Archive of SID

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۴، شماره ۱، صفحه ۱۰۱-۹۲ (۱۳۹۵)

القای کالوس، باززایی و پرآوری زرشک بی‌دانه (*Berberis vulgaris*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

مرتضی سازمند[۱] و عباس صفرنژاد*[۲]

۱- کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آشتیان

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

پست الکترونیک: sebre14@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۲۲

چکیده

جنس زرشک بیش از ۶۶۰ گونه دارد که فقط یک نوع آن یعنی زرشک بی‌دانه (*Berberis vulgaris*) به‌عنوان محصول باغی پرورش داده می‌شود. زرشک بی‌دانه اغلب به‌روش قلمه و پاجوش تکثیر می‌شود که زمان‌بر است، اما با استفاده از روش کشت بافت می‌توان تعداد زیادی گیاه در یک زمان کوتاه تولید کرد. در این تحقیق اثر هورمون‌های مختلف رشد گیاهی در تکثیر زرشک بی‌دانه بررسی شد. از جوانه‌های جانبی به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. ریزنمونه‌ها بعد از مراحل مختلف سترون‌سازی شامل محلول‌های هیپوکلریت سدیم، الکل ۷۰ درصد و کلریدجیوه به محیط‌های کشت حاوی مقادیر مختلف هورمون‌های BAP، IAA، Kin و GA3 منتقل شدند. کشت‌ها در دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد قرار داده شدند. نتایج نشان داد که تیمار هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه بهترین تیمار ضدعفونی‌کننده ریزنمونه‌های زرشک بود. همچنین محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین محیط برای باززایی بود. در بین تیمارهای هورمونی استفاده شده، بیشترین میانگین تعداد شاخه (۶ شاخه) مربوط به محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. به‌طور کلی از نتایج حاصل شده در این تحقیق می‌توان گفت هورمون BAP برای باززایی زرشک بی‌دانه مؤثرترین هورمون بود. بهترین تیمار ریشه‌زایی، محیط کشت MS + ۰/۵ mg/l IBA بود. به‌منظور سازگاری گیاهان ریشه‌دار شده به جی‌فی‌پات منتقل و با موفقیت به خاک انتقال یافتند.

واژه‌های کلیدی: این‌ویترو، پرآوری، زرشک بی‌دانه، هورمون‌های گیاهی.

مقدمه

زرشک بی‌دانه با نام علمی *Berberis vulgaris* درختچه‌ای با ارتفاع ۳/۵ متر بومی ایران و خود گرده‌افشان از تیره زرشکیان (Beriberidaceae) نزدیک به تیره آلالگان و از دولپه‌ای‌ها است (Anbarani, 1991). از جنس زرشک فقط یک نوع آن یعنی زرشک بی‌دانه به‌عنوان محصول باغی پرورش داده می‌شود و این نوع فقط در ایران و در عرض جغرافیایی ۳۲,۵ تا ۳۴,۵ درجه شمالی به‌عنوان یک محصول اقتصادی کشت و کار می‌شود. زرشک گیاهی بومی ایران است و نوع بی‌دانه آن برای نواحی جنوب خراسان به‌خصوص قاین و بیرجند شهرتی ایجاد کرده است (Kafi and Balandri, 2002). تولید زرشک در خراسان جنوبی

www.SID.ir

Archive of SID

سالانه بیش از ۸۴۰۰ تن بوده که از سطح ۶۴۴۲ هکتار اراضی باغی به‌دست می‌آید (Molafyabi *et al*. 2008).

در تمام قسمت‌های این گیاه آلکالوئیدهای بربرین (Berberine)، اکسیاکانتین(Oxyacontine)، بربامین (Berbamine) وجود دارد. مقدار آلکالوئید در پوست ریشه زرشک بیشتر از قسمت‌های دیگر این گیاه است. میوه زرشک دارای حدود ۴ درصد مواد قندی، ۶۵ درصد اسیدمالیک و اسیدتاتاریک و مقداری صمغ می‌باشد (Zargari, 1990). آلکالوئیدهای ژاتوریزین، پالماتین، برولیسین، کلومبامین و والرسین و ترکیبات دیگر موجود در زرشک هستند (Kafi and Balandri, 2002).

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

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

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

در القای کالوس مؤثر بودند به‌طوری‌که در اکثر تیمارها با فراوانی‌های متفاوت تشکیل کالوس مشاهده شده‌است. همچنین بهترین ترکیب هورمونی جهت القای کالوس در زرشک ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آمد (Ziaratnia *et al*., 2012).

ریزازدیادی گیاه *Mahonia soft caress* از خانواده Berberidaceae توسط Todd Jeffrey Rounsaville (۲۰۱۱) بررسی شد. محیط کشت پایه B5 همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هورمون‌های ۵ µM BAP، ۵ µM kinetin، 0.5 µM IAA و 2.5 µM gibberellic acid به‌عنوان بهترین محیط کشت برای تکثیر شناخته شد. تیمار روشنایی و غلظت ۸ µM اثر معنی‌داری روی درصد ریشه‌زایی نشان داد. تاکنون گزارشی از انجام موفق ریزازدیادی در زرشک بی‌دانه ارائه نشده است و تنها راه موجود جهت ازدیاد آن تکثیر از طریق کشت پاجوش بوده است (Kafi and Balandri, 2002).

از آنجا که زرشک بی‌دانه فاقد بذر بوده به‌طوری‌که در طبیعت تکثیر آن به‌صورت رویشی ریشه‌جوش (پاجوش) امکان‌پذیر است و از سوی دیگر به‌دلیل اهمیت گیاهان دارویی برای درمان بسیاری از ناراحتی‌ها و بیماری‌ها تکثیر و ازدیاد سریع آنها و ایجاد صفات مطلوب اهمیت خاصی دارد. بنابراین، در این تحقیق بهینه‌سازی کشت بافت زرشک بی‌دانه و تعیین بهترین محیط کشت جهت القای کالوس و باززایی زرشک بی‌دانه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

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

جدول ۱- تیمارهای مختلف ضدعفونی برای جوانه‌های جانبی زرشک

ردیف	تیمارضدعفونی
۱	کلریدجیوه۰/۰۲درصد به‌مدت ۳ دقیقه + الکل۷۰ درصد به‌مدت۲ دقیقه + هیپوکلریدسدیم ۱/۵ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه
۲	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۳ دقیقه + الکل۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه
۳	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۳ دقیقه + الکل۷۰ درصد به‌مدت ۲ دقیقه + هیپوکلریت‌سدیم ۱/۵ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه
۴	کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه + الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه
۵	هیپوکلریدسدیم ۳ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه

ریزنمونه‌ها پس از ضدعفونی، در زیر هود لامینار به داخل محیط‌های کشت همراه با هورمون‌های مختلف که از قبل تهیه شده بود منتقل و در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۵ نگهداری شدند. محیط‌های کشت پایه شامل MS (Murashige & Skoog,1962) و B5 (Gamborg *et al*.,1976) حاوی هورمون‌های گیاهی در غلظت‌های متفاوت برای کالوس‌زایی، باززایی و پرآوری بودند (جدول‌های ۲ و ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- تیمارهای مختلف هورمونی برای کالوس‌زایی زرشک

ردیف	تیمارهورمونی
۱	B5 + ۰/۸۶ mg/l GA_3 + ۰/۸۷ mg/l IAA + ۱/۱۲ mg/l BAP + ۱/۰۷ mg/l Kin
۲	MS + ۲ mg/l NAA + 1 mg/l Kin
۳	MS + ۱/۱۲ mg/l BAP
۴	MS + ۳/۴۴ mg/l GA_3
۵	B5 + ۰/۱ mg/l IAA + ۰/۴۹ mg/l BAP + ۰/۴۹ mg/l Kin
۶	MS + ۳ mg/l BAP + ۰/۰۱ mg/l IBA
۷	MS + ۲ mg/l BAP + ۰/۰۱ mg/l IBA

جدول ۳- تیمارهای مختلف هورمونی برای باززایی و پرآوری زرشک

ردیف	تیمارهورمونی
۱	B5 + ۰/۸۶ mg/l GA_3 + ۰/۸۷ mg/l IAA + ۱/۱۲ mg/l BAP + ۱/۰۷ mg/l Kin
۲	MS + ۱mg/l BAP
۳	MS + ۲mg/l BAP
۴	MS + ۳ mg/l BAP + ۰/۰۱ mg/l IBA
۵	MS + ۲ mg/l BAP + ۰/۰۱ mg/l IBA

ریشه‌زایی

گیاهان باززایی شده که دارای ساقه و برگ بودند در محیط‌های ریشه‌زایی طبق جدول ۴ قرار گرفتند. برای این آزمایش از محیط‌های کشت پایه MS و ½ MS حاوی هورمون‌های IBA و NAA در غلظت‌های مختلف و همچنین محیط‌های فاقد هورمون استفاده شد.

جدول ۴- محیط‌های استفاده شده برای ریشه‌زایی زرشک

ردیف	تیمارهورمونی
۱	MS + ۱/۶ mg/l IBA
۲	MS + ۰/۵ mg/l IBA
۳	½ MS + ۲ mg/l IBA
۴	MS + ۰/۰۲ mg/l NAA
۵	MS + ۵ mg/l IBA
۶	MS فاقد هورمون
۷	½ MS فاقد هورمون

روش های آماری و تجزیه داده‌ها

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

نتایج

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

ضدعفونی: نتایج تجزیه واریانس در جدول ۴ نشان داد که تیمارهای ضدعفونی بر درصد آلودگی اثر معنی‌داری داشت ($\alpha = ۰/۰۱$). نتایج مقایسه‌ی میانگین‌ها بیانگر آن است که تیمار هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه

www.SID.ir

Archive of SID

کمترین میزان آلودگی را داشت و تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت و به‌عنوان بهترین ضدعفونی‌کننده ریزنمونه‌های زرشک مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱ (الف)).

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تیمارهای ضدعفونی

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

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

کالوس‌زایی: از محیط‌های مختلفی برای القاء کالوس استفاده شد. القاء کالوس در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin با موفقیت انجام شد (شکل ۱ (ب) و ۲ (الف)).

باززایی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری ($\alpha = ۰/۰۱$) بین تیمارهای هورمونی مختلف برای درصد باززایی زرشک وجود داشت (جدول ۶)، به‌طوری که محیط‌کشت پایه MS همراه با ۱ mg/l هورمون BAP دارای بیشترین درصد باززایی در بین تیمارهای مورد استفاده بود. ریزنمونه‌ها پس از قرار گرفتن در محیط‌کشت پس از حدود یک هفته شروع به جوانه‌زنی کردند (شکل ۱ (ج) و ۲ (ب)).

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

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

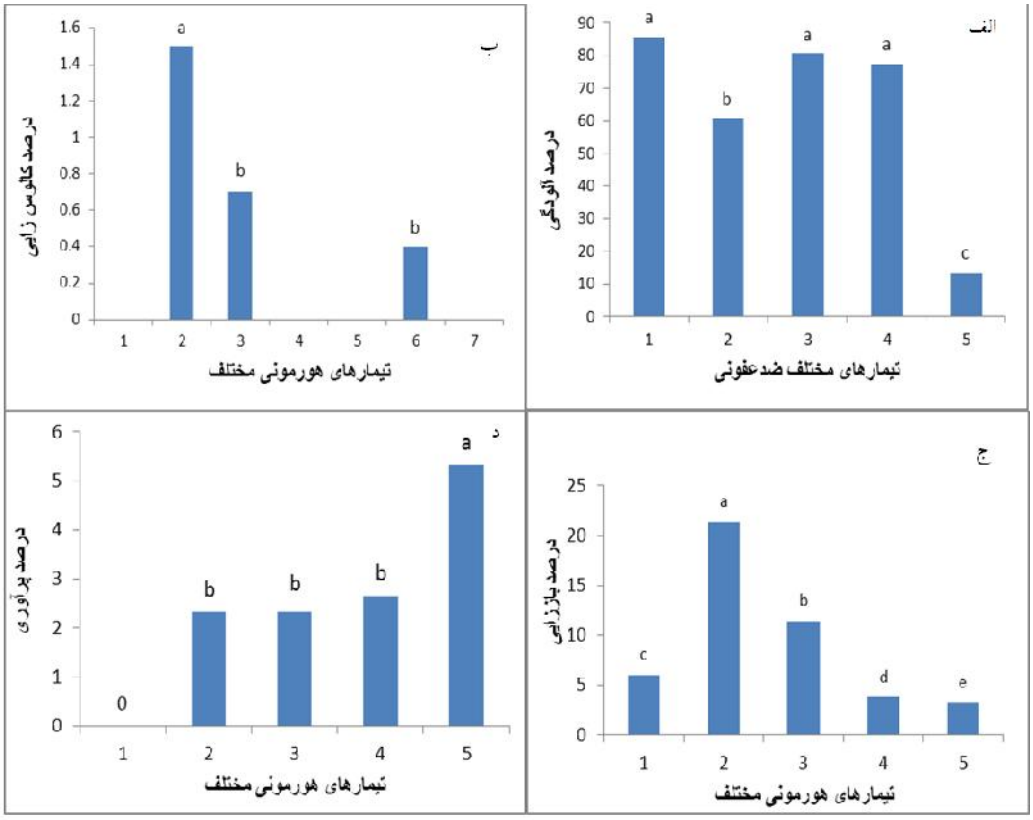
** به مفهوم اختلاف سطوح تیمار با یکدیگر در سطح یک درصد است

پرآوری: برای پرآوری و افزایش تعداد شاخه، ریزنمونه‌های باززایی شده درون محیط‌های مخصوص پرآوری قرار گرفتند. تقریبا بعد از گذشت یک ماه پرآوری صورت گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارهای هورمونی استفاده شده، بیشترین میانگین تعداد شاخه مربوط به تیمار ۵ محیط MS حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بود [شکل ۱ (د) و شکل ۲ (و)].

ریشه‌زایی: شاخه‌های با رشد مناسب تولید شده به‌منظور تولید ریشه به محیط‌های ریشه‌زایی منتقل شدند. بهترین تیمار ریشه‌زایی، محیط کشت ۰/۵ mg/l IBA + MS بود. به‌منظور سازگاری گیاهان ریشه‌دار شده به جی‌فی‌پات منتقل و سپس به خاک انتقال یافتند.

www.SID.ir

Archive of SID



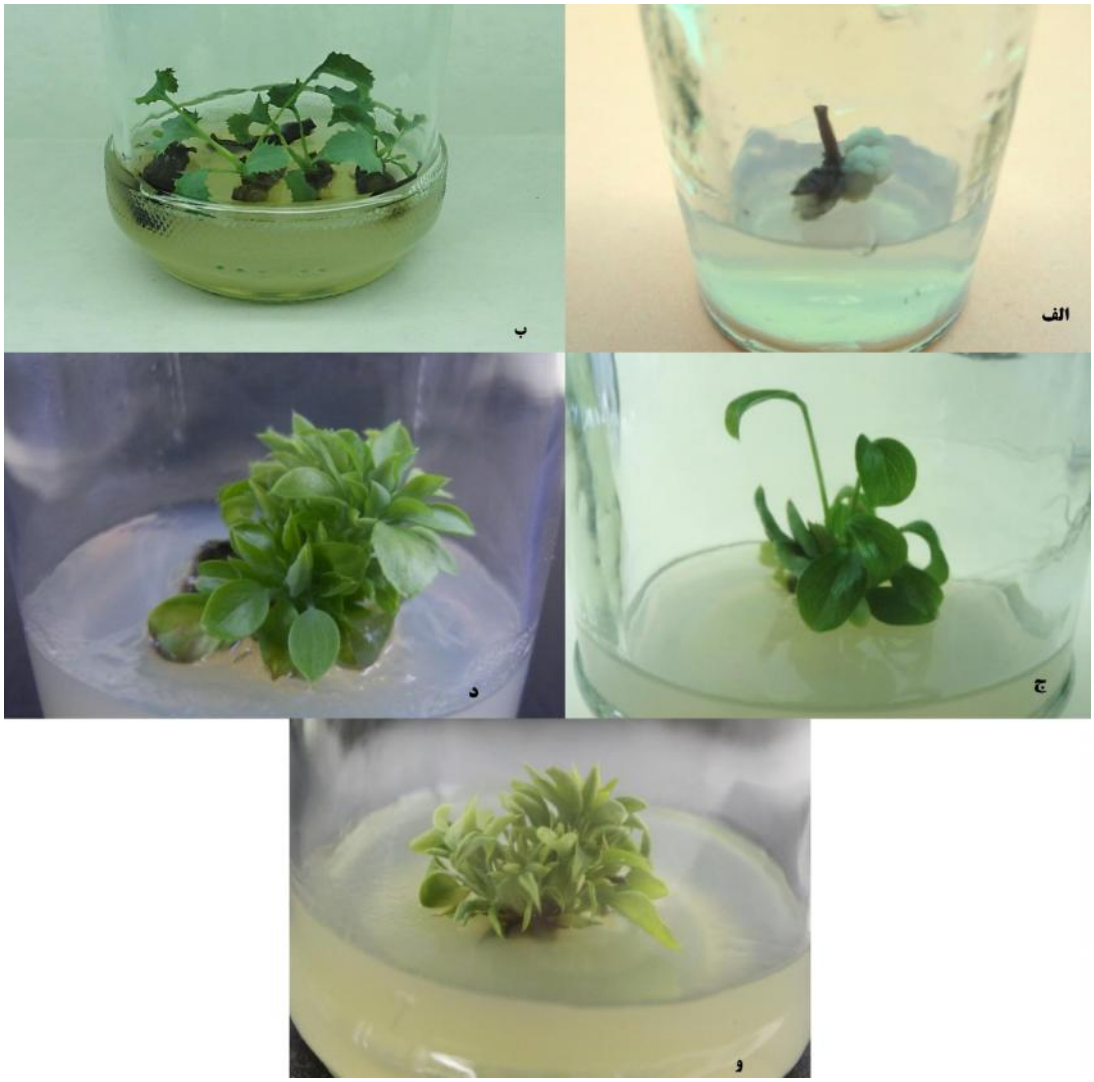
شکل ۱- مقایسه میانگین تحت تاثیر تیمارهای مختلف: الف) درصد آلودگی تحت تاثیر تیمارهای ضدعفونی ذکر شده در جدول ۱، ب) درصد کالوس‌زایی تحت تاثیر تیمارهای هورمونی ذکر شده در جدول ۲، ج) درصد باززایی تحت تاثیر تیمارهای هورمونی ذکر شده در جدول ۳، د) درصد پرآوری تحت تاثیر تیمارهای هورمونی ذکر شده در جدول ۳

بحث

نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد که تیمار ضدعفونی هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل بهترین تیمار برای ضدعفونی ریزنمونه‌های زرشک می‌باشد. در مطالعه‌ای دیگر Mohammadi (۲۰۱۱) نیز تیمار هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل را برای ضدعفونی ریزنمونه‌های زرشک گزارش کرده است. در تحقیقی Gurel و همکاران (۱۹۹۸) در ضدعفونی ریزنمونه‌های بادام از هیپوکلریت‌سدیم ۲ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه و به‌دنبال آن ۴ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل استفاده کردند. در بررسی دیگر Bunn و همکاران (۱۹۸۹) غلظت مؤثر برای ضدعفونی نوک ساقه‌های *Leucopogon obtectus* را با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد در ۱۵ ثانیه اعلام کردند. در تحقیقی دیگر Canan و همکاران (۲۰۰۶) ریزنمونه‌های برگرفته از درختان پسته را ۲ بار با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۲ دقیقه و یک بار با هیپوکلریت‌سدیم ۱۵ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه و نیز شستشو با آب‌مقطراستریل ضدعفونی کردند، که نتایج تمامی این آزمایشات با نتایج تحقیق حاضر که هیپوکلریت‌سدیم به‌عنوان تنها ماده ضدعفونی استفاده شد، مطابقت دارد. نتایج حاضر با نتایج ارائه شده توسط Ghavidel (۲۰۰۳) در گیاه سیب که بیان داشت ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم تأثیری بر از بین بردن آلودگی ندارد، درصورتی‌که استفاده از کلریدجیوه بدین‌منظور نتایج مطلوبی نشان داد مغایرت دارد.

www.SID.ir

Archive of SID



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

در آزمایشات باززایی در بین محیط‌های به‌کار برده شده، محیط کشت پایه MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین محیط برای باززایی شناخته شد. در آزمایشی بر روی زرشک *B. thunbergii* محیط کشت مایع با غلظت کمی از هورمون‌های IAA و IBA به‌عنوان بهترین محیط برای ریزازدیادی شناخته شده‌اند که با نتایج این مطالعه مغایرت داشت (Karhu *et al*., 2001). در تحقیقی برروی سماق Poordad و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده‌اند که بیشترین القاء کالوس و باززایی به‌ترتیب روی محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و یک میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد. در آزمایشی برروی نخود Vesal و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که بیشترین میزان کالوس در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین به‌دست آمد. در بررسی Safarnejad (۲۰۱۱) برروی زیره سفید (*Cuminum setifolium*) بیشترین القای کالوس در محیط B5 حاوی ۰/۲ میلی‌گرم

www.SID.ir

Archive of SID

در لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌دست آمد. در تحقیقی روی عناب Safarnejad (۲۰۱۵) نشان داد که بیشترین میزان بازایی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و به میزان ۹۶/۶ درصد به‌دست آمد. در تحقیقی بر روی افرا کیکم Saeedi Heidari و Safarnejad (۲۰۱۵) گزارش کردند که بهترین محیط جهت بازایی حاوی ۰/۰۰۰۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. در مطالعه‌ای دیگر روی قره‌قات Darrudi و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که بستر MS مناسب‌ترین بستر برای جوانه‌زنی ریزنمونه ها بود و غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BAP برای تکثیر ریزنمونه‌ها مناسب‌تر بود. در بررسی دیگری برروی بادام Sharifmoghaddam و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که بهترین تیمار جهت القاء کالوس، شاخساره‌زایی، تکثیر و تشکیل بلندترین طول شاخساره به‌طور توام محیط کشت MS همراه با ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و یک میلی‌گرم در لیتر BA بود. در مطالعه Roozban (۲۰۰۲) جهت پرآوری شاخساره در برخی از ارقام گلابی آسیایی، در بین ۳ غلظت صفر ، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین شاخه‌زایی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر اتفاق افتاد. در مطالعه‌ای Daguin و همکاران (۱۹۹۲) از جیبرلیک اسید به‌مقدار ۰/۶ و ۱۰ µM برای فعال‌سازی جوانه ماهونیا و زرشک به‌ترتیب استفاده کر که این نتایج با این تحقیقات که هورمون BAP را مؤثر در فعال‌سازی جوانه‌زنی زرشک شناخته شد مغایرت دارد. یکی از پارامترهایی که در تکنیک کشت‌بافت اهمیت دارد مسئله تولید شاخه جانبی می‌باشد، زیرا در مرحله واکشت نمونه‌ها، شاخه‌های جانبی تولید شده را می‌توان جدا کرد و هر یک را به‌عنوان یک نمونه در محیطی جداگانه کشت کرد. حتی در برخی موارد که رشد شاخساره‌ها قوی باشد از هر شاخساره می‌توان چندین ریزنمونه تهیه کرد و با اینکار سرعت تکثیر بسیار افزایش می‌یابد. نتایج مطالعه‌ای روی ریزازدیادی گونه ماهونیا از خانواده زرشک نشان داد که غلظت ۵ تا ۱۰ µM BAP برای رشد شاخه‌ها مؤثر بود (Mackay *et al.*, 1996) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در تحقیقی بر روی زالزالک Moghimi و Safarnejad (۲۰۱۴) بهترین محیط برای پرآوری محیط MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAو ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌دست آوردند. در ریزازدیادی گلابی روکا، Freire و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که غلظت بالای BAP موجب افزایش تعداد شاخه می‌شود، که با این نتایج مطابقت دارد. به‌طورکلی از نتایج حاصل شده در این تحقیق می‌توان گفت هورمون BAP برای باززایی زرشک بی‌دانه مؤثرترین هورمون می‌باشد و محیط MS حاوی IBA mg/l ۰/۰۱ + BAP ۲ mg/l بیشترین میانگین تعداد شاخه را داشت.

منابع مورد استفاده

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

www.SID.ir

Archive of SID

- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays-
- With tobacco tissue cultures. Plant Physiology, 15: 473-497.
- Piri, Kh. and Nazarian Firoozabadi, F., 2000. Manual of Plant Tissue Culture. Bu-Ali Sina University Press, Hamedan, 203 pages.
- Poordad, B., Safarnejad, A., Ebrahimi, M.A. and Bakhshi Khaniki, Gh., 2014. Investigation of effective factors on sumac *in vitro* propagation. Iraninan Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 22: 25-33.
- Roozban Mahmoud R.Z., 2002, Evaluation of *in vitro* propagation of some Asian pear, Sapling and Seed, 18: 348-361.
- Saeedi Heidari, A. and Safarnejad, A., 2015. Micropropagation of *Acer monospessulanum* through tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23: 237-246.
- Safarnejad, A., 2011. A rapid and efficient method for regeneration of *Cuminum setifolium* (Boiss.) Kos.-Pol (1916). International Journal of Science and Nature, 2: 737-742.
- Safarnejad, A., 2015, Effect of growth regulators on *in vitro* regeneration of *Ziziphus jujube*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23:40-48.
- Sharifmoghaddam, N., Safarnejad, A. and Tabatabae, S.M., 2011. The effect of plant growth regulators on callus induction and regeneration of *Amygdalus communis*. Notulae Scientia Biologicae, 3: 97-100.
- Samsam Shariat, E. and Moattar, F., 1992. Herbs toxicity (toxicity signs and treatment). Esteghlal publishing house. 461 P.
- Vessal, S.R., Bagheri, A. and Safarnejad, A., 2002. The possibility of *in vitro* haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 6: 68-76.
- Zargari, A., 1991. Herbs. Fourth Edition. Publications of University of Tehran, 942 P.
- Ziaratnia, M. and Salmani, A., 2012, Effect of growth regulators on callus induction seedless Berberis (*Berberis vulgaris* var asperam L.), Third National Conference on Agricultural Biotechnology in Mashhad. Page of 261.

Center for Education, Culture and Research, 181 pages.
- Freire, I.C.G., Coelho, C.P.S. and Barros, M.T.F., 2002. Improved culture media for the *in vitro* establishment of Pear from nodal cuttings. Acta Horticulture, 2: 457-461.
- Ghavidel Masooleh, A., 2003. Malyng26 (M26) basic of micropropagation. M.Sc. thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch.100 P.
- Gurel, S. and Gulsen, L., 1998. The effect of IBA and BAP on *in vitro* shoot production of almond (*Amygdalus communis* L.). Turkish Journal of Botany, 22:375-379.
- Kafi, M., and Balandri, A., 2002. Berberis, technology and processes of production, Zaban and Adab Publication, Mashhad. 210 P.
- Kamalinezhad, M. and Komeylizadeh, H., 1999. Harmful effects of Berberis fruit on the fetus. Journal of Educational Research Information Center (therapist) 1: 11-14.
- Karhu, S. and Hakala. K., 1990. Rooting *in vitro* of micropropagated barberry (*Berberis thunbergii*) shoots. Ann. Agr. Fenn. 29:179-185.
- Gamborg, O.L. and Shylak, J.P., 1976. Tissue culture, protoplast and morphogenesis in flax. Botany, 4: 301-306.
- Mackay, W.A., Molinar, Jr. F., Wall, M.M., and Cardenas, M., 1996. Micropropagation of agarita, Berberis trifoliata Moric. HortScience, 31:1030-1032.
- Misra, M., 2004. Regeneration of patchouli (*Pogostemon cablin Benth.*) plants from leaf and node callus and evaluation after growth in the field. Plant Cell Reports, 15: 991-994.
- Moazzen Ferdowsi, B., 1993. Berberis. Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, 49 P.
- Molafyabi, A. and Khafani, S., 2008. Evaluation of the possibility of Berberis production with new technologies, opportunities and challenges, the first national festival of yaghoot sorkh (Berberis). Ghayen. 283 P.
- Moghimi, Z. and Safarnejad, A., 2014. Assessment of micropropagation and flavonoid content of hawthorn through tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 22: 181-191.
- Mohammadi, M., 2011. Investigation the possibility of micropropagation of *Berberis vulgaris*. M.Sc. thesis of Ferdowsi University, Mashhad.

www.SID.ir

Archive of SID

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

M. Sazmand[1] and A. Safarnejad[*2]

1- M.Sc., Islamic Azad University Branch of Ashtian, Ashtian, I.R.Iran
2*- Corresponding Author, Assoc. Prof., Faculty member of Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center, Mashhad, I.R.Iran, Email: Sebre14@yahoo.com

Received:15.03.2015 Accepted: 13.07.2015

Abstract

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

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

www.SID.ir