بهینه‌سازی تولید پینه و تأثیر تنش اسمزی بر پینه‌های گل قرنفل (*Dianthus barbatus* L.) در محیط درون شیشه‌ای

عابدین مشعشعی[۱]، محمدمهدی جوکار[۱*] و عزت‌اله فرشادفر[۲]

[۱*] گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران.

[۲] گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۱۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۶/۱۲)

چکیده

گل قرنفل یکی از گیاهان زینتی فصلی فضای سبز در مناطق معتدل می‌باشد که علاوه بر کاربردهای زینتی فراوان، در طب سنتی نیز کاربردهایی دارد. کمبود آب و درمعرض تنش کم آبی قرار گرفتن مهمترین مشکل پیش‌روی توسعه فضای سبز و تولید گیاهان دارویی است. استقرار پینه کلیدی‌ترین مرحله جهت بهره‌مندی از تکنیک‌های مدرن اصلاح و همچنین از سوی دیگر مطالعه تنش کم آبی در محیط درون شیشه‌ای درک مکانیزم و پاسخ گیاهان به تنش را فراهم می نماید. لذا این پژوهش در دو بخش اقدام به بررسی الف) استقرار پینه با استفاده از ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه و تنظیم کننده‌های رشد BAP، NAA و 2,4-D، و ب) تأثیر سطوح مختلف تنش اسمزی (صفر، ۱-، ۳-، ٦-، ۹- و ۱۲- بار) بر پینه‌های گل قرنفل توسط پلی اتیلن گلیکول نمود. در بخش اول شاخص‌های مختلف پینه‌زایی همچون درصد پینه‌زایی، رنگ، نوع بافت، رشد پینه‌ها و کلرزه و نکروزه شدن آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. در بخش دوم نیز علاوه بر شاخص‌های بخش اول، میزان تغییرات پروتئین، اسمولیت گلاسین-بتائین، میزان فعالیت برخی آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد (همچون سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز) در طی تنش و سطوح مختلف آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بخش اول حاکی از مناسب‌تر بودن ریزنمونه برگ و ترکیب‌های هورمونی ۲ میکرومول BAP + ٦ میکرومول NAA و همچنین ٤ میکرومول BAP + ٤ میکرومول 2,4-D بود. با افزایش میزان تنش اسمزی، رشد و وزن پینه‌های تحت تنش کاهش یافت. از سوی دیگر با کاهش فشار اسمزی (افزایش تنش) میزان پروتئین کل در پینه‌های تحت تنش کاهش و میزان اسمولیت گلایسن-بتائین افزایش یافت. همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد همچون سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز نیز با افزایش سطح تنش، افزایش یافت.

کلمات کلیدی: بنزیل آمینو پورین، پراکسیداز، پلی اتیلن گلیکول،سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز، نفتالین استیک اسید

مقدمه

گل قرنفل (*Dianthus barbatus* L.) یکی از مهمترین گیاهان فصلی زینتی تحت کشت در فضای سبز به عنوان گل باغچه‌ای می‌باشد (قاسمی قهساره و کافی، ۱۳۹٤). این گل علفی، یکساله، بومی نواحی معتدل اروپا و از خانواده میخک سانان (Caryophyllaceae) می‌باشد. در ایران این گل بیشتر در لاهیجان، رشت، تهران، کرج و مناطق مرکزی کشور تحت کشت بوده و از پراکندگی مناسبتری برخوردار است (قاسمی

[*] نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: mjowk@iauksh.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]

قهساره و کافی، ۱۳۹٤). امروزه کشت این گل در سایر مناطق کشور به دلیل داشتن کاربردهای متنوع زینتی و دارویی روبه افزایش است. از کاربردهای زینتی این گل می‌توان به بسترهای کشت، جعبه‌های کشت، باغ‌های کانتینری و گل‌های شاخه بریده اشاره نمود. این گل همچنین به دلیل داشتن رنگ جذاب و عطر دلپذیر در باغ‌های پروانه (Butterfly Garden) در جذب پروانه و در مزارع محدود ایزوله جهت تولید عسل نیز کشت می‌گردد. امکان استفاده از برگ‌ها، ساقه و گل قرنفل به دلیل داشتن ترکیبات دارویی در درمان برخی بیماری‌ها ممکن می‌باشد. تحقیقات نشان داده که در اندام‌های هوایی گل قرنفل دو نوع ساپونین (Saponin) یافت می‌شود که خاصیت ضد درد و التهاب (Analgesic and Anti-inflammatory) دارند (Chandra and Rawat, 2015). در طب سنتی برخی کشورها همچون ترکیه از اندام هوایی قرنفل جهت درمان شکم درد استفاده می‌گردد (Oz Aydin *et al.*, 2006). همچنین گزارش شده که عصاره بذر آن خاصیت ضد ویروسی داشته و از برگ های آن پروتئینی به نام دیانتین (Dianthin) استخراج می‌گردد که خاصیت بازدارندگی فعالیت در برخی باکتری‌ها همچون *Escherichia coli* دارد (Chandra and Rawat, 2015).

اگرچه این گیاه توسط بذر به راحتی و همچنین با قلمه ساقه امکان تکثیر دارد، لیکن بهینه‌سازی پروتوکل تولید پینه و ریزافزایی (Micropropagation) آن جهت اصلاح توسط روش‌های نوین همچون انتقال ژن و ویرایش ژنوم (از طریق کشت بافت و سایر روش‌های بیوتکنولوژیکی) از اهمیت زیادی برخوردار است. طبق بررسی‌های صورت گرفته، مطالعات محدودی درخصوص ریزافزایی (کشت بافت) این گیاه صورت گرفته است که تنها می‌توان به پژوهش گودرزی (۱۳۹۰)، عبادی و همکاران (۱۳۹۲) و همچنین حیدریان و همکاران (۱۳۹۵) اشاره نمود. گودرزی (۱۳۹۰) در پژوهشی بر روی جداکشت‌های گل قرنفل دریافت که ترکیب محیط کشت بر رشد و نمو ریزنمونه‌ها تأثیرگذار است. وی مشاهده نمود مقادیر سولفات منیزیم و فسفات پتاسیم محیط کشت MS تأثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین گیاه قرنفل مستقر شده در محیط کشت MS دارد. عبادی و همکاران (۱۳۹۲) در مطالعه خویش اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد ستوکنین، اکسین و جیبرلین را در محیط کشت MS بر میزان تولید پروتئین‌های دفاعی و پرولین در محیط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار دادند. در پژوهشی دیگر، حیدریان و همکاران (۱۳۹۵) اثر تنظیم کننده‌های رشد ستوکنین، اکسین و جیبرلین را بر تغییرات فعالیت‌های آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در جداکشت‌های گل قرنفل حاصل از کشت شاخساره های دوگره‌ای در محیط درون شیشه‌ای را مورد بررسی قرار دادند.

از سوی دیگر، آب مهمترین عامل محیطی رشد گیاهان و تولید محصولات کشاورزی می‌باشد که میزان در دسترس بودن آن تأثیر بسزایی بر رشد و نمو گیاهان و تولید متابولیت‌های دارویی آنها دارد. کمبود آب در روند رشد گیاهان، صدمات جدی بر رشد و نمو گیاهان، به خصوص در گیاهان دارویی وارد می‌نماید (امید بیگی، ۱۳۷٤). مطالعات نشان داده که تنش کم آبی رشد گیاه را از جنبه‌های مختلف فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و آناتومیکی تحت تأثیر قرار می‌دهد و در بیشتر موارد رشد گیاه و تولید توده زیستی (Biomass) آن را کاهش می‌دهد. در تنش کم آبی رشد گیاهان به تأخیر افتاده و عملکرد آنها کاهش می‌یابد. در برخی موارد گزارش گردیده است که تنش خشکی و کم آبی عملکرد گیاهان را تا ۵۰ درصد کاهش می‌دهد (Mahajan and Toteja, 2005).

قسمت عمده کشور ایران با متوسط نزولات آسمانی ۲٤۰ میلی‌متر در سال دارای اقلیم خشک و نیمه خشک است. علاوه بر کشور ایران، خشکی و کم آبی یکی از مهمترین عوامل محدود کنندهٔ رشد گیاهان در سراسر جهان و شایع ترین تنش محیطی است که تقریباً تولید ۲۵ درصد از ارضی تحت کشت در دنیا را محدود ساخته است (کافی و همکاران، ۱۳۹۲). با توجه به اینکه بخش عمده‌ای از کشور عزیزمان را مناطق کم آب، نیمه خشک و خشک تشکیل می‌دهد، مطالعات تنش کم آبی به طور به خصوص برای گیاهانی که هم زینتی بوده و هم کاربرد دارویی دارند اهمیت به سزایی دارد. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که تنش کم آبی و خشکی موجب تنش اکسیداتیو

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]

از طریق تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌گردد (Kabiri and Naghizadeh, 2015). به رغم اینکه در رابطه با اثر تنش‌های غیر زیستی بر محصولات زراعی تحقیقات وسیعی انجام شده، اما متأسفانه تأثیر تنش کم آبی بر روی گیاهان دارویی،زینتی و معطر کمتر مورد توجه قرار گرفته است (حکمتی، ۱۳۸٦).

طبق بررسی‌های صورت گرفته، درخصوص تنش کم آبی مطالعه‌ای بر روی گل قرنفل صورت نگرفته است و تنها برخی پژوهش‌ها به بررسی تأثیر تنش شوری بر روی جوانه‌زنی و رشد این گل پرداخته‌اند. رستمی و مظاهری (۱۳۸۹) در پژوهشی بر روی گل قرنفل دریافتند که اعمال تنش شوری به میزان ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر در محیط درون شیشه‌ای باعث کاهش درصد جوانه زنی می‌گردد. Azizi و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر سه نوع نمک ($NaCl$, $NaHCO_3$, $NaCO_3$, $CaCl_2$) در غلظت‌های مختلف ۲ تا ۸ دسی‌زیمنس بر متر را بررسی و مشاهده نمودند که با افزایش غلظت نمک و ایجاد تنش شوری، درصد جوانه‌زنی و همچنین رشد و نمو ریشه‌چه و ساقه‌چه گل قرنفل کاهش چشمگیری یافت. در گیاهان هم خانوادهٔ گل قرنفل (میخک سانان) نیز تحقیقاتی کمی در خصوص تنش خشکی صورت گرفته است. Alvarez و همکاران (۲۰۰۹) در پژوهشی گیاهان میخک را توسط کم آبیاری کنترل شده تنش داده و مشاهد نمودند که با افزایش میزان تنش، وزن خشک، ارتفاع گیاه و سطح برگ کاهش می‌یابد. نوری‌کوتنایی و همکاران (۱۳۸۵) در تحقیقی درون شیشه‌ای بر روی گل میخک رقم "سریز رویالت" (Cerise Royallette) دریافتند که کاربرد سالیسیلیک اسید در مقاومت گیاهان به تنش خشکی مؤثر بوده و موجب افزایش میزان پروتئین گیاه می‌گردد.

طبق بررسی‌های صورت گرفته بهینه‌سازی تولید پینه که یکی از گام‌های اولیه و مهم در ریزازدیادی و اصلاح گیاهان به روش‌های مدرن می‌باشد، و همچنین تنش‌های غیرزیستی همچون تنش اسمزی در گل قرنفل مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا در این پژوهش با عنایت به مزایای افزونش درون شیشه‌ای نسبت به سایر روش‌های افزونش و همچنین با توجه به اهمیت گل قرنفل به عنوان یکی از گیاهان زینتی فضای سبز مناطق مرکزی و معتدل کشور، در بخش اول تحقیق، امکان استقرار پینه این گیاه در محیط کنترل شده درون شیشه‌ای توسط ریزنمونه و تنظیم کننده‌های رشد مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در بخش دوم پژوهش نیز تأثیر سطوح مختلف تنش اسمزی توسط پلی اتیلن گلایکول (Polyethylene Glycol-PEG) بر برخی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پینه‌های استقرار یافته گل قرنفل در محیط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پژوهش پیش رو در دو بخش :الف) بهینه سازی تولید پینه و ب) مطالعه تأثیر تنش اسمزی بر پینه‌های گل قرنفل توسط محیط کشت حاوی پلی اتیلن گلیکول انجام گردید.

مواد گیاهی: به منظور بهینه سازی تولید پینه و به دست آوردن پینه گل قرنفل جهت اعمال تنش، بذر گل قرنفل (*Dianthus barbatus* L.) از شرکت پارمیس بذر (اصفهان، ایران) تهیه گردید. درگام نخست درخصوص تولید گیاهان استریل در محیط درون شیشه‌ای به منظور تهیه ریزنمونه اقدام گردید. جهت استقرار گیاهان استریل در محیط درون شیشه‌ای، بذرها در مرحله اول با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی سطحی و سپس به مدت ٦۰ ثانیه در الکل اتانول ۷۰ درصد قرار داده شده و نهایتاً دوبار با آب مقطر دو بار تقطیر استریل در زیر هود لامینار شستشو داده شدند. بذرهای استریل شده در محیط کشت MS پایه (بدون هورمون) با غلظت ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز که pH آن بین ٥/٦ تا ٥/۸ تنظیم گردیده بود، درون ظروف کشت شیشه‌ای حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت با قطر۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۰ سانتی متر کشت گردیدند. بذرهای کشت شدهٔ مذکور به مدت چهار هفته درون ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند تا به اندازه مناسب برای تهیه ریزنمونه استریل برسند.

بهینه سازی تولید پینه در گل قرنفل: جهت پینه‌زایی از

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]

گیاهان استریل درون شیشه‌ای، ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه تهیه و بر روی محیط کشت MS غنی شده با سطوح مختلف هورمون‌های سیتوکنین (بنزیل آمینوپورین–BAP) (در سطوح ۲ و ٤ میکرومول) و اکسین کشت گردیدند. اکسین‌های مورد استفاده نفتالین استیک اسید (NAA) (در سطوح ٤ و ٦ میکرومول) و یا 2,4-D (در سطوح ٤ و ٦ میکرومول) بود. ریزنمونه‌های کشت شده در فواصل زمانی ۳ روزه مورد بررسی و شاخص‌های مختلف مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. شاخص‌های مورد مطالعه عبارت بودند از: درصد کلروزه و نکروزه شدن ریزنمونه‌ها، درصد پینه‌زایی، رنگ و نوع بافت پینه‌ها، وزن تر و خشک پینه‌ها و میزان رشد پینه‌ها.

تأثیر تنش اسمزی بر پینه‌های گل قرنفل: جهت مطالعه تأثیر تنش اسمزی بر پینه‌های گل قرنفل، پینه‌های حاصل در بخش اول آزمایش به منظور پرآوری (تکثیر) بر روی مناسبترین ترکیب هورمونی پینه زایی (MS غنی شده با ۲ میکرومول بنزیل آمینوپورین و ٦ میکرومول نفتالین استیک اسید) کشت و زیرکشت گردیدند تا حجم مناسب پینه جهت اعمال تنش به دست آمد. سپس پینه‌های پرآوری شده بر روی محیط کشت بهینه پینه زایی حاوی میزان مختلف پلی اتیلن گلیکول ٦۰۰۰ (ساخت شرکت مرک، آلمان) به منظور اعمال تنش اسمزی کشت گردیدند. سطوح مختلف تنش اسمزی شامل ٦ سطح صفر، ۱–، ۳–، ٦–، ۹– و ۱۲– بار بود. جهت به دست آوردن میزان پلی اتیلن گلیکول مورد نیاز جهت تنظیم پتانسیل اسمزی موردنظر از فرمول پیشنهادی Michel و Kaufmann (۱۹۷۳) استفاده گردید. پینه‌های تنش یافته در فواصل زمانی ۵ روزه مورد بررسی و برخی شاخص‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در آنها مورد مطالعه قرار گرفت. شاخص‌های 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، رشد پینه‌های تحت تنش، میزان محتوی پروتئین کل، میزان محتوی اسمولیت گلیسین–بتائین، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در پینه‌های تنش یافته.

شرایط آزمایش: شرایط محیطی نگه‌داری ریزنمونه درون دستگاه ژرمیناتور در بخش بهینه سازی تولید پینه و همچنین شرایط محیطی نگه‌داری پینه‌های تحت تنش اسمزی دمای ۲۵–۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۲۵ درصد با فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود.

پینه زایی: پینه زایی (بر حسب درصد) توسط شمارش تعداد ریز نمونه‌هایی که پینه در آنها القاء شده با تعداد ریز نمونه‌ها که کشت گردیده بودند محاسبه گردید. پینه‌های کلروزه و نکروزه (بر حسب درصد) نیز در پایان آزمایش یادداشت برداری گردیدند.

رشد پینه: اندازه پینه‌ها توسط اندازه‌گیری طول وعرض پینه بوسیله کاغذ شطرنجی و محاسبه قطر پینه توسط فرمول زیر طبق روش کامپتون (Compton, 1994) (فرمول ۱) محاسبه گردید. اندازه‌گیری پینه در بخش بهینه سازی تولید پینه در بازه‌های زمانی ۸ روزه و در بخش مطالعهٔ اثر تنش در بازه‌های زمانی ۵ روزه صورت گرفت.

$$\text{قطر کالوس} = \sqrt{\text{عرض} \times \text{طول}} \qquad \text{(فرمول ۱)}$$

وزن تر و وزن خشک پینه: وزن تر پینه‌ها در پایان آزمایش توسط ترازو دیجیتال با دقت یک ده هزارم گرم و وزن خشک همان پینه‌ها پس از قرار دادن آنها درون آون به مدت ۸ ساعت در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد توسط ترازو دیجیتال اندازه گیری گردید.

میزان پروتئین کل پینه‌های تنش یافته: میزان پروتئین کل پینه‌های تنش یافته به روش Bradford (۱۹۷٦) اندازه‌گیری گردید. در این روش۰/۲ گرم از بافت تازهٔ پینهٔ 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=٦/۸) هموژن گردید. سپس محلول هموژن شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد، سانتریوفیوژ گردید. فاز بالایی عصاره (محلول فوقانی) به دست آمده جهت اندازه‌گیری مقدار پروتئین محلول به میکروتیوپ جدید منتقل

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]

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 را در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه طیف سنج یو وی-مرئی قرائت گردید.

میزان گلاسین-بتائین: میزان گلاسین-بتائین (Glycine-Betaine) توسط روش Grieve و Grattan (۱۹۸۳) 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 ٢٤ 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 $KI-I_2$ به آن اضافه نموده و در دمای ٤ درجه سانتی-گراد به مدت ١٦ ساعت نگه‌داری گردید. بعد از سپری شدن مدت مذکور، محلول واکنش را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده و محلول فوقانی دور ریخته گردید. کریستال‌های ته‌نشین شده در ۵ میلی لیتر 1,2-dichloroethane حل و پس از گذشت ۲ ساعت میزان جذب در طول موج ٣٦٥ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج یو وی-مرئی اندازه‌گیری گردید.

آماده سازی عصاره آنزیمی: بافت گیاهی پینه‌های تنش یافته توسط ۵۰ میلی مول بافر فسفات سدیم (با pH=۷/۰) حاوی ۱ مول کلرید سدیم، ۱ درصد پلی ونیل پیرولیدین و ۱ میلی مول EDTA بر روی یخ همژنیزه و خرد گردیدند. سپس با دور ۲۰۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و محلول فوقانی که عصاره آنزیمی پینه‌های تنش یافته بود، جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم‌ها در دمای ۲۰- نگه‌داری گردیدند و سپس در مرحلهٔ اندازه گیری فعالیت آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز: میزان فعالیت آنزیم کاتالاز توسط مصرف پراکسید هیدروژن در طول موج ٢٤٠ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه توسط روش Aeby (١٩٨٤) با کمی تغییرات به کمک دستگاه طیف سنج یو وی-مرئی اندازه‌گیری گردید. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میلی مول بافر فسفات پتاسیم (با pH=۷/۰)، ۱۵ میلی مولار پراکسید هیدروژن و ۵۰ میلی لیتر عصاره گیاهی (تهیه شده در مرحله فوق الذکر) و رساندن به حجم ۳ میلی لیتر 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 Kar و Mishra (١٩٧٦) صورت گرفت. در این روش ابتدا مخلوط آزمایش تهیه گردید. مخلوط آزمایش که شامل ۱۲۵ میکرومول بافر فسفات (با pH=٦/٨)، ۵۰ میکرومول پیروگالول (Pyrogallol) و ۵۰ میکرومول پراکسید هیدروژن بود را ابتدا تهیه و سپس یک میلی لیتر 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 نگه‌داری شد. بعد از گذشت مدت مذکور، ۰/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک با نسبت حجمی ۵ درصد جهت متوقف شدن آزمایش به آن اضافه گردید. میزان پوپوروگالین (Purpurogallin) تشکیل شده توسط قرائت میزان جذب در طول موج ٤٢٠ نانومتر به وسیله دستگاه طیف سنج یو وی-مرئی مشخص گردید.

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز: میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز بر اساس روش Minami و Yoshikawa (١٩٧٩) توسط بافر نمک تریس کلسیم کدلیک (Tris-Ca-Codylic) (با pH=٨/٢) حاوی ۰/۱ میلی مولار EDTA توسط دستگاه طیف سنج یو وی-مرئی در طول موج٥٦٠ نانومتر اندازه‌گیری گردید. مخلوط واکنش حاوی ۱/٤٢ درصد تریتون X-۱۰۰ (Triton 100-x)، ۰/۰۵۵ میلی مولار نیتروبلوتترازولیوم (nitroblue tetrazolium)(NBT)، ١٦ میلی مول پیروگالول و عصارهٔ آنزیمی حاوی ۵۰ میلی گرم

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]

پروتئین بود. واحد فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز (SOD) طبق تعریف McCord و Fridovich (۱۹٦۹) به میزان آنزیم مورد نیاز برای بازدارندگی ۵۰ درصد فعالیت کاهنده نیتروبلوتترازولیوم در دقیقه تعریف گردید.

آنالیز داده‌ها: آزمایش بهینه سازی تولید پینه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار انجام گردید. فاکتور اصلی نوع ریزنمونه و فاکتور فرعی سطوح مختلف هورمونی مورد استفاده بودند. جهت اعمال تنش اسمزی، نیز از طرح آزمایشی کاملاً تصادفی (شامل ٦ سطح تنش در پنج تکرار) استفاده گردید. داده‌های هر دو بخش (پینه زایی و تنش اسمزی) به کمک نرم افزار SAS 16.0 مورد واکاوی آماری (تجزیه واریانس) قرار گرفت. میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan Multiple Range Test) در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

الف) بهینه‌سازی تولید پینه: نتایج آزمایش نشان داد که رنگ و نوع بافت پینه گل قرنفل متأثر از نوع ریز نمونه و ترکیب هورمونی مورد استفاده جهت پینه زایی بوده است. به طور کلی بافت پینه تولید شده در کلیه ریزنمونه‌ها و ترکیب هورمونی، سفت (خشبی) آبدار بود. رنگ پینه‌ها نیز متأثر از نوع ریزنمونه بود به نحوی که پینه‌های به دست آمده از ریزنمونه‌های برگ، سبز رنگ و رنگ پینه‌های به دست آمده از ریزنمونه‌های ریشه و همچنین ساقه زرد رنگ بود. همانند پژوهش پیش‌رو، Radojevic و همکاران (۲۰۱۰) نیز در پژوهش خود بر روی دو گونه دیگر جنس *Dianthus* به نام‌های *D. ciliates* و *D. giganteus* دریافتند که رنگ پینه‌های ساقه نیز زرد رنگ می‌گردد.

به طور کلی میزان پینه زایی گل قرنفل در محیط درون شیشه ای از میزان بالایی برخوردار بود. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که نوع ریزنمونه بر میزان پینه زایی ریزنمونه‌ها تأثیر معنی‌داری درحد یک درصد دارد. همچنین برهمکنش نوع ریزنمونه و ترکیب تنظیم کننده رشد مورد استفاده نیز تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد در پینه‌زایی ریزنمونه‌ها داشت. بیشترین میزان پینه زایی در ریزنمونه‌های برگ به میزان ۹۸/۷۵ درصد و کمترین میزان آن در ریزنمونه‌های ریشه به میزان ۷۵/۰ درصد مشاهده گردید (جدول ۱). در ریزافزایی و کشت بافت گونه‌های مختلف دیانتوس (*Dianthus*) از ریزنمونه‌های مختلف استفاده گردیده است. بیشتر پژوهش های صورت گرفته از نوک شاخساره به عنوان ریزنمونه جهت افزونش استفاده نموده‌اند. به عنوان مثال ترابی و همکاران (۱۳۸۰) جهت ریزافزایی میخک از ریزنمونه نوک شاخساره استفاده نمودند. همچنین خرازی و همکاران (۱۳۹۲)، Pareek و همکاران (۲۰۰٤)، Raobjevic و همکاران (۲۰۱۰) در پژوهش خویش از ریزنمونهٔ نوک شاخساره استفاده نمودند. این درحالی است که خرازی و همکاران (۱۳۹۰) در پژوهش دیگر خویش، از ریزنمونه جوانه جانبی جهت افزونش درون شیشه ای گل میخک استفاده نمودند. از سوی دیگر دلجو و همکاران (۱۳۸٤) و همچنین کرمی و همکاران (۱۳۸۷) در پژوهش‌های خویش بر روی ارقام میخک از ریزنمونه گلبرگ استفاده نمودند. Pareek و Kothari (۲۰۰۳) همانند پژوهش پیش رو از ریزنمونه‌های برگ جهت جنین زایی سوماتیکی استفاده نمودند.

درخصوص تنظیم کننده‌های مختلف رشد مورد استفاده، از بین سطوح مورد استفاده در بین تیمارهای حاوی ترکیب شبه اکسین 2,4-D، بیشترین درصد پینه زایی مربوط به تیمار ٤ میکرومول 2,4-D + ٤ میکرومول BAP و در بین تیمارهای حاوی اکسین NAA، بیشترین درصد پینه زایی مربوط به تیمار ٦ میکرومول NAA + ۲ میکرومول BAP هر دو به میزان ۱۰۰ درصد بوده است. کمترین میزان پینه زایی نیز مربوط به تیمار ٤ میکرومول NAA + ۲ میکرومول BAP بود که به میزان ۷۰ درصد مشاهده گردید (جدول ۲).

ترابی و همکاران (۱۳۸۰) جهت ریزافزایی میخک از غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های زئاتین، کایتین، ایندول بوتریک اسید، نفتالین استیک اسید و بنزیل آمینوپورین استفاده نمودند. آنها دریافتند که نفتالین استیک اسید در مقایسه با سایر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]

جدول ۱- تأثیر نوع ریزنمونه بر پینه زایی و وزن پینه‌های گل قرنفل در محیط درون شیشه‌ای

ریزنمونه	پینه زایی (٪)	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)
برگ	۹۸/۷۵^{a†}	۰/۳۰^{a}	۰/۰۲۰^{a}
ساقه	۸۸/۳^{a}	۰/۱۷^{b}	۰/۰۱۲^{b}
ریشه	۷۵/۰^{b}	۰/۰۷۵^{c}	۰/۰۰۶^{c}

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

جدول ۲- تأثیر تنظیم کننده‌های رشد مختلف بر پینه‌زایی و وزن پینه‌های در گل قرنفل در محیط درون شیشه‌ای

تیمارها	پینه زایی (٪)	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)
٤ میکرومول NAA + ۲ میکرومول BAP	۷۰/۰۰^{c†}	۰/۲۳^{a}	۰/۰۱۳^{ab}
٦ میکرومول NAA + ۲ میکرومول BAP	۱۰۰^{a}	۰/۲٦^{a}	۰/۰۱۷^{a}
٤ میکرومول NAA + ٤ میکرومول BAP	۹۱/۱۱^{a}	۰/۱۷^{ab}	۰/۰۱۳^{ab}
٦ میکرومول NAA + ٤ میکرومول BAP	۸۷/۷۷^{ab}	۰/۱٦^{ab}	۰/۰۱۳^{ab}
٤ میکرومول 2,4-D + ۲ میکرومول BAP	۹۰/۰۰^{ab}	۰/۱۵^{ab}	۰/۰۱۰^{b}
٦ میکرومول 2,4-D + ۲ میکرومول BAP	۷۳/۳۳^{c}	۰/۰۹^{b}	۰/۰۰۹^{b}
٤ میکرومول 2,4-D + ٤ میکرومول BAP	۱۰۰^{a}	۰/۱۸^{ab}	۰/۰۱۳^{ab}
٦ میکرومول 2,4-D + ٤ میکرومول BAP	۸٦/٦٦^{ab}	۰/۲۰^{ab}	۰/۰۱۳^{ab}

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

درصد تولید پینه در غلظت یک میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید به دست آمد. این درحالی است که در پژوهش حاضر غلظت بهینه تولید پینه توسط تنظیم کنندهٔ رشد نفتالین استیک اسید بالای ٤ میکرومول بود. Rabojevic و همکاران (۲۰۱۰) در پژوهش خویش جهت ریزافزایی گونه‌های مختلف دیانتوس استفاده از اکسین NAA و سایتوکنین BAP را توصیه نمودند. در پژوهش‌های پیشین بر روی جنس دیانتوس، از تنظیم کننده‌های رشد مشابه پژوهش پیش رو استفاده گردیده است.

خرازی و همکاران (۱۳۹۲) پرآوری دو رقم میخک "اسکیمو" (Eskimo) و "اینو اورنج" (Innove Orange) را شدیداً متأثر از غلظت هورمونی دانسته و توصیه نمودند از غلظت کم BAP استفاده گردد. Pareek و Kothari (۲۰۰۳) در بهینه سازی پروتوکول جنین زایی سوماتیکی چند گونه مهم جنس دیانتوس از جمله قرنفل ازتنظیم کننده رشد 2,4-D به میزان یک میلی گرم در لیتر استفاده نمودند. دلجو و همکاران (۱۳۸٤) در پژوهش خویش بر روی چهار رقم میخک مشاهده نمودند که 2,4-D به همراه سایتوکنین بنزیل آدنین موجب تشکیل پینه‌های جنین‌زا می‌گردد. این درحالی است که در پژوهش حاضر هیچگونه جنین سوماتیکی در ریزنمونه‌های برگ و سایر ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت حاوی 2,4-D، مشاهده نگردید. کرمی و همکاران (۱۳۸۷) علاوه بر استفاده از تنظیم کنندهٔ رشد 2,4-D، از غلظت‌های مختلف پیکلورام جهت جنین زایی سوماتیکی میخک‌های "نلسون" (Nelson) و "ایمولس" (Impulse) استفاده نمودند. در پژوهش دیگری Pareek و همکاران (۲۰۰٤) به طور موفقیت آمیز از تنظیم کننده‌های رشد NAA به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و BAP به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر جهت ریزافزایی سه گونه جنس دیانتوس ازجمله قرنفل استفاده نمودند. NAA توسط محققین مختلفی از جمله Jain و همکاران (2006) و Radojevic (2007) جهت تکثیر گونه‌های مختلف دیانتوس مورد استفاده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]

قرار گرفته است. تحقیق پیش رو اولین گزارش کاربرد تنظیم کننده رشد 2,4-D و تأثیر مثبت آن در این جنس می‌باشد. این درحالی است که در بیشتر تحقیقات همانند پژوهش پیش رو تنها از سایتوکنین BAP استفاده شده است.

لازم به ذکر می‌باشد سازگاری غلظت و نوع تنظیم کننده های رشد مورد استفاده به نحوی مطلوب بود که علاوه بر میزان بالای پینه زایی، هیچ پینه کلروزه یا نکرزه‌ای در بخش بهینه سازی تولید پینهٔ پژوهش پیش رو مشاهده نگردید.

وزن ریزنمونه: نتایج نشان داد نوع ریزنمونه تأثیر معنی داری بر وزن تر و خشک پینه‌های حاصله دارد. پینه حاصل از ریزنمونه برگ بیشترین وزن تر به میزان۰/۳۰ گرم و همچنین بیشترین میزان وزن خشک به میزان ۰/۰۲۰ گرم را به خود اختصاص دادند. در حالیکه پینه‌های حاصل از ریزنمونه‌های ریشه کمترین میزان وزن به میزان ۰/۰۷۵ گرم و وزن خشک به میزان ۰/۰۰٦ گرم را به خود اختصاص دادند (جدول ۱). در بین تیمارهای هورمونی مورد استفاده، بیشترین وزن تر و خشک پینه در تیمار ٦ میکرومول NAA + ۲ میکرومول BAP به ترتیب به میزان ۰/۲٦ و ۰/۰۱۷ گرم و کمترین میزان وزن تر و خشک پینه در تیمارهای ٤ میکرومول 2,4-D + ۲ میکرومول به ترتیب به میزان ۰/۰۹ و ۰/۰۰۹ گرم مشاهده گردید (جدول ۲). همچنین نتایج نشان داد که میزان وزن تر و خشک با میزان پینه زایی ریزنمونه‌های گل قرنفل همبستگی دارد.

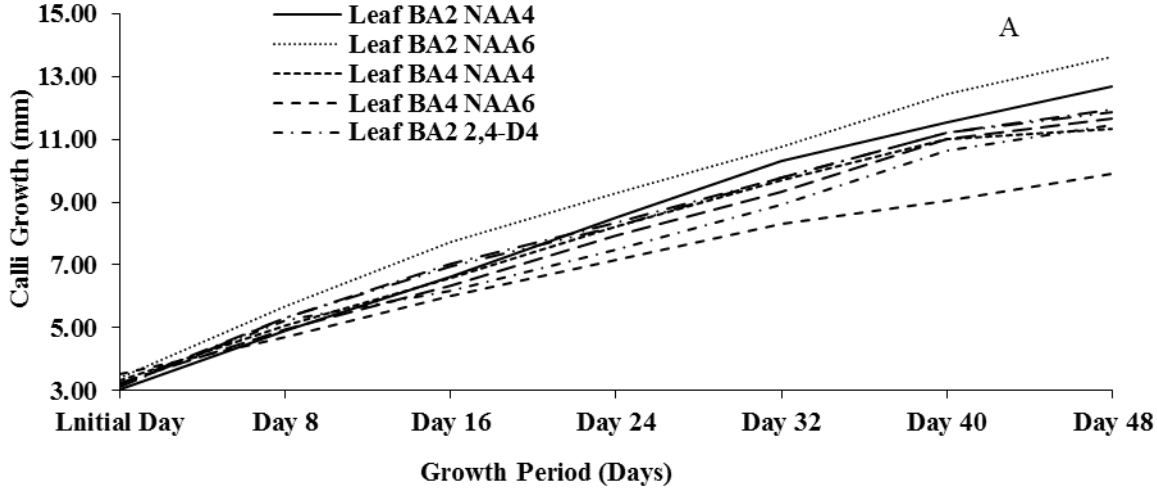
رشد پینه: بیشترین رشد پینه در پینه‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و در تیمارهای ٤ میکرومول NAA + ۲ میکرومول BAP و ٦ میکرومول NAA + ۲ میکرومول BAP مشاهده گردید (شکل ۱). این در حالی بود که کمترین رشد در پینه‌های حاصل از ریزنمونه ریشه مشاهده گردید. در بین ریزنمونه‌های برگ، بیشترین رشد در ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشد اکسین نفتالین استیک اسید (٤ و ٦ میکرومول) و ۲ میکرومول سایتوکنین بنزیل آمونوپورین و کمترین آن در ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت حاوی ٦ میکرومول NAA + ٤ میکرومول BAP مشاهده گردید (شکل ۱). در بین ریزنمونه‌های ساقه بیشترین رشد در ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت حاوی ٤ میکرومول NAA + ۲ میکرومول BAP و ٦ میکرومول NAA + ۲ میکرومول BAP و همچنین کمترین میزان رشد در ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت حاوی ٤ میکرومول 2,4-D + ۲ میکرومول BAP مشاهده گردید. به طور کلی ریزنمونه‌های ریشه کمترین رشد را داشتند. در بین تیمارهای مختلف، ریزنمونه‌های ریشه کشت شده بر روی محیط کشت حاوی ٤ میکرومول NAA + ٤ میکرومول BAP بیشترین رشد را به خود اختصاص دادند. این درحالی بود که ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت حاوی ٤ میکرومول NAA + ۲ میکرومول BAP و ٦ میکرومول NAA + ٤ میکرومول BAP رشد ننمودند.

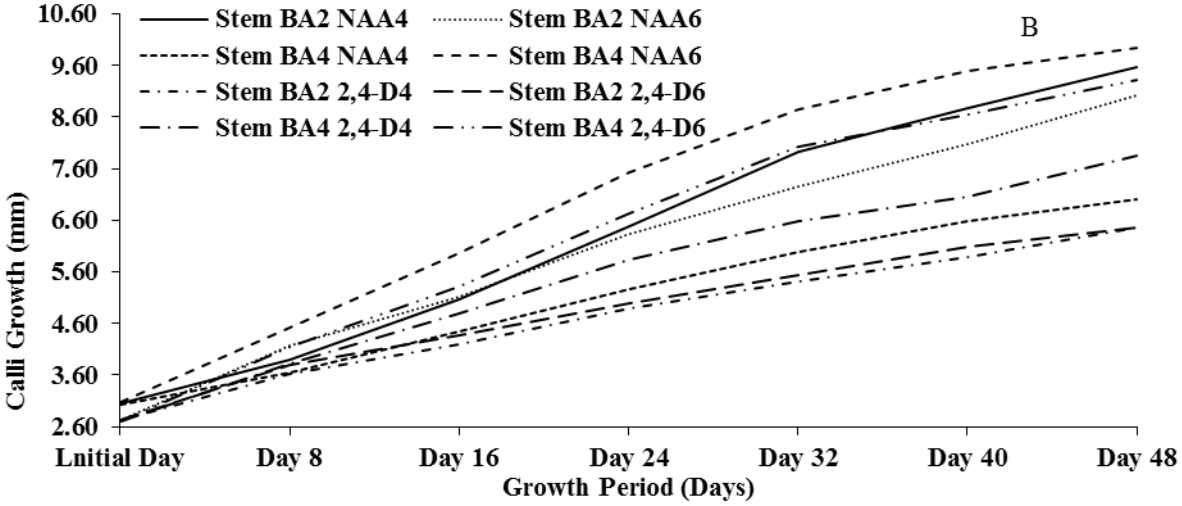
ب) تأثیر تنش اسمزی: همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، با اعمال تنش اسمزی توسط پلی اتیلن گلایکول، رشد پینه‌های گل قرنفل تحت تأثیر تنش اسمزی قرار گرفت. میزان رشد پینه‌ها با افزایش غلظت پلی اتیلن گلایکول و افزایش پتانسیل اسمزی ایجاد شده، کاهش یافت. این کاهش رشد به نحوی بود که بعد از گذشت ۲۰ روز از اعمال تنش اسمزی در کمترین سطح تنش (۱- بار)، رشد پینه‌ها به میزان تقریبی یک سوم رسید. این امر نشان دهنده حساسیت گل قرنفل و تنش اسمزی در محیط درون شیشه‌ای می‌باشد. کاهش رشد پینه‌ها در بالاترین سطح تنش (۱۲- بار)، به میزان تقریبی یک چهارم رشد در مقایسه با شاهد مؤید این مطلب می‌باشد.

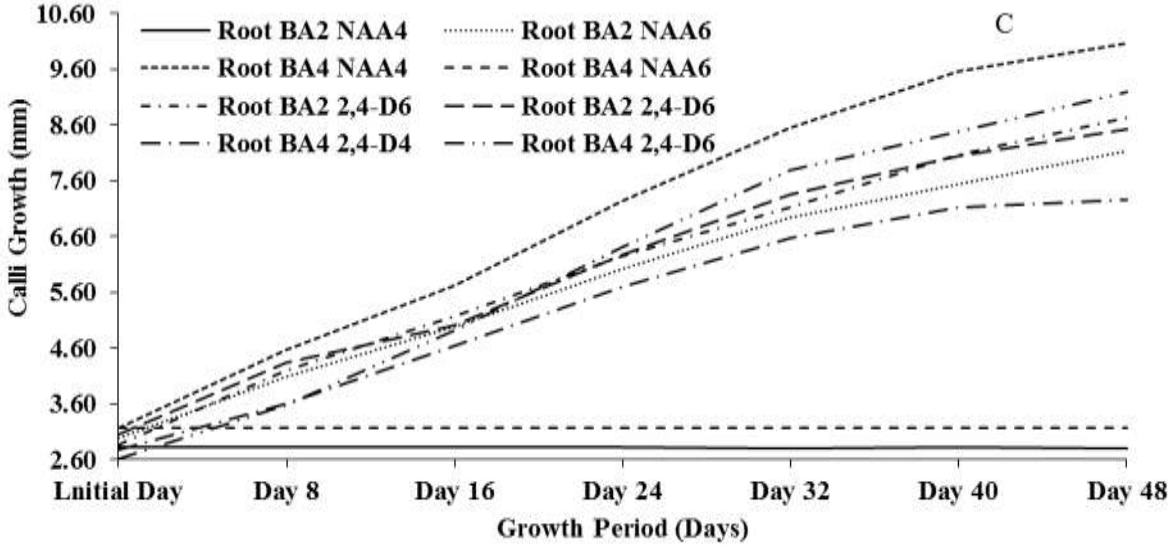
وزن تر و خشک: وزن تر و خشک پینه‌های گل قرنفل همانند رشد آن‌ها تحت تأثیر تنش اسمزی و میزان فشار اسمزی ایجاد شده توسط پلی اتیلن گلایکول قرار گرفت (جدول ۳). با اعمال تنش اسمزی میزان وزن تر به طور معنی داری کاهش یافت و در تیمار ۱- بار به کمتر از نصف خود رسید. با افزایش پتانسیل اسمزی میزان وزن تر کاهش قابل توجهی یافت به نحوی که میزان وزن تر در تیمار ۱۲- بار به یک پنجم تیمار شاهد کاهش یافت. وزن خشک نیز متأثر از رشد و وزن تر الگوی مشابه کاهشی را با اعمال و افزایش تنش اسمزی نشان داد (جدول ۳). کاهش وزن خشک در مقایسه با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]



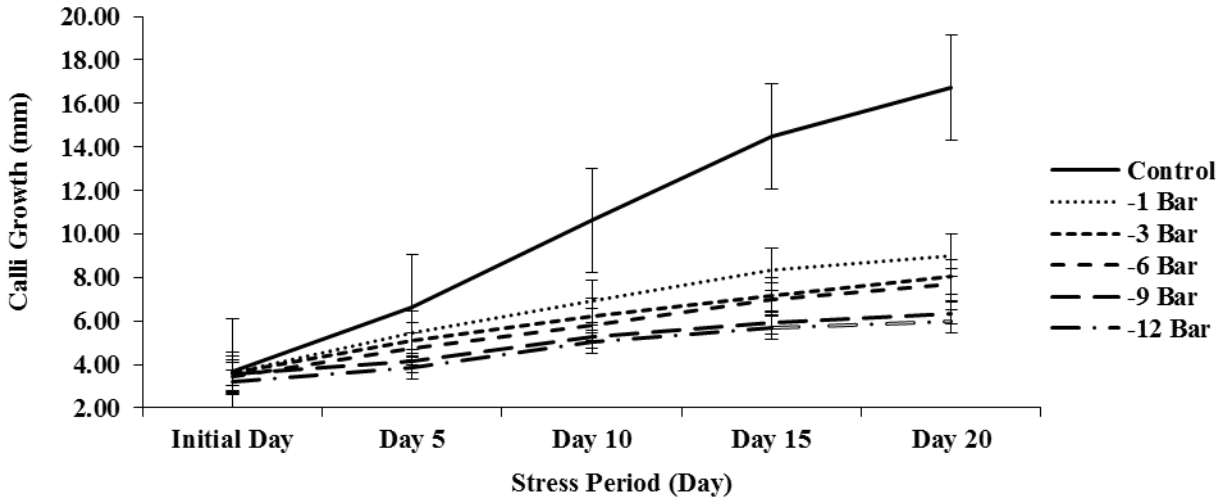




شکل ۱- تأثیر تنظیم کننده‌های رشد مختلف بر رشد پینه‌های حاصل از ریزنمونه‌های مختلف گل قرنفل در محیط درون شیشه‌ای. A) رشد پینه‌های ریزنمونه‌های برگ،B) رشد پینه‌های ریزنمونه‌های ساقه وC) رشد پینه‌های ریزنمونه‌های ریشه.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]



شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف فشار اسمزی ناشی از پلی ایتلن گلیکول بر رشد پینه‌های گل قرنفل تحت تنش در محیط درون شیشه‌ای

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف تنش اسمزی اعمال شده توسط پلی اتیلن گلیکول بر روی وزن پینه‌های گل قرنفل در محیط درون شیشه‌ای

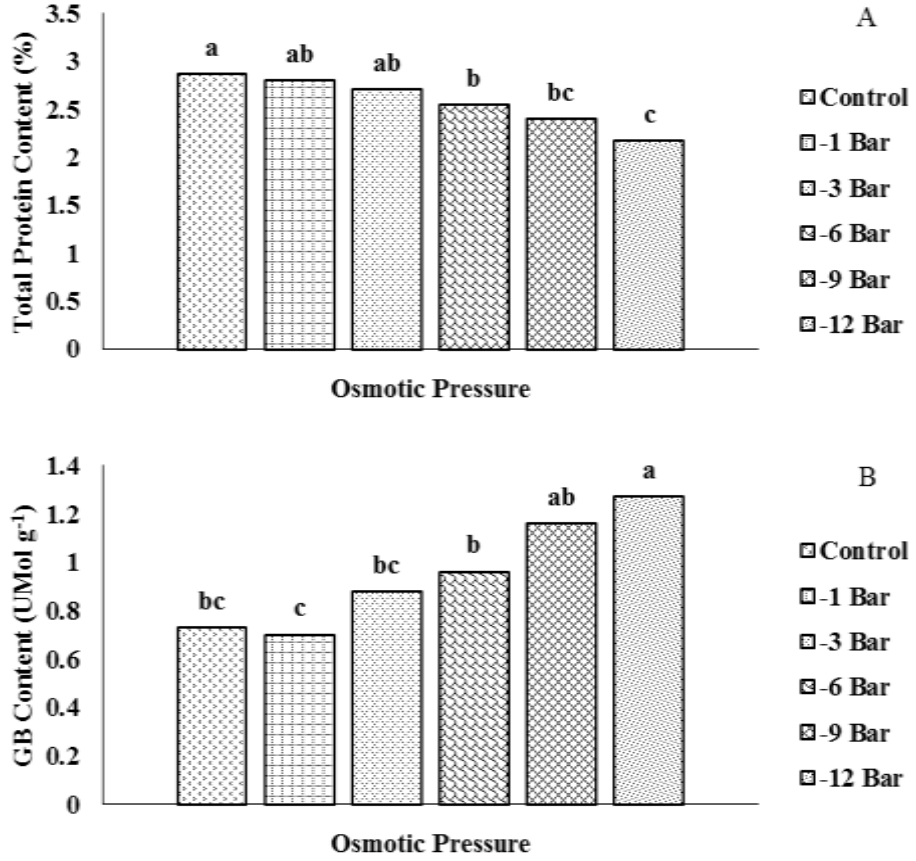
تیمار تنش اسمزی (بار)	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)
صفر (شاهد)	۰/۷۷۵^{a†}	۰/۱۸۹^{a}
-۱	۰/۳۳۰^{b}	۰/۱۰٦^{b}
-۳	۰/۳۲٥^{b}	۰/۰۹۷^{bc}
-٦	۰/۲۸٤^{bc}	۰/۰۸۷^{bcd}
-۹	۰/۲۰۲^{cd}	۰/۰٦۹^{cd}
-۱۲	۰/۱٥۷^{d}	۰/۰٦٥^{d}

† **میانگین‌های دارای حروف مشترک، فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ٥ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن هستند.**

وزن تر، از میزان کمتری برخوردار بود به نحوی که میزان وزن خشک در تیمار ۱۲- بار به یک سوم تیمار شاهد کاهش یافت. این مسئله علاوه بر کاهش رشد پینه‌ها به دلیل کمبود آب در دسترس بوده است به نحوی که کاهش وزن در اثر خشک نمودن پینه‌ها موجب کاهش یک چهارمی وزن در تیمار شاهد گردید. این درحالی است که کاهش وزن در اثر خشک شدن پینه‌های تنش یافته در تیمار ۱۲- بار نصف وزن تر بود. Khakshor Moghaddam و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای به بررسی تأثیر تنش اسمزی بر ریزنمونه‌های گیاه شوید نمودند. آنها دریافتند که وزن تر و خشک ریزنمونه‌های گیاه شوید به طور معنی‌داری از تنش شوری متأثر می‌گردند به نحوی که در تیمار پتانسیل اسمزی ۳- بار، کاهش وزن تر و خشک به ترتیب ٦٥/۱ و ٥۲/٤ درصد شاهد بود. آنها دلیل کاهش وزن تر در پینه‌های تیمار شده با تنش اسمزی را ناشی از ممانعت توسعه و رشد سلولی به دلیل کاهش فشار تورژسانس ذکر کردند که این مسأله در خصوص پینه‌های تنش یافته گل قرنفل نیز صادق است.

پروتئین کل: میزان پروتئین کل در پینه‌های گل قرنفل نیز تحت تأثیر تنش اسمزی قرار گرفت. با اعمال تنش اسمزی، میزان پروتئین کل در پینه‌های گل قرنفل تنش یافته کاهش یافت (شکل ۳). میزان کاهش پروتئین کل با افزایش سطح تنش افزایش یافت به نحوی که در پینه‌های تحت تنش ۱۲- بار در مقایسه با شاهد ۰/۷ درصد از پروتئین کل آنها کاسته شد. میزان کاهش پروتئین با کاهش فشار بیش از ٦- بار

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]



شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف فشار اسمزی بر پروتئین کل (a) و اسمولیت بتائین-گلاسین (b) در پینه‌های گل قرنفل تحت تنش اسمزی در محیط درون شیشه‌ای

اختلاف معنی‌داری با شاهد یافت در حالیکه قبل از این میزان از تنش، کاهش پروتئین کل اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت. تحقیقات نشان داده است که میزان پروتئین بافت گیاهی از سطح تنش متأثر است. علاوه بر تنش، میزان پروتئین از فاکتورهای دیگر نیز متأثر می‌باشد. در پژوهشی، حیدریان و همکاران (۱۳۹۵) دریافتند که غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد به خصوص BAP و NAA بر میزان پروتئین کل پینه‌های گل میخک تأثیرگذار است. در پژوهشی دیگر، نوری کوتنایی و همکاران (۱۳۸۵) ریزنمونه‌های میخک رقم "سریز رویالت" را بر روی محیط کشت حاوی NAA و BAP مستقر نموده و تغییرات بیوسنتزی پروتئین را توسط تیمار آنها با سالیسلیک اسید توسط روش برادفورد بررسی نموده و مشاهده کردند که تیمار ریزنمونه‌های میخک مذکور موجب افزایش قابل توجه میزان پروتئین می‌گردد. تحت تأثیر قرار گرفتن میزان پروتئین کل در اثر تنش در پینه‌های گیاهان مختلف گزارش گردیده است. به طور کلی، تنش اسمزی سبب کاهش پروتئین کل در گیاهان می‌گردد. نتایج این پژوهش نیز مؤید همین مطلب می‌باشد. تخریب پروتیین‌ها و انباشت برخی از اسیدهای آمینه به منظور حفظ و تنظیم فشار اسمزی تحت شرایط تنش اسمزی در گیاهان زینتی مختلف گزارش شده است (Izoo *et al.*, 1990). در فرآیند تخریب پروتیین‌ها، پروتئین‌ها به وسیله پروتئازها هیدرولیز می‌شوند تا آمینو اسیدها را برای ذخیره شدن، انتقال و نهایتاً تنظیم فشار اسمزی سلول افزایش دهند. کارکردهای پیشنهادی برای تنظیم اسمزی از طریق تجمع آمینو اسیدهای آزاد شده از پروتئین‌ها تحت تنش عبارتند از: محافظت از ماکرومولکول‌های سلولی، ذخیره نیتروژن، ثابت نگه داشتن pH سلول، سمیت-زدایی سلول‌ها و مهار رادیکال‌های آزاد (Paridaa *et al.*, 2004).

گلایسین-بتائین: اسمولیت گلایسین-بتائین که از اتصال

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]

دو اسید آمینه گلایسین و بتائین حاصل می‌گردد (و معمولاً در شرایط تنش از شکسته شدن پروتئین به دست می‌آید)، با افزایش سطح تنش در پینه‌های گل قرنفل از روند متفاوتی در مقایسه با پروتئین کل پیروی نمود (شکل ۳). در ابتدا با اعمال تنش ۱- بار، میزان گلایسین-بتائین کاهش جزئی و غیر معنی-دار و سپس با کاهش بیشتر میزان پتانسیل اسمزی، میزان این اسمولیت افزایش معنی‌داری یافت. میزان افزایش این اسمولیت در پینه‌های تنش یافته ۱۲- بار در مقایسه با پینه‌های تنش یافته ۱- بار به میزان تقریبی دو برابر افزایش یافت. افزایش میزان گلایسین-بتائین و یا به عبارت دیگری تجمع گلایسین-بتائین تحت شرایط تنش کم آبی و شوری یکی از مکانیزم‌های رایج مقابله با تنش است بدون آنکه در فعالیت‌های حیاتی سلول تأثیر منفی بگذارد (Park *et al.*, 2006). تجمع اسمولیت‌ها (Osmolytes) همچون گلایسین-بتائین در سلول‌های تحت تنش به محافظت گیاهان در مقابل تنش‌های غیرزیستی از طریق Osmo-regulation یا Osomo-protection کمک می کند (Giri, 2011). گزارش شده که گیاهانی که به صورت طبیعی گلایسین-بتائین در خود تجمع می‌دهند تحت شرایط کم آبی و شوری به خوبی رشد می‌کنند (Chen and Murata, 2002 and 2008). تحقیقات نشان داده که ارقام مقاوم و حساس بسته به میزان تجمع گلایسین-بتائین، سطوح مختلف مقاومت به تنش از خود نشان می‌دهند (Chen and Murata, 2008). همچنین Park و همکاران (۲۰۰٦) گزارش دادند که کابرد خارجی گلایسین-بتائین رشد و درصد زنده ماندن گیاهان تحت تنش‌های مختلف را بهبود می‌بخشد. در پژوهش پیش رو نیز میزان تجمع اسمولیت گلاسین-بتائین در پینه‌های تنش یافته گل قرنفل با افزایش سطح تنش اسمزی، افرایش یافت و این افزایش به نحوی در مقاومت پینه‌ها مؤثر بود که هیچ پینه کلروزه و یا نکروزه حتی در سطح تنش ۱۲- بار مشاهده نگردید.

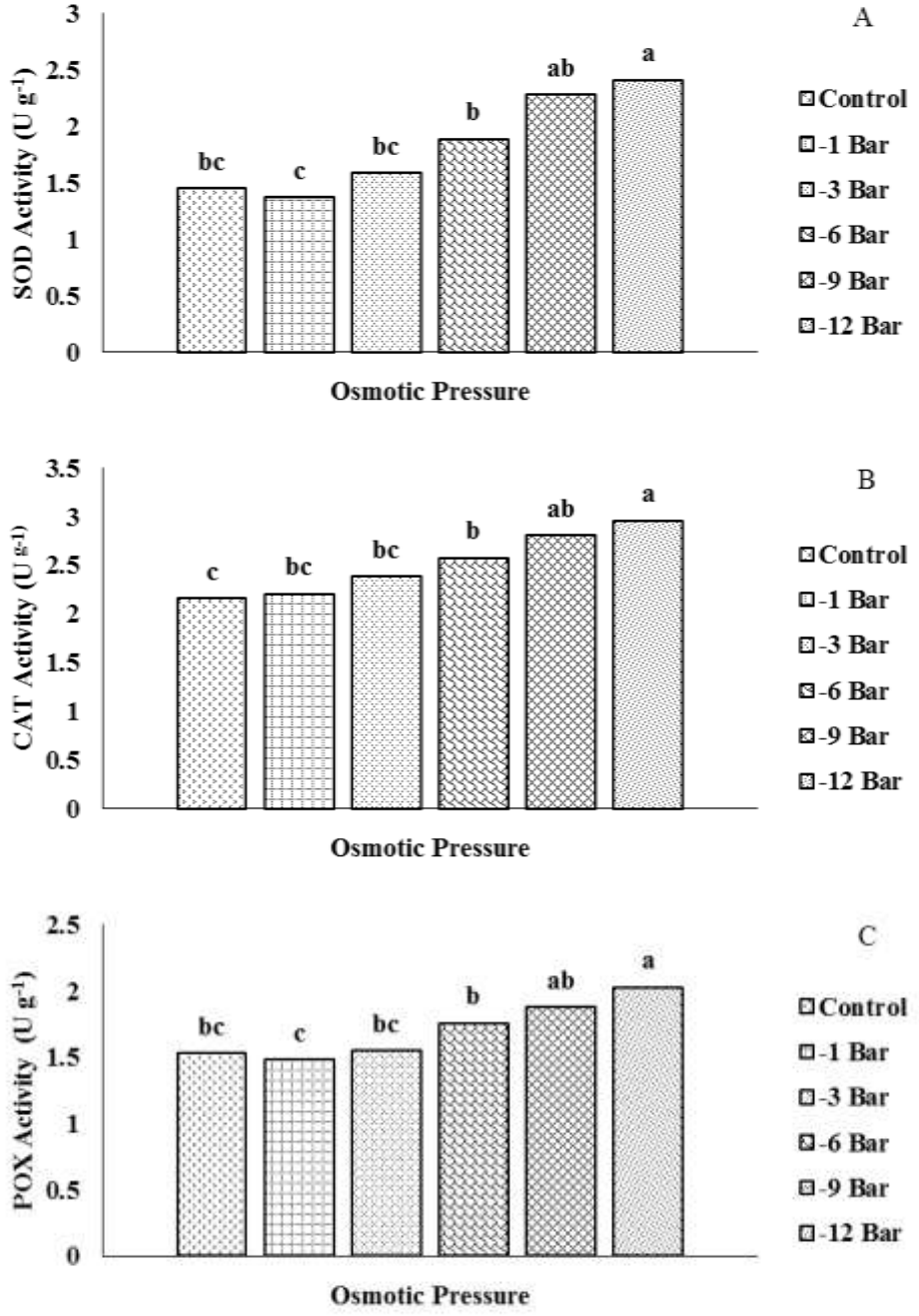
آنزیم‌های شکار کنندهٔ رادیکال‌های آزاد: میزان فعالیت آنزیم‌های شکار کنندهٔ رادیکال آزاد مورد مطالعه در پینه‌های تنش یافته گل قرنفل از الگوی مشابه ولیکن با تفاوت‌های جزئی از همدیگر تبعیت کردند (شکل ٤). میزان فعالیت سوپر اکسید دسموتاز در ابتدا با اعمال تنش اسمزی ۱- بار، مقداری کاهش و سپس به طور معنی‌داری با افزایش پتانسیل اسمزی محیط کشت، افزایش یافت. میزان افزایش در پینه‌های تیمار ۱۲- بار به میزان قابل توجه یک واحد (که معادل میزان آنزیم مورد نیاز برای جلوگیری از احیای ۵۰ درصد نیترو بلوتترازولیوم در دقیقه بود) رسید. این درحالی بود که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت شرایط تنش از روند دیگری پیروی نمود. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از سطوح پایین تنش اسمزی (۱- بار) با افزایش میزان پتانسیل اسمزی محیط کشت افزایش یافت. اگرچه این افزایش در پینه‌های تیمار ۱۲- بار کمتر از یک واحد در گرم بود (شکل ٤).

فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز همانند فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز با اعمال تنش اسمزی ۱- بار ابتدا روند کاهشی و سپس با افزایش پتانسیل اسمزی محیط کشت، فعالیت آن روند صعودی طی نموده و افزایش یافت. در پینه‌های گل قرنفل تنش یافتهٔ تیمار ۱۲- بار، میزان افزایش فعالیت پراکسیداز در مقایسه با شاهد نیم واحد بود (معادل نصف میزان آنزیم مورد نیاز جهت اکسیداسیون یک میلی مول NADPH در دقیقه برای یک میلی گرم پروتئین). میزان افزایش فعالیت پراکسیداز در مقایسه با سوپر اکسید دسموتاز و کاتالاز تحت شرایط تنش در پینه‌های گل قرنفل کمتر بود. در بین آنزیم‌های شکار کننده مورد مطالعه، بیشترین افزایش فعالیت آنزیم در پینه‌های تنش یافته ۱۲- بار در آنزیم سوپر اکسید دسموتاز و کمترین میزان افزایش فعالیت در پینه‌های تنش یافته در آنزیم پراکسیداز مشاهده گردید.

زمانی که گیاهان تحت تنش خشکی و کم آبی قرار می گیرند گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species- ROS) همچون پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال‌های آنیونی سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH)، اکسیژن منفرد (Singlet) ($^1O_2$) و رادیکال‌های آلکوکسی (Alkoxy) تولید می‌شوند (Gill and Tuteja, 2010). گونه‌های فعال اکسیژن با پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA واکنش نشان داده و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]



شکل ٤- تأثیر سطوح مختلف فشار اسمزی بر فعالیت آنزیم‌های شکار کنندهٔ رادیکال آزاد در پینه‌های گل قرنفل تحت تنش در محیط درون شیشه‌ای. A) فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز، B) فعالیت آنزیم کاتالاز و C) فعالیت آنزیم پراکسیداز

موجب آسیب اکسیداتیو و برهم خوردن کارکرد طبیعی سلول های گیاهی می‌گردند. جهت فائق آمدن بر تأثیرات نامطلوب مذکور و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو هنگام تنش، گیاهان سیستم‌های دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی به وجود آورده‌اند که از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن جلوگیری کنند (Miller *et al.*, 2010). مکانیزم‌های آنزیمی تکامل یافته جهت مقابله با تجمع گونه‌های فعال اکسیژن شامل سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و گلوتادیون ردوکتاز (Glutathione Reductase-GR) می‌باشند (Kaushal and Wani, 2015).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهندهٔ پتانسیل بسیار خوب گل قرنفل جهت استقرار پینه به منظور اصلاح این گیاه توسط روش‌های نوین و مدرن اصلاحی همچون انتقال ژن و ویرایش ژنوم می‌باشد. در بین ریزنمونه‌های مختلف استفاده شده، ریزنمونه برگ مناسبترین ریزنمونه و استفاده از تنظیم کننده های رشد ۲ میکرومول BAP + ٦ میکرومول NAA و همچنین ٤ میکرومول BAP + ٤ میکرومول 2,4-D درون محیط کشت MS، به عنوان مناسبترین ترکیب محیط کشت جهت استقرار پینه‌های این گل مشخص گردید. در مطالعات مرتبط با تنش کم آبی، نتایج بررسی‌های درون شیشه‌ای بر روی این گل نشان دهندهٔ مقاومت پینه‌های استقرار یافته به سطوح بالای تنش اسمزی ناشی از پلی اتیلن گلیکول می‌باشد. این مقاومت به نحوی بود که حتی در سطوح بالای تنش، پینه‌های تنش یافته نکروزه و یا حتی کلروزه نگردیدند. دلیل این امر عملکرد مناسب مکانیزم‌های تنظیم فشار اسمزی درون بافت گیاهی از طریق مکانیزم‌های مولکولی همچون تولید اسمولیت‌های گلایسن-بتائین و همچنین فعالیت مناسب و کارآمد آنزیم‌های شکار کنندهٔ رادیکال آزاد همچون سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز تحت شرایط تنش بوده است. به نظر می‌رسد باتوجه به بحران کم آبی و محدودیت‌های پیش‌روی ناشی از آن جهت توسعه فضای سبز شهری و تولید گیاهان دارویی، این گل از پتانسیل مناسبی جهت اصلاح و ایجاد ارقام مقاومتر به شرایط کم آب برخوردار است.

منابع

امیدبیگی، ر. (۱۳۷٤) تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد دوم. انتشارات آستان قدس رضوی. مشهد، ایران. ٤۸۰ ص.

ترابی گیگلو، م.، س. مسیحا، الف، مجیدی، م. خسروشاهی و ولی زاده، م. (۱۳۸۰) تعیین مناسبترین تنظیم کننده رشد در کشت درون شیشه‌ای انتهای شاخساره میخک (*Dinathus caryophyllus* L.). مجله دانش کشاورزی ۱۱: ٤۱-۵۰.

حکمتی، ج. (۱۳۸٦) تزئین گیاهی نمای ساختمان‌ها، جلد ۱، انتشارات نشر علوم کشاورزی،تهران، ایران. ۱۹۷ صفحه.

حیدریان، م.، حیدریان، م. و حیدریان، ک. (۱۳۹۵) تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بر میزان تغییرات فعالیت‌های آنزیمی بر جداکشت‌های میخک قرنفل (*Dianthus barbathus*) در شرایط کشت بافت. دومین همایش ملی علوم زیستی ایران.

خرازی، ص. م.، نعمتی، س. ح.، تهرانی فر، ع.، شریفی، ا. و باقری، ع. (۱۳۹۰) بررسی اثرات نوع و غلظت سیتوکنین بر تکثیر درون شیشه‌ای و میزان شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌های چهار ژنوتیپ میخک. نشریه علوم باغبانی ۲۵: ۳۷٦-۳۸۳.

خرازی، ص. م.، نعمتی، س. ح.، تهرانی فر، ع.، باقری، ع.، و شریفی، ا. (۱۳۹۲) بهینه سازی کشت نوک شاخساره میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) در شرایط درون شیشه‌ای. مجله فناوری زیستی در کشاورزی ۱۲: ۱۱-۱۹.

دلجو، ع.، کرمی، ا.، استاد احمدی، پ، محمودی پور، ع.، و احمدی، ح. (۱۳۸٤) ایجاد کالوس جنین زا و باززایی گیاه در میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، کرمان، ایران.

رستمی، م. و مظاهری، ش. (۱۳۸۹) بررسی اثرات تنش شوری بر جوانه زنی بذر گیاه قرنفل(*Dianthus barbatus*) ، همایش ملی گیاهان دارویی، ساری، جهاد دانشگاهی واحد مازندران، ایران.

عبادی، م. عباسپور، ح. و حیدریان. م. (۱۳۹۲) بررسی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بر جدا کشت‌های میخک قرنفل (*Dianthus barbathus* L.) در شرایط کشت بافت، انجمن گیاهان دارویی ایران.

قاسمی قهساره، م. و کافی، م. (۱۳۹٤) گلکاری علمی و عملی جلد ۱، انتشارات علم آفرین،اصفهان ،۳۱۳ صفحه.

کافی، م.، زند، ا.، کامکار، ب.، عباسی، ف.، و مهدوی، م. (۱۳۹۲) فیزیولوژی گیاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد، ایران. ٦۹۱ ص.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]

کرمی، ا.، کرمی کردستانی، گ. و محمدی، م. (۱۳۸۷) پرآوری پینه‌های رویان زا ،ایجاد رویان بدنی و باززایی گیاه در میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) . نهال و بذر ۲٤: ۷۳۹–۷٤۸.

گودرزی، گ. (۱۳۹۰) اثر برهمکنش پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات و سولفات منیزیم بر میزان پرولین و پروتئین قرنفل (*Dianthus barbatus* L.) در شرایط کشت بافت، اولین کنگره ملی علوم و فناوری‌های نوین کشاورزی، ایران.

نوری کوتنایی، برنارد، ف.، شاکر، ف. و فهیمی، ح. (۱۳۸۵) بررسی تاثیر سالیسیلیک اسید بر تغییرات پروتئین القا شده در کشت بافت گیاه میخک (*Dianthus caryophyllus* L.). مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی ٦٥:٦–٦٨.

Aeby, H. (1984) Catalase *in vitro*. Methods Enzymology 105: 121–126.

Alvarez, S., Navarro, A., Banon, S. and Sanchez-Blanco, M. J. (2009) Regulated deficit irrigation in potted *Dianthus* plants: Effects of severe and moderate water stress on growth and physiological responses. Scientia Horticulturae 122 :579-585.

Azizi, M., Chehrazi, 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: 453-458.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

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.

Chen, T. H. and Murata, N. (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. Current Opinions in Plant Biology 5:250-257.

Chen, T. H. and Murata, N. (2008) Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. Trends Plant Science 13:499–505.

Compton, M. E. (1994) Statistical method suitable for the analysis of plant tissue culture data. Plant Cell Tissue 37: 217-242.

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: 909-930.

Giri, J. (2011). Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. Plant Signaling and Behavior 6:1746-1751.

Grieve, C. M. and Grattan, S. R. (1983) Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. Plant and Soil 70: 303-307.

Izoo, F. N., Quartacausecci, M. F. and Izzo, R. (1990) Water stress induced change in protein and free amino acid in field-grown maize and sunflower. Plant Physiology and Biochemistry 28:531-537.

Jain, S. M., Jenks, M. A., Rout, G. R. and Radojevic, L. (2006) Micro-propagation of ornamental potted plants. Propagation of Ornamental Plants 6: 67-82.

Kabiri, R. and Naghizadeh, M. (2015) Exogenous acetylsalicylic acid stimulates physiological changes to improve growth, yield and yield components of barley under water stress condition. Journal of Plant Physiology and Breeding 5: 35-45.

Kar, M. and Mishra, D. (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology 57: 315-319.

Kaushal, M. and Wani, S. P. (2015) Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. Annals of Microbiology 2: 1-8

Khakshor Moghaddam, Z., Lahouti, M. and Ganjali, A. (2012) Investigating the effects of drought stress on germination and morphological characteristics of the plant (*Anethum graveolens* L.). Journal of Horticulture 25: 185-193.

Mahajan, S. and Toteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stress. An overview archives in biochemistry and biophysics. Annals of Botany 444: 139-458.

McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). Journal of Biological Chemistry 244:6049-6055.

Michel, B. E. and Kaufmann, M. R. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiology 51: 914-916.

Miller, G., Susuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. Plant Cell and Environment 33: 453-467.

Minami, M. and Yoshikawa, H. (1979) A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. Clinical Chemistry Acta 92, 337–342.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]

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.

Pareek, A. and Kothari, S. (2003) Direct Somatic emberyogenesis and plant regeneration form leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. Scientia Horticulturae 98:449-445.

Pareek, A., Kantia, A. and Kothari, S. (2004) *In vitro* cloning of ornamental species of *Dianthus*. Indian Journal of Biotechnology 3: 263-266.

Paridaa, A. K., Dasa, A. B., Mittrac, B. and Mohantyb, P. (2004) Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in the mangrove *Bruguiera parviflora*. Zeitschrift für Naturforschung 59: 408-414.

Park, E. J., Jeknic, Z. and Chen, T. H. (2006) Exogenous application of glycine-betaine increases chilling tolerance in tomato plants. Plant and Cell Physiology 47:706-714.

Radojevic, L. J. (2007) Primena *in vitro* kulture u proizvodnji cveća: Stanje i mogućnosti razvoja cvećarstva u Srbiji. Seminar pejzažne hortikulture, 8-9 februar, 2007, Šumarski Fakultet, Beograd, Zbornik Predavanja, pp. 46-48.

Radojevic, L., Calic-Dragosavac, D., Spiric, J., Stevanovic, B. and Stevanovic, V. (2010) *In vitro* propagation of *Dianthus ciliatus* ssp. *dalmaticus* and *D. giganteus* ssp. *croaticus* (Caryophyllaceae) from stem segment cultures. Botanica Serbica 34:153-161.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.21.2]