Biostimulants effect of salicylic acid, simvastatin and indole butyric acid on regeneration and some of morphological and physiological characteristics of *Satureja avromanica* Maroofi. under in vitro conditions

Narges Noori[1], Ali akbar Mozafari[2], Jalal Khorshidi[3]*

[1.] Biotechnology and Molecular Genetics of Horticultural Crops, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

[2.] Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

[3.] Department of Horticultural Sciences and Engineering, Research Center of Medicinal Plants Breeding and Development, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Abstract

Satureja avromanica Maroofi. is an endemic and endangered medicinal plant. In order to *in vitro* propagation of this plant, an experiment was performed in two phase. The first phase was performed as a factorial based on completely randomized design. The first factor included four concentrations of simvastatin (0, 5, 10 and 20 µmol) and second factor included four concentrations of salicylic acid (0, 0.1, 0.3 and 0.5 mmol). Shoot tips were used as micro explants and MS culture media was used as stock culture media for all treatments. After 45 days from culture of micro explants, viability of micro explants, percentage of dry weight, number and length of stem, leaf area, content of chlorophyll a, b and total chlorophyll, carotenoid, proline, total phenol and total soluble protein were evaluated. In the second phase, the effects of three levels of IBA (0, 0.5 and 1 µmol) on percentage of rooted sample, root length and number of roots were investigated. Results indicated that micro explants that were subjected under combined high concentrations of simvastatin and salicylic acid were burned. The most of studied traits were affected significantly by simvastatin and salicylic acid. Maximum mean of dry weight percentage, proline and total phenol were observed in explants treated with 0.3 mmol salicylic acid + 5µmol simvastatin. The highest of stem length was related to 10 µmol simvastatin treatment and the maximum of chlorophyll, carotenoid and total soluble protein were observed in explants treated with 20 µmol simvastatin. Among the applied treatments for stimulation of rooting, 0.5 µmol IBA was the most effective treatment.

Keywords: Endemic, *In-vitro*, Medicinal plant, Regeneration, Simvastatin

* Corresponding Author: j.khorshidi@uok.ac.ir

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

DOI: 10.22108/ijpb.2019.114594.1132

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال یازدهم، شمارهٔ چهل و دوم، زمستان ۱۳۹۸، صفحهٔ ۱۹-۳۸
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۹/۲۵
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵ و ۱۳۹۸/۰۶/۳۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۹/۱۷

نقش محرک‌های زیستی سالیسیلیک‌اسید، سیمواستاتین و ایندول‌بوتیریک‌اسید بر باززایی و برخی ویژگی‌های ریختی و فیزیولوژیکی مرزهٔ اورامانی (*Satureja avromanica* Maroofi) در شرایط درون‌شیشه‌ای (*in vitro*)

نرگس نوری[۱]، علی‌اکبر مظفری[۲]، جلال خورشیدی[۳*]
[۱] بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
[۲] گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
[۳] گروه علوم و مهندسی باغبانی، مرکز پژوهشی اصلاح و توسعهٔ گیاهان دارویی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

چکیده

مرزهٔ اورامانی (*Satureja avromanica* Maroofi) از گیاهان دارویی اندمیک و در معرض خطر انقراض ایران است. به‌منظور تکثیر درون‌شیشه‌ای (*in vitro*) این گیاه، آزمایشی در دو مرحله انجام شد: مرحلهٔ اول به‌شکل فاکتوریل بر پایهٔ طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. فاکتور اول، چهار غلظت سیمواستاتین (صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) و فاکتور دوم، چهار غلظت سالیسیلیک‌اسید (صفر، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌مولار) بود. نوک شاخساره به عنوان ریزنمونه و محیط‌کشت پایهٔ موراشیگ و اسکوگ (MS) به عنوان محیط‌کشت ثابت تمام تیمارها در نظر گرفته شد. پس‌از ۴۵ روز از کشت ریزنمونه‌ها، صفت‌های درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها، درصد وزن خشک، تعداد و طول شاخه‌های باززایی‌شده، سطح برگ، میزان کلروفیل a، b و کل، میزان کاروتنوئید، پرولین، فنول کل و پروتئین محلول کل ارزیابی شدند. در مرحلهٔ دوم، تأثیر سه غلظت ایندول‌بوتیریک‌اسید (صفر، ۰/۵ و ۱ میکرومولار) بر صفت‌های درصد نمونهٔ ریشه‌دارشده، طول و تعداد ریشه ارزیابی شد. نتایج نشان دادند ریزنمونه‌هایی که تحت‌تأثیر اثر متقابل غلظت‌های زیاد سیمواستاتین و سالیسیلیک‌اسید قرار می‌گیرند، از بین می‌روند. بیشتر صفت‌های ارزیابی‌شده به‌طور معناداری تحت‌تأثیر هر دو ترکیب قرار گرفتند. بیشترین میانگین درصد وزن خشک، پرولین و فنول کل در تیمار ۰/۳ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید+۵ میکرومولار سیمواستاتین و بیشترین طول شاخه در تیمار ۱۰ میکرومولار سیمواستاتین مشاهده شد. بیشترین سطح برگ، میزان کلروفیل، کاروتنوئید و پروتئین محلول در تیمار ۲۰ میکرومولار سیمواستاتین به دست آمد. در بین تیمارهای اعمال‌شده برای تحریک ریشه‌زایی، تیمار ۰/۵ میکرومولار IBA مؤثرترین تیمار بود.

واژه‌های کلیدی: اندمیک، باززایی، *درون‌شیشه‌ای*، سیمواستاتین، گیاه دارویی

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: j.khorshidi@uok.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۹۱۴۸۱۶۵۱۰۵

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

مرزه (*Satureja* sp.) یکی از مهم ترین گیاهان دارویی خانوادهٔ نعناع (Lamiaceae) است که به‌طور خام یا فرآوری‌شده به عنوان تسکین‌دهندهٔ درد دندان، آرام‌بخش، ضدعفونی‌کننده، ضدنفخ، خلط‌آور، اشتهاآور، ضداسهال، مقوی قوای جنسی و ضداسهال در صنایع مختلف استفاده می‌شود (Omidbaigi, 2005). حدود ۱۶ گونه از این جنس در ایران گزارش شده که ۱۰ گونهٔ آن ازجمله مرزهٔ اورامانی (*S. avromanica* Maroofi) اندمیک ایران است (Jamzad, 2012). تنها در محدودهٔ کوچکی از اورامانات استان کردستان حدود ۱۵۰ بوته مرزهٔ اورامانی رویش دارد و به‌شدت در معرض خطر انقراض است (Khorshidi *et al*., 2017). محتوای اسانس این گونه ۱/۴ درصد و ترکیب غالب اسانس آن، تیمول است (Hooshidary *et al*., 2017). بذرهای مرزهٔ اورامانی قدرت جوانه‌زنی بسیار کم و قلمه‌های علفی این گیاه توان ریشه‌زایی بسیار اندکی دارند (Khorshidi *et al*., 2017)؛ ازاین‌رو، ضروری به نظر می‌رسد برای حفظ این گونهٔ گیاهی و جلوگیری از انقراض آن یا به عبارتی، در راستای حفاظت برون‌جای (Ex-situ conservation) این گونهٔ اندمیک، مطالعه‌های بیشتری دربارهٔ روش بهینهٔ تکثیر آن انجام شوند. مطالعه‌های اندکی در زمینهٔ روش‌های تکثیر این گیاه ازجمله کشت *درون‌شیشه‌ای* (in vitro) آن انجام شده است. Mozafari و همکاران (۲۰۱۵) در پژوهشی به مطالعهٔ تأثیر محیط‌کشت‌های موراشیگ و اسکوگ (MS) و محیط‌کشت گیاهان چوبی (WPM) حاوی نسبت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر باززایی مرزهٔ اورامانی پرداختند و مشاهده کردند بیشترین تعداد شاخهٔ باززایی‌شده روی محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم‌درلیتر بنزیل‌آدنین (BA) به وجود می‌آید؛ درحالی‌که بیشترین طول شاخساره در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم‌درلیتر تیدیازورون (TDZ) ایجاد می‌شود. بر اساس گزارش Karimi و همکاران (۲۰۱۴)، محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر ۲ و ۴- دی‌کلروفنوکسی‌استیک‌اسید (2,4-D)، ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP) و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) مناسب‌ترین محیط‌کشت برای باززایی مرزهٔ اورامانی است. در دهه‌های اخیر، تولید و تکثیر گیاهان در شرایط *درون‌شیشه‌ای* به‌ویژه گونه‌هایی که تکثیر آنها با سایر روش‌ها امکان‌پذیر نیست یا درصد موفقیت آن کم است، رواج زیادی یافته است. تکثیر در شرایط *درون‌شیشه‌ای* راهکار مطلوبی برای تولید سریع و انبوه گونه‌های گیاهی و به‌دست‌آوردن گیاهان یکنواخت به شمار می‌آید که امروزه با عنوان فرایندی ضروری در زیست‌فناوری و اصلاح از آن یاد می‌شود (Sadeghian *et al*., 2014).

استفاده از محرک‌های زیستی (Elicitors) در فرایند تولید و تکثیر گیاهان و بهبود عملکرد کمّی و کیفی آنها رواج بسیاری یافته است. این ترکیبات از طریق فعال‌سازی و تحریک بیان ژن‌ها موجب افزایش تولید برخی آنزیم‌ها و نهایتاً ترکیبات مختلفی می‌شوند که درمجموع، رشد و نمو گیاه را بهبود می‌بخشند و به افزایش سنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه منجر می‌شوند (Howlett, 2006)؛ همچنین این ترکیبات به‌شکل مولکول‌های پیام‌رسان در گیاه عمل می‌کنند و موجب فعال‌شدن سیستم دفاعی گیاه می‌شوند (Zhao *et al*., 2005)؛ سالیسیلیک‌اسید و استاتین‌ها ازجملهٔ این ترکیبات به شمار می‌آیند.

سالیسیلیک‌اسید، ترکیبی فنولی است که با تأثیر بر فتوسنتز، تنفس، هدایت روزنه‌ای، تعرق و جذب و انتقال یون‌ها بر رشد و نمو گیاهان تأثیر می‌گذارد (Popova *et al*., 2003). تأثیر مثبت سالیسیلیک‌اسید بر رشد و نمو گیاهان در مطالعه‌های متعددی گزارش شده است (Gharib, 2006; Eraslan *et al*., 2007; Hussein *et al*., 2007; Idrees *et al*., 2011; Zahra *et al*., 2011; Hashmi *et al*., 2012; Hesami *et al*., 2012; Rahimi *et al*., 2013; Divya *et al*., 2014; Ghaderi *et al*., 2015; Mozafari *et al*., 2018).

استاتین‌ها با مهار آنزیم HMG-CoAردوکتاز موجب کاهش تولید ترکیبات مسیر موالونات و برعکس، افزایش تولید ترکیبات مسیر مستقل از موالونات می‌شوند و از این طریق بر رشد و نمو گیاهان تأثیر می‌گذارند (Zieden and Olsson, 2005). مطالعه‌های بسیار اندکی دربارهٔ تأثیر استاتین‌ها بر رشد و نمو گیاهان انجام شده‌اند. در پژوهشی که Laule و همکاران (۲۰۰۳) روی گیاه آرابیدوپسیس انجام دادند، گزارش کردند کاربرد لواستاتین (Lovastatin) که بازدارندهٔ مسیر موالونات است، موجب افزایش تولید کاروتنوئیدها و کلروفیل می‌شود؛ همچنین در گزارش دیگری آمده است لواستاتین موجب کاهش سنتز کاروتنوئید در گیاه گوجه‌فرنگی می‌شود (Rodriguez-concepcion and Gruissem, 1999).

ازآنجاکه مرزهٔ اورامانی گیاهی دگرگشن است و هر بوتهٔ آن مانند رقمی مستقل واکنش‌های متفاوتی به محیط‌کشت‌ها و محرک‌های زیستی مختلف نشان می‌دهد، نمی‌توان به نتایج یک پژوهش اکتفا کرد و به مطالعه‌های بیشتری در این زمینه نیاز است؛ بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف محرک‌های زیستی سیمواستاتین، سالیسیلیک‌اسید و نوع محیط‌کشت بر باززایی و پرآوری گیاه یادشده و دستیابی به مناسب‌ترین غلظت این ترکیبات برای تکثیر بهینهٔ این گیاه در شرایط *درون‌شیشه‌ای* انجام شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام پژوهش حاضر، نمونه‌های گیاهی زنده از عرصهٔ طبیعی استان کردستان (روستای بلبر شهرستان مریوان) جمع‌آوری و به‌شکل گلدانی در گلخانهٔ گروه علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه کردستان کشت و نگهداری شدند. پژوهش حاضر به‌شکل فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. عوامل شامل دو نوع محرک زیستی سالیسیلیک‌اسید و سیمواستاتین (هرکدام در چهار غلظت) و اثر متقابل آنها بودند (جدول ۱).

در پژوهش حاضر، محیط‌کشت پایهٔ موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۰/۱ میلی‌گرم‌درلیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA) و ۲ میلی‌گرم‌درلیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP)، محیط ثابت تمام آزمایش‌ها در نظر گرفته شد. در تهیهٔ محلول پایهٔ سالیسیلیک‌اسید از هیدروکسیدسدیم نرمال و در تهیهٔ محلول پایهٔ سیمواستاتین از اتانول ۹۶ درصد برای حلال استفاده شد؛ محلول‌های یادشده هم‌زمان با آماده‌سازی محیط‌کشت به آن اضافه شدند. شیشه‌های حاوی محیط‌کشت برای ضدعفونی‌شدن به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاوی با دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر قرار گرفتند. اشعهٔ فرابنفش و اتانول ۹۶ درصد برای استریل‌کردن محیط کار و سایر تجهیزات استفاده شد. سرشاخه‌های گیاه

به طول ۲ سانتی‌متر، ریزنمونه‌های استفاده‌شده در پژوهش حاضر بودند که برای ضدعفونی سطحی، ابتدا به‌مدت ۱۰ ثانیه در اتانول ۷۶ درصد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت‌سدیم ۱/۲ درصد قرار گرفتند؛ در نهایت، ریزنمونه‌ها سه بار با آب دوبارتقطیرشده شستشو و روی محیط‌های کشت آماده‌شده قرار داده شدند. در هر ظرف کشت، چهار گیاه کشت و هر ۱۳ ظرف کشت، یک تکرار در نظر گرفته شد. هر تیمار شامل سه تکرار بود. ظروف شیشه‌ای استفاده‌شده ۲۵۰ میلی‌لیتری و حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت بودند. نمونه‌های گیاهی برای رشد و باززایی به اتاقک رشدی با دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نور ۴۰ میکرومول بر متر در ثانیه، دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد منتقل شدند. پس‌از گذشت ۴۵ روز از کشت ریزنمونه‌ها، شاخص‌های درصد وزن خشک گیاه، تعداد شاخه، طول شاخه، سطح برگ، میزان کلروفیل a، b و کل، میزان کاروتنوئید، پرولین، فنول کل و پروتئین محلول نمونه‌ها اندازه‌گیری و ثبت شدند. درصد وزن خشک با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم، سطح برگ با دستگاه پلانیمتر، کلروفیل a، b و کل و نیز کاروتنوئید مطابق روش Lichtenthaler و Buschmann (۲۰۰۱)، پرولین بر اساس روش Bates و همکاران (۱۹۷۳)، فنول کل مطابق روش Singleton و همکاران (۱۹۹۹) و پروتئین محلول کل بر اساس روش Bradford (۱۹۷۶) به دست آمد؛ همچنین تعداد شاخه به‌شکل مشاهده‌ای شمارش و طول شاخه‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- تیمارهای مختلف اعمال‌شده برای باززایی *درون‌شیشه‌ای* گیاه مرزهٔ اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.)

نوع محرک زیستی	سطوح تیماری
سیمواستاتین (SS)	چهار غلظت صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار
سالیسیلیک‌اسید (SA)	چهار غلظت صفر، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌مولار
سالیسیلیک‌اسید+سیمواستاتین	۵ میکرومولار SS + ۰/۱ میلی‌مولار SA
	۵ میکرومولار SS + ۰/۳ میلی‌مولار SA
	۵ میکرومولار SS + ۰/۵ میلی‌مولار SA
	۱۰ میکرومولار SS + ۰/۱ میلی‌مولار SA
	۱۰ میکرومولار SS + ۰/۳ میلی‌مولار SA
	۱۰ میکرومولار SS + ۰/۵ میلی‌مولار SA
	۲۰ میکرومولار SS + ۰/۱ میلی‌مولار SA
	۲۰ میکرومولار SS + ۰/۳ میلی‌مولار SA
	۲۰ میکرومولار SS + ۰/۵ میلی‌مولار SA

ریشه‌دارکردن نمونه‌ها: گیاهچه‌های حاصل از مرحلهٔ پرآوری به قطعه‌های کوچک‌تری شامل ریزشاخه‌ای به طول ۲ سانتی‌متر تقسیم شدند و روی محیط‌کشت ½MS در معرض سه تیمار مختلف صفر، ۰/۵ و ۱ میکرومولار ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA) قرار گرفتند. پس‌از گذشت چهار هفته، صفت‌هایی ازجمله درصد نمونهٔ ریشه‌دارشده، تعداد ریشهٔ تشکیل‌شده در هر ریزنمونه و طول ریشه

اندازه‌گیری شدند. به‌منظور سازگاری و ادامهٔ رشد ریزنمونه‌ها، گیاهچه‌های ریشه‌دارشده به گلدان‌های کوچک پلاستیکی حاوی مخلوطی از محیط‌کشت‌های خاک باغچه، کوکوپیت، پرلیت و ورمی‌کولایت به نسبت حجمی منتقل و در اتاقک رشدی با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نور ۴۰ میکرومول بر متر در ثانیه، متوسط دمای شبانه‌روز ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد قرار داده شدند. پس‌از گذشت دو هفته، پوشش پلاستیکی روی گلدان‌ها به‌تدریج برداشته شد. پس‌از سازگارشدن گیاهچه‌ها با شرایط طبیعی بیرون از محیط *درون‌شیشه‌ای* کشت بافت، نهایتاً نمونه‌ها به گلدان‌های پلاستیکی بزرگ حاوی خاک زراعی منتقل و در گلخانه قرار داده شدند.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS (نسخهٔ ۹/۱)، مقایسهٔ میانگین‌ها بر اساس آزمون حداقل اختلاف معناداری (LSD) و رسم نمودارها با نرم‌افزار Sigma Plot (نسخهٔ ۱۲/۳) انجام شد.

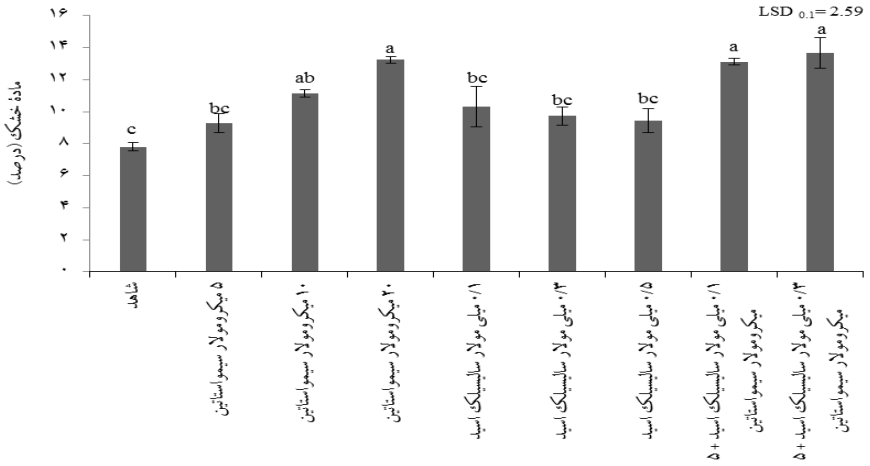
نتایج

مشاهده‌های ۴۵ روز پس‌از کشت ریزنمونه‌ها نشان دادند برخی تیمارها نه‌تنها موجب باززایی و پرآوری مطلوب گیاه نمی‌شوند، ریزنمونه‌ها حالت سوخته می‌یابند و درنتیجه، این تیمارها از روند ارزیابی‌ها حذف شدند (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج ارزیابی کلی ریزنمونه‌ها ۴۵ روز پس‌از کشت ریزنمونه‌های گیاه مرزهٔ اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) در تیمارهای مختلف سالیسیلیک‌اسید و سیمواستاتین

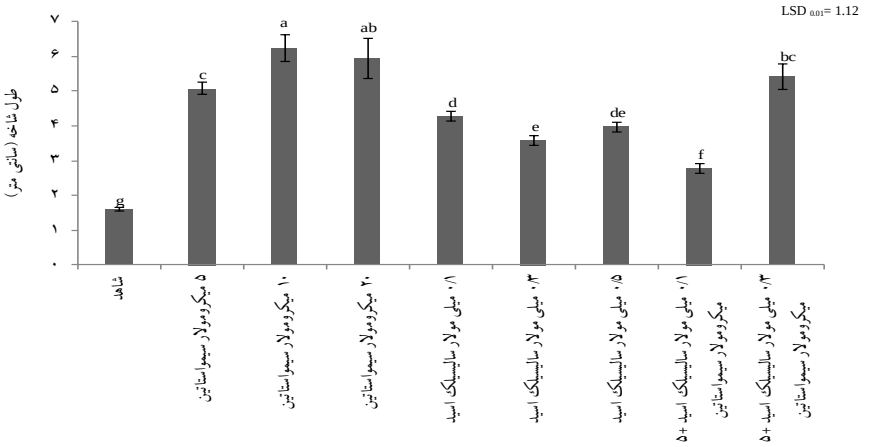
تیمارهای با رشد مطلوب که ازنظر مورفوفیزیولوژیک ارزیابی شدند.	تیمارهایی که دچار سوختگی شدند و از روند ارزیابی‌ها حذف شدند.
چهار غلظت ۰، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید (SA) چهار غلظت ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار سیمواستاتین (SS) ۵ میکرومولار SS + ۰/۱ میلی‌مولار SA ۵ میکرومولار SS + ۰/۳ میلی‌مولار SA	۵ میکرومولار SS + ۰/۵ میلی‌مولار SA ۱۰ میکرومولار SS + ۰/۱ میلی‌مولار SA ۱۰ میکرومولار SS + ۰/۳ میلی‌مولار SA ۱۰ میکرومولار SS + ۰/۵ میلی‌مولار SA ۲۰ میکرومولار SS + ۰/۱ میلی‌مولار SA ۲۰ میکرومولار SS + ۰/۳ میلی‌مولار SA ۲۰ میکرومولار SS + ۰/۵ میلی‌مولار SA

درصد وزن خشک: مادهٔ خشک به‌دست‌آمده از شاخه‌های باززایی‌شده تحت‌تأثیر تیمارهای سیمواستاتین به‌طور معناداری بیشتر از تیمار شاهد بود و به‌طور متوسط، سیمواستاتین در مقایسه با سالیسیلیک‌اسید مادهٔ خشک بیشتری تولید کرد. میزان زیست‌تودهٔ گیاه با افزایش غلظت سیمواستاتین از ۵ به ۲۰ میکرومولار، روند افزایشی نشان داد؛ در حالی‌که با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید، تغییر معناداری در میزان زیست‌تودهٔ گیاه مشاهده نشد. بیشترین میزان مادهٔ خشک گیاه از نمونه‌هایی به دست آمد که از هر دو محرک زیستی سیمواستاتین و سالیسیلیک‌اسید در آنها استفاده شده بود؛ هرچند تیمارهای یادشده با تیمارهای ۱۰ و ۲۰ میکرومولار سیمواستاتین تفاوت معناداری نداشتند. میزان مادهٔ خشک تیمارهای سالیسیلیک‌اسید ازنظر آماری تفاوت معناداری با تیمار شاهد نداشت (شکل ۱).

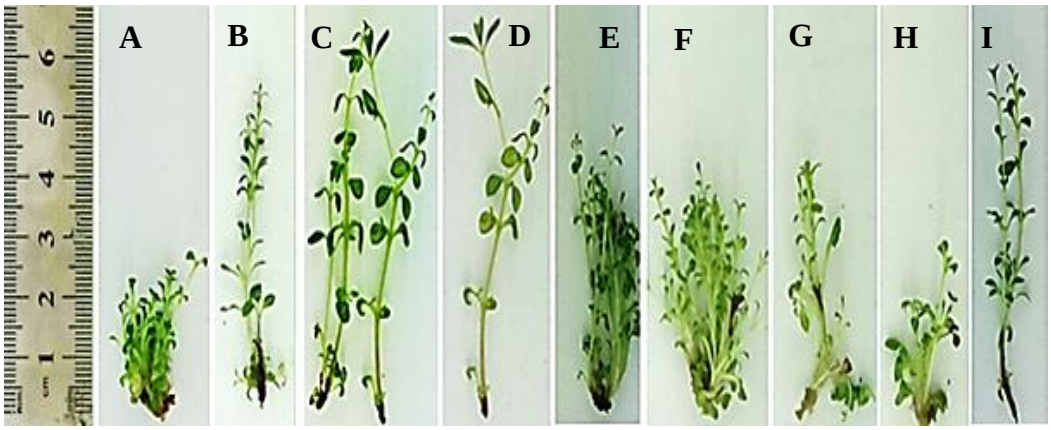


شکل ۱- میانگین درصد مادهٔ خشک شاخه‌های باززایی‌شدهٔ مرزهٔ اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) تحت‌تأثیر تیمارهای مختلف سیمواستاتین (SS) و سالیسیلیک‌اسید (SA) در شرایط *درون‌شیشه‌ای*. میانگین‌های هر ستون که حرف‌های مشابهی دارند، اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد ندارند.

طول شاخه: هر دو محرک زیستی سیمواستاتین و سالیسیلیک‌اسید طول شاخه را به‌طور درخور توجهی در مقایسه با شاهد افزایش دادند؛ هرچند افزایش طول شاخه با افزایش غلظت محرک‌های زیستی روند منطقی نداشت. در تیمارهای سیمواستاتین، طول شاخه با افزایش غلظت این محرک به‌طور معناداری افزایش و سپس کاهش یافت که البته کاهش آن معنادار نبود. تیمارهای مختلف سالیسیلیک‌اسید ازنظر طول شاخه اختلاف معناداری باهم نداشتند. طول شاخه‌های باززایی‌شده در تیمار ترکیبی ۰/۳ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید+۵ میکرومولار سیمواستاتین به‌طور معناداری بیشتر از طول شاخه‌های باززایی‌شدهٔ تیمارهای سالیسیلیک‌اسید بود؛ هرچند تفاوت معناداری با تیمارهای ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار سیمواستاتین نداشت (شکل‌های ۲ و ۳).

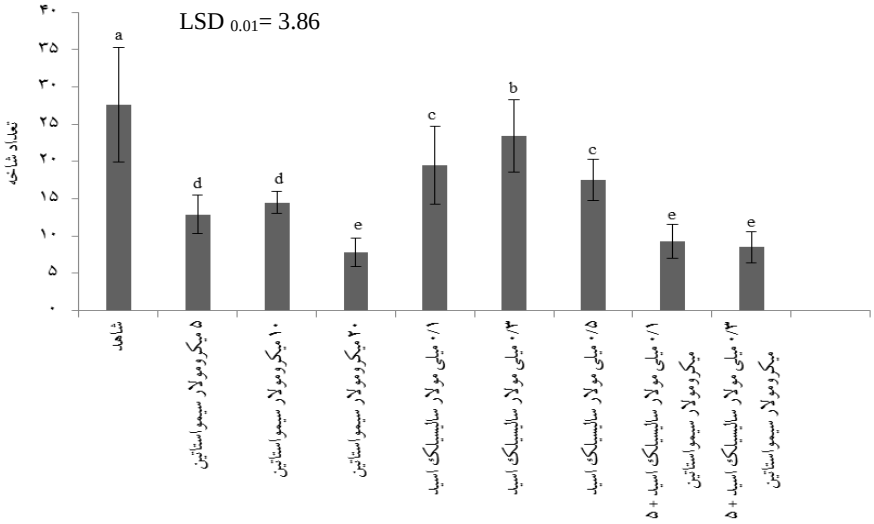


شکل ۲- میانگین طول شاخساره‌های باززایی‌شده از ریزنمونه‌های مرزهٔ اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) در معرض تیمارهای مختلف سیمواستاتین (SS) و سالیسیلیک‌اسید (SA) در شرایط *درون‌شیشه‌ای*. میانگین‌های هر ستون که حرف‌های مشابهی دارند، اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد ندارند.



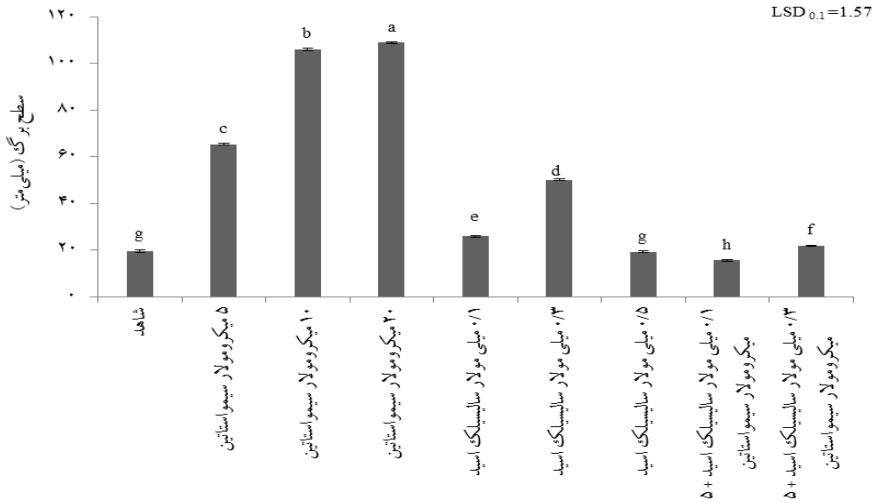
شکل ۳- مقایسهٔ طول شاخساره‌های پرآوری‌شدهٔ مرزهٔ اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) در شرایط *درون‌شیشه* (۴۵ روز پس‌از کشت ریزنمونه‌ها) در تیمارهای مختلف شاهد (A)، ۵ میکرومولار سیمواستاتین (B)، ۱۰ میکرومولار سیمواستاتین (C)، ۲۰ میکرومولار سیمواستاتین (D)، ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید (E)، ۰/۳ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید (F)، ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید (G)، ۵ میکرومولار سیمواستاتین+۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید (H) و ۵ میکرومولار سیمواستاتین+۰/۳ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید (I)

تعداد شاخه: بیشترین تعداد شاخهٔ باززایی‌شده از هر ریزنمونه به تیمار شاهد مربوط بود و کمترین تعداد شاخه در تیمارهای ۲۰ میکرومولار سیمواستاتین و اثر متقابل تیمارهای ترکیبی سیمواستاتین و سالیسیلیک‌اسید مشاهده شد. افزایش غلظت سیمواستاتین و سالیسیلیک‌اسید با افزایش تعداد شاخهٔ باززایی‌شده روند منطقی نداشت. تیمارهای ترکیبی دو محرک ازنظر تعداد شاخهٔ باززایی‌شده اختلاف معناداری باهم نداشتند. تعداد شاخه‌های باززایی‌شده در تیمارهای سالیسیلیک‌اسید به‌طور متوسط بیشتر از تیمارهای سیمواستاتین و اثر متقابل آنها بود (شکل ۴).



شکل ۴- میانگین تعداد شاخهٔ باززایی‌شده از هر ریزنمونهٔ مرزهٔ اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) در تیمارهای مختلف سیمواستاتین (SS) و سالیسیلیک‌اسید (SA) در شرایط *درون‌شیشه‌ای*. میانگین‌های هر ستون که حرف‌های مشابهی دارند، اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد ندارند.

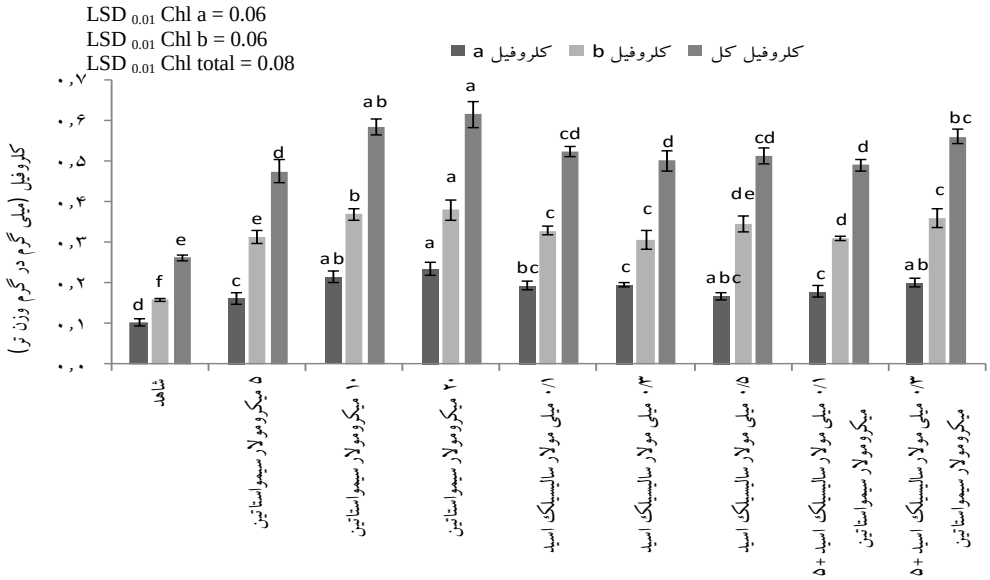
سطح برگ: سطح برگ شاخه‌های باززایی‌شده در معرض تیمارهای سیمواستاتین به‌طور معناداری بیشتر از سایر تیمارها بود و با افزایش غلظت این محرک رشد، سطح برگ نیز افزایش یافت؛ درحالی‌که در تیمارهای سالیسیلیک‌اسید، ابتدا روند افزایشی و سپس کاهشی مشاهده شد. سطح برگ ریزنمونه‌هایی که با هر دو محرک زیستی تیمار شده بودند کمتر از ریزنمونه‌هایی بود که تنها با یکی از محرک‌های زیستی تیمار شده بودند. بیشترین سطح برگ به تیمار ۲۰ میکرومولار سیمواستاتین مربوط بود و کمترین سطح برگ در تیمار ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید+۵ میکرومولار سیمواستاتین مشاهده شد (شکل ۵).



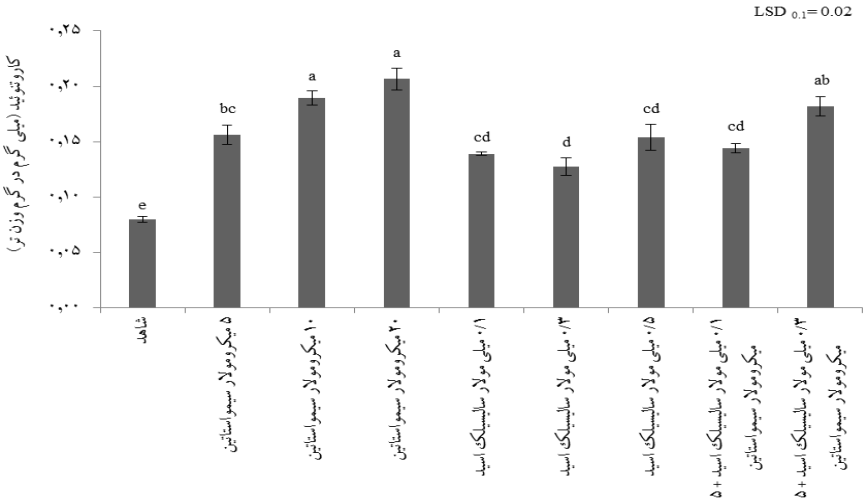
شکل ۵- سطح برگ شاخساره‌های باززایی‌شده از هر ریزنمونهٔ مرزه اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) در تیمارهای مختلف سیمواستاتین (SS) و سالیسیلیک‌اسید (SA) در شرایط *درون‌شیشه‌ای*. میانگین‌های هر ستون که حرف‌های مشابهی دارند، اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد ندارند.

محتوای کلروفیل و کاروتنوئید: تغییرات میزان کلروفیل a، b و کل و کاروتنوئید گیاهچه‌های باززایی‌شده روند نسبتاً مشابهی داشتند. میزان رنگیزه‌های یادشده با افزایش غلظت سیمواستاتین، روند افزایشی معناداری نشان داد؛ ولی با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید، تفاوت معناداری در میزان این رنگیزه‌ها مشاهده نشد. بیشترین میزان کلروفیل a در تیمار ۲۰ میکرومولار سیمواستاتین مشاهده شد که البته با تیمارهای ۱۰ میکرومولار سیمواستاتین و تیمار ترکیبی ۰/۳ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید و ۵ میکرومولار سیمواستاتین تفاوت معناداری نداشت. بیشترین میزان کلروفیل b به نمونه‌های تیمار ۲۰ میکرومولار سیمواستاتین تعلق داشت که اختلاف معناداری با تیمارهای ۱۰ میکرومولار سیمواستاتین، تیمارهای مختلف سالیسیلیک‌اسید و نیز تیمارهای ترکیبی سیمواستاتین و سالیسیلیک‌اسید نداشت. بیشترین محتوای کلروفیل کل و نیز کاروتنوئید در نمونه‌های تیمار ۲۰ میکرومولار سیمواستاتین مشاهده شد که با تیمارهای ۱۰ میکرومولار سیمواستاتین و تیمار ترکیبی ۰/۳ میلی‌مولار

سالیسیلیک‌اسید و ۵ میکرومولار سیمواستاتین تفاوت معناداری نداشت. میزان کلروفیل a، b و کل و نیز کاروتنوئید در تیمار سیمواستاتین به‌طور متوسط بیشتر از سایر تیمارها بود و کمترین میزان این رنگیزه‌ها در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل‌های ۶ و ۷).

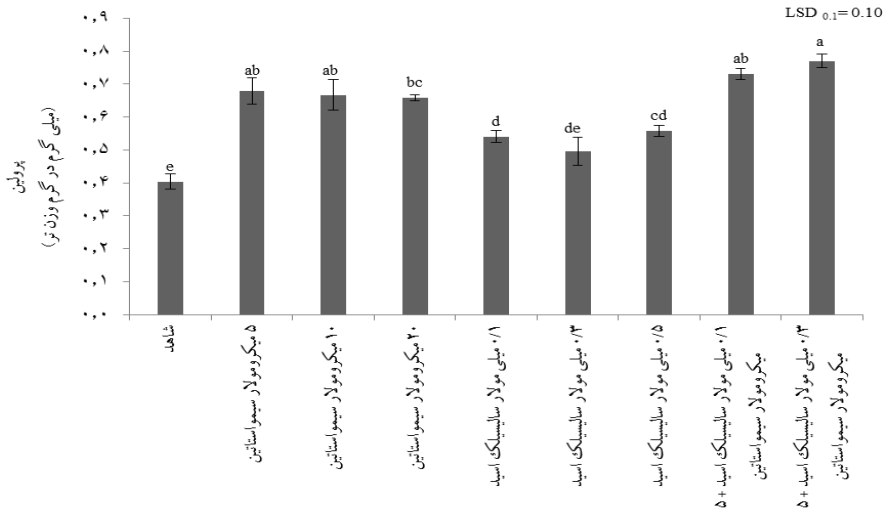


شکل ۶- میانگین محتوای کلروفیل a، b و کل شاخه‌های باززایی‌شدهٔ مرزه اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) در تیمارهای مختلف سیمواستاتین (SS) و سالیسیلیک‌اسید (SA) در شرایط *درون‌شیشه‌ای*. میانگین‌های هر ستون که حرف‌های مشابهی دارند، اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد ندارند.



شکل ۷- میانگین محتوای کاروتنوئید شاخه‌های باززایی‌شدهٔ مرزه اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) در تیمارهای مختلف سیمواستاتین (SS) و سالیسیلیک‌اسید (SA) در شرایط *درون‌شیشه‌ای*. میانگین‌های هر ستون که حرف‌های مشابهی دارند، اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد ندارند.

محتوای پرولین: به‌طور کلی، میزان پرولین نمونه‌های تیمارشده با ترکیبی از دو محرک زیستی سیمواستاتین و سالیسیلیک‌اسید بیشتر از سایر نمونه‌ها بود؛ هرچند اختلاف معناداری با میزان پرولین تیمارهای ۵ و ۱۰ میکرومولار سیمواستاتین نداشت. افزایش غلظت سیمواستاتین و سالیسیلیک‌اسید تغییر معناداری در محتوای پرولین نمونه‌ها ایجاد نکرد. درمجموع، محتوای پرولین نمونه‌های تیمارشده با سیمواستاتین بیشتر از نمونه‌های تیمارشده با سالیسیلیک‌اسید بود. کمترین میزان پرولین به نمونه‌های شاهد مربوط بود (شکل ۸).

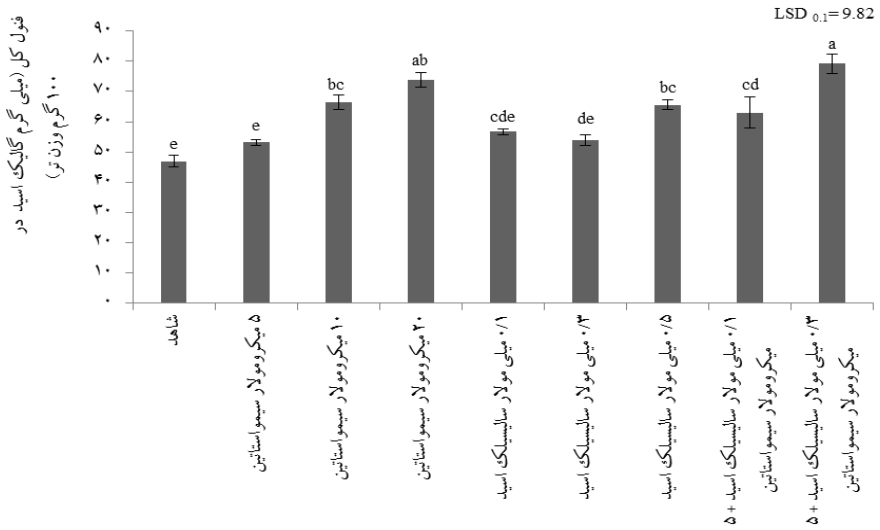


شکل ۸- میانگین محتوای پرولین شاخه‌های باززایی‌شدهٔ مرزهٔ اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) در تیمارهای مختلف سیمواستاتین (SS) و سالیسیلیک‌اسید (SA) در شرایط *درون‌شیشه‌ای*. میانگین‌های هر ستون که حرف‌های مشابهی دارند، اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد ندارند.

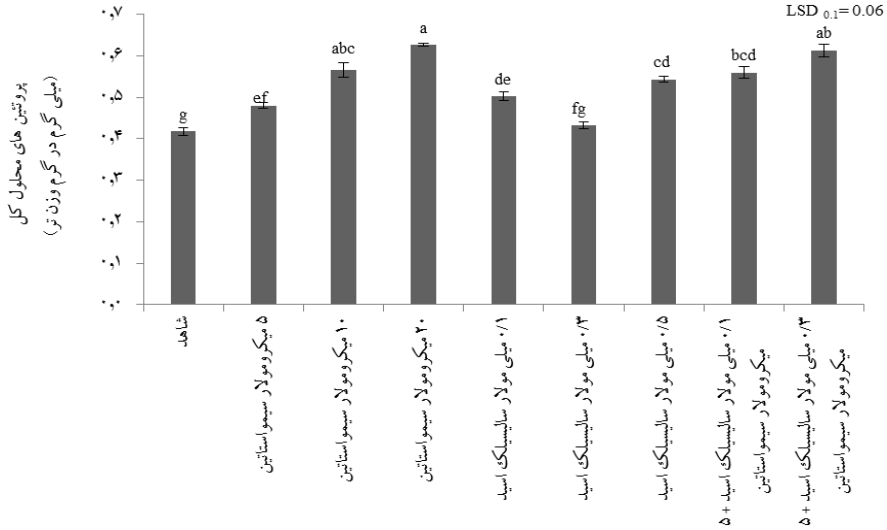
میزان فنول کل: افزایش غلظت سیمواستاتین به‌طور معناداری موجب افزایش محتوای فنول کل شد، ولی افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید تغییر معناداری در میزان فنول کل ایجاد نکرد. میانگین میزان فنول نمونه‌های تیمارشده با سیمواستاتین بیشتر از میانگین فنول نمونه‌های تیمارشده با سالیسیلیک‌اسید بود. بیشترین محتوای فنول به نمونه‌های تیمار ترکیبی ۰/۳ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید+۵ میکرومولار سیمواستاتین مربوط بود؛ هرچند تفاوت معناداری با تیمار ۲۰ میکرومولار سیمواستاتین نداشت. کمترین میزان فنول به نمونه‌های شاهد تعلق داشت که تفاوت معناداری با تیمار ۵ میکرومولار سیمواستاتین و تیمارهای ۰/۱ و ۰/۳ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید نداشت (شکل ۹).

پروتئین محلول کل: مشابه با فنول کل، محتوای پروتئین محلول نمونه‌ها به‌طور معناداری تحت‌تأثیر غلظت سیمواستاتین قرار گرفت؛ به‌طوری‌که با افزایش غلظت این محرک زیستی، میزان پروتئین محلول افزایش معناداری داشت. افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید تأثیر معناداری بر میزان پروتئین محلول نداشت. بیشترین محتوای پروتئین محلول در نمونه‌هایی مشاهده شد که با ۲۰ میکرومولار

سیمواستاتین تیمار شده بودند که البته با تیمار ۱۰ میکرومولار سیمواستاتین و تیمار ترکیبی ۰/۳ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید+۵ میکرومولار سیمواستاتین تفاوت معناداری نداشت. کمترین محتوای پروتئین محلول کل به نمونه‌های تیمار شاهد تعلق داشت و اختلاف معناداری با تیمار ۰/۳ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید نداشت (شکل ۱۰).

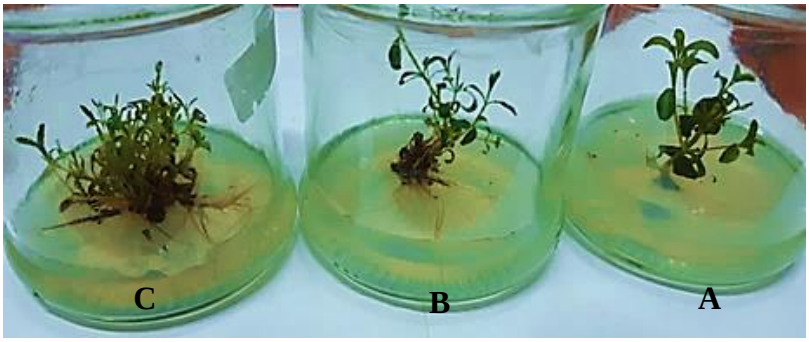


شکل ۹- میانگین میزان فنول شاخه‌های باززایی‌شدهٔ مرزهٔ اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) در تیمارهای مختلف سیمواستاتین (SS) و سالیسیلیک‌اسید (SA) در شرایط *درون‌شیشه‌ای*. میانگین‌های هر ستون که حرف‌های مشابهی دارند، اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد ندارند.



شکل ۱۰- میانگین میزان پروتئین محلول شاخه‌های باززایی‌شدهٔ مرزهٔ اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) در تیمارهای مختلف سیمواستاتین (SS) و سالیسیلیک‌اسید (SA) در شرایط *درون‌شیشه‌ای*. میانگین‌های هر ستون که حرف‌های مشابهی دارند، اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد ندارند.

ریشه‌زایی شاخساره‌ها: ارزیابی ریزنمونه‌ها پس‌از گذشت چهار هفته از کشت در محیط ریشه‌زایی نشان داد ریشه‌زایی در هیچ‌کدام از ریزنمونه‌های تیمار شاهد اتفاق نیفتاده است؛ هرچند با گذشت زمان استقرار در محیط کشت، درصد شاخساره‌های ریشه‌دارشده در ریزنمونه‌های تیمارشده با IBA افزایش یافت. درنهایت، بیشترین میانگین ریزنمونه‌های ریشه‌دارشده (۹۶/۶ درصد) و تعداد ریشهٔ به‌وجودآمده از هر ریزنمونه (۵/۶۶) در تیمار ۰/۵ میکرومولار IBA مشاهده شد که تفاوت معناداری با تیمار ۱ میکرومولار IBA نداشت. بیشترین میانگین طول ریشه (۵/۷۳ سانتی‌متر) به نمونه‌های تیمار ۰/۵ میکرومولار IBA متعلق داشت (شکل ۱۱ و جدول ۳).



شکل ۱۱- ریشه‌زایی شاخساره‌های باززایی‌شدهٔ مرزهٔ اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) در شرایط *درون‌شیشه‌ای* در تیمارهای صفر (A)، ۰/۵ میکرومولار (B) و ۱ میکرومولار (C) ایندول‌بوتیریک‌اسید

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد، تعداد و طول ریشه‌های به‌وجودآمده از شاخساره‌های مرزهٔ اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) در تیمارهای مختلف ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA) در شرایط *درون‌شیشه‌ای*

غلظت ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA)	ریزنمونه‌های ریشه‌دارشده (درصد)	تعداد ریشهٔ به‌وجودچآمده از هر ریزنمونه	طول ریشه (سانتی‌متر)
صفر (شاهد)	۰/۰ ± ۰/۰ b	۰/۰ ± ۰/۰ b	۰/۰ ± ۰/۰ c
۰/۵ میکرومولار	۹۶/۶ ± ۳/۰۵ a	۵/۶۶ ± ۰/۵۷ a	۵/۷۳ ± ۰/۹۲ a
۱ میکرومولار	۹۱/۶ ± ۳/۵۱ a	۴ ± ۱ a	۳/۲۳ ± ۰/۸۷ b

میانگین‌های هر ستون که حرف‌های مشابهی دارند، اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد ندارند.

سازگارکردن گیاهچه‌ها با محیط *برون‌شیشه‌ای* (*in vivo*): تعدادی از گیاهچه‌های باززایی‌شده در محیط *درون‌شیشه‌ای* پس‌از انتقال به اتاقک رشد از بین رفتند. میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها پس‌از گذشت دو هفته از انتقال به محیط *برون‌شیشه‌ای* برابر ۷۶ درصد بود؛ اما پس‌از گذر از مرحلهٔ اتاقک رشد و انتقال به محیط گلخانه، گیاهان رشد بسیار مطلوبی داشتند (شکل ۱۲).

شکل ۱۲- گیاهچه‌های مرزۀ اورامانی (*S. avromanica* Maroofi.) قرارگرفته در اتاقک رشد (سمت راست) و گیاه سازگار شدۀ مرزۀ اورامانی در گلخانه (سمت چپ)

بحث

محرک‌های زیستی ترکیباتی‌اند که از طریق ایجاد تغییرات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی در گیاه و نهایتاً ایجاد تغییر در متابولیسم گیاه سبب افزایش یا کاهش رشد و عملکرد آن می‌شوند. افزایش یا کاهش رشد و عملکرد گیاه بسته به نوع محرک زیستی، غلظت آن، مرحلۀ رشدی گیاه، نوع گیاه و مدت زمان تیمار متفاوت است (Namdeo, 2007). همان‌طور که نتایج نشان دادند در برخی تیمارها که اغلب اثر متقابل غلظت‌های زیاد سیمواستاتین و سالیسیلیک‌اسید بودند، ریزنمونه‌ها رشد نداشتند، حالت سوخته پیدا کردند و نهایتاً از بین رفتند که احتمالاً به‌علت تنش شدید ناشی از غلظت زیاد محرک‌های زیستی به‌کاررفته است. تجمع بیش از حد متابولیت‌های ثانویه، آسیب به سلول و سرانجام مرگ سلول و بافت در اثر کاربرد غلظت زیاد محرک‌های زیستی گزارش شده است (Kai *et al.*, 2012)؛ همچنین غلظت زیاد محرک‌های زیستی موجب آسیب به غشای سلول و کاهش و نهایتاً توقف متابولیسم سلول و مرگ بافت گیاه می‌شود (Ghanati *et al.*, 2010). گزارش شده است غلظت کم سالیسیلیک‌اسید (کمتر از ۰/۰۱ میلی‌مولار) در گیاه شابیزک محرک رشد است، ولی غلظت زیاد آن (بیشتر از ۰/۱ میلی‌مولار) موجب اختلال در رشد می‌شود (Ahmadian Chashmi *et al.*, 2010). ایجاد خسارت به گیاه در غلظت زیاد سالیسیلیک‌اسید بسته به گونۀ گیاهی متفاوت است؛ به این مطلب در گزارش Horvath و همکاران (۲۰۰۷) اشاره است. بیشترین سطح برگ، طول شاخساره و وزن خشک به تیمارهای سیمواستاتین مربوط بود و با افزایش غلظت این محرک زیستی، میزان سه صفت یادشده افزایش یافت. کلروفیل و کاروتنوئیدها رنگیزه‌های جاذب نور و مؤثر در فتوسنتز هستند و افزایش تولید آنها تحت‌تأثیر تیمار سیمواستاتین موجب افزایش فتوسنتز و طبیعتاً افزایش سطح برگ، طول شاخساره و وزن خشک گیاه می‌شود. دو صفت سطح برگ و وزن خشک تحت‌تأثیر سالیسیلیک‌اسید به‌طور جزئی افزایش یافتند؛ هرچند اختلاف معناداری با شاهد نداشتند که شاید به‌علت حساسیت زیاد این گیاه به غلظت‌های زیاد سالیسیلیک‌اسید است. محرک یادشده در غلظت‌های زیاد به‌شکل بازدارندۀ رشد عمل می‌کند (Karlidag *et al.*, 2009). افزایش سطح برگ تحت‌تأثیر تیمار سالیسیلیک‌اسید در مطالعه روی گیاهان مرزۀ تابستانه (غلظت ۳ میلی‌مولار) (Faraji-mehmani

(*et al*., 2016)، ریحان (غلظت ۱ میلی‌مولار) (Gharib, 2006) و توت‌فرنگی (غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) (Ghaderi *et al*., 2015) گزارش شده است. سالیسیلیک‌اسید با اثر روی میزان جذب و انتقال مواد غذایی و فتوسنتز بر میزان مادهٔ خشک گیاهی تأثیر می‌گذارد (Hayat *et al*., 2010). افزایش وزن خشک گیاهان مرزهٔ تابستانه (Faraji-mehmani *et al*., 2016)، بابونه (Kovacik *et al*., 2009)، رازیانه (Hashmi *et al*., 2012)، ذرت و سویا (Khan *et al*., 2003) و گندم (Shakirova *et al*., 2003) تحت‌تأثیر سالیسیلیک‌اسید گزارش شده است. طویل‌تربودن شاخساره‌ها در تیمارهای سیمواستاتین در مقایسه با سایر تیمارها احتمالاً به‌علت افزایش تولید هورمون جیبرلین ناشی از اثر بازدارندگی سیمواستاتین بر مسیر موالونات و تأثیر محرک آن بر مسیر مستقل از موالونات است. جیبرلین، هورمونی است که نقش بسزایی در طویل‌شدن سلول‌ها و طبیعتاً بافت‌ها و اندام‌های گیاهی دارد و ازآنجاکه پیش‌مادهٔ آن، دی‌ترپن است و اغلب تولید دی‌ترپن‌ها در مسیر مستقل از موالونات انجام می‌شود، طبیعی است میزان تولید آن تحت‌تأثیر سیمواستاتین افزایش یابد و نهایتاً موجب افزایش طول شاخساره‌ها شود (Kafi *et al*., 2003). طول شاخساره‌ها تحت‌تأثیر سالیسیلیک‌اسید در مقایسه با شاهد افزایش یافت که احتمالاً به‌علت تأثیر مثبت این محرک زیستی در پروتئین‌سازی و تقسیم و تمایز سلولی در مریستم انتهایی گیاه است (Shakirova, 2007). برخلاف سایر صفت‌های اندازه‌گیری‌شده، بیشترین تعداد شاخسارهٔ به‌وجودآمده از هر ریزنمونه به تیمار شاهد تعلق داشت. افزایش تعداد شاخساره در نمونه‌های شاهد احتمالاً از تولید بیشتر هورمون سایتوکینین ناشی می‌شود. سایتوکینین، هورمونی است که نقش مهمی در شاخه‌زایی دارد و تولید آن از مسیر موالونیک انجام می‌شود و ازاین‌رو، در نمونه‌های تیمارشده با سیمواستاتین که بازدارندهٔ مسیر یادشده است، تولید آن کمتر و شاخه‌زایی کمتری انجام می‌شود (Kafi *et al*., 2003). ازآنجاکه سالیسیلیک‌اسید موجب تحریک تولید داخلی اکسین می‌شود، طول شاخساره را بیشتر از تعداد شاخساره تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (Shakirova, 2007). مشاهده‌ها نشان دادند نمونه‌های با شاخساره‌های طویل‌تر، تعداد شاخسارهٔ کمتری دارند و به نظر می‌رسد در نمونه‌های با تعداد شاخسارهٔ کمتر، انرژی گیاه بیشتر صرف طویل‌شدن شاخساره می‌شود؛ به عبارتی، تعداد شاخساره با طول شاخساره همبستگی منفی دارد. بیشترین محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در نمونه‌های تیمارشده با سیمواستاتین مشاهده شد و با افزایش‌یافتن غلظت سیمواستاتین، میزان رنگیزه‌های یادشده افزایش یافت که احتمالاً به‌علت تأثیر سیمواستاتین بر مسیر بیوسنتزی این رنگیزه‌هاست. پیش‌ماده‌های کلروفیل و کاروتنوئیدها اغلب از مسیر مستقل از موالونات سنتز می‌شوند (Kafi *et al*., 2003). سیمواستاتین مهارکنندهٔ مسیر موالونات است و با منحرف‌کردن مسیر بیوسنتزی به‌سمت مسیر مستقل از موالونات موجب افزایش سنتز محصولات نهایی این مسیر می‌شود. اگرچه سالیسیلیک‌اسید میزان کلروفیل و کاروتنوئید را در مقایسه با نمونه‌های شاهد افزایش داد، همسو با افزایش غلظت این محرک زیستی، میزان این

رنگیزه‌ها تغییر معناداری نشان نداد. سالیسیلیک‌اسید با تأثیر بر میزان بازشدگی روزنه‌ها و درنتیجه، تأثیر بر فتوسنتز و تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه بر تولید رنگیزه‌های یادشده تأثیر می‌گذارد (Faraji-mehmani *et al*., 2016). افزایش محتوای پرولین و پروتئین محلول کل تحت‌تأثیر کاربرد سالیسیلیک‌اسید ممکن است به‌علت نقش مثبت این محرک در تنظیم متابولیسم نیتروژن و پروتئین‌سازی باشد (Shakirova, 2007). در شرایط تنش، معمولاً پرولین افزایش چشمگیری در گیاه دارد و نقش بسزایی در تنظیم اسمزی، تثبیت پروتئین‌ها، پایداری غشا و مهار رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کند (Iqbal *et al*., 2014). به نظر می‌رسد غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید اعمال‌شده در آزمایش حاضر ازنظر اعمال تنش بر گیاه تفاوت چندانی باهم ندارند و به‌همین‌علت، میزان پرولین تولیدشده در غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید اختلاف معناداری نشان نمی‌دهند. افزایش محتوای فنول کل همسو با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید از نقش مؤثر این محرک زیستی در افزایش فتوسنتز و تولید متابولیت‌های اولیه ناشی می‌شود (Ying *et al*., 2013). متابولیت‌های اولیه پیش‌مادهٔ متابولیت‌های ثانویه‌اند و ازآنجاکه ترکیبات فنولی جزو متابولیت‌های ثانویه به شمار می‌روند، طبیعی است با افزایش تولید متابولیت‌های اولیه، تولید ترکیبات فنولی نیز افزایش یابد. مشابه با سالیسیلیک‌اسید، محتوای پروتئین و فنول کل همسو با افزایش غلظت سیمواستاتین افزایش یافت. پیش‌مادهٔ تمام مسیرهای بیوسنتزی موالونیک‌اسید (مسیر سنتز ترپن‌ها)، مالونیک‌اسید (مسیر سنتز ترکیبات فنولی) و تری‌کربوکسیلیک‌اسید (مسیر سنتز ترکیبات نیتروژن‌دار ازجمله پروتئین‌ها)، استیل‌کوآنزیم‌آ است و ازاین‌رو، سیمواستاتین با اثر بازدارندگی روی مسیر موالونیک موجب منحرف‌کردن مسیر بیوسنتزی به‌سمت تولید پروتئین‌ها و ترکیبات فنولی می‌شود (Kafi *et al*., 2003). به‌طورکلی و بر اساس نتایج پژوهش حاضر می‌توان گفت هرچند سیمواستاتین و سالیسیلیک‌اسید تأثیر مثبتی بر اغلب صفت‌های رشدی مرزهٔ اورامانی دارند، در غلظت‌های زیاد به‌ویژه زمانی که این دو محرک زیستی باهم استفاده شوند، سمیت ایجاد می‌کنند و موجب ازبین‌رفتن ریزنمونه‌ها می‌شوند؛ ازاین‌رو، غلظت بهینهٔ محرک‌های زیستی بسته به نوع گیاه و نوع محرک زیستی متفاوت است. همان‌طور که نتایج نشان دادند ریزنمونه‌ها رشد بهتری در تیمارهای سیمواستاتین در مقایسه با سایر تیمارها دارند و افزایش غلظت این محرک زیستی، رشد ریزنمونه‌ها را به‌طور درخور توجهی بهبود می‌بخشد. ایندول‌بوتیریک‌اسید به‌طور معناداری موجب تحریک ریشه‌زایی و افزایش تعداد و طول ریشه‌های ریزنمونه‌ها شد، ولی افزایش غلظت آن از ۰/۵ به ۱ میکرومولار صفت‌های یادشده را کاهش داد. ایندول‌بوتیریک‌اسید از تنظیم‌کننده‌های رشد مصنوعی است که نقشی مشابه با اکسین طبیعی دارد و موجب تحریک تقسیم سلول، طویل‌شدن سلول‌ها و در ادامه، رشد ریشه‌ها می‌شود (Shahhoseini *et al*., 2015). در مطالعه‌های بسیاری که دربارهٔ گیاهان مختلف ازجمله پونه‌سای بی‌کرک (Narimani *et al*., 2017)، مرزنجوش (Ccedil *et al*., 2013)، پروانش (Junaid *et al*., 2007;

(Dhandapani *et al*., 2008) و رزمـــاری (Shahhoseini *et al*., 2015) انجام شـده‌اند، نقـش مؤثر و مثبـت ایـن تنظیم‌کننـده در ریشـه‌زایی اثبـات شـده اسـت؛ بـاوجوداین، بـه نظـر می‌رسـد کـاربرد غلظت‌های بیش از حد این تنظیم‌کننده کـه بسته بـه نـوع گیـاه متفـاوت اسـت، نـه‌تنها اثـر مثبتـی روی ریشه‌زایی نـدارد، به‌شـکل بازدارنـده عمـل می‌کنـد (Shahhoseini *et al*., 2015; Narimani *et al*., 2017). افزایش بیش از حد ایندول‌بوتیریک‌اسـید بـا بـرهم‌زدن تعـادل هورمـونی گیـاه موجـب کـاهش ریشـه‌زایی می‌شـود (Jull *et al*., 1994)؛ همچنـین گزارش شده اسـت اکسـین و ترکیبـات شبه‌اکسـینی در غلظت‌هـای زیـاد موجـب تخریـب سـلول و بافت‌های ته قلمـه و درنتیجـه، کـاهش شـاخص‌های مرتبط بـا ریشـه‌زایی می‌شـوند (Puri and Verma, 1996). دستیابی به مناسب‌ترین غلظـت تنظیم‌کننـدهٔ رشد بـرای تحریـک ریشـه‌زایی بـه عوامـل بسـیاری ازجمله نوع تنظیم‌کنندهٔ رشد، نوع گیـاه، سـن گیـاه، وضـعیت تغذیـه‌ای گیـاه و میـزان هورمون‌هـای درون‌زای گیاه بستگی دارد و نیازمنـد پژوهش‌هـای بیشتر در این زمینه است.

جمع‌بندی

همان‌طور کـه نتـایج نشـان دادنـد، محرک‌هـای سالیسیلیک‌اسـید و سیمواسـتاتین تـأثیر معنـاداری بـر اغلـب صـفت‌های مطالعه‌شـده در مـرزهٔ اورامـانی دارند. از بین تیمارهای اعمال‌شده، بیشترین میـانگین درصد وزن خشـک، پـرولین و فنـول کـل در تیمـار ترکیبـی ۰/۳ میلی‌مـولار سالیسیلیک‌اسـید+۵ میکرومولار سیمواستاتین و بیشترین طـول شـاخه در تیمـار ۱۰ میکرومـولار سیمواسـتاتین مشـاهده شـد. بیشترین سطح برگ، میزان کلروفیـل، کاروتنوئیـد و پـروتئین محلـول در تیمـار ۲۰ میکرومـولار سیمواسـتاتین بـه دسـت آمـد. بـه‌طورکلی، ریزنمونه‌های تیمارشده با سیمواستاتین در مقایسـه بـا تیمارهای شاهد و سالیسیلیک‌اسید وضـعیت رشـدی مطلـوب‌تری داشـتند؛ همچنـین از بـین غلظت‌هـای اعمال‌شـدهٔ ایـندول بوتیریک‌اسـید بـرای تحریـک ریشـه‌زایی ریزنمونـه‌ها، غلظـت ۰/۵ میکرومـولار مناسب‌ترین غلظت بود.

سپاسگزاری

از واحـد پژوهشـی اصـلاح و توسـعهٔ گیاهـان دارویی دانشگاه کردستان برای حمایت‌های مادی و معنوی از پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

Ahmadian Chashmi, N., Sharifi, M., Karimi, F. and Rahnama, H. (2010) Comparative study of tropane alkaloids production in hairy roots and plantlet cultures of *Atropa belladonna* L. by salicylic acid treatments. Iranian Journal of Plant Biology 2(1): 63-76 (in Persian).

Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39(1): 205-207.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72(1): 248-254.

Ccedil, A. K., Oluk, A. E. and Ihsan, Y. A. (2013) Comparison of the antimicrobial activity and essential oil content of wild and micropropagated *Origanum sipyleum* L.: A medicinal herb native to Turkey. Journal of Medicinal Plants Research 7(6): 230-233.

Dhandapani, M., Kim, D. H. and Hong, S. B. (2008) Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from the explants of *Catharanthus roseus*. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology 44(1): 18-25.

Divya, P., Puthusseri, B. and Neelwarne, B. (2014) The effect of plant regulators on the concentration of carotenoids and phenolic compounds in foliage of coriander. LWT-Food Science and Technology 56(1): 101-110.

Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A. and Alpaslan, M. (2007) Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. Scientia Horticulturae 113(2): 120-128.

Faraji mehmani, A., Esmaielpour, B., Sefidkon, F. and Khorramdel, S. (2016) Effects of foliar spraying with salicylic acid and putrescine on growth characteristics and yield of summer savory (*Satureja hortensis* L.). Iranian Journal of Field Crops Research 14(1): 73-85 (in Persian).

Ghaderi, N., Normohammadi, S. and Javadi, T. (2015) Morpho-physiological responses of strawberry (*Fragaria×ananassa*) to exogenous salicylic acid application under drought stress. Journal of Agricultural Science and Technology 17(1): 167-178 (in Persian).

Ghanati, F., Bakhtiarian, S. and Abdolmaleki, P. (2010) Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites in *Calendula officinalis* L. Biological Sciences and Technology 1(1): 21-31(in Persian).

Gharib, F. A. (2006) Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and marjoram. International Journal of Agriculture and Biology 4: 485-492.

Hashmi, N., Khan, M. A., Idrees, M. and Aftab, T. (2012) Exogenous salicylic acid stimulates physiological and biochemical changes to improve growth, yield and active constituents of fennel essential oil. Plant Growth Regulation 68(2): 281-291.

Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. Environmental and Experimental Botany 68(1): 14-25.

Hesami, S., Nabizadeh, E., Rahimi, A. and Rokhzadi, A. (2012) Effects of salicylic acid levels and irrigation intervals on growth and yield of coriander (*Coriandrum sativum*) in field conditions. Environmental and Experimental Biology 10: 113-116.

Hooshidary, F., Sefidkon, F. and Naderi, M. (2017) The essential oils components of wild and cultivated *Satureja avromanica* Maroofi in Kurdistan province of Iran. Iranian Journal of Horticultural Science 48(1): 149-159 (in Persian).

Horvath, E., Szalai, G. and Janda, T. (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. Journal of Plant Growth Regulation 26(3): 290-300.

Howlett, B. J. (2006) Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. Current Opinion in Plant Biology 9(4): 371-375.

Hussein, M. M., Balbaa, L. K. and Gaballah, M. S. (2007) Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 3(4): 321-328.

Idrees, M., Naeem, M., Aftab, T. and Khan, M. M. A. (2011) Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defense system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. Acta Physiologiae Plantarum 33(3): 987-999.

Iqbal, N., Umar, S., Khan, N. A. and Khan, M. I. R. (2014) A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. Environmental and Experimental Botany

100: 34-42.

Jamzad, Z. (2012) Flora of Iran: Lamiaceae. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran (in Persian).

Jull, L. G., Warren, S. L. and Blazich, F. A. (1994) Rooting yoshinocryptomeria stem cutting as influenced by growth stage, branch order IBA treatment. Scientia Horticulturae 29(12): 1532-1535.

Junaid, A., Mujib, A., Bhat, M. A., Sharma, M. P. and Aamaj, J. (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Catharanthus roseus*. Biologia Plantarum 51: 641-646.

Kafi, M., Zand, A., Kamkar, B., Sharifi, H. and Goldani, M. (2003) Plant physiology. Jahad e Daneshgahi, Mashhad (in Persian).

Kai, G., Yang, Sh., Zhang, Y., Luo, X., Fu, X., Zhang, A. and Xiao, J. (2012) Effects of different elicitors on yield of tropane alkaloids in hairy roots of *Anisodus acutangulus*. Molecular Biology Reports 39: 1721-1729.

Karimi, N., Ghasmpour, H. R. and Yari, M. (2014) Effect of different growth regulators on callus induction and plant regeneration of *Satureja* species. Annual Research and Review in Biology 4(16): 2646-2654.

Karlidag, H., Yildirim, E. and Turan, M. (2009) Salicylic acid ameliorates the adverse effect of salt stress on strawberry. Scientia Agricola 66(2): 180-187.

Khan, W., Prithiviraj, B. and Smith, D. L. (2003) Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. Journal of Plant Physiology 160(5): 485-492.

Khorshidi, J., Ghaderi, N., Mozafari, A. A. and Javadi, T. (2017) The first results of propagation methods of *Satureja avromanica* Maroofi. 2th National Congress of Dry Farming Medicinal Plants of Iran, Urmia University, Urmia, Iran (in Persian).

Kovacik, J., Klejdus, B., Hedb avny, J. and Backor, M. (2009) Salicylic acid alleviates NaCl-induced changes in the metabolism of *Matricaria chamomilla* plants. Ecotoxicology 18(5): 544-554.

Laule, O., Furholz, A., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P. B., Gruissem, W. and Lange, M. (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences 100(11): 6866-6871.

Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. (2001) Extraction of photosynthetic tissues: Chlorophylls and carotenoids. Food Analytical Chemistry 4(3): 1-8.

Mozafari, A. A., Vafaee, Y. and Karami, E. (2015) *In vitro* propagation and conservation of *Satureja avromanica* Maroofi, an indigenous threatened medicinal plant of Iran. Physiology and Molecular Biology of Plants 21(3): 433-439.

Mozafari, A. A., Havas, F. and Ghaderi, N. (2018) Application of iron nanoparticles and salicylic acid in in vitro culture of strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) to cope with drought stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 132(3): 511-523.Namdeo, A. G. (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacognosy Reviews 1(1): 69-79.

Narimani, R., Moghaddam, M. and Mojarab, S. (2017) Evaluation of the micro propagation of hairless catmint (*Nepeta nuda* L.), an endangered medicinal plant. Journal of Cell and Tissue 7(4): 387-398 (in Persian).

Omidbaigi, R. (2005) Production and processing of medicinal plants. Astane Ghodse Razavi, Mashhad (in Persian).

Popova, L., Ananieva, E., Hristova, V., Christov, K., Georgieva, K., Alexieva, V. and Stoinova, Z. H. (2003) Salicylic acid and methyl jasmonate induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. Bulgarian Journal of

Plant Physiology 133: 152.

Puri, S. and Verma, R. C. (1996) Vegetative propagation of Dalbergiasissoo Roxb. using softwood and hardwood stem cuttings. Journal of Arid Environmental 34: 235-245.

Rahimi, A. R., Rokhzadi, A., Amini, S. and Karami, E. (2013) Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on growth and secondary metabolites in *Cuminum cyminum* L. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences 3(12): 140-149.

Rodriguez-Concepcion, M. and Gruissem, W. (1999) Arachidonic acid alters tomato HMG expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation. Plant Physiology 119(1): 41-48.

Sadeghian, S., Ranjbar, Gh. A. and Kazemitabar, K. (2014) Consideration and selection of suitable hormonal composition for in vitro shoot regeneration and propagation of *Ocimum basilicum* L. Journal of Crop Breeding 6(13): 40-48 (in Persian).

Shahhoseini, R., Moghaddam, M., Kiani, D. and Mansori, R. (2015) Effect of different concentrations of IBA and NAA on rooting of semi-hardwood cuttings of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 31(4): 574-586 (in Persian).

Shakirova, F. M. (2007) Role of hormonal system in the manifestation of growth promoting and antistress action of salicylic acid. In: Salicylic acid: a plant hormone (Eds. Hayat, S. and Ahmad, A.) 69-90. Springer, Dordrecht.

Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A. and Fatkhutdinova, D. R. (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. Plant Science 164(3): 317-322.

Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299: 152-178.

Zahra, S., Amin, B., Ali, V. S. M., Ali, Y. and Mehdi, Y. (2011) The salicylic acid effect on the tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) sugar, protein and proline contents under salinity stress (NaCl). Journal of Biophysics and Structural Biology 2(3): 35-41.

Zhao, J., Davis, L. C. and Verpoorte, R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23(4): 283-333.

Zieden, B. and Olsson, A. G. (2005) The role of statins in the prevention of ischemic stroke. Current Atherosclerosis Reports 7(5): 364-368.