Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دوازدهم ـ شماره اول ـ فروردین- اردیبهشت ۱۳۸٤
www.magiran.com/jasnr

# تعیین غلظت و ترکیب هورمونی مناسب برای کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه درخت بالغ ژینکو
*Ginkgo biloba*

**سید علی قائم مقامی و یدا... لبافی**
پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران

تاریخ دریافت: ۸۱/٦/۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۳/٦/۱۸

## چکیده

ژینکو درختی است از بازدانگان اولیه که به لحاظ زینتی و تولیدات دارویی از جمله ژینکولوئید و فلاونوئید اهمیت دارد. در تحقیقات کشت درون‌شیشه‌ای این گیاه تاکنون از جنین حاصل از بذر به‌عنوان ریزنمونه استفاده شده است. در این بررسی به منظور تعیین غلظت و ترکیب هورمونی مناسب برای کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه درخت بالغ، سه آزمایش انجام شد. در آزمایش اول ریزنمونه‌ها (تک گره) در محیط MS با ترکیب هورمونی از (۱٦/۱μ M، ٥/٤ ، ۰،۰/۰٥) BA و (۳۷/٦ μ M، ۲٦/۸، ۱٦/۱، ٥/٤، ۰/۰٥، ۰) NAA کشت گردیدند. دراین آزمایش غلظت ۰/۰٥ میکرومول از هر دو هورمون مناسب تشخیص داده شدند. در آزمایش دوم هورمون‌های (IAA, IBA, NAA, 2, 4-D, BA, Kin, 2ip, BPA, Zeatin) به تنهایی و یا ترکیبی از آنها با غلظت به‌دست آمده در آزمایش اول مورد استفاده قرار گرفتند، نتایج حاصل نشان داد ترکیب دو هورمون Zeatin و IBA با غلظت ۰/۰٥ میکرومول نسبت به دیگر هورمون‌ها بهتر می‌باشد. در آزمایش سوم اثر غلظت‌های مختلف از (۲/٥ μ M، ۱/۲٥، ۰/۲٥، ۰/۰٥، ۰/۰۱) Zeatin و (۰/۲٥ μ M، ۰/۰٥، ۰/۰۱، ۰/۰۰۲) IBA بررسی شدند در نتیجه ۰/۲٥ میکرومول Zeatin و ۰/۰۱ میکرومول IBA بهترین تیمار برای کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های درخت بالغ ژینکو تشخیص داده شد بطوریکه در این تیمار برگ و شاخه بهتر رشد نمودند.

***واژه‌های کلیدی:*** ژینکو بیلوبا، کشت درون شیشه‌ای، درخت بالغ، تنظیم کننده‌های رشد

## مقدمه

گیاه ژینکو با نام علمی *Ginkgo biloba* درختی از تیره *Ginkgoaceae* و بومی چین که ارتفاع آن به ۳۰ متر و قدمت آن به ۱۵۰ میلیون سال پیش می‌رسد این درخت از لحاظ زینتی و تولیدات دارویی از جمله درمان نارسائی عروقی آلزایمر، آلرژی و آسم دارای اهمیت است (فلش و همکاران[1]، ۱۹۹۲؛ هو و استابا[2]، ۱۹۹۲). از برگ و میوه آن مواد مختلفی از جمله ژینکولوئیدها (ژینکو لوئید A , B, C) و فلاونوئیدها استخراج می‌گردد (بالز و همکاران[3]، ۱۹۹۹؛ کمپر و همکاران[4]، ۱۹۹۵؛ کری‌یر و همکاران[5]، ۱۹۹٦). در ایران بصورت تک درخت در چند نقطه کشت شده است.

1-Flesch et al
2- Huh & Staba
3- Balz et al
4- Camper et al
5- Carrier et al



www.SID.ir

Archive of SID



این درخت دو پایه بوده و دانهال‌های به وجود آمده از بذر، درختان نر یا ماده تولید می‌کنند و تا زمان گلدهی درختان (پس از حدود ۲۰ سال) نمی‌توان جنسیت آنها را تشخیص داد (روهر[1]، ۱۹۸۹). بنابراین تکثیر درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های درخت بالغ منجر به تولید سریع و انبوه پایه‌های دلخواه نر یا ماده خواهد شد که اولاً منبع گیاهی برای تولید ژینکولوئید و فلاونوئید خواهند بود. ثانیاً میوه‌های شبه آلویی که روی درختان ماده تشکیل می‌شوند بوی نامطبوعی دارند، در نتیجه فقط از درختان نر برای منظورهای زینتی استفاده می‌شود که در این روش می‌توان با اطمینان، از پایه‌های نر تولیدی برای توسعه فضای سبز بخصوص در شهرهای بزرگ استفاده نمود زیرا میوه‌های شبه آلویی که روی درختان ماده تشکیل می‌شوند بوی نامطبوعی دارند. این درخت در برابر آلودگی هوا بسیار مقاوم می‌باشد (روهر، ۱۹۸۹). تحقیقات اولیه کشت درون‌شیشه‌ای این گیاه برروی کشت پرچم و تخمدان انجام شده است (لورین و همکاران[2]، ۱۹۹٤ الف؛ لورین و همکاران، ۱۹۹۳ب) و اخیراً برای تولید کالوس، از جنین حاصل از بذر، دمبرگ و برگ‌های جوان مطالعاتی صورت گرفته است (بالز و همکاران، ۱۹۹۹؛ کری‌یر و همکاران[3]، ۱۹۹۰؛ وب و همکاران[4]، ۱۹۸٦). همچنین با استفاده از کشت سلولی، تولید مواد مؤثره این گیاه بخصوص ترپنوئید و ژینکولوئید بررسی شده است (کری‌یر و همکاران، ۱۹۹٦؛ کری‌یر و همکاران، ۱۹۹۱؛ فلش و همکاران، ۱۹۹۲). کمپر و همکاران، (۱۹۹۷) اثر هورمون‌های سایتوکینین و اکسین را برروی کشت لپه و جنین حاصل از بذر بررسی نمودند بطوریکه ضمن تعیین مواد مؤثره در کالوس تولید شده از لپه‌ها، جنین‌های رشد کرده برروی محیط کشت به گلدان منتقل شدند.

هدف از این مطالعه، تعیین مناسب‌ترین غلظت و ترکیب هورمونی برای کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه درخت بالغ ژینکو بوده و گزارش حاضر اولین گزارش در این زمینه است.

## مواد و روش‌ها

شاخه‌های درخت بالغ در ماه اردیبهشت از فضای سبز داخل دانشگاه تهران جمع‌آوری شد (شکل۱) و پس از قطع برگ‌ها، به قطعات تک گره[5] تقسیم شدند. نمونه‌ها پس از شستشوی مقدماتی به‌منظور گندزدایی با کلرید جیوه به غلظت ۰/۱ درصد به همراه ٤ قطره Tween20 به‌مدت ۳ دقیقه ضدعفونی و آنگاه سه بار با آب مقطر استریل آبشویی شدند. نمونه‌ها هر بار داخل آب مقطر به مدت ۵ دقیقه باقی ماندند. سپس در شرایط استریل دو سر تک گره (ریزنمونه) قطع شد و به محیط کشت برای اجرای سه آزمایش ذیر انتقال داده شدند:

در آزمایش اول محیط کشت موراشیگی و اسکوک[6] با ترکیب هورمونی ( $\mu M$ ۱٦/۱ و ۵/٤ و ۰/۰۵ و ۰) BA و ( $\mu M$ ۳۷/٦ و ۲٦/۸ و ۱٦/۱ و ۵/٤ و ۰/۰۵ و ۰) NAA ۲٤ تیمار بهمراه۳۰ گرم ساکارز و ۷ گرم درلیتر آگار و pH = ۵/۷ استفاده گردید (جدول ۲).

در آزمایش دوم نیز محیط کشت موراشیگی و اسکوگ MS به همراه هورمون‌های Zeatin[7]، BPA[8]، 2ip[9]، Kin[10]، BA[11]، 2-4D[12]، NAA[13]، IBA[14]، IAA[15] به غلظت ۰/۰۵ به تنهایی یا ترکیبی از آنها (۳۰ تیمار) به‌همراه ۳۰ گرم ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار و ۵/۷ = pH تهیه گردید (جدول ٤).

در آزمایش سوم نمونه‌ها برروی محیط کشت موراشیگی و اسکوگ MS با ترکیب هورمونی از (۲/۵،

1- Roher
2- Laurain et al
3- Carrier et al
4- Webb et al

5- Single node
6- Murashinge & Skooge
7- Zeatin
8- N-Benzyl 1-9-(2-tetrahydropyrany1)-adenine
9- (Dimethylallylamino) purine
10- Kinetin
11- Benzylaminopurine
12- 2,4- Dicholorophenoxyacetic Acid
13- Naphthaleneacetic Acid
14- Indol-3-Butiric Acid
15- Indol-3-aacetiv Acid





www.SID.ir

Archive of SID

۱/۲۵، ۰/۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۱) Zeatin و (۰/۲۵ و ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۰۲) IBA (۲۰ تیمار) به‌همراه ۳۰ گرم ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار pH=۵/۷ کشت شدند (جدول ٦).

شیشه‌های حاوی ریزنمونه‌ها به داخل اتاق رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰۰۰ لوکس نور و ١٦ ساعت روشنایی انتقال داده شدند. برای هر تیمار در سه آزمایش ۱۵ تکرار در نظر گرفته شد و پس از شش هفته در نمونه‌های کشت شده درصد زنده ماندن، تعداد برگ، طول شاخه، پرآوری جوانه و تعداد جوانه فعال شده به غیر از مریستم انتهایی یادداشت‌برداری شدند. تمامی آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و داده‌ها برای هر آزمایش به‌طور مستقل با استفاده از برنامه SAS تجزیه آماری و با آزمون دانکن مقایسه میانگین‌ها انجام پذیرفت.

## نتایج و بحث

به‌رغم گسترش کشت درون‌شیشه‌ای درختان چوبی،استقرار ریزنمونه از درخت بالغ بدلیل آلودگی‌های ناشی از قارچ و باکتری مشکلات زیادی را بهمراه دارد و به سختی در برخی از گونه‌ها امکان پذیر بوده است (بونگا و آدرکاس[1]، ۱۹۹۲). در این مطالعه ریزنمونه‌ها بدلیل نوع گندزدایی مناسب، آلودگی میکروبی کمتری را در زمان استقرار نشان دادند.

در آزمایش اول طبق جدول ۱ اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد در مورد هورمون NAA و اثر متقابل آنها برای تعداد برگ موجود بود. بهترین غلظت برای جوانه زنی و سبز نمودن برگ‌ها به میزان ۰/۰۵ میکرومول از NAA و BA می‌باشد (جدول ۲) و غلظت‌های بالاتر اثر منفی داشته بطوریکه با افزایش غلظت NAA و BA در ریزنمونه‌ها جوانه‌زنی نداشتیم (این پدیده در جدول ۲ با عدد صفر مشخص گردید). درصد زنده ماندن نیز تحت تأثیر نسبت هورمون‌ها قرار داشته نتیجتاً هر چه نسبت،غلظت دو هورمون (NAA به BA و بالعکس) کمتر بوده درصد زنده ماندن ریز نمونه‌ها بیشتر بود. بیشترین درصد زنده ماندن با ۸۲/۳۵ درصد در ترکیب هورمونی NAA و BA با غلظت ۰/۰۵ میکرومول مشاهده شد و کمترین درصد زنده ماندن با ١٦/٦٦ درصد با استفاده از NAA به تنهایی با غلظت ۳۷/٦ میکرومول حاصل شد. در حقیقت غلظت ۰/۰۵ میکرومول از هر دو هورمون بالاترین درصد زنده ماندن و بیشترین تعداد برگ را در مدت شش هفته تولید کردند. در این آزمایش فقط در شش تیمار (تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۷، ۸، ۹ ) شاهد رشد برگ بودیم و در هیچ تیماری اثری از رشد شاخه نداشتیم در حقیقت برگ‌ها از یک نقطه به صورت فشرده ظاهر گردیدند ( شکل ۲) .این مسئله نشان‌دهنده نامناسب بودن نوع هورمون و یا ترکیب آنها می‌باشد اگر چه شروع آزمایش‌ها با این دونوع هورمون براساس بکارگیری آنها در تحقیقات قبلی می‌باشد (وو و همکاران[2]، ۱۹۹٦؛ اسکیروین و چو[3]، ۱۹۷۹؛ ائون و همکاران[4]، ۱۹۹۳؛ کمپر و همکاران، ۱۹۹۷؛ بالز و همکاران، ۱۹۹۹) اما غلظت به‌دست آمده برای این دو نوع هورمون با تحقیقات صورت گرفته اختلاف داشته که دلیل آن احتمالاً نوع ریز نمونه بکار رفته در آن تحقیقات یعنی جنین در مقایسه با ریزنمونه از درخت بالغ می‌باشد. در انتهای ریز نمونه‌های مستقر شده برروی محیط در غلظت ثابت BA با افزایش هورمون NAA کالوس تشکیل گردید (شکل ۳). این کالوس کاملاً نامطلوب می‌باشد زیراباززائی از این کالوس

**جدول ۱ـ تأثیر دو هورمون BA و NAA برتعداد برگ ریز نمونه‌های درخت ژینکو.**

| هورمون | تعداد برگ |
|---|---|
| BA | ns |
| NAA | ** |
| BA* NAA | ** |

1- Bonga & Aderkas

2 - Wu et al
3 - Skirvin
4 - Eon et al


www.SID.ir

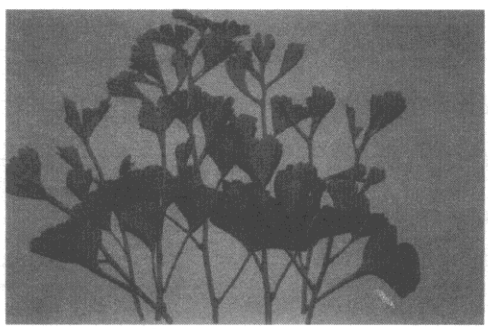
Archive of SID



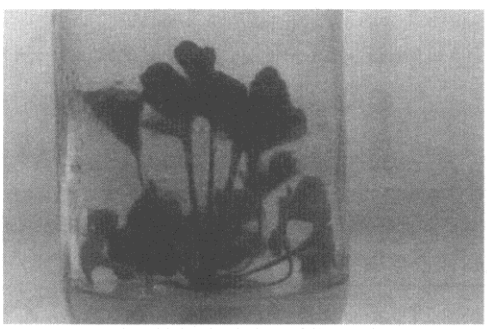
جدول۲ ـ اثرترکیب‌های‌مختلف BA و NAA بردرصدزنده‌ماندن و تعداد برگ ریز نمونه درخت ژینکو.

| تنظیم کننده های رشد (میکرومول) | | محیط MS | |
|---|---|---|---|
| تیمار | BA | NAA | درصد زنده ماندن | تعداد برگ |
| ۱ | ۰ | ۰ | ۷۶/۴۷ | ۲/۷۰ a |
| ۲ | ۰ | ۰/۰۵ | ۷۰/۵۸ | ۳/۲۹ a |
| ۳ | ۰ | ۵/۴ | ۸۰/۰۰ | ۱/۳۳ b |
| ۴ | ۰ | ۱۶/۱ | ۴۳/۷۵ | ۰ |
| ۵ | ۰ | ۲۶/۸ | ۳۱/۲۵ | ۰ |
| ۶ | ۰ | ۳۷/۶ | ۱۶/۶۶ | ۰ |
| ۷ | ۰/۰۵ | ۰ | ۸۲/۳۵ | ۳/۴۱ a |
| ۸ | ۰/۰۵ | ۰/۰۵ | ۸۲/۳۵ | ۳/۷۶ a |
| ۹ | ۰/۰۵ | ۵/۴ | ۷۶/۴۷ | ۲/۱۷ b |
| ۱۰ | ۰/۰۵ | ۱۶/۱ | ۴۷/۰۵ | ۰ |
| ۱۱ | ۰/۰۵ | ۲۶/۸ | ۲۲/۲۲ | ۰ |
| ۱۲ | ۰/۰۵ | ۳۷/۶ | ۱۷/۶۴ | ۰ |
| ۱۳ | ۵/۴ | ۰ | ۵۵/۵۵ | ۰ |
| ۱۴ | ۵/۴ | ۰/۰۵ | ۲۹/۴۱ | ۰ |
| ۱۵ | ۵/۴ | ۵/۴ | ۷۶/۴۷ | ۰ |
| ۱۶ | ۵/۴ | ۱۶/۱ | ۴۱/۱۷ | ۰ |
| ۱۷ | ۵/۴ | ۲۶/۸ | ۴۳/۷۵ | ۰ |
| ۱۸ | ۵/۴ | ۳۷/۶ | ۱۷/۶۴ | ۰ |
| ۱۹ | ۱۶/۱ | . | ۴۷/۰۵ | ۰ |
| ۲۰ | ۱۶/۱ | ۰/۰۵ | ۴۱/۱۷ | ۰ |
| ۲۱ | ۱۶/۱ | ۵/۴ | ۷۵/۰۰ | ۰ |
| ۲۲ | ۱۶/۱ | ۱۶/۱ | ۴۷/۰۵ | ۰ |
| ۲۳ | ۱۶/۱ | ۲۶/۸ | ۵۰/۰۰ | ۰ |
| ۲۴ | ۱۶/۱ | ۳۷/۶ | ۵۲/۹۴ | ۰ |





شکل ۱ـ شاخه‌های درخت ماهد ژینکو.



شکل ۲ـ رشد برگ در تیمار هورمونی BA و NAA به غلظت ۰/۰۵ میکرومول.



www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳ـ تاثیر هورمون‌های مختلف (اکسین و سایتوکینین) برتعداد برگ، طول شاخه و پرآوری جوانه در ریزنمونه درخت ژینکو.

| هورمون | تعداد برگ | طول شاخه | پرآوری جوانه |
|---|---|---|---|
| اکسین | ns | ns | ns |
| سایتوکینین | ns | ns | * |
| اکسین * سایتوکینین | ns | ns | * |

جدول٤ ـ اثر هورمونهای مختلف بر روی ریز نمونه درخت ژینکو.

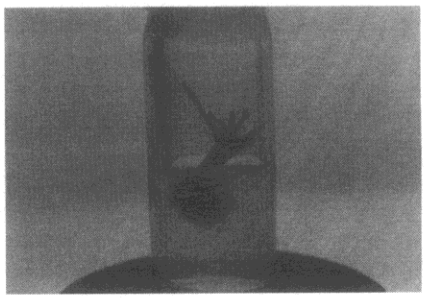
| تیمار | سایتوکینین ۰/۰۵ میکرومول | اکسین ۰/۰۵ میکرومول | درصد زنده ماندن | تعداد برگ | طول شاخه (میلی‌متر) | پرآوری جوانه |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | BA | IAA | ۵۲/۹٤ | ۱/۸۲a | ۱/۱۷b-d | ۰ |
| ۲ | BA | IBA | ۳۵/۲۹ | ۱/٤۱a-d | ۲/۳۵ab | ۰/۵۸ b |
| ۳ | BA | NAA | ۲۰/۰۰ | ۰/٤٦c-f | ۰ d | ۰ |
| ٤ | BA | 2,4-D | ۱۷/٦٤ | ۰/۲۳c-f | ۰ d | ۰ |
| ۵ | Kin | IAA | ۲۳/۵۳ | ۱/٤۷a-c | ۲/۰۵ a-c | ۰/۵۸ b |
| ٦ | Kin | IBA | ۱۷/٦٤ | ۱/۰۵a-c | ۰/۲۳ cd | ۰ |
| ۷ | Kin | NAA | ٤۳/۷۵ | ۰/۵۰c-f | ۰ d | ۰ |
| ۸ | Kin | 2,4-D | ۱۷/٦٤ | ۱/۰۵a-f | ۰/۱۷ cd | ۰ |
| ۹ | 2ip | IAA | ۱۱/۷٦ | ۰/۷٦b-f | ۰/۲۳ cd | ۰ |
| ۱۰ | 2ip | IBA | ٦/۲۵ | ۰/۱۲ d-f | ۰d | ۰ |
| ۱۱ | 2ip | NAA | ۱۸/۷۵ | ۱/۰۰ a-f | ۲/٤۳ a | ۰/ ۳۹b |
| ۱۲ | 2ip | 2,4-D | ۲۹/٤۱ | ۰/۸۲ b-f | ۰ d | ۰ |
| ۱۳ | BPA | IAA | ۱۷/٦٤ | ۰/۱۷ d-f | ۰/۲۳ cd | ۰ |
| ۱٤ | BPA | IBA | ۱۱/۱۱ | ۰/۷۷ b-f | ۰/۸۳ cd | ۰ |
| ۱۵ | BPA | NAA | ٦/۲۵ | ۰/۰٦ ef | ۰ d | ۰ |
| ۱٦ | BPA | 2,4-D | ۲۰/۰۰ | ۰/۱۳ d-f | ۰d | ۰ |
| ۱۷ | Zeatin | IAA | ٤۰/۰۰ | ۰/٦۰ c-f | ۰ d | ۰ |
| ۱۸ | Zeatin | IBA | ۳۱/۲۵ | ۱/۷۵ ab | ۱/۵٦ a-d | ۱/۷٦a |
| ۱۹ | Zeatin | NAA | ۱۱/۷٦ | ۰/۰۵ef | ۰ d | ۰ |
| ۲۰ | Zeatin | 2,4-D | ٤۷/۰۵ | ۱/۰۰ a-f | ۰d | ۰ |
| ۲۱ | BA | ۰ | ۲۵/۰۰ | ۰/۲۵ c-f | ۰d | ۰ |
| ۲۲ | Kin | ۰ | ٦٤/۷۰ | ۱/۰۵ a-f | ۰/٤۱ cd | ۰/٤۹b |
| ۲۳ | 2ip | ۰ | ۵۰/۰۰ | ۱/۰۰ a-c | ۰/۹۳ b-d | ۰/٤۱b |
| ۲٤ | BPA | ۰ | ٤۷/۰۵ | ۰/۱۷ d-f | ۰d | ۰ |
| ۲۵ | Zeatin | ۰ | ۲۳/۵۲ | ۰/٤۱ c-f | ۰/۵۲ cd | ۰ |
| ۲٦ | ۰ | IAA | ۱۲/۵۰ | ۰/۵۰ c-f | ۰/۲۵ cd | ۰ |
| ۲۷ | ۰ | IBA | ۵٦/۲۵ | ۱/۲۵ a-c | ۰/۳۷ cd | ۰ |
| ۲۸ | ۰ | NAA | ۱۷/٦٤ | ۰/۳۵ c-f | ۰d | ۰ |
| ۲۹ | ۰ | 2-4-D | ۵/۸۸ | ۰/۰۵ ef | ۰ d | ۰ |
| ۳۰ | ۰ | ۰ | ۳۵/۲۹ | ۰/۷٦ b-f | ۰ d | ۰ |



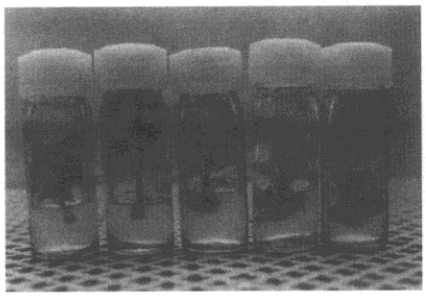
www.SID.ir

Archive of SID





شکل ۳ـ تشکیل کالوس در غلظت‌های بالای NAA.



شکل ٤ـ مقایسه رشد ریزنمونه‌های ژینکو در غلظت‌های ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۱ میکرومول Zeatin (از چپ به راست) و غلظت ثابت BA.

جدول ۵ ـ تاثیر دو هورمون Zeatin و IBA بر تعداد برگ ، طول شاخه و تعداد جوانه فعال شده به غیر از مریستم انتهائی در ریز نمونه درخت ژینکو.

| هورمون | تعداد برگ | طول شاخه | تعداد جوانه فعال شده به غیر از مریستم انتهائی |
|---|---|---|---|
| Zeatin | ** | ** | ** |
| IBA | ns | * | ns |
| Zeatin * IBA | ns | ns | * |

** معنی‌دار در سطح ۱درصد  * معنی‌دار در سطح ۵درصد  Ns اختلاف معنی‌دار ندارند

ممکن است باعث تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در طی مراحل ریز ازدیادی شود (بونگا و آدرکاس، ۱۹۹۲). این پدیده در کشت ریزنمونه‌های پسته با استفاده از همین ترکیب هورمونی نیز اشاره شده است (برقچی و آلدرسون[1]، ۱۹۸۳). همچنین ایجاد کالوس در کشت درون شیشه ای جنین ژینکو با ترکیب هورمونی ۲ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش گریده است (وو و همکاران، ۱۹۹٦). نوع بافت اولیه گیاهی(جوان یا بالغ) و موقعیت قلمه در روی گیاه (که نشان‌دهنده میزان هورمون‌های داخلی است)احتمالاً اثرات مهمی در فرآیند این تقسیم سلولی داشتند (پیریک[2]، ۱۹۹۷).

در آزمایش دوم: برای پرآوری جوانه اثر سایتوکینین و اثر متقابل اکسین و سایتوکینین در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود ولی اختلافی بین تیمارها در تعداد برگ و طول شاخه مشاهده نشد (جدول‌های ۳، ٤). ترکیب دو هورمون IBA و Zeatin به غلظت ۰/۰۵ میکرومول بهترین تیمار برای پرآوری جوانه بوده (تیمار۱۸). البته در تیمارهای ۲، ۵، ۱۱، ۲۲، ۲۳ نیز شاهد پرآوری جوانه بودیم ولی در بقیه تیمارها پرآوری جوانه رخ نداد (بصورت صفر مشخص شده است ). در این آزمایش کمترین در صد زنده ماندن با استفاده از4-D , 2 به‌تنهایی با ۵/۸۸ درصد و بالاترین درصد زنده ماندن با استفاده از Kin به تنهایی با٦٤/۷۰ درصد حاصل شد. طبق بررسی‌ها ساقه در این درخت به دو شکل شاخه کوتاه و بلند می‌باشد. در شاخه‌های کوتاه شاهد تشکیل تعداد زیادی برگ از یک نقطه می‌باشیم که هورمونها نقش اساسی در این دو شکل از رشد ایفا می‌نمایند. به‌طوری که در شرایط مناسبتر شاخه‌های کوتاه می‌توانند به رشد ادامه داده و به شاخه‌های بلند تبدیل شوند (هو و استابا، ۱۹۹۲). در این آزمایش نیز در ترکیب‌های مناسبتر هورمونی شاهد رشد شاخه بودیم (جدول ٤). به‌طورکلی تفاوت تأثیر هورمون‌های گیاهی مورد استفاده به "حساسیت" بافت‌ها تعبیر شده است.

1 - Bargh chi & Alderson
2 - Pierik





www.SID.ir

Archive of SID

براساس این تئوری در بیشتر موارد، حساسیت به مواد رشد گیاهی نسبت به غلظت واقعی آن از اهمیت بیشتری برخوردار است (دیویس[1]، ۱۹۹۵). به‌عبارت دیگر افزایش در گیرنده‌های هورمونی، کاهش عوامل تجزیه‌کننده و متابولیسم به‌عنوان حساسیت به هورمون‌های گیاهی برون زا تفسیر می‌شوند که بصورت اختلاف در تاثیر هورمون‌ها برروی ریزنمونه تظاهر می یابد (کاسپر و همکاران[2]، ۱۹۹۶).

**در آزمایش سوم:** اثر هورمون Zeatin برای تعداد برگ، طول شاخه و تعداد جوانه فعال شده به غیر از مریستم انتهائی، در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. تاثیر هورمون IBA برروی طول شاخه در سطح ۵درصد معنی‌دار بوده ولی برروی تعداد برگ و تعداد جوانه فعال شده به غیر از مریستم انتهائی اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (جدول ۵). اثر متقابل این دو هورمون نیز برای جوانه فعال شده به غیر از مریستم انتهائی در سطح ۵درصد معنی‌دار می‌باشد. در این آزمایش بهترین تیمار (تیمار ۱۰) با ۰/۲۵ میکرومول Zeatin و ۰/۰۱ میکرومول IBA به‌دست آمد (جدول ٦). با افزایش غلظت Zeatin شاهد رشد مطلوب‌تر و تولید

جدول ٦ ـ اثر ترکیب‌های مختلف **Zeatin** و **IBA** بر تعداد برگ، طول شاخه، تعداد جوانه فعال شده به غیر از مریستم انتهائی، درخت‌ژینکو.

| | تنظیم کننده‌های رشد (میکرومول) | | | تعداد برگ | طول شاخه (میلی‌متر) | تعداد جوانه فعال شده به‌غیراز مریستم انتهائی |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | تیمار | Zeatin | IBA | | | |
| ۱ | ۰/۰۱ | | ۰/۰۰۲ | ۳/۱۱cd | ۸/۰۰ a-d | ۰ |
| ۲ | ۰/۰۱ | | ۰/۰۱ | ۳/٤٤cd | ۷/۲۲ a-d | ۰ |
| ۳ | ۰/۰۱ | | ۰/۰۵ | ۳/۰۰d | ۳/٦٦ d | ۰ |
| ٤ | ۰/۰۱ | | ۰/۲۵ | ۳/۰۰ d | ٤/۷۰ cd | ۰ |
| ۵ | ۰/۰۵ | | ۰/۰۰۲ | ٤/۱۱ b-d | ۸/۲۲ a-c | ۰ |
| ٦ | ۰/۰۵ | | ۰/۰۱ | ۵/۳ ab | ۹/٦ a | ۰/۱۱b |
| ۷ | ۰/۰۵ | | ۰/۰۵ | ۳/۲۲ cd | ٤/٤٤ d | ۰/۲۸ b |
| ۸ | ۰/۰۵ | | ۰/۲۵ | ٤/۸۸ a-d | ۸/٤٤ ab | ۰ |
| ۹ | ۰/۲۵ | | ۰/۰۰۲ | ٤/۸۷ a-d | ۵/٦۲ b-d | ۰ /۸۷a |
| ۱۰ | ۰/۲۵ | | ۰/۰۱ | ۵/٦۲ a | ۵/۳۷ b-d | ۱/۰۰ a |
| ۱۱ | ۰/۲۵ | | ۰/۰۵ | ٤/٤٤ b-d | ٤/۳۳ d | ۰/۱۸ b |
| ۱۲ | ۰/۲۵ | | ۰/۲۵ | ۵/۰۰ a-c | ٦/۲۰ b-d | ۰/۷٦ a |
| ۱۳ | ۱/۲۵ | | ۰/۰۰۲ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱٤ | ۱/۲۵ | | ۰/۰۱ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۵ | ۱/۲۵ | | ۰/۰۵ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱٦ | ۱/۲۵ | | ۰/۲۵ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۷ | ۲/۵ | | ۰/۰۰۲ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۸ | ۲/۵ | | ۰/۰۱ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۹ | ۲/۵ | | ۰/۰۵ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۲۰ | ۲/۵ | | ۰/۲۵ | ۰ | ۰ | ۰ |

1 - Davies
2 - Caspar et al.



www.SID.ir

Archive of SID



بـــرگ و شـــاخه بـــودیم و در غلظـــت بـــالاتر از ۰/۲۵ میکرومول این جهت عکس شده و در ریزنمونه‌ها شـاهد توقف رشد و تغییرات در شکل ظاهری آنها بودیم (شکل ٤) که در جـدول بصـورت صـفر مشـخص شـده اسـت. همانطور که ذکر شد تأثیر دو هورمون مناسب انتخـابی در این آزمایش بصورت اخـتلاف معنـی‌دار در طـول شـاخه (جـدول ٥) انعکـاس یافتـه و در نتیجـه تـأثیر مثبـت هورمون‌ها در تبدیل شاخه کوتاه به بلند را در این درخت تائید می‌نماید.

کشت درون‌شیشه‌ای گونه‌های چوبی به دلایل مختلف از جمله باززائی نسبتاً ضعیف، سرعت کمتر تکثیـر، نقـش خواب در جوانه‌ها، ضدعفونی سـخت‌تـر ریزنمونـه‌هـا و ترشح مواد فنلی، نسبت به گونه‌های علفی مشکل‌تر اسـت و باعث کندی تحقیق در این گونه‌ها شده است (پیریـک، ۱۹۹۷). از طرفی نیاز هورمونی و نسبت آنهـا در درختـان چوبی فوق‌العاده متغیر است که این مسـئله ناشـی‌از تنـوع ژنتیکی، وضعیت فیزیولوژیکی، سن گیـاه و شـرایط رشـد درخت مادری است (بونگـا و آدرکـاس، ۱۹۹۲). در ایـن بررسی نیز شناسایی این نیاز بـرای ایـن گونـه چـوبی بـا استفاده از دو گروه هورمونی اکسین و سـایتوکینین و اثـر متقابل آنها مدنظر بوده و نتـایج حاصـله مـی‌توانـد زمینـه مناسـبی را بـرای مطالعـات دیگـر از جملـه تکثیـر درون شیشه‌ای این درخت فراهم نماید.

## سپاسگزاری

بدینوسیله از مدیریت شرکت کشت نباتات دارویـی و صنعتی ایران که قسمتی از بودجه ایـن پـژوهش را تـأمین نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع

1.Balz, J.P., D., Courtois, J., Drieu, K., Drieu, J.P., Reynoird, C., Shohier, B.P., Teng, A., Touche, and V. Petiard. 1999. Production of Ginkgo ides and bilobalied by *Ginkgo biloba* plants and tissue culture. Planta Medica 65: 620-626

2.Barghchi, M., and P.G. Alderson. 1983. *In vitro* propagation of *Pistacia Vera* from seedling tissues. J. Hort. Sci. 58: 435 - 445

3.Bonga, J.M., and P, Von. Aderkas, 1992. *In vitro* culture of trees. Kluwer Academic Pub. London. 236 PP

4.Camper, N. D., P.S., Coker, D.E., Wedge, and R.J. Kesse. 1997. *In vitro* culture of *Ginkgo. In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 33:125-127

5.Camper, N.D., D.E., Wedge, and R.J. Kesse. 1995. *In vitro* culture of *Ginkgo*, ginkgolide detection, Current Topics. Plant Physiology. 15:33

6.Carrier, D.J., J., R., Archambault, R. Heijden, and Verpoorte. 1996. Formation of terpenoid products in *Ginkgo biloba* L. cultivated cells. Plant Cell Rep. 15: 888-891

7.Carrier, D. J., N. Chauret, M., Mancini, P., Coulombe, R., Neufeld, M., Weber, and J. Archambault. 1991. Detection of ginkgolide A in *Ginkgo biloba* cell cultures. Plant Cell Rep. 10: 256- 259

8.Carrier, D.J., D., Cosention, R., Neufeld, D., Rho, M., Weber, and T.J. Archambaul. 1990. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo – derived callus and suspension cell culture. Plant Cell Rep. 8:635- 638

9.Caspar, T., C., Kevers, C., Penel, H., Greppin, D.M., Reid. and T.A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 32: 272-289

10.Davies, P.J. 1995. Plant hormones. Dordrecht: Kluwer Academic pub.London. 13-38

11.Eon,M.H., S.H., Sung, S., Eon, H., Huh, J. Kim, and Y.C. Kim. 1993. Cultrues of *Ginkgo biloba*, effect of nutritional and hormonal factors on the growth of cultured cells derived from *Ginkgo biloba*. Arch. Pharm. Res. 16:244-250

12.Flesch.V., M., Jacques, L., Cosson B.P., Teng, V., Petlard, and J.P. Balz. 1992. Relative importance of growth and light level on terpene content of *Ginkgo biloba*. Phytochemistry 31:1941-1945



www.SID.ir

Archive of SID


13.Huh , H., and E. J. Staba. 1992. The botany and chemistry of *Ginkgo biloba*. J. Herbs Species and Medicinal Plants 1: 91-124
14.Laurain, D., J.C. Chenieux, and J. Tremouillaux – Guiller. 1993a. direct embryogenesis from female haploid protoplast of *Ginkgo biliba* a medicinal woody species. Plant Cell Rep. 12:656-660
15.Laurain, D., J., Tremovillaux- Guiller and J.C. Chenicux, 1993b. Embryogenesis from microspores of *Ginkgo biloba* a medicinal woody species. Plant Cell Rep. 12:501-505
16.Murashige, T., and F.A. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology. Plant 15:437-497
17.Pierik, R.L.M. 1997. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Pub. London. 348pp
18.Rohr, R., 1989. Maidenhair Tree (Ginkgo *biloba* ). P.251- 257. In Y.P.S. Bajaj (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 5 Trees II. Springer –Verlag, Berlin, Heidelberg.
19.Skirvin, R.M., and M.C. Chu. 1979. *Ginkgo*: A beautiful tree with edible seeds III Res. Univ. III Agric. Exp. Sta. 21:10-11
20.Webb, D., W., Arias, and E. De Hostos. 1986. Callus formation by *Ginkgo biloba* embryos on hormone free media controlled by closures and media components. Phytomorph. 36:121-127
21.Wu, Y., X., Yan, Y. l., Wu, and X. Yan. 1996. The mature embryo of *Ginkgo biloba*: *in vitro* culture and its cytohistological studies. Sci. Silvae Sin. 34:8-13


www.SID.ir

Archive of SID

*J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 12(1), April-May 2005*
*www.magiran.com/jasnr*

# Determination of suitable hormonal combination and concentration for *in vitro* culture of mature *Ginkgo biloba* explants

**S.A. Ghaem maghami and Y. Labafi**
Agricultural Institute, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran.

**Abstract**

*Ginkgo biloba* one of the primary gymnosperms is important in term of ornamental and medicinal usage because of its Ginkgolide and Flavonoid contents. Earlier research embryo has tended to emphasize specific use of embryo to obtion explants.Three experiments was conducted to determine the kinde of hormones and their proper concentrations on growth potential of mature *Ginkgo biloba* explants(single node). In first experiment, a combination of two hormones of BA (0.0, 0.05, 5.4, 16.1 µM) and NAA (0.0, 0.05, 5.4 16.1, 26.1, 37.6 µM), were cultured on Murashige and Skoog medium. The result showed that the 0.05 µM concentration could increase the explants growth in both hormones. In second experiment, different hormones (IAA, IBA, NAA, 2, 4-D, BA, 2ip, BPA, Zeatin) separately or as combination with obtained proper concentration in first experiment (0.05 µM) was used. The results showed that two hormones of Zeatin and IBA had best results on growth of explants. Third experiment was conducted to find the best concentration of Zeatin (0.01, 0.05, 0.25, 1.25. 2.5 µM) and IBA (0.002, 0.01, 0.05, 0.25 µM) obtained hormones in second experiment. It was concluded that Zeatin and IBA with 0.25 and 0.01 µM had proper growth of shoots and leaves respectively.

***Keywords:*** *Ginkgo biloba; In vitro* culture; Mature tree; Plant growth regulator





www.SID.ir