

## تأثیر برخی آنتی‌اکسین‌ها بر شاخص‌های ریزازدیادی، رشدی و

### فعالیت IAA-اکسیداز پایه رویشی سنت‌جولین-A

قاسمعلی گروسی\*، امید استاد شریف و اسمعیل نظامی

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۰۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۱۱/۱۴)

#### چکیده:

پایه رویشی سنت‌جولین A یکی از پایه‌های رویشی نیمه پاکوتاه جنس پرونوس می‌باشد که به دلیل مقاومت به برخی بیماری‌ها و آفات شایع در هسته‌داران و همچنین سازگاری بالا در ارقام مختلف هسته‌داران از اهمیت خاصی برخوردار است. در این مطالعه تأثیر متیل‌جاسمونات، آنتی-اکسین‌های تیا و اسکوپولتین بر برخی شاخص‌های نوساقه‌زایی، فعالیت آنزیم IAA-اکسیداز و همچنین بهبود برخی نارسایی‌های رشدی مانند رشد کند و بطئی نوساقه‌های تولید شده در طی فرآیند ریزازدیادی در شرایط درون‌شیشه مورد مطالعه قرار گرفت. دو نوع ریزنمونه در آزمایش‌ها استفاده شد؛ ریزنمونه‌های با رشد عادی و با رشد کند و بطئی. در ریزنمونه‌های عادی اسکوپولتین و متیل‌جاسمونات با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط MS میزان نوساقه‌زایی را (به ترتیب  $3/5 \pm 0/2$  و  $2/06 \pm 0/06$ ) و رشد طولی را (به ترتیب  $1/77 \pm 0/02$  و  $1/45 \pm 0/03$ ) به معنی‌داری نسبت به شاهد و تیا افزایش دادند. این مواد همچنین تأثیر بسیار معنی‌داری در افزایش پارامترهای نوساقه‌زایی (به ترتیب  $3/18 \pm 0/18$  و  $3/11 \pm 0/11$  cm) و رشد طولی (به ترتیب  $4/31 \pm 0/11$  و  $3/93 \pm 0/06$ ) ریزنمونه‌های با رشد کند و بطئی دارند. مطالعه تغییرات آنزیم IAA-اکسیداز هم نشان داد که نوساقه‌های با رشد کند و بطئی علی‌رغم رشد کم در مقایسه با شاهد، بیشترین میزان فعالیت آنزیمی را دارا هستند. استفاده از تیا در مقایسه با اسکوپولتین کاهش معنی‌داری در فعالیت IAA-اکسیداز در هر دو نوع منبع ریزنمونه با روند نزولی در طول ۳۰ روز را نشان داد. نتایج بدست آمده در این مطالعه می‌تواند بیانگر تأثیر معنی‌دار تیمارهای مورد استفاده بویژه اسکوپولتین بر روی بهبود شاخص‌های رشد نوساقه‌ها از نظر صفات کیفی و کمی باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسین، IAA-اکسیداز، ریزازدیادی، رشد کند و بطئی، متیل‌جاسمونات.

#### مقدمه:

است. از طرفی، در حال حاضر با توجه به رویکرد بیشتر تولیدکنندگان نهال به استفاده از روش‌های سنتی (تولید نهال-های بذری، به عنوان مثال)، باغداران را با مشکلات متعددی از جمله غیریکنواختی درختان رشد یافته از نظر ارتفاع، تنوع زیاد در مقابل مقاومت به آفات و بیماری‌ها و همچنین عملکرد متفاوت ارقام پیوندی روی پایه‌های رویشی بذری روبرو ساخته است؛ که این مهم تلاش محققان را به منظور معرفی دستورالعمل‌های ریزازدیادی مقرون به صرفه امری اجتناب

پایه‌رویشی سنت‌جولین (*Prunus domestica* spp. *Insititia*) از پایه‌های نیمه پاکوتاه جنس پرونوس می‌باشد که مقاومت و تحمل زیاد آن در مقابل تنش‌های زیستی و غیر زیستی و همچنین سازگاری آن با ارقام مختلف هلو، شلیل، آلو و گوجه سبز (Beckman and Lang, 2002)، در سال‌های اخیر منجر به استقبال روز افزون باغداران کشور به استفاده از آن به عنوان جایگزین مناسبی در مقایسه با سایر پایه‌های رویشی شده

\*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: coagaroosi90@yahoo.

ناپذیر می‌نماید.

در سال‌های اخیر موارد متعددی از بروز نارسایی رشدی در هنگام تکثیر گونه‌های مختلف جنس پرونوس در شرایط درون‌شیشه (*in vitro*)، در نتیجه عدم بهینه بودن ترکیبات محیط کشت شامل منبع کربنی، ترکیبات ماکرو و میکروالمنت، ویتامین، تنظیم کننده‌های رشدی و یا نوع جامد کننده، گزارش گردیده است؛ که می‌توان به بروز مشکلات متعددی از جمله نرخ پایین نوساقه‌زایی، رشد طولی کم، نکروزگی، شیشه‌ای شدن، رشد رزت و یا رشد کند و بطئی (بسته به نوع گیاه) اشاره نمود (استادشریف، ۱۳۹۲؛ استاد شریف و همکاران، ۱۳۹۳، زارعی و همکاران، ۱۳۹۲؛ Fotopoulos and Sotiropoulos, 2005; Kornova and Popov, 2007; Nezami-Alanagh et al., 2014; Nezami-Alanagh et al., 2010; Ruzic and Vujovic, 2008).

استادشریف و همکاران (۱۳۹۳) به منظور معرفی یک دستورالعمل موفق و تکرارپذیر با هدف افزایش نرخ ریزازدیادی و همچنین بهبود کیفیت رشدی پایه رویشی سنت-جولین-A، تاثیر پارامترهای متعددی از جمله نوع محیط کشت، تنظیم کننده‌های رشدی و منبع، مورد ارزیابی قرار گرفت. علی-رغم بهبود نسبی پارامترهای رشدی، نرخ پایین نوساقه‌زایی و همچنین تولید نوساقه‌هایی بارشد کند و بطئی بویژه پس از چندین واكشت متوالی، از مشکلات قابل توجه در آن مطالعه بود. گزارش‌های متعددی از تاثیر استفاده از مقادیر زیاد تنظیم کننده‌های رشدی در افزایش نسبی در تعداد نوساقه و کاهش طول نوساقه ایجاد شده و بروز نارسایی‌های رشدی در تکثیر گونه‌های مختلف جنس پرونوس از جمله پایه رویشی سنت-جولین وجود دارد (Ruzic and Vujovic, 2008; Tatari et al., 2012)؛ که احتمالا می‌تواند بیانگر این فرضیه باشد که در این قبیل گیاهان سطح برخی از هورمون‌های درون سلولی از جمله IAA واكنش آنتاگونیستیکی شدیدی با تنظیم کننده‌های اضافه شده به محیط کشت ایجاد می‌کند.

اکسین درون سلولی و انتقال آن در داخل سلول، در تنظیم فرایندهای گسترده فیزیولوژیکی و توسعه‌ای در طی رشد و نمو از قبیل تقسیم سلولی و طولیل شدن سلول‌ها

(Magyar et al., 2005; Pasternak et al., 2002)، جنین‌زایی (Rossin and Rey, 2011; Yang et al., 2012)، اندام‌زایی (George et al., 2008a)، تشکیل و توسعه ریشه در گیاهان (Pacurar et al., 2014) دخیل می‌باشد. علی‌رغم تاثیر بارز اکسین درون سلولی در رشد و تمایز، غلظت بالای این هورمون می‌تواند تاثیرات نامطلوبی در ازدیاد گیاهان داشته باشد. به عنوان مثال، Chong و Andrew (۲۰۰۶) با استفاده از آنتی-اکسین‌های اسکوپولتین (7-hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one (Scopoletin)) (بواسطه تاثیر روی فعالیت IAA-اکسیداز) و تیبیا (Triiodo Benzoic Acid (TIBA)) (بازدارنده انتقال قطبی اکسین)، مشکل کاهش رشد طولی نونهال‌های گیلاس در شرایط گلخانه را برطرف کردند (Chong and Andrew, 2006). اخیرا گزارش‌های متعددی از کاربرد این مواد روی افزایش نرخ نوساقه‌زایی در شرایط درون‌شیشه و گلخانه گردیده است (ملکی و همکاران ۱۳۹۱؛ ملکی، ۱۳۹۲؛ ملکی و همکاران، ۱۳۹۲؛ George et al., 2008b, 2013; Ranade and Kanwar, 2014; Shukla et al., 2014). جاسمونات‌ها نیز از تنظیم کننده‌های رشدی به شمار می‌روند که نقش آن‌ها در محافظت گیاهان در مقابل تنش‌های زیستی و غیر زیستی (Rohwer and Erwin, 2008)، غده‌زایی (Koda and Kikuta, 1991)، تولید پیازچه در گیاهان زیتنی (Hosseini et al., 2013) و همچنین افزایش تولید فلاونوئیدها (Wang et al., 2015) به خوبی شناخته شده است. علیرغم این یافته‌ها، براساس مطالعات انجام شده گزارشی از تاثیر این ماده روی رشد و ریزازدیادی گونه‌های جنس پرونوس وجود ندارد. در این پژوهش تاثیر تیبیا، اسکوپولتین و متیل جاسمونات روی رفع مشکلات رشد کند و بطئی نوساقه‌های پایه رویشی سنت-جولین-A، میزان نوساقه‌زایی و همچنین فعالیت آنزیم IAA-اکسیداز مورد بررسی قرار گرفته است.

#### مواد و روش‌ها:

**ماده گیاهی و شرایط کشت:** گیاه گلدانی پایه‌رویشی سنت-جولین به‌صورت نونهال از دانشگاه تربیت مدرس تهران تهیه و

**سنجش میزان پروتئین کل:** به منظور تهیه عصاره پروتئین، مقدار ۰/۵ گرم از بافت تر (FW) گیاهی به همراه ۰/۱ گرم PVP (Poly Vinyl Pyridine) در مجاورت نیتروژن مایع، خرد گردید و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج [بافر فسفات M ۰/۰۵ (pH: ۷) و سدیم متابای سولفیت M ۰/۰۱] به آن اضافه گردید. عصاره به دست آمده به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس فاز رویی به آرامی داخل تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شد و پس از افزودن ۰/۲ میلی‌لیتر گلیسرول ۵۰٪ در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پروتئین محلول کل در ۳ تکرار به روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه‌گیری گردید. به منظور بررسی تغییرات فعالیت آنزیمی نمونه‌برداری در روزهای اول، ۱۵ و ۳۰ پس از شروع آزمایش انجام گرفت.

**سنجش فعالیت آنزیم IAA-اکسیداز:** مخلوط واکنش با کمی تغییرات در حجم نهایی ۰/۵ میلی‌لیتر شامل بافر فسفات ۶/۶۶ میلی‌مولار (pH: ۷)،  $MnCl_2$  ۱۰۰ میکرومولار، p-coumaric acid ۵۰ میکرومولار، IAA ۵۰ میکروگرم (۲۸۲/۴۸ میکرومولار) تهیه (Bradford, 1976) و ۴۰ میکرولیتر از عصاره پروتئین به آن اضافه گردید و به مدت ۵۰ دقیقه داخل انکوباتور با دمای  $37 \pm 2$  °C در تاریکی نگهداری و پس از افزودن واکنش‌گر سالکوفسکی (Gordon and Weber, 1951) به حجم ۱ میلی‌لیتر، مجدداً به مدت ۲۵ دقیقه در همین شرایط نگهداری شد. بعد از رسم منحنی استاندارد، مخلوط واکنش و معرف سالکوفسکی در داخل کووت شیشه‌ای ۳ میلی‌لیتری ریخته شد و میزان فعالیت آنزیم IAA-اکسیداز در طول موج ۵۳۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (UV-3200 Labomed UV-Visible) اندازه‌گیری و تعیین شد. هر واحد فعالیت آنزیم IAA-اکسیداز عبارتست از ۱ میکروگرم IAA تجزیه شده توسط یک میلی‌لیتر از عصاره پروتئینی وزن تر بافت گیاهی (Beffa et al, 1990).

**تجزیه و تحلیل آماری:** آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح‌های کاملاً تصادفی انجام شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای آماری SAS 9.1 استفاده شد.

پس از ضدعفونی، جوانه‌های جانبی و انتهایی، جهت استقرار و تکثیر به محیط کشت MS حاوی BAP و IBA به ترتیب با غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر، ۲۰ گرم در لیتر ساکارز، pH: ۵/۷ و ۷ گرم در لیتر فیتوآگار (Merck) به عنوان جامدکننده، منتقل شدند و سپس در اتاق رشد در دمای  $22 \pm 2$  °C و شرایط نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/روشنایی) با لامپ‌های سرد-سفید با شدت روشنایی  $40 \mu mol m^{-2} S^{-1}$  قرار گرفتند (استادشریف، ۱۳۹۲).

**تأثیر متیل‌جاسمونات، تیا و اسکوپولتین روی میزان نوساقه‌زایی و نارسایی‌های رشدی:** در این آزمایش دو نوع ریزنمونه شامل الف) ریزنمونه‌های با رشد عادی (به طول ۰/۲  $\pm$  ۱/۵ سانتی‌متر) و ب) ریزنمونه‌های با رشد کند و بطنی (به طول ۰/۲  $\pm$  ۰/۵ سانتی‌متر) انتخاب و تأثیر برخی القاء‌کننده رشدی شامل تیا، اسکوپولتین و متیل‌جاسمونات هرکدام به طور جداگانه در غلظت ثابت ۱ میلی‌گرم (براساس آزمایش اولیه و همچنین نتایج گزارش شده توسط Sing و همکاران (۲۰۰۰)) بروی رشد ریزنمونه‌های یادشده بررسی گردید. تمامی شرایط رشدی و همچنین سایر ترکیبات شیمیایی مطابق شرایط ذکر شده در مرحله ریزازدیادی به صورت ثابت در نظر گرفته شد؛ با این تفاوت که IBA (به‌عنوان منبع اکسین خارجی) در این آزمایش حذف گردید. به ازای هر تیمار ۸ ظرف شیشه‌ای (۱۸۰ سی‌سی) با درب کریستالی در نظر گرفته شده و در هرکدام ۴ ریزنمونه کشت گردید که در فواصل ابتدای آزمایش (۱ روزه) و ۱۵ روزه، از ۴ ظرف از هرکدام ۱-۲ نوساقه (شامل جوانه انتهایی، برگ و ساقه رشد یافته) به وزن تقریبی ۰/۵ گرم نمونه‌برداری و به منظور بررسی فعالیت آنزیمی و پروتئینی تثبیت گردید. نوساقه‌های تولید شده در ۴ ظرف شیشه‌ای باقی مانده در روز ۳۰م پس از انجام یادداشت‌برداری از میزان نوساقه‌زایی، وزن‌تر نوساقه (g)، رشد طولی نوساقه (cm) و میزان پرآوری (cm)، نمونه‌برداری انجام گرفت. نمونه‌های حاصله در طول مدت آزمایش پس از حذف بقایای آگار، در داخل نیتروژن مایع تثبیت و سپس در فریزر  $-80$  °C نگهداری گردیدند.

معنی داری با تیمار شاهد (بدون استفاده از آنتی اکسین یا متیل-جاسمونات) داشتند؛ به طوریکه اسکوپولتین با تحریک ریزنمونه های با رشد کند و بطئی منجر به بهبود صفات کیفی و کمی با تولید بیشترین تعداد نوساقه ( $3/5 \pm 0/2$ )، با بیشترین رشد طولی ( $1/77 \pm 0/02 \text{ cm}$ )، بیشترین وزن تر ( $0/01 \pm 0/4$ ) همراه با بالاترین نرخ پرآوری ( $6/04 \pm 0/35 \text{ cm}$ ) در مقایسه با تیبیا با اختلاف معنی دار حاصل گردید. اثر متیل-جاسمونات نیز روی بهبود پارامترهای رشدی به طور معنی-داری بیشتر از آنتی اکسین تیبیا و همچنین شاهد بود. اسکوپولتین و متیل جاسمونات همچنین در مقایسه با شاهد و تیبیا، تاثیر معنی داری در بهبود صفات کیفی و کمی ریزنمونه-های حاصل از نوساقه های بارشد عادی داشتند، بطوری که بیشترین تعداد نوساقه ( $4/12 \pm 0/17$ )، رشد طولی ( $4/31 \pm 0/11 \text{ cm}$ )، وزن تر ( $0/64 \pm 0/02 \text{ g}$ ) و همچنین بالاترین نرخ پرآوری ( $18/25 \pm 0/84 \text{ cm}$ ) در حضور اسکوپولتین حاصل گردید (شکل های ۲ و ۳). براساس نتایج گرفته شده می توان به نقش بارز اسکوپولتین با فعالیت IAA-اکسیدازی در مقایسه با سایر تنظیم کننده های رشدی استفاده شده در این مطالعه اشاره نمود که احتمالاً بیانگر نقش و عملکرد متفاوت این مواد در سلول می باشد. اسکوپولتین به عنوان یکی از اولین ترکیبات فنولی شناخته شده کومارین، در مقادیر کم (کمتر از  $12/5$  میلی گرم در لیتر) افزایش دهنده فعالیت IAA-اکسیدازی (تجزیه IAA) و در مقادیر زیاد مهار کننده فعالیت IAA-اکسیدازی می باشد (Imbert and Wilson, 1970; Sirois and Miller, 1972). اخیراً کارایی اسکوپولتین در بهبود صفات رشدی در مقایسه با تیبیا در سایر درختان میوه گزارش شده است (ملکی و همکاران، ۱۳۹۱؛ ملکی، ۱۳۹۲؛ ملکی و همکاران، ۱۳۹۳ Chong and Andrew, 2006). آنتی اکسین تیبیا به عنوان یکی از اعضای خانواده فیتوتروپین ها محسوب می گردد که با متوقف کردن انتقال قطبی اکسین داخل سلولی تاثیر بارز فیزیولوژیکی در رشد گیاه می گذارد که از مهمترین آن ها می توان به کاهش رشد طولی گیاه، افزایش شاخه زایی و تاثیر غیر قابل پیش بینی در شرایط مختلف محیطی بر رشد گیاه اشاره نمود (Naidu et al.,

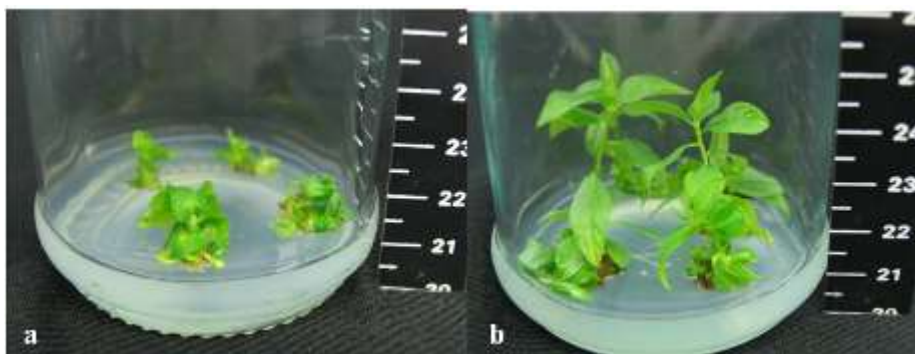
لازم به ذکر است که قبل از تجزیه و تحلیل داده ها، باقیمانده داده های خام محاسبه شده و سپس از نظر نرمال بودن با آزمون Shapiro-Wilk مورد بررسی قرار گرفته و در صورت نیاز برای داده های شمارشی از تبدیل ریشه دوم استفاده شد. مقایسه میانگین ها توسط آزمون چند دامنه دانکن در سطح ( $\alpha=0/01$ ) انجام گرفت.

### نتایج و بحث:

در گزارشی ریزازدیادی پایه رویشی سنت جولین (استاد شریف، ۱۳۹۰ و استاد شریف و همکاران، ۱۳۹۲) علی رغم بهینه سازی برخی از ترکیبات محیط کشت شامل منبع کربنی، نمک های معدنی و تنظیم کننده های رشدی و همچنین فراهم نمودن شرایط محیطی یکسان در شرایط درون شیشه (شدت نور و دمای محیط)، پس از انجام واکشت های متعدد (بیش از ۱۰ واکشت هریک با دوره رشدی ۳۰ روزه)، با مشکلاتی از جمله تولید نوساقه هایی با رشد کند و بطئی مواجه گردید که از نظر کیفیت رشد رویشی در مقایسه با نوساقه های بارشد عادی تفاوت قابل ملاحظه ای داشت (شکل ۱). در این مطالعه تاثیر برخی آنتی اکسین ها (تیبا و اسکوپولتین) و متیل جاسمونات هریک به طور جداگانه در غلظت ثابت ۱ میلی گرم (براساس آزمایش اولیه و همچنین نتایج گزارش شده توسط Sing و همکاران (۲۰۰۰)) روی بهبود مشکلات فیزیولوژیکی رشدی یاد شده با استفاده از دو نوع ریزنمونه (ریزنمونه های با رشد عادی و ریزنمونه های با رشد کند و بطئی) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مربوط به صفات تعداد، طول، وزن تر نوساقه و همچنین نرخ پرآوری بیانگر معنی دار بودن تاثیر نوع ریزنمونه، نوع محرک رشدی و همچنین اثر متقابل آنها روی صفات یادداشت برداری شده در سطح یک درصد بود (جدول ۱).

همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین با آزمون چنددامنه ای دانکن نشان داد که تیمارهای استفاده شده در تحریک ریزنمونه های حاصل از نوساقه های با رشد کند و بطئی و همچنین در بهبود رشد ریزنمونه های سالم اختلاف



شکل ۱- تاثیر نوع ریزنمونه روی رشد کیفی نوساقه. نوساقه‌های تکثیر شده در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA (a) نوساقه‌های با رشد کند و بطئی و (b) نوساقه‌های عادی.

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر متیل‌جاسمونات، آنتی‌اکسین‌های اسکوپولتین و تیا روی شاخص‌های رشدی

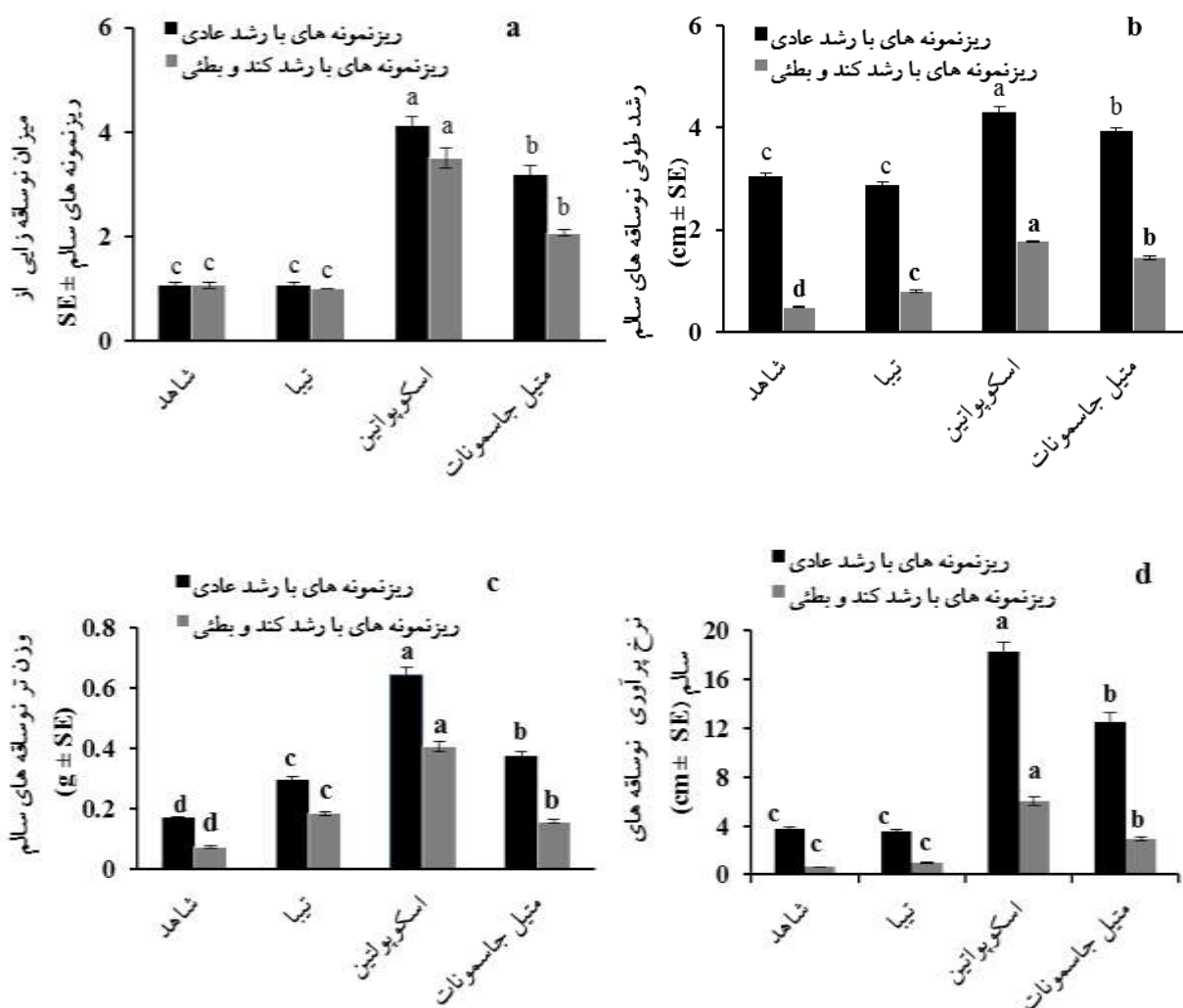
منبع تغییرات	درجه آزادی	تعداد نوساقه	وزن تر (g)	طول نوساقه (cm)	پراوری (cm)
نوع ریز نمونه	۱	۵/۴۶**	۰/۸۹**	۱۸۷/۶۹**	۶۷۳/۹۸**
آنتی‌اکسین	۳	۲/۸۸**	۰/۹۲**	۱۲/۷۹**	۱۰۷/۳۷**
آنتی‌اکسین × نوع ریزنمونه	۳	۰/۸۳**	۰/۰۴**	۰/۴۴**	۳۱/۴۱**
خطا	۱۲۰	۰/۰۱۱	۰/۰۰۲	۰/۰۶	۰/۲۷۵
%CV		۷/۴۱	۱۸/۰۵	۱۰/۸۳	۱۴/۰۴

\*\* بیانگر اختلاف معنی دار در سطح  $\alpha=0/01$  می‌باشد

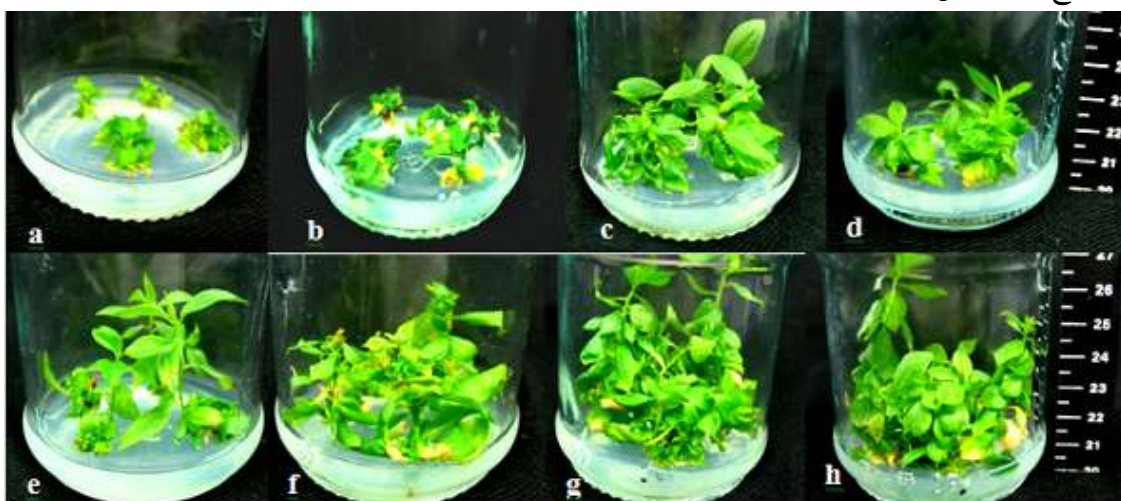
بهبود بافت‌های آسیب دیده و مانع نکروزه شدن برگ‌ها در گیاه *Panax ginseng* می‌شود. لذا به نظر می‌رسد نوع تأثیر آن بسته به نوع گیاه (ژنوتیپ)، بافت، میزان غلظت، مدت زمان تیمار و نوع صفت و شاخص فیزیولوژیک می‌تواند متفاوت بوده و مطالعات دقیق‌تری را می‌طلبد.

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم IAA-اکسیداز (جدول ۲) نشان می‌دهد که تأثیر تیمارهای استفاده شده در این آزمایش روی تغییرات فعالیت آنزیم IAA-اکسیداز در بازه دوره رشدی ۳۰ روزه، بسته به نوع ریزنمونه متفاوت بود. بطوریکه ریزنمونه‌های با رشد کند و بطئی تیمار شده با آنتی‌اکسین تیا، در مقایسه با سایر تیمارهای بکار برده شده و همچنین تیمار شاهد، در روز نخست بعد از اعمال تیمار بیشترین فعالیت IAA-اکسیدازی را نشان دادند ( $217/32 \mu \text{min} / \text{g}$ ) که با یک روند نزولی معنی‌دار ( $36/57 \mu \text{min} / \text{g}$ ) در روز

(2014; Ramanayake et al., 2008; Venkatesh et al., 2009) جاسمونات‌ها در حال حاضر به عنوان هورمون درون‌سلولی بشمار می‌روند؛ که نقش‌های مهمی در جنبه‌های متعدد رشدی از قبیل تنظیم تجمع متابولیت‌های ثانویه متعدد (Wanger et al, 2015)، محافظت گیاهان در مقابل تنش‌های زیستی و غیر زیستی (Rohwer and Erwin, 2008)، غده‌زایی (Koda and Kikuta, 1991) و اخیراً تولید پیازچه در گیاهان زینتی (Hosseini et al., 2013) بازی می‌کنند. در مطالعه‌ای (Hosseini, et al., 2013) نشان داده شد که متیل‌جاسمونات بر ریشه‌زایی در گل نرگس تأثیر بارزی دارد که تا حدودی این تأثیر در روی شاخص رشدی دیگر مشاهده می‌شود. هر چند عنوان می‌شود که متیل‌جاسمونات باعث نکروزه شدن بافت می‌شود ولی مطالعه بالوسامی و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که تیمار خارجی آن در غلظت ۵۰ ماکرو مولار باعث ترمیم و



شکل ۲-مقایسه آزمون چند دامنه‌ای دانکن اثر متیل جاسمونات، آنتی اکسین‌های تیبا و اسکوپولتین روی صفات رشدی. (a) تعداد نوساقه، (b) رشد طولی، (c) وزن تر و (d) پراوری ریزنمونه‌های با رشد عادی و ریزنمونه‌های با رشد کند و بطئی. حروف متفاوت بالای ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی دار در سطح  $\alpha=0/01$  می‌باشد



شکل ۳-تأثیر آنتی اکسین‌ها و متیل جاسمونات روی کیفیت رشد رویشی نوساقه. ریزنمونه‌های با رشد کند و بطئی (d-a) و ریزنمونه‌های سالم (e-h). (a و e) شاهد، (b و f) تیبا، (c و g) اسکوپولتین، (d و h) متیل جاسمونات.

جدول ۲- تاثیر متیل جاسمونات، آنتی‌اکسین‌های اسکوپولتین و تیبیا روی تغییرات فعالیت آنزیم IAA-اکسیداز

نوع ریزنمونه	نوع تیمار	روز اول ( $\mu$ /min / g FW)	روز ۱۵م ( $\mu$ /min / g FW)	روز ۳۰م ( $\mu$ /min / g FW)
	شاهد	۱۶۲/۸ <sup>a</sup>	۸۹/۶۵ <sup>b</sup>	۱۰۸/۱۰ <sup>b</sup>
ریزنمونه‌های بارشد کند و بطئی	تیبا	۲۱۷/۳۲ <sup>a</sup>	۱۰۴/۷۲ <sup>b</sup>	۵۷/۳۶ <sup>c</sup>
	اسکوپولتین	۱۲۶/۳۵ <sup>b</sup>	۷۵/۴۰ <sup>c</sup>	۱۹۴/۵۹ <sup>a</sup>
	متیل جاسمونات	۶۰/۰۴ <sup>a</sup>	۵۵/۳۳ <sup>a</sup>	۵۸/۷۶ <sup>a</sup>
	شاهد	۱۳۲/۸۲ <sup>a</sup>	۴۷/۱۴ <sup>c</sup>	۹۴/۴۱ <sup>b</sup>
ریزنمونه‌های عادی	تیبا	۸۱/۶۰ <sup>a</sup>	۵۷/۳۵ <sup>b</sup>	۶۷/۲۷ <sup>ab</sup>
	اسکوپولتین	۲۳/۵۷ <sup>b</sup>	۴۹/۴۸ <sup>a</sup>	۱۸/۶۲ <sup>b</sup>
	متیل جاسمونات	۲۸/۰۴ <sup>a</sup>	۱۴/۵۵ <sup>a</sup>	۳۲/۶۷ <sup>a</sup>

حروف متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی دار در سطح  $\alpha=0/01$  می‌باشد.

گردید؛ ولی چنانچه شاخص‌های رشدی در روزهای ۱ و ۱۵ نیز بررسی شود می‌تواند درک بهتری از ارتباط تغییرات فعالیت آنزیمی با شاخص‌های رشد را ارائه نماید. این مهم، لزوم مطالعات بیشتر برای درک بهتر مکانیسم‌های عمل این مواد روی رشد و تمایز را امری اجتناب‌ناپذیر می‌نماید. از طرفی دیگر، نتایج حاصل از تغییرات غیرمعنی‌دار فعالیت آنزیمی متأثر از اعمال متیل جاسمونات روی تحریک رشد هر دونوع ریزنمونه، می‌تواند بیانگر مکانیسم عمل متفاوت این ماده (Balusamy *et al.*, 2015) در بهبود رشد صفات کیفی و کمی مورد مطالعه در این پژوهش باشد؛ که نیاز به بررسی و تحقیق بیشتر را نشان می‌دهد (جدول ۲). در مقایسه با نتایج بدست آمده در این مطالعه، گزارش‌های متعددی از تاثیر تیبا در افزایش نوساقه‌زایی گیاه رز (Singh and Syamal, 2000)، نارون (Shukla *et al.*, 2012) به عنوان دستور العمل موفق گزارش گردیده است؛ در مطالعات مذکور تغییرات آنزیمی IAA-اکسیداز مورد بررسی قرار نگرفته است تا بتوان میزان رشد متأثر از تغییرات فعالیت آنزیمی در این مطالعه را با آنها مورد بررسی و مقایسه دقیق‌تر قرار داد.

#### تشکر و قدردانی:

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی<sup>(ره)</sup>

سی‌ام کاهش یافت. در مقابل تغییرات فعالیت IAA-اکسیدازی اسکوپولتین با کاهش معنی‌دار در روز ۱۵م نمونه برداری در روز پایانی روند افزایشی معنی‌داری داشت (جدول ۲). بررسی تغییرات فعالیت آنزیم IAA-اکسیداز نوساقه‌های حاصل از ریزنمونه‌های سالم بیانگر بیشترین فعالیت IAA-اکسیدازی آنتی‌اکسین تیبا در اوایل دوره رشدی و اسکوپولتین در روز ۱۵م نمونه برداری ( $49/48 \mu \text{ min / g FW}$ ) بود. نظر به فعالیت بالای آنزیم IAA-اکسیداز تیمارهای شاهد مربوط به هر دونوع ریزنمونه در بازه زمانی ۳۰ روزه، احتمالاً بیانگر مکانیسم عمل چند بعدی (Multi-function) تیبا و اسکوپولین روی رشد و تمایز و متعاقب آن بهبود صفات کیفی و کمی مورد بررسی در این مطالعه می‌باشد؛ در غیر اینصورت رشد ریزنمونه‌ها در تیمار شاهد می‌بایست به نحو قابل ملاحظه‌ای بیشتر می‌بود؛ در حالیکه بطور معنی‌داری کمترین میزان رشد و نوساقه‌زایی مربوط به این تیمار می‌باشد (شکل ۲). این نتایج احتمالاً بیانگر عملکرد متفاوت فیزیولوژیکی دو آنتی‌اکسین مذکور بوده، بطوریکه که آنتی‌اکسین تیبا با بیشترین فعالیت IAA-اکسیدازی در اوایل دوره رشدی و اسکوپولتین با بیشترین تاثیر از روز ۱۵م (اواخر دوره رشدی) به بعد، منجر به تحریک رشد ریزنمونه‌های بارشد کند و بطئی گردیده‌اند. بهرحال شاخص‌های رشدی در روز ۳۰م یادداشت برداری

و با کد طرح پژوهشی ۱۱۵۱۴ در آزمایشگاه‌های گروه مراتب تشکر و امتنان خود را از حمایت‌های صورت گرفته در بیوتکنولوژی دانشگاه انجام یافته است. بدینوسیله نویسندگان طی اجرای پروژه ابراز می‌دارند.

#### منابع:

استادشریف، ا. (۱۳۹۰) بهینه‌سازی ریزازدیادی پایه رویشی سنت جولین در شرایط درون‌شیشه (*Prunus domestica SPP. Insititia*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی<sup>(ره)</sup>، قزوین، ایران.

استادشریف، ا.، گروسی، ق.، حداد، ر. و نظامی، ا. (۱۳۹۳) تاثیر محیط کشت، قند و تنظیم‌کننده رشدی روی ریزازدیادی پایه رویشی سنت جولین (*Prunus domestica spp. Insititia*) A. بیوتکنولوژی کشاورزی ۹: ۱۳-۸.

ملکی، س. (۱۳۹۲) مطالعه تاثیر بازدارنده‌های انتقال اکسین روی فعالیت IAA-اکسیداز و پراکسیداز در پایه‌های رویشی پسته (قزوینی و UCB-1) در شرایط درون‌شیشه، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی<sup>(ره)</sup>، قزوین، ایران.

ملکی، س.، گروسی، ق.، حداد، ر. و نظامی، ا. (۱۳۹۱) گامی در تهیه پروتکل ریزازدیادی پسته (پایه رویشی قزوینی): باتاکید بر تاثیر اسکوپولتین. کنگره ملی آخرین یافته‌های علمی و تحقیقاتی پسته، دانشگاه تربت حیدریه.

ملکی، س.، گروسی، ق.، حداد، ر. و نظامی، ا. (۱۳۹۲) تاثیر آنتی‌اکسیدانتی برخی از القاء‌کننده‌های نوساقه و ریشه‌زایی در پسته (پایه-های رویشی قزوینی و UCB-1) در شرایط درون‌شیشه. مجله مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی. پذیرفته شده برای چاپ.

زارعی، م.، گروسی، ق.، نظامی، ا. و حسینی، ر. (۱۳۹۲) ریزازدیادی گزیلا ۶: تاثیر محیط کشت، منبع کربن و تنظیم‌کننده‌های رشدی (PGRs). مجله سلول و بافت ۲: ۱۶۹-۱۸۵.

- Beckman, T. and Lang, G. (2002) Rootstock breeding for stone fruits. XXVI International Horticultural Congress: Genetics and Breeding of Tree Fruits and Nuts 622: 531-551.
- Beffa, R., Martin, H. and Pilet, P-E. (1990) *In vitro* oxidation of indoleacetic acid by soluble auxin-oxidases and peroxidases from maize roots. Plant Physiology 94: 485-491.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Balusamy, S. R. D., Rahimi, S., Sukweenadhi, J., Kim, Y. J., Yang, DC. (2015) Exogenous methyl jasmonate prevents necrosis caused by mechanical wounding and increases terpenoid biosynthesis in *Panax ginseng*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 123: 341-348.
- Chong, S. and Andrew, P. (2006) The relationship of dwarfing and IAA oxidase activity in sweet cherry (*Prunus avium* L.) rootstocks. Journal of Tropical Agriculture and Food Science 34:211-217.
- Fotopoulos, S. and Sotiropoulos, T. (2005) *In vitro* propagation of the PR 204/84 (*Prunus persica* × *P. amygdalus*) rootstock: axillary shoot production and rhizogenesis. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 33:75-79.
- George, E., Hall, M. and De Klerk, G-J. (2008a) Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. Plant propagation by tissue culture. Springer, p<sub>p</sub> 175-204.
- George EF, Hall MA, De Klerk G-J (2008b) Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. Plant propagation by tissue culture. Springer, Pp 205-226.
- Gordon, S. and Weber, R. (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant physiology 26(1): 192-195
- Hosseini, R., Moradnejad, M., Nezami-Alanagh, E., Ashrafi, S. and Ghane-Golmohammadi, F. (2013) Somatic embryogenesis and bulblet production in *Narcissus papyraceusev*. Shirazi: effect of plant growth regulators, light intensity, sucrose concentration, methyl jasmonate and anti-gibberellin. Journal of Genetics and Plant Breeding 2: 27-34.
- Imbert, M. and Wilson, L. (1970) Stimulatory and inhibitory effects of scopoletin on IAA oxidase preparations from sweet potato. Phytochemistry 9: 1787-1794.
- Koda, Y. and Kikuta, Y. (1991) Possible involvement of jasmonic acid in tuberization of yam plants. Plant and Cell Physiology 32: 629-633.
- Kornova, K and Popov, S. (2007) Effect of the *in vitro* container type on growth characteristics of the microplants in *in vitro* propagation of GF 677. I Balkan Symposium on Fruit Growing 825: 277-282.
- Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., BakĀ, L., InzĀ, D. and BĀgre, L. (2005) The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. The Plant Cell Online 17: 2527-2541.



- Naidu, J. H., Ashok, P., Sekhar, R. C. and Sasikala, K. (2014) Effect of plant growth retardants and spacings on vegetative growth and flower yield of African marigold (*Tagetes erecta* L) cv Pusa Narangi Gaiinda. International Journal of Farm Sciences 4: 92-99.
- Nezami-Alanagh, E., Garoosi, G-A., Haddad, R., Maleki, S., Landin, M. and Gallego, P. P. (2014) Design of tissue culture media for efficient Prunus rootstock micropropagation using artificial intelligence models. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 117: 349-359.
- Nezami-Alanagh, E., Garoosi, G. and Haddad, R. (2010) The effect of PGRs on *in vitro* shoot multiplication of GF677 hybrid (*Prunus persica* × *P. amygdalus*) rootstock on GNH medium. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding 1:34-43.
- Pacurar, D., Perrone, I. and Bellini, C. (2014) Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. Physiologia Plantarum 151: 83-96.
- Pasternak, T. P., Prinsen, E., Ayaydin, F., Miskolczi, P., Potters, G., Asard, H., Van Onckelen, H., Dudits, D. and Fehér, A. (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. Plant Physiology 129: 1807-1819.
- Ramanayake, S., Maddegoda, K., Vitharana, M. and Chaturani, G. (2008) Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities. Scientia Horticulturae 118: 270-273.
- Ranade, R. and Kanwar, K. (2014) Examining synergistic effects of TDZ and TIBA on adventitious shoot induction in *Dianthus caryophyllus* L. leaf explants. International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR) 4: 17-26.
- Rohwer, C. and Erwin, J. (2008) Horticultural applications of jasmonates: a review. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 83: 283-304.
- Rossin, C. and Rey, M. (2011) Effect of explant source and auxins on somatic embryogenesis of selected cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars. South African Journal of Botany 77: 59-65.
- Ruzic, D. and Vujovic, T. (2008) The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). Horticultural Science 35: 12-21.
- Shukla, M. R., Jones, A. P., Sullivan, J. A., Liu, C., Gosling, S. and Saxena, P. K. (2012) *In vitro* conservation of American elm (*Ulmus americana*): potential role of auxin metabolism in sustained plant proliferation. Canadian Journal of Forest Research 42: 686-697.
- Shukla, P., Das, A., Jha, B. and Agarwal, P. (2014) High-frequency *in vitro* shoot regeneration in *Cucumis sativus* by inhibition of endogenous auxin. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 50: 729-737.
- Singh, S. and Syamal, M. (2000) Anti-auxin enhance *Rosa hybrida* L. micropropagation. *Biologia Plantarum* 43 : 279-281.
- Sirois, J. C. and Miller, R. (1972) The mechanism of the scopoletin-induced inhibition of the peroxidase catalyzed degradation of indole-3-acetate. *Plant physiology* 49: 1012-1018.
- Tatari, V., Mousavi, S. and Bouzari, N. (2012) Micropropagation of some clonal rootstocks of stone fruits. *Seed and Improvement Journal* 28: 53-66.
- Venkatesh, K., Rani, A., Baburao, N. and Padmaja, G. (2009) Effect of auxins and auxin polar transport inhibitor (TIBA) on somatic embryogenesis in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *African Journal of Plant Science* 3: 288-293.
- Wang J., Qian j., Lu Y. (2015) Enhanced Production of Flavonoids by Methyl Jasmonate Elicitation in Cell Suspension Culture of *Hypericum Perforatum*. *Bioresource and Bioprocessing*. 2:1-9
- Yang, X., Zhang, X., Yuan, D., Jin, F., Zhang, Y. and Xu, J. (2012) Transcript profiling reveals complex auxin signalling pathway and transcription regulation involved in dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton. *BMC Plant Biology* 12: 110.

