بررسی وضعیت گالاکتوز در قندهای محلول قطعات جداکشت سه گونه اکالیپتوس بعنوان یک نشانگر شرایط رشد بافتها

حسن ابراهیم زاده[۱]، محمد رضا عباسی[۲]، سید محمد فخر طباطبایی[۳]

[۱]دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲] موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، بخش تحقیقات ژنتیک و ذخایر توارثی، کرج

[۳]دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی

چکیده

قطعات جداکشت زیر لپه دانه رستهای سه گونه اکالیپتوس (*Eucalyptus*)، *E. camaldulensis* Dehnh.، *E. viminalis* Labill و *E. froticetorum* E. Muell بر روی محیط LS با سه تیمار هورمونی و در دمای C ° ۲٤جهت تولید کالوس و رشد کشت داده شد. با عصاره‌گیری الکلی- آبی و سپس آبی، قندهای محلول و پلی ساکاریدهای ذخیره ای از بافتها استخراج گردید. ویژگیها و تغییرات کمّی و کیفی قندهای استخراج شده توسط تکنیکهای رنگ‌سنجی، کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و کروماتوگرافی گاز- مایع (GLC) مورد بررسی قرار گرفت. تیمارحاوی ۰/۸۸ µM بنزیل آدنین (BA)، ۲/٦ µM نفتالن استیک اسید (NAA)، ۲/۸ µM اندول بوتیریک اسید (IBA) و ۰/۹ ۲و٤- دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) باعث ایجاد کالوسهای تیره و خشک چوبی شده گردید و بیشترین میزان رشد را در کالوسهای هر سه گونه القا کرد. درصورتیکه در تیمار هورمونی واجد ۲۰ µM 2,4-D کالوسهای آبدار و شفافی بوجود آمد. تیمار واجد ۱۰ µM IBA باعث ایجاد ریشه از جدا کشتها شد. در هر سه گونه تیمارهای ذکر شده پاسخ مشابهی را در جدا کشتها القا نمودند. عمده قندهای عصاره هیدروالکلی هیدرولیز نشده را قندهای گلوکز و ساکارز و تا حدودی رامنوز، فوکوز، ریبوز و گلوکورونیک اسید تشکیل می دهند. این عصاره فاقد گالاکتوز می باشد. در عصاره هیدرولیز شده نیز اثری از گالاکتوز دیده نمی شود، بلکه قندهای گلوکز و فروکتوز ناشی از هیدرولیز ساکارز ، عمده ترین قندهای این بخش را تشکیل می دهند. در عصاره آبی هیدرولیز شده (پلی ساکارید ذخیره ای) قندهای گلوکز، گالاکتوز، مانوز- آرابینوز، گزیلوز بهمراه یک اورونیک اسید در تمام گونه ها و تیمارها تشخیص داده شد. نتایج نشان داد که برخلاف گیاهان کامل اکالیپتوس که در آنها قند گالاکتوز یکی از قندهای عصاره هیدروالکلی هیدرولیز شده است، در قطعات جدا کشت این قند وجود ندارد. درصورتیکه در عصاره آبی هیدرولیز شده کشت بافت دیده می شود. فقدان گالاکتوز در عصاره هیدروالکلی اعم از هیدرولیز شده یا نشده نشانگر وجود شرایط بهینه و عدم شرایط تنش محیطی در رشد بافتهای قطعات جدا کشت می باشد.

واژه های کلیدی: اکالیپتوس، گالاکتوز، کشت بافت

مقدمه

وجود گالاکتوز بعنوان قند غیر ساختمانی در برگ گیاهان اکالیپتوس گزارش شده است (۱). این ترکیب بصورت جزیی از ساختمان گلیکوزیدها و یا الیگوساکاریدها در سلولهای برگی وجود دارد. میشل و همکاران (۱۹۹۸) وجود گلوکوزید فلاوونوئیدی ژنکوانین٤- O- بتا- د- گالاکتوز(genkwanin-4-O-beta-D-galactoside) را در برگهای [*E. camaldulensis*] *E. rostrata* نشان دادند(۳). این ترکیب در هیدرولیز اسیدی، گالاکتوز را بعنوان جزء قندی آزاد می نماید.

گالاکتوز می تواند بعنوان قندی در نظر گرفته شود که بطور مستقیم (در ترکیبات رافینوزی) یا غیر مستقیم (بعنوان

Archive of SID

www.SID.ir

پیشرو بعضی ترکیبات) در شرایط تنش برای مکانیسمهای تحمل گیاه نقش بازی می کند. این ترکیب می تواند بعنوان پیش ماده (پیشرو) مؤثر ال-آسکوربات که به فراوانی در گیاهان در غلظت ۱ تا ۵ میلی مولار در برگها و ۲۵ میلی مولار در کلروپلاستها وجود دارد استفاده شود. وجود آسکوربات بالا در گیاه می تواند نقش افزایش تحمل گیاه به شرایط تنش را ایفا نماید (۱۷).

از طرفی مشخص شده است در دو گونه عناب (*Ziziphus mauritiana* Lamk. and *Z. rotundifolia* Lamk) طی تنش خشکی قندهای اصلی تشکیل دهنده موسیلاژ برگی رامنوز، گلوکز و گالاکتوز هستند. در طی تنش مقدار موسیلاژ برگی تغییر نمی کند ولی مقدار گلوکز و نشاسته در موسیلاژ بطور قابل توجهی کاهش می یابد. این موسیلاژ درون برگی نقشی در کنترل حالت بافری آب سلول برگی در تنش خشکی ندارد بلکه با هیدرولیز آن و انتقال مواد حاصل به ریشه باعث افزایش جذب آب توسط ریشه در هنگام تنش خشکی می شود (۷) .

گیاه *Ajuga reptans* سخت شده در سرما[1]، یک گیاه چند ساله از خانواده نعناعیان، بدلیل وجود مقدار بالای الیگوساکاریدهای خانواده رافینوزی (RFO) در برگهایش مشهور است. این قندها در طول سال تغییر می کنند و بیشترین مقدار را در پاییز و زمستان (۲۰۰mg/g fw) و کمترین مقدار را در تابستان (۷۵ mg/g fw) نشان می دهند. در صورتیکه نشاسته و ساکارز مقدار جزیی را در برگها تشکیل می دهند. تیمار سرمائی گیاهان (14 d at 10/3° c, day/night) مقدار قندهای غیرساختمانی را تا ۱۰ برابر که عمدتاً بخاطر افزایش RFO می باشد افزایش می دهد. درجه بسپار شدن RFO بطور پی درپی تا ۱۵ بار افزایش می یابد. RFO همچنین بعنوان مهمترین قند جابجا شونده در آبکش، بیشتر به شکل استاکیوز، می باشد. مطالعات نشان می دهند که دو خزانه متابولیسم RFO در این گیاه وجود دارد: یکی درمزوفیل برگ که احتمالاً در تحمل به سرما دخالت دارد و دیگری در آبکش است(٤).

حسن یوسف (*Coleus blumei* Benth) در ده روز اول تیمار تنش شوری(60 mM NaCl:12 mM CaCl2)، کاهش شدیدی در میزان رشد و فتوسنتز نشان می دهد که بعد از ۳۰ روز بهبود می یابد. چنین الگوئی از کاهش زود گذر برای نشاسته در بافت برگی سبز هم مشاهده می شود. کاهش سطح نشاسته با ظهور چندین قند تازه از جمله الیگوساکاریدهای خانواده رافینوزی (OFRs) (با درجه پلیمریزاسیون ۵ تا ۸) و اینوزیتول متیله شده در گیاه همراهی می شود. فعالیت آنزیمهای ترانسفرازی مربوطه با تنش شوری القا می شود. آنالیز شیره سلولی نشان داد که در شرایط تنشی مقدار بیشتری از ساکارز و اینوزیتول متیله شده نسبت به OFRs منتقل می شوند. در بافتهای سفید که چاهک (محل مصرف) محسوب می شوند، قندهای شیره آبکشی برای بیوسنتز OFRs مورد استفاده قرار می گیرند، در حالیکه میواینوزیتول متیله در بیوسنتز وارد نمی شود. فعالیت آنزیمهای مسئول سنتز OFRs توسط تنش شوری در بافتهای چاهک القا می شود درصورتیکه برای آنزیمهای میواینوزیتول متیله این عمل انجام نمی گیرد (۹).

تنش خشکی در چمن (*Lolium prenne*) غلظت رافینوز و لولیبوز و آنزیمهای سنتازی وابسته را افزایش نمی هد. برعکس این تنش سبب می شود تا غلظت فروکتانها در بافتهای برگی بویژه در غلاف برگی و پایه های برگی طویل تجمع می یابد. این افزایش عمدتاً بخاطر تجمع فروکتانها واجد زنجیره طویل (با درجه پلیمریزه بیش از ۸) صورت می گیرد که با افزایش ساکارز همراه نیست اما مقدار ساکارز (نه فروکتانها) در ریشه های تحت تنش بطور قابل توجهی افزایش می یابد (Amiard *et al.* 2003).

کشت سلولی حاصل از دورگه مقاوم به سرما *Eucalyptus gunnii/Eucalyptus globulus* در زمان سخت شدن به تنش سرمائی افزایش قابل توجهی از قندهای محلول بویژه

[1] Cool hardening

Archive of SID
www.SID.ir

ساکارز و فروکتوز و افزایش جزیی در اسمولالیته سلولی را نشان می دهد. در صورتیکه در ژنوتیپ حساس به سرمای هیبرید *Eucalyptus cypellocarpa/Eucalyptus globules* این افزایش دیده نمی شود. بعد از مرحله سخت شدن در نمونه مقاوم قندهای محلول ساکارز، رافینوز، فروکتوز و مانیتول افزایش می یابد (١٦).

همچنین وجود گالاکتوز در صمغ حاصل از کالوس جداکشتهای محور زیر لپه و ریشه دو گونه گون (*Astragalus gossypinus* و *A. keyserlingii*) که در پاسخ به تنش (ایجاد زخم) بوجود می آید مشخص شده است (٢).

گیاهان زیتون رشد کرده در تنش ۱۰۰ mM سدیم کلرید که در معرض کربن ١٤ رادیواکتیو گذاشته شده اند، افزایش ورود کربن نشاندار در مانیتول را نشان داده اند. رادیواکتیویته ساکارز بطور معنی داری در گیاهان تحت تنش کاهش می یابد . هیچ اختلاف معنی داری بین گیاهان کنترل و تیمار در مقدار فرکتوز و گالاکتوز وجود ندارد . درصورتیکه اختلاف معنی داری در کاهش رادیواکتیویته استاکیوز و رافینوز دیده می شود. بجز افزایش در مقدار مانیتول اختلاف معنی داری در بین بقیه قند های غیرساختمانی دیده نمی شود (١٠).

مقدار پلی ساکاریدهای دیواره ای محور زیرلپه گیاهان کدو تحت تنش آبی بررسی شد. گالاکتوز و آرابینوز در ترکیبات پکتیکی در گیاهان تحت تنش و غیر تنش افزایش می یابد. تنش آبی سنتز اکثر پلی ساکاریدهای دیواره ای را کاهش می دهد، درصورتیکه بر سنتز پلی ساکاریدهای گالاکتوزی تأثیری ندارد. سنتز پلی ساکاریدهای غیر گالاکتوزی احتمالاً در ارتباط با رشد محور زیر لپه است و پلی ساکاریدهای دارای گالاکتوز ممکن است نقشی در رابطه با جلوگیری از توانائی سست شدن دیواره سلولی داشته باشد(١٤ و ١٥).

در مقاله حاضر ابتدا شرایط لازم برای رشد قطعات جداکشت سه گونه اکالیپتوس تعیین می شود و سپس قندهای موجود در عصاره هیدروالکلی این قطعات قبل و بعد از هیدرولیز و همچنین قندهای تشکیل دهنده عصاره آبی قطعات مذکور بررسی شده وضعیت گالاکتوز بعنوان نشانگر وجود و یا عدم تنش در قطعات جداکشت مورد بحث قرار می گیرد.

مواد و روشها

جهت تهیه بافتهای ریشه ای و کالوسی از قطعات جداکشت محور زیر لپه دانه رستهای سه گونه اکالیپتوس (ویمینالیس، کامالدولنسیس و فروتیستوروم) بر روی محیط کشت LS (١٢) دارای pH=5 در دمای ٢٤ درجه سانتی گراد استفاده گردید. سه تیمار هورمونی: الف) µM ۱۰ اندول بوتیریک اسید (IBA) ب) µM ۲۰ ٢،٤- دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) و ج) تیماری مرکب از µM ۰/۸۸ بنزیل آدنین (BA)، µM ۲/٦ نفتالن استیک اسید (NAA)، µM ۲/۸ IBA و µM ۰/۹ 2,4-D برای القای بافتهای ریشه ای و کالوس استفاده شد.

تعداد ۲۰ پتری دیش از هر تیمار هورمونی و هر گونه گیاهی کشت گردید. رشد نسبی بافتها با توزین هر پتری در دو زمان به فاصله سه هفته و استفاده از فرمول رشد نسبی انجام شد.

$$RGR=2.303(logW2-logW1) /t2-t1$$

تغییرات کمی و کیفی قندهای استخراج شده توسط تکنیکهای رنگ سنجی، کروماتوگرافی لایه نازک و گروماتوگرافی گاز- مایع بررسی شد. در بررسی رنگ سنجی میانگین سه بار اندازگیری از سه نمونه مجزا مورد استفاده قرار گرفت .

برای عصاره گیری، بافتهای حاصل از جداکشت در حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد آون خشک شد وپس از آسیاب، پودر حاصل با اتانول ۸۰٪ در دمای ۷۰ تا ۸۰

Archive of SID

www.SID.ir

درجه سانتی‌گراد طی ۱۵ دقیقه عصاره گیر ی شد. محلول سرد شده حاصل صاف گردید (باقیمانده روی صافی در آون ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد بمدت نیم ساعت خشک گردید و جهت تهیه پلی ساکاریدها نگهداری شد). مایع زیر صافی در دمای ۳۵ تا ٤۰ درجه سانتی‌گراد تبخیرشد. باقیمانده در ml ۵۰ آب مقطر حل شد و با ۱۰ میلی‌لیتر باریم هیدروکسید ۰/۳ نرمال و ۱۰ میلی لیتر سولفات روی ۵٪ در ۲۷۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. ته مانده دور ریخته شد و قسمت روئی به حجم ۷۵ میلی‌لیتر رسید . این محلول حاوی منو و الیگو ساکاریدها است . برای تعیین الیگوساکاریدها (قندهای غیر احیا کننده) مقداری از این محلول را برداشته و یک پنجم حجم آن سولفوریک اسید ٦ نرمال اضافه گردید. مجموعه در حمام آب جوش برای ۲۰ دقیقه هیدرولیز شد. پس از سرد شدن، توسط باریم سولفات خنثی و سپس سانتریفیوژ، و به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. این محلول حاوی منو ساکاریدها می باشد. بمنظور استخراج پلی ساکاریدهای درون سلولی، رسوب روی صافی حاصل از عصاره‌گیری الکلی که در بالا ذکر شد، پس از خشک کردن و سائیدن (جهت یکنواخت شدن ماده) در آب جوش برای ۵ دقیقه جوشانیده شد و پس از صاف کردن، این عمل برای باقیمانده روی صافی تکرار گردید. پس از سرد شدن، محلول زیر صافی به حجم رسانیده شد ، محلول حاوی پلی ساکاریدهای درون سلولی می‌باشد و برای آزاد کردن زیر واحدهای پلی ساکارید حجمی از محلول حاصل با یک پنجم حجم از سولفوریک اسید ٦ نرمال در حمام آب جوش بمدت ۳ ساعت هیدرولیز شده و با باریم کربنات خنثی گردید و باریم سولفات راسب شده از محیط حذف شد. باقیمانده به حجم رسانده،۵ میلی لیتر از محلول جهت بررسی کمی استفاده شد و بقیه در آون خلاء تبخیر گردید (۸).

از آنجائیکه تمام محلولهای بدست آمده بصورت قندهای تک واحدی می‌باشند از روش رنگ سنجی ارائه شده توسط نلسون استفاده شد. برای اندازه گیری قندهای غیراحیا کننده از محلول بعد از هیدرولیز اسیدی استفاده و محاسبه به شکل زیر انجام شد :

مقدار قندهای حاصل از سنجش محلول هیدرولیز نشده- مقدار قندهای حاصل از سنجش محلول هیدرولیز شده = مقدار قندهای غیر احیاکننده

برای سنجش پلی ساکاریدهای درون سلولی محلول هیدرولیز شده روی صافی مورد استفاده قرار گرفت . اندازه‌گیریهای رنگ سنجی در سه تکرار از هر نمونه انجام شد.

در کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) برای پوشش صفحات (۲۰×۲۰ سانتیمتر) از ۳۰ گرم سیلیکاژل G60 در۷۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (ارتو فسفریک اسید ۱/. مولار + دی‌سدیم هیدروژن فسفات دارای دوازده مولکول آب تبلور ، در حجمهای مساوی و pH=5) در دستگاه TLC-Coater استفاده شد. صفحات در دمای اتاق خشک شدند و بعد از ٢٤ ساعت مورد استفاده قرار گرفتند. پس از لکه گذاری، صفحات در داخل تانک ویژه کروماتوگرافی حاوی حلال: استن- ۱- بوتانول- بافرفسفات (۱۰+٤۰+۵۰) گذاشته شد (٦). برای ظاهرسازی نوارها از معرف تازه دارای ۵۰ میلی‌لیتر استن، ۱گرم دی‌فنیل آمین، یک میلی‌لیتر آنیلین و ۵ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۸۵٪ استفاده شد (۱۱) در تهیه معرف رعایت ترتیب اضافه نمودن مواد و همزدن محلول ضروری می‌باشد. بعد از بیرون آوردن صفحات از تانک و خشک شدن در هوای آزمایشگاه، با معرف ظهور و زیر هود بطور یکنواخت اسپری شد. سپس جهت ظاهر سازی در آون ۱۰۰ تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه قرارگرفت . در برخی نمونه‌ها تا ٦۰ دقیقه گرمادهی برای ظهور نوارها لازم است. زمان و دمای آون دررنگ و ظهور نوارها مؤثرند.

در کروماتوگرافی گاز- مایع (GLC)، برای مشتق سازی قندها، استاتهای آلدیتول قندها طبق روش انجام شده توسط بلاکنی و همکاران تهیه شد (۵) . جهت نمونه‌های

Archive of SID

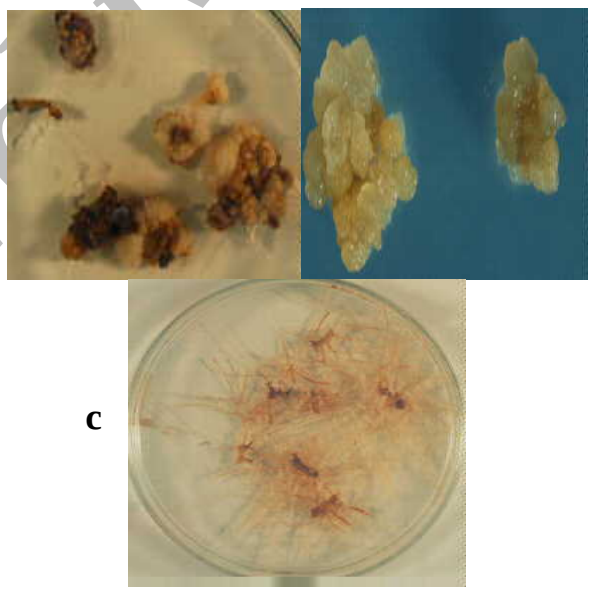
www.SID.ir

استاندارد، ۰/۵ میلی‌گرم و برای نمونه‌های گیاهی بدلیل وجود ناخالصی، ۵ میلی‌گرم ماده خشک استفاده شد. پس از آماده سازی، کروماتوگرام نمونه‌ها توسط دستگاه GC مدل 16A ساخت شرکت شیمادزو بدست آمد. ستون مورد استفاده شیشه‌ای SE-30 ۵درصد، گاز حامل، نیتروژن و آشکارساز، یونیزاسیون شعله‌ای (FID) بود. گاز هیدروژن و هوا برای سوختن، توسط ژنراتور مدل OPGU 1500S و یک پمپ هیتاچی تأمین شد. چاپگر از نوع C-R5A و نوع کاغذ آن حرارتی بود. در این تحقیق از شرایط هم دمائی با ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد برای آون ستون و ۲۱۰ درجه سانتی‌گراد برای محل تزریق و ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد برای آشکار ساز استفاده شد. فشار رگولاتور کپسول نیتروژن ۵ Kg/Cm2 و جریان نیتروژن 50 ml/min و هوا 400 ml/min انتخاب شد. حساسیت چاپگر ۲ و سرعت حرکت کاغذ ۱/۵ تا ۳ میلی‌متر در دقیقه و مقدار تزریق ۱تا ۳ میکرولیتر بود.

برای هریک از اندازه گیریهای رنگ سنجی سه نمونه (پتری دیش) ارزیابی گردید. برای محاسبه درصد آب بافتها، ابتدا وزن تر اندازگیری شد سپس، نمونه ها در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد بمدت ۲٤ ساعت خشک و بلافاصله وزن شدند. آزمون t برای مقایسه بین درصد آب نمونه ها، رشد نسبی نمونه ها و تغییرات مقدار کل قندهای القا شده توسط تیمارهای هورمونی مختلف انجام شد.

نتایج و بحث

تیمار هورمونی IBA۱۰ µM باعث تولید ریشه های زیاد از جداکشتهای محور زیر لپه ای شد. تیمار هورمونی ۲۰ µM 2,4-D کالوسهای آبدار و شفافی بوجود آورد که مقدار آب بافتی آنها نسبت به تیمار دیگر القاء کننده کالوس بیشتر بود. تیمار مرکب از BA ۰/۸۸ µM، NAA ۲/٦ µM، IBA ۲/۸ µM و 2,4-D ۰/۹ µM باعث ایجاد کالوسهای تیره و خشک چوبی شده گردید (شکل ۱). در هر سه گونه اکالیپتوس تیمارهای ذکر شده پاسخ مشابهی را در جدا کشتها القا نمودند. لازم بذکر است این تیمارها در پی آزمایش چندین تیمار هورمونی انتخاب شد زیرا کمترین مقدار تراوش ترکیبات پلی فنلی را در محیط کشت آزاد کرده و همچنین پاسخهای تمایزی متفاوتی را در جداکشت ها القا می نمودند.



شکل ۱- تولید بافتهای: a) کالوس خشک و چوبی با تیمار هورمونی مرکب از BA ۰/۸۸ µM، NAA ۲/٦ µM، IBA ۲/۸ µM و 2,4-D ۰/۹ µM b) کالوس آبدار در تیمار هورمونی ۲۰ µM 2,4-D و c) ریشه زائی در تیمار هورمونی IBA۱۰ µM، در جداکشت محور زیر لپه سه گونه اکالیپتوس بر روی محیط LS، در روشنائی و ۲٤ درجه سانتی گراد.

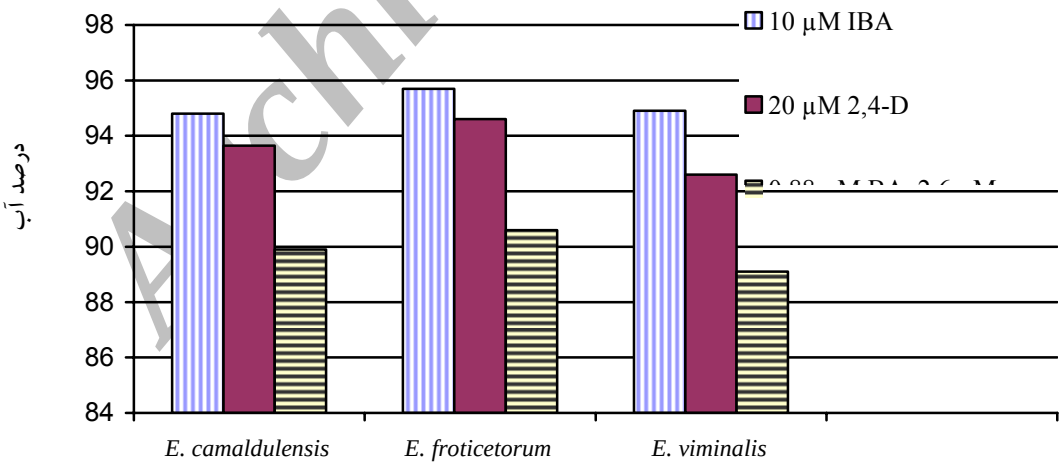
Archive of SID
www.SID.ir

درصد آب در بافت حاصل از تیمار **µM** ۱۰ IBA که ریشه زائی را در جدا کشتها القا می نمود نسبت به دو تیمار دیگر در هر سه گونه بیشتراست . همچنین در بین دو تیمار القاء کننده کالوس درصد آب بافت همچنانکه شکل کالوسها نشان می دهد (شکل۱)، در تیمار 2,4-D بیشتر بود. شکل ۲ و نتایج آزمون t وجود این اختلافات را تأیید نمود. براساس این آزمون اختلاف معنی داری در آب القا شده بافتها توسط تیمارهای هورمونی وجود دارد (جدول۱).

جدول ۱- نتایج آزمون **t** برای مقایسه درصد آب القا شده توسط تیمارهای هورمونی در سه گونه اکالیپتوس

تیمار هورمونی	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
10 µM IBA	162.081	2	.000	93.6167	91.1315	96.1018
20 µM 2,4-D	207.385	2	.000	89.8667	88.0022	91.7311
0.88 µM BA, 2.6 µM NAA, 2.8 µM IBA, 0.9 µM 2,4-D	334.035	2	.000	95.1333	93.9079	96.3587

میزان رشد نسبی کالوسهای هر سه گونه در پاسخ به تیمار های هورمونی مشابه بود . هر چند بین گونه ها در پاسخ به تیمار هورمونی تنوع وجود داشت ولی تیمار هورمونی مرکب از µM ۰/۸۸ BA، µM ۲/٦ NAA، µM ۲/۸ IBA و µM ۰/۹ 2,4-D نسبت به دو تیمار دیگر بیشترین میزان رشد را در کالوسهای هر سه گونه القاء کرد (شکل ۳).



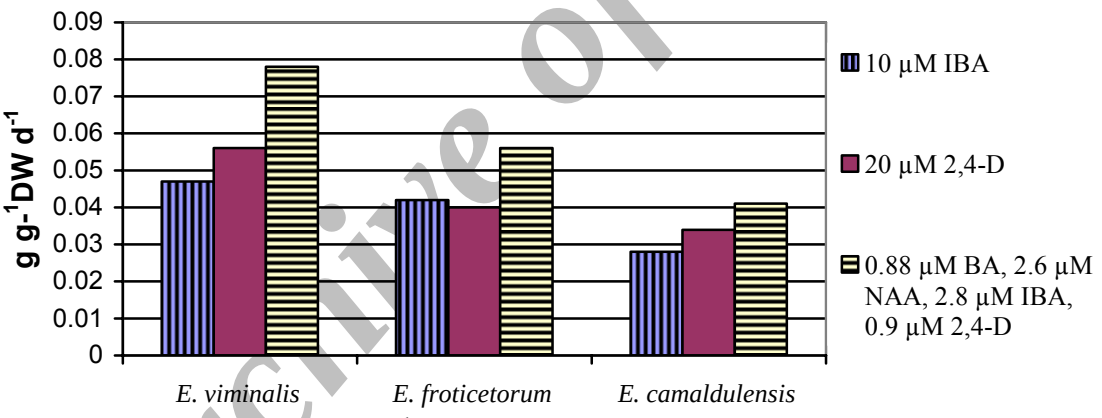
شکل ۲- درصد آب بافتهای حاصل از کشت بافت سه گونه اکالیپتوس در سه تیمار هورمونی

Archive of SID
www.SID.ir

تیمار هورمونی ۱۰ µM IBA کمترین تأثیر را بر میزان رشد نسبی بافتها در گونه های کامالدولنسیس و ویمینالیس داشت، درصورتیکه پاسخ گونه فروتیستوروم به تیمارهای هورمونی ۱۰ µM IBA و ۲۰ µM 2,4-D تقریبا مشابه ولی کمتر از تیمار هورمونی سوم در القای میزان رشد نسبی بر جداکشتها بود (شکل۳). نتایج آزمون t وجود این گونه تفاوتها را در سطح پنج درصد نشان داد (جدول۲).

جدول ۲- نتایج آزمون t برای مقایسه اثر تیمار هورمونی در رشد نسبی بافتها در سه گونه اکالیپتوس

تیمار هورمونی	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
10 µM IBA	6.600	2	.022	.0433	.0151	.0716
20 µM 2,4-D	5.429	2	.032	.0583	.0121	.1046
0.88 µM BA, 2.6 µM NAA, 2.8 µM IBA, 0.9 µM 2,4-D	6.859	2	.021	.0390	.0145	.0635



شکل۳- میزان رشد نسبی بافتهای حاصل از کشت بافت سه گونه اکالیپتوس در سه تیمار هورمونی

مقدار قندهای احیا کننده (منوساکاریدها)، غیر احیاکننده (الیگوساکاریدها) و پلی ساکاریدها بترتیب از ۲۰/۸۳ تا ٤۷/۳۹، ۹/۱ تا ۷۷/۳ و ۷ تا ٤٥/٥ میلی گرم بر گرم وزن خشک بافت در تیمارها و گونه های مختلف متغییر بود (جدول ۳).

آزمون t اختلاف معنی داری را در سطح ۵ درصد برای قندهای احیاکننده در تیمارهای مختلف نشان داد. در قندهای غیر احیا کننده اختلاف معنی داری بین تیمارها دیده نشد ولی در پلی ساکارید ذخیره ای تیمار هورمونی 2,4-D اختلاف معنی داری را در سطح ۵ درصد نشان داد (جدول٤).

گرچه، همانگونه که نتایج رنگ سنجی نشان دادند، مقدار قندهای مختلف در تیمارها و گونه ها متفاوت بود، ولی با توجه به نتایج حاصل از کروماتوگرافی لایه نازک، از نظر کیفی تفاوتی در نوع قندها در تیمارهای هورمونی متفاوت و در گونه ها وجود نداشت.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- مقدار قندهای احیا کننده، غیر احیا کننده و پلی ساکاریدها در تیمارهای هورمونی مختلف سه گونه اکالیپتوس براساس رنگ سنجی

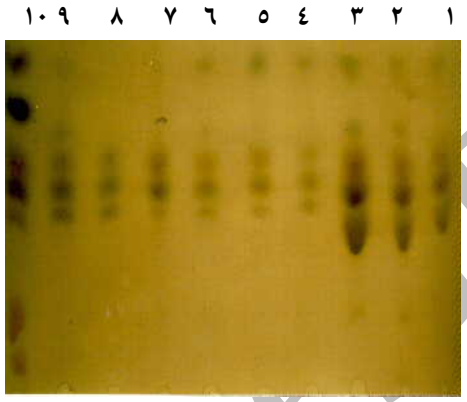
نوع قند و گونه	تیمار هورمونی		
	10 µM IBA	20 µM 2,4-D	0.88 µM BA, 2.6 µM NAA, 2.8 µM IBA, 0.9 µM 2,4-D
احیا کننده			
کاملدولنسیس	36.9	21.2	21.3
فروتیستوروم	20.83	32.1	33.16
ویمینالیس	47.39	31.98	25.77
غیر احیا کننده			
کاملدولنسیس	12.6	77.3	29.7
فروتیستوروم	76.3	9.1	11
ویمینالیس	14.2	10.5	10.66
پلی ساکارید			
کاملدولنسیس	7.9	10.5	6.5
فروتیستوروم	45.5	7	10
ویمینالیس	8.8	8.3	17.6

جدول٤- نتایج آزمون t برای مقایسه تیمارهای هورمونی در القا تولید ترکیبات قندی در سه گونه اکالیپتوس بر اساس نتایج رنگ سنجی

نوع گروه قند و تیمار هورمونی	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
احیا کننده						
10 µM IBA	4.537	2	.045	35.0400	1.8089	68.2711
20 µM 2,4-D	7.867	2	.016	28.4267	12.8790	43.9743
0.88 µM BA, 2.6 µM NAA, 2.8 µM IBA, 0.9 µM 2,4-D	7.734	2	.016	26.7433	11.8643	41.6224
غیر احیا کننده						
10 µM IBA	1.639	2	.243	34.3667	-55.8675	124.6008
20 µM 2,4-D	1.435	2	.288	32.3000	-64.5253	129.1253
0.88 µM BA, 2.6 µM NAA, 2.8 µM IBA, 0.9 µM 2,4-D	2.721	2	.113	17.1200	-9.9470	44.1870
پلی ساکارید						
10 µM IBA	1.674	2	.236	20.7333	-32.5596	74.0262
20 µM 2,4-D	8.420	2	.014	8.6000	4.2051	12.9949
0.88 µM BA, 2.6 µM NAA, 2.8 µM IBA, 0.9 µM 2,4-D	3.469	2	.074	11.3667	-2.7303	25.4636

www.SID.ir

عمده قندهای عصاره هیدرولیز نشده را قندهای ساکارز و گلوکز و در مواردی رامنوز- فوکوز- ریبوز و گلوکورونیک اسید تشکیل می دادند (شکل٤). چون رامنوز، فوکوز و ریبوز Rf تقریباً مشابهی داشتند لکه ظاهر شده در بالا ی نوار می تواند مربوط به این قندها باشد. البته همانگونه که ذکر خواهد شد، نتایج GLC نشان داد این قندها در محلول وجود دارند قندهای مشاهده شده در این بخش از عصاره بافتهای حاصل از کشت بافت، بجز در فقدان رافینوز شبیه به ترکیبات قندی موجود در گیاه کامل سه گونه اکالیپتوس بود (۱).



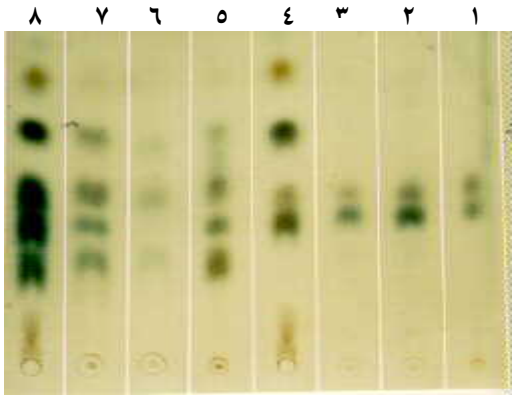
شکل٤- کروماتوگرام عصاره هیدرولیز نشده قندهای محلول موجود در بافتهای حاصل از کشت بافت، نوارها از راست به چپ: ۱،۲و ۳) گونه کامالدولنسیس بترتیب تیمارهای: مرکب* ، 2,4-D ، IBA . نوارهای٤، ٥ و ٦) گونه ویمینالیس بترتیب تیمارهای: مرکب* ، 2,4-D ، IBA. نوارهای ۷، ۸ و ۹) گونه فروتیستوروم بترتیب تیمارهای: مرکب* ، 2,4-D ، IBA و نوار ۱۰) قندهای استاندارد (از پائین به بالا: گالاکتورونیک اسید، گلوکورونیک اسید، ساکارز، گلوکز، فروکتوز، گزیلوز و رامنوز). ترکیب قندی سه نوار اول همانند نوارهای بعدی است ولی بدلیل غلظت عصاره نیمرخ ظاهراً متفاوتی را نشان می دهند.

* تیمار مرکب= تیمار هورمونی مرکب از۰/۸۸ µM BA، ۲/٦ µM NAA، ۲/۸ µM IBA و ۰/۹ µM 2,4-D

در عصارهٔ هیدرولیز شدهٔ قندهای محلول، اثری از گالاکتوز دیده نشد وقندهای گلوکز و فروکتوز که از هیدرولیز ساکارز ناشی می شوند مهمترین قندهای این بخش را تشکیل می دهند (شکل٥). اگرچه در شکل ٥، کروماتوگرافی لایه نازک برای گونه فروتیستوروم نشان داده شده است ولی برای بقیه گونه ها نیز الگوی مشابه با این کروماتوگرام قابل مشاهده بود. لازم بذکر است در عصاره هیدرولیز شده قندهای محلول در گیاه کامل (ابراهیم زاده و همکاران ۱۳۸۲) وجود گالاکتوز نشان داده شده است که از هیدرولیز ترکیبات گروه رافینوز حاصل شده است. در عصاره هیدرولیز شده پلی ساکارید ذخیره ای، قندهای گلوکز، گالاکتوز، مانوز- آرابینوز، گزیلوز همراه یک اورونیک اسید مهمترین قندهای تشکیل دهنده این بخش در تمام گونه ها و تیمارها بود (شکل٦،٥و٧).

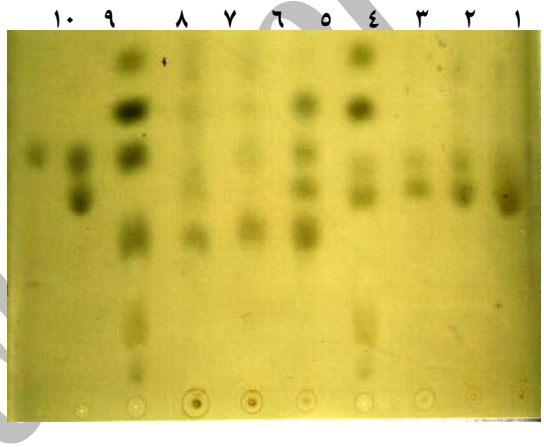
قندهای تشکیل دهندهٔ عصاره پلی ساکاریدی الگوئی مشابه با کروماتوگرام این عصاره در گیاه کامل را نشان داد (۱). نتایج حاصل از کروماتوگرافی گاز-مایع وجود قندهای مشاهده شده در کروماتوگرافی لایه نازک را تایید کرد و تغییرات کمی در مقدار قندها را در تیمارها و گونه های مختلف نشان داد. اگر تیمار هورمونی مرکب (۰/۸۸ میکرومولار BA، ۲/٦ میکرومولار NAA، ۲/۸ میکرومولار IBA و ۰/۹ میکرومولار 2,4-D) بدلیل القای میزان رشد نسبی بالا و تولید آب کم در بافتها بعنوان تیمار هورمونی نمونه در نظر گرفته شود، بیشترین مقدار قندهای عصارهٔ محلول را قندهای گلوکز و فروکتوز تشکیل می دهند و مقدار قند رامنوز کمترین درصد نسبی را دارد که نتیجه حاصل از کروماتوگرام لایه نازک را تأیید می کند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۵- کرو ماتوگرام قندهای موجود در قطعات جدا کشت گونه فروتیستوروم، نوار ۱) تیمار مرکب* ، نوار ۲) 2,4-D ، نوار ۳) IBA ، در عصاره هیدرولیز شده قندهای بخش محلول، نوار ٤) قندهای استاندارد از پائین به بالا (گالاکتورونیک اسید، گلوکورونیک اسید، گلوکز، فروکتوز، ریبوز و رامنوز)، نوار ٥) تیمار مرکب* نوار ٦) ، 2,4-D ، نوار ۷) IBA ، در عصاره هیدرولیز شدهٔ پلی ساکاریدی و نوار ۸) قندهای استاندارد از پائین به بالا (گالاکتورونیک اسید، گلوکورونیک اسید، گالاکتوز، گلوکز، آرابینوز- مانوز، گزیلوز و رامنوز)

* تیمار مرکب= تیمار هورمونی مرکب از۰/۸۸ µM ،BA ۲/٦ µM ،NAA ۲/۸ µM و IBA ۰/۹ µM 2,4-D

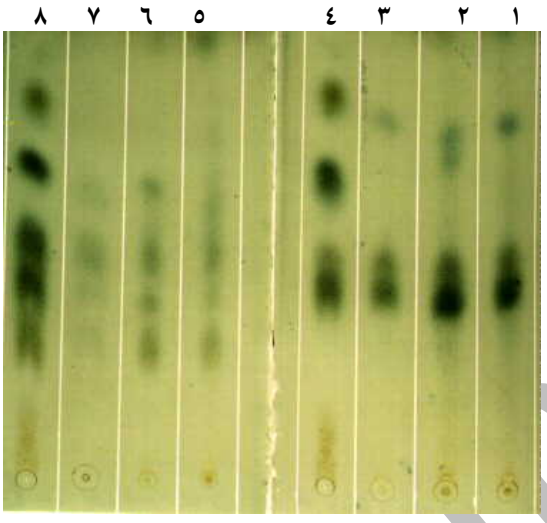


شکل٦- کرو ماتوگرام قندهای موجود در قطعات جدا کشت گونه کامالدولنسیس، نوار ۱) تیمار مرکب* ، نوار ۲) IBA، نوار ۳) 2,4-D، در عصاره هیدرولیز شده قندهای بخش محلول، نوار ٤) قندهای استاندارد از پائین به بالا (گالاکتورونیک اسید، گلوکورونیک اسید، گلوکز، فروکتوز، گزیلوز و رامنوز)، نوار ٥) تیمار مرکب* نوار ٦) ، 2,4-D ، نوار ۷) IBA ، در عصاره هیدرولیز شدهٔ پلی ساکاریدی و نوار ۸) قندهای استاندارد از پائین به بالا (گالاکتورونیک اسید، گلوکورونیک اسید، آرابینوز، گزیلوز و رامنوز)، نوار ۹) از پایین به بالا قندهای استاندارد گلوکز و مانوز و نوار ۱۰) قند استاندارد فوکوز

- تیمار مرکب= تیمار هورمونی مرکب از۰/۸۸ µM ،BA ۲/٦ µM ،NAA ۲/۸ µM و IBA ۰/۹ µM 2,4-D

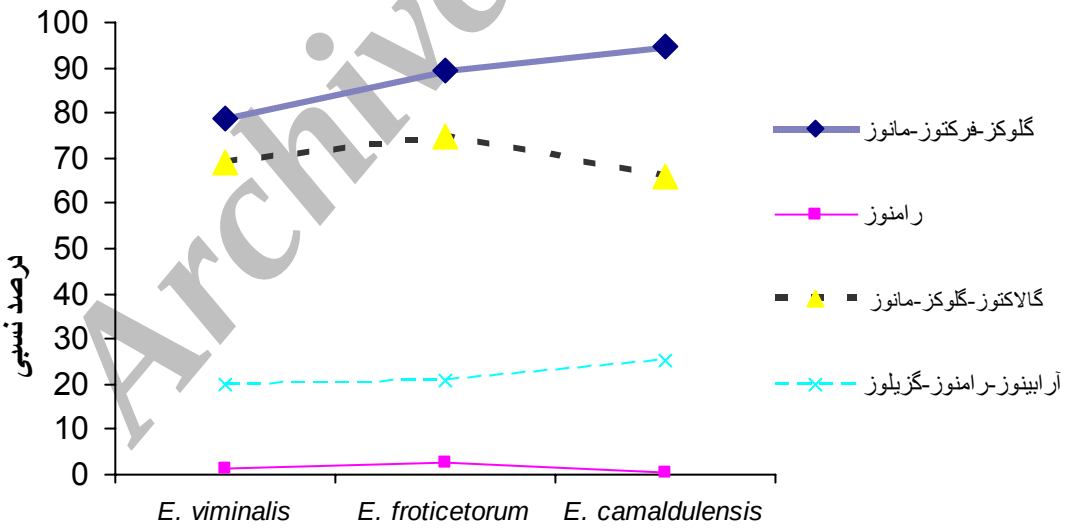
همچنین آنالیز عصاره پلی ساکاریدی نشان داد که درصد نسبی گلوکز- گالاکتوز و مانوز نسبت به آرابینوز- رامنوز- گزیلوز بیشتر است (شکلهای ۷ و ۸). چنین تغییراتی را برای عصاره حاصل از گیاهان کامل این سه گونه نیز گزارش شده است (۱).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۷-کرو ماتوگرام قندهای موجود در قطعات جدا کشت گونه ویمینالیس، نوار ۱) تیمار مرکب* ، نوار ۲) 2,4-D ، نوار ۳) IBA ، در عصاره هیدرولیز شده قندهای بخش محلول، نوار ٤) قندهای استاندارد از پائین به بالا (گالاکتورونیک اسید، گلوکورونیک اسید، گلوکز، فروکتوز، ریبوز و رامنوز)، نوار ٥) تیمار مرکب* نوار ٦) ، 2,4-D ، نوار ۷) IBA ، در عصاره هیدرولیز شدهٔ پلی ساکاریدی و نوار ۸) قندهای استاندارد از پائین به بالا (گالاکتورونیک اسید، گلوکورونیک اسید، گلوکز، آرابینوز- مانوز، گزیلوز و رامنوز)

- تیمار مرکب= تیمار هورمونی مرکب از BA ۰/۸۸ µM، NAA ۲/٦ µM، IBA ۲/۸ µM و 2,4-D ۰/۹ µM



شکل۸- تغیرات قندهای بخش محلول (خط پیوسته) و پلی ساکاریدی (خط شکسته)، بر اساس نتایج کروماتوگرافی گاز مایع، بافتهای کالوس چوبی شده سه گونه اکالیپتوس در محیط LS و تیمار هورمونی مرکب از IBA ، NAA، BA و D-٤,۲

Archive of SID
www.SID.ir

قند گالاکتوز یکی از قندهای تشکیل دهندهٔ محلول عصاره آبی- الکلی گیاهان کامل اکالیپتوس است که بصورت ترکیب در مولکولهای الیگوساکاریدی از قبیل رافینوز و استاکیوز وجود دارد. این قند در گیاهان کامل اکالیپتوس در پاسخ به شرایط تنشی حاکم بر گیاه بوجود می آید (۱).

نتایج حاکی از آن است که گرچه در عصاره قندهای بخشهای محلول و پلی ساکاریدی حاصل از قطعات جدا کشت در مقایسه با گیاهان کامل سه گونه اکالیپتوس تا حدود زیادی در بعضی موارد همخوانی وجود دارد، ولی در بعضی موارد اختلافات اساسی دیده می شود. از جمله این که گالاکتوز که یکی از قندهای عصارهٔ هیدرولیز شدهٔ بخش محلول در گیاهان کامل است (۱).در قطعات جداکشت عصاره هیدرولیز شدهٔ بخش محلول دیده نمی شود (نوارهای ۱، ۲ و ۳ در شکلهای ٥، ٦ و۷). درصورتیکه این قند در عصاره هیدرولیز شده پلی ساکاریدی کشت بافت همانند گیاهان کامل مشاهده می گردد (نوارهای ٥، ٦ و ۷ در شکل ٥) و همانگونه که در نوارهای ٥، ٦ و ۷ شکلهای ٥، ٦ و ۷ دیده می شود لکه مربوط به گالاکتوز (اولین لکه واضح از پائین) حتی پر رنگ تر از لکه مربوط به گلوکز (دومین لکه واضح از پائین) است. فقدان گالاکتوز در عصارهٔ هیدرولیز شده نشان می دهد که این قند احتمالا در پاسخ به شرایط تنشی بعنوان قند موجود در گروه رافینوزی بخش محلول (۹،۱۰و٤) و بعنوان پیش مادهٔ آسکوربیک اسید، افزایش دهنده تحمل در پاسخ به شرایط تنشی (۱۷) و یا گیاهان کامل در شرایط تنشی بعنوان قند ساختمانی در جزء پکتینی پلی ساکاریدهای دیواره ای (١٤ و ١٥) ایفای نقش می نماید.

بنابراین از آنجا که کشتهای اکالیپتوس مورد مطالعه در این تحقیق در شرایط بهینه رشد قرار داشته و هیچگونه تنشی بر آنها وارد نشده است ، بافتها این ترکیب را بعنوان قند شاخص شرایط تنشی حاکم بر بافت تولید ننموده اند. بنابراین مقدار آن در کروماتوگرافی لایه نازک قابل ردیابی نبود. ولی همانگونه که ابراهیم زاده و همکاران (۱۳۸۲) نشان دادند این قند در گیاهان کامل سه گونه اکالیپتوس که بطور طبیعی در معرض تنشهای محیطی قرار داشتند در تمام فصول و همه گونه ها توسط سازگانهای آنزیمی گیاه سنتز می شود و گیاه را برای مقابله با شرایط محیطی آماده می نماید.در نتیجه فقدان گالاکتوز در عصارهٔ محلول قندی نشانگر وجود شرایط بهینه برای رشد سلول و بافت است.

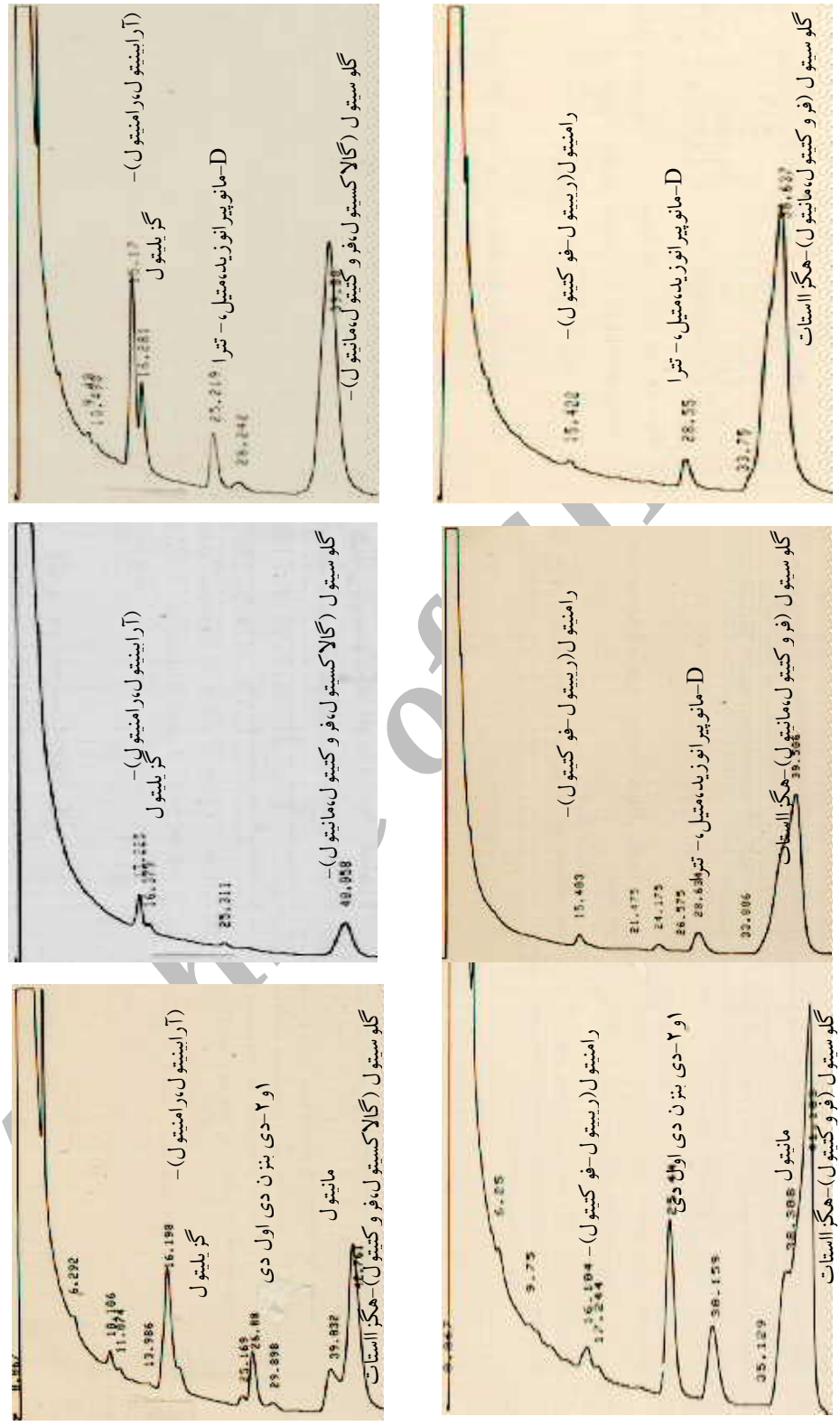
منابع

۱- ابراهیم زاده ح، عباسی م ر و فخرطباطبائی س م. ۱۳۸۲. بررسی اثر شرایط محیطی بر تغییرات کربوهیدراتها در سه گونه اکالیپتوس (*Eucalyptus*): *viminalis* Labill, *E. E. camaldulensis* Dehnh. *froticetorum* E. Muell . مجله زیست شناسی ایران جلد١٦، شماره٤.

۲- ابراهیم زاده ح و میقانی ف. ۱۳۷۷. مطالعات کمی و کیفی تراگاکانت در جداکشتهای دو گونه *Astragalus* (*A. gossypinus* Fisch. and *A. keyserlingii* Bunge). مجله نهال و بذر ، جلد ١٤ شماره۱.

3- Amiard V., Morvan-Bertrand A., Billard ., Huault C., Keller F. and M.P. Prud'homme. 2003. Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in perennial ryegrass. *Plant Physiology,* 132, 2218-2229.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۹- کروماتوگرامهای گاز مایع تیمار هورمونی مرکب. کروماتوگرامهای سمت راست قندهای بخش محلول و سمت چپ قندهای پلی ساکارید ذخیره‌ای . گونه های گیاهی از بالا به پایین : کامالدولنسیس، فروتیستوروم و ویمینالیس

www.SID.ir

4-Bachmann M., P. Matile and F. Keller. 1994. Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of Ajuga reptans L. (cold acclimation, translocation, and sink to source transition: discovery of chain elongation enzyme). Plant Physiology,105, 1335-1345.

5-Blakeney, A. B., P. J.Harris, R. J.Henry, and B. A. Stone. 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. Carbohydrate Research113:291–99.

6-Chaplin M.F. and J.F Kenedy.1986. Carbohydrate analysis, a practical approach, monosaccharides. IRL Press, Oxford.

7-Clifford S.C., S.K. Arndt, M. Popp and H.G. Jones. 2002. Mucilages and polysaccharides in Ziziphus species (Rhamnaceae): localization, composition and physiological roles during drought-stress. Journal of Experimental Botany, 53 (366):131-138.

8-Ebrahimzadeh H. (1969). Metabolisme Glucidique associé à L'organogenèse florale in vitro chez Nicotiana tabacum L. These de doctorat d'etat ès sciences naturelles ;La Faculaté des Sciences de Paris.

9-Gilbert G. A., C. Wilson and M. A. Madore. 1997. Root-zone salinity alters raffinose oligosaccharide metabolism and transport in Coleus. Plant Physiology, 115 (3):1267-1276.

10-Gucci, R; Moing A; Gravano E and JP Gaudillere. 1998. Partitioning of photosynthetic carbohydrates in leaves of salt-stressed olive plants. Australian Journal of Plant Physiology. 25 (5): 571-579.

11-Jork H., Funk W., Fischer w. and H. Winimer. 1990. Thin- layer chromatography. Reagent and detection method. Vol.1. VCH Publishers, 107-157.

12-Linsmaeir E. M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18: 100-127.

13-Michael HN., Salib JY; MS Ishak. 1998. New genkwanin glycoside from Eucalyptus rostrata leaves. Pharmazie. 1998, 53 (2): 145-146.

14-Sakurai N., Tanaka S and S Kuraishi. 1987. Changes in wall polysaccharides of squash (Cucurbita maxima Duch.) hypocotyls under water stress condition. I. Wall sugar composition and growth as affected by water stress. Plant-and-Cell-Physiology. 28 (6): 1051-1058.

15-Sakurai N., Tanaka S and S Kuraishi. 1987. changes in wall polysaccharides of squash (Cucurbita maxima Duch.) hypocotyls under water stress condition. II. Composition of pectic and hemicellulosic polysaccharides. Plant-and-Cell-Physiology. 28 (6): 1059-1070.

16-Travert S., L. Valerio, I. Fouraste, A. M. Boudet and C. Teulieres. 1997. Enrichment in specific soluble sugars of two Eucalyptus cell-suspension cultures by various treatments enhances their frost tolerance via a noncolligative mechanism. Plant Physiology , 114(4): 1433-1442.

17-Wheeler GL., Jones MA and N Smirnoff. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. Nature-London. 393: 365-369.

Archive of SID

www.SID.ir

Study of glactose in the extracted soluble sugars from three *Eucalyptus* species explants as a marker of explants growth conditions

Ebrahimzadeh H.[1], Abbasi M.[2], and Fakhr Tabatabaei M.[3]

[1]**Biology Dep, Science Faculty, Tehran University**

[2]**Plant Genetics and Genetic Resources Dep, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj,**

[3]**Horticultural department, Agriculture Faculty, Tehran University**

Abstract

Hypocotyledon explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *E. froticetorum* E. Muell and *E. viminalis* Labill were cultured on LS medium with three hormonal treatments at 24 ºC and were used to produce callus and root. The non-structural carbohydrates were extracted. These sugars were quantitatively and qualitatively analyzed based on spectrophotometry, thin layer chromatography and gas liquid chromatography. A hormonal treatment with a combination of 0.88 µM BA, 2.6 µM NAA, 2.8 µM IBA, and 0.9 µM 2, 4-D which produced the dark woody callus, induced the highest growth rate. Whereas in 20 µM 2, 4-D the light-fresh callus were produced. At IBA 10 µM the explants produced too much root. The major sugars in the nonhydorized of soluble sugars extraction were sucrose and glucose and a little amount of romnose, fructose, ribose and glucoronic acid. Also in this fraction there was no any galactose. In the its hydrolyzed fraction there was no galactose, whereas glucose and fructose which was produced from sucrose were the major sugars in this fraction. In ydrolyzed nonstructural - polysaccharide fractions, galactose, glucose, mannose – arabinose, xylose and one uronic acid were appeared in all treatments and species. Contrary to sugars in intact plants of *Eucalyptus* tree, there was no any galactose in the hydrolyzed soluble sugars fraction in the tissue culture extractions, but it was appeared in the hydrolyzed nonstructural - polysaccharides fraction of explant extractions. The absence of galactose in the hydrolyzed or unhydrolized soluble extraction sugars could serve as a marker or an indicator for optimum conditions of growth of explants.

Key word: Eucalyptus , Galactose , Tissue cultuer

Archive of SID

www.SID.ir