

ارزیابی تحمل به شوری کنگرفرنگی (*Cynara scolymus* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

محمدامین شهرکی^۱، عباسعلی امام‌جمعه^{۲*}، محرم ولی‌زاده^۳ و لیلا فهمیده^۴

- ۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
- ۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران؛ گروه بیوانفورماتیک، دانشگاه زابل، زابل، ایران
پست الکترونیک: aliimamjomeh@uoz.ac.ir
- ۳- استادیار، گروه گیاهان دارویی، دانشکده علوم زیست محیطی و کشاورزی پایدار، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
- ۴- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۸

تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۸

چکیده

کنگرفرنگی (*Cynara scolymus* L.) به‌عنوان یک گیاه دارویی دارای ارزش اقتصادی، با سطح گسترده‌ای از زمین‌های کم آب و شور روبرو می‌باشد. بنابراین شناسایی روش مناسب کشت بافت برای این گیاه، می‌تواند به‌منظور گزینش ارقام متحمل به شوری مفید باشد. این پژوهش با هدف شناسایی ریزنمونه و روش مناسب برای کشت بافت این گیاه به‌عنوان گام اول در پژوهش‌های آینده به‌منظور تولید ارقام مقاوم به شوری کنگرفرنگی انجام شد. در این پژوهش، ابتدا اقدام به تهیه گیاهچه‌های سترون از بذرهای گیاه گردید. سپس مرستم انتهایی به‌عنوان ریزنمونه مناسب طی یک پیش‌آزمایش، انتخاب و ارزیابی درون شیشه‌ای برای تحمل به شوری با پنج غلظت مختلف کلریدسدیم (صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌مولار) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. این آزمایش در مرکز پژوهشی گیاهان دارویی دانشگاه سیستان و بلوچستان در سال ۱۳۹۶ انجام شد. شوری باعث کاهش برخی از خصوصیات مورفولوژیکی (طول ساقه، طول ریشه، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه) گیاهچه‌های رشد کرده از ریزنمونه مرستم انتهایی گردید. با افزایش غلظت کلریدسدیم به ۶۰ و ۸۰ میلی‌مولار، میزان قندهای محلول و پرولین روند افزایشی نشان داد. کمترین میزان قندهای محلول (۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و پرولین (۵۰ میکرومول) مربوط به غلظت‌های صفر و ۲۰ میلی‌مولار کلریدسدیم بود. نتایج حکایت از آن دارد که این گیاه نسبت به سطوح مختلف شوری حساس می‌باشد، هرچند که تا حدودی نسبت به سطوح کم و متوسط شوری مقاومت نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: مرستم انتهایی، تنش محیطی، ریزنمونه، کشت بافت، کلریدسدیم.

مقدمه

گیاه کنگرفرنگی با نام علمی (*Cynara scolymus* L.) از خانواده کاسنی (Asteraceae) می باشد. این گیاه به عنوان یکی از غذاهای محبوب در رژیم های غذایی نواحی مدیترانه است و سرشار از ترکیب های پلی فنلی، اینولین، فیبر و عناصر معدنی می باشد (Alamanni & Cossu, 2003). این گیاه نقش مهمی در کاهش کلسترول و مشکلات کبدی، کاهش ابتلا به سرطان و بیماری های قلبی داشته و بالاترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی را در میان سبزیجات دارد (Li et al., 2004). در واقع، کنگرفرنگی گیاهی است که علاوه بر ارزش تغذیه ای فراوان نقش مهمی در پیشگیری بسیاری از بیماری ها همانند نارسای های کبدی، افزایش ترشحات صفراوی، پایین آورنده کلسترول و چربی خون، کاهش ابتلا به سرطان و بیماری های قلبی رژیم بیماران دیابتی، ضدنفخ، تحلیل هضم غذا و درمان یرقان مزمن دارد (Ceccarelli et al., 2010).

امروزه گیاهان دارویی از گیاهان مهم اقتصادی هستند که به صورت خام یا فرآوری شده در طب سنتی و مدرن صنعتی مورد استفاده و بهره وری قرار می گیرند (Castañeda et al., 2018).

در محیط شور در ابتدا به دلیل عدم تعادل پتانسیل آب بین آپوپلاست و سیمپلاست در گیاه که منجر به کاهش پتانسیل فشاری می شود، ممکن است کاهش رشد مشاهده شود. بنابراین کاهش رشد یک پاسخ اولیه و رایج در گیاهان به تنش شوری در هر دو شرایط درون و برون شیشه ای است (Kumar et al., 2015).

استفاده از تکنیک کشت بافت برای مطالعه و انتخاب گونه های گیاهی مقاوم به شوری و خشکی و سایر تنش ها بسیار متداول است، زیرا امکان کنترل بیشتر شرایط محیطی فراهم می باشد و تعداد زیادی از ژنوتیپ ها می توانند در یک فضای محدود ارزیابی شوند. این تکنیک برای شناسایی واکنش های گیاهان به تنش شوری یا تنش خشکی در بسیاری از گونه های گیاهی مورد استفاده قرار می گیرد. در تحقیقی که روی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژی استویا (*Stevia*

rebaudiana L. تحت تنش شوری در ش درون شیشه ای انجام شد، آشکار گردید که تنش شوری به طور قابل توجهی رشد و اجزای عملکرد استویا را کاهش می دهد. زمانی که گیاهان در محیط کشت حاوی کلرید سدیم قرار گرفتند، کاهش قابل توجهی در طول ساقه، تعداد و طول ریشه مشاهده شد (Pandey & Chikara, 2014). در پژوهشی دیگر گزارش شد که کاهش در میزان کلروفیل طی شرایط تنش شوری، ممکن است به دلیل افزایش تجزیه کلروفیل و یا کاهش بیوسنتز کلروفیل در شرایط درون شیشه ای بوده باشد. همچنین در این تحقیق گزارش شد که تغییر در محتویات کلروفیل به علت شوری بارزترین پاسخ بیوشیمیایی است (Jamil et al., 2012). در گزارشی درباره تحمل به شوری ناشی از کلرید سدیم روی گیاه آغوزه (*Ferula assa-foetida*) بیان شد که با افزایش شوری، تمامی صفات مورد بررسی اختلاف معنی داری را از خود نشان می دهند (Noorbakhsh Samani & Mohamadkhani, 2014). البته نتایج مشابهی روی انگور (*Vitis vinifera* L.) نیز حاصل شده است (Castañeda et al., 2018). امروزه با توجه به شناخت و آگاهی نسبت به اثرهای درمانی گیاه کنگرفرنگی و ارزش اقتصادی آن به عنوان یک گیاه دارویی، تحقیقات گسترده ای در سرتاسر جهان روی این گیاه دارویی انجام شده است (Ceccarelli et al., 2010). با توجه به محدودیت سطح زیر کشت کنگرفرنگی در ایران، به دلیل دارا بودن حجم وسیعی از اراضی شور و کم آب، گزینش و انتخاب واریته، ژنوتیپ و گیاهچه مقاوم و متحمل به شوری برای کشت این گیاه به صورت یک گیاه زراعی و باغی بیش از پیش محسوس است.

از آنجایی که روش های به نژادی گیاهان در راستای تحمل خشکی و شوری معطوف شده است، گزینش درون شیشه ای گیاهی برای تحمل به تنش های غیرزیستی و بعد باززایی گیاهان به طور روزافزونی در حال گسترش است. این پژوهش، با هدف تعیین آستانه تحمل به شوری برای کنگرفرنگی در شرایط درون شیشه ای به منظور رفع مشکلات مربوط به ازدیاد این گیاه انجام شد. از آنجایی که

سیگما) و 2.4-D با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر (ساخت شرکت سیگما) به محیط کشت نیم غلظت موراشیگ و اسکوگ (MS) اضافه شد. پس از آنکه محیط کشت ویژه هر یک از تیمارها تهیه شد، نمونه‌های آماده روی محیط کشت حاوی آگار قرار داده شد و پس از بستن درب ویال‌ها آنها به اتاقک رشد (فیتوترون) منتقل گردید. پس از ۴۰ روز، صفات گیاهچه‌های تولید شده از این نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند که این صفات و ویژگی‌ها شامل طول گیاهچه و طول ریشه، وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه، وزن تر ریشه، وزن تر ساقه، اندازه‌گیری پرولین و کربوهیدرات بودند. برای به حداقل رساندن کاهش وزن تر ریشه و گیاهچه، ابتدا وزن تر با ترازوی دیجیتال (مدل Kern، آلمان) با دقت (۰/۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد و بعد طول ریشه و ساقه به وسیله خط‌کش اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری وزن خشک ریشه و ساقه آنها را به آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت منتقل و پس از گذشت این زمان، با ترازوی دیجیتالی وزن شدند (۰/۰۰۱ گرم). برای سنجش قندهای محلول، الکال ۷۰٪ به نمونه‌های خشک افزوده شد، سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته و یک میلی‌لیتر فنل ۵٪ و پنج میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به نمونه‌ها اضافه شد و جذب نوری آنها در طول موج ۴۸۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (HACH, DR500, USA) قرائت گردید. رسم منحنی استاندارد با استفاده از گلوکز و تعیین میزان قند برحسب میلی‌گرم در گرم وزن خشک انجام شد (Kochert, 1978). محتوای پرولین آزاد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید و بر حسب میکروگرم گزارش شد (Bates et al., 1973). به این منظور، پس از توزین ۰/۱ گرم برگ‌های تر و همگن‌سازی آنها در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفاسالیسیلیک ۳٪، نمونه‌ها ساترپیوژ (مدل ۵۷۰۲ شرکت اپندروف، آلمان) شدند؛ همچنین معرف نین‌هیدرین و اسید استیک خالص به فاز رویی افزوده شد. پس از قرار دادن نمونه‌ها در حمام آب گرم به مدت یک ساعت، چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه و محلول بالایی جدا گردید و در طول موج ۵۲۰ نانومتر

برآورد اثرهای تنش شوری در شرایط مزرعه‌ای با محدودیت زمان و مکان روبرو می‌باشد، بنابراین شرایط کشت درون شیشه‌ای برای این منظور انتخاب گردید.

مواد و روش‌ها

به منظور ارزیابی درون‌شیشه‌ای، ابتدا یک پیش‌آزمایش با فاکتور نوع ریزنمونه (ساقه، برگ و مریستم انتهایی) برای تحمل به شوری گیاه دارویی کنگرفرنگی در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه سیستان و بلوچستان طی سال ۱۳۹۶ انجام شد که طی آن ریزنمونه مریستم انتهایی به عنوان ریزنمونه مناسب انتخاب گردید. سپس پنج غلظت مختلف کلرید سدیم (صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌مولار) با سه تکرار اعمال شد. این سطوح غلظت، بر مبنای دامنه‌بندی حداقل و حداکثر سطوح تحمل گیاهان زراعی به شوری انتخاب شدند (Pandey & Chikara, 2014; Sotiropoulos, 2007). هر یک از طرح‌های یادشده در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. بدین‌منظور، از بذره‌های کنگرفرنگی که از مرکز پژوهشی گیاهان دارویی دانشگاه سیستان و بلوچستان تهیه شده بود، استفاده گردید. بذرها توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و بعد توسط آب مقطر استریل سه بار آبشویی شدند. بذره‌های ضدعفونی شده بلافاصله به شیشه‌های حاوی محیط جوانه‌زنی در اتاقک رشد با دمای 28 ± 2 و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی (حدود ۶۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. جوانه‌زنی بذرها پس از یک هفته آغاز شد. پس از دستیابی به گیاهچه‌هایی به ارتفاع در حدود ۸-۱۰ سانتی‌متر بعد از چهار هفته، ریزنمونه‌های مناسب از ساقه، برگ و مریستم انتهایی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱). ریزنمونه‌های انتخاب شده به شیشه‌های حاوی محیط کشت باززایی همراه با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (ساخت شرکت مرک) منتقل شدند. به‌منظور پاسخ به تیمارهای اعمال شده از نظر القای جوانه و باززایی نمونه‌های مربوطه، ترکیب هورمون بنزیل‌آمینوپورین (BAP) با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (ساخت شرکت

آزمایشگاهی در شکل ۱ مشاهده می‌شود. تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی برای صفات اندازه‌گیری شده (شامل طول گیاهچه و طول ریشه، وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه، وزن تر ریشه، وزن تر ساقه، اندازه‌گیری پرولین و کربوهیدرات) با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد و میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند. همچنین از نرم‌افزار Excel 2013 برای ترسیم نمودارها استفاده شد.

قرائت شد. وزن تر و خشک ریشه و ساقه با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری گردید. برای به حداقل رساندن کاهش وزن تر ریشه و گیاهچه، ابتدا وزن تر با ترازوی دیجیتال با دقت (۰/۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد و بعد طول ریشه و ساقه به وسیله خط‌کش اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری وزن خشک ریشه و ساقه آنها را به آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت منتقل و پس از گذشت این زمان، با ترازوی دیجیتالی وزن شدند (۰/۰۰۱ گرم). مراحل مهم



شکل ۱- مراحل مختلف آزمایش؛ جوانه‌زنی بذرها در محیط کشت (بالا، سمت راست)، نگهداری ظرف‌ها در محیط کنترل شده (بالا، سمت چپ)، ضدعفونی بذرها (پایین، سمت راست)، کشت ریزنمونه در محیط کشت حاوی هورمون (پایین، سمت چپ)

نتایج حاصل از اندازه‌گیری صفات برای گیاهچه‌های حاصل از ریزنمونه مریستم انتهایی، براساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. براساس نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی (طول

نتایج

نتایج ارزیابی صفات مورفولوژیکی

پس از پیش آزمایش، بجز ریزنمونه مریستم انتهایی، ریزنمونه ساقه و برگ هیچ رشدی نشان ندادند، بنابراین

شرایط نرمال (شاهد) بیشترین طول گیاهچه (۳۸/۱۶ میلی‌متر) بدست آمد. همچنین در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌مولار طول گیاهچه اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت. افزایش غلظت کلرید سدیم به ۶۰ و ۸۰ میلی‌مولار باعث کاهش معنی‌داری در طول گیاهچه شد. کمترین طول گیاهچه (۱۴/۳۳ میلی‌متر) متعلق به گیاهچه‌هایی بود که در شرایط تنش شوری با غلظت ۸۰ میلی‌مولار قرار داشتند (شکل ۲).

گیاهچه، وزن تر ساقه، وزن خشک ساقه، طول ریشه، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه) مشخص شد. غلظت‌های مختلف کلرید سدیم تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر صفات مذکور داشتند (جدول ۱).

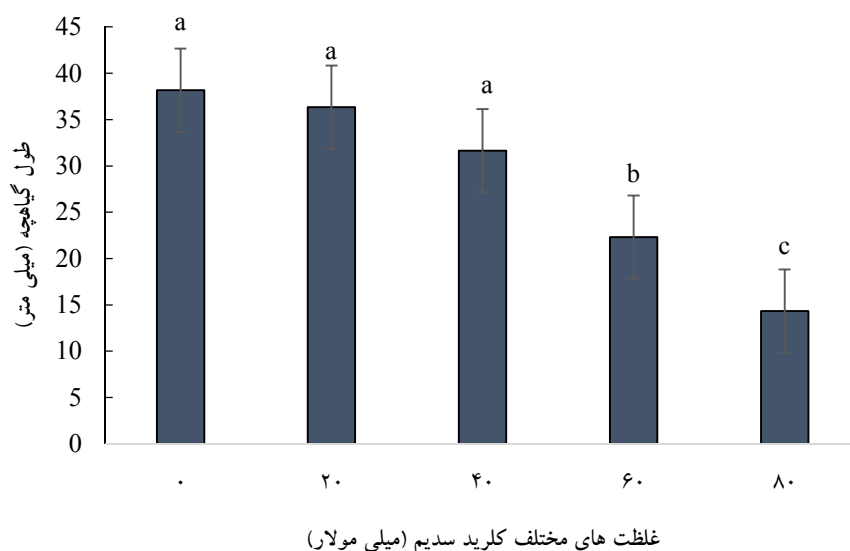
طول گیاهچه

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد، کاربرد غلظت‌های مختلف کلرید سدیم باعث کاهش طول گیاهچه کنگر فرنگی در شرایط درون‌شیشه‌ای شد. در

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی حاصل از کشت بافت کنگر فرنگی در شرایط تنش شوری

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییرات
وزن خشک ریشه	وزن تر ریشه	طول ریشه	وزن خشک ساقه	وزن تر ساقه	طول گیاهچه		
۰/۳۱۴**	۶/۷۷**	۳۰/۸۱**	۵/۸۹**	۲۸۹/۷۱**	۳۰۲/۶۵**	۴	غلظت کلرید سدیم
۰/۰۰۴۰	۰/۰۴۰۶	۲/۲۹	۰/۳۹	۲۵/۱۴	۱۷/۰۷	۱۰	خطای آزمایش
۱۸/۶۰	۱۰/۴۶	۱۱/۰۸	۱۱/۱۰	۱۴/۷۸	۱۴/۴۶	—	ضریب تغییرات (%)

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪



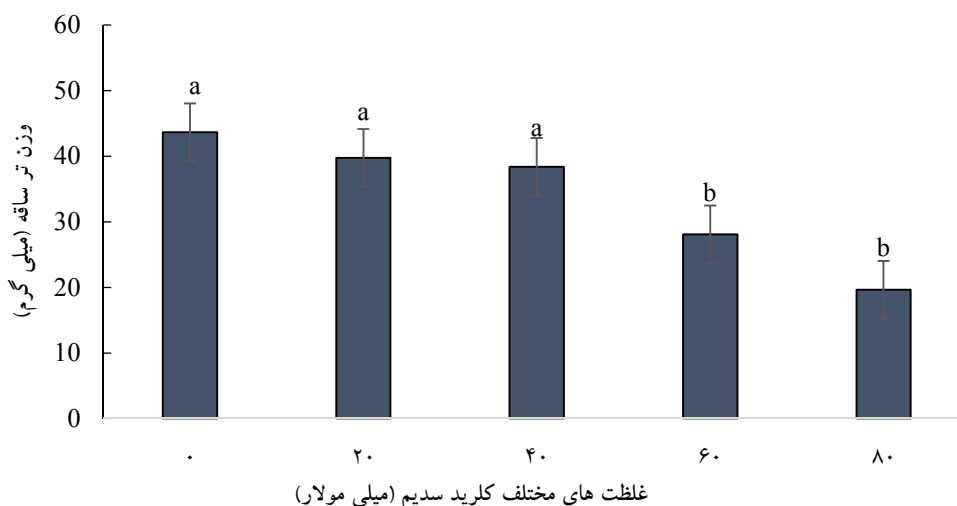
شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم بر طول گیاهچه کنگر فرنگی در شرایط درون‌شیشه‌ای

تشابه و تفاوت حروف روی ستون‌ها به ترتیب به معنای غیر معنی‌داری و معنی‌داری تیمارهای مختلف می‌باشد.

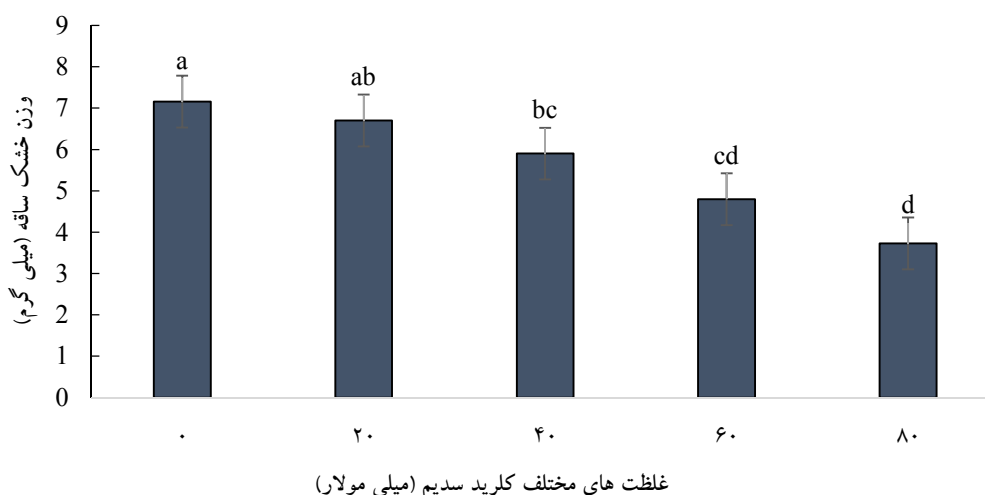
وزن تر ساقه

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد، کاربرد غلظت های مختلف کلرید سدیم باعث کاهش وزن تر ساقه شد. بیشترین وزن تر ساقه در شرایط نرمال ثبت شد. همچنین در غلظت های ۲۰ و ۴۰ میلی مولار وزن تر ساقه

اختلاف معنی داری با شرایط نرمال (۴۳/۶۶ میلی گرم) نداشتند. افزایش غلظت کلرید سدیم به ۶۰ و ۸۰ میلی مولار باعث کاهش قابل توجه وزن تر ساقه (تقریباً ۲۰ میلی گرم) شد و اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند (شکل ۳).



شکل ۳- تأثیر غلظت های مختلف کلرید سدیم بر وزن تر ساقه کنگر فرنگی در شرایط درون شیشه ای
تشابه و تفاوت حروف روی ستون ها به ترتیب به معنای غیر معنی داری و معنی داری تیمارهای مختلف می باشد.



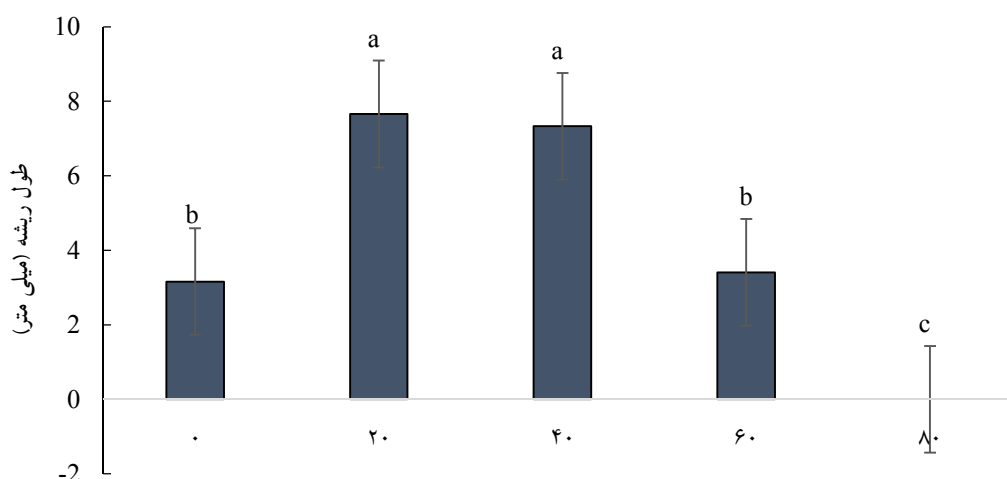
شکل ۴- تأثیر غلظت های مختلف کلرید سدیم بر وزن خشک ساقه کنگر فرنگی در شرایط درون شیشه ای
تشابه و تفاوت حروف روی ستون ها به ترتیب به معنای غیر معنی داری و معنی داری تیمارهای مختلف می باشد.

وزن خشک ساقه

طول ریشه

براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین بیشترین وزن خشک ساقه (۷/۱۶ میلی گرم) متعلق به گیاهچه‌هایی بود که در شرایط نرمال قرار داشتند. همچنین در شرایط تنش شوری با غلظت ۲۰ میلی مولار وزن خشک ساقه اختلاف معنی داری با تیمار یادشده نداشت. افزایش غلظت کلرید سدیم باعث کاهش وزن خشک ساقه شد. به طوری که کمترین وزن خشک ساقه (۳/۷۳ میلی گرم) متعلق به غلظت ۸۰ میلی مولار کلرید سدیم بود (شکل ۴).

نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین‌ها نشان داد، طول ریشه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم قرار گرفت. طول ریشه در غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی مولار کلرید سدیم بیشترین مقدار (۷/۶۶ و ۷/۳۳ میلی متر) را داشت و اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند. طول ریشه در شرایط نرمال و غلظت ۶۰ میلی مولار کلرید سدیم روند کاهشی داشت و کمترین میزان طول ریشه در گیاهانی که در شرایط تنش شوری با غلظت ۸۰ میلی مولار (تقریباً صفر) قرار داشتند مشاهده شد (شکل ۵).



غلظت های مختلف کلرید سدیم (میلی مولار)

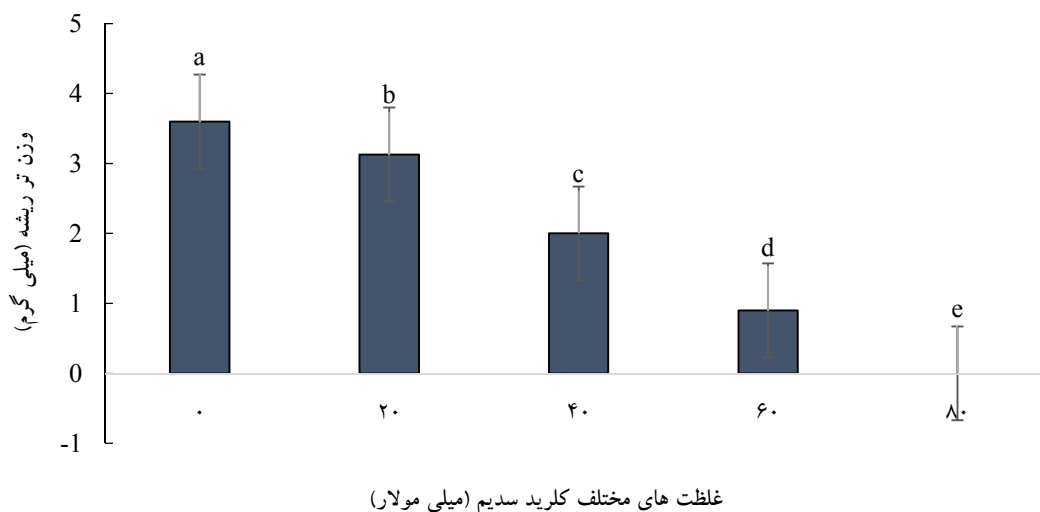
شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم بر طول ریشه کنگرفرنگی در شرایط درون‌شیشه‌ای

تشابه و تفاوت حروف روی ستون‌ها به ترتیب به معنای غیرمعنی داری و معنی داری تیمارهای مختلف می‌باشد.

وزن تر ریشه

نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین‌ها نشان داد، وزن تر ریشه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم قرار گرفت. وزن تر ریشه در شرایط نرمال بیشترین مقدار (۳/۶ میلی گرم) را داشت. روند تغییرات وزن تر ریشه

در کنگرفرنگی در شرایط درون‌شیشه‌ای، به صورت نزولی بود. به طوری که در شرایط تنش شوری با غلظت ۸۰ میلی مولار، ریشه وجود نداشت و کمترین مقدار (تقریباً صفر میلی گرم) را به خود اختصاص داد (شکل ۶).

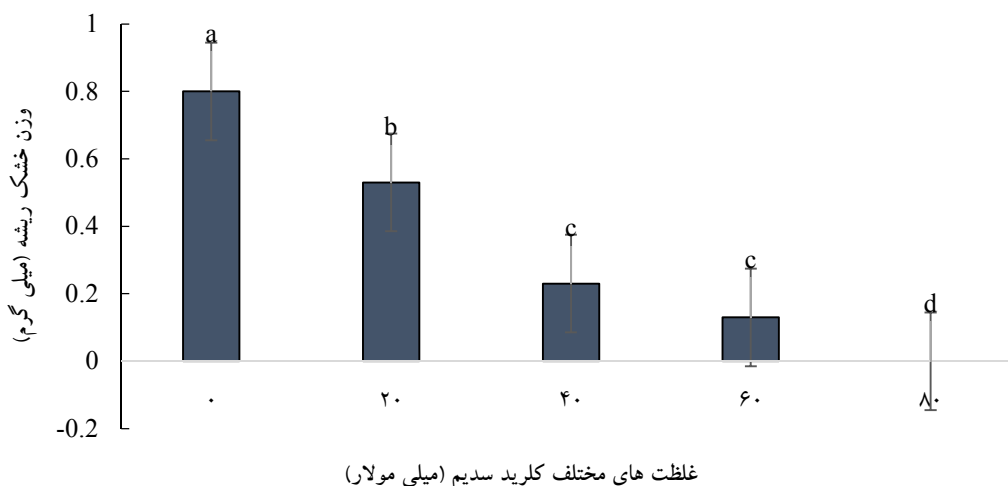


شکل ۶- تأثیر غلظت های مختلف کلرید سدیم بر وزن تر ریشه کنگرفرنگی در شرایط درون شیشه ای
تشابه و تفاوت حروف روی ستون ها به ترتیب به معنای غیرمعنی داری و معنی داری تیمارهای مختلف می باشد.

وزن خشک ریشه در کنگرفرنگی در شرایط درون شیشه ای، مشابه تغییرات وزن تر ریشه به صورت نزولی بود. به طوری که کمترین مقدار در شرایط تنش شوری با غلظت ۸۰ میلی مولار که وزن خشک ریشه برابر با صفر بود، مشاهده شد.

وزن خشک ریشه

نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین ها نشان داد، وزن خشک ریشه تحت تأثیر غلظت های مختلف کلرید سدیم قرار گرفت. وزن خشک ریشه در شرایط نرمال بیشترین مقدار (۰/۸ میلی گرم) را داشت (شکل ۷). روند تغییرات



شکل ۷- تأثیر غلظت های مختلف کلرید سدیم بر وزن خشک ریشه کنگرفرنگی در شرایط درون شیشه ای
تشابه و تفاوت حروف روی ستون ها به ترتیب به معنای غیرمعنی داری و معنی داری تیمارهای مختلف می باشد.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی حاصل از کشت بافت کنگر فرنگی در شرایط تنش شوری

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		میزان پرولین	میزان قندهای محلول
غلظت کلرید سدیم	۴	۱۰۰/۴۲**	۱۴۲/۴۲**
خطای آزمایش	۱۰	۲/۰۴	۵/۸۵
ضرب تغییرات (%)	-	۲/۵۴	۵/۹۲

** معنی دار در سطح احتمال ۱٪

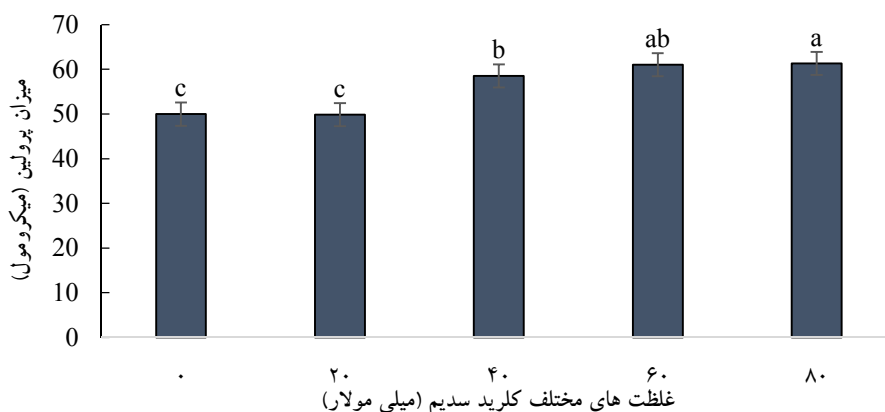
نتایج ارزیابی صفات فیزیولوژیکی

نتایج تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی (محتوای پرولین و محتوای کربوهیدرات های محلول) بیانگر تأثیر معنی دار غلظت های کلرید سدیم بر صفات مذکور بود (جدول ۲).

محتوای پرولین

افزایش غلظت کلرید سدیم باعث افزایش محتوای پرولین

شد. به طوری که در شرایط تنش شوری با غلظت ۸۰ میلی مولار بیشترین مقدار پرولین (۶۱/۳۳ میکروگرم بر وزن تر برگ) وجود داشت. همچنین در شرایط تنش شوری با غلظت ۶۰ میلی مولار محتوای پرولین تفاوت معنی داری با تیمارهای یادشده نداشت. کمترین میزان پرولین متعلق به گیاهچه هایی بود که در شرایط نرمال و غلظت ۲۰ میلی مولار قرار داشتند (۴۹/۹۷ و ۴۹/۸۶ میکروگرم بر وزن تر برگ) (شکل ۸).



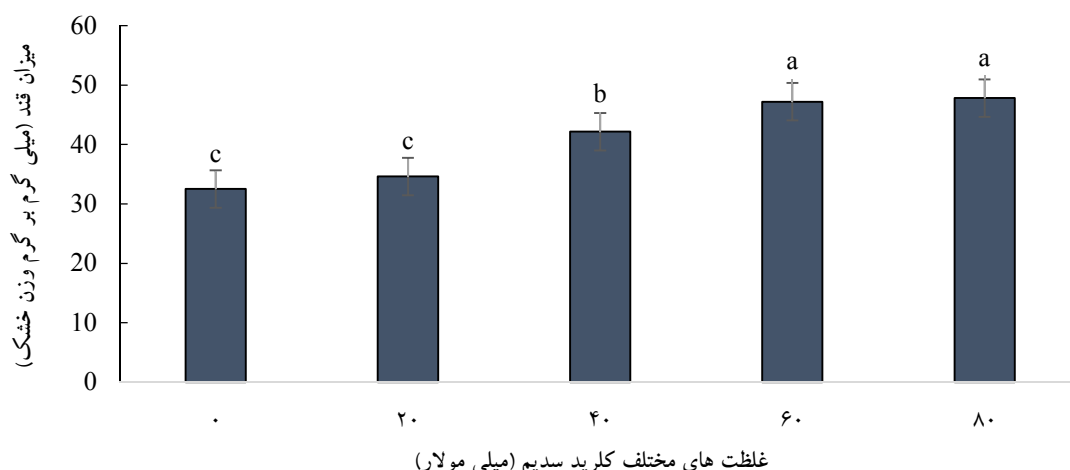
شکل ۸- تأثیر غلظت های مختلف کلرید سدیم بر محتوای پرولین کنگر فرنگی در شرایط درون شیشه ای

تشابه و تفاوت حروف روی ستون ها به ترتیب به معنای غیر معنی داری و معنی داری تیمارهای مختلف می باشد.

میزان قندهای محلول

نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین نشان داد، میزان قندهای محلول در شرایط تنش شوری با غلظت ۸۰ و ۶۰ میلی مولار به طور معنی داری بیشتر از سایر غلظت ها بود (۴۷/۸ و ۴۷/۲ میلی گرم بر گرم وزن خشک). با کاهش

غلظت کلرید سدیم، میزان قندهای محلول نیز کاهش یافت. کمترین میزان قندهای محلول متعلق به گیاهچه هایی بود که در شرایط نرمال و غلظت ۲۰ میلی مولار کلرید سدیم قرار داشتند (۳۴/۶ و ۳۲/۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک) (شکل ۹).



شکل ۹- تأثیر غلظت های مختلف کلرید سدیم بر محتوای قندهای محلول کنگرفرنگی در شرایط درون شیشه ای

تشابه و تفاوت حروف روی ستون ها به ترتیب به معنای غیرمعنی داری و معنی داری تیمارهای مختلف می باشد.

بحث

دارد (Sotiropoulos, 2007). کاهش وزن تر و خشک اندام هوایی احتمالاً ناشی از تأثیر سوء کلریدسدیم بر دو فرایند تقسیم و بزرگ شدن سلولی است. تنش اسمزی ناشی از شوری فرایند ذکرشده را کاهش می دهد. به علاوه سمیت ویژه یون های سدیم و کلر نیز با تأثیر منفی بر مراحل تقسیم سلولی و سیستم فتوسنتزی، رشد را تقلیل می دهد (Kerepesi & Galiba, 2000). از سوی دیگر، کاهش طول ریشه در شرایط شوری به علت کاهش جذب آب در سطوح بالاتر شوری بود که این نکته در تطابق با نتایج سایر پژوهشگران می باشد (Epron *et al.*, 1999). در این آزمایش زمانی که گیاهان در محیط کشت حاوی کلریدسدیم حاوی غلظت های مذکور قرار گرفتند، کاهش قابل توجهی در طول ساقه و ریشه مشاهده شد. این نتایج با گزارش هایی روی گیاه استویا (Pandey & Chikara, 2014؛ Zeng *et al.*, 2013) مطابقت دارد. در اثر تنش شوری تعداد ریشه های مو بین و میزان پیچش آنها کاهش می یابد. البته مشخص شده است که رشد تحت شرایط اسمزی شاید به طور عمده به علت کاهش حجم سیتوپلاسم و کاهش آماس سلول به دلیل خروج اسمزی آب داخل سلولی کاهش یابد (Summart *et al.*, 2010). کاهش رشد نه تنها به گیاه برای حفظ انرژی کمک می کند بلکه همچنین خطر تخریب ژنتیکی

براساس نتایج این آزمایش، طول و وزن تر و خشک اندام هوایی در نتیجه افزایش غلظت کلریدسدیم کاهش یافت. تجمع نمک در برگ ها باعث می شود برگ های قدیمی در ابتدا از بین بروند. زردی برگ در اثر شوری ممکن است به دلیل تخریب کلروفیل در اثر افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز باشد (Munns & Tester, 2008). به طوری که با افزایش سطح شوری تعداد برگ کاهش می یابد، در نتیجه وزن تر و خشک اندام هوایی کاهش یافت که این به دلیل کاهش تقسیم سلولی و تمایز و در نتیجه کاهش تعداد و کاهش وزن می باشد که این نتیجه با تنش شوری روی آناناس در شرایط درون شیشه ای مطابقت دارد (Hasan & Abdullah, 2007). طبق نظر پژوهشگران در اثر افزایش غلظت نمک، تغییراتی که در گیاه اتفاق می افتد موجب عدم قابلیت در افزایش جذب یون های تحت شرایط تنش ناشی از نمک و یا عدم توانایی گیاه در انتقال سریع یون ها به برگ ها و توزیع آنها در سلول های برگ می گردد (Erturk *et al.*, 2007). عدم وجود اختلاف معنی دار بین غلظت صفر، ۲۰ و ۴۰ میلی مولار کلریدسدیم، در طول و وزن تر و خشک اندام هوایی، نشانگر مقاومت کنگرفرنگی به غلظت کم نمک می باشد و با نتایج برخی از پژوهشگران مطابقت

(Tuteja, 2010 &). تجمع پرولین در گیاهانی که تحمل بیشتری به شوری دارند، می‌تواند یک سازوکار دفاعی برای مقابله و تحمل تنش باشد و هم به‌عنوان علامت تنش و هم واکنشی سازگارانه مورد توجه بوده است (Munns & Tester, 2008).

افزایش غلظت محلول سازگار شامل قندهای محلول در سلول‌های گیاهی، به‌عنوان یک سازوکار مؤثر در تحمل تنش شوری معرفی شده است. کربوهیدرات‌ها به دلیل داشتن رابطه مستقیم با فرایندهای فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، انتقال مواد و تنفس، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. استفاده از غلظت ۲۰ میلی‌مولار کلریدسدیم در بستر کشت باعث کاهش میزان قند شد و تفاوت معنی‌داری با غلظت صفر نداشت. افزایش قندهای محلول در تنش شوری طی کشت درون‌شیشه‌ای کنگرفرنگی همسو با گزارش‌های پیشین روی ژنوتیپ‌های مختلف مرکبات (Murkute et al., 2010) و پایه‌های انگور (Alizadeh et al., 2010؛ Das & Majumder, 2019) بوده است که بیشترین تجمع قندهای محلول در سطوح بالای تنش مشاهده شده است. شوری بر متابولیسم قندهای محلول اثر می‌گذارد و مقدار آن را افزایش می‌دهد. در پاسخ اسمزی گیاهان، تجمع کربوهیدرات از عواملی است که می‌تواند از اختلالات در غشای سلولی جلوگیری کند (Molassiotis et al., 2006). مشخص شده است که قند طی تنش شوری علاوه بر نقش کارکردی به‌عنوان محافظت‌کننده اسمزی و سوسترای رشدی، به‌عنوان تنظیم‌کننده بیان ژن نیز نقش مهمی را ایفا می‌کند (Djibril et al., 2005).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که ابتدا در این پژوهش، استفاده از هورمون‌های بنزیل‌آدنین‌پورین (BAP) و توفوردی (2,4-D) در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف کلریدسدیم باعث از بین رفتن کامل ریزنمونه‌های برگ و ساقه شد؛ اما ریزنمونه‌های مرستم انتهایی باقی ماندند. سپس در بین ریزنمونه‌های مرستم انتهایی، برای القای باززایی درون‌شیشه‌ای از ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D توأم با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP استفاده گردید. نتایج این

را نیز محدود می‌نماید. کاهش سطح پتاسیم مشاهده شده در گیاه تحت شرایط تنش شوری شاید فشار اسمزی حاصل از تجمع پتاسیم را در سلول کاهش دهد، بنابراین گسترش سلولی، جایگزین کرین تثبیت شده و فشار تورگور تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Lokhande et al., 2010). این شاید یکی از دلایل کاهش رشد اندام هوایی و ریشه گیاه کنگرفرنگی در شرایط تنش شوری باشد. رشد گیاه در غلظت‌های بالای کلریدسدیم به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. با وجود اینکه با افزایش غلظت کلریدسدیم، توده زیستی و به‌دنبال آن وزن خشک در هر دو بخش هوایی و ریشه کاهش یافته، رشد ریشه حساسیت بیشتری در مقایسه با رشد بخش هوایی داشته است. تنش شوری منجر به تنش اسمزی و به‌دنبال آن کاهش پتانسیل آب می‌شود. در شرایط کنترل، پتانسیل آبی در سلول‌های ریشه نسبت به محیط خارج پایین‌تر است و ورود آب به ریشه از طریق پروتئین‌های کانال آب رخ می‌دهد (Katsuhara et al., 2008). در محیط شور، تفاوت در پتانسیل آب خاک و سلول‌های ریشه کاسته شده و یا حتی معکوس می‌شود که منجر به کاهش جذب آب و یا از دست رفتن آب می‌گردد. وجود پتانسیل آب برای رشد ریشه لازم است، بنابراین ممانعت رشد و آسیب‌های بافتی در این شرایط اتفاق می‌افتد (Hauser & Horie, 2010). افزایش پرولین در بالاترین سطح تیمار شوری در شرایط درون‌شیشه‌ای در ژنوتیپ‌های مرکبات (Murkute et al., 2010) و پایه‌های انگور (Alizadeh et al., 2010) نیز همانند آزمایش ما حاصل شده است. افزایش پرولین در شرایط تنش، می‌تواند ناشی از سنتز پرولین، کاهش اکسیدشدن پرولین به گلوتامات و یا کاهش مصرف آن در سنتز پروتئین و یا افزایش تجزیه پروتئین‌ها باشد (Khan et al., 2007). کاهش پتانسیل اسمزی در گیاه در شرایط تنش با تجمع یون‌های معدنی مثل Na و Cl ایجاد می‌شود که تأثیرات زیان‌باری بر رشد گیاه دارد. زمانی که یون‌هایی مانند سدیم و کلر در واکوئل سلول‌ها جای می‌گیرند، برای تعادل فشار اسمزی در سلول، پرولین در سیتوزل و اندامک‌ها سنتز و تجمع می‌یابد (Gill

- artichoke as a functional food. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(3): 197-201.
- Das, P. and Majumder, A.L., 2019. Transcriptome analysis of grapevine under salinity and identification of key genes responsible for salt tolerance. *Functional and Integrative Genomics*, 19(1): 61-73.
 - Djibril, S., Mohamed, O.K., Diaga, D., Diégane, D., Abaye, B., Maurice, S. and Alain, B., 2005. Growth and development of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedlings under drought and salinity stresses. *African Journal of Biotechnology*, 4(9): 968-972.
 - Epron, D., Toussaint, M.L. and Badot, P.M., 1999. Effects of sodium chloride salinity on root growth and respiration in oak seedlings. *Annals of Forest Science*, 56(1): 41-47.
 - Erturk, U., Sivritepe, N., Yerlikaya, C., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I., 2007. Responses of the cherry rootstock to salinity in vitro. *Biologia Plantarum*, 51(3): 597-600.
 - Gill, S.S. and Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12): 909-930.
 - Hasan, S.M.Z., and Abdullah, N.S. 2007. Effect of salinity on growth, proline accumulation and malate content of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill.) under tissue culture condition. *Malaysian Applied Biology*, 36(2): 57-63.
 - Hauser, F. and Horie, T., 2010. A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell and Environment*, 33(4): 552-565.
 - Jamil, M., Bashir, S., Anwar, S., Bibi, S., Bangash, A., Ullah, F. and Rha, E.S., 2012. Effect of salinity on physiological and biochemical characteristics of different varieties of rice. *Pakistan Journal of Botany*, 44(2): 7-13.
 - Katsuhara, M., Hanba, Y.T., Shiratake, K. and Maeshima, M., 2008. Expanding roles of plant aquaporins in plasma membranes and cell organelles. *Functional Plant Biology*, 35(1): 1-14.
 - Kerepesi, I. and Galiba, G., 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science*, 40(2): 482-487.
 - Khan, M.N., Siddiqui, M.H., Mohammad, F., Khan, M. and Naeem, M., 2007. Salinity induced changes in growth, enzyme activities, photosynthesis, proline accumulation and yield in linseed genotypes. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(5): 685-695.
 - Kochert, G., 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method: 95-97. In: Hellebust, J.A. and Craigie, J.S., (Eds.). *Handbook of*

آزمایش نشان داد که شوری باعث کاهش برخی از خصوصیات مورفولوژیک (طول ساقه، طول ریشه، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه) گیاه کنگرفرنگی در شرایط درون شیشه‌ای می‌گردد. همچنین با افزایش غلظت کلریدسدیم، میزان قندهای محلول و پرولین روند افزایشی را نشان می‌دهد و بعکس. با توجه به نتایج بدست‌آمده از این آزمایش می‌توان استنباط نمود که هر چند غلظت‌های بالای شوری سبب کاهش رشد کنگرفرنگی می‌شود، اما این گیاه نسبت به سطوح کم و متوسط شوری مقاومت نشان می‌دهد. از این رو می‌توان کشت این گیاه دارویی را پس از بررسی بر روی سایر ارقام دیگر این گیاه و انجام آزمایش‌های تکمیلی برای استفاده بهینه از منابع خاک و آب‌های شور، پیشنهاد داد. همچنین بررسی ترکیبات ثانویه نیز تحت این شرایط باید مورد بررسی قرار گیرد.

سیاسگزاری

این پژوهش با استفاده از حمایت مالی (گزارت) معاونت پژوهشی دانشگاه زابل با شماره UOZ-GR-9618-9 انجام شده است، از این رو از دست‌اندرکاران دانشگاه قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاد

- 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., Singh, S., Patel, V., Bhattacharya, R. and Yadav, B., 2010. In vitro responses of grape rootstocks to NaCl. *Biologia Plantarum*, 54(2): 381-385.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1): 205-207.
- 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.
- Ceccarelli, N., Curadi, M., Picciarelli, P., Martelloni, L., Sbrana, C. and Giovannetti, M., 2010. *Globe*

- Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 19(2): 203-208.
- Noorbakhsh samani, M. and Mohamadkhani, A., 2014. Investigation of the effect of NaCl induced salinity stress on germination and seedling growth of *Ferula assa-foetida* L. Second National Conference of Medicinal Plants and Sustainable Agriculture, Hamedan, Iran, 23 August: 1-8.
 - Pandey, M. and Chikara, S.K., 2014. In vitro regeneration and effect of abiotic stress on physiology and biochemical content of *Stevia rebaudiana* 'Bertoni'. Journal of Plant Science and Research, 1(3): 01-09.
 - Sotiropoulos, T., 2007. Effect of NaCl and CaCl₂ on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M 4 cultured in vitro. Biologia Plantarum, 51(1): 177-180.
 - Summart, J., Thanonkeo, P., Panichajakul, S., Prathepha, P. and McManus, M., 2010. Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus culture. African Journal of Biotechnology, 9(2): 145-152.
 - Zeng, J., Chen, A., Li, D., Yi, B. and Wu, W., 2013. Effects of salt stress on the growth, physiological responses, and glycoside contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(24): 5720-5726.
 - Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods. Cambridge University Press, 528p.
 - Kumar, S., Saxena, S., Mistry, J., Fougat, R., Solanki, R. and Sharma, R., 2015. Understanding *Cuminum cyminum*: An important seed spice crop of arid and semi arid regions. International Journal of Seed Spices, 5(2): 1-19.
 - Li, H., Xia, N., Brausch, I., Yao, Y. and Förstermann, U., 2004. Flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) up-regulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 310(3): 926-932.
 - Lokhande, V.H., Nikam, T.D. and Penna, S., 2010. Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 102(1): 17-25.
 - Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Kofidis, G., Diamantidis, G. and Therios, E., 2006. Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. Biologia Plantarum, 50(3): 331-338.
 - Munns, R. and Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology, 59: 651-681.
 - Murkute, A.A., Sharma, S. and Singh, S.K., 2010. Biochemical alterations in foliar tissues of citrus genotypes screened in vitro for salinity tolerance.

In vitro evaluation for salinity tolerance in *Cynara scolymus* L.

M.A. Shahraki¹, A. Emamjomeh^{2*}, M. Valizadeh³ and L. Fahmideh⁴

1-M.Sc. graduated, Department of Green Space Engineering, University of Zabol, Zabol, Iran

2*- Corresponding author, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran; Department of Bioinformatics, University of Zabol, Zabol, Iran, E-mail: aliimamjomeh@uoz.ac.ir

3- Department of Medicinal Plants, Faculty of Life Science and Sustainable Agriculture, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

4- Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: June 2019

Revised: March 2020

Accepted: March 2020

Abstract

Cynara scolymus L. is an economically valuable medicinal plant, but salinity can limit the regions under cultivation of this crop. Therefore, identifying the appropriate tissue culture method for this plant can be useful for selecting salinity tolerant cultivars. This research was carried out with the aim of identifying the appropriate explant and method for tissue culture of this plant as the first step to produce tolerant cultivars in future projects. In this study, firstly, sterile seedlings of plant seeds were prepared. Then, the terminal meristem was selected as a suitable explant during a pre-test and evaluated *in vitro* to study salinity tolerance with five different concentrations of sodium chloride (0, 20, 40, 60, and 80 mM) in a completely randomized design with three replications. This research was performed in the medicinal plants research center of Sistan and Baluchistan University in 2017. Salinity reduced some morphological traits (stem length, root length, shoot and root fresh and dry weight) of seedlings grown from terminal meristem explant. As the concentration of sodium chloride increased to 60 and 80 mM, the amount of soluble sugars and proline increased. The lowest amount of soluble sugars (33 mg g⁻¹ dry weight) and proline (50 μM) was related to zero and 20 mM sodium chloride concentrations, respectively. The results indicate that this plant is sensitive to different levels of salinity, although it is somewhat tolerant to low and moderate levels of salinity.

Keywords: Terminal meristem, environmental stress, explant, tissue culture, NaCl.