DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

پاسخ شاخساره‌های باززایی شده مورد معطر (*Myrtus communis* L.) به شوری در شرایط کشت در شیشه

پیمان آقائی[1*]، سید علی حسینی تفرشی[2] و محمد امین طغیانی[3]

[1] **ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی**

[2] **ایران، کاشان، دانشگاه کاشان، دانشکده شیمی، گروه سلولی و مولکولی**

[3] **ایران، تهران، دانشگاه شاهد، گروه زیست شناسی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

چکیده

شوری یکی از مهمترین محدودیت‌های پیش روی رشد و پراکنش گیاهان خشکی است. این تنش با تحت تأثیر قرار دادن پتانسیل اسمزی محیط اطراف ریشه ضمن ایجاد سمیت برای گیاه، به کاهش رشد، تولید محصول و اختلال در جذب عناصر غذایی می‌انجامد. مورد معطر (*Myrtus communis* L.) درختچه‌ای زینتی- دارویی است که به سبب دارا بودن ترکیبات آروماتیک مفید، استفاده در طب سنتی و استفاده در پروژه‌های مرمت اکوسیستم‌های طبیعی و فرسایش خاک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مطالعات محدودی در خصوص پاسخ‌های فیزیولوژی و مقاومتی این گیاه به تنش انجام پذیرفته که نتایج محدود موجود، تعمیم آن را روی تمامی جمعیت‌ها دشوار می‌سازد. دراین تحقیق تلاش شد تا ضمن بررسی میزان باززایی و کمیت رشد گیاهچه‌های مورد معطر در شرایط کشت درون‌شیشه تحت ۴ سطح شوری (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی مولار NaCl)، برخی پاسخ‌های فیزیولوژی گیاه نظیر تغییرات محتوای رنگیزه‌ای و RWC، پایداری غشاهای سلولی، محتوای پرولین برگ، مقدار رادیکال‌های فعال اکسیژن، پارامترهای بیوشیمیایی و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد سنجش و ارزیابی قرارگیرد. نتایج مؤید آن بود که سطوح متوسط و شدید شوری (بترتیب ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی مولار NaCl) تأثیرات قابل ملاحظه‌ای بر پارامترهای رشد و نموی، پایداری غشاء، میزان کربوهیدرات و آمیدها و نیز میزان کلروز و نکروز برگ داشته است. نتایج همچنین نشان داد که محتوای نسبی آب برگ، میزان کلروفیل و درصد شاخص مقاومت تنها در شوری شدید و میزان لیپید و پرولین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و میزان ROS، در همه سطوح شوری تحت تأثیر قرارگرفتند.

واژه های کلیدی: مورد معطر (*Myrtus communis* L.)، تنش شوری، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کشت درون‌شیشه، FTIR، ROS، پرولین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۳۳۹۱۸۰۳ ، پست الکترونیکی: peyman.aghaie@pnu.ac.ir

مقدمه

مورد معطر (*Myrtus communis* L.) گیاهی دارویی و معطر از خانواده میرتاسه به ارتفاع ۱ تا ۳ متر با برگ‌های متقابل، تخم مرغی و سرنیزه‌ای و میوه سته است که در صنایع بهداشتی و دارویی، کاربرد فراوانی دارد. محل رویش آن اروپای جنوبی، جنوب غربی آسیا و همچنین ایران است. ارزش اقتصادی این درختچه همیشه سبز، علاوه بر استفاده‌های زینتی، به واسطه وجود ترکیبات فنولی و آروماتیک ارزشمند آن نظیر آلفاپینن، لیمونن، سینوئل و ترپینول است که در تهیه ترکیبات فعال زیستی حائز اهمیت است (۱۷). این گیاه در طب سنتی و مدرن

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

به واسطه خواصی همچون قابض بودن، ضدعفونی کنندگی، ضد انگلی، مقوی معده، نیرو دهنده، بهبود زخم و رفع اختلالات مجاری ادراری مورد توجه است (۵۰). باتوجه به توان تولید تاج پوشش انبوه و مناسب مورد و قدرت بازیابی بالای این گیاه در مواجهه با آسیب‌های ناشی از آتش‌سوزی و چرای دام، از آن بعنوان یک کاندیدای مناسب برای برنامه‌های مرمت اکوسیستم‌های طبیعی یاد می‌شود (۱۳). این درختچه در زمین‌های شیبدار و نامساعد به راحتی قابل کشت بوده و از فرسایش خاک جلوگیری می‌کند. در کل گیاه مورد، تحمل قابل قبولی را در مواجهه با تنش‌های محیطی غیرزنده از جمله خشکی، شوری و نور شدید از خود نشان می‌دهد. لیکن تداوم این تنش‌ها، شدت و دفعات آن‌ها در مناطق مختلف می‌تواند اثرات منفی جبران ناپذیری به گیاه وارد نماید (۲۷و ۴۱). شوری اما یکی از جدی‌ترین مسائل زیست محیطی در اکوسیستم‌های خشکی است. حدود ۸۰۰ میلیون هکتار از زمین‌های دنیا متأثر از شوری است که خود حدود ۷ درصد از کل خشکی‌های دنیا را شامل می‌شود (۲۳).

تنش ناشی از شوری، جوانه زنی، رشد و تولید مثل گیاهان را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵۲). این موضوع آنجا اهمیت بیشتری می‌یابد که بدانیم تقریباً سه چهارم سطح زمین توسط آب‌های شور پوشیده شده و نمک ناشی از آن بخش قابل توجهی از جهان اطراف ما را تحت تأثیر قرار داده است. زهکشی ضعیف و نامناسب، فرسایش خاک، استفاده از آب‌های شور و بی‌کیفیت در کشاورزی، جنگل‌زدایی و استفاده بی رویه از کودهای شیمیایی، باعث گسترش اثرات مخرب شوری در جهان گردیده است (۲۱). در غالب موارد، پاسخ گیاهان به تنش شوری به میزان سمیت یونی، تغییرات پتانسیل اسمزی، مدت زمان تنش و نوع گونه گیاهی بستگی دارد (۱۷). متداول‌ترین شیوه ایراد خسارت تنش نمک در گیاهان از طریق ایجاد اختلال‌های اسمزی است که خود ناشی از افت پتانسیل اسمزی آب در حضور نمک و متعاقب آن کاهش امکان دسترسی سلول‌های ریشه به آب است. دراین شرایط، اغلب پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاه به خشکی بروز یافته و تأثیر آن به صورت کاهش میزان آب سلول، سمیت یونی و اختلال در جذب عناصر غذایی آشکار می‌شود (۱۴و ۵۲). اختلال در فرایندهای متابولیکی همچون کاهش فعالیت نیترات ردوکتاز، تجزیه کلروفیل، بروز کلروز در بافت‌های گیاه و تخریب فعالیت‌های فتوسنتزی از جمله آسیب‌های ناشی از فزونی سدیم و کلر در گیاهان است (۲۲و ۶۰). در کل تعداد اندکی از تحقیقات به موضوع اثر شوری روی درختچه‌های زینتی و مکانیزم‌های دخیل در پاسخ آن‌ها به این تنش پرداخته‌اند (۳، ۱۵ و ۵۹). بررسی اعمال تنش غلظت بالای نمک NaCl (250 mM) به صورت درون شیشه‌ای در مورد توسط Di Cori و همکاران (۲۱) نشان داد این شرایط به کاهش طول ساقه و ریشه و محتوای کلروفیل گیاه منجر می‌شود. نتایج آن‌ها نشان داد، در حالیکه محتوای کاروتنوئید گیاه دراین شدت شوری بدون تغییر مانده، فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز افزایش معنی‌داری یافته است. کاهش کارآیی فتوسیستمII و افزایش پلی‌فنل‌ها به خصوص فلاونوئیدها در مطالعه اثر شوری روی گیاه مورد توسط Tattini و همکاران (۲۰۰۶)، گزارش شد (۵۹). Acosta-Moto و همکارانش در ۲۰۱۵ با بررسی مکانیزم‌های مقاومت گیاه مورد به تنش شوری بلند مدت، وقوع تغییرات آناتومی در برگ‌ها از جمله کاهش پارانشیم اسفنجی و افزایش فضاهای بین سلولی در برگ، افزایش فعالیت کاتالاز، تغییر در پارامترهای رشد و نموی، فتوسنتز و پایداری غشاء را در ایجاد مقاومت به شوری، مؤثر دانسته‌اند (۳). در مطالعه حاضر، اثر سطوح متوسط و شدید شوری، روی گیاهچه‌های باززایی شده به روش درون شیشه‌ای گیاه مورد، تحت بررسی قرارگرفت. هدف، شناسایی و تجزیه و تحلیل برخی پاسخ‌ها و سازوکارهای دخیل در مقاومت به شوری در این گیاه بود. بدین منظور برخی ویژگی‌های ریختی در حالت درون‌شیشه‌ای شامل،

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

میزان باززایی، کمیت رشد بخش‌های هوایی، طول گیاهچه و وزن تر آن و نیز برخی شاخص‌های فیزیولوژی نظیر تغییرات محتوای نسبی آب برگ، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، کاروتنوئیدها، پراکسیداسیون چربی‌های غشایی، نشت الکترولیت‌ها از خلال سلول‌ها، محتوای پرولین برگ، مقدار رادیکال‌های فعال اکسیژن و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مورد سنجش و ارزیابی قرارگرفت.

مواد و روشها

تهیه ماده گیاهی و شرایط کشت درون‌شیشه‌ای: جدا کشت‌ها از تک گره‌های حاصل از درختچه‌های گیاه *Myrtus communis* L. کاشته شده در مجموعه فضای سبز شهرداری کاشان- ایران تهیه گردید. نمونه‌ها پس از انتقال فوری به آزمایشگاه، ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه با آب جاری شستشو داده شدند. پس از آن یک‌بار و به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد و سپس به مدت پانزده دقیقه در محلول حاوی هیپوکلریت سدیم دو درصد گندزدایی شدند. در نهایت نیز نمونه‌ها پس از سه بار آبشویی با استفاده از آب دوبار تقطیر استریل، برای کشت در شیشه مورد استفاده قرارگرفتند. محیط کشت پایه MS (موراشیگ و اسکوگ- ۱۹۶۲) حاوی سوکروز (۳۰ g/l) و آگار (۷ g/l) با غلظت‌های مختلف (۳ mg/l، ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰/۲) BAP (6-benzylaminopurine) و NAA (1-Naphthaleneacetic acid) (۰،۰/۲ mg/l) برای بهینه‌سازی پروتکل باززایی مورد استفاده قرارگرفت (جدول۱) (۴۲). pH کلیه محیط‌های کشت روی ۵/۷ ±۰/۰۵ تنظیم و سپس اتوکلاو گردیدند. نمونه‌ها در دمای ۲۵±۱ °C و تحت دوره‌های نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت ۱۰۰ $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ نگهداری شدند. شاخساره‌های ۴ هفته‌ای جهت ارزیابی پارامترهای کشت بافتی شامل درصد بازیابی، تعداد شاخساره در هر جدا کشت و طول آن‌ها مورد ارزیابی قرارگرفتند. پس از این مرحله، نمونه‌ها به صورت منظم و هر سه هفته یکبار و طی ۵ هفته متوالی، واکشت داده شدند تا ثبات نتایج در واکشت‌های متوالی احراز گردد. محیط بهینه شده حاصل و همچنین جداکشت‌های تولید شده، برای انجام آزمایش‌های مرحله تنش شوری در شرایط درون شیشه، مورد استفاده قرارگرفتند.

اعمال تیمار شوری: جدا کشت‌های یکسان واجد گره حاصل از کشت درون شیشه، با اندازهٔ تقریبی ۰/ ۵ cm، به محیط کشت بهینه شده M8 حاوی ۱/۵ mgl^{-1} از هورمون BAP و ۰/۲ mgl^{-1} از هورمون NAA منتقل شدند. برای اعمال تنش شوری، سه غلظت ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی مولار NaCl به محیط‌های کشت اضافه و همراه با نمونهٔ شاهد (غلظت صفر میلی مولار NaCl)، در اتاقک کشت کنترل شده (مشابه شرایط ذکر شده در بخش ۲-۱) قرارگرفتند. درون هر شیشه، چهار نمونه جدا کشت در فواصل یکسان از یکدیگر واکشت شدند. پس از سی روز، نمونه‌های حاصل جهت بررسی میزان باززایی، کمیت رشد و شاخص‌های فیزیولوژیکی برداشت شدند.

مطالعه صفات ریختی، شاخص‌های رشدی و باززایی شاخساره: پارامترهای باززایی شاخساره‌های کشت یافته در شیشه، شامل درصد بازیابی و تعداد شاخساره در هر گره اندازه گیری شد. علاوه بر آن طول و عرض شاخساره‌ها و نیز میانگین طول برگ‌ها، به کمک یک کولیس دیجیتال اندازه گیری شد. در ادامه نمونه‌ها پس از قرارگیری در آون با دمای ۶۵ درجه‌سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن خشک ثابت، خشک شدند. وزن تر اولیه بافت و وزن خشک به کمک یک ترازوی دیجیتال با درجه حساسیت ۰/۰۰۰۱ گرم، اندازه گیری شد. میزان کلروز و نکروزشدگی بافت‌های گیاه بر مبنای شاخص مک کینی (McKinney Index یا MKI) و از روی علائم بصری ناشی از شوری، مورد ارزیابی قرارگرفت (۳۹).

محتوای نسبی آب برگ: محتوای نسبی آب برگ به روش Ings و همکاران (۲۰۱۳) اندازه گیری شد (۳۰). برگ‌های

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

توسعه یافته شاخساره، بلافاصله پس از برداشت توزین شدند و بعنوان وزن تر برگ (Fresh weight به اختصار FW) منظور گردید. پس از آن نمونه‌های برگ در آب دوبار تقطیر استریل غوطه‌ور و برای ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۴ºC نگهداری شدند. مجدداً وزن تر برگ‌ها اندازه‌گیری گردید که معرف وزن تورژسانس (Turgid weightبه اختصار TW) است. نمونه‌های وزن شده (برگ‌های اشباع شده از آب) برای مدت ۷۲ ساعت یا بیشتر (تا رسیدن به وزن ثابت) در آون تحت دمای ۷۰ºC خشک شده و سپس بعنوان وزن خشک توزین گردیدند (Dry weight یا DW). با قرار دادن مقادیر حاصل در معادله زیر درصد محتوای نسبی آب برگ‌ها محاسبه شد (۳۰).

$$RWC\ (\%) = [(FW - DW)/(TW - DW)] \times 10$$

نشت الکترولیت: بررسی پایداری غشاهای سلولی از طریق سنجش هدایت الکتریکی ناشی از نشت الکترولیت‌ها از خلال سلول‌های برگ و به روش Liu و همکاران (۲۰۱۱) با اندکی اصلاح، انجام شد (۳۷). نمونه‌های برگی شاخساره‌های هم وزن، پس از جداسازی، در فالکون‌های قابل اتوکلاو حاوی۲۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر، غرق گردیدند. نمونه‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ ºC آنکوبه شدند. پس از این مدت هدایت الکتریکی (Electrical conductivityبه اختصار EC) آن‌ها با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج الکتریکی (Jenway, Model 4510 – انگلیس) اندازه‌گیری شد (EC اولیه). در ادامه نمونه‌ها برای۲۰ دقیقه در اتوکلاو تحت دمای ۱۲۱ ºC قرارگرفتند. پس از سرد شدن نمونه‌ها تا دمای۲۵ ºC، هدایت الکتریکی محلول مجدداً قرائت گردید (EC نهایی). با قرار دادن مقادیر EC اولیه و نهایی در معادله مربوط، میزان نشت الکترولیت از خلال سلول‌های برگ به درصد تعیین گردید.

$$EL\ (\%) = (initial\ EC / final\ EC) \times 100$$

پراکسیداسیون چربی‌های غشایی: سنجش پراکسیداسیون چربی‌های غشایی به واسطه اندازه‌گیری میزان مالوندی آلدهید (MDA) و به روش Heath و Packer (۲۸) با اندکی اصلاح، انجام شد. بدین منظور، ۰/۱ گرم از برگ تر شاخساره مورد با ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد (m/v) تری‌کلرواستیک اسید سائیده شد. عصاره همگن حاصل برای ۲۵ دقیقه و با دور 12000 g سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۴ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی تیوباربیتوریک اسید 5/0% (m/v) افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه تحت حرارت 95 ºC حمام آب گرم قرارگرفت و پس از آن به سرعت بر روی یخ منتقل شد. پس از انجام مجدد سانتریفیوژ، جذب محلول رویی در طول موج‌های ۵۳۲ (جذب کمپلکسMDA-TBA) و ۶۰۰ نانومتر (جذب سایر رنگیزه‌های غیراختصاصی) قرائت گردید. میزان MDA با در نظر گرفتن ضریب خاموشی $155\ mM^{-1}cm^{-1}$ با استفاده از معادله زیر و بر حسب $nmol\ g^{-1}F.W.$ محاسبه گردید.

$$MDA\ level\ (nmol) = \Delta(A532nm - A600nm)/1.56 \times 105$$

رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاروتنوئید: رنگیزه‌های برگ شامل کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید کل شامل کاروتن و گزانتوفیل پس از استخراج از نمونه‌های شاخساره به روش Lichtenthaler و Welburn (۱۹۹۴) مورد سنجش قرار گرفت (۳۶). بدین منظور ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ گیاه مورد کشت در شیشه از هر تیمار در ۵ میلی لیتر استون۸۰ درصد سرد، سائیده و به صورت عصاره همگنی تهیه شد. نمونه به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) و در دمای ۴ºC سانتریفوژ گردید. فاز رویی هر لوله اپندورف به کمک استون۸۰ درصد به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول‌موج‌های۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ و۴۷۰ نانومتر قرائت شد. با قرار دادن مقادیر جذب در معادله‌های مربوطه، مقادیر کلروفیل و کاروتنوئید هر نمونه بر حسب

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

میکرومول محاسبه گردید. در ادامه نیز ضریب سازگاری (Tolerance Index به اختصار TI) به تنش برای هریک از شاخساره‌های تحت تنش و شاهد با بهره‌گیری از معادله Köhl و Lösch (۲۰۰۴) محاسبه شد (۲۱)

$$TI(\%) = \frac{\text{Total chlorophylls of stressed plants}}{\text{total chlorophylls of control plants}} \times 100$$

استخراج آنزیم و سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز: مقدار ۰/۲ گرم از برگ شاخساره کشت شده در شیشه برای هر تیمار برداشت شد و با ۱ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۸ سائیده شد. بافر همچنین حاوی آلفادی‌تیوتریتول (α-Dithiothreitol) و اتیلن‌دی‌آمونیوم‌ترا (EDTA) ۲ میلی‌مولار، پی وی پی (Polyvinylpyrrolidone) ۱درصد، سوکروز ۴ میلی‌مولار و گلیسرول۱۰ درصد بود. عصاره حاصل بلافاصله به مدت۲۰ دقیقه در دور rpm ۱۳۰۰۰ و دمای°C ۴ سانتریفیوژ شد. محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد استفاده قرارگرفت. سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Aebi (۱۹۸۴) انجام شد (۴). مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات۵۰ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۱۰ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تجزیه هیدروژن پراکسید و کاهش جذب در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر در مدت ۶۰ ثانیه، میزان فعالیت آنزیم را نشان داد. یک واحد از فعالیت آنزیم CAT براساس سرعت مصرف یک $\mu mol\ H_2O_2\ mL^{-1}\ min^{-1}$ در دمای ۲۵°C (یا بر حسب تغییرات جذب ۰/۰۱ واحد در دقیقه) بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) به روش Nakano و Asada (۱۹۸۱)، انجام شد. در این روش مخلوط واکنش شامل آب اکسیژنه (H_2O_2) ۳۰ درصد با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار، اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی بود. بمنظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، منحنی کاهش جذب ناشی از اکسیداسیون آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر طی مدت ۲ دقیقه دنبال گردید. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی (ε 290) معادل $mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۲/۸ محاسبه شد. یک واحد آنزیمی معادل تجزیه یک مول آسکوربات در مدت زمان یک دقیقه و در دمای ۲۵ °C در نظر گرفته شد (۴۳). فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز (SOD) بر پایه روشBeauchamp و Fridovich در ۱۹۷۱ اندازه‌گیری شد (۱۱). مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۸، L– متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیترو بلو تترازولیوم ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۲ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۵۰ میکرومولار از عصاره آنزیمی استخراج شده بود. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه تحت نور فلورسنت با ۵۰۰۰ لوکس نوری، برای ۱۵ دقیقه قرار گرفت و سپس جذب آن در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. همچنین از یک لوله‌آزمایش حاوی مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی بعنوان شاهد استفاده شد. یک واحد از فعالیت آنزیم SOD مقدار آنزیمی است که موجب۵۰ درصد ممانعت از احیای نوری NBT می‌گردد.

پرولین: اندازه‌گیری محتوای پرولین به روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) و با استفاده از L-پرولین، بعنوان استاندارد، صورت گرفت (۹). بدین منظور ۰/۵ گرم بافت تازه برگی مربوط به هر تیمار در۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد ساییده و به مدت ۲۰ دقیقه در دورrpm 12000 سانتریفیوژ گردید. ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال برای مدت۶۰ دقیقه در دمای°C۱۰۰ در بن ماری قرار داده شد و پس از این زمان، بلافاصله در حمام یخ قرارگرفت و بدین ترتیب واکنش متوقف شد. به هر نمونه ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و با استفاده از ورتکس به مدت ۲۰ ثانیه بخوبی یکنواخت شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه ثابت نگه داشته شدند تا در هر لوله آزمایش دو فاز تشکیل گردد. جذب فاز رویی که حاوی کمپلکس صورتی تا قرمز رنگ واجد پرولین است، جهت اندازه‌گیری پرولین استفاده شد. شدت جذب

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

محلول‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت و در ادامه با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از پرولین خالص، غلظت پرولین در هر نمونه تعیین گردید. در نهایت میزان پرولین بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ($\mu mol\ g^{-1}$ F.W.) به دست آمد.

اندازه‌گیری مقدار رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS): برای اندازه‌گیری مقدار رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) از روش زایلنول اورنج اسیدی استفاده شد (۱۲). بر اساس این روش ROS در شرایط اسیدی، منجر به تغییر یون فرو به فریک شده و یون فریک حاصل با زایلنول اورنج کمپلکس نارنجی رنگ ایجاد می‌کند. برای این منظور ابتدا بافت برگ درون هاون چینی ریخته و بر روی یخ کاملاً ساییده شد. سپس بافر فسفات سدیم ۵۰ mM با pH ۶/۸ استفاده گردید و محلول همگن حاصل مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۶۰۰۰ rpm در 4°C در سانتریفیوژ (Micro Centrifuge Eppendorf 1540– آلمان) گردید. جذب نوری محلول حاصل حاوی عصاره و زایلنون اورنج اسیدی در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. از غلظت‌های مختلف H_2O_2 برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج حاصل بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ($\mu M\ g^{-1}$ FW) محاسبه و ارائه گردید.

طیف سنجی FT-IR : ۰/۱ گرم پودر خشک حاصل از شاخساره‌های نمونه‌های شاهد و تیمار برای انجام آنالیزهای FT-IR استفاده شد. نمک KBr به نسبت ۱ به ۱ به پودر خشک گیاهی افزوده شد و نمونه‌ها به صورت قرص تهیه شد. طیف مادون قرمز نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکترومتر FT-IR مدل Nicolet Magna-550 در محدوده طول موج cm^{-1} ۴۰۰۰–۴۰۰ قرائت گردید. آنالیز نمونه‌ها طی سه تکرار انجام و نتایج حاصل از بخشی از طیف خروجی در محدوده۹۰۰ تا ۱۸۰۰ بر سانتی‌متر، با استفاده از نرم افزار Essential FTIR Spectroscopy (نسخه ۳/۵۰) مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. آنالیز بیشتر داده‌های خروجی این نرم افزار و رسم منحنی‌ها با استفاده از نرم افزارهای اکسل (نسخه ۲۰۱۳) و GraphPad Prism (نسخه ۶) انجام شد. در این صورت با محاسبه مقادیر حداکثر پیک‌های حاصل از منحنی‌های هر تیمار نسبت‌های کربوهیدرات به آمید۲، آمید ۱ به آمید ۲، لیپید به آمید ۲ و نوکلئیک اسید به آمید ۲، محاسبه و به صورت نمودار ارائه گردید.

تجزیه تحلیل آماری: تمامی آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی و حداقل در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری، انجام تحلیل واریانس (Analysis of variance یا به اختصارANOVA) و آزمون مقایسه‌ای دانکن در سطح $P <$ ۰/۰۵، با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 19.0, SPSS Inc, Chicago, IL)انجام شد. برای رسم کلیه نمودارها از نرم‌افزار گراف پد (version 6, GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA) استفاده شد.

نتایج

بهینه سازی محیط کشت باززایی شاخساره: اثر ترکیبات متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی روی باززایی شاخساره‌های حاصل از جداکشت‌های گرهی مورد، در جدول ۱ آورده شده است. بیشترین میزان استقرار جداکشت‌ها به میزان ۱۰۰ درصد، در محیط‌های کشت M6 (mgl^{-1} NAA) M8 ،(۱ mg^{-1} BAP+۰/۲ mgl^{-1} NAA) (mg^{-1} +۰mgl^{-1} NAA) M9 و (۱/۵ mg^{-1} BAP+۰/۲ ۲BAP) مشاهده شد. در پنجمین واکشت، بیشترین تعداد شاخساره‌های جدید، در جداکشت‌های گرهی رشد یافته روی محیط M8 (جدول۱)، ایجاد شد. در هر جداکشت روی این محیط، به طور متوسط ۱۱ نوشاخه حاصل شد که به طور قابل ملاحظه‌ای بیش از سایر محیط‌ها بود. پس از سه هفته از کشت، بلندترین شاخساره به ارتفاع ۳۰/۱ میلی متر در محیط بدون هورمون (شاهد) و پس از آن در محیط‌های M1، M2 و M8 با بترتیب ۲۳، ۲۲/۲ و ۲۰/۳

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

میلی‌متر ایجاد شد. براساس نتایج حاصل، در نهایت محیط کشت M8 بعنوان محیط کشت بهینه برای انجام آزمایش‌های تنش شوری انتخاب شد.

جدول ۱- اثر ترکیب‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی جداکشت‌های گرهی گیاه مورد. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل هستند. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵$ است.

محیط کشت	ترکیب تنظیم کننده های رشد	استقرار (٪)	تعداد نوشاخه	ارتفاع شاخساره
شاهد	-	۲۶/۶ ± ۶/۴ f*	۰/۹ ± ۰/۳ d	۳۰/۱ ± ۵/۴ a
M1	۰/۲ mg^{-1} BAP+۰mgl^{-1} NAA	۵۱/۹ ± ۴/۷ e	۲/۷ ± ۰/۵ cd	۲۲/۲ ± ۴/۷ bc
M2	۰/۲ mg^{-1} BAP+۰/۲mgl^{-1} NAA	۸۵/۷ ± ۵/۷ ab	۲/۴ ± ۰/۹ cd	۲۳/۰ ± ۴/۹ ab
M3	۰/۵ mg^{-1} BAP+۰mgl^{-1} NAA	۵۴/۴ ± ۹/۷ e	۲/۷ ±۱/۰ cd	۱۱/۲ ± ۳/۱ efg
M4	۰/۵ mg^{-1} BAP+۰/۲mgl^{-1} NAA	۷۵/۵ ± ۹/۷ cd	۲/۶ ± ۰/۷ cd	۷/۸ ± ۴/۰ fg
M5	۱ mg^{-1} BAP+۰mgl^{-1} NAA	۶۸/۰ ± ۷/۵ e	۲/۵ ± ۰/۷ cd	۱۴/۳ ± ۴/۳ def
M6	۱ mg^{-1} BAP+۰/۲mgl^{-1} NAA	۱۰۰/۰ ± ۰/۰ a	۲/۸ ± ۱/۰ cd	۴/۸ ± ۳/۴ g
M7	۱/۵ mg^{-1} BAP+۰mgl^{-1} NAA	۸۵/۱ ± ۷/۱ b	۲/۹ ± ۱/۱ cd	۱۶/۶ ± ۴/۳ bcde
M8	۱/۵ mg^{-1} BAP+۰/۲mgl^{-1} NAA	۱۰۰/۰ ± ۰/۰ a	۱۱/۰ ± ۲/۴ a	۲۰/۳ ± ۳/۱ bcd
M9	۲ mg^{-1} BAP+۰mgl^{-1} NAA	۱۰۰/۰ ± ۰/۰ a	۲/۶ ± ۱/۴ cd	۷/۰ ± ۲/۶ fg
M10	۲ mg^{-1} BAP+۰/۲mgl^{-1} NAA	۹۷/۳ ± ۲/۵ ab	۷/۴ ± ۱/۱ b	۱۵/۰ ± ۲/۰ cdef
M11	۳ mg^{-1} BAP+۰mgl^{-1} NAA	۶۷/۵ ±۶/۷ a	۳/۳ ± ۱/۱ e	۱۰/۴ ± ۳/۱ efg
M12	۳ mg^{-1} BAP+۰/۲mgl^{-1} NAA	۶۶/۶ ± ۷/۰ d	۳/۲ ± ۰/۹ e	۷/۱ ± ۴/۱ fg

اثر شوری بر باززایی و پارامترهای رشد: بخش دیگری از نتایج این تحقیق بیانگر تأثیر کمی و کیفی متفاوت غلظت‌های مختلف شوری بر پارامترهای رشدی و قدرت باززایی نوشاخه‌های مورد، بود (جدول۲). در حالی‌که در جداکشت‌های تحت غلظت‌های پائین‌تر نمک (۱۰۰ و۱۵۰میلی مولار) تفاوت معنی‌داری میان درصد باززایی نوشاخه‌ها با نمونه‌های کنترل مشاهده نشد، در شوری بالا (۲۵۰ میلی مولار) میزان باززایی شاخساره‌ها بنحو معنی‌داری کاهش یافت. بررسی میزان پرآوری (Proliferation rate) نمونه‌ها، مؤید اثر منفی غلظت بالای شوری بر تعداد نوساقه در هر گره بود. بیشترین و کمترین میزان پرآوری بترتیب در نمونه‌های کنترل و غلظت۲۵۰ میلی مولار NaCl به دست آمد. در عین حال شوری اثر منفی معنی‌داری روی طول، وزن تر و وزن خشک شاخساره در جداکشت‌های تحت تأثیر نمک داشت. در هر سه سطح، تنش باعث کاهش پارامترهای رشدی و افت شاخص مک‌کینی شد. البته تفاوت شاخصی میان نمونه‌های تحت شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار NaCl نسبت به هم در این پارامترها، مشاهده نشد. در عوض تفاوت میان شاخساره‌های رشد یافته در این دو غلظت (۱۰۰و ۱۵۰) با نمونه‌های شاهد و شوری ۲۵۰ میلی مولار نمک، کاملاً برجسته و مشخص می‌باشد. بیشترین ارتفاع و طول برگ شاخساره‌ها با بترتیب ۲۸/۱ و ۱۰/۲ میلی متر در نمونه‌های شاهد و کمترین آن با ۵/۵ و ۲/۴ در نمونه‌های تحت تنش ۲۵۰ میلی مولار نمک ثبت شد. همین روند کم و بیش در صفات رشدی وزن تر و خشک شاخساره‌ها تکرار شد. چنانکه نمونه شاهد با ۱۹۶ و ۲۴ میلی‌گرم بترتیب واجد بیشترین و نمونه تحت تنش ۲۵۰ میلی مولار با بترتیب ۳۹

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

و ۶ میلی‌گرم کمترین وزن تر و خشک شاخساره در شرایط کشت درون شیشه شدند. محاسبه شاخص مک‌کینی نشان داد که نمونه‌های کنترل واجد کمترین میزان کلروز و نکروز شدگی و سطح بالایی از سبزی و سلامت بودند. در غلظت بالای نمک در محیط‌های کشت (۲۵۰ میلی مولار)، عدد شاخص مک‌کینی بنحو معنی‌داری افزایش یافت و از ۰/۲۴ در کنترل به ۲/۷۴ در غلظت ۲۵۰ میلی مولارنمک رسیدکه مؤید افزایش قابل توجه در میزان کلروزه و نکروزه شدن بافت‌ها است. در این خصوص تفاوت معنی‌داری میان نمونه‌های تحت تنش ۱۰۰ میلی مولار نمک با کنترل مشاهده نمی شود. در غلظت ۱۵۰ نیز هر چند شاخص مک‌کینی افزایش یافته، لیکن همچنان میزان آن کمتر از یک سوم مقادیر ثبت شده در غلظت ۲۵۰ میلی مولار شوری بود.

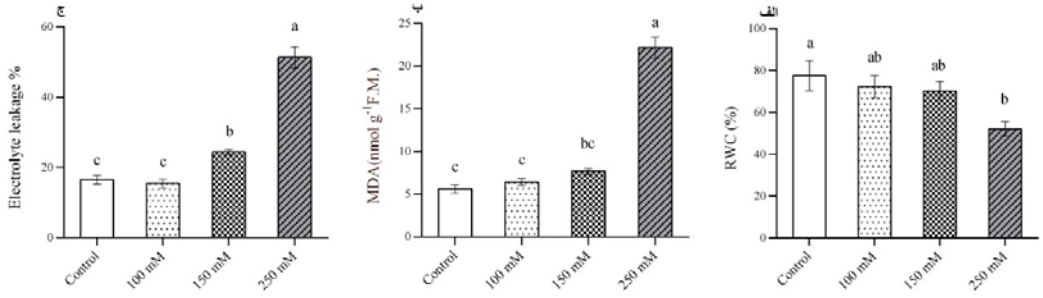
جدول ۲- اثر سطوح مختلف تنش شوری (کنترل و غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی مولار NaCl) بر میزان باززایی، صفات رشدی و شاخص مک‌کینی (MKI) گیاه *Myrtus communis* کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل هستند. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵$ است.

تیمار	درصد باززایی	تعداد نوساقه در هر گره	طول شاخساره (میلی متر)	وزن تر شاخساره (میلی گرم)	وزن خشک شاخساره (میلی گرم)	طول برگ (میلی متر)	شاخص مک‌کینی (MKI)
شاهد	۱۰۰/۰ ±۰/۰^{a}	۱۱/۰ ±۰/۳^{a}	۲۸/۱ ±۰/۹^{a}	۱۹۶ ±۱۷^{a}	۲۴±۲^{a}	۱۰/۲ ±۱/۳^{a}	۰/۲۴^{a}
۱۰۰ میلی مولار NaCl	۹۹/۱ ±۰/۹^{a}	۸/۲ ±۱/۳^{b}	۲۴/۷ ±۱/۲^{ab}	۱۴۷ ±۱۹^{b}	۳± ۱۶ ^{b}	۸/۳ ±۰/۸^{ab}	۰/۵۸^{ab}
۱۵۰ میلی مولار NaCl	۹۵/۹ ±۱/۱^{a}	۵/۵ ±۰/۶^{c}	۲۱/۴ ±۰/۸^{bc}	۱۲۱ ±۱۳^{b}	۴± ۱۳ ^{b}	۷/۱ ±۱^{bc}	۰/۸۶^{bc}
۲۵۰ میلی مولار NaCl	۸۷/۳ ±۱/۴^{b}	۲/۱ ±۰/۲^{d}	۵/۵ ±۰/۶^{d}	۳۹ ±۷^{d}	۲± ۶ ^{c}	۲/۴ ±۰/۵^{d}	۲/۸۴^{d}

محتوای نسبی آب برگ: افزایش غلظت نمک تا سطح ۱۵۰ میلی‌مولار در محیط‌های کشت، اثر شاخصی بر محتوای نسبی آب برگ، نداشت (شکل ۱- الف). بالاترین سطح RWC در جداکشت‌های تحت شرایط کنترل به میزان ۷۷/۵ درصد ثبت گردید. در مقابل در غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار نمک، محتوای نسبی آب به شدت و تا سطح ۵۲ درصد کاهش یافت. غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار نمک با ثبت بترتیب ۷۲/۲ و ۷۰/۲ درصد، فاقد اختلاف متمایزکننده با نمونه‌های کنترل بودند. RWC یک شاخص بسیار مهم است که وضعیت آبی گیاه را نشان می‌دهد و در شرایط تنش بعنوان یک شاخص نشانگر پساییدگی بافت‌ها مورد سنجش قرار می‌گیرد.

اثر تنش شوری روی پایداری غشاهای زیستی: مقایسه محتوای MDA برگ مورد تحت تنش با نمونه‌های شاهد در شرایط کشت در شیشه جهت تعیین میزان پراکسیداسیون چربی‌های غشایی نشان داد که در سطوح بالای شوری (۲۵۰ میلی مولار)، میزان MDA به شدت افزایش می‌یابد (شکل ۱- ب). هم‌زمان شدت نشت الکترولیت‌ها از خلال غشاء (EL) نیز بنحو چشمگیری زیاد می‌شود (شکل ۱- ج). در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار نمک، گرچه میزان نشت الکترولیت تا حدی بالا است، لیکن این میزان به طور برجسته‌ای نسبت به نمونه‌های تحت شوری۲۵۰ میلی‌مولار کمتر است (کمتر از نصف). در غلظت۱۵۰میلی‌مولار محتوای MDA در سطحی نسبتاً پائین‌تر و فاقد تفاوت معنی‌دار با نمونه‌های تحت شوری ۱۰۰ و کنترل بود.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری (کنترل و غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی مولار NaCl) بر محتوای نسبی آب برگ (الف)، میزان مالون دی آلدئید(ب) و نشت الکترولیت از خلال غشاء (ج) و در شاخسارههای کشت بافتی مورد معطر. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل هستند. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های معنی‌دار در سطح P <۰/۰۵ است.

اثر تنش شوری روی محتوای رنگیزه‌ای و شاخص مقاومت: اثر تنش شوری بر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید برگ نوشاخه‌های مورد بیانگر اثر منفی شوری بالا (۲۵۰ میلی مولار نمک) بر محتوای کلروفیل (a و b) و کاروتنوئید برگ ها است (جدول۳). در این شرایط محتوای هر سه نوع رنگیزه به شدت کاهش می‌یابد. در حالی‌که تیمار جداکشت‌ها با غلظت ۱۰۰ میلی مولار NaCl فاقد هرگونه اثر مشخص در محتوای کلروفیل برگ‌ها در مقایسه با کنترل است، محتوای کاروتنوئید آن‌ها در این شرایط حدود ۲۴ درصد افزایش یافته است. در غلظت ۱۵۰ میلی مولار نمک در محیط‌های کشت، محتوای رنگیزه‌ای فاقد اختلاف معنی‌دار با نمونه‌های کنترل است. همچنین بیشترین درصد کاهش شاخص مقاومت در شوری ۲۵۰ میلی مولار NaCl رخ داد. از این نظر تفاوت معنی‌دار میان غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار نمک مشاهده نشد.

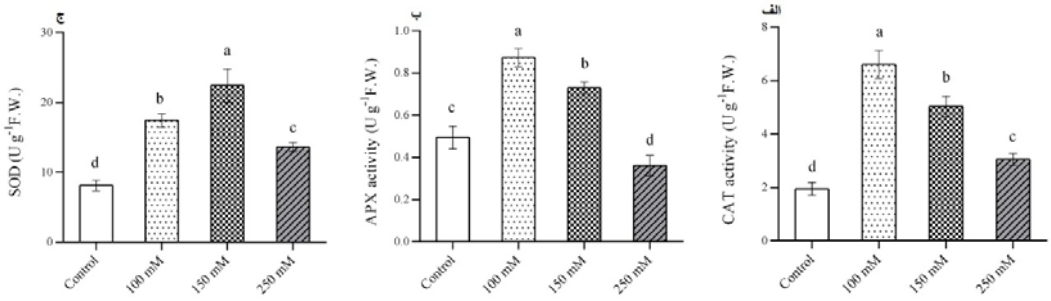
جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری (کنترل و غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی مولار NaCl) بر محتوای کلروفیل، کاروتنوئید و شاخص مقاومت در شاخسارههای کشت بافتی *Myrtus communis*. مقادیر کلروفیل و کاروتنوئید بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه ($mg.g^{-1}F.W$) محاسبه شده است. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل هستند. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های معنی‌دار در سطح P <۰/۰۵ است.

تیمار	کلرفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئیدها	شاخص مقاومت % (TI)
شاهد	۲/۷۱± ۰/۳۴^{a}	۰/۵۵۴± ۰/۰۷^{a}	۱/۶۵± ۰/۱۶^{b}	-
۱۰۰ میلی مولار NaCl	۲/۳۱± ۰/۶۱^{a}	۰/۴۹۹± ۰/۰۸^{a}	۲/۲۳± ۰/۱۲^{a}	۶۵ ^{a}
۱۵۰ میلی مولار NaCl	۲/۰۱±۲/۳۱± ۱/۷۱±/۱۹^{ab}	۰/۴۶۲± ۰/۰۵^{ab}	۱/۹۱± ۰/۱۷^{ab}	۵۳ ^{a}
۲۵۰ میلی مولار NaCl	۰/۸۸± ۰/۰۹^{c}	۰/۲۶۱± ۰/۰۳^{c}	۰/۸۵± ۰/۰۴^{c}	۴۱ ^{b}

اثر تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: تنش شوری فعالیت آنزیم کاتالاز را در همه غلظت‌های نمک نسبت به کنترل افزایش داد (شکل ۲- الف). بیشترین افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد در نمونه‌های تحت شوری ۱۰۰ و پس از آن بترتیب در نمونه‌های تحت شوری۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار نمک اتفاق افتاد. در حالی که اعمال شوری۱۰۰ میلی‌مولار نمک باعث افزایش حدود ۳/۴ برابری در فعالیت آنزیم CAT شد، این افزایش در شوری‌های۱۵۰ و۲۵۰ میلی‌مولار NaCl بترتیب در حد ۲/۶ و ۱/۵ برابر نسبت به شاهد ثبت گردید. بررسی تغییرات فعالیت آنزیم APX در سطوح مختلف شوری بیانگر تغییرات کم و بیش مشابه آن با CAT در سطوح مختلف شوری است با این تفاوت که اولاً سطح و شدت نوسانات

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

کمتر بوده و ثانیاً شوری ۲۵۰ میلی مولار نمک، سطح فعالیت APX را به پائین‌تر از سطح کنترل رسانده است (شکل ۲- ب). نتیجه‌ای که در فعالیت آنزیم CAT، به گونه‌ای معکوس رخ داده است. در این میان بالاترین فعالیت آنزیم APX در نمونه‌های تحت تنش ۱۰۰ میلی‌مولار نمک و کمترین میزان فعالیت آن در غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار NaCl قابل مشاهده است. برخلاف CAT و APX، بیشترین فعالیت آنزیم SOD در نمونه‌های کشت شده در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار نمک مشاهده شد (شکل ۲- ج). نوعی روند افزایشی در فعالیت آنزیم SOD در مقایسه با کنترل تا غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl مشاهده می‌شوند که در غلظت بالاتر نمک (۲۵۰ میلی‌مولار NaCl) جریان آن معکوس می‌گردد. فعالیت SOD در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl به ۲/۷ برابر میزان آن در نمونه‌های کنترل و در نمونه‌های رشد یافته در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار نمک بترتیب به ۲/۱ و ۱/۷ برابر فعالیت مشاهده شده در نمونه‌های کنترل رسید.



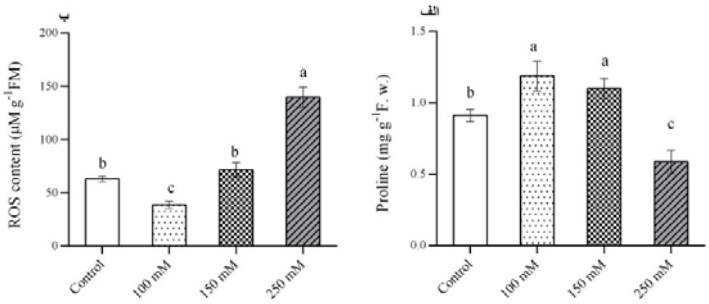
شکل۲- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری (کنترل و غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی مولار NaCl) بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (الف)، آسکوربات پراکسیداز (ب) و سوپراکسیددسموتاز (ج) در شاخساره‌های کشت بافتی مورد معطر. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل هستند. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵$ است.

اثر تنش شوری روی محتوای پرولین برگ: نتایج نشان داد که در تنش شوری شدید (۲۵۰ میلی مولارنمک)، محتوای پرولین برگ‌های نوشاخه‌های کشت بافتی مورد، به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل۳-الف). در مقابل در شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار NaCl، محتوای پرولین به میزان ۲۳ و ۱۷ درصد افزایش یافته است. از این نظر تفاوت معنی‌داری میان دو سطح شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار دیده نمی‌شود.

اثر تنش شوری روی محتوای ROS : تغییرات محتوای ROS طی مواجهه با سطوح مختلف تنش شوری (کنترل و غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی مولار NaCl) در نوشاخه‌های رشد یافته در شیشه گیاه مورد، در شکل ۳-ب نشان داده شده است. نتایج بیانگر افزایش نسبتاً شدید محتوای ROS در نمونه‌های تحت تنش شدید شوری (۲۵۰ میلی‌مولار نمک) است. در این غلظت از نمک، محتوای ROS تا ۲/۲ برابر نمونه‌های شاهد افزایش یافت. در حالی که محتوای ROS در نمونه تحت تنش۱۵۰میلی‌مولار نمک فاقد اختلاف معنی‌دار با نمونه‌های شاهد است، در نمونه‌های تحت شوری۱۰۰ میلی‌مولار، میزان ROS در سطحی پائین‌تر از نمونه‌های کنترل برآورد گردید.

اثر تنش شوری روی تغییرات طیف FT-IR : منحنی‌های حاصل از آنالیز طیف منطقه مادون قرمز در محدوده ۹۰۰ تا ۱۸۰۰ هر تیمار در شکل ۴ نشان داده شده است.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2



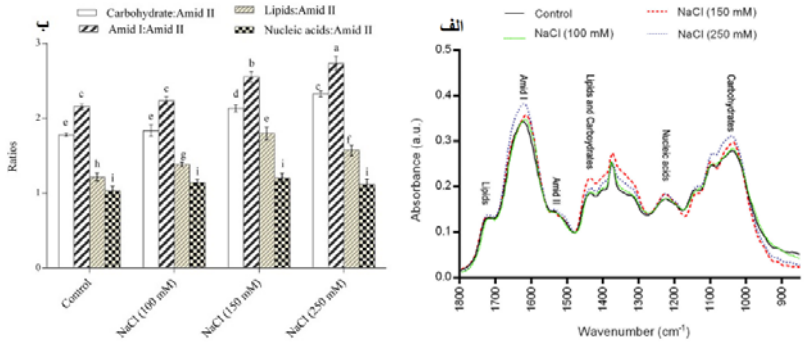
شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری (کنترل و غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی مولار NaCl) بر محتوای پرولین (الف) و سطح ROS (ب) در شاخساره‌های کشت بافتی مورد معطر. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل هستند. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵$ است.

همان‌طور که ملاحظه می‌گردد، هر ناحیه طیف مربوط به ترکیبات خاصی می‌باشد. بنابر نتایج حاصل، حداکثر پیک مربوط به ترکیبات مختلف از جمله کربوهیدرات‌ها، اسیدهای نوکلئیک، چربی‌ها و پروتئین‌ها در تیمارهای مختلف متفاوت بوده است. با توجه به اینکه ناحیه مربوط به آمید ۲ در تمام منحنی‌های مربوط به تیمارهای کنترل و شوری تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشته است. برای محاسبه میزان تغییرات ترکیبات مختلف، حداکثر جذب هر پیک با استفاده از حداکثر جذب پیک آمید ۲، نرمال‌سازی شد. نتایج آورده شده در نمودار ۳-۵ نشان داد که تیماردهی نمونه‌ها با غلظت نمک ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار، باعث افزایش میزان کربوهیدرات‌ها در برگ‌های مورد شده است، در حالی‌که سطح کربوهیدرات در نمونه‌های کنترل و شوری ۱۰۰ میلی‌مولار نمک از نظر آماری معنی‌دار نبود. در این میان بیشترین افزایش کربوهیدرات نسبت به نمونه کنترل در غلظت ۲۵۰ نمک حاصل شد. در طیف FT-IR ناحیه مربوط به آمید ۱ (حدود $۱۶۵۵cm^{-1}$) با میزان پروتئین در نمونه‌ها رابطه مستقیم دارد. نتایج بیانگر آن است که میزان پروتئین در نمونه‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۵۰ نمک، نسبت به نمونه‌های کنترل و غلظت ۱۰۰ نمک، افزایش یافته است. در این رابطه بیشترین میزان افزایش پروتئین در نمونه‌های تحت تیمار با غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار NaCl، مشاهده شد. از سویی نتایج FT-IRنشان داد که تیمار نمک در غلظت‌های۱۵۰ و ۲۵۰ باعث افزایش میزان چربی‌ها در برگ‌های مورد معطر شده است. در اینجا برخلاف آنچه که در مورد پروتئین و کربوهیدرات دیده شد، بیشترین میزان چربی در تیمار با غلظت میلی‌مولار نمک حاصل شد و افزایش بیشتر نمک به محیط کشت باعث کاهش روند تولید چربی‌ها در مورد شده است. نتایج همچنین نشان داد که شوری در غلظت‌های مورد استفاده در این آزمایش، تأثیری بر میزان اسیدهای نوکلئیک برگ‌های مورد معطر نداشته است.

بحث و نتیجه گیری

ترکیب محیط کشت نقش مهمی در موفقیت ریزازدیادی دارد. محیط‌های کشت مختلفی برای کشت موفق مورد، بمنظور استقرار و اندام‌زایی گیاه بهینه‌سازی شده است، از جمله این موارد می‌توان به دستورالعمل ریزازدیادی از طریق کشت مریستم توسط Nobre (۴۶) جنین زایی سوماتیک توسط Parra و Amo-Marco (۴۸) اشاره نمود. در تحقیق حاضر محیط کشت M8، غنی شده با ۱/۵میلی‌گرم بر لیتر BAP و۰/۲میلی‌گرم برلیترNAA، برای القای بیشترین تعداد نوساقه (۱۱ عدد در هر گره جداکشت) برای گیاه مورد بهینه‌سازی گردید.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2



شکل ۴- منحنی‌های حاصل از آنالیز طیف منطقه مادون قرمز در محدوده ۹۰۰ تا ۱۸۰۰ (الف) و نمودار مقایسه نسبتهای میزان کربوهیدرات به آمید ۲ ، آمید ۱ به آمید ۲، لیپید به آمید ۲ و اسیدهای نوکلئیک به آمید ۲ (ب) در شاخساره‌های کشت بافتی *Myrtus communis* تیمار شده با مقادیر سطوح مختلف تنش شوری (کنترل و غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی مولار NaCl). مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل هستند. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های معنی‌دار در سطح P <۰/۰۵ است.

Shekafandeh (۲۰۰۷) بیشترین میزان پرآوری با ۲۷ نوشاخه در هر گره جداکشت مورد را در یک محیط MS ½ اصلاح شده با ۲ میلی‌گرم بر لیتر BPA و ۰/۲میلی‌گرم برلیتر NAA گزارش نموده است (۵۶). در پژوهش Grigoriadouو Leventakis (۱۹۹۹) نیز ایجاد حداکثر ۳ نوساقه روی هر جداکشت گرهی، در محیط MS اصلاح شده با ۳ میکرومول BAP، ۰/۳ میکرومول GA3 و ۰/۰۵ میکرومول NAA، گزارش گردیده است (۲۶). نتایج تا حدی مشابهی نیز توسط Şan و همکاران (۲۰۱۵) با ایجاد ۴ نوساقه در هر جداکشت حاصل از کشت رأس ساقه در محیط MS حاوی ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به دست آمده است (۵۳). در این میان اما بالاترین نرخ پرآوری کشت بافت *Myrtus* با ۳۴/۸ نوساقه در هر جداکشت روی یک محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم برلیتر BAP و۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA توسط Scarpa و همکارانش (۲۰۰۰) گزارش شده است (۵۴). شاید دلیل عمده این میزان تفاوت در میزان پرآوری جداکشت‌های گیاه مورد در شرایط کشت بافت را بتوان به تفاوت موجود در ژنوتیپ‌های متنوع مورد استفاده در تحقیقات مختلف نسبت داد. گیاهان بومی اقلیم مدیترانه‌ای از جمله *M. communis*، در طول حیات خود با تنش‌های محیطی مختلفی از جمله خشکی، شوری و تشعشع شدید خورشیدی مواجه‌اند (۳۸). این گونه‌ها سطوح متفاوتی از تحمل به تنش را از خود نشان می‌دهند. شوری یکی از اصلی‌ترین این تنش‌ها است که از عوامل اصلی کاهنده رشد، محصول و پراکنش گیاهان در بوم‌های خشکی است. تأثیر این تنش بر پارامترهای رشد و فیزیولوژی گیاه *M. communis* در شرایط کشت در خاک و در شیشه، همواره مورد توجه محققین مختلفی بوده است (۳و ۲۱). مشخص شده که *M. communis* در مواجهه با تنش‌ها، شدت فتوسنتز خود را کاهش داده و میزان تنفس خود را در حد ثابتی نگه می‌دارد (۲۵). با این حال به دلیل اثرات ترکیبی تنش‌ها در محیط طبیعی، امکان بررسی پاسخ گیاهان به یک تنش خاص نظیر شوری به شیوه‌ای مستقل وجود ندارد. نتایج تحقیق حاضر بیانگر وجود اثر منفی شوری بر شاخص‌های رشدی نظیر طول، وزن تر و وزن خشک شاخساره و نیز تعداد نوساقه حاصل از جداکشت‌های مورد است. کاهش رشدی که می‌تواند به واسطه کاهش پتانسیل جذب آب، ورود میزان زیاد عنصر سدیم و نیز سایر عناصر (مانند کلر که به تدریج همراه سدیم جذب می‌شوند) به درون گیاه باشد. در هنگام شوری بسیاری از عناصر به طور غیرمتعارف جذب ریشه شده و سمیت زیادی برای گیاه ایجاد می‌کنند که می‌تواند در ادامه متابولیسم طبیعی گیاه را مختل نماید. این امکان

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

نیز وجود خواهد داشت که در این شرایط، گیاه بخشی از انرژی حاصل از فتوسنتز را به جای تخصیص به رشد، به تولید محلول‌های سازگارکننده بمنظور تعدیل اسمزی سلول‌ها اختصاص دهد (۱۰). در تحقیقی Di Cori و همکارانش (۲۰۱۳) گزارش کردند که غلظت بالای NaCl (۲۵۰ میلی‌مولار) پس از ۱۵ و ۳۰ روز می‌تواند طول ساقه مورد را در مقایسه با محیط کشت شاهد، کاهش دهد (۲۱). تیمار گیاهچه‌ها با غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ میلی‌مولار نمک در این حال، تأثیری روی کاهش طول ساقه نداشت. مشابه با نتایج ما، آنها نشان دادند که مواجهه گیاه با شوری باعث کاهش ضریب MKI در مقایسه با گیاهان شاهد می‌شود. کاهش ارزش MKI در گیاهان تحت تنش شوری مؤید افزایش درصد کلروز و نکروزشدگی آن‌ها در مقایسه با گیاهان شاهد است. نتیجه‌ای که توسط تحقیقات سایر محققین نیز در مواجهه با تنش شوری نیز گزارش شده است (۱۶، ۳۵ و ۵۷).

بنابر نتایج حاصل، محتوای نسبی آب برگ تنها در شوری بالا (غلظت ۲۵۰ میلی مولار نمک) با کاهش معنی دار مواجه شد. به نظر می‌رسد در سطوح پائین‌تر نمک، سازگاری‌های اسمزی تا حدی باعث جلوگیری از کاهش شدید سطح RWC شده است. اصولاً کاهش پتانسیل آب، یکی از فوری‌ترین پاسخ‌های گیاهان تحت تنش شوری است. نتایج مشابهی در سایر گیاهان تحت تنش شوری همچون نخود (۲۴) و کهور سفید (۴۰) گزارش شده است. افزایش ناپایداری غشاءهای زیستی مورد معطر در غلظت‌های بالای نمک که با افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدهید و نشت الکترولیت به محیط قابل رصد است، یکی از متداول‌ترین پاسخ‌های گیاهان به تنش شوری محسوب می‌شود که حتی در گیاهان شاخص مقاوم به شوری نظیر سالیکورنیا هم در سطح مشخصی از نمک، دیده می‌شود (۵). در گزارشی، افزایش نشت الکترولیت در گیاه شمعدانی تحت تنش شوری نیز توسط حسنوند و همکاران (۱۳۹۴) گزارش گردیده است (۱). در شوری بالا، هنگامی که ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد، تشکیل رادیکال‌های آزاد افزایش یافته و منجر به تجزیه و تخریب بسیاری از متابولیت‌های سلولی می‌گردد. حمله ROSها به لیپیدهای غشای پلاسمایی در سلول بر ساختار، سیالیت و نفوذپذیری غشای سلولی اثرات تخریبی وارد آورده و در این حالت نشت الکترولیت‌ها از خلال غشاء و پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع لیپیدها افزایش می‌یابد (۵۲). افزایش ناپایداری غشاء در گیاهانی متعددی از جمله کدوحلوایی (۵۵)، خیار (۳۴) و رزماری (۳۲) تحت تنش بالای شوری گزارش شده است. اثر کاهنده نمک روی محتوای کلروفیل و کاروتنوئید و شاخص مقاومت گیاه مورد معطر حاصل از این تحقیق، با روند کلی کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهان تحت تنش شوری، مطابقت دارد (۴۷). کاهش کلروفیل در مواجهه با شوری می‌تواند ناشی از کاهش سنتز یا تجزیه آنزیمی این رنگیزه باشد (۶۱). همچنین تخریب رنگدانه‌ها در شرایط تنشی می‌تواند تا حد زیادی متأثر از تنش‌های اکسیداتیو موازی با تنش شوری صورت پذیرد. نتایج مشابهی در مواجهه گیاهان مختلف با تنش شوری گزارش شده است (۳۲). در بسیاری از موارد این چنینی، کاهشی در محتوای رنگدانه‌ای در اثر تنش را، به تخریب فراساختاری پلاستیدها و غشاهای تیلاکوئیدی نسبت می‌دهند (۶). با این وجود افزایش میزان کاروتنوئید در گیاه مورد تحت تنش در غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک را شاید بتوان نقش کاروتنوئیدها بعنوان بخشی از مکانیزهای دخیل در حفاظت سلول در مقابله با تنش نسبت داد که از صرفه‌جویی بهینه‌تری در انرژی بهره می‌برند (۷). از آنجایی که کاروتنوئیدها عمدتاً در ارتباط با مراکز واکنش فتوسنتزی یافت می‌شوند که در تنش‌ها مستعد آسیب هستند، مشاهده کاهش عمومی کاروتنوئیدها در سطوح بالای شوری دور از انتظار نیست (۲۰). بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برگ‌های مورد، مؤید اثر افزایشی شوری روی فعالیت هر سه آنزیم تحت بررسی (CAT، APX و SOD) در

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

غلظت‌های ۱۰۰ و۱۵۰میلی مولار نمک بود. با این توضیح که CAT و APX در غلظت ۱۰۰ و SOD در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار نمک بیشترین میزان افزایش فعالیت را از خود نشان دادند. یک افت معنی‌دار و مشخص در غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار نمک در فعالیت هر سه آنزیم ثبت گردید. در مقابل میزان ROS در این غلظت به طور معنی‌داری افزایش یافته است. در شرایط نامساعد محیطی، بسته شدن روزنه‌ها سبب کاهش غلظت CO_2 در بافت مزوفیل، اختلال در واکنش‌های تثبیت کربن و در نهایت افزایش تولید رادیکال‌های سوپر اکسید (O^{2-})، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) می‌گردد که با صدمات تخریبی فراوانی در سلول همراه است (۱۹و ۵۱). تولید این مولکول‌ها، یکی از اجتناب ناپذیرترین عواقب تنش خشکی در اجزای مختلف سیستم‌های سلولی از جمله کلروپلاست، پراکسی‌زوم‌ها و میتوکندری‌ها است (۴۹). افزایش فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدانی (CAT، APX و SOD) در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰، بخشی از نقش کلیدی این آنزیم‌ها در مسیر سم‌زدایی از ROSها، حذف مالون‌دی‌آلدهید و حفظ ثبات و پایداری دیواره سلولی است. کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در غلظت‌های بالای شوری (۲۵۰ میلی مولار) نسبت به غلظت‌های کمتر (۱۰۰، ۱۵۰ و حتی کنترل در مورد APX) را شاید بتوان به اثرات منفی عمومی نمک بر مسیرهای سنتز پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت داد (۴۷). برابر نتایج حاصل از آنالیز FTIR، افزایش غلظت نمک اثری روی اسیدهای نوکلئیک نداشته و آن به این معنی است که هیچ یک از سطوح تنش شوری به کار رفته در این تحقیق، نتوانسته باعث ایجاد تغییرات گسترده و شکست ساختاری در ژنوم و تجزیه آن شود. در مقابل، آنالیز FTIR همچنین نشان داد که گیاه مورد تحت تنش شوری به نوعی محتوای کربوهیدرات، آمید (تا سطح ۲۵۰ میلی مولار نمک)، پروتئین و لیپید (تا سطح ۱۵۰ میلی‌مولار نمک) را درون سلول‌هایش افزایش داده است. قبلاً نشان داده شده که پاسخ‌هایی مشابه با آنچه در تنش خشکی رخ می‌دهد، در تنش شوری نیز قابل ملاحظه است (۴۵). در این راستا، گیاهان تلاش می‌کنند که پتانسیل اسمزی خود را از طریق افزایش سنتز ترکیبات سازگارکننده بمنظور جذب بهتر آب در گیاه تحت تنش شوری، ارتقاء دهند. پرولین، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های محلول از جمله مهمترین سازگارکننده‌ها هستند که در سیتوزول سنتز و انباشته می‌شوند تا به جذب بهتر آب در مواجهه با شوری و حفظ تورژسانس برای تداوم رشد، کمک کنند (۳۱). برخی محققین به نقش پرولین بعنوان جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد و محافظ سلول ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو اشاره کرده اند (۲۹). پرولین یک اسمولیت سازگار رایج است و با تنظیم اسمزی و محافظت از غشاها، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها از اثرات مخرب تنش‌های اسمزی در گیاهان جلوگیری می‌کند (۲).

تغییر سطح لیپید در گیاهان واجد اسانس مانند مورد معطر در مواجهه با تنش را می‌توان بر اثرگذاری شرایط تنش محیطی بر میزان تولید محصولات متابولیسم ثانویه و از جمله اسانس‌های روغنی در این گیاهان قلمداد نمود (۸). تأثیر مثبت و منفی نمک بر تولید اسانس و در کل سطح لیپید گیاهان به سطح شوری وارده به گیاه بستگی دارد. اثر مثبت در سطوح پائین شوری و اثر عکس آن در غلظت‌های بالاتر را در گیاهانی همچون گشنیز (*Coriandrum sativum*) (۴۴)، گل همیشه بهار (*Calendula officinalis*) (۳۳) و مریم گلی (*Salvia officinalis*) (۵۸) گزارش گردیده است. دراین رابطه افت کمیت پروتئین و لیپید در غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار نمک را احتمالاً باید به حساس بودن مسیرهای بیوسنتز آنها به غلظت‌های بالای نمک نسبت داد.

سپاسگزاری

این تحقیق تحت حمایت دانشگاه های پیام نور مرکز اردستان و دانشگاه کاشان انجام شده است. نگارندگان بر خود لازم می‌دانند ضمن تشکر از مدیران ارشد

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

دانشگاه‌های مذکور، از زحمات سرکار خانم مهدیه صادقی، مدیر آزمایشگاه پیام نور اردستان تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

۱- حسنوند، ف.، رضایی‌نژاد، ع.، و فیضیان، م.، ۱۳۹۴. تأثیر سیلیسیک اسید بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی شمعدانی معطر(*Pelargonium graveolens* L.) تحت تنش شوری ناشی از کلرید کلسیم، مجله پژوهش های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، دوره ۳۰، شماره ۲، صفحات ۳۰۹-۳۱۷.

۲- عباسی فر، ا.ر.، محمدی خلیفه لوئی، ز.، خدیوی، ع.، و اکرمیان، م.، ۱۳۹۸. تأثیر پرولین و ۲۴-اپی براسینولید بر شاخص‌های رشد و صفات بیوشیمیایی مرزه تابستانه (*Satureja hortensis* L.). مجله پژوهش های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، دوره ۳۲، شماره ۴، صفحات ۸۷۳-۸۸۵.

3. Acosta-Motos, J.R., Diaz-Vivancos, P., Álvarez, S., Fernández-García, N., Sánchez-Blanco, M.J., and Hernández, J.A., 2015. NaCl-induced physiological and biochemical adaptative mechanisms in the ornamental *Myrtus communis* L. plants. Journal of Plant Physiology, 183, PP: 41-51.
4. Aebi, H., 1984. Catalase in vitro, Methods in Enzymology, Elsevier, 105, PP: 121-126.
5. Aghaleh, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., and Razavi, K., 2009. Salt stress effects on growth, pigments, proteins and lipid peroxidation in *Salicornia persica* and *S., europaea*., Biologia Plantarum, 53(2), PP: 243-248.
6. Ahmad, M.A., Murali, P., and Panneerselvam, R., 2013. Drought stress induced biochemical alterations in two varieties of *Paspalum scrobiculatum* L., International Journal of Current Science, 7, PP: 80-96.
7. Asada, K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, Annual Review of Plant Biology, 50(1), PP: 601-639.
8. Aziz, E.E., Al-Amier, H., and Craker, L.E., 2008. Influence of salt stress on growth and essential oil production in peppermint, pennyroyal, and apple mint. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 14(1-2), PP: 77-87.
9. Bates, L., Waldren, R., and Teare, I., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies, Plant and soil, 39(1), PP: 205-207.
10. Bayuelo-Jiménez, J.S., Debouck, D.G., and Lynch, J.P., 2003. Growth, gas exchange, water relations, and ion composition of Phaseolus species grown under saline conditions, Field Crops Research, 80(3), PP: 207-222.
11. Beauchamp, C., and Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, Analytical biochemistry, 44(1), PP: 276-287.
12. Bindschedler, L.V., Minibayeva, F., Gardner, S.L., Gerrish, C., Davies, D.R., and Bolwell, G.P., 2001. Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca^{2+}, New Phytologist, 151(1), PP: 185-194.
13. Camarda, I., and Valsecchi, F., 1983. Myrtaceae. In. I. Camarda e F. Valsecchi. Alberi earbusti spontanei della Sardegna, Edizioni Gallizzi, Sassari,45, PP: 370-374.
14. Carillo, P., Annunziata, M.G., Pontecorvo, G., Fuggi, A., and Woodrow, P., 2011. Salinity stress and salt tolerance. Abiotic stress in plants-mechanisms and adaptations. IntechOpen, 1, pp: 21-38.
15. Cassaniti, C., Leonardi, C., and Flowers, T.J., 2009. The effects of sodium chloride on ornamental shrubs, Scientia Horticulturae, 122(4), PP: 586-593.
16. Chan, Z., Grumet, R., and Loescher, W., 2011. Global gene expression analysis of transgenic, mannitol-producing, and salt-tolerant *Arabidopsis thaliana* indicates widespread changes in abiotic and biotic stress-related genes, Journal of Experimental Botany, 62(14), PP: 4787-4803.
17. Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., and Florou-Paneri, P., 2012. Aromatic plants as a source of bioactive compounds, Agriculture, 2(3), PP: 228-243.
18. Comba, M.E., Benavides, M.P., and Tomaro, M.L., 1998. Effect of salt stress on antioxidant defence system in soybean root nodules, Functional Plant Biology, 25(6), PP: 665-671.
19. Demiral, T., Turkan, I., Sekmen, A.H., and Ismail, T., Chapter 8 - Signalling Strategies During Drought and Salinity, Recent News, Advances in Botanical Research, Academic Press, Volume 57, PP: 293-317.
20. Demmig-Adams, B., and Adams Iii, W., 1992. Photoprotection and other responses of plants to

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

high light stress, Annual Review of Plant Biology, 43(1), PP: 599-626.

21. Di Cori, P., Lucioli, S., Frattarelli, A., Nota, P., Tel-Or, E., Benyamini, E., Gottlieb, H., Caboni, E., and Forni, C., 2013. Characterization of the response of in vitro cultured *Myrtus communis* L. plants to high concentrations of NaCl. Plant Physiology and Biochemistry, 73, PP: 420-426.

22. Erturk, U., Sivritepe, N., Yerlikaya, C., Bor, M., Ozdemir, F., and Turkan, I., 2007. Responses of the cherry rootstock to salinity in vitro, Biologia Plantarum, 51(3), PP: 597-600.

23. FAO, 2013. The state of food and agriculture Rome, FAO.

24. Fedina, I., and Tsonev, T., 1997. Effect of pretreatment with methyl jasmonate on the response of Pisum sativum to salt stress, Journal of Plant Physiology, 151(6), PP: 735-740.

25. Gratani, L., Catoni, R., and Varone, L., 2013. Morphological, anatomical and physiological leaf traits of *Q., ilex*, *P., latifolia*, *P., lentiscus*, and *M., communis* and their response to Mediterranean climate stress factors, Botanical Studies, 54(1), 35 p.

26. Grigoriadou, K., and Leventakis, N., 1999. Preliminary study on large scale in vitro propagation of *Myrtus communis* L., IV International Symposium on New Floricultural Crops, 541 p.

27. Gucci, R., Massai, R., Casano, S., Gravano, E., and Lucchesini, M., 1997. The effect of drought on gas exchange and water potential in leaves of seven Mediterranean woody species. Impacts of global change on tree physiology and forest ecosystems, Springer, PP: 225-231.

28. Heath, R.L., and Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I., Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, Archives of Biochemistry and Biophysics, 125(1), PP: 189-198.

29. Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., and Verma, D.P.S., 2000. Removal of feedback inhibition of Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress., Plant Physiology, 122(4), PP: 1129-1136.

30. Ings, J., Mur, L.A., Robson, P.R., and Bosch, M., 2013. Physiological and growth responses to water deficit in the bioenergy crop *Miscanthus x giganteus*, Frontiers in plant science, 4, 468 p.

31. Kerepesi, I., and Galiba, G., 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings, Crop Science, 40(2), PP: 482-487.

32. Kiarostami, Kh., Mohseni, R., and Saboora, A., 2010. Biochemical changes of *Rosmarinus officinalis* under salt stress. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 6(3), pp: 114-122.

33. Khalid, K.A., and da Silva, J.A.T., 2010. Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L., flower heads cultivated under salt stress conditions. Scientia Horticulturae, 126(2), PP: 297-305.

34. Khan, M.M., Al-Mas'oudi, R.S., Al-Said, F., and Khan, I., 2013. Salinity effects on growth, electrolyte leakage, chlorophyll content and lipid peroxidation in cucumber (*Cucumis sativus* L.), International Conference on Food and Agricultural Sciences Malaysia: IACSIT Press.

35. Koffler, B.E., Luschin-Ebengreuth, N., and Zechmann, B., 2015. Compartment specific changes of the antioxidative status in *Arabidopsis thaliana* during salt stress. Journal of Plant Biology, 58(1), PP: 8-16.

36. Lichtenthaler, H., and Welburn, W., 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents." *Biochemical Society Transaction,* pp: 591-592.

37. Liu, C., Liu, Y., Guo, K., Fan, D., Li, G., Zheng, Y., Yu, L. and Yang, R. 2011. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China, Environmental and Experimental Botany, 71(2), PP: 174-183.

38. Llusia, J., Peñuelas, J., Alessio, G., and Ogaya, R., 2011. Species-specific, seasonal, inter-annual, and historically-accumulated changes in foliar terpene emission rates in *Phillyrea latifolia* and *Quercus ilex* submitted to rain exclusion in the Prades Mountains (Catalonia), Russian Journal of Plant Physiology, 58(1), PP: 126-132.37.

39. McKinney, H., 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*, Journal of Agricultural Research, 26(5), PP: 195-218.

40. Meloni, D.A., Gulotta, M.R., Martínez, C.A., and Oliva, M.A., 2004. The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in Prosopis alba, Brazilian Journal of Plant Physiology, 16(1), PP: 39-46.

41. Mendes, M., Gazarini, L., and Rodrigues, M., 2001. Acclimation of *Myrtus communis* to

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

contrasting Mediterranean light environments-effects on structure and chemical composition of foliage and plant water relations, Environmental and Experimental Botany, 45(2), PP: 165-178.

42. Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, Physiologia Plantarum, 15(3), 41, PP: 473-497.

43. Nakano, Y., and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, Plant and cell physiology, 22(5), PP: 867-880.

44. Neffati, M., and Marzouk, B., 2008. Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions, Industrial crops and products, 28(2), PP: 137-142.

45. Nemati, I., Moradi, F., Gholizadeh, S., Esmaeili, M., and Bihamta, M., 2011. The effect of salinity stress on ions and soluble sugars distribution in leaves, leaf sheaths and roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings, Plant, Soil and Environment, 57(1), PP: 26-33.

46. Nobre, J., 1994. In vitro shoot proliferation of *Myrtus communis* L., from field-grown plants, Scientia horticulturae, 58(3), PP: 253-258.

47. Parida, A.K., and Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, Ecotoxicology and Environmental Safety, 60(3), PP: 324-349.

48. Parra, R., and Amo-Marco, J., 1998. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtus communis* L.), Plant Cell Reports, 18(3), PP: 325-330.

49. Phaniendra, A., Jestadi, D.B., and Periyasamy, L., 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 30(1), PP: 11-26.

50. Philpot, M.J., 2004. The sacred tree in religion and myth, Dover Publications, 192 p.

51. Sairam, R. K., and Saxena, D. C., 2000. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance, Journal of Agronomy and Crop Science, 184(1), PP: 55-61.

52. Sairam, R.K., Rao, K.V., and Srivastava, G., 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science, 163(5), PP: 1037-1046.

53. Şan, B., Karakurt, Y., and Dönmez, F., 2015. Effects of thidiazuron and activated charcoal on in vitro shoot proliferation and rooting of Myrtle (*Myrtus communis* L.), Journal of Agricultural Sciences, 21(2), PP: 177-183.

54. Scarpa, G.M., Milia, M., and Satta, M., 2000. The influence of growth regulators on proliferation and rooting of in vitro propagated myrtle, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62(3), PP: 175-179.

55. Sevengor, S., Yasar, F., Kusvuran, S., and Ellialtioglu, S., 2011. The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidative enzymes of pumpkin seedling. African Journal of Agricultural Research, 6(21), PP: 4920-4924.

56. Shekafandeh, A., 2007. Effect of different growth regulators and source of carbohydrates on in and ex vitro rooting of Iranian myrtle. International Journal of Agricultural Research, 2, PP: 152-158.

57. Slabu, C., Zörb, C., Steffens, D., and Schubert, S., 2009. Is salt stress of faba bean (*Vicia faba*) caused by Na+ or Cl–toxicity? Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 172(5), PP: 644-651.

58. Taarit, M.B., Msaada, K., Hosni, K., and Marzouk, B., 2010. Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress, Food Chemistry, 119(3), PP: 951-956.

59. Tattini, M., Traversi, M.L., Castelli, S., Biricolti, S., Guidi, L., and Massai, R., 2009. Contrasting response mechanisms to root-zone salinity in three co-occurring Mediterranean woody evergreens: a physiological and biochemical study. Functional Plant Biology, 36(6), PP: 551-563.

60. Tavakkoli, E., Fatehi, F., Coventry, S., Rengasamy, P., and McDonald, G.K., 2011. Additive effects of Na+ and Cl–ions on barley growth under salinity stress, Journal of Experimental Botany, 62(6), PP: 2189-2203.

61. Yang, F., Xiao, X., Zhang, S., Korpelainen, H., and Li, C., 2009. Salt stress responses in *Populus cathayana* Rehder, Plant Science, 176(5), PP: 669-677.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.8.2

Regenerate shoot responses of aromatic *Myrtus communis* L. to salinity under *in vitro* condition

Aghaie P.[1*], Hosseini Tafreshi S.A.[2] and Toghyani M.A.[3]

[1] **Dept. of Biology, Faculty of Science, Payame Noor Universtiy, Tehran, I.R. of Iran.**

[2] **Biotechnology division, Dept. of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, I.R. of Iran**

[3] **Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahed University, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Salinity is one of the most important limits growth and distribution of terrestrial plants. Salt stress, by affecting the osmotic potential of the soil around the root, causes toxicity to plants leading to reduced growth, restricted crop production and impaired nutrient uptake. The *Myrtus communis* L. is an ornamental-medicinal shrub that is of particular importance due to its useful aromatic compounds, its uses in traditional medicine and applications in natural ecosystem restoration and soil erosion projects. Few studies have been conducted on the physiological responses and resistance of myrtle to abiotic stresses and the limited available results make it difficult to generalize to all populations. In the present study, we attempted to investigate shoot regeneration and growth rate of myrtle over different salinity levels (0, 100, 150 and 250 mM NaCl) and under in vitro culture condition. Additionally, some physiological responses such as pigment content, RWC, cell membrane stability, leaf proline content, amount of reactive oxygen species, biochemical parameters, and activity of some antioxidant enzymes, were evaluated. The results showed that the salinity at moderate and severe levels (150 and 250 mM NaCl, respectively) had significant effects on in vitro growth and regeneration, membrane stability, carbohydrate and protein contents as well as leaf chlorosis and necrosis. The results also showed that relative water content, chlorophyll content and resistance index were only affected at high salinity level, while lipid and proline content, activity of antioxidant enzymes and ROS levels were relatively affected at all salinity levels.

Key words: *Myrtus communis* L, Salinity stress, Antioxidant enzymes, In vitro, ROS, FTIR, Proline