Summer (2023) 12(42): 37-47.
DOI: 10.30473/cb.2023.69016.1922
Received: 10, May 2023 Accepted: 17, Sep. 2023

Crop Biotechnology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Investigating the growth and phytochemical characteristics in the *in vitro* cultivation of *Nitraria schoberi* under salt stress

Hamideh Khalaj[1], Nasim Zarinpanjeh[2*], Mojtaba Askarizadeh[1], Hadi Kalantari Khalilabad[2], Javad Shahghaghi[3]

[1]Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.
[2]Medicinal Plants Research Center, Institute of medicinal plants, ACECR, Karaj, Iran.
[3]Department of Plant Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Karaj, Iran.

Correspondence
Nasim Zarinpanjeh
Email: zarinpanjeh@imp.ac.ir

How to cite
Khalaj, H., Zarinpanjeh, N., Askarizadeh, M., Kalantari Khalilabad, M., & Shahghaghi, J. (2023). Investigating the growth and phytochemical characteristics in the in vitro culture of *Nitraria schoberi* under salt stress. *Crop Biotechnology, 12*(42), 37-47.

ABSTRACT

To investigate the effect of salt stress on the growth and phytochemical characteristics in the *in vitro* cultivation of *Nitraria schoberi*, an experiment was conducted in the form of a factorial design with a completely random basis. The treatments included different concentrations of sodium chloride (0, 50 and 100 mM) and sodium sulfate (0, 10 and 20 mM). First, the seeds were germinated *in vitro* and then the cotyledon leaves with the hypocotyl of germinated seeds were placed as explants in MS cultivation environment with 2 mg/L BAP, 0.5 mg/L IBA, and the mentioned treatments. The explants were placed in the growth room under the conditions of 16 hours of light and 8 hours of darkness at a temperature of 25±2. After 4 weeks, stem length, number of leaves, and total phenol and flavonoids were measured. The results of variance analysis showed that different levels of salt have a significant effect (at the 99% level) on the growth indices of seedlings such as the length of the stem and the number of leaves, as well as on the total amount of phenol and flavonoid in the tissue of leaves. Based on comparisons, the maximum length of the stem (4.3 cm) and the number of leaves (5.5) related to the cultivation environment without salt and the highest amount of total phenol (35.37 mg/g) and flavonoid (24.6 mg/g) g/g) related to the cultivation environment containing 50 mM sodium chloride with 10 mM sodium sulfate.

KEYWORDS

Sodium Sulfate, total Flavonoid, total Phenol, Sodium Chloride, *Nitraria schoberi*.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

سال دوازدهم، شماره چهارم، پیاپی چهل و دوم، تابستان ۱۴۰۲ (۴۷-۳۷)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۶

DOI: 10.30473/cb.2023.69016.1922

نشریه علمی

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی خصوصیات رشدی و فیتوشیمیایی در کشت درون‌شیشه‌ای *Nitraria schoberi* تحت تنش شوری

حمیده خلج[۱]، نسیم زرین‌پنجه[۲*]، مجتبی عسکری‌زاده[۱]، هادی کلانتری خلیل‌آباد[۲]، جواد شقاقی[۳]

[۱]گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
[۲]مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران.
[۳]گروه بانک گیاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران.

نویسنده مسئول:
نسیم زرین‌پنجه
رایانامه: zarinpanjeh@imp.ac.ir

چکیده

به منظور بررسی اثر تنش شوری بر خصوصیات رشدی و فیتوشیمیایی در کشت درون شیشه‌ای گیاه قره‌داغ (*Nitraria schoberi*) آزمایشی در قالب طرح فاکتوریل با پایه کاملا تصادفی انجام شد. تیمارها شامل غلظت‌های مختلف کلریدسدیم (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) و سولفات‌سدیم (۰، ۱۰ و ۲۰میلی‌مولار) بود. ابتدا بذرها در شرایط درون‌شیشه‌ای جوانه دار شدند و سپس قسمت‌های برگ‌های کوتیلدونی به همراه هیپوکوتیل بذرهای جوانه‌زده به عنوان ریزنمونه در محیط کشت MS به همراه ۲ میلی گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA و تیمارهای ذکر شده قرار گرفتند. ریزنمونه‌های آماده شده در اتاق رشد درشرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی دمای ۲±۲۵ قرار داده شدند. پس از ۴ هفته طول ساقه، تعداد برگ و میزان فنل و فلاونویید کل اندازه گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که سطوح مختلف نمک بر شاخص‌های رشدی گیاهچه‌ها چون طول ساقه و تعداد برگ‌ها و همینطور بر میزان فنل و فلاونوئید کل موجود در بافت برگ‌ها تاثیر معنی‌داری (در سطح ۹۹ درصد) دارد. بر اساس مقایسات میانگین بیشترین طول ساقه (۴/۳ سانتی متر) و تعداد برگ (۵/۵) مربوط به محیط کشت فاقد نمک و بیشترین میزان فنل کل (۳۵/۳۷ میلی گرم در گرم) و فلاونوئید کل (۲۴/۶ میلی گرم در گرم) مربوط به محیط کشت حاوی ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به همراه ۱۰ میلی‌مولار سولفات‌سدیم بوده است.

واژه‌های کلیدی

سولفات‌سدیم، فلاونویید کل، فنل کل، کلریدسدیم، قره‌داغ (*Nitraria schoberi*).

استناد به این مقاله:

خلج، حمیده، زرین‌پنجه، نسیم، عسکری‌زاده، مجتبی، کلانتری خلیل‌آباد، هادی و شقاقی، جواد (۱۴۰۲). بررسی خصوصیات رشدی و فیتوشیمیایی در کشت درون شیشهای گیاه قرهداغ تحت تنش شوری . فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۲), ؟؟-؟؟.

https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

مقدمه

شرایط محیط رشد گیاهان دارویی بر میـزان و کیفیـت متابولیـت های ثانویه آنها تاثیر زیادی دارند و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و مسیرهای متابولیکی متناظر با آنها به شدت با شرایط رشد گیاهی ارتباط دارد (behdad *et al*., 2020). تنش‌هـای محیطـی ماننـد خشکی، شوری و سرما می‌توانند تاثیرات منفی بر تولیدات گیـاهی داشته باشند و حتی بقای گیـاه را تهدیـد کننـد (Boyer, 1982). شوری یکی از عوامل محیطی است که بـا تـاثیر بـر روی بیشـتر فعالیت‌های مرفوفیزیولوژیکی، رشد و نمو گیاه را تغییـر مـی‌دهـد. شوری با تاثیر بر روی جذب عناصر مختلف نظیر فسفر، پتاسیم و نیترات سبب کاهش رشد گیاه مـی‌شـود (Iraji Mareshk and Moghaddam, 2021). با توجه بـه توسـعه شـوری در اراضـی کشاورزی و وجود منابع آب شور، لزوم تعیین حد تحمل به شوری گیاهان مختلف به ویژه گیاهان دارویی ضروری است و استفاده از گیاهان متحمل به شوری به عنوان یک عامل مدیریتی در شرایط آب یا خاک شور توصیه می‌شود. گیاه دارویی قـره‌داغ(*Nitraria schoberi* L.)، از گیاهان دارویی بسیار مفید و مقـاوم بـه تـنش شوری است.

قـره‌داغ از جـنس Nitraria و از خـانواده zygohpylaceae می‌باشد. به دلیل تحمل بـالای گونـه‌هـای جـنس Nitraria بـه شرایط خشکی و شوری، این گیاه در جهت کاهش اثرات شـوری خاک و همینطور تثبیت شـن‌های روان بسـیار ارزشـمند می‌باشـد (Zhao *et al*., 2002). تحقیقات بسیاری نشـان داده اسـت گـه گونـه قـره‌داغ دارای خـواص دارویـی گسـترده‌ای چـون خـواص آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدقارچی، ضدالتهابی و ضدویروسی می‌باشـد (Sharifi-Rad *et al*., 2014; Zheleznichenko *et al*., 2018). واژه الیستور در گیاهان به موادی اطلاق می‌شود که منجر به پاسخ‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک و در نهایت تجمع فیتوالکسین‌هـا مـی‌شـود. الیسـیتورها بـر اسـاس طبیعتشـان بـه الیسـتورهای زیسـتی و غیرزیسـتی و بـر اسـاس منشاشـان بـه الیستورهای درونی و بیرونی طبقه بندی می‌شوند (Angelova *et al*., 2006). استفاده از الیسیتورها یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است (Patel *et al*., 2013). با این حال، دسترسی به این ترکیبات در گیاهان، اغلب با مشکلاتی روبـرو اسـت. سیسـتم‌هـای کشـت سـلول گیـاهی بـرای تولیـد متابولیت‌های ثانویه‌ای کـه اهمیـت تجـاری در صـنایع غـذایی و دارویی دارند قابل جایگزینی می‌باشند. در تحقیق علی و همکاران (۲۰۱۸) تاثیر الیستورها بر روی میـزان فنـل و فلاونوئیـد کـل در بافت کالوس گیـاه *Zingiber officinale* Rosc مـورد بررسـی قرار گرفت و نتایج نشان داد که تیمار کالوس بـا الیسـتور تفـاوت معنی داری را در سطح احتمال ۹۵ درصد بر میزان ترکیبات فنلـی کل نشان داد. در زمینه کاربرد الیستور در افـزایش میـزان فنـل و فلاونوئید کل در گیاه قره‌داغ، پژوهشی توسط رفیعـی و همکـاران (۲۰۲۲) انجـام گرفـت. کـالوس‌هـای بـه دسـت آمـده در کشـت سوسپانسیون سلولی با الیستورهای اسیدسالسیلیک و نمـک طعـام تیمار شدند. نتایج حاکی از سودمند بودن این روش زیسـت‌فناورانه در افزایش تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بوده است.

از آنجایی که تنش‌های محیطی و بویژه تنش شوری یکـی از موانـع اصـلی در کـاهش تولیـد محصـولات گیاهـان دارویـی در بسیاری از نقاط دنیا خصوصا در منـاطق خشـک و نیمـه خشـک مانند ایران محسوب می‌شود، بنابراین بررسی تـاثیر غلظـت‌هـای مختلـف کلریدسـدیم و سولفات‌سـدیم بـر میـزان تولیـد فنـل و فلاونویید کل در کشت درون شیشه‌ای گیاه دارویی قره‌داغ انجـام شد.

مواد و روش‌ها

گنـدزدایی سـطحی و کشـت درون شیشـه‌ای بـذور قره‌داغ

بذرهای گیـاه قـره‌داغ (*Nitraria schoberi*) ابتـدا بـرای مـدت ۵ ساعت زیر آب جاری شست و شـو داده شـدند. سـپس بـه مـدت ۲۴ ساعت درون آب مقطر استریل و در دمای ۴ درجه سـانتی گـراد و در تاریکی (یخچال) نگهداری شدند. سـپس پوسـته کـه در اثـر خـیس خوردن، نرم شده بودند با کمک مالش و حـین شسـت وشـو زیـر آب جاری از بذرها جدا شدند. بذرها برای مدت ۲۴ ساعت دیگـر درون آب مقطر استریل و در یخچال نگهـداری شـدند. سـپس بـا محلـول ۷۰ درصد اتانل برای مدت ۱ دقیقه و متعاقبا با محلول ۰/۱ درصـد هیپـو کلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط استریل (زیر هـود لامینـار) ضدعفونی و در نهایت سه بـار بـا آب مقطـر اسـتریل، شستشـو داده شدند. پس از انجام مراحل گندزدایی سطحی، با کمـک انبـر، شـکاف کوچکی در بذرها ایجاد گردید، بدون آنکه به جنـین بـذر آسـیبی وارد گردد. سپس با استفاده از پنس اتوکلاو شده به صورت افقی در محیط کشـت MS (Murashige and skoog, 1962)کشـت داده شـدند. بـذرها پـس از اسـتقرار در محـیط کشـت درون شیشـه، در شـرایط محیطی شامل شرایط ۱۶ سـاعت روشـنایی و ۸ سـاعت تـاریکی بـا

دمای ۲±۲۵ و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس نگهداری شدند (Rafiee *et al.*, 2022).

اعمال تیمارهای مختلف شوری در کشت درون‌شیشه‌ای قره‌داغ

یک ماه پس از کشت بذرهای قره‌داغ در محیط جوانه زنی ، بذرها جوانه زده و تبدیل به گیاهچه شدند. در مرحله بعدی، برگ‌های کوتیلدونی به همراه هیپوکوتیل (۱ سانتی متر) حاصل از گیاهچه‌های جوانه‌زده بر روی محیط کشت پایه MS به همراه تنظیم کننده‌های رشد گیاهی شامل BAP به میزان ۲ میلی گرم در لیتر و IBA به میزان ۰/۵ میلی گرم در لیتر (Kheirabadi *et al.*, 2020) همراه با نمک‌های کلریدسدیم (در غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) و سولفات‌سدیم (در غلظت‌های ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) کشت داده شدند. در نهایت ریزنمونه‌های کشت شده در تیمارهای مختلف شوری در اتاق رشد درشرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی دمای ۲±۲۵ و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس به مدت ۴ هفته قرار داده شدند.

بررسی شاخص‌های رشدی

شاخص‌های طول ساقه و تعداد برگ گیاهچه‌های باززا شده در شرایط درون شیشه‌ای حدود ۸ هفته پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌های کشت ساقه‌زایی با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شدند.

عصاره گیری از پودر بافت گیاه برای استخراج کامل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی

در این روش ابتدا، برگ‌های گیاه قره‌داغ پس از خارج شدن از محیط درون‌شیشه، در دمای ۳۰ درجه به مدت ۳ روز خشک شدند. برگ‌ها پس از خشک شدن با هاون چینی به صورت پودر درآمدند. مقدار ۱۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد به ۰/۵ گرم از پودر برگ اضافه شد و سپس به مدت نیم ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در دستگاه التراسونیک (مدل الما ۶۰ کیلو هرتز) قرار گرفتند. در نهایت محلول با کاغذ صافی صاف گردید.

سنجش میزان فنل کل

ابتدا جهت رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از محلول استاندارد گالیک اسید در آب تهیه شد. سپس در بالن‌های ۱۰ میلی لیتری، مقدار ۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده سپس از محلول‌های استاندارد و نمونه که قبلا تهیه شده، به مقدار ۱ میلی لیتر به هر بالن اضافه شد. در ادامه مقدار ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین – سیوکالتو هم به نمونه و هم به استاندارد اضافه گردید. محلول‌ها به خوبی هم زده شد و بعد از گذشت ۳ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر از محلول ۲۰ درصد از کربنات سدیم که قبلا تهیه شده بود به بالن‌های ۱۰ میلی‌لیتری واکنش اضافه گردید. بلافاصله بالن‌ها با آب مقطر به حجم رسانده شدند. در انتها بعد از گذشت زمان یک ساعت، جذب تمامی محلول‌های در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه UV خوانده شد. برای هر آزمایش سه تکرار انجام گرفت.

سنجش میزان فلاونوئید کل

ابتدا جهت رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از محلول استاندارد کوئر ستین در آب تهیه شد. در بالن‌های ۱۰ میلی لیتری، مقدار ۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و از محلول‌های استاندارد و نمونه که قبلا تهیه شده، به مقدار ۰/۵ میلی لیتر به هر بالن اضافه شد. سپس۳۰۰ ماکرولیتر از نیتریت سدیم ۵ درصد، ۳۰۰ ماکرولیتر از کلرید آلومنیوم ۱۰درصد و ۲ میلی لیتر از NaOH یک نرمال اضافه شد. پس از آنکه محلول‌ها به خوبی هم زده شدند، بالن‌ها با آب مقطر به حجم رسانده شدند. در انتها جذب تمامی محلول‌های در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه UV خوانده شد. برای هر آزمایش سه تکرار انجام گرفت.

آنالیز داده‌ها

تمامی آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار طراحی و انجام شد. برای محیط‌های کشت جامد برای هر تکرار چهار ریزنمونه در نظر گرفته شد. به منظور آنالیز داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS استفاده شد و تیمارها به کمک روش ANOVA و بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد گروه بندی و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 رسم شدند.

نتایج

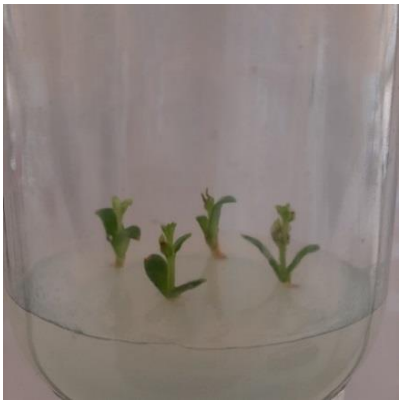
پس از گذشت چهار هفته از انتقال ریزنمونه‌ها که شامل کوتیلدون به همراه هیپوکوتیل حاصل از گیاهچه‌های جوانه زده قره‌داغ در شرایط

درون شیشه‌ای بودند، میزان فنل کل آنها به روشی که در قسمت مواد و روش‌ها توضیح داده شده است، اندازه‌گیری شد. ریزنمونه ها در محیط‌های کشت بدون شوری و شوری ملایم یعنی ۵۰ میلی‌مولارکلریدسدیم و ۱۰ میلی‌مولار سولفات‌سدیم سبز و شاداب بودند (شکل۱). این در حالی است که ریزنمونه‌ها در غلظت‌های شوری زیاد یعنی در محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی مول کلریدسدیم و ۲۰ میلی‌مولار سولفات‌سدیم کاملا زرد شدند (شکل ۲).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به طول نو ساقه (سانتی متر) نشان داد که اثر متقابل اعمال غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفات‌سدیم در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۱).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسات میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلریدسدیم× غلظت‌های مختلف سولفات‌سدیم، بیشترین میانگین طول نوساقه (۴/۳ سانتی متر) گیاه قره‌داغ مربوط به تیمار بدون نمک در محیط کشت درون شیشه‌ای بود. همچنین کمترین میانگین طول نوساقه (۱ سانتی متر) مربوط به تیمارهای کاربرد ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم با و بدون سولفات‌سدیم بود (شکل ۳).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تعداد برگ نشان داد که اثر متقابل اعمال غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفات‌سدیم در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار شده است (جدول۲).



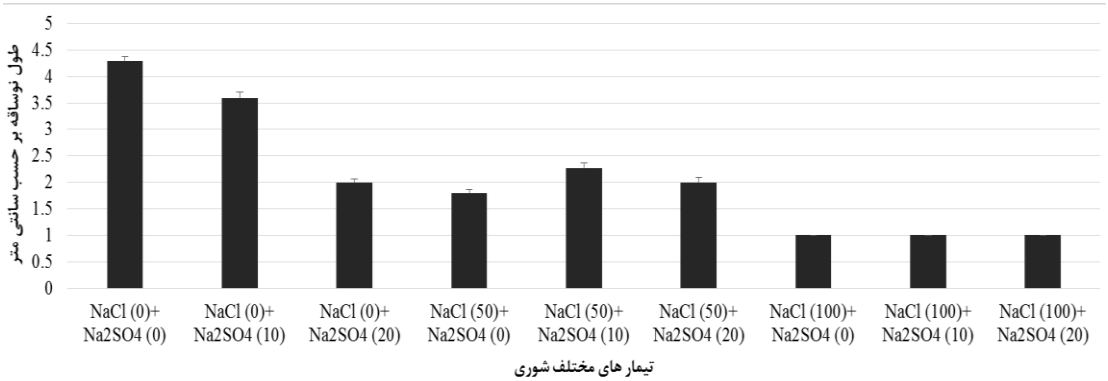
شکل ۱. ریزنمونه‌های قره‌داغ بعد از گذشت چهار هفته قرارگرفتن در غلظت کم شوری ۵۰ میلی‌مولارکلریدسدیم و ۱۰ میلی‌مولار سولفات‌سدیم

شکل ۲. ریزنمونه‌های قره‌داغ بعد از گذشت چهار هفته قرارگرفتن در غلظت زیاد شوری۱۰۰ میلی‌مولارکلریدسدیم و ۲۰ میلی‌مولار سولفات‌سدیم

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفات‌سدیم بر طول نو ساقه (سانتی متر)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
اثر کلریدسدیم	۲	۱۶/۲۷۵	۱۹۵۳/۰۳۳**
اثر سولفات‌سدیم	۲	۱/۷۴۱	۲۰۸/۹۳۳**
اثر متقابل گندزدایی کلریدسدیم× سولفات‌سدیم	۴	۲/۰۷۱	۲۴۸/۵۳۳**
خطای آزمایشی	۲۷	۰/۰۰۸	-

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۳. مقایسات میانگین تیمارهای مختلف شوری بر طول نوساقه (سانتی متر)

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفات‌سدیم بر تعداد برگ

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
اثر کلریدسدیم	۲	۴۲/۷۵۰	۲۵۶/۵۰۰ **
اثر سولفات‌سدیم	۲	۳/۰۸۳	۱۸/۵۰۰**
اثرمتقابل گندزدایی کلریدسدیم× سولفات‌سدیم	۴	۶/۴۵۸	۳۸/۷۵۰**
خطای آزمایشی	۲۷	۰/۱۶۷	-

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

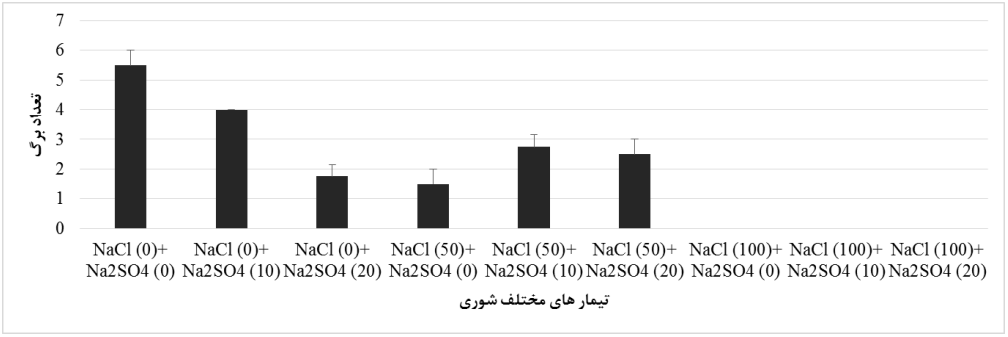
بر اساس نتایج حاصل از مقایسات میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلریدسدیم× غلظت‌های مختلف سولفات‌سدیم، بیشترین میانگین تعداد برگ (۵/۵) گیاه قره‌داغ مربوط به تیمار بدون نمک در محیط کشت درون شیشه‌ای بود. همچنین کمترین میانگین تعداد برگ (۰) مربوط به تیمارهای کاربرد ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم با و بدون سولفات‌سدیم بود (شکل ۴).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان فنل کل ریزنمونه‌های قره‌داغ نشان داد که اثر متقابل اعمال غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفات‌سدیم در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۳).

براساس نتایج حاصل از مقایسات میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلریدسدیم× غلظت‌های مختلف سولفات‌سدیم، بیشترین میانگین فنل کل (۳۵/۳۷ میلی گرم در گرم) موجود در بافت برگ گیاه قره‌داغ مربوط به تیمار کاربرد ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به همراه ۱۰ میلی‌مولار سولفات‌سدیم در محیط کشت درون شیشه‌ای بود. همچنین کمترین میانگین فنل کل (۱۳/۱۵ میلی گرم در گرم) مربوط به تیمار کاربرد ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به همراه ۲۰ میلی‌مولار سولفات‌سدیم بود (شکل ۵).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان فلاونوئید کل ریزنمونه‌های قره‌داغ نشان داد که اثر متقابل اعمال غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفات‌سدیم در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار شده است (جدول۴).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسات میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلریدسدیم× غلظت‌های مختلف سولفات‌سدیم، بیشترین میانگین فلاونوئید کل (۲۴/۶ میلی گرم در گرم) موجود در بافت برگ گیاه قره‌داغ مربوط بوده است به تیمار کاربرد ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به همراه ۱۰ میلی‌مولار سولفات‌سدیم در محیط کشت درون شیشه‌ای. همچنین کمترین میانگین فنل کل (۸/۱۷ میلی گرم در گرم) مربوط بوده است به تیمار کاربرد ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به همراه ۲۰ میلی‌مولار سولفات‌سدیم (شکل ۶).

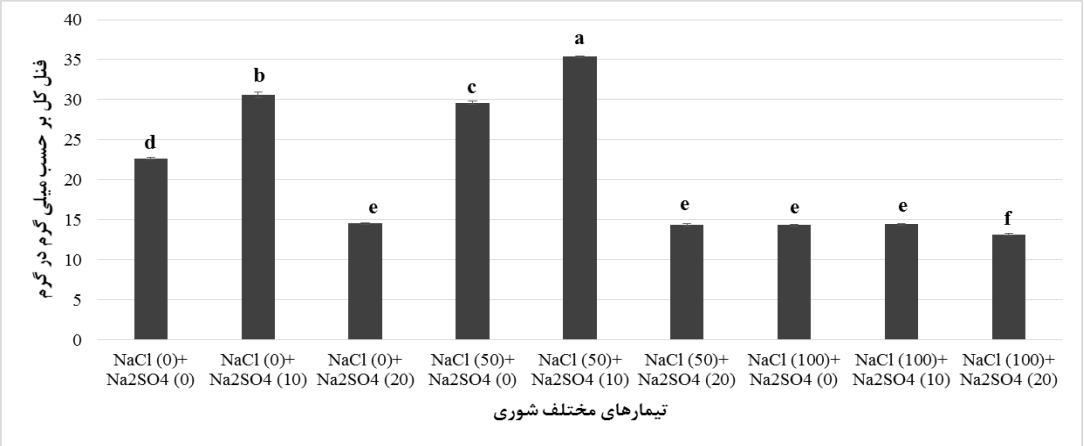


شکل ٤. مقایسات میانگین تیمارهای مختلف شوری بر تعداد برگ

جدول ۳. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفات‌سدیم بر میزان فنل کل

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
اثر کلریدسدیم	۲	۴۸۹/۶۷۷	۱۴۲۳۹۸/۸۹۶ **
اثر سولفات‌سدیم	۲	۵۰۲/۸۴۳	۴۳۸۵/۱۷۲**
اثرمتقابل گندزدایی کلریدسدیم× سولفات‌سدیم	۴	۱۱۳/۹۶۸	۱۰۴۵۰۳/۰۷۵**
خطای آزمایشی	۲۷	۰/۱۱۲	-

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

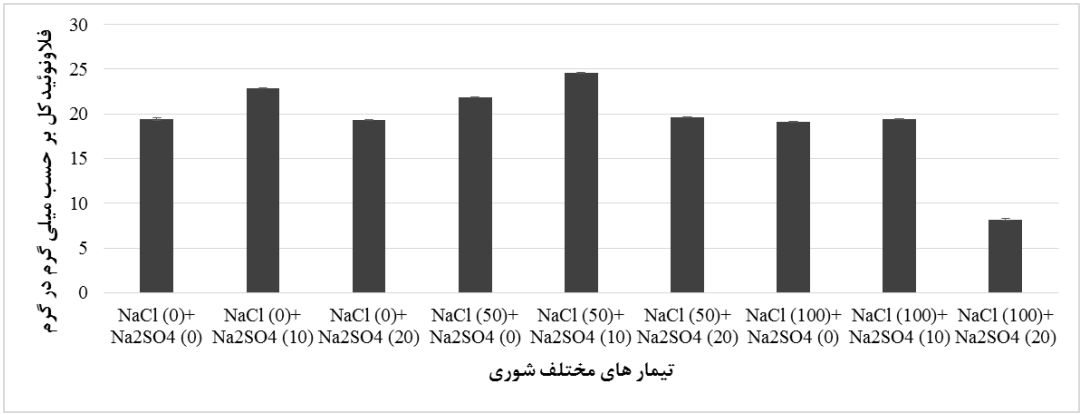


شکل ۵. مقایسات میانگین تیمارهای مختلف شوری بر میزان فنل کل

جدول ٤. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفات‌سدیم بر میزان فلاونوئید کل

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
اثر کلریدسدیم	۲	۱۳۷/۴۷۱	۷۴۰۴۴۷/۶۵۰ **
اثر سولفات‌سدیم	۲	۱۳۵/۳۷۵	۷۵۳۶/۴۸۷**
اثرمتقابل گندزدایی کلریدسدیم× سولفات‌سدیم	۴	۳۴/۸۳۸	۱۹۰۹/۸۸۸**
خطای آزمایشی	۲۷	۰/۰۱۸	-

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ٦. مقایسات میانگین تیمارهای مختلف شوری بر میزان فلاونوئید کل

بحث

کشت بافت گیاهی، شرایط کنترل شده و مستقل از تغییرات محیطی برای رشد سریعتر گیاه و تولید و بازدهی بیشتر در سطح کمتر، در سیستم درون‌شیشه و در تمامی طول سال مهیا می سازد. از سوی دیگر روش کشت بافت تاکنون در بررسی مسیرهای بیوسنتزی، بیوشیمیایی و آنزیمی، متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات دارویی و مهم گیاهان، اثر عوامل مختلف همچون تنش‌های زیستی و غیر زیستی کاربرد زیادی داشته است. کشت‌های درون‌شیشه‌ای برای ارزیابی مقاومت به شوری در بسیاری از گونه‌های گیاهی مفید است که در نهایت به انتخاب صفات مطلوب در سلول و باززایی به گیاهان برتر منجر می‌شود (Rai *et al*., 2011). اگرچه تنش شوری به عنوان یک عامل موثر در کاهش عملکرد محصول در نظر گرفته می‌شود، ولیکن در بهبود کیفیت محصول نقش مثبت دارد (Rouphael, *et al*., 2018). تنش اسمزی ناشی از نمک منجر به اختلالات فیزیولوژیکی متعددی در گیاهان می‌شود، از جمله کمبود آب، عدم تعادل مواد مغذی، آسیب غشا، عدم تعادل هورمونی و آسیب اکسیداتیو(Hasanuzzaman *et al*., 2013) با این وجود، تنش

شوری در سطوح متوسط، می‌تواند یک روش موثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی باشد (Ampofo and Ngadi, 2021). در مطالعات مختلفی مشخص شده است که شوری در بهبود خواص فیزیکی، ترکیبات طعم دهنده، ترکیبات فعال زیستی موثر می‌باشد. اثرات شوری بر گیاهان عبارتند از: (۱) تنش اسمزی ناشی از کمبود آب به علت افزایش غلظت نمک در محیط رشد و (۲) تنش خاص یونی که منجر به کمبود K^+ به دلیل تغییر نسبت K^+/Na^+ می‌شود (Keisham *et al*., 2018). تغییر نسبت K^+/Na^+ به دلیل افزایش هجوم Na^+ تحت تنش شوری می‌باشد. کاهش Na^+ در شاخساره، با حفظ هموستاز K^+، جزء کلیدی تحمل به شوری در بسیاری از گیاهان است (Negrao *et al*., 2017). تنش شوری با افزایش غلظت املاح در محیط رشد، می‌تواند منجر به توقف رشد در گیاهان شود. کلریدسدیم و سولفات‌سدیم قادرند رشد گیاه را به دلیل افزایش شوری در محیط مهار کنند. غلظت بالای نمک پتانسیل اسمزی محیط را کاهش داده و جذب آب را برای گیاهان دشوارتر می‌کند. این موضوع منجر به کاهش انبساط سلولی و در نهایت کندتر شدن رشد می‌گردد. سطوح بالای نمک می‌تواند منجر به کاهش طول ساقه شود که اغلب نتیجه تنش اسمزی است و جذب آب را محدود می‌کند؛ باعث پژمرده شدن و توقف رشد ساقه می‌شود. تنش شوری بیش از حد همچنین می‌تواند تعداد برگ‌های گیاه را کاهش دهد که به دلیل کاهش فعالیت فتوسنتزی می‌باشد، زیرا غلظت بالای نمک عملکرد کلروفیل را مختل کرده و منجر به زرد شدن برگ‌ها می‌گردد (Munns and Tester, 2008; Flowers and Colmer, 2008). هم‌راستا با مطالب ذکر شده، نتایج تحقیق حاضر نشان داد بیشترین میزان شاخص‌های رشدی چون طول ساقه و تعداد برگ در محیط بدون نمک و تنش شوری به دست آمده است. شایان ذکر است، اگر چه کاربرد نمک‌های کلریدسدیم و سولفات‌سدیم در کشت درون‌شیشه‌ای گیاه قره‌داغ منجر به کاهش طول ساقه و تعداد برگ شده است ولیکن به عنوان الیستور در افزایش فنل و فلاونوئید کل تاثیر مثبت داشته است. اثرات خاص تنش شوری بر تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سوسپانسیون سلولی بسته به گونه گیاهی خاص، غلظت نمک‌ها و مدت زمان قرار گرفتن در معرض می‌تواند متفاوت باشد. تنش شوری می‌تواند از طریق ایجاد تنش اسمزی تولید متابولیت‌های ثانویه مانند فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی و ترپنوئیدها را افزایش دهد. این متابولیت‌ها اغلب به عنوان محافظ اسمز عمل می‌کنند و به سلول‌های گیاهی کمک می‌کنند آب و فشار درون سلول را حفظ کنند. از طرف دیگر، افزایش میزان نمک می‌تواند منجر به تنش اکسیداتیو به دلیل تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) شود. برای مقابله با این پدیده، گیاهان ممکن است سنتز متابولیت‌های ثانویه با خواص آنتی‌اکسیدانی مانند پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها و کاروتنوئیدها را افرایش دهند (Jogaiah *et al*., 2013; Gill and Tuteja, 2010). البته توجه به این نکته مهم است که پاسخ به تنش شوری در بین گونه‌های مختلف گیاهی و حتی ارقام مختلف در یک گونه متفاوت است. برخی از گیاهان ممکن است تولید متابولیت‌های ثانویه خاص را در پاسخ به تنش شوری افزایش دهند، در حالی که برخی دیگر ممکن است تغییرات قابل توجهی را نشان ندهند (Kim *et al*., 2012; Khan *et al*., 2015).در تائید اینکه نمک‌ها می‌توانند به عنوان عامل مثبتی در افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان موثر واقع شوند، پژوهشی در رابطه با تاثیر کلریدسدیم از غلظت ۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌مولار بر میزان فنل و فلاونوئید کل در سه گونه از کلم (Brassica) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، تیمار شوری، که یکی از عوامل تنش غیرزیستی است، باعث افزایش ترکیبات فنلی کل در گیاه شده است. بالاترین سطح فنل کل در کلم چینی و کلم سفید در گیاهان تیمار شده با ۱۰۰ میلی‌مولار نمک طعام مشاهده شد. در حالی که در کلم پیچ بیشترین میزان فنل کل با تیمار ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم حاصل شد (Samec *et al*., 2021). شوری متوسط (۲۵–۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم) همچنین در جوانه‌های کلزا نیز بالاترین افزایش نسبی محتوای فنلی را نشان داده است (Falcinelli *et al*., 2017). نتایج حاصل از اعمال تنش شوری از طریق کاربرد غلظت‌های ۲۵ تا ۱۰۰ میلی‌مولارکلریدسدیم در کشت درون‌شیشه و گلدان گیاه *Ballota nigra* هم راستا با تحقیق حاضر بود و نشان داد که کاربرد شوری متوسط (۵۰ میلی‌مولار) می تواند محتوی فنل و فلاونئید کل را افزایش دهد (Younessi-Hamzekhanlu *et al*., 2021). در تحقیق دیگری، پاسخ به تنش شوری در گیاه دارویی *Stevia rebaudiana* طی کشت درون شیشه‌ای گزارش شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، علاوه بر افزایش قابل توجه‌ای در پارامترهای فیزیولوژیکی، فعالیت‌های آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی و فعالیت مهار رادیکال آزادDPPH ، در محتوای فنول و فلاونوئید کل نیز در طول فرآیند تشکیل شاخساره تحت تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده شده (Rathore *et al*., 2014). در مطالعه دیگری، اثر NaCl، برای افزایش بیوسنتز و

تجمع متابولیت‌های ثانویه فنلی در گیاه مریم گلی *Melissa officinalis* L مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی، تیمارهای NaCl گرچه موجب مهار رشد گیاهان گردید ولی به طور همزمان باعث افزایش تجمع ترکیبات فنلی (فنولیک کل، فلاونول‌های محلول، آنتوسیانین، اسیدهای فنولیک)، به ویژه در ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl گشت (Hawrylak-Nowak *et al*., 2021). همچنین سطوح مختلف کلریدسدیم (۲۵ الی ۵۰۰ میلی‌مولار) بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی دو گونه کمیاب هالوفیت *Spergularia marina* (L.). و *Glaux maritima* L در کشت درون‌شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. در مورد گیاه *G. maritima* L ، حداکثر محتوی فنلی و فلاونوئید کل به ترتیب در غلظت ۵۰ – ۱۰۰ میلی‌مولار و ۷۵ – ۴۰۰ میلی‌مولار از کلریدسدیم به دست آمد. مسلما افزایش میزان فنل و فلاونوئید کل در این غلظت‌های بالا از کلریدسدیم در این گیاه می‌تواند ناشی از تفاوت در تحمل به تنش شوری و هالوفیت بودن این گونه گیاهی داشته باشد. در مقابل، میزان فنل و فلاونوئید کل در گونه قره‌داغ در شوری بالا کاهش معنی‌داری نشان داده است. جالب توجه است که گونه *S. marina* نتایج مشابه گونه قره‌داغ در مقاله حاضر را نشان داده است و کاربرد کلریدسدیم در مقادیر بالا باعث کاهش میزان فنل و فلاونوئید کل گشته است (Pungin *et al*., 2023). همانطور که در متن اشاره شده است، در تمام مطالعات نام برده از کلریدسدیم به تنهای برای اعمال تنش شوری و بررسی میران فنل و یا فلاونوئید کل در گیاهان مختلف استفاده شده است و در اکثر آنها کاربرد میزان ۱۰۰ میلی‌مولار از کلریدسدیم منجر به بیشینه افزایش در محتوی فنل و فلاونوئید کل شده است. در حالی در این تحقیق در کنار کلریدسدیم از سولفات‌سدیم نیز برای اعمال تنش شوری استفاده شده است و بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل در کاربرد ۵۰ میلی‌مولار از کلریدسدیم حاصل شده است. چنین می توان نتیجه گرفت که کاربرد ۱۰ میلی‌مولار از سولفات‌سدیم میزان مصرف کلریدسدیم را به نصف کاهش داده است. در زمینه کاربرد توام کلریدسدیم و سولفات‌سدیم جهت اعمال تنش شوری، تحقیقی بر روی جوانه‌زنی گیاه قره‌داغ و بررسی شاخص‌های رشدی گیاهچه‌های حاصل انجام گرفت. جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، ساقه‌چه و تعداد برگچه‌ها در دامنه ای از شوری (۰ تا ۱۲۰ دسی‌زیمنس از هر دو نمک) در شرایط خارج از شیشه مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، جوانه‌زنی، طول ساقه چه و تعداد برگ‌ها به طور معنی‌داری با افزایش شوری در هر دو نمک، کاهش یافت (Naseri *et al*., 2011). این نتایج، دقیقا هم راستا با نتایج تحقیق ما می‌باشد که نشان می دهد شاخص‌های رشدی چه در شرایط درون‌شیشه و چه خارج از شیشه با افزایش غلظت نمک‌ها، به شدت کاهش می‌یابند. در شوری زیاد نیز کل گیاه زرد شده و از بین می‌رود.

نتیجه‌گیری

از تحقیق حاضر چنین می‌توان نتیجه گرفت که اعمال تنش شوری شامل کاربرد ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به همراه ۱۰ میلی‌مولار سولفات‌سدیم در محیط کشت درون‌شیشه‌ای گیاه قره‌داغ می تواند ضمن حفظ خصوصیات بهینه رشدی و سبز و شاداب نگه‌داشتن گیاهان، تاثیر مثبتی بر خصوصیات فیتوشیمیایی (محتوی فنل و فلاونوئید کل) داشته باشد. این نتایج می‌تواند به درک بهتر از پاسخ گیاه به تنش شوری برای کشت این گیاه در شرایط تنش شوری کمک کند.

References

Ahmed Ali, A.M., Mohamed El-Nour, M.E., Mohamed Yagi, S. (2018). Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.*16* (2), 677-682.

Ampofo, JO., & Ngadi, M. (2021). Stimulation of the phenylpropanoid pathway and antioxidant capacities by biotic and abiotic elicitation strategies in common bean (Phaseolus vulgaris) sprouts. *Process Biochem*., *100*, 98-106.

Angelova, Z., Georgiev, S., Roos, W. (2006). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*., *20*, 72-83.

Behdad, A., Mohsenzadeh, S., Azizi, M. and Moshtaghi, N. (2020). Salinity effects on physiological and phytochemical characteristics and gene expression of two Glycyrrhiza glabra L. *populations. phytochemistry*, *171*, 112236

Boyer, J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, *218*, 443-448.

Falcinelli, B., Sileoni, V., Marconi, O., Perretti, G., Quinet, M., Lutts, S., Benincasa, P. (2017). Germination under Moderate Salinity Increases Phenolic Content and Antioxidant Activity in Rapeseed (*Brassica napus* var oleifera Del.) Sprouts. *Molecules*, *22*, 1377.

Flowers, T. J., Colmer, T.D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, *179*(4), 945-963.

Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry, 48*(12), 909-930.

Hasanuzzaman, M., Nahar K, Fujita M. (2012). Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. *In Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*; Springer, New York, NY, USA, pp. 25–87.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M. (2012). Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. *In Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*; Springer, New York, NY, USA, pp. 25–87.

Hawrylak-Nowak, B., Dresler, Stasi., nska-Jakubas, M., Wójciak, M., Sowa, I., Matraszek-Gawron, R. (2012). NaCl-Induced Elicitation Alters Physiology and Increases Accumulation of Phenolic Compounds in Melissa officinalis L. *J. Mol. Sci*., *22*, 6844.

Iraji Mareshk, M. and Moghaddam M. (2021). Physiological and biochemical responses of Mexican marigold (Tagetes minuta L.) to mycorrhizal fungi application under salinity stress condition. *Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research*, *60*, 79-94.

Jogaiah, S., Govind, S.R., Tran, L.S. (2013). Systems biology-based approaches toward understanding drought tolerance in food crops. *Critical Reviews in Biotechnology*, *33*(1), 23-39.

Keisham, M., Mukherjee, S., Bhatla, SC.(2018). Mechanisms of sodium transport in plants-progresses and challenges. Int. *J. Mol. Sci*. *19*, 647.

Khan, M.I., Nazir, F., Asgher, M., Per, T. S., Khan, N.A. (2015). Selenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium-induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat. *Journal of Plant Physiology*, *173*,9-18.

Kheirabadi, S., Zarinpanjeh, N., Ebrahimi, M.A., Bakhshi Khaniki, G.R., Naseri, H. R. (2020). Effective *in vitro* seed germination and direct regeneration from cotyledonary leaf explants of *Nitraria schoberi. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, *9* (1), 10-16.

Kim, J.Y., Lee, S. H., Lee, J. S. (2012). Differential responses of three perennial grasses to salt stress by sodium chloride, Growth, ion accumulation, the role of anti-oxidant enzymes and osmolyte concentration. *African Journal of Biotechnology*, *11*(40), 9719-9729.

Naseri, H.R., Jafari, M., Sadeghi Sangdehi, S.A., Mohammadzadeh Khani, H., Saffariha, M. (2011). The effect of salinity on seed germination and the growth of Qara Dagh species (*Nitraria schoberi*). *Journal of Rangland*, *5*(1), 81-90. (In Persian).

Munns, R., Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 651-681.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, *15*, 473-497.

Negrao, S., Schmockel, SM., Tester, M.(2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Ann. Bot.*, *119*, 1-11.

Pangin, A., Lartseva, L., Loskutnikova, V., Shakhov, V., Popova, E., Skrypnik, L., Krol, O. (2023). Effect of Salinity Stress on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Halophytes *Spergularia marina* (L.) Griseb. and *Glaux maritima* L. Cultured In Vitro. *Plants*, *12*, 1905.

Patel, H., & Krishnamurthy, R. (2013). Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *2*, 60-65.

Rafiee, D., Ebrahimi, MA., Qavami, N., Zarinpanjeh, N. (2022). The Effect of NaCl and Salicylic Acid on Total Phenolic and Flavonoid Contents in Suspension Culture of *Nitraria schoberi. Journal of Medicinal Plants and By-products.* Doi, 10.22092/JMPB.2022.358302.1465

Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P. and Dhawan, A. K. (2011). Developing stress tolerant plants through in vitro selection- an overview of the recent progress. Environmental and Experimental. *Botany*, *71*, 89-98.

Rathore, S., Singh, N., Singh, SK. (2014). Influence of NaCl on biochemical parameters of two cultivars of Stevia rebaudiana regenerated *in vitro*. *J Stress Physiol Biochem., 10*, 287-29.

Rouphael, Y., Petropoulos, SA., Cardarelli, M., Colla, G. (2018). Salinity as eustressor for enhancing quality of vegetables. *Sci. Hortic*., *234*, 361-369.

Samec, D., Lini´c, I., Salopek-Sondi, B. (2021). Salinity Stress as an Elicitor for Phytochemicals and Minerals Accumulation in Selected Leafy Vegetables of Brassicaceae. *Agronomy*, *11*, 361.

Sharifi-Rad, J., Hoseini-Alfatemi, SM., Sharifi-Rad, M., Iriti, M. (2014). Free radical scavenging and antioxidant activities of different parts of *Nitraria schoberi* L. *J Biol Act Prod Nat., 4*(1), 44-51.

Younessi-Hamzekhanlu, M., Dibazarnia, Z., Oustan, S., Vinson, T., Katam, R., Mahna, N. (2021). Mild Salinity Stimulates Biochemical Activities and Metabolites Associated with Anticancer Activities in Black Horehound (*Ballota nigra* L.). *Agronomy*, *11*,2538.

Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, *23*, 283-333.

Zheleznichenko, T., Banaev, E., Asbaganov, S., Voronkova, M., Kukushkina, T., Filippova, E., Mazurkova, N., Shishkina, L., Novikova, T. (2018). *Nitraria schoberi* L. hairy root culture as a source of compounds with antiviral activity against influenza virus subtypes A (H5N1) and A (H3N2). 3 *Biotech*., *8*, 260.