بررسی اثر نوع درپوش و تعداد دفعات واکشت بر باززایی مستقیم میخک (*Dianthus caryophyllus* L.)

Effect of Cultivar, Vessel Closure Type and Frequency of Subculturing on Direct Regeneration of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)

سیده مهدیه خرازی[1*]، سید حسین نعمتی[2]، علی تهرانی‌فر[3]، عبدالرضا باقری[4]، احمد شریفی[5] و مهناز آشنایی[6]

چکیده

در این مطالعه، جهت بررسی اثر نوع درپوش و تعداد دفعات واکشت بر میزان تکثیر و شیشه‌ای شدن (Vitrification) ارقام Prado Aquila Kgr و Mondeo Kgr میخک، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. ریزنمونه‌های جوانه جانبی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA کشت گردیدند. تیمارهای آزمایش شامل انواع مختلف درپوش (فویل آلومنیومی، پارافیلم، سلفون و درپوش کاغذی) و تعداد دفعات واکشت (کشت اولیه و دو مرحله واکشت) و رقم (دو رقم) بود. نتایج آزمایش نشان داد که بیش‌ترین تعداد جوانه رشد یافته در رقم Prado Aquila Kgr (۸/۴) در واکشت دوم و تیمار درپوش فویل و در رقم Mondeo Kgr در واکشت اول و تیمار درپوش پارافیلم (۸/۶) مشاهده گردید. هم‌چنین در هر دو رقم بیش‌ترین میزان شیشه‌ای شدن در واکشت دوم و تیمار درپوش فویل و کم‌ترین میزان آن در کشت اولیه ریزنمونه‌های جوانه جانبی و تیمار درپوش کاغذی مشاهده شد. با این وجود گیاهان باززایی شده در تیمار درپوش سلفونی و کاغذی کیفیت مطلوبی نداشتند اما کاربرد درپوش پارافیلم باعث افزایش باززایی گیاهچه‌ها و کاهش میزان شیشه‌ای شدن آن‌ها گردید. با توجه به اینکه گیاهچه‌های شیشه‌ای شده به علت رشد غیرطبیعی، درصد زنده‌مانی کمی دارند و طی مراحل سازگاری از بین می‌روند، بنابراین با در نظر گرفتن میزان شاخه‌زایی و میزان شیشه‌ای شدن آن‌ها، برای به دست آوردن بیش‌ترین شاخه طبیعی، کاربرد درپوش پارافیلم در واکشت اول برای رقم Mondeo Kgr و کاربرد درپوش فویل آلومینیومی در واکشت دوم برای رقم Prado Aquila Kgr توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: میخک، درپوش، واکشت، شیشه‌ای شدن، پرآوری

۱، ۲ و ۳. به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴. استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۵. عضو هیات علمی گروه کشت بافت و ریزازدیادی گیاهان جهاد دانشگاهی مشهد

۶. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*: نویسنده مسوول Email:ma_kh230@yahoo.com

مقدمه

میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) به‌عنوان سومین گل شاخه بریده مهم دنیا مطرح است که هم به جهت زیبایی و گوناگونی و هم از نظر اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. تکنیک‌های کشت‌بافت روش مناسبی را برای ریزازدیادی این گیاه زینتی فراهم کرده است. ابتدا تکنیک کشت‌بافت در میخک به منظور حذف ویروس در این گیاه مورد استفاده قرار گرفت و اکنون به عنوان روشی برای تکثیر تجاری آن درآمده است (Ali *et al*. 2008). با این وجود یکی از مشکلات متداول در طی فرایند کشت‌بافت میخک، پدیده شیشه‌ای شدن می‌باشد (Winarto *et al*. 2004).

شرایط کشت درون شیشه‌ای[1] علی رغم کنترل دقیق تمام شرایط باز هم تنش‌زا و مصنوعی است. برش ریزنمونه، ترکیب هورمونی محیط کشت، نوع آگار، نوع محیط کشت پایه و مقدار آب محیط کشت همه از عوامل ایجاد تنش می‌باشند. یکی از عوارضی که در شرایط درون شیشه‌ای در اثر تنش ایجاد می‌شود، پدیده شیشه‌ای شدن[2] می‌باشد که با علایم مورفولوژیکی نظیر برگ‌های ضخیم و شفاف و تغییرات فیزیولوژیکی مانند هیپرتروفی پارانشیم مغزی، کاهش سلول‌های نردبانی میانبرگ، کاهش تعداد دسته‌جات آوندی، اپیدرم ناقص، مقدار موم، کوتین، پکتین و سلولز اندک، واکوئل حجیم، روزنه‌های غیر عادی و کلروپلاست کم کلروفیل قابل تشخیص است. اغلب، گیاهان شیشه‌ای شده برگ‌هایی ترد و شکننده دارند و ظرفیت فتوسنتزی کم‌تری دارند، در نتیجه شانس زنده ماندن این گیاهان پس از انتقال به شرایط محیطی طبیعی کاهش می‌یابد (Hazarika and Bora 2010, Hazarika 2006, Yadav *et al*. 2003, Majada *et al*. 2001, Olmos & Hellin 1998, Altvorst *et al*. 1992).

عوامل متعددی بر پدیده شیشه‌ای شدن در شرایط درون‌شیشه‌ای موثر می‌باشند. میزان رطوبت نسبی درون ظروف کشت، پتانسیل آب محیط کشت، میزان تولید اتیلن، تعداد دفعات واکشت، نوع درپوش مورد استفاده، نوع و غلظت هورمون سیتوکنین، غلظت یون آمونیوم در محیط کشت و شدت نور همگی از جمله عوامل موثر بر این پدیده می‌باشند (Casanova *et al*. 2008, Dantas *et al*. 2001, Leshem 1988).

تغییر در شرایط محیطی کشت مانند خنک سازی، تهویه و سیستم‌های هوا دهی باعث کاهش پدیده شیشه‌ای شدن می‌شود (Debergh and Vanderschaeghe, 1990). هم چنین تهویه مناسب باعث کاهش تجمع گازهایی نظیر اتیلن و دی‌اکسیدکربن در ظروف کشت می‌گردد، این گازها در رخداد پدیده شیشه‌ای شدن موثر می‌باشند (Jackson *et al*. 1991). *روزتو* و همکاران (Rossetto *et al*. 1992) بیان کردند با هوا دهی و تهویه مناسب در محیط کشت می‌توان کشت بافت بسیاری از گیاهان، به خصوص گیاهان حساس به پدیده شیشه‌ای شدن را بهبود بخشید. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که با کاربرد این روش ساده و موثر می‌توان شاهد کاهش میزان شیشه‌ای شدن، افزایش کیفیت شاخساره‌های تکثیر یافته و افزایش سازگاری گیاهان پس از انتقال به محیط طبیعی بود. نتایج پژوهش *کاسانوا* و همکاران (Casanova *et al*. 2008) نشان داد که نوع درپوش بر میزان رطوبت نسبی درون ظروف کشت تاثیرگذار است و چنان‌چه درپوش مورد استفاده باعث افزایش میزان تهویه درون ظروف کشت گردد، شیشه‌ای شدن به میزان قابل توجهی کاهش خواهد یافت. *وینارتو* و همکاران تاثیر درپوش‌های فویل آلومینیومی، پنبه‌ای، سلفونی و پارافیلم را بر کشت درون شیشه‌ای میخک بررسی کردند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که درپوش سلفونی بهترین تاثیر را در کاهش میزان پدیده شیشه‌ای شدن داشت. این در حالی است که نتایج پژوهش *هاکارت* و *ورسلویجز* (Hakkaart and Versluijs 1983) نشان داد که کاربرد درپوش پنبه‌ای نسبت به فویل آلومینیومی و یا پارافیلم در کاهش این پدیده موثرتر است.

بیش‌ترین گزارش در ارتباط با پدیده شیشه‌ای شدن، در محیط کشت *موراشی* و *اسکوگ*[3] گزارش شده است (Tsay, 1998). زیرا این محیط کشت حاوی درصد بالایی از نیترات آمونیوم می‌باشد. علاوه بر این هنگامی که واکشت گیاهان در محیط کشت MS بیش از دو بار متوالی صورت گیرد، میزان رخداد پدیده شیشه‌ای شدن تشدید می‌شود (Vieitez *et al*. 1985). *تیسی* (1998) تاثیر تعداد دفعات واکشت را بر ریزنمونه‌های نوک شاخساره میخک بررسی کرد. نتایج پژوهش وی نشان داد که تعداد دفعات واکشت تاثیر معنی‌داری بر میزان شیشه‌ای شدن داشت، به طوری که با افزایش تعداد دفعات واکشت، شیشه‌ای شدن به میزان قابل توجهی افزایش یافت.

1. *In Vitro*
2. Vitrification
3. Murashige and Skoog

از آن‌جایی که خانواده میخک‌سانان[1] جزو گیاهان حساس به پدیده شیشه‌ای شدن می باشد، یافتن راهکاری جهت کاهش میزان این عارضه فیزیومورفولوژیک و در نتیجه افزایش میزان باززایی گیاهان از اهداف مهم کشت‌بافت میخک محسوب می‌شود (Mii *et al*. 1990). در این راستا هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر نوع درپوش و تعداد دفعات واکشت بر شاخه‌زایی مستقیم ریزنمونه‌های جوانه جانبی دو رقم میخک و تاثیر آن‌ها بر میزان شیشه‌ای شدن گیاهچه‌های تکثیر شده، است.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشی این پژوهش، ۲۰ گلدان میخک (Dianthus caryophyllus L.) شِش‌ماهه و یکنواخت از نظر رشد ارقام Prado Aquila Kgr و Mondeo Kgr (هر رقم ۱۰ گلدان) بودند که از مجتمع تولیدی توس‌گل در نزدیکی شهر جدید گلبهار تهیه و در گلخانه تحقیقاتی جهاد دانشگاهی مشهد با شرایط محیطی و تغذیه مناسب نگهداری شدند و از آن‌ها برای تهیه ریزنمونه استفاده گردید. گیاهان شاداب، عاری از بیماری و در مرحله رشد فعال انتخاب و ریزنمونه‌های جوانه جانبی به اندازه یک سانتی‌متر از آن‌ها تهیه و برای کشت آماده شدند. ریزنمونه‌ها ابتدا به‌مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری شستشو و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با محلول دو درصد هیپوکلریت‌سدیم ضدعفونی گردیدند. ریزنمونه‌های ضد عفونی شده تحت شرایط استریل ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شده و جوانه‌هایی به طول ۳ تا ۵ میلی‌متر از آن‌ها تهیه و کشت شدند.

در این بررسی از محیط کشت نیمه جامد MS (موراشی و اسکوگ) حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA[2]، ۳ درصد ساکارز، pH=۵/۷ استفاده گردید. تیمارهای آزمایش شامل انواع مختلف درپوش (فویل آلومنیومی، پارافیلم، سلفون و درپوش کاغذی) و تعداد دفعات واکشت (کشت اولیه ریزنمونه و دو مرحله واکشت ریزنمونه) و رقم (دو رقم) بود. محیط کشت‌ها در لوله‌های آزمایش به میزان ۱۳ میلی‌لیتر توزیع گردیده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردیدند. پس از کشت ریزنمونه‌ها در لوله‌های آزمایش، ریزنمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) در دمای ۲۵±۱ $^{\circ}$C منتقل شده و در فاصله زمانی هر ۴ هفته واکشت انجام شد. به این‌صورت که جوانه‌های جانبی رشد یافته بر روی ریزنمونه اولیه در محیط کشت جدید با همان ترکیب هورمونی اولیه کشت گردیدند و برای کاهش میزان خطا سعی گردید ریزنمونه‌هایی جهت واکشت انتخاب گردند که اندازه تقریبی یک سانتی‌متر را داشته باشند. در پایان هر واکشت عکس‌العمل ریزنمونه‌ها (تعداد و طول شاخه‌های باززایی شده، تعداد گره، فاصله میان‌گره و درصد شیشه‌ای شدن) مورد ارزیابی قرارگرفت. درصد شیشه‌ای شدن به صورت کیفی و با دادن نمره به ریزنمونه‌ها محاسبه گردید (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد). برای ریشه‌زایی شاخه‌های تکثیر شده از محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده شد و در نهایت گیاهان ریشه دار شده به گلدان‌های حاوی مخلوطی از ماسه، پیت و خاک باغچه به نسبت حجمی ۱:۱:۱ منتقل شدند و مراحل سازگاری در شرایط محیطی ۲۳±۲ $^{\circ}$C و ۱۶ ساعت روشنایی صورت گرفت و سپس گیاهان سازگار شده به شرایط گلخانه انتقال یافتند. این بررسی به‌صورت آزمایش فاکتوریل با ۳ فاکتور، رقم (۲ سطح)، نوع درپوش (۴ سطح) و تعداد دفعات واکشت (۲ سطح) در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. نرمال‌سازی داده‌های درصدی آزمایش (درصد شیشه‌ای شدن) با استفاده از فرمول [ArcSin Sqrt (X/100)] صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی نشان داد که اثر ساده رقم، نوع درپوش و تعداد دفعات واکشت بر تعداد جوانه رشدیافته، ارتفاع گیاهچه باززایی شده و فاصله میان‌گره در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. هم‌چنین اثرات متقابل دوگانه نوع درپوش و تعداد دفعات واکشت بر تعداد جوانه رشدیافته، ارتفاع گیاهچه باززایی شده و فاصله میان‌گره معنی‌دار بود ($P \leq ۰/۰۵$). در حالی‌که اثرات متقابل دوگانه رقم × تعداد دفعات واکشت و رقم × نوع درپوش و هم‌چنین اثرات متقابل سه گانه رقم × تعداد دفعات واکشت × نوع درپوش بر ارتفاع گیاهچه باززایی شده، شیشه‌ای شدن و فاصله میان‌گره معنی‌دار نبود (جدول ۱).

1. Caryophyllaceae
2. Naphthalene acetic acid

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر نوع درپوش، تعداد دفعات واکشت و رقم بر میانگین مربعات صفات مورد ارزیابی در کشت درون‌شیشه‌ای میخک

Table 1: ANOVA analysis for the effect of vessel closure type, number of subculturing and cultivar effects on mean square of evaluated traits of carnation in *in vitro* culture

Number of leaf	Number of node	Internode length	vitrification	Height of plantlet	Number of regenerated shoots	df	Source of variation
0.83 ns	0.20 ns	0.09 **	7441.87**	1.97 **	16.87 **	1	cultivar (A)
4.23 ns	1.05 ns	0.56 **	2548.12 *	15.44 **	188.05 **	2	number of subculturing (B)
7.05 *	1.76 *	0.03 **	6001.87 **	2.05 **	10.49 **	3	Vessel closure type (C)
3.63 ns	0.90 ns	0.006 ns	50.62 ns	0.06 ns	31.52 **	2	A*B
0.92 ns	0.23 ns	0.007 ns	781.87 ns	0.16 ns	4.69 *	3	A*C
5.78 *	1.44 *	0.02 *	500.62 ns	0.51 **	16.28 **	6	B*C
1.98 ns	0.49 ns	0.01 ns	73.12 ns	0.15 ns	8.68 **	6	A*B*C
2.11	0.52	0.007	675.00	0.11	1.49	96	error

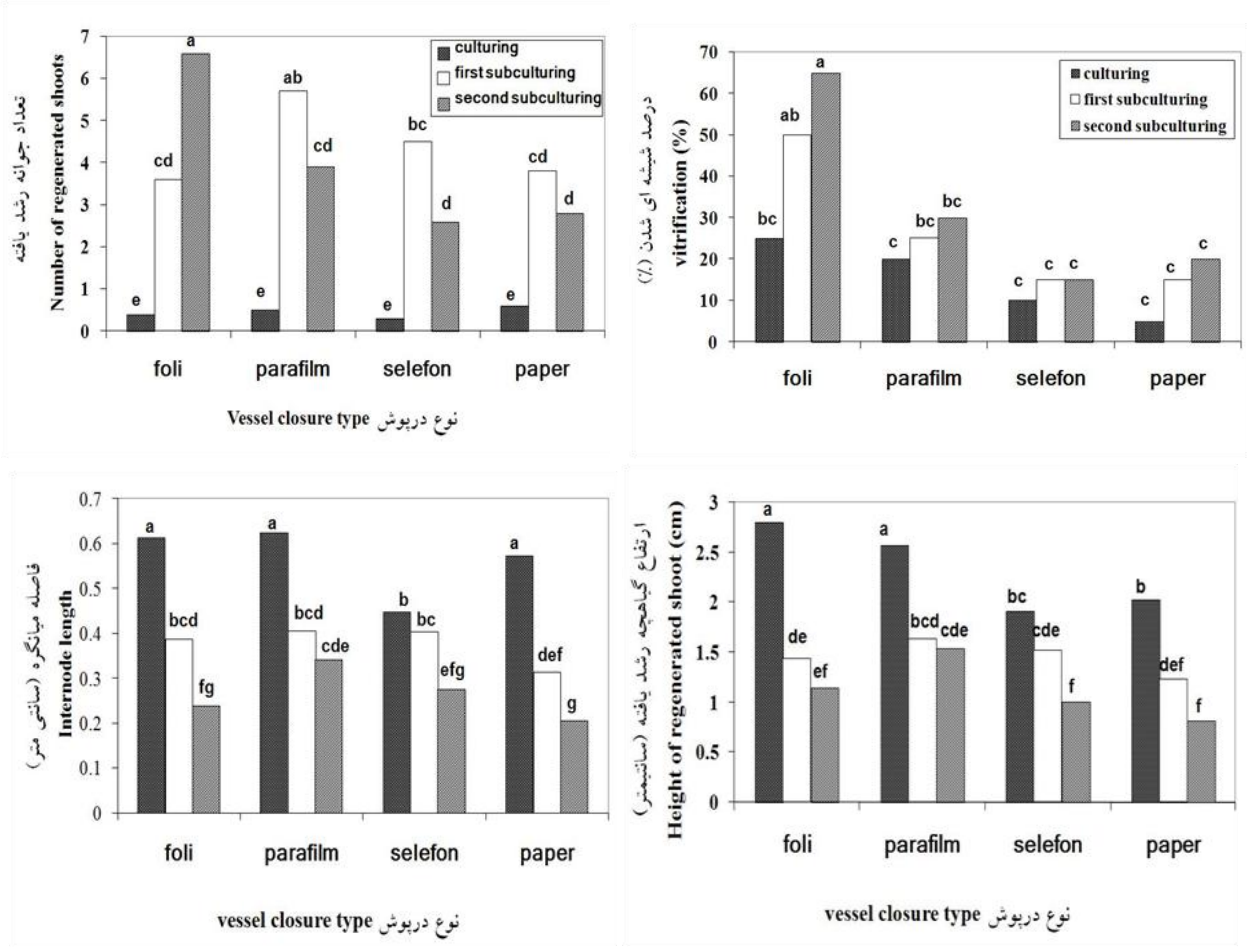
n.s، * و **: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در در سطح $\alpha= 0.05$ و $\alpha= 0.01$.

ns :Non-significant, *and **: Significant at $\alpha= 0.05$ & $\alpha= 0.01$, respectively.

مقایسه میانگین داده‌های آزمایش نشان داد که بیش‌ترین تعداد جوانه رشدیافته در واکشت دوم جوانه میخک و تیمار درپوش فویل آلومینیومی با میانگین ۶/۶ مشاهده شد. هم‌چنین بیش‌ترین میزان درصد شیشه‌ای شدن نیز در همین تیمار با میانگین ۶۵٪ مشاهده شد (شکل ۱). از آن‌جایی که پدیده شیشه‌ای شدن، یک عارضه نامطلوب در شرایط کشت بافت محسوب می‌شود، بنابراین کاربرد تیماری که بتواند باعث افزایش تعداد جوانه رشدیافته و در عین حال کاهش میزان پدیده شیشه‌ای شدن در حد قابل قبول گردد، حایز اهمیت می‌باشد. در محاسبه تعداد جوانه سالم رشدیافته این نکته نیز باید لحاظ گردد که میزان جوانه‌های رشد یافته شیشه‌ای شده از تعداد کل جوانه‌های رشدیافته کم گردد. با در نظر گرفتن این موضوع، نتایج مندرج در شکل یک نشان می‌دهد که بیش‌ترین تعداد جوانه سالم رشدیافته در تیمار درپوش پارافیلم و در واکشت اول از ریزنمونه‌های جوانه میخک به دست آمد. همان‌طور که در شکل یک مشاهده می‌شود، رابطه‌ای معکوس بین میزان شیشه‌ای شدن با ارتفاع گیاهچه باززایی شده و فاصله میان‌گره وجود دارد، به‌طوری که در اکثر تیمارهایی که میزان شیشه‌ای شدن در آن‌ها افزایش یافت، فاصله میان‌گره و هم‌چنین ارتفاع گیاهچه باززایی شده کاهش یافت.

نتایج پژوهش محققان نیز نشان می‌دهد که در گیاهان حساس به شیشه‌ای شدن، فاصله میان‌گره کاهش می‌یابد و گیاهچه‌های باززایی شده دارای ارتفاع کم‌تری نسبت به گیاهان سالم می‌باشند (Saher *et al*. 2005 and Kevers *et al*. 2004).

نوع درپوش، تعداد دفعات واکشت و رقم اثر معنی‌داری بر تعداد جوانه رشد یافته داشت ($P \leq ۰/۰۱$). مقایسه میانگین داده‌های آزمایش نشان داد که در رقم Prado Aquila Kgr بیش‌ترین تعداد جوانه جانبی رشد یافته (۸/۴) در واکشت دوم و تیمار درپوش فویل و کم‌ترین میزان آن (صفر) در کشت ریزنمونه‌های جوانه جانبی و تیمارهای درپوش فویل، سلفون و کاغذی مشاهده شد. در صورتی‌که نتایج به‌دست آمده در رقم Mondeo Kgr متفاوت از رقم Prado Aquila Kgr بود، به‌طوری‌که بیش‌ترین و کم‌ترین میزان آن به‌ترتیب در واکشت اول و تیمار درپوش پارافیلم (۸/۶) و کشت ریزنمونه‌های جوانه جانبی و تیمار درپوش سلفون (۰/۶) مشاهده گردید. با این وجود بین انواع مختلف درپوش در کشت اولیه ریزنمونه‌های جوانه جانبی از نظر میزان باززایی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). هم‌چنین نتایج مندرج در جدول ۲ نشان می‌دهد که در هر دو رقم، در واکشت اول تعداد شاخه تولید شده نسبت به کشت ریزنمونه‌های گل‌خانه‌ای افزایش قابل توجهی داشت.



شکل ۱: مقایسه میانگین اثر متقابل نوع درپوش و تعداد دفعات واکشت بر برخی پارامترهای رشدی میخک در شرایط درون شیشه‌ای

Fig 1: Mean comparison of vessel closure type and number of subculturing effects on some growth characteristic of carnation in *in vitro* culture.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های شیشه‌ای شدن نشان داد که بین ارقام مختلف میخک از نظر میزان شیشه‌ای شدن اختلاف معنی‌داری (در سطح احتمال ۱ درصد) وجود دارد، به‌طوری‌که در تمامی تیمارهای به‌کار رفته، میزان شیشه‌ای شدن در رقم Mondeo Kgr نسبت به رقم Prado Aquila Kgr بیش‌تر بود (جدول ۲). چنین به‌نظر می‌رسد که رقم Mondeo Kgr، یک رقم حساس به شیشه‌ای شدن و رقم Prado Aquila Kgr، رقمی متحمل به این پدیده می‌باشند. نتایج مندرج در جدول ۲ نشان می‌دهد که میانگین بیش-ترین و کم‌ترین درصد شیشه‌ای شدن در هر دو رقم در تیمارهای مشابهی مشاهده گردید، به‌طوری‌که در هر دو رقم بیش‌ترین میزان شیشه‌ای شدن در واکشت دوم و تیمار درپوش فویل (Mondeo Kgr با میانگین ۸۰٪ و Prado Aquila Kgr با میانگین ۵۰٪) و کم‌ترین میزان آن در کشت اولیه ریزنمونه‌های جوانه جانبی و تیمار درپوش کاغذی (Mondeo Kgr با میانگین ۱۰٪ و Prado Aquila Kgr با میانگین ۰٪) مشاهده شد.

با این وجود گیاهان باززایی شده در تیمار درپوش سلفون و کاغذی کیفیت مطلوبی نداشتند و به‌علت تبادلات گازی زیاد، این گیاهان رطوبت خود را به سرعت از دست دادند. اما کاربرد درپوش پارافیلم به‌علت داشتن تبادلات گازی مطلوب باعث افزایش باززایی گیاهچه‌ها و کاهش میزان شیشه‌ای شدن در حد مطلوب گردید. *وینارتو* و همکاران (2004) اثر درپوش‌های فویل آلومینیومی، پنبه‌ای، سلفونی و پارافیلم را بر کشت درون شیشه‌ای میخک بررسی کردند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که درپوش سلفونی بهترین تاثیر را در کاهش میزان شیشه‌ای شدن شاخه‌های تکثیر شده داشت. این در حالی است که نتایج پژوهش *هاکارت و ورسلویجز* (1983) نشان داد که کاربرد درپوش پنبه‌ای نسبت به فویل آلومینیومی و یا پارافیلم در کاهش میزان این پدیده موثرتر بوده است. نتایج پژوهش حاضر با نتایج *وینارتو* و همکاران (2004) از نظر تاثیر نوع درپوش بر میزان شیشه‌ای شدن مطابقت دارد. ولی با این وجود درپوش سلفون جهت کاهش میزان شیشه‌ای شدن توصیه نمی‌گردد.

جدول ۲: مقایسه میانگین اثرات متقابل سه گانه رقم، درپوش و تعداد دفعات واکشت بر میزان باززایی و درصد شیشه‌ای شدن در ریزنمونه‌های میخک

Table 2: Mean comparison of cultivar, vessel closure type and number of subculturing effects on regeneration and vitrification of carnation explants

Vitrification (%)			Number of regenerated shoots			vessel closure	Cultivar
Second subculturing	First subculturing	culturing	Second subculturing	First subculturing	culturing		
50 abc	30 bcd	10 cd	8.4 a	2.6 c-g	0.0 h	Foil	Prado Aquila Kgr
20 cd	20 cd	10 cd	4.6 bc	2.8 b-g	0.2 h	Parafilm	
10 cd	10 cd	0 d	2.2 d-h	4.0 bcd	0.0 h	Selefon	
20 cd	10 cd	0 d	2.8 b-g	3.2 b-e	0.0 h	Paper	
80 a	70 ab	40 bcd	4.8 bc	4.6 bc	۰/۸ fgh	Foil	Mondeo Kgr
40 bcd	30 bcd	30 bcd	3.2 b-e	8.6 a	۰/۸ fgh	Parafilm	
20 cd	20 cd	20 cd	3.0 b-f	5.0 b	۰/۶ gh	Selefon	
20 cd	20 cd	10 cd	2.8 b-g	4.4 bcd	۱/۲ e-h	Paper	

زیرا به‌علت تبادلات گازی زیاد و تبخیر سریع آب محیط کشت، گیاهان در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرند و برای رفع این مشکل، تنها راه‌کار کوتاه کردن فواصل دفعات واکشت می‌باشد که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست.

با افزایش تعداد دفعات واکشت شرایط فیزیولوژیکی گیاه به‌نحوی تغییر می‌کند که توانایی غلبه بر شرایط کشت بافت را نداشته و درصد شیشه‌ای شدن افزایش می‌یابد. نتایج پژوهش *ویتز* و همکاران (1985) نیز نشان داد که شیشه‌ای شدن زمانی اتفاق می‌افتد که واکشت گیاهان در محیط کشت MS بیش از دو بار متوالی صورت گیرد زیرا با افزایش میزان شیشه‌ای شدن، میزان لگنینی شدن بافت‌ها کاهش می‌یابد. *تیسی* (1998) کاهش تعداد دفعات واکشت را در کشت ریزنمونه‌های نوک شاخساره میخک پیشنهاد کرد. نتایج پژوهش وی نشان داد که با افزایش تعداد دفعات واکشت تا چهار مرتبه میزان پدیده شیشه‌ای شدن به میزان قابل توجهی افزایش یافته و ریزنمونه‌هایی که به تعداد دفعات کم‌تری واکشت شده بودند، از نظر خصوصیات ظاهری دارای کیفیت مطلوب‌تری بودند و شانس بیش‌تری برای کاهش رخداد پدیده شیشه‌ای شدن داشتند.

بر اساس نتایج این پژوهش و هم‌چنین گزارش‌های سایر پژوهش‌گران می‌توان بیان نمود که از عوامل موثر در ریزازدیادی میخک رقم، نوع درپوش و تعداد دفعات واکشت می‌باشد. در این پژوهش بین دو رقم میخک از نظر تکثیر (تعداد شاخساره باززایی شده و درصد شیشه‌ای شدن) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. چنین به نظر می‌رسد که رقم Mondeo Kgr، یک رقم حساس به شیشه‌ای شدن و رقم Prado Aquila Kgr ، رقمی متحمل به این پدیده می‌باشند.

هم‌چنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزایش تعداد دفعات واکشت، باعث افزایش میزان شیشه‌ای شدن گردید. با توجه به این‌که گیاهچه‌های شیشه‌ای شده به‌علت رشد غیر طبیعی، درصد زنده‌مانی کمی دارند و طی مراحل سازگاری از بین می‌روند، لذا در مراحل پرآوری میخک توجه به میزان شاخه تکثیر شده و درصد شیشه‌ای شدن آن‌ها اهمیت زیادی دارد. بنابراین با در نظر گرفتن میزان شاخه‌زایی و میزان شیشه‌ای شدن آن‌ها، برای به‌دست آوردن بیش‌ترین شاخه طبیعی، در رقم Mondeo Kgr توصیه می‌گردد کشت نمونه‌ها تا واکشت دوم ادامه یابد و بهترین درپوش پارافیلم است و در رقم Prado Aquila Kgr توصیه می‌گردد کشت نمونه‌ها تا واکشت اول ادامه یابد و بهترین درپوش فویل آلومینیومی است (جدول ۲).

شاخساره‌های شیشه‌ای شده به علت رشد غیر طبیعی قادر به ریشه‌زایی نبودند، لذا در ریشه‌زایی تنها از شاخساره‌های نرمال تکثیر شده استفاده گردید. با انتقال گیاهچه‌های نرمال به محیط کشت ریشه‌زایی، ریشه‌زایی پس از ۲۰ روز صورت گرفت و ۹۰ درصد از شاخه‌های تکثیر شده، ریشه‌دار شدند. گیاهان ریشه‌دار شده پس از انتقال به شرایط گل‌خانه به میزان ۹۵ درصد سازگاری نشان دادند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از گروه پژوهشی کشت‌بافت گیاهی جهاد دانشگاهی مشهد جهت فراهم آوردن امکانات لازم جهت انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می گردد.

Effect of Cultivar, Vessel Closure Type and Frequency of Subculturing on Direct Regeneration of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)

Kharrazi[1*], M., Nemati[2], S. H., Tehranifar[3], A., Bagheri[4], A., Sharifi[5], A. and Ashnayi[6], M.

Abstract

In order to study the effect of vessel closure type and number of subculturing on the rate of proliferation and vitrification of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars (Mondeo Kgr and Prado Aquila Kgr), an experiment was conducted as factorial in completely randomized design with 5 replications. Lateral bud explants were cultured on MS medium supplemented with 2 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA. Treatments were comprised of vessel closure type (foil, parafilm, selefon and paper), number of subculturing (culturing of explants and 2 stage of subculturing) and cultivar. Results showed that the highest amount of regenerated shoots was observed in second subculturing and foil closure for Prado Aquila Kgr (8.4) and in first subculturing and parafilm closure for Mondeo Kgr (8.6). Also in both cultivars the highest percentage of vitrification were observed in second subculturing and foil closure and the lowest of vitrification was observed in first culturing of lateral buds and paper closures. However, regenerated plants in selefon and paper closures had no good quality. But application of parafilm closure leads to increasing the rate of regeneration and reducing vitrification. Because of abnormal growth, vitrified plantlets have low percentage of surviving and they fail to acclimatized, so by considering the amount of multiplication and vitrification for obtaining the highest number of shoots, application of parafilm closure in first subculturing and foil closure in second subculturing of Mondeo Kgr and Prado Aquila Kgr is suggested, respectively.

Keywords: Carnation, Vessel closure, Subculturing, Vitrification, Proliferation

References

Ali, A., Afrasiab, H., Naz, S., Rauf, M. and Iqhbal, J. 2008. An efficient protocol for *in vitro* propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Pakistan Journal of Botany 40: 111-121.

Altvorst, A. G., Koehorst, H. J. J., Bruinsma, T., Jansen, J., Custers, J. B. M., Jong, J. and Dons, J. J. M. 1992. Adventitious shoot formation from *in vitro* leaf explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Scientia Horticulturae 51: 223-235.

Casanova, E., Moyyset, L. and Trillas, M. I. 2008. Effect of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. Biological Plantarum 52(1): 1-8.

Dantas de Oliveira, A. K., Majada, J. P., Fernandez, B. and Canal, M. J. 2001. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions. Plant Growth Regulation 32: 237-243.

Debergh, P. and Vanderschaeghe, A. 1990. Mass propagation of in vitro plantlets. Chronica Hortic. 30:1-2.

Hakkaart, F. A. and Versluijs, J. M. A. 1983. Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. Netherlands Journal of Plant Pathology 89:47-53.

Hazarika, B. N. and Bora, A. 2010. Hyperhydricity – a bottleneck to micropropagation of plants. Acta Horticulturea 865: 95-102.

Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. Scientia Horticulturae 108: 105-120.

Jackson, M. B., Abbott, A. J. and Belcher, A. R. 1991. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. Annals of Botany 67:229-237.

Kevers, C., Franck, T., Strasser, R. J., Dommes, J. and Gaspar, T. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. Plant Cell Tissue and Organ Culture 77: 181-191.

Leshem, B. 1988. Cytokinin : the primary inducer of vitrification. Agricell Report 10: 46.

Majada, J. P., Sierra, M. I. and Sanchez-Tames, R. 2001. Air exchange rate affects the in vitro developed leaf cuticle of carnation. Scientia Horticulturae 87: 121-130.

1, 2 and 3. MSc Student, Assistant Professor and Associate Professor Respectively, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

4. Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

5. Faculty member of Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Branch of Mashhad

6. Former MSc. Student, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

*. Corresponding Author Email: ma_kh230@yahoo.com

Mii, M., Buiatti, M. and Gimelli, F.1990. Carnation. In Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R., Bajaja, Y.P.S. (eds.) Handbook of Plant Cell Culture.V.5. Ornamental species. McGraw-Hill Publishing Company, New York. pp. 284-318.

Olmos, E. and Hellin, E. 1998. Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. Scientia Horticulturae 75:91-101.

Rossetto, M., Dixon, K. W. and Bunn, E. 1992. Aeration: A simple method to control vitrification and improve in vitro culture of rare Australian plants. In Vitro Cellular & Developmental Biology 28: 192-196.

Saher S., Fernandez-Garcia N., Piqueras A., Hellin, E. and Olmos, E. 2005. Reducing properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured in vitro: a hypoxia stress? Plant Physiology and Biochemistry 43: 573-582.

Tsay, H. 1998. Effect of medium composition at different recultures on vitrification of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro* shoot proliferation. Acta Horticulture 461: 243-249.

Vieitez, A. M., Ballester, A., San-Jose, C. and Vieitez, E. 1985. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated in vitro. Physiologica Plantarum 65:177-184.

Winarto, B., Aziz, M. A., Rashid, A. A. and Ismail, M. R. 2004. Effect of permeable vessel closure and gelling agent on reduction of hyperhydricity in *in vitro* culture of carnation. Indonesian Journal of Agricultural Science 5(1):11-19.

Yadav, M. K., Gaur, A. K. and Garg, G. K. 2003. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72: 153-156.