بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
گروه علوم باغبانی

بررسی اثر تنش شوری و خشکی بر برخی خصوصیات کمی و کیفی کشت درون شیشه‌ای گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth)

اساتید راهنما
دکتر حسن خوش قلب - دکتر زیبا قسیمی حق

استاد مشاور
دکتر معصومه مدرس

دانشجو
نجمه سادات حسینی

پایان‌نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد

ماه وسال انتشار
بهمن ۱۳۹۴

تقدیم به

محضر ارزشمند **پدر و مادر عزیزم**

به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید.....

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.....

سپاسگزاری

نخستین سپاس از آن خداوندی است که بنده کوچکش را در دریای بیکران اندیشه، قطره‌ای ساخت تا وسعت آن را از دریچه اندیشه‌های ناب آموزگارانی بزرگ به تماشا نشیند. لذا اکنون که در سایه سار بنده نوازی هایش پایان نامه حاضر به انجام رسیده است، بر خود لازم می‌دانم تا مراتب سپاس را از بزرگوارانی به جا آورم که دست یاریگرشان همواره همراه من بوده است.

ابتدا از مهربانترین همراهان زندگیم، پدر و مادر عزیزم و خانواده بزرگوارم قدردانی می کنم که حضورشان در فضای زندگیم مصداق بی ریای سخاوت بوده است. هم چنین از جناب آقای مهندس احمد کریمی به خاطر زحمات ارزنده شان در انجام این پایان نامه بی نهایت سپاسگزارم.

از اساتید راهنمای عالی‌قدرم، سرکار خانم دکتر زیبا قیمی حق و جناب آقای دکتر حسن خوش قلب کمال سپاس را دارم که در سایه لطف و مساعدت ایشان، این پایان نامه نگارش شده است.

از استاد محترم سرکار خانم دکتر معصومه مدرس که زحمت مشاوره این پایان نامه را متحمل شدند سپاسگزارم.

و در خاتمه از دوستان ارجمندم که مرا در انجام این تحقیق یاری کردند قدردانی و تشکر می نمایم.

چکیده

نوروزک از جمله گیاهان با ارزش مناطق کویری ایران می‌باشد که دارای خواص با ارزشی از قبیل، آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضددرد است. به‌منظور بررسی واکنش گیاه دارویی نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth) به تنش شوری و خشکی درون شیشه‌ای، دو آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد. در آزمایش اول جنین‌ها در محیط مایع MS به‌ترتیب با غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰، ۳۰ و ۵۰) میلی‌مولار سدیم کلراید و (۰، ۰/۵-، ۱- و ۱/۵-) بار پلی‌اتیلن-گلیکول قرار گرفتند. نتایج نشان داد با افزایش سطوح مختلف تنش شوری و خشکی، صفات مورفولوژیکی گیاهچه از جمله شاخص سطح برگ، شاخص کلروفیل، طول اندام هوایی به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P\leq0.01$). هم‌چنین میزان پرولین، پروتئین کل و فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز افزایش قابل توجهی نسبت به شاهد نشان داد ($P\leq0.01$). در آزمایش دوم جهت القای کالوس از تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و KIN در غلظت‌های ۰، ۱:۰/۵، ۱:۱ ۰/۵: ۲، ۱: ۲ استفاده شد. نتایج آزمایش نشان داد محیط کشت همراه با ۲ میلی‌گرم 2,4-D و ۱ میلی‌گرم KIN بیشترین تاثیر را بر درصد کالوس‌زایی داشت از این رو به‌عنوان مناسب‌ترین تیمار جهت القای کالوس انتخاب شد ($P\leq0.01$). کالوس‌های رشد یافته در محیط جامد MS حاوی ۲ میلی‌گرم 2,4-D و ۱ میلی‌گرم KIN پس از دو بار واکشت به محیط‌های تنش شوری و خشکی با غلظت‌های مشابه در آزمایش اول انتقال یافتند. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد با افزایش تنش شوری و خشکی فعالیت آنزیم کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و میزان پرولین افزایش یافت ($P\leq0.01$). در حالیکه میزان پروتئین کل با افزایش تنش شوری و خشکی به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر این مطلب است که صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهچه و کالوس تحت تاثیر هر دو تنش شوری خشکی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: MS، تنش شوری و خشکی، پرولین، پروتئین کل، گایاکول پراکسیداز، کاتالاز

مقدمه ۱

فصل اول: کلیات

۱-۱- نوروزک ۴
۱-۱-۱-گیاه‌شناسی نوروزک ۴
۱-۱-۲- اهمیت دارویی ۵
۱-۱-۳- جوانه‌زنی و تکثیر گیاه نوروزک ۶
۱-۱-۴- نیازهای اکولوژیکی ۶
۱-۲-۱- انواع کشت بافت ۷
۱-۲-۱-۱-کشت جنین ۸
۱-۲-۱-۱-۱- عواملی که در موفقیت کشت جنین دخالت دارند ۸
۱-۲-۱-۱-۲- موارد کاربرد کشت جنین ۱۰
۱-۲-۱-۲- کشت کالوس ۱۰
۱-۲-۲- مزایا ی کاربرد کشت بافت ۱۱
۱-۲-۳- مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت ۱۱
۱-۲-۴- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ۱۴
۱-۲-۵- ضدعفونی ۱۶
۱-۳- تنش‌های محیطی ۱۷
۱-۳-۱- تنش شوری ۱۸
۱-۳-۱-۱- سدیم کلرید (NaCl) ۱۸
۱-۳-۱-۲- مکانیسم مقاومت به تنش شوری ۱۹
۱-۳-۲- تنش خشکی ۲۰
۱-۳-۲-۱- پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) ۲۰
۱-۳-۲-۲- مکانیسم مقاومت به تنش خشکی ۲۱

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- کشت جنین ۲۴
۲-۲- تاثیر تیمار NaCl بر برخی ویژگی‌های کمی و کیفی درگیاهان مختلف ۲۵

۲-۳- تاثیر تیمار PEG بر برخی ویژگی های کمی و کیفی گیاهان مختلف ۲۶

فصل سوم: مواد وروش‌ها

۳-۱- نمونه گیاهی ۳۰
۳-۲- مواد شیمیایی ۳۰
۳-۳- تهیه محیط کشت مایع ۳۱
۳-۳- ۱- محیط‌های تنش شوری و خشکی ۳۲
۳-۴- ضدعفونی ۳۲
۳-۴-۱- ضدعفونی محیط و وسایل کار ۳۲
۳-۴-۲- ضدعفونی بذور ۳۳
۳-۵- کشت جنین ۳۳
۳-۶ کشت کالوس ۳۴
۳- ۶- اندازه‌گیری صفات ۳۵
۳- ۶-۱- اندازه‌گیری وزن تر و خشک ۳۵
۳- ۶- ۲- اندازه‌گیری صفات رویشی ۳۵
۳- ۶- ۳- اندازه گیری سطح برگ ۳۵
۳- ۶- ۴- اندازه‌گیری کلروفیل ۳۶
۳- ۶- ۵- اندازه‌گیری پرولین ۳۶
۳- ۶- ۶- عصاره‌گیری آنزیم و پروتئین کل ۳۷
۳- ۶- ۶- ۱-سنجش پروتئین کل به روش بردفورد (۱۹۷۶) ۳۷
۳- ۶- ۶- ۲- سنجش کاتالاز به روش ابی (۱۹۸۴) ۳۸
۳-۶-۶-۲-۱- محاسبه فعالیت آنزیم کاتالاز به روش نیکولس - شونبام و برگمایر (۱۹۸۳) ۴۰
۳-۶-۶-۳- سنجش گایاکول پراکسیداز به روش چنس و مهلی (۱۹۵۵) ۳۸
۳-۷- محاسبات آماری ۴۲

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- نتایج آزمایش اول (تنش شوری و خشکی درگیاهچه) ۴۶
۴-۱-۱- وزن تر و خشک ۴۶
۴-۱-۲- صفات رویشی ۴۶
۴-۱-۲-۱- قطر ساقه ۴۶

۴-۱-۲-۲- طول ریشه ۴۹
۴-۱-۲-۳- طول اندام هوایی ۵۱
۴-۱-۲-۴- درصد رشد جنین ۵۴
۴-۱-۲-۵- تعداد برگ ۵۶
۴-۱-۳- شاخص سطح برگ ۵۶
۴-۱-۴- شاخص کلروفیل ۵۸
۴-۱-۵- میزان پرولین ۶۱
۴-۱-۶- پروتئین کل ۶۳
۴-۱-۷-فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ۶۵
۴-۱-۸- فعالیت آنزیم کاتالاز ۶۸
۴-۲- نتایج آزمایش دوم (تنش شوری و خشکی در کالوس‌ها) ۶۸
۴-۲-۱- میزان پرولین ۷۱
۴-۲-۳- فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ۷۴
۴-۲-۴- فعالیت آنزیم کاتالاز ۷۷
نتیجه گیری کلی ۸۱
پیشنهادات ۸۲
پیوست‌ها ۸۳
فهرست منابع ۸۸

فهرست جداول

جدول ۳- ۱ غلظت نمک‌های پر مصرف محیط کشت پایه MS ۳۱
جدول ۳- ۲ غلظت نمک‌های کم مصرف محیط کشت پایه MS ۳۱
جدول ۴-۱ تجزیه واریانس سطوح مختلف تنش شوری و خشکی بر برخی صفات فیزیولوژیکی گیاه نوروزک ۸۴
جدول ۴-۲ تجزیه واریانس سطوح مختلف تنش شوری و خشکی بر برخی صفات بیوشیمیایی گیاه نوروزک ۸۵
جدول۴-۳- تجزیه واریانس سطوح مختلف تنش شوری و خشکی بر برخی ویژگی های کیفی کالوس نوروزک ۸۶

فهرست اشکال

شکل ۳-۱ ریزنمونه‌های برگی کشت شده در محیط کالزایی. ۳۴

شکل ۴-۱ اثر تنش شوری بر قطر ساقه ۴۵

شکل۴-۲ تاثیر غلظتهای مختلف NaCl بر ویژگی های رشدی نوروزک ۴۵

شکل ۴-۳ اثر تنش خشکی بر قطر ساقه ۴۶

شکل۴-۴ اثر تنش شوری بر طول ریشه ۵۰

شکل ۴-۵ اثر تنش خشکی بر طول ریشه ۵۱

شکل۴-۶ اثر تنش شوری بر طول اندام هوایی ۵۲

شکل ۴- ۷ تاثیر غلظتهای مختلف PEG بر نحوه رشد نوروزک در شرایط درون شیشه‌ای ۵۳

شکل۴-۸ اثر تنش خشکی بر طول اندام هوایی ۵۴

شکل ۴-۹ اثر تنش شوری بر درصد رشد جنین ۵۵

شکل ۴-۱۰ اثر تنش خشکی بر درصد رشد جنین ۵۲

شکل ۴-۱۱ اثر تنش شوری بر شاخص سطح برگ ۵۶

شکل ۴-۱۲ اثر تنش خشکی بر شاخص سطح برگ ۵۸

شکل ۴-۱۳ اثر تنش شوری بر شاخص کلروفیل ۵۹

شکل ۴-۱۴ اثر تنش خشکی بر شاخص کلروفیل ۶۱

شکل ۴-۱۵ اثر تنش شوری بر میزان تجمع پرولین در بافت تازه گیاه ۶۲

شکل ۴-۱۶ اثر تنش خشکی بر میزان تجمع پرولین در بافت تازه گیاه ۶۳

شکل ۴-۱۷ اثر تنش شوری بر محتوی پروتئین کل ۶۴

شکل ۴-۱۸ اثر تنش خشکی بر محتوی پروتئین کل ۶۵

شکل ۴-۱۹ اثر تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ۶۶

شکل ۴-۲۰ اثر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ۶۷

شکل ۴-۲۱ اثر تنش شوری بر میزان پرولین کالوس نوروزک ۷۱

شکل ۴-۲۲ اثر تنش خشکی بر میزان پرولین گیاه نوروزک ۷۲

شکل ۴-۲۳ اثر تنش شوری بر میزان پروتئین کل ۷۰
شکل ۴-۲۴ اثر تنش خشکی بر محتوی پروتئین کل در کالوس نوروزک ۷۴
شکل ۴-۲۵ اثر تنش شوری بر فعالیت گایاکول پراکسیداز در کالوس نوروزک ۷۶
شکل ۴-۲۶ اثر تنش خشکی بر فعالیت گایاکول پراکسیداز در کالوس نوروزک ۷۶
شکل ۴-۲۷ اثر تنش شوری بر میزان فعالیت کاتالاز در کالوس نوروزک ۷۸
شکل ۴-۲۸ کالوس‌های تحت تیمار ۰.۵- بار PEG در محیط حاوی ۲ میلی گرم 2,4 D و ۱ میلی گرم KIN.. ۷۹
شکل ۴-۲۹ کالوس‌های تحت تیمار ۱- بار PEG در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم 2,4 D و ۱ میلی‌گرم KIN..... ۷۹
شکل ۴-۳۱ کالوس‌های تحت تیمار ۱۰ میلی‌مولار NaCl در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم 2,4 D و ۱ میلی گرمKIN ۸۰
شکل ۴-۳۲ کالوس‌های تحت تیمار ۳۰ میلی‌مولار NaCl در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم 2,4 D و۱ میلی گرم KIN ۸۰

مقدمه

با توجه به این‌که رویکرد جهانی به سمت تولید داروهای گیاهی و فاصله گرفتن از داروهای شیمیایی است، توجه بیش از پیش به گیاهان دارویی را ایجاب می‌نماید. از این رو کشت گیاهان دارویی در حال حاضر به‌عنوان شاخه مهمی از کشاورزی مطرح می‌باشد.

تنش‌های غیرزیستی از قبیل خشکی و شوری، رشد، نمو و باروری گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. تولید گونه‌های اکسیژن فعال یکی از تغییرات بیوشیمیایی است که در گیاهان در معرض این‌گونه تنش‌ها رخ می‌دهد (کریمی و همکاران، ۲۰۱۱). در مزرعه، گیاهان در شرایط آب و هوایی متغیری هستند که انجام تحقیقات و پژوهش‌ها را دشوار می‌سازد. مطالعه تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در شرایط تنش، راهکار مناسبی جهت بررسی جنبه‌های گوناگون تحمل به تنش را فراهم می‌آورد.

تکنیک کشت بافت بر این محدودیت‌ها غلبه کرده و به گیاه اجازه رشد هم‌گروهی تحت شرایط تغذیه‌ای و آب و هوایی کنترل‌شده را می‌دهد تا امکان انجام این آزمایش‌ها در شرایط یکسان در تمام طول سال امکان‌پذیر باشد (ژانگ [1]وهمکاران، ۱۹۹۸).

تکثیر گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia*) از طریق کشت جنین، روش مفیدی برای غلبه بر خواب دانه‌ها و کوتاه کردن دوره اصلاح گیاه است. از آن‌جا که با جداسازی جنین از بذر، بازدارنده‌های رشد موجود در ساختارهای احاطه‌کننده جنین حذف می‌شوند، جنین‌ها زودتر از موعد مقرر جوانه می‌زنند. از این‌رو کشت جنین ابزار مفیدی جهت تکثیر گیاهانی است که با محدودیت در جوانه‌زنی مواجه هستند. تکثیر گیاه نوروزک در شرایط آزمایشگاهی و بعد استقرار آن در محیط طبیعی و هم‌چنین بررسی امکان کشت و پرورش آن در مناطقی به‌غیر از زیستگاه‌های طبیعی، امکان استفاده بهینه از این

[1] - Zhang

گیاه را به‌عنوان گیاه دارویی، زراعی و مرتعی فراهم خواهد کرد. نوروزک از جمله گونه‌های باارزش مناطق کویری و بیابانی ایران محسوب می‌شود که با توجه به گسترش وسیع آن در ارتفاعات سنگلاخی و خاک‌های مارنی آهکی و سبک و هم‌چنین مقاومت زیاد به شرایط کم‌آبی و درجه حرارت بالا، بسیار حائز اهمیت است. زمان رسیدگی این گونه در مناطق بیابانی نیز نشان می‌دهد که به‌عنوان گونه آخر فصل بهار قسمتی از علوفه دام را تأمین می‌کند (فیله کش، ۱۳۸۲). بنابراین، تلاش در جهت تکثیر این گونه می‌تواند علاوه بر زراعی نمودن آن، سبب جلوگیری از فرسایش خاک شده و زمینه ایجاد مرتع و کویرزدایی را فراهم آورد. بنابراین، در تحقیق حاضر تلاش شد تا تکثیر گیاه از طریق کشت جنین در شرایط تنش شوری و خشکی مورد بررسی قرار گیرد. از جمله اهداف این پژوهش می‌توان به بررسی آستانه تحمل گیاه دارویی نوروزک و نحوه واکنش آن به تنش‌های ایجاد شده در شرایط درون‌شیشه‌ای اشاره کرد.

فصل اول

کلیات

جنس مریم‌گلی

جنس سالویا[1] بالغ بر ۹۰۰ گونه دارد که احتمالا بزرگ‌ترین تعداد را در خانواده نعناع دارا است و پراکنش آن در هر دو منطقه نیمه‌گرم و معتدل مشاهده می‌شود (لود میر و سنل[2]، ۱۹۹۹). این جنس دارای ۵۶ گونه در نقاط مختلف ایران است که به صورت بوته‌های چوبی یا درختچه‌مانند، پایا و به ندرت دو یا یک ساله می‌باشد و غالبا معطر است (قهرمان، ۱۳۷۳).

۱-۱- نوروزک

۱-۱-۱-گیاه‌شناسی نوروزک

نوروزک یا مریم‌گلی مشهدی با نام علمی (*Salvia leriifolia* Benth) متعلق به تیره نعناعیان (*Lamiaceae*) گیاهی چندساله، علفی و بسیار معطر است. اندام‌های هوایی این گیاه به ویژه برگ و ساقه‌ی گلدار آن معطر است و پوست بذرهای آن حاوی موسیلاژ فراوان می باشد (قربانعلی و همکاران، ۱۳۸۸) (شکل ۱-۱). هم‌چنین برگ‌های گیاه غنی از کلسیم، فسفر و آهن بوده و دانه و برگ آن دارای مقادیر بالایی از پروتئین و اسیدهای چرب است که دارای ارزش غذایی فراوانی می‌باشد. از این‌رو در تغذیه دام و انسان از اهمیت زیادی برخوردارند (خداپرست، حسینی، ۱۳۷۲). تاج پوشش گیاه به صورت مدور متشکل از تعداد زیادی بوته به قطر ۱۵۰-۵۰ و ارتفاع ۴۰-۳۰ سانتیمتر می باشد . وزن هزار دانه این گیاه با توجه به شرایط اقلیمی منطقه از ۵۰ تا ۸۸ گرم متغیر است. شروع رسیدن بذر و نیز تشکیل گل از پایین ساقه به بالا بوده و در یک ساقه همه مراحل رشد زایشی امکان دارد دیده شود. تکثیر بوسیله بذر و زادآوری آن با توجه به شرایط منطقه و فصل چرای دام مناسب است. مراحل فنولوژیکی گیاه نشان میدهد که این گیاه پس از کاهش سرمای زمستانه از نیمه اسفند، رشد رویشی خود را آغاز

[1] - Salvia

[2]- Loadmir and Sennel

می‌کند و در اوایل فروردین (بسته به شرایط محیطی) رشد ساقه‌های گلدهنده آن شروع می شود. ارتفاع ساقه گلدهنده بین ۲۳/۵-۱۲ سانتیمتر، تعداد ردیف گلدهنده بین ۹-۴ ردیف و تعداد بذر در هر شاخه ۳۶-۱۶ عدد می باشد.

شکل ۱-۱ گیاه نوروزک، بذور سبز نوروزک قبل از رسیدن

۱-۱-۲- اهمیت دارویی

نوروزک از جمله گیاهان با ارزش مناطق کویری ایران می‌باشد که دارای خواص با ارزشی از قبیل، آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضددرد است (مدرس و همکاران، ۱۳۸۶). تأثیر عصاره آبی و الکلی برگ گیاه نوروزک در جلوگیری از ایجاد و توسعه زخم‌های معده مشابه با داروی سوکرالفیت[۱] گزارش شده است. فعالیت ضد درد و آرام‌بخش عصاره برگ نوروزک در دز $۵۰۰ mg.kg^{-۱}$ قابل مقایسه با دز $۵ mg.kg^{-۱}$ دیازپام گزارش شده است (حسین‌زاده و همکاران، ۲۰۰۰). هم‌چنین عصاره‌ی برگ و ریشه‌ی آن دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (مدرس و همکاران، ۱۳۸۶). بر اساس تحقیق خداپرست و همکاران (۲۰۰۶) دانه نوروزک حاوی ۲۶ درصد روغن زردرنگی است که با پراکسید بسیار

[۱]- Sucralfate

پایین و وجود آنتی‌اکسیدان‌های قوی سبب افزایش ماندگاری روغن این دانه نسبت به سایر روغن‌ها می شود.

۱-۱-۳- جوانه‌زنی و تکثیر گیاه نوروزک

در گیاه نوروزک بذرها به محض رسیدن می‌ریزند و توسط سایر موجودات مصرف می‌شوند. این گیاه تعداد زیادی بذر تولید می‌کند، ولی بسیاری از آن‌ها قوه نامیه ندارند و برخی نیز شرایط مساعد برای جوانه‌زنی نداشته و گروهی توسط حشرات، دام و انسان خورده می‌شوند. بنابراین حتی در شرایط مطلوب، بذر گیاه با محدودیت شدید در جوانه‌زنی مواجه است و از طرف دیگر، به‌دلیل وجود مواد موسیلاژی در پوسته بذر به سرعت دچار آلودگی‌های قارچی می‌شود (حداد خداپرست و حسینی، ۱۳۷۲). بررسی‌های انجام شده روی جوانه‌زنی و تکثیر گیاه نوروزک بسیار اندک است. بذر این گیاه در صفر درجه سانتی‌گراد شروع به جوانه‌زنی کرده و در ۸-۴ درجه‌سانتی‌گراد به حداکثر می‌رسد.

۱-۱-۴- نیازهای اکولوژیکی

این گیاه در فلور طبیعی ایران به عنوان گیاه بومی مناطق سرد و نیمه‌خشک استان‌های خراسان و برخی از مناطق استان سمنان شناسایی شده است (رچینگر[۱]، ۱۹۸۲). پراکنش این گیاه در اقلیم فراخشک بیابانی سرد، ارتفاعات سنگلاخی، ارتفاعات کنگلومرایی و واریزه‌های سنگی است. بررسی پروفیل خاک در مناطق گسترش ریشه این گونه نشان می دهد که بیش از ۶۴٪ خاک شن می باشد و به عبارتی گسترش این گونه بیشتر در روی خاکهای سبک است. گسترش ریشه تا عمق ۹۰ و پراکندگی آن تا ۱۶۰ سانتیمتر اندازه گیری شد. این گونه معمولا در روی شیب‌های جنوبی حضور دارد (فیله‌کش، ۱۳۸۲).

[۱] - Rechinger

۱-۲- کشت بافت گیاهی

کشت سلول و اندام گیاهی به عنوان ابزاری مفید جهت مطالعه مکانیسم تحمل به تنش‌های غیر زیستی تحت شرایط درون‌شیشه‌ای مورد استفاده قرار گرفته است (باجی و همکاران، ۲۰۰۰). استفاده از این فن برای انتخاب گونه‌های گیاهی مقاوم به شوری و خشکی و سایر تنش‌ها بسیار متداول است، زیرا کنترل بیشتری از شرایط رشد طبیعی دارد و تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها می‌توانند در یک فضای محدود و مدت زمان کوتاه‌تری ارزیابی شوند (ساکتیولو[۱] و همکاران، ۲۰۰۸؛ معصومی و همکاران، ۲۰۰۸؛ شیاب[۲] و همکاران، ۲۰۰۳).

۱-۲-۱- انواع کشت بافت

کشت گیاه کامل : یک بذر ممکن است در شرایط آزمایشگاهی کشت شود و یک گیاهچه و در نهایت یک گیاه کامل تولید کند.

کشت جنین : در این نوع کشت ، جنین جدا شده و پس از حذف پوسته بذر، کشت می‌شود.

کشت اندام گیاهی : در این کشت ، انواع مختلفی مثل کشت مریستم ، کشت ریشه ، کشت نوک ساقه قابل تشخیص هستند.

کشت کالوس : اگر یک بافت تمایز یافته جدا شود و در شرایط آزمایشگاهی تولید یک توده سلولی تمایز نیافته به نام کالوس نماید، این پدیده را کشت کالوس می‌نامند.

---

[۱] - Saktivelu

[۲] - Shyab

کشت سلول : کشت سلولهای منفرد که به کمک آنزیمها یا به روشهای مکانیکی از یک بافت گیاهی یا سوسپانسیون سلولی بدست می‌آیند.

کشت پروتوپلاست : کشت پروتوپلاستهایی که در اثر هضم آنزیمی دیواره سلولی بوجود آمده‌اند، کشت پروتوپلاست نام دارد.

۱-۲-۱-۱-کشت جنین

کشت جنین، عبارت است از جدا نمودن و رشد یک جنین نارس یا رسیده استریل در محیط درون شیشه، که هدف آن تولید یک گیاه زنده است (ال ام پیریک، ۱۳۷۶) .

۱-۲-۱-۱-۱- عواملی که در موفقیت کشت جنین دخالت دارند

ایجاد یک گیاه کامل از جنین، بستگی به عوامل متعددی دارد، که به‌طور خلاصه عبارت‌اند از:

۱- ژنوتیپ : در بعضی گونه‌های گیاهی، رشد جنین آسان، و در برخی دیگر مشکل می‌باشد. در بین ارقام مختلف یک گونه نیز تفاوت‌هایی وجود دارد.

۲- مرحله نمو جنین در هنگام جداسازی: جنین‌های بسیار کوچک و تمایز نیافته، معمولا در شرایط درون شیشه، رشد نمی‌کنند (جنسن[۱]،۱۹۷۶ ؛ مونیر[۲]، ۱۹۸۰). جنین‌هایی که در محیط بیرون تکامل بیشتری یافته‌اند، راحت‌تر در درون شیشه کشت می‌شوند.

۳- شرایط رشد گیاهان مادری : معمولا گیاهان مادری در گلخانه کشت می‌شوند از این رو بهبود رشد گیاه مادری تحت شرایط کنترل شده، معمولا منجر به نمو بهتر آندوسپرم و در نتیجه رشد بهتر جنین می‌گردد. هم‌چنین اگر لپه‌ها رشد بیشتری داشته باشند، رشد جنین تسریع خواهد شد (کستر[۳]، ۱۹۵۳).

---

[۱] - Jensen

[۲] - Monnier

[۳] - Kester

۴- ترکیب محیط کشت : جنین نابالغ نسبت به جنین بالغ، نیاز به محیط کشت پیچیده‌تری دارد. با این وجود، هر دو گروه نیاز به عناصر کم‌مصرف و پرمصرف و قند دارند. معمولا از یک محیط کشت جامد با pH ۵ تا ۶ استفاده می‌شود. برای کشت جنین، محیط‌های کشت معدنی زیادی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در منابع مختلف معرفی شده‌اند (پیریک[1]، ۱۹۹۹). ساکارز معمولا به عنوان منبع قند مورد استفاده قرار می‌گیرد. جنین‌های بالغ معولا در غلظت‌های ۲ تا ۳ درصد ساکارز، رشد می‌کنند در حالی‌که جنین‌های نابالغ در غلظت‌های بالاتر ساکارز (۸ تا ۱۲) بهتر رشد می‌کنند. غلظت آگار بین ۰/۶ تا ۰/۸ درصد، در نظر گرفته می‌شود. غلظت‌های بالاتر مانع رشد می‌گردد (اشتولز[2]، ۱۹۷۱). در برخی مواقع نیز از کشت مایع جهت انجام کشت جنین استفاده می‌شود (رابچولت[3] و همکاران، ۱۹۷۲).

از تنظیم‌کننده‌های اکسین و سیتوکینین، معمولا در کشت جنین استفاده نمی‌شود، چون این مواد غالبا موجب تشکیل کالوس می‌شوند (مونیر، ۱۹۷۶). در بعضی موارد، جیبرلین باعث تسریع رشد جنین می‌شود، مخصوصا هنگامی که دوره خواب وجود دارد (راگاوان[4]، ۱۹۸۰).

۵- اکسیژن : این عامل اهمیت زیادی دارد و به نظر می‌رسد گاهی اوقات نیاز جنین به اکسیژن، بیش از غلظت اکسیژن موجود در هوا باشد (مونیر، ۱۹۸۰).

۶- نور: در برخی موارد لازم است جنین‌های جدا شده، مدت ۷ تا ۱۴ روز را در تاریکی بگذرانند؛ و پس از آن به منظور تشکیل کلروفیل در روشنی قرار گیرند (اسمال[5]، ۱۹۸۰).

۷- درجه حرارت: درجه حرارت مطلوب به گونه گیاهی مورد استفاده بستگی دارد. معمولا درجه حرارت‌های نسبتا بالا (۲۲ تا ۲۸) درجه سانتی‌گراد برای رشد استفاده می‌شوند (اسمال، ۱۹۸۰).

[1] - Pierik
[2] - Schulze
[3] - Robchould
[4] - Raghavan
[5] - Smaal

۱-۲-۱-۱-۲- موارد کاربرد کشت جنین

۱- رفع موانع (مطلق) جوانه‌زنی بذر

۲- کوتاه کردن دوره اصلاح نباتات

۳- تولید هاپلوییدها

۴- جلوگیری از سقط جنین در درختان هسته‌دار زودرس

۵- جلوگیری از سقط جنین در اثر ناسازگاری

۶- تکثیر رویشی (غیرجنسی)

۱-۲-۱-۲- کشت کالوس

کالوس اصولا یک بافت غده‌ای کم و بیش تمایز نیافته است که معمولا در محل زخم‌های ایجاد شده در بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته ایجاد می‌شود. عمل تحریک برای تشکیل کالوس، القای کالوس نامیده می‌شود. امکان تولید کالوس و پس از آن رشد مجدد در یک محیط کشت جدید، در گونه‌های مختلف گیاهی وجود دارد که این رشد مجدد واکشت کردن کالوس نامیده می‌شود. تشکیل کالوس تحت تأثیر مواد تنظیم کننده رشدی خارجی که به محیط کشت اضافه می‌شوند قرار می‌گیرد. نوع ماده تنظیم‌کننده رشد مورد نیاز و غلظت مصرفی آن در محیط کشت، به طور شدیدی به ژنوتیپ و محتوی تنظیم کننده رشدی درون ریزنمونه دارد. پنج مرحله در رشد کالوس وجود دارد:

۱- فاز کمون: در این مرحله سلول‌ها برای آغاز تقسیم آماده می‌شوند.

۲- فاز تصاعدی: در این مرحله تقسیم سلولی با حداکثر سرعت صورت می‌گیرد.

۳- فاز خطی: در این مرحله تقسیم سلولی کند است، اما میزان توسعه سلولی افزایش می‌یابد.

۴- فاز کند شدن: مرحله‌ای است که سرعت تقسیم و توسعه سلولی کاهش می‌یابد.

۵- فاز سکون: در این مرحله اندازه و تعداد سلول‌ها ثابت می‌ماند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۷).

۱-۲-۲- مزایا ی کاربرد کشت بافت

در سال‌های اخیر فنون کشت بافت گیاهی به یک ابزار قدرتمند جهت تکثیر بسیاری از گونه‌های گیاهی تبدیل شده است. از جمله مزایای کاربرد کشت بافت می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد (تاجی و همکاران، ۱۳۸۲).

۱. امکان تکثیر سریع کلون‌ها

۲. حفظ و نگه‌داری منابع ژنتیکی

۳. امکان گزینش گیاه

۴. قابل بررسی بودن شرایط و کیفیت گیاه مادری

۵. محیط کنترل شده

۶. امکان استفاده برای تولید هیبریدها در گونه‌های ناسازگار از طریق کشت جنین یا تخمک

۷. امکان تولید گیاه در طول سال با استفاده از روش‌های درون‌شیشه‌ای

۸. افزایش گونه‌هایی که تکثیر آن‌ها در طبیعت به سختی صورت می‌گیرد

۱-۲-۳- مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت

یکی از عوامل ایجاد رشد و مورفوژنز[۱] در کشت بافت گیاهی، مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت می‌باشد. انتخاب محیط کشت یا تهیه فرمولاسیون[۲] آن برای موفقیت در کشت بافت ضروری است. هیچ محیط کشت مشخصی را نمی‌توان برای رشد انواع سلول‌ها توصیه کرد و اغلب لازم است تغییراتی در محیط کشت برای پاسخ‌گویی انواع مختلف ریزنمونه صورت گیرد. بیشتر گونه‌های گیاهی به محیط کشت‌های مختلفی نیاز دارند. از این‌رو انتخاب محیط کشت مناسب برای یک گونه با مشکلات فراوانی

[۱] - Morphogens

[۲] - Formolation

همراه است. کاربرد محیط کشت MS به دلیل این‌که بسیاری از گیاهان به آن عکس‌العمل مناسبی نشان می‌دهند بسیار متداول است (پیریک، ۱۹۹۰).

به طور کلی محیط‌های کشت از بخشی یا تمام موارد زیر تشکیل شده است:

۱- عناصر پرمصرف (نیتروژن(N)، فسفر(P)، پتاسیم (K)، کلسیم(Ca)، منیزیم (Mg) و گوگرد (S): محیط کشت برای رشد کافی سلول حداقل دارای ۲۵ تا ۶۰ میلی مول نیتروژن معدنی است. پتاسیم به غلظت ۲۰ تا ۳۰ میلی مول و فسفر، منیزیوم، گوگرد و کلسیم ۱تا ۳ میلی‌گرم بر لیتر می باشند.

۲- عناصر کم‌مصرف مولیبدن (Mo)، مس(Cu)، بور(B)، روی(Zn)، منگنز (Mn) و آهن(Fe): مس و کبالت در حالت عادی به غلظت ۰/۱ میکرومول، مولیبدن ۱ میکرومول، ید ۵ میکرومول، روی ۵ تا ۳۰ میکرومول، منگنز ۲۰ تا ۹۰ میکرومول و بر ۲۵ تا ۱۰۰ میکرومول در محیط کشت بکار می‌رود. در حالت عادی، برای تهیه محیط کشت شکل‌های کلات‌آهن و روی مورد استفاده قرار می گیرد. آهن ممکن است مهم‌ترین عنصر کم‌مصرف باشد. سیترات‌آهن نیز ممکن است در محیط کشت به کار رود، اما این ترکیبات به‌سختی در آب حل می‌شوند و معمولا پس از تهیه محیط کشت رسوب می‌کنند. MS[۱] با به‌کارگیری کلات آهنی به‌نام اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک (EDTA) این مشکل را برطرف کردند.

۳- ویتامین‌ها: ویتامین‌های لازم برای گیاهان در فرآیندهای متابولیکی به‌کار می‌رود. ویتامین‌هایی که بیشتر در محیط کشت سلول‌های گیاهی به‌کار می‌رود عبارت‌اند از: تیامین (B_1)[۲] نیکوتیک اسید ، پیریدوکسین (B_6)[۳] و میواینیوزیتول[۴]. ویتامین‌های دیگر مانند بیوتین[۵]، فولیک اسید[۶]، آسکوربیک

[۱] - Murashige & skoog

[۲] -Tiamin

[۳]- Pyridoxin

[۴]- Myo-inositol

[۵] - Biotin

[۶] - Folic acid

اسید[۱]، پانتوتنیک اسید[۲]، ویتامین E، ریبوفلاوین[۳] و آمینوبنزوییک اسید[۴] که در برخی کشت‌ها به‌کار می‌روند (شنک[۵] و همکاران، ۱۹۷۲).

۴- کربن و منبع انرژی: قند، جزء بسیار مهمی در هر نوع محیط کشت است و چون معمولا شرایط رشد برای فتوسنتز کافی نیست، یا اصولا به علت تاریکی، فتوسنتز انجام نمی‌شود اضافه کردن قند به محیط کشت ضروری است. از میان کربوهیدرات‌هایی که در محیط‌های کشت بکار می‌روند ساکارز ترجیح داده می‌شود. ساکارز موجود در محیط کشت به سرعت به فروکتوز و گلوکز شکسته می‌شود. ابتدا گلوکز و پس از آن فروکتوز توسط یاخته‌ها به کار برده می‌شود (شنک و همکاران، ۱۹۷۲).

۵- اسیدهای‌آمینه و سایر افزودنی‌های نیتروژن‌دار: با آنکه سلول‌های کشت شده به طور عادی قادر به سنتز تمام اسیدهای‌آمینه مورد نیاز خود هستند، افزودن برخی از اسیدهای‌آمینه به‌ویژه برای کشت‌های یاخته‌ای و پروتوپلاست اهمیت دارد. اسیدهای آمینه میزان متوسطی از منبع نیتروژن قابل استفاده را در اختیار یاخته‌های گیاهی قرار می‌دهد که در مجموع می‌تواند سریعتر از نیتروژن معدنی توسط یاخته‌ها جذب شود. (لی‌چون[۶] و موراشیگ[۷]، ۱۹۷۷).

۶- آگار: اکثر بافت‌ها روی محیط کشت جامد کشت می‌شوند که توسط آگار یا جانشین آن مانند ژل‌رایت[۸] و فیتاژل[۹]، ژله‌ای می‌شوند. آگار معمولی‌ترین ماده ژل‌مانند است که برای تهیه محیط‌های

---

[۱] - Ascorbic acid
[۲] - Pantotenic acid
[۳] - Riboflavin
[۴] - P- aminobenzoic acid
[۵] - Schenk
[۶] - Li-Chun
[۷] - Murashige
[۸] - Gelrite
[۹] - Fytagel

کشت جامد و نیمه‌جامد کشت بافت بکار گرفته می‌شود. آگار چندین مزیت بر دیگر مواد ژل‌مانند دارد و نخست این‌که هنگام آمیخته شدن آگار با آب ژلی تولید می‌شود که در دمای حدود ۶۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد ذوب شده و در دمای حدود ۴۵ درجه سانتی گراد جامد می‌شود. از این‌رو ژل آگار با تمام دماهای نگه داری سازگاری دارد. افزون بر این، آگار واکنشی با مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت نداشته و توسط آنزیم‌های گیاهی جذب نمی‌شود. سفتی ژل آگار بستگی به غلظت و نوع آگاری که در محیط کشت به‌کاررفته و نیز pH محیط کشت دارد. غلظت‌هایی از آگار که به‌طور معمول در محیط‌های کشت یاخته به‌کار می‌رود بین ۰/۵ تا ۱ درصد است (تورز، ۱۳۸۶).

۸- آب : در کشت بافت معولا از آب مقطر یا آب مقطر دو بار تقطیر استفاده می‌شود (تاجی و همکاران، ۱۳۸۲). آب اصلی‌ترین ترکیب تشکیل‌دهنده محیط کشت است زیرا ۹۵ درصد از محیط کشت را آب تشکیل می‌دهد (پیریک، ۱۹۹۹).

۹- اسیدیته : pH محیط کشت معمولا بین ۵/۶ تا ۵/۸ تنظیم می‌شود. اما گیاهان مختلف برای رشد مطلوب ممکن است به pH های متفاوتی نیاز داشته باشند. اگرpH از ۶ بالاتر رود ممکن است محیط کشت بسیار سخت و سفت شود و اگر کمتر از ۵/۵ باشد مشکلات ژله‌ای شدن محیط کشت را خواهیم داشت (تاجی و همکاران، ۱۳۸۲).

۱-۲-۴- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

هورمون‌ها ترکیبات آلی هستند که به‌طور طبیعی در گیاهان عالی سنتز می‌شوند و رشد و نمو را تحت تاثیر قرار می‌دهند. هورمون‌ها معمولا در مکانی متفاوت از محل تولیدشان به فعالیت پرداخته و فقط در مقادیر بسیار اندک، موجود و فعال می‌باشند. غیر از ترکیبات طبیعی انواع مختلفی از ترکیبات مصنوعی نیز تولید شده‌اند که مشابه انواع طبیعی می‌باشند. این ترکیبات مجموعا "تنظیم‌کننده‌های رشد" نامیده می‌شوند. دو گروه اصلی از تنظیم‌کننده‌های رشد وجود دارد که در کشت بافت گیاهی از

اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. این دو گروه عبارت‌اند از اکسین‌ها[1] و سیتوکنین‌ها[2]. درحالی‌که دیگر تنظیم کننده‌های رشد یعنی جیبرلین‌ها[3]، اسیدآبسیزیک[4]، اتیلن[5] و غیره اهمیت کمی دارند. تنظیم‌کننده‌ی رشد اکسین ایندول‌استیک‌اسید و تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین و زآتین[6] نمونه‌هایی از تنظیم‌کننده‌های رشد طبیعی هستند، درحالی‌که بقیه تنظیم‌کننده‌های رشد مصنوعی هستند.

ویژگی عمومی اکسین‌ها القای رشد سلول و تشکیل کالوس است. اکسین موجب تقسیم سلول، طویل‌شدن سلول، تورم بافت‌ها و تشکیل ریشه‌های نابجا می‌شود. اکسین غالبا از شکل‌گیری ساقه‌های نابجا و جانبی ممانعت می‌کند. در غلظت‌های پایین اکسین، تشکیل ریشه‌های نابجا بیشتر می‌شود در حالی‌که در غلظت‌های بالای اکسین، ریشه تشکیل نمی‌شود و بافت کالوس ایجاد می‌گردد. ترکیبی که بیشترین کاربرد را داشته و بسیار موثر است، ۲ و ۴- دی کلروفنوکسی‌استیک‌اسید (2,4 – D)[7] می‌باشد. قابل ذکر است که محلول ذخیره تمام اکسین ها باید به دور از نور و در مکان تاریک نگه‌داری شود(ال ام پیریک، ۱۳۷۶).

سیتوکنین‌ها مشتقات آدنین[8] بوده و نقش مهمی در القای ساقه‌دهی ایفا می‌نمایند. سیتوکنین‌هایی که معمولا در محیط‌های کشت به‌کار می‌روند شامل بنزیل آمینو پورین [9] , تیادیازول [10] , کینتین[11] , زاتین و[12] 2-ip می‌باشد. این تنظیم‌کننده‌های رشد غالبا برای تحریک رشد و نمو به‌کار می‌روند. اگر همراه با

[1] - Auxin
[2] - Cytokinine
[3] - Gibberrlline
[4] - Abscisic Acid
[5] - Ethylene
[6] - Zeatin
[7] - Dichlorophenoxy Acetic Acid
[8] - Adenin
[9] - Benzyl Amino Purine
[10] - 1,2,3-Thiadiazol-5-yl
[11] - Kinetin
[12]- Isopentyl adenin

اکسین به‌کار برده شوند، تقسیم‌سلولی را سرعت می‌بخشند. در غلظت‌های بیشتر (۱تا ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)، تشکیل ساقه‌های نابجا القا شده و تشکیل ریشه متوقف می‌شود. این تنظیم‌کننده‌های رشد با کاهش غالبیت انتهایی، تشکیل ساقه‌های جانبی را تسریع می‌نمایند.

۱-۲-۵- ضدعفونی

ریزنمونه‌ها و کشت‌ها ممکن است توسط انواع میکروارگانیزم‌ها[۱] مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و یا حشرات آلوده شوند. چنین ارگانیزم‌هایی معمولا در سطح و داخل بافت گیاهی وجود دارند. بسیاری از آن‌ها تحت شرایط طبیعی بیماری‌زا نیستند ولی شرایط درون‌شیشه‌ای مناسب برای رشد گیاه، یعنی سطوح بالای عناصر معدنی، ساکارز، رطوبت نسبی و درجه حرارت بالا، باعث رشد و تکثیر سریع میکروارگانیزم‌ها شده و در نتیجه ریزنمونه‌های کشت شده بر اثر شدت آلودگی نابود می‌شوند. آلودگی‌های سطحی را می‌توان با شست وشو و با تیمارهای شیمیایی مختلف برطرف نمود. تعیین تیمارهای مطمئن جهت حذف آلودگی، بدون آسیب‌رساندن به مواد گیاهی، از محدودیت‌های اصلی به‌شمار می‌آید (تاجی و همکاران، ۱۳۸۲). وایتکس (هیپوکلریت‌سدیم[۲]) معمول‌ترین ماده ضدعفونی‌کننده بافت‌های گیاهی است که بسته به نوع بافت گیاهی در غلظت ۱۰ تا ۵۰ درصد در کشت بافت استفاده می‌شود (انجالریک[۳] و همکاران، ۱۹۹۸). غلظت و مدت‌زمان استفاده از سفیدکننده‌های کلردار متفاوت است. بافت‌های ظریف و آبدار معولا پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در محلول ۱۰درصد سفیدکننده کلردار ضدعفونی می‌شوند و بعضی بذور جهت ضدعفونی نیاز به محلول ۳۰ تا ۵۰ درصد سفیدکننده کلردار به مدت ۶ تا ۲۰ دقیقه دارند (اسمیت[۴]، ۲۰۰۰). پوسته بذر را می‌توان بدون وارد شدن آسیب به جنین برای مدتی در معرض غلظت‌های بالای مواد ضدعفونی‌کننده مثل

---

۱ - Microorganism

۲ - Hypochlorite Sodium

۳ - Enjarlic

۴ - Smith

پراکسیدهیدروژن قرار داد و یا آن‌را درون الکل غوطه‌ور کرد. اتانول به نوبه خود یک ماده سمی بالقوه است که تمام میکروارگانیزم‌ها را ازبین نمی‌برد. برخی باکتری‌ها در معرض اتانول[۱] ۹۶٪ حداقل به‌مدت ۴۰ دقیقه زنده می‌مانند. پس از ضدعفونی سطحی، مواد ضدعفونی کننده با چند بار شستشو در آب مقطر استریل حذف می‌شوند. مواد ضدعفونی‌کننده باقی‌مانده نه تنها برای ریزنمونه سمی هستند بلکه می‌توانند اجزای ضروری محیط کشت را نیز از بین ببرند. به عنوان مثال تیامین با بقایای هیپوکلریت‌سدیم تخریب می‌شود (بونگاو و وون آدرکاس[۲]، ۱۹۹۲).

۱-۳- تنش‌های محیطی

شوری و خشکی از جمله مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی در بخش کشاورزی هستند که باعث کاهش تولید محصولات کشاورزی در سرتا سر جهان شده‌اند، به این منظور تلاش‌های زیادی تاکنون جهت بهبود بهره‌وری محصولات کشاورزی تحت شرایط کم‌آبی و شوری انجام شده است (کریمی و همکاران، ۲۰۱۱، کاتیولی [۳]و همکاران، ۲۰۰۸، فولدا [۴]و همکاران، ۲۰۱۱). گیاهانی که در معرض تنش‌های مختلف قرار می‌گیرند، به منظور هماهنگی با شرایط محیطی غالب، تغییراتی در متابولیسم خود ایجاد می‌کنند که این یک مکانیسم دفاعی برای ارگانیزم‌های کم‌تحرک می‌باشد (کاویانی، ۲۰۰۸، کریمی و همکاران، ۲۰۱۱).

سلول‌های گیاهی جهت مقابله با اثرات منفی تنش‌های محیطی از مکانیسم‌های دفاعی ویژه‌ای برخوردارند که از همکاری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (سوپراکسید دیسموتاز[۵]، کاتالاز[۶]، گلوتاتیون ردوکتاز[۷]،

---

[۱] - Etanol
[۲] - Bunga and Von adercas
[۳] - Katiuly
[۴] - Fulda
[۵] - Superoxide Dismutase
[۶] - Catalase
[7] - Glutathione Redoctase

پراکسیدازها[۱] و غیره) (بلوخینا[۲] و همکاران، ۲۰۰۳) و آنتی‌اکسیدان‌ها (کاروتنوئید[۳]، توکوفرول[۴]، آسکوربات[۵]، گلوتاتیون و غیره) (میتلر[۶]،۲۰۰۲) تشکیل شده‌اند. همکاری این اجزا با همدیگر سبب تشکیل چرخه‌های بسیار مهمی نظیر آسکوربات-گلوتاتیون، مهلر و گزانتوفیل می‌گردد (میتلر و همکاران، ۲۰۰۴). اجرای این چرخه‌ها به‌عنوان مکانیسم‌های دفاعی، سلول را قادر می‌سازد تا از تولید فرم‌های فعال اکسیژن پیشگیری نمایند و یا این‌که آن‌ها را جمع‌آوری نموده و اثرات مضر آن‌ها را کاهش می‌دهند (آسادا[۷]، ۲۰۰۰).

۱-۳-۱- تنش شوری

شوری به‌عنوان یکی از عوامل محدودکننده رشد گیاه و تولیدات کشاورزی در مناطق خشک و نیمه‌خشک محسوب می‌گردد که علت آن کاهش پتانسیل اسمزی، فراوانی یون‌های سمی و عدم تعادل تغذیه‌ای در این محیط‌ها می‌باشد (پاسارکلی[۸]، ۱۹۹۹).

۱-۳-۱-۱- سدیم کلرید (NaCl)

سدیم کلرید، یک ترکیب یونی است که از نسبت‌های معادل سدیم و کلر تشکیل شده است که از واکنش بین سدیم مذاب و گاز کلر بدست می آید. کلرید سدیم ترکیب اصلی تشکیل‌دهنده نمک طعام است و بخش اعظم شوری آب اقیانوس‌ها نیز به‌دلیل این ترکیب است. شوری با ایجاد تغییرات مضر در تعادل یون‌ها، وضعیت آب، عناصر غذایی، عملکرد روزنه و کارآیی فتوسنتز موجب کاهش فرآیندهای رشد و نموی گیاه نظیر جوانه‌زنی، رشد گیاهچه و کاهش میزان تولید محصول در گیاه می‌شود. تنش

---

۱ - Peroxidase
۲ - Blokhina
3 - Carotenoid
4 - Tocopherol
5 - Ascorbat
۶ - Mittler
۷ - Asada
۸ - Passarkli

شوری باعث از بین رفتن تعادل اسمزی و در نتیجه خروج آب از برگ‌ها و در نهایت از بین رفتن آماس سلولی می‌شود. افزایش جذب نمک و سمیت یونی، سبب اختلال در کارکرد سلولی و آسیب رساندن به فرآیندهای فیزیولوژیک، از قبیل فتوسنتز و تنفس می‌شود (مانز[۱]،۲۰۰۲).

۱-۳-۱-۲- مکانیسم مقاومت به تنش شوری

پاسخ گیاهان به تنش شوری بسیار پیچیده است. این پاسخ از غلظت نمک، نوع یون‌ها، عوامل مختلف محیطی و مرحله رشد و نموی گیاه تآثیر می‌پذیرد. مسمومیت یونی در اثر تجمع یون‌های خاص به‌ویژه سدیم ایجاد می‌شود که موجب اختلال در واکنش‌های متابولیک گیاه می‌شوند. برای مقابله با این تنش‌ها، در شرایط شوری کم و ملایم گیاهان با افزایش غلظت مواد محلول، فشار اسمزی داخلی خود را حفظ می‌نمایند (سوباراو[۲]، ۱۹۹۹). در غلظت‌های بالای نمک، با ورود و خروج یون‌ها میزان Na^+ درون سیتوپلاسم را کاهش داده با ثابت نگه‌داشتن غلظت یون پتاسیم، نسبت Na^+/K^+ را پایین نگه می‌دارند (فرانسس[۳] و همکاران، ۱۹۸۶). این مکانیسم به‌حدی در مقابله با اثرات سوء ناشی از تنش شوری موثر است که نسبتNa^+/K^+ در گیاهان به عنوان یکی از خصوصیات مهم جهت تفکیک گونه‌های متحمل از حساس گزارش شده است (امیلین [۴]و همکاران، اسکاچمن[۵] و همکاران، ۱۹۹۱، ویمبرگ[۶] و همکاران، ۱۹۸۷). خصوصیات فیزیولوژیک گیاه، از جمله بسته شدن روزنه‌ها، تغییر درالگوی تنظیم-کننده‌های رشد و تجمع متابولیت‌ها نیز نمونه‌های بارزی از سازگاری با شرایط تنش می‌باشند (خاوری، ۱۳۷۵ ؛ سینگ[۷] و همکاران، ۲۰۰۴). لذا بررسی اثرات تنش شوری به کمک آنزیم‌ها ، می‌تواند با سرعت

---

[۱] - Munns
[۲] - Subbarao
[۳] - Francois
[۴] - Omielan
[۵] - Schatchman
[۶] - Weimberg
[۷] - Singh

بیشتری به شناسائی پایه‌های مقاوم یک گیاه منجر شود، چراکه رابطهٔ قوی در تحمل به تنش‌های محیطی و تغییرات غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان فتوسنتز کننده وجود دارد.

۱-۳-۲- تنش خشکی

یکی از تعاریف رایج خشکی در کشاورزی توسط ماس و هوفمن[۱] (۱۹۷۷) ارائه شده است. طبق این تعریف، تنش خشکی هنگامی افزایش می‌یابد که تقاضای بالای تبخیر اتمسفری برگ‌ها (تبخیر- تعرق بالقوه) از ظرفیت ریشه‌ها برای استخراج آب از خاک (تبخیر- تعرق حقیقی) فراتر می‌رود. به طور کلی توانایی گیاهان برای پاسخ به تنش و بقا در شرایط کمبود آب به مجموع راهکارهای پاسخ‌های سلولی مرتبط است. علاوه بر این پاسخ به شرایط کمبود آب به گونه و رقم گیاهی، طول و مدت تنش خشکی، سن و مرحله نموی گیاه، نوع سلول و اندام گیاهی و اجزای زیرسلولی و ساختار آن بستگی دارد (برای[۲]، ۱۹۹۷؛ لویت، ۱۹۸۰).

۱-۳-۲-۱- پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG)

پلی‌اتیلن‌گلیکول پلی‌مری با وزن مولکولی بالا است که باعث کاهش پتانسیل اسمزی می‌شود (هاردرگری و امریچ[۳]، ۱۹۹۲). میشل و کافمن[۴] به بررسی اثرات غلظت پلی‌اتیلن‌گلیکول ۶۰۰۰ و دما بر پتانسیل اسمزی محلول پرداختند. اثرات غلظت و دما بر پتانسیل اسمزی محلول‌های ۶۰۰۰ PEG با بیشتر نمک‌ها و قندهای دیگر متفاوت است و همان‌طور که واضح است به تغییر ساختمان پلیمر PEG مرتبط می‌باشد. معمول‌ترین معادله برای محاسبه روابط بین غلظت، دما و پتانسل اسمزی رابطه ذیل است.

---

[۱]- Mass and Hoftman

[۲] - Bry

[۳] - Hardegree and Emmerich

[۴] - Michel and Kaufmann

رابطه (۱-۱)

$$\phi s = -(۱/۱۸ * ۱۰^{-۲})\, C - (۱/۱۸ * ۱۰^{-۴}) C^{۲} + (۲/۶۷ * ۱۰^{-۴}) CT + (۸/۳۹ * ۱۰^{-۷}) C^{۲}\, T$$

C غلظت PEG- ۶۰۰۰ بر حسب $g/kg\ H_2O$

T دما بر حسب درجه سانتی‌گراد است.

۱-۳-۲-۲- مکانیسم مقاومت به تنش خشکی

سازگاری در یک گونه، جمعیت یا گیاه می‌تواند به تغییر ساختمان یا متابولیسم در پاسخ به تغییر در محیط اطلاق شود که بقای فرد یا نتاج آن را افزایش می‌دهد. سازگاری ممکن است از دو طریق صورت گیرد: نخست گیاهان ممکن است فنولوژی، ساختمان یا متابولیسم خود را به منظور کاهش اثرات تنش تغییر دهند که این تغییرات ممکن است در عرض چند ثانیه و یا به تدریج در طول یک فصل رشد صورت گیرد. این فرآیندها معمولا به‌عنوان تطابق[۱] در نظر گرفته می‌شوند. همه تغییرات ناشی از واکنش به خشکی تطابق محسوب نمی‌شوند، آن‌ها ممکن است نتیجه اختلال یا عدم تعادل در فرآیندهای متابولیکی باشند که توصیف و اهمیت آن‌ها موضوع بحث‌های زیادی بوده است (کاندو[۲] و همکارن، ۱۹۹۰). تنش خشکی در حقیقت کاهش پتانسیل آب خاک است. در چنین شرایطی گیاه به منظور ادامه جذب آب، از طریق تجمع ترکیبات اسمزی از جمله قندهای محلول و پرولین، پتانسیل اسمزی خود را کاهش می‌دهد و به عبارتی تنظیم اسمزی صورت می‌گیرد (مارتین[۳] و همکاران، ۱۹۹۳). عکس‌العمل گیاهان به تنش خشکی به ماهیت کمبود آب وابسته است و می‌تواند به صورت: ۱- پاسخ‌های

[1] - Acclimization
[۲] - Kando
[۳] - Martin

فیزیولوژیکی به تنش (پاسخ‌های کوتاه مدت) ۲- تطابق غیرقابل توارث با سطح مشخصی از تنش خشکی (پاسخ میان مدت) و تطابق قابل توارث با خشکی (پاسخ بلندمدت) طبقه‌بندی شود (پاسارکلی، ۱۹۹۹).

از جمله اهداف این تحقیق عبارت اند از:

- ✓ بررسی واکنش گیاه دارویی نوروزک به شرایط تنش شوری و خشکی درون شیشه‌ای
- ✓ بررسی آستانه تحمل گیاه نوروزک به شرایط تنش شوری و خشکی درون شیشه‌ای
- ✓ ارزیابی صفات بیوشیمیایی در کالوس و گیاهچه تحت شرایط تنش شوری و خشکی

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- کشت جنین

مدرس و همکاران در سال ۱۳۸۶ اقدام به بررسی بهترین جداکشت جنین گیاه نوروزک نمودند. ابتدا قطعاتی از لپه و جنین در محیط MS مورد آزمون قرار گرفت. نتایج نشان داد بین جداکشت‌های مورد بررسی، جنین‌های کامل و بدون لپه پس از چهار روز رشد کرد، در حالی‌که جنین به همراه نصف لپه بعد از ۶۵ روز هیچ گونه رشدی نداشت. در این بررسی پس از تعیین بهترین جدا کشت، تاثیر شرایط نوری مختلف بر رشد جنین مورد بررسی قرار گرفت. جنین‌ها پس از ضدعفونی و جداسازی در ۳۰ ظرف کشت شدند و به سه تیمار مختلف نوری منتقل شدند. ده ظرف به شرایط یک هفته تاریکی مطلق و دمای ۲۵ درجه ، ده ظرف به مدت دو هفته تاریکی و دمای ۲۵ درجه و ده ظرف نیز به شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی منتقل شدند. در ادامه ویال‌های هر سه تیمار ابتدا به شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و دمای ۲۸-۲۵ منتقل شدند. نتایج نشان داد بهترین شرایط نوری در کشت جنین نوروزک، نگه‌داری جنین‌ها به مدت یک هفته در تاریکی کامل بود. گیاهان بدست آمده از این جنین‌ها از نظر رشد طولی ریشه و بخش هوایی، نتایج بهتری را نسبت به شرایط نوری معمولی و شرایط دو هفته تاریکی نشان دادند. همچنین در این پژوهش تآثیر تیمارهای مختلف هورمونی 2,4 D و KIN به تنهایی و در ترکیب باهم در کشت جنین مورد بررسی قرار گرفت، که بر اساس نتایج به‌دست آمده محیط $^{-۱}$ 2,4 D ۲mg l به همراه KIN . /۱ $mg\ l^{-۱}$، به طور معنی‌داری نسبت به سایر محیط‌ها جهت افزایش باززایی و رشد جنین مناسب‌تر بود.

در بررسی روی گیاه باریجه توسط تفرشی و همکاران در سال ۱۳۸۶، محور جنینی پس از ضدعفونی سطحی در محیط‌های پایه MS ۱/۸، MS ۱/۴، MS کشت گردید. پس از گذشت ۲۰ روز، از گیاهچه‌های با بنیه‌های مناسب ریز نمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل، کوتیلدون، برگ اصلی، جنین کامل و جنین برش یافته تهیه شد. نتایج نشان داد جنین‌ها ۲-۳ روز پس از قرار گرفتن در محیط MS ۱/۴، جوانه زدند و گیاهچه کامل ۲۰ روز پس از کشت حاصل شد. بر این اساس کشت جنین درون‌شیشه به‌منظور به

حداقل رساندن دوره خواب بذر و جوانه‌زنی آن و هم‌چنین ریز ازدیادی و در نتیجه تولید انبوه و جلوگیری از انقراض آن توصیه می‌شود.

۲-۲- تاثیر تیمار NaCl بر برخی ویژگی‌های کمی و کیفی درگیاهان مختلف

حبیبی و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند با بررسی اثرات غلظت‌های مختلف NaCl (۵۰ تا ۲۰۰) میلی‌مولار بر پایه‌های مرکبات تحت شرایط درون‌شیشه‌ای، با افزایش غلظت NaCl، رشد نسبی، میزان کلروفیل برگ و بارگیری مواد معدنی کاهش معنی‌داری نشان داد در حالیکه میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز افزایش قابل توجهی پیدا کرد. هم‌چنین در پژوهشی اثر تنش شوری NaCl و $CaCl_2$ بر روی سیب M4 در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت NaCl و $CaCl_2$، غلظت پرولین در گیاهچه‌ها افزایش یافت در حالی‌که میزان کلروفیل برگ در مقایسه با شاهد کاهش یافت (سوتیروپولوس[۱] و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعه‌ای که توسط میزیک[۲] و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی ژنوتیپ‌های مختلف گیاه سنتوریوم ماریتیموم انجام شد. به‌منظور بررسی تحمل گیاه به شوری، از سطوح مختلف نمک ۰، ۲۵، ۷۵، ۱۰۰ میلی‌مولار جهت جوانه‌زنی بذور در محیط MS استفاده شد. نتایج نشان داد در ژنوتیپ (مقاوم)، طول ریشه‌چه در تمام غلظت‌ها افزایش یافت. اما در ژنوتیپ حساس، طول ریشه‌چه تنها در تیمار ۲۵ میلی مولار افزایش داشته است. در تحقیقی که پاندی و چیکارا در سال ۲۰۱۴ انجام دادند، نتیجه گرفتند که اعمال تیمارهای NaCl و مانیتول[۳] در سطوح ۰، ۲۵، ۷۵، و ۱۰۰میلی‌مولار، تاثیر معنی‌داری بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه استویا داشته است. در این بررسی غلظت‌های مانیتول و نمک باعث افزایش صفات فیزیومورفولوژیک و ترکیبات بیوشیمیایی از قبیل میزان پرولین، پروتئین و کلروفیل گردید و تاثیرات منفی روی رشد

[۱] - Sotiropoulos
[۲] - Misic
[۳] - Mannitol

گیاه داشت. با این حال ۵۰ درصد از گیاه، در غلظت ۵۰ میلی‌مولار نمک و مانیتول زنده ماند. نتایج واکنش پایه‌های انگور به تنش شوری NaCl درغلظت صفر تا ۱۲۵ میلی‌مولار در شرایط درون‌شیشه‌ای نشان داد، پروتئین کل، پرولین، سدیم و پتاسیم درتمام پایه‌ها افزایش یافت، در حالی‌که میزان کلروفیل و قند کل کاهش پیدا کرد (علیزاده و همکاران، ۲۰۱۰). همچنین در بررسی که شارما و راماوا[۱] در سال (۲۰۱۳) روی رشد و فعالیت آنتی اکسیدانی کالوس‌های کشت شده در گیاه سالوادورا[۲] انجام دادند نشان داد که تحت تاثیر تیمارهای مختلف NaCl، میزان پرولین، پروتئین کل، وزن خشک و فعالیت آنزیمی در مقایسه با کنترل افزایش یافت.

۲-۳- تاثیر تیمار PEG بر برخی ویژگی‌های کمی و کیفی گیاهان مختلف

در بررسی اثرات تنش خشکی PEG بر میزان تغییرات پرولین گیاه نوروزک در شرایط محیطی و شرایط درون‌شیشه‌ای، خویدکی و همکاران (۱۳۸۹) به این مهم دست یافتند که با افزایش غلظتPEG، میزان پرولین موجود در برگ‌ها افزایش یافت. نیوتن[۳] و همکاران (۱۹۸۶) در بررسی روی میزان تغییرات پرولین کالوس در کاج پینوس تدا[۴] به این نتیجه دست یافتند که در شرایط تنش خشکی نسبت به محیط شاهد، با افزایش غلظت PEG، پتانسیل اسمزی کاهش یافته و تجمع اسید آمینه پرولین را به همره دارد که با نتایج بررسی کوچووا وجورجیو[۵] (۲۰۰۳) بر روی دو رقم جو همخوانی دارد. جیروسی و همکاران با بررسی شیره آبکش یونجه در هنگام تنش خشکی گزارش کردند که در هنگام کاهش پتانسیل آب از ۱- به ۲- مگاپاسگال، افزایش ناگهانی و شدیدی در غلظت پرولین شیره آبکش مشاهده

[۱] - Sharma and Ramava
[۲] -Salvadora
[۳] - Newton
[۴]- Pinus taeda
[۵] - Kocheva and Georgiev

می‌شود. آن‌ها نتیجه گرفتند که پرولین می‌تواند در برگ‌ها افزایش یافته و از آن‌جا به بافت‌های مریستمی برای حفظ و ایجاد تنظیم اسمزی در بافت‌های در حال رشد منتقل گردد (خویدکی و همکاران، ۱۳۸۹).

نتایج بررسی تنش خشکی پنج رقم گندم ایرانی در محیط درون‌شیشه‌ای نشان داد با افزایش سطوح PEG وزن تر کالوس ها کاهش پیدا کرده و در غلظت های بالای PEG بیشترین مقاومت مربوط به رقمی است که با کاهش رشد نسبی همراه است (ابراهیمی، ۲۰۰۲). هم‌چنین در بررسی روی کالوس آفتابگردان که از PEG6000 در غلظت‌های ۰، ۵ درصد، ۱۰ درصد، ۱۵درصد و ۲۰درصد استفاده شد، نتایج نشان داد با افزایش غلظت PEG رشد کالوس‌های حاصل از هیپوکوتیل و کوتیلدون به طور معنی‌داری کاهش یافت. نتایج بررسی شریعت و عصاره در سال (۱۳۸۵) روی چهارگونه گیاه اکالیپتوس نشان داد تحت تاثیر تنش خشکی در سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول، میزان پرولین و قندهای محلول به علت نقش این مواد در تنظیم اسمزی گیاه تحت شرایط تنش افزایش یافت. در حالی‌که با افزایش غلظت پلی اتیلن گلیکول، کاهش رنگیزه‌های گیاهی و کاهش پارامترهای رشد در هر چهارگونه مشاهده شد.

هم‌چنین نتایج بررسی اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکیدان و پراکسیداسیون لیپیدی گیاهچه سه رقم گندم نشان داد افزایش شدت تنش اسمزی، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی را در پی دارد. بعلاوه فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در تمامی ارقام بویژه در سطوح بالای تنش اسمزی کاهش نشان داد. ولی فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز در هر سه رقم مورد بررسی با افزایش شدت تنش اسمزی افزایش یافت (اسفندیاری، ۱۳۸۸).

فصل سوم

مواد و روش‌ها

این پژوهش با هدف بررسی واکنش گیاه دارویی نوروزک و ارزیابی آستانه تحمل این گیاه به تیمارهای شوری و خشکی، در قالب دو آزمایش جداگانه بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه علوم باغبانی دانشگاه صنعتی شاهرود طی سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ انجام گرفت. تعداد ریزنمونه در هر کرت آزمایشی سه عدد و تعداد کل ریزنمونه‌ها ۱۸۹ عدد بود.

۳-۱- نمونه گیاهی

جمع‌آوری بذور گیاه دارویی نوروزک در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ از منطقه بجستان صورت گرفت و سپس جهت رفع نیاز سرمایی و جوانه‌زنی به مدت سه هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. در ادامه جهت تهیه ریزنمونه هر دو آزمایش، جنین از بذور جدا شده در محیط MS قرار داده شد.

۳-۲- مواد شیمیایی

ویتامین و عناصر ماکرو و میکرو مورد استفاده در محیط MS از نمایندگی شرکت نهال‌گستر و هم‌چنین ساکارز از نمایندگی شرکت Merck آلمان و آگار نیز از نمایندگی Sigma خریداری شد. در جداول زیر به ترتیب مقادیر نمک‌های پرمصرف و کم‌مصرف مورد استفاده در محیط کشت پایه MS بر حسب میلی‌گرم در لیتر آمده است.

نمک	مقدار (میلی‌گرم)
$NH4NO_3$	۱۶/۵
$KH2PO_4$	۱/۷
$MgSO_4. 7H_2O$	۳/۷
$CaCl_{2.}2H_2o$	۴/۴
KNO_3	۱۹

جدول ۳- ۱ غلظت نمک‌های پر مصرف محیط کشت پایه MS

جدول ۳- ۲ غلظت نمک‌های کم مصرف محیط کشت پایه MS

نمک	مقدار (میلی‌گرم)
$CuSO_4. 5H_2O$	۲/۵
$ZnSO_4. 7H_2O$	۸۶۰
KI	۸۳
$COCl_2. 6H_2O$	۵/۲
H_3BO_3	۶۲۰

۳-۳- تهیه محیط کشت مایع

جهت تهیه یک لیتر محیط کشت مایع ابتدا مقداری آب مقطر (۷۰۰ میلی لیتر) در داخل بشر یک لیتری ریخته شد. سپس ترکیبات مورد نیاز (محیط آماده MS و ویتامین) پس از وزن کردن و هم‌چنین

ساکارز به اندازه ۳۰ گرم به ترتیب و پس از حل شدن کامل، به محلول اضافه گردید و در نهایت به حجم یک لیتر رسانده شد. جهت تنظیم pH محیط ۵/۸، از NaOH و Hcl یک نرمال استفاده شد و پس از آن ذغال فعال به میزان ۲ گرم در لیتر به محیط اضافه گردید. در ادامه محلول درون یک بطری یک لیتری ریخته شد و جهت استریل شدن در داخل اتوکلاو قرار گرفت. زمان لازم جهت استریل شدن محیط کشت، ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر بود. پس از اتمام زمان مورد نظر، بطری حاوی محیط کشت به شرایط استریل، زیر هود لامینار منتقل شد و در ادامه به داخل لوله‌های آزمایش با قطر ۱/۵ سانتی‌متر توزیع گردید. لازم به ذکر است که آماده سازی محیط کشت جامد نیز به همین طریق صورت می‌گرفت با این تفاوت که از آگار جهت ژله‌ای شدن محیط کشت استفاده شد، که مقدار مصرف آن ۷ گرم در لیتر بوده و پس از تنظیم pH به محیط اضافه گردید.

۳-۳- ۱- محیط‌های تنش شوری و خشکی

جهت اعمال تنش شوری از سدیم کلرید (NaCl) در غلظت‌های صفر، ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌مولار و از پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) به عنوان کاهنده اسمزی در سطوح مختلف تنش خشکی شامل صفر، ۰/۵-، ۱- و ۱/۵- بار استفاده شد. این مواد قبل از تنظیم pH و پس از حل شدن سایر مواد، به محیط کشت مورد نظر اضافه گردید.

۳-۴- ضدعفونی

۳-۴-۱- ضدعفونی محیط و وسایل کار

جهت کار کشت بافت گیاهی، وجود مکان عاری از آلودگی لازم و ضروری است. برای ایجاد این فضا از هود لامینار استفاده شد. قبل از شروع کار یک ساعت نور ماورای بنفش روشن شد، سپس فن دستگاه پانزده دقیقه زودتر شروع به کار کرد. فضای داخلی هود لامینار، با پنبه‌ای آغشته به الکل (۷۰ درصد)، ضدعفونی شد و تمام وسایل استریل شده به داخل آن انتقال یافت. سپس به

مدت ۲۰ دقیقه تحت تابش نور UV[۱] قرارگرفت. پس از خاموش کردن لامپ UV، فن دستگاه پانزده دقیقه زودتر شروع به کار کرد.

ضدعفونی کلیه لوازم شیشه‌ای با استفاده از اتوکلاو و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ به مدت ۱۵ دقیقه و ابزارهای فلزی شامل پنس‌ها و اسکالپل با استفاده از آون در دمای ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت دو تا سه ساعت صورت گرفت.

۳-۴-۲- ضدعفونی بذور

بذور نوروزک پس از جدا کردن پوسته سخت آن به مدت دو ساعت در آب استریل قرار گرفتند تا کاملا متورم شوند. سپس جهت ضدعفونی در زیر هود ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و در ادامه به مدت ۳ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۳ درصد قرار گرفتند. پس از سه بار آبکشی با آب مقطر استریل، اقدام به جداسازی پوسته نازک بذر گردید.

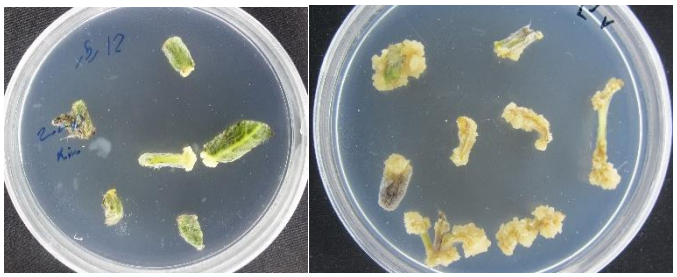
۳-۵- کشت جنین

با توجه به جوانه‌زنی کم بذور در شرایط درون‌شیشه‌ای، از کشت جنین برای بدست آوردن گیاهچه‌های استریل استفاده شد (مدرس و همکاران، ۱۳۸۶). پس از ضدعفونی بذور، جنین چند میلی‌متری به کمک پنس و سوزن‌های استریل، با دقت از داخل لپه‌ها جدا شد و در داخل لوله آزمایش محتوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع قرار گرفت. جهت عدم تداخل ریزنمونه با محیط و جلوگیری از شناور شدن آن، از پل کاغذصافی استفاده شد. پس از کشت، جنین‌ها به مدت یک هفته در شرایط تاریکی مطلق و سپس به شرایط ۱۶و ۸ ساعت به ترتیب روشنایی (۴۰ میکرومول فتون برمترمربع بر ثانیه) و تاریکی در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

[۱] - Ultra violent

۳-۶ کشت کالوس

ابتدا جنین گیاه نوروزک در شرایط درون شیشه‌ای و در محیط MS کامل کشت شد. پس از مدت سه الی چهار هفته که گیاه به رشد مطلوب خود رسید جهت تکثیر، از قسمت‌های میانگره گیاه قطعاتی جدا کرده و در محیط MS کامل کشت شد. در ادامه پس از اضافه نمودن مواد و عناصر معدنی مورد نیاز محیط کشت ، از 2,4 D و KIN در غلظت‌های ۰، ۱:۰/۵، ۱ :۰/۱ ۱ ۰/۵: ۲، ۱: ۲ استفاده شد. جهت القای کالوس از گیاه جوان ریزنمونه برگی گرفته شد. ابتدا برگ‌ها به قطعات کوچک‌تر تقسیم شدند و سپس به‌منظور ایجاد زخم و تحریک کالوس‌زایی برش‌هایی در اطراف ریزنمونه با استفاده از تیغ اسکالپل صورت گرفت (شکل۳-۱). نمونه ها هر دو هفته یک‌بار واکشت شدند تا به اندازه موررد نظر جهت انتقال به محیط تنش شوری و خشکی برسند. از بین تیمارهای مختلف هورمونی، مناسب‌ترین تیمار جهت القای کالوس برای تهیه ریزنمونه ارزیابی تنش استفاده شد. پس از چهار هفته کالوس‌های رشد یافته به محیط‌های تنش شوری ۰،۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی مولار و تنش خشکی PEG ۰، ۰/۵-، ۱- و ۱/۵-بار، دارای تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4 D و KIN به ترتیب با نسبت ۱: ۲ انتقال یافتند. نمونه‌ها به مدت دوهفته در شرایط تنش استقرار یافتند، پس از آن ویژگی‌های بیوشیمیایی از قبیل محتوی پرولین، پروتئین کل و هم‌چنین میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان گایاکول پراکسیداز مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۳-۱ تصویر سمت چپ: ریزنمونه‌های برگی کشت شده در محیط کالزایی حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4 D و ۱ میلی‌گرم KIN پس از گذشت سه روز. سمت راست: ریزنمونه‌های برگی کشت شده در محیط کالزایی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4 D و ۱ میلی‌گرم KIN پس از گذشت ۱۰ روز.

۳- ۶- اندازه‌گیری صفات کمی و کیفی گیاهچه

در آزمایش اول که ارزیابی تنش شوری و خشکی درون شیشه‌ای بر رشد گیاهچه بود، پس از کشت جنین به طور همزمان در محیط تنش و شاهد، چهار هفته به ریزنمونه‌ها اجازه رشد داده شد و سپس صفات مورفولوژیکی از جمله وزن تر و وزن خشک، بیوماس، قطر ساقه، طول ریشه، طول اندام هوایی، تعداد برگ، شاخص سطح برگ، صفات فیزیولوژیکی از جمله درصد رشد جنین و شاخص کلروفیل و صفات بیوشیمیایی از جمله میزان پرولین، میزان پروتئین کل، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و کاتالاز مورد بررسی قرار گرفت.

۳- ۶-۱- اندازه‌گیری وزن تر و خشک

ابتدا وزن اولیه گیاهچه‌ها با ترازو با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شد و سپس جهت تعیین بیوماس [۱] و وزن خشک به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه قرار گرفت.

۳- ۶- ۲- اندازه‌گیری صفات رویشی

برای ارزیابی صفات رویشی از قبیل قطر ساقه، طول ریشه، طول اندام هوایی از دستگاه کولیس استفاده شد و صفاتی مانند درصد رشد جنین و تعداد برگ نیز به طور شمارشی اندازه گیری شد.

۳- ۶- ۳- اندازه گیری سطح برگ

جهت تعیین میزان سطح برگ از دستگاه سطح سنجش برگ مدل A3 Light ساخت کشور انگلستان استفاده شد. برای این‌کار ابتدا تمام برگ‌ها از نمونه جدا شد و جهت اندازه‌گیری روی دستگاه قرار گرفت.

[۱] -Biomass

۳- ۶- ۴- اندازه‌گیری کلروفیل

برای تعیین شاخص کلروفیل از دستگاه SPAD مدل Minolta SPAD 502 ساخت کشور ژاپن استفاده شد به این ترتیب که از هر نمونه سه برگ بالایی انتخاب و داده مربوط به آن یادداشت شد.

۳- ۶- ۵- اندازه‌گیری پرولین

در این بررسی جهت اندازه‌گیری میزان اسیدآمینه پرولین از روش بتس[۱] (1973) استفاده گردید. مقدار ۰/۱ گرم از بافت گیاهی همراه با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک‌اسید سه درصد در یک هاون کوچک به مدت سه دقیقه سائیده شد. سپس به مدت ده دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از اتمام سانتریفیوژ از محلول رویی ۲ میلی‌لیتر برداشته و با ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلایسیال و ۲ میلی‌لیتر اسیدنین‌هیدرین ترکیب شد. در ادامه محلول به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از سرد شدن، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به آن اضافه شد تا دو فاز در لوله آزمایش تشکیل شود. از فاز رویی جهت قرائت میزان پرولین با استفاده از سل کوارتز در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده شد.

تهیه محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد: برای این منظور ۳ گرم از پودر سولفوسالیسیلیک اسید در ۹۷ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد (در صورت نبوداسیدسولفوسالیسیلیک ۳ درصد می‌توان از اسیدسولفوریک ۳درصد نیز استفاده نمود).

تهیه فسفریک اسید ۶ مولار: برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول اسیدفسفریک ۶ مولار مقدار ۴۰/۴۵ میلی‌لیتر اسیدفسفریک با اضافه کردن آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد

[۱] - Bates

(مشخصات فسفریک اسید بکار رفته خلوص ۸۵ درصد، چگالی ۱/۷۱، جرم اتمی ۹۸، فرمول H_3PO_4).

تهیه محلول اسیدنین‌هیدرین: مقدار ۱/۲۵ گرم از معرف نین‌هیدرین با ۳۰ میلی‌لیتراستیک اسید گلایسال (با فرمول CH3_COOH) و ۲۰ میلی‌لیتر فسفریک‌اسید ۶ مولار در یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی هیتر چرخان در دمای حدود ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد حل گردید. این مقدار مصرف برای ۲۵ نمونه و برای کمتر از ۲۴ ساعت در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) قابل استفاده می‌باشد.

۳- ۶- ۶- عصاره‌گیری آنزیم و پروتئین کل

ابتدا ۰/۱ گرم از بافت گیاهی با ۱۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار در یک هاون چینی سائیده شد. سپس نمونه های آماده شده در تیوپ ۲ میلی‌لیتری با دورrpm ۱۵۰۰۰ (دور در دقیقه) در مدت زمان ۳۰ دقیقه و دمای $4c^{\circ}$ سانتریفیوژ شد و در ادامه ۱۰۰میکرولیتر از فاز رویی برداشته و در تیوپ‌های ۰/۵ میلی‌لیتری به تعداد آنزیم های که سنجش خواهد شد ریخته شد. بلافاصله عصاره‌ها به فریزر ۱۸- درجه سانتیگراد منتقل شدند. از این عصاره می‌توان برای تعیین غلظت پروتئین و آنزیم‌ها استفاده نمود.

۳- ۶- ۶- ۱-سنجش پروتئین کل به روش بردفورد[1] (۱۹۷۶)

تهیه محلول استوک BSA[2] : حل کردن ۲۰ میلی گرم BSA در۱۰ میلی لیتر آب مقطر تزریقی. از غلظت‌های ذکر شده هر کدام به میزان ۱ میلی لیتر در تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری تهیه شد (به‌عنوان مثال؛ برای تهیه غلظت ۰/۱ مقدار ۵۰ میکرولیتر از BSA + ۹۵۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی) سپس

[1] - Bradford

[2] - Bovine Serum Albomin

۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ها استاندارد ا با ۳ میلی‌لیتر بردفورد (بعد از اضافه کردن BSA با افزایش غلظت استانداردها باید رنگ بردفورد روشن‌تر شود) حل گردید. محلول حاصل با استفاده از سل پلاستیکی منحنی استانداردها رسم شده و در صورتی که ضریب پیوستگی بیشتر از ۹۵ درصد باشد قابل قبول است (ضریب پیوستگی تمام منحنی های استاندارد رسم شده در طول آزمایش ۹۶درصد بود.) بعد از رسم منحنی استاندارد ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های عصاره آنزیمی با ۳ میلی‌لیتر معرف بردفورد مخلوط گردید (مدت زمان قرائت نمونه های آماده شده از ۲ دقیقه تا یک ساعت می باشد).

۳-۶-۶-۲- سنجش گایاکول پراکسیداز[۱] به روش چنس و مهلی[۲] (۱۹۵۵) :

۱- بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=7) به میزان ۷۵۰ میکرولیتر

۲- گایاکل ۱۰ میلی‌مولار (۰/۱۲۴۱۴گرم گائیکول در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) به میزان ۷۵۰ میکرولیتر

۳- ۷۰H_2O_2 میلی‌مولار محلول در فسفات پتاسیم (تهیه ۵ میلی‌لیتر H_2O_2 ۷۰ میلی مولار: ۴/۹۶ میلی لیتر بافر+ ۳۵ میکرولیتر H_2O_2) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر .

۴- آب دو بار تقطیر ۱۴۰۰ میکرولیتر

۵- ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی

محلول تهیه شده در سل کوارتز در طول موج ۴۷۰ نانومتر و در مدت ۶۰ ثانیه (با گذشت زمان میزان جذب نمونه ها افزایش داشت) اندازه گیری شد. ضمن این‌که از مخلوط حاصل به جز عصاره به عنوان شاهد برای صفر کردن اسپکتروفتومتر استفاده گردید. جهت محاسبه فعالیت آنزیم گایاکل‌پراکسیداز از رابطه زیر استفاده شد.

$$\boldsymbol{Activity\ (U/ml)} = \frac{\Delta\ \mathbf{A240} \times \mathbf{l} \times \mathbf{Vt} \times \mathbf{df}}{\boldsymbol{\varepsilon} \times \mathbf{l} \times \mathbf{t} \times \mathbf{Vs}}$$ رابطه ۳-۱

[۱] - Guayacol Peroxidasa

[۲] - Chance and Maehly

U : واحد آنزیمی

Δ A240 : تفاوت میزان جذب مخلوط واکنش در زمان شروع (۰ثانیه) و پایان واکنش (۶۰ ثانیه)

l : با توجه به ضریب پراکسیدهیدروژن در معادله زیر تعیین می‌شود که معادل ۴ می‌باشد.

$$4\ \text{guaiacol} + 4\ H_2O_2 \rightarrow \text{tetraguaiacol} + 8\ H_2O$$

V_t : حجم مخلوط واکنش (در این آزمایش برابر سه میلی‌لیتر بود)

d_f : فاکتور رقیق‌کننده (۵۰)

t : مدت زمان واکنش (۶۰ ثانیه)

V_s : حجم نمونه (در این آزمایش برابر ۲۰ میکرولیتر بود)

ε : ضریب خاموشی برابر ۲۶/۶ $mM^{-1}cm^{-1}$

l : طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش (برابر یک است)

محاسبه گایاکل ۱۰ میلی مولار: **(**۰/۱۲۴۱۴ گرم گایاکل در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم**)**

رابطه (۳-۲)

$$\mathbf{C * M * V * \frac{1}{A}}$$

C= غلظت

$$۰/۱\ cc * \frac{۱}{۱۲٤/۱٤}\ g/M = ۰/۱۲٤۱٤\ \ g/100cc$$

M ۰/۰۱*

M= جرم مولکولی

V= حجم مورد نیاز

۳- ۶- ۶- ۳- سنجش کاتالاز به روش ابی[۱] (۱۹۸۴)

تهیه محلول‌های مورد نیاز جهت قرائت آنزیم کاتالاز به شرح زیر است.

[۱] - Aebi

۱- بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی‌مولار (pH = ۷) به میزان ۷۵۰ میکرولیتر

۲- آب مقطر استریل به میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر

۳- پراکسیدهیدروژن[1] ۱۰ میلی‌مولار به میزان ۷۵۰ میکرولیتر

۴- عصاره آنزیمی ۲۰ میکرولیتر

ابتدا مخلوط در یک سل کوارتز ۳ میلی‌لیتری ریخته شده و فعالیت آنزیم در اسپکتروفتومتر مدل UV2150 ساخت کشور آمریکا در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. سپس منحنی فعالیت آنزیم کاتالاز در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه و بر حسب Abs/min ترسیم شد. قبل از قرائت نمونه‌های آنزیمی دستگاه با بلنک صفر گردید (بلنک حاوی تمامی مواد استفاده شده برای سنجش کاتالاز به جز عصاره می‌باشد).

۳-۶-۶-۳-۱- محاسبه فعالیت آنزیم کاتالاز به روش نیکولس- شونبام و برگمایر[2] ۱۹۸۳

$$\boldsymbol{Activity\ (U/ml)} = \frac{\Delta\ \mathbf{A240} \times \mathbf{l} \times \mathbf{Vt} \times \mathbf{df}}{\boldsymbol{\varepsilon} \times \mathbf{l} \times \mathbf{t} \times \mathbf{Vs}}$$ رابطه(۳-۳)

U : واحد آنزیمی

Δ A240 : تفاوت میزان جذب مخلوط واکنش در زمان شروع و پایان واکنش

l: با توجه به ضریب پراکسیدهیدروژن در معادله (۱) تعیین می‌گردد که معادل ۲ می‌باشد.

V_t : حجم مخلوط واکنش (در این آزمایش برابر سه میلی‌لیتر بود)

d_f : فاکتور رقیق‌کننده (۵۰)

t : مدت زمان واکنش (۱۸۰ ثانیه)

V_s : حجم نمونه (در این آزمایش برابر ۲۰ میکرولیتر بود)

ε : ضریب خاموشی برابر ۳۹/۴ $mM^{-1}cm^{-1}$

[1] - Hydrogen Peroxide
[2] - Nicolass and Bragmayer

l : طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش (برابر یک است)

۳-۷- اندازه گیری صفات فیزیکی و بیوشیمیایی کالوس تحت تنش شوری و خشکی

در آزمایش دوم که ارزیابی تنش شوری و خشکی درون شیشه‌ای بر رشد کالوس بود، صفات فیزیکی مانند قهوه‌ای شدن و هم‌چنین درصد کالوس‌زایی و صفات بیوشیمیایی از جمله میزان پرولین، پروتئین کل و فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز مورد بررسی قرار گرفت. سنجش پرولین، پروتئین کل، آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و کاتالاز مطابق روش ارائه شده در بخش گیاهچه انجام شده است.

۳-۷-۱- درصد کالوس زایی

رابطه (۳-۴)

$$\frac{\text{تعداد ریزنمونه‌ها به کالوس رفته}}{\text{تعداد کل ریزنمونه‌ها}} * ۱۰۰$$

۳-۷-۲- شاخص قهوه‌ای شدن (BI)

جهت مقایسه میزان قهوه‌ای شدن در بین تیمارهای مختلف تحت تنش شوری و خشکی درون شیشه‌ای از نمونه‌های کالوس عکس‌برداری شد. با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ، شاخصه‌های L، a و b تعیین شد. شاخص قهوه‌ای شدن[۱] (BI) خلوص رنگ قهوه‌ای را نشان می‌دهد و طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود (وانگ و همکاران، ۲۰۰۴).

رابطه (۳-۵)

$$BI= [۱۰۰(X-۰/۳۱)]/۰/۱۷۲$$

$$X= (a+۱/۱۷۵ L)/(۵.۶۴۵ L+a-۳/۰۱۲ b)$$

[۱]- Browing index

۳-۷- محاسبات آماری

ابتدا داده‌ها در نرم افزار Excel وارد شدند و سپس برای تجزیه داده‌ها از نرم افزار SAS 9/0 استفاده شد، هم‌چنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح آماری معنی‌دار ۱ درصد صورت گرفت. در ادامه نیز برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2013 استفاده شد.

فصل چهارم

نتایج و بحث

۴-۱- نتایج آزمایش اول (تنش شوری و خشکی بر گیاهچه)

۴-۱-۱- صفات وزنی

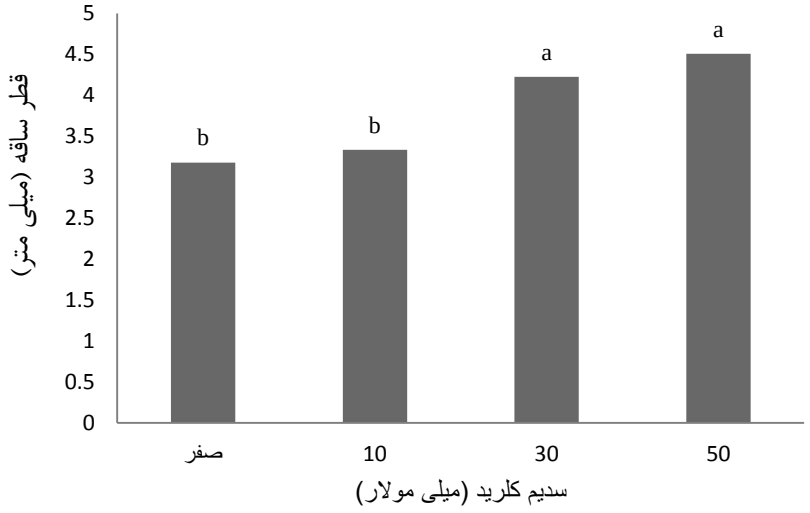
طبق نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول۴-۱) صفات وزن تر، وزن خشک و بیوماس تحت تاثیر سطوح مختلف تنش شوری و خشکی درون شیشه‌ای معنی‌دار نشد.

۴-۱-۲- صفات رویشی

۴-۱-۲-۱- قطر ساقه

طبق مشاهدات موجود در جدول ۴-۱، اثر تنش شوری بر صفت قطر ساقه در سطح احتمال ۱درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد با اعمال سطوح مختلف تنش شوری، قطر ساقه به طور معنی‌داری افزایش یافت. به طوری‌که تیمار NaCl ۵۰ میلی مولار با ۵۰/ ۴ میلی‌متر، دارای بیشترین میزان قطر ساقه بود (شکل ۴-۱) (شکل ۴-۲). این در حالی بود که تیمار بدون اعمال شوری کم‌ترین میزان ۳/۱۸۰ میلی‌متر را نشان داد. گیاهان در برابر تنش شوری واکنش‌های متفاوتی را نشان می‌دهند. از جمله مهم‌ترین این واکنش‌ها می‌توان پدیده‌هایی مانند نفی نمک که از رسیدن نمک به آوند چوبی جلوگیری می‌کند، خارج کردن یون‌ها از مسیر اصلی متابولیسم سلول و تجمع تدریجی آن‌ها در یکی از اجزای سلول مانند واکوئل، تنظیم اسمزی به‌وسیله سنتز مواد آلی از جمله اسیدآمینه پرولین، دفع نمک به‌وسیله ساختارهایی مانند غدد و کرک‌های نمکی، رقیق کردن نمک به‌وسیله افزایش حجم و گوشتی شدن در برخی گیاهان نام برد. رقیق کردن غلظت یون‌ها در بافت گیاهی یکی از مکانیسم‌های دفاعی در برابر شوری می‌باشد. گیاهان به‌وسیله افزایش حجم ذخیره‌ای‌شان با توسعه ساختمان‌های گوشتی، آبدار و ضخیم در برابر شرایط تنش ایجاد شده از خود محافظت می‌نمایند (همایرا[۱]و همکاران، ۱۹۹۵).

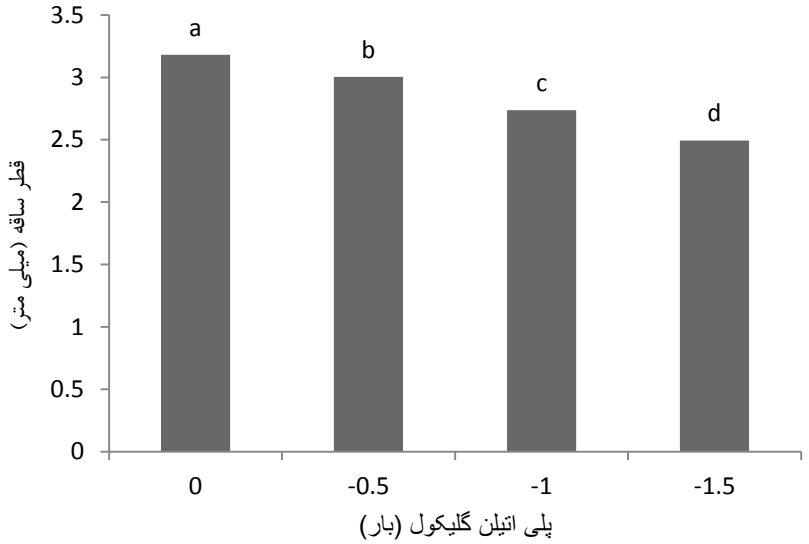
[۱] - Humaira



شکل ۴-۱ اثر تنش شوری بر قطر ساقه

شکل۴-۲ تاثیر غلظت‌های مختلف NaCl بر ویژگی‌های رشدی نوروزک (طول اندام هوایی، قطر ساقه و طول ریشه). ازسمت چپ به ترتیب: شاهد, تیمار با NaCl ۱۰ میلی مولار, تیمار با NaCl ۳۰ میلی‌مولار و تیمار با NaCl۵۰ میلی-مولار.

اثر تنش خشکی نیز برای صفت قطر ساقه با استفاده از PEG در سطح احتمال ۱درصد معنی‌دار شد. نتایج نشان داد که افزایش مصرف PEG منجر به کاهش معنی‌دار قطر ساقه نسبت به شاهد شد (شکل۴-۳). در بررسی که سیفی و همکاران در سال ۱۳۹۴روی کدو انجام دادند نشان داد تاثیر تنش کم‌آبیاری بر قطر کدو در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. نتایج حاصل از این بررسی بیان‌گر آن بود که تنش شدید موجب کاهش معنی‌دار قطر کدو (۱۱/۹۴) نسبت به شاهد (عدم تنش) و کاهش غیرمعنی‌دار این صفت (۵/۶۴ درصد) نسبت به تنش خفیف شد. کاهجه پور[۱] (۲۰۰۴) نیز بیان کرد: کاهش قطر ساقه در گیاهان می‌تواند به دلیل تراکم، ژنوتیپ و شرایط محیطی نظیر تنش خشکی و گرما و در نتیجه کاهش آب قابل دسترس برای گیاه باشد. به نظر می‌رسد گیاهانی که از قطر ساقه بیشتری برخوردارند قادر به تامین تعداد واحد زایشی بیشتر بوده و ماده خشک بیشتری نیز به این واحدها تخصیص می‌دهند.



شکل ۴-۳ اثر تنش خشکی بر قطر ساقه

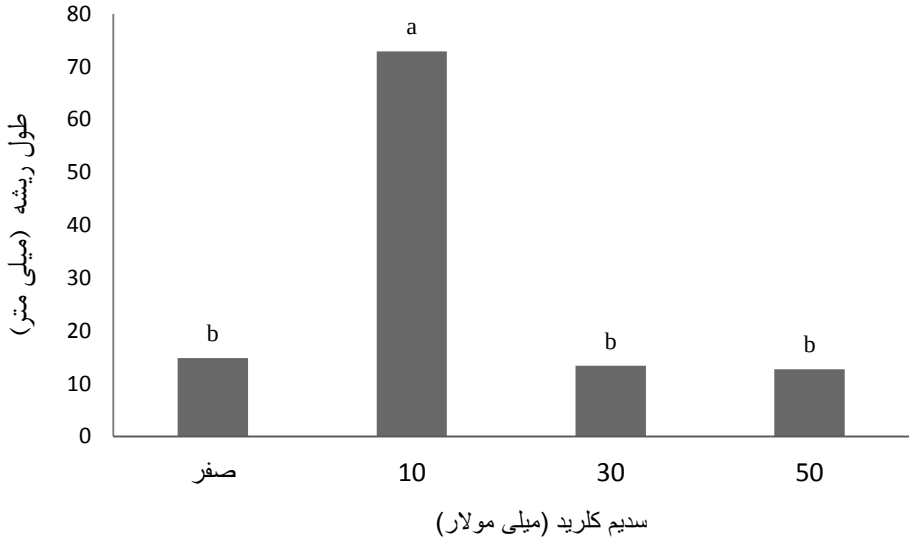
[۱] - Kahjehpoor

۴-۱-۲-۲- طول ریشه

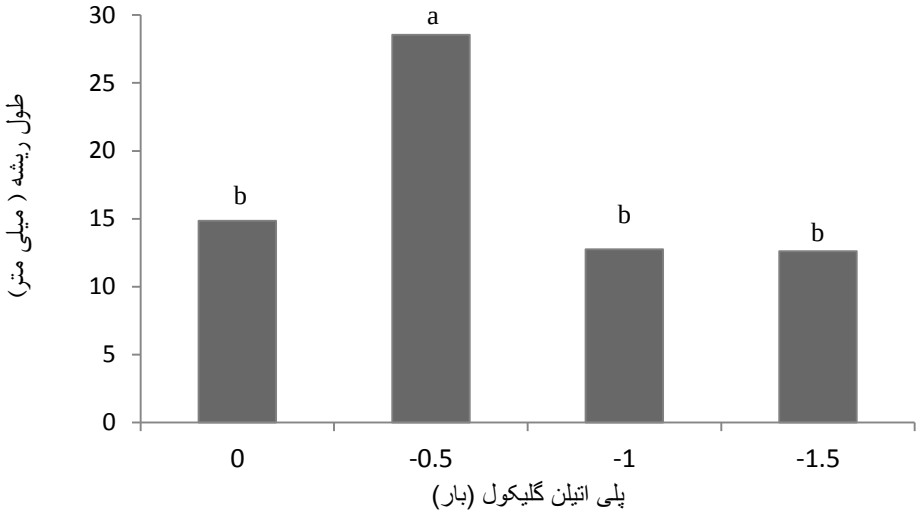
تاثیر تنش شوری بر اندازه طول ریشه در سطح احتمال ۱درصد معنی‌دار شد (جدول ۴-۱). به طوریکه بیشترین طول ریشه در غلظت ۱۰ میلی‌مولار NaCl با اندازه ۷۲/۸۷ میلی متر مشاهده شد (شکل ۴-۴). بهمنی و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی غلظت‌های مختلف NaCl بر شاخه‌زایی و ریشه‌زایی پایه MM۱۰۶ سیب در شرایط درون شیشه‌ای پرداختند. نتایج حاصل نشان داد که طول ریشه در غلظت ۲۰ میلی مولار نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. در حالیکه با افزایش غلظت نمک، طول ریشه به طور معنی‌داری کاهش یافت. در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار طول شاخه به نصف طول شاخه در غلظت ۲۰ میلی‌مولار رسید این در حالی بود که با افزایش غلظت، تعداد شاخه خیلی به‌ندرت کاهش یافت. گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد که پارامترهای رشدی به طور معنی داری تحت تاثیر سطوح شوری قرار می‌گیرند که احتمالا به‌دلیل سمیت یونی و عدم تعدیل مواد غذایی می‌باشد (برنشتاین، ۱۹۶۴). گزارش‌های مشابه نیز در ذرت (آزودو[۱] و همکاران، ۲۰۰۶)، کنجد (کوکا[۲] و همکاران، ۲۰۰۷)، برنج (کومار[۳] و همکاران، ۲۰۰۸) و سویا (همایون و همکاران، ۲۰۱۰) وجود دارد هم‌چنین نتایج تجزیه واریانس حاصل از تاثیر تنش خشکی بر طول ریشه درسطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴-۱). مقایسه میانگین دادها نشان داد که بیشترین میانگین طول ریشه در تیمار ۰/۵- بار، با ۲۸/۵۵ میلی‌متر بود که با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد. در حالیکه تفاوت معنی‌داری بین سایر تیمارها مشاهده نشد (شکل ۴-۵). با توجه به نتایج موجود می‌توان بیان کرد که صفت طول ریشه بیشتر تحت تاثیر غلظت ۱۰ میلی‌مولار نمک قرار گرفت و بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. سیستم ریشه‌ای هر چقدر که فعالتر و توسعه یافته‌تر باشد باعث می‌گردد که میزان آبی

[۱] - Azevedo
[۲] - Koca
[۳] - Kumar

که در کل در دسترس گیاه و اندامهای آن قرار می‌گیرد، افزایش یابد، و بهمین خاطر است وقتی گیاهان در تحت شرایط تنش قرار می‌گیرد نسبت وزن خشک ریشه به ساقه افزایش می‌یابد که علت این پدیده بخاطر تخصیص بیشتر ماده خشک به ریشه، جهت دوری گیاه از خشکی می‌باشد. افلاطونی (۱۳۶۹) در طی انجام یک تحقیق به منظور یافتن ارقام مقاوم به خشکی در مرحله گیاهچه‌ای، مشاهده کرد که ارقام مقاومتر به **تنش** خشکی طول و وزن خشک ریشه بیشتری داشتند (افلاطونی ، ۱۳۶۹). گسترش ریشه بستگی به تأمین مواد جهت رشد آن، حفظ رطوبت به اندازه کافی، تأمین اکسیژن کافی، درجه حرارت مناسب و کمی موانع مکانیکی دارد (راشد و کوچکی ، ۱۳۷۳).



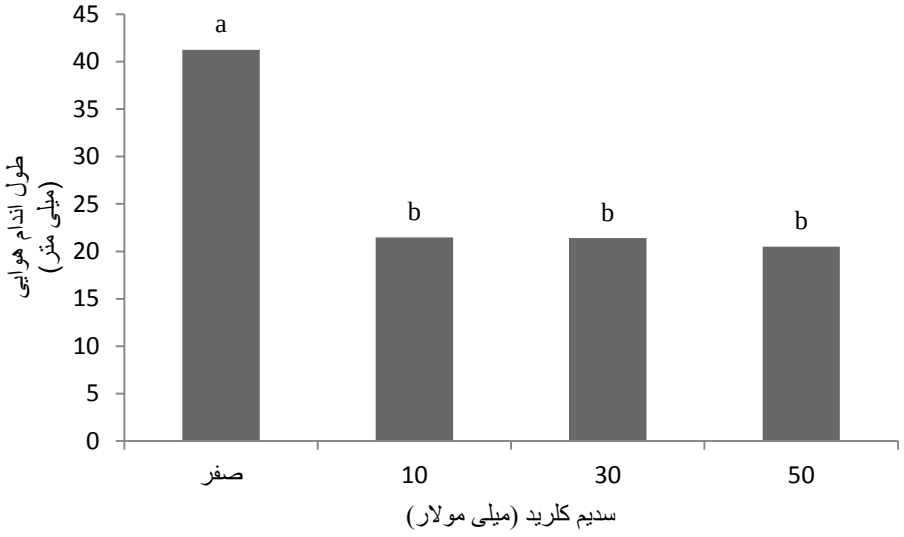
شکل۴-۴ اثر تنش شوری بر طول ریشه



شکل ۴-۵ اثر تنش خشکی بر طول ریشه

۴-۱-۲-۳- طول اندام هوایی

جدول ۴-۱ حاکی از آن است که صفت طول اندام هوایی در سطوح مختلف تنش شوری در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (شکل۴-۶). به‌طوری‌که تیمار شاهد نسبت به گیاهچه‌های تحت تنش، بیشترین طول اندام هوایی ۴۱/۲۵ میلی‌متر را دارا بود. این در حالی بود که طول اندام هوایی در تیمار ۵۰ میلی‌مولار به کمترین میزان ۲۰/۴۷۶ میلی‌متر رسید (شکل ۴-۶).

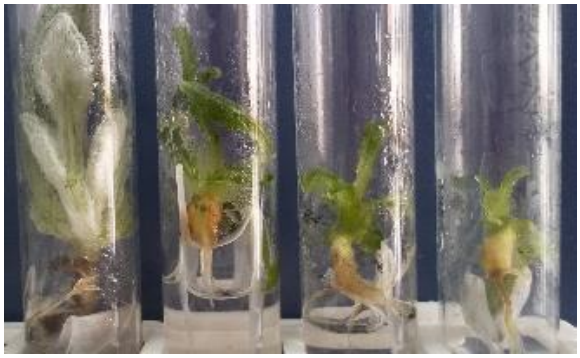


شکل۴-۶ اثر تنش شوری بر طول اندام هوایی

اثر تنش خشکی نیز بر این صفت در سطح معنی‌داری یک درصد قرار گرفت (جدول ۴-۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش مصرف PEG رشد اندام هوایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۴-۷) (شکل ۴-۸). طوری که در تیمار ۱/۵- بار به ۲۱/۰۸ میلی‌متر رسید (شکل ۴-۷). کاهش رشد در حضور غلظت‌های بالای PEG در محیط کشت، با بررسی روی نیشکر (ایرابی[۱] و همکاران، ۲۰۰۸) و آفتابگردان (حسن و همکاران، ۲۰۰۴) مطابقت دارد. اضافه کردن PEG به محیط کشت باعث ایجاد تنش اسمزی و کاهش پتانسیل اسمزی می‌شود (کومار و همکاران، ۲۰۱۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد که بازتاب عمده ناشی از تنش خشکی، عبارت است از توقف نابرابر رشد شاخساره نسبت به رشد ریشه. این پدیده عمدتا منجر به کاهش نسبت ساقه به ریشه می‌گردد، زیرا تنظیم کننده آبسیزیک اسید (ABA)، نقش کلیدی را در این زمینه ایفا می‌نماید (رایث و رایت، ۱۹۹۲). افزون بر این، مشخص شد در شرایط تنش شدید خشکی، شیره پرورده بیشتری به ریشه‌ها منتقل شده و این امر موجب افزایش

[۱] - Errabii

بیشتر نسبت رشد ریشه به ساقه می‌شود (شولز[۱]، ۱۹۷۴). ویلسون[۲] (۱۹۸۶) با مطالعه اثر تنش خشکی بر رشد رویشی کلزا اظهار داشت خشکی از طریق کاهش رشد میانگره‌ها، سبب کم شدن ارتفاع ساقه گردید. از طرفی تاثیر اولیه تنش بر ارتفاع ساقه بوده ولی در تنش شدیدتر، رشد عرضی ساقه نیز کاهش می‌یابد. هوگن بوم [۳]و همکاران (۱۹۸۷) گزارش کردند افزایش رشد طولی ساقه مربوط به بیشتر شدن تعداد گره و طول میانگره می‌باشد که در اکثر مواقع، طویل شدن میانگره بیش از سرعت تشکیل گره تحت تاثیر تنش خشکی قرار می‌گیرد. دلیل کاهش طول میانگره، کاهش مقدار فتوسنتز از طریق مکانیسم‌هایی مانند کاهش سطح برگ عنوان شده است.

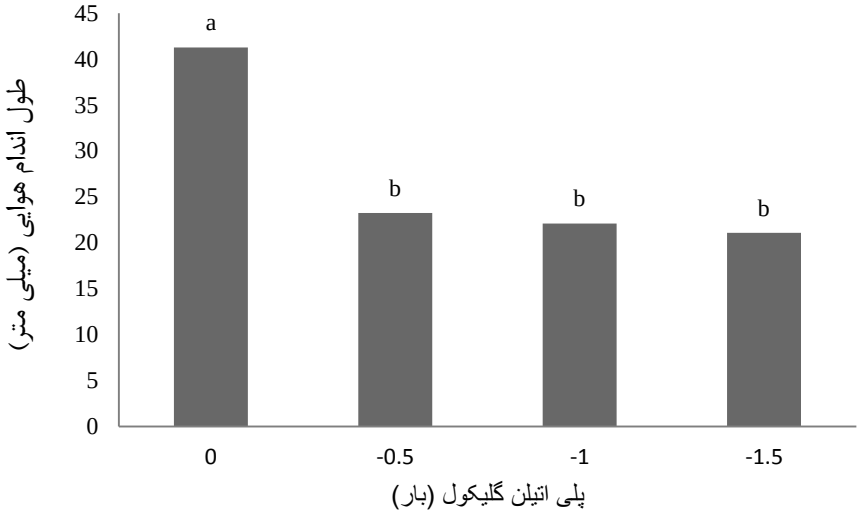


شکل ۴- ۷ تاثیر غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلیکول بر نحوه رشد نوروزک در شرایط درون شیشه‌ای

[۱] - Schulz

[۲] - Wilson

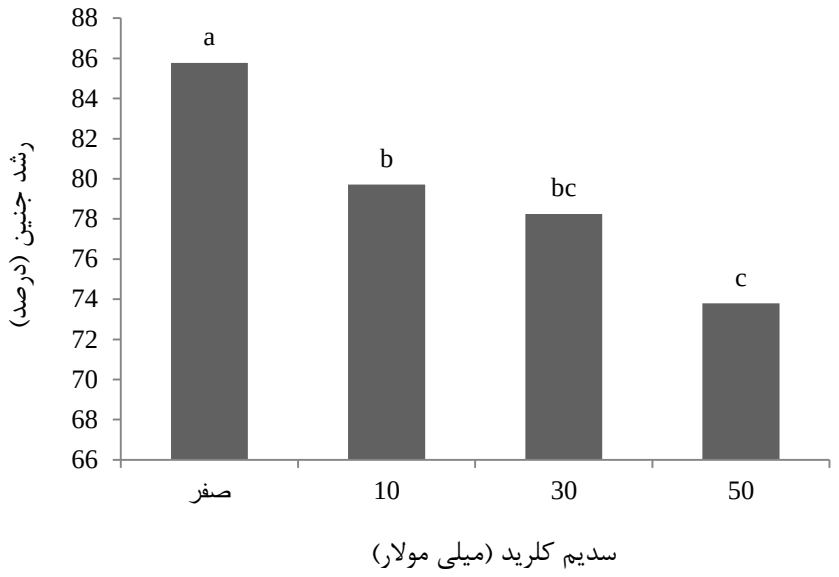
[۳] - Hoogenboom



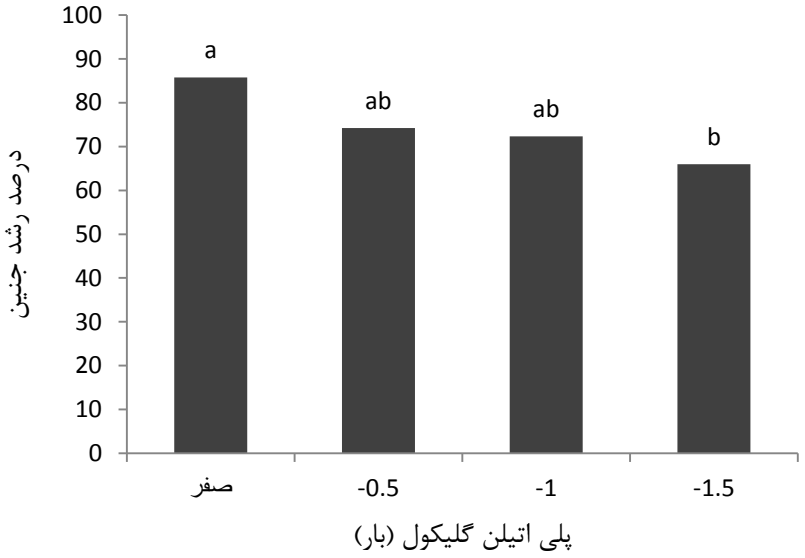
شکل۴-۸ اثر تنش خشکی بر طول اندام هوایی

۴-۱-۲-۴- درصد رشد جنین

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴-۱) نشان داد که درصد رشد جنین در سطح یک درصد تحت تاثیر اصلی تنش شوری قرار گرفت. به‌طوری‌که با افزایش غلظت نمک، درصد رشد جنین به طور معنی داری از ۸۵/۷۸ به ۷۳/۷۹۷ کاهش یافت (شکل ۴-۹). طبق مطالعه خداپرست و حسینی (۱۳۷۲) روی جوانه‌زنی نوروزک به این نتیجه دست یافتند که درصد جوانه‌زنی نوروزک در شوری صفر حداکثر است و با افزایش فشار اسمزی کاهش می‌یابد. هم‌چنین درصد جوانه‌زنی به شدت تحت تاثیر خشکی (پلی‌اتیلن‌گلیکول ۶۰۰۰) کاهش می‌یابد.



شکل ۴-۹ اثر تنش شوری بر درصد رشد جنین



شکل ۴-۱۰ اثر تنش خشکی بر درصد رشد جنین

اثر غلظت‌های مختلف PEG نیز بر درصد رشد جنین در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۴-۱). اعمال تیمار تنش خشکی در سطح ۱/۵- بار منجر به کاهش ۲۳ درصدی آن نسبت به شاهد شد (شکل ۴-۱۰). در ارزیابی سه رقم کنجد تحت تاثیر تنش شوری و خشکی توسط ایزدی و همکاران

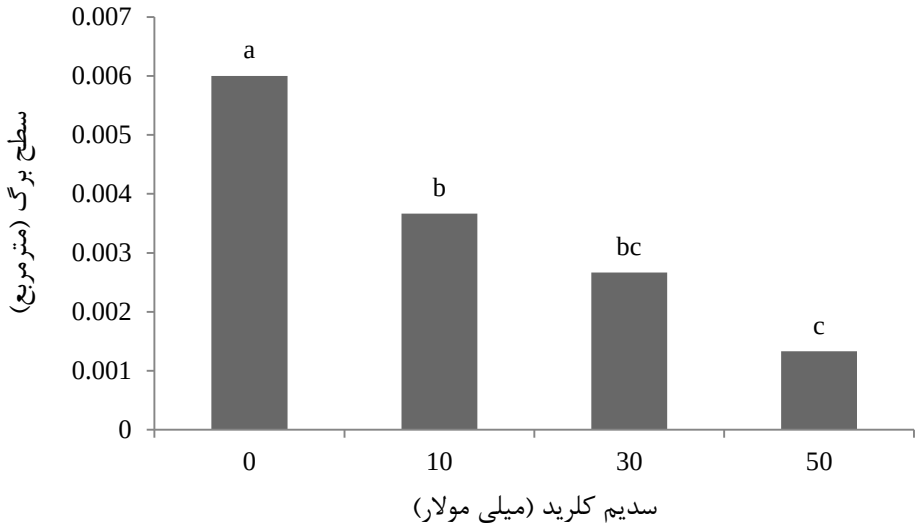
(۱۳۸۹)، نتایج نشان داد تنش شوری و خشکی تاثیر معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی بذرها داشت و در هر سه ژنوتیپ با افزایش تنش خشکی و شوری کاهش معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی آن‌ها مشاهده شد و بیشترین درصد جوانه‌زنی در ژنوتیپ‌های کنجد شاهد بدست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده به‌نظر می رسد که تنش خشکی نسبت به شوری درصد رشد جنین را بیشتر متاثر ساخته است.

۴-۱-۲-۵- تعداد برگ

صفت تعداد برگ در هیچ یک از تیمارهای شوری و خشکی معنی‌دار نشد.

۴-۱-۳- سطح برگ

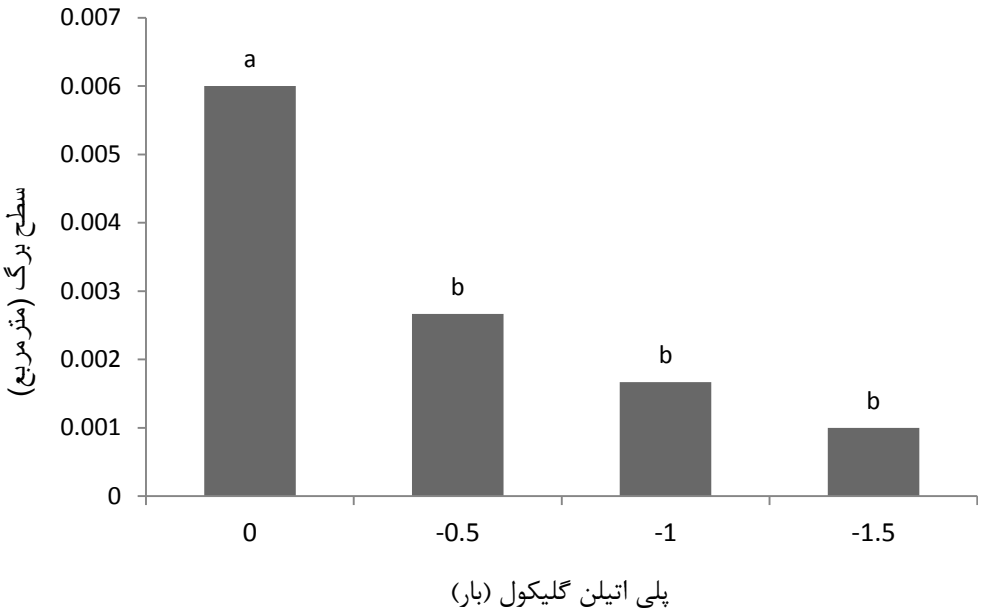
طبق جدول ۴-۱ اثر تیمار NaCl بر سطح برگ در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. در مقایسات میانگین صورت گرفته نتایج نشان داد با افزایش نمک در محیط کشت، سطح برگ به طور معنی‌داری کاهش یافت. به طوریکه در تیمار ۵۰ میلی‌مولار نسبت به تیمار شاهد، ۷۷/۸۳ درصد کاهش را به همراه داشت. این در حالی بود که سایر تیمارها نسبت به شاهد به ترتیب کاهش ۵۵ و ۳۹ درصدی را نشان دادند (شکل۴-۱۱).



شکل ۴-۱۱ اثر تنش شوری بر سطح برگ

همچنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که کاربرد PEG نیز سبب کاهش سطح برگ در سطح احتمال ۱ درصد شد (جدول۴-۱). این نتایج بیانگر آن است که شاخص سطح برگ با افزایش غلظت PEG نسبت به تیمار شاهد به ترتیب با کاهش ۵۵، ۷۲ و ۸۳ درصدی همراه بود (شکل ۴-۱۲). تنش در مراحل مختلف رشد اثرات مختلفی روی گیاهان دارد. به‌عنوان مثال در مراحل اولیه تنش، سطح برگ کاهش می‌یابد. در این مرحله نه تنها اندازه برگ بلکه تغییراتی نیز در ویژگی‌های ساختمانی رخ می‌دهد. (حیدری،۲۰۰۷). کوچکی و بنایان (۱۳۷۲) اظهار داشتند تنش شدید خشکی موجب کاهش سطح برگ شد. رفیعی و همکاران (۱۳۸۳) در بررسی اثرات تنش خشکی روی شاخص‌های رشد و برخی از صفات فیزیولوژیکی ارقام مختلف آفتابگردان روغنی بیان کردند بیشترین شاخص سطح برگ در مرحله پر شدن دانه در هر دو تیمار شاهد و تنش خشکی به دست آمد. در بررسی دیگر کاهش رشد و نمو برگ‌ها و پیری زودرس آن‌ها در شرایط تنش خشکی در نهایت منجر به کاهش سطح برگ گیاه و کاهش تولید ماده خشک شد (ناخدا، ۱۳۷۵). در آزمایشی که بر روی گشنیز انجام دادند مشخص شد در دوره رشد، وقتی گیاه با تنش خشکی روبه رو می‌شود بسته شدن روزنه‌ها همراه با کاهش پتانسیل آب برگ موجب محدود شدن تثبیت در دی‌اکسیدکربن هنگام فتوسنتز می‌شود. این عامل نیز باعث کاهش سطح برگ و مواد غذایی در دسترس گیاه و در نتیجه کاهش دوام سطح برگ می‌گردد. بنابراین تنش خشکی از طریق کاهش توسعه برگ و دوام سطح برگ، باعث کاهش استفاده از نور می‌گردد (کاسکولئولا و فاکت[۱]، ۱۹۹۲). در شروع تنش آب ، ممانعت از رشد سلولی منجر به کاهش توسعه برگها می‌شود. سطح برگ کمتر موجب جذب آب کمتر از خاک و کاهش تعرق می‌شود. مقداری آب به شکلی موثر برای استفاده یک دوره طولانی‌تر در خاک نگهداری می‌شود. محدودیت سطح برگ می‌تواند اولین خط دفاعی برای مقابله با خشکی باشد.

[۱] - Cosculleola and Fact



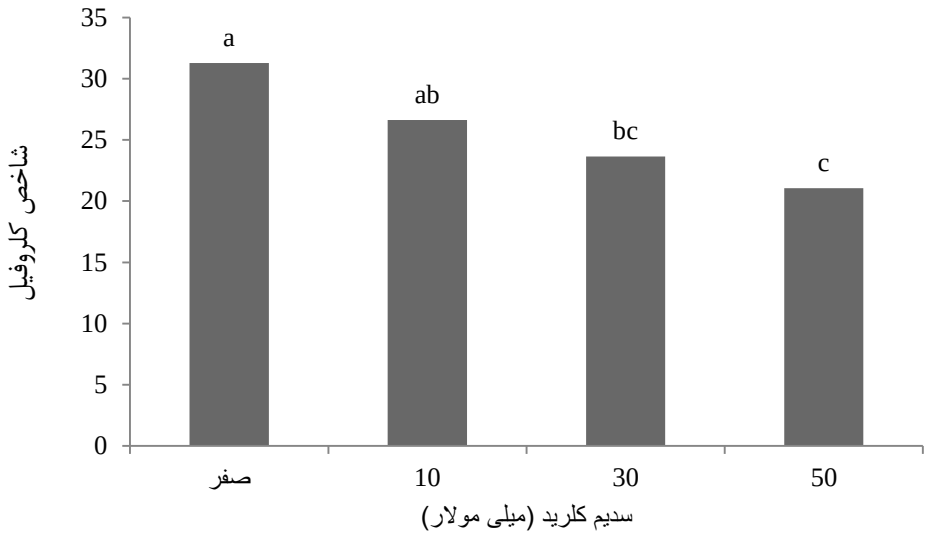
شکل ۴-۱۲ اثر تنش خشکی بر سطح برگ

۴-۱-۴- شاخص کلروفیل(SPAD)

طبق نتایج به‌دست آمده از جدول ۴-۱ شاخص کلروفیل گیاه نوروزک تحت تاثیر اصلی نمک در سطح معنی‌داری ۱ درصد قرار گرفت. به طوریکه با افزایش غلظت نمک، شاخص کلروفیل به طور معنی‌داری کاهش یافت و این میزان در تیمار ۵۰ میلی مولار NaCl به کم‌ترین مقدار خود ۰۶۷/ ۲۱ رسید که می توان گفت: کاهش ۱۹ درصدی نسبت به تیمار شاهد داشت (شکل۴-۱۳). کاهش رنگیزه-های فتوسنتزی توسط شوری در گونه‌های مختلفی گزارش شده است (ملونی[۱] و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج بررسی تنش شوری درون‌شیشه‌ای روی گیاه دارویی گل گندم (قنطوریون) در سال ۲۰۰۷ توسط سیلر و همکاران، نشان داد که با اعمال تیمارهای شوری در غلظت‌های ۰ تا ۴۰۰ میلی‌مولار NaCl، بین کنترل و گیاهان تیمار شده با نمک از ۰ تا ۲۰۰ میلی‌مولار هیچ گونه کاهشی در رشد ریشه و ساقه، تولید بیوماس و میزان کلروفیل رخ نداد. از این رو این گیاه یک گیاه متحمل به شوری معرفی شد و

[۱] - Meloni

بنابراین می‌تواند در خاک‌های شور بدون کاهش رشد و از دست دهی محصول کشت شود. کاهش کلروفیل در واقع به سطوح شوری، زمان در معرض قرار گرفتن آن و نوع گونه مورد نظر بستگی دارد. در بررسی اشرف و همکاران (۲۰۰۰) و لی[۱] و همکاران (۲۰۰۴) کاهش کلروفیل تحت شرایط بالای نمک، برای برخی گونه‌های حساس به نمک مشاهده شد. در مقابل، میزان کلروفیل در گونه‌های متحمل به نمک، در شرایط تنش کاهش نشان نداد و یا اینکه با افزایش تنش، میزان آن افزایش یافت.



شکل ۴-۱۳ اثر تنش شوری بر شاخص کلروفیل

هم‌چنین اثر تنش خشکی بر شاخص کلروفیل در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۴-۱). نتایج به‌دست آمده ازمقایسات میانگین بیان‌گر آن بود که شاخص کلروفیل با اعمال تنش خشکی نسبت به شاهد ۴۵ درصد کاهش یافت (شکل ۴-۱۴). شریعت و عصاره در سال ۱۳۸۷ با مطالعه اثر تنش خشکی در چهار سطح مختلف ۰، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۱۲ مگاپاسگال پلی‌اتیلن‌گلیکول و چهار گونه از اکالیپتوس، گزارش کردند که با اعمال مقدار کم تیمار خشکی از مقدار کلروفیل کاسته شد. با این حال در مقایسه با گونه‌های دیگر مقدار کلروفیل کل، کلروفیل a وکلروفیل b در گونه *E.microtheca*

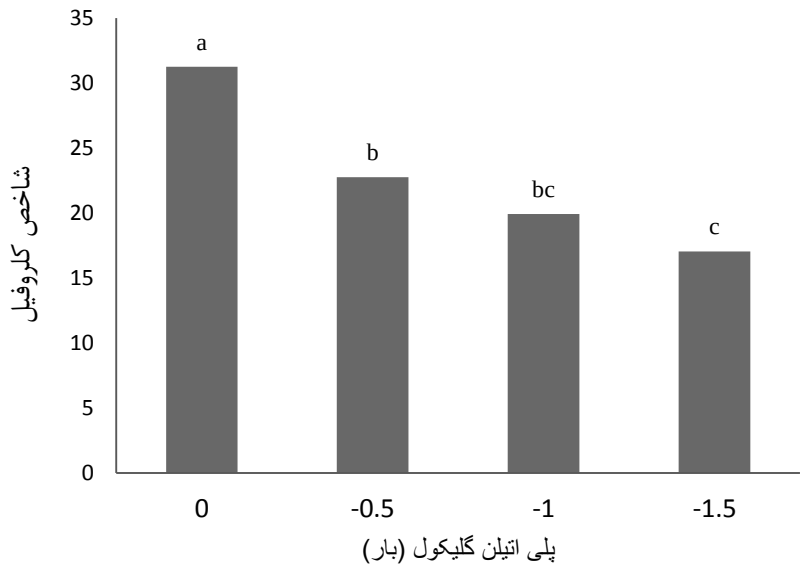
[۱] - Lee

بیشتر از سه گونه مورد مطالعه بود. صالحی و همکاران (۱۳۸۲) در مطالعات خود روی میزان کلروفیل برگ به عنوان شاخصی از تنش خشکی در گندم دریافتند که با افزایش تنش خشکی، عدد کلروفیل متر (SPAD) بیشتر می‌شود. هم‌چنین در پژوهشی دیگر، آنتولینو یولر [۱] (۱۹۹۵) دریافتند که با افزایش تنش خشکی میزان کلروفیل برگ کاهش ولی نسبت کلروفیل a/b افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد افزایش نسبت a/b موجب تیره شدن برگ‌ها و افزایش عدد کلروفیل می‌شود. از طرفی کاهش میزان کلروفیل می‌تواند به‌دلیل تجمع کلرین در بافت برگ باشد.

پایداری کلروفیل به عنوان یک معیار مقاومت به خشکی برای انتخاب ارقام مقاوم پیشنهاد شده است. غلظت کلروفیل در گیاه از عوامل مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی است. به نظر می‌رسد این امر توانسته به افزایش سوخت و ساز برگ‌های گیاه در شرایط تنش کمک کند و در ادامه به افزایش عملکرد منتهی شود. تفاوت‌های مشاهده شده در سنتز کلروفیل گیاهان مختلف به هنگام خشکی، نتیجه عمل مسیرهای مختلف سنتزی می‌باشد که با آنزیم‌های متفاوت همراه بوده و این آنزیم‌ها پاسخ‌های متفاوتی را به خشکی نشان می‌دهند. تاثیر معنی‌دار تنش بر غلظت کلروفیل در مرحله ابتدائی رشد گیاه به معنی کاهش پتانسیل تولید و کاهش ظرفیت ذخیره‌سازی می‌باشد (اینگر و همکاران[۲]، ۱۹۹۶). با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت که گیاه در حضور PEG بیشتر، رنگیزه‌های فتوسنتزی خود را از دست داده است. به‌نظر می‌رسد که کاهش غلظت کلروفیل به‌واسطه اثر کلروفیلاز، پراکسیداز و ترکیبات فنلی و در نتیجه تجزیه کلروفیل باشد (بتس و همکاران، ۱۹۷۳).

[۱] - Antoline and uller

[۲] - Iyengar

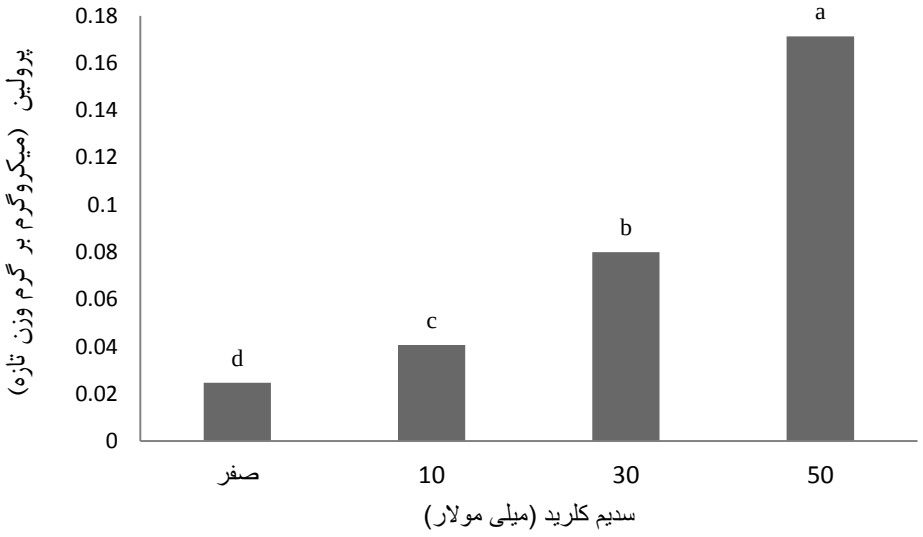


شکل ۴-۱۴ اثر تنش خشکی بر شاخص کلروفیل

۴-۱-۵- پرولین

یکی از روش‌های متابولیسمی بارز دیگر تجمع پرولین در واکنش به تنش اسمزی است (آرشی و همکاران، ۲۰۰۲). نتایج تجزیه واریانس نشان داد کاربرد تیمارهای مختلف NaCl باعث افزایش معنی‌دار میزان پرولین در سطح احتمال ۱ درصد شد (جدول ۴-۲). به طوری‌که در تیمار ۵۰ میلی مولار بیشترین میزان پرولین ۰/۱۷۱۳۳ میکروگرم بر گرم وزن تر بود (شکل۴-۱۵). پاندی و چیکارا [۱]در سال ۲۰۱۴ نیز به نتایجی مبنی بر افزایش میزان پرولین در گیاه استویا، تحت شرایط تنش محیطی با استفاده از غلظت‌های مختلف نمک و مانیتول (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵و ۱۰۰) میلی‌مولار دست یافتند. بررسی‌های انجام شده روی هالوفیت‌ها[۲] نشان می‌دهد که افزایش سطوح پرولین و قندهای محلول به تنظیم اسمزی و حفظ غشای سلولی تحت تنش شوری مرتبط است (مگدیچه [۳]و همکاران، ۲۰۰۷).

[۱] - Pandey and Chikara
[۲]- Halophytes
[۳] - Megdiche



شکل ۴-۱۵ اثر تنش شوری بر میزان تجمع پرولین در بافت تازه گیاه

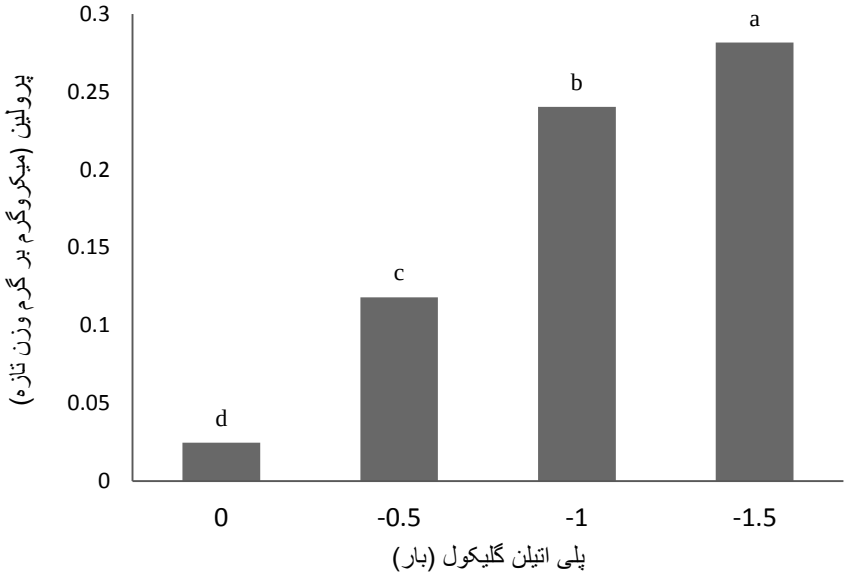
هم‌چنین نتایج جدول ۴-۲ نشان داد که افزایش میزان پرولین به طور معنی‌داری تحت تآثیر تیمارهای PEG قرار گرفت. به طوری که میزان پرولین در سطح ۱/۵- بار افزایش ۹۱ درصد نسبت به شاهد نشان داد (شکل۴-۱۶). به‌طور کلی نقش پرولین به‌عنوان محافظت کننده اسمزی، کمک به پایداری غشا و کاهش اثرات تنش بر تخریب غشای سلولی می‌باشد (اشرف و عروج، ۲۰۰۶). چیرین و ردی [۱]در سال ۲۰۰۳، افزایش ۲ تا ۹ برابر محتوی پرولین در سلول‌های تحت تنش سیاه‌شور را گزارش داده‌اند.

یکی از مکانیسم‌های مقاومت به تنش، تجمع پرولین در گیاهان مقاوم می‌باشد. بنابراین تجمع پرولین می‌تواند به‌عنوان یکی از شاخصه‌های مقاومت به تنش ذکر گردد (کاردناس[۲] و همکاران، ۲۰۰۶). مقدار این ماده پس از کاهش آب بافت‌ها تا ۵۰-۴۰ میلی‌گرم در گرم ماده خشک افزایش می‌یابد که با ادامه

[۱] - Cherian and Reddy

[۲] - Cardenas

کم‌آبی فقط اسیدآمینه پرولین بیشتر تجمع و ذخیره می‌شود (راجیندر[1]، ۱۹۸۷). گزارش‌های متعددی مبنی بر وجود همبستگی مثبت بین انباشت پرولین و سازش به شرایط اسمزی در گیاهان وجود دارد (بابایی و همکاران، ۱۳۸۴). هم‌چنین پرولین با حفاظت از آنزیم‌ها و ساختارهای سلولی به‌عنوان رادیکال آزاد عمل می‌کند (آقاله[2] و همکاران، ۲۰۱۱).



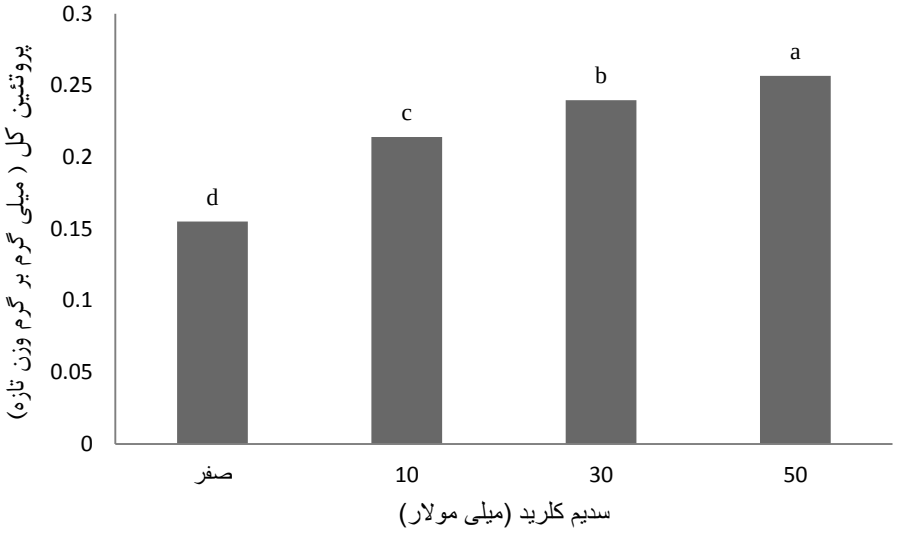
شکل ۴-۱۶ اثر تنش خشکی بر میزان تجمع پرولین در بافت تازه گیاه

۴-۱-۶- پروتئین کل

مطابق جدول تجزیه واریانس ۴-۲ اثر تنش شوری بر محتوی پروتئین کل در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار گردید. نتایج مقایسه میانگین نشان داد بیشترین میزان پروتئین در تیمار ۵۰ میلی‌مولار NaCl

[1] - Rajinder
[2] - Aghaleh

تولید شد که دارای تفاوت ۴۰ درصدی با شاهد بود (شکل ۴-۱۷). سیبل[۱] و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند تیمار NaCl در غلظت‌های ۰، ۱، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار به مدت ۳۰ روز، سبب افزایش میزان پروتئین نهال بذری در مقایسه با گیاه شاهد شد. مطالعات دیگری نیز در همین راستا توسط کاپور و اسریواستاوا روی گیاه ماش در سال ۲۰۱۰ انجام شد.

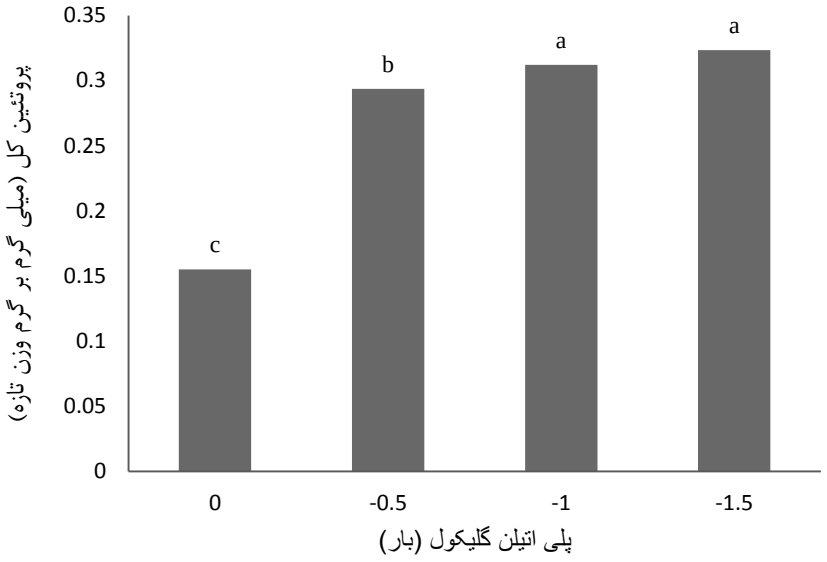


شکل ۴-۱۷ اثر تنش شوری بر محتوی پروتئین کل

هم‌چنین مشاهده شد اثر تنش خشکی بر محتوی پروتئین کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴-۲). نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان داد که بیشترین میزان پروتئین در غلظت ۱/۵- بار PEG به‌دست آمد که تفاوت شاهد با این میزان و سایر غلظت ها به ترتیب برابر ۵۲، ۵۰ و ۴۷ درصد بود و بین تیمارهای ۳۰ و ۵۰ میلی‌مولار به لحاظ کلاس آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۴-۱۷). با توجه به این‌که بسیاری از پروتئین‌ها در شرایط تنش هیدرولیز می‌شوند، بر همین اساس کاهش در غلظت پروتئین می‌تواند از پیامدهای تنش به‌شمار آید (ساتیروپولوس، ۲۰۰۷). اما افزایش

[۱] - Sibole

محتوی پروتئین می‌تواند به علت القای پروتئین‌های متعددی باشد که در پاسخ به تنش شوری و خشکی به‌طور جدیدی ساخته می‌شوند و یا به‌طور نهادی در غلظت‌های پایین وجود داشته و هنگامی که گیاهان در معرض تنش قرار می‌گیرند، غلظت آن‌ها افزایش می‌یابد (صراحی نوبر و همکاران، ۱۳۸۹). تنش‌های غیرزنده مانند خشکی، شوری، گرما و سرما می‌تواند سبب افزایش میزان پروتئین شود که نقش مهمی در ایجاد سازگاری بر عهده دارد (اشرف و هاریس، ۲۰۰۴).

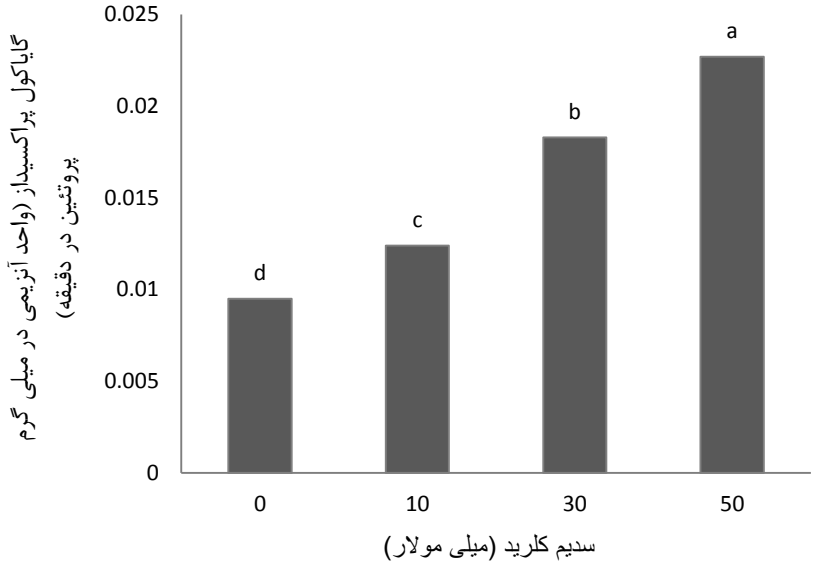


شکل ۴-۱۸ اثر تنش خشکی بر محتوی پروتئین کل

۴-۱-۷-فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)

فعالیت آنزیمی گایاکول پراکسیداز در گیاهچه تحت تاثیر تیمار NaCl در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۴-۲). در مقایسه بین سطوح مختلف نمک مصرفی، با افزایش مصرف نمک میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز به طور معنی‌داری افزایش یافت به‌گونه‌ای که کم‌ترین میانگین این صفت مربوط به شاهد و بیشترین میانگین مربوط به تیمار ۵۰ میلی مولار ۰/۰۲۲ بود (شکل ۴-۱۹). با مطالعه‌ای که

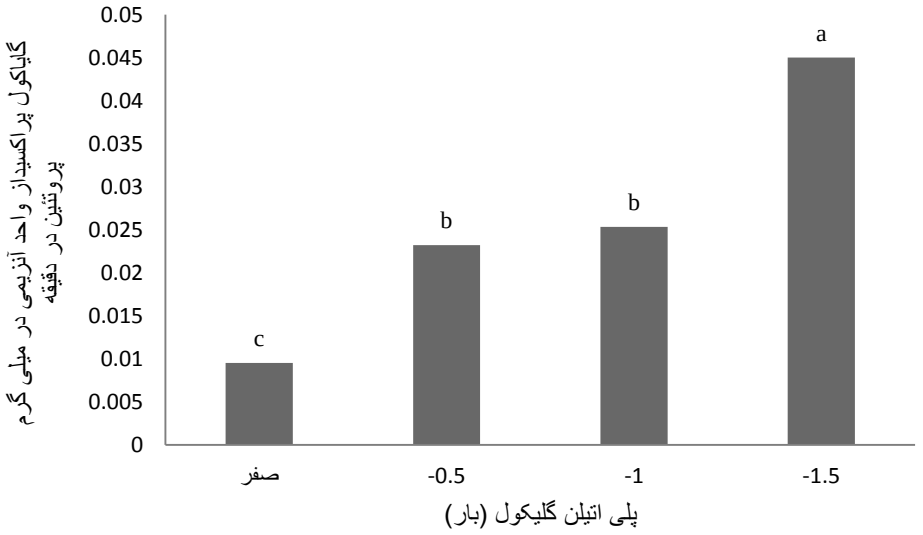
حبیبی و امیری (۱۳۹۲) روی دو پایه مرکبات (پونسیروس و نارنج) انجام شد نشان داد فعالیت‌های پراکسیداز به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر تنش شوری درون شیشه‌ای قرار گرفت. به‌طوری‌که با افزایش شوری در هر دو پایه فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش یافت. این افزایش می‌تواند انعکاسی از پاسخ به دفاع سلولی در اثر آسیب ایجاد شده توسط غلظت‌های بالاتر NaCl باشد. در نتیجه فعالیت زیاد پراکسیداز تخریب کم‌تر صورت می‌گیرد و گیاه می‌تواند در شرایط تنش ایجاد شده بیشتر زنده بماند. از طرفی کمبود پتاسیم در سطح سلولی ممکن است یک عامل موثر در تنش اکسیداتیو ناشی از نمک و آسیب سلولی مرتبط باشد. افزایش در فعالیت پراکسیدازها در گیاهان مختلف و در سطوح بالا نشان داد که فعالیت پراکسیدازها در ارقام متحمل‌تر بالاتر بود.



شکل ۴-۱۹ اثر تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

داده‌های جدول ۴-۲ هم‌چنین نشان می‌دهد اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. به‌طوریکه در غلظت ۱/۵- بار میزان این آنزیم به ۰/۰۴۵ افزایش یافت (شکل ۴-۲۰). فعالیت‌های آنزیمی ممکن است به‌طور مستقیم وابسته به میزان فنول‌ها و فلاونوئیدها باشد و در نتیجه فعالیت رادیکال‌های آزاد را به‌همراه داشته باشد. علاوه بر این مقاومت گیاه

به تنش‌های مختلف با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، باعث جلوگیری از آسیب تنش وارد شده به گیاه می‌شود (بتاییب و همکاران، ۲۰۱۱). نتایج پژوهش‌های مختلف حاکی از آن است که تنش خشکی با بر هم زدن شرایط مطلوب، سبب بروز اختلالات متابولیسمی در سلول‌های گیاهی می‌گردد که یکی از عوامل اصلی این اختلالات افزایش تولید انواع اکسیژن فعال یا (ROS) می‌باشد. احیای ناقص اکسیژن اتمسفری، سبب تشکیل رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل می‌شود (نیکاور [۱] و همکاران، ۲۰۰۶). یکی از روش‌های از بین رفتن H_2O_2 توسط پراکسیدازهاست. این آنزیم‌ها که در سراسر سلول یافت می‌شوند، میل ترکیبی بیش‌تری با H_2O_2 نسبت به کاتالاز دارند. بر این اساس، تغییر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز یک مکانیسم حمایتی جهت انهدام موثر سوپراکسیدها و هیدروژن پراکسیدها محسوب می‌شود.



شکل ۴-۲۰ اثر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

[۱] - Nickavar

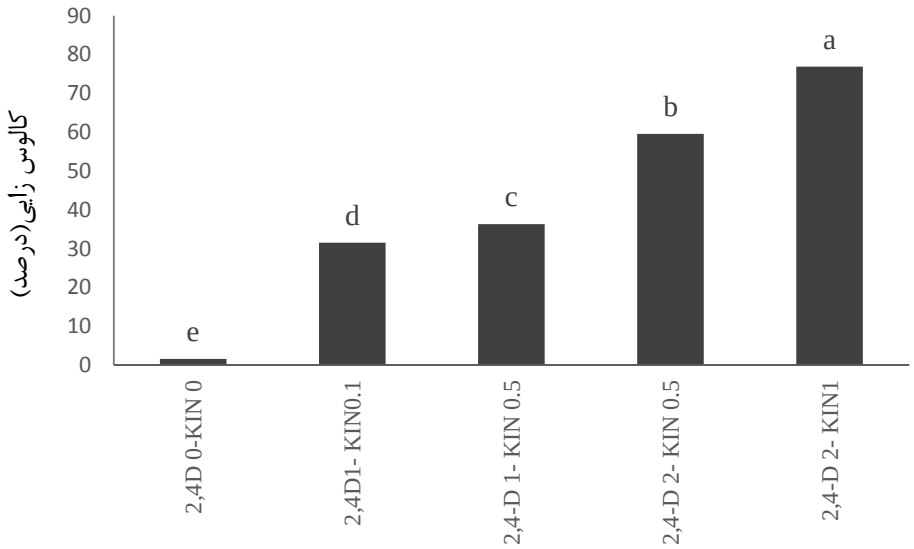
۴-۱-۸- فعالیت آنزیم کاتالاز

طبق جدول ۴-۲ هیچ یک از تیمارهای شوری و خشکی تاثیر معنی‌داری در میزان فعالیت کاتالاز تولید شده در گیاه نداشتند.

۴-۲- نتایج آزمایش دوم (تنش شوری و خشکی بر کالوس‌ها)

۴-۲-۱- درصد کالوس‌زایی

نتایج محاسبه درصد کالوس‌زایی پس از ۳۰ روز نشان داد بیشترین درصد کالوس‌زایی با میانگین ۷۶/۸۹ در محیط کشت MS حاوی دو میلی‌گرم 2,4-D و یک میلی‌گرم KIN وجود داشت (شکل ۴-۲۱).

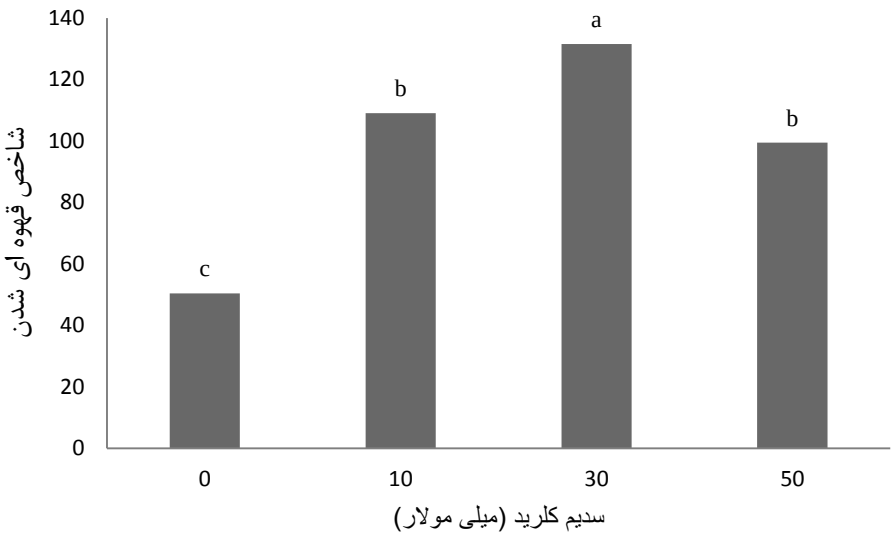


شکل ۴-۲۱ اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و KIN بر درصد کالوس زایی

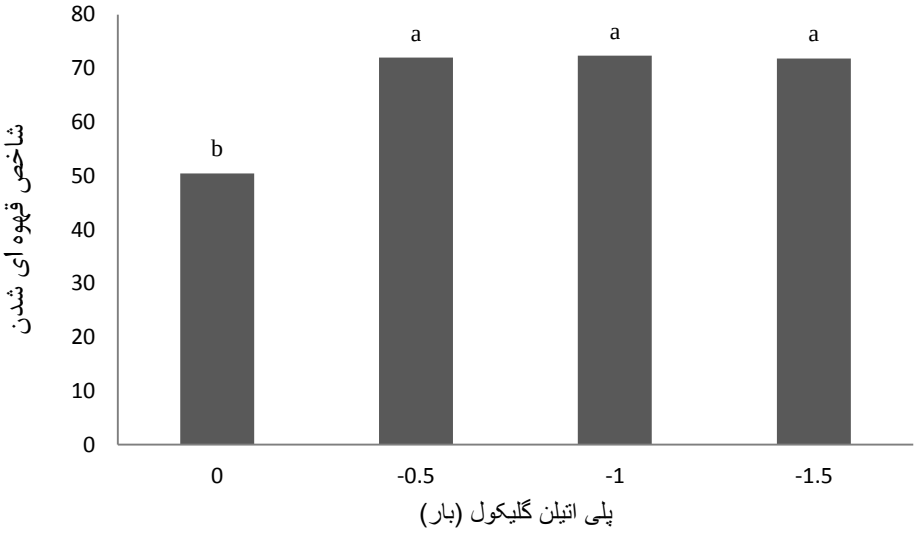
۴-۲-۲- قهوه ای شدن

نتایج تجزیه واریانس جدول (۴-۳) نشان داد صفت قهوه‌ای شدن تحت تاثیر تنش شوری در سطح یک درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین صفات نشان داد بیشترین میزان قهوه‌ای شدن مربوط به تیمار ۳۰ میلی‌مولار نمک بود که تفاوت ۶۱ درصدی با شاهد نشان داد (شکل ۴-۲۲). هم‌چنین نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (۴-۳) نشان داد که صفت قهوه‌ای شدن کالوس تحت تاثیر پلی‌اتیلن‌گلیکول در سطح احتمال یک‌درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین صفات نشان داد بیشترین میزان قهوه‌ای شدن مربوط به تیمار ۱- بار پلی‌اتیلن‌گلیکول (۷۲/۳۳۹) بود و تیمار شاهد نیز کمترین مقدار (۵۰/۴۸۰) را به خود نسبت داد (شکل ۴-۲۳). به نظر می‌رسد در هر دو تنش شوری و خشکی، آستانه قهوه‌ای شدن مربوط به تیمار ۳۰ میلی‌مولار تنش شوری و غلظت ۱- بار تنش خشکی بوده و پس از آن با افزایش غلظت، از شاخص قهوه‌ای شدن کاسته می‌شود تصاویر مربوط به تغییرات قهوه ای شدن کالوس در پایان این فصل آمده است (شکل ۴-۳۲ تا شکل ۴-۳۷).

قهوه‌ای شدن یک پدیده‌ی شناخته شده است که از اکسیداسیون ترکیبات فنلی به کیون‌ها ایجاد می شود (نیکولاس و همکاران، ۱۹۹۴؛ ماکیکس و همکاران، ۱۹۹۱) و منجر به ایجاد رنگ قهوه‌ای می‌شود یکی از دلایل آن افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز است که در شرایط تنش میزان فعالیت این آنزیم بیشتر می‌شود.



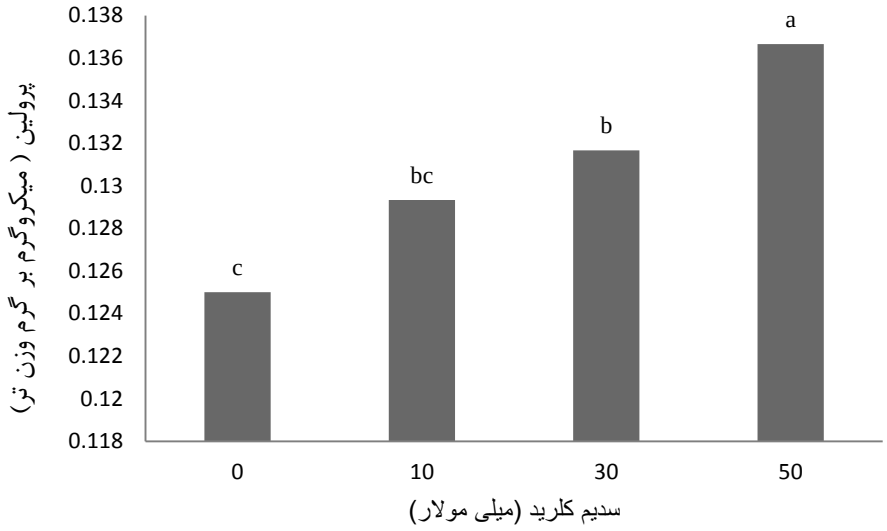
شکل ۴-۲۲ اثر تنش شوری بر شاخص قهوه ای شدن



شکل ۴-۲۳ اثر تنش خشکی بر شاخص قهوه‌ای شدن

۴-۲-۳- میزان پرولین

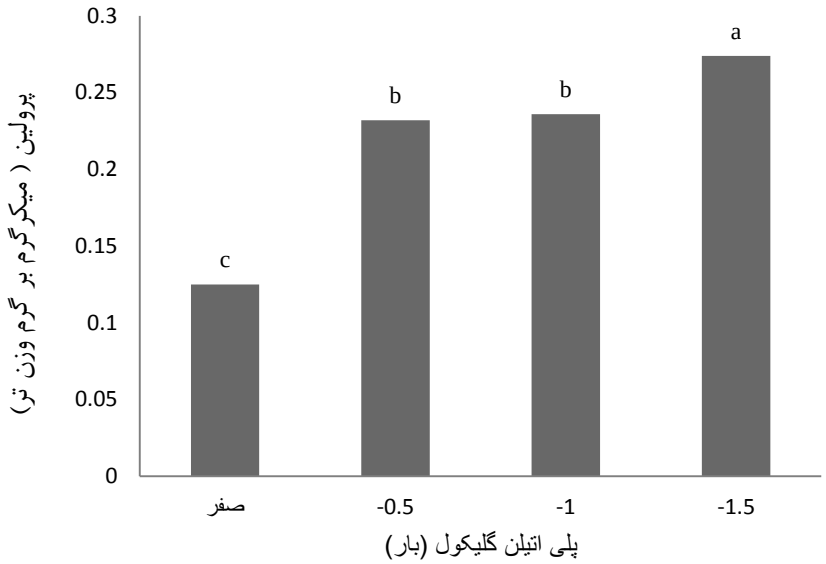
نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس جدول(۴ -۳) نشان داد اثر غلظت‌های نمک در میزان تجمع پرولین کالوس‌ها در سطح یک درصد معنی‌دار شد. طوری که در تیمار ۵۰ میلی مولار نمک بیشترین میزان پرولین به مقدار ۱۳۶.۶۶۷ میکروگرم بر گرم وزن تر در گیاه تجمع یافت (شکل۴-۲۴).



شکل ۴-۲۴ اثر تنش شوری بر میزان پرولین کالوس نوروزک

نتایج حاصل از بررسی چن و همکاران (۲۰۰۱) و کیروش و همکاران (۲۰۰۷) روی کالوس‌های ماش نشان داد محتوی پرولین و پروتئین کل به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت‌های بالای نمک تا غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار قرار گرفت. بطوری‌که بیش‌ترین میزان پرولین در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار بود. سطوح بالای پرولین در کالوس‌های متحمل به نمک ممکن است به دلیل افزایش سنتز و یا کاهش اکسیداسیون این‌گونه ترکیبات باشد (وین جونس و استوری[۱] ۱۹۸۴).

[۱] - Wyn Jones and Storey



شکل ۴-۲۵ اثر تنش خشکی بر میزان پرولین کالوس نوروزک

هم‌چنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس جدول ۴-۳ نشان داد میزان پرولین تحت تاثیر تیمارهای پلی‌اتیلن‌گلیکول در سطح معنی‌داری یک درصد قرار گرفت. به گونه‌ای که با افزایش تنش خشکی میزان پرولین کالوس نیز به طور معنی داری افزایش یافت و در غلظت ۱.۵- بار به میزان ۲۷۴.۶۶۷ میکروگرم بر گرم وزن تر رسید (شکل۴-۲۵). ظاهراً با افزایش تنش، پتانسیل آب سلول به پایین‌تر از حد آستانه رسیده و سنتز پرولین به منظور افزایش توان جذب آب افزایش یافته است (دهقانزاده و همکاران، ۱۳۸۸). این نتایج با گزارش‌های عباس زاده و همکاران (۱۳۸۶)، قربانعلی و همکاران (۱۳۸۴)، کاردناس و همکاران (۲۰۰۶) و ساکتیولو و همکاران (۲۰۰۸) مبنی بر افزایش تجمع پرولین در شرایط تنش مطابقت دارد.

افزایش پرولین نشان‌دهنده نقش این اسیدامینه در تنظیم فشار اسمزی می‌باشد. تنظیم اسمزی در گیاهان، مکانیسم عمده اجتناب از تنش‌های آبی در محیط‌های خشک و شور است و به‌طور کلی به کاهش پتانسیل اسمزی در اثر تجمع مواد محلول در شرایط تنش‌های خشکی و شوری اطلاق می‌گردد

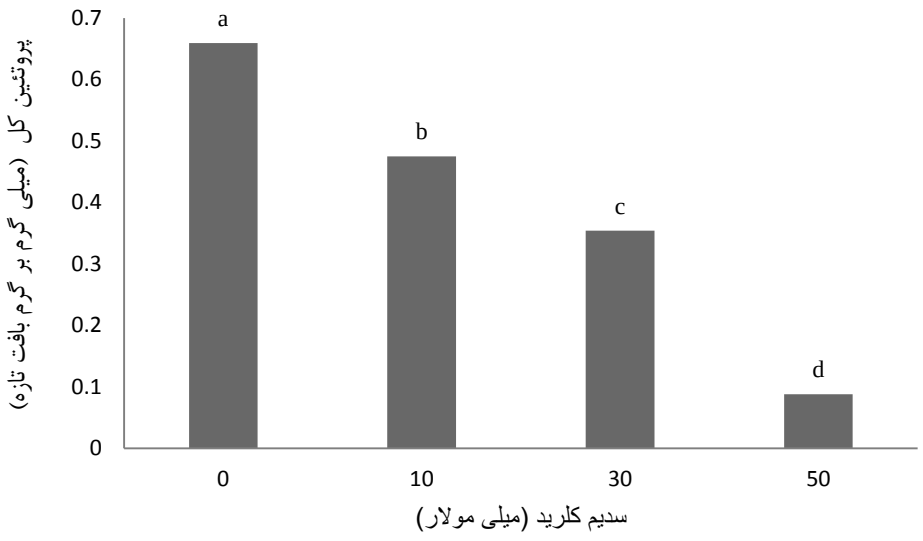
و شدت انجام آن به سرعت و میزان توسعه تنش، نوع و سن اندام و تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای بستگی دارد (باجی و همکاران، ۲۰۰۱).

یکی از معمول‌ترین واکنش‌هایی که گیاهان در برابر تنش‌های محیطی، به‌خصوص تغییرات اسمزی محیط (در اثر تنش خشکی و شوری) از خود بروز می‌دهند پدیده‌ای موسوم به تنظیم یا تعدیل اسمزی است. تنظیم اسمزی به عنوان یک واکنش سازگاری در گیاهان آوندی و غیرآوندی و حتی در جلبک‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی به ویژه تغییرات اسمزی محیطی نظیر گلایسین بتایین، پرولین و قندهای محلول است که اکثرا به سیتوپلاسم محدود می‌شوند و در واکوئل وجود ندارند (باجی و همکاران، ۱۹۹۸). گیاهان در مقابل تنش‌های اکسیداتیو، انواع آنتی اکسیدانت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی مثل پرولین را تولید می‌کنند (کساوا[۱] و همکاران، ۲۰۱۱). پرولین به طور کلی از دو مسیر عمده ساخته می‌شود: مسیر گلوتامات که آنزیم‌های آن در سیتوپلاسم قرار دارند، و مسیر اورنتین که آنزیم‌های آن در میتوکندری می‌باشند. مسیر گلوتامات در گیاهان عالی اهمیت بیش‌تری دارد.

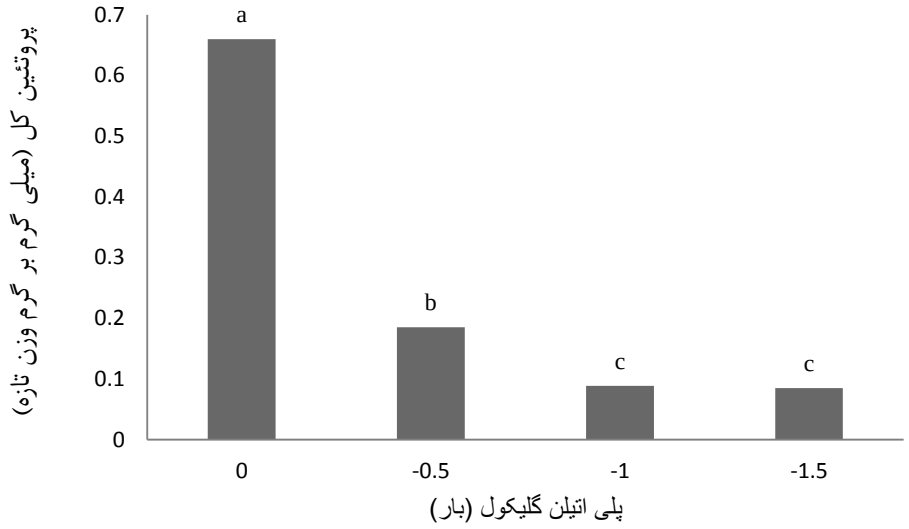
۴-۲-۴- میزان پروتئین کل

همانطور که در جدول ۴-۳ مشاهده می‌شود اثر تنش شوری بر میزان پروتئین کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کم‌ترین میزان پروتئین کل در تیمار ۵۰ میلی مولار ۰/۰۸۸ بود و بیش‌ترین میزان آن در شاهد ۶/۶۵۹ میلی‌گرم بر گرم بافت تازه بود (شکل ۴-۲۶). نتایج حاصل از این تحقیق هم‌چنین نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار پروتئین کل در سطح احتمال ۱ درصد تحت تاثیر عامل خشکی بود. به‌طوری‌که در تیمار ۱/۵- بار PEG برابر ۰/۰۸۵ بود (شکل ۴-۲۷). با توجه به این‌که بسیاری از پروتئین‌ها در شرایط تنش هیدرولیز می‌شوند، بر همین اساس کاهش در غلظت پروتئین می‌تواند از پیامدهای تنش به‌شمار آید (ساتیروپولوس، ۲۰۰۷).

[۱] - Kosavaa



شکل ۴-۲۶ اثر تنش شوری بر میزان پروتئین کل در کالوس گیاه نوروزک



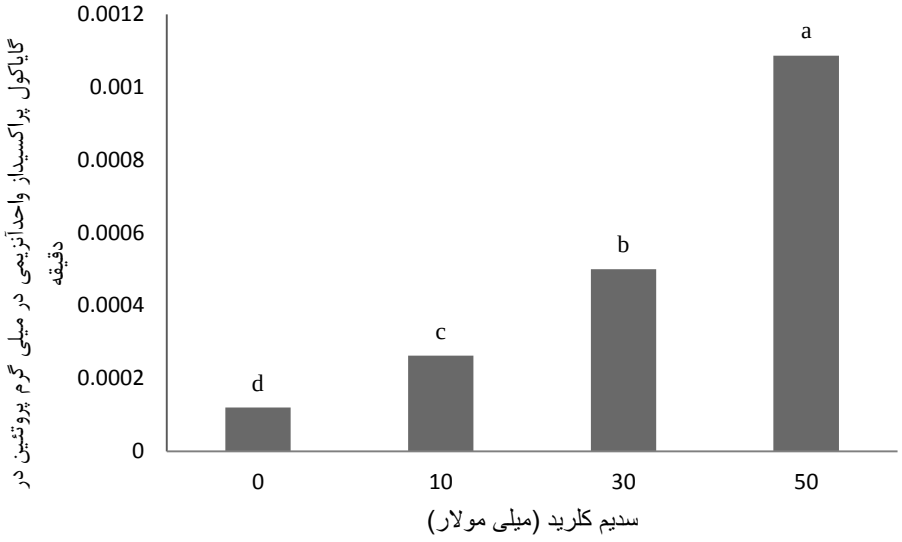
شکل ۴-۲۷ اثر تنش خشکی بر میزان پروتئین کل در کالوس نوروزک

۴-۲-۵- فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

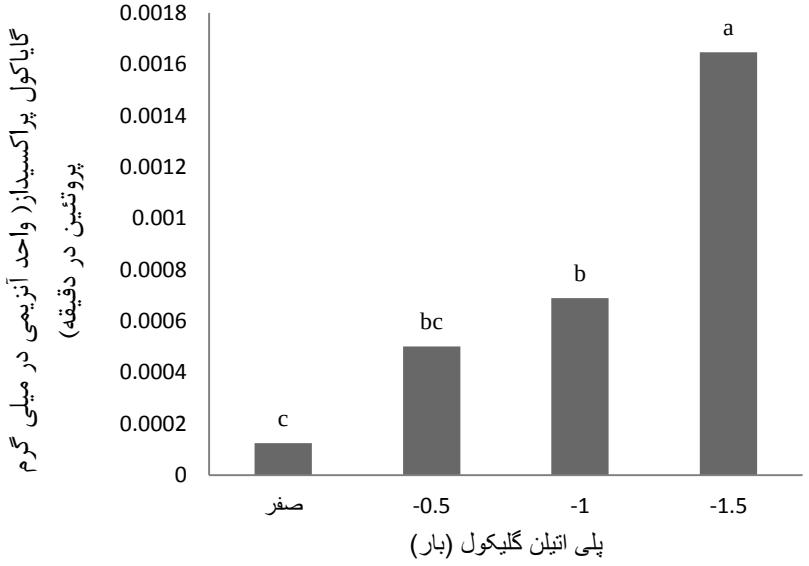
تجزیه واریانس داده‌های موجود معنی‌داری اثر تنش شوری بر میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز را در سطح احتمال یک درصد نشان داد (جدول۴-۳). مقایسه میانگین صفات نشان داد که بیشترین

فعالیت پراکسیداز در تیمار ۵۰ میلی‌مولار ۰/۰۰۱۱ بود که این مقدار اختلاف ۸۹ درصدی را با تیمار شاهد داشت (شکل ۴-۲۸). هم‌چنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که فعالیت پراکسیداز در اثر تنش خشکی درون شیشه‌ای در سطح احتمال یک درصد قرار گرفت (جدول ۴-۳). همانطور که مقایسه میانگین (۴-۲۹) نشان می‌دهد تنش خشکی در بالاترین غلظت به میزان ۰/۰۰۱۶ بیشترین فعالیت پراکسیداز را دارا بود که دارای اختلاف ۹۲/۵ درصدی با تیمار شاهد بود. تغییر در بیان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بسیاری از گونه‌های گیاهی در واکنش به شرایط نامساعد محیطی و تنش-های زنده و غیر زنده و محرک‌های نمو مشاهده شده است. فعالیت بیشتر آنزیم‌ها از میزان تنش اکسیداتیو کاسته و از فرآیندهای متابولیکی که ضامن بقای سلول و گیاه هستند محافظت می‌کند (سافو [۱]و همکاران، ۲۰۰۵، مولاسوتایز[۲]، ۲۰۰۵). پراکسیداز به همراه آسکوربات پراکسیداز، پراکسیدازهیدروژن را درون سلول و در آپوپلاست خنثی می‌کند. پراکسیدهیدروژن نسبتا پایدار و از نظر بار الکتریکی خنثی است، اما از آن‌جا که می‌تواند از میان غشای سلولی عبور کرده و وارد اجزای سلولی شود، بسیار زیان آور است. پراکسیدهیدروژن در حضور رادیکال سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل را که بسیار فعال است تولید می‌کند. بنابراین خنثی کردن پراکسیدهیدروژن برای بقای سلول از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (میچالاک[۳]، ۲۰۰۶، ارتوک[۴]، ۲۰۰۴).

[۱] - Sofo
[۲] - Molassiotis
[۳] - Michalak
[۴] - Erturk



شکل ۴-۲۸ اثر تنش شوری بر فعالیت گایاکول پراکسیداز در کالوس نوروزک



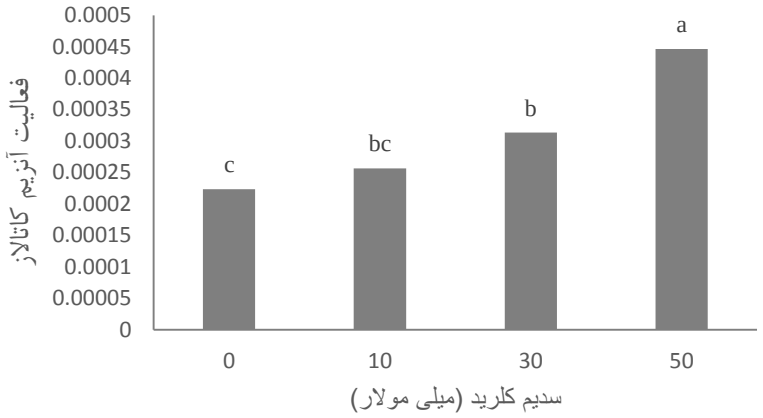
شکل ۴-۲۹ اثر تنش خشکی بر فعالیت گایاکول پراکسیداز در کالوس نوروزک

۴-۲-۶- فعالیت آنزیم کاتالاز

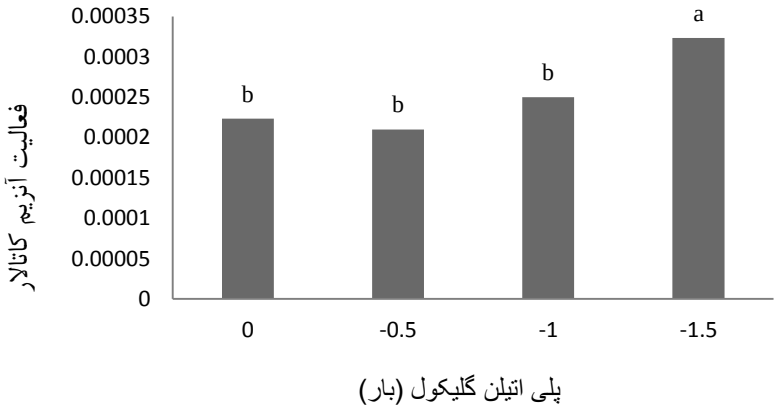
تجزیه واریانس داده‌های مربوطه نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز کالوس در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. طوری‌که بیشترین میزان کاتالاز ۰/۰۰۰۴۵ U/ml از تیمار ۵۰ میلی‌مولار NaCl به‌دست آمد، در حالی‌که کم‌ترین میزان ۰/۰۰۰۲۲ U/ml از تیمار شاهد حاصل شد (شکل ۴-۳۰). نتایج مطالعه شارما و همکاران (۲۰۱۳) روی گیاه سالوادورا نتایج نشان داد که تحت تاثیر تیمارهای مختلف NaCl، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در کالوس‌های رشد یافته در طول دوره ۳۰ روز به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۴-۳۰). هم‌چنین نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس ۴-۳ بیانگر این مطلب است که فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تاثیر تیمارهای پلی اتیلن گلیکول در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد تیمارهای تنش خشکی نیز فعالیت آنزیم کاتالاز را تحت تاثیر خود قرار دادند. به نحوی که بیشترین فعالیت این آنزیم در تیمار ۱/۵- بار PEG ۰/۰۰۰۳۲ U/ml بود (شکل ۴-۳۱). گیاهان از دو سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی برای دفاع در برابر گونه‌های اکسیژن فعال استفاده می‌نمایند. سیستم‌های آنزیمی شامل آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز می‌باشد (آریانو[۱] و همکاران، ۲۰۰۵). آنزیم کاتالاز یکی از آنزیم‌های کلیدی در تجزیه پراکسید هیدروژن است (کوک[۲] و همکاران، ۲۰۰۴). حداکثر جذب پراکسیدهیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر صورت می‌گیرد، از این رو با آغاز واکنش بوسیله آنزیم کاتالاز به‌تدریج از میزان پراکسید هیدروژن در مخلوط واکنش کم شده و در نتیجه میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر نیز کاهش می‌یابد (برگمایر، ۱۹۸۳). کمبود آب در گیاه باعث فعال شدن اشکال اکسیژن فعال می‌شود. این مولکول‌های فعال موجب صدمه به ماکرومولکول‌ها و نیز ساختار سلولی شده است و یا این‌که به عنوان مولکول منفرد موجب فعال شدن سلسله پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌گردد. در سیستم غیر آنزیمی، آنتی اکسیدانت‌هایی مانند ویتامین E، آسکوربیک اسید و ویتامین A خط دفاعی بعدی را در مقابل حمله

[۱] - Ariano
[۲] - Cook

انواع رادیکال‌های اکسیژن فعال تشکیل می‌دهند (بیابر[1] و همکاران، ۲۰۰۴). کافی و مهدوی دامغانی (۱۳۷۹) گزارش کردند افزایش فعالیت کاتالاز جهت کاهش پراکسیداز در هنگام تنش‌های محیطی در گیاهان گندم، جو، سویا و نخود نقش مهمی دارد. پس می‌توان با تعیین سطح فعالیت‌های این آنزیم جهت تعیین گونه‌های مقاوم به خشکی در گیاهان مختلف و هم‌چنین میزان مقاومت گیاه به شرایط تنش ایجاد شده استفاده نمود.

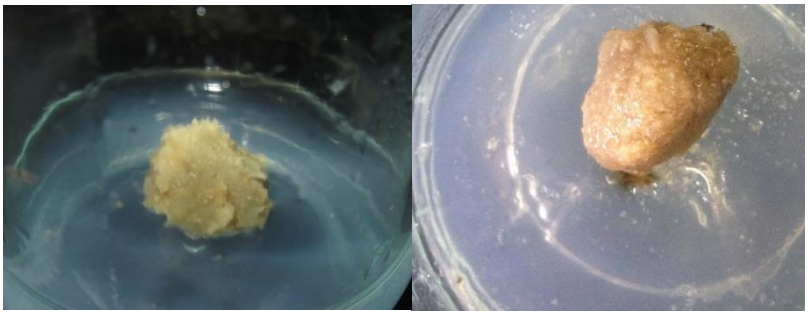


شکل ۴-۳۰ اثر تنش شوری بر میزان فعالیت کاتالاز در کالوس نوروزک



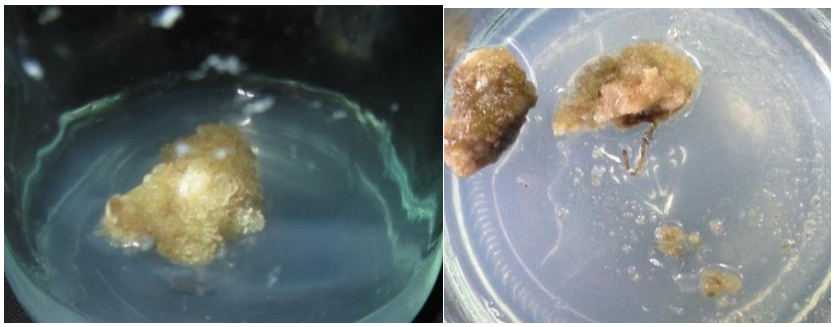
شکل ۴-۳۱ اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم کاتالاز در کالوس گیاه نوروزک

[1] - Biaber

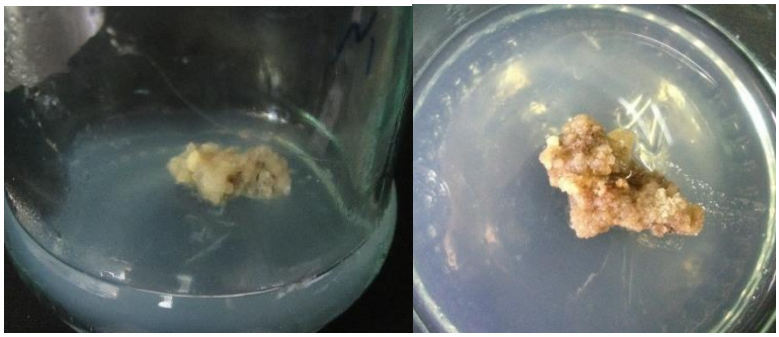


شکل ۴-۳۲ سمت چپ: کالوس‌های تحت تیمار ۰.۵- بار PEG در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم 2,4 D و ۱ میلی‌گرم KIN. سمت راست: کالوس‌ها پس از دو هفته قرار گرفتن در شرایط تنش خشکی

شکل ۴-۳۳ سمت چپ: کالوس‌های تحت تیمار ۱- بار PEG در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم 2,4 D و ۱ میلی‌گرم KIN. سمت راست: کالوس‌ها پس از دو هفته قرار گرفتن در شرایط تنش خشکی

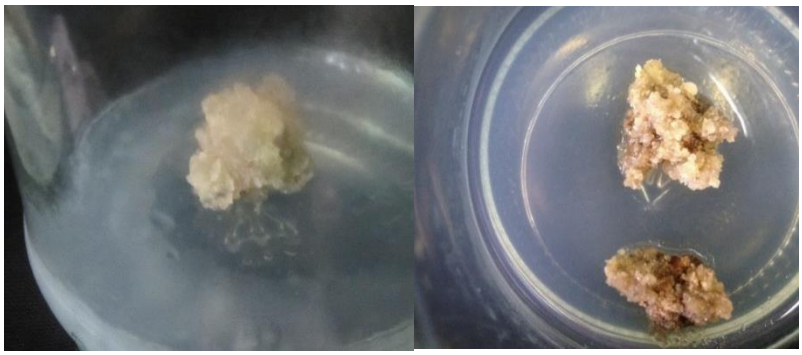


شکل ۴-۳۴ سمت چپ: کالوس‌های تحت تیمار ۱.۵- بار PEG در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم 2,4 D و ۱ میلی‌گرم KIN. سمت راست: کالوس‌ها پس از دو هفته قرار گرفتن در شرایط تنش خشکی



شکل ۴-۳۵ کالوس‌های تحت تیمار ۱۰ میلی‌مولار NaCl در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم 2,4 D و ۱ میلی‌گرم KIN. سمت راست: کالوس‌ها پس از دو هفته قرار گرفتن در شرایط تنش شوری

شکل ۴-۳۶ کالوس‌های تحت تیمار ۳۰ میلی‌مولار NaCl در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم 2,4 D و ۱ میلی‌گرم KIN. سمت راست: کالوس‌ها پس از دو هفته قرار گرفتن در شرایط تنش شوری



شکل ۴-۳۷ کالوس‌های تحت تیمار ۵۰ میلی‌مولار NaCl در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم 2,4 D و ۱ میلی‌گرم KIN. سمت راست: کالوس‌ها پس از دو هفته قرار گرفتن در شرایط تنش شوری

نتیجه‌گیری کلی

در این بررسی، صفات مورفولوژیکی نظیر طول اندام هوایی، درصد رشد جنین، سطح برگ و هم‌چنین شاخص کلروفیل تحت تاثیر سطوح مختلف NaCl و PEG به طور معنی‌داری کاهش یافت. از بررسی صفت قطر ساقه نیز می‌توان نتیجه گرفت که قطر ساقه تحت تاثیر تیمار NaCl افزایش یافت. در حالیکه غلظت‌های مختلف PEG روی صفت قطر ساقه اثر منفی گذاشت و با افزایش غلظت خشکی از قطر ساقه کاسته شد. صفت طول ریشه در تیمار ۰/۵- بار PEG و ۱۰ میلی‌مولار NaCl به طور معنی‌داری افزایش یافت این در حالی بود که سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند.

در مقایسه بین غلظت‌های مختلف NaCl و PEG ، صفات بیوشیمیایی نظیر اسیدآمینه پرولین، GPX، CAT در کالوس و پرولین، GPX و پروتئین کل در گیاهچه افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت. میزان پروتئین کل در کالوس تحت تنش شوری و خشکی به طور معنی‌داری کاهش یافت. از این بررسی می‌توان نتیجه گرفت که واکنش کالوس‌های تحت تنش نسبت به میزان پروتئین کل با گیاهچه تفاوت داشت. در گیاهچه با افزایش غلظت شوری و خشکی درون شیشه‌ای میزان پروتئین کل نیز افزایش یافت. اما در کالوس‌های تحت تنش محتوی پروتئین کل به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. با توجه به این‌که بسیاری از پروتئین‌ها در شرایط تنش هیدرولیز می‌شوند، بر همین اساس کاهش در غلظت پروتئین می‌تواند از پیامدهای تنش به‌شمار آید (ساتیروپولوس، ۲۰۰۷). اما افزایش محتوی پروتئین می‌تواند به علت القای پروتئین‌های متعددی باشد که در پاسخ به تنش شوری و خشکی به‌طور جدیدی ساخته می‌شوند و یا به‌طور نهادی در غلظت‌های پایین وجود داشته و هنگامی که گیاهان در معرض تنش قرار می‌گیرند، غلظت آن‌ها افزایش می‌یابد (صراحی نوبر و همکاران، ۱۳۸۹). هم‌چنین نتایج آزمایش دوم نشان داد که از بین تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد در محیط کالزایی، محیط کشت MS کامل حاوی ۲ میلی‌گرم 2,4-D و ۱ میلی‌گرم KIN مناسبترین محیط جهت القای کالوس از ریزنمونه برگی بود.

در بررسی کلی می‌توان دریافت آستانه تحمل گیاهچه و کالوس در تمامی صفات، غلظت‌های ۵۰ میلی-مولار نمک و ۱/۵- بار پلی‌اتیلن‌گلیکول بوده است، اما در صفت طول ریشه و شاخص قهوه‌ای شدن، آستانه تحمل گیاه در غلظت ۳۰ میلی‌مولار نمک و ۱- بار پلی اتیلن گلیکول بود که دلیل این امر می‌تواند به دلیل سیستم گیاه در برابر شرایط تنش باشد که گیاه بوسیله مکانیسم اجتناب خود را در شرایط تنش سازگار می‌کند.

هم‌چنین می‌توان نتیجه گرفت تکنیک کشت بافت به دلیل کنترل شرایط محیطی، بهترین روش برای ارزیابی واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاهان و هم‌چنین میزان مقاومت آن‌ها به شرایط تنش درون شیشه‌ای محسوب می‌شود (مونتولیو [۱] و همکاران، ۲۰۰۹).

پیشنهادات

۱- بررسی شرایط مختلف کشت جنین نوروزک با pH های مختلف و با توجه به حساسیت بالای جنین نوروزک به تغییرات اندک pH محیط کشت.

۲- بررسی شرایط سازگاری گیاه پس از شناسایی نمونه‌های متحمل به شرایط تنش شوری و خشکی و انتقال آن‌ها از محیط درون شیشه‌ای به محیط بیرون.

۳- اندازه‌گیری میزان تجمع دو عنصر Na^+ و Cl^- در بافت گیاه، به دلیل وجود همبستگی منفی بین تجمع این دو عنصر و میزان مقاومت گیاه به شوری.

۴- ارزیابی میزان تحمل سایر گونه های دارویی مریم‌گلی به تنش شوری و خشکی جهت بررسی حساسیت و یا مقاومت گونه‌ها نسبت به تنش ایجاد شده.

۵- بررسی تاثیر سایر عوامل ایجاد کننده تنش، مانند مانیتول و سوربیتول در ارزیابی صفات کمی و کیفی تحت شرایط تنش.

[۱] - Montoliu

پیوست‌ها

جدول ۴-۱ تجزیه واریانس سطوح مختلف تنش شوری و خشکی بر برخی صفات فیزیولوژیکی و رشدی گیاه نوروزک

** و ns به ترتیب معنی دار در سطح یک درصد و غیر معنی‌دار

منابع نغییرات	درجه‌آزادی	میانگین مربعات									
		وزن تر	وزن خشک	بیوماس	قطر ساقه	طول ریشه	طول اندام هوایی	درصد رشد جنین	تعداد برگ	سطح برگ	شاخص کلروفیل
تیمار شوری	۳	۰.۰۰۶ns	۰.۰۰۰۰۲۱ns	۰.۰۰۸ ns	۱.۲۸**	۲۶۳۲.۲۷**	۳۰۴.۷۰۴**	۷۳.۵۳**	۴.۲۲ns	۰.۰۰۰۰۱۲**	۵۷.۶۳**
خطا	۸	۰.۰۱۰۲	۰.۰۰۰۰۲۶	۰.۰۰۲۳	۰.۰۳۲	۹۷.۳۴	۲.۸۰	۳.۹۳	۱.۴۲	۰.۰۰۰۰۰۰۵	۳.۱۲۳
% CV		۱۵.۸۵	۱۱.۶۲	۸.۳۰	۴.۷۳	۳۴.۶۶	۶.۴۰	۲.۵۰	۲۳.۸۰	۲۰.۶۹	۶.۸۸
تیمارخشکی	۳	۰.۰۰۸۴ ns	۰.۰۰۰۰۲۲	۰.۰۰۷۹	۰.۲۷۱۹**	۱۷۵.۲۶**	۲۷۶.۳۲۴**	۲۰۴.۹۸**	۲.۸۸ ns	۰.۰۰۰۰۱۵**	۱۱۳.۱۱۹**
خطا	۸	۰.۰۰۲۵	۰.۰۰۰۰۰۵۷	۰.۰۰۲۵	۰.۰۰۲۰	۱۴.۰۸	۱.۶۲۸	۲۶.۹۱	۲.۲۵	۰.۰۰۰۰۰۰۴۲	۲.۶۵
% CV		۹.۶۶	۵.۹۶	۱۰.۴۲	۱.۵۶	۲۱.۸۳	۴.۷۴	۶.۹۵	۲۶.۴۷	۲۲.۷۸	۷.۱۵

** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح یک درصد و غیر معنی‌دار

جدول ۴-۲ تجزیه واریانس سطوح مختلف تنش شوری و خشکی بر برخی صفات بیوشیمیایی گیاه نوروزک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		پرولین	پروتئین کل	گایاکول‌پراکسیداز	کاتالاز
شوری	۳	۰.۰۱۳**	۰.۰۰۶۰**	۰.۰۰۰۱۰۴۲۳**	۱۳۱.۲۷۶ns
خطا	۸	۰.۰۰۰۰۹۲	۰.۰۰۰۰۱۴	۰.۰۰۰۰۰۰۰۶۲	۷۲.۹۴۰
CV		۳.۸۴	۱.۷۲	۵.۰۰۶	۱۶.۱۲۸
خشکی	۳	۰.۰۴۱۲**	۰.۰۱۸**	۰.۰۰۰۶۴۱۳۰**	۲۶.۲۶۷ns
خطا	۸	۰.۰۰۰۰۳۵	۰.۰۰۰۰۲۶	۰.۰۰۰۰۰۰۱۷۰	۲۵.۲۰۳
CV		۱.۱۲	۱.۸۹	۵.۰۵۲	۱۱.۳۴۷

** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح یک درصد و غیر معنی‌دار

جدول۴-۳- تجزیه واریانس سطوح مختلف تنش شوری و خشکی بر برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیای کالوس نوروزک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		قهوه‌ای شدن	پرولین	پروتئین کل	گایاکول پراکسیداز	کاتالاز(U/ml)
تیمار شوری	۳					
خطا	۸	۴۷.۴۶	۰.۰۰۰۰۰۰۲۷۵	۰.۰۰۰۱۶۵۴۲	۱.۵۹۱۸	۶.۰۸۳۳
% CV		۷.۰۵	۱.۲۶	۳.۲۶	۸	۷.۹۶
تیمارخشکی	۳	۳۴۹.۱۵۰۲۷۶**	۰ .۰۱۲۴۰۸۵۶**	۰.۲۲۵۲۲۱۲**	۱.۲۶۰۴۰۱**	۷. ۶۷۷**
خطا	۸	۱۰.۹۵	۰.۰۰۰۰۰۰۲۷۵	۰.۰۰۰۱۴۹۴۲	۲.۲۱۵۸۴۱	۴.۴۱۶
% CV		۴.۹۶	۰.۸	۴.۸	۲۰.۱۱	۸.۳۵

** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح یک درصد و غیر معنی‌دار

فصل پنجم

فهرست منابع

فهرست منابع

ال ام پیریـک، (۱۳۷۶)، **مبانی گشـــت بافت‌های گیاهی،** مترجم: دکتر عبدالرضـــا باقری با همکاری مهندس مهری صفاری.

اسفندیاری، ع. شکیبا، م. محبوب، س. آلیاری، ه. برادران فیروزآبادی، م. (۱۳۸۸). اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی گیاهچه‌های گندم. **مجله کشاورزی، جلد ۱۹ شماره ۲.**

ایزدی ا، قربانی ه، محمدیان م و بانق ع. (۱۳۹۳). ارزیابی ویژگی‌های جوانه‌زنی و رشد سه رقم کنجد در شرایط تنش شوری و خشکی. **نشریه زراعت،** پژوهش و سازندگی، ش ۱۰۲، ص ۹۴.

بابایی ک، امینی د، مدرس ثانوی، س.ع، جباری ر، (۱۳۸۹). اثر تنش خشکی بر میزان پرولین، درصد تیمول در آویشن Thymus vulgaris . **فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران** جلد ۲۶ شماره ۲ صفحه ۲۳۹- ۲۵۱.

تاجی، ا، ویلیامز، ا (۱۳۸۲) **کشت بافت گیاهی،** ترجمه معینی، الف، کهریزی، د، انتشارات سازمان بسیج دانشجویی، ۱۶۳ص.

تفرشی، ر.، امیدی، م.، بی همتا، م.، دوازده امامی، س. ۱۳۸۶. بررسی کشت درون‌شیشه و تاثیر محیط کشت و سطوح مختلف هورمونی و ریزنمونه در کالزایی و ساقه‌زایی گیاه باریجه. فصلنامه گیاهان دارویی.

تورز، کنت سی(۱۳۸۶) **فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی (بوستانکاری)،** مترجم خوشخوی، م، چاپ سوم، انتشارات دانشگاه شیراز، ص ۴۱.

حبیبی ف، و امیری م، ۱۳۹۲، بررسی واکنش‌های فیزیولوژیکی دو پایه مرکبات به تنش شوری درون شیشه‌ای. **نشریه علوم باغبانی** (علوم و صنایع غذایی)، ج ۲۷، ش ۳، ص ۳۵۷-۳۵۰.

حداد خداپرست، م. حسینی، م.، ۱۳۷۲. اثر عوامل محیطی بر جوانه‌زنی گیاه نوروزک در شرایط آزمایشگاهی. **مجله پژوهش و سازندگی،** سال ۱۰، ۳۷: ۴۵-۴۲.

حسینی، م.، ۱۳۷۴. تکنولوژی تولید انبوه گیاه نوروزک. مجله پژوش و سازندگی، ۱۲(۴۲) :۵۴-۵۰.

خاوری، ر. ۱۳۷۵. **فیزیولوژی گیاهی.** انتشارات دانشگاه تربیت معلم.

سیفی م، غلامی ا، عباس‌دخت ح و قلی‌پور م. ۱۳۹۳. پایان نامه کارشناسی ارشد، بررسی تاثیر کم آبی، سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر عملکرد و محتوای روغن گیاه دارویی کدو تخم کاغذی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهرود.

شریعت آ، عصاره م ح، بررسی اثر تنش خشکی بر رنگیزه‌های گیاهی، پرولین، قندهای محلول و پارامترهای رشد چهار گونه از اکالیپتوس. **منابع طبیعی** ۷۸، بهار ۱۳۸۷.

صالحی، م. کوچکی، ع. نصیری محلاتی، م. ۱۳۸۲. میزان نیتروژن و کلروفیل برگ به عنوان شاخصی از تحمل به خشکی در گندم. **مجله پژوهش‌های زراعی ایران**. ج ۱۰. ش ۲. ص ۲۲۵-۱۹۹.

صراحی نوبر، م، نیکنام، و، مرادی، بابک، ۱۳۸۹. اثر تنش شوری بر محتوی پروتئین، رنگیزه‌ها، قندها و ترکیبات فنلی در کشت بافت چند گونه از شنبلیله‌های ایران. **مجله علوم دانشگاه تهران**، جلد سی و ششم. شماره ۲، ص ۵۹-۵۳.

فیله‌کش، ا.، ۱۳۸۲. بررسی آت اکولوژی گیاه مرتعی *Salvia lerrifolia* در سبزوار، خلاصه مقالات اولین **همایش توسعه پایدارگیاهان دارویی** ص ۳۳

قربانعلی ، م. میقانی ، ف. میرقاضی ، ش. (۱۳۸۸). اثر غلظت‌های مختلف مس و برهم‌کنش آن با کینتین بر چند جنبه بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی نوروزک. **فصلنامه شناخت و کاربرد گیاهان دارویی** / جلد دوم ، شماره۱

لایق خویدکی، ح، لاهوتی، م، عباسی، ف، ۱۳۸۹. بررسی مقایسه‌ای اثر تنش خشکی بر میزان تغییرات پرولین در گیاه نوروزک در محیط کشت خاک و این ویترو، **فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان**، جلد ۴، شماره ۱، ص ۱۱۵ – ۱۰۵.

مدرس ، م. ابریشم چی، پ. اجتهادی، ح . ورمضانی،ع ۱۳۸۶تکثیر گیاه نوروزک ازطریق کشت رویان. **فصل نامه علمی پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران**.

Aebi H, (**1984**). Catalase in vitro. Methods Enzymol **105:121-126**.

Aghaleh M, Niknam V, Ebrahimzadeh H, Razavi K (**2011**) Effect of salt stress on physiological and antioxidative responses in two species ofSalicornia(S. persica and S. europaea). **Acta Physiol Plant 33:1261–1270.**

Alizadeh M., Sigh S.K., Patel V.B., Bhattacharya R. C., and Yadav B.P. **(2010)**. In Vitro Responses of grape rootstocks to NaCl **Biologia Plantarum, 54:381-385**

Ariano S. Baratolomeo D. Cristos X. and Andras M, **(2005)** Antioxidant defenses in Olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes, Functional **plant Biology 32: 45-53.**

Asada K, **(2000)**. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. Phill Trans R Soc Lond **B 355:1419-1431.**

Ashraf M, Orooj A. **(2006**)**.** Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in arid zone traditional medicinal plant ajwain (Trachyspermum ammi [L.] Sprague). **J. Arid Environ. 64: 209-220.**

Ashraf M., Karim, F ., and E. Rasul **(2000).** Interactive effects of gibberellic acid (GA3) and salt stress on growth, ion accumulation andphotosynthetic capacity of two spring wheat(Triticum aestivum L.) cultivars differing in salt tolerance. **Plant Growth Regulation 36, 49-59.**

Azevedo, N.A.D., J.T. Prico, F.J. Eneas, A.C.E. Braga and F.E Gomes. **(2006).** Effect of salt stress on antioxidativeenzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environ. Exper. Bot **56: 235-241.**

Bahmani R, Gholami M, Mozafari AA, Alivaisi R **(2012)**. Effects of Salinity on In vitro Shoot Proliferation and Rooting of Apple Rootstock MM.106 World Applied **Sciences Journal 17 (3): 292-295.**

Bajji M, Kinet J.M, Lutts, S. **(1998)**; Salt stress effects on roots and leaves of Atriplex halimus and their corresponding callus cultures. **Plant science. 137: 131-142.**

Bajji M, S. Lutts and J.M. Kinet, **(2001);** Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (Triticum durcultivars) performing differently in arid conditions. **Plant Science, 160:669-681.**

Bajji M, S. Lutts, J. M. Kinet, **(2000).** Physiological changes after exposure to and recovery from polyethylene glycol induced water deficit in callus culture issued from durum wheat (Triticum durum) cultivars differing in drought resistance. **J. Plant Physiol., 156, 75–83.**

Bates L.S, Waldern, R.P., Teare, I.D. **(1973).** Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil,39 (1);205-207.**

Bettaieb I, Knioua S, Hamrouni I, Limam F, Marzouk B. **(2011)**. Waterdeficit impact on fatty acid and essential oil composition and antioxidant activities of cumin (Cuminum cyminumL.) aerial parts. **J Agric Food Chem 59: 328-334.**

Biaber B. Cureuett J. T. and Kipnes R. S**, (2004)**. Biologic defens mechanisms. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine 85: 235-244.**

Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV, **(2003)**. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. **Ann Botany 91: 179-194.**

Bradford M, **(1976**). A rapid and sensitive method for the quantitative estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Ann. Biochem, 72: 248-254.**

Bray E. A. **(1997).** Plant responses to water deficit. Trends in plant science. 2:48-54.

Bunga, J .M and Von Adercas, P. 1992 " In vitro culture of trees" Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp **232.**

Cardenas C.A, Cardenas CG, de Armendi AJ& Scroggs RS **(2006).**Neurosci Lett **408,129-134.**

Chance B, and A. C. Maehly**. (1955).** Assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymol. 11: 764-775.

Cherian S, Reddy M.P. **(2003)**: Evaluation of NaCl tolerance in the callus cultures of Suaeda nudiflora Moq . **Biol. Plant 46:193-198**.

Cook D. Fowler S and Fiehen O, (**2004)** A prominent role fore the CBF cold response pathway in configuring the low temperature metabolome of Arabidopsis. **Plant biology 101: 15243-8.**

Cosculleola F. and Fact, J.M, **(1992)**. Determination of the mize (Zea mays L.) yield functions in respect to water using a line source sprinkler. **Field Crops Abst. 93: 5611.**

Ebrahimi F**. (2002)**. Evaluation callus induction and regeneration several Iranian wheat for drought tolerance and saltfrom tissue culture.Msc thesis.Mazandaran university (in Persian).

Enjarlic F, Carron, M, Lardet, L. **(1988)** " Contamination of primary cultures in tropicalareas: The case of Hevea Brasilensis " **Horticulure, 225 pp57.**

Errabii T, Gandonou CB, Essalmani H, Abrini J, Idaomar M, Senhaji NS **(2008)** Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. **Afri J Biotechnol 5:1488–1493.**

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

Francois L.E, E. Mass, T. J. Donovand, & V.L. Yoongs**.(1986)**. Effect of salinity on grain and quality, vegetative growth and germin ation of semidwarf and durum wheat. Agron.**J. 78: 1053-1058.**

Fulda S, Mikkat, H, Stegmann, H, Horn, R**. (2011)**. Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (Helianthus annuus L.). **Plant Biology 13(4): 632-642.**

Habibi F, Mohammad E, Amiri **(2013).** Influence ofin vitrosalinity on growth, mineral uptake and physiological responses of two citrus rootstocks International **journal of Agronomy and Plant Production.** Vol., **4 (6),1320-1326.**

Hall J.L, Flowers T.J. **(1973)**. The effect of salt on protein synthesis in the halophyte Suaeda maritima. Planta. **110:361-368.**

Hamayun M, S.A. Khan, Z.K. Shinwari, A.L. Khan, N. Ahmad and endogenous growth hormones of soybean cultivar Hwangkeumkong. Pak. **J. Bot., 42: 977-986.**

Hardegree, S. P. and Emmerich, W.E. **(1992)**. Effect of matric primming duraion and primming water potential on germination of four grasses. **Journal of Experimental Botany, 43, 233-238.**

Hassan N.S, Shaaban LD, El-Sayed AH, Seleem EE **(2004)** In Vitro Selection for Water Stress Tolerant Callus Line ofHelianthus annusL Cv Myak. Int **J Agric Biolhttp**://www.ijab.org.

Heidari M, **(2007).** Response plants to environmental stresses. Aras rayaneh, **96.**

Hoogenboom G, M. Peterson and M. G. Huck. **(1987).** Shoot growth rate of soybean as affected by drought stress. Agron**. J. 79: 598-607.**

Hosseinzadeh, H. and Lary, P. **(2000)** The of Salvia leriifolia Benth root extracts on morphine dependence in mice. **Phytotherapy Research 14: 384-387.**

Humaira M, shoaib Is, Farkhunda A., and Rafiq A., an A**. (1995)**. Studies on growth and salt regulation in some halophytes as influenced by edaphic and climatic conditions. Pak. **J. (1): 151-163.**

Iyengar E.R. and M.P. Reddy**, (1996)**; Photosynthesis in highly salt-tolerant plants. In: Pessarakli, M. (eds). Handbook of photosynthesis. Chapman and Hall, London, pp**:897-909.**

Jensen. **(1976).** Newsal. I.A.P.T.C.18: **2-7**.

Kahjehpoor M.R., **(2004).** Industrial Plants. Jahadeh Daneshgahi Publisher, Isfahan Industrial University. [In Persian].
Kapoor K, Srivastava A **(2010)** Assessment of salinity tolerance of Vinga mungo var. Pu-19 using ex vitro and in vitro methods. Asian **J Biotechnol 2: 73-85**

Karimi N, Soheilikhah Z, Ghasempour HR, Zebarjadi A **(2011)**. Effect of salinity stress on germination and early seedling growth of different Safflower (Carthamus tinctorius L.) genotypes. **J Ecobiotech. 3(10): 7-13.**

Kato M, Shimizu S. **(1985)**: Chlorophyll metabolism in higher plants .**Plant Cell Physiol. 26: 1291-1301.**

Kaviani B **(2008)** Proline accumulation and growth of soybean callus under salt and water stress. Int **J Agric Biol. 10:221-223.**

Kester. **(1953)** Hilgardia **22: 335- 365.**

Khodaparast M.H, Haghdoost, A, Elhami-Rad, A.H, Movahhed, G. and Karazhiyan, H, (**2006)** Antioxidant activity and thermal Properties of salvia leriifolia (Norozak) root extract Proceedings of the intemational conference on innovations in food and Bioprocess Technologyes, pathumthani, Thailand,12-14 December. **378.**

Kocheva K. and Georgiev,G**. (2003)**. Evaluation and reaction of two contrasting barley(Hordeum vulgare) cultivar in response to osmotic stress with PEG6000.Bulg.**j.plant physiol.special Issue. 290-294.**

Kondo H, Abe K, Nishimura I, Watanabe H, Emori Y. and Arai S. **(1990)** Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases**. J of biologLcal chemistry, 26,15832-15837.**

Kondo H, Emori Y., Abe K., Suzuki K. and Arai S. **(1989)** Cloning and sequence analysis of the genomic DNA fragment encoding oryzacystin. Gene**, 81, 259-265.**

Kosavaa K. Vitamvasa P. Prasila I. T. and Renautb J**. (2011).** Plant proteome changes under abiotic stress contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Proteomic 74: 1301-1322.**

Kumar A, J. Bernier, S. Verulkar, H.R. Lafitte and G.N. Atlin **(2011).** Breeding for drought tolerance: direct selection for yield, response to selection and use of drought-tolerant donors in upland and lowland-adapted populations. Field Crops Res., **107: 221-231.**

Kumar R.R, Karjol K, Naik GR **(2011)** Effect of polyethylene glycol induced water stress on physiological and biochemical responses in Pigeon pea (Cajanus cajanL. Millsp.). RRST-**Plant Physiol 152-3:148**

Lee G, Carrow, R. N, and R.R. Duncan **(2004)**. Photosynthetic responses to salinity stress of halophytic seashore paspalum ecotypes. **Plant Science 166, 1417-1425.**

Li-Chun H, Murashige, H. **(1977)** Plant tissue culture media; their prepatin and some applications. **Tissu Culture Assoc, Man, 3**, pp **539**

Manuhara Y, Thresia Valentina, and Pristantho. **(2013).** Effect of drought stress induced by poly ethylene glycol (PEG6000) on callus of Heliantus annus L. CV. **Journal of aplied hytotechnology** in eniremental sanitation. Volume 2 , Number **3 :7**

Martin M. F. Micell, J.A. Morgan, M. Scalet and G. Zebi, **(1993).** Synthesis of osmotically active substances in winter wheat leaves as related to drought resistance of different genotypes. **Journal of Agronomy and Crop Science, 171: 176-184.**

Mass E. V. & G. J. Hoftman. **(1977).** Crop salt tolerance-current assessement. Journal of Irrigation. Drainage. Division of American Society of Civil Engineering. **103: 115-134.**

Megdiche W, Amor NDA, Hessini K, Ksouri R, Zuily Fodil Y, Abdelly **C (2007)** Salt tolerance of the annual halophyte Cakile maritime as affected by the provenance and the developmental stage. Acta **Physiol Plant 29:375-384.**

Meloni D.A.,Oliva M.A., Martinez C.A., Cambraia J. **(2003).** Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and gluthatione reductase in cotten under salt stress. Environ . Experi. Bot. **49:69-76**

Michalak A. **(2006)**. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish **Journal of Environmental Studies, 15:523-530.**

Michel B.E. and M.R. Kaufmann**, (1973).** The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology, 51:914-916.**

Misic D, Siler, B, Philipovic, B, Popovic, Z, Zivkovic, S, Cvetic, T, and Mijovic, A. **(2009).** Rapid in vitro selection of salt- tolerant genotypes of the potentially medicinal (L). fritsch. Arch. Biol. Sci., Belgrade, **61 (1), 57-69.**

Mittler R, **(2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Tren Plant Sci **7: 405-410.**
Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M and Breusegem FV, **(2004).** Reactive oxygen gene network of plants. **Tren Plant Sci 9: 490-498.**

Molassiotis A.N, Diamantidis G.C, Therios I.N., Tsirakoglou V, and Dimassi K.N. **(2005).** Oxidative stress, antioxidant activity and Fe (III)-chelate reductase activity of five Prunusrootstocks explants in response to Fe deficiency. Plant Growth Regulation, **46:69-78.**

Molassiotis AN, Sotiropoulos T, Tanou G, Kofidis G, Diamantidis G, Therios I. **(2006).** Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. Biol Plant. **50: 61-68.**

Monnier. Bull. Soc. Bot. France **127: 59-70.**

Montoliu A., Lopez-Climent M.F. Arbona V., Perez-Clemente R.M., and Gomez-Cadenas A. **(2009).** A novel in vitro tissue culture approach to study salt stress responses in citrus. **Plant Growth Regulation** , **59:179-187**.

Mousumi d, **(2008).** Responnses of bacopa monnieri salinity and drought stress *in vitro*. **Journal of Medicinal Plant** Research Vol. 2(11), p**.347-351.**

Munns R. **(2002**). Comprative physiology of salt and water stress plant cell and invironment, **25:239-250.**

Murashige T and Skoog, F, **(1962)**. A revised medium for rapid growth and bioassays in tobacco tissue culture. **Physiology Plant 15: 473-493.**

Newton R. J, Sen S, Puryar J. D **(1986).** Free proline changes in Pinus taeda L. callus in response to drought stress. **Tree Physiology 1, 325-332.**

Nickavar B. Kamalinejad M. HajYahya M and Shafagh B. **(2006).** Camparition of the free radical scaverging activity of six Iranian Achillea species. **Pharmaceutical Biology. 44: 208-212.**

Nicolas J Cheynier.V Fleuriet, A Rouet-mayer MA and Aubert S,y **(1993)**, Polyphenols and enzymatic browning in polyphenolic phenomena INRa Editions paris 165-175.

Omielan J.A, E. Epstein, & J. Dvorak**. (1991)**. Salt tolerance and ionic relations of wheat as affected by individual chromosomes of salt tolerant Lonphopyrum elongatum. Genome.**34:961-964**.

Pandey M and Chikara., Su K. **(2014).** In vitro Regeneration and Effect of Abiotic Stress on Physiology and Biochemical Content of Stevia Rebaudiana‘Bertoni. **Journal of Plant Science & Research** Volume 1, Issue **3.**

Passarkli M, **(1999).** Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker Inc. **697** pages.

Pierik R.I.M**. (1999**) “In vitro culture of higher plants” K luwer Academic Publishers, pp **260.**

Raghavan. Int. Rev. Cytol. 11B: **209-240.**

Rechinger K.H., **(1982).** Flora Iranica. N.150,Academishe Druk.u.Verlag sustalt Gratz.page **439.**

Sadeghnia H.R., Nassiri Asl, M., Haddad Khodaparast, M.H. and Hosseinzadeh, H., **(2003).** Theeffect of Salvialeriifolia Benth root extracts on lipidperoxidation during global ischemic-reperfusion rats. Medicinal Plants, **7.**

Saktivelu G, Akitha Devi,M.K., Giridhar,P.,Rajasekaran,T., Ravishankar,. Nedev,T.,Ko sturkova G, **(2008)**. Drought induced alteration in growth, osmotic potential and *in vitro* Regeneration of soybean cultivars .**Plant Physiology**,Specl,lssue.

Schatchman D. P., R. Munns, & M. I. Whitecross. **(1991).** Variation in sodium exclusion and salt tolerance in Triticum tauschii . Crop Sci. 31: 992-997.

Schenk R.V and Hildebrandt, A.C. **(1972)** "Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. "**Can J Bot** , **50**, pp **199**

Schulze J. E. **(1974).** Root development of wheat at the flowering stage under different cultural practices. Agric. Res**, 1: 12-17.**

Sharma V, Ramawa K.G. **(2013).** Salinity-induced modulation of growth and antioxidant activity in the callus cultures of miswak (Salvadora persica) **Biotech 3:11–17.**

Shyiab M. S, Shibli, R. A. and Mohammad, M. **(2003).** Influence of sodium chloride salt stress on growth and nutrient acquisition of sour orange *in vitro*. **Journal of Plant Nutrition. 26(5): 985-996.**

Sibole J.V, Cabot C, Poschenreder C, Barcelo J **(2003)** Efficient leaf ion partitioning, an overriding condition for abscisic acid-controlled stomatal and leaf growth responses to NaCl salinization in two legumes**. J Exp** Bot **54: 2111-2119.**

Siler B, Misic., D, Philipovic., B, Popovic., Z, Zivkovic., S, Cvetic., T, and Mijovic., A. **(2007).** Efects of salinity on in vitro growth and photosynthesis of common centaury (Centaurium erytraea RAFN). Arch. Biol. Sci., Belgrade, **59 (2), 129-134.**

Singh A, M.L. Saini, R.K. Behl**. (2004).** Seed germination and seedling growth of citrus (*Cytrus species*) root stocks under different salinity regimes. Indian **Journal of Agriculture Science . 74: 246-248.**

Smaal. **1980**. Vakbl. Bloem. **35(46): 46-47, 49.**

Smith R. H. **(2000)**" Plant tissu culture. Techniques and experiments" Academc Press, pp **231.**

Sofo A, Dichio B., Xiloyannis C., and Masia A. **(2005).** Antioxidant defences in olive trees during drought stress: Changes in activity of some antioxidant enzymes. Functional **Plant Biology, 32:45-53.**

Sotiropoulos T.E. (**2007)**. Effect of NaCl and CaCl2on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M4 cultured in vitro. Biologia Plantarum, **51:177-180.**

Sotiropoulos T.E. **(2007).** Effect of NaCl and CaCl2on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M4 cultured in vitro. **Biologia Plantarum, 51:177-180.**

Subbarao G.V. & C. Johansen **(1999)**. Strategies and scope for improving salinity tolerance in crop plants. pp. 1069 1087 In Pessaraki, M.Hand book of plant and crop stress. Marcel Dekker Inc.New York. USA.

Wang Y. S, Tian S. P, Xu Y, Qin G. Z, & Yao H. J, **(2004)**. "Changes in the activities of pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruit inoculated withCryptococcus laurentii or Penicillium expansum at 0 or 20 °C". Postharvest biology and technology. 34, 21–28.

Weimberg R. (**1987)**. Solute adjustments in leaves of two specious of wheat at two different stages of growth in response to salinity. Physiol. Planta. 70: 381-388.

Wilson C.C **(1986).** Maximum yield potential: tranition from extensive to intensive agriculture. Int. Cong**. 7: 34-56.**

Wyn Jones R.G. and Storey, R. **(1981).** Betaines. In: Paleg LG, Aspinall D, eds. Physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Sydney: Academic Press, **171-204.**

Zhang Y.J, Qian Y.Q, Mu X, Cai Q.G, Zhou Y.L, and Wei X.P. **(1998).** Plant regeneration from in vitro cultured seedling leaf protoplasts of Actinidia eriantha Benth. Plant Cell Report, **17:819-821.**

Abstract

Nuruozak is valuable plants desert areas of Iran, which has valuable properties such as antioxidant, antibacterial, antifungal and is analgesic. In order to study response of Nurouzak medicinal plant (*Salvia leriifolia* Benth) to *in vitro* salinity and drought stresses, two saperate experiments were designed in a completely randomized design with three replications. First test the embryos were cultured on modified MS liquid medium supplemented with different concentrations of at 0, 10, 30 and 50 mM NaCl, as well as PEG at 0, -0.5, -1 and -1.5 bar. The results showed that with increasing levels of salinity and drought, morphological parameters such as leaf area index, chlorophyll, shoot length was significantly decreased ($P \leq 0.01$). Also proline, total protein and guaiacol peroxidase activity showed a significant increase compared to the control. In a second experiment to induce callus from growth regular 2,4-D and KIN at concentrations of 0, 5.0: 1, 1: 1, 5.0: 1, 2: 2 was used. The results was showed that medium with 2 mg 2,4-D and 1 mg KIN had the more effective on callus percent of the treatment into account as the most suitable criteria for induction callus was selected. Callus grown on MS medium containing 2 mg 2,4-D and 1 mg KIN after two subcultures, were transferred to salinity and drought environments with similar concentrations in the first experiment. Analysis of datas variance of showed with increasing in salinity and drought catalase activity, guaiacol peroxidase and proline significantly increased (($P \leq 0.01$). While the total protein by increasing salinity and drought significantly decreased. The results of this study suggest that morphological and biochemical characteristics of seedling and callus was affected by both salinity and drought stress.

Key words: MS, Nuruozak, Salinity and Drought Stress, Proline, Guaiacol peroxidase.Catalase.

Abbreviations: MS, Murashinge & skoog, NaCl, sodium chloride, PEG, Polyethylene glycol.

Shahrood University of Technology

Faculty Of Agriculture

Department Of Hurticulture

Title:

Effect of Salinity and Drought Stresses on Some Quantitative and Qualitative Characteristics of Nuruozak (*Salvia leriifolia* Benth) *in vitro*culture

Supervisors:

Dr. Hassan Khosh Ghalb - Dr. Ziba Ghasimi Hagh

Advisor:

Dr. Masoomeh Modarres

Researcher:

Najmeh Sadat Hosseini

Thesis For Master's Degree

February, 2016