Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 12:42 IRST on Tuesday September 26th 2017

تغییرات رشد و اندازه سلول‌های کالوس *Salsola arbuscula* تحت تنش شوری

فریبا امینی*، زهره قنبر زاده و مهری عسکری

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، کد پستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۲۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۱۴)

چکیده:

شوری یک تنش محیطی است که مانع اصلی بازدهی محصولات کشاورزی در جهان است. *Salsola arbuscula* یک گیاه هالوفیت و مقاوم به شوری می‌باشد. لذا این تحقیق با هدف بررسی مکانیسم مقاومت به شوری با مطالعه تغییرات رشد و بررسی میکروسکوپی کالوس‌ها انجام گرفت. بدین منظور ابتدا بذر گیاه در محیط کشت MS کشت گردید و پس از ۲ ماه از جداکشت ریشه در محیط کشت MS حاوی ترکیبات هورمونی Kin ($1mgL^{-1}$) و 2,4-D ($1mgL^{-1}$) کالوس تهیه شد. پس از دو مرحله واکشت کالوس‌ها و تکثیر آنها کالوس‌ها به محیط کشت قبلی همراه با غلظت‌های مختلف نمک (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و۴۰۰ میلی‌مولار) منتقل و پس از یک ماه نگهداری در شرایط این ویترو، وزن‌تر و خشک، میزان آب نسبی کالوس، میزان رشد نسبی کالوس، شاخص حساسیت و ابعاد سلول‌ها اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد با افزایش غلظت NaCl رنگ کالوس‌ها تغییر کرده و نکروزه شدن آنها بیشتر و سریع‌تر رخ داد. همچنین با افزایش غلظت NaCl وزن‌تر و خشک، میزان آب کالوس، میزان رشد نسبی و شاخص حساسیت کاهش یافت و میزان کاهش در وزن‌تر بیشتر از وزن خشک بود. کاهش طول، عرض و مساحت سلول‌ها نیز با افزایش تنش مشاهده گردید. تأثیر تنش شوری بر کاهش طول سلول‌ها نسبت به عرض سلول‌ها بیشتر بود. در مجموع کالوس با کاهش رشد و اندازه سلول‌ها توانسته است در برابر شوری مقاومت کند.

واژه‌های کلیدی: ابعاد سلول، تنش شوری، شاخص حساسیت، *Salsola arbuscula*

مقدمه:

گرچه شوری پدیده مشترک در نواحی خشک و نیمه خشک جهان است، خاک‌های تحت تأثیر نمک در همه نواحی جهان، و در طیف گسترده‌ای از ارتفاعات به ثبت رسیده‌اند (Madhava Rao *et al*., 2006). شوری خاک بر اساس EC مشخص شده است ، EC به صورت هدایت الکتریکی املاح محلول در آب خاک، که بعد از افزودن مقدار معینی آب مقطر به آن و رسیدن به درجه اشباع معین می‌گردد تعریف می‌شود. بر اساس طبقه‌بندی کریسپ یک خاک شور دارای EC مساوی و یا بیشتر از ۴ دسی‌زیمنس بر متر می‌باشد (EL-Bassiouny and Bekheta, 2007). افزایش شوری محیط کشت تغییرات خاصی را در سطوح سلول، بافت و اندام القا می‌کند که به صورت فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و آناتومی هستند (Boughalleb *et al*., 2009). در بسیاری مطالعات مشخص شده است که شوری زیاد سبب تغییراتی از قبیل کاهش ضخامت برگ (Cavusoglu *et al*., 2007)، اندازه سلول‌ها (احسان پور و امینی، ۱۳۸۲)، تعداد روزنه، سطح بین دستجات آوندی و تعداد سلول‌های اپیدرمی می‌شود

* نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: F-Amini@araku.ac.ir

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 12:42 IRST on Tuesday September 26th 2017

(Cavusoglu *et al*., 2007). مطالعات زیادی نشان دهنده این موضوع هستند که افزایش تنش شوری موجب بسیاری از تغییرات آناتومیکی از جمله افزایش ضخامت برگ، تعداد سلول‌های اپیدرمی و تعداد روزنه می‌گردند (Kilic *et al*., 2007). تغییرات ساختاری دیگری در گیاهان تحت تنش شوری از قبیل ممانعت از تمایز یابی، ضخامت و تعداد آوندهای چوب تغییر یافته اتفاق می‌افتد (Hacke *et al*., 2006). در چندین مطالعه پیشنهاد شده است همه‌ی گیاهان به طور کلی برای تحمل در برابر شوری مکانیسم‌های تنظیمی مشابهی دارند و تفاوت بین گونه‌های هالوفیت و گلیکوفیت نسبتاً کم است. از آنجایی که مقاومت به شوری یک رفتار پیچیده شامل چندین خصوصیت برهم‌کنش است، علاقه به مطالعه رفتار آناتومیک و مورفولوژیک در گونه‌های هالوفیتیک و گلیکوفیتیک جهت شناسایی و درک مکانیسم‌های مقاومت به شوری افزایش می‌یابد (Boughalleb *et al*., 2009).

مطالعه هالوفیت‌ها و غیر هالوفیت‌ها نشان داده است که سازوکار سازگاری به تنش شوری موجود در گیاه کامل در بافت کالوس نیز مشاهده می‌شود اما تفاوت‌هایی بین آنها وجود دارد. نتایج بررسی کالوس‌های هالوفیت *Sesuvium portulacastrum* L. تحت تنش شوری مشخص کرد که کالوس‌ها به طور متفاوت به تنش شوری در مقایسه با پاسخ‌های مشاهده شده در کل گیاه تحت تنش شوری یا خشکی واکنش می‌دهند (Messedi *et al*. 2004; Slama *et al*. 2008). در سطوح بالای شوری گیاه شاید به طور موثر اثر سمی یون‌های نمک را در بخش‌های مختلف گیاهان با تجمع در بخش‌های متفاوت از طریق تقسیم‌بندی در واکوئل و یا خروج توزیع کند، بنابراین ظرفیت تحمل شوری بهتری را نشان دهد که چنین سازوکاری در سطح سلولی یافت نشده است. بعلاوه، ممانعت ورود یون‌های نمک اضافه داخل گیاه در سطح ریشه آسیب به کل گیاه را کاهش می‌دهد که در مورد کالوس این نوع سازگاری مشاهده نمی‌گردد. به علاوه، چندین فاکتور فیزیولوژی راه‌اندازی شده در سطح کل گیاه موجب تحمل به شوری می‌گردند که در کشت‌های کالوس تمایز نیافته وجود ندارد (Zhang *et al*. 2004). این می‌تواند دلیلی باشد که کشت کالوس و گیاه کامل به طور متفاوت به تنش شوری واکنش نشان دهند.

Salsola بزرگ‌ترین جنس در خانواده Chenopodiaceae است که ۱۲۰ تا ۲۰۰ گونه دارد و لاین های تکاملی مجزای شروع شده و تکامل یافته در این جنس موجود است. درختچه‌های هالوفیت جنس‌هایی از قبیل *Salsola* می‌توانند در خاک‌های شور رشد کنند به طوری که آنها یک زیستگاه و منبع مناسب از چراگاه‌های فصل خشک برای چهارپایان فراهم می‌کنند. این گیاه در مراحل بلوغ مقاومت بالایی نسبت به شوری و خشکی خاک، تغییرات pH و عدم ثبات شرایط آب‌وهوایی دارند. این ویژگی آن را برای رشد در نواحی خشک و نیمه‌خشک مناسب کرده است (Heidari-Sharifabad and Mirzaie-Nodoushan, 2006). این گیاه در فصول بهار و پاییز از منابع علوفه حیوانی است. از جمله استفاده‌های دیگر از این نوع گیاهان تزیین نواحی شهری، در شهرهایی با آب‌وهوای بیابانی است (Ryan *et al*., 2007).

با توجه به اینکه تاکنون اطلاعات زیادی در زمینه اثر تنش شوری بر اندازه سلول‌های گیاهان در کشت این ویترو گزارش نشده است و این اطلاعات می‌تواند بخشی از چگونگی عکس‌العمل سلول‌ها در برابر تنش‌های محیطی را روشن سازد و بدین ترتیب مکانیسم مقاومت نسبت به تنش شوری در این گیاه نیز مشخص خواهد گردید لذا این تحقیق با هدف بررسی مکانیسم مقاومت نسبت به تنش شوری در کالوس گیاه *Salsola arbuscula* با تکیه بر تغییرات رشد و اندازه سلول‌ها انجام گرفت. اطلاعات به دست آمده می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های افزایش مقاومت به شوری در گیاه *Salsola arbuscula* کمک کند.

مواد و روش‌ها:

کشت بذر، تولید کالوس و انجام تیمار شوری: بذر گیاه *Salsola arbuscula* از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 12:42 IRST on Tuesday September 26th 2017

گردید. بذر این گیاه دارای باله می‌باشد که این باله‌ها علاوه بر این‌که حاوی آبسیزیک اسید می‌باشند یک سد مکانیکی در مقابل ظهور ریشه‌چه بوده و در نتیجه از جوانه‌زنی بذر جلوگیری می‌کنند (Yan Weia *et al,* 2008). از این رو قبل از استفاده از بذر به منظور کشت، باله‌ها جدا شده و سپس بذرها با استفاده از اتانول ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و سپس وایتکس ۲۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. در پایان ۴-۳ بار شستشو در شرایط استریل در کابینت ایرفلو و با استفاده از آب مقطر استریل انجام گرفت. سپس بذرهای استریل به تعداد ۱۲-۱۰ عدد در شیشه‌های حاوی محیط کشت MS (Murashig and Skoog, 1962) کشت شدند. بذرهای کشت شده در اتاق کشت با نور حدود ۱۱۰ mmol photons.m^{-2}.S^{-1} و فتوپریود ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت نور نگهداری گردید. دمای اتاق کشت ۲۶-۲۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد (Ajmal Khan *et al*., 2002). پس از جوانه‌زنی و رشد گیاهان به مدت دو ماه در شرایط استاندارد، جداکشت ریشه گیاهان قطعه قطعه شده و برای تولید کالوس در محیط کشت MS حاوی ۱mg/L 2,4-D، ۰/۵، ۰ و ۱mg/L Kin، ۰/۵، ۰ و ترکیبی از این دو هورمون جهت تولید کالوس منتقل شدند. پس از گذشت ۲ ماه و تولید کالوس از جداکشت‌ها کالوس‌ها جهت تکثیر به طور منظم در فاصله زمانی ۲۰ روز یک‌بار در محیط کشت بهینه واکشت شده و پس از سه مرحله واکشت و تکثیر کالوس ها تحت تنش غلظت‌های مختلف نمک (۰, ۱۰۰, ۲۰۰, ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار) قرار گرفتند.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: پس از گذشت یک ماه از زمان شروع تیمار شوری، کالوس‌هایی که در ابتدا وزن شده بودند به فویل‌های وزن شده انتقال یافته و مجدداً توزین شدند، با کم کردن وزن اولیه و وزن فویل از وزن کل، وزن تر کالوس‌ها اندازه‌گیری گردید. کالوس‌های قرار گرفته در فویل به آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت منتقل شدند، سپس آنها را از آون خارج کرده و وزن شدند. با کم کردن وزن فویل از وزن حاصله وزن خشک کالوس در غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار NaCl محاسبه گردید. میزان رشد نسبی کالوس (RGR) طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Lokhande *et al*., 2010):

$$RGR\% = (W_f - W_i) / W_i * 100\%$$ (فرمول۱)

RGR= میزان رشد نسبی کالوس، W_i = وزن اولیه کالوس در زمان انتقال به محیط شوری، W_f= وزن نهایی کالوس‌ها پس از یک ماه

جهت اندازه‌گیری میزان آب نسبی کالوس‌ها (RWC) از فرمول زیر استفاده گردید (Sun *et al*., 2010).

$$X\% = (FW - DW) * 100\% / FW$$ (فرمول۲)

X = مقدار آب نسبی کالوس، FW= وزن‌تر کالوس، DW= وزن خشک کالوس

شاخص حساسیت (SI) به‌منظور اندازه‌گیری میزان حساسیت گیاه به NaCl بکار می‌رود این پارامتر هرچه منفی‌تر باشد گیاه به NaCl حساس‌تر خواهد بود. این شاخص مطابق روش Saadallah و همکاران (۲۰۰۱) از این فرمول محاسبه می‌گردد:

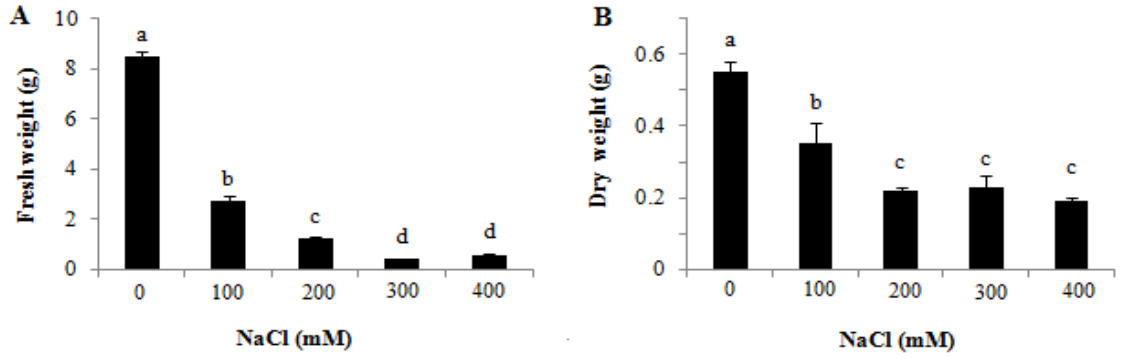
(فرمول ۳)

$$SI_{NaCl}\ (\%) = [(DW_{NaCl} - DW_{control})/DW_{control}] *100$$

SI: شاخص حساسیت کالوس، DW_{NaCl}: وزن خشک کالوس حاصل از شوری، $DW_{control}$: وزن خشک کالوس شاهد (Saadallah *et al*., 2001).

اندازه‌گیری اندازه سلول‌ها: جهت بررسی ابعاد سلول‌های کالوس تحت تنش شوری ابتدا نمونه‌های تصادفی کالوس‌ها از هر غلظت ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار روی لام میکروسکوپی قرار گرفته و با رنگ ائوزین رنگ‌آمیزی گردید (Lillie, 1965)، سپس از نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری متصل به دوربین و مانیتور کامپیوتر و با بزرگنمایی شیئی ۴۰ عکس‌برداری شد. طول، عرض و مساحت سلول‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار MOTIC (Motic Images Advanced 3.2 Software)

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 12:42 IRST on Tuesday September 26th 2017



شکل۱- تغییرات A) وزن‌تر و B) وزن خشک کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیر مشابه نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵٪ بر اساس روش دانکن می‌باشد.

(نرم افزاری است که به کمک آن می‌توان ابعاد و مساحت سلول‌ها را از روی عکس آنها اندازه گرفت) محاسبه گردید.

آنالیز آماری: آزمایشات انجام شده برای هر تیمار در سه تکرار انجام شد. طرح آماری مورد استفاده طرح کاملاً تصادفی و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS16 و مقایسه میانگین‌ها بر اساس تست دانکن انجام گرفت. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج:

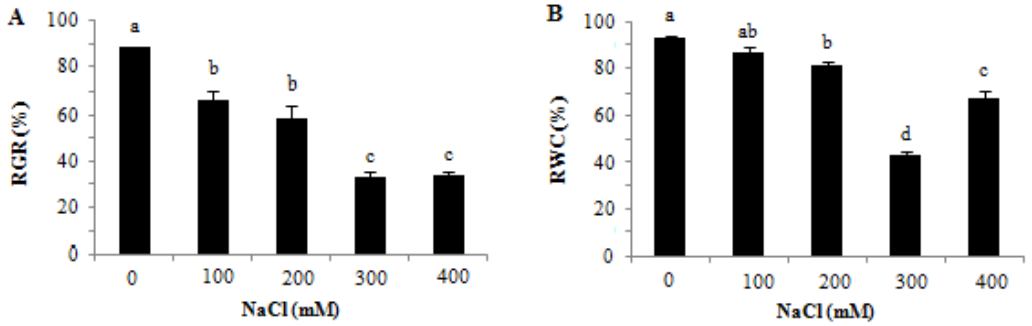
تأثیر تنش شوری بر شاخص‌های رشد کالوس: نتایج نشان داد که مناسب‌ترین محیط کشت MS حاوی ترکیبات Kin ($1mgL^{-1}$) و 2,4-D ($1mgL^{-1}$) بود، چون بهترین رشد کالوس‌ها در این محیط کشت مشاهده گردید (داده‌ها ارائه نشده است). بررسی ظاهری کالوس‌ها پس از یک ماه تنش شوری نشان‌دهنده کاهش رشد و تسریع پیری و نکروزه شدن در آنها بود و با افزایش غلظت نمک این روند افزایش بیشتری را نشان داد اما با این حال در غلظت ۴۰۰ mM نمک کالوس‌ها هنوز قادر به بقا بودند. با افزایش مقادیر NaCl از صفر تا ۴۰۰ میلی‌مولار، به‌طور معنی‌داری (در سطح ۱٪) از میزان وزن خشک و تر کالوس کاسته شد. بیشترین و کم‌ترین میانگین وزن خشک در شاهد (۰ میلی‌مولار) و ۴۰۰ (میلی‌مولار) به ترتیب ۰/۵۵ و ۰/۱۹ گرم (۶۵٪ کاهش نسبت به شاهد) بود. بیشترین و کم‌ترین میانگین وزن تر کالوس نیز در شاهد(۰ میلی‌مولار) و ۳۰۰ (میلی‌مولار) به‌ترتیب ۸/۴۷ و ۰/۴ گرم (۹۵٪ کاهش) بود. در هر دو مورد اختلاف بین نمونه شاهد و سایر تیمارها معنی‌دار (در سطح ۱٪) بوده و میزان کاهش وزن‌تر از خشک بیشتر بود (شکل ۱).

بررسی داده‌های مربوط به رشد نسبی و آب نسبی کالوس گیاه *Salsola arbuscula* نشان داد که تیمار شوری بر RGR و RWC کالوس تأثیر معنی‌دار (در سطح ۱٪) دارد. در کالوس بیشترین RGR و RWC در غلظت صفر میلی‌مولار NaCl (شاهد) به ترتیب با میانگین ۸۸/۴۶ و ۹۳/۵۱٪ درصد و کم‌ترین آنها در تیمار ۳۰۰ میلی‌مولار به ترتیب با میانگین ۳۳/۲۱٪ و ۴۲/۹۱٪ درصد (به ترتیب ۶۲٪ و ۵۴٪ کاهش نسبت به شاهد) محاسبه شده است (شکل۲).

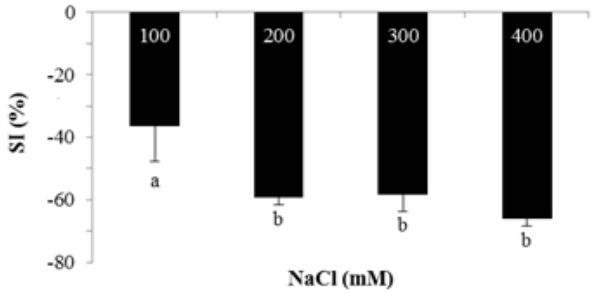
نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد تفاوت معنی‌داری بین شاخص حساسیت در تیمار ۱۰۰NaCl mM با تیمارهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار NaCl وجود دارد (در سطح ۵٪) و با افزایش شوری تا غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار SI کاهش و پس از آن تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (شکل۳).

تأثیر تنش شوری بر اندازه سلول‌های کالوس: آنالیز داده‌ها به روش دانکن نشان داد که تنش شوری تأثیر معنی‌داری (در سطح ۱٪) بر طول و عرض سلول‌های کالوس داشت. در کالوس تحت تنش شوری از غلظت

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 12:42 IRST on Tuesday September 26th 2017



شکل۲- تغییرات A) میزان رشد نسبی و B) آب نسبی کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیر مشابه نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵٪ بر اساس روش دانکن می‌باشد.



شکل۳- تغییرات شاخص حساسیت کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیر مشابه نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵٪ بر اساس روش دانکن می‌باشد.

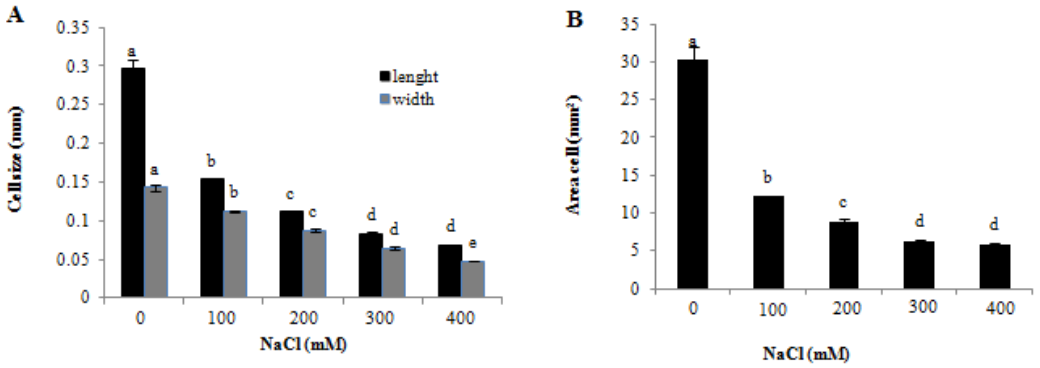
شاهد تا ۴۰۰ میلی‌مولار نمک به‌طور معنی‌داری طول و عرض سلول‌ها کاهش یافت به طوری که بیشترین میزان طول و عرض سلول‌ها در شاهد به ترتیب با میانگین ۰/۲۹۶ و ۰/۱۴۳ میلی‌متر و کم‌ترین آنها در تیمار ۴۰۰ میلی‌مولار NaCl به ترتیب با میانگین ۰/۰۶۸ و ۰/۰۴۸ میلی‌متر مشاهده شد ولی کاهش طول سلول‌ها نسبت به عرض بیشتر بود (شکل ۴A). مساحت سلول‌ها نیز با افزایش تنش کاهش یافت که به ترتیب بیشترین و کم‌ترین آن در شاهد و تیمار ۴۰۰ میلی‌مولار مشاهده گردید (شکل ۴B). همچنین در غلظت‌های مختلف شوری نسبت به شاهد فشردگی و چسبیدن سلول‌ها به یکدیگر افزایش پیدا کرد که با افزایش شوری این میزان فشردگی افزایش یافت.

بحث:

در این تحقیق با افزایش تنش شوری کاهش رشد و تسریع پیری و نکروزه شدن کالوس‌ها مشاهده گردید که موافق با گزارشات حاصله در کالوس *Odyssea paucinervis* بود (Naidoo *et al*., 2008). وزن‌تر و خشک اغلب برای آشکار کردن رشد گیاهان و سلول‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی اندازه‌گیری می‌شود (Yang *et al*., 2010). یکی از استراتژی‌های موجود در گیاه تحت تنش شوری میزان رشد آهسته آنها است که در تعدادی از کشت‌های درون شیشه هالوفیت‌ها و غیر هالوفیت‌ها مشاهده می‌شود (Al-Khayri 2002; Zhang *et al*., 2004; Patade *et al*., 2008; Zhao *et al*., 2009). کاهش رشد نه تنها به گیاه برای حفظ انرژی کمک می‌کند بلکه همچنین خطر آسیب ژنتیکی را نیز محدود می‌کند (Lokhande *et al*., 2010).

با افزایش غلظت NaCl در کالوس *Salsola arbuscula* وزن‌تر و خشک کالوس نسبت به شاهد به طور چشمگیری کاهش یافت و این کاهش در وزن‌تر بیشتر از وزن خشک بود. نتایج مشابهی در کالوس گیاه *Sesuvium portulacastrum* L. مشاهده شده است

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 12:42 IRST on Tuesday September 26th 2017



شکل۴- تغییرات A) طول و عرض و B) مساحت سلول‌های کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیر مشابه نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵٪ بر اساس روش دانکن می‌باشد.

(Lokhande *et al*., 2010). کاهش رشد کالوس (وزن‌تر و خشک) تحت تنش شوری شاید نتیجه عدم توازن تغذیه‌ای به علت دخالت یون‌های نمک اضافی با مواد مغذی ضروری دخیل در جذب و انتقال باشد (Patade *et al*., 2008). گرچه سطح بازدارندگی NaCl در بین ژنوتیپ‌ها گوناگون است، بازدارندگی رشد کالوس در پاسخ به افزایش غلظت NaCl در تعدادی از کشت‌های درون شیشه مشاهده شده است. مطالعات نشان داده است که رشد کالوس خرما، براساس وزن‌تر کالوس، به طور کلی همان روند بازدارندگی رشد در گیاه را دنبال می‌کند (Al-Khayri, 2002). رشد پایدار کالوس‌های تحمل کننده در برنج در محیط کشت NaCl نشان داد که بافت‌ها شوری را تحمل می‌کنند (Basu *et al*., 2002). این نویسندگان گزارش کردند که کالوس‌های برنج تحمل کننده قابلیت زیست بالا و ظرفیت رشد مجدد را در حضور NaCl در مقایسه با کالوس‌های حساس حفظ می‌کنند. در کالوس *Nitraria tangutaum* Bobr. غلظت‌های کم شوری (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) سبب کاهش کمی در وزن‌تر و افزایش چشمگیر در وزن خشک کالوس در مقایسه با شاهد گردیدند هر چند غلظت‌های بالای نمک رشد کالوس را باز می‌دارند بنابراین کالوس *Nitraria tangutaum* Bobr رشد بهتری را در پاسخ به غلظت‌های کم نمک نشان می‌دهد که تحمل سلولی به شوری ملایم در این گونه هالوفیت را پیشنهاد می‌کند (Yang *et al*., 2010).

در صورتی که در این تحقیق وزن‌تر و خشک کالوس با افزایش غلظت NaCl کاهش یافت. نمک سرعت توسعه سلول‌ها را کند کرده و در غلظت‌های بالا این توسعه را کاملاً باز می‌دارد. در دیگر هالوفیت‌های خانواده Chenopodiaceae مانند *Halosarcia Pergranulata* و *Suaeda fruticosa* و *Sarcocorina fruticosa* رشد بهینه در شوری بالا کند شده است. غلظت‌های بالای NaCl رشد را حتی در گونه‌های مقاوم به شوری ممانعت می‌کند که ممکن است به علت اثر سمی NaCl و یا عدم توانایی جذب آب به علت فشار اسمزی بالای محیط باشد. در آزمایشی که بر روی سه گونه سالسولا شامل *Salsola orientalis* و *S. dendroides* و *S. richteri* انجام شد ثابت کرد که هر سه گونه در نخستین سطح شوری ۱۰۰ میلی‌مولار رشد مثبتی در بخش هوایی داشته‌اند ولی در سطوح بالاتر NaCl (۲۰۰ الی ۴۰۰ میلی‌مولار) رشد در بخش هوایی به طور معنی‌داری کاهش یافته است (Heidari-Sharifabad and Mirzaie- Nodoushan, 2006)..

مشخص شده است که رشد تحت شرایط اسمزی شاید به طور عمده به علت کاهش حجم سیتوپلاسم و کاهش تورگر سلول به دلیل خروج اسمزی آب داخل سلولی کاهش یابد (Summart *et al*., 2010). در این تحقیق بررسی میزان رشد نسبی مشخص کرد که بالاترین میزان RGR در شاهد بوده و پس از آن با افزایش غلظت شوری

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 12:42 IRST on Tuesday September 26th 2017

میزان RGR کاهش یافت (شکل ۱). موافق با نتایج گزارش شده، مطالعه رشد کالوس گیاه *Sesuvium portulacastrum* L. تحت تیمار NaCl کاهش روند رشد نسبی کالوس‌ها را نشان داد (Lokhande *et al*., 2010). کاهش میزان RGR تحت تنش شوری نسبت به شاهد در کالوس‌های چند گونه هالوفیت از قبیل *Populus euphratica* (Zhang *et al*., 2004)، *Thellungiella halophila* (Zhao *et al*., 2009)، و چند گونه گلیکوفیت مانند نیشکر(Patade *et al*., 2008; Errabii *et al*., 2007) و آرابیدوپسیس (Zhao *et al*.,2009) گزارش شده است.

نتایج این تحقیق نشان داد تنش شوری بر میزان آب نسبی کالوس اثر منفی داشته و با افزایش تنش از میزان آن کاسته شد. بیشترین و کم‌ترین میزان آب نسبی کالوس به ترتیب در تیمار شاهد و ۳۰۰ میلی‌مولار بوده و در تیمار ۴۰۰ میلی‌مولار دوباره میزان آب نسبی کالوس نسبت به غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار افزایش پیدا کرد (شکل ۱). این امر احتمالاً به علت فعال شدن سازوکارهای مقاومت کالوس در غلظت بالای نمک جهت حفظ و بقا در شرایط تنش باشد. تنش شوری سبب کاهش چشمگیر در مقدار آب نسبی کالوس‌های ۸ ژنوتیپ انتخاب شده گندم (تحمل کننده شوری و حساس به شوری) شد اما کاهش در ژنوتیپ‌های تحمل کننده نسبت به حساس کمتر بود (Koutoua *et al*., 2011). از طرف دیگر Almansouri و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که در برخی ارقام گندم مقدار آب نسبی کالوس تحت تأثیر تنش شوری قرار نگرفته است ، بنابراین به طور کلی تغییر میزان آب نسبی به طور چشمگیری به وسیله ژنوتیپ مشخص می‌شود. در کالوس *Sesuvium portulacastrum* L. درصد میزان آب نسبی کالوس‌های تیمار شده با شوری به طور چشمگیری با افزایش در سطوح نمک در مقایسه با کالوس‌های شاهد کاهش یافت (Lokhande *et al*., 2010). تنش اسمزی بالا دسترسی به آب سلول در محیط کشت را کاهش می‌دهد، همچنین وزن‌تر و مقدار آب سلول کالوس‌های تحت تنش در مقایسه با کالوس‌های شاهد کاهش می‌یابد (Chamandoosti, 2007). اثر منفی شوری بر رشد گیاهان و مقدار آب شاید به علت نقص متابولیسم در سلول‌های گیاهی است چون با فشار اسمزی حاصله از شوری بالا جذب آب و بعضی مواد مغذی حل شده در محیط کشت محدود می‌شود (Cicek and Cakirlar, 2002). مشخص شده است که در نیشکر مقدار آب کالوس به طور چشمگیری متناسب با افزایش تنش کاهش می‌یابد. در بالاترین فشار اسمزی، مقدار آب تا حدود ۴۸-۴۵٪ سلول‌های شاهد کاهش یافت (Errabii *et al*., 2006).

برای درک حساسیت گیاهان به شوری از شاخص حساسیت استفاده می‌شود. هرچه این شاخص منفی‌تر باشد گیاه به شوری حساس‌تر است (Saadallah *et al*., 2001). نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد SI در غلظت ۱۰۰mM NaCl از همه کمتر و تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ وجود ندارد (شکل۲). بنابراین کالوس گیاه *Salsola arbuscula* به شوری مقاوم هستند. Gorai and Neffati (۲۰۱۱) با بررسی SI در ریشه و ساقه گیاه *Reaumuria vermiculata* به این نتیجه رسیدند که حساسیت ریشه به شوری با SI منفی‌تر نسبت به ساقه بیشتر است.

بررسی و آنالیز داده‌ها نشان داد که تنش شوری تأثیر معنی‌داری (در سطح ۱٪) بر ابعاد سلول‌های کالوس دارد. در کالوس تحت تنش شوری از غلظت شاهد تا ۴۰۰ میلی‌مولار به طور معنی‌داری طول، عرض و مساحت سلول‌ها کاهش می‌یابد بیشترین و کم‌ترین میانگین طول، عرض و مساحت سلول‌ها به‌ترتیب در تیمار شاهد و ۴۰۰ میلی‌مولار بود. همچنین در غلظت شوری نسبت به شاهد تراکم و فشردگی سلول‌ها به یکدیگر افزایش یافت به گونه‌ای که جدا کردن سلول‌ها از یکدیگر مشکل بود و با افزایش شوری این میزان فشردگی افزایش یافت. نتایج نشان دادند کاهش طول سلول‌ها نسبت به عرض آنها تحت تنش شوری بیشتر

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 12:42 IRST on Tuesday September 26th 2017

بود (شکل ۳و۴). اولین پاسخ گیاه نسبت به شوری کاهش رشد است (احسان پور و امینی، ۱۳۸۲).

در مطالعه حاضر کاهش اندازه سلول به طور محسوس با افزایش تنش شوری در محیط کشت مشاهده می‌گردد. موافق با نتایج این آزمایش کالوس‌های یونجه رقم همدانی تحت تنش شوری کاهش طول و عرض سلول‌ها را به عنوان بخشی از مکانیسم مقابله با شوری نشان دادند (احسان پور و امینی، ۱۳۸۲). در دو گیاه *Nitraria retusa* و *Atriplex halimus* در غلظت‌های شوری کم با افزایش رشد گیاهان، مساحت برگ بیشتر، مساحت مقطع عرضی و کورتکس بزرگ‌تر پاسخ می‌دهند اما در سطوح شوری بالاتر، (۴۰۰–۸۰۰mM) این پارامترها به‌شدت کاهش می‌یابند. بعلاوه، طول آوند چوب نیز به طور چشمگیری فقط در سطوح شوری بالاتر کاهش می‌یابد (۸۰۰mM–۴۰۰). در مقابل، تراکم آوند افزایش واضحی را در شرایط شوری بالا نشان داد (Boughalleb *et al*., 2009). در حالی که رشد *Medicago arborea* به تدریج با افزایش شوری محیط کشت کاهش می‌یابد (Boughalleb *et al*., 2009). گزارشات نشان داده است، افزایش تنش شوری سبب کاهش ضخامت لایه‌های پارانشیم پوست و کاهش رشد سلول‌های اپیدرمی می‌گردد. اثر شوری بر بافت گیاه و نمو اندام‌ها ممکن است اثر مستقیم نمک بر سرعت تقسیم سلولی و در نتیجه سرعت کمتر نمو یا کاهش در طول مدت توسعه باشد (اسکندری و همکاران، ۱۳۸۹). این کاهش رشد همراه با کاهش گسترش سلولی و کاهش نرخ گسترش واکوئلی صورت می‌گیرد. کاهش در اندازه سلول می‌تواند ناشی از کاهش گسترش واکوئل باشد که خود تحت تأثیر کاهش نرخ حجره‌بندی در تنش شوری قرار دارد و ثانیاً به عنوان یک مکانیسم دفاعی پس از تقسیم، سلول‌ها فعالیت‌های متابولیسمی خود را بسته به غلظت نمک کاهش می‌دهند که خود موجب کاهش اندازه سلول می‌گردد. علاوه بر این احتمال دارد نمک موجب تحریک سیگنال‌های خاص غشایی جهت حفظ موازنه یون‌های سدیم و پتاسیم و کلر در داخل و خارج سلول شود که در نهایت ابعاد دیواره سلول کاهش می‌یابد (احسان پور و امینی، ۱۳۸۲).

نتیجه‌گیری:

بر طبق پژوهش حاضر کالوس های گیاه *Salsola arbuscula* در غلظت‌های بالای شوری نیز قادر به حیات بوده و با کاهش ابعاد سلول و افزایش فشردگی سلول‌ها در برابر تنش شوری مقاومت می‌کنند و حتی در غلظت‌های بالاتر از ۳۰۰ میلی مولار احتمالاً ژن‌های مقاومتی جدیدی در سلول‌ها بیان شده که سبب افزایش رشد سلول‌ها و افزایش میزان آب آنها می‌شود که شناخت علل مقاومت و ژن‌های مربوطه نیازمند بررسی‌های بیشتری می‌باشد، همچنین بررسی شاخص حساسیت در این آزمایش نشان داد که کالوس *Salsola arbuscula* نیز مانند گیاه آن به شوری بالا مقاوم می‌باشد.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان مقاله از حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک که حمایت مالی و اجرایی این تحقیق را به عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین نویسندگان مقاله از قطب تنش‌های گیاهی دانشگاه اصفهان تشکر می‌نمایند.

منابع:

احسان پور، ع. ا. و امینی، ف. (۱۳۸۲) اثر تنش خشکی و شوری در اندازه سلول‌های کالوس یونجه (*Medicago sativa* L.) در شرایط کشت درشیشه. مجله پژوهشی علوم پایه دانشگاه اصفهان ۱۷: ۱۴۰–۱۳۳.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 12:42 IRST on Tuesday September 26th 2017

اسکندری، س.، مظفری، و.، و تاج‌آبادی‌پور، ا. (۱۳۸۹) تاثیر شوری و مس بر برخی شاخص‌های فیزیولوژی و آناتومی دو رقم پسته در شرایط گلخانه. مجله آب و خاک ۲۴: ۱۲۱۰-۱۲۲۳.

Ajmal Khan, M., Gul, B., and Weber, D. J. (2002) Seed germination in the Great Basin halophyte *Salsola iberica*. Canadian Journal of Botany 80: 650–655.

Al-Khayri, J. M. (2002) growth, proline accumulation and ion content in sodium chloride-stressed callus of date palm. *In vitro* Cellular and Developmental Biology Plant 38:79–82.

Almansouri, M., Kinet, J. M., and Lutts, S., (1999) Compared effects of sudden and progressive impositions of salt stress in three Durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars. Journal of Plant Physiology 154:743-752.

Basu, S., Gangopadhyay, G., and Mukherjee, B. B. (2002) Salt tolerance in rice *in vitro*: Implication of accumulation of Na^+, K^+ and proline. Plant Cell Tissue and Organ Culture 69:55-64.

Boughalleb, F., Denden, M., and Ben Tiba, B. (2009) Anatomical changes induced by increasing NaCl salinity in three fodder shrubs, *Nitraria retusa*, *Atriplex halimus* and *Medicago arborea*. Acta Plant Physiology 31947-960.

Cavusoglu, K., Kilic, S., and Kabar, K. (2007) Some morphological and anatomical observations during alleviation of salinity (NaCl) stress on seed germination and seedling growth of barley by polyamines. Acta Physiologiae Plantarum 29:551–557.

Chamandoosti, F. (2007) Effect of sodium chloride on establishment of callus and organogenesis in *Brassica napus* L. Pakistan Journal of Biology Sciences 10:3880–3884.

Cicek, N., and Cakirlar, H. (2002) The effect of salinity on some physiological parameters in two maize cultivars. Bulgarian Journal of Plant Physiology 28: 66-74.

EL-Bassiouny H. M. S., and Bekheta M. A. (2007) Effect of Salt Stress on Relative Water Content, Lipid Peroxidation, Polyamines, Amino Acids and Ethylene of Two Wheat Cultivars. Agriculture and Biologiacal Science 7:363-368.

Errabii, T., Gandonou, C. B., Essalmain, H., Abrini, J., Idaomar, M., and Skalisenhaji, N. (2006) Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. African Journal of Biotechnology 5: 1488-1493.

Errabii, T., Gandonou, C. B., Essalmani, H., Abrini, J., Idaomar, M., and Senhaji, N. S. (2007) Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures. Acta Physiologiae Plantarum 29:95–102.

Hacke, U. G., Sperry, J. S., Wheeler, J. K., and Castro, L. (2006) Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. Tree Physiology 26:689–701.

Heidari-Sharifabad, H. and Mirzaie-Nodoushan, H. (2006) Salinity-induced growth and some metabolic changes in three *Salsola* species. Journal of Arid Environment 67: 715–720.

Kilic, S., Cavusoglu, K., and Kabar, K. (2007) Effects of 24-epibrassinolide on salinity stress induced inhibition of seed germination, seedling growth and leaf anatomy of barley. Journal of Sciences 2:41–52.

Koutoua, A., Y., Rochdi, A., Laurent, K. K, and Kouakou, T. H. (2011) NaCl stress-induced growth, water and ions contents changes on *in vitro* selection of salt tolerant and salt sensitive callus of wheat (*Triticum durum* Desf.). International Journal of Biosciences 1:12-25.

Lillie, R. D. (1965). Histopathologic technic and practical histochemistry. 3th Ed. the Blakiston Company, New York.

Lokhande, V. H., Nikam, T. D., and Penna, S. (2010) Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture 102: 17-25.

Madhava Rao, K. V., Raghavendra, A. S. and Janardhan Reddy, K. (2006) Physiology and molecular biology of Salt stress tolerance in plants. Springer, Paris.

Messedi, D., Labidi, N., Grignon, C., and Abdelly, C. (2004) Limits imposed by salt to the growth of the halophyte *Sesuvium portulacastrum*. Journal of Plant Nutition and Soil Science 167:720–725.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tabacco tissue cultures. Plant Physiology: 15: 473-479.

Naidoo, G., Somaru, R. and Achar, P. (2008) Morphological and physiological responses of the halophyte, *Odyssea paucinervis* (Staph) (Poaceae), to salinity. Flora 203:437–447.

Patade, V. Y., Suprasanna, P., and Bapat, V. A. (2008) Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus cultures. Plant Growth Regulation 55:169–173.

Ryan, F. J., Mosyakin, S. L., and Pitcairin, M. J. (2007) Molecular comparisons of *Salsola tragus* from California and Ukraine. Canadian Journal of Botany 85:224-229.

Saadallah, K., Drevon, J. J., and Abdelly, C. (2001) Nodulation and growth nodular common bean (*Phaseolus vulgaris*) under saline stress. Agronomy 21:627–634.

Slama, I., Ghnaya, T., Savoure, A., and Abdelly, C. (2008) Combined effects of long-term salinity and soil drying on growth, water relations, nu-

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 12:42 IRST on Tuesday September 26th 2017

deserts of Xinjiang. China. Flora Science Direct 203:134–140.

Yang, Y., Wei, X., Shi, R., Fan, Q. and An, L. (2010) Salinity-induced physiological modification in the callus from halophyte *Nitraria tangutorum* Bobr. Journal of Plant Growth Regulation 29: 465-476.

Zhang, F., Yang, Y. L., He, W. L., Zhao, X., and Zhang, L. X. (2004) Effects of salinity on growth and compatible solutes of callus induced from *Populus euphratica*. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 40:491–494.

Zhao, X., Tan, H. J., Liu, Y. B., Li, X. R., and Chen, G. X. (2009) Effect of salt stress on growth and osmotic regulation in *Thellungiella* and *Arabidopsis* callus. Plant Cell Tissue and Organ Culture 98:97–103.

trient status and proline accumulation of *Sesuvium portulacastrum*, Comptes Rendus Biologies, 331:442–451.

Summart, J., Thanonkeo, P., Panichajakul, S., Prathepha, P., and McManus, M. T. (2010) Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus culture. African Journal of Biotechnology 9:145-152.

Sun, Y. L., and Hong, S. K. (2010) Effects of plant growth regulators and L-glutamic acid on shoot organogenesis in the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 100:317-328.

Yan Weia, b., Ming Dong, b., Zhen-ying Huang, b. and Dun-yan, b. (2008) Factors influencing seed germination of *Salsola affinis* (Chenopodiaceaea dominant annual halophyte) inhabiting the