به‌زراعی کشاورزی
دوره ۱۶ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۳
صفحه‌های ۸۶۹-۸۵۷

تأثیر متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلیک بر صفات مورفولوژیکی و رنگدانه‌های درونی کالوس کنگر فرنگی

آتنا تنوری [۱]، عظیم قاسم‌نژاد[۲]* و مهدی علیزاده[۲]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۰۷/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۴/۰۲

چکیده

کنگر فرنگی از جمله گیاهان دارویی است که تولید مواد ثانویهٔ آن از طریق کشت بافت به‌سرعت در حال گسترش است. تحقیق حاضر با هدف مطالعهٔ چگونگی رشد کالوس و توانایی زنده‌مانی آن در شرایط درون‌شیشه‌ای تحت تیمار اسید سالیسیلیک (SA) و متیل‌جاسمونات (MJ) انجام گرفت. به این منظور، کالوس‌های کنگر فرنگی در محیط کشت جامد MS با اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات با غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار به‌صورت جداگانه تیمار شدند. نتایج نشان داد که اسید سالیسیلیک سبب کاهش وزن تر و افزایش وزن خشک کالوس شد. همچنین با اعمال تیمار متیل‌جاسمونات تفاوت معناداری در مقدار وزن تر مشاهده نشد ولی با افزایش غلظت از مقدار وزن خشک کالوس‌ها کاسته شد. تغییرات رنگدانه‌های درونی کالوس نشان داد که در هر دو تیمار اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات با افزایش غلظت ترکیبات از صفر تا ۲۰۰ میکرومولار به‌ترتیب از مقدار کلروفیل کاسته و به مقدار کاروتنوئید افزوده شد. با اینکه اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات به‌عنوان محرک سبب افزایش تولید متابولیت ثانویهٔ کالوس می‌شوند، سطح قابل دسترس آنها در محیط، قدرت زنده‌مانی کالوس را تحت تأثیر قرار می‌دهد و با افزایش این ترکیبات، رشد سلولی کاهش می‌یابد.

کلیدواژه‌ها: اسید سالیسیلیک، رنگدانه‌های درونی، کالوس، کنگر فرنگی، متیل‌جاسمونات.

* نویسنده مسئول Email: aghasemnajad@hotmail.com

۱. مقدمه

بیوتکنولوژی سلولی با استفاده از روش‌هایی چون کشت بافت و سلول، در تأمین ترکیبات دارویی با منشأ گیاهی به انسان کمک می‌کند [۸]. ازآنجا که بیوسنتز ترکیبات دارویی به مرحلهٔ ویژهٔ نموی و سلول‌های تخصصی‌شده محدود می‌شود، غلظت فراورده‌های ثانویه در کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی که متشکل از سلول‌های تمایزیافته است، کم و متفاوت است [۵ ، ۶]. بدین‌منظور، همواره در کشت بافت از روش‌های متعددی از قبیل کاربرد محرک‌هایی[1] (ایلیسیتورهایی) نظیر اسید سالیسیلیک[2] و متیل‌جاسمونات[3] به‌منظور تحریک تمایز سلول‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود.

تحقیقات نشان داد که اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات به‌عنوان مولکول‌های علامت‌رسان همچون سایر محرک‌ها بیان ژن‌های مرتبط با تولید متابولیت ثانویه را در گیاه القا می‌کنند. در واقع اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات دو تنظیم‌کنندهٔ رشد گیاهی‌اند که ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فعال‌سازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی گیاهی محسوب می‌شوند. پاسخ‌های دفاعی گیاه نیز به کاهش تولید مواد اولیه و بیوسنتز و تجمع انواع ترکیبات ثانویه گیاه می‌انجامد [۱۸، ۱۹، ۲۹، ۳۲، ۳۳].

متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلیک دامنهٔ وسیعی از پاسخ‌های نموی گیاه را تنظیم می‌کنند و به‌هنگام ایجاد تنش در گیاه، القای بیوسنتز آنها به تولید گونه‌های فعال اکسیژن منجر می‌شود [۱۵]. القای تنش اکسیداتیو در گیاهان تحت تیمار متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید گزارش شده است [۱۶،۳۱]. تولید سریع پراکسید هیدروژن همچنین در گیاه گوجه‌فرنگی در طی سه دقیقه بعد از تیمار با متیل‌جاسمونات مشاهده شده است [۱۷]. در واقع، اسید سالیسیلیک با مهار فعالیت کاتالیزی و متیل‌جاسمونات با حملهٔ لیپاز به غشا و آزادسازی اسیدهای چرب غیراشباع (لینولیک اسید) از طریق افزایش NADH اکسیداز، سطح اکسیژن فعال را در سلول‌ها افزایش می‌دهد. بدین ترتیب این دو محرک می‌توانند پس از القا به سلول‌ها، خود به‌عنوان فاکتور تنش‌زا یا مولکول انتقال‌دهندهٔ پیام‌رسان همانند سایر تنش‌ها عمل کنند [۷].

گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای واکنش‌های متفاوتی به تنش‌های القاشده نشان می‌دهند؛ تا جایی‌که ممکن است به ازبین رفتن و زوال سلول‌ها نیز منجر شود. ازاین‌رو لازم است که قبل از بررسی اثر محرک‌ها بر افزایش تولید مواد مؤثرهٔ سلول، تأثیر آن بر کیفیت و کمیت کالوس‌های تحت تیمار بررسی شود [۳، ۵]. کنگر فرنگی[4] نوعی گیاه دارویی مدیترانه‌ای است که به‌دلیل داشتن ترکیبات پلی‌فنولی و آنتی‌اکسیدانی، در درمان بسیاری از بیماری‌ها و عوارض ناشی از تنش‌های اکسیداتیو تأثیر دارد [۴]. در نتیجه کشت درون‌شیشه‌ای و تشخیص تکنیک‌های مؤثر افزایش متابولیت‌های ثانویهٔ این گیاه، اولویت برنامه‌های اصلاحی این گیاه است [۳].

با توجه به اهمیت زیست‌توده در تولید مقرون‌به‌صرفهٔ ترکیبات مؤثره، هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر احتمالی ترکیبات محرک تولید متابولیت‌های ثانویه بر روند تشکیل کالوس و تغییرات رنگدانه‌ای آن بود.

۲. مواد و روش‌ها

۲ .۱. تهیهٔ کالوس

به‌منظور تهیهٔ کالوس کنگر فرنگی ابتدا بذرهای تهیه‌شده از مزرعهٔ تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به‌کمک اتانول ۷۰ و هیپوکلریدسدیم ۲۰ درصد

1. licitoErs
2. SA
3. MJ
4. Artichoke (*Cynara scolymus* L.)

استریل شده و با هدف جوانه‌زنی در پتری‌دیش استریل حاوی کاغذ صافی مرطوب در اتاق کشت قرار داده شد. پس از جوانه‌زنی بذور، گیاهچه‌ها به‌منظور رشد بهتر به محیط کشت 1/2MS با نصف غلظت نمک‌های مورد نیاز منتقل شد. گیاهچه‌های پنج تا شش‌برگی به‌عنوان منبع تهیهٔ نمونهٔ گیاهی برای ادامهٔ آزمایش استفاده شدند. برای تهیهٔ کالوس قطعات ۱ تا ۲ سانتی‌متری دمبرگ در محیط کشت فاز القا دارای BA (۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. پس از ۲۸ روز کالوس‌های به‌دست‌آمده در دو آزمایش مجزا به محیط کشت‌های MS جامد حاوی غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات به‌عنوان فاز القا منتقل شدند.

۲.۲. اندازه‌گیری عملکرد کالوس

پس از گذشت چهار هفته از واکشت کالوس‌ها به محیط کشت حاوی تیمارها، زمانی که کالوس‌ها به رشد کافی رسیدند با استفاده از ترازوی دیجیتالی توزین شده و وزن تر آنها محاسبه شد.

پس از تعیین درصد وزن تر، کالوس‌ها در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک شده و وزن خشک آنها نیز طی چند نوبت و پس از ثابت شدن به‌عنوان وزن نهایی ثبت شد.

۳.۲. اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی کالوس

پس از گذشت چهار هفته، همزمان با تعیین وزن تر و خشک، شاخص‌های مورفولوژیکی کالوس نظیر رنگ، میزان سفتی، مقدار رشد و درصد ترکیبات فنولی (درصد قهوه‌ای شدن) بررسی شد.

۴.۲. رنگ کالوس

تعیین شدت و نوع رنگ کالوس به‌صورت مشاهده‌ای و امتیازدهی انجام گرفت. بدین منظور ابتدا شدت و نوع رنگ کدگذاری شد. درنهایت رنگ کالوس با یکی از حروف انگلیسی یا ترکیبی از آنها نشان داده شد و شدت آن با سه درجه گزارش شد [۶]:

نوع رنگ: سیاه (Bk)، سبز (G)، سفید (W)، قرمز (R)، آبی (AB)، قهوه‌ای (nB)، بنفش (V)، زرد (Y) و نارنجی (O).

شدت رنگ: کمرنگ (۱)، رنگ با تراکم زیاد (۲) و شدت رنگ با تراکم خیلی زیاد (۳).

اگر کالوس دو رنگ مجزا داشته باشد، هر دو کد نوشته می‌شود و بین آنها علامت ممیز قرار می‌گیرد. برای مثال، کالوسی به رنگ سبز متمایل به سفید را با GW نشان می‌دهند، ولی G/W نشانگر کالوسی است که بخشی از آن سبز و بخش دیگری از آن کاملاً سفید است.

۵.۲. سفتی کالوس

بلافاصله پس از خروج کالوس از محیط کشت با استفاده از فشار پنس (روش لمسی) نوع بافت تعیین شد. سفتی کالوس به‌صورت خیلی نرم (۲-)، نرم (۱-)، متوسط (۰)، سفت (۱+) و خیلی سفت (۲+) امتیازدهی شد.

۶.۲. درصد قهوه‌ای شدن[1]

کالوس‌های سبز فاقد علائم زوال (۰)، ۱-۲۵ درصد بافت قهوه‌ای و نکروزه (۱)، ۲۵-۵۰ درصد بافت قهوه‌ای (۲)، ۵۰-۷۵ درصد بافت قهوه‌ای و نکروزه (۳) و ۷۵-۱۰۰ درصد بافت قهوه‌ای و نکروزه (۴). با احتساب درصد ترکیبات فنولی محیط، مقدار رشد و درصد حجم نکروزه‌شده، سلامت کالوس‌ها بررسی شد.

1. Browning percent

۷.۲. مقدار رشد

مقدار رشد کالوس به دو صورت مشاهده یا اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس مشخص شد. تعیین مقدار رشد کالوس به‌صورت مشاهده‌ای و امتیازدهی به‌صورت کدهای زیر صورت گرفت. بدون رشد (۰)، ۳۰-۵۰ درصد افزایش حجم در کالوس (۱)، ۵۰-۱۰۰ درصد افزایش حجم در کالوس (۲) و ۱۰۰ درصد یا بیشتر افزایش در حجم کالوس (۳).

۸.۲. اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئید

تعیین مقدار کلروفیل وکاروتنوئید براساس روش پیشنهادی بارنس انجام گرفت [۱۲]. به‌منظور استخراج کلروفیل و کاروتنوئید ابتدا ۰/۱۵۰ گرم کالوس تر و نکوبیده از هر تکرار توزین و با ۱/۵ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) مخلوط شد. پس از قرار دادن نمونه در آون ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت سه ساعت، از نمونهٔ حاصل ۲۵۰ میکرولیتر برداشته شده و مجدد دو میلی‌لیتر DMSO به آن اضافه شد. نمونه‌ها به‌وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شده و از DMSO خالص به‌عنوان نمونهٔ شاهد استفاده شد. اندازه‌گیری کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید به‌ترتیب در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳، ۴۸۰ و ۵۱۰ نانومتر انجام گرفت و اعداد به‌دست‌آمده در رابطهٔ زیر قرار داده شد:

$$\text{Chlo a (mg/g.F.w)} = 12.7(A663) - 2.69(A645) \times V/1000 \times W \quad (۱)$$

$$\text{Chlo b (mg/g.F.w)} = 22.9(A645) - 4.68(A663) \times V/1000 \times W \quad (۲)$$

$$\text{Chlo total (mg/g.F.w)} = 20.2(A645) + 8.02(A663) \times V/1000 \times W \quad (۳)$$

$$\text{Car (mg/g.F.w)} = 7.6(A480) - 1.49(A510) \times V/1000 \times W \quad (۴)$$

در این رابطه، A: طول موج؛ V: محلول نهایی حجم؛ و W: نمونهٔ وزن است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و مقایسهٔ میانگین از طریق آزمون LSD انجام گرفت.

۳. نتایج

گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای واکنش‌های متفاوتی به تنش‌های القاشده از خود نشان می‌دهند، تا جایی‌که تنش‌ها ممکن است به ازبین رفتن و زوال سلول‌ها منجر شوند، ازاین‌رو باید به هر عنوان قبل از بررسی تأثیر محرک‌ها بر افزایش تولید مواد مؤثرهٔ سلول، تأثیر آنها بر کیفیت و کمیت کالوس‌های تحت تیمار، مطالعه شود. بنابراین به‌منظور ارزیابی تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات بر صفات کیفی و کمی کالوس کنگر فرنگی، بررسی‌هایی روی رنگ، بافت، میزان قهوه‌ای شدن و مقدار رشد کالوس در طی چهار هفته صورت گرفت.

۱.۳. نتایج تأثیر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر صفات مورفولوژیکی

بررسی وضعیت کالوس‌های حاصل پس از اعمال تیمارها نشان داد که با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک از صفر به ۲۰۰ میکرومولار، رنگ کالوس از سبز (G) به زرد (Y) و قهوه‌ای (Bn) تغییر یافت و با افزایش غلظت بر درصد بافت قهوه‌ای افزوده شد. همچنین با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک از فشردگی بافت کالوس (سفتی کالوس) کاسته شد (جدول ۱). مطابق با نتایج حاصل از مشاهدات تغییرات ظاهری در حجم کالوس و همچنین بررسی تغییرات وزن کالوس‌ها با افزایش اسید سالیسیلیک محیط، کاهش چشمگیری در رشد کالوس مشاهده شد. مقدار ترکیبات فنولی، مقدار رشد و در نهایت رشد مجدد کالوس‌های تیمارشده پس از واکشت، نمایانگر سلامت کالوس در شرایط تنش است.

جدول ۱. مقایسهٔ صفات مورفولوژیکی کالوس کنگر فرنگی تحت تیمار اسید سالیسیلیک

تیمار	رنگ کالوس	بافت کالوس	قهوه‌ای شدن (٪)	سلامت کالوس	رشد کالوس
شاهد	G_1	۱	۵	۲	۳
۲۵SA	G_2/Y	۱	۲۳	۲	۲
۵۰SA	G_1/Bn	۱	۵۳	-۱	۲
۱۰۰ SA	Bn_2/GY	۱	۶۹	-۱	۲
۲۰۰ SA	Bn_3/G	۲	۸۱	-۲	۱

رنگ کالوس: Bn (قهوه‌ای)، W (سفید)، G (سبز)،Y (زرد)، WY (سفید مایل به زرد) - کمرنگ (۱)، رنگ با تراکم بالا (۲)، رنگ با تراکم خیلی بالا (۳). بافت کالوس: ۲- (خیلی نرم)، ۱- (نرم)، ۰ (متوسط)؛ ۱+ (سفت)؛ ۲+ (خیلی سفت). مقدار رشد: ۰ (بدون رشد)؛ ۱ (۳۰ تا ۵۰ درصد افزایش حجم)؛ ۲ (۵۰ تا ۱۰۰ درصد افزایش حجم) و ۳ (۱۰۰<).

شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک بر صفات مورفولوژیکی کالوس

(الف) کالوس‌های رشدیافته در محیط (SA)+ 25 µM MS، (ب) کالوس‌های رشدیافته در محیط (SA)+ 50 µM MS، (ج) کالوس‌های رشدیافته در محیط (SA)+ 100 µM MS، (د) کالوس‌های رشدیافته در محیط (SA) + 200 µMMS

با توجه به توان ژنتیکی سلول‌های کالوس کنگر فرنگی در تولید ترکیبات فنولی، می‌توان نکروزه شدن و تخریب بافت را این‌گونه توضیح داد که با افزایش اسید سالیسیلیک و القای استرس اکسیداتیو در کالوس ترکیبات فنولی چون اسیدکلروجنیک و دیگر مشتقات آن برای کاهش خسارت اکسیداتیو در آنها القا می‌شود و تجمع می‌یابد. تجمع این ترکیبات و نشت آن از سلول به محیط سبب تغییر رنگ کالوس و به‌ویژه محیط کشت اطراف آن می‌شود و خود منبعی برای استخراج ترکیبات ارزشمند دارویی است (شکل ۱).

۲.۳. نتایج تأثیر سطوح مختلف متیل‌جاسمونات بر صفات مورفولوژیکی

طبق نتایج موجود، با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات رنگ کالوس از سبز به زرد تا قهوه‌ای متفاوت بوده است (جدول ۲). همچنین بر مقدار ترکیبات فنولی و بافت‌های نکروزه محیط افزوده شد. کالوس‌های ایجادشده در محیط حاوی متیل‌جاسمونات کالوس‌هایی با بافت متوسط و آبدار بودند و این حالت با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات افزایش یافت. در مقابل افزایش حجم کالوس از مقدار آب محیط کاسته شد که این حالت را می‌توان به توانایی متیل‌جاسمونات در ارتباط با تعادل آبی سلول و افزایش تورژسانس سلول‌ها مرتبط دانست [۱].

نتایج حاصل از مشاهدات تغییرات ظاهری در حجم کالوس و همچنین بررسی تغییرات وزن کالوس در طی مدت رشد نشان داد که با افزایش مقدار متیل‌جاسمونات محیط تغییر چندانی در رشد کالوس نسبت به شاهد ایجاد نشد. در تیمار ۲۰۰ میکرومولار در بعضی از تکرارها اندام‌زایی مشاهده شد. همچنین در تیمار ۱۰۰ میکرومولار در بعضی از نقاط کالوس ساختمان‌های کروی شبیه به عناصر اولیهٔ اندام‌های گیاهی، مشاهده شد (شکل ۲). تغییر رنگ کالوس‌های تحت تیمار با اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات نتیجهٔ تحریک سلول‌ها توسط تنش القاشده در ایجاد پاسخ فوق‌حساسیت است. ازاین‌رو احتمالاً نکروزه شدن بافت به‌دلیل تخریب کلروفیل، افزایش ترکیبات فنولی در نتیجهٔ القای تنش اکسیداتیو، زوال و پیری بافت کالوس درنتیجهٔ سنتز اتیلن است [۱۶،۱۴].

جدول ۲. مقایسهٔ صفات مورفولوژیکی کالوس کنگر فرنگی تحت تیمار متیل‌جاسمونات

تیمار	رنگ کالوس	بافت کالوس	قهوه‌ای شدن (٪)	سلامت کالوس	رشد کالوس
شاهد	G1	۱	۵	۲	۳
۲۵MJ	G2	۰	۲۰	۲	۳
۵۰MJ	G2/YW	۰	۲۵	۲	۳
۱۰۰MJ	B2/GY	۰	۵۵	۲	۳
۲۰۰MJ	B3/YW	-۱	۸۰	۲	۳

رنگ کالوس: Bn (قهوه‌ای)، W (سفید)، G (سبز)، Y (زرد)، WY (سفید مایل به زرد) - کمرنگ (۱)، رنگ با تراکم زیاد (۲)، رنگ با تراکم خیلی زیاد (۳). بافت کالوس: ۲- (خیلی نرم)، ۱- (نرم)، ۰ (متوسط)؛ ۱+ (سفت)، ۲+ (خیلی سفت). میزان رشد: ۰ (بدون رشد)، ۱ (۳۰ تا ۵۰ درصد افزایش حجم)، ۲ (۵۰ تا ۱۰۰ درصد افزایش حجم) و ۳ (۱۰۰<).

شکل ۲. تأثیر غلظت‌های متفاوت متیل‌جاسمونات بر صفات مورفولوژیکی کالوس

(الف) کالوس‌های رشدیافته در محیط MS+ 25 µM (MJ)، (ب) کالوس‌های رشدیافته در محیط MS+ 50 µM (MJ)، (ج) کالوس‌های رشدیافته در محیط MS+ 100 µM (MJ)، (ج۲) ساختمان‌های کروی القاشده در تیمار 100 µM و (د) کالوس‌های رشدیافته در محیط MS+ 200 µM (MJ)

۳.۳. نتایج اثر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر وزن تر و خشک کالوس

اسید سالیسیلیک می‌تواند در گیاه نقش‌های متفاوتی ایفا کند [۲۴،۲۳]. همچنین در این آزمایش، مطابق با نتایج حاصل از تجزیهٔ واریانس جدول ۳ تغییرات معناداری در اکثر فرایندهای فیزیولوژیکی کالوس تحت تأثیر اسید سالیسیلیک در مقایسه با شاهد مشاهده شد.

جدول ۳. تجزیهٔ واریانس وزن کالوس و رنگدانه‌های درونی کالوس کنگر فرنگی تحت تأثیر اسید سالیسیلیک

منابع تغییرات	وزن تر	وزن خشک	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید
SA	۳/۷۶ ***	۰/۰۰۲۲ ***	۰/۰۰۰۳۴***	۰/۰۰۰۴ ***	۰/۰۰۴ ***	۰/۰۰۰۱ ***
خطاء	۰/۲۱	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۰۶	۰/۰۰۰۰۰۹	۰/۰۰۰۰۴	۰/۰۰۰۰۰۱
CV (٪)	۱۷/۴۸	۱۷/۴۸	۱۰/۷۴	۱۵/۹	۹/۹	۷/۲۶

***(P<۰/۰۰۱)، ** (P<۰/۰۱)، * (P <۰/۰۵)، ns معنادار نیست. وزن تر و خشک به گرم و رنگدانه‌های درونی به میلی‌گرم بر گرم بیان شده است.

جدول ۴. مقایسهٔ میانگین وزن تر و خشک کالوس کنگر فرنگی تحت تیمار اسید سالیسیلیک

تیمار SA	وزن تر (g)	وزن خشک (g)
شاهد	۴/۱۲[a]	۰/۰۵۷[d]
۲۵	۲/۷۴[b]	۰/۰۶[d]
۵۰	۲/۰۸[bc]	۰/۰۸۵[c]
۱۰۰	۲/۵۲[b]	۰/۱۱[b]
۲۰۰	۱/۵۳[c]	۰/۹۹[a]
LSD	۰/۷۰	۰/۰۰۷

در هر ستون، اعداد دارای حروف مشترک تفاوت معنادار ندارند (P<۰/۰۰۱).

نتایج نشان داد که کاهش معناداری در وزن تر کالوس تیمارهای اسید سالیسیلیک در مقایسه با شاهد وجود دارد. با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک، از وزن تر کالوس کاسته شد (جدول ۴). در مقابل زیست‌تودهٔ کل (وزن خشک) افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین وزن تر کالوس در شاهد و کمترین آن در تیمار ۲۰۰ میکرومولار مشاهده شد. اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک تنظیم‌کنندهٔ رشد گیاهی در اکثر فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه تأثیر مهمی دارد و به‌دلیل ماهیتش در گیاه، سلول‌های گیاهی تحت تیمار این ترکیب رفتارهای رشدی یک سلول تحت تنش را، از جمله افزایش مواد جامد قابل حل سلول، کاهش اندازهٔ سلول و غلیظ کردن محلول سیتوپلاسمی، از خود نشان می‌دهند. ازاین‌رو کاهش وزن تر در مقابل افزایش نسبی وزن خشک توجیه‌پذیر است.

البته ارتباط یا عدم ارتباط مستقیم بین غلظت‌های القاکننده‌ها و القای فعالیت‌های متابولیسمی اولیه که به افزایش وزن سلول‌ها منجر می‌شود، به ماهیت ترکیب، گیاه و غلظت اسید سالیسیلیک بستگی دارد [۲۱]. با توجه به رابطهٔ آنتاگونیستی و سینرجیستی اسید سالیسیلیک با هورمون‌های اصلی، به‌نظر می‌رسد افزایش اسید سالیسیلیک

در محیط کشت کالوس کنگر فرنگی، موجب تغییر نسبت هورمون‌های رشد از قبیل اکسین و سیتوکینین و نیز سبب افزایش سنتز سایر ترکیبات فنوله در سلول‌های کالوس می‌شود که نشر آن به محیط کشت به‌تدریج به القای اتیلن و سایر بازدارنده‌های رشد می‌انجامد. اسید سالیسیلیک با تأثیر بر تعادل هورمون‌های رشدی، سبب تنظیم تعادل در رشد و پیری می‌شود [۲۲، ۲۳]. اسید سالیسیلیک علاوه بر افزایش وزن خشک کالوس گیاه داتوره در وزن تر کالوس تفاوت معناداری ایجاد نکرد. همچنین رابطهٔ مستقیمی بین اسید سالیسیلیک و تحریک سلول‌ها و فعالیت متابولیسم اولیه در کالوس روناس گزارش شده است [۱۳].

۴.۳. تأثیر سطوح مختلف متیل‌جاسمونات بر وزن تر و خشک کالوس

نتایج تجزیهٔ واریانس اثرهای تیمار متیل‌جاسمونات بر صفات مورد مطالعه و همچنین مقایسهٔ میانگین به‌ترتیب در جدول‌های ۵ و ۶ آمده است. تیمار متیل‌جاسمونات بر مقدار وزن تر کالوس اثر معنادار نداشت، با وجود این اختلاف معناداری بین تیمارهای متیل‌جاسمونات بر مقدار وزن تر مشاهده شد.

جدول ۵. تجزیهٔ واریانس وزن کالوس و رنگدانه‌های درونی کالوس کنگر فرنگی تحت تأثیر متیل‌جاسمونات

منابع تغییرات	وزن تر	وزن خشک	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید
MJ	۰/۰۷۲^{ns}	۰/۰۰۱ ***	۰/۰۰۰۴***	۰/۰۰۰۰۳***	۰/۰۰۱۲***	۰/۰۰۰۱***
خطاء	۰/۰۵۴	۰/۰۰۰۰۱۴	۰/۰۰۰۰۰۱۴	۰/۰۰۰۰۰۱۳	۰/۰۰۰۰۱۱	۰/۰۰۰۰۰۱
CV (٪)	۵/۵۲	۵/۷	۵/۹	۸/۵	۶/۳۵	۸/۸

***(P<۰/۰۰۱)، ** (P<۰/۰۱)، * (P <۰/۰۵)، ns– معنادار نیست. وزن تر و خشک به گرم و رنگدانه‌های درونی به میلی‌گرم بر گرم بیان شده است.

جدول ۶. مقایسهٔ میانگین وزن تر و خشک کالوس کنگر فرنگی تحت تیمار متیل‌جاسمونات

تیمار MJ	وزن تر (g)	وزن خشک (g)
شاهد	۴/۱۲^{a}	۰/۰۵۷^{bc}
۲۵	۳/۸۳^{a}	۰/۰۸۲^{a}
۵۰	۴/۱۳^{a}	۰/۰۸۳^{a}
۱۰۰	۴/۱۲^{a}	۰/۰۶^{b}
۲۰۰	۴/۱۴^{a}	۰/۰۵^{c}
LSD	۰/۳۶	۰/۰۰۵۷

در هر ستون، اعداد دارای حروف مشترک تفاوت معنادار ندارند (P<۰/۰۰۱).

بررسی نتایج نشان می‌دهد که اگرچه در تیمار ۲۵ کاهش نسبی در وزن تر کالوس مشاهده شد، تیمار متیل‌جاسمونات تأثیر معناداری بر وزن تر کالوس نداشت. در مقابل کاهش معناداری در وزن خشک نمونه‌های کالوس تحت تأثیر سطوح مختلف متیل جاسمونات مشاهده شد (جدول ۶). بیشترین مقدار وزن خشک کالوس در تیمار ۲۵ و ۵۰ میکرومولار ثبت شد. با افزایش غلظت، کاهش معناداری در روند رشد سلول‌ها مشاهده شد، به‌نحوی‌که کمترین مقدار وزن خشک در تیمار ۲۰۰ میکرومولار مشاهده شد.

نتایج بسیاری از تحقیقات نشان داد که جاسمونات‌ها تأثیرات تحریک‌کنندگی و بازدارندگی بر رشد و فعالیت متابولیکی گیاهان دارند و آثار بازدارندگی مشابه آبسیزیک اسید و اتیلن از خود نشان می‌دهند. به‌نظر می‌رسد که جاسمونات‌ها با کاهش فعالیت پروتئین کینازها وابسته به سیکلین مانع ورود چرخهٔ یاخته از حالت G_1 به S و G_2 به M می‌شوند و از این طریق، از رشد و تقسیم سلولی ممانعت می‌کنند [۲۸،۱۶]. تیمار کالوس توتون با متیل‌جاسمونات تقسیم میتوز و همانندسازی DNA را با کاهش فعالیت سیکلین‌ها و توقف سلول‌ها در مرحلهٔ G_1، مهار کرد. همچنین مهار رشد و کاهش زنده‌مانی درنتیجهٔ زوال تمامیت سلول توسط جاسمونات‌ها در بسیاری از گیاهان به اثبات رسیده است [۲۸،۲۰،۱۱]. یکسان بودن مقدار وزن تر با شاهد در مقابل کاهش مقدار وزن خشک آن به‌دلیل تأثیر متیل‌جاسمونات در روابط آبی و توان افزایش فشار اسمزی سلول‌ها و در نتیجه جذب آب از محیط کشت است [۲۵،۱]. در یک آزمایش دربارهٔ تأثیر ساکارز و متیل‌جاسمونات بر زیست‌توده و تجمع آنتوسیانین در کشت رودندرون هندی، افزایش غلظت متیل‌جاسمونات کاهش معناداری در وزن تر و خشک کالوس ایجاد کرد [۲۷]. همچنین تأثیر مثبت متیل‌جاسمونات بر کاهش وزن خشک در کشت سلول فندق گزارش شده است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد [۲].

۵.۳. نتایج تأثیر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات بر مقدار رنگدانه‌های درونی

در این تحقیق، تأثیر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر مقدار رنگدانه‌های درونی صرف‌نظر از محیط کشت و سن کالوس بررسی شد. نتایج نشان‌دهندهٔ کاهش معنادار مقدار کلروفیل (در سطح ۰/۰۰۱ درصد) بین غلظت‌های اسید سالیسیلیک است (جدول ۷). همچنین کمترین مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در تیمار ۲۰۰ میکرومولار به ثبت رسید. البته بین تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ اختلاف معناداری مشاهده نشد. احتمالاً تأثیر اسید سالیسیلیک بر مقدار کلروفیل، ناشی از تأثیر آن بر ACC سنتتاز و ACC اکسیداز و درنهایت بیوسنتز اتیلن است. اسید سالیسیلیک در غلظت زیاد سبب افزایش سنتز اتیلن می‌شود و در مقابل در غلظت‌های مناسب از سنتز آن ممانعت می‌کند. با توجه به اینکه اتیلن به‌عنوان محرک القای فرایند پیری سبب افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز و در نتیجه افزایش تخریب کلروفیل می‌شود [۲۵،۹،۱۰]، کاهش کلروفیل و افزایش نسبی کاروتنوئید مشاهده‌شده، شایان بحث است. کاروتنوئیدها به‌عنوان رنگدانه‌های همراه در فرایند فتوسنتز، نسبت به جذب برخی از طول موج‌ها قابلیت‌هایی دارند. با این حال، کاروتنوئید بیشتر به‌عنوان پیش‌ساز ویتامین A مطرح است و ترکیب بتاکاروتن در گروه ترکیبات آنتی‌اکسیداتیو قرار دارد. افزایش کاروتنوئید تحت غلظت مشخصی از اسید سالیسیلیک را می‌توان در این راستا ارزیابی کرد. محققان بیان داشتند که غلظت‌های کم اسید سالیسیلیک، سبب افزایش رنگدانه‌های درونی می‌شود، ولی با افزایش غلظت آن به ۱۰۰۰ میکرومولار، کلروفیل و کاروتنوئید کاهش می‌یابد [۱۴].

جدول ۷. مقایسهٔ میانگین رنگدانه‌های درونی کالوس کنگر فرنگی تحت تیمار اسید سالیسیلیک

تیمار SA	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید
شاهد	۰/۰۳۶[a]	۰/۰۳۳[a]	۰/۱۱[a]	۰/۰۰۷[e]
۲۵	۰/۰۲۷[b]	۰/۰۲۲[b]	۰/۰۷۷[b]	۰/۰۱۱[d]
۵۰	۰/۰۲۳[b]	۰/۰۱۵[c]	۰/۰۵۸[c]	۰/۰۱۳[c]
۱۰۰	۰/۰۱۷[c]	۰/۰۱۱[c]	۰/۰۴۳[d]	۰/۰۱۷[b]
۲۰۰	۰/۰۱۲[d]	۰/۰۱[c]	۰/۰۳۶[c]	۰/۰۲۲[a]
LSD	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۴۵	۰/۰۰۹۹	۰/۰۰۱۶

در هر ستون، اعداد دارای حروف مشترک تفاوت معنادار ندارند (P<۰/۰۰۱). رنگدانه‌های درونی به mg/g F.W بیان شده است.

جدول ۸. مقایسهٔ میانگین رنگدانه‌های درونی کالوس تحت تیمار متیل‌جاسمونات

تیمار MJ	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید
شاهد	۰/۰۳۷[a]	۰/۰۱۶[a]	۰/۰۷۹[a]	۰/۰۰۷[e]
۲۵	۰/۰۲۰[b]	۰/۰۱۶[a]	۰/۰۵۶[b]	۰/۰۱۱[d]
۵۰	۰/۰۱۶[c]	۰/۰۱۱[b]	۰/۰۴۲[c]	۰/۰۱۳[c]
۱۰۰	۰/۰۱۳[d]	۰/۰۱۱[b]	۰/۰۳۹[dc]	۰/۰۱۷[b]
۲۰۰	۰/۰۱۲[d]	۰/۰۱۱[b]	۰/۰۳۶[cd]	۰/۰۲۲[a]
LSD	۰/۰۰۱۸	۰/۰۰۱۸	۰/۰۰۵۱	۰/۰۰۱۶

در هر ستون، اعداد دارای حروف مشترک تفاوت معنادار ندارند (P<۰/۰۰۱). رنگدانه‌های درونی به mg/g F.W بیان شده است.

براساس نتایج به‌دست‌آمده اختلاف معناداری (در سطح ۰/۰۰۱ درصد) از نظر مقدار رنگدانه‌ها تحت تأثیر تیمارهای به‌کاررفتهٔ متیل جاسمونات مشاهده شد. نتایج مقایسهٔ میانگین، نشان‌دهندهٔ کاهش معنادار مقدار کلروفیل a، b و کلروفیل کل با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات است (جدول ۸). بیشترین مقدار کلروفیل در محیط فاقد متیل‌جاسمونات مشاهده شد.

با افزایش متیل‌جاسمونات بر مقدار کاروتنوئید قرائت‌شده افزوده شد. به‌نحوی‌که در غلظت ۲۰۰ میکرومولار بیشترین مقدار کاروتنوئید قرائت شد. احتمالاً تأثیر متیل‌جاسمونات بر مقدار رنگدانه‌های درونی کالوس، ناشی از افزایش فعالیت ACC سنتتاز و بیوسنتز اتیلن است [۲۷،۲۶]. mRNAAtCLH1 به‌عنوان القاکنندهٔ پیری و تخریب‌کنندهٔ کلروفیل (سنتز کلروفیلاز) در گیاهان در اثر

تیمار متیل‌جاسمونات القا شده و سبب تخریب کلروفیل می‌شود و ازآنجا که رنگدانه‌های کاروتنوئید در بخش زیرین کلروفیل‌ها قرار گرفته است، با تخریب و تجزیهٔ کلروفیل بر اثر اتیلن القایی و متیل‌جاسمونات، رنگ کاروتنوئید ظاهر می‌شود [۳۰،۲۶].

۴. نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده از مقدار وزن تر و خشک، نشان‌دهندهٔ تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات در گسترش، مرگ و تقسیم سلولی است که شاید بتوان دلیل آن را در ارتباط این دو تنظیم‌کننده با سایر محرک‌ها و بازدارنده‌های رشد بیان کرد. همچنین کاهش مقدار کلروفیل و افزایش کاروتنوئید با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات می‌تواند نشان‌دهندهٔ نقش این دو فیتوهورمون بر فعالیت ACC سنتتاز، ACC اکسیداز و بیوسنتز اتیلن باشد. با توجه به رابطهٔ معکوس بین تولید زیست‌توده و متابولیت‌های اولیه با متابولیت‌های ثانویه، به‌نظر می‌رسد که این دو تنظیم‌کننده در شرایط تنش با مهار رشد سلولی و کاهش فعالیت‌های فتوسنتزی، سبب افزایش سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تولید متابولیت‌های ثانویه و مهار آثار مخرب تنش می‌شوند. به‌نظر می‌رسد با اینکه اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات به‌عنوان محرک سبب افزایش تولید متابولیت ثانویه در کالوس می‌شوند، سطح قابل دسترس آنها در محیط کشت، قدرت زنده‌مانی کالوس را تحت تأثیر قرار می‌دهد و با افزایش این ترکیبات، رشد سلولی کاهش می‌یابد.

منابع

۱. پرجود م و آروین س م ج (۱۳۹۰) بررسی اثرات تنظیم‌کننده رشد گیاهی متیل‌جاسمونات بر روابط آبی و رشد گیاه طالبی تحت شرایط خشکی در مزرعه. یازدهمین سمینار سراسری آبیاری و کاهش تبخیر. دانشگاه شهید باهنر.

۲. رضایی ا ا، قناتی ف و بهمنش م (۱۳۹۰) افزایش تولید و آزادسازی تاکسول توسط متیل‌جاسمونات، امواج فراصوت و دی‌بوتیل فتالات در کشت سلولی فندق (*Corylusavellana* L.). زیست‌شناسی گیاهی. ۳(۷): ۵۵-۷۲.

۳. سلیمانی م، شیرآلی م، شریفی س و لطفی م (۱۳۸۸) بیوتکنولوژی در گیاهان دارویی و محرک‌ها (Elicitors) راهکارهایی برای افزایش تولید ترکیبات دارویی. همایش منطقه‌ای غذا و بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه: ۱-۴.

۴. ضیایی س، دست‌پاک ا، نقدی بادی ح، چورحسینی ل، همتی مقدم ا و غروی نائینی م (۱۳۸۳) مروری بر گیاه کنگرفرنگی (*Cynarascolymus* L.). گیاهان دارویی. ۴(۱۳): ۱-۱۰.

۵. طباطبایی ب ا ا و امیدی م (۱۳۸۸) کشت بافت و سلول گیاهی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۳۶۸.

۶. علیزاده م (۱۳۹۰) راهنمای کاربران کشت بافت گیاهی و ریزازدیادی. انتشارات نوروزی گرگان. ۳۲۲ ص.

۷. فهیمی ح (۱۳۸۷) تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی. ویراست دوم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران. ۲۱۴ ص.

۸. قاسمی‌بزدی ک و احمدی ا (۱۳۸۸) بیوتکنولوژی بافت و سلول (در ریزازدیادی و به‌نژادی) (ترجمه).گرگان مختومقلی فراغی، ص ۲۵۳.

۹. لسانی ح و مجتهدی م (۱۳۷۰) مبانی فیزیولوژی گیاهی (ترجمه). انتشارات دانشگاه تهران. ص ۷۳۸.

۱۰. . لسانی ح و مجتهدی م (۱۳۷۴) زندگی گیاه سبز (ترجمه). انتشارات دانشگاه تهران. ص ۵۸۷.

11. Ananieva K and Ananiev ED (2000) Interaction between methyl ester of jasmonic acid and benzylaldenine during the growth of excised greening cotyledonse of Cucurbita pepo L. (Zuchini). BULG. Journal of Plant Physiology. 26(1-2): 48-57.

12. Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S and Davison AW (1992) A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophyll a and b in lichens and higher plants. Environmental and Experimental Botany. 32(2): 85-90.

13. Bulgakov VP, Tchernoded GK, Mischenko NP, Khodakovskaya MV, Glazunov VP, Radchenko SV, Zvereva EV, Fedoreyev SA and Zhuravlev YN (2002) Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by Rubia cordifolia callus cultures transformed with the rolB and rolC genes. Biotechnology. 97: 213-221.

14. Cag S, Ahir-Oz GC, Sarsag M and Goren-Saglam N (2009) Effect of salicylic acid on pigment, protein content and peroxidase activity in excised sunflower cotyledons. Pakistanian Journal of Botany. 41(5): 2297-2303.

15. Chen Z, Ricigliano JW and Klessig DF (1993) Purification and characterization of a soluble salicylic acid-Binding protein from tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences. 90: 9533-9537.

16. Chong TM, Abdullah MA, Fadzillah NM, Lai OM and Lajis NH (2005) Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in Morinda elliptica. Enzyme and Microbial Technology. 36: 469-477.

17. Creelman RA, Tierney ML and Mullet JE (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences. 89: 4938-4941.

18. Dong HD and Zhong JJ (2001) Significant improvement of taxane production in suspension cultures of Taxus chinensis by combining elicitation with sucrose feed. Biochemical Engineering. 8: 145-50.

19. Ebel J and Mithofer A (1998) Early events in the elicitation of plant defense. Planta. 206: 335-348.

20. Miyamoto K, Oka M and Uedea J (1997) Update in the possible mode of action of Jasmonates: Focus on the metabolism of cell wall polysaccharides in relation to growth and development. Physiologiae Plantarum. 100: 631-638.

21. Namdeo A (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacognosy Review. 1(1): 69-79.

22. Popova L, Pancheva T and Uzonova A (1997) Salicylic acid: Properties, Biosynthesis and Physiological role. Plant Physiology. 23: 85-93.

23. Raskin I (1992a) Role of salicylic acid in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 43: 439-460.

24. Raskin I (1992b) Salicylate, A new plant hormone. Plant Physiology. 99: 79-803.

25. Roustan JP, Lotche A and Fallot J (1989) Stimulation of Daucus carota somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis cobalt and nickel. Plant Cell Reports. 8: 182-185.

26. Rudell DR and Mattheis JP (2002) Methyl jasmonate enhances Anthocyanin accumulation and modifies production of Phenolics and Pigments in Fuji Apples. Journal of American Society of Horticultural Sciences. 127(3): 435-441.

27. . See KS, Bhatt A and Keng CL (2011) Effect of sucrose and methyl jasmonate on biomass and anthocyanin production in cell suspension culture of Melastoma malabathricum (Melastomaceae). International Journal of Tropical Biology and Conservation. 59(2): 597-606.

28. Swiatek A, Azmi A, Witters E and Van Onckelen H (2003) Stress messengers Jasmonic acid and Abscisic acid negatively regulate plant cell cycle. Bulgarian Journal of Plant Physiology. Special Issue. Pp. 172-178.

29. Szabo E, Thelen A and Peterson M (1999) Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of Coleus blumei. Plant Cell Reports. Pp. 485-489.

30. Tsuchiya T, Ohta H, Okawa K, Lwamatsu A, Shimada H, Masuda T and Takamiya KI (1995) Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. Proceedings of the National Academy of Sciences. 96(26): 15362-15367.

31. Yu DQ, Cen CA, Yang ML and Li BJ (1999) Studies on the salicylic acid inducted lipid peroxidation and defense gene expression in tobacco cell culture. Acta Botanica Sinica. 41: 977-983.

32. Yu KW, Gao W, Hahn EJ and Paek KY (2002) Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of Panax ginseng C.A. Meyer. Biochemical Engineering. 11: 211-5.

33. Yu LJ, Lan WZ, Qin WM and Xu HB (2001) Effects of salicylic acid on fungal elicitor induced membrane-lipid peroxidation and Taxol production in cell suspension cultures of Taxus chinensis. Process. Biochemical. 37: 477-482.