مطالعه تغییرات میزان هورمون‌های اکسین و سیتوکینین و تغییرات سوماکلونال در گیاهان باززایی شده و کالوس توتون (*Nicotiana rustica* L.)

محمد امین طغیانی، علی اکبر احسان‌پور*، منصور شریعتی و رحمان امام زاده

اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۳

چکیده

فیتوهورمون‌های اکسین و سیتوکینین در کنترل فرایندهای متعدد و حیاتی ازجمله رشد، نمو و تنظیم پاسخ به محرک‌های محیطی گیاه نقش مؤثری دارند. مشخص شده است که هریک از هورمون‌های اکسین و سیتوکینین می‌تواند با تنظیم میزان سطح دیگری، بر فرایندهایی همانند اندام‌زایی مؤثر باشد. در این مطالعه جداکشت‌های برگ توتون در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP (بنزیل آمینو پورین) و محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون Kinetin به‌ترتیب به‌عنوان محیط‌های القای باززایی و تولید کالوس قرار گرفتند. میزان هورمون‌های اکسین و سیتوکینین به‌ترتیب در ماه اول، دوم و سوم پس از باززایی در نوساقه‌ها و کالوس‌های نسل ۱ اندازه‌گیری شد. نسبت اکسین به سیتوکینین در بازه زمانی سه ماه تغییر یافته بود که حاکی از اثرات سریع و ممانعت کننده اکسین در مراحل اولیه رشد بر سنتز و مقدار سیتوکینین بود. در حالی که اثرات ممانعت کننده سیتوکینین روی اکسین کند و احتمالا" از طریق تنظیم و تغییر دیگر فرایندهای نموی انجام شد. همچنین میزان اکسین و سیتوکینین در کالوس پایین‌تر از مقدار آن در گیاه شاهد بود که با توجه به عدم تمایزیافتگی سلول‌های کالوس و وجود تنها یک منبع هورمونی قابل دسترس برای آنها در مقایسه با شاهد توجیه کننده کاهش هورمونی مشاهده شده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اکسین، ، باززایی گیاه، تنباکو، سیتوکینین کالوس.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۱۱۳۵۵۲۰ ، پست الکترونیکی: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

مقدمه

حفظ حد مطلوب و بهینه اکسین در سلول و انتقال قطبی آن در گیاه برای شکل گیری الگوهای نموی، حیاتی و ضروری می باشد. همچنین همانند اکسین، سیتوکینین‌ها نیز تنظیم کننده‌های مهمی در رشد و نمو گیاهان به شمار می-آیند (۱۴). به طور مشخص اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها دارای وظایف مشخص و مهمی در رشد و نمو گیاه هستند و از آنجا که هر دو هورمون به عنوان تنظیم کننده رشد، قابلیت سنتز در بیشتر قسمت‌های گیاه و داشتن وظیفه سیگنالینگ در فرایند نمو دارند، بنابراین از این جهت میانکنش اکسین و سیتو کینین در فرایندهای توسعه‌ای و نمو بسیار مورد اهمیت است. به عنوان مثال برای شکل‌گیری و حفظ مریستم‌ها که بنیان کل پیکره گیاه را تشکیل می‌دهند، تعامل اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها لازم است (۱۴). به طور مثال شکل‌گیری قسمت‌های هوایی و بخش‌های زیرزمینی گیاه به ترتیب از مریستم‌های ساقه و مریستم‌ها به وجود می‌آیند (۱۶). اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در کنترل فرایندهای نموی همانند ایجاد چیرگی راسی در ریشه و ساقه، با یکدیگر تقابل و بر هم کنش دارند. تحقیقات اخیر در زمینه بیوشیمیایی و ژنتیکی تصدیق کرده است که میانکنش‌های تداخلی و بر هم‌کنش‌های سیگنالینگ بین اکسین و

سیتوکینین برای تمایز یابی و حفظ مریستم گیاه لازم و ضروری می باشد (۱۴). آزمایش های رایج دیگر نیز به خوبی نشان داده است که تعادل هورمونی بین اکسین و سیتوکینین عامل اصلی در کنترل اندام‌زایی (Organogenesis) می‌باشد (۱۳). قرار دادن جدا کشت‌های کالوس در معرض نسبت بالای اکسین به سیتوکینین منجر به شکل گیری ریشه و بعکس آن یعنی نسبت بالای سیتوکینین به اکسین باعث القای تشکیل نوساقه می‌شود. پژوهش‌های دیگر به وضوح بیانگر این امر است که هر یک از هورمون‌های اکسین و سیتوکینین می‌تواند سطح دیگری را تنظیم کند (۷ و ۱۲). بر اساس یافته‌های مشاهده شده از فنوتیپ‌های موتانت و گیاهان تراریخت توتون که تولید بیش از معمول سیتوکینین در آنها القاء شده بود، مقدار IAA کاهش یافته بود. همچنین سنتز IAA زیاد در تنباکو ترانس ژن شده منجر به کاهش مخزن سیتوکینین گیاه می‌شود (۱، ۴ و ۷). با توجه به مشاهدات انجام شده وجود تعامل و یا تقابل در میان کنش این دو هورمون گیاهی با هم محتمل است و این فرضیه را بوجود می‌آورد که شبکه‌ای پیچیده از پیام‌های میانکنشی بین اکسین و سیتوکینین وجود دارد (۵ و۱۲). این پژوهش سعی در مطالعه مقدماتی تغییرات این دو هورمون و تغییرات احتمالی سوماکلونال در هنگام باززایی، تشکیل کالوس و اثرات احتمالی هورمون‌های محیط کشت روی غلظت‌های داخلی اکسین و سیتوکینین در نوساقه‌های باززایی شده دارد.

مواد و روشها

گیاه توتون (*Nicotiana rustica* L.) گیاهی است علفی که به دلیل رشد سریع، تولید بذر فراوان و عدم نیاز به هزینه و تیمارهای خاص برای رشد، مدلی مناسب برای مطالعات کشت بافت و فیزیولوژی گیاهیست. برای انجام تمام آزمایشهای مربوطه در این تحقیق از محیط کشت پایه MS استفاده شد (۱۰) و ۳ درصد حجم به وزن ساکارز و به طور جداگانه BAP به مقدار ۲ میلی گرم در لیتر (برای القای باززایی) و NAA به مقدار ۱ میلی گرم در لیتر به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر Kinetin (برای القای تشکیل کالوس) افزوده شد و پس از مخلوط کردن، حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس به کمک NaOH (۰/۱ N) و HCl (۰/۱ N) pH محیط کشت روی ۵/۸ تنظیم گردید و در آخر آگار (حدود ۱۰ گرم) به محیط کشت اضافه گردید. این محیط کشت به شیشه‌های ۲۵۰ میلی لیتری منتقل و اتوکلاوه شد و بعد از خنک شدن آماده مصرف شد.

برای ایجاد سیستم باززایی (Regeneration) از جدا کشت-های (explant) برگ توتون که در ابعاد تقریبی ۱ سانتی-متر مربع، تحت شرایط استریل برش زده شده بودند، استفاده شد. این جدا کشت‌ها در محیط کشت‌های MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر هورمون BAP (بنزیل آمینو پورین) قرار گرفتند و به اتاق کشت منتقل شدند. شیشه‌ها در شرایط نور دوره‌ای ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت تقریبی ۳۰ میکرومول فوتون بر ثانیه متر مربع نگهداری شدند. همچنین به منظور القای تشکیل کالوس جداکشت‌های برگ توتون در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون NAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون Kinetin قرار گرفت. پس از قرار گرفتن جدا کشت‌ها روی محیط کشت، نمونه‌ها به اتاق کشت منتقل و در شرایط نور دوره‌ای ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت تقریبی ۳۰ میکرومول فوتون برثانیه مترمربع نگهداری شدند.

سنجش سیتوکینین و اکسین: برای خالص سازی سیتوکین (زآتین) از روش اصلاح شده Unyayar و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد. همچنین برای تعیین سطح مقدار هورمون سیتوکنین آزاد سنجش از طریق اسپکتروفتومری مورد استفاده قرار گرفت. بدین‌منظور ۰/۵ گرم وزن تر گیاه توتون را توزین و با ۱۵ میلی لیتر از محلول استخراج

شامل متانول، کلروفروم، آمونیوم هیدروکسید (۳: ۱۲:۵) مخلوط و در هاون ساییده شد. سپس به محلول همگن حاصل ۶ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و در ادامه فاز کلروفرم دور و فاز آبی برای تبخیر متانول روی هیتر منتقل شد. در ادامه فاز آبی روی pH 7 تنظیم گردید. سپس مقدار ۴ میلی لیتر اتیلن استات به فاز آبی اضافه شد. فاز اتیلن استات به یک پتری دیش با قطر ۱۵ سانتی متر منتقل و روی هیتر قرار داده شد تا به طور کامل تبخیر گردد. این کار سه مرتبه تکرار شد. سپس محتوای باقیمانده روی پتری را با ۱ میلی لیتر NaOH یک نرمال شستشو و در نهایت NaOH را جمع و به اپندورف انتقال داده شد. برای سنجش با اسپکتروفوتومتر طول موج ۲۶۰ نانومتر تنظیم گردید. برای محاسبه مقدار هورمون‌ها از منحنی استاندارد تهیه شده برای سیتوکینین استفاده و مقادیر بدست آمده برای سیتوکینین بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر ثبت شد.

برای استخراج اکسین (IAA) از روش اصلاح شده Mandal و همکاران استفاده شد (۹). برای اندازه‌گیری اکسین اندامهای هوایی، مقدار ۰/۲۵ گرم بافت تر نمونه‌ها توزین و در ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد درون هاون چینی ساییده تا محلولی همگن بدست آمد. محلول حاصل به درون اپندورف ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد (بدلیل فتواکسیده شدن اکسین استخراج باید به دور از نور انجام بگیرد). محلول مذکور به مدت ۲۴ ساعت در یک محیط تاریک آنکوبه گردید. بعد از طی این زمان محلول به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۷۷ درجه سانتی گراد درون بن‌ماری قرار گرفت و در ادامه محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محلول رویی بعد از سانتریفیوژ جدا سازی شد و به درون لوله آزمایش انتقال یافت و درب لوله‌ها با ورقه آلومینیومی پوشیده شد. سپس ۰/۸ میلی لیتر عصاره استخراج شده از ریشه یا اندام‌های هوایی در مرحله قبل درون یک لوله آزمایش ریخته شد. سپس ۱/۶ میلی لیتر معرف سالکوفسکی به هر لوله آزمایش اضافه گردید. لوله‌های آزمایش برای کامل شدن واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری در دمای ۵۰-۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. با کامل شدن واکنش اکسیداسیون کمپلکس صورتی رنگی که نتیجه اکسید شدن IAA توسط کلرید فریک در حضور اسید پرکلریک است، تشکیل شد.

پس از آماده شدن محلول‌ها جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۰nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتری تعیین شد. محلول بلانک ۱/۶ ml معرف سالکوفسکی با ۰/۸ ml الکل استفاده گردید. در نهایت مقدار اکسین بر حسب میکروگرم در گرم بافت گیاهی گزارش شد.

آنالیزهای PCR : به منظور بررسی احتمال وقوع تنوعات سوماکلونال از آزمایش PCR با ۱۰ پرایمر استفاده شد، که ۵ عدد از پرایمرها RAPD و با ترتیب OPA18 ، OPA20، OPAA06 ، FPK101، FPK105 و ۵ عدد دیگر مربوط به پرایمرهای ISSR بود که شامل (AC)8CG ، (CAA)5 ، (AC)8TA ، (GATA)4 و (GACA)4 می‌شد. برای هر یک از نمونه‌ها PCR در دو تکرار انجام شد. به منظور استخراج DNA از CTAB استفاده شد (6)، ابتدا ۰/۵ گرم از بافت گیاه با استفاده از دانه‌های کوچک شیشه‌ای (Glass beed) در یک تیوب ۱ میلی لیتری سانتریفیوژ گردید. سپس به هر یک از تیوپ‌ها ۲۵۰ میکرو لیتر بافر (16 ml EDTA 0.25M ,56 ml NaCl 5M ,20 ml Tris-Hcl ,4 g DNA (CTAB 2% و ۲۵۰ میکرولیتر از محلول ایزوآمیل الکل/کلروفوم و نمونه ها به مدت ۱۲ دقیقه در دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد و بعد حدود ۱۴۰ میکرولیتر از محلول ایزوپروپانل سرد به آن افزوده و به مدت ۷ دقیقه در دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و به مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب DNA خشک گردید و بعد حدود ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گردید و شامل مواد زیر بود: 0.2 µL Taq DNA polymerase و 2 µL dNTp 20 Mm و 2 µL PCR Buffer (lx) و 3 µL genomic DNA و 1.5 µL primer(10 p moL) و 1.5 µL primer (10 p moL) و 0.8 µL $Mgcl_2$ mM. شرایط انجام PCR در جدول شماره ۱ آورده شده است و در نهایت محصول PCR با ژل ۱ درصد آگارز با ولتاژ ۱۰۰-۸۰ ولت الکتروفورز گردید. در پایان الکتروفورز، باندهای DNA با استفاده از نور UV در دستگاه Gel Documentation مشاهده شد. آزمایش‌های PCR با استفاده از پرایمرهای نام برده شده در جدول شماره ۲ با دو تکرار انجام گردید.

جدول۱- مراحل انجام PCR

۴ دقیقه	۹۴°C	دناتوره
۱ دقیقه	۹۴°C	دناتوره
۴۰ ثانیه	۳۵°C	اتصال
۴۰ ثانیه	۷۲°C	طویل شدن
	۳۵	تعداد سیکل

جدول ۲- کد و توالی پرایمرهای مورد استفاده در ISSR-PCR و RAPD-PCR

ISSR primer code	Primer Sequence 5' to 3	RAPD Primer code	Primer Sequence 5' t o 3'
(CAA)5	5' –CAACAACAACAACAA–3'	OPA 18	5'–AGGTGAACCGT–3'
(AC)8TA	5'–CACACACACACACACTA– 3'	OPA 20	5' – GTTGCGATCC – 3'
(GATA)4	5'–GATAGATAGATAGATA-3'	OPAA 06	5'–GTGGGTGCCA–3'
(GACA)4	5'–GACAGACAGACAGACA–3'	FPK101	5'–ACACGGACGTCA–3'
(AC)8CG	5'–ACACACACACACACACCG–3	FPK105	5'–ACTTGGCGGCCT–3'

اندازه‌گیری تمامی شاخص‌ها بر اساس یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گردید و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS و آزمون ANOVA و پست هاک دانکن استفاده شد.

نتایج

در این مرحله از آزمایش‌ها همان طور که در قسمت مواد و روش‌ها بدان اشاره شد، جداکشت‌های برگ توتون در محیط MS حاوی BAP و محیط MS همرا Kinetin و NAA قرار گرفت. پس از گذشت ۱۵ روز آثاری از ظهور کالوس‌های کوچک در لبه زخمی قطعات برگی مشاهده شد. از این کالوس‌ها، نوساقه‌هایی ظاهر شده که با رشد و ایجاد جوانه‌های جانبی و برگ، در نهایت یک گیاه کامل باززایی و سیستم باززایی کامل شد. سپس در یک بازه زمانی ۳ ماهه به ترتیب در ماه اول، دوم و سوم میزان محتوای هورمون‌های سیتوکینین و اکسین در نوساقه‌های باززایی شده اندازه‌گیری شد.

همچنین پس از گذشت یک هفته، در محیط کشت حاوی Kinetin و NAA در کناره لبه برگ‌ها در تمام نمونه‌ها (۱۰۰٪) کالوس‌های کوچکی ظاهر شد که در ادامه تبدیل به یک توده بزرگ سفید رنگ کالوس گردید. واکشت کالوس‌ها سه هفته بعد از قرار دادن جداکشت‌ها روی محیط کشت انجام شد. بدین صورت که کالوس‌های ایجاد شده روی پلیت‌های استریل در زیر هود لامینار به قطعات کوچکتر تقسیم شده و به محیط تازه منتقل و در شرایط مشابه تولید کالوس نگهداری شدند. این کالوس‌های نسل اول، ۱ ماه پس از رشدشان از محیط کشت خارج و برای بررسی محتوای اکسین و سیتوکینین مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی محتوای هورمون‌های رشد در اندام‌های هوایی در گیاهان باززایی شده

بررسی محتوای هورمون سیتوکینین در اندام هوایی گیاهان باززایی شده: مقدار بالاترین درصد باززایی یعنی

۱۰۰٪ در محیط MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BAP مشاهده شد. میزان محتوای سیتوکینین اندازه‌گیری شده در اندام‌های هوایی (مجموعه جوانه برگ و ساقه) نوساقه‌های باززایی شده در یک بازه زمانی سه ماهه، افزایش معنی-داری را در سطوح سیتوکینین نشان داد (شکل ۱A). میزان سیتوکینین نوساقه‌های ۳ ماهه نسبت به نوساقه‌های ۲ و ۱ ماهه، افزایش یافته بود. در نوساقه‌های ۶۰ روزه، سطح هورمون سیتوکینین در آنها نسبت به گیاهچه‌های ۳۰ روزه افزایش معنی‌داری را نشان می‌داد. همچنین بررسی انجام شده نشان داد که کمترین مقدار سیتوکینین در نوساقه‌های ۳۰ روزه وجود دارد.

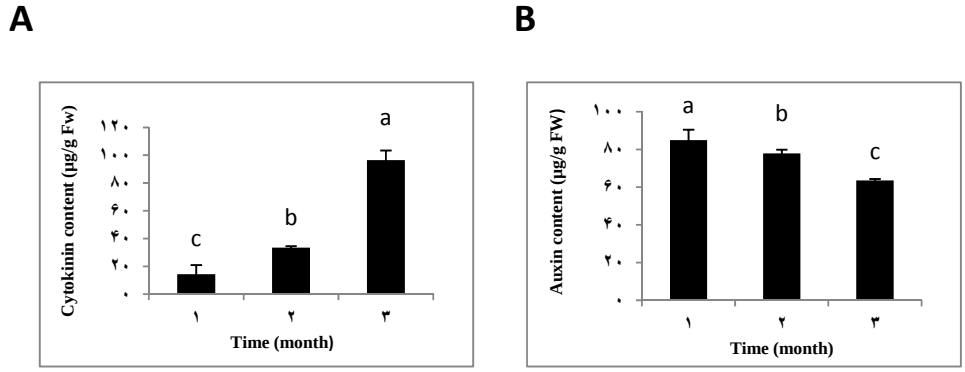
بررسی محتوای هورمون اکسین در اندام هوایی گیاهان باززایی شده: اندازه‌گیری میزان اکسین در نوساقه‌های باززایی شده در طول سه ماه، نشان از کاهش معنی‌دار اکسین دارد (شکل ۱B). نوساقه‌هایی که ۳۰ روز از باززایی آنها گذشته بود نسبت به نوساقه‌هایی با عمر ۲ و ۳ ماه، میزان محتوای اکسین آنها بالاتر بود. نوساقه‌های ۶۰ روزه نسبت به ۹۰ روزه هم، افزایش میزان اکسین را نشان دادند اما نسبت به نوساقه‌های ۳۰ روزه، میزان اکسین کمتری داشتند. همانطور که ذکر شد نوساقه‌هایی با عمر ۳ ماه کمترین مقدار اکسین را نسبت به دو بازه زمانی دیگر نشان دادند.

بررسی محتوای هورمون‌های رشد در کالوس‌های تولید شده از برگ تنباکو

بررسی محتوای هورمون اکسین در کالوس: از آنجا که برای القای تولید کالوس نیاز به هورمون در محیط کشت است، ازاین‌رو تنها امکان مقایسه کالوس‌ها با برگ گیاه رشد یافته در محیط بدون هورمون (محیط MS) به عنوان شاهد وجود داشت. علاوه بر این بدلیل عدم امکان بررسی تغییرات هورمون در بازه زمانی (نیاز به واکشت کالوس مرتب) امکان اندازه گیری تغییرات هورمون در بازه زمانی مناسب نیز بسیار کم است.

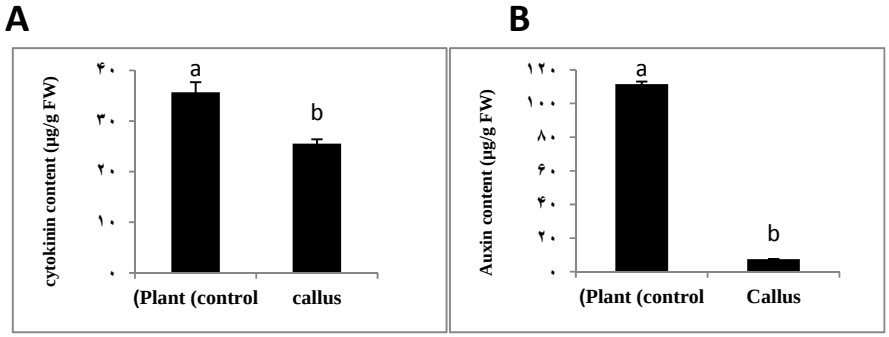
مقایسه میزان محتوای هورمون سیتوکینین و اکسین در کالوس‌های تولید شده با گیاهان شاهد (برگ)، نشان داد که اختلافی معنی‌داری در میزان سیتوکینین و اکسین این دو تیمار وجود دارد (شکل ۲A و ۲B). البته مقدار اکسین اندازه‌گیری شده در کالوس‌هایی که یک ماه از واکشت آنها می‌گذشت، کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد رشد یافته در محیط پایه MS نشان داد.

نوساقه‌های باززایی شده و کالوس‌های تولید شده در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل۱- محتوای هورمون سیتوکینین (A) و اکسین (B) در اندام‌های هوایی در گیاهان باززایی شده

داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P\leq 0.05$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

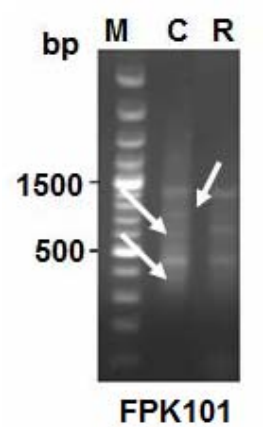


شکل ۲- بررسی محتوای هورمون سیتوکینین (A) و اکسین (B) در کالوس و گیاه شاهد

داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

شکل ۳- رشد کالوس و مراحل باززایی نوساقه‌های توتون

در این تحقیق به منظور بررسی این احتمال که، در گیاهان باززایی شده تنوعات سوماکلونال به وقوع پیوسته و موجب ایجاد تغییرات ژنتیکی شده باشد، الگوی ژنی گیاهان باززایی شده با استفاده از ده نوع پرایمر تصادفی در دو تکرار مورد بررسی قرار گرفت و با گیاهان غیر باززایی شده مقایسه شد (شکل۴). نتایج نشان داد که الگوی باند-های حاصل از PCR نوساقه‌های باززایی شده با شاهد (گیاه رشد کرده در محیط MS) تفاوت سه باند را در محدوده۳۵۰و ۵۵۰ و ۹۰۰ bp تنها با استفاده از پرایمر FPK101 نشان داد که این امر بیانگر وقوع احتمالی تغییر در الگوی DNA بین گیاه شاهد و گیاه باززایی شده می باشد. قابل ذکر است از کلیه پرایمر های استفاده شده در این پژوهش تنها FPK101 توانست تغییراتی را در الگوی DNA گیاه شاهد در مقایسه با گیاه باززایی شده نشان دهد. مقایسه الگوی DNA در کالوس و گیاه شاهد نیز تغییری را نشان نداد.



شکل ۴- نتایج آنالیز RAPD-PCR، باندهای تکثیر شده در گیاهان شاهد و باززایی شده (M: مارکر، C: شاهد، R: باززایی شده) با استفاده از پرایمر FPK101

فلش تغییر باند حدود ۳۵۰، ۷۰۰ و ۹۵۰ bp را در گیاه شاهد در مقایسه با گیاه باززایی شده نشان می‌دهد.

بحث

اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در کنترل بسیاری از فرایندهای اصلی در نمو همانند ایجاد چیرگی راسی در ریشه و ساقه، با یکدیگر تقابل و بر هم کنش دارند. پژوهش‌های انجام شده در این زمینه بوضوح بیانگر این امر است که هر یک از هورمون‌های اکسین و سیتوکینین می‌تواند سطح دیگر را تنظیم کند.

نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری محتوای اکسین و سیتوکینین در گیاهان باززایی شده در طول یک بازه زمانی سه ماهه احتمالا نشان دهنده اثرات متقابل این دو هورمون بر هم می‌باشد. بدیهی است تغییرات مشاهده شده در گیاه می‌تواند منشأهای دیگری مانند فرایندهای متابولیسمی و فیزیولوژیکی نظیر فتوسنتز نیز باشد. مقدار سیتوکینین اندازه‌گیری شده در ماه اول نسبت به اکسین اندازه‌گیری شده در همان ماه، ناچیز و کم بوده و با گذشت زمان در ماه‌های دوم و سوم میزان سیتوکینین افزایش و کاهش اکسین اتفاق افتاد، به طوری که در ماه سوم نسبت اکسین به سیتوکینین به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. در این باره مشخص شده است که سطوح سیتوکینین فعال می تواند از طریق کاهش سنتز، تبدیل به فرم پیوسته و یا آنزیم‌های اکسیداتیو تقلیل یابد و القای آنزیم سیتوکینین اکسیداز توسط اکسین در جدا کشت‌های تنباکو توسط اکسین به خوبی در پژوهش Kaminek و نشان داده شده است (۸ و ۱۵). از طرفی دیگر سیتوکینین‌ها می‌توانند با تبدیل به فرم پیوسته نیز غیر فعال شوند. این پیوستگی می-تواند بوسیله IAA و یا فرم‌های متصل شده IAA القا شود (۳). این گزارش‌ها می‌تواند نسبت هورمون اکسین و سیتوکینین را در ماه اول تفسیر کند. با توجه به اینکه نوساقه‌ها در ماه اول فاقد ریشه بوده و ریشه‌ها از مکان‌های اصلی سنتز سیتوکینین هستند، از این رو ممکن است نسبت بالای اکسین به سیتوکینین به دلیل عدم تمایز کامل ریشه باشد.

در مورد اثر سیتوکینین بر روی اکسین، گزارش شده است که سیتوکینین می‌تواند هم اثر ممانعتی و هم اثر افزایشی بر مقدار اکسین داشته باشد (۱، ۲ و ۳) و به نظر می‌رسد که سیتوکینین از طریق ممانعت فعالیت آنزیم‌های شرکت‌کننده در تشکیل فرم پیوسته اکسین، باعث افزایش میزان اکسین فعال و آزاد شود (۱۷). این گزارش با نتایج بدست آمده از این تحقیق مطابقت داشته و می‌تواند به این علت باشد که چون در محیط کشت سیتوکینین وجود دارد، توجیحی باشد برای افزایش محتوای اکسین در ماه اول. از طرف دیگر مطالعات انجام شده توسط Eklof و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که در گیاهان تراریخت با خصوصیت افزایش سنتز سیتوکینین، محتوای اکسین در کل پیکره کاهش می یابد که این یافته با نتایج پژوهش حاصل در تضاد است. این تضاد موجود در نتایج، پیچیدگی موجود در میانکنش بین این دو هورمون را نشان می‌دهد و به نظر می‌رسد سیتوکینین القای سنتز IAA را فقط در برگ‌های جوان و در حال توسعه افزایش می‌دهد و به نظر می‌رسد تنها راه پاسخ گویی به اثر متضاد سیتوکینین روی اکسین مطالعه محتوای هورمونی بلافاصله بعد از تغییر در محتوای یکی از این دو هورمون باشد.

بر اساس یافته‌های Nordstrom و همکاران، (۲۰۰۴) اکسین از طریق مسیر مستقل از ایزوپنتیل آدنوزین-۵- منو فسفات (اولین حد واسط تولید شده در مسیر بیوسنتز سیتوکینین)، یک اثر تعدیل کننده منفی روی میزان سیتوکینین دارد اما اثرات سیتوکینین بر میزان محتوای اکسین در کل پیکره گیاه آهسته می‌باشد. این امر نشان می‌دهد که به احتمال زیاد سیتوکینین از طریق تغییر تعدادی از فرایندهای رشد و نمو می‌تواند بر محتوای اکسین تأثیرگذار باشد. با توجه به این یافته‌ها می‌توان نتایج حاصل از این پژوهش را بدین گونه تفسیر کرد که احتمالا" در مراحل اولیه ایجاد نوساقه‌ها، اکسین موجب کاهش تولید و یا القای متصل شدن سیتوکینین در برگ‌های راسی شده است. با این حال با گذشت مدت زمان باززایی و با توجه به اینکه در محیط کشت فقط سیتوکینین وجود داشت، احتمالا" به مرور زمان سیتوکینین جذب شده به همراه سیتوکینین تولید شده در خود نوساقه‌ها و ریشه‌های ایجاد شده، باعث ایجاد اثرات کاهشی در محتوای اکسین شده و مقدار اکسین آزاد را در ماه سوم کاهش داده است.

در این تحقیق همچنین میزان محتوای هورمون‌های اکسین و سیتوکینین در کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های برگ تنباکو نیز سنجش و با محتوای هورمونی برگ‌های راسی توتون که در محیط MS رشد یافته بودند (به عنوان شاهد)، مقایسه شد. نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که محتوای هورمونی اندازه‌گیری شده در کالوس‌ها پایین‌تر از مقدار آن در گیاهان شاهد است. این امر می‌تواند به این دلیل باشد که سلول‌های کالوس به‌علت اینکه فاقد تمایز می‌باشند، با ماهیت سلول‌های برگ که دارای کلروپلاست و سیستم هدایت آوندی بوده و قسمت‌های هوایی را مرتبط با سیستم ریشه‌ای می‌کند، متفاوت می‌باشد. بعلاوه گیاهان شاهد دارای چند منبع متفاوت برای سنتز هورمون می‌باشد، در حالی که کالوس‌ها فاقد اندامک و اندام‌هایی هستند که عنوان مکان‌های اصلی سنتز هورمون اکسین و سیتوکینین می‌باشند و اساسا" تنها منبع دسترسی کالوس‌ها به هورمون، همان نسبت‌های هورمونی موجود در محیط کشت است که در مقایسه با منابع سنتز کننده هورمون‌ها و عدم وجود سیستم جذب کننده و هدایتی، مقدار هورمون-های مذکور را در کالوس کمتر می‌کند (۱۱).

تغییرات ژنتیکی بین نسل‌های گیاهان جدید می‌تواند منجر به ایجاد تغییر در بیان ژن‌ها و احتمالا ژن‌هایی که در سنتز و متابولیسم هورمون‌های اکسین و سیتوکینین دخالت دارند، شده باشد، در نتیجه باعث تغییر در میزان نسبت هورمون‌های اندازه‌گیری شده بشود. در این مطالعه اگرچه تغییر یک باند DNA در گیاه باززایی شده پس از تکثیر توسط پرایمر FPK101 مشاهده شد ولی اینکه چنین تغییری مربوط به ژن های مسیر سنتز سیتوکینین و یا اکسین است بدون انجام آزمایشهای دقیق تکمیلی غیرممکن است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان بدلیل حمایت از انجام این پژوهش تشکر می‌کنند.

منابع

1. Binns, A. N., Labriola, J. and Black R. C. 1987. Initiation of auxin autonomy in *Nicotiana glutinosa* cells by the cytokinin-biosynthesis gene from *Agrobacterium tumefaciens*. Planta.171(4), 539-548.
2. Bourquin, M. and Pilet, P. E. 1990. Effect of zeatin on the growth and indolyl-3-acetic acid and abscisic acid levels in maize roots. Physiologia Plantarum. 80(3), 342-349.
3. Brzobohatý , B., Moore, I. and Palme, K. 1994. Cytokinin metabolism: implications for regulation of plant growth and development. In Signals and Signal Transduction Pathways in Plants, pp. 247-261. Springer.

4. Catterou, M., Dubois, F., Smets, R., Vaniet, S., Kichey, T., Van Onckelen, H., Sangwan-Norreel B. S. and Sangwan, R. S. 2002. hoc: an Arabidopsis mutant overproducing Cytokinins and expressing high in vitro organogenic capacity. The Plant Journal. 30(3), 273-287.

5. Coenen, C. and Lomax, T. L. 1997. Auxin—cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. Trends in plant Science. 2(9), 351-356.

6. Ehsanpour, A. A. and Twell, D. 2005. Analysis of SFL1 and SFL2 promotor region in *Arabidopsis thaliana* using gateway cloning system. Journal of Science. 16, 303-309.

7. Eklöf, S., Åstot, C., Sitbon , F., Moritz, T., Olsson, O. and Sandberg , G. 2000. Transgenic tobacco plants co-expressing Agrobacterium *iaa* and *ipt* genes have wild-type hormone levels but display both auxin-and cytokinin-overproducing phenotypes. The Plant Journal. 23(2), 279-284.

8. Kaminek , M., Motyka, V. and Vaňková, R. 1997. Regulation of cytokinin content in plant cells. Physiologia Plantarum. 101(4), 689-700.

9. Mandal, S. M., Mondal, K. C., Dey, S. and Pati, B. R. 2007. Optimization of Cultural and Nutritional Conditions for Indole 3-acetic Acid (IAA) Production by a Rhizobium sp. Isolated from Root Nodules of Vigna mungo (L.) Hepper. Research Journal of Microbiology. 2(239-246).

10. Murashige , T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15(3), 473-497.

11. Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska , D., Norbaek, R., Åstot, C., Dolezal, K. and Sandberg, G. 2004. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.101(21), 8039-8044.

12. Palni , L., Burch, L. and Horgan, R. 1988. The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. Planta. 174(2), 231-234.

13. Skoog F. and Miller C. 1957. The biological action of growth substances. Proceedings of the Symp. Experimental Biology. 11(2), 118-131.

14. Su, Y. H., Liu, Y. B. and Zhang, X. S. 2011. Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. Molecular plant. 4(4), 616-625.

15. Zhang, R., Zhang, X., Wang, J., Letham, D., McKinney, S. and Higgins, T. 1995. The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an ipt gene. Planta. 196(1), 84-94.

16. Zhao, Z., Andersen, s., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S. J. and Lohmann, J. U. 2010. Hormonal control of the shoot stem-cell niche. Nature. 465, 1089-1092.

17. Yip W.K. and Yang S. F. 1986. Effect of thidiazuron, a cytokinin-active urea derivative, in cytokinin-dependent ethylene production systems. Plant physiology. 80(2), 515-519.

The studuy of Auxin and Cytokinin varation and somaclonal varation in regenerated plant and callus of tobacco (*Nicotiana rustica* L.)

Toghyani M.A., Ehsanpour A.A., Shariati M. and Emamzadeh R.

Biology Dept., Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Auxin and cytokinin are two phytohormones which are effective for various vital processes such as plant growth, development and coordinating the responses to the environmental stimuli. It has been argued that these two phytohormones can affect the process of organogenesis by balancing each other's level. In this study tobacco explants were used in an MS medium including 2 mg/lit of BAP hormone and the MS medium including 1 mg/lit of NAA hormone and 0.05 mg/lit of kinetin hormone were respectively for regeneration and callus formation. The amounts of Auxin and cytokinin were estimated in the first, second and third months after regeneration in the new shoots and the first generation callus respectively. The results of the above analyses revealed the proportion of Auxin to cytokinin in the time span of three months and this proportion confirmed the quick and preventing effects of auxin in early stages of growth on synthesis and amount of cytokinin**.** However, the preventing effects of cytokinin on auxin are slow and are probably through managing and changing other developmental processes. In addition, the amount of auxin and cytokinin in callus was lower compared with the amount of it in the control plant. This can be due to the fact that the cells of the callus are not distinctive and are different from the cells of the leafs which have compartment and different sources for the synthesis of hormone, in fact, the only available hormonl source for calluses is the one provided in the culture medium.

Key words: Auxin, Callus, Cytokinin, *Nicotiana rustica*, Plant Regeneration.