

بهینه‌سازی تولید پینه و اندام‌زایی دو رقم تجاری گلابول (*Gladiolus grandiflorus* L. cv Amsterdam, Advance Red)

سیده رضیه موسوی متین^۱، سید نجم‌الدین مرتضوی^۱، پژمان آزادی^{۲،۳*} و میترا اعلایی^۱

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ^۲ پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج (ABRII)، ^۳ پژوهشکده گل و گیاهان زینتی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی محلات (AREEO)

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۰۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۱۱/۰۲)

چکیده

گلابول به‌عنوان یک گیاه زینتی با ارزش اقتصادی بالا در سراسر جهان کشت می‌شود و در ایران با دارابودن بالاترین سطح زیر کشت و بیشترین میزان واردات اندام زیرزمینی جایگاه خاصی دارد. در این تحقیق، به‌منظور بررسی باززایی غیرمستقیم ارقام Amsterdam و Advance Red آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. جهت تولید پینه، ریزنمونه‌های جوانه چشمی (بخش راسی)، قطعات پدازه (بخش میانی) و صفحه پایگاهی (بخش تحتانی) پدازه در ابعاد یک سانتی‌متر مربع در محیط پایه MS به‌همراه غلظت‌های مختلف پیکلورام، دایکامبا، BAP، کایتین، NAA و 2,4,5-T کشت شدند. در مرحله باززایی، غلظت‌های مختلف TDZ و GA₃ در ترکیب با آمینواسیدهای پرولین و گلوتامین استفاده شد. براساس نتایج به‌دست آمده، در محیط حاوی ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر دایکامبا ریزنمونه جوانه چشمی بالاترین میزان پینه‌زایی را (به‌ترتیب ۷۷/۴۷ و ۷۵/۹۱ درصد در ارقام Amsterdam و Advance Red) نشان داد. بالاترین درصد باززایی (به‌ترتیب ۸۱/۱۱ و ۷۵/۵۷ درصد در ارقام Amsterdam و Advance Red) و بیشترین تعداد شاخساره (به‌ترتیب ۲۳/۶۹ و ۲۰/۱۹ شاخه در ارقام Amsterdam و Advance Red) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA₃، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین به‌دست آمد. بالاترین درصد ریشه‌زایی (به‌ترتیب ۸۴/۴۱ و ۸۲/۵۰ درصد در ارقام Amsterdam و Advance Red) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال تولید شد. گیاهچه‌های تولیدی با موفقیت در شرایط گلخانه سازگار شدند.

واژه‌های کلیدی: پرولین، پیکلورام، جوانه چشمی، دایکامبا، گلوتامین، 2,4,5-T

مقدمه

(2009). گلابول به‌عنوان گل شاخه بریده، باغچه‌ای و گلدانی کاربرد دارد و به‌خاطر ساقه بلند گل‌دهنده و عمر طولانی گل بریدنی شهرت خاصی دارد (Goo et al., 2003). با وجود اینکه در سطح بین‌المللی گل‌های داوودی، میخک و رز

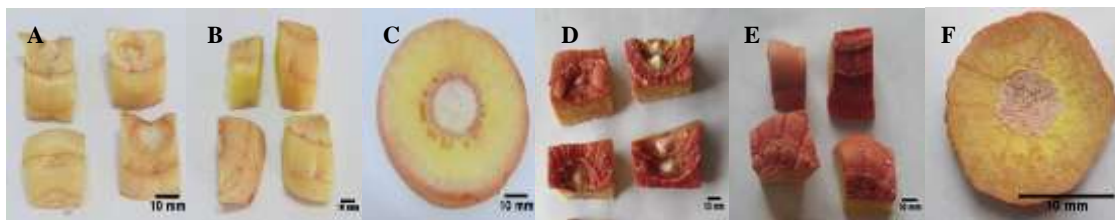
گلابول با نام علمی *Gladiolus grandiflorus* L. متعلق به خانواده ایریداسه (Iridaceae) و بومی آفریقای جنوبی است که امروزه در سراسر دنیا کشت می‌شود (Ramos-Garci et al.,

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: azadip22@gmail.com

خروج ارز از کشور جلوگیری می‌کند. کشت بافت گلابول را می‌توان به هر دو روش بازرایی مستقیم و غیرمستقیم انجام داد (Memon, 2012). بازرایی غیرمستقیم از طریق پینه در برنامه‌های اصلاحی از طریق مهندسی ژنتیک نیز کاربرد دارد (Wu et al., 2015). در طول سال‌های اخیر، ترکیبات محیطی و ریزنمونه‌های متعددی جهت بازرایی غیرمستقیم ارقام مختلف گلابول گزارش شده است (Ziv and Lilien-Kipnis, 2000; Pragma et al., 2012). براساس پژوهش‌های پیشین، ریزنمونه پداژک و قسمت‌های مختلف ساقه گل‌دهنده در محیط پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) همراه با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد (Plant Growth Regulators) Xu et al., 2009; Wu et al., 2015). کاربرد نفتالین استیک اسید (NAA) یا ۲،۴-دی کلروفونوکسی استیک اسید (2,4-D) به مقدار ۲ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در پینه‌زایی گلابول نقش عمده ایفا می‌کند (Bajaj et al., 1994; Stefaniak, 1994). پتانسیل بازرایی شاخساره از پینه در گیاهان مختلف علاوه بر ژنوتیپ و انتخاب ریزنمونه به ترکیب و غلظت نمک‌های پایه، تنظیم‌کننده‌های رشد و ترکیبات ارگانیک نیز بستگی دارد (Singh et al., 2018). در بازرایی گلابول غالباً از سابتوکینین‌های بنزیل آدنین (BAP) یا کایتین (Kinetin) به مقدار ۱ تا ۴ میلی‌گرم در لیتر استفاده می‌شود (Sinha and Roy, 2002; Pragma et al., 2012). بررسی‌ها نشان می‌دهد استفاده از منابع ارگانیک نیتروژن مانند آمینواسیدهای پرولین و گلوتامین در ترکیب محیط‌های کشت گیاهان مختلف می‌تواند باعث بهبود پینه‌زایی و بازرایی شود (Pawar et al., 2015).

براساس بررسی‌های انجام‌شده، در مورد تأثیر اکسین‌های پیکلورام، 2,4,5-T و آمینواسیدهای مختلف در تولید پینه و بازرایی ارقام گلابول گزارشی وجود ندارد. در این پژوهش سعی شده است تولید پینه در ریزنمونه‌های قسمت‌های مختلف پداژ (راسی، میانی و تحتانی) در غلظت‌های پایین‌تری از تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف (حداکثر ۲ میلی‌گرم در لیتر) بررسی شود. علاوه بر این، تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد در

به‌ترتیب مهم‌ترین گل‌های بریدنی دنیا هستند ولی در ایران گلابول اهمیت بیشتری دارد و بالاترین سطح زیر کشت از گیاهان زینتی را به خود اختصاص داده است (فخرایی لاهیجی و همکاران، ۱۳۹۰). گردش مالی سالیانه این گل در بازارهای بین‌المللی بالغ بر ۹ میلیون یورو برآورد شده است (Azadi et al., 2016) و با واردات بیش از ۵۰ میلیون عدد پداژ در ایران، بیشترین میزان واردات سالانه اندام زیرزمینی را در بین سایر گل‌های پیازی دارد. از طرف دیگر با توجه به ویژگی‌های پس از برداشت گلابول، قابلیت صادرات گل شاخه بریده آن به کشورهای همسایه وجود دارد (حسن‌پور اصیل و همکاران، ۱۳۹۳). در سال‌های اخیر به لطف پیشرفت برنامه‌های اصلاحی و دو رگ‌گیری رنگ‌های مختلف گلابول (سفید، کرم، زرد، صورتی، نارنجی، بنفش، آبی و قرمز) با تقاضای قابل‌توجهی در بازار جهانی مواجه شده است (Singh et al., 2018). ارقام تجاری Amsterdam (گل سفید) و Advance Red (گل قرمز) سال‌هاست در ایران کشت می‌شوند و بازارپسندی بالایی دارند. افزایش انبوه گلابول از طریق روش مرسوم جداسازی پداژ و پداژک است که نه تنها کارایی بالایی ندارد، بلکه باعث افزایش آلودگی به عوامل بیماری‌زا در مراحل کشت و انبارداری می‌شود (ناظریان و همکاران، ۱۳۹۲). از آنجا که تکنیک کشت بافت برای تکثیر انبوه در کاربردهای تجاری گیاهان مختلف به‌ویژه گل و گیاهان زینتی به‌خوبی مورد بهره‌برداری قرار گرفته است (Azadi et al., 2016)، بکارگیری این تکنیک به‌عنوان روش جایگزین در تولید گلابول نیز ضروری است. از مهم‌ترین مزیت‌های کشت بافت به‌صورت تجاری می‌توان به تکثیر سریع ارقام، افزایش ظرفیت تولید در زمان کوتاه، تولید گیاه عاری از بیماری، تولید گیاهان یکسان ژنتیکی، سرعت بخشیدن به برنامه‌های اصلاحی و تولید چند نسل در سال اشاره کرد (Kamo, 1995; Xu et al., 2009; Wu et al., 2015; Naloussi et al., 2019). استفاده از روش کشت بافت در تولید انبوه گلابول با کاهش خسارات افزایش سنتی، افزایش کیفیت تولید (جعفری مفید آبادی و کریمی، ۱۳۹۳) و صرفه‌جویی در وقت و انرژی، موجب خودکفایی صنعت گل و گیاه شده و از



شکل ۱- ریزنمونه‌های مختلف ارقام گلابول: A و D) جوانه چشمی، B و E) قطعات پدازه و C و F) صفحه پایگاهی (A-C رقم Amsterdam و D-F رقم Advance Red)

پینه‌زایی: جهت بررسی تولید پینه، ریزنمونه‌های مختلف در محیط پایه MS به‌همراه غلظت‌های مختلف BAP (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر)، کاینترین (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، NAA (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، پیکلورام (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، 2,4,5-T (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و دایکامبا (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، کشت گردید. بعد از گذشت یک ماه درصد پینه‌زایی ریزنمونه‌های مختلف طبق رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$\text{درصد پینه} = \frac{\text{تعداد پینه تشکیل شده}}{\text{تعداد کل ریز نمونه کشت شده}} \times 100$$

باززایی: پینه تکثیرشده جهت باززایی در محیط پایه MS با غلظت‌های مختلف TDZ (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، GA₃ (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، پرولین (صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و گلوتامین (صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت شد. پس از گذشت دو ماه درصد باززایی (رابطه ۲)، تعداد و ارتفاع شاخساره اندازه‌گیری گردید.

$$\text{درصد باز زایی} = \frac{\text{تعداد پینه باززایی شده}}{\text{تعداد پینه‌های انتقال داده شده}} \times 100$$

ریشه‌زایی: شاخه‌های پرآوری‌شده با حداقل ارتفاع ۴۰ میلی‌متر به‌منظور ریشه‌زایی به‌صورت جداگانه در محیط پایه MS با غلظت‌های مختلف IAA (ایندول استیک اسید) (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و زغال فعال (صفر، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. پس از دو هفته درصد ریشه‌زایی توسط رابطه ۳، ارزیابی شد.

ترکیب با آمینواسیدهای با منشا ارگانیک بر اندام‌زایی ارقام تجاری Advance Red و Amsterdam گلابول نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: پدازه‌های سالم و یکسان ارقام تجاری Advance Red و Amsterdam گلابول با قطر ۴۵-۴۰ میلی‌متر (بعد از گذراندن دوره خواب به‌مدت دو ماه در انبار با شرایط تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) انتخاب شدند. پس از حذف فلس‌های سطحی پدازه‌ها، جوانه چشمی، قطعات پدازه فاقد جوانه و صفحه پایگاهی به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفت.

زمان و مکان اجرای آزمایش: این آزمایش در طی سال‌های ۹۷-۱۳۹۶ در آزمایشگاه کشت‌بافت گیاهی پژوهشکده گل و گیاهان زینتی محلات انجام شد.

ضدعفونی ریزنمونه: پس از حذف آلودگی ظاهری و پوسته خارجی پدازه‌ها ریزنمونه جوانه چشمی از قسمت راسی، ریزنمونه قطعات پدازه فاقد جوانه از قسمت میانی و ریزنمونه صفحه پایگاهی از قسمت تحتانی پدازه در ابعاد ۱ سانتی‌متر مربع جدا گردیدند (شکل ۱) و پس از آن به‌مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند. سپس ریز نمونه‌ها در زیر محفظه استریل هود لامینار به‌ترتیب با محلول اتانول ۷۰ درصد (۱ دقیقه)، بنومیل ۲ در هزار (۱۵ دقیقه) و هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد (۱۰ دقیقه) ضدعفونی شدند. درنهایت جهت شستشوی مواد ضدعفونی‌کننده، ریز نمونه‌ها چهار بار متوالی با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

رابطه ۳

$$\text{درصد ریشه زایی} = \frac{\text{تعداد شاخه‌های ریشه دار شده}}{\text{تعداد شاخه‌های انتقال داده شده}} \times 100$$

شرایط نگهداری: شرایط نگهداری ریز نمونه‌ها در مراحل مختلف کشت شامل ۱۶ ساعت فتوپریود ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$) تحت نور لامپ سفید فلورسنت، دمای 26 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 60 ± 10 درصد بود. واكشت ریز نمونه‌ها به فاصله زمانی دو هفته یکبار انجام شد.

سازگاری: پس از خارج کردن گیاهچه‌ها از محیط کشت به منظور حذف آگار ریشه‌ها با آب جاری شسته شدند. سپس گیاهچه‌ها در ترکیب استریل کوکویت و پرلایت (۱:۱) کشت و پس از گذشت ۳ هفته گیاهان به گلدان بزرگ‌تری منتقل گردیدند. قبل از انتقال به گلخانه گلدان‌ها در شرایط محیطی کنترل شده با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 60 ± 10 نگهداری شدند.

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی (برای هر رقم به صورت جداگانه) با سه تکرار و پنج ریزنمونه در هر تکرار انجام گردید. تجزیه داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر پینه‌زایی: ده روز بعد از کشت اولیه، پینه‌زایی در ریزنمونه‌ها با سرعت متفاوتی آغاز شد. براساس مقایسه میانگین تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد، تأثیر معنی‌داری بر پینه‌زایی ریزنمونه‌های پدازه گلايول نشان دادند (جدول ۱). در تیمار MS فاقد تنظیم‌کننده رشد، هیچ‌کدام از ریز نمونه‌ها پینه‌زایی نداشتند. بالاترین میزان پینه‌زایی ریزنمونه جوانه چشمی رقم Amsterdam در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر دایکامبا ($77/47$ درصد) به دست آمد که با تیمار ترکیبی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (76 درصد) تفاوت معنی‌داری نداشت. بیشترین میزان پینه‌زایی

ریزنمونه‌های قطعات پدازه و صفحه پایگاهی رقم Amsterdam در تیمارهای ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4,5-T و ۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام (به ترتیب $64/47$ و $45/62$ درصد) مشاهده شد (شکل ۲ A, C). بالاترین میزان پینه‌زایی ریزنمونه جوانه چشمی Advance Red در تیمار ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر دایکامبا (به ترتیب $75/91$ و $75/33$ درصد) تولید شد. بیشترین میزان پینه‌زایی ریزنمونه‌های قطعات پدازه و صفحه پایگاهی رقم Advance Red نیز در تیمارهای ۲ میلی‌گرم در لیتر دایکامبا و ۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام (به ترتیب $56/03$ و $38/29$ درصد) مشاهده شد (شکل ۳ F, D). براساس نتایج به دست آمده، پینه حاصل از ریزنمونه جوانه چشمی (تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر) دایکامبا که از لحاظ کیفیت و حجم نسبت به سایر تیمارها بهتر بود در هر دو رقم انتخاب و در محیط ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D تکثیر شد.

به طور کلی، در نتیجه ترکیب غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سابتوکین پینه در گیاهان مختلف القا می‌شود (Ikeuchi et al., 2013). پینه‌زایی در ارقام مختلف گلايول در حضور اکسین‌ها به تنهایی یا در ترکیب با مقادیر کم سابتوکین صورت می‌گیرد (Pragya et al., 2012). در سایر گیاهان پیازی به علت چندساله و تک‌لپه بودن ریزنمونه‌های جنین، مریستم یا جوانه پینه‌زایی بهتری دارند (Nesi et al., 2009). طبق مطالعات پیشین پینه‌زایی ریزنمونه‌های برگ (Bajaj et al., 1983)، قطعات پدازه (Stefaniak, 1994)، پدازک (Sinha and Roy, 2002) و گل آذین (Xu et al., 2009) گلايول، در غلظت‌های ۲ تا ۱۰ میلی‌گرم در NAA یا 2,4-D حاصل شد. تأثیر مثبت دایکامبا (۲ میلی‌گرم در لیتر) بر جنین‌زایی برخی ارقام گلايول اثبات شده است (Kamo, 1995). در مورد تأثیر اکسین‌های پیکلورام و 2,4,5-T بر پینه‌زایی سایر ارقام گلايول گزارشی وجود ندارد. در این پژوهش سعی شده است پینه‌زایی سایر قسمت‌های پدازه در غلظت‌های پایین‌تری از تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف (حداکثر ۲ میلی‌گرم در لیتر) بررسی شود. طبق نتایج به دست آمده از این پژوهش، علاوه بر جوانه چشمی می‌توان از سایر

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد پنبه‌زایی ریزنمونه‌های مختلف گلابول

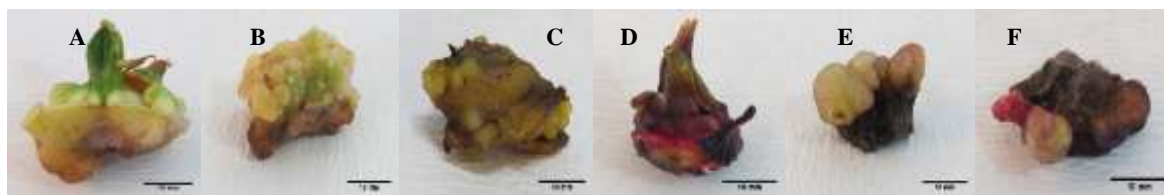
پنبه‌زایی (درصد)			تنظیم‌کننده‌های رشد (میلی‌گرم در لیتر)					
cv. Amsterdam			Dicamba	2,4,5-T	Picloram	NAA	Kinetin	BAP
صفحه پایگاهی	قطعات پدازه	جوانه چشمی						
ج	ج	ج
ج	ج	۸/۲۰±۰/۲۰ ⁱ	۰/۵
ج	۱۴/۱۲±۰/۳۵ ⁱ	۱۲/۶۵±۰/۲۴ ^h	۰/۵	۰/۵
۱۰/۴۵±۰/۷۳ ⁱ	۱۶/۸۵±۰/۳۷ ^h	۳۱/۰۳±۰/۶۴ ^g	.	.	.	۰/۵	۰/۵	۰/۵
۱۳/۳۷±۰/۲۸ ^h	۲۰/۲۱±۰/۴۱ ^g	۷۶/۰۰±۰/۸۶ ^a	.	.	.	۰/۵	۰/۵	۱
۲۰/۱۳±۰/۸۴ ^f	۲۵/۴۷±۰/۴۲ ^f	۶۰/۵۴±۰/۷۴ ^d	.	.	.	۱	۱	۱/۵
۴۰/۳۲±۰/۱۹ ^b	۲۶/۲۳±۰/۱۶ ^f	۶۵/۱۱±۰/۸۹ ^c	.	.	۱	.	.	.
۴۵/۶۲±۰/۷۲ ^a	۳۵/۹۶±۰/۹۷ ^e	۷۰/۱۳±۰/۸۷ ^b	.	.	۲	.	.	.
۲۵/۳۲±۰/۴۶ ^c	۶۰/۴۸±۰/۷۶ ^b	۴۵/۰۸±۰/۹۴ ^f	.	۱
۳۰/۱۸±۰/۱۹ ^c	۶۴/۴۷±۰/۵۲ ^a	۴۸/۷±۰/۹۸ ^e	.	۲
۱۸/۲۹±۰/۸۵ ^g	۴۲/۰۶±۰/۸۱ ^d	۷۰/۶۳±۱/۶۳ ^b	۱
۲۱/۵۰±۰/۸۴ ^e	۴۸/۱۳±۰/۹۴ ^c	۷۷/۴۸±۰/۴۵ ^a	۲

حروف مشابه در هر ستون عدم تفاوت معنی‌دار را در آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال یک درصد نشان می‌دهد. تمام داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده‌اند.

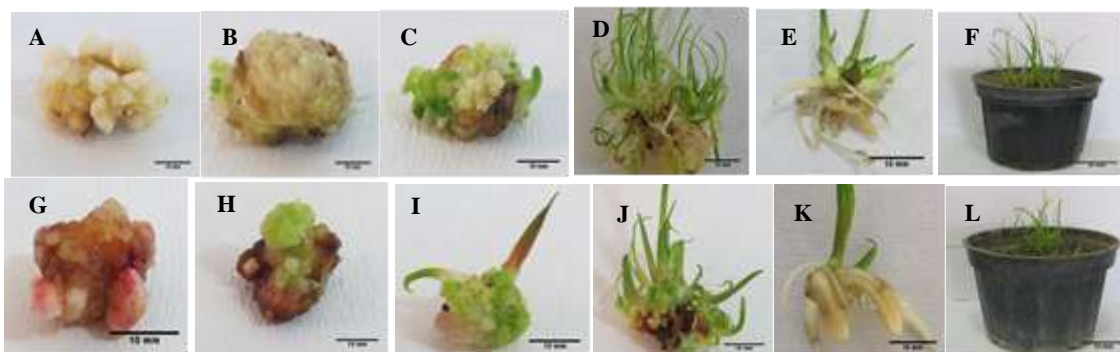
ادامه جدول ۱-

پنبه‌زایی (درصد)			تنظیم‌کننده‌های رشد (میلی‌گرم در لیتر)					
cv. Advance Red			Dicamba	2,4,5-T	Picloram	NAA	Kinetin	BAP
صفحه پایگاهی	قطعات پدازه	جوانه چشمی						
ج	ج	ج
ج	۵/۳۳±۰/۲۰ ^k	ج	۰/۵
ج	۱۰/۲۴±۰/۲۴ ^j	۱۹/۶۶±۰/۶۰ ⁱ	۰/۵	۰/۵
۸/۱۶±۰/۱۹ ^h	۱۲/۵۶±۰/۸۴ ⁱ	۴۵/۴۵±۰/۲۲ ^h	.	.	.	۰/۵	۰/۵	۰/۵
۱۶/۲۱±۰/۲۵ ^f	۱۲/۱۸±۰/۶۰ ^h	۶۸/۳۵±۰/۷۵ ^c	.	.	.	۰/۵	۰/۵	۱
۱۹/۷۵±۰/۱۲ ^e	۲۱/۴۴±۰/۳۸ ^g	۶۵/۱۸±۰/۵۸ ^d	.	.	.	۱	۱	۱/۵
۳۱/۲۶±۰/۴۵ ^c	۲۵/۴۳±۰/۹۹ ^f	۵۵/۷۳±۰/۶۳ ^e	.	.	۱	.	.	.
۳۸/۲۹±۰/۹۵ ^a	۳۲/۳۴±۰/۶۲ ^d	۷۰/۵۰±۰/۸۸ ^b	.	.	۲	.	.	.
۲۸/۴۶±۰/۹۳ ^d	۳۸/۳۳±۰/۷۵ ^c	۵۲/۸۰±۰/۹۴ ^g	.	۱
۳۴/۵۳±۰/۷۳ ^b	۲۹/۲۸±۰/۴۵ ^e	۵۷/۱۱±۰/۶۲ ^e	.	۲
۱۵/۰۷±۰/۱۹ ^g	۵۲/۱۶±۰/۸۶ ^b	۷۵/۹۱±۰/۶۴ ^a	۱
۱۵/۲۱±۰/۶۷ ^g	۵۶/۰۳±۰/۶۷ ^a	۷۵/۳۳±۰/۲۸ ^a	۲

حروف مشابه در هر ستون عدم تفاوت معنی‌دار را در آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال یک درصد نشان می‌دهد. تمام داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده‌اند.



شکل ۲- پینه‌زایی ریزنمونه‌های مختلف گلابول: A و D) جوانه چشمی، B و E) قطعات پدازه، C و F) صفحه پایگاهی، (A-C) رقم Amsterdam و D-F) رقم Advance Red



شکل ۳- مراحل مختلف باززایی غیرمستقیم گلابول: A و G) پینه تکثیرشده، B و H) مراحل اولیه باززایی شاخساره، C و I) شکل‌گیری شاخساره‌های اولیه، D و J) توسعه کامل شاخساره، E و K) ریشه‌زایی گیاهچه‌ها، F و L) گیاهچه‌های سازگار شده در ترکیب کوکویت و پرلایت (۱:۱)، A-F) رقم Amsterdam و G-L) رقم Advance Red

شاخساره (به ترتیب ۵۵/۱۱ و ۵۳/۳۰ میلی‌متر در ارقام Amsterdam و Advance Red) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ، ۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3 ، ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین مشاهده شد (شکل A-D و G-J-۳).

کیفیت پینه تأثیر مستقیم بر پتانسیل باززایی گلابول دارد و تحت تأثیر نوع ریزنمونه و سایتوکینین‌ها قرار می‌گیرد (Sen and Sen, 1995). TDZ یک سایتوکینین فاقد پورین است که در اغلب گیاهان نسبت به بنزیل آدنین تأثیر بیشتری در باززایی و پرآوری دارد (Liu et al., 2018). در پژوهش‌های پیشین، TDZ (۳ و ۶ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با NAA (۶ میلی‌گرم در لیتر) یا BA (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) بر پینه‌زایی رقم Advance Red تأثیر مثبتی نشان داد ولی در مورد تأثیر آن بر باززایی سایر ارقام گلابول گزارشی وجود ندارد (Xu et al., 2009; Wu et al., 2015). GA_3 محرک مثبتی برای افزایش ارتفاع شاخساره در باززایی گلابول محسوب می‌شود

قسمت‌های پدازه در تیمار مناسب پینه تولید و تکثیر کرد. استفاده از پینه علاوه بر تولید مداوم گیاهچه در تمام سال، امکان انجام برنامه‌های اصلاح درون شیشه‌ای از طریق مهندسی ژنتیک یا جهش‌زایی نیز وجود دارد (Wu et al., 2015).

تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد و آمینواسیدها بر باززایی: براساس مقایسه میانگین تیمارهای ترکیبی تنظیم‌کننده‌های رشد و آمینواسیدها بر باززایی ارقام گلابول تأثیر معنی‌داری دارد (جدول ۲). در محیط MS فاقد تنظیم‌کننده رشد و آمینواسید باززایی مشاهده نشد ولی با افزایش غلظت این مواد درصد باززایی افزایش یافت. بالاترین درصد باززایی (۸۱/۱۱ و ۷۵/۵۷ درصد به ترتیب برای ارقام Amsterdam و Advance Red) و بیشترین تعداد شاخساره (۲۳/۶۹ و ۲۰/۱۹ عدد به ترتیب برای ارقام Amsterdam و Advance Red) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 ، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین به دست آمد. ولی بیشترین ارتفاع

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد و آمینواسیدها بر باززایی پنبه حاصل از ریزنمونه جوانه چشمی گلابول

cv. Advance Red			cv. Amsterdam			تیمار (میلی‌گرم در لیتر)			
ارتفاع	تعداد	درصد باززایی	ارتفاع	تعداد	باززایی	پژوهش‌های پیشین	پژوهش‌های پیشین	GA ₃	TDZ
شاخساره	شاخساره	درصد	شاخساره	شاخساره	درصد	۱۰۰	۱۰۰	۰/۲۵	۰/۵
میلی‌متر	عدد	درصد	میلی‌متر	عدد	درصد	۱۰۰	۱۰۰	۰/۲۵	۰/۵
،g	،g	،g	،g	،g	،g	،	،	،	،
۱۳/۳۴±۰/۷۵ ^f	۴/۰۰±۰/۵ ^f	۶/۳۶±۰/۸۰ ^f	۱۵/۳۳±۰/۶۳ ^f	۴/۴۹±۰/۸۳ ^f	۸/۱۲±۰/۹۰ ^f	۰	۰	۰	۰/۲۵
۱۵/۵۸±۰/۶۷ ^e	۶/۰۳±۰/۷۲ ^e	۱۵/۳۸±۰/۴۶ ^e	۱۸/۵۷±۰/۷۵ ^e	۶/۶۵±۰/۷۲ ^e	۱۷/۰۲±۰/۸۴ ^e	۰	۰	۰	۰/۵
۱۹/۲۹±۰/۳۸ ^d	۶/۹۰±۰/۶۴ ^d	۲۰/۵۱±۰/۷۶ ^d	۲۲/۵۱±۰/۹۳ ^d	۸/۰۶±۰/۲۳ ^d	۲۴/۵۵±۰/۷۷ ^d	۰	۰	۰/۲۵	۰/۵
۲۴/۶۸±۰/۳۳ ^c	۹/۸۶±۰/۸۲ ^c	۴۱/۲۸±۰/۳۶ ^c	۲۵/۶۵±۰/۷۱ ^c	۱۰/۴۰±۰/۱۹ ^c	۷۶/۳۷±۰/۶۴ ^b	۱۰۰	۱۰۰	۰/۲۵	۰/۵
۴۶/۳۰±۰/۹۸ ^b	۲۰/۱۹±۰/۵۷ ^a	۷۵/۵۷±۰/۹۷ ^a	۴۸/۵۵±۰/۸۴ ^b	۲۳/۶۹±۰/۵۸ ^a	۸۱/۱۱±۰/۹۷ ^a	۲۰۰	۲۰۰	۰/۵	۱
۵۳/۳۰±۰/۷۶ ^a	۱۸/۵۴±۰/۹۲ ^b	۷۲/۲۷±۰/۳۵ ^b	۵۵/۱۱±۰/۹۸ ^a	۲۱/۲۳±۰/۳۷ ^b	۶۶/۱۶±۰/۸۲ ^c	۴۰۰	۴۰۰	۱	۲

حروف مشابه در هر ستون عدم تفاوت معنی‌دار را در آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال یک درصد نشان می‌دهد. تمام داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده‌اند.

میلی‌متر به ترتیب برای ارقام Advance Red و Amsterdam) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال به دست آمد (شکل E و K ۳).

ریشه‌زایی گیاهان باززایی شده مرحله پایانی چرخه تولید درون شیشه‌ای است، لذا کیفیت و حجم ریشه تولیدی تأثیر مستقیم بر افزایش درصد زنده‌مانی در سازگاری و انتقال گیاهان به گلخانه دارد (Chandra et al., 2010). غلظت بالای اکسین‌ها نسبت به سایتوکینین‌ها، غلظت نمک‌های پایه و ساکارز، حذف آگار و حضور زغال فعال از عوامل تأثیرگذار بر ویژگی‌های ریشه‌زایی گیاهان پیازی هستند (Nagaraju et al., 2002; Chandra et al., 2010). در ریشه‌زایی گلابول، حضور اکسین‌های IAA و IBA در غلظت‌های کمتر تأثیر بهتری نسبت به غلظت‌های بیشتر NAA و پاکلوبوترازول دارند (Nagaraju et al., 2002; Sinha and Roy, 2002). در بعضی موارد غلظت‌های بالای اکسین باعث تولید اتیلن و پیری زودرس گیاهچه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای می‌شود. زغال فعال قابلیت بالایی در جذب اتیلن، آبسزیک اسید، رادیکال‌های آزاد و مواد فنولی که بر اثر پیری و زخم تولید می‌شود دارد و به این صورت از پیری گیاهچه‌ها جلوگیری

(Pragya et al., 2012). براساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، حضور GA₃ تفاوت معنی‌داری در درصد باززایی ایجاد نکرد ولی باعث افزایش ارتفاع شاخساره شد. براساس پژوهش‌های پیشین، حضور آمینواسیدها به عنوان منابع نیتروژن با تأمین پروتئین و افزایش رشد سلول‌ها تأثیر مثبتی بر پنبه‌زایی و باززایی گیاهان دارد (Husin et al., 2014; Pawar et al., 2015). براساس نتایج این پژوهش افزودن آمینواسیدهای پرولین و گلوتامین به تیمار باززایی، در ابتدا باعث رشد پنبه گردید و تأثیر مثبتی بر ویژگی‌های باززایی ارقام گلابول داشت.

تأثیر IAA و زغال فعال بر ریشه‌زایی: براساس مقایسه میانگین تیمارهای مختلف IAA و زغال فعال تأثیر معنی‌داری بر ریشه‌زایی ارقام گلابول دارد (جدول ۳). در محیط MS فاقد تنظیم‌کننده رشد IAA و زغال فعال ریشه‌زایی مشاهده نشد ولی با افزایش غلظت این مواد درصد ریشه‌زایی افزایش یافت. بالاترین درصد ریشه‌زایی (۸۴/۴۱ و ۸۲/۵۰ درصد به ترتیب برای ارقام Advance Red و Amsterdam)، بیشترین تعداد ریشه (۴/۸۴ و ۴/۹۲ عدد به ترتیب برای ارقام Amsterdam و Advance Red) و بیشترین طول ریشه (۳۸/۵۰ و ۴۲/۵۵

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف IAA و زغال فعال بر ریشه‌زایی گلابول

cv. Advance Red			cv. Amsterdam			تیمار	
طول ریشه	تعداد ریشه	ریشه‌زایی	طول ریشه	تعداد ریشه	ریشه‌زایی	زغال فعال	IAA
میلی‌متر	عدد	درصد	میلی‌متر	عدد	درصد	میلی‌گرم در لیتر	
،g	،g	،g	،g	،g	،g	،	،
۱۹/۲±۰/۵۶ ^f	۲/۵۵±۰/۱۵ ^f	۱۳/۳۸±۰/۹۴ ^f	۱۵/۲۳±۰/۱۶ ^f	۲/۱۲±۰/۱۱ ^f	۱۰/۴۳±۰/۱۱ ^f	۲۵۰	۰/۵
۲۱/۲۳±۰/۶۱ ^e	۳/۹۲±۰/۱۹ ^e	۱۸/۳۹±۰/۴۵ ^e	۱۸/۱۹±۰/۱۷ ^e	۳/۷۸±۰/۱۸ ^e	۱۲/۷۱±۰/۵۱ ^e	۵۰۰	۰/۵
۲۷/۴۵±۰/۸۴ ^d	۴/۱۷±۰/۲۳ ^d	۲۴/۲۳±۰/۴۹ ^d	۲۰/۱۸±۰/۰۵ ^d	۳/۹۱±۰/۲۴ ^d	۲۶/۴۱±۰/۴۵ ^d	۲۵۰	۱
۳۰/۱۵±۰/۲۹ ^c	۴/۳۳±۰/۳۱ ^c	۳۵/۳۵±۰/۶۷ ^c	۲۵/۱۲±۰/۸۵ ^c	۴/۲۵±۰/۲۹ ^c	۳۴/۹۵±۰/۲۵ ^c	۵۰۰	۱
۳۳/۴۵±۰/۶۹ ^b	۴/۵۱±۰/۶۵ ^b	۷۰/۵۲±۰/۸۴ ^b	۳۰/۹۲±۰/۱۳ ^b	۴/۴۳±۰/۳۴ ^b	۷۵/۶۵±۰/۳۱ ^b	۲۵۰	۲
۴۲/۵۵±۰/۷۵ ^a	۴/۹۴±۰/۸۷ ^a	۸۲/۵۰±۰/۲۵ ^a	۳۸/۵۰±۰/۵۰ ^a	۴/۸۴±۰/۶۲ ^a	۸۴/۴۱±۰/۳۷ ^a	۵۰۰	۲

حروف مشابه در هر ستون عدم تفاوت معنی‌دار را در آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال یک درصد نشان می‌دهد. تمام داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده‌اند.

(۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با تنظیم‌کننده‌های رشد TDZ (۱ میلی‌گرم در لیتر) و GA₃ (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) باعث بهبود کیفیت باززایی گلابول می‌شود. از طرف دیگر افزودن زغال فعال (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به محیط ریشه‌زایی حاوی اکسین (۲ میلی‌گرم در لیتر IAA) سرعت و کیفیت ریشه‌زایی را افزایش می‌دهد. با استفاده از این پروتکل می‌توان در زمان کوتاه تولید انبوه گلابول را با موفقیت انجام داد. علاوه بر کاربرد تجاری، این پروتکل می‌تواند زمینه مناسبی برای پروژه‌های اصلاحی با هدف مهندسی ژنتیک جهت بهبود سایر ویژگی‌های کیفی ارقام مختلف گلابول و انتقال ژن مقاومت به بیماری باشد.

سیاس‌گذاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از پژوهشکده گل و گیاهان زینتی محلات (OPRC) و ستاد توسعه زیست‌فناوری (شماره کمک ملی ۹۶۰۴۱) به منظور حمایت مالی جهت انجام این پژوهش تشکر نمایند.

می‌کند، از طرف دیگر با تاریک کردن محیط کشت باعث بهبود ریشه‌زایی نیز می‌گردد (Thomas, 2008). در نهایت گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با موفقیت سازگار و به گلخانه با شرایط کنترل شده منتقل شدند (شکل F و L ۳).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش بر دو رقم تجاری Amsterdam و Advance Red گلابول نشان داد، غلظت بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد و انتخاب درست ریزنمونه تأثیر معنی‌داری بر سایر مراحل پینه‌زایی، باززایی، ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه‌های باززایی شده دارد. براساس نتایج به دست آمده، درصد پینه‌زایی ریزنمونه تهیه شده از قسمت رأسی (جوانه چشمی) نسبت به قسمت میانی (قطعات پدازه فاقد جوانه) و قسمت تحتانی (صفحه پایگاهی) پدازه گلابول بیشتر بود. از میان سایر تنظیم‌کننده‌های رشد مورد آزمایش اکسین‌های مختلف از قبیل پیکلورام، دایکامبا و T-2,4,5 در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر تأثیر به‌سزایی در پینه‌زایی سایر ریزنمونه‌های پدازه گلابول داشتند. استفاده از آمینواسیدهای پرولین و گلوتامین با منشاء ارگانیک

منابع

- حسن پور اصیل، م.، کریمی، ح. ع. و موسی نژاد، ص. (۱۳۹۳) اثرات اسانس های گیاهی، نانوذرات نقره و برخی ترکیبات شیمیایی بر ماندگاری گل بریدنی گلابول (*Gladiolus grandiflora* L.). علوم باغبانی ایران ۴۵: ۴۶۰-۴۴۹.
- جعفری مفید آبادی، ع. و کریمی، م. (۱۳۹۳) دورگ گیری درون گونه ای در گلابول با استفاده از کشت درون شیشه ای تخمک بالغ. نشریه پژوهش های تولید گیاهی ۲۱: ۱۷۳-۱۶۵.
- فخرایی لاهیجی، م.، رحیمی میدانی، ا. و قنواتی، ف. (۱۳۹۰) مطالعه کاربوتیپ سه جمعیت گلابول *Gladiolus italicus* Mill. تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی ۴: ۴۸-۳۷.
- ناظریان، ع.، مدرس نجف آبادی، س. و مهدوی، م. (۱۳۹۲) بیماری زردی فوزاریومی گلابول. دو فصلنامه علمی ترویجی دانش بیماری شناسی گیاهی ۲: ۲۹-۱۸.
- Azadi, P., Bagheri, H., Naloussi, M. A., Nazari, F. and Chandel, S. F. (2016) Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. *Biotechnology Advance* 34: 1073-1090.
- Bajaj, Y. P. S., Sidhu, M. M. S. and Gill, A. P. S. (1983) Some factors affecting the in vitro propagation of gladiolus. *Scientia Horticulture* 18: 269-275.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V. and Chandra, R. (2010) Acclimatization of tissue cultured plantlets: From laboratory to land. *Biotechnology Letters* 32: 1199-1205.
- Goo, D. H., Joung, H. Y. and Kinm, K. W. (2003) Differentiation of gladiolus plantlets from callus and subsequent flowering. *Acta Horticulturae* 620: 339-342.
- Husin, N., Jalil, M., Othman, R.Y. and Khalid, N. (2014) Enhancement of regeneration efficiency in banana (*Musa acuminata* cv. Berangan) by using proline and glutamine. *Scientia Horticulture* 168: 33-37.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K. and Iwase, A. (2013) Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25: 3159-3173.
- Kamo, K. (1995) A cultivar comparison of plant regeneration from suspension cells, callus and cormel slices of gladiolus. *In-vitro Cellular and Developmental Biological Plant* 31: 113-115.
- Liu, J., Feng, H., Ma, Y., Zhang, L., Han, H. and Huang, X. (2018) Effects of different plant hormones on callus induction and plant regeneration of miniature roses (*Rosa hybrida* L.). *Horticulture International Journal* 2: 201-206.
- Memon, N. (2012) In-vitro propagation of gladiolus plantlets and cormels. *Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants* 3: 280-291.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant* 15: 473-492.
- Nagaraju, V., Howmik, G. and Parthasarathy, V. A. (2002) Effect of paclobutrazol and sucrose on in vitro cormel formation in gladiolus. *Acta Botanica Croatica* 61: 27-33.
- Naloussi, A. M., Hatamzadeh, A., Azadi, P., Mohsenpour, M. and Samizadeh Lahiji, H. (2019) A procedure for indirect shoot organogenesis of *Polianthes tuberosa* L. and analysis of genetic stability using ISSR markers in regenerated plants. *Scientia Horticulturae* 244: 315-321.
- Nesi, B., Trinchello, D., Lazzereschi, S. and Grassott, A. (2009) Production of lily symptomless virus-free plants by shoot meristem tip culture and in vitro chemotherapy. *Horticulturer Science* 44: 217-219.
- Pawar, B., Kale, P., Bahurupe, J., Jadhav, A., Kale, A. and Pawar, S. (2015) Proline and glutamine improve in vitro callus induction and subsequent shooting in rice. *Rice Science* 22: 283-289.
- Pragya, S., Sing, K., Misra, R. L. and Ranjan, J. K. (2012) In-vitro shoot regeneration from cormel derived callus of gladiolus and bio-hardening of plantlets. *Indian Journal Biotechnology* 11: 99-104.
- Ramos-Garci, M., Ortega-Centeno, S., Herna, A., Lauzardo, I., Tejacal, A., Bosquez-Molina, E. and Bautista-Ban, S. (2009) Response of gladiolus (*Gladiolus* spp) plants after exposure corms to chitosan and hot water treatments. *Scientia Horticulturae* 121: 480-484.
- Sen, J. and Sen, S. (1995) Two-step bud culture technique for a high frequency regeneration of gladiolus corms. *Scientia Horticulture* 64: 133-138.
- Singh, D., Kumar Singh, V. K., Fayaz, K., Verty, P. and Bhuj, B. D. (2018) Review article impact of plant growth regulators in gladiolus. *International Journal Current Microbiology Application Science, Special Issue* 7: 139-148.
- Sinha, P. and Roy, S. K. (2002) Plant regeneration through in-vitro cormel formation from callus culture of *Gladiolus primulinus* Baker. *Plant Tissue Culture* 2: 139-145.

- Stefaniak, B. (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration of gladiolus (*Gladiolus hort.*). Plant Cell Reports 13: 386-389.
- Thomas, T. D. (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances 26: 618-631.
- Wu, J., Liu, C., Seng, S., Khan, M. A., Sui, J., Gong, B., Liu, C., Wu, C., Zhong, X., He, J. and Yi, M. (2015) Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation of *Gladiolus hybridus* cv. 'Advance Red'. Plant Cell Tissue Organ Culture 120: 717-728.
- Xu, Z., Hao, J., He, X. and Yi, M. (2009) Callus induction and plant regeneration of *Gladiolus hybridus* Hort. Plant Physiology Commun 45: 473-478.
- Ziv, M. and Lilien-Kipnis, H. (2000) Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes in vitro. Plant Cell Report 19: 845-850.

Optimization of callus production and organogenesis of two commercial cultivars of *Gladiolus* (*Gladiolus grandiflorus* L. cv Amsterdam, Advance Red)

Seyedehraziyeh Mousavimatin¹, Seyed Najmmaddin Mortazavi¹, Pejman Azadi^{2,3*}, Mitra Aelaei¹

¹ Horticulture Science, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

² Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran

³ Ornamental Plants Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mahallat, Iran

(Received: 23/07/2019, Accepted: 22/01/2020)

Abstract

Gladiolus is cultivated as a high-value ornamental plant in the worldwide and it has the highest cultivation area and the highest level of underground organs imports in Iran. In this study, in order to investigate indirect regeneration of Amsterdam and Advance Red cultivars an experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. For callogenesis, bud sprout (apical section), corm slices (middle section) and basal plate (bottom section) explants of corm with 1 cm² dimensions were cultured in MS medium with different concentrations of Picloram, Dicamba, BAP, kinetin, NAA and 2,4,5-T. At the regeneration stage, different concentrations of TDZ and GA₃ were combined with Proline and Glutamine amino acids. Based on the results, in the medium containing 1 or 2 mg L⁻¹ of Dicamba, the bud sprout explant showed the highest callogenesis (77.77% and 75.91% in Amsterdam and Advance Red, respectively). The highest percentage of regeneration (81.11% and 75.57% in Amsterdam and Advance Red, respectively) and the highest number of shoots (23.69 and 20.19 in Amsterdam and Advance Red, respectively) were obtained in 1 mg L⁻¹ TDZ + 0.5 mg L⁻¹ GA₃ + 200 mg L⁻¹ Proline + 200 mg L⁻¹ Glutamine. The highest percentage of rooting (84.41% and 82.50% in Amsterdam and Advance Red, respectively) were produced in MS medium supplemented with 2 mg L⁻¹ IAA + 500 mg L⁻¹ activated charcoal. Produced plantlets from indirect regeneration were successfully adapted in greenhouse condition.

Keywords: Bud sprout, Dicamba, Glutamine, Picloram, Proline, 2,4,5-T

Corresponding author, Email: azadip22@gmail.com