Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 47, No 4, Winter 2017 (631-640)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.114490.670

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۴، زمستان ۱۳۹۵ (ص ۶۴۰-۶۳۱)

بررسی اثر کاربرد سدیم نیتروپروساید در ریزازدیادی گل ژربرا رقم بایودر (*Gerbera jamesonii* Bol. Ex Adlam)

سیده سوما ابراهیمی[۱]، علیرضا بابائی[۲*]، یوسف حمیداوغلی[۳] و محمد جیرانی[٤]
۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳. دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان
٤. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۹- تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۲/۲۱)

چکیده

سدیم نیتروپروساید (Sodium nitroprusside) به عنوان یک تنظیم‌کننده رشد مهم شناخته شده است و توجه زیادی را از چند رشته پزشکی، بیوشیمی، فیزیولوژی و ژنتیک دریافت کرده است. نیتریک اکساید (Nitric Oxide) در کشت درون‌شیشه‌ای از طریق انتقال پیام سایتوکنین، اثر بخشی هورمونی را افزایش می‌دهد. اثر تحریک کنندگی سدیم نیتروپروساید (SNP) به‌واسطه آزاد کردن نیتریک اکساید (NO) در محیط کشت است. در این تحقیق اثر SNP در ریزازدیادی ژربرا در آزمایشی در پایه طرح کاملا تصادفی بررسی شد. در مرحله کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ روی محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و غلظت‌های مختلف SNP (۰، ۲۰، ٤۰، ٦۰ و ۸۰ µM) کشت شدند. در مرحله پرآوری گیاهچه‌های کشت بافتی ژربرا به محیط کشت MS دارای غلظت‌های مختلف SNP (۰، ۲۰، ٤۰ و ٦۰ µM) منتقل شدند. در همه تیمارها غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA ثابت بود. جهت ریشه‌زایی گیاهچه های پرآوری شده به محیط کشت دارای غلظت‌های SNP (۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ µM) انتقال داده شدند. کاربرد سدیم نیتروپروساید در تحریک کالوس برگ مؤثر بود و در تیمار ٦۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید بیشترین تحریک و وزن کالوس مشاهده شد. بین تیمارهای مختلف سدیم نیتروپروساید در میزان پرآوری ژربرا با شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت و بالاترین تعداد پرآوری و وزن گیاهچه با استفاده از تیمار ۲۰ میکرومولار به‌دست آمد. در بررسی استفاده از سدیم نیتروپروساید در ریشه‌زایی افزایش قطر ریشه‌ها که با افزایش وزن ریشه در محیط‌های دارای SNP همراه بود مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، نیتریک اکسید، تنظیم کننده رشد، درون شیشه‌ای، ریشه زایی.

Study of sodium nitroprusside application on micropropagation of *Gerbera jamesonii cv.* bayoder

Sayede soma Ebrahimi[1], Ali reza Babaei[2*], Yosef Hamidoghli[3] and Mohammad Jirani[4]
1, 2. M. Sc. Student and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Faculty of Agriculture, Guilan University, Guilan, Iran
3. M. Sc. Student, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Iran
(Received: Dec. 30, 2014 - Accepted: May 11, 2015)

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) has been found as an important growth regulator and posses much attention in different aspects of science, including medicine, biochemistry, physiology and genetics. NO enhances hormonal effects through cytokinen signal transduction *in vitro*. The stimulation effect of sodium nitroprusside (SNP) is by releasing NO during *in vitro* culture. In this experiment, the effect of NO on *Gerbera* micropropagation has been studied based on completely randomized design. Leaf explants were cultured on modified MS, containing 0.5 mg/L 2,4-D and different concentrations of SNP (0, 20, 40, 60, 80, µM). In the second experiment, proliferation of shoot was studied on MS containing 0.5 mg/l BAP+0.1mg IAA and different concentrations of SNP (0, 20, 40 and 60 µM). Then, the regenerated shoots were transferred to modified MS with 0.1mg IAA and different levels of SNP (0, 10, 20 and 30 µM). The results showed that the maximum amount of leaf callus formation and stimulation were observed in 60 µM treatment. There was a significant difference between different concentration of NO and control. The highest proliferation of shoots and plant weight were obtained in medium containing 20 µM SNP compared with the medium without SNP. Sodium nitroprusside increased root diameter along with root weight.

Keywords: growth regulators, *In vitro*, nitric oxide, proliferation, rooting.

* Corresponding author E-mail: arbabaei@modares.ac.ir Tel: +98 21 48293089

مقدمه

گل ژربرا (*Gerbera jamesonii* Bol. Ex Adlam) گیاهی دائمی ازخانواده کلاپرک سانان[1] دارای بیش از 40 گونه است که بومی آفریقای جنوبی و پنجمین گل شاخه بریده در کشور هلند می‌باشد. ازدیاد بذری امروزه متداول نیست زیرا تغییرات ژنتیکی زیادی در بین گیاهان حاصل از بذر مشاهده می‌شود (Van Son, 2007). ازدیاد غیرجنسی ژربرا با استفاده از روش‌های تقسیم بوته، قلمه، ریزقلمه و ریزازدیادی انجام می‌شود، ریزازدیادی روش مرسوم ازدیاد ژربرا است (Van Son, 2007). نیاز به واردات نشا ژربرا یکی از بزرگترین عوامل عدم توسعه سطح زیر کشت ژربرا در ایران است. با توجه به این که در کشور هلند هزینه تولید نشا به دلیل هزینه سوخت و نیروی کارگری بالاست، در صورت افزایش تولید گیاهچه در داخل کشور، قیمت نشا به یک چهارم میزان فعلی کاهش می یابد در حال حاضر ۵۰-۴۰ درصد از هزینه خرید نشاء ژربرا مربوط به هزینه حمل و نقل است بنابراین در صورت افزایش تولید نشاء در داخل کشور، هزینه خرید نشاء کاهش پیدا خواهد کرد (Askari *et al*., 2005).

واکنش‌های متفاوت رشد و باززایی ارقام ژربرا نسبت به ترکیبات اکسین و سایتوکنین‌های اضافه شده به محیط کشت مشاهده شده است (Constantinovici & Sandu, 1995). ترکیبات شیمیایی دیگری نیز وجود دارند که می‌توانند از راه‌های مختلف اثرات تحریک کننده‌ای بر رشد و باززایی ریزنمونه داشته باشند. برای مثال ترکیب فنلی فلوروگلوسینول[2] از طریق ممانعت از تجزیه اکسین‌ها در محیط کشت (Gaime *et al*., 2013)، زغال فعال[3] با کنترل ترکیبات مضر و فنل تولید شده در محیط کشت (Thomas, 2008) و OTC[4] و BTH[5] که از طریق فعال کردن سیستم دفاع اکتسابی و تأثیر بر آلودگی ویروسی، تحریک تولید مواد آنتی اکسیدان و تولید پرتئین های وابسته به پاتوژن در تحریک رشد و مقاومت به آلودگی نقش دارند (Moreno *et al*., 2012). همچنین آب نارگیل که بیش از ۱۸ ترکیب سایتوکنینی در آن یافت شده است و به عنوان یک مکمل رشد در ریزازدیادی و کشت بافت گیاهی استفاده می شود (Agampodi & Gayawardena, 2009).

یکی دیگر از این ترکیبات شیمیایی، نیتریک اکسید (NO) است. NO، یک ملکول کوچک، نسبتا پایدار، متحرک و یک رادیکال آزاد گازی با فعالیت زیستی بالاست (Kalra & Babbar, 2010). اثر تحریک کنندگی سدیم نیتروپروساید به واسطه آزاد کردن NO در محیط کشت است و اثرات تحریک کننده آن در باززایی شاخساره و توسعه ریشه در چند گونه گیاهی در شرایط درون شیشه ای گزارش شده است (Tan *et al*., 2013). برای اولین بار سدیم نیتروپروساید به عنوان آزادکننده NO در کشت بافت سیب بکار برده شد (Han *et al*., 2009). سدیم نیتروپروساید القای کالوس و باززایی شاخه از غده گیاه *Dioscorea opposita* را افزایش و به صورت مشخصی تجمع پراکسید هیدروژن را در نمونه ها کاهش داده است (Xu *et al*., 2009). همچنین موفقیت اثر NO روی کالوس‌زایی، اندام‌زایی شاخه و ریشه‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل *Linum usitatissimum* (Kalra & Babbar, 2010) و باززایی و تکثیر *Vanilla planifolia* (Tan *et al*., 2013) گزارش شد. سدیم نیتروپروساید به عنوان یک تنظیم‌کننده رشد مهم شناخته شده است و توجه زیادی را از چند رشته پزشکی، بیوشیمی، فیزیولوژی و ژنتیک دریافت کرده است (Kopyra & Gwózdz, 2004). برای اولین بار SNP در ریز ازدیادی گل شاخه بریده ژربرا مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی- دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. در این بررسی ریزنمونه‌های برگ گیاه ژربرا رقم بایودر (*Gerbera jamesonii* Bol. Ex Adlam) به قطعات یک سانتی‌متر مربع از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای تهیه شد و جهت

1. Asteracea
2. Phloroglucinol
3. activated charcoal
4. 1-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid
5. Benzothiadiazole

کالوس‌زایی روی محیط کشت MS دارای ۰/۵میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و غلظت‌های مختلف SNP (۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ µM) کشت شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد و برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد همچنین هر تیمار دارای ۴ واحد آزمایشی بود. سدیم نیترو پروساید در حالت محلول به شدت به نور حساس بوده و تجزیه آن توسط اکسیژن و دمای زیاد تسریع می‌شود، بنابراین جهت جلوگیری از تجزیه این ماده، پس از آماده و اتوکلاو کردن محیط کشت، در شرایط استریل زیر هود با عبور از فیلتر به آرامی به محیط کشت اضافه شد. سپس کشت‌ها به مدت یک ماه در تاریکی و دمای تقریبی ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از ۳۰ روز کالوس‌های برگ مورد ارزیابی قرار گرفتند و صفات وزن تر کالوس‌های برگ با استفاده از ترازوی حساس و درصد تحریک کالوس با شمارش تعداد ریزنمونه های که در هر تکرار تولید کالوس کردند اندازه‌گیری شد.

شاخساره‌های باززایی شده از کالوس‌های برگ جهت پرآوری به محیط کشت MS تغییر یافته دارای غلظت‌های مختلف SNP (۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ µM) منتقل شدند. در همه تیمارها غلظت ۰/۵میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱میلی‌گرم بر لیتر IAA ثابت بود. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام و برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. صفات مورد بررسی در این آزمایش تعداد برگ هر شاخساره، تعداد شاخساره‌های پرآوری شده، ارتفاع شاخساره و وزن گیاهچه بود.

به‌منظور ریشه‌زایی، گیاهان تولید شده به محیط کشت MS دارای غلظت‌های SNP (۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰µM) انتقال داده شدند. همچنین آزمایش ریشه‌زایی در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. بعد از گذشت یک ماه، با استفاده از خط کش طول ریشه‌ها اندازه‌گیری شد و جهت توزین ریشه‌ها ترازوی حساس به کار برده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ایی دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس بررسی SNP بر کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف SNP برای وزن کالوس، و درصد تحریک کالوس مشاهده شد. هر دو صفت ذکر شده در سطح ۵ درصد معنی‌دار بودند (جدول ۱). بیشترین کالوس‌زایی از ریزنمونه‌ها به ترتیب در غلظت ۶۰ و ۴۰ میکرومول SNP تحریک شد (شکل‌های ۱ و ۷). در واقع استفاده از غلظت ۶۰ میکرومول SNP از نظر تحریک کالوس با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت و بیشترین میزان تحریک کالوس (۹۷ درصد) و میانگین وزن کالوس (۰/۸۸ گرم) در این تیمار مشاهده شد (شکل‌های ۱ و ۲). در این بررسی محیط شاهد و سایر تیمارهای SNP دارای ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بود اما با کاربرد سدیم نیتروپروساید مقدار کالوس تولید شده بیشتر و در بازه زمانی کوتاهتری تحریک کالوس مشاهده شد. کمترین میزان کالوس در تیمار شاهد تولید شد (شکل‌های ۱، ۷، ۸ و ۹) همچنین درصد تحریک کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها تا حدی با افزایش SNP کاهش یافت، بطوریکه در غلظت ۸۰ میکرومول SNP تحریک کالوس‌زایی کاهش و اختلاف معنی‌داری با شاهد دیده نشد (شکل‌های ۲ و ۸) هر چندکه از نظر مقدار وزن کالوس تولیدشده تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشت (شکل ۱).

اثر NO روی کالوس‌زایی، اندام‌زایی شاخه و ریشه‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل (*Linum usitatissimum*) با کاربرد ترکیبات تکمیلی رهاکننده‌های NO در محیط کشت، به میزان SNP µM ۵/۰ و SIN-1 µM ۲/۰ بررسی و نشان داده شد که ترکیب رهاکنندهی NO به میزان SNP ۵/۰µM در محیط کشت، موجب تحریک معنی‌دار تمایز شاخه شد (Kalra & Babbar, 2010). استفاده از غلظت ۴ میکرومولار SNP در گیاه *Albizzia lebbeck* موجب تحریک کالوس‌زایی و همین‌طور تمایز شاخه از ریزنمونه هیپوکوتیل شده است (Kalra & Babbar, 2012). تیمار SNP در القای کالوس و باززایی شاخه از غده گیاه *Dioscorea opposita* نشان داد که غلظت ۴۰ میکرومول SNP همراه با مقدار مشخصی از BAP و NAA در محیط MS، القای کالوس را افزایش و به صورت معنی‌دار موجب باززایی شاخه‌های نابه‌جا شده است (Xu *et al*., 2009).

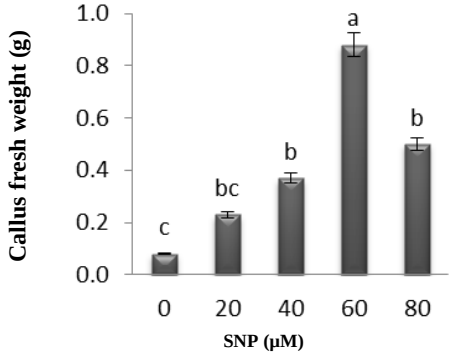
جدول ۱. تجزیهٔ واریانس اثر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید بر پینه‌زایی برگ

Table 1. ANOVA for experimental different concentrations of sodium nitroprusside on leaf callus induction

Source of variation	df	Mean squares	
		Cllus fresh weight	Callus induction percentage
Sodium nitroprusside	3	0.37*	4528.07*
Error	15	0.18	314.84

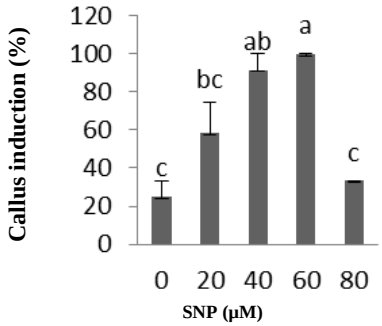
* و **: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

*, **: Significantly differences on 5% and 1% probability level, respictevely.



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف SNP بر وزن پینهٔ تحریک‌شده از ریزنمونه‌های برگ

Figure 1. The effect of different concentrations of SNP callus weight of leaf



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف SNP درصد تحریک پینه بر وزن پینهٔ تحریک‌شده از ریزنمونه‌های برگ

Figure 2. The effect of different concentrations of SNP on ratio percentage to weight callus

استفاده از غلظت‌های مختلف SNP در مرحله پرآوری بر روی صفات تعداد شاخساره‌های پرآوری شده، تعداد برگ و وزن گیاهچه در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). برای صفت ارتفاع شاخساره اختلاف معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد. بین تیمارهای مختلف سدیم نیتروپروساید در میزان پرآوری ژربرا با شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت و بالاترین تعداد پرآوری (۱۹ نوساقه) با استفاده از تیمار ۲۰ میکرومولار بدست آمد. بین تیمارهای ۲۰ و ۴۰ میکرومولار SNP اختلاف معنی‌داری وجود داشت. و غلظت ۴۰ میکرومولار با ۱۶/۵۱ عدد، تعداد پرآوری بالایی را نسبت به تیمار شاهد داشت. همچنین غلظت ۶۰ میکرومولار با میانگین تعداد شاخساره پرآوری ۱۳/۵ عدد، اختلاف معنی‌داری با شاهد و سایر غلظت‌های SNP نشان داد (شکل ۱۱). تعداد پرآوری (۵/۷۵ عدد) کمتری در تیمار شاهد دارای ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱میلی‌گرم بر لیتر IAA نسبت به تیمارهای دارای SNP مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد تعداد شاخساره پرآوری شده در محیط دارای SNP نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت و تقریباً در غلظت ۲۰ میکرومولار افزایش (۴ برابر)، ۴۰ میکرومولار (۳ برابر) و ۶۰ میکرومولار (۲ برابر) تعداد شاخساره‌ها در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد (شکل‌های ۳ و ۱۰).

جدول ۲. تجزیهٔ واریانس اثر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید در مرحلهٔ پرآوری

Table 2. ANOVA test for effect different concentrations of sodium nitroprusside on multiple shoot formation

Source of variation	df	Mean squares			
		Multiplication rate	Shoot heigh (cm)	Shoot weight (g)	Number of leaves / shoot
Sodium nitroprusside	3	132.229*	0.049ns	8.621*	84.563*
Error	12	0.896	0.129	0.149	3.313

ns، * و **: عدم وجود اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

ns, *, **: Non-significant differences and significantly differences on 5% and 1% probability level, respictevely.

NO نقش مؤثری در تحریک تولید شاخه نسبت به طویل شدن شاخه بازی می‌کند، کاربرد خارجی NO بر طویل شدن هیپوکوتیل و میانگره گیاهچه‌های رشد کرده در تاریکی آرابیدوبسیس و کاهو تأثیر بازدارنده داشته است (Beligni & Lamattina, 2000). به‌طور کلی محیط‌های دارای سایتوکنین و SNP نسبت به محیط‌های که فقط دارای سایتوکنین هستند، تولید شاخه بیشتری دارند در واقع بهبود تمایز شاخه و باززایی گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای را می‌توان به علت نقش بالقوه NO در انتقال پیام‌های سایتوکنین دانست. کاربرد ۴۰میکرومول SNP به‌همراه سایتوکنین و اکسین تأثیر معنی‌داری در جلوگیری از قهوه‌ای شدن و افزایش زنده ماندن ریزنمونه‌های غده گیاه *Dioscorea opposite* داشته است (Xu *et al*., 2009).

اثر NO بر باززایی و تکثیر گیاه *Vanilla planifolia* بررسی و مشاهده شد، تعداد شاخه‌های باززایی شده هر ریزنمونه (قطعات گره) به صورت معنی‌داری در حضور SNP افزایش و در بیش از ۹۳٪ ریزنمونه‌ها تشکیل شاخه مشاهده شد (Tan *et al*., 2013). NO با اکسین و سایتوکنین در تعامل است و می‌تواند در تقسیم سلولی طی تمایززدایی و تمایزیابی مجدد سلول‌های گیاهان نقش داشته باشد (Xu *et al*., 2009). در نتیجه در باززایی شاخساره جانبی و تکثیر شرکت دارد و یا به‌عنوان یک واسطه عمل می‌کند (Han *et al*., 2009). بنابراین، استفاده توام ماده آزادکننده NO، یعنی SNP، ریزازدیادی گونه‌های گیاهی را بهبود می‌بخشد، سیتوکنین می‌تواند آزاد شدن NO را در کشت‌های سلولی گیاه مانند آرابیدوپسیس، توتون و جعفری تحریک کند (Tun *et al*., 2001). علاوه بر این NO می‌تواند، رشد برگ‌های نخود را تحریک و کشیدگی نوک ریشه در ذرت را باعث شود (Leshem *et al*., 1998). همه این موارد به اثر NO بر تقسیم سلولی، باززایی و پرآوری تاکید دارند. قرار گرفتن در برابر غلظت‌های زیاد NO، متابولیسم طبیعی را تحت تأثیر قرار داده و فتوسنتز و تنفس را کاهش می‌دهد (Zottini *et al*., 2002).

اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف سدیم نیتروپروساید و شاهد بر وزن گیاهچه مشاهده شد (شکل ۴). اختلاف معنی دار بین دو تیمار ۲۰ و ۴۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید با میانگین ۴/۵۰ گرم وجود نداشت و بیشترین وزن گیاهچه‌پرآوری شده در این دو تیمار به‌دست آمد. همچنین کمترین وزن گیاهچه در تیمار شاهد با میانگین ۱/۳۵ به‌دست آمد. تیمار ۶۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید با شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت و با میانگین وزن ۳/۳۵ گرم در دسته b قرار گرفت.

همان‌طور که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود بین تیمارهای مختلف سدیم نیتروپروساید بر صفت تعداد برگ شاخساره با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت. تیمارهای ۲۰ و ۴۰ میکرومولار SNP با میانگین ۱۳ عدد برگ اختلاف معنی‌داری نداشتند و بیشترین تعداد برگ در این دو تیمار مشاهده شد. کمترین تعداد برگ در تیمار شاهد با میانگین ۳/۵۰ بدست آمد. برگ شاخساره‌های تیمار شده با سدیم نیتروپروساید از لحاظ اندازه کوچکتر بود، البته میزان پرآوری و تعداد بالای برگ در تیمارهای اعمال شده قابل توجه بود.

همانطور که جدول ۳ نشان می‌دهد، اثرات غلظت‌های مختلف SNP با شاهد فقط دارای ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ایندول استیک اسید (IAA) بر پارامتر وزن ریشه در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود و برای صفت طول ریشه غیرمعنی‌دار بود و همه تیمارها

بدون اختلاف قابل توجهی ریشه‌دار شدند (شکل‌های ۱۶ و ۱۷). یکی از نکات مورد توجه در بررسی استفاده از سدیم نیتروپروساید افزایش وزن ریشه‌ها در تیمارهای به‌کار برده شده بود (شکل‌های ۱۲ تا ۱۵) بیشترین وزن ریشه با میانگین ۶/۶۰ در غلظت ۳۰ میکرومولار SNP بدست آمد و کمترین آن با میانگین ۲/۱۲ در شاهد مشاهده شد (شکل ۶). NO آزاد شده از ترکیب دهنده‌ی SNP تعداد ریشه‌های جانبی را در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی افزایش و تحریک ریشه را کاهش داده است (Manai *et al*., 2014). همچنین تأثیر مثبت افزایش توسعه ریشه‌های جانبی در آرابیدوپسیس گزارش شد (Laskowski *et al*., 1995).

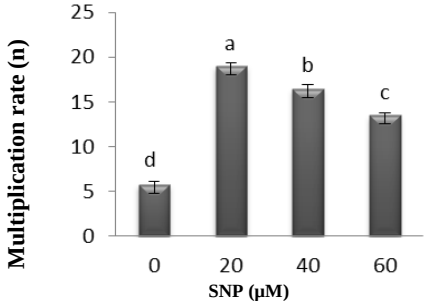
جدول ۳. تجزیهٔ واریانس اثر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید (SNP) بر صفات ریشه

Table 3. ANOVA for different concentrations of sodium nitroprusside on root formation from regenerated shoots

Source of variation	Df	Mean squares	
		Root weight (g)	Root length
Treatment	3	4.65*	0.069ns
Error	13	0.04	0.057

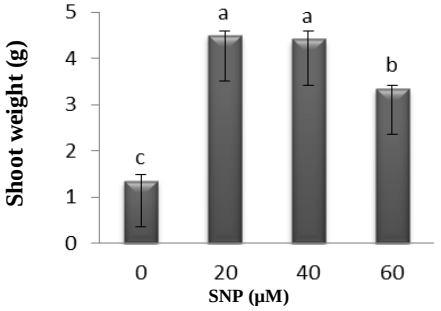
* و **: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

*, **: Significantly differences on 5% and 1% probability level, respictevely.



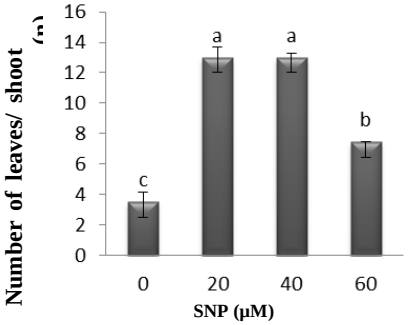
شکل ۳. اثر غلظت‌های مختلف SNP بر شمار پرآوری

Figure 3. The effect of different concentrations of SNP on proliferation of shoots



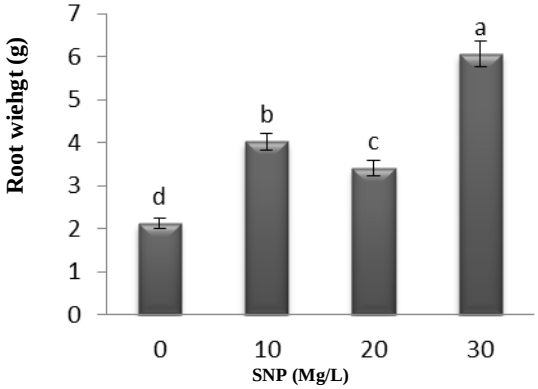
شکل ۴. اثر غلظت‌های مختلف SNP بر وزن گیاهچهٔ پرآوری

Figure 4. The effect of different concentrations of SNP on proliferation of seedling weight



شکل ۵. اثر غلظت‌های مختلف SNP بر شمار برگ شاخساره

Figure 5. The effect of different concentrations of SNP on the number of leaves shoots

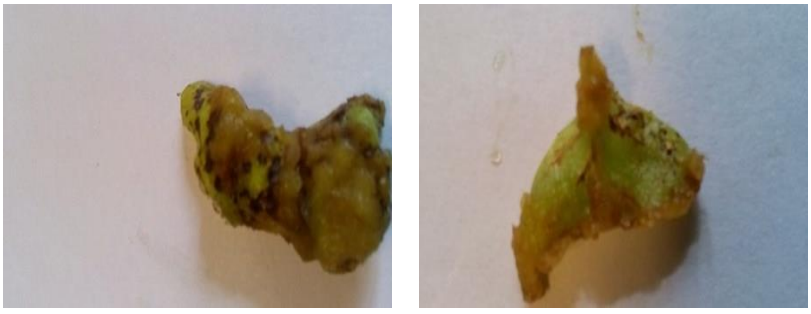


شکل ۶. اثر غلظت‌های مختلف SNP بر وزن ریشه

Figure 6. The effect of different concentrations of SNP on root weight

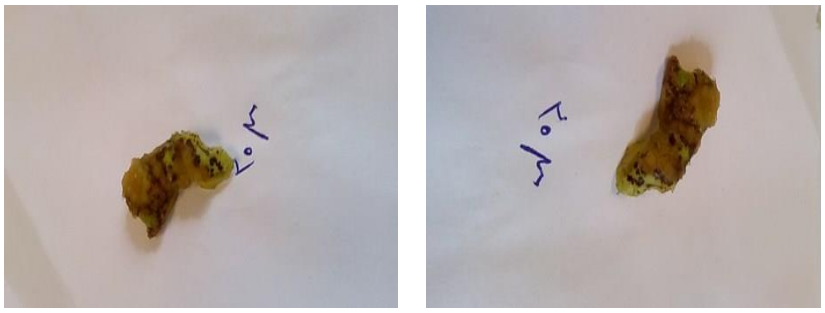
شکل ۷. پینه‌های حاصل در ۶۰ میکرومولار SNP

Figure 7. Callus obtained in 60µM SNP



شکل ۸. پینه‌های حاصل در ۸۰ میکرومولار SNP

Figure 8. Callus obtained in 80µM SNP



شکل ۹. پینه‌های حاصل ۲۰ میکرومولار SNP

Figure 9. Callus obtained in 20µM SNP

شکل ۱۰. گیاهچهٔ پرآوری‌شده در ۴۰ میکرومولار SNP
Figure 10. Seedling proliferation on 40 µM SNP

شکل ۱۱. پرآوری شاخساره در ۶۰ میکرومولار SNP
Figure 11. Shoot proliferation on 60 µM SNP

شکل ۱۲. ریشه‌های رشدیافته در ۲۰ میکرومولار SNP
Figure 12. developed roots on 20 µM SNP

شکل ۱۳. ریشه‌های رشدیافته در ۱۰ میکرومولار SNP
Figure 13. developed roots on 10 µM SNP

شکل ۱۴. ریشه‌های رشدیافته در ۳۰ میکرومولار SNP
Figure 14. developed roots on 30 µM SNP

شکل ۱۵. ریشه‌های رشدیافته در ۳۰ میکرومولار SNP
Figure 15. developed roots on 30 µM SNP

شکل ۱۶. ریشه‌های رشدیافته در تیمار شاهد
Figure 16. developed roots on control treatment

شکل ۱۷. ریشه‌های رشدیافته در تیمار شاهد
Figure 17. developed roots on control treatment

نتیجه‌گیری کلی

کاربرد سدیم نیترو پروساید به‌عنوان یک ترکیب آزادکننده NO همراه با BAP در محیط کشت با افزایش اثر غلظت‌های پایین تنظیم‌کننده‌های رشد، میانگین تعداد شاخساره را افزایش داد و همچنین ترکیبی مؤثر جهت کالوس‌زایی و سرعت تکثیر ژربرا داشت. همچنین با توجه به ارزان قیمت بودن سدیم نیتروپروساید و تأثیر آن در افزایش اثر غلظت‌های پایین تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت، استفاده از آن توجیه اقتصادی کافی را دارا می‌باشد. همچنین توصیه می‌شود مطالعاتی در زمینه برهم‌کنش این ماده با غلظت‌های بسیار ناچیز تنظیم‌کننده‌های رشد و همچنین محیط فاقد تنظیم‌کننده رشد صورت گیرد.

REFERENCES

1. Agampodi, V. A. & Jayawardena, B. (2009). Effect of coconut (*Cocos nucifera* L.) water extracts on adventitious root development in vegetative propagation of *Dracaena purplecompacta* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 279-284.
2. Askari, N., Fotouhi, R. & Moini, A. (2005). *In vitro* plantlet production of two cultivares *Gerbera* from young capitulums. *Iranian Journal of Horticultural science and Technology*, 6(4), 203-214. (in Farsi)
3. Beligni, M. V. & Lamattina, L. (2000). Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 210, 215-22.
4. Constantinovici, D. & Sandu, C. (1995). Studies on the regenerative capacity of different Gerbera explants for effective *in vitro* multiplication. *Cercetari Agronomice in Molecular Dova*, 28, 149-152.
5. Han, X., Yang, H., Duan, K., Zhang, X., Zhao, H., You, S. & Jiang, Q. (2009). Sodium nitroprusside promotes multiplication and regeneration of *Malus hupehensis in vitro* plantlets. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 96, 29-34.
6. Kalra, C. & Babbar, S. B. (2010). Nitric oxide promotes *in vitro* organogenesis in *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell, Tissue & Organ Cultuer*, 103, 353-359.
7. Kopyra, M. & Gwózdz, W. A. (2004). The role of nitric oxide in plant growth regulation and responses to abiotic stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 26, 459-472.
8. Laskowski, M. J., Williams, M. E., Nusbaum, H. C. & Sussex, I. M. (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*, 121, 3303-3310.
9. Leshem, Y. A. Y., Wills, R. B. & Ku, V. V. (1998). Evidence for the function of the free radical gas nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36- 825-833.
10. Manai, J., Kalai, T., Gouia, H. & Corpas, F. (2014). Exogenous nitric oxide (NO) ameliorates salinity-induced oxidative stress in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Journal of soil science and plant nutrition*, 14, 433-446
11. Tan, C. B., Chin, C. F. & Alderson, P. (2013). Effects of sodium nitroprusside on shoot multiplication and regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49, 626-630.
12. Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26, 618-631.
13. Tun, N. N., Holk, A. & Scherer, G. F. (2001). Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS letters*, 509, 174-176.
14. Van son, N. G. U. Y. E. N. (2007). *Response of Gerbera (Gerbera jamesonii bolus) varieties to micropropogatio*. Ph. D. thesis, University of Agricultural Sciences, UAS, Dharwad.
15. Xu, J., Yin, H., Wang, W., Mi, Q. & Liu, X. (2009). Effects of sodium nitroprusside on callus induction and shoot regeneration in micropropagated *Dioscorea opposita*. *Plant Growth Regulation* , 59, 279-285.
16. Zottini, M., Formentin, E., Scattolin, M., Carimi, F., Lo Schiavo, F. & Terzi, M. (2002). Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in vivo*. *FEBS letters*, 515, 75-78.