

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

محبوبه زراوشان<sup>۱</sup>، فرانسواز برنارد<sup>۲\*</sup> و زهره حیدریان<sup>۳</sup>

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 پذیرش: آبان ۱۳۹۰

تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۰

تاریخ دریافت: خرداد 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. به نظر می‌رسد که استفاده از تکنیک کشت درون شیشه‌ای برای تکثیر آن مفید باشد. شرایط کشت درون شیشه‌ای، به دلیل 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 با توجه 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 بنزیل آدنین و سالیسیلیک اسید بر سندرم شیشه‌ای شدن جوانه‌ها سنجیده شد. به این منظور، بذرها در محیط موراشیک-اسکوگ (MS) با تیمارهای بنزیل آدنین ( $0.1 \text{mg l}^{-1}$ ) کشت شدند. جوانه‌های رشد یافته در محیط بدون هورمون، به محیط مشابه انتقال یافت. همچنین جوانه‌های رشد یافته در محیط دارای بنزیل آدنین به محیط‌هایی با چهار تیمار هورمونی مختلف (بدون هورمون، دارای بنزیل آدنین به همراه سالیسیلیک اسید یا بدون سالیسیلیک اسید) منتقل شدند. به دنبال آن اثر تیمارهای مذکور بر پدیده شیشه‌ای شدن، ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که هورمون بنزیل آدنین 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 سالیسیلیک اسید باعث بهبود بازگشت به حالت نرمال می‌گردد. سالیسیلیک اسید باعث کاهش آب داخلی بافت و افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌گردد. در نمونه تیمار شده با بنزیل آدنین، در حضور سالیسیلیک اسید بازگشتی به حالت نرمال دیده نشد.

**واژه‌های کلیدی:** آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.)، بنزیل آدنین، پدیده شیشه‌ای شدن، رنگدانه فتوسنتزی، سالیسیلیک اسید.

## مقدمه

آویشن دنیایی 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 دنیایی 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 ۴۹/۷٪ و پاراسیمن به میزان ۶/۴٪ 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 می‌گردد (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 (۴) ساقه پرآب گוشتی تغییر شکل داده شده، شکننده و ترد، که این شکنندگی به علت اتصال کم دیواره سلول‌ها به یکدیگر ایجاد می‌شود (Fauguel et al., 2008).

برگ‌های 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 سلول‌ها به‌وجود آمده و در نتیجه برگ‌ها ضخیم‌تر از برگ طبیعی به‌نظر می‌رسد. از طرفی کلروپلاست سلول‌ها دارای تیلاکوئیدهای غیرعادی می‌شوند که این امر نیز منجر به ایجاد ظرفیت اندک فتوسنتزی، کاهش شفافیت برگ‌ها و محتوای کلروفیل می‌شود. ایجاد واکوئل بزرگ در این سلول‌ها نشانه‌ای از پدیده اتوفازی است که هنگام استرس زیاد، ایجاد می‌شود. اپیدرم حالت ناقص پیدا کرده و کوتیکول در آن به شدت کاهش می‌یابد. سلول‌های نگهبان روزنه از نظر اندازه و شکل با روزنه‌های 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 آبسزیک 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

بیماری و مقاومت به گرما می شود. اطلاعاتی راجع به اثر سالیسیلیک اسید بر پدیده شیشه ای شدن در دست نیست ولی مشاهده شده که استیل سالیسیلیک اسید با غلظت ۵۰ میکرومولار باعث کم شدن آب داخلی بافت و کاهش شیشه ای شدن در گیاه *Origanum vulgare* شده است (Andarwulan & Shetty, 1999).

در این پژوهش اثر بنزیل آدنین و سالیسیلیک اسید به صورت مجزا و ترکیبی در محیط کشت آویشن دنیایی بر جوانه زنی، رشد، پدیده شیشه ای شدن، همچنین تغییرات آناتومیکی، مورفولوژیک و تغییر در مقدار رنگدانه های موجود تحت تأثیر تیمارهای مختلف بررسی شده است.

### مواد و روشها

#### کشت بافت و آنالیز رشد

بذر آویشن دنیایی در سال ۱۳۸۴ از منطقه آباده واقع در استان فارس جمع آوری شد و با شماره هرباریومی MPH-660 در پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهران، نگهداری گردید. به منظور جوانه زنی، بذرها به مدت ۲ دقیقه در ۳۰ میلی لیتر محلول آب مقطر استریل حاوی ۳ قطره توپین ۲۰ و سپس به مدت ۲ دقیقه در محلول الکل ۷۰٪ (v/v) قرار داده شد، سپس بذرها دو بار با آب مقطر استریل به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد و بعد از آن ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ غوطه ور گردید و در نهایت سه بار در آب مقطر به ترتیب به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه شستشو داده شد.

محیط کشت موراشیگ-سکوگ (Murashige & Skoog, 1962) همراه با ساکارز با غلظت  $30 \text{ g l}^{-1}$  و آگار به غلظت  $7 \text{ g l}^{-1}$  به همراه بنزیل آدنین ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) آماده

آوندهای چوبی آن کاهش می یابد. همچنین ترتیبی که در بافت طبیعی وجود دارد، در این سلولها از بین می رود. از لحاظ فیزیولوژیک ریزنمونه های شیشه ای شده، در مسیر سنتز ترکیب های فنلی و لیگنین نقص پیدا می کنند و در نتیجه کلروفیل و سایر ترکیب های تراپیرولی در آنها پایین می آید (Gaspar et al., 1995). شیشه ای شدن نوعی حالت تنش برای گیاه محسوب می شود.

عوامل مختلفی مانند نوع و مقدار سیتوکینین، اکسین و سایر هورمون های مورد استفاده در محیط کشت، گونه و واریته گیاه، طول زمان پس از آخرین واکشت، نوع برش، نحوه کاشت ریزنمونه در محیط کشت و فاصله اندام از سطح محیط کشت در شیشه ای شدن دخالت دارند (Debergh et al., 1992; Ochatt et al., 2001).

یکی از عوامل اصلی در ایجاد پدیده شیشه ای شدن، استفاده از هورمون بنزیل آدنین است. این هورمون برای رشد و باززایی ریزنمونه ها ضروری می باشد. بنزیل آدنین ماده ای سنتتیک بوده که از لحاظ ساختمان و عملکرد شبیه سیتوکینین می باشد و افزودن آن به محیط کشت گیاه *Lavandula dentate* سبب بهبود جوانه زنی و افزایش شاخه زایی می گردد (Echeverrigaray et al., 2005). اثر استفاده از این هورمون در ایجاد پدیده شیشه ای شدن، در محیط کشت گیاه *Lathyrus sativus* (Ochatt et al., 2001) و سیب درختی دیده شده است (Chakabarty et al., 2005). تحقیقات مختلف نشان داده که غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید سبب کاهش اثرهای سوء تنش های محیطی چون تنش خشکی و شوری در گیاهان و افزایش مقاومت سلول های گیاهی می شود (Sakhabutdinova et al., 2003). در کشت بافت گیاه سیب زمینی هورمون سالیسیلیک اسید موجب مقاومت به

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 ۴ بذر قرار داده شد. برای بررسی‌های 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  $1 \text{ mg l}^{-1}$  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 بنزیل‌آدنین 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 برگ‌ها

گردید. شیشه‌های حاوی نمونه در اتاق رشد با دمای  $25 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تحت نور فلئوئورسنس ۲۲۰۰ لوکس نگهداری شدند. بعد از گذشت ۴ 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 ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  بنزیل‌آدنین) واکشت گردید. تنها تفاوت این مرحله با مرحله قبل، کاهش مقدار ساکارز محیط به نصف مقدار اولیه بود ( $15 \text{ g l}^{-1}$ ) 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. نمونه‌های رشد یافته در محیط دارای بنزیل‌آدنین در چهار شرایط هورمونی متفاوت: محیط بدون بنزیل‌آدنین، محیط دارای بنزیل‌آدنین به غلظت  $1 \text{ mg l}^{-1}$ ، محیط دارای بنزیل‌آدنین به همراه سالیسیلیک‌اسید  $5 \mu\text{M}$  و محیط بدون بنزیل‌آدنین دارای سالیسیلیک‌اسید  $5 \mu\text{M}$  واکشت شد. شرایط اتاق رشد مشابه مرحله قبل تنظیم گردید. در پایان ۴ 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  $2/5\%$  ( $V/V$ ) به مدت ۴۰ دقیقه قرار داده شد. پس از شستشو با آب مقطر به مدت ۱۰ ثانیه در اسید استیک  $2\%$  ( $V/V$ ) 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

به اندازه ۷۴/۱۹٪ شد، در حالی که اثر کاهش رشدی بنزیل آدنین در ترکیب با سالیسیلیک اسید به طور معنی داری کم شد (شکل ۸). برای بررسی اثر هورمون بر ساختار مورفولوژیکی ساقه برش عرضی ساقه گیاهان در تیمارهای فوق الذکر پس از رنگ آمیزی مضاعف با یکدیگر مقایسه شدند (شکل ۴). در نمونه های شیشه ای شده (شکل ۴، الف) آب زیادی در بخش پوستی و آوند چوبی دیده می شود و بافت حالت اصلی خود را از دست داده، به طوری که بخش پوست به راحتی متلاشی می شود و به علت انباشتگی آب، مقطع عرضی به شکل دایره در می آید. در مقابل، در نمونه هایی که بازگشت به حالت نرمال را نشان می دادند، ساقه و استوانه آوندی حالت چند ضلعی را نشان می دهد (شکل ۴، ب و ج).

#### شاخص های شیمی گیاهی

هورمون بنزیل آدنین 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 به صورت معنی داری 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 بنزیل آدنین نمی تواند تأثیر منفی بنزیل آدنین را بر کاهش میزان کلروفیل، حداقل در مدت زمان چهار هفته، جبران نماید. در نمونه هایی که بازگشت به حالت نرمال دیده شد، مقدار رنگدانه، مشابه بافت نرمال بود.

به صورت بسیار نزدیک و به هم فشرده دیده می شدند. در مقابل، گیاهچه هایی که در محیط بدون بنزیل آدنین رشد کرده بودند دارای ساقه ای راست و بلند بودند که برگ های سبز تیره با فاصله بر روی آن قرار داشتند. البته تعداد شاخه در گیاهچه های رشد یافته در محیط دارای بنزیل آدنین نسبت به محیط بدون هورمون بسیار بیشتر بود (شکل ۶).

#### شاخص های مورفولوژیک و بافتی در تیمار سالیسیلیک اسید

هورمون بنزیل آدنین چه به تنهایی و چه به صورت ترکیب با سالیسیلیک اسید موجب شیشه ای شدن نمونه ها شد. این ساقه ها، پر آب با برگ های ضخیم و کم رنگ بودند (شکل ۳). در نمونه های شیشه ای شده، افزایش آب داخلی گیاهچه ها به اندازه ۲/۶٪ در مقایسه با سایر تیمارها دیده شد (شکل ۷). در نمونه هایی که از محیط دارای بنزیل آدنین به محیط های بدون بنزیل آدنین (به همراه سالیسیلیک اسید و یا بدون سالیسیلیک اسید) منتقل شدند، بازگشت به حالت طبیعی و غیرشیشه ای به مقدار زیادی مشهود بود، البته سالیسیلیک اسید در بازگشت به حالت طبیعی مؤثرتر بود.

گیاهچه هایی که در محیط بدون بنزیل آدنین رشد یافتند در مقایسه با نمونه های رشد یافته در محیط حاوی بنزیل آدنین بلندتر بودند. اما رشد در محیط دارای سالیسیلیک اسید هیچگونه اثر کاهشی در طول گیاهچه ها نداشت. بنزیل آدنین به تنهایی بیشترین اثر را در کاهش طول گیاهچه ها داشت و باعث کم شدن طول گیاهچه ها



شکل ۱- الف) گیاهچه رشد یافته از بذر در محیط فاقد هورمون، ب) گیاهچه رشد یافته از بذر در محیط دارای بنزیل آدنین  $1\text{mg l}^{-1}$

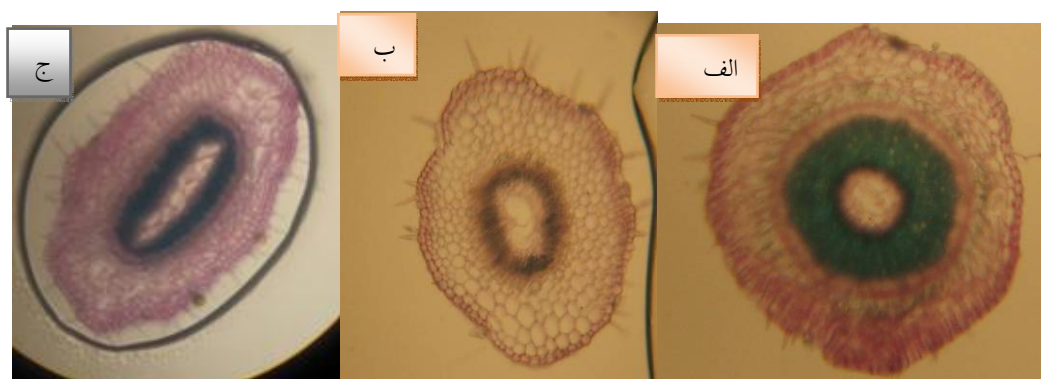


شکل ۲- الف) گیاهچه واکشت یافته در محیط بدون هورمون، منتقل شده از محیط بدون هورمون، ب) گیاهچه واکشت یافته در محیط دارای بنزیل آدنین، منتقل شده از محیط دارای بنزیل آدنین



شکل ۳- اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر شیشه‌ای شدن

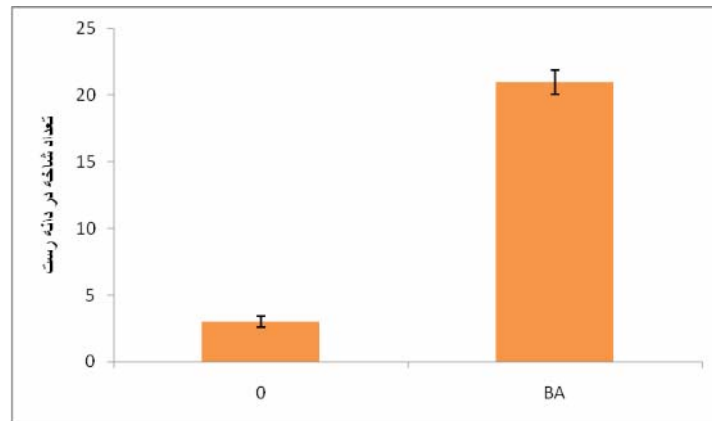
نمونه (0/0) از محیط بدون هورمون به محیط بدون هورمون منتقل شده و بقیه نمونه‌ها از محیط دارای بنزیل آدنین به محیط‌های فاقد هورمون (BA/0)، واجد سالیسیلیک (BA/SA)، واجد سالیسیلیک به همراه بنزیل آدنین (BA/BA+SA) و بنزیل آدنین (BA/BA) منتقل شد. نمونه (0/0) حالت نرمال را نشان می‌دهد. نمونه‌های رشد یافته در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



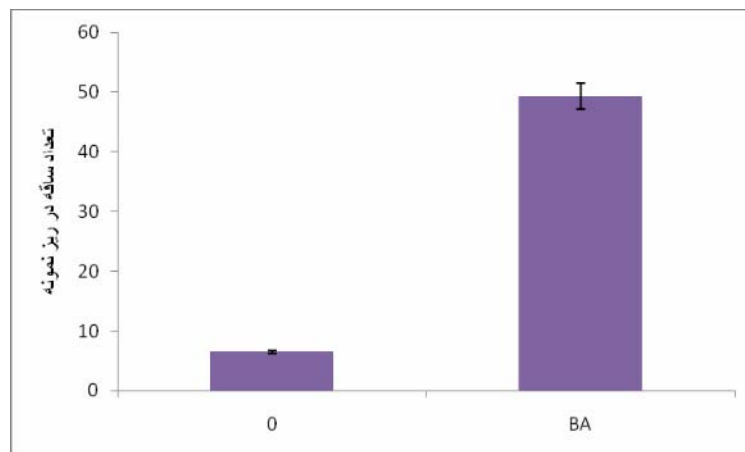
شکل ۴- اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر بافت ساقه و پوست

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

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

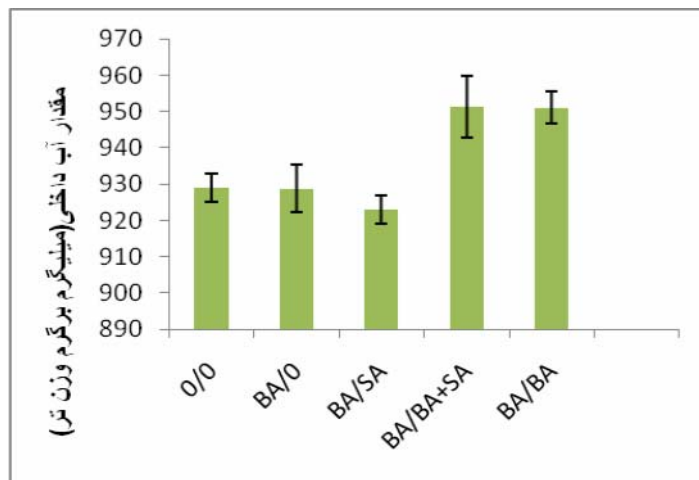


شکل ۵- اثر بنزیل آدنین بر متوسط تعداد شاخه‌های گیاهچه رشد یافته از بذر در محیط فاقد هورمون و دارای بنزیل آدنین 1mg/l<sup>۱</sup> چهار هفته پس از جوانه‌زنی  
(بارها نمایانگر میانگین ۵ نمونه با ۳ تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.)



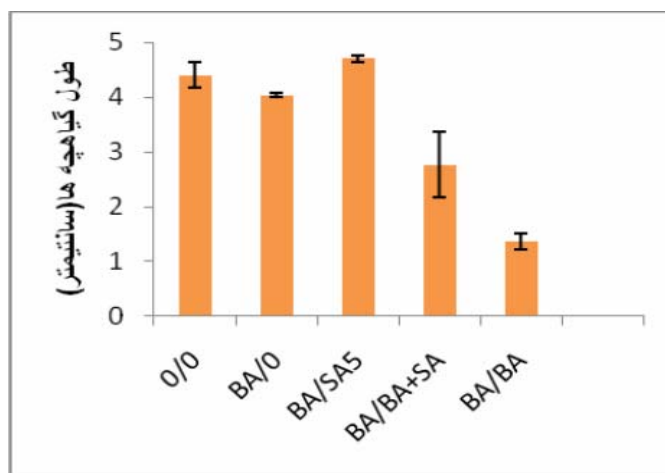
شکل ۶- اثر بنزیل آدنین بر متوسط تعداد شاخه ریزنمونه‌ها چهار هفته پس از واگشت  
(بارها نمایانگر میانگین ۵ نمونه با ۳ تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.)





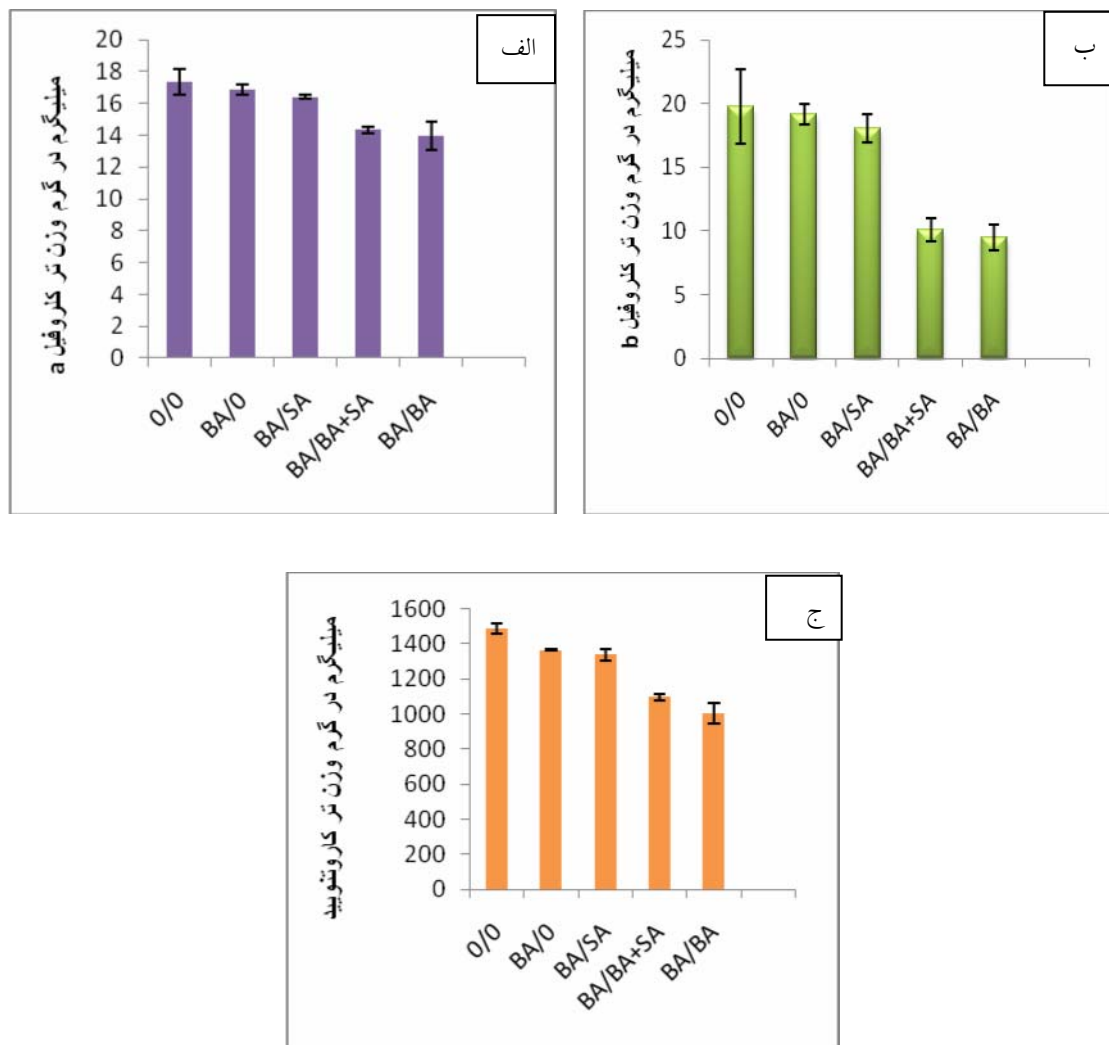
شکل ۷- اثر تیمار هورمونی بر میزان آب داخلی بافت‌ها

نمونه (0/0) از محیط بدون هورمون به محیط مشابه منتقل شده و بقیه نمونه‌ها از محیط دارای بنزیل آدنین به محیط‌های: فاقد هورمون (BA/0)، واجد سالیسیلیک (BA/SA)، واجد سالیسیلیک به همراه بنزیل آدنین (BA/BA+SA) و بنزیل آدنین (BA/BA) منتقل شد. (بارها نمایانگر میانگین ۵ نمونه با ۳ تکرار  $\pm$  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 بنزیل آدنین به محیط‌های: فاقد هورمون (BA/0)، واجد سالیسیلیک (BA/SA)، واجد سالیسیلیک به همراه بنزیل آدنین (BA/BA+SA) و بنزیل آدنین (BA/BA) منتقل شد. (بارها نمایانگر میانگین ۵ تکرار با ۳ تکرار  $\pm$  انحراف معیار می‌باشد).



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 بنزیل آدنین به محیط‌های: فاقد هورمون (BA/0)، واجد سالیسیلیک (BA/SA)، واجد سالیسیلیک به همراه بنزیل آدنین (BA/BA+SA) و بنزیل آدنین (BA/BA) منتقل شد. (بارها نمایانگر میانگین ۵ نمونه با ۳ تکرار  $\pm$  انحراف معیار می‌باشد).

## بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که وجود بنزیل آدنین در محیط کشت گیاه آویشن دناپی اثرهای متفاوتی را در مورفولوژی و مراحل مختلف رشدی گیاه به جا 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 بنزیل آدنین در گیاه *Lavandula dentate* نشان دادند. به نظر می‌رسد به دلیل روش‌های بهینه نگهداری و تازگی بذرها، قوه نامیه بذرها حفظ شده و در نتیجه

جایگزینی آن با بافت اسفنجی را در میان برگ 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. در این بافت‌ها، محتوای لیگنین سیستم آوندی پایین است و سیستم آوندی غیرعادی و یا ناقص دارند (Debergh *et al.*, 1992). در نمونه‌های شیشه‌ای شده آویشن دناپی، بررسی مقطع عرضی گیاه وجود آب فراوان را در پارانشیم پوستی و مغزی نشان داد، به طوری 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 ۴).

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

به دلیل ۱۰۰٪ بودن جوانه‌زنی در حالت عادی، افزایش جوانه‌زنی ناشی از مصرف بنزیل آدنین 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 سالیسیلیک اسید بر طول ساقه و ریشه در گیاهان مختلف موجود است. در گیاه سویا و خیار این اثر به صورت افزایش طول به دلیل افزایش میزان آنزیم نیترات ردوکتاز است (Singh *et al.*, 2010)؛ طبق تحقیقات (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998). انجام شده، در نمونه‌های تیمار شده با سالیسیلیک اسید به همراه بنزیل آدنین، اثر بازدارندگی بنزیل آدنین بر رشد طولی ساقه کمتر شد.

افزودن بنزیل آدنین به محیط کشت سبب افزایش میزان آب داخلی گیاه و شیشه‌ای شدن در نمونه‌ها گردید. همچنین افزودن سالیسیلیک اسید بدون بنزیل آدنین، 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 سالیسیلیک اسید را بر کاهش آب داخلی گیاه نشان داد (Ochatt *et al.*, 2001؛ Andarwulan & Shetty, 1999). در تحقیق انجام شده در گیاه آویشن دناپی، میزان آب داخلی گیاه در نمونه‌های حاوی بنزیل آدنین (چه به صورت مجزا، چه به صورت ترکیب با سالیسیلیک اسید) 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

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. ریزادیداری و بررسی اثرات شوری بر ترکیبات اساسی گیاه آویشن دناپی. 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 ۲۷۴۴.
- مظفریان، و.ا. و برزگری، م.، ۱۳۷۹. فلور استان یزد. انتشارات یزد، یزد، ۶۳۶ 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 "vittrification" 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.

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 تراپیرولی می‌گردد (Gaspar *et al.*, 1995) که به نظر 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

- 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.

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

M. Zarooshan<sup>1</sup>, F. Bernard<sup>2\*</sup> and Z. Heydarian<sup>3</sup>

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 ( $0.1\text{mg l}^{-1}$ ). Non benzyladenine-treated plantlets were transferred to the same medium and benzyladenine-treated plantlets were cultured in four experimental media including without benzyladenine, with  $1\text{mg l}^{-1}$  benzyladenine in presence or without  $5\mu\text{M}$  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.