



تأثیر هورمون استروئیدی تستوسترون بر رشد گیاهچه، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کالوس‌زایی گیاه بابونه آلمانی *Matricaria chamomilla L.*

الناز نوذری^۱، رسول اصغری زکریا^۲، سدابه جهانبخش^۳ و ناصر زارع^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیل
۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیل (نویسنده مسؤول: r-asghari@uma.ac.ir)
تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۲۱ تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۱

چکیده

به منظور بررسی تأثیر هورمون استروئیدی تستوسترون بر رشد گیاهچه و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آن در شرایط کشت درون شیشه‌ای و همچنین تأثیر آن بر کالوس‌زایی از ریزنمونه برگ در گیاه بابونه آلمانی *Matricaria chamomilla L.* آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از غلظت‌های مختلف هورمون تستوسترون (صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) به تنها یی و یا به همراه غلظت ثابتی از فیتوهورمون‌های NAA و BAP در محیط کشت MS در سه تکرار انجام گرفت. نتایج نشان داد که این هورمون در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش طول گیاهچه، وزن تر ریشه و وزن تر گیاهچه و در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فلن‌اکسیداز و در غلظت ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود. علی‌رغم اینکه ریزنمونه‌های برگ کشت شده بعد از گذشت یک تا دو هفته در همهٔ محیط‌ها به القای کالوس پاسخ دادند ولی رشد آن‌ها بسته به وجود فیتوهورمون‌ها و غلظت هورمون تستوسترون متفاوت بود. بیشترین وزن تر کالوس ریزنمونه‌ی برگ در غلظت ۰/۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون استروئیدی تستوسترون به تنها یی و یا به همراه فیتوهورمون‌های NAA و BAP به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که این هورمون می‌تواند در بهینه کردن شرایط رشد گیاه و بهبود رشد کالوس نقش مهمی داشته باشد که این امر نیازمند تحقیق و مطالعه بیشتری است.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، پلی‌فلن‌اکسیداز، کاتالاز، کالوس‌زایی، هورمون استروئیدی تستوسترون

مقدمه

این هورمون را روی رشد، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و واکنش‌های سنتزی در ذرت در شرایط تنش شوری بررسی کرد. نتایج آنها نشان داد که تیمار گیاهچه‌ها با آندروسترون به طور قابل توجهی عوارض سوء شوری را بر طول ریشه و گیاهچه بهبود می‌بخشد و موجب افزایش پروتئین، قند محلول، محتوای پرولین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسیدیدیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز شده در حالی که تولید سوپراکسید و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می‌دهد. همچنین ارдал (۵) با بررسی اثر آندروسترون روی گیاهچه گندم در شرایط تنش شوری نشان داد که آندروسترون موجب بهبود وزن خشک و ترکیبات قند، پرولین، پروتئین، کلروفیل و گلوتاتیون می‌شود. علاوه بر این، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیدیدیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربیات پراکسیداز و نیترات ردوکتاز به وسیله این هورمون افزایش می‌یابد. از سوی دیگر افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدی و تولید پراکسید هیدروژن و محتوای سوپراکسید ناشی از تنش شوری تحت تأثیر تیمار با آندروسترون کاهش می‌یابد. ارдал (۶) با مطالعه اثر هورمون استروئیدی آندروسترون بر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهچه‌ی ذرت تحت شرایط تنش سرما نشان داد که کاربرد آندروسترون موجب افزایش فعالیت سوپراکسیدیدیسموتاز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربیات پراکسیداز، گلوتاتیون ریدوکتاز و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند آسکوربیک اسید، گلوتاتیون، پرولین و کارتوئید می‌شود. در پستانداران، این هورمون نقش کلیدی و مهمی در کنترل فرایند رشد و نمو و تولید مثل داشته و همچنین در متابولیسم پروتئین و کنترل مواد معدنی نیز شرکت می‌کند (۱۵). گیاه

هورمون استروئیدی تستوسترون که یکی از هورمون‌های جنسی پستانداران محسوب می‌شود، مولکول‌های چربی دوست با وزن مولکولی کم می‌باشد (۱۵، ۱۱). برخی از محققین به مطالعه اثرات آندروسترون (پیش‌ساز تستوسترون) و تستوسترون در گیاهان پرداخته و نقش موثر این هورمون‌ها را بر رشد گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای نشان داده‌اند. به عنوان مثال، ارдал و دوملوپینار (۹) اثر آندروسترون را روی رشد ریشه و ساقه و پارامترهای بیوشیمیایی (ترکیبات پروتئینی، قند و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پراکسید لیپید و میزان H_2O_2) گیاه نخود *Cicer arietinum L.* در شرایط رشدی کنترل شده، بررسی و مشاهده کردند که این هورمون موجب افزایش چشمگیر رشد گیاه و افزایش میزان پروتئین و قند محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسیدیدیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و کاهش شدید H_2O_2 و پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود. همچنین دوملوپینار و همکاران (۲) اثر هورمون آندروسترون را بر محتوای عناصر معدنی برگ در جو بررسی و نشان دادند که کاربرد این هورمون موجب افزایش غلظت کلسیم، منیزیم، فسفر، گوگرد، مس، منگنز، الومینیوم، روی، آهن، پتاسیم و کلر و کاهش غلظت سدیم در برگ‌های جو می‌شود. ارдал و دوملوپینار (۹) نیز با بررسی اثر این هورمون جنسی بر محتوای عناصر معدنی برگ‌های نخود نشان دادند که این هورمون موجب افزایش غلظت سدیم، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، فسفر، گوگرد، مس، الومینیوم، روی، آهن و نیکل می‌شود و تنها غلظت عناصر منگنز و کلر را در برگ‌های آن کاهش می‌دهد. ارдал (۷) اثر

تغییرات جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم کاتالاز نیز با استفاده از روش چنس و مهلهی (۱) سنجیده شد. برای این منظور ۲/۵ میلی‌لیتر بافر تریس به همراه ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه در حمام یخ با ۶۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط شد. میزان تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش کار و میشرا (۱۸)، ابتدا محلول‌های بافر تریس ۱ مولار، آب اکسیژنه ۵۰ میلی‌مولار، پیروگالل ۱۰۰ میلی‌مولار تهیه شد. از هر کدام از مواد ذکر شده، ۱۰ میلی‌لیتر برداشته و محلول حاصل به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول فوق با ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط و میزان تغییرات جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد.

در آزمایش دیگر اثر این هورمون بر کالوس‌زایی این گیاه از ریزنمونه‌های برگی آن بررسی شد. برای تهیه ریزنمونه برگ، برگ‌های تازه و خوب رشد کرده تحت شرایط استریل از گیاهان درون شیشه‌ای شاهد جدا شده و با استفاده از اسکالپل تیز و در داخل آب مقطر به قطعات کوچک برشیده شدند و روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون استروئیدی تستوسترون (در پنج سطح صفر، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) به تنها یا یا به همراه غلظت ثابتی از فیتوهورمون‌های NAA و BAP در سه آزمایش جداگانه برای کالوس‌زایی کشت شدند. آزمایش اول شامل بررسی کالوس‌زایی در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون استروئیدی تستوسترون در حضور ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. در آزمایش دوم، کالوس‌زایی این گیاه در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون استروئیدی تستوسترون در حضور فقط ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP بررسی شد و آزمایش سوم، شامل محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون استروئیدی تستوسترون بدون حضور NAA و BAP بود. مقادیر بهینه‌ی NAA و BAP بر اساس نتایج کوهی و همکاران (۱۹) انتخاب شدند. پنج هفتۀ بعد از انتقال جداساخته‌ها، درصد کالوس‌زایی و وزن ترکالوس‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال ثبت گردید. این آزمایش‌ها در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. آزمون نرمال بودن داده‌ها و تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS ۱۶.۰ و SAS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت و نمودارها توسط نرم‌افزار Microsoft Office Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

مطابق با جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر غلظت هورمون تستوسترون بر تمامی صفات مورد بررسی در گیاهچه‌های ۴۰ روزه بابونه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که هورمون

بابونه آلمانی با نام علمی *Matricaria chamomilla* L. گیاهی است یک ساله علفی، متعلق به خانواده کاسنی (Asteraceae) و یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی شناخته شده است که ترکیبات دارویی این گیاه در گل آذین، شاخ و برگ این گیاه انباشته شده است. بسیاری از مواد دارویی آن در انسانس آبی رنگ آن نهفته است. در انسانس این گیاه نزدیک به ۴۰ نوع ترکیب مختلف شناسایی شده است (۲۰).

اگرچه حضور هورمون‌های استروئیدی در گیاهان به اثبات رسیده است (۲۴، ۲۵، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۵) اما اطلاعات اندکی در مورد نقش اصلی و اثرات این هورمون‌ها در گیاهان وجود دارد. بر این اساس، هدف از این تحقیق، مطالعه اثر هورمون استروئیدی تستوسترون بر رشد گیاهچه، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کالوس‌زایی گیاه بابونه آلمانی *Matricaria chamomilla* L. در شرایط کشت درون شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش طی سال‌های ۹۳ و ۹۴ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده‌ی علوم کشاورزی دانشگاه حقق اردبیلی انجام شد. بذور بابونه پس از شستشو با آب مقطر، به مدت ۱۰ دقیقه در هیبوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرار داده شدند و پس از آبکشی توسط آب مقطر استریل، به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند. سپس بذور بعد از سه بار آبکشی با آب مقطر استریل توسط دستمال کاغذی استریل خشک و در ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS (۲۲) نیمه جامد کشت شده و در اتفاقک رشد با شرایط دمای ۲۵ ± ۲ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شدند. گیاهچه‌های ۱۰ روزه‌ی رشد یافته، به محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون استروئیدی تستوسترون (Sigma-Aldrich T1500) (در پنج سطح صفر، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. با توجه به نامحلول بودن این هورمون در آب، ابتدا در چند قطره اتانول ۹۶ درصد حل شده و سپس آب مقطر لازم اضافه شد. لازم به ذکر است برای حذف اثرات نامطلوب اتانول به تیمارهای شاهد نیز اتانول لازم اضافه گردید. بعد از ۴۰ روز از اعمال این هورمون، صفات طول گیاهچه، وزن ریشه، وزن گیاهچه مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. همچنین بعد از استخراج عصاره آنزیمی به روش سوده‌کار و همکاران (۲۸)، فعالیت آنزیم پلی‌فلکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز بررسی شد. بدین منظور، ۱ گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوای ۵ میلی‌لیتر بافر تریس - ۰/۰۵ HCl بازدید شده سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰ دور و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. محلول روئی (حاوی عصاره پروتئینی) جهت بررسی فعالیت پلی‌فلکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم پلی‌فلکسیداز با روش کار و میشرا (۱۸) بررسی شد. برای این منظور ۱/۵ میلی‌لیتر بافر تریس با ۰/۴ میلی‌لیتر پیروگالل و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی خوب مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، میزان

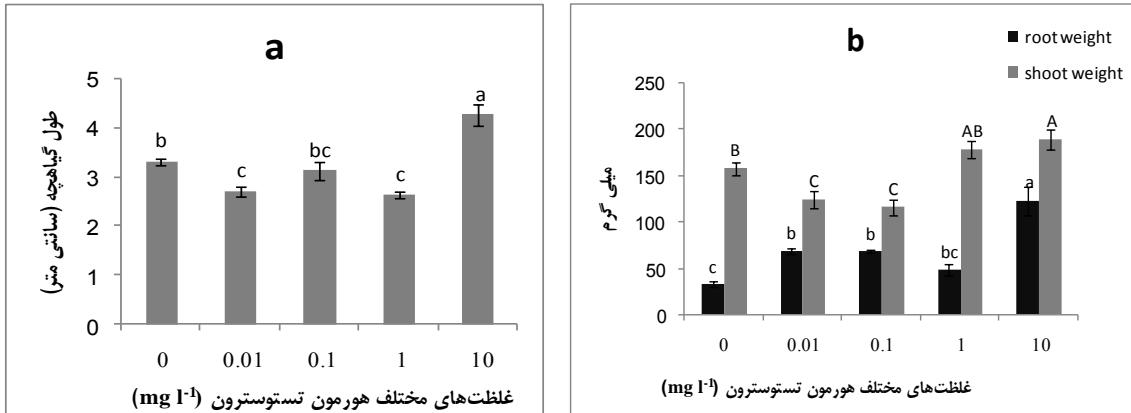
با مقدار آن در غلظت ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و نیز شاهد نداشت (شکل ۱a). همچنین بیشترین وزن گیاهچه در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و کمترین آن در غلظت ۰/۱ و ۰/۱۰ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد که تفاوت آن‌ها با تیمار شاهد معنی‌دار بود (شکل ۱b).

تسوسترون در افزایش طول گیاهچه، وزن تر ریشه و گیاهچه بابونه آلمانی موثر است. بیشترین طول گیاهچه در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و کمترین آن در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون تسوسترون مشاهده شد. بیشترین وزن تر ریشه نیز در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و کمترین آن در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد که اختلاف معنی‌داری

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات گیاهچه‌ای و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بابونه آلمانی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون تسوسترون
Table 1. Analysis of variance of seedling traits and antioxidant enazmzs activities in German chamomile affected by different concentrations of testosterone hormone

غلظت‌های مختلف هورمون تسوسترون (mg l ⁻¹)	میانگین مربوط						منابع تغییر درصد ضریب تغییرات
	فعالیت آنزیم پلی‌فلن اکسیداز	فعالیت آنزیم پراکسیداز	وزن تر ریشه	وزن تر گیاهچه	طول گیاهچه	درجه آزادی	
۰/۰۱/۲۷	۳۹۹۰/۸۰/۵۶	۲۸۸۹/۷۴۳۱/۱	۳۵۰/۵/۱۶	۳۱۳۰/۴	۱/۲۶	۴	غلظت
۰/۱۰/۱۳	۲۱۲۰/۱۶/۴۹	۸۴۸۳/۰/۵	۱۸۰/۲۶	۱۶۶/۷	۰/۰۶	۱۰	خطا
۰/۱۱/۸۳	۱۲/۰/۷	۹/۸۱	۱۹/۶۴	۸/۴۲	۷/۹	۵	درصد ضریب تغییرات

** و *: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

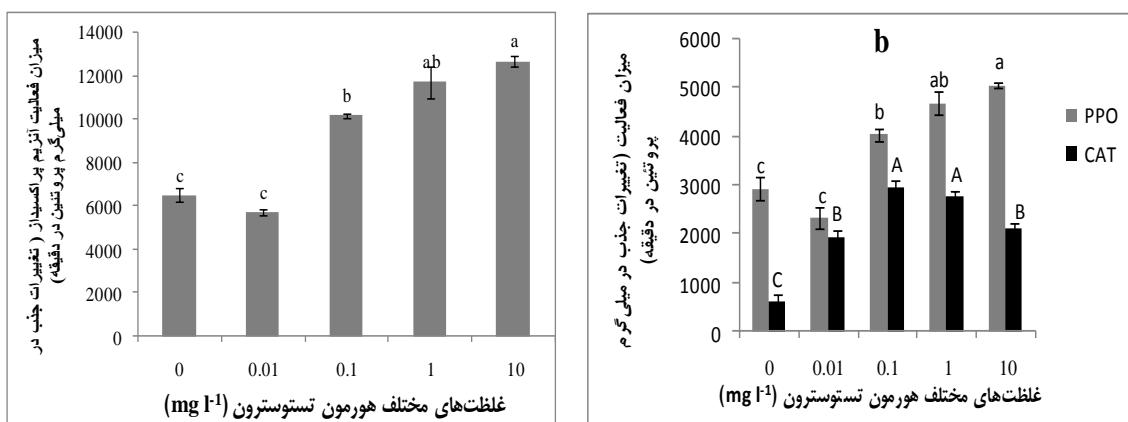


شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون تسوسترون بر طول گیاهچه (a)، وزن تر ریشه و گیاهچه (b) (بابونه آلمانی). حروف غیرمشابه روی هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون توکی است.

Figure 1. Effect of different concentrations of testosterone hormone on seedling length (a), root and shoot fresh weight (b) of German chamomile. Means with different letters show significant differnecs by Tukey's test at 5% probability level

۱b). در مورد آنزیم کاتالاز بیشترین فعالیت این آنزیم در غلظت ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و کمترین میزان فعالیت این آنزیم در غلظت ۰/۰۱ و ۰/۱۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون تسوسترون بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت (شکل ۱b).

همچنین هورمون تسوسترون در غلظت‌های بالاتر موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فلن اکسیداز شد. حداکثر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فلن اکسیداز بر حسب میزان جذب در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه در غلظت ۰/۰۱ و ۰/۱۰ میلی‌گرم در لیتر آن و کمترین میزان فعالیت این آنزیم در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد (شکل a,



شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون مختلط‌های آنتی‌اکسیدان پراکسیداز (a)، پلی‌فنل‌اکسیداز و کاتالاز (b) گیاهچه‌های بابونه آلمانی. حروف غیرمشابه روی هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون توکی است.
Figure 2. Effect of different concentrations of testosterone on antioxidant enzymes activities of peroxidase (a), poly phenol oxidase and catalase (b) of German chamomile seedlings. Means with different letters show significant differneecs by Tukey's test at 5% probability level

محیط کشت MS حاوی NAA و BAP در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون تستوسترون، و کمترین مقدار آن در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر آن مشاهده شد. بیشترین وزن تر کالوس ریزنومه برگ در محیط MS حاوی فقط BAP نیز در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون تستوسترون و کمترین آن در غلظت ۰/۰۱ آن به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت (شکل ۳a). همچنین در محیط کشت MS فاقد NAA و BAP بیشترین مقدار وزن تر کالوس در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر آن و کمترین مقدار آن در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت (شکل ۳b).

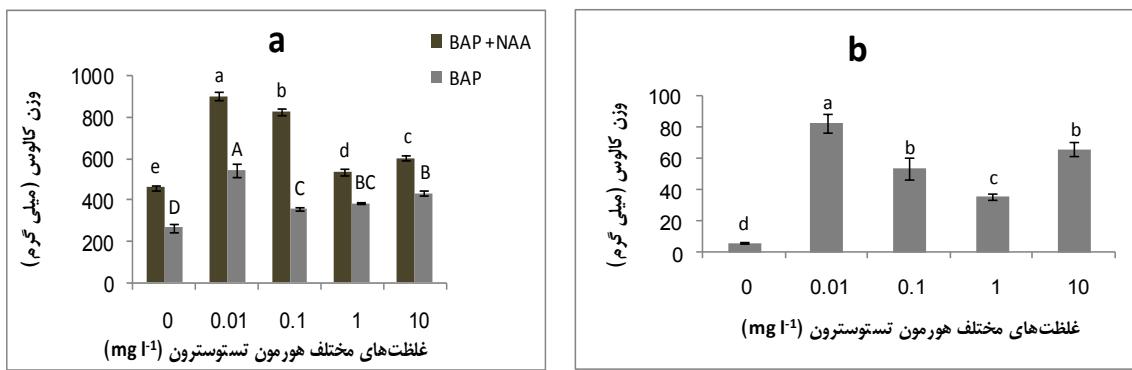
تاثیر هورمون تستوسترون بر القاء و رشد کالوس
علی‌رغم اینکه ریزنومه‌های برگ کشت شده بعد از گذشت یک تا دو هفته در همه‌ی محیط‌ها به القای کالوس پاسخ دادند ولی رشد آن‌ها بسته به وجود فیتوهورمون‌ها و غلظت هورمون تستوسترون متفاوت بود. با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) اثر غلظت هورمون تستوسترون بر وزن تر کالوس ریزنومه برگ در محیط MS حاوی NAA و BAP و فاقد آن‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین وزن تر کالوس ریزنومه برگ تحت تاثیر هورمون تستوسترون در هر سه محیط مورد مطالعه در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. به طوری که بیشترین وزن تر کالوس ریزنومه برگ در

جدول ۲- تجزیه واریانس وزن تر کالوس بابونه آلمانی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون تستوسترون در محیط MS حاوی NAA و BAP و فاقد آنها

Table 2. Analysis of variance of callus fresh weight in German chamomile affected by different concentrations of testosterone hormone in MS medium alone or supplemented with NAA and BAP

منابع تغییر	درجه آزادی	حاوی NAA و BAP	حاوی BAP	میانگین مربیات در محیط کشت	فاقد فیتوهورمون
غلظت	۴	۱۰۷۷۴۳/۳	۳۱۲۶۰/۴	۳۱۲۶۰/۴	۲۶۵/۰/۷۶
خطا	۱۰	۷۰۰	۹۰۹/۲	۹۰۹/۲	۶۵/۴۶
درصد ضریب تغییرات	۳/۹۷	۷/۶	-	۷/۶	۱۶/۴۶

** : به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد



شکل ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون تستوسترون بر وزن تر کالوس ریزنمونه برگ گیاه بابونه آلمانی در محیط MS حاوی NAA و BAP و محیط MS حاوی فقط BAP (a) و در محیط MS فاقد فیتوهورمون (b)

Figure 3. Effect of different concentrations of testosterone on callus fresh weight of German chamomile leaf explants in MS medium supplemented with NAA and BAP and MS medium supplemented with BAP only (a), and MS medium without NAA and BAP (b). Means with different letters show significant differences by Tukey's test at 5% probability level

را بر فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان گیاهچه نخود تحت شرایط تش سرما مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که فعالیت ایزوفرم‌های مختلف آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و اسکوربیات پراکسیداز) تحت شرایط تش سرما به تنهایی و به همراه تیمار گیاهچه‌ها با پروژسترون تغییر می‌یابد. آن‌ها اعلام کردند که این ممکن است به علت تغییر در تولید ایزوفرم‌های جدید از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت شرایط تش باشد که قبل از تقطیع ادوارد و همکاران (۳) و لی و لی (۲۰) گزارش شده بود. همچنین ارداد و دیوملوپینار (۸) گزارش کردند که این هورمون موجب افزایش غلظت‌های کلسبیم، مینزیم، فسفر، گوگرد، مس، منگنز، الومینیوم، روی، آهن، پتاسیم و کلر در گیاه می‌شود. عناصر معدنی نقش مهمی را در تشکیل ترکیبات آلی دارند. بنابراین، می‌توان گفت که این هورمون با افزایش مواد آلی و عناصر معدنی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شرایط را برای رشد گیاهان بهبود می‌بخشد. با توجه به اینکه افزایش رشد گیاهچه و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در غلظت‌های بالا بدست آمد است به نظر می‌رسد این هورمون در غلظت‌های بالاتر با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجب بهبود شرایط رشد گیاهچه شده و امکان مقاومت و خوگیری به شرایط محیطی را فراهم کرده است. جانکزو و همکاران (۱۷) نشان دادند که هورمون استروئیدی اندرrostوندیون (پیش‌ساز تستوسترون) باعث افزایش فعالیت سیستم فنوتسترنی سویا تحت شرایط تش خشکی می‌شود که احتمالاً این افزایش به دلیل فعالیت ترکیبات آکبپورینی و افزایش پایداری غشاها سیتوپلاسمی می‌باشد. ترکیبات آکبپورینی پروتئین‌های غشاها هستند که در پایداری غشاها سلولی و حرکت آب در داخل سلول و فضاهای بین سلولی دخالت دارند (۴). همچنین بررسی تاثیر هورمون تستوسترون بر وزن تر کالوس ریزنمونه برگ بابونه آلمانی نشان داد که بیشترین وزن تر کالوس ریزنمونه برگ در غلظت‌های پایین ۰/۰ میلی‌گرم در لیتر آن به دست آمد که

نتایج بدست آمده از بررسی تاثیر هورمون جنسی تستوسترون بر رشد گیاهچه بابونه آلمانی نشان داد که این هورمون در غلظت‌های بالا (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) موجب افزایش طول گیاهچه، وزن تر ریشه و گیاهچه می‌شود. گیاهان مجموعه‌ای از ساز و کارهای تنظیمی را برای سازگاری در برابر تنفس‌های مختلف محیطی به کار می‌گیرند (۱۲). شرایط تش زا موجب افزایش بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌شود که این ترکیبات می‌توانند به لپیدهای غشا آسیب وارد کنند (۲۲). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ترکیبات با وزن مولکولی پایین این توانایی را دارد که بدون آن که خود مورد تغییر قرار گرفته و به مواد مخرب رادیکال تبدیل شود، ROS را مهار کند (۲۱). گیاهان برای مهار ROS دارای دو نوع ساز و کار آنتی‌اکسیدانی بوده که شامل سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی و آنزیمی می‌باشد (۲۶). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (پراکسیداز، پلی‌فلن اکسیداز و کاتالاز) عمدها با پاکسازی ROS و کاهش اثرات تخریبی تنش اکسیداتیو در ارتباط است (۲۷، ۲۶). مطالعه بسیار کمی در مورد تاثیر هورمون استروئیدی تستوسترون بر گیاهان تحت شرایط درون شیشه‌ای وجود دارد (۱۷). نتایج این تحقیق نشان داد که این هورمون تاثیر مهمی بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دارد به طوری که تحت تاثیر این هورمون فعالیت این آنزیم‌ها افزایش می‌یابد. بیشترین فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فلن اکسیداز در غلظت ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمده است. بنابراین به نظر می‌رسد که کاربرد هورمون تستوسترون ممکن است به وسیله تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به پاکسازی ROS و کاهش اثرات تخریبی آن کمک کند. ارداد و دوملوپینار (۹) و ارداد (۵، ۶) نشان دادند که کاربرد هورمون جنسی آندروسترون در گیاهان مختلف موجب افزایش چشمگیر رشد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود. جنسیل و همکاران (۱۰) نیز اثر هورمون پروژسترون

نشان دادند که آندرواستروئید و آندروستنودیون به میزان یک میکرومولار در لیتر موجب القا و ازدیاد بافت‌های کالوس از اسکوتلوم جنین‌های نابالغ گندم (*Triticum aestivum L.*) می‌شود. نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر نیز تایید‌کننده‌ی نقش موثر هورمون تستوسترون در رشد و ازدیاد کالوس گیاه بابونه آلمانی است. القای کالوس‌زایی در واریته‌های مختلف گیاهان، تنوع زیادی نشان داده و بر اساس پژوهش‌های انجام شده، به نظر می‌رسد که غلظت‌های هورمونی مناسب برای القای کالوس، تا حد زیادی وابسته به ژنتیک هستند (۲۳).

در کل، اگرچه این تحقیق وجود اثرات موثر این هورمون را در بهبود صفات مورفولوژیکی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و القاء و رشد کالوس گیاه بابونه آلمانی نشان داد اما به دلیل وجود تنوع در غلظت بهینه که این هورمون در رشد گیاه بابونه آلمانی دارد نیازمند تحقیق و مطالعه بیشتر در گونه‌های دیگر گیاهی است.

اختلاف آن با شاهد معنی‌دار بود. این امر بیانگر این است که می‌توان به کمک هورمون تستوسترون وزن تر کالوس را به وسیله فیتوهورمون‌ها در حضور NAA و BAP به دست می‌آید (۱۹) را به طور چشمگیر افزایش داد. علاوه بر این، افزایش وزن تر کالوس در محیط فاقد اکسیجن (محیط حاوی فقط BAP) نیز بیانگر نقش موثر این هورمون در بهبود شرایط رشد کالوس در غیاب اکسیجن است. به نظر می‌رسد القاء و رشد کالوس ریزنمونه برگ در محیط کشت فاقد NAA به دلیل افزایش اکسیجن موجود در ریزنمونه، تحت تاثیر این هورمون استروئیدی باشد. علاوه بر این، کالوس‌زایی ریزنمونه برگ در محیط MS فاقد فیتوهورمون‌ها نیز نشان داد که این هورمون به تنها یکی و در غیاب فیتوهورمون‌هایی مانند BAP و NAA می‌تواند کالوس‌زایی را در ریزنمونه برگ القاء کند هرچند میزان رشد کالوس در مقایسه با زمانی که این هورمون همراه با فیتوهورمون‌های BAP و NAA استفاده می‌شود کمتر است. جانکزکو و همکاران (۱۶) نیز

منابع

- Chance, B. and A.C. Maehly. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Method Enzymology*, 11: 764-755.
- Dumlupinar, R., M. Genisel, S. Erdal, T. Korkut, M.S. Taspinar and M. Taskin. 2011. Effects of progesterone, b-estradiol and androsterone on the changes of inorganic element content in barley leaves. *Biological Trace Element Research*, 143:1740-1745.
- Edwards, EA., C. Enard, GP. Creissen and P.M. Mullineaux. 1994. Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta*, 192:137-143.
- Eisenbarth, D.A. and A.R. Weig. 2005. Dynamics of aquaporins and water relations during hypocotyl elongation in *Ricinus communis* L. seedlings, *Journal of Experimental Botany*, 56: 1831-1842
- Erdal, S. 2012. Alleviation of salt stress in wheat seedlings by mammalian sex hormones. *Science of Food and Agriculture*, 92:1411-1416.
- Erdal, S. 2012. Androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 1-7
- Erdal, S. 2012. Exogenous mammalian sex hormones mitigate inhibition in growth by enhancing antioxidant activity and synthesis reactions in germinating maize seeds under salt stress. *Science of Food and Agriculture*, 92: 839-843.
- Erdal, S. and R. Dumlupinar. 2011. Exogenously treated mammalian sex hormones affects inorganic constituents of plants. *Biological Trace Element Research*, 143: 500-50.
- Erdal, S. and R. Dumlupinar. 2011. Mammalian sex hormones stimulate antioxidant system and enhance growth of chickpea plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 1011-1017.
- Genisel, M., H. Turk and S. Erdal. 2013. Exogenous progesterone application protects chickpea seedlings against chilling-induced oxidative stress. *Acta Physiol Plantarum*, 35(1): 241-251.
- Geuns, J.M.C. 1978. Steroid hormones and plant growth and development, *Phytochemistry*, 17: 1-14.
- Hung, Sh.H., Ch.W. Yu and Ch.H. Lin. 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46: 1-10.
- Iino, M., N. Nomura, Y. Tamaki, Y. Yamada, K. Yoneyama and Y. Takeuchi. 2007. Progesterone: its occurrence in plants and involvement in plant growth, *Phytochemistry*, 68: 1664-1673.
- Janeczko, A. 2012. The presence and activity of progesterone in the plant kingdom. *Steroids*, 77: 169-173.
- Janeczko, A. and A. Skoczowski. 2005. Mammalian sex hormones in plants. *Folia Histochemistry and Cytochemistry*, 43: 71-79.
- Janeczko, A., W. Filek and A. Skoczowski. 2002. Influence of human sex hormones on the growth response of winter wheat immature embryos and callus (in Polish). *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych*, 488: 667-673.
- Janeczko, A., M. Kocurek and I. Marcińska. 2012. Mammalian androgen stimulates photosynthesis in drought-stressed soybean. *Central European Journal of Biology*, 7: 902-909.
- Kar, M. and D. Mishra. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57: 315-319.
- Koohi, L., N. Zare, R. Asghari Zakaria and P. SheikhZadeh-Mosaddegh. 2014. Effect of plant growth regulators and different explants on tissue culture response and suspension cell cultures of German chamomilla (*Matricaria chamomilla* L.). *Journal of Crop Ecophysiology*, 8(2):203-214 (In Persian).
- Lee, D.H. and C.B. Lee. 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Science*, 159: 75-85.

- ۳۷
21. Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery and F. Van Breusegem. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10): 490-498.
 22. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 472-497.
 23. Petronilho, S., M. Maraschin, M.A. Coimbra and S.M. Rocha. 2012. In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Industrial Crops and Products*, 40: 1-12.
 24. Simerský, R., O. Novak, D.A. Morris, V. Pouzar and M. Strnad. 2009. Identification and quantification of several mammalian steroid hormones in plants by UPLC-MS/MS. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28: 125-136.
 25. Simons, R.G. and D.L. Greenwich. 1989. Immunoreactive detection of four mammalian steroids in plants, *Canadian Journal of Botany*, 67: 288-96.
 26. Singh Gill, S. and N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.
 27. Smirnoff, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125: 27-58.
 28. Sudhakar, S., Y. Li, M.S. Katz and N. Elango. 2001. Translational regulation is a control point in RUNX2/Cbfα1 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289: 616-622.

The Effect of Steroidal Testosterone Hormone on Seedling Growth, Antioxidant Enzymes Activity and Callus Induction in German Chamomile (*Matricaria chamomilla L.*)

Elnaz Nozari¹, Rasool Asghari-Zakaria², Sodabeh Jahanbakhsh³ and Nasser Zare³

1 and 3- Graduated M.Sc. Student and Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili

2- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, (Corresponding author: r-asghari@uma.ac.ir)

Received: January 30, 2017

Accepted: December 12, 2017

Abstract

In order to study the effects of steroid testosterone hormone on seedling growth, antioxidant enzyme activity and also on callus induction from leaf explants of German Chamomile (*Matricaria chamomilla L.*) under *in vitro* culture, an experiment was conducted based on completely randomized design with three replications using MS medium containing different concentrations of testosterone (0, 0.01, 0.1, 1, and 10 mg l⁻¹) alone or in combination with a steady concentration of 1-naphthalene acetic acid (NAA) and Benzylaminopurine (BAP). The results showed that this hormone at concentration of 10 mg l⁻¹ increased seedling length, seedling fresh weight, and root fresh weight. Peroxidase and polyphenol oxidase activities were increased at concentrations of 1 and 10 mg l⁻¹ of this hormone. Also, catalase activity was increased at concentrations of 0.1 and 1 mg l⁻¹. Although the callus induction from leaf explants were observed after one to two weeks in all media, its growth depending on the presence of phytohormones and concentration of testosterone hormone were different. The most callus fresh weight of leaf explants alone and in combination with NAA and BAP was achieved at low concentration (0.01 mg l⁻¹) of testosterone hormone that was significantly different from the control. Results of this study showed that this hormone can play an important role in optimizing the growth of plants and improvement of callus growth.

Keywords: Callus induction, Catalase, Peroxidase, Polyphenol oxidase, Steroidal testosterone hormone