Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 48, No 2, Summer 2017 (535-543)
DOI: 10.22059/ijfcs.2017.205836.654098

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۶ (ص ۵۴۳-۵۳۵)

تأثیر سطوح مختلف برخی از انواع تنظیم‌کنندهٔ رشد اکسین بر ریشه‌دهی قلمهٔ یونجه (*Medicago sativa* L.)

ویدا قطبی[۱]، حمید دهقانی[۲*]، رجب چوکان[۳] و احمد معینی[۲]
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳. استاد، مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۱۵)

چکیده

یونجه یک گیاه دگرگرده‌افشان است، به‌طوری‌که نگهداری و افزونش مواد گیاهی انتخاب‌شده در برنامه‌های اصلاحی از راه بذر امکان‌پذیر نیست. افزونش رویشی گیاهان انتخاب‌شده از راه قلمه، افزونش سریع و قابل‌اعتماد همسانه (کلون)های یونجه را امکان‌پذیر می‌کند. در این پژوهش ریشه‌زایی قلمه‌های سه بوم‌جور (اکوتیپ) نیک‌شهری، همدانی و سکوئل پس از قرار گرفتن در سطوح مختلف محلول‌های تنظیم‌کنندهٔ رشد اکسین، ایندول استیک اسید (IAA) و ایندول بوتریک اسید (IBA) در غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ mgl^{-1} به مدت‌زمان ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت بررسی شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایهٔ بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام یافت. نتایج تحقیق نشان داد، هیچ ریشه‌ای در تیمار بدون تنظیم‌کنندهٔ رشد تولید نشد، درحالی‌که در همهٔ سطوح دیگر ریشه‌زایی القا شد. تفاوت معنی‌داری بین نوع اکسین IAA و IBA و همچنین مدت‌زمان قرار گرفتن در محلول اکسین مشاهده نشد. قلمه‌هایی که در محلول اکسین به میزان ۱۰۰ mgl^{-1} به مدت ۱۶ ساعت قرار گرفته بودند بیشترین میزان ریشه‌زایی و توسعهٔ ریشه را نشان دادند. در بین بوم‌جورهای یونجهٔ بررسی‌شده، مشخص شد که بوم‌جور نیک‌شهری بیشترین میزان ریشه‌زایی را در بین تیمارهای مورد بررسی دارد. بنابراین افزونش برون شیشه‌ای از راه قلمه، به‌عنوان روشی سریع، کارآمد و ارزان نسبت به دیگر روش‌های افزونش رویشی می‌تواند در برنامه‌های بهنژادی یونجه مانند تولید رقم (واریته)های مصنوعی، دورگ (هیبرید)، نگهداری و افزونش نسل‌های خودبارورشده در شرایط گلخانه استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: **ایندول استیک اسید، ایندول بوتریک اسید، افزونش رویشی، ریشه‌زایی، کلون یونجه.**

Effects of different auxin solutions on rooting of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cuttings

Vida Ghotbi[1], Hamid Dehghani[2*], Rajab Choucan[3] and Ahmad Moeini[2]
1, 2. Ph.D. Candidate and Associate Professor, Department of Plant Breeding, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Professor, Seed and Plant Improvement Research Institute, Karaj, Iran
(Received: May 2, 2016 - Accepted: Nov. 5, 2016)

ABSTRACT

Alfalfa is a cross-pollinating forage crops, so that maintenance and multiplication of selected plant material from breeding programs through seed is impossible. Vegetative propagation of selected plants through cutting allows rapid and reliable multiplication of alfalfa clones. This study examined the root development of three ecotypes, Nikshahri, Hamedani and Sequel, of alfalfa cuttings after dipping in two auxin's growth regulators, IAA (Indole acetic acid) and IBA (indole butyric acid) different solutions include 0, 25, 50, 100, 200 and 400 mgl^{-1} for 8, 16 and 24 hours. The study was performed in a full factorial design in RCBD with three replications. The results indicated that untreated cuttings with regulators produced no roots, while, all auxin treatments stimulated rooting on almost cuttings. Dipping treatments in 100 mgl^{-1} of auxin solutions for 16 hour produced the most root development. Among studied alfalfa ecotypes, Nikshahri showed highest rooting development. This method is more rapid, efficient and cost-effective than other vegetative reproduction methods in alfalfa which can be utilized in breeding programs such as producing synthetic and hybrid varieties and also maintenance and reproduction of different selfing generations in alfalfa.

Keywords: Alfalfa clones, Indole acetic acid, indole butyric acid, rooting, vegetative propagation.

* Corresponding author E-mail: dehghanr@modares.ac.ir

مقدمه

یونجه با نام علمی *Medicag sativa* L. یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای است که به دلیل، ارزش غذایی زیاد، میزان تولید بالای پروتئین در واحد سطح، تثبیت نیتروژن و حفظ ساختار مناسب خاک، اهمیت بسیار زیادی در تغذیهٔ دام و کشاورزی پایدار دارد. همچنین این گیاه صفات مهمی مانند مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد و به‌عنوان یک راکتور زیستی سبز برای تولید متابولیت‌های ثانویه و پروتئین‌های نوترکیب دارویی اهمیت ویژه‌ای دارد (Maleki Band *et al*., 2013). بیش از ۳۰ میلیون هکتار سطح زیر کشت در سراسر جهان به یونجه اختصاص دارد (Hill *et al*., 1988; Michaud *et al*., 1988; Iantacheva *et al*., 2005a; Scasta *et al*., 2012). یونجه زراعی گیاهی دگرگرده‌افشان و اتوتتراپلوئید با شمار کروموزوم $2n=4x=32$ است و گرده‌افشانی به‌طورکلی توسط حشرات به‌ویژه زنبورها صورت می‌گیرد. خاستگاه این گیاه از کشورهای قزاقستان، ترکمنستان، شمال ایران، شمال غرب ایران و شمال ترکیه است (Michaud *et al*., 1988; Tesfaye *et al*., 2006). ایران به‌عنوان یکی از مناطق مهم پیدایش و تنوع گیاه یونجه در جهان شناخته شده است و زراعت آن به چهار هزار سال پیش بر می‌گردد و دامنهٔ پراکنش گسترده از مناطق سردسیر غرب و شمال غرب کشور تا گرم‌ترین مناطق در جنوب‌شرقی را به خود اختصاص داده است. همچنین از مناطق مهم تنوع و تولید یونجه در کشور می‌توان به استان‌های همدان، آذربایجان شرقی و غربی، کرمان، یزد و بلوچستان اشاره کرد، به‌طوری‌که هر منطقه بوم‌جور (اکوتیپ)های ویژهٔ خود را دارد (Mofidian *et al*., 2009).

یکی از نارسایی‌هایی که بسیاری از متخصصان با آن روبه‌رو هستند، افزونش نژادگان (ژنوتیپ)های برتر در بسیاری از گیاهان است. استفاده از افزونش رویشی، یک روش ساده برای تولید فراوان و قابل‌اعتماد مواد گیاهی مورد نظر در مدت کوتاه برای نگهداری پایداری ژنتیکی است (Avci *et al*., 2010). به دلیل ماهیت دگرگرده‌افشانی یونجه، برنامه‌های بهنژادی یونجه همیشه با نارسایی‌هایی روبه‌رو بوده است (Veronesi *et al*., 2006). افزونش نژادگان‌های برتر در یونجه نیز از جمله نارسایی‌هایی است که بهنژادگران با آن روبه‌رو هستند، به‌طور مثال در تولید بذر مصنوعی (سینتتیک) یا دورگ (هیبرید) یونجه که افزونش همسانه (کلون)ها باید انجام گیرد (Tabakh & Massengale, 1965).

افزونش رویشی توانایی تولید دوبارهٔ یک گیاه به‌صورت غیرجنسی است که از راه آن می‌توان همسانه‌های یکسان از نظر ژنتیکی را افزایش داد (Danehloueipour *et al*., 2006). بررسی‌های بسیاری در مورد افزونش رویشی گیاهان مختلف در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است. ریشه‌زایی گیاهچه‌های یونجه از راه زیرلپه (هیپوکوتیل)، لپه (کوتیلدون)، برگ‌ها، ساقه، جوانه‌های نارس و بالغ ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت دارای انواع مختلف تنظیم‌کنندهٔ رشد اکسین به‌دست‌آمده است (Maleki Band *et al*., 2013). افزونش رویشی یونجه در شرایط درون‌شیشه‌ای از راه باززایی غیرمستقیم از راه جنین‌زایی بدنی یا سوماتیکی (Bingham *et al*., 1975; Iantcheva *et al*., 2005 a,b; Shao *et al*., 2000)، اندام‌زایی مستقیم بدون داشتن مرحلهٔ پینه یا فاز کالوس (Hisano *et al*., 2004; Beegum *et al*., 2007) بررسی شده‌اند. برای مثال Iantcheva *et al*. (2001) و Abedi *et al*. (2015) از جنین‌زایی بدنی ریز نمونه‌های برگ و دم‌برگ برای بهینه‌سازی افزونش رویشی درون‌شیشه‌ای به ترتیب در یونجهٔ یک‌ساله و چندساله استفاده کردند. همچنین Maleki Band *et al*. (2013) باززایی گیاه یونجه را از راه ریزنمونه گره ساقه در محیط کشت گزارش کردند. با کشت درون شیشه‌ای میان گرهٔ ساقهٔ یونجه در محیط کشت MS در حضور تنظیم‌کننده‌های رشد IAA و N6-isopentenyl-adenine مشاهده شد که محل و موقعیت اولیهٔ میان‌گره و سن گیاه یونجه در ریشه‌زایی تأثیر نداشته است (Pupilli *et al*., 1992). همچنین در باززایی گیاه لوتوس از راه ریز نمونهٔ گرهٔ ساقه، مشاهده شد که ریزنمونه‌های لوتوس، بدون وجود اکسین نیز در محیط کشت MS تولید ریشه کردند (Pupilli *et al*., 1992). با در نظر گرفتن نارسایی‌هایی مانند بهینه‌سازی ضدعفونی

کردن، روش‌های کشت بافت و سازگاری که وقت‌گیر هستند، افزونش رویشی بیرون‌شیشه‌ای با استفاده از قلمه می‌تواند روشی معمول و ارزان‌تر برای افزونش بسیاری از گونه‌های گیاهی باشد، همان‌طور که در افزونش بسیاری از گیاهان زراعی مانند نخود، یونجه، لوتوس، اسپرس و همچنین در بسیاری از گیاهان چوبی استفاده می‌شود (Tabakh & Massengale, 1965; Eliasson & Areblad, 1984; Sevimay *et al*., 1994; Syed *et al*., 2002; Rosier *et al*., 2004; Abdullah *et al*., 2005; Danehloueipour *et al*., 2006; Henrique *et al*., 2006). روش‌های قلمه‌زدن در محلول‌های کشت و کاشت مستقیم در مخلوط خاک و ماسه برای بسیاری از گیاهان بررسی شده است (Danehloueipour *et al*., 2006). قلمه‌های بعضی از گونه‌های گیاهی بدون اکسین سریع ریشه‌دار می‌شوند، درحالی‌که قلمه‌های بسیاری از گونه‌ها به‌آسانی ریشه‌دار نمی‌شوند (Eliasson & Areblad, 1984; Griffith, 1998; Hartmann *et al*., 2002; Blythe *et al*., 2004). در نتایج پژوهشی Danehloueipour *et al*. (2006) در بررسی تأثیر تنظیم‌کنندهٔ رشد IAA و NAA بر ریشه‌دهی قلمهٔ گیاه نخود مشاهده کردند که بهترین تحریک ریشه‌دهی هنگامی صورت می‌پذیرد که قلمه‌ها در مرحلهٔ پیش از گل‌دهی انتخاب شوند. در مورد گیاهان چوبی مانند کاج نیز Rosier *et al*. (2004) مشاهده کردند، با کاربرد تیمارهای مختلف اکسین IBA و NAA، اگرچه تفاوت معنی‌داری بین نوع اکسین بر درصد ریشه‌زایی و طول ریشه‌ها وجود نداشت، ولی گیاهان در مرحله‌های مختلف رشد واکنش متفاوتی نشان دادند. همچنین روش افزونش بیرون شیشه‌ای توسط Avci *et al*. (2010) با استفاده از سه نوع اکسین (IAA، IBA و NAA) نشان دادند که قلمه‌های اسپرس در محلول تنظیم‌کنندهٔ رشد IAA تحت غلظت $۱۰۰ mgl^{-1}$ به مدت ۸ ساعت در محیط حاوی MS ریشه‌زایی و رشد و نمو ریشه بیشتری در مقایسه با دیگر تیمارهای مورد بررسی داشتند. تأثیر تیمارهای مختلف IAA، NAA، IBA، ویتامین B1، GA و 2,4-D روی قلمه‌های ساقهٔ بالغ شامل دو میان گره و یک گرهٔ برگ پس از فروبردن در محلول‌های تنظیم‌کنندهٔ رشد به مدت ۳۰ ثانیه توسط Tabakh & Massengale (1965) روی گیاه یونجه مشاهده شد که غلظت $۶۰۰ mgl^{-1}$ از هر دو نوع تنظیم‌کنندهٔ رشد IAA و IBA در ریشه‌زایی مؤثرتر بودند و در ضمن برای قلمه‌ها ایجاد سمیت نکردند. درحالی‌که استفاده از 2,4-D در غلظت‌های بالاتر از $۴۰ mgl^{-1}$ اثر سمی ایجاد کرد. افزون بر آن، گزارش شده است که واکنش نژادگان‌های مختلف یونجه به غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد متفاوت است. همچنین در بین سه روش کشت برای ریشه‌زایی قلمه‌های یونجهٔ تحریک‌شده با تنظیم‌کنندهٔ رشد، Sevimay *et al*. (1994) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، کشت قلمه‌ها در آب (۹۴٪)، درصد ریشه‌زایی بیشتری نسبت به کشت در ماسه مرطوب (۸۵/۸٪) و یا سوپرجاذب استاکوسرب (۶۹/۲٪) دارد. هدف از این بررسی ارزیابی و ایجاد یک روش کاربردی، آسان و ارزان برای افزونش برون شیشه‌ای یونجه با استفاده از قلمهٔ ساقه است.

مواد و روش‌ها

بذرهای سه بوم‌جور یونجهٔ همدانی، نیک‌شهری از ایران و رقم خارجی سکوئل از استرالیا در مزرعهٔ آزمایشی مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر، کرج، ایران در شهریور ۱۳۹۱ کشت شدند. پس از استقرار گیاهان در شرایط مزرعه، قلمه‌های ساقه در بهار ۱۳۹۲ در مرحله‌های اولیهٔ گلدهی به طول ۶cm- ۵ شامل دو الی سه گره برگ‌دار از مزرعه برداشت و به گلخانهٔ مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر منتقل شدند. پس از شستشوی ساقه‌ها، قلمه‌ها در محلول‌های اکسین به میزان ۰ (شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰، ۴۰۰ mgl^{-1} تنظیم‌کنندهٔ رشد ایندول استیک اسید (IAA) و ایندول بوتیریک اسید (IBA) برای ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت قرار داده شدند. برای هر غلظت، اکسین در ایزوپروپیل الکل/آب مقطر دو بار تقطیر حل شدند و محلول‌های اکسین در بطری‌های مات در دمای ۴ °C تا زمان استفاده ذخیره شدند. پس از این مدت ساقه‌ها به سینی‌های پلاستیکی کشت شامل پرلیت و ماسه در گلخانه (۱±۲۵ °C) با ۱۶ ساعت نور

و هشت ساعت تاریکی و ۵۰درصد رطوبت انتقال داده شدند. قلمه‌های مورد استفاده در این پژوهش، به‌منظور حفظ رطوبت کافی به‌صورت روزانه آبیاری شدند. ۱۵ روز بعد، شمار قلمه‌های ریشه‌دار، شمار ریشه در هر قلمه و طول بلندترین ریشه روی هر ساقهٔ قلمه اندازه‌گیری شد. هر قلمه در صورتی ریشه‌دار در نظر گرفته شد که دست‌کم یک ریشه به طول بزرگ‌تر از ۱mm داشته باشد. قلمه‌های ریشه‌دار به گلدان‌هایی شامل ماسه، رس و پیت‌ماس به میزان یکسان انتقال یافتند و برای دو ماه در شرایط گلخانه نگهداری شدند.

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایهٔ بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و هر تکرار شامل ده ساقهٔ قلمه انجام یافت. تیمارهای نوع اکسین (در دو سطح)، غلظت‌های اکسین (در پنج سطح) پلات فرعی و مدت‌زمان باقی ماندن در تنظیم‌کنندهٔ رشد (در سه سطح) و بوم‌جور یونجه (در دو سطح) در نظر گرفته شد. تجزیهٔ واریانس برای فراسنجه‌های مورد بررسی با نرم‌افزار آماری SAS (9.1 version) انجام شد. مقایسهٔ میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار فیشر (FLSD: Fisher's Least Significant Difference) انجام شد (P<۰/۰۵).

نتایج و بحث

تجزیهٔ واریانس داده‌ها برای صفات میزان ریشه‌دهی، شمار ریشه در هر قلمه و طول بلندترین ریشه در جدول ۱ ارائه شده است.. با توجه به جدول تجزیهٔ واریانس (جدول ۱) مشاهده می‌شود که اثر اصلی غلظت اکسین و بوم‌جور یونجه روی همهٔ صفات درصد ریشه‌دهی، شمار ریشه در هر قلمه و طول بلندترین ریشه معنی‌دار شده است (P<۰/۰۱)، مدت‌زمان قرار گرفتن در محلول اکسین تنها برای صفت شمار ریشه در هر ساقهٔ قلمه (P<۰/۰۵) معنی‌دار شد، درحالی‌که نوع اکسین استفاده‌شده (IAA و IBA) برای همهٔ صفات معنی‌دار نشد (جدول ۱).

از سوی دیگر، نتایج تجزیهٔ واریانس نشان می‌دهد، اثر متقابل معنی‌دار برای نوع تنظیم‌کنندهٔ رشد × غلظت اکسین برای صفت میزان ریشه‌دهی و شمار ریشه در هر ساقه، نوع تنظیم‌کنندهٔ رشد × مدت‌زمان برای درصد ریشه‌زایی (P<۰/۰۵)، غلظت اکسین × مدت زمان، غلظت اکسین × نوع بوم‌جور یونجه برای هر سه صفت و مدت‌زمان × نوع بوم‌جور یونجه برای صفت شمار ریشه (P<۰/۰۱) وجود دارد (جدول ۱). ازآنجایی‌که اثر متقابل سه‌گانه برای نوع تنظیم‌کنندهٔ رشد × مدت‌زمان × بوم‌جور یونجه برای صفات درصد ریشه‌زایی (P<۰/۰۵) و غلظت تنظیم‌کنندهٔ رشد × مدت‌زمان×نوع بوم‌جور یونجه برای صفات شمار ریشه در هر ساقه و طول بلندترین ریشه معنی‌دار شده است (جدول ۱)، میانگین این اثرگذاری‌های سه‌گانه برای صفات مورد نظر و میانگین اثر متقابل دوگانه بررسی و تجزیه‌وتحلیل شدند. به‌طوری‌که میانگین غلظت‌های مختلف دو نوع اکسین (ایندول استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید) بر میزان ریشه‌دهی (٪) و شمار ریشه در هر ساقهٔ قلمهٔ یونجه در جدول ۲ نشان می‌دهد، میزان ریشه‌دهی و شمار ریشه به ترتیب در اثر تیمار با IAA از ۲۱/۶۷درصد و ۳/۲۴ در غلظت mgl^{-1} ۴۰۰ تا ۸۵/۶۳درصد و ۱۳/۶۰ در غلظت mgl^{-1} ۱۰۰ متغیر است و میزان ریشه‌دهی و شمار ریشه در ساقه در نتیجهٔ تیمار با IBA دارای دامنه‌ای از ۱۳/۱۵درصد و ۳/۶۷ در غلظت mgl^{-1} ۴۰۰ تا ۸۶/۴۱درصد و ۱۴/۶۲ در غلظت mgl^{-1} ۱۰۰ است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود میزان کاهش در ریشه‌دهی با استفاده از تنظیم‌کنندهٔ رشد IBA در غلظت در mgl^{-1} ۴۰۰ بیشتر از تنظیم‌کنندهٔ رشد IAA است. کاهش بیشتر درصد ریشه‌دهی می‌تواند به دلیل سمی بودن یا بازدارندگی بیشتر IBA در غلظت‌های بالا نسبت به IAA باشد. در گزارش‌هایی که در مورد گیاهان مختلف ارائه شده است تنظیم‌کنندهٔ رشد اکسین IAA نسبت به دیگر تنظیم‌کننده‌های رشد بررسی‌شده برتر معرفی شده است (Avci *et al.*, 2010)، ولی در این بررسی همسان نتایج بررسی‌های Rosier *et al.* (2004) تفاوت معنی‌داری بین نوع اکسین استفاده‌شده در تحریک ریشه‌زایی و رشد و نمو ریشه‌ها ملاحظه نشد. همچنین در بررسی مشاهده شده است که غلظت‌های بالاتر از mgl^{-1} ۶۰۰ از هر دو نوع اکسین IAA و IBA تأثیر سمی روی ریشه‌زایی قلمه‌های یونجه نداشته است (Tabakh & Massengale, 1965).

همچنین میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین و مدت‌زمان در معرض تنظیم‌کنندهٔ رشد بودن بر میانگین میزان ریشه‌دهی یونجه نشان می‌دهد، بیشترین میزان ریشه‌دهی در غلظت mgl^{-1} ۱۰۰ و با قرار دادن ساقه‌ها در ۱۶ساعت محلول اکسین به‌دست‌آمده است (۸۹/۳۸٪). با افزایش غلظت و شمار ساعتی که ساقه‌ها در معرض تنظیم‌کنندهٔ رشد اکسین بودند باعث کاهش شدید میزان ریشه‌دهی شد به‌طوری‌که کمترین درصد ریشه‌زایی در غلظت mgl^{-1} ۴۰۰ و ۲۴ ساعت مشاهده شد. همچنین کاهش غلظت تنظیم‌کنندهٔ رشد با شدت کمتری میزان ریشه‌زایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، به‌طوری‌که کاهش بیشتر در پایین‌ترین غلظت (mgl^{-1} ۲۵) و در کمترین ساعت در معرض تنظیم‌کنندهٔ رشد (۸ ساعت) مشاهده شد (جدول ۳). بنابراین به نظر می‌رسد غلظت‌های بالای mgl^{-1} ۱۰۰ و همچنین ساعت بیشتر قرار گرفتن در تنظیم‌کنندهٔ رشد ممکن است تأثیر سمی برای گیاه داشته باشند، به‌طوری‌که یا بازدارندهٔ ریشه‌زایی ساقه‌ها شده‌اند یا اینکه باعث مرگ ساقه‌ها و از بین رفتن ساقه‌ها شده‌اند. در نتایج بررسی‌هایی که توسط De Klerk *et al.* (1997) و Avci *et al.* (2010) انجام شد، بیشترین ریشه‌زایی در غلظت mgl^{-1} ۱۰۰ تنظیم‌کنندهٔ رشد و به مدت ۸ ساعت در محلول گزارش شد.

جدول ۱. خلاصهٔ تجزیهٔ واریانس برای اثر نوع اکسین، غلظت اکسین، مدت‌زمان و بوم‌جورهای یونجه روی میزان ریشه دهی (٪)، شمار ریشه در هر قلمه و طول بلندترین ریشه روی قلمهٔ یونجه

Table 1. Summary of analysis of variance for effects of auxin type (AT), auxin concentration (AC), duration (D) and alfalfa ecotypes (E) on rooting percentage, root number and length of longest root on alfalfa cutting

S.O.V	df	M.S.		
		Rotting rate (%)	Root number per cutting	Length of longest root (cm)
Replication	2	27.88^{ns}	8.20^{ns}	5.92^{ns}
Auxin type (AT)	1	92.46^{ns}	27.05^{ns}	1.31^{ns}
Auxin concentration (AC)	4	32761.63^{**}	802.46^{**}	124.06^{**}
Duration (D)	2	7.63^{ns}	60.39^{*}	3.37^{ns}
Ecotype (E)	2	1083.10^{**}	728.33^{**}	18.63^{**}
AT × AC	4	397.77^{**}	49.92^{*}	3.72^{ns}
AT × D	2	97.80^{*}	14.51^{ns}	0.68^{ns}
AT × E	2	2.29^{ns}	41.22^{ns}	3.82^{ns}
AC × D	8	896.54^{**}	143.21^{**}	9.10^{**}
AC × E	8	158.19^{**}	322.70^{**}	20.74^{**}
D × E	4	68.53^{ns}	68.82^{**}	2.16^{ns}
AT × AC × D	8	42.73^{ns}	23.11^{ns}	1.21^{ns}
AT × AC × E	8	12.65^{ns}	28.09^{ns}	1.22^{ns}
AT × D × E	4	75.74^{*}	14.18^{ns}	1.20^{ns}
AC × D × E	16	29.27^{ns}	106.02^{**}	3.34^{*}
AT × AC × D × E	16	23.95^{ns}	18.94^{ns}	0.75^{ns}
Error	178	33.44	14.20	1.85

ns، * و **: به ترتیب ، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد. ns, * and ** Significant at the 0.05 and 0.01 level, respectively.

جدول ۲. اثرگذاری‌های متقابل غلظت‌های مختلف دو نوع اکسین بر میانگین میزان ریشه‌دهی یونجه (٪) و شمار ریشه در هر قلمه ساقهٔ یونجه

Table 2. The interaction effects of different concentration treatments of two auxin types (IAA and IBA) on means of rooting rate and root number per cutting in alfalfa

Auxin concentration (mgl^{-1})	Auxin type			
	IAA		IBA	
	Rooting rate (%)	Root number	Rooting rate (%)	Root number
25	46.15	10.87	44.26	8.78
50	51.89	12.35	58.30	9.09
100	85.63	13.60	86.41	14.62
200	47.04	9.30	44.41	10.04
400	21.67	3.24	13.15	3.67
LSD (P<0.05)	2.96	1.95	2.96	1.95

جدول ۳. اثر متقابل غلظت‌های مختلف اکسین و مدت‌زمان قرار گرفتن در تنظیم‌کنندهٔ رشد بر میانگین میزان ریشه‌دهی یونجه (٪)
Table 3. The interaction effects of auxin concentrations and dipping duration on rooting rate (%) in alfalfa

Duration (h)	Auxin concentration (mgl^{-1})				
	25	50	100	200	400
8	40.61	50.33	83.06	54.11	19.72
16	42.17	51.94	89.83	47.33	18.55
24	52.83	63.00	85.17	35.72	13.94
LSD (P<0.05)			4.39		

ازآنجایی‌که اثر متقابل سه‌گانهٔ نوع اکسین× غلظت× بوم‌جور تنها برای صفت شمار ریشه در هر قلمه (P<۰/۰۵) و اثر متقابل غلظت × زمان × بوم‌جور برای صفات شمار ریشه (P<۰/۰۱) در هر قلمه و طول بلندترین ریشه (P<۰/۰۵) معنی‌دار شده است. بنابراین میانگین اثر متقابل دوگانهٔ غلظت اکسین × بوم‌جور در جدول ۴ و میانگین اثر متقابل سه‌گانه معنی‌دار در جدول‌های ۵ و ۶ آورده شده است. بالاترین میزان ریشه‌دهی همان‌طور که مشاهده می‌شود در غلظت mgl^{-1} ۱۰۰ برای بوم‌جور نیک‌شهری به‌دست‌آمده است (۹۱/۳۳٪) و پایین‌ترین میزان ریشه‌زایی در غلظت mgl^{-1} ۴۰۰ برای بوم‌جور همدانی مشاهده شد. به‌طورکلی در همهٔ غلظت‌ها میزان ریشه‌دهی بیشتری در بوم‌جور نیک‌شهری نسبت به دو بوم‌جور دیگر ملاحظه می‌شود. داشتن ساقه‌های ضخیم‌تر و قوی‌تر در بوم‌جور نیک‌شهری می‌تواند دلیل میزان ریشه‌دهی بیشتر این بوم‌جور نسبت به دو بوم‌جور دیگر باشد. همچنین در مقایسهٔ میانگین برای اثر متقابل سه‌گانه معنی‌دار نوع اکسین × مدت‌زمان × بوم‌جور برای صفت میزان ریشه‌زایی در جدول ۵ نشان می‌دهد که به‌طورکلی بیشترین میزان ریشه‌زایی نیز برای بوم‌جور نیک‌شهری در ۸ و ۱۶ ساعت تنظیم‌کنندهٔ رشد IAA و IBA به‌دست‌آمده است. بوم‌جور همدانی نیز در ۸ ساعت قرار گرفتن در محلول تنظیم‌کنندهٔ رشد ریشه‌دهی بیشتری را نشان داد. اگرچه بوم‌جور سکوئل در ۱۶ ساعت قرار گرفتن در تنظیم‌کنندهٔ رشد IAA ریشه‌دهی بیشتری را داشته است. بوم‌جور نیک‌شهری به دلیل ساقهٔ ضخیم‌تر و قوی‌تر میزان ریشه‌زایی بیشتری را داشته است. در بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریشه‌زایی قلمهٔ گیاه نخود توسط Danehloueipour *et al.* (2006)، مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری از نظر میزان ریشه‌زایی در بین رقم‌های نخود وجود دارد.

در مقایسهٔ میانگین اثر متقابل سه‌گانهٔ غلظت اکسین × مدت‌زمان × بوم‌جور در جدول ۶ مشاهده می‌شود که بوم‌جور نیک‌شهری در غلظت mgl^{-1} ۱۰۰ در ۱۶ ساعت (۳۵/۸۳) بیشترین شمار ریشه را در بین دیگر تیمارها داشته است، درحالی‌که بالاترین شمار ریشه در هر قلمه در ۲۴ ساعت برای بوم‌جور همدانی و در ۸ ساعت برای بوم‌جور سکوئل در غلظت mgl^{-1} ۱۰۰ مشاهده شد. ولی طول بلندترین ریشه روند متفاوتی را ارائه داد، به‌طوری‌که بوم‌جور نیک‌شهری به‌ترتیب در ۲۴ و ۱۶ ساعت در غلظت mgl^{-1} ۱۰۰ بلندترین ریشه (به‌ترتیب ۸cm و ۷/۴۲) را نشان داد. این روند با تفاوت بیشتر در بوم‌جورهای سکوئل و سپس همدانی مشاهده شد، به‌طوری‌که برای بوم‌جور سکوئل طول بلندترین ریشه در غلظت mgl^{-1} ۲۵ در ۱۶ ساعت (۵/۹۵ cm) و برای بوم‌جور همدانی طول بلندترین ریشه در غلظت mgl^{-1} ۵۰ در ۲۴ ساعت (۶/۹۷ cm) مشاهده شد (جدول۶).

همان‌طور که Massengale & Tabakh (1965) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، غلظت‌های بالاتر از mgl^{-1} ۶۰۰ از هر دو تنظیم‌کنندهٔ رشد اکسین IAA و IBA اگرچه تأثیر سمیت نداشته است، ولی میزان ریشه‌زایی کاهش یافت. Avci *et al.* (2010) نیز در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، قلمه‌های اسپرس در محلول تنظیم‌کنندهٔ رشد IAA با غلظت mgl^{-1} ۱۰۰ بالاترین میزان ریشه‌زایی و رشد و نمو ریشه را ارائه داده‌اند.

همسان نتایج دیگر بررسی‌های افزونش رویشی از راه قلمه روی یونجه و دیگر گیاهان (Tabakh & Massengale, 1965; Rosier *et al.*, 2004; Danehloueipour *et al.*, 2006)، نژادگان و یا رقم همچنین غلظت تنظیم‌کنندهٔ رشد از عامل‌های مهم در به دست آوردن بهترین نتیجه در ریشه‌زایی قلمه‌ها هستند.

جدول ۴. اثر متقابل غلظت‌های مختلف اکسین و بوم‌جورهای یونجه بر میانگین میزان ریشه‌دهی یونجه (٪)
Table 4. The interaction effects of auxin concentration and alfalfa ecotypes on rooting rate (%) in alfalfa

Ecotypes	Auxin concentration (mgl^{-1})				
	25	50	100	200	400
Nikshahri	46.72	58.22	91.33	52.67	20.33
Hamadani	48.61	52.50	84.44	40.56	15.83
Sequel	40.28	54.55	82.28	43.94	16.06
LSD (P<0.05)			3.57		

جدول ۵. میانگین اثر متقابل نوع و مدت‌زمان (h) بر سه بوم‌جور یونجه روی صفت ریشه‌دهی در هر قلمهٔ یونجه
Table 5. Means interaction effects of auxin type and auxin concentration on three alfalfa ecotypes on root number per alfalfa cutting

Auxin type	Duration (h)	Alfalfa ecotypes		
		Nikshahri	Hamadani	Sequel
IAA	8	57.07	50.67	46.33
	16	54.07	45.87	49.93
	24	52.73	50.20	47.40
IBA	8	55.53	49.80	46.93
	16	53.73	47.20	46.73
	24	50.00	47.20	46.60
LSD (P<0.05)			3.91	

جدول ۶. اثر متقابل غلظت اکسین، مدت‌زمان فروبردن و بوم‌جور یونجه روی شمار ریشه و طول ریشهٔ قلمهٔ یونجه
Table 6. Interaction Effects of auxin concentration, duration of dipping and alfalfa ecotypes on root number and root length on alfalfa cuttings

Auxin concentation	Duration (h)	Root number per cutting			Length of longest root (cm)		
		Nikshahri	Hamadani	Sequel	Nikshahri	Hamadani	Sequel
25	8	7.67	5.50	9.10	6.17	3.78	5.85
	16	9.83	7.60	10.93	5.83	4.10	5.95
	24	17.33	8.22	12.33	5.07	4.61	5.67
50	8	22.67	9.97	3.94	6.00	6.22	2.58
	16	12.00	7.20	4.00	5.02	5.42	3.17
	24	12.68	16.55	7.50	5.10	6.97	4.00
100	8	13.33	5.04	11.49	6.67	3.29	5.34
	16	35.83	8.56	10.97	7.42	6.51	5.00
	24	23.17	11.58	7.01	8.00	6.17	5.28
200	8	7.08	8.38	11.17	4.78	5.92	5.25
	16	14.25	10.11	10.08	3.92	4.19	3.08
	24	4.33	9.00	12.62	3.45	6.42	4.77
400	8	4.92	5.28	3.62	2.25	4.48	2.11
	16	3.83	2.17	3.00	1.75	2.33	1.36
	24	3.67	2.33	2.25	1.25	1.33	1.00
LSD (P<0.05)			4.45			1.21	

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این بررسی نشان داد، غلظت تنظیم‌کنندهٔ رشد مهم‌ترین عامل در تحریک ریشه‌زایی و رشد و نمو ریشه در قلمه یونجه است. واکنش بوم‌جورها به غلظت و مدت‌زمان در معرض تنظیم‌کنندهٔ رشد بودن متفاوت بوده است. بین بوم‌جورهای بررسی‌شده، بوم‌جور نیک‌شهری از مناطق گرمسیری با ساقهٔ قوی‌تر بیشترین درصد ریشه‌زایی، شمار ریشه در هر ساقه و طول بلندترین ریشه را در نتیجهٔ تیمار با غلظت‌های متفاوت اکسین و مدت‌زمان در معرض تنظیم‌کنندهٔ رشد نشان داد. اگرچه تفاوت معنی‌داری بین مدت‌زمان‌های در معرض تنظیم‌کنندهٔ رشد بودن مشاهده نشد ولی اثر متقابل نشان داد، بهترین بهره در غلظت mgl^{-1} ۱۰۰ از تنظیم‌کنندهٔ رشد اکسین و به مدت ۱۶ ساعت به‌دست‌آمده است. با کاربرد روش افزونش برون شیشه‌ای از راه قلمهٔ ساقه، افزونش سریع، ارزان، قابل‌اعتماد مواد گیاهی مورد نیاز برای برنامه‌های اصلاحی یونجه امکان‌پذیر می‌شود. قلمه‌های ریشه‌دارشده در این بررسی به گلدان‌های شامل ماسه، رس و پیت‌ماس به میزان یکسان انتقال یافتند و برای دو ماه در شرایط گلخانه نگهداری و در برنامه‌های اصلاحی استفاده شدند. بنابراین این روش افزونش که در شرایط گلخانهٔ معمولی قابل اجرا است، می‌تواند مشکل افزونش نژادگان‌های برتر در تولید بذر رقم‌های مصنوعی، دورگ و همچنین نگهداری و افزونش نسل‌های خودبارور در یونجه را حل کند.

سپاسگزاری

از مسئولان و محققان مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج، بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای برای حمایت و در اختیار قرار دادن امکانات و از بخش تحقیقات غلات به دلیل در اختیار قرار دادن گلخانه برای انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abdullah, A. T. M., Hossain, M. A. & Bhuiyan, M. K. (2005). Propagation of laktan (*Baccaurea sapida* Muel.Arg.) by mature stem cutting. *Research Journal of Agriculture and Biological Science*, 1(2), 129-134.
2. Abedi, S., Zare, N., Asghari Zakaria, R., Sheikhzadeh Mosaddegh, P. & Shokrpour, M. (2015). In vitro regeneration of some Iranian alfalfa (*Medicago sati*va L.) genotypes via somatic embryogenesis. *Iranian Journal of Plant Biology*, 22, 39-50. (in Farsi)
3. Avci, S., Cocu, S., Aasim, M., Sancak, C. & Ozcan, S. (2010). Effects of treating with auxin solutions on rooting of cuttings of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Tropical Grasslands*, 44, 123-127.
4. Beegum, S. A., Martin, K. P., Zhang, C. L., Nishitha, I. K., Ligimol, M., Slater, A. & Madhusoodanan, P. V. (2007). Organogenesis from leaf and internode explants of *Ophiorrhiza prostrata*, an anticancer drug (camptothecin) producing plant. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(1), 114-123.
5. Bingham, E. T., Hurley, L. V., Kaatz D. M. & Saunders, J. W. (1975). Breeding alfalfa which regenerates from callus in culture. *Crop Science*, 15, 719-721.
6. Blythe, E. K., Sibley, J. L., Ruter, J. M. & Tilt, K. M. (2004). Cutting propagation of foliage crops using a foliar application of auxin. *Scientia Horticulturae*, 103, 31-37.
7. Danehloueipour, N., Yan, G., Clarke, H. J. & Siddique, K. H. M. (2006). Successful stem cutting propagation of chickpea, its wild relatives and their interspecific hybrids. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(10), 1349-1354.
8. De Klerk, G. J., Ter Brugge, J. & Marinova, S. (1997). Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthalene acetic acid during adventitious root formation in vitro in Malus 'Jork 9'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49, 39-44.
9. Eliasson, L. & Areblad, K. (1984). Auxin effects on rooting in pea cuttings. *Physiologia Plantarum*, 61, 293-297.
10. Griffith, J. R. L. (1998). Tropical Foliage Plants: A Grower's Guide. (Ball Publishing: Batavia IL).
11. Hartmann, H. T., Kester, D E., Davies, J. R. F. T. & Geneve, R. L. (2002). Plant Propagation: Principles and Practices. (7th ed) Prentice-Hall: Upper Saddle River, NJ.
12. Henrique, A., Campinhos, E. N., Ono, E. O. & Pinho, Z. (2006). Effect of plant growth regulators in the rooting of Pinus cuttings. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(2), 189-196.
13. Hill, R. R. Jr., Shenk, J. S. & Barnes, R. F. (1988). Breeding for yield and quality. In: A. A. Hanson, D. K. Barnes & R. R. Hill (Ed.) *Alfalfa and alfalfa improvement*. (pp. 809–825.) ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI.
14. Hisano, H., Kimoto, Y., Hayakawa, H., Takeichi, J., Domae, T., Hashimoto, R., Abe, J., Kanazawa, A. & Shimamoto, Y. (2004). High frequency Agrobacterium mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formation from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritima*. *Plant Cell Reports*, 22, 910-918.
15. Iantcheva, A., Slavov, S., Prinsen, E., Vlahova, M., Onckelen, H. V. & Atanassov, A. (2005a). Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula* after osmotic pre-treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 37-43.
16. Iantcheva, A., Vlahova, M. & Atanassov, A. (2005b). Investigation of the potential of two wild medicago spesies–*Medicago orbicularis* and *Medicago arabica* for in vitro callusogenesis and direct organogenesis. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 14, 27-31.
17. Iantcheva, A., Vlahova, M., Hanhtrinh, T., Brown, S.C., Slater, A., Elliott, M.C. & Atanassov, A. (2001). Assessment of polysomaty, embryo formation and regeneration in liquid media for various species of diploid annual Medicago. *Plant Science*, 160, 621-627.
18. Maleki Band, S., Jafari, M., Ghadimizadeh, M. & Bernousi, I. (2013). Plant regeneration via direct organogenesis in three Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars using stem nodal explant. *Seed and Plant Improvement Journal*, 29(1), 65-80. (in Farsi)
19. Michaud, R., Lehman, W. F. & Rumbaugh, M. D. (1988). World distribution and historical development. In: A. A. Hanson, D. K. Barnes & R. R. Hill (Ed), *Alfalfa and alfalfa improvement*. (pp. 26–82) ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI.
20. Mofidian, M. A., Movahedi, Z. & Dehghani, H. (2009). Yield stability analysis for superior alfalfa ecotypes from cold regions in iran- using univariate methods. *Iranian Journal of Crop Science*, 11, 162-173. (in Farsi)

21. Pupilli, F., Damiani, F., Nenz, E. & Arcioni, S. (1992). In vitro propagation of Medicago and Lotus species by node culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 28,167-171.
22. Rosier, Ch. L., Frampton, J., Goldfarb, B., Blazich F. & Wise, F. C. (2004). Growth stage, auxin type, and concentration influence rooting of Virginia Pine stem cuttings. *Hort Science*, 39 (6), 1397-1402.
23. Scasta, J. D., Trostle, C. L. & Foster, M. A. (2012). Evaluating alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars for salt tolerance using laboratory, greenhouse and field methods. *Journal of Agricultural Science*, 4, 90-103.
24. Sevimay, C. S., Kendir, H. & Sancak, C. (1994). Determination of a suitable method in fast propagation of alfalfa clones. *Journal of Field Crops Central Research Institute*, 3, 159-17. (in Turkish)
25. Shao, C. Y., Russinova, E., Iantcheva, A., Atanassov, A., Mc Cormac, A., Chen, D. F., Elliott, M. C. & Slater, A. (2000). Rapid transformation and regeneration of alfalfa (*Medicago falcata* L.) via direct somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 31, 155-166.
26. Syed, H., Ahsan-Ul-Haq, M. & Shah, T. M. (2002). Vegetative propagation of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) through stem cutting. *Asian Journal of Plant Sciences*, 1(3), 218-219.
27. Tabbakh, E. E. & Massengale, M. A. (1965). Rooting Alfalfa Stem Cuttings. https://arizona.openrepository.com/arizona/bitstream/10150/299472/1/pa-17-02-21-22.pdf
28. Tesfaye, M., Kevin, A. T., Silverstein, B., Bruna, B. D., Bucciarelli, B., Samac, D. A. & Vance, P. V. (2006). The affymetrix medicago gene Chip® array is applicable for transcript analysis of alfalfa (*Medicago sativa*). *Functinal Plant Biology*, 33, 783-788.
29. Veronesi, F., Huyghe, C. & Delgado, I. (2006). Lucerne breeding in Europe: results and research strategies for future developments. *Grassland Science in Europe*, 11, 232-242.