

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
 شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2019.121178.1296
 جلد ۲۷، شماره ۱، صفحه ۵۸-۴۵ (۱۳۹۸)
 شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.27.45.53.1.1578.41

تأثیر اکسین و برخی ترکیبات سیگنالی بر رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت درون‌شیشه‌ای قره‌قاپ (*Vaccinium arctostaphylos* L.)

مهران نوروزپور^۱، ناصر زارع^{۲*}، پریسا شیخ‌زاده مصدق^۳ و رسول اصغری‌ذکریا^۴

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۲- نویسنده و مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

پست الکترونیک: zarenasser@yahoo.com

۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۴- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۳

چکیده

قره‌قاپ یکی از گیاهان دارویی مهم در طب سنتی است که به‌منظور کاهش قند خون و تنظیم فشار خون از دیرباز در ایران کاربرد دارد. در این تحقیق تأثیر اکسین، اسید جیبرلیک، کازئین هیدرولایسیت، پوترسین و سالیسیلیک اسید بر استقرار و رشد ریزنمونه‌های قره‌قاپ و میزان ترکیبات ثانویه آنتوسیانین، فلاونوئیدی و فنل‌تام بررسی شد. ریزنمونه‌های تک‌گرهی و جوانه‌های انتهایی قره‌قاپ از رویشگاه‌های طبیعی تهیه شده و پس از ضدعفونی سطحی روی محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و سطوح مختلف IBA یا NAA (۰/۱ تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA یا IBA به همراه سطوح مختلف اسید جیبرلیک (۰ تا ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر)، کازئین هیدرولایسیت (صفر تا ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)، پوترسین و سالیسیلیک اسید (۰ تا ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند. نتایج نشان داد درصد برگ‌دهی و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع و غلظت اکسین قرار گرفت. درصد برگ‌دهی و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در تیمار هورمونی NAA در غلظت‌های پایین‌تر به‌طور معنی‌داری بیشتر از غلظت‌های بالاتر NAA و کلیه سطوح IBA بود. اضافه کردن GA3 به ترکیب محیط کشت باعث افزایش معنی‌دار تعداد برگ در ریزنمونه شد؛ ولی تأثیری در زنده‌مانی و درصد برگ‌دهی ریزنمونه‌ها نداشت. علاوه‌براین کازئین هیدرولایسیت، پوترسین و اسید سالیسیلیک باعث افزایش تعداد برگ و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها گردید ولی این افزایش در برخی از تیمارها از نظر آماری معنی‌دار نبود. از نظر میزان متابولیت‌های ثانویه بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیشترین میزان ترکیبات آنتوسیانینی در محیط کشت MS+2mg/l BAP+ 0.1mg/l NAA و بیشترین میزان فلاونوئید و فنل کل نیز در همان محیط کشت حاوی ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر سالیسیلیک‌اسید بدست آمد. بنابراین، از نتایج و دستورالعمل ارائه شده در این تحقیق می‌توان در کشت و تکثیر درون‌شیشه‌ای این گیاه استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: پوترسین، کشت‌بافت، گیاهان دارویی، *Vaccinium arctostaphylos* L.

مقدمه

گیاه قره‌قاط (*Vaccinium arctostaphylos* L.) عضوی از خانواده Ericaceae می‌باشد. میوه و برگ‌های این گیاه دارای خواص دارویی است. میوه به صورت سته، کروی و پربزر بوده و به دلیل دارا بودن ترکیبات آنتوسیانینی، فلاونوئیدی، ضدسرطان و ضد میکروبی از ارزش تجاری بالایی برخوردار است. علاوه بر این، میوه این گیاه سرشار از اسیدهای فنولیک از جمله اسید کافیلونیک، اسید کافیک، اسید کوماریک، مشتقات اسید هیدروکسی بنزوئیک و مشتقات هیدروکسی سینامیک و ترکیبات آلی غیر فنولی همانند ایریدوئیدها و اسیدهای گیاهی و مقادیر بسیار کمی از میریتین و اپی میریتین در بخش‌های هوایی می‌باشد (Ayaz *et al.*, 2001). نام انگلیسی این گونه Whortleberry می‌باشد که به بلوبری قفقازی نیز معروف است.

ریزازدیادی شاخه‌ای از علوم کاربردی در مبانی بیوتکنولوژی گیاهی است که سازمان‌های مختلف تحقیقاتی از جمله شرکت‌های کشت‌بافتی و شرکت‌های تولیدی گیاهان پایه در سطوح مختلف و بر اساس برنامه‌های تحقیقاتی و درآمذایی خود از آن بهره‌برداری می‌کنند. در برخی از روش‌های ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای از جمله جنین‌زایی سوماتیکی و اندام‌زایی با توجه به گونه گیاهی، ریزنمونه و شرایط کشت بافتی این احتمال که افراد حاصل نسبت به گیاه مادری متفاوت باشند، همواره وجود دارد. ولی مطالعات متعدد نشان داده که چنین تنوعی در کشت اندام از قبیل گره و جوانه‌های جانبی و انتهایی یا وجود ندارد و یا اینکه بسیار کم است. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، به‌ویژه اکسین و سیتوکینین‌ها، در کنترل رشد و نمو سلول‌ها هم در گیاه کامل و هم در ریزنمونه‌های کشت شده در شرایط درون‌شیشه‌ای نقش بسیار مهمی دارند (Mirzaie-Nodoushan *et al.*, 2016; Iliev *et al.*, 2010).

کشت بافت و اندام گیاهی رهیافت مؤثری را برای تکثیر گونه‌های مختلف گیاهی از جمله قره‌قاط فراهم کرده و با توجه به امکان تکثیر سریع و مستقل از فصل رشدی و همچنین امکان تولید نهال‌هایی عاری از بیماری، این تکنیک

از اهمیت بالایی برخوردار است. به این دلیل در ۳۰ سال گذشته استفاده از سیستم‌های ریزازدیادی برای تکثیر گونه‌های مختلف جنس *Vaccinium* توسعه فراوانی یافته است (Fan *et al.* 2017; Mirjani *et al.*, 2017).

در مقایسه با تکثیر معمولی (تکثیر غیرکشت‌بافتی)، گیاهان قره‌قاط حاصل از ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای میوه‌های بیشتری تولید می‌کنند (ElShiekh *et al.*, 1996). در تحقیقی روی کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های قره‌قاط (V. *arctostaphylos* Meiners) و همکاران (2007) نشان دادند که بهترین عملکرد ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی NAA بدست می‌آید. متابولیت ثانویه، به دلیل داشتن خواص ضد درد، ضد التهاب، ضدافسردگی، ضد اضطراب و ... در صنایع دارویی کاربرد فراوان دارد. مواد مؤثره (متابولیت‌های ثانویه) موجود در گیاهان دارویی به دلیل همراه بودن با مواد دیگر پیوسته از حالت زیستی برخوردارند، از این رو در بدن انباشته نمی‌شوند و اثرهای جانبی از خود به جای نمی‌گذارند و این امر سبب برتری آنها نسبت به داروهای شیمیایی شده است (Castilho *et al.*, 2006). با توجه به اینکه تولید متابولیت‌های ثانویه بیشتر در بافت‌های تمایز یافته انجام می‌شود، تلاش‌های زیادی انجام شده است تا بتوان ترکیبات دارویی بسیار مهم را از طریق کشت ریشه و ساقه گیاه به دست آورد. کشت چنین اندام‌هایی از نظر ژنتیکی و تولید نیز در مقایسه با کشت سلولی پایدارتر است. در گیاهان متعددی از جمله شایبک، پروانش کبیر، گل انگشتانه و درمنه کشت ساقه به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Ramachandra & Ravishankar, 2002). اما مشکلاتی بر سر راه استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان بیماری‌ها وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به غلظت پایین ترکیبات دارویی در گیاه، محدودیت منابع طبیعی، سرعت پایین تولید متابولیت‌های ثانویه، تخریب روزافزون مراتع و نابودی گونه‌های متنوع گیاهی، مشکلات مرتبط با اصلاح و اهلی نمودن و کشت زراعی و گسترده گیاهان زراعی اشاره کرد. از این رو روش‌هایی که بتواند سبب کاهش این محدودیت‌ها شود و

دوره روشنایی ۱۶ ساعت و شدت نور ۳۵۰۰-۳۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. حدود ۴ هفته پس از کشت، صفاتی از قبیل درصد زنده‌مانی و درصد برگ‌دهی ریزنمونه‌ها و تعداد برگ در ریزنمونه ثبت گردید. درصد برگ‌دهی به‌عنوان معیاری از درصد ریزنمونه‌های رشد کرده است، ولی تعداد برگ در ریزنمونه‌ها نشان‌دهنده میانگین تعداد برگ رشد کرده در هر ریزنمونه است. در همه موارد محیط‌کشت‌ها از طریق اتوکلاو و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شد. ترکیبات ناپایدار در دماهای بالا از قبیل اسیدجیرلیک، سالیسیلیک‌اسید و پوترسین از طریق فیلتر سرسرنگی با منافذ ۰/۲ میکرومتر استریل شده و پس از اتوکلاو شدن محیط کشت و در دماهای پایین‌تر و زیر هود به آن اضافه شد.

اندازه‌گیری متابولیت ثانویه در برگ‌های رشد کرده در شرایط درون‌شیشه‌ای

به‌منظور اندازه‌گیری متابولیت‌های مهم گیاه قره‌قاط رشد کرده در شرایط درون‌شیشه‌ای و همچنین بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی بر میزان این متابولیت‌های ثانویه، ریزنمونه‌های تک یا دو گرهی قره‌قاط روی محیط کشت‌های مشخص شده با علامت (*) در جدول شماره ۱ و همچنین محیط کشت $15 \text{ mg/l SA} + 0.1 \text{ mg/l NAA} + 0.1 \text{ mg/l BAP}$ و $MS+2$ کشت شدند. حدود ۴۵ روز پس از کشت، برگ‌های رشد کرده در شرایط درون‌شیشه‌ای برداشت شده و میزان فلاونوئید، آنتوسیانین و فنل‌تام در آنها اندازه‌گیری شد. از برگ‌های تهیه شده از رویشگاه طبیعی نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد. به‌منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه، حدود ۰/۱ گرم از نمونه گیاهی (نمونه تازه) درون هاون چینی با ۵ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۱:۹۹) کاملاً سائیده و عصاره به‌دست آمده به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و مقدار فلاونوئید، فنل‌تام و آنتوسیانین محلول رویی آن اندازه‌گیری شد.

همچنین شناسایی، تولید و افزایش ترکیبات ثانویه را در گیاهان دارویی موجب گردد، در حال گسترش می‌باشد. راهکارهای کشت سلول و بافت، مهندسی ژنتیک، استفاده از نشانگرهای مولکولی، بررسی مسیرهای مؤثر در تولید متابولیت‌ها و افزایش بیان ژن قادر است کارآیی گیاهان را به‌عنوان منابع تجدیدپذیر برای تولید دارو افزایش دهد (Sato et al., 2001; Kumar & Gupta, 2008). بنابراین این آزمایش ابتدا به بررسی تأثیر انواع هورمون‌ها و محرک‌های رشدی مختلف بر رشد ریزنمونه‌های قره‌قاط در شرایط درون‌شیشه‌ای پرداخته و بعد به بررسی تأثیر این ترکیبات بر سطوح مختلف آنتوسیانین، فلاونوئید و فنل‌تام اقدام کرده است.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت ریزنمونه

سرشاخه‌های یکساله و حاوی جوانه‌های سالم (از لحاظ فنتویی) قره‌قاط در فصل پاییز از مناطق جنگلی روستای سوها (شمال: ۳۸/۲۵ و شرق: ۴۸/۶۴ و ۱۶۷۰ متر) از توابع شهرستان اردبیل تهیه و در بسته‌بندی مناسب به آزمایشگاه منتقل شدند. ریزنمونه‌های تک یا دو گرهی قره-قاط ابتدا با محلول ظرف‌شویی به مدت ۳۰ دقیقه شستشو داده شده و زیر آب جاری به مدت یک ساعت آبکشی شدند. سپس، ریزنمونه‌ها در محلول ۳ گرم بر لیتر بنومیل به مدت ۲ ساعت و بعد محلول پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شده و با آب استریل به مدت ۵ دقیقه آبکشی گردیدند. در نهایت ریزنمونه‌ها با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد با $pH=10$ و حاوی Tween20 ۰/۱ درصد به مدت ۱۲ دقیقه تیمار شده و پس از سه بار آبکشی با آب مقطر استریل و حذف آب اضافی، روی محیط کشت‌های پایه مختلف MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه غلظت‌های مختلف اکسین و محرک‌های رشدی از جمله جیرلیک‌اسید، کازئین و سالیسیلیک‌اسید و پوترسین (جدول ۱) کشت شدند. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای 24 ± 1 ،

جدول ۱- انواع تیمار هورمونی و ترکیبات سیگنالی مورد استفاده برای کشت درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های گرهی قره‌قاپ

در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP

اسید سالیسیلیک (mg/l)	پوتریسین (mg/l)	کازئین هیدرولایسیت (mg/l)	اسید جیبرلیک (mg/l)	IBA (mg/l)	NAA (mg/l)	آزمایش
-	-	-	-	-	۰/۰۱	آزمایش اول
-	-	-	-	-	۰/۱	
-	-	-	-	-	۰/۵	
-	-	-	-	-	۱	
-	-	-	-	۰/۰۱	-	
-	-	-	-	۰/۱	-	
-	-	-	-	۰/۵	-	
-	-	-	-	۱	-	
-	-	-	-	-	۰/۱ (شاهد)	آزمایش دوم
-	-	-	۰/۱	-	* ۰/۱	
-	-	-	۰/۵	-	* ۰/۱	
-	-	-	-	۰/۱ (شاهد)	-	
-	-	-	۰/۱	۰/۱	-	
-	-	-	۰/۵	۰/۱	-	
-	-	-	-	-	۰/۱ (شاهد) *	آزمایش سوم
-	-	۵۰	-	-	* ۰/۱	
-	-	۱۰۰	-	-	* ۰/۱	
-	-	۱۵۰	-	-	۰/۱	
-	۵	-	-	-	۰/۱	
-	۱۰	-	-	-	۰/۱	
۵	-	-	-	-	* ۰/۱	
۱۰	-	-	-	-	۰/۱	

*: محیط‌کشت‌های مورد استفاده برای ارزیابی متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های درون شیشه‌ای قره‌قاپ

استفاده از روش (Chang et al., 2002) سنجیده شد. برای این منظور جذب نوری عصاره گیاهی در طول موج ۴۹۸ نانومتر

اندازه‌گیری فلاونوئید
فلاونوئید کل نمونه‌ها براساس منحنی استاندارد کوئرستین با

ریزنمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش‌ها در سه مرحله رشدی مختلف از رویشگاه طبیعی تهیه شده و به این دلیل تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب سه آزمایش مجزا انجام شده است. قبل از انجام تجزیه و تحلیل داده‌ها، آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون تک نمونه‌ای کولوگروف انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 انجام گردید.

نتایج

تأثیر غلظت‌های مختلف IBA و NAA بر رشد ریزنمونه‌های قره‌قاپ در شرایط درون‌شیشه‌ای

به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و IBA بر رشد درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های گرهی، تأثیر ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۵ و یک میلی‌گرم بر لیتر از NAA یا IBA در ترکیب با ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP در محیط کشت MS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر درصد برگ‌دهی ریزنمونه‌های قره‌قاپ اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد وجود دارد.

اما از نظر میانگین تعداد برگ در هر ریزنمونه برگ داده و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بیشترین درصد برگ‌دهی (۶۶/۶۳ و ۶۹/۴۰ درصد) به ترتیب مربوط به محیط کشت MS حاوی ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به همراه ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود که به طور معنی‌داری بیشتر از درصد برگ‌دهی ریزنمونه‌ها در محیط کشت‌های حاوی سطوح مختلف IBA بود (شکل ۱، a، b، c و d و جدول ۳). اضافه نمودن غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های قره‌قاپ را نسبت به بقیه تیمارها بیشتر کرد ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بدست نیامد (جدول ۳).

تأثیر غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک بر رشد ریزنمونه‌های قره‌قاپ در شرایط درون‌شیشه‌ای

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس به تأثیر غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک نشان داد که بین غلظت‌های مختلف

قرائت گردید. از غلظت‌های مختلف کوئرستین به عنوان استاندارد استفاده گردید و منحنی استاندارد رسم شد. سپس مقدار فلاونوئید با استفاده از فرمول $T=(C \times V)/M$ بر حسب میلی‌گرم در یک گرم برگ تازه محاسبه گردید. در این فرمول T برابر با میزان فلاونوئید بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم برگ تر، C برابر است با مقدار غلظت فلاونوئید بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر، V برابر است با حجم نهایی عصاره (بر حسب میلی‌لیتر) و M برابر وزن نمونه گیاهی (بر حسب گرم نمونه تازه) است.

اندازه‌گیری فنل تام

برای اندازه‌گیری مقدار فنل تام فولین سیوکالتیو استفاده از روش (Al-Farsi et al., 2005) با کمی تغییر استفاده شد. جذب نوری عصاره گیاهی در طول موج ۷۲۵ اندازه‌گیری گردید. به منظور کمی‌سازی مقدار فنل کل از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده شد. سپس مقدار فنل کل نیز با استفاده از فرمول $T=(C \times V)/M$ بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در یک گرم برگ تر محاسبه گردید.

اندازه‌گیری آنتوسیانین

برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین از روش (Wagner, 1979) استفاده شد. برای این منظور جذب نوری عصاره گیاهی در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد. محاسبه غلظت با استفاده از فرمول $A=\epsilon bc$ و ضریب خاموشی $M^{-1}cm^{-1}$ ۳۳۰۰۰ انجام شد و عدد بدست آمده در 10^6 ضرب گردید تا نتایج بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ارائه گردد. در فرمول فوق A برابر مقدار عدد جذبی، b برابر عرض کووت، ϵ برابر ضریب خاموشی و c برابر غلظت آنتوسیانین است.

طرح آزمایشی و تجزیه داده‌ها

همه آزمایش‌ها بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و حداقل ۱۰ لوله آزمایشی در هر تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) و در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

اسید جیبرلیک از نظر میانگین تعداد برگ در ریزنمونه برگ اختلاف معنی داری وجود داشت. ولی از نظر درصد برگ‌دهی و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های قره‌قاپ کشت شده در شرایط درون‌شیشه‌ای اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول ۴).

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و IBA بر رشد ریزنمونه‌های گرهی قره‌قاپ در شرایط درون‌شیشه‌ای

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		میانگین تعداد برگ	درصد برگ‌دهی
تیمار هورمونی	۷	۰/۵۷۳ ^{ns}	۱۰۵۰/۸۲۱ ^{**}
خطا	۱۶	۰/۹۶۳	۲۷۱/۴۳۸
ضریب تغییرات (درصد)	-	۳۵/۷۱	۴۶/۰۵
۳۸/۴۱ درصد زنده‌مانی			

ns: غیرمعنی دار، **: معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین‌های NAA و IBA بر خصوصیات رشدی ریزنمونه‌های گره قره‌قاپ

درون محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP

غلظت NAA (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت IBA (میلی‌گرم بر لیتر)	میانگین تعداد برگ	درصد برگ‌دهی	زنده‌مانی ریزنمونه‌ها (درصد)
۰/۰۱	-	۳ ± ۰/۲۰۸ ^{**a}	۶۹/۴۰ ± ۲/۸۰ ^a	۶۹/۴۰ ± ۲/۸۰ ^a
۰/۱	-	۲/۹۶ ± ۰/۷۷ ^a	۶۶/۶۳ ± ۹/۶۱ ^a	۷۲/۲۰ ± ۱۴/۷۰ ^a
۰/۵	-	۲/۳۳ ± ۰/۳۳ ^a	۴۹/۹۶ ± ۹/۶۱ ^{ab}	۴۹/۹۶ ± ۹/۶۱ ^{ab}
۱	-	۲/۱۶ ± ۰/۰۲ ^a	۴۲/۷۳ ± ۷/۲۵ ^{bc}	۵۳/۸۳ ± ۸/۴۳۲ ^{ab}
-	۰/۰۱	۲/۱۶ ± ۰/۵۷۷ ^a	۲۵/۷۶ ± ۳/۷۶ ^{cd}	۲۹/۵۳ ± ۳/۷۷ ^b
-	۰/۱	۲/۶۶ ± ۰/۸۸ ^a	۱۴/۶۶ ± ۳/۷۱ ^d	۳۳/۶۰ ± ۲/۱۷ ^b
-	۰/۵	۲/۲۷ ± ۰/۱۴ ^a	۴۵/۹۰ ± ۷/۷۴ ^{bc}	۵۲/۵۶ ± ۱۴/۰۸ ^{ab}
-	۱	۳/۱۶ ± ۰/۹۲ ^a	۳۶/۲۰ ± ۲/۹۰ ^{bc}	۵۱/۴۳ ± ۱۰/۹۰ ^{ab}

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) است.
*: نشان‌دهنده خطای استاندارد تیمارهاست.

جدول ۴- تجزیه واریانس تأثیر اسید جیبرلیک بر رشد ریزنمونه‌های گرهی قره‌قاپ در شرایط درون‌شیشه‌ای

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		میانگین تعداد برگ	درصد برگ‌دهی
تیمار هورمونی	۵	۰/۶۰۱ [*]	۷۲۴/۴۵۰ ^{ns}
خطا	۱۲	۰/۱۵۸	۳۴۸/۵۳۸
ضریب تغییرات (درصد)	-	۳۰	۳۴/۳۴
۳۵/۹۴ درصد زنده‌مانی			

ns: غیرمعنی دار، *: معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد

نداشت. این در حالیست که از نظر درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها بین محیط کشت‌ها با غلظت‌های مختلف و تیمار شاهد (فاقد اسید جیبرلیک) همچنین محیط پایه MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و اسید جیبرلیک اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۵ و شکل ۱، e و f). بدین گونه که در تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و اسید جیبرلیک کمترین درصد زنده‌مانی ریزنمونه (۳۴ درصد) به‌دست آمد (شکل ۱، g).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌های تأثیر اسید جیبرلیک بر میانگین تعداد برگ در هر ریزنمونه (جدول ۵) نشان داد که با افزایش میزان اسید جیبرلیک بر میانگین تعداد برگ در هر ریزنمونه افزوده شد، به‌نحوی که بیشترین تعداد برگ در ریزنمونه تیمار شده با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری در مقایسه با محیط بدون اسید جیبرلیک (شاهد) داشت. اما از نظر برگ‌دهی ریزنمونه‌های قره‌قاپ بین محیط کشت‌ها و غلظت‌های مختلف و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود

جدول ۵- تأثیر اسید جیبرلیک بر خصوصیات رشدی ریزنمونه‌های گرهی قره‌قاپ در شرایط درون‌شیشه‌ای درون محیط کشت MS

حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP

تیمار هورمونی (میلی‌گرم بر لیتر)	تعداد برگ	درصد برگ‌دهی	درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها
۰/۱ NAA	۱/۴۰ ± ۰/۱۰ ^{ab}	۶۹/۹۶ ± ۱۲/۶۱ ^a	۷۴/۶۵ ± ۱۲/۹۵ ^a
۰/۱ + NAA ۰/۱ GA	۱/۹۴ ± ۰/۵۰ ^{ab}	۶۱/۱۶ ± ۱۱/۸۸ ^{ab}	۷۴/۱۶ ± ۱۸/۸۳ ^a
۰/۱ + NAA ۰/۵ GA	۲/۰۸ ± ۰/۸۳ ^{ab}	۷۵/۴۳ ± ۷/۵۹ ^a	۸۳/۳۳ ± ۸/۳۳ ^a
۰/۱ IBA	۱/۵ ± ۰/۲۵ ^b	۶۱/۴۰ ± ۱۲/۶۱ ^{ab}	۸۰/۰۰ ± ۲/۸۸ ^a
۰/۱ + IBA ۰/۱ GA	۱/۸۳ ± ۰/۴۴ ^b	۳۰/۶۶ ± ۵/۲۰ ^b	۳۴/۰۰ ± ۶/۰۰ ^b
۰/۱ + IBA ۰/۵ GA	۲/۶۴ ± ۰/۱۹ ^a	۵۶/۹۳ ± ۱۲/۳۵ ^{ab}	۵۶/۹۳ ± ۱۲/۳۵ ^{ab}

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) است. #: نشان‌دهنده خطای استاندارد تیمارهاست.

داشته است (شکل ۱، h، i، m و n). از نظر درصد برگ‌دهی استفاده از پوتریسین در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تأثیر منفی بر درصد برگ‌دهی ریزنمونه‌ها داشت (۶۲/۲۲ درصد)، به‌طوری‌که حتی نسبت به محیط فاقد محرک رشدی (تیمار شاهد) (۶۹/۹۶ درصد) عملکرد ضعیف‌تری از خود نشان داد. همچنین از نظر درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها نیز استفاده از محیط فاقد محرک رشدی (تیمار شاهد) عملکرد ضعیف‌تری (۷۴/۶۵ درصد) داشت، این در حالیست که محیط‌های کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به همراه ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر

تأثیر کازئین هیدرولایسیت، سالیسیلیک‌اسید و پوتریسین بر روی رشد ریزنمونه‌های قره‌قاپ در مرحله استقرار طبق نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۶) محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بین محیط‌های کشت حاوی کازئین یا سالیسیلیک‌اسید و یا پوتریسین و تیمار شاهد (فاقد محرک رشدی) از نظر میانگین تعداد برگ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. اما استفاده از سالیسیلیک‌اسید و پوتریسین، نسبت به محیط حاوی کازئین هیدرولایسیت تأثیر مثبتی بر تعداد برگ در هر ریزنمونه

سالیسیلیک اسید (۱۰۰ درصد) و ۱۰ میلی گرم بر لیتر کازتین هیدرولایسیت (۱۰۰ درصد) عملکرد بیشتری از تیمار پوترسین (۱۰۰ درصد) و همچنین ۵۰ میلی گرم بر لیتر شاهد داشتند (جدول ۶).

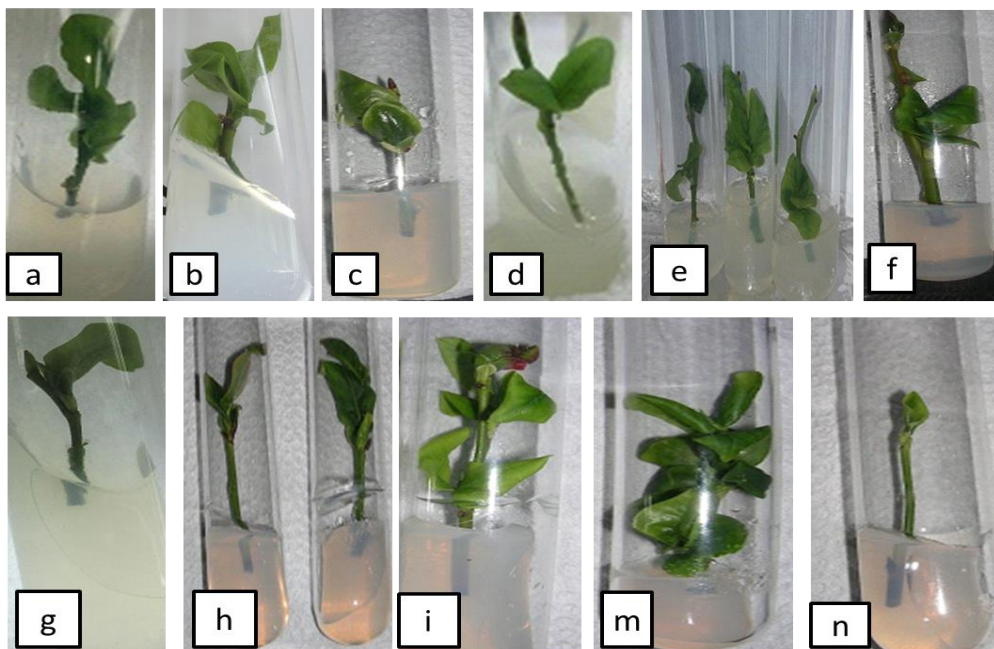
جدول ۶- تأثیر کازتین هیدرولایسیت، سالیسیلیک اسید و پوترسین بر میانگین تعداد برگ در هر ریزنمونه برگ داده، درصد برگ دهی و

درصد زنده مانده های ریزنمونه های قره قاط در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر BAP

تیمار هورمونی (میلی گرم بر لیتر)	میانگین تعداد برگ	درصد برگ دهی	درصد زنده مانده ریزنمونه
۰/۱ NAA	۱/۴۰ ± ۰/۱۰ ^b	۶۹/۹۶ ± ۶۱/۱۲ ^a	۷۴/۶۵ ± ۱۲/۹۵ ^b
۰/۱ NAA + ۵ SA	۲/۱۶ ± ۰/۴۴ ^{ab}	۷۵ ± ۱۴/۴۳ ^a	۹۱/۶۶ ± ۸/۳۳ ^{ab}
۰/۱ NAA + ۱۰ SA	۲/۸۳ ± ۰/۷۲ ^a	۱۰۰ ± ۰/۰۰ ^a	۱۰۰ ± ۰/۰۰ ^a
۰/۱ NAA + ۵۰ CA	۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{ab}	۱۰۰ ± ۰/۰۰ ^a	۱۰۰ ± ۰/۰۰ ^a
۰/۱ NAA + ۱۰۰ CA	۱/۶۶ ± ۰/۵۰ ^{ab}	۸۳/۳۳ ± ۱۶/۶۶ ^a	۹۱/۶۶ ± ۸/۳۳ ^{ab}
۰/۱ NAA + ۱۵۰ CA	۱/۷۲ ± ۰/۱۴ ^{ab}	۶۴/۴۴ ± ۲/۲۰ ^a	۹۳/۳۳ ± ۶/۶۶ ^{ab}
۰/۱ NAA + ۵ PU	۲/۴۴ ± ۰/۲۹ ^{ab}	۷۷/۷۷ ± ۱۴/۶۹ ^a	۹۵ ± ۵/۰۰ ^{ab}
۰/۱ NAA + ۱۰ PU	۲/۶۳ ± ۰/۲۱ ^{ab}	۶۲/۲۲ ± ۶/۱۸ ^a	۱۰۰ ± ۰/۰۰ ^a

CA: کازتین هیدرولایسیت، SA: سالیسیلیک اسید و PU: پوترسین

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه ای دانکن (DMRT) است. *: نشان دهنده خطای استاندارد تیمارهاست.



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف NAA و IBA و همچنین اسید جیبرلیک، کازتین هیدرولایسیت، سالیسیلیک اسید و پوترسین بر رشد ریزنمونه های گرهی قره قاط در شرایط درون شیشه ای درون محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر BAP به همراه (a و b) ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA (به ترتیب: c و d) ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IBA (به ترتیب: e و f) ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA به همراه ۰/۵ و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر اسید جیبرلیک (به ترتیب: g) ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IBA به همراه ۰/۱ میلی گرم بر لیتر اسید جیبرلیک؛ (h، i، m و n) ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA به همراه ۱۰ میلی گرم بر لیتر سالیسیلیک اسید، ۱۰ میلی گرم بر لیتر پوترسین، ۵۰ میلی گرم بر لیتر کازتین هیدرولایسیت و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر کازتین هیدرولایسیت

جدول ۷- تجزیه واریانس مقدار آنتوسیانین، فلاونوئید و فنل کل برگ قره‌قاپ در شرایط درون‌شیشه‌ای تحت تأثیر عوامل مختلف

منبع تغییر	درجه آزادی	میزان فنل کل	میزان فلاونوئید	میانگین مربعات
تیمار هورمونی	۷	۱۰۷۵/۵۸۱**	۱۵/۹۲۷**	۴۶/۸۳۲**
خطا	۱۶	۳۶۴/۲۲۶	۴/۸۱۷	۸/۹۷۲
ضریب تغییرات (درصد)		۲۶/۲۹	۲۴/۳۵	۲۵/۵۵

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

بررسی میزان ترکیبات آنتوسیانینی، فنلی‌تام و فلاونوئیدی ریزنمونه‌های قره‌قاپ در کشت درون‌شیشه‌ای طبق نتایج به‌دست آمده از جدول تجزیه واریانس بین تیمارهای هورمونی و همچنین شاهد (نمونه جمع‌آوری شده از طبیعت) از نظر میزان آنتوسیانین، فلاونوئید و فنل‌تام اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده شد (جدول ۷).

همان‌طوری‌که در جدول شماره ۸ نشان داده شده است، مقدار آنتوسیانین برگ در محیط کشت‌های MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر سالیسیلیک‌اسید به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها و همچنین نمونه‌های برگ تهیه شده از رویشگاه طبیعی بود. ولی بین نمونه‌های برگ تهیه شده از رویشگاه طبیعی و بقیه تیمارهای درون‌شیشه‌ای (به غیر از محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر

لیتر NAA و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر سالیسیلیک‌اسید) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین مقدار فنل کل در محیط کشت حاوی ۲ mg/l BAP و ۰/۱ NAA mg/l و ۱۵ mg/l سالیسیلیک‌اسید به‌دست آمد که اختلاف آماری با تیمارهای MS حاوی ۲ mg/l BAP و NAA و ۰/۱ mg/l سالیسیلیک‌اسید و همچنین محیط‌های کشت ۰/۱ mg/l GA₃ + ۰/۱ NAA mg/l + ۰/۱ BAP + ۰/۱ NAA mg/l + ۱۵۰ CA mg/l + ۲ mg/l MS و ۰/۱ BAP + ۲ mg/l MS داشته ولی با سایر تیمارها و همچنین نمونه برگ‌های تهیه شده از طبیعت اختلاف زیادی نداشت. بیشترین مقدار فلاونوئید نیز مربوط به محیط کشت ۱۵ SA mg/l + ۰/۱ NAA + ۰/۱ BAP + ۰/۱ MS + ۲ mg/l بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با نمونه‌های برگ تهیه شده از رویشگاه طبیعی و تیمار - ۰/۱ NAA mg/l + ۲ mg/l BAP + ۰/۱ MS و همچنین محیط کشت‌های ۱۵۰ mg/l CA + ۰/۱ NAA mg/l + ۰/۱ BAP + ۰/۱ MS نداشته ولی به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۸).

جدول ۸- مقدار آنتوسیانین، فلاونوئید و فنل کل برگ قره قاط در شرایط درون شیشه‌ای تحت تأثیر عوامل مختلف

فنل کل	فلاونوئید	آنتوسیانین	تیما (میلی گرم بر لیتر)
(میکروگرم بر گرم نمونه تازه)	(میلی گرم بر گرم نمونه تازه)	(میکرومول بر گرم وزن نمونه تازه)	
۸۲/۴۹ ± ۱۳/۰۱ ^{abc}	۱۲/۸۲ ± ۰/۹۵ ^{ab}	±۱/۷۹ ۱۶/۲۳ ^{cd}	شاهد (جمع آوری شده از روبشگاه طبیعی)
۱۱۲/۱۰ ± ۶/۲۵ ^{ab}	۱۲/۸۹ ± ۲/۲۳ ^{ab}	۲۴/۲۲ ± ۲/۲۸ ^a	۲ BAP + ۰/۱ NAA
۷۵/۹۲ ± ۱۲/۲۰ ^{bc}	۷/۷۴ ± ۰/۵۰ ^c	۱۳/۲۱ ± ۱/۳۳ ^d	۲ BAP + ۰/۱ NAA + ۰/۱ GA
۱۱۱/۴۶ ± ۱۴/۴۱ ^{ab}	۱۰/۶۸ ± ۰/۶۹ ^{bc}	۱۷/۰۳ ± ۰/۹۲ ^{bcd}	۲ BAP + ۰/۱ NAA + ۰/۵ GA
۸۴/۵۰ ± ۱۰/۴۵ ^{abc}	۱۱/۵۷ ± ۱/۳۲ ^{bc}	۱۴/۵۴ ± ۱/۷۲ ^{cd}	۲ BAP + ۰/۱ NAA + ۱۰۰ CA
۷۷/۴۲ ± ۷/۵۹ ^{bc}	۱۱/۹۱ ± ۱/۳۲ ^{ab}	۱۹/۳۲ ± ۲/۱۸ ^{abc}	۲ BAP + ۰/۱ NAA + ۱۵۰ CA
۷۱/۲۲ ± ۱۰/۴۷ ^c	۱۰/۶۲ ± ۰/۶۵ ^{bc}	۱۴/۷۱ ± ۱/۳۲ ^{cd}	۲ BAP + ۰/۱ NAA + ۱۰ SA
۱۱۸/۰۵ ± ۱۲/۴۷ ^a	۱۵/۷۷ ± ۱/۵۰ ^a	۲۲/۴۴ ± ۱/۸۳ ^{ab}	۲ BAP + ۰/۱ NAA + ۱۵ SA

GA: جیبرلیک اسید، CA: کازین هیدرولایسیت و SA: سالیسیلیک اسید

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) است. #: نشان دهنده خطای استاندارد تیمارهاست.

بحث

و نمو سلول‌ها و بافت‌های گیاهی دارند و در اغلب مطالعات به منظور ریزازدیادی درون شیشه‌ای به تنهایی یا در ترکیب با همدیگر مورد تأکید قرار گرفته است. ولی نوع اکسین و غلظت مناسب آن با توجه به گونه گیاهی و نوع ریزنمونه متفاوت بوده و یا به طور تجربی مورد بهینه‌سازی قرار می‌گیرد (Machakova et al., 2008; Daryani et al., 2016; Taimori et al., 2017). اکسین‌ها در القای رونویسی ژنهای کد کننده پروتئین‌های مرتبط با رشد سلولی نقش داشته و از طریق اسیدی کردن دیواره سلولی و در نتیجه افزایش توسعه پذیری آن منجر به رشد سلولی می‌شوند (Stals & Inze, 2001).

اسید جیبرلیک به عنوان یک تنظیم کننده رشدی، باعث رشد سلول به ویژه رشد طولی آنها می‌شود. اسید جیبرلیک مانع پیری زودرس گیاه شده و پیری را با خنثی کردن اثر - اسید آبسزیک و اتیلن به تعویق می‌اندازد. از جمله مهمترین ویژگی این هورمون افزایش فاصله میانگره‌ها می‌باشد که این کار نیز به وسیله تحریک تولید سیتوکینین‌ها در این مناطق و در نتیجه افزایش تقسیم سلولی و همچنین افزایش اندازه

در این تحقیق محیط کشت MS حاوی NAA در مقایسه با محیط حاوی IBA شرایط رشدی مساعدتری را برای ریزنمونه‌های گرهی و جوانه‌های انتهایی قره قاط فراهم کرد. علاوه بر این در غلظت‌های پایین تر NAA (۰/۰۱) و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر) درصد برگ‌دهی و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های قره قاط کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای بیشتر از غلظت‌های بالاتر (۱ میلی گرم بر لیتر) بود (جدول - ۳). (Meiners et al., 2007). با بررسی کشت درون شیشه‌ای *V. corymbosum* گزارش نموده‌اند که استفاده از NAA به جای IBA در مرحله استقرار و رشد ریزنمونه‌ها نتایج بهتر-ی دارد که با یافته‌های تحقیق ما روی *V. arctostaphylos* مطابقت دارد. همچنین (Tetsumura et al., 2008) با بررسی غلظت‌های مختلف IBA روی پاسخ رشدی ریزنمونه‌های *V. vitisidiae* نشان دادند که با افزایش غلظت IBA از ۱ به ۵ میلی گرم بر لیتر از رشد و تکثیر ریزنمونه‌های *V. vitisidiae* کاسته می‌شود. اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها از جمله تنظیم کننده‌های رشدی هستند که بیشترین تأثیر را روی رشد

کشت‌های درون‌شیشه‌ای نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند (Dempsey and Klessig, 2017).

همانطوری که در جدول ۸ نشان داده شده، میزان متابولیت‌های ثانویه فلاونوئید، آنتوسیانین و ترکیبات فنل کل هم در برگ‌های تهیه شده از رویشگاه طبیعی و هم در برگ‌های حاصل از کشت‌های درون‌شیشه‌ای تولید شده است. به‌ویژه اینکه وجود محرک در محیط کشت تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه را در شرایط درون سلولی به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (Wang et al, 2008). در این تحقیق نیز اختلاف آماری معنی‌داری در محیط کشت-های حاوی تیمارهای مختلف مشاهده گردید (جدول ۸). به‌طوری که در برخی تیمارها میزان متابولیت‌های ثانویه بیشتر از برگ‌های تهیه شده از رویشگاه طبیعی بود ولی در برخی از تیمارها میزان متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون‌شیشه‌ای کاهش پیدا کرده است. به‌عنوان مثال در محیط کشت حاوی ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر سالیسیلیک‌اسید مقدار فلاونوئید، آنتوسیانین و ترکیبات فنلی کل بیشتر از مقدار این ترکیبات در برگ‌های تهیه شده از رویشگاه طبیعی بود. ولی در فلاونوئید در برگ‌های رشد کرده در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 به‌طور معنی‌داری کمتر از مقدار آن در برگ‌های تهیه شده از رویشگاه طبیعی بود (جدول ۸). محرک‌ها یا ترکیبات سیگنالی از قبیل سالیسیلیک‌اسید، مولکول‌هایی هستند که در مسیرهای ترانس‌سانی علامتی سلول‌ها به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان عمل کرده و در فعال‌سازی بیان ژن‌ها و مسیرهای بیوسنتزی به‌ویژه بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه درگیر هستند (Dempsey & Klessig, 2017). بنابراین، این مواد باعث تحریک و تقویت فعالیت مسیرهای بیوسنتزی و تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان بخشی از سیستم دفاعی سلول‌ها در کشت‌های درون‌شیشه‌ای می‌شوند و می‌توان از این ترکیبات در جهت تقویت تولید این متابولیت‌ها بهره برد (Zare et al., 2014; Ramachandra & Ravishankar, 2002). نوع و مقدار اکسین یا سیتوکنین، همچنین نسبت اکسین به

سلول می‌باشد. در این آزمایش ریزنمونه‌های قره‌قاط در اواسط پاییز جمع‌آوری شدند و چون این زمان مصادف با مراحل پایانی رشد گیاه است غلظت اسیدجیرلیک در ریزنمونه‌های جمع‌آوری شده کمتر می‌باشد که با استفاده از غلظت بالاتر نتایج رشدی بهتری به‌دست آمد (جدول ۵). بنابراین به نظر می‌رسد اسیدجیرلیک اثر ممانعت‌کننده رشدی به‌ویژه آبسزیک‌اسید را که باعث فرو رفتن گیاه به خواب می‌شود از بین برده و باعث رشد ریزنمونه‌ها در محیط کشت می‌شود (Sharma et al, 2000).

کازئین هیدرولایسیت از هیدرولیز پروتئین کازئین بدست می‌آید که یک مخلوطی از اسیدهای آمینه بوده و به‌عنوان منبع آلی نیتروژن در کشت سلول و بافت گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق اضافه کردن کازئین هیدرولایسیت و پوترسین در غلظت‌های مختلف به ترکیب محیط کشت تأثیر مثبت و معنی‌داری در شاخص‌های رشدی ریزنمونه‌های گرهی قره-قاط در کشت درون‌شیشه‌ای نداشت (جدول ۶). با این حال (Hossain et al., 2008) با استفاده از پوترسین در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA ریزنمونه‌های *Sativa rebuudiana* بهترین پاسخ رشدی را با بیشترین درصد رشد و تعداد شاخه‌های تولیدی مربوط به تیمار با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کرده‌اند. پوترسین جزو مواد پلی‌آمینی می‌باشد که در بسیاری از فرایندهای سلولی مانند جنین‌زایی، تمایز و رشد و نمو سلولی دخالت دارد. در این آزمایش افزودن سالیسیلیک‌اسید به ترکیب محیط کشت رشد ریزنمونه‌ها را بهبود داد و بهترین شرایط رشدی ریزنمونه‌های *V.arctostaphylos* در شرایط درون‌شیشه‌ای در تیمار حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سالیسیلیک‌اسید بدست آمد (جدول ۶). سالیسیلیک‌اسید یکی از ترکیبات فنلی و هورمون‌های مهم گیاهی است که در تنظیم و کنترل فرایندهای رشد و نمو و همچنین مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی هم در گیاه کامل و هم در

- Persian).
- Dempsey, D.A. and Klessig, D.F. 2017. How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans. *BMC Biology*, 15:23- 27.
 - ElShiekh, A., Wildung, D.K., Luby, J.J., Sargent, K.L. and Read, P.E. 1996. Long-term effects of propagation by tissue culture or softwood single-node cuttings on growth habit, yield, and berry weight of 'Northblue' blueberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121: 339-342.
 - Fan, S., Jian, D., Wei, X., Chen, J., Beeson, R.C., Zhou, Z. and Wang, X. 2017. Micropropagation of blueberry 'Bluejay' and 'Pink Lemonade' through *in vitro* shoot culture. *Scientia Horticulturae*, 226: 277-284.
 - Hossain, M.A., Shamim Kabir, A.M., Jahan, T.A. and Hasan, M.N. 2008. Micropropagation of *Stevia*. *International Journal of Sustainable Crop Production*, 3: 1-9.
 - Iliev, I., Gajdosova, A., Libiakova, G. and Jain, S. M. 2010. Plant micropropagation: 1-23. In: Davey M., Anthony P. (Eds.). *Plant Cell Culture: Essential Methods*. John Wiley & Sons Ltd., 341p.
 - Kumar, J. and Gupta, P.K. 2008. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnology Reports*, 2: 93-112.
 - Machakova, I., Zazimalova, E. and George, E.F. 2008. Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors: 175-204. In E.F. George, A.H. Micheal, D.K. Greet-Jan (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture*. V.1, The background, 3rd ed., Springer.
 - Meiners, J., Schwab, M. and Szankowski, I. 2007. Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89: 169-176.
 - Mirjani, L., Salimi, A., Matinzadeh, M., Razavi, K. and M. Shahbazi. 2017. Effective factors on micropropagation of medicinal plant of *Satureja khuzistanica*. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 26 (1): 53-62.
 - Mirzaie-Nodoushan, H., Emam, M., Ezazi, S. and Kalatehjari, S. 2016. Light and growth regulator effects on propagation of wild almond (*Amygdalus scoparia*) by *in vitro* embryo culture. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 25 (1): 13-23.
 - Ramachandra, R.S. and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20: 101-153.
 - Sato, F., Hashimoto, T. and Hachiya, A. 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of sciences of the*

سیتوکنین، تشکیل و تجمع متابولیت‌های ثانویه را در کشت سلول‌های گیاهی تغییر می‌دهد.

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از NAA به‌ویژه در غلظت‌های پایین‌تر برای رشد ریزنمونه‌های گرهی گیاه قره‌قاپ در شرایط درون‌شیشه‌ای بسیار مؤثرتر از تیمار هورمونی IBA بود. همچنین در این تحقیق نشان داده شد که استفاده از اسیدجیبرلیک، اسیدسالسیلیک و بوترسین در غلظت‌های بالاتر و کازئین‌هیدرولاسیت در غلظت‌های پایین‌تر رشد ریزنمونه‌های گرهی قره‌قاپ را در شرایط درون‌شیشه‌ای افزایش می‌دهد. همچنین از نظر میزان متابولیت ثانویه تحت تأثیر تیمارهای محرک قرار گرفت و استفاده از اسیدسالسیلیک به‌ویژه در غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر میزان فلاونوئید و فنل کل را افزایش داد.

منابع مورد استفاده

- Al-Farsi, M., Alsalvar, C., Morris, A., Baron, M. and Shadih, F., 2005. Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7592 - 7599.
- Ayaz, F.A., Kadioglu, A., Bertoft, E., Acar, C. and Turna, I., 2001. Effect of fruit maturation on sugar and organic acid composition in twoblueberries (*Vaccinium arctostaphylos* & *V. myrtillus*) native to Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29: 137 - 141.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10: 178-182.
- Castilho, P., Liu, K., Rodrigues, A., Feio, S., Tomi, F. and Casanova, J. 2006. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Clinopodium ascendens* (Jordan) Sampaio from Madeira. *Flavor and Fragrance Journal*, 22:139- 144.
- Daryani, P. Zare, N. Chamani, E. Sheikhzadeh Mossadeg, P. and Javadi Mojaddad, D. 2016. Evaluation of the effects of different basal medium and plant growth regulators on *in vitro* growth of hazelnut. *Journal of Horticultural Science*. 30: 417-422. (In

- Wagner, G.J. 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars free amino acids, and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*, 64: 88-93.
- Wang, S.Y., Bowman, L. and Ding, D. 2008. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes anti proliferation and promotes anti proliferation of human cancer cells. *Food Chemistry*, 107: 1261 – 1269.
- Zare, N., Farjaminezhad, R., Asghari-Zakaria, R. and Farjaminezhad, M. 2014. Enhanced thebaine production in *Papaver bracteatum* cell suspension culture by combination of elicitation and precursor feeding. *Natural Product Research*, 28:711–717.
- United States of America, 98: 367-372.
- Sharma, M., Modgil, M. and Sharma, D.R. 2000. Successful propagation *in vitro* of apple rootstock MM106 and influence of phloroglucinol. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38: 1236-1240.
- Stals, H. and Inze, D. 2001. When plant cells decide to divide. *Trends in Plant Science*, 8: 359–364.
- Taimori, N., Kahrizi, D., Abdossi, V. and Papzan, A. 2017. Effects of species and plant growth regulators on shoots and rooting of three species of hawthorn. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 25 (2). 337-347.
- Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K. and Komatsu, H. 2008. Evaluation of basal media for micropropagation of four Blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 119: 72–74.

The effect of auxin and signaling compounds on growth and production of secondary metabolites in *in vitro* cultures of Whortleberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.)

M. Noruzpour¹, N. Zare^{2*}, P. Sheikhzadeh-Mosadegh³, R. Asghari-Zakaria⁴

1- Ph.D. Student of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R.Iran.

2*- Corresponding Author, Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R.Iran. zarenasser@yahoo.com

3- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R.Iran.

4- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R.Iran

Received: 18.03.2018

Accepted: 14.07.2018

Abstract

Whortleberry is one of the important medicinal plants in traditional medicine that has been used in Iran for decades in reducing blood sugar and blood pressure adjustment. In the present study, the effect of auxin, gibberellin (GA₃), casein hydrolysate (CA), putrescine (PU), and salicylic acid (SA) on *in vitro* establishment and growth of Whortleberry explants and the amount of anthocyanin, flavonoid and total phenolic compounds in *in vitro* condition were evaluated. The apical bud and nodal explants were collected from natural habitat, surface sterilized and cultured on the MS medium supplemented with 2 mg/L BAP and different concentrations of NAA or IBA (0.01- 1 mg/l) and MS medium supplemented with 2 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA or IBA and different concentrations of gibberellin (0- 0.5 mg/l), CA (0- 150 mg/l), PU and SA (0- 10 mg/l). The results indicated that the percentage of explant viability and leaf producing explants were significantly influenced by auxin type and concentration. So, the percentage of explant viability and explants leaf production on MS media supplemented with low concentration of NAA were significantly higher than those of the higher concentration of NAA and all levels of IBA. Addition of GA₃ to the culture medium was significantly increased the number of leaves per explant. Furthermore, CA, PU and SA led to an increase in the percentage of explants leaf production and number of leaves per explant, but this increase was not statistically significant in some of these treatments. Moreover, the amount of secondary metabolites was significantly affected by medium compositions. So, the highest amount of anthocyanin was observed in the MS + 2mg/l BAP+0.1mg/l IBA and the highest amount of flavonoids and total phenolic compounds were observed in the same medium 15 mg/l SA. This result and protocol will be helpful for *in vitro* culture and propagation of this plant.

KeyWords: Medicinal plant, Plant tissue culture, Putrescine, *Vaccinium arctostaphylos* L.