



تأثیر تنش شوری درون شیشه‌ای بر شاخص‌های رشدی، محافظت اسمزی و تنش اکسیداتیو در پینه گیاه قرنفل

عابدین مشعشی^۱ - محمدمهدی جوکار^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۱۳

چکیده

قرنفل (*Dianthus barbatus L.*) یکی از مهمترین گیاهان فضای سبز در مناطق معتدل است که به‌عنوان گیاه باغچه‌ای، گل‌دانی و همچنین گل‌بریدنی کشت می‌گردد. شوری خاک و آب در بخش‌های وسیعی از کشور مهمترین مشکل پیش‌رو در گسترش فضای سبز شهری آن می‌باشد. با توجه به اهمیت قرنفل در فضای سبز شهری و درک بهتر مبانی فیزیولوژیکی پاسخ گیاه به تنش در محیط درون شیشه‌ای، در این پژوهش تأثیر تنش شوری بر گیاه قرنفل در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پینه‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ که در محیط کشت MS حاوی ۲ میکرومولار BAP + ۶ میکرومولار NAA پرآوری گردیده بودند، تحت تأثیر سطوح مختلف کلریدسدیم (۰، ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ گرم‌درلیتر) در محیط کشت MS قرار گرفتند. سپس شاخص‌های مختلف فیزیولوژیکی (همچون رشد، نرخ رشد نهایی، وزن‌تر و خشک) و بیوشیمیایی (همچون میزان تغییرات پروتئین کل، اسمولیت گلاسین-بتائین، فعالیت آنزیم بتائین آلدهیددیهیدروژناز و همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسیددسموتاز و میزان بیومارکر تخریبی مالون‌دی‌آلدهید) در پینه‌های تنش‌یافته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد با افزایش سطح تنش، رشد پینه‌ها کاهش و در نتیجه از وزن‌تر و خشک آن‌ها نیز کاسته شد. از سوی دیگر میزان پروتئین کل، فعالیت آنزیم بتائین آلدهیددیهیدروژناز و در نتیجه اسمولیت گلاسین-بتائین با افزایش سطح تنش، افزایش یافت. فعالیت آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد همچون کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددسموتاز نیز با افزایش میزان تنش به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در بین سه آنزیم شکارکننده رادیکال آزاد، پراکسیداز کمترین میزان فعالیت و کاتالاز بیشترین میزان فعالیت را در نتیجه تنش داشتند. پراکسیداز همچنین کمترین میزان افزایش فعالیت در نتیجه تنش را به خود اختصاص داد. این در حالی بود که افزایش میزان فعالیت در دو آنزیم کاتالاز و سوپراکسیددسموتاز تقریباً به یک اندازه مشاهده گردید. بیومارکر تخریبی مالون‌دی‌آلدهید نیز علیرغم افزایش فعالیت آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد با افزایش تنش شوری، افزایش یافت. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که گیاه قرنفل در محیط درون شیشه‌ای به تنش شوری حساس بوده و آستانه تحمل آن به شوری محیط غلظت ۱ گرم در لیتر کلریدسدیم می‌باشد. این در حالی است که، پینه‌های این گیاه تا شوری ۱۲ گرم در لیتر کلریدسدیم مقاوم بوده و ضمن رشد بطئی به حیات خود ادامه دادند.

واژه‌های کلیدی: بتائین آلدهیددیهیدروژناز، سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز، گلاسین-بتائین، مالون‌دی‌آلدهید

مقدمه

مهمترین گیاهان زینتی در مناطق معتدل می‌باشد که هم به جهت زیبایی و تنوع بالا و هم از نظر ارزش اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (۳ و ۲۲). گل‌ها در قرنفل به صورت منفرد یا به تعداد زیاد در یک گل‌آذین چترمانند در اندازه کوچک و به رنگ‌های صورتی، سفید، قرمز، ابلق و خالدار ظاهر می‌گردد. به دلیل تنوع رنگ گل‌ها در این گیاه و به دلیل فراوانی تعداد گل در هر بوته، باغچه‌ها و حاشیه‌های گلکاری شده با قرنفل یک پارچه و بسیار زیبا بوده و این امر موجب استقبال زیاد از این گل در فضاهای سبز گردیده است (۲۱، ۲۲ و ۳۱). علاوه بر کاربردهای مختلف زینتی همچون گل فصلی باغچه‌ای، گل‌دانی و بریدنی (۱۸)، از برگ، ساقه و گل‌های گیاه قرنفل برای استحصال بسیاری از ترکیبات دارای خواص بالای دارویی جهت

گل فصلی قرنفل با نام علمی *Dianthus barbatus L.* به خانواده میخک‌سانان (Caryophyllaceae) و جنس *Dianthus* تعلق دارد. قرنفل، گیاهی دوساله، بومی مناطق مدیترانه‌ای و یکی از

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

(Email: mjowk@iauksh.ac.ir)

DOI: 10.22067/jhorts4.v33i4.80302

*- نویسنده مسئول

درمان بیماری‌هایی همچون دیابت، ضعف اعصاب و سیستم گوارش استفاده می‌شود (۱۴ و ۴۷).

سالانه ۱۰ میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی جهان در اثر شوری حاصل از آبیاری و به دلیل شوری ثانویه ناشی از فعالیت‌های بشر از چرخه تولید خارج و به زمین‌های غیرقابل کاشت تبدیل می‌شوند. در قاره آسیا بعد از روسیه، چین، هندوستان و پاکستان بیشترین سطح زمین‌های کشاورزی متأثر از تنش شوری به ایران تعلق دارد (۳۲). در ایران بخش قابل توجهی از کشور دارای خاک‌های شور و یا آب با EC بالاتر از استاندارد می‌باشد. وسعت اراضی شور ایران براساس آمار منابع مختلف بین ۲۳-۳۴ میلیون هکتار برآورد شده است (۲۰). قرار گرفتن ایران در بخشی از کره زمین که نزولات جوی در بسیاری از مناطق آن، نیاز آبی گیاهان را تأمین نمی‌نماید، مشکل تنش شوری را تشدید نموده است (۳۲). شوری خاک در ایران پس از کم آبی مهمترین عامل محدود کننده رشد و موجب تنش می‌باشد. شوری خاک دامنه گسترده‌ای از اختلالات را در سلول‌های گیاه ایجاد می‌کند که عمدتاً به دلیل تجمع آنیون و کاتیون‌های Cl^- و Na^+ می‌باشد (۱۳). کاهش فعالیت فتوسنتزی گیاه در نتیجه کاهش فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی، کاهش آماس سلولی، کاهش سطح برگ و در نتیجه کاهش رشد و عملکرد اقتصادی از اثرات تنش شوری بر گیاهان است (۴۴). تحقیقات نشان داده است که تنش شوری در سطح مولکولی موجب ایجاد رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو در سلول می‌گردد. تنش‌های اکسیداتیو نیز به نوبه خود موجب آسیب به سلول‌ها و نهایتاً مرگ آن‌ها و در نتیجه مرگ کل گیاه می‌گردد (۲۴).

طبق بررسی‌های صورت گرفته، مطالعات کمی در خصوص تنش‌های غیر زیستی در گیاه قرنفل صورت گرفته و هیچ مطالعه‌ای در خصوص تنش شوری در محیط درون شیشه‌ای بر روی پینه گیاه قرنفل نیز به مشاهده نگردیده است. هاولا و جزیری (۳۶) در پژوهشی بر روی گیاه میخک (*Dianthus caryophyllus*) به بررسی تأثیر سطوح مختلف نمک کلرید سدیم اضافه شده به میخک کشت MS در محیط درون شیشه‌ای پرداختند. آن‌ها دریافتند که اعمال تنش شوری موجب کاهش ریشه‌زایی و طول ریشه‌ها در ارقام کریمسون تمپو (Crimson Tempo) و یلو لیبرتی (Yellow Liberty) و در نتیجه کاهش رشد رویشی شاخساره‌های میخک در محیط درون شیشه‌ای می‌گردد. میزان تحمل ارقام مذکور به کلرید سدیم نیز متفاوت بود، به نحوی که آستانه تحمل کلرید سدیم و عدم کاهش رشد در رقم کریمسون تمپو در غلظت ۱۰۰ میلی مولار و در رقم یلو لیبرتی در غلظت ۵۰ میلی مولار بود. سوندراجان و همکاران (۵۵) در پژوهشی دیگر بر روی گیاه میخک رقم تولا (Tula) به بررسی تأثیر سیلیکون بر تنش شوری ناشی از اضافه نمودن کلرید سدیم به محیط کشت در محیط درون شیشه‌ای پرداختند. آن‌ها مشاهده نمودند که تنش شوری موجب کاهش رشد، افت فتوسنتز و کاهش کلروفیل

(a, b و کل) در میخک استقرار یافته در محیط درون شیشه‌ای می‌گردد. تنش شوری همچنین موجب افزایش تنش اکسیداتیو در میخک گردید که به طور موفقیت آمیزی توسط کاربرد سیلیکون کنترل گردید. به طور کلی فعالیت آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفت. به نحوی که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددسموتاز، پراکسیداز و گوایکول پراکسیداز با افزایش سطح تنش به طور معنی‌داری افزایش یافت، این درحالی بود که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت. ما و همکاران (۳۷) در پژوهشی اقدام به بررسی تأثیر تنش شوری بر گیاه میخک بنفش (*Dianthus superbus* L.) و همچنین مکانیزم کاهش اثرات منفی تنش توسط استفاده از اسید سالیسیلیک پرداختند. آن‌ها دریافتند با افزایش تنش شوری، میزان تخریب لیپیدهای غشاء سلولی افزایش می‌یابد، درحالی که همزمان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همچون سوپراکسیددسموتاز افزایش می‌یابد.

نیسیرین و همکاران (۴۵) در پژوهشی درون شیشه‌ای بر روی گیاه میخک دریافتند که مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم در مقاومت گیاه به تنش شوری باعث افزایش میزان پروتئین گیاه می‌گردد. عزیزی و همکاران (۱۰) در تحقیقی بر روی گیاه قرنفل از نمک‌های $NaCl$ و $CaCl_2$ در سطوح ۰، ۲، ۴ و ۶ دسی‌زیمنس بر متر در جهت اعمال تنش استفاده نمودند. آن‌ها دریافتند که در سطح تنش شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر کلرید سدیم میزان جوانه‌زنی و رشد گیاه کاهش می‌یابد. در پژوهشی رستمی و مظاهری (۵۱) به منظور بررسی میزان مقاومت گیاه قرنفل به تنش شوری کلرید سدیم، گیاهان را در معرض کلرید سدیم با غلظت‌های صفر، ۴، ۸ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر قرار دادند. آن‌ها دریافتند که اعمال تنش شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر باعث کاهش جوانه‌زنی میزان ۴۰ درصد در مقایسه با تیمار شاهد و در تیمار شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر، به میزان ۳۳ درصد گردید.

مطالعات پایه بر روی مقاومت به تنش شوری از جنبه‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اهمیت بسیاری دارد. باتوجه به اینکه کشت بافت و پینه یکی از مهمترین تکنیک‌ها در به‌نژادی مدرن گیاهان می‌باشد، تحقیق بر روی مکانیزم‌های تنش شوری در محیط درون شیشه‌ای اهمیت ویژه‌ای در مطالعات مرتبط با تنش دارد. در تحقیق حاضر باتوجه به اهمیت گیاه قرنفل در فضای سبز مناطق کم‌آب، تأثیر سطوح مختلف تنش شوری توسط کلرید سدیم بر برخی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پینه‌های استقرار یافته گیاه قرنفل در محیط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در پژوهش پیش رو تأثیر تنش شوری بر پینه‌های گیاه قرنفل از

دو جنبه فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد گیاهی

بذر گیاه قرنفل (*Dianthus barbatus* L.) جهت دستیابی به پینه گیاه قرنفل به منظور اعمال تنش شوری، از شرکت پارمیس بذر (اصفهان، ایران) تهیه گردید. در ابتدا اقدام به استقرار گیاهان استریل به صورت دانهال در محیط درون شیشه‌ای جهت دستیابی به ریزنمونه‌های مختلف استریل گردید. بدین منظور، در مرحله اول بذرها با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در زیر هود لامینار ضد عفونی سطحی و سپس به مدت ۶۰ ثانیه در الکل اتانول ۷۰ درصد قرار داده شده و نهایتاً دوبار با آب مقطر دو بار تقطیر استریل شستشو داده شدند. بذرهای استریل شده در درون ظروف کشت شیشه‌ای با قطر ۱۰ سانتی متر و ارتفاع ۲۰ سانتی متر که حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت MS پایه (بدون هورمون) با غلظت ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز که pH آن بین ۵/۶ تا ۵/۸ تنظیم گردیده بودند، کشت گردیدند. بذرهای کشت شده فوق‌الذکر جهت رسیدن به اندازه مناسب برای استحصال ریزنمونه استریل، به مدت ۴ هفته درون دستگاه ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی (و ۸ ساعت تاریکی) نگهداری شدند.

استقرار پینه

استقرار پینه گیاه قرنفل در محیط درون شیشه‌ای از گیاهان استریل مطابق روش پیشنهادی توسط مشعشی و همکاران (۴۲) و با کشت ریزنمونه‌های مختلف برگ، ساقه و ریشه بر روی محیط کشت MS غنی شده با سطوح مختلف هورمون‌های بنزیل آمینوپورین (BAP) (۲ و ۴ میکرومولار)، نفتالین استیک اسید (NAA) (۴ و ۶ میکرومولار) و یا 2,4-D (۴ و ۶ میکرومولار) صورت گرفت. پینه‌های حاصل از روش مذکور جهت پرآوری بر روی محیط کشت MS غنی شده با ۲ میکرومولار بنزیل آمینوپورین و ۶ میکرومولار نفتالین استیک اسید که مناسبترین ترکیب هورمونی جهت پینه‌زایی معرفی شده بود، کشت و چندین مرتبه تا حصول حجم مناسبی از پینه جهت اعمال تنش، واکشت گردیدند.

تأثیر تنش بر پینه‌های گیاه قرنفل

به منظور بررسی تأثیر تنش شوری بر پینه‌های گیاه قرنفل، پینه‌های پرآوری شده در مرحله قبل، بر روی محیط کشت بهینه پینه زایی فوق‌الذکر حاوی مقادیر مختلف کلرید سدیم (ساخت شرکت مرک، آلمان) به منظور اعمال تنش شوری کشت گردیدند. سطوح مختلف تنش شوری شامل شش تیمار با مقادیر ۰، ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ گرم‌درلیتر کلرید سدیم بود. شاخص‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی

پینه‌های تنش یافته در فواصل زمانی شش روزه و شاخص‌های بیوشیمیایی آن‌ها پس از گذشت ۳۰ روز از اعمال تنش مورد مطالعه قرار گرفت. شاخص‌های مورد مطالعه در پینه‌های تنش یافته از سه جنبه رشدی، مکانیزم محافظت اسمزی (Osmoprotection) و تنش اکسیداتیو (Oxidative Stress) مورد بررسی قرار گرفتند. شاخص‌های رشدی مورد مطالعه عبارت بودند از: درصد پینه‌های کلروزه و نکروزه شده، رنگ و نوع بافت پینه‌های تنش یافته، وزن تر و خشک پینه‌های تنش یافته و رشد پینه‌های تحت تنش.

میزان محتوی پروتئین کل، میزان آنزیم بتائین آلدهیدددهیدروژناز و محتوی اسملیت گلیسین-بتائین به عنوان شاخص‌های دخیل در محافظت اسمزی و همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز و میزان بیومارکر تخریبی مالون‌دی‌آلدئید به عنوان شاخص‌های دخیل در تنش اکسیداتیو در پینه‌های تنش یافته از دیگر شاخص‌های مورد مطالعه بودند.

شرایط آزمایش

جهت اعمال و بررسی آثار تنش، پینه‌های تحت تنش شوری در دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۲۵ درصد، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی درون دستگاه ژرمیناتور نگهداری شدند.

شاخص‌های رشدی مورد مطالعه

رشد قطری پینه

رشد قطری پینه‌های تنش یافته توسط اندازه‌گیری طول و عرض آن‌ها توسط کاغذ شطرنجی و محاسبه قطر پینه بوسیله فرمول پیشنهادی توسط کامپتون (۱۵) (فرمول ۱) در بازه‌های زمانی ۶ روزه محاسبه گردید.

$$\text{عرض} \times \text{طول} = \text{قطر پینه} \quad (\text{فرمول ۱})$$

نرخ رشد نهایی پینه

در انتهای دوره تنش، قطر پینه‌ها اندازه‌گیری و با استفاده از فرمول زیر نرخ رشد نهایی پینه‌ها در سطوح مختلف تنش محاسبه شد.

$$\text{نرخ رشد نهایی پینه} = \frac{D_2 - D_1}{D_1} \quad (\text{فرمول ۲})$$

D_1 : قطر پینه در ابتدای آزمایش و D_2 : قطر پینه در پایان دوره تنش

درصد پینه‌های کلروزه و نکروزه

درصد پینه‌های کلروزه و نکروزه، ۲۱ روز بعد از کشت پینه‌های تنش یافته در محیط کشت حاوی کلرید سدیم با مشاهده و اختصاص عدد ۰ تا ۱۰ (عدد صفر نمایانگر پینه سالم و عدد ۱۰ نمایانگر پینه کاملاً کلروزه و یا نکروزه) ثبت گردید.

وزن تر و خشک پینه

در انتهای آزمایش وزن تر پینه‌ها توسط ترازو دیجیتالی با دقت یک ده هزارم گرم سنجیده و سپس همان پینه‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و وزن خشک آنها توسط ترازو دیجیتالی اندازه‌گیری گردید.

میزان پروتئین کل

میزان پروتئین کل پینه‌های تنش یافته به روش بردفورد (۱۲) اندازه‌گیری گردید. در این روش ۰/۲ گرم از بافت تازه پینه تنش یافته در هاون چینی سرد توسط قرار دادن در ظرف یخ و اضافه نمودن ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH=۶/۸) هموزن گردید. سپس محلول هموزن شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی عصاره (محلول فوقانی) به دست آمده جهت اندازه‌گیری مقدار پروتئین محلول به میکروتیوپ جدید منتقل و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جهت اندازه‌گیری، ۵۰ میکرولیتر از فاز بالایی عصاره برداشته و ۲/۵ میلی لیتر محلول کوماسی آبی جی-۲۵۰ به آن اضافه کرده و پس از مخلوط نمودن توسط ورتکس، جذب نور توسط نمونه در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه طیف سنج یو-مرئی قرائت گردید.

میزان گلاسین-بتائین

میزان گلاسین-بتائین (Glycine-Betaine) توسط روش گریو و گراتن (۲۶) با کمی تغییرات اندازه‌گیری گردید. بدین منظور پینه‌های تنش یافته را ابتدا خشک نموده، کاملاً پودر کرده و میزان ۰/۵ گرم از آن را درون ۲۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و برای ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده تا به هم زده شوند. سپس عصاره به دست آمده در محلول ۲ نرمال اسید سولفوریک با نسبت مساوی ۱:۱ حل گردید. مقادیر ۰/۵ میلی لیتر از محلول ذکر شده درون لوله آزمایش ریخته و برای یک ساعت بر روی یخ قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر عامل واکنش KI-I₂ به آن اضافه نموده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت نگهداری گردید. بعد از سپری شدن مدت مذکور، محلول واکنش را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده

و محلول فوقانی دور ریخته شد. کریستال های ته‌نشین شده در ۵ میلی لیتر 1,2-dichloroethane حل و پس از گذشت ۲ ساعت میزان جذب در طول موج ۳۶۵ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج یو-مرئی اندازه‌گیری گردید.

میزان فعالیت بتائین آلدئید دهیدروژناز**استخراج آنزیم**

استخراج آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژناز توسط روش آرکاوا و همکاران (۵) انجام پذیرفت. مطابق روش مذکور ۱۰ گرم از بافت پینه تنش یافته گیاه قرنفل در ۲۰ میلی لیتر بافر استخراج هموزنیزه گردید. بافر استخراج شامل ۵۰ میلی مولار MOPS-NaOH (با پی‌اچ ۷/۵)، ده درصد حجمی گلیسرول، یک میلی مولار EDTA، دو میلی مولار DTT و ۱۰ درصد جرم‌به‌حجم پلی‌ونیل-پلی‌پیرولیدون (Polyvinyl-Polypyrrolidone) بود. محلول استخراج هموزنیزه، ابتدا فیلتر و با دور ۴۰۰۰g برای ده دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس محلول فوقانی به دست آمده با (NH₄)₂SO₄ به ۵۵ درصد اشباع رسانده و برای ۲۰ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. محلول فوقانی حاصل مجدداً توسط (NH₄)₂SO₄ به ۷۰ درصد اشباع رسانده و مجدداً برای ۲۰ دقیقه دیگر با دور ۱۶۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. ته‌نشین حاصل، درون بافر حاوی ۱۰ میلی مولار MOPS-NaOH (با پی‌اچ ۷/۵)، ده درصد وزن‌به‌حجم گلیسرول، یک میلی مولار EDTA، دو میلی مولار DTT تعلیق گردید و محلول حاصل به عنوان بتائین آلدئید دهیدروژناز خام در مرحله بعد جهت اندازه‌گیری فعالیت مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت

آزمون سنجش فعالیت آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژناز توسط روش فلئومتریکی توصیف شده توسط آرکاوا و همکاران (۶) انجام پذیرفت. در روش مذکور مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میلی مولار بافر پتاسیم-فسفات (با پی‌اچ ۸/۰)، ۰/۵ میلی مولار NAD⁺، پنج میلی مولار DTT و ۰/۵ میلی مولار بتائین آلدئید بود. اندازه‌گیری فلورسانس محلول واکنش توسط اسپکتروفتومتر فلورسانس مدل هیتاچی در طول موج تهییج ۳۴۰ و نشر ۴۶۰ نانومتر انجام پذیرفت. میزان فعالیت توسط نرخ ابتدایی جهت احیاء NAD⁺ در میلی گرم پروتئین کل بیان گردید.

آماده سازی عصاره آنزیمی از پینه‌های تنش یافته

بافت گیاهی پینه‌های تنش یافته توسط ۵۰ میلی مولار بافر فسفات سدیم (با pH=۷/۰) حاوی ۱ مولار کلرید سدیم، ۱ درصد پلی ونیل پیرولیدین و ۱ میلی مولار EDTA بر روی یخ هموزنیزه و خرد گردیدند. سپس با دور ۲۰۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و محلول فوقانی که عصاره آنزیمی پینه‌های تنش یافته بود، جهت

به میزان آنزیم مورد نیاز برای بازدارندگی ۵۰ درصد فعالیت کاهنده نیتروبولوتترازولیوم در دقیقه تعریف گردید.

میزان بیومارکر تخریبی مالون‌دی‌آلدئید

برای سنجش مالون دی آلدئید طبق روش بومیناتان و دوران (۱۱) با استفاده از عصاره پینه‌های برگ در محلول ۰/۱ درصد (W/V) تری کلرواستیک اسید استخراج شده و به مدت ۵ دقیقه در ۲۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. به نسبت ۱ به ۴ از محلول فاز بالایی با ۲۰ درصد تری کلرواستیک اسید حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید در لوله آزمایش با هم مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس لوله‌های آزمایش بلافاصله در یخ سرد شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. همزمان با عصاره‌های پینه، محلول استاندارد در محدوده صفر تا ۱۰۰ میکرومول از ۳، ۱، و -۱- تترا اتوکسی پروپان تهیه شده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانو متر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شدند.

طرح آزمایش و واکاوی آماری

در این پژوهش از طرح آزمایشی کاملاً تصادفی (شامل ۶ سطح تنش در ۵ تکرار) استفاده گردید. داده‌ها به کمک نرم‌افزار SAS 16.0 مورد واکاوی آماری (تجزیه واریانس) قرار گرفت. میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

رشد پینه‌های تنش یافته

تنش شوری توسط کلرید سدیم، رشد پینه‌های گیاه قرنفل را تحت تأثیر قرار داد و موجب کاهش رشد پینه‌های گیاه قرنفل گردید. میزان رشد پینه‌ها با سطح تنش (افزایش میزان غلظت کلرید سدیم)، همبستگی منفی داشت به نحوی که کمترین رشد در پینه‌های تنش یافته توسط ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم مشاهده گردید. این کاهش رشد در بازه زمانی بعد از گذشت ۳۰ روز از اعمال تنش شوری حتی در کمترین سطح تنش (یک گرم در لیتر) نیز، رشد پینه‌ها را به میزان قابل توجهی کاهش داد. کاهش رشد به نحوی بود که رشد پینه‌ها در غلظت ۳ گرم در لیتر به نصف میزان شاهد رسید و اندازه آن‌ها در تیمار ۱۲ گرم در لیتر به نصف اندازه پینه‌ها در تیمار شاهد نیز نرسید.

سنجش میزان فعالیت آنزیم‌ها در دمای ۲۰- نکه‌داری گردیدند و سپس در مرحله‌اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

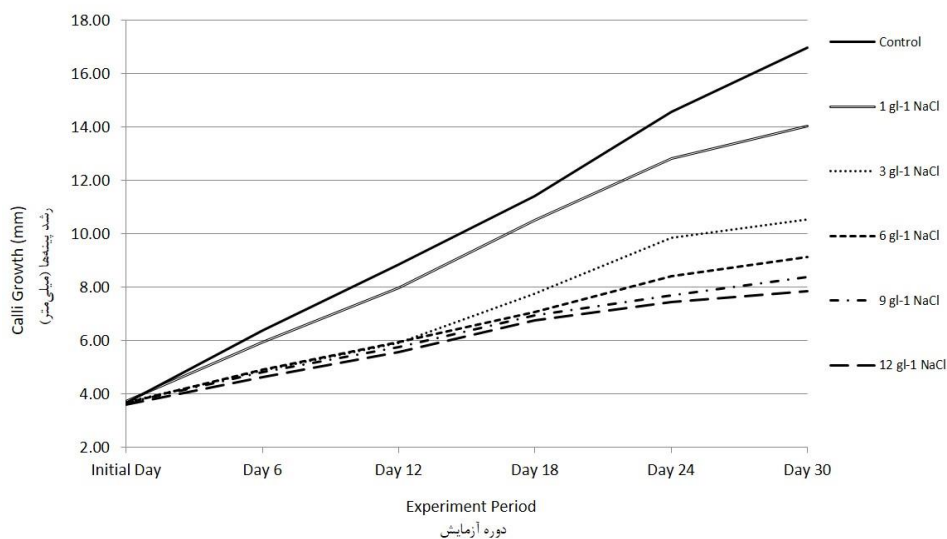
میزان فعالیت آنزیم کاتالاز توسط مصرف پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه توسط روش آبی (۱) با کمی تغییرات به کمک دستگاه طیف سنج یو-وی-مرئی اندازه‌گیری گردید. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (با pH=۷/۰)، ۱۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۵۰ میلی‌لیتر عصاره گیاهی (تهیه شده در مرحله فوق‌الذکر) و رساندن به حجم ۳ میلی‌لیتر بود. میزان فعالیت برحسب مقدار پراکسید هیدروژن تجزیه شده برحسب نانو مول در دقیقه محاسبه گردید.

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز توسط روش کارا و میسرا (۳۴) صورت گرفت. در این روش ابتدا مخلوط آزمایش تهیه گردید. مخلوط آزمایش که شامل ۱۲۵ میکرومولار بافر فسفات (با pH=۶/۸)، ۵۰ میکرومولار پیروگالول (Pyrogallol) و ۵۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن بود را ابتدا تهیه و سپس یک میلی‌لیتر عصاره آنزیمی پینه‌های تنش یافته به آن اضافه گردید. سپس مخلوط آزمایش تهیه شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت واکنش نکه‌داری شد. بعد از گذشت مدت مذکور، ۰/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک با نسبت حجمی ۵ درصد جهت متوقف شدن آزمایش به آن اضافه گردید. میزان پورپورگالین (Purpurogallin) تشکیل شده توسط قرائت میزان جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه طیف سنج یو-وی-مرئی مشخص گردید.

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز بر اساس روش مینامی و یوشیکاوا (۴۰) توسط بافر نمک تریس کلسیم کدلیک (Tris-Ca-) (Codylic) (با pH=۸/۲) حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA توسط دستگاه طیف‌سنج یو-وی-مرئی در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. مخلوط واکنش حاوی ۱/۴۲ درصد تریتون x-۱۰۰ (Triton 100-x)، ۰/۰۵۵ میلی‌مولار نیتروبولوتترازولیوم (nitroblue tetrazolium) (NBT)، ۱۶ میلی‌مولار پیروگالول و عصاره آنزیمی حاوی ۵۰ میلی‌گرم پروتئین بود. واحد فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز (SOD) طبق تعریف مک‌کورد و فریدوویچ (۳۹)



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر رشد پینه‌های گیاه قرنفل در محیط درون شیشه‌ای
Figure 1- Effect of different levels of salinity stress on calli growth in *Dianthus barbatus*

وزن تر و خشک پینه‌های تنش یافته

همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، وزن تر پینه‌های قرنفل مانند رشد آن‌ها تحت تأثیر تنش شوری توسط کلرید سدیم قرار گرفت و با اعمال تنش شوری، مقدار آن به طور معنی‌داری کاهش یافت. این کاهش برای وزن خشک به نحوی بود که در تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم به حداقل خود و کمتر از نصف در تیمار شاهد به میزان ۰/۲۸ گرم رسید. وزن خشک پینه‌ها نیز همانند وزن تر با افزایش سطح تنش شوری، کاهش یافت (جدول ۱). میزان کاهش وزن خشک نیز همانند رشد و وزن تر در تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم به کمتر از نصف مقدار آن در تیمار شاهد به میزان مقدار ۰/۰۸ گرم رسید.

نرخ رشد نهایی پینه‌های تنش یافته

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، نرخ رشد نهایی پینه‌های گیاه قرنفل با افزایش میزان کلرید سدیم در محیط کشت (تنش شوری)، کاهش یافت. تنش شوری موجب کاهش معنی‌دار نرخ رشد نهایی پینه‌ها گردید. این درحالی است که اختلاف معنی‌داری بین نرخ رشد نهایی پینه‌ها در سطوح مختلف کلرید سدیم مشاهده نگردید.

کلروزه و نکروزه شدن پینه‌های تنش یافته

در این آزمایش علی‌رغم اعمال تنش شوری، پینه‌ها در هیچ کدام از سطوح مختلف تنش کلروزه و یا نکروزه نگردیدند.

جدول ۱- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری درون شیشه‌ای بر نرخ رشد نهایی، وزن تر و خشک پینه‌های قرنفل

Table 1- Effect of different levels of salinity stress on final growth rate, fresh weight and dry weight of *Dianthus barbatus* calli

تنش شوری Salt stress treatment (g l ⁻¹ NaCl)	وزن تر Fresh weight (g)	وزن خشک Dry weight (g)	نرخ رشد نهایی Final growth rate (mm)
0 (control)	0.77 a	0.018 a	0.61 a [†]
1	0.66 b	0.017 a	0.31 b
3	0.45 b	0.011 b	0.10 bc
6	0.37 bc	0.011 b	0.09 bc
9	0.36 bc	0.010 b	0.08 bc
12	0.28 c	0.008 b	0.05 c

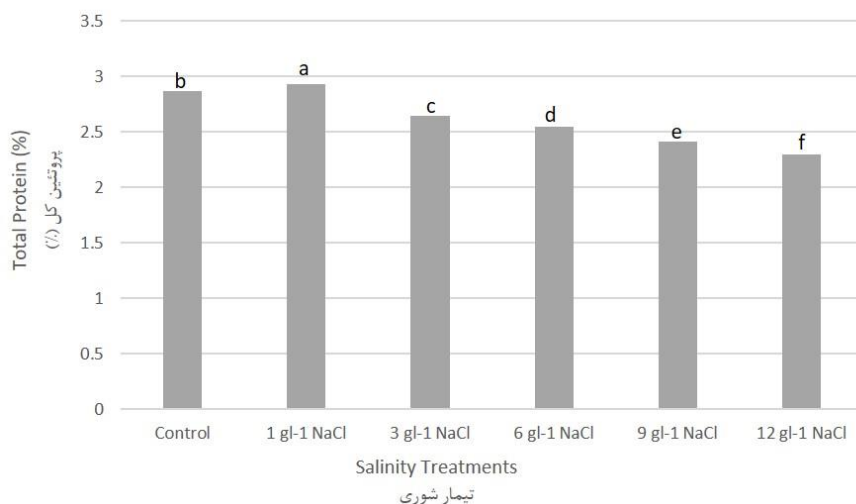
[†] میانگین‌های دارای حروف مشترک، فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن هستند.

^{††}The means with common alphabets are not significantly different at the 5% probability level using Duncan's multiple range test.

میزان پروتئین کل در پینه‌های تنش یافته

مقدار پروتئین کل در پینه‌های گیاه قرنفل تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفت (شکل ۲). در پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل،

کمترین میزان پروتئین کل در پینه‌های تیمار تنش شوری ۱۲ گرم در لیتر مشاهده گردید.



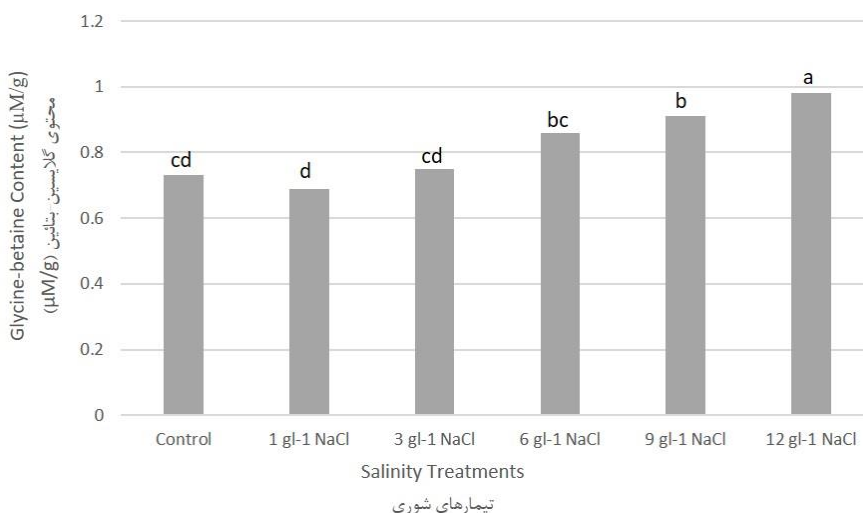
شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان پروتئین کل در پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)

Figure 2- Effect of different salinity levels on total protein content in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)

این اسمولیت، به میزان ۰/۹۸ میکرومول بر گرم در پینه‌ای تنش یافته تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم مشاهده گردید. گلیسین-بتائین معمول‌ترین و فراوان‌ترین نوع بتائین در گیاهان است که از اتصال دو اسید آمینه گلیسین و بتائین در شرایط تنش و از سنتز پروتئین‌ها بدست می‌آید. افزایش میزان اسمولیت گلیسین-بتائین تحت تنش شوری در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده است (۲۵).

میزان اسمولیت گلیسین-بتائین در پینه‌های تنش یافته

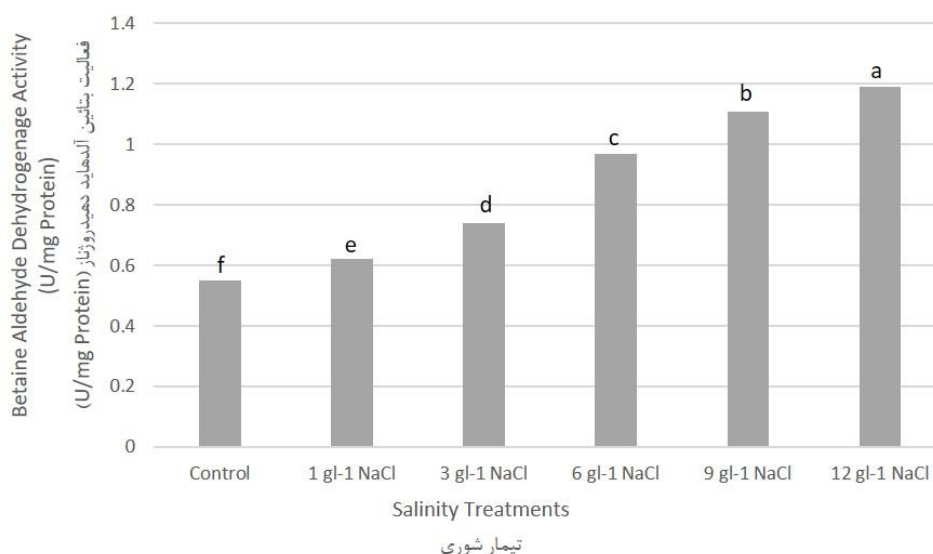
میزان اسمولیت گلیسین-بتائین نیز متأثر از تنش شوری گردید. در ابتدا با افزایش میزان کلرید سدیم به میزان ۱ گرم در لیتر، میزان گلیسین-بتائین مقدار کم و غیر معنی‌دار کاهش و سپس با افزایش بیشتر میزان کلرید سدیم و در نتیجه تنش شوری، میزان اسمولیت گلیسین-بتائین افزایش معنی‌داری یافت (شکل ۳). بیشترین میزان



شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان اسمولیت گلیسین-بتائین در پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)

Figure 3- Effect of different salinity levels on glycine-betaine content in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)

میزان ۱/۱۹ واحد بر میلی گرم پروتئین و کمترین میزان فعالیت آن در تیمار شاهد به میزان ۰/۵۵ واحد بر میلی گرم پروتئین مشاهده گردید (شکل ۴). از آنجایی که این آنزیم در سنتز اسمولیت گلاسیسین-بتائین نقش کلیدی دارد (۵)، افزایش فعالیت آن با میزان تجمع اسمولیت گلاسیسین-بتائین در پینه‌های تنش یافته همخوانی دارد. نتایج تجزیه همبستگی (جدول ۲) نیز نشان دهنده همبستگی معنی دار میزان اسمولیت گلاسیسین-بتائین با میزان فعالیت آنزیم بتائین آلدهید دهیدروژناز به میزان ۰/۹۷۲ درصد می‌باشد.



شکل ۴- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم بتائین آلدهاید دهیدروژناز در پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)

Figure 4- Effect of different salinity levels on betaine aldehyde dehydrogenase activity in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در پینه‌های تنش یافته

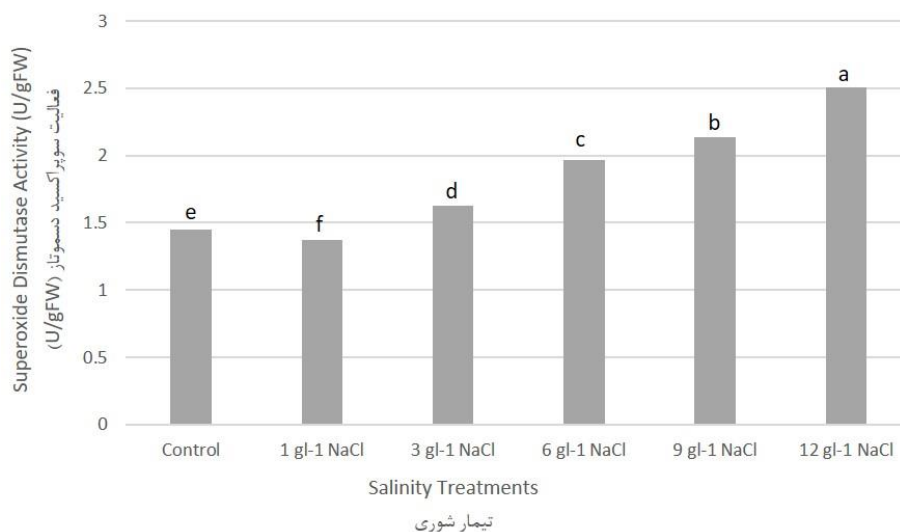
فعالیت آنزیم کاتالاز در پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل همانند فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز با تنش شوری افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت کاتالاز در تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم به میزان ۳/۱۳ واحد در گرم وزن تر و کمترین مقدار فعالیت آن در تیمار شاهد به میزان ۲/۱۶ واحد در گرم وزن تر مشاهده شد. اگرچه بیشترین میزان افزایش فعالیت کاتالاز در مقایسه با شاهد به میزان ۰/۹۷ واحد مشاهده گردید، لیکن به طور کلی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با سوپراکسید دسموتاز تحت شرایط تنش شوری در پینه‌های گیاه قرنفل بیشتر بود (شکل ۴).

میزان بتائین آلدهاید دهیدروژناز در پینه‌های تنش یافته

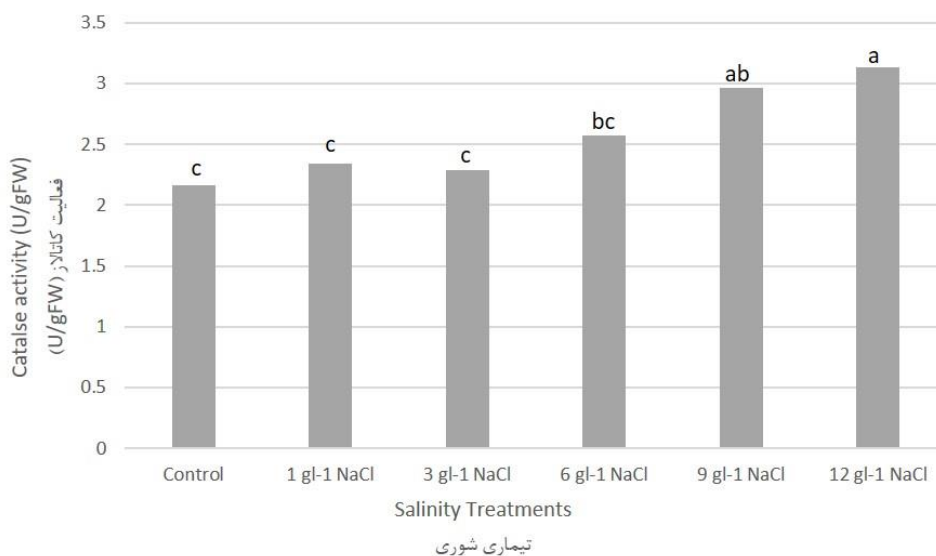
میزان فعالیت آنزیم بتائین آلدهید دهیدروژناز با افزایش تنش شوری در پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل به طور معنی داری افزایش یافت. میزان افزایش در فعالیت آنزیم مذکور با افزایش سطح تنش افزایش یافت به نحوی که میزان فعالیت این آنزیم در پینه‌های تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم تقریباً دو برابر میزان آن در پینه‌های تنش یافته تیمار ۱ گرم در لیتر بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم بتائین آلدهاید دهیدروژناز در تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم به

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در پینه‌های تنش یافته

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در پینه‌های گیاه قرنفل تحت تأثیر تنش شوری افزایش یافت. در پینه‌های تحت تنش میزان فعالیت این آنزیم ابتدا در غلظت ۱ گرم در لیتر کلرید سدیم کاهش جزئی غیر معنی دار و سپس با افزایش سطح تنش، افزایش معنی دار یافت به نحوی که پینه‌های تیمار ۱۲ گرم در لیتر بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز به میزان ۲/۵۱ واحد در گرم وزن تر را به خود اختصاص داده و کمترین میزان فعالیت آن نیز در پینه‌های تیمار شاهد به میزان ۱/۴۵ واحد در گرم وزن تر مشاهده شد (شکل ۵). بیشترین میزان افزایش این آنزیم در مقایسه با تیمار شاهد ۱/۰۶ واحد بود.



شکل ۵- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)
 Figure 5- Effect of different salinity levels on superoxide dismutase activity in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)



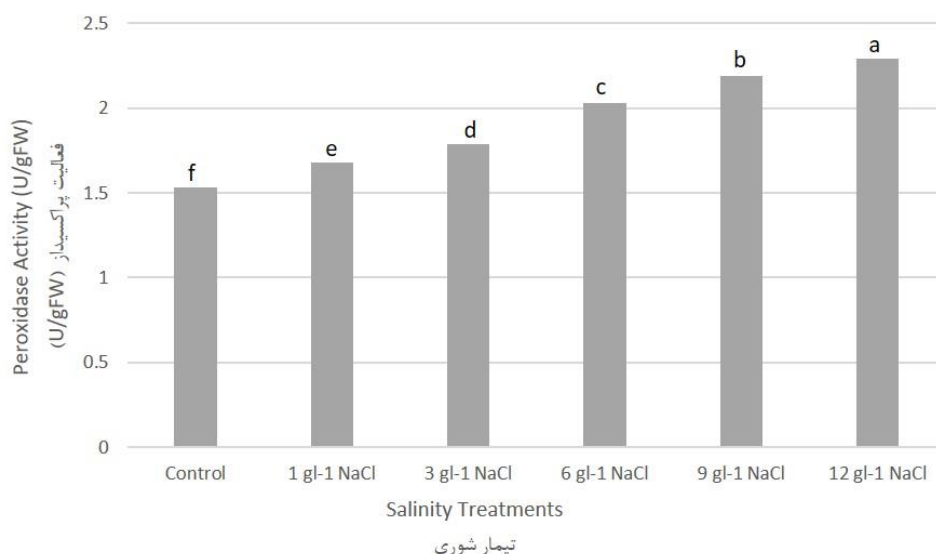
شکل ۶- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)
 Figure 6- Effect of different salinity levels on catalase activity in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)

میزان مالون‌دی‌آلدهاید در پینه‌های تنش یافته

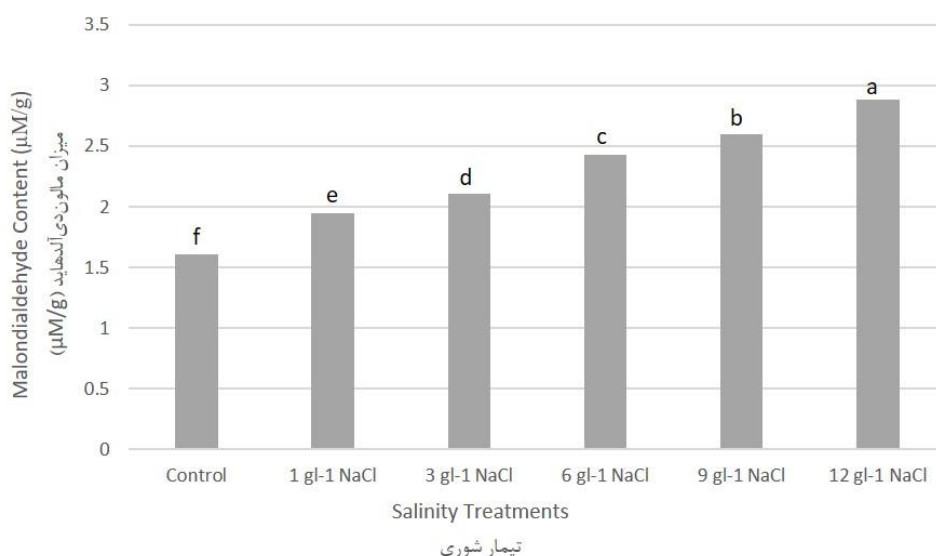
در پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل، میزان مالون‌دی‌آلدهاید در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۸). روند افزایشی به نحوی بود که با افزایش سطح تنش این مقدار نسبت به تیمار شاهد ۱/۲۷ میکرومول بر گرم افزایش یافت. بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدهاید در پینه‌های تنش یافته تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم به میزان ۲/۸۸ میکرومول بر گرم و کمترین میزان آن در تیمار شاهد به میزان ۱/۶۱ میکرومول بر گرم مشاهده گردید. افزایش مالون‌دی‌آلدهاید تحت تنش شوری در گیاهان مختلفی گزارش شده است (۱۷، ۱۹ و ۲۴).

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در پینه‌های تنش یافته

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز مانند آنزیم‌های دیگر شکار کننده رادیکال آزاد مورد مطالعه (سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز) با اعمال تنش شوری، افزایش یافت (شکل ۷). بیشترین میزان فعالیت پراکسیداز در تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم به میزان ۱/۱۲ واحد در گرم وزن تر و کمترین مقدار فعالیت آن در تیمار شاهد به میزان ۰/۵۵ واحد در گرم وزن تر مشاهده گردید. بیشترین میزان افزایش فعالیت این آنزیم در مقایسه با شاهد ۰/۵۷ واحد بود که نصف میزان افزایش فعالیت دو آنزیم دیگر مورد مطالعه بود.



شکل ۷- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)
 Figure 7- Effect of different salinity levels on peroxidase activity in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)



شکل ۸- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان مالون‌دی‌آلدهاید پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)
 Figure 8- Effect of different salinity levels on malondialdehyde content in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)

تغییر سطح فعالیت آنها با میزان فعالیت آنها در شاهد تفاوت‌هایی وجود دارد، لیکن افزایش فعالیت آنها در نتیجه تنش همبستگی قوی و ارتباط مستقیمی با میزان تخریب لیپیدها داشت. در بین آنزیم‌های مورد مطالعه، بیشترین ضریب همبستگی بین به میزان ۹۶/۷ درصد در پراکسیداز و کمترین میزان ۹۵/۰ درصد در سوپراکسید دسموتاز مشاهده گردید.

نقش آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد در تخریب لیپید در پینه‌های تنش یافته

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد، آزمون همبستگی بین فعالیت آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد همچون سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز با بیومارکر تخریبی مالون‌دی‌آلدهاید که در نتیجه تخریب لیپیدهای غشاء به وجود می‌آید، همسو و مثبت می‌باشد. اگرچه بین میزان فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه و همچنین

جدول ۲- همبستگی فعالیت آنزیم‌های مختلف مورد مطالعه و محصولات مرتبط با فعالیت آن‌ها

Table 2- Correlation analysis between the activity of different studied enzymes and their related products

	Superoxide Dismutase سوپراکسید دسموتاز	Catalase کاتالاز	Peroxidase پراکسیداز	Glycine-Betain گلایسین-بتائین
Malondialdehyde مالون‌دی‌آلدهید	0.950 **	0.951 **	0.967**	Betaine Aldehyde Dehydrogenase بتائین آلدیئید دهیدروژناز

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد با استفاده از آزمون همبستگی پیرسون.

** Significantly correlated at 0.01 probability level by Pearson Correlation Test.

بحث

توسط محققین مختلف گزارش شده است. آیسه و علی کمان‌آغلو (۹)، هاوولا و جزیری (۲۸)، هاوولا و همکاران (۲۹)، سونیتا و گوپتا (۵۷) و تهرانی‌فر و خرازی (۵۹) در مطالعات خود پینه‌های گیاه میخک را در محیط درون شیشه‌ای تحت تأثیر تنش خشکی قرار داده بودند نیز دریافتند تنش کیفیت و رشد پینه را تحت تأثیر قرار داده و موجب کاهش وزن آن می‌گردد. کاهش رشد سلول در شرایط تنش شوری می‌تواند به دلایل متعددی باشد که از جمله مهمترین آن‌ها کاهش فشار تورژسانس سلول‌ها، جمع شدن و چروکیدگی آن‌ها، عدم انبساط دیواره سلولی و توقف تقسیم سلولی در پینه‌ها باشد (۴۶ و ۴۸).

همچنین از سوی دیگر پژوهش‌ها نشان می‌دهد که میزان پروتئین بافت گیاهی تحت تأثیر سطوح مختلف تنش می‌تواند تغییر کند. در پژوهشی تاکاهاشی و همکاران (۵۸) ریزنمونه‌های میخک رقم "سوئیت ویلیام" (*Sweet William*) را بر روی محیط کشت حاوی NAA و 2,4-D مستقر نموده و تغییرات بیوسنتزی پروتئین را توسط تیمار آن‌ها با کلرید سدیم بررسی کردند. آنها مشاهده نمودند که تیمار شوری موجب جلوگیری از ساخت پروتئین شده و در نتیجه مقدار پروتئین‌های موجود در پینه‌های تنش یافته در پاسخ به شوری کاهش می‌یابد. یکی از فرآیندهای مهم درون سلولی، سنتز پروتئین است که شدیداً تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرد. سوتیروپولوس (۵۴) گزارش نمودند که بسیاری از پروتئین‌ها طی تنش هیدرولیز می‌شوند و بر همین اساس، کاهش در غلظت پروتئین کل، می‌تواند از نتایج تنش باشد. تنش شوری علاوه بر کاهش میزان پروتئین، با تغییر در ساختمان پروتئین‌ها می‌تواند موجب کاهش فعالیت بسیاری از آنزیم‌های موجود در گیاهان شود (۶۰). تنش شوری موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد شده که آنها نیز موجب تخریب آمینواسیدها می‌شوند (۴۶ و ۴۸).

یکی از مکانیزم‌های متداول در گیاهان جهت مقابله با تنش و اثرات منفی آن، تجمع ترکیبات محافظت‌کننده اسمزی و یا تعدیل‌کننده اسمزی می‌باشد. مالکا و همکاران (۳۸) گزارش نمودند که بیشتر گیاهان زمانی که در معرض تنش شوری قرار می‌گیرند، بدون آنکه به گیاه صدمه‌ای وارد گردد، مکانیزم بیوسنتز تعدیل‌کننده‌های

کاهش رشد پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل با یافته‌های ساکتیولو و همکاران (۵۲)، الخیری و البحرانی (۴) و لوتوس و همکاران (۳۶) و همچنین سونداراجان و همکاران (۵۵) که گزارش نموده‌اند با افزایش سطح تنش (شوری و خشکی) میزان رشد کم می‌شود، مطابق می‌باشد. کاهش رشد در هنگام مواجهه به تنش شوری به دلیل برهم‌خوردن هومئوستازی پتانسیل آب در بافت درحال رشد می‌باشد که با نتایج داش و پاندا (۱۶) همسو است.

تنش شوری ضمن تأثیر منفی بر رشد پینه و کاهش رشد آن، موجب کاهش وزن پینه‌ها در محیط درون شیشه‌ای نیز می‌گردد. درحقیقت یکی از اثرات تنش شوری در گیاهان کاهش فعالیت فتوسنتزی آن‌ها است که موجب کاهش جذب CO_2 و به دنبال آن میزان رشد و وزن گیاه نیز کم می‌شود (۳۳). در پژوهشی سلمالیان و همکاران (۵۳) با بررسی تنش شوری بر روی ریزنمونه‌های گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)، آنها دریافتند که وزن تر و خشک پینه‌های گیاه استویا به طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش شوری قرار می‌گیرند. به طور مشابه‌ای، آنها نیز مشاهده نمودند که در تیمار ۵۰ میلی مولار کلرید سدیم، وزن تر و خشک پینه‌ها به طور معنی‌داری کمتر از شاهد و به ترتیب به میزان ۰/۲۰۲ و ۰/۰۰۲۶ گرم بود. آن‌ها دلیل کاهش وزن تر و خشک پینه‌ها را عامل تنش شوری و تأثیر کلرید سدیم بر روی بخش‌های مختلف به ویژه سیستم آنزیمی و کاهش فشار تورژسانس ذکر نمودند. نیسرین و همکاران (۴۵) که پینه‌های گیاه میخک را تحت تأثیر تنش شوری قرار دادند، نیز همانند پژوهش پیش‌رو دریافتند که با افزایش میزان غلظت کلرید سدیم رشد پینه‌ها تا حد بسیار زیادی کاهش می‌یابد. همچنین رضوی‌زاده (۵۰) با اعمال تنش اسمزی بر روی پینه‌های حاصل از گل میخک دریافتند که با افزایش تنش (غلظت پلی اتیلن گلایکول) میزان رشد پینه‌ها به تدریج کاهش پیدا می‌کند و در غلظت‌های ۲۰ درصد و ۳۰ درصد رشد پینه‌ها به میزان زیادی کاهش می‌یابد. کاهش رشد پینه در گیاهان مختلف خانواده میخک تحت تنش نیز

تنش، میزان فعالیت آنزیم شکارکننده رادیکال آزاد در هنگام تنش افزایش می‌یابد. از سوی دیگر در برخی تحقیقات روند تغییر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز با توجه به مقاومت گیاه مورد مطالعه متفاوت بوده است. ابراهیمی و همکاران (۱۹) در پژوهش خود بر روی گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) الگوی متفاوتی را مشاهده نمودند. آنها گزارش نمودند که تحت شرایط تنش، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز نسبت به تیمار شاهد در گیاه همیشه بهار ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. آنها دلیل این امر را تجمع بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال و ناکارآمدی سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه در مواجهه با آن دانستند.

به طور مشابه‌ای، سوندراجان و همکاران (۵۵) نیز در مطالعه خویش بر روی میخک رقم "تولا" مشاهده نمودند که تنش شوری در کلیه تیمارها موجب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز می‌گردد. ما و همکاران (۳۷) نیز همانند پژوهش‌های ذکر شده، در مطالعه خویش دریافتند با افزایش تنش شوری، میزان آنزیم سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز در میخک بنفش (*Dianthus superbis*) تنها افزایش می‌یابد و روند کاهش برای آن مشاهده نمی‌گردد. هراتی و همکاران (۱۱) نیز گزارش مشابه‌ای در خصوص آویشن دناهی (*Thymus daenensis* Celak) به چاپ رساندند مبنی بر اینکه تنش شوری موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در آویشن دناهی می‌گردد. احمدپور دهکردی و بلوچی (۲) نیز دریافتند تنش شوری موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به ویژه پراکسیداز در گیاه سیاهدانه (*Nigella sativa* L.) می‌شود. این روند افزایشی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مذکور در تنش‌های دیگر همچون تنش اسمزی نیز مشاهده گردیده است. مشعشی و همکاران (۴۲) نیز در مطالعه خویش بر روی پینه‌های گیاه قرنفل تحت تنش اسمزی دریافتند که با افزایش میزان تنش، بر میزان فعالیت آنزیم‌های مختلف شکار کننده رادیکال آزاد همچون سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز افزوده می‌گردد.

دآوزدو و همکاران (۱۷) و همچنین گونز و همکاران (۲۷) گزارش نمودند که رادیکال‌های سوپراکسید ایجاد شده تحت تنش شوری باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء شده و در نتیجه میزان مالون‌دی‌آلدهاید را افزایش می‌دهد. از آنجایی که مالون‌دی‌آلدهاید محصول پراکسیداسیون اسیدلینولئیک می‌باشد، به عنوان یک شاخص مناسب برای پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، و تنش اکسیداتیو محسوب می‌شود (۶۱). همانند پژوهش حاضر، ما و همکاران (۳۷) در مطالعه‌ای که بر روی *Dianthus superbis* انجام دادند، دریافتند که میزان بیومارکر مالون‌دی‌آلدهاید در گیاهان تنش یافته با افزایش غلظت نمک، افزایش معنی‌دار می‌یابد. ابراهیمی و همکاران (۱۹) نیز در مطالعه‌ای بر روی گیاه همیشه بهار تحت تنش دریافتند که با افزایش تنش، محتوای مالون‌دی‌آلدهاید در بافت تنش یافته بیشتر

اسمزی همچون گلاسیسین-بتائین (از طریق افزایش فعالیت آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژناز) را در سلول‌های خود فعال نموده و میزان این اسمولیت را افزایش می‌دهند. تجمع اسمولیت گلاسیسین-بتائین در سیتوسل سلول‌های گیاهی در حفظ آب درون سلولی و ایجاد مقاومت در برابر تنش وارده کمک می‌نماید. اشرف و فولاد (۷) تجمع اسمولیت گلاسیسین-بتائین را به نحوی می‌دانند که از تجمع آن به عنوان شاخص مهم در مطالعات تنش شوری و کم آبی در گیاهان یاد نموده‌اند. از سوی دیگر، پاتاد و همکاران (۴۹) افزایش اسمولیت گلاسیسین-بتائین را در فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی و چرخه گلی‌اگرالات سلول‌های گیاهی مؤثر دانسته و گزارش نموده‌اند که گلاسیسین-بتائین در پایداری غشاهای سلولی و کاهش اثرات تنش اکسیداتیو نقش ایفا می‌نماید. مطالعات نشان می‌دهد که گیاهان در تنش‌های مختلف مقاومت‌های متفاوتی در نتیجه تجمع اسمولیت گلاسیسین-بتائین از خود نشان می‌دهند (۲۵). یافته‌های پژوهش حاضر در خصوص افزایش تجمع اسمولیت گلاسیسین-بتائین در بافت پینه‌های تنش یافته با یافته‌های میری و مقدم (۴۱) همخوانی دارد. زیرا تجمع اسمولیت گلاسیسین-بتائین در پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل با افزایش سطوح تنش شوری، افزایش یافت و این افزایش به نحوی در مقاومت پینه‌ها مؤثر بود که هیچ پینه‌ای کلروزه و یا نکروزه حتی در سطح تنش ۱۲ گرم در لیتر مشاهده نگردید.

آنزیم سوپراکسید دسموتاز در کاهش اکسیژن فعال در گیاهان نقش اساسی ایفاء می‌کند و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز منجر به مهار انواع اکسیژن فعال از جمله پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شود که در طی تنش‌های غیرزیستی همانند شوری و خشکی ایجاد و تجمع می‌یابد (۶۳). کاتالاز نیز یکی دیگر از آنزیم‌های دخیل در کاهش تنش اکسیداتیو است که موجب تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌گردد و از این طریق سطح پراکسید هیدروژن را در سلول کاهش می‌دهد (۳۵). از سوی دیگر، پراکسیدازها به عنوان یک گروه بزرگ از ایزوآنزیم‌ها به دلیل داشتن گستره‌ای وسیع از نقاط ایزوالکتریک، عملکردهای متنوعی دارند که مهمترین آن در چرخه فعالیت گیاهی، شکار کننده رادیکال آزاد و کاتالیز کننده احیاء پراکسید هیدروژن می‌باشد (۸ و ۶۲).

تحقیقات بسیاری نشان داده‌اند که افزایش سطح تنش موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های شکار کننده رادیکال آزاد و آنتی‌اکسیدانی همچون سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در گیاهان مختلف می‌گردد. در خصوص تنش شوری منیر و آفتاب (۴۳) نیز همانند پژوهش حاضر، در پژوهش خود بر روی نیشکر در محیط درون شیشه‌ای دریافتند که تیمار تنش شوری موجب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در پینه‌های تحت تنش می‌گردد. آنها گزارش نمودن در صورت مقاومت مناسب گیاه به

اسمپروتکشن (osmoprotection) علاوه بر افزایش میزان پروتئین کل در نتیجه تنش، میزان فعالیت آنزیم بتائین آلدهاید دهیدروژناز با افزایش میزان تنش، افزایش یافت. این امر موجب افزایش میزان محتوی گلاسن-بتائین به طور معنی‌داری در پینه‌های تنش یافته گردید. در مکانیزم محافظتی آنتی‌اکسیدانتی، میزان فعالیت‌های آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد (سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز) با افزایش میزان تنش به طور معنی‌داری افزایش یافت. لیکن از سوی دیگر میزان تخریب لیپیدهای غشاء (که مالون‌دی‌آلدهاید به عنوان یک بیومارکر مشخص کننده میزان تخریب آن می‌باشد) در نتیجه تنش افزایش یافت. این امر نشان دهنده میزان تنش شدید وارده به پینه‌ها می‌باشد. با در نظر گرفتن جنبه‌ها و پاسخ‌های متفاوت پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل به تنش شوری، به نظر می‌رسد علیرغم وارد شدن تنش شدید به پینه‌ها، مکانیزم‌های دخیل در مقاومت به تنش در این گیاه به خوبی عمل نمودند و اگرچه تنش، موجب کاهش رشد گردید، ولی مکانیزم‌های محافظت اسمزی و آنتی‌اکسیدانی از مرگ و زوال پینه‌ها جلوگیری به عمل آوردند.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی انجمن علمی زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه می‌باشد. بدینوسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه جهت حمایت مالی و معنوی این طرح پژوهشی تشکر و قدردانی می‌گردد.

می‌گردد. به طور مشابه‌ای، قربانلی و همکاران (۲۳) نیز هنگام مطالعه زیره سبز تنش یافته با کلرید سدیم چهار هفته بعد از جوانه زدن، مشاهده نمودند با افزایش غلظت نمک، میزان مالون‌دی‌آلدهاید در بافت گیاهی افزایش می‌یابد. همانند پژوهش پیش‌رو، سودهاکار و همکاران (۵۶) نیز در توت‌های (*Morus alba* L.) تحت تنش شوری دریافتند که با افزایش تنش، مقدار مالون‌دی‌آلدهاید افزایش می‌یابد. مالون‌دی‌آلدهاید یک شاخص از پراکسیداسیون غشای سلول‌ها است و با نشت مواد از غشاء همبستگی مثبت دارد، هر چقدر میزان مالون‌دی‌آلدهاید بیشتر شود پراکسیداسیون غشاء و نشت الکترولیت‌ها از غشای سلولی زیادتر شده و در پی آن خسارت احتمالی بیشتر می‌شود. نتایج این پژوهش نیز مؤید این امر است.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر بیانگر پایین بودن آستانه تحمل پینه‌های گل قرنفل در محیط درون شیشه‌ای و در عین حال مقاومت پینه‌های گیاه قرنفل به تنش درون شیشه‌ای ناشی از شوری با کلرید سدیم می‌باشد. اگرچه به دلیل پایین بودن آستانه تحمل، رشد پینه‌های تنش یافته و وزن آنها تحت شرایط تنش شوری کاهش یافت، لیکن در هیچیک از سطوح تنش پینه‌ها کلروزه و یا نکروزه نگردیدند. از سوی دیگر مکانیزم‌های مختلف مقاومت به تنش (از جمله تولید محافظ‌های اسمزی و شکارکننده‌های رادیکال آزاد) به خوبی فعال شده و با افزایش سطح تنش به طور معنی‌داری افزایش یافتند. در مکانیزم

منابع

- 1- Aeby H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymology 105: 121-126.
- 2- Ahmadpour Dehkordi S., and Balouchi H.R. 2012. Effect of seed priming on antioxidant enzymes and lipids peroxidation of cell membrane in Black cumin (*Nigella sativa*) seedling under salinity and drought stress. Electronic Journal of Crop Production 5(4): 63-85. (In Persian with English Abstract)
- 3- Ali A., Afrasiab H., Naz S., Rauf M., and Iqbal J. 2008. An efficient protocol for *in vitro* propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Pakistan Journal of Botany 40: 111-121.
- 4- Al-Khayre K.M., and Al-Bahranny A.M. 2002. Growth, water Content, and proline accumulation in drought stressed callus of date palm. Biological Plantrum 48(1): 105-108.
- 5- Arakawa K., Katayama M., and Takabe T. 1990. Levels of Betaine and Betaine Aldehyde Dehydrogenase Activity in the Green Leaves, and Etiolated Leaves and Roots of Barley. Plant Cell Physiology, 31(6):797-803.
- 6- Arakawa K., Takabe T., Sugiyama T., and Akazawa T. 1987. Purification of betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. Journal of Biochemistry 101: 1485-1488.
- 7- Ashraf M., and Foolad M.R. 2007. Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59: 206-216.
- 8- Ashraf, M., and Harris, P.J.C. 2004. Potential Biochemical Indicators of Salinity Tolerance in Plants. Plant Science 166: 3-16.
- 9- Ayse S., and Alikamanoglu S. 2013. Antioxidant enzyme activities, malondialdehyde, and total phenolic content of PEG-induced hyperhydric leaves in sugar beet tissue culture. In Vitro Cell Developmental Biology Plant 49: 396-404.
- 10- Azizi M., Chehrizi M., and Zahedi S.M. 2011. Effects of Salinity Stress on Germination and Early Growth of Sweet William (*Dianthus barbatus*). Asian Journal of Agricultural Sciences 3(6): 453-458.
- 11- Boominathan R., and Doran P.M. 2002. Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertoloni*. New Phytologist 156: 202-205.

- 12- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 13- Cai X., Niu G., Starman T. and Hall C. 2014. Response of six garden roses (*Rosa× hybrida* L.) to salt stress. *Scientia Horticulturae* 168: 27-32.
- 14- Chandra S., and Rawat D.S. 2015. Medicinal plants of the family Caryophyllaceae: a review of ethno-medicinal uses and pharmacological properties. *Integrative Medicine Research* 4: 123-131.
- 15- Compton M.E. 1994. Statistical method suitable for the analysis of plant tissue culture data. *Plant Cell Tissue* 37: 217- 242.
- 16- Dash M., and Panda S.K. 2001. Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germination *Phaseolus mungo* seeds. *Biologia Plantarum* 44(4): 587-589.
- 17- de Azevedo-Neto A.D., Prisco J.T., Enéas-Filho J., de Abreu C.E.B., and Gomes-Filho E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 56(1): 87-94.
- 18- Doel J.M., and Wilkins H.F. 1999. *Floriculture: principles and species*. Prentic-Hall, Inc. New Jersey, USA. 613p.
- 19- Ebrahimi M., Zamani G.R., and Alizadeh Z. 2017. A study on the effects of water deficit on physiological and yield-related traits of pot marigold (*Calendula officinalis* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 33(3): 492-508. (In Persian with English Abstract)
- 20- FAO. 2010. Extent and causes of salt-affected soils in participating countries. Available on URL: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spuch/topic4.htm>.
- 21- Galbally J., and Galbally E. 1997. *Carnations and Pinks for garden and greenhouse*. Timber Press, Portland Oregon, USA. 310p.
- 22- Ghasemi Ghasareh M. and Kafi M. 2015. *Floriculture: Principles and Practicals*. Elm Afarin Publication, Esfahan, Iran. 313p.
- 23- Ghorbanli M., Ahmadi F., Monfared A., and Bakhshi Khaniki G.H. 2012. Effect of salt stress and its interaction with ascorbate on catalase, ascorbate peroxidase activity, proline and malondialdehyde in *Cuminum cyminum* L. four weeks after germination. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 28(1): 14-27. (In Persian with English Abstract)
- 24- 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.
- 25- Giri J. 2011. Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6(11):1746-1751.
- 26- Grieve C.M., and Grattan S.R. 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant Soil* 70: 303-307.
- 27- Gunes A., Inal A., Alpaslan M., Eraslan F., Bagci E.G., and Cicek N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology* 164: 728-736.
- 28- Haouala F., and Jaziri F. 2009. *In Vitro* Propagation of Carnation (*Dianthus Caryophyllus* L.) Under Salt Stress. *Pakistan Journal of Biotechnology* 6(1-2): 27-30.
- 29- Haouala F., Hannachi C., and Zid E. 2003. Exploitation de la variabilité soma-clonale pour la recherche d'oeillet (*Dianthus caryophyllus* L.) tolérant à la salinité. *Tropicultura* 21(1): 16-21.
- 30- Harati E., Kashefi B., and Matinzadeh M. 2017. Investigation of Reducing Detrimental Effects of Salt Stress on Morphological and Physiological Traits of (*Thymus daenensis* Celak.) through Salicylic Acid Application. *Plant Production Technology* 8(2): 111-125. (In Persian with English Abstract)
- 31- Hashemi Esfahani S.A. 2008. *Modern Floriculture Extension*. Sepehr Publication, Tehran, Iran. 192 p. (In Persian)
- 32- ICARDA. 2002. International cooperation Highlands regional program. Available on: URL: <http://www.icarda.cgiar.org>.
- 33- Irma T., Jolan C., Gabriella S., Ferenc H., Attila P., Gabriella K., Agnes S., Margit S., and Laszlo E. 2002. Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre- treatment. *Acta Biologica Szegediensis* 46(3-4): 55-56.
- 34- Kar M. and Mishra D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 578:315-319.
- 35- Li-Ping B., Fang-Gong S., Ti-Da G., Zhao-Hui S., Yin-Yan L., and Guang-Sheng Z. 2006. Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize. *Pedosphere* 16: 326-332.
- 36- Lutts S., Almansoure M., Kinet J.M. 2004. Salinity and water stress have contrasting effects on the relation ship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. *Plant Science* 167: 9-18.
- 37- Ma X., Zheng J., Zhang X., Hu Q., and Qian R. 2017. Salicylic Acid Alleviates the Adverse Effects of Salt Stress on *Dianthus superbus* (Caryophyllaceae) by Activating Photosynthesis, Protecting Morphological Structure, and Enhancing the Antioxidant System. *Frontiers in Plant Science* 8: 600

- 38- Makela P., Peltonen-Sainio P., Jokinen K., Pehu E., Setala H., Hinkkanen R., and Somersalo S. 1996. Uptake and translocation of foliar applied glycinebetaine in crop plants. *Plant Science* 121: 221-230.
- 39- McCord J.M., and Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244(22):6049-6055.
- 40- Minami M., and Yoshikawa H. 1979. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clinical Chemistry Acta* 92: 337-342.
- 41- Miri H.R., and Moghadam A.Z. 2015. The Effect of External Usage of Glycine Betaine on Corn (*Zea mays* L.) in Drought Condition. *Iranian Journal of Field Crops Research* 12(4): 704-717. (In Persian with English Abstract)
- 42- Moshashaei A., Jowkar M.M., and Farshadfar E. 2019. Callogenesis optimization and the effect of *in vitro* osmotic stress on *Dianthus barbatus* (L.) calli. *Journal of Plant Process and Function* 7(27): 237-252. (In Persian with English Abstract)
- 43- Munir N., and Aftab F. 2009. The role of polyethylene glycol (PEG) pretreatment in improving sugarcane's salt (NaCl) tolerance. *Turkish Journal of Botany* 33(6): 407-415.
- 44- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250.
- 45- Nisreen Y., El-Kichaoui A., and Ayesh B. 2015. Enhancement of Salinity Tolerance in (*Dianthus caryophyllus* L.) using *in vitro* Selection Technique and Isolation of Potential Salinity Tolerance. Islamic University- Gaza Deanship of Postgraduate Studies, Faculty of Science, Department of Biological Sciences. pp: 67-87.
- 46- Orcutt D.M., and Nilsen E.T. 2000. The physiology of plants under stress, soil and biotic factors. John Wiley and Sons. New York, USA. pp: 177-235.
- 47- Oz Aydin S., Dirmenci T., Tumen G., and Can Baser K.H. 2006. Plants used as analgesic in the folk medicine of Turkey. *Proceedings of the 4th International Congress of Ethnobotany (ICEB 2005)*. pp: 167-171.
- 48- Parida A.K., and Das A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
- 49- Patade V.Y., Lokhande V.H., and Suprasanna P. 2014. Exogenous application of proline alleviates salt induced oxidative stress more efficiently than glycine betaine in sugarcane cultured cells. *Sugar Technology*, 16 (1): 22-29.
- 50- Razavizadeh R., and Ehsanpour A. 2004. Studying the tolerance of *Medicago sativa* L. calli to drought stress under UV-C irradiation. *Iranian Biology Journal* 17(2): 1-12. (In Persian with English Abstract)
- 51- Rostami M., and Mazaheri S. 2010. Effect of salinity stress on *Dianthus barbatus* seed germination. *Medicinal Plant National Conference*. Sari, Iran. (In Persian)
- 52- Sakthivelu G., Akitha M.K., Giridhar P., Rajasekaran T., Ravishankar G.A., Nedev T., and Kosturkova A. 2008. Drought- induced alteration in growth, osmotic potential and *in vitro* regeneration of Soybean cultivars. *Plant Physiology* 34(1-2): 103-112.
- 53- Salmalian M., Ghasemnejad A., and Mashayekhi K. 2017. The study of quantitative and qualitative changes of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Callus under the influence of salicylic acid and salt in solid and liquid culture conditions. *Quarterly Journal of Ecophytochemistry of Medicinal Plants* 19(3): 23-39. (In Persian with English Abstract)
- 54- Sotiropoulos T.E. 2007. Effect of NaCl and CaCl₂ on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M4 cultured *in vitro*. *Biologia Plantarum* 51: 177-180.
- 55- Soundararajan P., Abinaya M., Yoo G., Park M., Sowbiya M., and Byoung R.J. 2015. Silicon Alleviates Salt stress by Modulating Antioxidant Enzyme Activities in *Dianthus caryophyllus* 'Tula'. *Environmental Biotechnology* 56(2): 233-239.
- 56- Sudhakar C., Lakshmi A., and Giridarakumar S. 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science* 141: 613-619.
- 57- Sunita D., and Gupta A.K. 2002. Tissue culture studies in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). MS Thesis. College of Agriculture. CCS Haryana Agricultural University, Hisar, India. pp: 68-96.
- 58- Takahashi R., Liu S., and Takano T. 2009. Isolation and Characterization of Plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter Genes from Salt-Sensitive and Salt-Tolerant (Sweet William). *Journal of Plant Physiology* 166: 301- 309.
- 59- Tehranifar A., and Kharrazi M. 2016. *In Vitro* Culture of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Focusing on the Problem of Vitrification. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 5(13): 1-6.
- 60- Thakur M., and Sharma A.D. 2005. Salt-stress-induced proline accumulation in germinating embryos: evidence suggesting a role of proline in seed germination. *Journal of Arid Environments* 62: 517-523.
- 61- Varier A., Vari A.K., and Dadlani M. 2010. The subcellular basis of seed priming. *Current Science* 99(4): 450-456.
- 62- Yildirim O., Aras S., and Ergul A. 2004. Response of Antioxidant System to Short-term NaCl stress in Grapevine Root stock-1616c and *Vitis vinifera* L. cv. Razaki. *Acta Biologica Cracoviensia* 46: 151-158.
- 63- Zhang F.Q., Zhang H.X., Wang G.P., Xu L.L., and Shen Z.G. 2009. Cadmium induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *Journal of Hazardous Materials* 168(1): 76-84.



Effect of *in Vitro* Salinity Stress on Growth Parameters, Osmo-protection and Oxidative Stress of *Dianthus barbatus* L. Calli

A. Moshashaei¹- M.M. Jowkar^{2*}

Received: 28-04-2019

Accepted: 05-10-2019

Introduction: *Dianthus barbatus* L. from Caryophyllaceae is an important herbaceous landscape ornamental plant in the temperate regions throughout the world. Although this ornamental plant is used as bedding plant, it also has other extensive applications such as cut flower and pot plant. Besides, in some countries the leaves of *Dianthus barbatus* are used for treatment of digestive disorders in their traditional medicine. Landscape and its quality, plays an essential role in human life. Nowadays, maintenance and development of urban landscape in many regions such as Iran is facing major challenging issues. Soil and water salinity are the most important challenges of urban landscape. Considering the challenges which landscape development faces in many parts of the country and the importance of this plant in landscape, the effect of salinity on *D. barbatus* during *in vitro* condition was studied in order to obtain some basic physiological information for future stress studies on this plant.

Materials and Methods: *In vitro* sterile plants were initially obtained from seeds by culturing them on basal MS medium. Calli were obtained by culturing leaf, stem and root explants on previously reported callogenesis optimization medium which was MS medium supplemented with 2 μ M BAP + 6 μ M NAA. Calli proliferation was then conducted on the same media. Proliferated calli with same size were subjected to MS medium supplemented with the mentioned plant growth regulators and various NaCl concentrations (0, 1, 3, 6, 9, 12 gl⁻¹) in order to induce salinity stress. Various physiological aspects and stress related mechanisms such as growth, osmo-protection and oxidative stress mechanisms were consequently studied in the stressed *Dianthus barbatus* calli. Studied growth features were calli growth, final growth rate, fresh and dry weight. Total protein content, glycine-betaine content, and the activity of betaine aldehyde dehydrogenase (BAD) were studied as a part of osmo-protection mechanism. On the other hand, the activity of free radical scavenger enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) and malondialdehyde damage biomarker content were studied in stressed calli as a part of oxidative stress mechanism. Total protein was measured using Bradford method. Glycine-betaine content was measured using spectroscopy method by KI-I₂ reaction agent. The activity of betaine aldehyde dehydrogenase was evaluated using spectroscopy method by reduction with NAD⁺. SOD activity was measured using spectroscopy method and formation as an indicator. CAT activity was measured using spectroscopy method by measuring hydrogen peroxide breakdown. POX activity was measured using spectroscopy method by nitro-blue tetrazolium reduction activity. Malondialdehyde content was also measured by using spectroscopy method.

Results and Discussion: Results indicated that by increasing salinity level, calli growth and consequently fresh and dry weight reduced. Calli growth was dramatically reduced as salinity level reached above 1 gl⁻¹. This slow growth was also observed at high stress levels such as 12 gl⁻¹. By salinity increment, total protein content of the stressed calli significantly reduced. On the other hand, BAD activity increased as a result of salinity stress and consequently glycine-betaine content also increased significantly. The highest level of glycine-betaine content and also the activity of BAD activity were observed in 12gl⁻¹ NaCl treated calli. A significant correlation between glycine-betaine content and BAD activity was observed. The activity of free radical scavenger enzymes such as SOD, CAT, POX also significantly increased by salinity stress increment. The highest activity of the mentioned free radical scavenger enzymes were observed in 12 gl⁻¹ NaCl treated calli. CAT had the most activity among the mentioned studied free radical scavenger enzymes. The highest increase in POX activity was half of the control and also half of the activity increment of other studied free radical scavenger enzymes. Although the activity of free radical scavenger enzymes increased, the level of malondialdehyde damage biomarker also increased as the result of salinity stress increment. The highest amount of

1- M.Sc. Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

2- Assistant Professor, Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

(*- Corresponding Author Email: mjowk@iauksh.ac.ir)

malondialdehyde content was seen in the 12gl⁻¹ NaCl treated calli. A significant correlation between malondialdehyde content and the activity of free radical scavenger enzymes was observed.

Conclusion: In general, the calli of *Dianthus barbatus* cultured *in vitro* are sensitive to salinity stress induced by more than 1 gl⁻¹ NaCl; indicating the stress tolerance threshold. The tolerance and resistance mechanisms performed well under stress condition and the stress calli resisted to salinity up to 12 gl⁻¹ NaCl and survived without chlorosis.

Keywords: Betaine aldehyde dehydrogenase, Catalase, Glycine-betaine, Malondialdehyde, Superoxide dismutase