Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Consideration of adenine hemi-sulfate effect on increasing the direct regeneration rate of carnation cultivars' leaf explants

Hamidreza Sabaghi

Ph.D. Candidate, Department of Horticultural Science, Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran. E-mail: h.sabaghi65@gmail.com

Gholamreza Sharifi-Sirchi

*Corresponding author. 1- Associate Professor, Department of Biotechnology Engineering, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. 2- Department of Horticultural Science, Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas.Iran. sharifi-sirchi@uk.ac.ir

Pejman Azadi

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Genetic Engineering, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran. azadip22@gmail.com

Mohamad Hossein Azimi

Department of Breeding, Ornamental Plants Research Institute, Mahallat, Iran. m.h.azimi58@gmail.com

Abstract

Purpose

The genetic improvement of carnation (*Dianthus Caryophyllus*), as one of the most important cut flowers in the world, is of utmost significance. For this purpose, the use of *in vitro* breeding techniques is very important. One of the most crucial in vitro breeding needs of carnation is accessibility to a regeneration method with maximum productivity and minimum genetic modification probability. The present study aimed to determine an optimal and fast method for the direct regeneration of carnation cultivars by employing various regulators and adenine hemi-sulfate for the first time in these cultivars.

Materials and Methods

For the determination of the optimal level of the culture medium compositions toward the direct regeneration of carnation cultivars (Skimo, Tibor, and Labret), an experiment with a completely randomized design was designed and implemented in an MS culture medium, in different

concentrations of growth regulators, including four levels of TDZ (0.5, 1, 2, and 3mg/L), two levels of IAA (0.5 and 1mg/L), and four levels of adenine hemi-sulfate (0. 20, 40, and 80mg/l), were used.

Results

The model used for this experiment was significant at the level of 1%, where R^2=96% and CV=22, indicating the acceptable accuracy of the analysis. With respect to the results, it was observed that, in the leaf explants of different carnation cultivars, the utilization of the MS culture medium in light conditions with TDZ 2 mg/L+ IAA 0.5 mg/L occurred the direct regeneration of the leaf explants. It is worth mentioning that the addition of 40mg/L of adenine hemi-sulfate to the culture medium increased the regeneration mean from 66% to 94% among different cultivars. In addition, the mean shoot number per explant increased from 12 to 36 shoots.

Conclusion

Generally, the results of the experiments showed that the mixing of the MS base medium, leaf explants in light conditions, and the TDZ 2 mg/L+ IAA 0.5 mg/L+As 40 mg/L regulator composition significantly led to the leaf regeneration of carnation cultivars. Briefly, the results of this study proved that the use of adenine hemi-sulfate significantly impacted the upsurge of the direct regeneration rate of carnation cultivars.

Keywords: In Vitro Breeding, Co-factors, Growth Regulators, Direct Organogenesis, Tissue culture.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Sabaghi H, Sharifi sirchi, Gh, Azadi, P, Azimi, MH (2021) Consideration of Adenine Hemi-Sulfate Effect on Increasing the Direct Regeneration Rate of Carnation Cultivars' Leaf Explants. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (3), 171-186.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (3), 171-186. DOI: 10.22103/jab.2021.17125.1289

Received: July 23, 2021. Accepted: August 30, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

بررسی اثر آدنین همی سولفات و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر افزایش نرخ باززایی مستقیم ریزنمونه برگی ارقام میخک

حمیدرضا صباغی

دانشجوی دکتری گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران. رایانامه: h.sabaghi65@gmail.com

غلامرضا شریفی سیرچی

*نویسنده مسئول: ۱-دانشیار گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. ۲- گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران. رایانامه: sharifi-sirchi@uk.ac.ir

پژمان آزادی

*نویسنده مسئول: دانشیار گروه مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج. ایران. رایانامه: azadip22@gmail.com

محمدحسین عظیمی

دانشیار گروه اصلاح، پژوهشکده گل و گیاهان زینتی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، محلات، ایران، کرج. ایران. رایانامه:m.h.azimi58@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۸

چکیده

هدف: اصلاح ژنتیکی میخک به عنوان یکی از مهم‌ترین گل‌های شاخه بریده دنیا، از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. به این منظور استفاده از تکنیک‌های اصلاح درون شیشه‌ای بسیار ضروری است. یکی از مهم‌ترین ملزومات اصلاح درون شیشه‌ای میخک، دسترسی به یک روش باززایی با بهره‌وری بالا و کم‌ترین احتمال تغییر ژنتیکی می‌باشد. در پژوهش حاضر به منظور تعیین روشی بهینه و با سرعت بالا، برای باززایی مستقیم ارقام میخک با استفاده از تنظیم‌کننده‌های مختلف از جمله استفاده از آدنین همی‌سولفات، برای اولین بار در ارقام میخک طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها: به منظور تعیین سطح بهینهٔ ترکیبات محیط کشت جهت باززایی مستقیم ارقام میخک (اسکیمو، تیبور و لابرتی)، آزمایشی با استفاده از محیط کشت MS به همراه غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد شامل تیدیازورون (TDZ) در چهار سطح (0.5, 1, 2, 3 mg/L)، IAA در دو سطح (0.5,1, mg/L) و آدنین‌همی سولفات در چهار سطح (0, 20, 40, 80 mg/L) به صورت طرح کاملاً تصادفی طراحی و اجرا شد.

نتایج: مدل استفاده شده برای این آزمایش، در سطح یک در صد با R^2= 96% و CV=22 معنی‌دار شد که نشان‌دهندهٔ دقت قابل قبول آزمایش می‌باشد. با توجه به نتایج، مشاهده شد که در ریزنمونه‌های برگی ارقام مختلف میخک، استفاده از محیط کشت MS در شرایط نوری به همراه TDZ 2 mg/L+ IAA 0.5 mg/L به طور مطلوبی سبب باززایی مستقیم از ریزنمونه‌های برگی شد. قابل ذکر است، با اضافه‌کردن ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین‌همی‌سولفات به محیط کشت، میانگین باززایی در بین ارقام مختلف، از ۶۶ درصد به ۹۴ درصد و میانگین تعداد شاخه در هر ریزنمونه از ۱۲ شاخه به ۳۶ شاخه افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج آزمایش نشان داد که استفاده از ترکیب محیط پایه MS، ریزنمونه برگی در شرایط روشنایی و همچنین استفاده از ترکیب تنظیم‌کننده TDZ 2mg/L+ IAA 0.5 mg/L+ Adenine sulfate 40 mg/L به طور معنی‌داری سبب باززایی از برگ ارقام میخک شد. به طور خلاصه نتایج این پژوهش گواه این بود که استفاده از آدنین‌همی‌سولفات تأثیر معنی‌داری در افزایش نرخ باززایی مستقیم ارقام میخک دارد.

کلیدواژه‌ها: اصلاح درون شیشه‌ای، کوفاکتورها ، تنظیم‌کننده‌های رشد، اندام‌زایی مستقیم، کشت بافت

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: صباغی حمیدرضا، شریفی سیرچی غلامرضا، آزادی پژمان، عظیمی محمدحسین (۱۴۰۰) بررسی اثر آدنین همی سولفات و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر افزایش نرخ باززایی مستقیم ریزنمونه برگی ارقام میخک. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۳)، ۱۷۱-۲۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

اختصارات: PGRs: Plant Growth Regulators، TDZ: Thidiazuron، IAA: Indole-3-Acetic Acid، MS: Murashige and Skoog، As: Adenine sulfate

مقدمه

میخک گیاهی اســـت دو لپه، از خانوادهٔ Caryophyllaceae با نام علمی *Dianthus caryophyllus* L. و در زبان انگلیسی به آن Carnation گفته می شود. جنس Dianthus حدود ۳۰۰ گونه دارد و بومی اروپا و آ سیا ست و گونه‌های اندکی از آن بومی آفریقای شمالی و یک گونه *D. repens* بومی آمریکای شمالی ا ست. اغلب این گیاهان دارای ساختار خ شبی، برگ‌ها ساده، کامل، غالباً متقابل، معمولا گو شوارک‌دار یا بی شتر مواقع بدون گو شوارک می‌با شند (در قبیله Poronychiae گو شوارک غشایی وجود دارد). جنس میخک عموماً دارای گیاهان دیپلوئید (30=2x) می‌باشد که گونه‌هایی به‌صورت تتراپلوئید (60=4x) هم شـناسـایی شـده‌اسـت. به طورکلی اکثر ارقام تجاری میخک که در گلخانه‌ها کشـت و کار می‌شـوند نرعقیم و در پی‌آن دگرگشـن می‌باشند و به‌طور معمول، ارقام مختلف این گیاه به‌راحتی با قلمه‌زنی تکثیر می‌شوند. گل میخک به رنگ‌های سفید، صورتی، قرمز، ارغوانی، زرد و نارنجی در ترکیبات مختلف دیده‌می‌شـود (Siddique and Yadav 2021). بر اسـاس میزان فروش در بازار گل هلند، میخک یکی از ۱۰ گل برتر شـــاخه بریده جهان اســـت و ازاین‌رو اصـــلاح آن به‌منظور بهبود صـــفات کیفی و کمّی این گیاه ارز شمند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌با شد (Zia et al. 2020). قابل ذکر ا ست، در اکثر ارقام میخک مشکلات زیادی بر سر راه اصلاح به روش‌های کلاسیک از جمله هیبریداسیون و دورگ‌گیری وجود دارد. در این رابطه عنوان می‌شود که، در اکثر گونه‌های میخک م شکلات کروموزومی، انواع نا سازگاری‌ها، عدم تولید گرده فعال و همچنین م شکلات پس از لقاح وجود دارد (Dyaberi et al. 2015). این م شکلات سبب می شود که تمرکز بر تولید ارقام جدید بیش‌تر بر ا ساس روش‌های نوین ا صلاحی، از جمله روش‌های اصلاح درون شیشه‌ای باشد. بر همین اساس استفاده از روش‌های کشت بافت گیاهی سبب کاهش بسیاری از مشکلات و افزایش چشـــم‌گیر کارایی روش‌های اصـــلاحی شـــده‌اســـت (Datta 2014). به طورکلی یکی از کاربردهای مهم کشـــت بافت، اندام‌زایی از بافت‌های مختلف گیاهی به منظور تسهیل فعالیت‌های اصلاحی بعدی می‌باشد. به این منظور یافتن ترکیب بهینه جهت باززایی با نرخ بالا و منا سب برای هر رقم، در گیاه میخک از اهمیت بالایی برخوردار می‌با شد (Shen et al. 2008). با ا ستناد به تحقیقات گذشـته در زمینه باززایی ارقام مختلف میخک، می‌توان عنوان کرد که اسـتفاده از سـایتوکینین در ترکیب با غلظت پایین اک سین به‌طور سودمندی سبب باززایی بهینه خواهد شد (Prasad et al. 2016). در همین رابطه، پژوهش‌های زیادی به‌منظور اندام‌زایی ارقام میخک طراحی و اجرا شده‌است، نتایج این پژوهش‌ها گواه این بود که بنزیل آمینو پورین (BAP) و توفوردی (2,4-D) به طور معنی‌داری ســـبب باززایی در ارقام مختلف میخک می‌شـــود (Jain et al. 2001; Dyaberi et al. 2015; Iantcheva 2016; Mujib 2015). پژوهش دیگری در همین رابطه به منظور کالوس‌زایی و باززایی در میخک انجام شـد، در این پژوهش از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره با ا ستفاده از غلظت‌های مختلف هورمونی ا ستفاده شد؛ محققین در پژوهشی دریافتند که بهترین نتیجه باززایی حاصل از ریزنمونه برگی میخک به‌همراه ترکیبات هورمونی سایتوکینین و اکسین می‌باشد (Arif et al. 2010). قابل ذکر است، تحقیقات بسیاری در زمینه تعیین بهترین تیمار برای باززایی ارقام مختلف میخک صورت گرفته که در اکثر این پژوهش‌ها، ترکیب سایتوکین و اکسین استفاده شده‌است، اما باید توجه داشت که میزان واکنش ارقام مختلف به تنظیم‌کننده‌های

رشـد متفاوت اسـت، لذا یافتن بهینه‌ترین تیمار در هر رقم، امری ضـروری و غیر قابل انکار می‌باشـد (Azadi et al. 2018; Lukatkin et al. 2017; Siddique and Yadav 2021; Thakur and Kanwar, 2018). اشاره به این مطلب بسیار اهمیت دارد که به‌منظور افزایش کارایی روش‌های اصـلاحی درون شـیشـه‌ای، بررسـی سـایر عوامل مؤثر بر افزایش نرخ باززایی، اهمیت بسیار بالایی دارد. بر همین اساس در پژوهشی غلظت‌های مختلف ساکاروز و مانیتول به منظور تولید کالوس‌های جنین‌زا در ریزنمونه‌های گلبرگ میخک مورد آزمون قرار گرفت، نتیجه این تحقیق بیان‌گر این موضـوع بود که با افزایش میزان مانیتول، به طور معنی‌داری میزان تولید جنین سوماتیکی افزایش می‌یابد. به طور خلاصه بهترین تیمار در این پژوهش، استفاده از محیط کشت MS با میزان سـاکاروز ۳ درصـد و مانیتول ۱۲ درصـد بود (Karami et al. 2008). پژوهش‌گران اخیراً در اکثر ارقام گیاهی دریافته‌اند که استفاده از محرک‌ها و عناصر مؤثر بر رشد سلولی به طور معنی‌داری سبب افزایش نرخ باززایی در ارقام مختلف خواهد شـد (Lukatkin et al. 2017; Phillips and Garda 2019). یکی از مهم‌ترین محرک‌های مؤثر بر افزایش نرخ باززایی آدنین‌همی‌سـولفات می‌باشـد. آدنین‌همی‌سـولفات از مشـتقات نوکلوباز می‌باشـد و با طیف گسـترده‌ای از نقش‌های شـیمیایی و بیوشـیمیایی، یک مولکول تنظیم‌کننده و جزء دی ان ای (DNA) ، آر ان ای (RNA)، کوفاکتورهای ان ای دی (NAD) ، اف دی ای (FAD) و از همه مهم‌تر در باززایی جزء مولکول‌های سیگنالینگ cAMP است (Naaz et al. 2014; Silue et al. 2017). در همین رابطه در گیاه شاه اشرفی تحقیقی به‌منظور بررسی اثر آدنین‌همی‌سولفات بر افزایش نرخ باززایی انجام شد، نتایج تحقیق نشان داد استفاده از این ترکیب به‌طور معنی‌داری سبب افزایش نرخ باززایی می شود (Jaberi et al. 2017). در پژوهش حاضر به منظور تعیین یک روش بهینه و با سرعت بالا، جهت باززایی مستقیم با استفاده از تنظیم‌کننده‌های مختلف، و همچنین بررسی اثر آدنین‌همی سولفات برای اولین بار در میخک، بر روی سه رقم تجاری میخک شاخه بریده (اسکیمو، تیلور و لایبرتی)، آزمایشی به صورت طرح کاملاً تصادفی، با استفاده از محیط کشت MS و سطوح غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

مکان و نمونهٔ گیاهی: این پژوهش در آزمایشـگاه کشـت بافت گیاهی پژوهشـکده ملی گل و گیاهان زینتی شـهرسـتان محلات، با مشخصه جغرافیایی (عرض: ۵۳° ۳۳′ شمالی، طول: ۵۰° ۲۹′ شرقی وارتفاع ۱۶۲۲ متر با سطح آب‌های آزاد) در تابسـتان و پاییز ۹۵ انجام شـد. مواد گیاهی مورد اسـتفاده در این پژوهش شـامل سـه رقم میخک شـاخه بریده (اسـکیمو، تیبور و لایبرتی) متعلق به شـرکت HilverdaFlorist هلند و از نوع اسـتاندارد بود. به منظور القای باززایی مسـتقیم، از ریزنمونه برگی گیاهان استریل آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده گل وگیاهان زینتی محلات استفاده‌شد (شکل ۱a). گیاهان مادری با کشت جوانهٔ

جانبی در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی KIN 1 mg/l and NAA 0.1 mg/L و اسیدیته در سطح ۵/۸ تکثیر و و تحت شرایط دمایی ۲۴ درجه و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

تهیه ریزنمونه و تیمارهای باززایی: ریزنمونه برگی به‌طول تقریبی ۵ الی ۷ میلی‌متر از قسمت یک سوم انتهایی برگ گیاهان استریل مادری درون شیشه‌ای، که در شرایط دمایی، نوری و هورمونی یک‌نواخت نگهداری شده‌بودند تهیه و به‌صورت افقی روی محیط کشت قرار گرفتند. جهت تعیین سطح بهینه ترکیبات محیط کشت جهت باززایی مستقیم ارقام میخک، از محیط کشت MS به همراه ۳۲ ترکیب از غلظت‌های تنظیم‌کننده‌های رشد شامل TDZ در چهار سطح (0.5, 1, 2, 3 mg/L)، IAA در دو سطح (0.5,1, mg/L) و آدنین‌همی‌سولفات در چهار سطح (0, 20, 40, 80 mg/L) به صورت طرح کاملاً تصادفی طراحی و اجراء شد (Alexander et al. 2017; Thakur and Kanwar 2018). به طور کلی تعداد ۲۰ ریزنمونه در هر پتری‌دیش ۸ سانتی‌متری و ۵ تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته‌شد. تیمارها در محیط کشت MS با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد و اسیدیته در سطح ۵/۸ کشت، و تحت شرایط دمایی ۲۴ درجه و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، انجام گرفت. پس از تولید شاخه در ریزنمونه‌های برگی میخک، به منظور پرآوری و طویل‌سازی شاخه‌ها، گیاهچه‌های باززایی‌شده به محیط MS به همراه(GA3 0.3+ BA 0.3 mg/L) به مدت سه هفته منتقل شدند. پس از طویل شدن شاخه‌ها به سینی‌کاشت‌های با حفره‌های ۱۷ سی سی منتقل و جهت سازگاری و ریشه‌زایی به گلخانه منتقل شدند (Kumari et al. 2017; Agnieszka et al. 2016).

داده‌برداری و آنالیز داده‌ها: سه هفته پس از کشت، علایم باززایی در ریزنمونه‌ها مشاهده‌شد و به سرعت پس از گذشت حدود دو هفته برگچه‌های قابل مشاهده ظهور پیدا کردند. و در آخر، پس از ۸ هفته ریزنمونه‌ها از نظر نرخ باززایی مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور، گیاهچه‌های باززاشده شمارش و با تقسیم بر تعداد کل ریزنمونه در هر پتری‌دیش، میانگین نرخ باززایی گزارش شد. همچنین درصد باززایی براساس تعداد ریزنمونه‌های تولیدی یک شاخه نسبت به کل ریزنمونه‌ها محاسبه شد. حدود یکسال قبل از این پژوهش پیش تیمارهای زیادی انجام و به کلیه حالات ممکن تنظیم کننده‌های رشد مورد بررسی قرار گرفتند و در آزمایش حاضر ۳۲ ترکیب مختلف از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی با استفاده نرم افزار SAS نسخه ۹,۴ آنالیز مورد سنجش قرار گرفتند. به دلیل اینکه تعداد تیمارها در این آزمایش زیاد بود، و در بیشتر تیمارها باززایی معنی‌داری مشاهده نشد پس از آزمون مقایسه میانگین، تعداد ۱۰ تیمار که بیشترین نرخ باززایی را نشان دادند به عنوان تیمارهای گزینش شده انتخاب و به‌منظور یافتن بهترین ترکیب، با استفاده نرم افزار SAS نسخه ۹,۴ مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن آنالیزانجام و نتایج گزارش شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS بر اساس ۳۲ تیمار انجام شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد طرح انتخاب شده برای این آزمایش، در سطح معنی‌دار یک درصد با $R^2 = 96\%$ و CV=22 معنی‌دار شد، که نشان‌دهندهٔ دقت قابل قبول آزمایش می‌باشد.

جدول ۱. جدول تجزیه واریانس بر اساس ۳۲ تیمارمختلف باززایی مستقیم در ریزنمونه برگی ارقام میخک بر اساس طرح کاملا تصادفی، با توجه به جدول مشاهده می‌شود که اثرات تیمارها در هر دو صفت در سطح یک درصد معنی‌دار شد که با علامت ستاره مشخص شده است.

Table 1. Analysis of variance table based on 32 different regeneration treatments in Carnation leaf explant based on a completely randomized design. According to the table, significantly different at the 99 percent confidence in both traits was observed, which is marked with an asterisk.

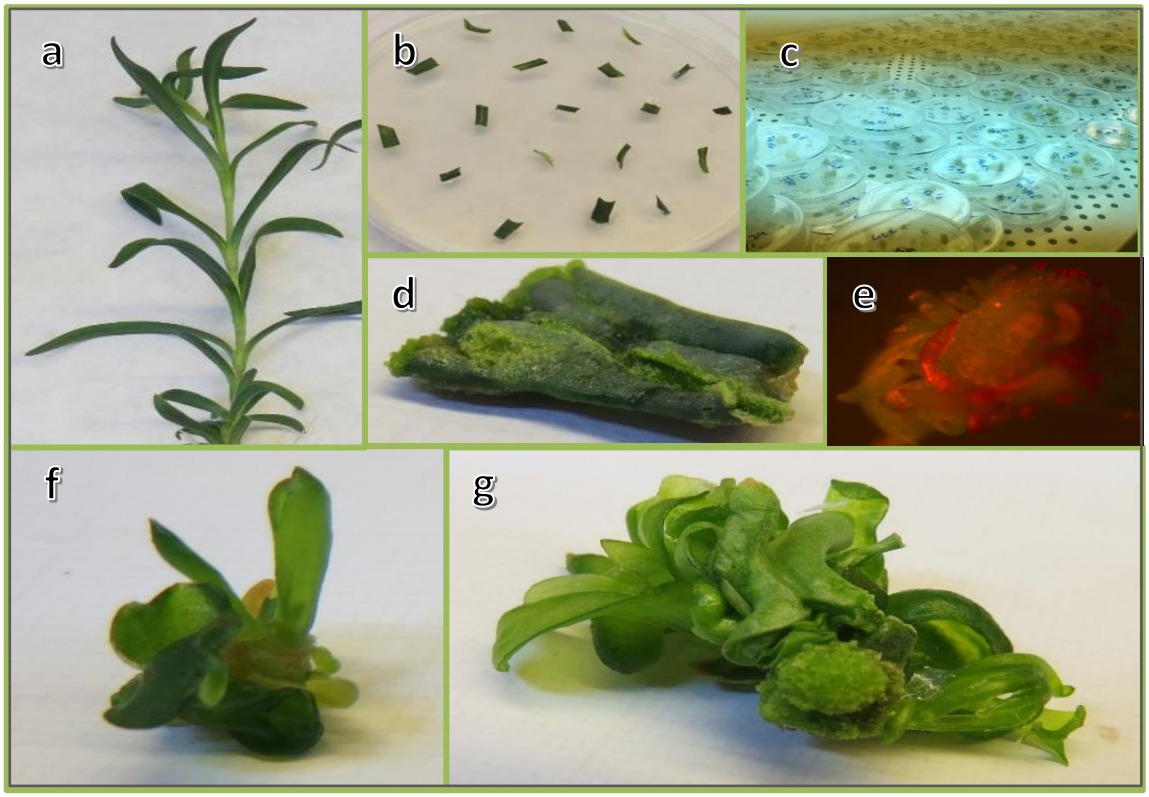
میانگین مربعات درصد باززایی MS of regeneration percentage	مجموع مربعات درصد باززایی SS of regeneration percentage	میانگین مربعات تعداد شاخه در هر ریزنمونه MS of number of shoot in each explant	مجموع مربعات تعداد شاخه در هر ریزنمونه SS of number of shoot in each explant	درجه آزادی df	منابع تغییر S.O.V
2103.99**	65221.6	209.306**	6798.5	31	تیمار Treatment
32.98 ns	2111.3	2.94ns	188	64	خطا *Error*
--	67332.9	--	6986.5	95	کل Total

در این آزمایش از گیاهان مادری درون شیشه استفاده شد (شکل۱ a). به این منظور ریزنمونه‌های برگی ارقام میخک (شکل۱ b , c) کشت‌شده در شرایط کنترل‌شده در غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد پس از گذشت سه هفته علائم باززایی را نشان دادند (شکل ۱ d , e). در نهایت پس از گذشت هفتهٔ هشتم، ریزنمونه‌ها به طور کامل باززا شده و به اندازه‌ای که بتوان آن‌ها را شمرد رشد کردند و داده‌برداری از ریزنمونه‌ها پس از این مرحله آغاز شد. تعداد قابل قبولی شاخه در تیمارهای برگزیده مشاهده‌شد (شکل ۱ f , g). به طور کلی براساس نتایج این پژوهش، مشخص شد که استفاده از ترکیب هورمونی و محرک‌های رشد، جهت

بهینه‌سازی باززایی مستقیم ارقام میخک بسیار مؤثر می‌باشد. به‌علاوه مشاهده‌شد که در ریزنمونه‌های برگی ارقام مختلف میخک، سرعت باززایی و تعداد تولید شاخه در هر ریزنمونه در تیمارهای برگزیده نسبت به سایر تیمارها و شاهد، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته‌است. در این رابطه با توجه به نتایج، مشخص شد که استفاده از محیط کشت MS در شرایط نوری به همراه TDZ 2 mg/L+ IAA 0.5 mg/L در همه ارقام به‌طور قابل قبولی سبب باززایی مستقیم بهینه از ریزنمونه¬های برگی می‌شود. در این شرایط میانگین باززایی در بین ارقام مختلف ۶۶ در صد و میانگین تعداد شاخه در بین ارقام ۱۲ عدد بود، این میزان باززایی، به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داشت. به علاوه در تیمارهایی که آدنین‌همی سولفات اضافه شد به طور معنی‌داری نرخ باززایی افزایش یافت. در تیماری که ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین¬همی¬ سولفات اضافه شد باززایی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۲). به نحوی که در این تیمار میانگین باززایی در بین ارقام مختلف ۹۴ درصد و میانگین تعداد شاخه در هر ریزنمونه در ارقام به ۳۶ شاخه افزایش یافت (جدول ۲).

نتایج میانگین ارقام نشان‌داد که، تعیین غلظت بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد تأثیر به‌سزایی در باززایی مستقیم دارد، بخصوص زمانی که غلظت‌های بالای اکسین استفاده شد، در صد باززایی و تعداد شاخه به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد؛ به نحوی که در تیمار شماره ۷ زمانی که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA استفاده‌شد، تعداد شاخه بازا شده در هر ریزنمونه به ۶ عدد کاهش یافت (جدول ۲). به علاوه با توجه به نتایج باززایی، مشاهده‌شد که در تیمارهای با غلظت بالای سایتوکنین، به ویژه در تیمارهای با ۳ میلی‌گرم در لیتر سایتوکنین ، علی‌رغم کاهش نرخ باززایی، شاهد افزایش تولید گیاهچه‌های شیشه‌ای بودیم (جدول ۲). به‌طور کلی تیمار شماره یک در بین ارقام مورد استفاده در این پژوهش به‌طور معنی‌داری سبب افزایش نرخ باززایی در ریزنمونه‌های برگی شد. در بین ارقام، رقم تیبور بیشترین واکنش را به غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد نشان داد (شکل۲).

در پژوهش حاضر به منظور افزایش راندمان باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های برگی میخک از غلظت‌های مختلف هورمون‌های TDZ و IAA به همراه آدنین‌همی سولفات استفاده شد. پژوهش‌های زیادی در رابطه با استفاده از تنظیم کننده‌های رشد دربازایی میخک صورت گرفته، اما در پژوهش حاضر از محرک آدنین‌همی سولفات به منظور افزایش نرخ باززایی مستقیم استفاده شد. با توجه به منابع، مشخص شد که استفاده از آدنین‌همی سولفات با نشان‌دادن فعالیت سایتوکینینی به طور معنی‌داری سبب افزایش اندام‌زایی در ریزنمونه‌های تک جوانه می شود (Gatica et al. 2010). براساس گزارش محققین محرک‌های رشد گیاهی عاملی تعیین کننده در میزان باززایی گیاه میخک است (Teixeira da Silva and Dobra´nszki 2016) و با توجه به منابع مختلف و نتایج این پژوهش، مشخص شد که در ارقام میخک، سایتوکنین‌ها با افزایش میزان تقسیم سلولی در محیط کشت بافت از مهم‌ترین محرک‌های اندام‌زایی به شمار می‌روند (Siddique and Yadav 2021;Kanwar and Kumar 2009).



شکل ۱. مراحل کامل باززایی مستقیم ریزنمونه‌های برگی گیاهان درون شیشه‌ای ارقام میخک. (a) گیاهان مادری درون شیشه‌ای، (b) تهیهٔ ریزنمونه برگی و کشت در محیط MS با ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد، (c) نگهداری در شرایط روشنایی با نور ۲۰۰۰ لوکس، (d) ظهور علایم باززایی در ریزنمونه‌ها پس از سه هفته، (e) اندام‌زایی و شروع رشد شاخساره‌ها پس از پنج هفته در ریزنمونه‌ها، (f و g) باززایی کامل ریزنمونه پس از حدود دو ماه.

Figure 1. The direct regeneration stages in leaf explants of in-vitro carnation cultivars. (a) in-vitro mother plant, (b) leaf explant preparation and cultured in MS with different component, (c) kept in controlled condition with 2,000 lux lights, (d) appearance of regeneration symptom after three weeks, (e) organogenesis initiation and start to shoot growth after five weeks, (f & g) complete regeneration after two months.

جدول ۲. اثر غلظت‌های مختلف IAA و TDZ و آدنین‌همی سولفات بر در صد باززایی و نرخ تولید شاخه در ریزنمونه‌های برگی ارقام استاندارد میخک.

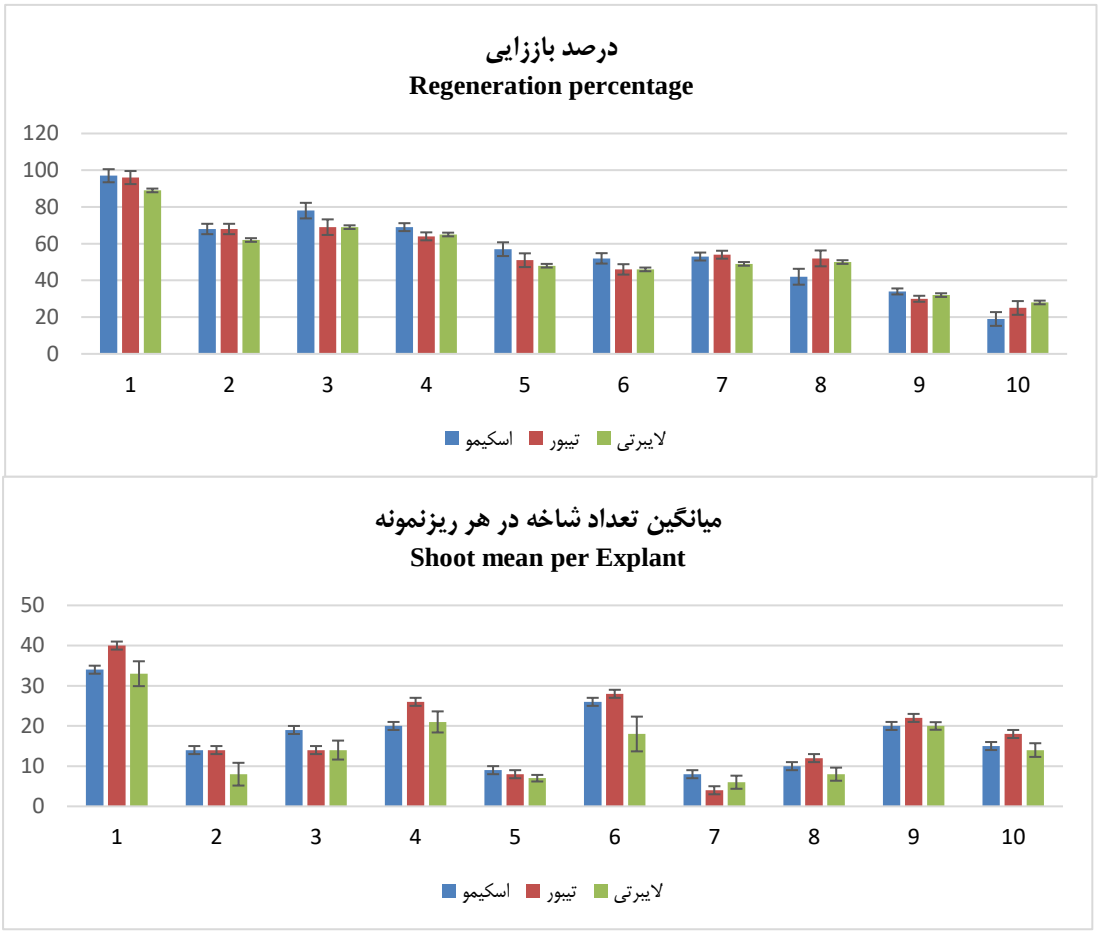
Table 1. The effect of different concentrations of IAA and TDZ and Adenine hemi sulfate on regeneration percentage and rate of shoot induction in leaf explant of carnation cultivars.

میانگین تعداد شاخه در هر ریزنمونه Shoot mean per Explant	درصد باززایی Regeneration%	As mg/L	TDZ mg/L	IAA mg/L	شماره تیمار Treatments number
36±3.09[a]	94±3.56[a*]	40	2	0.5	19
12±2.83[d]	66±2.83[c]	0	2	0.5	3
16±2.36[c]	72±4.24[b]	20	2	0.5	11
22±2.92[b]	66±2.16[c]	40	2	1	23
8±0.82[g]	52±3.74[d]	80	2	0.5	27
24±4.34[b]	48±2.83[e]	40	1	0.5	18
6±1.63[g]	52±2.16[e]	0	2	1	7
10±1.63[e]	48±4.34[e]	20	2	1	15
22±0.94[b]	32±1.63[f]	40	3	1	24
16±1.70[c]	24±3.74[f]	40	3	0.5	20

* هرحرف نشان‌دهنده یک گروه متفاوت در گروه‌بندی بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

در این را ستا، دان شمندان در تحقیقی بر روی باززایی م ستقیم گیاه زینتی میخک با انواع مختلف هورمون‌های گیاهی به این نتیجه د ست یافتند که از بین هورمون‌های مورد ا ستفاده، کاربرد TDZ بی‌شترین اثر را باززایی این گیاه دا شت به طور کلی در این پژوهش مشـــاهده‌شـــد که اســـتفاده ترکیبی از ســـایتوکینین و اکســـین به طور معنی‌داری در باززایی ارقام میخک مؤثر اســـت (Alexander et al. 2017) که این نتایج با یافته‌های .Arif et al (2010) مطابقت دارد. در این پژوهش، زمانی که غلظت‌های بالای تنظیم کننده‌های ر شد ا ستفاده شد، اثر کاه شی بر نرخ باززایی دا شت که با توجه به نتایج تحقیقات گذ شته، م شاهده شد که هرچند اســتفاده از اکســین‌ها و ســایتوکینین‌ها ســبب تحریک باززایی در ارقام مختلف می‌شــود، اما باید دقت کرد که اســتفاده از غلظت‌های بالای اکسین سبب سرکوب‌کردن اندام‌زایی و کاهش چشم‌گیر نرخ باززایی در ارقام مختلف می‌شود (Siddique and Yadav 2021). در مورد اکسین‌ها، در این پژوهش م شاهده شد زمانی که غلظت IAA از ۰,۵ میلی‌گرم بر لیتر به ۱ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت نه تنها نرخ باززایی به طور چشـــم‌گیری کاهش نشـــان داد، بلکه اکثر ریزنمونه‌ها به ســـمت تولید کالوس از لبهٔ برگ‌ها پیش رفتند که با نتایج .Alexander et al (2017) مطابقت دارد.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل ۲. نمودارهای ستونی اثر ترکیبات مختلف بر در صد باززایی و میانگین تعداد شاخه در ریزنمونه‌های برگی ارقام میخک؛ نمودار بالا مربوط به اثر تیمارهای مختلف بر درصد باززایی و نمودار پایین مربوط به اثر تیمارهای مختلف بر میانگین تعداد شاخه در هر ریزنمونه می‌با شد. اعداد عمودی سمت چپ در نمودار بالا ن شان دهنده در صد باززایی و در نمودار پایین ن شان دهنده میانگین تعداد شاخه در هر ریزنمونه می‌با شد. اعداد ستون افقی در هر دو نمودار شماره تیمار بر اساس جدول ۱ را نشان می‌دهد. در هر دو نمودار، ستون‌ها با رنگ مشابه نشان‌دهنده یک رقم می‌باشد که در زیر نمودار به آن اشاره شده است.

Figure 2. Diagram of the effect of different combinations on regeneration percentage and average of shoot number in leaf explants of Carnation cultivars; the above graph is related to the effect of different treatments on regeneration percentage and the lower graph is related to the effect of different treatments on the average of shoot number in each explant. The vertical numbers on the left in the graph above indicate the percentage of regeneration and in the graph below indicate the average of shoot number per explant. The horizontal column numbers in both graphs showed the treatment number according to Table 1. In both diagrams, columns with the same color represent a Carnation Cultivar, which is indicated in diagram legend.

همچنین در مورد سایتوکین‌ها، زمانی که غلظت TDZ از ۱ میلی‌گرم بر لیتر بیشتر شد، علاوه بر اینکه نرخ باززایی به طور معنی‌داری کاهش یافت در اکثر شاخه‌های تولید شده م شکل شی شه‌ای شدن م شاهده شد (جدول ۲). با توجه به نتایج، در میان تیمارهای مختلف، تیمارهای حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ پاسخ بهتری به اضافه‌کردن محرک‌های رشدسلولی از جمله آدنین‌همی سولفات نشان دادند. به‌علاوه با توجه به نتایج، مشاهده شد که به‌طور کلی در تیمارهای با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر سایتوکنین و غلظت‌های پایین‌تر اکسین، شاخه‌هایی با کیفیت بالا، سازگار و مستعد ریشه‌زایی تولید شدند. گرچه تحقیقات زیادی به‌منظور بهینه‌سازی پروتکل‌های کالوس‌زایی و باززایی ارقام میخک در دنیا صورت پذیرفته، اما بهینه‌سازی روش‌های موجود و افزایش نرخ باززایی با ا ستفاده از ترکیبات جدید از جمله آدنین‌همی سولفات ب سیار مهم و ضروری می‌با شد (Lukatkin et al. 2017; Naaz et al. 2014). استفاده از ترکیبات محرک تقسیم سلولی نرخ باززایی را به‌طور قابل قبولی در بسیاری از گونه‌های گیاهی افزایش می‌دهد. یکی از مهم‌ترین محرک‌های افزایش نرخ باززایی، آدنین‌همی سولفات می‌باشد (Hegazy et al. 2009). به‌طور کلی آدنین همی سولفات با تحریک تق سیم سلولی و پس از آن با تحریک اندام‌زایی، سبب افزایش راندمان باززایی می شود (Gatica et al. 2010). همان‌طور که اشاره شد، در این پژوهش از آدنین همی‌سولفات برای اولین بار در باززایی مستقیم ریزنمونه‌های برگی ارقام میخک استفاده‌شد. در پژوهش حاضر استفاده از آدنین همی‌سولفات به طور معنی داری سبب افزایش نرخ باززایی شد که این نتایج با نتایج Jaberi et al. (2017) در رابطه با گیاه شاه‌اشرفی مطابقت دارد. در این رابطه نتایج آزمایش باززایی مستقیم ارقام میخک نشان داد که ا ضافه کردن آدنین همی سولفات40 mg/l سبب افزایش معنی‌دار نرخ باززایی و تعداد شاخه در ارقام مختلف شد، که این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران در دیگر گیاهان نیز مطابقت دارد (Varshney et al. 2013; Jaberi et al. 2017; Thakur and Kanwar 2018; Siddique and Yadav 2021). همچنین با توجه به نتایج (جدول ۲)، مشاهده شد که استفاده از آدنین همی‌سولفات برروی افزایش تعداد تولید شاخه مؤثرتر از افزایش درصد شاخه‌زایی بود به نحوی که در تیمار شمارهٔ ۴ علی‌رغم این‌که درصد باززایی در گروه‌بندی، در رتبه سوم قرار گرفت اما میانگین تعداد شاخه در هر ریزنمونه در رتبه دوم قرار گرفت. به علاوه قابل ذکر است، تیمار شمارهٔ ۴ و شمارهٔ ۷ از نظر ترکیبات هورمونی با هم مشابه بودند و تنها تفاوت در غلظت آدنین همی‌سولفات بود، به نحوی که تیمار ۷ بدون آدنین همی‌سولفات و تیمار ۴ حاوی ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین همی سولفات بود. نتایج نشان داد که ا ضافه کردن ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین همی سولفات سبب می شود به‌طور میانگین در ارقام مختلف تعداد شاخه در هر ریزنمونه از ۶ عدد به ۲۲ عدد افزایش یابد. در آخر عنوان می‌گردد که استفاده از ترکیب محیط پایه MS، ریزنمونه برگی در شرایط روشنایی و همچنین استفاده از ترکیب تنظیم کننده TDZ 2mg/L+ IAA 0.5 mg/L+As 40 mg/L به طور معنی‌داری سبب باززایی از برگ ارقام میخک شد. همچنین، در روش باززایی م ستقیم با توجه به اینکه با کم‌ترین تغییر ژنتیکی نسبت به گیاه مادری اندام‌زایی انجام می‌شود، لذا در پروژه‌های اصلاح درون‌شیشه‌ای ارقام میخک از نتیجهٔ این پژوهش با بهره‌وری بالا می‌توان استفاده کرد. به علاوه اشاره به این موضوع اهمیت دارد که از آن‌جایی که دسترسی به جامعهٔ

آماری بالا در پروژه‌های ا صلاحی از اهمیت بالایی برخوردار می‌با شد، افزایش نرخ باززایی ب سیار مهم می‌با شد. لذا امید ا ست این پژوهش با کارایی بالا بتواند سبب بهره‌وری بیش ازپیش پروژه‌های اصلاح درون شیشه‌ای ارقام مختلف میخک شود.

سپا سگزاری: پژوهشگران و نگارندگان این پژوهش، از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه هرمزکان و همچنین پژوهشکده ملی گل و گیاهان زینتی محلات کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

References

Agnieszka, W, Edyta S, Eleonora G (2016) Morphological and biochemical responses to gibberellic acid in Magnolia × 'Spectrum' In vitro. Acta Biol Crac Ser Bot58 (1), 103-111.

Arif M, Rauf S, Ud Din A et al. (2010) High Frequency Plant Regeneration from Leaf Derived Callus of High 9-tetrahydrocannabinol Yielding *Cannabis Sativa* L. Planta Med 76(14), 1629–1633.

Azadi P, Kermani MJ, Samiei L (2018) Somatic Embryogenesis in Rosa Hybrida. In: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants, Forestry Sciences 85, (1 st. edn). Springer International publishing, part of Springer Nature. Cham. pp. 161-170.

Datta SK (2014) Induced mutagenesis: basic knowledge for technological success. In: Mutagenesis, exploring novel genes and pathways (1 st edn). Wageningen Academic Publisher, Wageningen, Netherland. pp. 97–140.

Dyaberi A, Dhananjaya MV, Kumar R et al. (2015) Floral Biology and Seed Setting in Standard Carnation (*Dianthus caryophyllus*). Indian J Agric Sci 8(59), 1175–1180.

Gatica AAM, Munoz VJ, Ramírez FP et al. (2010) In vitro plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N 6 -benzylaminopurine and adenine sulphate. Electron J Biotechnol 13(1), 0717-3458.

Hegazy A, Nasr MI, Ibrahim IA et al. (2009). Micropropagation of Date Palm cv. malakaby through somatic embryogenesis (Effect of adenine hemisulfate, glutamine and glutathione). J Agric Sci Mansoura Uni 34 (3), 1613–1627.

Iantcheva A (2016). Somatic Embryogenesis and Genetic Transformation of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). In Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications. Springer India, India. pp, 107–120.

Jaberi M, Azadi P, Gharehyazi B et al. (2017) Silver Nitrate and Adenine Sulphate Induced High Regeneration Frequency in the Recalcitrant Plant *Cosmos Bipinnatus* Using cotyledon explants. J Hortic Sci Biotechnol 1–5.

Jain A, Kantia A, Kothari SL (2001) De Novo Differentiation of Shoot Buds from Leaf-callus of *Dianthus Caryophyllus* L. and Control of Hyperhydricity. S Sci Hortic 8(74), 319–326.

Kantia A, Kothari SL (2002) High Efficiency Adventitious Shoot Bud Formation and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Dianthus Chinensis* L. Sci Hortic 96(1–4), 205–212.

Kanwar JK, Kumar S (2009) Influence of growth regulators and explants on shoot regeneration in carnation. Hortic Sci 36, 140–146.

Karami O, Deljou A, Kordestani, GK (2008) Secondary Somatic Embryogenesis of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult 92(3), 273–280.

Kumari P, Baskaran J, Van S (2017) In vitro regeneration of *Begonia homonyma* — A threatened plant. S A fr J Bot 109, 174-177.

Lukatkin AS, Mokshin EV, Teixeira da Silva JA (2017) Use of Alternative Plant Growth Regulators and Carbon Sources to Manipulate *Dianthus caryophyllus* L. *Shoot Induction in Vitro*. Rend Lincei 28 (3), 583–588.

Mujib A (2015) Somatic Embryogenesis in Ornamentals and its Applications. *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications*, 1–267.

Naaz A, Shahzad A, Anis, M. (2014). Effect of Adenine Sulphate Interaction on Growth and Development of Shoot Regeneration and Inhibition of Shoot Tip Necrosis Under in Vitro Condition in Adult *Syzygium cumini L.* A Multipurpose Tree. Appl Biochem Biotechnon 173 (1), 90–102.

Phillips GC, Garda M (2019) Plant Tissue Culture Media and Practices: an overview. In: In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. Springer New York LLC, USA. pp. 242–257.

Prasad HM, Mythili JB, Anand L et al. (2016) Optimization of Regeneration Protocol and Agrobacterium Mediated Transformation in Carnation (*Dianthus caryophyllus L.*). Int J Hortic. Sci (4)2, 120–127.

Shen X, Kane ME, Chen J (2008) Effects of Genotype, Explant Source, and Plant Growth Regulators on Indirect Shoot Organogenesis in Dieffenbachia Cultivars. In Vitro Cell Dev Biol - Plant 44(4), 282–288.

Siddique I, Yadav, V (2021) Cytokinin Influence on Micropropagation System of *Dianthus caryophyllus* L. In Propagation and Genetic Manipulation of Plants. Springer Singapore pp, 33–41.

Silue O, Kouassi M. K, Koffi EK et al. (2017) Effect of Adenine Sulphate, Casein Hydrolysate and Spermidine on in Vitro Shoot Multiplication of Two Banana Varieties. Afr J Biotechnol 46, 2152–2159.

Thakur K, Kanwar, K (2018) In Vitro Plant Regeneration by Organogenesis from Leaf Callus of Carnation, *Dianthus caryophyllus* L. cv. Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences (88)3, 1147–1155.

Varshney A, Anis M, Aref IM (2013). Potential Role of Cytokinin-auxin Synergism, Antioxidant Enzymes Activities and Appraisal of Genetic Stability in *Dianthus caryophyllus* L.-An Important Cut Flower Crop. In Vitro Cell Dev Biol Plant (49)2, 166–174.

Zia M, Yaqoob K, Mannan, A. et al. (2020). Regeneration Response of Carnation Cultivars in Response of Silver Nanoparticles under in Vitro Conditions. Vegetos 1(33), 11–20.