

## بهبود اندام‌زایی شاخساره نابه‌جا و تشکیل پینه از ریزنمونه‌های برگ اطلسی دورگه (*Petunia hybrida* L.) با استفاده از بنزیل آدنین (BA) و نفتالن استیک اسید (NAA)

فرزاد نظری<sup>\*۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۲۰)

### چکیده

گل اطلسی یکی از گونه‌های زینتی، با پتانسیل بالای اقتصادی است. یکی از روش‌های مناسب برای تکثیر و به‌نژادی آن، ریززایی (کشت بافت) است. در این پژوهش اثر غلظت‌های متفاوت بنزیل آدنین (BA) به‌تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های مختلف نفتالن استیک اسید (NAA) بر باززایی شاخساره نابه‌جا و تشکیل پینه در اطلسی دورگه بررسی شد. با این هدف، ریزنمونه‌های قطعات برگ از دانه‌های درون‌شیشه‌ای، روی محیط کشت موراشیگی و اسکوک (MS) دارای غلظت‌های متفاوت BA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌تنهایی و در ترکیب با NAA (غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. کشت‌ها به‌مدت دو هفته در تاریکی گذاشته و سپس به روش‌نمایی منتقل شدند. پس از گذشت ۲۰ روز از روش‌نایی، نتایج نشان داد که BA و NAA اثر معنی‌داری بر درصد باززایی، تعداد، طول و وزن تر شاخساره و نیز وزن تر پینه دارند. در استفاده از BA به‌تنهایی، غلظت‌های پایین‌تر آن در باززایی شاخساره مؤثرتر بود، اما در ترکیب با NAA، غلظت‌های بالاتر آن نتایج مناسب‌تری داشت. بیشترین میزان باززایی شاخساره در محیط کشت‌هایی به‌دست آمد که دارای غلظت بیشتری از BA نسبت به NAA بودند. بیشترین تعداد و وزن تر شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه (۱۸ عدد) در محیط کشت MS دارای دو میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. بیشترین طول شاخساره (۵/۱۰ سانتی‌متر) در محیط کشت MS با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. همچنین بیشترین وزن تر پینه در محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. بنابراین، می‌توان برای باززایی مستقیم شاخساره و تکثیر وسیع اطلسی از ریزنمونه‌های برگ، محیط کشت MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA را پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: اطلسی، انگیزش، باززایی مستقیم شاخساره، پینه، نسبت سائتوکینین به اکسین

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

\*: مسئول مکاتبات: پست الکترونیکی: f.nazari@uok.ac.ir

## مقدمه

گل اطلسی از تیره سیب‌زمینی‌سانان (*Solanaceae*) در دهه ۱۹۶۰ میلادی به‌عنوان اولین گل فصلی در دنیا مطرح شد (۱۱ و ۲۴) و امروزه یکی از شاخص‌ترین گل‌های فصل گرم با تنوع رنگ زیاد و کاربردهای متفاوت است، که همیشه ارقام جدیدی از آن وارد بازار می‌شود (۱۰). تولید ارقام جدید در اطلسی با استفاده از روش‌های جدید مهندسی ژنتیک نیازمند یک روش ساده، کم‌هزینه و کارآمد با نسبت باززایی بالا است. همچنین برای تکثیر ارقام پرپر که فاقد اندام‌های جنسی کامل برای تشکیل بذر هستند، یک روش مناسب ریززایی و به‌ویژه باززایی مستقیم شاخساره برای جلوگیری از گوناگونی‌های سوماکلونال (*Somaclonal variation*) و نیز شبیه به اصل بودن گیاهان در همگروه (*True-to-type clonal fidelity*)، ضروری است (۱۸). در باززایی شاخساره از بافت‌های پینه (کالوس)، احتمال وقوع گوناگونی‌های سوماکلونال در بین شاخساره‌های باززایی یافته بیشتر است. به‌عنوان مثال بردالو و همکاران گزارش کردند که پینه‌های ایجاد شده از ریزنمونه‌های برگ و ساقه پنج رقم تجاری سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum L.*)، دارای درصد بالایی از گوناگونی سوماکلونال هستند (۷). اندام‌زایی شاخساره در ریزنمونه‌های برگ اطلسی دورگه تحت تأثیر نوع و اندازه ریزنمونه و نیز مدت زمان تماس آن با بنزیل آدنین (BA) است (۱۲). به‌طور معمول برای باززایی بهینه شاخساره نابه‌جا از ریزنمونه برگ در اطلسی، غلظت BA از ۰/۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر و غلظت نفتالن استیک اسید یا ایندول بوتیریک اسید از ۰/۱ تا ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر مناسب است. از طرف دیگر، در بیشتر این گزارش‌ها روی غلظت BA تأکید داشته‌اند، ولی در همه پژوهش‌ها درصد باززایی و تعداد شاخساره به‌دست آمده به‌ازای هر ریزنمونه به نسبت پایین بوده است (۱). در پژوهشی دیگر، بیشترین تعداد شاخساره جانبی (۷/۸ عدد) به‌ازای هر ریزنمونه ریزشاخساره (*Microshoot*)، در محیط کشت MS دارای ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (۲) به‌طوری که اگر از

ریزنمونه‌های شاخساره استفاده شود، برای پرآوری شاخساره جانبی به نسبت پایین BA و NAA نیاز است. در آزمایش دیگری بیشترین درصد باززایی (۴۵ درصد) و بیشترین تعداد شاخساره (۷/۵ عدد) به‌ازای هر ریزنمونه قطعه برگ، در محیط کشت MS دارای دو میلی‌گرم در لیتر BA بدون استفاده از NAA به‌دست آمد (۲). همچنین بوربولیس و همکاران (۲۰۱۵) در ریزنمونه‌های برگ در دو رقم اطلسی، بیشترین درصد باززایی شاخساره (۷۵/۲ درصد) و تعداد شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه (۴/۴ عدد) با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل آمینوپورین (BAP) به غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر و NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر مشاهده کردند (۸). در گزارشی دیگر بیشترین درصد باززایی شاخساره (۵۲/۱ درصد) از ریزنمونه‌های برگ اطلسی با استفاده از دو میلی‌گرم در لیتر تیدیاورون (TDZ) در محیط کشت MS گزارش شده است (۲۷). البته به‌نظر می‌رسد با توجه به گران‌قیمت بودن تنظیم‌کننده رشد TDZ، استفاده از آن در کشت بافت اطلسی برای باززایی شاخساره توجیه پذیر نباشد. همچنین در پژوهش دیگر غلظت‌های متفاوت TDZ با NAA به غلظت ۲/۷ میکرومول و یا بدون آن، بر باززایی مستقیم شاخساره از ریزنمونه‌های برگ اطلسی بررسی شد که نتایج نشان داد بسته به غلظت ترکیبی تنظیم‌کننده‌های رشد، باززایی متفاوت بوده و بیشترین درصد باززایی (۸۷/۵ تا ۹۰ درصد) زمانی به‌دست آمد که غلظت TDZ بین ۰/۵ تا ۸ میکرومول بود. بیشترین تعداد شاخساره در رقم‌های Daddy Blue (۹ عدد) و DreaMS White (۱۶/۲۵ عدد) به‌ازای هر ریزنمونه در محیط کشت MS دارای چهار میکرومول TDZ بدون کاربرد NAA به‌دست آمد (۱). در این پژوهش دو هدف دنبال شد، هدف اول استفاده از غلظت‌ها و ترکیب‌های متفاوت بنزیل آدنین و نفتالن استیک اسید به‌منظور باززایی مستقیم شاخساره نابه‌جا از ریزنمونه‌های برگ اطلسی، با میزان درصد باززایی بیشتر و نیز تعداد شاخساره بیشتر به‌ازای هر ریزنمونه در کمترین زمان ممکن و هدف دوم تولید پینه با

قابلیت تولید شاخساره نابه‌جا، با استفاده از این تنظیم‌کننده‌های رشد بود.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت و گلخانه گروه علوم باغبانی در دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان انجام شد. برای انجام پژوهش از بذرهای نسل اول (F1) اطلسی دورگه (P. hybrida cv. Petunia Eagle Pink Vein Hybrid F1) تهیه شده از شرکت ساکاتا در ژاپن استفاده شد. با هدف انجام گندزدایی سطحی، ابتدا بذرها در زیر دستگاه هود لامینار به ترتیب ابتدا در اتانول ۷۰ درصد به مدت دو دقیقه و سپس در وایتکس (کلراکس) پنج درصد به مدت پنج دقیقه قرار داده شدند و در پایان سه مرتبه با آب مقطر اتوکلاو شده، شسته شدند (۱۹). قابل ذکر است به دلیل ریز بودن بذرها از کیسه‌های توری کوچک اتوکلاو شده، برای نگهداری آنها در مرحله گندزدایی استفاده شد. پس از شستشوی بذرها، آنها روی کاغذ صافی از پیش اتوکلاو شده خشک کرده و در محیط کشت MS پایه دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هشت گرم در لیتر آگار کشت شدند. سپس بذرها کشت شده در شیشه‌ها، در شرایط دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه سلسیوس و نور ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه توسط لامپ‌های فلورسنت خنک) و هشت ساعت تاریکی پس از دو هفته تثبیدند. پس از تثبیدن بذرها، حدود یک ماه اجازه رشد به دانه‌ها در همین شرایط داده شد و در ادامه آزمایش، از این گیاهان برای تهیه ریزنمونه برگ استفاده شد. برای تهیه ریزنمونه، با انتقال این گیاهان به زیر دستگاه هود لامینار برگ‌های کوچک با طول تقریبی ۱/۵ تا ۲/۵ سانتی‌متر از روی بوته جدا شدند. سپس با نصف کردن برگ‌ها از وسط و حذف لبه‌های برگ، هر کدام از نصف برگ‌ها به ۲ تا ۳ قسمت تقسیم شدند و سپس از سطح نامحور سو (Abaxial) به صورت افقی روی محیط کشت MS قرار گرفتند. به منظور انگیزش شاخساره‌های نابه‌جا و پینه، از غلظت‌ها و برهمکنش‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد BA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (صفر، ۰/۱، ۰/۲

و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. پس از کشت، نمونه‌ها به مدت دو هفته در تاریکی و در دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس به شرایط روشنایی (مشابه شرایط کشت بذرها) انتقال داده شدند و پس از ۲۰ روز، درصد ریزنمونه‌هایی که شاخساره تولید کردند، میانگین تعداد، طول و وزن تر شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه و همچنین وزن تر پینه آنها بررسی شد. pH تمام محیط کشت‌های مورد استفاده در این پژوهش با استفاده از NaOH و HCl ۰/۱ نرمال روی ۵/۷ تا ۵/۸ پیش از اتوکلاو تنظیم شد و اتوکلاو آنها در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌مترمربع، انجام شد. برای سنجش وزن تر شاخساره و پینه از ترازوی دیجیتالی آزمایشگاهی قابل حمل Sartorius با دقت یک صدم گرم استفاده شد. شاخساره‌های به‌دست آمده از باززایی مستقیم ریزنمونه‌های برگ، برای طویل شدن و ریشه‌زایی به محیط کشت نصف غلظت MS دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA منتقل شدند و پس از دو هفته ریشه‌زایی انجام شد. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده درون شیشه‌ای، با انتقال به گلدان‌های سفالی دارای ترکیب خاک‌برگ، خاک و ماسه با نسبت حجمی ۱:۱:۱، به صورت موفقیت‌آمیزی در شرایط گلخانه سازگاری یافتند. آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور (دو نوع تنظیم‌کننده رشد BA و NAA هر کدام در چهار سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر تکرار سه پتری دیش با شش ریزنمونه) بود. برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار آماری MSTAT-C استفاده شد و میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد با آزمون LSD مقایسه شدند.

## نتایج

همچنان که در جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) مشاهده می‌شود اثر متقابل BA در NAA بر همه صفات اندازه‌گیری شده (میزان باززایی شاخساره، تعداد شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه، میانگین طول شاخساره، وزن تر شاخساره و نیز وزن تر پینه) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین همه صفات ارزیابی شده به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر غلظت‌های مختلف BA و NAA، بر باززایی مستقیم شاخساره نابه‌جا و نیز تولید پینه از ریزنمونه‌های برگ اطلسی دورگه

منابع تغییر	درجه آزادی	باززایی شاخساره (درصد)	تعداد شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه	میانگین طول شاخساره (سانتی‌متر)	وزن تر شاخساره (گرم)	وزن تر پینه (گرم)
بنزیل آدنین (BA)	۳	۱۹۰۹۰/۳۹۲**	۲۲۴/۲۵۸**	۴۴/۴۷۲**	۱۷/۹۷۷**	۰/۳۸۸**
نفتالن استیک اسید (NAA)	۳	۴۳۶/۹۶۴**	۱۰/۴۷۵**	۰/۲۸۰*	۰/۱۹۸ <sup>ns</sup>	۰/۸۴۴**
BA×NAA	۹	۲۲۷۴/۲۹۲**	۵۴/۶۵۰**	۰/۳۶۴**	۴/۵۷۳**	۰/۰۹۸**
خطا	۳۲	۶۲/۰۰	۰/۶۲۵	۰/۰۷۸	۰/۱۱۰	۰/۰۰۴
ضریب تغییرات	-	۱۳/۸۵	۱۴/۹۴	۱۰/۰۱	۱۹/۵۲	۱۷/۷۵

\*\* و ns: به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و غیرمعنی‌دار

جدول ۲. نتایج مقایسه میانگین اثر BA و NAA بر درصد باززایی شاخساره در ریزنمونه‌های برگ گل اطلسی دورگه

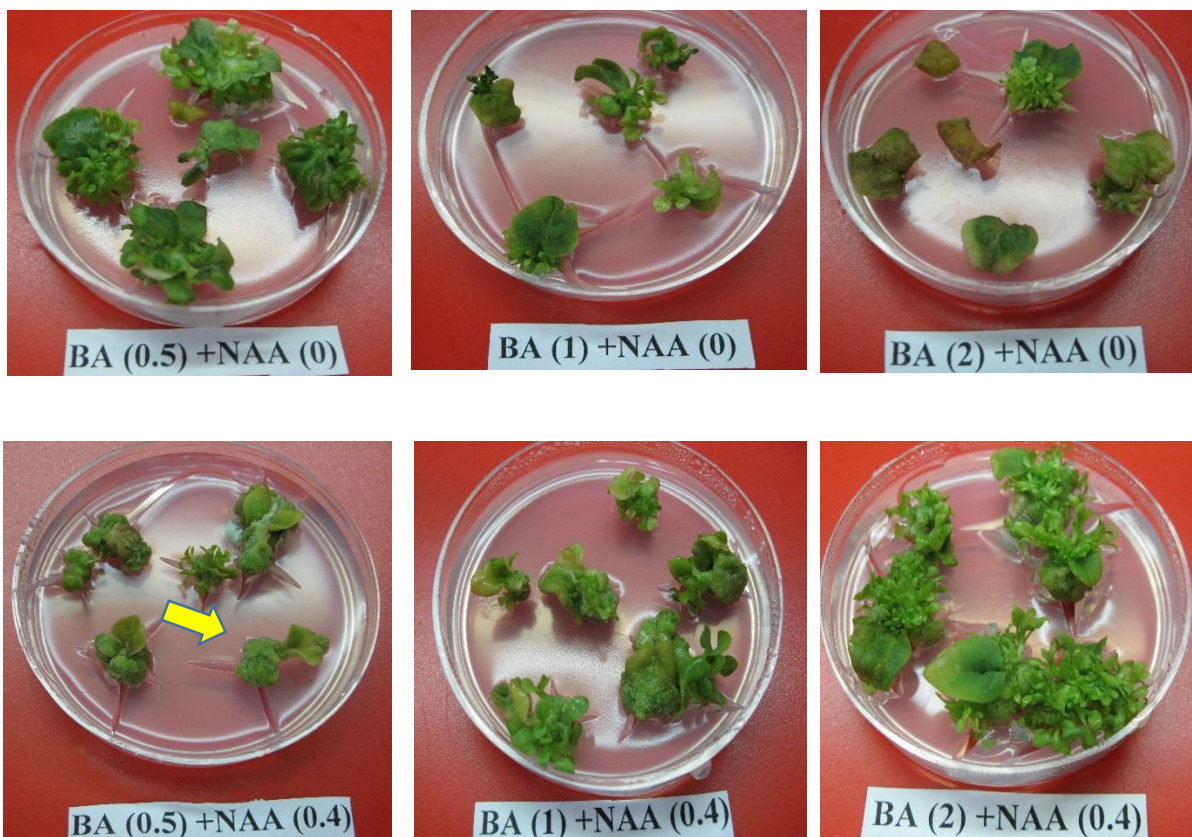
میانگین	NAA (میلی‌گرم در لیتر)				BA (میلی‌گرم در لیتر)
	۰/۴	۰/۲	۰/۱	صفر	
۰/۰۰ <sup>D</sup>	۰/۰۰ <sup>e</sup>	۰/۰۰ <sup>e</sup>	۰/۰۰ <sup>e</sup>	۰/۰۰ <sup>e</sup>	صفر
۵۸/۹۲ <sup>C</sup>	۴۰/۰۰ <sup>c</sup>	۳۳/۳۳ <sup>cd</sup>	۶۲/۳۳ <sup>b</sup>	۱۰۰/۰۰ <sup>a</sup>	۰/۵
۸۸/۵۸ <sup>A</sup>	۹۴/۳۳ <sup>a</sup>	۱۰۰/۰۰ <sup>a</sup>	۹۳/۳۳ <sup>a</sup>	۶۶/۶۷ <sup>b</sup>	۱
۷۹/۸۶ <sup>B</sup>	۱۰۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱۰۰/۰۰ <sup>a</sup>	۹۳/۳۳ <sup>a</sup>	۲۶/۱۱ <sup>d</sup>	۲
	۵۸/۵۸ <sup>A</sup>	۵۸/۳۳ <sup>A</sup>	۶۲/۲۵ <sup>A</sup>	۴۸/۱۹ <sup>B</sup>	میانگین

میانگین‌های دارای حروف مشترک، براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

درصد) در محیط کشت دارای دو میلی‌گرم در لیتر BA بدون NAA بود. نتایج نشان داد چنانچه از BA به‌تنهایی استفاده شود در غلظت‌های پایین نتایج بهتری دارد چون طبق نتایج به‌دست آمده درصد باززایی در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر آن (۱۰۰ درصد) از یک میلی‌گرم در لیتر (۶۶/۶۷ درصد) و از دو میلی‌گرم در لیتر (۲۶/۱۱ درصد) بیشتر بود. چنانچه از BA در ترکیب با NAA استفاده شود، غلظت‌های بالاتر آن مناسب‌تر بود (جدول ۲). در تیمارهای ترکیبی یک میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، دو میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۲ یا ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA همه ریزنمونه‌های برگ باززایی شاخساره داشتند. نتایج نشان داد،

تحت تأثیر اثر ساده NAA قرار گرفتند. افزون بر این، BA اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر میزان باززایی شاخساره، تعداد شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه و وزن تر پینه داشت، اما اثر آن بر میانگین طول شاخساره در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. از طرف دیگر اثر آن بر وزن تر شاخساره غیرمعنی‌دار بود (جدول ۱).

پس از یک ماه از کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد BA و NAA به‌تنهایی و یا در برهم‌کنش باهم برای باززایی مستقیم شاخساره از ریزنمونه‌های برگ اطلسی، آشکار شد که در تیمارهای بدون تنظیم‌کننده BA، هیچ‌گونه باززایی شاخساره‌ای انجام نمی‌شود (جدول ۲). همچنین کمترین درصد باززایی شاخساره (۲۶/۱)



شکل ۱. اثر تیمارهای ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به‌تنهایی (ردیف بالا) و در برهمکنش با غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA (ردیف پایین) بر باززایی شاخساره و تشکیل پینه در ریزنمونه‌های برگ اطلسی دورگه نشان داده شده است. همچنان که در شکل‌های ردیف بالا مشخص است میزان باززایی شاخساره در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA از دو غلظت دیگر آن بیشتر است. در شکل‌های ردیف پایین و در محیط کشت دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA، تشکیل پینه به نسبت بهتر بود و با علامت پیکان نشان داده شده است. همچنین در همین شکل‌ها میزان افزایش باززایی شاخساره با افزایش تدریجی غلظت BA از ۰/۵ میلی‌گرم تا ۲ میلی‌گرم در لیتر کاملاً مشهود است.

رشد BA به‌تنهایی در غلظت‌های پایین آن تعداد شاخساره بیشتری به‌دست آمد. به‌عنوان نمونه در غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بدون استفاده از NAA، به‌ترتیب تعداد ۸/۷۷ و ۲/۹۰ شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه برگ به‌دست آمد (جدول ۳). در برهمکنش BA با NAA، بیشترین تعداد شاخساره (۱۸ عدد) به‌ازای هر ریزنمونه برگ، در تیمار دو میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد که با تمامی تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۳ و شکل ۱). نتایج اثر ساده BA بر تعداد شاخساره باززایی یافته نشان داد که غلظت دو میلی‌گرم در لیتر آن در مقایسه با دیگر غلظت‌ها مناسب است. بیشترین تعداد شاخساره در اثر ساده NAA،

برای باززایی مناسب در تیمارهای ترکیبی، غلظت BA حداقل باید حدود ۲/۵ برابر غلظت NAA باشد. در بررسی اثر ساده BA بر باززایی شاخساره، نتایج نشان داد که در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر آن درصد باززایی بیشتر است و با سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین نتایج نشان داد که غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در اثر ساده آن، بیشترین درصد باززایی دارد هرچند که تفاوت آن با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر آن معنی‌دار نبود. (جدول ۲ و شکل ۱). در محیط کشت‌های بدون تنظیم‌کننده رشد و یا محیط کشت‌هایی که تنها دارای NAA بودند، هیچ شاخساره‌ای تولید نشد (جدول ۳). مشابه باززایی شاخساره، استفاده از تنظیم‌کننده

جدول ۳. نتایج مقایسه میانگین اثر BA و NAA بر تعداد شاخساره باززایی یافته از یک ریزنمونه برگ اطلسی دورگه

میانگین	NAA (میلی گرم در لیتر)				BA (میلی گرم در لیتر)
	۰/۴	۰/۲	۰/۱	صفر	
۰/۰۰D	۰/۰۰ <sup>e</sup>	۰/۰۰ <sup>e</sup>	۰/۰۰ <sup>e</sup>	۰/۰۰ <sup>e</sup>	صفر
۴/۴۰C	۳/۰۰ <sup>g</sup>	۱/۴۰ <sup>h</sup>	۴/۲۰ <sup>ef</sup>	۸/۷۷ <sup>c</sup>	۰/۵
۶/۳۷B	۳/۸۰ <sup>fg</sup>	۱۰/۶۷ <sup>b</sup>	۵/۷۵ <sup>d</sup>	۵/۲۷ <sup>de</sup>	۱
۱۰/۴۰A	۱۸/۰۰ <sup>a</sup>	۱۱/۷۰ <sup>b</sup>	۹/۰۰ <sup>c</sup>	۲/۹۰ <sup>g</sup>	۲
	۶/۲۰ <sup>A</sup>	۵/۹۴ <sup>A</sup>	۴/۷۹ <sup>B</sup>	۴/۲۳ <sup>B</sup>	میانگین

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی دار ندارند.

جدول ۴. نتایج مقایسه میانگین اثر ساده و برهمکنش BA و NAA بر طول شاخساره (سانتی‌متر) باززایی یافته در ریزنمونه‌های برگ گل اطلسی دورگه

میانگین	NAA (میلی گرم در لیتر)				BA (میلی گرم در لیتر)
	۰/۴	۰/۲	۰/۱	صفر	
۰/۰۰D	۰/۰۰ <sup>f</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	صفر
۴/۲۹A	۳/۸۸ <sup>bc</sup>	۵/۱۰ <sup>a</sup>	۴/۱۸ <sup>b</sup>	۴/۰۰ <sup>bc</sup>	۰/۵
۳/۷۸B	۴/۰۰ <sup>bc</sup>	۳/۵۷ <sup>c</sup>	۳/۹۰ <sup>bc</sup>	۳/۶۶ <sup>c</sup>	۱
۳/۰۹C	۲/۷۷ <sup>e</sup>	۳/۱۰ <sup>de</sup>	۳/۵۵ <sup>cd</sup>	۲/۹۸ <sup>e</sup>	۲
	۲/۶۶ <sup>B</sup>	۲/۹۴ <sup>A</sup>	۲/۹۱ <sup>A</sup>	۲/۶۶ <sup>B</sup>	میانگین

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی دار ندارند.

تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد که تفاوت آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود (جدول ۴).

اثر ساده BA و NAA و نیز اثر برهمکنش آنها در جدول ۵ نشان می‌دهد که وزن تر شاخساره در اثر ساده NAA معنی‌دار نیست. در بررسی اثر ساده BA بر وزن تر شاخساره، نتایج نشان داد که هرچه غلظت آن بالاتر باشد، وزن تر شاخساره بیشتر است و بیشترین مقدار وزن تر شاخساره در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد (جدول ۵). برهمکنش BA و NAA بر وزن تر شاخساره معنی‌دار بود و بیشترین مقدار آن (۴/۵ گرم) در تیمار دو میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (جدول ۵).

نتایج جدول ۶ نشان می‌دهد که در برخی از تیمارها

مربوط به غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر آن بود، هر چند که با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر معنی‌دار نبود (جدول ۳).

نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد که هم اثر ساده و هم اثر برهمکنش BA و NAA بر طول شاخساره‌های باززایی یافته از ریزنمونه‌های برگ معنی‌دار است و نتایج بررسی اثر ساده آنها نشان داد که طول شاخساره در اثر ساده BA از NAA بیشتر است. همچنین، بیشترین طول شاخساره (۲/۹۴ سانتی‌متر) در اثر ساده NAA مربوط به غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بود که با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر آن معنی‌دار نبود. بیشترین طول شاخساره (۴/۲۹ سانتی‌متر) در اثر ساده BA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد و در غلظت‌های بیشتر از آن به تدریج طول شاخساره کاهش یافت. در بررسی اثر برهمکنش BA و NAA بیشترین طول شاخساره (۵/۱۰ سانتی‌متر) در

جدول ۵. نتایج مقایسه میانگین اثر ساده و برهمکنش BA و NAA بر وزن تر (گرم) شاخساره‌های باززایی یافته از ریزنمونه‌های برگ گل اطلسی دورگه

میانگین	NAA (میلی‌گرم در لیتر)				BA
	۰/۴	۰/۲	۰/۱	صفر	(میلی‌گرم در لیتر)
۰/۰۰ <sup>D</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	صفر
۱/۷۱ <sup>C</sup>	۱/۰۹ <sup>ef</sup>	۰/۶۵ <sup>f</sup>	۱/۶۹ <sup>cd</sup>	۳/۴۲ <sup>b</sup>	۰/۵
۲/۲۲ <sup>B</sup>	۱/۴۲ <sup>de</sup>	۳/۴۲ <sup>b</sup>	۲/۰۸ <sup>c</sup>	۱/۹۸ <sup>c</sup>	۱
۲/۸۵ <sup>A</sup>	۴/۵۰ <sup>a</sup>	۳/۲۸ <sup>b</sup>	۲/۸۸ <sup>b</sup>	۰/۷۵ <sup>f</sup>	۲
	۱/۷۵ <sup>A</sup>	۱/۸۴ <sup>A</sup>	۱/۶۷ <sup>A</sup>	۱/۵۳ <sup>A</sup>	میانگین

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۶. نتایج مقایسه میانگین اثر ساده و برهمکنش BA و NAA بر وزن تر پینه (گرم) باززایی یافته از ریزنمونه‌های برگ اطلسی دورگه

میانگین	NAA (میلی‌گرم در لیتر)				BA
	۰/۴	۰/۲	۰/۱	صفر	(میلی‌گرم در لیتر)
۱/۱۲ <sup>B</sup>	۱/۵۰ <sup>e</sup>	۱/۶۷ <sup>de</sup>	۱/۳۳ <sup>e</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	صفر
۱/۸۴ <sup>A</sup>	۳/۱۷ <sup>a</sup>	۲/۱۷ <sup>c</sup>	۲/۰۰ <sup>cd</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	۰/۵
۰/۷۵ <sup>C</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	۳/۰۰ <sup>ab</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	۱
۰/۶۷ <sup>C</sup>	۲/۶۷ <sup>b</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	۰/۰۰ <sup>f</sup>	۲
	۱/۸۳ <sup>A</sup>	۱/۷۱ <sup>A</sup>	۰/۸۳ <sup>B</sup>	۰/۰۰ <sup>C</sup>	میانگین

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد، هرچند که با تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA معنی‌دار نبود (جدول ۶ و شکل ۱). برخلاف NAA، در تیمارهای BA به‌تنهایی، هیچ‌گونه پینه‌ای تشکیل نشد (جدول ۶). یکی از نتایج جالب توجه این بخش از پژوهش این بود که چنانچه از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA استفاده شد، تنها در برهمکنش با غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر NAA پینه تشکیل نشد، اما در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BA در غلظت‌های صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA تشکیل پینه مشاهده نشد. همچنین اگر از غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BA استفاده شد، در برهمکنش با غلظت‌های صفر، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA پینه‌ای تشکیل نشد.

هیچ‌گونه پینه‌ای تشکیل نشد. اثر ساده NAA بر وزن تر پینه به‌دست آمده از ریزنمونه‌های برگ اطلسی، معنی‌دار شد و در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر آن، وزن تر پینه بیشتر از غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بود، هرچند که تفاوت معنی‌داری بین این دو غلظت وجود ندارد (جدول ۶). برخلاف NAA، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، از غلظت‌های دیگر آن، اثر بهتری بر وزن تر پینه داشته و بیشترین وزن تر در این غلظت مشاهده شد. در بررسی اثر برهمکنش BA و NAA بر وزن تر پینه، نتایج نشان داد که چنانچه از غلظت کمتر BA همراه با غلظت بالای NAA استفاده شود، وزن تر بیشتری به‌دست خواهد آمد. بیشترین وزن تر پینه (۳/۱۷ گرم به‌ازای یک ریزنمونه) در تیمار ۰/۵



شکل ۲. A: باززایی شاخساره‌ها از پینه تولید شده از ریزنمونه‌های برگ روی محیط کشت MS دارای ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر BA، B: گل‌دهی درون‌شیشه‌ای یکی از شاخساره‌های باززایی یافته در مرحله ریشه‌دهی روی محیط کشت نصف غلظت MS دارای ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر NAA و C: سازگاری گیاهچه درون‌شیشه‌ای با شرایط گلخانه و گل‌دهی آن

### بحث

اگرچه باززایی غیرمستقیم شاخساره از بافت‌های پینه، روش با ارزشی برای استفاده در بیوتکنولوژی جهت انتقال ژن و به‌نژادی گل اطلسی است، اما این روش دارای معایبی مانند گوناگونی‌های سوماکلونال در بین شاخساره‌های باززایی یافته است (۲). برخلاف این روش، اندام‌زایی مستقیم شاخساره یکی از مهم‌ترین رخدادهای مورفوژنتیک در ریزافزایی گیاهان است، زیرا نمو مستقیم شاخساره بدون دخالت پینه، سبب کاهش معنی‌داری در گوناگونی‌های سوماکلونال می‌شود (۱۳). در واقع شبیه به اصل بودن گیاهان در هم‌گروه، یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های ریزافزایی گیاهان است (۶). اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها، در بسیاری از جنبه‌های رشدونمو گیاهان اهمیت دارند و نیز نقش انکارناپذیری در فرایندهای تمایزدایی و بازتمایزایی در گیاهان دارند. به‌طورکلی پذیرفته شده که این دو هورمون در کنترل نمو شاخساره عمل می‌کنند، هر چند که

در تیمارهایی که دارای NAA به‌تنهایی بودند، رنگ پینه کرم و قهوه‌ای 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 قهوه‌ای متمایل به سبز بود و در غلظت‌های بیشتر رنگ آن کاملاً سبز بود. باززایی شاخساره از پینه‌ها به‌راحتی در محیط کشت MS دارای ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر BA انجام شد (شکل ۲-۱). همچنین شاخساره‌های به‌دست آمده از باززایی مستقیم ریزنمونه‌های برگ، به‌سهولت در محیط کشت نصف غلظت MS دارای ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر NAA پس از دو هفته از کشت آنها ریشه‌دار شدند (شکل ۲-۱) و به‌طور موفقیت‌آمیزی با شرایط گلخانه سازگار یافتند (شکل ۲-۱). یکی دیگر از رخدادهای جالب توجه این پژوهش، گل‌دهی برخی از شاخساره‌ها به‌صورت درون‌شیشه‌ای در هنگام ریشه‌دهی بود (شکل ۲-۱)، که این در واقع نشان‌دهنده یکی از مزیت‌های ریزافزایی برای کاهش طول دوره نونهالی است.



شد. افزون بر این، گزارش شده که سایتوکینین‌ها سبب تبدیل و تغییر نواحی چند یاخته‌ای مریستماتیک به ساختارهای سازمان‌یافته مانند شاخساره می‌شوند (۱۵). در واقع می‌توان گفت، وجود BA برای آغازش تشکیل شاخساره ضروری است (۲۵). افزون بر این، گزارش شده چنانچه در اطلسی، پینه‌ها برای باززایی در محیط کشتی با غلظت کم سایتوکینین باشند، باززایی شاخساره انجام نخواهد شد (۲۲). همچنان که در جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داده شد اثر NAA بر باززایی شاخساره معنی‌دار بود که این برخلاف نتایج ابوقاعد و همکاران است که احتمال دارد این تفاوت، مربوط به نوع رقم و واکنش‌پذیری متفاوت آنها به تنظیم‌کننده‌های رشد باشد (۲). نتایج این پژوهش در زمینه تعداد شاخساره با یافته‌های آور و همکاران که دریافتند چنانچه ریزنمونه‌های برگ اطلسی روی محیط کشت دارای BA کشت شوند، به‌طور معنی‌داری سبب افزایش تعداد شاخساره خواهد شد، همسو است (۴). افزون بر این، گزارش شده که تعداد جوانه‌های نابه‌جا و شاخساره‌های باززایی یافته از ریزنمونه‌ها ممکن است به‌راحتی توسط غلظت‌های متفاوت BA در محیط کشت تنظیم شود (۲۰) که چنین نتیجه‌ای به‌طور کاملاً مشهودی در پژوهش ما و در استفاده از غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد (شکل ۱). همچنین ابوقاعد و همکاران گزارش کردند که در پینه‌های اطلسی با افزودن BA به محیط کشت سبب افزایش تعداد شاخساره خواهد شد، ولی چنانچه همراه با آن از NAA استفاده شود به نسبت غلظت بالاتری از آن نیاز است (۲). جالب‌تر اینکه، در پژوهش حاضر وقتی از BA به‌تنهایی استفاده شد، در غلظت‌های بالاتر کارایی کمتری در باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های دم‌برگ داشت که احتمالاً به‌دلیل به هم خوردن سطح تعادل هورمونی در ریزنمونه بوده است. همچنین احتمال دارد افزودن BA با غلظت‌های بالاتر به محیط کشت، سبب افزایش فعالیت آنزیم سایتوکینین اکسیداز و بدین ترتیب سبب تجزیه سایتوکینین شده و تا حدی اثر آن را از بین برده است

عوامل بیوشیمیایی، فیزیولوژی و ژنتیکی در این تنظیم نقش دارند (۵). همچنین، تعادل بین این دو هورمون در کنترل فرایندهای نمو مانند تشکیل یاخته‌های مریستمی و حفظ حالت مریستمی آنها برای ایجاد پیکره کامل گیاه، اهمیت دارد (۲۵). افزون بر این، ممکن است مسیرهای بیوشیمیایی کنترل‌کننده میزان سایتوکینین درونی ریزنمونه، تحت تأثیر شرایط کشت، مورفولوژی، نوع ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد برونزا، ژنوتیپ و دیگر عوامل قرار گیرند (۱۴). در واقع می‌توان گفت که اندام‌زایی مستقیم و غیرمستقیم شاخساره به‌صورت درون‌شیشه‌ای، توسط مسیرهای بیوشیمیایی دینامیک اثرگذار بر مقدار سایتوکینین‌های درونزا و برونزا، کنترل می‌شود (۵).

نتایج این پژوهش نشان داد که وجود BA در محیط کشت، برای باززایی مستقیم شاخساره و تشکیل آن در ریزنمونه‌های برگ اطلسی ضروری است و حتی به‌تنهایی و بدون استفاده با NAA، توانایی باززایی شاخساره را دارد، ولی چنانچه در ترکیب با NAA استفاده شد، کارایی آن بهتر می‌شود. این نتایج مشابه گزارش ابوقاعد و همکاران است که گزارش کردند برای باززایی شاخساره در ریزنمونه‌های برگ اطلسی، نیاز به وجود BA در محیط کشت دارد و NAA به‌تنهایی قادر به باززایی شاخساره نیست. همچنین مشابه نتایج ما، این پژوهشگران گزارش کردند بهترین غلظت BA برای دستیابی به بیشترین درصد باززایی (۴۵ درصد) و بیشترین تعداد شاخساره (۷/۵ شاخساره) به‌ازای هر ریزنمونه برگ، غلظت دو میلی‌گرم در لیتر است. در واقع می‌توان گفت که وجود BA در محیط کشت، سبب آغازش تشکیل شاخساره و نیز سبب افزایش واکنش‌پذیری ریزنمونه‌ها به پاسخ‌های نمو شده است (۹). همچنین می‌توان احتمال داد که جذب و انتقال BA توسط ریزنمونه‌های برگ، با افزایش مکانیزم‌های هومئوستازی و القای مسیرهای پیام‌رسانی سایتوکینین، سبب بیان یکسری از ژن‌های مسئول در متابولیسم مریستمی شاخساره (مانند ژن WUSCHEL) شده است (۱۷). بیان این ژن‌ها، سبب توانمندی یاخته‌های مریستمی برای باززایی شاخساره خواهند

که این نشان‌دهنده عدم نیاز ضروری این رقم جهت تولید پینه به BA است. البته هرچند که در مشاهدات ظاهری دیده شد که این پینه‌های با رنگ کرم و قهوه‌ای، برخلاف پینه‌های تولید شده از محیط کشت‌های دارای BA، قابلیت کمی برای باززایی شاخساره دارند. همچنین، نتایج نشان داد که برای تولید پینه بیشتر، تقریباً غلظت BA و NAA در استفاده ترکیب آنها باید مساوی باشند. بیشترین میزان پینه در محیط کشت MS دارای ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر BA + ۴/۰ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد. به نظر میرسد مشابه باززایی شاخساره، تولید پینه بستگی به تعادل دو تنظیم کننده رشد BA و NAA دارد. همسو با نتایج این پژوهش، تشکیل پینه در ریزنمونه‌های برگ اطلسی با استفاده از BA، در محیط کشت MS گزارش شده است و تاکید شده که وجود BA در محیط کشت برای آغاز تشکیل پینه مناسب اهمیت دارد. افزون بر این مشاهده شده که حتی BA به تنهایی در غلظت‌های ۸/۰ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با ۴/۰ میلی‌گرم در لیتر سبب تولید پینه بیشتر شده است (۳). همچنین با توجه به اینکه بیشترین وزن تر پینه در محیط کشتی به دست آمد که نسبت BA به NAA آن ۲۵/۱ بود، احتمالاً می‌توان استنباط کرد که میزان اکسین درونی ریزنمونه برگ اطلسی به نسبت بالا بوده و این سبب کاهش این نسبت به صورت درونی شده است.

### نتیجه‌گیری

طبق نتایج این پژوهش، افزودن BA به محیط کشت MS، برای باززایی شاخساره ضروری بود. در باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های برگ، چنانچه از BA به تنهایی استفاده شد در غلظت‌های پایین نتایج بهتری به دست آمد، اما چنانچه در ترکیب با NAA استفاده شد، غلظت‌های بالاتر آن مناسب‌تر بود و مشخص شد که غلظت آن حداقل باید حدود ۵/۲ برابر غلظت NAA باشد. با افزایش غلظت BA، طول شاخساره‌های باززایی یافته کاهش یافت، اما وزن تر آنها افزایش یافت. با افزایش غلظت NAA، مقدار تولید پینه افزایش یافت اما این روند در

(۵). به‌طور کلی نتایج این پژوهش و به‌ویژه در مورد تعداد و وزن تر شاخساره باززایی یافته نشان داد که اثر ترکیبی BA و NAA مؤثرتر از اثر هر کدام به‌صورت جداگانه بود. همسو با این نتایج، مندی و همکاران نشان دادند که در ریزافزایی بگونیا نسبت بالای سایتوکین به اکسین سبب اثر مثبت و نسبت پایین آن، سبب اثر منفی بر باززایی شاخساره خواهد داشت (۱۶). به‌طور معمول پاسخ‌دهی یاخته‌ها در مراحل مختلف نمو، متفاوت است و ممکن است بین مسیرهای پیام‌رسانی اکسین‌ها و سایتوکین‌ها برهمکنش‌هایی وجود داشته باشد (۲۳). در واقع در اینجا مشخص است که توانایی باززایی شاخساره و یا حتی پینه، بستگی به تعادل این دو هورمون در محیط کشت و نیز به‌صورت درونی در ریزنمونه دارد. در واقع می‌توان گفت عامل اصلی اندام‌زایی تعادل بین دو هورمون سایتوکینین و اکسین است (۲۵). در پژوهشی، نشان داده شده که چنانچه در اطلسی از BA در غلظت ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر و NAA در غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با هم استفاده شود در تحریک تولید شاخساره ناتوان بوده‌اند که به احتمال غلظت بالای NAA با خنثی کردن اثر BA، از آغازش جوانه جلوگیری کرده است (۲۱). گزارش شده که سایتوکینین‌ها در آغازش اندام‌ها نقش داشته و در مکان‌هایی از گیاهان مانند مریستم انتهایی شاخساره و مریستم گل‌آذین که اندام‌ها آغازش می‌یابند، مقدار آن توسط اکسین‌ها کاهش می‌یابد. بنابراین می‌توان استنباط کرد که پاسخ‌های سایتوکینینی، به‌صورت منفی توسط اکسین‌ها تنظیم می‌شوند (۲۵). مطمئناً چنانچه در پژوهش حاضر از NAA با غلظت بیشتر از ۴/۰ استفاده می‌شد، تا حدی از باززایی شاخساره جلوگیری می‌کرد، زیرا کاربرد خارجی آن سبب افزایش میزان اکسین درونی و برهم خوردن تعادل آن با سایتوکینین شده و ممکن است اثر بازدارنده‌ای بر میزان باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های برگ داشته باشد (۲۶). مشابه باززایی شاخساره، در محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد هیچ‌گونه پینه‌ای تشکیل نشد. در محیط کشت‌هایی که دارای NAA به تنهایی بودند، برخلاف BA تا حدی پینه تولید کردند،

مورد BA، برعکس بود. زمانی که از غلظت کمتر BA همراه با غلظت بالای NAA استفاده شد، پینه‌های با وزن تر بیشتری به‌دست آمد. به‌طور کلی محیط کشت MS دارای دو میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA، بهترین محیط کشت برای باززایی و تولید مستقیم شاخساره از ریزنمونه‌های برگ بود. همچنین، برای تولید پینه‌های با قابلیت باززایی غیر مستقیم شاخساره، استفاده از محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA توصیه می‌شود.

## منابع مورد استفاده

1. Abu-Qaoud, H. 2012. Improving adventitious shoot regeneration from cultured leaf explants of *Petunia hybrida* using thidiazuron. *African Journal of Biotechnology* 11: 11230-11235.
2. Abu-Qaoud, H., A.Y Abu-Rayya and S. Yaish. 2010. *In vitro* regeneration and somaclonal variation of *Petunia hybrida*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 18: 71-82.
3. Abu-Rayya, A. Y. 2002. *In vitro* regeneration and somaclonal variation of *Petunia hybrida*. MSc. Thesis. An-Najah National University. Nablus.
4. Auer, C. A., J. D. Cohen, M. Laloue and T. J. Cooke. 1992. Comparison of benzyl adenine metabolism in two *Petunia hybrida* lines differing in shoot organogenesis. *Plant Physiology* 98: 1035-1041.
5. Auer, C. A., V. Motyka, A. Broezinova, M. Kaminek. 1999. Endogenous cytokinin accumulation and cytokinin oxidase activity during shoot organogenesis of *Petunia hybrida*. *Physiologia Plantarum* 105: 141-147.
6. Bhatia, R., K. P. Singh, T. Jhang and T. R. Sharma. 2009. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. *Scientia Horticulturae* 119: 208-211.
7. Bordallo, P. N., D. H. Silva, J. Maria, C. D. Cruz and E. P. Fontes. 2004. Somaclonal variation on *in vitro* callus culture potato cultivars. *Horticultura Brasileira* 22: 300-304.
8. Burbulis, N., A. Blinstrubiene and V. Jonytiene. 2015. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Petunia hybrida* L. *Propagation of Ornamental Plants* 15: 47-52.
9. Christianson, M. L. and D. A. Warnick 1988. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. *HortScience* 23: 515-519.
10. Dole, J. M. and H. F. Wilkins. 2005. Floriculture Principles and Species. Prentice- Hall, Inc. USA.
11. GriesBach, J. R. 2007. *Petunia*. PP. 301-336. In: N. O. Anderson (Ed.), Flower Breeding and Genetics, Springer. USA.
12. Kag, B., V. Hegde, B. N. Sathyanarayana, R. Sharath and SH. Manchali. 2012. Direct regeneration from leaf explants of *Petunia hybrida*. *Journal of Agricultural Science and Technology* 1: 12 -17.
13. Koné, M., T. Koné, H. T. Kouakou, S. Konaté and J. S. Ochatt. 2013. Plant regeneration *via* direct shoot organogenesis from cotyledon explants of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 17: 584-592.
14. Krikorian, A. D. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. PP. 774-796. In: P. J. Davies (Ed.), Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Dordrecht, Netherlands.
15. Lowe, K. C., M. R. Davey and J. B. Power. 1996. Plant tissue culture: past, present and future. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 2: 175-185.
16. Mendi, Y. Y., P. Curuk, E. Kocaman, C. Unek, S. Eldogan, G. Gencil and S. Cetiner. 2009. Regeneration of begonia plantlets by direct organogenesis. *African Journal of Biotechnology* 8: 1860-1863.
17. Motte, H., D. Vereecke, D. Geelen and S. Werbrouck. 2013. The molecular path to *in vitro* shoot regeneration. *Biotechnology Advances* 32: 107-121.
18. Nazari, F., M. Khosh-Khui and P. Azadi. 2016. A simple and efficient direct shoot organogenesis method using leafy petiole explants in *Gerbera jamesonii* cv. Royal Soft Pink. *International Journal of Horticultural Science and Technology* 3: 51-58.
19. 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). *International Journal of Agriculture and Biosciences* 3: 185-189.
20. Pollard, J. W. and J. M. Walker. 1990. Methods in Molecular Biology. Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press, Clifton, New Jersey, USA.
21. Rao, P. S., W. Handro and H. Harada. 1973. Bud formation and embryo differentiation in *in vitro* cultures of *Petunia*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 69: 87-90.
22. Renaudin, J. P., C. Tournaire and B. Teyssendier dela Serve. 1991. Quantitative analysis of protein changes during meristem initiation and bud formation in protoplast-derived *Petunia hybrida* callus. *Physiologia Plantarum* 82: 48-56.

23. Shi, L.Y., T. J. StraBala, G. Hagen and T. J. Guifoyle. 1994. Transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins show increased tolerance to exogenous auxin and auxin transport inhibitors. *Plant Science* 100: 9-14.
24. Stehmann, J. R., A. P. Lorenz-Lemke, L. B. Freitas and J. Semir 2009. *Petunia*, Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics, Springer, New York.
25. Su, Y. H., Y. B. Liu and X. S. Zhang. 2011. Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant* 4: 616-625.
26. Subotic, A., S. Jevremovic, A. Cingel and S. Milosevic. 2008. Effect of urea- type cytokinins on axillary shoot regeneration of *Impatiens walleriana* L. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 22: 817-819.
27. Thirukkumaran, G., V.O. Ntui, R. SherKhan, M. Mii. 2009. Thidiazuron: an efficient plant growth regulator for enhancing *Agrobacterium*-mediated transformation in *Petunia hybrid*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 109-115.
28. Wojciechowicz, M. K. 2007. Comparison of regenerative potential of petals, stamens and pistils of five *Sedum* species in vitro. *Biodiversity, Research and Conservation* 5–8: 87–94.

## Improved Adventitious Shoot Organogenesis and Callus Production from Leaf Explants of *Petunia hybrida* L. by Benzyladenine (BA) and Naphthalene Acetic Acid (NAA)

F. Nazari<sup>1\*</sup>

(Received: August 25-2017; Accepted: April 9-2018)

### Abstract

*Petunia (Petunia hybrida)* is an ornamental plant species of high economic potential. One of the appropriate methods for propagation and breeding of petunia is tissue culture. This experiment was conducted to investigate the effects of different concentrations of benzyl adenine (BA) either alone or in combination with different concentrations of naphthalene acetic acid (NAA) on the regeneration of adventitious shoots and callus production in *Petunia hybrida*. For the regeneration of adventitious shoots and callus production, leaf segment explants taken from germinated seeds were cultured on MS basal media supplemented with different concentrations of BA (0.1, 0.4, 0.8 mg L<sup>-1</sup>) solely and/or in combinations with and NAA (0, 0.1, 0.2 and 0.4 mg L<sup>-1</sup>). Cultures were incubated under dark conditions for two weeks and then transferred to light condition. After 20 days of keeping in the light condition, the results showed that BA and NAA had significant effect on shoot regeneration. When BA applied alone, the lowered concentrations were effective in shoot regeneration, however when used in combination with NAA, its increased concentrations were more suitable. The greatest percentage of shoot regeneration was recorded in the medium with high level of BA to NAA. The highest number and fresh weight of shoots (18 shoots per explant) were obtained in MS medium supplemented with 2 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.4 mg L<sup>-1</sup> NAA. The greatest shoot length (5.1 cm) was obtained in MS medium containing 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA. Also, the greatest callus fresh weight was observed in MS medium supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.4 mg L<sup>-1</sup> NAA. Therefore, MS medium supplemented with 2 mg L<sup>-1</sup> BA combined with 0.4 mg L<sup>-1</sup> NAA could be suggested for direct shoot regeneration and large scale propagation of petunia from leaf explants.

**Keywords:** Callus, Cytokinin-to-auxin ratio, Direct shoot regeneration, Induction, *Petunia*

---

1. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, College of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

\*: Corresponding Author, Email: f.nazari@uok.ac.ir