مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی ریزازدیادی شمشاد خزری (*Buxus sempervirens auct non* L.)، یک درختچه زینتی بحرانی در حال انقراض با تیمار بنزیل آمینو پورین و نفتالین استیک اسید

بهزاد کاویانی*[1] و ناصر نگهدار[2]

[1,2] گروه باغبانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، [2] مؤسسه تحقیقاتی علوم کشاورزی و بیوتکنولوژی هیرکان، آمل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۴، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۰۱/۳۱)

چکیده

شمشاد خزری (*Buxus sempervirens auct non* L.) درختچه‌ای سخت ریشه‌زا است و تکثیر کندی دارد. این گونه‌ی گیاهی با ارزش به دلیل هجوم نوعی قارچ به نام *Calonectria pseudonaviculata*، در معرض خطر انقراض قرار دارد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر غلظت‌های مختلف ۶- بنزیل آمینو پورین (BAP) و α- نفتالن استیک اسید (NAA) (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر، از هر دو) بر ریزازدیادی شمشاد خزری بود. ضدعفونی ریزنمونه‌های این گونه بسیار مشکل است. کاربرد تلفیقی ضدعفونی‌کننده‌ها پیشنهاد می‌شود. نتایج ریزازدیادی نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره (۶/۶۰ در گیاهچه)، در ریزنمونه‌های سرشاخه‌ی تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. بیشترین تعداد گره (۵/۵۰ در گیاهچه) و تعداد برگ (با میانگین ۸/۱۰ عدد در گیاهچه)، به‌ترتیب در محیط‌های غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. بالاترین طول ریشه (۱۰/۱۵ سانتی‌متر در گیاهچه) در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. همچنین، بیشترین تعداد ریشه (۸/۲۰ در گیاهچه)، در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA اندازه‌گیری شد. بعد از تکثیر، گیاهچه‌ها برای سازگاری به بستری از پیت و پرلیت به نسبت ۱ به ۱ منتقل شدند. حدود ۹۰ درصد از این گیاهچه‌ها باززایی شدند و بقا داشتند. این گیاهچه‌های زنده، از نظر ریخت‌شناسی شبیه پایه‌های مادری بودند.

واژه‌های کلیدی: اکسین، سیتوکینین، ریزنمونه، گیاهان زینتی، کشت درون شیشه‌ای

مقدمه

شمشاد خزری (*Buxus sempervirens auct non* L.) از خانواده‌ی شمشاد (Buxaceae)، یک گونه‌ی زینتی درختچه‌ای و درختی است که در صنایع مختلف از جمله صنایع دستی، دارویی و طراحی فضای سبز (احداث دیواره‌های سبز در حاشیه پیاده‌روها و همچنین مجسمه‌های گیاهی) کاربرد دارد. شمشادها بومی اروپا، شمال غربی آفریقا، آمریکای شمالی و مرکزی، آسیای شرقی، ماداگاسکار و مکزیک هستند (Orhan *et al.*, 2012). 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. رشدونمو آن بسیار کند است، قلمه‌ی سخت ریشه‌زا دارد و تکثیر آن آهسته است (Kaviani and

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: kaviani@iaurasht.ac.ir, b.kaviani@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2023-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.2.8]

(Negahdar, 2017).

ریزازدیادی یک فناوری پیشرفته‌ی تکثیر رویشی برای تولید تعداد زیادی گیاهان ژنتیکی ممتاز و عاری از عوامل بیماری‌زا در یک زمان و مکان محدود است. این فن می‌تواند به حفظ گونه‌های در معرض خطر انقراض و ذخیره و تبادل ژرم‌پلاسم کمک نماید (Kaviani, 2020). 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 (Salehi Shanjani *et al*., 2018). ریزازدیادی شمشاد خزری یک روش تکثیر جدید این گونه‌ی در خطر انقراض است که توسط نویسندگان این مقاله آغاز شده است (Kaviani and Negahdar, 2017). ازدیاد درختان توسط فن‌کشت بافت، در آینده با سرعتی متناسب با سرعت تخریب برای کشت و تجدید حیات دوباره‌ی جنگل‌ها مورد استفاده قرار خواهد گرفت. آنچه موجب برتری این روش نسبت به سایر روش‌ها می‌شود، سرعت ازدیاد و امکان کاربرد آن در مورد گیاهان بالغ و مسن است (Ahmadloo *et al*., 2015). باززایی موفق گیاهان در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای به عواملی مانند ژنوتایپ، نوع ریزنمونه، سن گیاه مادر و ترکیب محیط‌کشت به‌ویژه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بستگی دارد. دو تنظیم‌کننده‌ی عمده‌ی مؤثر در تمایز اندام‌ها در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای، اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها هستند. از غلظت‌های مختلف NAA و BAP در ترکیب با یکدیگر برای شاخه‌زایی مؤثر در شرایط کشت‌بافت برخی درختان و درختچه‌های زینتی استفاده شده است (Jain and Ochatt, 2010). در این گیاهان، ریشه‌زایی مناسب در محیط حاوی NAA به‌دست آمد. پرکاربردترین تنظیم‌کننده‌ی رشد اکسینی برای القای ریشه‌زایی در پایه‌ی ریزشاخه‌ها، همچنین برای کاربرد تلفیقی با سیتوکینین‌ها به منظور شاخه‌زایی، NAA است (Kaviani, 2015). امروزه، روش تکثیر از سرشاخه‌ها نسبت به سایر روش‌ها ترجیح دارد، زیرا تغییر ژنتیکی کمی در آنها اتفاق می‌افتد.

یکی از موانع مهم در مسیر ریزازدیادی موفق شمشاد خزری، مشکل در ضدعفونی ریزنمونه‌های به‌دست آمده از این گیاه است. برای حل این مشکل، استفاده‌ی تلفیقی از مواد ضدعفونی‌کننده لازم به‌نظر می‌رسد. قلمه‌ی ساقه‌ی شمشاد خزری، سخت‌ریشه‌زا است. تلاش زیادی برای ریزازدیادی شمشاد خزری انجام نشده است. با توجه به اهمیت تکثیر وسیع شمشاد خزری برای حفاظت از این درختچه‌ی در حال انقراض، در این پژوهش، اثر غلظت‌های مختلف BAP و NAA روی تکثیر درون‌شیشه‌ای شمشاد خزری با استفاده از ریزنمونه‌ی سرشاخه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

شرایط آزمایش: این تحقیق طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۵ در مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم کشاورزی هیرکان واقع در شهر آمل استان مازندران به مرحله اجرا در آمد.

منبع ریزنمونه: گیاهان شمشاد خزری به‌عنوان نمونه‌های گیاهی از نهالستانی در شهرستان آمل خریداری شده و در گلخانه نگهداری شدند. قسمت انتهایی راس شاخه‌ی گیاهان دو ساله، بریده شده و به‌عنوان منبع ریزنمونه ضدعفونی شدند.

ضدعفونی نمونه‌های گیاهی: ضدعفونی نمونه‌ها (سرشاخه) با استفاده از هیپوکلریت سدیم، کلرید جیوه و اتانول انجام شد. در ابتدا، نمونه‌های گیاهی به‌مدت یک ساعت در زیر جریان روان آب شهری همراه با چند قطره مایع ظرفشویی به‌خوبی شسته شدند. بعد از این مدت، نمونه‌ها برای ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم (با یک درصد کلراید قابل دسترس) قرار داده شدند، سپس سه بار با آب‌مقطر استریل مورد شستشو قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۰/۵ درصد کلرید جیوه قرار داده شدند و پس از آبکشی کامل به‌مدت ۵ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی گردیدند. بعد از سه بار شستشوی کامل با آب‌مقطر استریل در زیر هود، ۵ تا ۱۰ میلی‌متری انتهای سرشاخه‌های ضدعفونی‌شده جدا شده و به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد ۵۰ ظرف ارلن ۲۰۰ میلی‌لیتری انتخاب شده و در آنها تیمارهای هورمونی ریخته شد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2023-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.2.8]

محیط‌کشت و تیمارها: ابتدا لازم است محیط‌کشت پایه تهیه شود. به این منظور، محیط‌کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) آماده شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه MS درون هر ارلن حاوی تیمارهای هورمونی توزیع گردید. تیمارهای هورمونی، غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از هر دوی NAA و BAP (۲۵ تیمار) بودند. هر تیمار شامل چهار تکرار و هر تکرار چهار مشاهده بود. اسیدیته (pH) محیط‌کشت 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 درجه 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 درجه 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 آب‌مقطر 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 سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد با آبیاری منظم در زمان خشکی نسبی خاک گلدان‌ها، نگهداری شدند تا سازگاری انجام شود.

بررسی‌ها در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کامل تصادفی (RCD) در چهار تکرار انجام شدند. کرت‌ها، ظروف پتری حاوی ریزنمونه‌ها هستند. مشاهدات هر دو هفته یکبار انجام شدند.

نتایج

ضدعفونی ریزنمونه‌ها: این طرح یک روش بسیار کارآمد برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها به‌ویژه سرشاخه را ارائه می‌کند. استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه همراه با محلول ۰/۵ درصد کلرید جیوه به‌مدت ۱۵ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۵ دقیقه بالاترین کارایی با کمترین آلودگی را به‌همراه داشت.

ارتفاع شاخساره: تفاوت‌های ارتفاع شاخساره در ریزنمونه‌های رشدیافته تحت غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA و BAP معنی‌دار بود (P≤۰/۰۱) (جدول ۱). کمترین ارتفاع شاخساره (۲/۷۰ سانتی‌متر) در شمشاد خزری در ریزنمونه‌های شاهد به‌دست آمد (جدول ۲). بیشترین ارتفاع شاخساره (۶/۰۶ سانتی‌متر) در شمشاد خزری در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (جدول ۲). ارتباط مستقیمی بین افزایش ارتفاع شاخساره و افزایش غلظت BAP و NAA وجود نداشت (جدول ۲). در میان تمام غلظت‌های BAP استفاده‌شده، بیشینه و کمینه‌ی ارتفاع شاخساره (به‌ترتیب با ۵/۱۰ و ۲/۷۰ سانتی‌متر) در گیاهچه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر و شاهد القا شد (جدول ۲). از طرف دیگر، در میان تمام غلظت‌های NAA به‌کار گرفته‌شده، بیشینه و کمینه‌ی ارتفاع شاخساره (به‌ترتیب با ۳/۵۶ و ۲/۷۰ سانتی‌متر) در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر و شاهد القا گردید (جدول ۲). بنابراین، اگر قرار باشد از یکی از این دو تنظیم‌کننده‌ی رشد برای القای طول شاخساره استفاده گردد، استفاده از BAP به‌تنهایی بهتر از استفاده از NAA به‌تنهایی است.

تعداد شاخساره: تعداد شاخساره‌های تولیدشده توسط ریزنمونه‌ی سرشاخه متعاقب اعمال تیمارها، بعد از حدود ۶۰ روز ثبت شد. نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان‌دهنده‌ی وجود اثرات متقابل معنی‌دار غلظت‌های NAA و BAP بر تعداد شاخساره در سطح احتمال ۵ درصد (P≤۰/۰۵) بود. تیمار با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، بیشترین تعداد شاخساره (۶/۶۰ عدد در گیاه) را در مقایسه با تیمار شاهد با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2023-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.2.8]

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2023-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.2.8]

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و NAA روی برخی صفات شمشاد خزری (*Buxus sempervirens auct non* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

منبع تغییرات	درجه آزادی	مقایسه میانگین						
		ارتفاع شاخساره	تعداد شاخساره	تعداد گره	تعداد برگ	طول ریشه	تعداد ریشه	بقای گیاه‌چه (درصد)
تیمار	۲۴	۱/۹۸۶**	۲/۵۱۰*	۱/۹۹*	۲/۶۰**	۶/۴۵**	۲/۴۲۳*	۱۹۱/۸**
خطا	۵۰	۰/۶۲۱	۰/۵۱۱	۱/۱۲۲	۱/۱۳۸	۲/۷۲	۱/۳۷	۸۴/۳۸
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱۹/۰۲	۱۳/۰۴	۳۳/۵۴	۱۸/۳۳	۲۵/۱۸	۲۰/۱۷	۱۱/۶۹

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد، * معنی‌دار در سطح ۵ درصد

کمترین تعداد شاخساره (۳/۳۳ عدد در گیاه) القا کرد (جدول ۲). سایر تیمارهایی که باعث القای بیش از ۶ شاخساره در هر ریزنمونه شدند، تیمارهای ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (۶/۳۳ شاخساره در گیاه) و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (۶/۲۰ شاخساره در گیاه) بودند (جدول ۲، شکل ۱).

تعداد گره: جداول ۱ و ۲، اثر BAP و NAA روی تعداد گره‌ی ایجادشده از ریزقلمه‌های سرشاخه را خلاصه می‌کند. بالاترین فراوانی تعداد گره (۵/۵۰ عدد در گیاه) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. این تعداد بیش از سه برابر تعداد گره‌های تولیدشده در تیمار شاهد (۱/۷۲) است. نتایج نشان داد که بین تیمار و پاسخ مشارکت وجود دارد (P≤۰/۰۵). بالاترین غلظت BAP یعنی ۲ میلی‌گرم در لیتر، تولید تعداد کمتری گره را القا کردند. بنابراین، در صورت استفاده از BAP به‌عنوان تنها تنظیم‌کننده‌ی رشد مورد استفاده برای القای تولید گره، غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر آن توصیه می‌شود (جدول ۲).

تعداد برگ: جداول تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌های حاصل از اثر متقابل NAA و BAP بر تعداد برگ نشان از تفاوت‌های معنی‌دار بین تیمار و پاسخ دارد. بیشترین تعداد برگ (۸/۱۰ عدد در گیاه) در محیط‌کشت غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و کمترین تعداد آن (۴/۴۰ عدد در گیاه) در محیط‌کشت غنی‌شده با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون حضور BAP مشاهده شد (جدول ۲). این نتیجه نشان از نقش مؤثر BAP در تحریک تولید برگ دارد. غلظت‌های ۰/۵، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA زمانی نقش مؤثری در القای تولید برگ دارند که با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه شوند (جدول ۲).

طول ریشه: جدول ۱ نشان می‌دهد که اثر متقابل NAA و BAP بر طول ریشه در سطح احتمال ۱ درصد (P≤۰/۰۱) معنی‌دار است. جدول ۲ نشان می‌دهد که بیشترین طول ریشه (۱۰/۱۵ سانتی‌متر در گیاه) مربوط به گیاهچه‌های رشدیافته در محیط‌کشت غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA است. طول ریشه (۹/۳۶ سانتی‌متر در گیاه) در گیاهچه‌های رشدیافته در محیط‌کشت غنی‌شده با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA نیز مناسب بود (شکل ۲). در هر دوی این تیمارها غلظت NAA برابر با ۱ میلی‌گرم در لیتر بود. از طرف دیگر، کمترین طول ریشه (۴/۳۵ سانتی‌متر در گیاه) مربوط به گیاهچه‌های رشدیافته در محیط‌کشت غنی‌شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (بدون NAA) است. این یافته نقش مثبت NAA را در تحریک مؤثر رشد ریشه نشان می‌دهد. هیچ ارتباط مستقیمی بین افزایش یا کاهش غلظت هر دو تنظیم‌کننده‌ی رشد در محیط‌کشت با افزایش یا کاهش رشد ریشه مشاهده نشد (جدول ۲). نامناسب‌ترین غلظت BAP برای القای رشد ریشه، ۲ میلی‌گرم در لیتر است، زیرا در هر دو تیمار ضعیف‌تر، حضور داشتند. از طرف دیگر، مناسب‌ترین غلظت NAA برای

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2023-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.2.8]

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و NAA روی برخی صفات شمشاد خزری (*Buxus sempervirens auct non* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

تیمارها	مقایسه میانگین						
	ارتفاع شاخساره (سانتی‌متر)	تعداد شاخساره	تعداد گره	تعداد برگ	طول ریشه (سانتی‌متر)	تعداد ریشه	بقای گیاه‌چه (درصد)
B_0N_0	۲/۷۰^{i}	۳/۳۳^{c}	۱/۷۲^{g}	۵/۵۶$^{c-e}$	۶/۲۰^{de}	۵/۷۶$^{b-e}$	۷۰/۰۰^{de}
$B_0N_{0.5}$	۲/۸۶^{i}	۵/۶۳$^{a-c}$	۲/۹۰$^{b-g}$	۶/۰۰$^{c-e}$	۶/۲۳^{de}	۶/۰۳$^{b-e}$	۷۰/۰۰^{de}
B_0N_1	۳/۵۶^{efghi}	۵/۵۶$^{a-c}$	۲/۷۳$^{b-g}$	۶/۰۰$^{c-e}$	۵/۲۰^{e}	۵/۹۰$^{b-e}$	۸۳/۳۳$^{a-d}$
$B_0N_{1.5}$	۳/۲۳^{ghi}	۵/۵۳$^{a-c}$	۳/۲۳$^{b-g}$	۴/۴۰^{e}	۵/۵۳^{e}	۵/۷۳$^{b-e}$	۷۰/۰۰^{de}
B_0N_2	۳/۴۶^{fghi}	۵/۲۶$^{a-c}$	۲/۹۳$^{b-g}$	۵/۲۶$^{b-e}$	۵/۹۳^{de}	۵/۸۰$^{b-e}$	۸۰/۰۰$^{b-e}$
$B_{0.5}N_0$	۳/۴۶^{fghi}	۵/۶۶$^{a-c}$	۲/۲۳$^{e-g}$	۶/۳۰$^{b-d}$	۷/۴۰$^{b-e}$	۴/۹۰$^{c-e}$	۶۶/۶۶^{e}
$B_{0.5}N_{0.5}$	۴/۵۰^{bcdefg}	۵/۵۳$^{a-c}$	۳/۰۳$^{b-g}$	۷/۹۳^{ab}	۶/۴۰^{de}	۵/۹۶$^{b-e}$	۸۳/۳۳$^{a-d}$
$B_{0.5}N_1$	۴/۹۳^{abcd}	۵/۶۳$^{a-c}$	۲/۸۳$^{b-g}$	۵/۹۶$^{c-e}$	۵/۱۳^{e}	۸/۲۰^{a}	۸۷/۰۰$^{a-c}$
$B_{0.5}N_{1.5}$	۴/۸۳^{abcde}	۵/۴۶$^{a-c}$	۲/۴۳$^{e-g}$	۵/۵۰$^{c-e}$	۵/۸۳^{de}	۵/۶۰$^{c-e}$	۸۳/۳۳$^{a-d}$
$B_{0.5}N_2$	۴/۴۶^{bcdefgh}	۵/۵۳$^{a-c}$	۴/۴۰^{ab}	۵/۱۶^{de}	۸/۴۰$^{a-d}$	۶/۳۳$^{a-d}$	۷۰/۰۰^{de}
B_1N_0	۵/۱۰^{abc}	۶/۶۰^{a}	۴/۲۰$^{a-d}$	۵/۵۶$^{c-e}$	۶/۵۳^{de}	۶/۶۶$^{a-c}$	۸۰/۰۰$^{b-e}$
$B_1N_{0.5}$	۴/۶۶^{bcdef}	۴/۹۶^{c}	۵/۵۰^{a}	۵/۹۶$^{c-e}$	۶/۴۰^{de}	۵/۸۳$^{b-e}$	۷۰/۰۰^{de}
B_1N_1	۴/۳۶^{bcdefgh}	۵/۲۳^{bc}	۳/۶۶$^{a-f}$	۵/۲۶^{de}	۱۰/۱۵^{a}	۶/۱۶$^{b-e}$	۹۳/۳۳^{a}
$B_1N_{1.5}$	۴/۴۳^{bcdefgh}	۶/۳۳^{ab}	۳/۸۰$^{a-e}$	۷/۲۳$^{a-c}$	۷/۲۶$^{b-e}$	۶/۵۶$^{a-c}$	۸۳/۳۳$^{a-d}$
B_1N_2	۶/۰۶^{a}	۵/۵۳$^{a-c}$	۳/۶۰$^{a-f}$	۸/۱۰^{a}	۶/۳۶^{de}	۶/۵۶$^{a-c}$	۸۶/۶۶$^{a-c}$
$B_{1.5}N_0$	۳/۹۶^{cdefghi}	۵/۵۳$^{a-c}$	۳/۶۶$^{a-f}$	۵/۱۳^{de}	۶/۲۳^{de}	۶/۱۶$^{a-c}$	۸۶/۶۶$^{a-c}$
$B_{1.5}N_{0.5}$	۵/۲۶^{ab}	۶/۲۰^{ab}	۴/۳۰$^{a-c}$	۵/۶۰$^{c-e}$	۵/۵۰^{e}	۶/۱۶$^{b-e}$	۸۳/۳۳$^{a-d}$
$B_{1.5}N_1$	۳/۸۳^{cdefghi}	۵/۳۰$^{a-c}$	۳/۱۳$^{b-g}$	۵/۳۶^{de}	۹/۳۶$^{a-c}$	۵/۱۳$^{c-e}$	۷۳/۳۳$^{c-e}$
$B_{1.5}N_{1.5}$	۴/۴۳^{bcdefgh}	۵/۳۶$^{a-c}$	۲/۷۳$^{c-g}$	۵/۷۶$^{c-e}$	۵/۸۳^{de}	۵/۲۶$^{c-e}$	۷۰/۰۰^{de}
$B_{1.5}N_2$	۴/۸۰^{abcde}	۵/۴۶$^{a-c}$	۳/۱۶$^{b-g}$	۵/۶۰$^{c-e}$	۶/۶۳^{de}	۵/۴۶$^{c-e}$	۸۰/۰۰$^{b-e}$
B_2N_0	۴/۵۳^{bcdef}	۴/۷۶^{c}	۱/۷۳^{g}	۵/۱۰^{de}	۴/۳۵^{e}	۴/۴۶^{de}	۷۳/۳۳$^{c-e}$
$B_2N_{0.5}$	۳/۲۰^{hi}	۵/۴۳$^{a-c}$	۳/۵۰$^{a-f}$	۵/۶۰$^{c-e}$	۶/۶۶$^{c-e}$	۴/۸۳$^{c-e}$	۸۶/۶۶$^{a-c}$
B_2N_1	۳/۸۰^{defghi}	۵/۶۶$^{a-c}$	۲/۲۶$^{e-g}$	۵/۵۰$^{c-e}$	۴/۶۳^{e}	۴/۴۰^{e}	۸۳/۳۳$^{a-d}$
$B_2N_{1.5}$	۳/۶۶^{defghi}	۴/۸۶^{c}	۳/۳۰$^{b-g}$	۵/۳۶^{de}	۶/۳۳^{de}	۴/۵۰^{de}	۷۶/۶۶$^{c-e}$
B_2N_2	۳/۴۶^{fghi}	۴/۸۰^{c}	۲/۵۳$^{d-g}$	۶/۱۶$^{c-e}$	۵/۸۰^{de}	۴/۵۰$^{c-e}$	۷۰/۰۰^{de}

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف همسان، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای LSD تفاوت معنی‌داری ندارند.

القای رشد ریشه، ۱ میلی‌گرم در لیتر است، زیرا در هر دو تیمار برتر، حضور داشتند.

تعداد ریشه: نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل NAA و BAP بر تعداد ریشه در سطح احتمال ۵ درصد ($P\leq۰/۰۵$) معنی‌دار است. جدول مقایسه‌ی میانگین صفات (جدول ۲) نشان می‌دهد که بیشترین تعداد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2023-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.2.8]

شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف BAP و NAA روی تعداد شاخساره در گیاهچه‌های شمشاد خزری (*Buxus sempervirens auct non* L.) رشدیافته در شرایط درون شیشه‌ای. از راست به چپ؛ گیاهچه‌های شاهد، گیاهچه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون NAA، گیاهچه‌های تیمارشده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، گیاهچه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و گیاهچه‌های تیمارشده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون BAP

شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف BAP و NAA بر تعداد و طول ریشه گیاهچه‌های شمشاد خزری (*Buxus sempervirens auct non* L.) رشدیافته در شرایط درون شیشه‌ای و مراحل سازگاری. شکل سمت چپ: گیاهچه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA. دارای بالاترین طول ریشه و شکل سمت راست: یک گیاهچه‌ی سازگاری‌شده به شرایط برون شیشه‌ای با ساختار ریشه‌ای حجیم

ریشه (۸/۲۰ عدد در گیاه) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و کمترین تعداد آن (۴/۵۰ عدد در گیاه) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA شمارش شد. نتایج نشان داد که نقش BAP در تحریک تولید ریشه نیز تقریباً به اندازه‌ی NAA مهم است، زیرا در برترین تیمارها جهت تحریک تولید ریشه، NAA نیز وجود داشت. با نگاهی به جدول ۲ می‌توان دریافت که در همه‌ی تیمارهایی که BAP در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر استفاده شده است، کمترین تعداد ریشه (حدود ۶ ریشه در گیاه) تولید شد.

بقای گیاهچه: درصد بقای گیاهچه‌ها طی ریزازدیادی، در تیماری که بیشترین تولید ریشه را تحریک کرد، بیشینه بود. بنابراین می‌توان گفت که ارتباط تنگاتنگی بین تعداد ریشه و درصد بقای گیاهچه‌ها وجود دارد. سایر تیمارهای با تعداد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2023-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.2.8]

ریشه‌ی بیشتر، درصد بقای بیشتری را در گیاهچه‌ها موجب شدند. بیشینه‌ی بقای گیاهچه‌ها (۹۶/۶۶ درصد) در محیط کشت غنی‌شده با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون NAA مشاهده شد. بقای گیاهچه‌ها در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (۸۷/۰۰ درصد) مناسب‌تر از سایر محیط‌ها بود (جدول ۲). کمینه‌ی بقای گیاهچه‌ها (۶۶/۶۶ درصد) در محیط‌کشت غنی‌شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون NAA مشاهده شد. تعداد ریشه‌ی تولیدشده در این محیط کم بود. نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان‌دهنده‌ی وجود اثرات متقابل معنی‌دار غلظت‌های مختلف NAA و BAP بر درصد بقای گیاهچه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد (P≤۰/۰۱) بود.

بحث

شمشاد خزری یک گونه‌ی زینتی درختچه‌ای در حال انقراض با قلمه‌ی ساقه‌ی خشبی و سخت ریشه‌زا است. شرایط مناسب برای به‌دست‌آوردن تعداد زیادی گیاهچه‌ی شمشاد خزری در شرایط درون‌شیشه‌ای، حضور تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی است. ریزازدیادی یک روش مناسب برای احیای گیاهان با ارزش در حال انقراض یا تهدید شده است. نقش مؤثر سیتوکینین BAP در تحریک شاخه‌زایی در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شد، به‌طوری‌که بیشترین تعداد شاخساره در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و کمترین آن در تیمار فاقد این هورمون مشاهده گردید. نوع و غلظت بهینه‌ی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط‌کشت، برای ریزازدیادی مناسب در گونه‌های مختلف متفاوت است. از دلایل مهم این تفاوت می‌توان به تفاوت ژنتیکی (نوع گونه)، تفاوت در میزان تولید درون‌زای این ترکیبات و اثر متقابل آنها با یکدیگر اشاره کرد. به‌عنوان مثال، درحالی‌که در مطالعه‌ی حاضر، غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای شاخه‌زایی بهینه مناسب تشخیص داده شد، مطالعه روی درخت زینتی *Crataeva adansonii* نشان داد که غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون موجب حداکثر شاخه‌زایی گردید (Tyagi *et al*., 2010). گزارش‌های زیادی وجود دارد که در آنها از BAP برای شاخه‌زایی گونه‌های درختی و درختچه‌ای در شرایط درون‌شیشه‌ای استفاده شده است (Sedaghati *et al*., 2014; Darroudi *et al*., 2015; Abravesh *et al*., 2015; Ahmadloo *et al*., 2015).

در مطالعه‌ی حاضر، علاوه بر تحریک بالاترین شاخه‌زایی در محیط‌کشت حاوی BAP، استفاده‌ی تلفیقی از غلظت‌های مناسب BAP و NAA نیز موجب القای تعداد شاخساره‌ی زیاد، بیشترین تعداد گره و بیشترین تعداد برگ شد. نتایج مشابهی در *Jatropha* (Emam *et al*., 2015) و *Poinsettia* (Castellanos *et al*., 2010) گزارش شده است. در اقاقیا (*Robinia pseudoacasia* L.)، ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA موجب القای بیشینه‌ی تعداد سرشاخه، تعداد گره و تعداد ریشه در شرایط درون‌شیشه‌ای شد (Kaviani *et al*., 2011). در اغلب مطالعات از غلظت بالای یک سیتوکینین در ترکیب با غلظت پایین از یک اکسین برای شاخه‌زایی بهینه استفاده شده است (Castellanos *et al*., 2010; Shahrzad and Emam, 2012; Sedaghati *et al*., 2014). بالاترین پرآوری شاخساره در *Jasminum officinale* L.، یک درخت زینتی، در محیط‌کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد (Bhattacharya and Bhattacharya, 2010). در درخت زینتی *Crataeva adansonii* حداکثر شاخه‌زایی از کشت جوانه‌ی سرشاخه در محیط حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (Tyagi *et al*., 2010). مطالعه روی چندین گونه از Bromeliads نشان داد که بالاترین شاخه‌زایی طی اندام‌زایی مستقیم با کشت جوانه‌ها روی محیط غنی‌شده با ۲ میکرومولار NAA همراه با ۴ میکرومولار BAP به‌دست آمد (Guerra and Vesco, 2010). نتایج مطالعه‌ی حاضر، نتایج مطالعات قبلی نویسندگان این مقاله روی شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.) با استفاده از ایندول بوتیریک اسید (IBA) و کینتین (KIN) را تأیید کرد. در یکی از آن مطالعات مشخص گردید که بالاترین تعداد برگ از کشت ریزنمونه‌ی سرشاخه در محیط غنی‌شده با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2023-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.2.8]

۲ میلی‌گرم در لیتر KIN در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد (Negahdar *et al*., 2019). در مطالعه‌ی دیگر، بیشترین تعداد شاخه و بیشترین تعداد برگ به‌ترتیب در محیط‌های کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده گردید (Kaviani and Negahdar, 2017). در این مطالعات نقش همکاری اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در القای شاخه‌زایی نشان داده شد. نسبت مناسب ترکیب هورمونی اکسین و سیتوکینین در محیط‌کشت برای القای تقسیم سلولی، تمایز سلولی، اندام‌زایی و درنهایت برای دستیابی به گیاه کامل مؤثر است (Ahmadloo *et al*., 2015). گزارش‌های متعدد مشخص کرد که غلظت بهینه‌ی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای القای بالاترین درصد پرآوری شاخساره در بین گونه‌های مختلف گیاهی، متفاوت است. علت اصلی این تفاوت، مقدار متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی درون‌زا در گونه‌های گیاهی مختلف است. به علاوه، پاسخ به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برون‌زا در گونه‌های مختلف، متفاوت است که درصد پاسخ با تیمارهای هورمونی و نوع ریزنمونه‌ها متغیر است (Kaviani and Negahdar, 2017).

تولید ریشه‌ی با کمیت و کیفیت خوب، بقای مناسب گیاهچه‌های حاصل از رشد ریزنمونه‌های کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای و گیاهان سازگارشده را به‌دنبال دارد. با نگاهی به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق می‌توان دریافت که ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط‌های فاقد NAA کمترین ریشه‌زایی را داشتند. البته، استفاده از غلظت‌های بالای این هورمون در محیط‌کشت نیز برای ریشه‌زایی توصیه نمی‌شود. بیشترین ریشه‌زایی، در محیط‌های حاوی هر دوی NAA و BAP به‌دست آمد. یافته‌های این تحقیق، گزارش‌های قبلی نویسندگان این مقاله روی شمشاد خزری را تأیید کرد. در بخشی از این مطالعات مشخص گردید که بالاترین درصد ریشه‌زایی در سرشاخه‌های کشت‌شده روی محیط حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر از هر دوی IBA و KIN تولید شد (Negahdar *et al*., 2019). در بسیاری از مطالعات، فقط از هورمون‌های اکسینی بدون ترکیب با هورمون‌های سیتوکینینی به‌عنوان محرک‌های مناسب‌تر ریشه‌زایی نام برده شده است (Jain and Ochatt, 2010). تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی IBA و NAA، ریشه‌زایی را در درختان و درختچه‌های زینتی مختلف تحریک کردند (Takihira *et al*., 2007; Chen *et al*., 2012). مطالعه روی درخت زینتی *Crataeva adansonii* نشان داد که ۱ میلی‌گرم در لیتر از NAA موجب حداکثر ریشه‌زایی شد (Tyagi *et al*., 2010). برخی گزارش‌های دیگر نشان داد که در حضور سیتوکینین‌ها ریشه‌زایی کاهش یافت (Darroudi *et al*., 2015). در مطالعه‌ای، Mahdavian و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که یکی از اثرات سیتوکینین‌ها ممانعت کامل یا کاهش ریشه‌زایی است. مهم‌ترین 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. مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ارتباط مستقیمی بین ریشه‌زایی مناسب و بقای خوب گیاهچه‌های سازگارشده وجود دارد، به‌طوری‌که در اغلب موارد بالاترین درصد بقای گیاهان در تیمارهایی مشاهده شد که بیشترین ریشه‌زایی را تحریک کردند.

نتیجه‌گیری

تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی زینتی از جمله برخی درختان و درختچه‌های جنگلی در معرض خطر انقراض قرار دارند. چندین روش برای حفاظت از این گیاهان ارائه شده است. ریزازدیادی، یکی از این روش‌ها است که با تولید تعداد زیادی از این گونه‌ها احتمال حذف کلی آنها بسیار کاهش می‌یابد. پژوهش حاضر سعی در ریزازدیادی یک گونه‌ی در حال انقراض (شمشاد خزری) داشت. در پژوهش حاضر، بیشترین تعداد شاخساره، در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. همچنین بیشترین تعداد ریشه در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2023-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.2.8]

تشکر و قدردانی

لازم است از مساعدت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت سپاسگزاری نماییم.

منابع

Abravesh, Z., Assareh, M. H., Emam, M. and Morid, A. (2015) Effects of culture medium and growth regulators on micropropagation of *Eucalyptus occidentalis*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 23: 192-202 (In Farsi).

Ahmadloo, F., Tabari Kouchaksaraei, M., Azadi, P., Hamidi, A. and Beiramizadeh, E. (2015) The effect of plant growth regulators on shoot proliferation and rooting of *Crataegus pseudohetrophylla* Pojark. via *In vitro* culture. Journal of Crop Production and Processing 5: 85-95 (In Farsi).

Bhattacharya, S. and Bhattacharya, S. (2010) *In vitro* propagation of *Jasminum officinale* L.: A woody ornamental vine yielding aromatic oil from flowers. In: Protocols for *In Vitro* Propagation of Ornamental Plants. (eds. Jain, S. M. and Ochatt, S. J.) Pp. 117-126. Springer Protocols, Humana Press.

Castellanos, M., Power, J. B. and Davey, M. R. (2010) Micropropagation of *Poinsettia* by organogenesis. In: Protocols for *In Vitro* Propagation of Ornamental Plants. (eds. Jain, S. M. and Ochatt, S. J.) Pp. 67-76. Springer Protocols, Humana Press.

Chen, F. C., Wangb, C. Y. and Fang, J. Y. (2012) Micropropagation of self-heading *Philodendron* via direct shoot regeneration. Scientia Horticulturae 141: 23-29.

Darroudi, H., Akbarinia, M., Safarnejad, A., Hosseini, S. M. and Hajian Shahri, M. (2015) Micropropagation of *Ribes khorasanicum* species by tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 23: 66-76 (In Farsi).

Emam, M., Mirjani, L., Naraghi, T. S. and Keneshloo, H. (2015) Effects of medium, genotype and plant growth regulators on micro propagation of *Jatropha curcas*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 23: 182-191 (In Farsi).

Guerra, M. P. and Vesco, L. L. D. (2010) Strategies for the micropropagation of Bromeliads. In: Protocols for *In Vitro* Propagation of Ornamental Plants. (eds. Jain, S. M. and Ochatt, S. J.) Pp. 47-66. Springer Protocols, Humana Press.

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

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.

Kaviani, B. and Negahdar, N. (2017) Propagation, micropropagation and cryopreservation of *Buxus hyrcana* Pojark., an endangered ornamental shrub. South African Journal of Botany 111: 326-335.

Kaviani, B. (2015) Some useful information about micropropagation. Journal of Ornamental Plants 5: 29-40.

Kaviani, B. (2020) Conservation of Ornamental Plants in Danger of Extinction by Biotechnology Methods. Islamic Azad University Press, Rasht, Iran (In Farsi).

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.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15: 473-479.

Negahdar, N., Hashemabadi, D. and Kaviani, B. (2019) An improved procedure for *in vivo* and *in vitro* propagation of *Buxus hyrcana*, an ornamental shrub critically at the risk of extinction. Biotechnologia 100: 417-428.

Orhan, I. E., Sinem, A. E., Fatma, S. S. and 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.

Salehi Shanjani, P., Javadi, H., Rasoulzadeh, L. and Amirkhani, M. (2018) Evaluation of genetic differentiation among healthy and infected *Buxus sempervirens* with boxwood blight using RAPD and ISSR markers. New Zealand Journal of Forestry Science 45: 15-25.

Sedaghati, M., Emam, M., Ghamari Zare, A., Assareh, M. H. and Kiarostami, Kh. (2014) Study of conventional and photoautotrophic methods of micropropagation on *Eucalyptus maculate*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 22: 211-224 (In Farsi).

Shahrzad, Sh. and Emam, M. (2012) Micropropagation of *Populus euphratica* and *P. alba* hybrids by tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 19: 328-336 (In Farsi).

Takihira, M., Otani, M., Tsuchiya, S. and Shimada, T. (2007) Plant regeneration from leaf explants of auricula cultivars (*Primula* × *pubescens* Jacq.). Plant Biotechnology 24: 425-427.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2023-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.2.8]

Tyagi, P., Sharma, P. K. and Kothari, S. L. (2010) Micropropagation of *Crataeva adansonii* D.C. Prodr: An ornamental avenue tree. In: Protocols for *In Vitro* Propagation of Ornamental Plants. (eds. Jain, S. M. and Ochatt, S. J.) Pp. 39-46. Springer Protocols, Humana Press.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2023-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.2.8]

Optimization of micropropagation of *Buxus sempervirens auct non* L., an ornamental shrub critically endangered with treatment of BAP and NAA

Behzad Kaviani [1*] and Naser Negahdar [2]
[1] Department of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
[2] Hyrcan Agricultural Sciences and Biotechnology Research Institute, Amol, Iran
(Received: 06/10/2019, Accepted: 20/04/2021)

Abstract

Common boxwood (*Buxus sempervirens auct non* L.) is a hard-rooted shrub with slow propagation rate. This plant species is in danger of extinction due to invasion of a type of fungus named *Calonectria pseudonaviculata*. The purpose of this research was investigation of the effects of different concentrations of BAP and NAA (0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg/L form each two) on micropropagation of *B. sempervirens*. Sterilization of explants of this species is very difficult. Combined application of disinfectants is proposed. Results of micropropagation showed that the largest number of shoots (6.60/plantlet) was obtained in apical buds expalnts treated with 1 mg l^{-1} BAP. Maximum number of nodes (5.50/plantlet) and number of leaf (8.10/plantlet) were obtained in media enriched with 1 mg l^{-1} BAP along with 0.5 and 2 mg l^{-1} NAA, respectively. The highest root length (10.15 cm/plantlet) was obtained in explants treated with 1 mg l^{-1} BAP along with 1 mg l^{-1} NAA. Also, the largest number of roots (8.20/plantlet) was calculated in explants treated with 0.5 mg l^{-1} BAP together with 1 mg l^{-1} NAA. After propagation, plantlets were transferred to a bed containing peat and perlite with ratio of 1:1 for acclimatization. About 90% of them were recovered and survived. These survived plantlets were morphologically similar to the mother plants.

Keywords: Auxin, Cytokinin, Explant, Ornamental plants, *In vitro* culture

Corresponding author, Email: b.kaviani@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2023-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.2.8]