ریزازدیادی شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.)، یک گونه‌ی زینتی در حال انقراض

بهزاد کاویانی* و ناصر نگهدار

ایران، رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، گروه باغبانی

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۵

چکیده

شمشاد خزری یا شمشاد جنگلی (*Buxus hyrcana* Pojark.) یک گونه‌ی زینتی درختی و درختچه‌ای است که در صنایع مختلف کاربرد دارد. رشد و نمو شمشاد خزری بسیار کند است، ریشه‌زایی سختی دارد و خطر انقراض، این گیاه را تهدید می‌کند. بنابراین، هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر غلظت‌های مختلف BAP و IBA (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر، از هر دو) روی ریزازدیادی در شرایط درون‌شیشه‌ای شمشاد خزری بود. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۴ تکرار انجام شد. نتایج تحقیق نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره (۶/۲۰۰ در گیاهچه)، در ریزنمونه‌های سرشاخه‌ی تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. ریزنمونه‌های سرشاخه در محیط‌های کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین تعداد گره (۴/۱۰۰ در گیاهچه) و همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، بیشترین تعداد برگ (با میانگین ۶/۵۶۶ عدد در گیاهچه) را تولید کردند. همچنین بیشترین تعداد ریشه (۶/۴۶۶ در گیاهچه)، در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA اندازه‌گیری شد. گیاهچه‌ها جهت سازگاری به گلدان‌های حاوی پیت و پرلیت به نسبت ۱ به ۱ منتقل شدند. گلدان‌ها در یک گلخانه با دمای ۲۶-۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد با آبیاری دوره‌ای نگهداری شدند. حدود ۹۰ درصد از گیاهچه‌ها سالم ماندند. این گیاهچه‌های سازگارشده، از نظر ریخت‌شناسی شبیه پایه‌های مادری بودند.

واژه‌های کلیدی: اکسین، سیتوکینین، ریزنمونه، گیاهان زینتی، کشت درون‌شیشه‌ای

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۱۷۷۷۴۸۲، پست الکترونیکی: b.kaviani@yahoo.com

مقدمه

شمشاد خزری یا شمشاد جنگلی (*Buxus hyrcana* Pojark. یا *Buxus sempervirens auct non* L.) یک جنس از حدود ۷۰ گونه از خانواده‌ی شمشاد یا کیش (Buxaceae)، یک گونه‌ی زینتی درختی است که در صنایع مختلف کاربرد دارد. این گیاه بومی اروپا، شمال غربی آفریقا، آمریکای شمالی و مرکزی، آسیای شرقی، ماداگاسکار و مکزیک است (۵۱). یک گونه با نام شمشاد در ایران وجود دارد که در جنگل‌های کرانه‌ی دریای مازندران رویش دارد. اغلب رویشگاه‌های شمشاد از بین رفته‌اند و در حال حاضر رویشگاه‌های خالص و انبوه آن را تنها در پارک جنگلی سی‌سنگان می‌توان دید. رشد و نمو آن بسیار کند است ولی دوام و دیرزیستی آن نسبتا بالا است. از چوب سخت شمشاد خزری برای صنایع دستی و زینتی استفاده می‌شود. این درخت بیشتر به‌عنوان یک درخت تزئینی برای احداث پرچین استفاده می‌شود (۱۳). قلمه‌ی شمشاد خزری، سخت‌ریشه‌زا است و ازدیاد آن به‌کندی انجام می‌گیرد.

ریزازدیادی، طی کشت بافت اجازه‌ی باززایی تعداد زیادی

از گیاهان را از قطعه‌ی کوچکی از گیاه مادری (ریزنمونه) در یک بازه‌ی زمانی کوتاه و بدون محدودیت فصلی می-دهد. در زمینه‌ی گیاهان زینتی، کشت بافت، تولید زیاد ارقام برتر را موجب شده است که خود قابلیت تجاری-سازی مواد گیاهی یک‌شکل و سالم را به‌دنبال دارد (۶۵). این روش همچنین فرصتی را برای اصلاح گیاهی فراهم می‌کند (۵۰). ریزازدیادی گیاهان عاری از ویروس در شرایط درون‌شیشه‌ای، بهترین روش برای اطمینان از تولید گیاهان سالم است. در ریزازدیادی گیاهان، عوامل زیادی دخیل هستند که مهم‌ترین آنها نوع و غلظت تنظیم‌کننده-های رشد گیاهی است. ریزازدیادی با استفاده از ریزنمونه-های محورهای جنینی، بذرها و جوانه‌های راسی و جانبی در مقایسه با سایر ریزنمونه‌ها، به‌دلیل پایداری ژنتیکی بیشتر، تنوع سوماکلونال کمتر و همچنین عدم نیاز به غلظت‌های زیاد سیتوکینین‌ها برای رشد جوانه‌های جانبی، ساده‌تر و قابل اعتمادتر است (۳۶). بنابراین، استفاده از روش ریزازدیادی، یکی از راه‌های دستیابی به تعداد زیادی گیاهچه‌ی شمشاد خزری با ساختار ژنتیکی یکسان و کاهش هزینه‌های تولید می‌باشد و امکان تولید مداوم و سریع را در پی دارد.

با توجه به ازدیاد کند شمشاد خزری در شرایط طبیعی، این تحقیق به اصلاح ازدیاد این گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای اختصاص دارد. با توجه به اینکه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، رشد و نمو گیاهان را کنترل می‌کنند و نقش موثری در ریزازدیادی در شرایط درون‌شیشه‌ای دارند، از برخی از این مواد در غلظت‌های مختلف استفاده شد. نتایج پژوهش‌های مختلف نشان داد که انواع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و غلظت‌های مختلف آنها روی افزایش ریزازدیادی گیاهان زینتی نقش قابل‌توجهی داشته است (۳۶). سیتوکینین‌ها معمولا در محیط‌های کشت ریزازدیادی، برای تکثیر سرشاخه استفاده می‌شوند (۳۶). یافته‌های زیادی نشان داد که افزایش اکسین‌ها به محیط‌های کشت، برای افزایش تعداد و طول ریشه‌ها موثر است (۳۶، ۳۹، ۴۱). ریشه‌زایی، یک مرحله‌ی بحرانی برای موفقیت ریزازدیادی است. بدون سیستم ریشه‌ای کارآمد، سازگاری گیاه دچار مشکل می‌شود و مقدار تکثیر تحت تاثیر قرار می‌گیرد. برخی مطالعات، تاثیر مثبت سیتوکینین‌ها را روی ریشه‌زایی نشان داده‌اند (۳۱). اگرچه در برخی مطالعات دیگر، سیتوکینین‌ها نقش منفی روی ریشه‌زایی شاخساره‌ها داشته‌اند (۶۳). در مطالعه‌ای روی کشت درون‌شیشه‌ای گل ارکید، اکسین رشد ریشه را تحریک کرد (۳۷). بر اساس نظر Hartmann و همکاران (۳۲)، اکسین‌ها در غلظت‌های پایین بیشتر برای ریشه‌زایی و نه برای رشد مداوم استفاده می‌شوند. مطالعه‌ی Kaviani و همکاران (۳۹) نشان داد که اکسین روی ریشه‌زایی و طول شاخساره‌ی گیاهی تاثیر مثبتی دارد. مطالعات بسیار زیاد دیگری نقش اکسین‌ها در ریشه‌زایی سرشاخه‌های تولیدشده در شرایط درون‌شیشه‌ای را مثبت ارزیابی کردند (۱۵، ۱۶). از نقطه‌نظر فیزیولوژیکی، نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق Kaviani و همکاران (۳۹) در ارتباط با نقش اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در شاخه‌زایی و ریشه‌زایی با نقش شناخته‌شده‌ی این تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی هماهنگی دارد.

خطر انقراض نسل، شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.) را تهدید می‌کند. پراکنش اکولوژیکی آن نیز محدود است. برای جلوگیری از انقراض این گیاه زینتی، تکثیر سریع و زیاد آن ضروری به نظر می‌رسد. تلاشی برای ریزازدیادی شمشاد خزری با استفاده از هورمون‌های مختلف انجام نشده است. بنابراین، هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر غلظت‌های مختلف BAP و IBA روی ریزازدیادی شمشاد خزری با استفاده از ریزنمونه‌ی سرشاخه در شرایط درون‌شیشه‌ای بود.

مواد و روشها

شرایط آزمایش: این تحقیق طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۳ در موسسه‌ی تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم کشاورزی هیرکان واقع در شهر آمل استان مازندران به مرحله‌ی اجرا در آمد.

منبع ریزنمونه: گیاهان شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.) به‌عنوان نمونه‌های گیاهی از نهالستانی در شهرستان آمل خریداری شده و در گلخانه نگهداری شدند. دمای گلخانه، ۲۶-۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت نسبی آن ۷۰ درصد و نور مورد نیاز طبیعی بود. قسمت انتهایی راس شاخه‌ی گیاهان دو ساله، بریده شده و به‌عنوان منبع ریزنمونه ضدعفونی شدند.

ضدعفونی نمونه‌های گیاهی: ضدعفونی نمونه‌ها با استفاده از اتانول، هیپوکلریت سدیم و کلرید جیوه انجام شد. در ابتدا، نمونه‌های گیاهی به‌مدت یک ساعت در زیر جریان روان آب شهری شسته شدند. بعد از این مدت، نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در اتانول ۵ درصد قرار داده شدند و سپس در هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد برای ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. در انتها نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در کلرید جیوه قرار داده شدند. در زیر هود، ۵ تا ۱۰ میلی‌متری انتهای سرشاخه‌های ضدعفونی‌شده جدا شده و به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد ۵۰ ظرف ارلن ۲۰۰ میلی-لیتری انتخاب شده و در آنها تیمارهای هورمونی ریخته شد.

محیط کشت و تیمارها: ابتدا لازم است محیط کشت پایه تهیه شود. به این منظور، محیط کشت پایه‌ی (۴۹) Mureshige and Skoog (MS) آماده شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه‌ی MS درون هر ارلن حاوی تیمارهای هورمونی ریخته شد. تیمارهای هورمونی، غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از هر دو-ی IBA و BAP (۲۵ تیمار) بودند (جدول ۱). این غلظت-های تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر اساس اصل آزمون و خطا انتخاب شدند. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته، و هر تکرار شامل ۴ مشاهده بود. pH محیط کشت قبل از اتوکلاو، برابر با ۵/۸-۵/۶، آگار ۰/۸-۰/۷درصد و ساکارز ۳ درصد بود. محیط‌های کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به‌مدت ۳۰ دقیقه ضدعفونی شدند.

شرایط نگهداری ریزنمونه‌ها: محیط‌های کشت حاوی ریزنمونه‌ها در اتاق رشد تحت فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۱ ± ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۸۰-۷۵ درصد و جریان تراکم فتون فتوسنتزی ۵۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه نگهداری گردیدند.

صفات اندازه‌گیری‌شده: پس از حدود ۶۰ روز پارامترهایی مانند تعداد شاخساره، تعداد گره، تعداد برگ، طول ریشه، تعداد ریشه و درصد بقای گیاهچه اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری صفات طولی اندام‌ها با خط‌کش انجام شد. تعداد اندام‌ها با چشم غیرمسلح شمارش گردید.

شرایط سازگاری گیاهچه‌ها: گیاهچه‌های بالغ با آب مقطر استریل شسته شده و به گلدان‌های پلاستیکی حاوی پیت و پرلیت به نسبت ۱ به ۱ منتقل گردیدند. گلدان‌ها در یک گلخانه با دمای ۲۶-۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد با آبیاری دوره‌ای نگهداری شدند تا سازگاری انجام شود.

طرح آماری و تجزیه‌ی داده‌ها: بررسی‌ها در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه‌ی بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) در ۴ تکرار انجام شدند. کرت‌ها، ظروف پتری حاوی ریزنمونه‌ها می‌باشند. مشاهدات برای ثبت تغییرات و نتایج احتمالی هر ۲ هفته یکبار انجام شدند.

نتایج

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی IBA و BAP روی صفات اندازه‌گیری‌شده

ارتفاع شاخساره: تفاوت‌های ارتفاع شاخساره در ریزنمونه‌های رشدیافته تحت غلظت‌های مختلف تنظیم-کننده‌های رشد گیاهی IBA و BAP معنی‌دار بود ($p\leq$۰/۰۱) (جدول ۱). ارتفاع شاخساره در تیمارهای

مختلف، حاصل از کاربرد غلظت‌های مختلف BAP و IBA، تفاوت‌هایی را نشان دادند. بیشترین ارتفاع شاخساره (۷/۳۰۰ سانتی‌متر در گیاهچه) در شمشاد خزری در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد (جدول ۲). کمترین ارتفاع شاخساره (۲/۳۰۰ سانتی‌متر) در شمشاد خزری در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدون BAP به‌دست آمد (جدول ۲). ارتباط مستقیمی بین افزایش ارتفاع شاخساره و افزایش غلظت BAP و IBA وجود ندارد (جدول ۲). در میان تمام غلظت‌های BAP استفاده-شده، بیشینه و کمینه‌ی ارتفاع شاخساره (به‌ترتیب با ۴/۳۶۶ و ۲/۷۰۰ سانتی‌متر) در گیاهچه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر و شاهد القا شد. از طرف دیگر، در میان تمام غلظت‌های IBA به‌کار گرفته شده بود، بیشینه و کمینه‌ی ارتفاع شاخساره (به‌ترتیب با ۳/۶۳۳ و ۲/۳۰۰ سانتی‌متر در گیاهچه) در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر القا شد (جدول ۲). بنابراین استفاده از ترکیب مناسب این دو تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی برای القای بیشترین طول شاخساره لازم است.

تعداد شاخساره: نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل IBA و BAP بر تعداد شاخساره در سطح احتمال ۱ درصد ($p\leq۰/۰۱$) معنی‌دار بود. مقایسه‌ی میانگین صفات نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره (۶/۲۰۰ عدد در گیاه) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین تعداد شاخساره (۲/۶۳۳ عدد در گیاه) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (بدون BAP)، به‌دست آمد (جدول ۲، شکل ۱). نتایج نشان داد که BAP نقش مهم‌تری نسبت به IBA در افزایش تعداد شاخساره دارد، زیرا کمترین تعداد شاخساره در تیمار فاقد BAP مشاهده شد. با نگاهی به جدول ۲ می-توان دریافت که گیاهچه‌های با تعداد شاخساره‌ی بیشتر (۵/۶۳۳ و ۵/۵۰۰ عدد در گیاه) تحت تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP قرار داشتند. نتایج به‌دست‌آمده همچنین به‌طور کامل نشان می‌دهد که BAP زمانی بیشترین اثر را روی تحریک تولید شاخساره دارد که با غلظت مناسبی از IBA به‌کار رود.

تعداد گره: مقایسه‌ی میانگین صفات نشان داد که بیشترین تعداد گره (۴/۱۰۰ عدد در گیاه) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون IBA و کمترین تعداد گره (۰/۹۳۳ عدد در گیاه) در تیمار شاهد به‌دست آمد (جدول ۲). نتایج نشان داد که BAP نقش مهم‌تری نسبت به IBA در افزایش تعداد گره دارد، زیرا یکی از کمترین تعداد گره (۱/۴۰۰) در تیمار فاقد BAP مشاهده شد. همچنین، بهترین تیمار برای افزایش تعداد گره، استفاده از BAP به‌تنهایی بود. البته استفاده از بیشترین غلظت این هورمون نیز باعث تولید گره کم (۱/۴۶۶ عدد در هر گیاه) شد. با نگاهی به جدول ۲ می‌توان دریافت که گیاهچه‌های با تعداد گره‌ی بیشتر (۳/۲۳۳ و ۳/۱۳۳ عدد در گیاه) تحت تیمارهای مختلف BAP غیر از ۲ میلی‌گرم در لیتر قرار داشتند. استفاده از غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در کنار غلظت-های مختلف BAP غیر از ۲ میلی‌گرم در لیتر، نتایج مناسبی در ارتباط با تولید گره به‌دنبال داشت (جدول ۲). نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل IBA و BAP بر تعداد گره در سطح احتمال ۵ درصد ($p\leq۰/۰۵$) معنی‌دار بود.

تعداد برگ: نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل IBA و BAP بر تعداد برگ در سطح احتمال ۱ درصد ($p\leq۰/۰۱$) معنی‌دار بود. جدول مقایسه‌ی میانگین صفات نشان می‌دهد که بیشترین تعداد برگ (۶/۵۶۶ عدد در گیاه) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین تعداد آن (۳/۵۶۶ عدد در گیاه) در تیمار شاهد شمارش شد (جدول ۲، شکل‌های ۲ و ۳). نتایج نشان می‌دهد که نقش BAP و IBA در تحریک تولید برگ تقریبا یکسان است. در ارتباط با نقش BAP در القای تولید برگ، باید اذعان

داشت که بهترین غلظت این هورمون، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بود، درحالی‌که، در بین تیمارهای مناسب، تمام غلظت‌های IBA دیده می‌شود (جدول ۲). چنانچه به‌دنبال بهترین غلظت IBA باشیم، به غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر خواهیم رسید، به‌شرط اینکه به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌کار نرود. در بین تیمارهایی که کمترین نقش را در تولید برگ داشتند، BAP با غلظت‌های صفر، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در کنار تمام غلظت‌های IBA مشاهده می‌شود.

طول ریشه: جدول ۱ نشان می‌دهد که اثر متقابل IBA و BAP بر طول ریشه در سطح احتمال ۱ درصد ($p\leq$۰/۰۱) معنی‌دار است. جدول ۲ نشان می‌دهد که بیشترین طول ریشه (۵/۹۰۴ سانتی‌متر در گیاه) مربوط به گیاهچه‌های تیمارشده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA است. از طرف دیگر، کمترین طول ریشه (۲/۱۳۳ سانتی‌متر در گیاه) مربوط به گیاهچه‌های تیمارشده با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (بدون IBA) است (شکل ۴). این یافته نقش انکارناپذیر IBA را در تحریک موثر رشد ریشه نشان می‌دهد. هیچ ارتباط مستقیمی بین افزایش یا کاهش غلظت هر دو تنظیم‌کننده‌ی رشد در محیط کشت با افزایش یا کاهش رشد ریشه مشاهده نشد (جدول ۲). نامناسب‌ترین غلظت BAP برای القای رشد ریشه، ۲ میلی‌گرم در لیتر است. از طرف دیگر، مناسب‌ترین غلظت IBA برای القای رشد ریشه، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر است، زیرا در ۲ تیمار از ۳ تیمار برتر که بیشترین رشد ریشه را القا کردند، حضور دارد.

تعداد ریشه: نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل IBA و BAP بر تعداد ریشه معنی‌دار نیست. جدول مقایسه‌ی میانگین صفات نشان می‌دهد که بیشترین تعداد ریشه (۶/۴۶۶ عدد در گیاه) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین تعداد آن (۳/۲۰۰ عدد در گیاه) در تیمار شاهد شمارش شد (جدول ۲، شکل ۵). نتایج نشان می‌دهد که نقش IBA در تحریک تولید ریشه بارزتر از نقش BAP است، زیرا در یکی از تیمارهای برتر BAP وجود ندارد. مناسب‌ترین غلظت IBA برای القای تولید ریشه، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر است، زیرا در ۵۰ درصد از تیمارهای برتر حضور دارد.

بقای گیاهچه: کاربرد غلظت‌های مناسب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق در محیط کشت، روی درصد بقای گیاهچه‌ها موثر است. حضور هر دوی اکسین و سیتوکینین در این ارتباط، قابل‌توجه است. بیشینه‌ی بقای گیاهچه‌ها (۹۶/۶۶ درصد) در محیط کشت غنی‌شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. بقای گیاهچه‌ها در محیط‌های کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (۹۳/۳۳ درصد) و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA (۹۰/۶۶ درصد) مناسب‌تر از سایر محیط‌ها بود (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه‌ی واریانس اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و IBA روی برخی صفات شمشاد خزری در شرایط درون شیشه‌ای.

		مقایسه میانگین						
منبع تغییرات	درجه آزادی	ارتفاع شاخساره	تعداد شاخساره	تعداد گره	تعداد برگ	طول ریشه	تعداد ریشه	بقای گیاهچه (درصد)
تیمار	۲۴	۳/۳۸**	۱/۹۳۷**	۱/۱۹۹*	۱/۶۴۷**	۲/۷۷**	۱/۵۰۹^{ns}	۱۹۹/۶۰۰*
خطا	۵۰	۰/۴۳۶	۰/۷۶۶	۰/۶۷۱	۰/۶۶۵	۰/۸۵۶	۱/۰۳۵	۸۲/۶۶۰
ضریب تغییرات(درصد)		۱۷/۴۵	۲۰/۰۰	۳۸/۲۳	۱۷/۵۶	۲۵/۳۵	۱۸/۸۵	۱۱/۵۳

^{ns}: غیرمعنی‌دار، **: معنی‌دار در سطح ۱ درصد، *: معنی‌دار در سطح ۵ درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و IBA روی برخی صفات شمشاد خزری در شرایط درون شیشه‌ای.

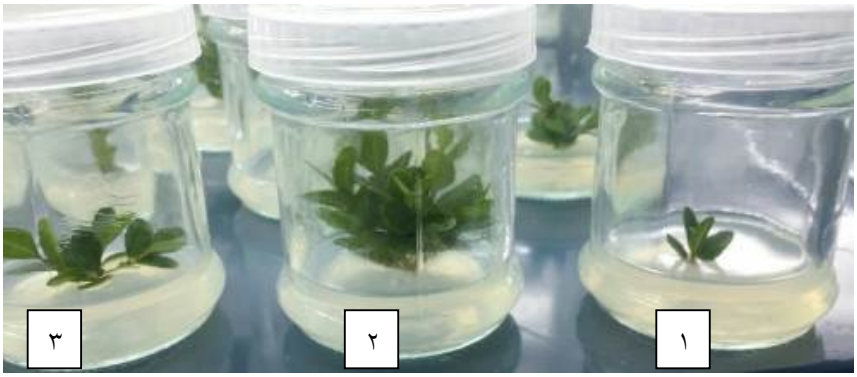
تیمارها	مقایسه میانگین						
	ارتفاع شاخساره (سانتی‌متر)	تعداد شاخساره	تعداد گره	تعداد برگ	طول ریشه (سانتی-متر)	تعداد ریشه	بقای گیاه‌چه (درصد)
B_0I_0	۲/۷۰۰^{gh}	۳/۱۶۶$^{e-g}$	۰/۹۳۳^{f}	۳/۵۶۶^{f}	۳/۲۳۳$^{c-g}$	۳/۲۰۰	۷۶/۶۶$^{c-f}$
$B_0I_{0.5}$	۲/۶۳۳^{gh}	۴/۳۳۳$^{b-f}$	۲/۵۰۰$^{b-e}$	۳/۷۰۰^{f}	۲/۸۰۰$^{e-g}$	۴/۷۳۳	۷۶/۶۶$^{c-f}$
B_0I_1	۲/۳۰۰^{h}	۲/۶۳۳^{f}	۱/۹۳۳$^{b-f}$	۴/۶۰۰$^{c-f}$	۴/۵۶۶$^{a-c}$	۵/۹۳۳	۸۰/۰۰$^{b-e}$
$B_0I_{1.5}$	۳/۶۳۳^{defg}	۴/۳۰۰$^{b-f}$	۱/۹۶۶$^{b-f}$	۵/۱۳۳$^{b-e}$	۴/۲۳۳$^{b-e}$	۶/۲۰۰	۸۶/۶۶$^{a-c}$
B_0I_2	۲/۹۶۶^{fgh}	۴/۶۶۶$^{b-e}$	۱/۴۰۰$^{d-f}$	۳/۶۳۳^{f}	۵/۰۳۳^{ab}	۵/۵۶۶	۸۰/۰۰$^{b-e}$
$B_{0.5}I_0$	۴/۲۳۳^{cde}	۴/۹۶۶$^{a-d}$	۳/۰۰۰$^{a-c}$	۴/۴۶۶$^{c-f}$	۲/۳۶۶^{fg}	۵/۰۶۶	۸۰/۰۰$^{b-e}$
$B_{0.5}I_{0.5}$	۵/۶۳۳^{b}	۳/۲۶۶$^{e-g}$	۲/۱۶۶$^{b-f}$	۵/۳۳۳$^{a-d}$	۴/۶۶۰$^{a-c}$	۶/۰۳۳	۸۶/۶۶$^{a-c}$
$B_{0.5}I_1$	۳/۲۳۳^{efgh}	۴/۱۳۳$^{c-f}$	۱/۷۰۰$^{c-f}$	۴/۸۰۰$^{b-f}$	۴/۴۳۳$^{a-c}$	۵/۰۶۶	۸۳/۳۳$^{a-d}$
$B_{0.5}I_{1.5}$	۴/۱۳۳^{cde}	۴/۲۶۶$^{b-f}$	۲/۰۶۶$^{b-f}$	۵/۷۳۳$^{a-c}$	۵/۹۰۴^{a}	۶/۳۰۰	۹۶/۶۶^{a}
$B_{0.5}I_2$	۴/۸۰۰^{bc}	۴/۳۳۳$^{b-f}$	۲/۸۰۰$^{a-d}$	۵/۱۶۶$^{b-e}$	۲/۷۳۳$^{e-g}$	۵/۹۳۳	۶۶/۶۶^{ef}
B_1I_0	۴/۳۶۶^{cd}	۴/۶۰۰$^{b-e}$	۴/۱۰۰^{a}	۴/۹۶۶$^{b-f}$	۳/۵۳۳$^{b-g}$	۵/۸۰۰	۶۳/۳۳^{f}
$B_1I_{0.5}$	۳/۱۶۶^{efgh}	۶/۲۰۰^{a}	۳/۲۳۳^{ab}	۵/۸۰۰$^{a-c}$	۴/۳۶۶$^{b-d}$	۵/۶۰۰	۷۰/۰۰$^{d-f}$
B_1I_1	۵/۰۳۳^{bc}	۴/۰۶۶$^{c-g}$	۱/۹۶۶$^{b-f}$	۴/۸۶۶$^{b-f}$	۴/۴۳۳$^{a-c}$	۴/۶۳۳	۷۳/۳۳$^{c-f}$
$B_1I_{1.5}$	۷/۳۰۰^{a}	۵/۶۳۳^{ab}	۲/۵۰۰$^{b-e}$	۶/۵۶۶^{a}	۵/۰۳۹^{ab}	۶/۴۶۶	۸۶/۶۶$^{a-c}$
B_1I_2	۳/۶۳۳^{defg}	۵/۵۰۰$^{a-c}$	۱/۸۶۶$^{b-f}$	۴/۱۰۰$^{d-f}$	۳/۴۶۶$^{c-g}$	۴/۵۶۶	۹۰/۶۶^{ab}
$B_{1.5}I_0$	۳/۳۳۳^{defgh}	۴/۴۰۰$^{b-f}$	۱/۷۸۶$^{e-f}$	۳/۷۰۰^{f}	۳/۱۶۶$^{c-g}$	۴/۷۰۰	۷۳/۳۳$^{c-f}$
$B_{1.5}I_{0.5}$	۴/۰۰۰^{cdef}	۳/۶۰۰$^{d-g}$	۲/۳۰۰$^{b-e}$	۴/۸۰۰$^{b-f}$	۲/۸۶۶$^{d-g}$	۶/۱۳۳	۷۶/۶۶$^{c-f}$
$B_{1.5}I_1$	۳/۴۰۰^{defg}	۵/۰۳۳$^{a-d}$	۳/۱۳۳^{ab}	۳/۹۳۳^{ef}	۲/۵۰۰^{fg}	۵/۱۰۰	۸۰/۰۰$^{b-e}$
$B_{1.5}I_{1.5}$	۳/۵۶۶^{defg}	۴/۰۰۰$^{d-g}$	۲/۰۶۶$^{b-f}$	۴/۶۳۳$^{c-f}$	۳/۷۰۰$^{b-f}$	۵/۰۳۳	۸۰/۰۰$^{b-f}$
$B_{1.5}I_2$	۲/۹۶۶^{fgh}	۴/۲۶۶$^{b-f}$	۲/۶۳۳$^{a-e}$	۴/۱۶۶$^{d-f}$	۳/۸۳۳$^{b-f}$	۴/۸۳۳	۸۳/۳۳$^{a-d}$
B_2I_0	۴/۱۰۰^{cde}	۴/۸۶۶$^{a-d}$	۱/۸۳۳$^{b-f}$	۴/۴۶۶$^{c-f}$	۲/۱۳۳^{g}	۵/۷۳۳	۷۶/۶۶$^{c-f}$
$B_2I_{0.5}$	۳/۲۰۰^{efgh}	۴/۹۳۳$^{a-d}$	۲/۴۳۳$^{b-e}$	۴/۴۶۶$^{c-f}$	۲/۸۶۶$^{d-g}$	۴/۳۳۳	۹۳/۳۳^{ab}
B_2I_1	۳/۳۶۶^{defgh}	۴/۰۶۶$^{c-g}$	۱/۴۶۶$^{d-f}$	۴/۷۰۰$^{c-f}$	۲/۹۰۰$^{d-g}$	۵/۰۰۰	۸۶/۶۶$^{a-c}$
$B_2I_{1.5}$	۳/۵۶۶^{defg}	۴/۹۶۶$^{a-d}$	۱/۸۶۶$^{b-f}$	۳/۷۳۳^{f}	۳/۴۳۳$^{c-g}$	۴/۲۳۳	۶۶/۶۶^{ef}
B_2I_2	۳/۴۰۰^{defg}	۳/۸۰۰$^{d-g}$	۱/۷۳۳$^{c-f}$	۴/۵۰۰$^{c-f}$	۲/۸۳۳$^{e-g}$	۵/۷۰۰	۷۰/۰۰$^{d-f}$

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف همسان هستند، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای ال.اس.دی تفاوت معنی‌داری ندارند.

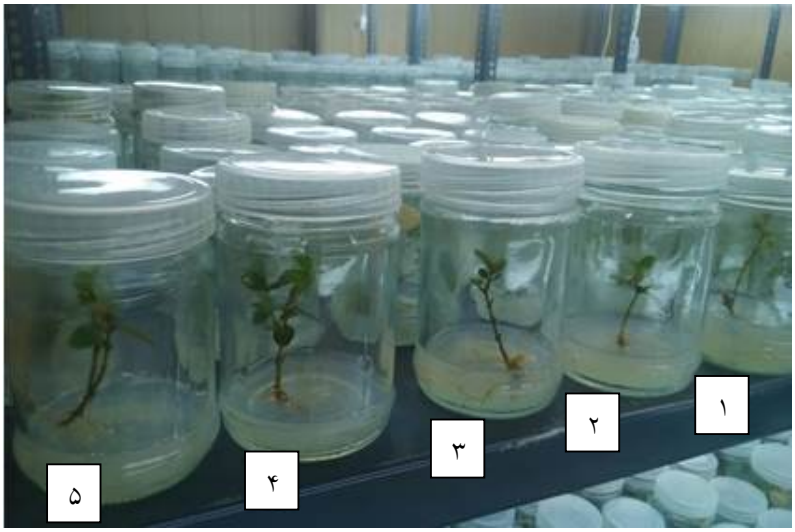
شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف BAP و IBA روی تعداد شاخساره در گیاهچه‌های شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.) رشدیافته در شرایط درون‌شیشه‌ای. ۱) گیاهچه‌های تیمارشده با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۲) گیاهچه‌های تیمارشده با ۱ میلی-

گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۳) گیاهچه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۴) گیاهچه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۵) گیاهچه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدون BAP.

شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف BAP و IBA روی تعداد برگ در گیاهچه‌های شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.) رشدیافته در شرایط درون‌شیشه‌ای در مراحل اولیه‌ی رشد. ۱) ریزنمونه‌ی شاهد و ۲) ریزنمونه‌ی تیمارشده با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA.

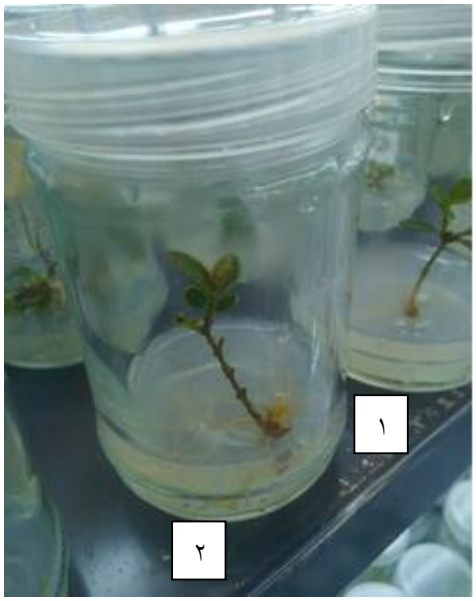


شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف BAP و IBA روی تعداد برگ در گیاهچه‌های شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.) رشدیافته در شرایط درون‌شیشه‌ای. ۱) گیاهچه‌های شاهد، ۲) گیاهچه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۳) گیاهچه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف BAP و IBA روی تعداد ریشه در گیاهچه‌های شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.) رشدیافته در شرایط درون‌شیشه‌ای. ۱) گیاهچه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۲) گیاهچه‌های شاهد، ۳) گیاهچه‌های

تیمارشده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۴) گیاهچه‌های تیمارشده با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۵) گیاهچه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA.



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف BAP و IBA روی طول ریشه در گیاهچه‌های شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.) رشدیافته در شرایط درون‌شیشه‌ای. ۱) گیاهچه‌های شاهد و ۲) گیاهچه‌های تیمارشده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA.

شکل ۶- سازگاری گیاهچه‌های شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.) انتقال یافته از شرایط درون‌شیشه‌ای به شرایط برون‌شیشه‌ای.

کمینه‌ی بقای گیاهچه‌ها (۶۳/۳۳ درصد) در محیط کشت غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون IBA مشاهده شد. نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان‌دهنده‌ی وجود اثرات متقابل معنی‌دار غلظت‌های مختلف IBA و BAP بر درصد بقای گیاهچه‌ها در سطح احتمال ۵ درصد ($p\leq ۰/۰۵$) بود.

گیاهچه‌ها جهت سازگاری به بستری از پیت و پرلیت به نسبت ۱ به ۱ منتقل شدند و حدود ۹۰ درصد از گیاهچه‌ها سالم ماندند (شکل ۶).

بحث

شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.) یک گونه‌ی جنگلی (زینتی درختی) در حال انقراض است. مطالعه روی ریزازدیادی شمشاد خزری بسیار اندک انجام شده است. اغلب مطالعات در سطح کشور و جهان روی پراکنش اکولوژیکی و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف آن تمرکز دارد. ازدیاد درختان توسط روش کشت بافت، در آینده با سرعتی متناسب با سرعت تخریب برای کشت و تجدید

حیات دوباره‌ی جنگل‌ها مورد استفاده قرار گیرد. آنچه موجب برتری این روش نسبت به سایر روش‌ها می‌شود، سرعت ازدیاد و امکان کاربرد آن در مورد گیاهان بالغ مسن است (۲).

انتخاب صحیح ریزنمونه، نقش موثری در موفقیت ریزازدیادی به‌ویژه در مورد گیاهان درختی و درختچه‌ای دارد. به نظر می‌رسد بیشترین ریزنمونه‌ی مورد استفاده در ریزازدیادی گیاهان درختی و درختچه‌ای (خشبی و نیمه-خشبی)، سرشاخه (جوانه‌ی راسی) است. استفاده از سرشاخه به‌عنوان ریزنمونه، در مطالعه‌ی بسیاری از محققان مشاهده شد. استفاده از سرشاخه، مرحله‌ی برگشت تمایز و تمایز از نو را تا حد زیادی حذف می‌کند و می‌توان به‌طور مستقیم و سریع به گیاهان تکثیرشده دست‌یافت. همچنین آلودگی، به‌ویژه آلودگی به ویروس بسیار کاهش خواهد یافت. جوانه، بالقوه توانایی تکثیر و تولید اندام‌های جدید را دارد و به همین دلیل از ثبات ژنتیکی بالایی برخوردار است و کمترین تغییر ژنتیکی در ازدیاد به این روش دیده می‌شود (۲، ۲۰). علاوه بر نوع ریزنمونه، سن و اندازه‌ی ریزنمونه، عوامل مختلف ژنوتیپی و فیزیولوژیکی، شرایط رشدی گیاه مادری، ترکیب، مقدار و کیفیت ترکیبات موجود در محیط کشت به‌ویژه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، نوع محیط کشت، شرایط محیطی و برخی عوامل دیگر در موفقیت ریزازدیادی نقش دارند.

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی در موفقیت شاخه-زایی و ریشه‌زایی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای (ریزازدیادی) دارند. ریزازدیادی در تحقیق حاضر تحت تاثیر غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده (IBA و BAP) قرار داشت. نقش انکارناپذیر سیتوکینین BAP در تحریک شاخه‌زایی در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شد، به‌طوری که بیشترین تعداد شاخساره در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و کمترین آن در تیمار فاقد این هورمون مشاهده گردید. هورمون BAP یکی از قوی‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی سیتوکینینی است. گزارش‌های زیادی وجود دارد که بیان می‌کند، هیچ شاخه‌زایی در محیط غنی‌شده با اکسین و فاقد BAP انجام نمی‌شود (۲، ۳۰، ۴۰، ۴۷). این یافته‌ها با یافته‌های ما کاملا مغایرت دارد، زیرا در محیط‌های فاقد این هورمون نیز نوشاخه تشکیل شد. اگرچه برخی مطالعات، یافته‌های مشابهی را گزارش کرده‌اند (۲۸). تفاوت گونه‌ای، نوع ریزنمونه‌ی مورد استفاده، پاسخ متفاوت سلول‌ها به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و مقدار متفاوت سیتوکینین‌های درون‌زا در گیاهان مختلف، دو علت اصلی این تفاوت در اندام‌زایی است (۳۶، ۴۲). تشکیل نوشاخه نشاندهنده‌ی تشکیل بنیادی‌های (پریموردیوم) جدید تحت تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت است. در حضور سیتوکینین‌ها، نوشاخه‌های محوری در شاخساره‌ها تولید می‌شوند. نقش سیتوکینین‌ها از جمله BAP در شکستن تسلط انتهایی و تحریک رشد نوشاخه‌ها است (۳۴). نقش دیگر این هورمون، تخصیص بیشتر مواد غذایی در دسترس گیاه برای تولید شاخه‌های بیشتر می‌باشد.

با نگاهی به نتایج به‌دست‌آمده در ارتباط با تعداد شاخساره، تعداد گره و تعداد برگ تولیدشده‌ی شمشاد خزری در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌توان دریافت که استفاده از غلظت مناسب هورمون اکسینی استفاده‌شده در این تحقیق (IBA) در ترکیب با هورمون سیتوکینینی استفاده‌شده (BAP)، موجب القای بیشترین تعداد شاخساره و بیشترین تعداد برگ شد. نتایج مشابهی در جاتروفا (*Jatropha curcas*) به‌دست آمد، به‌طوری‌که بیشترین میزان شاخه‌زایی در محیط کشت غنی‌شده با ۳ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد (۶). در همین ارتباط، Bonga و Aderkas (۲۰) و شهرزاد و امام (۱۱) نیز نتیجه گرفتند که تیمار سیتوکینین به‌همراه غلظت‌های ضعیف اکسین بر ایجاد شاخه‌های نابجا به‌ویژه در آغاز شاخه‌زایی موثر بوده است. این نتیجه در کار محققان دیگر

نیز نشان داده شد (۲۳، ۵۴، ۶۰). مطالعه روی چند گونه‌ی درختی نشان داد که حضور غلظت پایین IBA به‌همراه BAP در رشد و تکثیر جوانه‌های جانبی مناسب است (۸، ۱۲، ۲۳، ۵۴). ترکیب بهینه‌ی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای القای بیشینه‌ی تعداد سرشاخه، تعداد گره و تعداد ریشه در اقاقیا (*Robinia pseudoacasia* L.) در شرایط درون‌شیشه‌ای، ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بود (۱۴). نتایج مطالعه‌ی Pasqual و Ferreira (۵۲) روی ریزازدیادی *Ficus carica* L. (یک گیاه چوبی)، تعداد زیادی از شاخه‌ها و رشد مناسب ریشه‌ها و قسمت‌های هوایی را در محیط کشت غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA نشان داد. مطالعات مختلف، موثربودن سیتوکینین‌ها را برای القای شاخه‌زایی نشان دادند (۳۶، ۴۲). در انتخاب غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی باید به ویژگی گونه‌ای، نوع ریزنمونه‌ی مورد استفاده و غلظت درون‌زای این تنظیم‌کننده‌ها توجه شود. در مطالعه‌ی حاضر، غلظت بالای BAP برای القای شاخساره، برگ و گره مناسب نبود. Heloir و همکاران (۳۳) نشان دادند که IBA اکسین مناسب‌تری برای ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای انگور (*Vitis vinifera*) (یک گیاه چوبی) نسبت به NAA است. در مطالعه‌ای روی *Pyrus syrica* (یک گیاه چوبی)، تکثیر موفق شاخه در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر BA نشان داده شد (۵۸). استفاده از BA و NAA (به‌ویژه در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر) برای ریزازدیادی موفق چند گیاه چوبی توسط برخی از محققان پیشنهاد شده است (۲۱، ۲۸، ۶۱). با توجه به نتایج Bejoy و همکاران (۱۹)، حضور یک سیتوکینین مانند BAP برای باززایی شاخساره بسیار موثر است. استفاده از BAP با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، سبب گسترش همه جوانه‌ها شد. بهترین نتیجه با ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر BAP با ۶/۷ شاخساره به‌دست آمد. غلظت بالای ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP نوعی بازدارندگی در جوانه‌زنی و شاخه‌زایی گیاه قره‌قاط (*Ribes khorasanicum*) ایجاد کرد (۹). به نظر می‌رسد یکی از دلایل اصلی این بازدارندگی، حضور غلظت مناسبی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی درون‌زا در این گونه‌ها است که با افزودن مقادیر زیاد این تنظیم‌کننده‌ها به‌صورت برون‌زا، اثر منفی را به دنبال خواهند داشت (۳۶). استفاده از سایر هورمون‌های اکسینی و سیتوکینینی برای شاخه‌زایی در شرایط درون‌شیشه‌ای درختان و درختچه‌ها در مطالعه‌ی بسیاری از محققان مشاهده شد (۱۷، ۳۶). تولید شاخساره‌ی بیشتر، از این نظر حائز اهمیت است که در مرحله‌ی پرآوری یا واکشت نمونه‌های گیاهی، این شاخه‌های جانبی را می‌توان جدا کرد و هر یک را به‌عنوان یک نمونه‌ی مستقل، در محیط کشت قرار داد.

ترکیب غلظت‌های مناسب IBA با BAP، سطح متعادل هورمونی را برای شاخه‌زایی و ریشه‌زایی در کشت شمشاد خزری ایجاد کرد. نسبت مناسب ترکیب هورمونی اکسین و سیتوکینین در محیط کشت برای القای تقسیم سلولی، تمایز سلولی، اندام‌زایی و در نهایت برای دستیابی به گیاه کامل موثر است (۲). نتایج مشابهی توسط بسیاری از محققان که روی ریزازدیادی گیاهان درختی و درختچه‌ای مطالعه کرده‌اند، گزارش شده است (۷، ۸، ۲۴، ۴۸). مطالعه‌ی صفرنژاد (۷) روی عناب (*Ziziphus jujuba*) نشان داد که در بین ۶ نوع هورمون اکسینی و سیتوکینینی، استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، بالاترین میزان باززایی را باعث شد. مطالعه‌ی Dai و همکاران (۲۴) روی عناب مشخص کرد که غلظت بالای BA همراه با غلظت پایین IBA بیشترین تولید شاخساره را باعث شد. نتیجه‌ی مشابه، با غلظت پایین هر دوی این هورمون‌ها (به‌ترتیب، ۰/۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) در شاخه‌زایی صنوبر (*Populus* spp.) و دم‌گاوی (*Smirnovia turkestana* Bunge) گزارش شد (۱۱، ۱۸). در طی تحقیقی، Kamali و همکاران (۳۸) شاخه‌زایی بهینه‌ی بادام را در محیط کشت غنی‌شده با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست

آوردند. ازدیاد مطلوب نوعی اوکالیپتوس (*Eucalyptus occidentalis*) در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، به‌دست آمد (۱). امام و همکاران (۴، ۵) غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA را برای شاخه‌زایی درخت تیس (*Sorbus aucuparia*) و بادام کوهی (*Amygdalus scoparia*) مناسب تشخیص دادند. بررسی روی گیاه تا (*Celtis caucasica* Willd.) آشکار کرد که محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-ip، برای استقرار و شاخه‌زایی مناسب است (۸). مطالعه روی گز از برتری غلظت‌های ترکیبی ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی-گرم در لیتر NAA، حکایت داشت (۴۸). مطالعه روی بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia*) نشان داد که BAP به‌عنوان هورمون منفرد، شاخه‌زایی را بیشتر از ترکیب آن با سایر هورمون‌ها تحریک کرد (۶۴). برخی مطالعات دیگر اثر مثبت اکسین را روی شاخه‌زایی قره‌قاط نشان ندادند (۵۶).

نوع و غلظت بهینه‌ی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت، برای ریزازدیادی مناسب در گونه‌های مختلف محیطی متفاوت است. از دلایل مهم این تفاوت می‌توان به تفاوت ژنتیکی (نوع گونه)، تفاوت در میزان تولید درون-زای این ترکیبات و اثر متقابل آنها با یکدیگر اشاره کرد. به‌عنوان مثال، درحالی‌که مطالعه‌ی ما، غلظت پایین (۱ میلی‌گرم در لیتر) BAP را برای شاخه‌زایی بهترین می‌داند، احمدلو و همکاران (۲) غلظت بالای این هورمون (۸ میلی‌گرم در لیتر) را بهترین غلظت برای شاخه‌زایی زالزالک (*Crataegus pseudoheterophylla* Pojark.) معرفی کردند. مشابه یافته‌های ما، مطالعه روی تعدادی از جمعیت-های گز روغنی (*Moringa peregrina*) نشان داد که بیشترین درصد شاخه‌زایی در محیط کشت حاوی ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد (۳، ۳۵). نتایج مشابه (۹، ۱۰، ۱۷، ۲۵) و متفاوت (۳۰، ۴۳) از نظر غلظت مورد استفاده‌ی سیتوکینین‌ها در محیط پرآوری شاخه‌ی گونه‌های درختی و درختچه‌ای گزارش شده است. گزارش‌های زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد در بین سیتوکینین‌های مختلف، BAP نقش موثرتری در شاخه‌زایی گونه‌های درختی و درختچه‌ای دارد (۱، ۲، ۸، ۹، ۱۰، ۱۲، ۴۶، ۵۳، ۶۲).

ریشه‌زایی مناسب، بقای مناسب گیاهچه‌های حاصل از رشد ریزنمونه‌های کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای و گیاهان سازگارشده را به‌دنبال دارد. با نگاهی به نتایج به-دست‌آمده در این تحقیق می‌توان دریافت که ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط‌های فاقد هورمون اکسین کمترین ریشه‌زایی را داشتند. البته استفاده از غلظت‌های بالای این هورمون‌ها در محیط کشت نیز برای ریشه‌زایی توصیه نمی‌شود. بیشترین ریشه‌زایی، در محیط‌های حاوی هر دوی IBA و BAP به‌دست آمد. مشابه با تحقیق حاضر، یافته‌ها روی بلوط مشخص کرد که استفاده از ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌تنهایی و یا همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA موثرترین تیمار روی رشد طولی ریشه‌های اصلی و فرعی بود (۱۰). در بسیاری از مطالعات، فقط از هورمون‌های اکسینی بدون ترکیب با هورمون‌های سیتوکینینی به‌عنوان محرک‌های مناسب‌تر ریشه‌زایی نام برده شده است (۸، ۹، ۱۷، ۲۶، ۲۷، ۵۹). نتایج دیگر نشان داد که در حضور سیتوکینین‌ها ریشه‌زایی کاهش یافت (۹). در همین راستا Mahdavian و همکاران (۴۴) بیان کردند که یکی از اثرات سیتوکینین‌ها ممانعت کامل یا کاهش ریشه‌زایی است. مهم-ترین علت این تفاوت را باید در تفاوت گونه‌ای و تفاوت در مقدار تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی درون‌زا به‌ویژه اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در گونه‌های مختلف گیاهی جستجو کرد. به‌عنوان مثال، مطالعه روی ریزازدیادی عناب نشان داد که ۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین تیمار برای ریشه‌زایی است (۷). ریشه‌زایی مطلوب اوکالیپتوس در محیط کشت حاوی ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، به‌دست آمد (۱، ۵۷). در جاتروفا (*Jatropha curcas*)، تیس، بادام

کوهی، اکالیپتوس و زالزالک (*Crataegus* sp.)، بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط کشت غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد (۴، ۵، ۶، ۱۲، ۱۷). همچنین بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط کشت غنی‌شده با ۰/۵ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد (۹). مطالعه روی *Mucuna pruriens* نشان از برتری ریشه‌زایی در محیط کشت حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر دارد (۲۹). در مطالعات مختلف دیگر نیز نقش برتر IBA نسبت به سایر اکسین‌ها برای تحریک تشکیل ریشه مشخص گردید (۴۵، ۵۵، ۵۹).

دو هورمون IBA و NAA متداول‌ترین اکسین‌های مورد استفاده در ریشه‌زایی هستند (۱، ۲، ۶، ۷، ۵۷). به عقیده‌ی Bunn و همکاران (۲۲)، موثرترین هورمون‌های اکسینی بر ریشه‌زایی اکالیپتوس، IBA و NAA و یا ترکیبی از این دو هورمون است. غلظت مناسب هورمون، وابسته به گونه‌ی مورد نظر است.

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ارتباط مستقیمی بین ریشه-زایی مناسب و بقای خوب گیاهچه‌های سازگارشده وجود دارد، به‌طوری که در اغلب موارد بالاترین درصد بقای گیاهان در تیمارهایی مشاهده شد که بیشترین ریشه‌زایی را تحریک کردند.

نتیجه‌گیری کلی

ریزازدیادی یک روش بسیار مهم برای ازدیاد گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌ویژه گیاهانی است که در شرایط طبیعی به‌سختی تکثیر می‌شوند. یکی از اهداف ریزازدیادی، تکثیر گونه‌های مهم گیاهی است که خطر انقراض، نسل آنها را تهدید می‌کند. شمشاد خزری در شرایط برون‌شیشه-ای به‌سختی تکثیر می‌شود. در پژوهش حاضر بیشترین تعداد شاخساره، در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. همچنین بیشترین تعداد ریشه در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA اندازه‌گیری شد. بیشترین ارتفاع شاخساره، در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. بیشترین طول ریشه مربوط به گیاهچه‌های تیمارشده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود.

منابع

۱- آبروش، ز.، عصاره، م.ح.، امام، م. و مرید، ع. (۱۳۹۴). بررسی تاثیر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی گونه *Eucalyptus occidentalis*. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲۳ (۲): ۲۰۲-۱۹۲.

۲- احمدلو، ف.، طبری کوچکسرایی، م.، آزادی، پ.، حمیدی، آ. و بیرامی‌زاده، ا. (۱۳۹۴). اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر اندام-زایی گونه زالزالک ایروانی (*Crataegus pseudoheterophylla* Pojark.) در کشت درون‌شیشه‌ای. تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی. ۵ (۱۷): ۹۴-۸۵.

۳- اسدی کرم، ف.، میرزایی ندوشن، ح.، امام، م.، بخشی خانیکی، غ.ر. و سردابی، ف. (۱۳۹۲). بررسی شاخه‌زایی در تعدادی از جمعیت‌های گز روغنی (*Moringa peregrina*). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲۱ (۲): ۱۸۲-۱۷۴.

۴- امام، م.، قمری زارع، ع.، اسپهبدی، ک.، نراقی، ط.س. و شهرزاد، ش. (۱۳۹۰). ریزازدیادی درخت جنگلی تیس (*Sorbus aucuparia*) از طریق کشت ریزنمونه جوانه گیاه بالغ. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۱۹ (۲): ۲۷۳-۲۶۳.

۵- امام، م.، قمری زارع، ع.، اسدی کرم، ف.، لوکی اناری، ک. (۱۳۹۲). ریزازدیادی بادام کوهی (*Amygdalus scoparia*) از طریق کشت جوانه و جنین. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲۱ (۱): ۸۶-۷۸.

۶- امام، م.، میرجانی، ل.، نراقی، ط.س. و کنشلو، ه. (۱۳۹۴). اثر محیط کشت، ژنوتیپ و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی گیاه جاتروفا (*Jatropha curcas* L.). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲۳ (۲): ۱۹۱-۱۸۲.

۷- صفرنژاد، ع. (۱۳۹۴). اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد بر باززایی درون-شیشه‌ای گیاه عناب (*Ziziphus jujuba*). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲۳ (۱): ۴۸-۴۰.

۸- دادور، ف.، رستمی شاهراجی، ت.، عصاره، م.ح.، امام، م. و شیروانی، ا. (۱۳۹۲). بررسی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده-های رشد گیاهی در ریزازدیادی درخت تا (*Celtis caucasica* Willd.). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲۱ (۱): ۲۳-۱۳.

۹- درودی، ه.، اکبری‌نیا، م.، صفرنژاد، ع.، حسینی، س.م. و حاجیان شهری، م. (۱۳۹۴). ریزازدیادی گونه قره‌قات (*Ribes khorasanicum*) از طریق کشت بافت. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲۳ (۱): ۷۶-۶۵.

۱۰- زمانی، س.م.، امام، م.، محمدی گل‌تپه، ا.، صفایی، ن.، قمری زارع، ع. و فارسی، م.ج. (۱۳۹۱). تکثیر آزمایشگاهی بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia*). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲۰ (۲): ۲۵۲-۲۴۰.

۱۱- شهرزاد، ش. و امام، م. (۱۳۹۰). تکثیر غیرجنسی دورگ‌های دوجانبه پده و کبوده به روش کشت بافت. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۱۹ (۲): ۳۳۶-۳۲۷.

۱۲- صداقتی، م.، امام، م.، قمری زارع، ع.، عصاره، م.ح. و کیارستمی، خ. (۱۳۹۳). بررسی دو روش ریزازدیادی مرسوم و فتواتوتروفیک در گونه *Eucalyptus maculata*. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲۲ (۲): ۲۲۴-۲۱۱.

۱۳- قهرمان، ا. (۱۳۷۲). کورموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی). انتشارات مرکز نشر دانشگاهی. تهران. ایران. ۸۴۲ صفحه.

۱۴- کاویانی، ب.، نگهدار، ن. و هاشم‌آبادی، د. (۱۳۹۵). بهبود ریزازدیادی و ازدیاد اقاقیا (*Robinia pseudoacasia* L.) با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و عصاره‌ی جلبک قهوه‌ای آسکوفیلوم (*Ascophyllum nodosum*). تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی. ۶ (۲۱): ۷۹-۶۱.

۱۵- کاویانی، ب. و غفاری ایسی‌زاد، س. (۱۳۹۴). اثر غلظت‌های مختلف نفتالن استیک اسید و کینتین روی ریزازدیادی گیاه زینتی لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۸ (۵): ۱۰۹۶-۱۰۸۸.

۱۶- مرادی‌پور، ا.، حسینی، ب. و پیرزاد، ع.ر. (۱۳۹۵). اثر تنظیم‌کننده-های رشد گیاهی بر باززایی مستقیم ریزنمونه نوک شاخه در چهار ژنوتیپ از گیاه بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست-شناسی ایران). ۳۰ (۲): ۳۷۵-۳۶۴.

۱۷- مقیمی، ز. و صفرنژاد، ع. (۱۳۹۳). بررسی ریزازدیادی و میزان فلاونوئید زالزالک (*Crataegus* sp.) از طریق کشت بافت. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲۲ (۲): ۱۹۱-۱۸۱.

۱۸- ناصر، ش.، قمری زارع، ع.، شهرزاد، ش. و بخشی خانیکی، غ. (۱۳۸۹). ریزازدیادی گیاه دم‌گاوی (*Smirnovia turkestana* Bunge). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۱۸ (۱): ۸۲-۷۴.

19- Bejoy M., Sumitha V.R. and Anish N.P. (2008). Foliar regeneration in *Anthurium andraeanum* Hort. cv. Agnihorti. Biotechnolohy, 7 (1): 134-138.

20- Bonga J.M. and Aderkas P.V. (1992). *In Vitro* Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

21- Brum G.R. (2001). Micropropagação da figueira *(Ficus carica* L.) 'Roxo de Valinhos' Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, p. 41.

22- Bunn E., Senaratna T., Sivastihamparam K. and Dixon K. (2005). *In vitro* propagation of *Eucalyptus phylacis* L. Jhnson and K. Hill., A critically endangered relict from Western Australia. *In vitro* Cellullar and Development of Biology Plant, 41: 812-815.

23- Chalupa V. (1987). Effect of benzyl amino purine and thydiazuron on *in vitro* shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudoacaciae* L. Biology Plantarum, 29: 425-429.

24- Dai L., Zhao J. and Liu M.J. (2006). Tissue culture of Chines jujube using different explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 72: 261-265.

25- Dai H., Zhany Z. and Xiuwu G. (2007). Adventitious bud regeneration from leaf and cotyledon explants of Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N.E. Br.). *In vitro* Cellular and Development of Biology and Morphogenesis, 43: 2-8.

26- Dalal N.V. and Rai V.R. (2004). *In vitro* propagation of *Oroxylum indicum* Vent. A

medicinally important forest tree. Journal of Research, 9: 61-65.

27- Datta M.M., Mukherjee P., Ghosh B. and Jha T.B. (2007). *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant. Current Science, 93: 1438.

28- Ďurkovič J. (2008). Micropropagation of mature *Cornus mas* 'Macrocarpa'. Trees, 22: 597-602.

29- Faisal M., Siddique I. and Anis M. (2006). An efficient plant regeneration system for *Mucuna pruriens* L. (DC.) using cotyledonary node explants. *In vitro* Cellullar and Development of Biology Plant, 42: 59-64.

30- Gökbunar L. (2007). *In vitro* micropropagation of howthorn (*Crataegus* sp.), MSc. Thesis, Kahramanmaras Sutcu Imam University. Kahramanmaras, Turkey.

31- Gomes F., Simões M., Lopes M.L. and Canhoto M. (2010). Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). New Biotechnology, 27 (6): 882-892.

32- Hartmann H.T., Kester D.E., Davis F.T. and Genere R.L. (1997). Plant Propagation: Principles and Practices. (6th ed.). Prentice Hall International INC, USA, pp: 40-46.

33- Heloir M.C., Fournioux J.C., Oziol L. and Bessis R. (1997). An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary bud microcuttings. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 49: 223-225.

34- Iapichino G. and Airò M. (2009). Multiplication of *Crataegus monogyna* by *in vitro* culture of nodal segments, ISHS Acta Horticulturae 812. In: Proceeding of III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. Bávaro, Punta Cana (Dominican Republic), pp. 135-140.

35- Islam S., Akthar Jahan M.A. and Khatun R. (2005). *In Vitro* regeneration and multiplication of yearround fruit bearing *Moringa oleifera* L. Journal of Biological Science, 5: 145-148.

36- Jain S.M. and Ochatt S.J. (2010). Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants. Springer Protocols, Humana Press.

37- Kalimuthu K., Senthilkumar R. and Vijayakumar S. (2007). *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). African Journal of Biotechnology, 6 (10): 1171-1174.

38- Kamali K., Majidi E. and Zarghami R. (2001). Identification of optimum medium and growth factors for micropropagation of asexual stands GF677. Journal of Seed and Seedling, 17: 234-243.

39- Kaviani B., Ahmadi Hesar A. and Kharabian Masouleh A. (2011). *In vitro* propagation of *Matthiola incana* (Brassicaceae)-an ornamental plant. Plant Omics Journal, 4: 435-440.

40- Leblay C., Chevreau E. and Raboin L.M. (1990). Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 25: 99–105.

41- Lee-Epinosa H.E., Murguia-Gonzalez J., Garcia-Rosas B., Cordova-Contreras A.L. and Laguna C. (2008). *In vitro* clonal propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). HortScience, 43: 454-458.

42- Lu M. (2005). Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb.et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shoot tip culture. Scientia Horticulturae., 107: 64-69.

43- Maharik N., Elgengaihi S. and Taha H. (2009). *In vitro* mass propagation of the endangered sinai howthorn *Crataegus sinaica* Boiss. International Journal of Academic Research, 1 (1): 24-29.

44- Mahdavian M., Bouzari N. and Abdollahi H. (2010). Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative mahlab rootstock (SL-64). Seed and Plant, 26-1: 15-26.

45- Manjari M., Priyanka M., Biswajit G. and Timir B. (2007). *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). Res. Commun. Current Science, Vol. 1.

46- McComb J.A., Bennet I.J. and Tonkin C. (1996). *In vitro* propagation of *Eucalyptus* species. In: Taji, A.M. and Williams, R.P., (Eds), Tissue Culture of Australian Plants. University of New England, Armidale, p: 112-156.

47- Miguel C.M., Druart P. and Oliveira M.M. (1996). Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants. *In vitro* Cellullar and Development of Biology Plant, 32: 148–153.

48- Mohan V., Purohit M. and Srivastava P.S. (1995). *In Vitro* micropropagation of *Moringa pterygosperma*. Phytomorphology, 45: 253-261.

49- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with

tobacco tissue cultures. Physiology Plant, 15: 473-479.

50- Nhut D.T., Duy N., Vy N.N.H., Khue C.D., Khiem D.V. and Vinh D.N. (2006). Impact of *Anthurium* spp. genotype on callus induction derived from leaf explants, shoot and root regeneration capacity from callus. Journal of Applied Horticulture, 8 (2): 135-137.

51- Orhan I.E., Sinem A.E., Fatma S.S., Murat K.B.S. (2012). Exploration of cholinesterase and tyrosinase inhibitory, antiprotozoal and antioxidant effects of *Buxus sempervirens* L. (boxwood). Industrial Crops Production, 40: 116–121.

52- Pasqual M. and Ferreira E.A. (2007). Micropropagation of fig tree (*Ficus carica* L.), in: Jain, S.M., Häggman, H. (Eds.), Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits, 409-416.

53- Pati P.K., Rath M.S., Sood A. and Ahuja P.S. (2005). *In vitro* propagation of rose—a review. Biotechnology Advance, 95-111.

54- Puddephat I.J., Alderson P.G. and Wright N.A. (1999). *In vitro* root induction in axillary microshoots of *Quercus robur* L. Annual Applied Biology, 134: 233-239.

55- Rathore J.S., Rathore M.S., Singh M., Singh R. and Pyshekhawat N.S. (2007). Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. Indian Journal of Biotechnology, 6: 239-244.

56- Ruzic D. and Lazic T. (2006). Micropropagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black currant cultivars. Agricultural Conspicuous Science, 71: 149 -153.

57- Sharma S. and Ramamurthy V. (2000). Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tertecornis* trees. Plant Cell Report, 19: 511-518.

58- Shibli R.A., Ajlouni M.M., Jaradat A., Aljanabi S. and Shatnawi M. (1997). Micropropagation in wild pear (*Pyrus syrica*). Scientia Horticulturae, 68: 237-242.

59- Singh A., Reddy M.P., Chikera J. and Singh S.A. (2010). Simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas*. Industial Crops Production, 31: 209-213.

60- Sujatha M., Makkar H.P.S. and Becker K. (2006). Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. Plant Growth Regulation, 47: 83–90.

61- Thakur R.C. and Karnosky D.F. (2007). Micropropagation and germplasm conservation of Central Park Splendor Chinese elm (*Ulmus parvifolia* Jacq. 'A/Ross Central Park') trees. Plant Cell Report, 26: 1171-1177.

62- Trindad H.M. and Pais S. (2003). Meristematic nodule culture: a new pathway for *in vitro* propagation of *Eucalyptus globulus*. Trees, 17: 308-315.

63- Van Staden D. (2008). Plant growth regulators, II: cytokinins, their analogues and inhibitors. In: Plant Propagation by Tissue Culture (edn 3) (George, E.F. et al. eds.), pp. 205-226, Springer.

64- Vengadesan G. and Pijut P.M. (2007). *In vitro* propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *In vitro* Cellullar and Development of Biology Plant, 45: 474-482.

65- Winkelmann T., Geier T. and Preil W. (2006). Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985-2004. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 86: 319-327.

Micropropagation of *Buxus hyrcana* Pojark., an ornamental species under danger of extinction

Negahdar N. and Kaviani B.

Dept. of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R. of Iran

Abstract

Box tree (*Buxus hyrcana* Pojark.), is an ornamental tree and shrub species that has application in various industries. Growth and development of box tree is very slow, its rooting is hard and is under danger of extinction. Thus, the purpose of this research was investigation of the effect of different concentrations of BAP and IBA (0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg l^{-1} form each two) on micropropagation of box tree. The experiment was carried out as factorial based on a randomized complete block design in four replications. Results of the present research showed that the largest number of shoots (6.200/plantlet) was obtained in apical buds expalnts treated with 1 mg/L BAP along with 0.5 mg/L IBA. Apical bud explants were produced the maximum node number (4.100/plantlet) in medium containing 1 mg/L BAP and the largest number of leaf (with average of 6.566/plantlet) along with 1.5 mg/L IBA. Also, the largest number of root (6.466/plantlet) was calculated in explants treated with 1 mg/L BAP plus 1.5 mg/L IBA. Plantlets were transferred to pots containing peat and perlite with ratio of 1:1 for acclimatization. The pots were kept in a greenhouse with temperature of 24-26ºC and relative humidity of 70% and periodic irrigation. Around 90% of those were healthy. These acclimatized plantlets were similar to mother plants.

Key words: Auxin, Cytokinin, Explant, Ornamental plants, *In vitro* culture