بهینه‌سازی کشت نوک شاخساره میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) در شرایط درون‌شیشه‌ای

Optimization of Shoot Tip Culture of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Under *In Vitro* Conditions

سیده مهدیه خرازی[1*]، سیدحسین نعمتی[2]، علی تهرانی‌فر[3]، عبدالرضا باقری[4] و احمد شریفی[5]

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۱۳

چکیده

استقرار اولیه ریزنمونه نوک شاخساره یکی از مهم‌ترین مراحل کشت‌بافت می‌باشد که در این مرحله به‌علت کوچک بودن ریزنمونه، درصد شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و در نتیجه عدم استقرار آنها بالا می‌باشد. به‌منظور بررسی تأثیر اندازه ریزنمونه و نوع تنظیم‌کننده رشد بر کشت نوک شاخساره میخک، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل اندازه‌های مختلف نوک شاخساره (۰/۴، ۰/۷ و ۱ میلی‌متر) و محیط‌کشت MS حاوی یکی از تنظیم‌کننده‌های رشدی (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین(BA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک (GA_3) و محیط‌کشت فاقد هورمون بودند. نتایج نشان داد که اندازه ریزنمونه و نوع تنظیم‌کننده رشد تأثیر معنی‌داری بر میزان شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها داشت و بیشترین میزان آن (۵۹/۳٪) در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و در ریزنمونه با اندازه ۰/۴ میلی‌متر و کمترین میزان آن (۰٪) در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و در ریزنمونه با اندازه ۱ میلی‌متر مشاهده شد. کاربرد هورمون BA در محیط‌کشت باعث کاهش ارتفاع، افزایش وزن خشک شاخساره، عرض برگ، تعداد جوانه باززایی شده و شاخص سطح برگ شد ولی با این حال باعث افزایش پدیده شیشه‌ای شدن نیز شد و در نتیجه کیفیت گیاهان حاصل کاهش یافت. درصورتی‌که هورمون GA_3 باعث افزایش ارتفاع، افزایش طول برگ و کاهش عرض برگ شد و گیاهان رشد یافته ظاهری سالم داشتند. در محیط‌کشت فاقد هورمون، گیاهان استقرار یافته رشد مطلوبی را از خود نشان ندادند و پس از مدتی رشد آنها متوقف شد. در مرحله استقرار ریزنمونه، کیفیت گیاهچه حاصل نقش اساسی در مراحل پرآوری دارد و تعداد جوانه باززایی شده از اهمیت کمتری برخوردار است، بنابراین محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک و ریزنمونه با اندازه یک میلی‌متر جهت استقرار ریزنمونه نوک شاخساره میخک توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: میخک، اسیدجیبرلیک، بنزیل‌آدنین، نوک شاخساره، اندازه ریزنمونه

۱، ۲ و۳. به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۴. استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۵. عضو هیات علمی گروه کشت بافت و ریزازدیادی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد
*: نویسنده مسوول Email: ma_kh230@yahoo.com

مقدمه

گیاه میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) از مهم‌ترین گونه‌های جنس *Caryophyllaceae* می‌باشد که به جهت دارا بودن گل‌های بسیار زیبا و جذاب برای تولید گل شاخه بریده مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد. اهمیت و جایگاه گل میخک در میان گیاهان زینتی (سومین گل شاخه بریده مهم دنیا) در حدی است که لزوم استفاده از روش‌های نوین جهت نیل به اهداف اقتصادی را ایجاب می‌کند (*کانوار و کومار*، Kanwar and Kumar 2009؛ *علی* و همکاران، Ali *et al*, 2008 ؛ *صالحی*، Salehi, 2006).

روش سنتی افزایش میخک از طریق جداکردن جوانه‌های جانبی رشد یافته بر گیاه مادری و کشت آنها در بسترهای ریشه زایی به‌عنوان قلمه می‌باشد (*جواهرلال* و همکاران؛ Jawaharhal *et al*, 2010). با توجه به اینکه سرعت تکثیر میخک با روش‌های سنتی کم است و نیز امکان انتقال بیماری‌ها با روش‌های سنتی تکثیر وجود دارد و با عنایت به اینکه با روش‌های کشت درون‌شیشه‌ای امکان انتقال بیماری‌ها حداقل بوده و سرعت تکثیر بالا می‌باشد و در عین‌حال نیاز به مواد گیاهی به‌عنوان پایه مادری حداقل می‌باشد (*جواهرلال* و همکاران، 2010؛ *صالحی*، 2006)، لذا بهینه نمودن شرایط کشت درون‌شیشه‌ای این گیاه زینتی ضروری به‌نظر می‌رسد تا بتوان از آن به‌عنوان مقدمه‌ای برای ارائه پروتکل ارقام تجاری این گیاه در کشور استفاده نمود و از این طریق از خروج ارز جهت ورود پایه‌های آن از کشور جلوگیری نمود.

استقرار اولیه ریزنمونه‌ها یکی از مهم‌ترین مراحل کشت بافت می‌باشد. در واقع موفقیت در استقرار ریزنمونه‌ها، تضمینی برای ادامه کار جهت پرآوری مطلوب می‌باشد (*سلامی* و همکاران، ۱۳۸۴؛ *کهریزی* و همکاران، Kahrizi *et al*, 2007). از طرفی در مرحله استقرار ریزنمونه نوک شاخساره، به‌علت کوچک بودن ریزنمونه، درصد شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و در نتیجه عدم باززایی آنها بالا می‌باشد. عارضه شیشه‌ای شدن در واقع ایجاد نوعی تغییرات نامطلوب فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در بافت‌های گیاهی می‌باشد. در گیاهان شیشه‌ای شده تعداد دسته‌جات‌آوندی، سلول‌های روزنه و سلول‌های کوتیکول برگ کاهش می‌یابد و سلول‌های مزوفیل برگ دارای واکوئل حجیمی می‌شوند. در این گیاهان برگ‌ها پهن، ضخیم، ترد و شکننده می‌باشند و ظرفیت فتوسنتزی آنها کاهش می‌یابد و در نتیجه شانس زنده‌مانی این گیاهان پس از انتقال به شرایط محیطی طبیعی کاهش می‌یابد (*الموس و هلین*، Olmos & Hellin, 1998؛ *ماجادا* و همکاران، Majada *et al*, 2001؛ *یاداو* و همکاران، Yadav *et al*, 2003؛ *کِورس* و همکاران، Kevers *et al*, 2004؛ *ساحر* و همکاران، Saher *et al*, 2005).

استقرار مطلوب ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت تحت تاثیر فاکتورهای مختلفی از جمله ترکیب محیط‌کشت و اندازه مناسب ریزنمونه اولیه قرار می‌گیرد (*فایک* و همکاران، Fayek *et al*, 2009؛ *سلامی* و همکاران، ۱۳۸۴). رشد و تمایز ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت تحت کنترل هورمونی است و حضور هورمون جهت استقرار ریزنمونه‌ها و رشد مطلوب بعدی آنها ضروری است (*شابد و موراشیگ*، Shabde and Murashige 1977). در اکثر گزارش‌های موجود، از ترکیبات هورمونی مختلف چون سیتوکینین‌ها به‌خصوص هورمون بنزیل‌آدنین به تنهایی یا همراه با اکسین جهت استقرار ریزنمونه نوک شاخساره استفاده گردیده است و کمتر به کاربرد هورمون اسیدجیبرلیک در کشت ریزنمونه نوک شاخساره اشاره شده است (*کالاک* و همکاران، Kalak *et al*, 1996؛ *علی* و همکاران، 2008؛ *فایک* و همکاران، 2009). این در حالی است که کاربرد هورمون بنزیل‌آدنین در ترکیب محیط‌کشت باعث کاهش فاصله میان‌گره و ارتفاع گیاهچه باززایی شده و در نتیجه افزایش پدیده شیشه‌ای شدن و کاهش درصد باززایی می‌گردد (*پاکوئس*، Paques 1991؛ *هازاریکا و بورا*، Hazarika and Bora, 2010). از آنجایی که هورمون اسیدجیبرلیک میزان رشد طولی و فاصله میان‌گره را افزایش می‌دهد (*داگنینو* و همکاران؛ Dagnino *et al*. 1991)، بنابراین می‌توان انتظار داشت که در کاهش پدیده شیشه‌ای‌شدن در کشت ریزنمونه نوک شاخساره موثر واقع گردد.

در این راستا هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر اندازه ریزنمونه و نوع تنظیم‌کننده رشد بر کشت ریزنمونه نوک شاخساره میخک و تأثیر آن بر میزان شیشه‌ای‌شدن گیاهچه‌های تکثیر شده، بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش میخک رقم Prado Aquila Kgr از مجتمع تولیدی توس‌گل در نزدیکی شهر جدید گل‌بهار تهیه و در گلخانه تحقیقاتی جهاد دانشگاهی مشهد با شرایط محیطی و تغذیه مناسب نگهداری و از آن برای تهیه ریزنمونه استفاده شد. گیاهان شاداب، عاری از بیماری و در مرحله رشد فعال انتخاب و ریزنمونه‌های جوانه انتهایی به اندازه ۱ سانتی‌متر از آنها تهیه و برای کشت آماده شدند. ریزنمونه‌ها ابتدا به‌مدت ۳۰ دقیقه در زیر

آب جاری شستشو و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با محلول دو درصد هیپوکلریت‌سدیم ضدعفونی گردیدند. ریزنمونه‌های ضدعفونی شده تحت شرایط استریل ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شده و نوک شاخساره‌هایی به اندازه‌های مختلف (۰/۴، ۰/۷ و ۱ میلی‌متر) از آنها تهیه و کشت گردیدند.

در این بررسی از محیط‌کشت جامد MS (*موراشیگ و اسکوگ*، Murashige and Skoog 1962) فاقد هورمون، محیط‌کشت حاوی ۰/۵میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) و محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک (GA_3)، ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار، pH=۵/۷ استفاده گردید. محیط‌کشت‌ها در لوله‌های آزمایش به میزان ۱۳ میلی‌لیتر توزیع گردیده و به‌مدت 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 ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شده و در فاصله زمانی هر ۴ هفته واکشت انجام شد. در پایان هر واکشت عکس‌العمل ریزنمونه‌ها (تعداد و طول شاخه‌های باززایی شده، درصد شیشه‌ای شدن، طول و عرض برگ‌های رشد یافته، وزن خشک اندام هوایی، درصد ریشه‌زایی و سطح برگ) مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت گیاهان ریشه‌دار شده به گلدان‌های حاوی مخلوطی از ماسه، پیت و خاک باغچه با نسبت حجمی ۱:۱:۱ منتقل شدند و مراحل سازگاری در شرایط محیطی ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی صورت گرفت و سپس گیاهان سازگار شده به شرایط گلخانه انتقال یافتند. این بررسی به‌صورت آزمایش فاکتوریل با ۲ فاکتور نوع تنظیم‌کننده رشد (۳ سطح شامل محیط‌کشت فاقد هورمون، محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3) و اندازه ریزنمونه (۳ سطح شامل ۰/۴، ۰/۷ و ۱ میلی‌متر) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. نرمال‌سازی داده‌های درصدی آزمایش (درصد شیشه‌ای شدن و درصد ریشه‌دهی) با استفاده از فرمول [ArcSin√(X/100)] صورت گرفت (*صالحی*، 2006).

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که اثرات متقابل اندازه ریزنمونه و نوع تنظیم کننده رشد بر میزان شیشه‌ای شدن، ارتفاع گیاهچه و میزان ریشه‌دهی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود، در حالی‌که اثرات متقابل آنها بر تعداد جوانه باززایی شده معنی‌دار نبود (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌های آزمایش نشان داد که بیشترین تعداد جوانه رشد یافته (۵/۱) در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ریزنمونه با اندازه ۱ میلی‌متر حاصل شد. بین اندازه‌های مختلف ریزنمونه در محیط‌کشت حاوی BA اختلاف معنی‌داری از این لحاظ مشاهده نشد ولی با این حال در محیط‌کشت حاوی BA، افزایش اندازه ریزنمونه باعث افزایش میزان باززایی ریزنمونه‌ها شد. همچنین در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد باززایی صورت نگرفت و تنها خود ریزنمونه اولیه رشد یافت (شکل ۱- د).

فایک و همکاران (2009) در تحقیقی تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون BA را بر دو اندازه مختلف ریزنمونه نوک شاخساره انگور بررسی کردند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که اندازه ریزنمونه تأثیر معنی‌داری بر تعداد شاخساره باززایی شده داشت، به‌طوری‌که با افزایش اندازه آن از ۰/۵ به ۱ میلی‌متر، تعداد شاخساره باززایی شده از ۳/۹ به ۸/۳ افزایش یافت. *شابد و موراشیگ* (1977) گزارش کردند که ریزنمونه مریستم و همچنین ریزنمونه مریستم حاوی یک جفت سرآغازه‌های برگی در محیط‌کشت بدون هورمون قادر به رشد نخواهد بود. ولی چنانچه ریزنمونه مریستم حاوی دو جفت سرآغازه‌های برگی همراه با یک جفت برگ‌های اولیه باشد، تولید گیاه کامل صورت خواهد گرفت. بنابراین حضور بافت کوچکی از ساقه و سرآغازه‌های برگی جهت تأمین منبع هورمونی در کشت ریزنمونه مریستم ضروری است. ولی چنانچه سرآغازه‌های برگی حضور نداشته باشد، استفاده از منبع خارجی اکسین و سیتوکینین ضروری به‌نظر می‌رسد.

جدول۱: تجزیه واریانس اثر نوع تنظیم‌کننده رشد و اندازه ریزنمونه بر میانگین مربعات صفات مورد ارزیابی در کشت نوک شاخساره میخک

Table 1: ANOVA analysis for the effect of growth regulators and explant size on mean square of evaluated traits during shoot tip culture of carnation

منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	تعداد جوانه رشد یافته Number of regenerated shoots	ارتفاع گیاهچه Height of plantlet	شیشه‌ای شدن Vitrification	فاصله میانگره Internode length	تعداد گره Number of node	تعداد برگ Number of leaf	سطح برگ leaf area	طول برگ Leaf length	عرض برگ Leaf width	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	درصد ریشه‌زایی Rooting percentage
نوع هورمون Type of hormone (A)	2	112.02 **	12.96 **	14085.00 **	0.33 **	88.95 **	355.82 **	176.86 **	517.13 **	8.20 **	1217.10 **	23220.00 **
اندازه ریزنمونه Explant size (B)	2	0.42 ns	4.21 **	1665.00 *	0.10 **	3.62 ns	14.48 ns	9.31 **	46.48 **	1.16 **	26.69 *	3780.00 *
نوع هورمون ×اندازه ریزنمونه A × B	4	0.42 ns	0.62 **	45.00 ns	0.007 ns	1.55 ns	6.22 ns	1.97 **	10.14 **	0.17 *	3.39 ns	1080.00 ns
خطا Error	36	5.73	0.14	450.00	0.01	2.31	9.24	0.12	1.15	0.05	8.14	900.00

n.s، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در در سطح $\alpha= 0.05$ و $\alpha= 0.0$

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

نتایج پژوهش *داگنینو* و همکاران (1991) بر کشت نوک شاخساره سیب‌زمینی شیرین نشان داد که کاربرد هورمون اسیدجیبرلیک باعث تولید شاخساره‌های متعدد از ریزنمونه می‌گردد، در حالی‌که پژوهش‌های انجام شده بر گیاه سنبل، کاسنی، تنباکو نشان می‌دهد که کاربرد این هورمون مانع تشکیل شاخساره‌های نابه‌جا می‌شود و تنها رشد طولی ریزنمونه را افزایش می‌دهد (پیئریک، Pierik, 1987). نتایج این پژوهش نیز نشان داد که هورمون اسیدجیبرلیک رشد طولی ریزنمونه را تسریع می‌کند و تاثیری بر شاخساره‌زایی آن ندارد و آنچه که مسلم است در کشت ریزنمونه نوک شاخساره استقرار ریزنمونه نسبت به پرآوری آن از اهمیت بیشتری برخوردار است.

از لحاظ میزان شیشه‌ای شدن نیز بیشترین میزان شیشه‌ای شدن (۵۹/۳٪) در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ریزنمونه با اندازه ۰/۴ میلی‌متر و کمترین میزان آن (۰٪) در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ریزنمونه با اندازه ۱ میلی‌متر مشاهده شد و به‌طور کلی در تمامی اندازه ریزنمونه‌ها بیشترین میزان شیشه‌ای شدن در محیط‌کشت حاوی بنزیل‌آدنین مشاهده شد (شکل ۱- ج).

نتایج پژوهش *فان* (Phan, 1991) نشان داد که چنانچه حجم اتیلن در ظروف کشت بالا باشد و یا محیط‌کشت مایع جهت کشت ریزنمونه‌ها مورد استفاده قرار گیرد، رخداد پدیده شیشه‌ای شدن تحریک نمی‌شود. بلکه حضور هورمون BA در محیط‌کشت است که این پدیده را تحریک می‌کند. *لشم* (Leshem, 1988) گزارش کرد که پدیده شیشه‌ای‌شدن تنها در حضور هورمون سیتوکنین اتفاق می‌افتد. زمانی‌که سایر عوامل موثر بر پدیده شیشه‌ای شدن نظیر غلظت پایین آگار، رطوبت نسبی بالا و غلظت زیاد یون آمونیوم حضور داشته باشند، در صورت عدم‌حضور هورمون سیتوکینین، پدیده شیشه‌ای‌شدن تحریک نمی‌شود. نتایج این تحقیق نیز نشان داد که کاربرد هورمون BA باعث تحریک پدیده شیشه‌ای‌شدن شد.

بر اساس نتایج مندرج در شکل ۱- ج می‌توان بیان نمود که عموماً با کاهش اندازه ریزنمونه، میزان پدیده شیشه‌ای‌شدن افزایش یافت. از سوی دیگر به‌علت تغییرات فیزیومورفولوژیک نامطلوبی که در گیاهان شیشه‌ای‌شده روی می‌دهد، حساسیت این گیاهان به شرایط درون‌شیشه‌ای افزایش می‌یابد و درصد بالایی از آنها قابل انتقال به مرحله پرآوری نخواهند بود. بنابراین اندازه ریزنمونه در استقرار آن نقش تعیین‌کننده‌ای دارد. کشت ریزنمونه‌های کوچک دشوار است و ریزنمونه‌های بزرگتر احتمالاً به دلیل برخورداری از مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی برای کشت مناسب‌تر هستند (*باقری و آزادی*؛ ۱۳۸۱).

جین و همکاران (Jain *et al*, 2001) گزارش کردند که عدم کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط‌کشت سبب افزایش تشکیل تعداد شاخساره‌های سالم می‌شود، این درحالی است که محیط‌کشت حاوی BA منجر به شیشه‌ای‌شدن ریزنمونه‌ها می‌شود. نتایج پژوهش آنها نشان داد که کاربرد محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک توانست میزان شیشه‌ای‌شدن را تا حدود زیادی کاهش دهد ولی برطرف شدن کامل این پدیده در محیط‌کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک و یا محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک همراه با ۵ گرم در لیتر باکتوپپتون مشاهده شد.

جین و همکاران (Jain *et al*, 1997) نیز بیان کردند کاربرد هورمون اسیدجیبرلیک تأثیر مطلوبی بر کاهش پدیده شیشه‌ای‌شدن داشت و کاربرد آن بر گیاهچه‌های میخک شیشه‌ای شده، باعث برطرف شدن این پدیده شد. از سوی دیگر *کیم* و همکاران (Kim *et al*, 1988) گزارش کردند که کاربرد هورمون اسیدجیبرلیک میزان رشد را افزایش می‌دهد ولی تأثیری بر کاهش میزان شیشه‌ای شدن و افزایش تشکیل گیاهچه‌های سالم ندارد. نتایج پژوهش حاضر با نتایج *جین* و همکاران (2001) و *جین* و همکاران (1997) مطابقت دارد و با نتایج *کیم و همکاران* (1988) مغایر می‌باشد. چرا که در این پژوهش کاربرد هورمون اسیدجیبرلیک تاثیر مطلوبی بر کاهش پدیده شیشه‌ای‌شدن داشت.

مقایسه میانگین داده‌های آزمایش نشان داد که اندازه ریزنمونه و نوع تنظیم‌کننده رشد تأثیر معنی‌داری بر ارتفاع گیاهچه داشتند، به‌طوری‌که بیشترین ارتفاع گیاهچه (۲/۹۰ سانتی‌متر) در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتراسیدجیبرلیک و ریزنمونه با اندازه ۱ میلی‌متر و کمترین میزان آن (۰/۳۶ سانتی‌متر) در محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد و ریزنمونه با اندازه ۰/۷ میلی‌متر مشاهده شد. با این حال بین اندازه‌های مختلف ریزنمونه در محیط‌کشت فاقد هورمون از این لحاظ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱-الف). بنابراین در تمامی اندازه‌های ریزنمونه، حضور هورمون بنزیل‌آدنین در محیط‌کشت باعث تولید گیاهچه‌های کوتاه‌تر نسبت به محیط‌کشت حاوی اسیدجیبرلیک شد.

فایک و همکاران (2009) بیان کردند که اندازه ریزنمونه تأثیر معنی‌داری بر ارتفاع گیاهچه استقرار یافته دارد و با افزایش اندازه

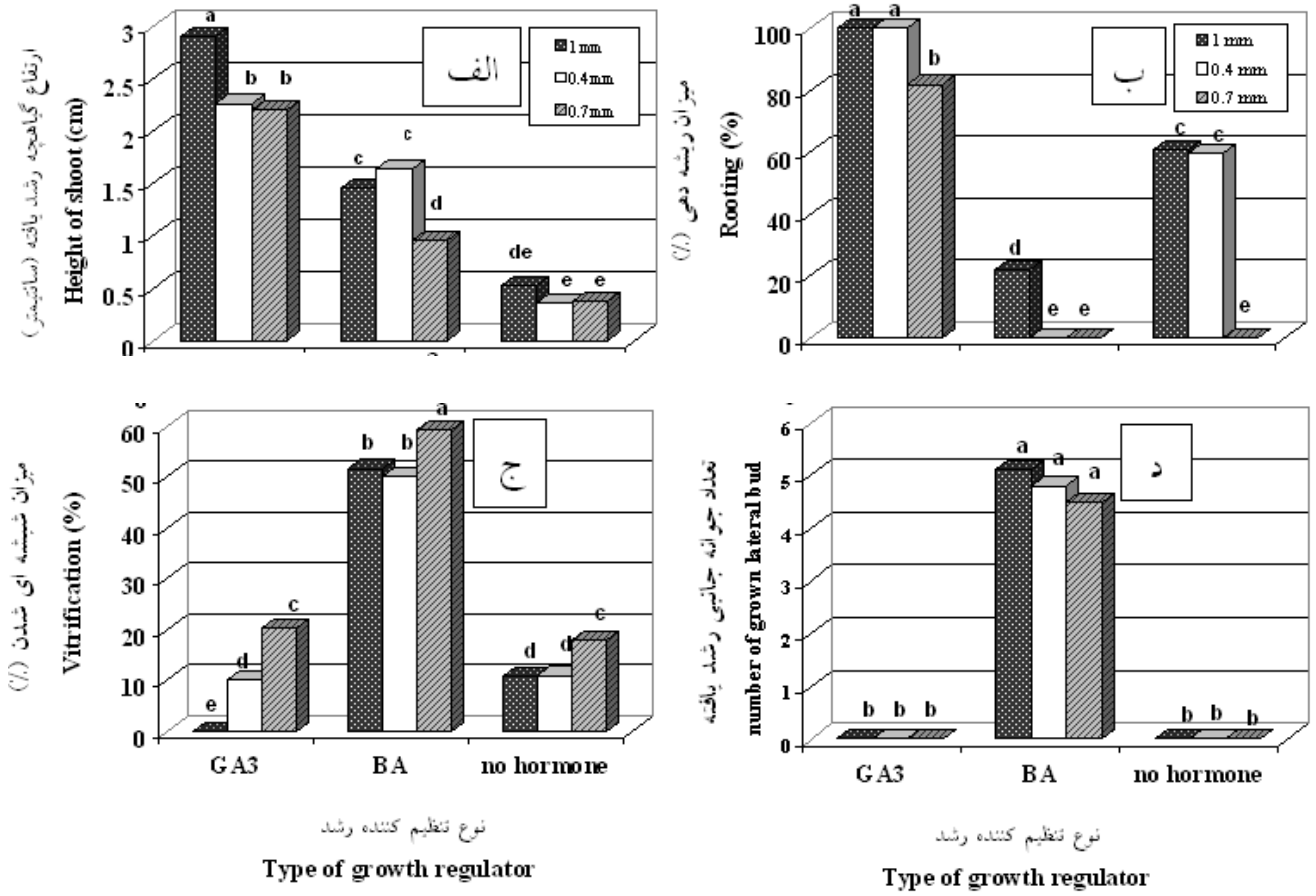
ریزنمونه از ۰/۵ به ۱ میلی‌متر، ارتفاع ریزنمونه استقرار یافته از ۵/۷ به ۸/۰ سانتی‌متر افزایش یافت. نتایج پژوهش *جین* و همکاران (1997) بر گیاه میخک نشان داد که کاربرد هورمون اسیدجیبرلیک میزان ارتفاع گیاهچه‌ها را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. از سوی دیگر، *جین* و همکاران (2001) نیز بیان کردند که کاربرد هورمون BA در محیط‌کشت سبب تولید گیاهچه‌هایی فشرده و با ظاهری متراکم می‌شود و همچنین ارتفاع آنها نیز به شدت کاهش می‌یابد. *وجودی* و همکاران (۱۳۸۳) گزارش کردند که کاربرد غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک باعث افزایش میزان رشد ریزنمونه گردید و بیشترین تأثیر را بر رشد گیاهچه در مرحله استقرار داشت.

نتایج مندرج در شکل ۱-ب نشان می‌دهد که اثر اندازه ریزنمونه و نوع تنظیم‌کننده رشد بر میزان ریشه‌دهی ریزنمونه‌ها معنی‌دار می‌باشد و هر چه اندازه ریزنمونه کوچک‌تر باشد، میزان ریشه‌دهی آن نیز کمتر خواهد بود. در محیط‌کشت حاوی اسیدجیبرلیک، در تمامی اندازه‌های ریزنمونه ریشه‌دهی با درصد بالایی صورت گرفت، این در حالی است که در ریزنمونه‌هایی که در محیط‌کشت فاقد هورمون و همچنین محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین کشت شده بودند، ریشه‌زایی مشاهده نشد (شکل ۱- ب).

فایک و همکاران (2009) گزارش کردند که اختلاف بین اندازه ریزنمونه از نظر تعداد ریشه تشکیل شده بر ریزنمونه نوک شاخساره انگور معنی‌دار بود و با افزایش اندازه ریزنمونه تعداد ریشه‌های تشکیل شده افزایش یافت. نتایج پژوهش *پاولیکی و ولاندر* (Pawlicki and Welander, 1992) نشان داد که کاربرد هورمون بنزیل‌آدنین تأثیر بازدارنده شدیدی بر ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها دارد، به‌خصوص زمانی که در آغاز مرحله ریشه‌زایی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین هورمون اسیدجیبرلیک نیز میزان ریشه‌دهی را کاهش می‌دهد. این در حالی است که نتایج پژوهش *یولاه* و همکاران (Ullah *et al*, 2007) نشان داد که کاربرد محیط‌کشت حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک نسبت به محیط‌کشت MS فاقد هورمون باعث افزایش تعداد ریشه‌های تولید شده از ۲/۳ به ۵/۸ شد. در این پژوهش نیز هورمون اسیدجیبرلیک تأثیر مطلوبی بر میزان ریشه‌زایی ریزنمونه‌های نوک شاخساره داشت.

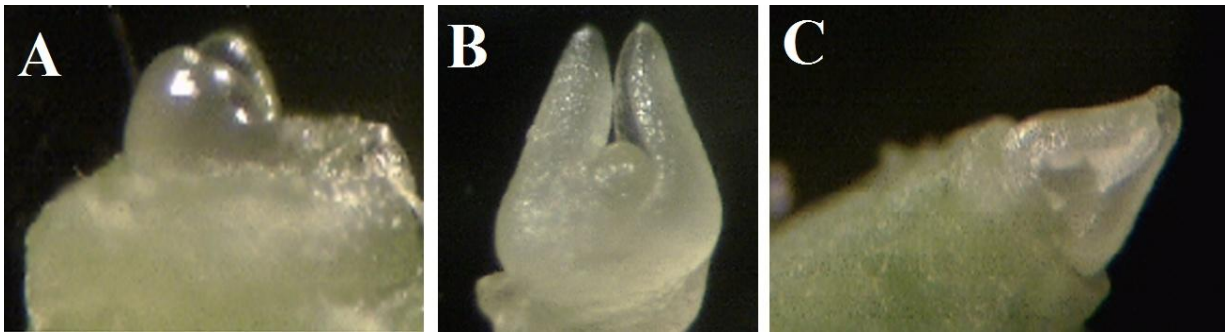
اثر اندازه ریزنمونه و نوع تنظیم‌کننده رشد بر شاخص سطح برگ در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بررسی مقایسه میانگین داده‌های آزمایش نشان داد که محیط‌کشت حاوی هورمون BA در تمامی اندازه ریزنمونه‌ها، سطح برگ بیشتری نسبت به محیط‌کشت فاقد هورمون و یا حاوی اسیدجیبرلیک تولید می‌کند و در محیط‌کشت حاوی BA با افزایش اندازه ریزنمونه، شاخص سطح برگ نیز افزایش می‌یابد، به‌طوری که با افزایش اندازه ریزنمونه شاخص سطح برگ از ۸/۱۰ به ۱۱/۱۱ سانتی‌متر مربع افزایش می‌یابد. اما چنین روندی در محیط‌کشت فاقد هورمون مشاهده نمی‌شود و شاخص سطح برگ نسبتاً ثابت است (جدول ۲).

همچنین از لحاظ تعداد برگ رشد یافته و وزن خشک اندام هوایی، بیشترین و کمترین میانگین به‌ترتیب در ریزنمونه رشد یافته در محیط حاوی BA و با اندازه ۱ میلی‌متر و ریزنمونه کشت شده در محیط‌کشت فاقد هورمون و با اندازه ۰/۴ میلی‌متر حاصل شد. در محیط‌کشت فاقد هورمون نیز به‌علت رشد ناکافی ریزنمونه‌ها، تعداد برگ رشد یافته نیز از سایر تیمارها کمتر بود (جدول ۲). *فایک* و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که افزایش اندازه ریزنمونه نوک شاخساره انگور تأثیر معنی‌داری بر تعداد برگ رشد یافته داشت و با افزایش اندازه آن از ۰/۵ به ۱ میلی‌متر، تعداد برگ رشد یافته ۲۰٪ افزایش یافت.



شکل ۱: مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع تنظیم‌کننده رشد و اندازه ریزنمونه بر برخی خصوصیات رشدی میخک در شرایط درون‌شیشه‌ای

Fig. 1: Mean comparison of growth regulators and explant size effects on some growth characteristic of carnation under *in vitro* condition



شکل ۲: اندازه‌های مختلف نوک شاخساره. A، B و C به‌ترتیب نوک شاخساره با اندازه‌های ۰/۴، ۰/۷ و ۱ میلی‌متر

Fig. 2: Different sizes of shoot tip; A, B and C: 0.4, 0.7 and 1 mm, respectively

جدول ۲: مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع تنظیم‌کننده رشد و نوع ریزنمونه بر برخی خصوصیات رشدی میخک در شرایط درون‌شیشه‌ای
Table 2: Mean comparison of growth regulators and explant size effects on some growth characteristic of carnation under *in vitro* condition

نوع تنظیم‌کننده رشد Type of growth regulator	اندازه ریزنمونه (میلی‌متر) Explants size (mm)	سطح برگ (سانتی‌متر مربع) Leaf area (cm^2)	طول برگ (میلی‌متر) Leaf length (mm)	عرض برگ (میلی‌متر) Leaf width (mm)	وزن خشک اندام هوایی (میلی‌گرم) Shoot dry weight (mg)	تعداد برگ Leaf number
اسیدجیبرلیک (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)	1	5.50 c	23.40 a	2.49 bc	6.66 b	7.60 c
	0.7	4.70 cd	22.60 a	2.24 bc	5.60 bc	6.80 c
GA_3 (0.5 mg/l)	0.4	4.70 cd	20.80 a	2.00 c	5.68 bc	5.20 d
بنزیل آدنین (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)	1	11.11 a	14.90 b	4.20 a	23.50 a	13.20 b
	0.7	9.80 a	13.40 b	4.00 a	22.40 a	12.40 ab
BA (0.5 mg/l)	0.4	8.10 b	13.89 b	4.30 a	22.50 a	11.60 a
بدون هورمون Without hormone	1	4.20 cd	10.20 c	2.66 bc	4.00 cd	2.00 e
	0.7	4.00 d	9.60 c	3.04 b	3.80 cd	2.00 e
	0.4	4.30 cd	9.70 c	3.00 b	2.30 d	2.00 e

در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $\alpha= 0.05$ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند
Means followed by similar letters in each column, are not significantly different base on Duncan test at $\alpha= 0.05$

براساس نتایج این پژوهش و همچنین گزارش‌های سایر محققین می‌توان بیان نمود که کاربرد هورمون بنزیل‌آدنین در محیط‌کشت سبب افزایش پرآوری و تعداد شاخساره باززایی شده می‌شود و در نتیجه می‌توان انتظار داشت که به‌دنبال آن شاخص سطح برگ، تعداد برگ و وزن خشک اندام هوایی نیز افزایش یابد.

اثر متقابل نوع تنظیم‌کننده رشد و نوع ریزنمونه بر طول و عرض برگ معنی‌دار نشد، با این حال هورمون اسیدجیبرلیک باعث تولید برگ‌های باریک و طویل‌تری نسبت به سایر تیمارها شد و در محیط‌کشت فاقد هورمون به علت عدم‌حضور تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط‌کشت و به‌دنبال آن رشد ناکافی ریزنمونه، کمترین میزان طول برگ مشاهده شد. از سوی دیگر کاربرد هورمون بنزیل آدنین در محیط‌کشت باعث عریض‌شدن برگ‌ها در مقایسه با سایر تیمارها شد و از آنجایی که کاربرد هورمون اسیدجیبرلیک باعث باریک شدن برگ‌ها می‌شود، بنابراین کمترین میانگین عرض برگ در این محیط‌کشت مشاهده شد (جدول ۲). *ویو و یلنوسکی* (Vu and Yelenosky, 1988) طی پژوهشی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد را بر گیاه لیموترش در شرایط طبیعی یا در *زیوه* (*in vivo*) بررسی کردند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که کاربرد هورمون اسیدجیبرلیک در مقایسه با بنزیل‌آدنین باعث کاهش سطح برگ، وزن خشک اندام هوایی، تعداد برگ و عرض برگ و افزایش طول برگ شد.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج به‌دست آمده از این پژوهش می‌توان بیان کرد که چنانچه هدف از کشت درون‌شیشه‌ای گیاه میخک، پرآوری آن باشد، در این صورت تعداد جوانه رشد یافته سالم از اهمیت زیادی

برخوردار است. ولی در صورتی که هدف استقرار ریزنمونه نوک شاخساره جهت به‌دست آوردن گیاهچه‌های سالم و با کیفیت مطلوب باشد، در این صورت به‌دست آوردن گیاهچه‌های سالم و با کمترین میزان شیشه‌ای‌شدن جهت انتقال به مرحله پرآوری از اهمیت بیشتری نسبت به تعداد جوانه باززایی شده برخوردار می-باشند. از سوی دیگر حضور بافت کوچکی از ساقه و سرآغازه‌های برگی جهت تأمین منبع هورمونی ضروری است. بنابراین با در نظرگرفتن این موضوع، محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک و ریزنمونه با اندازه ۱ میلی‌متر جهت استقرار ریزنمونه نوک شاخساره توصیه می‌شود.

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۳-۴ متن انگلیسی مراجعه شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از گروه پژوهشی کشت بافت گیاهی جهاد دانشگاهی مشهد جهت فراهم آوردن امکانات لازم جهت انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.