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

Effect of explant type and different concentrations of growth regulators on micropropagation of *Pelargonium hortorum* Maverick at *In vitro* condition

Peyman Farzandi

Master student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: mfarzandi896@gmail.com

Hassan Marashi

Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: marashi@um.ac.ir

Nasrin Moshtaghi

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: moshtaghi@um.ac.ir

Fereshte Moshiri

Educational Expert, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: moshiri-fe@um.ac.ir

Abstract

Objective

Geranium is one of the most economically important pot plants in the world and is widely used in landscape. In order to produce disease-free and homogenic plants, proliferation by tissue culture is one of the alternative methods for mass production of this valuable plant. The aim of this study was to achieve an efficient and rapid method for micropropagation of Geranium by comparing leaf discs, petiole, stem and root explants on MS and B5 media.

Material and Methods

For callus induction, stem, leaf and root explants were cultured on MS basal medium with 11 different kinds of hormonal combination, containing auxin (NAA and IAA) and cytokinin (BAP, Kin and Zeatin) with various concentrations. For direct regeneration of stem, leaf and petiole

explants, 10 different culture media were used in MS and B5. After shooting, the explants were transferred to B5 culture medium containing auxin (0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l IAA) for root induction.

Results

The best hormonal treatment for callus induction was 1mg/l NAA+10mg/l Kin by using stem and leaf explants as 92.5% and 88.75%, respectively. Also, the maximum fresh and dry weight of callus were related to stem explants on MS culture medium included 1mg/l NAA+10mg/l Kin, which were not significantly different from leaf explants on the same culture medium. The maximum percentage of direct regeneration and number of branches, respectively as 71.25% and 7.12 shoots, were related to stem explant on B5 medium containing 2mg/l BAP+1mg/l Zeatin, and the maximum shoot length, as 2.56 cm, was observed during direct regeneration in MS culture medium included 0.2 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP+1 mg/l Zeatin. The shoots were successfully rooted and adapted to the environment.

Conclusions

The results of the present study were showed that the micropropagation of ornamental geranium plant is affected by the type of explant, the concentration of growth regulators and the type of culture medium and the stem explant is efficient in callus induction and direct regeneration.

Keywords: Auxin, Growth regulator, Explant, Callus, Culture medium.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Farzandi P, Marashi H, Moshtaghi N, Moshiri F (2021) Effect of explant type and different concentrations of growth regulators on micropropagation of *Pelargonium hortorum* Maverick at *In vitro* condition. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (4), 1-18.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (4), 1-18. DOI: 10.22103/jab.2021.17281.1301

Received: August 11, 2020. Accepted: September 16, 2020.

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

اثر نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد در ریز ازدیادی گیاه شمعدانی زینتی (*Pelargonium hortorum* Maverick) در شرایط درون‌شیشه‌ای

پیمان فرزندی

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: mfarzandi896@gmail.com

سید حسن مرعشی

استاد، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: marashi@um.ac.ir

نسرین مشتاقی

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: moshtaghi@um.ac.ir

فرشته مشیری

کارشناس آموزشی، دانشکده کشاورزی،گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: moshiri-fe@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۵

چکیده

هدف: گیاه شمعدانی از لحاظ اقتصادی یکی از پر اهمیت‌ترین گیاهان گلدانی در دنیا می‌باشد و در طراحی فضای سبز کاربرد فراوانی دارد. به جهت تولید گیاهان عاری از بیماری و یکنواخت از لحاظ ژنتیکی یکی از روش‌های جایگزین برای تولید انبوه این گیاه ارز شمند، تکثیر از طریق ک شت بافت ا ست. بنابراین هدف از این پژوهش د ستیابی به رو شی کارآمد و سریع در ریزازدیادی شمعدانی زینتی با مقایسه ریزنمونه‌های قطعات برگی، دمبرگ، ساقه و ریشه در محیط کشت MS و B5 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: جهت کالوس‌زایی، از ریزنمونه‌های ساقه، برگ و ریشه در محیط کشت پایه MS با ۱۱ نوع ترکیب هورمونی مختلف حاوی اکسین (NAA و IAA) و سایتوکینین (BAP، Kin و Zeatin) در غلظت‌های متفاوت استفاده شد. جهت باززایی

مستقیم از ریزنمونه‌های ساقه، برگ و دمبرگ، ۱۰ نوع محیط کشت با ترکیب هورمونی متفاوت از MS و B_5 استفاده گردید. ریزنمونه‌ها پس از شاخه‌زایی به محیط کشت B5 حاوی اکسین (0.5 mg/l NAA و 0.5mg/l IAA) جهت ریشه‌زایی منتقل شدند.

نتایج: بهترین تیمار هورمونی جهت القای کالوس 1mg/l NAA+10mg/l Kin با ریزنمونه ساقه و برگ به ترتیب به میزان ۹۲/۵ و ۸۸/۷۵ در صد کالوس‌زایی بود. همچنین بیشترین وزن‌تر و خشک کالوس نیز مربوط به ریزنمونه ساقه در محیط کشت MS حاوی 1mg/l NAA+10mg/l Kin بود که تفاوت معنی‌داری با ریزنمونه برگی در همین محیط کشت نداشت. بیشترین درصد باززایی مستقیم و تعداد شاخه مربوط به ریزنمونه ساقه در محیط کشت B5 حاوی 2mg/l BAP+1mg/l Zeatin به ترتیب به میزان ۷۱/۲۵ در صد و ۷/۱۲ عدد شاخه بود و بیشترین طول شاخه به میزان ۲/۵۶ سانتی‌متر طی باززایی مستقیم در محیط کشت MS حاوی0.2mg/l NAA+0.5mg/l BAP+1mg/l Zeatin دیده شد. در ادامه شاخه‌ها با موفقیت ریشه‌دار و سازگار شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر نشان داد، ریزازدیادی گیاه شمعدانی زینتی تحت تأثیر نوع ریزنمونه، غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع محیط کشت قرار می‌گیرد و ریزنمونه ساقه در کالوس‌زایی و باززایی مستقیم دارای نتایج مطلوبی می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: اکسین، تنظیم‌کننده رشد، ریزنمونه، کالوس، محیط کشت.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: فرزندی پیمان، مرعشی سیدحسن، مشتاقی نسرین، مشیری فرشته (۱۴۰۰) اثر نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد در ریز ازدیادی گیاه شمعدانی زینتی (*Pelargonium hortoru*m Maverick) در شرایط درون‌شیشه‌ای. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۴)، ۱-۱۸.

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

© the authors

مقدمه

گیاه شمعدانی (*Pelargonium hortorum* Maverick) متعلق به خانواده ژرانیاسه (Geraniaceae) بوده و از جمله گیاهان پرطرفدار و رایج است که تنوع در اندازه، رنگ برگ و گل، عادت رشد و نوع گلدهی آن سبب شده که در طراحی‌های فضای سبز، سازگار و مناسب باشد (Raymond 2004). کشت و کار گیاه شمعدانی در جهان سابقه طولانی داشته و از لحاظ اقتصادی

یکی از پر اهمیت‌ترین گیاهان گلدانی در دنیا (جایگاه دوم) می‌باشد (Mithaila et al. 2001). گیاه شمعدانی را عموماً می‌توان با روش‌های کشت بذر (فقط رقم‌های خالص) و قلمه علفی تکثیر نمود (Amidon and Brobst 2005). با توجه به گران بودن بذر شمعدانی و شرط عدم آلودگی قلمه‌ها به امراض قارچی و باکتریایی جهت تکثیر با قلمه علفی (Mastalerz 1971)، یکی از روش‌های جایگزین برای تولید انبوه این گیاه ارز شمند، تکثیر از طریق کشت بافت است (Magyar-Tábori et al. 2010). از مزایای این روش نسبت به روش‌های تکثیر متعارف می‌توان به امکان تکثیر سریع، کاهش هزینه‌های تولید، اشغال کردن فضای فیزیکی کمتر، عاری از بیماری بودن گیاه حاصل و عدم وجود محدودیت‌های قرنطینه‌ای اشاره کرد (Mithila et al., 2001).

در پژوهشی Gupta et al. (2002) در بررسی برای بهینه‌سازی تکثیر و تنوع سوماکلونال گیاه شمعدانی *P. graveolens*، از محیط کشت MS[1] با ترکیب BA[2] (۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و NAA[3] (۱ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده کردند. محیط کشت آن‌ها جهت القای کالوس از ریزنمونه‌های برگ شمعدانی مطلوب بود و به منظور باززایی شاخساره‌ها، کالوس‌های تولید شده به محیط کشت حاوی BA (۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و NAA (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند. نتایج حاکی از آن بود که بیشترین باززایی با اضافه شدن آدنین سولفات (AdS[4]) با غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر بدست می‌آید (Gupta et al., 2002).

در مطالعه Benazir et al. (2013)، برای القای کالوس از ریزنمونه برگی *P. graveolens* حداکثر پرآوری در محیط کشت MSدارای ۲۰ میکرومولار IBA و ۱۰ میکرومولار کینتین و محیط کشت حاوی ۲۰ میکرومولار IBA[5] و ۱۰ میکرومولار BAPو نیز ۲۰ میکرومولار IAA[6] و ۱۰ میکرومولار کینتین بدست آمد (Benazir et al. 2013). این نتایج بر خلاف گزارش Razdan (2003) است که در محیط کشت از اکسین به تنهایی برای تشکیل کالوس استفاده کرده بود (Razdan 2003). در پژوهشی دیگر، به منظور باززایی مستقیم شاخساره در ریزازدیادی گیاه شمعدانی *P. radula*، حداکثر باززایی شاخساره، از ریزنمونه‌های گره ساقه در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و یک میلی‌گرم بر لیتر IBA بدست آمد (Zuraida et al. 2013). در بررسی باززایی مستقیم از جوانه‌های جانبی گیاه شمعدانی *P. graveolens* در محیط کشت MS حاوی BAPو IAA Gandhi and Saravanan (2018) گزارش کردند که بیشترین درصد القای شاخساره به میزان ۰/۳۳ ± ۴/۳۳ درصد، در محیط کشت حاوی یک و نیم میلی‌گرم بر لیتر BAP و یک میلی‌گرم بر لیتر IAA بدست آمد (Gandhi and Saravanan 2018).

[1] Murashige and Skoog
[2] benzyl adenine
[3] Naphthalene acetic acid
[4] Adenine sulfate
[5] Indole butyric acid
[6] Indole acetic acid

با توجه به اینکه روش‌های تکثیر معمول شمعدانی زمان بر و سخت است، تحقیقات متعددی در نقاط مختلف دنیا در رابطه با ریزازدیادی آن انجام شده است اما یک روش بهینه سازی کلی برای کشت درون شیشه‌ای گونه‌های شمعدانی بویژه در ایران تاکنون وجود ندارد (Wojtania et al., 2004) ، از این رو پژوهش حاضر تلاشی در جهت بررسی و تهیه دستورالعملی کارآمد برای تکثیر شمعدانی زینتی (*Pelargonium hortorum* Maverick) است که از روش ریز ازدیادی در شرایط درون شیشه‌ای بهره می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی ریزازدیادی درون شیشه‌ای شمعدانی زینتی ، پژوهشی در قالب دو آزمایش مجزا، به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۸ تکرار در آزمایشگاه کشت بافت گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد در طی سال‌های ۹۸-۹۷ انجام شد. فاکتورهای آزمایش (آزمایش اول و دوم) شامل نوع ریزنمونه و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد بودند که نوع ریزنمونه در آزمایش اول (ساقه، برگ و ریشه) و در آزمایش دوم (ساقه، برگ و دمبرگ) و نوع تنظیم کننده‌های رشد در آزمایش اول (BAP, IAA, NAA, Kin, Zeatin) و در آزمایش دوم (BAP, NAA, Kin, Zeatin, IAA) بود. برای تکثیر گیاه شمعدانی زینتی، از گیاهان گلدانی تهیه شده از بذور نسل F_1 در مرحله رشد فعال، شاداب و عاری از بیماری استفاده گردید. جهت تهیه ریزنمونه، قطعاتی از ساقه به طول حدود ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر، برگ‌های جوان به مساحت ۱ در ۱ سانتی‌متر و ریشه و دمبرگ به طول ۳-۲ سانتی‌متر تهیه گردید. در این پژوهش از محیط کشت MS (در مرحله کالوس‌زایی و باززایی مستقیم) و B_5 (در مرحله باززایی مستقیم و ریشه‌زایی) استفاده گردید. به منظور ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌ها، ابتدا ریزنمونه ریشه توسط آب جاری به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد. سپس ریشه و ریزنمونه‌های دم برگ، برگ و ساقه بوسیله آب مقطر ۳ بار و به مدت ۷-۵ دقیقه شستشو داده شدند. بقیه مراحل ضدعفونی در زیر هود لامینار انجام شد که شامل غوطه‌وری ریزنمونه‌ها در الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، استفاده از هیپوکلریت سدیم یک درصد حاوی دو قطره توین ۲۰ به مدت ۵ دقیقه و در انتها آبشویی ریزنمونه‌ها با استفاده از آب مقطر استریل ۳ بار و به مدت ۷-۵ دقیقه بود. سپس ریزنمونه‌ها بر روی کاغذ صافی استریل جهت گرفتن آب اضافی قرار گرفت و پس از آن کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت مورد نظر انجام شد (Mohamadzadeh Moghadam et al. 2019).

کالوس‌زایی (آزمایش اول): به منظور ارزیابی تأثیر تنظیم کننده‌های رشد جهت کالوس‌زایی، ریزنمونه‌های ساقه، برگ و ریشه شمعدانی زینتی پس از انجام مراحل ضدعفونی در ظروف کشت حاوی محیط کشت MS با یازده ترکیب تیماری مختلف (جدول ۱) کشت شدند. در هر محیط کشت به طور متوسط ۵ عدد از هر ریزنمونه با ۸ تکرار کشت شد و سپس ظروف شیشه‌ای به

اتاقک رشد با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. عمل واکشت پس از سه هفته انجام شد و به فاصله یک هفته صفات موردنظر، شامل درصد کالوس‌زایی، وزن‌تر و خشک کالوس اندازه‌گیری گردید.

جدول ۱. نوع و مقادیر ترکیب هورمونی جهت کالوس‌زایی ریزنمونه‌های شمعدانی زینتی

Table 1. Type and amount of hormonal composition for callus formation of ornamental geranium explants

شماره تیمار Treatment number	نوع تنظیم‌کننده‌های رشد Type of growth regulators	غلظت‌ها (میلی‌گرم بر لیتر) Concentrations (mg/l)
1	BAP + NAA	1.5+0.1
2	BAP + NAA	2+0.1
3	BAP + NAA	2.5+0.1
4	BAP + NAA	3+0.1
5	BAP + NAA	4+0.1
6	BAP + NAA	1.5+0.5
7	Kin + NAA	5+1
8	Kin + NAA	10+1
9	Zeatin+ BAP + NAA	1+0.5+0.2
10	Zeatin+ BAP + IAA	1+0.5+0.2
11	Zeatin+ BAP + IAA	0.5+0.5+0.2

باززایی مستقیم (آزمایش دوم): ریزنمونه‌ها شامل ساقه، برگ و دمبرگ پس از انجام مراحل ضدعفونی در ظروف کشت حاوی ۱۰ محیط کشت مختلف در هشت تکرار کشت شدند. نوع محیط کشت و مقادیر تنظیم کننده‌های رشد دراین ۱۰ محیط مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است. پس از سه هفته ریزنمونه‌ها در محیط کشت جدید با ترکیب تیماری اولیه واکشت گردیدند و به فاصله یک هفته صفات درصد شاخه‌زایی، تعداد و طول شاخه‌های تولید شده اندازه‌گیری شد.

جهت القای ریشه، شاخه ها به محیط کشت های B5+ 0.5 mg/l IAA و B5+ 0.5 mg/l NAA منتقل شدند. سپس به منظور سازگاری، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده پس از شست‌وشوی آرام ریشه‌ها با جریان آب و حذف آگار، در مخلوطی از خاک، پیت

و ماسه با نسبت وزنی، ۱:۱:۱ در اتاقک رشد و در شرایط دمایی ۲ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت جریان فتون فتوسنتزی PPFD=40µ mol m-2s-1)، نگهداری شدند. آبیاری به‌صورت روزانه انجام گرفت و گیاهچه ها به گلدان و شرایط گلخانه انتقال یافتند.

تجزیه آماری

آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر مبنای طرح پایه کاملاً تصادفی آنالیز شد. داده‌های حاصل، در نرم افزار Excel ثبت گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم افزار JMP-8 و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت. برای داده‌های درصدی نیز از تبدیل داده Arcsin، جهت نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد.

جدول ۲. نوع و مقادیر ترکیب هورمونی جهت باززایی مستقیم ریزنمونه‌های شمعدانی زینتی

Table 2. Type and amounts of hormonal composition for direct regeneration of ornamental geranium explants

شماره تیمار Treatment number	نوع محیط کشت Type of culture medium	نوع تنظیم‌کننده‌های رشد Type of growth regulators	غلظت‌ها (میلی‌گرم بر لیتر) Concentrations (mg/l)
1	B_5	Zeatin+ BAP	1+2
2	B_5 + آدنین سولفات (۵ mg/L) (Adenine sulfate)	Zeatin+ BAP	3+2
3	B_5 + آدنین سولفات (۲ mg/L) (Adenine sulfate)	Zeatin+ BAP	2+2
4	MS	Zeatin+ BAP + NAA	1+0.5+0.2
5	MS	BAP	3
6	MS	BAP	4
7	MS	BAP	5
8	MS	Kin	5
9	MS	BAP + IAA	0.1+0.5
10	MS	BAP + NAA	0.5+0.1

نتایج و بحث

کالوس‌زایی: نتایج تجزیه واریانس داده‌های کالوس‌زایی، نشان داد اثر متقابل محیط کشت و نوع ریزنمونه بر درصد کالوس‌زایی و وزن‌تر و خشک کالوس در سطح احتمال یک درصد ($p\leq0.01$) معنی‌دار است (جدول ۳). بیشترین میزان درصد کالوس‌زایی با مقدار ۹۲/۵ و ۸۸/۷۵ درصد به ترتیب مربوط به ریزنمونه‌های ساقه و برگ در محیط کشت MS+ 1 mg/l NAA+ 10 mg/l Kin می‌باشد. ریزنمونه ساقه و برگ به عنوان بهترین ریزنمونه در فرایند کالوس‌زایی بودند در حالی که ریزنمونه ریشه فقط در محیط کشت حاوی زآتین، کالوس تولید کرد. افزایش غلظت هورمون اکسین NAA از مقدار ۰/۱ به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ۱/۵ میلی‌گرم BAP، نشان داد که درصد کالوس‌زایی در ساقه و برگ به میزان ۴۲/۱۱ و ۷۸/۵۷ درصد به ترتیب افزایش یافته است. همچنین نتایج حاکی از این بود که هورمون زآتین در کالوس‌زایی ریزنمونه ها مؤثر واقع شده و اکسین از نوع NAA موفقیت بالایی در میزان کالوس‌زایی داشت (شکل ۱ و ۷).

نتایج مقایسه میانگین تیمارها نشان داد با استفاده از ریزنمونه ساقه در محیط کشت MS+ 1mg/l NAA+ 10 mg/l Kin بیشترین وزن‌تر کالوس (۰/۴۱ گرم) حاصل شد، به طوری‌که اختلاف معنی‌داری با ریزنمونه برگی (۰/۳۹ گرم) در همین محیط کشت نداشت. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، استفاده از ریزنمونه ساقه و برگ همراه با کاربرد Kin[7] در سطوح ۱۰ و ۵ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش وزن‌تر کالوس به میزان قابل توجهی می‌گردد. با توجه به نتیجه آزمایش، کاربرد هورمون اکسین از نوع NAA و هورمون سیتوکینین، Kin (در غلظت بالا) و BAP در غلظت پایین (۱/۵–۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، و همچنین استفاده از زآتین در القای کالوس و افزایش وزن کالوس‌های حاصل از ریزنمونه گیاه شمعدانی زینتی توصیه می‌شود (شکل ۲).

بیشترین وزن خشک کالوس (۰/۰۶۷ گرم) در ریزنمونه ساقه همراه با محیط کشت MS+ 1mg/l NAA+ 10 mg/l Kin حاصل شد. به طوری‌که با ریزنمونه برگی (۰/۰۶۰ گرم) در همین محیط کشت تفاوت معنی‌داری نداشت. همچنین استفاده از ریزنمونه ساقه (۰/۰۵۷ گرم) و برگ (۰/۰۵۳ گرم) در محیط کشت MS+ 1mg/l NAA+ 5 mg/l Kin سبب افزایش قابل ملاحظه‌ای در وزن خشک کالوس گردید. بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده از آزمایش حاضر بهترین نوع ریزنمونه و محیط کشت برای افزایش وزن خشک کالوس به ترتیب ریزنمونه ساقه و برگ و محیط کشت حاوی Kin به میزان ۱۰ میلی گرم بر لیتر برای ریز نمونه ساقه و ۵ میلی‌گرم در لیتر برای ریز نمونه برگ می‌باشد (شکل ۳).

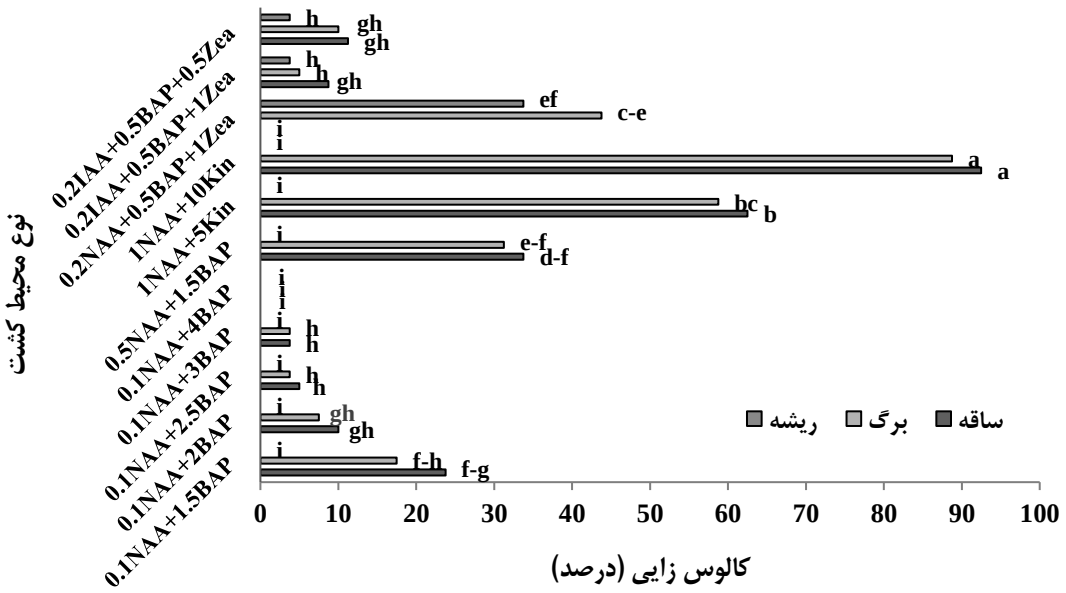
[7] Kinetin

جدول ۳. تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در آزمایش اول در گیاه شمعدانی زینتی در محیط کشت‌های مختلف و انواع ریزنمونه

Table 3. Analysis of variance of the studied traits in the first experiment in ornamental geranium plant in different culture media and types of explants

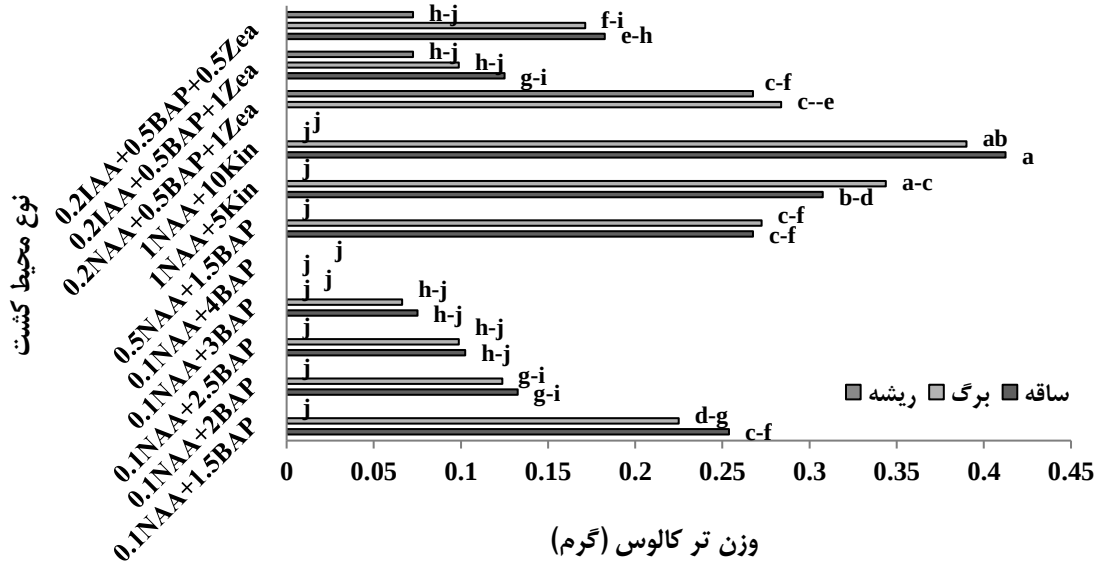
منابع تغییرات Sources of variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares		
		درصد کالوس‌زایی Percentage of callus formation (%)	وزن‌تر کالوس Callus wet weight (gr)	وزن خشک کالوس Callus dry weight (gr)
محیط کشت Culture medium	10	1676.05**	0.20**	0.25**
ریزنمونه Explant	2	3725.97**	1.78**	0.65**
محیط کشت × ریزنمونه Culture medium × Explants	20	1521.37**	0.05**	0.05**
خطا Error	231	8.08	0.003	0.002

** معنی‌دار در سطح ۱٪ Significant at 1% level **



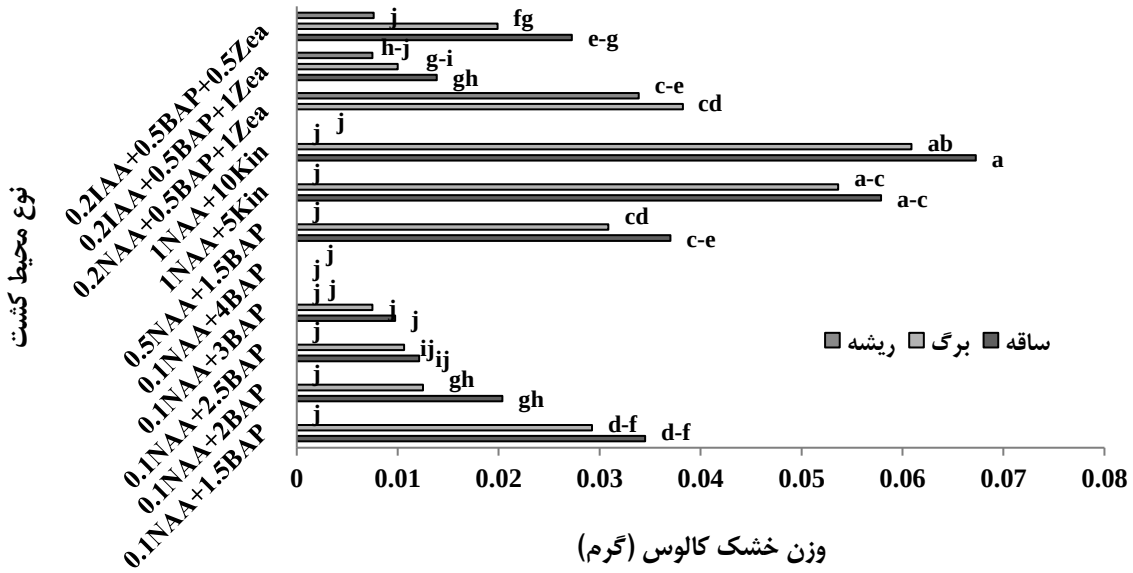
شکل ۱. درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های شمعدانی زینتی تحت تأثیر تیمار مختلف هورمونی (mg/L) و نوع ریزنمونه. (میانگین‌های دارای حروف مشترک با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند)

Figure 1. Percentage of callus formation of ornamental geranium explants under the influence of different hormonal treatments (mg / L) and type of explant. (Means with the same letter are not significantly different from each other)



شکل ۲. وزن‌تر کالوس ریزنمونه‌های شمعدانی زینتی تحت تأثیر تیمار مختلف هورمونی (mg/L) و نوع ریزنمونه. (میانگین‌های دارای حروف مشترک با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند)

Figure 2. Fresh weight of callus of ornamental geranium explants under the influence of different hormonal treatments (mg / L) and type of explant. (Means with the same letter are not significantly different from each other)



شکل ۳. وزن خشک کالوس ریزنمونه‌های شمعدانی زینتی تحت تأثیر تیمار هورمونی (mg/L) و نوع ریزنمونه (میانگین‌های دارای حروف مشترک با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند)

Figure 3. Callus dry weight of ornamental geranium explants under the influence of hormonal treatment (mg / L) and type of explant. (Means with the same letter are not significantly different from each other)

عموماً پاسخ بافت‌ها برای کالوس‌زایی به مقادیر تنظیم کننده‌های رشد درونی و بیرونی گیاه بستگی دارد (Benazir et al. 2013). تلفیق مناسبی از اکسین و سایتوکینین به عنوان تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و فاکتورهای کلیدی برای کنترل تقسیم سلولی و کالوس‌زایی ریزنمونه‌های گیاهی در شرایط کشت بافت مورد نیاز است (Richard et al. 2002; Silveira et al. 2004). استفاده از NAA (به عنوان اکسین) و Kin و Zea [8](به عنوان سایتوکینین) به منظور تولید کالوس در کشت بافت گیاهان زیادی گزارش شده است (Bagheri et al. 2012; Iranbakhsh et al. 2007). Mayer (2000) عنوان نمود که بالاترین درصد کالوس‌زایی به ترتیب با کشت ریزنمونه‌های ساقه و برگ گیاه شمعدانی عطری به میزان ۸۵ و ۷۹/۸ درصد در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و سایتوکینین Kin با غلظت‌های ۳ و ۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. در مطالعه دیگر، میزان اکسین کمتر به‌همراه کاربرد سطوح بالاتر سایتوکینین کالوس‌زایی را در شمعدانی عطری افزایش داد (Saxena et al. 2000) که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. بنابراین برخلاف برخی گیاهان که در غلظت‌های بالای اکسین، کالوس‌زایی بهتری دارند، اما در شمعدانی غلظت بالای سایتوکینین در القای کالوس مؤثر است. رشد کالوس (وزن‌تر و خشک کالوس) در یک گونه گیاهی براساس نوع ریزنمونه و ترکیب محیط کشت آن گیاه متفاوت است (Magyar-Tábori et al. 2010) و کاربرد هورمون اکسین NAA در ترکیب با هورمون‌های سایتوکینین Kin، BAP و Zeatin باعث افزایش رشد کالوس می‌شود (Bagheri et al. 2012) که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد.

باززایی مستقیم؛ درصد شاخه‌زایی: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل نوع محیط کشت و نوع ریزنمونه بر درصد شاخه‌زایی، تعداد شاخساره و طول شاخساره در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است (جدول ۴). همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود بهترین ریزنمونه برای شاخه‌زایی مستقیم، ریزنمونه ساقه بود و در ریزنمونه برگ و دمبرگ هیچ‌گونه شاخه‌زایی مشاهده نگردید و تنها در دو محیط کشت MS+ 0.2 mg/l NAA+ 0.5 mg/l BAP+ 1mg/l Zeatin و B5+ 2 mg/l BAP+ 1mg/l Zeatin شاخه‌زایی مستقیم به ترتیب با مقدار ۷۱/۲۵ و ۵۲/۵ درصد مشاهده گردید (شکل ۴ و ۷).

تعداد شاخساره باززاشده: همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، فقط ریزنمونه ساقه سبب شاخه‌زایی گردید و بیشترین تعداد شاخه در محیط کشت حاوی B5+ 2 mg/l BAP+ 1mg/l Zeatin با مقدار ۷/۱۲ عدد حاصل شد. محیط کشت دیگری که باززایی در آن مشاهده گردید، مربوط به محیط کشت MS+ 0.2 mg/l NAA+ 0.5 mg/l BAP+ 1 mg/l Zeatin با ۵/۲۵ عدد شاخه در هر ریزنمونه ساقه بود.

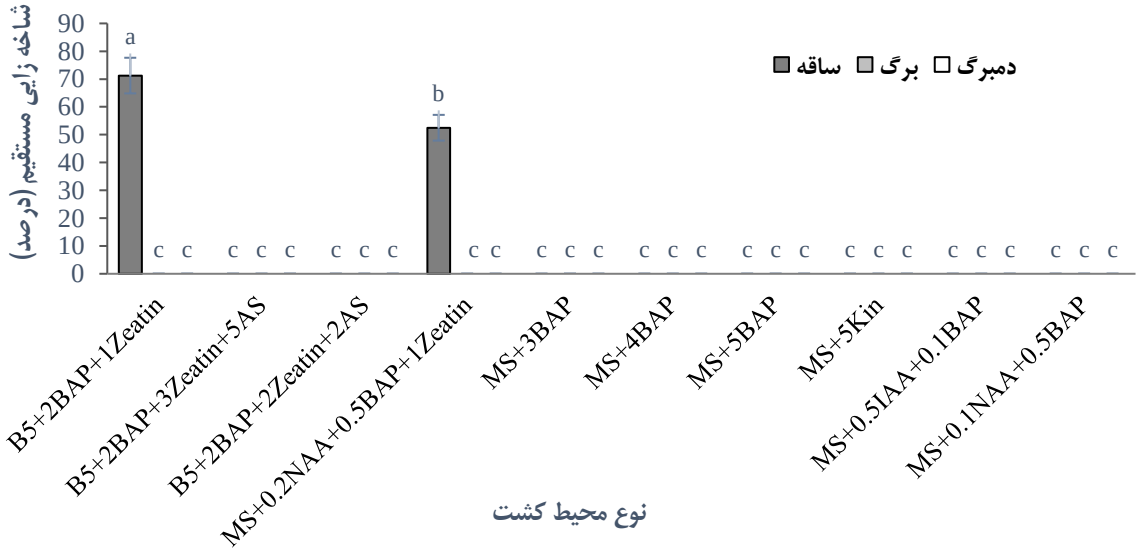
[8] zeatin

جدول ٤. تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در آزمایش دوم در گیاه شمعدانی زینتی در محیط کشت‌های مختلف و انواع ریزنمونه

Table 4. Analysis of variance of the studied traits in the second experiment in ornamental geranium plant in different culture media and types of explants

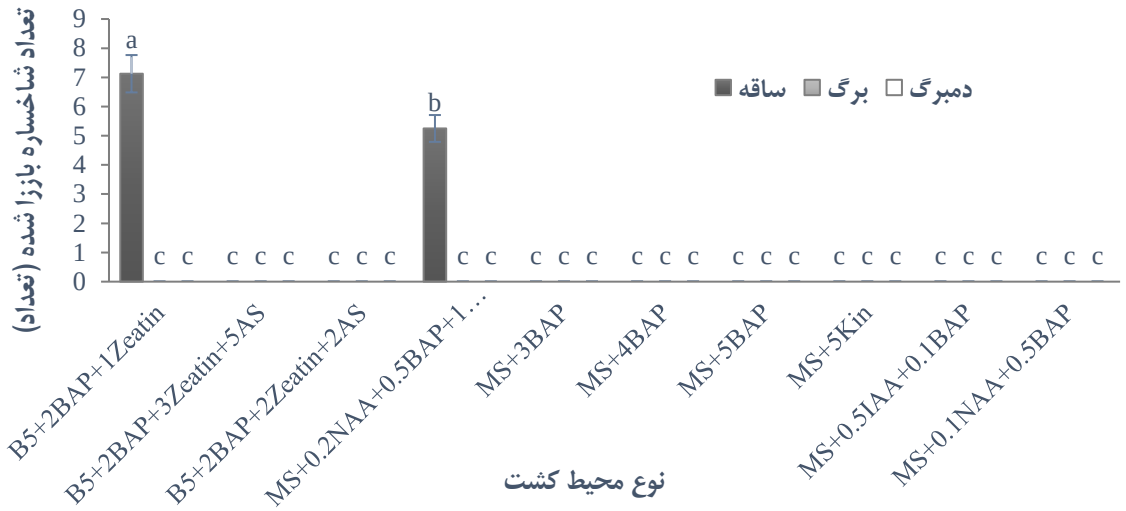
منابع تغییرات Sources of variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares		
		درصد شاخه‌زایی Percentage of callus formation (%)	تعداد شاخه Callus wet weight (n)	طول شاخه Callus dry weight (cm)
محیط کشت Culture medium	9	1867.08**	17.67**	2.63**
ریزنمونه Explant	2	4083.75**	39.83**	5.85**
محیط کشت × ریزنمونه Culture medium × Explants	18	1867.08**	18.67**	2.63**
خطا Error	210	2.08	0.02	0.005

** معنی‌دار در سطح ۱٪ Significant at 1% level **



شکل ٤. درصد شاخه‌زایی مستقیم ریزنمونه‌های شمعدانی زینتی تحت تأثیر تیمارهای هورمونی (mg/L) و ریزنمونه ساقه

Figure 4. Percentage of direct branching of ornamental geranium explants under the influence of hormonal treatments (mg / L) and stem explants

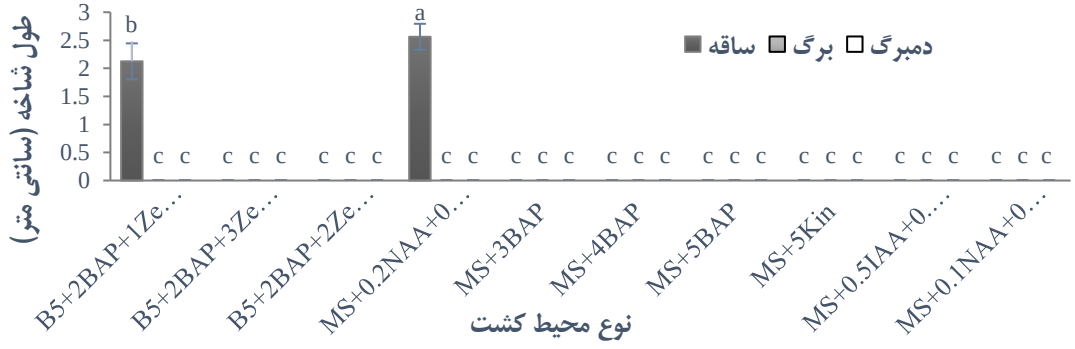


شکل ۵. تعداد شاخه در باززایی مستقیم ریزنمونه ساقه شمعدانی زینتی تحت تأثیر تیمارهای هورمونی (mg/L) و ریزنمونه ساقه

Figure 5. Number of branches in direct regeneration of ornamental geranium stem explants under the influence of hormonal treatments (mg / L) and stem explants

طول شاخساره باززا شده: بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در بین دو تیماری که شاخه‌زایی در آن‌ها حاصل شد، بیشترین طول شاخساره با میزان ۲/۵۶ سانتی‌متر مربوط به محیط کشت MS+ 0.2 NAA+ 0.5 BAP+ 1 Zeatin با ریزنمونه ساقه مشاهده گردید. در حالی که طول شاخساره همین ریز نمونه در محیط کشت B5+ 2 BAP+ 1 Zeatin، ۲/۱۲ سانتی‌متر مشاهده گردید که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۶).

توانایی باززایی شاخساره در ریزنمونه‌ها نیز به تغییرات سنتز، انتقال، برهمکنش و تعادل بین هورمون‌های درونی و نیز تغییر در حساسیت سلول‌ها به تنظیم کننده‌های رشد بیرونی وابسته است (Wojtania et al. 2004). برخی محققین معتقدند که حضور غلظت مناسب اکسین در کنار سایتوکینین باعث باززایی بهتر ریز نمونه‌ها می‌شود (Guo et al. 2005). در آزمایشی کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA در ریزازدیادی شمعدانی عطری *P. radula*، باعث حداکثر باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های گرهی ساقه شد (Zuraida et al. 2013). در صورتی که در آزمایش حاضر زآتین نقش مهمی در میزان باززایی ریزنمونه ساقه داشت. در نتایج آزمایش Goodarzi et al (2016) بیشترین میزان شاخساره‌زایی در محیط کشت MS به میزان ۱۴/۶۷ عدد در هر ریزنمونه گیاه محلب (*Prunus mahaleb* L.)، در تیمار ۰/۲ میلی گرم در لیتر Zeatin در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد و Zeatin نقش موثری در شاخساره‌زایی ریزنمونه‌ها داشت که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.



شکل ٦. طول شاخه در باززایی مستقیم ریزنمونه‌های شمعدانی زینتی تحت تأثیر تیمار هورمونی (mg/L) و ریزنمونه ساقه

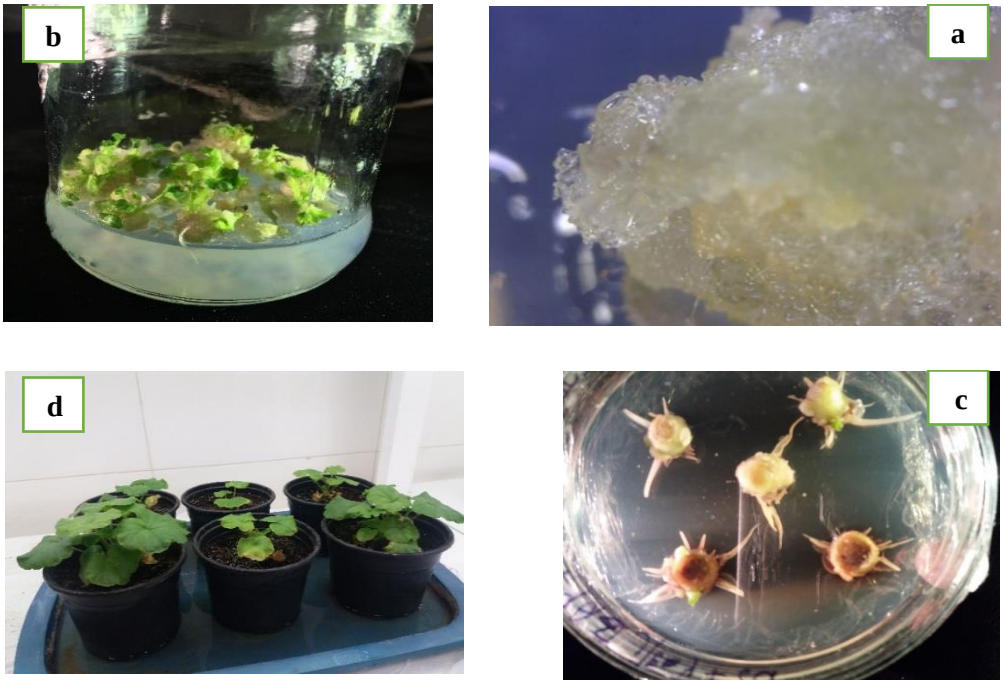
Figure 6. Branch length in direct regeneration of ornamental geranium explants under hormonal treatment (mg / L) and stem explants

همچنین در آزمایش‌های مختلف افزایش میزان شاخساره‌زایی با حضور BAP در گونه‌های مختلف شمعدانی عطری را به نقش و اثر این هورمون در شکستن غالبیت انتهایی، تحریک رشد شاخساره‌های جدید و ایجاد سطح متعادل هورمونی مربوط دانسته‌اند (Zaffari et al. 2000; Negi et al. 2004; Tembe and Deodhar 2010). Steephen et al. (2010) بیان کرده‌اند که با افزایش غلظت سیتوکینین تعداد شاخساره افزایش و طول شاخساره کاهش می‌یابد و افزودن اکسین تا حدودی سبب خنثی شدن تأثیر سایتوکینین‌ها در رشد شاخساره شده و از این طریق رشد شاخساره‌ها تحریک می‌شود. در آزمایش دیگری Ye et al. (2002) نیز مشاهده نمودند که درمحیط کشت MS با کاهش غلظت هورمون سایتوکینین BA از ۰/۸ به ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر، شاخه‌زایی در گیاه عدس کمتر شده اما طول شاخساره‌ها به میزان ۳۰/۹۱ درصد افزایش می‌یابد که با نتایج Zaffari et al. (2000) و تحقیق حاضر مطابقت دارد. ریشه زایی و سازگاری در محیط های ذکر شده با میزان بالایی انجام گرفت و حاکی از موفق بودن روش در استقرار گیاهان بود (شکل۷).

نتیجه‌گیری: با ابزار کشت بافت و دستیابی به توانایی‌های ذاتی گیاهان می‌توان روند طولانی رویش گیاه را کوتاه کرد. در بین ریزنمونه‌های انتخاب شده به منظور کالوس‌زایی گیاه شمعدانی زینتی، ریزنمونه‌های ساقه و برگ نسبت به ریشه موفق عمل نمودند. بیشترین میزان کالوس‌زایی، وزن‌تر کالوس و وزن خشک کالوس در ریزنمونه ساقه و محیط کشت 1mg/l NAA+ 10 mg/l Kin حاصل شد. نتایج بیانگر آن بود که کاربرد Kin سبب افزایش درصد کالوس‌زایی، وزن‌تر و وزن خشک کالوس می‌گردد. باززایی مستقیم تنها در ریزنمونه ساقه و محیط کشت‌های B5+ 2 mg/l BAP+ 1mg/l Zeatin و MS+ 0.2 mg/l NAA+ 0.5 mg/l BAP+ 1mg/l Zeatin دیده شد و بیشترین درصد شاخه‌زایی مستقیم و تعداد شاخه در تیمار هورمونی حاوی سایتوکینین مربوط به محیط کشت B5+ 2 mg/l BAP+ 1mg/l Zeatin در ریزنمونه ساقه بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد

که شاخه‌ها پس از انتقال به محیط کشت حاوی اکسین بالا، بعد از ۱۰ روز ریشه‌دار شده و سازگاری بالایی در گیاهچه‌ها مشاهده شد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر حمایت مالی و همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.



شکل ۷. مراحل ریز ازدیادی گیاه شمعدانی زینتی (a: کالوس‌زایی b: باززایی مستقیم c: ریشه‌زایی d: سازگاری)

Figure 7. Micropropagation stages of ornamental geranium plant (a: callus formation b: direct regeneration c: rooting d: adaptation)

منابع

گودرزی غلامرضا، پیام نور وحیده، جعفری مصطفی، علی عرب علیرضا (۱۳۹۵) اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و محیط کشت بر شاخساره‌زایی و کاهش میزان شیشه‌ای شدن محلب (*Prunus mahaleb* L.) در کشت درون‌شیشه‌ای. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۲۴(۱)، ۱-۱۲.

محمد زاده مقدم نجمه، صفی پور افشار اکبر، سعید نعمت پور فاطمه (۱۳۹۸) بررسی چند نوع محیط کشت، تیمار ضد عفونی و هورمونی جهت ریز ازدیادی برخی پایه های سیب (*Mallus domestica* Borkh.). مجله پژوهشهای گیاهی (زیست شناسی ایران) ۳۲(۳)، ۵۲۳-۵۱۲.

References

Amidon CW, Brobst JE (2005) To grow pelargoniums is to know them. The Herbalist 71, 4-10.

Bagheri A, Ghasemi Omraan VO, Hatefi S (2012) Indirect in vitro regeneration of lentil (*Lens culinaris* Medik.). J Plant Mol Breed 1(1), 43-50.

Benazir JF, Suganthi R, Mathithumilan B (2013) In vitro regeneration and transformation studies on *Pelargonium graveolens* (geranium)-an important medicinal and aromatic plant. Res J Med Plant 7(38), 2815-2822.

Gandhi K, Saravanan S (2018) In vitro regeneration of Geranium (*Pelargonium graveolens* L. Hert.) through Axillary bud culture- an important essential oil yielding plant. Int J Sci Res 7(11), 17-23.

Goodarzi GH, Payamnour V, Jafari M, Ali-Arab A (2016) Effects of plant growth regulators and culture media on shoot proliferation and reduction of vitrification of *Prunus mahaleb* L. via in vitro culture. Iran J Rangel Forest Plant Breed Genetic Res 24(1), 1-12 (In Persian).

Guo DP, Zhu ZJ, Hu XX, Zheng SJ (2005) Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem mustard (*Brassica juncea* var. tsatsai). Plant Cell Tissue Organ Cult 83(1), 123-127.

Gupta R, Gupta SK, Banerjee S et al. (2002) Micropropagation of Elite Cultivars of Rose-scented Geranium (*Pelargonium graveolens* L'Herit.) for Industrial Production of Propagules. Indian J Biotechnol 1(3), 286-291.

Iranbakhsh AR, Oshagi MA, Ebadi M (2007) Growth and production optimization of tropane alkaloids in *Datura stramonium* cell suspension culture. Pak J Biol Sci 10(8), 1236-1242.

Laughner LJ (1993) History. In: White JW (ed) Geraniums IV. Ball Publishing, Geneva, pp. 363-371.

Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Da Silva JA, Bulley SM, Hudák I (2010) The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell Tissue Organ Cult 101(3), 251-267.

Mastalerz JW (1971) A manual on the culture, diseases, insects, economics, taxonomy and breeding of geraniums. Pennsylvania Flower Growers Bulletin, Pennsylvania, p.350.

Mayer L (1956) Growth and organ formation of in vitro cultivated segments of *Pelargonium zonale* and *Cyclamen persicum*. Planta 47, 401-446.

Mithila J, Murch SJ, KrishnaRaj S, Saxena PK (2001) Recent advances in Pelargonium in vitro regeneration systems. Plant Cell Tissue Organ Cult 67(1), 1-9.

Mohamadzadeh Moghadam N, Safipour Afshar A, Saeid Nematpour F (2019) Study on the effects of medium, sterilization and hormonal treatment on micropropagation of some apple (*Mallus domestica* Borkh.) rootstocks. J Plant Res 32 (3), 512-523 (In Persian).

Negi PS, Biswas VR, Verma S, Kumar N (2004) A new protocol for micropropagation of rose geranium (*Pelargonium graveolens*). Indian J Hortic Res Dev 36, 31-34.

Raymond CA (2004) Factors affecting media pH and nutrient uptake in geraniums. PhD thesis, University of Maryland. pp. 220.

Razdan MK (2003) Germplasm conservation. Introduction to plant tissue culture, 2nd edn. Science Publishers Inc. pp. 122-134.

Richard C, Lescot M, Inzé D, De Veylder L (2002) Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. Plant Cell Tissue Organ 69(2), 167-176.

Ristić MS, Radanović D (2006) Proceedings from the Third Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Belgrade, Serbia, 5-8 September 2004. Institute for Medicinal Plant Research and Association for Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (AMAPSEEC), Serbia. pp. 167.

Saxena G, Banerjee S, Rahman L et al. (2000) An efficient in vitro procedure for micropropagation and generation of somaclones of rose scented *Pelargonium*. Plant Sci 155(2), 133-140.

Silveira V, Floh EI, Handro W, Guerra MP (2004) Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. Plant Cell Tissue Organ Cult 76(1), 53-60.

Steephen M, Nagarajan S, Ganesh D (2010) Phloroglucinol and silver nitrate enhances axillary shoot proliferation in nodal explants of *Vitex negundo* L.–an aromatic medicinal plant. Iran J Biotechnol 8(2), 82-89.

Tembe RP, Deodhar MA (2010) Clonal propagation of different cultivars of *Pelargonium graveolens* (L'Herit.) viz., Reunion, Bourbon and Egyptian. Biotech 9(4), 492-498.

Wojtania A, Gabryszewska E, Marasek A (2004) Regeneration of *Pelargonium*× *hederaefolium* 'Bonete'from petiole explants. Acta Physiol Plant 26(3), 255-262.

Ye G, McNeil DL, Conner AJ, Hill GD (2002) Multiple shoot formation in lentil (*Lens culinaris*) seeds. New Zeal J Crop Hort 30(1), 1-8.

Zaffari GR, Kerbauy GB, Kraus JE, Romano EC (2000) Hormonal and histological studies related to in vitro banana bud formation. Plant Cell Tissue Organ Cult 63(3), 187-192.

Zuraida AR, Shukri M, Ayu Nazreena O, Zamri Z (2013). Improved micropropagation of biopesticidal plant, *Pelargonium radula* via direct shoot regeneration. Am J Res Commun 1(1), 1-12.