فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۳، تابستان ۱۴۰۲ ص. ۷۰-۵۹

مقاله پژوهشی

مطالعه روش‌های مختلف کشت در ارس یا سرو کوهی (*Juniperus seravschanica* L.)

فرخنده رضانژاد[۱،۲*]، فرزانه فرزان[۱]، الهه زمانی[۱،۲]، فرزاد گنجعلیخانی حاکمی[۱،۲]

[۱] بخش زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، کرمان، ایران

[۲] پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): frezanejad@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۱

DOI: 10.30495/jdb.2023.1967001.1332 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.3.7.9

چکیده

جنس *Juniperus*، دومین جنس رایج مخروطیان است. کاهش دانه‌های زیست‌پذیر و زادآوری طبیعی، مهم‌ترین مشکل جنگل‌های ارس است. *Juniperus seravschanica* در حفاظت خاک بسیار مهم، همچنین، در برابر یخبندان و خشکی بسیار مقاوم است. در این مطالعه، تعداد دانه‌ها در مخروط، درصد پوکی و رویش دانه در جمعیت‌های گلوچار، سربیژن و دلفارد (استان کرمان)، روی کاغذ صافی، مخلوط پیت‌ماس + پرلیت و در باغچه مطالعه شد. همچنین میزان پرآوری و ریشه‌زایی شاخسارها در کشت گلدانی و کشت در شیشه، بررسی شد. میانگین تعداد دانه‌های مخروط در گلوچار، سربیژن و دلفارد بترتیب ۴/۸۶، ۳/۶۹ و ۳/۲۱ دانه در مخروط بود. میانگین تعداد دانه‌های پر در مخروط بترتیب برابر ۱/۱، ۰/۲۲ و ۰/۱ در گلوچار، سربیژن و دلفارد بود که بترتیب معادل ۲۲، ۵/۹۶ و ۳/۱ درصد (با درصد پوکی بترتیب ۷۸، ۹۴ و ۹۷) می‌باشد. دانه‌های بدون تیمار سرما و نیز دانه‌هایی که بدون سوراخ کردن اما تحت تیمار سرما به شرایط کشت منتقل شدند، هیچ رویشی نشان ندادند. شاخسارهای جوان ۲۰ سانتی‌متری، پس از تیمار سرما و غوطه‌وری سریع در IBA، تا چهار هفته، ظاهر طبیعی و سالم داشتند اما سرانجام خشک و ریشه ندادند. شاخسارهای ۱-۱/۵ سانتی‌متری انتهایی و کناری، روی هر دو محیط MS وWPM، باززایی و پرآوری شدند. بیشترین باززایی در محیط WPM (۴۰ درصد) و MS (۵۷ درصد) در ترکیب هورمونی BAP و NAA بترتیب در غلظت ۲ + ۳ و ۰/۲ + ۳ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. تیمار IBA، پس از ۲۴ هفته، ریشه ایجاد نکرد.

کلیدواژه‌ها: ارس، پوکی دانه، رویش بذر، پرآوری شاخسارها، ریشه‌زایی.

مقدمه

در دنیاي معاصر، منابع و ذخایر طبیعی از جمله پوشش گیاهی زیربناي حیات و اقتصاد هر کشور به شمار می‌رود و فراتر از این باید اذعان داشت که موجودیت بشر بنا به دلایل مختلف در گرو حفظ و استفاده صحیح از این منابع است. مخروطیان درختانی زیبا و همیشه سبز هستند که نقش مهمی در شکل‌دهی زیستگاه

دارند. از صفات ویژه و مشترک مخروطیان، طول عمر بالای آن‌ها است. بسیاری از گونه‌های مخروطیان می‌توانند بیش از ۱۰۰۰ سال سن داشته باشند. اگرچه گونه‌های بسیار طولانی عمر در تیره کاج و سرو (Cupressaceae) شایع‌تر هستند اما سایر خانواده‌ها نیز دارای گونه‌هایی هستند که می‌توانند بیش از ۱۰۰۰ سال رشد کنند. ظرفیت ماندگاری زیاد مخروطیان به مقاومت چوب آن‌ها، وجود کانال‌های رزین، ترکیبات فنلی نسبت داده شده است که در برابر پوسیدگی و عوامل زیستی و غیرزیستی متعدد مقاومت می‌نمایند [۳-۱].

جنس یا سرده ارس (*Juniperus* L.) یکی از پیچیده‌ترین جنس‌های مخروطیان که دارای حدود ۷۵ گونه است که در سه بخش (سکشن) قرار می‌گیرد: سکشن *Caryocedrus* دارای یک گونه، سکشن *Juniperus* دارای ۱۴ گونه و سکشن *Sabina* دارای ۶۰ گونه می‌باشد. مطالعات اخیر حجتی و همکاران (۲۰۱۸) با استفاده از آنالیز بیوشیمیایی و مولکولی نشان داده است که گیاهان متعلق به این جنس که در جنوب شرقی ایران (بافت، رابر و دهبکری)، پراکنش دارند *J. Seravschanica* هستند در حالیکه در مطالعات قبلی *J. polycarpus* نامیده شده بودند [۴].گونه‌های مختلف سرده (جنس) *Juniperus* مناسب برای جنگل‌کاری در مناطق خشک و نیمه خشک می‌باشند. گیاهان این سرده رشد کند و یک چرخه زندگی طولانی با بیش از ۲۰۰۰ سال عمر دارند و اغلب به عنوان فسیل زنده جنگل، نامیده می‌شوند. همچنین، این گیاهان در برابر شرایط محیطی سخت مانند دماهای بسیار پایین (یخزدگی) و بالا مقاوم هستند [۷-۵].

چوب و مخروط‌های سته‌مانند ارس، از تمدن‌های باستانی بعنوان یک درمان سنتی برای بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شده است. امروزه، جوشانده و روغن آن در صنایع غذایی، پزشکی، آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود [۱۰-۸]. مردم ایران در جنوب شرق کشور (جیرفت) از آن برای درمان روماتیسم، کهیر، گوش درد و همچنین حشره‌کش استفاده می‌کنند (اطلاعات محلی).

این جنس توانایی رشد در خاک‌های کم عمق و سنگی در محیط‌های سخت را دارد و بطور معمول روی خاک‌های شنی ماسه‌ای، آهکی و فقیر از نظر مواد مغذی یافت می‌شود، همچنین نسبت به خشکی و سرما مقاوم بوده و می‌تواند دماهای تا ۳۵- را تحمل نمایند. ارس نقش اکولوژیکی بسیار مهمی ایفا می‌کند و از خاک در برابر فرسایش محافظت می‌کند. بهرحال، مطالعات اخیر نشان می‌دهد که جمعیت گونه‌های مختلف این جنس از جمله ارس (در زبان محلی استان کرمان اورس، avorse) یا سرو کوهی (*Juniperus seravshanica*)، در حال کاهش است [۷، ۱۳-۱۱]. بنابراین جهت مدیریت احیا، حفاظت و برنامه‌هاي اصلاحی و توسعه‌اي، مطالعه روش‌های مختلف تکثیر و رویش و رشد دانه، به حفظ گونه و تلاش در جهت اهلی‌سازی آن کمک می‌کند.

مطالعات زادآوری و تکثیر ارس در رویشگاه‌های طبیعی نشان داده است که در اغلب رویشگاه‌ها میزان پراکنش گیاهان جوان کم می‌باشد و این گیاهان جوان، بیشتر در شکاف کوه یا سنگ‌ها دیده می‌شوند. عوامل متعددی برای این کاهش، ذکر شده است، از جمله تغییرات آب و هوایی، کیفیت پایین دانه، گرده‌افشانی ناکافی، تولید بذر کم، سرعت جوانه‌زنی کم، خواب دانه، کاهش زنده‌مانی رویان بطوری که بذرها می‌توانند تا دو سال عمر کنند [۷، ۱۴]. بهرحال، در منطقه گلوچار (ذخیره‌گاه ارس در شهرستان رابر، استان کرمان)، گیاهان کوچک پراکنش به نسبت خوبی دارند و در زیر پایه‌هاي ماده، ۴-۱ گیاه‌چه در حال رشد دیده می‌شود [۷].

مطالعات روی رویش دانه‌های ارس نشان داده است که قابلیت رویش بذرهای این گیاه در شرایط عادی پایین بوده و پیش تیمارهایی مانند خیساندن در اسید جیبرلیک، پراکسید هیدروژن و اسید سولفوریک، آب گرم و سایش، اثر قابل توجهی روی رویش دانه نداشتند و در این شرایط درصد رویش حداکثر به ۲۱ درصد می‌رسد (در تیمار آب گرم، پایین‌ترین درصد رویش در مقایسه با سایر تیمارها دیده شد). مطالعات نشان داده است که جمع‌آوری دانه‌ها در شهریور نسبت به مهر سبب رویش بالاتری می‌شود (حدود ۱۲ درصد). همچنین جمع‌آوری آن‌ها در شهریور (دو ماه قبل از خشک شدن آنها در زیستگاه) و قرار دادن آن‌ها در ۲۰-۵ درجه سانتیگراد برای رفع خفتگی، سپس له کردن با تراکتور یا غلتک، قرار دادن در آب به منظور جمع‌آوری دانه‌های سنگین و سپس قرار دادن در آب سرد به مدت دو هفته، رویش دانه‌های این گیاه را تحریک می‌کند [۱۵].

مشکل تکثیر غیرجنسی گونه‌های *Juniperus* از طریق ریشه‌زایی قلمه‌های رویشی، برای بسیاری از آن‌ها تاکنون حل نشده است که تکثیر در مقیاس بزرگ را غیرممکن می‌سازد. موفقیت در ریشه‌زایی شاخه‌های ارس اغلب پایین گزارش شده است. بهرحال، این نوع تکثیر نیز مورد توجه است. آهانی و همکاران (۲۰۱۳) قلمه‌های رویشی *J. polycarpus* را با استفاده از تیمارهای مختلف شاخه‌دار و ریشه‌دار نمودند [۱۵].

تنها ۲۴ درصد از قلمه‌های ارس آفریقایی (*J. procera*) که از گیاهان ۲-۱/۵ ساله بدست آمدند، ۳۲ هفته پس از کشت ریشه‌دار شدند. در این گونه، سن گیاه مادر، که از آن قلمه‌ها تهیه شدند، بعنوان مهم‌ترین عامل کنترل ریشه‌زایی قلمه‌ها معرفی شد [۱۶]. به طور کلی، تکثیر مرسوم درختان چوبی فرآیندی کند و دشوار است. بنابراین، ریزازدیادی ممکن است یک روش تولید مثل جایگزین برای این گروه از گیاهان باشد.

در حال حاضر، روش‌های در شیشه بطور معمول در زیست‌فناوری (بیوتکنولوژی) و تولید انبوه گیاهان استفاده می‌شوند. اولین کار در مورد تکثیر در شیشه ارس توسط جاوید و همکاران در سال ۱۹۸۰ انجام شد. از آن زمان، مطالعات کمی در مورد این موضوع منتشر شده است و تنها انتشارات محدودی، موفقیت این روش را گزارش کرده‌اند [۱۶].

آهانی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که پلی وینیل پیرولیدون (PVP) و ساکارز ۲ درصد در محیط کشت پایه MS یا WRC[1]، شاخسارهای جدید تولید کردند. در همه این مطالعات به کاهش درصد ریشه‌زایی اشاره شده است. با توجه به اهمیت گیاه ارس در حفاظت و احیای خاک، تعدیل آب و هوا و نیز استفاده مفید آن در صنایع دارویی، غذایی و ...، بررسی شرایط رویش و رشد دانه و شاخساره‌های آن به منظور تهیه نهال و گسترش کشت آن، در این مطالعه رویش دانه و نیز پرآوری شاخسارها در گلدان و کشت در شیشه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش سرو کوهی یا ارس (*Juniperus seravschanica*) مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

جمع‌آوری نمونه گیاهی

برای انجام مطالعه و بررسی تکثیر رویشی (از طریق قلمه) و تکثیر زایشی (از طریق بذر)، کشت درون شیشه[2] (کشت شاخساره)، نمونه‌ها، ماهی یک بار از سه ژنوتیپ متفاوت در سه منطقه از استان کرمان، شامل سربیژن با مختصات جغرافیایی طول (''۲۱/۷۵۶ '۲۹ °۵۷) و عرض (''۳۷/۰۴۵ '۵ °۲۹) و ارتفاع ۳۱۰۰، منطقه گدار امیرالمومنین دلفارد با مختصات طول (''۵۶/۱۴۱ '۳۴ °۵۷) و عرض (''۳۰/۷۰۸ '۳ °۲۹) و ارتفاع ۲۶۰۷ متر و منطقه حفاظت شده گلوچار (رابر) با مختصات طول (''۶/۸۹۰ '۶ °۵۷) و عرض (''۱۰/۵۵۵ '۱۹ °۲۹) و ارتفاع ۲۶۷۹ شهرستان رابر جمع آوری شد و برای بررسی به آزمایشگاه دانشگاه باهنر منتقل شد.

مطالعه تکثیر زایشی (تکثیر از طریق دانه یا بذر)

جمع‌آوری بذر: مخروط‌های ماده که ظاهری شبیه سته دارند از ژنوتیپ‌های مختلف در فصل پاییز، زمانی که مخروط‌ها رسیده بودند جمع‌آوری شد و در یخچال نگهداری شدند. در مرحله اول پس از جدا کردن دانه‌ها از مخروط، نمونه‌های پوک شناسایی و دور ریخته شدند. برای این هدف، ابتدا دانه‌ها را در آب قرار داده که بطور معمول اغلب دانه‌های پوک روی آب قرار می‌گرفتند. پس از این مرحله، متوجه شدیم هنوز هم تعدادی دانه پوک که در ته ظرف آب قرار گرفتند، وجود دارد. به این دلیل، نوک دانه‌های فرورفته در آب را سوراخ و دانه‌های پر انتخاب و شمارش شد. ۵۰ دانه پر برای هر تکرار و سه تکرار برای هر آزمایش استفاده شد. سپس به منظور ضد عفونی کردن و نیز از بین بردن موانع رویش، دانه‌ها به مدت ۱۲ ساعت زیر آب جاری قرار داده شدند. پس از این مرحله، دانه‌ها به دو گروه تقسیم شده که گروه اول حدود ۳۰-۱۰ روز در سرمای مرطوب یخچال نگهداری شدند و گروه دوم بطور مستقیم به شرایط کشت منتقل شدند. قابل ذکر است که برخی از دانه‌ها هم پس از ته‌نشین شدن در آب، بدون سوراخ کردن بطور مستقیم به شرایط کشت منتقل شدند.

شرایط کشت بذر: بستر کشت شامل کاغذ صافی، پرلیت و کشت در خاک معمولی (در باغچه در منطقه ساردوئیه) بود. در هر تیمار، ۲۵ بذر کشت شد و تعداد تکرارها ۴ عدد بود. نمونه‌ها

[1] White's root culture

[2] *in vitro*

به اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد روز و ۱۹ درجه سانتی‌گراد شب، به مدت ۱۲ + ۱۲ ساعت و رطوبت ۵۵ درصد قرار داده شدند و در نهایت درصد رویش بررسی و ثبت شد.

مطالعه کشت شاخسارها (قلمه‌ها) در گلدان (تکثیر رویشی)

۳۰ شاخساره یا قلمه از گیاهان نر ارس و ۳۰ نمونه نیز از گیاهان ماده از منطقه گلوچار جمع‌آوری شدند و به‌مدت حدود ۷-۳ روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در آماده‌سازی برای کشت، شاخه‌های انتهایی به طول ۲۰ سانتی‌متر بریده و برگ‌های سوزنی از ۵ سانتی‌متری بخش پایینی جدا شدند. دو شکاف روی بخش پایه‌ای هر قلمه ایجاد شد و شاخه ها به مدت ۲۴ ساعت در آب قرار گرفتند. به منظور تحریک ریشه‌زایی، شاخسارهای تهیه شده، حدود ۸ ثانیه، به غلظت‌های مختلف (۰، ۲، ۴، ۶ و۸ گرم در لیتر) ایندول بوتیریک اسید (IBA) آغشته شدند. براساس پژوهش‌های قبلی در منابع مختلف [۱۵، ۱۶] و تجربیات شخصی، سپس شاخسارهای (قلمه‌های) تیمار شده همراه با نمونه‌های شاهد، در مخلوط ماسه رودخانه‌ای نرم وپیت ماس به نسبت حجمی ۳ : ۱ در گلدان کشت شدند. در هر گلدان ۵ قلمه کاشته شد و برای هر تیمار سه گلدان در نظر گرفته شد.

مطالعه کشت شاخسارها در شرایط درون شیشه (تکثیر رویشی)

مشابه شرایط بالا شاخسارهای جوان از درختان منطقه حفاظت شده گلوچار جمع‌آوری و به آزمایشگاه کشت بافت منتقل و به‌مدت ۷-۳ روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سرشاخه‌های انتهایی با اندازه ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متری از قلمه‌ها جدا و بعنوان ریزنمونه، برای کشت در شیشه استفاده شدند. برای سترون‌سازی، نمونه‌ها ابتدا بوسیله آب و مواد شوینده شسته و چند ساعت زیر آب جاری قرار داده شدند. سپس در هیپوکلرید سدیم ۲۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و پس از آن در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه قرار داده شدند و در آخر با آب مقطر استریل سه مرتبه آب‌شویی انجام شد.

از دو محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) [۱۷] و محیط کشت گیاهان چوبی (WPM) [۱۸] بدون هورمون گیاهی برای کشت سرشاخه‌های انتهایی استفاده گردید (جدول ۱). پس از تهیه محیط کشت، ۸ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به آن افزوده شد. از پلی‌ونیل پیرولیدون (PVP) و زغال فعال (هر یک به میزان ۲ گرم در لیتر) برای جلوگیری از آلودگی و حذف ترکیبات فنلی استفاده شد. سپس pH محیط کشت روی ۵/۸ تنظیم و به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. برای کشت نمونه‌ها از شیشه‌هایی به ارتفاع ۱۰ و قطر ۶ سانتی‌متر استفاده و درون هر شیشه ۵ عدد ریزنمونه استقرار یافت و تعداد تکرارها ۶ عدد بود. واکشت نمونه‌ها هر ۳۰ روز یک بار انجام گرفت تا جوان‌سازی صورت گیرد و پس از واکشت چهارم، نمونه‌ها به محیط‌های ریشه‌زایی انتقال یافتند. نمونه‌ها پس از کشت در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶/۸ ساعت تاریکی/ روشنایی، دمای۴±۲۵ درجه سانتی‌گراد در دوره روشنایی و ۲±۲۰ درجه سانتی‌گراد در دوره تاریکی قرار گرفتند.

پس از استقرار شاخسارها در محیط بدون هورمون و رشد جزئی آن‌ها، به منظور پرآوری یا شاخسارزایی، همه کشت‌ها به محیط دارای هورمون منتقل شدند. در محیط WPM، تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده، بنزیل آمینوپورین (BAP) با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و نفتالین استیک اسید (NAA) با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر بودند. غلظت‌های استفاده شده در محیط کشت MS نیز BAP با غلظت‌های ۰/۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و NAA با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر بودند. هر ماه واکشت نمونه‌ها انجام و به منظور جوان‌سازی شاخسارها، بخش پایین آن‌ها قطع و سرشاخه‌های جوان‌تر به محیط کشت جدید منتقل می‌شدند. پس از ۴ ماه که شاخسارها بخوبی رشد کردند میزان شاخسارزایی یا پرآوری بررسی شد.

به منظور مطالعات ریشه‌زایی، شاخسارهای جوان به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. محیط‌های مورد استفاده، محیط کشت WPM، MS و ½MS بودند و هورمون استفاده شده برای ریشه‌زایی IBA در سه سطح (۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر) بود.

آنالیز آماری: برای بررسی داده‌های مربوط به درصد پوکی، درصد رویش (جوانه‌زنی) و پرآوری شاخساره‌ها در آزمایش فاکتوریل در پایه طرح به‌طور کامل تصادفی بررسی و نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد (SE) ارائه شدند. آنالیز داده‌ها به روش آنالیز واریانس دو طرفه (ANOVA) در نرم‌افزار

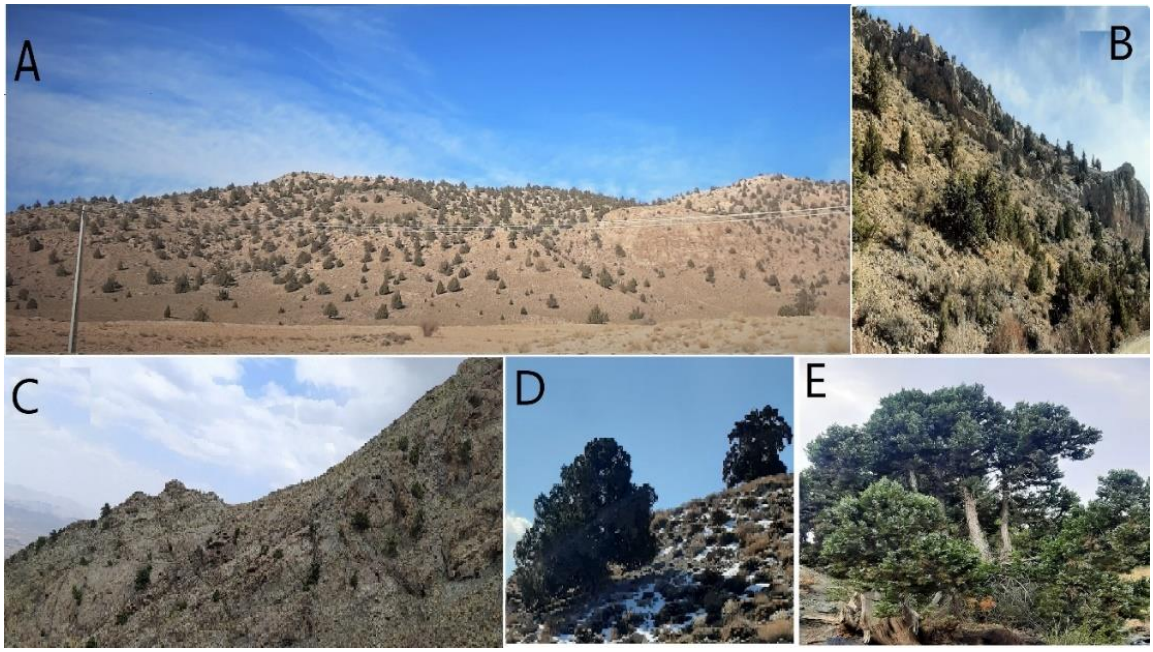
SPSS Ver. 26 توسط آزمون دانکن و در سطح معني‌دار ۹۵% مورد مقایسه قرار گرفتند و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel (۲۰۲۱) رسم شدند.

جدول ۱. دو محیط کشت استفاده شده (محیط کشت MS و WPM) و ترکیبات هر محیط بر حسب میلی‌گرم در لیتر

انواع ترکیبات	محیط کشت	
	MS	WPM
Na2EDTA.2H2O	37.25	3.724
Myo-inositol	100	100
Thiamin-HCL	1	1
Nicotinic acid	1	1
Pyridoxine-HCL	1	1
Glycine	2	2
Glutamine	-	2
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	22.3
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25
ZnSO4.4H2O	8.6	8.6
CuSO4.5H2O	0.025	0.025
KI	0.83	-
H3BO3	6.2	6.2
$CoCl_2.6H2O$	0.025	-
$FeSO_4.7H2O$	27.85	2.784
NH_4NO_3	1650	400
KNO_3	1900	-
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-	556
$CaCl_2.2H_2O$	440	96
K_2SO_4	-	990
$MgSO_4.7H_2O$	370	370
KH_2PO_4	170	170

نتایج

ارس یا اورس یا سرو کوهی (*Juniperus seravschanica*)، بصورت درختان و درختچه‌های همیشه سبز با برگ‌های فلسی در مناطق کوهستانی مختلف جنوب شرقی کشور از جمله در منطقه ساردوئیه، دلفارد، رابر، جبالبارز، خبر و کوهبنان استان کرمان پراکنش وسیعی دارد که در شکل ۱ نمونه‌های پراکنش یافته در منطقه حفاظت شده گلوچار، ساردوئیه، سربیژن و دلفارد دیده می‌شوند. همانطور که در شکل هم دیده می‌شود در بسترهای مختلفی قابلیت رشد دارد.



شکل ۱. ریخت، زیستگاه و پراکنش ارس (*Juniperus seravschanica*). A-E به‌ترتیب منطقه حفاظت شده گلوچار (A، B) منطقه ساردوئیه، سربیژن و دلفارد. شکل E پایه ماده است که تعداد زیادی مخروط روی آن تشکیل شده است که به رنگ متمایل به نقره‌ای دیده می‌شوند.

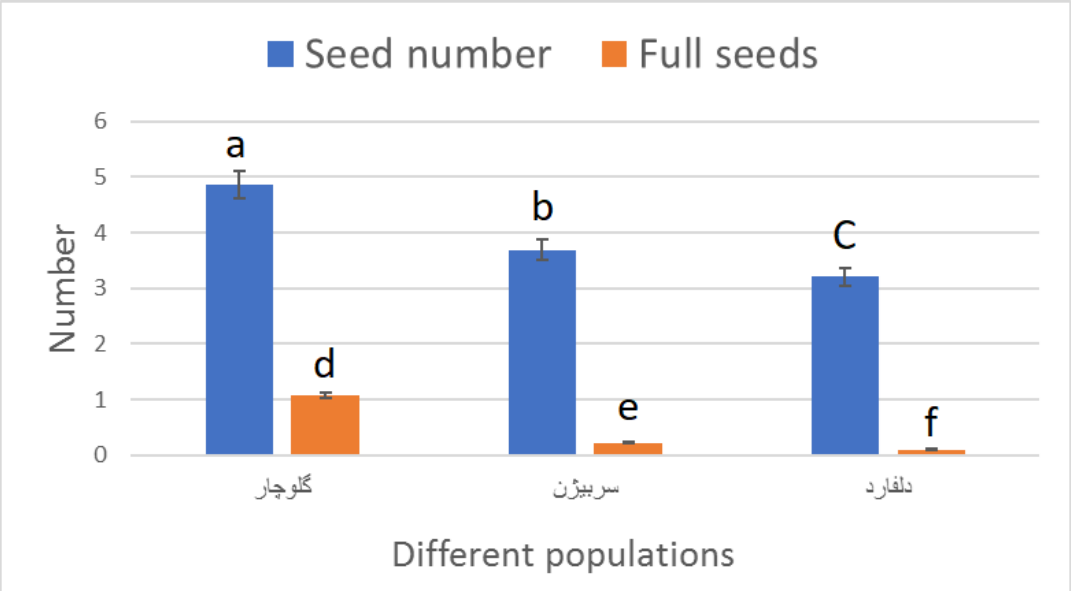
بررسی دانه‌ها در مخروط و پوکی آن‌ها

میانگین تعداد دانه‌ها بطور کلی و دانه‌های پر (full seeds) در هر مخروط و میزان پوکی جمعیت‌های مختلف از نظر آماری معنی‌دار بود. بالاترین میزان دانه در مخروط (٤/٨٦ دانه در مخروط) در گلوچار مشاهده شد. میانگین تعداد دانه‌های مخروط در سربیژن ٣/٦٩ و در دلفارد ٣/٢١ بود. براساس دانه‌های تشکیل شده در هر مخروط، تعداد دانه‌های پر به ترتیب برابر ١/١، ٠/٢٢ و ٠/١ در گلوچار، سربیژن و دلفارد بود که به‌ترتیب معادل ٢٢، ٥/٩٦ و ٣/١ درصد می‌باشد (شکل ٢). بنابراین، بذرهای منطقه حفاظت شده گلوچار نسبت به بذرهای منطقه سربیژن و دلفارد درصد پوکی کمتری داشتند. منظور از پوکی در این مطالعه این است که دانه‌های پوک، یا فاقد اندوسپرم و رویان بودند و یا این مجموعه در آن‌ها بسیار کوچک و رشد نیافته بود در حالی‌که در دانه‌های پر، این مجموعه (اندوسپرم و رویان احتمالی، زیرا با مشاهده مجموعه بافتی درون دانه، اندوسپرم دیده می‌شود و رویان آشکار نیست و در صورت وجود، درون بافت اندوسپرم قرار دارد) دیده می‌شد و حجم دانه را پر کرده بود.

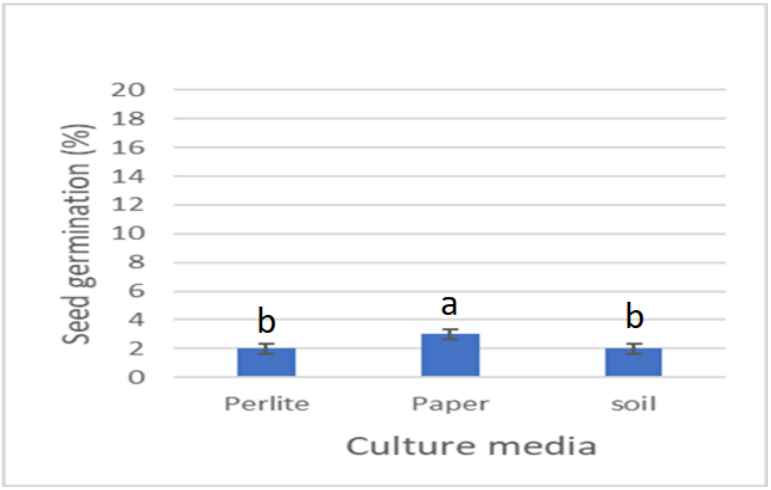
بهرحال، دانه‌هایی که بعنوان دانه پر در نظر گرفته شدند میزان اندوسپرم و رویان آن‌ها نسبت به دانه‌های پوک بزرگ‌تر بود اما دلالت بر این ندارد که این دانه‌ها زیست‌پذیر باشند. با توجه به تعداد و درصد دانه‌های پر (دارای اندوسپرم و رویان رشد یافته) (شکل ٢)، درصد پوکی بذرهای سربیژن و دلفارد بسیار بالا و بترتیب ٩٤/٠٤ و ٩٦/٩ بود و در اغلب موارد، در هر مخروط ماده، تقریبا همگی پوک بودند. در بذرهای منطقه گلوچار از میانگین حدود ٥ بذر در مخروط ماده، اغلب یک و گاهی دو بذر به ظاهر سالم بودند و درصد پوکی این منطقه پایین‌تر و ٧٨ درصد ثبت شد.

بررسی درصد رویش دانه (تکثیر زایشی)

همانطور که نتایج بالا نشان می‌دهد در منطقه سربیژن و دلفارد میزان دانه‌های پر کمتر از نیم درصد است؛ بنابراین، بررسی رویش دانه، روی دانه‌های جمع‌آوری شده از منطقه گلوچار انجام شد. پس از اعمال تیمار سرما که در بخش مواد و روش‌ها شرح داده شد، رویش دانه‌ها در بسترهای کشت مختلف (کاغذ صافی، پرلیت و کشت در خاک در منطقه ساردوئیه)، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعات نشان داد در هر سه بستر استفاده شده، درصد رویش بسیار پایین و بالاترین درصد (٣ درصد) در نمونه‌های کشت شده روی دستمال مرطوب در ظرف پتری مشاهده شد (شکل ٥-٣). قابل ذکر است گروه دوم دانه‌ها، یعنی دانه‌هایی که بطور مستقیم و بدون تیمار سرما به شرایط کشت منتقل شدند و نیز دانه‌هایی که پس از ته‌نشین در آب، بدون سوراخ کردن و تحت تیمار سرما به شرایط کشت منتقل شدند، هیچ رویشی نشان ندادند.

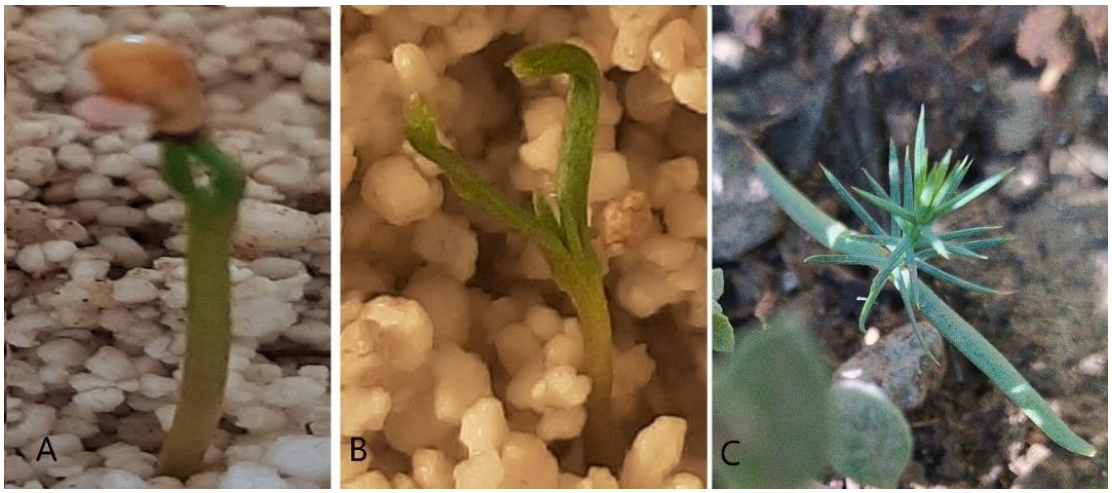


شکل ٢. میانگین میزان دانه بطور کلی و دانه‌های پر در هر مخروط ارس (*Juniperus seravschanica*) در سه منطقه گلوچار، سربیژن و دلفارد. داده‌ها شامل میانگین± خطای استاندارد می‌باشند، مقایسه میانگین داده‌ها تحت ANOVA و با آزمون دانکن در سطح پنج درصد، حروف متفاوت، نشانه معنی‌داری می‌باشد.



شکل ۳. درصد رویش دانه‌های ارس (*J. seravschanica*). در بسترهای کشت مختلف (پرلیت، کاغذ صافی، خاک باغچه). داده‌ها شامل میانگین± خطاي استاندارد مي‌باشند، مقایسه میانگین داده‌ها تحت ANOVA و با آزمون دانکن در سطح پنج درصد و حروف متفاوت، نشانه معنی‌داری می‌باشد.

شکل ٤. A و B. رویش دانه و نمو دانه‌رست ارس (*J. seravschanica*) کشت شده روی کاغذ صافی، همانطور که آشکار است میزان رویش پایین می‌باشد. A، ریشه‌چه از میان بافت اندوسپرم در حال بیرون آمدن است (محل خروج ریشه‌چه سوراخ شده است). B، دانه‌رست دارای برگ‌های لپه‌ای.



شکل۵. A–C. رویش دانه و نمو دانه رست ارس (*J. seravschanica*). A و B، کشت شده در پرلیت، در شکل A، برگ های لپه‌ای در حال خروج از پوسته دانه هستند و در B، علاوه بر برگ‌های لپه‌ای، برگ‌های بعدی (که بطور معمول سوزنی هستند) تشکیل شده‌اند که در میان برگ‌های لپه‌ای قابل مشاهده هستند. C. گیاهک رویش یافته در باغچه، برگ‌های لپه‌ای و برگ‌های سوزنی (فراهم سه‌تایی) دیده می‌شوند.

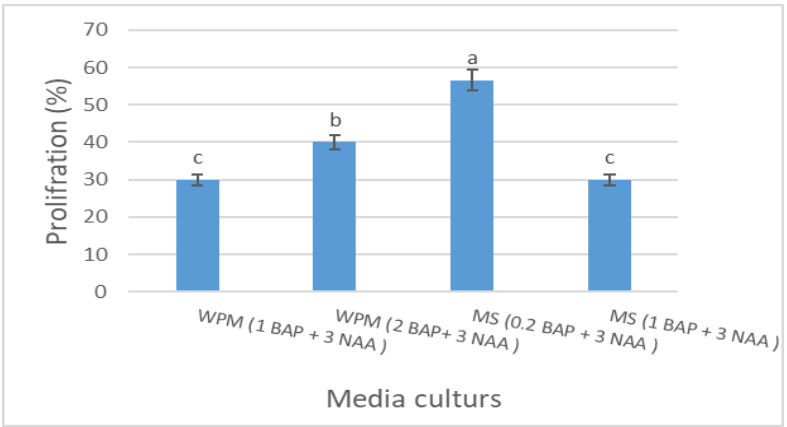
بررسی رشد شاخسارها یا قلمه‌ها در کشت گلدانی (تکثیر رویشی)

شاخساره‌ها یا قلمه‌های ۲۰ سانتی‌متری جوان گیاهان نر و ماده پس از تیمار سرما و غوطه‌وری سریع در غلظت‌های مختلف (۰، ۲، ٤، ٦ و۸ گرم درلیتر) ایندول بوتیریک اسید (IBA) در مخلوط ماسه رودخانه‌ای نرم و پیت ماس کشت شدند. در همه تیمارهای استفاده شده، قلمه‌های کشت شده تا هفته چهارم، ظاهری عادی و سالم داشتند و پس از آن آثار خشکیدگی در آن‌ها ظاهر شد. خشک شدن آن‌ها با از دست دادن کلروفیل و زرد شدن بافت‌ها همراه نبود و شاخسارهای سبز بتدریج به سمت خشک شدن رفتند. در نهایت در هفته پنجم و یا ششم کشت، قلمه‌ها به طور کامل خشک و هیچ ریشه‌ای تولید نکردند.

بررسی کشت شاخسارها در شرایط درون شیشه (تکثیر رویشی)

شاخسارهای جوان از منطقه گلوچار جمع‌آوری شدند و به‌مدت حدود ۷-۳ روز در دمای ٤ درجه سانتیگراد تحت تیمار سرما قرار گرفتند. سرشاخه‌های انتهایی ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متری این شاخسارها پس از سترون‌سازی، در دو محیط کشت MS و WPM بدون هورمون گیاهی کشت شدند. نتایج نشان داد که در هر دو محیط WPM و MS استقرار ریزنمونه‌ها بخوبی انجام شد و پس از دو ماه، طول آن‌ها به ۲ سانتی‌متر رسید. پس از استقرار و استفاده از تنظیم کننده‌های رشد، ریزنمونه‌ها پرآوری شده و انشعابات جدید متعددی تشکیل دادند. بالاترین درصد (۴۰ درصد) پرآوری در محیط WPM، در تیمار همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. در محیط کشت MS، نیز بالاترین درصد پرآوری (۵۷ درصد) در محیط همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد (شکل‌های ۶ و ۷). انتقال شاخسارهای پرآوری شده به محیط ریشه‌زایی و استفاده از هورمون IBA، پس از چهار ماه هیچ ریشه‌ای ایجاد نکردند و سرشاخه‌ها زرد شدند.

شکل ٦. A-C. استقرار، رشد و پرآوری شاخسارهای انتهایی ارس (*J. seravschanica*) در محیط کشت MS. A. استقرار شاخسارها در محیط بدون هورومون دو ماه پس از کشت و تشکیل شاخسارهای ۲ سانتی‌متری، B. انتقال شاخسارها به محیط دارای هورمون ($BAP+NAA, 0.2+3\ mgl^{-1}$) پس از دو ماه، پرآوری شاخسارها بخوبی آشکار است C. شاخسارهای ۴ ماهه در محیط واجد هورمون، رشد و پرآوری شاخسارها بخوبی آشکار است.



شکل ۷. مقایسه پرآوری شاخسارهای انتهایی در ارس (*J. seravschanica*) در محیط کشت WPM و MS در غلظت‌های هورمونی مختلف. داده‌ها شامل میانگین ± خطاي استاندارد مي‌باشند، مقایسه میانگین داده ها تحت ANOVA و با آزمون دانکن در سطح پنج درصد و حروف متفاوت، نشانه معنی‌داری می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

ارس‌های پراکنش یافته در استان کرمان، بطور معمول در خاک‌ها و صخره‌های آهکی و مناطق کوهستانی و اغلب در ارتفاعات بیش از ۲۵۰۰ متر از سطح دریا پراکنش دارند و حتی در برخی مناطق از جمله در کوه‌های بحرآسمان در ارتفاع ۳۸۰۰ متری (در نزدیک قله نشانه بحرآسمان) نیز پراکنش دارند. در برخی مناطق صخره‌ای و کوهستانی، روی صخره‌ها و کوه‌ها، تنها پوشش گیاهی است. در برخی مناطق سنگی و کوهستانی ساردوئیه که شرایط رویش بسیار سخت است، تنها درختان ارس خودنمایی می‌نمایند. جوانشیر گزارش کرده است که در بین مخروطیان، ژونی‌پرها، مقاوم‌ترین گیاهان نسبت به شرایط بایر هستند [۱۹]. رشد کند این گروه گیاهان و وجود بافت‌های لیگنینی، سلول‌های با ذخایر فنلی و نیز مجاری رزین، نقش مهمی در مقاومت گیاه به شرایط سخت از جمله یخبندان‌های طولانی و تحمل دماهای تا ۳۵- درجه سانتیگراد دارد [۷]. بررسی تعداد دانه‌ها در مخروط و میزان پوکی آن‌ها در سه جمعیت مورد مطالعه شامل منطقه حفاظت شده گلوچار، سربیژن و دلفارد نشان داد که میانگین تعداد دانه‌های هر مخروط، تعداد دانه‌های پر در مخروط و نیز میزان پوکی جمعیت‌های مختلف، متفاوت بود. بالاترین تعداد دانه در مخروط (٤/٨٦ دانه در مخروط) در گلوچار مشاهده شد و در سربیژن و دلفارد بترتیب ۳/٦۹ و ۳/۲۱ بود. تعداد دانه‌های پر به ترتیب برابر ۱/۱، ۰/۲۲ و ۰/۱ در گلوچار، سربیژن و دلفارد بود که بترتیب معادل ۲۲، ٥/٩٦ و ۳/۱ درصد می‌باشد. بنابراین، درصد پوکی در این سه منطقه بترتیب ۷۸، ٩٤/٠٤ و ٩٦/٩ بود که کمترین میزان پوکی در منطقه حفاظت شده گلوچار مشاهده می‌شود. در گلوچار، بعلت اینکه منطقه حفاظت شده است در نتیجه گیاهک‌هایی که قابلیت رشد و نمو پیدا می‌کنند توسط دام مورد چرا قرار نمی‌گیرند و ضمن نمونه‌برداری در زیر برخی درختان، این دانه‌رست‌ها بیشتر رویش داشتند (در زیر برخی درختان هم هیچ دانه‌رستی دیده نمی‌شد و در زیر برخی دیگر ٦- ۳ دانه‌رست دیده می‌شد) و مخروط‌ها و دانه‌ها از این درختان جمع‌آوری شد؛ به احتمال درختانی که زیر آن‌ها، دانه‌رست‌های بیشتری دیده می‌شد، دانه‌های زایای بیشتری تولید می‌کنند و به این دلیل در این منطقه، تعداد دانه‌های پوک کمتر است. بنابراین، بنظر می‌رسد میزان پوکی درختان مختلف، متفاوت باشد. دانه‌های پوک، یا فاقد اندوسپرم و رویان بودند و یا این مجموعه در آن‌ها بسیار کوچک و رشد نیافته بود. بهرحال، دانه‌هایی که بعنوان دانه پر در نظر گرفته شدند میزان اندوسپرم و رویان آن‌ها نسبت به دانه‌های پوک بزرگ‌تر بود اما دلالت بر این ندارد که این دانه‌ها زیست‌پذیر باشند و این موضوع در نتایج مشخص شد که همه دانه‌های انتخاب شده بعنوان دانه‌های پر، قابلیت رویش نداشتند و درصد رویش حدود ٥-۲ درصد بود. گزارش‌های متعددی درباره پوکی گونه‌های مختلف *Juniperus* وجود دارد که یک مشکل جدی و یک وضعیت بسیار نگران کننده است. پوکی دانه‌ها، باعث کاهش جوانه‌زنی بذر و در نتیجه سبب کاهش تولید گیاهان جدید می‌شود. گزارش شده است در *J. thulifera*، بیش از ۶۰ درصد دانه‌ها خالی و پوک هستند. در *J. polycarpos*، *J. communis*، *J. sabina* و *J. thurifera*، تعداد بسیار کمی از دانه‌ها زنده و بنابراین اغلب پوک هستند و یا بخش زیادی از دانه‌های تشکیل شده از نظر تشریحی و نموی رشد نکرده‌اند و حدود ۹۳ درصد پوک بودند [۲۰، ۱۶]. عوامل متعددی برای افزایش پوکی ذکر شده است. از جمله فقدان گرده‌افشانی، تغییرات آب و هوایی، خواب عمیق فیزیولوژیکی بذرها که به سختی شکسته می شود. تلاش های دانشمندان برای بهبود کارایی جوانه‌زنی بذرهای گونه‌های مختلف با استفاده از روش‌های مختلف خیلی موفقیت‌آمیز نبوده است. مطالعات آهانی و همکاران (۲۰۱۳) نشان داده است که جمع‌آوری دانه‌ها در شهریور نسبت به مهر سبب رویش بالاتری می‌شود (حدود ۱۲ درصد) [۱۵]. Hazubska-Przybył (۲۰۱۹) گزارش کرد که استفاده از دانه‌های نارس ارس، نقشی در موفقیت رویش دانه‌ها ندارد. همچنین، پس از تیمار دانه‌های *J. cedrus* با نیتریک اسید غلیظ یا سولفوریک اسید، تیمار سرما، هیچ نتیجه بهتری در جوانه‌زنی بدست نیامد. تلاش برای تحریک جوانه‌زنی در *J. oxycedrus*، با استفاده از بذرهای کامل (intact seeds) و دانه‌هایی که پوشش آنها جدا شده بود نیز بی‌اثر بود و مشکل را حل نکرد. بهرحال، گزارش درباره جوانه‌زنی بهتر بذر *J. procera*، با استفاده از تیمار سرما و مرطوب و نیز استفاده از نور قرمز/قرمز دور، مثبت گزارش شده است. همچنین در *J. polycarpus*، استفاده از تیمار دمایی ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ هفته و ۱درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۲ هفته مفید گزارش

شده است [۱۶]. در این گونه، از تست تترازولیوم برای بررسی زیست‌پذیری دانه استفاده شده است که با توجه به پوسته بسیار سخت دانه، اثر درست این تست بعید به نظر می‌رسد. به هر حال، همانطور که در شرح بالا گزارش شده است نتایج در مورد رویش دانه این سرده متفاوت و گاهی ضد و نقیض است. به احتمال، ژنوتیپ گونه‌ای هم نقش موثری داشته باشد. بازدیدهای متعدد نویسندگان و نیز گزارشات مردم محلی نشان می‌دهد که رویش گونه *J. seravschanica*، در مناطق پراکنش بسیار کم و دلیل آن را پوسته سخت دانه ذکر می‌کنند. مطابق نظر مردم محلی، دانه اگر توسط حیوانات وحشی بویژه خوک خورده شود و پس از دفع آن در فضولات حیوان، قابلیت رویش دارد. بررسی رشد شاخسارها یا قلمه‌ها در کشت گلدانی نشان داد که شاخسارها تا هفته چهارم ظاهری عادی و سالم داشتند و پس از آن آثار خشکیدگی در آن‌ها ظاهر شد و سرانجام در هفته پنجم و یا ششم کشت، قلمه‌ها به طور کامل خشک و هیچ ریشه‌ای تولید نکردند. اثر غلظت‌های مختلف IBA هم اثری بر رشد و فعالیت ریشه‌زایی نشان نداد. همچنین، بررسی کشت شاخسارها در شرایط درون شیشه (*in vitro*) در دو محیط کشت WPM و MS در جمعیت‌های مختلف نشان داد که در هر دو محیط بدون هورمون، استقرار قلمه‌ها بخوبی انجام شد و پس از دو ماه، طول آنها به ۲ سانتی‌متر رسید. پس از استقرار و استفاده از تنظیم کننده‌های رشد، ریزنمونه‌ها پرآوری شده و انشعابات جدید متعددی تشکیل دادند. بالاترین درصد پرآوری در محیط MS و WPM، دو ماه پس از کشت بترتیب برابر ۵۷ و ۴۰ درصد بود. انتقال شاخسارهای پرآوری شده به محیط ریشه‌زایی و استفاده از هورمون IBA، پس از دو ماه ریشه‌ای ایجاد نکرد. گزارش شده است که مشکل تکثیر غیرجنسی گونه‌های *Juniperus* از طریق ریشه‌زایی قلمه‌های رویشی، برای بسیاری از آنها تا کنون حل نشده است و این مشکل سبب شده است که امکان تکثیر در مقیاس بزرگ عملی نباشد. موفقیت در ریشه‌زایی شاخه‌های ارس اغلب پایین گزارش شده است. بهرحال، این نوع تکثیر نیز مورد توجه است. آهانی و همکاران (۲۰۱۳) قلمه‌های رویشی *J. polycarpus*، را با استفاده از تیمارهای مختلف شاخه‌دار و ریشه‌دار نمودند [۱۵]. فقط ۲۴ درصد از قلمه‌های ارس آفریقایی (*J. procera*)، که از گیاهان ۲-۱/۵ ساله بدست آمدند ۳۲ هفته پس از کشت ریشه‌دار شدند. در این گونه، سن گیاه مادر که از آن قلمه‌ها تهیه شدند بعنوان مهم‌ترین عامل کنترل ریشه‌زایی قلمه‌ها معرفی شد [۱۶].

در مطالعه مورد نظر، شاخسارهای ۱۶ هفته‌ای هنوز ریشه تشکیل نداده‌اند که می‌تواند بدلیل رشد کند آنها و نیاز به زمان بیشتر برای ریشه‌زایی داشته باشد (مطابق گزارش قبل به ۱۶ هفته دیگر نیاز هست). مطالعات منتشر شده درباره ریزازدیادی سرده *Juniperus*، کم می‌باشد و در همه این مطالعات به کاهش باززایی و ریشه‌زایی اشاره شده است. بهترین ریزنمونه‌های سرشاخه‌های انتهایی، شاخه‌های انتهایی یا جانبی جوان گزارش شده‌اند که بر حسب گونه میزان باززایی و پرآوری متفاوت است. در *J. oxycedrus*، میزان ۷ تا ۱۰ درصد ریشه‌زایی گزارش شده است [۱۶]. آهانی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که پلی وینیل پیرولیدون (PVP) و ساکارز ۲ درصد در محیط کشت پایه MS یا WRC، شاخسارهای جدید تولید کردند [۱۵]. در این مطالعات به کاهش درصد ریشه‌زایی اشاره شده است و ریشه‌زایی مخروطیان، از طریق کشت بافت فرآیندی بسیار دشوار، آهسته و ناکارآمد گزارش شده است. NAA، IBA و IAA اکسین‌هایی هستند که اغلب برای تحریک ریشه‌زایی موفق در مخروطیان در شرایط in vitro و ex vitro استفاده می‌شوند. بعلاوه، سن ریزنمونه‌ها، نوع و ترکیب محیط کشت و ژنوتیپ هم بعنوان عوامل موثر ذکر شده‌اند. در *J. excelsa*، *J. phoenicea*، *J. navicularis* و *J. thurifera*، نرخ ریشه‌زایی ۶۰-۱۸ درصد گزارش شده است [۱۶]. مطالعات اخیر آهانی و همکاران نشان داده است تلاش برای ریشه‌زایی شاخسارهای *J. polycarpos* رضایت بخش نبوده است. به نظر می رسد گونه گیاهی نقش مهمی در ریشه‌زایی دارد و این گونه، گونه‌ای دشوار برای تحریک ریشه‌زایی در شرایط آزمایشگاهی در حضور IBA یا NAA باشد [۱۶]. قابل ذکر است که *J. seravschanica*، در مطالعه حاضر، در رده‌بندی‌های قبل بعنوان *J. polycarpos* نام‌گذاری شده است [۷]. بنابراین، به احتمال، گونه مورد مطالعه توسط آهانی و همکاران (جمع‌آوری شده در خراسان)، با گونه مورد مطالعه در تحقیق حاضر، مشابه و یکی هستند که نتایج کشت دانه و قلمه‌ها هم مشابه می‌باشد. بهرحال، این فرضیه، نیاز به مطالعات رده‌بندی بیشتری دارد. مقایسه نتایج

در کشت in vitro و کشت در مخلوط پیت+ پرلیت+ورمیکولیت در *J. cedrus* و *J. exelsa* نشان داده است که تحت شرایط گلدانی (در مقایسه با کشت in vitro)، اگرچه درصد ریشه‌زایی پایین‌تر است اما این بستر بدلیل اثر مثبت آن بر بقای بعدی گیاهان در نهالستان، محیط بهتری در نظر گرفته می‌شود. شاخسارهای ایجاد شده در این بستر، سریع‌تر رشد کردند و در مقایسه با شاخه‌های ریشه‌دار در شرایط در شیشه، کمتر در معرض اختلالات مختلف در طول سازگاری قرار گرفتند و زودتر اتوتروف شدند. این ویژگی، از نظر اقتصادی نیز مطلوب است، زیرا امکان حذف مشکلات سازگاری را فراهم می‌کند و به طور قابل توجهی هزینه‌های تولید گیاهان ارس را کاهش می دهد [۱۶]. بعنوان یک فرضیه جدید، احتمال می‌دهیم پلوئیدی هم در کاهش رویش دانه و رشد کند شاخسارها و کاهش ریشه‌زایی گونه مورد مطالعه دخیل است. همانطور که در بالا ذکر شد این گونه در رده‌بندی قبلی، *J. polycarpus* معرفی شده و در مطالعات گونه‌های مختلف ژونی‌پروس، این گونه بعنوان سخت‌ترین گونه در مطالعات رویش و رشد گزارش شده است. از طرفی، هیچ مطالعه‌ای رویش میزان پوکی و درصد رویش *J. seravschanica* وجود ندارد. ضمن مطالعه رویان‌زایی گونه مورد مطالعه، شاهد سلول‌های اندوسپرم و رویان با هسته‌های بسیار درشت با رنگ‌پذیری بسیار بالا بودیم (داده‌ها نشان داده نشده است) که به احتمال، این هسته‌های درشت، درجاتی از پلوئیدی را نشان می‌دهند که نیاز به مطالعه بیشتر دارد. مطالعات فلوسایتومتری در مخروطیان نشان داده است که با وجودی که اندوسپرم بازدانگان هاپلوئید معرفی شده است اما سطوح پلوئیدی به وضعیت سیستماتیک تاکزون‌های گیاهی بستگی دارد. در *Abies*، *Cedrus* و *Pinus*، اندوسپرم هاپلوئید گزارش شده است اما در تیره کوپرساسه شمال *Cupresus arizonica*، *C. oxycedrus* و *Thuja orientalis*، یک مخلوط از هسته‌های هاپلوئید-دیپلوئید مشاهده شده است در صورتی‌که در *C. atlantica* و *C. sempervirens*، اندوسپرم‌ها ۶ سطح پلوئیدی نشان می‌دهند که شامل ۶-۱ پلوئیدی هستند [۲۱]. بهرحال هیچ گزارش روی رویان وجود ندارد.

سپاسگزاری

از حمایت‌های مالی دانشگاه شهید باهنر کرمان و پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

[1] Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, Bucci SJ, Feild TS, Gleason SM, Hacke UG, Jacobsen AL. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. Nature. 2012 Nov;491(7426):752-5.

[2] Kshatriya K, Whitehill JG, Madilao L, Henderson H, Kermode A, Kolotelo D, Bohlmann J. Histology of resin vesicles and oleoresin terpene composition of conifer seeds. Can. J. For. Res. 2018;48(9):1073-84.

[3] Della Rocca G, Papini A, Posarelli I, Barberini S, Tani C, Danti R, Moricca S. Ultrastructure of terpene and polyphenol synthesis events in the bark of *Cupressus sempervirens* after Seiridium cardinale infection. Front Microbiol.: 1788.

[4] Hojjati FA, Kazempour-Osaloo S, Adams RP, Assadi MO. Molecular phylogeny of *Juniperus* in Iran with special reference to the *J. excelsa* complex, focusing on *J. seravschanica*. Phytotaxa. 2018;375(2):135-57.

[5] Adams RP. Junipers of the world: the genus *Juniperus*. Trafford Publishing; 2014.

[6] Piovesan G, Biondi F. On tree longevity. New Phytol. 2021 Aug; 231 (4):1318-37.

[7] Rezanejad F, Bakhteyari F, Rahini H. Morphological and anatomical studies of vegetative and reproductive structures in Ors (*Juniperus seravshanica*). (JPR) (IJBio). 2022 Jun 15 (Articles in Press).

[8] Yaglioglu AS, Eser F. Screening of some *Juniperus* extracts for the phenolic compounds and their antiproliferative activities. S. Afr. J. Bot. 2017 Nov 1; 113:29-33.

[9] Raina R, Verma PK, Peshin R, Kour H. Potential of *Juniperus communis* L as a nutraceutical in human and veterinary medicine. Heliyon. 2019 Aug 1;5(8):e02376.

[10] Gonçalves AC, Flores-Félix JD, Coutinho P, Alves G, Silva LR. Zimbro (*Juniperus communis* L.) as a Promising Source of Bioactive Compounds and Biomedical Activities: A Review on Recent Trends. Int. J. Mol. Sci. 2022 Mar 16;23(6):3197.

[11] Pirani A, Moazzeni H, Mirinejad S, Naghibi F, Mosaddegh M. Ethnobotany of *Juniperus excelsa* M. Bieb. (Cupressaceae) in Iran. Ethnobot. Res. Appl. 2011 Dec 10; 9: 335-41.

[12] Thomas PA, El- Barghathi M, Polwart A. Biological flora of the British Isles: *Juniperus communis* L. J. Ecol. 2007 Nov;95(6):1404-40.
[13] Khater N, Benbouza H. Preservation of *Juniperus thurifera* L.: a rare endangered species in Algeria through in vitro regeneration. J. For. Res. 2019 Feb;30(1):77-86.
[14] Al-Ramamneh EA, Daradkeh N, Rababah T, Pacurar D, Al-Qudah M. Effects of explant, media and growth regulators on 'in vitro' regeneration and antioxidant activity of '*Juniperus*' phoenicea. Aust. J. Crop Sci. 2017 Jul 1;11(7):828-37.
[15] Ahani H, Jalilvand H, Hosseini Nasr SM, Soltani Kouhbanani H, Ghazi MR, Mohammadzadeh H. Reproduction of juniper (*Juniperus polycarpos*) in Khorasan Razavi, Iran. For. Sci. Pract. 2013 Sep;15(3):231-7.
[16] Hazubska-Przybył T. Propagation of Juniper species by plant tissue culture: A mini-review. Forests. 2019 Nov 14;10(11):1028.
[17] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962 Jul;15(3): 473-97.
[18] Lloyd G, McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture. Comb. proc. Int. Plant Propag. 1980; 30: 421-7.
[19] Javanshir, K. Research about seed production and method of growth in juniper trees in order to reclamation of juniper forests. Publication of Research Institute of Forests and Rangelands (RIFR), Tehran, Iran 1981: 35.
[20] Al-Refai A, El-Kateb H, Stimm B, Mosandl R. Quality and germination of seeds of *Juniperus excelsa* M. Bieb. in the Kalamoun mountains, Syria (in German). Forstl Forsch.ber Munchen. 2003; 192: 164-75.
[21] Pichot C, Maataoui ME. Flow cytometric evidence for multiple ploidy levels in the endosperm of some gymnosperm species. Theor. Appl. Genet. 1997 Jun;94(6):865-70.

The studies of different culture methods in ors (*Juniperus seravshanica*)

Rezanejad F. [1, 2*], Farzan F.[1], Zamani E.[1, 2], Ganjalikhani Hakemi F. [1, 2]

[1] Department of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
[2] Research and Technology Institute of Plant Production, Kerman, Iran.

* (Corresponding author): frezanejad@uk.ac.ir

DOI: 10.30495/jdb.2023.1967001.1332 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.3.7.9

Received: September 2022 Accepted: December.2022

Abstract

Juniperus is the second most prevalent group of conifers on Earth. The reduction in viable seeds and natural regeneration is an important problem of *Juniperus*. *Juniperus seravschanica* is important in soil protection and is very resistant to frost and drought too. In this study, seed number in cone, seed emptiness and germination were studied on filter paper, peatmoss+ perlite mixture and in field in Galuchar, sarbijan and Dalfard (Kerman province) in populations. In addition, shoot proliferation and rooting in pot and in vitro culture was assayed. The average number of cone seeds in Glochar, Serbijan and Delfard was 4.86, 3.69 and 3.21, respectively. The average number of full seeds per cone was 1.1, 0.22 and 0.1 (22, 5.96 and 3.1%, respectively) in Glochar, Sarbijan and Dalfard, showing 78, 94 and 97% emptiness, respectively. In all media, seed germination percentage was very low (2-5%). No germination was observed in seeds without cold treatment as well as without scarification (making a hole in seed coat). 20 cm young shoots, after cold treatment and rapid immersion in IBA, grew as normal until 4 week and finally dried after 5-6 weeks. The young shoots (1-1.5 cm) cultured in MS and WPM media proliferated and regenerated new branches in WPM (40% regeneration) and MS (57%) media in combination of BAP and NAA (2+3 and 0.2+3 mgl^{-1}, respectively for WPM and MS). No rooting was observed using IBA after 24 weeks.

Keywords: *Juniperus seravschanica*, Seed emptiness, seed germination, shoot regeneration, rooting.