مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۸، شماره ۱، صفحه ۱۷۵-۱۶۶ (۱۴۰۱)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2022.356438.3090
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1401.38.1.10.8

اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی و ریشه‌زایی درون شیشه‌ای *Rubus occidentalis*

یوسف قاسمی[۱]، فرشته حیدرقلی‌نژاد[۲]، صدیقه کلیچ[۳] و مجتبی ایمانی راستابی[۴*]

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۲- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۴*- نویسنده مسئول، دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

پست الکترونیک: M_imani_M@yahoo.com

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۰ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۰

چکیده

تمشک سیاه حاوی موادی مانند الاژیک اسید، آنتوسیانین، کمپفرول و سالیسیلیک اسید است. به‌همین دلیل دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است که می‌تواند غیرفعال‌کننده رادیکال آزاد باشد و از بروز بسیاری از بیماری‌ها ازجمله سرطان جلوگیری کند. بهینه‌سازی روش‌های کشت بافت برای تولید انبوه و انتقال ژن در تمشک سیاه بسیار حائز اهمیت است. هدف از این تحقیق، تعیین اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی و ریشه‌زایی و همچنین غلظت‌های مختلف ساکارز بر ریشه‌زایی درون شیشه‌ای تمشک سیاه بی‌خار (*Rubus occidentalis*) است. در مرحله اول اثر متقابل BA با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و IBA در غلظت‌های ۰ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بر باززایی ریزنمونه جوانه جانبی بررسی شد. در مرحله ریشه‌زایی اثر IBA، NAA و غلظت‌های مختلف ساکارز بررسی شد. غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در چهار سطح ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و از ساکارز در سطوح ۱، ۱/۵، ۳ و ۴/۵ درصد استفاده شد. بهترین تیمار مربوط به غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با ۱۰۰٪ میزان باززایی، میانگین تعداد شاخه (۴/۶) و طول شاخه (۱/۳۰ سانتی‌متر) بود. نتایج نشان داد که محیط کشت حاوی NAA (با غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و ساکارز ۳٪ و ۴/۵٪ با ریشه‌دهی (۱۰۰٪)، تعداد (۷/۵) و طول ریشه (۲/۸۸ سانتی‌متر) برای ریشه‌دهی مناسب بود.

واژه‌های کلیدی: اکسین، باززایی، *Rubus occidentalis* L.، سیتوکنین، کشت بافت.

مقدمه

تمشک‌های سیاه (Blackberry) در جنس *Rubus* طبقه‌بندی می‌شوند و از نخستین ارقام تجاری شده این جنس، تمشک سیاه (Blackberry) و تمشک فرنگی (Raspberry) است (Clark & Finn, 2011). تمشک سرشار از الاژیک اسید، کریستین، گالیک اسید، آنتوسیانین، کاتچین، کمپفرول و سالیسیلیک اسید است و به‌دلیل وجود این مواد از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار است که

می‌تواند از آسیب به غشاء سلول و ساختارهای دیگر در بدن جلوگیری کند. میزان بالای ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی مانند ویتامین C و پلی‌فنول‌ها باعث شده تمشک ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن را داشته باشد. همچنین فلاونوئیدهای موجود در تمشک با غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد از تنش اکسیداتیو جلوگیری کرده و در نتیجه از بروز بیماری‌های قلبی- عروقی، سرطان و دیگر بیماری‌های مرتبط با این تنش‌ها جلوگیری می‌کند (Zhang *et al*., 2010). برای ازدیاد تمشک می‌توان از روش تکثیر غیرجنسی استفاده کرد که شامل خوابانیدن، قلمه چوب نرم، قلمه ریشه و کشت بافت است (Weber, 2013). تکثیر از طریق خوابانیدن با مشکلاتی مانند نیاز به فضای بیشتر، کنترل شرایط محیطی و احتمال تولید گیاهان خاردار همراه است. در تکثیر با قلمه چوب نرم نیز ریشه‌دهی و استقرار گیاه در حد مطلوب نیست. اما در تکثیر درون شیشه‌ای امکان کنترل شرایط و تأمین محیط مناسب انجام شده و محدودیت زمان و مکان در تکثیر و تولید گیاه وجود ندارد (Larkin & Scowcroft, 1981؛ Faisal *et al*., 2006). ازاین‌رو، بکارگیری روشی سریع و پربازده در ازدیاد تمشک سیاه مورد توجه است. به همین منظور، مطالعات باززایی از طریق کشت بافت می‌تواند بسیار سودمند باشد. در چند سال اخیر تعداد محدودی باغ تمشک در کشور احداث شده است که با روش‌های تکثیر سنتی نیاز بازار مصرف تأمین نمی‌شود. در نتیجه، استفاده از تکنیک کشت بافت به‌عنوان جایگزین روش‌های سنتی که بتواند محدویت روش‌های پیشین ازجمله عدم تولید گیاهان یکدست، کلون شده و بدون خار را فراهم نماید بسیار سودمند است. ازاین‌رو، با توجه به ارزش تغذیه‌ای و افزایش نیاز بازار مصرف، در این پژوهش تکثیر تمشک سیاه در محیط کشت بافت به‌عنوان روشی جایگزین و مؤثر در تکثیر این محصول ارزشمند انجام شد. نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد دو مشخصه اصلی در باززایی و پرآوری در کشت گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای است (Grattapaglia & Machado, 1998). براساس گزارش‌های پیشین، محیط کشت موراشینگ اسکوک (MS) بیشترین کاربرد را در کشت بافت گیاهان جنس *Rubus* دارد (George, 1996؛ Reed, 1996). ترکیب هورمونی برای تکثیر ریزنمونه نوک شاخه در جنس *Rubus*، یک تا دو میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۱ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA یا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بوده است (Fernandez & Clark, 1991؛ George, 1996). در پژوهشی در تمشک سیاه رقم ماریون (Marion) بالاترین میزان باززایی در محیط کشت همراه با ۵ میکرومولار BA و ۰/۵ میکرومولار IBA بدست آمد (Meng *et al*., 2004). در پرآوری ارقام مختلف تمشک سیاه از جوانه‌های موجود در شاخه استفاده شد. بالاترین میزان تکثیر در تمشک سیاه رقم *Cacanska* در غلظت‌های هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین بدست آمد. ریشه‌دهی شاخه‌های باززایی شده در محیط کشت ۱/۲MS همراه با یک میلی‌گرم در لیتر IBA، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین و یک گرم در لیتر زغال فعال انجام شد (Ruzic & Lazic, 2006). ریشه‌دهی در تمشک به آسانی با حذف سیتوکینین و انتقال به محیط حاوی اکسین بدست می‌آید، بیشتر پژوهشگران، IBA و NAA را در محیط تکثیر استفاده کردند (George, 1996؛ Jafari Najaf-Abadi & Hamidoghli, 2009). در گزارش دیگری بالاترین میزان تکثیر و تعداد شاخه در محیط کشت MS در حضور تنظیم‌کننده‌های BA و جیبرلین همراه با IBA بدست آمد که به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۳، ۰/۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شدند (Georgieva *et al*., 2016). بهبود روش‌های ریزازدیادی علاوه‌بر اینکه بخش بسیار مهمی از برنامه‌های پژوهشی اصلاحی درون شیشه‌ای و انتقال ژن به گیاه است، به‌دلیل عدم وابستگی به فصل، زیاد بودن سرعت تکثیر و امکان تولید گیاهان کلون شده می‌تواند در تمشک سیاه بی‌خار بسیار ارزشمند باشد. با توجه به افزایش آگاهی در مورد اهمیت تمشک سیاه و اثر آن در رونق بازار و اقتصاد کشور و انجام تحقیقات کمی در کشت بافت و تکثیر این گیاه، نیاز به آزمایش‌های به روز با جزئیات کامل برای تعیین شرایط بهینه در تکثیر کشت بافتی

آن است. در این پژوهش بهینه‌سازی محیط کشت و باززایی تمشک سیاه در محیط کشت بافت برای افزایش سرعت تکثیر و تهیه گیاهان کلون بدون خار ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

در ابتدا برای آماده‌سازی ریزنمونه‌های تمشک سیاه بی‌خار (*Rubus occidentalis*)، شاخه‌هایی که حاوی جوانه جانبی بودند در فصل بهار ۱۳۹۹ از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری برداشت شدند و در زیر آب جاری به‌مدت نیم ساعت قرار گرفتند. سپس برای استریل کردن نهایی، ساقه‌ها در اندازه دو سانتی‌متر جدا و با استفاده از الکل ۷۰٪ و محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ به‌مدت ۲۲ دقیقه ضدعفونی شدند. درنهایت، زیر هود لامینار سه مرتبه با آب استریل شستشو داده شده و ریزنمونه جوانه جانبی در قطعات یک سانتی‌متر جدا و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BA و IBA کشت شدند. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف BA (۰/۲، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) همراه با IBA در غلظت‌های ۰ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند. شش هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها، درصد باززایی، تعداد و طول شاخه‌های باززایی شده اندازه‌گیری شد. برای ریشه‌زایی شاخه‌های باززایی شده از محیط کشت ۱/۲MS همراه با زغال فعال ۰/۰۲٪ و غلظت‌های مختلف ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر از دو نوع اکسین IBA و NAA استفاده گردید. پس از گذشت شش هفته درصد ریشه‌زایی، تعداد شاخه‌های ریشه‌دار شده و طول ریشه اندازه‌گیری شد. پس از تعیین ترکیب هورمونی مناسب در ریشه‌زایی (NAA با غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر)، اثر ساکارز در غلظت‌های مختلف ۱، ۱/۵، ۳ و ۴/۵ درصد بر ریشه‌زایی بررسی شد. کشت‌ها در اتاقک کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زیر نور سفید فلورسنت با ۲۵۰۰ لوکس نگهداری شدند. در بخش باززایی آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور غلظت‌های مختلف BA و IBA و در بخش ریشه‌زایی به‌صورت طرح کاملاً تصادفی انجام شد. هر آزمایش با سه تکرار انجام و هر تکرار شامل چهار مشاهده بود. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ استفاده گردید و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

باززایی شاخه

نتایج تجزیه واریانس صفات درصد باززایی، تعداد و طول شاخه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. طبق نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس، اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BA و IBA بر صفات ارزیابی شده در سطح ۱٪ معنی‌دار است.

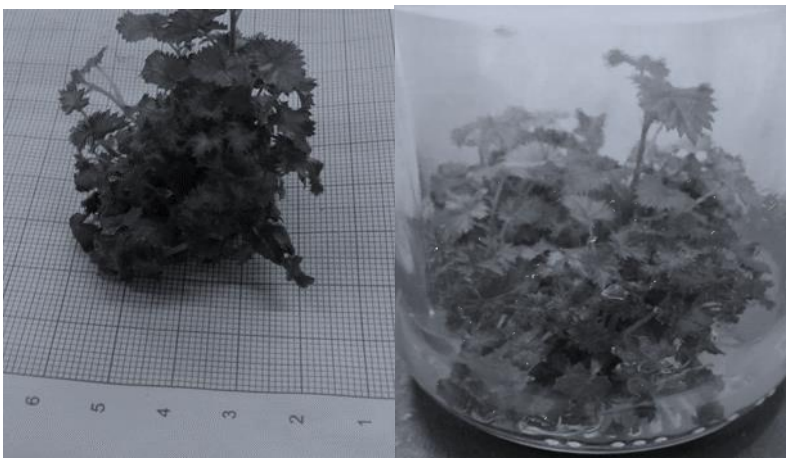
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی درون شیشه‌ای شاخه تمشک سیاه بی‌خار (*Rubus occidentalis* L.)

Table1. ANOVA of PGRs on *in vitro* shoot regeneration of thornless black raspberry (*Rubus occidentalis* L.)

Source of variation	d.f.	Mean Square		
		Regeneration (%)	Number of shoots per explant	Shoot length
BAP	4	21.6490**	9.62**	0.33**
IBA	1	80.2764**	3.46**	1.54**
BAP × IBA	4	88.716**	3.60**	0.351**
Erorr	20	160.93	0.287	0.016
Total	29	14.15	11.33	15.95
CV (%)	7.8			

**: Significant at 1% probability level.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر متقابل دو هورمون BA و IBA نشان داد که بالاترین میزان باززایی (۱۰۰٪) در غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و کمترین میزان باززایی در محیط حاوی ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد (جدول ۲). عامل اختلاف در میزان باززایی و صفات ارزیابی شده غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شده بود. در صفت تعداد شاخه باززایی شده از ریزنمونه، محیط کشت MS همراه با غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌ترتیب با ۴/۶ و ۴/۵ شاخه در ریزنمونه بالاترین و غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کمترین میزان باززایی را نشان دادند (شکل ۱).



شکل ۱- محیط باززایی (**BA: 1 & 1.5 mg.L^{-1} + IBA: 0.1 mg.L^{-1}**) درون شیشه‌ای تمشک سیاه بی‌خار

Figure 1. *In vitro* regeneration medium (BA: 1 & 1.5 mg. L^{-1} + IBA: 0.1 mg. L^{-1}) of thornless black raspberry (*Rubus occidentalis* L.)

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی درون شیشه‌ای شاخه تمشک سیاه بی‌خار

Table 2. Means comparison of the PGRs effects on *in vitro* shoot regeneration of thornless black raspberry (*Rubus occidentalis* L.)

BA (mg/l)	IBA (mg/l)	Regeneration (%)	Number of shoots in explant	Shoot length (cm)
0.2	0	30e	1cd	0.93abc
	0.1	0f	0e	0e
0.5	0	60d	1.06ed	0.46cd
	0.1	25e	0.73ed	0.36de
1	0	100a	1.66c	1.13ab
	0.1	66.67cd	4.66a	1.30a
1.5	0	100a	3.03b	1.16ab
	0.1	83.33abc	4.5a	1.1ab
2	0	72.67bcd	1.33cd	0.8bc
	0.1	91.67ab	2.6b	0.53cd

*In each column, the means with at least one common letter are not significantly different at 5% probability level (Duncan test).

از سویی، همان‌طور که در جدول ۲ مشخص است در غلظت‌های بالاتر BA حضور IBA موجب افزایش معنی‌داری در تولید تعداد شاخه شد و بیانگر اینست که وجود اکسین در القاء جوانه‌های جانبی تأثیر مثبت گذاشته است. حضور BA و IBA در غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بالاترین میزان طول شاخه (۱/۳۰ سانتی‌متر) را داشت (جدول ۲).

ریشه‌زایی شاخه

تأثیر تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر میزان ریشه‌زایی

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد IBA، NAA و ساکارز به‌صورت جداگانه بر همه صفات مربوط به ریشه‌زایی شاخه‌های باززایی شده به‌استثناء اثر دو نوع اکسین بر درصد ریشه‌زایی (عدم معنی‌داری) در سطح ۱٪ معنی‌دار شد (جدول‌های ۳ و ۵). در همه محیط کشت‌های استفاده شده ریشه‌زایی انجام شد. دو تنظیم‌کننده رشد IBA و NAA هر دو در ریشه‌زایی مؤثر بوده و در تمامی سطوح استفاده شده از این دو هورمون، میزان ریشه‌زایی ۱۰۰٪ بوده است (جدول ۴).

بالاترین تعداد ریشه (۷/۵) و طول ریشه (۲/۸۸ سانتی‌متر) در محیط کشت ۱/۲MS حاوی NAA با غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که بهترین نتیجه را داشت (شکل ۲). استفاده از غلظت بالاتر آن باعث کاهش تعداد و طول ریشه‌ها شد.

شکل۲ – محیط ریشه‌زایی (NAA 0.75 mg.L^{-1}) و گیاهچه ریشه‌دار درون شیشه‌ای تمشک سیاه بی‌خار

Figure 2. *In vitro* rooting medium and rooted seedlings (NAA 0.75 mg.L^{-1}) of thornless black raspberry (*Rubus occidentalis* L.)

جدول ۳– تجزیه واریانس صفات بررسی شده در ریشه‌زایی درون شیشه‌ای تمشک سیاه بی‌خار (*Rubus occidentalis* L.)

Table 3. ANOVA of parameters studied on *in vitro* rooting of thornless black raspberry (*Rubus occidentalis* L.)

Source of variation	d.f.	Mean Square		
		Regeneration (%)	Number of roots per explant	Shoot length (cm)
Concentration of auxin (NAA & IBA)	7	300ns	0.77**	0.93**
Error	16	3.541	1.59	2.51
Total	23			
C.V. (%)		6.67	9.19	10.92

ns and **: not significant and significant at 1% probability level, respectively.

در نوع دیگر اکسین استفاده شده، IBA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بالاترین تعداد ریشه (۶/۳۳) و طول ریشه (۲/۱۶) را داشت. با افزایش غلظت IBA نیز تعداد و طول ریشه‌ها کاهش یافت. در هر دو اکسین بکاررفته، استفاده از غلظت یک میلی‌گرم در لیتر تعداد و طول ریشه را کاهش داد (جدول ۴).

تأثیر غلظت ساکارز بر میزان ریشه‌زایی

در بررسی اثر ساکارز بر میزان ریشه‌زایی، استفاده از ساکارز ۳٪ و ۴/۵٪ بیشتر مؤثر بوده که بالاترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰٪)، تعداد و طول ریشه را داشت.

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات مربوط به ریشه‌زایی درون شیشه ای تمشک سیاه بی‌خار

Table 4. Means comparison of *in vitro* rooting parameters of thornless black raspberry (*Rubus occidentalis* L.)

Auxin	Concentration (mg. L^{-1})	Rooting (%)	Number of roots	Root length (cm)
NAA	0.2	100^{a*}	5.66^{b}	2.16^{b}
	0.5	100^{a}	5.66^{b}	2.06^{b}
	0.75	100^{a}	7.5^{a}	2.88^{a}
	1	100^{a}	3.66^{cd}	1.10^{c}
IBA	0.2	100^{a}	5.66^{b}	2.06^{b}
	0.5	100^{a}	6.33^{b}	2.16^{b}
	0.75	100^{a}	4.33^{c}	2^{b}
	1	100^{a}	3.73^{c}	1.53^{c}

*In each column, the means with at least one common letter are not significantly different at 5% probability level (Duncan test).

جدول ۵- تجزیه واریانس ساکارز بر صفات بررسی شده در ریشه‌زایی درون شیشه ای تمشک سیاه بی‌خار

Table 3. ANOVA of sucrose on *in vitro* rooting parameters of thornless black raspberry (*Rubus occidentalis* L.)

Source of variation	d.f.	Mean Square		
		Rooting (%)	Number of roots	Root length
Sucrose	3	1544.44**	10.44**	1.58**
Error	7	45.83	0.79	0.04
Total	10			
C.V. (%)	-	8.28	12.24	10.51

**: Significant at 1% probability level.

جدول ۶- مقایسه میانگین غلظت‌های ساکارز بر صفات بررسی شده در ریشه‌زایی درون شیشه ای تمشک سیاه بی‌خار

Table 6. Means comparison of sucrose concentrations on *in vitro* rooting parameters of thornless black raspberry (*Rubus occidentalis* L.)

Sucrose (%)	Rooting (%)	Number of roots	Root length
1	53.33c*	2.33b	1b
1.5	73.33b	2.66b	1.33b
3	100a	4.66a	2.33a
4.5	100a	5.33a	2.46a

*In each column, the means with at least one common letter are not significantly different at 5% probability level (Duncan test).

هرچند غلظت بالاتر یعنی ۴/۵٪ بالاترین میزان ریشه‌زایی، تعداد (۵/۳۳) و طول ریشه (۲/۴۶) را داشت اما از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین این دو غلظت وجود نداشت و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۶).

در غلظت‌های کمتر ساکارز درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه کاهش یافت. کمترین میزان ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه در ساکارز ۱٪ بدست آمد (جدول ۶).

بحث

نتایج این پژوهش نقش مؤثر دو تنظیم‌کننده رشد سیتوکینین و اکسین را در باززایی و ریشه‌دهی در تمشک سیاه نشان داد. بالاترین درصد باززایی (۱۰۰٪) در BA ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد اما برای افزایش تعداد و طول شاخه حضور همزمان هورمون اکسین در سطوح پایین مؤثر بود که با نتایج گزارش مبنی بر حضور مؤثر سیتوکینین در باززایی و حضور همزمان اکسین در افزایش طول و تعداد ریزنمونه‌های باززایی شده در (*Pogostemom cablin*) مطابقت دارد (Nurulhidayah, 2012). بنابراین به‌نظر می‌رسد نسبت هورمونی مناسب بین BA و IBA منجر به بهترین باززایی در ریزنمونه جوانه جانبی شده است. در گزارش‌های زیادی به حضور همزمان BA و سطوح پایین اکسین در باززایی اشاره شده است که مطابق آن در مطالعه‌ای بر روی تمشک سیاه در ترکیب هورمونی چهار میکرومولار BA و ۰/۲۵ میکرومولار IBA بالاترین میزان باززایی بدست آمد (Gonzalezm *et al*., 2000). همچنین در تکثیر رقمی از تمشک، بالاترین میزان تکثیر در محیط کشت MS در ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده است (Gajdosava *et al*., 2006). نتایج این پژوهش نیز در راستای نتایج مطالعات اشاره شده است و این دو تنظیم‌کننده رشد را در باززایی تمشک سیاه بسیار مؤثر می‌داند. به‌طوری که حضور همزمان BA و IBA بالاترین میزان باززایی، تعداد و طول شاخه را داشت. سیتوکینین BA به تنهایی بهترین اثر را روی درصد باززایی داشته است ولی با استفاده ترکیبی از BA و IBA، تعداد و طول شاخه افزایش یافت که می‌تواند تأکیدی بر نقش مؤثر اکسین‌ها در تحریک و افزایش تقسیم سلولی باشد. به‌نحوی که در گزارشی بر جنس تمشک، بیشترین تعداد و طول شاخه در محیطی با ترکیب دو هورمون جیبرلین و BA به‌ترتیب در غلظت ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که در آن از اکسین استفاده نشد و تعداد شاخه‌ها حدود ۳/۳۳ بدست آمد (Jafari Najaf-Abadi & Hamidoghli, 2009). اما در این پژوهش با استفاده همزمان از اکسین و سیتوکینین باززایی به میزان بیشتری بود، به‌طوری که بالاترین تعداد شاخه حدود ۴/۶ بدست آمد که می‌تواند به نقش مؤثر IBA همراه با سیتوکینین در افزایش باززایی و پرآوری در شرایط درون شیشه‌ای اشاره کند. در جنس تمشک گزارش شده است که کاهش غلظت BA از دو به یک میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش پرآوری در ریزنمونه‌های جوانه جانبی شد و همچنین استفاده از غلظت‌های بالاتر نیز میزان باززایی را کاهش داده است (Ruzic & Lazic, 2006). مطابق با گزارش بالا، در این پژوهش نیز استفاده از سطح بالاتر BA (دو میلی‌گرم در لیتر) میزان باززایی و سایر صفات مربوط به آن را کاهش داد. سیتوکینین نقش ضروری در تقسیم سلولی دارد و در القاء شاخه‌زایی مستقیم و غیرمستقیم بسیار مؤثر است (Jafari Najaf-Abadi & Hamidoghli, 2009). نکته مهم در استفاده از سیتوکینین، غلظت استفاده شده آن است که توانست نتایج متفاوتی را نشان دهد. در این پژوهش با استفاده همزمان از BA و IBA در مدت زمان شش هفته گیاهچه‌های کشت‌بافتی با بالاترین میزان باززایی بدست آمد. در زمینه تأثیرات اکسین بر ریشه‌زایی گیاهان مختلف، پژوهش‌های زیادی انجام شده است. در این پژوهش هر دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA و NAA در ریشه‌زایی مؤثر بودند اما بالاترین تعداد و طول ریشه در محیط حاوی NAA با غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که با نتایج Kollarova و همکاران (۲۰۰۴) که اشاره

کردند در (*Karwinskia humboldtiana*) محیط حاوی NAA بالاترین میزان ریشه‌دهی رخ داده است، مطابقت دارد (Kollarova *et al*., 2004). در تمشک سیاه رقم Cacanska اشاره شد که IBA در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بهترین محیط در ریشه‌زایی بوده اما در تحقیق حاضر بهترین محیط ریشه‌دهی مربوط به NAA با غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر بود و IBA در غلظت پایین‌تر (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بعد از آن قرار گرفت. نتایج پژوهش‌های مشابه نشان داد (*Rosa hybrid* L.) که محیط کشت MS ۱/۲ همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین محیط در ریشه‌زایی بوده است و غلظت پایین‌تر آن توصیه شد (Rajendrap *et al*., 2013). با توجه به گونه گیاهی و تنظیم‌کننده‌های درون گیاه، ریشه‌زایی در حضور تنظیم‌کننده‌های مختلف اکسین متفاوت است که در تمشک سیاه بی‌خار NAA نقش مؤثرتری در ریشه‌زایی داشته است و بالاترین تعداد (۷/۵) و طول ریشه (۲/۸) بدست آمد. IBA و NAA از مهمترین اکسین‌ها در محیط کشت بافت هستند که باعث تقسیم سلولی، طویل شدن و رشد سلولی شده و تشکیل ریشه‌ها را تحریک می‌کنند (Hartman *et al*., 1997). کاربرد هر دو هورمون در ریشه‌دهی تأثیر به‌سزایی داشت و در غلظت‌های مختلف هر دو اکسین میزان ریشه‌دهی ۱۰۰٪ بود اما در سایر صفات مطالعه شده (تعداد و طول ریشه)، اختلاف معنی‌داری میان غلظت‌های مختلف دیده شد. این نتایج با نتایج تحقیقات سایر پژوهشگران مبنی بر افزایش درصد ریشه‌زایی در بلک‌بری و گیاهان چوبی توسط کاربرد IBA و NAA همخوانی دارد (Kasim & Rayya, 2009؛ Kollarova *et al*., 2004). بیشترین اکسین مورد استفاده در ریشه‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای IBA و NAA است که نوع و غلظت‌های مختلف اکسین می‌تواند اثرهای متفاوتی بر میزان ریشه‌دهی، تعداد و طول آن داشته باشد (Zhang *et al*., 2010؛ Jiang *et al*., 2015). علاوه بر اکسین مشخصه‌های دیگر مانند قندها، انتقال کربوهیدرات‌ها از برگ به سمت ریشه، ترکیب‌های حاوی نیتروژن و ترکیب‌های فنلی نیز در ریشه‌زایی مؤثرند (Hartman *et al*., 1997). ساکارز منبع اصلی انرژی برای کشت درون شیشه‌ای است. سلول‌های گیاهی و بافت‌ها در یک محیط کشت توانایی اتوتروفی کمتری دارند، بنابراین نیاز به منبع کربن خارجی است تا نیاز آنها را برای فتوسنتز تأمین کند (Razdan, 1993). البته، تکثیر و رشد در محیط کشت بافت به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر ساکارز است. در این پژوهش برای اولین بار اثر غلظت‌های مختلف ساکارز بر ریشه‌زایی تمشک سیاه بی‌خار بررسی شد، به‌طوری که در بررسی غلظت ساکارز بر میزان ریشه‌دهی استفاده از سطوح ۳٪ و ۴/۵٪ بالاترین میزان ریشه‌دهی را داشته است. اثر غلظت‌های مختلف ساکارز در کشت بافت گونه‌های مختلف آزمایش شده است که مطابق آنها سطوح بالاتر ساکارز تأکید شده است (Amin *et al*., 2003؛ Rahman *et al*., 2004). بنابراین، به نظر می‌رسد غلظت‌های مختلف ساکارز یکی از فاکتورهای مهم کنترل در ریشه‌دهی و رشد باشد. در سطوح پایین‌تر ساکارز ریشه‌های کمتری تشکیل شد. غلظت‌های بالاتر ساکارز در ترکیب مناسب از اکسین توانستند بالاترین میزان ریشه‌دهی و صفات مربوط به آن را نشان دهند. ازاین‌رو، به نظر می‌رسد در شرایط درون شیشه‌ای برای انجام فتوسنتز، ریزنمونه‌ها به منبع کربن بیشتری نیازمندند تا فرایند تقسیم و رشد سلول‌ها انجام شود.

برای باززایی مناسب و افزایش تعداد و طول شاخه که در نهایت منجر به تولید گیاهچه مقاوم‌تر می‌گردد استفاده از هورمون BA در سطوح ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA توانست محیط کشت مناسبی در باززایی از ریزنمونه جوانه جانبی در گیاه تمشک سیاه باشد. در ریشه‌زایی گیاهچه‌های تولیدی، غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین نتیجه را نشان داد. ساکارز به‌عنوان منبع کربن در تأمین انرژی در محیط کشت بافت نیز در غلظت ۳٪ و ۴/۵٪ بالاترین میزان ریشه‌دهی و تعداد و طول ریشه را داشت.

References

- Amin, M.N., Rahman, M.M. and Manik, M.S., 2003. *In vitro* clonal propagation of *Paederia foetida* L. A medicinal plant of Bangladesh. Plant Tissue Culture, 13(5): 117-123.
- Clark, J.R. and Finn, C.E., 2011. Blackberry breeding and genetics Fruit, vegetable and cereal and biotechnology. Global Science Books, 5(3): 27-43.
- Faisal, M., Siddigque, I. and Anis, M., 2006. *In vitro* rapid regeneration of plantlets from nodal explants of *Mucuna pruriens*- A valuable medicinal plant. Plant Biotechnology, 148(1): 1-6.
- Fernandez, G.E. and Clark, J.R., 1991. *In vitro* propagation of thornless 'Navaho' blackberry. Hort Science, 26(8): 1219-1226.
- Gajdosava, A., Ostrolucka, M.G., Libiakov, G. and Simala, D., 2006. Microclonal propagation of *vaccinum* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture *in vitro*. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 14(1): 103-119.
- George, E.F., 1996. Plant Propagation by Tissue Culture Part 2: In practice. Exegetics Ltd., Edington England, 574p.
- Georgieva, M., Badjakov, I., Dincheva, I., yancheva, S. and Kondakova, V., 2016. *In vitro* propagation of wild Bulgarian small berry fruits. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 22(1): 46-51.
- Gonzalezm, M.V., Lopez, M., Valdes A.E. and Ordas., R.J., 2000. Micropropagation of three fruit species using nodal segments from field-grow plants. Annals Applied Biology, 137(14): 73-78.
- Grattapaglia, D. and Machado, M.A., 1998. Micropropagation in culture de tecidos transformacao genetica de plantas. Embrapa-CNPH Brasilia, 10(2): 183-198.
- Hartman, H.T., Kester, D.E., Davies J.R. and Genever, R.L., 1997. Plant Propagation: Principles and Practices. Prentice Hall International INC, 770p.
- Jafari Najaf-Abadi, A. and Hamidoghli, Y., 2009. Micropropagation of thronless trailing blackberry (*Rubus* sp.) by axiallary bud explants. Australian Journal of Crop Science, 3(4): 191-194.
- Jiang, C.H., Liu, Z. and Zheng, Q., 2015. Direct regeneration of plants derived from *in vitro* cultured shoot tips and leaves of poplar (*Populus euramericana*). Journal of Life Sciences, 9(3): 366-372.
- Kasim, N.E. and Rayya, A., 2009. Effect of different collection times and some treatments on rooting and chemical in terminal constituents of bitter almond hardwood cutting. Journal of Agriculture and Biological Sciences, 5(2): 116-122.
- Kollarova, K., Liskova, D., Kakoniova, D. and Lux, A., 2004. Effect of auxins on *Karwinskia humboldtiana* root cultures. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 79(2): 213-221.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R., 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics, 60(5): 197-214.
- Meng, R., Tony, H.H, chad, E.F. and Yonghai, L., 2004. Improving *in vitro* plant regeneration from leaf and petiole explants of Mario blackberry. Horticulture science, 39(2): 316-320.
- Nurulhidayah, W.A., 2012. Effect of medium strength and hormones concentration on regeneration of *Pogostemon cablin* using nodes explant. Asian Journal of Biotechnology, 4(1): 46-52.
- Rahman, M.M., Amin, M.N. and Ahmed, R., 2004. *In vitro* rapid regeneration from cotyledon expant of native olive (*Elaeocarpus robustus* Roxb.). Asian Journal Plant Science, 3(1): 31-35.
- Rajendrap, M., Ram, C., Godara, N.R. and Vijay, B., 2013. *In vitro* plant regeneration of Rose (*Rose hybrida* L.) through various explants. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, 14(3): 112-119.
- Razdan, M.K., 1993. An Introduction to Plant Tissue Culture. Oxford and IBH publishing, New Delhi, Bambey, Calcutta, 398p.
- Reed, B.M., 1996. Multiplication of *Rubus* germplasm *in vitro*: A screen of 256 accessions. Fruit Varities Journal, 44(10): 141-148.
- Ruzic, D. and Lazic, T., 2006. Micropropagation as means of rapid multiplication of newly developed Blackberry and Black currant cultivars. Agriculture Conspectus Scientificus, 71(4): 149-153.
- Weber, C.L., 2013. Propagation: 83-90. In: Funt, R.C. and Harvey, K.H. (Eds.). Raspberries. CABI, 300p.
- Zhang, L., Jiarong. L., Hogan, S., Chung, H., Gregorg, E. and Zhou, W.K., 2010. Inhibitory effect of rasberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. Food Chemistry, 11(9): 592-599.

Effects of different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* regeneration and rooting of thornless black berry (*Rubus occidentalis* L.)

Y. Ghasemi[1], F. Heidargholinezhad[2], S. Kelij[3] and M. Imani Rastabi[4*]

1- M.Sc. graduate, Horticulture Department of Sari Agriculture Science and Natural Resources University, Sari, Iran
2- Ph.D. student, Horticulture Department of Guilan University, Rasht, Iran
3- Assistant professor, Department of Biology, Mazandaran University, Babolsar, Iran
4*- Corresponding author, Ph.D. graduate, Department of Forestry, Sari Agriculture Science and Natural Resources University, Sari, Iran, E-mail: M_imani_M@yahoo.com

Received: November 2021 Revised: February 2022 Accepted: February 2022

Abstract

The thornless Black berry (*Rubus occidentalis*) contains components such as elagic acid, anthocyanin, campherol and salicylic acid. So, it has high antioxidant activity that can inactivate the free radicals and prevent many diseases, such as cancer. Optimization of tissue culture methods for mass production and gene transfer is very important for blackberry. The present study was aimed at determining the effects of different plant growth regulators concentrations on regeneration and rooting and the effects of different concentrations of sucrose on rooting of thornless black berry (*Rubus occidentalis* L.) under *in vitro* conditions. Interaction of BA (0.2, 0.5, 1, 1.5, and 2 $mg.L^{-1}$) and IBA (0 and 0.1 $mg.L^{-1}$) was investigated on lateral bud explants regeneration. In the rooting stage, the effects of IBA and NAA each at four levels of 0.2, 0.5, 0.75, and 1 $mg.L^{-1}$ as well as sucrose at four levels of 1, 1.5, 3, and 4.5% were studied. BA (1 and 1.5 $mg.L^{-1}$) + IBA (0.1 $mg.L^{-1}$) was the best regeneration treatment (regeneration: 100%, number of shoots: 4.6, and shoot length: 1.30 cm). The results indicated that the best rooting medium contained NAA (0.75 $mg.L^{-1}$) and sucrose 3 and 4.5% (rooting: 100%, number of roots: 7.5, and root length: 2.88 cm).

Keywords: Auxin, regeneration, *Rubus occidentalis*, cytokinin, tissue culture.