

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

شماره پیاپی ۹، 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 کاربردهای 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 بر کشت درون شیشه ای گل آهار (*Zinnia elegans*)، آزمایشی با استفاده از غلظت‌های مختلف انواع سیتوکینین‌ها (بنزیل آمینو پورین و کینتین با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میکرومولار) به صورت فاکتوریل در محیط کشت موراشیک - اسکوک (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 BAP با غلظت ۲ میکرومولار، هم چنین تولید شاخه در هورمون BAP با غلظت ۲ میکرومولار دیده شد. بیشترین افزایش طول ساقه مربوط به هورمون BAP با 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

یکی از مهم‌ترین و موفقیت آمیزترین کاربردهای این روش است (۸). در بیشتر روش‌های ریزازدیادی گیاهان زینتی از محیط آگار جامد برای فراهم کردن شرایط رشد و تکثیر ریزنمونه‌ها استفاده می‌شود (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 می‌شود (۵). گاهی نیز

گل آهار ظریف (*Zinnia elegans thumbelina*) یکی از گونه‌های زینتی خانواده *Asteraceae* با گل‌های رنگارنگ، کوب مانند بوده و بومی مکزیک است که 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،

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 گیری شد. درصد جوانه زنی رویان‌ها در غلظت‌های مختلف هورمون‌های کینتین (KIN) و بنزیل آمینو پورین (BAP) از فرمول زیر بدست آمد:

$$100 \times \frac{\text{تعداد رویان‌های جوانه زده}}{\text{تعداد کل رویان‌ها}} = \text{درصد جوانه زنی رویان‌ها}$$

تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون ANOVA و تست دانکن در سطح کمتر از ۰/۰۵ بررسی و رسم نمودارها به کمک برنامه Excel صورت گرفت.

نتایج

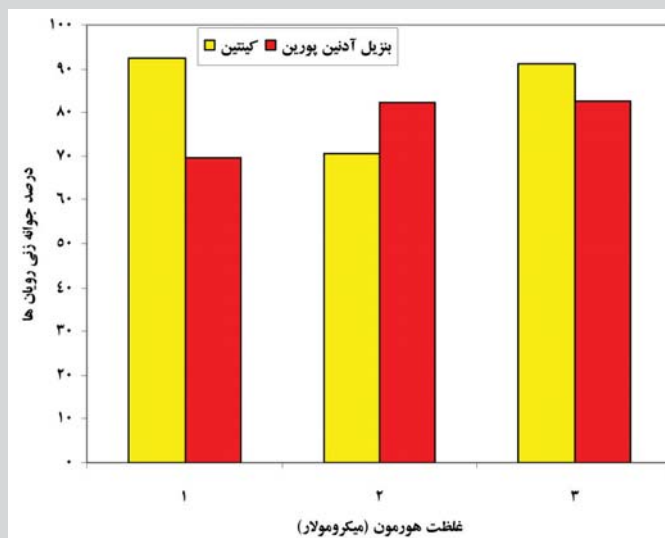
در بررسی‌های انجام شده بالاترین درصد جوانه زنی ۹۲/۵٪ مربوط به تیمار ۱ میکرومولار کینتین و کمترین درصد جوانه‌زنی رویان‌ها در تیمار ۳ میکرومولار بنزیل آدنین پورین مشاهده گردید (نمودار ۱). به طور کلی جوانه زنی رویان‌ها در حضور غلظت‌های مختلف KIN بیشتر از BAP بود.

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

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 elegans thumbelina) 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، ۱۰، ۲۰ 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.



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

بحث و نتیجه گیری

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 در تحقیقات دیگر گزارش شده است. به عنوان مثال Hartnie در سال ۲۰۰۷ گزارش داد که جوانه زنی رویان‌های *Labisia pumila* در محیط کشت حاوی BAP با غلظت ۱ میکرومولار بیش از درصد جوانه زنی رویان‌های محیط کشت حاوی KIN است. مشابه این

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 (شکل ۱). بیشترین افزایش طول ساقه مربوط به تیمار ۱ 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 میلی متر 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).

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

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

شکل ۱- دانه رست‌های گل آهار (*Zinnia elegans thumbelina*) در شیشه (in vitro)



(۱۵). در بذرهاي تعدادی از لگوم‌هایی که تعداد دانه‌های آن‌ها زیاد است، سیتوکینین‌ها بر جوانه زنی بذر تاثیري ندارد (۱۶). Spichal و همکاران (۲۰۰۴) ثابت کرده‌اند که گیرنده‌های سیتوکینین مشابه در شناسایی و تشخیص سیتوکینین‌ها به عنوان لیگاند و نیز انتقال سیگنال‌های خود به فرایندهای بیولوژیکی متفاوت عمل می‌کنند (۱۷). حضور BAP شاخه زایی و تشکیل ساقه‌های متعدد را در تحقیق حاضر، تحریک نمود، در حالی که محیط کشت‌های شاهد و حاوی کیتین در شاخه زایی شکست خوردند. این یافته‌ها در مورد باززایی ساقه‌ها، با تحقیقات Nikolic و همکاران (۲۰۰۶) هم‌خوانی دارد (۱۸). (Bunn ۲۰۰۵) نشان داد که BAP, KIN به تنهایی و یا به صورت ترکیبی بر تکثیر شاخه در اکالیپتوس اثرات خوبی دارند و بهترین تیمار شاخه زایی را در غلظت‌های ۲ میکرومولار کیتین 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 می‌کند. Goerge نشان داد (۱۹۹۳) کیتین 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 ۲ میکرومولار BAP در محیط MS تولید شاخه و افزایش رشد طولی آن در *Zelegans* مشاهده شد.

نتایج را بر روی گیاه *Kniphofia* و گیاه *Swainsona* به دست آمده است (۱۰). سیتوکینین‌های آزمایش شده در این بررسی را می‌توان بر اساس فعالیت‌های بیولوژیکی به دو گروه الف- بنزیل آمینو پورین که دارای اثرات ضعیف‌تر و ب- کیتین که بسیار فعال می‌باشد، تقسیم کرد. در رشد طولی ریشه و ساقه نیز کیتین 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 اهمیت‌اند. از میان فعالیت‌های متعدد این هورمون، اثرات آن‌ها بر رویش، جوانه زنی بذر و مورفوژن 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 دیگر سیتوکینین‌های آگروژن، اثرات متنوعی بر جوانه زنی بذرها در گونه‌های مختلف دارند. اثرات تحریک کنندگی آن‌ها بیشتر مربوط به مقابله با فاکتورهای تنشی است. کیتین یکی از تنظیم کننده‌های رشد است که دوره خواب دانه را که به وسیله شوری القاء شده، از بین می‌برد (۱۲). تنش القا شده به وسیله فلزات سنگین نظیر سرب و روی، موجب افزایش زآتین و زآتین ریوزید اندوژن در بذرهاي گیاه نخود می‌شود (۱۳)، در حالی که کیتین اثرات مضر مس و روی در *Lupinus* را خنثی می‌نماید (۱۴). هم چنین گزارش شده است که کیتین قوه نامیه بذرهایی را که در معرض تنش هستند از طریق محافظت غشاهای سلولی در برابر تنش اکسیداتیو افزایش می‌دهد

منابع

- ۱- حکمتی جمشید ۱۳۸۲. گل‌های فصلی (گل‌های فضای ازاد). انتشارات علوم کشاورزی. ۸۶- ۸۳.
- ۲- کریمی هادی ۱۳۸۱. فرهنگ رستنی‌های ایران. جلد دوم. انتشارات پرچم. ۴۶۷.
- ۳- خوشخوی مرتضی ۱۳۷۸. گیاه‌افزایی (ازدیاد نباتات)، مبانی و روش‌ها. جلد سوم. انتشارات دانشگاه شیراز. ۱۰۶۲.
۴. 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

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 gibberellin 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 seeds germinating under lead or zinc 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 Regulation 29:151-160.

15. Chaitanya KSK, Naithani SC.(1998) Kinetin-mediated prolongation of viability in recal-

itrant 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. Bennet IJ, McComb JA, Tonkin CM, 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 enzymatic and toxic activities of Crotalus durissus terrificus snake venom. Plant Cell REP. 22:540-552.

22. Lakshmi-Sita G.(1993) Micropropagation of Eucalyptus of Eucalyptus. Kluwer Academic Publisher, NAETHERLANDS. 263-280.

