نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۷، شماره ۱، صفحه ۵۸-۴۵ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2019.121178.1296
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 قره‌قاط (*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

قره‌قاط 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 قره‌قاط و میزان ترکیبات ثانویه آنتوسیانین، فلاونوئیدی و فنل‌تام بررسی شد. ریزنمونه‌های تک‌گرهی و جوانه‌های انتهایی قره‌قاط 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 پربذر بوده و به‌دلیل دارا بودن ترکیبات آنتوسیانینی، فلاونوئیدی، ضدسرطان و ضدمیکروبی از ارزش تجاری بالایی برخوردار است. علاوه‌براین، میوه این گیاه سرشار از اسیدهای فنولیک ازجمله اسید کافیئلیونیک، اسید کافئیک، اسید کوماریک، مشتقات اسید هیدروکسی بنزوئیک و مشتقات هیدروکسی سینامیک و ترکیبات آلی غیرفنولی همانند ایریدوئیدها و اسیدهای گیاهی و مقادیر بسیار کمی از میریتن و اپی‌میریتن 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 ازجمله شرکت‌های کشت‌بافتی و شرکت‌های تولیدی گیاهان پایه در سطوح مختلف و بر اساس برنامه‌های تحقیقاتی و درآمدزایی خود از آن بهره‌برداری می‌کنند. در برخی از روش‌های ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای ازجمله 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. تنظیم کننده‌های 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*., Iliev *et al*., 2010; 2016).

کشت بافت و اندام گیاهی رهیافت مؤثری را برای تکثیر گونه‌های مختلف گیاهی ازجمله 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 ضددرد، ضدالتهاب، ضدافسردگی، ضداضطراب 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، ازاین‌رو 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 به‌دست آورد. کشت چنین اندام‌هایی از نظر ژنتیکی و تولید نیز در مقایسه با کشت سلولی پایدارتر است. در گیاهان متعددی ازجمله شابیزک، پروانش کبیر، گل انگشتانه و درمنه کشت ساقه به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Ramachandra & Ravishankar, 2002). اما مشکلاتی بر سر راه استفاده از گیاهان دارویی به‌منظور درمان بیماری‌ها وجود دارد که ازجمله 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. ازاین‌رو روش‌هایی که بتواند سبب کاهش این محدودیت‌ها شود و

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 (Kumar & Gupta, 2008 ؛Sato *et al*., 2001). بنابراین این آزمایش ابتدا به بررسی تأثیر انواع هورمون‌ها و محرک های 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 فنوتیپی) 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 پراکسیدهیدروژن (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 هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵ درصد با pH=۱۰ و حاوی Tween20 ۰/۱ درصد به مدت ۱۲ دقیقه تیمار شده و پس از سه بار آبکشی با آب‌مقطر 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 ازجمله جیبرلیک‌اسید، کازئین و سالیسیلیک‌اسید و پوترسین (جدول ۱) کشت شدند. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۴، 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 اسیدجیبرلیک، 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 mg/l BAP + ۰/۱ mg/l NAA + ۱۵mg/l SA MS+۲ 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 ۹۹:۱) کاملا سائیده و عصاره به‌دست‌آمده به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگه‌داری شد. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و مقدار فلاونوئید، فنل‌تام و آنتوسیانین محلول رویی آن اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- انواع تیمار هورمونی و ترکیبات سیگنالی مورد استفاده برای کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های گرهی قره‌قاط در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP

آزمایش	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	اسید جیبرلیک (mg/l)	کازئین‌هیدرولایسیت (mg/l)	پوتریسین (mg/l)	اسید سالیسیلیک (mg/l)
آزمایش اول	۰/۰۱	–	–	–	–	–
	۰/۱	–	–	–	–	–
	۰/۵	–	–	–	–	–
	۱	–	–	–	–	–
	–	۰/۰۱	–	–	–	–
	–	۰/۱	–	–	–	–
	–	۰/۵	–	–	–	–
	–	۱	–	–	–	–
آزمایش دوم	۰/۱ (شاهد)	–	–	–	–	–
	❋ ۰/۱	–	۰/۱	–	–	–
	❋ ۰/۱	–	۰/۵	–	–	–
	–	۰/۱(شاهد)	–	–	–	–
	–	۰/۱	۰/۱	–	–	–
	–	۰/۱	۰/۵	–	–	–
آزمایش سوم	۰/۱ (شاهد) ❋	–	–	–	–	–
	❋ ۰/۱	–	–	۵۰	–	–
	❋ ۰/۱	–	–	۱۰۰	–	–
	۰/۱	–	–	۱۵۰	–	–
	۰/۱	–	–	–	۵	–
	۰/۱	–	–	–	۱۰	–
	❋ ۰/۱	–	–	–	–	۵
	۰/۱	–	–	–	–	۱۰

❋: محیط‌کشت‌های مورد استفاده برای ارزیابی متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های درون‌شیشه‌ای قره‌قاط

اندازه‌گیری فلاونوئید

فلاونوئید کل نمونه‌ها براساس منحنی استاندارد کوئرستین با استفاده از روش (Chang *et al.*, 2002) سنجیده شد. برای این منظور جذب نوری عصاره گیاهی در طول موج ۴۹۸ نانومتر

قرائت گردید. از غلظت‌های مختلف کوئرستین به‌عنوان استاندارد استفاده گردید و منحنی استاندارد رسم شد. سپس مقدار فلاونوئید با استفاده از فرمول T=(C × 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 میلی-گرم در میلی‌لیتر،V برابر است با حجم نهایی عصاره (برحسب میلی‌لیتر) و M برابر وزن نمونه گیاهی (برحسب گرم نمونه تازه) است.

اندازه‌گیری فنل‌تام

برای اندازه‌گیری مقدار فنل‌تام 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. به‌منظور کمی‌سازی مقدار فنل کل از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده شد. سپس مقدار فنل کل نیز با استفاده از فرمول T=(C × V)/M بر حسب میلی‌گرم گالیک‌اسید 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=εbc و ضریب خاموشی $M^{-1}cm^{-1}$ ۳۳۰۰۰ انجام شد و عدد بدست‌آمده 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 کاملا 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. ریزنمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش‌ها در سه مرحله رشدی مختلف از رویشگاه طبیعی تهیه شده و به این دلیل تجزیه‌وتحلیل داده‌ها در قالب سه آزمایش مجزا انجام شده است. قبل از انجام تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون تک نمونه‌ای کولوگروف انجام شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 انجام گردید.

نتایج

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

به‌منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و IBA بر رشد درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های گرهی، تأثیر ۰/۰۱، ۰/۱، 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 قره‌قاط 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 و۶۹/۴۰ درصد) به‌ترتیب مربوط به محیط کشت MS حاوی ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به همراه ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود که به‌طور 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 قره‌قاط 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 قره‌قاط در شرایط درون‌شیشه‌ای

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

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

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

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		میانگین تعداد برگ	درصد برگ‌دهی	درصد زنده‌مانی
تیمار هورمونی	۷	۰/۵۷۳ ns	۱۰۵۰/۸۲۱ **	۶۶۸/۸۹۱ ns
خطا	۱۶	۰/۹۶۳	۱۲۸/۱۱۸	۲۷۱/۴۳۸
ضریب تغییرات (درصد)	–	۳۵/۷۱	۴۶/۰۵	۳۸/۴۱

ns: غیرمعنی‌دار، **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین‌های NAA و IBA بر خصوصیات رشدی ریزنمونه‌های گره قرقاط 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±۰/۰ ۲ 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 معنی‌دار 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 قرقاط در شرایط درون‌شیشه‌ای

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		میانگین تعداد برگ	درصد برگ‌دهی	درصد زنده‌مانی
تیمار هورمونی	۵	۰/۶۰۱ *	۷۲۴/۴۵۰ ns	۱۰۴۱/۵۱۲ ns
خطا	۱۲	۰/۱۵۸	۳۴۸/۵۳۸	۳۹۴/۶۰۴
ضریب تغییرات (درصد)	–	۳۰	۳۴/۳۴	۳۵/۹۴

ns: غیرمعنی‌دار، *: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

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، به‌نحوی‌که 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 قره‌قاط بین محیط کشت‌ها و غلظت-های مختلف و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود 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 معنی-داری 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).

جدول ۵- تأثیر اسید جیبرلیک بر خصوصیات رشدی ریزنمونه‌های گرهی قره‌قاط 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*b	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 ±۱۲/۳۵ab	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.

تأثیر کازئین هیدرولایسیت، سالسیلیک‌اسید و پوتریسین بر روی رشد ریزنمونه‌های قره‌قاط 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 سالسیلیک اسید و یا پوتریسین و تیمار شاهد (فاقد محرک رشدی) از نظر میانگین تعداد برگ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. اما استفاده از سالیسیلیک اسید و پوتریسین، نسبت به محیط حاوی کازئین هیدرولایسیت تأثیر مثبتی بر تعداد برگ در هر ریزنمونه 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 ضعیف-تری (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

سالیسیلیک‌اسید (۱۰۰ درصد) و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر پوترسین (۱۰۰درصد) و همچنین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولایسیت (۱۰۰درصد) عملکرد بیشتری از تیمار شاهد داشتند (جدول ۶).

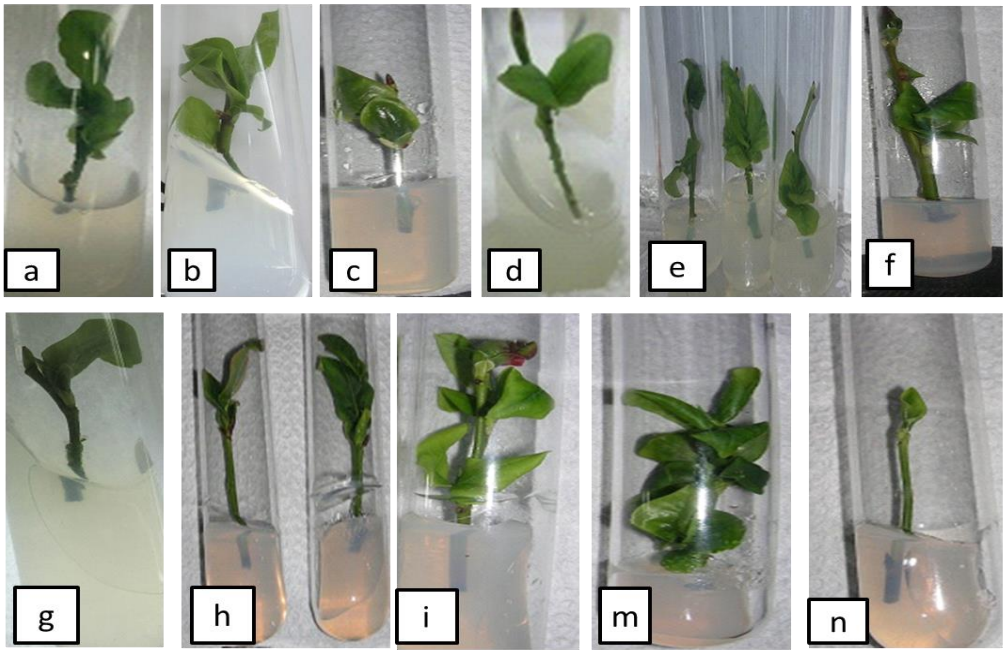
جدول ۶- تأثیر کازئین هیدرولایسیت، سالسیلیک‌اسید و پوتریسین بر میانگین تعداد برگ در هر ریزنمونه برگ داده، درصد برگ‌دهی و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های قره‌قاط در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP

تیمار هورمونی (میلی‌گرم بر لیتر)	میانگین تعداد برگ	درصد برگ‌دهی	درصد زنده‌مانی 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: کازئین‌هیدرولایسیت، SA: سالیسیلیک‌اسید و PU: پوتریسین

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

*: نشان‌دهنده خطای استاندارد تیمارهاست.



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف NAA و IBA و همچنین اسید جیبرلیک، کازئین هیدرولایسیت، سالیسیلیک اسید و پوتریسین بر رشد ریزنمونه‌های گرهی قره‌قاط در شرایط درون‌شیشه‌ای درون محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه a و b) ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA (به‌ترتیب)؛ c و d) ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA (به‌ترتیب)؛ e و f) ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌همراه ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک (به‌ترتیب)؛ g) ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک؛ i,h ، m و n) ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌همراه ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سالیسیلیک اسید، ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر پوتریسین، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولایسیت و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولایسیت

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

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		میزان فنل کل	میزان فلاونوئید	میزان آنتوسیانین
تیمار هورمونی	۷	۱۰۷۵/۵۸۲**	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 قره‌قاط در کشت درون‌شیشه‌ای

طبق نتایج به‌دست‌آمده 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 BAP ۲ mg/l و NAA mg/l ۰/۱ و ۱۵ mg/l سالیسیلیک‌اسید به‌دست آمد که اختلاف آماری با تیمارهای MS حاوی BAP ۲ mg/l و NAA mg/l ۰/۱ و ۱۰mg/l سالیسیلیک‌اسید و همچنین محیط‌های کشت BAP+۰/۱ NAA mg/l+۰/۱ mg/l GA_3 و MS +۲mg/l NAA mg/l+ ۱۵۰CA mg/l BAP+۰/۱ MS +۲mg/l داشته ولی با سایر تیمارها و همچنین نمونه برگ‌های تهیه شده از طبیعت اختلاف زیادی نداشت. بیشترین مقدار فلاونوئید نیز مربوط به محیط کشتBAP+۰/۱ NAA+ mg/l۱۵ SA mg/l MS+۲mg/l بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با نمونه‌های برگ تهیه شده از رویشگاه طبیعی و تیمار BAP+۰/۱ NAA mg/l MS+۲mg/l و همچنین محیط کشت‌های BAP+۰/۱ NAA mg/l+۱۵۰ mg/l CA MS +۲mg/l نداشته ولی به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۸).

جدول ۸- مقدار آنتوسیانین، فلاونوئید و فنل کل برگ قره‌قاط در شرایط درون‌شیشه‌ای تحت تأثیر عوامل مختلف

تیمار (میلی‌گرم بر لیتر)	آنتوسیانین (میکرومول بر گرم وزن نمونه تازه)	فلاونوئید (میلی‌گرم بر گرم نمونه تازه)	فنل کل (میکروگرم بر گرم نمونه تازه)
شاهد (جمع‌آوری شده از رویشگاه طبیعی)	۱۶/۲۳* cd ±۱/۷۹	۱۲/۸۲±۰/۹۵۰ ab	۸۲/۴۹ ±۱۳/۰۱ abc
۲ BAP + ۰/۱ NAA	۲۴/۲۲ ±۲/۲۸ a	۱۲/۸۹±۲/۲۳ ab	۱۱۲/۱۰± ۶/۲۵ ab
۲ BAP + ۰/۱ NAA + ۰/۱ GA	۱۳/۲۱±۱/۳۳ d	۷/۷۴±۰/۵۰ c	۷۵/۹۲±۱۲/۲۰ bc
۲ BAP + ۰/۱ NAA + ۰/۵ GA	۱۷/۰۳ ±۰/۹۲ bcd	۱۰/۶۸±۰/۶۹ bc	۱۱۱/۴۶±۱۴/۴۱ ab
۲ BAP + ۰/۱ NAA + ۱۰۰ CA	۱۴/۵۴ ±۱/۷۲ cd	۱۱/۵۷±۱/۳۲ bc	۸۴/۵۰±۱۰/۴۵ abc
۲ BAP + ۰/۱ NAA + ۱۵۰ CA	۱۹/۳۲±۲/۱۸ abc	۱۱/۹۱±۱/۳۲ ab	۷۷/۴۲ ± ۷/۵۹ bc
۲ BAP + ۰/۱ NAA + ۱۰ SA	۱۴/۷۱±۱/۳۲ cd	۱۰/۶۲±۰/۶۵ bc	۷۱/۲۲±۱۰/۴۷ c
۲ BAP + ۰/۱ NAA + ۱۵ SA	۲۲/۴۴±۱/۸۳ ab	۱۵/۷۷±۱/۵۰ a	۱۱۸/۰۵±۱۲/۴۷ a

GA: جیبرلیک‌اسید، CA: کازئین‌هیدرولایسیت و SA: سالیسیلیک‌اسید

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

*: نشان‌دهنده خطای استاندارد تیمارهاست.

بحث

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. علاوه‌براین در غلظت‌های پایین‌تر NAA (۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) درصد برگ‌دهی و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های قره‌قاط کشت شده در شرایط درون‌شیشه‌ای بیشتر از غلظت‌های بالاتر (۱ میلی‌گرم 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 بهتری 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. vitisideae* نشان دادند که با افزایش غلظت IBA از ۱ به ۵ میلی‌گرم بر لیتر از رشد و تکثیر ریزنمونه‌های *V. vitisideae* کاسته می‌شود. اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها ازجمله تنظیم‌کننده‌های رشدی هستند که بیشترین تأثیر را روی رشد و نمو سلول‌ها و بافت‌های گیاهی دارند و در اغلب مطالعات به‌منظور ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای 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 به‌طور 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 توسعه‌پذیری آن منجر به رشد سلولی می‌شوند (Stals & Inze, 2001).

اسید جیبرلیک به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشدی، باعث رشد سلول به‌ویژه 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. ازجمله 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

سلول می‌باشد. در این آزمایش ریزنمونه‌های قره‌قاط در اواسط پاییز جمع‌آوری شدند و چون این زمان مصادف با مراحل پایانی رشد گیاه است غلظت اسیدجیبرلیک در ریزنمونه‌های جمع‌آوری شده کمتر می‌باشد که با استفاده از غلظت بالاتر نتایج رشدی بهتری به‌دست آمد (جدول ۵). بنابراین به نظر می‌رسد اسیدجیبرلیک اثر ممانعت کننده 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 پوتریسین 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. پوتریسین 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 نموی و همچنین مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی هم در گیاه کامل و هم در کشت‌های درون‌شیشه‌ای نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند (Dempsey and Klessig, 2017).

همانطوری‌که 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). به‌طوری‌که 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 سالیسیلیک اسید، مولکول‌هایی هستند که در مسیرهای ترارسانی 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

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 قره‌قاط در شرایط درون‌شیشه‌ای بسیار مؤثرتر از تیمار هورمونی با IBA بود. همچنین در این تحقیق نشان داده شد که استفاده از اسیدجیبرلیک، اسیدسالیسیلیک و پوترسین در غلظت‌های بالاتر و کازئین‌هیدرولاسیت در غلظت‌های پایین‌تر رشد ریزنمونه‌های گرهی قره‌قاط را در شرایط درون‌شیشه‌ای افزایش می‌دهد. همچنین از نظر میزان متابولیت ثانویه تحت تأثیر تیمارهای محرک قرار گرفت و استفاده از اسیدسالیسیلیک 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 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., Matinizadeh, 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

- 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 phloroglusinol. 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. Noruzpour[1], N. Zare [2*], P. Sheikhzadeh-Mosadegh[3], R. Asghari-Zakaria [4]

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 (GA_3), 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 GA_3 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.