نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص.۳۸۸-۳۷۶
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 2, Summer 2017, P. 376-388
ISSN: 2008 - 4730

بررسی اثرات ژنوتیپ، نوع سیتوکنین و اکسین بر تکثیر درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های کاپیتول گیاه ژربرا (*Gerbera jamesonii*)

احمد شریفی[۱] - سیده مهدیه خرازی[۲*] - فاطمه کیخا آخر[۳] - عبدالرضا باقری[۴] - الهه ثمری[۵] - مریم مرادیان[۶]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۱۸

چکیده

ژربرا یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی دنیا می‌باشد که هم به جهت زیبایی و گوناگونی و هم از نظر اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. تکنیک‌های کشت بافت روش مناسبی را برای ریزازدیادی این گیاه زینتی فراهم کرده است. در این پژوهش تاثیر عوامل مختلف بر القاء باززایی، پرآوری، ریشه‌زایی و سازگاری ریزنمونه‌های کاپیتول ژربرا، بصورت چهار آزمایش جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت القاء باززایی، ریزنمونه‌های کاپیتول هشت رقم مختلف ژربرا در محیط‌کشت جامد MS حاوی ترکیب‌های هورمونی BA، TDZ، 2IP و یا KIN (۴ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با IAA (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) کشت گردیدند. نتایج نشان داد که محیط کشت حاوی ۴ میلی گرم در لیتر هورمون BA و ۰/۲ میلی گرم در لیترهورمون IAA در تمامی ژنوتیپ‌ها، بیشترین درصد باززایی را القا نمود. در مرحله پرآوری، اثر سطوح مختلف هورمون BA بر میزان پرآوری گیاهچه‌های باززایی شده ژربرا ژنوتیپ Sunway مورد ارزیابی قرار گرفت. بیشترین تعداد گیاهچه باززایی شده در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر هورمون BA با میانگین ۶ عدد گیاهچه باززایی شده و کمترین میزان آن در محیط کشت MS فاقد هورمون با میانگین ۱ عدد گیاهچه باززایی شده، مشاهده گردید. در مرحله ریشه‌زایی، ریزنمونه‌های رشد یافته ژربرا ژنوتیپ Sunway در محیط کشت جامد MS ½ حاوی ترکیب‌های هورمونی NAA، IBA، IAA (۱ میلی گرم در لیتر) و یا محیط کشت جامد MS ½ فاقد هورمون کشت گردیدند. نتایج نشان داد که بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط کشت MS ½ فاقد هورمون و محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون IAA و یا IBA با میانگین ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی مشاهده گردید. نتایج مرحله سازگاری نیز نشان داد که بیشترین درصد سازگاری در بستر کشت پیت ماوس، کوکوپیت و قارچ‌کش (با میانگین ۹۰/۴۲) و کمترین درصد سازگاری در بستر کشت حاوی پرلیت (با میانگین ۴۷/۵) حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: باززایی، پرآوری، ریشه‌زایی، سازگاری، محیط کشت MS

مقدمه

ژربرا از جمله گیاهان زینتی است که بیشترین سطح زیر کشت را در غرب اروپا دارد و سابقه کشت آن به منظور گل شاخه بریده به اوایل قرن بیستم در فرانسه باز می گردد. اهمیت تجاری آن روز به روز در حال افزایش است، بنحوی که یکی از مهم‌ترین گل های شاخه بریده در بین ۱۰ گل شاخه بریده برتر جهان قرار دارد. در سال ۱۹۹۶ ژربرا در بین گیاهان حاصل از کشت بافت در اروپا با ۱۷ میلیون گیاهچه مقام اول را داشت. در حال حاضر ژربرا در بیش از ۲۵ کشور دنیا پرورش داده می شود و حدود ۱۱۰۰ تا ۱۲۰۰ هکتار سطح زیر کشت گلخانه ای دارد. ۵۰ درصد سطح زیر کشت این گیاه در کشور هلند و ایتالیا است (۱۱ و ۹). سطح زیر کشت ژربرا در ایران در سال ۱۳۸۱ نزدیک به ۵ هکتار با تولید ۶/۷ میلیون شاخه گل گزارش شده است که در سال ۱۳۸۳، به ۷/۳ میلیون شاخه و در سال ۱۳۸۷ به ۱۳ هکتار با تولید بیش از ۲۹ میلیون شاخه گل رسیده است (۲۲ و ۲۳). مطالعات نشان می دهد عمومی ترین سیستم برای ازدیاد تجاری ژربرا ریزازدیادی است و روش های معمول تکثیر (تقسیم بوته و قلمه زدن) کارایی تامین تقاضای جهانی برای این گیاه را ندارد. از بذر نیز برای تکثیر این گیاه استفاده نمی شود زیرا علاوه بر طولانی بودن دوره رشد، باعث تولید جمعیت های هتروزیگوت با رنگ گل، اندازه و فرم

۱، ۲ و ۳- استادیاران پژوهشی گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی
(*- نویسنده مسئول: Email: ma_kh230@yahoo.com)
۴- استاد گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۵- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۶ - پژوهشگر، گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی
DOI: 10.22067/jhorts4.v0i0.53432

متنوع می‌شود و گیاهان بدست آمده مشابه گیاه مادری نیستند (۱۱ و ۹). گیاه ژربرا تنوع رنگی بسیار زیادی دارد (بیش از ۸۰ تنوع رنگی) و متاسفانه ژنوتیپ‌های مختلف عکس العمل‌های متفاوتی به باززایی در شرایط این ویترو[1] نشان می دهند. بطوری که لازم است شرایط کشت، نوع ریزنمونه مورد استفاده و زمان تهیه ریزنمونه برای هر ژنوتیپ بهینه شود و برای هر ژنوتیپ دستورالعملی جداگانه تهیه شود.

از ریزنمونه‌ها (نوک شاخه، جوانه گل، برگ، ساقه، کاپیتول و...) و محیط کشت های مختلفی جهت ریزازدیادی ژربرا استفاده شده است. اما در تکثیر تجاری بیشتر از دو ریزنمونه نوک شاخه و کاپیتول نابالغ جهت تکثیر به روش شاخه‌زایی جانبی و ایجاد جوانه استفاده می‌شود (۲۰). از خصوصیات مهم این روش توانایی تکثیر تعداد زیاد گیاهچه و همچنین تولید کلون با خصوصیات یکسان می‌باشد.

از سوی دیگر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی همچون سیتوکنین ها و اکسین ها تاثیر قابل توجهی بر قدرت باززایی ریزنمونه ها دارا می باشند. از نقطه نظر تاثیر هورمون در ریزازدیادی گیاهان مختلف، بین سیتوکنین های مختلف تفاوت وجود دارد به طوری که در بسیاری از گیاهان BA[2] بسیار مؤثرتر از کینتین، آدنین و زآتین است (۶). بلاکسلی و همکاران (۲) جذب و متابولیسم سیتوکنین را در باززایی شاخه ژربرا مورد بررسی قرار دادند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که سیتوکنین‌های طبیعی همانند زآتین نسبت به سیتوکنین‌های مصنوعی اثر کمتری در باززایی شاخه دارند. پارتاسارتی و ناگاراجو (۱۶) از محیط کشت MS[3] (موراشی و اسکوگ، ۱۹۶۲) تغییر یافته حاوی غلظت‌های مختلف BA و ریزنمونه کاپیتول ژربرا ژنوتیپ گلداست استفاده کردند و گزارش نمودند که بیشترین تعداد شاخه باززایی شده در غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA تولید شد و شاخه‌های حاصله به طور موفقیت‌آمیزی در محیط کشت ½ MS ریشه‌دار شدند. در پژوهشی کاپیتول ارقام سفید، زرد و نارنجی ژربرا درمحیط کشت MS تغییر یافته حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BA کشت گردیدند و پس از ۴۷ روز اولین گیاهچه‌ها از ارقام زرد و سفید و پس از ۶۵ روز گیاهچه هایی از رقم نارنجی باززا شدند. بین ارقام مورد بررسی، رقم نارنجی در غلظت ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بهترین باززایی را نشان داد (۲۴). سوزک و همپل (۲۱) اثر کینتین، 2IP[4] و BA را در دامنه ۱/۵ تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بر باززایی رقم مارلین ژربرا مورد ارزیابی قرار دادند و بیشترین تعداد شاخه باززایی شده را در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین تولید نمودند. پوسادا و همکاران (۱۸) قطعات کاپیتول با قطر ۱ سانتی متر را در محیط کشت حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA کشت کردند و بعد از ۴ هفته جوانه‌های باززایی شده را به محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA منتقل کردند و موفق به تولید شاخساره شدند. تیاجی و کوتاری (۲۵) برای باززایی سریع جوانه‌ها از ریزنمونه قطعات کاپیتول، از ترکیب هورمونی ۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA[5] استفاده کردند و موفق به تولید ۲۰ تا ۲۵ شاخه از هر ریزنمونه شدند. رای و همکاران (۱۹) برای تکثیر ژربرا با استفاده از ریزنمونه کاپیتول از ترکیب هورمونی ۷ میلی‌گرم در لیتر BAو ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA استفاده کردند و تعداد ۱۰ شاخه از هر ریزنمونه بدست آوردند. در تحقیقی دیگر مودح و همکاران (۱۴) ریزنمونه کاپیتول نابالغ را در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAAبه همراه ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BA کشت کردند و موفق به باززایی و تولید شاخه شدند. غیور کریمیانی (۱۰) قطعات کاپیتول رقم رد اکسپلوژن را در محیط کشت MS تغییر یافته حاوی سطوح ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم درلیتر TDZ[6] کشت نمود و ۳۹ درصد شاخه‌زایی در دو سطح ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده گردید.

در مرحله ریشه‌زایی ژربرا از تنظیم کننده‌های رشد مختلفی استفاده گردیده است. در پژوهش انجام شده توسط رینورد و همکاران (۲۰) اثر NAA[7] و IAA بر ریشه‌زایی ژربرا در محیط کشت MS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از اثر کمتر IAA نسبت به NAAبر میزان ریشه‌زایی بود. در تحقیقی دیگر ماریسکا و همکاران (۱۳) اثر IAA و NAA را روی رشد ریشه ژربرا مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایش آن ها نشان داد که بیشترین ریشه‌زایی در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA حاصل می‌شود و تیمارهای دارای NAA باعث تولید ریشه‌های کوتاه و ضخیم می‌شود. نتایج تحقیق الیورا و همکاران (۱۵) بر ریشه‌زایی درون شیشه‌ای گیاهچه‌های ژربرا نیز نشان داد که IAA ریشه‌های کمتر و کوتاه‌تری نسبت به IBA[8] تولید می‌کند.

با توجه به این که در حال حاضر بخش اعظم پایه های این گیاه از خارج از کشور تامین می شود، تامین آن در داخل از اهمیت زیادی برخوردار است و لذا به لحاظ اهمیت اقتصادی، تولید گیاهچه ژربرا از طریق کشت بافت در صدر اولویت های تحقیقاتی گیاهان زینتی ایران قرار دارد و ارائه دستوالعمل‌های تکثیر سریع و مقرون به صرف این گیاه لازم و ضروری است. اگرچه گزارش‌های زیادی مبنی بر

1 - *In Vitro*
2- Benzyladenine
3- Murashige & Skoog
4- N^6-(2-Isopentenyl) adenine

5- 3-Indoleacetic acid

6- Thidiazuron
7- 1-Naphthylacetic acid
8 - Indole-3-butyric acid

ریزازدیادی آن وجود دارد ولی پروتکل‌های ارائه شده قابلیت بهره‌برداری نداشته و برای رسیدن به این دستورالعمل‌ها نیاز است محیط کشت های مختلف، ترکیب هورمونی محیط کشت، شرایط کشت و گیاه بهینه شود. لذا این آزمایش با هدف بررسی عوامل تاثیر گذار بر باززایی ژنوتیپ‌های مختلف گیاه ژربرا انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در قالب چهار آزمایش جداگانه به شرح زیر انجام شد:

بررسی اثر نوع هورمون سیتوکنین و ژنوتیپ بر تکثیر درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های کاپیتول

به منظور اجرای این پژوهش ابتدا گیاهان شاداب، عاری از بیماری و در مرحله رشد فعال انتخاب و ریزنمونه های کاپیتول با قطر ۱/۵-۰/۵ سانتی متر از آنها تهیه و برای کشت آماده شدند. جهت ضدعفونی ابتدا ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری و چند قطره مایع شوینده رایج شستشو داده شدند تا گردوغبار و همچنین مواد زائد دیگر از سطح آن برطرف گردد. در مرحله بعد نمونه های مورد نظر ابتدا به محلول رقیق شده هیپوکلریت سدیم تجاری، حاوی ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه و سپس محلول حاوی ۰/۱ درصد کلرید جیوه به مدت ۱۰ دقیقه منتقل گردیدند. به منظور کاهش کِشش سطحی و افزایش سطح تماس گیاه و ماده گندزدا، بسته به حجم محلول گندزدا ۲ تا ۳ قطره تِوین ۲۰ به محلول ضدعفونی اضافه شد. در پایان مدت ضدعفونی، ریزنمونه ها تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار ۳ مرتبه در بازه های زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. پس از آن به منظور بررسی اثر نوع هورمون سیتوکنین بر تکثیر درون شیشه‌ای ارقام مختلف ژربرا، ریزنمونه‌های کاپیتول ارقام Famous، Sunway، Red Pearl، Pink، Snow، Popov، Balance، Dune، Eagle در محیط‌کشت جامد MS حاوی ترکیب‌های هورمونی BA، TDZ، 2IP و یا KIN (۴ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با IAA (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر)، ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار، pH=۵/۷ کشت گردیدند. محیط کشت‌ها در ویال‌هایی به میزان ۱۵ میلی‌لیتر توزیع گردیده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اُتوکلاو گردید. پس از کشت جهت القاء باززایی، ریزنمونه‌ها ابتدا به مدت یک ماه در شرایط تاریکی نگهداری شدند و پس از آن به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در پایان آزمایش عکس‌العمل ریزنمونه‌ها (درصد باززایی، تعداد برگ باززایی شده، تعداد گیاهچه باززایی شده و درصد ریزنمونه‌های قهوه-ای شده) مورد ارزیابی قرارگرفت.

بررسی اثر سطوح مختلف هورمون BA بر میزان پرآوری گیاهچه‌های باززایی شده ژربرا ژنوتیپ Sunway

نتایج آزمایش اول مؤید برتری ژنوتیپ Sunway در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها بود. لذا در این بخش از پژوهش به منظور تعیین غلظت بهینه BA، تنها پرآوری گیاهچه‌های این رقم مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این آزمایش گیاهچه‌های باززایی شده ژنوتیپ Sunway، در محیط‌کشت جامد MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون BA (۰، ۱، ۲ و یا ۴ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار و pH=۵/۷ کشت گردید. محیط کشت‌ها در ویال‌هایی به میزان ۱۵ میلی‌لیتر توزیع گردیده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اُتوکلاو گردیدند. پس از کشت، ریزنمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از گذشت ۳۰ روز پارامترهایی نظیر تعداد و طول گیاهچه‌های باززایی شده، وزن خشک، درصد ریشه‌زایی، طول و تعداد ریشه مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی اثر نوع هورمون اکسین بر میزان ریشه‌زایی ریزنمونه‌های تکثیرشده ژربرا ژنوتیپ Sunway

از آنجا که تولید ریشه در طول مرحله شاخه‌زایی در شرایط درون‌شیشه‌ای بسیار محدود است و یا اصلا مشاهده نمی‌شود، بنابراین یک مرحله مجزا برای ریشه‌زایی در نظر گرفته می‌شود. مواد گیاهی لازم در این مرحله از ریزنمونه‌های رشد یافته ژربرا ژنوتیپ Sunway در مرحله پُرآوری تهیه گردید و در محیط کشت جامد MS ½ حاوی ترکیب‌های هورمونی NAA، IBA، IAA (۱ میلی گرم در لیتر) و یا محیط کشت جامد MS ½ فاقد هورمون، ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار، pH=۵/۷ کشت گردیدند. محیط کشت‌ها در ویال‌هایی به میزان ۱۵ میلی‌لیتر توزیع گردیده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اُتوکلاو گردید. شرایط نگهداری ریزنمونه‌های کشت شده، همانند مرحله پرآوری بود. در این آزمایش اثر ترکیب‌های هورمونی مختلف بر ریشه‌زایی گیاهچه‌های تولید شده با بررسی صفات تعداد و طول ریشه‌های تولید شده و درصد ریشه‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی اثر بستر کشت‌های مختلف بر استقرار و سازگاری گیاهچه‌های باززایی شده ژربرا ژنوتیپ Sunway

پس از آنکه شاخه‌ها ریشه‌دار شده و به اندازه کافی رشد کردند تا بتوانند آب و املاح کافی را جذب کنند به خاک منتقل شدند. در این مرحله گیاهچه‌های ریشه‌دار از محیط کشت ریشه‌زایی خارج و پس از شستشوی ریشه‌ها و حذف تمام آگار از سطح ریشه‌ها و احیاناً سطح

برگ‌ها، گیاهچه‌ها به گلدان‌های کوچک حاوی بستر کشت‌های مختلف شامل پرلیت؛ پرلیت : کوکوپیت به نسبت ۱:۲؛ کوکوپیت : پیت ماوس به نسبت ۱:۱ و کوکوپیت : پیت ماوس به نسبت ۱:۱ و اعمال تیمار قارچ‌کش کاربندازیم (۱در هزار) منتقل شدند. از آنجا که گیاهچه‌ها در مراحل اولیه انتقال به خاک نسبت به آلودگی‌های باکتریایی و قارچی حساس هستند، بستر کشت‌های مختلف قبل از کشت کاملاً ضدعفونی (اتوکلاو) شدند. پس از انتقال گیاهچه ها به گلدان برای حفظ رطوبت و کمک به سازگاری آنها، لیوان های پلی اتیلن شفاف (یک بار مصرف) به صورت وارونه بر روی گلدان‌ها قرار داده شد. سپس در اتاقک رشد در دمای ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۸ درجه سانتی‌گراد در شب و در شرایط نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند. پس از گذشت چند روز برای سازگاری تدریجی گیاهان به رطوبت محیط هر روز سوراخی با قطر تقریبی ۲ تا ۳ میلی متر در لیوان ایجاد شد. این کار به مدت ۲ هفته ادامه پیدا کرد و به تدریج سوراخ ها به طرف قاعده لیوان نزدیک شدند. پس از دو هفته از کشت، لیوان ها ابتدا به مدت ۱ ساعت در روز از روی گلدان‌ها برداشته شدند و در روزهای بعد این زمان افزایش پیدا کرد و بالاخره پس از ۷ روز لیوان‌ها کاملاً از روی گلدان‌ها برداشته شدند. برای جلوگیری از پوسیدگی طوقه، آبیاری و تغذیه گیاهان از زیر گلدان‌ها انجام شد. برای تغذیه گیاهان محلول ½ MS هفته‌ای یکبار روی گلدان ها محلول پاشی شد.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

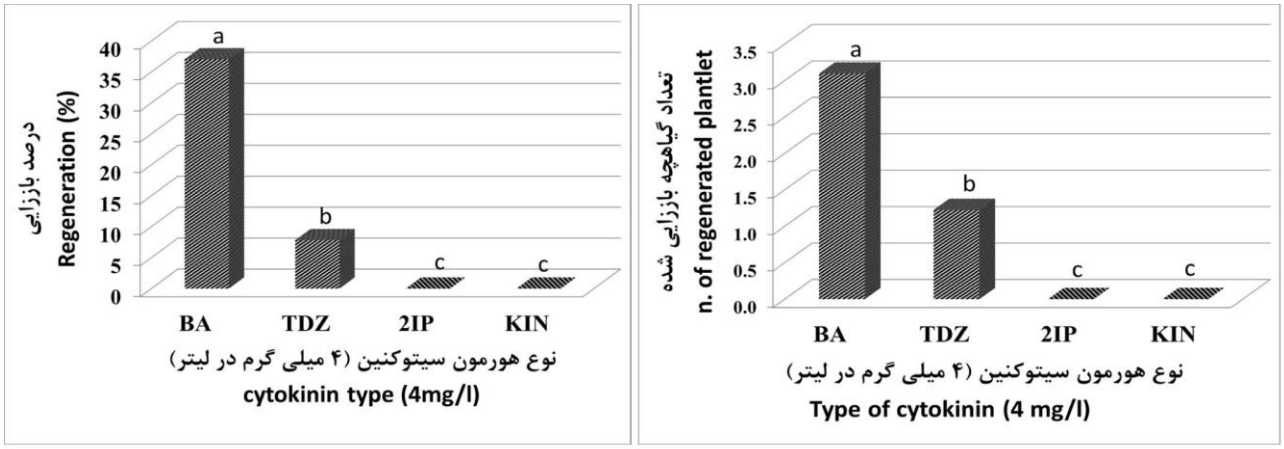
طرح آزمایشی مورد استفاده برای آزمایش اول فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تکرار و سایر آزمایش‌ها بصورت طرح کاملا تصادفی با ۷ تکرار بود (به جز آزمایش دوم که با ۱۰ تکرار بود). آماده‌سازی داده‌ها در برنامه Excel و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP8 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت و نمودارها نیز با استفاده از برنامه Excel رسم گردیدند. تبدیل داده‌های درصدی با استفاده از فرمول [ArcSin Sqrt (X/100)] صورت گرفت.

نتایج و بحث

بررسی اثر نوع هورمون سیتوکنین و ژنوتیپ بر تکثیر درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های کاپیتول

اثر نوع هورمون سیتوکنین بر صفات مورد ارزیابی

در ارزیابی اثر نوع سیتوکنین‌های مورد استفاده بر درصد باززایی و تعداد گیاهچه تولید شده، تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. در بین سیتوکنین‌های مورد بررسی، BA با متوسط ۳۷ درصد باززایی و میانگین ۳/۰۹ گیاهچه برای هر ریزنمونه بهتر از TDZ با متوسط ۷/۸ درصد باززایی و میانگین ۱/۲۳ گیاهچه برای هر ریزنمونه بود. کاربرد سیتوکنین‌های 2IP و KIN پاسخ مناسبی را ایجاد ننمود و علائم باززایی در ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت حاوی 2IP و یا KIN مشاهده نگردید (شکل ۱). مودح و همکاران (۱۴) بیشترین مقدار باززایی را با کاربرد ۴ میلی گرم در لیتر هورمون BA گزارش کردند. آنها توانستند در این محیط کشت حدود ۲/۳ شاخه برای هر ریزنمونه تولید کنند. در پژوهشی دیگر دویر و همکاران (۵) از محیط کشت MS حاوی ۴ میلی گرم در لیتر BA استفاده و موفق به باززایی ۲ شاخه در ۶۳ درصد ریزنمونه‌ها شدند. چاکرابارتی و داتا (۳) نیز در باززایی ریزنمونه کاپیتول، با کاربرد ترکیب هورمونی ۴ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IAA موفق به باززایی و تولید ۳ شاخه در هر ریزنمونه شدند.



شکل۱- اثر نوع هورمون سیتوکنین بر درصد باززایی و تعداد گیاهچه باززایی شده در ریزنمونه‌های کاپیتول ژربرا

Figure 1- Effect of cytokinin types on percentage of regeneration and number of plantlets of gerbera capitulum explant

در تحقیقی دیگر پوسادا و همکاران (۱۸) با کاربرد ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی گرم در لیتر IAA و ۴ میلی گرم در لیتر BA موفق به باززایی و تولید ۳/۲ شاخه در هر ریزنمونه شدند. نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد که بیشترین درصد باززایی و تعداد گیاهچه باززایی شده در محیط کشت MS حاوی ۴ میلی گرم در لیتر هورمون BA در ترکیب با ۰/۲ میلی گرم در لیتر هورمون IAA حاصل شد که با نتایج سایر محققان مطابق می‌باشد. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که در محیط کشت MS حاوی BA، القاء شاخساره به میزان زیادی تحریک می‌گردد و مقایسه اثربخشی هورمون‌های مختلف جهت تشکیل شاخساره، ترتیب اثربخشی را بصورت ذیل مشخص می‌نماید: 2ip< Kin< BA (۸). برتری BA نسبت به سایر سیتوکنین‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای در ارتباط با گیاهان متعددی با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف گزارش شده است. ساختار پایدارتر ریبوزید و نوکلئوتید در هورمون BA نسبت به سایر سیتوکنین‌ها یکی از دلائل پاسخ عملکردی مناسب‌تر BA می‌باشد (۷).

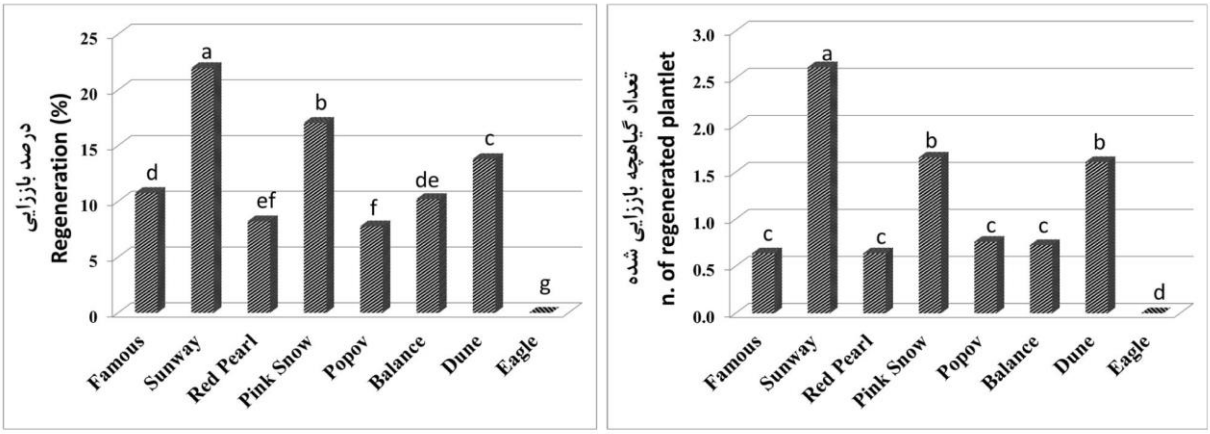
اثر ژنوتیپ بر صفات مورد ارزیابی

بررسی مقایسه میانگین داده‌های مربوط به باززایی نشان داد که ژنوتیپ تاثیر معنی‌داری بر درصد باززایی ریزنمونه‌های کاپیتول داشت ($p \leq ۰/۰۵$). بیشترین درصد باززایی در ژنوتیپ Sunway (با میانگین ۲۱/۹۶ درصد) مشاهده گردید و پس از آن ژنوتیپ Pink Snow با میانگین ۱۷ درصد باززایی در رتبه دوم قرار گرفت. از سوی دیگر در ژنوتیپ Eagle هیچگونه علائم باززایی مشاهده نگردید (شکل ۲). محققان دیگر (۳، ۱۸ و ۲۶) نیز گزارش کردند که ژنوتیپ اثر معنی‌داری بر باززایی ریزنمونه کاپیتول در شرایط درون شیشه‌ای دارد.

از لحاظ تعداد گیاهچه تولیدی همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد بیشترین تعداد گیاهچه تولیدی با میانگین ۲/۶۱ در ژنوتیپ Sunway مشاهده گردید. در ژنوتیپ Eagle به علت عدم مشاهده علائم باززایی، هیچگونه گیاهچه‌ای باززا نگردید و این ژنوتیپ کمترین میانگین را از این لحاظ به خود اختصاص داد. بین ژنوتیپ‌های Pink Snow و Dune از لحاظ تعداد گیاهچه تولیدی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

اثر متقابل ژنوتیپ و نوع هورمون سیتوکنین بر صفات مورد ارزیابی

نتایج نشان داد که اثر متقابل ژنوتیپ و نوع هورمون سیتوکنین بر درصد باززایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود و محیط کشت حاوی ۴ میلی گرم در لیتر هورمون BA و ۰/۲ میلی گرم در لیترهورمون IAA در ژنوتیپ‌های Sunway و Pink Snow به ترتیب با میانگین ۶۸/۶۷ و ۵۸/۳۳ درصد باززایی، بیشترین درصد باززایی را در ریزنمونه های کاپیتول القا کردند. در تمامی ژنوتیپ‌های مورد استفاده، کاربرد هورمون‌های 2IP و KIN تاثیر مطلوبی بر باززایی ریزنمونه‌های کاپیتول نداشت و هیچگونه باززایی در محیط کشت‌های حاوی این هورمون‌ها صورت نگرفت. با کاربرد هورمون TDZ در مورد برخی از ارقام، علائم باززایی مشاهده گردید ولی با این حال کاربرد هورمون BA تاثیر مطلوب‌تری بر باززایی ریزنمونه-های کاپیتول داشت. ژنوتیپ Eagle تنها ژنوتیپی بود که با کاربرد انواع مختلف هورمون سیتوکنین، هیچگونه علائم باززایی در آن مشاهده نگردید (جدول ۱).



شکل ۲ – اثر ژنوتیپ بر درصد باززایی و تعداد گیاهچه باززایی شده در ریزنمونه کاپیتول ژنوتیپ‌های مختلف ژربرا

Figure 2 – Effect of genotype on regeneration percentage and plantlets number of capitulum explant of different genotype of gerbera

شکل ۳- تصویر سمت راست: گیاهچه باززا شده ژربرا ژنوتیپ Sunway، تصویر سمت چپ: ریزنمونه کاپیتول ژربرا ژنوتیپ Sunway

Figure 3- The right picture: plantlet regenerated of gerbera cv. Sunway, the left picture: capitulum explants of gerbera cv. Sunway

جدول ۱- برهمکنش نوع سیتوکنین × ژنوتیپ بر درصد باززایی ریزنمونه‌های کاپیتول ارقام مختلف ژربرا.

Table 1– Interaction effect of cytokinin types ×genotypes on regeneration percentage of gerbera capitulum explants

ژنوتیپ Genotype	نوع هورمون سیتوکنین (٤ میلی‌گرم در لیتر) Cytokinin type (4 mg/l)			
	KIN	2IP	TDZ	BA
Famous	0.00 h	0.00 h	8.17 g	34.83 d
Sunway	0.00 h	0.00 h	19.17 f	68.67 a
Red Pearl	0.00 h	0.00 h	0.00 h	32.83 d
Pink Snow	0.00 h	0.00 h	9.83 g	58.33 b
Popov	0.00 h	0.00 h	0.00 h	31.00 de
Balance	0.00 h	0.00 h	0.00 h	40.83 c
Dune	0.00 h	0.00 h	25.33 e	29.83 de
Eagle	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letters are not significantly different at p<0.05 based on Tukey's test.

در رابطه با تعداد گیاهچه باززایی شده، عکس‌العمل ارقام نسبت به انواع مختلف سیتوکنین متفاوت بود. ژنوتیپ Sunway با میانگین ۶/۷۳ گیاهچه، بیشترین تعداد گیاهچه تولیدی را در محیط کشت حاوی ۴ میلی گرم در لیتر هورمون BA و ۰/۲ میلی گرم در لیتر هورمون IAA تولید نمود. در رابطه با این ژنوتیپ، کاربرد محیط کشت حاوی هورمون TDZ با غلظت ۴ میلی گرم در لیتر، باعث کاهش تعداد گیاهچه تولیدی به ۳/۷۳ گیاهچه گردید ولی با این حال از نظر تعداد گیاهچه تولیدی در رتبه دوم قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که در محیط کشت حاوی 2IP و KIN هیچگونه گیاهچه‌ای باززا نگردید (جدول ۲). بنابراین کاربرد این دو نوع هورمون سیتوکنین جهت باززایی ریزنمونه‌های کاپیتول ژربرا توصیه نمی‌گردد و بهترین نوع سیتوکنین جهت القاء باززایی در ریزنمونه‌های کاپیتول، هورمون BA می‌باشد.

رقم در باززایی ریزنمونه‌ها در ژربرا مؤثر است و هر رقم در شرایط درون‌شیشه‌ای پاسخی متفاوت از سایر ارقام نشان می‌دهد و نسبت بهینه تنظیم کننده‌های رشد برای باززایی شاخساره بستگی به زیادی به رقم دارد (۳، ۱۸ و ۲۶). در این بخش از پژوهش، بیشترین درصد باززایی و تعداد گیاهچه باززایی شده در محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA حاصل شد. با توجه به اینکه BA باعث از بین رفتن

غالبیت انتهایی و فعال شدن جوانه‌های جانبی می‌شود، به نظر می‌رسد کاربرد این هورمون می تواند باعث تحریک جوانـه‌هـا و تولیـد شـاخه بیشتر گردد.

جدول ۲- برهمکنش نوع سیتوکنین × ژنوتیپ بر تعداد گیاهچه باززایی شده ریزنمونه‌های کاپیتول ارقام مختلف ژربرا.

Table 2– Interaction effect of cytokinin types ×genotypes on number of regenerated plantlet of gerbera capitulum explants

ژنوتیپ Genotype	نوع هورمون سیتوکنین (٤ میلی‌گرم در لیتر) Cytokinin type (4 mg/l)			
	KIN	2IP	TDZ	BA
Famous	0.00 e	0.00 e	0.00 e	2.55 d
Sunway	0.00 e	0.00 e	3.73 b	6.73 a
Red Pearl	0.00 e	0.00 e	0.00 e	2.55 d
Pink Snow	0.00 e	0.00 e	2.98 cd	3.65 b
Popov	0.00 e	0.00 e	0.00 e	3.04 c
Balance	0.00 e	0.00 e	0.00 e	2.90 cd
Dune	0.00 e	0.00 e	3.09 c	3.34 bc
Eagle	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e

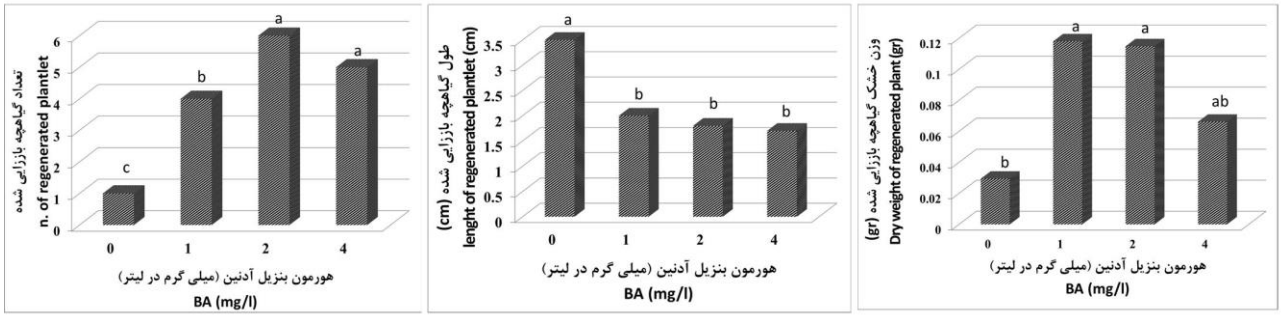
میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letters are not significantly different at p<0.05 based on Tukey's test

بررسی اثر سطوح مختلف هورمـون BA بـر میـزان پـرآوری گیاهچه‌های باززایی شده ژربرا ژنوتیپ Sunway

اثر سطوح مختلف هورمون بنزیل آدنین بر تمـامی صـفات مـورد ارزیابی در سطح احتمال یک درصـد معنـی‌دار بـود. بررسـی مقایسـه میانگین تعداد گیاهچه باززایی شده نشان داد کـه بـا افـزایش سـطح هورمون BA از صفر به ۲ میلی گرم در لیتر، تعـداد گیاهچـه بـاززایی شده از ۱ به ۶ افزایش یافت اما پس از آن با افزایش غلظت هورمـون تا ۴ میلی گرم در لیتر، روند کاهشی از خود نشان داد. با این حال بـین غلظت‌های ۲ و ۴ میلی گـرم در لیتـر هورمـون BA از لحـاظ تعـداد گیاهچه باززایی شده اختلاف معنی‌داری مشـاهده نگردیـد. بیشـترین تعداد گیاهچه باززایی شده در غلظت ۲ میلـی گـرم در لیتـر هورمـون BA با میانگین ۶ عدد گیاهچه باززایی شده و کمتـرین میـزان آن در محیط کشت MS فاقد هورمون با میانگین یک عدد گیاهچه بـاززایی شده، مشاهده گردید (شکل ۴).

در پژوهشی مودح و همکاران (۱۴) اثر سطوح ۲ تا ۱۰ میلی گـرم در لیتر هورمون BA را بر باززایی و تولید گیاهچه ژربرا مـورد ارزیـابی قرار دادند و بیشترین مقدار باززایی را در محدوده ۴ میلی گرم در لیتـر این هورمون گزارش کردند. آنها توانستند در این محیط کشـت حـدود ۲/۳ شاخه برای هر ریزنمونه تولید نمایند. در پژوهشـی دیگـر دویـر و همکاران (۵) از محیط کشت MS حـاوی ۴ میلـی گـرم در لیتـر BA استفاده و موفق به باززایی ۲ شاخه در ۶۳ درصد ریزنمونه‌ها شـدند. از سوی دیگر دانیل و کوزمیکیـک (۴) در پـژوهش خـود بـرای تکثیـر شاخه های باززایی شده از ریزنمونه نوک ساقه از محیط کشت حـاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون BA استفاده کردند.



شکل ٤- اثر غلظت هورمون بنزیل آدنین بر طول، تعداد و وزن خشک گیاهچه باززایی شده در گیاهچه‌های باززا شده ژربرا ژنوتیپ Sunway

Table 4- Effect of BA concentrations on length, number and dry weight of gerbera cv. Sunway regenerated plantlets

شکل ۵- اثر غلظت هورمون بنزیل آدنین بر گیاهچه باززایی شده ژربرا ژنوتیپ Sunway
تصویر سمت راست: ۲ میلی گرم در لیتر و تصویر سمت چپ: ۱ میلی گرم در لیتر
Figure 5- Effect of BA concentrations on regenerated plantlet of Sunway genotype.
Right picture: 2 mg/l and the left picture: 1 mg/l

ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف هورمون BA بر طول گیاهچه باززایی شده نشان داد که با افزایش غلظت هورمون BA از صفر به ۴ میلی گرم در لیتر، طول گیاهچه باززایی شده از ۳/۵ سانتی متر به ۱/۷ سانتی متر کاهش یافت. اما بین غلظت‌های ۱ تا ۴ میلی گرم در لیتر هورمون BA از این لحاظ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. از لحاظ وزن خشک گیاهچه‌های باززایی شده نیز بین سطوح مختلف هورمون BA اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($p \leq ۰/۰۵$) و با افزایش غلظت هورمون تا ۲ میلی گرم در لیتر، وزن خشک تولید شده نیز افزایش یافت و پس از آن روند کاهشی از خود نشان داد (شکل ۴). از آنجا که بین وزن خشک گیاهچه تولید شده و تعداد گیاهچه باززایی شده همبستگی مثبتی وجود دارد، بنابراین طبیعی به نظر می‌رسد که با مشاهده روند کاهشی تعداد گیاهچه باززایی شده در غلظت ۲ تا ۴ میلی گرم در لیتر هورمون BA، وزن خشک تولید شده نیز کاهش یابد.

همبستگی مثبتی بین افزایش غلظت BA تا حد مطلوب و تعداد شاخساره باززایی شده گزارش شده است ولی غلظت‌های بالاتر از حد مطلوب اثرات نامطلوبی بر القاء شاخساره، میزان پرآوری و ارتفاع گیاهچه‌های تکثیر شده دارد و گیاهچه‌هایی با حالت بوته‌ای ایجاد می‌گردد. کاهش در پتانسیل باززایی به نظر می‌رسد به علت اثرات نامطلوب غلظت‌های بالای هورمون بر سلول‌های از پیش تعیین شده جهت تشکیل جوانه‌های رویشی باشند (۷ و ۸).

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که افزوده شدن BA به محیط کشت و همچنین غلظت مناسب آن موجب افزایش پرآوری شاخساره‌ها در مقایسه با محیط فاقد هورمون می‌گردد. در محیط فاقد هورمون سیتوکنین باززایی بخوبی صورت نگرفته و این نشان دهنده نقش مشخص سیتوکنین‌ها در قابلیت تحریک، تکثیر و تقسیم سلولی در بافت‌های ریزنمونه مورد کشت و در نتیجه تشکیل اندام (اندام زایی) در بافت‌های تیمار شده می‌باشد. در این آزمایش غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA موجب پرآوری قابل قبولی در ریزنمونه‌های گیاه ژربرا گردید. با این حال با بررسی تحقیقات انجام شده مشخص گردید که برای پرآوری مناسب، برخی از محققین غلظت‌های بالاتری از سیتوکنین‌ها را برای افزایش تعداد شاخساره پیشنهاد داده‌اند. ولی در پرآوری ژربرا کاربرد سیتوکنین متجاوز از سطوح بحرانی از تشکیل شاخساره سالم جلوگیری می‌کند (۳). شایان ذکر است یافتن مناسب‌ترین غلظت هورمونی برای مراحل باززایی و پرآوری مستلزم در نظر گرفتن مزایا و معایب استفاده از غلظت‌های هورمونی بالاست، زیرا اگرچه در مواردی غلظت‌های بالای هورمونی کمک به تسریع باززایی یا افزایش شاخه‌زایی می‌کند، اما در مواردی موجب افزایش تنوع سوماکلونال، شیشه‌ای شدن و ایجاد گیاهان بدشکل می‌کند. بنابراین محقق بایستی همواره عواملی چون صرفه اقتصادی و سلامت گیاه تولید شده را نیز در نظر بگیرد. با در نظر گرفتن این نکته، غلظت بهینه بنزیل آدنین برای تولید حداکثر پرآوری شاخساره‌های سالم در گیاه ژربرا، غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر آن می‌باشد.

بررسی اثر نوع هورمون اکسین بر میزان ریشه‌زایی ریزنمونه‌های تکثیرشده ژربرا ژنوتیپ Sunway

بر اساس نتایج بدست آمده اثر نوع هورمون اکسین بر تمامی صفات مورد آزمایش در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بررسی

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به درصد ریشه‌زایی نشان داد که کاربرد انواع مختلف اکسین تاثیر معنی‌داری بر میزان ریشه‌زایی گیاهچه‌ها داشت بطوریکه بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط کشت MS ½ فاقد هورمون و محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون IAA و یا IBA با میانگین ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی مشاهده گردید. این در حالی است که میزان ریشه‌زایی در محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون NAA برابر با ۵۵ درصد بود (جدول ۳). چنین به نظر می‌رسد که کاربرد هورمون NAA در ترکیب محیط کشت، تاثیرات کمتری را بر ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززایی شده ژربرا داشت.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بین تیمارهای مختلف هورمون اکسین از لحاظ تعداد ریشه اصلی و فرعی تولیدی اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. بیشترین تعداد ریشه اصلی (۵/۵۳) در محیط کشت ½ MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون IBA مشاهده گردید و کمترین میزان آن در محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون NAA با میانگین ۱/۸۷ مشاهده گردید. از لحاظ تعداد ریشه فرعی تولیدی نیز بیشترین میزان آن در محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون IBA (۳/۰۱) مشاهده گردید ولی با این حال بین محیط کشت MS ½ فاقد هورمون و محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون IAA و یا IBA اختلاف معنی‌داری از این لحاظ مشاهده نشد. از سوی دیگر، در محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون NAA هیچگونه ریشه فرعی تولید نگردید که اختلاف ایجاد شده نسبت به سایر ترکیبات مورد استفاده معنی‌دار بود (جدول ۳).

جدول ۳- اثر نوع هورمون اکسین بر میزان ریشه‌زایی ریزنمونه‌های تکثیرشده ژربرا ژنوتیپ Sunway

Table 3- Effect of auxin types on rooting of regenerated explant of gerbera sunway genotype

نوع هورمون اکسین Type of auxin	طول ریشه Root length (cm)	تعداد ریشه فرعی n. of secondary root	تعداد ریشه اصلی n. of origin root	درصد ریشه‌زایی Rooting (%)
½ MS + Ø	4.84 a	2.32 a	3.47 b	100.00 a
½ MS + 1 mg/l IBA	4.25 a	3.01 a	5.53 a	100.00 a
½ MS + 1 mg/l IAA	4.42 a	2.54 a	4.34 b	100.00 a
½ MS + 1 mg/l NAA	0.77 b	0.00 b	1.87 c	55.00 b

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند

Means within the column followed by the same letters are not significantly different at $p<0.05$ based on Tukey's test

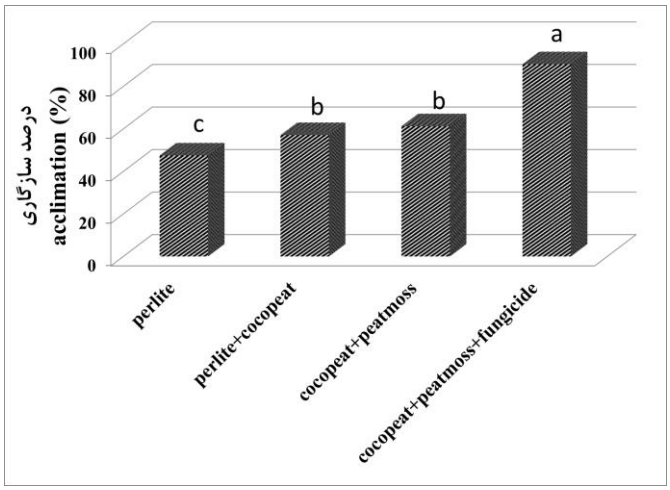
ارزیابی اثر نوع هورمون اکسین بر طول ریشه‌های تولیدی نشان داد که بین انواع مختلف هورمون اکسین از این لحاظ اختلاف معنی‌داری وجود دارد بطوریکه طویل‌ترین ریشه‌های تولیدی در محیط کشت MS ½ فاقد هورمون با میانگین ۴/۸۴ سانتی متر مشاهده گردید. با این حال بین محیط کشت MS ½ فاقد هورمون و محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون IAA و یا IBA از لحاظ طول ریشه تولیدی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید و کمترین میزان طول ریشه تولیدی (۰/۷۷ سانتی متر) در محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون NAA حاصل گردید (جدول ۳).

در تحقیقی سوزک و همپل (۲۱) در مرحله ریشه‌زایی اثر سطوح مختلف IAA و NAA را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که IAA از نظر تعداد و طول ریشه، ریشه های بیشتر و بلندتری نسبت به NAA تولید می کند. غیور کریمیانی (۱۰) برای ریشه‌دار کردن شاخه ها از محیط کشت MS بدون هورمون استفاده کرد. محققانی دیگر نظیر الیورا و همکاران (۱۵) نیز ریشه‌زایی در محیط کشت MS بدون هورمون را گزارش کردند. نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد که بهترین عکس‌العمل گیاهچه‌ها از نظر ریشه‌زایی در محیط کشت های MS ½ فاقد هورمون و محیط کشت MS ½ حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون IAA مشاهده گردید که با نتایج پژوهش محققان مطابق می‌باشد.

در طی مراحل ریزازدیادی، ریشه‌زایی شاخساره‌های باززایی شده از اهمیت قابل توجهی برخوردار است و عدم ریشه‌زایی مناسب، سازگاری گیاهچه‌های تولید شده را به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهد. از آنجائیکه برخی از ژنوتیپ‌ها ریشه‌زایی مطلوبی را از خود نشان نمی‌دهند، بنابراین تشکیل ریشه‌های نابجا در شرایط کشت بافت یکی از موضوعات اساسی طی مراحل ریزازدیادی می‌باشد. ریشه‌زایی بعنوان یک مرحله مجزا در نظر گرفته می‌شود که در این مرحله اکسین‌ها نقش اساسی را ایفا می‌کنند (۸). با این حال نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که گیاه ژربرا دارای پتانسیل ریشه‌زایی بالایی بوده، بطوریکه در محیط کشت بدون هورمون اکسین نیز براحتی ریشه تولید می‌نماید. احتمالا گیاه ژربرا با برخورداری از اکسین درونی بالا براحتی قادر به تولید ریشه در محیط کشت مغذی می‌باشد. بنابراین جهت تکثیر تجاری، به منظور کاهش هزینه‌های تولیدی، کاربرد محیط کشت MS ½ جهت ریشه‌زایی گیاه ژربرا توصیه می‌گردد.

بررسی اثر بستر کشت‌های مختلف بر استقرار و سازگاری گیاهچه‌های باززایی شده ژربرا ژنوتیپ Sunway

بر اساس نتایج بدست آمده، اثر نوع بستر کشت بر درصد سازگاری نمونه‌های سازگار شده معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌های آزمایش نشان داد که بیشترین درصد سازگاری در بستر کشت پیت ماوس، کوکوپیت و قارچ‌کش (با میانگین ۹۰/۴۲) و کمترین درصد سازگاری در بستر کشت حاوی پرلیت (با میانگین ۴۷/۵) حاصل شد. بین بسترهای کشت کوکوپیت همراه با پرلیت و کوکوپیت با پیت ماوس اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان سازگاری مشاهده نگردید (شکل ۶).



شکل ٦- اثر بستر کشت بر میزان سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی ژربرا ژنوتیپ Sunway در شرایط برون شیشه‌ای

Figure 6- Effect of medium on acclimation of *in vitro* plantlet of gerbera cv. Sunway

رینورد و همکاران (۲۰) گزارش کردند که بهترین بستر کشت جهت سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی ژربرا، بستر کشت پیت و پرلیت به نسبت مساوی ۱:۱ می‌باشد. نتایج پژوهش آنها نشان داد که انتقال گیاهان به این بستر به میزان صد در صد موفقیت آمیز بوده است. پترو و ماتوس (۱۷) نیز با استفاده از همین نسبت پیت: پرلیت استقرار خوبی را گزارش کردند. لالیبرته و همکاران (۱۲) گیاهان ریشه‌دار شده را در گلدان‌های محتوی پیت: پرلیت کشت کردند. پس از استقرار گیاهان در این بستر و سازگاری آنها با شرایط محیطی آنها را به گلخانه و بستر کشت پرلیت منتقل کردند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که ۹۵ درصد گیاهان منتقل شده به گلخانه با شرایط جدید سازگار شدند. آسوات و کوهاری (۱) از کوکوپیت، خاک سرخ و شن به نسبت ۳:۱:۱ استفاده نمودند. نتایج آزمایش آنها حاکی از استقرار صد در صدی گیاهچه‌های انتقال یافته بود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در مرحله القاء، بیشترین درصد باززایی و تعداد گیاهچه باززایی شده در محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA حاصل شد. با توجه به اینکه BA باعث از بین رفتن غالبیت انتهایی و فعال شدن جوانه‌های جانبی می‌شود، به نظر می‌رسد افزایش غلظت این هورمون تا حد مطلوب باعث تحریک جوانه‌ها و تولید شاخه بیشتر می‌شود. در مرحله پرآوری، افزودن BA به محیط کشت و همچنین غلظت مناسب آن موجب افزایش پرآوری شاخساره‌ها در مقایسه با محیط فاقد هورمون می‌گردد. در این آزمایش غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA موجب پرآوری قابل قبولی در ریزنمونه‌های گیاه ژربرا گردید. اثر رقم در باززایی ریزنمونه‌ها مؤثر می‌باشد و هر رقم در شرایط درون‌شیشه‌ای پاسخی متفاوت از سایر رقم‌ها نشان می‌دهد و نسبت بهینه تنظیم کننده‌های رشد برای باززایی شاخساره بستگی زیادی به رقم دارد. نتایج این آزمایش نشان داد که گیاه ژربرا دارای پتانسیل ریشه‌زایی بالایی بوده، بطوریکه در محیط کشت بدون هورمون اکسین نیز براحتی ریشه تولید می‌نماید. بنابراین جهت تکثیر تجاری، به منظور کاهش هزینه‌های تولیدی، کاربرد محیط کشت MS ½ جهت ریشه‌زایی گیاه ژربرا توصیه می‌گردد. در پایان آزمایش نیز سازگاری گیاهچه‌های تکثیر شده در بستر کشت پیت ماوس، کوکوپیت و قارچکش با میانگین ۹۰/۴۲، با موفقیت در شرایط گلخانه انجام شد.

منابع

1- Aswath C., and Choudhary M.L. 2002. Rapid plant regeneration from *Gerbera jamesonii* Bolus callus cultures. Acta Botanica Croatica, 61: 125-134.
2- Blakesly D., Lenton J., and Horgan R. 1987. Cytokinin uptake and metabolism in relation to Gerbera shoot multiplication in vitro. Plant Growth Regulator Group 28, 87–99.
3- Chakrabarty D., and Datta S.K. 2008. Micropropagation of Gerbera: lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities during acclimatization process. Acta Physiologiae Plantarum, 30:325-331.
4- Daneila H., and Kuzmicic I. 1993. The effects of Genotype on Gerbera shoot multiplication *in vitro*. Acta Botanica. 52:25-32.
5- Dewir Y.H., Chakrabarty D., Hahn E.J., and Paek K.Y. 2006. A simple method for mass propagation of spathiphyllum using an air-lift bioreactor. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 42: 291-297.
6- Evaldsson I.E. and Welander N.T. 1985. The effects of medium composition on in vitro propagation and in vitro growth of *Cordyline terminalis* cv. Atoom. The Journal of Horticultural Science & Biotechnology. 60: 525-530.
7- Fatima, N., Ahmad, N., Ahmad, I., Anis, M. 2015. Interactive Effects of Growth Regulators, Carbon Sources, pH on Plant Regeneration and Assessment of Genetic Fidelity Using Single Primer Amplification Reaction (SPARS) Techniques in Withania somnifera L. Applied biochemistry and biotechnology, 177:118-136.
8- Fatima, N., Anis, M. 2012. Role of growth regulators on in vitro regeneration and histological analysis in Indian ginseng (*Withania somnifera* L.) Dunal. Physiology and molecular biology of plants, 18(1):59-67.
9- Gerado M. 2002. Gerbera cultivation in greenhouse. Schreurs the Netherland.
10- Ghayur karimiyani z. 1386. Tissue Culture of Gerbera (*Gerbera jamesonii*) and investigation the possibility of using oryzalin for producing of tetraploid plant. MSc Thesis, Ferdowsi University of Mashhad.
11- Kanwar J.K. and Kumar S. 2008. In vitro propagation of Gerbera - A Review. Horticultural Sciences (Prague), 35: 35-44.
12- Laliberté S., Chrétien L. and Vieth J. 1985. *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. Hortscience, 20: 137-139.
13- Mariska I., Gati E. and Sukmadja D. 1989. *In vitro* clonal propagation of Gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus). Buletin Penelitian Horticulture, 17(4): 34-43.
14- Modh F.K., Dhaduk B.K. and Shah R.R. 2002. Factors affecting micropropagation of gerbera from capitulum explants. Journal of Ornamental Horticulture, 5: 4-6.
15- Olivera O.V.Z., Gutierrez E.M.A. and Andrade R.M. 2000. In vitro culture of gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) and its acclimatization in greenhouse. Bioagro., 12:75-80.
16- Parthasarthy V.A. and Nagaraju V. 1999. In vitro propagation in *Gerbera jamesonii* Bolus. Indian Journal of Horticulture, 56: 82-85.
17- Petru E. and Matous J. 1984. In vitro cultures of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus). Sborník ÚVTIZ Zahradnictví. 11: 309-314.
18- Posada M., Ballesteros N., Obando W. and Angarita A. 1999. Micropropagation of gerbera from floral buds. Acta Horticulturae. 482: 329-331.
19- Ray T., Saha P. and Roy S.C. 2005. In vitro plant regeneration from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology. 6: 35-40.
20- Reynoird J.P., Chriqui D., Noin M., Brown S. and Marie D. 1993. Plant propagation from in vitro leaf culture of several gerbera species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 33: 203-210.
21- Soczek U. and Hempel M. 1986. Some aspects influencing the efficiency of Gerbera micropagation. Prace Inst. Sadowni Ctwa Rosliny Oadobne, 11:117-124.
22- Statistics of Agriculture, Volume II. 1381. Agriculture and horticulture, sericulture, livestock, poultry and aquaculture, natural resources, rural development and organization of tribes, extension and education, agriculture and rural cooperation. Publications Office of Statistics and Information Technology of the Ministry of Agriculture (in Persian).
23- Statistics of Agriculture, Volume II. 1383. Agriculture and horticulture, livestock and poultry, aquaculture, natural resources, rural industries, the tribes, and the promotion of farming systems, training, research and rural cooperation. Publications Office of Statistics and Information Technology of the Ministry of Agriculture (in Persian).
24- Topoonyanont N. and Dillen W. 1988. Capitulum explants as a start for micropropagation of gerbera; culture technique and applicability. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent. 53: 169-173.
25- Tyagi P. and Kothari S.L. 2004. Rapid in vitro regeneration of Gerbera jamesonii (H. Bolus ex Hook f.) from different explants. Indian Journal of Biotechnology, 3: 584-586.
26- Verma N. and Anand A. 2006. Micropropagation of *Gerbera jamesonii* (Bolus) on different culture media. Advances in Plant Sciences, 19: 19-22.

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 2, Summer 2017, P. 376-388
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص.۳۸۸-۳۷۶
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Effect of different Genotypes, Cytokinins and Auxins on *In vitro* Capitulum Regeneration of Gerbera (*Gerbera jamesonii*)

A. Sharifi[1]- M. Kharrazi[2*]- F. Keykha[3]- A. R. Bagheri[4]- E. Samari[5]- Maryam Moradian[6]

Received: 29-02-2016
Accepted: 09-10-2016

Introduction: Gerbera is one of the most important ornamental plants in the world. The importance of Gerbera is due to its beauty, diversity and economically aspects. Traditional propagation methods such as crown division and cutting methods are not suitable for obtaining disease free plants and rapid multiplication. These methods also do not have the capacity to fulfill global demands. Therefore, obtaining efficient protocol for micropropagation of this ornamental plant is necessary.

Materials and Methods: In this study the effect of various factors on *in vitro* regeneration, proliferation, rooting and acclimation of gerbera capitulum explants were analyzed in four separate experiments. Capitulum explants were first washed with running tap water for 30 min then surface sterilized by dipping in 1.5% sodium hypochlorite solution for 15 min and rinsed with sterile distilled water, followed by immersing in 0.1 % mercuric chloride solution for 10 min. To remove mercuric chloride residue, capitulum was rinsed with sterile distilled water. Subsequent washing was done with sterile distilled water for three times. Sterilization steps were done under laminar air flow hood. For regeneration, eight genotypes of gerbera capitulum explants (Famous, Sunway, Red Pearl, Pink Snow, Popov, Balance, Dune, Eagle)were cultured on solid MS medium containing several cytokynins, BA, TDZ, 2IP or KIN (4 mg/l) in combination with IAA (0.2 mg/l). In proliferation stage, the effect of different concentrations of BA was evaluated on proliferation rate of Sunway regenerated explants. In the rooting stage, Sunway genotype plantlets were cultured on ½ MS medium containing NAA, IBA or IAA (1 mg/l) or ½ MS medium without any hormones. The pH of the medium was adjusted to 5.7-5.8 prior to autoclaving (15 min at 121 ^{o}C and 1.5 kg.cm-2 pressure). The cultures were incubated in a growth chamber at 25±2 ^{o}C with a 16-h photoperiod (2500-3000 Lux) provided by cool-white fluorescent lamps. For acclimation of rooted plantlets, different substrates used as follow: 1- perlite, 2- perlite: Cocopeat, 3- Cocopeat: peat moss, 4- Cocopeat: peat moss; treated with fungicide.

After 30 days, the response of explants was evaluated for each experiment. Data preparation was done in the Excel program and data analysis was done using JMP-8 software. Mean comparison of the treatments was done by Tukey test and finally the charts were drawn using the Excel program.

Results and Discussion: The results of regeneration stage showed that application of MS media containing kinetin or 2IP did not make an appropriate response to capitulum explants and no regeneration was observed in this condition. The medium containing 4 mg/l BA and 0.2 mg/l IAA indicated the highest percentage of regeneration in all genotypes.

The highest regeneration was observed in Sunway genotype with an average of 21.96%. On the other hand no regeneration was observed in Eagle genotype. In terms of the number of regenerated plantlet, the highest number (61.2) was attributed to the Sunway genotype while no plantlet was recorded for Eagle genotype. No significant differences were also observed between Pink Snow and Dune genotypes.

For the proliferation stage, only Sunway genotype was utilized due to its vigorous growth in comparison to other genotypes. In this stage, the highest (6 regenerated plantlets) and the lowest (1 regenerated plantlet) regeneration rate were observed in MS medium containing 2 mg/l BA and hormone-free medium, respectively. Hormone-free ½ MS medium and ½ MS medium containing 1 mg/l IAA or IBA, indicated the highest rooting

1, 2 and 3 - Research Assistant, Department of Ornamental Plant Biotechnology, Academic Center for Education, Culture and Research: ACECR, Razavi Khorasan Province, Mashhad, Iran
(*-Corresponding Author Email: ma_kh230@yahoo.com)
4 - Professor, Department of Biotechnology and Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
5- PhD Student of Plant Physiology, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
6- Researcher, Department of Ornamental Plant Biotechnology, Academic Center for Education, Culture and Research: ACECR, Razavi Khorasan Province, Mashhad, Iran

rate (100% rooting) while medium containing 1 mg/l NAA showed 55% rooting rate. It seems that the application of NAA in the medium composition had the lowestimpact on the rooting of regenerated plantlets. At the end of the experiment, the highest (90.42%) and the lowest (47.5%) acclimation rate was obtained in peat moss + cocopeat + fungicide medium and perlite medium, respectively.

Conclusions: Generally, for shoot induction of gerbera through capitulum culture, application of MS medium containing 4 mg/l BA and 0.2 mg/l IAA is recommended. It is also concluded that for proliferation stage, the MS medium containing 2 mg/l BA showed the highest rate of regeneration. Using of Hormone-free ½ MS medium is economically affordable. Finally for acclimation of the plantlets, application of peat moss + cocopeat + fungicide medium is recommended.

Keywords: Acclimation, MS medium, Proliferation, Regeneration, Rooting