دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2018.110351.1256
جلد ۲۶، شماره ۱، صفحه ۱۳۱-۱۲۱ (۱۳۹۷)

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف، ماده ژله‌ای‌کننده و منبع کربوهیدرات بر رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه (*Berberis vulgaris* var. *asperma*)

یوسف‌علی سعادت[۱*] و علیرضا عباسی[۲]

۱*- نویسنده مسئول، دانشیار پژوهشی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، شیراز.

پست الکترونیک: y.saadat1336@gmail.com

۲- کارشناس پژوهشی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، شیراز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۸

چکیده

زرشک بی‌دانه (*Berberis vulgaris* var. *asperma*) یکی از گیاهان دارویی ایران است و کمبود نهال سالم از مشکلات موجود توسعه کشت این گیاه ارزشمند است. این پژوهش به‌منظور دستیابی به روش سریع و آسان برای ریزافزایی زرشک بی‌دانه انجام شد. در چندین آزمایش تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف، مواد ژله‌ای‌کننده مختلف محیط‌کشت و منابع مختلف کربوهیدرات بر رشد درون‌شیشه‌ای این گیاه بررسی شد. براساس نتایج حاصل مشخص شد که قطعات شاخه نیمه‌خشبی ساقه دارای ۲-۱ جوانه جانبی مناسب‌ترین ریزنمونه برای استقرار درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه است. گندزدایی مواد گیاهی منشأ گرفته از درختان بالغ با غوطه‌ور کردن در محلول دو گرم در لیتر قارچ‌کش بنومیل به‌مدت یک ساعت و بعد محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم تجاری به‌مدت ۱۵ دقیقه و در پایان سه بار آبشویی با آب مقطر سترون انجام شد. محیط کشت نیمه جامد شده با فیتاژل در مقایسه با دیفکوباکتوآگار و آگارژل برای تولید شاخساره برتری معنی‌دار نشان داد. افزودن سه گرم در لیتر زغال فعال به محیط کشت موجب کنترل قهوه‌ای شدن محیط کشت و بافت‌های گیاهی، افزایش زنده‌مانی و رشد درون‌شیشه‌ای شد. محیط‌کشت DKW دارای دو میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و دو میلی‌گرم در لیتر GA_3 و نیمه جامد شده با ۲/۵ گرم در لیتر فیتاژل برای رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه مطلوب بود و برای تولید شاخساره توصیه می‌شود. ریشه‌زایی در دو مرحله جداگانه انگیزش ریشه در حضور اکسین با غلظت زیاد و بعد انتقال شاخساره‌ها به محیط‌کشت بدون تنظیم‌کننده رشد برای نمو ریشه‌ها اجرا شد، اما ریشه‌زایی مشاهده نشد و به پژوهش‌های بیشتر نیاز است.

واژه‌های کلیدی: استان فارس، بنزیل آدنین، ریشه‌زایی، ساکارز، فیتاژل، محیط کشت DKW

مقدمه

زرشک بی‌دانه (*Berberis vulgaris* var. *asperma*) از تیره Berberidaceae یکی از گیاهان دارویی ایران است که در تمام مناطق معتدل نیمکره شمالی می‌روید. در ایران پنج گونه زرشک شامل *B. vulgaris* L.، *B crataegina* DC.، *B. Khorassanica* Browicz & J. Zielinski، *B. orthobotrys* Bienert ex C. K. Schneider و *B. integrrima* Bunge رشد می‌کند (Mozaffarian,

2004). زرشک بی‌دانه با نام علمی *B. vulgaris* var. *asperma* انحصاری ایران است و در خراسان جنوبی در شهرستان‌های بیرجند، قاین، گناباد، فردوس و کاشمر می‌روید. کشور ایران بزرگ‌ترین تولیدکننده زرشک در دنیا است و استان خراسان جنوبی با داشتن نزدیک به ۹۷ درصد از اراضی زیرکشت این محصول، تولید ۹۵ درصد از زرشک دنیا را در اختیار دارد. زرشک به‌عنوان ماده افزودنی به غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد. آلکالوئیدهای بربرین، اکسیاکانتین و بربامین در زرشک وجود دارد که جنبه دارویی دارد. زرشک در خاک‌های آهکی سبک به‌خوبی رشد می‌کند و تا حدودی نسبت به شوری آب و خاک سازگار است و شوری خاک را نیز تا هدایت الکتریکی حدود ۵/۵ میلی زیمنس بر سانتی‌متر تحمل می‌کند (Tehranifar, 2003).

در سال‌های اخیر کشاورزان و عشایر در حوزه‌های آبخیز استان فارس اقدام به کاشت زرشک بی‌دانه کرده که با توجه به ویژگی‌های این گیاه کاشت آن در مناطق با اقلیم مشابه خراسان جنوبی در استان‌های دیگر به‌ویژه استان فارس که با مشکل کم‌آبی مواجه است و کشت تجاری سایر گیاهان زراعی و باغی را با محدودیت شدید روبرو کرده اقتصادی می‌نماید. کمبود نهال‌های سالم و با سیستم ریشه توسعه یافته که به‌خوبی در اراضی شیبدار و حوزه‌های آبخیز مستقر شوند از مشکلات موجود توسعه کاشت این گیاه است. در مورد تکثیر رویشی زرشک بی‌دانه پژوهش‌های لازم انجام نشده و در منابع علمی گزارشی وجود ندارد. دستیابی به یک روش تکثیر قابل اطمینان می‌تواند گامی مؤثر در راه حفاظت آب و خاک کشور و تأمین درآمد برای ساکنان حوزه‌های آبخیز باشد. ریزازدیادی از تکنیک‌های جدید برای تکثیر رویشی است که در سطح وسیعی در دنیا استفاده می‌شود و با استفاده از این تکنیک می‌توان نهال رویشی زرشک بی‌دانه را در سطح مورد نیاز کشور تأمین کرد. ازدیاد گیاه زرشک با پاجوش انجام می‌شود و هر چه پاجوش‌ها جوان‌تر باشند امکان استقرار آنها به‌صورت گیاه مستقل بیشتر است. با وجودی‌که ازدیاد زرشک با پاجوش امکان‌پذیر است اما روشی است مشکل و برای تأمین نهال در سطح انبوه هزینه‌بر و به‌دلیل نداشتن سیستم ریشه توسعه یافته قابل اعتماد نیست (Tehranifar, 2003). البته در مورد ازدیاد زرشک بی‌دانه با قلمه گزارشی در منابع علمی یافت نشد.

در تحقیقی Arena و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که کشت ریزنمونه‌های گونه *Berberis bukifolia* روی محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) دارای ۰/۵۵ میکرومول BA منجر به تولید ۴/۷ شاخساره در هر ریزنمونه بعد از ۶۳ روز شد. ۸۰ درصد شاخساره‌ها بعد از کشت روی محیط کشت نیم غلظت MS دارای ۱/۲۵ میکرومول IBA به‌مدت یک هفته (چهار روز در تاریکی) و انتقال به‌محیط کشت بدون IBA به‌مدت ۲۸ روز ریشه‌دار شدند. همچنین Arena و Pastur (2001) گزارش کردند که افزودن زغال فعال به محیط کشت موجب افزایش تعداد شاخساره بلندتر از پنج میلی‌متر شد اما شاخص افزون‌گری کاهش یافت. در ضمن Chakraborty و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که استفاده از محیط کشت MS دارای ۱۱/۴ میکرومول اسید ایندول‌استیک بعد از سه ماه موجب تشکیل انبوه شاخساره در *Podophyllum hexandrum* (یکی از گیاهان تیره زرشک) شد. ضمن اینکه Sazmand و Safarnejad (2016) گزارش کردند که هیپوکلریت سدیم سه درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه بهترین تیمار برای گندزدایی سطحی ریزنمونه‌های زرشک بی‌دانه بود. همچنین محیط کشت MS دارای یک میلی‌گرم در لیتر BA بهترین محیط برای باززایی بود. همچنین آنان تشکیل بافت کالوس را بر روی محیط کشت MS دارای دو میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر کاینتین گزارش کرده‌اند. این محققان محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA را بهترین تیمار برای ریشه‌زایی زرشک بی‌دانه گزارش کردند. هدف از انجام این پژوهش دستیابی به یک روش آسان و اقتصادی برای تولید انبوه زرشک بی‌دانه با استفاده از تکنیک ریزازدیادی بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه ریزازدیادی و کشت بافت گیاهی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی

فارس واقع در شیراز انجام شد. تعدادی درخت سالم و بالغ زرشک بی‌دانه در ایستگاه تحقیقات درختان چند منظوره استهبان به‌منظور گرفتن نمونه گیاهی به‌عنوان درختان مادری انتخاب شدند. شاخه‌های رشد فصل جاری این درختان جمع‌آوری و در درون پلاستیک به آزمایشگاه ریزازدیادی مرکز منتقل شد. عمل گندزدایی پنس، اسکالپل، ظروف شیشه‌ای، ظروف کاشت و محیط کشت به‌وسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد و فشار یک کیلوگرم بر سانتی‌مترمربع به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. پنس و اسکالپل در هنگام کار توسط Hot bead sterilizer به‌مدت یک دقیقه گندزدایی شد.

برای گندزدایی سطحی مواد گیاهی، ابتدا در آزمایشگاه برگ‌ها و خارهای شاخه‌های رشد فصل جاری را حذف کرده، بعد شاخساره‌ها را قطعه قطعه کرده و قطعات را با آب جاری و چند قطره مایع ظرفشویی شسته و به‌منظور کاهش آلودگی قارچی به‌مدت یک ساعت در محلول یک‌گرم در لیتر بنومیل غوطه‌ور کرده و بعد در زیر کابینت جریان هوای یکطرفه با محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم تجاری به‌مدت ۱۵ دقیقه گندزدایی شدند. در پایان بعد از سه مرتبه آبشویی با آب مقطر سترون، ریزنمونه‌های مناسب از موادگیاهی جدا و روی محیط کشت، کشت شدند. ظرف‌های کشت مورد استفاده شامل لوله‌های آزمایش دهان گشاد و شیشه‌های غذای کودک بود. کشت‌ها در دمایی برابر ۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد با طول مدت روشنایی ۱۶ ساعت و شدت نور ۷۵ میکرومول بر مترمربع در ثانیه که توسط لامپ‌های فلورسنت ایجاد گردید، برای رشد قرار داده شدند. تجزیه‌وتحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS Institute, 1988) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

آزمایش‌های انجام شده

تأثیر نوع کربوهیدرات و غلظت آن بر تولید شاخساره در کشت‌های درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه

هدف از انجام این آزمایش تعیین مناسب‌ترین کربوهیدرات و غلظت مناسب آن برای رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه بود. در این آزمایش از نوک شاخساره‌های رشد کرده درون شیشه‌ای منشأ گرفته از درختان بالغ به‌عنوان ریزنمونه و محیط کشت DKW (McGranahan *et al.*, 1987) دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA برای همه تیمارها استفاده شد. آزمایش به‌صورت طرح کاملا تصادفی با ۶ تیمار و هر تیمار دارای پنج تکرار و هر تکرار از چهار ریزنمونه تشکیل شده بود. شاخص‌های رشد تعداد شاخساره در ریزنمونه و تعداد شاخساره طویل شده در هر ریزنمونه بعد از یک ماه یادداشت‌برداری شد.

تیمارهای آزمایش عبارت بودند از: ۱- ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و نیمه جامد شده با ۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل، ۲- ۴۰ گرم در لیتر ساکارز و نیمه جامد شده با ۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل، ۳- ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و نیمه جامد شده با هشت گرم در لیتر دیفکو باکتو آگار، ۴-۳۰ گرم در لیتر ساکارز و نیمه جامد شده با ۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل (دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA)، ۵- ۳۰ گرم در لیتر فروکتوز و نیمه جامد شده با ۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل و ۶- ۴۰ گرم در لیتر فروکتوز و نیمه جامد شده با ۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل.

تأثیر نوع ماده ژله‌ای کننده محیط کشت بر رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه

هدف از انجام این آزمایش تعیین مناسب‌ترین ماده ژله‌ای‌کننده محیط کشت برای رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه بود. در این آزمایش از شاخسارهای رشد کرده درون شیشه‌ای منشأ گرفته از درختان بالغ به‌عنوان ریزنمونه و از محیط کشت DKW دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، دو گرم در لیتر GA_3 و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز برای همه تیمارها استفاده شد. فیتاژل به‌میزان ۲/۵ گرم در لیتر، دیفکوباکتو آگار به‌میزان هشت گرم در لیتر و آگارژل به‌میزان پنج گرم در لیتر تیمارهای آزمایش بودند. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد و هر تیمار دارای پنج تکرار و هر تکرار از چهار ریزنمونه تشکیل

شده بود. شاخص‌های رشد تعداد شاخساره رشد کرده در تکرار، تعداد شاخساره طویل شده در تکرار، تعداد شاخساره نکروزه شده در تکرار و وزن تر کل در تکرار بعد از یک ماه یادداشت‌برداری شد.

تأثیر غلظت‌های مختلف BA و Kinetin بر رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه

هدف از انجام این آزمایش تعیین مناسب‌ترین سایتوکاینین، غلظت مناسب و برهم‌کنش BA و Kinetinبرای رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه بود. در این آزمایش از نوک شاخساره‌های مستقر شده و سالم به‌عنوان ریزنمونه، از محیط کشت DKW دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، یک گرم در لیتر GA_3، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و نیمه جامد شده با ۲/۴ گرم در لیتر فیتاژل و سه گرم در لیتر زغال فعال برای همه تیمارها استفاده شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد. سایتوکاینین‌های BA و Kinetin به‌عنوان فاکتور A و غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌گرم در لیتر به‌عنوان فاکتور B استفاده شد. هر تیمار دارای چهار تکرار و هر تکرار از چهار ریزنمونه تشکیل شده بود. شاخص‌های رشد تعداد شاخساره در تکرار و وزن تر شاخساره در تکرار یعد از یک ماه یادداشت‌برداری شد.

تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین و زغال فعال‌شده بر رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه

هدف از انجام این آزمایش تعیین اثر غلظت‌های مختلف اکسین و مقایسه تأثیر افزودن زغال فعال به محیط کشت در مقایسه با محیط کشت بدون زغال فعال (شاهد) برای رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه، تولید بافت پینه و بهبود رشد بود. در این آزمایش از نوک شاخساره‌های رشد کرده درون شیشه‌ای منشأ گرفته از درختان بالغ به‌عنوان ریزنمونه و محیط کشت DKW دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و نیمه جامد شده با هفت گرم در لیتر باکتو آگار و دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز برای همه تیمارها استفاده شد. آزمایش بر پایه طرح کاملا تصادفی و هر تیمار دارای پنج تکرار و هر تکرار از چهار ریزنمونه تشکیل شد. تیمارهای آزمایش عبارت بودند از: ۱- ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و سه گرم در لیتر زغال فعال شده، ۲- محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و سه گرم در لیتر زغال فعال شده، ۳- محیط کشت دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و سه گرم در لیتر زغال فعال شده، ۴- محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و سه گرم در لیتر زغال فعال شده، ۵- محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و بدون زغال فعال شده. از شاخص‌های رشد وزن تر شاخساره و تعداد شاخساره در هر ریزنمونه بعد از یک ماه یادداشت‌برداری شد.

تأثیر غلظت‌های مختلف IBA و مدت زمان‌های مختلف قراردادن شاخساره در محیط کشت انگیزش ریشه روی ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه

با اجرای چندین آزمایش ریشه‌زایی و دست نیافتن به نتیجه مناسب، این آزمایش انجام شد. شیوه ریشه‌زایی در دو مرحله جداگانه انگیزش ریشه در حضور اکسین با غلظت زیاد برای مدت زمان کوتاه و بعد انتقال شاخساره‌ها به محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد برای نمو ریشه‌ها اجرا شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل شامل غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آکسین IBA برای انگیزش ریشه به‌عنوان فاکتورA و مدت زمان‌های مختلف (۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت) قرار داشتن شاخساره‌ها در محیط کشت انگیزش ریشه به‌عنوان فاکتور B اجرا شد. از محیط کشت DKW با نصف غلظت عناصر ماکرو دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و نیمه جامد شده با ۸ گرم در لیتر دیفکوباکتو آگار برای همه تیمارها استفاده شد. در ابتدا برای انگیزش ریشه، شاخساره‌ها در محیط‌های کشت دارای غلظت‌های مختلف IBA بدون زغال فعال، به‌مدت زمان لازم کشت و در اتاق رشد در شرایط تاریکی قرار داده شدند، سپس برای نمو ریشه‌ها، به‌محیط کشت DKW بدون تنظیم‌کننده رشد و ۳ گرم در لیتر زغال فعال منتقل و در شرایط روشنایی در اتاق

رشد قرار داده شدند. هر تیمار دارای ۴ تکرار و هر تکرار از ۵ شاخساره به‌طول ۳-۲ سانتی‌متر تشکیل شد. یادداشت‌برداری پس از ۴ هفته قرار گرفتن در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد انجام شد.

نتایج

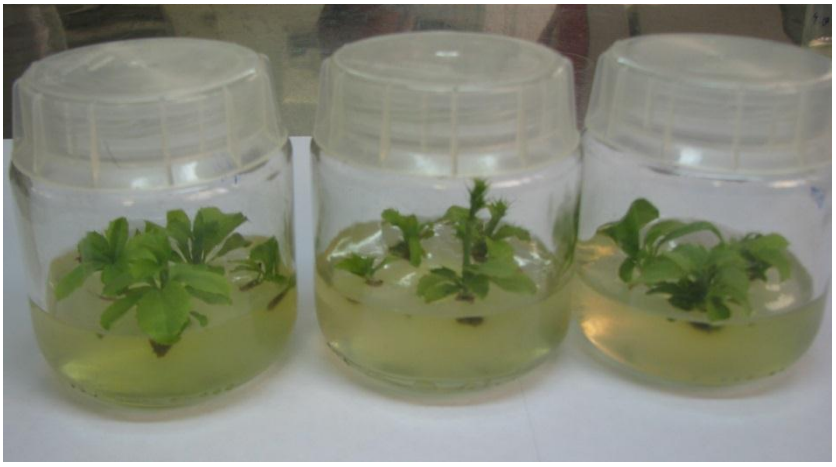
تأثیر نوع کربوئیدرات و غلظت آن بر تولید شاخساره در کشت‌های درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه

براساس نتایج حاصل از این آزمایش، ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت DKW دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و دو میلی‌گرم در لیتر GA_3 و نیمه جامد شده با ۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل با تولید ۱/۵ شاخساره طویل شده در مقایسه با محیط کشت دارای ۴۰ گرم در لیتر فروکتوز اختلاف معنی‌داری در سطح پنج‌درصد نشان دادند (جدول ۱) و این تیمار برای تولید شاخساره در زرشک بی‌دانه مناسب‌ترین بود (شکل ۱). کیفیت شاخساره‌های تولید شده بر روی محیط کشت‌های دارای ساکارز و نیمه جامد شده با فیتاژل بهتر از شاخساره‌های تولید شده بر روی محیط کشت‌های دارای فروکتوز و یا نیمه جامد شده با دیفکوباکتوآگار بودند.

جدول ۱- تأثیر نوع کربوئیدرات و غلظت آن بر تولید شاخساره **در کشت‌های درون شیشه‌ای زرشک بی‌دانه**

شماره تیمار	نوع و غلظت کربوئیدرات	غلظت ماده نیمه جامد کننده محیط کشت (گرم در لیتر)	تعداد شاخساره طویل شده در هر ریزنمونه	تعداد شاخساره در ریزنمونه
۱	ساکارز ۳۰ گرم در لیتر	۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل	۱/۵۰a الف	۲/۶۸ a
۲	ساکارز ۴۰ گرم در لیتر	۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل	۱/۱۲ab	۲/۴۰ a
۳	ساکارز ۳۰ گرم در لیتر	۸/۰ گرم در لیتردیفکو باکتو آگار	۰/۷۸ ab	۱/۹۰ a
۴	ساکارز ۳۰ گرم در لیتر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA	۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل	۰/۵۸ ab	۱/۸۵ a
۵	فروکتوز ۳۰ گرم در لیتر	۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل	۰/۷۷ ab	۱/۱۲ a
۶	فروکتوز ۴۰ گرم در لیتر	۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل	۰/۳۸ b	۰/۹۳ a

¥: میانگین‌های هر ستون که دارای حرف‌های یکسانی هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چنددامنه‌ای دانکن با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.



شکل ۱- تولید شاخساره بر روی محیط‌کشت DKW دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و دو میلی‌گرم در لیتر GA_3 در زرشک بی‌دانه

تأثیر نوع ماده ژله‌ای‌کننده محیط کشت بر رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه

براساس نتایج حاصل از این آزمایش مشخص شد که فیتاژل مناسب‌ترین عامل ژله‌ای‌کننده محیط کشت برای رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه می‌باشد و تعداد شاخساره رشد کرده در محیط کشت‌های نیمه جامد شده با فیتاژل حداکثر بود که به‌طور معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) از محیط کشت‌های نیمه جامد شده با دیفکوباکتو آگار و آگارژل بیشتر بود (جدول ۲). البته بین عامل‌های ژله‌ای‌کننده محیط کشت از نظر سایر شاخص‌های اندازه‌گیری شده تفاوت معنی‌دار وجود نداشت، اما ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های نیمه جامد شده با فیتاژل حداکثر وزن تر کل و تعداد شاخساره طویل شده در تکرار و حداقل تعداد شاخساره نکروزه شده را تولید کردند.

جدول ۲- تأثیر نوع ماده ژله‌ای کننده محیط کشت بر شاخص‌های رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه[¥]

نوع ماده ژله‌ای‌کننده محیط کشت	تعداد شاخساره رشد کرده در تکرار	تعداد شاخساره طویل شده در تکرار	تعداد شاخساره نکروزه شده در تکرار	وزن تر کل در تکرار (گرم در لیتر)
فیتاژل (۲/۵ گرم در لیتر)	۶/۰A	۱/۸ a	۰/۸ a	۱/۳ a
دیفکوباکتو آگار (۸ گرم در لیتر)	۴/۳b	۱/۷ a	۱/۷ a	۰/۸ a
آگارژل (۵ گرم در لیتر)	۴/۳b	۱/۰ a	۱/۸ a	۱/۱ a

[¥]: میانگین‌های هر ستون که دارای حرف‌های یکسانی هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چنددامنه‌ای دانکن با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

تأثیر غلظت‌های مختلف BA و Kinetin بر رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه

براساس نتایج حاصل از این آزمایش تفاوت معنی‌داری بین محیط کشت‌های دارای BA و Kinetin از نظر تعداد شاخساره و وزن تر شاخساره در تکرار مشاهده نشد، هرچند کاربرد BA نسبت به Kinetin برتری داشت و کیفیت ظاهری شاخساره‌ها بهتر بود. اما غلظت‌های مختلف سایتوکاینین‌ها از نظر شاخص‌های اندازه‌گیری شده با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند. با وجود این غلظت یک میلی‌گرم در لیتر نسبت به سایر غلظت‌ها برتری داشت (جدول ۳).

تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین و زغال فعال شده بر رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه

هدف از اجرای این آزمایش بررسی تأثیر افزایش غلظت IBA در محیط کشت به‌منظور تولید بافت پینه و بهبود جذب بهتر مواد غذایی از محیط کشت و تأثیر زغال فعال شده بر شاخص‌های رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه بود. براساس نتایج این آزمایش مشخص شد که افزایش غلظت IBA تأثیر مثبت بر وزن تر شاخساره در ریزنمونه دارد و محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در مقایسه با محیط کشت دارای ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA تفاوت معنی‌دار داشت (جدول ۴). ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در مقایسه با محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA اما بدون زغال فعال شده نیز تفاوت معنی‌دار داشتند. البته بین تیمارهای مختلف آزمایش از نظر تعداد شاخساره در ریزنمونه تفاوت معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) مشاهده نشد، اما کیفیت شاخساره‌ها در محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA یا محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA نسبت به سایر تیمارها بهتر بود.

جدول ۳- تأثیر نوع سایتوکاینین و غلظت‌های مختلف آن بر شاخص‌های رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه¥

نوع سایتوکاینین	تعداد شاخساره در تکرار	وزن تر شاخساره در تکرار
BA	۷/۳۳a	۲/۱۲a
Kinetin	۵/۰۰ a	۲/۰۵ a
غلظت (میلی‌گرم در لیتر)		
۱	۸/۳۳ a	۲/۴۱ a
۲	۵/۰۰ a	۲/۲۵ a
۴	۵/۰۰ a	۱/۷۶ a
برهم‌کنش	ns	ns

¥: میانگین‌های هر ستون که دارای حرف‌های یکسانی هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چنددامنه‌ای دانکن با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

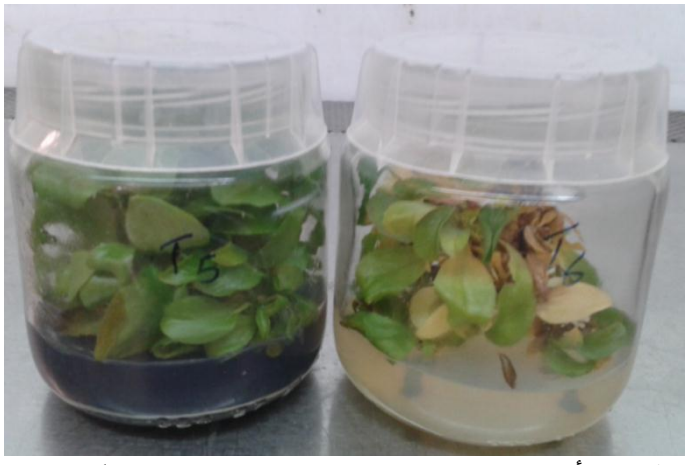
ns: اثر متقابل سایتوکاینین‌های مختلف و غلظت‌های آنها معنی‌دار نیست.

ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت بدون زغال فعال شده بعد از یک ماه زرد و حتی خشک شدند و مشخص شد که افزودن زغال فعال شده به محیط کشت زرشک بی‌دانه تا حد زیادی می‌تواند مانع قهوه‌ای شدن و زوال ریزنمونه‌های زرشک گردد (شکل ۲). البته افزودن غلظت‌های بیشتر IBA موجب تشکیل بافت پینه در ریزنمونه‌ها نشد و تعداد اندکی از آنها تولید پینه کردند.

جدول ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین و زغال فعال شده بر شاخص‌های رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه¥

شرح تیمار	تعداد شاخساره در هر ریزنمونه	وزن تر شاخساره در هر ریزنمونه (گرم)
۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و بدون زغال فعال شده (شاهد)	۱/۸۵ a	۰/۶ b
۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۳ گرم در لیتر زغال فعال	۱/۷۶ a	۰/۶ b
۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۳ گرم در لیتر زغال فعال	۲/۶۰ a	۰/۸۴a
۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۳ گرم در لیتر زغال فعال	۲/۳ a	۰/۶۷ ab
۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ گرم در لیتر زغال فعال	۲/۱۵ a	۰/۸۱ ab

¥: میانگین‌های هر ستون که دارای حرف‌های یکسانی هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چنددامنه‌ای دانکن با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.



شکل ۲- تأثیر افزودن زغال فعال شده بر رشد درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه

تأثیر غلظت‌های مختلف IBA و مدت زمان‌های مختلف قراردادن شاخساره در محیط کشت انگیزش ریشه روی ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه

پس از ۴ هفته قرار داشتن شاخساره‌ها در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد، شاخساره‌هایی که به‌مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت انگیزش ریشه قرار داشتند بدون توجه به غلظت اکسین سالم و سبز ماندند ولی هیچگونه ریشه‌زایی مشاهده نشد. شاخساره‌هایی که به‌مدت ۷۲ و ۱۲۰ ساعت در محیط کشت انگیزش ریشه قرار داشتند در همه غلظت‌های اکسین به‌تدریج قهوه‌ای و در نهایت خشک شدند (شکل ۳). البته درصد خشک شدن در محیط کشت‌های با غلظت بیشتر اکسین بیشتر و شدیدتر بود.

شکل ۳- واکنش شاخساره‌های درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه در محیط کشت‌های مختلف انگیزش ریشه (غلظت IBA در محیط کشت از چپ به‌راست به‌ترتیب ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و زمان‌های مختلف (به‌ترتیب از بالا به‌پایین ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت) بعد از ۴ هفته قرار داشتن در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد

بحث

قطعات شاخه نیمه خشبی ساقه دارای ۲-۱ جوانه جانبی با کمترین درصد قهوه‌ای شدن و حداکثر رشد مناسب‌ترین ریزنمونه برای استقرار کشت‌های درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه است. در این تحقیق از BA و Kinetin با غلظت‌های متفاوت به‌عنوان سایتوکاینین استفاده شد و تفاوت معنی‌داری بین محیط کشت‌های دارای BA و Kinetin از نظر تعداد شاخساره و وزن تر شاخساره در تکرار مشاهده نشد، هرچند کاربرد BA نسبت به Kinetin برتری داشت (جدول ۳). با وجود این غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA برای شاخه‌زایی بهینه بود و در محیط کشت‌های دارای زغال فعال میزان دو میلی‌گرم در لیتر BA همراه با چهار میلی‌گرم در لیتر Kinetin رشد شاخساره مطلوب‌تر بود. در این زمینه Sazmand و Safarnejad (2016) نیز غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA را برای تولید بیشترین شاخه گزارش کردند و با نتایج این آزمایش یکسان است.

افزودن سه گرم در لیتر زغال فعال شده به محیط کشت زرشک موجب افزایش وزن تر شاخساره و رشد درون‌شیشه‌ای شد (جدول ۴) و با گزارش Arena و Pastur (۲۰۰۱) در مورد *Berberis bukifolia* و نیز Ehteshamnia و Gholami (۲۰۱۴) در مورد حل مشکل قهوه‌ای شدن بافتهای گیاهی گردو با استفاده از زغال فعال مطابقت دارد. در ضمن Thomas (۲۰۰۸) با مروری بر پژوهش‌های انجام شده در مورد نقش زغال فعال در کشت بافت گیاهی اظهار کرد که زغال فعال موجب بهبود رشد و

نمو یاخته در کشت‌های درون‌شیشه‌ای می‌شود. اثر مثبت افزودن زغال فعال به محیط کشت مایع یا نیمه جامد به‌طور عمده به جذب مواد بازدارنده محیط کشت به‌ویژه مواد فنلی و ترشحات قهوه‌ای‌کننده محیط کشت بستگی دارد. به‌طوری‌که یکی از تأثیرات دیگر زغال فعال جذب تنظیم‌کننده‌های رشد و مواد آلی موجود در محیط کشت است که موجب مشکل برای پژوهشگران کشت بافت گیاهی می‌گردد. در ضمن Soniya و Sujitha (۲۰۰۶) گزارش کردند که با افزودن زغال فعال و زیرکشت‌های متعدد در کشت‌های درون‌شیشه‌ای گونه *Aristtochia indica* مشکل رشد نکردن ریزنمونه‌ها به‌دلیل ترشح پلی‌فنل‌ها به‌محیط کشت حل شد. در همین زمینه Wang و همکاران (۲۰۰۵) در کشت‌های درون‌شیشه‌ای *Rubus idaeus* با افزودن ۰/۲۵ گرم در لیتر زغال فعال به محیط کشت موفق به ۹۰ درصد زنده‌مانی و کاهش قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها به ۱۰ درصد شدند.

براساس نتایج حاصل از این پژوهش مشخص شد که فیتاژل مناسب‌ترین عامل ژله‌ای‌کننده محیط کشت برای زرشک بی‌دانه از نظر تعداد شاخساره رشد کرده، وزن تر کل و کمترین تعداد شاخساره نکروزه شده بود (جدول ۲). محیط کشت‌های نیمه جامد شده با دیفکوباکتو آگار نیز در مقایسه با آگارژل از نظر شاخص‌های بررسی شده برتری داشت (جدول ۲). برتری فیتاژل در مقایسه با آگار توسط پژوهشگران متعددی گزارش شده است که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (Saadat *et al*., 2012, Saadat & Hennerty, 2002, Naing *et al*., 2014, Podwyszynska & lszewski, 1995).

استفاده از فیتاژل به‌عنوان ماده ژله‌ای‌کننده محیط کشت در مقایسه با آگار برتری‌هایی دارد. نخست اینکه محیط کشت نیمه‌جامد شده با فیتاژل شفاف است و برای آزمایش‌هایی که ریزنمونه‌ها از عرصه تهیه می‌شوند و دارای آلودگی باکتریایی هستند تشخیص نمونه‌های بدون آلودگی راحت‌تر است. همچنین کیفیت شاخساره‌های تولید شده بر روی محیط کشت‌های نیمه‌جامد شده با فیتاژل بهتر است (Saadat & Hennerty, 2002).

در این پژوهش در شاخساره‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های دارای غلظت‌های مختلف IBA تولید ریشه مشاهده نشد که با نتایج Sazmand و Safarnejad (2016) یکسان نیست. علت تفاوت احتمالا مربوط به محیط کشت‌های متفاوت مورد استفاده و غلظت‌های متفاوت اکسین و غلظت مورد استفاده است. استفاده از شیوه دومرحله‌ای ریشه‌زایی در گلابی وحشی و گردو (Saadat & Hennerty, 1999, Saadat *et al*., 2012) نتایج مطلوبی داشت اما در مورد زرشک نتیجه‌بخش نبود که احتمالا به ساختار ژنتیکی متفاوت آن بستگی دارد و نیازمند پژوهش‌های بیشتر است. البته استفاده از گلدان‌های جیفی برای نمو ریشه‌ها به‌جای محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد توأم با استفاده از پودرهای ریشه‌زایی می‌تواند ثمربخش باشد.

به‌طور کلی محیط‌کشت DKW با دو میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و دو میلی‌گرم در لیتر GA_3، سه گرم در لیتر زغال فعال و نیمه جامد شده با ۲/۵ گرم در لیتر فیتاژل برای تولید شاخساره توصیه می‌شود و قطعات نیمه خشبی زیر جوانه انتهایی ساقه دارای ۲-۱ جوانه جانبی مناسب‌ترین ریزنمونه برای کشت درون‌شیشه‌ای زرشک بی‌دانه می‌باشد.

سپاسگزاری

اعتبار لازم برای اجرای این پروژه از محل اعتبارهای صندوق حمایت از پژوهشگران و نوآوران معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری تأمین شد، این همکاری ارزشمند شایسته تشکر و سپاسگزاری است. همکار محترم آقای مهندس عباس نعمتی در امر تهیه محیط کشت و کشت و زیرکشت نمونه‌ها با نهایت لطف ما را یاری کردند که از ایشان صمیمانه تشکر می‌گردد. مدیریت محترم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس یاریگر همیشگی ما در اجرای این پژوهش بودند که محبت‌های ایشان را ارج می‌نهیم. آقایان علی اصغر ناطوری و جمعه

ناطوری آبیاری و مراقبت از درختان زرشک بی‌دانه را در ایستگاه تحقیقات درختان چند منظوره استهبان بر عهده داشتند، از زحمت‌های صمیمانه آنان تشکر می‌کنیم.

منابع مورد استفاده

– Arena, M.E., Pastur, G.M. and Vater, G., 2000. *In vitro* propagation of *Berberis buxifolia* Lam. Biocell, 24: 73-80.
– Arena, M.E. and Pastur, G.M., 2001. 6-Benzyl aminopurine and activated charcoal affect *in vitro* shoot morphogenesis of *Berberis buxifolia* Lam. Revista de la Facultad de Agronomia, 21: 41-47.
– Chakraborty, A., Bhattacharya, D., Ghanta S. and Chattapadhyay, S., 2010. An efficient protocol for *in vitro* regeneration of *Podophyllum hexandrum*, a critically endangered medicinal plant. Indian Journal of Biotechnology, 9: 217-220.
– Ehteshamnia, A. and Gholami, M., 2014. Inhibition of Persian walnut (*Juglans regia* L.) microcuttings browning by utilizing different methods. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 5: 562-571.
– Gamborge, O.L., Miller R.A. and Ojima O., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. Experimental Cell Research, 50: 151-158.
– McGranahan, G. H., Driver, A. and Tulecke, W., 1987. Tissue culture of *Juglans.* In: Bonga, G. M. and D. J. Durzan, (eds.). *Cell and Tissue Culture in Forestry*, 3: 261-271.
– Mozaffarian, V., 2004. Trees and Shrubs of Iran. Farhang Moaser Publications. Tehran, Iran, 1003 p.
– Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
– Naing, A.H., Jeon, S.M., Han, J.S., Lim, S.H., Lim, K.B. and Kim, C.K., 2014. Factors influencing *in vitro* shoot regeneration from leaf segments of *Chrysanthemum.* Plant Biology and Pathology, 337: 383-390
– Pacholczak, A., Szydlo W. and Lukaszewska, A., 2006. The effects of shading of stock plants on rhizogenesis in stem cuttings of *Berberis thunbergii* 'Red Rocket'. Acta Physiolgia Plantarum, 28: 567-575.
– Podwyszynska, M. and Olszewski, T., 1995. Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, cordyline and homalomena. Scientia Horticulturae, 64: 77-88
– Saadat, Y.A. and Hennerty, M. J., 2002. Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Scientia Horticulturae, *95: 251-260.*
– Saadat, Y.A. and Hennerty, M. J., 1999. The effects of different *in vitro* and *ex vitro* treatments on rooting performance of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Acta Horticulturae, 544:473-480.*
– Saadat, Y.A., Jokar, L. and Sayyah Jahromi, L., 2012. *In vitro* rooting of *Pyrus glabra* Boiss. microshoots. Iranian Journal of Natural Resources, 1: 46-51.
– 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.
– SAS Institute. 1988. SAS/ STAT users Guide. Release 6.03, Statistical Analysis System (SAS) Institute, Inc., Cary, N0 C0, USA.
– Sazmand, M. and Safarnejad, A., 2016. Callus induction, regeneration and proliferation of *Berberis vulgaris* var. asperma using *in vitro* technique. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24: 92-101
– Shimelis, D., Bantte, K. and Feyissa, T., 2015. Effects of Polyvinylpyrrolidone and activated charcoal to control effect of phenolic oxidation on *in vitro* culture establishment stage of micropropagation of sugarcane (*Saccharum Officinarum* L.). Advances in Crop Science and Technology, 3: 184. doi:10.4172/2329-8863.1000184 (open access journal).
– Soniya, E.V. and Sujitha, M., 2006. An efficient *in vitro* propagation of *Aristolochia indica*. Biologia Plantarum, 50:272–274.
– Tehranifar**,** A., 2003. Barberry Growing in Iran. Acta Horticulturae, 620: 193-195.
– Thomas, T. D., 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances, 26: 618-631.
– Wang. Q., Jaana Laamanen, J., Uosukainen, M. and Valkonen, J.P.T., 2005. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration. Plant Cell Reports, 24:280–288.

Effects of different growth regulators, gelling agents and carbon sources on *in vitro* growth of *Berberis vulgaris* var. *asperma*

Y.A. Saadat[1*] and A. Abbasi[2]

[1*] - Corresponding author, Associate Prof., Fars Research and Education Centre for Agriculture and Natural Resources, Shiraz, I.R.Iran E-mail: y.saadat1336@gmail.com
[2] - B.Sc. Fars Research and Education Centre for Agriculture and Natural Resources, Shiraz, I.R.Iran

Received: 04.04.2017 Accepted: 19.07.2017

Abstract

Berberis vulgaris var. *asperma*, is a medicinal plant of Iran and lack of healthy vigorous seedlings is the main limitation of barberry cultivation. This research was carried out to develop a suitable technique for mass micropropagation of the species. Effects of different plant growth regulators, different gelling agents and different carbon sources on in vitro growth of barberry were studied in several experiments. Based on the results of the experiments, nodal segments containing 1-2 axillary buds of semi-hardwood shoots were the best explants for establishment of clean in vitro cultures. Surface disinfection of plant materials originated from adult trees was performed with immersion in 2 gl^{-1} of Benomyl solution for one hour, then 1% solution of commercial bleach for 15 minutes and rinsed three times with sterile distilled water. Explants cultured on media solidified with Phytagel were significantly better than the media with DifcoBacto agar and Agargel for shoot production. Addition of 3 gl^{-1} activated charcoal resulted in control of nutrient medium and explants browning, improvement of survival and in vitro growth of the explants. DKW medium containing 2 mgl^{-1} BA, 0.5 mgl^{-1} IBA , 2 mgl^{-1} GA_3, 3 gl^{-1} activated charcoal and solidified with 2.5 gl^{-1} Phytagel was optimum for in vitro growth of barberry and recommended for shoot multiplication of the species. Rooting experiment was carried out using a two phase procedure, root induction in media with high concentration of IBA, followed by transferring to growth regulators free medium for root development. No rooting was observed and further research is needed.

Keywords: BA, DKW nutrient medium, Fars province, Phytagel, rooting, sucrose,