خالص سازی و شناسایی سیتوکینین ها در شیره خام جمع آوری شده از آوند چوبی گیاهان پیوندی و غیرپیوندی خربزه تحت تیمارهای مختلف تربیت بوته

رضا صالحی (۱)، عبدالکریم کاشی (۲)، مصباح بابالار (۳) و مجتبی دلشاد (۴)

۱، ۲، ۳ و ۴- بترتیب دانشجوی دکترا، استاد، دانشیار و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم باغبانی و گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

چکیده

در این آزمایش، خربزه رقم 'خاتونی' روی سه پایه هیبرید کدو از جنس *Cucurbita* (ارقام 'Ace'، 'Shintozwa' و 'ShintoHongto') بعنوان پایه جهت خالص سازی و شناسایی سیتوکینین های موجود در شیره خام در شرایط گلخانه ای پیوند شد. گیاهان غیرپیوندی بعنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین سه تیمار تربیت بوته (بدون هرس و تراش، فقط هرس و هرس به همراه تراش) روی گیاهان پیوندی و غیرپیوندی بعد از نشاکاری اعمال گردید. بر اساس نتایج HPLC، پنج نوع سیتوکینین (ترانس – زآتین ریبوزاید (t-ZR)، ترانس – زآتین (t-Z)، دی هیدروزآتین ریبوزاید (DHZR)، ایزوپنتنیل آدنین (IPA) و ایزوپنتنیل آدنین ریبوزاید (IPAR)) در شیره خام شناسایی شد که مقدار هر یک با توجه به نوع تیمار آزمایش، تفاوت فاحشی را در شیره خام نشان داد. در بین سیتوکینین های شناسایی شده، بیشترین مقدار به ترانس – زآتین ریبوزاید و کمترین آن به ایزوپنتنیل آدنین ریبوزاید اختصاص داشت. مقدار کل سیتوکینین موجود در شیره خام گیاهان پیوندی بیشتر از غیرپیوندی بوده و در بین پایه ها نیز پایه 'Shintozwa' در این مورد برتر از بقیه پایه ها بود. شیره خام جمع آوری شده از گیاهان خربزه پیوند شده روی پایه 'Shintozwa' حاوی مقادیر بالایی ترانس – زآتین ریبوزاید (۵۶/۳۱ نانوگرم در میلی لیتر شیره) بود و کمترین غلظت این سیتوکینین در شیره خام گیاهان غیرپیوندی و حدود ۱۱/۴۵ نانوگرم در میلی لیتر شیره خام به ثبت رسید. گیاهان غیرپیوندی نسبت به گیاهان پیوندی دارای بیشترین غلظت سیتوکینین دی هیدروزآتین ریبوزاید (۶/۵۴ نانوگرم در میلی لیتر شیره) بودند و تفاوتی بین پایه ها در مورد این نوع سیتوکینین از نظر آماری مشاهده نشد. روش تربیت بوته نتوانست تغییرات معنی داری در محتوای سیتوکینین شیره خام ایجاد نماید ولی با اینحال بیشترین محتوای سیتوکینین به تیمار هرس همراه با تراش اختصاص داشت.

مقدمه

سیتوکینین ها مهم ترین هورمون های گیاهی هستند که اصولا در ریشه، نزدیک منطقه کلاهک ساخته می شوند. سیتوکینین ها بطرف بالا حرکت می کنند و اثر مهمی در رشد گیاه اعمال می نمایند. گیاهان با سیستم ریشه ای قوی، سیتوکینین بیشتری تولید می کنند و افزایش عملکرد با کاربرد یک پایه قوی، رابطه نزدیکی با مقدار سیتوکینین ها در شیره آوند چوبی دارد (کاتو و لو، ۱۹۸۹). ترکیب سیتوکینین به مقدار زیادی با نوع گیاهان خانواده کدوئیان تغییر می کند. بعنوان مثال، در خیار فقط زآتین و دی هیدروزآتین یافت می شود در حالیکه در کدو مسمایی و کدوهای زینتی،

ایزوپنتیل آدنین و ایزوپنتیل آدنوزین در مقادیر زیادی وجود دارد. بخش کوچکی از ساقه پیوندک، تقریباً به طول ۱۵ تا ۲۰ سانتی متر، بطور موثر می تواند ترکیب سیتوکینین ها را در شیره آوند چوبی تغییر دهد و این نشانگر تغییرات سریع ترکیب سیتوکینین در بافتهای گیاهی می باشد. در میان کدوئیان، فقط *Sicyos angulatus* کمترین مقدار سیتوکینین ها را در شیره آوندهای چوبی خود نشان می دهد. رشد ساقه *Sicyos angulatus* و هر پیوندک پیوند شده روی آن، متفاوت تر از رشد ساقه همان پیوندک روی پایه های قوی دیگر می باشد (لی و ادا، ۲۰۰۳). چون عوامل محیطی مختلف همچون نور یا شرایط ریزوسفر، تغییرات چشمگیری را روی سطح سیتوکینین در شیره خام آوند چوبی باعث می شود (یامازاکی و همکاران، ۱۹۹۴). این نوسان هورمونی بنظر می رسد که انعکاس دهنده شرایط فیزیولوژیکی ریشه ها باشد.

مواد و روش‌ها

عملیات اجرایی این تحقیق در سال ۱۳۸۶ در یک گلخانه شیشه ای در انستیتوی ملی تحقیقات باغبانی وابسته به سازمان توسعه روستایی کشور کره جنوبی واقع در شهر سوون انجام شد. خربزه رقم 'خاتونی' بر روی سه رقم کدوی هیبرید تجاری به نامهای 'ایس' ، 'شینتوزا' و 'شینتوهونگتو' پیوند شدند. همه پایه ها هیبریدهای بین گونه ای *Cucurbita maxima* × *C. moschata* می باشند. گیاهان غیرپیوندی نیز بعنوان شاهد در نظر گرفته شدند. بذور پایه و پیوندک بطور همزمان در ۱۵ بهمن ماه سال ۱۳۸۶ در سینی های نشایی ۳۲ حجره ای کاشته شدند. گیاهچه های پایه و پیوندک، یک هفته بعد از کاشت بذور، آماده برای عملیات پیوند بودند. روشی که برای پیوند گیاهچه های خربزه بر روی پایه های کدو استفاده شد، روش نیمانیم تغییر یافته بود. گیاهچه های پیوند شده بعد از پیوند به اتاقک پیوند که در آن دما (۳۰ درجه سانتیگراد)، رطوبت نسبی (سه روز اول بعد از پیوند در حدود ۹۵٪ و بعد حدود ۷۰٪) و نور (سه روز اول تاریکی مطلق و بعد نور طبیعی) بطور دقیق کنترل می شد، منتقل شدند. پس از گذشت ۷ روز از زمان پیوند، گیاهچه های پیوندی از اتاقک پیوند خارج شده و به یک گلخانه شیشه ای با نور کافی و طبیعی (۱۵-۱۰ هزار لوکس)، دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی گراد (روز) و ۲۰-۱۸ درجه سانتی گراد (شب) منتقل شده و روزی یک نوبت آبیاری شدند. مجموعاً ۱۲ تیمار آزمایشی وجود داشت [۴ تیمار پایه (سه پایه + شاهد غیرپیوندی) و ۳ تیمار روش تربیت بوته (بدون هرس و تراش، فقط هرس و هرس بهمراه تراش] . طرح آزمایشی بکار رفته، طرح بلوک های کاملاً تصادفی و هر تیمار دارای ۳ تکرار بود. برای هر تکرار ۳۰ گیاه در نظر گرفته شد. یکماه بعد از عملیات پیوند، نشاهای پیوندی و غیرپیوندی با فاصله ۶۰ سانتیمتر از یکدیگر به محل اصلی خود بر روی ردیف های کاشت منتقل شدند. برای آبیاری نشاها از سیستم آبیاری قطره ای استفاده شد.

۸۵ روز بعد از نشاکاری (۱۱۵ روز بعد از پیوند)، ساقه بوته های پیوندی و غیرپیوندی خربزه جهت جمع آوری شیره خام آوند چوبی در فاصله ۱۵ سانتیمتری یقه گیاه قطع گردید. شیره خام هر گیاه بمدت ۲۴ ساعت بطور جداگانه در داخل پاکت های پلاستیکی (پوشانده شده با فویل آلومینیومی جهت جلوگیری از تبخیر) جمع آوری گردید. برای خالص سازی از روش یامازاکی و همکاران (۱۹۹۴) استفاده شد. از هر نمونه صاف شده، ۱۰ سی سی شیره خام مورد استفاده قرار گرفت و pH آنها با اسید استیک روی عدد ۳/۵ تنظیم شد. سپس شیره خام از ستون های پلی وینیل پیرولیدون و سلولز فسفات عبور داده شد. محلول حاصله سپس به داخل ان – بوتانول با pH برابر با ۸ تزریق گردید.

با استفاده از Sep-pak C18، بوتانول خالص شد و با روش HPLC فاز معکوس و ستون Develosil ODS-5 (۱۵ × ۱۰ میلیمتر) تفکیک گردید. سیتوکینین های شناسایی شده شامل زآتین، زآتین ریبوزاید، دی هیدروزآتین ریبوزاید، ایزوپنتنیل آدنین و ایزوپنتنیل آدنین ریبوزاید بودند. در نهایت نتایج بصورت نانوگرم در میلی لیتر شیره خام گزارش گردید.

نتایج و بحث

سطح سیتوکینین در گیاهان پیوندی خربزه خاتونی به مراتب بیشتر از خربزه های غیرپیوندی بود. پنج نوع سیتوکینین مختلف در شیره خام گیاهان پیوندی و غیرپیوندی خربزه شناسایی شد. ترانس – زآتین ریبوزاید (t-ZR) بیشترین مقدار را در بین سیتوکینین های شناسایی شده در شیره خام بخود اختصاص داد. بعد از آن ترانس – زآتین (t-Z) و دی هیدروزآتین ریبوزاید (DHZR) قرار گرفتند. ایزوپنتنیل آدنین (IPA) و ایزوپنتنیل آدنین ریبوزاید (IPAR) نیز در نهایت خود را نشان دادند. شیره خام جمع آوری شده از گیاهان خربزه پیوند شده روی پایه 'Shintozwa' حاوی مقادیر بالایی ترانس – زآتین ریبوزاید (۵۶/۳۱ نانوگرم در میلی لیتر شیره) بود که بعد از آن پایه 'Ace'(۵۲/۷۳ نانوگرم در میلی لیتر شیره) و سپس پایه 'ShintoHongto' (۵۰/۹۰ نانوگرم در میلی لیتر شیره) قرار داشتند. کمترین غلظت این سیتوکینین در شیره خام گیاهان غیرپیوندی و حدود ۱۱/۴۵ نانوگرم در میلی لیتر شیره خام بود. در حالیکه گیاهان غیرپیوندی نسبت به گیاهان پیوندی دارای بیشترین غلظت سیتوکینین دی هیدروزآتین ریبوزاید (۶/۵۴ نانوگرم در میلی لیتر شیره) بودند و تفاوتی بین پایه ها در مورد این نوع سیتوکینین از نظر آماری مشاهده نشد. روش تربیت بوته نتوانست تغییرات معنی داری در محتوای سیتوکینین شیره خام ایجاد نماید ولی با اینحال بیشترین محتوای سیتوکینین به تیمار هرس همراه با تراش اختصاص داشت. این نتایج نشان می دهند که محتوای سیتوکینین شیره خام بطور قابل توجهی می تواند تحت تاثیر پیوند و پایه قرار گیرد. قابل توجه است که پایه 'Shintozwa' که بیشترین غلظت سیتوکینین ها را بخود اختصاص داده بود، منجر به رشد و نمو قابل قبول و معنی دار نسبت به دیگر پایه ها و گیاهان غیرپیوندی خربزه خاتونی گردید. این نشان می دهد که غلظت سیتوکینین می تواند در ارتباط نزدیک با تشکیل میوه و عملکرد گیاه باشد که یامازاکی و همکاران (۱۹۹۴) به آن اشاره نمودند. اما بطور قطعی نمی توان این ارتباط را بیان نمود و ارتباط بین عملکرد و محتوای سیتوکینین شیره خام نیاز به تحقیقات بیشتر و جزئیات دقیق تر دارد.

منابع

Kato, T., Lou, H., 1989. Effect of rootstock on the yield, mineral nutrition and hormone level in xylem sap in eggplant. J. Jpn. Sot. Gort. Sci. 58, 345-352.

Lee, J.M. and Oda, M. 2003. Grafting of herbaceous vegetable and ornamental crops. Hortic. Rev. 28: 61-124.

Yamasaki A, Yamashita M and Furuya S 1994 Mineral concentrations and cytokinin activity in the xylem exudate of grafted watermelons as affected by rootstocks and crop load. J. Jpn. Soc. Hort. Soc.62, 817–826.

Abstract

Effect of three cucurbita varieties, cvs. 'Ace', 'Shintozwa' and 'ShintoHongto' as rootstocks, on purification and identification of cytokinins in xylem sap of melon cv. Khatooni seedlings was

investigated in greenhouse conditions. three training methods to were applied the grafted and non-grafted melon seedlings after transplanting: T1) No pinching and fruit thinning, T2) Pinched to produce 2 lateral branches, and T3) Pinched to 2 branches and all the flowers and lateral branches from lower nodes thinned. HPLC recognized five type cytokinins (t-ZR, t-Z, DHZR, IPA and IPAR) in xylem sap of grafted and nongrafted plants. Among cytokinins, t-ZR and IPAR had the highest and lowest concentration respectively. Total amount of cytokinins in xylem sap of grafted plants was higher than nongrafted ones and plants grafted on Shintozwa' rootstock had the highest amount. T-ZR had the highest concentration (56.31 ng/ml) in plants grafted on Shintozwa' rootstock and the lowest amount (11.45 ng/ml) in nongrafted plants. Nongrafted plants had the highest concentration (6.54 ng/ml) DHZR compare to grafted plants. There is not any significant differences among training treatments in cytokinins concentration, but plants trained with T3 had the highest concentration.