فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی۹، جلد ۳، شماره ۲، بهار ۸۹، صفحه ۶۱ تا صفحه ۶۵

بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکینین بر ریز ازدیادی گل آهار ظریف *(Zinnia elegans thumbelina)* در شرایط شیشه (In vitro)

هما محمودزاده[۱]، فروغ عباسی[۱]، **شاهده روحانی**[۲]

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد.
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد. **rohani _ 61@yahoo.com**

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۲ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۲۰

چکیده

کشت بافت گیاهی مقدمه‌ای در زیست فناوری بوده و ریز ازدیادی (تکثیر و تولید انبوه گیاهان) از طریق فنون مختلف کشت بافت گیاهی، یکی از مهم‌ترین و موفقیت آمیزترین کاربرد این روش است و فاکتورهای زیادی از جمله غلظت هورمون در ریزازدیادی گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای موثر و مهم می‌باشد. هدف از این پژوهش به دست آوردن غلظت‌های مناسب سیتوکینین‌ها و بررسی اثر این غلظت‌ها بر روی ریز ازدیادی گل آهار ظریف (Zinnia elegans thumbelina) در شرایط شیشه(Invitro) می‌باشد.جهت بررسی اثرات تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برکشت درون شیشه ای گل آهار (Zinnia elegans)، آزمایشی با استفاده از غلظت‌های مختلف انواع سیتوکینین‌ها (بنزیل آمینو پورین و کینتین با غلظت‌های ۱، ۲ و۳ میکرومولار) به صورت فاکتوریل در محیط کشت موراشیگ - اسکوگ (MS) صورت گرفت. ریز نمونه‌های به کار گرفته شده، رویان همراه دو لپه نیمه شده بود. درصد جوانه زنی، تعداد و طول برگ، طول ساقه و طول ریشه مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین تعداد برگ در هورمون BAP با غلظت ۳ میکرومولار بود. بهترین غلظت در افزایش طول برگ، هورمون BAPبا غلظت ۲ میکرومولار، هم چنین تولید شاخه در هورمون BAP با غلظت ۲ میکرومولار دیده شد. بیشترین افزایش طول ساقه مربوط به هورمون BAPبا غلظت ۱ میکرومولار و بیشترین افزایش طول ریشه مربوط به هورمون Kin با غلظت ۲ میکرومولار بود.

کلید واژه: گل آهار، ریزازدیادی، هورمون سیتوکینین، کشت درون شیشه ای.

مقدمه

گل آهار ظریف *(Zinnia elegans thumbelina)* یکی از گونه‌های زینتی خانواده *Asteraceae* با گل‌های رنگارنگ، کوکب مانند بوده وبومی مکزیک است که و پرورش می‌یابد(۲). امروزه تکثیر درون شیشه ای یکی از جنبه‌های تجاری تکثیر خزانه ای بسیاری از گیاهان بوده و روند رو به افزایشی دارد (۳).کشت بافت گیاهی مقدمه ای در زیست فناوری و ریزازدیادی(تکثیر و تولید انبوه گیاهان) از طریق فنون مختلف کشت بافت گیاهی، یکی از مهم‌ترین و موفقیت آمیزترین کاربرد این روش است(۸). در بیشترروش‌های ریزازدیادی گیاهان زینتی از محیط آگار جامد برای فراهم کردن شرایط رشد و تکثیر ریزنمونه‌ها استفاده می شود (۴). این محیط در مقایسه با محیط‌های مایع حالت‌هایی مانند شیشه ای شدن را کمتر نشان می‌دهد، البته گاهی به منظور تکثیر بیشتر و کاهش هم زمان پدیده شیشه ای شدن از محیط دارای دو فاز (فاز مایع روی فاز جامد) نیز استفاده می شود (۵). گاهی نیز

www.SID.ir

ابتدا ریزنمونه در محیط مایع کشت داده شده و سپس به محیط جامد منتقل می شوند (۶). (۷). هدف از این پژوهش بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکینین بر روی میزان ریزازدیادی گل آهار ظریف(Zinnia elegansthumbelina) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذرهای گل آهار *(Zinnia elegans thumbelina)* از ایستگاه تحقیقات گل و گیاه محلات تهیه و پس از ۳۰ دقیقه شستشو با آب جاری و الکل ۷۰ درصد، توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شد. پس از ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل، پوسته بذرها را جدا و رویان به همراه ۲ لپه به محیط کشت موراشیگ – اسکوگ(MS) به همراه غلظت‌های مختلف کینتین و بنزیل آمینو پورین (۱،۲،۳ میکرومولار)، با pH ۸/۵ و آگار ۸٪ منتقل شدند. کلیه مواد، ظروف و محیط‌های کشت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو و پس از سرد شدن محیط‌های کشت، ۲-۵ ریز نمونه به ظروف شیشه ای (ویالهای) حاوی محیط کشت منتقل و در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۱۲۰۰- ۱۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. هر تیمار شامل ۱۰ تکرار بود.

بعد از سه هفته گیاهچه‌ها به خاک منتقل و مراحل رویش بذرها به صورت هفتگی بررسی و پارامترهایی مانند درصد جوانه زنی، تعداد و طول برگ، طول ساقه و طول ریشه اندازه کیری شد. درصد جوانه زنی رویان‌ها در غلظت‌های مختلف هورمون‌های کینتین (KIN) و بنزیل آمینو پورین (BAP) از فرمول زیر بدست آمد:

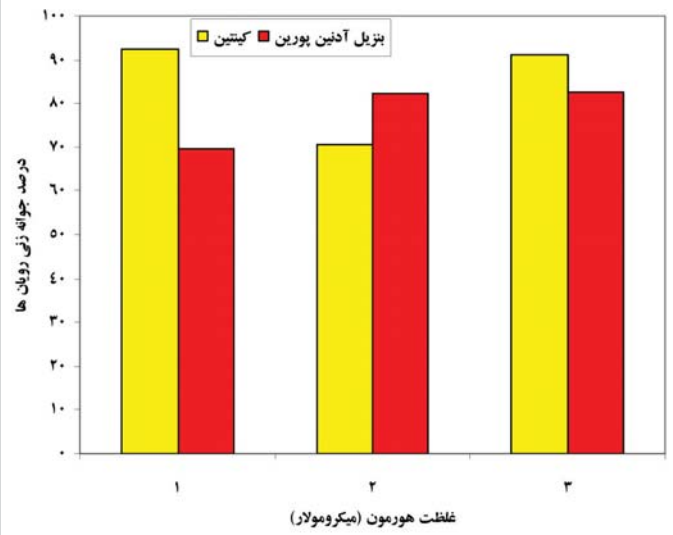
$$\text{درصد جوانه زنی رویان‌ها} = \frac{\text{تعداد رویان‌های جوانه زده}}{\text{تعداد کل رویان‌ها}} \times ۱۰۰$$

تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS وآزمون ANOVA و تست دانکن در سطح کمتر از۰/۰۵ بررسی و رسم نمودارها به کمک برنامه Excelصورت گرفت.

نتایج

دربررسی‌های انجام شده بالاترین درصد جوانه زنی ۹۲/۵٪ مربوط به تیمار۱ میکرومولار کینتین و کمترین درصد جوانه‌زنی رویان‌ها در تیمار۳ میکرومولار بنزیل آدنین پورین مشاهده گردید(نمودار ۱). به طور کلی جوانه زنی رویان‌ها در حضور غلظت‌های مختلف KIN بیشتر از BAP بود.

بیشترین تعداد برگ، در حضور تیمار ۳ میکرومولار بنزیل آدنین پورین مشاهده گردید که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی داری دارد گرچه تیمار ۲ میکرومولار



نمودار ۱-اثر غلظت‌های متفاوت هورمون‌های سیتوکینین بر روی میزان درصد جوانه زنی رویان‌های گل آهار (Zinnia elegans thumbelina) رشد یافته در شیشه (Invitro)

Archive of SID

www.SID.ir

بنزیل آدنین پورین بیشترین رشد طولی برگ را موجب گردیده ولی با سایر تیمارهای BAP تفاوت معنی داری نداشته است (جدول ۱). این تیمار باعث تولید شاخه در دانه رست‌ها می‌شود (شکل۱).بیشترین افزایش طول ساقه مربوط به تیمار۱ میکرومولار بنزیل آدنین پورین در حدود ۲۷/۵ میلی متر است و در سایر غلظت‌های BAP طول ساقه افزایش کمتری را نشان می‌دهد. در حضور غلظت‌های KIN، بیشترین افزایش طول ساقه مربوط به غلظت ۲ میکرومولار در حدود ۲۷/۲۷ میلی‌متر می‌باشد (جدول ۱).در این پژوهش تیمار هورمونی ۲ میکرومولار کینتین تشکیل بلند ترین ریشه را القا نموده و در حضور غلظت ۲ میکرومولار بنزیل آدنین پورین کمترین طول ریشه در دانه رست‌ها مشاهده شده است(جدول ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش بیشترین در صد جوانه زنی رویان‌های گل آهار در حضور هورمون کینتین با غلظت ۱ میکرومولار مشاهده گردید،گرچه در گروه شاهد نیز ۸۲/۶ در صد رویان‌ها جوانه زده که این در صد بالای جوانه زنی در محیط فاقد هورمون را می توان به حضور مقادیر زیادی از کربن، عناصر معدنی و هورمون‌های ذخیره شده در لپه‌ها نسبت داد (۹). اثر هورمون BAP بر جوانه زنی رویان‌ها بیش از کینتین درتحقیقات دیگر گزارش شده است. به عنوان مثال Hartinie در سال ۲۰۰۷ گزارش داد که جوانه زنی رویان‌های *Labisia* pumila در محیط کشت حاوی BAP با غلظت ۱ میکرومولار بیش ازدرصد جوانه زنی رویان‌های محیط کشت حاوی KIN است. مشابه این

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکینین بر فاکتورهای رشد دانه رست‌های گل آهار (Zinnia elegans thumbelina)در شیشه(in vitro)

هورمون / شاخص رشد اندام	کینتین			بنزیل آمینو پورین			شاهد
	۱میکرو مولار	۲میکرو مولار	۳میکرو مولار	۱میکرو مولار	۲میکرو مولار	۳میکرو مولار	
تعداد برگ	۲/۲۸±۰/۱	۲/۳۶±۰/۲	۲±۰/۰	۲/۸۳±۰/۲	۲/۷±۰/۳	۳/۸±۰/۲	۲±۰/۱
طول برگ	۷/۵۷±۰/۵	۷/۵۹±۰/۳	۶/۴۳±۰/۵	۷/۰۸±۰/۷	۸/۶±۰/۹	۷/۹۵±۱/۲	۷±۰/۱
طول ساقه	۲۴/۴۲±۲/۸	۲۷/۲۷±۲/۵	۲۳±۶/۵	۲۷/۵۰±۴/۹	۱۸/۶±۲/۷	۲۲/۵۰±۲/۰	۳۰/۷±۰/۱
طول ریشه	۱۴±۱/۹	۱۶/۹۱±۲/۶	۱۲/۲۹±۲/۴	۱۴/۲۵±۱/۷	۷/۱±۱/۵	۱۳/۴۰±۲/۸	۲۶±۰/۱

شکل۱-دانه رست‌های گل آهار *(Zinnia elegans thumbelina)* در شیشه (in vitro)

www.SID.ir

نتایج را بر روی گیاه *Kniphofia* و گیاه *Swainsona* به دست آمده است (۱۰). سیتوکینین‌های آزمایش شده در این بررسی را می توان بر اساس فعالیت‌های فیزیولوژیکی به دو گروه الف- بنزیل آمینو پورین که دارای اثرات ضعیف‌تر و ب- کینتین که بسیار فعال می باشد، تقسیم کرد. در رشد طولی ریشه و ساقه نیز کینتین موثرتر از بنزیل آمینو پورین عمل کرد، در حالی که BAP در شاخه زایی اثر قوی‌تر و موثرتری داشت. سیتوکینین‌ها، هورمون‌های گیاهی هستند که در تنظیم فرایندهای مختلف رشد و نمو حائز اهمیت اند. از میان فعالیت‌های متعدد این هورمون، اثرات آن‌ها بر رویش، جوانه زنی بذر و مورفوژنز اندام‌های هوایی قابل توجه است.با استفاده از روش‌های جدید، متابولیسم بسیار فعال این هورمون‌ها را در همه مراحل جوانه زنی از مرحله جذب آب تا ظهور ریشه اولیه و شروع استقرار دانه نشان داده شده است (۱۱). از طرف دیگرسیتوکینین‌های اگزوژن، اثرات متنوعی بر جوانه زنی بذرها در گونه‌های مختلف دارند. اثرات تحریک کنندگی آن‌ها بیشتر مربوط به مقابله با فاکتورهای تنشی است. کینتین یکی از تنظیم کننده‌های رشد است که دوره خواب دانه را که به وسیله شوری القاء شده، از بین می برد(۱۲). تنش القا شده به وسیله فلزات سنگین نظیر سرب و روی، موجب افزایش زآتین و زآتین ریبوزید اندوژن در بذرهای گیاه نخود می‌شود (۱۳)، در حالی که کینتین اثرات مضر مس و روی در *Lupinus* را خنثی می‌نماید (۱۴). هم چنین گزارش شده است که کینتین قوه نامیه بذرهایی را که در معرض تنش هستند از طریق محافظت غشاهای سلولی در برابر تنش اکسیداتیو افزایش می دهد (۱۵). در بذرهای تعدادی از لگوم‌هایی که تعداد دانه‌های آن‌ها زیاد است، سیتوکینین‌ها بر جوانه زنی بذر تاثیری ندارد (۱۶). Spichal و همکاران(۲۰۰۴) ثابت کرده اند که گیرنده‌های سیتوکینین مشابه در شناسایی و تشخیص سیتوکینین‌ها به عنوان لیگاند و نیزانتقال سیگنال‌های خود به فرایندهای بیولوژیکی متفاوت عمل می کنند (۱۷). حضور BAP شاخه زایی و تشکیل ساقه‌های متعدد را در تحقیق حاضر، تحریک نمود، در حالی که محیط کشت‌های شاهد و حاوی کینتین در شاخه زایی شکست خوردند. این یافته‌ها در مورد باززایی ساقه‌ها، با تحقیقات Nikolic و همکاران (۲۰۰۶) هم‌خوانی دارد(۱۸).(۲۰۰۵) Bunn) نشان داد که BAP, KIN به تنهایی و یا به صورت ترکیبی برتکثیر شاخه در اکالیپتوس اثرات خوبی دارند و بهترین تیمار شاخه زایی را در غلظت‌های ۲ میکرومولار کینتین و غلظت ۰/۲۵ میکرومولار BAP در ریزازدیادی گونه *E.impensa* بیان نمود (۱۹). در این پژوهش نیز اثر BAP بر شاخه‌زایی که با پژوهش‌های قبلی هم‌سویی دارد. در اکثر بررسی‌های کشت بافتی، BAP به عنوان سیتوکینین بسیار فعال در شاخه زایی عمل می کند. Goerge نشان داد (۱۹۹۳)کینتین در تکثیر شاخه BAP اثر منفی دارد(۲۰). Bionda و همکاران (۲۰۰۴) نیز گزارش دادند پدیده مشابهی در رابطه با تاثیر ضعیف سیتوکینین بر تکثیر شاخه در گیاه *Mandevilla* وجود دارد(۲۱). محققین دیگر نیز اثر مثبت کاربرد سیتوکینین‌ها را در صفات شاخه زایی نشان دادند(۲۲). با به کار بردن ۲میکرو مولار BAP در محیط MS تولید شاخه و افزایش رشد طولی آن در *Z.elegans* مشاهده شد.

منابع

۱- حکمتی جمشید۱۳۸۲.گل‌های فصلی(گل‌های فضای ازاد).انتشارات علوم کشاورزی.۸۶-۸۳.

۲-کریمی‌هادی۱۳۸۱.فرهنگ رستنی‌های ایران.جلد دوم. انتشارات پرچم.۴۶۷.

۳- خوشخوی مرتضی۱۳۷۸.گیاه‌افزایی (ازدیاد نباتات)، مبانی و روش‌ها.جلد سوم.انتشارات دانشگاه شیراز.۱۰۶۲-۱۰۰۳.

4. Skirvin R M, Chu M C , Yong H J. (1990) Handbook of plant cell culture. 5: 716-743.

5.Pierik R LM. (1987) In Vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. boston.

6. Brave D M, Lyer R S, Kendurkar S ,Mascarenhas A F.(1986) An effective method for rapid

Archive of SID

www.SID.ir

propagation of some buded rose variety. Indian journal of horticulture. 41: 1-7.

7. Ziv M, Mier g, Halevy A H.(1983) Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro. Plant cell, tissu and organ culture.2: 55-65.

۸- معینی احمد، کهریزی دانیال(تالیف، اکرم م.تاجی،ویلیام ا.داد،ریچارد ا،ویلیامز)(۱۳۸۲).کشت بافت گیاهی.انتشارات بسیج دانشجویی تهران.

9.Hopkins huner W.G. Hopkins N.P.A. Huner.(2004) Introduction to Plant Physiology,john Wiley& Sons.New jersey.

10. Yang Z. Yang Z. Hu G.Q. Guo G.C. Zheng ET.(2001) In vitro plant regeneration from cotyledon explants of Swainsona salsula Taubert. Plant Cell Tissue Organ Cult. 66: 35-39.

11. Chiwocha SDS, Cutler AJ, Abrams SR, Ambrose SJ, Yang J.(2005)The ert 1-2 mutation in Arabidopsis thaliana affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberreiiin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist chilling and germination. Plant J. 42:35-48.

12. Khan MA, Ungar IA.(1997). Alleviation of seed dormancy in the desert forb Zygophyllum simplex L. from Pakistan. Ann Bot. 80:395-400.

13. Atici O, Agar G, Battal P. (2005)Changes in phytohormone contents in chickpea seeda germinating under lead or zink stress.Biol Plant. 49:215-222.

14. Gadallah MAA, EL-Enany AE.(1999)Role of kinetin in alleviation of copper and zinc toxicity in lupines termis plants. Plant Growth R EGUL 29:151-160.

15. Chaitanya KSK, Naithani SC.(1998) Kinetin-mediated prolongation of viability in recalcitrant sal(Shorea robusta Gaertn f.) seed at low temperature: role of kinetin in delaying membrane deterioration during desiccation-induced injury. J plant Growth Regul. 17:63-69.

16. Malik KA, Saxena PK.(1992) Somatic embryogenesis and shoot regeneration from intact of Phaseolus acutifolius A.,P. aureus(L) Wilczek, P. coccineus L., and P.wrightii L.Plant Cell Reports. 11:163-168.

17. Spichal L, Rakova NYu, Riefler M, Mizuno T, Romanov GA.(2004)Two cytokinin receptors of Arabidopsis thaliana, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay.Plant Cell Physiol 45:1299-1305.

18. Nikolic R, Mitic N, Neskovic M.(1997)Evaluation of agronomic traits in tissue culture-derived progeny of birds-foot trefoil. Plant Cell Tiss Org Cult. 48:67-69.

19. BennetIJ,McCombJA,TonkinCM, McDavid DAJ. (1993) Alternating cytokinins in multiplication media stimulates in vitro shoot growth and rooting of E.globulus Labill.Annals of Botany,74:53-58.

20. George E F.(1993) Plant propagation by tissue culture(part I:The technology).Exegetics LTD,UK.

21. Bionda R. Biondo A.M,Soares BW,Bertoni S C,Franca A.M.S. (2004) Pereira, direct organogenesis of Mandevilla illustris(Vell) Woodson and effects of its aqueous extract on the enxymatic and toxic activities of Crolatus durissus terrificus snak venom.Plant Cell REP.22:540-552.

22. Lakshmi-Sita G.(1993)Micropropagation of Eucalyptus of Eucalyptus.KluwerAcademic Publisher,NAETHERLANDS.

263-280.

Archive of SID

www.SID.ir