دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
بوم‌شناسی جنگل‌های ایران

اثر محیط کشت‌های مختلف روی برخی از مشخصه‌های ریختی آکاسیا ویکتوریا در شرایط درون شیشه‌ای

مجتبی ایمانی راستابی[۱]، سیّدمحمّد حسینی‌نصر[۲]، جمشید حاتم[۳] و حمید جلیلوند[٤]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی جنگل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (نویسنده مسوول: Smhnasr@Sanru.ac.ir)
۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۴- استاد، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۱

چکیده

آکاسیا ویکتوریا درخت غیر بومی ایران است اما با اهداف مهمی مانند تثبیت تپه‌های شنی و زیبایی منظر در مناطق جنوبی کشور به‌ویژه در استان‌های خوزستان و ایلام کاشت می‌شود. هر گونه پژوهش در امر توسعه درختان بومی و غیربومی سازگار با شرایط گرد و غبار خیز کشور مانند استان‌های غربی حائز اهمیت فراوان است. بدون تردید کشت درون شیشه‌ای درختان یکی از سریع‌ترین و مطمئن‌ترین راه‌های دستیابی به تولید انبوه درختان است. هدف از این تحقیق بررسی اثر محیط کشت‌های مختلف گیاهی بر صفات مورفولوژیک آکاسیا ویکتوریا در شرایط درون شیشه‌ای بود. بذور مورد نیاز از مرکز بذر کلوده آمل تهیه شد. پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار شامل محیط کشت‌های MS، WPM، DKW، B5، L2 و N6 و هر تیمار با ۲٤ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. صفات ریختی مورد مطالعه شامل درصد جوانه‌زنی، طول ساقه و ریشه، تعداد شاخه‌دوانی، وزن تر ساقه و ریشه، وزن خشک ساقه و ریشه، وزن تر و وزن خشک زی‌توده کل گیاهچه به‌مدت ٤۲ روز مورد آزمایش قرار گرفتند. بعد از جمع‌آوری داده‌ها در نرم‌افزار SAS تجزیه واریانس و مقایسه میانگین با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین محیط کشت‌های مورد بررسی، به استثنای صفت نسبت طول ساقه به ریشه، در بقیه صفات در سطح معنی‌داری یک درصد، تفاوت معنی‌دار وجود دارد. مقایسه میانگین نشان داد که صفات تعداد شاخه‌دوانی، وزن خشک ساقه، وزن تر و خشک ریشه، وزن خشک و تر زی‌توده کل گیاهچه در محیط کشت WPM و صفات طول ساقه و ریشه و وزن تر ساقه در محیط کشت L2 بیشترین مقدار خود را داشتند. همچنین نتایج نشان داد که علی‌رغم انتظار، محیط کشت MS ضعیف‌ترین عملکرد را نسبت به دیگر محیط کشت‌ها در ارتباط با صفات داشت. می‌توان پیش‌بینی کرد که محیط کشت‌های WPM و L2 برای تولید گیاهچه از بذور آکاسیا ویکتوریا در شرایط درون شیشه‌ای عملکرد بهتری نسبت به دیگر محیط کشت‌های مورد بررسی خواهند داشت.

واژه‌های کلیدی: جوانه‌زنی، درون شیشه‌ای، کشت بافت، گیاهان چوبی، ریخت‌شناسی

مقدمه

آکاسیا جزء زیر تیره شب خسب (Mimosoideae)، تیره نیام داران یا نخودیان یا بقولات (Leguminosae) است (۲۳). این جنس شامل ۱۴۵۰ گونه است که در آفریقا، آمریکا، آسیا و استرالیا پراکنده و قادر به تحمل دامنه وسیعی از شرایط محیطی می‌باشد. جنس آکاسیا اولین بار حدود ۱۰۰ سال پیش به ایران وارد شد که با توجه به سطوح وسیع مناطق خشک و نیمه خشک ایران، انتخاب گونه‌های سریع‌الرشدی از جنس آکاسیا که می‌تواند در مقابل کم آبی و خشکی هوا مقاومت کند، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار بوده‌است. در کشور ایران، جنس آکاسیا به‌دلیل داشتن کارکردهای مختلفی شامل حفاظت خاک (۳۲)، چوب مناسب برای لنج‌سازی (۲۵)، آگروفارستری (۱۰)، گیاه‌پالایی و جذب عناصر سنگین (۱۹) و جنگل‌کاری با اهداف مختلف دارای اهمیت ویژه‌ای است. با توجه به اهمیت گونه آکاسیا ویکتوریا و خدماتی که فراهم می‌کند استفاده از روش‌های نوین افزایش و ازدیاد گیاهان برای تکثیر این گونه بسیار کاربرد دارد.

کشت بافت دارای پتانسیل بالایی برای توسعه سطح زیر کشت درختان جنگلی است (۲۲). در کشت‌های آزمایشگاهی همه نیازهای شیمیایی و فیزیکی اندام گیاهی می‌بایست به وسیله لوله کشت، محیط خارجی (نور، دما و غیره) و از همه مهم‌تر محیط کشت تأمین شود (۱۶،۸). محیط کشت یکی از اجزای بسیار مهم فنون کشت بافت گیاهی است و کاربرد موفق این فنون به میزان زیادی به محیط کشت با ترکیب صحیح بستگی دارد (۶). هیچ محیط کشت مشخصی را نمی‌توان برای رشد انواع سلول‌ها توصیه کرد و اغلب لازم است تغییراتی در محیط کشت برای پاسخگویی انواع مختلف ریزنمونه‌ها صورت گیرد (۴). عواملی که در هر مورد مناسب بودن یک محیط کشت را برای گونه‌ای خاص یا نوع خاصی از رشد تعیین می‌کند غلظت یونی، نیتروژن کل، نسبت آمونیوم به نیترات، کمبود کلسیم و حساسیت کلریدی بافت است (۳). بنابراین پژوهش برای انتخاب محیط کشت مناسب مفید و حائز اهمیت است.

امروزه اکثر محیط کشت‌هایی که استفاده می‌شوند نوع تغییریافتهٔ محیط کشت‌های قدیمی هستند. با بررسی فهرستی بیش از ۲۶۰ محیط کشت بافت گیاهی (۱۴) تنها ۳۹ محیط کشت دارای ترکیبات پایه بودند. از معروف‌ترین محیط کشت‌ها می‌توان به DKW (۹)، MS (۲۴)، L_2 (۲۹)، B_5 (۱۲)، WPM (۲۲) و SH (۳۳) اشاره کرد، که هر کدام از آنها برای نوع خاصی از گیاه و هدف‌های مشخصی از کشت استفاده می‌شوند. محیط کشت MS در بین دیگر محیط کشت‌های گیاهی و گونه‌های درختی سخت چوب بیشترین کاربرد را دارد. محیط کشت WPM محیط کشت تخصصی

گیاهان چوبی و محیط DKW محیط کشت تخصصی گونه گردو است.

محیط کشت‌های مختلف از نظر ترکیب و غلظت یونی با هم تفاوت زیادی دارند. مواد تشکیل‌دهنده هر محیط‌کشت شامل نمک‌های معدنی (عناصر پر مصرف و کم مصرف) به عنوان تأمین کننده رشد بیشینه (۱۸)، اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها به عنوان نیتروژن، قند به عنوان منبع کربن و انرژی، تنظیم کننده‌های رشد به عنوان محرک رشد و ریخت زایی (۱۸)، آگار به عنوان جامد کننده محیط کشت و آب که ۹۰ درصد محیط کشت را شامل می‌شود (۱۱).

بررسی اثر محیط کشت‌های مختلف در شرایط درون شیشه‌ای روی بذر و انواع اندام گیاهی و با اهداف مختلفی در پژوهش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در پژوهشی تأثیر سه نوع محیط کشت بر ریزازدیادی گونه درختی محلب نشان داد که درصد ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده در محیط کشت‌های MS و DKW با مقدار مشابه هورمون متفاوت است (۲۰). نتایج نشان داد که تعداد شاخه‌های جانبی در محیط DKW نسبت به محیط کشت MS حدود ۱/۶ برابر بیشتر بود (۲۰). در پژوهش دیگری تأثیر هفت محیط کشت شامل DKW، WPM، QL، CP، MS و دو محیط کشت ترکیبی از آنها با نسبت‌های مساوی، بر روی اندام‌زایی پنج رقم تجاری گیلاس مطالعه شد و گزارش شده که محیط‌های DKW/WPM اثر بیشتری بر اندام‌زایی داشتند (۲). پنج محیط کشت MS، C2D، WPM، DKW و DKW-G به منظور یافتن بهترین ترکیب غذایی مناسب برای درخت کنار مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اثر محیط کشت‌های مختلف بر رشد شاخه معنی‌دار است. همچنین طول شاخه در محیط کشت DKW و فاقد تنظیم کننده‌های رشد به‌طور معنی‌داری بهتر از سایر محیط کشت‌ها بوده است (۲). در پژوهشی برای استقرار، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی درخت گلابی از سه محیط کشت MS، 1/2MS و WPM استفاده شد (۲۲). نتایج نشان داد که محیط کشت WPM از نظر صفات درصد شاخه‌زایی، تعداد و طول ساقه نسبت به دیگر محیط کشت‌های مورد مطالعه برتری داشت (۳۱). در پژوهشی بر روی گونه‌های ارس سه محیط کشت WPM، MS و N6 را با هم مقایسه کردند و نتیجه گرفتند که محیط کشت WPM بهترین عملکرد را در بین دیگر محیط کشت داشت (۴۲).

گونه‌های مختلف جنس آکاسیا در محیط کشت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۵). در پژوهش‌هایی کشت بذور آکاسیا ویکتوریا در محیط کشت‌های DKW (۱۵) و محیط L2 (۲۷) به‌طور جداگانه کشت شدند و نتایج مطلوبی از نظر جوانه‌زنی، رشد اندام هوایی و ریشه گزارش دادند. اما تاکنون مقایسه چند محیط کشت مختلف و کاربردی با هدف شناسایی بهترین محیط کشت روی صفات ریختی گونه آکاسیا ویکتوریا انجام نشده است. آکاسیا ویکتوریا اگرچه بومی ایران نیست، اما در استان‌های فارس و ایلام به صورت تزیینی و مهم‌تر از آن در خوزستان به منظور تثبیت تپه‌های شنی کاشته می‌شود. کشور ایران در معرض شدید گرد و غبار در قسمت‌های غربی و جنوب غرب است. بدون تردید گونه‌های بومی و غیربومی مقاوم با شرایط بوم‌شناختی این مناطق و هر گونه پژوهش در جهت تسریع و تسهیل تولید انبوه آنها، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. پیش‌بینی می‌شود چنین پژوهش‌هایی به منظور ایجاد پروتوکل‌های جامع در ارتباط با گونه آکاسیا ویکتوریا به مراکز اجرایی کمک شایانی کند. هدف این پژوهش بررسی شرایط رشد گونه آکاسیاویکتوریا در شرایط درون شیشه‌ای تحت تیمارهای مختلف محیط کشت و به دست آوردن مناسب‌ترین محیط برای کشت این گونه است.

مواد و روش‌ها

تهیه، انتخاب و تأمین بذر

این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی جنگل دانشکده منابع طبیعی ساری در سال ۱۳۹۶ انجام شد. برای این منظور ابتدا بذور درخت آکاسیا ویکتوریا از مرکز بذر درختان جنگلی کلوده آمل، تهیه شد. از روش تعیین حدود اعتماد میانگین وزن بذور با کمک توزیع t استیودنت و اشتباه معیار برای تعیین احتمال جوانه‌زنی و بالا بودن قوه نامیه بذور، استفاده شد. بدین صورت که ابتدا ۳۰ عدد بذر به صورت تصادفی انتخاب و با ترازوی دیجیتالی با دقت یک هزارم وزن شد. سپس با محاسبه میانگین، انحراف معیار و اشتباه از معیار و با توجه به درجه آزادی در سطح احتمال پنج درصد (موجود در جدول t استیودنت)، عدد حدود اعتماد محاسبه شد. در نهایت بذوری که وزنشان از میزان بیشینه حدود اعتماد میانگین وزن بذور بالاتر بود، برای انجام آزمایش‌ها انتخاب شدند تا از بذور با شانس جوانه‌زنی بالاتر استفاده شود.

محیط کشت و استریل آن

انتخاب یک محیط کشت مناسب برای افراد کم‌تجربه نسبتاً مشکل و اغلب با خطا همراه است. برای رفع این مشکل روش طیف گسترده‌ای از محیط کشت‌ها پیشنهاد شده است (۱۲). در پژوهش حاضر، از شش محیط کشت گیاهی (شش تیمار) شامل MS، WPM، DKW، B5، L2 و N6 بدون اضافه کردن هورمون گیاهی خاصی استفاده شد. ترکیب و غلظت عناصر موجود در هر محیط کشت در جدول ۱ آمده است.

استریل کردن بذور، محیط کشت و وسائل آزمایشگاهی

در این تحقیق سطح بذور به شیوه معمول استریل کردن بذر که در اکثر آزمایشگاه‌ها صورت می‌گیرد استریل شد (۲۶). به این ترتیب که برای زدودن گرد و غبار موجود بر روی پوسته بذر، ابتدا با ماده شوینده (تیپول) شست و شو و پس از آبکشی با آب مقطر، به مدت ۱۰ دقیقه در کلرید جیوه ($HgCl_2$) نیم درصد (۱۸) قرار داده شدند. سپس با آب مقطر استریل، آبکشی شدند و به مدت ۶۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند. در مرحله آخر دوباره با آب مقطر استریل آبکشی و ظرف حاوی بذور به وسیله سلفون پوشانده شد تا ارتباط بذور با هر گونه آلودگی خارجی قطع شود. پنس، اسکالپل، لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت که درب آنها با سرپوش‌های پنبه‌ای محکم شده بود، در دستگاه اتوکلاو قرار

داده و استریل شدن محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. پس از خارج کردن لوله‌های آزمایش از داخل دستگاه اتوکلاو، سرد شدن و ژل شدن آنها، آماده کشت شدند (۱).

قبل از شروع کشت و انتقال بذر به محیط کشت، اتاقک کشت و کابینت دستگاه لامینار فلو ابتدا با الکل اتیلیک ۷۰ درصد ضدعفونی، سپس به مدت ۲۰ دقیقه لامپ ماوراء بنفش (UV) برای تکمیل مراحل ضدعفونی روشن شد. برای ضدعفونی تجهیزات، سطح خارجی لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت و سبدهای نگهدارنده، همزمان با روشن کردن لامپ ماوراء بنفش آنها هم زیر نور ماوراء بنفش قرار گرفتند. با شروع کار کشت، لامپ UV خاموش و از دستکش و ماسک برای جلوگیری از آلودگی احتمالی استفاده گردید.

کشت و شرایط نگهداری از کشت‌ها

بعد از تهیه محیط کشت، یک عدد بذر درون هر لوله آزمایش قرار داده شد و در مجموع ۲۴ لوله (۲۴ تکرار) برای هر تیمار آماده شد. تمامی کشت‌های انجام شده در اتاقک رشد که دارای ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و هشت ساعت تاریکی با دمای ۲±۱۵ درجه سانتی‌گراد بود، قرار داده شدند (۲۹).

صفات مورد بررسی

پس از کشت بذور، گزارش نویسی به صورت روزانه انجام گرفت. در مدت ۱۰ روز اول مشخصه درصد سرعت جوانه‌زنی با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد:

$$G_s = \sum_{i=1}^{n}\left(\frac{n}{t}\right)$$

رابطه (۱)

که، GS سرعت جوانه‌زنی، n تعداد بذوری که در زمان مشخصی روییده‌اند و t فاصله زمانی از روز کشت است (۲۸).

پس از گذشت شش هفته و زمانی که بعضی از تیمارها با توجه به ظرفیت لوله آزمایشگاه به بیشترین حد رشد خود رسیدند، صفات طول ساقه و ریشه با استفاده از کاغذ میلی‌متری و تعداد شاخه‌دوانی با شمارش شاخه‌های منشعب شده از ساقه اصلی، اندازه‌گیری شدند. همچنین پس از جدا کردن ساقه و ریشه در هر نمونه، وزن تر ساقه و ریشه با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت میلی‌گرم تعیین و با تقسیم این مقادیر بر یکدیگر، نسبت وزن تر ساقه به ریشه نمونه‌ها مشخص شد. از مجموع وزن تر ساقه و ریشه هر نمونه وزن تر زی‌توده کل گیاهچه به دست آمد. به دنبال توزین وزن تر، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه آون با درجه حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از خروج از دستگاه بلافاصله قبل از جذب رطوبت محیط با ترازوی دیجیتالی وزن شدند. از تقسیم مقادیر ثبت شده نسبت وزن خشک ساقه به ریشه محاسبه و از مجموع وزن خشک ساقه و ریشهء هر نمونه وزن خشک زی‌توده کل گیاهچه نیز حاصل شد.

جدول ۱- مقدار عناصر کم مصرف، پرمصرف، ویتامین‌ها و ساکارز (میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت‌های مورد مطالعه

Table 1. The amount of macro elements, micro elements, vitamins and sucrose (mgL^{-1}) in the studied culture media

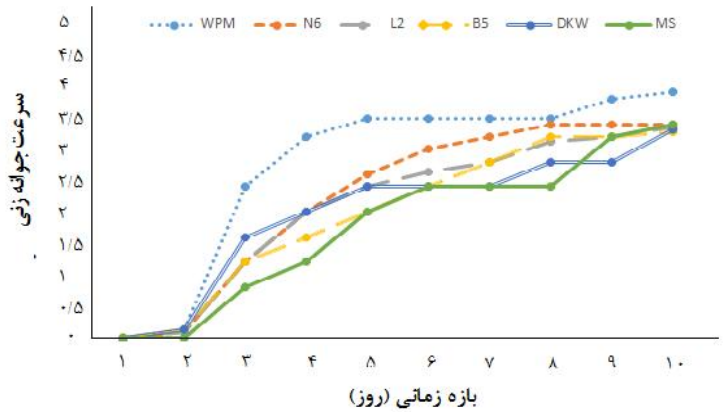
ترکیبات	محیط کشت (میلی‌گرم در لیتر)					
	N6	L2	B5	WPM	DKW	MS
NH_4NO_3	–	۱۰۰۰	–	۴۰۰	۱۴۱۶	۱۶۵۰
KNO_3	۲۸۳۰	۲۱۰۰	۲۵۰۰	–	–	۱۹۰۰
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	–	–	–	۵۵۶	۱۹۶۸	–
$CaCl_2.2H_2O$	۱۶۶	۶۰۰	۱۵۰	۹۶	۱۴۹	۴۴۰
K_2SO_4	–	۴۳۵	–	۹۹۰	۱۵۵۹	–
$MgSO_4.7H_2O$	۱۸۵	–	۲۵۰	۳۷۰	۷۴۰	۳۷۰
$(NH4)_2SO_4$	۴۶۳	–	۱۳۴	-	-	-
$NaH_2PO_4.H_2O$	–	۸۵	۱۵۰	–	–	–
KH_2PO_4	۴۰۰	–	–	۱۷۰	۲۶۵	۱۷۰
$MnSO_4.4H_2O$	۳/۳	۱۹/۸	–	۲۲/۳	۳۳/۵	۲۲/۳
$MnSO_4.H_2O$	–	–	۱۰	–	–	–
$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۲۵	۴	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۳۹	۰/۲۵
$ZnSO_4.7H_2O$	۱/۵	۵	۲	۸/۶	–	۸/۶
$Zn(NO_3)_2.6H_2O$	–	–	–	–	۱۷	–
KI	۰/۸	۱	۰/۷۵	–	–	۰/۸۳
H_3BO_3	۱/۶	۵	۳	۶/۲	۴/۸	۶/۲
$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۲۵	۱	۰/۰۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۲۵
$CoCl.6H_2O$	–	–	۰/۰۲۵	–	–	۰/۲۵
$NiSO_4.6H_2O$	–	–	–	–	۰/۰۰۵	–
$FeSO_4.7H_2O$	۲۷/۸	۲۵	۲۷/۸	۲۷/۸	۳۳/۸	۲۷/۸
$Na_2EDTA.2H_2O$	۳۷/۳	۳۳/۵	۳۷/۳	۳۷/۳	۴۵/۴	۳۷/۳
Myo-inositol	–	۲۵۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
Thiamin-HCL	۱	۲	۱۰	۱/۶	۲	۰/۱
Nicotinic acid	۰/۵	–	۱	۰/۵	۱	۰/۵
Pyridoxine-HCL	۰/۵	۰/۵	۱	–	۰/۵	۰/۵
Glycine	۴۰	–	–	–	۲۰	۲
Glutamine	–	–	–	–	۲۵۰	–
Sucrose	۵۰۰۰۰	۲۵۰۰۰	۲۰۰۰۰	۲۰۰۰۰	۳۰۰۰۰	۳۰۰۰۰

منبع (۱۷)

قبل از تجزیه و تحلیل، به علت نرمال نبودن داده‌ها، برای صفات آزمایش از نرمال‌سازی داده به روش لگاریتم طبیعی استفاده شد. برای مقادیر خیلی کوچک و ناچیز مانند مشخصه‌های نسبت طول ساقه به طول ریشه و نسبت وزن تر به وزن خشک ریشه، از تبدیل داده به روش جذر با فرجه سوم استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری کلیه صفات اندازه‌گیری شده شامل تجزیه واریانس و مقایسات میانگین‌ها به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت و برای رسم کلیه نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

به‌طور کلی تمام بذور آکاسیا ویکتوریا در محیط کشت‌های مختلف زنده و سالم باقی ماندند. همچنین نتایج نشان داد که ۱۰۰ درصد بذور در محیط کشت‌های مورد مطالعه جوانه زدند. به‌طوری‌که درصد جوانه‌زنی در بازه زمانی ۴۰ روزه برای تمامی محیط کشت‌ها ۱۰۰ بود. اما سرعت جوانه‌زنی بذور در محیط کشت‌های مورد مطالعه متفاوت بود. نتایج مربوط به سرعت جوانه‌زنی بذور آکاسیا ویکتوریا در محیط کشت‌های مورد مطالعه در شکل ۱ آمده است. سرعت جوانه‌زنی در محیط کشت‌های مختلف تقریباً مشابه یکدیگر بودند ولی به ترتیب، در محیط WPM و B5 بیشترین و کمترین سرعت جوانه‌زنی مشاهده شد.



شکل ۱- درصد جوانه‌زنی آکاسیا ویکتوریا در بازه زمانی ۱۰ روز
Figure 1. Germination percentage of *A. victoria* in the 10-day period

پس از گذشت دو هفته از کاشت بذور در محیط کشت‌های مختلف، نتایج اولیه در ارتباط با صفات مورد بررسی قابل لمس بود. به‌طور مثال تعداد شاخه‌دوانی در محیط کشت‌های WPM و N6 به‌طور قابل توجهی بیشتر از دیگر محیط کشت‌ها بود. بعد از گذشت شش هفته تفاوت معنی‌داری در مشخصه‌های مورد مطالعه در محیط کشت‌های مختلف مشاهده شد که نتایج آن در جدول ۲ آمده است.

بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که بین محیط کشت‌های مورد بررسی، به استثنای صفت نسبت طول ساقه به ریشه، در بقیه صفات در سطح معنی‌داری یک درصد، تفاوت معنی‌دار وجود داشت. پژوهش‌های فراوانی نتیجه‌گیری کردند که تفاوت معنی‌دار بین صفات رویشی گیاهان در محیط کشت‌های مختلف مختلف به دلیل وجود ترکیبات مختلف و غلظت‌های مختلف وجود دارد (۳۴،۳۱،۳۰،۲۱،۲،۷).

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در محیط کشت‌های مختلف
Table 2. ANOVA of studied characteristics in different culture media

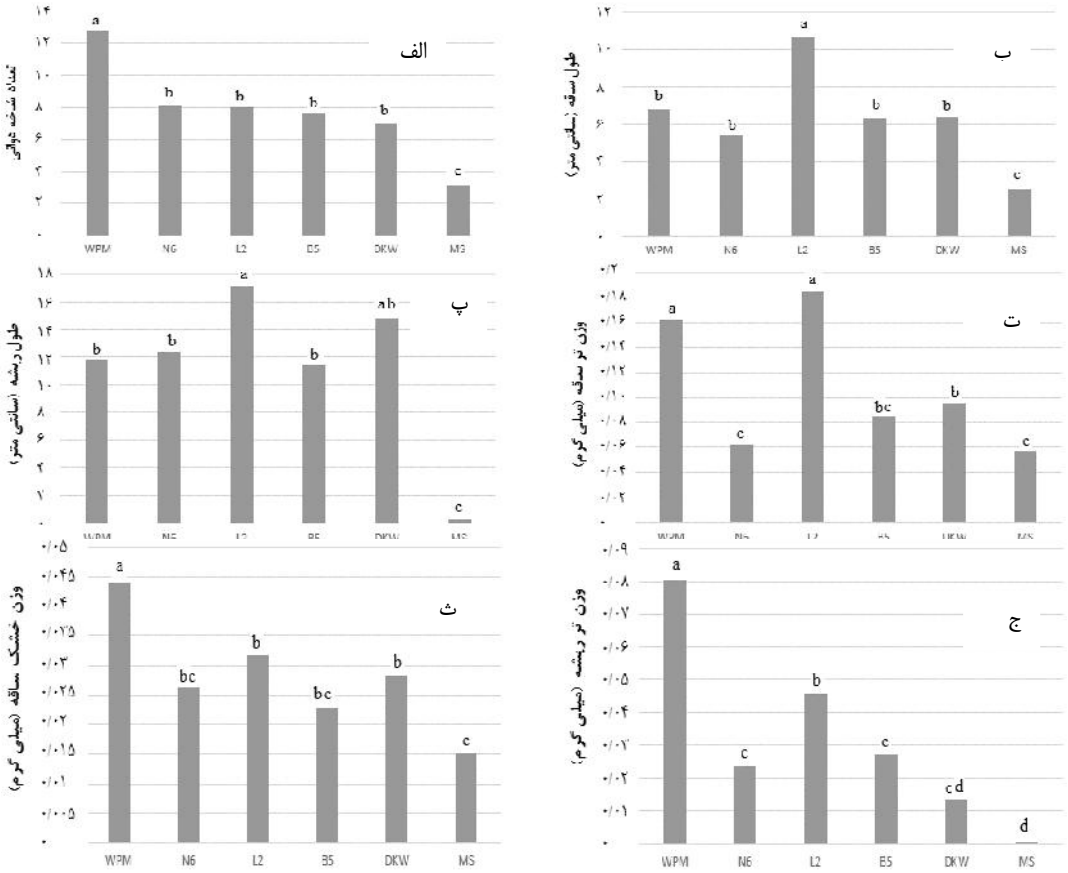
صفات	میانگین	ضریب تبیین	انحراف معیار	مقدار F
تعداد شاخه دوانی	۷/۷۶	۰/۵۴	۰/۲۶	۱۶/۷۱**
طول ساقه	۰/۷۰۷	۰/۴۱	۰/۴۳	۹/۸۸**
طول ریشه	۴/۸۹۴	۰/۴۹	۰/۵۴	۱۳/۷۶**
وزن تر ساقه	۰/۷۷۲	۰/۶۱	۰/۲۶	۲۲/۳۷**
وزن خشک ساقه	۰/۳۴۰	۰/۳۱	۰/۲۳	۶/۴۶**
وزن تر ریشه	۳/۱۸۰	۰/۷۲	۰/۵۸	۳۶/۷۷**
وزن خشک ریشه	۲/۱۹۷	۰/۵۳	۰/۶۳	۱۶/۲۵**
نسبت طول ساقه به ریشه	۰/۱۲۵	۰/۱۱	۰/۱۳	۱/۸۶ns
نسبت وزن تر ساقه به وزن خشک ساقه	۰/۱۴۰	۰/۲۹	۰/۴۰	۹/۴۱**
نسبت وزن تر ریشه به وزن خشک ریشه	۰/۴۲۸	۰/۲۹	۰/۵۵	۱۷/۴۴**
مقدار آب ساقه و ریشه	۰/۵۸۹	۰/۵۹	۰/۳۳	۲۰/۴۲**
وزن تر زی‌توده کل گیاهچه	۰/۹۸۵	۰/۶۷	۰/۲۹	۲۸/۷۸**
وزن خشک زی‌توده کل گیاهچه	۰/۴۴۵	۰/۴۱	۰/۲۶	۹/۹۹**

**: وجود معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ درصد ns: عدم وجود معنی‌داری

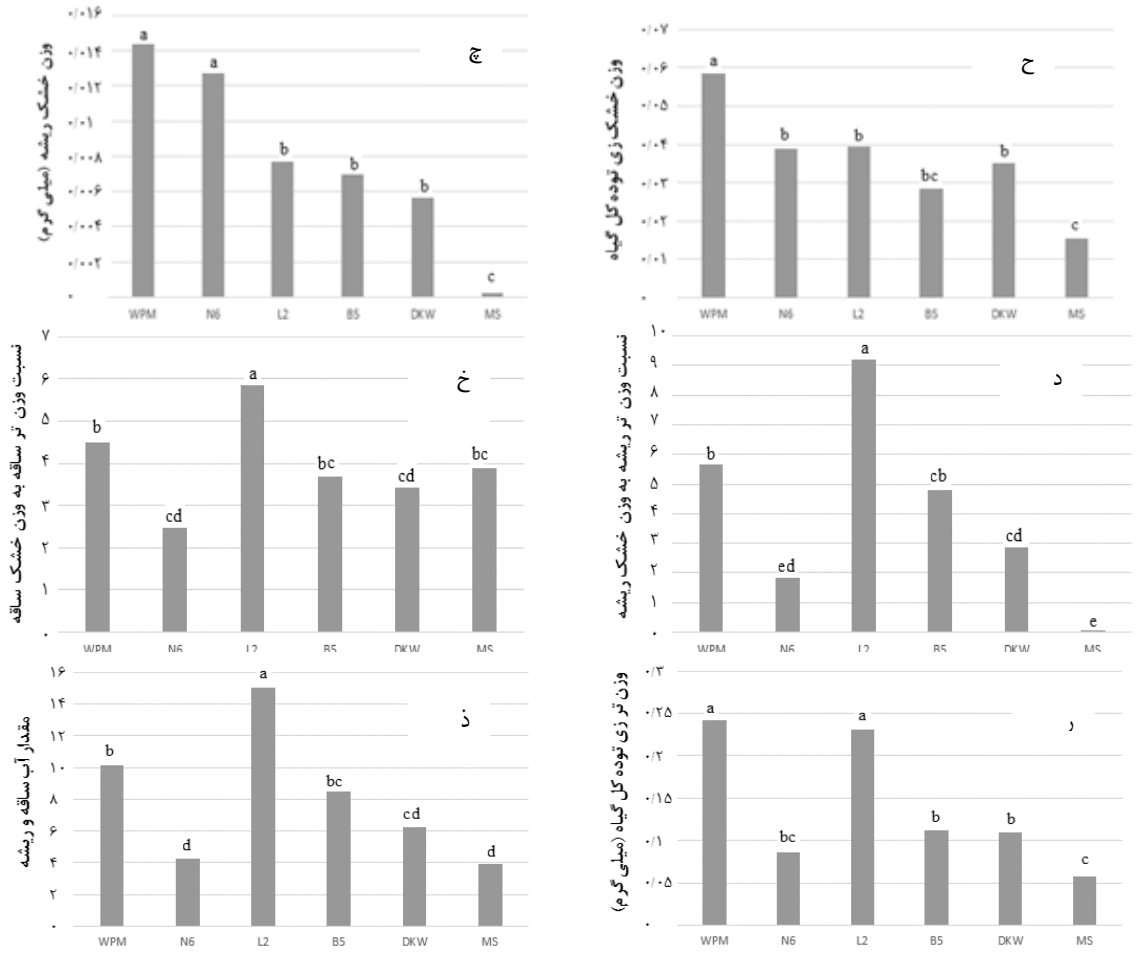
نتایج مقایسه میانگین محیط کشت‌های مختلف برای صفات مورد مطالعه در شکل ۲ آمده است. نتایج نشان داد صفات تعداد شاخه‌دوانی، وزن خشک ساقه، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و وزن تر و خشک زی‌توده کل گیاه در محیط کشت WPM بیشترین میانگین را به خود اختصاص دادند. در ارتباط با صفات طول ساقه، طول ریشه، وزن تر ساقه و ریشه و نسبت‌های وزن تر و خشک ریشه به ساقه بیشترین میانگین در محیط کشت L2 مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که محیط کشت MS در مقایسه با دیگر محیط کشت‌ها کمترین میانگین را در اغلب صفات مورد مطالعه به خود اختصاص داد. به‌طور کلی دو محیط کشت WPM و L2 در بیشتر مشخصه‌های مورد بررسی گیاه عملکرد بهتری نسبت به دیگر محیط کشت‌ها داشتند. عملکرد بهتر محیط WPM نسبت به محیط کشت‌های MS و N6 در شرایط یکسان هورمون‌های گیاهی بر روی گونه‌های جنس ارس گزارش شده است (۴۲).

اختلاف معنی‌دار صفات مورد مطالعه می‌تواند به دلیل تفاوت نوع و غلظت برخی عناصر و ترکیبات کم مصرف و پرمصرف بین محیط کشت‌های مورد مطالعه باشد. نسبت نیترات به آمونیوم در سه محیط کشت DKW، WPM و MS تقریباً برابر ولی در محیط B5 حدود ۱۸/۶۶ برابر، در محیط L2 ۲/۱ برابر و در محیط N6 ۶/۱۱ برابر نسبت به سه محیط کشت DKW، WPM و MS بود. همچنین ترکیب آمونیوم در محیط‌های L2، WPM، DKW و MS به صورت NH_4NO_3 و در محیط‌های N6 و B5 به صورت $(NH_4)_2SO_4$ است. یا به‌طور مثال در محیط‌های MS، B5 و N6 در مقایسه با محیط‌های WPM و DKW سولفات پتاسیم حذف و نیترات پتاسیم جایگزین می‌شود و در محیط L2 هر دو ترکیب وجود دارند (جدول ۱). نیترات و آمونیوم منابع اصلی نیتروژن در محیط کشت هستند که نیترات به دلیل سهولت جذب و غیرسمّی بودن منبع بهتری است (۳۴).

تعداد شاخه‌دوانی در شرایط درون شیشه‌ای آکاسیا ویکتوریا نشان داد که بذور محیط WPM با میانگین ۱۲/۷۷ بیشترین و محیط MS با میانگین ۳/۷ کمترین میزان شاخه‌دوانی را داشتند. یکی از دلایل شاخه‌دوانی بیشتر در محیط WPM مقدار کمتر کلرید در این محیط به فرم CaCl2 نسبت به دیگر محیط کشت‌ها به ویژه محیط MS است. تعداد جوانه تولید شده در محیط MS با مقدار کلرید و کلسیم محیط کشت مرتبط است (۷).



شکل ۲- مقایسه میانگین محیط کشت‌های MS، WPM، DKW، N6، L2 و B5 در ارتباط با صفات مورد مطالعه
Figure 2. Mean comparison of MS, WPM, DKW, N6, L2 and B5 media for studied characteristics



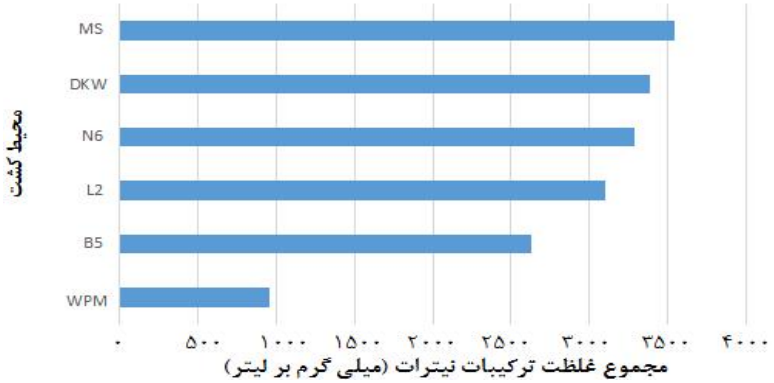
ادامه شکل ۲- مقایسه میانگین محیط کشت‌های MS، WPM، DKW، N6، L2 و B5 در ارتباط با صفات مورد مطالعه

Continued Figure 2. Mean comparison of MS, WPM, DKW, N6, L2 and B5 media for studied characteristics

نتایج در ارتباط با صفت طول ساقه و طول ریشه نشان داد که اندازه مشخصه مورد مطالعه در محیط L2 بیشترین و در محیط MS کمترین مقدار را دارند. نتایج به دست آمده از پژوهش مهدویان و همکاران نیز بیانگر کاهش رشد ریشه در محیط MS بود (۲۰). پیش‌بینی می‌شود با افزایش نیترات محیط کشت، رشد ریشه کاهش یابد. در محیط کشت MS میزان نیترات در قالب دو نمک پرمصرف NH_4NO_3 و KNO_3 بیشترین غلظت نیترات را نسبت به دیگر محیط کشت‌ها به خود اختصاص داده است که تا حدودی کاهش طولی ریشه در این محیط کشت را می‌توان توجیه کرد (شکل ۳). البته غلظت نیترات در محیط L2 نیز نسبت به دیگر محیط کشت‌ها بالا است که می‌توان احتمال داد نیترات به تنهایی عامل تمایز دو محیط کشت MS و L2 در ارتباط با صفت طول ریشه نیست. نتایج پژوهش‌های مختلف بیانگر رابطه مستقیم میان کاهش پتاسیم محیط کشت با کاهش طول ریشه بوده است (۳۹،۳۸). با توجه به جدول ۱، نمک‌های حاوی عنصر پتاسیم شامل KNO_3، K_2SO_4 و KI در محیط کشت MS غلظت کمتری در مقایسه با دیگر محیط کشت‌ها دارند.

نتایج نشان داد که وزن تر ساقه در محیط L2 (حدود ۲۰ میلی‌گرم) و در محیط MS (حدود شش میلی‌گرم) به ترتیب بیشترین و کمتر بوده است. اما وزن خشک ساقه در محیط WPM (چهار میلی‌گرم) و در محیط MS (یک میلی‌گرم) به ترتیب بیشتر و کمتر از دیگر محیط کشت‌ها بود.

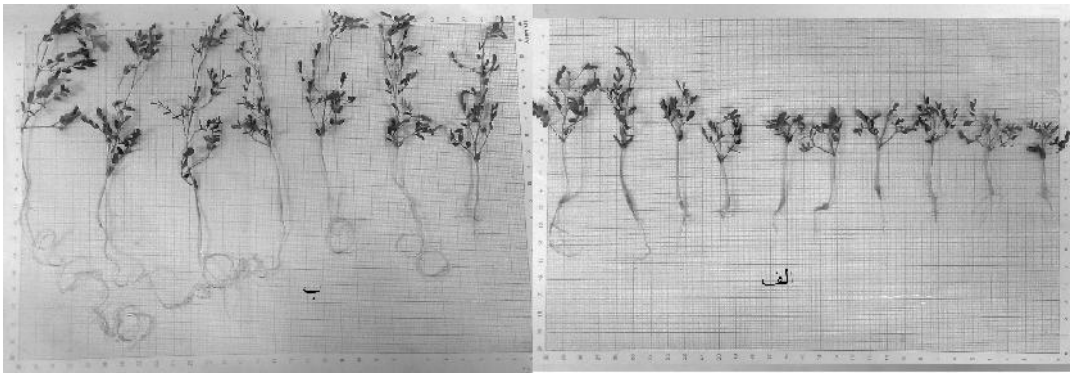
وزن تر و خشک ریشه در محیط WPM بیشترین و در محیط MS کمترین مقدار را داشت (شکل ۲). علت افزایش وزن خشک گیاهچه در اثر نارسایی عناصر پرمصرف گیاه، کاهش میزان قندهای احیا نشده، بر هم خوردن نسبت آنها با قندهای احیا شده و اختلال در متابولیسم کربوهیدرات است که باعث تجمع کربوهیدرات‌ها و افزایش وزن خشک می‌شود (۳۶،۳۵).



شکل ۳- مقایسه غلظت ترکیبات نیترات در محیط کشت‌های مورد مطالعه
Figure 3. Comparison of nitrate concentration of compounds in the studied culture media

در این پژوهش هم وزن تر هم وزن خشک زی‌توده کل گیاهچه در محیط WPM با ۲۴ و ۶ میلی‌گرم و در محیط MS با شش و یک میلی‌گرم به ترتیب بیشترین و کمترین میزان را داشتند. برای توجیه وزن تر زی‌توده کل گیاهچه می‌توان به مقایسه ترکیبات نیترات موجود در محیط کشت‌ها پرداخت. مطابق شکل ۳، مجموع ترکیبات نیترات به ترتیب از محیط کشت MS، L2، N6، B5، DKW و WPM کاهش یافته است. چون نیتروژن در سنتز برخی از آنزیم‌ها دخالت دارد لذا سطح نیتروژن یک اثر فوری در تقسیم سلولی و رشد گیاهان دارد و به نوعی فتوسنتز تحت تأثیر میزان نیتروژن در گیاه است (۴۱،۳۷). همچنین نیتروژن با تأثیر بر نقش فیزیولوژیک آب در گیاهان، رشد و توسعه گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۴۰). نیتروژن در گیاه متناسب با آبسیزیک اسید است و در تنظیم فعالیت روزنه‌های گیاه تأثیر دارد (۱۳). سطح مطلوب نیتروژن با کاهش سطح آبسیزیک اسید از دریچه روزنه محافظت می‌کند و باعث افزایش سرعت فتوسنتز و تولید بیشتر می‌شود. بنابراین نیتروژن در افزایش بازده مصرف آب و دسترسی گیاه به آب نقش مهم دارد (۴۱). از این‌رو پیش‌بینی می‌شد که چون محیط MS بیشترین میزان ترکیبات را دارد بیشترین وزن تر زی‌توده کل گیاهچه هم در این محیط کشت باشد. البته در پژوهشی بر روی آکاسیا ویکتوریا مشخص شده است که با کاهش غلظت نیتروژن در محیط کشت وزن تر زی‌توده کل گیاهچه افزایش یافت (۱۷).

به‌طور کلی اختلاف در پاسخ به محیط کشت‌های مختلف گونه آکاسیا ویکتوریا در این پژوهش متأثر از تفاوت در تنوع و مقادیر مختلف عناصر هر محیط کشت بود. قابل ذکر است که عوامل مختلف دیگری مانند اندازه و وزن بذر نیز می‌توانند روی صفات مورد مطالعه تأثیر بگذارند. از ابتدا برای یکسان‌سازی شرایط کشت، تمامی بذور هم اندازه و دارای وزن تقریباً یکسان انتخاب شدند. بعد از مقایسه مشخصه‌های رویشی نتیجه‌گیری شد که محیط کشت‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری روی مشخصه‌های رویشی آکاسیا ویکتوریا داشتند. شناسایی محیط کشت مناسب برای کشت درون شیشه‌ای از مقدمات فرآیندهای پیشرفته فن‌آوری زیستی گیاهان است. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، به‌طور کلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بهترین محیط کشت برای جوانه‌زنی و رشد بذر آکاسیا ویکتوریا دو محیط WPM و L2 هستند. اما علی رغم انتظارات که پیش‌بینی می‌شد در محیط کشت MS به عنوان محیط کشت کاربردی گیاهان، مشخصه‌های مورد مطالعه کمترین عملکرد را داشتند.



شکل ۴- گیاهچه حاصل از بذر در محیط کشت‌های MS (الف) و L2 (ب)
Figure 4. Seedlings from seeds in MS (a) and L2 (b)

منابع

1. Al-Sulaiman, M.A. 2010. Clonal propagation of *Ziziphus spina-christi* by shoot tip culture: I. Improved Inorganic and organic media constituents for in vitro shoot multiplication. Arid Land Agriculture Science, 2: 3-17.
2. Assareh, M.H. and H. Sardabi. 2005. Macropropagation and micropropagation of *Ziziphus spina-christi*. Brazilian Agricultural Research, 5: 459-465.
3. Bagheri, A., A. Sharifi and N. Moshtaghi. 2010. Applied plant tissue culture. 1sd edn, Mashhad University Jihad Press, Mashhad, Iran, 480 pp (In Persian).
4. Bagheri, H. and P. Azadi, R. Smith. 2002. Plant tissue culture (techniques and experiments). 1sd edn, Mashhad University Jihad Press, Mashhad, Iran, 154 pp (In Persian).
5. Beck, S. and R.W. Dunlop. 2001. Micropropagation of the acacia species-a review. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 37: 531-538.
6. Behnamian, M., M. Khosrowshahli and Gh. Noori-Ghanballani (Coleman, J., A. Currant and D. Owens,). 2007. Plant cell culture. 1sd edn, Tabriz University Press, Tabriz, Iran, 294 pp (In Persian).
7. Bolandi A.R., H. Hamidi and H.H. Rezagholy. 2016. Effects of culture media and growth regulators on propagation of rootstock GF677 in tissue culture conditions. The Journal of Plant Research (Biology of Iran), 29(1): 1-14 (In Persian).
8. De fossard, R.A. 1976. Tissue culture for plant propagation. 2sd edn, University of New England Printery, New South Wales, Australia, 704p.
9. Driver, J.A. and A.H. Kuniyuki. 1984. In vitro propagation of paradox walnut *Juglans hindsii*×*Juglans regia* rootstock. Horticultural Science, 19: 507-509.
10. Emtehani, M.H. 2003. Native acacias of Iran. 1sd edn, Yazd University Press, Yazd, Iran, 122 pp (In Persian).
11. Esna-Ashari, M. and M.R. Zokaei-Khosroshahi. 2013. Comprehensive guide to plant tissue culture. Bu-Ali Sina University press, 474 pp (In Persian).
12. Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158.
13. Garcia, M.C. and L. Lamattia. 2002. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. Plant Physiology, 128: 790-792.
14. George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. 1sd edn, Exegetics Ltd, UK, 709 pp.
15. Hatam, J. 2016. In Vitro Study of NPKS Nutrients Stress on *Acacia victoriae* Benth. Growth and Survival. M.Sc. Thesis of Forestry, Faculty of Natural Resources, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, 73 pp (In Persian).
16. Heidari, B. and H. Pakanite. 2012. Plant Biotechnology Genetic manipulation of plants. 1sd edn, Mashhad University Jihad Press, Mashhad, Iran, 440 pp (In Persian).
17. Hosseini-nasr, S.M., O.L. Gamborg and G.C. Philips. 2015. Plant cell, tissue and organ culture. Gamborg, O.L. and Philips, G.C., Ayeezh press, Tehran, 408 pp (In Persian).
18. Khoshkhuy, M. 2011. Plant Growth: Basics and Methods. Caster, D., Davis, F. and Hartman, H.T., Dhiraz University press, 408 pp (In Persian).
19. Mahdavi, A. and K. Khermandar. 2015. Assessment of the potential of *Acacia victoriae* seedlings in uptake of lead and zinc heavy metals. Iranian Journal of Forest, 7(2): 195-208 (In Persian).
20. Mahdavian, M., N. buzari, and H. Abdollahi. 2010. Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative mahlab rootstock (sl-64). Journal of seedling breeding and seed, 26-1(1): 15-26 (In Persian).
21. Malcolm, P.J., P. Holford, W.B. Mc-Glasson and S. Newman. 2003. Temperature and seed weight affect the germination of Peach rootstock seeds and the growth of root stock seedlings. Scientia Horticulture, 98: 247-256.
22. McKeand, S.E. and R.J. Weir. 1984. Tissue culture and forest productivity. Journal of Forest, 82: 212-218.
23. Mozaffarian, V. 2005. Trees and shrubs of Iran. 4sd edn, Farhang Moaser: Tehran, Iran, 1452 pp (In Persian).
24. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiolgia Plantarum, 15: 473-497.
25. Najafi-Tireh Shabankareh, K. 1995. Investigation of some ecological characteristics of acacia species. M.Sc. Thesis range management. Faculty of natural resources of Tehran University, 254 pp (In Persian).
26. Oyebanji, O.B., O. Nweke, O. Odebunmi, N.B. Galadima, M.S. Idris, U.N. Nodi, A.S. Afolabi and G.H. Ogbadu. 2009. Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. African Journal of Biotechnology, (20): 5395-5399.
27. Parvaz, A. 2016. Salinity Tolerance Measurement of *Acacia vicoriae* Benth. In Vitro Culture. M.Sc. thesis of Forestry, Faculty of Natural Resources, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, 73 pp (In Persian).

28. Panwar p, Bhardwaj SD .2005. Hand book of practical forestry. Agrobios (India) p.191.
29. Purohit. S.D. and A. Singhvi. 1998. Micropropagation of Achras sapota through enhanced axillary branching. Scientia Horticulturae, 76: 219-229.
30. Qingrong, S., L. Qingzhong and S. Hongyan. 2002. Effects of Culture Condititions on Shoot Regeneration from Leaves of Sour Jujube (*Zizyphus spinosus* Hu.). Journal of Fruit Science, 1: 007 pp.
31. Rehman H.U., M.I.S. Gill, W.S. Dhillon and S. Bedi. 2014. Micropropagation of Pathernakh (*Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai) pear using explants obtained from forced cuttings. International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, 2(2): 54-65.
32. Saleheh shushtari, M.H. 2003. Study on compatibility of three species of acacia in order to stabilize the sand dunes in Khuzestan province. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 11(4): 585-612 (In Persian).
33. Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany, 50(1): 199-204.
34. Shanjani P.S. 2003. Nitrogen effects on callus induction and plant regeneration of *Juniperus excelsa*. International Journal of Agriculture and Biology, 5: 419-422.
35. Tewari, R.K., P. Kumar and P.N. Sharma. 2007. Oxidative stress and antioxidant response in young leaves of mulberry plant grown under nitrogen, phosphorus or potassium deficiency. Journal of Integrative Plant Biology, 49: 313-322.
36. Tewari, R.K., P. Kumar and P.N. Sharma. 2010. Morphology and oxidative physiology of Sulphur-deficient mulberry plants. Environmental and Experimental Botany, 68: 301-308.
37. Tian, J., S.R. Guo and J. Sun. 2011. Effect of exogenous spermidine on nitrogen metabolism of cucumber seedling under high temperature stress. Chinese Journal of Ecology, 30(10): 2197-2202.
38. Turnbull, T.L., C.R. Warren and M.A. Adams. 2007. Novel mannose-sequestration technique reveals variation in subcellular orthophosphate pools do not explain the effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in Eucalyptus globulus seedlings. New Phytology, 176: 849-861.
39. Warren, C.R. 2011. How P affect photosynthesis and metabolite does profiles of *Eucalyptus globulus*? Tree Physiology, 31: 727-739.
40. Wu, W. and J. Zhao. 2010. Advances of plant's nitrogen assimilation and utilization. Chinese Agricultural Science Bulletin, 26(13): 75-78.
41. Xin, C., Y. Qing-wei, S. Jia-lin, X. Shuang, X. Fu-chun and C. Ya-jun. 2014. Research progress on nitrogen use and plant growth. Journal of Northeast Agricultural University (English Edition), 21(2): 68-74.
42. Zaidi, M.A., S. Khan, N. Jahan, A. Yousafzai and A. Mansoor. 2012. Micropropagation and conservation of three Juniperus species (Cupressaceae). Pakistan Journal of Botany, 44: 301-304.

Effect of Different Media on Some Morphological Characteristics of *Acacia victoria* Benth. *In V*itro Conditions

Mojtaba Imani Rastabi[1], Seyed Mohammad Hosseini Nasr[2], Jamshid Hatam[3] and Hamid Jalilvand[4]

1- PhD Student, Department of Forest Sciences and Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Associated Professor, Department of Forest Sciences and Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, (Corresponding author: Smhnasr@sanru.ac.ir)
3- Graduated M.Sc. Student, Department of Forest Sciences and Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
4- Professor, Department of Forest Sciences and Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
Received: October 19, 2017 Accepted: June 11, 2018

Abstract

In Iran, *Acacia victoriae* is not native to tree in Iran but it is used for important goals such as stabilize hills and the beautify landscape in the southern regions of the Iran, especially in the Khuzestan and Ilam provinces. Researches that include the development of native and non-native trees, which are compatible with the conditions of dusting areas in the western provinces of Iran, are very important. Undoubtedly, in vitro culture of trees is one of the fastest and most reliable approach to achieve mass production of trees. The aim of this study was to investigate the effect of different plant medium cultures on the morphological characteristics of Acacia victoria under in vitro conditions. Required seeds of *Acacia victoriae* were prepared from the center seed of koludeh institute of Amol. The present study was conducted in a completely randomized design with six treatments including MS, WPM, DKW, B5, L2 and N6 culture media and each treatment with 24 replications. The studied morphological characteristics, including germination percentage, shoot and root length, number of shoots, shoot and root fresh weight total dry and fresh weight of plantlets were measured for 42 days. After data collection, SAS software was used to analyze of variance and mean comparison and Excel software was used to draw all the charts. The analysis of variance results showed that there was a significant difference at 1% level between studied media, except for the shoot: root ratio. Mean comparisons showed that number of shoots, shoot dry weight, fresh and dry weight of the root, total dry weight and total fresh weight of plantlets had the highest values in WPM. Also shoot and root length and shoot fresh weight had the highest values in L2. Despite the expectation, results showed that MS medium culture had the poorest results in comparison with other media. It can be predicted that the WPM and L2 cultures will be better for seedling production from *Acacia victoria* seeds than in other culture media.

Keywords: Germination, *In Vitro*, Tissue culture, Woody plant, Morphology