مقاله تحقیقی

اثر آسکوربیک اسید بر کشت در شیشه گیاه کلزا .(*Brassica napus* L)

احمد مجد*[۱]، الهام پورغلامی[۲]، فیروزه چلبیان[۱]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

* **مسؤول مکاتبات**: احمد مجد، تهران، میدان هروی، خیابان مکران جنوبی، خیابان بوستان دهم، دانشکده علوم زیستی، پست الکترونیکی: ahmad_majd2005@yahoo.com

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی

تاریخ دریافت:۸۹/۱۱/۳ تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۳۰

چکیده

یکی از روش‌های نوین برای تولید بیشتر و بهتر محصولات گیاهی، کشت بافت گیاهی است که با عنوان کشت سترون هم مطرح می‌شود. در سال‌های اخیر، آسکوربیک اسید به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در کشت بافت گیاهان مورد توجه بوده و گزارش‌های علمی زیادی در مورد اثر آن بر رشد، نمو و تکوین گیاهان در شرایط گلخانه و نیز کشت در شیشه، منتشر شده است. در پژوهش حاضر، نقش غلظت‌های ۵۰،۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر این اسید، بر کشت در شیشه گیاه کلزا مورد بررسی قرار گرفته است. محیط کشت مورد استفاده، محیط MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN در pH: 5.8 بوده است. جداکشت‌ها، قطعات کوچکی از ریشه، محور زیر لپه، برگ‌های لپه‌ای و مریستم راسی تهیه شده از دانه‌رست‌های سترون بوده‌اند. نتایج آزمایش‌ها نشان داد که غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید، ریشه‌زایی و تمایز اندام ریشه را تحریک می‌کند؛ به طوری که در همه جداکشت‌های تحت این تیمارها، ریشه‌ها زودتر از نمونه‌های کنترل تشکیل می‌شوند. بیشترین رشد ریشه، در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید بود، اما غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر این اسید، بر اندام‌زایی اثر بازدارنده داشت و موجب قهوه‌ای شدن جداکشت‌ها شد. بهترین جداکشت‌ها برای ریزازدیادی گیاه کلزا مریستم راسی و سپس برگ‌های لپه‌ای بودند. برای القای کالوس‌زایی و بررسی اثر آسکوربیک اسید بر آن، از محیط کشت MS با هورمون‌های 2,4-D و KIN استفاده شد. در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید، بالاترین درصد کالوس‌زایی مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: آسکوربیک اسید، کشت در شیشه، کلزا، آنتی‌اکسیدان

مقدمه

آسکوربیک اسید یا ویتامین C از ویتامین‌های محلول در آب و یک متابولیت اولیه مهم در گیاهان است. این ویتامین در اکثر فرآورده‌های گیاهی، به‌خصوص در مرکبات، گیاهان سبز، گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی به مقدار فراوان وجود دارد. در شرایط طبیعی، آسکوربیک اسید به شکل احیا شده وجود دارد که نتیجه فعالیت دو آنزیم مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز و دی‌هیدرو آسکوربات

ردوکتاز است. اکسیداسیون آن در آغاز باعث تشکیل رادیکال مونو دهیدروآسکوربات (MDA) می‌شود که می‌تواند مجدداً به شکل آسکوربات و دی-هیدروآسکوربات (DHA) تغییر ساختار یابد. این ترکیب تقریباً در تمام بخش‌های سلولی، همچون سیتوزول، کلروپلاست‌ها، واکوئل‌ها، میتوکندری‌ها و دیواره‌های سلولی یافت می‌شود. این انتشار گسترده، نقش این ماده را در پهنه وسیعی از فرآیندهای زیستی نشان می‌دهد. فرم احیا شده آسکوربیک اسید، به مقدار زیادی در برگ‌ها و کلروپلاست‌ها وجود دارد که احتمالاً به نقش آن در فتوسنتز باز می‌گردد (۳). آسکوربیک اسید به عنوان یک آنتی-اکسیدان در گیاهان مطرح می‌شود که در ارتباط با دیگر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بوده و با پاک‌سازی اشکال اکسیژن واکنشی، گیاه را در برابر تنش‌های اکسیداتیو حفاظت می‌کند (۴). گلوتاتیون دیگر آنتی‌اکسیدان مهم سلول گیاهی به عنوان دهنده الکترون در احیای DHA عمل کرده با هم چرخه-آسکوربات- گلوتاتیون را شکل می‌دهند (۵ ،۴). آسکوربیک اسید در بیوسنتز دیواره سلولی، متابولیت‌های ثانویه و هورمون‌های گیاهی، فتوسنتز، تقسیم سلولی و رشد، دخالت دارد؛ به عنوان کوآنزیم برای عملکرد برخی آنزیم‌ها لازم است و اخیراً اثر آن در رشد و نمو و تکوین گیاهان در شرایط گلخانه‌ای و همچنین کشت در شیشه، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۷ ،۶ ،۴ ،۳).

آسکوربیک اسید می‌تواند سیکل‌سلولی، تقسیم سلولی و رشد سلولی را در گیاهان تعدیل کند و بدین ترتیب، در رشد و نمو گیاهی درگیر شود. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که هر جا فعالیت میتوزی زیاد باشد، مقدار آسکوربیک اسید هم زیاد است و حضور آن برای عبور از مرحله G به S در چرخه سلولی، ضروری است. این ماده، با کوتاه کردن زمان G و تحریک ورود به مرحله S، باعث کوتاه شدن زمان چرخه سلولی شده و با دخالت در این چرخه، باعث افزایش رشد سلول گیاهی می‌شود (۷). در گیاهان جهش‌یافته و یا تراریخت که میزان آسکوربیک اسید درون‌زاد (اندوژن) کاهش یافته باشد، تقسیم سلولی و رشد ساقه گیاه، کاهش می-یابد. در سلول‌های BY-2 تنباکو، غنی‌کردن سلول-ها با آسکوربیک اسید، تقسیم سلولی را تحریک می-کند (۸). آسکوربیک اسید در دیواره سلول، با افزایش رادیکال هیدروکسیل و ایجاد تنش اکسیداتیو بر پلی‌ساکاریدهای دیواره، باعث نرم شدن آن می‌شود. همچنین بر فعالیت پراکسیدازهای ترشحی که سبب کاهش رادیکال‌های فنلی می‌شوند، اثر کرده و در نهایت باعث سخت شدن دیواره می‌شود (۹ ،۳). گیاهان تراریخت واجد کاهش مقدار AS، تغییراتی در دیواره، از جمله کاهش مقدار سلولز را نشان می-دهند (۱۰).

در گیاهان عالی، برای داشتن تولیدمثلی موفق و بقای گیاه، انتقال از مرحله رویشی به مرحله زایشی، امری بسیار مهم و حیاتی است و زمان گل‌دهی توسط عوامل داخلی و خارجی متعددی کنترل می-گردد. آسکوربیک اسید از طریق یک شبکه پیچیده هدایت پیام در ارتباط با زمان گل‌دهی، پیری و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی فعالیت می‌کند و به عنوان یک پیام داخلی در جهت پاسخ به عوامل خارجی عمل کرده، با تنظیم نمو گیاهی، همچون انتقال از مرحله رویشی به مرحله زایشی، به توازن و ثبات گیاه کمک می‌کند؛ به طوری که گیاهان جهش یافته آرابیدوپسیس (vtc) که میزان آسکوربیک اسید درون‌زاد آن‌ها کمتر از نوع وحشی است، در فتوپریود روز بلند، گل‌دهی سریع‌تر از نوع وحشی دارند؛ اما با افزودن آسکوربیک اسید به صورت برون‌زاد، این روند گل‌دهی به تأخیر می‌افتد (۱۱).

آسکوربیک اسید به عنوان کوفاکتور مهمی در جهت بیوسنتز بسیاری از هورمون‌ها مانند اتیلن، ژیبرلیک اسید و آبسیزیک اسید، دخالت می‌کند و با انتقال پیام، در میزان این هورمون‌ها در سلول و گیاه مؤثر بوده، می‌تواند بر فرآیندهای نموی مانند پیری اثر بگذارد. چنان‌که در همان گیاهان تراریخت آرابیدوپسیس (*Arabdiopsis thaliana*) به دلیل مقدار کم آسکوربیک اسید، میزان هورمون ژیبرلیک اسید که بازدارنده پیری در گیاه است کاهش می‌یابد و بدین ترتیب، روند گل‌دهی، تسریع و پیری زود-رس، واقع می‌گردد (۱۲).

آسکوربیک اسید در فتوسنتز نیز نقش دارد و در

شرایط درون شیشه (*in vitro*) به‌عنوان یک دهنده الکترون قوی، شناخته می‌شود. و پژوهش‌های سال-های اخیر، بر این امر اشاره دارند که نوع اکسید شده آن، مونودهیدروآسکوربیک اسید، به عنوان پذیرنده الکترون از PSII در شرایط در شیشه عمل می‌کند (۱۳ ،۴). یکی از روش‌های نوین در تکثیر گیاهان، کشت سلول و بافت گیاهی است که از آن تحت عنوان کشت در شیشه یا کشت سترون یاد می‌شود. امروزه، کشت بافت گیاهی، ابزار مهمی در مطالعات پایه و کاربردی محسوب می‌شود، به طوری‌که از طریق آن می‌توان نسبت به تکثیر گیاهان مختلف، اعم از صنعتی، دارویی، مرتعی و زراعی، اقدام نمود. در پژوهش حاضر، اثر آسکوربیک اسید بر کشت بافت گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) که یک گیاه دانه روغنی و دارای ارزش اقتصادی بسیار بالا است، مورد توجه قرار گرفته است تا تاثیر آن بر کالوس-زایی، اندام‌زایی و در نهایت، باززایی گیاه کلزا مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

ضدعفونی کردن بذرها

ابتدا بذرهای کلزا رقم Hyola 401 تهیه شده از مرکز توسعه کشت دانه‌های روغنی، با آب‌جاری و مایع شوینده، کاملاً شستشو شدند. سپس در زیر هود لامینار، بذرها با استفاده از اتانول ۷۰ درصد، به مدت یک دقیقه و پس از آن با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه، سترون گردیدند و در نهایت، سه مرتبه با آب مقطر سترون، کاملا شسته شدند تا اثر مواد ضدعفونی کننده از بین برود. بذرهای ضدعفونی شده، در محیط کشت MS فاقد ویتامین، کشت شدند و از دانه رست‌های ده روزه حاصل از آن‌ها برای تهیه جداکشت‌ها استفاده شد.

تهیه جداکشت‌ها

دانه رست‌های سترون، روی کاغذ صافی سترون قرار داده شد و با کمک اسکالپل، از بخش‌های ریشه، محور زیر لپه (هیپوکوتیل)، برگ‌های لپه‌ای و مریستم راسی ساقه، قطعاتی با اندازه ۳-۲ میلی‌متر به عنوان جداکشت تهیه گردید. این جداکشت‌ها در محیط‌های کشت دارای آسکوربیک اسید ۰ ، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. سپس درب پتری‌ها کاملا با پارافیلم بسته شد و نمونه‌ها در ژرمیناتور با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

تهیه محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده، محیط MS دارای هورمون‌های IAA (ایندول استیک اسید) و KIN (فورفوریل آمینو پورین) به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر بود. به دلیل تخریب آسکوربیک اسید در دمای بالا، پس از اتوکلاو کردن محیط کشت و سرد شدن آن تا دمای حدود ۴۵- ۴۰ درجه سانتی‌گراد، از محلول پایه تهیه شده آسکوربیک اسید، غلظت‌های مورد نیاز برای مقادیر ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، برداشته شد و با کمک فیلتر سرنگی به محیط‌های کشت افزوده شد. محیط کشت در شرایط سترون در درون پتری‌ها توزیع شد و پس از جامد شدن محیط، درب پتری‌ها با پارافیلم کاملا مسدود گردید.

برای بررسی اثر آسکوربیک اسید بر کالوس‌زایی، از محور زیر لپه (هیپوکوتیل) قطعاتی به عنوان جداکشت تهیه شد و در محیط کشت MS دارای هورمون‌های 2,4-D (۲ و۴- دی‌کلرو، فنوکسی-استیک اسید) و KIN با نسبت برابر ۱ میلی‌گرم در لیتر و غلظت‌های ۰ ، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید کشت گردید. برای هر غلظت از آسکوربیک اسید، ۳ پتری دیش به عنوان تکرار و برای هر پتری، ۵ تا ۶ قطعه جداکشت، در نظرگرفته شد. پس از کالوس‌زایی جداکشت‌ها، برای هر غلظت آسکوربیک اسید از هر پتری، ۳ کالوس با اندازه متوسط انتخاب و با ترازو توزین شد و وزن تر آن‌ها ثبت گردید. سپس کالوس‌های انتخاب شده، به مدت ۲۴ ساعت در آون قرار داده شد و پس از توزین، وزن خشک آن‌ها ثبت گردید. کالوس‌های حاصل از تیمارهای متفاوت، از نظر درصد کالوس‌زایی، وزن تر و وزن خشک، با هم مقایسه شد.

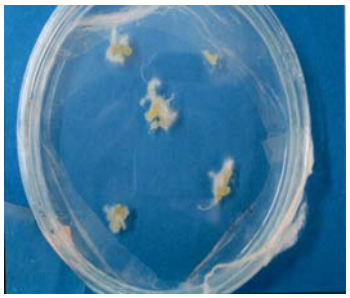
آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (تجزیه واریانس) انجام شد و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید. ملاک استنتاج آماری $P<0.05$ بود.

نتایج

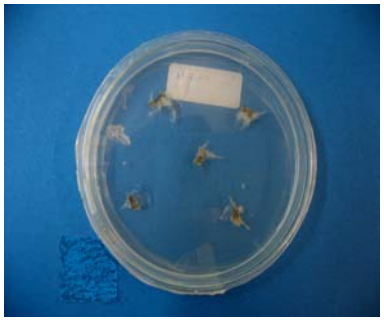
نتایج حاصل از کشت جداکشت‌های ریشه‌ای در غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید

جداکشت‌های ریشه‌ای در تیمار ۵۰ mg/l آسکوربیک اسید، کالوس‌های بسیار کوچکی تشکیل دادند و همزمان با آن، ریشه‌زایی نیز داشتند. ریشه-های تشکیل شده، ظریف و کرک‌مانند بودند (تصویر ۱). به تدریج، کالوس‌زایی افزایش یافت و کالوس‌های کرم‌رنگ و دانه‌دار، کاملاً رشد یافتند. در ادامه روند ریشه‌زایی، تراکم ریشه، بیش از افزایش طول ریشه نمایان بود (تصویر ۱).



تصویر ۱- جداکشت ریشه‌ای درغلظت ۵۰mg/l آسکوربیک اسید.

پس از آن، نمونه‌های شاهد شروع به ریشه‌زایی کردند که ریشه‌زایی در آن‌ها کمتر از تیمار ۵۰mg/l آسکوربیک اسید بود و پس از ریشه‌زایی کالوس‌های بسیار کوچکی نیز تشکیل شد که گسترش نیافتند. در تیمار ۱۰۰ mg/l آسکوربیک اسید هم تقریباً همزمان با نمونه شاهد، کالوس‌های کوچکی، تشکیل شد و سپس، ریشه‌زایی مشاهده شد. ریشه‌های تشکیل شده، تا حدودی رشد طولی داشتند، اما جداکشت‌ها به تدریج قهوه‌ای رنگ می‌شدند (تصویر ۲).



تصویر ۲- جداکشت ریشه‌ای در غلظت ۱۰۰mg/l آسکوربیک اسید.

در تیمار ۲۰۰ mg/l آسکوربیک اسید، کالوس و یا اندامی تشکیل نشد و فقط جداکشت‌ها قهوه‌ای شدند (جدول ۱).

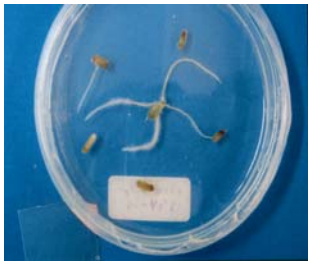
جدول۱- اثر آسکوربیک اسید بر جداکشت‌های ریشه.

نوع جداکشت	غلظت AS Mg/l	نوع کالوس‌زایی	ریشه زایی	رشدطولی‌ریشه‌ها	رشدقطری ریشه‌ها	حالت خاص
قطعات ریشه	۰	بسیار کوچک	متوسط	بسیار کم	---------	----------
	۵۰	سریع- کوچک	قوی	کم	---------	----------
	۱۰۰	بسیار کوچک	ضعیف	بسیار کم	---------	قهوه‌ای شدن
	۲۰۰	-------	--------	--------	---------	قهوه‌ای شدن

نتایج حاصل از کشت جداکشت‌های محور زیر لپه (هیپوکوتیل) در غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید

در جداکشت‌های محور زیر لپه، ابتدا در تیمار ۵۰ mg/l آسکوربیک اسید، ریشه‌زایی شروع شد و ریشه‌های تشکیل شده دارای رشد طولی خوبی بودند. پس از مدتی، ریشه‌های بلند با تارهای کشنده فراوان تشکیل شد. این ریشه‌ها تا حدودی رشد

قطری هم داشتند (تصویر ۳).



تصویر ۳- جداکشت محور زیر لپه‌ای درغلظت ۵۰mg/l آسکوربیک اسید.

پس از آن، نمونه‌های تحت تیمار ۱۰۰ mg/l آسکوربیک اسید، ریشه‌زایی کردند و ریشه‌های تشکیل شده، تا حدودی رشد طولی داشتند. ریشه-زایی در نمونه‌های شاهد، دیرتر از دو تیمار قبلی صورت گرفت. ریشه‌های تشکیل شده، ظریف و کرک مانند بودند و نسبت به دو تیمار قبل، رشد طولی کمتری داشتند. جداکشت‌های محور زیر لپه‌ای در محیط کشت دارای ۲۰۰ mg/l آسکوربیک اسید، قهوه‌ای شدند (تصویر۴، جدول۲).

تصویر ۴- جداکشت محور زیر لپه‌ای در غلظت mg/l ۲۰۰ آسکوربیک اسید.

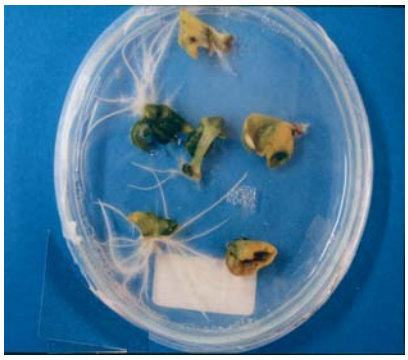
جدول ۲- اثر آسکوربیک اسید بر جداکشت‌های محور زیر لپه‌ای.

نوع جداکشت	غلظت AS Mg/l	نوع کالوس-زایی	ریشه زایی	رشد طولی‌ریشه‌ها	رشدقطری‌ریشه‌ها	حالت خاص
قطعات محور زیر لپه‌ای	۰	---------	کند،ضعیف	بسیار کم	---------	---------
	۵۰	---------	قوی	زیاد	+	---------
	۱۰۰	---------	قوی	زیاد	---------	---------
	۲۰۰	---------	--------	---------	---------	قهوه‌ای شدن

نتایج حاصل از کشت برگ‌های لپه‌ای در غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید

در این جداکشت‌ها کالوسی تشکیل نگردید و مستقیماً ریشه‌زایی صورت گرفت. شروع ریشه‌زایی هم با تیمار ۵۰ mg/l آسکوربیک اسید بود که در آن، ریشه‌ها با رشد طولی سریع و انبوهی از تارهای کشنده تشکیل شدند (تصویر ۵).

با گذشت زمان، ریشه‌ها کاملاً در محیط کشت گسترده شدند. پس از آن، نمونه‌های شاهد، ریشه-زایی کردند و ریشه‌ها رشد طولی کمتری داشتند. در تیمار ۱۰۰ mg/l آسکوربیک اسید، ریشه‌های کرک مانند و ظریف تشکیل شد که البته رشد وگسترش چندانی نشان ندادند.



تصویر ۵- جداکشت برگ لپه‌ای درغلظت ۵۰ mg/l آسکوربیک اسید.

تغییر رنگ تا حدودی در این جداکشت‌ها قابل مشاهده بود. برگ‌های لپه‌ای در ۲۰۰ mg/l آسکوربیک اسید، فقط قهوه‌ای رنگ شدند، ولی اندام‌زایی در آن‌ها مشاهده نگردید (جدول ۳).

جدول ۳- اثر آسکوربیک‌اسید بر جداکشت‌های برگ‌های لپه‌ای.

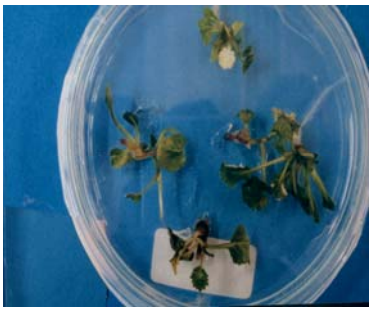
نوع جداکشت	غلظت AS Mg/l	نوع کالوس‌زایی	ریشه‌زایی	رشدطولی‌ریشه ها	رشدقطری‌ریشه ها	حالت خاص
	۰	----------	متوسط	کمی	--------	---------
برگ‌های	۵۰	----------	سریع، قوی	زیاد	+	ساقه و برگ
لپه‌ای	۱۰۰	----------	کند، ضعیف	--------	--------	کمی‌قهوه‌ای
	۲۰۰	----------	----------	--------	--------	قهوه‌ای شدن

پس از واکشت جداکشت‌های برگ‌های لپه‌ای به محیط کشت جدید با همان ترکیب قبلی، در تیمار ۵۰ mg/l از آسکوربیک اسید، اندام‌زایی از نوع ساقه و مدتی پس از آن هم برگ‌زایی مشاهده گردید. این گیاهچه‌های کامل، به درون شیشه دردار با همان ترکیب قبلی محیط کشت منتقل شدند و با گذشت زمان، افزایش رشد ساقه، سطح برگ و گسترش ریشه در آن‌ها آشکار بود (تصویر ۶).

تصویر ۶- نمونه گیاهچه حاصل از کشت برگ لپه‌ای در غلظت 50mg/l آسکوربیک اسید.

نتایج حاصل از کشت مریستم راسی ساقه در غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید

در جداکشت‌های مریستم راسی ساقه، شروع اندام‌زایی با تشکیل ساقه همراه بود. ابتدا در تیمار ۵۰ mg/l آسکوربیک اسید، کالوس‌های شیری رنگ تشکیل شد و تقریباً همزمان با آن، ساقه‌زایی مشاهده گردید. کمی پس از تشکیل ساقه، برگ‌ها هم پدیدار شدند (تصویر۷).



تصویر ۷- جداکشت مریستم راسی در غلظت ۵۰mg/l آسکربیک اسید.

نمونه‌های شاهد و تیمار ۱۰۰mg/l آسکوربیک اسید، کمی پس از تیمار ۵۰mg/l از AS، کالوس-های کرم‌رنگ و اندام ساقه و برگ تشکیل دادند. رشد اندام‌های تشکیل شده، در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید، بیش از سایر تیمارها بود و پس از تشکیل ساقه و برگ، اولین آثار ریشه‌زایی نیز در این تیمار مشاهده گردید و بدین‌ترتیب، گیاهچه-های کامل نوپدید تشکیل گردید (تصویر۷). در تیمار ۱۰۰mg/l آسکوربیک اسید، کمی پس از تیمار ۵۰ mg/l از AS، نمونه‌ها ریشه‌زایی کردند و ریشه-های تشکیل شده، رشد طولی خوبی داشتند. نمونه-های شاهد، دیرتر از دو تیمار قبل ریشه‌زایی کردند و ریشه‌های ظریف و کوچک در آن‌ها تشکیل شد. در تیمار ۲۰۰mg/l آسکوربیک اسید، نمونه‌ها پس از گذشت مدتی، اندام‌زایی از نوع تشکیل ساقه و برگ را نشان دادند که اندام‌های تشکیل شده، بسیار کوچک بودند و رشد چندانی نداشتند (جدول ۴).

جدول ۴- اثر آسکوربیک اسید بر جداکشت‌های مریستم راسی.

نوع جداکشت	غلظت AS Mg/l	نوع‌کالوس زایی	ریشه زایی	رشد طولی ریشه ها	رشدقطری ریشه ها	حالت خاص
	۰	کوچک	ضعیف	کم	--------	تشکیل ساقه و برگ
مریستم	۵۰	سریع- کوچک	قوی	زیاد	+	تشکیل ساقه و برگ
راسی	۱۰۰	کوچک	قوی	زیاد	+	تشکیل‌ساقه‌و برگ
	۲۰۰	-------	--------	-------	-------	--------

نتایج کلی اثر آسکوربیک اسید بر کشت ریز نمونه‌ها

به‌طور کلی، نوع و میزان هورمون‌های به کارگرفته شده در پژوهش حاضر، بیشتر اندام‌زایی را تحریک کرده و همواره، اندام‌زایی مقدم بر کالوس-زایی بوده است. همچنین غلظت ۵۰ و در مواردی، غلظت۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید، بیش از سایر غلظت‌ها و نمونه‌های شاهد، تمایز اندام ریشه را تحریک کرده و سبب افزایش ریشه‌زایی در جداکشت‌ها شده است. غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر این اسید، اثر بازدارنده بر اندام‌زایی و رشد داشته و با وجود این که آسکوربیک اسید خود یک ترکیب آنتی‌اکسیدان است و از قهوه‌ای شدن نمونه‌ها در کشت بافت جلوگیری می‌کند، غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم آن تغییر رنگ نمونه‌ها را تحریک کرده و تمام ریز نمونه‌ها در این غلظت آسکوربیک اسید، قهوه‌ای شده است. در نهایت، با توجه به نتایج این آزمایش‌ها می-توان جداکشت‌های برگ لپه‌ای و مریستم راسی ساقه را به عنوان جداکشت‌های مناسب و غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید را غلظت مناسب برای ریزازدیادی گیاه کلزا معرفی نمود.

انتقال گیاهان نوپدید، از محیط کشت به گلدان

یک ماه پس از اولین واکشت، گیاهچه‌ها به گلدان‌های کوچک از ورمی‌کولیت سترون منتقل گردیدند. این گلدان‌ها در محیط گلخانه با دمای بین ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و دارای نور کافی، نگهداری و به طور متناوب با آب مقطر و محلول غذایی هوگلند آبیاری شدند. گیاهان پس از انتقال، دارای رشد خوبی بودند و انتقال گیاهان به محیط بیرون از محیط کشت، با موفقیت صورت گرفت (تصویر ۸).

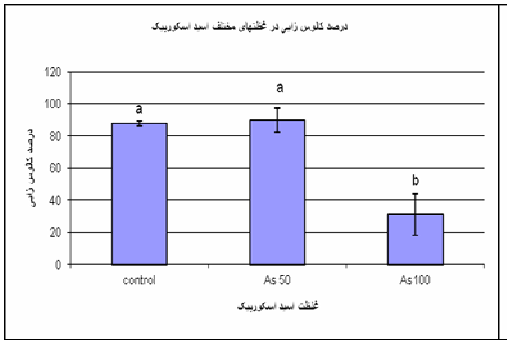
تصویر ۸- گیاه منتقل شده به ورمی‌کولیت، دو ماه پس از انتقال.

نتایج حاصل از کالوس‌زایی در غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید

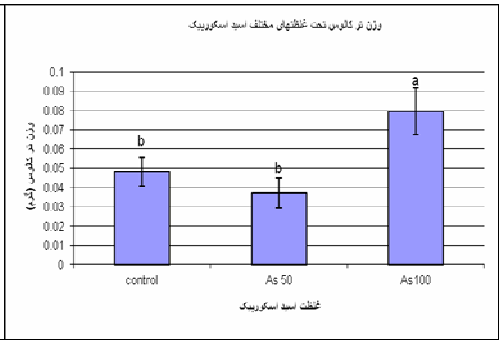
نمونه‌های شاهد و تیمار ۵۰mg/l آسکوربیک اسید، تقریباً به طور همزمان شروع به کالوس‌زایی کردند و حدود دو هفته پس از کشت، اولین آثار تشکیل کالوس در آن‌ها مشاهده گردید. پس از آن، در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید هم کالوس‌ها تشکیل شدند. در نمونه شاهد و تیمار ۵۰mg/l آسکوربیک اسید، بیشتر ریزنمونه‌ها کالوس‌زایی کردند، اما کالوس‌های تشکیل شده، دارای اندازه کوچک و حجم کم بودند. در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید، در تعداد کمتری از ریز نمونه‌ها کالوس بوجود آمد و بیشتر جداکشت-ها فقط در حد بی‌رنگ شدن بافت، تغییر کردند، ولی همان تعداد کالوس کم، دارای اندازه بسیار بزرگ‌تر و حجیم‌تر از تیمارهای قبل بودند. کالوس‌های حاصل از تیمارهای متفاوت، از نظر درصد کالوس‌زایی، وزن تر و وزن خشک، با هم مقایسه گردیدند. بالاترین درصد کالوس‌زایی، متعلق به تیمار ۵۰mg/l آسکوربیک اسید و پس از آن، شاهد بود که با هم، اختلاف معنی‌داری نداشتند. کمترین درصد تشکیل

کالوس هم در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید مشاهده گردید که با تیمارهای قبل اختلاف معنی‌دار داشت ($P<0.05$)، (نمودار A،۱). بالاترین وزن تر، در تیمار ۱۰۰mg/l آسکوربیک اسید مشاهده گردید که اختلاف آن با شاهد و تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، معنی‌دار بود ($P<0.05$)، (نمودار B،۱). بالاترین وزن خشک، مربوط به تیمار ۱۰۰mg/l آسکوربیک اسید بود، ولی با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>0.05$)، (نمودار C،۱).

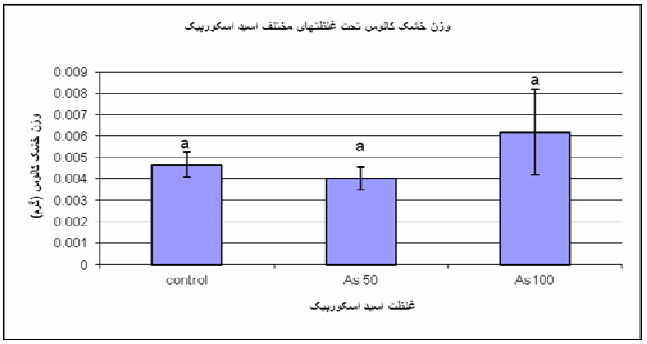
A



B



C



نمودار ۱- (A)درصد کالوس‌زایی در غلظت‌های مختلف آسکوربیک‌اسید. (B) وزن ترکالوس در غلظت‌های مختلف آسکوربیک‌اسید. (C) وزن خشک کالوس در غلظت‌های مختلف آسکوربیک‌اسید.

بحث

اگرچه آسکوربیک اسید به عنوان یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های حاضر در گیاهان برای حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو شناخته شده است، اما یافته‌های حاصل از پژوهش‌های محققان در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که آسکوربیک اسید، بیش از یک مولکول دفاعی بوده و متابولیتی است که در بسیاری از فرآیندهای زیستی و رشد و نمو گیاهان، درگیر می‌شود (۱۴). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که در همه جداکشت‌ها، غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید، ریشه‌زایی و تمایز اندام ریشه را تحریک می‌کند. رشد ریشه، فرآیند پیچیده‌ای شامل تکثیر سلولی، طویل شدن و تمایز سلول‌ها است و آسکوربیک اسید، ترکیب متعارفی در گیاهان است که از نظر زیستی، در تنظیم تقسیم سلول و توسعه‌پذیری دیواره سلولی دخالت دارد (۸). افزایش قابلیت ریشه‌زایی و تمایز اندام ریشه در این تیمارها را می‌توان چنین تفسیر کرد که چون آسکوربیک اسید، رفتاری مشابه اکسین دارد، همانطور که اکسین در غلظت‌های مناسب، هورمون ریشه‌زایی محسوب می‌گرد (۱،۲)، آسکوربیک اسید هم اثر مطلوبی بر ریشه‌زایی

جداکشت‌های گیاه داشته است. این تاثیر حتی در ریز نمونه‌های مریستمی هم به خوبی مشهود است که گرچه به دلیل ماهیت مریستم رویشی رأس ساقه، ابتدا اندام برگ و ساقه، متمایز می‌شود، اما آثار ریشه‌زایی هم در تیمار ۵۰ میلی‌گرم این اسید مشاهده گردید. Pedregosa و همکاران در سال ۲۰۰۵ با مطالعه بر روی ریشه‌های پیاز نشان دادند که افزودن آسکوربیک اسید و یا پیش‌ماده آن Gail (L – گالاکتونو – ۱و۴- لاکتون) به صورت برون‌زاد به محیط کشت این گیاه، باعث القای پریموردیم‌های ریشه در پایه‌های پیاز شده و سرعت طویل شدن ریشه‌های در حال رشد را افزایش می‌دهد. در تیمار-های تحت این غلظت از آسکوربیک اسید تعداد ریشه‌های فرعی تشکیل شده بیشتر بود (۱۵). این نتایج با گزارش‌هایArrigoni و همکاران در سال ۱۹۹۲، Paciolla و همکاران در سال ۲۰۰۱، که آسکوربیک اسید را عامل تکثیر سلولی در تمام مریستم ریشه و لایه ریشه زا معرفی کرده‌اند، همسویی دارد. افزایش تقسیمات سلولی در لایه ریشه‌زا به عنوان یک نتیجه منطقی برای پیدایش ریشه‌های فرعی در گیاهان تحت تیمار آسکوربیک اسید است (۱۶،۱۷).

به‌طور کلی، حالت ردوکس آسکوربیک اسید و میزان آن در سلول، مراحل نموی خاصی در ریشه را نشان می‌دهد و به همین دلیل است که آسکوربیک اسید را از متابولیت‌های مهم موثر در نمو گیاه می-شناسند که مقدار آن در بافت‌های جوان که فعالیت متابولیسمی زیادتری دارند، بیشتر از بافت‌های مسن گیاهان است (۱۶). طبق بررسی‌های انجام شده توسط Horemans و همکارانش در سال ۲۰۰۳، شکل احیا شده آسکوربیک اسید سبب پیشرفت چرخه سلولی شده، اما شکل اکسید شده آن DHA از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کند و در طویل شدن سلول‌ها دخالت دارد (۱۸). این پژوهشگران با بررسی سلول‌های BY-2 تنباکو نشان دادند که فعالیت زیاد آسکوربیک اسید اکسیداز (AOX) سرعت طویل شدن سلول‌ها را افزایش می‌دهد که این سرعت با تولید AFR و DHA همراه است. زیرا AFR با القای هیپرپلاریزاسیون غشایی، باعث افزایش جذب یونی و توسعه واکوئل‌ها و DHA هم با افزایش انعطاف‌پذیری دیواره سلولی، سبب توسعه سلولی و طویل شدن آن می‌شوند. بررسی‌های این پژوهشگران همچنین نشان داده است بافت‌هایی که سلول‌های در حال رشد سریع دارند، میزان جذب DHA بیشتری دارند. Horemans و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که در غشای پلاسمایی سلول‌ها عوامل ناقل مربوط به DHA وجود دارند که در جذب آن دخالت داشته و در این مورد از مبادله AS/DHA استفاده می‌کنند که در آن، جذب همزمان DHA توسط سلول، همراه با خروج AS درون سلولی است. در تکمیل این مطلب، گیاهان تراریخت یا جهش یافته با آسکوربیک اسید درون‌زاد کمتر، سرعت رشد کمتری را در نوساقه‌ها نشان دادند (۱۸).

نتایج حاصل از بررسی اثر آسکوربیک اسید بر القای کالوس نشان داد که وجود این اسید، تشکیل کالوس را تحریک می‌کند. افزایش تشکیل کالوس را می‌توان به تقسیم سلولی بیشتر در قطعات جداکشت نسبت داد و آسکوربیک اسید باعث افزایش این تقسیمات می‌گردد. آسکوربیک اسید برای پیشرفت و تسلسل چرخه سلولی، مورد نیاز است و با دخالت در تکثیر سلولی، در نمو گیاه شرکت می‌کند (۱۹). در سلول‌های رأس ریشه با تکثیر و فعالیت زیاد از میزان آسکوربیک اسید کاسته می‌شود و پیشرفت چرخه سلولی در G1 متوقف می‌گردد. اما اگر میزان آسکوربیک اسید با افزودن پیش‌ماده آن L-گالاکتونو، ۱ و ۴ لاکتون افزایش یابد، تقسیم سلولی را تحریک می‌کند (۱۴). سلول‌های کشت شده تنباکو در زمانی که شاخص میتوزی بالاترین مقدار را دارد، بیشترین مقدار از آسکوربیک اسید را دارند و حال آنکه در مراحل رشد با شاخص میتوزی پایین‌تر، مقدار AS کمتر است(۱۰).

Smirnoff و Wheeler در سال ۲۰۰۰ گزارش کردند که تغییرات تدریجی متابولیسم AS در طول ساقه از مریستم به مناطق تمایز یافته رخ داده و مریستم با قدرت تقسیم‌پذیری بالا، بیشترین میزان AS را دارا است (۷).

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق و انجام بررسی‌های بیشتر بر روی گونه‌های دیگر

گیاهی، شاید روزی بتوان در مطالعات کشت بافت، از آسکوربیک اسید که از نظر اقتصادی، بسیار مقرون به صرفه است، به جای هورمون اکسین استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

از کلیه مسؤولین مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران که اینجانب را در اجرای این پژوهش کمک و یاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع مورد استفاده

۱- ابراهیم‌زاده، ح، ۱۳۸۰، فیزیولوژی گیاهی ۲ (مبحث تمایز)، انتشارات دانشگاه تهران

۲- مجد، ا، ۱۳۸۲، گرده‌شناسی، جزوه‌های درسی دانشگاه تربیت معلم تهران

3- Foyer, C. H., Lelandais, M., 1993. The roles of ascorbate in the regulation of photosynthesis. In Yamamoto HY, Smith CM, eds. Photosynthetic response the environment. Rockvill, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 88 – 101.

4- Smirnoff, N., 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. Annals of Botany, 78: 661- 669.

5- Potters, G., Horemans, S. N., Bellone, S., Cauberys, R.J., Trost, P., Guisez, Y., Asard, H., 2004. Dehydro ascorbate influences the plant cell cycle through a Glutathione independent reduction mechanism. Plant Physiology 134 :1479-1487.

6- Liso, R., Calabrese, G., Bitonti, MB., Arrigoni O., 1984. Relationship between ascorbic acid and cell division. Experimental Cell Research 150: 314-320.

7- Smirnoff, N., Wheeler, G., 2000. Ascorbic acid in plants. Critical Review in Plant Science 4: 267- 290.

8- Tokunaga, T., Miyahara, K., Tabata, K., Esaka, M., 2005. Generation and properties of ascorbic acid– overproducing transgenic tobacco cells experessing sense RNA for L- galactono– 1, 4– lactone dehydrogenase Planta. 220: 854 – 863.

9- Pignocchi, C., Fletcher, J. M., Wilkinson, J. E., Barnes, J. D., Foyer, C.H., 2003. The function of Ascorbate oxidase in Tabacco Plant Physiology, 132: 1631-1641.

10- De Pinto, C. M., De Gara, L., 2004. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell and differentiation, Journal of Experimental of Botany 2550-2569.

11- Barth, C., Tullio, M., Conklin, Pl., 2006. The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onest of senescene Journal of Experimental Botany 57: 1657-1665.

12- Kotchoni, S., Larrimore, K., Mukherjee, M., Kempinski, C,. Barth, C., 2009. Alterations in the endogenous Ascorbic acid content affect flowering time in Arabidopsis. Plant Physiology 149: 803-815.

13- Miyake, C., Asada, K., 1992. Thylakoid bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product, monodehydroascorbate radicals in the thylakoids. Plant Cell and Physiology 33: 541- 553.

14- Arrigoni, O., Calabrese, G., De Gara, L., Bitonti, M. B., Liso, R., 1997. Correlation between changes in cell Ascorbate and growth of Lupinus albus seedlings. Journal of plant physiology 150: 302 - 308

15- Pedregosa, M. C., Cordoba, Inmunologia, F., Cordoba, U.D., Rabanales, C., Ochoa, E.S., 2005. Change in intracellular and apoplastic peroxidase activity, ascorbate redox status, and root elongation indused by enhanced ascorbate Content in *Allium sepa L.* Journal of Experimental Botany 56: 685 – 69.

16- Arrigoni, O., De Gara, L., Tommasi, F., Liso, R., 1992. Changes in the Ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L., Plant Physiology 99: 235- 238.

17- Paciolla, C., De Tullio, M. C., Chiappetta, A., Innocenti, A. M., Bitonti, M. B., Liso, R., Arrigoni, O., 2001. Short and long-term effects of dehydro ascorbate in *Lupinus albus* and *Allium cepa* roots. Plant and Cell Physiology 42: 857 – 863.

18- Horemans, N., Potters, G., Wild, L. D., Gaubergs, R. J., 2003. Dehydro ascorbate uptake activity correlates with cell growth and cell division of Tabacco Bright yellow–2- cell cultures. Plant Physiology 133: 361- 367.

19- Potters, G., De Gara, L., Asard, H., Horemans, N., 2002. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle partners in crime?, Plant Physiology Biochem 40: 537 – 548.