نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰ ، ص. ۳۸۳-۳۷۶
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 25, No. 4, Winter 2012, P. 376-383
ISSN: 2008 - 4730

# بررسی اثرات نوع و غلظت سیتوکنین بر تکثیر درون شیشه‌ای و میزان شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌های چهار ژنوتیپ میخک (*Dianthus caryophyllus* L.)

سیده مهدیه خرازی[1*]- سید حسین نعمتی[2]- علی تهرانی‌فر[3]- احمد شریفی[4]- عبدالرضا باقری[5]

تاریخ دریافت:۸۹/۵/۱۲
تاریخ پذیرش:۸۹/۱۲/۳

## چکیده

میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) به عنوان سومین گل شاخه بریده مهم دنیا مطرح است. تکنیک‌های کشت بافت روش مناسبی را برای ریزازدیادی این گیاه زینتی فراهم کرده است. در این بررسی اثر کینتین (Kin) و بنزیل آدنین (BA) بر تکثیر شاخساره و میزان شیشه‌ای شدن شاخساره‌های تکثیر شده چهار رقم میخک (Prado Aquila Kgr, Skimo Mogr, Mondeo Kgr and Innove Orange Bogr) مورد ارزیابی قرار گرفت. ریزنمونه‌های گره در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و کینتین (۱، ۲، ۳ و ۴ میلی گرم در لیتر ) همراه با ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار قرار گرفتند. ریشه زایی ریزنمونه‌های تکثیر شده در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر NAA صورت گرفت. نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری بین ارقام در میزان باززایی شاخساره وجود دارد، بطوریکه ارقام Eskimo و Prado Aquila Kgr با میانگین ۳/۲ و ۱/۵ شاخساره به ترتیب بیشترین و کمترین میزان باززایی را از خود نشان دادند. افزایش غلظت سیتوکنین از ۱ میلی گرم در لیتر به ۴ میلی گرم در لیتر باعث افزایش تعداد شاخساره باززایی شده از ۱/۷ به ۲/۴ شاخه در هر ریزنمونه و افزایش میزان شیشه‌ای شدن از ۱۲ درصد به ۵۴ درصد شد. همچنین سطوح بالای سیتوکنین به خصوص هورمون BA ارتفاع گیاهچه‌های باززایی شده را کاهش داد. از نظر میزان شیشه‌ای شدن بین ارقام و نوع سیتوکنین اختلاف معنی داری مشاهده شد، بطوریکه ارقام Mondeo Kgr وPrado Aquila Kgr به ترتیب بیشترین (۴۴ درصد) و کمترین (۲۳ درصد) میزان شیشه‌ای شدن را به خود اختصاص دادند و ریزنمونه‌های تکثیر شده در محیط کشت حاوی BA، درصد شیشه‌ای شدن بیشتری (۴۰ درصد) نسبت به Kin (۲۶ درصد) داشتند. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش میزان سیتوکنین در محیط کشت بویژه BA شاخه زایی افزایش می‌یابد، اما در عین حال باعث افزایش پدیده شیشه‌ای شدن نیز می‌شود که این پدیده اثری نامطلوب در شرایط این ویترو است و باعث از بین رفتن گیاهچه‌ها می‌شود. با درنظر گرفتن میزان شاخه زایی و پدیده شیشه‌ای شدن، برای بدست آوردن بیشترین شاخه طبیعی، کاربرد هورمون BA با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر همراه با ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA در محیط کشت MS نتیجه بهتری داده است.

**واژه‌های کلیدی:** میخک، بنزیل آدنین، کینتین، شیشه‌ای شدن، شاخه زایی، ریزازدیادی

## مقدمه

میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) یکی از مهم ترین گیاهان زینتی دنیا می‌باشد که هم به جهت زیبایی و گوناگونی و هم از نظر اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (۱). مصرف گل شاخه بریده میخک در دنیا در سال ۱۹۸۵ حدود ۱۲/۵ میلیارد دلار بود که این میزان در سال ۲۰۰۰ به ۳۵ میلیارد دلار افزایش یافت که این امر نشان دهنده اهمیت و توجه جامعه جهانی به این گیاه زینتی است (۱). ابتدا تکنیک کشت بافت در میخک به منظور حذف ویروس در این گیاه مورد استفاده قرار گرفت و اکنون به عنوان روشی برای تکثیر تجاری آن درآمده است. باززایی شاخساره‌های نابجا در میخک توسط ریزنمونه‌های مختلفی چون گلبرگ، برگ، گره ساقه، جوانه جانبی و انتهایی شاخساره امکان پذیر است (۱، ۲، ۶، ۷، ۱۱ و ۱۳). روش باززایی غیر مستقیم به علت تولید بافت کالوس، درصد گیاهان باززایی شده غیر مشابه با والد را افزایش می‌دهد و در نتیجه

۱،۲و۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email:ma_kh230@yahoo.com)
۴- عضو هیئت‌علمی گروه کشت‌بافت و ریزازدیادی گیاهان جهاددانشگاهی مشهد
۵- استاد گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

ثبات ژنتیکی کاهش می‌یابد. جوانه‌های جانبی میخک ریزنمونه‌های مناسبی برای تکثیر این گیاه می‌باشند، زیرا با استفاده از این نوع ریزنمونه‌ها مرحله کالوس را نخواهیم داشت و در نتیجه شاخاره‌های باززایی شده از نظر خصوصیات ژنتیکی یکسان و مشابه گیاهان مادری خواهند بود. علاوه براین سرعت تکثیر در این روش نسبت به باززایی غیر مستقیم بیشتر است (۳).

باززایی مستقیم میخک در شرایط این ویترو تحت تاثیرعوامل متعددی نظیر نوع ریزنمونه، ژنوتیپ و تنظیم کننده‌های رشد قرار می‌گیرد (۳). به این منظور از ترکیبات هورمونی مختلفی چون BA، Kin ، 2ip وTDZ در سطوح ۰/۵، ۲، ۳ و حتی ۲۰ میلی گرم در لیتر استفاده شده است (۱، ۳، ۹، ۱۲ و ۱۶). امیر علی و همکاران (۱) توانایی باززایی ریزنمونه‌های مریستم انتهایی و جانبی میخک را مورد ارزیابی قرار دادند و برای القای شاخه زایی در ریزنمونه ها، محیط کشت MS حاوی ۴ میلی گرم در لیتر BA و برای تکثیر آنها محیط کشت حاوی ۱ میلی گرم در لیتر این هورمون را توصیه کردند. آنها گزارش کردند که افزودن کینتین به این محیط کشت باعث کاهش تکثیر اندام هوایی می‌گردد، اما در عین حال باعث افزایش ارتفاع گیاهچه تولیدی می شود. مجیب و پال (۱۲) عکس العمل متفاوت ارقام در تکثیر به روش درون شیشه‌ای با استفاده از جوانه انتهای شاخاره میخک را گزارش کردند. نتایج آزمایش آنها نشان داد که بیشترین تعداد شاخاره در محیط کشتی بدست آمد که کمترین میزان BA را داشت ( ۰/۵ میلی گرم در لیتر). همچنین کینتین نسبت به BA دارای این مزیت بود که شاخاره‌های تولیدی ارتفاع بیشتری داشتند. اما نتایج پژوهش صالحی (۱۶) بر روی کشت جوانه ۱۳ رقم میخک نشان داد که بهترین ترکیب هورمونی برای استقرار و تکثیر شاخاره محیط کشت MS حاوی ۳ میلی گرم در لیتر کینتین در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA یا ۱ میلی گرم در لیتر BA در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر NAA می‌باشد. وی بیان کرد که عکس العمل ارقام مختلف نسبت به ترکیبات هورمونی محیط کشت جهت تکثیر شاخاره یکسان می‌باشد. این در حالی است که نتایج آزمایش برار و همکاران (۳) نشان داد که ارقام مختلف میخک عکس العمل متفاوتی نسبت به ترکیبات هورمونی محیط کشت از خود نشان می دهند. عموما برای ریشه زایی شاخارهای تولید شده میخک در شرایط کشت بافت از ترکیبات هورمونی IBA و NAA (۰/۵ تا ۲ میلی گرم در لیتر) و همچنین انتقال مستقیم شاخاره‌ها به بستر کشت استفاده شده است (۱، ۱۱ و ۱۶).

یکی از مشکلات متداول در طی فرایند کشت بافت میخک، پدیده شیشه‌ای شدن می‌باشد. این فرایند در واقع ایجاد نوعی تغییرات نامطلوب فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در بافت‌های گیاهی می‌باشد. در گیاهان شیشه‌ای شده تعداد دسته جات آوندی، 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 زنده مانی این گیاهان پس از انتقال به شرایط محیطی طبیعی کاهش می‌یابد (۵ و ۲۰). عوامل متعددی بر پدیده شیشه‌ای شدن موثر می‌باشد که یکی از مهم ترین این عوامل نوع و غلظت سیتوکنین مورد استفاده در محیط کشت است. افزایش غلظت هورمون سیتوکنین باعث افزایش پدیده شیشه‌ای شدن می‌شود (۵ و ۱۴). حضور هورمون BA در محیط کشت عامل مهمی در ایجاد پدیده شیشه‌ای شدن می‌باشد، به طوری که با کاهش میزان این هورمون پدیده شیشه‌ای شدن نیز کاهش می‌یابد، در عین حال میزان تکثیر و باززایی نیز کاهش می‌یابد (۱۰).

تیسی (۱۸) با بررسی پاسخ ریزنمونه‌های جوانه انتهایی میخک نسبت به غلظت‌های مختلف هورمون BA نتیجه گرفت که با افزایش غلظت هورمون BA از صفر به ۴ میلی گرم در لیتر ، میزان شاخه زایی افزایش می‌یابد ولی غلظت بالای هورمون BA باعث افزایش پدیده شیشه‌ای شدن می‌شود. دنسو (۴) اظهار داشت که افزایش غلظت هورمون کینتین از ۱ به ۲ میلی گرم در لیتر، باعث افزایش درصد شیشه ای شدن از ۱۹ درصد به ۶۵ درصد می شود. اگرچه کاربرد ۱ میلی گرم در لیتر هورمون BA یا 2ip باعث افزایش تعداد شاخاره می شود، اما گیاهان حاصله ظاهری غیرطبیعی خواهند داشت. لشم (۱۰) نشان داد که پدیده شیشه‌ای شدن 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 عدم حضور هورمون سیتوکنین، پدیده شیشه‌ای شدن تحریک نمی شود.

ژنوتیپ‌های مختلف میخک عکس العمل متفاوتی نسبت به تنظیم کننده‌های رشد از خود نشان می‌دهند (۳ و ۱۶). پژوهش‌های زیادی بر روی ژنوتیپ‌های مختلف میخک صورت گرفته است. اما از آنجایی که تا کنون پژوهشی بر روی ارقام Prado Aquila Kgr, Eskimo Mogr, Mondeo Kgr and Innove Orange Bogr صورت نگرفته است، ضرورت انجام این پژوهش آشکار می‌گردد.

هدف پژوهش حاضر آزمون تاثیر غلظت‌های مختلف سیتوکنین‌های BA وKin بر روی شاخه زایی مستقیم ریزنمونه‌های گره جانبی چهار ژنوتیپ میخک وتاثیر آنها بر میزان شیشه‌ای شدن جهت پیدا کردن سطح بهینه ترکیب هورمونی بود.

## مواد و روش ها

در این پژوهش چهار رقم میخک (Prado Aquila Kgr, Eskimo Mogr, Mondeo Kgr and Innove Orange

(Bogr در شرایط محیطی مناسب در گلخانه نگهداری و از آنها برای تهیه ریزنمونه استفاده شد. گیاهان شاداب، عاری از بیماری و در مرحله رشد فعال انتخاب و ریزنمونه‌های جوانه‌های جانبی به اندازه ۱ سانتی متر از آنها تهیه و برای کشت آماده شدند. ریزنمونه‌ها ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب شیر شستشو و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با محلول دو درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی گردیدند. ریزنمونه‌های ضدعفونی شده تحت شرایط استریل ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند و جوانه هایی به طول ۳ تا ۵ میلی متر از آنها تهیه و کشت گردیدند.

در این بررسی از محیط کشت جامد MS (موراشیگ و اسکوگ) حاوی ترکیب‌های هورمونی BA و یا Kin (۱، ۲، ۳ و ۴ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با NAA (۰/۲ میلی گرم در لیتر)، ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار، pH=۵/۷ استفاده گردید. محیط کشت‌ها در لوله‌های آزمایش به میزان ۱۳ میلی لیتر توزیع گردیده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو گردید. پس از کشت ریزنمونه‌ها در لوله‌های آزمایش، ریزنمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی گراد منتقل شده و در فاصله زمانی ۴ هفته واکشت انجام شد. در پایان هر واکشت عکس العمل ریزنمونه‌ها (تعداد و طول شاخه‌های باززایی شده، تعداد گره، فاصله میانگره و درصد شیشه‌ای شدن) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای ریشه زایی شاخه‌های تکثیر شده از محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر NAA استفاده شد و در نهایت گیاهان ریشه دار 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 سانتی گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با میزان موفقیت ۹۵ درصد صورت گرفت و سپس گیاهان سازگار شده به شرایط گلخانه انتقال یافتند. در این بررسی شاخه زایی به صورت آزمایش فاکتوریل با ۳ فاکتور ژنوتیپ (۴ سطح)، نوع هورمون سیتوکنین (۲ سطح) و غلظت هورمون سیتوکنین (۴ سطح) در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۰ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد. نرمال سازی داده‌های درصدی (درصد شیشه‌ای شدن) با استفاده از فرمول [ArcSin Sqrt (X/100)] صورت گرفت.

## نتایج و بحث

**اثر ترکیب هورمونی و رقم بر شاخه زایی:** نتایج داده‌های شاخه زایی نشان داد که بین ارقام مختلف میخک از نظر میانگین تعداد شاخساره تولید شده در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی داری وجود دارد، به طوری که بیشترین تعداد جوانه رشد یافته در رقم Eskimo Mogr با میانگین ۳/۲ و کمترین تعداد جوانه رشد یافته در رقم Prado Aquila Kgr با میانگین ۱/۵ مشاهده شد.

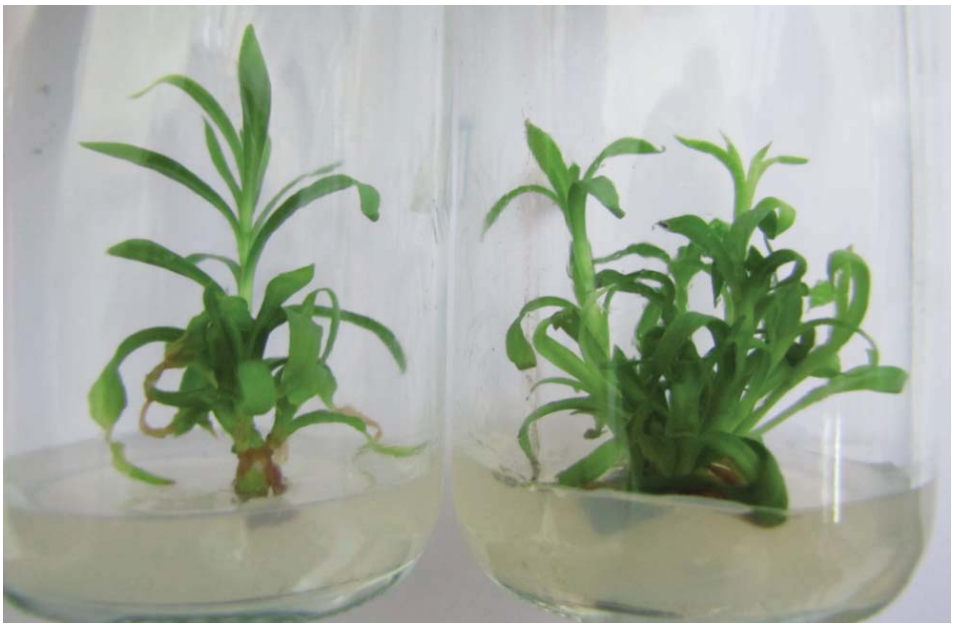
اثر نوع و غلظت هورمون سیتوکنین نیز بر تعداد شاخساره تولید شده در سطح ۱ درصد معنی دار بود. بررسی مقایسه میانگین تعداد جوانه تولید شده نشان داد که هورمون BA در تمام سطوح تعداد جوانه بیشتری نسبت به Kin تولید می‌کند (شکل ۲) و با افزایش سطوح هورمون BA تعداد شاخه تولیدی افزایش می‌یابد، بطوری که با افزایش BA از ۱ میلی گرم در لیتر به ۴ میلی گرم در لیتر تعداد شاخه تولید شده از ۲/۵ به ۳/۷ افزایش می‌یابد. اما چنین روندی در هورمون Kin مشاهده نمی شود و میزان شاخه تولید شده نسبتا ثابت است (شکل ۲). یافته‌های امیر علی و همکاران (۱) در ارتباط با کشت مریستم انتهایی و جانبی میخک موید این مطلب است که کاربرد هورمون BA تعداد شاخه بیشتری نسبت به هورمون کینتین تولید می‌کند. برار و همکاران (۳) نشان دادند که افزایش غلظت هورمون سیتوکنین باعث افزایش درصد باززایی در ریزنمونه‌ها می‌گردد. مجیب و پال (۱۲) اظهار داشتند که در بین غلظت‌های مختلف هورمون BA، کمترین غلظت هورمون باعث تولید بیشترین تعداد شاخساره می‌شود. کاپچینا و یاکیموا (۸) بیان کردند کاربرد هورمون سیتوکنین در محیط کشت باعث فعال شدن جوانه‌های جانبی می‌شود و افزایش غلظت آن منجر به ازبین رفتن غالبیت انتهایی می‌شود. با توجه به اینکه BA باعث از بین رفتن غالبیت انتهایی و فعال شدن جوانه‌های جانبی می‌شود، به نظر می‌رسد افزایش غلظت این هورمون باعث تحریک جوانه‌ها و تولید شاخه بیشتر می‌شود.

اثر متقابل رقم و نوع سیتوکنین بر تعداد شاخساره تولید شده معنی دار نبود و هر چهار رقم در محیط کشت حاوی BA بهترین شاخه زایی را داشتند. اما عکس العمل ارقام نسبت به سطوح سیتوکنین متفاوت بود، بطوری که بیشترین شاخه در رقم Prado Aquila Kgr در سطوح ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر BA، رقم Eskimo Mogr در سطوح ۳ و ۴ میلی گرم در لیتر BA، رقم Mondeo Kgrدر سطح ۴ میلی گرم در لیتر BA و رقم Innove Orange Bogr در سطح ۲ میلی گرم در لیتر BA بدست آمد (جدول ۱).

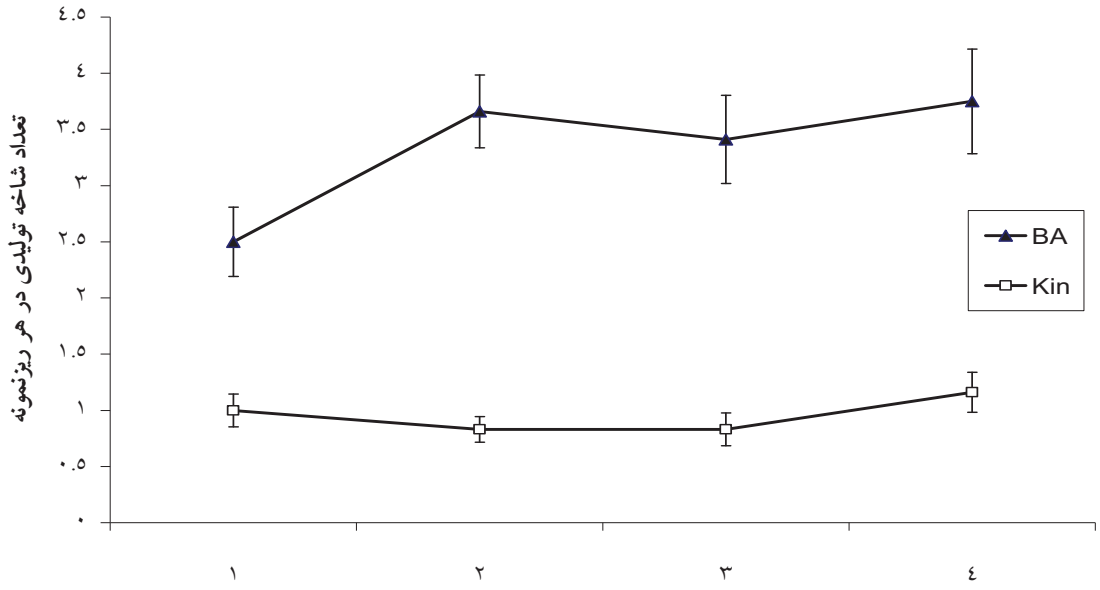
بر اساس نتایج بدست آمده اثر رقم بر ارتفاع گیاهچه در سطح ۱ درصد معنی دار بود. به طوری که بیشترین و کمترین ارتفاع گیاهچه به ترتیب در ارقام Innove Orange Bogr و Innove Orange Bogr با میانگین ۳/۵ و ۲/۱ سانتی متر مشاهده شد. کاربرد سیتوکنین‌های BA و Kin و سطوح مختلف آنها اثر معنی داری روی ارتفاع گیاهچه‌های تولید شده داشت، بطوری که در اغلب سطوح، Kin گیاهچه‌های بلندتری نسبت به BA تولید کرد و با افزایش سطوح سیتوکنین، ارتفاع گیاهچه‌ها کاهش یافت. بیشترین ارتفاع گیاهچه با میانگین ۳/۹ سانتی متر در تیمار ۲ میلی گرم در لیتر

کینتین مشاهده شد ولی بین غلظت‌های ۱ و ۲ میلی گرم درلیتر کینتین اختلاف معنی داری مشاهده نشد. همچنین بین غلظت‌های ۱ میلی گرم در لیتر هورمون BA و Kin اختلاف معنی داری مشاهده نشد (شکل ۳).

برار و همکاران (۳) نیز طی آزمایشی بر روی دو رقم میخک نشان دادند که افزایش غلظت هورمون سیتوکنین منجر به کاهش ارتفاع گیاهچه می‌شود که با نتیجه آزمایش اخیر مطابقت دارد. مجیب و پال (۱۲) نیز گزارش کردند که کاربرد هورمون کینتین نسبت به BA باعث افزایش بیشتر ارتفاع گیاهچه می‌شود.



**شکل ۱- اثر غلظت ٤ میلی گرم در لیتر هورمون سیتوکنین بر باززایی گیاهچه‌های میخک رقم Skimo (تصویر سمت راست: هورمون BA و تصویر سمت چپ: هورمون Kin)**

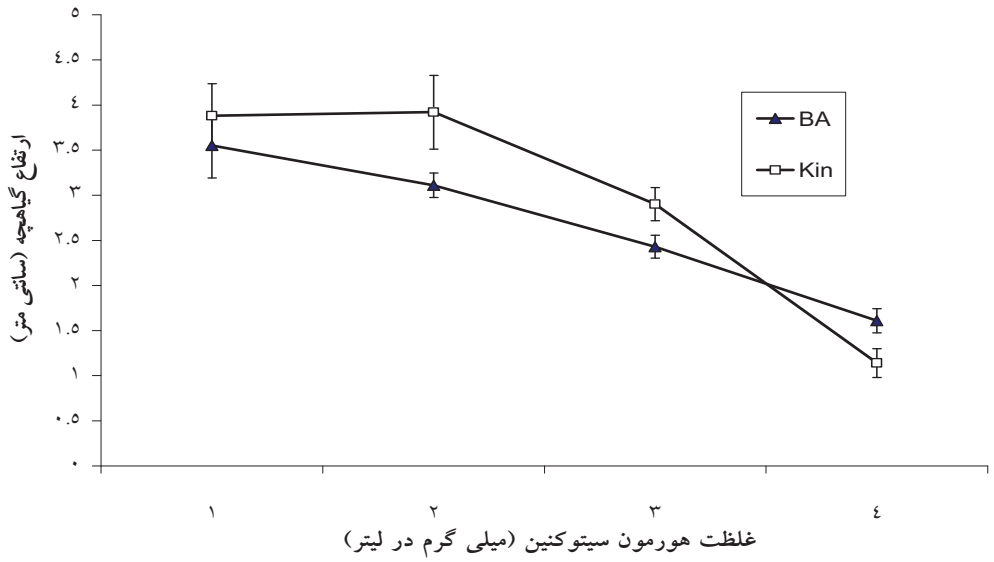



**شکل۲ – تاثیر نوع و غلظت هورمون سیتوکنین بر تعداد شاخساره تولید شده**

**جدول ۱- تاثیر نوع و غلظت هورمون سیتوکنین بر تعداد جوانه رشد یافته در ٤ ژنوتیپ میخک**

| ژنوتیپ | Kin (میلی گرم در لیتر) | | | | BA (میلی گرم در لیتر) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ۱ | ۲ | ۳ | ٤ | ۱ | ۲ | ۳ | ٤ |
| Prado Aquila Kgr | ۰/۸۳ gh | ۰/۵۰ h | ۰/۵۰ h | ۰/۵۲ h | ۲/۱۶ ef | ۲/۸۳ de | ۲/۸۳ de | ۲/۵۰ e |
| Skimo Mogr | ۱/۱۶ f-h | ۰/۵۰ h | ۰/۵۲ h | ۱/۸۳ e-g | ۴/۱۶ c | ۵/۵۰ ab | ۵/۸۳ a | ۶/۱۶ a |
| Mondeo Kgr | ۱/۱۵ f-h | ۱/۱۸ f-h | ۱/۱۷ f-h | ۱/۱۸ f-h | ۱/۱۶ f-h | ۲/۵۰ e | ۲/۸۳ de | ۴/۵۰ bc |
| Innove Orange Bogr | ۰/۸۳ gh | ۱/۱۵ f-h | ۱/۱۸ f-h | ۱/۱۸ f-h | ۲/۵۰ e | ۳/۸۳ cd | ۲/۱۶ ef | ۱/۸۳ e-g |

حروف متفاوت بیان کننده اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد ($p<۰/۰۱$) می‌باشد.




**شکل ۳ – تاثیر نوع و غلظت هورمون سیتوکنین بر ارتفاع گیاهچه (میلی‌گرم در لیتر)**

بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان اظهار داشت که کاربرد هورمون کینتین و BA هر کدام به ترتیب برای افزایش ارتفاع گیاهچه و افزایش تعداد شاخساره تولیدی مناسب می‌باشد. اما از آنجایی که تعداد شاخساره تولیدی نسبت به ارتفاع گیاهچه از اهمیت بیشتری برخوردار است، در نتیجه می‌توان گفت که هورمون BA تاثیر مطلوب تری نسبت به کینتین در پرآوری شاخساره‌های میخک دارد.

**اثر ترکیب هورمونی و رقم بر میزان پدیده شیشه‌ای شدن:**

نتایج تجزیه واریانس داده‌های شیشه‌ای شدن نشان داد که بین ارقام مختلف میخک از نظر میزان شیشه‌ای شدن اختلاف معنی داری (درسطح ۱ درصد) وجود دارد، بطوری که بیشترین و کمترین درصد شیشه‌ای شدن به ترتیب در ارقام Mondeo Kgr (۴۵ درصد) و Prado Aquila Kgr (۲۳ درصد) مشاهده شد. همچنین نوع و سطوح مختلف سیتوکنین نیز اثر معنی داری (به ترتیب در سطح ۱ و ۵ درصد) روی شیشه‌ای شدن و شاخه‌های تکثیر شده داشت. با توجه به نتایج بدست آمده هورمون BA در تمام سطوح باعث شیشه‌ای شدن بیشتری نسبت به Kin شد (به ترتیب ۴۰ و ۲۶ درصد) و با افزایش غلظت هر دو هورمون درصد شیشه‌ای شدن نیز افزایش یافت. بیشترین درصد شیشه‌ای شدن در نمونه‌های تیمار شده با ۴ میلی گرم در لیتر BA (۶۵ درصد) و کمترین میزان آن در نمونه‌های تیمار شده با ۱ میلی گرم در لیتر کینتین مشاهده شد (جدول ۲). نتایج پژوهش هازاریکا (۵) و تیسی (۱۸) مؤید این مطلب می‌باشد. شارما و همکاران (۱۷) نیز بیان کردند که کاربرد هورمون Kin نسبت به BA میزان پدیده شیشه‌ای شدن را کاهش می‌دهد و با افزایش غلظت هر دو نوع هورمون سیتوکنین پدیده شیشه‌ای شدن افزایش می‌یابد.

بین درصد شیشه‌ای شدن و فاصله میانگره همبستگی منفی و بالایی ($R= - 0.94$) مشاهده شد. به عبارت دیگر با افزایش غلظت هورمون سیتوکنین فاصله میانگره کاهش و درصد شیشه‌ای شدن افزایش یافت (شکل ۴).

**جدول ۲ – تاثیر نوع و غلظت هورمون سیتوکنین بر درصد شیشه‌ای شدن ریزنمونه ها**

| نوع سیتوکنین | غلظت (میلی گرم در لیتر) | درصد شیشه‌ای شدن ریزنمونه |
|---|---|---|
| BA | ۱ | ۱۸/۶۰ e |
| | ۲ | ۳۰/۵۹ cd |
| | ۳ | ۴۵/۰۰ b |
| | ۴ | ۶۵/۹۶ a |
| Kin | ۱ | ۵/۸۴ f |
| | ۲ | ۲۳/۵۰ de |
| | ۳ | ۳۲/۷۷ c |
| | ۴ | ۴۲/۵۱ b |

حروف متفاوت بیان کننده اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد ($p<۰/۰۵$) می‌باشد.

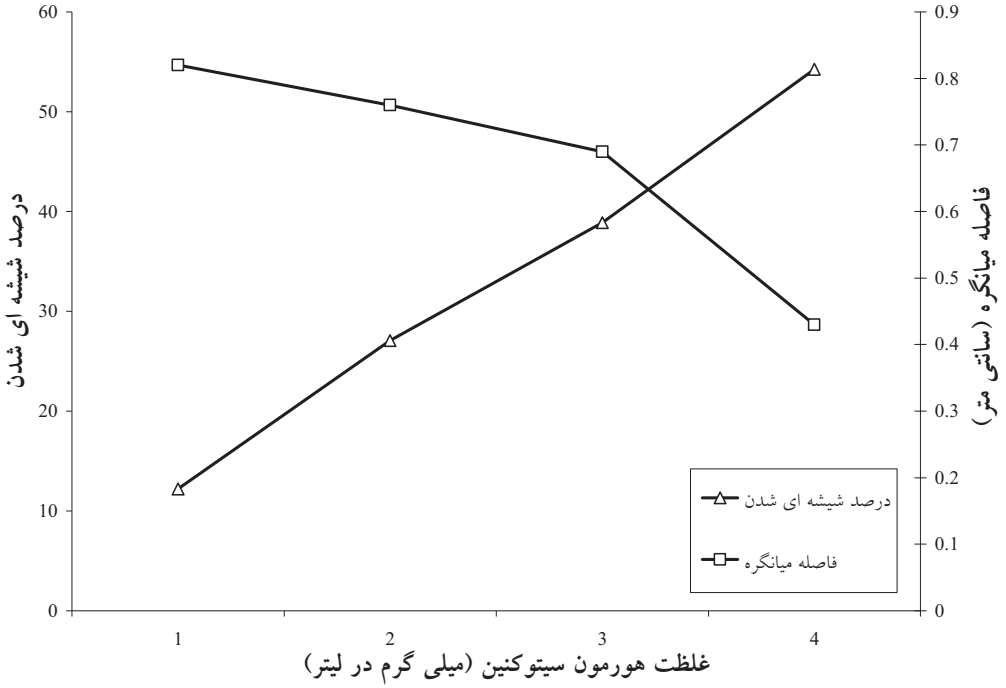
نتایج این پژوهش نشان داد که هورمون کینتین تاثیر مثبتی در افزایش ارتفاع گیاهچه و در نتیجه افزایش فاصله میانگره دارد. اما کاربرد هورمون BA نسبت به کینتین باعث کاهش ارتفاع گیاهچه و در نتیجه افزایش پدیده شیشه‌ای شدن شد. با توجه به نتایج بدست آمده هورمون BA باعث القای شاخه زایی مناسب در ریزنمونه‌های کشت شده می‌شود. اما این هورمون و بخصوص سطوح بالای آن باعث افزایش پدیده شیشه‌ای شدن گیاهچه‌های تولیدی می‌شود. بهتر است که برای تکثیر گیاهچه‌های سالم، سطوح پایین BA (۱ میلی گرم در لیتر) استفاده شود. شارما و همکاران (۱۷) نیز طی پژوهشی تاثیر غلظت‌های مختلف BA و Kin را بر کشت جوانه انتهایی سجافی (*Chlorophytum borilivinum*) بررسی کردند. نتایج آزمایش آنها نشان داد که کاربرد هورمون BA نسبت به کینتین پدیده شیشه‌ای شدن را افزایش داد. همچنین بیشترین میزان تکثیر شاخساره در محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BA بدست آمد ولی در این محیط کشت میزان شیشه‌ای شدن افزایش یافت. کاهش غلظت هورمون BA از ۲ به صفر میلی گرم در لیتر در طی واکشت‌های متمادی باعث کاهش میزان پدیده شیشه‌ای شدن در این گیاه شد.

## نتیجه گیری

بر اساس نتایج این پژوهش و همچنین گزارش‌های سایر محققین می‌توان بیان نمود که از عوامل موثر در ریزازدیادی میخک رقم، نوع و غلظت هورمون سیتوکنین می‌باشد. در این پژوهش بین ارقام مختلف از نظر تکثیر اختلاف معنی داری مشاهده شد و بهترین رقم از این لحاظ، رقم Eskimo Mogr می‌باشد. در ارتباط با نوع هورمون سیتوکنین می‌توان اظهار داشت که برای تحریک شاخه زایی در ریزنمونه‌ها کاربرد هورمون BA نسبت به کینتین مناسب تر می‌باشد. اما کینتین نسبت به BA دارای این مزیت است که شاخساره تولیدی طویل تر می‌باشد ولی به هر حال تعداد شاخساره تولیدی در ریزنمونه‌های تیمار شده با کینتین نسبت به BA کمتر می‌باشد.

در ارتباط با میزان شیشه‌ای شدن، افزایش غلظت هورمون سیتوکنین باعث افزایش میزان شیشه‌ای شدن می‌شود و همچنین کاربرد هورمون BA نسبت به کینتین منجر به افزایش وقوع این پدیده می‌شود. اما از آنجایی که هورمون BAتاثیر مطلوب تری از نظر باززایی ریزنمونه‌ها دارد، می‌توان با کاربرد غلظت‌های کمتر آن (۱ میلی گرم در لیتر)، علاوه بر افزایش میزان تکثیر در حد مطلوب، شاهد کاهش میزان شیشه‌ای شدن نیز بود.

شاخساره‌های شیشه‌ای شده به علت رشد غیر طبیعی قادر به ریشه زایی نبودند، لذا در ریشه زایی تنها از شاخساره‌های نرمال تکثیر شده در هر دو محیط کشت BA و Kin استفاده گردید. با انتقال گیاهچه‌های نرمال به محیط کشت ریشه زایی، ریشه زایی پس از ۲۰ روز صورت گرفت و ۹۰ درصد از شاخه‌های تکثیر شده، ریشه دار شدند. نتایج نشان داد که ریشه زایی تحت تاثیر نوع سیتوکنین محیط کشت تکثیر قرار نگرفت و گیاهان ریشه دار شده پس از انتقال به شرایط گلخانه به میزان ۹۵ درصد سازگاری نشان دادند.




**شکل ٤ – تاثیر غلظت هورمون سیتوکنین بر فاصله میانگره و درصد شیشه‌ای شدن**

## منابع


1- Ali A., Afrasiab H., Naz S., Rauf M., and Iqhbal J. 2008. An efficient protocol for in vitro propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Pak. J. Bot., 40: 111-121.
2- 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 Hort., 51: 223-235.
3- Brar M.S., Al-khayri M., and Klingaman G.L. 1995. Effect of thidiazuron and benzylaminopurine on in vitro shoot proliferation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Proceeding Arkansas Academy of Science, 49: 30-33.
4- Dencso I. 1987. Factor influencing vitrification of carnation and conifers. Acta Hort., 212: 167-176.
5- Hazarika B.N., and Bora A. 2010. Hyperhydricity – a Bottleneck to Micropropagation of Plants. Acta Hort., 865: 95-102.
6- Kanwar, J.K. and S. Kumar. 2009. Influence of growth regulators and explants on shoot regeneration in carnation. Hort. Sci. 36: 140-146.
7- Karami O. 2008. Induction of embryogenic callus and plant regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). online journal of biological science, 8(4): 68-72.
8- Kapchina Toteva V., and Yakimova E. 1997. Effect of purine and phenylurea cytokinins on peroxidase activity in relation to apical dominance of in vitro cultivated *Rasa hybrida* L. Bulg. J. Plant physiol., 23: 40-48.
9- Kovac J. 1995. Micro propagation of *Dianthus caryophyllus* sub sp. Bohemicus-an endangered endemic from the Czech Republic. Biol., 37: 27-33.
10- Leshem B. 1988. Cytokinin : the primary inducer of vitrification. Agricell Report, 10: 46.
11- Miller R.M., Kaul V., and Richards D. 1991. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) from axillary bud explants. Annals of Botany, 67: 35-42.
12- Mujib A., and Pal A.K. 1995. Inter-varietal variation in response to in vitro cloning of carnation. Crop Research, 10: 190-194.
13- Onamu, R., Obukosia S.D., Musembi N., and Hutchinson M.J. 2003. Efficacy of thidiazuron in *in vitro* propagation of carnation shoot tips: influence of dose and duration of exposure. Afr. Crop Sc. J. 11(2): 125-132.
14- Paques M. 1991. Vitrification and micropropagation : causes, remedies and prospects. Acta Hort., 289: 283-290.
15- Pareek A., Kantia A., and Kothari S.L. 2004. *In vitro* cloning of ornamental species of Dianthus. Indian J. Biotechnol. 3: 263-266.
16- Salehi H. 2006. Can a general shoot proliferation and rooting medium be used for a number of carnation cultivars?.

African Journal of Biotechnology, 5: 25-30.
17- Sharma U., and Mohan J.S.S. 2006. Reduction of vitrification in *in vitro* raised shoots of *Chlorophytum borilivinum* sant. and fernand., a rare potent medicinal herb. Indian Journal of Experimental Biology, 44: 499-505.
18- Tsay H. 1998. Effect of medium composition at different recultures on vitrification of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in vitro shoot proliferation. Acta Hort., 461: 243-249.
19- Van A., Bruinsma A.C., Koehorst H.J., and Dons J.J.M. 1992. Regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) using leaf explant. Acta Hort., 307: 109-116.
20- 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.