

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. Associate Professor, Department of Biotechnology Engineering, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. sharifi-sirchi@uk.ac.ir
<https://orcid.org/0000-0001-8485-1651>.

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


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: دانشیار گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

sharifi-sirchi@uk.ac.ir رایانامه: <https://orcid.org/0000-0001-8485-1651>

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. رایانامه:

m.h.azimi58@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱

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 تنظیم کننده‌های مختلف از جمله استفاده از آدنین همی سولفات، برای اولین بار در ارقام میخک طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها: به منظور تعیین سطح بهینه ترکیبات محیط کشت جهت باززایی مستقیم ارقام میخک (اسکیمو، تیپور و لابرته)، 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 درصد با $R^2 = 96\%$ و $CV = 22\%$ معنی‌دار شد که نشان‌دهنده دقت قابل قبول آزمایش می‌باشد. با توجه به نتایج، مشاهده شد که در ریزنمونه‌های برگ‌های ارقام مختلف میخک، استفاده از محیط کشت MS در شرایط نوری به همراه IAA 0.5 mg/L + TDZ 2 mg/L به طور مطلوبی سبب باززایی مستقیم از ریزنمونه‌های برگ‌ها شد. قابل ذکر است، با اضافه کردن ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین‌همی سولفات 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 برگ‌ها در شرایط روش‌شنایی 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 آدنین‌همی سولفات 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 آدنین‌همی سولفات و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر افزایش نرخ باززایی مستقیم ریزنمونه برگ‌های 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: MS: .JAA: Indole-3-Acetic Acid, TDZ: Thidiazuron, PGRs: Plant Growth Regulators

As: Adenine sulfate, Murashige and Skoog

میخک گیاهی است دو لپه، از خانواده Caryophyllaceae با نام علمی *Dianthus caryophyllus* L. و در زبان انگلیسی به آن Carnation گفته می‌شود. جنس *Dianthus* حدود ۳۰۰ گونه دارد و بومی اروپا و آسیاست و گونه‌های اندکی از آن بومی آفریقای شمالی و یک گونه *D. repens* بومی آمریکای شمالی است. اغلب این گیاهان دارای ساختار خشبی، برگ‌ها ساده، کامل، غالباً متقابل، معمولاً گو شوارک‌دار یا بیشتر مواقع بدون گو شوارک می‌باشند (در قبیله *Poronychia* گو شوارک غشایی وجود دارد). جنس میخک عموماً دارای گیاهان دیپلوئید ($2x=30$) می‌باشد که گونه‌هایی به صورت تتراپلوئید ($4x=60$) هم شناسایی شده‌است. به طور کلی اکثر ارقام تجاری میخک که در گلخانه‌ها کشت و کار می‌شوند نرعیتم و در پی آن دگرگشت می‌باشند و به طور معمول، ارقام مختلف این گیاه به راحتی با قلمه‌زنی تکثیر می‌شوند. گل میخک به رنگ‌های سفید، صورتی، قرمز، ارغوانی، زرد و نارنجی در ترکیبات مختلف دیده می‌شود (Siddique and Yadav 2021). بر اساس میزان فروش در بازار گل هلند، میخک یکی از ۱۰ گل برتر شاخه بریده جهان است و از این رو اصلاح آن به منظور بهبود صفات کیفی و کمی این گیاه ارزشمند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (Zia et al. 2020). قابل ذکر است، 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 مشکلات کروموزومی، انواع ناسازگاری‌ها، عدم تولید گرده فعال و همچنین مشکلات پس از لقاح وجود دارد (Dyaberi et al. 2015). این مشکلات سبب می‌شود که تمرکز بر تولید ارقام جدید بیش‌تر بر اساس روش‌های نوین اصلاحی، از جمله روش‌های اصلاح درون شیشه‌ای باشد. بر همین اساس استفاده از روش‌های کشت بافت گیاهی سبب کاهش بسیاری از مشکلات و افزایش چشم‌گیر کارایی روش‌های اصلاحی شده‌است (Datta 2014). به طور کلی یکی از کاربردهای مهم کشت 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 مناسب برای هر رقم، در گیاه میخک از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (Shen et al. 2008). با استناد به تحقیقات گذشته در زمینه باززایی ارقام مختلف میخک، می‌توان عنوان کرد که استفاده از سایتوکینین در ترکیب با غلظت پایین اکسین به طور سودمندی سبب باززایی بهینه خواهد شد (Prasad et al. 2016). در همین رابطه، پژوهش‌های زیادی به منظور اندام‌زایی ارقام میخک طراحی و اجرا شده‌است، نتایج این پژوهش‌ها گواهی می‌دهد که بنزیل آمینو پورین (BAP) و توفوردی (2,4-D) به طور معنی‌داری سبب باززایی در ارقام مختلف میخک می‌شود (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 شد، در این پژوهش از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره با استفاده از غلظت‌های مختلف هورمونی استفاده شد؛ محققین در پژوهشی دریافتند که بهترین نتیجه باززایی حاصل از ریزنمونه برگ میخک به همراه 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 سایتوکینین و اکسین استفاده شده‌است، اما باید توجه داشت که میزان واکنش ارقام مختلف به تنظیم‌کننده‌های

رشد متفاوت است، لذا یافتن بهینه‌ترین تیمار در هر رقم، امری ضروری و غیر قابل انکار می‌باشد (Azadi et al. 2018; Lukatkin et al. 2017; Siddique and Yadav 2021; Thakur and Kanwar, 2018). اشاره به این مطلب بسیار اهمیت دارد که به منظور افزایش کارایی روش‌های اصلاحی درون شیشه‌ای، بررسی سایر 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 موضوع 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 ساکاروز ۳ درصد و مانیتول ۱۲ درصد 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 شد (Lukatkin et al. 2017; Phillips and Garda 2019). یکی از مهم‌ترین محرک‌های مؤثر بر افزایش نرخ باززایی آدنین‌همی‌سولفات می‌باشد. آدنین‌همی‌سولفات از مشتقات نوکلوباز می‌باشد و با طیف گسترده‌ای از نقش‌های شیمیایی و بیوشیمیایی، یک مولکول تنظیم‌کننده و جزء دی‌ان‌ای (DNA)، آر‌ان‌ای (RNA)، کوفاکتورهای ان‌ای دی (NAD)، اف دی‌ای (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 به منظور بررسی اثر آدنین‌همی‌سولفات بر افزایش نرخ باززایی انجام شد، نتایج تحقیق نشان داد استفاده از این ترکیب به طور معنی‌داری سبب افزایش نرخ باززایی می‌شود (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 آدنین‌همی‌سولفات 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 نمونه گیاهی: این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی پژوهشکده ملی گل و گیاهان زینتی شهرستان محلات، با مشخصه جغرافیایی (عرض: ۵۳°: ۳۳' شمالی، طول: ۵۰°: ۲۹' شرقی و ارتفاع ۱۶۲۲ متر با سطح آب‌های آزاد) در تابستان و پاییز ۹۵ انجام شد. مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل سه رقم میخک شاخه بریده (اسکیمو، تیلور و لایبرتی) متعلق به شرکت HilverdaFlorist هلند و از نوع استاندارد بود. به منظور القای باززایی مستقیم، از ریزنمونه برگ‌های گیاهان استریل آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده گل و گیاهان زینتی محلات استفاده شد (شکل ۱a). گیاهان مادری با کشت جوانه

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

تهیه ریزنمونه و تیمارهای باززایی: ریزنمونه برگ به طول 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 اسیدیتته 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 برگ میخک، به منظور پرآوری و طول‌سازی شاخه‌ها، گیاهچه‌های باززایی شده به محیط MS به همراه (GA3 0.3+ BA 0.3 mg/L) به مدت سه هفته منتقل شدند. پس از طول‌شدن شاخه‌ها به سینی کاشت‌های با حفره‌های ۱۷ سی سی منتقل و جهت سازگاری و ریشه‌زایی به گلخانه منتقل شدند (Kumari et al. 2016; Agnieszka et al. 2017).

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 در صد 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 تنظیم‌کننده‌های رشد مورد بررسی قرار گرفتند و در آزمایش حاضر ۳۲ ترکیب مختلف از تنظیم‌کننده‌های 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 نشان‌دهنده دقت قابل قبول آزمایش می‌باشد.

جدول ۱. جدول تجزیه واریانس بر اساس ۳۲ تیمار مختلف بازرایی مستقیم در ریزنمونه برگی ارقام میخک بر اساس طرح کاملاً 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.

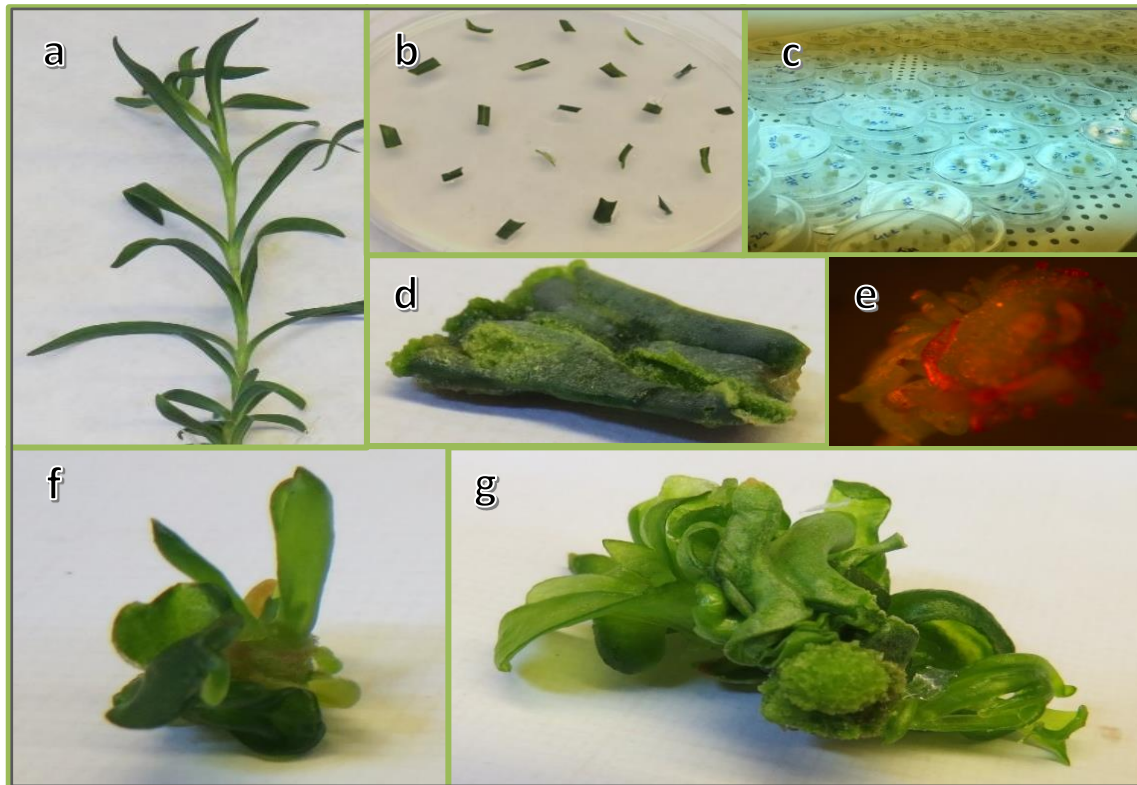
منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	مجموع مربعات تعداد شاخه در		مجموع مربعات	میانگین مربعات
		در هر ریزنمونه SS of number of shoot in each explant	هر ریزنمونه MS of number of shoot in each explant	درصد بازرایی SS of regeneration percentage	درصد بازرایی MS of regeneration percentage
تیمار Treatment	31	6798.5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

در این آزمایش از گیاهان مادری درون شیشه استفاده شد (شکل ۱ a). به این منظور ریزنمونه‌های برگ‌های ارقام میخک (شکل ۱ b, c) کشت شده در شرایط کنترل شده در غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد پس از گذشت سه هفته علائم بازرایی را نشان دادند (شکل ۱ d, e). در نهایت پس از گذشت هفته 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 مشاهده شد (شکل ۱ f, g). به طور کلی براساس نتایج این پژوهش، مشخص شد که استفاده از ترکیب هورمونی و محرک‌های رشد، جهت

بهینه سازی باززایی مستقیم ارقام میخک بسیار مؤثر می باشد. به علاوه مشاهده شد که در ریزنمونه های برگ ارقام مختلف میخک، سرعت باززایی و تعداد تولید شاخه در هر ریزنمونه در تیمارهای برگزیده نسبت به سایر تیمارها و شاهد، به طور معنی داری افزایش یافته است. 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 به طور قابل قبولی سبب باززایی مستقیم بهینه از ریزنمونه های برگ می شود. در این شرایط میانگین باززایی در بین ارقام مختلف ۶۶ درصد و میانگین تعداد شاخه در بین ارقام ۱۲ عدد بود، این میزان باززایی، به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش داشت. به علاوه در تیمارهایی که آدنین همی سولفات اضافه شد به طور معنی داری نرخ باززایی افزایش یافت. در تیماری که ۴۰ میلی گرم در لیتر آدنین همی سولفات اضافه شد باززایی به طور معنی داری 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 نشان داد که، تعیین غلظت بهینه تنظیم کننده های رشد تأثیر به سزایی در باززایی مستقیم دارد، بخصوص زمانی که غلظت های بالای اکسین استفاده شد، در صد باززایی و تعداد شاخه به طور معنی داری کاهش نشان داد؛ به نحوی که در تیمار شماره ۷ زمانی که غلظت ۱ میلی گرم در لیتر IAA استفاده شد، تعداد شاخه باززا شده در هر ریزنمونه به ۶ عدد کاهش یافت (جدول ۲). به علاوه با توجه به نتایج باززایی، مشاهده شد که در تیمارهای با غلظت بالای سایتوکینین، به ویژه در تیمارهای با ۳ میلی گرم در لیتر سایتوکینین، علی رغم کاهش نرخ باززایی، شاهد افزایش تولید گیاهچه های شیشه ای بودیم (جدول ۲). به طور کلی تیمار شماره یک در بین ارقام مورد استفاده در این پژوهش به طور معنی داری سبب افزایش نرخ باززایی در ریزنمونه های برگ می شود. در بین ارقام، رقم تیور بیشترین واکنش را به غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد نشان داد (شکل ۲).

در پژوهش حاضر به منظور افزایش راندمان باززایی شاخساره از ریزنمونه های برگ میخک از غلظت های مختلف هورمون های TDZ و IAA به همراه آدنین همی سولفات استفاده شد. پژوهش های زیادی در رابطه با استفاده از تنظیم کننده های رشد در باززایی میخک صورت گرفته، اما در پژوهش حاضر از محرک آدنین همی سولفات به منظور افزایش نرخ باززایی مستقیم استفاده شد. با توجه به منابع، مشخص شد که استفاده از آدنین همی سولفات با نشان دادن فعالیت سایتوکینینی به طور معنی داری سبب افزایش اندام زایی در ریزنمونه های تک جوانه می شود (Gatica et al. 2010). بر اساس گزارش محققین محرک های رشد گیاهی عاملی تعیین کننده در میزان باززایی گیاه میخک است (Teixeira da Silva and Dobranszki 2016) و با توجه به منابع مختلف و نتایج این پژوهش، مشخص شد که در ارقام میخک، سایتوکینین ها با افزایش میزان تقسیم سلولی در محیط کشت بافت از مهم ترین محرک های اندام زایی به شمار می روند (Siddique and Yadav 2021; Kanwar and Kumar 2009).



شکل ۱. مراحل کامل باززایی مستقیم ریزنمونه‌های برگ گیاهان درون شیشه‌ای ارقام میخک. (a) گیاهان مادری درون شیشه‌ای، (b) تهیه ریزنمونه برگی و کشت در محیط MS با ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد، (c) نگهداری در شرایط روشنائی با نور ۲۰۰۰ لوکس، (d) ظهور علائم 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.

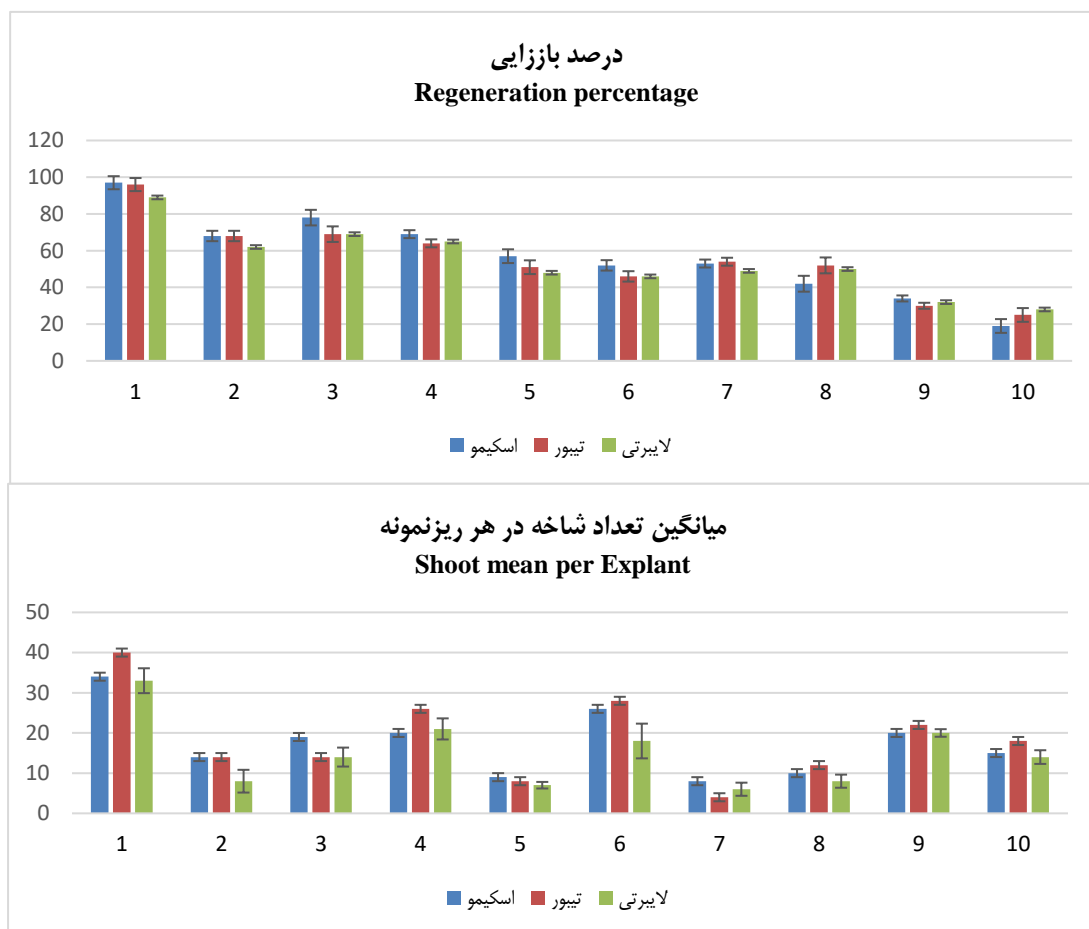
جدول ۲. اثر غلظت‌های مختلف IAA و TDZ و آدنین‌همی سولفات بر درصد باززایی و نرخ تولید شاخه در ریزنمونه‌های برگ‌ی ارقام استاندارد میخک.

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	درصد باززایی	As mg/L	TDZ mg/L	IAA mg/L	شماره تیمار
Shoot mean per Explant	Regeneration%				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

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

در این راستا، دانشمندان در تحقیقی بر روی باززایی مستقیم گیاه زینتی میخک با انواع مختلف هورمون‌های گیاهی به این نتیجه دست یافتند که از بین هورمون‌های مورد استفاده، کاربرد TDZ بیشترین اثر را باززایی این گیاه داشت به طور کلی در این پژوهش مشاهده شد که استفاده ترکیبی از سایتوکینین و اکسین به طور معنی‌داری در باززایی ارقام میخک مؤثر است (Alexander et al. 2017) که این نتایج با یافته‌های Arif et al. (2010) مطابقت دارد. در این پژوهش، زمانی که غلظت‌های بالای تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شد، اثر کاهشی بر نرخ باززایی داشت که با توجه به نتایج تحقیقات گذشته، مشاهده شد که هرچند استفاده از اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها سبب تحریک باززایی در ارقام مختلف می‌شود، اما باید دقت کرد که استفاده 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 مشاهده شد زمانی که غلظت IAA از ۰.۵ میلی‌گرم بر لیتر به ۱ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت نه تنها نرخ باززایی به طور چشم‌گیری کاهش نشان داد، بلکه اکثر ریزنمونه‌ها به سمت تولید کالوس از لبه برگ‌ها پیش رفتند که با نتایج Alexander et al. (2017) مطابقت دارد.



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 می‌باشد. اعداد عمودی سمت چپ در نمودار بالا نشان دهنده در صد باززایی و در نمودار پایین نشان دهنده میانگین تعداد شاخه در هر ریزنمونه می‌باشد. اعداد ستون افقی در هر دو نمودار شماره تیمار بر اساس جدول ۱ را نشان می‌دهد. در هر دو نمودار، ستون‌ها با رنگ مشابه نشان دهنده 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 مشکل شیشه‌ای شدن مشاهده شد (جدول ۲). با توجه به نتایج، در میان تیمارهای مختلف، تیمارهای حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ پاسخ بهتری به اضافه کردن محرک‌های رشد سلولی از جمله آدنین همی سولفات نشان دادند. به علاوه با توجه به نتایج، مشاهده شد که به طور کلی در تیمارهای با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر سایتوکین و غلظت‌های پایین تر اکسین، شاخه‌هایی با کیفیت بالا، سازگار و مستعد ریشه‌زایی تولید شدند. گرچه تحقیقات زیادی به منظور بهینه‌سازی پروتکل‌های کالوس‌زایی و باززایی ارقام میخک در دنیا صورت پذیرفته، اما بهینه‌سازی روش‌های موجود و افزایش نرخ باززایی با استفاده از ترکیبات جدید از جمله آدنین همی سولفات بسیار مهم و ضروری می‌باشد (Lukatkin et al. 2014; Naaz et al. 2017). استفاده از ترکیبات محرک تقسیم سلولی نرخ باززایی را به طور قابل قبولی در بسیاری از گونه‌های گیاهی افزایش می‌دهد. یکی از مهم‌ترین محرک‌های افزایش نرخ باززایی، آدنین همی سولفات می‌باشد (Hegazy et al. 2009). به طور کلی آدنین همی سولفات با تحریک تقسیم سلولی و پس از آن با تحریک اندام‌زایی، سبب افزایش راندام باززایی می‌شود (Gatica et al. 2010). همان‌طور که اشاره شد، در این پژوهش از آدنین همی سولفات برای اولین بار در باززایی مستقیم ریزنمونه‌های برگی ارقام میخک استفاده شد. در پژوهش حاضر استفاده از آدنین همی سولفات به طور معنی‌داری سبب افزایش باززایی شد که این نتایج با نتایج Jaber et al. (2017) در رابطه با گیاه شاه‌اشرفی مطابقت دارد. در این رابطه نتایج آزمایش باززایی مستقیم ارقام میخک نشان داد که اضافه کردن آدنین همی سولفات 40 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; Siddique and Yadav 2021; Thakur and Kanwar 2018; Jaber et al. 2017). همچنین با توجه به نتایج (جدول ۲)، مشاهده شد که استفاده از آدنین همی سولفات بر روی افزایش تعداد تولید شاخه مؤثرتر از افزایش درصد شاخه‌زایی بود به نحوی که در تیمار شماره ۴ علی‌رغم این که در صد باززایی در گروه بندی، در رتبه سوم قرار گرفت اما میانگین تعداد شاخه در هر ریزنمونه در رتبه دوم قرار گرفت. به علاوه قابل ذکر است، تیمار شماره ۴ و شماره ۷ از نظر ترکیبات هورمونی با هم مشابه بودند و تنها تفاوت در غلظت آدنین همی سولفات بود، به نحوی که تیمار ۷ بدون آدنین همی سولفات و تیمار ۴ حاوی ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین همی سولفات بود. نتایج نشان داد که اضافه کردن ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین همی سولفات سبب می‌شود به طور 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 مستقیم با توجه به اینکه با کم‌ترین تغییر ژنتیکی نسبت به گیاه مادری اندام‌زایی انجام می‌شود، لذا در پروژه‌های اصلاح درون‌شیشه‌ای ارقام میخک از نتیجه این پژوهش با بهره‌وری بالا می‌توان استفاده کرد. به علاوه اشاره به این موضوع اهمیت دارد که از آنجایی که دسترسی به جامعه

آماری بالا در پروژه‌های اصلاحی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد، افزایش نرخ باززایی بسیار مهم می‌باشد. لذا امید است این پژوهش با کارایی بالا بتواند سبب بهره‌وری بیش از پیش پروژه‌های اصلاح درون شیشه‌ای ارقام مختلف میخک شود.

سپاسگزاری: پژوهشگران و نگارندگان این پژوهش، از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه هرمزگان 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 Bot* 58 (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, Ramirez 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 Horti 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 Horti* 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.