Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 48, No 3, Autumn 2017 (527-534)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.200140.934

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۶ (ص ۵۳۴-۵۲۷)

واکنش ریزنمونه‌های مختلف یک رقم گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط درون شیشه‌ای

رضوان السادات کازرونیان[۱]، سپیده کلاته جاری[۲*]، امیرموسوی[۳] و مسعود توحیدفر[٤]
۱ و ۲. دانشجوی سابق دکتری و استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
۳. دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
٤. دانشیار، دانشکدهٔ مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۱/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱۵)

چکیده

اهمیت اقتصادی گل داوودی در میان دیگر گونه‌های زینتی سبب انجام بررسی‌های متنوعی برای بهینه‌سازی کشت بافت این گیاه در سرتاسر جهان شده است. در این آزمایش، ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ، گلبرگ و TCL ساقه از داوودی رقم Reagan Elite Salmon در محیط MS حاوی ترکیب‌ها و غلظت‌های متنوع NAA، BAP و TDZ کشت شدند. درصد باززایی، شمار گیاهچهٔ باززاشده در هر ریزنمونه و چگونگی باززایی در هر تیمار بررسی شد. نتایج گویای برتری معنی‌دار درصد باززایی شاخساره از ریزنمونهٔ دمبرگ (۸۰/۵ درصد) بود؛ درحالی‌که کمینهٔ باززایی از ریزنمونه‌های گلبرگ به دست آمد (۳۷/۲ درصد). چگونگی باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های مختلف در تیمارهای حاوی BAP به‌تنهایی، به‌صورت مستقیم و در تیمارهای حاوی TDZ و NAA به‌صورت غیرمستقیم بود. واکنش ریزنمونه‌های بررسی‌شده نسبت به تیمارهای تنظیم‌کنندهٔ رشد گیاهی از لحاظ درصد باززایی شاخساره و میانگین شمار شاخسارهٔ باززایی‌شده به ازای هر ریزنمونه بسیار متفاوت بود. به‌طوری‌که از میان تیمارهای حاوی ترکیبی از NAA و هر یک از دو سایتوکینین، در T12 (٤/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA)، دمبرگ و گلبرگ، بیشترین درصد و شمار باززایی شاخساره و ریزنمونه‌های TCL ساقه، کمترین میزان باززایی را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: **اندام‌زایی، پینه‌دهی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، نوع ریزنمونه.**

Reaction of various explants of a *Chrysanthemum morifolium* cultivar to plant growth regulators *in vitro*

Rezvanolsadat Kazeroonian[1], Sepideh Kalatejari[2*], Amir Mousavi[3] and Masoud Tohidfar[4]
1, 2. Former Ph.D. Student and Assistant Professor, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Associate Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
4. Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Energy Engineering and New Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
(Received: Feb. 6, 2016 - Accepted: May 4, 2016)

ABSTRACT

Economic importance of Chrysanthemum among the other ornamental species has resulted in performing various investigations in tissue culture optimization of this plant, worldwide. In the current experiment, leaf, petiole, petal and stem TCL explants, from *Chrysanthenum morifolium* cv. Reagan Elite Salmon were cultured in MS medium supplemented with different combinations and concentrations of NAA, BAP and TDZ. Regeneration percentage, number of regenerated shoots per explants and regeneration type were investigated in each treatment. Results indicated significant superiority of shoot regeneration percentage from petiole explants (80.5 percent), while minimum regeneration was achieved from the petal explants (37.2 percent). Shoot regeneration type from different explants in the treatments containing only BAP, was direct and in the treatments containing TDZ and NAA was indirect. Reactions of the explants to the PGR treatments, considering shoot regeneration percentage and average number of regenerated shoots per explants, were so different. As among the treatments consisting combinations of NAA plus each of the cytokinins, in T12 (4.5 mg/l BAP + 1 mg/l NAA), petioles and petals represented maximum shoot regeneration percentage and number, while stem TCLs showed minimum rates of regeneration.

Keywords: Callogenesis, explant type, organogenesis, plant growth regulators (PGRs).

* Corresponding author E-mail: kalatejari@yahoo.com

مقدمه

گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) گیاهی متعلق به تیرهٔ کاسنی (Asteraceae) است (Anderson, 1990) که پیشینهٔ کشت و اصلاح آن از راه بهنژادی سنتی، به بیش از ۲۰۰۰ سال پیش باز می‌گردد (Teixeira da Silva, 2003b). گرچه این روش به دلیل محدودیت خزانهٔ ژنتیکی و ناسازگار بودن تلاقی‌ها با محدودیت‌هایی روبه‌رو است (Rout & Das, 1997). افزون بر این، استفاده از قلمه به‌منظور افزایش داوودی، سرعت کمی دارد و گیاهان به‌دست‌آمده اغلب کیفیت پایینی دارند (Nahid *et al*., 2007). باززایی شاخسارهٔ نابجا در محیط درون‌شیشه‌ای، به‌عنوان یک روش ریزازدیادی در داوودی و متداول‌ترین روش در تولید رقم‌های جدید از راه اصلاح جهشی (موتاسیونی) و تراریختی ژنتیکی به شمار می‌آید (Zalewska *et al*., 2011a; Lim *et al*., 2012) که از این روش، به دست آوردن شمار زیادی گیاه از یک ریزنمونه در محیط درون شیشه‌ای، به‌عنوان جایگزینی برای روش‌های سنتی افزونش امکان‌پذیر است (Waseem *et al*., 2009).

باززایی شاخسارهٔ نابجا در محیط درون شیشه‌ای در داوودی، تحت تأثیر عامل‌هایی مانند برهمکنش تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، نوع ریزنمونه و نژادگان (ژنوتیپ) گیاه قرار می‌گیرد (Nahid *et al*., 2007; Zalewska *et al*., 2011b). تنظیم‌کننده‌های رشد، برای تنظیم چرخهٔ یاخته به‌منظور القاء تقسیم و تخصصی شدن، به‌عنوان محرک عمل می‌کنند (Hodson de Jaramillo *et al*., 2008). در تحقیقات مختلف روی داوودی، کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های حاوی تیمارهای متفاوتی از تنظیم‌کننده‌های رشد بررسی و مقایسه شده است. نتایج گزارش شده در رابطه با نسبت بهینه بین اکسین و سایتوکینین، برای اندام‌زایی شاخساره در داوودی تفاوت نشان می‌دهد (Park *et al*., 2007) و تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد به نژادگان نیز بستگی دارد (Zalewska *et al*., 2011a). نوع ریزنمونه نیز می‌تواند یکی از عامل‌های بسیار مهم در ایجاد شرایط مناسب برای باززایی مؤثر گیاهچه به‌شمار آید (Lim *et al*., 2012). تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد گیاهی ویژگی‌های متفاوتی دارند و ریزنمونه‌های متنوع نیازهای متفاوتی به این هورمون‌ها نشان می‌دهند (Ji *et al*, 2011). در ریزازدیادی درون شیشه‌ای نژادگان‌های مختلف داوودی از ریزنمونه‌های متفاوتی شامل برگ (Song *et al*., 2011; Zalewska *et al*., 2011a; Naing *et al*., 2014, Khalili *et al*., 2014)، گلبرگ (Nahid *et al*., 2007; Barakat *et al*., 2010; Song *et al*., 2011, Khalili *et al*., 2014)، دمبرگ (Song *et al*., 2011; Lim *et al*., 2012)، ساقه (Song *et al*., 2011) یا لایهٔ یاخته‌ای نازک (TCL)[1] گرفته‌شده از ساقه (Teixeira da Silva, 2003a) استفاده شده است که نتایج این گزارش‌ها گاه در تأیید و گاه متناقض با یکدیگر بوده است.

بنابر گزارش Floraholland (2013 & 2014)، داوودی اسپری از لحاظ حجم معامله‌های جهانی، در سال ۲۰۱۳ با فروش ۲۹۱ میلیون یورویی و در سال ۲۰۱۴ با افزایش ۴/۲ درصدی در فروش (۳۰۳ میلیون یورو) در رتبهٔ دوم پس از رز قرار گرفت. بنابراین، یکی از چالش‌های بهنژادگرهای داوودی، نیاز به پاسخ سریع به گرایش‌های رایج در بازار، برای تولید سالانهٔ چندین رقم جدید و جذاب است؛ بنابراین بهینه‌سازی شیوهٔ کار (پروتکل)های افزایش برای هر رقم جدید نظر تجاری بااهمیت، به نظر می‌رسد (Song *et al*., 2011). در این آزمایش، رقم Reagan Elite Salmon به دلیل بازارپسندی بالا انتخاب شد. باززایی درون شیشه‌ای داوودی از ریزنمونه‌های مختلف در تیمارهای متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد با غلظت‌های متنوع بررسی شد تا بتوان با معرفی شیوهٔ کار باززایی کارآمد برای رقم بیان شده، افزون بر بهینه‌سازی ریزازدیادی، زمینه را برای تراریختی ژنتیکی این رقم آسانگری کرد.

مواد و روش‌ها

روش گندزدایی

در این تحقیق از گیاهان چهار ماههٔ داوودی اسپری رقم Reagan Elite Salmon که گل‌های کم پر، به رنگ صورتی روشن دارد، استفاده شد. برای انجام

1. Thin Cell Layer

گندزدایی، قطعه‌های ساقه با ۳ تا ۴ جوانهٔ جانبی از گیاهان مادری از گلخانه‌ای در پاکدشت، توسط یک قیچی باغبانی تیز جدا شدند. پس از انتقال به آزمایشگاه، شستشو به‌مدت سی دقیقه زیر آب جاری شیر همراه با یک تا دو قطره مایع ظرف‌شویی صورت گرفت. آنگاه با انتقال ساقه‌ها به زیر محفظهٔ لامینار، گندزدایی با الکل ۷۰ درصد به‌مدت سی ثانیه انجام شد و پس از آن ده دقیقه غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به همراه دو قطره توئین ۲۰ صورت گرفت. درنهایت، سه نوبت آبشویی با آب مقطر سترون (استریل) در مدت بیست دقیقه انجام شد و از قطعه‌های ساقه، ریزنمونه‌های تک گره تهیه شد.

برای گندزدایی گلبرگ، پس از قطع دیسک گل و انتقال آن به آزمایشگاه، گلبرگ‌ها از دیسک جدا شده و به‌مدت پانزده دقیقه زیر جریان آب شیر همراه با یک تا دو قطره مادهٔ شوینده در معرض شستشو قرار گرفتند. سپس گندزدایی زیر محفظهٔ لامینار به‌مدت سی ثانیه در الکل ۷۰ درصد و ده دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱ درصد همراه با دو قطره توئین ۲۰ انجام شد. آبشویی نیز با آب مقطر سترون، در مدت بیست دقیقه در سه فاصلهٔ زمانی ۱۰، ۵ و ۵ دقیقه‌ای صورت گرفت.

تهیهٔ ریزنمونهٔ تک گره

پس از گندزدایی، از قطعه‌های ساقه، تک گره تهیه شد که در محیط MS (Murashige & Skoog, 1962) تغییریافتهٔ حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP)، در شیشهٔ مربایی کشت شدند. در این محیط کلات آهن FeEDTA با ۷۰ میلی‌گرم در لیتر FeEDDHA جایگزین شده بود. قطع ریزنمونه‌های گره در فاصلهٔ نزدیک به ۰/۵ سانتی‌متری از بالا و پایین جوانه انجام شد. با رشد جوانهٔ جانبی و گسترش برگ‌ها و شاخساره، ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و TCL ساقه از گیاهان مادری رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای، بین هفتهٔ پنجم تا هفتم پس از کشت تهیه شدند.

چگونگی برش ریزنمونه‌ها

ریزنمونه‌های برگ پس از رشد کافی گیاهچه‌های درون شیشه‌ای، با جدا کردن برگ‌ها و بریدن آن‌ها در قطعه‌هایی به‌اندازهٔ تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر مربع تهیه شدند؛ به‌طوری‌که هر قطعه، بخش رگبرگ میانی داشت. ریزنمونه‌های TCL ساقه، به‌صورت لایه‌ای بسیار نازک از مقطع عرضی ساقه (به ضخامت تقریبی ۵۰۰-۲۰۰ میکرومتر و قطر ۳-۲ میلی‌متر) توسط کاردک (اسکالپل) برش زده شدند. ریزنمونه‌های دمبرگ نیز به طول تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای تهیه شدند. در مورد گلبرگ، پس از گندزدایی سطحی، از بخش میانی هر گلبرگ شعاعی دیسک گل، ریزنمونه‌هایی به ابعاد تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر مربع بریده شد. ریزنمونه‌های برگ و گلبرگ، پس از خراش‌دهی سطحی، به ترتیب از سطح رویی و زیرین، در تماس با محیط کشت، قرار داده شدند. ریزنمونه‌های دمبرگ و TCL ساقه، به‌طور افقی و بدون خراش‌دهی، روی سطح محیط قرار گرفتند.

همهٔ چهار نوع ریزنمونه پس از تهیه، در محیط MS حاوی ترکیب‌های و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (جدول ۱) کشت شدند. سپس در اتاقک رشدی با دورهٔ روشنایی ۱۶ ساعت و ۸ ساعت تاریکی، در دمای ۱±۲۵ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. زیرکشت چهار نوع ریزنمونهٔ یادشده، هر سه هفته در محیط همسان انجام شد. چند هفته پس از کشت، بخش‌های باززایی‌شده از این ریزنمونه‌ها، با رسیدن به‌اندازهٔ تقریبی ۱ سانتی‌متر، جدا شده و به محیط MS بدون هورمون، برای طویل شدن و ریشه‌زایی منتقل شدند.

صفات مورد ارزیابی و تجزیهٔ آماری

آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار حاوی پنج ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. ویژگی‌های مورد ارزیابی شامل درصد باززایی و شمار گیاهچه باززایی‌شده در هر ریزنمونه در هر تیمار بود. مستقیم یا غیرمستقیم بودن اندام‌زایی نیز در هر تیمار تنظیم‌کنندهٔ رشد گیاهی برای هر یک از انواع ریزنمونه‌ها به کمک استریومیکروسکوپ مشاهده و ثبت شد. در صورت غیرمستقیم بودن اندام‌زایی، به حجم پینهٔ (کالوس) تشکیل‌شده، امتیاز داده شد. برای تجزیه‌وتحلیل آماری از

نرم‌افزار SPSS استفاده و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

جدول ۱. تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در این آزمایش

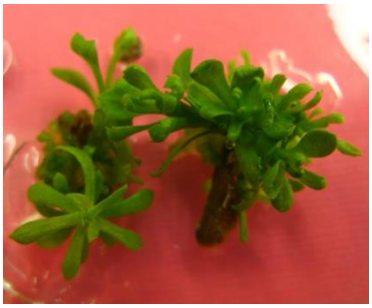
Table 1. Different plant growth regulator (PGR) treatments used in the current experiment

PGR* treatments (mg/l)	
T1: 0 BAP+ 0 NAA	T9: 0 BAP+ 1 NAA
T2: 1.5 BAP+ 0 NAA	T10: 1.5 BAP+ 1 NAA
T3: 3 BAP+ 0 NAA	T11: 3 BAP+ 1 NAA
T4: 4.5 BAP+ 0 NAA	T12: 4.5 BAP+ 1 NAA
T5: 0 BAP+ 0.5 NAA	T13: 0 TDZ+ 0.1 NAA
T6: 1.5 BAP+ 0.5 NAA	T14: 0.4 TDZ+ 0.1 NAA
T7: 3 BAP + 0.5 NAA	T15: 0.6 TDZ+ 0.1 NAA
T8: 4.5 BAP+ 0.5 NAA	T16: 0.8 TDZ+ 0.1 NAA

* Plant Growth Regulator

نتایج و بحث

در این آزمایش، همهٔ گیاهان بدون استثنا ریشه‌دار شدند و همهٔ این گیاهان مرحلهٔ سازگاری را نیز با موفقیت گذراندند. در جدول ۲، چگونگی اندام‌زایی (مستقیم یا غیرمستقیم) ریزنمونه‌های مختلف در هر یک از تیمارهای تنظیم‌کننده رشد گیاهی ثبت و در صورت تولید پینه، حجم پینه‌زایی امتیازدهی شده است. نتایج بررسی‌ها نشان داد، در تیمار T1 که محیط MS بدون هرگونه تنظیم‌کنندهٔ رشدی است؛ باززایی از هیچ‌یک از ریزنمونه‌ها صورت نگرفت که این مسئله گویای نقش مؤثر استفاده از این مواد در کشت بافت گیاهی برای القاء باززایی اندام یا پینه‌زایی است (Hobbie, 1998). مشخص شد حتی در تیمارهایی که BAP بدون حضور اکسین استفاده شد؛ باز هم آغازش شاخساره رخ داد (جدول‌های ۲ و ۳، شکل ۱) که در تأیید یافته‌های Song *et al.* (2011) است. در شماری از تحقیقات پیشین تأیید شده است که BAP نمو سرآغازه‌های شاخساره را در داوودی تسریع می‌کند (Karim *et al.*, 2003; Chagas *et al.*, 2004). به‌رغم باززایی شاخساره در تیمارهای حاوی سایتوکینین به‌تنهایی، در تیمارهای T5 و T9 که تنها حاوی غلظت‌هایی از اکسین نفتالن استیک اسید (NAA) بودند؛ میزانی ریشه‌زایی از ریزنمونه‌ها صورت گرفت. در همهٔ تیمارهایی که ترکیبی از یک سایتوکینین- BAP یا تیدیازورون (TDZ)- همراه با NAA بودند؛ صرف‌نظر از غلظت هورمون‌های به‌کاررفته، همهٔ ریزنمونه‌ها باززایی شاخساره را نشان دادند (جدول۲). این مسئله تأیید کرد که سایتوکینین‌ها توأم با اکسین‌ها، نقش مهمی را باززایی شاخساره در داوودی بر عهده دارند (Karim *et al.*, 2003).



شکل ۱. باززایی مستقیم شاخساره از ریزنمونهٔ دمبرگ در تیمار T3 که حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

Figure 1. Direct shoot regeneration from petiole explants in T3 treatment which contained 3 mg/l of BAP.

جدول ۲. میزان پینه‌زایی و نوع اندام‌زایی از ریزنمونه‌های مختلف در تیمارهای متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

Table 2. Callogenesis rates and types of organogenesis from different explants in the various plant growth regulator treatments

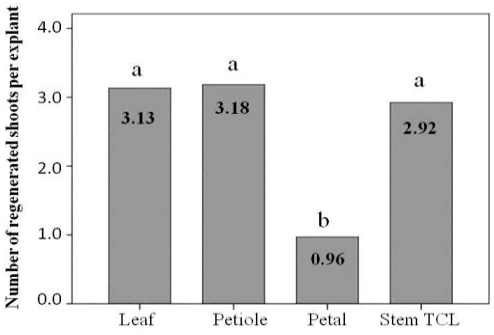
Treatment no.	Leaf	Petiole	Petal	Stem TCL
T1	-	-	-	-
T2	*- /**D	- / D	+	- / D
T3	- / D	- / D	+	- / D
T4	- / D	- / D	+	- / D
T5	- / D	- / D	++ / D	- / D
T6	+ / D	+ / ID	+++ / ID	+ / D
T7	+ / D	++ / ID	++ / D	+ / D
T8	++ / D	++ / ID	+++ / D	+ / D
T9	- / D	- / D	++/ D	- / D
T10	+ / D	++ / ID	+++ / ID	+ / ID
T11	++ / ID	++ / ID	+++ / ID	++ / ID
T12	+ / D	++ / ID	+++/ D	++ / ID
T13	-	-	-	-
T14	+ / ID	++ / ID	++ / ID	+ / ID
T15	++ / ID	+++ / ID	+++ / ID	++ / ID
T16	+++ / ID	+++ / ID	+++ / ID	+++ / ID

* Callogenesis rates: - = No callogenesis, + = Weak, ++ = Moderate, +++ = Strong

** Types of organogenesis: D= Direct, ID= Indirect

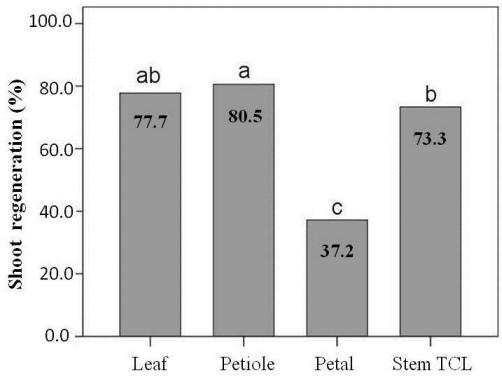
بر پایهٔ جدول ۲، چگونگی اندام‌زایی و حجم پینهٔ تولیدی بین ریزنمونه‌های متنوع در رابطه با هر یک از تیمارهای هورمونی که ترکیبی از BAP وNAA بودند؛ تفاوت نشان داد و در مجموع، بیشترین میزان پینه‌زایی متعلق به ریزنمونه گلبرگ بود. در این میان، تنها در تیمار T11 همهٔ ریزنمونه‌ها چگونگی اندام‌زایی همسانی، به‌صورت باززایی غیرمستقیم شاخساره از پینه را نشان دادند. بنابر گزارش رشد و نمو پینه، تحت تأثیر نژادگان و

اجزای تشکیل‌دهندهٔ محیط کشت قرار می‌گیرد (Mandal & Datta, 2005; Barakat *et al*., 2010). تفاوت موجود در پاسخ بین ریزنمونه‌های مختلف از نظر حجم پینهٔ تولیدی و چگونگی اندام‌زایی می‌تواند انعکاس‌دهندهٔ سطوح متفاوت هورمون‌های درونی گیاه در بافت‌های مختلف آن باشد که می‌تواند بر بروز واکنش نسبت به هورمون‌های خارجی تأثیرگذار باشد (Kaul *et al*., 1990).



شکل ۳. مقایسهٔ بین شمار شاخسارهٔ باززایی‌شده به ازای هر ریزنمونه در انواع مختلف ریزنمونه‌ها

Figure 3. Comparing number of regenerated shoots per explant among different types of the explants



شکل ۲. مقایسهٔ درصد باززایی شاخساره در انواع مختلف ریزنمونه‌ها

Figure 2. Comparison of shoot regeneration (%) among various types of the explants

در تیمارهای T14، T15 و T16 که ترکیبی از TDZ و NAA بودند؛ شاخساره‌زایی از همهٔ ریزنمونه‌ها به‌صورت غیرمستقیم صورت گرفت. گزارش شده است که نوع سایتوکینین مورد استفاده می‌تواند بر چگونگی باززایی شاخساره مؤثر باشد (Song *et al*., 2011).

برابر با شکل ۲، بیشترین درصد باززایی شاخساره (۸۰/۵ درصد) و بنابر شکل ۳، بیشترین شمار شاخسارهٔ باززایی‌شده به ازای هر ریزنمونه (۳/۱۸)، متعلق به دمبرگ بود. هرچند که از لحاظ آماری، تفاوت معنی‌داری بین ریزنمونه‌های برگ و TCL ساقه با دمبرگ از نظر میانگین شمار شاخسارهٔ باززایی‌شده به ازای هر ریزنمونه وجود نداشت (شکل ۳).

نتایج به‌دست‌آمده از ریزنمونهٔ گلبرگ درزمینهٔ هر دو ویژگی مورد بررسی، به‌طور معنی‌داری نسبت به سه ریزنمونهٔ دیگر ضعیف‌تر بود (شکل‌های ۲ و ۳). بر پایهٔ دو شکل یادشده؛ بیشترین درصد باززایی شاخساره و میانگین شمار شاخساره به ازای هر ریزنمونه، به ترتیب متعلق به دمبرگ، برگ و پس از آن TCL ساقه و گلبرگ بود. درحالی‌که بر پایهٔ یک گزارش، بالاترین درصد باززایی و شمار شاخسارهٔ تولیدشده به ازای هر ریزنمونه در شش رقم داوودی، در گلبرگ به‌طور معنی‌داری بیشتر بود و پس از آن به ترتیب، ریزنمونه‌های ساقه، دمبرگ، و برگ قرار داشتند (Song *et al*., 2011). نتایج این آزمایش با گزارش Kaul *et al*. (1990) نیز مغایرت داشت. این محققان، ریزنمونه‌های برگ، ساقه و دمبرگ را در محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP همراه با NAA کشت کردند و بیشترین باززایی را از ساقه و پس از آن از ریزنمونه‌های برگ به دست آوردند. بنا بر این گزارش، باززایی از ریزنمونه‌های دمبرگ، بسیار ضعیف بود و بیشتر دمبرگ‌ها، قهوه‌ای شده و از بین رفتند. بسیاری از آزمایش‌ها، وابستگی به رقم را برای باززایی شاخساره نابجا از ریزنمونه‌های مختلف در داوودی مطرح کرده‌اند (Himstedt & Jacobsen, 2001; Zalewska *et al*., 2010). تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی تحت تأثیر نژادگان نیز قرار دارد (Zalewska *et al*., 2011a). عامل تفاوت در نژادگان‌ها می‌تواند دلیل احتمالی مغایرت‌های مشاهده شده باشد.

بر پایهٔ جدول ۳، مقایسهٔ پاسخ ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و TCL ساقه در هر یک از تیمارهای T6، T7، T8، T10 و T11 از لحاظ درصد باززایی شاخساره، گویای نبود تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای یادشده بود. به‌طوری‌که این ریزنمونه‌ها در هر یک از تیمارهای یادشده که ترکیبی از غلظت‌های مختلف BAP و NAA بودند، درصد باززایی بالایی را نشان دادند. از سوی دیگر، شمار شاخسارهٔ باززایی‌شدهٔ کمتری به ازای هر ریزنمونه

در تیمارهای ترکیبی TDZ و NAA در مقایسه با BAP و NAA از هر یک از ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و گلبرگ به دست آمد که در اغلب موارد، از لحاظ آماری، تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر نشان دادند. در این مورد احتمال دارد برتری BAP در القای شاخساره، مرتبط با توانایی بافت‌های گیاه در سوخت‌وساز (متابولیزه) کردن آسان‌تر BAP نسبت به دیگر تنظیم‌کننده‌های ساختی (سنتزی) رشد گیاهی باشد یا به توانایی آن در القای تولید هورمون‌های طبیعی مانند زآتین درون بافت گیاه مرتبط باشد (Malik *et al*., 2005; Lindiro *et al*., 2013)؛ هرچند که در این آزمایش، تفاوت معنی‌داری بین کشت ریزنمونه‌های TCL ساقه در هیچ‌یک از تیمارهای ترکیبی حاوی هر یک از دو سایتوکینین BAP و TDZ- به‌استثنای تیمار T12- از لحاظ صفات مورد بررسی مشاهده نشد (جدول ۳).

بنابر جدول ۳، در تیمار T11 (۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA)؛ باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و TCL ساقه صد درصد بود. در حالی‌که در آزمایش Naing *et al*. (2014) روی ریزنمونه برگ داوودی رقم Vivid Scarlet در تیمار و شرایط همسان رشدی، هیچ‌گونه باززایی به دست نیامد و تنها پس از قرار دادن ریزنمونه‌های برگ به مدت ده روز در تاریکی، باززایی از آن صورت گرفت. با توجه به همسان بودن تیمار و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در این آزمایش و پژوهش یادشده، تفاوت مشاهده شده در رابطه با ریزنمونه برگ، به‌احتمال مرتبط با اختلاف بین نژادگان‌های داوودی است. گزارش شده است، رقم در مقایسه با نوع محیط کشت، تأثیر بیشتری بر باززایی در داوودی داشته است (De Jong *et al*., 1990).

بر پایهٔ جدول ۳، هر سه نوع ریزنمونه برگ، دمبرگ و TCL ساقه در تیمار T11، ۱۰۰ درصد باززایی نشان دادند؛ در حالی‌که ریزنمونهٔ گلبرگ در تیمار T12 بیشترین درصد باززایی (۷۳/۳ درصد) و بیشترین شمار شاخسارهٔ باززایی‌شده (۳/۰) به‌ازای هر ریزنمونه را داشت. این مسئله نشان داد که در ریزنمونه گلبرگ در غلظت ثابت NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و افزایش غلظت BAP، باززایی شاخساره بهبود یافت که در تأیید گزارش‌های پیشین مبنی بر واکنش متفاوت بخش‌های مختلف گیاه نسبت به تنظیم‌کننده‌های رشدی افزوده‌شده به محیط کشت است (Kaul *et al*., 1990; Park *et al*., 2007) که به‌احتمال ناشی از تفاوت در سطوح هورمون‌های درونی گیاه در اندام‌های متفاوت آن است. درواقع باززایی درنتیجهٔ تأثیر توأم بیان ژن هورمون‌های درونی گیاه و پاسخ‌دهی به محرک خارجی است. در یک نژادگان خاص، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مشخص ممکن است تأثیر مختلفی بر پایهٔ نوع ریزنمونه نشان دهند (Annadana *et al*., 2000).

جدول ۳. مقایسهٔ درصد باززایی شاخساره و میانگین شمار شاخسارهٔ باززایی‌شده به ازای هر ریزنمونه بین چهار نوع ریزنمونهٔ مختلف کشت‌شده در تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

Table 3. Comparing shoot regeneration percentage and mean number of regenerated shoots per explants among four different types of explants cultured in the various plant growth regulators treatments

*PGR treatment	Leaf		Petiole		Petal		Stem TCL	
(mg/l)	**SR (%)	***S/exp	SR (%)	S/exp	SR (%)	S/exp	SR (%)	S/exp
T1	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	80 ab	2.6 b	46.6 b	2.4 c	0	0	26.6 c	0.7 b
T3	60 bc	1.8 bcd	40 b	0.6 d	0	0	33.3 c	1.4 b
T4	80 ab	2.1 bc	33.3 b	0.6 d	0	0	33.3 c	1.4 b
T5	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	100 a	6.2 a	100 a	5.1 ab	40 cd	0.7 cd	86.6 a	4.1 a
T7	93.3 a	5.4 a	100 a	4.2 b	46.6 bcd	0.9 cd	93.3 a	3.5 a
T8	100 a	2.8 b	86.6 a	3.9 b	66.6 ab	1.1 cd	86.6 a	4.4 a
T9	0	0	0	0	0	0	0	0
T10	100 a	5.9 a	100 a	5.0 ab	53.3 abc	2.5 ab	93.3 a	3.4 a
T11	100 a	5.5 a	100 a	3.8 b	66.6 ab	1.6 bc	100 a	3.5 a
T12	86.6 ab	2.9 b	100 a	5.8 a	73.3 a	3.0 a	53.3 b	1.9 b
T13	0	0	0	0	0	0	0	0
T14	26.6 d	0.3 e	80 a	1.7 cd	40 cd	1.0 cd	93.3 a	3.2 a
T15	46.6 cd	0.9 cd	93.3 a	2.8 c	33.3 cd	0.3 d	86.6 a	3.6 a
T16	60 bc	0.8 cd	86.6 a	2.1 c	26.6 d	0.3 d	93.3 a	3.6 a

* Plant Growth Regulator, ** Shoot regeneration (%), *** Mean number of regenerated shoots per explants.
Means with the same letters within each column are not significantly different at P= 0.05.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد، بین ریزنمونه‌های مختلف در یک تیمار معین تنظیم‌کنندهٔ رشد گیاهی، درصد باززایی شاخساره و میانگین شمار شاخسارهٔ باززایی‌شده به ازای هر ریزنمونه و همچنین چگونگی اندام‌زایی و حجم پینهٔ تولیدی متفاوت بود. در مجموع، ریزنمونهٔ دمبرگ، بیشینه و ریزنمونهٔ گلبرگ، کمترین درصد باززایی شاخساره و میانگین شمار شاخسارهٔ باززایی‌شده به ازای هر ریزنمونه را نشان دادند. در سه تیماری که سایتوکینین BAP به‌تنهایی و بدون NAA داشتند. باززایی از همهٔ انواع ریزنمونه‌ها به‌استثنای گلبرگ صورت گرفت. همچنین، در همهٔ ریزنمونه‌ها به‌استثنای TCL ساقه، تیمارهای ترکیبی BAP و NAA نسبت به تیمارهای ترکیبی TDZ و NAA در رابطه با میانگین شمار شاخسارهٔ باززایی‌شده به ازای هر ریزنمونه، برتری معنی‌داری داشتند.

REFERENCES

1. Anderson, N. O., Ascher, P. D., Widmer, R. E. & Luby, J. J. (1990). Rapid generation cycling of *Chrysanthemum* using laboratory seed development and embryo rescue techniques. *Journal of American Society of Horticultural Sciences*, 115(2), 329-336.
2. Annadana, S., Rademaker, W., Ramanna, M., Udayakumar, M. & de Jong, J. (2000). Response of stem explants to screening and explant source as a basis for methodical advancing of regeneration protocols for *Chrysanthemum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62, 47-55.
3. Barakat, M. N., Abdel Fattah, R. S., Badr, M. & EI-Torky, M. G. (2010). *In vitro* culture and plant regeneration derived from ray florets of *Chrysanthemum morifolium*. *African Journal of Biotechnology*, 9(8), 1151-1158.
4. Chagas, E. A., Fraguas, C. B., da Silva, E. F., Pasqual, M. & Mendonca, V. (2004). *In vitro* multiplication of chrysanthemum 'White polaris'. *Revista- Brasileira-de-Agrociencia*, 10(1), 123-126.
5. De Jong, J., van Wordragen, M. F. & Rademaker, W. (1990). Early transformation events in *Dendranthema grandiflora*. In: Proceedings of *EUCARPIA* (Section Ornamentals*): Integration of in vitro techniques in ornamental plant breeding*, Wageningen, pp. 156-161.
6. Floraholland, Facts and Figures. (2013). *Cut flower*: *FloraHolland departments Finance and MiMa (Market Information & Market Analysis), International Statistics*, *Flowers and Plants (Bloemen en Planten AIPH)*, from https://www.royalfloraholland.com/media/ 2460310/ Kengetallen-EN-2013.pdf
7. Floraholland, Facts and Figures. (2014). *Cut flower*: *FloraHolland departments Finance and MiMa (Market Information & Market Analysis), International Statistics*, *Flowers and Plants (Bloemen en Planten AIPH)*, from https: //www. royalfloraholland.com / media/ 4213130/ floraholland _Kengetallen 2014_Engels.pdf.
8. Himstedt, J. P. & Jacobsen, H. J. (2001). Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Chrysanthemum*. *Acta Horticulturae*, 560, 421-424.
9. Hobbie, L. J. (1998). Auxin: Molecular genetic approaches in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 91-102.
10. Hodson de Jaramillo, E., Forero, A., Cancino, G., Moreno, A. M., Monsalve, L. E. & Acero, W. (2008). *In vitro* regeneration of three chrysanthemum (*Dendrathema grandiflora*) varieties via organogenesis and somatic embryogenesis. *Universitas Scientiarum*, 13(2), 118-127.
11. Ji, A., Geng, X., Zhang, Y., Yang, H. & Wu. G. (2011). Advances in somatic embryogenesis research of horticultural plants. *American Journal of Plant Sciences*, 2, 727-732.
12. Karim, M. Z., Amin, M. N., Azad, M. A. K., Begum, F., Rahman, M. M., Ahmad, S. & Alam, R. (2003). *In vitro* shoot multiplication of *Chrysanthemum morifolium* as affected by sucrose, agar and pH. *Biotechnology*, 2(2), 115-120.
13. Kaul, V., Miller, R. B., Hutchinson, J. F. & Richards, D. (1990). Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21, 21-30.
14. Khalili, S., Jafarkhani Kermani, M., Azadi, P. & Kalatejari, S. (2014). Investigating effects of different factors on regeneration efficiency of two commercial cultivars of *Chrysanthemum grandiflorum.* In: Proceedings of *1st National Ornamental Plants Congress*, 21-22 Oct 2014, Karaj, Iran, p. 43. (in Farsi)
15. Lim, K. B., Kwon, S. J., Lee, S. I., Hwang, Y. J. & Naing, A. H. (2012). Influence of genotype, explant source, and gelling agent on *in vitro* shoot regeneration of Chrysanthemum. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 53(4), 329-335.

16. Lindiro, C., Kahia, J., Asiimwe, T., Mushimiyimana, I., Waweru, B., Kouassi, M., Koffi, E., Kone, S. & Sallah, P. Y. (2013). *In vitro* regeneration of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) plantlets from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. *International Journal of Application or innovation in Engineering & management*, 2(7), 207-213.
17. Malik, S. K., Chadhury, R. & Kalia, R. K. (2005). Rapid *in vitro* multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree species. *Scientia Horticulturae*, 106, 539-553.
18. Mandal, A. K. A. & Datta, S. K. (2005). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from ray florets of *Chrysanthemum*. *Biologia Plantarum*, 49(1), 29-33.
19. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497.
20. Nahid, J. S., Shyamali, S. & Kazumi, H. (2007). High frequency shoot regeneration from petal explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *in vitro*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(19), 3356-3361.
21. Naing, A. H., Jeon, S. M., Han J. S., Lim, S. H., Lim, K. B. L. & Kim, C. K. (2014). Factors influencing *in vitro* shoot regeneration from leaf segments of *Chrysanthemum*. *Comptes Rendus Biologies*, 337, 383-390.
22. Park, S. H., Kim, G. H. & Jeong, B. R. (2007). Adventitious shoot regeneration from cultured petal explants of *Chrysanthemum*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 48(6), 387-392.
23. Rout, G. R. & Das, P. (1997). Recent trends in the biotechnology of *Chrysanthemum*: A critical review. *Scientia Horticulturae*, 69, 239-257.
24. Song, J. Y., Mattson, N. S., & Jeong, B. R. (2011). Efficiency of shoot regeneration from leaf, stem, petiole and petal explants of six cultivars of *Chrysanthemum morifolium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 107, 295-304.
25. Teixeira da Silva, J. A. (2003a). Filter paper type affects morphogenic programs and buffers the phytotoxic effect of antibiotics in chrysanthemum and tobacco thin cell layers. *Horticultural Science*, 38(7), 1403-1407.
26. Teixeira da Silva, J. A. (2003b). Chrysanthemum: Advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnology Advances*, 21, 715-766.
27. Waseem, K., Khan, M. Q., Jaskani, J., Jilani, M. S. & Khan, M. S. (2009). Effect of different auxins on the regeneration capability of *Chrysanthemum* leaf discs. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11, 468-472.
28. Zalewska, M., Miler, N. & Wenda-Piesik, A. (2010). Effect of *in vitro* topophysis on the growth, development, and rooting of *Chrysanthemum* explants (*Chrysanthemum × grandiflorum*/ Ramat./ Kitam). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 85(4), 362-366.
29. Zalewska, M., Tymoszuk, A. & Miler, N. (2011a). New chrysanthemum cultivars as a result of *in vitro* mutagenesis with the application of different explant types. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 10(2), 109-123.
30. Zalewska, M., Lema-Rumińska, J., Miler, N., Gruszka M. & Dąbal, W. (2011b). Induction of adventitious shoot regeneration in *Chrysanthemum* as affected by the season. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47, 375-378.