



تأثیر ساکارز و پلی اتیلن گالایکول بر رنگیزه‌های فتوستنتزی و پرولین جنین‌های رویشی مارچوبه

عقیله لطفی^۱، یوسف حمید اوغلی^۲، سید جواد موسوی زاده^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲ دانشیار گروه علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۳ استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

e.Lotfi.ro@gmail.com:

چکیده

مارچوبه گیاهی ریزوم‌دار و دائمی است که برای استفاده ا از ساقه خوراکی آن که اصطلاحاً اسپیر نامیده می‌شود، کشت می‌گردد. سطوح مختلف پلوئیدی از دیپلوئید تا دکاپلوئید در بین مارچوبه‌های بومی ایران یافت می‌شود. در پژوهش حاضر تاثیر شرایط اسمزی بر رنگیزه‌های فتوستنتزی و پرولین جنین‌های رویشی مارچوبه اکتاپلوئید بررسی شد. برای القای جنین رویشی از محیط B5 حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی استفاده شد و در ادامه از ساکارز با دو غلظت ۴۰ و ۶۰ گرم بر لیتر و پلی‌اتیلن‌گالایکول با سه غلظت ۱۵، ۳۰ و ۶۰ گرم بر لیتر برای اعمال تنش اسمزی بر جنین‌های رویشی مارچوبه استفاده شد، سپس تأثیر این مواد بر رنگیزه‌های فتوستنتزی و مقدار پرولین بررسی شد. طبق نتایج بدست‌آمده بیشترین مقدار کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید به ترتیب ۰/۰۷۷، ۰/۱۰۳، ۰/۱۸۰ و ۰/۰۵۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در تیمار ۶۰ گرم پلی‌اتیلن‌گالایکول مشاهده شد. بیشترین مقدار پرولین (۱۵/۰۸ میلی کرم بر گرم وزن‌تر) مربوط به تیمار ساکارز ۶۰ گرم بود و بیشترین مقدار آنتوسیانین (۰/۱۶۶ میکرومول بر گرم وزن‌تر) مربوط به تیمار ۳۰ گرم پلی‌اتیلن‌گالایکول بود.

واژه‌های کلیدی : مارچوبه اکتاپلوئید، کلروفیل، کاروتنوئید، آنتوسیانین

مقدمه

گونه‌های مارچوبه در ایران از سواحل دریای خزر با کمترین ارتفاع تا مناطق کوهستانی با بیشترین ارتفاع از سطح دریا یافت می‌شوند. سطوح مختلف پلوئیدی، از دیپلوئید تا دکاپلوئید در مارچوبه‌های بومی ایران شناسایی شده است (Mousavizadeh et al., 2016). تکنیک کشت بافت شامل کشت سلول یا قطعات جدا شده بافت گیاهی در یک محیط کشت غذایی است. در مواردی تولید گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای از طریق جنین‌زایی رویشی (جنین حاصل از بافت‌های غیرجنسی) انجام می‌شود. جنین حاصل از بافت‌های غیرجنسی را جنین‌زایی رویشی می‌گویند (مشایخی، ۱۳۸۶). تنش اسمزی از طریق اثر بر فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی و رشد گیاه مانند فتوستنتز و تنفس سلولی منجر به کاهش جذب یون‌ها، کاهش تولید کربوهیدرات‌ها و اختلال در متابولیسم رشد می‌شود. طبق پژوهش‌ها رنگدانه‌های فتوستنتزی که نقش اساسی در ساختار و تأمین انرژی گیاه به جهت جذب نور و تولید ATP و NADPH ایفا می‌کنند، تحت تأثیر فشار اسمزی قرار می‌گیرند. تنظیم اسمزی سازوکاری است که منجر به نگهداری آب و حفظ تورژانس سلول‌ها در اثر بروز تنش می‌گردد. این فرآیند ناشی از تجمع مولکول‌ها و ترکیبات فعال اسمزی از جمله قندهای محلول و پرولین در محیط سلول می‌باشد (Taiz and Zeiger, 2002). لقا و رشد جنین‌های رویشی تحت تأثیر ترکیبات محیط کشت به خصوص قندها و ترکیبات اسمزی قرار می‌گیرد. غلظت‌های مختلف ساکارز بر سلول‌های رویشی ریزنمونه‌ها اثرگذار است. به طور کلی تنش اسمزی، سبب تولید پرولین و کاهش پتانسیل اسمزی سلول‌ها می‌شود و گیاه نسبت به تنش مقاومت بیشتری خواهد داشت، همچنین گزارش شد که افزودن قندها و نمک‌ها به محیط کشت اثر منفی بر پایداری آنتوسیانین دارد و تنش خشکی نیز سبب صدمه به کلروپلاست و کاهش رنگیزه‌های فتوستنتزی می‌شود (Khalid et al., 2010). کاروتنوئیدها به عنوان محافظ کلروفیل عمل می‌کنند به همین دلیل کاروتنوئیدها می‌توانند نشانگر خوبی برای تنش باشند (Sircelj et al., 2007). هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر شرایط اسمزی با کاربرد ساکارز و پلی‌اتیلن‌گالایکول بر رنگیزه‌های فتوستنتزی و پرولین جنین‌های رویشی مارچوبه اکتاپلوئید می‌باشد.

مواد و روش ها

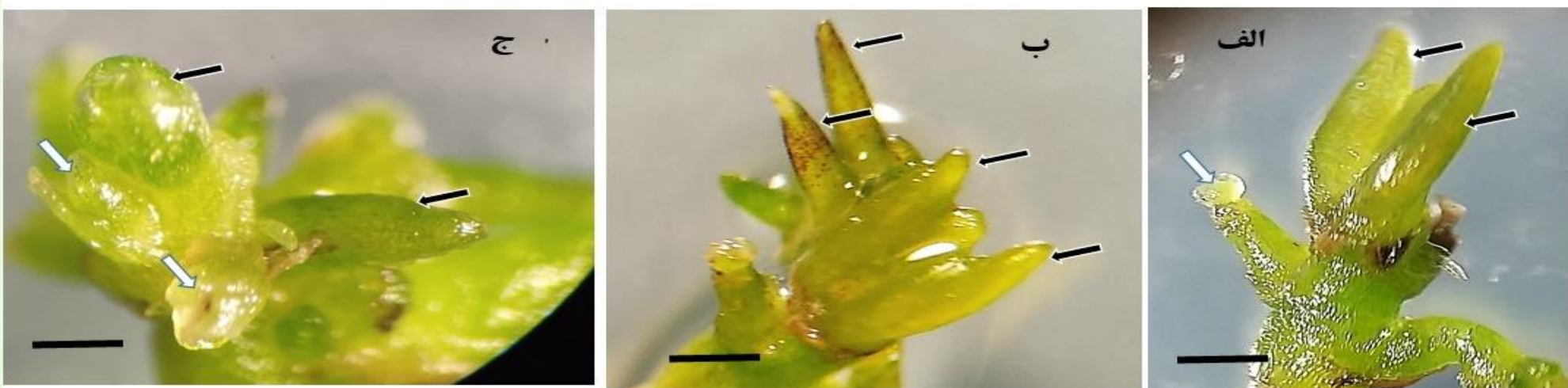
در این طرح از مارچوبه با سطح پلوئیدی اکتاپلوئید بومی ایران استفاده شد. بذور جهت جوانه‌زنی به محیط کشت پایه B5 منتقل شدند. پس از آماده کردن محیط‌های کشت، ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت در ظروف آ شکل توزیع گردید. سپس درب ظروف بسته و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۳/۱ اتمسفر استریل شدند. پس از جوانه زنی بذور، برای القای جنین‌زایی رویشی، از گیاهچه‌های رشد یافته ریزنمونه‌های تک‌گره تهیه و به محیط B5 مایع حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی منتقل شد. سپس در دستگاه آکسوفیتون با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت نور (۳۰۰۰ لوکس توسط لامپ‌های فلورسنت) به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. بعد از گذراندن فاز القا (۴ هفته) نمونه‌ها برای تشکیل جنین در محیط کشت B5 بدون هورمون بازکشت شدند. پس از آن تشکیل جنین‌های رویشی در فواصل زمانی ۴ هفته مورد بررسی قرار گرفت. به منظور باززایی جنین‌ها در محیط‌های کشت مایع B5، هورمون کینتین با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر به محیط اضافه شد. جهت ایجاد شرایط اسمزی، پلی‌اتیلن‌گالایکول با غلظت‌های ۱۵، ۳۰، ۶۰ گرم بر لیتر به ترتیب معادل ۰/۳، ۰/۶ و ۱/۲- مگاپاسکال و ساکارز با غلظت‌های ۳۰ و ۶۰ گرم بر لیتر اعمال شد. چهار هفته بعد از کشت، صفت‌های آنتوسیانین، کلروفیل و کاروتنوئید، پرولین اندازه‌گیری شد. پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌های به‌دست‌آمده نشان داد که ساکارز و پلی‌اتیلن‌گالایکول بر مقدار کلروفیل a، b، کلروفیل کل، محتوای کاروتنوئید، آنتوسیانین و پرولین جنین‌های رویشی مارچوبه اکتاپلوئید اثر معنی‌داری در سطح یک درصد دارد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین بیشترین مقدار کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید مربوط به تیمار پلی‌اتیلن‌گالایکول ۶۰ گرم بود. بیشترین مقدار آنتوسیانین مربوط به تیمار پلی‌اتیلن‌گالایکول ۳۰ گرم بود. یشتترین مقدار پرولین مربوط به تیمار ساکارز ۶۰ بود (جدول ۱). در شرایط اسمزی که به وسیله تیمار ساکارز به جنین اعمال می‌شود، مقدار کربن در محیط کشت به مقدار قابل توجهی افزایش می‌کند و مقدار تولید پرولین بالا می‌رود. همانطور که در جدول نتایج بدست‌آمده بیشترین مقدار پرولین تولید شده در تیمار ساکارز ۶۰ گرم قابل مشاهده است، البته غلظت بالای پرولین در تیمار ساکارز ۶۰ گرم، سبب کاهش کلروفیل کل نیز شده است. در شرایط تنش، گیاه با کاهش سرعت انتقال مواد، توقف رشد و افزایش سنتز ساکارز به دلیل فعال شدن آنزیم ساکارز فسفات سنتاز، مقدار کربوهیدرات را افزایش می‌دهد تا با تبدیل کردن آن‌ها به عوامل دفاعی، خود را در برابر شرایط تنش‌زا، مقاوم کند (Hashemi et al., 2018). آنتوسیانین یکی از عوامل دفاعی گیاه برای تخریب رادیکال‌های آزاد اکسیژن است و طبق نتایج بدست‌آمده بیشترین مقدار آنتوسیانین در تیمار پلی‌اتیلن‌گالایکول ۳۰ گرم تولید شد که این امر به دلیل تخریب کلروفیل‌ها و تبدیل کاروتنوئیدها به آنتوسیانین رخ داد. در شرایط تنش خشکی، از برگ‌های گیاه کاسته می‌شود اما مقدار کلروفیل گیاه افزایش پیدا میکند. کاروتنوئید در تنش خشکی با نقش آنتی اکسیدانی خود می‌تواند از گیاه تحت تنش محافظت کند. کاروتنوئیدها از ترکیبات دفاعی هستند که تحت شرایط تنش اثرات رادیکال‌های آزاد اکسیژن را خنثی می‌کنند و به عنوان محافظ کلروفیل‌ها نیز عمل می‌کنند (Sircelj et al., 2007). در شرایط اسمزی که به وسیله تیمار پلی‌اتیلن‌گالایکول به جنین اعمال شد طبق نتایج بدست‌آمده بیشترین مقدار کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید متعلق به تیمار پلی‌اتیلن‌گالایکول ۶۰ گرم است که بیشترین مقدار فشار اسمزی را بر جنین اعمال می‌کند.

نتیجه گیری کلی

با اعمال غلظت‌های پایین پلی‌اتیلن‌گالایکول به دلیل عدم ایجاد فشار اسمزی و حالت تنشی، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش یافته و سبب تخریب ساختمرویشی مارچوبه ان کلروپلاست می‌شود و در ادامه با ممانعت از بیوسنتز کلروفیل سبب افزایش آنتوسیانین شده است. پاسخ‌های درون شیشه‌ای جنین‌های اکتاپلوئید به افزایش فشار اسمزی محیط کشت با پلی‌اتیلن‌گالایکول، افزایش غلظت کلروفیل و آنتوسیانین می‌باشد. افزایش فشار اسمزی محیط کشت با ساکارز منجر به افزایش پرولین در جنین‌های رویشی گردید.



شکل ۱- جنین‌های رویشی مارچوبه چهار هفته بعد از قرارگیری در معرض شرایط اسمزی در محیط کشت مایع B5. مقیاس = یک میلی‌متر

جدول ۱- مقایسه میانگین رنگیزه‌های فتوستنتزی و پرولین جنین‌های رویشی مارچوبه.

پرولین ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)	آنتوسیانین ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)	کاروتنوئید (mg g^{-1} FW)	کلروفیل کل (mg g^{-1} FW)	کلروفیل b (mg g^{-1} FW)	کلروفیل a (mg g^{-1} FW)	تیمار
10.79 b	0.031 c	0.047 a	0.136 b	0.081 b	0.053 b	ساکارز 40 گرم
15.08 a	0.069 b	0.021 b	0.074 c	0.046 cd	0.028 c	ساکارز 60 گرم
11.28 b	0.078 b	0.031 b	0.099 c	0.062 c	0.039 c	PEG 15 گرم
9.88 b	0.166 a	0.028 b	0.079 c	0.042 d	0.035 c	PEG 30 گرم
11.59 b	0.033 c	0.054 a	0.180 a	0.103 a	0.077 a	PEG 60 گرم
<0.0027	<0.0001	<0.0012	<0.0001	<0.0001	<0.0001	Pr>F
9.91	11.83	19.75	15.54	15.01	16.29	ضریب تنوعیات

اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد ندارند

منابع

مشایخی، ک. ۱۳۸۶. جنین‌زایی رویشی گیاهی، انتشارات مختم‌قلی فراغی (سارلی)، گرگان. ۴۸۳ ص.

Bates, L. S., Waldern, R. P., Tear, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil science, 39: 205-207
Bittencourt, M. L. C., Dias, D. C. F. S., Dias, L. A. S., Araújo, E. F. 2004. Effects of priming on asparagus seed germination and vigour under water and temperature stress. Seed science. & Technol, 32: 607-616
Hashemi, E., Fakheri, B., MahdiNezhad, N., Mohammadpour Vashvaei, R. 2018. Effects of nano and nano bio-fertilizer on physiological, biochemical characteristics and yield of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) under drought stress. Agricultural Crops Production, 20: 1. 45- 66.
Gamburg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Response, 50: 151-158.
Khalid, K. A., daSilva, J. A. T. Cai, W. 2010. Water deficit and polyethylene glycol 6000 affects morphological and biochemical characters of (Pelargonium odoratissimum L.). Scientia Horticulturae, 125:159-166.
Horticulturae, 211:269-276.
Mousavizadeh, s. J., Mashayekhi, K., Hassandokht, M. R. 2017. Indirect somatic embryogenesis on rare octoploid (Asparagus breslerianus L.) plants. Scientia Horticulturae, 226: 184-190.
Taiz, L., and Zeiger, E. 2002. Plant Physiology, Sinauer Associates; 3 edition, 690 p.
Sircelj, H., Tausz, M., Grill, D. Batic, F. 2007. Detecting different levels of drought stress in apple trees (Malus domestica Borkh.) with selected biochemical and physiological parameters. Scientia Horticulturae, 113:362-369.
Wanger, G. J. 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of natural sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplasts. Plant Physiology, 64: 88-93.