فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۹، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۴۳-۱۳۰ (۱۳۹۲)

اثر بنزیل‌آدنین و سالیسیلیک اسید بر پدیده شیشه‌ای شدن در کشت ساقه ریزازدیادی شده گیاه آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.)

محبوبه زراوشان[۱]، فرانسواز برنارد[۲*] و زهره حیدریان[۳]

۱- کارشناس ارشد، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

پست الکترونیک: f_bernard@sbu.ac.ir

۳- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۰ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۰

چکیده

گیاه آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak. subsp. *daenensis*) یکی از گونه‌های اندمیک جنس آویشن در ایران است. این گونه مصارف زیادی در زمینه دارویی دارد. به‌نظر می‌رسد که استفاده از تکنیک کشت درون شیشه‌ای برای تکثیر آن مفید باشد. شرایط کشت درون شیشه‌ای، به‌دلیل ایجاد برش در بافت گیاهی و تغییر در میزان هورمون‌های گیاهی نسبت به شرایط طبیعی سبب ایجاد استرس خشکی یا پر آبی در بافت‌ها می‌شود که باتوجه به نوع محیط کشت، نوع آگار و مقدار آب محیط می‌تواند متفاوت باشد. شیشه‌ای شدن یکی از عمده‌ترین مشکلاتی است که در رشد درون شیشه‌ای دیده می‌شود و با ایجاد بدشکلی، مانع تکثیر گیاه می‌شود. در کشت جوانه آویشن دنایی شیشه‌ای شدن به مقدار زیادی دیده می‌شود. در این تحقیق، اثر بنزیل‌آدنین و سالیسیلیک‌اسید بر سندرم شیشه‌ای شدن جوانه‌ها سنجیده شد. به این منظور، بذرها در محیط موراشیک-اسکوگ (MS) با تیمارهای بنزیل‌آدنین ($0.1 mgl^{-1}$) کشت شدند. جوانه‌های رشد یافته در محیط بدون هورمون، به محیط مشابه انتقال یافت. همچنین جوانه‌های رشد یافته در محیط دارای بنزیل‌آدنین به محیط‌هایی با چهار تیمار هورمونی مختلف (بدون هورمون، دارای بنزیل‌آدنین به همراه سالیسیلیک اسید یا بدون سالیسیلیک‌اسید) منتقل شدند. به‌دنبال آن اثر تیمارهای مذکور بر پدیده شیشه ای شدن، ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که هورمون بنزیل‌آدنین به تنهایی، سبب ایجاد پدیده شیشه‌ای شدن در آویشن دنایی شد. بعد از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط بدون بنزیل آدنین، بازگشتی نسبی به حالت نرمال دیده شد. حضور سالیسیلیک‌اسید باعث بهبود بازگشت به حالت نرمال می‌گردد. سالیسیلیک اسید باعث کاهش آب داخلی بافت و افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌گردد. در نمونه تیمار شده با بنزیل‌آدنین، در حضور سالیسیلیک اسید بازگشتی به حالت نرمال دیده نشد.

واژه‌های کلیدی: آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.)، بنزیل‌آدنین، پدیده شیشه‌ای شدن، رنگدانه فتوسنتزی، سالیسیلیک‌اسید.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

آویشن دنایی از خانواده Lamiaceae (نعنائیان) می‌باشد. این گیاه بومی ایران بوده و می‌توان از مناطق مهم رویش این گیاه به استان‌های اردبیل، زنجان، کردستان، آذربایجان، فارس، یزد و تهران اشاره کرد (مظفریان و برزگری، ۱۳۷۹).

آویشن دنایی از گونه‌های مهم دارویی است. Askari و Sefidkon (۲۰۰۳) ترکیب‌های اسانس بخش‌های هوایی این گونه را شناسایی کرده و ۳۰ ترکیب را در آن مشخص نمودند که در ۱ گرم وزن خشک آن، تیمول به میزان ۱۵/۲٪، کارواکرول به میزان ٤۹/۷٪ و پاراسیمن به میزان ٦/٤٪ بالاترین غلظت را در بین ترکیب‌های مؤثره آن به خود اختصاص می‌دهند. این ترکیب‌ها به‌طور عمده در غدد اپیدرمی برگ‌ها، ساقه و اندام‌های زایشی گیاه ذخیره می گردد (قهرمان، ۱۳۷۹). استفاده دارویی زیاد از این گیاه خطر انقراض طبیعی آن را افزایش داده و برای حفظ و تکثیر آن به‌منظور مصارف دارویی استفاده از تکنیک کشت درون شیشه‌ای به‌عنوان راهکاری عملی توصیه شده‌است (النجار، ۱۳۸۸).

یکی از مشکلات پیش روی محققان در تولید انبوه گیاه به روش کشت در شیشه، ایجاد پدیده شیشه‌ای شدن است که سبب از بین رفتن ریزنمونه و عدم موفقیت در باززایی گیاه می‌گردد. در این پدیده تغییرات آناتومیکی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی پس از سپری شدن یک دوره زمانی معین بروز می‌کند که این نوع تغییرات و زمان بروز این پدیده با توجه به بافت و گیاه استفاده شده می‌تواند متغیر باشد.

در ریزنمونه‌های مبتلا به پدیده شیشه‌ای شدن، با توجه به نوع گیاه، ساقه به یکی از چهار فرم زیر دیده می‌شود: ۱) ساقه شفاف به رنگ سبز روشن ۲) ساقه ضخیم شده با میان‌گره کوچک ۳) ساقه خمیده ٤) ساقه پرآب گوشتی تغییر شکل داده شده، شکننده و ترد، که این شکنندگی به علت اتصال کم دیواره سلول ها به یکدیگر ایجاد می‌شود (Fauguel *et al.*, 2008).

برگ های گیاه به حالت ضخیم، کم‌رنگ، چروکیده و خمیده تبدیل شده و طول آنها افزایش پیدا می‌کند و ترد، پُر آب و شکننده می‌شوند (Debergh *et al.*, 1992). تعداد سلول‌های میان‌برگ نرده‌ای به شدت کم شده، تقریباً فقط سلول‌های میان‌برگ اسفنجی باقی می‌ماند. فضای زیادی بین سلول ها به‌وجود آمده و در نتیجه برگ ها ضخیم‌تر از برگ طبیعی به‌نظر می رسد. از طرفی کلروپلاست سلول‌ها دارای تیلاکوئیدهای غیرعادی می‌شوند که این امر نیز منجر به ایجاد ظرفیت اندک فتوسنتزی، کاهش شفافیت برگ ها و محتوای کلروفیل می‌شود. ایجاد واکوئل بزرگ در این سلول‌ها نشانه‌ای از پدیده اتوفاژی است که هنگام استرس زیاد، ایجاد می‌شود. اپیدرم حالت ناقص پیدا کرده و کوتیکول در آن به شدت کاهش می‌یابد. سلول های نگهبان روزنه از نظر اندازه و شکل با روزنه های طبیعی تفاوت خواهند داشت (به شکل گرد در می‌آیند) که این تغییر شکل سبب عدم بسته شدن آنها در مقابل سیگنال‌های مختلف محیطی مثل تاریکی، اسید آبسیزیک و کلسیم می‌شود. در این سلول‌ها مقدار کالوز نسبت به سلولز بیشتر است (Chakrabarty *et al.*, 2005؛ Olmos & Hellin, 1998). ساقه‌ها افزایش بیش از حدی در میزان پارانشیم پوستی و پارانشیم مغزی و فضای بین سلولی نشان می‌دهد (Debergh *et al.*, 1992). این اختلالات در سیستم آوندی نیز مشاهده شده‌است. سیستم آوندی ناهنجار می‌شود و میزان

Archive of SID

www.SID.ir

آوندهای چوبی آن کاهش می‌یابد. همچنین ترتیبی کـه در بافت طبیعی وجود دارد، در این سلول‌ها از بین می‌رود. از لحاظ فیزیولوژیک ریزنمونه‌های شیشه‌ای شـده، در مسـیر سنتز ترکیب‌های فنلی و لیگنین نقص پیـدا مـی‌کننـد و در نتیجه کلروفیل و سایر ترکیب های تتراپیرولی در آنها پایین مـی‌آیـد (Gaspar *et al.*, 1995). شیشـه‌ای شـدن نـوعی حالت تنش برای گیاه محسوب می‌شود.

عوامل مختلفی مانند نوع و مقدار سیتوکینین، اکسین و سایر هورمون‌های مورد استفاده در محیط کشـت، گونـه و واریته گیاه، طول زمان پس از آخرین واکشت، نوع بـرش، نحوه کاشت ریزنمونه در محیط کشـت و فاصـله انـدام از سـطح محـیط کشـت در شیشـه‌ای شـدن دخالـت دارنـد (Debergh *et al.*, 1992 ؛Ochatt *et al.*, 2001).

یکی از عوامل اصلی در ایجاد پدیده شیشـه ای شـدن، استفاده از هورمون بنزیل‌آدنین است. ایـن هورمـون بـرای رشد و باززایی ریزنمونه‌ها ضروری می‌باشد. بنزیـل‌آدنـین ماده ای سنتتیک بوده که از لحاظ ساختمان و عملکرد شبیه سیتوکینین می‌باشد و افـزودن آن بـه محـیط کشـت گیـاه *Lavandula dentate* سبب بهبـود جوانـه‌زنـی و افـزایش شاخه‌زایی می‌گردد (Echeverrigaray *et al.*, 2005). اثـر استفاده از این هورمون در ایجاد پدیده شیشه‌ای شـدن، در محـیط کشـت گیـاه *Lathyrus sativus* (Ochatt *et al.*, 2001) و سیب درختی دیده شده‌اسـت (Chakabarty *et al.*, 2005). تحقیقات مختلف نشان داده کـه غلظـت‌هـای مختلـف سالیسـیلیک‌اسـید سـبب کـاهش اثرهـای سـوء تنش‌های محیطی چون تنش خشکی و شوری در گیاهـان و افـزایش مقاومـت سـلول‌هـای گیـاهی مـی‌شـود (Sakhabutdinova *et al.*, 2003). در کشـت بافـت گیـاه سیب‌زمینی هورمون سالیسیلیک‌اسید موجب مقاومـت بـه بیماری و مقاومت به گرما می شود. اطلاعاتی راجع به اثـر سالیسیلیک‌اسید بر پدیده شیشه‌ای شدن در دسـت نیسـت ولی مشاهده شده که اسـتیل سالیسـیلیک‌اسـید بـا غلظـت ۵۰ میکرومولار باعث کم شدن آب داخلی بافت و کاهش شیشه‌ای شـدن در گیـاه *Origanum vulgare* شـده‌اسـت (Andarwulan & Shetty, 1999).

در این پژوهش اثـر بنزیـل‌آدنـین و سالیسـیلیک‌اسـید به‌صورت مجزا و ترکیبی در محیط کشـت آویشـن دنـایی بر جوانـه‌زنـی، رشـد، پدیـده شیشـه ای شـدن، همچنـین تغییـرات آناتومیـک، مورفولوژیـک و تغییـر در مقـدار رنگدانه های موجود تحت تأثیر تیمارهای مختلف بررسـی شده‌است.

مواد و روشها

کشت بافت و آنالیز رشد

بذر آویشن دنایی در سال ۱۳۸٤ از منطقـه آبـاده واقـع در استان فارس جمع‌آوری شـد و بـا شـماره هربـاریومی MPH-660 در پژوهشکده گیاهان دارویی دانشـگاه شـهید بهشتی تهران، نگهداری گردید. به‌منظور جوانه‌زنی، بـذرها به مدت ۲ دقیقه در ۳۰ میلی‌لیتر محلول آب مقطر استریل حاوی ۳ قطره تـوییـن ۲۰ و سـپس بـه مـدت ۲ دقیقـه در محلول الکل ۷۰٪ (v/v) قرار داده شد، سپس بذرها دو بار با آب مقطر استریل به مدت ۵ دقیقه شستشـو داده شـد و بعـد از آن ۵ دقیقـه در محلـول هیپوکلریـت‌سـدیم ۱٪ غوطه‌ور گردید و درنهایت سه بار در آب مقطر بـه‌ترتیـب به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه شستشو داده شد.

محـیط کشـت موراشـیگ- سـکوگ (Murashige & Skoog, 1962) همراه با ساکارز با غلظـت $۳۰ gl^{-1}$ و آگـار به غلظت $۷gl^{-1}$ به همـراه بنزیـل‌آدنـین ($0.1mgl^{-1}$) آمـاده

Archive of SID

www.SID.ir

گردید. شیشه های حاوی نمونه در اتاق رشد با دمای ۳ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تحت نور فلوئورسنس ۲۲۰۰ لوکس نگهداری شدند. بعد از گذشت ٤ هفته از مرحله رشد بذر، اثر هورمون بر شاخه‌زایی و شیشه‌ای شدن مورد بررسی قرار گرفت.

بعد از چهار هفته گیاهچه‌های رشد یافته از بذر، در محیط همسان با قبلی ($0.1mgl^{-1}$ بنزیل‌آدنین) واکشت گردید. تنها تفاوت این مرحله با مرحله قبل، کاهش مقدار ساکارز محیط به نصف مقدار اولیه بود ($15gl^{-1}$) که این کاهش به‌منظور تحریک سیستم فتوسنتزی و بهبود کیفیت گیاهچه‌ها انجام شد (النجار، ۱۳۸۸). نمونه کشت شده از محیط بدون هورمون به محیط مشابه منتقل شد. نمونه های رشد یافته در محیط دارای بنزیل‌آدنین در چهار شرایط هورمونی متفاوت: محیط بدون بنزیل‌آدنین، محیط دارای بنزیل‌آدنین به غلظت $1mgl^{-1}$، محیط دارای بنزیل‌آدنین به همراه سالیسیلیک‌اسید ۵µM و محیط بدون بنزیل‌آدنین دارای سالیسیلیک‌اسید ۵µM واکشت شد. شرایط اتاق رشد مشابه مرحله قبل تنظیم گردید. در پایان ٤ هفته، وزن تر و میانگین طول شاخه گیاهچه‌ها، درصد شاخص جوانه‌زنی، درصد زنده‌مانی و درصد شیشه‌ای شدن بافت و تعداد شاخه اندازه‌گیری شد. گیاهچه‌های رشد یافته طی تیمارهای مختلف هورمونی با تیغ و به‌صورت دستی برش‌گیری و در آب ژاول ۲/۵٪ (V/V) به مدت ٤۰ دقیقه قرار داده شد. پس از شستشو با آب مقطر به مدت ۱۰ ثانیه در اسید استیک ۲٪ (V/V) قرار داده شده و دوباره با آب مقطر آبکشی شدند. برای رنگ‌آمیزی مضاعف، نمونه‌ها ابتدا در کارمن زاجی به مدت ۲۰ دقیقه و پس از شستشو در سبز متیل به مدت ۲۰ ثانیه قرار داده شد. نمونه‌ها پس از شستشو با آب مقطر با میکروسکوپ نوری بررسی شد.

برای سنجش کلروفیل و کاروتنوئید از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاده شد.

آنالیزهای آماری

در زمان آزمایش، در هر تیمار ۱۲ واحد آزمایشی (شیشه) کشت داده شد که در هر شیشه ۳ جوانه قرار داشت، بجز در مورد بذر که در هر شیشه ٤ بذر قرار داده شد. برای بررسی های آماری از هر تیمار، ۵ شیشه به‌طور تصادفی انتخاب شد و ویژگی‌های مورد نظر در جوانه‌ها، مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشها در قالب بلوک‌های کاملاً تصادفی و ANOVA به کمک نرم‌افزار spss16 مورد تحلیل قرار گرفت.

نتایج

اثر محیط کشت بذر

جوانه‌زنی بذر در محیط بدون هورمون و محیط دارای هورمون بنزیل‌آدنین $1mgl^{-1}$ مورد مقایسه قرار گرفت. جوانه‌زنی در هر دو محیط به یک اندازه بوده و میزان جوانه‌زنی در هر دو محیط ۱۰۰٪ بود (شکل ۱). اما تعداد شاخه‌ها در محیط دارای بنزیل آدنین نسبت به محیط بدون هورمون به میزان ۷ برابر افزایش نشان داد (شکل ۱ و ۵).

قطعات رأسی شاخه‌های گیاهچه‌های حاصل از کشت بذر، در محیط همسان واکشت گردید. پس از چهار هفته، پدیده شیشه‌ای شدن در محیط دارای بنزیل‌آدنین ظاهر شد (شکل ۲). این جوانه‌ها دارای برگ‌های لوله‌ای و پرآب، کم‌رنگ و شفاف و دارای ساقه کوتاه بوده که برگ ها

Archive of SID

www.SID.ir

به‌صورت بسیار نزدیک و به‌هم فشرده دیده می‌شدند. در مقابل، گیاهچه‌هایی که در محیط بدون بنزیل‌آدنین رشد کرده بودند دارای ساقه‌ی راست و بلند بودند که برگ های سبز تیره با فاصله بر روی آن قرار داشتند. البته تعداد شاخه در گیاهچه‌های رشد یافته در محیط دارای بنزیل‌آدنین نسبت به محیط بدون هورمون بسیار بیشتر بود (شکل ٦).

شاخص‌های مورفولوژیک و بافتی در تیمار سالیسیلیک‌اسید

هورمون بنزیل‌آدنین چه به تنهایی و چه به‌صورت ترکیب با سالیسیلیک‌اسید موجب شیشه‌ای شدن نمونه‌ها شد. این ساقه‌ها، پر آب با برگ های ضخیم و کم‌رنگ بودند (شکل ۳). در نمونه‌های شیشه‌ای شده، افزایش آب داخلی گیاهچه‌ها به اندازه ۲/٦٪ در مقایسه با سایر تیمارها دیده شد (شکل ۷). در نمونه‌هایی که از محیط دارای بنزیل آدنین به محیط‌های بدون بنزیل‌آدنین (به‌همراه سالیسیلیک‌اسید و یا بدون سالیسیلیک‌اسید) منتقل شدند، بازگشت به حالت طبیعی و غیرشیشه ای به مقدار زیادی مشهود بود، البته سالیسیلیک‌اسید در بازگشت به حالت طبیعی مؤثرتر بود.

گیاهچه‌هایی که در محیط بدون بنزیل‌آدنین رشد یافتند در مقایسه با نمونه های رشد یافته در محیط حاوی بنزیل‌آدنین بلندتر بودند. اما رشد در محیط دارای سالیسیلیک‌اسید هیچگونه اثر کاهشی در طول گیاهچه ها نداشت. بنزیل‌آدنین به تنهایی بیشترین اثر را در کاهش طول گیاهچه‌ها داشت و باعث کم شدن طول گیاهچه‌ها به اندازه ۷٤/۱۹٪ شد، در حالی‌که اثر کاهش رشدی بنزیل‌آدنین در ترکیب با سالیسیلیک‌اسید به طور معنی‌داری کم شد (شکل ۸). برای بررسی اثر هورمون بر ساختار مورفولوژیکی ساقه برش عرضی ساقه گیاهان در تیمارهای فوق‌الذکر پس از رنگ‌آمیزی مضاعف با یکدیگر مقایسه شدند (شکل ٤). در نمونه‌های شیشه‌ای شده (شکل ٤، الف) آب زیادی در بخش پوستی و آوند چوبی دیده می‌شود و بافت حالت اصلی خود را از دست داده، به‌طوری که بخش پوست به راحتی متلاشی می‌شود و به علت انباشتگی آب، مقطع عرضی به شکل دایره در می‌آید. در مقابل، در نمونه‌هایی که بازگشت به حالت نرمال را نشان می‌دادند، ساقه و استوانه آوندی حالت چند ضلعی را نشان می‌دهد (شکل ٤، ب و ج).

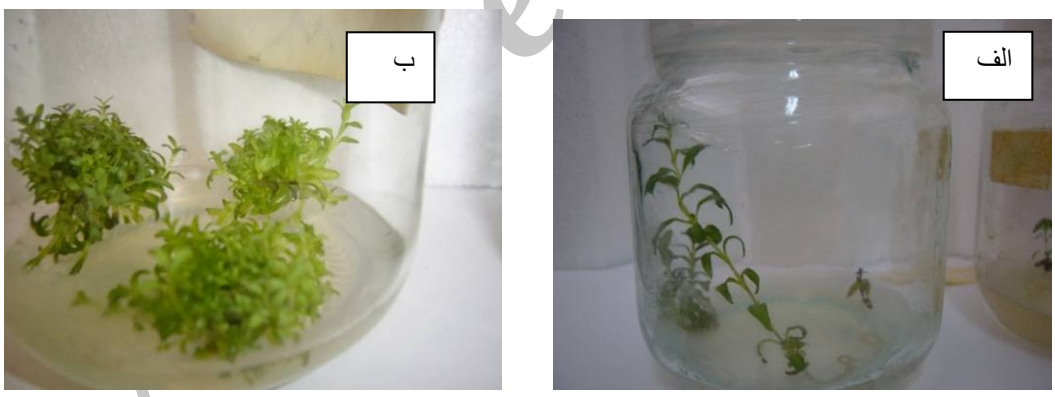
شاخص‌های شیمی گیاهی

هورمون بنزیل‌آدنین باعث پایین آمدن مقدار رنگدانه ها در گیاه می شود. این هورمون اثر قویتری بر کاهش کلروفیل b دارد. بنزیل آدنین مقدار کلروفیل a را به‌صورت معنی‌داری به اندازه ۲۳/۵٪ کاهش داد (شکل ۹، الف) و موجب کاهش ۵۰ درصدی مقدار کلروفیل b شد (شکل ۹، ب). همچنین باعث پایین آمدن کاروتنوئید به اندازه ۲۳٪ شد (شکل ۹، ج). افزودن سالیسیلیک اسید به همراه بنزیل‌آدنین نمی‌تواند تأثیر منفی بنزیل‌آدنین را بر کاهش میزان کلروفیل، حداقل در مدت زمان چهار هفته، جبران نماید. در نمونه‌هایی که بازگشت به حالت نرمال دیده شد، مقدار رنگدانه، مشابه بافت نرمال بود.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱- الف) گیاهچه رشد یافته از بذر در محیط فاقد هورمون، ب) گیاهچه رشد یافته از بذر در محیط دارای بنزیل‌آدنین $1mgl^{-1}$

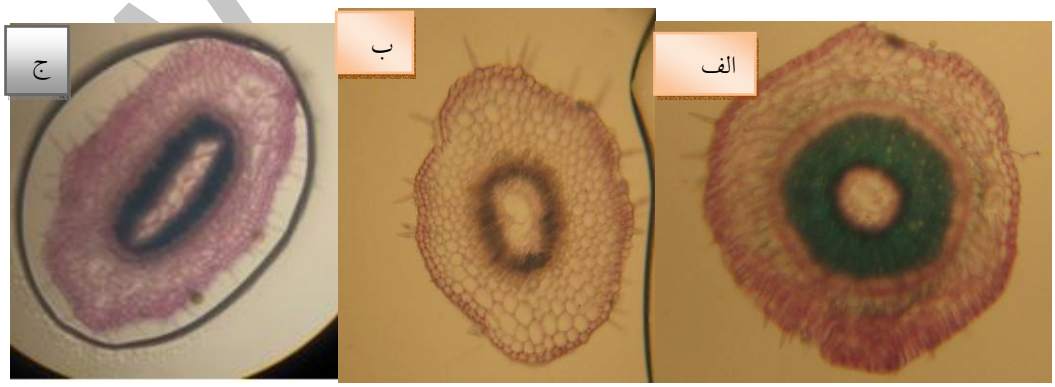


شکل ۲- الف) گیاهچه واکشت‌یافته در محیط بدون هورمون، منتقل شده از محیط بدون هورمون، ب) گیاهچه واکشت یافته در محیط دارای بنزیل آدنین، منتقل شده از محیط دارای بنزیل آدنین

www.SID.ir

شکل ۳- اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر شیشه‌ای شدن

نمونه (0/0) از محیط بدون هورمون به محیط بدون هورمون منتقل شده و بقیه نمونه‌ها از محیط دارای بنزیل‌آدنین به محیط‌های: فاقد هورمون (BA/0)، واجد سالیسیلیک (BA/SA)، واجد سالیسیلیک به همراه بنزیل‌آدنین (BA/BA+SA) و بنزیل‌آدنین (BA/BA) منتقل شد. نمونه (0/0) حالت نرمال را نشان می‌دهد. نمونه‌های رشد یافته در محیط دارای بنزیل‌آدنین (به‌صورت مجزا و یا ترکیب با سالیسیلیک‌اسید) شیشه‌ای شدند و نمونه‌هایی که به محیط بدون بنزیل‌آدنین منتقل شدند (BA/0)، (BA/SA)، بازگشت به حالت نرمال دیده می‌شود.

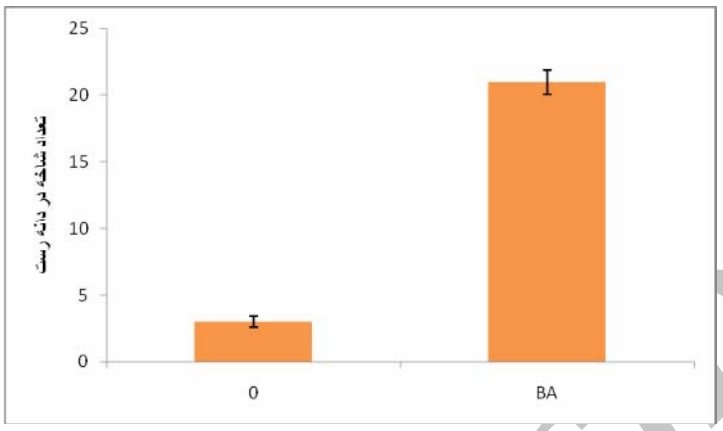


شکل ٤- اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر بافت ساقه و پوست

الف) ساقه شیشه‌ای شده، ب) ساقه بازگشته به حالت نرمال،

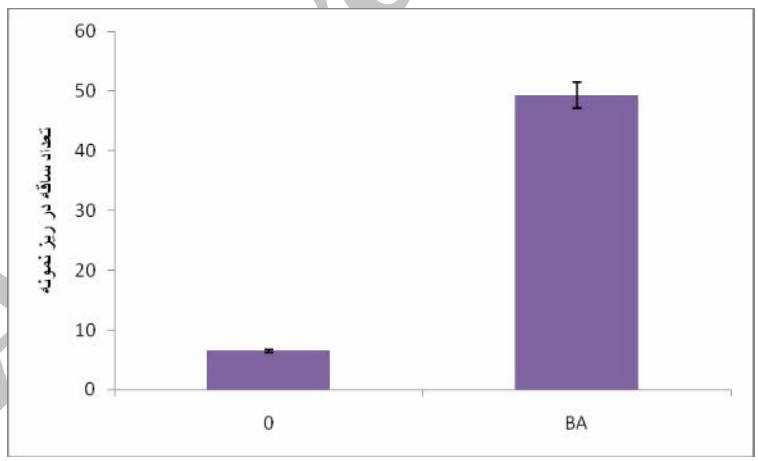
ج) ساقه بازگشته به حالت نرمال در حضور سالیسیلیک‌اسید (عکس‌ها در مقیاس ۱۲۰ برابر)

Archive
www.SID.ir



شکل ۵- اثر بنزیل‌آدنین بر متوسط تعداد شاخه‌های گیاهچه رشد یافته از بذر در محیط فاقد هورمون و دارای بنزیل‌آدنین $1mgl^{-1}$ چهار هفته پس از جوانه‌زنی

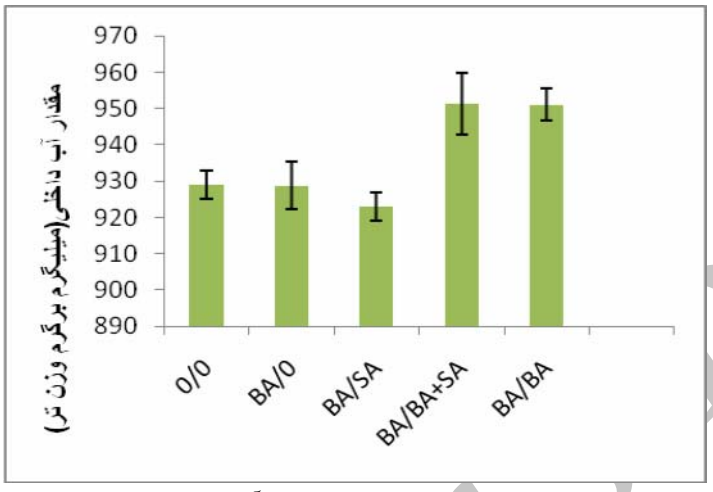
(بارها نمایانگر میانگین ۵ نمونه با ۳ تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.)



شکل ٦- اثر بنزیل‌آدنین بر متوسط تعداد شاخه ریزنمونه‌ها چهار هفته پس از واکشت

(بارها نمایانگر میانگین ۵ نمونه با ۳ تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.)

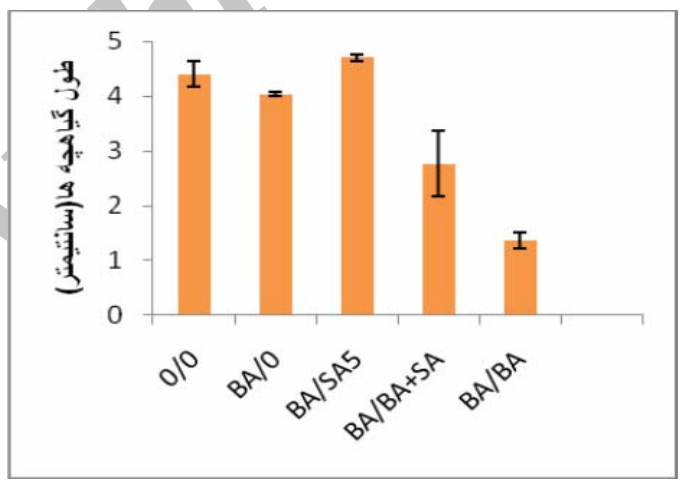
www.SID.ir



شکل ۷- اثر تیمار هورمونی بر میزان آب داخلی بافت‌ها

نمونه (0/0) از محیط بدون هورمون به محیط مشابه منتقل شده و بقیه نمونه‌ها از محیط دارای بنزیل‌آدنین به محیط‌های: فاقد هورمون (BA/0)، واجد سالیسیلیک (BA/SA)، واجد سالیسیلیک به‌همراه بنزیل‌آدنین (BA/BA+SA) و بنزیل‌آدنین (BA/BA) منتقل شد.

(بارها نمایانگر میانگین ۵ نمونه با ۳ تکرار ±انحراف معیار می‌باشد.)

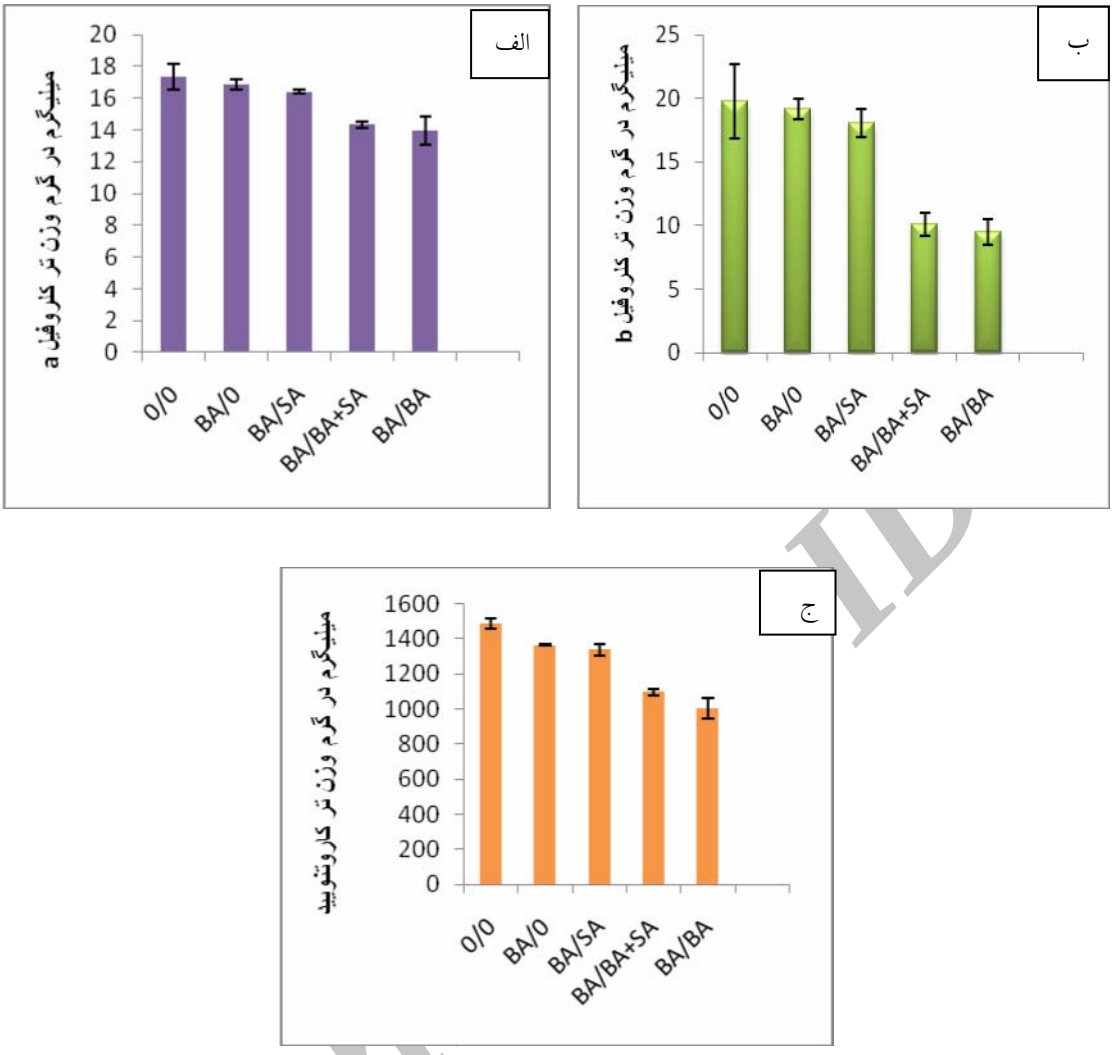


شکل ۸- اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر طول گیاهچه‌ها

نمونه (0/0) از محیط بدون هورمون به محیط مشابه منتقل شده و بقیه نمونه‌ها از محیط دارای بنزیل‌آدنین به محیط‌های: فاقد هورمون (BA/0)، واجد سالیسیلیک (BA/SA)، واجد سالیسیلیک به‌همراه بنزیل‌آدنین (BA/BA+SA) و بنزیل‌آدنین (BA/BA) منتقل شد.

(بارها نمایانگر میانگین ۵ تکرار با ۳ تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۹- تعیین مقدار رنگدانه‌ها در نمونه‌ها

الف) کلروفیل a، ب) کلروفیل b، ج) کاروتنوئید

نمونه (0/0) از محیط بدون هورمون به محیط مشابه منتقل شده و بقیه نمونه‌ها از محیط دارای بنزیل‌آدنین به محیط‌های: فاقد هورمون (BA/0)، واجد سالیسیلیک (BA/SA)، واجد سالیسیلیک به‌همراه بنزیل‌آدنین (BA/BA+SA) و بنزیل‌آدنین (BA/BA) منتقل شد.

(بارها نمایانگر میانگین ۵ نمونه با ۳ تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.)

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که وجود بنزیل‌آدنین در محیط کشت گیاه آویشن دنایی اثرهای متفاوتی را در مورفولوژی و مراحل مختلف رشدی گیاه به‌جا می‌گذارد. وجود این هورمون، درصد جوانه‌زنی بذر را در محیط حاوی هورمون در مقایسه با نمونه بدون هورمون تغییری نداد. این هورمون سبب افزایش میزان شاخه‌زایی با کاهش طول در نمونه‌ها گردید. Echeverrigaray و همکاران (۲۰۰۵) بهبود جوانه‌زنی و شاخه‌زایی را در محیط‌های کشت حاوی بنزیل‌آدنین در گیاه *Lavandula dentate* نشان دادند. به‌نظر می‌رسد به‌دلیل روشهای بهینه نگهداری و تازگی بذرها، قوه نامیه بذرها حفظ شده و در نتیجه

Archive of SID

www.SID.ir

به‌دلیل ۱۰۰٪ بودن جوانه‌زنی در حالت عادی، افزایش جوانه‌زنی ناشی از مصرف بنزیل‌آدنین مشاهده نشد. افزایش میزان شاخه‌زایی و کاهش طول ساقه در ریزنمونه‌های تیمار شده با هورمون مشابه نتایج Echeverrigaray و همکاران (۲۰۰۵) در گیاه *Lavandula dantate* و نتایج Be و همکاران (۲۰۰۸) در گیاه *Vetiveria zizanioides* L. بود.

گزارشهای متفاوتی از اثر سالیسیلیک‌اسید بر طول ساقه و ریشه در گیاهان مختلف موجود است. در گیاه سویا و خیار این اثر به‌صورت افزایش طول به‌دلیل افزایش میزان آنزیم نیترات‌ردوکتاز است (Singh *et al.*, 2010؛ Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998). طبق تحقیقات انجام شده، در نمونه‌های تیمار شده با سالیسیلیک‌اسید به همراه بنزیل‌آدنین، اثر بازدارندگی بنزیل‌آدنین بر رشد طولی ساقه کمتر شد.

افزودن بنزیل‌آدنین به محیط کشت سبب افزایش میزان آب داخلی گیاه و شیشه‌ای شدن در نمونه‌ها گردید. همچنین افزودن سالیسیلیک‌اسید بدون بنزیل‌آدنین، سبب کاهش میزان آب بافت و برطرف شدن حالت شیشه‌ای در نمونه‌ها شد (شکل ۳). آزمایشهایی که روی گیاه *Origanum vulgare* و *Lathyrus sativus* انجام شد تأثیر استیل سالیسیلیک‌اسید را بر کاهش آب داخلی گیاه نشان داد (Andarwulan & Shetty, 1999؛ Ochatt *et al.*, 2001). در تحقیق انجام شده در گیاه آویشن دنایی، میزان آب داخلی گیاه در نمونه‌های حاوی بنزیل‌آدنین (چه به‌صورت مجزا، چه به‌صورت ترکیب با سالیسیلیک‌اسید) تفاوت معنی‌داری را نسبت به بافت طبیعی نشان نداد (شکل ۷).

بررسی‌های Olmos و همکاران (۱۹۹۸) بر روی گیاه میخک، از بین رفتن سلول‌های پارانشیم نردبانی و جایگزینی آن با بافت اسفنجی را در میان‌برگ برگ‌های شیشه‌ای شده، نشان داد. برگ‌های شیشه‌ای شده، نسبت به برگ طبیعی ضخامت بیشتری دارند و سلول‌های میان‌برگ فشردگی اندکی با یکدیگر دارند.

برش عرضی بافت‌ها نشان داد که شیشه‌ای شدن، تغییرات عمده‌ای را در نحوه قرارگیری سلول‌ها و شکل و حالت آوندها ایجاد می‌کند. در بافت‌های شیشه‌ای شده، آب زیادی در بافت‌ها و در فضای بین سلولی جمع می‌شود (Kevers & Gaspar, 1986). ساقه شیشه‌ای شده، دارای فضای بین سلولی زیاد در پارانشیم مغزی و قشری می‌باشد. دراین بافت‌ها، محتوای لیگنین سیستم آوندی پایین است و سیستم آوندی غیرعادی و یا ناقص دارند (Debergh *et al.*, 1992). در نمونه‌های شیشه‌ای شده آویشن دنایی، بررسی مقطع عرضی گیاه وجود آب فراوان را در پارانشیم پوستی و مغزی نشان داد، به‌طوری که بر اثر تجمع آب در فضای بین سلولی و به علت پایین آمدن میزان لیگنین، آوند چوبی به شدت تحلیل رفته و تخریب سلول‌های بافت آوندی، سبب تغییر شکل مقطع عرضی از حالت چند ضلعی که شکل رایج ساقه در نعنائیان می‌باشد، به شکل دایره‌ای گردید. در سایر تیمارها که شیشه‌ای نبودند، مقطع عرضی به حالت نرمال و در حالت چند ضلعی دیده شد (شکل ٤).

پدیده شیشه‌ای شدن سبب کاهش میزان رنگدانه‌ها می‌گردد. کشت گیاه Big Bluestem (*Andropogon gerardii*) در محیط دارای بنزیل‌آدنین سبب کاهش مقدار رنگدانه‌ها و به‌خصوص کلروفیل b، در طول زمان گردیده‌است (Towne & Owensby, 1983). اسید سالیسیلیک نیز بر مقدار رنگدانه‌ها مؤثر است که این اثر وابسته به غلظت آن می‌باشد، به‌طوری که افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

اسید سالیسیلیک تا حدود ۰/۲mM موجب افزایش کلروفیل‌های a و b در گیاه جو و تربچه شد. ولی افزایش بیش از آن موجب کاهش مقدار رنگدانه‌ها در آنها گردید. این‌طور به نظر می‌رسد که اثر کاهشی اسید سالیسیلیک در غلظت بالا به دلیل اثر القایی آن روی تولید سیتوکینین‌ها باشد (Canakci & Munzuroghlu, 2009).

در گیاه آویشن شیشه‌ای شده، مقدار رنگدانه‌ها پایین می‌آید. بنزیل‌آدنین اثر قویتری بر کاهش کلروفیل b دارد. در گیاهانی که شیشه‌ای شدند، نقص در مسیر سنتز ترکیب‌های فنلی و لیگنین سبب کاهش سنتز و میزان کلروفیل و سایر ترکیب‌های تتراپیرولی می‌گردد (Gaspar *et al.*, 1995) که به‌نظر می‌رسد حضور بنزیل‌آدنین در محیط، سبب افزایش این نقص و کاهش میزان کلروفیل در این گیاهان شده و وقتی بنزیل‌آدنین از محیط کشت گیاه آویشن حذف می‌شود این اثر نیز از بین می‌رود. به همین علت، در گیاهچه‌هایی که بازگشت از حالت شیشه‌ای شدن به حالت نرمال را دارند، مقدار رنگدانه‌ها مشابه گیاهچه نرمال است. نتایج نشان داد که افزودن سالیسیلیک‌اسید به همراه بنزیل‌آدنین طی مدت زمان چهار هفته، نمی‌تواند اثر منفی بنزیل‌آدنین بر میزان کلروفیل گیاه را در زمان نمونه‌گیری خنثی نماید.

در پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که محیط کشت درون شیشه‌ای شرایطی استرس‌زا برای گیاه به حساب می‌آید و بنزیل‌آدنین هر چند که به فرایند رشد و تکثیر ریز نمونه‌ها کمک می‌نماید، اما سبب افزایش احتمال ایجاد استرس شیشه‌ای شدن در محیط کشت می‌گردد. به‌منظور استفاده بهینه از خصوصیات این هورمون و جلوگیری از ایجاد پدیده شیشه‌ای شدن می‌توان از مواد بهبوددهنده، نظیر اسید سالیسیلیک که اثر منفی بر رشد و نمو گیاه ندارد استفاده نمود. این هورمون کاهنده استرس و آب داخلی گیاه بوده و سبب برگشت حالت شیشه‌ای می‌شود و شرایط داخلی گیاه را به حالت نرمال نزدیک می‌نماید.

منابع مورد استفاده

- النجار، ن.، ۱۳۸۸. ریزازدیادی و بررسی اثرات شوری بر ترکیبات اسانس گیاه آویشن دنایی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه شهید بهشتی.
- قهرمان، ا.، ۱۳۷۹. فلور رنگی ایران. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور و دانشگاه تهران. جلد ۲۲.گونه شماره ۲۷٤٤.
- مظفریان، و.ا. و برزگری، م.، ۱۳۷۹. فلور استان یزد. انتشارات یزد، یزد، ٦٣٦ صفحه.
- Andarwulan, N. and Shetty, K., 1999. Influence of acetyl salicylic acid in combination with fish protein hydrolysates on hyperhydricity reduction and phenolic synthesis in oregano (*Origanum vulgare*) tissue cultures. Journal of Food Biochemistry, 23(6): 619-635.
- Askari, F. and Sefidkon, F., 2003. Essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak. from Iran. Journal of Essential Oil-Bearing Plants, 6(3): 217-219.
- Be, L.V., Tan, V.T., Uyen, N.T.T. and Dung, L.V., 2008. Low-cost Micropropagation of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.). Assumption University Journal Thailand, 12(1): 18-24.
- Canakci, S. and Munzuroghlu, O., 2009. Effect of Salicylic acid on Growth and chlorophyll destruction of some plant tissues. World Journal of Agricultural Science, 5(5): 577-581.
- Chakrabarty, D., Park, S.Y., Ali, M.B., Shin, K.S. and Paek, K.Y., 2005. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. Tree Physiology, 26(3): 377-388.
- Debergh, P., Aitkenchristie, J., Cohen, D., Grout, B., Vonarnold, S., Zimmerman, R. and Ziv, M., 1992. Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 30(2): 135-140.
- Echeverrigaray, S., Basso, R. and Andrade, L.B., 2005. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. Biologia plantarum, 49(3): 439-442.

Archive of SID

www.SID.ir

- Ochatt, S., Durieu, P., Jacas, L. and Pontecaille, C., 2001. Protoplast, cell and tissue cultures for the biotechnological breeding of grass pea (*Lathyrus sativus* L.). Lathyrus Lathyrism Newsletter, 2: 35-38.
- Olmos, E. and Hellin, E., 1998. Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. Scientia Horticulturae, 75: 91-101.
- Sakhabutdinova, A.R., Fatkhutdinova, D.R., Bezrukova, M.V. and Shakirova, F.M., 2003. Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. Bulgarian Journal of plant physiology (special issue), 314-319.
- Singh, P.K., Chaturvedi, V.K. and Bose, B., 2010. Effects of salicylic acid on seedling growth and nitrogen metabolism in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Journal of Stress Physiology and Biochemistry, 6(3):102-113.
- Towne, G. and Owensby, C., 1983. Cytokinins effect on protein and chlorophyll content of big bluestem leaves. Journal of Range Management, 36: 75-77.
- Fauguel, C.M., Vega, T.A., Nestares, G., Zorzoli, R. and Picardi, L.A., 2008. Anatomy of normal and hyperhydric sunflower shoots regenerated in vitro. Helia, 31(48): 17-26.
- Gaspar, T., Kevers, C, Franck, T., and Bisbis, B., Billard, J.P., Huault, C., Dily, F.L., Petit-Paly, G., Rideau, M., Penel, C., Crèvecoeur, M. and Greppin, H., 1995. Paradoxical results in the analysis of hyperhydric tissues considered as being under stress: questions for a debate. Bulgarian Journal of Plant Physiology, 21(2-3): 80-97.
- Gutiérrez-Coronado, M.A., Trejo-López, C. and Larqué-Saavedra, A., 1998. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. Plant Physiology and Biochemistry, 36(8): 563-565.
- Kevers, C. and Gaspar, T., 1986. Vitrification of carnation in vitro: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. Physiologie Végétale, 24(6): 647-653.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 350-382.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of benzyladenine and salisylic acid on hyperhydricity syndrome in micropropagated stem culture of *Thymus daenensis* Celak.

M. Zarooshan[1], F. Bernard[2*] and Z. Heydarian[3]

1- Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
E-mail: f_bernard@sbu.ac.ir
3- Biotechnology institute, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: June 2011 Revised: August 2011 Accepted: October 2011

Abstract

Thymus daenensis Celak. is an endemic plant species in Iran used for medicinal purposes. It seems that *In vitro* culture is a useful technique for its propagation. *In vitro* culture conditions cause water stress or hyperhydricity in tissues due to the cut in the plant tissue and changes in levels of plant hormones compared to natural conditions and may vary depending on the type of medium, type of agar and available water. Hyperhydricity syndrome is one of the major problems that occur in *in vitro* growth and through a deformity prevents the propagation of plants. In shoot culture of *Thymus daenensis* Celak., hyperhydricity happens commonly. In this investigation, the effect of benzyladenine and salicylic acid were studied on shoot hyperhydricity syndrome. For this purpose, disinfected seeds were cultured into glass jars containing Murashige and Skoog (MS) medium with benzyladenine ($0.1mgl^{-1}$). Non benzyladenine-treated plantlets were transferred to the same medium and benzyladenine-treated plantlets were cultured in four experimental media including without benzyladenine, with $1mgl^{-1}$ benzyladenine in presence or without 5µM salicylic acid. Afterward, effects of the mentioned treatments on hyperhydricity, morphological and physiological characteristics of the plant were measured. Results showed that benzyladenine singly caused hyperhydricity in shoot explants of *Thymus daenensis*. After transferring the explants to the medium free of benzyladenine, hyperhydricity reversed toward normal state and the presence of salicylic acid improved this reversion. Salicylic acid reduced water content in shoot explants and enhanced the amount of photosynthetic pigments. In benzyladenine treated sample, the hyperhydricity was not reversed by salicylic acid.

Key words: *Thymus daenensis* Celak., benzyladenine, hyperhydricity syndrome, photosynthetic pigments, salicylic acid.

Archive of SID

www.SID.ir