مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۲۵ ، شماره ۴، سال ۱۳۸۸

بهینه‌سازی کشت درون شیشه‌ای برای ژربرا رقم Tropic Blend

Optimization of *in vitro* Culture for Gerbera *cv.* Tropic Blend

مریم تاتاری ورنوسفادرانی[۱]، ناصر عسکری رابری[۲] و سید ضیا نصرتی[۳]

۱- پژوهشگر، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر
۲- مربی، دانشکده کشاورزی جیرفت، دانشگاه کرمان
۳- مربی، جهاد دانشگاهی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۰/۲۴

چکیده

تاتاری ورنوسفادرانی، م.، عسکری رابری، ن.، و نصرتی، س. ض. ۱۳۸۸. بهینه‌سازی کشت درون شیشه‌ای برای ژربرا رقم Tropic Blend. **مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۲۵ (۴):** ۴۰۱ - ۳۸۹.

در این پژوهش گل‌آذین نابالغ ژربرا رقم Tropic Blend پس از گندزدایی و جدا کردن کاسبرگ‌ها به چهار قسمت مساوی تقسیم شد و به منظور باززایی در محیط کشت با غلظت نصف MS حاوی مقادیر ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون (TDZ) به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و نیز در محیط کشت با غلظت نصف MS حاوی غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و یک میلی‌گرم در لیتر IAA قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها به مدت یک ماه در شرایط تاریکی قرار گرفتند. پس از آن به شرایط روشنایی منتقل شدند. پس از گذشت یک ماه در محیط کشت نصف MS حاوی BAP هیچگونه باززایی مشاهده نشد. بیشترین تعداد گیاهچه از محیط نصف MS حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به دست آمد. به منظور پرآوری سرشاخه گیاهچه‌های باززایی شده در محیط پایه MS حاوی غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ و ۸ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA بازکشت شدند. بیشترین و کمترین پرآوری به ترتیب در محیط کشت MS حاوی ۲ و ۸ میلی‌گرم در لیتر کینتین و یک میلی‌گرم در لیتر IAA حاصل شد. بیشترین تعداد برگ و بیشترین ارتفاع گیاه نیز در محیط دارای ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین به دست آمد. شاخساره‌های پرآوری شده جهت ریشه‌زایی، روی محیط کشت MS با غلظت‌های ۰، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر NAA کشت شدند. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد ریشه در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید شد. در پایان گیاهچه‌های ریشه‌دار شده جهت سازگاری به گلدان منتقل و به خوبی سازگار شدند.

واژه‌های کلیدی: ژربرا، پرآوری، ریشه‌زایی، تنظیم‌کننده‌های رشد و گیاهچه.

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: mtatari1@yahoo.com

مقدمه

ژربرا (*Gerbera jamesonii*) گیاهی دائمی و بومی آفریقای جنوبی است و پنجمین گل شاخه‌بریده در کشور هلند می‌باشد. تمایل به کشت و پرورش ژربرا در ایران به دلیل زیبایی، تنوع رنگ، عمر طولانی پس از برداشت، عملکرد زیاد و فاصله کوتاه بین دوره‌های برداشت، در حال افزایش است. نیاز به واردات نشا ژربرا یکی از بزرگ‌ترین عوامل عدم توسعه سطح زیر کشت ژربرا در ایران است. با توجه به این‌که در کشور هلند هزینه تولید نشا به دلیل هزینه سوخت و نیروی کارگری بالاست، در صورت تولید گیاهچه در داخل کشور، قیمت نشا به یک چهارم میزان فعلی کاهش می‌یابد. در حال حاضر ۵۰-۴۰ درصد از هزینه خرید نشا ژربرا فقط هزینه واسطه و حمل و نقل است. در صورت تولید نشا در داخل کشور، هزینه خرید نشا، کاهش خواهد یافت (Fotouhi *et al.*, 2005). ازدیاد غیر جنسی ژربرا با استفاده از روش‌های تقسیم بوته، کاشت قلمه و ریزازدیادی قابل انجام است. ساده‌ترین فرم ازدیاد غیر جنسی، استفاده از روش تقسیم بوته است. میانگین تولید در این روش ۶-۲ گیاهچه از هر گیاه مادری است. عمومی‌ترین روش برای ازدیاد ژربرا ریزازدیادی است. از مهم‌ترین ویژگی‌های ازدیاد گیاهان از این طریق حفظ صفات مادری، امکان تولید انبوه در سطح وسیع و جلوگیری از انتقال بیماری های ویروسی است. در بین گیاهان مختلف حاصل از کشت بافت در اروپا ژربرا با ۱۷ میلیون گیاهچه در مقام اول قرار دارد (Azadi and Moini, 2001). عمر پس از برداشت گل ژربرا در رقم Tropic Blend حدود ۱۸-۱۶ روز است. طول ساقه گل‌دهنده آن ۶۰ سانتی‌متر و قطر این ساقه گل‌دهنده ۱۲-۱۰ میلی‌متر می‌باشد. عملکرد این رقم در روش خاکی و روش هیدروپونیک به ترتیب ۱۸۰-۱۶۰ و ۲۴۰-۲۲۰ شاخه در هر مترمربع است. رنگ گل‌های زبانه‌ایی زرد و گل‌های وسط نارنجی هستند.

در پژوهشی کلاپرک‌های نابالغ پس از حذف کاسبرگ، در محیط کشت MS حاوی ۱، ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیت TDZ (Thidiazoron) قرار گرفتند (Murashige and Skoog, 1962). بیشترین تعداد شاخساره در محیط حاوی ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، بیشترین ارتفاع شاخساره در محیط دارای یک میلی‌گرم در لیتر و بیشترین تعداد برگ در محیط حاوی ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده شد. پینه‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ در حضور TDZ باززایی نداشتند (Askari *et al.*, 2005). رینولد و همکاران (Reynold *et al.*, 1997) باززایی را از برگ‌های سالم درون شیشه‌ای یک رقم ژربرا در محیط کشت MS تغییر یافته با یک میلی‌گرم در لیتر BA (Benzyl Adenine) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین در ۲۲ درجه سانتی‌گراد مشاهده کردند. در آزمایشی دیگر

مشخص شد که کاربرد TDZ موثرتر از کاربرد BA و یا کینتین (Kinetin) در القای پینه می‌باشد (Nhut *et al.*, 2003). دونگ و همکاران (Duong *et al.*, 2006) گزارش کردند در کشت درون شیشه‌ای ژربرا، TDZ به منظور باززایی، کاهش زمان کشت و افزایش میزان ازدیاد نقش موثری دارد. کلاپرک ارقام سفید، زرد و نارنجی ژربرا روی محیط کشت MS تغییر یافته با ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BA کشت شد. اولین گیاهچه‌ها از رقم زرد و سفید بعد از ۴۷ روز و از رقم نارنجی بعد از ۶۵ روز ظاهر شد. در بین ارقام، رقم نارنجی در غلظت ۷/۵ یا ۵ میلی‌گرم در لیتر از BA بهترین باززایی را نشان داد. کنتی و همکاران (Conti *et al.*, 1992) کلاپرک ارقام مختلف ژربرا را روی محیط کشت نصف MS حاوی یک درصد ساکارز، دو میلی‌گرم در لیتر BA و یک میلی‌گرم در لیتر IAA (Indole Acetic Acid) کشت کردند. افزونگری و ریشه‌زایی گیاهچه‌های بدست آمده به سهولت انجام شد. باربوسا و همکاران (Barbosa *et al.*, 1998) محیط کشت MS تغیر یافته با ترکیبات متفاوت IAA یا 2,4-D همراه با BA را جهت تولید شاخساره از ریزنمونه کلاپرک بکار بردند و در محیط کشت حاوی ۳ و۶ میلی‌گرم در لیتر BA دو شاخساره از هر ریزنمونه مشاهده کردند. سل و همکاران (Cl *et al.*, 1999) در محیط کشت MS تغییر یافته با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به تنهایی و یا در ترکیب با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (Naphthalene Acetic Acid) از قطعات دمگل جوانه‌های نابجا تولید کردند و سپس آن‌ها را به محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA انتقال دادند. آثار تنظیم‌کننده رشد BAP (Benzyl Amino Purine) در دو محیط کشت MS و B5 (Gamborg *et al.*, 1968) بر ریزازدیادی Gerbera jamesonii برای تولید حداکثر تعداد شاخساره مورد بررسی قرار گرفت (Rai and Chikhale, 2004). بیشترین تعداد شاخساره از هر ریزنمونه در هر دو محیط با میزان یک میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد. بیشترین تعداد شاخساره تولیدی در محیط کشت B5+BAP و در محیط کشت MS+BAP به ترتیب ۱۱ و ۱۶ عدد گزارش شد (Rai and Chikhale, 2004). در پژوهشی از قسمت‌های مختلف ژربرا برای ازدیاد درون شیشه‌ای استفاده شد که از بین ریزنمونه‌های آزمایش شده نوک شاخساره (Shoot tip) و کلاپرک‌های جوان (Young capitula) به ترتیب با میزان باززایی ۳۴/۲ و ۴۸/۳ در مدت ۲۱ روز بیشترین مقدار باززایی را نشان دادند (Severin *et al.*, 2000). در کشت درون شیشه‌ای ژربرا (*G. jamesonii*) از کلاپرک‌های جوان به عنوان ریزنمونه استفاده شد. موثرترین محیط به منظور شروع تشکیل شاخساره و پرآوری، محیط کشت MS حاوی ۷ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپیورین و ۰/۱

میلی‌گرم در لیتر IAA و گذراندن یک دوره ۳۰ روزه تاریکی پیوسته، بود (میانگین ۱۰ گیاهچه از هر نمونه). در محیط MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (Indolebutyric Acid) کلیه گیاهچه‌ها ریشه‌دار شدند. گیاهچه‌های به دست آمده پس از انتقال و گل‌دهی از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی اختلافی با گیاه مادری نداشتند (Tui *et al.*, 2005).

در این پژوهش روش‌های کشت درون شیشه‌ای برای ژربرا رقم Tropic Blend مورد بررسی قرار گرفت و برای استفاده کاربردی در ازدیاد تجارتی این رقم در ایران بهینه‌سازی شد.

مواد و روش ها

در این تحقیق ژربرا رقم Tropic Blend به عنوان گیاه مادری در نظر گرفته شد. گیاهان مادری در طی دوران رشد از تغذیه و نور کافی برخوردار بودند. کلاپرک‌های یک سانتی‌متری این ارقام جدا شده و به مدت ۳۰ دقیقه در آب صابونی گرم شستشو شدند. پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در آب جاری شسته شده و پس از حذف دمگل، به مدت ۶۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند. سپس کلاپرک‌ها در غلظت‌های مختلف هیپوکلریت‌سدیم (۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ درصد)، به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند تا مناسب‌ترین غلظت برای گندزدایی بدست آید. در مرحله بعد کلاپرک‌ها سه بار با آب مقطر استریل آبشویی شدند. کلاپرک‌ها به پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی گندزدایی شده، منتقل شده و کاسبرگ‌های اطراف کلاپرک با اسکالپل جدا کرده و هر کلاپرک به چهار قسمت مساوی تقسیم شد. به منظور تولید شاخساره، کلاپرک‌ها در محیط کشت نصف MS حاوی غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون (TDZ) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و نیز در محیط کشت نصف MS حاوی غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر BA و یک میلی‌گرم در لیتر IAA قرار گرفتند. سپس ظروف کشت به مدت یک ماه در تاریکی و دمای ۱±۲۱ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از یک ماه ظروف کشت از تاریکی خارج شده و در دمای ۱±۲۱ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. شاخساره‌های تولیدی جدا شده و جهت پرآوری در محیط پایه MS حاوی غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ و ۸ میلی‌گرم در لیتر کینتین و یک میلی‌گرم در لیتر IAA بازکشت شدند. شاخساره‌های پرآوری شده جهت ریشه‌زایی، روی محیط کشت MS با غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA کشت شدند. در پایان گیاهچه‌های ریشه‌دار شده جهت سازگاری به گلدان‌های حاوی نسبت مساوی پیت و پرلیت منتقل شده و در گلخانه قرار گرفتند. آزمایش‌ها در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی انجام شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین‌ها

با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

۱- گندزدایی

گندزدایی با غوطه‌ورسازی ریزنمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت‌سدیم (وایتکس با ۵ درصد ماده موثره) انجام گرفت. بیشترین تعداد ریزنمونه‌های سالم با میانگین ۹۰ درصد، در محلول حاوی ۱ درصد هیپوکلریت‌سدیم (۲۰ درصد وایتکس) به دست آمد. غوطه‌ورسازی کلاپرک‌ها در محلول حاوی ۱/۲۵ درصد هیپوکلریت‌سدیم (۲۵ درصد وایتکس)، منجر به ازبین رفتن کلیه آنها شد (شکل ۱). این نتایج با آزمایش عسکری و همکاران (Askari *et al.*, 2005) تطابق دارد. پوسادا و همکاران (Posada *et al.*, 1999) بهترین تیمار ضدعفونی کلاپرک را با وایتکس ۲۵ درصد و به مدت ۱۵ دقیقه گزارش کردند. این اختلاف ممکن است در اثر رقم ژربرای مورد کشت و یا قطر کلاپرک مورد استفاده به عنوان ریزنمونه باشد.

۲- باززایی

یکی از فعالیت‌های مورفوژنتیکی TDZ اثر قوی آن بر روی شکست خواب جوانه‌های جانبی (در گل‌آذین و یا در بخش رویشی) و تشکیل شاخساره در گونه‌های مختلف گیاهی است(Huylenbroeek *et al.*, 1992). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر سطوح مختلف TDZ بر تعداد گیاهچه در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود ولی بر تعداد برگ در هر گیاهچه اثر معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱). به عبارت دیگر TDZ باعث تمایزیابی و تولید گیاهچه شد اما بر روی تعداد برگ حاصل از گیاهچه‌های باززایی شده اثر معنی‌داری نداشت.

بررسی مقایسه میانگین تعداد گیاهچه با آزمون دانکن نشان می‌دهد که حداکثر میزان تولید گیاهچه در تیمار ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ با میانگین ۵ عدد گیاهچه حاصل شد. بین سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲). سل و همکاران (Cl *et al.*, 1999) در محیط کشت MS تغییر یافته با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به تنهایی و یا در ترکیب با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA از قطعات دمگل جوانه‌های نا به جا تولید کردند. TDZ در غلظت‌های خیلی کم تمایزیابی مراکز سازمان‌دهی شده رشد را تحریک می‌کند. باززایی شاخساره در غلظت‌های بالاتر سایر سیتوکنین‌ها اتفاق می‌افتد (Duong *et al.*, 2006). در پژوهش دیگری که از ریزنمونه‌های مریستم انتهایی ژربرا رقم جامسونی استفاده شد بیشترین پرآوری در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم TDZ به دست آمد (Subodh and Dedasis, 2008). بر اساس نتایج به دست آمده در ژربرا رقم Tropic Blend غلظت بسیار کمی از TDZ به منظور القای تمایزیابی در قطعات کلاپرک

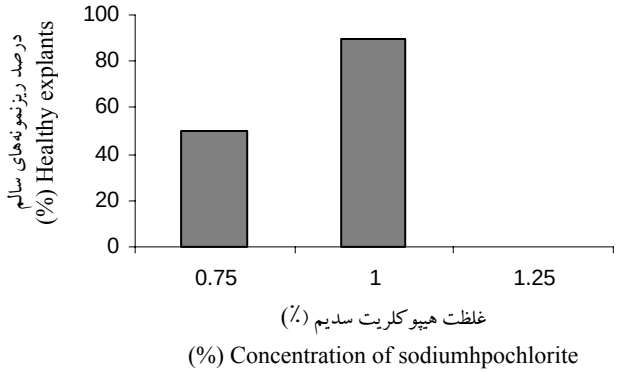
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت های تیدیازورون (TDZ) بر تعداد گیاهچه و تعداد برگ در هر گیاهچه

Table 1. Analysis of variance for the effect of thidiazoron concentrations (TDZ) on plantlet numbers and leaf numbers per each plantlet

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات Mean square	
			تعداد گیاهچه Plantlet numbers	تعداد برگ در هر گیاهچه Leaf numbers per each plantlet
Thidiazoron	تیدیازورون	3	63.36**	0.55ns
Error	خطا	8	0.83	0.58
C.V. (%)	ضریب تغییرات (٪)		13.03	13.91

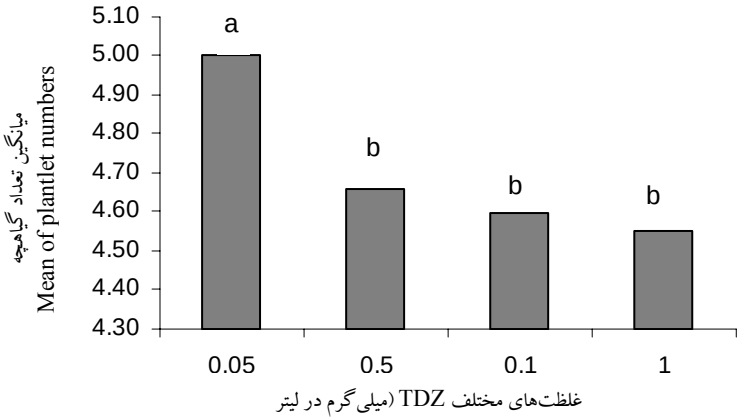
**: Significant at the 1% probability level. **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

ns: Non-significant . ns: غیر معنی دار



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم بر گندزدایی ریزنمونه

Fig 1. Effects of different concentration of sodium hypochlorite on disinfection of explant



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف TDZ بر میانگین تعداد گیاهچه

Fig 2. Effect of different concentrations of TDZ on mean of plantlet numbers

کافی است و استفاده از غلظت‌های بالاتر منجر به کاهش باززایی می‌شود.

کشت ریزنمونه‌های کلاپرک، در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر از BA بکار رفته در محیط کشت نصف MS هیچ‌گونه باززایی را نشان نداد. با توجه به عدم باززایی در کلیه غلظت‌های BA به کار رفته در این پژوهش، به نظر می‌رسد که قدرت سایتوکنینی BA برای ایجاد باززایی از ریزنمونه‌های کلاپرک کافی نبوده است، اما با استفاده از تیدیازورون که از جمله فعال‌ترین ترکیبات است باززایی صورت گرفت. لازم به ذکر است که در پژوهشی بیشترین باززایی ریزنمونه‌های نهنج جوان در محیط کشت حاوی ۸ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (Wang and Yu, 2001). در کشت کلاپرک نابالغ ژربرا رقم Atella بیشترین میزان باززایی در محیط کشت حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد (Modh *et al.*, 2002). به نظر می‌رسد شرایط نگهداری و تغذیه گیاه مادری و نیز نوع رقم مورد آزمایش دلیل این تناقض باشد.

با توجه به اینکه پایین‌ترین غلظت TDZ به کار رفته در این آزمایش بیشترین تولید گیاهچه را به دنبال داشت به نظر می‌رسد غلظت‌های بالاتر TDZ تا حدی بازدارنده است. بازدارندگی TDZ در غلظت‌های بالاتر با نتایج عسکری و همکاران (Askari *et al.*, 2005) تطابق دارد. اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف TDZ بر میانگین تعداد برگ تولیدی مشاهده نشد و این با نتایج حاصل از کشت درون شیشه‌ای رقم جیمی متفاوت است (Askari *et al.*, 2005). جیمی رقمی مینیاتوری بوده و سرعت رشد بیشتری دارد، اما رقم مورد کشت در این پژوهش رقمی استاندارد است. TDZ یک ترکیب شبه‌سایتوکنینی است که در پرآوری شاخساره و تولید جنین نابجا در دامنه وسیعی از گونه‌ها اثرات قوی‌تری را نسبت به سیتوکنین‌ها نشان داده است. این تنظیم‌کننده رشد در غلظت‌های بسیار پایین به منظور تحریک تمایزیابی کشت‌های درون شیشه‌ای به کار می‌رود (Duong *et al.*, 2006). باززایی از ریزنمونه‌های برگ در محیط کشت MS تغییر یافته حاوی ۲/۳ میکرو مول TDZ و ۰/۵۳ میکرومول NAA صورت گرفت (Orlikowska, 1999).

۳- پرآوری

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر غلظت‌های مختلف کینتین بر تعداد و ارتفاع گیاهچه در سطح ۵ درصد و بر تعداد برگ در هر گیاهچه در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

مقایسه میانگین صفات نشان داد که محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین بیشترین تعداد گیاهچه را با میانگین ۵/۸۹ عدد و محیط حاوی ۸ میلی‌گرم در لیتر از این تنظیم‌کننده کمترین تعداد گیاهچه را با میانگین ۳/۶۱ عدد تولید کرد (جدول ۳). بیشترین تعداد برگ در محیط‌های

جدول ۲ - تجزیه واریانس اثر غلظت‌های کینتین بر تعداد گیاهچه، تعداد برگ در هر گیاهچه و میانگین ارتفاع گیاهچه

Fig 2. Analysis of variance for the effect of kinetin concentrations on plantlet numbers, leaf numbers per each plantlet and mean of plantlet height

S.O.V.	منابع تغییر	درجه آزادی df.	میانگین مربعات Mean square		
			تعداد گیاهچه Plantlet numbers	تعداد برگ در هر گیاهچه Leaf numbers per each plantlet	میانگین ارتفاع گیاهچه Mean of plantlet height
Kinetin	کینتین	3	3.85*	7.57**	0.25*
Error	خطا	8	1.15	0.26	0.036
C.V. (%)	ضریب تغییرات (٪)		22.82	6.73	15.74

* و **: به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

*and **: Significant at the 5% and 1% probability levels, respectively.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت های مختلف کینتین بر برخی صفات گیاهچه

Table 3. Mean comparison for the effect of different kinetin concentrations on some characteristics of plantlet

غلظت کینتین (میلی‌گرم در لیتر) Kinitin concentration (mg/l)	میانگین تعداد گیاهچه Mean of plantlet numbers	میانگین تعداد برگ Mean of leaf numbers	میانگین ارتفاع گیاهچه (سانتی‌متر) Mean of plantlet height (cm)
2	5.89a	8.77a	4.59a
4	5.44ab	9.00a	4.88a
6	3.86ab	7.33b	3.78ab
8	3.61b	5.55c	2.72b

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% of probability level-using Duncan's Multiple Range Test.

حاوی ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین به ترتیب با میانگین‌های ۹ و ۸/۷۷ عدد تولید شد و این دو غلظت در یک گروه قرار گرفتند. کمترین تعداد برگ در محیط حاوی ۸ میلی‌گرم در لیتر کینتین با میانگین ۵/۵۵ عدد تولید شد. غلظت‌های بیش از ۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین منجر به شیشه‌ای شدن نمونه‌ها شد. بیشترین ارتفاع گیاهچه در محیط کشت حاوی ۲ و ۴ میلی‌گرم درلیتر کینتین به ترتیب با میانگین ۴/۵۹ و ۴/۸۸ سانتی‌متر تولید شد. در بین غلظت‌های مختلف کینتین به کار رفته در این آزمایش، غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین برای کلیه صفات مورد بررسی بیشترین مقادیر را نشان دادند. غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر نیز برای صفات تعداد برگ و ارتفاع گیاه بیشترین مقادیر را داشتند. با افزایش غلظت کینتین مقادیر عددی مربوط به صفات اندازه‌گیری شده کاهش یافته و در گروه‌های پایین تری قرار گرفتند. در

پرآوری ژربرا کاربرد سیتوکنین متجاوز از سطوح بحرانی از تشکیل شاخساره جلوگیری می‌کند (Subodh and Dedasis, 2008). طبق نتایج حاصله پرآوری در محیط کشت حاوی کینتین به خوبی انجام می‌گیرد. غلظت‌های بالاتر کینتین پرآوری کمتری را نشان داده و شیشه‌ای شدن را به دنبال دارد. ویتریفیکاسیون به حالت‌های نیمه شفافی، آب‌گیری زیاد و شیشه‌ای شدن بافت‌های گیاهی کشت شده در محیط کشت اطلاق می‌شود. وقوع و شدت شیشه‌ای شدن توسط عوامل متعددی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. این پدیده با میزان بالای سیتوکنین در ارتباط است (Bagheri, 1997). با توجه به اینکه سیتوکینین‌ها بطور معمول در باززایی نقش دارند به نظر می‌رسد تنها افزودن مقادیر کمی سیتوکینین خارجی پاسخ مثبت به باززایی را در ریزنمونه‌های ژربرا به دنبال دارد و افزودن سیتوکینین بیشتر به محیط کشت سبب به هم خوردن تعادل هورمونی می‌شود. در مرحله پرآوری TDZ بر روی تعداد برگ تولید شده اثر معنی‌داری نداشت. با استفاده از غلظت‌های مناسب کینتین می‌توان تعداد برگ گیاهچه‌های باززایی شده را به حد قابل قبولی رساند.

بر اساس آزمایش تیتل و همکاران (Title *et al.*, 1987) ژربرا جز گیاهانی است که به BA حساسیت دارد. به همین دلیل استفاده از BA و نیز غلظت‌های بالای کینتین در مرحله پرآوری توصیه نمی‌شود. از طرفی در پژوهشی که بر روی ریزنمونه‌های کلاپرک جوان ژربرا انجام شد محیط کشت MS با ۷ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA بیشترین پرآوری را نشان دادند (Tui *et al.*, 2005). در پژوهشی که همپل و همکاران (Hempel *et al.*, 1985) انجام دادند غلظت‌های ۱/۵ تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر از کینیتین، 2ip و BA را بر روی افزونگری ژربرا رقم مارلین بررسی کردند و بهترین غلظت را برای افزونگری ۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین گزارش نمودند که با نتایج تحقیق حاضر موافقت دارد.

۴- ریشه زایی

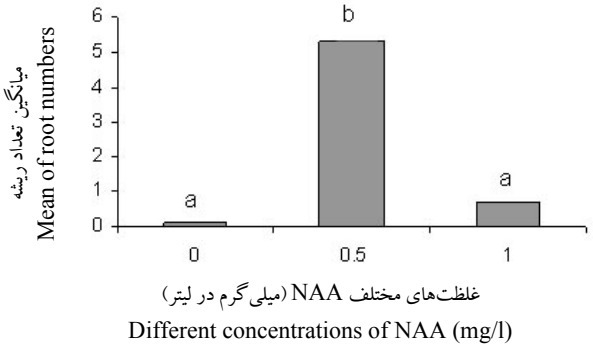
تجزیه واریانس نشان داد اثر غلظت‌های مختلف NAA بر تعداد ریشه در هر گیاهچه در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴).

مقایسه میانگین نشان داد که محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد ریشه را با میانگین ۵/۳۳ عدد تولید کرد و محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده و نیز محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر از این تنظیم‌کننده کمترین تعداد ریشه را به ترتیب با میانگین‌های ۰/۱ و ۰/۷ عدد تولید کرد (شکل ۳). نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج پورنیما و کوثری (Purnima and Kothari, 2004) که بیشترین ریشه‌زایی گیاهچه‌های ژربرا را در محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به دست آوردند تطابق دارد. در ریشه‌زایی گیاهچه‌های ژربرا مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهچه‌ها در محیط کشت MS دارای IAA به

جدول ۴ - تجزیه واریانس اثر غلظت‌های نفتالین استیک اسید بر تعداد ریشه در هر گیاهچه
Table 4. Analysis of variance for the effect of naphthalene acetic acid on root numbers per plantlet

S.V.O.	منابع تغییر	درجه آزادی df.	میانگین مربعات Mean square تعداد ریشه در هر گیاهچه Root numbers per plantlet
Naphthalene acetic acid	نفتالین استیک اسید	2	2.31**
Error	خطا	6	0.05
C.V. (%)	ضریب تغییرات (٪)		16.25

**: Significant at the 1% of probability level. **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪



شکل ۳ - اثر غلظت های مختلف NAA بر میانگین تعداد ریشه
Fig. 3. Effect of different concentrations of NAA on mean of root numbers

غلظت ۱۰-۳ میلی‌گرم در لیتر و در پژوهشی دیگر رینیرید و همکاران (Reinirid *et al.*, 1993) اثر NAA و IAA را ۳-۱ میلی‌گرم در لیتر NAA کشت شدند. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد IAA اثر کمی روی ریشه‌زایی داشت، اما NAA صد در صد ریشه‌زایی را به دنبال داشت. تحقیقات سایر محققان نیز نشان می‌دهند که ژنوتیپ در باززایی ریزنمونه‌ها در ژربرا موثر می‌باشند و هر ژنوتیپ در شرایط درون شیشه‌ای پاسخی متفاوت از سایر ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد (Reynold *et al.*, 1993).

نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در ریزازدیادی ژربرا بسته به رقم مورد کشت تفاوت‌هایی دارد. کلاپرک ریزنمونه مناسبی جهت ازدیاد درون شیشه‌ای ژربرا است. به منظور باززایی نیاز به تاریکی و غلظت‌های نسبتاً بالایی از سیتوکنین می‌باشد، اما در صورت استفاده از سیتوکنین مصنوعی TDZ

غلظت هورمونی کم توصیه می‌شود. پرآوری گیاهچه‌های باززایی شده نیاز به غلظت‌های نسبتاً پایین سیتوکنین دارد. غلظت‌های پایین اکسین نیز منجر به ریشه‌زایی می‌شود. انتقال و سازگاری گیاهچه‌ها با تلفات کمی انجام می‌شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مسئولین محترم جهاد دانشگاهی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران بدلیل در اختیار گذاشتن آزمایشگاه کشت بافت و تامین مواد مصرفی مورد نیاز این تحقیق کمال تشکر را داریم.

References

Askari, N., Fotouhi, R., and Moini, A. 2005. *In vitro* plantlet production of two cultivars gerbera from young capitulums. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 6(4): 203-214 (in Farsi).

Aswath, C., Deepa, S. M., and Choudhary, M. L. 2003. Commercial multiplication of gerbera through *in vitro* shoot tip culture. Journal of Ornamental Horticulture New Series 6(4): 303-309.

Azadi, P., and Moini, A. 2001. Micropropagation industry and its importance in ornamental plants. First Applied Scientific Seminar on Flowers and Ornamental Plants: 60-61 (in Farsi).

Bagheri, A. 1997. *In vitro* culture of higher plants. Ferdowsi University Press. 406 pp.

BarBosa, M., Pinto, J., Pinto, C., and Innecco, R. 1998. *In vitro* propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus exHook cv. Appel belosom using young capitulums. Revista Ceres (41): 386-395.

Cl, L., Julmi, C., Thomas, D., and Tschuy, F. 1999. *In vitro* regeneration and multiplication of *Gerbera jamesonii*: Bolus. Revista Suisse de Viticulture Degrboriculeture et de Horticulture 31(4): 201-211.

Conti, L., Ferangi, P., and Tosca, A. 1992. Breeding clone of *Gerbera jamesonii* suitable to micropropagation and pot cultivation. Acta Horticulture 300: 103-106.

Debasis, C., and Subodh, K. D. 2008. Micropropagation of gerbera: lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities during acclimatization process. Acta Physiologiae Plantarum 30: 325–331.

Duong, T. N., Truong, T. A., Nguyen, T. D., Nguyen, T. H., Nguyen, Q. T., and Nguyen, H. V. 2006. Effect of genotype, explant size, position and culture medium

on soot generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverse thin cell layer culture. Scientia Horticulturae 111: 146-151.

Fotouhi, R., Askari, N., and Moini, A. 2005. Plantlet production via tissue culture for development of green house culture of gerbera (*Gerbera jamesonii*) in Iran. First Congrees of Green House Productions of Technology: 57-65.

Gamborg, O. L., Miller, R. A., and Ojima, K. 1968. Nutrient requirement of suspension culture of soybean root cells. Experimental. Cell. Research 50: 151-158.

Hempel, M., Witkowska, B., and Tymoszuk, J. 1985. The influence of cytokinin on multiplication and subsequent rooting of Gerbera *in vitro*. Acta Horticulturae 167: 301-305.

Huylenbroeek, J., Deberg, V., and Huylenbroeek, V. 1992. Acclimatization of micropropagated *Gerbera jamesonii* use of chlorophylla fluoresence. 6th Forum for Applied Biotechnology Bruges Belgium 24-25.

Modh, F. K., Dhaduk, B. K. and Shah, R. P. 2002. Factors affecting micropropagation of gerbera from capitulum explants. Journal of Ornamental Horticulture New Series 5(1): 4-6.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15: 473-497.

Nhut, D. T., Teixeira da Silva, J. A., Le, B. V. and Tran Thanh Van, K. 2003. Thin cell layer morphogenesis as a powerful tool in ornamental plant micropropagation and biotechnology. Thin cell layer culture system. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 247-284.

Orlikowska, T., Nowak, E., Marasek A. and Kucharska, D. 1999. Effects of growth regulators and incubation period on *in vitro* regeneration of adventitious shoots from gerbera petioles. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59: 95–102.

Posada, M., Ballesteros, N., Obando, W., Angarita, A., and Fischer, G. 1999. Micropropagation of Gerbera from Floral Buds. Acta Horticulturae 482: 329-331.

Purnima, T., and Kothari, S. L. 2004. Rapid *in vitro* regeneration of *Gerbera jamesonii* from different explant. Indian Journal of Biotechnology 3(4):584-588.

Rai, M. K., Chikhale, N. J. 2004. Micropropagation studies in gerbera (*Gerbera jamesonii*). Recent Trends in Biotechnology. 232 pp.

Reinirid, J., Chriqui, D., Noin, M., Browm, S., and Marie, D. 1993. Plant

regeneration from *in vitro* leaf culture of several Gerbera species. Plant Cell Tissue Culture 33: 203-210.

Reynold, J. Meyent, J., Caissard, C., and Chriqut, D. 1997. Micropropagation of Gerbera. In: I. Biotechnology in Agriculture and Forstery 40. High-Tech and Micropropagation VI. - New Delhi. India. Pp. 147-162.

Severin, C., Gonzales, M., and Murray, R. 2000. Micropropagation of *Gerbera* spp. From different explants. Revista Five 14(1):67-71.

Title, C., Ehwald, R., and Zoglauer, K. 1987. A paranchymatic medium Solidifier for Plant *in vitro* cultur. Plant Cell Reports 6(6): 473-475.

Tui, R., Prasenjit, S., and Roy, S. C. 2005. *In vitro* plant regeneration from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology 6(1/2): 35-40.

Wang, C., and Yu, Y. X. 2001. Tissue culture and quik propagation of pot *Gerbera jamesonii*. Journal of China Zhejiang Information Center of Forestry Science and Technology 21(3): 30-31.