بهبود باززایی شاخساره نابجا از ریزنمونه های برگ اطلسی دورگه با استفاده از غلظت ها و ترکیب های مختلف بنزیل آدنین (BA) و نفتالن استیک اسید (NAA) در شرایط درون شیشه ای

فرزاد نظری[1*]

۱- استادیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

*نویسنده مسئول: f.nazari433@gmail.com

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی اثر مقادیر مختلف (صفر، ۰/۵، ۱ و۲ میلی گرم در لیتر) بنزیل آدنین (BA) به تنهایی و در ترکیب با غلظت های متفاوت (صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم در لیتر) نفتالن استیک اسید (NAA) برای انگیزش و باززایی شاخساره نابجا از قطعات برگ گل اطلسی در محیط کشت MS، انجام شد. کشت ها به مدت دو هفته در تاریکی گذاشته شدند و سپس به روشنایی منتقل شدند. پس از ۲۰ روز از گذاشتن در روشنایی، نتایج نشان داد که BA و NAA اثر معنی داری بر باززایی مستقیم شاخه دارند. بیشترین شمار شاخه در هر ریزنمونه (۱۸ عدد) و نیز بیشترین میزان پینه، به ترتیب در محیط کشت MS دارای ۲ میلی گرم در لیتر BA +۰/۴ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۴ میلی گرم در لیتر NAA به دست آمد. بیشترین میزان باززایی در محیط کشت هایی به دست آمد که دارای غلظت بیشتری از BA نسبت به NAA بودند.

کلمات کلیدی: اطلسی، انگیزش، باززایی مستقیم، شاخساره

مقدمه

گل اطلسی از اولین گیاهانی بودند که به عنوان گیاهان مدل برای شناسایی برخی از ژن های تاثیر گذار در ساخت آنتوسیانین ها بهره گیری شدند (Mol *et al*., 1999). باززایی درون شیشه ای شاخساره در اطلسی از ریزنمونه های مختلف انجام شده است. به طور معمول گزارش شده که دامنه غلظت BA از ۰/۱ تا ۲ میلی گرم در لیتر و دامنه غلظت NAA یا IBA از ۰/۱ تا ۰/۳ میلی گرم در لیتر برای باززایی بهینه شاخساره نابجا از ریزنمونه برگ در اطلسی مناسب می باشد و نیز در بیشتر این گزارش ها روی غلظت BA تاکید داشته اند ولی در همه این تحقیقات هم درصد باززایی و هم تعداد شاخساره به نسبت پایین تر بوده است (Abu-Qaoud *et al*., 2012). هدف از این پژوهش باززایی مستقیم شاخساره از ریزنمونه های برگ اطلسی با میزان باززایی بیشتر و نیز شمار شاخساره بیشتر در کمترین زمان ممکن می باشد.

مواد و روش‌ها

با هدف انجام گندزدایی سطحی، ابتدا بذر ها در زیر دستگاه جریان هوا به ترتیب ابتدا در الکل اتانول ۷۰٪ به مدت دو دقیقه و سپس در وایتکس (کلراکس) ۵٪ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شده و در پایان ۳ مرتبه با آب مقطر اتوکلاو شده شسته شدند (Nazari *et al*., 2014). پس از شستشوی بذرها، آن ها روی کاغذ صافی از پیش اتوکلاو شده خشک شده و در محیط کشت MS دارای ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ۸ گرم در لیتر آگار کشت شدند. سپس بذرهای کشت شده در شیشه ها در شرایط دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه سلسیوس و نور ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه توسط لامپ های فلورسنت خنک) و ۸ ساعت تاریکی تنژیدند. pH تمام محیط کشت های مورد بهره گیری در این پژوهش با بهره گیری از NaOH و HCl ۰/۱ نرمال روی۵/۷ تا ۵/۸ پیش از اتوکلاو تنظیم شد و اتوکلاو آن ها در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی متر مربع، تنظیم شد. از این گیاهان مادری درون شیشه ای یک ماهه برای تهیه ریزنمونه برگ بهره گیری شد. برای تهیه ریزنمونه، پس از انتقال این گیاهان به زیر دستگاه جریان هوا با دقت تمام برگ های کوچک که با طول تقریبی ۱/۵ تا ۲/۵ سانتی متر از روی بوته جدا و به ۴ تا ۵ قسمت تقسیم شدند. به منظور انگیزش شاخه های نابجا از ریزنمونه های برگ، ریزنمونه ها به طور افقی روی سطح محیط کشت

MS دارای غلظت ها و برهمکنش های مختلف BA و NAA کشت شدند (جدول ۱). آزمایش مورد بهره گیری طرح به طور کامل تصادفی با ۱۶ تیمار (دو نوع تنظیم کننده) و ۶ تکرار (هر تکرار یک پتری دیش با ۷ ریزنمونه) بود. پس از کشت ریزنمونه ها روی سطح محیط کشت، نمونه ها به مدت ۲ هفته در تاریکی و در دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از ۲هفته نمونه ها به شرایط روشنایی انتقال داده شدند و پس از ۲۰ روز از انتقال به روشنایی درصد ریزنمونه هایی که شاخه تولید کرده و نیز میانگین تولید شاخه به ازای هر ریزنمونه و همچنین میزان تولید پینه آنها بررسی شد. برای سنجش مقدار پینه بر اساس وضعیت ظاهری رشدی آن به صورت کیفی شماره های ۱ تا ۴ در نظر گرفته شد. به این صورت که عدد ۱ نمایانگر میزان رشد کمتر، رنگ قهوه ای و نامناسب آن و عدد ۴ نمایانگر پینه با رشد مناسب و دارای رنگ سبز پر رنگ بود. برای واکاوی آماری داده ها از نرم افزار آماری MSTAT-C بهره گیری شد و میانگین ها در سطح احتمال ۱٪ با آزمون توکی مقایسه شدند.

نتایج و بحث

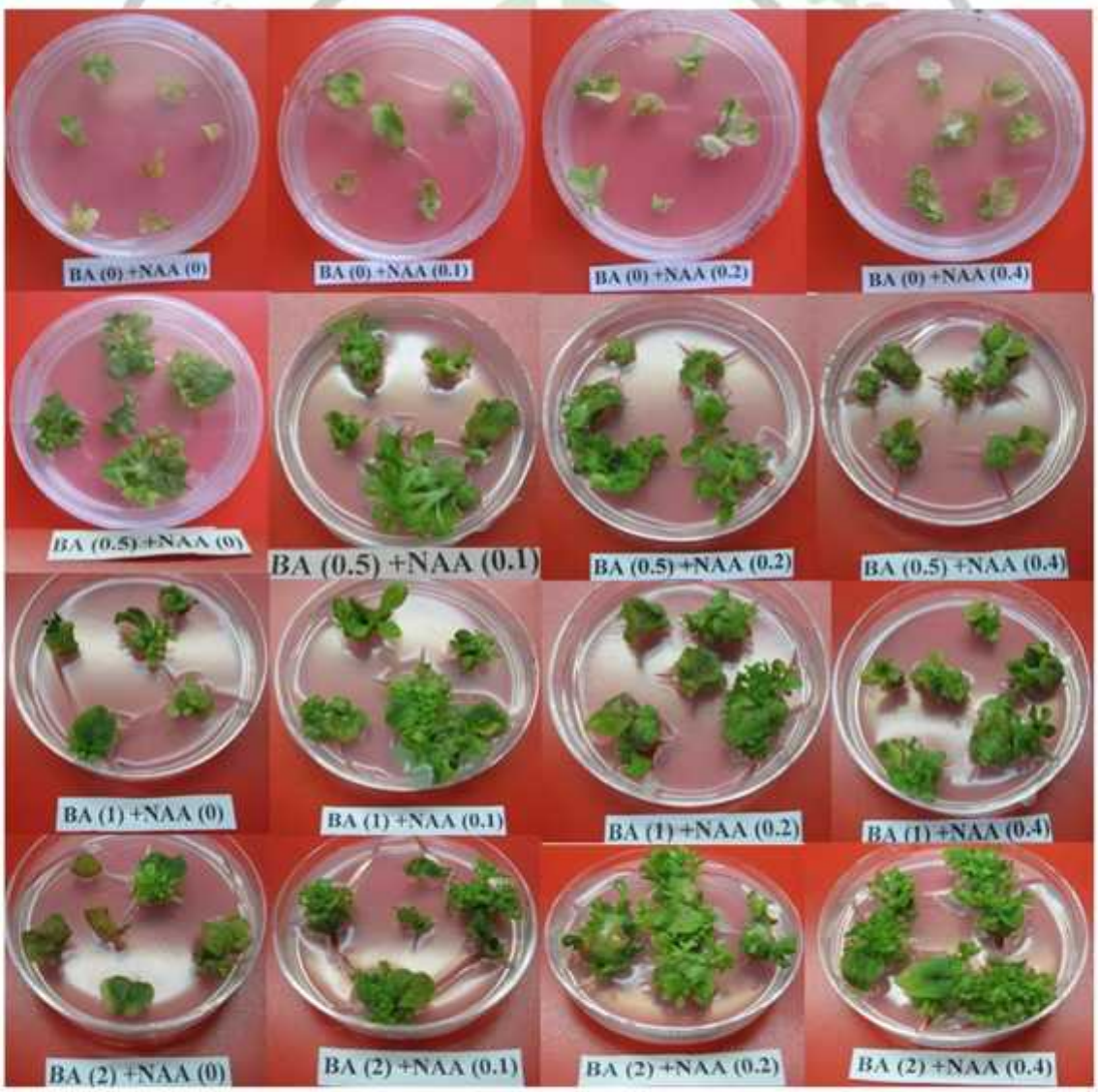
پس از یک ماه از کاربرد تیمار تنظیم کننده های رشد BA و NAA به تنهایی و یا در برهمکنش با هم، باززایی مستقیم شاخه از ریزنمونه های برگ، آشکار شد که در تیمارهای بدون تظیم کننده رشد و نیز در تیمار ۰/۴ میلی گرم در لیترNAA، هیچگونه باززایی شاخه مشاهده نشد. بیشترین درصد ریزنمونه های با تشکیل شاخه (۱۰۰ درصد) در تیمارهای ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA به تنهایی،۱میلی گرم در لیتر BA +۰/۲ میلی گرم در لیتر، ۲ میلی گرم در لیتر BA +۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA و تیمار ۲ میلی گرم در لیتر BA +۰/۴ میلی گرم در لیتر NAA به دست آمد. کمترین درصدهای باززایی در محیط کشت های بدون BA به دست آمد (جدول-۱ و نگاره -۱).

جدول ۱-اثر غلظت های مختلف BA و NAA بر باززایی مستقیم شاخساره نابجا و نیز تولید پینه از ریزنمونه های برگ اطلسی.

تنظیم کننده های رشد (میلی گرم در لیتر)		درصد ریزنمونه های با تشکیل شاخه نابجا	میانگین شمار شاخه به ازای هر ریزنمونه	میزان تشکیل پینه در ریزنمونه ها
BA	NAA			
صفر	صفر	۰/۰۰e†	۰/۰۰f	۰/۰۰c
صفر	۰/۱	۴/۷۵e	۰/۰۵f	۱/۳۳bc
صفر	۰/۲	۶/۶۷de	۰/۰۶f	۱/۶۷abc
صفر	۰/۴	۰/۰۰e	۰/۰۰f	۱/۵۰abc
۰/۵	صفر	۱۰۰/۰۰a	۸/۷۷b-e	۰/۰۰c
۰/۵	۰/۱	۶۲/۳۳b	۴/۴۲b-f	۲/۰۰ab
۰/۵	۰/۲	۳۳/۳۳c	۱/۴۰ef	۲/۱۷ab
۰/۵	۰/۴	۴۰/۰۰c	۳/۰۰def	۳/۱۷a
۱	صفر	۶۶/۶۷b	۵/۲۷bf	c۰/۰۰
۱	۰/۱	۹۳/۳۳a	۵/۷۵bf	c۰/۰۰
۱	۰/۲	۱۰۰/۰۰a	۱۰/۶۷bc	۳/۰۰ab
۱	۰/۴	۹۴/۳۳a	۳/۸۰c-f	c۰/۰۰
۲	صفر	۲۶/۱۱cd	۲/۹۰def	c۰/۰۰
۲	۰/۱	۹۳/۳۳a	۹/۰۰bcd	c۰/۰۰
۲	۰/۲	۱۰۰/۰۰a	۱۱/۷۰b	c۰/۰۰
۲	۰/۴	۱۰۰/۰۰a	۱۸/۰۰a	۲/۶۷ab

†در هر ستون میانگین هایی که دارای حروف یکسان هستند در سطح احتمال ۱٪ آزمون توکی تفاوت معنی داری با هم ندارند.

در محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد هیچگونه باززایی شاخساره ای مشاهده نشد. در محیط کشت هایی که تنها دارای NAA بودند یا شاخساره مشاهده نشد و یا اینکه دارای تعداد خیلی کمی بودند. بیشترین شمار شاخساره (۱۸ عدد) به ازای هر ریزنمونه برگ در تیمار ۲ میلی گرم در لیتر BA +۰/۴ میلی گرم در لیتر NAA به دست آمد که با تمامی تیمارها تفاوت معنی داری داشت (جدول-۱ و نگاره-۱). مشابه باززایی شاخساره، در محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد هیچگونه پینه ای مشاهده نشد. بیشترین میزان پینه در محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۴ میلی گرم در لیتر NAA به دست آمد. در تیمارهایی که دارای NAA به تنهایی بودند رنگ پینه کرم و قهوه ای بود ولی در تیمارهایی که دارای BA هم بودند بسته به غلظت آن رنگ پینه متفاوت بود. در تیمارهایی که غلظت BA کمتر بود رنگ پینه قهوه ای متمایل به سبز بود و در غلظت های بیشتر رنگ آن کاملا سبز بود (جدول-۱ و نگاره-۱). نتایج این پژوهش نشان داد که BA به تنهایی توانایی باززایی شاخساره را دارد ولی چنانچه همراه با آن از NAA استفاده شود به نسبت غلظت بالاتری از آن نیاز است. جالب تر اینکه وقتی از BA به تنهایی استفاده شود در غلظت های بالاتر کارایی کمتری در باززایی شاخساره از ریزنمونه های دمبرگ دارد. در واقع در اینجا مشخص است که توانایی باززایی بستگی به تعادل این دو هورمون در محیط کشت و نیز به صورت درونی در ریزنمونه دارد. بنابراین افزایش میزان آکسین درونی با استعمال خارجی آن ممکن است اثر بازدارنده ای بر میزان باززایی شاخساره از ریزنمونه های برگ داشته باشد (Subotic, 2008).



نگاره ۱-اثر غلظت های مختلف BA و NAA بر باززایی مستقیم شاخساره نابجاو نیز تولید پینه از ریزنمونه های برگ اطلسی.

منابع

1. Abu-Qaoud H. 2012. Improving adventitious shoot regeneration from cultured leaf explants of *Petunia hybrida* using thidiazuron. Afr. J. of Biotechnol. 11: 11230-11235.
2. Mol, J., E. Cornish, J. Mason, and R. Koes. 1999. Novel colored flowers. Curr. Opin. Biotechnol. 10:198–201.
3. Nazari, F., M. Khosh-Khui, P. Azadi, H. Salehi, and A. Niazi. 2014. Growth regulators affected *in vitro* propagation of pot gerbera (*Gerbera jamesonii* cv. Royal Soft Pink). Intl. J. Agr. Biosci. 3:185-189.

4. Subotic, A., S. Jevremovic, A. Cingel, and S. Milosevic. 2008. Effect of urea- type cytokinins on axillary shoot regeneration of *Impatiens walleriana* L. Biotechnol. 22: 817-819.

Improving adventitious shoot regeneration from leaf explants of *Petunia hybrida* using different concentrations and combinations of benzyl adenine (BA) and naphthalene acetic acid (NAA) under *in vitro* condition

F. Nazari[1*]

Department of Horticultural Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

*Corresponding aurhor: f.nazari433@gmail.com

Abstract

This experiment was conducted to investigate the effects of different concentrations (0, 0.5, 1 and 2 mg L^{-1}) of benzyl adenine (BA) solely and/or in combinations with different concentrations (0, 0.1, 0.2 and 0.4 mg L^{-1}) of naphthalene acetic acid (NAA) on the induction, and regeneration of adventitious shoots in *Petunia hybrida* from leaf segments on Murashige and Skoog (MS) medium. The cultures were placed in darkness for two weeks, then transferred to light condition. After 20 days of keeping in the light condition, the results showed that BA and NAA had significantly effect on shoot regeneration. The highest number of shoots (18 shoots per explant) and the most of callus was obtained in MS medium supplemented with 2 mg L^{-1} BA + 0.4 mg L^{-1} NAA and 0.5 mg L^{-1} BA + 0.4 mg L^{-1} NAA, respectively. The highest evaluations for percentage of shoot regeneration was recorded in the medium with high level of BA to NAA.

Key words: *Petunia*, induction, direct regeneration, shoot.