

القای کالوس، باززایی و پرآوری زرشک بی دانه (*Berberis vulgaris*) در شرایط درون شیشه‌ای

مرتضی سازمند^۱ و عباس صفرنژاد^{۲*}

۱- کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آشتیان

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد

پست الکترونیک: sebre14@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۴

چکیده

جنس زرشک بیش از ۶۶۰ گونه دارد که فقط یک نوع آن یعنی زرشک بی دانه (*Berberis vulgaris*) به عنوان محصول باغی پرورش داده می شود. زرشک بی دانه اغلب به روش قلمه و پاجوش تکثیر می شود که زمان بر است، اما با استفاده از روش کشت بافت می توان تعداد زیادی گیاه در یک زمان کوتاه تولید کرد. در این تحقیق اثر هورمون های مختلف رشد گیاهی در تکثیر زرشک بی دانه بررسی شد. از جوانه های جانبی به عنوان ریزنمونه استفاده شد. ریزنمونه ها بعد از مراحل مختلف سترون سازی شامل محلول های هیپوکلریت سدیم، الکل ۷۰ درصد و کلرید جیوه به محیط های کشت حاوی مقادیر مختلف هورمون های GA3 و Kin, IAA, BAP منتقل شدند. کشت ها در دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد قرار داده شدند. نتایج نشان داد که تیمار هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه بهترین تیمار ضد عفونی کننده ریزنمونه های زرشک بود. همچنین محیط MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BAP بهترین محیط برای باززایی بود. در بین تیمارهای هورمونی استفاده شده، بیشترین میانگین تعداد شاخه (۶ شاخه) مربوط به محیط MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر IBA بود. به طور کلی از نتایج حاصل شده در این تحقیق می توان گفت هورمون BAP برای باززایی زرشک بی دانه مؤثرترین هورمون بود. بهترین تیمار ریشه زایی، محیط کشت MS + ۰/۵ mg/l IBA بود. به منظور سازگاری گیاهان ریشه دار شده به جی فی بات منتقل و با موفقیت به خاک انتقال یافتند.

واژه های کلیدی: این ویترو، پرآوری، زرشک بی دانه، هورمون های گیاهی.

مقدمه

پرورش داده می شود و این نوع فقط در ایران و در عرض جغرافیایی ۳۲،۵ تا ۳۴،۵ درجه شمالی به عنوان یک محصول اقتصادی کشت و کار می شود. زرشک گیاهی بومی ایران است و نوع بی دانه آن برای نواحی جنوب خراسان به خصوص قاین و بیرجند شهرتی ایجاد کرده است (Kafi and Balandri, 2002). تولید زرشک در خراسان جنوبی

زرشک بی دانه با نام علمی *Berberis vulgaris* درختچه ای با ارتفاع ۳/۵ متر بومی ایران و خود گرده افشان از تیره زرشکیان (Berberidaceae) نزدیک به تیره آلانگان و از دولپه ای ها است (Anbarani, 1991). از جنس زرشک فقط یک نوع آن یعنی زرشک بی دانه به عنوان محصول باغی

اندام، بافت و یا حتی پروتوپلاست، گیاهی کامل و منطبق بر هدف مورد نظر را تولید می‌کند (Piri et al., 2000). ریزازدیادی را می‌توان تکثیر جوانه انتهایی یا جانبی و تکثیر غیرجنسی این ویترو نیز نامید که یک روش تکثیر برای گونه‌ها یا وارپته‌های با ویژگی‌های مطلوب است. در این راستا تنظیم‌کننده‌های رشد نقش مهمی دارند (Bouhouche et al., 2007). کالوس یک بافت غده‌ای کم و بیش تمایز نیافته است که به‌طور معمول در محل زخم‌های ایجاد شده در بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته ایجاد می‌شود (Misra, 2004). کالوس از کشت بخش‌های مختلف گیاه مانند برگ، ساقه، ریشه، دانه گرده و حتی پروتوپلاست می‌تواند به‌وجود آید. بافت کالوس بسته به گونه گیاهی می‌تواند سفت و سخت (به علت وجود لیگنین) و یا ترد و شکننده باشد. همچنین کالوس ممکن است به رنگ‌های سفید، زرد، سبز و یا به‌علت تولید آنتوسیانین و سایر ترکیبات به رنگ‌های دیگر مانند صورتی و قرمز درآید (Ehsanpour et al., 2003).

در تحقیقی Mackay و همکاران (۱۹۹۶) با استفاده از محیط کشت WPM تغییر یافته و ویتامین‌های محیط کشت MS، موفق به کشت بافت زرشک *B. trifoxila* شدند. روش جلوگیری از قهوه‌ای شدن در این پژوهش تکرار هر سه روز یک بار واکشت بود که این روش موجب جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه در محیط کشت شد. در این گونه القای کالوس با استفاده از تنظیم‌کننده رشد گیاهی BA تا ۸۰ درصد انجام پذیرفت. در بررسی دیگری Arena و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از محیط کشت MS تغییر یافته موفق به ریزازدیادی زرشک *B. buxifolia* گردیدند. در این پژوهش از دوره‌های تاریکی برای کنترل ترشح مواد فنولی و تحریک ریشه‌زایی استفاده شد. در آزمایش دیگر Karhu و همکاران (۲۰۰۱) موفق به ریزازدیادی زرشک *B. thubbergi* شدند. آنها در پژوهش خود از جوانه‌های رأسی استفاده کردند و این بافت گیاهی بهترین پاسخ را به محیط کشت نشان داد.

نتایج مطالعه‌ای بر روی کالوس‌زایی زرشک بی‌دانه نشان داد تیمارهای هورمونی که دارای Kin, NAA و BA بودند،

سالانه بیش از ۸۴۰۰ تن بوده که از سطح ۶۴۴۲ هکتار اراضی باغی به‌دست می‌آید (Molafyabi et al., 2008). در تمام قسمت‌های این گیاه آلکالوئیدهای بربرین (Berberine)، اکسیاکانتین (Oxyacontine)، برسامین (Berbamine) وجود دارد. مقدار آلکالوئید در پوست ریشه زرشک بیشتر از قسمت‌های دیگر این گیاه است. میوه زرشک دارای حدود ۴ درصد مواد قندی، ۶۵ درصد اسیدمالیک و اسیدتاتاریک و مقداری صمغ می‌باشد (Zargari, 1990). آلکالوئیدهای ژاتوریزین، پالماتین، برولیسین، کلومبامین و والرین و ترکیبات دیگر موجود در زرشک هستند (Kafi and Balandri, 2002).

میوه زرشک طبیعتی سرد و خشک دارد و در طب سنتی مقوی کبد و قلب، صفرابر، مسکن حرارت معده و بندآورنده سیلان خون بواسیر است، همچنین از خونریزی مزمن جلوگیری می‌کند. از برگ زرشک به تنهایی یا مخلوط با داروهای مناسب برای زخم روده‌ها و نیز رفع اسهال‌های ناشی از ضعف امعاء و احشای داخل شکم استفاده می‌شود. همچنین برای میوه زرشک خاصیت منقبض کننده عروق هم قائل بوده و بربرین را به‌عنوان مقوی معده و ضد استفراغ‌های دوره بارداری توصیه کرده‌اند. جویدن برگ زرشک نیز باعث استحکام لته‌ها می‌شود. برگ زرشک به‌عنوان قابض و در درمان عوارض ناشی از فقدان ویتامین C نیز به کار می‌رود (Shariat et al., 1992 Samsam). همچنین برگ زرشک در دیسانتری مزمن، آب آوردن انساج و در اسکوروبوت استفاده شده است (Kamalinezhad et al., 1999). از زرشک علاوه بر مصارف گفته شده، جهت رنگ‌کردن الیاف پشم، ابریشم و پنبه استفاده می‌شود. همچنین از چوب زرشک که بسیار خوب خراطی می‌شود برای کارهای خاتم‌کاری و منبت‌کاری استفاده می‌شود و خار آن نیز برای خلال دندان مفید است. ضمناً چوب زرشک جلاپذیر هم می‌باشد (Moazzen Ferdowsi, 1993).

کشت این ویترو شامل مجموعه روش‌های آزمایشگاهی است که با تکیه بر خاصیت پرتوانی از یک

امکان‌پذیر است و از سوی دیگر به دلیل اهمیت گیاهان دارویی برای درمان بسیاری از ناراحتی‌ها و بیماری‌ها تکثیر و ازدیاد سریع آنها و ایجاد صفات مطلوب اهمیت خاصی دارد. بنابراین، در این تحقیق بهینه‌سازی کشت بافت زرشک بی‌دانه و تعیین بهترین محیط کشت جهت القای کالوس و باززایی زرشک بی‌دانه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ریزنمونه‌ها در فصول مختلف (از زمستان ۱۳۹۰ تا تابستان ۱۳۹۱) از باغ‌های زرشک فائن جمع‌آوری و در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا برگ‌ها و تیغ‌های شاخه‌های جمع‌آوری شده جدا شد و سپس به قطعاتی کوچک تقسیم شد به طوری که هر قطعه شامل یک جوانه بود. سپس ظرف حاوی جوانه‌ها را به مدت ۴۵ الی ۶۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار داده و ادامه کار ضدعفونی در زیر هود لامینار صورت گرفت. در این آزمایش به منظور ضدعفونی نمونه‌ها از الکل ۷۰ درصد، کلریدجیوه و هیپوکلریت سدیم در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف استفاده شد (جدول ۱).

در القای کالوس مؤثر بودند به طوری که در اکثر تیمارها با فراوانی‌های متفاوت تشکیل کالوس مشاهده شده است. همچنین بهترین ترکیب هورمونی جهت القای کالوس در زرشک ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به دست آمد (Ziaratnia et al., 2012).

ریزازدیادی گیاه *Mahonia soft caress* از خانواده Berberidaceae توسط Todd Jeffrey Rounsaville (۲۰۱۱) بررسی شد. محیط کشت پایه B5 همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هورمون‌های $5 \mu\text{M}$ BAP، $5 \mu\text{M}$ kinetin، $0.5 \mu\text{M}$ IAA و $2.5 \mu\text{M}$ gibberellic acid به عنوان بهترین محیط کشت برای تکثیر شناخته شد. تیمار روشنایی و غلظت $8 \mu\text{M}$ اثر معنی‌داری روی درصد ریشه‌زایی نشان داد. تاکنون گزارشی از انجام موفق ریزازدیادی در زرشک بی‌دانه ارائه نشده است و تنها راه موجود جهت ازدیاد آن تکثیر از طریق کشت پاجوش بوده است (Kafi and Balandri, 2002).

از آنجا که زرشک بی‌دانه فاقد بذر بوده به طوری که در طبیعت تکثیر آن به صورت رویشی ریشه‌جوش (پاجوش)

جدول ۱- تیمارهای مختلف ضدعفونی برای جوانه‌های جانبی زرشک

ردیف	تیمار ضدعفونی
۱	کلریدجیوه ۰/۰۲ درصد به مدت ۳ دقیقه + الکل ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه + هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه
۲	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه + الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه
۳	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه + الکل ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه + هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه
۴	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه + الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه
۵	هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه

ریزنمونه‌ها پس از ضدعفونی، در زیر هود لامینار به داخل محیط‌های کشت همراه با هورمون‌های مختلف که از قبل تهیه شده بود منتقل و در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای 25 ± 2 نگهداری شدند. محیط‌های کشت پایه شامل MS (Murashige & Skoog, 1962) و B5 (Gamborg et al., 1976) حاوی هورمون‌های گیاهی در غلظت‌های متفاوت برای کالوس‌زایی، باززایی و پرآوری بودند (جدول‌های ۲ و ۳).

ریزنمونه‌ها پس از ضدعفونی، در زیر هود لامینار به داخل محیط‌های کشت همراه با هورمون‌های مختلف که از قبل تهیه شده بود منتقل و در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای 25 ± 2 نگهداری شدند. محیط‌های کشت پایه شامل MS

جدول ۲- تیمارهای مختلف هورمونی برای کالوس‌زایی زرشک

تیمارهورمونی	ردیف
B5 + ۰/۸۶ mg/l GA ₃ + ۰/۸۷ mg/l IAA + ۱/۱۲ mg/l BAP + ۱/۰۷ mg/l Kin	۱
MS + ۲ mg/l NAA + 1 mg/l Kin	۲
MS + ۱/۱۲ mg/l BAP	۳
MS + ۳/۴۴ mg/l GA ₃	۴
B5 + ۰/۱ mg/l IAA + ۰/۴۹ mg/l BAP + ۰/۴۹ mg/l Kin	۵
MS + ۳ mg/l BAP + ۰/۰۱ mg/l IBA	۶
MS + ۲ mg/l BAP + ۰/۰۱ mg/l IBA	۷

جدول ۳- تیمارهای مختلف هورمونی برای باززایی و پرآوری زرشک

تیمارهورمونی	ردیف
B5 + ۰/۸۶ mg/l GA ₃ + ۰/۸۷ mg/l IAA + ۱/۱۲ mg/l BAP + ۱/۰۷ mg/l Kin	۱
MS + ۱ mg/l BAP	۲
MS + ۲ mg/l BAP	۳
MS + ۳ mg/l BAP + ۰/۰۱ mg/l IBA	۴
MS + ۲ mg/l BAP + ۰/۰۱ mg/l IBA	۵

ریشه‌زایی

گیاهان باززایی شده که دارای ساقه و برگ بودند در محیط‌های ریشه‌زایی طبق جدول ۴ قرار گرفتند. برای این آزمایش از محیط‌های کشت پایه MS و MS 1/2 حاوی هورمون‌های IBA و NAA در غلظت‌های مختلف و همچنین محیط‌های فاقد هورمون استفاده شد.

روش‌های آماری و تجزیه داده‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام گرفت. تجزیه آماری طرح و رسم نمودارها به ترتیب با استفاده از نرم‌افزار SAS و Excel صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها، با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن با احتمال ۵ درصد انجام شد.

جدول ۴- محیط‌های استفاده شده برای ریشه‌زایی زرشک

تیمارهورمونی	ردیف
MS + ۱/۶ mg/l IBA	۱
MS + ۰/۵ mg/l IBA	۲
$\frac{MS}{2}$ + ۲ mg/l IBA	۳
MS + ۰/۰۲ mg/l NAA	۴
MS + ۵ mg/l IBA	۵
MS فاقد هورمون	۶
$\frac{MS}{2}$ فاقد هورمون	۷

نتایج

زمان نمونه‌برداری: نمونه‌برداری در این آزمایش از بهمن ۹۰ تا تیر ۹۱ انجام شد. بهترین ریزنمونه از لحاظ جوانه‌زنی مربوط به ریزنمونه‌هایی بود که از اواسط اردیبهشت تا اواخر خرداد جمع‌آوری شده بودند.

ضد عفونی: نتایج تجزیه واریانس در جدول ۴ نشان داد که تیمارهای ضد عفونی بر درصد آلودگی اثر معنی‌داری داشت (۰/۰۱ = P). نتایج مقایسه‌ی میانگین‌ها بیانگر آن است که تیمار هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه

کمترین میزان آلودگی را داشت و تفاوت معنی داری با سایر تیمارها داشت و به عنوان بهترین ضد عفونی کننده (الف)).

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تیمارهای ضد عفونی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	ضریب تغییرات
تیمار	۳	۴۹۵۶/۶۹**	۲۳/۰۸
خطا	۱۱	۲۱۳/۹۱	

** به مفهوم اختلاف سطوح تیمار با یکدیگر در سطح یک درصد است

برای درصد باززایی زرشک وجود داشت (جدول ۶)، به طوری که محیط کشت پایه MS همراه با ۱ mg/l هورمون BAP دارای بیشترین درصد باززایی در بین تیمارهای مورد استفاده بود. ریزنمونه‌ها پس از قرار گرفتن در محیط کشت پس از حدود یک هفته شروع به جوانه زنی کردند (شکل ۱ ج) و ۲ (ب)).

کالوس زایی: از محیط‌های مختلفی برای القاء کالوس استفاده شد. القاء کالوس در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۱ میلی گرم در لیتر Kin با موفقیت انجام شد (شکل ۱ (ب) و ۲ (الف)). باززایی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی داری ($\alpha = 0.01$) بین تیمارهای هورمونی مختلف

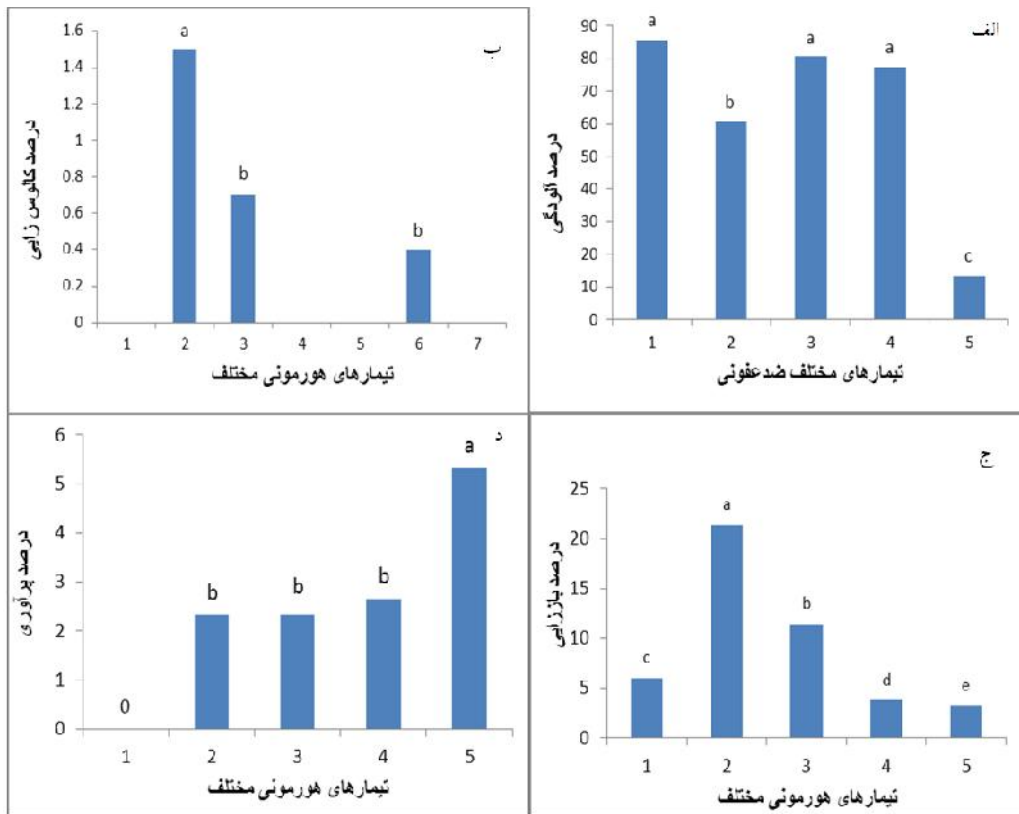
جدول ۶- نتایج تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی برای تیمارهای باززایی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	ضریب تغییرات
تیمار	۴	۲۸۶**	۶۸
خطا	۱۷	۵۰/۲۴	

** به مفهوم اختلاف سطوح تیمار با یکدیگر در سطح یک درصد است

[شکل ۱ (د) و شکل ۲ (و)]. ریشه زایی: شاخه‌های با رشد مناسب تولید شده به منظور تولید ریشه به محیط‌های ریشه زایی منتقل شدند. بهترین تیمار ریشه زایی، محیط کشت ۰/۵ mg/l IBA + MS بود. به منظور سازگاری گیاهان ریشه دار شده به جی‌پی‌پات منتقل و سپس به خاک انتقال یافتند.

پرآوری: برای پرآوری و افزایش تعداد شاخه، ریزنمونه‌های باززایی شده درون محیط‌های مخصوص پرآوری قرار گرفتند. تقریباً بعد از گذشت یک ماه پرآوری صورت گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارهای هورمونی استفاده شده، بیشترین میانگین تعداد شاخه مربوط به تیمار ۵ محیط MS حاوی ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر IBA و ۲ میلی گرم در لیتر BAP بود

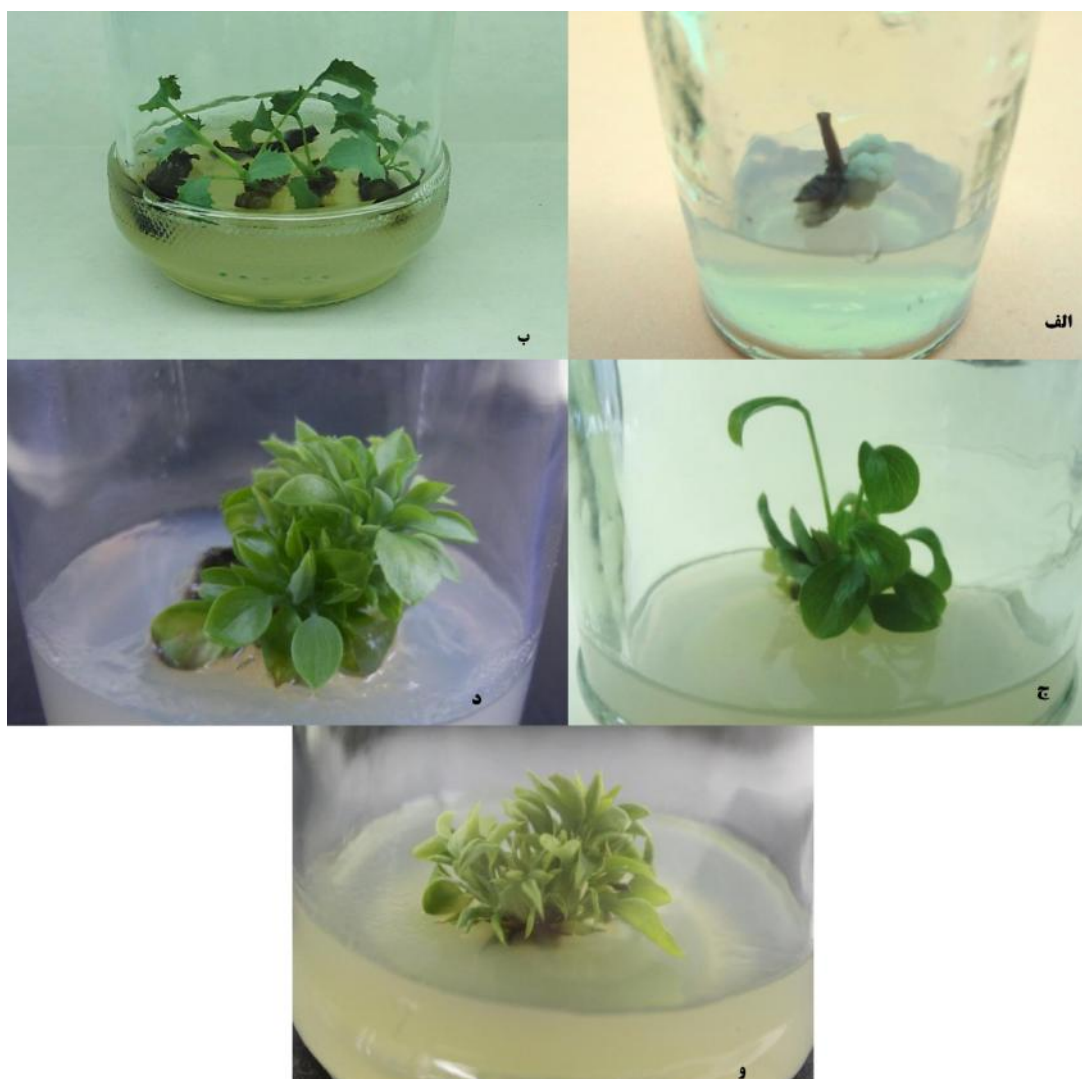


شکل ۱- مقایسه میانگین تحت تاثیر تیمارهای مختلف: الف) درصد آلودگی تحت تاثیر تیمارهای ضد عفونی ذکر شده در جدول ۱، ب) درصد کلوس زایی تحت تاثیر تیمارهای هورمونی ذکر شده در جدول ۲، ج) درصد باززایی تحت تاثیر تیمارهای هورمونی ذکر شده در جدول ۳، د) درصد پرآوری تحت تاثیر تیمارهای هورمونی ذکر شده در جدول ۳

ساقه‌های *Leucopogon obtectus* را با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد در ۱۵ ثانیه اعلام کردند. در تحقیقی دیگر Canan و همکاران (۲۰۰۶) ریزنمونه‌های برگرفته از درختان پسته را ۲ بار با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و یک بار با هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و نیز شستشو با آب مقطر استریل ضد عفونی کردند، که نتایج تمامی این آزمایشات با نتایج تحقیق حاضر که هیپوکلریت سدیم به عنوان تنها ماده ضد عفونی استفاده شد، مطابقت دارد. نتایج حاضر با نتایج ارائه شده توسط Ghavidel (۲۰۰۳) در گیاه سیب که بیان داشت ضد عفونی با هیپوکلریت سدیم تأثیری بر از بین بردن آلودگی ندارد، در صورتی که استفاده از کلرید جیوه بدین منظور نتایج مطلوبی نشان داد مغایرت دارد.

بحث

نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد که تیمار ضد عفونی هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل بهترین تیمار برای ضد عفونی ریزنمونه‌های زرشک می‌باشد. در مطالعه‌ای دیگر Mohammadi (۲۰۱۱) نیز تیمار هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل را برای ضد عفونی ریزنمونه‌های زرشک گزارش کرده است. در تحقیقی Gurel و همکاران (۱۹۹۸) در ضد عفونی ریزنمونه‌های بادام از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۴ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل استفاده کردند. در بررسی دیگر Bunn و همکاران (۱۹۸۹) غلظت مؤثر برای ضد عفونی نوک



شکل ۲- الف) التقاء کالوس در ریزنمونه زرشک در محیط پایه MS حاوی ۲ mg/l NAA و ۱ mg/l Kin، ب) رشد ریزنمونه‌های زرشک در محیط پایه MS همراه با ۱ mg/l هورمون BAP، ج) پرآوری زرشک در محیط پایه MS همراه با ۱ mg/l هورمون BAP، د، و) باززایی و پرآوری زرشک در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

بیشترین التقاء کالوس و باززایی به ترتیب روی محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و یک میلی‌گرم در لیتر BA به دست آمد. در آزمایشی بر روی نخود Vesal و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که بیشترین میزان کالوس در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین به دست آمد. در بررسی Safarnejad (۲۰۱۱) بر روی زیره سفید (*Cuminum setifolium*) بیشترین التقاء کالوس در محیط B5 حاوی ۰/۲ میلی‌گرم

در آزمایشات باززایی در بین محیط‌های به کار برده شده، محیط کشت پایه MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین محیط برای باززایی شناخته شد. در آزمایشی بر روی زرشک *B. thunbergii* محیط کشت مایع با غلظت کمی از هورمون‌های IAA و IBA به عنوان بهترین محیط برای ریزازدیادی شناخته شده‌اند که با نتایج این مطالعه مغایرت داشت (Karhu et al., 2001). در تحقیقی بر روی سماق Poordad و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده‌اند که

BAP برای رشد شاخه‌ها مؤثر بود (Mackay *et al.*, 1996) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در تحقیقی بر روی زالزالک Moghimi و Safarnejad (۲۰۱۴) بهترین محیط برای پرآوری محیط MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌دست آوردند. در ریزازدیادی گلابی روکا، Freire و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که غلظت بالای BAP موجب افزایش تعداد شاخه می‌شود، که با این نتایج مطابقت دارد. به‌طورکلی از نتایج حاصل شده در این تحقیق می‌توان گفت هورمون BAP برای باززایی زرشک بی‌دانه مؤثرترین هورمون می‌باشد و محیط MS حاوی ۰/۱ mg/l IBA + ۲ mg/l BAP بیشترین میانگین تعداد شاخه را داشت.

منابع مورد استفاده

- Anbarani, M., 1370. Berberis and jujube two bright opal of Khorasan deserts, Astan Quds Razavi Publications, p: 13-25.
- Arena, M. E., Pastur, G. M. and Vater, G., 2000. *In vitro* propagation of *Berberis buxifolia* Lam. Biocell, 24:73-80.
- Bouhouche, N., and Ksiksi, T., 2007. An efficient *in vitro* plant regeneration system for the medicinal plant *Teucrium stocksianum* Boiss. Plant Biotechnology Reports, 1: 179-184.
- Bunn, E., Dixon, K.W. and Langley, M., 1989. *In vitro* propagation of *Leocopogon obtectus* Benth. (Epacridaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 19:77-84.
- Canan, C, Ozalsan, M., Toremeh, H., Sarpkaya, K. and Iskender, E., 2006. *In vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. Var. siirt, on wild pistachio rootstocks. Journal of Cell and Molecular Biology, 5:25-31.
- Daguin, F., Guyot, E., Cavan. A.C. and Letouze. R., 1992. Micropropagation of three Mahonia clones. Acta Horticulturae, 320:193-197.
- Darroudi, H., Akbarinia, M., Safarnejad, A., Hosseini, S.M. and Hajian Shahri, M., 2015. Micropropagation of *Ribes khorasanicum* species by tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23: 65-76.
- Ehsanpour, A.A. and Amini, F., 2003. Plant Cell and Tissue Culture. Esfahan publication of Academic

در لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌دست آمد. در تحقیقی روی عناب Safarnejad (۲۰۱۵) نشان داد که بیشترین میزان باززایی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و به میزان ۹۶/۶ درصد به‌دست آمد. در تحقیقی بر روی افرا کیکم Safarnejad و Saeedi Heidari (۲۰۱۵) گزارش کردند که بهترین محیط جهت باززایی حاوی ۰/۰۰۰۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. در مطالعه‌ای دیگر روی قره‌قات Darrudi و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که بستر MS مناسب‌ترین بستر برای جوانه‌زنی ریزنمونه‌ها بود و غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BAP برای تکثیر ریزنمونه‌ها مناسب‌تر بود. در بررسی دیگری بر روی بادام Sharifmoghaddam و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که بهترین تیمار جهت القاء کالوس، شاخساره‌زایی، تکثیر و تشکیل بلندترین طول شاخساره به‌طور توأم محیط کشت MS همراه با ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و یک میلی‌گرم در لیتر BA بود. در مطالعه Roozban (۲۰۰۲) جهت پرآوری شاخساره در برخی از ارقام گلابی آسیایی، در بین ۳ غلظت صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین شاخه‌زایی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر اتفاق افتاد. در مطالعه‌ای Daguin و همکاران (۱۹۹۲) از جیبرلیک اسید به‌مقدار ۰/۶ و ۱۰ μM برای فعال‌سازی جوانه ماهونیا و زرشک به‌ترتیب استفاده کرد که این نتایج با این تحقیقات که هورمون BAP را مؤثر در فعال‌سازی جوانه‌زنی زرشک شناخته شد مغایرت دارد. یکی از پارامترهایی که در تکنیک کشت‌باقت اهمیت دارد مسئله تولید شاخه جانبی می‌باشد، زیرا در مرحله واگشت نمونه‌ها، شاخه‌های جانبی تولید شده را می‌توان جدا کرد و هر یک را به‌عنوان یک نمونه در محیطی جداگانه کشت کرد. حتی در برخی موارد که رشد شاخساره‌ها قوی باشد از هر شاخساره می‌توان چندین ریزنمونه تهیه کرد و با اینکار سرعت تکثیر بسیار افزایش می‌یابد. نتایج مطالعه‌ای روی ریزازدیادی گونه ماهونیا از خانواده زرشک نشان داد که غلظت ۵ تا ۱۰ μM

- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays- With tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497.
- Piri, Kh. and Nazarian Firoozabadi, F., 2000. Manual of Plant Tissue Culture. Bu-Ali Sina University Press, Hamedan, 203 pages.
- Poordad, B., Safarnejad, A., Ebrahimi, M.A. and Bakhshi Khaniki, Gh., 2014. Investigation of effective factors on sumac *in vitro* propagation. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*. 22: 25-33.
- Roozban Mahmoud R.Z., 2002, Evaluation of *in vitro* propagation of some Asian pear, Sapling and Seed, 18: 348-361.
- Saeedi Heidari, A. and Safarnejad, A., 2015. Micropropagation of *Acer monosperulatum* through tissue culture. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 23: 237-246.
- Safarnejad, A., 2011. A rapid and efficient method for regeneration of *Cuminum setifolium* (Boiss.) Kos.-Pol (1916). *International Journal of Science and Nature*, 2: 737-742.
- Safarnejad, A., 2015, Effect of growth regulators on *in vitro* regeneration of *Ziziphus jujube*. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 23:40-48.
- Sharifmoghaddam, N., Safarnejad, A. and Tabatabae, S.M., 2011. The effect of plant growth regulators on callus induction and regeneration of *Amygdalus communis*. *Notulae Scientia Biologicae*, 3: 97-100.
- Samsam Shariat, E. and Moattar, F., 1992. Herbs toxicity (toxicity signs and treatment). Esteghlal publishing house. 461 P.
- Vessal, S.R., Bagheri, A. and Safarnejad, A., 2002. The possibility of *in vitro* haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 6: 68-76.
- Zargari, A., 1991. Herbs. Fourth Edition. Publications of University of Tehran, 942 P.
- Ziaratnia, M. and Salmani, A., 2012, Effect of growth regulators on callus induction seedless Berberis (*Berberis vulgaris* var *asperam* L.), Third National Conference on Agricultural Biotechnology in Mashhad. Page of 261.
- Center for Education, Culture and Research, 181 pages.
- Freire, I.C.G., Coelho, C.P.S. and Barros, M.T.F., 2002. Improved culture media for the *in vitro* establishment of Pear from nodal cuttings. *Acta Horticulture*, 2: 457-461.
- Ghavidel Masooleh, A., 2003. Malyng26 (M26) basic of micropropagation. M.Sc. thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch.100 P.
- Gurel, S. and Gulsen, L., 1998. The effect of IBA and BAP on *in vitro* shoot production of almond (*Amygdalus communis* L.). *Turkish Journal of Botany*, 22:375-379.
- Kafi, M., and Balandri, A., 2002. Berberis, technology and processes of production, Zaban and Adab Publication, Mashhad. 210 P.
- Kamalinezhad, M. and Komeylizadeh, H., 1999. Harmful effects of Berberis fruit on the fetus. *Journal of Educational Research Information Center (therapist)* 1: 11-14.
- Karhu, S. and Hakala. K., 1990. Rooting *in vitro* of micropropagated barberry (*Berberis thunbergii*) shoots. *Ann. Agr. Fenn.* 29:179-185.
- Gamborg, O.L. and Shylak, J.P., 1976. Tissue culture, protoplast and morphogenesis in flax. *Botany*, 4: 301-306.
- Mackay, W.A., Molinar, Jr. F., Wall, M.M., and Cardenas, M., 1996. Micropropagation of agarita, *Berberis trifoliata* Moric. *HortScience*, 31:1030-1032.
- Misra, M., 2004. Regeneration of patchouli (*Pogostemon cablin Benth.*) plants from leaf and node callus and evaluation after growth in the field. *Plant Cell Reports*, 15: 991-994.
- Moazzen Ferdowsi, B., 1993. Berberis. Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, 49 P.
- Molafyabi, A. and Khafani, S., 2008. Evaluation of the possibility of Berberis production with new technologies, opportunities and challenges, the first national festival of yaghoot sorkh (Berberis). Ghayen. 283 P.
- Moghimi, Z. and Safarnejad, A., 2014. Assessment of micropropagation and flavonoid content of hawthorn through tissue culture. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 22: 181-191.
- Mohammadi, M., 2011. Investigation the possibility of micropropagation of *Berberis vulgaris*. M.Sc. thesis of Ferdowsi University, Mashhad.

Callus induction, regeneration and proliferation of *Berberis vulgaris* var. *asperma* using *In vitro* technique

M. Sazmand¹ and A. Safarnejad^{*2}

1- M.Sc., Islamic Azad University Branch of Ashtian, Ashtian, I.R.Iran

2*- Corresponding Author, Assoc. Prof., Faculty member of Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center, Mashhad, I.R.Iran, Email: Sebre14@yahoo.com

Received: 15.03.2015

Accepted: 13.07.2015

Abstract

Genus *Berberis* include 660 species and only one of them, *Berberis vulgaris* is cultivated as a horticultural species. *Berberis vulgaris* is propagated via cutting and souker that is very time consuming. Using tissue culture method may product larg number of plants in a short period of time. In this research, effects of plant growth regulating hormones on micropropagation of *Berberis vulgaris* were studied. Axillary buds were sterilized as explants. The explants were transferred to different medium after sterilization stages including mercuric chloride, 70% ethanol and sodium hypochlorite supplemented with different concentrations of BAP, IAA, Kin and GA3 growth regulating hormones. The cultures were kept in a growth room at 25 ± 2 °C in 16/8 h light and dark periods. Results showed that 3% NaOCl for 15 minutes was the best sterilization treatment. Also ANOVA results indicated that MS medium supplemented with 1 mg/l BAP was the best medium for regeneration. The most number of shoots (6) was observed in MS supplemented with 2 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA. Therefore, BAP was the best hormone for regeneration of *Berberis vulgaris*. The best medium for root initiation was MS containing 0.5 mg/l IBA. The regenerated plant were succesfully transferred to Jify pots and then to soil.

Keywords: *Berberis vulgaris*, *In vitro*, multiplication, plant hormons.