زیست‌شناسی گیاهی، سال پنجم، شماره شانزدهم، تابستان ۱۳۹۲، صفحه ۲۷-۴۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۵/۲۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۷/۰۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۹/۰۱

تأثیر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر بهبود رشد و شاخص‌های بیوشیمیایی گیاهان پروانش باززایی شده تحت تیمار تریپتوفان طی فرآیند سازگاری

سمانه رحمت‌زاده [۱]، جلیل خارا [۱]* و سید کمال کاظمی تبار [۲]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
[۲] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران

Archive of SID

چکیده

میکوریزها فراهم آورنده اجتماعی همزیست هستند که در آن، میکوریز کربن را از گیاه به دست می‌آورد و در ذخیره فسفر را برای گیاه فراهم می‌کند. گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* L.) به علت تولید دو آلکالوئید دارویی وینبلاستین و وینکریستین بررسی شده است. در این بررسی، تریپتوفان به عنوان پیش‌ساز این آلکالوئیدها در شرایط کشت بافت استفاده شده است. آغشتگی (کلونیزاسیون) گیاه توسط میکوریز، به رشد و حیات گونه‌های متعددی در طول سازگاری به عنوان مهم‌ترین چالش کشت بافت، کمک کرده است. به همین منظور، گیاهچه‌های حاصل از باززایی تحت تیمار غلظت‌های مختلف تریپتوفان، در شرایط آغشتگی میکوریزی تحت سازگاری قرار گرفته، شاخص‌های رشدی و بیوشیمیایی اندام هوایی آنها بررسی شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری طول، وزن تر و خشک، محتوای قندهای محلول و پروتئین کل و همچنین کلروفیل‌های a و b اندام هوایی بیانگر نقش مثبت این دو تیمار بر رشد گیاهچه‌های پروانش در طول سازگاری بود. بیشترین میزان طول و وزن تر و خشک اندام هوایی در نمونه‌های همزیست با *Glomus versiforme* و به ترتیب تحت تأثیر تیمارهای صفر، ۱۵۰ و ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان به دست آمد. همچنین، بهترین نتیجه حاصل از اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل و قندهای محلول نیز در همزیستی با *G. versiforme* و تحت تیمار ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان مشاهده شد. در نهایت، بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوای کلروفیل‌های a و b نشان داد که بیشترین میزان این شاخص‌ها به ترتیب در نمونه‌های همزیست با *G. versiforme* و *G. etunicatum* تحت تأثیر تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان است.

واژه‌های کلیدی: باززایی، پروانش، سازگاری، میکوریز

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: j.khara@urmia.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۴۱۲۹۷۲۱۰۷

www.SID.ir

مقدمه

پروانش (*Catharanrthu sroseus* L.) گیاه علفی و همیشه سبز متعلق به تیره خرزهره (*Apocynaceae*) است. این گیاه ارتفاعی معادل ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر داشته، دارای ساقه‌های استوانه‌ای، مستقیم و چوبی به رنگ‌های سبز یا قرمز کم‌رنگ است. برگ‌های گیاه به صورت براق، سبز تیره و گل‌های آن معطر و در رنگ‌های سفید تا بنفش متمایل به صورتی در انتها است. واریته‌ای که دارای گل‌های قرمز- صورتی است به علت مقدار بالای آلکالوئیدهای آن مورد توجه است و در این پژوهش نیز استفاده شد. همچنین، این گیاه به صورت معمول در باغ‌ها به عنوان گیاهی زینتی کشت می‌شود (Aslam *et al*., 2010). این گیاه یکی از مهم‌ترین گیاهان طبی و دارویی است که دارای بیش از ۴۰۰ نوع آلکالوئید از نوع ترپنوئید ایندول آلکالوئید است (Faheem *et al*., 2011). دو آلکالوئید دیمر وینبلاستین و وینکریستین که به صورت عمده در بخش‌های هوایی این گیاه وجود دارند به صورت وسیعی در درمان تومورهای انسانی به کار می‌روند. همچنین، آلکالوئید مونومر آجمالیسین که در ریشه این گیاه به فراوانی وجود دارد، از کاربرد وسیعی در درمان بیماری‌های گردش خون، به ویژه در بهبود تخریب جریان خون طبیعی در مغز برخوردار است. گیاهان پروانش رشد یافته در محیط زراعی هنوز هم منبع اقتصادی برای تولید این داروها هستند. کشت بافت و سلول این گیاه به عنوان منبع جایگزین برای تولید این آلکالوئیدهای ارزشمند است (Whitmer *et al*., 2002).

کشت بافت کاربرد زیادی در علم گیاه‌شناسی، بیوشیمی، مهندسی ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی دارد و ابزاری مهم در مهندسی ژنتیک برای دست‌ورزی سلول‌های پذیرنده ژن خارجی است، در حالی که انجام آن در شرایط طبیعی کاری مشکل و غیر قابل کنترل است. علاوه بر این، روش کشت بافت به صورت مؤثر امکان تکثیر تعداد زیادی از واریته‌های مهندسی شده را فراهم می‌کند. بهینه‌سازی شرایط کشت نظیر افزودن پیش‌سازهای بیوسنتزی به محیط‌کشت، ممکن است تولید آلکالوئیدها را در جایی که تولید توسط فقدان پیش‌ساز ویژه محدود می‌شود، افزایش می‌دهد. تریپتوفان یکی از آمینو اسیدهای ضروری در گیاهان است و پیش‌ساز آلکالوئیدهای ایندولی در پروانش به شمار می‌آید. این آمینو اسید توسط آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) به تریپتامین تبدیل می‌شود که فراهم کننده شاخه ایندولی در این آلکالوئیدها است (Whitmer *et al*., 2002). همچنین، تریپتوفان می‌تواند به صورت مستقیم یا غیر مستقیم از طریق تبدیل شدن به اکسین (IAA) بر فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه تأثیر گذارد.

انتقال گیاهچه‌های کشت شده در محیط درون شیشه (*in vitro*) به *ex vitro* یکی از مهم‌ترین مراحل سازگاری ساختاری و فیزیولوژیک در طول آماده‌سازی گیاهچه‌ها است به طوری که فرآیند سازگاری برای بسیاری از گونه‌های گیاهی، چالش برانگیزترین مرحله کشت بافت است. این مسأله به صورت عمده ناشی از ناتوانی این قبیل گیاهان نسبت به تحمل انواع مختلف تنش‌ها، نظیر شوک انتقال گیاه، از دست رفتن آب، حمله پاتوژن‌ها، فتوسنتز ضعیف و ... است. گیاهان تولید شده در سوبسترای غنی از مواد غذایی در شرایط

Archive of SID

www.SID.ir

سترون بسیار حساس هستند. ممکن است حتی یک درصد از گیاهان باززایی شده در شرایط درون شیشه‌ای زمانی که به شرایط ناسترون منتقل می‌شوند، زنده نمانند. برگ‌های گیاهان ریزازدیادی شده نازک و دارای مزوفیل برگی با مقدار اندک کلروفیل هستند که به علت سازمان‌دهی ضعیف کلروپلاست‌های آن است. همچنین، برگ گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط درون شیشه دارای روزنه‌های بدون عملکرد هستند و فعالیت آنزیم فتوسنتزی روبیسکو در چنین برگ‌هایی ضعیف است. همه این شاخص‌ها به کارآیی فتوسنتزی پایین در گیاهچه‌های منتقل شده به *ex vitro* منجر می‌شود. آبگیری بالا یا شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها که به کاهش رشد در این گیاهان منجر می‌شود، مشکل دیگری در تثبیت موفق گیاهچه‌های مشتق شده از شرایط درون شیشه‌ای است. گیاهان باززایی شده در شرایط درون شیشه به طور ضعیف در برابر بیماری‌ها مقاومت می‌کنند که ناشی از مقدار کم فیتوآلکسین‌های آنها است. گیاهان باززایی شده اغلب ارتباطات آوندی ضعیفی را نشان می‌دهند که بر جذب آب از ریشه‌ها و انتقال آن به بافت‌های اندام هوایی اثر می‌گذارد (Kapoor *et al.*, 2008).

شاید گسترده‌ترین و احتمالاً مهم‌ترین همیاری بین گیاهان و قارچ‌ها، نوعی همزیستی ریشه‌ای به نام همزیستی میکوریزی آربوسکولار با ریشه گیاهان باشد. این قارچ‌های درون همزیست که با حدود ۸۰ درصد گیاهان خاکزی همزیست می‌شوند، مزایای متعددی را برای گیاهان میزبان خود فراهم می‌سازند که از آن جمله می‌توان افزایش جذب عناصر غذایی به ویژه فسفر، تولید هورمون‌های گیاهی، افزایش مقدار پروتئین و بالا بردن مقادیر لیپیدها و قندها، افزایش تحمل در برابر تنش‌های محیطی و بیماری‌ها را نام برد (Selvaraj and Chellappan, 2006). قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با افزایش جذب عناصر معدنی نظیر فسفر که تحرک نسبتاً اندکی در خاک دارند، حیات گیاه میزبان را بهبود می‌بخشند. در گیاهان، به ویژه آن دسته از گیاهانی که سیستم‌های ریشه‌ای محدود و ضعیفی دارند، ارتباطات هیفی توسط این قارچ‌ها به عنوان پُلی ارتباطی میان ریشه و مکان‌های تغذیه‌ای در خاک عمل کرده، جذب عناصر غذایی غیر متحرک و کم تحرک را توسط سلول‌های میزبان تسهیل می‌کند (Kapoor *et al.*, 2008). در این پژوهش، اثر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر گیاهچه‌های ریزازدیادی شده تحت شرایط اعمال تریپتوفان در محیط کشت باززایی طی فرآیند سازگاری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این بررسی، از ریزنمونه‌های قطعات گرهی حاصل از گیاهچه‌های سترون رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای و محیط MS استفاده شد. به منظور سترون‌سازی، بذرهای گیاه پروانش ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در آب خیسانده شد، سپس در اتاقک کشت استریل به مدت ۳۰ ثانیه در معرض اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند. پس از آن، بذرها با آب مقطر استریل چندین بار شسته و الکل اضافی از آنها زدوده شد. سپس، به مدت ۱۵ دقیقه توسط محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد حاوی چند قطره توین ۲۰ ضدعفونی شدند. برای به دست آوردن گیاهچه‌های سترون، دانه‌ها در محیط موراشیگ و اسکوگ (MS)

Archive of SID

www.SID.ir

بدون هورمون که اسیدیته آن با استفاده از NaOH یک نرمال در حد ۵/۵ تنظیم شده بود، کشت شدند.

محیط کشت استفاده شده برای شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها شامل محیط کشت MS غنی شده با ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ۷ گرم در لیتر آگار و هورمون‌های BAP(۰/۵mg/l)+ NAA(۱mg/l) بود. برای تعیین اثر تریپتوفان بر رشد و میزان شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه پروانش، این آمینو اسید در ۴ غلظت (صفر، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی گرم در لیتر) به محیط کشت باززایی اضافه شد. برای افزودن تریپتوفان به محیط کشت باززایی، پس از تهیه محیط کشت بهینه شاخه‌زایی و اتوکلاو نمودن آن، تحت شرایط هود لامینار و در اتاق کشت سترون شده، تریپتوفان در آب مقطر سترون حل و پس از سترون‌سازی از طریق فیلترهای ۰/۲ میکرومتری واتمن در غلظت‌های مشخص شده به ۴ محیط کشت مورد نظر اضافه شد. پس از آن، محیط کشت آماده شده به شیشه‌ها منتقل و پس از سه روز برای کشت استفاده شد. نمونه‌ها در دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد و در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و تحت شدت نور ۳۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. واکشت نمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار صورت گرفت. پس از شاخه‌زایی نمونه‌ها، گیاهچه‌های حاصل برای تشکیل گیاهچه کامل و ریشه‌زایی به محیط کشت ریشه‌زایی شامل محیط کشت MS ۱/۲غنی شده با ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ۷ گرم در لیتر آگار و IBA (۰/۱ mg/l) و غلظت‌های در نظر گرفته شده تریپتوفان، منتقل شدند. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و در ۴ تکرار انجام شد.

تهیه مایه تلقیح قارچی

از سه گونه قارچ میکوریز آربوسکولار به نام‌های *Glomus intraradices*، *G. etunicatum* و *G. versiforme* استفاده شد. برای هر گونه قارچی یک گلدان در نظر گرفته شد و در هر گلدان ۵۰۰ گرم از قارچ مورد نظر به علاوه خاک و ماسه به نسبت ۱ به ۵ افزوده شد. ذرت (*Zea mays* L.) واریته ۷۰۳ به علت همزیستی بالایی که با این گونه از قارچ‌ها نشان می‌دهد، برای تهیه مایه تلقیح استفاده شد. بذرهای ذرت به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۲۰ درصد هیپوکلریت سدیم (NaOCl) استریل شده، با آب مقطر شستشو داده شدند. گلدان‌ها در شرایط گلخانه‌ای با دمای شبانه ۳۲ و روزانه ۲۰ درجه، شدت نور ۱۰۰۰۰ لوکس، دوره روشنایی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۴۰ تا ۵۰ درصد قرار داده شدند. نور مورد نیاز برای رشد گیاه توسط لامپ‌های فلورسنت، تنگستن و سدیمی تأمین شد. از هفته سوم از محلول غذایی Rorison برای تغذیه گیاهان استفاده شد.

در پایان هفته پنجم برای اطمینان از همزیستی، نمونه‌ای از ریشه ذرت پس از رنگ‌آمیزی زیر میکروسکوپ بررسی شد. پس از گذشت ۱۰ هفته، بخش هوایی گیاه حذف و از بستر خاک حاوی خاک، ماسه، ریشه و هیف قارچی به عنوان مایه تلقیح استفاده شد.

آماده سازی گیاهان برای مرحله سازگاری

برای سازگار نمودن گیاهان باززایی شده با شرایط محیط خارج، ابتدا گیاهچه‌های حاصل از باززایی به آرامی از داخل ژل خارج شده با آب ولرم شسته شدند تا از حذف تمامی ذرات آگار اطمینان حاصل شود. سپس گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلدان‌های حاوی پیت: ورمیکولیت: شن (۱:۱:۱) منتقل شدند. در این

Archive of SID

www.SID.ir

تحقیق، برای بررسی نقش قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در سازگاری گیاهان درون شیشه‌ای با محیط خارج، از ۱۰ گرم از هر سه گونه قارچ میکوریز شامل *Glomus etunicatum*، *G. intraradices* و *G. versiforme* به علاوه نمونه‌های شاهد بدون میکوریز، استفاده شد. پیش از انتقال گیاهچه‌ها به گلدان‌ها، خاک به خوبی آبیاری و زهکشی شد. پس از آن، روی گلدان‌ها با نایلون پوشیده شد تا رطوبت محیط اطراف گیاه بالا نگه داشته شود. گلدان‌ها به اتاقک کشت با شدت نور کم که توسط دستگاه رطوبت‌ساز مرطوب نگه داشته شده بود، منتقل شدند. دمای اتاقک کشت در ۲۵ درجه سانتیگراد تنظیم شد. پس از ۴ هفته گیاهان به شرایط نوری بالاتر و رطوبت پایین‌تر منتقل شدند. پس از ۵ هفته درصد حیات در گیاهان سازگاری یافته ارزیابی شد. آزمایش در ۴ تکرار انجام شد.

اندازه‌گیری طول اندام هوایی

برای اندازه‌گیری طول اندام هوایی، پس از برداشت نمونه‌های گیاه پروانش، بخش‌های هوایی در هر یک از بوته‌ها بریده و طول بلندترین بخش در بوته از محل مریستم انتهایی تا محل بریدگی با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد. این عمل برای هر تیمار در ۴ گلدان، هر کدام حاوی یک بوته انجام شد.

اندازه‌گیری وزن تر و خشک اندام هوایی

پس از جداسازی اندام هوایی، وزن تر اندام هوایی با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد و پس از شستشوی آن با آب مقطر، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد آون قرار داده شد. سپس، مجدداً نمونه‌ها در آون قرار داده و توزین شدند. این عمل تا زمانی انجام شد که وزن نمونه‌ها ثابت ماند. پس از آن، وزن خشک اندام هوایی محاسبه شد.

اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی

ابتدا ۰/۵ گرم از بافت تر برگ همراه با ۱۰ میلی‌لیتر استون سایبده شد تا رنگ سبز آن کاملاً برطرف شود و محلول به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی صاف شد. سپس، جذب نمونه‌ها در ۶۴۵ و ۶۶۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. در پایان، مقدار کلروفیل‌های a و b با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد (Lichtenthaler and Wellburn, 1983):

$$Chl\ a = 11.75\ A_{662} - 2.350A_{645}$$

$$Chl\ b = 18.61\ A_{645} - 3.960\ A_{662}$$

اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول

برای اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول از روش فنل سولفوریک استفاده شد که بر اساس هیدرولیز قندهای محلول و ایجاد ترکیبات فورفورال است. این ترکیبات با فنل کمپلکس رنگی ایجاد می‌کنند (Fales, 1951). بدین منظور، بر روی ۱۰۰ میلی‌گرم از ماده خشک اندام هوایی ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد افزوده شد و به مدت یک هفته در دمای ۴ درجه یخچال قرار داده شد تا قندهای محلول آن آزاد شوند. پس از این مدت، با افزودن آب مقطر، حجم ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی نمونه‌ها به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس روی هر کدام از لوله‌های آزمایش، یک میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و سولفوریک اسید افزوده شد. محلول زردرنگ ایجاد شده با گذشت زمان تغییر رنگ داد. پس از ۳۰ دقیقه و بعد از سرد شدن لوله‌ها و ایجاد رنگ نهایی، شدت رنگ حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت قندهای محلول لازم است

Archive of SID

www.SID.ir

منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های معلوم گلوکز تهیه شود. به این منظور، غلظت‌هایی از گلوکز (صفر، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میلی‌گرم در لیتر) تهیه و طیف جذبی آنها تعیین شد.

استخراج پروتئین

برای استخراج پروتئین، ابتدا ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت‌های اندام هوایی گیاه پروانش توزین شده، توسط ازت مایع به صورت پودر درآمد. سپس، ۰/۸ میلی‌لیتر از بافر استخراج شامل تریس ۰/۰۹ مولار، بوریک اسید ۰/۰۸ مولار و اتیلن دی آمین تترا استات (EDTA) ۰/۹۳ گرم در لیتر با اسیدیته ۴/۸، به علاوه ۰/۸ میلی‌لیتر سوکروز برای غلیظ کردن بافر به نمونه‌های پودر شده درون یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شد. پس از آن، تیوب‌ها در دستگاه سانتریفیوژ ۱۳۰۰۰ دور قرار داده شدند. محلول رویی حاوی پروتئین به تیوب‌های مجزا منتقل شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد فریزر نگهداری شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین کل

برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین کل از روش برادفورد استفاده شد و سرم آلبومین گاوی در غلظت‌های مختلف برای رسم نمودار استاندارد به کار رفت (Bradford, 1979). برای تهیه معرف برادفورد، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از کوماسی بلو G- 250 به ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه شد. سپس، ۱۰۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۸۵ درصد به این محلول اضافه و حجم کل محلول با استفاده از آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. محلول از کاغذ صافی واتمن نمره یک عبور داده شد. برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین در نمونه مجهول ۵۰ میکرولیتر به همراه ۲۰ میکرولیتر بافر استخراج و ۹۰۰ میکرولیتر معرف برادفورد ترکیب شده و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد. محلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس، جذب آن در ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. در پایان، غلظت پروتئین بر اساس منحنی استاندرد بر حسب میکروگرم گرم وزن تر تعیین شد.

تحلیل داده‌ها

تحلیل آماری نتایج حاصل با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون توکی انجام و تفاوت میان گروه‌ها با کمک خطای استاندارد در سطح ۵ درصد مقایسه شد.

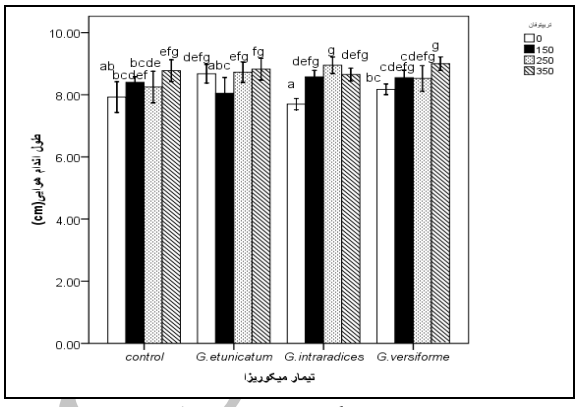
نتایج

نتایج حاصل از اندازه‌گیری طول اندام هوایی در گیاهان پروانش باززایی شده تحت تیمار تریپتوفان پس از طی دوره سازگاری نشان داد که بالاترین میزان طول اندام هوایی در گیاهان شاهد غیر میکوریزی و گیاهان همزیست با *G. etunicatum* و *G. versiforme* در ۳۵۰ mg/l تریپتوفان و در نمونه‌های همزیست با میکوریز *G. intraradices* در ۲۵۰ mg/l تریپتوفان است که با نمونه‌های شاهد با تریپتوفان صفر در هر گروه قارچی دارای تفاوت معنی‌داری بودند. همچنین، بین تیمارهای میکوریزی در غیاب تریپتوفان بیشترین طول اندام هوایی در گیاهان همزیست با *G. etunicatum* به دست آمد که بررسی آماری نتایج حاصل، بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین تیمارهای *G. etunicatum* با سایر تیمارها بود و اختلاف میان شاهد غیر میکوریزی و تیمارهای *G. versiforme* و *G. intraradices* در سطح آماری ۵ درصد معنی‌دار نبود. بررسی نتایج حاصل از اعمال تریپتوفان در گیاهانی که طی سازگاری آغشتگی

Archive of SID

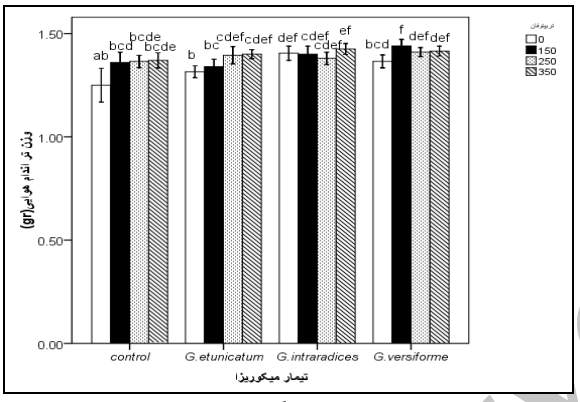
www.SID.ir

میکوریزی نداشته‌اند نشان داد که بیشترین طول اندام هوایی مربوط به تیمار ۳۵۰ mg/l بود که با تیمارهای صفر و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌داری را در سطح آماری ۵ درصد نشان دادند (شکل ۱).



شکل ۱- طول اندام هوایی گیاهان پروانش تحت تیمار میکوریز و تریپتوفان. مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۵ است.

بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن تر اندام هوایی نشان داد که بین تیمارهای همزیست با *G. etunicatum*، *G. intraradices* و شاهد غیر میکوریزی بالاترین میزان وزن تر در تیمار ۳۵۰ mg/l تریپتوفان و در گیاهان همزیست با *G. versiforme* در تیمار ۱۵۰ mg/l تریپتوفان به دست آمد و بالاترین میزان وزن تر به گیاهان *G. versiforme* تحت تیمار ۱۵۰ mg/l تریپتوفان مربوط بود که اختلاف معنی‌داری را تنها با گیاهان شاهد غیر میکوریزی همزیست با *G. etunicatum* تحت تیمار صفر و ۱۵۰ mg/l تریپتوفان و گیاهان همزیست با *G. versiforme* فاقد تریپتوفان نشان داد. همچنین، تحلیل نتایج مربوط به وزن تر اندام هوایی در گیاهان شاهد غیر میکوریزی بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌های فاقد تریپتوفان و غلظت‌های به کار رفته آن بود. از سوی دیگر، مقایسه نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن تر اندام هوایی در گیاهان میکوریزی و غیر میکوریزی در شرایط عدم اعمال تریپتوفان نشان داد که بالاترین میزان وزن تر به گیاهان همزیست با *G. intraradices* مربوط بود که تفاوت معنی‌داری را با نمونه‌های شاهد غیر میکوریزی و همزیست با *G. etunicatum* نشان داده و با گیاهان همزیست با *G. Versiforme* تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵ درصد نداشتند (شکل ۲).



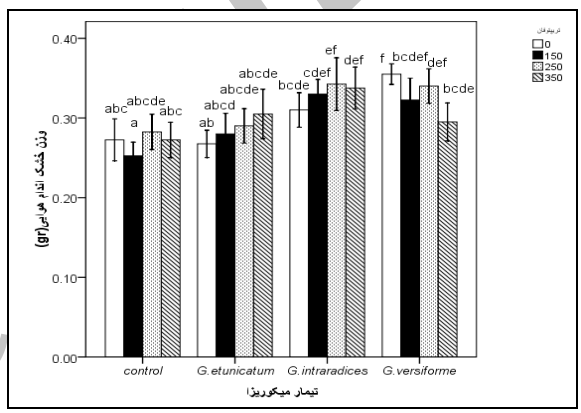
شکل ۲- وزن تر اندام هوایی گیاهان پروانش تحت تیمار میکوریز و تریپتوفان. مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P<۰/۰۵ است.

از سوی دیگر، تحلیل نتایج مربوط به وزن خشک اندام هوایی نشان داد که قارچ‌های میکوریز می‌توانند باعث افزایش این شاخص در مقایسه با نمونه‌های غیر میکوریزی شوند. بررسی آماری نتایج نشان داد که تیمار میکوریز در غیاب اعمال تریپتوفان باعث افزایش معنی‌داری در وزن خشک اندام هوایی در سطح آماری ۵ درصد تنها در نمونه‌های همزیست با *G. versiforme* در مقایسه با شاهد غیر میکوریزی شده است و در بین سایر تیمارهای میکوریزی تفاوت معنی‌داری نسبت به

Archive of SID

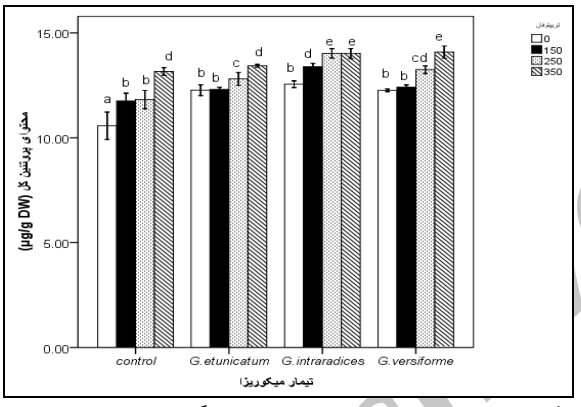
www.SID.ir

شاهد مشاهده نشد. مقایسه اثر غلظت‌های مختلف تریپتوفان در غیاب میکوریز بیانگر بالاترین میزان وزن خشک اندام هوایی در غلظت mg/l ۲۵۰ تریپتوفان بود. در مجموع، بالاترین میزان این شاخص در نمونه‌های همزیست با *G. versiforme* در غلظت صفر تریپتوفان مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری را با همه غلظت‌های تریپتوفان اعمال شده نمونه‌های شاهد غیر میکوریزی و غلظت‌های صفر تریپتوفان در سایر تیمارهای میکوریزی نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳- وزن خشک اندام هوایی گیاهان پروانش تحت تیمار میکوریزا و تریپتوفان. مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۵ است.

تحلیل نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان پروتئین کل در گیاهان پروانش میکوریزی و غیر میکوریزی تحت تیمار غلظت‌های مختلف تریپتوفان پس از طی دوره سازگاری بیانگر آن بود که بالاترین میزان این شاخص در نمونه‌های همزیست با *G.versiforme* قرار گرفته تحت تیمار mg/l ۳۵۰ تریپتوفان مشاهده شد که تفاوت اندکی را با گیاهان همزیست با *G.intraradices* تحت غلظت‌های mg/l ۲۵۰ و mg/l ۳۵۰ تریپتوفان نشان دادند و تفاوت معنی‌داری بین این تیمارها مشاهده نشد، در حالی که با سایر تیمارها تفاوت در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. مقایسه نتایج حاصل از اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول در تیمارهای تریپتوفان در عدم حضور میکوریز نشان دهنده بالاترین میزان آن در غلظت mg/l ۳۵۰ بود که تفاوت معنی‌داری را با سه غلظت دیگر نشان ندادند. همچنین، بررسی نتایج حاصل از اثر قارچ‌های میکوریز در غلظت صفر تریپتوفان بر مقدار پروتئین محلول نیز تفاوت معنی‌داری را بین سه تیمار قارچی نشان نداد، در حالی که تفاوت با شاهد غیر میکوریزی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. (شکل ۴).



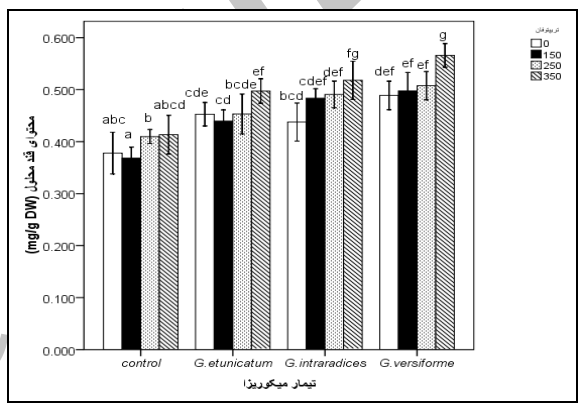
شکل ۴- محتوای پروتئین کل اندام هوایی گیاهان پروانش تحت تیمار میکوریزا و تریپتوفان. مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۵ است.

بررسی مقدار قند محلول در گیاهان پروانش میکوریزی و غیر میکوریزی تحت تیمار تریپتوفان نشان داد که بیشترین میزان این شاخص در گیاهان همزیست با *G. versiforme* تحت تیمار mg/l ۳۵۰ تریپتوفان به دست آمده است که به استثنای نمونه‌های همزیست با *G .intraradices* تحت تیمار mg/l ۳۵۰ تریپتوفان، با سایر تیمارها، تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵

Archive of SID

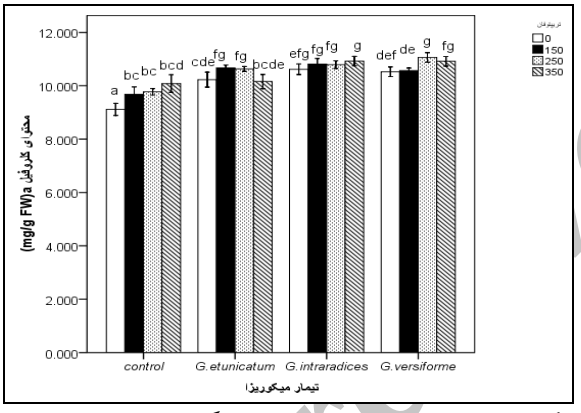
www.SID.ir

درصد نشان دادند. در بررسی اثر تریپتوفان بر مقدار قندهای محلول در نمونه‌های شاهد غیر میکوریزی، نتایج نشان دادند که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود نداشته است. همچنین، مقایسه نتایج حاصل از بررسی اثر قارچ‌های میکوریز بر مقدار قندهای محلول اندام هوایی در غیاب اعمال تریپتوفان نشان داد که بالاترین میزان آن در نمونه‌های همزیست با *G. versiforme* به دست آمده که تفاوت معنی‌داری را با گیاهان شاهد غیر میکوریزی نشان داد (شکل ۵).



شکل ۵- مقدار قند محلول اندام هوایی گیاهان پروانش تحت تیمار میکوریز و تریپتوفان. مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۵ است.

بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل‌های a و b نشان داد که میزان این دو رنگیزه نیز در تیمارهای میکوریزی بالاتر از نمونه‌های شاهد غیر میکوریزی بود. بالاترین میزان کلروفیل a در نمونه‌های همزیست با *G. versiforme* تحت تیمار ۲۵۰ mg/l تریپتوفان مشاهده شد، با وجود این، تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد با نمونه‌های همزیست با *G. intraradices* در تمامی غلظت‌های تریپتوفان و همچنین، *G. etunicatum* تحت تیمارهای ۱۵۰ mg/l و ۲۵۰ mg/l تریپتوفان نشان ندادند. همچنین، بررسی اثر آمینو اسید تریپتوفان بر محتوای کلروفیل a نشان داد که بالاترین میزان این رنگیزه بین نمونه‌های غیر میکوریزی که تنها تحت تیمار تریپتوفان قرار داشتند به تیمار ۳۵۰ mg/l تریپتوفان مربوط بود که تفاوت معنی‌داری را تنها با تیمار فاقد تریپتوفان نشان دادند. تحلیل مقایسه‌ای تیمارهای میکوریزی در غیاب اعمال تریپتوفان نیز بیانگر بالاترین میزان در مقدار کلروفیل a در نمونه‌های همزیست با *G .intraradices* بود که تنها با نمونه‌های شاهد غیر میکوریزی تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۶).



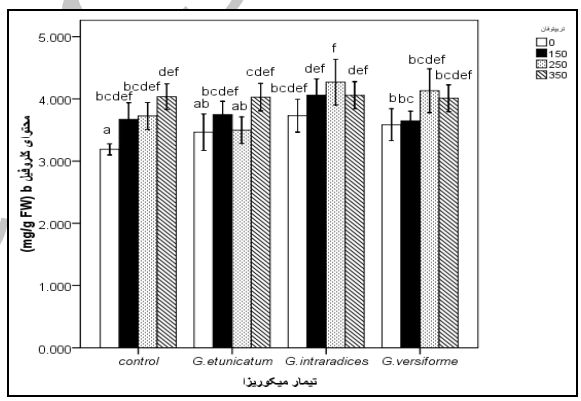
شکل ۶- محتوای کلروفیل a اندام هوایی گیاهان پروانش تحت تیمار میکوریز و تریپتوفان. مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۵ است.

بررسی نتایج مربوط به کلروفیل b نشان دهنده بالاترین میزان این رنگیزه در نمونه‌های همزیست با *G. intraradices* تحت تیمار ۲۵۰ mg/l تریپتوفان بود، با این وجود، این تفاوت در سطح آماری ۵ درصد تنها با نمونه‌های شاهد غیر میکوریزی در همه غلظت‌های تریپتوفان، *G. etunicatum* و در غلظت صفر و

Archive of SID

www.SID.ir

۲۵۰ mg/l تریپتوفان و *G. versiforme* در غلظت صفر و ۱۵۰ mg/l تریپتوفان معنی‌دار بود. همچنین، مقایسه نتایج حاصل از بررسی اثر تریپتوفان به تنهایی در نمونه‌های غیر میکوریزی نشان داد که بالاترین میزان کلروفیل b در غلظت ۳۵۰ mg/l تریپتوفان مشاهده شد که تنها با شاهد فاقد تریپتوفان تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان دادند. از سوی دیگر، نتایج حاصل از آغشتگی گیاهان با میکوریز در تیمارهای فاقد تریپتوفان بیانگر بالاترین میزان کلروفیل b در *G. intraradices* بود که تنها با شاهد غیر میکوریزی تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد دارا بود (شکل ۷).



شکل ۷- محتوای کلروفیل b اندام هوایی گیاهان پروانش تحت تیمار میکوریز و تریپتوفان. مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۵ است.

بحث

بررسی نتایج حاصل از برهم‌کنش قارچ‌های میکوریز در گیاهچه‌های پروانش رشد یافته در شرایط درون شیشه که تحت تأثیر غلظت‌های مختلف تریپتوفان قرار گرفته بودند، طی فرآیند سازگاری نشان داد که این قارچ‌ها اثر مثبتی بر رشد و عوامل بیوشیمیایی این گیاهچه‌ها داشته‌اند. نتایج نشان دادند که قارچ‌های میکوریز سبب افزایش رشد و طول اندام هوایی و وزن تر و خشک در گیاهچه‌های تحت تیمار تریپتوفان شده‌اند.

قارچ‌های میکوریز با افزایش جذب عناصر معدنی نظیر فسفر که تحرک نسبتاً کمی در خاک دارند باعث افزایش رشد در گیاهان می‌شوند. این قارچ‌ها به شدت ریشه‌های جانبی را در خاک افزایش می‌دهند و با تشکیل ریسه شعاعی به گیاه برای جذب آب و مواد معدنی یاری می‌رسانند. همچنین، آغشتگی با قارچ‌های میکوریز می‌تواند بسته به نوع میزبان مقدار سایر عناصر غذایی نظیر کلسیم، مس، منیزیم و روی را در گیاه افزایش دهد و این خود به رشد گیاه کمک می‌کند. از سوی دیگر، یکی از مهم‌ترین آثار دوره سازگاری بر گیاهان انتقال یافته به محیط *ex vitro* قرار گرفتن گیاهان تحت تنش رطوبت و آب است. نشان داده شده که تلقیح گیاهچه‌های ریزازدیادی شده با قارچ‌های میکوریز نقش مهمی را در اقتصاد آب گیاه ایفا می‌کند (Kapoor *et al.*, 2008). قارچ‌های میکوریز با افزایش محتوای آب نسبی (RWC) می‌توانند باعث بهبود جذب فسفر از خاک شده، در نهایت، نقش مؤثری در افزایش رشد گیاه داشته باشند (Krishna *et al.*, 2005). از دیگر عوامل مؤثر بر میزان رشد توسط قارچ‌های میکوریز، تأثیر این قارچ‌ها بر هورمون‌های گیاهی به ویژه IAA است. افزایش مقدار IAA، جیبرلین و سیتوکینین در گیاه *Prosopis juliflora* همزیست با *G. fasciculatum* توسط Selvaraj و Chellappan (۲۰۰۶) گزارش شده است. Karthikeyan و همکارانش (۲۰۰۸) نشان داده‌اند که همزیستی گیاهان پروانش با قارچ‌های میکوریز *G. mosseae* می‌تواند باعث افزایش ارتفاع گیاه شود.

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین، اثر این قارچ‌ها بر شاخص‌هایی نظیر وزن تر و خشک اندام هوایی گزارش شده است (Morone-Fortunato and Avato, 2008).

از سوی دیگر، Talaat و همکارانش (۲۰۰۵) نشان داده‌اند که با افزایش غلظت تریپتوفان به کار رفته در گیاه پروانش، میزان وزن تر و خشک و ارتفاع گیاه افزایش می‌یابد. همچنین، Nahed و همکاران (۲۰۰۹) با به کار بردن دو غلظت از تریپتوفان در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام (ppm) افزایش رشد را در گیاهان *Antirrhinum majus* نشان داده‌اند. اثر مثبت تریپتوفان می‌تواند به علت نقش این آمینو اسید به عنوان مسیری جایگزین در سنتز IAA باشد. به علاوه، زمانی که گیاه دچار کمبود کربوهیدرات می‌شود، تریپتوفان می‌تواند به عنوان منبع کربن و انرژی عمل کند و به این طریق در رشد گیاه مؤثر باشد.

اثر مثبت چند گونه از قارچ‌های میکوریز بر رشد و ارتفاع گیاهچه‌های *Vitis vinifera* در طول سازگاری *ex vitro* گزارش شده است (Krishna *et al.*, 2005). تحلیل نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل نیز بیانگر اثر مثبت قارچ‌های میکوریز و تیمارهای تریپتوفان بر مقادیر این شاخص بوده است. نشان داده شده است که تلقیح میکوریزی غلظت اسیدهای آمینه و مقدار پروتئین کل را در گیاهان همزیست افزایش می‌دهد. مشخص شده است که گیاهان *Prosopis juliflora* همزیست با *G. fasciculatum* نسبت به شاهد از پروتئین بیشتری در برگ‌های خود برخوردار بوده‌اند (Selvaraj and Chellappan, 2006). همچنین، نشان داده شده است که در گیاهان پروانش تیمار شده با سه غلظت تریپتوفان، مقدار پروتئین کل با افزایش غلظت تریپتوفان به صورت جزیی افزایش می‌یابد (Talaat *et al.*, 2005).

برهم‌کنش دو تیمار میکوریز و تریپتوفان باعث افزایش غلظت قندهای محلول در گیاهچه‌های پروانش شد. برهم‌کنش همزیستی در اجتماعات میکوریزی بر اساس تبادل کربوهیدرات‌ها و سنتز پلی‌ساکاریدها استوار است. از سوی دیگر، قارچ‌های میکوریز می‌توانند با افزایش غلظت هورمون‌های گیاهی نظیر سیتوکینین که در باز شدن روزنه‌ها مؤثرند، باعث افزایش فتوسنتز و در نهایت، تشکیل کربوهیدرات‌ها در گیاه شوند. Demir (۲۰۰۴) نشان داد که میزان قندهای فروکتوز، آلفا گلوکز و مقدار قند کل در گیاهان فلفل همزیست با *G. intraradices* بالاتر از انواع غیر میکوریزی بوده است. همچنین، اثر تریپتوفان بر افزایش کربوهیدرات‌ها توسط Wahba و همکارانش (۲۰۰۲) روی *Antholyza acthiopoica* نشان داده شده است.

بررسی مقادیر کلروفیل‌های a و b در گیاهچه‌های پروانش میکوریزی که تحت تیمار تریپتوفان، طی فرآیند سازگاری بیانگر مؤثر بودن این دو تیمار در افزایش این عوامل فتوسنتزی بوده است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که غلظت کلروفیل در گیاهان تیمار شده با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بالاتر از انواع غیرمیکوریزی است (Kapoor *et al.*, 2006). بالا بودن غلظت کلروفیل در نمونه‌های میکوریزی را می‌توان به بالا بودن جذب فسفر به عنوان حامل انرژی طی فرآیند فتوسنتز نسبت داد (Selvaraj and Chellappan, 2006). از سوی دیگر، قارچ‌های میکوریز با افزایش جذب عناصر ضروری در بیوسنتز کلروفیل‌ها (شامل منیزیم و آهن) می‌توانند سبب افزایش ساخت این

Archive of SID

www.SID.ir

رنگیزه‌ها و در نهایت، افزایش میزان فتوسنتز شوند (Krishna *et al.*, 2005). افزایش مقدار کلروفیل‌های a و b در گیاهان *Prosopis juliflora* همزیست با *G. fasciculatum* گزارش شده است (Selvaraj and Chellappan, 2006). همچنین، Krishna و همکارانش (۲۰۰۵) افزایش غلظت کلروفیل کل را در گیاهان *Vitis vinifera* همزیست با چند گونه از قارچ‌های میکوریز و Moraes و همکارانش (۲۰۰۴) در گیاه *Podyphillum peltatum* طی فرآیند سازگاری در شرایط *ex vitro* گزارش کرده‌اند. از سوی دیگر، مشاهده شده که آمینو اسیدها و از جمله تریپتوفان می‌توانند سبب افزایش غلظت کلروفیل‌های a و b و کاروتنوئیدها شوند که این نتایج هماهنگ با یافته‌های Abdel Aziz و Balbaa (۲۰۰۷) بر گیاه *Phylodendron erubescens* است.

جمع‌بندی

در مجموع، از بررسی حاضر این نتیجه به دست آمد که طی فرآیند سازگاری، قارچ‌های میکوریز و تریپتوفان بر رشد گیاهان پروانش مؤثر بوده، از میان تیمارهای اعمال شده، برهم‌کنش دو تیمار تأثیر بیشتری بر رشد و عوامل بیوشیمیایی این گیاه دارویی ارزشمند دارد.

منابع

Abdel Aziz, N. G. and Balbaa, L. K. (2007) Influence of tyrosine and zinc on growth, flowering and chemical constituents of *Salvia farinaceae* plants. Journal of Applied Sciences Research 3: 1479-1489.

Aslam, J., Haque Khan, S. and Siddiqui Z. H. (2010) *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. an important drug: its applications and production. Pharmacie Globale 4: 1-16.

Bradford, M. M. (1979) 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.

Demir, S. (2004) Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. Turkish Journal of Biology 28: 85-90.

Faheem, M., Singh, S., Tanwer, B. S., Khan, M. and Shahzad, A. (2011) *In vitro* regeneration of multiplication shoots in *Catharanthus roseus* - an important medicinal plant. Advances in Applied Science Research 2: 208-213.

Fales, F. W. (1951) The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. Journal of Biological Chemistry 193: 113-124.

Kapoor, R., Sharma, D. and Bhatnagar, A. K. (2008) Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. Scientia Horticulturae 116: 227-239.

Karthikeyan, B., Abdul Jaleel, C. and Changxing, Z. (2008) The effect of AM fungi and phosphorous level on the biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. Eurasian Journal of Biosciences 2: 26-33.

Krishna, H., Singh, S. K. and Sharma, R. R. (2005) Biochemical changes in micropropagated grape (*Vitis vinifera* L.) plantlets due to arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculated during ex vitro acclimatization. Scientia Horticulturae 106: 554-567.

Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1983) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf in different solvents. Biochemical Society Transactions 11: 591-592.

Moraes, R. M., Andrade, Z. D., Bedir, E.,

Archive of SID

www.SID.ir

Dayan, F. E., Lata, H., Khan, I. and Pereira, M. S. (2004) Arbuscular mycorrhiza improves acclimatization and increases lignin content of micropropagated mayapple (*Podophyllum peltatum* L.). Plant Science 166: 23-29.

Morone-Fortunato, I. and Avato, P. (2008) Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *Hirtum* (Link) Ietswaart. Plant Cell Tissue and Organ Culture 93: 139-149.

Nahed, A. A., Mahgoub N. H. and Mazher, A. A. M. (2009) Physiological effect of phenylalanine and tryptophan on the growth and chemical constituents of *Antirrhinum majus* plants. Ozean Journal of Applied Sciences 2: 399-407.

Selvaraj, T. and Chellappan, P. (2006) Arbuscular mycorrhizae: a diverse personality. Journal of Central European Agriculture 7: 349-358.

Talaat, I. M., Bekheta, M. A. and Mahgoub, M. H. (2005) Physiological response of periwinkle plants (*Catharanthus roseus*) to tryptophan and putrescine. International Journal of Agriculture and Biology 2: 210-213.

Wahba, H. E., Safaa, M. M., Attoa, G. E. and Farahat, A. A. (2002) Response of *Antholyza acthipoica* L. to foliar spray with some amino acids and mineral nutrition with sulphur. Annals of Agricultural Science 47: 929-944.

Whitmer, S., Van Der Heijden R. and Verpoorte, R. (2002) Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a tryptophan decarboxylase over-expressing transgenic cell line T22 of *Catharanthus roseus*. Journal of Biotechnology 96: 193-203.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth improvement and biochemical factors of regenerated *Catharanthus roseus* L. plants under tryptophan treatment during acclimatization process

Samaneh Rahmatzadeh [1], Jalil Khara [1]* and Seyed Kamal Kazemitabar [2]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Agriculture and Natural Resources, Sari, Iran

Archive of SID

Abstract

Mycorrhizas providea symbiotic associations in which the fungus obtains carbon from the plant, while providing the plant with a supply of phosphorus. On the other hand, periwinkle plants (*Catharanthus roseus* L.) have been investigated due to production of two medicinal alkaloids namely vinblastine and vincristine. In this evaluation, tryptophan was used as precursor of these alkaloids under tissue culture conditions. Inoculation by mycorrhiza induced the growth and survival of several species during acclimatization, which was the most important challenge of tissue culture. For this reason, the regeneration plantlets obtained under different concentrations of tryptophan, were exposed to acclimatization to mycorrhizal colonization and their shoot growth and biochemical factors were evaluated. Results from measurement of length, fresh and dry weights, soluble sugars and total protein content and also, chlorophyll a and b of shoots, indicated the positive role of these two treatments on growth of periwinkle plantlets under acclimatization. The highest amount of height and fresh and dry weight in shoots were obtained in colonized samples with *Glomus versiforme* and under 0, 150 and 250 mg/l tryptophan treatments, respectively. Also, the highest content of total protein and soluble sugars content was observed in *G. versiforme* colonized plants under 350 mg/l tryptophan treatment. Finally, evaluation of the chlorophyll a and b contents showed that the highest amount of these factors obtained in the colonized samples with *G. versiforme* and *G. etunicatum*, respectively, under 250 mg/l tryptophan treatment.

Key words: Regeneration, Periwinkle, Acclimatization, Mycorrhiza

* Corresponding Author: j.khara@urmia.ac.ir

www.SID.ir