جنگل و فرآورده‌های چوب، مجلهٔ منابع طبیعی ایران
دورهٔ ۷۱، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۷
ص ۱۳۷-۱۴۷

DOI: 10.22059/jfwp.2018.252698.898

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر میزان شاخه‌زایی گیاه سرو چهارهزارسالهٔ ابرکوه

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

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان، یزد
۲. استادیار گروه علوم باغبانی دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان یزد
۳. استادیار گروه علوم خاک‌شناسی دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه یزد

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۱۲/۰۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۱۵

چکیده

سرو ابرکوه (*Cupressus sempervirens* L. var. horizontalis (Mill) Gord) از قدیمی‌ترین سروها در سراسر جهان است. یکی از بهترین روش‌های نگهداری، حفظ و ازدیاد گیاهان در حال انقراض و کمیابی همچون این گیاه کشت بافت آن است. هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر انواع تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنینی، اکسین و شیرهٔ نارگیل به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی بر میزان شاخه‌زایی گیاه بود. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار به اجرا درآمد. ریزنمونه‌ها پس از ضدعفونی به‌منظور شاخه‌زایی در محیط کشت WPM تحت سه آزمایش بررسی شد: ۱. تنظیم‌کننده‌های رشد (Kin، BA، TDZ و 2ip) در پنج سطح (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)؛ ۲. اثر متقابل غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر سیتوکنین‌ها (Kin، BA، TDZ و 2ip) با IBA (صفر و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر)؛ ۳. شیرهٔ نارگیل (صفر و ۵۰ میلی‌لیتر + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA). براساس نتایج، تعداد شاخه در محیط کشت‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و نیز ۰/۱ و ۱ میلی گرم در لیتر 2ip افزایش یافت. افزودن ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به محیط کشت‌های حاوی Kin، TDZ و BA تعداد شاخه را افزایش داد، درحالی که سبب کاهش طول شاخساره شد. استفاده از شیرهٔ نارگیل به‌طور معنی‌داری تعداد شاخه را افزایش و طول آن را کاهش داد. برای ریشه‌زایی از محیط کشت‌های WPM، SH، LS با تیمارهای مختلف استفاده شد که تنها در محیط کشت WPM حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin ریشه حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آدنین، تکثیر، تی‌دیازورون، درون‌شیشه‌ای، ریزازدیادی، کینتین.

مقدمه

سرو ابرکوه با نام علمی *Cupressus sempervirens* L. var. horizontalis (Mill) Gord یکی از گونه‌های جنس *Cupressus* از خانوادهٔ سروها Cupressaceae واقع در شهرستان ابرکوه استان یزد است [۱]. این سرو حدود ۴۰۰۰ سال دارد و از قدیمی‌ترین سروهای جهان محسوب می‌شود. درختان کهنسال به‌عنوان مهم‌ترین ذخایر ژنتیکی هر کشور از ابعاد مختلفی مانند روند تکاملی گیاهان و همچنین تحولات اقلیمی و بیوشیمیایی محیط زیست خود شایان بررسی‌اند [۲]. در کنار مطالعات زیربنایی شناسایی و تکثیر این درختان، ایران قادر خواهد بود در عرصهٔ بین‌المللی خود را کشوری با سرمایهٔ ذخایر ژنتیکی ارزشمند در مورد محیط زیست و جنگل معرفی کند [۲]. سرو زربین یک گونهٔ بسیار مهم جنگلی است که به‌علت توانایی رشد و

* نویسندهٔ مسئول، تلفن همراه: ۰۹۱۳۳۵۷۷۸۱۶
Email: mdehestani@ardakan.ac.ir

نمو در منطقهٔ مدیترانه و در محیط‌هایی مانند خاک‌های آهکی، خاکستری، خشک و ضعیف و اهمیت آن در فضای سبز، اقتصاد محلی، فرهنگ و نمادگرایی، دارای اهمیت است [۳]. با توجه به اهمیت سرو کهنسال ابرکوه و لزوم تولید نتاج مشابه پایهٔ مادری، استفاده از کشت بافت بهترین راه ازدیاد این گیاه ارزشمند است. توسعهٔ سیستم‌های کشت بافت به‌طور مؤثر می‌تواند ابزار مفیدی برای تکثیر باشد که هم برای تولید انبوه کلون و هم برای انتقال ژن صفات مهم در پرورش و توسعهٔ جنگل‌ها کارامد است [٤].

کاپونا و جیانینی [٥] به‌منظور ریزازدیادی پایه‌های جوان و مسن گونهٔ سرو (*Cupressus sempervirens* L.) از ریزنمونه‌های جوانهٔ جانبی پایه‌های با سنین مختلف در محیط کشت‌های مختلف برای رشد و ریشه‌زایی استفاده کردند. القای جوانه‌های درخت سرو در محیط کشت SH[1] حاوی ۱/۱۲ میلی‌گرم در لیتر BA[2] و ۱/۸٦ میلی‌گرم در لیتر NAA[3] صورت گرفت. در این ترکیب بیشترین تعداد شاخه (٤/٥ عدد) حاصل شد. سیتوکنین برای القای جوانه‌زنی جوانه‌های جانبی ضروری بود. چانگ و همکاران [٦] گزارش کردند که گونهٔ *Taxus mairei* (Lemée & H.Lév.) S.Y.Hu در محیط کشت MS ½ حاوی غلظت‌های کم تنظیم‌کننده‌های رشد، شاخه‌های بلندتری ایجاد کردند. آنان همچنین بیان کردند که ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP[4] در تولید شاخه‌های جدید این گیاه تأثیر زیادی دارد.

اگرچه تکثیر از طریق جنین‌زایی رویشی در تعداد زیادی از سوزنی‌برگان گزارش شده است، ازدیاد از طریق اندام‌زایی تنها در تعداد معدودی از سوزنی برگان به‌دست آمده است [۷]. خوشحال سرمست و همکاران [۸] ریزازدیادی کاج مطبق (*Araucaria excels* R.) را با استفاده از قطعه‌های ۹ میلی‌متری ساقهٔ عمودی بررسی کردند. آنان بیشترین میانگین تعداد شاخه را در محیط کشت MS دارای ۰/۰۰۹ میلی‌گرم در لیتر (تیدیازورون) TDZ[5] به‌دست آوردند. در کشت بافت ارس (*Juniperus excelsa* L.) با ریزنمونهٔ جوانهٔ جانبی در شرایط درون‌شیشه‌ای، بیشترین میانگین کالوس‌زایی در محیط کشت WPM[6] حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آمد [۹].

رحمتی و همکاران [۱۰] نشان دادند که بیشترین درصد کالوس‌زایی (57 درصد) ریزنمونه‌های ساقه دو گونهٔ سرخدار *T. baccata* L. و *T. brevifolia* Nutt. در محیط کشت WPM حاوی 2 میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و 0/2 میلی‌گرم در لیتر Kin صورت گرفت. همچنین استفاده از غلظت‌های کم تنظیم‌کننده‌های رشد نسبت به غلظت‌های بیشتر، تأثیر بیشتری بر متغیر کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های ساقهٔ دو گونهٔ سرخدار داشت.

ازآنجا که تکثیر سرو ٤۰۰۰ سالهٔ 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 حاصل از نظر ژنتیکی مشابه والد خود نخواهند بود، استفاده از روش‌های جدید زیست‌فناوری مانند کشت بافت کمک شایان توجهی خواهد کرد. از این‌رو در این پژوهش اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر شاخه‌زایی جوانه گیاه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

سرو ابرکوه در بخش جنوبی شهرستان ابرکوه در مختصات جغرافیایی ٥۲ درجه و ٥۸ دقیقهٔ شرقی و ۳۰ درجه و ٤٦ دقیقهٔ شمالی در استان یزد و در کنار یک قنات قدیمی واقع شده است. ارتفاع کنونی این درخت حدود ۲٥ متر، ارتفاع ناحیهٔ فعلی تشکیل تاج از سطح

1. Shenck and Hildebrandt, 1972
2. Benzyl adenine
3. Naphthyl Acetic Acid
4. 6-Benzylaminopurine
5. Thidiazoron
6. Woody Plant Medium

زمین ۲/۱۰ متر، محیط یقه (تنهٔ روی سطح زمین) ۹/۶۲ متر، قطر تنهٔ برابرسینه ۳/۱٤ متر، قطر متوسط تاج ۱۸/۵۰ متر و سطح تاج‌پوشش آن ۲۱۰ متر مربع است [۱].

مواد گیاهی پژوهش شامل جوانه‌های جانبی و انتهایی جداشده از سرشاخه‌های تازه‌رشدیافته و قسمت میانی شاخهٔ درخت سرو ابرکوه (به طول ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر) واقع در شهرستان ابرکوه استان یزد با اخذ مجوز از ادارهٔ حفاظت محیط زیست در اواخر اردیبهشت تهیه شد و داخل کیسه‌های نایلونی و درون یخ به آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه اردکان انتقال یافت. برای کشت، ریزنمونه‌هایی به‌اندازهٔ ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر آماده شدند. برای سترون‌سازی، نمونه‌ها ابتدا در محلول اسیدسیتریک ۰/۰۵ درصد و سپس محلول اسیدسیتریک ۰/۰۵درصد + کلرید جیوه ۰/۱ درصد قرار داده شد و در نهایت دوباره به محلول اسیدسیتریک ۰/۰۵ درصد منتقل شده و در هر مرحله به‌مدت ۳ تا ٤ دقیقه ضدعفونی شد. مرحلهٔ نهایی سه مرتبه تکرار شد. به‌دلیل آلودگی زیاد ریزنمونه‌ها و تولید فنل توسط آنها از آنتی‌اکسیدان اسیدسیتریک استفاده شد. در زمان ضدعفونی، محلول به‌خوبی تکان داده شد تا کاملاً با ریزنمونه‌ها تماس برقرار کند. برای استقرار، ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS [۱۱] بدون هورمون قرار گرفتند. پس از تهیهٔ محیط کشت، ۷/۵ گرم در لیتر باکتوآگار 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 و قطر ٦ سانتی‌متر استفاده شد و درون هر شیشه سه عدد ریزنمونه قرار گرفت (شکل ٤-الف). واکشت نمونه‌ها هر ۲۸ روز یک‌بار انجام گرفت تا جوان‌سازی صورت گیرد و پس از واکشت ششم، نمونه‌ها به محیط‌های شاخه‌زایی انتقال یافتند. نمونه‌ها پس از کشت در اتاقک رشد با دورهٔ نوری ۱٦/۸ ساعت تاریکی/ روشنایی، دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد در دورهٔ روشنایی و ۲±۱۸ درجهٔ سانتی‌گراد در دورهٔ تاریکی و شدت نور ۲۵۰۰ تا ۳۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. پس از استقرار نمونه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای و تشکیل شاخه‌ها به طول ۲/۵ تا ۳ سانتی‌متر، از آنها برای شاخه‌زایی استفاده شد (شکل ٤-ب). در این مرحله طی سه آزمایش جداگانه، میزان شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها بررسی شد.

آزمایش اول: در این قسمت ریزنمونه‌ها طی سه آزمایش جداگانه در محیط کشت WPM حاوی سه نوع سیتوکنین BAP، TDZ و 2ip در پنج غلظت ۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و شش تکرار با ۱۸ ریزنمونه کشت شدند. نمونه‌ها پس از کشت در اتاقک رشد با شرایط ذکرشده در بالا نگهداری شدند. چهار هفته پس از کشت، تعداد و طول شاخساره ارزیابی شد. داده‌های به‌دست‌آمده براساس طرح پایهٔ کاملاً تصادفی (شش تکرار و سه ریزنمونه در هر تکرار) تجزیه‌وتحلیل شد. مقایسهٔ میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها و آزمون نرمالیتی با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 انجام گرفت.

آزمایش دوم: در این مرحله طی چهار آزمایش جداگانه اثر متقابل ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر سیتوکنین‌های BA، TDZ، 2ip و Kin با دو سطح (صفر و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA[1]) بررسی شد. در این آزمایش نیز از محیط کشت WPM استفاده شد. نوع، ترکیبات، نحوهٔ تهیه و شرایط نگهداری محیط کشت مانند آزمایش اول بود.

آزمایش سوم: در این آزمایش اثر ۵۰ میلی‌لیتر شیرهٔ نارگیل + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در محیط کشت WPM به‌منظور شاخه‌زایی بررسی شد و این محیط کشت با محیط فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و شیرهٔ نارگیل به‌عنوان شاهد مقایسه شد.

چهار هفته پس از کشت، تعداد و طول شاخساره‌ها ارزیابی شد. داده‌های به‌دست‌آمده براساس طرح پایهٔ کاملاً

1. Indole-3-Butyric Acid

تصادفی (شش تکرار و سه ریزنمونه در هر تکرار) تجزیه‌وتحلیل شد. در نهایت، نتایج آزمایشگاهی داده‌های آزمایش دوم و سوم در نرم افزارSPSS نسخهٔ ۱۶ تجزیه‌وتحلیل شد. قبل از تجزیه‌وتحلیل آماری، داده‌ها از نظر نبود ناهنجاری‌هایی مانند مقادیر انتهایی و پرت کنترل شده و نرمال بودن آنها در سطح احتمال ۵ درصد بررسی شد. سپس میانگین‌ها با استفاده از آزمون تی مستقل در سطح معنی‌داری ۱ درصد مقایسه شد.

در نهایت نمونه‌های گیاهی برای رشد طولی به محیط کشت WPM کامل حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA منتقل شدند تا رشد طولی شاخه‌ها کامل شود و برای انتقال به مرحلهٔ ریشه‌زایی آماده شوند. طول هر گیاهچه در این مرحله حدود ۳/۵ سانتی‌متر بود. برای ریشه‌زایی از محیط کشت‌های WPM، SH و LS استفاده شد. پس از کشت، محیط کشت‌های حاوی نمونه به‌طور کامل با فویل آلومینیومی پوشانده شده و به‌مدت یک هفته به داخل یک کارتن در تاریکی درون اتاقک رشد با شرایط ذکرشده در بالا منتقل شدند. در مرحلهٔ ریشه‌زایی نیز از تیمارهای مختلف شامل IBA در چهار سطح (۰، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر)، NAA در چهار سطح (۰، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و Kin در چهار سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) با شش تکرار استفاده شد. پس از کشت نمونه‌ها در محیط‌های ریشه‌زایی برخی از آنها، کالوس با ساختار پفکی و اسفنجی ایجاد کردند. به‌دلیل کم بودن تعداد نمونه‌های ریشه‌دارشده آنالیز آماری صورت نگرفت.

نتایج و بحث

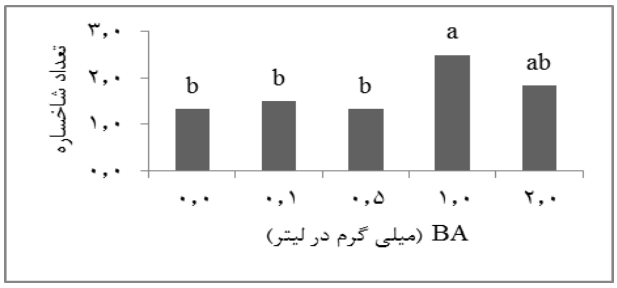
آزمایش اول

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف BA (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم برلیتر) بر تعداد شاخه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود، ولی بر طول شاخه اثر معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱). یکی از وظایف اصلی سیتوکنین در کشت بافت، تحریک شاخه‌های نابجاست. سیتوکنین‌ها برای آزاد کردن جوانه‌های جانبی از تسلط انتهایی که سبب آغاز شاخه‌زایی شاخه می‌شود، به‌کار می‌روند [۱۲]. عمل مهم سیتوکنین‌ها در گیاهان، تحریک تقسیم سلولی است و در واقع مواد افزایندهٔ تقسیم سلولی محسوب می‌شوند؛ آنها همچنین بر توسعه و بزرگ شدن سلول‌ها نیز تأثیرگذارند. تغییر در نوع و مقدار سیتوکنین‌ها در محیط کشت می‌تواند بر باززایی شاخساره‌ها تأثیر بگذارد. نتایج مقایسهٔ میانگین نشان داد که بیشترین تعداد شاخه با میانگین ۲/۵ عدد شاخه در محیط کشت WPM حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA حاصل شد و با سطح ۲ میلی‌گرم بر لیتر با تعداد ۱/۸۳ شاخه از این نظر اختلاف معنی‌داری نداشتند. کمترین تعداد شاخه نیز در شاهد، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد (شکل ۱). نتایج به‌دست‌آمده با یافته‌های اسپانوس و همکاران [۱۳] مطابقت داشت. آنها گزارش کردند که شاخه‌زایی شاخساره در محیط فاقد BA صورت گرفت و افزودن ۰/۰۰۱ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به طور معنی‌داری تعداد شاخه را افزایش داد. عباسیان و همکاران [۱٤] نیز با استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین شاخه‌زایی ریزنمونه‌های *T. baccata* را به‌دست آوردند.

جدول ۱. تجزیهٔ واریانس اثر سطوح مختلف BA بر تعداد و طول شاخسارهٔ گیاهچهٔ سرو ابرکوه (*Cupressus semprvirens* var. *horizontalis*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد شاخه	طول شاخه
غلظت BA	۴	۰/۱۴*	۰/۰۰۲ ns
خطای آزمایشی	۲۵	۰/۰۵	۰/۰۱۶۴
کل	۲۹		
C.V	–	۱۵/۷۶	۹/۲۲

*معنی‌داری در سطح ۵ درصد؛ ns: غیرمعنی‌دار



شکل ۱. مقایسهٔ میانگین اثر سطوح مختلف BA بر تعداد شاخسارهٔ گیاهچهٔ سرو ابرکوه (*Cupressus semprvirens* var. *horizontalis*) در شرایط درون‌شیشه‌ای
(حروف یکسان، نشان‌دهندهٔ نبود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است)

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف 2ip (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم برلیتر) بر تعداد شاخه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود، ولی بر طول شاخه اثر معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲). نتایج مقایسهٔ میانگین بررسی سطوح مختلف 2ip بر میزان شاخه‌زایی گیاه نشان داد که بیشترین تعداد شاخه با میانگین ۲/۵ در محیط کشت WPM حاوی ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2ip حاصل شد که با سطح ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2ip به‌ترتیب با تعداد ۲ و ۱/۵ شاخه، اختلاف معنی‌داری نشان نداد و در یک گروه قرار گرفتند. کمترین تعداد شاخه‌دهی ۱/۳۳ بود که در تیمار شاهد (بدون 2ip) حاصل شد (شکل ۲). خوشحال سرمست و همکاران [۸] در کشت درون‌شیشه‌ای *Araucaria excelsa* R. در محیط کشت MS، نشان دادند که ریزنمونه‌های گرفته‌شده از بخش بالایی ساقه در مقایسه با بخش پایینی آن در محیط کشت حاوی 2ip بیشترین تعداد شاخساره در ریزنمونه (۳/۴۷ عدد) و بیشترین طول شاخساره در ریزنمونه (۶/۲۷ میلی‌متر) را داشتند. همچنین تقی‌پور و همکاران [۱۵] برای القای جوانه‌های جانبی در *Araucaria excelsa* R.، 2ip را بهترین هورمون گزارش کردند.

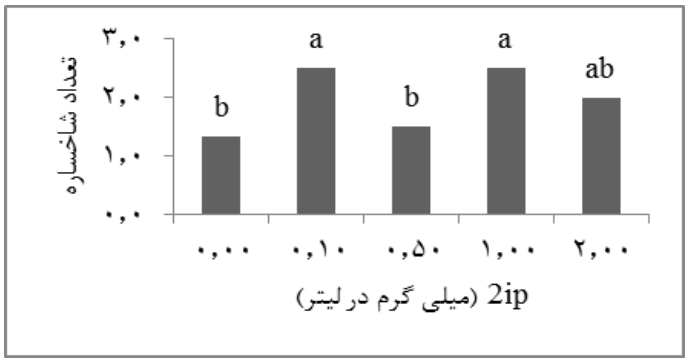
نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که سطوح مختلف TDZ بر طول شاخساره در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود، ولی بر تعداد شاخساره اثر معنی‌داری نشان نداد (جدول ۳).

نتایج مقایسهٔ میانگین اثر سطوح مختلف TDZ بر طول شاخساره نشان داد که بیشترین طول شاخه با میانگین ۲/۱۷ سانتی‌متر در محیط کشت WPM حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ حاصل شدکه با سطح ۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ به میزان ۱/۵۹ سانتی‌متر از این نظر اختلاف معنی‌داری نشان نداد و در یک گروه قرار گرفتند. سایر تیمارهای اعمال‌شده از نظر طول شاخه در گروه بعدی قرار گرفتند و با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل ۳). الرامامنه و همکاران [۱۶] نیز گزارش کردند که استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ طول شاخسارهٔ *J. phoenicea* را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. استفاده از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ همراه با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسپرمیدین، سبب بیشترین افزایش طول شاخساره‌های *T. baccata* شد [۱۷].

جدول ۲. تجزیهٔ واریانس اثر سطوح مختلف 2ip بر تعداد و طول شاخسارهٔ گیاهچهٔ سرو ابرکوه (*Cupressus semprvirens* var. horizontalis) در شرایط درون‌شیشه‌ای

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد شاخه	طول شاخه
غلظت 2ip	۴	۰/۱۷*	۰/۰۳ ns
خطای آزمایشی	۲۵	۰/۰۶	۰/۰۳
کل	۲۹		
C.V	–	۱۶/۰۹	۱۲/۰۷

*معنی‌داری در سطح ۵ درصد؛ ns: غیرمعنی‌دار



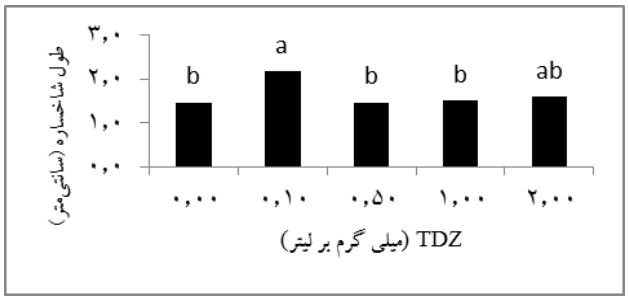
شکل ۲. مقایسهٔ میانگین اثر سطوح مختلف 2ip بر تعداد شاخسارهٔ گیاهچهٔ سرو ابرکوه (*Cupressus semprvirens* var. *horizontalis*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

(حروف یکسان، نشان‌دهندهٔ نبود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است)

جدول ۳. تجزیهٔ واریانس اثر سطوح مختلف TDZ بر تعداد و طول شاخسارهٔ گیاهچهٔ سرو ابرکوه (*Cupressus semprvirens* var. horizontalis) در شرایط درون‌شیشه‌ای

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد شاخه	طول شاخه
غلظت TDZ	۴	۰/۰۵ ns	۰/۰۵*
خطای آزمایشی	۲۵	۰/۰۵	۰/۰۳
کل	۲۹		
C.V	-	۱۶/۴۱	۱۲/۲۲

*معنی‌داری در سطح ۵ درصد؛ ns: غیرمعنی‌دار



شکل ۳. مقایسهٔ میانگین اثر سطوح مختلف TDZ بر طول شاخسارهٔ گیاهچهٔ سرو ابرکوه (*Cupressus semprvirens* var. horizontalis) در شرایط درون‌شیشه‌ای

(حروف یکسان، نشان‌دهندهٔ نبود تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد است)

آزمایش دوم

2ip: نتایج جدول ۲ نشان داد که IBA به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بر طول و تعداد شاخساره اثر گذاشت (جدول ٤). افزودن ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به ریزنمونه‌های درون محیط کشت WPM حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2ip، تعداد شاخساره را از ۲/۵۰ به ۱/۸۳ عدد و طول شاخساره را از ۲/۰۳ به ۱/۰۷ سانتی‌متر کاهش داد (جدول ٤).

Kin: براساس نتایج جدول ۲، افزودن IBA به ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط کشت WPM حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵)

طول شاخساره را از ۱/٦۸ به ۰/۹۸ سانتی‌متر کاهش داد (جدول ٤). با اینکه IBA تعداد شاخساره را از ۱/۸۳ به ۲/۱٦ عدد افزایش داد، این افزایش معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) (جدول ٤).

TDZ: نتایج جدول ۲ بیانگر این است که افزودن IBA به محیط کشت WPM حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) طول شاخساره را از ۲/۱۷ به ۰/۸۳ سانتی‌متر کاهش داد (جدول ٤). همین‌طور تعداد شاخساره از ۱/۵۰ به ۱/۸۳ عدد افزایش یافت که معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) (جدول ٤). استفاده از ٦ میکرومول TDZ سبب بیشترین ساقه‌زایی در *Pinus strobus* L. شد [۱۸].

BA: نتایج جدول ۲ نشان داد که با افزودن ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به محیط کشت WPM حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BA تعداد شاخساره به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) از ۱/۵ به ۲/٦٦ عدد افزایش یافت (جدول ٤). درحالی که در محیط کشت WPM دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA با افزودن IBA، طول شاخساره از ۱/۵۰ به ۱/۱۰ سانتی‌متر کاهش یافت (جدول ٤). BA در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخساره‌های جدید نقش دارد [۱۲]، بنابراین با افزایش غلظت BA در محیط کشت WPM به میزان ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر، شاخه‌های بیشتر اما کوتاه‌تری تولید شد. BA بر رشد و نمو و افزایش تعداد شاخساره‌های جانبی اثر گذاشت و مقادیر کمتر آن بهترین اثر در نمو شاخساره‌ها داشت. طبق نتایج تحقیق حاضر می‌توان گفت BA مؤثرترین تنظیم‌کنندهٔ رشد در شاخه‌زایی گیاه سرو ابرکوه بوده و حتی غلظت‌های ناچیز آن برای القای رشد در جوانه‌ها ضروری است. سیتوکنین‌ها اغلب برای افزایش رشد و نمو به‌کار می‌روند [۱۲]، در بیشتر موارد ذکرشده این هورمون‌ها به‌ویژه اگر با یک اکسین ترکیب شوند، سبب تحریک تقسیم سلولی می‌شوند [۱۲]. BA در غلظت‌های کم موجب طویل شدن شاخه‌ها می‌شود و در غلظت‌های زیاد با توجه به اینکه نسبت به مقدار اکسین داخل گیاهچهٔ غالب خواهد شد، از غلبهٔ انتهایی جلوگیری می‌کند و در نهایت، رشد طولی کاهش می‌یابد و شاخه‌های جانبی تولید می‌شوند. بنابراین می‌توان گفت در تیمارهایی که تعداد شاخه‌های باززایی‌شده بیشتر است، به‌دلیل استفادهٔ آنها از هورمون‌ها و مواد غذایی موجود در محیط کشت، شاخه‌های باززایی‌شده در این محیط‌ها، رشد کمتری دارند؛ بنابراین می‌توان ادعا کرد که در این محیط رقابت برای جذب عناصر غذایی در یک محدوده افزایش و در نتیجه، رشد کاهش خواهد یافت. بدیهی است براساس نتایج به‌دست‌آمده، زمانی‌که ریزقلمه‌های تولیدشده در مرحلهٔ شاخه‌زایی جدا و در محیط مستقل واکشت شوند، دوباره رشد افزایش خواهد یافت که نتایج این تحقیق نیز چنین بود.

آزمایش سوم

نتایج جدول ۳ نشان‌دهندهٔ آن است که شیرهٔ نارگیل به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بر طول و تعداد شاخساره اثر داشت (جدول ۵). با افزودن شیرهٔ نارگیل به محیط کشت، تعداد شاخساره از ۱/۳۳ به ۲/۳۳ عدد افزایش یافت (جدول ۳). اما طول شاخساره از ۱/٤۵ به ۰/۹٤ کاهش یافت (جدول ۵). ممقانی قاضی‌جهانی و همکاران [۱۹] گزارش کردند که شیرهٔ نارگیل در افزایش وزن کالوس‌های نارون تأثیر زیادی داشت. در واقع شیرهٔ نارگیل دارای فعالیت‌های سیتوکنینی است. یکی از اثرهای سیتوکنین‌ها افزایش تعداد شاخه‌های جانبی و از بین بردن غالبیت انتهایی است که با نتایج حاصل همخوانی داشت. این محصولات با دارا بودن منبع نیتروژن احیا می‌شوند و شماری از ترکیبات پیچیدهٔ شیمیایی، می‌توانند رشد و اندام‌زایی را تحریک کنند [۱۹].

جدول ۴. نتایج آزمون تی مستقل برای مقایسهٔ اثر ترکیب انواع سیتوکنین‌ها با IBA بر تعداد و طول شاخسارهٔ گیاهچهٔ سرو ابرکوه (*Cupressus semprvirens* var. horizontalis) در شرایط درون‌شیشه‌ای

متغیر	IBA (میلی گرم در لیتر)	درجه آزادی	میانگین	انحراف استاندارد	t
2ip (تعداد شاخساره)	۰	۱۰	۲/۵۰	۱/۰۴	۱/۴۵*
	۰/۰۱		۱/۸۳	۰/۴۰	
2ip (طول شاخساره (سانتی‌متر))	۰	۱۰	۲/۰۳	۰/۲۶	۲/۹۳*
	۰/۰۱		۱/۰۷	۰/۴۰	
Kin (طول شاخساره (سانتی‌متر))	۰	۱۰	۱/۶۸	۰/۸۳	۱/۹۹*
	۰/۰۱		۰/۹۸	۰/۱۷	
Kin (تعداد شاخساره)	۰	۱۰	۱/۸۳	۰/۷۵	−۰/۹۵ns
	۰/۰۱		۲/۱۶	۰/۴۰	
TDZ (تعداد شاخساره)	۰	۱۰	۱/۵۰	۰/۵۴	−۱/۱۹ns
	۰/۰۱		۱/۸۳	۰/۴۰	
TDZ (طول شاخساره (سانتی‌متر))	۰	۱۰	۲/۱۷	۰/۷۰	۴/۴۳*
	۰/۰۱		۰/۸۳	۰/۲۱	
BA (تعداد شاخساره)	۰	۱۰	۱/۵۰	۰/۵۴	−۳/۷۹**
	۰/۰۱		۲/۶۶	۰/۵۱	
BA (طول شاخساره (سانتی‌متر))	۰	۱۰	۱/۵۱	۰/۴۶	۱/۹۳*
	۰/۰۱		۱/۱۰	۰/۲۱	

** معنی‌داری در سطح ۱ درصد؛ * معنی‌داری در سطح ۵ درصد؛ ns غیرمعنی‌دار

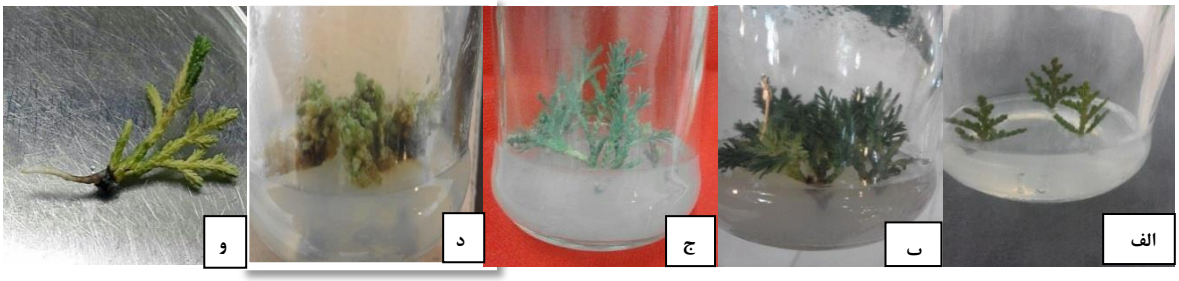
جدول ۵. نتایج آزمون تی مستقل برای مقایسهٔ اثر شیرهٔ نارگیل بر تعداد و طول شاخسارهٔ گیاهچهٔ سرو ابرکوه (*Cupressus semprvirens* var. horizontalis) در شرایط درون‌شیشه‌ای

متغیر	شیره نارگیل	درجه آزادی	میانگین	انحراف استاندارد	t
تعداد شاخساره	۰	۱۰	۱/۳۳	۰/۵۱	−۳/۳۵**
	۵۰		۲/۳۳	۰/۵۱	
طول شاخساره (سانتی‌متر)	۰	۱۰	۱/۴۵	۰/۴۶	۲/۶۰*
	۵۰		۰/۹۴	۰/۱۰	

** معنی‌داری در سطح ۱ درصد؛ * معنی‌داری در سطح ۵ درصد؛ ns غیرمعنی‌دار

با توجه به اینکه سرو ابرکوه، نوعی درختچهٔ چوبی سخت ریشه‌زا و دارای قدمت زیادی است، با وجود استفاده از محیط‌های کشت و تیمارهای مختلف، ریشه‌زایی آن چندان موفقیت‌آمیز نبود و تنها در برخی تیمارها کالوس تشکیل شد (شکل ٤– د) که به‌صورت موفق باززا نشدند. ریشه‌زایی محدود در محیط کشت WPM حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل شد (شکل ٤–و) که نشان می‌دهد این گیاه در غلظت‌های کم اکسینی ممکن است ایجاد ریشه کند. به‌عبارت دیگر مقدار اکسین موجود در گیاه در حد کافی است که با سیتوکنین خارجی اضافه‌شده، سبب هم‌افزایی شده و گیاه ریشه داده است. زمانی که قلمه از وجود جوانهٔ انتهایی و به‌تبع آن اکسین درونی محروم است، تعداد سلول در پیش‌آغازنده‌های ریشه کاهش می‌یابد و هر چقدر پیش آغازندهٔ ریشه مسن‌تر بوده و دارای تعداد سلول بیشتری باشد، اثر اکسین درونی نیز کم‌اهمیت می‌شود [۲۰]. برای موفقیت در ریشه‌زایی، سن بیولوژیک عامل مهم است، نه سن تقویمی مواد رویشی [۲۰]. از طرف دیگر، میزان تمایزیابی یاخته‌ها در قلمه‌های انتهایی کمتر است و

بیشتر یاخته‌ها در حالت مریستمیک هستند [۲۰]. کاهش پتانسیل ریشه‌دهی، همراه با سالمند شدن گیاهان، ممکن است در نتیجهٔ تشکیل و تکامل ساختار ثانویه در گیاه و نیز سخت شدن دیوارهٔ سلولی و در نتیجه تمایزیابی کمتر باشد [۲۰]. بسیاری از مطالعات پایه‌ای نشان داده است که عواملی مانند سن گیاه، ژنوتیپ و نوع ریزنمونه، تیمارهای اکسین و شرایط محیطی بر ریشه‌دهی اثر دارند [۱۶]. هرچند فرایندهای مولکولی مشابهی در مخروطیان شناسایی شده است، تفاوت‌های فیزیولوژیکی و تکاملی ریشه‌زایی همچنان ناشناخته مانده است [۱۶].



شکل ۴. مراحل مختلف ریزازدیادی گیاهچهٔ سرو ابرکوه: الف) استقرار ریزنمونه در شیشهٔ مربایی؛ ب) شاخه‌زایی؛ ج) افزایش رشد طولی ریزنمونه‌ها؛ د) ایجاد کالوس و) ایجاد ریشه در ریز نمونهٔ موجود در محیط کشت WPM با ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ترکیب، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات مختلف در اندام‌زایی گیاه سرو تأثیرگذار بود. تعداد شاخه در محیط کشت WPM حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و نیز ۰/۱ و ۱ میلی گرم بر لیتر 2ip افزایش یافت. مقدار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ در رشد طولی شاخساره تأثیر بیشتری داشت. افزودن ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به محیط کشت WPM حاوی Kin، TDZ و BA تعداد شاخه را افزایش داد، اما سبب کاهش طول شاخساره شد. ریشه نیز در محیط کشت WPM حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin تشکیل شد. با بهینه‌سازی روش کار، می‌توان برای تولید انبوه این گیاه ارزشمند گام برداشت، البته برای این کار، تحقیقات تکمیلی ضرورت دارد.

References

[1].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, Yazd.

[2].Khoshnevis, M., Matinizadeh, M., Shirvani, A., and Teimuri, M. (2017). Iran, the treasure of long-lived trees, Journal of Iran Nature, 2(4): 42-55.

[3].Bagnoli, F., Vendramin, G.G., Buonamici, A., Doulis, A.G., González-Martínez, S.C., La Porta, N., Magri, D., Raddi, P., Sebastiani, F., and Fineschi, S. (2009). Is *Cupressus sempervirens* native in Italy? An answer from genetic and palaeobotanical data. Molecular Ecology. 18(10): 2276-2286.

[4].Chee, P. P. (1995). Organogenesis in *Taxus brevifolia* tissue cultures. Plant Cell Report, 14(9): 560-565.

[5].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.

[6].Chang, S. H., HO, C. K., Chen, Z. Z., and Tsay, J.Y. (2001). Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. Plant Cell Report, 20: 496-502.

[7].Tang, W., and Newton, R. J. (2007). Micropropagation via organogenesis in slash pine: 15-22. In: Jain, S.M. and Haggman, H., (Eds.). Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Springer, Dordrecht.

[8].Khoshhal Sarmast, M., Salehi, H., and Khosh-Khui, M. (2012). Micropropagation of *Araucaria excelsa* R. Br. var. glauca Carrière from orthotropic stem explants. Physiology, Genetics and Molecular Biology of Plants, 18(3): 265–271.

[9].Baravardi, H., Ranjbar, Gh. A, and Kamali Farahabadi, S. (2016). Comparison of amount of callus induction in *Juniperus excelsa* on MS and WPM culture media using different concentration of NAA, 2,4-D and Kin. Journal of Crop Breeding, 7(16):149-157.

[10]. 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, 70(3): 381-391.

[11]. Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiology of Plant, 15(3): 473-497.

[12]. Green, J. F., and Muir, R.M. (1979). An analysis of the role of Potassium in the growth effects of cytokinin, light and abscisic acid on cotyledon expansion. Physiologia Plantarum. 46(1): 19- 24.

[13]. 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.

[14]. Abbasin, Z., Zamani, S., Movahedi, S., Khaksar, G., and Sayed Tabatabaei, B.E. (2010). In Vitro Micropropagation of Yew (*Taxus Baccata*) and Production of Plantlets. Biotechnology. 9 (1): 48-54.

[15]. 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.

[16]. 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.

[17]. Mohan Jain, S., and H, Haggman. (2007). Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Published by Springer, Netherland, pp.119-120.

[18]. Tang, W., and Newton, R.J. (2005). Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. Plant Physiology and Biochemistry. 43(8): 760-769.

[19]. Mamghani Ghazi Jahani, M., Mashayekhi, K., and Rahnama, K. (2007). The investigation of the effect of various hormonal compounds and coconut milk on the growth and production of Chinese elm callus (*Ulmus parvifolia* Jacq.). Journal of Agricultural Sience and Natural Resource, 14(3): 155-163.

[20]. Khandan-Mirkohi, A., Moshrefi-Araghi, A., Haghdoost, L., Rashid- Rostami, F., and Sahraii, S. (2015). The effect of rooting medium, cutting type and auxin (IBA) treatment on propagation of Arizona cypress (*Cupressus arizonica* var. glabra). Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture, 5(20) :193-202.

Effect of Plant growth regulators on shoot induction of four thousand years old Abarkooh cypress

Mitra Ghaedi; MSc student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Yazd

Maryam Dehestani-Ardakani*; Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Yazd

Kazem Kamali Aliabad; Assistant Professor, Department of Soil Science, Faculty of Natural Resources, Yazd University, Yazd

(Received: 21 Fabraury 2018 , Accepted: 05 June 2018)

ABSTRACT

Abarkooh cypress (*Cupressus sempervirens* L. var. horizontalis (Mill) Gord) is one of the oldest cypresses in the world. Tissue culture is a method for saving and propagation of endangered and rare plants such as this cypress. This study aims at investigating the effects of different cytokinins and auxin plant growths regulators and coconut milk on micropropagation of plant. Experiments were performed as completely randomized design with six replicates. After sterilization for proliferation, explants were cultured in WPM medium culture by different treatments consisted of 1. Plant growth regulators (Kin, BA, TDZ and 2ip) at concentrations of (0, 0.1, 0.5, 1 and 2 mg/l) 2. Interaction effect of 0.1 mg/l cytokinins (Kin, BA, TDZ and 2ip) with IBA (0 and 0.01 mg/l) and 3. Coconut milk (0 and 50 ml) + 0.05 mg/l IBA. According to the results the number of shoots in culture media contained 1 mg/l BA and 0.1 and 1 mg/l 2ip increased. Addition of 0.01 mg/l IBA on culture media contained kin, TDZ and BA increased the number of shoots, but decreased the shoot length. Using coconut milk significantly increased the number of shoots and decreased their length. For root induction different media cultures of WPM, SH and LS with different hormonal treatments was used and only in WPM medium culture contained 2 mg/l kin root was obtained.

Keywords: Benzyladenine, Propagation, Tidiazouron, Micropropagation, *In vitro*, Kinetin

* Corresponding Author, Email: mdehestani@ardakan.ac.ir, Tel: +989133577816