Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Plant Production Research

Print ISSN: 2322-2050
Online ISSN: 2322-2778

Effect of different concentrations of indole butyric acid and benzyl adenine on the regeneration of raspberries (*Rubus idaeus* L.) in vitro

Akram Yousefi[1] | Hosein Moradi[2] | Mehdi Hadadinejad[*3] | Seyed Alireza Salami[4]

1. M.Sc. Graduate, Dept. of Horticultural Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran. E-mail: akram.yosefi@ymail.com
2. Assistant Prof., Dept. of Horticultural Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran. E-mail: moradiho@yahoo.com
3. Corresponding Author, Assistant Prof., Dept. of Horticultural Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran. E-mail: m.hadadinejad@sanru.ac.ir
4. Associate Prof., College of Agriculture and Natural Resources - Tehran University, Karaj, Iran. E-mail: seyed.salami@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 05.26.2020
Revised: 11.30.2020
Accepted: 12.15.2020

Keywords:
Explant,
PGRs,
Photosynthetic pigment,
Regeneration,
Side bud

ABSTRACT

Background and Objectives: Raspberry (*Rubus idaeus* L.) is most important small fruits in the world with a good color and taste. The potential for optimum off-season production under greenhouse conditions improved its commercial value. *In-vitro* tissue culture is one of the methods for large-scale and uniform propagation of raspberries, where the type and concentration of employed growth regulators are crucial to complement and accelerate growth. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of benzyladenine and indolebutyric acid on direct regeneration of the raspberry lateral bud.

Material and Methods: Red raspberry bushes cv. September were used for this experiment. The experiment was carried out a factorial experiment in a completely randomized design with four replications and each replication with five explants at Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Uniform lateral bud explants after disinfection placed in culture medium containing benzyladenine at three levels of 0, 0.4 and 1 mg L^{-1} and indolebutyric acid at three levels of 0, 0.1 and 0.5 mg L^{-1} in controlled environmental conditions and finally traits such as leaf number, node number, root number, root length and ect as well as photosynthetic pigments were measured.

Results: The results of this study showed that simultaneous use of different concentrations of benzyladenine and indolebutyric acid growth regulators in the culture medium of raspberry explants had a positive effect on a number of studied traits. The use of high concentrations of benzyladenine increased traits such as leaf number, number of node, number of internode, leaf length, lamina length. Also, the use of benzyladenine with high concentrations of indolebutyric acid increased explant size and petiole diameter. Examination of explant root length and number showed that increasing benzyl adenine concentration decreased these traits, but the use of indolebutyric acid at higher levels increased root length and number. Evaluation of the effect results of benzyladenine and indolebutyric acid on photosynthetic pigments indicated that the increase of these regulators increased chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid in traeted explants.

Conclusion: In general, the use of benzyladenine plus indolebutyric acid was effective depending on the concentration used, was effective in improving the vegetative traits of the plantlets of the raspberry lateral bud explants, but indolebutyric acid alone only affected rooting at high concentrations. So that, the use of indolebutyric acid increased root number and length at higher levels that suggesting a functional contrast between these two growth regulators. Investigating the effect results of benzyladenine and indolebutyric acid on photosynthetic pigments resolved the ambiguity of how enhancing these regulators led to synergized and improved explant size. It was observed that with increasing concentrations of these regulators, increased in important photosynthetic pigments such as chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid was obvious. Importantly, the tissue and organs of raspberries are more susceptible than black berry and respond to lower concentrations of this growth regulators.

Cite this article: Yousefi, Akram, Moradi, Hosein, Hadadinejad, Mehdi, Salami, Seyed Alireza. 2022. Effect of different concentrations of indole butyric acid and benzyl adenine on the regeneration of raspberries (*Rubus idaeus* L.) in vitro. *Journal of Plant Production Research*, 28 (4), 123-140.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/JOPP.2021.17678.2636
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۲۰۵۰
شاپا آنلاین: ۲۳۲۲-۲۷۷۸

باززایی مستقیم تمشک فرنگی (*Rubus idaeus* L.) تحت‌تأثیر غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتیریک و بنزیل آدنین

اکرم یوسفی[۱] | حسین مرادی[۲] | مهدی حدادی‌نژاد*[۳] | سید علیرضا سلامی[۴]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: akram.yosefi@ymail.com
۲. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: moradiho@yahoo.com
۳. نویسنده مسئول، استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: m.hadadinejad@sanru.ac.ir
۴. دانشیار گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی- دانشگاه تهران. رایانامه: seyed.salami@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۶
تاریخ ویرایش: ۱۳۹۹/۰۹/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۲۵

واژه‌های کلیدی:
باززایی،
تنظیم‌کننده رشد،
جوانه جانبی،
رنگیزه فتوسنتزی،
ریزنمونه

چکیده

سابقه و هدف: تمشک فرنگی (*Rubus idaeus* L.) از مهم‌ترین ریزمیوه‌ها در دنیا بوده که دارای رنگ و طعم مناسبی می‌باشد. امکان تولید مطلوب خارج از فصل آن در شرایط گلخانه‌ای به ارزش تجاری آن افزوده است. یکی از روش‌های تکثیر در مقیاسی وسیع و یکنواخت تمشک فرنگی، کشت در شرایط درون‌شیشه‌ای است که در این روش نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد برای تکمیل و تسریع رشد و نمو بسیار مهم می‌باشد. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی اثر غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و اسید ایندول بوتیریک بر باززایی مستقیم حاصل از ریزنمونه جوانه جانبی تمشک فرنگی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: برای انجام این آزمایش از بوته‌های تمشک فرنگی قرمز رقم سپتامبر استفاده گردید. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار و هر تکرار با پنج ریزنمونه در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام گرفت. ریزنمونه‌های یکنواخت جوانه جانبی بعد از ضدعفونی، در محیط کشت محتوی ترکیب‌های هورمونی شامل بنزیل آدنین در سه سطح ۰، ۰/۴ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و اسید ایندول بوتیریک در سه سطح ۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در شرایط محیطی کنترل شده قرار گرفتند و در نهایت صفاتی مانند تعداد برگ، تعداد گره، تعداد ریشه، طول ریشه و هم‌چنین رنگیزه‌های فتوسنتزی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده هم‌زمان از غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل آدنین و اسید ایندول بوتیریک در محیط کشت ریزنمونه‌های تمشک فرنگی موجب اثرگذاری مثبت بر تعدادی از صفات مورد بررسی شده است. استفاده از غلظت‌های بالای بنزیل آدنین صفاتی مانند تعداد برگ، تعداد گره، تعداد میانگره، طول برگ و طول پهنک را افزایش

داده است. هم‌چنین استفاده از هورمون بنزیل آدنین به همراه غلظت‌های بالای اسید ایندول بوتیریک موجب افزایش اندازه گیاهچه و قطر دمبرگ شده است. بررسی صفات طول و تعداد ریشه گیاهچه‌ها نشان داد که افزایش غلظت بنزیل آدنین موجب کاهش این صفات شده است اما استفاده از اسید ایندول بوتیریک در سطوح بالاتر تعداد و طول ریشه را افزایش داد. بررسی نتایج اثر بنزیل آدنین و اسید ایندول بوتیریک بر رنگیزه‌های فتوسنتزی بیانگر آن بود که افزایش این تنظیم‌کننده‌ها موجب افزایش کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید در گیاهچه‌های رشد یافته شده است.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی استفاده از بنزیل آدنین به همراه اسید ایندول بوتیریک بسته به غلظت مورد استفاده، برای بهبود صفات رویشی گیاهچه‌های حاصل از ریزنمونه‌های جوانه جانبی تمشک فرنگی مؤثر می‌باشد، اما اسید ایندول بوتیریک به تنهایی و در غلظت‌های بالا فقط بر ریشه‌زایی اثرگذار بود. به‌طوری‌که استفاده از اسید ایندول بوتیریک در سطوح بالاتر تعداد و طول ریشه را افزایش داد که بیانگر تقابل کارکردی این دو تنظیم‌کننده رشد بود. بررسی نتایج اثر بنزیل آدنین و اسید ایندول بوتیریک بر رنگیزه‌های فتوسنتزی این ابهام را که افزایش این تنظیم‌کننده‌ها چگونه موجب هم‌افزایی و بهبود اندازه گیاهچه شده است را حل نمود. به‌طوری‌که مشاهده شد با افزایش غلظت این تنظیم‌کننده‌ها، رنگیزه‌های مهم فتوسنتزی هم‌چون کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید افزایش نشان دادند. نکته مهم این‌که تمشک فرنگی از بافت و اندام‌های حساس‌تری نسبت به تمشک سیاه برخوردار است و نسبت به غلظت‌های پایین‌تر این تنظیم‌کننده‌های رشد واکنش نشان می‌دهد.

استناد: یوسفی، اکرم، مرادی، حسین، حدادی‌نژاد، مهدی، سلامی، سید علیرضا (۱۴۰۰). باززایی مستقیم تمشک فرنگی (*Rubus idaeus* L.) تحت‌تأثیر غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتیریک و بنزیل آدنین. *نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی*، ۲۸ (۴)، ۱۴۰-۱۲۳.
DOI: 10.22069/JOPP.2021.17678.2636

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

تمشک فرنگی قرمز (*Rubus idaeus* cv. september) از جنس *Rubus* و از خانواده Rosaceae بوده و گیاهان این جنس دارای تنوع زیادی هستند و بومی مناطق معتدل با تابستان ملایم و خاک‌های نسبتاً اسیدی هستند. برخی از ارقام این گیاه همچون رقم "سپتامبر[1]" همیشه بارده بوده و برخلاف ارقام رایج که روی شاخه دوساله بار[2] می‌دهند، روی شاخه سال جاری[3] نیز بار می‌دهند و علاوه بر رنگ و طعم مناسب با داشتن قابلیت باردهی مجدد در سال با استقبال زیادی مواجه شده است (۲۳ و ۴۵). برگ تمشک‌ها منبع غنی از مشتقات فلاونوئیدها، اسید فنولیک، تری‌ترپن‌ها، نمک‌های معدنی و ویتامین c می‌باشند با این‌حال نشان داده شده که به دلیل تفاوت در بافت، برگ تمشک فرنگی نسبت به بیماری‌های قارچی و تابش شدیدی نور خورشید، حساس‌تر از تمشک سیاه است (۸). تولید جهانی تمشک فرنگی در سال ۲۰۱۸ به میزان ۸۷۰۲۰۹ تن از ۱۲۵ هزار هکتار سطح زیر کشت بوده است و طبق آمار سازمان خواربار جهانی (فائو) تولیدکنندگان بزرگ تمشک در جهان به ترتیب شامل روسیه، ایالات متحده، لهستان، مکزیک و صربستان می‌باشند (۱۰).

روش‌های سنتی مختلفی برای تکثیر تجاری تمشک فرنگی وجود دارد که از جمله این روش‌ها، استفاده از قلمه، پاجوش و خوابانیدن می‌باشد. به دلیل برخی معایب مانند زمان‌بر بودن این فناوری‌ها، نیاز به تعداد زیاد بوته مادری سالم جهت افزایش سطح زیر کشت و محدودیت به فصل خاصی از سال؛ لازم است تمشک فرنگی را از طریق کشت درون شیشه‌ای نیز تکثیر نمود (۴۵). در اواخر دهه ۱۹۷۰ و اوایل دهه ۱۹۸۰، روش کشت درون‌شیشه‌ای یا کشت بافت برای تکثیر همه انواع تمشک آغاز شد (۱۲ و ۲۳). کشت بافت روشی سریع برای تکثیر درون‌شیشه‌ای درختان میوه است که طی آن تعداد زیادی گیاه شبیه به هم، عاری از ویروس، در فضایی کوچک و بدون تأثیرپذیری از شرایط محیطی تولید می‌شود (۴۵) گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت، علاوه بر تکثیر می‌توانند برای اهداف آزمایشی هم‌چون جهش‌زایی توسط پرتودهی هسته‌ای نیز مورداستفاده قرار گیرند (۳).

محیط کشت پایه برای تمشک فرنگی، موراشی و اسکوگ (۳۰) است، هر چند دیگر محیط کشت‌های مشتق از این محیط با ایجاد تغییراتی در عناصر پرمصرف یا نمک‌ها توسط نودسون (۲۰) نیز به کار گرفته شده است، علاوه بر این پژوهش‌گرانی هم‌چون هوفنر (۱۴) از غلظت، ترکیب و زمان مصرف هورمون‌ها نیز برای رسیدن به اهداف خود در تکثیر تمشک فرنگی استفاده نموده‌اند (۴۳).

در ایران نیز تاکنون کوشش‌هایی برای تکثیر تمشک در محیط کشت درون‌شیشه‌ای صورت گرفته و طبق پژوهش‌های به‌دست آمده نوع ریزنمونه و هم‌چنین غلظت هورمون‌های به کار برده شده می‌تواند در باززایی مؤثر باشد (۳۴). در پژوهشی جاجرمی (۲۰۱۹) اثر محیط‌های کشت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد را در باززایی تمشک سیاه ارزیابی نمود (۱۶). جعفری و یوسف اوغلو (۲۰۰۹)، نیز با کشت جوانه جانبی اقدام به ریزازدیادی تمشک سیاه بی‌خار نمودند (۱۵). در پژوهشی دیگر شمالی (۲۰۱۸) از ریزنمونه تک گره، لوگان بری (دورگ تمشک سیاه و فرنگی) استفاده نمودند و دریافتند غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد اثر متفاوتی روی ریشه‌زایی لوگان بری دارند، با این‌حال تکثیر تمشک فرنگی *R.ideaus* به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی که با تمشک سیاه دارد، پیچیدگی بیش‌تری نسبت به تمشک سیاه دارد (۳۸). در این ارتباط مظفرزاده و همکاران

1- September
2- Floricane
3- Primocane

(۲۰۱۴) علاوه بر متغیرهای تنظیم‌کننده‌های رشد و محیط کشت با کنترل غلظت ویتامین میواینوزیتول توانستند رقمی از تمشک فرنگی که روی شاخه دوساله بار می‌داد را ریزازدیادی نمایند (۲۸). بنابر اعلام مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی ایران ارقام متعددی از تمشک فرنگی سیاه و قرمز پس از طی کردن فرآیند قرنطینه به کشور وارد شده است تا با تکثیر آن‌ها، مشکلات ناشی از استفاده از ارقام ناشناخته و بدون شناسنامه تمشک در کشور ساماندهی گردد (۳۳). این ارقام وارداتی نیز همگی روی شاخه دوساله باردهی دارند. در حالی‌که ارقامی هم‌چون سپتامبر نیز معرفی شده‌اند که روی شاخه یکساله باردهی دارند و با داشتن قابلیت کشت در گلخانه از ارزش افزوده بیش‌تری نیز برخوردار هستند.

یکی از عوامل اصلی موفقیت برنامه‌های کشت بافت گیاهی، افزایش تعداد شاخساره است. سیتوکینین در القاء شاخساره و تقسیم سلولی و اسید ایندول بوتیریک در ریشه‌زایی تمشک سیاه مؤثر می‌باشند (۲۷). سیتوکینین در تمام اندام گیاه ساخته می‌شوند و آدنوزین فسفات- ایزوپنتنیل ترانسفراز، که اولین مرحله بیوسنتز سیتوکینین را کاتالیز می‌کند، در کل گیاه بیان می‌شود (۲۹). از جمله سیتوکینین‌های مصنوعی بنزیل آدنین می‌باشد که در تعداد بی‌شماری از گیاهان کاربردهای بسیاری دارد (۲۵). بنزیل آدنین تعداد سلول‌های گیاه را از طریق تشکیل لایه‌های سلولی و تقسیم سلولی افزایش می‌دهد (۵) از طرفی هورمون اکسین اکثر جنبه‌های رشد و فیزیولوژی گیاه را کنترل یا تحت‌تأثیر قرار می‌دهد که به طور مثال در رابطه با برگ، اثرات مورفوژنیکی شامل کنترل پریموردیای برگ، کنترل تمایز آوندی و هم‌چنین کنترل گسترش برگ در هر دو مرحله تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلول می‌باشد که در نتیجه با افزایش سطح اکسین برگ‌ها کاهش می‌یابند (۱۸). هورمون اکسین انواع مختلفی دارند که اسید ایندول بوتیریک یکی از آن می‌باشد که هم به‌صورت طبیعی و مصنوعی وجود دارد، رشد را تنظیم می‌کند و بر فرآیندهایی مانند کشیدگی ساقه، تشکیل ریشه اولیه، تشکیل کالوس، افزایش گلدهی، القا آنزیم و هم‌چنین پیری برگ و میوه تأثیر می‌گذارد (۴۲). با توجه به این‌که در مسیر باززایی گیاهان کشت بافتی از هر دو روش مستقیم و غیرمستقیم استفاده می‌شود و هر کدام هم دارای مزایایی می‌باشد بنابراین در این پژوهش هدف اصلی تعیین بهترین غلظت اسید ایندول بوتیریک و بنزیل آدنین به تنهایی و اثر متقابل این دو تنظیم‌کننده در باززایی مستقیم تمشک فرنگی رقم سپتامبر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش بوته‌های تمشک فرنگی رقم سپتامبر از پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در کرج تهیه شد. جهت رشد بهینه و رسیدن به اندازه مناسب، بوته‌ها به مدت چند ماه در شرایط گلخانه‌ای (دمای روز ۲۵ و شب ۱۸ درجه، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و نور طبیعی) نگهداری شدند. پس از اعمال سرمادهی و از بین بردن رکود، جوانه‌های نسبتاً یکنواخت از یک سوم پایینی شاخه اصلی جدا شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. پس از ضدعفونی با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۵ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد، به محیط کشت MS[1] حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل گردیدند.

به‌منظور استقرار، نمونه‌های ضدعفونی شده در محیط‌های پایه موراشیگی و اسکوگ (۳۰) در شیشه‌های شفاف محتوی ساکاروز ۲۰ گرم در لیتر، آگار ۷/۵ گرم در لیتر و pH محلول قبل از اتوکلاو ۵/۸ کشت شدند. اتاق رشد با دمای ۲۲ درجه

1- Murashige & Skoog

سانتی‌گراد و نور سفید فلورسنت و ۱۶/۸ ساعت فتوپریود و شدت نور ۲۵۰۰ لوکس نگهداری شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل و ۴ تکرار که هر تکراری شامل ۵ ریزنمونه انجام شد. کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های حاوی تیمارهای هورمونی شامل تیمار بنزیل آدنین[1] در سه سطح ۰، ۰/۴ و ۱ میلی‌گرم در لیتر، اسید ایندول بوتیریک[2] در سه سطح ۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک بوده که در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال زراعی ۱۳۹۶ انجام شد. گیاهچه‌ها پس از ریشه‌دار شدن در محیط درون شیشه‌ای، به گلخانه منتقل گردیدند. بدین منظور از گلدان‌های کوچک نشایی حاوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۱:۱ استفاده شد. در طول دوره رشد مراقبت‌های لازم از جمله حفظ دائمی رطوبت خاک مد نظر قرار گرفت. بعد از یک ماه گیاهان سازگار شده در شرایط طبیعی محیط قرار گرفتند.

صفات بررسی شده: در این آزمایش پس از انجام ضدعفونی بهترین روش گندزدایی بر اساس نتایج حاصل از آزمایشی ابتدایی (نتایج ارائه نشده) انتخاب گردید. بعد از تعیین بهترین تیمار ضدعفونی، ریزنمونه‌های تهیه شده از جوانه جانبی در محیط هورمونی حاوی بنزیل آدنین در سه سطح ۰، ۰/۴ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و اسید ایندول بوتیریک در سه سطح ۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و بطور یکنواخت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک برای تمام تیمارها قرار گرفت. دو هفته پس از انجام کشت اصلی و رشد کافی ریزنمونه‌ها صفاتی مانند اندازه گیاه (کولیس دیجیتال)، تعداد برگ، تعداد گره، تعداد میانگره، طول برگ (کولیس دیجیتال)، طول پهنک (کولیس دیجیتال)، وزن گیاه (با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱)، تعداد ریشه و طول ریشه (کولیس دیجیتال) بررسی گردید. اندازه‌گیری کلروفیل‌ها و کارتنوئید به روش Lichtenthaler (۲۴) انجام پذیرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. رسم نمودار با استفاده از نرم‌افزار اکسل (۲۰۱۶) انجام شد.

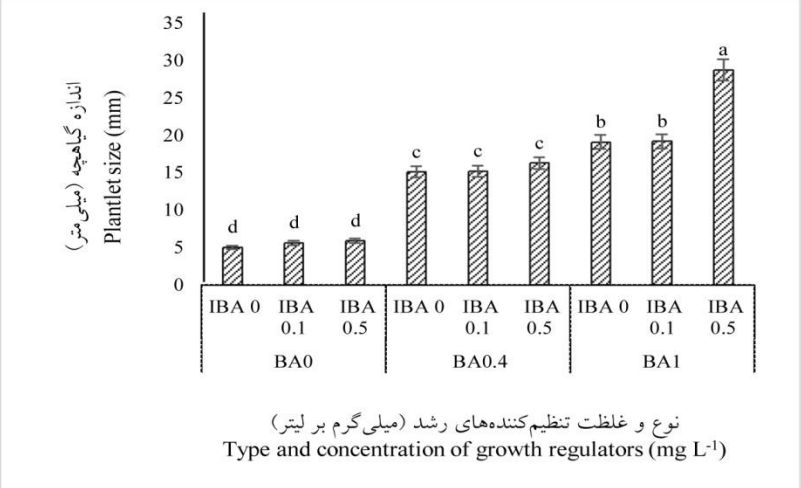
نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده بنزیل آدنین نیز بر تمام صفات رویشی اندازه‌گیری‌شده شامل تعداد برگ، تعداد گره، تعداد میانگره، طول برگ، طول پهنک، تعداد و طول ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید. در حالی‌که اثر ساده اسید ایندول بوتیریک تنها بر صفات تعداد و طول ریشه در سطح احتمال یک درصد و اثر متقابل این دو تنظیم‌کننده تنها بر اندازه گیاهچه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. هم‌چنین این دو تیمار روی وزن گیاهچه تأثیر معنی‌داری نداشتند.

اندازه گیاهچه با افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌ها افزایش یافت. هنگامی که بنزیل آدنین در محیط کشت حضور نداشت، استفاده از غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتیریک اثری بر اندازه گیاه نداشت. با اضافه شدن ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین اندازه گیاه نسبت به شاهد با افزایش سه برابری همراه بود. تنظیم‌کننده اسید ایندول بوتیریک با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و در حضور یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین بر اندازه گیاهچه اثرگذار بود، به طوری‌که در این تیمار جهشی در اندازه گیاه رخ داده و حدوداً شش برابر تیمار شاهد به‌دست آمد (شکل ۱). تکثیر و پرآوری و ریشه‌زایی شاخساره در کشت درون شیشه‌ای تحت‌تأثیر عوامل زیادی از جمله گونه، ژنوتیپ، رقم، محیط کشت، نمک‌های معدنی، مواد

1- Benzyladenine (BA)
2- Indolebutyric acid (IBA)

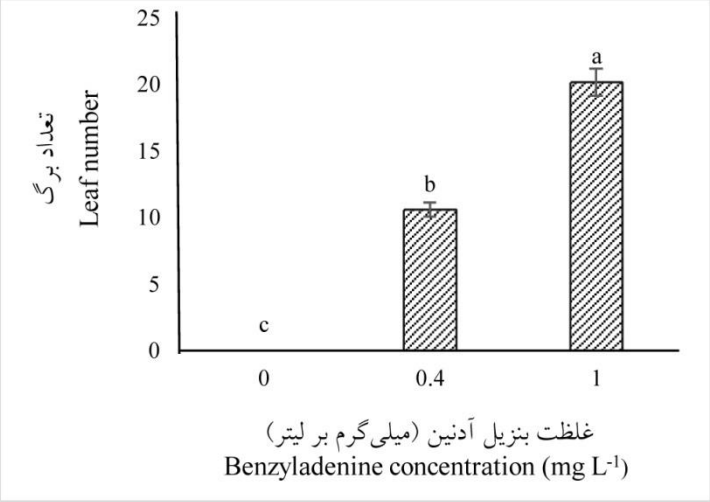
آلی، کربوهیدرات‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد و شرایط محیطی قرار می‌گیرد که از این بین، نقش نسبت اکسین به سیتوکینین از همه مهم‌تر است (۱۱). همان‌طور که قبلاً مشخص شده از سیتوکینین برای تحریک بیش‌تر رشد شاخساره، تقسیم سلول، گسترش سلول، از بین بردن چیرگی رأسی، تشکیل کلروفیل، جذب مواد غذایی و گسترش برگ استفاده می‌شود (۴). از طرفی دیگر هم اکسین‌ها هورمون‌های گیاهی هستند که جنبه‌های کلیدی رشد گیاه از جمله توسعه مریستم‌های شاخه، ریشه و گسترش سلول و کشیدگی سلول را کنترل می‌کنند (۲۲). با توجه به پژوهش‌های انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که اسید ایندول بوتیریک با افزایش تعداد ریشه منجر به انتقال سریع‌تر مواد غذایی به ساقه و در نهایت افزایش رشد گیاه می‌شود هم‌چنین از طریق کشیدگی سلول باعث طویل شدن گیاهچه می‌گردد (۴۲). در پژوهش‌های آکباش و همکاران (۲) بنزیل آدنین در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تعداد نوساقه‌های تولید شده به ازای هر ریزنمونه را به میزان ۱۰/۱۶ نوساقه افزایش داد. آن‌ها هم‌چنین اعلام کردند که نفتالین اسید استیک نقش بازدارندگی را در تولید نوساقه داشت به‌طوری‌که وقتی نفتالین اسید استیک به محیط افزوده شد میزان نوساقه‌زایی کاهش یافت و در برخی موارد هیچ‌گونه نوساقه‌زایی مشاهده نشد ولی ریزنمونه‌هایی که در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید ایندول استیک کشت یافته بودند به‌طور متوسط ۱۱/۲۵ نوساقه به ازای هر ریزنمونه مشاهده شد. ساباتینی و همکاران (۳۵) گزارش دادند که تمایز آغازین‌های ریشه از سلول‌های پارانشیم فلوئم بستگی به نوع و غلظت اکسین مورد استفاده دارد. علاوه برآن طبق گزارش ارائه شده توسط بلک اسلیف و چالدوکوت (۶) سلول‌های تمایز یافته نیاز به نوع و غلظت مناسبی از اکسین دارند تا قادر باشند به علایم و سیگنال‌های ارگانوژنیک پاسخ دهند. در بین اکسین‌های مختلف از لحاظ پایداری و سرعت انتقال تفاوت دیده می شود به‌طوری‌که نیسن و ساتر (۳۱) و هاوسمن (۱۳) نشان دادند که در محیط کشت بافت ایندول اسید استیک سریعاً تحت تجزیه نوری قرار می‌گیرد (۵۰ درصد در ۲۴ ساعت)؛ در حالی‌که تجزیه نوری اسید ایندول بوتیریک به آرامی صورت می‌گیرد (۱۰ درصد). حرکت کند اسید ایندول بوتیریک در داخل بافت و هم‌چنین تخریب دیرهنگام آن می‌تواند دلیل اصلی کارایی بهتر این اکسین در مقایسه با اسید ایندول استیک و نفتالین اسید استیک باشد.



شکل ۱- تأثیر برهمکنش نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر اندازه گیاهچه تمشک فرنگی.

Fig. 1. Interaction effect of plant growth regulators concentration and type on plantlet size of raspberry.

نتایج نشان داد که تعداد برگ تنها تحت‌تأثیر بنزیل آدنین قرار گرفت، بدین‌صورت که با افزایش غلظت این تنظیم‌کننده تعداد برگ افزایش معنی‌داری نشان داد. در شاهد هیچ برگی تولید نشد، اما با افزایش غلظت بنزیل آدنین، تعداد برگ با افزایش همراه بود، به طوری‌که در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر حدود ۲ برابر بیش‌تر از غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده گردید (شکل ۲). رشد اندام‌های گیاهی ناشی از فعالیت‌های ترکیبی بین تقسیم سلول و گسترش سلول است که هماهنگی بین این دو فرآیند به تعامل بین هورمون‌های مختلف که اندازه نهایی اندام را مشخص می‌کند بستگی دارد (۴۱). از طرفی هورمون اکسین اکثر جنبه‌های رشد و فیزیولوژی گیاه را کنترل یا تحت‌تأثیر قرار می‌دهد که به‌طور مثال در رابطه با برگ، اثرات مورفوژنیکی شامل کنترل پریموردیای برگ، کنترل تمایز آوندی و هم‌چنین کنترل گسترش برگ در هر دو مرحله تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلول می‌باشد که در نتیجه با افزایش سطح اکسین برگ‌ها کاهش می‌یابند (۱۸).

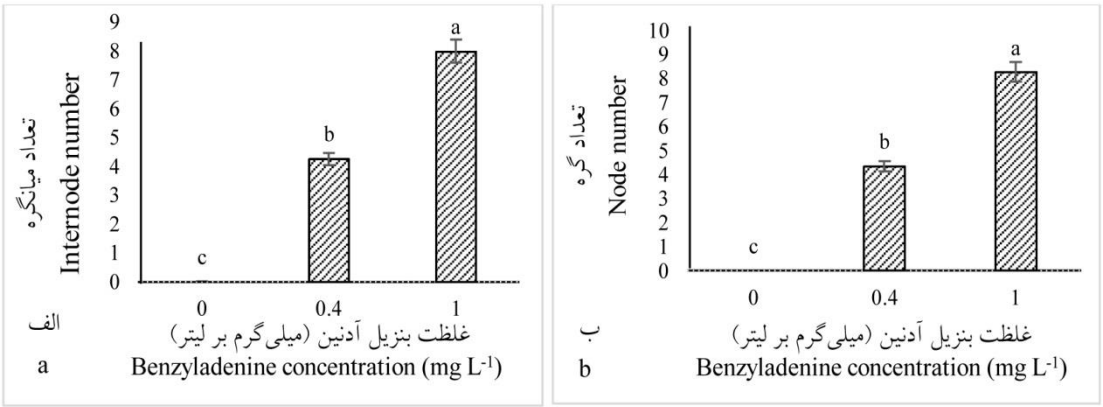


شکل ۲- تأثیر غلظت‌های بنزیل آدنین بر تعداد برگ ریزنمونه تمشک فرنگی.

Fig. 2. Effect of benzyladenine concentrations on leaf number of raspberry explant.

تعداد میانگره و گره هنگامی که از بنزیل آدنین استفاده گردید، افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان دادند. به طوری‌که در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر تعداد میانگره نسبت به غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر افزایشی در حدود ۲ برابر را نشان داد (شکل ۳- الف). تعداد گره نیز در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور متوسط ۴/۳۳ عدد گره و در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر به‌طور متوسط ۸/۲۵ عدد گره (۲ برابر) تولید گردید (شکل ۳- ب). در پژوهش‌های به عمل آمده توسط پژوهش‌گران بر روی تمشک فرنگی *R. ideaus*؛ بهترین ریزنمونه، جوانه جانبی بوده و محیط موراشیگ و اسکوگ مناسب‌ترین محیط برای تولید بیش‌ترین میزان گره و طول ساقه می‌باشد در این شرایط بهترین نتیجه در تیمار هورمونی بنزیل آدنین با غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر به همراه اسید ایندول بوتیریک با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است که با نتایج این پژوهش همخوانی ندارد (۲۷). با این‌حال ضمن توجه به تفاوت ارقام مورد

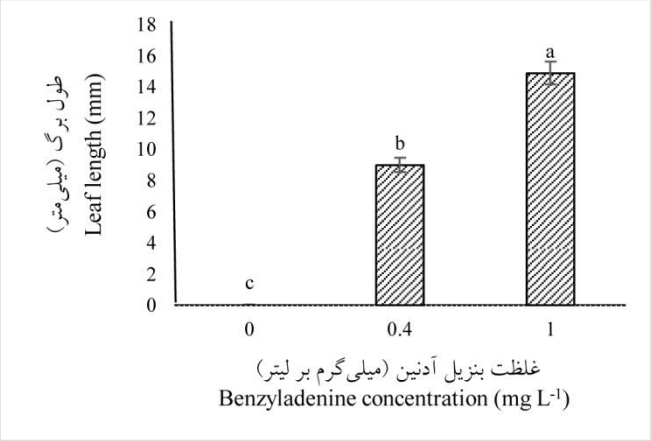
استفاده باید توجه داشت که موفقیت در کشت درون‌شیشه‌ای تا حد بسیار زیادی به تعادل هورمونی و مواد معدنی در محیط کشت بستگی دارد و هم‌چنین نشان داده شده که استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد به‌ویژه سیتوکینین‌ها بر میزان جذب و جابجایی مواد معدنی اساسی به‌خصوص نیتروژن در گیاهان تحت شرایط درون‌شیشه‌ای تأثیر می‌گذارد (۱۹ و ۳۲). مواد معدنی ترکیبات مهم محیط کشت هستند که در انواع محیط کشت‌ها به‌خصوص محیط موراشیگ و اسکوگ وجود دارد که این محیط کشت بر خلاف سایر محیط کشت‌ها دارای سطوح بالای نیتروژن، پتاسیم و برخی از عناصر ریزمغذی به‌ویژه بور و منگنز می‌باشد (۹). نیتروژن مهم‌ترین ترکیب معدنی است که باعث افزایش رشد گیاه، افزایش تعداد و طول میانگره، تعداد برگ، افزایش سطح برگ، افزایش تعداد ریشه و پهنک برگ می‌گردد (۴۰). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بنزیل آدنین با افزایش جذب مواد مغذی به‌خصوص نیتروژن از محیط کشت منجر به افزایش تعداد میانگره شده است.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های بنزیل آدنین بر تعداد میانگره (شکل الف) و گره (شکل ب) ریزنمونه تمشک فرنگی.

Fig. 3. The effect of benzyladenine concentrations on the number of internode (Fig. a) and node (Fig. b) of raspberry explant.

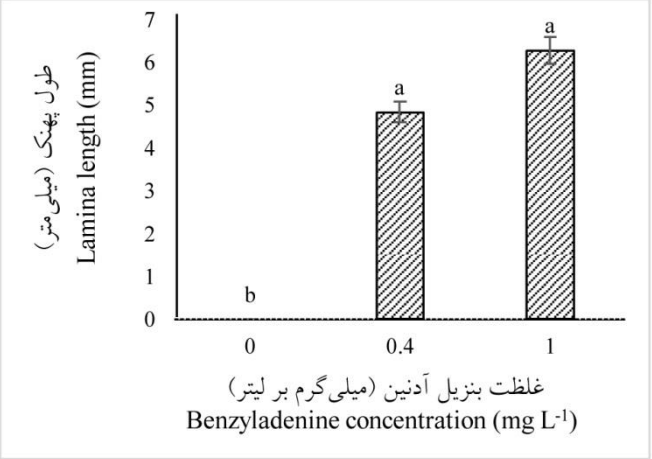
در بررسی طول برگ نتایج بیانگر آن بود که اگرچه در شاهد برگی وجود نداشت اما با اضافه شدن بنزیل آدنین و تولید برگ، بر طول برگ نیز اثر معنی‌داری داشت. در مقایسه دو غلظت بنزیل آدنین مشخص گردید که افزایش غلظت بنزیل آدنین موجب افزایش طول برگ شده است. به طوری‌که در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین با میانگین طول برگ ۱۴/۸۷ میلی‌متر و در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین طول برگ با میانگین ۸/۹۷ میلی‌متر مشاهده گردید (شکل ۴). تعداد سلول و اندازه سلول دو عامل اصلی تعیین‌کننده اندازه برگ هستند (۴۶). سیتوکینین یک نوع هورمون تقویت‌کننده رشد است که فرآیندهایی مانند رشد شاخساره، چیرگی رأسی، پیری و پیشرفت تکثیر سلولی را تنظیم می‌نماید و هم‌چنین این هورمون در گیاهان دولپه‌ای با تحریک تقسیم سلولی باعث رشد برگ می‌شود (۴۱).



شکل ۴- تأثیر غلظت‌های بنزیل آدنین بر طول برگ ریزنمونه تمشک فرنگی.

Fig. 4. The effect of benzyladenine concentrations on leaf length of raspberry explant.

طول پهنک در وجود و عدم وجود بنزیل آدنین در محیط کشت تفاوت معنی‌داری داشت. اگرچه دو غلظت ۰/۴ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند، اما با تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار نشان دادند (شکل ۵). از آن‌جایی‌که در سایر بخش‌ها نیز اشاره شد سیتوکینین در تقسیم سلولی، گسترش سلول، جذب مواد غذایی و رشد شاخساره نقش دارد که می‌تواند بر روی طول پهنک نیز تأثیر بگذارد (۱۹).

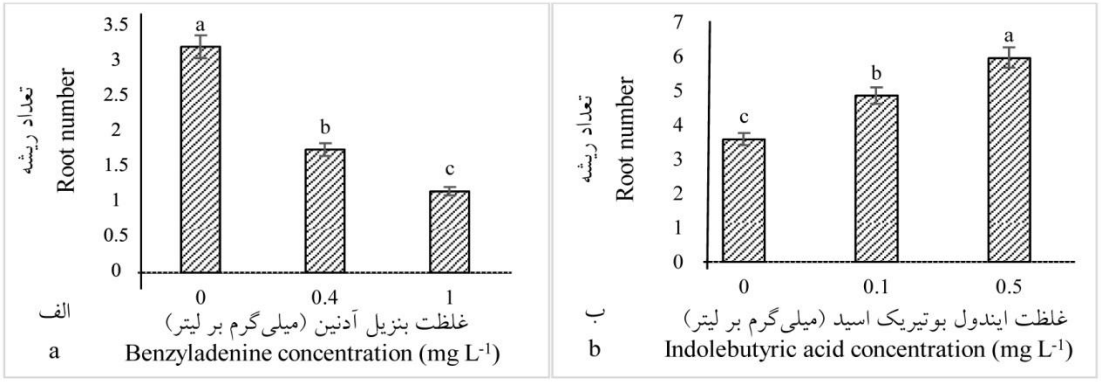


شکل ۵- تأثیر غلظت‌های بنزیل آدنین بر طول پهنک ریزنمونه تمشک فرنگی.

Fig. 5. The effect of benzyladenine concentrations on lamina length of raspberry explant.

نتایج بررسی تعداد ریشه نشان داد که این صفت هنگامی که سیتوکینین (بنزیل آدنین) در محیط کشت افزایش یافت، با کاهش همراه بود. به‌طوری‌که در تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین کم‌ترین تعداد ریشه به‌دست آمد (شکل ۶- الف). هم‌چنین اثر اسید ایندول بوتیریک بر تعداد ریشه بیانگر آن بود که استفاده از این اکسین موجب افزایش تعداد ریشه گردید (شکل ۶- ب). تشکیل ریشه‌های نابجا یک صفت ژنتیکی کمی است که توسط عوامل بیرونی (به‌خصوص نور، دما و رطوبت نسبی) و درونی (هورمون‌ها، قندها، نمک‌های معدنی و سایر مولکول‌ها) تنظیم می‌شود (۲۱). با توجه به تأثیر

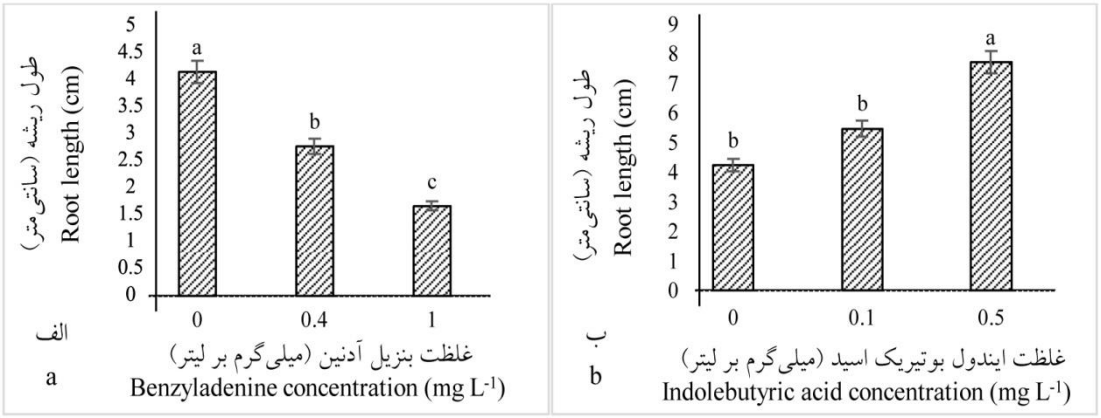
آنتاگونیستی اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها بر رشد مریستم شاخه و ریشه، جهت مورفوژنز گیاه بستگی به نسبت اکسین/سیتوکینین دارد (۴۴). از مدت‌ها قبل هورمون اکسین در فرآیند تشکیل ریشه‌های نابجا دخیل بوده است و مراحل فیزیولوژی وابسته به هم که شامل فرآیند ریشه‌زایی هم بوده با تغییرات در غلظت‌های درونی این هورمون همراه است (۳۷). نتایج به‌دست آمده با رقم‌های مختلف گونه‌های وحشی نشان داد که گیاه تمشک *R. ideaus* بالاترین پتانسیل ریشه‌زایی در محیط کشت نسبتاً ساده درون‌شیشه را دارد. کیفیت بالای ریشه‌زایی در کشت درون شیشه از نظر تعداد، طول و قدرت توسعه ریشه که پیش‌نیاز ضروری برای سازگاری با محیط خارج است گزارش شد (۱۲). در پژوهشی بر ریشه‌زایی انگور نشان داده شد که در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر اسید ایندول بوتیریک بیش‌ترین میزان ریشه‌زایی حاصل گردیده است (۱).



شکل ۶- تأثیر غلظت‌های بنزیل آدنین (شکل الف) و اسید ایندول بوتیریک (شکل ب) بر تعداد ریشه ریزنمونه تمشک فرنگی.

Fig. 6. Effect of concentrations of benzyladenine (Fig. a) and indolebutyric acid (Fig. b) on root number of raspberry explant.

اثر بنزیل آدنین بر طول ریشه نیز همانند تعداد آن منفی بود. به‌طوری‌که با افزایش غلظت این تنظیم‌کننده طول ریشه با کاهش همراه بود. بیش‌ترین طول ریشه در شاهد و کم‌ترین آن در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین حاصل شد (شکل ۷- الف). در بررسی اثر اسید ایندول بوتیریک مشخص گردید که افزایش غلظت آن موجب افزایش طول ریشه شد. در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بیش‌ترین طول ریشه و در شاهد کم‌ترین آن مشاهده گردید (شکل ۷- ب). تعداد و طول ریشه با افزایش اسید ایندول بوتیریک افزایش و با افزایش بنزیل آدنین کاهش یافت. بااین‌حال نتایج بررسی جعفری نجف‌آبادی و حمید اوغلی (۲۰۰۹) نشان داد که استفاده از اسید ایندول بوتیریک با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین اثر را بر طول و تعداد ریشه در کشت درون‌شیشه‌ای تمشک سیاه بی‌خار در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ داشته است که بیانگر تفاوت واکنش این دو گونه به غلظت مناسب اسید ایندول بوتیریک می‌باشد (۱۵). به‌طورکلی اکسین‌ها باعث تحریک ریشه‌زایی و سیتوکینین‌ها در غلظت‌های بالا (۰/۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث مهار یا تأخیر در تشکیل ریشه و هم‌چنین جلوگیری از رشد ریشه می‌شوند. به همین دلیل به‌طور معمول در مرحله ریشه‌زایی، سیتوکینین‌ها از محیط کشت ریشه‌زایی حذف می‌شوند. گاهی نیز به‌منظور کاهش مقدار سیتوکینین موجود در خود بافت‌ها بیش از یک مرتبه واکشت صورت می‌گیرد تا سطح سیتوکینین موجود در بافت‌ها به اندازه کافی کاهش یابد (۲۶).



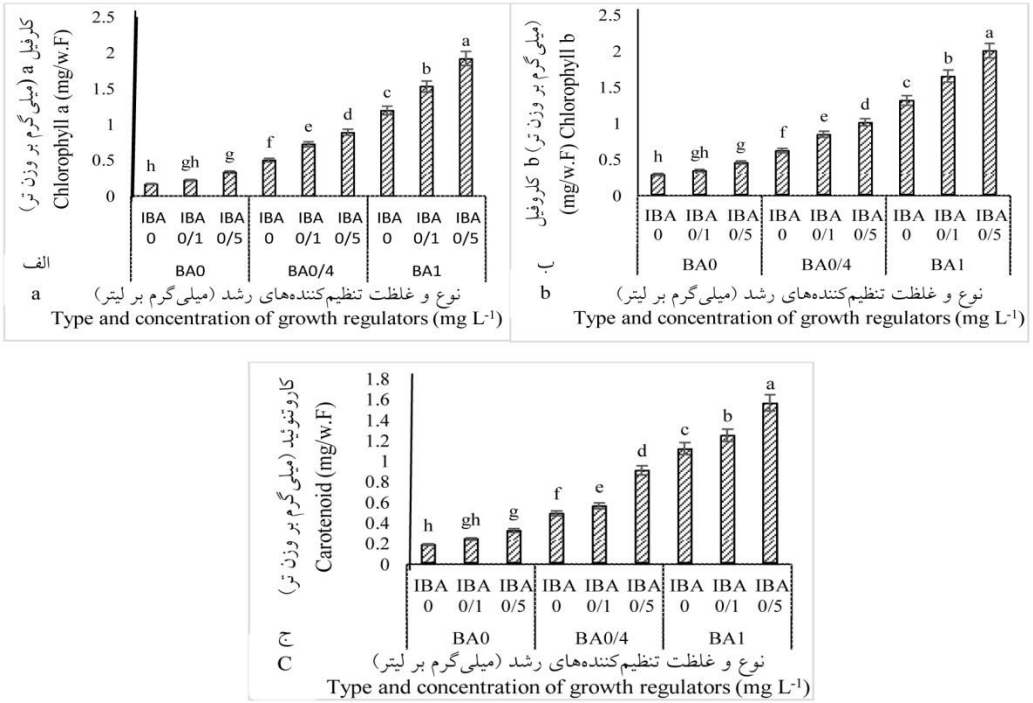
شکل ۷- تأثیر غلظت‌های بنزیل آدنین (شکل الف) و اسید ایندول بوتیریک (شکل ب) بر طول ریشه ریزنمونه تمشک فرنگی.

Fig. 7. Effect of concentrations of benzyladenine (Fig. a) and indolebutyric acid (Fig. b) on root length of raspberry explant.

رنگیزه‌های فتوسنتزی: در بررسی رنگیزه‌های فتوسنتزی مشخص گردید که اثر متقابل بنزیل آدنین و اسید ایندول بوتیریک بر کلروفیل a، b و کارتنوئید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید.

نتایج رنگیزه‌های فتوسنتزی بیانگر آن بود که نحوه واکنش کلرفیل a (شکل ۸- الف)، کلروفیل b (شکل ۸- ب) و کارتنوئید (شکل ۸- ج) نسبت به تنظیم‌کننده‌ها روند یکسانی را نشان دادند. با افزایش غلظت بنزیل آدنین به همراه اسید ایندول بوتیریک میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی افزایش یافت. به طوری‌که در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر اسید ایندول بوتیریک بیش‌ترین مقدار این رنگیزه‌ها به‌دست آمد. در حالی‌که نتایج مظفرزاده و همکاران (۲۰۱۴) روی تمشک فرنگی پریموکین نشان داده بود بیش‌ترین پاسخ رشد را این رقم به ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین داشته و از این لحاظ به‌نظر می‌رسد تفاوت ارقام مورد استفاده منجر به مشاهده نتایج متفاوت گردد (۲۸).

بیان شده است که اکسین ممکن است فعالیت RNase را سرکوب کند که باعث افزایش RNA و پروتئین و در نتیجه از پیری جلوگیری می‌شود (۱۷). هم‌چنین در میان تنظیم‌کننده‌های رشد، سیتوکینین‌ها نقش حیاتی در جهت افزایش تقسیم سلولی، بیوسنتز کلروفیل و تعدیل غالبیت انتهایی در گیاهان دارند (۳۹). سیتوکینین در نگهداری کلروفیل، پروتئین و سطوح RNA نقش مهمی دارد و هم‌چنین تیمار با این هورمون منجر به افزایش DNA کلروپلاست، تکثیر کلروپلاست، تشکیل گرانا و سنتز پروتئین می‌گردد، سطح رنگدانه را حفظ می‌کند، نفوذپذیری غشا را تغییر می‌دهد، بلوغ را تحت‌تأثیر قرار داده و در نتیجه پیری برگ را به تأخیر می‌اندازد (۳۶) و علاوه بر این نقش مهمی در توسعه و تمایز ساختاری کلروپلاست‌ها دارند (۷). در آزمایشی روی برگ‌های سیب در شرایط آزمایشگاهی با انواع سیتوکینین‌ها مانند بنزیل آدنین، بنزیل آدنین ریبوزید و ۳- هیدروکسی بنزیل آدنین درون محیط MS و ۳ هفته بعد از کاشت پژوهش‌گران دریافتند که محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و نسبت این دو وقتی بنزیل آدنین به تنهایی استفاده شده، بالاترین بود (۷). به نظر می‌رسد به همین دلیل کاربرد هم‌زمان این دو تنظیم‌کننده توانسته موجب افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی در ریزنمونه‌ها گردد.



شکل ۸- تأثیر برهمکنش نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر کلروفیل a (شکل الف)، کلروفیل b (شکل ب) و کارتنوئید (شکل ج).

Fig. 8. Interaction effect of plant growth regulators concentration and type on chlorophyll a (Fig. a), chlorophyll b (Fig. b) and carotenoid (Fig. c).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که در محیط کشت ریزنمونه‌های جوانه جانبی تمشک فرنگی، اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل آدنین و اسید ایندول بوتیریک به تنهایی و توأم بسته به نوع صفت متفاوت است. به‌طوری‌که استفاده از هورمون بنزیل آدنین به‌همراه غلظت‌های بالای اسید ایندول بوتیریک موجب افزایش اندازه گیاهچه و قطر دمبرگ شده است. غلظت‌های بالای بنزیل آدنین به تنهایی، صفات مربوط به رشد اندام هوایی مانند تعداد برگ، تعداد گره، تعداد میانگره، طول برگ، طول پهنک را افزایش و صفات ریشه گیاهچه‌ها شامل طول و تعداد ریشه را کاهش داد. اما از طرف دیگر استفاده از اسید ایندول بوتیریک در سطوح بالاتر تعداد و طول ریشه را افزایش داد. که بیانگر تقابل کارکردی این دو تنظیم‌کننده رشد بود. بررسی نتایج اثر بنزیل آدنین و اسید ایندول بوتیریک بر رنگیزه‌های فتوسنتزی این ابهام را که افزایش این تنظیم‌کننده‌ها چگونه موجب هم‌افزایی و بهبود اندازه گیاهچه شده است را حل نمود. به‌طوری‌که مشاهده شد (شکل ۹) با افزایش غلظت این تنظیم‌کننده‌ها، رنگیزه‌های مهم فتوسنتزی هم‌چون کلروفیل‌ها (a و b) و کارتنوئید افزایش نشان داده‌اند و فعالیت فتوسنتزی منجر تولید متابولیت‌های ضروری رشد گردیده است. به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت با دستیابی به نسبت متعادل بنزیل آدنین و اسید ایندول بوتیریک می‌تواند منجر به بهبود صفات رویشی گیاهچه تمشک گردد. اما در زمینه بهبود صفات ریشه‌زایی استفاده از اسید ایندول بوتیریک در غلظت‌های بالاتر اثرگذار است. نکته مهم این‌که تمشک فرنگی که از بافت و اندام‌های حساس‌تری نسبت به تمشک سیاه برخوردار است و نسبت به غلظت‌های پایین‌تر این تنظیم‌کننده رشد واکنش نشان می‌دهد. اما در بین تمشک‌های فرنگی مختلف، نوع پریموکین (همیشه بار) نسبت به نوع فلوریکین از نیاز هورمونی بالاتری برخوردار است و در غلظت بالاتری به بنزیل آدنین پاسخ داد.

شکل ۹- تأثیر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریزنمونه جوانه گیاه تمشک فرنگی رقم سپتامبر در محیط کشت MS به‌ترتیب از چپ به راست شاهد (شکل الف)، اسید ایندول بوتیریک (۰/۱ $mg\ L^{-1}$) بدون بنزیل آدنین (شکل ب)، اسید ایندول بوتیریک (۰/۵ $mg\ L^{-1}$) بدون بنزیل آدنین (شکل پ)، بنزیل آدنین (۰/۴ $mg\ L^{-1}$) بدون اسید ایندول بوتیریک (شکل ت)، بنزیل آدنین (۰/۴ $mg\ L^{-1}$) + اسید ایندول بوتیریک (۰/۱ $mg\ L^{-1}$) (شکل ث)، بنزیل آدنین (۰/۴ $mg\ L^{-1}$) + اسید ایندول بوتیریک (۰/۵ $mg\ L^{-1}$) (شکل ج)، بنزیل آدنین (۱ $mg\ L^{-1}$) بدون اسید ایندول بوتیریک (شکل چ)، بنزیل آدنین (۱ $mg\ L^{-1}$) + اسید ایندول بوتیریک (۰/۱ $mg\ L^{-1}$) (شکل ح)، بنزیل آدنین (۱ $mg\ L^{-1}$) + اسید ایندول بوتیریک (۰/۵ $mg\ L^{-1}$) (شکل خ)، نمونه ریشه‌دار شده (شکل د)، سازگاری (شکل ذ) و نهال (شکل ر).

Fig. 9. Effect of plant growth regulator concentration and type on plant bud explant of raspberry cv. September in culture medium of MS from left to right respectively: control (Fig. a), indole butyric acid (0.1 mg L^{-1}) without benzyl adenine (Fig. b), indole butyric acid (0.5 mg L^{-1}) without benzyl adenine (Fig. c), benzyl adenine (0.4 mg $^{-1}$) without indole butyric acid (Fig. d), benzyl adenine (0.4 mg L^{-1}) + indole butyric acid (0.1 mg L^{-1}) (Fig. e), benzyl adenine (0.4 mg L^{-1}) + indole butyric acid (0.5 mg L^{-1}) (Fig. f), benzyl adenine (1 mg L^{-1}) without indole butyric acid (Fig. g), benzyl adenine (1 mg L^{-1}) + indole butyric acid (0.1 mg L^{-1}) (Fig. h), benzyl adenine (1 mg $^{-1}$) + indole butyric acid (0.5 mg L^{-1}) (Fig. i), rooted simple (Fig. j), adaptability (Fig. k) and plant (Fig. l)

منابع

1. Abido, A.S., Aly, M.M., Hassanen, A.S. and Rayan, A.G. 2013. In vitro propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of Alexandria cv. for conservation of endangerment. Middle East J. Sci. Res. 13: 3. 328-337.
2. Akbaş, F., Işıkalan, Ç., Namlı, S. and Erol Ak, B. 2009. Effect of plant growth regulators on in vitro shoot multiplication of *Amygdalus communis* L. cv. Yaltsinki. Afr. J. Biotechnol. 8: 22. 6168-6174.
3. Almeyda, C., Talton, L. and Guzman, T. 2019. Production of berry crops nuclear stock at the micropropagation and repository unit. XII rubus and ribes symposium, 25-28 June, Zurikh, Switzerland, P O21. (In Persian)
4. Anjarsari, I.R.D., Hamdani, J.S., Suherman, C. and Nurmala, T. 2019. Effect of pruning and cytokinin application on the growth of tea GMB 7 clone. Asian J. Plant Sci. 18: 3. 110-116.
5. Batlang, U., Emongor, V.E. and Pule-Meulenburg, F. 2006. Effect of benzyladenine plus gibberellins and gibberellic acid on yield and yield components of cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. 'Tempo'). J. Agron. 5: 3. 418-423.
6. Blakesley, D. and Chaldecott, M.A. 1993. The role of endogenous auxin in root initiation. Plant Growth Regul. 13: 1. 77-84.
7. Dobranszki, J. and Mendler-Drienyovszki, N. 2014. Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. J. Plant Physiol. 171: 1472-1478.
8. Durgo, K., Belscak-Cvitanovic, A., Stancic, A., Jasna Franekic, J. and Komes, D. 2012. The bioactive potential of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) leaves in exhibiting cytotoxic and cytoprotective activity on human laryngeal carcinoma and colon adenocarcinoma. J. Med. Food. 15: 3. 258-268.
9. Fadel, D., Kintzios, S., Economou, A.S., Moschopoulou, G. and Constantinidou, H.I.A. 2010. Effect of different strength of medium on organogenesis, phenolic accumulation and antioxidant activity of spearmint (*Mentha spicata* L.). Open Hort. J. 3: 31-35.
10. FAO. 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations Website. in: http://www.faosat.org.
11. George, E.F., Hall, M.A. and Klerk, G.J.D. 2008. The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. Plant propagation by tissue culture, Springer, pp. 65-113.
12. Georgieva, M., Badjakov, I., Dincheva, I., Yancheva, S. and Kondakova, V. 2016. In vitro propagation of wild Bulgarian small berry fruits (bilberry, lingonberry, raspberry and strawberry). Bulg. J. Agric. Sci. 22: 46-51.
13. Hausman, J.F. 2003. Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised in vitro. Plant Growth Regul. 13: 3. 263-268.
14. Hoepfner, A.S. 1989. In vitro propagation of red raspberry. Acta Hort. 262: 285-288.
15. Jafari Najaf-Abadi, A. and Hamidoghli, Y. 2009. Micropropagation of thornless trailing blackberry (*Rubus* sp.) by axillary bud explants. Aust. J. Crop Sci. 3: 4. 191-194.
16. Jajarmi, V. 2019. The study of effects of cultural media and growth regulators concentration on regeneration and rhizogenesis of *Rubus* (blackberry). XII rubus and ribes symposium, 25-28 June, Zurikh, Switzerland, 37p. (In Persian)
17. Karatas, I., Ozturk, L., Ersahin, Y. and Okatan, Y. 2010. Effects of auxin on photosynthetic pigments and some enzyme activities during dark-induced senescence of tropaeolum leaves. Pak. J. Bot. 42: 3. 1881-1888.
18. Keller, Ch.P., Grundstad, M.L., Evanoff, M.A., Keith, J.D., Lentz, D.S., Wagner, S.L., Culler, A.H. and Cohen, J.D. 2011. Auxin-induced leaf blade expansion in Arabidopsis requires both wounding and detachment. Plant Signaling Behav. 6: 12. 1997-2007.
19. Kieber, J.J. and Schaller, G.E. 2014. Cytokinins. Arabidopsis Book. doi: 10.1199/tab.0168.

20.Knudson, L., Knudson, L. and Knudson, I. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. Amer. Orchid Soc. Bull. 15: 214-217.
21.Krajnc, A.U., Turinek, M. and Ivancic, A. 2013. Morphological and physiological changes during adventitious root formation as affected by auxin metabolism: Stimulatory effect of auxin containing seaweed extract treatment. Agricultural. 10: 1-2. 17-27.
22.Kurepa, J., Shull, T.E., Karunadasa, S.S. and Smalle, J.A. 2018. Modulation of auxin and cytokinin responses by early steps of the phenylpropanoid pathway. BMC Plant Biology. 18: 278. 1-15.
23.Lebedev, V., Arkaev, M., Dremova, M., Pozdniakov, I. and Shestibratov, K. 2019. Effects of growth regulators and gelling agents on ex vitro rooting of raspberry. Plants. 8: 1. 1-10.
24.Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymol. 148: 350-382.
25.Mangena, Ph. 2020. Benzyl adenine in plant tissue culture- succinct analysis of the overall influence in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] seed and shoot culture establishment. J. Biotech Res. 11: 23-34.
26.Meszaros, A. 2006. Application of methods suitable for improving the efficiency of in vitro propagation on horticultural plants. PhD Thesis, Corvinus University of Budapest.
27.Mozaffarzade, S.F., Hoseinpour, B., Ebrahimi, A. and Boshehri, M. 2014. The effect of different media and concentration of benzyl adenine on in vitro cultivation of raspberry (*Rubus idaeus*). The first International and 13th National Genetics Congress, 24-26 May, Tehran. (In Persian)
28.Mozaffarzadeh, S.F., Hosseinpour, B., Ebrahimi, A., Boushehri, S.M.Sh. and Torabi, S. 2014. The effects of different culture media on in vitro proliferation of Raspberry (*Rubus idaeus*). 1st International and 13th Iranian Crop Science Congress and 3rd Iranian Seed Science and Technology Congress, 24-26 August, Karaj. (In Persian)
29.Muller, D. and Leyser, O. 2011. Review: Part of a special issue on the plant cell cycle auxin, cytokinin and the control of shoot branching. Annals of Botany. 107: 1203-1212.
30.Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
31.Nissen, S.J. and Sutter, E.G. 1990. Stability of IAA and IBA in nutrient medium of several tissue culture procedures. HortScience. 25: 7. 800-802.
32.Oliveira, L.M.D., Paiva, R., Santana, J.R.F.D., Pereira, F.D., Nogueira, R.C. and Silva, L.C. 2010. Effects of cytokinins on in vitro mineral accumulation and bud development in *Annona glabra* L. Cienc. Agrotec. 34: 6. 1439-1445.
33.Padasht Dehkaei, M.N., Hassani, D. and Aghaei, M.J. 2019. The first report of blueberry and raspberry varieties imported to Iran. 11th Iranian Horticultural Science Congress, 26-29 August, Urmia University. (In Persian)
34.Reed, B., Poothong, S. and Hall, H. 2017. blackberries and their hybrids, Propagation of blackberries and related *Rubus* species. Harvey, K. and Hall, M.S. (Ed), New Zealand, 376p.
35.Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. and Scheres, B. 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. Cell. 99: 5. 463-472.
36.Sabovljevi, A., Sabovljevi, M. and Vukojevi, V. 2010. Effects of different cytokinins on chlorophyll retention in the moss *Bryum argenteum* (Bryaceae). Period. Biol. 112: 3. 301-305.
37.San Jose, M.C., Romero, L. and Janeiro, L.V. 2012. Effect of indole-3-butyric acid on root formation in alnus glutinosa microcuttings. Silva Fennica. 46: 5. 643-654.
38.Shomali, A. 2018. Evaluating in vitro rooting of loganberry (*Rubus loganobaccu*) affected by plant growth regulators. 1th National Congress of

Horticulture and Crop Production, 25 January, Gonbad-e Kavus. (In Persian)
39. Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. Plant Physiology, 4th edition. Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts, USA.
40. Thummanatsakun, V. and Yampracha, S. 2018. Effects of interaction between nitrogen and potassium on the growth and yield of cassava. Int. J. Agric. Technol. 14: 7. 2137-2150.
41. Uyehara, A.N., Valle-Echevarria, A.R.D., Hunter, Ch.T., Nelissen, H., Demuynck, K., Cahill, J.F., Jander, G. and Muszynski, M.G. 2019. Cytokinin promotes jasmonic acid accumulation in the control of maize leaf growth. bioRxiv. doi: https://doi.org/ 10.1101/ 760405.
42. Waheed, A., Hamid, F.S., Ahmad, H., Abbassi, F.M., Aslam, S., Shah, A.H., Ahmad, N., Naheed, Z., Ali, H. and Khan, N. 2015. Effect of indole butyric acid (IBA) on early root formation (tomato "Sahil" hybrid) cuttings. J. Mater. Environ. Sci. 6: 1. 272-279.
43. Weber, C. 2013. Propagation. In raspberries, by R.C. Funt & Hall. H.K. CABI. 83p.
44. Wroblewska, K. 2013. Benzyl adenine effect on rooting and axillary shoot out growth of *Gaura lindheimeri Engelm*. A. Gray cuttings. Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus. 12: 3. 127-136.
45. Wu, J.H., Miller, S.A., Hall, H.K. and Mooney, P.A. 2009. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 99: 17-25.
46. Wu, Y., Gong W. and Yang, W. 2017. Shade inhibits leaf size by controlling cell proliferation and enlargement in soybean. Sci. Rep. 7: 9259.