Cell and Tissue Journal 14(3) (2023) 203 – 216

Journal of Cell and Tissue
http://jct.araku.ac.ir

In Vitro Callus Formation And Regeneration Of *Juniperus seravschanica* Kom. In Different Culture Media

Farzan F[a], Rezanejad F[*b, c], Zamanid E[d]

[a.]MSc. Student, Department of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
[b] Professor, Department of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
[c.] Researcher, Research and Technology Institute of Plant Production, Kerman, Iran
[d] Ph.D., Department of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Farzan F, Rezanejad F, Zamanid E. *In Vitro* Callus Formation And Regeneration Of Juniperus seravschanica Kom. In Different Culture Media. Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(3):180-116

https://10.61186/JCT.14.3.203

KEYWORDS

Conifers
in vitro culture
callus regeneration
root formation
shoot regeneration

ABSTRACT

Aim: After pines, Ors (*Juniperus*) is the second most diverse genus of Coniferals, consisting of approximately 75 species and comprising the majority of evergreen shrubs and trees. Several studies have pointed out the importance of the genus in soil stabilization, and its ornamental, medicinal, and industrial applications. Ors or sarve kuhi (*Juniperus seravschanica*) has a wide distribution in Kerman province. However, in most areas, seedlings or young plants have very little distribution, which indicates the difficulty of seed germination due to various reasons. Also, rooting of its microshoots in micro culture techniques is considered to be difficult due to poor development and low frequency of rooting. Therefore, to overcome these problems, it needs to optimize an *in vitro* shoot multiplication and root induction and growth protocol. The purpose of this study was *in vitro* culture of apical shoots to induce their multiplication and rooting. Further, seeds were planted on micro culture media to study seed germination, callus induction and shoot and root regeneration from calli. The studied species was a population of *J. seravschanica* grown in Glochar (Raber, Kerman province).

Materials and methods: Young shoots were collected from Glochar reserve of Rabor city (Kerman province) and kept at 4°C temperature for 3-7 days. The apical shoots with a size of 1.5 to 1.5 cm were separated and after sterilization, were cultured in woody plant medium (WPM) and Morashig and Skoog (MS) culture media without hormones to establish the samples. For shoot multiplication and growth, all samples were transferred to the medium containing plant growth regulators with optimized levels. Young shoots were transferred to rooting media (WPM, MS and ½MS) with different levels of IBA hormones. Seeds were separated from mature female cones, and full seeds (there are many empty seeds in cones) were exposed to cold treatment for 1-2

* Corresponding author. Tel.: 0983132673139; Fax: 031-32673139
E-mail address: frezanejad@uk.ac.ir
DOI: https://10.61186/JCT.14.3.203
Received: 10 Aug Jul. 2023; Received in revised form: 20 Oct. 2023; Accepted: 31 Oct. 2023
Original Article
©Author

weeks. Then, they were sterilized and cultivated in MS (containing hormone) medium to study seed germination and callus formation from embryos. Callus regeneration and shoot formation and their rooting were investigated under appropriate hormone concentrations.

Results: In the WPM medium, the highest percentage of shoot proliferation (40%) was obtained in the combined treatment of 3 mg/L BAP and 2 mg/L NAA. The shoot proliferation percentage was higher in MS media than WPM with 57% in concentrations of 0.2 and 3 mg/L of BAP and NAA, respectively. In both media, Proliferated shoots did not form any root in both media until four months after planting. The highest percentage of seed germination in MS medium was 33% at the concentrations of 5 mg/L BAP and 0.2 mg/L NAA. The highest rate of callus formation (40%) from embryos (seeds), as explants, was recorded in MS culture medium at the concentration of 0.2 and 3 mg/L of BAP and NAA, respectively. Calli produced shoots in in 3 mg/L BAP and 2 mg/L NAA in WPM medium. Root formation was not observed until six months, but about 10% of these regenerated shoots produced roots eight months after shoot proliferation.

Conclusion: It seems that various factors such as genotype, polyploidy or hybrid formation, slow plant growth (which is common in coniferal), or secondary compounds are the reasons for the low rate of regeneration, especially rooting. Also, the duration of cultivation can be effective in rooting.

سلول و بافت، دوره ۱۴، شماره ۳، سال ۱۴۰۲، صفحات ۲۰۳تا ۲۱۶

سلول و بافت

مطالعه کالوس‌زایی و باززایی اُرس یا سرو کوهی (*Juniperus seravschanica*) در محیط کشت‌های مختلف در شرایط در شیشه (*in vitro*)

فرزانه فرزان[۱]، فرخنده رضانژاد[۲و۳*]، الهه زمانی[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بخش زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان f.farzan1530@gmail.com

[۲] استاد بخش زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان frezanejad@uk.ac.ir

[۳] پژوهش‌گر پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان frezanejad@uk.ac.ir

[۴] دانش‌آموخته دکتری، بخش زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان zamani@yahoo.com-elaheh

واژگان کلیدی

ریشه‌زایی
شاخسارزایی
کالوس‌زایی کشت درون شیشه‌ای
مخروطیان

چکیده

هدف: اُرس (*Juniperus*. L) یکی از پیچیده‌ترین جنس‌های مخروطیان است که پس از کاج‌ها، با حدود ۷۵ گونه رایج‌ترین درختچه‌ها و درختان همیشه سبز را تشکیل می‌دهد. مطالعات متعددی به اهمیت این جنس در تثبیت خاک، استفاده زینتی، دارویی و صنعتی آن اشاره کرده‌اند. ارس یا سرو کوهی (*Juniperus seravschanica*)، در استان کرمان پراکنش وسیعی دارد، بهرحال، در اغلب مناطق دانه‌رست‌ها یا گیاهان جوان، به مقدار خیلی کم مشاهده می‌شوند که اشاره به رویش سخت دانه‌ها به دلایل مختلف دارد. همچنین ریشه‌دهی سخت آن‌ها در شرایط کشت در شیشه گزارش شده است. بنابراین، برای غلبه بر این مشکلات، نیاز به یافتن یک روش بهینه، برای تشکیل و تکثیر ساقه و تحریک ریشه‌زایی و رشد ریشه در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. بنابراین، تکثیر از طریق کشت در شیشه، در صورت موفقیت می‌تواند گزینه خوبی برای تکثیر آن باشد. هدف از این مطالعه، کشت در شیشه سرشاخه‌ها به منظور باززایی و تکثیر آن‌ها، و نیز کشت در شیشه بذر، به منظور تولید کالوس و باززایی کالوس‌ها و ریشه‌زایی آن‌ها در جمعیت رشد یافته در ذخیره‌گاه گلوچار (رابر، استان کرمان) *J. seravschanica*، بود. **مواد و روش‌ها:** شاخسارهای جوان، از ذخیره‌گاه گلوچار شهرستان رابر (استان کرمان) جمع‌آوری و به‌مدت حدود ۷-۳ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سرشاخه‌های انتهایی با اندازه ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متری جدا و پس از سترون سازی، در محیط گیاهان چوبی (WPM) و محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) بدون هورمون، برای استقرار نمونه‌ها، کشت شدند. به منظور پرآوری یا شاخسارزایی، همه کشت‌ها به محیط دارای هورمون منتقل و غلظت‌های مناسب هورمونی بهینه‌سازی شد. شاخسارهای جوان به محیط ریشه‌زایی WPM، MS و MS½ دارای سطوح مختلف هورمونی IBA، منتقل شدند. دانه‌های دارای رویان از مخروط‌های ماده بالغ جدا، و پس از جمع‌آوری دانه‌های پر، دانه‌ها به‌مدت ۲-۱ هفته تحت تیمار سرما قرار گرفتند. سپس، ضدعفونی شده و در محیط MS(هورمون‌دار) برای بررسی رویش دانه و نیز کالوس‌زایی از رویان، کشت شدند. باززایی کالوس‌ها و تشکیل شاخساره و ریشه‌زایی آن‌ها تحت غلظت‌های مناسب هورمونی بررسی شد. **نتایج:** در محیط WPM، بالاترین درصد شاخسارزایی یا پرآوری (۴۰ درصد)،

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۷/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۹

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۳۱۳۲۶۷۳۱۳۹--؛ فکس:۰۳۱-۳۲۶۷۳۱۳۹

آدرس پست الکترونیک: frezanejad@yahoo.com

در تیمار توام ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. در محیط MS، بالاترین درصد پرآوری (۵۷٪) در محیط همراه ۰/۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر بترتیب BAP و NAA مشاهده شد. در هر دو محیط، ساخسارهای پرآوری شده، تا حدود ۴ ماه پس از کشت، در محیط ریشه‌زایی، هیچ ریشه‌ای تولید نکردند. بالاترین درصد رویش دانه در محیط MS، در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳۳ درصد بود. بالاترین مقدار کالوس‌زایی از رویان (۴۰٪) در محیط کشت MS، و در غلظت ۰/۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر ب‌ترتیب BAP و i NAA به‌دست آمد. کالوس‌ها در محیط شاخسارزایی WPM، شاخساره تولید کردند. تشکیل ریشه تا شش ماه مشاهده نشد اما پس از هشت ماه، حدود ۱۰ درصد شاخسارها، ریشه ایجاد کردند. **نتیجه‌گیری:** بنظر می‌رسد عوامل مختلفی از جمله ژنوتیپ، پلی‌پلوئیدی یا تشکیل هیبرید، رشد کند گیاه که در بازدانگان معمول است، یا ترکیبات ثانویه، دلیل کم باززایی بویژه ریشه‌زایی باشد. همچنین مدت زمان کشت، می‌تواند در ریشه‌زایی موثر باشد.

۱- مقدمه

اُرس (*Juniperus* L.) یکی از پیچیده‌ترین جنس‌های مخروطیان است که پس از کاج‌ها، با حدود ۷۵ گونه، رایج‌ترین گروه درختچه‌ها و درختان همیشه سبز روی زمین است (۱). درختان اُرس در آب و هوای معتدل و سرد در اوراسیا و آمریکای شمالی و در مناطق کوهستانی رشد می‌کنند (۲). اسدی و همکاران وجود شش گونه از این جنس را برای ایران گزارش کرده است که به دلیل نیازهای اکولوژیکی متفاوت در ارتفاعات مختلف کوهستانی استقرار دارند (۳). مطالعات اخیر حجتی و همکاران (۱) ، با استفاده از آنالیز بیوشیمیایی و مولکولی نشان داده است که گیاهان متعلق به کمپلکس *J. excelsa* M.-Bieb. (شامل سه گونه *J. excelsa* M.-Bieb.، *J. seravschanica* Kom. و *J. polycarpos* K.Koch.) که در جنوب شرقی ایران (بافت، رابر و دهبکری) پراکنش دارند *J. seravschanica* هستند و هیچ *J. excelsa* M.-Bieb. در ایران وجود ندارد. قبل از آن، گیاهان پراکنش یافته در جنوب کشور، *J. polycarpos* K.Koch.، نام‌گذاری شده بودند. درخت ارس، معمولا در ارتفاعات زیاد، ۴۰۰۰-۲۰۰۰ متر، دیده می‌شود و به‌طور معمول، گونه‌های متعدد آن در مناطق سخت قابلیت رویش و رشد دارند و نسبت به خشکی و سرما مقاوم بوده و می‌توانند دمای تا ۳۵- درجه سانتی‌گراد را تحمل نمایند. درخت ارس نقش اکولوژیکی بسیار مهمی ایفا می‌کند و از خاک در برابر فرسایش محافظت می‌کند (۴). با این‌حال، آن‌ها ممکن است در مواردی در معرض شرایط محیطی بالاتر یا پایین‌تر از تحمل بهینه خود قرار بگیرند. از آن‌جایی که گیاهان بی‌تحرک هستند، ممکن است در معرض مجموعه‌ای از شرایط استرس زا قرار گیرند که به منابع مورد نیاز برای رشد و تولید مثل آسیب می‌رساند (۵). در حال حاضر، زیستگاه‌های طبیعی برخی از گونه‌های ارس به‌طور چشم‌گیری کاهش یافته‌اند (۶). دلایل ذکر شده عبارتند از: استفاده از چوب و چوب سوختی، تغییرات آب و هوایی، کیفیت پایین دانه، گرده‌افشانی ناکافی، تولید بذر کم، سرعت جوانه‌زنی کم، خواب دانه، کاهش زنده‌مانی رویان به‌طوری‌که بذرها می‌توانند تا دو سال عمر کنند، مخروط‌های آلوده به آفات و سرعت رشد بسیار کند درختان (۷ و ۸). بر اساس داده‌ها، چند گونه ارس به‌عنوان نادر یا در معرض خطر در نظر گرفته می‌شوند، بنابراین تلاش شده است تا جنگل‌های ارس بر اساس تکنیک‌های مختلف تکثیر جنسی و غیرجنسی احیا شوند (۹). در خیلی از موارد روش‌های سنتی تکثیر از طریق بذر یا ریشه‌دار کردن قلمه‌ها رضایت‌بخش نبوده است، بنابراین کشت آزمایشگاهی مورد توجه قرار گرفته است (۱۰). کشت بافت گونه‌های سوزنی برگ می‌تواند با تولید ژنوتیپ‌های منتخب، بهره‌وری جنگل را به مقدار قابل توجهی افزایش دهد (۱۱). گزارش‌های متعددی اشاره کرده‌اند که ریشه‌زایی ریزشاخه‌های باززایی شده از طریق کشت بافت در مخروطیان، دشوار، کند و یا ناممکن است (۱۲-۱۵). این مسئله، امکان تکثیر بسیاری از گونه‌های مخروطی را در مقیاس تجاری محدود می‌کند. عوامل متعددی در

بهینه کردن کشت در شیشه Juniperus، این گروه از گیاهان موثرند: سرشاخه‌های انتهایی، بیشترین ریزنمونه‌های مورد استفاده برای کشت و تکثیر ارس گزارش شده‌اند. همچنین، مشخص شده است که نوع محیط استفاده شده، نقش مهمی در تکثیر دارد و تعیین کننده تعداد شاخساره ایجاد شده در هر ریزنمونه، طول ساقه و تعداد شاخه در هر شاخساره در *J. phoenicea* L. است. نتایج مشابهی برای *J. navicularis* Gand و *J. phoenicea* L. گزارش شده است (۱۰ و ۱۲). مطالعات Bertsouklis و همکاران (۱۲) روی *Juniperus phoenicea* در چهار محیط کشت مختلف دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین، نشان داد که نشان داد که بالاترین درصد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده شاخساره روی محیط کشت OM (محیط کشت زیتون) و محیط DKW (محیط کشت گردو) مشاهده شد درصورتی‌که در محیط WPM، درصد شاخسارزایی بسیار کم بود. بهرحال، در محیط OM و نیز در سایر محیط‌ها از جمله محیط MS، در غلظت‌های مختلف ایندول بوتیریک اسید (IBA)، هیچ ریشه‌ای تولید نشد.

NAA، IBA و IAA اکسین‌هایی هستند که اغلب برای ریشه‌زایی موفق شاخه‌های مخروطیان در شرایط *in vitro* و *ex vitro* استفاده می‌شوند (۱۰ و ۱۵). مطالعات دیگر نشان داد که شاخسارهای *J. excelsa*، *J. phoenicea*، *J. navicularis*، *J. thurifera* ، بین ۱۸.۳ تا ۶۰ درصد، ریشه تشکیل دادند. شاخسارهای *J. oxycedrus*، در شرایط آزمایشگاهی در محیط ۱/۳ (یک سوم) SH دارای ۰.۴۷ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴ درصد ساکارز ریشه دار شدند. برعکس، ریشه‌زایی شاخسارهای *J. polycarpos*، موفق نبوده است (۱۶). همچنین، رویش کم دانه نیز در این جنس گزارش شده است. یکی از دلایل خواب بذر حضور مواد بازدارنده در رویان، اندوسپرم یا پوش دانه است .برای از بین بردن اثر بازدارندگی این مواد، بذرهای بدون بدون پوسته و یا جنین های جدا شده در محیط کشت قرار می‌گیرند تا فرآیند جوانه زنی تحریک شود .این رویکرد نیز توسط برخی از محققان برای افزایش سرعت رویش ارس بررسی شده است. رویش کم (۱۲ درصد) دانه‌های بدون پوسته در *J. oxycedrus* L.، روی محیط MS همراه با درصد ساکارز با یا بدون GA3 گزارش شده است اما نتایج بهتری در شرایط مشابه (حدود ۵۰ درصد) ، برای رویان‌های جدا شده از دانه مشاهده شد (۱۵). جوانه‌زنی موفقیت‌آمیز رویان‌های جدا شده *J. thurifera L.* نیز در شرایط کشت آزمایشگاهی گزارش شده است که بالاترین درصد رویش در این گونه نادر ارس ۸۰ درصد در محیط جامد DCR (محیط معرفی شده توسط Gupta and Durzan, 1985) مشاهده شد (۱۵ و ۱۷). همان‌طور که شرح داده شد استفاده از کشت در شیشه، برای رویش (جوانه‌زنی) رویان تخمی جدا شده از پوسته، می‌تواند راهی امیدوارکننده برای غلبه بر مشکلات مربوط به سرعت جوانه‌زنی پایین گونه‌های ارس و بهبود تکثیر آن‌ها از طریق دانه باشد (۱۰ و ۱۵). به‌علاوه، توانایی رویش رویان‌ها در شرایط آزمایشگاهی این فرصت را ایجاد می‌کند تا از آن‌ها به‌عنوان منبع بالقوه ریزنمونه‌های استریل (شاخه، جوانه، ریشه، برگ) برای القای کشت ارس از طریق انواع مختلف تکنیک‌های تکثیر آزمایشگاهی (برای مثال، اندام‌زایی و جنین‌زایی) استفاده شود (۱۰ و ۱۵). ریزازدیادی از طریق کالوس یک روش جایگزین برای تولید مثل رویشی است. در مخروطیان، از دست دادن سریع ظرفیت تکثیر کالوس تحت کشت‌های آزمایشگاهی، یک مشکل جدی است. در نتیجه، نگه‌داری کالوس‌ها برای مدت طولانی‌تر و استفاده از آن‌ها به‌عنوان منبع جوانه‌های نابه‌جا غیرممکن است. بنابراین، برای برخی از گونه‌های *Juniperus*، تحقیق در مورد توسعه تکنیک‌های ریزازدیادی بسیار پایدارتر و کارآمدتر ضروری است (۱۰، ۱۵ و ۱۸). با توجه به نمای زیبا و همیشه سبز درخت ارس، مقاومت بالای آن در پاسخ به سرما و خشکی و نیز خواص دارویی متعددی که برای آن ذکر شده است می‌توان این گیاه را در فضای سبز و حتی به‌عنوان جایگزین سایر بازدانگان کشت کرد. از طرفی کشت این گیاه با مشکلاتی مواجه بوده و در مقالات منتشر شده به رویش کند آن اشاره شده است. هدف از این مطالعه، تکثیر ارس کوهی یا *J. seravschanica* از طریق کشت در شیشه بود که مطابق مطالعات مروری، هیچ مطالعه منتشر شده‌ای روی کشت در شیشه آن وجود ندارد.

۲- مواد و روش‌ها

برای انجام مطالعه و بررسی تکثیر درون شیشه (*in vitro*) سرو کوهی (*Juniperus seravschanica* Kom.)، نمونه‌ها (مخروط‌های ماده و سرشاخه‌های جوان) ماهی یک بار از منطقه حفاظت شده گلوچار (رابر) با مختصات طول ۵۷ درجه، ۶ دقیقه، ۶.۸۹۰ ثانیه شمالی و عرض ۲۹ درجه، و ۱۹ دقیقه، ۱۰.۵۵۵ ثانیه شرقی و ارتفاع ۲۶۷۹ شهرستان رابر جمع آوری و برای بررسی به آزمایشگاه دانشگاه باهنر آورده شد.

شاخسارهای جوان به‌مدت حدود ۳ تا ۷ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سرشاخه‌های انتهایی با اندازه ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متری از قلمه‌ها جدا و به‌عنوان ریزنمونه، برای کشت در شیشه استفاده شدند. برای سترون سازی، نمونه‌ها ابتدا به‌وسیله آب و مواد شوینده شسته و چند ساعت زیر آب جاری قرار داده شدند. سپس در هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه و پس از آن در اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه قرار داده شدند و در آخر با آب مقطر استریل سه مرتبه آبشویی شدند. از دو محیط MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹۶۲) (۱۹) و محیط کشت گیاهان چوبی)WPM((McCown, 1981) (۲۰) بدون هورمون گیاهی برای کشت سرشاخه‌های انتهایی استفاده شد. پس از تهیه محیط کشت، ۸ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به آن افزوده شد. از پلی‌ونیل پیرولیدون و زغال فعال (هر یک به مقدار ۲ گرم در لیتر) برای جلوگیری از آلودگی و حذف ترکیبات فنلی استفاده شد. سپس pH محیط کشت روی ۵/۸ تنظیم و به‌مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد استریل شد. درون هر شیشه ۷ عدد ریزنمونه استقرار یافت و تعداد تکرارها ۶ عدد بود. واکشت نمونه‌ها هر ۳۰ روز یک بار انجام گرفت تا جوان سازی صورت گیرد. 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، به‌منظور پرآوری یا شاخسارزایی)proliferation(، همه کشت‌ها به محیط دارای هورمون منتقل شدند. در محیط WPM (Woody plant medium) تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده پس از بهینه‌سازی با استفاده از غلظت‌های مختلف، 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 پس از بهینه‌سازی با استفاده از غلظت‌های مختلف، BAP با غلظت‌های ۰/۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و NAA با غلظت۳ 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 به‌خوبی رشد کردند مقدار شاخسارزایی یا پرآوری بررسی شد . به منظور مطالعات ریشه‌زایی، شاخسارهای جوان به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. محیط‌های مورد استفاده، محیط کشتWPM ، MS و ½MS بودند. هورمون استفاده شده برای ریشه‌زایی،IBA در سه سطح (۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر) بود.

مخروط‌های ماده که ظاهری شبیه میوه سته دارند جمع‌آوری و در یخچال نگه‌داری شدند. دانه‌ها را از مخروط‌ها بیرون آورده و در آب قرار داده که بطور معمول اغلب دانه‌های پوک روی آب قرار می‌گرفتند. پس از این مرحله، متوجه شدیم هنوز هم تعدادی پوک در دانه‌هایی که در ته ظرف آب قرار گرفتند وجود دارد. به این دلیل، نوک دانه‌های فرورفته در آب را سوراخ و دانه‌های پر را انتخاب نمودیم (همچنان که در زیر شرح داده شده است، هدف از سوراخ کردن، بررسی اثر آن در افزایش رویش دانه هم بود). سپس به منظور ضد عفونی کردن و نیز از بین بردن موانع رویش، دانه‌ها به‌مدت ۱۲ ساعت زیر آب جاری قرار داده شدند. سپس، به‌مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد و پس از آن در اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه قرار داده شدند و در آخر

سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند.پس از این مرحله، دانه‌ها به دو گروه تقسیم شده که گروه اول حدود دو هفته تحت سرمای مرطوب یخچال (دمای ۶-۴ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شدند و گروه دوم به‌طور مستقیم به شرایط کشت منتقل شدند. قابل ذکر است که برخی از بذور هم پس از ته نشین در آب، بدون سوراخ کردن بطور مستقیم به شرایط کشت منتقل شدند. دانه‌های دارای جنین در دو محیط MS و WPM با غلظت‌های مختلف BAP وNAA کشت شدند.

همچنین همانند آزمایش قبل، دانه‌های دارای رویان جدا شدند، و بعد از تیمار سرما، آبشویی، ضدعفونی کردن و سوراخ کردن، در محیط MS هورمون‌دار به منظور بررسی کالوس‌زایی از رویان، در محیط کالوس‌زایی کشت شدند. پس از ایجاد کالوس از بذرها، برای ایجاد شاخساره از کالوس، کالوس‌های ایجاد شده به محیط شاخسارزایی MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA منتقل شدند. سرانجام، شاخسارهای ایجاد شده به محیط ریشه‌زایی دارای نیم میلی‌گرم در لیتر IBA منتقل شدند.

۳- آنالیز آماری

برای بررسی داده‌های مربوط به درصد پرآوری شاخساره‌ها، آزمایش به‌صورت فاکتوریل با طرح پایه کامل تصادفی انجام شد. مقایسه بین میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS Ver 26.0، آنالیز ANOVA و آزمون Duncan در سطح معنی‌دار ۹۵ درصد انجام شد. خطای معیار در نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel (۲۰۲۱) رسم و داده‌های مربوط به به شکل میانگین ±خطای معیار ارائه شدند.

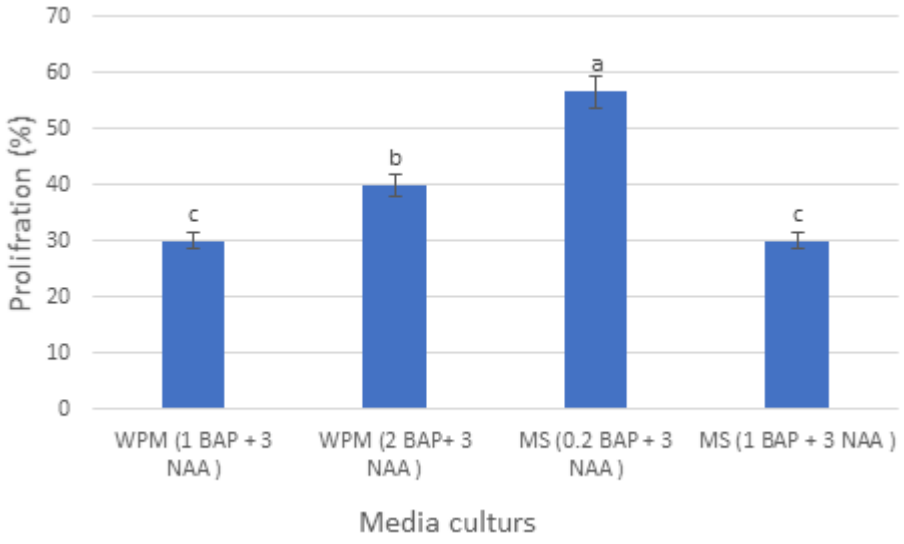
۴- نتایج

شکل ۱: نمایی از منطقه حفاظت شده گلوچار نشان می‌دهد که درختان ارس، پوشش غالب منطقه هستند.

تکثیر از طریق شاخساره

مطالعه شاخسارهای با اندازه ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متری، کشت شده در هر دو محیط WPM و MS، نشان داد که استقرار

ریزنمونه‌ها به‌خوبی انجام شده و پس از دو ماه، طول آن‌ها به ۲ سانتی‌متر رسید. همچنین بیش از ۹۰ درصد ریزنمونه‌ها سالم مانده و رشد کردند. پس از استقرار و استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف، همه ریزنمونه‌ها شاخسارهای جدید تولید کردند (پرآوری شدند). بالاترین درصد (۴۰ درصد) پرآوری در محیط WPM، در تیمار توام ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. در محیط کشت MS، نیز بالاترین درصد پرآوری (۵۷) در محیط توام ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۳).



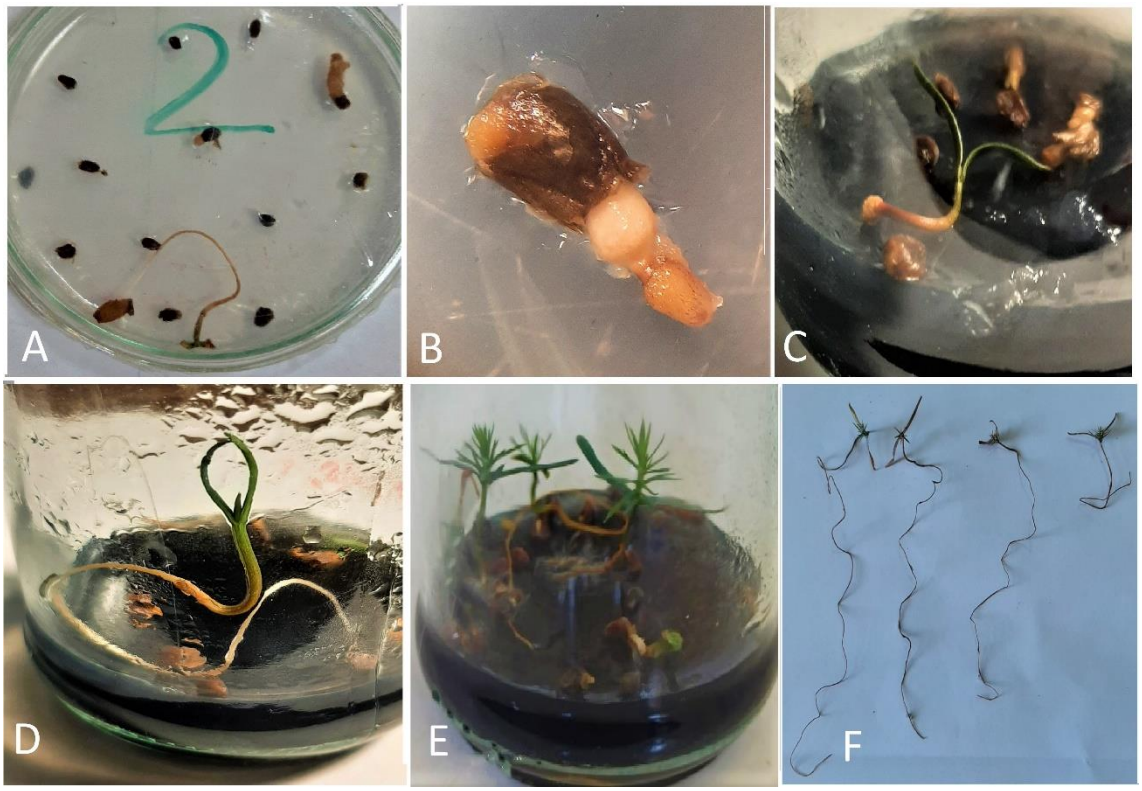
شکل ۲: مقایسه درصد شاخسارزایی (پرآوری) ریزنمونه‌های استقرار یافته در دو محیط کشت WPM و MS با غلظت‌های هورمونی مختلف. بالاترین درصد پرآوری به مقدار حدود ۵۷ درصد در محیط توام ۰/۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر، به‌ترتیب BAP و NAA مشاهده می‌شود. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد توسط آزمون دانکن هستند.

انتقال شاخسارهای پرآوری شده به محیط ریشه‌زایی و استفاده از هورمون IBA، پس از چهار ماه هیچ ریشه‌ای ایجاد نکرد و سرانجام شاخسارها زرد شدند (شکل ۳).

شکل ۳: A-C. استقرار، رشد و پرآوری شاخسارهای انتهایی در ارس یا سرو کوهی (*J. seravschanica*) در محیط کشت MS. A . استقرار شاخسارها در محیط بدون هورومون دو ماه پس از کشت و تشکیل شاخسارهای ۲ سانتی‌متری، B. پرآوری شاخسارها پس از انتقال آن‌ها به محیط واجد هورمون (BAP+NAA, .02+3mgl^{-1}) پس از دو ماه، C. شاخسارهای ۴ ماهه در محیط واجد هورمون، رشد و پرآوری شاخسارها دیده می‌شود.

رویش (تکثیر) بذر

مطالعات رویش دانه نشان داد که بهترین نتایج در محیط MS با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. در این تیمار، میانگین رویش (جوانه‌زنی) حدود ۳۳ درصد بود که ضمن رشد، دانه‌رست‌های رویش یافته، دو برگ لپه‌ای را که رشد روی زمینی داشتند از خاک خارج نموده که بعنوان اولین برگ‌های فتوسنتزی شروع به فعالیت کردند. پس از ظهور برگ‌های لپه‌ای، برگ‌های سوزنی شکل تشکیل شدند. . پس از واکشت این دانه‌رست‌ها (گیاهچه‌ها) بهتر رشد کردند و پس از حدود ۶ ماه حدود ۱۸-۱۲ برگ سوزنی تشکیل شد. طول ریشه‌ها در مقایسه با شاخساره یا بخش هوایی قابل توجه بود (شکل ۴). 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 ته نشین در آب، بدون سوراخ کردن اما تحت تیمار سرما به شرایط کشت منتقل شدند هیچ رویشی نشان ندادند.

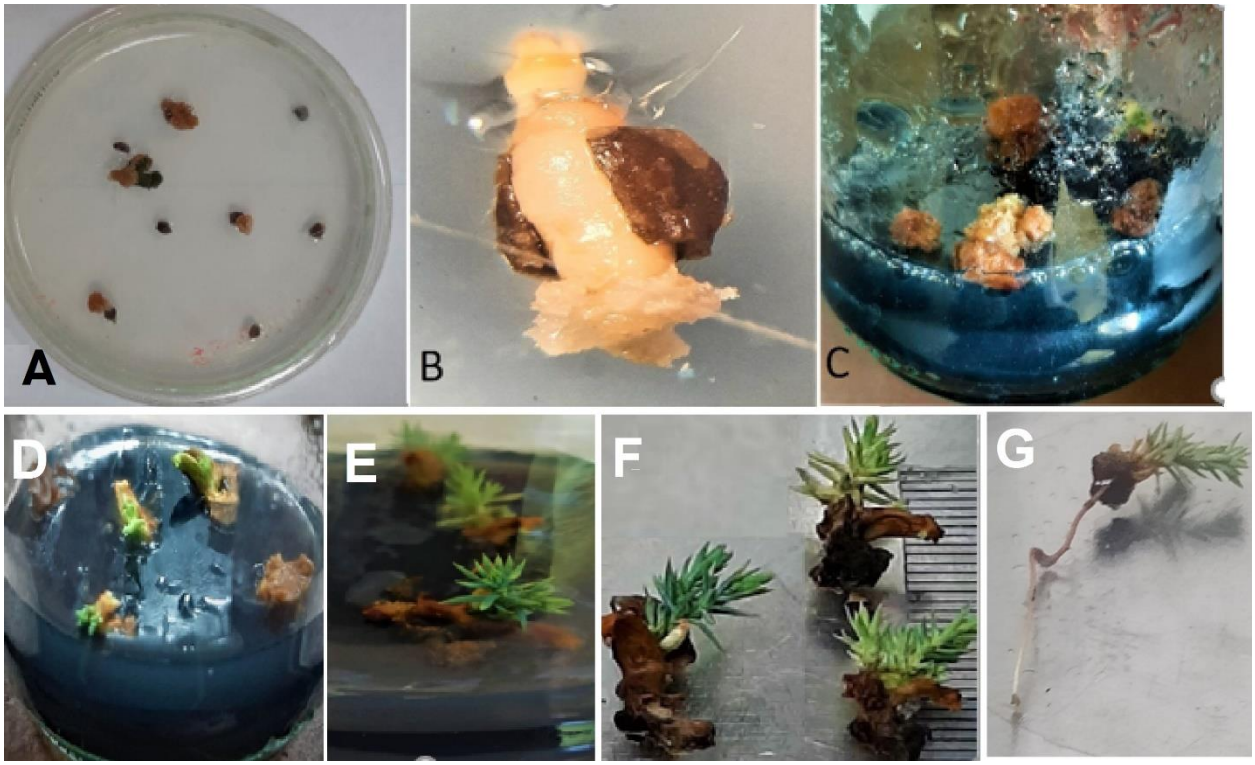


شکل ۴: رویش و رشد بذر (دانه) سرو کوهی (*J. seravschanica*) در محیط کشت MS با غلظت هورمونی۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم NAA. A, B. بذر کشت شده در محیط بدون زغال فعال. C-E واکشت دانه‌رست‌ها روی محیط دارای زغال فعال. D، رشد قابل توجه ریشه و پیدایش جوانه انتهایی (مریستم و برگ‌های در حال نمو) دیده می‌شود. D. گیاهک‌های شش ماه که تعدادی برگ سوزنی تشکیل داده‌اند اما هنوز برگ‌های لپه‌ای سالم و سبز دیده می‌شوند. F، گیاهک‌های مرحله E، از محیط بیرون آورده شده و عکس‌برداری شدند که رشد قابل توجه ریشه در مقایسه با بخش هوایی (شاخساره) دیده می‌شود.

تکثیراز طریق تشکیل کالوس

نتایج نشان دادند که تشکیل کالوس از بخش‌های مختلف رویان، به نوع محیط و مقدار و انواع هورمون‌های اضافه شده به محیط

بستگی داشت. از بین غلظت‌های استفاده شده، بهترین غلظت در محیط کشت MS، مربوط به ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA بود که در این محیط حدود ۴۰ درصد زیزنمونه‌ها، کالوس تشکیل دادند. کالوس‌های ایجاد شده در همین محیط که مشابه محیط استفاده شده برای تحریک شاخسارزایی سرشاخه‌های انتهایی بود بالاترین مقدار تشکیل شاخساره و رشد را نشان دادند (شکل ۵). تا شش ماه پس از کشت، شاخساره‌های ایجاد شده از کالوس، هیچ ریشه‌ای تولید نکردند اما پس از هشت ماه، حدود ۱۰ درصد شاخسارهای ایجاد شده در محیط ریشه‌زایی واحد نیم میلی‌گرم در لیتر IBA، ریشه ایجاد کردند.



شکل۵: تشکیل کالوس و شاخساره از بذر گیاه سروکوهی (*J. seravschanica*). A, B. رشد رویان و تشکیل کالوس از آن در محیط کشت MS با غلظت هورمونی ۳ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم درلیتر BAP. C-F. تشکیل شاخساره از کالوس در همان محیط حاوی زغال فعال، پس از قهوه‌ای شدن کالوس‌ها، شاخساره‌های دارای برگ‌های سوزنی تشکیل می‌شوند (پس از ۶ ماه هنوز ریشه تشکیل نشده است). G. تشکیل ریشه پس از ۸ ماه.

۵- بحث

بررسی کشت شاخساره‌ها در شرایط درون شیشه در دو محیط کشت WPM و MS نشان داد که در هر دو محیط بدون هورمون، استقرار ریزنمونه‌ها به‌خوبی انجام شد و پس از دو ماه، طول آن‌ها به ۲ سانتی‌متر رسید. بالاترین درصد پرآوری در محیط کشت MS و WPM، دو ماه پس از کشت به‌ترتیب برابر ۵۷ و ۴۰ درصد بود. انتقال شاخسارهای پرآوری شده به محیط ریشه‌زایی و استفاده از هورمون IBA، پس از ۴-۲ ماه، هیچ ریشه‌ای ایجاد نکرد. مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که مشکل تکثیر غیرجنسی برخی گونه‌های Juniperus، از طریق ریشه‌زایی قلمه‌های رویشی، تا کنون حل نشده است و میزان ریشه‌زایی بسیار کم بوده و یا

بطور کلی ریشه تشکیل نمی‌شود (۱۰، ۱۵، ۱۶، ۲۳، ۲۴، ۲۵). این مشکل سبب شده است که امکان تکثیر در مقیاس بزرگ عملی نباشد. بهرحال، مطالعات دیگر روی برخی گونه‌های دیگر این جنس، تشکیل ریشه از شاخسارهای کشت شده در شرایط در شیشه را گزارش کردند که بسته به گونه مورد مطالعه، نتایج متفاوتی ذکر شده است اما در این مطالعات نیز درصد ریشه‌زایی به نسبت کم و بین ۴۰-۳۰ درصد گزارش شده است (۱۰، ۱۵، ۲۳، ۲۶). در J. excelsa، J. phoenicea، J. navicularis و J. thurifera، نرخ ریشه‌زایی ۶۰-۱۸ درصد گزارش شده است (۱۵). Ahani و همکاران (۱۴)، قلمه‌های رویشی J. polycarpos، را در گلدان‌های حاوی خاک با استفاده از تیمارهای مختلف شاخه‌دار و ریشه‌دار نمودند. Berhe و Negash (۱۴ و ۲۶) گزارش کردند تنها ۲۴ درصد از قلمه‌های J. procera، که از گیاهان ۲-۱/۵ ساله به‌دست آمدند ۳۲ هفته پس از کشت ریشه‌دار شدند. بهترین‌های ریزنمونه‌های شاخسارهای انتهایی، سرشاخه‌های انتهایی یا جانبی جوان گزارش شده‌اند که بر حسب گونه، مقدار باززایی و پرآوری در آنها نیز متفاوت است (۱۴ و ۱۵). NAA، IBA و IAA، اکسین‌هایی هستند که اغلب برای تحریک ریشه‌زایی موفق در مخروطیان در شرایط in vitro و ex vitro استفاده می‌شوند. به‌علاوه، سن ریزنمونه‌ها، نوع و ترکیب محیط کشت و ژنوتیپ هم به‌عنوان عوامل موثر ذکر شده‌اند. به‌نظر می‌رسد گونه گیاهی و حتی واریته، نقش مهمی در ریشه‌زایی داشته باشند و این گونه، گونه‌ای دشوار برای تحریک ریشه‌زایی در شرایط آزمایشگاه در حضور IBA و NAA باشد. احتمال می‌دهیم که مدت زمان کشت نیز عامل مهمی باشد. شاید همانطور که در برخی گزارش‌ها آمده است نیاز باشد که تا حدود یکسال نیز منتظر تشکیل ریشه بود. قابل ذکر است که J. seravschanica، در رده‌بندی‌های قبل به‌عنوان J. polycapos، نام‌گذاری شده است (۱). بهرحال، همین گونه هم واریته‌های مختلفی دارد که واکنش گونه‌ها و واریته‌های مختلف می‌تواند متفاوت باشد. مطالعات سلول بافت‌شناختی در حال انجام، روی گونه پراکنش یافته در جنوب کشور توسط مولفان، نشان می‌دهد که به احتمال گونه پلی‌پلوئید است و این عامل نقش مهمی در کاهش رویش دانه و ریشه‌زایی ناموفق آن دارد (اطلاعات نشان داده نشده است). مقایسه نتایج در کشت in vitro و کشت در مخلوط پیت+ پرلیت+ ورمیکولیت در J. oxycedrus و J. excelsa، نشان داده است که تحت شرایط گلدانی (در مقایسه با کشت in vitro)، اگر چه درصد ریشه‌زایی کمتر است اما این بستر بدلیل اثر مثبت آن روی 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 اختلات 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 به‌طور قابل توجهی هزینه‌های تولید گیاهان ارس را کاهش می‌دهد (۱۵). پس از قرار دادن بذرهای سوراخ و استریل شده در محیط کشت MS، بهترین غلظت برای جوانه‌زنی، رویش و رشد گیاهچه، مربوط به غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. از ۱۵ بذر درون شیشه، میانگین ۵ بذر جوانه زده و رشد کردند که پس از انتقال و واکشت، این گیاهچه‌ها بهتر رشد کردند. در سال‌های اخیر، جوانه‌زنی موفق رویان‌های جدا شده J. thurifera، در کشت آزمایشگاهی گزارش شده است. بالاترین سرعت جوانه‌زنی برای این گونه نادر ارس، ۸۰ درصد در محیط جامد DCR بود (۱۵). همانطور که در مطالعات ذکر شده نشان داده شده است استفاده از یک روش کشت آزمایشگاهی برای جوانه‌زنی رویان، ممکن است راهی امیدوار کننده برای غلبه بر مشکلات مربوط به سرعت جوانه‌زنی پایین در ارس و بهبود تکثیر آن، از طریق کشت بذر باشد. به‌علاوه، توانایی جوانه‌زدن رویان‌ها در شرایط آزمایشگاهی، این فرصت را ایجاد می‌کند تا از آن‌ها بعنوان منبع بالقوه ریزنمونه‌های استریل (شاخه، جوانه، ریشه، برگ و ...)، برای القای کشت ارس از طریق انواع مختلف روش‌های تکثیر ازمایشگاهی (برای مثال، کالوس‌زایی، اندام‌زایی و رویان‌زایی) استفاده شود (۱۰ و ۱۵). به‌منظور تشکیل کالوس از رویان (دانه)، از محیط کشت MS، با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده شد و پس از ایجاد کالوس از بذرها، برای ایجاد شاخساره از کالوس، کالوس‌های ایجاد شد در محیط WPM شاخسارزایی

کرده و پرآوری شدند. Bravardi و همکاران (۲۲) با بررسی اثرات تنظیم کننده‌های رشد بر القای کالوس در J. excelsa، بیان کردند که تشکیل پینه (کالوس) در شرایط آزمایشگاهی، هم به مقدار و هم به نوع هورمون‌های اضافه شده به محیط، بستگی دارد و تیمار حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin، بالاترین درصد القای کالوس (۷۳ درصد) را داشته است. آزمایشات نشان داده که استفاده از Kin و NAA و اثر متقابل آنها در سطح احتمال یک درصد، اثر معنی‌داری بر ایجاد کالوس دارد. ریزنمونه‌های تیمار شده با ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر Kin تفاوت معنی‌داری در تشکیل کالوس نشان دادند زیرا تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بیشترین توده کالوس را تولید کرد. بر اساس نتایج، در برهم‌کنش NAA با Kin، بیشترین مقدار کالوس‌زایی (۶۰ درصد) روی ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آمد. همچنین، برخی محققان بر این باور بودند که افزایش غلظت هورمونی بالاتر از حد مطلوب، در شرایط آزمایشگاهی دارای اثرات مهاری روی ریزنمونه‌ها است و ممکن است تولید کالوس را کاهش دهد (۲۲). NAA، IBA، IAA اکسین‌هایی هستند که اغلب برای ریشه‌زایی موفق شاخه‌های مخروطیان در شرایط in vitro و ex vitro استفاده می‌شوند (۱۰ و ۱۵). در این آزمایش، شاخسارهای ایجاد شده از کالوس در محیط WPM دارای NAA، پس از هشت ماه، حدود ده درصد ریشه تولید کردند که در مقایسه با شاخساره‌های استفاده شده برای ریشه‌زایی، موفقیت بیشتری نشان دادند. همان‌طور که اشاره شد بنظر می‌رسد زمان استقرار شاخساره‌ها عامل موثری باشد به‌طوری که در این آزمایش نیز تا حدود ۶ ماه، شاخسارها ریشه تولید نکردند اما نتایج ریشه‌زایی شاخسارهایی که از گیاه جدا شدند و در محیط پرآوری و بعد ریشه‌زایی قرار گرفته پس از ۴ ماه بررسی شد. از طرفی، شاید سن شاخسارها نیز موثر باشد که در این آزمایش، آشکار است که شاخسارهای حاصل از کالوس سن کمتری و در نتیجه تجمع مواد اندوژن کمتری دارند که ممکن است بازدارنده باشند. گزارش‌هایی وجود دارد که کشت شاخسارهای انتهایی در گلدان حاوی خاک، پس از ۳۲ هفته ریشه‌زایی داشتند (۱۴). اما در این آزمایش، رشد اغلب شاخسارهای پس از جدود ۴ ماه متوقف و سپس زرد شدند.

۶- نتیجه‌گیری

ارس یا سرو کوهی یکی از درختان همیشه سبز و مقاوم پراکنش یافته در کشور است که می‌تواند شرایط سخت از جمله سرمای زمستان و یخبندان‌های طولانی را تحمل و پایا بماند. بعلاوه مانند همه بازدانگان، کند رشد بوده و می‌تواند سالیان زیادی باقی بماند به‌طوری‌که عمر آن را حدود ۵۰۰۰-۲۰۰۰ سال تخمین می‌زنند. بنابراین، این گیاه، یک گزینه خوب برای فضاهای سبز کشور می‌تواند پیشنهاد شود. همچنین، استفاده‌های دارویی متعددی برای آن گزارش شده است. به‌هرحال، مطابق نتایج این مطالعه، کشت در شیشه، به‌ویژه ریشه‌زایی آن مقداری سخت بوده که انجام آزمایشات بیشتر و استفاده از تنظیم کننده‌های رشد مختلف در غلظت‌های مختلف و نیز بررسی پلوئیدی آن می‌تواند به موفقیت بیشتر تکثیر آن کمک کند. از طرفی با توجه به این‌که دانه‌های پر (غیر پوک) هم‌چنان‌که در این آزمایش گزارش شد قابلیت تولید دانه‌رست و ایجاد گیاه را دارند. کشت بذر نیز می‌تواند گزینه مناسبی برای تکثیر آن باشد.

۷- منابع

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

2- Loureiro J, Capelo A, Brito G, Rodriguez E, Silva S, Pinto G, Santos C. Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry. Biologia Plantarum. 2007 Mar; 51:7-14.

3- Assadi M. Noteworthy plant records for the flora of Iran. The Iranian Journal of Botany. 1998 May 22; 7 (2):217-20.

4- Atkinson NJ, Urwin PE. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. Journal of experimental botany. 2012 Jun 13; 63 (10):3523-43.

5- Kashani SA, Asrar M, Leghari SK. *In vitro* callus induction and shoot formation of *Juniperus excelsa* of Ziarat, Balochistan, Pakistan. FUUAST Journal of Biology. 2018 Dec 18; 8 (2):203-8.

6- Ortiz PL, Arista M, Talavera S. Low reproductive success in two subspecies of *Juniperus oxycedrus* L. International Journal of Plant Sciences. 1998 Sep 1; 159 (5):843-7.

7- 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*. Australian Journal of Crop Science. 2017 Jul 1; 11 (7):828-37.

8- Rezanejad F, Farzan F, Zamani E, Ganjalikhani Hakemi F. The studies of different culture methods in ors (*Juniperus seravshanica*), Journal of Developmental Biology. Summer 2023 15(3) 59-70.

9- Sultangaziev O, Schueler S, Geburek T. Morphometric traits and sexual dimorphisms do not strongly differentiate populations of Zeravshan juniper (*Juniperus seravschanica* Kom.) in Kyrgyzstan. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants. 2010 Jan 1; 205 (8):532-9.

10- Ragonezi C, Klimaszewska K, Castro MR, Lima M, de Oliveira P, Zavattieri MA. Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. Trees. 2010 Dec; 24: 975-92.

11- Güvenç A, Hürkul MM, Erdem A. The leaf anatomy of naturally distributed *Juniperus* L.(Cupressaceae) species in Turkey. Turkish Journal of Botany. 2011; 35 (3):251-60.

12- Bertsouklis K, Paraskevopoulou AT, Zarkadoula N. In vitro propagation of *Juniperus phoenicea* L. InI International Symposium on Botanical Gardens and Landscapes 1298 2019 Dec 2 (pp. 331-334).

13- Lakušić, B., & Lakušić, D. (2011). Anatomy of four taxa of the genus *Juniperus* sect: *Juniperus* (Cupressaceae) from the Balkan peninsula. *Botanica Serbica*, *35* (2), 145-156.

14- Ahani H, Jalilvand H, Hosseini Nasr SM, Soltani Kouhbanani H, Ghazi MR, Mohammadzadeh H. Reproduction of juniper (*Juniperus polycarpos*) in Khorasan Razavi, Iran. Forest Science and Practice. 2013 Sep; 15: 231-7.

15- Hazubska-Przybył T. Propagation of Juniper species by plant tissue culture: a mini-review. Forests 2019 10, 1028.

16- Gomez, M.P.; Segura, J. Factors controlling adventitious bud induction and plant regeneration in mature *Juniperus oxycedrus* leaves cultured in vitro. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 1994, 30P, 210–218.

17- Gupta, P.K.; Durzan, D.J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Rep. 1985, 4, 177–179.

18- Harry, I.S.; Thorpe, T.A. In vitro culture of forest trees. In Plant Cell and Tissue Culture; Vasil, I.K., Thorpe, T.A., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1994; 539–560.

19- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum. 1962 Jul; 15 (3):473-97.

20- McCown BH. Woody Plant Medium (WPM)-a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species. Hort. Sci. 1981; 16: 453.

21- Hazubska-Przybył T. Propagation of Juniper species by plant tissue culture: A mini-review. Forests. 2019 Nov 14; 10 (11):1028.

22- Baravardi H, Ranjbar GA, Kamali S, Abadi F. Investigation of the effects of growth regulators on callus induction in *Juniperus excelsa* L. Bull. Env. Pharmacol. Life Sci. 2014 Dec 1; 4: 73-7.

23- Momeni MO, Ganji-Moghadam EB, Kazemzadeh-Beneh HA, Asgharzadeh AH. Direct organogenesis from shoot tip explants of *Juniperus polycarpos* L.: Optimizing basal media and plant growth regulators on proliferation and root formation. Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol. 2018 Mar 20;19:40-50.

24- Ioannidis K, Tomprou I, Panayiotopoulou D, Boutsios S, Daskalakou EN. Potential and Constraints on In Vitro Micropropagation of *Juniperus drupacea* Labill. Forests. 2023 Jan 12;14(1):142.

25- Castro, M.R.; Belo, A.F.; Afonso, A.; Zavattieri, M.A. Micropropagation of *Juniperus navicularis*, and endemic and rare species from Portugal SW coast. Plant Growth Regul. 2011, 65, 223–230.

26- Berhe D, Negash L. Asexual propagation of *Juniperus procera* from Ethiopia: a contribution to the conservation of African pencil cedar. Forest Ecology and Management. 1998 Dec 14;112(1-2):179-90.