مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۱۸ شماره ۳ صفحه‌های ۲۵۹ تا ۲۷۰ (۱۳۹۶)

تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر پرآوری ریزنمونه‌های برگی اطلسی دورگه سری Double Cascade[1]

Effect of Growth Regulators on Proliferation of Leaf Explants of *Petunia hybrida* Double Cascade Series

فاطمه خضرلو، زهره جبارزاده* و پرویز نوروزی[2]

Downloaded from journal.irshs.ir at 10:55 +0430 on Sunday August 5th 2018

چکیده

این پژوهش برای تعیین مناسب‌ترین غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی و سیتوکینینی جهت پرآوری ریزنمونه‌های برگی گیاه اطلسی دورگه در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور در سه تکرار اجرا شد. در این آزمایش از چهار غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد BAP یا TDZ (صفر، ۴/۴۴، ۸/۸۸ و ۱۷/۷۶ میکرومولار) و IBA در سه غلظت (صفر، ۰/۵۵ و ۱/۱ میکرومولار) استفاده شد. بیشترین مقدار باززایی شاخساره، وزن تر و خشک شاخساره و وزن تر و خشک پینه در محیط کشت دارای ۱۷/۷۶ میکرومولار BAP همراه با ۰/۵۵ میکرومولار IBA به‌دست آمد. در محیط کشت‌های دارای تنظیم‌کننده رشد TDZ ریزنمونه‌ها زرد شدند و بدون باززایی به همان شکل باقی ماندند. هم‌چنین در مورد شاخص طول شاخساره، در محیط کشت‌های دارای ۱/۱ میکرومولار IBA در ترکیب با ۴/۴۴ و ۸/۸۸ میکرومولار BAP و در شاخص شمار برگ و گره در محیط کشت دارای ۸/۸۸ میکرومولار BAP همراه با ۱/۱ میکرومولار IBA بیشترین مقدار مشاهده شد. نتیجه‌ها نشان داد که در پرآوری ریزنمونه‌های برگی اطلسی دورگه تنظیم‌کننده رشد BAP نسبت به TDZ کاراتر بود.

واژه‌های کلیدی: باززایی، بنزیل آمینوپیورین، تیدیازورون، سیتوکینین، کشت بافت.

مقدمه

اطلسی[3] از تیره سیب‌زمینی‌سانان[4] است که به‌خاطر توان سازگاری، گوناگونی رنگ و ریخت گل در میان محبوب‌ترین گیاهان فصلی در جهان قرار دارد (۱۵). اطلسی جز ده گیاه فصلی برتر فضای سبز می‌باشد (۱۳). این گیاه مناسب کشت در فصل‌های گرم سال است و دارای انواع کم‌پر و پرپر می‌باشد. نوع کم‌پر آن به‌عنوان اطلسی معمولی شناخته می‌شود. اطلسی دورگه حاصل تلاقی *P. integrifolia* و *P. axillaris* است (۵).

روش اصلی افزایش اطلسی با بذر است اما در رقم‌های پرپر به‌خاطر تبدیل شدن اندام جنسی به گلبرگ، بذر تولید نمی‌شود، بنابراین برای افزایش از قلمه استفاده می‌گردد (۵، ۱۵). با توجه به‌این‌که اطلسی‌ها دارای ارزش اقتصادی زیادی می‌باشند، افزایش سنتی با بذر یا قلمه برای تقاضاها کافی نبوده و بنابراین ریزافزایی آن اهمیت فراوانی دارد (۲۱). باززایی گیاهان با کشت بافت روشی برای افزایش گیاهان جدید در مدت زمان به‌نسبت کوتاه است (۲۲).

۱- تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۸

۲- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گیاهان زینتی، استادیاران گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول، ایمیل: (z.jabbarzadeh@urmia.ac.ir).

۳- *Petunia* spp.

۴- Solanaceae

Downloaded from journal.irshs.ir at 10:55 +0430 on Sunday August 5th 2018

براساس برخی گزارش‌ها بنزیل‌آمینوپیورین[1] به‌عنوان کاراترین سیتوکینین مورد استفاده در شاخه‌زایی بسیاری از گیاهان معرفی شده است (۴). معلوم شده عامل‌های محیطی گوناگونی بر اندام‌زایی درون‌شیشه‌ای اطلسی تاثیر می‌گذارند. اندام‌زایی شاخساره در ریزنمونه‌های برگ اطلسی دورگه زیر تاثیر اندازه ریزنمونه، طول مدت تماس با بنزیل‌آدنین (BA) قرار می‌گیرد (۲۱). جمشیدنیا و همکاران (۲)، بهترین محیط کشت را برای باززایی مستقیم از ریزنمونه های برگ چند رقم ایرانی و خارجی اطلسی و با هدف انتقال ژن، در محیط کشت MS[2] تغییر یافته همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر زآتین گزارش نمودند. در پژوهشی، بیشترین درصد شاخه‌زایی (۵-۸۷/۹۰ ٪) در ریزنمونه برگی اطلسی رقم‌های Daddy Blue و Dream White، در تیمار ۸-۰/۵ میکرومولار TDZ[3] به‌دست آمد (۱۰). در پژوهشی که روی کشت بافت رقم Mitchell گیاه اطلسی با به‌کارگیری ریزنمونه‌های برگی صورت گرفت، بیشترین مقدار باززایی شاخساره (۵۷/۲ ٪) و بالاترین میانگین شمار شاخساره در هر ریزنمونه (۴/۱) در محیط MS دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ بدون تنظیم‌کننده رشد اکسینی گزارش شد (۳۰). ابوکوآت و شتایا گزارش کردند توانایی باززایی از ریزنمونه‌های برگی اطلسی در دو رقم Daddy Blue و Dreams White با کاربرد کلشی‌سین، کاهش معنی‌داری در هر دو رقم داشت (۱۱). باربلیس و همکاران (۱۴) اثر سطح‌های مختلف BAP و NAA[4] را بر القای مستقیم شاخساره نابه‌جا در ریزنمونه‌های برگی اطلسی بررسی نمودند. رقم Ramblin Nu Blue به‌طور معنی‌داری بیشترین مقدار ریزنمونه باززایی شده (۵۷/۲ ٪) و بیشترین میانگین شمار شاخساره نابه‌جا (۴/۴) را نشان داد. رقم‌های Purple Velvet و Ramblin Nu Blue بیشترین مقدار باززایی ریزنمونه را در محیط کشت دارای ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA داشتند. در حالی‌که در رقم Touha بیشترین باززایی در محیط کشت دارای ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌دست آمد. هم‌چنین در این بررسی نشان داده شد که تشکیل شاخساره نابه‌جا نه تنها به ترکیب تنظیم‌کننده رشد و نژادگان بستگی دارد بلکه جهت قرارگیری ریزنمونه در محیط کشت نیز اهمیت دارد. ریزنمونه‌هایی که در جهت سطح شکمی برگ[5] در محیط کشت قرار داده شده بودند باززایی بیشتری نسبت به سمت دور از سطح پشتی برگ[6] نشان دادند. در این بررسی، تنظیم‌کننده رشد مناسب برای القای ریشه در محیط کشت MS در رقم Purple Velvet (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA)، Ramblin Nu Blue (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA یا NAA) و برای Touha (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA) به‌دست آمد (۱۴).

شوربختانه در کشور ما صنعت تولید بذر به‌نژادی شده و دورگه گیاهان زینتی کم فعالیت می‌باشد و به‌تقریب می‌توان گفت که تمامی بذرهای دورگه با کیفیت از خارج کشور وارد می‌شوند. از این رو ضرورت ابداع روش‌های جایگزین در تولید اطلسی در داخل کشور کامل احساس می‌شود. ضمن این‌که این اقدام، اشتغال‌زایی و درآمد را به‌همراه داشته و از خروج ارز از کشور برای خرید بذر جلوگیری می‌کند (۱). بنابراین در این پژوهش، آزمایش‌هایی انجام شد که هدف از آن، تعیین ترکیب و غلظت بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد برای تولید انبوه گیاه اطلسی دورگه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه‌های گندزدایی شده

در این آزمایش از بذرهای اطلسی دورگه (*Petunia hybrida*) سری Double Cascade که از شرکت Pan American خریداری شد، استفاده شد. این آزمایش در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم

۱- Benzyl amino purine
۲- Murashige and Skoog
۳- Thidiazuron
۴- Naphthalene acetic acid
۵- Adaxial
۶- Abaxial

Downloaded from journal.irshs.ir at 10:55 +0430 on Sunday August 5th 2018

باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام شد. برای گندزدایی بذرها از هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ و زمان ۵ دقیقه استفاده شد. پس از گندزدایی، بذرها ۳ بار با آب مقطر سترون شست‌وشو گردیدند. بذرهای گندزدایی شده روی محیط کشت پایه MS شامل ۳٪ ساکارز، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول و ۰/۷٪ آگار کشت شدند. در این پژوهش، pH محیط کشت روی ۵/۷ تنظیم شد. در داخل هر شیشه ۵ بذر کشت شد و در اتاق رشد در دمای ۲۴±۲ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی سیتوکینینی شامل بنزیل‌آمینوپیورین و تیدیازورون ساخت شرکت Sigma به همراه ایندول بوتیریک اسید (IBA) از گروه اکسین‌ها (شرکت Merck) در غلظت‌های مختلف در محیط کشت MS به کار رفتند. این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح به‌طورکامل تصادفی با دو فاکتور که فاکتور اول شامل سیتوکینین (BAP و یا TDZ هر کدام در چهار غلظت ۰، ۴/۴۴، ۸/۸۸ و ۱۷/۷۶ میکرومولار) و غلظت IBA (۰، ۰/۵۵ و ۱/۱ میکرومولار)، به‌صورت ۲۴ ترکیب تیماری مورد آزمایش قرار گرفتند.

کشت ریزنمونه

پس از تندش بذرها و رشد کامل گیاهچه‌ها پس از یک ماه، ریزنمونه‌های برگی از برگ‌های گسترش یافته و جوان قسمت میانی گیاه به اندازه ۷ تا ۸ میلی متر از پهنک برگ تهیه شدند. در هر ظرف کشت، دو ریزنمونه در محیط کشت پایه MS دارای ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد کشت گردید. پس از ۷ هفته ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد انتقال یافتند و داده‌ها در هفته نهم یادداشت‌برداری گردید.

ویژگی‌های اندازه‌گیری شده

ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در این آزمایش شامل شمار شاخساره باززایی شده به ازای هر ریزنمونه (شاخساره‌های با طول کمینه ۲ میلی‌متر دارای ۲ برگ)، وزن تر و خشک شاخساره‌های باززایی شده، وزن تر و خشک پینه، طول شاخساره‌های باززایی شده و شمار برگ و گره بودند. لازم به ذکر است که در این پژوهش، باززایی مستقیم بود.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌های این پژوهش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار و دو ریزنمونه در هر تکرار اجرا شد. واکاوی داده‌ها با نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک و پنج درصد انجام گرفت. هم‌چنین برای نرمال سازی داده‌ها نرم افزار SPSS به‌کار رفت.

نتایج و بحث

نتیجه‌های این پژوهش نشان داد، ریزنمونه‌های برگی اطلسی در محیط‌های کشت دارای BAP در ترکیب با IBA باززایی بهتری نسبت به محیط‌های کشت دارای TDZ، داشتند. با این حال، در تمامی ویژگی‌های اندازه‌گیری شده اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکینینی همراه با IBA در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

شمار شاخساره باززایی شده

ریزنمونه‌های برگی که در محیط کشت MS دارای BAP قرار گرفته بودند پس از دو هفته شروع به باززایی نمودند. در صورتی که ریزنمونه‌های قرار گرفته در محیط کشت دارای TDZ و یا بدون تنظیم‌کننده رشد سیتوکینینی، پس از دو هفته زرد شدند و هیچ باززایی نداشتند که نشان دهنده اهمیت سیتوکینین‌های مناسب برای تقسیم‌های یاخته‌ای می‌باشد. در واقع نوع و غلظت سیتوکینین‌ها، یک مرحله بحرانی در انگیزش شاخساره‌ها شناخته شده است (۹). بررسی نتیجه‌ها نشان داد، بیشترین مقدار باززایی در حضور غلظت کم و میانه BAP (۴/۴۴ و ۸/۸۸ میکرومولار) بدون تنظیم‌کننده رشد اکسینی به‌ترتیب (۴۲۰/۳۳ و ۴۲۷/۳۳ شاخساره در ریزنمونه) و هم‌چنین در محیط کشت دارای ۱۷/۷۶ میکرومولار BAP در ترکیب با ۰/۵۵ میکرومولار IBA (۴۴۸/۶۷ شاخساره در ریزنمونه)

Downloaded from journal.irshs.ir at 10:55 +0430 on Sunday August 5th 2018

به‌دست آمد (شکل‌های ۱ و ۲). در غلظت‌های ۴/۴۴ و ۸/۸۸ میکرومولار BAP با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد IBA مقدار باززایی کاهش یافت که به‌احتمال می‌تواند به خاطر حضور غلظت زیاد تنظیم‌کننده رشد اکسینی در بافت این رقم اطلسی باشد. باید گفت که وجود غلظت زیاد اکسین، مانع فعالیت پیام افزایش شاخه می‌شود و به‌عنوان ممانعت کننده شاخه‌دهی عمل می‌کند (۱۷). در تایید یافته‌های پژوهش حاضر، ایشاگ و همکاران (۲۰) دریافتند که ترکیب NAA با BA یا Kin (کینتین) نسبت به کاربرد سیتوکینین به‌تنهایی، تاثیر منفی در مقدار پرآوری در گیاه گوجه فرنگی داشت (۲۰). در غلظت ۱۷/۷۶ میکرومولار BAP روند مشخصی در مقدار باززایی دیده نشد که می‌توان نتیجه گرفت ایجاد تعادل بین نسبت‌های تنظیم‌کننده‌های رشد با همدیگر در محیط کشت برای اندام‌زایی بسیار مهم است، به‌طوری که با تغییر مقدار و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد می‌توان ریخت‌زایی را در شرایط درون شیشه‌ای هدایت نمود (۴). در هیچ یک از محیط‌کشت‌های دارای TDZ، باززایی دیده نشد. نتیجه‌های به‌دست آمده در ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت دارای TDZ با یافته‌های پژوهش‌های پیشین همسویی نداشت. به هر حال روش‌های زیست‌شیمیایی که سطح سیتوکینین‌های درونی را کنترل می‌کنند ممکن است زیر تاثیر شرایط کشت بافت، ریخت‌شناسی و سن ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد برون‌زا، نژادگان و غیره قرار گیرند (۱۲). در پژوهش انجام شده توسط نوبخت وکیلی و باقری (۸) برای مقایسه باززایی دو رقم اطلسی از قرص‌های برگی برای بهینه‌سازی انتقال ژن توسط آگروباکتریوم *(Agrobacterium tumefaciens)*، غلظت‌های مختلف TDZ و BAP، بدون اکسین در محیط کشت پایه MS بررسی شدند. رقم الوان در محیط کشت شامل ۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ بیشترین درصد باززایی (۹۹٪) و میانگین شمار نوساقه در هر ریزنمونه (۲/۲۵) را نشان داد. درحالی‌که در رقم محلات در محیط کشت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP بیشترین درصد باززایی (۷۷٪) و میانگین شمار نوساقه در هر ریزنمونه (۲/۰۳) به‌دست آمد. اگرچه TDZ در گروه سیتوکینین‌ها قرار دارد ولی یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد آن بروز هم‌زمان اثر اکسینی و سیتوکینینی می‌باشد. این درحالی است که از نظر ساختاری به‌طور کامل متفاوت از این دو گروه تنظیم‌کننده‌ها می باشد (۲۴). این احتمال وجود دارد که تنظیم‌کننده رشد TDZ در ریزنمونه‌های این گیاه ویژگی تنظیم‌کننده رشدی اکسینی را سبب شده است و از این راه موجب برهم خوردن تعادل تنظیم‌کننده‌های رشد درون‌زا شده است (۱۸). نسبت زیاد اکسین به سیتوکینین می‌تواند بازدارنده باشد و حتی از تشکیل پینه‌های ریز نیز جلوگیری نماید (۷).

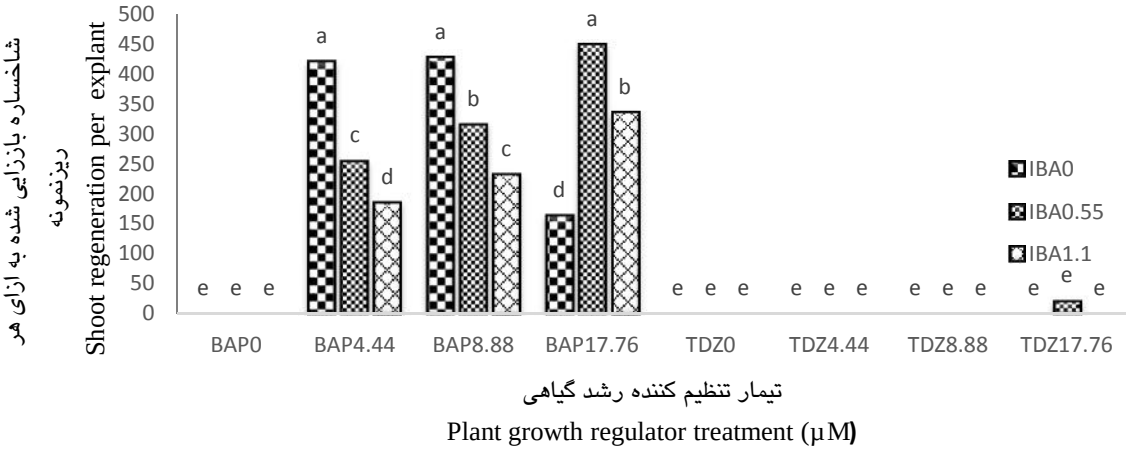

Fig. 1. Interaction effects of types and concentrations of cytokinin with IBA on shoot regeneration from leaf explants of *Petunia hybrida* Double Cascade series. Means with similar letters are not significantly different at 1% level of probability using Duncan's multiple range tests.

شکل ۱- اثرهای برهم‌کنش نوع و غلظت سیتوکینین به همراه IBA بر مقدار باززایی شاخساره از ریزنمونه برگی اطلسی دورگه سری Double Cascade. حرف‌های مشترک نشان دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

Downloaded from journal.irshs.ir at 10:55 +0430 on Sunday August 5th 2018

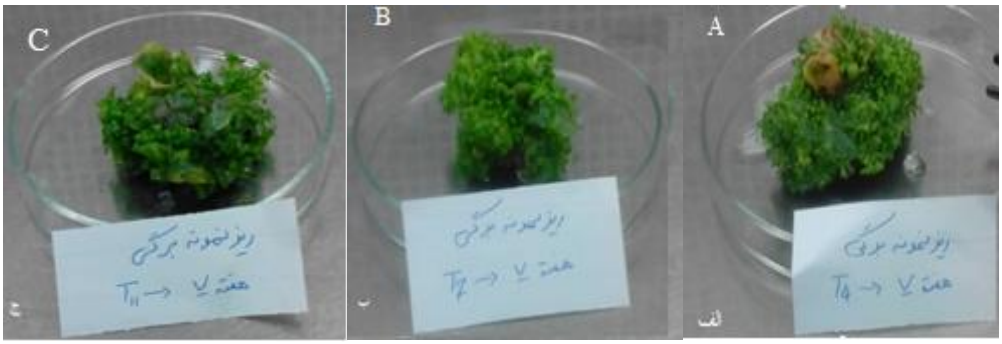

Fig. 2. Shoot regeneration from leaf explants of *Petunia hybrida* Double Cascade series in seventh week A- 4.44 µM BAP without IBA B- 8.88 µM BAP without IBA C- 17.76 µM BAP in combination with 0.55 µM IBA.

شکل ۲- باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های برگی اطلسی دورگه سری Double Cascade در هفته هفتم الف- تیمار ۴/۴۴ میکرومولار BAP بدون IBA ب- تیمار ۸/۸۸ میکرومولار BAP بدون IBA ج- تیمار ۱۷/۷۶ میکرومولار BAP در ترکیب با ۰/۵۵ میکرومولار IBA.

وزن تر و خشک شاخساره باززایی شده

به نظر می‌رسد نوع سیتوکینین به‌کارگیری شده در محیط کشت، در مقدار باززایی و قدرت رشدی گیاه باززایی شده بسیار مهم است و از اساسی‌ترین عامل‌های کارا بر مقدار موفقیت در کشت بافت می‌باشد (۷). همان‌طور که پیش از این بیان شد در محیط کشت‌های دارای تنظیم‌کننده رشد TDZ و هم‌چنین بدون تنظیم‌کننده رشد سیتوکینینی باززایی مشاهده نشد و گیاهچه‌ای برای ارزیابی به‌دست نیامد. شکل ۳ و ۴ اثر برهمکنش نوع و غلظت سیتوکینین به همراه اکسین را بر وزن تر و خشک شاخساره باززایی شده نشان می‌دهد. بیشترین مقدار وزن تر و خشک شاخساره باززایی شده در محیط کشت حاوی ۱۷/۷۶ میکرومولار BAP در ترکیب با ۰/۵۵ میکرومولار IBA به‌ترتیب ۲۱/۵۲ و ۰/۷۹ گرم به ازای هر ریزنمونه به‌دست آمد. کمترین وزن تر و خشک در بین تیمارهایی که باززایی نشان دادند مربوط به تیمار ۱۷/۷۶ میکرومولار BAP در ترکیب با ۰/۵۵ میکرومولار IBA به‌ترتیب ۰/۷۹ و ۰/۰۲۵ گرم به ازای هر ریزنمونه بود. در گزارش‌های مختلفی اثر مثبت BAP بر تحریک پرآوری شاخساره و رشد جوانه‌هایی جانبی در گونه‌های مختلف گیاهی گزارش شده است (۱۶، ۲۷). چنین به‌نظر می‌رسد در این پژوهش نیز تنظیم‌کننده رشد BAP در ریزنمونه‌های گیاه اطلسی تاثیر بهتری بر تولید شاخساره و به‌دنبال آن افزایش وزن تر و خشک شاخساره داشته است. در واقع غلظت مطلوب سیتوکینین در هر ریزنمونه باعث آغازش سرآغازه شاخه می‌شود (۲۳). از سوی دیگر، در منابع به نقش سیتوکینین‌ها به کمک در جذب و انتقال ماده‌های غذایی اشاره شده است که از این راه نیز موجب افزایش سوخت و ساز و در نتیجه افزایش زیست‌توده گیاهچه‌های باززایی شده، می‌شود (۶). با توجه به یافته‌های این پژوهش، نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد مورد به‌کارگیری نیز در وزن تر و خشک شاخساره‌ها تاثیر داشتند. سیتوکینین‌ها وقتی همراه اکسین باشند در انگیزش تقسیم در یاخته‌های گیاهی در محیط کشت اثر فعال دارند. از اثرهای سیتوکینین‌ها در گیاه، افزایش تقسیم‌های یاخته‌ای است و چون یاخته‌های به‌دست آمده، جوان هستند و دیواره نازک و واکوئل بزرگ دارند باعث افزایش وزن تر در گیاه می‌شوند (۲۵).

وزن تر و خشک پینه

پروتکل باززایی کارا با روش کشت پینه می‌تواند شرط لازم برای کاربرد شیوه‌های زیست‌فناوری برای بهبود ژنتیکی گیاهان باشد (۲۹). برگ‌ها بهترین ریزنمونه برای انگیزش پینه هستند (۲۶). نتیجه‌ها در شکل‌های ۵ و ۶ نشان می‌دهد مقدار تولید پینه با افزایش غلظت BAP افزایش یافته است. به‌طوری که غلظت ۴/۴۴ میکرومولار، در بین غلظت‌های مختلف BAP کمترین مقدار وزن تر و خشک پینه را دارا بوده است. این در حالی‌ست که در بیشترین

Downloaded from journal.irshs.ir at 10:55 +0430 on Sunday August 5th 2018

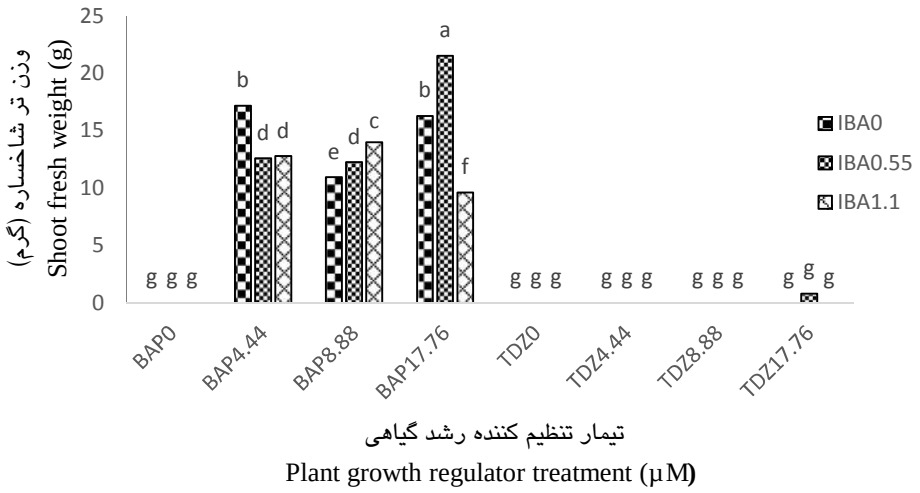

Fig. 3. Interaction effects of types and concentrations of cytokinin with IBA on fresh weight of regenerated shoots in leaf explants of *Petunia hybrida* Double Cascade series. Means with similar letters are not significantly different at 1% level of probability using Duncan's multiple range tests.

شکل ۳- اثرهای برهم‌کنش نوع و غلظت سیتوکینین به همراه IBA بر وزن تر شاخساره‌های باززایی شده در ریزنمونه برگی اطلسی دورگه سری Double Cascade. حرف‌های مشترک نشان دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

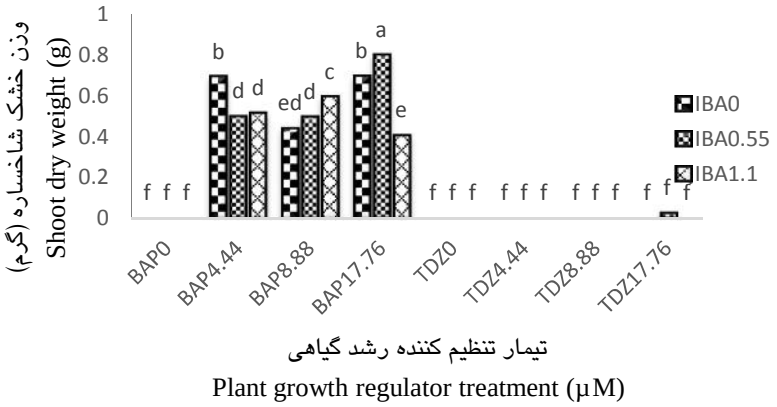

Fig. 4. Interaction effects of type and concentration of cytokinin with IBA on dry weight of regenerated shoots in leaf explants of *Petunia hybrida* Double Cascade series. Means with similar letters are not significantly different at 1% level of probability using Duncan's multiple range tests.

شکل ۴- اثرهای برهم‌کنش نوع و غلظت سیتوکینین به همراه IBA بر وزن خشک شاخساره‌های باززایی شده در ریزنمونه برگی اطلسی دورگه سری Double Cascade. حرف‌های مشترک نشان دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

غلظت BAP (۱۷/۷۶میکرومولار) با کاربرد ۰/۵۵ میکرومولار IBA بیشینه وزن تر و خشک پینه به‌ترتیب ۷/۲۱ و ۰/۳ گرم به‌دست آمد. علت این واکنش، به‌احتمال می‌تواند به‌خاطر حضور غلظت بیشتر اکسین درون‌زا در بافت گیاه اطلسی باشد. رستمی و همکاران (۳)، گزارش کردند، بعضی گیاهان دارای اکسین درون‌زا می‌باشند و در صورت کاربرد اکسین خارجی، موجب تحریک ساخت بیشتر اکسین در داخل گیاه شده و این امر باعث تولید پینه بیشتر در ریزنمونه‌ها می‌شود. در این پژوهش، در تیمارهای TDZ، ریزنمونه‌های موجود در محیط کشت دارای ۱۷/۷۶ میکرومولار TDZ در ترکیب با ۰/۵۵ میکرومولار IBA فقط پینه تولید کردند درحالی که ریزنمونه‌های دیگر تیمارها

Downloaded from journal.irshs.ir at 10:55 +0430 on Sunday August 5th 2018

بدون تولید پینه زرد شدند. همان‌طور که پیش‌تر نیز بیان شد، تنظیم‌کننده رشد TDZ موجب برهم خوردن تعادل تنظیم‌کننده‌های رشد درون‌زا شده است.

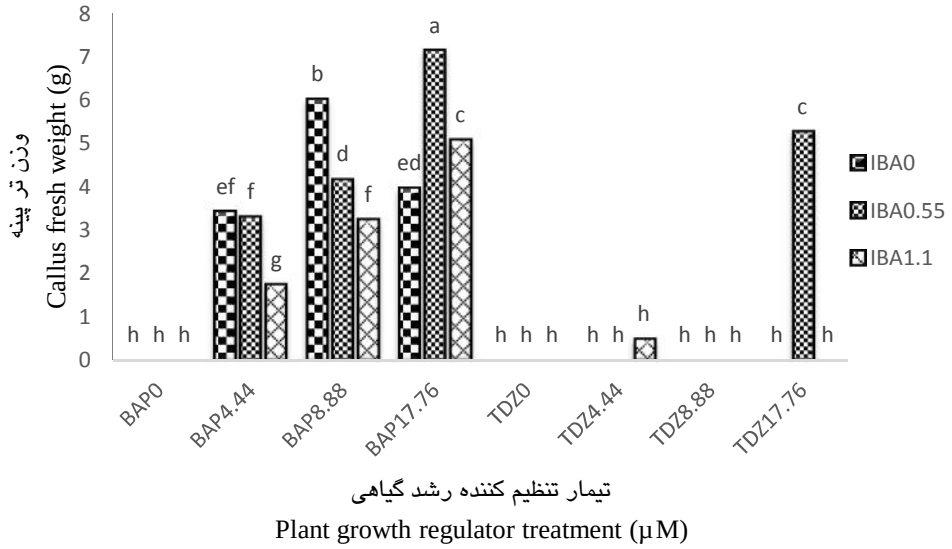

Fig. 5. Interaction effects of type and concentration of cytokinin with IBA on fresh weight of leaf-derived calluses of *Petunia hybrida* Double Cascade series. Means with similar letters are not significantly different at 1% level of probability using Duncan's multiple range tests.

شکل ۵- اثرهای برهم‌کنش نوع و غلظت سیتوکینین به همراه IBA بر وزن تر پینه در ریزنمونه برگی اطلسی دورگه سری Double Cascade. حرف‌های مشترک نشان دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

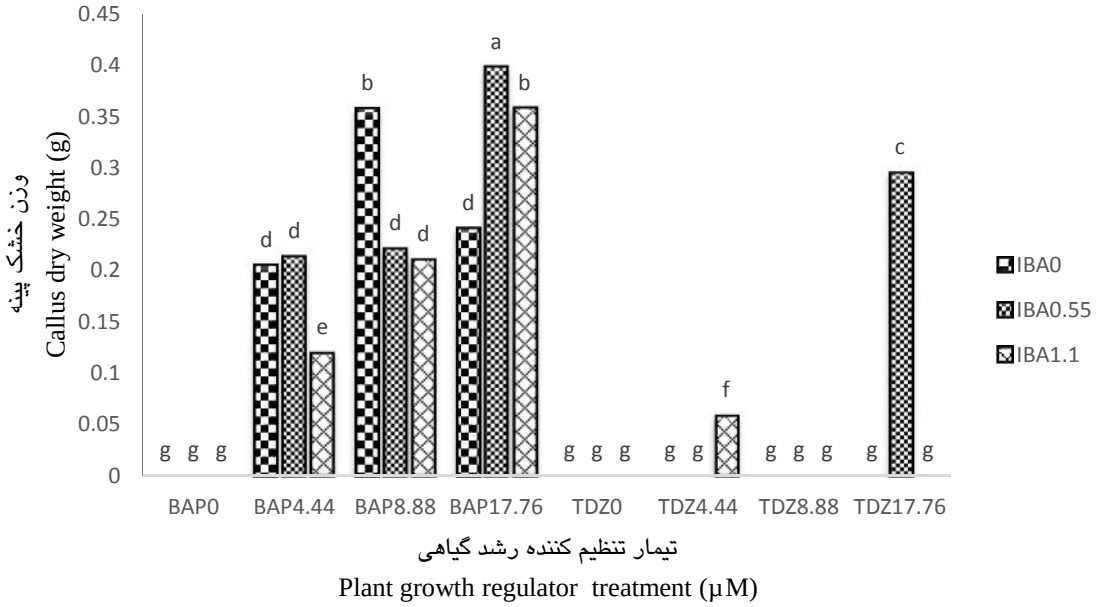

Fig. 6. Interaction effects of type and concentration of cytokinin with IBA on dry weight of leaf-derived calluses of *Petunia hybrida* Double Cascade series. Means with similar letters are not significantly different at 1% level of probability using Duncan's multiple range tests.

شکل۶ – اثرهای برهم‌کنش نوع و غلظت سیتوکینین به همراه IBA بر وزن خشک پینه در ریزنمونه برگی اطلسی دورگه سری Double Cascade. حرف‌های مشترک نشان دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

Downloaded from journal.irshs.ir at 10:55 +0430 on Sunday August 5th 2018

طول شاخساره باززایی شده و شمار برگ و گره

نتیجه‌های واکاوی آماری نشان داد، طول شاخساره در بین تیمارهای مختلف از ۲۹/۸۵ تا ۰/۸ میلی متر متفاوت بوده است. شکل ۷ نشان می‌دهد بیشترین میانگین طول شاخساره در محیط‌های کشت ۸/۸۸ و ۴/۴۴ میکرومولار BAP در ترکیب با ۱/۱ میکرومولار IBA به‌ترتیب (۲۹/۸۵ و ۲۸/۱۴ میلی‌متر) مشاهده شد. با افزایش غلظت اکسین در هر دو تیمار ۸/۸۸ و ۴/۴۴ میکرومولار BAP، طول شاخساره افزایش یافت. این نتیجه‌ها نقش اکسین را در افزایش طول یاخته نشان می‌دهد. این درحالی است که در محیط‌های کشت دارای تنظیم‌کننده رشد TDZ و یا بدون تنظیم‌کننده‌های رشد، باززایی به‌دست نیامد. در بیشتر موارد یافت شده است که BAP برای رشد ضروری است و بهتر از دیگر سیتوکینین‌ها برای انگیزش شاخساره است (۲۸). در تیمار ۱۷/۷۶ میکرومولار BAP طول شاخساره کاهش یافته است. مقایسه نتیجه‌های مربوط به طول شاخساره (شکل ۷) با نتیجه‌های مقدار باززایی (شکل ۱) نشان می‌دهد رابطه وارونه‌ای بین طول شاخساره و شمار گیاهچه باززایی شده وجود دارد. افزایش در شمار شاخساره ممکن است بر طول شاخساره‌ها اثرگذار باشد به‌خاطر این‌که ماده‌های غذایی جذب شده در بین شاخساره‌های بیشتری توزیع می‌گردند (۱۹).

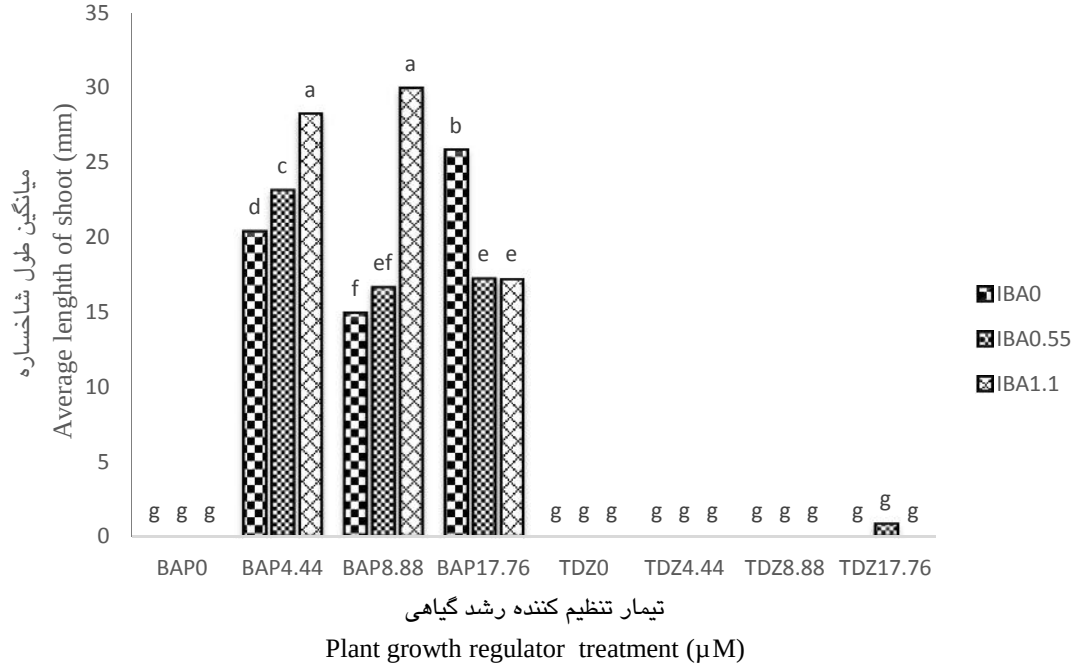

Fig. 7. Interaction effects of type and concentration of cytokinin with IBA on length of regenerated shoots from leaf explants of *Petunia hybrida* Double Cascade series. Means with similar letters are not significantly different at 1% level of probability using Duncan's multiple range tests.

شکل ۷- اثرهای برهم‌کنش نوع و غلظت سیتوکینین به همراه IBA بر طول شاخساره باززایی شده در ریزنمونه برگی اطلسی دورگه سری Double Cascade. حرف‌های مشترک نشان دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

یافته‌ها نشان می‌دهد رابطه‌ی نزدیکی بین طول شاخساره و شمار برگ و گره وجود دارد. در هر دو تیمار ۴/۴۴ و ۸/۸۸ میکرومولار BAP با افزایش غلظت اکسین شمار برگ و گره نیز افزایش یافته است شکل (۸). بیشترین شمار برگ و گره (۱۳/۳۳) در محیط کشت با ۸/۸۸ میکرومولار BAP و ۱/۱ میکرومولار IBA به‌دست آمد. کمترین شمار برگ و گره نیز در تیمار ۱۷/۷۶ میکرومولار TDZ در ترکیب با ۰/۵۵ میکرومولار IBA دیده شد. از یافته‌های این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت سیتوکینین و اکسین باعث تسریع تقسیم یاخته‌ای و در نتیجه تحریک تشکیل برگ

Downloaded from journal.irshs.ir at 10:55 +0430 on Sunday August 5th 2018

و گره می‌شوند. گیاهان تراریخته *Arabidopsis* که مقدار سیتوکینین آن‌ها افزایش یافته بود شمار برگ‌های بیشتری نسبت به شاهد تولید کردند (۳۱). افزون بر این، وجود غلظت زیاد اکسین در ترکیب این محیط کشت موجب شده گیاهچه‌های حاصل از این تیمار دارای طول شاخساره بیشتری نسبت به سایر تیمارها باشند.

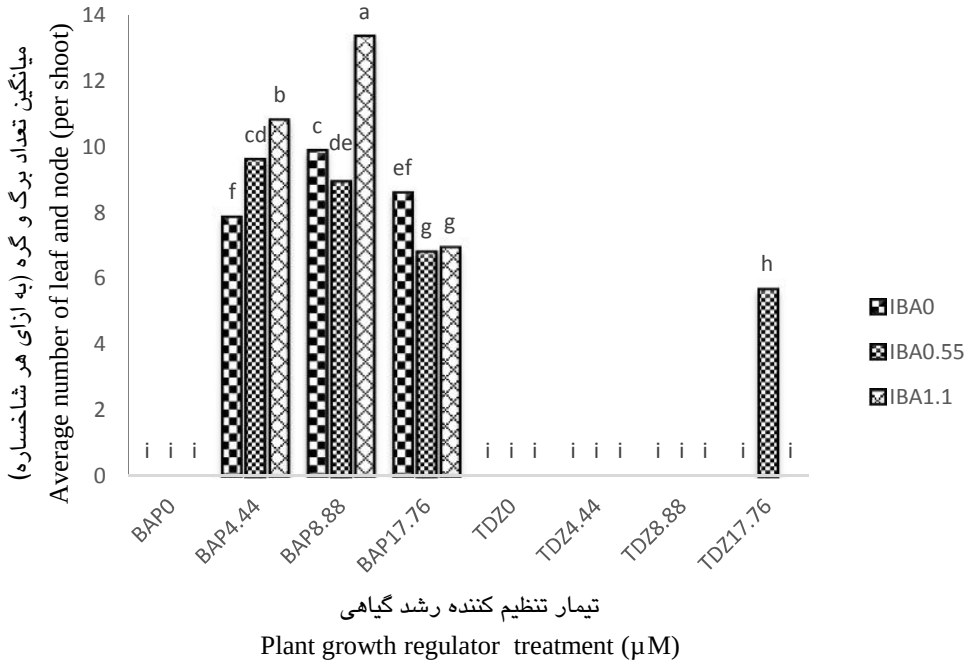

Fig. 8. Interaction effects of types and concentrations of cytokinin with IBA on the number of leaves and nodes of regenerated shoots from leaf explants of *Petunia hybrida* Double Cascade series. Means with similar letters are not significantly different at 1% level of probability using Duncan's multiple range tests.

شکل ۸- اثرهای برهم‌کنش نوع و غلظت سیتوکینین به همراه IBA بر شمار برگ‌ها و گره‌ها در ریزنمونه برگی اطلسی دورگه سری Double Cascade. حرف‌های مشترک نشان دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد با آزمون دانکن می‌باشد

مقایسه نتیجه‌ها نشان می‌دهد رابطه وارونه‌ای بین مقدار باززایی با شمار برگ و گره و طول شاخساره وجود دارد. به‌طوری که با افزایش غلظت BAP (۱۷/۷۶ میکرومولار) در حضور غلظت‌های ۰/۵۵ و ۱/۱ میکرومولار IBA، شمار برگ و گره کاهش یافته است که می‌تواند به‌خاطر برقراری تعادل هورمونی برای افزایش تقسیم‌های یاخته‌ای بیشتر و باززایی شاخساره‌های زیاد با ارتفاع کمتر باشد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که برهمکنش BAP و IBA، اثر بیشتری روی باززایی اطلسی داشت، در حالی‌که تنظیم‌کننده رشد TDZ همراه با IBA، موجب کاهش مقدار باززایی می‌شود. با توجه به فراوانی ریزنمونه برگ و کشت سریع و آسان‌تر آن پیشنهاد می‌شود از این ریزنمونه در غلظت ۴/۴۴ میکرومولار BAP بدون اکسین استفاده شود که از نظر اقتصادی مقرون به‌صرفه می‌باشد.

منابع References

۱. بیات، ح.، س.ح. نعمتی، ع. باقری، ع. تهرانی فر و م. ساعی. ۱۳۹۲. هتروزیس و قابلیت ترکیب پذیری لاین های اینبرید اطلسی (*Petunia hybrida* Hort.) برای ویژگی‌های زینتی. مجله به نژادی نهال و بذر، ۱۷۷-۱۵۹ :۲۹.

۲. جمشیدنیا، م.، س. قبادی، ب. سیدطباطبائی و الف. یامچی.۱۳۹۰. باززایی مستقیم شاخساره از برگ گیاه اطلسی. مجموعه مقالات هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران، ۱۸۱ – ۱۷۹.

۳. رستمی، ر.، پ. ابریشم‌چی و م. لاهوتی. ۱۳۸۸. بررسی اثر غلظت‌های مختلف 2, 4-D بر کشت بافت مریستم سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*). مجله علوم دانشگاه چمران اهواز، ۱۲۹– ۱۱۷ :۲۲.

۴. فارسی، م. و ج. ذوالعلی. ۱۳۸۴. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۵۰۸ ص.

۵. قاسمی قهساره، م. و م. کافی. ۱۳۸۹. گلکاری علمی و عملی. انتشارات مولف اصفهان. چاپ ششم. جلد اول. ۳۱۰ ص.

۶. کافی، م.، الف. زند. ب. کامکار. ح. شریفی و م. گلدانی. ۱۳۸۵. فیزیولوژی گیاهی (تالیف تایز و زایگر). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. چاپ ششم. جلد دوم. ۳۷۹ ص.

۷. مدنی، گ.، س. قبادی. ب. سیدطباطبایی. م. طالبی و الف. یامچی. ۱۳۹۲. اثر تنظیم‌کننده های رشد و انواع ریزنمونه بر باززایی و ریز ازدیادی توت فرنگی تجاری رقم سلوا (*Fragaria* x *ananassa* cv. Selva). مجله علوم و فنون کشت های گلخانه‌ای، ۱۲۲–۱۱۱ :۴.

۸. نوبخت وکیلی، الف. و ه. باقری. ۱۳۹۵. مقایسه مقدار باززایی دو رقم اطلسی ایرانی. کنگره بین المللی و کنگره ملی ژنتیک ایران، ۶–۱.

9. Abdellatef, E. and M.M. Khalafallah. 2007. Adventitious shoot formation and plant regeneration in medium staple cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivar Barac B-67. Int. J. Agr. Biol. 9: 913-916.

10. Abu-Qaoud, H. 2012. Improving adventitious shoot regeneration from culture leaf explants of *Petunia hybrida* using thidiazuron. Afr. J. Biotech. 11:11230 – 11235.

11. Abu-Qaoud, H. and M. Shtaya. 2014. The effect of colchicine on adventitious shoot regeneration from cultured leaf explants of *Petunia hybrid*a. Brit. Biotech. J. 4(5):531 -540.

12. Auer, C., V. Motyka, A. Btezinova and M. Kaminek. 1999. Endogenous cytokinin accumulation and cytokinin oxidase activity during shoot organogenesis of *Petunia hybrid*a. Physiol. Plant. 105:141-147.

13. Blanchard, M. and E. Runkle. 2009. Petunias. Prod. Energy-Efficient Ann. 6:37-41.

14. Burbulis, N., A. Blinstrubiene and V. Jonytiene. 2015. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Petunia hybrid*a. Propag. Ornament. Plant. 2(15):47-52.

15. Dole, J.M. and H.F. Wilkins. 2005. Floriculture: Principles and Species. Pearson, Pp. 744-750.

16. Faisal, M., N. Ahmad and M. Anis. 2005. Shoot multiplication in *Rauvalifa tetraphylla* L. using thidiazuron, Plant Cell, Tiss. Organ Cult. 80:187-190.

Downloaded from journal.irshs.ir at 10:55 +0430 on Sunday August 5th 2018

Downloaded from journal.irshs.ir at 10:55 +0430 on Sunday August 5th 2018

17. Foo, E., E. Bullier, M. Goussot, F. Foucher, C. Rameau and C.A. Beveridge 2005. The baraching gen RAMOSUSI mediates interaction among two novel signal and auxin in pea. Plant Cell. 17:464-474.

18. Guo, B., B.H. Abbasi, A. Zeb, L.L. Xu and H. Wei. 2011. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. Afr. J. Biotech. 10(45):8984-9000.

19. Huy, N. and T. Xuan-Mai. 2014. Investigation of effective *in vitro* propagation media for *Stevia rebaudiana* Bertoni. Asia-Pacific J. Sci. Technol. 19:172-180.

20. Ishag, S., M.G. Osman and M.M. Khalafalla. 2009. Effect of growth regulators, explant and genotype on shoot regeneration in Tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Omdurman). Int. J. Sust. Crop Prod. 4(6):7-13.

21. Kag, B., V. Hegde. B.N. Sathyanarayana. R. Sharath and Sh. Manchali. 2012. Direct regeneration from leaf explants of Petunia, *Petunia hybrida*. Agr. Sci. Technol. 1:12 -17.

22. Khadiga, G., S. Rasheid and M. Khalafalla. 2009. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. Afr. J. Biotech. 8:2529-2534.

23. Mok, M.C., R.C. Martin and D.W.C. Mok. 2000. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro* Cell Dev. Biol. 36:102- 107.

24. Murthy, B.N.S., S.J. Murch and P.K. Saxena. 1998. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro* Cell Dev. Biol. 34:267-275.

25. Opik, H. and S. Rolfe. 2005. The physiology of flowering plants. (4 edition). Cambridge University Press. 392p.

26. Sherkar, H.D. and A.M. Chavan. 2014. Effect of 2, 4-D, BAP and TDZ on callus induction and shoot regeneration in potato. Sci. Res. Rep. 4:101-105.

27. Siddique, I. and M. Anis. 2007. *In* V*itro* shoot multiplication and plantlet regeneration from nodal explants of *Cassia angustifolia.* Acta Physiol. Plant. 29:233-238.

28. Taware, A., D. Mukadam. A. Chavam and S. Taware. 2010. Comparative studies of *in vitro* and *in vivo* growth plants and callus of *Stevia rebaudiana*. Int. J. Integ. Biol. 1:1-10.

29. Tejavathi, D.H. and M.N. Indira. 2013. Regeneration of shoot from leaf callus cultures of drymaria *cordata* willd exroem and schult. Ind. J. Fundam. Appl. Life Sci. 3:111-115.

30. Thirukkumaran, G., V. Otang Ntui. R. Sher Khan and M. Mii. 2009. Thidiazuron: an efficient plant growth regulator for enhancing *Agrobacterrium*- mediated transformation in *Petunia hybrid*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 13:1-7.

31. Werner, T., V. Motyka. M. Strand and T. Schmulling. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. Plant Biol. 98:10487-10492.

Downloaded from journal.irshs.ir at 10:55 +0430 on Sunday August 5th 2018

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 18 (3): 259 - 270 (2017)

Effect of Growth Regulators on Proliferation of Leaf Explants of *Petunia hybrida* Double Cascade Series

F. Khezerlou, Z. Jabbarzadeh* and P. Noruzi[1]

Downloaded from journal.irshs.ir at 10:55 +0430 on Sunday August 5th 2018

The present study, aimed to investigate the effects of different concentrations of plant growth regulators such as auxin (IBA) and cytokinin (BAP, TDZ) on shoot proliferation from leaf explants of *Petunia hybrida* on MS medium. The experiment was conducted as a factorial with completely randomized design including two factors and 3 replications. In this experiment, 4 concentrations of BAP or TDZ (0, 4.44, 8.88 and 17.76 µM) and 3 concentrations of IBA (0, 0.55 and 1.1 µM) were used. The highest amount of regenerated shoots, fresh and dry weight of shoots and callus were obtained in medium containing 17.76 µM BAP and 0.55 µM IBA. Explants on media supplemented with TDZ, turned yellow with no regeneration. The longest shoots were observed in media containing 1.1 µM IBA in combination with 4.44 and 8.88 µM BAP and number of leaves and nodes were the highest in medium containing 8.88 µM BAP with 1.1 µM IBA. The results showed that on proliferation of leaf explants of *Petunia hybrida* Double Cascade series, BAP was more efficient than TDZ.

Keywords: Benzyl Amino Purine, Cytokinin, regeneration, Thidiazuron, Tissue culture.

1. M.Sc. Graduated Student of Ornamental Plants, Assistant Professors, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran, respectively.
*Corresponding author, E-mail: (z.jabbarzadeh@urmia.ac.ir).