

اثر آنتی اکسیدانی برخی القا کننده های نوساقه زایی و ریشه زایی در پسته (*Pistacia vera*)، پایه های رویشی قزوینی و UCB-1) در شرایط درون شیشه

The antioxidative effect of some shoots and root inducers in
Pistacia vera (Qazvini and UCB-1 rootstocks) under *in vitro*
conditions

سارا ملکی^۱، قاسمعلی گروسی^{۲*}، رحیم حداد^۲ و اسماعیل نظامی آلانق^۳
Sara maleki¹, Ghasemali Garoosi^{2*}, Raheem Haddad² and Esmaeil Nezami
Alanogh³

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه
بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین المللی امام
خمینی (ره)، قزوین، ایران
۳- کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین المللی
امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

- 1-M.Sc student, Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini
International University (IKIU), Qazvin, Iran.
2-Associate professor, Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini
International University (IKIU), Qazvin, Iran.
3-Technician (M.Sc), Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini
International University (IKIU), Qazvin, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: agaroosi90@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۰)

چکیده

پایه های رویشی پسته قزوینی و UCB-1 از ارقام شناخته شده در دنیا هستند که به لحاظ سازگاری
به خشکی و شوری (قزوینی) و سرما و بیماری های ورتیسلیومی (UCB-1) دارای اهمیت هستند. به
منظور بهبود کیفیت رشد رویشی و میزان ساقه زایی و همچنین افزایش راندمان ریشه زایی، اثر
اسکوپولتین و منبع آهن (Fe-EDTA و Fe-EDDHA) همراه با پژوهش تغییرات فعالیت آنزیم
پراکسیداز بررسی شد. همچنین بررسی خصوصیت های کینتیک با استفاده از مقادیر مختلف
کاتیون های Ca^{2+} ، Mg^{2+} و دماهای متفاوت و همچنین اثر غلظت های مختلف EDTA بر فعالیت
این آنزیم هدف دیگر این پژوهش بود. نتایج نشان داد که اسکوپولتین ضمن افزایش میزان
نوساقه زایی و بهبود کیفیت رشد رویشی، در فعالیت آنزیم پراکسیداز نقش مؤثری ایفا کرد که
اختلاف معنی داری در سطح $\alpha=0.05$ با تیمار شاهد داشت. جایگزینی Fe-EDDHA با Fe-
EDTA در محیط کشت، راندمان ریشه زایی را تا دو برابر افزایش داده و یک رابطه مستقیم بین
میزان ریشه زایی و فعالیت آنزیم پراکسیداز دیده شد، بنابراین فعالیت آنزیم پراکسیداز می تواند
به عنوان نشانگر پیش بینی کننده ریشه زایی در پسته مورد توجه باشد. بررسی فعالیت کینتیک آنزیم
پراکسیداز بیانگر نقش مثبت کاتیون ها، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به عنوان دمای بهینه فعالیت
آنزیم و اثر بازدارندگی EDTA روی فعالیت این آنزیم بود.

واژه های کلیدی

اسکوپولتین
پسته
پراکسیداز
ریشه زایی
نوساقه زایی
Fe-EDDHA

مقدمه

پایه رویشی پسته قزوینی (*Pistacia vera cv. Qazvini*) به عنوان یکی از ارقام با ارزش مقاوم به شوری و سازگار به کشت در مناطق خشک و نیمه خشک است (Mohammadi et al. 2007; Morgan et al. 1992). UCB-1 ($P. \times P. atlantica$) و *intergerima* نیز از پایه های هیبرید رویشی شناخته شده در دنیا است که به لحاظ مقاومت به سرما و پژمردگی ورتیسلیومی (*Verticillium sp.*) دارای اهمیت است (Morgan et al. 1992). تکثیر پسته با استفاده از روش های مرسوم از قبیل کشت بذر، قلمه زدن و خوابانیدن، به دلیل بالا بودن میزان هتروزیگوسیتی، سخت ریشه زایی و آلودگی به بیماری های باکتریایی و قارچی بسیار سخت و هزینه بر است (Onay. 2000). در این راستا بیوتکنولوژی گیاهی توانسته است با غلبه بر مشکلات یاد شده به عنوان جایگزین مناسبی برای تکثیر این درختان باشد (Abousalim and Dolcet-Sanjuan and Claveria. 1995; Jain Mantell. 1994; and Häggman. 2007; Onay. 2000). با وجود این، نوساقه زایی پسته در شرایط درون شیشه (*in-vitro*) همواره با مشکلاتی از جمله سوختگی سرشاخه (shoot tip necrosis (STN)، آبکی شدن نوساقه های تشکیل شده (hyperhydricity)، تولید کالوس زیاد در پایین ساقه (base callus at the cut edge) و غالبیت انتهایی (axillary dominant) همراه است (Abousalim and Bairu et al. 2009, Crane and Iwakiri. 1985, Mantell. 1994, Dolcet-Sanjuan and Claveria. 1995, Küden et al. 1994). پژوهش های اولیه نشان داد که استفاده از آنتی اکسین به واسطه تعدیل اکسین داخلی و خارجی می تواند فرآیندهای مورفولوژیکی در شرایط درون شیشه را در کشت های کالوس گوجه فرنگی و جو بهبود بخشد (Jelaska et al. Cassells. 1979). اسکوپولتین (نوعی آنتی اکسیدانت با ترکیبی طبیعی) (1984). احتمال دارد با کلاته کردن اکسین تولید شده در راس ساقه ها و جوانه های انتهایی و در نهایت با کنترل غالبیت انتهایی باعث فعال شدن جوانه های جانبی می شود (Imbert and Wilson. 1970; Malik et al. 2011). بدین منظور استفاده از این ماده با هدف افزایش نوساقه زایی به واسطه کنترل غالبیت انتهایی و همچنین اثر دنباله آن در رفع نارسایی های یاد شده در این گیاه نیاز به بررسی

بیشتری داشت. توانایی گیاه در تولید ریشه به عملکرد متقابل فاکتورهای متعدد داخل سلولی و خارج سلولی از جمله آهن بستگی دارد (Frenkel and Hess. 1974). نقش کلیدی آهن در فرآیندهای متعدد رشدی از جمله سنتز کلروفیل و دی.ان.ای و هورمون های رشدی به خوبی روشن شده است (Dunlap and Robacker. 1988). با توجه به این که آهن موجود در محیط کشت MS (Murashige & Skoog) حاوی آهن به شکل کلاته ($Fe-EDTA$) است (Murashige and Skoog. 1962)، سینگ و کریکوریان (۱۹۸۰) نشان دادند که غلظت توصیه شده Na_2EDTA (۳۷/۳ میلی گرم بر لیتر) بیش از اندازه مورد نیاز برای کلاته کردن Fe^{2+} ($FeSO_4 \cdot 7H_2O = 27.8 \text{ mg/L}$) است؛ به طوری که مقدار مازاد این ماده می تواند اثر سو روی دسترسی سایر کاتیون های دوفرفیتی توسط گیاه داشته باشد (Singh and Kirkoran. 1980). از طرف دیگر، براساس یافته های دیگران، جایگزینی $Fe-EDDHA$ با $Fe-EDTA$ اثر فزاینده ای در ریزازدیادی گونه های مختلفی داشته است (Antonopoulou et al. 2007; Molassiotis et al. 2003, Rashid and Street. 1973). وجود این براساس دانسته های ما اطلاعاتی در ارتباط با نقش این ماده در ریشه زایی پسته وجود ندارد. از سوی دیگر پراکسیدازها ($EC 1.11.1.7$) هموپروتئین هایی با حلقه پورفیرینی آهن هستند که کاتالیز رادیکال های آزاد ناشی از تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را بر عهده دارند (Brill. 1966). پژوهش های انجام شده روی این گروه از اکسیدازها به نقش کلیدی آنها در واکنش های متعددی از جمله به عنوان آنتی اکسیدانت رادیکال های آزاد، دخیل بودن در رشد و نمو گیاهی، تنظیم هورمون های رشدی، کنترل ساز و کار دفاعی و کنترل رشد طولی سلول ها اشاره داشته اند (Jackson et al. 2001; Schnabelrauch et al. Campa. 1991). امروزه گزارش های معدودی از پژوهش های انجام شده از خصوصیت های کیتیک آنزیم های پراکسیداز موجود در گیاهان عالی در دسترس است (Padmarajaiah et al. 2009) و تلاش ها در این راستا برای شناسایی هرچه بیشتر ویژگی های کیتیک این گروه از آنتی اکسیدانت ها و همچنین یافتن ارتباط بین تغییرهای مورفولوژی قابل مشاهده مانند نوساقه زایی، جنین زایی و ریشه زایی با فعالیت آنزیم های کلیدی درگیر در این فرآیندها مانند

شدت نور 1-2.5 μmol.m-2.s-1 65 μmol.m-2.s-1 نگهداری شدند (Nezami A et al. 2010). یادداشت برداری ها بعد از یک مرتبه زیرکشت در تیمارهای مربوطه انجام شد.

اثر اسکوپولتین در نوساقه زایی پسته و فعالیت آنزیم پراکسیداز: به منظور بررسی اثر اسکوپولتین به عنوان یک آنتی اکسین (در غلظت های پایین) روی کیفیت رشد و میزان نوساقه زایی، اثر آن در غلظت های ۰/۰ و ۳/۰ میلی گرم در لیتر به طور جداگانه با استفاده از محیط کشت GNH، مورد پژوهش قرار گرفت. اسکوپولتین با فیلتر استریل و بعد از اتوکلاو شدن محیط کشت به آن اضافه شد. بعد از گذشت ۲۱ روز از اعمال تیمار، صفت هایی مانند تعداد نوساقه های کل و سالم، وزن تر (fresh weight) کل و سالم تولیدی و میزان رشد طولی یادداشت برداری شدند. به ازای هر تیمار چهار شیشه مربای ۱۸۰ میلی لیتری با درب کریستالی حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط کشت (به عنوان تکرار) و در هر تکرار چهار ریز نمونه کشت شد. به منظور بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز نمونه برداری (سه تکرار به ازای هر تیمار) در پنج فاصله زمانی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۱۵ و ۳۰ روز بعد از کشت) انجام گرفت.

اثر منبع آهن روی ریشه زایی پسته و فعالیت آنزیم پراکسیداز: به منظور ریشه زایی، پایه ی نوساقه های رشد یافته (با طول ۱/۵ تا ۲ سانتی متر) به مدت ۱۰ دقیقه در داخل ۱۰۰۰ پی پی ام هورمون NAA فرو برده شده (پالس هورمونی) (Delijam. 2013) و سپس به منظور بررسی اثر نوع آهن روی راندمان ریشه زایی، نوساقه های پیش تیمار شده در دو تیمار (a) GNH بدون هورمون حاوی Fe-EDTA توصیه شده در محیط کشت MS (جدول ۳) و (b) GNH بدون هورمون حاوی ۱۸۷ میلی گرم در لیتر Fe-EDDHA (Antonopoulou et al. 2007) منتقل و بعد از اعمال هفت روز تاریکی در دمای دو درجه سانتی گراد $25 \pm$ ، به شرایط نوری ۱۶/۸ ساعت تاریکی بر روشنایی با لامپ های فلورسنت با شدت نور 1-2.5 μmol.m-2.s-1 65 μmol.m-2.s-1 منتقل و در دمای یاد شده نگهداری شدند. به ازای هر تیمار پنج شیشه مربای ۱۸۰ میلی لیتر با درب کریستالی حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط کشت (تکرار) و در هر تکرار چهار ریز نمونه کشت و به منظور بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز (۳ تکرار به ازای هر تیمار) نمونه برداری از هفته دوم تا پنجم بعد از

پراکسیداز، با هدف معرفی این آنزیم ها به عنوان نشانگرهای پیش بینی کننده (Predictive markers) (Gaspar et al. 1992) کماکان مورد توجه پژوهشگران است. براساس فرضیه بنسون (۲۰۰۱) تولید رادیکال های آزاد اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) در گیاهان در شرایط درون شیشه مرتبط با مقاومت گیاه در برابر تمایز، رشد و نمو (plant recalcitrance) است (Benson. 2000)؛ در حالی که تولید بیش از حد رادیکال های آزاد می تواند منجر به تنش های اکسیداتیو و در نهایت مرگ سلولی شود (Vatankhah et al. 2010). از سوی دیگر براساس گزارش های موجود به دلیل وجود تنش های اکسیداتیو حاصل از رشد و نمو، الگوی فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان در طول این فرایندها به طور هوشمندانه با هدف حفظ سلول ها از تنش های حاصله تغییر می یابد (Gupta and Datta. 2005; Tang and Newton. 2005; Libik et al. 2005). در این پژوهش اثر اسکوپولتین به عنوان یک آنتی اکسیدانت طبیعی در نوساقه زایی و همچنین اثر منبع آهن (Fe-EDTA و Fe-EDDHA) در ریشه زایی همراه با تغییرات ایجاد شده در سطح فعالیت آنزیم پراکسیداز و همچنین خصوصیت های کیتیک این آنزیم با استفاده از برخی کاتیون های دو ظرفیتی، تغییرات دما و EDTA مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی: در این پژوهش از نوساقه های درون شیشه ی پایه های رویشی پسته قزوینی و UCB-1 که قبلاً در شرایط درون شیشه در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) استقرار یافته بود (Delijam. 2013)، استفاده شد. تمام آزمایش ها بر روی هر دو پایه انجام و از آن ها یادداشت برداری شد. زیرکشت (sub-culture) ریز نمونه ها هر سه تا چهار هفته یکبار در محیط کشت GNH (Garoosi, Nezami & Haddad) (Nezami A et al. 2010) حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA، ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP، ۳ درصد ساکارز، و ۰/۵۷ درصد آگار که پس از تنظیم pH: ۵/۷ اتوکلاو شده بود، انجام شد. کشت ها در اتاق رشد تحت شرایط محیطی با دمای دو درجه سانتی گراد $25 \pm$ و ۱۶/۸ ساعت تاریکی بر روشنایی با لامپ های فلورسنت با

سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز: سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تمامی آزمایش ها مطابق روش تغییر یافته جنس و ماهتی (۱۹۵۵) با استفاده از سه میلی لیتر مخلوط واکنش (۱۰۰ میلی مولار گوئیکول، ۱۰۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (pH:۷)، ۷۰ میلی مولار پراکسید هیدروژن به همراه ۲۰ میکرو لیتر از عصاره استخراج شده) به مدت ۴ دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری (UV-3200 Labomed) -UV- visible اندازه گیری شد (Chance and Maehly, 1955).

تجزیه و تحلیل آماری: محاسبات آماری و رسم نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزارهای Excel و SAS 9.1 انجام شد. جهت مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح $\alpha=0.05$ استفاده شد.

نتایج و بحث

اثر اسکوپولتین در نوساقه زایی پسته و فعالیت آنزیم پراکسیداز: به منظور بررسی اثر اسکوپولتین روی میزان نوساقه زایی و همچنین بهبود کیفیت رشدی، این ماده در دو غلظت ۰/۰ (شاهد) و سه میلی گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش همراه با یادداشت برداری فاکتورهای رشدی مانند میزان نوساقه زایی کل و سالم، وزن تر تولیدی و رشد طولی نوساقه ها، تغییرهای فعالیت آنزیم پراکسیداز در بازه زمانی کوتاه مدت (۲۴ تا ۷۲ ساعت)، ۱۵ و ۳۰ روز بعد از کشت در شرایط یاد شده بررسی شد. نتایج نشان داد که اسکوپولتین در مقایسه با تیمار شاهد موجب افزایش معنی داری در میزان نوساقه زایی کل (۴/۲) و (۲/۶) و همچنین نوساقه های سالم (بهبود کیفیت رشد: کاهش سرسوخنگی، کالوس پایه و آبکی شدن نوساقه های رشد یافته) (۴/۱۲۵ و ۲/۴۶) به ترتیب در هر دو پایه رویشی قزوینی و UCB-1 شد. نتایج همچنین بیانگر نقش منفی اسکوپولتین در رشد طولی پایه رویشی قزوینی (۲/۵۳۴ سانتی متر) و عدم اختلاف معنی دار (با وجود افزایش جزئی رشد طولی) در پایه هیبرید رویشی UCB-1 بود (جدول ۱). با توجه به اثبات خاصیت آنتی اکسینی اسکوپولتین در مقادیر ۲/۵ تا ۱۰ میلی گرم در لیتر (Imbert and Wilson 1970)، گزارش های ارایه شده توسط دیگران در هماهنگی با نتایج این پژوهش بیانگر اثر استفاده از آنتی اکسین ها

کشت با فاصله زمانی هفت روزه انجام شد. همچنین صفت های درصد ریشه زایی، تعداد ریشه به ازای هر گیاهچه، طول ریشه های تشکیل شده و قطر تقریبی ریشه در هفته چهارم یادداشت برداری شد.

ویژگی های کیتیک آنزیم پراکسیداز: نمونه برداری از نوساقه های (۲۱ روزه) رشد یافته در شرایط درون شیشه برای بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز انجام و بلافاصله پس از افزودن ۰/۰۲ گرم پلی ونیل پیریدن (PVP) به ازای ۲۰۰ میلی گرم وزن تر، نمونه ها در داخل حاوی نیتروژن مایع و بافر استخراج (۵۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (pH:۷) و یک میلی مولار سدیم متابای سولفیت) هموژنیز شدند. عصاره به دست آمده به مدت ۲۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد با سرعت ۲۰۰۰۰ گرم سانتریفیوژ (Hermel Z36) و به دنبال آن محلول رویی حاصل جهت بررسی های آنزیمی بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. میزان تغییرهای فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور یون های منیزیم (Mg^{2+}) و کلسیم (Ca^{2+})، هر دو در غلظت های (۰/۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی مولار) با استفاده از سه میلی لیتر مخلوط واکنش (محلول ۱۰۰ میلی مولار گوئیکول، ۱۰۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (pH:۷)، ۷۰ میلی مولار پراکسید هیدروژن به همراه ۲۰ میکرو لیتر از عصاره استخراج شده) مورد پژوهش قرار گرفت. به منظور مشخص شدن دمای بهینه فعالیت آنزیم، مخلوط واکنش در دماهای ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری و سپس تغییرهای فعالیت آنزیمی بررسی شد. در نهایت به منظور بررسی میزان اثر بازدارندگی EDTA روی آنزیم مورد بررسی، این ماده در مقادیر ۰/۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی مولار به کار برده شد.

سنجش پروتئین کل: سنجش غلظت پروتئین طبق روش بردفورد (۱۹۷۶) با استفاده از سرم آلبومین گاوی جهت رسم منحنی استاندارد صورت گرفت (Bradford, 1976). بدین منظور ۹۸۰ میکرو لیتر از محلول بردفورد ۲۰ درصد با ۲۰ میکرو لیتر از هر کدام از عصاره های استخراج شده در کیوت شیشه ای یک میلی لیتری مخلوط و غلظت پروتئین در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری (UV-3200 Labomed) -UV- visible اندازه گیری شد.

در افزایش شاخه های جانبی، کاهش رشد طولی و تغییرهای غیرقابل پیش بینی در شرایط مختلف محیطی در گیاهان چوبی و زینتی بود (Lakshmanan et al. 1997; Maleki et al. 1991; al. 2013; Roberts and Hooley. 1988).

در ارتباط با اثر اسکوپولتین روی فعالیت آنزیم پراکسیداز نکات زیر به دست آمده است: (۱) فعالیت آنزیم پراکسیداز در ۲۴ ساعت بعد از کشت در شرایط کنترل (فاقد اسکوپولتین) در پایه های رویشی قزوینی و UCB-1 به ترتیب معادل ۰/۷۸۴ و ۰/۷۸۴ (واحد = U/mg protein) بود، که بعد از کاهش محسوس در مدت ۴۸ ساعت، به بیشترین مقدار در مدت ۷۲ ساعت بعد از کشت (زمان ظهور جوانه های رویشی) (۰/۵۱۱ و ۱/۰۴۸) (واحد) رسید. فعالیت آن بعد از ۱۵ روز (رشد ۱/۵ تا ۲/۰ سانتی متری نوساقه ها) کاهش معنی داری (۰/۲۳۶ و ۰/۱۸) داشت که در نهایت در اواخر دوره رشدی (۳۰ روز بعد از کشت) به ترتیب در هر دو

پایه رویشی به ۰/۵۹۲ و ۰/۵۶۹ رسید. (۲) پس از اعمال تیمار اسکوپولتین (در غلظت ۳ میلی گرم در لیتر)، فعالیت آنزیم پراکسیداز در پایه رویشی قزوینی و UCB-1 الگوی متفاوت اما منظمی را نشان داد؛ به طوری که در پایه رویشی قزوینی از ۰/۲۷۶ واحد (در مدت ۲۴ ساعت بعد از کشت) به ۰/۷۰۴ واحد (اواخر دوره رشدی) و در UCB-1 از ۱/۰۷۱ به ۰/۵۷۵ واحد در مدت زمان مشابه رسید. (۳) فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور اسکوپولتین در ابتدا جوانه زنی (۷۲ ساعت بعد از کشت) در هر دو پایه رویشی قزوینی و UCB-1 قابل مقایسه با هم (به ترتیب ۰/۵۰۷ و ۰/۵۱۳ واحد) و در مدت ۱۵ روز بعد از کشت، با اختلاف معنی داری بیشتر از شرایط کنترل (۰/۵۳۵ و ۰/۶۰۳ واحد) بود (جدول ۲). دلیل این اختلاف احتمال دارد وابسته به ساز و کارهای مولکولی درون سلولی در هریک از ژنوتیپ ها باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد.

جدول ۱- اثر اسکوپولتین روی نوساقه زایی در *Pistacia vera* (پایه های رویشی قزوینی و UCB-1)

Table 1- Effect of scopoletin on shoot regeneration of *Pistacia vera* cv. Qazvini and UCB-1 rootstocks

پایه های رویشی Rootstocks	اسکوپولتین Scopoletin (mg/L)	تعداد نوساقه کل به ازای ریزنمونه Total shoot N0. Per explants	تعداد نوساقه سالم به ازای ریزنمونه Healthy shoot N0. Per explant	وزن نوساقه کل به ازای ریزنمونه Total weight per explant (g)	وزن نوساقه سالم به ازای ریزنمونه Healthy weight per explant (g)	رشد طولی به ازای ریزنمونه (cm) Growth length per explant (cm)
قزوینی	0.00	3.33b	3.08b	1.15b	0.37a	2.53a
Qazvini	3.00	4.20a	4.13a	1.22a	0.46a	1.90b
UCB-1	0.00	2.00b	1.75b	0.64a	0.20a	1.87a
UCB-1	3.00	2.60a	2.46a	0.63a	0.24a	2.44a

داده ها میانگین ۴ تکرار با ۴ ریز نمونه به ازای هر تیمار بوده و حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح $\alpha=0.05$ با آزمون چند دامنه ای دانکن است.

Means with the different letter within a column are significantly different ($\alpha=0.05$), according to Duncan's Multiple Range Test. The values indicate means of four replications with 4 cultures per treatment.

جدول ۲- اثر اسکوپولتین روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در مراحل مختلف رشدی در *Pistacia vera* (پایه های رویشی قزوینی و UCB-1)

Table 2- Effect of scopoletin on peroxidase enzyme activity in different growth stages in *Pistacia vera* cv. Qazvini and UCB-1 rootstocks.

پایه های رویشی Rootstocks	اسکوپولتین Scopoletin (mg/L)	۲۴ ساعت 24h (U/ mg protein)	۴۸ ساعت 48h (U/ mg protein)	۷۲ ساعت 72h (U/ mg protein)	۱۵ روز 15 days (U/ mg protein)	۳۰ روز 30days (protein U/ mg)
قزوینی	0.00	0.767	0.304	1.048	0.236	0.592
Qazvini	3.00	0.276	0.479	0.507	0.535	0.704
UCB-1	0.00	0.748	0.688	1.511	0.180	0.569
UCB-1	3.00	1.071	0.880	0.513	0.603	0.575

داده ها میانگین ۳ تکرار هستند.

The values are given the mean of three replications.

جدول ۳- اثر منبع آهن روی ریشه زایی در *Pistacia vera* (پایه های رویشی قزوینی و UCB-1)Table 3- Effect of iron source on rooting of *Pistacia vera* cv. Qazvini and UCB-1 rootstocks.

قطر ریشه Root diameter (mm)	طول ریشه به ازای ریزنمونه Root length per rooted plantlet (cm)	تعداد ریشه به ازای گیاهچه ریشه دار شده Root NO. Per rooted plantlet	درصد ریشه زایی Rooting percentage	منبع آهن Iron source	پایه های رویشی Rootstocks
0.70b	0.81a	1.75b	31.25b	Fe-EDTA*	قزوینی
1.70a	1.20a	6.00a	62.50a	FeEDDHA**	Qazvini
0.79a	1.49a	2.10b	62.50b	Fe-EDTA	UCB-1
1.00a	1.60a	4.70a	75.00a	Fe-EDDHA	

Fe-EDTA* mg/L= 27/8 FeSO₄.7H₂O +mg/L 37/3 Na₂EDTA **, Fe-EDDHA =mg/L 187*Fe-EDTA= 27.8 mg/L FeSO₄.7H₂O +Na₂EDTA, **FEEDDHA=187 mg/Lداده ها میانگین ۴ تکرار با ۵ ریزنمونه بازی هر تیمار بوده و حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح $\alpha=0.05$ با آزمون چند دامنه ای دانکن است.Means with the different letter within a are significantly different ($\alpha=0.05$), according to Duncan's Multiple Range Test. The values indicate means of four replications with 5 cultures per treatment.

EDDHA به جای Fe-MS، به عنوان منبع آهن در هر دو پایه رویشی پسته، افزایش معنی داری یافت به طوری که درصد ریشه زایی در پایه رویشی قزوینی از ۳۱/۲۵ به ۶۲/۵ درصد و در پایه هیبرید رویشی UCB-1 از ۶۲/۵ به ۷۵/۰ رسید (جدول ۳). اثر دوچندان Fe-EDDHA نسبت به Fe-EDTA روی افزایش راندمان ریشه زایی در سایر درختان میوه از جمله هسته داران (Molassiotis et al. 2003, Antonopoulou et al. 2007) تایید کننده نتایج این پژوهش است. به عنوان مثال، افزودن ۱۸۷ میلی گرم در لیتر Fe-EDDHA به محیط کشت ریشه زایی پایه هیبرید رویشی هلو و بادام (GF677) راندمان ریشه زایی را در این گیاه از ۳۰ درصد به ۱۰۰ درصد افزایش داد (Antonopoulou et al. 2007) یکی از دلایل محتمل در دیده شدن اثر بارز Fe-EDDHA روی افزایش میزان ریشه زایی دخالت در مسیرهای آنزیمی درگیر در این فرآیند است.

بر اساس نتایج جدول چهارم، بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در مرحله ریشه زایی نشان می دهد که در حالت کلی فعالیت پراکسیدازی پایه هیبرید رویشی UCB-1 بیش از دو برابر قزوینی است، به طوری که بیشترین فعالیت آنزیم در این پایه هیبرید رویشی در حضور Fe-EDTA در هفته چهارم ۷/۶۱۲ واحد و در شرایط استفاده از Fe-EDDHA در هفته سوم ۷/۱۳۳ واحد بوده و این میزان در پایه رویشی قزوینی در هفته چهارم در حضور Fe-EDTA ۳/۵۴ و در حضور Fe-EDDHA در هفته سوم ۳/۸۳ واحد بود.

اثر منبع آهن روی ریشه زایی پسته و فعالیت آنزیم پراکسیداز: نوساقه های تکثیر شده در محیط کشت نوساقه زایی (به طول ۱/۵ تا ۲/۰ سانتی متر) بعد از اعمال تیمار اکسین NAA با غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام به شیوه پالسینگ به مدت ۱۰ دقیقه به محیط کشت های GNH حاوی آهن MS (Fe-EDTA) و Fe-EDDHA با غلظت ۱۸۷ میلی گرم در لیتر منتقل و راندمان ریشه زایی همراه با تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل کالوس در نوساقه های تیمار شده پس از دو هفته از شروع آزمایش دیده شده و ریشه های تشکیل شده در هفته سوم و چهارم قابل مشاهده بودند (داده ها نشان داده نشده اند).

نتایج جدول سه نشان می دهد که نوع آهن مورد استفاده اثر معنی داری در افزایش فاکتورهای ریشه زایی مانند درصد ریشه زایی، تعداد و طول ریشه تشکیل شده به ازای گیاهچه داشت به طوری که استفاده از Fe-EDDHA در پایه های رویشی قزوینی و UCB-1 به ترتیب منجر به ۶۲/۵ و ۷۵ (درصد ریشه زایی)، ۶/۰ و ۴/۷۰ (تعداد ریشه به ازای هر نوساقه Fe-EDDHA) و ۱/۲۰ و ۱/۶۰ سانتی متر (طول ریشه به ازای گیاهچه) شد که اختلاف معنی داری در سطح $\alpha=0.05$ با شرایط کنترل (آهن MS) داشت. بر اساس برخی گزارش ها، Fe-EDTA محیط کشت MS به دلیل رسوب و به دنبال آن کمبود آهن برای استفاده گیاه و همچنین تولید ترکیب های سمی، رشد گیاه را با محدودیت مواجه ساخته است (Hangarter and Stasinopoulos, Dalton et al. 1983)؛ (1991). در این پژوهش راندمان ریشه زایی با استفاده از Fe-

جدول ۴- اثر منبع آهن روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در مرحله ریشه زایی در *Pistacia vera* (پایه های رویشی قزوینی و UCB-1)

Table 4-Effect of iron source on peroxidase enzyme activity in rooting phase in *Pistachia vera* cv. Qazvini and UCB-1 rootstocks.

پایه های رویشی Rootstocks	منبع آهن Iron Source	هفته دوم week 2nd (U/ mg protein)	هفته سوم week 3rd (U/ mg protein)	هفته چهارم week 4th (U/ mg protein)	هفته پنجم week 5th (U/ mg protein)
قزوینی	Fe-EDTA	3.97	2.61	3.54	2.76
Qazvini	FeEDDHA**	2.48	2.63	3.83	3.09
UCB-1	Fe-EDTA	5.30	4.86	7.61	6.94
	FeEDDHA**	5.27	7.13	4.66	3.43

Fe-EDTA* mg/L= 27/8 FeSO₄.7H₂O +mg/L 37/3 Na₂EDTA **, Fe-EDDHA =mg/L 187

داده ها میانگین ۳ تکرار است.

*Fe-EDTA= 27.8 mg/L FeSO₄.7H₂O +Na₂EDTA, **FeEDDHA=187 mg/L
The values are given the mean of three replications.

در فعالیت آنزیم نسبت به یون منیزیم فعالیت آن را به ترتیب به ۲/۰۳ و ۱/۶۰ واحد در پایه های رویشی افزایش داد (شکل 1-B). استفاده از EDTA در هر دو پایه رویشی مورد پژوهش باعث کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز شد، به طوری که استفاده از ۵۰ میلی مولار EDTA فعالیت آنزیمی را در پایه رویشی قزوینی به ۰/۳۷۲ و در UCB-1 به ۰/۱۶۶ واحد تقلیل داد (شکل 1-C). نتایج به دست آمده از اثر دماهای مختلف روی فعالیت آنزیم پراکسیداز بیانگر بیشترین فعالیت آن (۱/۳۱۵ و ۰/۷۷۸) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد (دما بهینه) در هر دو پایه رویشی قزوینی و UCB-1 بود (شکل 1-D). از آن جاکه آنزیم پراکسیداز به عنوان یکی از آنزیم های پایدار در دماهای بالا شناخته می شود (Burnette, 1977) در تایید گزارش ما، نتایج ارایه شده توسط دیگران، در بیشتر گونه های گیاهی از قبیل *Solanacea*، *Crucifera* و درختان میوه، نیز فعالیت بهینه این آنزیم را بین ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد بیان داشتند (Bania and Mahanta, 2012; Rehman et al. 1999; Guida et al. 2011).

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که (۱) اسکوپولتین احتمال دارد با کنترل میزان اکسین داخل سلولی و اکسین اضافه شده به محیط کشت موجب افزایش میزان نوساقه زایی می شود. (۲) بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در شاهد نشان داد که فعالیت آن در دوره های زمانی مختلف رشد دارای نوسان است؛ به طوری که، در ابتدای جوانه زنی (۷۲-۲۴ ساعت بعد از کشت ریزنمونه) به حداکثر میزان و در پایان دوره ۱۵ روزه فعالیت به حداقل ممکن و دوباره فعالیت آن تا پایان دوره ۳۰ روز پس از کشت رو به فرونی گذاشت. در حالی که در حضور اسکوپولتین تغییرهای

با توجه به این که آنزیم پراکسیداز به عنوان یک نشانگر پیش بینی کننده (Predictive marker) در برخی گیاهان محسوب می شود (McDonald and Wynne. 2003, Gaspar et al. 1992) بنا براین، با توجه به مشاهده درصد بالای ریشه زایی، همراه با فعالیت بالای آنزیم پراکسیداز در پایه هیبرید رویشی UCB-1 نسبت به پایه رویشی قزوینی و وجود ارتباط مستقیم بین این دو پدیده فیزیولوژیکی در این پژوهش، احتمال دارد فعالیت این آنزیم می تواند به عنوان نشانگر مولکولی مناسبی در سایر ارقام و پایه های رویشی پسته (*Pistacia vera*) قابل بررسی باشد.

خصوصیات کیتیک آنزیم پراکسیداز: بررسی های کیتیک آنزیم پراکسیداز با استفاده از نوساقه های ۲۱ روزه رشد یافته در شرایط درون شیشه انجام شد. بدین منظور اثر یون های کلسیم و منیزیم (در غلظت های ۰/۰ تا ۵۰ میلی مولار)، دما (۲۰ تا ۸۰ درجه سانتی گراد) و همچنین EDTA به عنوان بازدارنده فعالیت این آنزیم (در مقادیر ۰/۰ تا ۵۰ میلی مولار) مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج شکل یک، فعالیت آنزیم پراکسیداز در تمامی موارد مورد پژوهش در پایه رویشی قزوینی اختلاف معنی داری با پایه هیبرید رویشی UCB-1 داشت.

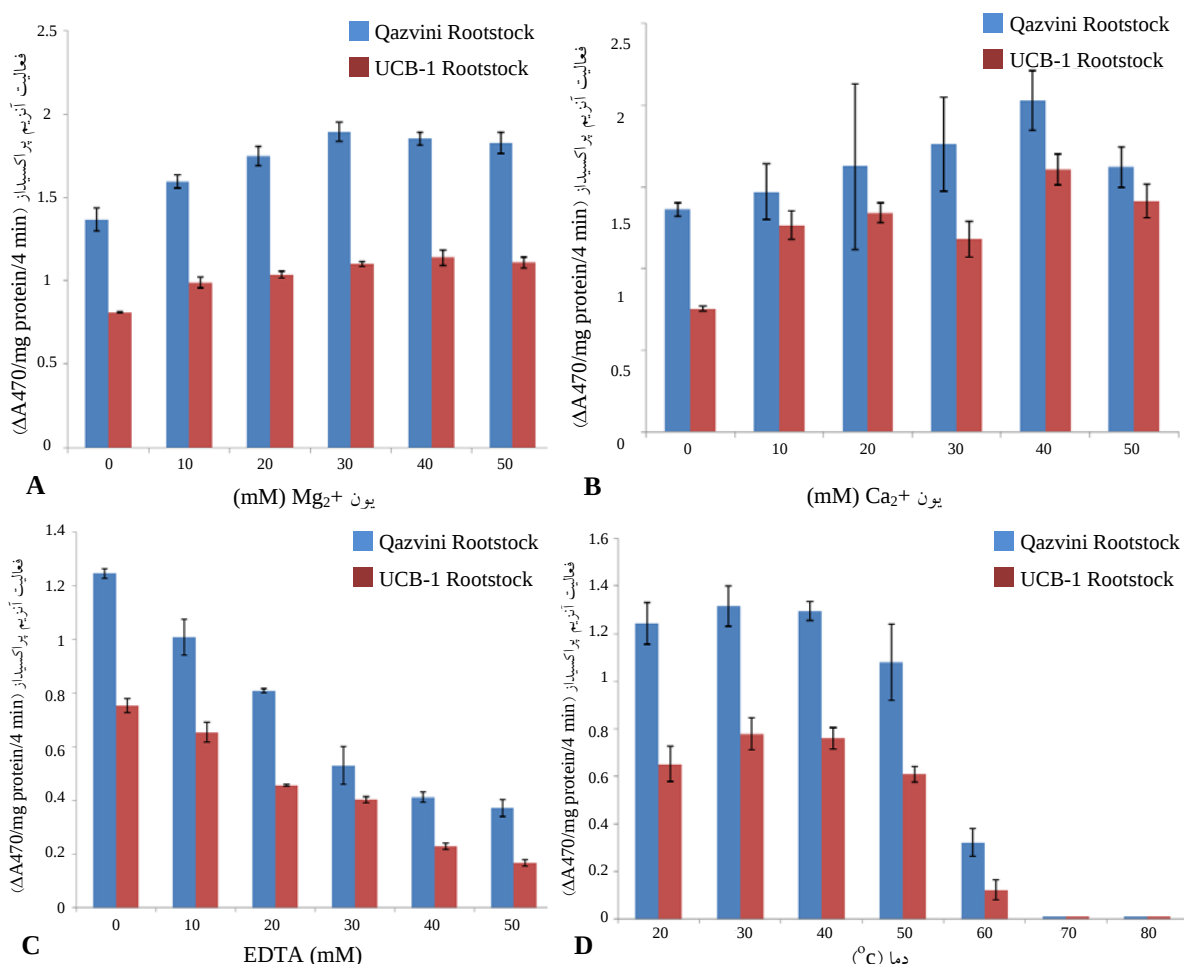
نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در پایه رویشی قزوینی ۱/۸۹۲ و در UCB-1 ۱/۱۳۹ واحد، به ترتیب در حضور ۳۰ و ۴۰ میلی مولار یون منیزیم حاصل شد (شکل 1A) و نتایج ارایه شده در پژوهشی در ارتباط با اثر کاتیون های دوز فیتی در افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز (*Phytolacca dioica*) Ombu (tree) نیز تایید کننده این موضوع است (Guida et al. 2011). در حالی که استفاده از ۴۰ میلی مولار از یون کلسیم با افزایش معنی دار

سانتی گراد فعالیت آنزیم را به بیشترین میزان رساندند درحالی که اثر بازدارندگی EDTA روی فعالیت آنزیم محرز بود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) انجام شد که بدین وسیله نویسندگان قدردانی خود را اعلام می کنم.

آنزیم پراکسیداز با یک روند منظم کاهشی (در UCB-1) یا افزایشی (در قزوینی) همراه بود. ۳) استفاده از Fe-EDDHA به جای Fe-EDTA راندمان ریشه زایی را در پایه های رویشی مورد پژوهش تا دو برابر افزایش داد. ۴) نتایج بیانگر بالابودن فعالیت آنزیم پراکسیداز و همچنین میزان ریشه زایی در پایه هیبرید رویشی UCB-1 نسبت به پایه رویشی قزوینی بود. بنابراین به نظر می رسد که بتوان فعالیت این آنزیم را به عنوان یک نشانگر پیش بینی کننده در *Pistacia vera* معرفی کرد. ۵) افزودن کاتیون های منیزیم و کلسیم در مقادیر ۳۰-۴۰ میلی مولار (وابسته به نوع پایه رویشی) به محیط کشت و تیمار دمای ۳۰ درجه



شکل ۱- اثر کاتیون های دوظرفیتی Mg^{2+} (A)، Ca^{2+} (B)، دما (C) و EDTA (D) روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در *Pistacia vera* (پایه های رویشی قزوینی و UCB-1). داده ها با میانگین ۳ تکرار $\pm$ معیار اشتباه هستند.

Figure 1- Effect of divalent cations Mg^{2+} (A), Ca^{2+} (B), temperature (C), and EDTA (D) on peroxidase enzyme activity in *Pistacia vera* cv. Qazvini and UCB-1 rootstocks. The values are mean $\pm$ Standard error (n=3)

منابع

- Abousalim A and Mantell SH. 1994.** A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in in vitro shoot cultures of *Pistacia vera* cv. Mateur. *Journal of horticultural science* 69: 357-366.
- Antonopoulou C, Dimassi K, Therios I, Chatzissavvidis C and Papadakis I. 2007.** The effect of Fe-EDDHA and of ascorbic acid on in vitro rooting of the peach rootstock GF-677 explants. *Acta Physiologiae Plantarum* 29: 559-561.
- Bairu MW, Stirk WA and Van Staden J. 2009.** Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 98: 239-248.
- Bania I and Mahanta R. 2012.** Evaluation of peroxidases from various plant species. *International journal of scientific and research publications* 2: 1-5.
- Benson E. 2000.** Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*: 163-170.
- Bond S. 1991.** Control of rhizome growth in *Alstroemeria*, University of Nottingham.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.
- Brill AS. 1966.** Peroxidases and catalase. *Comprehensive biochemistry* 14: 9.
- Burnette FS. 1977.** Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. *Journal of Food Science* 42: 1-6.
- Campa A. 1991.** Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. *Peroxidases in chemistry and biology* 2: 25-50.
- Cassells AC. 1979.** The Effect of 2, 3, 5 Triiodobenzoic Acids on Caulogenesis in Callus Cultures of Tomato and Pelargonium. *Physiologia Plantarum* 46: 159-164.
- Chance B, and Maehly AC. 1955.** [136] Assay of catalases and peroxidases. *Methods in enzymology* 2: 764-775.
- Crane JC and Iwakiri BT. 1985.** Vegetative and reproduction apical dominance in pistachio. *HortScience* 20: 1092-1093.
- Dalton C, Iqbal K and Turner D. 1983.** Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. *Physiologia Plantarum* 57: 472-476.
- Delijam MA. 2013.** In vitro micropropagation of Pistachio (*Pistacia vera*, cv. Qazvini). *Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University (IKIU)* (In Farsi with English abstract).
- Dolcet-Sanjuan R and Claveria E. 1995.** Improved shoot-tip micropropagation of *Pistacia vera* L. and the beneficial effects of methyl jasmonate. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120: 938-942.
- Dunlap JR and Robacker KM. 1988.** Nutrient salts promote light-induced degradation of indole-3-acetic acid in tissue culture media. *Plant physiology* 88: 379-382.
- Frenkel C and Hess CE. 1974.** Isozymic changes in relation to root initiation in mung bean. *Canadian Journal of Botany* 52: 295-297.
- Gaspar Th, Kevers C, Hausman JF, Berthon JY and Ripetti V. 1992.** Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. *Agronomie* 12: 757-765.
- Guida V, Tamburino R and Parente A. 2011.** Purification and enzymatic properties of a peroxidase from leaves of *Phytolacca dioica* L. (Ombú tree). *Biochemistry and Molecular Biology Reports* 44: 64-69.
- Gupta S and Datta S. 2003.** Antioxidant enzyme activities during in vitro morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. *Biologia plantarum* 47: 179-183.
- Hangarter R and Stasinopoulos T. 1991.** Effect of Fe-catalyzed photooxidation of EDTA on root growth in plant culture media. *Plant physiology* 96: 843-847.
- Imbert MP and Wilson LA. 1970.** Stimulatory and inhibitory effects of scopoletin on IAA oxidase preparations from sweet potato. *Phytochemistry* 9: 1787-1794.
- Jackson P, Galinha C, Pereira C, Fortunato A, Soares N, Amâncio S, and Ricardo C. 2001.** Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase. *Plant physiology* 127: 1065-1076.
- Jain SM and Häggman H. 2007.** *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*: Springer.
- Jelaska S, Rengel Z, and Cesar V. 1984.** Plant regeneration from mesocotyl callus of *Hordeum vulgare* L. *Plant Cell Reports* 3: 125-129.
- Küden AB, Kaska N, Tanriver E, Tekin H, and Ak BE. 1994.** Determining the chilling requirements and growing degree hours of some pistachio nut cultivars and regions. In *Determining the chilling requirements and growing degree hours of some pistachio nut cultivars and regions*, I International Symposium on Pistachio 419, 85-90.
- Lakshmanan P, Lee C and Goh C. 1997.** An efficient in vitro method for mass propagation of a woody ornamental *Ixora coccinea* L. *Plant Cell Reports* 16: 572-577.
- Libik M, Konieczny R, Pater B, Ślesak I and Miszalski Z. 2005.** Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. *Plant Cell Reports* 23: 834-841.
- Maleki S, Garoosi GA, Haddad R, and Nezami AE. 2013.** A step towards providing micropropagation protocol in *Pistacia vera* cv. Qazvin: with emphasis on the effect of scopoletin. In: *Proceeding of 1st National conference on the latest scientific research and Pistachios*. Iran, TorbatHeidarrieh University (In Farsi with English abstract).
- Malik A, Kushnoor A, Saini V, Singhal S, Kumar S,**

- and Yadav Y. 2011.** In vitro antioxidant properties of Scopoletin. Journal of chemical pharmaceutical research 3: 659-665.
- McDonald M and Wynne J. 2003.** Adventitious root formation in woody tissue: Peroxidase—A predictive marker of root induction in *Betula pendula*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 39: 234-235.
- Mohammadi AH, Banihashemi Z, and Maftoun M. 2007.** Interaction between salinity stress and Verticillium wilt disease in three pistachio rootstocks in a calcareous soil. Journal of plant nutrition 30: 241-252.
- Molassiotis AN, Dimassi K, Therios I and Diamantidis G. 2003.** Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) explants in vitro. Biologia Plantarum 47: 141-144.
- Morgan DP, Epstein L and Ferguson L. 1992.** Verticillium wilt resistance in pistachio rootstock cultivars: assays and an assessment of two interspecific hybrids. Plant disease 76: 310-313.
- Murashige T and Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Nezami AE, Garoosi GA, and Haddad R. 2010.** The effect of PGRs on in vitro shoot multiplication of GF677 hybrid (*Prunus persica* × *P. amygdalus*) rootstock on GNH medium. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding 1.
- Onay A. 2000.** Micropropagation of pistachio from mature trees. Plant cell, tissue and organ culture 60: 159-163.
- Padmarajaiah N, Anantharaman S and Ashwinee K. 2009.** Development and Evaluation of Kinetic Spectrophotometric Assays for Horseradish Peroxidase by Catalytic Coupling of Paraphenylenediamine and Mequinol. Analytical Sciences 25: 1243-1248.
- Rashid A and Street HE. 1973.** The development of haploid embryoids from anther cultures of *Atropa belladonna* L. Planta 113: 263-270.
- Rehman K, Yaqub M, Sheikh M and Arshad M. 1999.** Extraction and evaluation of peroxidases from various vegetable sources. Int. J. Agri. Biol 1: 170-173.
- Roberts J and Hooley R. 1988.** Plant growth regulators: Blackie and Son Ltd.
- Schnabelrauch LS, Kieliszewski M, Upham BL, Alizadeh H and Lamport D. 1996.** Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val—Tyr—Lys as putative intermolecular cross link site. The Plant Journal 9: 477-489.
- Singh M and Kirkoran AD. 1980.** Chelated iron in culture media. Annals of Botany 46: 807-809.
- Singh S and Syamal M. 2000.** Anti-auxin enhances *Rosa hybrida* L. micropropagation. Biologia plantarum 43: 279-281.
- Tang W and Newton R. 2005.** Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. Plant Physiology and Biochemistry 43: 760-769.
- Vatankhah E, Niknam V and Ebrahimzadeh H. 2010.** Activity of antioxidant enzyme during in vitro organogenesis in *Crocus sativus*. Biologia plantarum 54: 509-514.