

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

فریبا امینی*، زهره قنبر زاده و مهری عسکری

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

(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 و ۴۰۰ 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:

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

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

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

(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 لاین‌های 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

وزن خشک کالوس در غلظت های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار NaCl محاسبه گردید. میزان رشد نسبی کالوس (RGR) طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Lokhande *et al.*, 2010):

$$\text{RGR}\% = (W_f - W_i) / W_i * 100\% \quad (\text{فرمول ۱})$$

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

جهت اندازه گیری میزان آب نسبی کالوس ها (RWC) از فرمول زیر استفاده گردید (Sun *et al.*, 2010).

$$X\% = (FW - DW) * 100\% / FW \quad (\text{فرمول ۲})$$

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

شاخص حساسیت (SI) به منظور اندازه گیری میزان حساسیت گیاه به NaCl بکار می رود این پارامتر هرچه منفی تر باشد گیاه به NaCl حساس تر خواهد بود. این شاخص مطابق روش Saadallah و همکاران (۲۰۰۱) از این فرمول محاسبه می گردد:

(فرمول ۳)

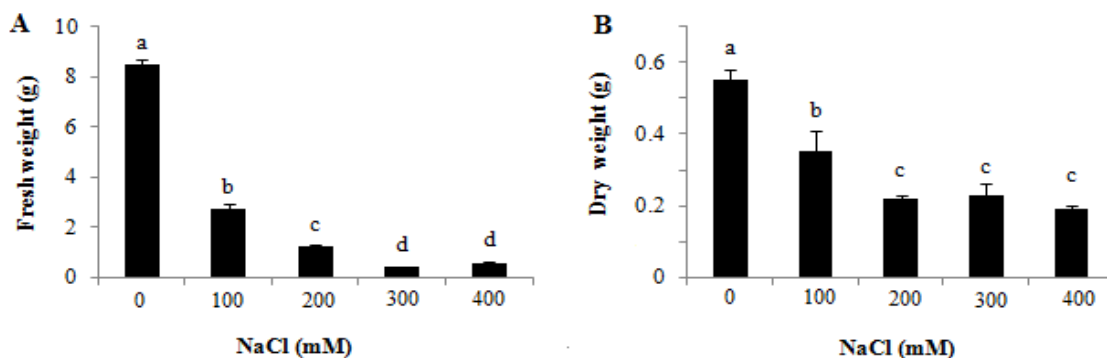
$$SI_{NaCl} (\%) = [(DW_{NaCl} - DW_{control}) / DW_{control}] * 100$$

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

اندازه گیری اندازه سلول ها: جهت بررسی ابعاد سلول های کالوس تحت تنش شوری ابتدا نمونه های تصادفی کالوس ها از هر غلظت ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار روی لام میکروسکوپی قرار گرفته و با رنگ اتوزین رنگ آمیزی گردید (Lillie, 1965)، سپس از نمونه ها با میکروسکوپ نوری متصل به دوربین و مانیتور کامپیوتر و با بزرگنمایی شیئی ۴۰ عکس برداری شد. طول، عرض و مساحت سلول ها نیز با استفاده از نرم افزار MOTIC (Motic Images Advanced 3.2 Software)

گردید. بذر این گیاه دارای باله می باشد که این باله ها علاوه بر این که حاوی آبسزیک اسید می باشند یک سد مکانیکی در مقابل ظهور ریشه چه بوده و در نتیجه از جوانه زنی بذر جلوگیری می کنند (Yan Weia *et al.*, 2008). از این رو قبل از استفاده از بذر به منظور کشت، باله ها جدا شده و سپس بذر ها با استفاده از اتانول ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و سپس وایتکس ۲۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. در پایان ۳-۴ بار شستشو در شرایط استریل در کابینت ایرفلو و با استفاده از آب مقطر استریل انجام گرفت. سپس بذر های استریل به تعداد ۱۰-۱۲ عدد در شیشه های حاوی محیط کشت MS (Murashig and Skoog, 1962) کشت شدند. بذر های کشت شده در اتاق کشت با نور حدود $110 \text{ mmol photons.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$ و فتوپریود ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت نور نگهداری گردید. دمای اتاق کشت ۲۴-۲۶ درجه سانتی گراد تنظیم شد (Ajmal Khan *et al.*, 2002). پس از جوانه زنی و رشد گیاهان به مدت دو ماه در شرایط استاندارد، جدا کشت ریشه گیاهان قطعه قطعه شده و برای تولید کالوس در محیط کشت MS حاوی $2,4\text{-D}$ 1mg/L ، 0.5mg/L Kin و 0.5mg/L ، ترکیبی از این دو هورمون جهت تولید کالوس منتقل شدند. پس از گذشت ۲ ماه و تولید کالوس از جدا کشت ها کالوس ها جهت تکثیر به طور منظم در فاصله زمانی ۲۰ روز یک بار در محیط کشت بهینه واکشت شده و پس از سه مرحله واکشت و تکثیر کالوس ها تحت تنش غلظت های مختلف نمک (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار) قرار گرفتند.

اندازه گیری شاخص های رشد: پس از گذشت یک ماه از زمان شروع تیمار شوری، کالوس هایی که در ابتدا وزن شده بودند به فویل های وزن شده انتقال یافته و مجدداً توزین شدند، با کم کردن وزن اولیه و وزن فویل از وزن کل، وزن تر کالوس ها اندازه گیری گردید. کالوس های قرار گرفته در فویل به آون با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت منتقل شدند، سپس آنها را از آون خارج کرده و وزن شدند. با کم کردن وزن فویل از وزن حاصله



شکل ۱- تغییرات (A) وزن تر و (B) وزن خشک کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیر مشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵٪ بر اساس روش دانکن می‌باشد.

میانگین وزن تر کالوس نیز در شاهد (۰ میلی‌مولار) و ۳۰۰ (میلی‌مولار) به ترتیب 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 وزن تر 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 (شکل ۲).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد تفاوت معنی‌داری بین شاخص حساسیت در تیمار ۱۰۰ mM NaCl 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 (شکل ۳).

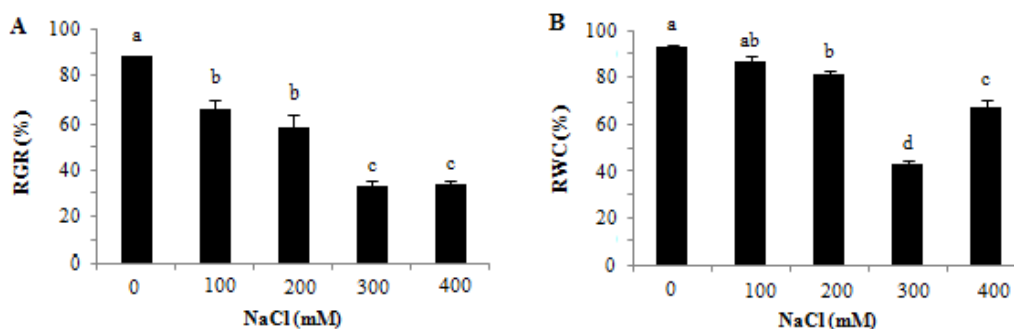
تأثیر تنش شوری بر اندازه سلول‌های کالوس: آنالیز
داده‌ها به روش دانکن نشان داد که تنش شوری تأثیر معنی‌داری (در سطح ۱٪) بر طول و عرض سلول‌های کالوس داشت. در کالوس تحت تنش شوری از غلظت

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

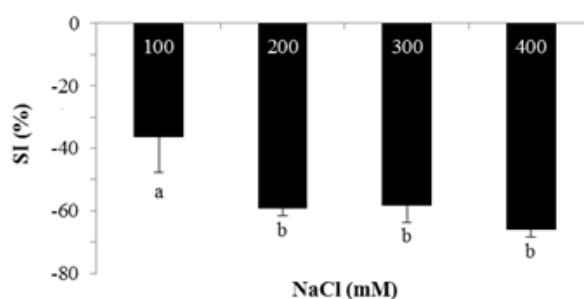
آنالیز آماری: آزمایشات انجام شده برای هر تیمار در سه تکرار انجام شد. طرح آماری مورد استفاده طرح کاملاً تصادفی و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS16 و مقایسه میانگین‌ها بر اساس تست دانکن انجام گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

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 ۵۵/۰ و ۱۹/۰ گرم (۶۵٪ کاهش نسبت به شاهد) بود. بیشترین و کم‌ترین



شکل ۲- تغییرات (A) میزان رشد نسبی و (B) آب نسبی کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl. خطوط نشان دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیر مشابه نشان دهنده معنی دار بودن در سطح ۵٪ بر اساس روش دانکن می باشد.



شکل ۳- تغییرات شاخص حساسیت کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl. خطوط نشان دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیر مشابه نشان دهنده معنی دار بودن در سطح ۵٪ بر اساس روش دانکن می باشد.

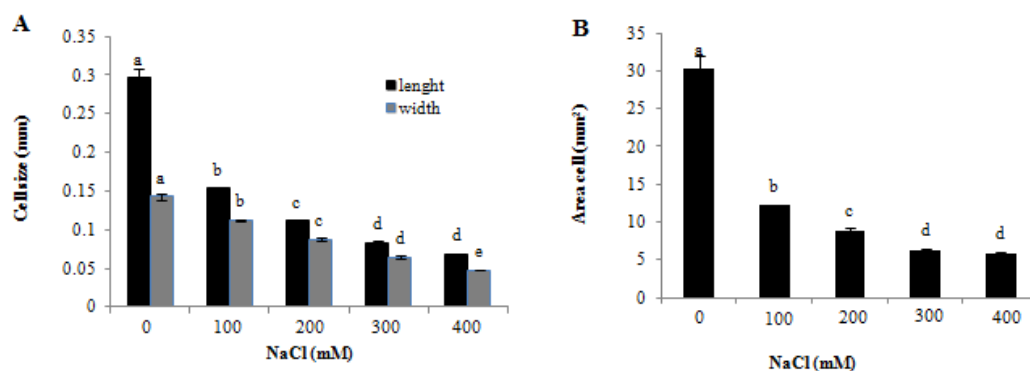
گزارشات حاصله در کالوس *Odyssea paucinervis* بود (Naidoo *et al.*, 2008). وزن تر و خشک اغلب برای آشکار کردن رشد گیاهان و سلول ها در پاسخ به تنش های محیطی اندازه گیری می شود (Yang *et al.*, 2010). یکی از استراتژی های موجود در گیاه تحت تنش شوری میزان رشد آهسته آنها است که در تعدادی از کشت های درون شیشه هالوفیت ها و غیر هالوفیت ها مشاهده می شود (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 می کند بلکه همچنین خطر آسیب ژنتیکی را نیز محدود می کند (Lokhande *et al.*, 2010).

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

شاهد تا ۴۰۰ میلی مولار نمک به طور معنی داری طول و عرض سلول ها کاهش یافت به طوری که بیشترین میزان طول و عرض سلول ها در شاهد به ترتیب با میانگین ۰/۲۹۶ و ۰/۱۴۳ میلی متر و کمترین آنها در تیمار ۴۰۰ میلی مولار NaCl به ترتیب با میانگین ۰/۰۶۸ و ۰/۰۴۸ میلی متر مشاهده شد ولی کاهش طول سلول ها نسبت به عرض بیشتر بود (شکل ۴A). مساحت سلول ها نیز با افزایش تنش کاهش یافت که به ترتیب بیشترین و کمترین آن در شاهد و تیمار ۴۰۰ میلی مولار مشاهده گردید (شکل ۴B). همچنین در غلظت های مختلف شوری نسبت به شاهد فشردگی و چسبیدن سلول ها 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 کالوس ها مشاهده گردید که موافق با



شکل ۴- 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.

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

(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 تحمل‌کننده 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 تحمل‌کننده 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 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 NaCl ۱۰۰mM از همه کمتر و تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ وجود ندارد (شکل ۲). 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 به ترتیب 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

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 گلکوفیت مانند نیشکر (Patade et al., 2008; Errabii et al., 2007) و آراییدوپسیس (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

بود (شکل ۴ و ۳). 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 به شدت 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 کالوس‌های 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:

(*Medicago sativa* L.) در شرایط کشت درشیشه. مجله پژوهشی علوم پایه دانشگاه اصفهان ۱۷: ۱۴۰-۱۳۳.

احسان پور، ع. ا. و امینی، ف. (۱۳۸۲) اثر تنش خشکی و شوری در اندازه سلول‌های کالوس یونجه

- 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 Jannardhan 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 Nutrition and Soil Science* 167:720-725.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*: 15: 473-479.
- Naidoo, G., Somaru, R. and Achar, P. (2008) Morphological and physiological responses of the halophyte, *Odysea 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 Pitcair, 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-
- اسکندری، س.، مظفری، و.، و تاج آبادی پور، ا. (۱۳۸۹) تاثیر شوری و مس بر برخی شاخص های 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., Essalmani, 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.

- 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