دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۵، شماره ۲، صفحه ۳۰۱-۲۸۹ (۱۳۹۶)

انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به شوری *Plantago ovata* در شرایط این‌ویترو

عباس صفرنژاد[۱*]، مریم شورورزی[۲] و مرضیه دلیر[۳]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، پست الکترونیک: sebre14@yahoo.com

۲- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، بخش تحقیقات کشت بافت، شعبه مشهد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد

۳- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، بخش تحقیقات کشت بافت، شعبه مشهد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۱۰

چکیده

اسفرزه گیاهی است از خانواده بارهنگ (Plantaginaceae) که گونه‌های مختلفی دارد. گیاه آن یکساله علفی و کوتاه است و بلندی آن به ۴۰ – ۱۰ سانتی‌متر می‌رسد. منشأ اولیه آن هند و پاکستان می‌باشد و در فلور ایران پراکنش وسیعی دارد. هدف از این تحقیق، بررسی تحمل به شوری گونه *Plantago ovata* با بهره‌گیری از تکنیک کشت بافت و استفاده از تنوع سوماکلونال به‌منظور شناسایی و تولید ژنوتیپ‌های متحمل می‌باشد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۲ تیمار و ۱۵ تکرار انجام شد. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل بیشترین و ریشه کمترین میزان القاء کالوس را در شرایط نبود تنش شوری (شاهد) نشان دادند. در حضور تنش شوری درصد کالوس‌زایی هیپوکوتیل از کوتیلدون بیشتر بود. درصد باززایی کالوس حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل در تمامی غلظت‌های NaCl از کالوس حاصل از ریزنمونه کوتیلدون بیشتر بود. افزایش غلظت NaCl موجب کاهش درصد باززایی شد. ریشه کمترین و کوتیلدون بیشترین وزن تر و خشک را در غلظت‌های مختلف NaCl داشت. همچنین افزایش غلظت NaCl موجب افزایش میزان سدیم و کاهش میزان پتاسیم در کالوس‌ها شد. میزان کلسیم با افزایش غلظت NaCl نوسان داشت. گیاهچه‌های باززایی شده در حضور غلظت‌های بالای NaCl برای توسعه ریشه به محیط ریشه‌زایی (محیط کشت MS فاقد هورمون) منتقل شده و گیاهچه‌های با رشد مناسب به خاک منتقل شدند.

واژه‌های کلیدی: اسفرزه، این‌ویترو، کالوس، نمک.

مقدمه

جنس اسفرزه (*Plantago*) از خانواده بارهنگ (Plantaginaceae) (Chakraborty and Patel, 1992) گیاهی یکساله بدون ساقه یا دارای ساقه بسیار کوتاه و پوشیده از تارهای نرم است. در ایران در نواحی شمال (قزوین، منجیل، رودبار، فیروزکوه)، غرب (همدان، مهران)، جنوب (بندرعباس، میمه، کرمان) و شرق کشور (سرچاه خراسان) گسترش دارد (Zargari, 1997). زمان گلدهی این گیاه اسفند – مرداد است.

ترکیبات موجود در *Plantago ovata* شامل اسیدها (بنزوئیک، کافئیک، سینامیک، فوماریک، سالسیلیک، ارسولیک، وانیلیک، p –کوماریک اسید)، آلکالوئیدها و آمینواسیدها می‌باشد. در چین و هند شرقی از دانه‌های اسفرزه برای بهبود اسهال خونی، فشار خون بالا، سرفه، رفع یبوست و مشکلات تنفسی استفاده می‌کنند. موسیلاژ این گیاه به‌علت داشتن ویژگی‌های با ارزش مانند پایدارکنندگی، سوسپانسیون‌کنندگی، امولسیون‌کنندگی در صنعت و داروسازی کاربردهای گسترده‌ای دارد. در داروسازی برای سوسپانسیون‌ها و به‌عنوان چسب در ساخت گرانول‌ها و قرص‌های مکیدنی و ساخت مسهل‌ها به‌کار می‌رود. براساس تعریف Shannon و Grieve (۱۹۹۹) شوری عبارت از حضور بیش از اندازه نمک‌های قابل حل و عناصر معدنی در محلول خاک می‌باشد که منجر به تجمع نمک در ناحیه ریشه شده و گیاه در جذب آب کافی از محلول خاک با اشکال روبرو می‌شود. محصول گیاهان در اثر شوری کاهش می‌یابد، بدون اینکه به‌ظاهر بتوان شوری را تشخیص داد (Mano and Takeda, 1997). البته شناسایی ارقام مقاوم به شوری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بررسی‌های انجام شده بر روی گونه‌های مختلف گیاهی نشان داده است که گیاهان مختلف تحت تأثیر تنش شوری، پاسخ‌های مختلفی را از خود بروز می‌دهند و تنش شوری در مراحل مختلف زندگی گیاه اثرات متفاوتی را به‌همراه دارد. با اعمال سطوح مختلف کلریدسدیم (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار) بر دو گونه *Plantago ovata* و *Plantago psyllium* در مرحله گیاهچه و گیاه کامل، Safarnejad و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که درصد جوانه‌زنی، طول ریشه و ساقه و وزن خشک ریشه و ساقه با افزایش تنش شوری کاهش معنی‌داری دارد. آنان در مطالعاتشان نشان دادند که در برابر تنش شوری گونه *P. ovata* نسبت به *P. psyllium* از تحمل بیشتری برخوردار است. گزارش شده است که ژنوتیپ‌های متحمل به شوری در گندم نسبت به ژنوتیپ‌های حساس به شوری جابجایی کندتر Na^+ از ریشه به اندام‌های هوایی را انجام می‌دهد (Almansouri *et al*., 2001). مشخص شده که ظرفیت پائین تعیین سیستم جذب K^+ در لوبیا و در حضور Na^+ می‌تواند دلیلی برای حساسیت گیاه لوبیا به NaCl باشد (Gorham *et al*., 1975). اساسی‌ترین هدف از کشت این‌ویترو کوتاه کردن طول دوره اصلاحی و تولید تعداد زیادی از گیاهان عاری از بیماری بوده که کالوس‌دهی و باززایی همزمان به این مسئله کمک می‌کند (Ebrahimie *et al*., 2003). در موارد زیادی نشان داده شده است که کشت بافت موجب القاء تنوع در گیاهان باززایی شده می‌گردد که از آن به‌عنوان تنوع سوماکلونال یاد می‌شود (Jain *et al*., 1990). با توجه به اهمیت گیاه اسفرزه به‌عنوان یکی از ۱۵ گیاه دارویی کشور و با عنایت به رشد روزافزون اراضی شور و بایر در ایران، امکان بررسی و شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش شوری در این گونه با بهره‌گیری از شرایط این‌ویترو وجود دارد.

هدف از این مطالعه، بررسی میزان تحمل به NaCl و شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل از گونه *Plantago ovata* در شرایط این‌ویترو می‌باشد که با القاء کالوس و باززایی در حضور تنش، میزان تحمل به تنش شوری این گیاه بررسی و ژنوتیپ‌های متحمل شناسایی و تولید می‌شوند.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از بذرهای گونه *P. ovata* که توسط مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه شده بود، استفاده شد.

ضدعفونی: بذرها توسط محلول هیپوکلریت‌سدیم ۱/۵٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و بعد توسط آب مقطر استریل سه بار آبشویی شدند. بذرهای ضدعفونی شده بلافاصله به شیشه‌های حاوی محیط جوانه‌زنی در اتاقک رشد در دمای ۲۵ – ۱۶ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند.

القاء کالوس: پس از ۸ روز ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، کوتیلدون و ریشه به ویال‌های حاوی محیط کشت کالوس‌زایی همراه با غلظت‌های مختلف NaCl (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌مول) و بدون NaCl (شاهد) منتقل شدند. در هر تیمار ۱۵ تکرار و مدت تیمار ۲۸ روز بود. پس از ۲۸ روز درصد کالوس‌زایی سه ریزنمونه به‌طور مجزا محاسبه و با یکدیگر مقایسه شدند.

جدول ۱- محیط کشت‌های مختلف مورد استفاده در تحقیق

علامت اختصاری	محیط پایه	محتوای هورمونی	هدف از کاربرد
MS	MS	–	کالوس‌زایی
A	MS	1mg 2,4-D + 1mg kinetin	باززایی
C	MS	4 mg kinetin + 0.1mg NAA	کالوس‌زایی
B	MS	0.4 mg NAA + 0.4 mg BA	باززایی
D	MS	0.2 mg IAA + 5 mg BA	کالوس‌زایی

اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس‌ها: کالوس‌های ۲۸ روزه با ترازوی دیجیتال و با دقت ۰/۰۰۰۱ توزین شدند. سپس نمونه‌های اندازه‌گیری شده به‌مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و وزن خشک آنها ثبت شد. از دو محیط کشت مختلف برای کالوس‌زایی استفاده شد، این محاسبات در هر دو محیط کشت به‌طور جداگانه انجام شد و در نهایت درصد کالوس‌زایی در دو محیط کشت با هم مقایسه شد.

اندازه‌گیری عناصر سدیم، پتاسیم و کلسیم: از محلول‌های خاکستر تر (Akhundi *et al.*, 2007)، به‌وسیله دستگاه فلم‌فتومتر، عناصر Na، K، Ca اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری تجمع پرولین: برای تعیین میزان پرولین از روش ارائه شده توسط Safarnejad و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد. پس از ۲۸ روز از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کالوس‌زایی، میزان تجمع پرولین آنها اندازه‌گیری شد. میزان پرولین در طول موج ۵۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد.

باززایی کالوس‌ها: کالوس‌ها به محیط باززایی حاوی غلظت‌های مختلف NaCl منتقل شدند. کالوس‌ها پس از گذشت یک ماه باززایی و مقایسه میزان باززایی بین غلظت‌های مختلف NaCl انجام شد.

انتقال گیاهچه‌های باززایی شده به محیط ریشه‌زایی: نمونه‌های باززایی شده در شرایط استریل به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند (محیط کشت MS فاقد هورمون). گیاهچه‌ها پس از ریشه‌دار شدن و سازگاری با محیط، برای تولید بذر به‌خاک منتقل شدند.

محاسبات آماری: آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۲ تیمار (۳ عدد ریزنمونه شامل هیپوکوتیل، کوتیلدون و ریشه در ۴ غلظت مختلف NaCl ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌مول) و ۱۵ تکرار در هر تیمار انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و رسم نمودارها با برنامه Excel انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن با احتمال ۱٪ انجام شد.

نتایج

متوسط درصد جوانه‌زنی گونه *P. ovata*، ۹۵٪ به‌دست آمد.

القاء کالوس در ریزنمونه‌های مختلف *P. ovata* در محیط کشت A: سه ریزنمونه هیپوکوتیل، کوتیلدون و ریشه برای القاء کالوس به محیط کشت A شامل MS + ۱ میلی‌گرم 2,4 – D و ۱ میلی‌گرم کینیتین منتقل شدند. القاء کالوس ۷ – ۶ روز پس از انتقال ریزنمونه‌ها آغاز و در مدت ۲۱ روز کالوس‌ها به حداکثر رشد خود رسیدند (شکل ۱ الف). نتایج نشان داد که درصد کالوس‌زایی سه ریزنمونه هیپوکوتیل، کوتیلدون و ریشه به‌ترتیب ۹۹/۲۵، ۸۸/۷۵ و ۰ درصد بود که درصد القاء کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیل بیشترین و در ریزنمونه ریشه کمترین مقدار را داشت (جدول ۲).

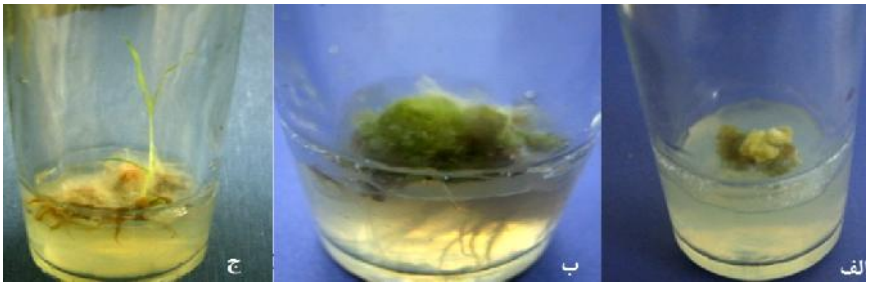
القاء کالوس در ریزنمونه‌های مختلف در تنش شوری: سه ریزنمونه هیپوکوتیل، کوتیلدون و ریشه در محیط

کشت القاء کالوس A حاوی غلظت‌های مختلف (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌مولار) NaCl قرار گرفتند. درصد القاء کالوس ریزنمونه هیپوکوتیل در غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl به‌ترتیب ۹۷، ۵۶ و ۲۴ درصد بود. درصد القاء کالوس ریزنمونه کوتیلدون در این غلظت‌ها به‌ترتیب ۸۶/۲۵ ، ۵۰/۵۰ و ۱۹/۷۵ به‌دست آمد. به‌دلیل تشکیل‌نشدن کالوس از ریزنمونه ریشه در محیط کشت A، از این ریزنمونه در شرایط تنش استفاده نشد (جدول ۲). نتایج نشان داد که بین دو ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون از نظر القاء کالوس در شرایط تنش شوری در محیط کشت A اختلاف معنی‌داری وجود داشت (۰/۰۱ >p). درصد کالوس‌زایی هیپوکوتیل از کوتیلدون بیشتر بود.

میزان باززایی کالوس در محیط کشت C: نتایج نشان داد که باززایی در کالوس‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون اختلاف معنی‌داری داشت. بدین ترتیب که درصد باززایی کالوس حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل در تمامی غلظت‌های NaCl از کالوس حاصل از ریزنمونه کوتیلدون بیشتر بود. همچنین بین سطوح مختلف شوری از نظر میزان باززایی از کالوس‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت (۰/۰۱ >p). افزایش غلظت NaCl موجب کاهش درصد باززایی شد (جدول ۲). به‌طور کلی نتایج نشان داد که از لحاظ قدرت پایداری کالوس در شرایط تنش شوری، کالوس‌های حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون تا غلظت ۱۵۰ میلی‌مول NaCl را تحمل کردند. اما درصد القاء کالوس کوتیلدون از هیپوکوتیل کمتر بود. از نظر باززایی و تشکیل ریشه و ساقه، کالوس حاصل از هیپوکوتیل و کوتیلدون تا ۵۰ میلی‌مول NaCl را تحمل کرده و باززایی در این غلظت انجام شد. در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مول در هیچ‌یک از انواع کالوس باززایی انجام نشد (جدول ۲).

القاء کالوس از ریزنمونه‌های مختلف در محیط کشت B: از محیط کشت B شامل MS + ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BA به‌عنوان محیط کشت مناسب برای کالوس‌زایی استفاده شد (۱۲۶). کالوس‌زایی ۴ روز پس از انتقال ریزنمونه به محیط کشت B آغاز شد و کالوس‌ها در مدت ۱۵ روز به حداکثر رشد خود رسیدند. همچنین همزمان با پدیده کالوس‌زایی، تولید ریشه‌های فرعی هم در تعدادی از نمونه‌های کالوس مشاهده شد (شکل ۱ ب). نتایج نشان داد درصد القاء کالوس سه ریزنمونه هیپوکوتیل، کوتیلدون و ریشه به‌ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰ و ۰ بود. بنابراین دو ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون بیشترین و ریزنمونه ریشه کمترین درصد القاء کالوس را داشتند (جدول ۲).

مقایسه میزان باززایی از کالوس در محیط کشت D: پس از ۲۸ روز از تشکیل کالوس‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون در محیط کشت B کالوس‌ها به محیط کشت باززایی D با شرایط تنش مشابه با محیط رشد کالوس منتقل شدند. میزان باززایی در محیط کشت B تحت تأثیر ریزنمونه، شوری و اثر متقابل اینها در سطح ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج نشان داد که در شاخص‌های میزان کالوس‌زایی، پایداری کالوس و باززایی از کالوس‌ها اختلاف معنی‌داری بین دو ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون وجود داشت (۰/۰۱ >p) (جدول ۳). بدین‌ترتیب که در غلظت‌های مختلف NaCl (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) درصد القاء کالوس و باززایی در ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به کوتیلدون بیشتر بود. همچنین نتایج نشان داد که بین سطوح مختلف شوری از نظر میزان باززایی از کالوس‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت (۰/۰۱ >p). البته با افزایش غلظت NaCl، درصد باززایی کالوس‌ها کاهش یافت (جدول ۲) (شکل ۱ ج).



شکل ۱- الف: تشکیل کالوس از ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت A، ب) تشکیل کالوس از هیپوکوتیل به‌همراه ریشه‌های فرعی در محیط B، ج) باززایی از کالوس هیپوکوتیل

نتایج نشان داد ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون تا غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl تشکیل کالوس دادند. اما کالوس‌های تشکیل شده در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار نکروزه شدند. همچنین ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت B کالوس‌زایی بهتری نسبت به کوتیلدون داشت. از نظر باززایی و تشکیل ریشه و ساقه، کالوس حاصل از هیپوکوتیل و کوتیلدون تا ۵۰ میلی‌مولار NaCl را تحمل کرده و باززایی انجام شد. در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl هر دو ریزنمونه باززایی داشتند اما درصد آن بسیار پایین بود و در غلظت ۱۵۰ میلی‌مول NaCl هیچ‌یک از کالوس‌ها باززایی نداشتند (جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف شوری از نظر القاء کالوس در گونه *P. ovata* اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p< ۰/۰۱$). درصد القاء کالوس در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl نسبت به شاهد ۷۰/۶۱ درصد کاهش نشان داد. البته با افزایش غلظت شوری، درصد القاء کالوس به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت ($p< ۰/۰۱$) (جدول ۴). همچنین مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین درصد القاء کالوس دو ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p< ۰/۰۱$). به‌طوری‌که میزان کالوس‌زایی هیپوکوتیل ۸/۳۴ درصد نسبت به کوتیلدون افزایش یافت (جدول ۵). مقایسه میانگین‌ها نشان داد با افزایش غلظت NaCl درصد باززایی به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۴). میزان باززایی در غلظت ۱۵۰ میلی‌مول NaCl نسبت به شاهد ۱۰۰ درصد کاهش یافت. میزان باززایی ریزنمونه هیپوکوتیل ۱۴/۳۵ درصد بیشتر از کوتیلدون بود (جدول ۵). نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اختلاف در میزان باززایی دو ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون معنی‌دار بود ($p< ۰/۰۱$).

مقایسه وزن تر و خشک کالوس در محیط کشت A و B: نتایج نشان داد با افزایش غلظت NaCl وزن تر کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون کاهش معنی‌داری یافت (جدول ۲). تنش شوری در مرحله کالوس‌زایی تأثیر مستقیم بر روی وزن خشک کالوس‌ها داشت. وزن خشک کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون با افزایش غلظت NaCl کاهش معنی‌داری داشت ($p< ۰/۰۱$). هر دو محیط کشت A و B در این مورد نتیجه مشابهی داشتند. نتایج نشان داد که بین ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون از نظر وزن تر و خشک کالوس اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p< ۰/۰۱$) (جدول ۳). مقایسه میانگین وزن تر و خشک کالوس‌ها در غلظت‌های مختلف شوری نشان داد که با افزایش غلظت NaCl وزن تر و خشک کالوس به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت ($p< ۰/۰۱$). میزان وزن تر و خشک کالوس‌ها در غلظت ۱۵۰ میلی‌مول NaCl نسبت به غلظت صفر (شاهد) به‌ترتیب ۷۳/۶۶ و ۴۸/۴۲ درصد کاهش نشان دادند (جدول ۲). نتایج نشان داد که بین ریزنمونه‌های مختلف از نظر وزن تر و خشک اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p< ۰/۰۱$) (جدول ۵).

میزان عناصر کالوس‌ها تحت تنش شوری: نتایج آزمایش‌ها در دو محیط کشت A و B نشان داد که با بالا رفتن غلظت NaCl میزان سدیم در کالوس‌های حاصل از هر دو ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p< ۰/۰۱) (جدول ۲). میزان پتاسیم در کالوس‌های هر دو ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون حاصل از محیط کشت‌های A و B با افزایش غلظت NaCl به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p< ۰/۰۱) (جدول ۲). اما با افزایش غلظت NaCl میزان کلسیم در هر دو محیط کشت A و B و همچنین در کالوس‌های هر دو ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون ناچیز بوده و اختلاف معنی‌داری نداشت (p< ۰/۰۱) (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میزان سدیم در ۱۵۰ میلی‌مول NaCl نسبت به شاهد ۸۳ درصد افزایش و میزان پتاسیم در آن غلظت‌ها ۷۴/۷۶ درصد کاهش یافت. اما میزان کلسیم در بین این دو غلظت اختلاف معنی‌داری نداشت (p< ۰/۰۵) (جدول ۲). مقایسه میانگین‌های عناصر نشان داد که ریزنمونه کوتیلدون درصد بالاتری از مقدار سدیم (۲۸/۶۱ درصد) و پتاسیم (۴۱/۵۲ درصد) را به‌خود اختصاص داد اما میزان کلسیم در بین دو ریزنمونه اختلاف معنی‌داری نداشت (p< ۰/۰۵) (جدول ۲).

مقایسه دو محیط کشت A و B: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۶) و نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که بین دو محیط کشت A و B از نظر القاء کالوس اختلاف معنی‌داری وجود داشت (p< ۰/۰۱). میزان القاء کالوس در محیط کشت B ۱۵/۰۹ درصد نسبت به محیط کشت A افزایش یافت. همچنین نتایج نشان داد کالوس‌های ایجاد شده در محیط کشت B، ۴۳/۰۳ درصد باززایی بیشتری نسبت به کالوس‌های حاصل از محیط A داشتند. نتایج نشان داد که وزن تر کالوس‌ها در محیط کشت A نسبت به محیط کشت B ۷/۹۱ درصد افزایش داشت. همچنین وزن خشک کالوس در محیط B نسبت به محیط کشت A ۱۲/۴۲ درصد افزایش نشان داد (p< ۰/۰۱). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین دو محیط کشت A و B از نظر میزان عناصر، اختلاف معنی‌داری وجود داشت (p< ۰/۰۱) (جدول ۳). بدین‌ترتیب که در برابر تنش شوری میزان سدیم کالوس‌ها در محیط کشت Aبه اندازه ۱۲/۷۳ درصد از محیط کشت B بیشتر بود. میزان پتاسیم و کلسیم کالوس‌ها در محیط کشت B نسبت به محیط A به‌ترتیب ۲۱/۸۰ و ۲۶/۳۷ درصد افزایش نشان داد.

انتقال گیاهچه‌های باززایی شده به خاک: گیاهچه‌های باززایی شده در محیط کشت C (جدول ۱) برای ریشه‌دار شدن به محیط ریشه‌زایی (جدول ۱) منتقل شدند. گیاهچه‌ها پس از ریشه‌دار شدن به محیط هیدروپونیک حاوی محلول هویت برای سازگاری با محیط منتقل شدند و پس از گذشت ۸ روز گیاهچه‌ها به خاک منتقل شدند.

در مورد گیاهچه‌های به‌دست آمده از محیط کشت D (جدول ۱)، به‌دلیل ریشه‌دار بودن گیاهچه‌ها پس از یک هفته از انتقال به‌محیط هیدروپونیک برای تولید بذر به‌خاک منتقل شدند. به‌طور کلی با توجه به نتایج به‌دست آمده محیط کشت B محیط مناسب‌تری برای القاء کالوس و باززایی گونه *P. ovata* بود.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط کشت، شوری و ریزنمونه بر صفات مورد ارزیابی

محیط کشت	غلظت NaCl (میلی‌مولار)	ریزنمونه	درصد کالوس‌زایی	درصد باززایی	وزن تر (میلی‌گرم)	وزن خشک (میلی‌گرم)	Na (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)
A	۰	H	۹۹/۲۵ b	۴۲/۷۵ c	۱۳۸/۹b	۷/۴۰cdef	۲/۰۵ f	۹/۳۲ f	۰/۵۰ bc
A	۰	C	۸۸/۷۵ e	۳۷ d	۱۱۷/۸bcd	۶/۲۹fgh	۲/۸۹ f	۲۴/۱۲ b	۱/۱۷ a
A	۵۰	H	۹۷ c	۱۳ g	۱۲۰/۶bc	۸/۳1cd	۱۵/۹۴ b	۶/۷۳ g	۰/۵۷ bc
A	۵۰	C	۸۶/۲۵ f	۱۰/۲۵ h	۹۵/۹۸e	۶/۷۱ efg	۱۶/۴۵ b	۶/۵۳ g	۰/۶۴ abc
A	۱۰۰	H	۵۶ i	۰ k	۱۰۵/۱cde	۸/۶۰ c	۹/۸۰ e	۴/۶۸ hi	۰/۵۷ bc
A	۱۰۰	C	۵۰/۵۰ j	۰/۲۵ k	۹۸/۵۷de	۶/۸۳ def	۲۲/۳۳ a	۱۲/۹۰ e	۰/۹۷ ab
A	۱۵۰	H	۲۴ m	۰ k	۳۹/۸۴f	۴/۶۶ i	۱۰/۵۸ e	۲/۹۵ j	۰/۶۴ abc
A	۱۵۰	C	۱۹/۷۵ n	۰ k	۲۸/۲۳f	۴/۷۹ hi	۲۲/۳۳ a	۸/۷۹ f	۰/۳۰ c
B	۰	H	۱۰۰ a	۶۲/۵۰ a	۱۲۲/۴bc	۱۰/۷۴ b	۲/۰۵ f	۱۹/۲۱ c	۰/۹۷ ab
B	۰	C	۱۰۰ a	۵۶/۵۰ b	۱۸۱/۴a	۱۳/۵۱ a	۲/۵۷ f	۳۲/۰۱ a	۰/۹۰ ab
B	۵۰	H	۹۹ b	۳۳ e	۸۸/۵۹e	۷/۹۹ cde	۱۲/۷۷ d	۱۳/۰۴ e	۰/۹۰ ab
B	۵۰	C	۹۳ d	۲۰/۷۵ f	۱۲۸/۶b	۱۰/۶۵ b	۱۵/۹۴ b	۱۶/۱۵ d	۰/۸۴ ab
B	۱۰۰	H	۸۰/۲۵ g	۲ j	۳۸/۸۳f	۳/۸۴ i	۱۴/۷۱ c	۴/۰۱ i	۰/۹۰ ab
B	۱۰۰	C	۷۱/۷۵ h	۶/۵۰ i	۴۶/۷۳f	۴/۳۶ i	۱۶/۳۹ b	۴/۲۸ hi	۰/۹۷ ab
B	۱۵۰	H	۳۷/۲۵ k	۰ k	۳۶/۴۰f	۵/۲۳ ghi	۱۱/۹۳ d	۴/۴۱ hi	۰/۹۷ ab
B	۱۵۰	C	۳۳ l	۰ k	۴۳/۱۳f	۴/۸۶ hi	۱۲/۹۷ d	۵/۲۱ h	۰/۸۴ ab

H هیپوکوتیل، C کوتیلدون و R ریشه

در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند ($p< ۰/۰۱$)

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در *Plantago ovata*

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد القاء کالوس	درصد باززایی	وزن تر (میلی‌گرم)	وزن خشک (میلی‌گرم)	Na (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)
تیمار	۱۵	۷۴۵۲/۲۸**	۵۴۳۶/۵۳**	۳۱۲۲۷/۳۹**	۱۱۰/۱۷**	۶۶۸/۸۷**	۱۰۳۶/۴۱**	۰/۷۷ns
محیط کشت	۱	۶۰۲/۲۳**	۳۶۸۱/۸۲ **	۳۲۵۷/۵۴*	۵۳/۹۶**	۱۵۹/۴۳ **	۴۶۶/۰۱**	۳/۴۷**
شوری	۳	۳۳۶۵۷/۳۱**	۲۵۱۶۷/۱۵**	۱۱۹۷۲۱/۷۲**	۲۷۴/۱۴ **	۲۴۷۰/۷۲**	۳۱۱۹/۰۵ **	۰/۵۳ ns
ریزنمونه	۱	۲۶۲۱/۱۳**	۷۰/۶۳**	۲۳۳۲/۵۱ ns	۱/۴۱ ns	۹۶۱/۳۲**	۱۹۵۲/۸۸ **	۰/۳۳ ns
محیط کشت×شوری	۳	۱۸۱/۴۸**	۸۲۹/۸۵**	۱۹۲۷۵/۹۵**	۲۰۳/۷۰**	۴۵/۳۳**	۶۷۰/۱۵**	۰/۳۱ ns
محیط کشت ×ریزنمونه	۱	۲۰۰/۳۸**	۰/۲۵**	۲۹۵۳۰/۴۵**	۹۲/۰۱**	۳۴۷/۱۶ **	۱۲۷/۶۵**	۰/۹۳ ns
شوری×ریزنمونه	۳	۲۱۶/۷۱**	۲۶۳/۳۵**	۱۳۵۳/۴۴ ns	۶/۳۶ ns	۱۵۵/۱۴**	۴۵۶/۹۲**	۰/۸۸ ns
محیط کشت×شوری×ریزنمونه	۳	۲۵۵/۹۸**	۷۱/۴۰**	۴۰۷۹/۰۲**	۱۷/۵۵**	۱۸۳/۸۸**	۸۷/۰۹**	۰/۵۷ ns
خطای آزمایشی	۲۲۴	۲/۹۶	۶/۱۲	۷۲۱/۷۵	۳/۸۱	۲/۴۶	۱/۶۱	۰/۴۱

ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و معنی‌دار در سطح ۰/۰۱

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات ارزیابی شده در غلظت‌های مختلف شوری

NaCl (میلی‌مولار)	درصد کالوس‌زایی	درصد باززایی	وزن تر (میلی‌گرم)	وزن خشک (میلی‌گرم)	Na (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)
شاهد	۹۷ a	۴۹/۶۹ a	۱۴۰/۱۴ a	۹/۴۸ a	۲/۴۰ c	۲۱/۱۶ a	۰/۸۸ a
۵۰	۹۳/۸۱ b	۱۹/۲۵ b	۱۰۸/۴۵ b	۸/۴۱ b	۱۵/۲۷ a	۱۰/۶۱ b	۰/۷۳ a
۱۰۰	۶۴/۶۳ c	۲/۱۹ c	۷۲/۳۰ c	۵/۹۱ c	۱۵/۸۱ a	۶/۴۷ c	۰/۸۵ a
۱۵۰	۲۸/۵۰ d	۰ d	۳۶/۹ d	۴/۸۹ d	۱۴/۴۵ b	۵/۳۴ d	۰/۶۸ a

در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند ($p< ۰/۰۱$)

جدول ۵- مقایسه میانگین صفات ارزیابی شده در ریزنمونه‌های مختلف

ریزنمونه	درصد کالوس‌زایی	درصد باززایی	وزن تر (میلی‌گرم)	وزن خشک (میلی‌گرم)	Na (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)
هیپوکوتیل	۷۴/۰۹ a	۱۹/۱۶ a	۸۶/۳۳ a	۷/۱۰ a	۹/۹۸ b	۸/۰۴ b	۰/۷۵ a
کوتیلدون	۶۷/۸۸ b	۱۶/۴۱ b	۹۲/۵۶ a	۷/۲۵ a	۱۳/۹۸ a	۱۳/۷۵ a	۰/۸۲ a

در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند ($p< ۰/۰۱$)

جدول ۶- مقایسه میانگین صفات ارزیابی شده در محیط کشت‌های A و B

محیط کشت	درصد کالوس‌زایی	درصد باززایی	وزن تر (میلی‌گرم)	وزن خشک (میلی‌گرم)	Na (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)
A	۶۵/۱۹ b	۱۲/۹۱ b	۹۳/۱۳ a	۶/۷۰ b	۱۲/۸۰ a	۹/۵۰ b	۰/۶۷ b
B	۷۶/۷۸ a	۲۲/۶۶ a	۸۵/۷۶ b	۷/۶۵ a	۱۱/۱۷ b	۱۲/۲۹ a	۰/۹۱ a

در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند ($p< ۰/۰۱$)

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد انتخاب محیط کشت مناسب اهمیت زیادی دارد. در گونه *P. ovata* انتخاب ریزنمونه مناسب نیز در میزان موفقیت کشت بافت مؤثر بود و میزان تحمل به شوری ریزنمونه‌های مختلف متفاوت بود. در برخی گیاهان، برگ (Mills et al., 2001) و در برخی جنین بالغ (Shanjun et al., 2005) و در برخی هیپوکوتیل به‌عنوان ریزنمونه مناسب برای کالوس‌زایی معرفی شده‌اند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بین سه ریزنمونه انتخابی هیپوکوتیل، کوتیلدون و ریشه، هیپوکوتیل گزینه مناسبی برای القاء کالوس می‌باشد. در این رابطه Pramanik و همکاران (۱۹۹۵) نیز در کشت بافت *P. ovata* ریزنمونه هیپوکوتیل را به‌عنوان بهترین ریزنمونه برای القاء کالوس معرفی کردند. همچنین Wakhlu و Barna (۱۹۸۹) در *P. ovata* و Safarnejad و همکاران (۲۰۱۶) در *P. psyllium* بهترین نتیجه القاء کالوس را از ریزنمونه هیپوکوتیل به‌دست آوردند.

در این تحقیق عملکرد ریزنمونه هیپوکوتیل از نظر میزان تحمل به شوری نیز بهتر بود. البته ریزنمونه ریشه مناسب نبود. ریزنمونه ریشه در هر دو نوع محیط القاء کالوس حتی

در شرایط فاقد تنش، کالوس‌زایی نداشت. همچنین Wakhlu, و Barna (۱۹۸۹) محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم از هریک از دو هورمون 2,4-D و کینیتین را محیط مناسبی برای القاء کالوس ریزنمونه هیپوکوتیل *P. ovata* ذکر کردند. ضمن اینکه Pramanik و همکاران (۱۹۹۵) محیط کشت MS حاوی ۰/۴ میلی‌گرم NAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA را برای القاء کالوس *P. ovata* محیط مناسبی معرفی کردند. در این تحقیق نیز استفاده از دو نوع محیط کشت با محتوای هورمونی متفاوت برای القاء کالوس در P. ovata، محیط کشت حاوی ۰/۴ میلی‌گرم NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA کالوس‌زایی بیشتری داشت و اختلاف معنی‌داری با محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم از هریک از دو هورمون 2,4-D و کینیتین نشان داد.

در این نتایج در محیط کشت حاوی NAA و BA کالوس‌زایی و باززایی به‌طور همزمان مشاهده شد. به‌طوری که پس از گذشت دوره کالوس‌زایی (۲۸ روز) گیاه کامل شامل ریشه، ساقه و برگ به‌دست آمد. ریشه‌زایی در تیمار دارای اکسین NAA رخ داد و در تیمار دارای 2,4-D هیچ‌گونه ریشه‌زایی مشاهده نشد. در کشت بافت، ترکیبات هورمونی مختلف می‌توانند اثرات متفاوتی داشته باشند. اکسین (2,4-D) به‌طور گسترده برای القاء کالوس و NAA برای تقسیم سلولی و ریشه‌زایی کاربرد دارد. سیتوکینین‌ها برای تقسیم سلولی، تکثیر ساقه و تمایز ساقه نابجا از کالوس کاربرد دارند. سیتوکینین‌ها (کینیتین و BA) باعث تسریع تقسیم سلولی شده، غلظت بالاتر سیتوکینین‌ها موجب القاء ریخت‌زایی و تشکیل اندام هوایی می‌شود (Miller and Skoog, 1953). چنانچه در طی فرایند باززایی در این تحقیق از غلظت‌های بالاتر سیتوکینین نسبت به اکسین استفاده شد و ۵ میلی‌گرم بر لیتر BA، ۰/۲ گرم بر لیتر IAA برای گونه *P. ovata* (Pramanik et al., 1995) نتیجه مطلوب حاصل شد.

از شاخص‌های اندازه‌گیری شده برای تعیین میزان مقاومت به شوری، وزن تر و خشک و اندازه‌گیری میزان رشد اندام‌های هوایی، میزان پرولین و نوسانهای غلظت یون‌های موجود در اندام‌ها می‌باشد (Munns and Schachtman, 1993 و Safarnejad et al., 1996). تحقیقات Abebe و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد با افزایش تنش شوری در گندم، وزن تر و خشک کالوس کاهش می‌یابد. همچنین Smekens و Van Tienderen (۲۰۰۱) در تحقیقی که بر روی *P. coronopus* داشتند، گزارش کردند که تحت تنش شوری بیوماس کل گیاه کاهش نشان داد. همچنین Vicente و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند محدود شدن رشد گیاه تحت شرایط تنش، یکی از بدیهی‌ترین اثرات تنش بر گیاه می‌باشد (Vicente et al., 2004). Bohnert و Jensen (۱۹۹۶) نیز عنوان کردند هرچه غلظت نمک بیشتر باشد کاهش رشد محسوس‌تر است. در آزمایشی که به‌منظور بررسی اثر تنش شوری بر برخی پارامترهای فیزیولوژیک گیاه مرزه انجام شد، Najafi و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که با افزایش شوری، پارامترهای رشد و سرعت فتوسنتز کاهش پیدا کرد. تنظیم اسمزی در اثر جذب نمک (یون‌های نمکی) و ساختن مواد آلی انجام می‌شود، از محلول‌های آلی که گیاهان در تنظیم اسمزی استفاده می‌کنند گلایسین بتائین، پرولین، مانیتول و سوربیتول است. برای ساخت این مواد گیاه انرژی زیادی صرف می‌کند که با صرف انرژی زیاد، برای تنظیم اسمزی، رشد اندام‌های هوایی کاهش می‌یابد (Safarnejad et al., 1996 Kerepesi and Galiba, 2000). با مطالعه بر روی دو گونه اسفرزه *P. ovata* و*P. psyllium* در برابر تنش شوری در محیط این‌ویو Safarnejad و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که در مراحل گیاهچه‌ای و گیاه کامل، وزن خشک ریشه و ساقه در اثر افزایش غلظت NaCl کاهش معنی‌داری یافت. در این تحقیق نیز مطابق با تمامی نتایج تحقیقات ذکر شده، با افزایش تنش شوری، کاهش قابل ملاحظه رشد کالوس‌ها و کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک کالوس‌ها به‌دست آمد.

نتایج این تحقیق نشان داد با افزایش غلظت شوری، میزان پتاسیم کاهش می‌یابد. پتاسیم فراوان‌ترین کاتیون موجود در سیتوپلاسم است و ترکیبات پتاسیم به اسمزی

سلول‌ها در بافت‌های گیاهان غیرنمکی (گلیکوفیت‌ها) کمک عمده‌ای می‌کنند. غلظت زیاد پتاسیم در سیتوپلاسم و کلروپلاست‌ها برای خنثی کردن آنیون‌های بزرگ حل‌نشدنی این بخش‌های سلول لازم است. همچنین باعث نگهداری pH مطلوب برای بیشتر فعالیت‌های آنزیمی می‌شود. کاهش پتانسیل تورژسانس در نتیجه شوری مهمترین عامل بازدارندگی رشد گیاهان در شرایط شوری است (Yokoi et al., 2002). نتایج نشان داد با افزایش میزان سدیم در محیط رشد ریشه، غلظت پتاسیم در بافت‌های گیاهی کاهش می‌یابد. از آنجایی که پتاسیم نقش مهمی در ساختن پروتئین‌ها در گیاهان عالی بر عهده دارد و در محیط‌های شور به‌دلیل افزایش میزان +Na و -Cl در جذب +K اختلال ایجاد می‌شود. کاهش +K موجب کاهش ساخت پروتئین‌ها و اختلالات رشدی در گیاهان می‌شود. پتاسیم در سیتوپلاست و کلروپلاست‌ها به ایجاد فشار اسمزی به‌میزان زیادی کمک می‌کند. در گیاهان مبتلا به کمبود پتاسیم برخی تغییرات شیمیایی رخ می‌دهد که شامل انباشتگی قندهای حل‌شدنی، کاهش میزان نشاسته و انباشتگی ترکیبات ازت حل‌شدنی است.

مطالعات Megdiche و همکاران (۲۰۰۷) نشان داده است تنش شوری در Cakile maritime (نوعی کلم چینی) که از خانواده Brasicaceae می‌باشد، موجب کاهش میزان +K شده است. همچنین تنش شوری در گونه *Foeniculum vulgare* منجر به کاهش میزان عناصر K^+ و Ca^{2+} گردید (Khorrami & Safarnejad, 2011; Khorrami et al., 2011).

در یک آزمایش گلخانه‌ای، اثر تنش شوری روی رشد و میزان انباشت یون‌ها در گیاه دارویی زنیان مطالعه شد. نتایج نشان داد که افزایش سطح شوری باعث کاهش معنی‌داری در وزن تر و خشک ریشه و ساقه، میزان کلسیم و پتاسیم و افزایش میزان سدیم در اندام هوایی و ریشه گردید (Ashraf et al., 2004، Safarnejad, 2008).

کلسیم یکی از عناصری بود که در این تحقیق به‌عنوان شاخص میزان مقاومت به‌شوری اندازه‌گیری شد. کلسیم نقشی ساختمانی در گیاه بر عهده دارد و وجود آن اثرات منفی سدیم را در خاک شور کم می‌کند و گیاهان حساس به‌شوری را در تحمل به تنش شوری کمک می‌کند (Bayuelo-Jimenez and Debouch, 2003). کلسیم نقش بسیار مهمی در تنظیم ورود فعال سدیم و انتخاب بین سدیم و پتاسیم دارد. گیاهان از کلسیم برای رهایی از تنش شوری استفاده می‌کنند. در هنگام شوری میزان کلسیم سلولی افزایش می‌یابد که این افزایش آثار ممانعتی از رشد توسط نمک را کاهش می‌دهد. در این حالت کلسیم به‌عنوان یک پیام‌رسان ثانویه سبب می‌شود که پروتئین‌های مربوط به انتقال سدیم، سبب انتقال سدیم به‌خارج سلول و ورود آن به واکوئول شود (Meloni et al., 2001). اثرات مثبت کلسیم در شرایط تنش NaCl منجر به‌کاهش اثر +Na می‌شود. همچنین پخش و کاربرد کلسیم، اثرات بد شوری NaCl را در تعدادی از گیاهان کاهش می‌دهد. به‌عبارت دیگر افزایش سطح کلسیم گیاهان را از سمیت NaCl محافظت می‌کند (Grieve et al., 1992). در تحقیق انجام شده، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میزان کلسیم در ریزنمونه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری نداشت.

یکی دیگر از عناصر مورد سنجش در این تحقیق سدیم بود که عنصری ضروری برای رشد است. در این رابطه Konigshofer (۲۰۰۵) دریافت که در گونه *P. maritima* با افزایش تنش شوری میزان +Na در گیاه بالا می‌رود. همچنین Megdiche (۲۰۰۷) نشان داد که تنش شوری ۴۰۰ میلی‌مول در نوعی کلم چینی (*Cakile maritime*) ، میزان سدیم را ۱۲ – ۷ برابر نسبت به شاهد افزایش داد. در این رابطه Singh و Pal (۲۰۰۱) با مطالعاتی که روی اسفرزه انجام دادند، گزارش کردند که در هدایت‌های الکتریکی مختلف آب شور، مقدار ازت و سدیم افزایش یافته و مقدار فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کاهش می‌یابد و این امر باعث کاهش طول اندام هوایی و در نتیجه کاهش وزن ساقه می‌گردد. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد با افزایش غلظت NaCl میزان سدیم موجود در بافت کالوس‌های رشد کرده در تنش

شوری افزایش معنی‌داری یافت. این نتایج دلالت بر حساس بودن گونه‌های اسفرزه نسبت به‌شوری دارد.

مسئله دیگری که مطرح است امکان به‌دست آوردن گیاهان مقاوم به‌شوری از طریق تنوع سوماکلونی می‌باشد. از طریق تنوع سوماکلونال Jain و همکاران (۱۹۹۰) دو لاین سوماکلونی متحمل به‌شوری را در *Brassica juncea* L. گزارش کردند. در بررسی تولید یونجه در شرایط این‌ویترو Safarnejad و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که گیاهان و سوماکلون‌هایی که در معرض تنش شوری و خشکی تولید شده‌اند تحمل به‌شوری و خشکی بیشتری نسبت به گیاه والد داشتند و شاخص‌های مورفولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی آن را تأیید کرد. همچنین تولید گیاهان متحمل به‌شوری در گوجه‌فرنگی از طریق انتخاب لاین‌های سوماکلونال گزارش شده است (Tal, and Gavish, 1973).

در این تحقیق درصد پایینی از کالوس‌ها در ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl باززایی داشتند. با توجه به حساس بودن این گیاه نسبت به تنش شوری، تولید گیاهان باززایی شده در شرایط تنش می‌تواند دلیل ایجاد سوماکلون‌های مقاوم باشد. همچنین نتایج نشان داد که گونه *P. ovata* در محیط D درصد بیشتری از گیاهان باززایی شده را در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نمک به‌خود اختصاص داد. از آنجایی که یکی از فاکتورهای مهم در ایجاد تنوع سوماکلونال، تنظیم‌کننده‌های رشد می‌باشند، این نتیجه می‌تواند به‌دلیل اثر هورمون‌های متفاوت به‌کار رفته در این محیط کشت باشد. به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ریزنمونه هیپوکوتیل بهترین ریزنمونه برای القاء کالوس، باززایی و تحمل به تنش شوری بود. همچنین با استفاده از شرایط این‌ویترو و القاء کالوس و باززایی در حضور تنش، شاخص‌های تحمل به شوری بهبود یافتند. تنش شوری موجب کاهش معنی‌دار در سطوح کالوس‌زایی، باززایی و میزان پتاسیم شد. به‌طوری‌که با افزایش غلظت NaCl میزان سدیم و پرولین نیز افزایش معنی‌داری یافت ($p< ۰/۰۱$). افزایش پرولین به‌عنوان یک مکانیزم برای تحمل شوری در گیاه می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایج تحقیقات گزارش شده و نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان گفت که روش این‌ویترو برای ارزیابی و شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به شوری گیاه اسفرزه مؤثر می‌باشد.

منابع مورد استفاده:

- Abebe, T., Guenzi, A.C., Martin, B. and Cushman, J.C. 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity, Plant Physiology, 131 (4): 1748 – 55.
- Akhundi, M., Safarnejad, A. and Lahouti, M., 2007. Effect of drought stress on proline accumulation and elements changes in alfalfa Yazdi, Nikshahri and Renjer (*Medicago sativa* L.). Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 10 (1): 165-175.
- Almansouri, M., Kinet, J.M. and Lutts, S. 2001. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat. Plant and Soil, 231: 243-254.
- Ashraf, M., Mukhtar, N., Rehman S. and Rha, E.S., 2004. Salt induced changes in photosynthetic activity and growth in a potential medicinal plant Bishop`s weed (*Ammi majus* L.). Photosynthetica, 42(4): 543-550.
- Bayuelo-Jimenez, J.S. and Debouch, D.G., 2003. Growth, gas exchange, water relation and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline condition. Field Crops Researche, 80: 207-222.
- Bohnert, H. J. and Jensen, R.G., 1996. Metabolic engineering for increased salt tolerance the next step. Australian Plant Physiology, 59:661-667.
- Ebrahimie, E., Habashi, A.A., Ghareyazie, B., Ghannadha, M. and Mohammadi, M., 2003. A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of Cumin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 75:19-25.
- Gorham, J., Wyn Jones, R.G. and McDonnel, E., 1985. Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. Plant and Soil, 89: 15 – 40.
- Grieve, C.M., Leseh, S.M., Francois, L.E. and Mass, E.V., 1992. Analysis of main spike yield components in salt stressed wheat.Crop Science, 32: 697 – 703.
- Jain, R.K., Jain, S., Nainawatee, H.S. and Chowdhury, J.B., 1990. Salt tolerance in *Brassica Juncea* L. *In vitro* Selection, Agronomic Evaluation and Genetic Stability, 48: 141-152.
- Kerepesi, H. and Galiba, G., 2000. Osmotic and salt stress Induced alteration in soluble carbohydrate

vitro selection for salt tolerance. Euphytica, 92: 55-61.
- Safarnejad, A., Salami, M.R. and Hamidi, H., 2008. Study of morphologic characteristics medicinal plants (*Plantago psyllium* and *Plantago ovata*) against salinity stress. Pajuhesh and Sazndegi, 75: 152-160.
- Safarnejad, A., Shoorvarzi, M. & M. Dalir, 2016. In vitro selection of Plantago psyllium L. for salt tolerance and Changes of Sodium, Calcium and Potassium levels at callus stage, Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24(2): 221-231.
- Shanjun, T.U., Sangwan, R.S. and Sangwan –Norrell, B.S., 2005. Improved efficiency of somatic embryogenesis from zygotic embryos in *Hyoscyamus niger* by seed water – soaking, Scientia Horticulturae, 106 (3): 440 – 445.
- Shannon, M.C., 1986. Breeding, selection and the genetics of salt tolerance .In Salinity Tolerance in Plants. (Eds: Staples, R.C. and Toenniessn, G.H.) John Wiley and Sons, 231 – 252.
- Singh, L. and Pal, B., 2001. Effect for saline water and fertility levels on yield, Potassium, Zinc content and uptake by blonde *psyllium (Plantago ovata* Forsk.*)*. Crop Research (Hisar), 22: 424 – 431.
- Smekens, M.J. and Van Tienderen, P., 2001. Genetic variation and plasticity of *Plantago coronopus* under saline conditions .Acta Oecologica, 22: 187 – 200.
- Tal, M. and Gavish, V., 1973. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato. Australian Journal of Agricultural Research, 24: 353 – 367.
- Vicente, O., Boscaiu, M., Naranjo, M.A., Estrelles, E., Jose, J.M., Belles, M. and Soriana, P., 2004. Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). Journal of Arid Environment, 58: 463 – 481.
- Wakhlu, A.K. and Barna, K.S., 1989. Callus initiation, growth and plant regeneration in *Plantago ovata* Forssk. Cv.GI-2. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 17: 235 – 241.
- Yokoi, S., Bressan, A. and Hasegawa, P.M., 2002. Salt stress tolerance of plants. JIRCAS Working Report, 25-33.
- Zargari, A., 1997. Medicinal Plants. Sixth Edition. Print and Publications Institute of Tehran University. Volume 4. 852 p.

content in wheat seedling. Crop Science. 40: 482-487.
- Khorrami, A. Safarnejad, A. and Shourvarz, M., 2011. Effect of salt stress on ion distribution and proline accumulation in Foeniculum vulgare using in vitro technique. International Journal of Science and Nature, 2(2): 168-175.
- Khorrami, A. and Safarnejad, A., 2011. In vitro selection of Foeniculum vulgare for salt tolerance. Notulae Scientia Biologicae, 3(2): 90-97.
- Konigshofer, H., 2005. Changes in ion composition and hexitol content of different *Plantago* species under the influence of salt stress. Plant and Soil, 72 (2-3): 289 – 296.
- Mano, Y. and Takeda, K., 1997. Mapping quantitative trait loci for salt tolerance at germination and the seeding stage in barley (*Hordeum vulgare* L.). Euphytica, 94: 263 – 272.
- Megdiche, W., Ben Amor, N., Debez, A., Hessini, K., Ksouri, R., Zuily-Fodil, Y. and Abdelly, C., 2007 . Salt tolerance of the annual halophyte *Cakile maritima* as affected by provenance and developmental stage. Acta Physiologiae Plantarum, 29 (4): 375 – 384.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Ruize, H.A. and Martinez, C.A., 2001. Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic in cotton under salt stress. Plant Nutrition, 24(3) : 599-612.
- Miller, C. O. and Skoog, F., 1953. Chemical control of bud formation in *Tabacco* stem segments. American Journal of Botany, 40: 768 -773.
- Mills, D., Zhang, G. and Benzioni, A., 2001 . Effect of different salts and of ABA on growth and mineral uptke in *Jojoba* shoots grown *in vitro* , Journal of Plant Physiology, 158 : 1031 – 1039.
- Munns, R. and Schachtman, D.P., 1993. Plant responses to salinity significance in relation to time. International Crop Science, 1: 741-745.
- Najafi, F., Khavari-Nejad, R.A. and Siah Ali, M., 2010. The effects of salt stress on physiological parameters in summer savory (*Satureja hortensis* L.) Journal of Stress Physiology and Biochemistry. 6(1): 14-21.
- Pramanik, S., Sen Raychaudhuri, S. and Chakraborty, S., 1995. Changes in esterase and superoxide dismutase isozymes during *in vitro* morphogenesis in *Plantago ovata* Forssk. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 44 (2) : 123–127.
- Safarnejad, A., Collin, H., Bruce, K.D. and McNeilly, T., 1996. Characterization of alfalfa following *in*

In vitro selection of *Plantago ovata* for NaCl tolerance

A. Safarnejad[1*] M. Shoorvarzi[2] and M. Dalir[3]

1*- Corresponding author, Assoc. Prof., Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, I.R. Iran. Email: Sebre14@yahoo.com
2- M.Sc., Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, I.R. Iran,
3- M.Sc., Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, I.R. Iran

Received: 31.03.2016 Accepted: 01.08.2016

Abstract

Plantago ovata is from "Plantaginaceae" family which has several species. It is an annual herbaceous plant. Its height reaches to 10-40 cm. Its primary origin is India and Pakistan and it has wide distribution in Iranian flora. In order to evaluate responses of Plantago ovata to salinity an experiment was conducted using in vitro selection and tissue culture technique as well as somaclonal variation for identification and production of tolerant genotypes. The experiment was performed based on a completely randomized design with 12 treatments and 15 replications in each treatment. Hypocotyl and root explants showed the highest and the lowest callus induction respectively in non-saline (control) condition. Regeneration percentage of hypocotyl calli at all NaCl concentrations was more than cotyledon calli. Increasing concentrations of NaCl led to reduce percentage of regeneration. Cotyledon and root explants showed the highest and the lowest dry and fresh weight at all concentrations of NaCl. Also increasing of NaCl concentrations led to increment of sodium and decrement of potassium ingredients of callus. Amount of calcium varied by increasing NaCl concentration. Rooting happened a week after transferring regenerated plants to rooting medium. Then suitable seedlings were transferred to soil.

Key words: *Plantago ovata*, *In vitro*, Callus, NaCl