Archive of SID

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۴، شماره ۲، صفحه ۲۳۱-۲۲۱ (۱۳۹۵)

انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به شوری گیاه دارویی اسفرزه (*Plantago psyllium* L.) و نوسان‌های سطح سدیم، پتاسیم و کلسیم در شرایط *In vitro*

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

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، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شرق و شمال‌شرق کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۷

چکیده

گیاه اسفرزه ازجمله گیاهان مهم دارویی است که در ایران پراکنش وسیعی دارد. هدف از این تحقیق، بررسی میزان تحمل به تنش شوری گونه *Plantago psyllium* L. با استفاده از کشت بافت به‌منظور شناسایی و تولید ژنوتیپ‌های مقاوم آن می‌باشد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۲ تیمار و ۱۵ تکرار در هر تیمار انجام شد. متوسط درصد جوانه‌زنی ۸۴٪ به‌دست آمد. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل بیشترین و ریشه کمترین میزان القاء کالوس را در شرایط فاقد تنش شوری (شاهد) نشان دادند. در شرایط تنش شوری در هر سه ریزنمونه با افزایش غلظت NaCl درصد القاء کالوس به‌طورصورت معنی‌داری کاهش یافت. کالوس‌های هیپوکوتیل بیشترین و ریشه کمترین باززایی را داشتند. ریشه کمترین و کوتیلدون بیشترین وزن تر و خشک را در تمامی غلظت‌های NaCl داشتند. همچنین افزایش غلظت NaCl موجب افزایش میزان سدیم و کاهش میزان پتاسیم در کالوس‌ها شد. میزان کلسیم با افزایش غلظت NaCl نوسان داشت. کالوس‌ها به محیط باززایی حاوی غلظت‌های مختلف NaCl منتقل شدند. نتایج نشان داد هر سه ریزنمونه تا غلظت ۵۰ میلی‌مول NaCl باززایی داشتند و اختلاف معنی‌داری بین انواع کالوس‌ها از نظر باززایی وجود داشت. کالوس‌های هیپوکوتیل بیشترین و ریشه کمترین باززایی را داشتند ولی در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مول NaCl باززایی اتفاق نیفتاد. در محیط فاقد تنش اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و کالوس ریشه کمترین باززایی را در این شرایط داشت. گیاهچه‌های باززایی شده برای ریشه‌زایی به محیط ریشه‌زایی منتقل و پس از رشد مناسب برای تولید بذر به خاک منتقل شدند.

واژه‌های کلیدی: اسفرزه، این‌ویترو، کالوس، نمک.

مقدمه

جنس اسفرزه (*Plantago*) متعلق به خانواده بارهنگ (Plantaginaceae) حدود ۲۵۰ گونه دارد. این جنس در سطح جهان پراکنده است، اما منشأ اولیه آن هند و پاکستان می‌باشد (Chakraborty & Patel, 1992). اثرات مثبت اسفرزه بر روی ناراحتی‌های معده و بهبود زخم‌های روده بزرگ اثبات شده است (Rezaeipoor *et al.*, 2000). در هند شرقی دانه‌های اسفرزه برای بهبود اسهال خونی، مشکلات ادراری، سوزاک،

www.SID.ir

Archive of SID

تب و سوء عملکرد دستگاه گوارش استفاده می‌شود (Libster, 2002). تحقیقات و بررسی‌ها حکایت از آن دارد که *P. psyllium* اثرات کاهشی بر سطوح گلوکز و چربی در بیماران دیابت نوع II دارد (Rodriguez *et al.*, 1998؛ Rezaeipoor *et al.*, 2000). شوری ازجمله تنش‌های محیطی می‌باشد که علاوه بر اختلال کاهش قابلیت جذب آب توسط ریشه‌ها، گیاهان را نیز از نظر تغذیه‌ای، و فرایندهای متابولیکی دچار مشکل می‌کند (Levitt, 1980). اکنون نیمی از کل اراضی قابل کشت ایران، متأثر از شوری است که تأثیر عمده‌ای در کاهش سطح زیر کشت و عملکرد محصولات کشاورزی دارد (Abdolzadeh & Saffari, 2003). شناسایی گونه‌ها و ارقام مقاوم به شوری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بررسی‌ها نشان داده است که شوری باعث کاهش طول خوشه، تعداد دانه در خوشه، عملکرد دانه، سبوس و کاه و کلش در تیمارهای مختلف در اسفرزه می‌شود (Singh & Pal, 2001). همچنین آب شور با هدایت الکتریکی $12dsm^{-1}$ باعث کاهش جذب روی و پتاسیم در دانه اسفرزه شده است (Shannon, 1986).

در تحقیقی Bernstein (۱۹۷۵) گزارش کرده است شوری برای رشد و گره‌زنی ریشه در سویا و یونجه، مانع ایجاد می‌کند. در همین رابطه Garg و Garg (۱۹۸۵) مشاهده کرده‌اند که تنش شوری ناشی از NaCl، $NaSO_4$ و $NaHCO_3$ تعداد گره و وزن خشک را در دو رقم لوبیا کم کرده است. در ضمن Patel و همکاران (۱۹۷۵) کاهش رشد گیاه را در محیط خیلی شور مربوط به کاهش جذب مواد غذایی دانسته‌اند. صفرنژاد و همکاران (۲۰۰۸) با اعمال سطوح مختلف کلرید سدیم (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار) بر دو گونه *Plantago ovata* و *Plantago psyllium* در مرحله گیاهچه و گیاه کامل گزارش کردند که درصد جوانه‌زنی، طول ریشه و ساقه و وزن خشک ریشه و ساقه با افزایش تنش شوری کاهش معنی‌داری داشت (Safarnejad *et al.*, 2008).

کشت این‌ویترو روشی مناسب برای ایجاد و یا تشخیص ژنوتیپ‌های مقاوم به شوری است (Jorjani *et al.*, 2005). اساسی‌ترین هدف 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 دارویی اسفرزه و رشد روزافزون اراضی شور و کمبود اراضی زراعی مطلوب برای کشاورزی در دنیا ضرورت تحقیق در زمینه میزان تحمل این گیاه و امکان بررسی شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش شوری در این گونه با بهره‌گیری از تنوع سوماکلونالی وجود دارد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از بذرهای اسفرزه که توسط مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه شده بود، استفاده شد. بذرها توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ به مدت 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.

جدول ۱– محتوای هورمونی مختلف مورد استفاده در محیط کشت پایه MS به منظور مطالعه تحمل به شوری در اسفرزه

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

www.SID.ir

Archive of SID

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. همچنین وزن تر و خشک کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. از محلول‌های خاکستر تر (Akhundi *et al.*, 2007)، به‌وسیله دستگاه فلم‌فتومتر، عناصر Na، K و Ca اندازه‌گیری شدند. 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.

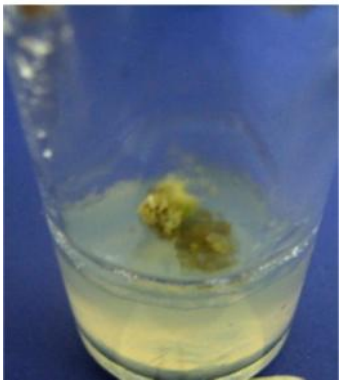
انتقال گیاهچه‌های باززایی شده به محیط ریشه‌زایی: نمونه‌های باززایی شده در شرایط استریل به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند (محیط کشت MS فاقد هورمون). گیاهچه‌ها پس از ریشه‌دار شدن و سازگاری با محیط، برای تولید بذر به خاک منتقل شدند.

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

در ارزیابی درصد جوانه‌زنی بذرهای مورد مطالعه، این میزان ۸۴٪ تخمین زده شد.

القاء کالوس در محیط فاقد تنش: برای القای کالوس از محیط کشت MS + ۱ میلی‌گرم 2 , 4 – D و ۱ میلی‌گرم کینیتین) استفاده شد. درصد کالوس‌زایی سه ریزنمونه هیپوکوتیل، کوتیلدون و ریشه به‌ترتیب ۹۹/۲۵، ۹۰ و ۷۵ درصد بود (جدول ۳).



شکل ۱- تشکیل کالوس از ریزنمونه کوتیلدون در محیط فاقد تنش

القاء کالوس از ریزنمونه‌های مختلف در شرایط تنش شوری: در هر سه ریزنمونه با افزایش غلظت NaCl درصد القاء کالوس به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. درصد کالوس‌زایی هیپوکوتیل در شرایط کنترل (شاهد) ۹۹/۲ درصد و در غلظت ۱۵۰ میلی‌مول NaCl، ۲۰/۲۵ درصد به‌دست آمد که نشان‌دهنده ۷۹/۶۰ درصد کاهش بود. کاهش درصد القاء کالوس برای کوتیلدون ۷۹/۷۳ درصد و در مورد ریشه ۸۰ درصد بود (جدول ۳).

تغییرات القاء کالوس تحت تأثیر ریزنمونه و شوری و اثر متقابل این دو معنی‌دار بود ($p< ۰/۰۱$) (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف شوری از نظر کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p< ۰/۰۱$). کالوس‌زایی در ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl نسبت به شاهد، ۷۹/۷۶ درصد کاهش یافت. همچنین بین درصد القاء کالوس سه ریزنمونه اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < ۰/۰۱$). ریشه کمترین درصد القاء کالوس را داشت (جدول ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

باززایی از کالوس‌های مختلف در برابر تنش شوری: نتایج نشان داد هر سه ریزنمونه تا غلظت ۵۰ میلی‌مول NaCl باززایی داشتند، ضمن اینکه اختلاف معنی‌داری بین انواع کالوس‌ها از نظر باززایی وجود داشت. کالوس‌های هیپوکوتیل بیشترین و ریشه کمترین باززایی را داشتند. ولی در غلظت های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مول NaCl باززایی در هیچ ریزنمونه‌ای انجام نشد. در محیط فاقد تنش بین باززایی از کالوس‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و کالوس ریشه کمترین باززایی را داشت. مقایسه میانگین‌ها نیز نشان داد که بین کالوس‌های مختلف از نظر باززایی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۱$) (جدول ۳).

مقایسه میانگین‌ها نشان داد با افزایش غلظت NaCl، درصد باززایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P< ۰/۰۱$). به‌نحوی‌که میزان باززایی در غلظت ۱۵۰ میلی‌مول NaCl نسبت به شاهد، ۱۰۰ درصد کاهش یافت (جدول ۵).

شکل ۲- باززایی از کالوس حاصل از هیپوکوتیل

مقایسه وزن تر و خشک کالوس تحت تنش شوری: نتایج نشان داد با افزایش غلظت NaCl، وزن تر و خشک کالوس کاهش یافت. ریشه کمترین و کوتیلدون بیشترین وزن تر و خشک را در تمامی غلظت‌های NaCl داشتند. اما در محیط شاهد هیپوکوتیل بیشترین وزن تر و خشک را نشان داد (جدول ۳).

تغییرات وزن تر و خشک کالوس تحت تأثیر ریزنمونه، شوری و اثر متقابل این دو در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. مقایسه میانگین وزن تر و خشک کالوس‌ها در غلظت‌های مختلف شوری نشان داد که با افزایش غلظت NaCl وزن تر و خشک کالوس به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P <۰/۰۱$). وزن تر و خشک کالوس در غلظت ۱۵۰ میلی‌مول NaCl نسبت به شاهد به‌ترتیب ۷۴/۰۵ و ۶۷/۱۰ درصد کاهش نشان دادند (جدول ۵). البته وزن تر و خشک کالوس‌های مختلف از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P <۰/۰۱$) (جدول ۵).

میزان عناصر در کالوس‌های تحت تنش شوری: نتایج نشان داد تغییرات عناصر سدیم و پتاسیم تحت تأثیر ریزنمونه و شوری و اثر متقابل این دو در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. افزایش غلظت NaCl موجب افزایش میزان سدیم و کاهش میزان پتاسیم در کالوس‌ها شد. البته میزان کلسیم با افزایش غلظت NaCl نوسان داشت (جدول ۳).

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میزان سدیم در غلظت ۱۵۰ میلی‌مول NaCl نسبت به شاهد ۹۲/۰۳ درصد افزایش و میزان پتاسیم در شرایط مذکور ۸۰/۴۸ درصد کاهش یافت که این اختلاف معنی‌دار بود ($P<۰/۰۱$). بین غلظت‌های صفر تا ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl نوسانهای کلسیم معنی‌دار نبود ولی در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl، نسبت به شاهد ۳۰/۹۷ درصد افزایش یافت ($P <۰/۰۱$) (جدول ۱). همچنین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میزان عناصر سدیم و پتاسیم در ریزنمونه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری با هم داشتند. ولی در مورد کلسیم این اختلاف معنی‌دار نبود ($P <۰/۰۱$) (جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات ارزیابی شده در اسفرزه

منابع تغییرات	df	کالوس‌زایی	باززایی	وزن تر	وزن خشک	Na	K	Ca
تیمار	۱۱	۷۹/۷۷ **	۷۲۶۹/۷۱**	۶۱۵۵/۲۵**	۳۳/۶۴**	۱۱۸۴/۷۱**	۴۷۶/۰۷**	۰/۹۵**
شوری	۳	۲۴۵۴۷/۰۹**	۱۴۴۷۲/۰۵**	۱۷۸۳۶/۴۹**	۹۹/۴۱**	۲۷۷۲/۴۳**	۱۴۲۶/۳۵**	۱/۲۲*
ریزنمونه	۲	۵۵۴/۳۱ **	۸۴۵۹/۲۷**	۵۸۹۷/۷۵**	۳۲/۳۱**	۱۷۳۱/۸۰**	۳۳۷/۰۱**	۰/۹۷ns
ریزنمونه×شوری	۶	۵۲۸/۴۳ **	۳۲۷۲/۰۳**	۴۰۰/۴۷ *	۱/۲۰ **	۲۰۸/۴۹**	۴۷/۲۸ **	۰/۸۱ns
خطای آزمایش	۱۶۸	۳/۵۹	۲۱/۳۰	۱۵۱/۶۵	۰/۶۰	۳/۸۸	۲/۴۸	۰/۳۱

ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار ، معنی‌دار در سطح ۵٪ و معنی‌دار در سطح ۱٪

جدول ۳- اثرات متقابل تیمارهای مختلف بر صفات ارزیابی شده در اسفرزه

غلظت NaCl (میلی‌مولار)	ریزنمونه	درصد کالوس‌زایی	درصد باززایی	وزن تر (میلی‌گرم)	وزن خشک (میلی‌گرم)	Na (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)
۰	هیپوکوتیل	۹۹/۲۵ a	۷۴ a	۵۹/۸۴ab	۵/۰۷ a	۲/۱۹ f	۱۷/۴۰ a	۰/۹۰abc
۰	کوتیلدون	۹۰ c	۶۴/۲۵ a	۵۶/۹۳ab	۴/۷۰ab	۱/۱۷fg	۱۴/۱۳ c	۰/۵۷ bcd
۰	ریشه	۷۵ d	۰/۲۵ d	۴۶/۹۶ c	۳/۹۱ c	۰/۳۵ g	۱۳/۲۰ c	۰/۴۴ cd
۵۰	هیپوکوتیل	۹۸/۷۵ b	۳۰/۵۰ b	۵۲/۷۴bc	۴/۱۹bc	۲۱/۷۱ b	۱۲ d	۰/۲۴ d
۵۰	کوتیلدون	۸۸/۷۵ c	۲۳/۲۵ c	۶۴/۵۹ a	۵/۰۳ a	۲۳/۶۲ a	۱۵/۵۳ b	۰/۹ abc
۵۰	ریشه	۶۸/۷۵ e	۰/۲۵ d	۳۴/۴۲ d	۳/۱۶ d	۱۲/۱۹ d	۷ e	۰/۵۷ bcd
۱۰۰	هیپوکوتیل	۵۲/۷۵ f	۰ d	۲۲/۴۸ e	۲/۳۵ef	۱۵/۴۵ c	۶ e	۰/۵۰ bcd
۱۰۰	کوتیلدون	۴۹/۷۵ g	۰ d	۳۶/۱۸ d	۲/۸۰de	۲۰/۸۹ b	۶/۴۰ e	۰/۸۴ abc
۱۰۰	ریشه	۲۳ h	۰ d	۱۲/۰۱fg	۱/۳۱ h	۷/۲۹ e	۲ g	۰/۷۷ abc
۱۵۰	هیپوکوتیل	۲۰/۲۵ i	۰ d	۱۵/۱۰efg	۱/۶۴gh	۱۴/۲۳ c	۳/۷۳ f	۰/۷۷ abc
۱۵۰	کوتیلدون	۱۸/۲۵ j	۰ d	۲۰/۶۹ ef	۲/۱۹fg	۲۴/۶۴ a	۴ f	۱/۱۰ a
۱۵۰	ریشه	۱۵ k	۰ d	۶/۷۰ g	۰/۶۸ i	۷/۸۳ e	۱ g	۰/۹۷ ab

در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (p< ۰/۰۱).

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات ارزیابی شده در ریزنمونه‌های مختلف اسفرزه (p<۰/۰۱)

ریزنمونه	درصد کالوس‌زایی	درصد باززایی	وزن تر (میلی‌گرم)	وزن خشک (میلی‌گرم)	Na (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)
هیپوکوتیل	۶۷/۷۵ a	۲۶/۱۳ a	۳۷/۵۴ b	۳/۳۱ b	۱۳/۳۹ b	۹/۷۸ a	۰/۶۰ b
کوتیلدون	۶۱/۶۹ b	۲۱/۸۸ b	۴۴/۶۰ a	۳/۶۹ a	۱۷/۵۸ a	۱۰/۰۲ a	۰/۸۵ a
ریشه	۴۴/۴۵ c	۰/۱۳ c	۲۵/۰۲ c	۶/۹۲ c	۶/۹۲ c	۵/۸۰ b	۰/۶۸ ab

در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (p< ۰/۰۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- مقایسه میانگین صفات ارزیابی شده در سطوح مختلف شوری اسفرزه (p<۰/۰۱)

شوری (میلی‌مولار)	درصد کالوس‌زایی	درصد باززایی	وزن تر (میلی‌گرم)	وزن خشک (میلی‌گرم)	Na (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)
شاهد	۸۸/۰۸ a	۴۶/۱۷ a	۵۴/۵۸ a	۴/۵۶ a	۱/۲۴ d	۱۴/۹۱ a	۰/۶۳ b
۵۰	۸۵/۴۲ b	۱۸ b	۵۰/۵۸ a	۴/۱۳ b	۱۹/۱۷ a	۱۱/۵۱ b	۰/۵۷ b
۱۰۰	۴۱/۸۳ c	۰ c	۲۳/۵۶ b	۲/۱۵ c	۱۴/۵۴ c	۴/۸۰ c	۰/۷۰ b
۱۵۰	۱۷/۸۳ d	۰ c	۱۴/۱۶ c	۱/۵۰ d	۱۵/۵۷ b	۲/۹۱ d	۰/۹۴ a

در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (p< ۰/۰۱).

بحث

نتایج نشان داد که انتخاب محیط کشت و ریزنمونه مناسب در میزان موفقیت کشت بافت مؤثر 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 ضمن Pramanik و همکاران (۱۹۹۵) و Wakhlu و Barna (۱۹۸۹) نیز در رابطه با کشت بافت در گونه *P. ovata* ریزنمونه هیپوکوتیل را به‌عنوان بهترین ریزنمونه برای القاء کالوس معرفی کردند.

در این تحقیق عملکرد ریزنمونه هیپوکوتیل از نظر میزان تحمل به شوری نیز بهتر بود. ریزنمونه ریشه غیرکارآمدترین ریزنمونه بود. ریزنمونه ریشه کمترین درصد کالوس‌زایی و باززایی را از خود نشان داد.

در این زمینه 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 در گونه *P. ovata* ذکر کرده‌اند. در حالی‌که Pramanik و همکاران (۱۹۹۵) محیط کشت MS حاوی ۰/۴ میلی‌گرم NAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA را برای القاء کالوس در گونه *P. ovata* محیط مناسبی معرفی کردند. در این تحقیق استفاده دو نوع محیط کشت با محتوای هورمونی متفاوت برای القاء کالوس در گونه *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 نتایج به‌دست آمده در این تحقیق در محیط کشت حاوی NAA و BA کالوس‌زایی و باززایی به‌طور همزمان مشاهده شد. به‌طوری‌که پس از گذشت دوره کالوس‌زایی 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. سیتوکینین‌ها برای تقسیم سلولی، تکثیر ساقه، تمایز ساقه نابجا از کالوس کاربرد دارند (Ehsanpoor & Amini, 2004). در رابطه با سیتوکینین‌ها (کینیتین و BA) باعث تسریع تقسیم سلولی شده، غلظت بالاتر سیتوکینین‌ها موجب القاء ریخت‌زایی و تشکیل اندام هوایی می‌شود (Miller & Skoog, 1953). چنانچه در طی فرایند باززایی در این تحقیق از غلظت‌های بالاتر سیتوکینین نسبت به اکسین استفاده شد و ۴ میلی‌گرم بر لیتر کینیتین، ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA (Wakhlu & Barna, 1989) نتیجه مطلوب حاصل شد.

از شاخص‌های اندازه‌گیری شده برای تعیین میزان مقاومت به شوری، وزن تر و خشک و اندازه‌گیری میزان

www.SID.ir

Archive of SID

رشد اندام‌های هوایی و غلظت یون موجود در اندام‌ها می‌باشد (Munns & Schachtman, 1993). تحقیقات Abebe و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که با افزایش تنش شوری در گندم، وزن تر و خشک کالوس کاهش می‌یابد. در تحقیقی که توسط Khorrami و Safarnejad (۲۰۱۱) بر روی تولید رازیانه در شرایط این‌ویترو انجام شد، شوری باعث کاهش معنی‌دار در کالوس و باززایی رازیانه گردید. همچنین وزن کالوس تر و خشک ریزنمونه‌ها با افزایش غلظت NaCl کاهش یافت. بالاترین و پایین‌ترین وزن تر و خشک کالوس به‌ترتیب در ۰ و ۱۵۰ میلی‌متر مشاهده شد. در این زمینه Zia و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقی بر روی آویشن گزارش کردند که بیشترین وزن تر و خشک کالوس از ریزنمونه هیپوکوتیل به‌ترتیب در غلظت ۰ و ۱۰۰ میکرومولار NaCl بدست آمده است. همچنین Tiendereنو Smekens (۲۰۰۱) در تحقیقی که بر روی *P. coronopus* داشتند، دریافتند که با تنش شوری بیوماس کل گیاه کاهش نشان داد. در پژوهشی Vicente و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که محدود شدن رشد گیاه تحت شرایط تنش، یکی از بدیهی‌ترین اثرات تنش بر گیاه می‌باشد. همینطور Dana (۲۰۰۷) با مطالعه بر روی زیره پارسی گزارش کرد که با افزایش غلظت NaCl وزن تر و خشک کالوس کاهش معنی‌داری یافت. ضمن اینکه Safarnjad و همکاران (۲۰۰۸) با مطالعه بر روی دو گونه اسفرزه *P. ovata* و *P. psyllium* در برابر تنش شوری در محیط این ویترو 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 که با افزایش غلظت شوری، میزان پتاسیم کاهش می‌یابد. پتاسیم فراوان‌ترین کاتیون موجود در سیتوپلاسم است و ترکیبات پتاسیم به قابلیت اسمزی سلول‌ها در بافت‌های گیاهان غیرنمکی (گلیکوفیت‌ها) کمک عمده‌ای می‌کنند. غلظت زیاد پتاسیم در سیتوپلاسم و کلروپلاست‌ها برای خنثی کردن آنیون‌های بزرگ حل نشدنی این بخش‌های سلول لازم است. همچنین باعث نگهداری pH مطلوب برای بیشتر فعالیت‌های آنزیمی می‌شود. کاهش قابلیت 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 (Kholdbarin & Slamzadeh, 2006). 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.

در این رابطه Megdiche و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که تنش شوری در نوعی کلم چینی (*Cakile maritime*) از خانواده *Brasicaceae*، موجب کاهش میزان K^+ شد. همچنین Koyro (۲۰۰۶) عنوان کرد در گونه *P. coronopus* تحت تنش NaCl، میزان عناصر K^+ و Ca^{2+} در گیاه کاهش می‌یابد. در پژوهشی که توسط Muhammed و همکاران (۱۹۸۷) بر روی برنج انجام دادند گزارش شد که رشد ریشه و ساقه برنج که در محلول ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl رشد کردند با زیاد شدن K^+ از ۱ به ۷ میلی‌مولار، افزایش یافت.

کلسیم یکی از عناصری بود که در این تحقیق به‌عنوان شاخص میزان مقاومت به شوری اندازه‌گیری شد. ضمن اینکه Hanson (۱۹۸۴) عنوان کرد که پخش و کاربرد کلسیم، اثرات بد شوری NaCl را در تعدادی از گیاهان کاهش می‌دهد. به عبارت دیگر افزایش سطح کلسیم گیاهان

www.SID.ir

Archive of SID

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 پژوهشی Konigshofer (۲۰۰۵) نشان داد که در گونه *P. maritima* با افزایش تنش شوری میزان Na^+ در گیاه بالا رفت. همچنین Megdiche و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که تنش شوری ۴۰۰ میلی‌مول در نوعی کلم چینی (*Cakile maritime*) میزان سدیم را ۱۲ – ۷ برابر نسبت به شاهد افزایش داد. همینطور Khorrami و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقی بر روی رازیانه نشان دادند که با افزایش شوری غلظت سدیم افزایش یافته است ولی غلظت کلسیم و پتاسیم کاهش یافت. در تحقیقی Pal و Singh (۲۰۰۱) با مطالعه بر روی اسفرزه 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 یافت و این امر باعث کاهش طول اندام هوایی و در نتیجه کاهش وزن ساقه شد. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد با افزایش غلظت NaCl میزان سدیم موجود در بافت کالوس‌های رشدیافته در تنش شوری افزایش معنی‌داری یافت. این نتایج دلالت بر حساس بودن گونه اسفرزه نسبت به شوری دارد.

مسئله دیگری که مطرح است امکان به‌دست آوردن گیاهان مقاوم به شوری از طریق تنوعات سوماکلونی می‌باشد. در این زمینه Jain و همکاران (۱۹۹۰) از طریق تنوع سوماکلونال، دو لاین سوماکلونی متحمل به شوری را در *Brassica juncea* L. گزارش کردند. همینطور Safarnejad و همکاران (۱۹۹۶) در مطالعه یونجه در شرایط این‌ویترو گزارش کردند که گیاهان و سوماکلون‌هایی که در معرض تنش شوری و خشکی تولید شدند تحمل به شوری و خشکی بیشتری نسبت به گونه والد داشتند و شاخص‌های مورفولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی آن را تأیید کرد. همینطور Safarnejad و Marvian (۲۰۰۵) در تحقیق خود بر روی گونه یونجه به تغییرات سوماکلونال با افزایش مراحل کشت بافت اشاره کردند. 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. به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ریزنمونه هیپوکوتیل بهترین ریزنمونه برای القاء کالوس، باززایی و تحمل به تنش شوری بود. 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 داشت ($p< ۰/۰۱$). بنابراین با توجه به نتایج تحقیقات گزارش شده و مقایسه آن با نتایج حاصل از این تحقیق، می‌توان گفت اسفرزه حساس به شوری می‌باشد. به‌طور کلی روش این‌ویترو گزینه مناسبی برای شناسایی و انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم به شوری اسفرزه می‌باشد.

منابع مورد استفاده

–Abdolzadeh, A. and Saffari, N., 2003. Study of salinity effects on vegetative growth in 11 cultivar and line of wheat with emphasis on the ions accumulation. Journal of Science of Agriculture and Natural Resources, 34: 95-102.

–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: 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: 165-175.

–Bernstein, L., 1975. Effect of salinity and sodicity on plant growth. Annual Reviews. Phytopathol, 13: 295 – 312.

www.SID.ir

Archive of SID

Plantago species under the influence of salt stress. Plant and Soil, 72: 289 – 296.

–Koyro, H.W., 2006. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). Environmental and Experimental Botany, 56: 136 – 146.

–Levitt, J., 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses. 2nd edition. New York . Academic Press, USA Salisbury.

–Libster, M., 2002. Herb Guide for Nurses Delmar, Thomson Learning, Inc. USA, pp: 450 – 7.

–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 the provenance and the developmental stage. Acta Physiologiae Plantarum, 29: 375 – 384.

–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 uptake in *Jojoba* shoots grown *in vitro.* J. Plant Physiol., 158 : 1031 – 1039.

–Muhammed, S., Akbar, M. and Neue, H.U., 1987. Effect of Na/Ca and Na/K ratios in saline culture solutions on the growth and mineral nutrition of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Soil, 104: 57 – 62.

–Munns, R. and Schachtman, D.P., 1993. Plant responses to salinity significance in relation to time. International Crop Science, 1: 741-745.

–Patel, P.M., Wallace, A. and Wallihan, E.E., 1975. Influence of salinity and N-P fertility levels on mineral content and growth of *Sorgum* in sand culture. Agronomy Journal, 67: 622 – 625.

–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.

–Rezaeipoor, R., Saeidnia , S. and Kamalinejad, M., 2000. The effect of *Plantago ovata* on humoral immune responses in experimental animal. Journal of Ethnopharmacology ,72 : 283 – 286.

–Rodriguez – Moran, M., Guerrero – Romero, F., Lazcano – Burciaga, G., 1998. Lipid – and glucose – lowering efficacy of *Plantago*

–Chakraborty, M.K. and Patel, K.V., 1992. Chemical composition of Isabgol (*Plantago ovata* Forsk) seed. Journal of Food Science, 29: 389 – 90.

–Dana, M., 2007. Identify of tolerant genotypes to salinity in Persian cumin (*Bunium persicom* Boiss.) via *in vitro* culture. Master thesis of plant physiology. Mashhad Azad University.

–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.

–Ehsanpoor, A. and Amini,A., 2004. Plant cell and tissue culture. University Jahad Publication of Isfahan, 181 p.

–Garg, B.K. and Garg, O.P., 1985. Influence of sodium carbonate and bicarbonate on photosyntesis and respiration of green gram and pea. Current Agriculture Research Journal, 9: 39–42.

–Grieve, C.M., Leseh, S.M., Francois, L.E. and Mass, E.V., 1992. Analysis of main spike yield components in salt stressed Wheat. Journal of Crop Science, 32: 697 – 703.

–Hanson, J.B., 1984. The functions of calcium in plant nutrition. In Advances in Plant Nutrition. Eds. P.B. Tinker and A. Lauchli, New York: Praeger Publishers.1: 149 – 208.

–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. Euphytica, 48: 141-152.

–Jorjani, A., Ebrahimi, M., Majd, F., Naseri Tafti, M. and Naserian, B., 2005. Evaluation of Tolerance in irradiated callus of soya (*Glycine max* L.) to salinity stress. Journal of Science of Agriculture and Natural Resources, 11: 79-85.

–Kholdbarin, B. and Slamzadeh, T., 2006. Mineral nutrition of higher plants (volume 1 and 2). Publications of Shiraz University, 902 p.

–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: 168-175.

–Khorrami, A. and Safarnejad, A., 2011. *In vitro* selection of *Foeniculum vulgare* for salt tolerance. Notulae Scientia Biologicae, 3: 90-97.

–Konigshofer, H., 2005. Changes in ion composition and hexitol content of different

www.SID.ir

Archive of SID

–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.

–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 1: 25-33.

–Zia, A., Rezanejad, F. and Safarnejad, A., 2011. *In vitro* selection for NaCl tolerance in *Thymus vulgaris* L. Journal of Cell and Molecular Research, 2: 86-92.

psyllium in type 2 diabetes. Journal of Diabetes and its Complications, 12: 273 – 8.

–Safarnejad, A., Collin, H., Bruce, K.D. and McNeilly, T., 1996. Characterization of alfalfa following *in 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. and S. Marvian., 2005. Cytogenetic studies in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somaclones following tissue culture. Iranian Journal of Rangeland and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 13: 209-220.

–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: 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.

www.SID.ir

Archive of SID

In vitro selection of *Plantago psyllium* L. for salt tolerance and changes of sodium, calcium and potassium levels at callus stage

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

1[*]-Corresponding Author, Associ, Prof., Faculty member of Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, I.R. Iran,
Email: Sebre14@yahoo.com
2-M.Sc., Department of Tissue Culture Research, Branch of East and North-East Region of Iran, Agricultural Biotechnology Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, I.R. Iran

Received: 18.11.2015 Accepted: 16.02.2016

Abstract

Plantago psyllium L. is from "Plantaginaceae" family and one of the most important medicinal plants with wide distribution in Iranian flora. In order to evaluate responses of *Plantago psyllium* L. to salinity, an experiment was conducted using 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 on each treatment. Seed germination percentage was 84%. Hypocotyl and root explants showed the highest and the lowest callus induction in non-saline (control) conditions respectively. In the terms of stress condition percentage of callus induction was decreased by increasing NaCl concentration on all of the three explants. Hypocotyl and root callus showed the highest and the lowest percentage of regeneration. Hypocotyl and root explants showed the highest and the lowest dry and fresh weight at all concentrations of NaCl. Also increment of NaCl concentrations led to increment of sodium and decrement of potassium ingredients of the callus. Amount of calcium varied by increasing NaCl concentration. Regenerated plants transferred to MS medium for root initiation. Then the seedlings were transferred to soil to set seed. Generally, *in vitro* selection is a suitable method for identification and selection of the tolerant genotypes to salinity in *Plantago psyllium*.

Keywords: Callus, *In vitro*, NaCl, *Plantago psyllium* L.

www.SID.ir