دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۳، شماره ۱، صفحه ۷۶-۶۵ (۱۳۹۴)

ریزازدیادی گونه قره‌قات (*Ribes khorasanicum*) از طریق کشت بافت

هادی درودی[۱]، مسلم اکبری نیا *[۲]، عباس صفرنژاد [۳]، سید محسن حسینی[۴] و محمد حاجیان شهری[۵]

۱- دانشجوی دکترای جنگل‌داری، دانشگاه تربیت مدرس و عضو پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شاخه شرق و شمال‌شرق کشور، مشهد

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه جنگل‌داری دانشگاه تربیت مدرس، نور، پست الکترونیک: Akbarim@modares.ac.ir

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد

۴- استاد، گروه جنگل‌داری دانشگاه تربیت مدرس، نور

۵- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۰۹

چکیده

گیاه قره‌قات (*Ribes khorasanicum* Saghafi & Assadi) یک گونه گیاهی با ارزش متعلق به تیره انگورک فرنگی (Grossulariaceae) و به‌فرم درختچه‌ای است که موارد استفاده مختلفی ازجمله استفاده دارویی دارد. تکثیر آن در طبیعت به‌طور عمده از طریق رویشی و به‌کمک جوانه‌های موجود در ریزوم است. یکی از روش‌های حفظ و توسعه این گونه با ارزش، تکثیر آن از طریق کشت بافت است. به‌این‌منظور جوانه‌های جانبی و انتهایی شاخه‌های تهیه شده از رویشگاه‌های طبیعی آن در کوه‌های هزارمسجد به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. روش‌های مختلف ضدعفونی مورد بررسی قرار گرفت و ریزنمونه‌های ضدعفونی شده در بسترهای MS، DKW و QL با غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و IBA برای بررسی جوانه‌زنی ریزنمونه‌ها مورد آزمایش قرار گرفت. به‌منظور بررسی پرآوری از بستر MS همراه با غلظت‌های مختلف BAP و IBA استفاده شد. همچنین از بستر MS با غلظت‌های مختلف IBA و BAP برای بررسی ریشه‌زایی استفاده شد. نتایج 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. بستر MS همراه با ۰/۵ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA برای القاء ریشه‌زایی مطلوب‌تر بود. پس از اینکه ریشه ریزنمونه‌ها به‌خوبی توسعه یافت و گیاهچه‌ها از کیفیت مطلوب برخوردار شدند اقدام به سازگار کردن آنها با محیط خارج از شیشه شد. به‌طوری‌که گیاهچه‌ها به‌تدریج با موفقیت با محیط بیرون سازگار شدند.

واژه‌های کلیدی: قره‌قات، ریزازدیادی، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، تکثیر، ریشه‌زایی.

مقدمه

جنس Ribes از تیره انگورفرنگی Grossulariaceae می‌باشد که در گذشته در تیره Saxifragaceae قرار داشت. این جنس در ایران دارای پنج گونه شناخته شده است. گونه قره‌قات خراسانی *Ribes khorasanicum* Saghafi & Assadi یکی از گونه‌های آن می‌باشد. گونه *R. khorasanicum* که انحصاری ایران و خراسان می‌باشد برای نخستین بار توسط Asadi و Sahafi در سال ۱۹۹۶ در نواحی شمال‌شرق خراسان شناسایی و معرفی گردید (Adibi *et al*., 2007). این گونه گیاهی، اندمیک شمال

خراسان و متعلق به بخش کوهستانی منطقه ایران و توران است که در ارتفاعات ۲۴۰۰ تا ۲۷۰۰ متری رشته‌کوه هزارمسجد در کلات نادری خراسان به‌صورت لکه‌های پراکنده در شیب‌های شمالی رشته‌کوه‌های منطقه دیده می‌شود و دارای اهمیت بسزایی از لحاظ زینتی، خواص دارویی و بازدارنده فرسایش خاک است. در رویشگاه‌های آن متوسط بارندگی حدود ۴۱۲ میلی‌متر است. منطقه رویش این گونه حداقل ۴ ماه خشک در سال دارد. بیشترین بارندگی در اسفندماه می‌باشد که ۱۵ تا ۲۵ درصد بارندگی سالانه را شامل می‌شود. اقلیم آن براساس روش دمارتن مدیترانه‌ای است. این گیاه در خاک‌های لومی خنثی تا کمی اسیدی که حاوی مقدار زیادی مواد آلی کربن‌دار باشد رشد می‌کند. نیاز گیاه به نیتروژن و پتاسیم خاک بالا اما نیاز آن به فسفر اندک است. این گیاه سایه‌دوست بوده و دمای بالا و تابش شدید برای این گیاه قابل تحمل نیست. سیستم ریشه‌ای آن سطحی می‌باشد. تکثیر آن در طبیعت به‌طور عمده از طریق رویشی و به‌کمک جوانه‌های موجود در ریزوم است.

مطالعات اکولوژیکی، ضمن نشان دادن ویژگی‌های فردی با ارزش، حساس بودن جمعیت این گیاه را نسبت به انقراض، به‌دلیل بهره‌برداری‌های بی‌رویه انسان نشان می‌دهد و براساس معیارهای منتشر شده مرکز جهانی پایش حفاظت می‌توان آن را جزو طبقه آسیب‌پذیر محسوب کرد که این مسئله اهمیت حفاظت آن را از نظر بیولوژی تأکید می‌کند (Adibi & Ejtehadi, 2008). در مطالعه‌ای که برای بررسی وضعیت زادآوری این گونه از طریق بذر انجام شد، نتایج بررسی درصد جوانه‌زنی بذرها تحت تیمارهای مختلف (سرما، اسید، و هورمون) نشان داد که هیچ‌یک آثاری از شکستن خفتگی و جوانه‌زنی نداشتند. نتیجه بررسی آزمون تترازولیوم نیز قدرت رویش بذرهای استفاده شده را صفر نشان داد (Adibi, 2005).

یکی از راه‌های حفظ و توسعه این گونه با ارزش کشت بافت می‌باشد. البته تاکنون کشت بافت این گونه و سایر گونه‌های این جنس در داخل کشور انجام نشده است؛ اما در خارج از کشور روی جنس‌های مشابه آن از قبیل *Ribes nigrum* , *Ribes rubrum, Ribes grossularia* به‌دلیل اهمیت دارویی و اهمیتی که در صنایع غذایی دارند مطالعات نسبتاً زیادی انجام شده‌است و هزاران هکتار باغ از این گونه‌ها در کشورهای اروپایی و آمریکا احداث شده است. ازجمله مطالعات انجام شده در خارج کشور می‌توان به‌موارد ذیل اشاره کرد: Welander (۱۹۸۵) محیط کشت بهینه برای ریزازدیادی انگورفرنگی (*Ribes grossularia*) را بررسی کرد، نتایج او نشان داد که محیط کشت MS با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۵ میکرومول IBA به‌عنوان محیط بهینه مطرح می‌باشد. محیط نمکی Lepoivre بدون هیچ هورمونی برای طویل‌شدن ساقه استفاده شد. در این محیط کشت حدود ۵۰ درصد از ساقه‌ها ریشه‌دار شدند. در مطالعه Kolbanova و Koukharchik (۲۰۰۰) روی *Ribes nigrum*، بهترین بستر محیط کشت MS نیمه جامد همراه با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر IBA بود و بهترین زمان برای انتقال گیاهچه‌ها به محیط غیراستریل ژانویه و فوریه معرفی گردید. در تحقیقی که توسط Ruzic و Lazic (۲۰۰۶) انجام شد، به بررسی روش‌های تکثیر سریع کولتیوارهای جدید Blackberry و Black currant پرداختند. آنان در مرحله استقرار، از بستر MS همراه با بنزیل آدنین (BA)، IBA و جیبرلین (GA_3) به‌ترتیب با غلظت‌های ۲، ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده کردند و در مرحله تکثیر نیز از بستر MS همراه با BA و IBA یا نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) و جبرلین استفاده کردند. در مرحله ریشه‌دهی نیز از بستر MS با غلظت نمک‌های معدنی ۰/۵ همراه با IBA و جبرلین به‌ترتیب با غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و ۱ گرم در لیتر زغال‌فعال استفاده کردند. بررسی کولتیوارهای red Currant توسط Sedlak و Paprstein (۲۰۱۲) انجام شد. آنان مناسب‌ترین نتیجه را در بستر MS حاوی غلظت کمتر هورمون ۶- بنزیل‌آمینوپورین (BAP) یعنی ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آوردند. از آنجا که گونه قره‌قات یکی از گونه‌های بومی و ارزشمند کشور می‌باشد، بنابراین از ارزش دارویی زیادی برخوردار است؛ همچنین به‌دلیل

خوش‌خوراکی زیاد، تعلیف دام، دامنه اکولوژیکی محدود، نیازهای بالای اکولوژیکی و محدودیت تکثیر این گونه در حال انقراض بوده و اگر مورد حمایت قرار نگیرد به‌طور قطع سیر قهقرایی را پیموده و از عرصه طبیعت محو خواهد شد (Sahafi & Asadi, 1996). بعلاوه اینکه در تلاش‌هایی که برای تکثیر این گونه از طریق قلمه و بذر انجام شده موفقیتی حاصل نشده است، از این‌رو ضرورت دارد که از طرق دیگر ازجمله کشت بافت اقدام به توسعه و تکثیر این گونه شود تا این گونه بومی و ارزشمند برای آیندگان نیز باقی بماند.

مواد و روش‌ها

با مراجعه به رویشگاه‌های گونه مورد نظر در کوه‌های هزار مسجد واقع در شمال استان خراسان رضوی در ارتفاع ۲۴۰۰ تا ۲۷۰۰ متری از سطح دریا اقدام به برداشت شاخه‌های جوان نیمه‌خشبی شد. شاخه‌ها بلافاصله در داخل کیسه‌های پلاستیکی قرار گرفته و به‌سرعت به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس ریزنمونه از بخش‌های مختلف گیاه ازجمله جوانه انتهایی و میانگره تهیه شد. ابتدا پیش تیمارهای ضدعفونی شامل جداکردن برگ‌های اضافی، قسمت‌های پوسیده و قدیمی و قراردادن در زیر آب جاری به‌مدت ۱ تا ۲ ساعت به‌منظور حذف آلودگی‌های سطحی انجام شد. پس از ضدعفونی نمونه‌ها با محلول‌های مناسب، برای عاری‌سازی آنها از پاتوژن (جدول ۱) به محیط‌های کشت مختلف و با غلظت‌های هورمونی متفاوت منتقل گردیدند تا محیط کشت مناسب و تیمار هورمونی مطلوب برای استقرار ریزنمونه‌ها شناسایی شوند (جدول ۲).

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده برای ضدعفونی ریزنمونه‌های قره‌قات

ردیف	تیمار ضدعفونی
۱	کلرید جیوه ۰/۰۳٪ به‌مدت ۲ دقیقه، اتانول ۷۰٪ به‌مدت ۲ دقیقه و هیپوکلریت سدیم (وایتکس) ۱/۵٪ کلر فعال ۱۵ دقیقه، سپس شستشو با آب مقطر در زیر هود لامینار فلو۳ مرتبه
۲	اتانول ۷۰٪ به‌مدت ۳۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۲٪ کلر فعال ۲۰ دقیقه، شستشو با آب مقطر استریل ۳ مرتبه
۳	کلرید جیوه ۰/۱٪ به‌مدت ۳ دقیقه، الکل ۷۰٪ به‌مدت ۱ دقیقه، شستشو با آب مقطر استریل ۳ مرتبه
۴	هیپوکلریت سدیم ۳٪ کلر فعال به‌مدت ۱۵ دقیقه و شستشو با آب مقطر ۳ مرتبه

جدول ۲- تیمارهای مورد استفاده برای القاء جوانه‌زنی ریزنمونه‌های قره‌قات

شماره	تیمار هورمونی	شماره	تیمار هورمونی
۱	MS فاقد هورمون	۹	MS+ 5 mg/l BAP+ 0.1 mg/l IBA
۲	MS+ 0.2 mg/l BAP	۱۰	MS+ 2 mg/l BAP
۳	MS+ 0.5 mg/l BAP	۱۱	MS+ 5 mg/l BAP
۴	MS+ 1 mg/l BAP	۱۲	DKW فاقد هورمون
۵	MS+ 3 mg/l BAP	۱۳	DKW+ 0.5 mg/l BAP+ 0.05 mg/l IBA
۶	MS+ 0.2 mg/l BAP+ 0.1 mg/l IBA	۱۴	QL فاقد هورمون
۷	MS+ 0.5 mg/l BAP+ 0.1 mg/l IBA	۱۵	QL + 0.5 mg/l BAP+ 0.05 mg/l IBA
۸	MS+ 3 mg/l BAP+ 0.1 mg/l IBA		

ریزنمونه‌هایی که اندازه آنها ۵ تا ۱۰ میلی‌متر بود به شیشه‌های کوچک ۴۰ تا۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ سی‌سی محیط منتقل شدند. در هر شیشه یک عدد ریزنمونه کشت شد. برای هر ترکیب تیمار ۳۰ تکرار در نظر گرفته شد. درصد جوانه‌زنی ریزنمونه‌ها در تیمارهای مختلف هورمونی و محیط‌های مختلف تعیین شد.

ریزنمونه‌های فعال‌شده برای بررسی پرآوری به محیط‌های پرآوری منتقل شدند، برای پرآوری سیتوکینین مورد استفاده بنزیل‌آمینوپورین (BAP) و اکسین مورد استفاده ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA) بود. به این صورت که غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱، ۳ و ۵) میلی‌گرم در لیتر از سیتوکینین (BAP) در حضور یا عدم حضور ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی پرآوری، هر تیمار در ۵ تکرار مطالعه شد و در هر تکرار ۵ ریزنمونه کاشته شد. پس از طی مراحل رشد لازم و پس از حدود ۴ هفته شاخسارهای پرآوری شده بزرگتر از یک سانتی‌متر در محیط‌های مختلف برای القاء ریشه‌زایی و تعیین تیمار مناسب ریشه‌زایی به محیط‌های پایه MS و با ترکیب هورمونی مختلف منتقل شدند. تیمارهای هورمونی مورد استفاده برای بررسی ریشه‌زایی شامل تیمارهای غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر IBA در حضور یا عدم حضور ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. برای بررسی میزان ریشه‌زایی نیز برای هر تیمار ۵ تکرار و در هر تکرار ۵ ریزنمونه کشت شد. پس از تعیین بهترین ترکیب تیمار ریشه‌زایی و رشد کافی ریشه گیاهچه‌ها و تولید مقادیر کافی گیاه ریشه‌دار، اقدام به انتقال آنها به‌خارج از شیشه برای اعمال سازگاری اولیه نمونه‌ها شد. به این صورت که پس از خارج‌کردن گیاهچه‌ها از داخل شیشه اقدام به شستن محیط اطراف ریشه شد، زیرا در صورت باقی‌ماندن محیط کشت در اطراف ریشه به‌علت مواد غذایی غنی آن سریع دچار آلودگی می‌شود. پس از شستشوی ریشه گیاهچه‌ها آنها را به داخل جیفی‌پاتی که قبلا استریل شده منتقل شد و به‌تدریج میزان رطوبت اطراف گیاهچه کم و میزان شدت نور اطراف گیاهچه افزایش یافت تا پس از دو تا سه هفته کاملا در شرایط محیط اطراف قرار گرفته و بعد اقدام به کشت در داخل گلدان شد. طرح آماری مورد استفاده طرح کاملا تصادفی بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و به این صورت عمل شد که پس از تعیین همگنی و نرمالیتی داده‌ها، برای مقایسات کلی تیمارها از آزمون تجزیه واریانس و برای دسته‌بندی میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد.

کلیه محیط‌های تهیه شده دارای ۳٪ ساکارز و ۰/۸٪ آگار بود و pH محیط‌ها با استفاده از NaoH و Hcl در ۵/۷ تا ۵/۸ تنظیم شد. برای استریل محیط‌های تهیه شده از اتوکلاو با فشار ۱/۲ اتمسفر و زمان ۱۵ دقیقه استفاده شد. کشت‌ها در اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی که با استفاده از لامپ‌های فلورسنت سرد تأمین شد، نگهداری شدند. واکاشت‌ها نیز هر ۴ هفته یکبار انجام شد.

نتایج

آلودگی‌های درون‌شیشه‌ای یکی از مشکلات کشت بافت بوده و از مهمترین مراحل کار در کشت بافت است و باید دقت کرد که علاوه بر از بین بردن آلودگی‌ها باعث مرگ گیاه نشود. برای تعیین روش مناسب ضدعفونی ریزنمونه‌ها از روش‌های متعددی استفاده شد، اما چون کشت ریزنمونه در زمان‌های متفاوتی از سال انجام شد و در فصول مختلف سال منشأ آلودگی و میزان آلودگی تغییر می‌کند و از طرفی چون میزان آلودگی بسیار بالا بود و یا گاهی بر اثر شدت ضدعفونی ریزنمونه‌ها می‌سوخت از ذکر سایر تیمارهای ضدعفونی خودداری گردید. نتایج تجزیه و تحلیل روش‌های مختلف ضدعفونی ریزنمونه‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر میزان درصد آلودگی ریزنمونه‌ها بین آنها وجود دارد (جدول ۳)، به‌طوری‌که کمترین درصد آلودگی حدود ۴۳ درصد و مربوط به تیمار ۱ می‌باشد (شکل ۱).

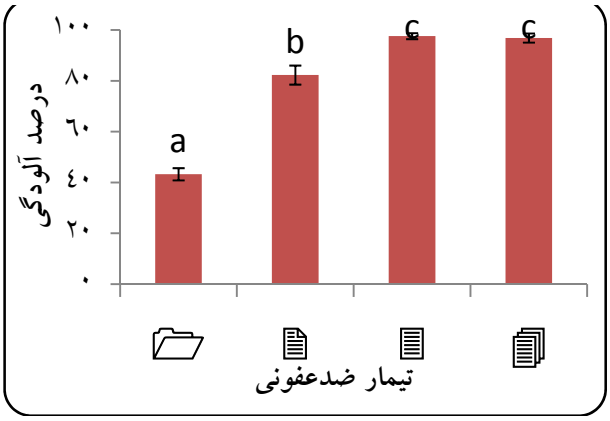
فعال‌سازی جوانه‌های جانبی و انتهایی

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که نوع محیط پایه و ترکیب تیمار هورمونی مورد استفاده تأثیر معنی‌داری بر میزان درصد فعال‌سازی جوانه‌های ریزنمونه‌ها داشت (جدول ۳). به‌طوری‌که بیشترین درصد فعال شدن در محیط پایه MS به‌دست آمد (شکل۲) و تیمار هورمونی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP نیز با ۹۰ درصد جوانه‌زنی بیشترین درصد فعال‌سازی جوانه را داشته است (شکل۳).

جدول۳- تجزیه واریانس درصد آلودگی ریزنمونه‌های کاشته در تیمارهای مختلف ضدعفونی، درصد فعال‌سازی جوانه ریزنمونه‌ها تحت تأثیر تیمارها و محیط کشت‌های مختلف

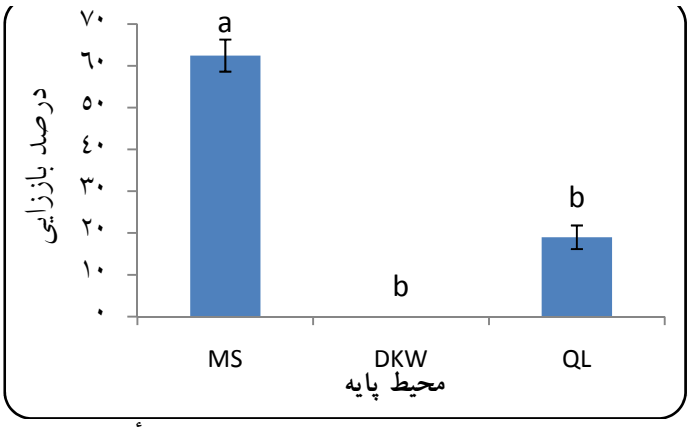
تیمار		df	میانگین مربعات	F
ضدعفونی		۳	۶۱۸/۱۹۵۰	۷۱۴/۱۰۵**
ترکیب هورمونی	تیمار	۱۵	۲۳۵۳/۸۱۵	۸/۱۶۸**
محیط پایه		۲	۱۲۸۷۷/۱	۳۴/۱۳۵**

**: معنی‌داری در سطح ۱ درصد

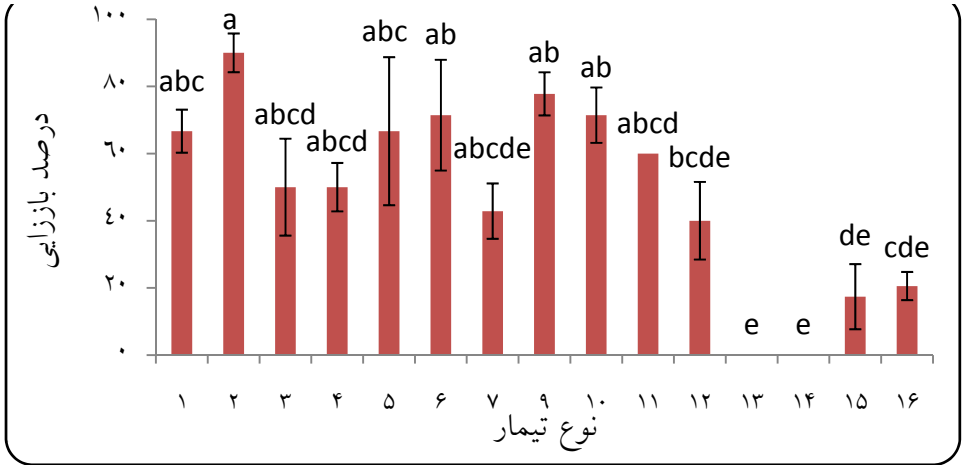


شکل ۱- درصد آلودگی ریزنمونه‌ها تحت تیمارهای مختلف ضدعفونی

(تیمارهای ضدعفونی مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است)



شکل ۲- درصد فعال سازی جوانه ریزنمونه‌ها تحت تأثیر محیط‌های پایه مختلف



شکل ۳- درصد فعال‌سازی جوانه ریزنمونه‌ها تحت تأثیر ترکیب‌های هورمونی مختلف

(انواع تیمارها در جدول ۲ ارائه شده‌اند)

پرآوری

نتایج آزمون تجزیه واریانس نشان داد که غلظت هورمون BAP باعث ایجاد تفاوت‌های معنی‌داری در تعداد شاخسارهای تولیدی و طول شاخسارها شد، اما هورمون IBA تفاوتی از این نظر ایجاد نکرد. البته از نظر میانگین تعداد شاخساره و طول شاخساره تفاوت‌های معنی‌داری بین ترکیب تیمارهای مختلف وجود داشت (جدول ۴).

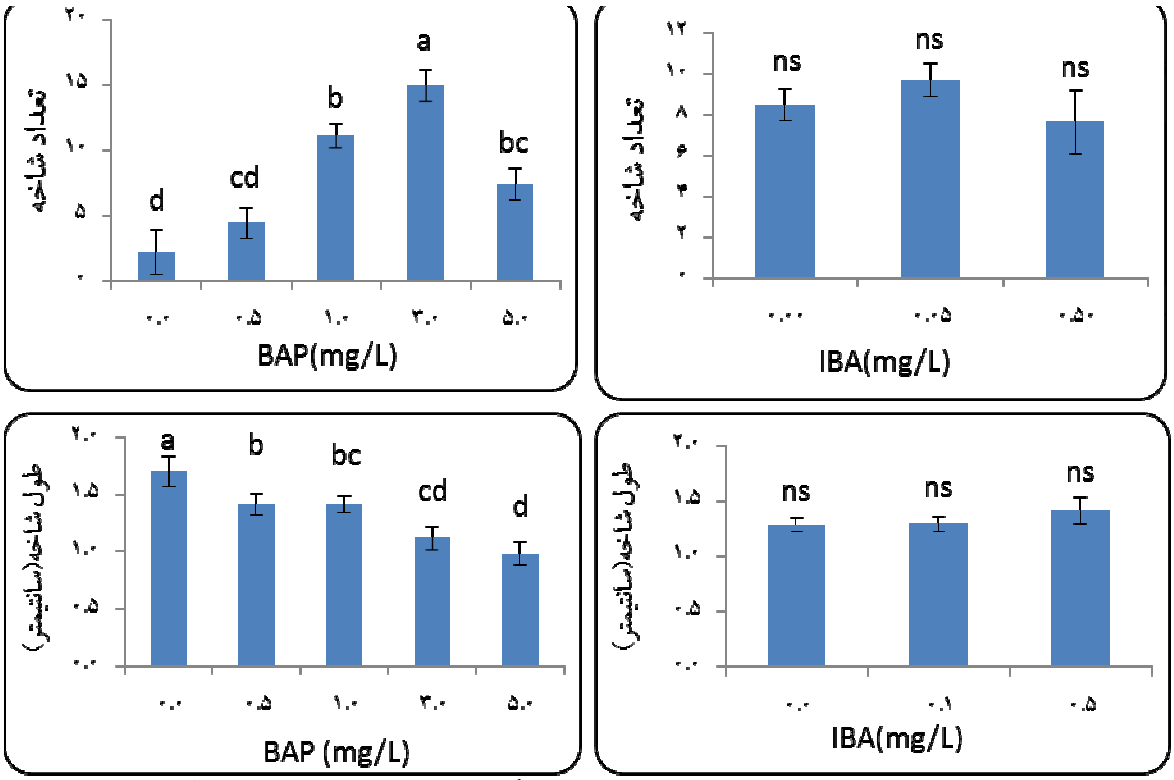
نتایج مقایسه میانگین تعداد شاخساره در تیمارهای مختلف نشان داد که در ۳ mg/l BAP بیشترین شاخه‌زایی مشاهده شد. درحالی که بیشترین طول شاخساره‌ها در تیمار فاقد هورمون مشاهده شد (شکل ۶).

جدول ۴- نتایج آزمون تجزیه واریانس اثر هورمون‌های مختلف بر میزان پرآوری قره‌قات

متغیر	متغیر	df	میانگین مربعات
غلظت **BAP**	تعداد شاخساره	۴	۱۹۹/۸**
	طول شاخساره	۴	۰/۵۱۸**
غلظت **IBA**	تعداد شاخساره	۲	۸/۳۷ ns
	طول شاخساره	۲	۰/۰۵۵ ns
ترکیب تیمار	تعداد شاخساره	۹	۹۳/۶۴**
	طول شاخساره	۹	۰/۲۴۶**

**: معنی‌دار در سطح ۱ درصد و ns: عدم اختلاف معنی‌دار

شکل ۴- مرحله فعال‌سازی و شاخه‌زایی ریزنمونه‌های قره‌قات (به‌ترتیب چپ و راست)



شکل ۵- مقایسه میانگین طول شاخه و تعداد شاخساره تحت تأثیر تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون دانکن

جدول ۵- میانگین ارتفاع و تعداد شاخساره‌های ایجاد شده از هر ریزنمونه در بین ترکیب تیمارهای مختلف

	ترکیب هورمونی	میانگین تعداد شاخساره	میانگین طول شاخساره (Cm)
۱	MS فاقد هورمون	۲/۱۸±۰/۵۴**d**	۱/۷۰±۰/۱۸**a**
۲	MS +۰/۵mg/l BAP	۴/۳۸±۱/۰۳**cd**	۱/۴۳±۰/۲۵ **ab**
۳	MS +۱mg/l BAP	۱۴/۵۵±۲/۵۶**a**	۱/۴۰±۰/۱۳ **ab**
۴	MS +۳mg/l BAP	۱۵/۰۸±۲/۲۸**a**	۱/۰۳±۰/۰۹ **bc**
۵	MS +۵mg/l BAP	۶/۳۰±۰/۸۴**bcd**	۰/۸۵±۰/۰۶**c**
۶	MS +۰/۵ mg/l BAP + ۰/۰۵ mg/l IBA	۴/۴۴±۰/۴۳**cd**	۱/۴۰±۰/۰۹**ab**
۷	MS +۱ mg/l BAP + ۰/۰۵ mg/l IBA	۱۱/۰۶±۱/۱۳**ab**	۱/۴۳±۰/۱۴**ab**
۸	MS +۳ mg/l BAP + ۰/۰۵ mg/l IBA	۱۴/۸۵±۳/۰۸**a**	۱/۲۱±۰/۰۳**bc**
۹	MS +۵ mg/l BAP + ۰/۰۵ mg/l IBA	۸/۴۳±۲/۰۲**bc**	۱/۱۱±۰/۱۴**bc**
۱۰	MS +۱ mg/l BAP + ۰/۵ mg/l IBA	۷/۶۵±۱/۱۶ **bc**	۱/۴۱±۰/۱۲**ab**

ریشه‌زایی

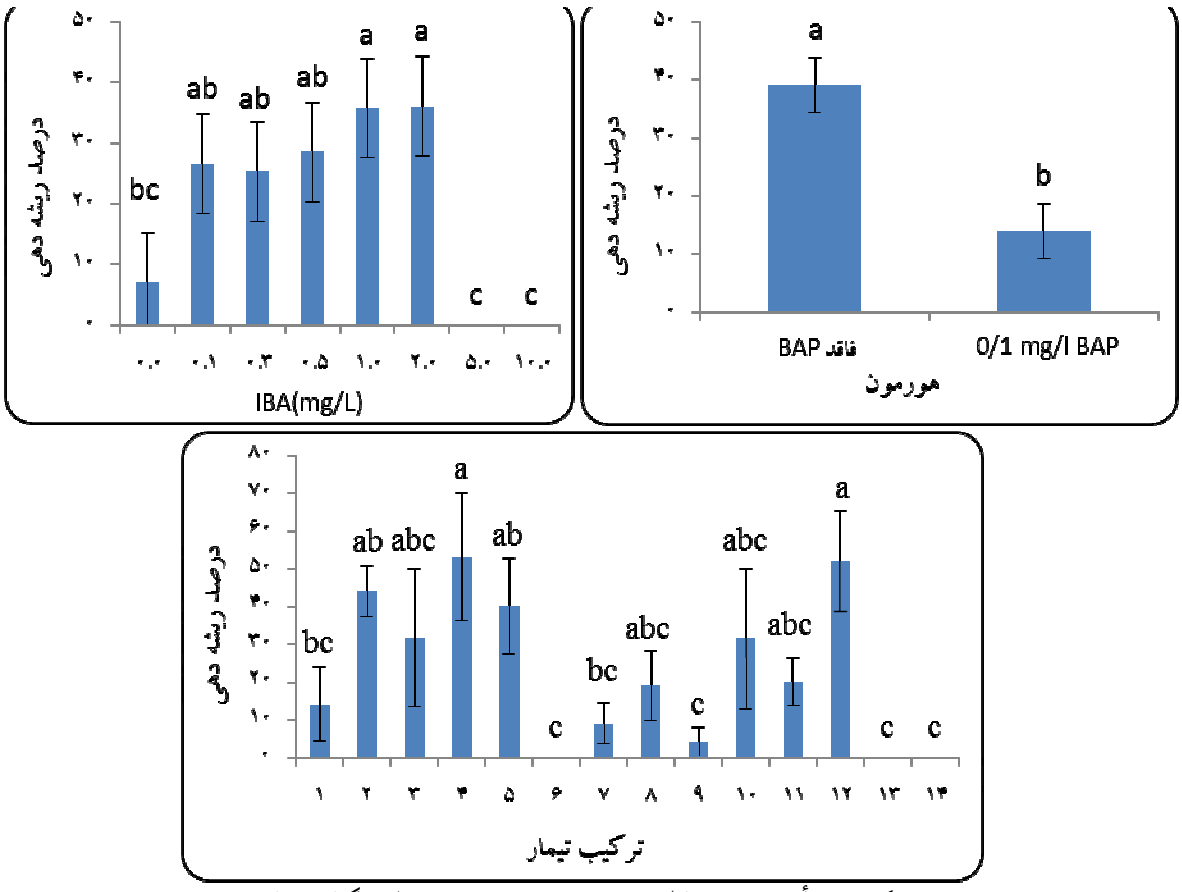
نتایج آزمون تجزیه واریانس نشان داد که ترکیب هورمون، غلظت هورمون IBA و ترکیب تیمارهای هورمونی تأثیر معنی‌داری بر درصد ریشه‌زایی شاخه‌ها داشت (جدول ۶).

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که افزودن هورمون BAP به محیط باعث کاهش درصد ریشه‌زایی شد (شکل ۶). بیشترین درصد ریشه‌زایی در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد و ترکیب تیمار MS +۲ mg/l IBA بیشترین درصد ریشه‌دهی را به خود اختصاص داد (شکل ۶).

جدول ۶- آزمون تجزیه واریانس اثر عوامل مختلف بر درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت در شرایط درون شیشه

تیمار	df	میانگین مربعات
نوع هورمون	۱	۲/۰۵۴**
غلظت	۷	۰/۶۵۹**
ترکیب تیمار	۱۳	۰/۴۶۸**

**: معنی‌داری در سطح ۱ درصد



شکل ۶- تأثیر نوع و غلظت هورمون بر درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌ها

شکل ۷- گیاهچه ریشه‌دار شده و گیاهچه‌های سازگار شده قره‌قات در شرایط گلخانه

بحث و نتیجه‌گیری

آلودگی‌های قارچی و باکتریایی در زمره شدیدترین آلودگی‌های محیط کشت هستند. این موجودات بسرعت و زودتر از مواد گیاهی رشد یافته شرایط تعریف شده محیط کشت را تغییر داده و باعث رشد ضعیف یا مرگ ریزنمونه‌ها می‌شوند (Mehrdad, 2012). در تحقیق حاضر تیمار ضدعفونی کلرید جیوه ۰/۰۳ درصد به‌مدت ۲ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۲ دقیقه و هیپوکلریت سدیم (وایتکس) ۱/۵ درصد کلر فعال ۱۵ دقیقه بهترین نتیجه را در بین تیمارهای مختلف دربرداشت که به‌نظر می‌رسد تأثیر همزمان کلرید جیوه، الکل و وایتکس باعث چنین نتیجه‌ای شده‌است. در همین رابطه عنوان شده که استفاده از الکل اتیلیک ۷۰ درصد باعث می‌شود لایه مومی سطح کوتیکول حذف شده و محلول ضدعفونی کننده اصلی قدرت نفوذ و تأثیر بهتری بر بافت نمونه‌ها داشته باشد (Harum, 2013). از عوامل مؤثر در آلودگی ریزنمونه‌ها منشأ ریزنمونه، روش جمع‌آوری ریزنمونه (هرچه ریزنمونه سریعتر به آزمایشگاه منتقل و مورد کاشت قرار گیرد احتمال آلودگی کمتر است)، نوع بافت و مورفولوژی ریزنمونه می‌باشد. گونه گیاهی و زمان برداشت ریزنمونه در میزان آلودگی نیز اهمیت زیادی دارد. در مطالعه انجام شده توسط Ruzic و Lazic (۲۰۰۶) روی گونه *R. nigrum* شستشوی ریزنمونه‌ها در آب جاری (۱/۵– ۲ ساعت) و قرار دادن در الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه و سفیدکننده ۱۰ درصد به‌مدت۱۰ دقیقه و در نهایت شستشو در آب مقطر استریل سه مرتبه، به‌عنوان تیمار ضدعفونی مناسب برای این گونه معرفی شد. در مورد قره‌قات قرمز حذف برگ‌های توسعه یافته و فروبردن در محلول تازه کلرید جیوه ($Hgcl_2$) ۰/۱۵٪ به‌مدت یک دقیقه که چند قطره محلول Tween 20 افزوده شده را به‌عنوان تیمار ضدعفونی مناسب معرفی کردند (جمله‌بندی ناقص و نامفهوم است) (Sedlak & Paprstein 2012). در گونه *R. magellanicum* نیز Arena و Pastur (۱۹۹۵) از هیپوکلریت سدیم ۱٪ کلر فعال استفاده کردند و تنها ۱۲ درصد آلودگی داشتند و ۷۰ درصد ریزنمونه‌ها زنده ماندند.

زمان تهیه ریزنمونه در میزان آلودگی خیلی اهمیت دارد، به‌طوری‌که بهترین زمان تهیه ریزنمونه اواسط اردیبهشت تا اواخر خرداد می‌باشد که ریزنمونه‌ها هنوز زیاد آلوده نشده‌اند و از طرفی جوانه‌های فعال توانایی باززایی بیشتری دارند. در تحقیق حاضر نمونه در زمان‌های مختلف تهیه شد و تیمارهای مختلف ضدعفونی روی آن اعمال شد، اما به‌علت ویژگی خاص جوانه‌های قره‌قات یا ریزنمونه‌ها آلوده می‌شدند یا در اثر ضدعفونی ریزنمونه می‌سوخت.

تفاوت عمده محیط‌های کشت MS و DKW در میزان یون‌های آمونیوم و نیترات و غلظت کل یون‌هاست و MS دارای مقدار بیشتری نیترات آمونیوم و کلر است. محیط DKW دارای نیترات کلسیم به‌عنوان منبع نیتروژن است و از نظر یون کلسیم غنی است (Saadat *et al.*, 2012). در مورد محیط QL نیز میزان کلسیم نسبت به MS بیشتر است، در حالی‌که آمونیوم در محیط پایه QL نسبت به MS کمتر است (Abdollahi *et al.*, 2006). در تحقیق حاضر محیط پایه MS نتایج بهتری در جوانه‌زنی ریزنمونه‌های قره‌قات از خود نشان داد که به‌نظر می‌رسد بیشتر به‌فرم دسترسی و میزان جذب نیتروژن توسط گیاه ارتباط داشته باشد. در بیشتر تحقیقات انجام شده روی جنس Ribes همانند تحقیق حاضر محیط پایه MS را به‌عنوان محیط پایه مناسب برای تکثیر تشخیص دادند (Pastur 1995., & Welander, 1985., Arena Lazic, 2006., Toshkov & Domozetova, &Ruzic 2006., Sedlak & Paprstein, 2012., Manole *et al.*, 2012). بهترین ترکیب تیمار هورمونی برای جوانه‌زنی ریزنمونه‌ها (باززایی) نیز محیط MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP تشخیص داده شد، اما به‌نظر می‌رسد در جوانه‌زنی محیط پایه از ترکیب هورمونی اهمیت بیشتری داشته است و تقریبا در تمام ترکیب‌های هورمونی محیط MS جوانه‌زنی نسبتاً مناسب بود؛ اما غلظت بالاتر از ۳ میلی‌گرم در لیترBAP نوعی حالت بازدارندگی ایجاد کرد. در همین رابطه Pastur و Arena (۱۹۹۵) روی *R. magellanicum* نیز بهترین غلظت هورمونی را ۰/۲۵ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تشخیص دادند.

در تحقیق حاضر از هورمون BAP در مرحله تکثیر ریزنمونه‌ها استفاده شد. البته نقش و اثر BAP در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخه‌های جدید است، بنابراین با افزایش غلظت BAP در محیط، شاخساره‌های بیشتر اما کوتاه‌تر تولید می‌شود. با استفاده از BAP پرآوری شاخساره‌ها در پای شاخساره‌ها انجام می‌شود و این شاخساره‌های جانبی از نوع محوری بوده و به‌ندرت از شاخساره‌های نابه‌جا هستند (Ruzic & Vujovic, 2008). نتایج تحقیق حاضر نیز مؤید مطلب ذکر شده می‌باشد و شاخساره‌هایی به‌فرم روزت تولید شد. در تحقیق حاضر بیشترین شاخه‌زایی در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد و بیشترین طول شاخساره‌ها در تیمار فاقد هورمون به‌دست آمد، اما با توجه به ترکیب تیمارها و با عنایت به هر دوی میانگین تعداد ساقه و طول ساقه و با توجه به ضریب تکثیر بالا (۱۴/۵) به‌نظر می‌رسد تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مناسب‌ترین تیمار برای تکثیر ریزنمونه‌ها باشد. بنابراین با افزایش غلظت هورمون فوق تا ۳ میلی‌گرم در لیتر بر تعداد شاخساره‌ها افزوده، اما از ارتفاع آنها کاسته شد. این کاهش ارتفاع به‌نظر می‌رسد به‌دلیل نقش هورمون BAP باشد که از غالبیت انتهایی جلوگیری می‌کند و از سویی نقش دیگر آن تخصیص بیشتر مواد غذایی در دسترس گیاه برای تولید شاخه‌های بیشتر می‌باشد. در تحقیق Calpa و همکاران (۲۰۱۲) روی گونه قره‌قات سیاه نیز کاهش تحت تأثیر BAP ذکر شده است.

حضور هورمون اکسین با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر تأثیر معنی‌داری در افزایش ضریب تکثیر و افزایش طول شاخساره‌ها نداشت. در همین رابطه Lazic و Ruzic(۲۰۰۶) نیز مانند این تحقیق، اثر مثبت اکسین بر پارامترهای تکثیر *R. nigrum* را مشاهده نکردند. افزودن ۱ mg/l NAA به محیط حاوی ۰/۵ mg/l BA باعث کاهش ضریب تکثیر شاخه‌ها در *Ribes nigrum* شد. بدون اینکه تأثیر مثبت در طول شاخه و کیفیت آنها ایجاد نماید (Ruzic *et al.*, 2006). به‌طور مشابه Orlikowska (۱۹۸۴) گزارش کرد که *Ribes nigrum* نسبت به افزودن اکسین به بستر پرآوری صرف‌نظر از نوع و غلظت اکسین به‌طور معکوسی پاسخ داده است و میزان ضریب تکثیر کاهش یافته است.

با توجه به نتایج حاصل شده از نظر ضریب تکثیر و ارتفاع شاخساره‌ها، به‌نظر می‌رسد که تیمار هورمونیBAP ۱ mg/l مناسب‌ترین ترکیب هورمونی برای استفاده در مرحله پرآوری این گونه می‌باشد. همانند تحقیق حاضر Sedlak و Parstin (۲۰۱۲) محیط MS حاوی ۱ mg/l هورمون BAP را مناسب‌ترین ترکیب به‌منظور تکثیر *R. rubrum* عنوان کردند. نتایج Lazic و Ruzic (۲۰۰۶) میزان ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP را مناسب‌ترین تیمار برای تکثیر *R. nigrum* تشخیص دادند.

ریشه‌زایی پس از حدود دو هفته از کشت در محیط ریشه‌زایی آغاز شد. معمولا برای تحریک ریشه‌زایی از اکسین‌ها استفاده می‌کنند، در این تحقیق اکسین مورد استفاده IBA بود که در غلظت‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت. بهترین میزان ریشه‌زایی در دو غلظت ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. نتایج نیز نشان داد که در حضور سیتوکینین‌ها ریشه‌زایی کاهش یافته است. در همین ارتباط Mahdavian و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که یکی دیگر از اثرات هورمون BAP ممانعت کامل یا نسبی از تشکیل ریشه است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه دوستان و همکاران در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شعبه شرق و شمال‌شرق کشور که در انجام این تحقیق همکاری کردند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Adibi-Bidi, F., 2005. Population Ecology of *Ribes khorasanicum* an Endemic Plant Species to North of Khorasan, Iran. M.Sc. thesis, Ferdowsi University of Mashhad. 105pp.
- Adibi, F., Ejtehadi H. and Abrishamchi P., 2007. Photochemical and antibacterial effects of *Ribes khorasanicum*, an endemic plant species to North-East of Khorasan, Iran. J. of Medicinal Plants, 24: 64-72.
- Adibi, F. and Ejtehadi, H., 2008. Population ecology of *Ribes khorasanicum* an endemic plant species to North of Khorasan, Iran. Iranian Journal of Biology, 21: 748-759.
- Arena, M.E. and Pastur, G.J.M., 1995. *In vitro* propagation of *Ribes magellanicum* Poiret. Scientia Horticulturae, 62: 139–134.
- Assadi, M. and Saghafi, F., 1996. *Ribes khorasanicum* Grossulariaceae, A new species from NE. Iran. The Iranian Journal of Botany, 7: 7-10.
- Harum, N., 2013. Surface sterilization procedures for leaves explants of rhododendron (*Rhododendron javanicum* (Blume) Benn) cultured *in vitro*. The Third Basic Science International Conference, B 21: 1-4
- Kolbanova, E.V. and Koukharchik, N.V., 2000. Propagation of black currant (*Ribes nigrum* L.) by tissue culture. Plodovodstvo, 13: 119-124.
- Mahdavian, M., Bouzari, N. and Abdollahi, H., 2010. Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative mahlab rootstock (SL-64). Seed and Plant, 26-1:15-26.
- Manole, C.G., Balan, V., Mencinicopschi, I.C., Golea, D., Rodino, S. and Butu, A., 2012. The influence of growth regulators concentrations on *in vitro* micropropagation of *Ribes rubrum*. Scientific Bulletin, Series F, Biotechnologies, 16:26- 29
- Orlikowska T., 1984. Micropropagation of roodknop cv. black currant. Fruit Science Reports 11:5-17.
- Ruzic, D. and Lazic, T., 2006. Micropropagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black currant cultivars. Agriculturae Conspectus Scientificus. 71:149 -153
- Ruzič, D.V., and Vujovič, T.I., 2008. The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). HortScience, 35: 12-21.
- Saadat, Y.A., Rasti, O. and Zamani, J., 2012. Effects of different growth regulators, nutrient media, gelling agents and carbohydrate sources on shoot multiplication of *Pyrus glabra* Boiss. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20: 83- 96.
- Sedlak, J. and Paprstein, F., 2012. *In vitro* establishment and proliferation of red currant cultivars. HortScience (Prague), 39:21-25.
- Toshkov, A. and Domozetova, D., 2006. Clonal micropropagation of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). Agricultural Science, 39: 18-25
- Welander, M., 1985. Micropropagation of gooseberry, *Ribes grossularia*. Scientia Horticulturae. 26: 267-272.

Micropropagation of *Ribes khorasanicum* species by tissue culture

H. Darroudi[1], M. Akbarinia*[2], A. Safarnejad[3], S.M. Hosseini[4] and M. Hajian Shahri[5]

1- Ph.D. student, Dept. of Forestry, Faculty of Natural Resources, University of Tarbiat Modares, Noor, I.R. Iran.
2*- Corresponding author, Asso. Prof., Dept. of Forestry, Faculty of Natural Resources, University of Tarbiat Modares, Noor, I. R. Iran. E-mail: Akbarim@modares.ac.ir
3- Asso. Prof., Research Center of Agriculture and Natural Resources of Khorasan Razavi, Mashhad, I.R.Iran.
4- Prof., Dept. of Forestry, Faculty of Natural Resources, University of Tarbiat Modares, Noor, , I.R.Iran.
5- Assis. Prof., Research Center of Agriculture and Natural Resources of Khorasan Razavi, Mashhad, I.R.Iran.

Received: 15.02.2014 Accepted: 29.01.2015

Abstract

Ribes khorasanicum is one of the most invaluable shrub plants belonging to the Grossulariaceae family which has wide use such as medicinal applications. Natural reproduction of the species is mainly through vegetative propagation via rhizomes. High palatability, grazing, restricted ecological range, high ecological demands, and its sexual reproduction difficulties exposed the species to the extinction. Tissue culture techniques are the modern approaches to maintain and develop the valuable plant species. Axillary and apical buds of branches obtained from several endemic plants in Hezarmasjed mountains were used as initial explants. Various treatments for surface sterilization were investigated. Aseptic culture was established on MS, DKW and QL media with deferent concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) and indole-3-butyric acid (IBA). MS media with BAP and IBA were used for multiplication phase, whereas, MS medium with different concentration of IBA and BAP were used for rooting phase. Results showed that MS medium was the best medium for establishment of explants and 1mg/L BAP was considered as an optimum concentration for multiplication phase. MS medium with 0.5 or 2 mg/l IBA, was the best one for rooting phase. Well developed root system and high quality rooted plants were acclimatized properly.

Keywords: *Ribes khorasanicum*, micropropagation, growth regulators, multiplication, rooting.