جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد هجدهم، شماره سوم، ۱۳۹۰
www.gau.ac.ir/journals

بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک بر جنین‌زایی رویشی و مقدار رنگیزه‌های درونی ریزنمونه‌های هویج در محیط کشت B_5

سمیرا حسینی[1] و *کامبیز مشایخی[2]
[1]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[2]دانشیار گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۲

چکیده

اسید سالیسیلیک نقش اساسی در تنظیم فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی در گیاهان دارد. در این پژوهش چگونگی تأثیر اسید سالیسیلیک بر القا جنین‌زایی رویشی ریزنمونه‌های دم‌برگ و آب‌کش ثانویه ریشه هویج و تشکیل رنگیزه‌های درونی در محیط کشت گامبورگ (B_5) مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور بررسی تأثیرات اسید سالیسیلیک تیمارها در قالب طرح کاملاً تصادفی با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌مولار به محیط کشت استاندارد B_5 اضافه گردید. نتایج به‌دست آمده نشان داد که میزان جنین‌زایی رویشی در تیمار ۰/۵ میلی‌مولار بیش از تیمارهای دیگر بود و در غلظت‌های بیش از ۰/۵ میلی‌مولار از میزان آن کاسته شد. همچنین در این مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک بر سنتز کلروفیل، آنتوسیانین و کارتنوئید در ریزنمونه‌های کشت شده هویج پس از ظهور جنین‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک بیش‌ترین میزان کارتنوئید، آنتوسیانین و کلروفیل دیده شد و این اختلاف بین غلظت‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. در غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ میلی‌مولار نه تنها از میزان جنین‌زایی کاسته شده بود بلکه میزان رنگیزه‌ها نیز کاهش پیدا کرد. نتایج به‌دست آمده از مقایسه جنین‌زایی در ریزنمونه‌های مختلف در هویج نشان داد که جنین‌زایی در ریزنمونه‌های دم‌برگ بیش از بافت آب‌کش ثانویه ریشه هویج بود. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که احتمالاً اسید سالیسیلیک در غلظت‌های مختلف دارای تأثیرات فیزیولوژیک متفاوتی می‌باشد که با توجه به هدف موردنظر می‌توان از دامنه‌های متفاوتی از غلظت‌های آن استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: دم‌برگ، آب‌کش ثانویه هویج، کلروفیل، کارتنوئید، آنتوسیانین

* مسئول مکاتبه: kambizm@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

اسید سالیسیلیک یا اورتو هیدروکسی بنزوئیک اسید[1] ترکیبی از گروه مواد فنلی می‌باشد، که دارای حلقه آروماتیک و یک گروه هیدروکسیل است. این ترکیب در بیش‌تر گیاهان وجود دارد و به‌دلیل اهمیت زیادی که در بیش‌تر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی درون گیاه دارد به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های گیاهی ازآن نام برده می‌شود (راسکین، ۱۹۹۲).

از جمله فرآیندهای فیزیولوژیکی که اسید سالیسیلیک در آن‌ها دخالت دارد می‌توان به بستن روزنه‌ها، آغازش ریشه‌های نابه‌جا، گرمازایی در زمان گرده‌افشانی، فتوسنتز، حفاظت از احیاء و تجزیه نیترات و مقاومت موضعی اشاره کرد (جوزف و همکاران، ۲۰۱۰). اسید سالیسیلیک تنظیم‌کننده اعمال سایر هورمون‌ها می‌باشد به‌طوری‌که از بیوسنتز اتیلن ممانعت می‌کند (کویروز و همکاران، ۲۰۰۱).

جنین‌زایی رویشی یکی از اساسی‌ترین تکنیک‌ها جهت تولید و باززایی گیاهان در کشت بافت می‌باشد (راینرت، ۱۹۵۹). تمایز جنین‌های رویشی چه به‌صورت مستقیم و یا غیرمستقیم از سلول‌های ریزنمونه نیاز به شرایط خاصی دارد که یکی از این شرایط مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت می‌باشد (مشایخی، ۲۰۰۸؛ جورج و همکاران، ۲۰۰۸). از شروع پژوهش‌هایی در زمینه جنین‌زایی رویشی بیش‌تر بررسی‌ها بر روی تغییر ترکیبات محیط کشت مانند تنظیم‌کننده‌های رشد و نمو بوده است، علاوه‌بر شرایط محیط کشت، بروز تنش یا واکنش گیاه به تنش‌ها سبب بروز جنین‌زایی در گیاهان می‌گردد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که برخی از مواد گیاهی که پس از بروز تنش در گیاه سنتز می‌شود می‌توانند جنین‌زایی را در ریزنمونه القا نمایند. یکی از این ترکیبات اسید سالیسیلیک می‌باشد که اخیراً به‌علت تأثیرات خاصی که بر فیزیولوژی گیاهی دارد به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد نام برده می‌شود. بر این اساس، پژوهش‌های مختلفی بر روی تأثیر این ماده بر روی مواد گیاهی در محیط‌های کشت بافت انجام گرفته است. به‌طور مثال راستان و همکاران (۱۹۸۹)گزارش کردند که اسید سالسیلیک در غلظت‌های ۵۰ میکرومولار سبب تحریک جنین‌زایی رویشی در هیپوکوتیل هویج می‌شود، در حالی‌که در شمعدانی جنین‌زایی در غلظت ۸/۳۲ میکرومولار این ماده تحریک شده بود (کوماریا و همکاران، ۲۰۰٤). طی بررسی‌های انجام گرفته مشخص گردید اسید سالیسیلیک به دو صورت، یکی از طریق ممانعت در فعالیت آنزیم ۱- آمینو سیکلو پروپان۱ - کربوکسیلیک اسید (کویرز و همکاران، ۲۰۰۱) و دیگری از

1- Salicylic Acid

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

طریق بالا بردن سطح H_2O_2 (جیان و همکاران، ۲۰۰۱) باعث افزایش جنین‌زایی رویشی می‌گردد. نیسن (۱۹۹٤) دریافت که اسید سالسیلیک در غلظت‌های بیش‌تر از ۱۰۰ میکرومولار نه تنها باعث جنین‌زایی در دم‌برگ هویج نمی‌شود بلکه از آن هم جلوگیری می‌کند. دانشمندان دیگر نتایج مشابهی در غلظت ۵ میکرومولار برای یونجه گرفتند (میجر و براون، ۱۹۸۸). به‌طوری‌که پژوهشگران عنوان کردند غلظت‌های بالا اسید سالیسیلیک باعث افزایش اتیلن و کاهش جنین‌زایی رویشی در گیاهان می‌گردد (تیزات و موراسیک، ۱۹۷۷؛ هکستر و همکاران، ۱۹۸۱؛ کومار و همکاران، ۲۰۰۷).

کشت درون شیشه‌ای علاوه‌بر ازدیاد گیاهان امکان تولید یک‌سری متابولیت‌های ثانویه فراهم کرده است. راهکارهایی برای بهبود شرایط تولید و افزایش سنتز این مواد در کشت درون شیشه ارایه شده که شامل مطلوب کردن محیط کشت با استفاده از محرک‌ها محیطی می‌باشد. آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان یک‌سری ترکیبات ممانعت‌کننده یا کندکننده اکسیداسیون مواد می‌باشند که در غلظت‌های پایین در گیاه وجود دارند (هالی‌ول و گاتریج، ۲۰۰۷). با توجه به محدودیت منابع گیاهی و تولیدات ناکافی آنتی‌اکسیدان‌ها برای تولید بیش‌تر و بهتر باید روش‌هایی برگزید که دارای برتری بیش‌تری نسبت به محیط طبیعی باشد، از جمله این روش‌ها می‌توان همان‌طورکه قبلاً نیز ذکر شد به کشت بافت اشاره کرد (ورپوت و همکاران، ۲۰۰۲). از جمله آنتی‌اکسیدان‌های مهم می‌توان آنتوسیانین‌ها و کارتنوئیدها را نام برد. آنتوسیانین‌ها یک گروه از فلاونوئیدهای محلول در آب هستند که در نتیجه تنش‌های محیطی در گیاه تولید می‌شوند (چالکر- اسکات، ۱۹۹۹). انباشتگی آنتوسیانین‌ها به‌وسیله محرک‌های محیطی گوناگون مانند اشعه ماورای بنفش، دمای پایین، حمله عوامل بیماری‌زا و چندین تنظیم‌کننده رشد مانند سایتوکنین‌ها، جیبرلین‌ها، اتیلن و اسید سالیسیلیک القا می‌شوند (آکینومی، ۲۰۰۱). تأثیرات اسید سالیسیلیک بر میزان رنگ‌دانه‌های درونی گیاه از طریق برهم‌کنش که با سایر هورمون‌ها می‌گذارد توسط پژوهشگران بسیاری مورد بررسی قرار گرفت (اسبورن، ۱۹٦٥؛ بن‌زیای و ایتای، ۱۹۷۳؛ دیسون و فریمن، ۱۹۷٦؛ مهارکا و همکاران، ۲۰۰٦).

اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک هورمون کلیدی و درون‌زا در بیش‌تر فرآیندهای گیاهی نقش مؤثر ایفا می‌کند. با توجه به ماهیت این ترکیب و برهم‌کنشی که با سایر هورمون‌ها دارد سبب شده که در غلظت‌های مختلف تأثیرات متفاوتی بگذارد. هدف از این بررسی نشان دادن تفاوت بین دو ریزنمونه دم‌برگ و آب‌کش ثانویه ریشه هویج تحت تیمار اسید سالیسیلیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال‌های ۸٦ و ۸۷ انجام شد. در این پژوهش از گیاه هویج به‌عنوان یک گیاه مدل در کشت بافت استفاده گردید. اندام مورد کشت در هویج، دم‌برگ و بافت آب‌کش ثانویه بود. به‌دلیل تفاوتی که در روند جنین‌زایی در این دو اندام وجود دارد این دو بافت انتخاب گردید. چرا که نوع جنین‌زایی در بافت دم‌برگ از نوع مستقیم و جنین‌زایی در بافت آب‌کش ثانویه هویج غیرمستقیم می‌باشد (مشایخی، ۲۰۰۸). بافت آب‌کش ثانویه ریشه[1] از گیاه هویج رقم نانتس[2] تهیه شد و ریزنمونه دم‌برگ، پس از کشت بذور هویج رقم نانتس در محیط کشت جامد B_5 به‌دست آمد. در هر دو موارد، نمونه‌ها توسط الکل ۷۰ درصد به‌مدت ٤۰ ثانیه و هیپوکلریدسدیم ۵ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه به همراه دو قطره توین به‌منظور افزایش کشش سطحی، ضدعفونی سطحی شدند. برای تهیه ریزنمونه‌های آب‌کش ثانویه ریشه، هویج‌های ضدعفونی شده را توسط دستگاه میکرتوم دستی برش داده و پس از آن با دستگاه تروکار[3]، قرص‌های دایره‌شکل یکسانی از بافت آب‌کش ثانویه هویج جدا و کشت گردید. محیط کشت مورد استفاده در این پژوهش محیط کشت گامبورک B_5 و NL به‌ترتیب دارای هورمون D- ٤ و ۲ (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و IAAدارای (۱ میلی‌گرم در لیتر) می‌باشد.

به‌منظور بررسی چگونگی تأثیرات اسید سالیسیلیک بر جنین‌زایی از تیمارهای اسید سالیسیلیک با ۵ سطح ۰، ۰/۵، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌مولار در ٤ تکرار استفاده گردید. نمونه‌های آب‌کش ثانویه کشت شده در ارلن‌مایر به‌مدت ٤ هفته در دستگاه شیکر تحت شرایط دمایی ۲±۲۷ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس (نور لامپ‌های فلورسنت) کشت گردید، نمونه‌های دم‌برگ هویج درون شیشه‌های T شکل به قطر داخلی ۳ سانتی‌متر دارای حجم حدود ۷۰ میلی‌لیتر بوده که فقط ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت درون آن‌ها ریخته و در شرایط مشابه روی دستگاه آکسوفیتون[4] قرار گرفت. آکسوفیتون دستگاهی است که اغلب می‌تواند جای شیکر را به‌خوبی بگیرد و در ضمن عمل هوادهی به نمونه‌ها را به بهترین نحو انجام دهد. عمل واکشت[5] ریزنمونه‌ها در محیط قبل اما بدون اکسین برای ظهور جنین‌ها (رئالیزاسیون[6]) ۳ هفته

1- Pheloem
2- *Daucus carrot* V. Nantes
3- Trokar
4- Auxophyton
5- Subculture
6- Realization

پس از کشت انجام گرفت بعد از گذشت ۳ هفته در این محیط برای نمونه‌های دم‌برگ و ۵ هفته برای نمونه‌های آب‌کش ثانویه ریشه جنین‌ها ظاهر و مورد بررسی قرار گرفتند. ریزنمونه‌های جنین‌دار شده توسط دستگاه استریوسکوپ مجهز به دستگاه نمایشگر با بزرگ‌نمایی ۲۰ و ٤۰ برابر مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهدات مورفولوژیکی شامل تعداد جنین‌ها که در مراحل مختلف تکامل (کروی، قلبی، اژدری و گیاهچه‌ها) ثبت گردید. علاوه‌بر جنین‌زایی تأثیر اسید سالیسیلیک روی میزان سنتز رنگیزه آنتوسیانین و کارتنوئید و کلروفیل a و b در مرحله ظهور جنین‌ها در ارلن‌مایر بررسی شد. برای تعیین میزان آنتوسیانین در نمونه‌ها از روش وانگر (۱۹۷۹) و همچنین برای بررسی میزان کلروفیل و کارتنوئید نیز از روش آرنون (۱۹٤۹) استفاده شد.

داده‌ها با استفاده از تبدیل جذری $\sqrt{X + ۰/۵}$ نرمال شدند. سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در آرایش فاکتوریل و ٤ تکرار صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد (سلطانی، ۱۹۹۸).

نتایج و بحث

نتایج مربوط به جنین‌زایی رویشی: نتایج به‌دست آمده از تجزیه آماری نشان داد که بین غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک و همچنین ریزنمونه‌های مختلف هویج از نظر میزان جنین‌زایی اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱).

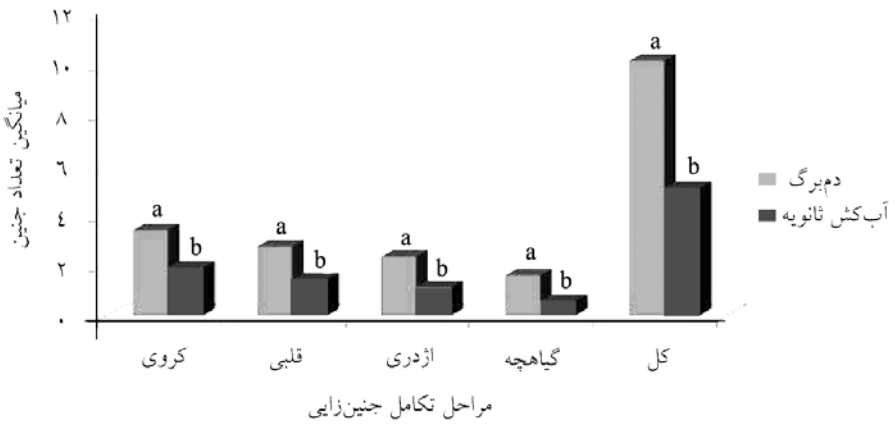
جدول ۱- تجزیه واریانس مراحل مختلف تکامل جنین‌زایی ریزنمونه‌های هویج براساس میانگین مربعات در تیمارهای میلی‌مولار اسید سالیسیلیک.

منبع تغییرات	درجه آزادی	جنین کروی	جنین قلبی	جنین اژدری	گیاهچه	کل جنین‌ها
ریزنمونه	۱	٦۱/۵**	٤۵/۹**	٤٤/۰۵**	۳۵/۱۵**	۱۷٤/٤**
تیمار	٤	۲۳۷/۰۸**	۱٤٦/۷**	۹۹/٦**	۳۷/۲۹**	۵٤۱/۱۷**
ریزنمونه × تیمار	٤	۲۲/۱**	۱۵/۹**	۱٤/۹**	۱۱/۰۹۷**	٦۰/۸۱**
خطا	۱۰۰	۰/۸۱	۰/۸٦	۰/۷۷	۰/٤۷	۱/۷٦
C.V٪		۲٦/۱	۲۰/۵	۱۸/۹	۲۲/۸	۲۰/۳

** (P<۰/۰۱)، * (P<۰/۰۵)، ns معنی‌دار نیست.

نتایج نشان می‌دهد بین دو ریزنمونه به‌کار رفته در محیط کشت یکسان تحت‌تیمار مشابه، ریزنمونه دم‌برگ در تمامی مراحل تکامل دارای بیش‌ترین میزان جنین‌زایی می‌باشد (شکل ۱).

در این پژوهش جنین‌زایی رویشی دم‌برگ هویج به‌صورت القای مستقیم سلول‌ها و در بافت آب‌کش ثانویه ریشه هویج به‌صورت غیرمستقیم انجام شد. در القای مستقیم، سلول‌هایی که در اصل قابلیت جنین‌زایی را دارند تحت‌تأثیر هورمون‌ها و یا شرایط محیط کشت، جنین‌زا می‌شوند که در این حالت تغییر در قابلیت توانایی جنین‌زایی در سلول‌ها در سطح مولکولی در سلول‌هایی مانند بافت‌های مریستمی و جوان، جنین‌های رویشی و یا زایشی نابالغ، مشاهده گردید. در انواع غیرمستقیم سلول‌های تمایزیافته پس از طی مرحله حد واسط نامتمایز و پس از آن کالوس‌دار و جنین‌دار می‌شوند (مشایخی، ۲۰۰۸؛ جورج و همکاران، ۲۰۰۸).



شکل ۱- مقایسه میانگین تعداد جنین‌های تولید شده در مراحل مختلف تکامل ریزنمونه‌های مختلف هویج در مرحله ظهور تحت‌تیمار اسید سالیسیلیک.

با توجه به جدول مقایسه میانگین (جدول ۲)، بیش‌ترین میزان جنین‌های سوماتیکی در مراحل تکاملی جنین‌زایی زمانی به‌دست آمد که غلظت اسید سالیسیلیک ۰/۵ میلی‌مولار بود.

جدول ۲- مقایسه میانگین جنین‌های ایجاد شده در مراحل مختلف جنین‌زایی تحت غلظت میلی‌مولار اسید سالیسیلیک.

تیمار (میلی‌مولار)	کروی	قلبی	اژدری	گیاهچه	کل جنین
۰	٦/٧[a]	٥/٤٧[a]	٤/٥٨[a]	٣/١٧[a]	٢٠/٠٢[a]
٠/٥	٦/٨[a]	٥/٥٩[a]	٤/٧٥[a]	٣/٢٢[a]	٢٠/٤[a]
١/٥	١/٢١[b]	١/٠١[b]	٠/٩٣[b]	٠/٦٣[b]	٣/٧٨[b]
٢	٠/٥[c]	٠/٥[c]	٠/٥[b]	٠/٥[b]	٢[c]
٣	٠/٥[c]	٠/٥[c]	٠/٥[b]	٠/٥[b]	٢[c]
LSD	٠/٤٧	٠/٥٣٢	٠/٥٠٣	٠/٣٩٣	١/٥١

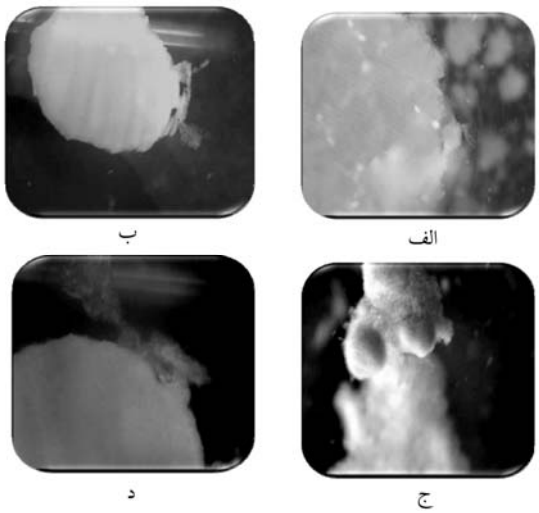
* اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ٠/٠١ ندارند.

** اعداد داخل جدول جذر اعداد اصلی به‌علاوه ٠/٥ می‌باشند.

اگرچه اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد و ٠/٥ میلی‌مولار وجود ندارد اما در مقایسه با سایر تیمارها بیش‌ترین جنین‌زایی رویشی در این تیمار مشاهده گردید. در غلظت‌های بالاتر از ٠/٥ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک از جنین‌زایی کاسته و یا به‌طورکلی ممانعت‌شده بود. که می‌توان اظهار داشت غلظت‌های بالاتر اسید سالیسیلیک تأثیر بازدارنده‌ای بر جنین‌زایی می‌گذارد، همان‌طورکه در شکل ۲ نشان داده شده، نه تنها ریزنمونه‌ها در مرحله القا در این تیمارها کالوس‌دار نشدند بلکه هیچ جنینی در این غلظت‌ها نیز متمایز نگردید. نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مشابه نتایج پژوهش‌های راستان و همکارانش (١٩٨٩) بر روی هیپوکوتیل هویج بود. در طی پژوهش‌های آن‌ها غلظت‌های بالا اسید سالیسیلیک سبب کاهش جنین‌زایی شده بود. ارتباطی که بین این پدیده (نبود جنین‌زای در غلظت‌های بالا) ارایه شد، بیانگر سنتز زیاد اتیلن تحت این شرایط بود. راستان و همکاران (١٩٨٩) در طی مشاهده‌های خود گزارش کرد که با بالا رفتن غلظت اسید سالیسیلیک نه تنها جنین‌زایی انجام نمی‌شود بلکه ازآن ممانعت می‌شود. او دلیل آن را سنتز زیاد اتیلن در محیط دانست و به عقیده نام‌بردگان غلظت‌های پایین اسید سالیسیلیک سبب توقف سنتز اتیلن می‌شود در حالی‌که غلظت‌های بالاتر سبب سنتز بیش‌تر آن می‌گردد و از این طریق است که بر جنین‌زایی تأثیر می‌گذارد. بر طبق پژوهش‌های تیزات و موراسیگ (١٩٧٧)، اتیلن سبب کاهش جنین‌زایی رویشی در ریزنمونه‌های مختلف هویج می‌شود و همچنین از باززایی تنباکو (هکستر و همکاران، ١٩٨١) نیز ممانعت می‌کند. طی بررسی‌هایی گزارش گردید که ممانعت‌کننده‌های سنتز اتیلن شامل نیترات نقره، کلرید کبالت، اسید سالیسیلیک در محیط کشت سبب بالا رفتن جنین‌زایی رویشی و جنین‌زایی ثانویه در ریزنمونه‌های گرفته شده از قهوه گردید (کومار و همکاران، ٢٠٠٧).

پژوهش‌های انجام شده در گلابی نشان داد اسید سالیسیلیک سبب تغییر فعالیت آنزیم تبدیل‌کننده ۱- آمینو سیکلو پروپان ۱- کربوکسیک اسید[1] به اتیلن می‌شود واز این طریق از سنتز اتیلن جلوگیری می‌کند (کویرز و همکاران، ۲۰۰۱).

در پژوهش جیان و همکاران (۲۰۰۱) اسید سالیسیلیک با غلظت‌های کم‌تر از ۲۰۰ میکرومولار باعث افزایش جنین‌زایی درگون می‌شود. افزایش جنین‌زایی هم‌زمان با افزایش سطح H_2O_2 درونی است افزایش سطح آندوژنی H_2O_2 سبب ممانعت فعالیت آسکوربیک پراکسیداز[2] و کاتالاز[3] می‌شود و از این طریق احتمالاً باعث افزایش جنین‌زایی می‌شود. آسکوربیک پراکسیدازها و کاتالازها موادی هستند که سبب حذف H_2O_2 گیاه می‌شوند و از این طریق سبب از بین رفتن شرایط تنش می‌شود، جنین‌زایی رویشی فرآیندی است که تحت شرایط تنش بیش‌تر القا می‌شود بنابراین از بین رفتن این شرایط سبب کاهش جنین‌زایی می‌گردد.



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک بر جنین زایی رویشی.

(الف) مرحله القا جنین‌زایی ریزنمونه آب‌کش ثانویه هویج در محیط کشت B_5 دارای ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک. (ب) مرحله القا و تولید نکردن کالوس در ریزنمونه تیمار شده با غلظت بیش از ۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک. (ج) جنین‌های ایجاد شده در نمونه‌های آب‌کش ثانویه هویج در محیط B_5 حاوی ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک در مرحله ظهور. (د) نبود جنین‌زایی در غلظت‌های بالاتر از ۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک.

1- ACC
2- APX
3- CAT

تأثیر اسید سالیسیلیک بر تشکیل رنگیزه‌ها درون اندام مورد کشت و جنین‌های رویشی: علاوه‌بر بررسی جنین‌زایی، میزان رنگ‌دانه‌های تولید شده در طی جنین‌زایی تحت‌تأثیر اسید سالیسیلیک و رابطه بین تشکیل جنین و سنتز رنگ‌دانه‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳). طبق نتایج به‌دست آمده، نوع ریزنمونه هیچ تأثیری بر میزان تحت‌تأثیر نوع ریزنمونه می‌باشد به‌طوری‌که میزان کارتنوئید موجود در جنین‌های به‌دست آمده از ریزنمونه آب‌کش ثانویه هویج در مقایسه با دم‌برگ رنگیزه‌های سنتز شده به‌جز در مورد رنگیزه کارتنوئید نداشت، نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین نشان داد میزان رنگیزه کارتنوئید به مراتب بیش‌تر بود (شکل ۳- ب).

نتایج به‌دست آمده از بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر میزان رنگیزه‌های درونی جنین‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطوح مختلف تیمار اسید سالیسیلیک اعمال شده می‌باشد (جدول ۳). به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان رنگیزه‌ها در غلظتی تولید شده بود که بیش‌ترین جنین تولید کرده بود. که می‌توان آن را نتیجه اتوتروف شدن نمونه‌ها بعد از جنین‌زایی رویشی دانست. این مشاهده‌ها با پژوهش‌های مشایخی مبنی بر افزایش میزان رنگیزه‌ها همگام با افزایش جنین‌زایی رویشی هویج مشابه می‌باشد (مشایخی، ۲۰۰۸).

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک بر حسب میلی‌مولار بر میزان رنگ‌دانه‌های درون جنین‌ها.

منبع تغییرات	درجه آزادی	آنتوسیانین	کلروفیل a	کلروفیل b	کل کلروفیل	کارتنوئید
ریزنمونه	۱	۰/۰۰۰۵^{ns}	۰/۰۹۷^{ns}	۰/۰۴۶^{ns}	۰/۵۴^{ns}	۱۳/۸۴**
تیمار	٤	۰/۱۷**	۳/٦۲**	۸/٦۰۵**	٦۰/۳**	۱۰۹/۲۹**
ریزنمونه × تیمار	٤	۰/۰۰۰۵۳^{ns}	۰/۰۹٦^{ns}	۰/۰۲۲^{ns}	۰/۳۷^{ns}	۷/۲**
خطا	۱۱۰	۰/۰۰٦	۰/۰۲	۰/۰۵۸	۰/۱۱۰۹	۰/۵۷
C.V (درصد)		٤/۷۸	۲۳/۵	۲۷/۹۷	۲۸/۸	۳۷/۹۲

** (P<۰/۰۱)، * (P<۰/۰۵)، ^{ns} معنی‌دار نیست.

محیط کشت $B_۵$ نقش مهمی در ساخت کلروفیل داشته و سبب می‌شود 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 یابد و در نهایت، باعث ظهور جنین‌هایی با رنگ‌دانه‌های قرمز در گیاهچه‌های حاصل گردد (مشایخی، ۲۰۰۸) (شکل ۲). به عقیده جان و همکاران (۱۹۹۵) علایم تجمع قند در جنین و گیاهچه‌های به‌دست آمده از آن به‌صورت رنگ‌دانه‌های قرمز یا آنتوسیانین‌ها در آن‌ها مشخص می‌شود. میزان کلروفیل در پژوهشی که توسط مهارک روی گندم و انبه انجام شد با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید کاهش پیدا کرد این در مورد کارتنوئید برعکس بود یعنی با افزایش غلظت SA میزان کارتنوئید افزایش پیدا کرد (مهارکار و همکاران، ۲۰۰٦).

احتمالاً تأثیری که سالیسیلیک روی رنگیزه‌ها می‌گذارد ناشی از تأثیر آن روی اتیلن است. به‌طوری‌که شرایط استرس سبب تشدید اتیلن در محیط می‌شود و این هورمون سبب کاهش سنتز رنگیزه‌های گیاه می‌شود. وجود اسید سالیسیلیک با غلظت مناسب در محیط کشت سبب کاهش اثرات تنش‌زا می‌شود و از طریق کاهش بیوسنتز اتیلن سبب افزایش رنگیزه‌های داخلی می‌شود از جمله پژوهش‌هایی که در آن اسید سالیسیلیک به‌عنوان هورمون افزایش‌دهنده رنگیزه‌های درونی معرفی شده می‌توان به آزمایش‌های دیسون و فریمن اشاره کرد به‌طوری‌که آن‌ها دریافتند که اسید سالیسیلیک یک تنظیم‌کننده رنگ‌دانه‌ها در شرایط تنش می‌باشد. آن‌ها عنوان کردند که اسید سالیسیلیک تأثیراتش را از طریق تأثیری که بر فعالیت هورمون‌های تنش‌زا مانند اتیلن و آبسیزیک اسید دارد، می‌گذارد (دیسون و فریمن، ۱۹۷٦). ایتای و بن- زیان (۱۹۷۳) در پژوهشی عنوان کردند که در شرایط تنش از میزان سایتوکنین کاسته شده و به این دلیل باعث زردی و رنگ‌پریدگی اندام‌های گیاهی می‌شود. اسید سالیسیلیک به‌عنوان ماده‌ای که تحت شرایط تنش سنتز می‌شود باعث ایجاد اعتدال در میزان رنگیزه‌ها در گیاه می‌گردد (اسبورن، ۱۹٦۵).

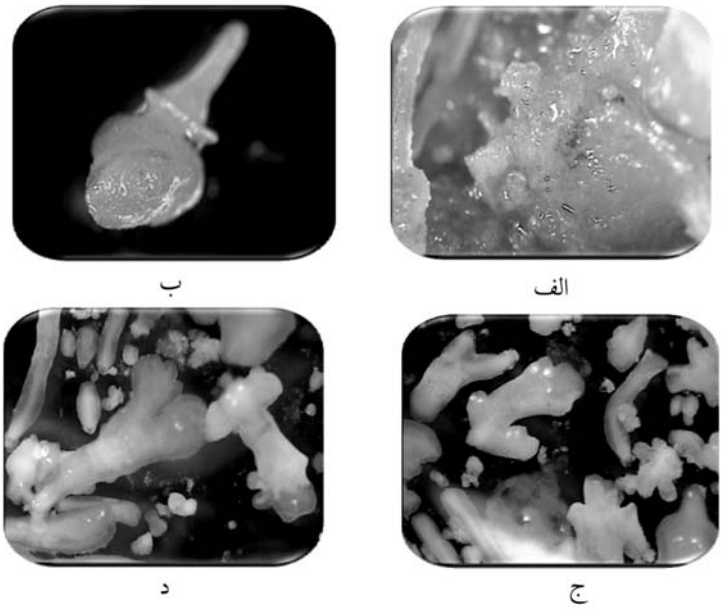
در تمامی این پژوهش‌ها حضور سالیسیلیک اسید در غلظت مناسب باعث اعتدال در رنگیزه‌های درونی شده بود، که تأثیر خود را از طریق تنظیم هورمون‌هایی مانند اتیلن می‌گذارد. وجود مکانیسم بسیار پیچیده‌ای که هورمون‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی دارند باعث شده که تا به امروز نقاط مبهم فراوانی باقی بماند.

جدول ٤- نتایج مقایسه میانگین تیمار الیسیلیک اسید میلی‌مولار و نوع ریزنمونه بر میزان رنگیزه‌های داخلی با استفاده از آزمون LSD در سطح ۱ درصد (فاز رئالیزاسیون).

		کلروفیل a	کلروفیل b	کل کلروفیل	آنتوسیانین	کارتنوئید
ریزنمونه	دم‌برگ	۰/۹۳^{a}	۰/۷۵^{a}	۲/۱۱^{a}	۰/۵٦^{a}	۱/٦^{b}
	فلوئم	۰/۹٦^{a}	۰/۸۱^{a}	۲/۲۵^{a}	۰/۵۷^{a}	۲/۳^{a}
	LSD	۰/۰۹	۰/۰٦	۰/۲۲	۰/۰۰۹۵	۰/۲۷۳
اسید سالیسیلیک (میلی‌مولار)	۰	۱/۰۰۵^{b}	۱/۲۷^{b}	۳/۰۵^{b}	۰/٦٤^{b}	۲/۹۳^{b}
	۰/۵	۱/۳۵^{a}	۱/۸۵^{a}	٤/۵۷^{a}	۰/٦۷^{a}	۵/۳^{a}
	۱/۵	۰/۵٤^{c}	۰/٦۲^{c}	۱/۲۹^{c}	۰/۵۲^{c}	۰/٦۲^{c}
	۲	۰/۵^{c}	۰/۵^{c}	۱^{c}	۰/۵^{d}	۰/۵^{c}
	۳	۰/۵^{c}	۰/۵^{c}	۱^{c}	۰/۵^{d}	۰/۵^{c}
	LSD	۰/۱۰۵	۰/۱۵۲	۰/۳٦	۰/۰۱۵	۰/٤۲

* اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ ندارند.

** اعداد داخل جدول جذر اعداد اصلی به‌علاوه ۰/۵ می‌باشند.



شکل ۳- تشکیل رنگیزه‌های مختلف در طی روند جنین‌زایی رویشی درون اندام مورد کشت و جنین رویشی.

(الف) رنگیزه آنتوسیانین در جنین‌های تشکیل شده از دم‌برگ تیمار شده با ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک.

(ب) رنگیزه کارتنوئید در جنین‌های تشکیل شده از ریزنمونه آب‌کش ثانویه ریشه هویج تیمار شده با ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک. (ج) رنگیزه کارتنوئید در جنین‌های به‌دست آمده از دم‌برگ هویج تیمار شده با ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک.

(د) رنگیزه کلروفیل در جنین‌های تشکیل شده از ریزنمونه دم‌برگ تیمار شده با ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک.

منابع

1.Akinwunmi, O. 2001. The plant Defense Activator Acibenzolar-S-Methyl Primes Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] Seedlings for Rapid Induction of Resistance, Physiol. Mol. Plant Pathol. 58: 199-208.

2.Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidae in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15.

3.Chalker-Scott, L. 1999. Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Response, Photochem and Photobiol. 70: 1-9.

4.Duysen, M.E. and Freman, T.P. 1976. Promotion of plastid pigment accumulation in water stressed what leaf section by hormone treatment. Am. J. Bot. 63: 8. 1134-1141.

5.Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.

6.Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 2007. Free radicals in biology and medicine ,4th edition, Oxford University Press, Oxford.
7.Huxter, T.J., Thorpe, T.A. and Reid, D.M. 1981. Plant. Physiol. 53: 319-326.
8.Itai, C. and Ben-Zioni, A. 1973. short and long term effect of high temperatures (47-49°c) on tobacco leaves, II. O_2 uptake and amylolytic activity. Physiol. Plant, 28: 490-492.
9.Jian-Ping, L., Shao-Tong, J. and Li-Jun, P. 2001. Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of Astragalus adsurgens Pall: relationship with H_2O_2 production and H_2O_2-metabolizing enzyme activities, Plant Sci. 161: 125-132.
10.John, A., Drake, P. and Selby, C. 1995. Somatic embryogenesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). In Jan, M.S., Gupta, P.K. and R.J. Newton (eds.), Somatic Embryogenesis in woody Plants, Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 3: 125-143.
11.Joseph, B., Jini, D. and Sujatha, S. 2010. Insight into the role of exogenous salicylic acid on plants grown under salt environment. Asian J. Crop Sci. 2: 226-235.
12.Komaraiah, P., Jogeswar, G., Ramakrishn, S.V. and Kavikishor, P.B. 2004. Acetylsalicylic Acid and Ammonium Induced Somatic Embryogenesis and Enhanced Polumbagin Prodduction in Suspension Cultures of *Plumbago Rosea* L. In Vitro Cell & Developmental Bio-Plant, 40: 2: 230-234.
13.Kumar, V., Ramakrishna, A. and Ravishankar, G.A. 2007. Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora* P ex Fr. In Vitro Cellular & Developmental Bio-Plant, 43: 6. 602-607.
14.Mashayekhi, K. 2008. Plant somatic Embryogenesis. Makhdum-Gholi Feraghi Press, 483p. (In Persian)
15.Meijer, E.G.M. and Brown, D.C.W. 1988. Inhibition of somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* by aminoethoxyvinylglycine, amino-oxyacetic acid, 2, 4-dinitrophenol and salicylic acid at concentrations which do not inhibit ethylene biosynthesis and growth. J. Exp. Bot. 39: 263-270.
16.Nissen, P. 1994. Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. Plant Physiol. 92: 397-403.
17.Osborn, D.J. 1965. Interactions of hormonal substances in the growth and development of plants. J. Sci. Agric. 16: 1-13.
18.Quiroz-Figueroa, F.R., Fuentes-Cerda, C.F.J., Rojas-Herrera, R. and Loyola-Vargas, V.M. 2001. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. Plant Cell Rep. (In Persian)
19.Raskin, I. 1992a. Role of salicylic acid in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 439-463.

20.Raskin, I. 1992b. Salicylate, a new plant hormone. Plant Physiol. 99: 799-803.
21.Reinert, J. 1959. Ueber die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. Plant. 53: 318-333.
22.Roustan, J.P., Latche, A. and Fallow, J. 1989. Inhibition of Ethylene Production and Stimulation of Carrot Somatic Embryogenes by Salicylic Acid. Plant Cell Rep. 8: 182-185.
23.Soltani, A. 1998. Application of in statistical analysis (for fields in agriculture). Mashhad Univ. Press, 166p. (In Persian)
24.Verpoorte, R., Contin, A. and Memelink, J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites, Phytochem. 1: 13-25.
25.Wanger, G.J. 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acid, and anthocyaninin protoplast. Plantphysiology, 64: 88-93.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Plant Production, Vol. 18(3), 2011
www.gau.ac.ir/journals

The effects of salicylic acid on induction somatic embryogenesis and plant pigments carrot of root secondary phloem and petiole explant in B_5 medium

S. Hosseini[1] and *K. Mashayekhi[2]
[1]M.Sc. Student, Dept. of Horticultural, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associate Prof., Dept. of Horticultural, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
Received: 2010/05/23; Accepted: 2011/07/24

Abstract

Salicylic acid play an important role in plants physiological processes. In this research the effect of Salicylic Acid on induction of somatic embryogenesis and plant pigments synthesis in the phloem and petiole explants of carrot in the B_5 medium was investigated. We added treatments with 0, 0.5, 1.5, 2 and 3 mM to culture medium by experimental base on the randomized design to investigate the effect of salicylic acid on somatic embryogenesis. Result showed that somatic embryogenesis in 0.5 mM treatment was more than other treatments and the higher concentration (1.5, 2, 3 Mm) reduced somatic embryogenesis. Also the effect of salicylic acid on chlorophyll, Anthocyanin, caratonoid synthesis of explants at realization phasein culture medium was studied. The maximum amount of Caratonoid, Chlorophyll and Anthocyanin was observed at 0.5 mM that was significant between treatments ($P<0.01$). By more than 0.5 mM concentration, both pigment synthesis and embryogenesis were decreased. Compression among embryogenesis of different carrot explants showed that embryogenesis in petiole explants was more than phloem. Therefore, it could be concluded that probably salycilic acid have different physiological effect at different concentration.

Keywords: Petiole, Phloem, Chlorophyll, Anthocyanin, Caratonoid

* Corresponding Author; Email: kambizm@yahoo.com