نشریه پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران، شماره پیاپی ۳۲، سال هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲/صفحات: ۲۰-۱۲

ارزیابی اثر قارچ میکوریزای *Glomus etunicatum* بررنگیزه‌های فتوسنتزی و خصوصیات آنتی اکسیدانی گیاهچه‌های پروانش (*Catharanthus roseus* L.) باززایی شده طی شرایط سازگاری

سمانه رحمت‌زاده[۱]، جلیل خارا[۲]، سیدکمال کاظمی‌تبار*[۳]

[۱] دانش‌آموخته دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه

[۲] استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه

[۳] دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۱ **تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۸**

چکیده

پروانش (*Catharanthus roseus* L. var G. Don) یکی از گیاهان دارویی و زینتی مهم بوده و حاوی آلکالوئیدهایی ضدتومور می‌باشد که در سال‌های اخیر، تلاش‌های زیادی جهت کشت این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای صورت گرفته است. از سوی دیگر، قارچ‌های میکوریزای آربوسکولار یک همزیست‌های اجباری با اغلب گیاهان خاکزی می‌باشند. در این مطالعه، اثر قارچ میکوریز *Glomus etunicatum* بر محتوای رنگیزه‌ای فتوسنتزی و سیستم آنتی‌اکسیدانی پس از طی فرآیند سازگاری در گیاهان پروانش باززایی شده مورد بررسی قرار گرفت. گیاهچه‌های باززایی شده، از کشت ریزنمونه‌های قطعات گره‌ای در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ غنی‌شده با مقادیر مختلف هورمونی به‌دست آمد. ۳ ماه پس از طی دوره سازگاری این گیاهچه‌ها تحت آنالیز قرار گرفتند. نتایج بیانگر محتوای بالاتر کلروفیل a، b، کاروتنوئیدها، پرولین و ترکیبات فنولی و همچنین فعالیت بالای آنزیم پراکسیداز در گیاهان همزیست در مقایسه با گیاهان شاهد غیرمیکوریزایی بود که به استثنای محتوای پرولین و کلروفیل b در کلیه پارامترها تفاوت معنی‌داری را نشان دادند.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پروانش، سازگاری، کلروفیل، میکوریزا.

مقدمه

Catharanthus roseus L. var G.Don یا گیاه پروانش یکی از گیاهان دارویی مشهور متعلق به خانواده خرزهره *Apocynaceae* می‌باشد (Faheem et al., 2011). این گیاه از قدیم برای درمان تعداد زیادی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Talaat et al., 2005). پروانش یکی از گیاهان طبی و دارویی است که بیشترین تحقیقات بر روی آن انجام شده است. مطالعات نشان داده است که گیاه پروانش حاوی مقادیر بالایی از آلکالوئیدهای ایندولی می‌باشد که تاکنون بیش از ۱۰۰ آلکالوئید از این گیاه استخراج شده است. ریشه‌ها به صورت عمده حاوی آلکالوئیدهای آجمالیسین و سرپنتین می‌باشند که در درمان بیماری‌های مرتبط با جریان خون مصرف می‌گردد. مهم‌ترین آلکالوئیدهای این گیاه شامل وین بلاستین و وین کریستین است که به‌عنوان داروهای ضدتوموری به کار می‌روند. تحقیقات نشان داده است که این آلکالوئیدها میوز را در مرحله متافاز متوقف

*نویسنده مکاتبه: samane_rahmatzade@yahoo.com

کرده و با اتصال به توبولین‌ها مانع از تشکیل دوک تقسیم می‌شوند و در نتیجه می‌توانند به‌عنوان ترکیبات ضدسرطان مورد استفاده قرار گیرند (Kalidass et al., 2010). این ترکیبات دارویی ارزشمند در مقادیر بسیار اندک (۰/۰۰۰۳ درصد وزن خشک) تولید می‌شوند. با توجه به قیمت بالای این ترکیبات و مقادیر اندک آنها در این گیاه، تلاش در جهت توسعه استراتژی‌های جایگزین برای تولید این ترکیبات، منجر به تحقیقات وسیع بر روی این گیاه شده است (Kalidass et al., 2010).

روش‌های مختلف کشت در شیشه گیاه پروانش، منابع جدیدی از مواد گیاهی را برای تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای نظیر آلکالوئیدهای ایندولی فراهم می‌سازد. نشان داده شده است که کشت اندام‌های گیاهی به‌عنوان بافت‌های تمایز یافته از نظر مورفولوژیک، بیشترین متابولیت‌های ثانویه را تولید کرده و این ترکیبات دارای بیشترین ثبات ژنتیکی می‌باشند (Pietrosiuk et al., 2007). تکنیک‌های کشت بافت امکان تولید سریع با کیفیت بالا، فاقد بیماری و مواد گیاهی یکنواخت را در مدت زمان نسبتاً کوتاه ایجاد می‌نماید (Kapoor et al., 2008). باززایی گیاهان از یک سلول و یا اندام گیاهی، از قابلیت‌های کشت بافت می‌باشد که با کشف هورمون‌های گیاهی امکان‌پذیر گردید. توانایی باززایی گیاه از یک سلول منفرد برای دست‌ورزی ژنتیکی موجودات حائز اهمیت است. اما برای بسیاری از گونه‌ها، مهم‌ترین چالش کشت بافت و باززایی، فرایند سازگاری می‌باشد (Moraes et al., 2004). این مسئله به‌صورت عمده ناشی از ناتوانی این قبیل گیاهان نسبت به تحمل انواع مختلف تنش‌ها، نظیرشوک ناشی از انتقال گیاه، از دست رفتن آب، حمله پاتوژن‌ها، فتوسنتز ضعیف و غیره می‌باشد (Krishna et al., 2005). علاوه بر این نشان داده شده است که وضعیت بیوشیمیایی و فعالیت‌های آنزیمی تحت تنش‌های ناشی از شوک انتقال از محیط درون شیشه‌ای به خارج شیشه‌ای در گیاهچه‌های باززایی شده تغییر می‌یابد (Krishna et al., 2005, Kapoor et al., 2008).

قارچ‌های میکوریزای آربوسکولار به‌دلیل توانایی در افزایش قدرت گیاه از طریق بهبود جذب آب و مواد معدنی، خصوصا فسفر، شناخته شده می‌باشند. همزیستی میکوریزایی شامل اجتماعاتی میان قارچ‌های راسته Glomales و ریشه گیاهان خاکزی می‌باشد. این ارتباطات همزیستی، نوعی رابطه همیاری دو جانبه می‌باشد که در آن از یک سو گیاه میزبان کربن مورد نیاز قارچ را از طریق ترکیبات فتوسنتزی فراهم ساخته، در حالی که قارچ‌ها به گیاهان در جذب فسفر و سایر ترکیبات معدنی از خاک یاری می‌رسانند (Gadkar et al., 2001).

تلقیح موفق گیاهان با قارچ‌های میکوریزا در آغاز دوره سازگاری یا حتی در طول شرایط در شیشه نشان داده شده است. قارچ‌های میکوریز می‌توانند از طریق توسعه یک سیستم ریشه‌ای وسیع، افزایش کارایی فتوسنتزی و ظرفیت هدایت آب، افزایش جذب عناصر غذایی، دفع پاتوژن‌های خاکی و در نهایت تخفیف تنش‌های محیطی موجب افزایش قدرت حیات گیاهان طی فرایند سازگاری شوند (Kapoor et al., 2008). اثر قارچ‌های میکوریز بر میزان ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانت در گیاهان *Vitis vinifera* L. ریزازدیادی شده طی سازگاری توسط Krishna و همکارانش در سال ۲۰۰۵ گزارش شده است.

هدف از این مطالعه، بررسی اثر قارچ‌های *Glomus etunicatum* بر محتوای پرولین، ترکیبات فنلی و همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز طی ایجاد تنش‌های ناشی از انتقال گیاهچه‌های باززایی شده پروانش به شرایط خارج شیشه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شرایط باززایی: جهت انجام باززایی گیاه پروانش از ریزنمونه‌های قطعات گره‌ای حاصل از گیاهچه‌های استریل رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای و محیط MS استفاده شد. به‌منظور استریل سازی بذرهای گیاه پروانش، بذرها ابتدا به‌مدت ۳۰ دقیقه در آب خیسانده شده و سپس در اتاقک کشت استریل به مدت ۳۰ ثانیه در معرض اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند. پس از آن بذرها با آب مقطر اتوکلاو شده چندین بار شسته شده و الکل اضافی از آن زدوده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه به وسیله محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد حاوی چند قطره توین ۲۰ ضدعفونی شدند. جهت به‌دست آوردن گیاهچه استریل، بذور استریل شده در محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) بدون هورمون که pH آن توسط NaOH یک نرمال بر روی عدد ۵/۵ تنظیم شده بود، کشت شدند. محیط کشت مورد استفاده جهت شاخه‌زایی ریز نمونه‌ها شامل، محیط کشت MS غنی‌شده با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۷ گرم بر لیتر آگار و هورمون‌های NAA(۱mg/l) + BAP (۰/۵mg/l) بود. نمونه‌ها در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و تحت شدت نور ۳۰۰۰ لوکس که توسط لامپ‌های تنگستن و فلورسنت تامین می شد، قرار گرفتند. واکشت نمونه‌ها هر دو هفته یک بار مطابق با شرایط اولیه شاخه زایی صورت گرفت.

پس از شاخه‌زایی نمونه‌ها، گیاهچه‌های حاصل جهت تشکیل گیاهچه‌ی کامل و ریشه‌زایی به محیط کشت ریشه‌زایی شامل محیط کشت MS ۱/۲غنی شده با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۷ گرم بر لیتر آگار و IBA(۰/۱ mg/l) منتقل شدند.

سازگاری گیاهچه‌های حاصل از باززایی: جهت سازگار نمودن گیاهان باززایی شده با شرایط محیط خارج، ابتدا گیاهچه‌های حاصل از باززایی به آرامی از داخل ژل خارج شده با آب ولرم شسته شدند تا از حذف تمامی ذرات آگار اطمینان حاصل شود. سپس گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلدان‌های حاوی پیت: ورمیکولیت: شن (۱:۱:۱) منتقل شدند. در این تحقیق، جهت بررسی نقش قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در سازگاری گیاهان درون شیشه‌ای با محیط خارج، از ۱۰ گرم قارچ میکوریز *Glomus etunicatum* استفاده شد. همچنین، نمونه‌های فاقد میکوریز نیز در گلدان‌های مجزا تحت عنوان نمونه‌های شاهد در نظر گرفته شد. قبل از انتقال گیاهچه‌ها به گلدان‌ها، خاک به خوبی آبیاری و زهکشی شده بود. پس از انتقال گیاهچه‌ها به گلدان، روی گلدان‌ها توسط نایلون پوشیده شد تا رطوبت محیط اطراف گیاه بالا نگه داشته شود. گلدان‌ها به اتاقک کشت (ژرمیناتور) مدل IKH-RH با شدت نور کم و شرایط رطوبتی بالا (۹۶ درصد) منتقل شدند. دمای اتاقک کشت در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شد. پس از گذشت ٤ هفته گیاهان به شرایط نوری بالاتر و رطوبت پایین‌تر منتقل شدند. پس از گذشت ۵ هفته درصد حیات در گیاهان سازگاری یافته بر اساس تعداد گلدان‌های دارای نمونه‌های زنده مورد ارزیابی قرار گرفت (Krishna et al., 2005). آزمایش به‌صورت طرح بلوک‌های تصادفی و در ٤ تکرار انجام شد.

اندازه‌گیری محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی: محتوای کلروفیل a، b و کاروتنوئیدهای برگ با استفاده از روش Lichtenthaler و Wellburn (۱۹۸۳) مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا ۰/۵ گرم از بافت تر برگ توسط استون استخراج شده و جذب نمونه‌ها در ٤۷۰، ٦٤۵ و ٦٦۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر JENUS مدل UV-1200 اندازه‌گیری شد. در پایان، محتوای کلروفیل‌های a وb و کاروتنوئیدها با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد:

$$Chl_a = 11.75\ A_{662} - 2.350 A_{645}$$
$$Chl_b = 18.61\ A_{645} - 3.960\ A_{662}$$
$$Carotenoids = (1000\ A_{470} - 2.270\ Chl_a - 81.4\ Chl_b) / 227$$

اندازه‌گیری محتوای فنل کل: محتوای فنل کل اندام هوایی با استفاده از روش Matta و همکارانش (۱۹٦۹) اندازه‌گیری شد. ابتدا ۰/۱ گرم از بافت‌تر اندام هوایی توزین شده و در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد قرار گرفته و به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتانول ۸۰ درصد جوشانده شد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. محلول فوقانی جدا شده و حجم آن توسط اتانول ۸۰ درصد به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. به ۲/۵ میلی‌لیتر از این محلول ۲/۵ میلی‌لیتر فولن رقیق شده با آب (۳:۱) و ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم اشباع افزوده شد. لوله‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاهی نگه داشته شده و پس از آن به‌مدت ۱۵ دقیقه در ٤۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. پس از گذشت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ، جذب محلول بالایی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٦٤۰nm خوانده شد. برای به‌دست آوردن غلظت ترکیبات فنلی از منحنی استاندارد تهیه شده به سیله کاتکول در غلظت‌های مختلف ۰، ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد.

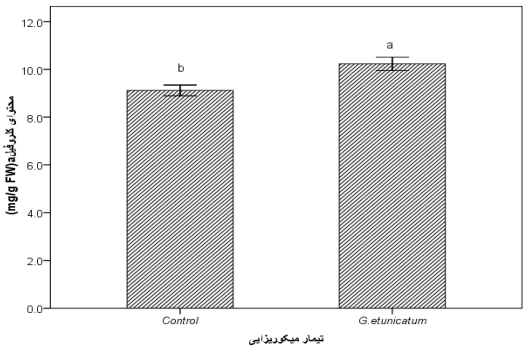
اندازه‌گیری میزان پرولین: محتوای پرولین اندام هوایی گیاهان پروانش باززایی شده پس از طی دوره سازگاری با استفاده از روش Bates و همکارانش (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. ۰/۲ گرم ازبافت تر بخش‌های هوایی در ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد ساییده و یک میلی‌لیتر از عصاره حاصل با ۱ میلی‌لیتر اسید نین هیدرین و یک میلی‌لیتر اسید استیک خالص ترکیب شد. لوله‌های آزمایش به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه حمام آب گرم قرار گرفتند و بلافاصله پس از خارج شدن ازحمام آب گرم به ظروف حاوی آب یخ منتقل شدند. در این مرحله به هر لوله آزمایش ۲ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شده و بخش بالایی دارای تولوئن توسط سرنگ از بخش پایین جدا شد. در نهایت میزان جذب بخش بالایی در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از شاهد (تولوئن) توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز: جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز اندام هوایی گیاهچه‌های پروانش، روش Koroi و همکارانش (۱۹۸۹) مورد استفاده قرار گرفت. بدین‌منظور، یک گرم از اندام هوایی در ٤ میلی لیتر محلول عصاره‌گیری شامل ۱/۲ گرم تریس، ۲ گرم آسکوربیک اسید، ۳/۸ گرم بوراکسی (دی‌سدیم تترا بورات)، ۵۰ گرم پلی‌اتیلن گلیکول، ۲ گرم EDTA ساییده شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در ٤۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. بر روی ۲ میلی‌لیتر بافر استات ۰/۲ مولار، ۰/٤ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی‌لیتر بنز یدین، ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی افزوده شد. پس از یک دقیقه جذب آن در طول موج ۵۳۰nm اسپکتروفتومتر خوانده و میزان فعالیت این آنزیم بر حسب جذب در دقیقه در گرم وزن تر بیان شد.

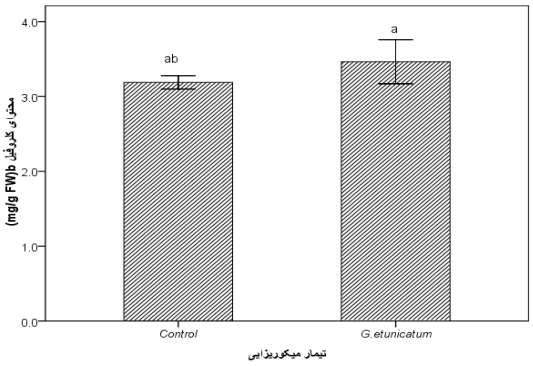
آزمایش به‌صورت طرح بلوک‌های تصادفی و در ٤ تکرار انجام شد. بررسی آماری نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱٦ و آزمون توکی صورت گرفته و تفاوت میان گروه‌ها با کمک خطای استاندارد در سطح ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

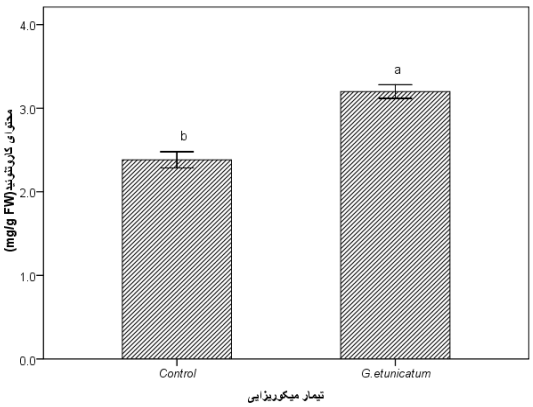
اثر قارچ میکوریزای *Glomus etunicatum* بر رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ گیاه پروانش: بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی در برگ گیاهچه‌های پروانش میکوریزایی و غیر میکوریزایی پس از طی دوره سازگاری نشان داد که محتوای کلروفیل‌های a، b و کاروتنوئیدها در گیاهان همزیست با قارچ میکوریزای *G. etunicatum* به‌ترتیب ۱۰/۸۹، ۷/۹٦ و ۲۵/۵۳ درصد بالاتر از نمونه‌های شاهد بوده که آنالیز آماری صورت گرفته بیانگر تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌های شاهد غیر میکوریزایی و میکوریزایی در محتوای کلروفیل a و کاروتنوئیدها بود، در حالی که محتوای کلروفیل b در نمونه‌های شاهد و همزیست تفاوت آماری معنی‌داری را نشان ندادند (شکل ۱، ۲ و ۳).



شکل ۱. محتوای کلروفیل a برگ گیاهان پروانش میکوریزایی (*G.etunicatum*) و غیرمیکوریزایی (شاهد) پس از سازگاری. مقادیر جدول، میانگین ٤ تکرار± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P<۰/۰۵ است.

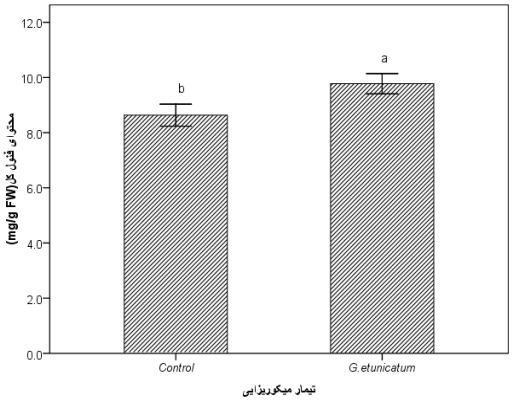


شکل ۲. محتوای کلروفیل b برگ گیاهان پروانش میکوریزایی (*G.etunicatum*) و غیر میکوریزایی (شاهد) پس از سازگاری. مقادیر جدول، میانگین ٤ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P<۰/۰۵ است.



شکل ۳. محتوای کاروتنوئیدهای برگ گیاهان پروانش میکوریزایی (*G.etunicatum*) و غیرمیکوریزایی(شاهد) پس از سازگاری. مقادیر جدول، میانگین ٤ تکرار± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P<۰/۰۵ است.

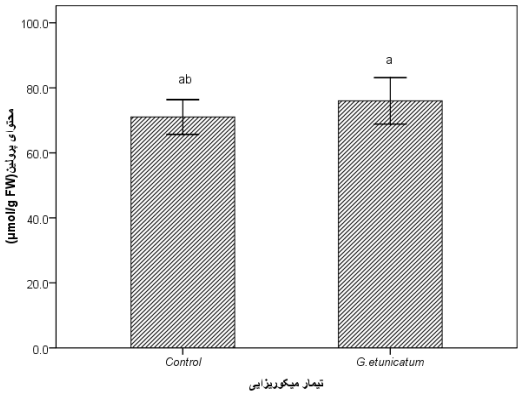
اثر قارچ میکوریزای *Glomus etunicatum* بر میزان فنل کل اندام‌هوایی گیاه پروانش: نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوای فنول کل اندام‌هوایی در گیاهچه‌های غیر میکوریزای و همزیست با *G.etunicatum* نشان داد که میزان فنول کل در نمونه‌های همزیست با میکوریز ۱۱/٦٦ درصد افزایش نسبت به نمونه‌های شاهد غیر میکوریزایی نشان داده که این تفاوت در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ٤).



شکل ٤. محتوای فنل کل اندام هوایی گیاهان پروانش میکوریزایی (*G.etunicatum*) و غیر میکوریزایی (شاهد) پس از سازگاری. مقادیر جدول، میانگین ٤ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P<۰/۰۵ است.

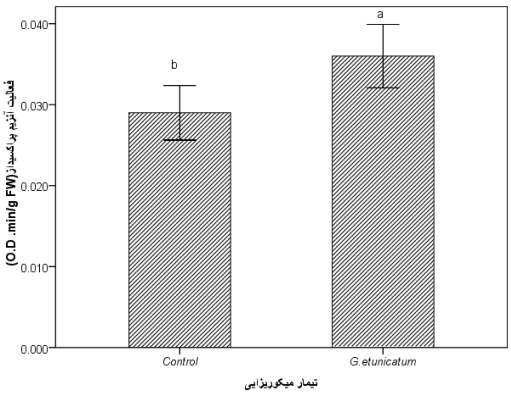
اثر قارچ میکوریزای *Glomus etunicatum* بر محتوای پرولین اندام هوایی گیاه پروانش: همچنین نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان آمینواسید پرولین در اندام هوایی گیاهچه‌های پروانش تحت تیمار میکوریزا و شاهد پس از طی دوره سازگاری بیانگر افزایش ٦/۵۵ درصدی پرولین در نمونه‌های همزیست نسبت

به شاهد بود. آنالیز آماری نتایج نشان داد که تفاوت میان شاهد و تیمارهای میکوریزایی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبود (شکل ۵).



شکل ۵. محتوای پرولین اندام هوایی گیاهان پروانش میکوریزایی (*G.etunicatum*) و غیرمیکوریزایی (شاهد) پس از سازگاری. مقادیر جدول، میانگین ٤ تکرار± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P<۰/۰۵ است.

اثر قارچ میکوریزای *Glomus etunicatum* بر فعالیت آنزیم پراکسیداز اندام هوایی گیاه پروانش: در نهایت بررسی آماری نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان‌دهنده ۱۹/٤٤ درصد افزایش در فعالیت این آنزیم در نمونه‌های میکوریزایی نسبت به شاهد غیر میکوریزایی بود که این تفاوت در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ٦).



شکل ٦. فعالیت آنزیم پراکسیداز اندام هوایی گیاهان پروانش میکوریزایی (*G.etunicatum*) و غیر میکوریزایی(شاهد) پس از سازگاری. مقادیر جدول، میانگین ٤ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P <۰/۰۵ است.

بحث

در این مطالعه اثرقارچ میکوریز *Glomus etunicatum* بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و ترکیبات آنتی‌اکسیدان پس از دوره سازگاری گیاهچه‌های باززایی شده پروانش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بیانگر اثر مثبت این قارچ بر محتوای رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها نسبت به شاهد غیرمیکوریزایی بود. افزایش در میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌تواند در نتیجه افزایش میزان فتوسنتز در گیاهچه‌های همزیست با *G. etunicatum* باشد. گیاهچه‌های باززایی شده دارای برگ‌های نازک با محتوای پایین کلروفیل در مزوفیل‌های برگی بوده که به‌دلیل سازمان‌دهی ضعیف کلروپلاست‌های در این برگ‌ها می‌باشد. همچنین روزنه‌ها در برگ‌های گیاهچه‌های مشتق شده از شرایط در شیشه غیرعملکردی بوده و فعالیت آنزیم فتوسنتزی روبیسکو در این برگ‌ها پایین می‌باشد. این عوامل در مجموع می‌تواند موجب کاهش عملکرد فتوسنتزی در این گیاهان طی دوره سازگاری گردد (Kapoor et al., 2008).

یکی از اثرات ناشی از انتقال گیاهچه‌های مشتق شده از شرایط درون شیشه‌ای به شرایط خارج شیشه می‌تواند تنش خشکی و کاهش رطوبت در دسترس گیاه باشد. همچنین ارتباطات آوندی ضعیف در این گیاهچه‌ها می‌تواند موجب کاهش جذب آب و عناصر غذایی از ریشه این گیاهان گردد. تحقیقان نشان داده است قارچ‌های میکوریز می‌توانند موجب افزایش در هدایت روزنه‌ای و فتوسنتز و در نهایت افزایش در غلظت کلروفیل‌ها در گیاهان پس از تنش آبی گردند (Selvaraj and Chellappan, 2006). از سوی دیگر،

همزیستی با قارچ‌های میکوریز می‌تواند موجب افزایش در جذب عناصر غذایی مانند منیزیم و آهن که جهت فتوسنتز ضروری می‌باشند گردد (Krishna et al., 2005). همچنین این قارچ‌ها نقش مهمی در جذب فسفر توسط گیاه داشته و از این طریق می‌تواند موجب بهبود فتوسنتز و در نتیجه افزایش در محتوا و سازمان‌دهی کلروپلاست‌های برگی در این گیاهان شوند (Selvaraj and Chellappan, 2006). از سوی دیگر، کاروتنوئیدها که به‌عنوان رنگیزه‌های برداشت کننده نور در فتوسنتز عمل می‌کنند، می‌توانند به‌عنوان یک عامل آنتی اکسیدانی در از بین بردن اثر رادیکال‌های آزاد در گیاه به‌کار رفته و در نتیجه موجب بهبود تنش‌های اکسیداتیو وارد شده بر گیاه طی سازگاری گردند (Krishna et al., 2005; Kapoor et al., 2008). افزایش در محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی طی فرایند سازگاری توسط قارچ‌های میکوریز، پیش از این توسط Moraes و همکارانش (۲۰۰٤) در گیاه *Podophyllum peltatum* L. و Krishna و همکارانش (۲۰۰۵) در گیاه *Vitis vinifera* L. مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به‌دست آمده در این تحقیق هماهنگ با نتایج به‌دست آمده توسط این محققین بود..

نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوای فنل کل اندام هوایی در گیاهچه‌های غیرمیکوریزای و همزیست نشان داد که میزان فنل کل در نمونه‌های همزیست با میکوریز نسبت به نمونه‌های شاهد غیرمیکوریزایی افزایش یافت. تحقیقات نشان داده است ترکیبات فنلی یکی از اجزای مهم و از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاه می‌باشند و یکی از عملکردهای مهم شناخته شده آنها شرکت در مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان است (Gan et al., 2010). اثر مثبت قارچ‌های میکوریزای آبوسکولار بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و محتوای فنل کل در گیاهان ریزازدیادی شده طی دوره سازگاری گیاهچه‌های *Vitis vinifera* L. نشان داده شده است (Krishna et al., 2005).

آنالیز آماری نتایج حاضر نشان داد که تفاوت میزان پرولین میان شاهد و تیمارهای میکوریزایی در سطح احتمال ۵درصد معنی‌دار نبود. پرولین یکی از اسیدهای آمینه ضروری در گیاه بوده که میزان آن تحت شرایط تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد (Laszlo and Arnould, 2009). پرولین می‌تواند به‌عنوان یک تنظیم کننده اسمزی در گیاه عمل کرده و همچنین تجمع آن در سیتوپلاسم سلولی نقش مهمی را در پایداری پروتئین‌های سلولی و غشایی طی تنش‌های وارد شده بر گیاه ایفا می‌نماید (Shao et al., 2006; Errabii et al., 2006). Pirzad و همکارانش (۲۰۱۱) افزایش میزان پرولین را در اثر ایجاد تنش آبی در گیاهان *Matricaria chamomilla* L. نشان دادند. همچنین اثر قارچ‌های میکوریزا برافزایش محتوای این آمینو اسید در گیاهچه‌های حاصل از شرایط درون شیشه‌ای *Vitis vinifera* L. پس از طی دوره سازگاری نشان داده شده است (Krishna et al., 2005).

بررسی آماری نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان‌دهنده افزایش در فعالیت این آنزیم در نمونه‌های میکوریزایی نسبت به شاهد غیرمیکوریزایی بود که این تفاوت در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. آنزیم پراکسیداز یکی از مهم ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه بوده که می‌تواند موجب از بین بردن رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش‌های زیستی و غیر زیستی ایجاد شده در گیاه گردد (Selvaraj and Chellappan, 2006)

تحقیقات نشان داده است که گیاهچه‌های مشتق شده از شرایط درون شیشه‌ای، مشخصه‌های ویژه‌ای نظیر رطوبت بالا و شدت نور پایین را که ناشی از شرایط کنترل شده در محیط کشت می باشد از خود بروز می‌دهند. در نتیجه انتقال گیاهچه‌های باززایی شده از

شرایط در شیشه به شرایط سازگاری در خارج شیشه موجب می‌شود که درصد بالایی از این گیاهچه‌ها قادر به ایستادگی در برابر شوک ناشی از این تغییرات محیطی نباشند. از سوی دیگر، به‌دلیل پایین بودن محتوای فیتوآلکسین در این گیاهان، نشان داده شده است که این قبیل گیاهچه‌ها به‌صورت ضعیفی در برابر عوامل بیماری‌زا یا پاتوژن‌ها مقاومت می‌کنند (Kapoor et al., 2008). همه این عوامل گیاه را در معرض تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف قرار داده و در نهایت موجب بروز برخی واکنش‌های دفاعی از سوی گیاه می‌شود. تحقیقات نشان داده است که تلقیح گیاهان با قارچ‌های میکوریز درچنین شرایطی نقش مهمی را در افزایش تحمل گیاه به محدوده وسیعی از تنش‌های محیطی ایفا می‌نماید که این همزیستی می‌تواند از بهبود روابط آبی، کسب مواد غذایی بیشتر و همچنین اصلاح ساختار خاک و تولید هورمون‌های گیاهی، در مقاومت گیاه موثر باشد (Selvaraj and Chellappan, 2006; Kapoor et al., 2008).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش می‌توان بیان داشت که قارچ‌های میکوریزا می‌توانند به عنوان یک عامل پیش برنده در افزایش مقاومت گیاهان طی فرایند سازگاری عمل کرده و با افزایش در میزان عوامل آنتی‌اکسیدان موجب بهبود رشد و حیات در گیاهان حاصل از شرایط درون شیشه‌ای طی فرایند سازگاری گردد.

منابع

Bates, L.S., Waldren, RP.and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil. 39: 205- 207.

Errabii, T., Gandonou, C.B., Essalmani, H., Abrini, J., Idomar, M. and Skali- Senhaji, N. (2006). Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus culture under drought – induced osmotic stress and its subsequent relief. African Journal of Biotechnology. 5(6): 1488-1493.

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

Gadkar, V., David- Schwartz,R., Kunik, T. and Kapulnik, Y. (2001). Arbuscular mucorrhizal fungi colonization. Factors involved in host recognition. Plant Physiology. 127: 1493- 1499.

Gan, R.Y., Xu, X.R., Song, F.L., Kuang, L. and Li, H. (2010). Antioxidant activity and total phenolic content of medicinal plants associated with prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular disease. Journal of Medicinal Plants Research. 4: 2438-2444.

Kalidass, CH., Mohan, V.R. and Daniel, A. (2010). Effect of auxin and cytokinin on vincristine production by callus culture of *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae). Tropical and subtropical Agroecosystems. 12: 283-288.

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

Koroi, S.A. (1989). Gel electrophoresis tissue and spectrophotometr scho unter uchungen zomeinfiuss der temperature auf struktur der amylase and peroxidase isoenzyme. Physiological Reviews. 20: 15-23.

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

Laszlo, S. and Arnould, S. (2009). Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Science. 5: 89-97.

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

Matta, A.J. and Giai, I. (1969). Accumulation of phenol in tomato plant is affected by different forms of *Fusarium oxysporum*. Planta Medica. 50: 512-513.

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

Pietrosiuk, A., Futmanowa, M. and Lata, B. (2007). *Catharanthus roseus*; micropropagation and *in vitro* techniques. Phytochemistry Review. 6:459-473.

Pirzad, A., Shakiba, M.R. and Zehtab-Salmasi, S. (2011). Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla*. Journal of Medicinal Plant Research. 51: 2483-2488.

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

Shao, H.B., Chen, X.Y., Chu, L.Y., Zhao, X.N., Wu, G.Y., Yong, B., Zhao, C.X. and Hu, Z.M. (2006). Investigation on the relationship of proline with wheat anti-drought under soil water deficits, colloids and surfaces. Biointerfaces. 53(1): 113-119.

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