مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره دوم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۲
صفحه ۱۴۴-۱۳۵

اثر آنتی‌اکسیدانی برخی القا کننده‌های نوساقه‌زایی و ریشه‌زایی در پسته (*Pistacia vera*، پایه‌های رویشی قزوینی و UCB-1) در شرایط درون‌شیشه

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 نظامی‌آلانق[۳]

Sara maleki[1], Ghasemali Garoosi[2*], Raheem Haddad[2] and Esmaeil Nezami Alanogh[3]

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی،دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام‌خمینی (ره)، قزوین، ایران

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۳- کارشناس‌ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی 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

پایه‌های رویشی پسته قزوینی و UCB-1 از ارقام شناخته‌شده در دنیا هستند که به‌لحاظ سازگاری به خشکی و شوری (قزوینی) و سرما و بیماری‌های ورتیسلیومی (UCB-1) دارای اهمیت هستند. به منظور بهبود کیفیت رشد رویشی و میزان ساقه‌زایی و همچنین افزایش راندمان ریشه‌زایی، اثر اسکوپولتین و منبع آهن (Fe-EDDHA و Fe-EDTA) همراه با پژوهش تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز بررسی‌شد. همچنین بررسی خصوصیت‌های کینتیک با استفاده از مقادیر مختلف کاتیون‌های Ca_2+، Mg_2+ و دماهای متفاوت و همچنین اثر غلظت‌های مختلف EDTA بر فعالیت این آنزیم هدف دیگر این پژوهش بود. نتایج نشان داد که اسکوپولتین ضمن افزایش میزان نوساقه‌زایی و بهبود کیفیت رشد رویشی، در فعالیت آنزیم پراکسیداز نقش مؤثری ایفا کرد که اختلاف معنی‌داری در سطح α=0.05 با تیمار شاهد داشت. جایگزینی Fe-EDDHA با Fe-EDTA در محیط کشت، راندمان ریشه‌زایی را تا دو برابر افزایش داده و یک رابطه مستقیم بین میزان ریشه‌زایی و فعالیت آنزیم پراکسیداز دیده‌شد، بنابراین فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌تواند به‌عنوان نشانگر پیش‌بینی‌کننده ریشه‌زایی در پسته مورد توجه باشد. بررسی فعالیت کینتیک آنزیم پراکسیداز بیانگر نقش مثبت کاتیون‌ها، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای بهینه فعالیت آنزیم و اثر بازدارندگی EDTA روی فعالیت این آنزیم بود.

واژه‌های کلیدی

اسکوپولتین
پسته
پراکسیداز
ریشه‌زایی
نوساقه‌زایی
Fe-EDDHA

مقدمه

پایه رویشی پسته قزوینی (*Pistacia vera cv. Qazvini*) به‌عنوان یکی از ارقام با ارزش مقاوم به شوری و سازگار به کشت در مناطق خشک و نیمه‌خشک است (Mohammadi *et al*. 2007 ; Morgan et al. 1992) و UCB-1 (*Pistacia atlantica* × P. *intergerrima*) نیز از پایه‌های هیبرید رویشی شناخته‌شده در دنیا است که به‌لحاظ مقاومت به سرما و پژمردگی ورتیسیلیومی (*Verticillium sp.*) دارای اهمیت است (Morgan *et al*. 1992). تکثیر پسته با استفاده از روش‌های مرسوم از قبیل کشت بذر، قلمه زدن و خوابانیدن، به دلیل بالا بودن میزان هتروزیگوسیتی، سخت ریشه‌زا بودن و آلودگی به بیماری‌های باکتریایی و قارچی بسیار سخت و هزینه‌بر است (Onay. 2000). در این راستا بیوتکنولوژی گیاهی توانسته است با غلبه برمشکلات یاد شده به‌عنوان جایگزین مناسبی برای تکثیر این درختان باشد (Abousalim and Häggman. 2007; Onay. 2000 ; Dolcet-Sanjuan and Claveria. 1995; Jain Mantell. 1994 and). با وجود این، نوساقه‌زایی پسته در شرایط درون‌شیشه (*in- vitro*) همواره با مشکلاتی از جمله سوختگی سرشاخه (shoot tip necrosis (STN))، آبکی شدن نوساقه‌های 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). پژوهش‌های اولیه نشان‌داد که استفاده از آنتی‌اکسین به‌واسطه تعدیل اکسین داخلی و خارجی می‌تواند فرآیندهای مورفولوژنتیکی در شرایط درون‌شیشه را در کشت‌های کالوس گوجه‌فرنگی و جو بهبود بخشد (Jelaska *et al*. Cassells. 1979 ; 1984). اسکوپولتین (نوعی آنتی‌اکسیدانت با ترکیبی طبیعی) احتمال دارد با کلاته کردن اکسین تولید شده در راس ساقه‌ها و جوانه‌های انتهایی و در نهایت با کنترل غالبیت انتهایی باعث فعال شدن جوانه‌های جانبی می‌شود (Imbert and Wilson. 1970; Malik *et al*. 2011). بدین‌منظور استفاده از این ماده با هدف افزایش نوساقه‌زایی به‌واسطه کنترل غالبیت انتهایی و همچنین اثر دنباله آن در رفع نارسایی‌های 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 درفرآیندهای متعدد رشدی از جمله سنتزکلروفیل و دی.ان.ای و هورمون‌های رشدی به‌خوبی روشن شده است (Dunlap and Robacker. 1988). با توجه به این‌که آهن موجود در محیط کشت MS (Murashige & Skoog) حاوی آهن به‌شکل کلاته (Fe-EDTA) است (Murashige and Skoog. 1962)، سینگ و کریکوریان (۱۹۸۰) نشان دادند که غلظت توصیه شده Na2EDTA (۳۷/۳ میلی‌گرم بر لیتر) بیش از اندازه مورد نیاز برای کلاته کردن Fe^{2+} ($FeSO_4.7H_2O$=27.8 mg/L) است؛ به طوری‌که مقدار مازاد این ماده می‌تواند اثر سو روی دسترسی سایر کاتیون‌های دوظرفیتی توسط گیاه داشته باشد (Singh and Kirkoran. 1980) از طرف دیگر، براساس یافته‌های دیگران، جایگزینی Fe-EDDHA با Fe-EDTA اثر فزاینده‌ای در ریزازدیادی گونه‌های مختلفی داشته است (Antonopoulou *et al*. Molassiotis *et al*. 2003, Rashid and Street. 19732007 ;)؛ با وجود این براساس دانسته‌های ما اطلاعاتی در ارتباط با نقش این ماده در ریشه‌زایی پسته وجود ندارد. از سوی دیگر پراکسیدازها (EC 1.11.1.7) هموپروتئین‌هایی با حلقه پورفیرینی آهن هستند که کاتالیز رادیکال‌های آزاد ناشی از تجزیه پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) را بر عهده دارند (Brill. 1966). پژوهش‌های انجام شده روی این گروه از اکسیدازها به نقش کلیدی آن‌ها در واکنش‌های متعددی از جمله به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت رادیکال‌های آزاد، دخیل بودن در رشد و نمو گیاهی، تنظیم هورمون‌های رشدی، کنترل ساز و کار دفاعی و کنترل رشد طولی سلول‌ها اشاره داشته‌اند (Jackson *et al*. 2001; Schnabelrauch *et al*. Campa. 1991 ; 1996). امروزه گزارش‌های معدودی از پژوهش‌های انجام شده از خصوصیت‌های کینتیک آنزیم‌های پراکسیداز موجود در گیاهان عالی در دسترس است (Padmarajaiah *et al*. 2009) و تلاش‌ها در این راستا برای شناسایی هرچه بیشتر ویژگی‌های کینتیک این گروه از آنتی‌اکسیدانت‌ها و همچنین یافتن ارتباط بین تغییرهای مورفولوژی قابل مشاهده مانند نوساقه‌زایی، جنین‌زایی و ریشه‌زایی با فعالیت آنزیم‌های کلیدی درگیر در این فرآیندها مانند

پراکسیداز، با هدف معرفی این آنزیم‌ها به‌عنوان نشانگرهای پیش‌بینی کننده (Predictive markers) (Gaspar *et al.* 1992) کماکان مورد توجه پژوهشگران است. براساس فرضیه بنسون (۲۰۰۱) تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) در گیاهان در شرایط درون‌شیشه مرتبط با مقاومت گیاه در برابر تمایز، رشد و نمو (plant recalcitrance) است (Benson. 2000)؛ در حالی‌که تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد می‌تواند منجر به تنش‌های اکسیداتیو و در نهایت مرگ سلولی شود (Vatankhah *et al.* 2010). از سوی دیگر براساس گزارش‌های موجود به دلیل وجود تنش‌های اکسیداتیو حاصل از رشد و نمو، الگوی فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان در طول این فرآیندها به طور هوشمندانه با هدف حفظ سلول‌ها از تنش‌های حاصله تغییر می‌یابد (Gupta and Datta. 2003; Libik *et al.* 2005; Tang and Newton. 2005). در این پژوهش اثر اسکوپولتین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت طبیعی در نوساقه‌زایی و همچنین اثر منبع آهن (Fe-EDTA و Fe-EDDHA) در ریشه‌زایی همراه با تغییرهای ایجاد شده در سطح فعالیت آنزیم پراکسیداز و همچنین خصوصیت‌های کینتیک این آنزیم با استفاده از برخی کاتیون‌های دو ظرفیتی، تغییرات دما و EDTA مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این پژوهش از نوساقه‌های درون‌شیشه‌ی پایه‌های رویشی پسته قزوینی و UCB-1 که قبلاً در شرایط درون‌شیشه در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) استقرار یافته بود (Delijam. 2013)، استفاده شد. تمام آزمایش‌ها بر روی هر دو پایه انجام و از آن‌ها یادداشت‌برداری شد. زیرکشت (sub-culture) ریز نمونه‌ها هر سه تا چهار هفته یک‌بار در محیط کشت GNH (Garoosi, Nezami & Haddad) (Nezami A *et al.* 2010) حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۳ درصد ساکارز، و ۰/۵۷ درصد آگار که پس از تنظیم pH:۵/۷ اتوکلاو شده بود، انجام شد. کشت‌ها در اتاق رشد تحت شرایط محیطی با دمای دو درجه سانتی‌گراد± ۲۵ و ۱۶/۸ ساعت تاریکی بر روشنایی با لامپ‌های فلورسنت با شدت نور 65µmol.m-2.s-1 نگهداری شدند (Nezami A *et al.* 2010). یادداشت‌برداری‌ها بعد از یک مرتبه زیرکشت در تیمارهای مربوطه انجام‌شد.

اثر اسکوپولتین در نوساقه‌زایی پسته و فعالیت آنزیم پراکسیداز: به‌منظور بررسی اثر اسکوپولتین به‌عنوان یک آنتی‌اکسین (در غلظت‌های پایین) روی کیفیت رشد و میزان نوساقه‌زایی، اثر آن در غلظت‌های ۰/۰ و ۳/۰ میلی‌گرم در لیتر به‌طور جداگانه با استفاده از محیط کشت GNH، مورد پژوهش قرارگرفت. اسکوپولتین با فیلتر استریل و بعد از اتوکلاو شدن محیط کشت به آن اضافه شد. بعد از گذشت ۲۱ روز از اعمال تیمار، صفت‌هایی مانند تعداد نوساقه‌های کل و سالم، وزن‌تر (fresh weight) کل و سالم تولیدی و میزان رشد طولی یادداشت‌برداری شدند. به‌ازای هر تیمار چهار شیشه مربای ۱۸۰ میلی‌لیتری با درب‌کریستالی حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت (به‌عنوان تکرار) و در هر تکرار چهار ریزنمونه کشت شد. به‌منظور بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز نمونه‌برداری (سه تکرار به‌ازای هر تیمار) در پنج فاصله زمانی (۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت، ۱۵ و ۳۰ روز بعد از کشت) انجام گرفت.

اثر منبع آهن روی ریشه‌زایی پسته و فعالیت آنزیم پراکسیداز: به‌منظور ریشه‌زایی، پایه‌ی نوساقه‌های رشد یافته (با طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر) به‌مدت ۱۰ دقیقه در داخل ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام هورمون NAA فرو برده شده (پالس هورمونی) (Delijam. 2013) و سپس به منظور بررسی اثر نوع آهن روی راندمان ریشه‌زایی، نوساقه‌های پیش‌تیمار 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 میلی‌گرم در لیتر Fe-EDDHA (Antonopoulou *et al.* 2007) منتقل و بعد از اعمال هفت روز تاریکی در دمای دو درجه‌سانتی‌گراد±۲۵، به‌شرایط نوری ۱٦/۸ ساعت تاریکی بر روشنایی با لامپ‌های فلورسنت با شدت نور 65 µmol.m-2.s-1 منتقل و در دمای یاد شده نگهداری شدند. به‌ازای هر تیمار پنج شیشه مربای ۱۸۰ میلی‌لیتر با درب‌کریستالی حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت (تکرار) و در هر تکرار چهار ریزنمونه کشت و به منظور بررسی تغییرهای آنزیم پراکسیداز (۳ تکرار به‌ازای هر تیمار) نمونه‌برداری از هفته دوم تا پنجم بعد از

کشت با فاصله زمانی هفت روزه انجام شد. همچنین صفت‌های درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه به‌ازای هر گیاهچه، طول ریشه‌های تشکیل شده و قطر تقریبی ریشه در هفته چهارم یادداشت برداری شد.

ویژگی‌های کینتیک آنزیم پراکسیداز: نمونه‌برداری از نوساقه‌های (۲۱ روزه) رشدیافته در شرایط درون‌شیشه برای بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز انجام و بلافاصله پس از افزودن ۰/۰۲ گرم پلی‌ونیل‌پیریدن (PVP) به‌ازای ۲۰۰ میلی‌گرم وزن‌تر، نمونه‌ها در داخل هاون‌چینی حاوی نیتروژن‌مایع و بافر استخراج (۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات‌پتاسیم (pH:۷) و یک میلی‌مولار سدیم‌متابای‌سولفیت) هموژنیز شوند. عصاره به‌دست آمده به‌مدت ۲۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۰۰۰۰ گرم سانتریفیوژ (Hermel Z36) و به دنبال آن محلول‌رویی حاصل جهت بررسی‌های آنزیمی بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان تغییرهای فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور یون‌های منیزیم (Mg_2+) و کلسیم (Ca_2+)، هر دو در غلظت‌های (۰/۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰ و ۵۰ میلی‌مولار) با استفاده از سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش (محلول ۱۰۰ میلی‌مولار گوئیکول، ۱۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات‌پتاسیم (pH:۷)، ۷۰ میلی‌مولار پراکسیدهیدروژن به‌همراه ۲۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده) مورد پژوهش قرار گرفت. به منظور مشخص شدن دمای بهینه فعالیت آنزیم، مخلوط واکنش در دماهای ۲۰، ۳۰، ٤۰، ۵۰، ٦۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه نگهداری و سپس تغییرهای فعالیت آنزیمی بررسی‌شد. درنهایت به منظور بررسی میزان اثر بازدارندگی EDTA روی آنزیم مورد بررسی، این ماده در مقادیر ۰/۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰ و ۵۰ میلی‌مولار به‌کار برده‌شد.

سنجش پروتئین کل: سنجش غلظت پروتئین طبق روش بردفورد (۱۹۷٦) با استفاده از سرم آلبومین گاوی جهت رسم منحنی استاندارد صورت گرفت (Bradford. 1976). بدین‌منظور ۹۸۰ میکرولیتر از محلول بردفورد ۲۰ درصد با ۲۰ میکرولیتر از هرکدام از عصاره‌های استخراج شده در کیوت شیشه‌ای یک میلی‌لیتری مخلوط و غلظت پروتئین در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری (UV-3200 Labomed) UV- visible اندازه‌گیری شد.

سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز: سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تمامی آزمایش‌ها مطابق روش تغییریافته چنس و ماهتی (۱۹۵۵) با استفاده از سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش (۱۰۰ میلی‌مولار گوئیکول، ۱۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات‌پتاسیم (pH:۷)، ۷۰ میلی‌مولار پراکسیدهیدروژن به‌همراه ۲۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده) به‌مدت ٤ دقیقه در طول موج ٤۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری (UV-3200 Labomed) UV- visible اندازه‌گیری شد (Chance and Maehly. 1955).

تجزیه و تحلیل آماری: محاسبات آماری و رسم نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزارهای Excel و SAS 9.1 انجام شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح α=0.05 استفاده شد.

نتایج و بحث

اثر اسکوپولتین در نوساقه‌زایی پسته و فعالیت آنزیم پراکسیداز: به منظور بررسی اثر اسکوپولتین روی میزان نوساقه‌زایی و همچنین بهبود کیفیت رشدی، این ماده در دو غلظت ۰/۰ (شاهد) و سه میلی‌گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش همراه با یادداشت‌برداری فاکتورهای رشدی مانند میزان نوساقه‌زایی کل و سالم، وزن‌تر تولیدی و رشد طولی نوساقه‌ها، تغییرهای فعالیت آنزیم پراکسیداز در بازه زمانی کوتاه مدت (٢٤ 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 معنی‌داری در میزان نوساقه‌زایی کل (٤/۲ و ۲/٦) و همچنین نوساقه‌های سالم (بهبود کیفیت رشد: کاهش سرسوختگی، کالوس پایه و آبکی شدن نوساقه‌های رشد یافته) (٤/۱۲۵ و ۲/٤٦) به ترتیب در هر دو پایه رویشی قزوینی و UCB-1 شد. نتایج همچنین بیانگر نقش منفی اسکوپولتین در رشد طولی پایه رویشی قزوینی (۲/۵۳٤ سانتی‌متر) و عدم اختلاف معنی‌دار (با وجود افزیش جزیی رشد طولی) در پایه هیبرید رویشی UCB-1 بود (جدول ۱). با توجه به اثبات خاصیت آنتی‌اکسینی اسکوپولتین در مقادیر ۲/۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر (Imbert and Wilson 1970)، گزارش‌های ارایه شده توسط دیگران در هماهنگی با نتایج این پژوهش بیانگر اثر استفاده از آنتی‌اکسین‌ها

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

در ارتباط با اثر اسکوپولتین روی فعالیت آنزیم پراکسیداز نکات زیر به‌دست آمده است: ۱) فعالیت آنزیم پراکسیداز در ۲٤ ساعت بعد از کشت در شرایط کنترل (فاقد اسکوپولتین) در پایه‌های رویشی قزوینی و UCB-1 به‌ترتیب معادل ۰/۷٦۸ و ۰/۷۸٤ (واحد= U/mg protein) بود، که بعد از کاهش محسوس در مدت ٤۸ ساعت، به‌بیشترین مقدار در مدت ۷۲ ساعت بعد از کشت (زمان ظهور جوانه‌های رویشی) (۱/۰٤۸ و ۱/۵۱۱ واحد) رسید. فعالیت آن بعد از ۱۵ روز (رشد ۱/۵ تا ۲/۰ سانتی‌متری نوساقه‌ها) کاهش معنی‌داری (۰/۲۳٦ و ۰/۱۸) داشت که در نهایت در اواخر دوره رشدی (۳۰ روز بعد از کشت) به‌ترتیب در هر دو پایه رویشی به ۰/۵۹۲ و ۰/۵٦۹ رسید. ۲) پس از اعمال تیمار اسکوپلتین (در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر)، فعالیت آنزیم پراکسیداز در پایه رویشی قزوینی و UCB-1 الگوی متفاوت اما منظمی را نشان داد؛ به طوری‌که در پایه رویشی قزوینی از ۰/۲۷٦ واحد (در مدت ۲٤ ساعت بعد از کشت) به ۰/۷۰٤ 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 جوانه‌زنی (۷۲ ساعت بعد از کشت) در هر دو پایه رویشی قزوینی و UCB-1 قابل مقایسه با هم (به‌ترتیب ۰/۵۰۷ و ۰/۵۱۳ واحد) و در مدت ۱۵ روز بعد از کشت، با اختلاف معنی‌داری بیشتر از شرایط کنترل (۰/۵۳۵ و ۰/٦۰۳ واحد) بود (جدول ۲). دلیل این اختلاف احتمال دارد وابسته به ساز و کارهای مولکولی درون سلولی در هریک از ژنوتیپ‌ها باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد.

جدول ۱- اثر اسکوپولتین روی نوساقه‌زایی در *Pistacia vera* (پایه‌های رویشی قزوینی و UCB-1)

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

پایه‌های رویشی Rootstocks	اسکوپولتین Scopoletin (mg/L)	تعداد نوساقه کل به‌ازای ریزنمونه Total shoot N0. Per explants	تعداد نوساقه سالم به‌ازای ریزنمونه Healthy shoot N0. Per explant	وزن نوساقه کل به‌ازای ریزنمونه (g) Total weight per explant (g)	وزن نوساقه سالم به‌ازای ریزنمونه (g) Healthy weight per explant (g)	رشد طولی به‌ازای ریزنمونه(cm) Growth length per explant (cm)
قزوینی Qazvini	0.00	3.33b	3.08b	1.15b	0.37a	2.53a
	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
	3.00	2.60a	2.46a	0.63a	0.24a	2.44a

داده‌ها میانگین ٤ تکرار با ٤ ریز نمونه به‌ازای هر تیمار بوده و حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح α=0.05 با آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

Means with the different letter within a column are significantly different (α=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* (پایه‌های رویشی قزوینی و UCB-1)

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

پایه‌های رویشی Rootstocks	اسکوپولتین Scopoletin (mg/L)	۲٤ ساعت 24h (U/ mg protein)	٤۸ 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 Qazvini	0.00	0.767	0.304	1.048	0.236	0.592
	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
	3.00	1.071	0.880	0.513	0.603	0.575

داده‌ها میانگین ۳ تکرار هستند.

The values are given the mean of three replications.

جدول ۳- اثر منبع آهن روی ریشه‌زایی در *Pistacia vera* (پایه‌های رویشی قزوینی و UCB-1)

Table 3- Effect of iron source on rooting of *Pistacia vera cv*. Qazvini and UCB-1 rootstocks.

پایه‌های رویشی Rootstocks	منبع آهن Iron source	درصد ریشه‌زایی Rooting percentage	تعداد ریشه‌بازای گیاهچه ریشه‌دار شده Root N0. Per rooted plantlet	طول ریشه به‌ازای ریزنمونه Root length per rooted plantlet (cm)	قطر ریشه Root diameter (mm)
قزوینی Qazvini	Fe-EDTA*	31.25b	1.75b	0.81a	0.70b
	FeEDDHA**	62.50a	6.00a	1.20a	1.70a
UCB-1	Fe-EDTA	62.50b	2.10b	1.49a	0.79a
	Fe-EDDHA	75.00a	4.70a	1.60a	1.00a

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/L

داده‌ها میانگین ٤ تکرار با ٥ ریزنمونه بازی هر تیمار بوده و حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح α=۰/۰۵ با آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

Means with the different letter within a are significantly different (α=0.05), according to Duncan's Multiple Range Test. The values indicate means of four replications with 5 cultures per treatment.

اثر منبع آهن روی ریشه‌زایی پسته و فعالیت آنزیم پراکسیداز:

نوساقه‌های تکثیر شده در محیط کشت نوساقه‌زایی (به طول ۱/۵ تا ۲/۰ سانتی‌متر) بعد از اعمال تیمار اکسین NAA با غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام به‌شیوه پالسینگ به‌مدت ۱۰ دقیقه به محیط کشت‌های GNH حاوی آهن MS (Fe-EDTA) و Fe-EDDHA با غلظت ۱۸۷ میلی‌گرم در لیتر منتقل و راندمان ریشه‌زایی همراه با تغییرهای فعالیت آنزیم پراکسیداز مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل کالوس در نوساقه‌های تیمارشده پس از دو هفته از شروع آزمایش دیده‌شده و ریشه‌های تشکیل‌شده در هفته سوم و چهارم قابل مشاهده‌بودند (داده‌ها نشان‌داده‌نشده‌اند).

نتایج جدول سه نشان می‌دهد که نوع آهن مورد استفاده اثر معنی‌داری در افزایش فاکتورهای ریشه‌زایی مانند درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه تشکیل‌شده به‌ازای گیاهچه داشت به‌طوری‌که استفاده از Fe-EDDHA در پایه‌های رویشی قزوینی و UCB-1 به‌ترتیب منجربه ٦٢/٥ و ٧٥ (درصد ریشه‌زایی)، ٦/٠ و ٤/٧٠ (تعداد ریشه به‌ازای هر نوساقه Fe-EDDHA) و ۱/۲۰ و ۱/٦٠ سانتی‌متر (طول ریشه به‌ازای گیاهچه) شد که اختلاف معنی‌داری در سطح α=۰/۰۵ با شرایط کنترل (آهن MS) داشت. براساس برخی گزارش‌ها، Fe-EDTA محیط کشت MS به‌دلیل رسوب و به دنبال آن کمبود آهن برای استفاده گیاه و همچنین تولید ترکیب‌های سمی، رشد گیاه را با محدودیت مواجه ساخته است (Hangarter and Stasinopoulos. Dalton *et al*. 1983 ; 1991). در این پژوهش راندمان ریشه‌زایی با استفاده از Fe-EDDHA به‌جای Fe-MS، به‌عنوان منبع آهن در هر دو پایه رویشی پسته، افزایش معنی‌داری یافت به‌طوری‌که درصد ریشه‌زایی در پایه رویشی قزوینی از ۳۱/۲۵ به ٦٢/٥ درصد و در پایه هیبرید رویشی UCB-1 از ٦٢/٥ به ٧٥/٠ رسید (جدول ۳). اثر دوچندان Fe-EDDHA نسبت‌به Fe-EDTA روی افزایش راندمان ریشه‌زایی در سایر درختان میوه از جمله هسته‌داران (Molassiotis *et al*. 2003,Antonopoulou *et al*. 2007) تایید کننده نتایج این پژوهش است. به‌عنوان مثال، افزودن ۱۸۷ میلی‌گرم در لیتر Fe-EDDHA به محیط کشت ریشه‌زایی پایه هیبرید رویشی هلو و بادام (GF677) راندمان ریشه‌زایی را در این گیاه از ۳۰ درصد به ۱۰۰ درصد افزایش داد (Antonopoulou *et al*. 2007) یکی از دلایل محتمل در دیده‌شدن اثر بارز Fe-EDDHA روی افزایش میزان ریشه‌زایی دخالت در مسیرهای آنزیمی درگیر در این فرآیند است.

براساس نتایج جدول چهار، بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در مرحله ریشه‌زایی نشان می‌دهد که در حالت کلی فعالیت پراکسیدازی پایه هیبرید رویشی UCB-1 بیش از دو برابر قزوینی است، به‌طوری‌که بیشترین فعالیت آنزیم در این پایه هیبرید رویشی در حضور Fe-EDTA در هفته چهارم ۷/٦١٢ 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 حضورFe-EDTA ۳/٥٤ و در حضور Fe-EDDHA در هفته سوم ۳/۸۳ واحد بود.

جدول ٤- اثر منبع آهن روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در مرحله ریشه‌زایی در *Pistacia vera* (پایه‌های رویشی قزوینی وUCB-1)

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

پایه‌های 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 Qazvini	Fe-EDTA	3.97	2.61	3.54	2.76
	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

داده‌ها 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.

با توجه به این‌که آنزیم پراکسیداز به‌عنوان یک نشانگر پیش‌بینی کننده (Predictive marker) در برخی گیاهان محسوب می‌شود (McDonald and Wynne. 2003,Gaspar *et al*. 1992) بنابراین، با توجه به مشاهده درصد بالای ریشه‌زایی، 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 می‌تواند به‌عنوان نشانگر مولکولی مناسبی در سایر ارقام و پایه‌های رویشی پسته (*Pistacia vera*) قابل بررسی باشد.

خصوصیات کینتیک آنزیم‌پراکسیداز: بررسی‌های کینتیک آنزیم پراکسیداز با استفاده از نوساقه‌های ۲۱ روزه رشدیافته در شرایط درون‌شیشه انجام‌شد. بدین‌منظور اثر یون‌های کلسیم و منیزیم (در غلظت‌های ۰/۰ تا ۵۰ میلی‌مولار)، دما (۲۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد) و همچنین EDTA به‌عنوان بازدارنده فعالیت این آنزیم (در مقادیر ۰/۰ تا ۵۰ میلی‌مولار) مورد بررسی قرارگرفت. براساس نتایج شکل یک، فعالیت آنزیم پراکسیداز در تمامی موارد مورد پژوهش در پایه رویشی قزوینی اختلاف معنی‌داری با پایه هیبرید رویشی UCB-1 داشت.

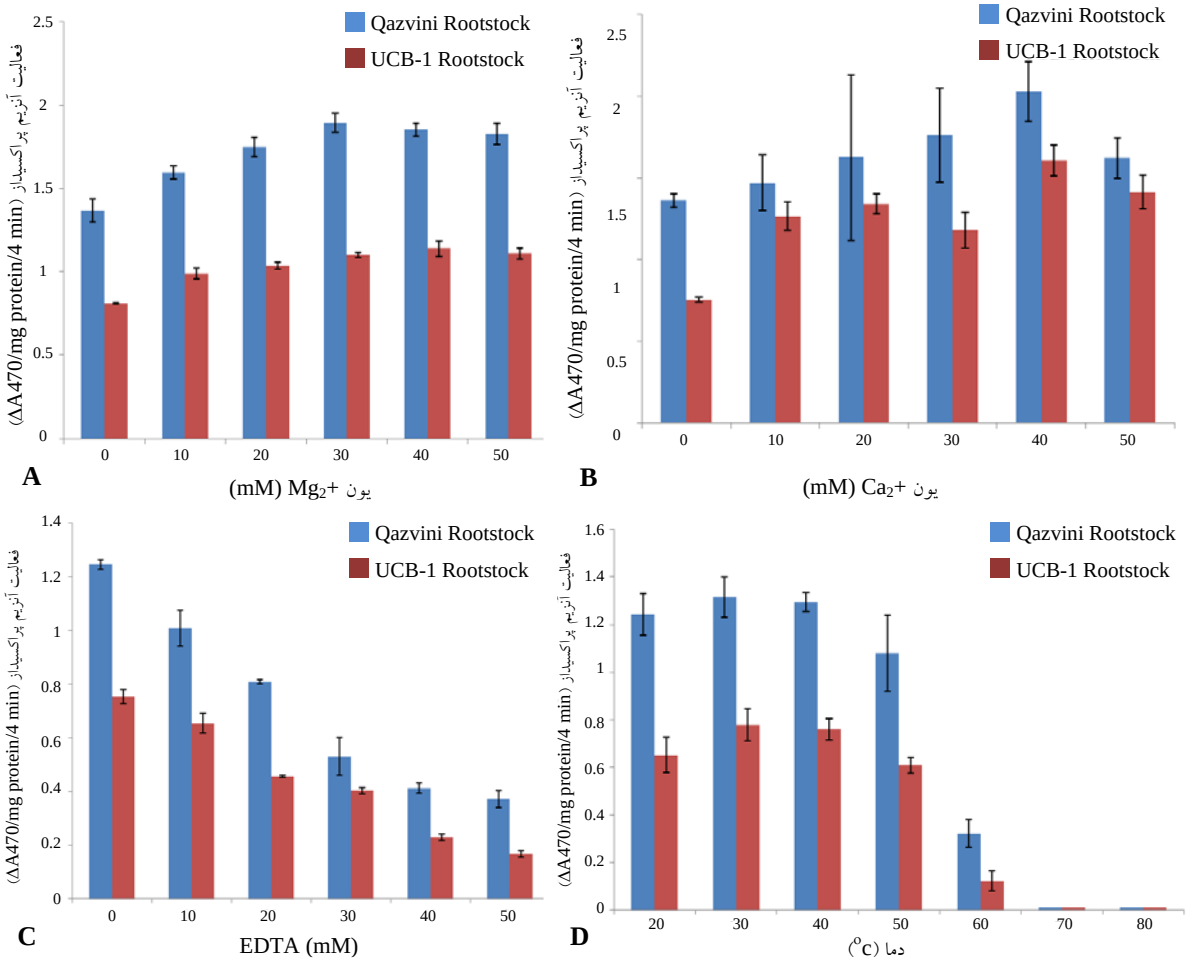
نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در پایه رویشی قزوینی ۱/۸۹۲ و در UCB-1 ۱/۱۳۹ واحد، به‌ترتیب در حضور ۳۰ و ٤۰ میلی‌مولار یون‌منیزیم حاصل شد (شکل 1A) و نتایج ارایه شده در پژوهشی در ارتباط با اثر کاتیون‌های دوظرفیتی در افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز *Phytolacca dioica* (Ombu tree) نیز تایید کننده این موضوع است (Guida *et al*. 2011). در حالی‌که استفاده از ٤۰ میلی‌مولار از یون کلسیم با افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم نسبت به یون‌منیزیم فعالیت آن را به‌ترتیب به ۲/۰۳ و ۱/٦۰ واحد در پایه‌های رویشی افزایش داد (شکل 1-B). استفاده از EDTA در هر دو پایه رویشی مورد پژوهش باعث کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز شد، به‌طوری‌که استفاده از ۵۰ میلی‌مولار EDTA فعالیت آنزیمی را در پایه رویشی قزوینی به ۰/۳۷۲ و در UCB-1 به ۰/۱٦٦ واحد تقلیل داد (شکل 1-C). نتایج به‌دست آمده از اثر دماهای مختلف روی فعالیت آنزیم پراکسیداز بیانگر بیشترین فعالیت آن (۱/۳۱۵ و ۰/۷۷۸) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه) در هر دو پایه رویشی قزوینی و UCB-1 بود (شکل 1D). از آن‌جاکه آنزیم پراکسیداز به‌عنوان یکی از آنزیم‌های پایدار در دماهای بالا شناخته می‌شود (Burnette. 1977) در تایید گزارش‌ما، نتایج ارایه شده توسط دیگران، در بیشتر گونه‌های گیاهی ازقبیل *Solanacea*، *Cruciferacea* و درختان میوه، نیز فعالیت بهینه این آنزیم را بین ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد بیان داشتند (Bania and Mahanta. 2012; Guida *et al*. 2011; Rehman *et al*. 1999).

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که ۱) اسکوپولتین احتمال دارد با کنترل میزان اکسین داخل‌سلولی و اکسین اضافه شده به محیط کشت موجب افزایش میزان نوساقه‌زایی می‌شود. ۲) بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در شاهد نشان داد که فعالیت آن در دوره‌های زمانی مختلف رشد دارای نوسان است؛ به‌طوری‌که، در ابتدای جوانه‌زنی (۷۲- ۲٤ 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 فزونی گذاشت. در حالی‌که در حضور اسکوپولتین تغییرهای

آنزیم پراکسیداز با یک روند منظم کاهشی (در UCB-1) یا افزایشی (در قزوینی) همراه بود. ۳) استفاده از Fe-EDDHA به‌جای Fe-EDTA راندمان ریشه‌زایی را در پایه‌های رویشی مورد پژوهش تا دو برابر افزایش داد. ٤) نتایج بیانگر بالابودن فعالیت آنزیم پراکسیداز و همچنین میزان ریشه‌زایی در پایه هیبرید رویشی UCB-1 نسبت به پایه رویشی قزوینی بود. بنابراین به نظر می‌رسد که بتوان فعالیت این آنزیم را به‌عنوان یک نشانگر پیش‌بینی کننده در *Pistacia vera* معرفی کرد. ۵) افزودن کاتیون‌های منیزیم و کلسیم در مقادیر ۳۰-٤۰ میلی‌مولار (وابسته به‌نوع پایه رویشی) به محیط کشت و تیمار دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم را به بیشترین میزان رساندند درحالی‌که اثر بازدارندگی EDTA روی فعالیت آنزیم محرز بود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) انجام شد که بدین‌وسیله نویسندگان قدردانی خود را اعلام می‌کنم.



شکل ۱- اثر کاتیون‌های دوظرفیتی Mg_2+ (A)، Ca_2+ (B)، دما (C) و EDTA (D) روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در *Pistacia vera* (پایه‌های رویشی قزوینی و UCB-1). داده‌ها با میانگین ۳ تکرار ± 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 ± 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 reseach 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 Molecurar 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, Alizedeh 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.