The effect of salinity stress on secondary metabolites and growth behavior of artichoke in vitro conditions

Pages 19-38

M. Rahim Barshi [*1], A. Ghasemnejad[2], M. Alizadeh [3] and A. Yamchi[4]

1, 2 & 3) Department of Horticulture, Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.
4) Department of Genetics and Biotechnology, Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.

*Corresponding author: **Masumehrahimy@yahoo.com**

Received date: 2024.02.09 **Accepted date: 2024.05.13**

Abstract

Artichoke (Cynara scolymus) is a medicinal plant with nutritional and economic value that faces a large area of water-scarce and saline soils. The present research was conducted through two separate experiments in a completely randomized design to investigate the effect of salinity on the growth and secondary metabolites of this plant. The experiment was carried out in two forms: Culturing explants in solid MS medium with concentrations of (0, 50, 150, 300, 600, and 1200 µM NaCl) and culturing callus in a similar medium with concentrations of (0, 50, 150, 300, 600, 1200, 2000, 4000, 6000, and 75000 µM NaCl). After four weeks, physiological and biochemical characteristics were investigated. The results indicated a decreasing trend in internal pigments with increasing salinity concentration. It was also observed that in explant cultures, the fresh weight of callus decreased with increasing salinity (the highest fresh weight was observed in the control and the lowest at the 1200 µM salinity level) while in callus culture, the highest fresh weight was observed at 75000 µM salinity level. At all salinity levels, the pigment density in explant cultures was higher than in callus cultures. Examination of changes in phenolic compounds and antioxidant activity showed that, unlike in explant culture, in callus culture, there was a significant difference in the percentage of free radical inhibition, chlorogenic acid, and caffeic acid (the highest values of these compounds were observed in 150 µM, control, and 2000 µM treatments, respectively).

Keywords: Callus, Antioxidant, Chlorogenic Acid, Caffeic Acid and Environmental Conditions.

اثر تنش شوری بر متابولیت‌های ثانویه و رفتار رشدی کنگر فرنگی در شرایط درون شیشه‌ای

شماره صفحات
۳۸-۱۹

معصومه رحیم‌برشی*[۱]، عظیم قاسم‌نژاد[۲]، مهدی علیزاده[۳] و احمد یامچی[۴]

۱، ۲ و ۳) گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
۴) گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

* نویسنده مسئول: **Masumehrahimy@yahoo.com**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۴

چکیده

کنگرفرنگی یک گیاه دارویی باارزش غذایی و اقتصادی است که با سطح وسیعی از زمین‌های کم‌آب و شور روبرو می‌باشد. تحقیق حاضر در دو آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با هدف بررسی اثر شوری بر رشد و متابولیت‌های ثانویه گیاه مذکور انجام شد. این آزمایش به دو صورت کشت ریزنمونه در محیط کشت جامد MS با غلظت‌های (۰، ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۱۲۰۰ میکرومولار NaCl) و کشت کالوس در محیط مشابه با غلظت‌های (۰، ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۱۲۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۶۰۰۰ و ۷۵۰۰۰ میکرومولار NaCl) صورت گرفت. پس از چهار هفته صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان‌دهنده روند کاهشی در رنگدانه‌های درونی با افزایش غلظت شوری بود. همچنین مشاهده شد که در کشت ریزنمونه با افزایش شوری وزن تر کالوس کاهش یافت (بیشترین وزن تر مربوط به شاهد و کمترین مربوط به سطح شوری ۱۲۰۰ میکرومولار) و در کشت کالوس بیشترین وزن تر مربوط به سطح شوری ۷۵۰۰۰ میکرومولار بوده است. در همه سطوح شوری تراکم رنگدانه‌ها نمونه‌های کشت ریزنمونه نسبت به نمونه‌های کشت کالوس بیشتر بود. بررسی تغییرات ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی نشان داد که برخلاف کشت ریزنمونه در کشت کالوس، اختلاف معنی‌داری بر میزان درصد مهار رادیکال آزاد، اسید کلروجنیک و اسید کافئیک وجود دارد (بیشترین مقادیر این ترکیبات به ترتیب مربوط به تیمار ۱۵۰ میکرومولار، شاهد و ۲۰۰۰ میکرومولار).

واژه‌های کلیدی: کالوس، آنتی‌اکسیدانت، اسید کلروجنیک، اسید کافئیک و شرایط محیطی.

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از منابع مهم تولید دارو هستند، که بشر سالیان دراز از آن‌ها استفاده نموده است. و در حال حاضر نیز نه تنها ارزش خود را در زمینه تولید دارو از دست نداده، بلکه اهمیت آن‌ها نیز فزونی یافته است. گیاهان دارویی به‌دلیل توام بودن ماهیت طبیعی و وجود ترکیبات همولوگ دارویی در آن‌ها با بدن سازگاری بهتری دارند و معمولا فاقد عوارض ناخواسته داروهای شیمیایی هستند. به خصوص در موارد مصرف طولانی، در درمان بیماری‌های مزمن مناسب‌تر واقع می‌شوند. اگرچه تقاضای این گیاهان افزایش یافته‌است، اما به‌علت محدود بودن زیستگاه‌های طبیعی بسته به شرایط محیطی جغرافیای محل رویش، مشکلات جمع‌آوری آن‌ها، غلظت پایین این ترکیبات در گیاه، مشکلات زراعی، تغییرات آب و هوایی و نابودی گونه‌های متنوع گیاهی، جانوری و مشکلات مرتبط با اهلی‌نمودن این گیاهان توجه محققین را به استفاده از راهکارهای فناوری زیستی جهت افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی معطوف نموده است (Omidi & Farzin., 2009; Kosova, 2013) یکی از راه‌های توسعه‌یافته برای این منظور، تکنیک کشت بافت و سلول است، که بر اساس این‌که سلول‌های گیاهی از نظر بیوسنتزی خاصیت توتی‌پوتنسی (TotiPotency Potential) دارند و به کمک آنزیم‌ها قادر به تولید مواد با ارزش طبیعی در محیط درون‌شیشه‌ای هستند استوار است. از آن‌جایی که سلول‌های کالوس حاصل از کشت بافت خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه سالم را دربر دارد و قادر به سنتز متابولیت‌های ثانویه است، می‌توان بازده تولید متابولیت‌های ثانویه آن را با کاربرد عوامل مختلف از جمله استرس‌های محیطی تغییر داد که یکی از آن‌ها استرس شوری است که به‌عنوان یک محرک برای تولید ROS (Reactive Oxygen Species) عمل می‌کند که این مولکول‌ها سیگنال‌هایی برای تغییر در فعالیت آنزیم‌ها و سایر ترکیبات ثانویه می‌شوند (Charbaji & Ayyoubi, 2004) کنگرفرنگی با نام علمی (Cyn*ara scolymus* L.) از خانواده گیاه کاسنی (Asteraceae) می‌باشد. این گیاه به عنوان یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی جهان است، که مصرف غذایی و دارویی داشته و سرشار از ترکیبات فیبر، عناصر معدنی، پلی فنلی و اینولین می‌باشد (Alamanni & Cossu, 2003) و در طول هزاران سال کشت شده است. امروزه گیاهان دارویی از جمله گیاهان مهم اقتصادی هستند که به شکل‌های مختلف خام و فرآوری شده در صنعت داروسازی سنتی و مدرن مورد بهره‌وری قرار می‌گیرند(Castaneda *et al*., 2018; Sarahi Nobar *et al*., 2019). با توجه به شناخت و آگاهی نسبت به تحقیقات گسترده‌ای که در سراسر جهان بر روی این گیاه دارویی انجام گرفته است، ابزار بیوتکنولوژی به ویژه کشت‌بافت نقش موثری در مطالعات تکمیلی روند سنتز ترکیبات دارویی در گیاهان دارد. اعمال استرس به‌عنوان محرک سنتز مواد موثره و مطالعه آن‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای نسبت به شرایط طبیعی دقیق‌تر است. یکی از استرس-های غیرزیستی یا یکی از پارامترهای انتخابی افزوده شده به محیط کشت که با تغییر در مسیرهای متابولیکی در سلول‌های گیاهی کشت شده و تغییر در فعالیت آنزیم‌ها منجر به تغییر در تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود، شوری است. شوری می‌تواند باعث برهم زدن اعمال حیاتی و فرآیندهای رشد و نمو گیاهان شده و افزایش آن به شکلی که از تحمل گیاه فراتر رود سبب

مرگ گیاه می‌شود (Charbaji & Ayyoubi, 2004., Taiz and Zaiger, 2009) فاکتورهای محیطی روی ویژگی‌ها، ترکیب، رشد و توسعه منحصر به فرد گیاهان در جوامع گیاهی موثر است. وقتی هر یک از این فاکتورهای محیطی از حد مقاومت و تحمل بهینه یک گیاه تجاوز کند نتیجه، تنش به گیاه است. که توسعه یکسری فرآیندهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، ساختاری را تحت تاثیر قرار می‌دهد. شوری خاک یکی از عمده‌ترین تنش‌های غیرزیستی محیطی است که به‌طور ویژه در نواحی خشک و نیمه خشک صورت گرفته و می‌تواند شدیداً رشد گیاه و تولید محصول را محدود کند (Gary, 2010). از این‌رو در پژوهش حاضر روند کالوس‌زایی و تغییرات بیوشیمیایی کالوس کنگر فرنگی تحت تنش‌شوری مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در شرایط درون‌شیشه‌ای با کاربرد سطوح مختلف NaCl در کشت کالوس و ریزنمونه کنگرفرنگی به منظور بررسی روند رشد، کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه و اختلاف این دو شیوه کشت از این نظر در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان طی سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۱ اجرا شد. در این تحقیق به منظور تولید گیاهچه کنگرفرنگی، بذور این گیاه از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه پردیس علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان تهیه شد. تیمارهای انجام شده در این تحقیق بر روی کالوس حاصل از دمبرگ برگ‌های کوتیلدونی و ریزنمونه حاصل از آن انجام شد.

آماده‌سازی و کشت بذور برای تولید گیاهچه

پس از تعیین مرغوبیت و سنجش میزان قوه نامیه بذرها از طریق آزمون مستقیم درصد جوانه‌زنی (درصد تنژگی)، بذرها به منظور تسریع و یکنواختی جوانه‌زنی در پارچه مرطوب در یخچال به مدت ۳ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا دوره‌ی رکود احتمالی آن برطرف شود. بعد این مدت بذرها در محلول قارچ‌کش ۰/۲ درصد (۲ گرم در لیتر) به مدت ۲ ساعت قرار گرفته سپس در بستر کشت مخلوط حاوی کوکوپیت، پرلیت و ماسه کشت شدند.

عملیات مربوط به القاء کالوس

گیاهچه‌ها در محلول هیپوکلرید سدیم ۳۵ درصد به مدت ۸ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱۰ ثانیه ضدعفونی شدند. با اتمام مراحل ضدعفونی گیاهچه‌ها ۶ مرتبه پی‌درپی با آب مقطر استریل شسته شده تا بقایای مواد ضدعفونی کننده کاملاً از گیاهچه‌ها حذف شود و پس از آن در شرایط کاملاً استریل با استفاده از اسکالپل ریزنمونه دمبرگ جدا شده و در محیط کشت حاوی هورمون‌های القاءکننده کالوس (2)BA(Benzyl Adenine)(5 mg/l)+ NAA(Naphthalene Acetic Acid)(mg/l) کشت شدند. درب ظروف توسط دو لایه فویل استریل و نوار پارافیلم کاملاً بسته شد. سپس ظروف حاوی ریزنمونه به مدت ۴ الی ۵ هفته در اتاق کشت در دمای ۲± ۲۸ درجه سانتی گراد و در شرایط نیمه تاریکی قرار گرفتند.

مرحله اعمال تیمار غلظت‌های مختلف شوری جهت القاء تولید متابولیت‌ثانویه

این تحقیق در دو آزمایش جداگانه کشت ریزنمونه و کالوس انجام شد. در یک آزمایش از ۶ غلظت متفاوت NaCl برای القاء تولید کالوس (کشت مستقیم) استفاده شد. بدین منظور در این کشت از ریز نمونه‌های حاصل از گیاهچه ضدعفونی شده به‌طور مستقیم استفاده شد. در آزمایش دیگر، از ۱۰ غلظت برای رشد کالوس (کشت غیرمستقیم) که بصورت کشت مستقیم کالوس حاصل از ریزنمونه در محیط‌های تیمار جهت بررسی میزان متابولیت‌های ثانویه استفاده گردید. اعمال تیمارها با ۳ تکرار انجام شده و تیمار صفر به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. محیط‌های کشت مربوط به فاز القاء(Induction Phase) متابولیت ثانویه، با افزودن نمک NaCl در غلظت‌های متفاوت (۰، ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۱۲۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۶۰۰۰ و ۷۵۰۰۰ میکرومولار) به محیط کشت MS حاوی هورمون‌های کالوس‌زایی و رشد کالوس تهیه شد و سپس در ظروف شیشه‌ای مربوط به کشت توزیع گردیدند. ریزنمونه‌های حاصل از گیاهچه استریل در محیط‌های کشت MS با غلظت‌های مختلف شوری به‌منظور بررسی تحریک کالوس و افزایش متابولیت‌های‌ثانویه کشت شدند. پس از انتقال ریزنمونه‌ها، درب ظروف با فویل آلومینیوم و پارافیلم پوشانده شد. ظروف حاوی ریزنمونه به مدت ۴ الی ۵ هفته در شرایط نیمه تاریکی در اتاق کشت نگه‌داری شد. در طول مدت نگهداری زمان تحریک کالوس مربوط به ریزنمونه ثبت شد.

اندازه‌گیری پارامترهای مورفولوژیک، بیوشیمیایی کالوس

پس از گذشت ۴ الی ۵ هفته وقتی کالوس از کشت ریزنمونه ایجاد شد و همچنین زمانی که کالوس‌ها به رشد کافی رسیدند؛ کالوس‌ها از شیشه خارج و با استفاده از ترازوی دیجیتالی توزین شدند. همچنین پس از گذشت ۴ الی ۵ هفته همزمان با تعیین وزن‌تر کالوس، پارامترهای مورفولوژیکی کالوس مانند رنگ، میزان سفتی، میزان رشد بصورت مشاهده‌ای و امتیازدهی مورد بررسی قرار گرفت (Alizadeh, 2018). جهت تعیین رنگ ، سفتی و میزان رشد کالوس از کدگذاری زیر استفاده شده است (Alizadeh, 2018): رنگ سیاه (B3)؛ سفید (W)؛ قرمز (R)؛ آبی (B)؛ قهوه‌ای (B2)؛ بنفش (V)؛ زرد (Y)؛ نارنجی (O).

سفتی کالوس به‌صورت خیلی نرم (۲-)؛ نرم (۱-)؛ متوسط (۰)؛ سفت (۱+)؛ خیلی سفت (۲+) امتیازدهی شد.

تعیین میزان رشد کالوس بصورت کدهای زیر صورت گرفت. بدون رشد (۰)؛ ۳۰-۵۰٪ افزایش حجم در کالوس (۱)؛ ۵۰-۱۰۰٪ افزایش حجم در کالوس (۲)؛ ۱۰۰٪ و یا بیشتر افزایش در حجم کالوس (۳).

برای تعیین میزان کلروفیل و کارتنوئید از روش پیشنهادی بارنس (۱۹۹۲) استفاده شد. همچنین به‌منظور اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی از جمله فنل کل، فلاونوئید از روش پیشنهادی ابراهیم‌زاده و همکاران (Ebrahimzade *et al*., 2008) و برای اندازه‌گیری میزان درصد مهار رادیکال‌های آزاد دی پی‌پی‌اچ (DPPH(2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl)) از روش ابراهیم زاده و همکاران (Ebrahimzade *et al*., 2008) با کمی تغییر استفاده گردید. بدین منظور یک میلی‌لیتر از عصاره‌ی متانولی با یک میلی‌لیتر DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار (۴ میلی‌گرم رادیکال در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول) مخلوط گردید. علاوه‌بر نمونه‌های

مذکور یک لوله آزمایش به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد که تنها حاوی یک میلی‌لیتر متانول خالص ویک میلی‌لیتر دی پی‌پی‌اچ بود. کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer) با متانول خالص انجام شد. معمولاً رنگ لوله‌ها در جهت افزایش غلظت از ارغوانی به زرد تغییر می‌کند. یعنی غلیظ‌ترین لوله که بیشترین عصاره را دارد زرد کمترین غلظت ارغوانی است که مربوط به DPPH است. اعداد بدست آمده توسط رابطه ۲ به درصد مهار تبدیل شد. به‌این صورت که عدد جذب نمونه از عدد شاهد کم شده و بر عدد شاهد تقسیم می‌شود.

رابطه ۲: $\frac{(Ac-As)\times 100}{Ac}$= درصد مهار رادیکال آزاد

در این فرمول Ac عدد جذب شاهد و As عدد جذب نمونه می‌باشد.

به‌منظور اندازه‌گیری اسید کلروجنیک و اسید کافئیک از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با مشخصات زیر استفاده شد:

مدل مرک- هیتاچی ال- ۷۱۰۰ مجهز به دتکتور دیود اری هیتاچی ال- ۲۴۵۰ (Diode array detector Hitachi L-2450) و آون هیتاچی ال-۲۳۰۰ (Column Oven L-2300)، با ستون آر پی- ۱۸ (Reverse Phase-18) دارای ابعاد ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر.

نمونه‌ها در فاز متحرک حاوی یک میلی‌لیتر اسیداستیک، ۸۹ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه شده و ۱۰ میلی‌لیتر استونیتریل و با سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آنالیز شدند و با سرعت جریان یک میلی‌متر در دقیقه با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در طول موج ۳۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. فاز متحرک شامل استونیتریل به میزان ۱۰ میلی‌لیتر و یک میلی‌لیتر اسید استیک و ۸۹ میلی‌لیتر آب دیونیزه بود.

آماده‌سازی نمونه و تهیه نمودار کالیبراسیون برای اسید کلروجنیک و اسیدکافئیک

برای آماده‌سازی نمونه جهت تزریق به دستگاه HPLC ۰/۵ گرم کالوس تر توزین و با ۵ میلی‌لیتر متانول با درجه خلوص HPLC (۱:۵) توسط هاون سرد همگن شده و به منظور بهتر حل شدن ذرات به مدت ۱۰ دقیقه در التراسوند قرار داده شد سپس نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت روی شیکر قرار داده شده و بعد از آن به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۵۰۰ سانتریوفیوژ شدند. بخش فوقانی محلول بعد از گذشتن از فیلتر سرنگی، به ظروف مخصوص HPLC منتقل گردید و آماده تزریق به دستگاه شد (Trajtemberg *et al*., 2006) همچنین به‌منظور تهیه منحنی کالیبراسیون و معادله خط مربوطه از غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۶ میلی‌گرم بر لیتر اسیدکلروجنیک و غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۱، ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر اسیدکافئیک استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این آزمایش بصورت طرح کاملا تصادفی و در شرایط کنترل شده در اتاقک کشت و با ۱۰ تیمار نمک (NaCl) در ۳

تکرار صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

کشت کالوس و ریزنمونه

تاثیر غلظت‌های مختلف شوری بر صفات مورفولوژیک کالوس کنگرفرنگی

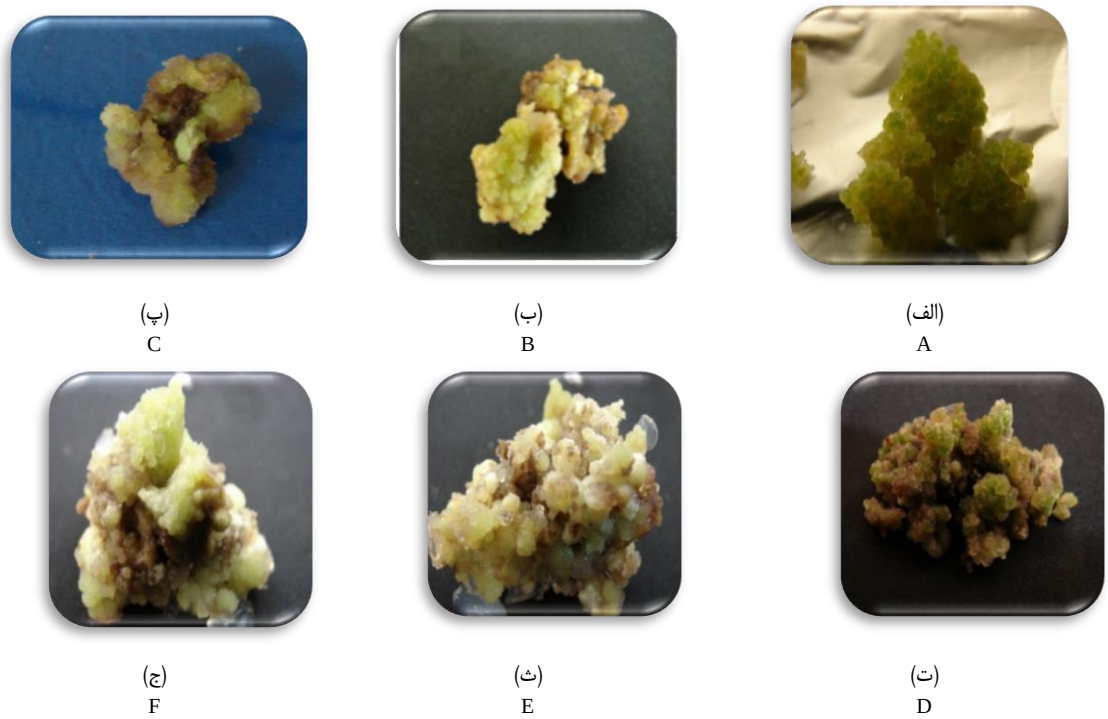
بررسی وضعیت کالوس‌های حاصله (شکل ۱ و۲) پس از چهار هفته از اعمال تیمار شوری نشان داد که با افزایش غلظت شوری از صفر به ۷۵۰۰۰ میکرومولار رنگ کالوس‌ها از سبز به زرد، سفید و رنگ‌های تیره‌ی قهوای و سیاه تغییر یافت. با توجه به اینکه غلظت بالای شوری به عدم تعادل یون‌ها و کاهش در یون منیزیم که عنصر اصلی در ساخت رنگدانه‌ی سبز (کلروفیل) است، منجر می‌شود (Meleigy, 2004)، در نتیجه مقادیر کلروفیل کاهش و همچنین تنش اکسیداتیو وارد آمده بر اثر پیامد شوری منجر به تخریب آن و نکروزه شدن بافت کالوس می‌شود. همچنین مطابق با نتایج بررسی بر وزن کالوس در طی بازه زمانی ۳ تا ۴ هفته با افزایش شوری افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان رشد کالوس مشاهده شد (جدول ۱). افزایش رشد کالوس در سطوح بالای شوری، به‌دلیل افزایش سطح بالای پروتئین و پرولین نسبت به شاهد که مانع از خسارت اکسیداتیو می‌شوند صورت می‌گیرد(Dehpour et al., 2011) چهار هفته پس از کشت ریزنمونه در محیط‌های کشت سطوح مختلف شوری، نشان داده‌شد که با افزایش غلظت شوری از صفر به ۱۲۰۰ میکرومولار رنگ کالوس‌های ایجاد شده تیره تر شد.

تأثیر شوری بر صفات فیزیولوژیک کالوس در هردو روش کشت

تاثیر غلظت‌های مختلف NaCl بر وزن‌تر و رنگدانه‌های درونی

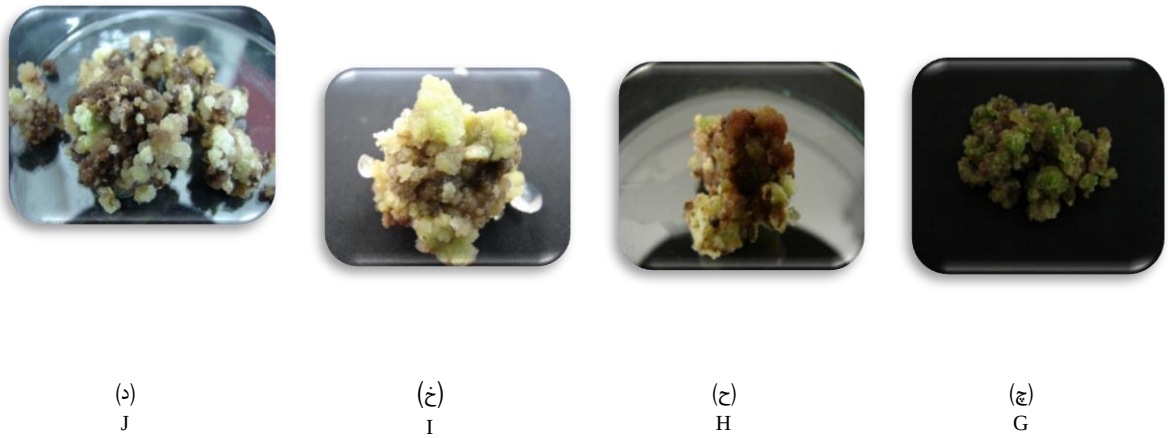
در آزمایش روش کشت کالوس مطابق با نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین، تغییرات معنی‌داری در اکثر فرایندهای فیزیولوژیکی کالوس تحت تیمار شوری نسبت به شاهد مشاهده شد. اما در آزمایش مربوط به کشت ریزنمونه نتایج حاصل از آنالیز آماری تغییرات معنی‌داری در فرآیندهای فیزیولوژیکی کالوس تحت تیمار شوری و نسبت به شاهد نشان نداد (جدول ۱). همچنین فاکتور شوری نیز به تنهایی بر هیچ‌کدام از این شاخص‌ها اثر معنی‌داری نشان نداد. به نظر می‌رسد با توجه به مقاومت نسبی کنگرفرنگی به شوری، عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار در پارامترهای اندازه‌گیری شده را بتوان به سطوح نسبتاً پایین تیمارهای اعمال شده دانست. روش کشت به جزء کارتنوئید بر سایر عوامل مورد مطالعه شامل وزن‌تر، کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل اثر معنی‌داری در سطح نشان داد. اگرچه اثر متقابل روش کشت و سطوح شوری بر تراکم رنگدانه‌ها و وزن تر کالوس اختلاف معنی‌داری نشان نداد، با این وجود همان‌گونه که از جدول ۶ استنباط می‌شود در تمام سطوح شوری تراکم رنگدانه‌ها و همچنین وزن تر نمونه‌ها کشت مستقیم نسبت به نمونه‌های کشت غیر مستقیم بیشتر بود. لازم به ذکر است که تنها میزان

کلروفیل b نمونه‌های کشت مستقیم کشت شده در سطوح شوری ۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ از این قاعده استثناء بود.



شکل ۱. (الف) شاهد؛ (ب) کالوس رشد کرده در محیط ۵۰ میکرومولار NaCl؛ (پ) کالوس رشد کرده در محیط ۱۵۰ میکرومولار NaCl؛ (ت) کالوس رشد کرده در محیط ۳۰۰ میکرومولار NaCl؛ (ث) کالوس رشد کرده در محیط ۶۰۰ میکرومولار NaCl ؛ (ج) کالوس رشد کرده در محیط ۱۲۰۰ میکرومولار NaCl.

Figure 1. (A) Blank; (B) Callus grown in 50 µM NaCl medium; (C) Callus grown in 150 µM NaCl medium; (D) Callus grown in 300 µM NaCl medium; (E) Callus grown in 600 µM NaCl medium; (F) Callus grown in 1200 µM NaCl medium.



شکل ۲. (چ) کالوس رشد کرده در محیط ۲۰۰۰ میکرومولار NaCl؛ (ح) کالوس رشد کرده در محیط ۴۰۰۰ میکرومولار NaCl؛ (خ) کالوس رشد کرده در محیط ۶۰۰۰ میکرومولار NaCl؛ (د) کالوس رشد کرده در محیط ۷۵۰۰۰ میکرومولار (۷۵ میلی‌مولار) NaCl.

Figure 2. (G) Callus grown in 2000 µM NaCl medium; (H) Callus grown in 4000 µM NaCl medium; (I) Callus grown in 6000 µM NaCl medium; (J) Callus grown in 75000 µM NaCl medium;

جدول ۱. مقایسه صفات مورفولوژیکی کالوس کنگرفرنگی تحت تیمار شوری در هر دو روش کشت

Table 1. Comparison of morphological characteristics of artichoke callus under salt treatment in both cultivation methods

روش کشت Cultivation method	تیمار Treatment	رنگ کالوس Callus Color	بافت کالوس Callus Tissue	رشد کالوس Callus Growth
کالوس Callus	شاهدBlank	G_1	1	2
	50	G_1Y/W	1	2
	150	G_1Y/B_2	1	2
	300	$Y/B_2/G_2$	1	2
	600	$G_1/B_2/V$	2	2
	1200	G_1Y/B_2	2	3
	2000	G_1Y/B_2	0	2
	4000	B_2B/G_1	0	2
	6000	$B/B_2/GY$	1	3
	750000	$B/G_1Y/W$	0	3
ریزنمونه Explant	شاهدBlank	G1/GY	1	2
	50	G1/Y/B2	1	2
	150	G1/GY/B2	1	1
	300	G1/B2	1	1
	600	GY/B2	1	1
	1200	GY/W/B2	1	1

جدول ۲. تجزیه واریانس تغییرات رشدی و مقادیر رنگدانه‌های کالوس کنگرفرنگی تحت تأثیر تیمار شوری و روش کشت

Table 2. Variance analysis of growth changes and the amounts of artichoke callus pigments under the influence of salinity treatment and cultivation method

منابع تغییرات Sources of changes	کلروفیلa Chlorophyll a	کلروفیلb Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll	کارتنوئید Carotenoid	وزن تر wet weight
روش کشت Cultivation method	0.011^{***}	0.044^{***}	0.021^{***}	$^{ns}0.000$	23.05^{***}
شوری Saltiness	$^{ns}0.001$	$^{ns}0.002$	$^{ns}0.001$	$^{ns}0.000$	$^{ns}0.389$
روش کشت× شوری Cultivation method × Salinity	$^{ns}0.000$	$^{ns}0.001$	$^{ns}0.000$	$^{ns}0.000$	$^{ns}1.31$
خطا Error	0.0004	0.001	0.0006	0.0002	0.53

*** ($P<0.001$)، ^{ns} غیر معنی دار.

جدول ۳. مقایسه میانگین تغییرات رشدی و مقادیر رنگدانه‌های کالوس کنگرفرنگی تحت تأثیر سطوح شوری

Table 3. Comparison of average growth changes and artichoke callus pigment values under the influence of salinity levels

وزن تر wet weight	کارتنوئید Carotenoid	کلروفیل کل Total chlorophyll	کلروفیلb Chlorophyll b	کلروفیلa Chlorophyll a	شوری Salinity
a 2.105	a 0.032	a 0.053	a 0.076	a 0.037	شاهد Blank
a 2.118	a 0.026	a 0.047	a 0.069	a 0.034	50
a 2.012	a 0.030	a 0.051	a 0.074	a 0.036	150
a 1.765	a 0.033	a 0.058	a 0.085	a 0.042	300
a 1.691	a 0.018	a 0.031	a 0.044	a 0.019	600
a 1.49	a 0.017	a 0.033	a 0.047	a 0.021	1200
ns	ns	ns	ns	ns	P-Value
0.871	0.017	0.037	0.053	0.026	LSD5%

ns= غیر معنی‌دار. در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارد.

جدول ۴. مقایسه میانگین تغییرات رشدی و مقادیر رنگدانه‌های کالوس کنگرفرنگی درهر دو کشت

Table 4. Comparison of average growth changes and the amounts of artichoke callus pigments in both cultures

وزن تر wet weight	کارتنوئید Carotenoid	کلروفیل کل Total chlorophyll	کلروفیلb Chlorophyll b	کلروفیلa Chlorophyll a	روش کشت Cultivation method
b 1.063	a0.022	b 0.022	b 0.031	b 0.014	کشت کالوس Cultivation of callus
a 2.664	a 0.029	a 0.069	a 0.101	a 0.049	کشت ریز نمونه Cultivation of explants
0.000	ns	0.000	0.000	0.000	P-Value
0.503	0.0098	0.021	0.03	0.015	LSD5%

جدول ۵. مقایسه میانگین تغییرات رشدی و مقادیر رنگدانه‌های کالوس کنگرفرنگی تحت تاثیر اثر متقابل سطوح شوری

Table 5- Comparison of average growth changes and artichoke callus pigment values under the influence of the mutual effect of salinity levels

وزن تر wet weight	کارتنوئید Carotenoid	کلروفیل کل Total chlorophyll	کلروفیلb Chlorophyll b	کلروفیلa Chlorophyll a	شوری Salinity	روش کشت Cultivation method
^{b}0.876	^{a}0.026	^{b}0.020	^{b}0.028	^{b}0.01	شاهدBlank	کالوس Callus
^{b}0.99	^{a}0.016	^{b}0.012	^{b}0.017	^{b}0.007	50	
^{b}0.96	^{a}0.026	^{b}0.025	^{b}0.037	^{b}0.017	150	
^{a}1.02	^{a}0.029	^{a}0.033	^{a}0.049	^{b}0.024	300	
^{b}0.973	^{a}0.018	^{b}0.015	^{b}0.022	^{b}0.011	600	
^{a}1.54	^{a}0.0188	^{b}0.020	^{b}0.029	^{b}0.014	1200	
^{b}0.876	^{a}0.026	^{b}0.020	^{b}0.028	^{b}0.01	شاهدBlank	ریزنمونه Explant
^{a}3.24	^{a}0.035	^{a}0.082	^{a}0.119	^{a}0.059	50	
^{a}3.06	^{a}0.033	^{a}0.076	^{a}0.111	^{a}0.055	150	
^{a}2.50	^{a}0.037	^{a}0.083	^{a}0.121	^{a}0.060	300	
^{a}2.41	^{a}0.016	^{a}0.045	^{b}0.064	^{a}0.028	600	
^{a}1.43	^{a}0.016	^{a}0.044	^{b}0.063	^{a}0.028	1200	
ns	ns	ns	ns	ns	P-Value	
1.23	0.024	0.053	0.075	0.037	$LSD_{5\%}$	

ns= غیر معنی‌دار. وزن‌تر به گرم و رنگدانه‌های درونی به میلی‌گرم بر گرم بیان شده است.

اگرچه اثر متقابل روش کشت و سطوح شوری بر تراکم رنگدانه‌ها و وزن‌تر کالوس اختلاف معنی‌داری نشان نداد، با این وجود همان‌گونه که از جدول ۶ استنباط می‌شود در تمام سطوح شوری تراکم رنگدانه‌ها و همچنین وزن‌تر نمونه‌ها

کشت ریزنمونه نسبت به نمونه‌های کشت کالوس بیشتر بود. لازم به ذکر است که تنها میزان کلروفیل b نمونه‌های کشت ریزنمونه کشت‌شده در سطوح شوری ۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ از این قاعده استثناء بود.

اثر شوری بر وزن‌تر کالوس در هر دو روش کشت

نتایج حاصل از آزمایش روش کشت کالوس و ریز نمونه (جدول ۶) نشان داد که افزایش معنی‌داری در وزن‌تر کالوس تیمارهای شوری در مقایسه با شاهد فقط در کشت کالوس وجود دارد. با افزایش تنش ناشی از شوری بر میزان وزن‌تر کالوس در روش کشت کالوس افزوده شد به‌طوری‌که بیشترین وزن تر کالوس در غلظت‌های شوری بالا۷۵۰۰ میکرومولار (۷۵ میلی‌مولار) NaCl و کمترین آن در شاهد دیده شد. لازم به ذکر است که علی‌رغم مشاهده روند افزایشی در وزن تر کالوس تحت تأثیر افزایش شوری، اختلاف معنی‌داری در وزن تر کالوس مشاهده نشد (جدول ۶). فاکتور روش کشت اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ بر میزان وزن تر نشان داد (جدول ۵). همچنین در آزمایش کشت ریزنمونه به‌طوری که بیشترین وزن تر نمونه مربوط به شاهد و کمترین آن مربوط به تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار NaCl بود. همچنین جدول ۶ نشان داد که روش کشت اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ بر میزان وزن تر می باشد. ولی عامل شوری اختلاف معنی‌داری بر میزان وزن تر نشان نداد. با وجود گزارش‌های قبلی در خصوص اثر تنش شوری بر رشد و وزن‌تر کالوس گیاهان مختلف، از جمله مطالعات ناشر محمد و همکاران (Nasher mohamad *et al*., 2011)، بر روی کالوس گیاه گوجه‌فرنگی که نشان داده شد شوری رشد و وزن‌تر کالوس را کاهش می‌دهد، در تحقیق حاضر افزایش نسبی در کالوس‌زایی نمونه کنگرفرنگی در شوری بالا نیز مشاهده شد. تنظیم پتانسیل اسمزی به نگه‌داری فشار تورژسانس که برای رشد و عملکرد لازم است کمک می‌کند (Arzani., 2008). با توجه به بررسی ال‌سعید و همکاران (El sayed *et al*., 2011) بر روی گیاه نخودفرنگی مبنی بر این‌که رشد کالوس در محیط تنش به خوبی محیط کشت عاری از تنش صورت گرفت، به این نتیجه رسیدند که سلول‌های مقاوم به شوری در برابر مقادیر بالاتر نمک رشد و عملکرد خوبی داشتند که به دلیل مقادیر پرولین بالا صورت گرفت. براین اساس می‌توان نتیجه گرفت که با وجود توان مقاومتی بالا کالوس کنگرفرنگی به شوری در غلظت‌های بالا وزن تر در ارتباط با افزایش رشد ناشی از تجمع اسمولیت‌ها و محلول‌های سازگار از جمله پرولین که با کاهش پتانسیل اسمزی جذب آب توسط سلول را افزوده و همچنین در تثبیت پروتئین نقش ایفا می‌کند افزایش می‌یابد. با توجه به بررسی Al-saeed *et al* (2011) بر روی گیاه نخودفرنگی مبنی بر این‌که رشد کالوس در محیط تنش به خوبی محیط کشت عاری از تنش صورت گرفت، به این نتیجه رسیدند که سلول‌های مقاوم به شوری در برابر مقادیر بالاتر نمک رشد و عملکرد خوبی داشتند که به دلیل مقادیر پرولین بالا صورت گرفت. براین اساس می‌توان نتیجه گرفت که با وجود توان مقاومتی بالا کالوس کنگرفرنگی به شوری در غلظت‌های بالا وزن تر در ارتباط با افزایش رشد ناشی از تجمع اسمولیت‌ها و محلول‌های سازگار از جمله پرولین که با کاهش پتانسیل اسمزی جذب آب توسط سلول را افزوده و همچنین در تثبیت پروتئین نقش ایفا می‌کند افزایش می‌یابد.

جدول ۶. مقایسه میانگین تغییرات رشدی و تراکم رنگدانه‌های درونی کالوس تحت تأثیر شوری در هر دو روش کشت

Table 6- Comparison of average growth changes and density of internal callus pigments under the influence of salinity in both cultivation methods

روش کشت Cultivation method	شوری Salinity	کلروفیلa Chlorophyll a	کلروفیلb Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll	کارتنوئید Carotenoid	وزن تر wet weight
کالوس Callus	شاهدBlank	۰/۰۱bc	۰/۰۳abc	۰/۰۲۳ab	۰/۰۲۶a	۰/۸۷۶c
	50	۰/۰۰۵bc	۰/۰۲bcd	۰/۰۱۵bcd	۰/۰۱۵bc	۱/۱۳bc
	150	۰/۰۱۶ab	۰/۰۳۶ab	۰/۰۲۶ab	۰/۰۲۳ab	۰/۹۶۳bc
	300	۰/۰۲۶a	۰/۰۵a	۰/۰۳۳a	۰/۰۳a	۱/۰۲۳bc
	600	۰/۰۱۳bc	۰/۰۲۳bcd	۰/۰۱۳bcd	۰/۰۲abc	۰/۹۷۳bc
	1200	۰/۰۱۳bc	۰/۰۳abc	۰/۰۲abc	۰/۰۲abc	۱/۵۶۷ab
	2000	۰/۰۰۳c	۰/۰۱dc	۰/۰۰۳d	۰/۰۱c	۱/۵۳ab
	4000	۰/۰۰۳c	۰/۰۱۳dc	۰/۰۰۳d	۰/۰۱۳bc	۱/۸۳a
	6000	۰/۰۰۳c	۰/۰۰۶d	۰/۰۰۷cd	۰/۰۱c	۱/۴۳abc
	750000	۰/۰۰۳c	۰/۰۰۳d	۰/۰۰۰d	۰/۰۱c	۱/۸۳a
	P-value	۰/۰۰۳	۰/۰۱	۰/۰۰۶	۰/۰۱	۰/۰۰۹
	LSD5%	۰/۰۱۳	۰/۰۲۲	۰/۰۱۶	۰/۰۱۱	۰/۵۷۲
ریزنمونه Explant	شاهدBlank	۰/۰۶۲a	۰/۱۲۳a	۰/۰۸۴a	۰/۰۳۸a	۳/۳۳a
	50	۰/۰۵۹a	۰/۱۱۹a	۰/۰۸۱a	۰/۰۳۵a	۳/۲۴a
	150	۰/۰۵۵a	۰/۱۱۱a	۰/۰۷۶a	۰/۰۳۳a	۳/۰۶a
	300	۰/۰۶۰a	۰/۱۲۱a	۰/۰۸۳a	۰/۰۳۷a	۲/۵۰ab
	600	۰/۰۲۷a	۰/۰۶۴a	۰/۰۴۵a	۰/۰۱۶a	۲/۴۱ab
	1200	۰/۰۲۸a	۰/۰۶۳a	۰/۰۴۴a	۰/۰۱۶a	۱/۴۳b
	P-value	ns	ns	ns	ns	ns
	LSD5%	0.059	۰/۱۰۳	۰/۰۶۸	۰/۰۳۷	۱/۳۳

ns= غیر معنی‌دار. وزن‌تر به گرم و رنگدانه‌های درونی به میلی‌گرم بر گرم بیان شده است.

تأثیر سطوح مختلف شوری بر میزان کلروفیل و کارتنوئید

در آزمایش روش کشت کالوس ۱۰ سطوح شوری بر میزان رنگدانه‌های درونی کالوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۷) کاهش معنی‌داری در میزان رنگیزه‌های کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید در سطح ۰/۰۱ درصد نشان داد. به‌طوری که بیشترین میزان آن‌ها در غلظت متوسط ۳۰۰ میکرومولارNaCl مشاهده شد. همچنین کمترین مقادیر این رنگیزه‌ها مربوط به غلظت‌های بالای ۴۰۰۰ میکرومولار بود. اثر متقابل بین تیمار شوری و روش کشت بر روی میزان این رنگیزه‌ها اثر معنی‌داری نشان نداد. ولی روش کشت فقط بر رنگیزه‌های کلروفیل اثر معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱

داشت (جدول ۷). طبق بررسی‌های صورت گرفته در گوجه‌فرنگی کاهش مقادیر کلروفیل در اثر شوری مشاهده شد. کاهش کلروفیل تحت تنش ممکن است، بستگی به کاهش در سنتز کلروفیل یا یک افزایش در تنزل (نابودی) کلروفیل باشد(Nasher mohamad et al., 2011).

اثر شوری بر صفات بیوشیمیایی کالوس کنگرفرنگی

در آزمایش روش کشت کالوس مطابق با نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین تغییرات معنی‌داری در میزان درصد مهار رادیکال آزاد، اسید کلروجنیک و اسید کافئیک مشاهده شد. اما روند معنی‌داری در مقادیر فنل و فلاونوئید کل نشان نداد. در بررسی اثر متقابل شوری وروش کشت و فاکتور شوری اختلاف معنی‌داری در عوامل مورد مطالعه به جز میزان اسید کلروجنیک مشاهده نشد. همچنین روش کشت بر میزان درصد مهار رادیکال آزاد، اسید کلروجنیک و اسید کافئیک اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول۷).

جدول ۷. تجزیه واریانس تغییرات میزان برخی از ترکیبات شیمیایی کالوس کنگرفرنگی تحت تأثیر شوری و روش کشت
Table 7. Variance analysis of changes in some chemical compounds of artichoke callus under the influence of salinity and cultivation method

کافئیک (mg/g) Caffeic	کلروجنیک (mg/g) Chlorogenic	درصد مهار رادیکال آزادDPPH Percentage of free radical inhibition DPPH	فلاونوئید کل (mg/g) Total flavonoids	فنل کل(mg/g) Total phenol	منابع تغییرات Sources of changes
0.563***	1.11*	679.03***	ns 0.095	ns 0.054	روش کشت Cultivation method
ns 0.003	0.566*	ns 45.36	ns 0.178	ns 0.196	شوری Saltiness
ns 0.002	0.555*	ns 92.56	ns 0.571	ns 0.175	روش کشت× شوری Cultivation method × salinity
0.002	0.215	45.72	0.294	0.170	خطا Error

*** (p<0.001)، ** (p<0.01)، * (p<0.05)، ns اثر معنی‌دار ندارد.

جدول ۸. مقایسه میانگین تغییرات میزان برخی از ترکیبات شیمیایی کالوس کنگرفرنگی تحت تاثیر شوری
Table 8- Comparison of Average changes in some chemical compounds of artichoke callus under the influence of salinity

کافئیک (mg/g) Caffeic	کلروجنیک (mg/g) Chlorogenic	درصد مهار رادیکال آزادDPPH Percentage of free radical inhibition DPPH	فلاونوئید کل (mg/g) Total flavonoids	فنل کل(mg/g) Total phenol	شوری Salinity
a 0.45	a 1.36	a 78.44	a 0.87	a 1.093	شاهدBlank
a 0.40	b 1.19	a 74.42	a 0.50	a 0.66	50
a 0.40	b 1.23	a 71.15	a 0.98	a 0.65	150
a 0.41	b 0.91	a 78.49	a 0.67	a 0.77	300
a 0.40	a 1.84	a 75.40	a 0.74	a 0.95	600
a 0.40	b 1.2	a 76.01	a 0.61	a 0.67	1200
ns	0.04	ns	ns	ns	P-Value
0.05	0.55	8.05	0.64	0.49	$LSD_{5\%}$

ns=غیر معنی‌دار. در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارد.

جدول ۹.مقایسه میانگین تغییرات میزان برخی از ترکیبات شیمیایی کالوس کنگرفرنگی در کشت ریزنمونه و کالوس

Table 9- Comparison of the average changes in the amount of some chemical compounds of artichoke callus in explant and callus culture

کافئیک (mg/g) Caffeic	کلروجنیک (mg/g) Chlorogenic	درصد مهار رادیکال آزادDPPH Percentage of free radical inhibition DPPH	فلاونوئید کل (mg/g) Total flavonoids	فنل کل(mg/g) Total phenol	روش کشت Cultivation method
b 0.288	a 1.484	a 80	a 0.783	a 0.843	کشت کالوس Cultivation of callus
a 0.539	b 1.132	b 71.314	a 0.681	a 0.766	کشت ریز نمونه Cultivation of explants
0.000	0.03	0.001	ns	ns	P-Value
0.03	0.319	4.65	0.373	0.284	$LSD_{5\%}$

ns= غیر معنی‌دار. در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارد.

جدول ۱۰. مقایسه میانگین تغییرات میزان برخی از ترکیبات شیمیایی کالوس کنگرفرنگی تحت تاثیر اثر متقابل سطوح شوری

Table 10. Comparison of the average changes in the amount of some chemical compounds of artichoke callus under the influence of the mutual effect of salinity levels

کافئیک (mg/g) Caffeic	کلروجنیک (mg/g) Chlorogenic	درصد مهار رادیکال آزاد DPPH Percentage of free radical inhibition DPPH	فلاونوئید کل (mg/g) Total flavonoids	فنل کل(mg/g) Total phenol	شوری Salinity	روش کشت Cultivation method
b 0.36	a 2.07	a 80.33	a 1.30	a 1.40	شاهد Blank	کالوس Callus
ab 0.27	b 1.48	a 75.33	b 0.50	b 0.57	50	
ab 0.27	a 1.40	a 83	b 0.54	b 0.68	150	
ab 0.29	b 0.73	a 81.33	a 1.003	a 0.94	300	
ab 0.26	a 1.89	a 80.33	a 0.79	a 0.84	600	
ab 0.26	a 1.31	a 79.66	b 0.55	b 0.59	1200	
b 0.36	a 2.07	a 80.33	a 1.30	a 1.40	شاهد Blank	ریزنمونه Explant
a 0.53	b 0.89	a 73.51	a 0.51	a 0.74	50	
a 0.53	b 1.05	b 59.31	b 1.41	b 0.62	150	
a 0.53	b 1.09	a 75.66	b 0.34	b 0.61	300	
a 0.53	a 1.80	b 70.46	a 0.68	a 1.06	600	
a 0.53	b 1.28	a 72.37	a 0.67	a 0.76	1200	
ns	0.05	ns	ns	ns	P-Value	
0.075	0.78	11.39	0.91	0.69	$LSD_{5\%}$	

ns= غیر معنی‌دار. در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارد.

اثر شوری بر میزان فنل کل کالوس

در آزمایش کشت کالوس با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین (جدول ۱۱) شوری اثر معنی‌داری بر میزان فنل کل کالوس کنگرفرنگی نشان نداد. به‌طوری که بیشترین مقدار آن مربوط به شاهد و کمترین آن مربوط به سطوح بالای شوری بود. همچنین طبق جدول مقایسه میانگین (جدول۱۰) و تجزیه واریانس (جدول ۷) هیچ اثر متقابلی بین روش کشت و شوری از نظر میزان فنل کل مشاهده نشد. فاکتورهای شوری و روش کشت هر کدام نیز اثر معنی‌داری بر روی فنل کل نشان ندادند.

با توجه به نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین (جدول ۱۱) در روش کشت ریزنمونه تنش شوری اختلاف معنی‌داری بر میزان فنل کل و ترکیبات فلاونوئیدی نشان نداد. به‌طوری که بیشترین مقدار فنل کل مربوط به تیمار ۶۰۰ میکرومولار NaCl و کمترین آن مربوط به شاهد بود و بیشترین مقدار ترکیبات فلانوئیدی مربوط به سطوح ۱۵۰ میکرومولار NaCl و کمترین مقدار آن مربوط به شاهد بود. همچنین طبق جدول مقایسه میانگین و تجزیه واریانس (جدول ۷) هیچ اثر متقابلی بین روش کشت و شوری از نظر میزان فنل کل و ترکیبات فلانوئیدی مشاهده نشد. فاکتورهای شوری و روش کشت نیز اثر معنی‌داری بر روی فنل کل و ترکیبات فلانوئیدی نشان ندادند. با مشاهده تأثیر سطوح شوری بر میزان فنل، سطح متوسط ۳۰۰ میکرومولار بیشترین میزان فنل را نسبت به سایر سطوح نشان داد. این نتایج با مشاهدات (Sabir *et al*., 2012) مطابقت دارد.

جدول ۱۱. مقایسه میانگین صفات بیوشیمیایی تحت تأثیر شوری در هر دو روش کشت

Table 11. Comparison of average biochemical traits under the influence of salinity in both cultivation methods

روش کشت Cultivation method	تیمار سطح شوری Salinity level treatment	فنل کل(mg/g) Total phenol	فلاونوئید کل (mg/g) Total flavonoids	درصد مهار رادیکال آزاد DPPH Percentage of free radical inhibition DPPH	کلروجنیک (mg/g) Chlorogenic	کافئیک (mg/g) Caffeic
کالوس Callus	شاهدBlank	a۱/۴۱	a۱/۳۰۳	abc۸۰/۰۱	a۲/۰۷۳	b۰/۳۶
	50	b۰/۵۸۵	ab۰/۴۹	abc۷۰/۱۹	bc۱/۷۳	c۰/۲۷
	150	ab۰/۶۸۷	ab۰/۵۴۳	a۸۲/۸۸	bc۱/۴۰۳	bc۰/۲۷۳
	300	ab۰/۹۴۶	ab۱/۰۰۶	a۸۰/۹۷	d۰/۷۴	bc۰/۲۹۳
	600	ab۰/۸۴۳	ab۰/۷۹۶	abc۷۹/۹۵	ab۱/۸۹۶	c۰/۲۶۷
	1200	b۰/۵۹۶	ab۰/۵۵۳	abc۸۰/۰۷	c۱/۳۱۳	c۰/۲۶
	2000	b۰/۵۶۷	b۰/۳۹۶	bc۷۰/۳۵	d۰/۵۸۶	a۰/۵۶۳
	4000	ab۰/۷۶۶	ab۰/۵۹	bc۷۰/۴۶	d۰/۶۱	a۰/۵۴۶
	6000	b۰/۲۵۶	b۰/۱۵۳	abc۷۳/۱۴	d۰/۶۰۳	a۰/۵۳۶
	75000	b۰/۳۹۷	b۰/۳۰۳	abc۷۴/۱۵	d۰/۶۰۶	a۰/۵۲۹
	P-Value	ns	ns	۰/۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	$LSD_{5\%}$	۰/۷۳۵	۰/۸۷۰	۸/۳۸	۰/۵۱۱	۰/۰۹۰
ریزنمونه Explant	شاهدBlank	b۰/۶۰	b۰/۴۳	a۷۶/۵۵	b۰/۶۶	a۰/۵۵۰
	50	ab۰/۷۴	b۰/۵۱	a۷۳/۵۱	ab۰/۸۹	b۰/۵۳۸
	150	b۰/۶۲	a۱/۴۱	b۵۹/۳۱	ab۱/۰۵۶	b۰/۵۳۳
	300	b۰/۶۱	b۰/۳۴	a۷۵/۶۶	ab۱/۰۹۲	b۰/۵۳۰
	600	a۱/۰۶	b۰/۶۸	abc۷۰/۴۶	a۱/۸۰	b۰/۵۳۸
	1200	ab۰/۹۲	b۰/۶۷	a۷۲/۳۷	ab۱/۲۸	b۰/۵۳۹
	P-Value	ns	ns	ns	ns	۰/۰۰
	$LSD_{5\%}$	۰/۳۸۸	۰/۶۹	۱۲/۸۲	۰/۹۰۶	۰/۰۰۹

ns= غیر معنی‌دار. در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارد.

اثر سطوح مختلف شوری بر میزان فلاونوئید

در آزمایش کشت کالوس طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین (جدول ۱۱) تنش شوری اثر معنی‌داری بر میزان ترکیبات فلاونوئیدی نداشت. به‌طوری‌که بیشترین مقدار آن مربوط به شاهد و کمترین مقادیر آن‌ها مربوط به سطوح بالای شوری بود. همچنین طبق جدول مقایسه میانگین (جدول۸) و تجزیه واریانس (جدول ۷) هیچ اثر متقابلی بین روش کشت و شوری از نظر میزان ترکیبات فلاونوئیدی مشاهده نشد و فاکتورهای شوری و روش کشت نیز اثر معنی‌داری بر روی فلاونوئید نشان ندادند.

در آزمایش کشت ریزنمونه نتایج حاصل از مقایسه میانگین (جدول ۶) اختلاف معنی‌داری در میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید نشان نداد. اما روند کاهشی در میزان این رنگدانه‌ها مشاهده شد. به‌طوری که بیشترین مقادیر آن‌ها مربوط به شاهد و کمترین آن‌ها مربوط به تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار NaCl بود. اثر متقابل بین تیمار شوری و روش کشت بر روی میزان این رنگیزه‌ها اثر معنی‌داری نشان نداد. ولی روش کشت فقط بر رنگیزه‌های کلروفیل اثر معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ داشت.

اثر سطوح مختلف شوری بر درصد مهار رادیکال‌آزاد (DPPH)

در آزمایش کشت کالوس داده‌های حاصل از مقایسه میانگین (جدول ۱۱) نشان داد که شوری اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر میزان درصد مهار رادیکال‌های آزاد عصاره کالوس کنگرفرنگی داشت. به‌طوری که کالوس‌های تیمار شده با غلظت-های متوسط شوری ۳۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار NaCl بیشترین توآنمندی مهار رادیکال‌های آزاد را نسبت به سایر تیمارها نشان داد. طبق بررسی اثر متقابل بین شوری و روش کشت، اثر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد وجود ندارد. شوری اثر معنی‌داری برمیزان درصد مهار رادیکال آزاد نشان نداد (جدول ۹). اما فاکتور روش کشت اثر معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ بر روی آن نشان داد (جدول ۸). در بیان رابطه بین میزان فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی دجریدان و همکاران (Djeridane *et al.*, 2006) بیان کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمی‌تواند فقط منشاء پلی‌فنلی داشته باشد، همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نه تنها به غلظت مواد آنتی‌اکسیدان مربوط است، بلکه با ساختار و طبیعت مواد آنتی‌اکسیدان نیز در ارتباط است. در آزمایش کشت ریزنمونه نتایج مقایسه‌ی میانگین (جدول ۱۱) اثر معنی‌داری بر میزان درصد مهار رادیکال آزاد نشان نداد. به‌طوری‌که بیشترین مقدار آن مربوط به شاهد و کمترین مقدار آن به تیمار ۱۵۰ میکرومولار NaCl تعلق داشت. طبق بررسی اثر متقابل بین شوری و روش کشت، اثر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد وجود ندارد. شوری اثر معنی‌داری برمیزان درصد مهار رادیکال آزاد نشان نداد. اما فاکتور روش کشت اثر معنی‌داری در سطح یک درصد بر روی آن نشان داد (جدول ۱۰).

اثر سطوح مختلف شوری بر میزان اسید کلروجنیک واسید کافئیک

در آزمایش کشت کالوس نتایج حاصل از مقایسه میانگین (جدول ۱۱) نشان داد که بین تیمارهای شوری میزان اسید کلروجنیک و اسید کافئیک اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ وجود داشت. به‌طوری که بیشترین میزان اسید کلروجنیک در

بین سطوح شوری، مربوط به سطح ۶۰۰ میکرومولار NaCl دیده شده و با افزایش سطوح شوری میزان اسید کلروجنیک کاهش یافت. تا جایی که در مقایسه با شاهد مقدار آن کمتر نیز شد. اثر متقابل تیمار شوری و روش کشت اختلاف معنی‌داری از این نظر نشان داد. هر کدام از فاکتورهای شوری و روش کشت نیز دارای اثر معنی‌داری بر میزان اسید کلروجنیک بودند. طبق بررسی میزان اسید کافئیک بیشترین مقادیر آن مربوط به سطوح بالای شوری بود. همچنین اختلاف معنی‌داری در اثر متقابل شوری و روش کشت بر میزان کافئیک اسید مشاهده نشد. سعید ال و همکاران (El sayed *et al*., 2011) نشان دادند که ترکیبات فنولیک اسیدها شامل اسید کافئیک و اسید کلروجنیک مطابق افزایش تنش شوری افزایش یافت. که این مورد با افزایش اسید کافئیک مطابقت داشت. در آزمایش کشت ریزنمونه نتایج حاصل از مقایسه میانگین (جدول ۱۱) نشان داد که بین تیمارهای شوری اثر معنی‌داری بر میزان اسید کلروجنیک وجود ندارد. ولی با افزایش شوری مقدار اسید کلروجنیک افزایش قابل توجه‌ای داشت. به‌طوری که بیشترین مقدار آن مربوط به تیمار ۶۰۰ میکرومولار NaCl و کمترین آن مربوط به محیط بدون تیمار است. همچنین طبق بررسی میزان اسید کافئیک، تیمار شوری اثر معنی‌داری بر میزان آن در سطح ۰/۰۱ نشان داد. به‌طوری که بیشترین مقدار آن مربوط به محیط بدون تیمار و کمترین مقدار آن مربوط به تیمار ۳۰۰ میکرومولار NaCl بود. با بررسی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه رشد کرده در محیط شور و فاقد آن می‌توان چنین بیان کرد که اسید کروجنیک به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی قوی در زمان افزایش تنش و با کاهش آستانه تحمل گیاه به‌منظور کاهش خسارت اکسیداتیو وارده و افزایش مقاومت در گیاه تولید می‌شود. با این وجود به نظر می‌رسد که اسیدکافئیک به‌عنوان ترکیب فنلی و پیش ساز اسید کلروجنیک و سایر ترکیبات سینارین و سیناروزید همواره در مقدار بسیار کم در گیاه وجود دارد. به عبارتی قابلیت تبدیل این ترکیب به مشتقات آن در شرایط تنش وجود دارد. اما در سطوح شوری بالا مقادیر بالای مشاهده شده آن را به افزایش تولید سایر ترکیبات پلی‌فنلی و یا کاهش قابلیت تبدیل کافئیک اسید به مشتقاتش از جمله اسید کلروجنیک مرتبط دانست.

نتیجه‌گیری

پس از انجام تحقیق حاضر و بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان بیان داشت که تحت تاثیر تیمار شوری بهترین کالوس در کشت غیر مستقیم و تحریک کالوس ایجاد شده از کشت ریزنمونه از لحاظ صفات کیفی و ظاهری نمونه‌های شاهد بود. کالوس‌های حاصله پس از افزایش غلظت شوری مورد بررسی، در رنگ‌های تیره مشاهده شدند. در روش کشت غیرمستقیم با افزایش غلظت شوری با توجه به ماهیت مقاومتی بالای کالوس نسبت به گیاهچه و ریزنمونه‌ی حاصل از آن به‌دلیل افزایش تولید مواد اسمزی برای مقابله با تنش با افزایش غلظت، آب بیشتری جذب کرده و کالوس‌های حاصله نرم و آبدارتر شدند. ولی در روش کشت ریزنمونه تغییرات قابل توجهی در بافت کالوس نسبت به شاهد مشاهده نشد. در روش کشت ریزنمونه در محیط شور، از آن‌جایی که شوری منجر به ناهمگنی در سلول‌ها می‌شود برخی سلول‌ها مقاوم و برخی حساس به شوری بود که به دلایل حساسیت بالا به افزایش غلظت‌های شوری سلول‌ها آب خود را از دست داده و با کاهش آب بین سلولی سلول‌ها محکم تر بهم چسبیده وبافت

در ظاهر متراکم تر و سفت تر به‌نظر می‌آمدند. با توجه به دلایل ذکر شده در بالا شوری در روش کشت غیرمستقیم وزن تر کالوس را افزایش داد. به‌طوری‌که بیشترین وزن، مربوط به شوری بالای ۴۰۰۰ میکرومولار NaCl و کمترین آن مربوط به نمونه بدون تیمار بود. ولی در مقایسه با روش کشت مستقیم شوری وزن تر کالوس‌های ایجاد شده را کاهش می‌دهد به‌طوری که کمترین مقدار وزن تر متعلق به غلظت ۱۲۰۰ میکرومولار NaCl و بیشترین مقدار آن مربوط به شاهد بود. در دو روش کشت غیرمستقیم و مستقیم افزایش غلظت شوری اختلاف معنی‌داری در میزان ترکیبات فنل و فلاونوئید نشان نداد ولی از نظر میزان توانمندی مهار رادیکال‌های آزاد و میزان سنتز کلروجنیک در روش غیر مستقیم نسبت به مستقیم اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. همچنین از نظر میزان سنتز اسید کافئیک در روش کشت مستقیم و غیر مستقیم اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در روش کشت غیرمستقیم بیشترین توانمندی مهار رادیکال‌های آزاد و میزان فنل و فلاونوئید مربوط به سطوح شوری متوسط ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار NaCl بود. افزایش ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی با افزایش سطح شوری تا حد معین بیانگر مقاومت نسبی گیاه در مقابله با ترکیبات اکسیداتیو ناشی از تنش شوری است. زمانی که گیاه در سطوح شوری تا آستانه‌ی تحمل رسید پس از آن برای مقابله با ترکیبات اکسیداتیو ایجاد شده ناشی از تنش، مکانیزم‌های دیگری را فعال نموده که همسو با ترکیبات فنلی عمل می‌نماید. که می‌تواند مقاومت کالوس را در سطح بیشتر از ۷۵۰۰۰ میکرومولار (۷۵ میلی‌مولار) NaCl با وجود کاهش فنل کل نشان دهد. این تفسیر با بررسی روند تغییرات پروتئین کالوس کشت شده در شوری ۱۲۰۰ میکرومولار مشاهده شد. که در شوری‌های بالا با تاثیر در بیان ژن و پروتئین‌های ایجاد شده ناشی از آن و همچنین ترکیبات پروتئینی همانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، سلول‌های کالوس مقاومت خود را نشان می‌دهند. با وجود این‌که اسید کافئیک پیش‌نیاز سنتز اسید کلروجنیک و دیگر ترکیبات پلی‌فنلی است، بررسی مقادیر اسید کافئیک و اسید کلروجنیک در کشت غیر مستقیم در غلظت‌های بالای شوری ۲۰۰۰ میکرومولار NaCl نشان داد که با وجود افزایش اسید کافئیک، سنتز کلروجنیک اسید کاهش یافت که می‌تواند ناشی از کاهش توانایی تبدیل اسید کافئیک به کلروجنیک باشد.

منابع

Alamanni, M. and Cossu, M., 2003. Antioxidant activity of the extracts of the edible part of artichoke (Cynara scolymus L.) var. spinoso sardo. Italian Journal of Food Science, 15(2): 187-195.

Alizadeh, M. 2018. Guide for users of plant tissue culture and micropropagation. Nowrozi Publications, Gorgan, pp. 238-239 and 322. (In Persian).

Arzani, A. 2008. Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological View.in vitro cellular and developmental Biology-Plant. 44(5): 373-383.

Borence, H.J., Su. H., Shen, B. 1992. Molecular mechanisms of salinity tolerance. 30-60.

Castañeda, C.S., Almanza-Merchán, P.J., Pinzón, E.H., Cely, G.E. and Serrano, P.A., 2018. Estimación de la concentración de clorofila mediante métodos no destructivos en vid (Vitis vinifera L.) cv. Riesling Becker. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 12(2): 329-337.

Charbaji, T., Ayyoubi, Z. 2004. Differental Growth of Som Grapevine varieties in respons to salt in vitro. Biology-plant 40(2): 221-224.

Dehpour, A.A, Gholampour, M., Rahdary, P., Jafari Tolubaghi, M.R., Medi hamid, S.M. 2011. Effect of gamma irradiation, callus, protein and proline in rice (*Oryza Sativa* L.). Iranian Journal of plant physiology.1 (4): 251-256.

Djeridane, M., Yousfi, B., Nadjemi, D., Boutassouna, P. and stocker, N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extractscontaining phenolic compounds, Food chem. 97: 654-660

Ebrahimzade, M.A., Pourmorad, F. and Hafezi, S. 2008. Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk. Turkish Journal of Biology. 32: 43-49.

El sayed, H., El sayed, A. 2011. solaiton and characterization of NaCl resistant callus culture of field pea (*Pisum sativum*, L.) to salinity. Agriculture and biology journal North America. 2 (6): 964-973.

Gary, G. 2010. In vitro screening of catharanthus Roseus L. cultivars for salt tolerance using physiological parameters. International journal of environmental science and development. 1 (1): 2010-0264.

Kosova, K., Ilja, T., Vitamvas, P. 2013. Protein Contribution to Plant Salinity Response and tolerance Acquisition.14: 6757-6789.

Meleigy, S., Gabr, M., Mohamed, F., Ismail, M. 2004. Responses to Nacl salinity of tomato cultivated and Breeding lines Differring in salt tolerance in callus cultures. International journal of Agriculture and Biology.6(1): 1560-8530.

Nasher mohamad, A., Ismail, M.R., Kadir, M.A, Saud, H.M. 2011. In virto performances of hypocotyl and cotyledon explants of tomato cultivars under sodium chloride stress. African Journal of Biotechnology. 1(44): 8757-8764.

Omidi, M., Farzin, N., 2009. Biotechnology solutions in increasing the efficiency of medicinal plants. Regional conference of food and biotechnology.153-157. (In Persian).

Sabir, F., Sangwan, R., Kumar, R., Sangwan, N., 2012. Salt Stress-induced Responses in Growth and Metabolism in Callus Cultures and Differentiating in Vitro Shoots of Indian Ginseng (Withania somnifera Dunal). J Plant Growth Regul DOI 10.1007/s00344-012-9264-x.

Sarahi Nobar, M., Niknam, V., Moradi, B. 2019. The effect of salinity stress on the content of protein, pigments, sugars and phenolic compounds in tissue culture of several species of Iranian fenugreek. Tehran University Science Journal. 36 (2): 53-59 (In Persian).

Taiz and Zaiger. 2009. Plant Physiology 2. Translation, Kafi, M., Zand, A., Kamkar, B., Abbasi, F., Mahdavi Damghani, M., Mashhad University Jihad pp. 613-60 (In Persian).

Trajtemberg, S., Apsotolo, N., Fernandez, G. 2006. Calluses of cynara cardancalus var. cardancolus cardon (Asteraceae): determination of cynarin and chlorogenic acid by Automated high-performance capillary electrophoresis. Biology-plant 42: 534-537.