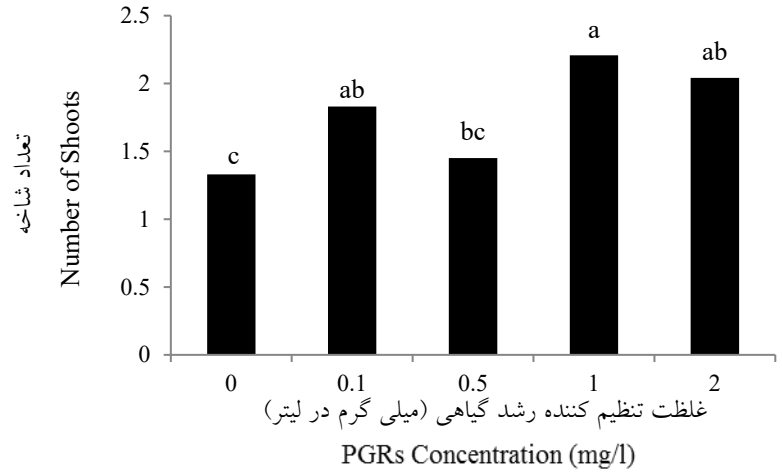
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر انواع تنظیم‌کننده‌های رشد و سطوح مختلف آن‌ها بر تعداد و طول شاخساره گیاه سرو در شرایط درون شیشه

Table 1. Analysis of variance of different plant growth regulators (PGRs) and their concentrations effects on number and length of cypress plant shoots in *in vitro* condition

میانگین مربعات Mean Square		درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییرات Source of variation
طول شاخه (سانتی‌متر) Length of shoot (cm)	تعداد شاخه Number of Shoot		
0.08 ns	0.076 ns	3	تنظیم‌کننده‌های رشد PGRs
0.06*	0.34 **	4	غلظت Concentration
0.23 ns	0.03 ns	12	تنظیم‌کننده‌های رشد * غلظت PGRs * concentration
0.02	0.05	100	خطای آزمایشی Test Error
-	-	119	کل Total Error
12.05	16.44	-	CV%

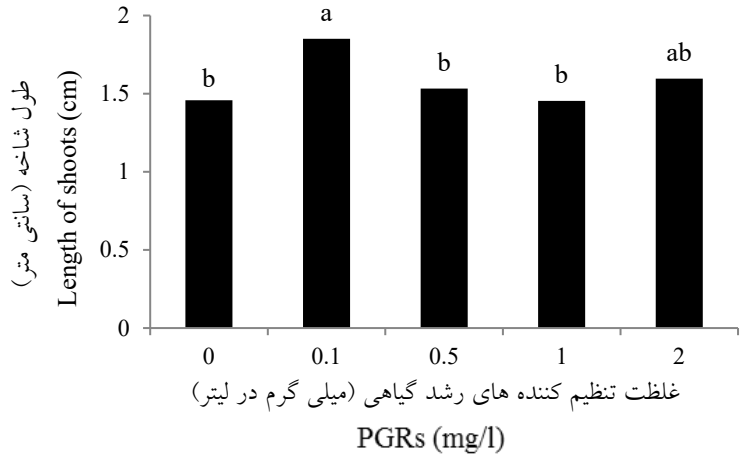
**و * به‌ترتیب معنی‌داری در سطح یک درصد و پنج درصد، ns غیرمعنی‌دار.

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



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف انواع تنظیم‌کننده‌های رشدی سیتوکنین بر تعداد شاخساره گیاه سرو در شرایط درون شیشه

Figure 1. Mean comparison of different concentrations of cytokinins PGRs on number of cypress shoots in *in vitro* condition



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی گیاهی سیتوکنینی بر طول شاخساره گیاه سرو در شرایط درون شیشه

Figure 2. Mean comparison of different concentrations of cytokinins PGRs on length of cypress shoots in *in vitro* condition

اثر ترکیبی سیتوکنین‌ها با IBA

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ترکیب ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA با سیتوکنین‌های مورد بررسی (BA, 2iP, Kin و TDZ) بر تعداد و طول شاخساره در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر ترکیب سیتوکنین‌ها با IBA نشان داد که بیشترین تعداد شاخه (۲/٦٦) در اثر ترکیب ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BA حاصل‌شده است (شکل ۳)، همچنین کمترین تعداد شاخه (۱/۳۳) در محیط کشت WPM فاقد IBA و تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنین (شاهد) به‌دست آمد (شکل ۳). نتایج مقایسه میانگین اثر ترکیب ۰/۱ میلی گرم بر لیتر تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنین با ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بر طول شاخساره نشان داد که بیشترین طول شاخساره در محیط کشت WPM فاقد IBA و تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنین (شاهد) به مقدار ۱/٤۷ سانتی‌متر حاصل شد و دیگر تیمارهای ترکیبی از نظر طول شاخه در یک سطح قرار داشتند و باهم اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (شکل ٤).

ریشه‌زایی

نتایج نشان داد که با توجه به اینکه سرو ابرکوه یک گیاه چوبی سخت‌ریشه‌زا و دارای قدمت زیادی است، باوجود استفاده از محیط‌های کشت و تیمارهای مختلف ریشه‌زایی آن چندان موفقیت‌آمیز نبود و فقط در برخی تیمارها کالوس تشکیل شد؛ که به‌صورت موفق باززا نشدند. تنها در محیط کشت WPM حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin ریشه‌زایی حاصل شد.

بحث

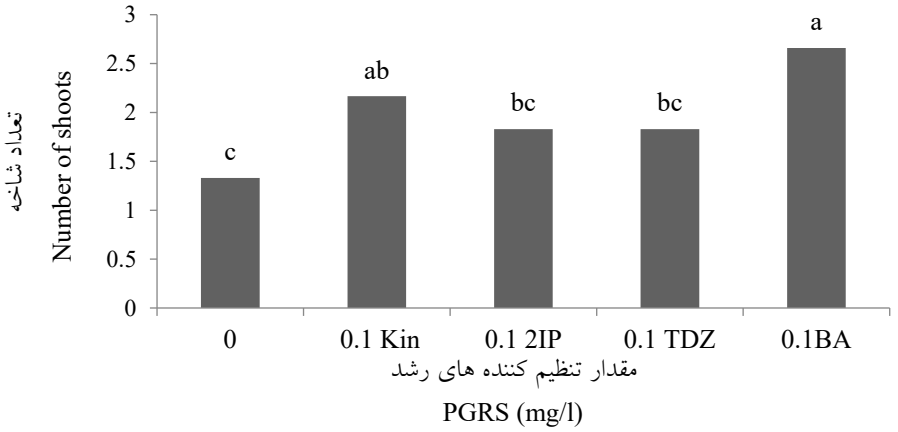
بر اساس نتایج این پژوهش در میان غلظت‌های مختلف انواع سیتوکنین‌ها، بیشترین تعداد و طول شاخساره در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. دلیل احتمالی افزایش تکثیر شاخه را منبع ریز نمونه و سطوح هورمونی استفاده شده برای تولید کالوس ذکر کرده‌اند (Patel and Shah, 2009). یکی از وظایف اصلی سیتوکنین در کشت بافت، انگیزش شاخه‌های نابه‌جا است.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر ترکیب سیتوکنین‌ها با ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بر تعداد و طول شاخساره گیاه سرو در شرایط درون شیشه

Table 2. Analysis of variance of combination of different cytokinins with 0.01 mg/l IBA effects on number and length of cypress plant shoots in *in vitro* condition

میانگین مربعات Mean Square		درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییرات Source of variation
طول شاخه (سانتی‌متر) Length of shoot (cm)	تعداد شاخه Number of Shoot		
0.05 **	0.15 **	4	انواع سیتوکنین Cytokinines
0.01	0.02	25	خطای آزمایشی Test Error
		29	خطای کل Total Error
8.76	9.63	-	CV%

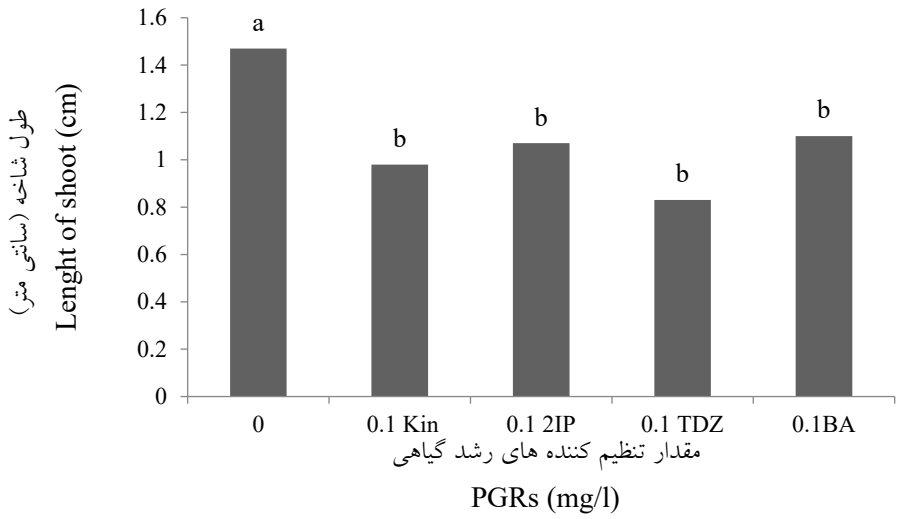
**: Significant at 1%. ** معنی‌داری در سطح یک درصد.



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر ترکیب ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر سیتوکنین‌ها با ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بر تعداد شاخساره گیاه سرو در شرایط درون شیشه

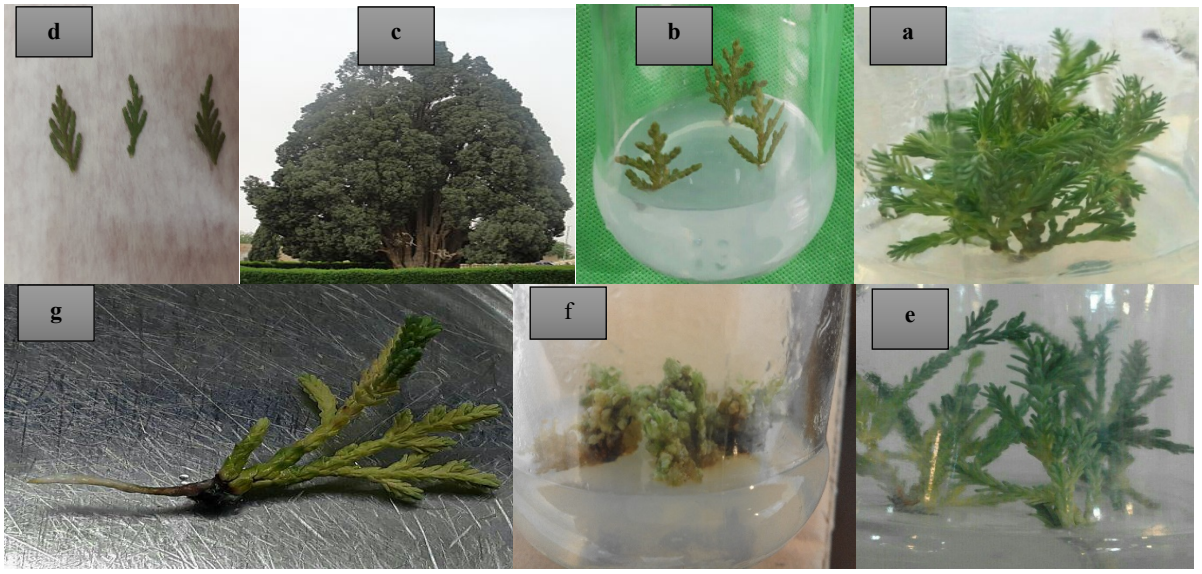
Figure 3. Mean comparison of combination 0.1 mg/l cytokinins PGRs by 0.01 mg/l IBA on number of cypress shoots in *in vitro* condition

سیتوکنین‌ها برای جلوگیری از غلبه انتهایی شاخه‌های انتهایی که منجر به آغازش پرآوری شاخه می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرند (Green and Muir, 1979). عمل مهم سیتوکنین‌ها در گیاهان تحریک تقسیم سلولی است و در واقع مواد افزاینده تقسیم سلولی محسوب می‌شوند و همچنین سیتوکنین‌ها بر توسعه و بزرگ شدن سلول‌ها نیز تأثیرگذارند. نتایج به‌دست‌آمده با نتایج پژوهش Ruzic and Vujovic (2008) مطابقت داشت. طبق پژوهش آن‌ها در استفاده از چهار نوع سیتوکنین در ریزازدیادی گیلاس رقم lapins، بنزیل‌آدنین (۱ میکرومولار BA) بهترین نوع سیتوکنین در تکثیر و پرآوری بود. سیتوکنین‌ها اغلب برای افزایش رشد و نمو به‌کار می روند.



شکل ٤- مقایسه میانگین اثر ترکیب ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر سیتوکنین‌ها با ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بر طول شاخساره گیاه سرو در شرایط درون شیشه

Figure 4. Mean comparison of combination of 0.1 mg/l cytokinins PGRs by 0.01 mg/l IBA on length of cypress shoots in *in vitro* condition



شکل ۵- مراحل مختلف ریزازدیادی گیاه سرو ابرکوه a) درخت سرو ابرکوه واقع در شهرستان ابرکوه استان یزد b) ریزنمونه‌های مورد استفاده به اندازهٔ ۲-۱/۵ سانتی‌متر c) استقرار ریزنمونه در شیشه مربایی d) پرآوری ریزنمونه‌ها e) افزایش رشد طولی ریزنمونه‌ها f) ایجاد کالوس در محیط ریشه‌زایی g) ایجاد ریشه حقیقی در ریز نمونه موجود در محیط کشت WPM حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin

Figure 5. Different stages of Abarkooh cypress micropropagation a) Abarkooh cypress tree located in Abarkooh city in Yazd province b) Used explants by 1.5-2 cm length c) Explants establishment in glass jar d) Explants proliferation e) Increasing the length of explants f) Callus induction in rooting culture medium g) Forming true root in explant that was cultured in WPM culture medium contained 2 mg/l kin

در بررسی انجام‌شده بیشترین طول و کمترین تعداد شاخساره در تیمار شاهد حاصل شد درحالی‌که به‌طور مجموع بیشترین طول و تعداد شاخساره در تیمار ترکیبی BA و IBA حاصل شد که برای پرآوری گیاه این تیمار معرفی می‌شود. Emam و همکاران (2015) نیز ترکیب ۳ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA را در افزایش تعداد و طول جوانه و نیز رشد طولی و سبزینگی شاخه در گیاه جاتروفا مؤثر دانستند که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت. Shekafandeh and Ghasemi (2008) اثر غلظت‌های مختلف BA (۰، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) همراه با غلظت‌های مختلف ۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بر رشد جوانه و پرآوری شاخساره بادام در محیط کشت MS را بررسی کردند، آن‌ها نشان دادند که بیشترین رشد جوانه و پرآوری شاخساره در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد که با نتایج حاصله همسو بود. Andrade و همکاران (1999) تأثیر BA و TDZ را بر سرعت ریز ازدیادی *Lavandula vera* بررسی کردند. نتایج نشان داد که استفاده از BA و TDZ سبب افزایش تکثیر شاخه و رشد طولی ساقه می‌شود. در پژوهش Razavi (2013) روی سرو کوهی، بیشترین رشد طولی شاخه با غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌تنهایی و یا در ترکیب با NAA و IBA به غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۵ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت.

بر اساس نتایج، ریشه‌زایی تنها در محیط کشت حاوی کینتین اتفاق افتاد. تأثیر کینتین در تولید شاخه در مرحله پرآوری و القاء ریشه‌زایی توسط Ruzic and Vujovic (2008) نیز مطرح شده است. همچنین Peyvandi و همکاران (2015) در گیاه *L. vera* ریشه‌زایی را در محیط کشت WPM دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به مقدار ۱۶/۶ درصد مشاهده کردند که با نتایج به‌دست‌آمده مطابقت داشت. بسیاری از پژوهش‌های پایه‌ای که روی ریشه‌دهی صورت گرفته نشان داده است که اثر عواملی مانند سن گیاه، ژنوتیپ و نوع ریز نمونه، تیمارهای اکسین و شرایط محیطی در این پدیده دخیل هستند (Taghipoor *et al*., 2015). هرچند فرآیندهای مولکولی مشابهی در مخروطیان شناسایی‌شده است اما تفاوت‌های فیزیولوژیکی و تکاملی ریشه‌زایی همچنان ناشناخته باقی‌مانده است (Taghipoor *et al*., 2015). به‌نظر می‌رسد که این دلایل موجب کاهش تولید ریشه در نمونه‌های مورد بررسی شده است.

به‌طورکلی نتایج این پژوهش نشان داد که ترکیب، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد روی صفات مختلف در اندام‌زایی و باززایی گیاه سرو تأثیرگذار بود. همچنین این پژوهش نشان داد که تعداد و طول شاخه تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی قرار دارد. استفاده از IBA به‌عنوان یک اکسین تأثیر مثبت و معنی‌داری روی افزایش تعداد شاخه داشت و در افزایش رشد طولی شاخه‌ها در ترکیب با دیگر سیتوکنین تأثیر منفی داشت به‌طوری‌که با افزودن IBA به محیط کشت WPM موجب کاهش رشد طولی شاخه‌ها شد؛ بنابراین مقدار کم IBA برای اهداف باززایی مناسب‌تر بود.

References

- Andrade, L. B., S. Echeverrigaray, F. Fracaro, G. F. Pauletti & L. Rota, 1999. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56(2): 79-83.
- Ashrafi, S., M. R. Mofid, M. Otroshi, M. Ebrahimi & M. Khosroshahli, 2010. Effect of plant growth regulators on the callogenesis and taxol production in cell suspension of *Taxusbaccata*L, *Trakia Journal of Sciences,* 8(2): 36-43.
- Chee, P. P., 1995. Organogenesis in *Taxus brevifolia* tissue cultures, *Plant Cell Reports*, 14(9): 560-565.
- Çördük, N. & C. Aki, 2011. Inhibition of browning problem during micropropagation of Sideritis trojana bornm., an endemic medicinal herb of Turkey, *Romanian biotechnological letters*, 16(6): 6760-6765.
- Emam, M., 2003. In vitro propagation of *Thuja orientalis* L by shoot tip culture*, Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 11(1): 1-15 (In Persian).
- Emam, M., L. Mirjani & T. Keneshlo, 2015. Effects of medium, genotype and plant growth regulators on micro propagation of *Jatropha curcas*, *Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research,* 23(2): 182-191.
- Green, J. F. & R. M. Muir, 1979. An analysis of the role of Potassium in the growth effects of cytokinin, light and abscisic acid on cotyledon expansion, *Physiology Plant,* 46(1): 19- 24.
- Irannejad Parizi, M., H. Akbari, M. Khoshnevis, J. Shams, T. Abedinin, M. Hadirad, A. Rasouli, A. Taheri & M. Mahdavi, 2016. National Monument of Abarkooh cypress. Yazd university publication, 318 p. (In Persian).
- Khosroshahi, M., M. Valizade, A. R. Ghasempour, M. KHosroshahli & H. A. Naghdibadi, 2006. The effect of Culture Media, Explant and growth regulators on callus and Taxol production in *Taxus baccata* L, *Journal of Agricultural Sciences*, 37-1(1): 69-78.
- Kriaa, W., F. Masmoudi & N. Drira, 2007. In vitro culture of date palm using mature female flower explants. In: Proceedings of the fourth Symposium on Date Palm, 5-8 May, Saudi Arabia, King Faisal University, Al-Hassa. p.146.
- Linsmaier, E. M. & F. Skoog, 1965. Organic growth factor requirments of tobacco tissue culture, *Physiologia plantarum*, 18(1): 100-127.
- McCown, B. H., 1981. Woody plant medium (WPM) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience,* 16: 453-453.
- Murashige, T. & F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures, *Physiology of Plant*, 15(3): 473-497.
- Omidi, M., B. Behjat Sasan, M. Naghavi, S. Kalate Jari & A. Etminan, 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.
- Patel, R. M. & R. R. Shah, 2009. Regeneration of stevia plant through callus culture, *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 71(1): 46-50.
- Peyvandi, M., L. Kazemi & A. Majd, 2015. Effect of different cytokinins on micropropagation of *Lavandula vera*, *Journal of plant research*, 28(2): 257-263.
- Razavi, R. S., 2013. Proliferation induction of shoot and root in in vitro for micropropagation of *Juniperus polycarpos* c.koch. MSc thesis. Payame noor university faculty of agricultural science. Center of south east of Tehran. Tehran, Iran, 113 p (In Persian).
- Ruzic, D. V. & T. I. Vujovic, 2008. The effects of cytokinin types and their concentration on *invitro*multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus savium* L.), *Horticultural Science,* 35(1): 12-21.
- Salehi Shanjani, P. & M. Mirza, 2006. Seasonal variation of the leaf and cone oil of *Juniperus excelsa* M.B, *Journal of Medicinal Plants*, 1(17): 50-58.
- Schenk, R. V. & A. C. Hildebrandt, 1972. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures, *Canadian Journal of Botany*, 50(1): 199-204.
- Shekafandeh, A. & M. Ghasemi, 2008. Effects of BA and TDZ on bud growth and immature cotyledons somatic embrygenesis of late flowering almond (*Prunus dulcis* L.) '7-Sharood' cultivar, *Journal of Horticultural Science*, 22(2): 147-154.

- Spanos, K. A., A. Pirri & S. Woodward, 1997. Micropropagation of *Cupressus sempervirens* L. and *Chamaecyparis lawsoniana* (A.MURR.) PAR, *Silva Genetica*, 46(5): 291-294.
- Taghipoor, M., R. Haddad & M. Ghannadnia, 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).
- Zaidi, M. A., S. Khan, N. Jahan, A. Yousafzai & A. Mansoor, 2012. Micropropagation and Conservation of Three JuniperusSpecices (Cuperssaceae), *Pakistan journal of Botany*, 44: 301-304.

Effect of plant growth regulators on micropropagation of old Abarkooh cypress

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

1- MSc student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, I. R. Iran. (ghaedimitra@gmail.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: 27.02.2018 Accepted: 02.06.2018

Abstract

In this study proliferation potential of four thousand year old cypress (*Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis* (Mill) Gord) using auxins and cytokinins plant growth regulators in in vitro condition was investigated. This study was performed as a factorial experiment and completely randomized design with six replications and each replication were contained three explants. Auxiliary bud explants in two different experiments were cultured in WPM culture medium consisted of cytokinins plant growth regulators (kin, BA, TDZ and 2ip) in five levels (0, 0.1, 0.5, 1 and 2 mg/l) and combination of 0.1 mg/l kin, BA, TDZ and 2ip with 0.01 mg/l IBA. Results showed that the maximum shoot numbers per treatment (2.66) was obtained in WPM culture medium contained 0.01 mg/l IBA + 0.1 mg/l BA and the highest length of shoots (1.85 cm) was obtained in media contained 0.1 mg/l cytokinins and without IBA. For root induction different culture media consisted of WPM, SH and LS contained four concentrations of IBA and NAA (0, 2, 2.5 and 3 mg/l) and also four concentrations (0, 0.5, 1 and 2 mg/l) of Kin was used and only in WPM culture medium contained 2 mg/l kin root was obtained.

Keywords: Culture medium, Cytokinine, Proliferation, Tissue culture.

[*] Corresponding author Tel: +98353226767