تأثیر ساکارز بر رنگیزه‌های فتوسنتزی جنین‌های رویشی مارچوبه (*Asparagus officinalis*) اکتاپلوئید

زینب طوسی*[۱]، سیدجواد موسوی‌زاده[۲]، کامبیز مشایخی[۳]، مهدی علیزاده[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

[۲]استادیار گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

[۳]دانشیار گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*نویسنده مسئول: ztoosi75@gmail.com

چکیده

جنین‌زایی رویشی، روش جدیدی برای ازدیاد گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای است. این روش تحت تأثیر عوامل مختلف ازجمله ترکیبات و عناصر غذایی در محیط کشت می‌باشد. ساکارز محصول نهایی فتوسنتز و قند اولیه منتقل‌شده در آوند آبکش اکثر گیاهان است. به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر رنگیزه‌های فتوسنتزی جنین‌های رویشی مارچوبه اکتاپلوئید، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار ساکارز (۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ درصد) در سه تکرار انجام پذیرفت. برای انجام این آزمایش ریزنمونه‌های مارچوبه حاوی یک جوانه در محیط B5 در فاز القایی جنین رویشی دارای هورمون توفوردی کشت شدند و بعد از دو هفته به فاز ظهور جنین منتقل گردیدند. در ادامه بعد از چهار هفته تأثیر غلظت‌های ساکارز بر میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل، کاروتنوئید و میزان آنتوسیانین بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که غلظت‌های مختلف ساکارز اثر معنی‌داری ($P<0.001$) بر مقدار کلروفیل a، b، کلروفیل کل، محتوای کاروتنوئید و آنتوسیانین جنین‌های رویشی مارچوبه دارد. بیش‌ترین میزان کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید مربوط به تیمار ۹ درصد ساکارز و کمترین میزان مربوط به تیمار ۳ و ۱۲ درصد می‌باشد. در مورد آنتوسیانین، بیشترین میزان در تیمار ۶ درصد و کمترین در تیمار ۳ درصد ساکارز مشاهده شد. درنهایت در این پژوهش مشخص شد که بهترین غلظت مؤثر بر رنگیزه‌های فتنوسنتزی جنین‌های رویشی مارچوبه اکتاپلوئید، غلظت ۹ درصد ساکارز می باشد.

واژه‌های کلیدی: توفوردی، جنین‌زایی، کلروفیل، کارتنوئید.

مقدمه

مارچوبه با نام علمی*Asparagus officinalis* گیاه چندساله متعلق به خانواده Asparagaceae می‌باشد. *Asparagus* یک جنس بزرگ در این تیره است که حدود ۲۰۰ گونه دارد (Denton *et al*., 2011). مهم‌ترین گونه برای اهداف کشاورزی، *A. officinalis* می‌باشد. گونه *A. officinalis* در بین مارچوبه‌های خودروی ایران از لحاظ سطح پلوئیدی منحصربه‌فرد بوده و اکتاپلوئید (۲n=۸x=۸۰) می‌باشد. به دلیل داشتن مقاومت به خشکی، دارا بودن سطح پلوئیدی ویژه و همچنین به دلیل تولید بذر کم، محافظت و نگهداری از آن به‌عنوان یک ژرم پلاسم مهم مارچوبه حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین لزوم به‌کارگیری روش‌های درون شیشه‌ای مانند جنین‌زایی رویشی، برای ازدیاد این گیاه ضروری می‌باشد. در فرایند جنین‌زایی رویشی روند ایجاد جنین در خارج از کیسه جنینی انجام می‌شود. از نظر ژنتیکی جنین‌های به وجود آمده بسیار شبیه به گیاه مادری هستند که سبب حفظ ژنوتیپ گیاه مادری و تولید گیاه با یکنواختی بیشتر می‌شود (Mousavizadeh *et al*., 2015 and 2016). جنین‌زایی رویشی راهی برای تولید تعداد زیادی گیاه و تهیه کلون‌های یکنواخت و عاری از آلودگی و بیماری برای استقرار در مزرعه می‌باشد. کارآیی این روش به‌شدت به ترکیبات محیط کشت بستگی دارد. مانند ساکارز که متداول‌ترین منبع کربوهیدرات است که در کشت بافت گیاهی استفاده می‌شود و در آوند آبکش گیاهان وجود آن گزارش شده است و به‌عنوان منبع کربن برای رشد در شرایط درون شیشه‌ای انواع مختلف ریز نمونه استفاده شده است (مشایخی، ۱۳۸۶). گزارش شده است

که قندها بر تشکیل جنین‌های سوماتیک در محیط کشت تأثیر می‌گذارند (Dogan *et al*., 2020). ازآنجاکه ساکارز یکی از مهم‌ترین ترکیبات در جنین‌زایی رویشی است و به‌عنوان منبع کربن، انرژی و عوامل اسمزی در گیاهان شناخته می‌شوند در پژوهش حاضر، تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر رنگیزه‌های فتوسنتزی جنین‌های رویشی مارچوبه بررسی شده است. بنابراین، هدف کلی از پژوهش حاضر، به دست آوردن غلظت‌های مناسب ساکارز بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در جنین‌های رویشی مارچوبه اکتاپلوئید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰ اجرا شده است. از بذور مارچوبه *(Asparagus officinalis)* با سطح پلوئیدی اکتاپلوئید در این آزمایش استفاده گردید. جهت کشت، ابتدا بذور با آب معمولی شسته و سپس به مدت ۳۰ ثانیه با الکل ۷۰ درصد شستشو گردید. ضدعفونی بذور با هیپوکلرید سدیم ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. سپس بذور سه بار با آب مقطر استریل شستشو شده و روی محیط‌های کشت استقرار یافتند. از محیط کشت پایه B5 جهت القای جنین رویشی استفاده گردید. به‌منظور بررسی اثر ساکارز از غلظت‌های ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ درصد در محیط مایع استفاده شد. پس از آماده کردن محیط‌های کشت و اعمال تیمارها، محلول‌ها در ظروف T شکل توزیع و در هر ظرف، ۲۵ میلی‌لیتر از محلول محیط کشت توزین گردید. آنگاه درب ظروف با سه لایه فویل بسته و با اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۳ اتمسفر استریل شدند. برای القای جنین از ریز نمونه‌های تک گره (حاوی یک جوانه) گیاهچه‌های رشد کرده درون شیشه استفاده شد (Mousavizadeh *et al*., 2017). برای تهیه ریز نمونه‌های تک گره، اندام هوایی گیاهچه به قطعاتی با طول یک سانتیمتر حاوی یک گره تقسیم شده و به ظروف حاوی محیط کشت مایع فاز القا، منتقل شد. در هر ظرف سه ریز نمونه قرار داده و سپس درب ظروف توسط فویل استریل پوشانده و با پارافیلم کاملاً درزگیری شدند. سپس در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت نور (۳۰۰۰ لوکس توسط لامپ‌های فلور سنت) به مدت ۴ هفته در دستگاه آکسوفیتون نگهداری شد. حرکت دورانی این صفحات به صورتی است که محیط کشت از این لوله‌ها بیرون نمی‌ریزد. این حرکت باعث می‌شود که اندام‌های مورد کشت به‌صورت متناوب از محلول غذایی خارج‌شده و بدین‌وسیله هوادهی انجام شود. (مشایخی، ۱۳۸۶). بعد از گذراندن فاز القا نمونه‌ها وارد فاز رئالیزاسیون شدند و عمل واکشت ریز نمونه‌ها در محیط‌های قبل اما با هدف ظهور جنین‌ها (فاز رئالیزاسیون) درحالی‌که هورمون از آن‌ها حذف‌شده، انجام پذیرفت. جهت حذف کامل هورمون، ریز نمونه‌ها در محیط‌های کشت ضدعفونی شده بدون هورمون و آگار، در سه مرحله به فواصل ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه شستشو شدند. پس از گذشت ۴ هفته در مرحله ظهور جنین‌ها، تعداد جنین‌های رویشی تولید شده با استفاده از دستگاه استرئوسکوپ متصل به کامپیوتر در دو بزرگنمایی ۲۰ و ۴۰ میکرون مشاهده شدند. سپس آنتوسیانین (وانگر، ۱۹۷۹)، کلروفیل و کارتنوئید (بارنز و همکاران، ۱۹۹۲) در جنین‌های رویشی اندازه گیری شدند. پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار ساکارز در سه تکرار انجام پذیرفت. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها در نرم‌افزار SAS (۲۰۰۱) و رسم نمودارها در نرم‌افزار Excel انجام گرفت. برای کمی سازی واکنش رنگریزه‌های فتوسنتزی جنین زایی رویشی مارچوبه به غلظت‌های مختلف ساکارز از مدل رگرسیونی استفاده شد. مدل رگرسیون ساده خطی[3] ($y = a + bx$) برای آنتوسیانین و مدل رگرسیونی درجه دوم[4] ($y = a + bx + cx2$) برای کلروفیل و کاروتنوئید با کاربرد رویه Proc Reg در نرم‌افزار SAS (۲۰۰۱)، پردازش داده‌شده است.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌های به‌دست‌آمده نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف ساکارز اثر معنی داری($P < 0/001$) بر مقدار کلروفیل a، b، کلروفیل کل و محتوای کارتنوئید و آنتوسیانین جنین های رویشی مارچوبه اکتاپلوئید دارد (جدول ۱).

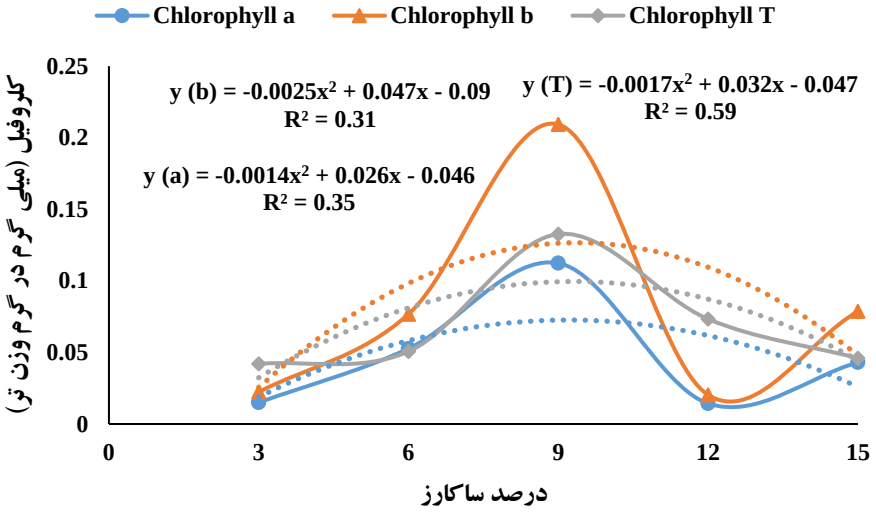
[3]Linear regression model
[4]Polynomial regression model

جدول ۱: مقایسه میانگین رنگریزه های فتوسنتزی جنین‌های رویشی مارچوبه.

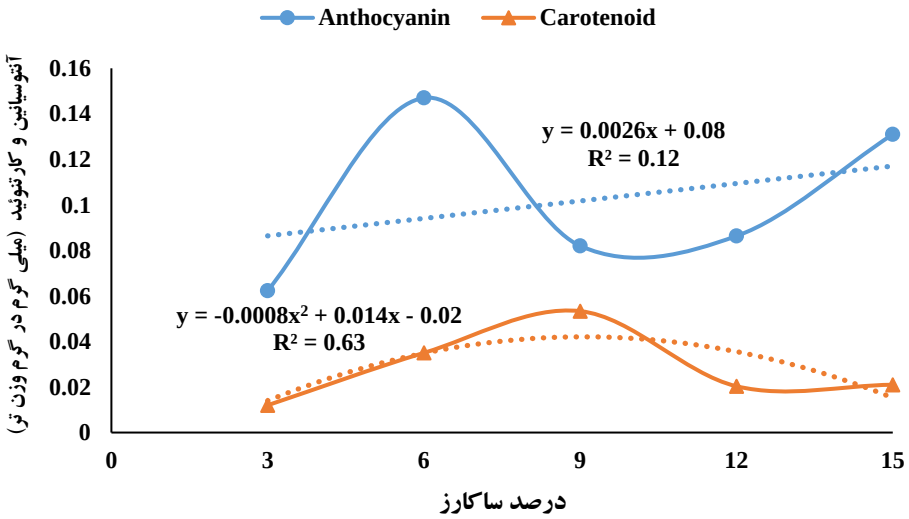
ساکارز (درصد)	کلروفیلa (mgg^{-1} FW)	کلروفیلb (mgg^{-1} FW)	کلروفیل کل (mgg^{-1} FW)	کاروتنوئید (mgg^{-1} FW)	آنتوسیانین ($\mu molg^{-1}$ FW)
3	0.015 c	0.022 c	0.042 c	0.012 d	0.062 d
6	0.052 b	0.076 b	0.05 c	0.035 b	0.147 a
9	0.112 a	0.209 a	0.132 a	0.053 a	0.082 c
12	0.014 c	0.02 c	0.073 b	0.02 c	0.086 c
15	0.043 b	0.078 b	0.046 c	0.021 c	0.131 b
Pr>F	<0.0001	<0.001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
ضریب تغییرات	16.37	11.17	14.04	14.77	6.48

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

نتایج مقایسه میانگین رنگیزه‌های فتوسنتزی و آنتوسیانین نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف ساکارز وجود داشته است. همان‌طور که شکل ۱ نشان می‌دهد، بیش‌ترین میزان کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید (به ترتیب۰/۱۱۲ mg/g.fw، ۰/۲۰۹، ۰/۱۳۲، ۰/۰۵۳) در غلظت ۹ درصد ساکارز (شکل ۳) و کم‌ترین مقدار کلروفیل a (۰/۱۱۴ mg/g.fw)، b (۰/۰۲ mg/g.fw) در غلظت ۱۲ درصد و کلروفیل کل و کارتنوئید به ترتیب (۰/۰۴۲ mg/g.fw، ۰/۰۱۲) در غلظت ۳ درصد مشاهده گردید. طبق شکل ۲، بیش‌ترین میزان آنتوسیانین (۰/۱۴۷ mg/g.fw) در ۶ درصد ساکارز و کم‌ترین آن (۰/۰۶۲mg/g.fw) در غلظت ۳ درصد ساکارز مشاهده شد. تجمع آنتوسیانین ناشی از قند در بسیاری از گونه‌های گیاهی مشاهده شده است. تنگ و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که ساکارز مؤثرترین عامل بیوسنتز آنتوسیانین در نهال‌های Arabidopsis است. همچنین نتایج Karami و همکاران (۲۰۰۶) بر گیاه میخک نیز نشان داد که حداکثر فراوانی جنین‌های رویشی در محیط حاوی ۹ و ۱۲ درصد ساکارز مشاهده شده است. رشد و نمو جنین‌های رویشی با افزایش غلظت ساکارز از ۱/۵ به ۱۲ درصد افزایش یافت درحالی‌که در غلظت‌های بالاتر ساکارز (۱۵ و ۱۸ درصد) کاهش یافت. تعداد کشت‌هایی که جنین‌زایی رویشی را نشان می‌دهند نیز به نوع کربوهیدرات‌های مورد استفاده بستگی دارد. بنا به گزارش Eapen و همکاران (۲۰۰۸) در بین کربوهیدرات‌ها گلوکز و ساکارز سبب جنین‌زایی با فرکانس بالا می‌شوند. وقتی غلظت‌های مختلف ساکارز در محیط پایهMs مورد استفاده قرار گرفت، بیشترین میانگین تعداد جنین رویشی با ۳٪ و به دنبال آن ۶٪، ۱٪، ۹٪ و ۱۲٪ به دست آمد. در غیاب ساکارز هیچ توسعه گیاهچه‌ای مشاهده نشد.



شکل ۱: تأثیر سطوح مختلف ساکارز بر میزان کلروفیل جنین‌های رویشی مارچوبه.



شکل ۲: تأثیر سطوح مختلف ساکارز بر میزان کارتنوئید و آنتوسیانین جنین‌های رویشی مارچوبه.

شکل ۳: جنین‌های رویشی دوقطبی مارچوبه در محیط کشت B5 حاوی ۹ درصد ساکارز.

نتیجه گیری کلی

وجود ارتباط بین وضعیت قند و تشکیل جنین رویشی به اثبات رسیده است به این صورت که افزایش قندهایی چون ساکارز منجر به افزایش پتانسیل جنین‌زایی می‌گردند. مناسبترین هیدروکربن برای محیط کشت جنین‌زا ساکارز می‌باشد. با توجه به نتایج تحقیق حاضر میزان ۹ درصد ساکارز در محیط کشت B5، نقش مهمی در ساخت کلروفیل نشان داد و باعث شد که فتوسنتز و متابولیسم کربوهیدرات‌ها در این محیط بالاتر رفته و در نتیجه میزان قند و تجمع آن در ریزنمونه‌های کشت شده در این محیط افزایش یافت و در نهایت باعث ظهور جنین‌هایی با رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاهچه‌های حاصل گردید.

منابع

مشایخی، ک. ۱۳۸۶. جنین زایی رویشی گیاهی. انتشارات مختوم قلی فراغی (سارلی). ۴۸۳ ص.

Barnes, J.D., L. Balaguer, E. Manrique, S. Elvira and A.W. Davison. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. Environ. Exp. Bot. 32: 85-100.

Denton, A., Schippers, R., and Oyen, L. 2004. Plant resources of tropical Africa2 Vegetables, 2: 668.
Dogan, M. 2020. The Effects of Different Sucrose Concentrations on The Regeneration Area of Riccia Fluitans L., A Medicinal Aquatic Plant. Journal of Engineering Technology and Applied Sciences, 5(2): 51-58.

Eapen, S., and George, L. 2008. Influence of phytohormones, carbohydrates, aminoacids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger millet. Plant cell, tissue and organ culture, 22(2): 87-93.

Karami, O., Deljou, A., Esna-Ashari, M., and Ostad-Ahmadi, P. 2006. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus L.).* Scientia Horticulturae, 110(4): 340-344.

Mousavizadeh, S.J., Hassandokht, M.R. Kashi, A., Gil, J. Cabrera, A., and Moreno, R. 2016. Physical mapping of 5S and45S rDNA genes and ploidy levels of Iranian Asparagus species. Sci. Hortic., 211: 269-276.

Mousavizadeh, S.J., Mashayekhi, K., and Hassandokht, M.R. 2017. Indirect somatic embryogenesis on rare octoploid *Asparagus breslerianus* plants. Scientia Horticulturae, 226: 184-190.

Mousavizadeh, S.J., Hassandokht, M.R. and Kashi, A. 2015. Multivariate analysis of edible Asparagus species in Iran by morphological characters. Euphytica, 206(2): 445-457.

Teng, S., Keurentjes, J., Bentsink, L., Koornneef, M., and Smeekens, S. 2005. Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis requires the MYB75/PAP1 gene. Plant physiology, 139(4), 1840-1852.

Wanger, G.J. 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of netural sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplasts. Plant Physiology, 64: 88-93.

The effect of sucrose on photosynthesis pigments of octoploid *asparagus officinalis* somatic embryogenesis

Zeinab Toosi*[1], Seyyed Javad Mousavizadeh[2], Kambiz Mashayekhi[3], Mahdi Alizadeh[3]
[1]MSc Student, Department of Horticultural Science, Gorgan University of agricultural science and natural resources, Gorgan, Iran.
[2]Assistance prof. Department of Horticultural Science, Gorgan University of agricultural science and natural resources, Gorgan, Iran.
[3]Associated Prof. Department of Horticultural Science, Gorgan University of agricultural science and natural resources, Gorgan, Iran.
Corresponding Author: ztoosi75@gmail.com

Abstract

Somatic embryogenesis is a new method for plant propagation via in vitro. This method influenced by various factors such as the composition and nutrients in the culture medium. Sucrose is the final product of photosynthesis and the primary sugar transferred to the phloem of most plants. For investigation the effect of different concentrations of sucrose on photosynthetic pigments of somatic embryos of octoploid asparagus, an experiment was conducted in a completely randomized design with five sucrose treatments (3, 6, 9, 12 and 15%) in three replications. Single node of asparagus explants was cultured in B5 medium in induction phase supplemented to 2,4-D and transferred to realization phase after 2 weeks. After 4 weeks, the effect of sucrose concentrations were investigated on chlorophyll a, b, total, carotenoids and anthocyanin content. The results showed that the effect of different concentrations of sucrose on octoploid asparagus had a significant effect ($P < 0.001$) on chlorophyll a, b, total chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content. The highest level of chlorophyll a, b, total and carotenoid was obtained in 9% sucrose and the lowest level was related to 3% and 12%. The highest amount of anthocyanin was observed in 6% and the lowest in 3% sucrose. Consequently, it was found that the best concentration on photosynthetic pigments of somatic embryos of octoploid asparagus is 9% sucrose.

***Keywords*:** 2,4-D, Carotenoid, Chlorophyll, Embryogenesis.