Archive of SID

نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل
جلد بیست و سوم، شماره سوم، ۱۳۹۵
http://jwfst.gau.ac.ir

اثر نوع هورمون و بستر پایه بر پرآوری و ریشه‌زایی گیاه دارویی قره‌قات (*Ribes khorasanicum*)

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

[۱]دانشجوی دکتری جنگلداری، دانشگاه تربیت مدرس مشهد، [۲]دانشیار گروه جنگلداری، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی تربیت مدرس، [۳]دانشیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، [۴]استاد گروه جنگلداری، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی تربیت مدرس، [۵]استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰٤/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: قره‌قات (*Ribes khorasanicum*) گیاهی درختچه‌ای و بدون خار متعلق به تیره تک‌جنسی انگور فرنگی است؛ از این جنس حدود ۱۵۰ گونه شناسایی شده است که عمدتاً در مناطق معتدله نیمکره شمالی پراکنش دارند. رویشگاه‌های گونه قره‌قات خراسانی به‌دلیل بهره‌برداری بی‌رویه از میوه و چرای بی‌رویه دام در گذشته و حال حاضر، دچار تخریب شده است؛ از سویی بذور آن دارای درصد قوه‌نامیه پایینی است و تجدیدحیات گونه در رویشگاه‌های آن تنها از طریق ریزوم صورت می‌گیرد. لذا یکی از راه‌های حفظ و احیاء این‌گونه ارزشمند ریزازدیادی از طریق کشت بافت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور تکثیر این‌گونه، جوانه‌های جانبی و انتهایی شاخه‌های تهیه شده از رویشگاه‌های طبیعی آن در کوه‌های هزارمسجد به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. در این تحقیق اثر دو

*مسئول مکاتبه: Akbarim@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

نوع سیتوکینین BAP و کینتین در غلظت‌های مختلف در حضور یا عدم حضور اکسین بر پرآوری و رشد شاخه‌های پرآوری شده مورد بررسی قرار گرفت. بدین صورت که غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱، ۳ و ۵) میلی‌گرم در لیتر از هرکدام از دو نوع سیتوکینین در حضور یا عدم حضور ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین اثر غلظت عناصر غذایی و میزان ساکارز بستر پایه، هورمون IBA و BAP بر ریشه‌زایی و طول ریشه گیاهچه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که هورمون BAP از ساقه‌زایی بهتری نسبت به کینتین برخوردار است. با در نظر گرفتن ضریب تکثیر شاخه‌ها و ارتفاع شاخه‌های تولیدی می‌توان عنوان نمود مناسب‌ترین بستر جهت پرآوری گیاهچه‌های این‌گونه، محیط MS همراه با یک میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP می‌باشد. با توجه به تیمارهای مورد ارزیابی جهت ریشه‌زایی و همچنین میانگین درصد ریشه‌زایی و طول ریشه گیاهچه‌ها مناسب‌ترین بستر، MS تعدیل‌یافته که در آن غلظت ساکارز به نصف تقلیل یافته (۱۵ گرم در لیتر)، همراه با غلظت‌های ۰/۵ تا دو میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA بود، استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP باعث کاهش درصد ریشه‌زایی و طول ریشه شد. گیاهچه‌ها در بستر، MS تعدیل‌یافته از بیشترین طول ریشه برخوردار بودند بیشترین طول ریشه در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA حاصل شد. گیاهچه‌های تولیدی سپس با حدود ۸۶ درصد زنده‌مانی با موفقیت به شرایط خارج شیشه و به درون گلخانه منتقل شدند.

نتیجه‌گیری: با توجه‌به تکثیر مناسب این‌گونه با استفاده از کشت بافت و سازگاری موفقیت‌آمیز گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت می‌توان از کشت بافت به‌عنوان یک جایگزین مناسب تکثیر از طریق بذر و قلمه جهت حفظ و گسترش این‌گونه دارویی ارزشمند استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: *Ribes khorasanicum*، ریزازدیادی، BAP، طول ریشه

مقدمه

گونه *Ribes khorasanicum* Saghafi & Assadi که گونه‌ای اندمیک و منحصر به ایران و ارتفاعات هزار مسجد خراسان می‌باشد که برای نخستین بار توسط اسدی و ثقفی در سال ۱۹۹۵، در نواحی شمال شرق خراسان شناسایی و معرفی شد. گونه مزبور متعلق به تیره تک‌جنسی انگورفرنگی

www.SID.ir

Archive of SID

(Grossulariaceae) می‌باشد. از این جنس حدود ۱۵۰ گونه شناسایی شده است که عمدتاً در مناطق معتدله نیمکره شمالی پراکنش دارند (۲۲). قره‌قات (*Ribes khorasanicum*) درختچه‌ای خزان کننده بدون خار و با شکل زیستی فانروفیت دارای جوانه‌های فلس‌دار بوده و ارتفاع آن به دو تا هشت متر می‌رسد. تکثیر گونه مزبور در محدوده پراکنش آن عمدتاً از طریق رویشی و به کمک جوانه‌های موجود در ریزوم است. علاوه‌بر درصد بسیار پایین جوانه‌زنی بذور این‌گونه، یکی از مهمترین علل تخریب جمعیت این‌گونه گیاهی دخالت‌های انسانی است که به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم در این امر نقش دارد. خوشبختانه درحال حاضر این‌گونه تحت کنترل حفاظت اداره منابع طبیعی درآمده و از تخریب بیشتر آن تا حدی جلوگیری می‌شود. براساس معیارهای تعیین شده از سوی مرکز جهانی پایش حفاظت (WCMC)[1] می‌توان این‌گونه را جزء آرایه‌ها (تکسون‌های) آسیب‌پذیر[2] (VU) تقسیم نمود (۱).

در مورد کشت بافت سایر گونه‌های جنس Ribes مطالعات نسبتاً زیادی در خارج کشور انجام شده است اما در مورد این‌گونه و سایر گونه‌های مشابه تاکنون چنین مطالعه‌ای در داخل کشور انجام نشده است. تأثیر تنظیم کننده‌های رشد بر ریزازدیادی گونه *Ribes rubrum* مورد بررسی قرار گرفت، بهترین بستر برای به‌دست آوردن جوانه، بستر نیم غلظت MS بود. بالاترین پرآوری[3] ترکیب تنظیم کننده‌های رشد BA/IBA/GA3 به‌دست آمد (۱۶). آرنا و پاستور (۱۹۹۵)، در تکثیر درون شیشه‌ای *Ribes magellanicum*، سه هفته پس از کاشت در بستر پایه MS با نصف غلظت عناصر ماکرو که به آن ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP اضافه شده بود حداکثر چهار جوانه محوری از هر ریزنمونه به‌دست آوردند. پس از بازکاشت در محیط مشابه بدون IBA درصد ریشه‌دهی بیشتر از ۹۵ درصد بود (۳). در بهبود ریزازدیادی درون شیشه‌ای انگور فرنگی سیاه (*Ribes nigrum*) توسط وجوویک و همکاران (۲۰۱۱)، نتایج نشان داد که ساقه‌هایی که در بستر فاقد سیتوکینین رشد نمودند (بستر MS که به آن ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA وجیبرلین افزوده شده است) به خوبی طویل می‌شوند و میزان ریشه‌دهی گیاهچه‌ها به ۱۰۰ درصد رسید (۲۵). سدلاک و پاپرستین، (۲۰۱۲)، به بررسی دستورالعمل تکثیر درون شیشه‌ای کولتیوارهای انگورفرنگی قرمز در جمهوری چک پرداختند و مناسب‌ترین نتیجه در بستر MS

1- World Conservation Monitoring Centre
2- Vulnerable
3- Multiplication

www.SID.ir

Archive of SID

حاوی غلظت کمتر هورمون ٦- بنزیل آمینو پورین (BAP) یعنی یک میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد (۲۱). تأثیر غلظت ساکارز بر تکثیر درون شیشه‌ای گونه قره‌قات قرمز در بستر MS حاوی نصف غلظت عناصر ماکرو مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین پرآوری با استفاده از بستر کاشت حاوی ٤٥ میلی‌گرم بر لیتر ساکارز به‌دست آمد (١٦). زدزیک و جاگلا (۲۰۱۳)، اقدام به کشت بافت قره‌قات سیاه (*Ribesnigrum*) با استفاده از ریزنمونه جوانه‌های جانبی و انتهایی نمودند. بستر مورد استفاده MS بوده که جهت القاء جوانه‌زنی دو میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۱میلی‌گرم در لیتر GA_3 به آن افزوده شده بود. جهت تکثیر یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به بستر MS نیز افزوده گردید. ریشه‌زایی در بستر حاوی دو میلی‌گرم در لیتر IBA و پنج میلی‌گرم در لیتر IAA انجام شد. گیاهچه‌های ریشه‌دار سپس به بستر حاوی پیت منتقل و در شرایط گلخانه سازگار شدند (۹). روزیک و لازیک (۲۰۰٦)، به بررسی روش‌های تکثیر سریع کولتیوارهای جدید قره‌قات سیاه پرداختند. در مرحله استقرار، از بستر MS همراه با بنزیل‌آدنین (BA)، IBA و جیبرلین (GA_3) به‌ترتیب با غلظت‌های دو، ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده نمودند و در مرحله تکثیر نیز، از بستر MS همراه با BA و IBA یا نفتالین استیک اسید (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 یک و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و یک گرم در لیتر زغال فعال استفاده نمودند. پس از ریشه‌دار نمودن گیاهچه‌ها اقدام به کاشت آن‌ها در بستر پیت در شرایط میست در داخل گلخانه نمودند میزان زنده‌مانی آن‌ها پایین و حدود ٤٠ درصد بود (۱۹).

گونه قره‌قات خراسانی در محدوده کوچکی از رشته کوه‌های هزار مسجد به‌صورت توده‌های پراکنده گسترش یافته است. این‌گونه در طب سنتی از ارزش بالایی در بین اهالی منطقه برخوردار است و به‌عنوان یک کاهنده فشار خون شناخته شده است؛ طوری‌که میوه آن با قیمت بالایی به فروش می‌رسد و مردم منطقه هرساله قبل از آنکه بذور آن به‌طور کامل برسد اقدام به جمع‌آوری آن می‌کنند. از سویی به‌دلیل چرای بی‌رویه دام و قوه‌نامیه پایین بذور، زادآوری جنسی آن به‌میزان زیادی کاهش یافته است و تکثیر آن تنها از طریق ریزوم صورت می‌گیرد. لذا یکی از راه‌های حفظ و تکثیر و کمک به احیای رویشگاه‌های آن، تکثیر غیرجنسی از طریق کشت بافت می‌باشد. لذا در این مطالعه به تعیین روش مناسب تکثیر این‌گونه از طریق کشت بافت اقدام شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

ابتدا با مراجعه به رویشگاه‌های گونه موردنظر در فصول مختلف در کوه‌های هزار مسجد واقع در شمال استان خراسان رضوی در ارتفاع ۲٤۰۰ تا ۲۷۰۰ متری از سطح دریا اقدام به تهیه ریزنمونه از بخش‌های مختلف گیاه از جمله جوانه انتهایی و میانگره شد نمونه‌های جمع‌آوری شده را بلافاصله داخل کیسه‌های پلاستیکی قرار داده، در آن را بسته و به آزمایشگاه منتقل شد. ریزنمونه‌های گیاهی پس از انتقال به آزمایشگاه و ضدعفونی با محلول‌های مناسب برای عاری‌سازی آن‌ها از پاتوژن به محیط‌های کشت مختلف و با غلظت‌های هورمونی متفاوت منتقل شدند تا محیط کشت مناسب و تیمار هورمونی مطلوب جهت استقرار ریزنمونه شناسایی شود. مناسب‌ترین تیمار ضدعفونی از بین تیمارهای ضدعفونی مختلف مورد بررسی (جدول ۱)، کلرید جیوه ۰/۰۳ درصد به‌مدت دو دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت دو دقیقه و هیپوکلریت سدیم (وایتکس) ۱/۵ درصد کلر فعال به‌مدت ۱۵ دقیقه سپس سه مرتبه شستشو با آب مقطر در زیر هود لامینار فلو بود.

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده جهت ضدعفونی ریزنمونه‌های قره‌قات.

Table 1. Treatments used for explant sterilization of Ribes.

ردیف Num.	تیمار ضدعفونی sterilization treatment
1	کلرید جیوه ۰/۰۳ درصد به‌مدت دو دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت دو دقیقه و هیپوکلریت سدیم (وایتکس) ۱/۵ درصد کلر فعال ۱۵ دقیقه سپس شستشو با آب مقطر در زیر هود لامینار فلو سه مرتبه
2	اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۲ درصد کلر فعال، به‌مدت ۲۰ دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل سه مرتبه
3	کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۳ دقیقه، الکل ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل سه مرتبه
4	هیپوکلریت سدیم ۳ درصد کلر فعال، به‌مدت ۱۵ دقیقه و شستشو با آب مقطر سه مرتبه

ریزنمونه‌ها که اندازه آن‌ها پنج تا ۱۰ میلی‌متر بود به شیشه‌های کوچک حاوی ۱۰ سی‌سی محیط منتقل شدند. در هر شیشه یک عدد ریزنمونه کشت شد. برای هر ترکیب تیمار ۳۰ تکرار در نظر گرفته شد. پس از شناسایی تیمار ضدعفونی مناسب، درصد باززایی ریزنمونه‌ها در تیمارهای مختلف هورمونی و محیط‌های مختلف تعیین شد. جهت افزایش تعداد ساقه باید اقدام به واکشت ریزنمونه‌ها در محیط پرآوری (proliferation) نمود. بدین منظور، ریزنمونه‌های باززایی شده جهت بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

پرآوری به محیط‌های پرآوری منتقل شدند که جهت پرآوری سیتوکینین‌های مورد استفاده بنزیل‌آمینو پورین (BAP) و کینتین و اکسین مورد استفاده ایندول بوتیریک اسید (IBA) بود. بدین صورت که غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱، ۳ و ۵) میلی‌گرم در لیتر از هرکدام از دو نوع سیتوکینین در حضور یا عدم حضور ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی پرآوری پنج ریزنمونه در هر شیشه مربا قرار داده شد و از هر شیشه مربا پنج تکرار (در هر تیمار ۲۵ ریزنمونه) کشت شد. هنگام واکشت، تعداد ساقه به‌عنوان پرآوری تعیین شد. فاکتورهای مورد بررسی اثر نوع سیتوکینین و افزودن ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بر پرآوری بود.

پس از طی مراحل رشد لازم شاخه‌های پرآوری شده، شاخه‌های بزرگتر از یک سانتی‌متر در محیط‌های مختلف جهت القاء ریشه‌زایی و تعیین تیمار مناسب ریشه‌زایی به محیط‌های مختلف و با ترکیب هورمونی مختلف منتقل شدند که تیمارهای مورد استفاده جهت بررسی ریشه‌زایی بدین صورت بود که غلظت‌های (۰، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵) میلی‌گرم در لیتر IBA در حضور یا عدم حضور ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط MS و MS/2 مورد بررسی قرار گرفت. جهت تهیه محیط MS/2 غلظت عناصر پرمصرف و کم‌مصرف و ساکارز نصف غلظت MS و میزان ویتامین‌ها برابر با MS در نظر گرفته شد (۱۹). همچنین محیط MS حاوی غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر IBA که تنها غلظت ساکارز آن به نصف تقلیل یافته بود نیز مورد بررسی قرار گرفت که تحت عنوان MSm ذکر شده است. برای بررسی میزان ریشه‌زایی نیز در هر شیشه مربا پنج ریزنمونه قرار داده شد و از هر شیشه مربا پنج تکرار (در هر تیمار ۲۵ ریزنمونه) کشت شد. فاکتورهای مورد بررسی اثر غلظت هورمون IBA و BAP و غلظت بستر پایه بود. پس از تعیین بهترین ترکیب تیمار ریشه‌زایی و رشد کافی ریشه گیاهچه‌ها، پس از حدود دو ماه گیاه ریشه‌دار شده به خارج از شیشه منتقل و اقدام به سازگاری اولیه نمونه‌ها شد. بدین ترتیب که با پنس گیاهچه‌ها از شیشه خارج و آگار چسبیده به ریشه گیاهچه‌ها با آب مقطر شسته شد. سپس در بسترهای مختلف جهت طی مراحل سازگاری کشت شدند. جهت سازگاری بهتر با شرایط محیط به‌تدریج رطوبت اطراف گیاهچه کاسته شد و شدت نور افزوده شد.

کلیه محیط‌های تهیه شده دارای ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار می‌باشد. pH محیط‌ها با استفاده از NaOH و Hcl در ۵/۷ الی ۵/۸ تنظیم شد. جهت استریل کردن محیط‌های تهیه شده، از اتوکلاو با فشار ۱/۲ اتمسفر و زمان ۱۵ دقیقه استفاده شد. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵

www.SID.ir

Archive of SID

درجه سانتی‌گراد و فتوپریود نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی که با استفاده از لامپهای فلورسنت سرد تأمین می‌شد، نگهداری شدند. واکاشت‌ها نیز هر چهار هفته یکبار انجام شد.طرح آزمایش به‌صورت کاملاً تصادفی و در قالب فاکتوریل بود. برای تجزیه تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. برای مقایسات کلی از آزمون تجزیه واریانس (ANOVA) و برای مقایسات میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج بررسی آزمون تجزیه واریانس تعداد ساقه تحت تأثیر فاکتورهای مختلف نشان داد که نوع سیتوکینین، اثرمتقابل سیتوکینین و اکسین تفاوت معنی‌داری ایجاد کرده‌اند ($p<۰/۰۱$). اما غلظت اکسین تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرده است ($p>۰/۰۵$). نتایج آزمون تجزیه واریانس، ارتفاع ساقه تولیدی، تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی همچون نوع سیتوکینین و اثر متقابل سیتوکینین و اکسین قرار گرفته است ($p<۰/۰۱$). در حالی‌که غلظت اکسین تفاوت معنی‌داری ایجاد ننمود ($p>۰/۰۵$) (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج آزمون تجزیه واریانس اثر هورمون‌های مختلف بر میزان پرآوری قره‌قات.

Table 2. The results analysis of variance effects of different hormones on proliferation.

متغیر Variable	متغیر Variable	درجه آزادی df.	میانگین مربعات MS	معنی‌داری Sig.
سیتوکینین Sytokinin	تعداد ساقه Shoot number	2	352.875	0.000**
	طول ساقه Shoot length	2	5.203	0.000**
غلظت اکسین Oxyn concentration	تعداد ساقه Shoot number	2	4.547	0.833^{ns}
	طول ساقه Shoot length	2	0.505	0.084^{ns}
سیتوکینین× اکسین Sytokinin × Oxyn	تعداد ساقه Shoot number	18	77.056	0.000**
	طول ساقه Shoot length	18	0.692	0.000**

علامت‌های **بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۹۹ درصد و ^{ns}نیز بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری است.

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه میانگین تعداد ساقه ایجاد شده تحت تأثیر نوع سیتوکینین مورد استفاده، نشان داد که هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) از توانایی ساقه‌زایی بیشتری در مورد این‌گونه نسبت به کینتین برخوردار است. استفاده از اکسین هم تأثیر معنی‌داری بر تعداد ساقه تولیدی نداشت (شکل ۱).

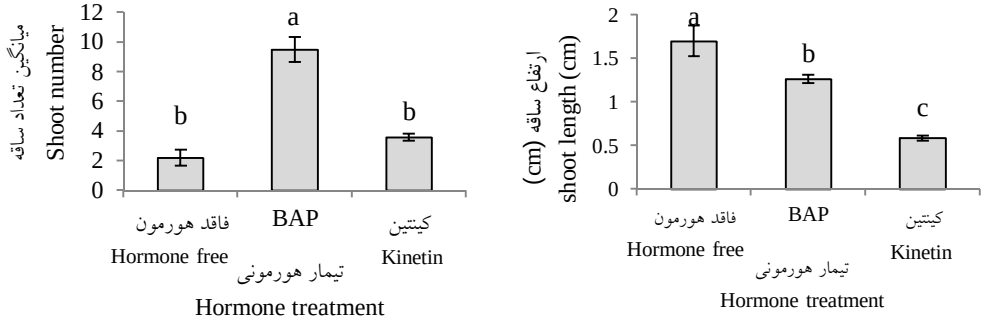
در تحقیق حاضر هورمون BAP از کینتین در پرآوری موفق‌تر عمل نمود و میزان ضریب تکثیر در محیط حاوی BAP به‌مراتب بیشتر از محیط حاوی کینتین بود. نقش و اثر BAP در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخه‌های جدید است. در این مورد ذکر شده که BAP جز ترکیبات آمینو می‌باشد، این ترکیبات می‌توانند باعث افزایش تقسیم سلولی، تمایز، رشد و توسعه ساقه‌های چندتایی در شرایط درون شیشه شوند (۲۳). توماس و همکاران (۲۰۰۱)، نیز گزارش نمودند که سیتوکینین‌ها از آدنین مشتق شده‌اند و فرایند ریخت‌زایی را به‌وسیله ایجاد دو اثر فوری تحریک سنتز DNA و افزایش تقسیم سلولی برسلول‌های تمایز نیافته تسریع می‌کنند. در تأیید نتایج تحقیق حاضر اشاره شده که تأثیر کینتین در تولید شاخه‌های قوی و برگ‌های توسعه یافته همراه با پرآوری کم و القاء ریشه‌زایی بهتر می‌باشد. بنابراین با افزایش غلظت BAP در محیط، شاخساره‌های بیشتر اما کوتاه‌تری تولید می‌شوند BAP(24) پرآوری شاخساره‌ها در پای شاخساره‌ها انجام می‌شود و این شاخساره‌های جانبی از نوع محوری بوده و به‌ندرت از شاخساره‌های نابه‌جا هستند (۲۰).

مقایسه میانگین ارتفاع ساقه گیاهچه‌ها تحت تأثیر نوع سیتوکینین و میزان اکسین مورد استفاده نشان داد که گیاهچه‌ها در محیط پایه فاقد هورمون، دارای بیشترین ارتفاع ساقه و در بستر حاوی کینتین دارای کمترین ارتفاع ساقه هستند. میزان اکسین مورد استفاده، تفاوت معنی‌داری در ارتفاع گیاهچه‌ها ایجاد ننمود (شکل ۱). نتایج تحقیق حاضر نیز موید مطلب ذکر شده می‌باشد و با افزایش غلظت هورمون تا سه میلی‌گرم بر لیتر بر تعداد شاخساره‌ها افزوده شده لیکن از ارتفاع آن‌ها کاسته شده‌است. در تأیید کاهش ارتفاع ساقه با افزایش غلظت سیتوکینین‌ها اشاره شده که استفاده از غلظت‌های بالاتر سیتوکینین یکی از مؤثرترین روش‌ها جهت کاهش رشد ساقه و برگ و افزایش تشکیل مریستم‌های چند شاخه است (۱۳). در مطالعه کارِلی و اچوریاگاراگ (۲۰۰۲)، روی کولتیوارهای رُز نیز BAP نتایج مناسب‌تری در مقایسه با کینتین در تکثیر شاخه‌ها از خود نشان داد و همانند تحقیق حاضر با افزایش غلظت BAP تعداد شاخه‌ها افزایش و طول شاخه‌ها کاهش یافت (۵). لازیک و روزیک (۲۰۰۶)، نیز در محیط فاقد سیتوکینین رشد مناسب‌تری از قره‌قات سیاه را گزارش نمودند. حضور هورمون اکسین با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر تأثیر معنی‌داری در افزایش ضریب

www.SID.ir

Archive of SID

تکثیر و افزایش طول شاخساره‌ها نداشته است (۱۹). لازیک و روزیک (۲۰۰۶)، نیز همانند تحقیق ما اثر مثبتی از اکسین بر پارامترهای تکثیر *R. nigrum* مشاهده ننمودند (۱۹). در مورد قره‌قات سیاه اوریلی‌کاوسکا (۱۹۸٤)، گزارش نمود که صرف‌نظر از نوع و غلظت اکسین این‌گونه به افزودن اکسین به‌طور معکوسی پاسخ می‌دهد (۱۷).



شکل ۱- اثر هورمون‌های مختلف برپرآوری و ارتفاع ریزنمونه‌های قره‌قات (میانگین ± اشتباه معیار).

Figure 1. The effect of different hormones on proliferation and plantlets height (mean±standard deviation)

نتایج مقایسه میانگین تعداد ساقه ایجاد شده نشان داد که بیشترین تعداد ساقه در بستر پایه حاوی یک و سه میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP به‌دست آمد و کمترین تعداد ساقه مربوط به بستر پایه حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA حاصل شد (جدول ۳). باتوجه به نتایج حاصل شده با در نظر گرفتن ضریب تکثیر و ارتفاع ساقه‌ها به‌نظر می‌رسد که تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP مناسب‌ترین ترکیب هورمونی در مرحله پرآوری این‌گونه می‌باشد. همانند تحقیق حاضر سدلاک و پارستین (۲۰۰۲) محیط MS حاوی ۱mg/l هورمون BAP را مناسب‌ترین ترکیب به‌منظور تکثیر *R. rubrum* عنوان نمودند (۲۱). نتایج لازیک و روزیک (۲۰۰٦)، میزان ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP را مناسب‌ترین تیمار جهت تکثیر *R. nigrum* تشخیص دادند (۱۹).

نتایج مقایسه میانگین ارتفاع ساقه گیاهچه‌های تولیدی نشان داد که بیشترین ارتفاع ساقه گیاهچه‌ها مربوط به تیمار بستر پایه فاقد هورمون می‌باشد (جدول ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- میانگین تعداد ساقه و ارتفاع ساقه ایجاد شده از هر ریزنمونه تحت تیمارهای مختلف (میانگین± اشتباه معیار).

Table 3. Mean shoot number and height of produced plantlets under different treatments (mean±standard error).

میانگین ارتفاع ساقه Mean shoot height	میانگین تعداد ساقه Mean shoot number	تیمار هورمونی Hormones tretment	Num.
1.70±0.18 [a]	2.18±0.54 [ef]	MS فاقد هورمون	1
1.43±0.25 [ab]	4.38±1.03 [cdef]	MS+0.5mg/l BAP	2
1.40±0.13 [ab]	14.55±2.56 [a]	MS+1mg/l BAP	3
1.03±0.09 [cde]	15.08± 2.28 [a]	MS+3mg/l BAP	4
0.85±0.06 [def]	6.30±0.84 [cde]	MS+5mg/l BAP	5
1.40±0.09 [ab]	4.44± 0.43 [cdef]	MS+0.5m/l BAP + 0.05 m/l IBA	6
1.43±0.14 [ab]	11.06±1.13 [ab]	MS+1m/l BAP + 0.05 m/l IBA	7
1.21±0.03 [bc]	14.85± 3.08 [a]	MS+3m/l BAP + 0.05 m/l IBA	8
1.11±0.14 [bcd]	8.43±2.02 [bc]	MS+5m/l BAP + 0.05 m/l IBA	9
1.41±0.12 [ab]	7.65±1.16 [bcd]	MS+1m/l BAP + 0.5 m/l IBA	10
0.43±0.05 [gh]	2.33±0 [ef]	MS+0.5 mg/l Kin	11
0.69±0.05 [efg]	3.97± 0.34 [cdef]	MS+1 mg/l Kin	12
0.56±0.14 [fgh]	4.57±0.81 [cdef]	MS+3 mg/l Kin	13
0.45±0.05 [gh]	3.83± 0.60 [cdef]	MS+5 mg/l Kin	14
0.30±0.01 [h]	0.83±0.26 [f]	MS + 0.05 mg/l IBA	15
0.59±0.14 [fgh]	3.95±0.93 [cdef]	MS+1mg/l Kin+ 0.05 mg/l IBA	16
0.73±0.03 [efg]	3.88±0.44 [cdef]	MS+3mg/l Kin + 0.05 mg/l IBA	17
0.58±0.08 [fgh]	4.28±0.34 [cdef]	MS+5mg/l Kin + 0.05 mg/l IBA	18
0.66±0.02 [fgh]	3.47± 0.53 [def]	MS+1mg/l Kin + 0.5 mg/l IBA	19

حروف غیرمشابه بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد.

درصد ریشه‌زایی: نتایج بررسی درصد ریشه‌زایی توسط آزمون تجزیه واریانس نشان داد که نوع بستر، استفاده از هورمون BAP، غلظت هورمون IBA و ترکیب تیمارها تفاوت معنی‌داری ایجاد نمود ($p<۰/۰۱$)، سایر عوامل تفاوت معنی‌داری در درصد ریشه‌زایی ایجاد نکردند (جدول ٤).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- نتایج تجزیه تحلیل تأثیر عوامل مختلف بر میانگین ویژگی‌های مورد بررسی گیاهچه‌های قره‌قات.

Table 4. The Results of analysis for differet factors on mean examined characteristics of Ribes plantlets (mean±standard error).

میانگین طول ریشه Mean root length		درصد ریشه‌زایی Root percentage		درجه‌آزادی	تیمار
معنی‌داری Sig.	میانگین مربعات MS	معنی‌داری Sig.	میانگین مربعات MS	df.	Treatment
0.000**	110.745	0.002**	3447.654	2	نوع بستر (media)
0.002**	121.314	0.000**	25725.408	1	هورمون BAP (BAP hormone)
0.009**	39.076	0.000**	4612.592	7	غلظت IBA (IBA Consentration)
0.448 ns	7.049	0.340ns	500.28	1	نوع بستر × هورمون BAP (media × BAP)
0.166 ns	18.522	0.082 ns	1016.515	7	نوع بستر × غلظت IBA (media × IBA)
0.087 ns	24.039	0.184 ns	837.788	5	هورمون BAP × غلظت IBA (BAP hormone × IBA)
0.000**	43.699	0.000**	3688.096	26	ترکیب تیمار Treatment composition

علامت ** بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۹۹ درصد و ns نیز بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری است.

مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی تحت تأثیر نوع بستر نشان داد که مناسب‌ترین بستر ریشه‌زایی، بستر MSm با حدود ۸۱ درصد ریشه‌زایی می‌باشد و کمترین درصد ریشه‌زایی مربوط به بستر MS می‌باشد (شکل ۲). تکثیر درون شیشه‌ای مواد گیاهی به عوامل زیادی بستگی دارد که از آن جمله می‌توان به غلظت عناصر غذایی، نوع و میزان منبع کربن خارجی اضافه شده به محیط که به‌عنوان منبع انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرد و در حفظ پتانسیل اسمزی موثر است می‌توان اشاره نمود (۲). نتایج درصد ریشه‌دهی نشان از برتری بستر MSm داشت که به‌نظر می‌رسد به‌دلیل کاهش پتانسیل اسمزی محیط کشت با کاهش درصد ساکارز محیط کشت به نصف غلظت استاندارد آن می‌باشد. یکی از مولفه‌های مؤثر در ریشه‌زایی، غلظت ساکارز است که در پتانسیل اسمزی و فتوسنتز مؤثر است (١٦). قمری زارع و همکاران (۲۰۰۷)، نیز بهترین ریشه‌دهی را با کاهش غلظت عناصر پرمصرف و ساکارز

www.SID.ir

Archive of SID

برای گونه سیاه گیله به‌دست آوردند (۱۰). حاج‌نجاری (۱۹۹٤) و باقری و همکاران (۲۰۰٤)، نیز کاهش غلظت ساکارز محیط کشت را یکی از تیمارهای مؤثر در ریشه‌دهی برخی گونه‌ها دانسته‌اند. آرنا و پاستور (۱۹۹۵) در تحقیق خود به نتایج مشابهی دست یافتند و درصد بالاتری از ریشه‌زایی را در غلظت کمتر برای گونه *R. magellanicum* داشتند.

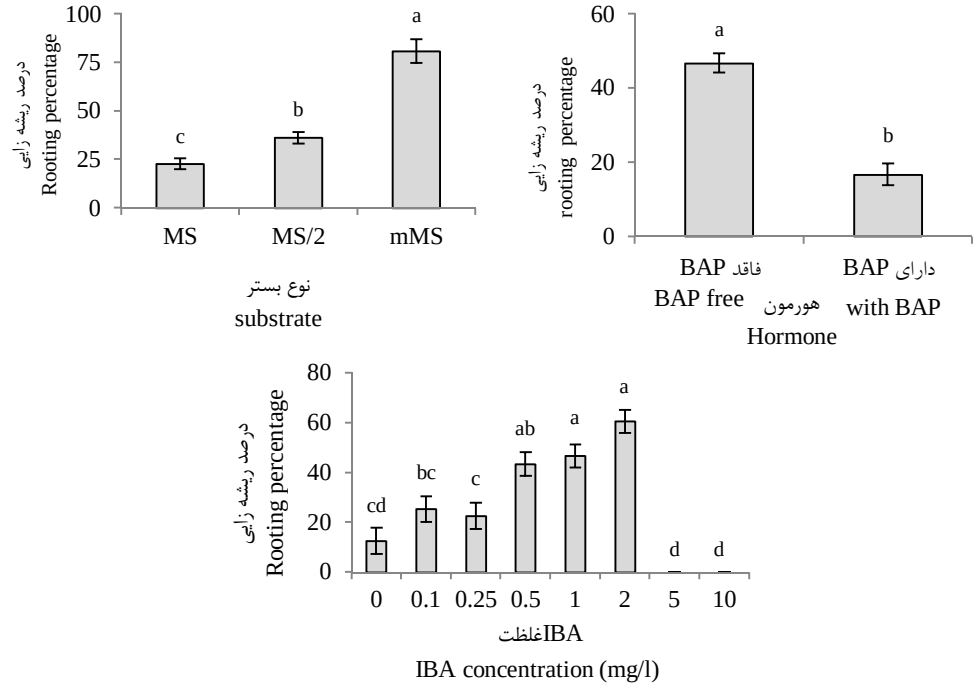
بررسی درصد ریشه‌زایی تحت تأثیر استفاده یا عدم استفاده از هورمون BAP نشان داد که استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP باعث کاهش درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌ها با ۱٦/٤٦ درصد شد (شکل ۲). بررسی‌ها نشان داد که استفاده از هورمون BAP درصد ریشه‌دهی را کاهش داد که به‌خاطر نقش بازدارنده سیتوکینین‌ها در ریشه‌زایی است. نسبت بالای اکسین به سیتوکینین برای انگیزش ریشه ضروری است در حالی‌که سیتوکینین بازدارنده است (٤) یکی از اثرهای BAP در محیط ممانعت کامل یا نسبی از تشکیل ریشه است (۱٤).

نتایج بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون IBA بر درصد ریشه‌زایی نشان داد که با افزایش غلظت هورمون IBA تا دو میلی‌گرم در لیتر، درصد ریشه‌زایی افزایش یافت؛ اما در غلظت‌های بالاتر، به‌جای تولید ریشه ایجاد کالوس نمود. بستر حاوی دو میلی‌گرم بر لیترهورمون IBA دارای بیشترین درصد ریشه‌زایی با حدود ٦۰ درصد ریشه‌زایی بود (شکل ۲).

نتایج بررسی ترکیب تیمارها نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌زایی در ترکیب تیمارهای محیط پایه MSm و MS/2 و در شرایط عدم حضور BAP و در غلظت‌های ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر و در بستر MS/2 و در حضور۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA رخ داد (جدول ۵). برخی از گونه‌های جنس قره‌قات (Ribes) همزمان با مرحله تکثیر، ریشه‌زایی می‌نمایند و نیازی به افزودن اکسین جهت ایجاد ریشه‌زایی نیست و در بستر فاقد هورمون ایجاد ریشه‌زایی می‌کنند (۳ و ۸). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که گیاهچه‌ها در غلظت دو میلی‌گرم بر لیتر IBA دارای بیشترین درصد ریشه‌دهی و همچنین طول ریشه بودند. درصدهای پایین ریشه‌زایی نشان می‌دهد که افزودن اکسین به بستر ریشه‌زایی جهت القاء ریشه در این‌گونه ضروری است. همانند نتایج تحقیق حاضر اورلی‌کاوسکا (۱۹۸٤)، افزودن اکسین‌های خارجی، جهت القاء ریشه‌زایی قره‌قات سیاه را ضروری عنوان می‌نماید (۱۷).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌ها تحت تأثیر عوامل مختلف توسط آزمون دانکن (میانگین± اشتباه معیار).

Figure 2. Comparing of mean percentage of plantlets rooting influenced by different fctors using Dancan test.

میانگین طول ریشه: نتایج آزمون تجزیه واریانس میانگین طول ریشه گیاهچه‌ها نشان داد که میانگین طول ریشه تحت‌تأثیر نوع بستر، هورمون BAP، غلظت هورمون IBA و ترکیب تیمارها تفاوت معنی‌داری از خود نشان دادند سایر عوامل تفاوت معنی‌داری از نظر متوسط طول ریشه در گیاهچه‌ها ایجاد نکردند (جدول ٤).

مقایسه میانگین طول ریشه گیاهچه‌ها تحت تأثیر نوع بستر نشان داد که بستر MSm باعث ایجاد بیشترین طول ریشه گیاهچه با ۱۰/٤ سانتی‌متر طول شد (شکل ۳). نتایج همچنین نشان داد که محیط MS/2 ریشه‌زایی بهتری نسبت به MS داشت که به اثر مثبت کاهش غلظت نمک‌های محیط کشت مربوط می‌شود؛ چرا که گیاه باید جهت دسترسی به مواد موردنیاز به منطقه بیشتری دسترسی داشته باشد. لذا ریشه‌ها و طول آن‌ها را در خود افزایش می‌دهد تا این کمبود را جبران نماید (۱۲ و ٤).

www.SID.ir

Archive of SID

محققین دیگری به اثرات مثبت کاهش غلظت نمک‌ها در ریشه‌زایی اشاره کرده‌اند (۳). به‌عنوان مثال در اکالیپتوس (۷) رز (۱۸) و در دیگر گونه‌های سوزنی برگ و پهن‌برگ جنگل (٦) اشاره نموده‌اند.

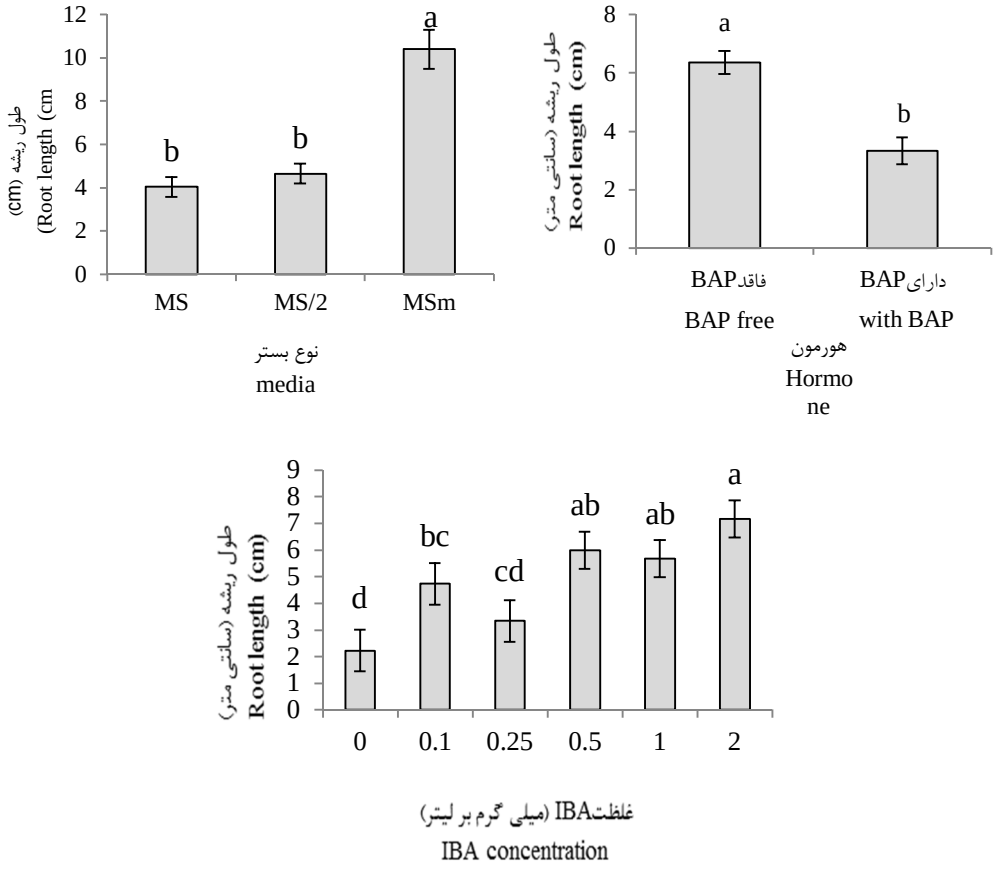
نتایج مقایسه میانگین طول ریشه گیاهچه تحت تأثیر هورمون BAP نشان داد که استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP باعث کاهش طول ریشه گیاهچه‌ها شده است. بیشترین طول ریشه مربوط به تیماری می‌شد که از هورمون‌های سیتوکینینی استفاده نشده بود و با ٦/۳٦ سانتی‌متر طول ریشه بیشترین میانگین طول ریشه را دارا بودند (شکل ۳). ریشه‌زایی معمولاً با تیمار اکسین به تنهایی حاصل می‌آید. سیتوکینین‌های خارجی معمولاً نقش بازدارنده در ریشه‌زایی دارند. نتایج بررسی‌ها نشان‌داد با افزودن سیتوکینین به بستر ریشه‌زایی از تعداد و طول ریشه گیاهچه کاسته می‌شود. که به‌نظر می‌رسد که به‌خاطر این است که در این مرحله میزان سیتوکینین موجود در بافت‌های گیاهی باقی‌مانده از مرحله تکثیر برای ریشه‌زایی کافی و نیازی به افزودن سیتوکینین نیست. همچنین، عنوان شده که به‌طور معمول به‌علت باقی ماندن مقادیر قابل توجهی از سیتوکینین در ریزقلمه‌ها در طی مرحله ازدیاد، در مرحله ریشه‌زایی نیازی به افزودن این هورمون نیست، و ذکر شده که مقادیر زیاد سیتوکینین در محیط کشت مرحله ریشه‌زایی ضررهای مهلکی به روند ریشه‌زایی و حتی رشد طولی ریشه وارد می‌کند و با بالا رفتن غلظت سیتوکینین ریشه‌زایی به کلی از بین می‌رود (۱۲).

مقایسه میانگین طول ریشه گیاهچه‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف IBA نشان داد که غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر دارای بیشترین طول ریشه (میانگین طول ریشه ۷/۲ سانتی‌متر) می‌باشند. عدم استفاده از هورمون IBA باعث ایجاد کمترین طول ریشه (میانگین ۲/۲۲ سانتی‌متر) در گیاهچه‌ها شد (شکل ۳). یکی از نقش‌های اکسین تحریک ریشه‌زایی است، کاهش ریشه‌دهی در تیمار فاقد اکسین نشان دهنده اهمیت اکسین در ریشه‌زایی این‌گونه می‌باشد.

بررسی میانگین طول ریشه گیاهچه‌ها تحت تأثیر ترکیب تیمارها نشان داد که ترکیب تیمار بستر MSm حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA دارای بیشترین طول ریشه می‌باشد (جدول ۵). به‌نظر می‌رسد کاهش ساکارز به نصف باعث کاهش پتانسیل اسمزی شده و در نتیجه باعث تحریک گیاه برای ایجاد ریشه‌های طویل‌تر شده است. عنوان شده که با کاهش غلظت عناصر پرمصرف و ساکارز محیط فشار اسمزی کاهش یافته و این کاهش اسمزی گیاه را وادار می‌کند تا با ایجاد ریشه و تارهای کشنده اقدام به جذب املاح و مواد غذایی از محیط کشت کند (۱۰).

www.SID.ir

Archive of SID

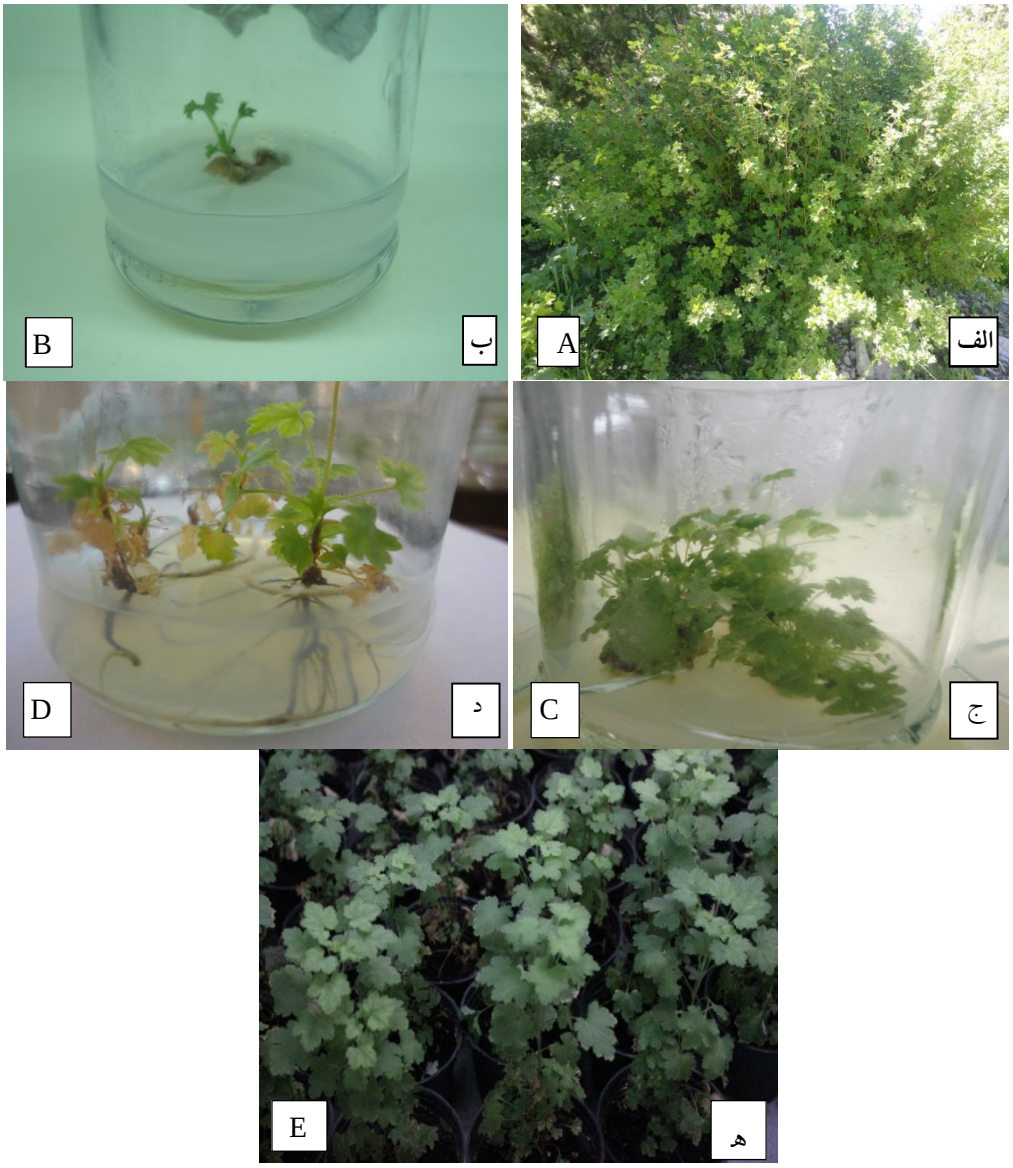


شکل ۳- مقایسه میانگین طول ریشه تحت تأثیر فاکتورهای مختلف توسط آزمون دانکن.

Figure 3. Comparing mean root under different factors using Duncan test.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- الف- گونه قره‌قات در رویشگاه طبیعی، ب- مرحله باززایی، ج- مرحله پرآوری، د- مرحله ریشه‌زایی و ه- گیاهچه‌های سازگار شده.

Figure 5. A, Ribes in natural habitat. B, Gemination stage. C, proliferation stage. D, Rooting stage and E, acclimized plntlets.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- نتایج بررسی ترکیب تیمارهای مختلف غلظت BAP× غلظت IBA× بستر بر ویژگی‌های مختلف.

Table 5. Results of treatment composition of BAP×IBA× media concentration on different characteristics.

بستر (media)	غلظت BAP (mg/l) (BAP concentration)	غلظت IBA (mg/l) (IBA concentration)	درصد ریشه‌دهی Root percentage	متوسط طول ریشه (Cm) Mean root length
MS	0	0	14.0± 9.8 def	2.6± 1.6 bcde
		0.1	44.0± 6.8 abcd	7.85± 1.02 ab
		0.25	31.6± 8.3 abcdef	3.15± 1.36 bcde
		0.5	53.0± 16.3 ab	4.03± 1.15 abcde
		1	40.0± 12.7 abcde	6.6± 1.8 abc
		2	52.0± 13.1 abc	7.5± 1.17 ab
	0.1	0	0±0 f	0± 0e
		0.1	9.0± 5.6 def	2.5± 1.68 bcde
		0.25	19.0± 9.3 bcdef	4.33± 1.8 abcde
		0.5	4.0± 0.4 ef	1± 1 de
		1	31.0± 10.65 abcdef	3.1± 1.3 bcde
		2	20.0± 6.3 bcdef	5.8± 1.6 abcd
MS/2	0	0	28.0±abcdef10.8	3.7± 1.85 abcde
		0.1	44.0± 11.6 abcd	7.81± 2.08 ab
		0.25	27.6± 9.8 abcdef	4.16± 1.25 abcde
		0.5	65.0± 18.7 a	5.8± 1.6 abcd
		1	64.0± 11.3 a	5.5± 0.77 abcd
		2	88.0± 4.9 a	5.5± 0.6 abcd
	0.1	0	8.0± 4.8 def	2.6± 1.6 bcde
		0.1	4.0± 1.8 ef	0.8± 0.16 de
		0.25	12.0± 3.7 def	1.73± 0.7 cde
		0.5	16.0± 4.8 cdef	6.4± 1.6 abc
		1	14.6± 6.4 def	4.6± 2.27 abcde
		2	62.0± 6.2 a	7.2± 0.68 ab
MSm	0	0.5	78.7± 14.8 a	12.7± 2.6 a
		1	83.0± 24.3 a	8.6± 1.8 a
		2	80.3± 21.5 a	9.96± 2.9 a

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در بین میانگین‌ها می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هورمون BAP از کینتین جهت پرآوری مناسب‌تر است و با در نظر گرفتن ضریب تکثیر و ارتفاع شاخساره‌ها مناسب‌ترین ترکیب جهت تکثیر استفاده از بستر پایه MS همراه با یک میلی‌گرم در لیتر BAP می‌باشد. بهترین ریشه‌زایی نیز در بستر MS تعدیل یافته که در آن ساکارز به نصف تقلیل یافته همراه با ۰/۵ تا دو میلی‌گرم در لیتر IBA می‌باشد. با توجه به تخریب رویشگاه‌های طبیعی قره‌قات خراسان و در معرض خطر قرار گرفتن این‌گونه دارویی ارزشمند، ضروری است که مطالعات بیشتری در خصوص تکثیر این‌گونه از طریق بذر صورت گیرد چرا که تکثیر از طریق روش‌های غیر جنسی باعث کاهش تنوع ژنتیکی و فرسایش ژنتیکی می‌شود. استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های نوین حفظ و نگهداری این‌گونه از جمله کشت بافت می‌تواند نقش مؤثری در حفظ و احیاء این‌گونه ارزشمند و بومی داشته باشد و همچنین می‌توان با تولید انبوه نهال از این طریق اقدام به احیاء رویشگاه‌های آن نمود. حتی باتوجه به خواص دارویی و موارد استفاده آن در صنایع غذایی، می‌توان پس از انجام بررسی‌های اولیه اقدام به ایجاد باغ‌های آن نمود، همانند گونه قره‌قات سیاه که در اروپا سطح وسیعی را به ایجاد باغ‌های این‌گونه اختصاص داده‌اند و کارهای اصلاحی زیادی روی آن در حال انجام است. همچنین با توجه به زیبایی آن می‌توان در فضای سبز نیز از آن استفاده نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه کارشناسان و مسئولان پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شعبه شرق و شمال شرق کشور (شهرستان مشهد) که در انجام این تحقیق همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Adibi, F., and Ejtehdi, H. 2008. Population ecology of *Ribes khorasanicum* an endemic plant species to north of Khorasan, Iran. Iranian Journal of Biology. 21: 5. 748-760 (In Persian)
2. Ahmad, T., Abbasi, N.A., Hafiz, I.A., and Ali, A. 2007. Comparation of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF–677. Pakistan Journal of Botany. v. 39: 4. 1269-1275.
3. Arena, M.E., and Pastur, G.J.M. 1995. *In vitro* propagation of *Ribes magellanicum* Poiret. Scientia Horticulturae. 62: 139–134.
4. Bagheri, A., Ziaratnia, S.M., and Hosseiny, M. 2004. Trees tissue culture. Ferdowsi University of Mashhad press, 245p. (Translated in Persian)
5. Carelli, B.P., and Echeverrigaray, S. 2002. An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. Scientia Horticulture. 92: 69-74.
6. Chalupa, V. 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees, Communicationes Instituti Forestalis, Forestryand Game Management Research Institute, Cechosloveniae. 13: 7-39.
7. Cheng, B., Peterson, C.M., and Mitchell, R.J. 1992. The role of sucrose, auxin and explant source on *in vitro* rooting of seedling explants of *Eucalyptus sideroxylon*. Plant Science Journal. 87: 207-214.
8. Clapa, D., Fira, A., Plopa, C., and Barbos, A. 2009. *In vitro* propagation of black currant Perla Neagra and Amurg cultivars. Scientific Papers of the R.I.F.G. Pitesti. Vol. XXV: 207-212.

www.SID.ir

Archive of SID

9. Dziedzic, E., and Jagla, J. 2013. Micropropagation of Rubus and Ribes spp. Methods in Molecular Biology. 994: 149-160.
10. Ghamari zare, A., Ghorbanli, M., Hosseiny, Sh., and Shahrzad, Sh. 2007. In vitro micropropagation of *Denderostellera lessertii* Van Tiegh. Pajohesh and Sazandegi in Natural Resources. 75: 173-178. (In Persian)
11. Gorge, E.F., Hall, M.A., and De Klark, G. 2008. Plant propagation by tissue culture. 3rd Edition. Published by Springer, 479p.
12. Hajnajari, H. 1994. Micropropagation. Research Institute of Forests and Range Lands, 177p. (Translated in Persian)
13. Lobana, S., Taha, M.M., Ibrahim, S., and Farahat, M.M. 2008. A micropropagation protocol of *Paulownia kowakamii* through *in vitro* culture technique. Australian Journal of Basic and Applied science. 2: 3. 594-600.
14. Mahdvian, 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 Improvement Journal. 26: 1. 15-26. (In Persian)
15. 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, XVI: 26-29
16. Manole, C., Balan, V., Tudora, C., Butu, M., Fidlr, G., Rodino, S., Golea, D., and Butu, A. 2011. Influence of sucrose concentration on in vitro multiplication of *Ribes rubrum* species. Banatanical Journal of Biotechnology. 2: 4. 73-75.
17. Orlikowska, T. 1984. Micropropagation of Roodknop cv. black currant. Fruit Science Reports. 11: 1. 5-17.
18. Rahman, S.M., Hossain, M., and Rafiul Islam, A.K.M. 1992. Effects of media composition and culture conditions on in vitro rooting of rose. Scientia Horticulture Journal. 52: 163-169.
19. Ruzic, D., and Lazic, T. 2006. Micropropagation as Means of RapidMultiplication of Newly DevelopedBlackberry and Black Currant Cultivars. Agriculturae Conspectus Scientificus. 71: 4. 149-153
20. Ruzič, D.V., and Vujovič, T.I. 2008. The effects of cytokinin types and their concentration on *invitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (Prunus avium L.) Journal of Horticultural Science. 35: 12-21.
21. Sedlak, J., and Paprstein, F. 2012. In vitro establishment and proliferation of red currant cultivars. Journal of Horticultural Science (Prague). 39: 21-25.
22. Saghafi khadem, F., and Asadi, M. 1996. *Ribes Khorasanica* a new species of north east of Iran. Plant botany of Iran. 7: 7-10.
23. Sotiropoulos, T.E., Mouhtaridou, G.N., Thomidis, T., Tsirakoglou, V., Dimassi K.N., and Therios, I.N. 2005. Effects of different N-sources on growth, nutritional status, chlorophyll content, and photosynthetic parameters of shoots of the apple rootstock MM 106 cultured *In vitro*. Biologia Plantarum. 49: 2. 297-299.

www.SID.ir

Archive of SID

24. Tomas, W., Motyka, V., Strnad, M., and Schmulling, T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinins. Journal of Horticultural Science. 6: 36-39.
25. Vujovic, T., Ruzic, D., and Cerovic, R. 2011. Improvement of *in vitro* micropropagation of black currant Cacanska Crna. International Rubus [and] Ribes Symposium, 10, Zlatibor (Serbia). 22-26 Jun.

www.SID.ir

Archive of SID

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Wood & Forest Science and Technology, Vol. 23 (3), 2016
http://jwfst.gau.ac.ir

The effect of hormone type and basic cultural media on multiplication and rooting of herbal species of *Ribes khorasanicum*

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, Iran, [2]Associate Prof., Dept., of Forestry, Faculty of Natural Resources, University of Tarbiat Modares, Noor, Iran, [3]Associate Prof., Research Center of Agriculture and Natural Resources of Khorasan Razavi Province and Management of Agricultural Biotechnology in the East and North East, Mashhad, Iran, [4]Professor, Dept., of Forestry, Faculty of Natural Resources, University of Tarbiat Modares, Noor, Iran, [5]Assistante Prof., Research Center of Agriculture and Natural Resources of Khorasan Razavi Province
Received: 09/16/2016 ; Accepted: 07/11/2015

Abstract

Background and objectives: Ribes khorasanicum is a deciduous woody shrub form and is one of the most valuable species belongs to the monogenus family of Grossulariaceae. Ribes is a genus has about 150 species of flowering plants native throughout the temperate regions of the Northern Hemisphere. Because of the non-normative utilization, the utility of fruits, high palatability, livestock grazing, restricted ecological range, high ecological demands and sexual reproduction difficulties (mainly regenerates by the vegetative method by rhizome) facing risk of extinction. One of the possible methods of protection of the endangered taxon is multiplying and conservation of plants with help in vitro cultures.

Materials and methods: Axillary and apical buds of the branches obtained from endemic plants in Hezarmasjed Mountains were used as initial explants. In this research effect of two cytokinins, BAP and Kinetin in presence or absence of auxin on proliferation coefficient and growth of multiplied shoots were investigated. The concentrations (0, 0.5, 1, 3 and 5) mg/l of each of cytokinins in the presence or absence of 0.05 mg IBA were studied. Furthermore, effect of nutrient concentration and sucrose concentration of cultural media, IBA and BAP hormones on rooting Percent and plantlet root length was investigated. Used treatment for root induction investigations was the concentrations of (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 and 5) mg/l of IBA

*Corresponding authors: Akbarim@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

hormone in presence or absence of 0.1 mg/l of BAP hormone in MS and MS/2 media.
Results: Results showed that, BAP hormone has the better shoot multiplication index than kinetin, considering the high rate of proliferation and higher shoots, the most suitable culture media for multiplication was MS media supplemented by 1 mg/l BAP. According to the treatments evaluated, and the average percentage of rooting and root length of plant lets, for root induction the best media was, modified MS media which sucrose concentration reduced to 15 g/l, and supplemented with0.5 to 2 mg/l of IBA. Addition of 0.1 mg per liter BAP decreased the percentage of rooting and root length. The longest root of plantlets was obtained from the modified MS media supplemented with 2mg/l IBA. Plantlets were successfully transferred from tissue culture vessels to ex vitro conditions with about 86 percent survival.
Conclusion: According to high multiplication index and successful acclimatization of tissue cultured plantlets, the tissue culture can be used as an alternative with seeds and cuttings propagation methods to maintain and expand this valuable herbal shrub.

Keypwords: *Ribes khorasanicum,* Micropropagation, BAP, Root lenght

www.SID.ir