نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، ص. ۷۷-۶۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.1, Spring 2019, P. 65-77
ISSN: 2008 - 4730

بررسی تاثیر نیتریک اکسید (NO) بر پرآوری و ریشه‌زایی ریزقلمه پایه‌های سیب MM111 و MM106 در شرایط درون‌شیشه‌ای

سید محمد حسین حیات‌الغیبی[۱]- علی‌اکبر مظفری[۲]*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۰۹

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی تاثیر سدیم نیتروپروساید (SNP) و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ویژگی‌های مورفو-فیزیولوژیکی گیاهچه‌های پرآوری شده و ریشه‌زایی آنها انجام گردید. این مطالعه شامل دو آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار بود. به منظور پرآوری میکروشاخه‌ها از محیط‌کشت پایهMS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد (یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید (NAA)) و SNP در شش سطح شامل صفر، ۲/۹۶، ۵/۹۸، ۸/۹۴، ۱۱/۹۱، ۱۴/۹۰میلی‌گرم در لیتر بر روی دو پایه سیب MM106 وMM111 استفاده شد. در آزمایش ریشه‌زایی به بررسی اثر SNP (صفر، ۷/۴۵، ۱۴/۱۱،۹۰/۹۱، ۲۲/۳۵و۵۷/۸۰ میلی‌گرمدر لیتر) به تنهایی و در ترکیب با یک میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA روی محیط‌کشت پایه MS½پرداختیم. پس از ۶۰ روز شاخص‌های رشدی ساقه و ریشه شامل طول شاخه و ریشه، تعداد شاخه و ریشه، وزن تر و خشک ریشه، پروتئین‌های‌محلول‌کل، فعالیت‌آنزیم پراکسیداز، کربوهیدرات‌محلول‌کل، کاروتنوئید و کلروفیلa، b و کل مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. نتایج نشان داد که روند تغییرات شاخه‌زایی تحت تاثیر تیمارهای‌SNP همسویی نسبتا بالایی با مقدار پروتئین‌های محلول و کربوهیدارت داشت بطوری که با افزایش میزان SNP به ۵/۹۸ میلی‌گرم در لیتر، مقدار هر سه پارامتر اندازه‌گیری شده افزایش و سپس کاهش یافت. همچنین روند تغییرات مقدار کاروتنوئید و کلروفیل گیاهچه‌ها با تغییرات مقدار SNP همبستگی نداشت. بیشترین تعداد ریشه در تیمارهای۱۱/۹۱ و ۲۲/۳۵ میلی‌گرم در لیترSNP به همراه یک میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیترNAA بدست آمد، در حالیکه بیشترین طول ریشه در تیمارهای ۷/۴۵، ۱۱/۹۱ و ۱۴/۹۰ میلی‌گرم در لیتر SNP حاصل شد. لذا غلظت‌های مختلف SNP و نیز ترکیب SNP با تنظیم کننده‌های می‌توانند نقش موثری روی اندام‌زایی پایه‌های سیب داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده رشد، سدیم نیتروپروساید، کشت بافت، گیاهچه

مقدمه

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در شرایط درون شیشه‌ای به علت کنترل دقیق شرایط محیطی، مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. محدودیت در تولید سریع گونه‌های با ارزش تجاری مانند سیب و به ویژه پایه‌های شناخته شده، یکی از مشکلات اساسی در تجاری سازی این محصول می‌باشد. باززایی درون شیشه-ای گونه‌های چوبی و سخت ریشه‌زا مانند پایه‌های سیب و تکثیر سریع آن‌ها در کوتاه مدت می‌تواند راه‌گشای محدودیت‌های موجود باشد. این تحقیق بر مبنای مشکلات موجود به ویژه در کشور انجام و توانسته است تا حدود زیادی بر محدودیت‌های افزایش تعداد شاخه باززایی شده (پرآوری) و ریشه‌زایی فائق آید.

نیتریک اکسید (NO) یک رادیکال آزاد گازی زیستی فعال با قابلیت انتشار بالا، کوچک، همه جا موجود و ناپایدار است (۷، ۸ و۱۴). تحقیقات روی نقش نیتریک اکسید در گیاهان تشویق‌های چشمگیری را در سال‌های اخیر به دنبال داشته و توجه بیشتری به نقش این مولکول به‌عنوان مولکول کلیدی سیگنال‌دهنده شده است (۲۱). نیتریک اکسید نقشی حیاتی در رشد و نمو گیاهان (۱۱ و ۱۶) از جمله تحریک جوانه‌زنی دانه، تحریک رشد دانهال و به تأخیر انداختن پیری بازی می‌کند (۱۷). کاربرد سدیم نیتروپروساید (SNP) همراه با یک ترکیب هورمونی در محیط کشت پایه MS (۲۰) نسبت به سایر تیمارها روی باززایی شاخه و ریشه‌زایی ریزقلمه‌های سیب از ریزنمونه برگ اثر تحریک کنندگی داشته است (۱۱). اثر NO روی کالوس‌زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل گیاه

۱ و ۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد باغبانی و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان
(*- نویسنده مسئول: (Email: a.mozafari@uok.ac.ir
DOI: 10.22067/jhorts4.v33i1.70173

Albizzia lebbeck (۲۷)، باززایی در گیلاس (۲۵)، شاخه‌زایی و باززایی در *Vanilla planifolia* (۲۷)، ریشه‌زایی در خیار (۲۲) و ماش (۱۳)، کاهش دوره رشد در ذرت (۱۰) و نمو ریشه‌های فرعی در گوجه فرنگی (۵) مورد مطالعه قرار گرفته است.

باززایی شاخه و ریشه نابجا یک فاکتور کلیدی در کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان به حساب می‌آید (۱۰). در کشت درون‌شیشه‌ای یک گیاه، عوامل متعددی بر باززایی و یا ریشه‌زایی تاثیر گذار می‌باشند. که اصلی‌ترین آنها می‌توان به ترکیبات محیط کشت، ژنتیک و شرایط فیزیولوژیکی غالب بر گیاه اشاره کرد (۲۷). همچنین ترکیبات شیمیایی و طبیعی مختلفی وجود دارند که می‌توانند مورد استفاده قرار گرفته و از طروق مختلف اثرات تحریک کننده‌ای بر رشد و نمو گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای داشته باشند (۱۹).

جنس سیب (*Malus*) بومی اروپای شرقی، آسیای غربی و نواحی شمال غربی کوه‌های هیمالیا است. این گیاه حدود ۶۰۰ سال قبل از میلاد مسیح کشت شده است. در جنس سیب بیش از ۳۰ گونه و ۶۰ زیرگونه وجود دارد که سرتاسر نیمکره شمالی پراکنده شده‌اند سیب‌های اهلی عموما از *Malus pumila* Mill، سیب‌های زینتی، هیبریدهای *M. pumila* و *M. baccata* (L.) Brock یا دیگر گونه‌های اولیه مشتق شده‌اند. از میان گونه‌های جنس سیب، گونه *Malus pumila* Mill خوراکی بوده و جنبه تجاری دارد. بقیه گونه‌ها یا جنبه زینتی دارند و یا به صورت وحشی زیست می‌کنند (۲۸). تعدادی از انواع سیب به عنوان پایه مورد استفاده قرار می‌گیرند، که پایه‌های MM111 و MM106 از آن جمله هستند. این پایه‌ها از دورگ‌گیری پایه‌های مالینگ و نورسرن اسپای (Northern spy) حاصل شده‌اند. پایه‌های MM106 و MM111 سازگاری خوبی با ارقام مختلف سیب دارند (۲۸).

در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف SNP به عنوان ماده آزادکننده آنیون NO^- بر باززایی شاخساره نابجا و نیز در ترکیب با تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی (NAA + IBA) روی تولید ریشه نابجا از ریزنمونه‌های دو پایه سیب MM111 و MM106 تحت شرایط دورن شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط محیط کشت

گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای پایه‌های MM111 و MM106 کشت بافت شده از موسسه نهال و بذر کرج تهیه و با طول حدود ۲/۵ سانتی‌متر به عنوان منبع گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند. این پژوهش در قالب دو آزمایش جداگانه (شاخه‌زایی و ریشه‌زایی) انجام پذیرفت. محیط کشت پایه MS برای شاخه‌زایی (آزمایش اول) و ۱/۲MS برای ریشه‌زایی (آزمایش دوم) مورد استفاده گرفت.

محیط کشت شاخه‌زایی (آزمایش اول)

برای شاخه‌زایی از محیط کشت پایه MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA) به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) مورد استفاده قرار گرفت و SNP در غلظت‌های صفر، ۲/۹۸، ۵/۹۶، ۸/۹۴، ۱۱/۹۱ و ۱۴/۹۰میلی گرم در لیتر به عنوان تیمار در نظر گرفته شد. در این آزمایش مقدار ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار (w/v) به محیط کشت اضافه شد. pH محیط‌های کشت بوسیله هیدروکلریک (HCl) و هیدروکسید سدیم (NaOH) یک نرمال قبل از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم شد، سپس در دمای ۱۲۱/۵ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۲ اتمسفر برای مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو استریل شدند. برای آزمایشات شاخه‌زایی از شیشه‌هایی ۲۵۰ سی‌سی استفاده شد. به منظور جلوگیری از تجزیه‌شدن، SNP به روش فیلتراسیون سرد با استفاده از فیلترهای سرسرنگی با منافذ به قطر۰/۲۲ میکرون استریل و سپس به محیط کشت اضافه شد. در آزمایش شاخه‌زایی به خاطر القاء و تشکیل بهتر سرآغازه‌های شاخه-زایی محیط‌های کشت در ۱۴ روز نخست در تاریکی و در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن تحت فتوپریود ۱۵ ساعت نور و نه ساعت تاریکی با شدت نور $38\ \mu M\ m^{-2}\ s^{-1}$ به مدت ۴۶ روز در اتاقک رشد با رطوبت نسبی ۵۵ درصد نگه‌داری شدند. زمانی طول شاخه‌های پرآوری شده به حدود ۲/۵ تا ۳ سانتی متر رسیدند، شاخص‌های ساقه شامل طول و تعداد شاخه، پروتئین‌محلول‌کل، فعالیت‌آنزیم پراکسیداز، کربوهیدرات محلول کل، کاروتنوئید، کلروفیلa، کلروفیلb و کلروفیل کل مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند.

در اندازه‌گیری صفات، طول شاخه و ریشه با خط‌کش با دقت یک میلی‌متر، تعداد شاخه با روش شمارش و برای وزن تر و خشک ریشه با روش خشک کردن با استفاده از آون با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت (۵) و توزین با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ انجام گرفت.

محیط کشت ریشه‌زایی (آزمایش دوم)

در این آزمایش از محیط کشت پایه MS ۱/۲ حاوی SNP در غلظت‌های صفر، ۷/۴۵، ۱۱/۹۱، ۱۴/۹۰، ۲۲/۳۵ و ۵۷/۸ میلی گرم در لیتر، IBA (یک میلی‌گرم در لیتر)، NAA (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) هر کدام به تنهایی و ترکیب (یک میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر NAA) همراه با سطوح مختلف SNP (۷/۴۵، ۱۱/۹۱، ۱۴/۹۰، ۲۲/۳۵ و ۵۷/۸ میلی گرم در لیتر) به عنوان تیمار آزمایشی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین به عنوان شاهد از یک میلی گرم در لیتر IBA یا ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده کردیم. شرایط آزمایش در مرحله ریشه‌زایی همانند مرحله شاخه‌زایی بودند. زمانی که شاخه‌ها به طول ۲/۵ تا ۳ سانتی متر رسیدند

گیاهچه‌ها در شرایط استریل از ظروف کشت خارج و روی محیط کشت ریشه‌زایی قرار داده شدند تا ریشه‌زایی صورت گیرد. در این مرحله شرایط نوری همانند مرحله شاخه‌زایی در نظر گرفته شد. در آزمایش دوم ۶۰ روز بعد از واکشت شاخص‌های ریشه (تعداد ریشه، طول ریشه، وزن تر و وزن خشک ریشه) به عنوان صفات مورد نظر اندازه گیری شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز با روش هیمدا و کلین اندازه‌گیری شد (۱۲). بر اساس این روش ابتدا ۰/۳ گرم بافت تازه برگ در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار HETTCH مدل MICRO ساخت آلمان در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره روشناور حاصل از سانتریفیوژ را با ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) ۱۰۰ میلی‌مولار و ۵۰۰ میکرولیتر یدید پتاسیم (KI) یک مولار مخلوط شد. جذب مخلوط حاصله با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV- 2100 مدل S2100 suv NEW JERSEY و در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد.

تعیین غلظت پروتئین‌های محلول کل

به منظور تعیین غلظت پروتئین‌های محلول کل از روش برادفورد استفاده شد (۲). در این روش ابتدا ۰/۵ گرم از هر نمونه برگی توسط ازت مایع در هاون چینی خرد و له شده و سپس به هر نمونه ۵۰ میلی‌گرم پلی وینیل پیرولیدون (PVP) اضافه شد. بعد از آن ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (PH=۷) حاوی سدیم متابای سولفیت (۰/۰۱۹ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر) اضافه شد و محتویات هاون به میکرو تیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری انتقال داده شد و در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به‌آرامی از دستگاه خارج و ۵۰۰ میکرو لیتر از فاز رویی عصاره با ۱۷۵ میکرو لیتر گلیسرول ۵۰ درصد مخلوط و محلول حاصله به میکرو تیوپ‌های ۲۰۰ میکرو لیتری منتقل و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای قرائت جذب پروتئین ۲۰ میکرو لیتر عصاره با ۵۰۰ میکرو لیتر محلول برادفورد مخلوط شد و ۲ دقیقه پس از اضافه نمودن عصاره به محلول برادفورد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و بر مبنای روش طیف‌سنجی و در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شدند.

اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول کل

کربوهیدرات‌های محلول کل با روش اریگوین و ایمریک اندازه‌گیری شد (۱۴). در این روش ابتدا ۰/۱ گرم از بافت برگ برای هر نمونه توزین و در هاون چینی با ازت مایع له و سپس ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد به آن اضافه شد. عصاره رویی را در فالکن ریخته و ته‌مانده برگی را با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد له و به فالکن اضافه شد. نمونه‌ها با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از خارج کردن نمونه‌ها از سانتریفیوژ ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره رویی را برداشته و به آن ۳ میلی‌لیتر آنترون ۷۰ درصد (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۷۲ درصد) اضافه کرده و فالکن‌های حاوی نمونه به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب جوش قرارداده شدند. پس‌از اینکه دمای آن‌ها به دمای محیط رسید ۱/۵ میلی‌لیتر از عصاره و ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول کالیبره (یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد + ۳ میلی‌لیتر آنترون) را داخل کووت ریخته و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۶۲۵ نانومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری مقدار کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید

جهت تعیین مقدار کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید ۰/۱گرم از بافت برگ تازه ریزنمونه در ۱۰ سی‌سی استون ۸۰ درصد و ۰/۱ گرم اکسید منزیم خرد گردید. عصاره بدست آمده به مدت پنج دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان جذب عصاره رو شناور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر قرائت شد(۱۸). در نهایت غلظت کلروفیل a, b, کل و کاروتنوئید با استفاده از روابط زیر محاسبه شد.

$Chl_a(mgml^{-1}) = (12.25\times A\ 663)-(2.79\times A\ 646)$

$Chl_b\ (mgml^{-1}) = (21.21\times A\ 646)-(5\times A\ 663)$

$Ch_{total}\ (mgml^{-1}) = Chl_{a+}\ Chl$

$Cartenoid\ (mgml^{-1}) = ((1000\times A\ 470)-(1.8\times\ Chl_a)-(85.02\times\ Chl_b))/198$

تجزیه‌های آماری

هر دو آزمایش شاخه‌زایی و ریشه‌زایی به روش فاکتوریل و بر پایه طرح کاملا تصادفی انجام گردید. در هر دو آزمایش ژنوتیپ‌ها و سطوح مختلف SNP همراه با تنظیم کننده‌های رشد به عنوان فاکتورهای آزمایش در نظر گرفته شدند. در آزمایش اول (شاخه‌زایی) برای هر تیمار ۱۶ ریزنمونه (چهار تکرار و در هر تکرار چهار ریزنمونه) و در آزمایش دوم (ریشه‌زایی) برای هر تیمار ۱۲ ریزنمونه (چهار تکرار و در هر تکرار سه ریزنمونه) مد نظر قرار گرفت.

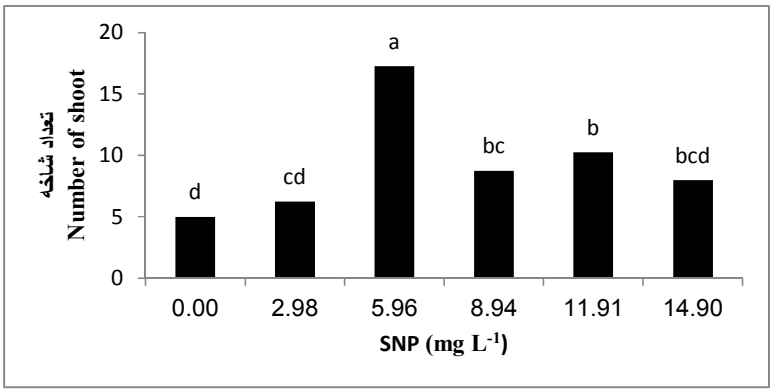
در آزمایش‌ها برای نرمال کردن داده‌ها از جذر داده‌ها استفاده شد. بنابراین از حروف معنی‌داری داده‌های تبدیل‌شده و میانگین داده‌های اصلی استفاده شد. داده‌ها بوسیله آنالیز واریانس یکطرفه با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTAT-C ver. 10.2 با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد آنالیز قرار گرفتند. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excle 2007 استفاده شد.

نتایج و بحث

این تحقیق جهت بررسی تاثیر سدیم نیتروپروساید (SNP) و تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی ویژگی‌های مورفو-فیزیولوژیکی گیاهچه‌های پرآوری‌شده و ریشه‌زایی آنها انجام شد.

پرآوری در شرایط کشت بافت

آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که طول شاخه در دو پایه تفاوت معنی‌داری داشتند، همچنین تیمار SNP بر تعداد شاخه اثر معنی‌دار داشت، در حالیکه تیمار SNP بر طول شاخه و نیز اثر متقابل آن‌ها بر طول و تعداد شاخه معنی‌دار نبود. همچنین اثر SNP روی شاخه باززایی شده بررسی و مشخص گردید که میانگین تعداد شاخه تحت تأثیر غلظت ۵/۹۶ میلی گرم در لیتر SNP ۳/۱۵ برابر بیشتر از شاهد بود. در غلظت‌های بیشتر از ۵/۹۶ میلی‌گرم در لیتر SNP شاخه‌زایی روند ثابتی داشت و اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نگردید (اشکال۱ و ۲).



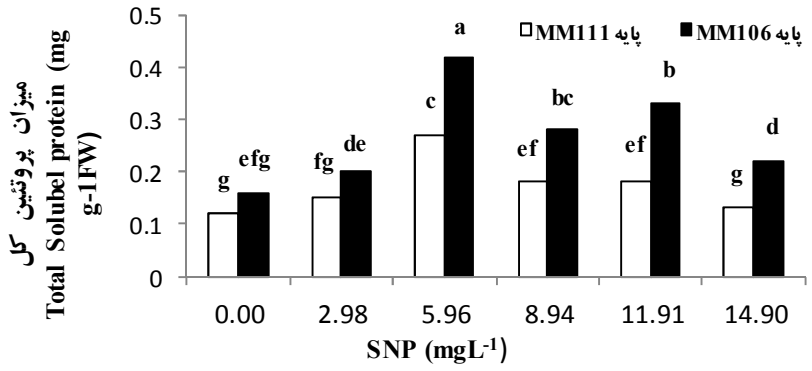
شکل ۱- اثر SNP بر میانگین تعداد شاخه باززایی شده در پایه‌های سیب MM111 و MM106 تحت شرایط درون شیشه‌ای
Figure 1- SNP effect on number of regenerated shoot in MM111 and MM106 apple rootstocks under *in vitro* condition (Duncan's multiple range test, $p<0.05$)

شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف SNP بر روی تعداد شاخه بازایی شده سیب پایه MM111؛ a: غلظت ۵/۹۶ میلی گرم در لیتر SNP ، b: غلظت ۱۱/۹۱میلی گرم در لیتر SNP. c: تیمار شاهد (بدون کاربرد SNP)
Figure 2- SNP different concentration effects on number of regenerated shoot in MM111apple rootstock. a: 5.96 mgL^{-1} SNP concentration, b: 11.91 mgL^{-1} SNP concentration, c: control (no application SNP)

همسو با نتایج محققان دیگر (۱۱) ازدیاد گیاهچه‌های سیب به طور چشمگیری با کاربرد ۵/۹۶ میلی گرم در لیتر SNP در محیط کشت MS افزایش یافت. نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که SNP به عنوان یک ماده رها کننده NO می‌تواند نقش موثری در پرآوری سیب داشته باشد. شاید با حضور SNP، سطح آنتی اکسیدانتهای غیر آنزیمی درون سلولی مانند پرولین و گلوتاتیون به طور قابل توجهی افزایش یابد (۱۵). NO ممکن است در تقسیم سلولی نقش بازی کند، بنابراین در باززایی شاخه جانبی و ازدیاد آن شرکت می‌نماید (۱۱). لذا کاربرد SNP به عنوان رهاکننده NO ممکن‌است ازدیاد گونه‌های گیاهی را بهبود بخشد. افزایش تمایزیابی مریستم‌ها در محیط کشت حاوی SNP توسط محققین مختلف گزارش شده است (۲۳، ۲۵) که نشان دهنده تنظیم ژن‌های تنظیم‌کننده سیکل سلولی و پروتئین کینازهای فعال‌شده در اثر میتوژن به وسیله NO است (۲۳). طبق نتایج این پژوهش طول شاخه‌های باززایی شده در پایه MM106 بطور معنی‌داری بیشتر از MM111 بود.

محتوی پروتئین‌های محلول کل

نتایج این تحقیق نشان داد که اثر ساده تیمار SNP و پایه سیب در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل پایه و غلظت SNP بر روی محتوی پروتئین‌های محلول کل در سطح ۵ درصد معنی‌دار است. مقدار پروتئین‌های محلول کل در تیمار۵/۹۶ میلی‌گرم در لیتر SNP روی سیب پایه MM106 در مقایسه با تیمارهای دیگر به طور معنی‌داری (P≤%5) بیشتر بود. کمترین نسبت محتوی پروتئین‌های محلول کل به تیمار سیب پایه MM111 در تیمارهای صفر، ۲/۹۸ و ۱۴/۹۰ میلی‌گرم در لیتر SNP مربوط بود (شکل ۳). بالاترین میزان پروتئین در پایه MM111 نیز در غلظت ۵/۹۶ میلی‌گرم در لیتر SNP مشاهده شد. هر دو پایه سیب نسبت به تیمارهای مختلف SNP روند واکنشی یکسانی نشان دادند و با افزایش غلظت SNP تا سطح ۵/۹۶ میلی‌گرم در لیتر محتوی پروتئین‌های محلول کل افزایش، ولی با بیشتر شدن غلظت SNP مقدار پروتئین محلول کل در هر دو پایه روند کاهشی نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل پایه و SNP بر محتوی پروتئین‌های محلول کل پایه‌های سیب MM111 و MM106 در شرایط درون‌شیشه‌ای

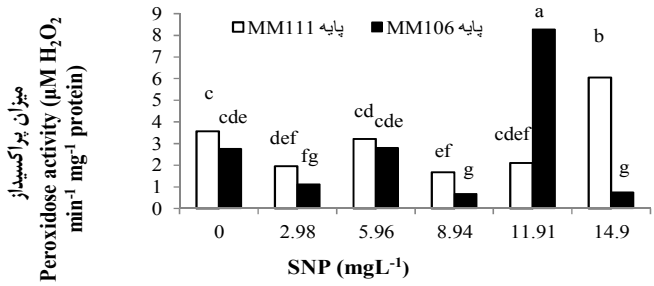
Figure 3- Mean comparison of Interaction between rootstock and SNP on total soluble protein in MM111and MM106 apple rootstocks in *in vitro* condition (Duncan's multiple range test, *p<0.05*)

نیترات ردوکتاز نقش مهمی در سنتز پروتئین دارد. کاربرد SNP فعالیت نیترات ردوکتاز را افزایش می‌دهد (۲۴). NO با کاهش گونه‌های فعال اکسیژن باعث جلوگیری از آسیب به پروتئین‌ها می‌شود (۲۶و ۲۷). نتایج ما نشان داد که کاربرد SNP به طور کلی صرف نظر از غلظت آن سبب افزایش محتوی پروتئین‌های محلول کل می‌شود (شکل ۳). شاید علت این باشد که رهاکننده‌های نیتریک اکسید، ۳-مورفولینوسیدنونیمین (که رهاکننده ONOO- است) و S-نیتروزوسیستئین، از فسفوریلاسیون درون‌شیشه‌ای پروتئین بدون بازدارندگی از تجزیه پروتئین جلوگیری می‌کنند. (۱). که این عامل خود می‌تواند موجب افزایش غلظت پروتئین در گیاه شود. در این تحقیق مشخص شد که غلظت‌های مختلف SNP اثرات متفاوتی بر روی پایه‌های مورد مطالعه داشته است. این عمل می‌تواند نتیجه اثر متقابل ژنوتیپ و محیط‌کشت باشد که اثرات آن بر واکنش‌های فیزیوولوژیکی در گیاه انعکاس یافته و تغییرات فنوتیپی متفاوتی را ایجاد می‌کند.

فعالیت آنزیم پراکسیداز

بر اساس نتایج بدست آمده اثر ساده تیمار SNP و پایه سیب و نیز اثر متقابل پایه و غلظت SNP بر روی میزان پراکسیداز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در پایه MM106 فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت ۱۱/۹۱میلی‌گرم در لیتر SNP در مقایسه با سایر تیمارها به طور معنی‌داری (P≤%1) بیشتر بود. در بین تیمارهای آزمایش، کمترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر دو پایه در غلظت۸/۹۴ میلی‌گرم در لیتر SNP مشاهده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز در پایهMM111 به طور متوسط حدود ۱۳ درصد بیشتر از پایه MM106 بود. فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت۱۴/۹۰میلی گرم در لیتر SNP نسبت به تیمار شاهد در پایه MM111 به طور معنی‌داری بیشتر بود، در حالی‌که فعالیت این آنزیم در پایه MM106 نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشت (شکل۴). اثر تیمارهای مختلف SNP از غلظت صفر تا ۸/۹۴ میلی-گرم در لیتر در هر دو پایه بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز روند

کاهشی نشان داد، اما در غلظت‌های بالاتر تاثیر SNP متفاوت از تیمارهای دیگر بود، به طوری که در غلظت‌های ۱۱/۹۱ و ۱۴/۹ میلی‌گرم در لیتر پایه‌های MM111 و MM106 واکنش‌های معکوسی نشان دادند بطوریکه بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز داشتند (شکل ۴).



شکل٤- اثر متقابل پایه × SNP بر فعالیت آنزیم پراکسیداز روی پایه‌های سیب MM111 وMM106 تحت شرایط درون‌شیشه‌ای

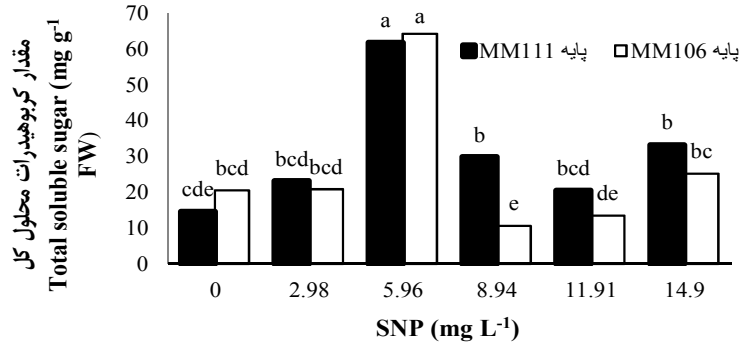
Figure 4- Interaction effect of rootstock ×SNP on peroxidase enzyme activity in MM111and MM106 apple rootstocks in *in vitro* condition(Duncan's multiple range test, $p<0.05$)

اثرات منفی تجمع انواع اکسیژن فعال ناشی از تنش‌ها، توسط سیستم‌های آنزیمی ضداکسایشی نظیر پراکسیداز (POD) خنثی می‌شود (۲۶). در تحقیق ما مشخص شد که غلظت‌های مختلفSNP تاثیرات متفاوتی بر روی میزان این آنزیم دارد (شکل۴). نیتریک اکسید ممکن است در افزایش محتوی آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیداتیوی درگیر باشد (۱۱). محققین دیگری بیان داشته‌اند که SNP با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در کلروپلاست‌ها می‌گردید (۸). نتایج تحقیق ما نشان داد که تاثیرات SNP بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز تاحدود زیادی وابسته به ژنوتیپ و غلظت SNP می‌باشد. در این تحقیق غلظت‌های مختلف نیتریک‌اکسید اثرات مختلفی بر روی دو پایه MM106 وMM111 داشتند. به طوری که موثرترین غلظت SNP در افزایش میزان پراکسیداز در پایه MM106 ۱۱/۹۱میلی گرم در لیتر و در پایه MM111 ۱۴/۹۰میلی گرم در لیتر بود. اختلاف مشاهده شده در نتایج بدست آمده می‌تواند به دلیل اثر متقابل بین تیمار و ژنوتیپ باشد. نتایج این تحقیق با نتایج (ساروپولو، ۲۰۱۴؛ کالرا و بابار، ۲۰۱۰) همسو بود (۱۶ و ۲۵).

مقدارکربوهیدرات‌های محلول کل

بر اساس نتایج بدست آمده اثر ساده تیمار SNP در سطح احتمال ۵ درصد، پایه سیب در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل پایه و غلظت SNP در سطح احتمال ۵ درصد بر روی مقدار کربوهیدرات-های محلول کل معنی‌دار بود. مطابق نتایج حاصله بیشترین مقدار کربوهیدرات‌های محلول کل به غلظت ۵/۹۶ میلی گرم در لیتر SNP مربوط می‌شود. کمترین مقدار کربوهیدرات‌های محلول کل به تیمار۱۱/۹۱میلی‌گرم در لیتر SNP اختصاص داشت. مقدار کربوهیدرات‌های محلول کل در هر دو پایهMM111 و MM106 با کاربرد ۵/۹۶ میلی‌گرم در لیتر SNP در مقایسه با تیمارهای دیگر ($P\leq\%5$) بیشتر بود (شکل ۵). در پایهMM111 کمترین میزان کربوهیدرات‌های محلول کل در تیمارهای شاهد و ۱۱/۹۱ میلی گرم در لیتر بدست آمد، اما در پایه MM106 پایین‌ترین غلظت کربوهیدرات‌های محلول کل مربوط به تیمارهای ۸/۹۴ و ۱۱/۹۱ میلی‌گرم در لیتر بود. تاثیر غلظت‌های مختلف SNP بر روی مقدار کربوهیدرات‌های محلول کل در هر دو پایه تقریبا با افزایش SNP تا ۵/۹۶ میلی گرم در لیتر میزان کربوهیدرات افزایش و سپس این میزان کاهش یافت. صرف نظر از غلظت ۸/۹۴ میلی‌گرم در لیتر که مقدار کربوهیدرات‌های محلول کل در پایه MM111 به طور معنی-داری بیشتر از MM106 بود، در بقیه تیمارها عکس العمل پایه ها نسبت به غلظت‌های مختلف SNP یکسان بود (شکل ۵).

نتایج این تحقیق بیان می‌کند که تغییرات کربوهیدرات تحت تاثیر مقدار NO آزاد شده در گیاه می‌باشد. اما این تاثیرات روند مشخصی نداشت. شاید این تاثیرات وابسته به ژنوتیپ و وضعیت فیزیولوژیکی گیاه باشد. تغییر مقدار قند ممکن است یک سیگنال برای تنظیم متابولیکی باشد (۹). NO باعث اختلال در انتقال الکترون فتوسنتزی شده و منجر به تشکیل رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^-) می‌شود (۱۹). افزایش عملکرد فتوسنتزی تولید کربوهیدرات را تحریک می‌کند (۱۹). نتایج ما نیز نشان داد که استفاده از NO به عنوان یک محرک در سنتز کربوهیدرات می‌تواند نقش تحریک کننده‌ای داشته باشد، اما شدت این تاثیرات همبستگی بالایی با غلظت آن در گیاه ندارد.



شکل۵- اثر متقابل پایه × غلظت SNP بر مقدارکربوهیدرات‌های محلول کل پایه‌های سیب MM111 و MM106 در شرایط درون‌شیشه‌ای
Figure 5- Interaction effect of rootstock ×SNP on total soluble hydrocarbon in MM111and MM106 apple rootstocks in *in vitro* condition (Duncan's multiple range test, *p<0.05*)

مقدارکاروتنوئید

نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده تیمار SNP، پایه سیب و نیز اثر متقابل پایه و سطوح مختلف SNP بر مقدار کاروتنوئید بطور معنی‌داری موثر است. براساس نتایج بدست آمده میزان کاروتنوئید در پایه MM106 به طور معنی‌داری (P≤%1) بیشتر از پایه MM111 بود. مقدار کاروتنوئید پایه MM106 ۰/۵۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر بود که حدود دو برابر بیشتر از پایه MM111 (۰/۲۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر) بود. میزان کاروتنوئید در غلظت‌های ۲/۹۸و ۱۴/۹۰ میلی گرم در لیتر SNP (به ترتیب ۰/۳۷ و ۰/۳۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در مقایسه با سایر تیمارها به طور معنی‌داری (P≤%1) کمتر بود. در هر دو پایه بیشترین غلظت کاروتنوئید در تیمارهای صفر، ۸/۹۴ و ۱۱/۹۱(به ترتیب با میانگین ۰/۴۷، ۰/۴۶ و ۰/۴۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر) بدست آمد. ماده SNP بر مقدار کاروتنوئید در هر دو پایه موثر بود، اما تاثیر غلظت‌های مختلف آن بر مقدار کاروتنوئید از روند مشخصی برخوردار نبود.

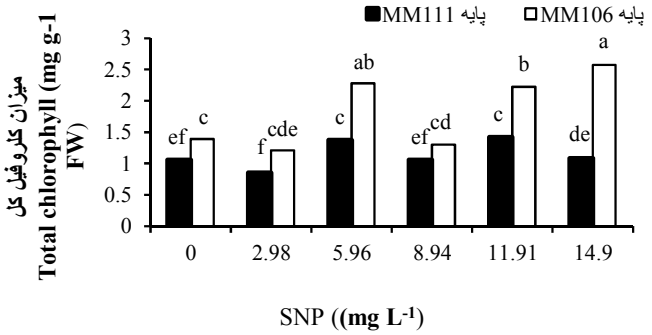
میزان کلروفیل کل

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر ساده تیمار SNP، پایه سیب و نیز اثر متقابل پایه و سطوح مختلف SNP بر مقدار کلروفیل کل به‌طور معنی‌داری موثر است. مقدار کلروفیل کل در تمام سطوح تیماری در پایه MM106 به‌طور معنی‌داری بیشتر از پایه MM111 بود. مقدار کلروفیل کل تحت تاثیر غلظت‌های غلظت‌های ۵/۹۶ و ۱۴/۹۰ میلی گرم در لیتر SNP بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۶). بیشترین مقدار کلروفیل کل در پایه MM106 تحت تیمار SNP با غلظت‌های ۵/۹۶ و ۱۴/۹۰میلی گرم در لیتر مربوط بود. میانگین مقدار کلروفیل کل در هر دو پایه MM111 و MM106 در تیمارهای صفر، ۲/۹۸و ۸/۹۴ میلی گرم در لیتر SNP کمتر از سایر تیمارها بود (شکل ۶). در رقم MM106 تقریبا در سطوح بالا تر از ۵/۹۶ میلی گرم در لیتر میزان کلرفیل کل افزایش یافت، اما رقم دیگر روند منطقی نداشت (شکل ۶).

طبق نتایج این تحقیق در مجموع مقدار کلروفیل کل در پایه MM106، ۶۱ درصد بیشتر از پایه MM111 بود. به نظر می‌رسد SNP باعث افزایش کلروفیل می‌شود. نتایج ما نشان داد که مقدار کاروتنوئید، کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b در هر دو پایه سیبMM111 و MM106 تحت تاثیر SNP قرار گرفته و به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. همسو با نتایج ما محققان دیگر بیان داشته‌اند که تیمار SNP مقدار کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b و نسبت chl. a/b را افزایش می‌دهد (۱۶).

نتایج بدست آمده نشان داد که میزان این رنگیزه‌ها تا حدود زیادی تابع ژنوتیپ است. گزارش شده است که قابلیت دسترسی به آهن در صورت وجود NO افزایش می‌یابد (۸). نویسندگان دیگر نشان داده‌اند که NO محتوای رنگریزه فتوسنتزی را در برگ افزایش می‌دهد (۲۷). وجود کاروتنوییدها و دیگر مولکول‌های باند شده می‌تواند تولید NO را شتاب بخشد (۷). طبق نتایج ما مقدار افزایش کاروتنوئید در ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بوده و تجمع رنگیزه کاروتن تحت تاثیر غلظت‌های مختلف SNP می باشد، اما میزان آن از روند مشخصی پیروی نمی‌کند. NO دامنه وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله پروتئین‌ها و ترکیبات فتوسنتزی را تحت تاثیر قرار می‌هد (۲۴). این مولکول از مسیرهای مختلف آنزیمی و غیر آنزیمی در گیاهان تولید و در سنتز سیتوکنین‌ها (کینتین) نقش دارد

(۲۹). اگرچه در شرایط درون شیشه‌ای میزان فتوسنتز کم است، اما با ساخته شدن ترکیبات پروتئینی و سیتوکنینی تقسیم سلولی و در نهایت پرآوری گیاهچه صورت می گیرد.



شکل٦- اثر متقابل بین پایه × SNP بر مقدار کلروفیل کل در پایه‌های سیب MM111 و MM106 در شرایط درون شیشه‌ای

Figure 6- Interaction effect on rootstock ×SNP on total chlorophyll in MM111and MM106 apple rootstocks in *in vitro* condition (Duncan's multiple range test, $p<0.05$)

ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززایی شده

بر اساس نتایج تجزیه واریانس تیمارهای ریشه‌زایی و ژنوتیپ و نیز اثر متقابل آنها در سطح یک درصد معنی‌دار بودند. طبق نتایج به دست آمده طول ریشه در غلظت‌های ۷/۴۵، ۱۱/۹۱ و ۱۴/۹۰میلی گرم در لیتر SNP (به ترتیب ۵/۷۵، ۷/۰۰ و ۵/۱۶ سانتی‌متر) نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی بیشتر بود. کمترین میانگین طول ریشه به تیمار شاهد (صفر میلی گرم در لیتر SNP) مربوط بود (جدول ۱).

در این تحقیق میانگین تعداد ریشه‌های تولید شده تحت تاثیر تیمارهای ریشه‌زایی روند نامنظمی داشتند. کمترین تعداد ریشه در تیمارهای شاهد (۰/۰۱ عدد) و ۵۷/۸۰ میلی‌گرم در لیتر SNP (۲ عدد) مشاهده گردید. بیشترین تعداد ریشه در تیمارهای۱۴/۹ میلی‌گرم در لیتر SNP به همراه یک میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و نیز ۲۲/۳۵میلی میلی گرم در لیتر SNP به همراه یک میلی‌گرم در لیتر IBA ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد (جدول ۱). تقریبا در تمام تیمارهای SNP با افزایش آن تعداد ریشه، طول ریشه و وزن خشک آن کاهش یافت، اما اضافه شدن ترکیب هورمونی به SNP باعث بروز نتایج متنوعی شد. با این حال بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت حاوی ترکیب هورمونی و مقدار ۱۱/۹۱و ۲۲/۳۵ میلی گرم در لیتر SNP بدست آمد (جدول ۱). در کلیه تیمارها حضور کالوس بر روی ریشه‌های اصلی مشاهده شد (شکل ۷).

شکل ۷- اثر غلظت‌های مختلف SNP بر ریشه‌زایی پایه‌های سیب MM111 و MM106 روی محیط کشت MS ½حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA ؛ a، تعداد ریشه در پایه MM 111 روی محیط کشت حاوی ۱٤/۹۱ میلی گرم در لیتر SNP، b: تعداد ریشه در پایه MM106 روی محیط کشت حاوی ۲۲/۳۵میلی گرم در لیتر SNP، c: تعداد ریشه در پایه MM111 روی محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA به تنهایی

Figure 7- Effect of different concentrations of SNP on root regeneration of MM111and MM106 rootstocks on ½ MS basal medium supplemented with 1 mgL^{-1} IBA + 0.01 mgL^{-1} NAA, a: root number in MM 111 apple rootstock on basal medium supplemented with 11.91 mgL^{-1} SNP, b: root number in MM106 on basal medium supplemented with 22.35 mgL^{-1} SNP, c: root number in MM111 on basal medium supplemented with1 mgL^{-1} IBA alone

سیب از گونه‌های چوبی سخت ریشه‌زا است که تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تا حدود کمی بر روی ریشه‌زایی آن تاثیر می‌گذارند. اما SNP به عنوان ماده آزاد کننده NO به تنهایی و یا همراه با تنظیم کننده‌های رشد تاثیر زیادی روی ریشه‌زایی ریز قلمه‌های سیب گذاشته است. احتمالاً NO انتقال سیگنال‌دهی هورمون‌های گیاهی در رشد و توسعه گیاه را میانجیگری می‌کند (۲۳). در هنگام شروع تشکیل پریموردیای ریشه‌های جانبی، NO بیان ژن‌های CYCD3:1 و KRP2 را القاء می‌کند (۶). NO ممکن است با اکسین و سایتوکینین واکنش دهد که نشان‌دهنده تنظیم ژن‌های تنظیم کننده سیکل سلولی و پروتئین کینازهای فعال شده در اثر میتوژن به وسیله NO است (۲۷). NO می‌تواند به عنوان یک سیگنال در آبشار سیگنالدهی القاء شده توسط اکسین که منجر به توسعه ریشه‌های نابجا می شود، عمل کند (۲۷).

نتایج این تحقیق نشان داد که SNP تاثیر زیادی بر روی طول ریشه‌های ریزقلمه داشته است. در راستای این تحقیق نتایج مختلف نیز نشان می‌دهند که NO روی طویل‌شدن نوک ریشه اثر مثبتی دارد و نیتریک‌اکسید در انتقال سیگنال هورمون‌های گیاهی موثر در رشد و نمو گیاه نقش دارد. بنابراین، نیتریک اکسید خارجی نقشی کلیدی در توسعه ریشه‌های جانبی گیاه بازی می‌کند (۱۳). این تحقیق نشان داد که حضور SNP و اکسین در کنار هم عوامل موثری در ریشه‌زایی می‌باشند. حضور NO در فرایند وابسته به اکسین در بخش‌های ریشه ذرت که در معرض رهاکننده‌های NO قرارگرفته بودند گزارش شده است (۱۰). رهاکننده‌های NO از اثرات اکسین تقلید می‌کند (۳). بنابراین NO به عنوان یک نیاز ضروری برای تشکیل پریموردیای ریشه‌ها عمل می‌کند (۳).

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف IBA، NAA و SNP بر روی صفات موفولوژیکی پایه‌های سیب MM111 و MM106 در شرایط درون شیشه‌ای
Table 1- different concentration effects of NAA, IBA and SNP on morphological traits of MM111 and MM106 rootstocks in *in vitro* condition

تیمار Treatment (mg L^{-1})	وزن خشک Dry weight (g)	طول ریشه Root length (cm)	تعداد ریشه Root number
(0) SNP	0.01^{i}	0.02^{g}	0.01^{g}
(7.45) SNP	0.09^{a}	5.75^{ab}	5.17^{bc}
(11.91) SNP	0.07^{b}	7.00^{a}	4.56^{c}
(14.90) SNP	0.06^{c}	5.16^{abc}	3.22^{e}
(22.35) SNP	0.03^{d}	3.53^{cde}	3.58^{d}
(57.80) SNP	0.07^{b}	4.68^{bcd}	2.00^{f}
A + SNP (7.45)	0.02^{e}	3.47^{def}	5.78^{b}
A + SNP (11.91)	0.03^{d}	2.39^{f}	6.50^{ab}
A + SNP (14.90)	0.04^{d}	4.25^{bcd}	4.22^{c}
A + SNP (22.35)	0.014^{ef}	3.66^{cde}	6.96^{a}
A + SNP (57.80)	0.044^{cd}	4.48^{bcd}	5.11^{bc}
NAA (0.01)	0.054^{c}	2.69^{f}	4.33^{c}
IBA (1)	0.064^{b}	3.79^{cde}	3.17^{e}

میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد درصد بر اساس آزمون چنددامنه ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.
Mean values are followed by the same letters are not significantly different at $p<0.05$by the Duncan's multiple range test.

A: IBA (1 mg L^{-1}) +NAA (0.01 mg L^{-1})

بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها ($P\leq\%1$) میانگین وزن خشک در تیمار ۷/۴۵ میلی گرم در لیترSNP نسبت به سایر تیمارها دارای بیشترین مقدار بود. کمترین میانگین وزن خشک ریشه به تیمارهای شاهد و ۲۲/۳۵ میلی‌گرم در لیتر SNP همراه با یک میلی‌گرم در لیتر IBAو ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مربوط بود. در مجموع تنظیم کننده‌های رشد نسبت به ترکیب آنها با SNP تاثیر بیشتری بر روی تجمع ماده خشک ریشه داشتند، تقریبا در تمام تیمارهای SNP با افزایش آن وزن خشک ریشه کاهش یافت، اما اضافه شدن ترکیب هورمونی به SNP باعث بروز نتایج متنوعی شد. با این حال بیشترین مقدار وزن خشک ریشه در محیط کشت حاوی ۷/۴۵ میلی گرم در لیتر SNP بدست آمد (جدول ۱).

کاربرد SNP باعث افزایش تجمع ماده خشک در قسمت‌های مختلف گیاهان می‌شود (۴). NO باعث افزایش تعداد برگ و شاخص سطح برگ و در نتیجه باعث افزایش مواد اسیمیلاسیون می‌گردد که در هنگام انتقال آنها به ریشه منجر به افزایش وزن خشک ریشه می‌گردد. به نظر می‌رسد که به علت حضور SNP، تغییراتی در سطح هورمون‌های گیاهی در مراحل مختلف توسعه‌ای اتفاق می‌افتد، و این تغییرات احتمالاً باعث شروع فرایندهای متابولیکی برای توسعه ریشه و تجمع ماده خشک می‌شود (۴). اما در این تحقیق SNP همراه با تنظیم کننده‌های رشد نتوانست با عث افزایش ماده خشک گردد. احتمالا این موضوع به ژنوتیپ گیاه مرتبط است.

نتیجه گیری کلی

پاسخ ریزنمونه‌ها به باززایی و پرآوری و برخی صفات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی بسته به غلظت SNP متفاوت است. این ماده اثرات مثبتی روی صفاتی مانند شاخه‌زایی، محتوی پروتئین‌های محلول کل و مقدار کربوهیدراتهای محلول کل دارد. بر اساس نتایج بدست آمده غلظت ۵/۹۶ میلی گرم در لیتر SNP نسبت به سایر تیمارها بر روی صفات تعداد شاخه و مقدار کربوهیدارت‌های محلول کل مطلوب‌ترین تیمار بود. غلظت‌های ۱۱/۹۱ و ۲۲/۳۵ میلی گرم در لیتر SNP به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر همراه با IBA یک میلی‌گرم در لیتر NAAنسبت به سایر تیمارها مناسب‌ترین تیمار برای افزایش تعداد ریشه نابجا بود. اما بیشترین طول ریشه در غلظت‌های ۷/۴۵، ۱۱/۹۱ و ۱۴/۹۰ میلی گرم در لیتر SNP به تنهای به دست آمد. بر اساس نتایج این تحقیق اثر SNP و تنظیم کننده‌های رشد بر تعداد و طول ریشه در شرایط درون‌شیشه‌ای بستگی به نوع ژنوتیپ دارد. در این آزمایش ژنوتیپ MM106 نسبت به MM111 از نظر واکنش به تنظیم‌کننده رشد عکس‌العمل مناسبتری نشان داد. بنابر این ماده SNP به عنوان آزاد کننده NO می‌تواند گیاه را از نظر فیزیولوژیکی در مسیری قرار دهد که بتواند پتانسیل باززایی اندام‌ها را بروز دهد، و این پتانسیل بستگی به غلظت SNP و نوع ژنوتیپ دارد.

منابع

1- Booij-James I.S., Edelman M. and Mattoo A.K. 2009. Nitric oxide donor-mediated inhibition of phosphorylation shows that light-mediated degradation of photosystem II D1 protein and phosphorylation are not tightly linked. Planta, 229:1347-1352.
2- Bradford M.M. 1979. 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.
3- Chen Y.H., Chao Y.Y., Hsu Y.Y., Hong C.Y. and Kao C.H. 2012. Hemeoxygenase is involved in nitric oxide- and auxin-induced lateral root formation in rice. Plant Cell Reports, 31:1085–1091.
4- Chohan A., Parmar U. and Raina S.K. 2012. Effect of sodium nitroprusside on morphological characters under chilling stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Environmental Biology, 33:695-698.
5- Correa-Aragunde N., Graziano M. and Lamattina L. 2004. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. Planta, 218:900–905.
6- Correa-Aragunde N., Graziano M., Chevalier C. and Lamattina L. 2006. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. Journal of Experimental Botany, 57:581–588.
7- Cui X.M., Zhang Y.K., Wu X.B. and Liu C.S. 2010. The investigation of the alleviated effect of copper toxicity by exogenous nitric oxide in tomato plants. Plant Soil Environment, 56:274–281.
8- Gao Z., Lin Y., Wang X., Wei M., Yang F. and Shi Q. 2014. Sodium nitroprusside (SNP) alleviates the oxidative stress induced by $NaHCO_3$ and protects chloroplast from damage in cucumber. African Journal of Biotechnology, 11:6974-6982.
9- Gibson S.I. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. Current Opinion in Plant Biology, 8:93-102.
10- Gouvea C.M.C.P., Souza J.F., Magalhas A.C.N. and Martins I.S. 1997. NO releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. Plant Growth Regulator, 21:183–187.
11- Han X., Yang H., Duan K., Zhang X., Zhao H., You S. and Jiang Q. 2009. Sodium nitroprusside promotes multiplication and regeneration of *Malus hupehensis in vitro* plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 96:29–34.
12- Hemeda H.M. and Kelin B.P. 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetables extracts. Journal of Food Science, 55:184-185.
13- Huang A.X. and She X.P. 2003. Effect of SNP on Rhizogenesis of hypocotyls cutting from mung bean seedling. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 23:2196–2199. (in Chinese with English abstract).
14- Irigoyen J.J., Emerich D.W. and Sanchez-Diaz M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Journal of Plant Physiology, 84:55-60.
15- Jhanji S., Setia R.C., Kaur N., Kaur P. and Setia N. 2012. Role of nitric oxide in cadmium-induced stress on growth, photosynthetic components and yield of *Brassica napus* L. Journal of Environmental Biology, 33:1027-1032.
16- Kalra C. and Babbar S.B. 2010. Nitric oxide promotes in vitro organogenesis in *Linum usitatissimum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 103:353–359.
17- Kolberz Z., Bartha B. and Erdei L. 2008. Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in Arabidopsis thaliana root primordial. Journal of Plant Physiology, 65:967–975.
18- Lichtenthaler H.K. and Buschmann C. 2001. Extraction of photosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids.

Food Analytical Chemistry, F4. 2.1-F4. 2.6.
19- Molnár Z., Virág E. and Ördög V. 2011. Natural substances in tissue culture media of higher plants. Acta Biologica Szegediensis, 55:123-127.
20- Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiology of Plant, 15:473-497.
21- Neill S.J. and Hancock J.T. 2003. Nitric oxide signaling in plants. New Phytology, 159:11–35.
22- Pagnussat G.C., Lanteri M.L. and Lamattina L. 2003. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious Rhizogenesis process. Plant Physiology, 132:1241–1248.
23- Pagnussat G.C., Lanteri M.L., Lombardo M.C. and Lamattina L. 2004. Nitric oxide mediated the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. Plant Physiology, 135:279–286.
24- Procházková D., Haisel D., Wilhelmová N., Pavlíková D. and Száková J. 2013. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis. Photosynthetica, 51(4):483-489.
25- Sarropoulou V., Dimassi-Theriou K. and Therios I. 2014. *In vitro* plant regeneration from leaf explants of the cherry rootstocks CAB-6P, Gisela 6, and MxM 14 using sodium nitroprusside. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 50:226-234.
26- Sarvajeet S.G. and Narendra T. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48:909–930.
27- Tan C.B., Chin C.F. and Alderson P. 2013. Effects of sodium nitroprusside on shoot multiplication and regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. *In vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant, 49:626-630.
28- Tavallali V. and Rahemi M. 2007. Effects of Rootstock on Nutrient Acquisition by Leaf, Kernel and Quality of Pistachio (*Pistacia vera* L.). American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 2:240-246.
29- Xu, J., Yin H., Wang W., Mi Q. and Liu, X. 2009. Effects of sodium nitroprusside on callus induction and shoot regeneration in micropropagated *Dioscorea opposita*. Plant Growth Regulation. 59:279–285.

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.1, Spring 2019, P. 65-77
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، ص. ۷۷-۶۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

The Study of Nitric Oxide (NO) Effect on Proliferation and Rhizogenesis of the MM106 and MM111 Apple Rootstocks Micro Cutting under *In vitro* Conditions

S. M. H. Hayatolgheibi[1]- A. A. Mozafari[2*]

Received: 28-01-2018
Accepted: 29-01-2019

Introduction: The major problem in apple well-known rootstocks is lack of protocols for fast propagation under in vitro condition. Nitric oxide (NO) has been received the great encouragement and more attention in the recent years for its key signaling role. Nitric oxide plays a vital role in the growth and development of plants, including stimulating the seed germination and seedlings growth as well as delaying in the senescence process.

In previous studies, the application of sodium nitroprusside (SNP), as NO-releasing agent, in combination with different plant hormones under in vitro conditions showed that, The application of 30 µM SNP significantly increased shoot multiplication (9.4 shoots per explant) and the use of 100 µM SNP induced rhizogenesis (2.1 roots per explants) of apple micro cutting. Accordingly, the current study attempted to investigate the effects of SNP treatments in combination with NAA and BA on the regeneration of adventitious shoots and in combination with IBA and NAA on rhizogenesis of micro cuttings in MM111 and MM106 apple rootstocks, , under in vitro conditions.

Materials and Methods: The current study was conducted to investigate the effects of SNP alone and in combination with different types of growth regulators (IBA, NAA and BA) on the morpho-physiological characteristics of Malling Merton 111 (MM111) and Malling Merton 106 (MM106) micro cuttings under in vitro conditions. MM111 and MM106 that growth under in vitro conditions were already used with about 2.5 cm length as the plant's sources. This research was carried out in the frame of two separate experiments (proliferation and rhizogenesis). For the proliferation, the MS medium supplemented with different concentrations of SNP (0.0, 2.96, 5.98, 8.94, 11.91 and 14.90 mg L^{-1}) used as treatments. For the rhizogenesis, the ½ MS medium supplemented with different concentrations of SNP (0, 7.45, 14.90, 22/35 and 57.80 mg L^{-1}) alone and combined with 1 mg L^{-1} IBA and 0.01 mg L^{-1} NAA was used. In the first experiment, characteristics such as shoot length, number of shoots, total soluble proteins and carbohydrates content, peroxidase activity, carotenoids, chlorophyll a, chlorophyll b as well as total chlorophyll content were measured. In the rhizogenesis experiment, root length, fresh and dry weight of roots, as desirable characteristics, were measured. In both experiments, the treatments were arranged in a completely randomized factorial design with four replicates. Four and three explants were used in each replication for proliferation and rhizogenesis experiments, respectively.

Results and Discussion: In the proliferation experiment, the number of shoots under 5.98 mg L^{-1} SNP was significantly higher than other treatments. The experimental treatments did not have a significant effect on the shoots length. Since nitric oxide may play a role in cell division, so it participates in the regeneration of the lateral branches and caused their proliferation (11). The results showed that total chlorophyll and carbohydrate contents in MM106 rootstock were significantly higher than MM111. The highest total chlorophyll content was observed in 5.98 and 14.90 mg L^{-1} SNP treatments and the maximum soluble carbohydrates was obtained in 2.96 mg L^{-1} SNP treatment. Shoot regeneration under SNP treatments had a relatively high correlation with the amount of soluble proteins and carbohydrates. In the rhizogenesis experiment, the root length at 5.98, 11.91 and 14.90 mg L^{-1} SNP treatments were significantly different from other treatments. The lowest root number was observed in the absence of SNP. The previous literature indicated that NO induces the CYCD3:1 gene and caused the expression of the anti-CDK inhibitor KPP2 gene at the onset of the formation of peripheral lateral root, and the genetic regulators of auxin-dependent cell cycle is directly related to NO. Also, our results showed that root fresh weight under 5.98 and 14.90 mg L^{-1} SNP treatments was significantly higher than other treatments, and the highest root dry weight was obtained in 5.98 mg L^{-1} SNP in comparison to other treatments. Based on the results it may be assumed that presence of SNP causes changes in the level of plant hormones at different stages of development, which is probably resulted in starting metabolic processes for root development and dry matter accumulation. Each trait showed a more favorable result at a specific concentration of SNP. However, proliferation under 5.96 mg L^{-1} SNP first increased then reduced.

Conclusion: Application of SNP treatments had a positive effect on the measured traits e.g. shoot numbers,

1 and 2- M.Sc. Student and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan
(*- Corresponding Author Email: a.mozafari@uok.ac.ir)

total soluble protein and carbohydrate contents, as well as fresh and dry weight of roots. In this experiment, the concentration of 5.98 mg L^{-1} SNP had the highest effect in term of shoot numbers, total soluble protein and carbohydrate contents, compared to other treatments. The apple rootstock MM106 showed the better performance to the plant growth regulators than MM111 rootstock. Overall, the present results indicated that SNP material, as a NO-releasing source, can physiologically be present in the plant in a way that can induce regeneration of plants and this potential depends on the genotype type.

Keywords: Growth regulator, Plantlet, Sodium nitroprusside, Tissue culture