DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2011.7642

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۹، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۸۴-۷۱ (۱۳۹۰)

ریزازدیادي شن (*Lonicera nummulariifolia* Jaub. & Spach)

پویا جلالی[۱]، یوسف علی سعادت[*۲] و حمید صادقی[۳]

۱- کارشناس ارشد باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
۲*- نویسنده مسئول مکاتبه‌ها، استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، پست الکترونیک: saadat@farsagres.ir
۳- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۱۵

چکیده

شن (*Lonicera nummulariifolia* Jaub. & Spach) یکی از درختچه‌های خزان‌کننده استان فارس است که در جنگل‌های مناطق زاگرس به‌ویژه در منطقه‌ی سپیدان به‌عنوان گونه‌ی همراه با بلوط دیده می‌شود. با وجود این، اطلاعات کافی در مورد نحوه تکثیر و جنبه‌های مختلف رشد و نمو این گونه در دسترس نیست. این پژوهش به منظور دستیابی به روشی مناسب برای ازدیاد سریع و انبوه این گونه با استفاده از تکنیک‌های کشت درون شیشه‌ای انجام شد. بذرها و نوک شاخساره‌های نهال حاصل از بذر به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. محیط کشت MS با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA برای تولید شاخساره بهینه بود. قطعات ساقه دارای یک جوانه، کشت شده بر روی محیط کشت DKW دارای ۰/٤، ۰/۷ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر دیفکو باکتو آگار در مقایسه با محیط کشت MS تفاوت معنی‌دار از نظر شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شده نداشتند. بهترین شیوه برای ریشه‌زایی شامل دو مرحله مجزای انگیزش ریشه و نمو ریشه بود. برای انگیزش ریشه مؤثرترین روش استفاده از محیط کشت MS با نصف غلظت عناصر ماکرو، ۸ گرم در لیتر دیفکو باکتو آگار، ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در شرایط تاریکی به مدت ٦۰ ساعت بود. به منظور نمو ریشه، شاخساره‌ها از محیط انگیزش ریشه به محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد و در شرایط روشنایی انتقال یافتند. با استفاده از این روش ٤٦/۷ درصد از شاخساره‌ها ریشه‌دار شدند. پس از نمو ریشه‌ها، گیاهچه‌ها به گلدان‌های دارای مخلوطی از پیت‌خزه، ماسه و ورمی‌کولایت به نسبت ۱:۱:۱ انتقال یافتند و به گلخانه منتقل شدند.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آدنین، تولید شاخساره، ریشه‌زایی، محیط کشت.

مقدمه

استان فارس دارای ۱۳۲۲۰۰۰ هکتار جنگل طبیعی بوده که به دلیل تنوع آب و هوایی در سرتاسر این استان پهناور به صورت جوامع متنوع گیاهی و جنگلی ظاهر شده است. یکی از گونه‌های جنگلی استان فارس شن (*Lonicera nummulariifolia* Jaub. & Spach) است که در جنگل‌های مناطق زاگرس به‌ویژه در منطقه سپیدان و دشت ارژن به صورت درختچه و به‌عنوان گونه‌ی همراه با بلوط دیده می‌شود. علاوه بر این، در مناطقی که پوشش بلوط به هر دلیل از بین رفته باشد این گونه به‌عنوان گونه

پیش‌آهنگ، پوشش خالص را بوجود آورده است (حمزه‌پور و بردبار، ۱۳۷۸). با توجه به شکل ظاهری و زیبای این درختچه، میوه‌ی سته و گل‌های رنگارنگ آن، بنظر می‌رسد که گزینه‌ی مناسبی برای احیای پوشش‌های جنگلی، ایجاد فضای سبز و حفاظت خاک باشد.

با وجودی که استان فارس یکی از رویشگاه‌های طبیعی شن (*L. nummulariifolia*) در ایران می‌باشد، اما اطلاعات کافی در مورد نحوه‌ی تکثیر و جنبه‌های مختلف رشد و نمو این گونه در دسترس نیست. علاوه بر این، چرای بی‌رویه و تبدیل اراضی شیب‌دار به عرصه‌های باغی و زراعی در سال‌های اخیر زادآوری طبیعی این گونه جنگلی را محدود کرده است، به نحوی که می‌توان این گونه را در کنار بسیاری از گونه‌های دیگر موجود در عرصه‌های جنگلی در معرض تهدید و انقراض محسوب کرد. بنابراین جهت احیای جنگل‌ها و حفظ این گونه‌ی ارزشمند ضرورت دارد که نحوه تکثیر، تولید و پرورش آن مورد بررسی قرار گیرد. ریزازدیادی به‌عنوان یک روش مناسب و سریع مورد توجه بسیاری از پژوهندگان و دانشمندان علوم کشاورزی قرار گرفته و در زمینه تولید انبوه گیاهان، تکثیر پایه‌های مناسب درختان میوه و تولید گونه‌های مرتعی و جنگلی مورد استفاده قرار گرفته است. در پژوهش حاضر ریزازدیادی درختچه شن مورد بررسی قرار گرفته است. امید است که گام کوچکی در زمینه حفظ این گونه‌ی با ارزش و بومی ایران باشد.

جنس *Lonicera* متعلق به تیره کاپریفولیاسه (خانواده پیچ امین الدوله) است، از این جنس شش گونه به‌عنوان گونه‌های بومی در ایران گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به *Lonicera nummulariifolia* (syn = *Lonicera persica* Jaub. & Spach، *L. periclymenum* L. (European honeysuckle) و *L. japonica* اشاره کرد (ثابتی، ۱۳۸۵).

شن گیاهیست دو لپه، به ارتفاع ۵ متر، برگ‌های آن به طول ۲-۱/۵ سانتی‌متر، کمی کروی و گاهی نیز بیضوی شکل است. نوک برگ‌ها گرد تا نوک‌دار می‌باشد و ته برگ‌ها گرد و گاهی قلبی شکل است. میوه‌ی آن از نوع سته و دارای یک پوشش سفید شفاف است. بذرهای آن به رنگ سیاه و ارغوانی دیده می‌شوند. ترکیبات پلی‌فنلی جدا شده از این گونه، مانع از فعالیت‌های پلاکتی می‌شود و باعث مقاومت یاخته در برابر تولید پراکسید هیدروژن می‌گردد (Javidnia *et al.*, 2004). این گزارش و گزارش‌های شبیه به آن جایگاه این درختچه را به‌عنوان یک گیاه دارویی با ارزش مشخص کرده و ضرورت حفاظت و احیاء عرصه‌های طبیعی این گونه را بیشتر می‌نماید. این گیاه دارویی در درمان آسم، بیماریهای مجاری ادراری، تب، التهاب، گرفتگی عضله و عفونت‌های باکتریایی مفید واقع شده است (Javidnia *et al.*, 2004). پژوهش‌های انجام شده در مورد شن بسیار محدود است و شناختی از ویژگی‌های رشد و تکثیر آن در منابع علمی در دسترس نیست. عمده‌ی مطالب موجود در منابع علمی مربوط به گونه‌ی *L. japonica* و *L. periclymenum* می‌باشد که به‌عنوان یک گیاه دارویی و زینتی مورد توجه محافل علمی چین، ژاپن و غرب می‌باشد که از نظر تجاری اهمیت ویژه‌ای دارند.

در این خصوص Boonnour و همکاران (۱۹۸۸) گزارش نموده‌اند که با کشت قطعات ساقه‌ی گره‌دار *L. periclymenum* بر روی محیط کشت گیاهان چوبی (WPM) (Lloid & McCown, 1981) دارای ۰/۵ میکرومول در لیتر بنزیل آدنین (BA) تکثیر شاخساره

انجام شده است. طبق همین گزارش با فروبردن سریع انتهای شاخساره‌های تولید شده درون شیشه‌ای در محلول ۱۰ میلی‌مول در لیتر اسید ایندول بوتیریک (IBA) منجر به ریشه‌زایی گردید. جهت تکثیر درون شیشه‌ای گونه *L. caerulea* L. var*kamtschatica* توسط Dziedzic (۲۰۰۸) جوانه‌های جانبی را مورد استفاده قرار داده و گزارش نمود که وزن تر حاصل از رشد ریزنمونه‌ها و تعداد شاخساره‌های تشکیل شده در محیط کشت به ژنوتیپ گیاه، نوع محیط کشت و غلظت BA بستگی دارد. بیشترین میانگین تعداد شاخساره‌ها بر روی محیط کشت $^{3}/_{4}$MS دارای BA با غلظت‌های ۱/۰ و IBA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایجاد شد. نامبرده جهت ریشه‌دار کردن شاخساره‌های تولید شده درون شیشه‌ای گونه *L. caerulea* L. var *kamtschatica* از محیط کشت (MS) (Murashige and Skoog, 1962) $^{1}/_{2}$MS و WPM و IBA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر و اسید ایندول استیک (IAA) با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده کردند. بنابر گزارش نامبرده غلظت‌های زیاد IAA و IBA نقش مؤثری در انگیزش ریشه در محیط کشت هر دو رقم *Lonicera* داشته است. اولین آثار ریشه‌زایی ۱۲ روز پس از مواجه کردن شاخساره‌های موجود در محیط کشت با غلظت‌های بالای اکسین مشاهده و بالاترین درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در هر شاخساره ریشه‌دار شده در محیط کشت WPM انجام گردید.

همینطور Karkonen و همکاران (۱۹۹۸) ریزازدیادی *L. chamissoi* را مورد بررسی قرار دادند و از جوانه‌های جانبی به‌عنوان ریزنمونه استفاده نمودند. آنها از محیط کشت WPM دارای غلظت‌های مختلف BA (۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) توام با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده کردند و بیشترین تعداد شاخساره در محیط کشت‌های دارای ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA تولید نمودند. جهت ریشه‌دار شدن شاخساره‌های تولید شده از محیط کشت $^{1}/_{2}$ WPM دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده کردند و شاخساره‌های ریشه‌دار شده را به مخلوطی از خاک پیت و ماسه منتقل نمودند و ۸۰ درصد از گیاهچه‌ها را در شرایط خارج از شیشه رشد دادند.

در تحقیق دیگری Sedlak و Paprstein (۲۰۰۷) نوک شاخساره‌های *L. kamtschatica* را به‌عنوان ریزنمونه برای کاشت درون شیشه‌ای مورد استفاده قرار دادند. مواد گیاهی (نوک شاخساره‌ها) را با کلرید جیوه ۰/۱۵ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی کرده و بر روی محیط کشت پایه MS دارای ۱، ۲/۰ و ٤ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۸ درصد آگار کشت نمودند که میزان تولید شاخساره بیشتر به ژنوتیپ و غلظت BA بستگی داشت. بیشترین میزان تکثیر برای ژنوتیپ ۲۰/۱ بر روی محیط کشت MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA تولید شد. برای ریشه‌زایی شاخساره‌ها از محیط کشت MS دارای عناصر ماکرو و میکرو با یک سوم غلظت و IBA با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده کردند و پس از دو هفته ریشه‌زایی انجام شد. از شاخساره‌های جانبی گونه *L. caerulea* توسط Karhu (۱۹۹۷) برای تولید شاخساره‌ها در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد. نامبرده برای ریشه‌دار کردن شاخساره‌های به‌دست‌آمده دو گونه *L. caerulea* و *L. edulis* از اکسین‌های مختلف IBA، IAA و اسید نفتالن استیک (NAA) با غلظت‌های مختلف و محیط کشت پایه MS، $^{1}/_{2}$MS و $^{1}/_{3}$MS استفاده کرد. نود و هشت درصد از شاخساره‌های گونه‌ی *L. caerulea*

بر روی محیط کشت MS دارای ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر IBA، ریشه‌دار شدند. شاخساره‌های گونه‌ی *L. edulis* بر روی محیط کشت $^{1}/_{4}$MS دارای ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر IBA، بیشترین تعداد ریشه‌های اولیه و ثانویه و درصد ریشه‌زایی را ایجاد نمودند. برای سازگار کردن گیاهچه‌ها از مخلوط پیت و ورمی کولایت استفاده شد. این پژوهش به منظور دست‌یابی به یک روش سریع و آسان برای تکثیر درختچه شن (*Lonicera nummulariifolia*) با استفاده از تکنیک‌های کشت درون شیشه‌ای انجام گردید.

مواد و روشها

میوه‌های رسیده درختچه شن از رویشگاه‌های طبیعی استان فارس (آبشار مارگون و اطراف جاده سپیدان به یاسوج) جمع‌آوری شدند و پس از تمیز کردن میوه‌ها در آزمایشگاه، بذرهای سالم را جدا و آنها را با آب و چند قطره مایع ظرفشویی شسته و بعد به مدت ٤-۳ ساعت در زیر آب جاری قرار داده شدند. سپس آنها را در محلول قارچکش بنومیل ۲ گرم در لیتر به مدت ۱ ساعت بر روی دستگاه لرزا (شیکر) قرار داده و پس از شستشو با آب معمولی در گلدان‌های دارای مخلوط خاک و پیت خزه کشت و در شرایط گلخانه رشد داده شدند و از قطعات ساقه این گیاهان به‌عنوان ریزنمونه استفاده گردید. ابتدا قطعات ساقه به مدت ۵ دقیقه با آب معمولی و چند قطره مایع ظرفشویی شستشو و سپس آبشویی شدند. برای گندزدایی سطحی مواد گیاهی به زیر هود با جریان هوای یکطرفه منتقل و به مدت یک دقیقه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد و بلافاصله در محلول ۱۰ درصد سفیدکننده تجاری گلرنک (دارای ۵ درصد کلر) به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده و سپس سه بار با آب مقطر سترون آبشویی شدند. سپس قطعات ساقه‌ی دارای یک تا دو جوانه جانبی به طول ۲-۱ سانتی‌متر را جدا کرده و بر روی محیط کشت‌های مورد نظر کشت نموده و در اتاق رشد قرار داده شدند.

در تمام آزمایش‌ها از ساکارز به میزان ۳۰ گرم در لیتر به‌عنوان کربوهیدرات و از دیفکوباکتوآگار به میزان ۸/۵-۸ گرم در لیتر جهت نیمه جامد نمودن محیط کشت استفاده گردید. اسیدیته محیط‌های کشت پیش از اضافه نمودن آگار و اتوکلاو کردن به کمک محلول‌های KOH و HCl یک نرمال در حدود ۵/۷±۰/۱ تنظیم شد. گندزدایی محیط کشت با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌مترمربع به مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید. در همه‌ی آزمایش‌ها به‌جز آزمایش‌های ذکر شده، پس ازکشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت، ظروف کاشت در اتاق رشد دارای ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ لوکس نور مهتابی، طول دوره روشنایی ۱٦ ساعت و دمای۱ ± ۲۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار (SAS Institute, 1988) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

آزمایش ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف BA جهت افزایش شاخساره در *L. nummulariifolia*

این آزمایش برای یافتن بهترین غلظت BA جهت پرآوری شاخساره انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تیمار انجام گردید. هر تیمار شامل ۵ تکرار و هر تکرار دارای ۵ ریزنمونه بود. از قطعات ساقه‌ی دارای ۲-۱ جوانه‌ی جانبی به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد، ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت MS دارای غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BA به‌عنوان ٤ تیمار

مختلف کشت شدند. همه‌ی تیمارها دارای ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بودند. چهار هفته پس از کشت، یادداشت‌برداری از شاخص‌های رشد شامل تعداد شاخساره ، طول شاخساره اصلی و وزن تر شاخساره انجام گردید.

آزمایش ۲. تأثیر نوع محیط کشت و غلظت‌های مختلف BA روی استقرار و پرآوری شاخساره در *L. nummulariifolia*

این آزمایش برای تعیین محیط کشت و غلظت مناسب BA جهت پرآوری شاخساره به‌صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی انجام گردید. قطعات ساقه دارای یک تا دو جوانه‌جانبی روی محیط کشت‌های DKW (Driver (and Kuniyuki walnut medium (McGranahan *et al.*, 1987) و MS به‌عنوان فاکتور اول همراه با BA با غلظت‌های ۰/٤، ۰/۷ و ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌عنوان فاکتور دوم کشت شدند، غلظت IBA در تمامی تیمارها ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بود. هر تیمار شامل ۵ تکرار و هر تکرار دارای ۵ ریزنمونه بود. چهار هفته پس از کشت یادداشت‌برداری از شاخص‌های رشد انجام گردید.

آزمایش ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف IBA روی ریشه‌زایی شاخساره‌های درون شیشه‌ای *L. nummulariifolia*

در این آزمایش اثر غلظت‌های مختلف IBA (۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت MS روی ریشه‌زایی شاخساره‌های درون شیشه‌ای شن در قالب آزمایش طرح کاملاً تصادفی بررسی گردید. هر تیمار شامل ۳ تکرار و هر تکرار دارای ۵ ریزنمونه بود. از شاخساره‌های تولید شده بر روی محیط کشت MS و DKW به‌عنوان ریزنمونه استفاده گردید. چهار هفته پس از کشت، یادداشت‌برداری از شاخص‌های ریشه‌زایی شامل درصد ریشه‌زایی، طول بلندترین ریشه و تعداد ریشه‌ها انجام شد.

آزمایش ٤. تأثیر زمان‌های مختلف قرار دادن شاخساره‌ها در محیط کشت انگیزش ریشه روی ریشه‌زایی درون شیشه‌ای *L. nummulariifolia* و سازگاری گیاهچه‌ها به شرایط گلخانه

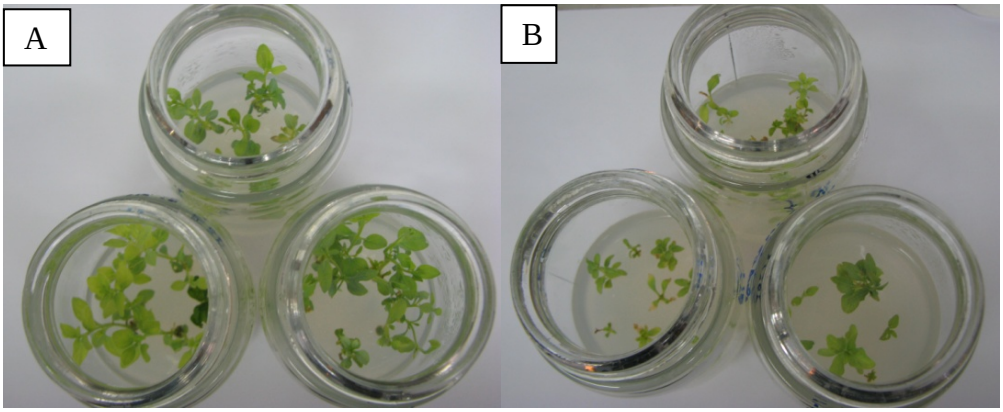
این آزمایش در دو مرحله‌ی مجزا شامل انگیزش ریشه و نمو ریشه‌ها انجام گردید. برای انگیزش ریشه، شاخساره‌ها به مدت ۳۰، ٤۰ و ٦۰ ساعت بر روی محیط کشت MS با نصف غلظت عناصر ماکرو دارای ۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBAکشت شدند و در تاریکی قرار داده شدند. پس از سپری شدن زمان انگیزش ریشه، شاخساره‌ها برای نمو ریشه‌ها به محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده‌ی رشد و روشنایی انتقال یافتند. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و هر تیمار شامل ۳ تکرار و هر تکرار دارای ۵ ریزنمونه اجرا شد. چهار هفته بعد از انتقال شاخساره‌ها به محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌ی رشد یادداشت‌برداری از شاخص‌های ریشه‌زایی انجام شد. برای سازگاری و انتقال به گلدان و عادت به شرایط طبیعی، گیاهچه‌هایی که ریشه‌های آنها در تیمارهای ریشه‌زایی به خوبی گسترش یافته بودند انتخاب گردیدند و پس از خارج کردن گیاهچه‌ها از محیط کشت، ابتدا ریشه‌های آنها با آب شیر به منظور حذف بقایای آگار از سطوح ریشه‌ها شسته شدند و علاوه بر آن جهت حذف پاتوژن‌های سطحی احتمالی و جلوگیری از نفوذ پاتوژن، ریشه‌ها در محلول ۲ گرم در لیتر کاپتان ضدعفونی شدند، و سپس به گلدان‌های پلاستیکی کوچک دارای پیت و ماسه و

خاک به نسبت ۱:۱:۱ انتقال داده شدند و در جعبه‌های کشت با رطوبت و دمای مناسب قرار داده شدند.

نتایج

آزمایش ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف BA جهت افزایش شاخساره در *L. nummulariifolia*

با توجه به نتایج حاصل از آزمایش (جدول ۱) مشخص گردید که ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA، تعداد شاخساره‌ی بیشتری در مقایسه با دیگر تیمارها تولید نمودند (شکل ۱). ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت دارای ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA دارای شاخساره‌های بلندتری نسبت به محیط کشت‌های دارای ۰/۵ و ۰/۸ گرم در لیتر BA بودند (شکل ۱)، اما در مقایسه با محیط کشت‌های دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA تفاوت معنی‌دار نداشتند.



شکل۱- شاخساره‌های تولید شده از کشت قطعات ساقه بر روی محیط کشت MS و غلظت‌های مختلف BA پس از یک ماه. (A. شاخساره‌های رشدیافته بر روی محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA؛ B. شاخساره‌های رشدیافته بر روی محیط کشت دارای ۰/۲ میلی‌گرم در لیترBA).

ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین وزن تر شاخساره را تولید کردند که در مقایسه با محیط کشت دارای ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BA به طور معنی‌دار بیشتر بود، اما با ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌های کشت دارای ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA تفاوت معنی‌دار نداشتند (جدول ۱).

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف BA روی شاخص‌های رشد درون شیشه‌ای در *L. nummulariifolia*

غلظت BA (میلی‌گرم در لیتر)	میانگین تعداد شاخساره در هر ریزنمونه	میانگین طول شاخساره اصلی در هر ریزنمونه (سانتی‌متر)	میانگین وزن تر شاخساره در هر ریزنمونه (گرم)
۰/۱	٤/۳۵ a*	۱/۹٤a	۰/۷۰a
۰/۲	۳/٤٥b	۲/۷٤a	۰/٥٥a
۰/٥	۲/٤۰c	۱/۱۹b	۰/٦۲a
۰/۸	۱/٦٥d	۱/۱۱b	۰/۱۷b

*میانگین‌های هر ستون که دارای حروف مشابه می‌باشند براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن با یکدیگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

آزمایش ۲. تأثیر نوع محیط کشت و غلظت‌های مختلف BA روی استقرار و پرآوری شاخساره در *L. nummulariifolia*

نتایج حاصل از این آزمایش (جدول ۲) نشان داد که ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های DKW بیشترین میانگین تعداد شاخساره، طول شاخساره و وزن تر شاخساره را تولید کردند. طول شاخساره در محیط کشت DKW اختلاف معنی‌داری با محیط کشت MS نشان داد، ولی در دو صفت دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). همچنین ساختار ظاهری شاخساره‌های تولید شده بر روی محیط کشت‌های DKW از MS بهتر بود (شکل ۲). ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های دارای ۰/٤، ۰/۷ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA از نظر میانگین تعداد شاخساره، میانگین طول شاخساره و وزن تر با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند (جدول ۲).

شکل۲ - شاخساره‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت‌های MS و DKW دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر BA

برهم کنش محیط‌های کشت و غلظت‌های مختلف BA روی میانگین طول شاخساره اصلی (جدول ۳) نشان داد که ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های DKW دارای ۰/٤ یا ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر BA نسبت به بقیه ترکیب‌های محیط کشت برتری معنی‌دار دارند.

جدول ۲- تأثیر نوع محیط کشت و غلظت‌های مختلف BA بر شاخص‌های رشد درون شیشه‌ای *L. nummulariifolia*

نوع محیط کشت	میانگین تعداد شاخساره در هر ریزنمونه	میانگین طول شاخساره اصلی در هر ریزنمونه (سانتی‌متر)	میانگین وزن تر شاخساره در هر ریزنمونه (گرم)
MS	۱/۵۲ a¥	۳/۲ b	۰/۲۹ a
DKW	۲/۰۰a	٤/۵ a	۰/۳۵ a
غلظت BA (میلی‌گرم در لیتر)			
۰/٤	۱/۸۸a	۳/۹۵a	۰/۳٦a
۰/۷	۱/۵۸a	٤/۰۱a	۰/۲۹ a
۱	۱/۸۲ a	۰/۷٤ a	۰/۳۱ a
برهم کنش	ns	*	ns

¥میانگین‌های هر ستون که دارای حروف مشابه می‌باشند براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن با یکدیگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.
ns = برهم کنش محیط کشت و غلظت‌های مختلف BA (در سطح احتمال ۵ درصد) معنی‌دار نیست.
* برهم کنش محیط کشت و غلظت‌های مختلف BA (در سطح احتمال ۵ درصد) معنی‌دار است.

جدول ۳- برهمکنش نوع محیط کشت و غلظت‌های مختلف BA بر میانگین طول شاخساره اصلی (سانتی‌متر) در کشت‌های درون شیشه‌ای شن (*L. nummulariifolia*)

محیط کشت	غلظت BA در محیط کشت (میلی‌گرم در لیتر)		
	۰/٤	۰/۷	۱/۰
MS	۳/۱٤ b¥	۳/۲۲b	۳/۳۸b
DKW	٤/۷٦a	٤/٦۵a	٤/۲٦b

¥میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه می‌باشند براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن با یکدیگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

آزمایش۳. تأثیر غلظت‌های مختلف IBA بر ریشه‌زایی شاخساره‌های درون شیشه‌ای *L. nummulariifolia*

براساس نتایج این آزمایش (جدول ٤) بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت دارای ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد که به طور معنی‌دار از محیط‌های کشت دارای ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشتر بود. درصد ریشه‌زایی شاخساره‌های کشت شده بر روی محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA اختلاف معنی‌داری با محیط کشت دارای ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA نشان نداد. بیشترین میانگین تعداد ریشه‌ی اصلی در محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد که در مقایسه با محیط کشت دارای ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به طور معنی‌دار بیشتر بود، اما با محیط کشت دارای ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA اختلاف معنی‌دار نداشت (جدول٤). میانگین طول ریشه‌ی اصلی در محیط کشت‌های دارای غلظت‌های مختلف IBA اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نداشتند.

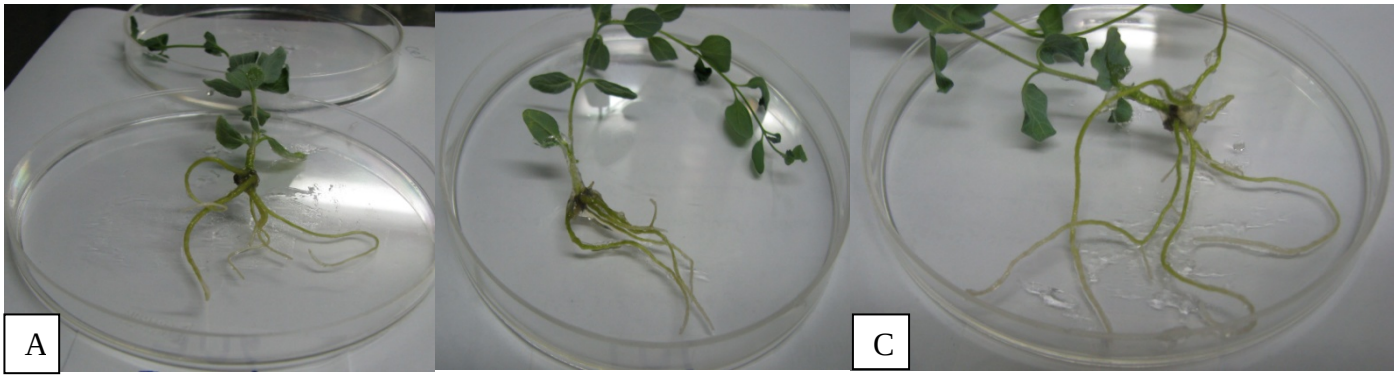
آزمایش ٤. تأثیر زمان‌های مختلف قرار دادن شاخساره‌ها در محیط کشت انگیزش ریشه بر ریشه‌زایی درون شیشه‌ای *L. nummulariifolia* و سازگاری گیاهچه‌ها به شرایط گلخانه

براساس نتایج بدست آمده از این آزمایش (جدول ۵) تفاوت معنی‌داری از نظر شاخص‌های ریشه‌زایی بین زمان‌های مختلف قرار دادن شاخساره‌های شن در محیط انگیزش ریشه مشاهده نگردید. با وجود این، افزایش مدت زمان قرار دادن شاخساره‌های شن در محیط کشت انگیزش موجب افزایش طول ریشه‌ی اصلی و تعداد ریشه‌ی اصلی گردید (شکل ۳). ریزشاخساره‌های کشت شده در تیمار زمانی ٦۰ ساعت ریشه‌ی ثانویه تولید کردند و در سایر تیمارها تولید ریشه‌ی ثانویه اتفاق نیفتاد (جدول ۵). شاخساره‌های ریشه‌دار شده در این آزمایش به گلدان‌های دارای مخلوط پیت‌خزه، ورمی‌کولایت و ماسه به خوبی سازگار شده و در گلخانه به رشد ادامه دادند (شکل ٤).

جدول ٤- تأثیر غلظت‌های مختلف IBA روی ریشه‌زایی شاخساره‌های *L. nummulariifolia*

غلظت IBA (میلی‌گرم در لیتر)	درصد ریشه‌زایی	تعداد ریشه اصلی در هر شاخساره ریشه‌دار شده	طول ریشه اصلی در هر شاخساره ریشه‌دار شده (سانتی‌متر)
۰/۰۱	۲۰b[¥]	۱/۰۰b	۰/۵۲a
۰/۰۵	۵۰a	۱/۵٦a	۱/۸۷a
۰/۱	۲۵b	۱/۸۷a	۱/۵۰a

[¥]میانگین‌های هر ستون که دارای حروف مشابه می‌باشند براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن با یکدیگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.



شکل ۳- ریشه‌دار شدن ریزشاخساره‌های شن در محیط کشت دارای ۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌عنوان محیط انگیزش ریشه در مدت زمان‌های متفاوت: A. ۳۰ ساعت، B. ٤٠ ساعت و C. ٦٠ ساعت.

جدول ٥- تأثیر زمان‌های مختلف قرار گرفتن شاخساره‌ها در محیط کشت انگیزش ریشه بر شاخص‌های ریشه‌زایی شن (*L. nummulariifolia*)

مدت زمان قرار دادن ریزشاخساره‌ها در محیط کشت انگیزش ریشه	درصد ریشه‌زایی	میانگین طول بلندترین ریشه اصلی در هر شاخساره ریشه‌دار شده (سانتی‌متر)	میانگین تعداد ریشه اصلی در هر شاخساره ریشه‌دار شده
۳۰ ساعت	٤٦/٦٧ a¥	١/٤٠a	٢/٦٧a
٤٠ ساعت	٤٦/٦٧a	٢/٨٤a	٢/٩٧a
٦٠ ساعت	٤٦/٦٧a	٤/٥٣a	٤/٢٨a

¥میانگین‌های هر ستون که دارای حروف مشابه می‌باشند براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن با یکدیگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ٥ درصد ندارند.

شکل ٤- شاخساره‌های ریشه‌دار شده شن پس از انتقال از محیط کشت به گلدان

بحث

تعداد شاخساره‌ی تولید شده بر روی محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر حداکثر و به طور معنی‌دار از سایر تیمارها بیشتر بود (جدول ۱). این نتایج با گزارش Schoene و Yeager (۲۰۰۵) که از محیط کشت MS با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA تولید بیشترین تعداد شاخساره را گزارش کرده‌اند مطابقت دارد. نکته‌ی حائز اهمیت این است که با افزایش غلظت BA وزن تر شاخساره کاهش یافته است (جدول ۱)، این موضوع با توجه به اینکه اعضای تیره کاپریفولیاسه دارای غلظت‌های بالایی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به صورت درون‌زا هستند (Karhu, 1997) طبیعی بنظر می‌رسد چرا که افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد تا حد معینی تحریک‌کننده‌ی رشد و چنانچه از حد معینی بالاتر رود، باعث بازدارندگی رشد خواهد شد. شاخص‌های رشد ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت دارای ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BA حداقل بود (جدول ۱) که تأیید کننده اثر بازدارندگی BA در غلظت‌های بالا می‌باشد. شیشه‌ای شدن (Hyperhydrecity) شاخساره‌های تولید شده از مشکلات دیگر کشت درون شیشه‌ای *Lonicera* است که بر روی محیط کشت‌های دارای غلظت زیاد BA توسط Dziedzic (۲۰۰۸) گزارش شده است.

میزان رشد طولی شاخساره تا حد زیادی متأثر از برهم کنش بین غلظت هورمون‌های سایتوکاینین و عناصر غذایی پرمصرف است (Karhu, 1997). در پژوهش حاضر ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت دارای ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA دارای شاخساره‌های بلندتری نسبت به محیط کشت‌های دارای ۰/۵ و ۰/۸ گرم در لیتر BA بودند که با نتایج Nobre و همکاران (۲۰۰۵) که بهترین رشد شاخساره‌ها بر روی محیط کشت MS دارای ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA را گزارش کرده‌اند مشابه است. از بین بردن چیرگی انتهایی و کاهش رشد طولی ساقه از ویژگی‌های سایتوکاینین‌هاست که با داده‌های جدول ۱ مطابقت دارد.

ریزنمونه‌های کشت‌شده بر روی محیط کشت DKW بیشترین میانگین تعداد شاخساره، طول شاخساره و وزن تر شاخساره را تولید کردند. همچنین ساختار ظاهری شاخساره‌های تولید شده بر روی محیط کشت DKW از MS بهتر بود (شکل ۲). مقایسه ترکیبات تشکیل دهنده‌ی دو محیط کشت نشان می‌دهد که عناصر پر مصرف محیط کشت DKW با محیط کشت MS متفاوت و مقدار نسبی عناصر پر مصرف محیط کشت DKW بیشتر از محیط کشت MS است. مقایسه‌ی ظاهری ریزنمونه‌ها در هر دو محیط کشت MS و DKW، با توجه به شکل ۲ موید این مطلب می‌باشد که در مجموع محیط کشت DKW از نظر پرآوری و رشد شاخساره محیط مناسبتری در مقایسه با محیط کشت MS است. استفاده از محیط کشت DKW در کشت‌های درون شیشه‌ای توسط پژوهشگران در منابع علمی گزارش نشده، اما برتری محیط کشت WPM نسبت به MS برای دو رقم از *Lonicera caerulea* var. *kamtschtica* Pojark. توسط Dziedzioc (۲۰۰۵) گزارش شده است.

بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت دارای ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد که به طور معنی‌دار از محیط‌های کشت دارای ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشتر بود (جدول ٤). بیشترین میانگین تعداد ریشه‌ی اصلی در محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد که در مقایسه با محیط کشت دارای

۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به طور معنی‌دار بیشتر بود، اما با محیط کشت دارای ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA اختلاف معنی‌دار نداشت (جدول ٤). با استفاده از غلظت پایین IBA، کالوس‌زایی مشاهده نگردید و ریشه‌های نابجا به طور مستقیم و بدون کالوس ایجاد شدند، اما درصد ریشه‌زایی برای تکثیر تجاری این گونه در حد مطلوب نیست و نیازمند پژوهش‌های بیشتر است. نتایج این آزمایش با نتایج Nobre و همکاران (۲۰۰۰) که گزارش نموده‌اند بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد مطابقت ندارد. این امر احتمالا به نوع اکسین مورد استفاده، غلظت آن و گونه مورد آزمایش بستگی دارد.

تفاوت معنی‌داری از نظر شاخص‌های ریشه‌زایی بین زمان‌های مختلف قرار دادن شاخساره‌های *L. nummulariifolia* در محیط انگیزش ریشه مشاهده نگردید (جدول ۵). با وجود این، افزایش مدت زمان قرار دادن شاخساره‌های شن در محیط کشت انگیزش ریشه موجب افزایش طول ریشه‌ی اصلی و تعداد ریشه‌ی اصلی گردید (شکل ۳). ریزشاخساره‌های کشت شده در تیمار زمانی ٦۰ ساعت ریشه‌ی ثانویه تولید کردند و در سایر تیمارها تولید ریشه‌ی ثانویه مشاهده نشد. تولید ریشه‌ی ثانویه یک ویژگی مطلوب است که می‌تواند به استقرار گیاهچه‌ها بعد از انتقال به گلدان و سازگاری آن کمک کند. مقایسه جدول‌های ٤ و ۵ نشان می‌دهد که درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه‌ی اصلی و ثانویه و بلندترین ریشه اصلی در روش ریشه‌زایی به صورت دومرحله‌ای به دلیل صرفه‌جویی در زمان و کیفیت گیاهچه‌های تولید شده مطلوبتر است. اما درصد ریشه‌زایی برای تکثیر تجاری این گونه در حد مطلوب نیست و نیازمند پژوهش‌های بیشتر است و لازم است مدت زمان قرار داشتن شاخساره‌ها در محیط کشت انگیزش ریشه برای مدت زمان بیشتر بررسی گردد. گزارش مشابهی با این آزمایش در مورد ***L. nummulariifolia*** در منابع علمی یافت نشد.

سپاسگزاری

از رئیس محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس (آقای دکتر مهرداد محمدنیا) به دلیل فراهم نمودن امکان اجرای این پایان‌نامه در آزمایشگاه ریزازدیادی و کشت بافت گیاهی آن مرکز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

– ثابتی، ح. ۱۳۸۵. جنگل‌ها، درختان و درختچه‌های ایران، چاپ چهارم، انتشارات دانشگاه یزد: ۲٤۲–۳٤۵.

– حمزه‌پور، م. و بردبار، ک.، ۱۳۷۸. بررسی برخی از خصوصیات جنگل‌شناسی گونه شن در منطقه سپیدان. پژوهش و سازندگی. شماره ٤۰، ٤۱ و ٤۲: ۷۲–۷۸.

– Boonnour, K., Wainwright, H. and Hicks, R.G.T., 1988. The micropropagation of *Lonicera periclymenum* L. (Honeysuckle). Acta Horticulturae, 226:183-190.

– Dziedzic, E., 2008. Propagation of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica Pojark*) in *in vitro* culture. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 16: 93-100.

– Javidnia, K., Miri, R., Sabet, R. and Jafari, R., 2004. Composition of the essential oil of *Lonicera nummulariifolia*. Journal of Essential Oil, 16: 239-240.

– Karhu, T.S., 1997. Rooting of blue honeysuckle microshoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 48: 153-159.

– Karkonen, A., Simola, L K. and Koponen, T., 1998. Micropropagation of several Japanese woody plants for horticulture purposes. Annales Botanici Fennici, 36: 21-31.

– Lloyd, G., and McCown, B., 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel,

Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture. Comb. Intl. Plant Prop. Soc., 30: 421-427.
– McGranahan, G.H., Driver, A. and Tulecke, W., 1987. Tissue culture of Juglans. In: Bonga, G.M., and Durzan, D.J. (Eds.). Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 3. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp. 261-271.
– Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
– Nobre, J., Santos, C. and Romano, A., 2000. Micropropagation of the Mediterranean species *Viburnum tinus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60: 75-78.
– SAS Institute. 1988. SAS/STAT User's Guide. Release 6.03, Statistical Analysis System (SAS) Institute, Inc., Cary, N.C., USA.
– Schoene, G. and Yeager, T., 2005. Micropropagation of sweet viburnum (*Viburnum odoratissimum*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 83: 271-277.
– Sedlak, J. and Paprstein, F., 2007. *In vitro* micropropagation of blue honeysuckle (*Lonicera kamtschatica*). Research and Breeding Inistitute of Pomology Holovousy Ltd., Holovousy, Czech Republic, 4: 129-131.

Micropropagation of *Lonicera nummulariifolia* Jaub. & Spach

P. Jalali[1], Y.A. Saadat[2]* and H. Sadeghi[3]

1- M.Sc., Horticultural Science, Azad Islamic University, Jahrom Branch, I.R.Iran.
2*- Corresponding author, Assis. Prof., Research Center for Agriculture and Natural Resources of Fars Province, Shiraz, I.R.Iran, E-mail: saadat@farsagres.ir
3- Assis. Prof., Azad Islamic University, Jahrom Branch, Jahrom, I.R.Iran.

Received: 29.05.2010 Accepted: 05.03.2011

Abstract

Lonicera nummulariifolia Jaub. & Spach, is a deciduous shrub growing in Zagros region of Iran as a companion species with oak, especially in Sepidan county, Fars Province, Iran. However, there isn't enough information about its propagation and different aspects of its growth. This study was carried out to develop *in vitro* culture techniques for rapid and mass propagation of the species. Shoot tips and nodal segments of seedlings were used as explants. Murashige and Skoog (MS) medium containing 0.1 mgl^{-1} BA was optimum for shoot multiplication. Nodal segments cultured on Driver and Kuniyuki walnut (DKW) medium containing 0.4, 0.7 and 1.0 mgl^{-1} BA, 30 gl^{-1} sucrose and solidified with 8.0 gl^{-1} Difco Bacto agar in comparison with MS medium didn't show any significant differences on measured growth indices. The best procedure for *in vitro* rooting consisted of two phases: root induction and root development. For root induction the most efficient method was utilization of MS medium (half strength macronutrients) solidified with 8.0 gl^{-1} Difco Bacto agar, containing 30 gl^{-1} sucrose and 25.0 mgl^{-1} IBA in dark conditions for 60 hours. For root development, shoots were transferred from root induction medium to hormone free medium in lighted conditions. Using this method, about 46.7 percent of the shoots rooted. After root development, plantlets were transferred to pots containing a mixture of peat, sand and vermiculite (1:1:1) and transferred to greenhouse.

Key words: BA, Shoot multiplication, Rooting, Nutrient medium.