تأثیر ساکارز و پلی اتیلن گالایکول بر رنگیزه‌های فتوسنتزی 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

*نویسنده مسئول:e.Lotfi.ro@gmail.com

چکیده

مارچوبه (*Asparagus officinalis* L) گیاهی ریزوم‌دار و دائمی است که برای استفاده از ساقه خوراکی آن که اصطلاحاً اسپیر (Spear) 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 فتوسنتزی و پرولین جنین‌های رویشی مارچوبه اکتاپلوئید بررسی شد. برای القای جنین رویشی از محیط B5 حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D استفاده شد و در ادامه از ساکارز با دو غلظت ۴۰ و۶۰ گرم بر لیتر و پلی‌اتیلن‌گلایکول با سه غلظت ۳۰،۱۵ و ۶۰ گرم بر لیتر برای اعمال تنش اسمزی برجنین‌های رویشی مارچوبه استفاده شد، سپس تأثیر این مواد بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و مقدار پرولین بررسی شد. طبق نتایج بدست‌آمده بیشترین مقدارکلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید به ترتیب ۰/۰۷۷، ۰/۱۰۳، ۰/۱۸۰و ۰/۰۵۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در تیمار۶۰ گرم پلی‌اتیلن‌گلایکول مشاهده شد. بیشترین مقدار پرولین (۱۵/۰۸ میکرومول بر گرم وزن‌تر) مربوط به تیمار ساکارز ۶۰ گرم بود و بیشترین مقدار آنتوسیانین (۰/۱۶۶ میکرومول بر گرم وزن‌تر) مربوط به تیمار۳۰ گرم پلی‌اتیلن‌گلایکول 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 فتوسنتز و تنفس سلولی منجر به کاهش جذب یون‌ها، کاهش تولید کربوهیدرات‌ها و اختلال در متابولیسم رشد می‌شود. طبق پژوهش‌ها رنگدانه‌های فتوسنتزی 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 تورژسانس 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).

القا 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 فتوسنتزی 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 تاثیر شرایط اسمزی با کاربرد ساکارز و پلی‌اتیلن‌گلایکول بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و پرولین جنین‌های رویشی مارچوبه اکتاپلوئید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این طرح از مارچوبه (*Asparagus officinalis* L.) با سطح پلوئیدی اکتاپلوئید بومی ایران استفاده شد که بر اساس مطالعات قبلی شناسایی شده بود (Mousavizadeh *et al*., 2016). ابتدا بذر مارچوبه از شهرستان بلده استان مازندران جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. گندزدایی بذور با هیپوکلریت سدیم دو درصد به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. بذور جهت جوانه‌زنی به محیط کشت پایه B5 (Gamburg *et al*., 1968) منتقل شدند. پس از آماده کردن محیط‌های کشت، ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت در ظروف T شکل توزیع گردید. سپس درب ظروف بسته و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۳ اتمسفر استریل شدند.

پس از جوانه زنی بذور، برای القای جنین‌زایی‌رویشی، از گیاهچه‌های رشد یافته ریزنمونه‌های تک‌گره (حاوی یک جوانه) تهیه و به محیط B5 مایع حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D منتقل شد (Mousavizadeh *et al*., 2017). سپس در دستگاه آکسوفیتون با دمای ۲±۲۵ 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، پلی‌اتیلن‌گلایکول (PEG-6000) با غلظت‌های ۱۵، ۳۰، ۶۰ گرم بر لیتر به‌ترتیب معادل ۰/۳-، ۰/۶- و ۱/۲ - مگاپاسکال (Bittencourt *et al*., 2004)، و ساکارز با غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ گرم بر لیتر اعمال شد (مشایخی، ۱۳۸۶). چهار هفته بعد از کشت، صفت‌های آنتوسیانین (Wonger *et al*., 1979)، کلروفیل و کاروتنوئید (Lichtenthalr *et al*., 1987) و پرولین (Bates *et al*., 1973) اندازه‌گیری شد.

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار ساکارز و پلی‌اتیلن‌گلایکول در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار SAS (۲۰۰۱) 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 پلی‌اتلین‌گلایکول بر مقدار کلروفیل a، b، کلروفیل کل، محتوای کاروتنوئید، آنتوسیانین و پرولین جنین‌های رویشی مارچوبه اکتاپلوئید اثر معنی‌داری در سطح یک درصد ($P < 0/001$) دارد (جدول ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین بیشترین مقدارکلروفیل a (۰/۰۷۷میلی‌گرم برگرم وزن تر) مربوط به تیمار پلی‌اتیلن‌گلایکول۶۰ گرم و کمترین مقدار آن (۰/۰۲۸ میلی‌گرم برگرم وزن‌تر) مربوط به تیمار ساکارز ۶۰ گرم بود که البته از لحاظ آماری با تیمارهای۳۰ و ۱۵گرم پلی‌اتیلن‌گلایکول اختلاف معنی‌داری نداشت.

بیش‌ترین مقدار کلروفیل b (۰/۱۰۳ میلی‌گرم برگرم وزن تر) مربوط به تیمار پلی‌اتیلن‌گلایکول ۶۰ گرم وکم‌ترین مقدار (۰/۰۴۲ میلی‌گرم بر وزن تر) مربوط به تیمار پلی‌اتیلن‌گلایکول۳۰ گرم بود. بیشترین مقدار کلروفیل کل (۰/۱۸۰میلی‌گرم برگرم وزن تر)مربوط به تیمار پلی‌اتیلن‌گلایکول۶۰ گرم و کمترین مقدار (۰/۰۷۴ میلی‌گرم برگرم وزن تر) مربوط به ساکارز ۶۰ بود (شکل ۱، جدول ۱).

بیشترین مقدار کاروتنوئید (۰/۰۵۴ میلی‌گرم برگرم وزن تر) مربوط به تیمار پلی‌اتیلن‌گلایکول۶۰ گرم بود که از لحاظ آماری با تیمار ساکارز۴۰ گرم اختلاف معنی‌داری ندارد. کمترین مقدار کاروتنوئید مربوط به تیمارساکارز ۶۰ (۰/۰۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود که از لحاظ آماری با تیمارهای پلی‌اتیلن‌گلایکول۳۰ و ۱۵ گرم اختلاف معنی‌داری ندارد (شکل ۱، جدول ۱). بیشترین مقدار آنتوسیانین

(۰/۱۶۶ میکرومول برگرم وزن تر) مربوط به تیمار پلی‌اتیلن‌گلایکول ۳۰ گرم بود و کمترین مقدار آن مربوط به ساکارز ۴۰ گرم (۰/۰۳۱ میکرومول برگرم وزن تر) بود که البته با تیمار پلی‌اتیلن‌گلایکول ۶۰ گرم از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ندارد.

بیشترین مقدار پرولین (۱۵/۰۸ میکرومول برگرم وزن تر) مربوط به تیمار ساکارز ۶۰ بود و کمترین مقدار پرولین (۹/۸۸ میکرومول برگرم وزن تر) مربوط به تیمارپلی‌اتیلن‌گلایکول ۳۰ گرم بود (شکل ۱، جدول ۱).

در شرایط اسمزی که به وسیله تیمار ساکارز به جنین اعمال می‌شود، مقدارکربن 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 درتیمار 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 ساکارزفسفات‌سنتاز، 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 ازعوامل دفاعی گیاه برای تخریب رادیکال‌های آزاد اکسیژن است و طبق نتایج بدست‌آمده بیشترین مقدار آنتوسیانین در تیمار پلی‌اتیلن‌گلایکول 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 رادیکال های آزاد اکسیژن را خنثی می‌کنند و به عنوان محافظ کلروفیل‌ها نیز عمل می‌کنند (Sircelj *et al*., 2007). درشرایط اسمزی که به وسیله تیمار پلی‌اتیلن‌گلایکول به جنین اعمال شد طبق نتایج بدست آمده بیشترین مقدار کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید متعلق به تیمار پلی‌اتیلن‌گلایکول ۶۰ گرم است که بیشترین مقدار فشار اسمزی را بر جنین اعمال می‌کند.

جدول ۱: مقایسه میانگین رنگریزه‌های فتوسنتزی و پرولین جنین‌های رویشی مارچوبه.

تیمار	کلروفیل a (mgg^{-1} FW)	کلروفیل b (mgg^{-1} FW)	کلروفیل کل (mgg^{-1} FW)	کاروتنوئید (mgg^{-1} FW)	آنتوسیانین ($\mu molg^{-1}$ FW)	پرولین ($\mu molg^{-1}$ FW)
ساکارز ۴۰ گرم	0.053 b	0.081 b	0.136 b	0.047 a	0.031 c	10.79 b
ساکارز ۶۰ گرم	0.028 c	0.046 cd	0.074 c	0.021 b	0.069 b	15.08 a
PEG ۱۵ گرم	0.039 c	0.062 c	0.099 c	0.031 b	0.078 b	11.28 b
PEG ۳۰ گرم	0.035 c	0.042 d	0.079 c	0.028 b	0.166 a	9.88 b
PEG ۶۰ گرم	0.077 a	0.103 a	0.180 a	0.054 a	0.033 c	11.59 b
Pr>F	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0012	<0.0001	<0.0027
ضریب تغییرات	16.29	15.01	15.54	19.75	11.83	9.91

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

شکل ۱: جنین های رویشی مارچوبه چهار هفته بعد از قرارگیری در معرض شرایط اسمزی در محیط کشت مایع B5. مقیاس = یک میلیمتر
(الف) تشکیل جنین دوقطبی (پیکان سیاه) و تشکیل جنین ثانویه (پیکان سفید) در محیط کشت دارای ۴۰ گرم ساکارز.
(ب) تشکیل جنین دوقطبی (پیکان سیاه) در محیط کشت ۳۰ گرم پلی‌اتیلن‌گلایکول حضور آنتوسیانین در ریزنمونه‌ها مورد توجه است.
(ج) تشکیل جنین دوقطبی (پیکان سیاه) و توسعه شاخه به طور مستقیم از ریزنمونه (پیکان سفید) در محیط دارای ۶۰ گرم پلی‌اتیلن‌گلایکول. حضور کلروفیل در ریزنمونه ها مورد توجه است.

نتیجه گیری

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

منابع

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

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., Mahdi Nezhad, N., Mohammadpour Vashvaei, R. 2018. Effects of nano and nano bio-fertilizer on physiological, biochemical characteristics and yield of roselle (*Hibisicus 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., Silva, J.A.T., Cai, W. 2010. Water deficit and polyethylene glycol 6000 affects morphological and biochemical characters of (Pelargonium odoratissimum L.). Scientia Horticulturea, 125:159-166.

Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotinoids. Pigments of photosynthetic membranes. Method Enzye, 148:350-382.

Mousavizadeh, S.J., Hassandokht, M.R., Kashi, A., Gil, J., Cabrera, A., Moreno, R. 2016. Physical mapping of 5S and 45S rDNA genes and ploidy levels of Iranian Asparagus species. Scientia 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., Zeiger, E. 2002. Plant Physiology, Sinauer Associates, 690.

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 netural sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplasts. Plant Physiology, 64: 88-93.

The effect of sucrose and PEG on photosynthesis pigments and proline of asparagus somatic embryo

Aghile Lotfi*[1], Yousef Hamid Oghli[2], Seyyed Javad Mousavizadeh[3]
[1*] MSc Student, Department of Horticultural Science, Guilan University, Rasht, Iran.
[2] Associated prof. Department of Horticultural Science, Guilan University, Rasht, Iran.
[3] Assistance prof. Department of Horticultural Science, Gorgan University of agricultural science and natural resources, Gorgan, Iran.
[*]*Corresponding Author: e.lotfi.ro@gmail.com*

Abstract

Asparagus officinalis is a perennial plant that is cultivated for its edible stem. Different ploidy levels from diploid to decaploid are found among Iranian asparagus. In the present study, the effect of osmotic conditions on photosynthetic pigments and proline content of octoploid asparagus embryos was investigated. B5 medium containing 2 mg-1 2,4-D was used to induce the embryo. Then 40 and 60 g-1 sucrose and 30, 15 and 60 g-1 polyethylene glycol were used to create osmotic stress on asparagus somatic embryo. Then the effect of these substances on photosynthetic pigments and proline content was investigated. According to the results, the highest levels of chlorophyll a, b, total and carotenoids were observed in 60 g PEG with 0.077, 0.103, 0.180 and 0.055 mgg-1 FW, respectively. The highest amount of proline (15.08 µmolg-1 FW) was related to sucrose 60 g and the highest amount of anthocyanin (0.166 µmolg-1 FW) was related to 30 g PEG.
Keywords: Octoploid asparagus, Chlorophyll, Carotenoid, Anthocyanin.