

The study of salt tolerance in regenerated plants from the roots of tobacco (*Nicotiana rustica* L.)

F. Sadat Fatehi, A.A. Ehsanpour*

Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received 5 April 2021; Accepted 18 September 2021

Extended abstract

Introduction

Soil salinity as a limiting factor for plant growth and development and one of the environmental stresses that has attracted the attention of scientists. NaCl Reduces seed germination percentage, root length, fresh weight and dry weight of seedlings and fresh weight of hypocotyl. Salinity stress inhibits plant growth and development and reduces photosynthesis, respiration and protein synthesis in susceptible species. When plants are exposed to environmental stresses such as salinity and drought, the balance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the activity of interfering systems in the clearance of these radicals by antioxidants is disturbed and ultimately oxidative damage. the reactive oxygen species (ROS) accumulates in the leaves and lead to the oxidation of important cellular constituents such as protein, chlorophyll, lipid and nucleic acids. Salt tolerance increases if free radicals are produced through the intensification of the antioxidant system. There is a relationship between oxidative depletion and increased tolerance to salt and other environmental stresses and the efficiency of the antioxidant system. Plants use complex antioxidant systems that reduce the oxidative damage caused by ROS to cellular parts. This system controls the amount of ROS under both natural and environmental stressful conditions, without which plants can not convert solar energy in to chemical energy All plant body cells have the ability to regenerate, that is, to proliferate or create a new plant. In fact, regeneration is the basis of plant tissue culture, which means creating a complete plant with roots and stems from undifferentiated plant cells. Regeneration of plants by culturing undifferentiated cells in this in vitro is a clear reason for the flexibility of plant cells that occurs in response to specific environmental signals.

Materials and methods

In this study, root regenerated plants as well as unregenerate plants from tobacco roots were cultured in MS medium containing concentration of zero, 100, 200 Mm Nacl were grown 4 a weeks and then growth indicators of including fresh and Dry weight, photosynthetic pigments content including total chlorophyll and carotenoids, concentration sodium and potassium, total phenol content, proline content, total antioxidant level, total ROS, Lipid peroxidation, auxin content as well as RAPID-PCR analysis Got it.

* Corresponding author: Ali Akbar Ehsanpour; E-Mail: ehsanpou@sci.ui.ac.ir



Results and discussion

It was observed that fresh and dry weight of regenerated plants increased significantly over non-regenerated plants showed. It also increased the amount of photosynthetic pigments and reduced sodium and increased potassium, decreased total ROS and MDA and increased total antioxidant and auxin also relative to non-regenerated plants were observed in salt conditions, results obtained from RAPID-PCR analysis it showed somatic variation in regenerated plants compared to non-regenerated plants. Present research suggests that regenerated plants can enhance improved salinity resistance growth indices in saline conditions. In general, the results show that regenerated plants in both non-stress and salinity stress improved growth, physical and biochemical indices compared to non-regenerative plants. It was also found that regenerated plants R2 had better performance under salinity stress than plants regenerated plants R1 and non-regenerated plants. The occurrence of somaclonal variations between regenerated and non-regenerated plants has also been identified.

Conclusion

In the present study, from regenerated and non-regenerated tobacco roots were cultured in MS medium containing concentration of zero, 100, 200 Mm NaCl were grown 4 weeks. The photosynthetic pigments were increased while, sodium content reduced but potassium was increased, Total ROS decreased and MDA increased, total antioxidant and auxin also relative to non-regenerated plants were observed in salinity conditions. Results obtained from RAPID-PCR analysis showed somaclonal variation in regenerated plants compared to non-regenerated plants. Present data suggested that regenerated plants from root improved salinity tolerance and growth parameters in saline conditions.

Keywords: Regeneration, Resistance to NaCl salt, Salinity stress, Somatic variation, Tobacco plant

مطالعه تحمل به شوری گیاهان باززایی شده از ریشه تنباکو (*Nicotiana rustica* L.)

فریبا سادات فاتحی، علی اکبر احسانپور*

گروه زیست‌شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان

مشخصات مقاله	چکیده
واژه‌های کلیدی:	
باززایی	
تنش شوری	
تنوع سوماتیکی	
گیاه تنباکو	
مقاومت به نمک NaCl	
تاریخ دریافت:	
۱۴۰۰/۰۱/۱۶	
تاریخ پذیرش:	
۱۴۰۰/۰۶/۲۷	
تاریخ انتشار:	
زمستان ۱۴۰۱	
۱۱۴۱-۱۱۲۷: (۴) ۱۵	

مقدمه

آن اثر بگذارد (Pencik et al., 2013). اکسین‌ها اولین گروه هورمون‌های گیاهی هستند که پس از کشف به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد و افزایش سلول استفاده شدند. بارزترین ویژگی اکسین‌ها، اثر بر رشد طولی سلول‌های ساقه، کلئوپتیل و ریشه است. باین‌حال در تشکیل ریشه‌های جانبی و ریشه‌های نابجا، تقسیم سلولی در کشت بافت و در بیوسنتز پروتئین و RNA هم نقش دارند. اعتقاد بر این است که اکسین با تغییراتی در بیان ژن موجب فعالیت‌های مذکور می‌شود (Zolman and Bartel, 2004). پژوهش‌های دیگر به‌وضوح مبین این امر است که هر یک از هورمون‌های اکسین و سیتوکینین می‌تواند سطح دیگر را تنظیم کند. به‌طور مثال،

شوری خاک به‌عنوان یک عامل محدودکننده رشد و تکامل گیاهان و یکی از تنش‌های محیطی است که توجه دانشمندان را به خود جلب کرده است (Auturi et al., 2009). اکسین‌ها گروه کوچکی از مولکول‌های مؤثر در القاء پاسخ‌های رشدی هستند و علاوه بر تأثیر مستقیمشان در رشد جنبه‌های مختلف و متنوعی از نمو گیاهی را نیز کنترل می‌کنند (Strader et al., 2008).

اکسین‌ها در رشد گیاهان و تشکیل مریستم‌های رأسی نقش دارند و برای تمایز ریشه ضروری هستند. نقش اکسین در غلبه بر تنش‌ها شناسایی شده است. تنش شوری می‌تواند بر روی هموستازی اکسین از طریق تغییر متابولیسم و توزیع

گزارش نشده است. با توجه به اینکه اندام ژنتیکی و شرایط فیزیولوژیکی ریشه اندام متفاوتی نسبت به ساقه و برگ است و همچنین تأثیر هورمون اکسین در ریشه و ساقه متفاوت است؛ بنابراین به نظر می‌رسد باززایی گیاهان حاصل از ریشه نسبت به تنش شوری می‌تواند متفاوت از ساقه و برگ بوده و نتایج متفاوتی را ارائه دهد بنابراین اهداف این پژوهش عبارت‌اند از (۱) بررسی شاخص‌های رشد و تحمل به شوری گیاهان باززایی شده از ریشه تنباکو، و (۲) بررسی وقوع تنوع سوماتیکی در گیاهان باززایی شده.

مواد و روش‌ها

گیاه تنباکو (*Nicotiana rustica* L.) به دلیل رشد سریع، تولید بذر فراوان و ... گیاه مدل خوبی جهت مطالعات بیوتکنولوژی و فیزیولوژی گیاهی است. این تحقیق در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه اصفهان در سال ۱۳۹۸ انجام شد. از آنجایی که هر گیاه باززایی شده محصول تمایز یک سلول است بنابراین در این تحقیق گیاهان باززایی شده حاصل از کالوس شماره ۱ تحت عنوان (Regeneration 1) و گیاهان باززایی شده حاصل از کالوس ۲ (Regeneration 2) و غیرباززایی شده (Non Regeneration) نامیده شدند که در محیط کشت MS حاوی نمک NaCl در غلظت‌های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار قرار گرفتند و پس از ۴ هفته میزان وزن تر و خشک، سدیم و پتاسیم، کلروفیل کل و کاروتنوئید، میزان پرولین، پراکسیداسیون لیپیدها، مالون دآلدئید، آنتی‌اکسیدان کل، ROS کل، فنل کل، میزان اکسین برگ، RAPD-PCR اندازه‌گیری شد. کلیه آزمایش‌ها بر اساس طرح کاملاً تصادفی انجام و مقایسه داده‌ها بر اساس حداقل میانگین ۳ تکرار و با استفاده از آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) انجام گرفت.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد

پس از چهار هفته گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نمک (صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی مولار) از محیط کشت خارج گردید و سپس وزن تر گیاهان در هر غلظت اندازه‌گیری شد. به‌منظور اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌های وزن شده در مرحله قبل درون پاکت‌های کاغذی قرار داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد درون آون قرار گرفت و پس‌ازاین مدت وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد.

گیاهان تنباکویی که تولید بیش از معمول سیتوکینین در آن‌ها القاء شده است، مقدار IAA کمتری داشته‌اند و همچنین تولید IAA زیاد در تنباکو منجر به کاهش مخزن سیتوکینین گیاه می‌شود (Eklof et al., 2000; Palni et al., 1988). به نظر می‌رسد افزایش میزان اکسین موجب افزایش فعالیت سیمپورت H^+/K^+ شود و در نتیجه انتقال پتاسیم به داخل سلول بیشتر گردد (Sharp and Lenoble, 2002). اکسین بر روی کانال‌های یونی اثر گذاشته و باعث جذب پتاسیم بیشتر در محیط نمکی یا عدم خروج پتاسیم شده است. بر طبق تئوری رشد اسیدی، اسیدی شدن به‌واسطه اکسین، برای افزایش توسعه دیواره سلولی ضروری است (Singh et al., 1987).

روش‌هایی برای حفظ تورژانس در گیاهان تحت تنش شوری به کار گرفته می‌شود که یکی از آن‌ها انباشته شدن پرولین است. پرولین انباشته‌شده در پاسخ به شوری، نقش مهمی در تنظیم اسمزی درون سلولی ایفا می‌کند و آنزیم‌ها و پروتئین‌های غشایی را در برابر واسرستگی حفظ می‌نماید. در پژوهش‌های پیشین اغلب خاصیت اسمولیتی پرولین در گیاهان تحت تنش جهت حفظ تعادل آب بیان شده است (Saradhi et al., 1995; Santoro et al., 1992). در شرایط تنش (شوری و خشکی)، سیستم ریشه‌ای خوب و گسترده می‌تواند تأثیر بسیاری را در گیاه داشته باشد (Sponchiado et al., 1989; Ludlow and Muchow, 1990). تمام سلول‌های پیکر گیاه توانایی باززایی یعنی پرتوانی یا ایجاد یک گیاه جدید را دارا می‌باشند (Ehsanpour and Amini, 2002). در واقع باززایی پایه و اساس کشت بافت گیاهی است که به معنای ایجاد یک گیاه کامل دارای ریشه و ساقه از سلول‌های تمایز نیافته گیاه است. باززایی گیاهان به‌وسیله کشت سلول‌های تمایز نیافته در محیط شیشه دلیل واضحی از تمایز یابی سلول‌های گیاهی است که در پاسخ به سیگنال‌های محیطی خاص اتفاق می‌افتد (Miguel and Marum, 2011). بدون باززایی گیاه، دوره‌گه کردن پروتوپلاست، مطالعه رشد و تمایز، تولید گیاهانی با اطلاعات ژنتیکی مختلف، کشت بساک و به‌طور کلی همه دستاوردهای مطلوب کشت بافت به نتیجه مطلوب نمی‌رسند (Afshari Pour, 1993).

گیاه تنباکو به‌عنوان یک گیاه مدل مورد توجه بسیاری از پژوهشگران است. باززایی گیاه از برگ تنباکو در گزارش‌های زیادی ارائه شده است. ولی باززایی گیاه از ریشه گیاه تنباکو

استخراج و سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی

۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ به تعداد سه تکرار از هر تیمار وزن شد و با استون ۸۰٪ حجمی در محیطی تاریک و بر روی یخ درون هاون چینی سابیده شد تا در نهایت محلولی یکنواخت به دست آمد. سپس عصاره‌های حاصل در دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس حجم محلول رویی به کمک استون ۸۰٪ در لوله‌های آزمایش به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب محلول‌های به دست آمده با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل AE-UV160 در سه طول موج ۴۷۰، ۶۴۶، ۶۶۳ نانومتر به ترتیب برای کلروفیل a و b و کاروتنوئید قرائت گردید. از استون ۸۰٪ به عنوان بلانک استفاده شد (Lichtenthaler, 1987).

اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم

میزان ۱۰ میلی‌گرم از پودر خشک نمونه‌ها داخل فالكون‌های جداگانه ریخته و ۱۰ میلی‌لیتر محلول سولفوسالسیلیک اسید ۳٪ به هر کدام اضافه گردید. درب فالكون‌ها محکم بسته و به مدت ۲۴ ساعت نمونه‌ها درون یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها از یخچال خارج و با کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف گردید. در نهایت از این محلول برای اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم استفاده شد. جهت رسم منحنی استاندارد سدیم و پتاسیم، محلول‌های استاندارد با غلظت‌های معینی از سدیم و پتاسیم تهیه گردید. بدین صورت که ابتدا یک استوک ۰/۲ مولاری از NaCl تهیه گردید ۱/۱۶۹ گرم NaCl با جرم مولکولی ۵۸/۴۴ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول سولفوسالسیلیک اسید ۳٪ ساخته شد. جهت ساخت محلول‌های استاندارد پتاسیم نیز از استوک ۰/۲ مولاری از نمک KCl استفاده شد (۱/۴۹ گرم از ماده KCl با جرم مولکولی ۷۴/۵۵ گرم، در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول سولفوسالسیلیک اسید ۳٪ حل شد) سپس غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴، ۰/۰۵، ۰/۰۶، ۰/۰۷، ۰/۰۸ میلی‌مولار از استوک اصلی و محلول سولفوسالسیلیک اسید ۳٪ تهیه شد. پس از آماده‌سازی محلول‌های استاندارد، غلظت نمونه‌ها به کمک دستگاه شعله سنج مدل Essex-orning410، Halstead اندازه‌گیری شد و مقدار سدیم و پتاسیم بر حسب میکروگرم بر گرم در بافت خشک گیاه گزارش شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل

۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ به ۰/۱ گرم بافت برگ اضافه شده و سابیده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm 12000 سانتریفیوژ شده و محلول رویی جمع‌آوری گردید. مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر معرف Folin-Ciocalteu (10%) و ۱ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد (w/v) به ۵/۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ها اضافه شد. محلول به خوبی تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. سپس شدت جذب محلول آبی‌رنگ حاصل در ۷۶۵ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر AE-UV160 اندازه‌گیری شد. از گالیک اسید جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد.

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

ابتدا محلول ۲-۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) آماده شد. برای تهیه این محلول ۸ میلی‌گرم ماده DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر الکل ۹۶ درصد حل شد. بعد از آن ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH مخلوط گردید. از محلول ۱ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید در یک میلی‌لیتر اتانول به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس مخلوط واکنش به مدت نیم ساعت در تاریکی قرار گرفت. از محلول DPPH به عنوان بلانک استفاده شد. جذب کنترل (A₀) و نمونه‌ها (A₁) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. سپس درصد ممانعت کنترلی (۱) بر اساس رابطه (۱) محاسبه شد:

$$I = (A_0 - A_1) / A_0 \quad [1]$$

اندازه‌گیری ROS کل

۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ را با ۱ میلی‌لیتر از بافر Tris- HCl 10 میلی‌مولار، (pH=7.2) بر روی یخ و درون هاون سرد سابیده شد. هموژنات به دست آمده را به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل نموده. سپس در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و دور 14000g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و از روشناور به دست آمده برای اندازه‌گیری ROS کل استفاده شد. ۹۰۰ میکرولیتر از هر نمونه را به تعداد حداقل ۳ تکرار به درون تیوب‌های پلاستیکی ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل نموده و به هر کدام از نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱ میلی‌مولار DCFDA حل شده (DMSO) اضافه شد. نمونه‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و ۱۵ دقیقه در دمای محیط و تاریکی انکوبه شدند. سپس فلورسانس نمونه‌ها را به کمک دستگاه

۱ تا ۲ ساعت در شرایط آزمایشگاه به صورت ثابت قرار داده شدند. در این مرحله ۲ فاز تشکیل شد. فاز آلی (صورتی مایل به قرمز) در بالا و فاز آبی (بی‌رنگ و شفاف) که در زیر آن قرار داشت. فاز آلی جهت رنگ سنجی استفاده گردید. مقدار پرولین با دستگاه اسپکتوفتومتر و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از پرولین خالص استفاده گردید.

بررسی تنوعات سوماتیکی توسط RAPD-PCR

جهت بررسی وقوع تنوعات سوماتیک از گیاهان باززایی شده و غیر باززایی استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه Master Cycler ساخت شرکت Eppendorf انجام شد. واکنش RAPD-PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گردید. برای انجام RAPD-PCR از چهار پرایمر زیر استفاده شد:

FPK1-05	5'-ACTTGGCGGCCT-3'
OPAA-20	5'-TTGCCTTCGG-3'
ISSR1	5'-CAACAACAACAACA-3'
ISSR2	5'-CAGCAGCAGCAGCAG

بعد از انجام واکنش PCR محصولات آن بر روی ژل آگار ۱ درصد حاوی ۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید در دستگاه الکتروفورز افقی با اختلاف پتانسیل ۸۰-۱۰۰ ولت به مدت ۱ تا ۱/۵ ساعت الکتروفورز شدند. با استفاده از دستگاه DNA مارکر ۱۰۰۲ bp وزن باندهای محصول PCR مشخص شد. در پایان الکتروفورز باندهای PCR در دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری اکسین به روش HPLC

مقدار یک گرم بافت برگ توزین شد. سپس بافت توزین شده با 5 cc متانول خالص روی یخ و تاریکی ساییده شد. نمونه در دور 10000 rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. با استفاده از سرنگ محلول رویی با فیلتر میلی پور صاف گردید؛ و سپس نمونه حاصل با دستگاه HPLC با شرایط زیر اندازه‌گیری شد: واحد X2 Shimadzu Nexera مانند Pump LC نمونه‌بردار خودکار Sil-30AC (حجم تزریق: ۴۰ ul)، اجاق‌گاز ستونی CTO-20A (۴۲ درجه سانتی‌گراد)، ردیاب UV/VIS SPD-20A (طول موج: ۲۵۹ nm)، حالت ایزوکراتیک است. سرعت جریان: ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه، زمان اجرا: ۸ min، ستون Macherey:C18 (وزن ۵ um Nucleodur C18.4.6/150 Nucleodur IAA، استونیتریل ۴۰، آب ۲۰ (v/v). استاندارد هورمون

اسپکتوفتومتر در طول موج برانگیختگی ۴۸۰ نانومتر و طول موج نشری ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. مقدار فلورسانس نمونه‌ها را به ازای واحد نسبی فلورسانس بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (Mahalingam et al., 2006).

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید

برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء غلظت مالون د آلدئید (MDA) که محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع است، اندازه‌گیری شد. طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت تر برگ به تعداد ۳ تکرار در هر تیمار توزین شد و با ۵ میلی‌لیتر TCA ۰/۰۱ ساییده شد. عصاره حاصل با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در دور 10000 rpm سانتریفیوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ ۴ میلی‌لیتر محلول تری کلرو استیک اسید (TCA) ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیوتوریک (TBA) بود اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب‌گرم حرارت داده شد. سپس بلافاصله بر روی یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دور 10000 rpm سانتریفیوژ شد. سپس شدت جذب این محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد (-AE UV1600). جذب بقیه رنگی‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد. برای محاسبه غلظت مالون د آلدئید از ضریب خاموشی معادل $55000 \text{ M}^{-1}\text{Cm}^{-1}$ استفاده شد.

اندازه‌گیری مقدار پرولین

اندازه‌گیری پرولین با استفاده از روش اصلاح‌شده بیتس و همکاران (Bates et al., 1973) انجام شد. بدین منظور ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی به همراه ۱/۷ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳٪ (w/v) به صورت هموژن درآمد. سپس عصاره‌های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در 20000g سانتریفیوژ شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی به دست آمده ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلایسال و ۱ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در بن ماری حرارت داده شد. در اثر حرارت واکنش بین نین هیدرین و پرولین انجام و ترکیب رنگی شکل گرفت. پس از سرد شدن نمونه‌ها ۲ میلی‌لیتر تولوئن به آن‌ها اضافه شد و سپس به مدت ۲۰ ثانیه به شدت ورتکس گردیدند. پس از این مرحله نمونه‌ها به مدت

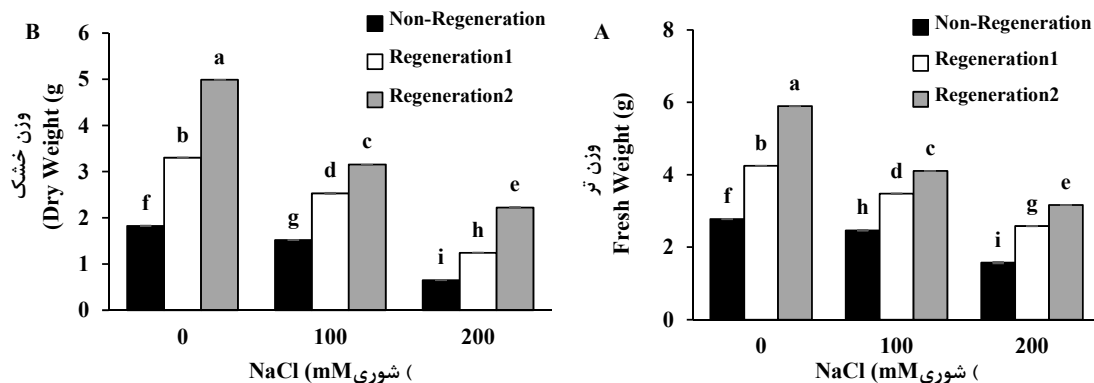
میلی مولار نمک بود که نسبت به گیاه غیرباززایی ۳۹ و ۵۱ درصد افزایش نشان دادند (شکل ۱). رشد به عنوان شاخصی که توسط عوامل داخلی و خارجی متعددی تحت تأثیر قرار می‌گیرد و ابزار مهمی برای ارزیابی بهره‌وری در گیاهان مختلف است (Chaves and Oliveira, 2004). یکی از ویژگی‌های مطلوب جهت بررسی تأثیر تنش شوری در گیاهان عالی، تعیین وزن تر و خشک در گیاه است. روند عمومی گیاهان تحت شرایط تنش، کاهش وزن تر و خشک است (Farooq et al., 2009). همچنین در مطالعات دیگر مشخص شده است تنظیم‌کنندگان رشد گیاه (به‌ویژه سیتوکینین) به‌طور مشخصی تجمع محتوای پروتئین و کربوهیدرات را القاء می‌کنند. این تنظیم‌کنندگان در تولید ماده خشک در فاز رویشی بیشتر فعال هستند. تجمع کربوهیدرات‌ها به علت تیمار سیتوکینین و دیگر هورمون‌های رشد مثل اکسین ممکن است با کارایی دستگاه فتوسنتزی مرتبط باشد که منجر به افزایش تولیدات گیاهی و تولید ماده خشک گیاهی می‌شود (Woodward and Bartel, 2005). اثر افزایشی هورمون‌ها بر روی سنتز DNA, RNA و پروتئین (Azooz et al., 2004) باعث مشارکت در تولید بیوماس در بخش رویشی به‌علاوه میوه‌ها و محتوای آن‌ها می‌شود. به‌علاوه افزایش نفوذپذیری غشای سلولی به‌وسیله هورمون‌ها (Aloni, 2001) و انتقال مواد تثبیت‌شده را تسهیل می‌کند (Sharp and Lenoble, 2002).

به مقدار 20 mg/100cc تهیه گردید (از اتانول خالص به‌عنوان حلال IAA استفاده شده است).

نتایج و بحث

اثر تنش شوری بر میزان وزن تر و خشک گیاهان باززایی شده و غیرباززایی

نتایج اندازه‌گیری وزن تر و خشک گیاه *Nicotiana rustica* نشان داد که با افزایش غلظت نمک وزن تر و خشک گیاه غیرباززایی شده نسبت به گیاه شاهد (بدون تیمار نمک) در غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک NaCl کاهش معنی‌داری نشان داد. بیشترین کاهش در وزن تر گیاهان غیرباززایی در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک بود که نسبت به شاهد (بدون تیمار نمک) ۷۴ درصد کاهش یافت. در گیاهان باززایی شده R2 و R1 در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک به ترتیب ۲۷ و ۴۹ درصد افزایش نسبت به گیاهان غیرباززایی نشان دادند. بیشترین افزایش وزن تر در گیاهان باززایی شده در غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک بود که نسبت به گیاه غیرباززایی شده (NR) به ترتیب ۲۹ و ۳۹ درصد افزایش یافت. وزن خشک گیاهان غیرباززایی نیز با افزایش نمک کاهش یافت که بیشترین کاهش در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک بود که نسبت به شاهد (بدون تیمار نمک) کاهش چشمگیری مشاهده شد. بیشترین افزایش وزن خشک تحت تیمار نمک در گیاهان باززایی شده R1 و R2 در غلظت ۱۰۰



شکل ۱. اثر شوری بر وزن تر (A) و خشک (B) گیاهچه‌های غیرباززایی و باززایی شده تنباکو. داده‌ها بر اساس میانگین سه تکرار. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) است.

Fig. 1. Effect of salinity on wet (A) and dry weight (B) The data are based on the average of three. Similar letters indicate not significant based on Duncan's test ($P \leq 0.05$).

سوماکلونال می‌تواند دلیلی برای افزایش وزن تر و خشک در این گیاهان باشد.

اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم

همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود با افزایش غلظت نمک در محیط کشت مقدار سدیم نیز افزایش می‌یابد. در شرایط بدون شوری تفاوت معنی‌داری در غلظت‌های مختلف سدیم بین گیاهان باززایی شده و غیرباززایی مشاهده نشد. در غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک کاهش معنی‌داری در گیاهان باززایی شده نسبت به غیرباززایی مشاهده شد. که این کاهش در گیاهان باززایی شده R1 و R2 نسبت به غیرباززایی (NR) به ترتیب ۵۰ و ۶۰ درصد و در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک به ترتیب ۷۰ و ۸۳ درصد کاهش نشان داد (شکل A۲). مقدار پتاسیم با افزایش غلظت نمک کاهش می‌یابد. در غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک به ترتیب ۱۱ و ۲۱ درصد افزایش معنی‌داری در مقدار پتاسیم گیاهان باززایی شده R1 و R2 نسبت به گیاهان غیرباززایی مشاهده شد و در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک نیز میزان پتاسیم گیاهان باززایی شده R1 و R2 نسبت به گیاهان غیرباززایی به ترتیب ۱۴ و ۲۵ درصد افزایش نشان دادند (شکل ۲). مطابق نتایج به‌دست‌آمده افزایش غلظت NaCl میزان سدیم را افزایش و پتاسیم را کاهش می‌دهد. این تغییرات با افزایش جذب و تجمع یون‌های سمی مثل سدیم و کلر طی تنش شوری مرتبط است (Dogan, 2011). توجه به اینکه اکسین روی کانال‌های یونی اثر گذاشته و باعث جذب پتاسیم بیشتر در محیط نمکی یا عدم خروج پتاسیم می‌شود به نظر می‌رسد احتمالاً افزایش میزان اکسین موجب افزایش فعالیت سیمپورت H^+/K^+ شده و در نتیجه انتقال پتاسیم به داخل سلول بیشتر شده باشد (Sharp and Lenoble, 2002). بر طبق تئوری رشد اسیدی، اسیدی شدن به‌واسطه اکسین، برای افزایش توسعه دیواره سلولی ضروری است (Singh et al., 1987). در این تحقیق مشخص شده که تحت تنش شوری میزان پتاسیم نسبت به سدیم در گیاهان باززایی شده نسبت به گیاهان غیر باززایی شده افزایش داشته است. در پژوهش حاضر با توجه به داده‌های حاصل از اندازه‌گیری اکسین گیاهان باززایی شده و غیرباززایی و افزایش اکسین در گیاهان باززایی شده تصور می‌شود این افزایش به دلیل تولید بیشتر هورمون اکسین در گیاهان باززایی شده باشد.

جدول ۱. مقایسه میانگین وزن تر گیاهان باززایی شده و غیرباززایی تحت تنش شوری.

Table 1. Comparison of the average fresh weight of regenerated and non-regenerated plants under salinity stress.

	Salinity (mM)		شوری
	0	100	
گیاه غیر باززایی	2.771 ^f	2.462 ^g	1.591 ⁱ
Non Regeneration			
گیاه باززایی شده لاین ۱	4.242 ^b	3.475 ^d	2.186 ^h
Regeneration1			
گیاه باززایی شده لاین ۲	5.894 ^a	4.103 ^c	3.166 ^e
Regeneration2			

میانگین‌های دارای حرف یا حروف نامشابه معنی‌دار بودن را بر اساس آزمون دانکن نشان می‌دهد.

Means with dissimilar letters or letters show significance based on Duncan's test.

جدول ۲. مقایسه میانگین وزن خشک گیاهان باززایی شده و غیرباززایی تحت تنش شوری.

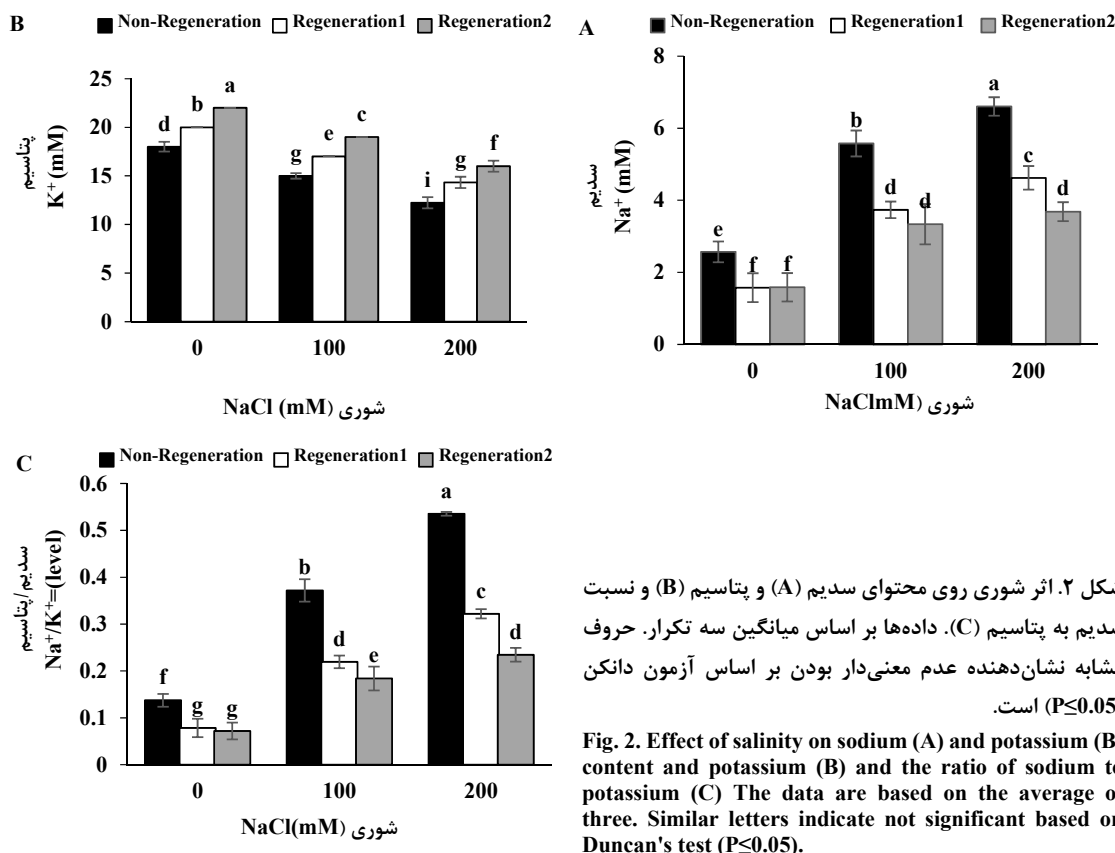
Table 2. Comparison of the average Dry weight of regenerated and non-regenerated plants under salinity stress.

	Salinity (mM)		شوری
	0	100	
گیاه غیر باززایی	1.829 ^f	1.52 ^g	0.649 ⁱ
Non Regeneration			
گیاه باززایی شده لاین ۱	3.3 ^b	2.53 ^d	1.243 ^h
Regeneration1			
گیاه باززایی شده لاین ۲	4.988 ^a	3.154 ^c	2.224 ^e
Regeneration2			

میانگین‌های دارای حرف یا حروف نامشابه معنی‌دار بودن را بر اساس آزمون دانکن نشان می‌دهد.

Means with dissimilar letters or letters show significance based on Duncan's test.

در مطالعه حاضر هورمون اکسین در گیاه اندازه‌گیری شد. از آنجایی که یکی از نقش‌های مهم اکسین افزایش تقسیم سلولی و رشد ناشی از آن است احتمالاً اکسین در گیاهان باززایی شده منجر به افزایش وزن تر و خشک در این گیاهان شده است. در مطالعه حاضر سیتوکینین اندازه‌گیری نشده است؛ و تأثیر سیتوکینین یک احتمال است. برای اثبات تأثیر سیتوکینین باید مطالعه دقیق‌تری در آینده با اندازه‌گیری هورمون سیتوکینین در گیاهان باززایی شده انجام گیرد. همچنین در گیاهان باززایی شده و غیرباززایی وجود تنوعات



شکل ۲. اثر شوری روی محتوای سدیم (A) و پتاسیم (B) و نسبت سدیم به پتاسیم (C). داده‌ها بر اساس میانگین سه تکرار. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن بر اساس آزمون دانکن است. ($P \leq 0.05$).

Fig. 2. Effect of salinity on sodium (A) and potassium (B) content and potassium (B) and the ratio of sodium to potassium (C) The data are based on the average of three. Similar letters indicate not significant based on Duncan's test ($P \leq 0.05$).

افزایش نشان دادند (شکل ۳ B). پژوهشگران بیان کردند که سیتوکینین‌ها نقش مهمی را در تنظیم رشد و نمو گیاه بازی می‌کنند. هورمون سیتوکینین باعث تجمع کلروفیل و تبدیل اتیوپلاست به کلروپلاست و تأخیر پیری برگ می‌شود که این عوامل باعث افزایش فتوسنتز خواهد شد (Alscher et al., 2002). در مطالعه حاضر نیز افزایش مقدار کلروفیل کل و کاروتنوئید در گیاهان باززایی شده نسبت به گیاهان غیر باززایی در تنش شوری مشاهده شد که افزایش کلروفیل در گیاهان باززایی شده احتمالاً به خاطر وجود سیتوکینین در محیط کشت کالوس باشد. همچنین دلیل دیگر می‌تواند وجود سوماکلونال در گیاهان باززایی شده و غیرباززایی باشد.

اندازه‌گیری پرولین

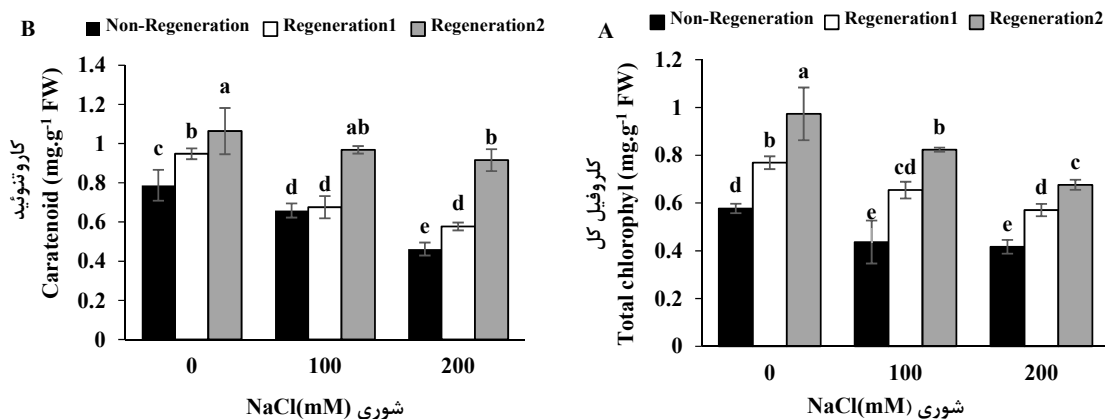
همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است که با افزایش شوری میزان پرولین نیز افزایش می‌یابد. بیشترین افزایش در گیاهان باززایی شده R1 و R2 نسبت به گیاهان غیرباززایی در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک که به ترتیب ۷ و ۴۴ درصد افزایش نشان دادند. در غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک نیز

اندازه‌گیری کلروفیل کل و کاروتنوئید

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است. میزان کلروفیل کل با افزایش شوری کاهش معنی‌داری یافته است. این کاهش در گیاه غیرباززایی نسبت به شاهد به ترتیب در شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار ۳۲ و ۳۸ درصد کاهش یافت. در شرایط بدون شوری میزان کلروفیل کل گیاهان باززایی شده R1 و R2 افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. در شوری ۱۰۰ میلی مولار افزایش معنی‌داری در میزان کلروفیل کل در گیاهان باززایی شده R1 و R2 نسبت به غیر باززایی (NR) به ترتیب ۳۳ و ۴۶ درصد افزایش یافت؛ و در شوری ۲۰۰ میلی مولار نیز R1 و R2 نسبت به NR به ترتیب ۲۶ و ۳۸ درصد افزایش نشان دادند (شکل ۳A). در شرایط بدون شوری و شوری ۱۰۰ میلی مولار میزان کاروتنوئیدها در گیاهان باززایی شده R1 و R2 نسبت به غیر باززایی افزایش معنی‌داری داشت. در شوری ۱۰۰ میلی مولار نمک میزان کاروتنوئید گیاهان باززایی شده R1 و R2 به ترتیب ۲۰ و ۳۱ درصد نسبت به گیاهان غیرباززایی افزایش داشتند و در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک به ترتیب ۲۰ و ۴۹ درصد

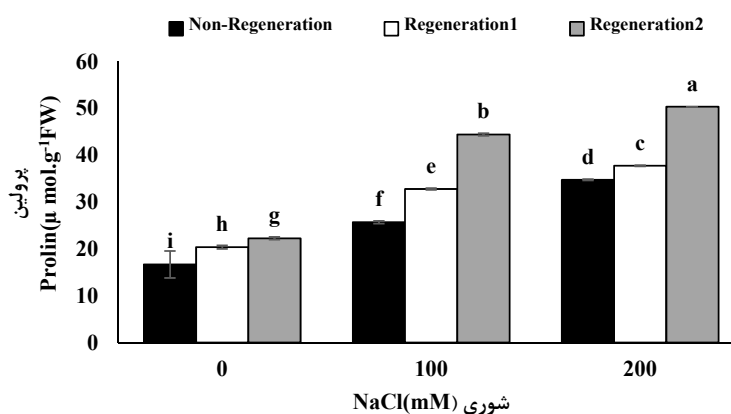
افزایش معنی‌داری در گیاهان باززایی شده R1 و R2 نسبت به گیاهان غیرباززایی مشاهده شد که به ترتیب ۲۱ و ۴۲ درصد افزایش نشان دادند. روش‌هایی برای حفظ تورژسانس در گیاهان تحت تنش شوری به کار گرفته می‌شود که یکی از آن‌ها انباشته شدن پرولین است. پرولین انباشته‌شده در پاسخ به شوری، نقش مهمی در تنظیم اسمزی درون‌سلولی ایفا می‌کند و آنزیم‌ها و پروتئین‌های غشایی را در برابر واسرشتگی حفظ می‌نماید. در پژوهش‌های پیشین اغلب خاصیت اسمولیتی پرولین در گیاهان تحت تنش جهت حفظ تعادل آب بیان شده است (Santoro et al., 1992). افزایش میزان پرولین در حضور

افزایش معنی‌داری در گیاهان باززایی شده R1 و R2 نسبت به گیاهان غیرباززایی مشاهده شد که به ترتیب ۲۱ و ۴۲ درصد افزایش نشان دادند. روش‌هایی برای حفظ تورژسانس در گیاهان تحت تنش شوری به کار گرفته می‌شود که یکی از آن‌ها انباشته شدن پرولین است. پرولین انباشته‌شده در پاسخ به شوری، نقش مهمی در تنظیم اسمزی درون‌سلولی ایفا می‌کند و آنزیم‌ها و پروتئین‌های غشایی را در برابر واسرشتگی حفظ می‌نماید. در پژوهش‌های پیشین اغلب خاصیت اسمولیتی پرولین در گیاهان تحت تنش جهت حفظ تعادل آب بیان شده است (Santoro et al., 1992). افزایش میزان پرولین در حضور



شکل ۳. اثر شوری بر میزان کلروفیل (A) و کاروتنوئید (B). داده‌ها بر اساس میانگین سه تکرار. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) است.

Fig. 3. Effect of salinity on chlorophyll content (A) and carotenoid (B). The data are based on the average of three. Similar letters indicate not significant based on Duncan's test ($P \leq 0.05$).



شکل ۴. اثر شوری بر میزان پرولین. داده‌ها بر اساس میانگین سه تکرار. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) است.

Fig. 4. Effect of salinity on proline content. The data are based on the average of three. Similar letters indicate not significant based on Duncan's test ($P \leq 0.05$).

باززایی شده R1 و R2 کاهش معنی‌داری در میزان MDA در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک نسبت به گیاهان غیرباززایی نشان دادند که به ترتیب ۲۲ و ۴۳ درصد بود. در غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک گیاهان باززایی R1 و R2 تفاوت معنی‌داری نسبت به هم نشان ندادند اما کاهش معنی‌داری را نسبت به گیاهان غیرباززایی (NR) نشان دادند که این کاهش ۴۱ درصد بود. یکی از آسیب‌های جدی تنش‌های محیطی خسارت به غشاء و رهاسازی یون‌ها از سلول به فضای سلولی است. این پدیده نتیجه تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که منجر به پراکسیداسیون لیپید، نفوذپذیری غشاء و خسارت به سلول می‌شود (Scandalios, 1993). گزارش‌هایی نشان می‌دهد که اکسین می‌تواند مقدار MDA را تا ۴۵٪ کاهش دهد. کاهش MDA به‌عنوان اثرات بیوشیمیایی اکسین است که تاکنون شناخته شده است (Bybord, 2010). در مطالعه حاضر نیز کاهش مقدار MDA در گیاهان باززایی شده نسبت به گیاهان غیرباززایی تحت تنش شوری مشاهده شده است. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری اکسین و افزایش آن در گیاهان باززایی شده شاید دلیلی برای کاهش میزان MDA در گیاهان باززایی شده باشد.

جدول ۳. مقایسه میانگین پرولین گیاهان باززایی شده و غیرباززایی تحت تنش شوری.

Table 3. Comparison of the average Prolin of regenerated and non-regenerated plants under salinity stress

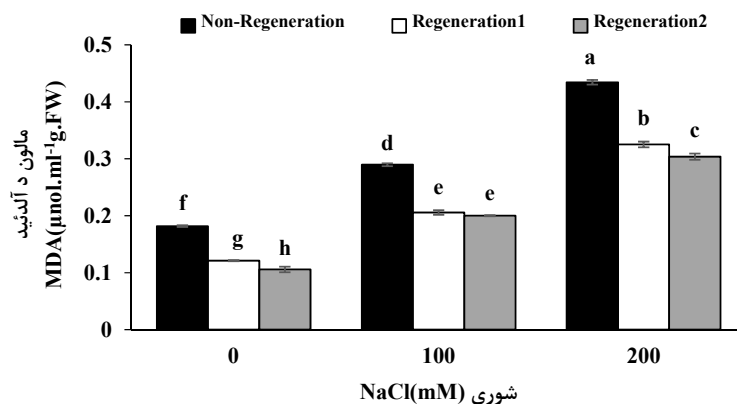
	Salinity		شوری (mM)
	0	100	
	μmol g ⁻¹ fresh tissue		
گیاه غیر باززایی	16.661 ⁱ	25.674 ^f	34.748 ^d
Non Regeneration			
گیاه باززایی شده لاین ۱	20.358 ^h	32.780 ^e	37.739 ^c
Regeneration1			
گیاه باززایی شده لاین ۲	22.24 ^g	44.404 ^b	250.355 ^a
Regeneration2			

میانگین‌های دارای حرف یا حروف نامشابه معنی‌دار بودن را بر اساس آزمون دانکن نشان می‌دهد.

Means with dissimilar letters or letters show significance based on Duncan's test.

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدها (مالون د آلدئید)

همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود. میزان پراکسیداسیون لیپیدها با افزایش تنش شوری افزایش می‌یابد. این افزایش در گیاهان غیر باززایی در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار نسبت به گیاه شاهد (بدون تیمار شوری) به ترتیب ۳۷ و ۵۸ درصد افزایش معنی‌داری را نشان داد. گیاهان



شکل ۵. اثر شوری بر میزان پراکسیداسیون لیپیدها. داده‌ها بر اساس میانگین سه تکرار. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) است.

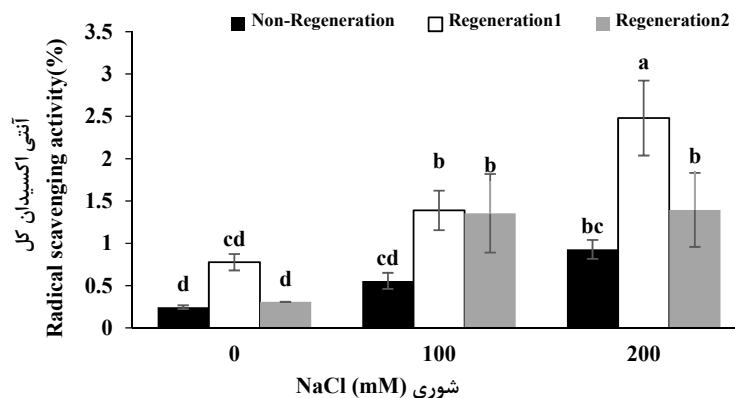
Fig. 5. Effect of salinity on lipid peroxidation. The data are based on the average of three. Similar letters indicate not significant based on Duncan's test ($P \leq 0.05$).

مولار نمک نسبت به شاهد (بدون تیمار شوری) ۷۶ درصد افزایش نشان داد. گیاهان باززایی شده R1 و R2 در غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک افزایش معنی‌داری را نسبت به گیاهان

اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدانی کل

همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در گیاهان غیرباززایی در غلظت میلی

غیرباززایی نشان دادند که این افزایش ۵۹ درصد بود. همچنین در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک R1 62 درصد (شکل ۶). افزایش معنی‌داری نسبت به NR (غیرباززایی) نشان داد



شکل ۶. اثر شوری بر میزان آنتی‌اکسیداسیون کل. داده‌ها بر اساس میانگین سه تکرار. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) است.

Fig. 6. Effect of salinity on total antioxidants. The data are based on the average of three. Similar letters indicate not significant based on Duncan's test ($P \leq 0.05$).

بود و در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک به ترتیب ۱۷ و ۳۱ درصد کاهش یافتند.

تنش یونی ناشی از شوری ممکن است سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان شود (Alscher et al., 2002). کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان تحت شوری بالا به دلیل افزایش بیش‌ازحد ROS است. ROS توسط فعالیت‌های مختلف متابولیکی مثل اکسیداسیون کلروپلاست‌ها، میتوکندری، پراکسیدازهای دیواره سلولی تولید می‌شود. سم‌زدایی ROS سبب تحمل گیاه نسبت به تنش شوری می‌شود (Alscher et al., 2002). مشاهده شده است که کاربرد سیتوکینین در شرایط تنش خشکی می‌تواند پیری برگ را به‌وسیله جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد به تعویق اندازد (Hansen and Grossmann, 2000) و باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانت ها و جمع‌آوری گونه‌های فعال اکسیژن و نهایتاً کاهش آسیب به غشاء و افزایش پایداری آن می‌شود (Zahir et al., 1997). در مطالعه حاضر احتمالاً وجود اکسین و سیتوکینین در محیط کشت کالوس باعث کاهش ROS کل در گیاهان باززایی شده نسبت به گیاهان شاهد (غیرباززایی) شده است. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری اکسین در گیاهان باززایی شده نسبت به غیرباززایی احتمالاً دلیل دیگری برای کاهش میزان ROS در گیاهان باززایی شده باشد. انباشتگی ترکیبات فنولی

جدول ۴. مقایسه میانگین آنتی‌اکسیدان کل گیاهان باززایی شده و غیرباززایی تحت تنش شوری.

Table 4. Comparison of the average Total antioxidants of regenerated and non-regenerated plants under salinity stress.

	Salinity (mM)		
	0	100	200
Relative percentage of total antioxidants			
گیاه غیر باززایی	0.244 ^d	0.555 ^{cd}	0.927 ^{bc}
Non Regeneration			
گیاه باززایی شده لاین ۱	0.776 ^{cd}	1.388 ^b	2.478 ^a
Regeneration1			
گیاه باززایی شده لاین ۲	0.308 ^d	1.354 ^b	1.395 ^b
Regeneration2			

میانگین‌های دارای حرف یا حروف نامشابه معنی‌دار بودن را بر اساس

آزمون دانکن نشان می‌دهد.

Means with dissimilar letters or letters show significance based on Duncan's test.

اندازه‌گیری ROS کل

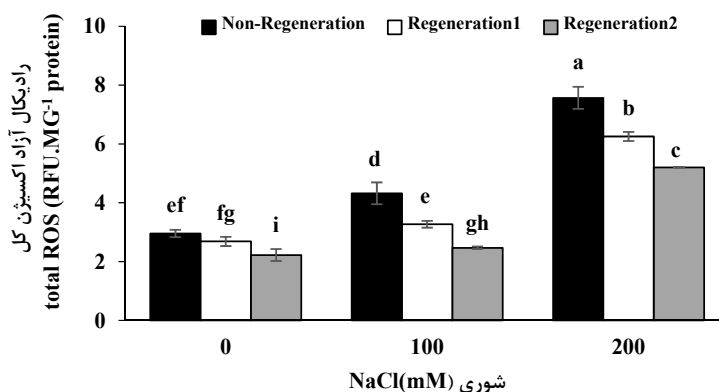
همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، میزان ROS کل با افزایش شوری افزایش می‌یابد. این افزایش در گیاهان غیرباززایی در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک به ترتیب ۳۱ و ۶۰ درصد بود. در گیاهان باززایی شده R1 و R2 کاهش معنی‌داری را در غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک نسبت به گیاهان غیرباززایی نشان دادند که این کاهش ۲۴ و ۷۵ درصد

می‌دهد که تجمع فلاونول ممکن است توسط اکسین به وجود آمده باشد و این متابولیت‌های تخصصی را در مسیرهای رشدی وابسته به هورمون دخیل کنند (Tognetti, 2012). در مطالعه حاضر با توجه به داده‌های حاصل از اندازه‌گیری اکسین و افزایش آن در گیاهان باززایی شده تصور می‌شود افزایش ترکیبات فنلی در گیاهان باززایی شده نسبت به گیاهان غیرباززایی به دلیل وجود اکسین در محیط کشت گیاهان باززایی شده باشد. جوان‌ترین برگ‌ها حاوی بیشترین مقدار اکسین و بیشترین ظرفیت را برای سنتز اکسین دارند (Ljung et al., 2001) و معمولاً از افزایش استرس جلوگیری می‌کنند (Muhlenbock, 2008).

به‌عنوان یک پاسخ دفاعی در برابر تنش زیستی و غیر زیستی تعیین می‌گردد (Alcazar et al., 2006).

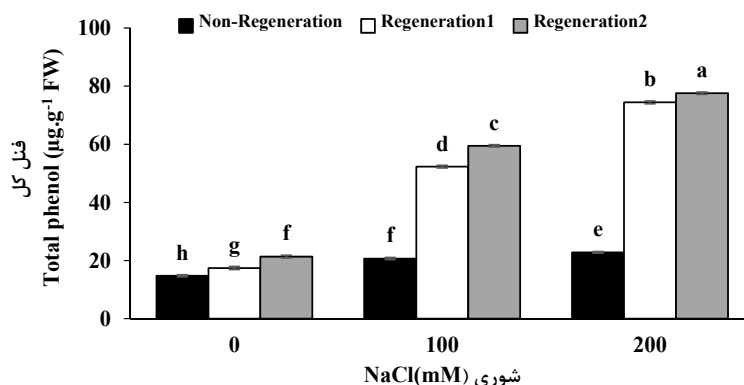
اندازه‌گیری فنل کل

همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود با افزایش شوری میزان فنل کل افزایش می‌یابد. این افزایش در گیاهان باززایی شده R1 و R2 در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک به ترتیب ۶۹ و ۷۰ درصد نسبت به گیاهان غیرباززایی است. همچنین در غلظت میلی مولار نمک ۶۰ و ۶۵ درصد افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان غیرباززایی است. مطالعات قبلی نشان



شکل ۷. اثر شوری بر میزان کل ROS داده‌ها بر اساس میانگین سه تکرار. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) است.

Fig. 7. Effect of salinity on total ROS The data are based on the average of three. Similar letters indicate not significant based on Duncan's test ($P \leq 0.05$)



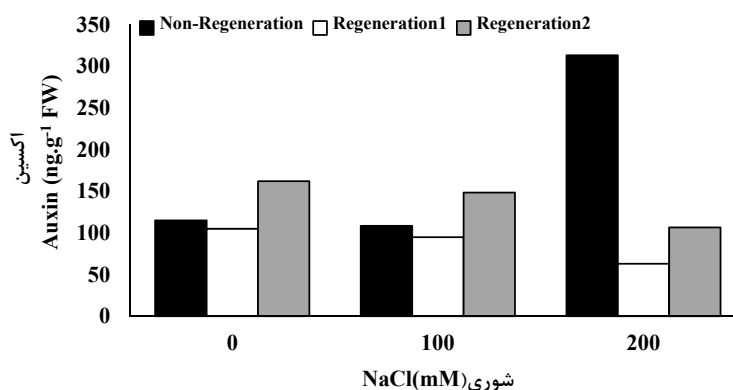
شکل ۸. اثر شوری بر میزان فنل کل. داده‌ها بر اساس میانگین سه تکرار. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) است.

Fig. 8. Effect of salinity on total phenol content The data are based on the average of three. Similar letters indicate not significant based on Duncan's test ($P \leq 0.05$)

اندازه‌گیری اکسین برگ

باززایی شده R2 نسبت به غیرباززایی در مقابل تنش باشد. همچنین در مطالعه حاضر مشخص شد میزان اکسین گیاهان باززایی شده R1 کاهش یافت. پژوهش‌های دیگر به‌وضوح مبین این امر است که هریک از هورمون‌های اکسین و سیتوکینین می‌تواند سطح دیگر را تنظیم کند. به‌طور مثال: گیاهان تنباکویی که تولید بیش از معمول سیتوکینین در آن‌ها القاء شده است، مقدار IAA کمتری داشته‌اند و همچنین تولید IAA زیاد در تنباکو منجر به کاهش مخزن سیتوکینین گیاه می‌شود (Eklof et al., 2000; Palni et al., 1988). در مطالعه حاضر میزان سیتوکینین اندازه‌گیری نشده است. احتمالاً وجود سیتوکینین در محیط کشت گیاهان باززایی شده باعث تأثیر آن در این گیاهان شده است. برای اثبات دقیق تأثیر سیتوکینین باید مطالعات دقیق‌تری در آینده با اندازه‌گیری این هورمون در گیاهان انجام گیرد.

در شکل ۹ مشاهده شد که با افزایش شوری در گیاهان باززایی شده میزان اکسین کاهش می‌یابد. همچنین مشاهده شد که در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک میزان اکسین در گیاهان غیرباززایی نسبت به شاهد (بدون تیمار نمک) ۶۳ درصد افزایش نشان داد. میزان اکسین در غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک در گیاهان باززایی شده R2 نسبت به گیاهان غیرباززایی ۲۷ درصد افزایش یافت. همچنین در گیاهان باززایی شده R2 در غلظت صفر میلی مولار نمک افزایش ۲۸ درصد میزان اکسین نسبت به گیاهان غیرباززایی مشاهده شد. در این پژوهش میزان اکسین گیاهان باززایی شده اندازه‌گیری شد و مشخص شد میزان اکسین گیاه باززایی شده R2 نسبت به غیرباززایی افزایش داشته و شاید دلیلی برای مقاومت گیاه



شکل ۹. اثر شوری بر میزان اکسین برگ گیاهان باززایی شده و غیرباززایی

Fig. 9. Effect of salinity on leaf auxin content of regenerated and non-regenerating plants

ISSR2 و ISSR1) استفاده شد. در بررسی و مقایسه نتایج حاصل از باندهای DNA تکثیرشده برگ گیاه غیرباززایی در مقایسه با گیاهان باززایی شده R1 و R2 با توجه به نتایج حاصل از پرایمر OPAA-20 تفاوت و عدم تفاوت وجود برخی از باندهای حاصل از DNA تکثیرشده محصول PCR دیده شد و در دیگر پرایمرها تفاوتی دیده نشد (شکل ۱۰).

جهت بررسی تنوعات ژنتیکی گیاهان باززایی شده از ریشه تنباکو و غیر باززایی استفاده شد. از میان چهار پرایمر استفاده شده، در نتایج حاصل از پرایمر OPAA-20 تفاوت و عدم وجود برخی از باندهای حاصل از DNA تکثیرشده محصول PCR به‌وضوح دیده شد که نتایج به‌دست‌آمده با

نتایج آنالیز RAPD-PCR

در آزمایش‌های PCR در مجموع از ۴ پرایمر شامل دو پرایمر RAPD (OPAA-20 و FFK1-05) و دو پرایمر ISSR (ISSR2 و ISSR1) استفاده شد. در بررسی و مقایسه نتایج حاصل از باندهای DNA تکثیرشده برگ گیاه غیر باززایی در مقایسه با گیاهان باززایی شده R1 و R2 با توجه به نتایج حاصل از پرایمر OPAA-20 تفاوت و عدم تفاوت وجود برخی از باندهای حاصل از DNA تکثیرشده محصول PCR دیده شد و در دیگر پرایمرها تفاوتی دیده نشد (شکل ۱۰). در آزمایش‌های PCR در مجموع از ۴ پرایمر شامل پرایمر RAPD (OPAA-20 و FFK1-05) و دو پرایمر ISSR

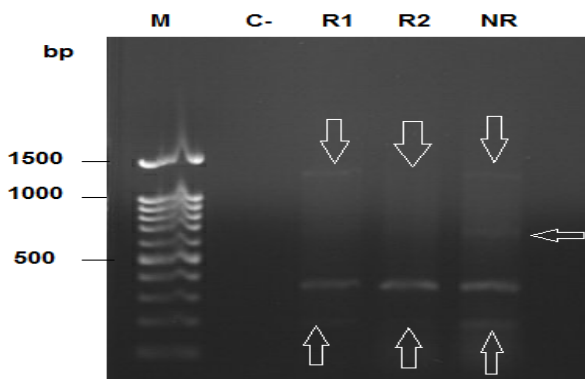
نتیجه‌گیری نهایی

به‌طور کلی از نتایج به‌دست‌آمده چنین استنباط می‌شود که گیاهان باززایی شده هم در شرایط غیر تنش و هم در تنش شوری سبب بهبود شاخص‌های رشد، فیزیکی و بیوشیمیایی نسبت به گیاهان غیر باززایی شدند. همچنین مشخص شد که گیاهان باززایی شده R2 نسبت به گیاهان باززایی شده R1 و گیاهان غیر باززایی عملکرد بهتری در شرایط تنش شوری داشتند. همچنین وقوع تنوعات سوماکلونال بین گیاهان باززایی شده و غیر باززایی مشخص شده است.

قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه اصفهان و قطب آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی تشکر می‌نمایند.

پژوهش‌هایی که در زمینه وقوع تنوع سوماتیکی در گیاهان باززایی شده انجام پذیرفته مطابقت دارد (Rani and Raina, 2000). در مورد نتایج به‌دست‌آمده نیز این احتمال وجود دارد که این اختلافات می‌تواند در اثر باززایی و ایجاد تنوعات سوماتیکی ایجاد شده باشد. مشابه این موارد در کشف افزایش متیلاسیون DNA در برنج (Rani and Raina, 2000) به‌دست‌آمده است که افزایش متیلاسیون می‌تواند منجر به خاموشی برخی ژن‌ها گردد. به‌رحال ممکن است برخی از تغییرات مشاهده‌شده در فرایند رشد و نمو گیاهان باززایی شده مربوط به تغییرات اپی ژنتیکی و یا فیزیولوژیکی باشد؛ بنابراین اثبات دقیق منشأ این تغییرات نیاز به بررسی‌های دقیق از جمله بررسی الگوی متیلاسیون DNA دارد.



شکل ۱۰. نتایج آنالیز RAPD-PCR (پرایمر OPAA-20) در گیاهان باززایی شده و غیر باززایی M: مارکر، C-: کنترل منفی، R1: گیاه باززایی شده لاین ۱ (Regeneration1)، R2: گیاه باززایی شده لاین ۲ (Regeneration2)، NR: گیاه غیر باززایی شده (Non-Regeneration). فلش نمایانگر باندهای تغییر یافته است.

Fig. 10. Results of RAPD-PCR analysis (OPAA-20 primer) in regenerated and non-regenerated plants: Marker, C: Negative Control, R1: Regeneration Plant Line 1 (Regeneration1), R2: Regeneration plant 2, NR: Non-regeneration plant. The arrow indicates modified bands

منابع

- Afshari Pour, S., 1993. Basics of plant tissue culture. Vice Chancellor for Research, Isfahan University of Medical Sciences, 247 pages. [In Persian].
- Aeturi, M.J. Aulicino, M.B. Collado, M.B., Molina, M.C., 2009. Evaluation salinity tolerance at seedling stage in maize (*Zea mays* L.). Maize Genetics Cooperation Newsletter. 83, 1-4.
- Azooz, M.M., Shaddad, M.A., Abdel-Latef, A.A., 2004. Leaf growth and K^+/Na^+ ratio as an indication of the salt tolerance of three sorghum cultivars grown under salinity stress and IAA treatment. Acta Agronomica Hungarica. 52, 287-296.
- Aloni, R., 2001. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. Journal of Plant Growth Regulation. 20, 22-34.
- Alscher, R.G., Erturk, N. Health, L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling

- oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53, 1331-1341.
- Alcazar, R., Marco, F., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P. Altabella, T., 2006. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters*. 28, 1867-1876.
- Bates, L.S, Waldren, R.P, Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 39, 205-207.
- Bybordi, A., 2010. The influence of salt stress on seed germination, growth and yield of canola cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Chj-Napoca*. 38, 128-133.
- Chaves, M.M., Oliveira, M.M., 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*. 55, 2365-2384.
- Dogan, M., 2011. Antioxidative and proline potentials as a protective mechanism in soybean plants under salinity stress. *African Journal of Biotechnology*. 10, 5972-5978.
- Ehsanpour, A.A., Amini, F., 2002. *Plant Tissue Culture*. Edition 2, Isfahan University Jihad Publications. 181 pages. [In Persian].
- Eklof, S., Astot, C., Sitbon, F., Moritz, T., Olsson, O., Sandberg, G., 2000. Transgenic tobacco plants co-expressing *Agrobacterium iaa* and *ipt* genes have wild-type hormone levels but display both auxin- and cytokinin-overproducing phenotypes. *The Plant Journal*. 23, 279-284.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D.B.S.M.A., Basra, S.M.A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable Agriculture*. 153-188.
- Hansen, H., Grossmann, K. 2000. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant physiology*. 124, 1437-1448.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148, 350-382.
- Ljung, K., Bhalarao, R.P., Sandberg, G., 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*. 28, 465-474.
- Ludlow, M.M., Muchow, R.C., 1990. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Advances in Agronomy*. 43, 107-153.
- Mahalingam, R., Jambunathan, N., Gunjan, S. K., Faustin, E., Weng, H.U.A., Ayoubi, P., 2006. Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*. 29, 1357-1371.
- Miguel, C., Marum, L., 2011. An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*. 62, 3713-3725.
- Muhlenbock, P., Szechynska-Hebda, M., Plaszczyca, M., Baudo, M., Mateo, A., Mullineaux, P.M., Karpinski, S., 2008. Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 20, 2339-2356.
- Palni, L.M.S., Burch, L., Horgan, R., 1988. The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. *Planta*. 174, 231-234.
- Pencik, A., Simonovik, B., Petersson, S.V., Henykova, E., Simon, S., Greenham, K., Ljung, K., 2013. Regulation of auxin homeostasis and gradients in *Arabidopsis* roots through the formation of the indole-3-acetic acid catabolite 2-oxindole-3-acetic acid. *The Plant Cell*, 25, 3858-3870.
- Rani, V., Raina, S.N., 2000. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: critical reappraisal. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 36, 319-330.
- Sharp, R.E., LeNoble, M.E., 2002. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*. 53, 33-37.
- Singh, R.J., Kollipara, K.P., Hymowitz, T. 1987. Intersubgeneric hybridization of soybeans with a wild perennial species, *Glycine clandestina* Wendl. *Theoretical and Applied Genetics*. 74, 391-396.
- Santos, C.V., 2004. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae*. 103, 93-99.
- Saradhi, P.P., AliaArora, S., Prasad, K.V.S.K., 1995. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV-induced peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 209, 1-5.

- Santoro, M.M., Liu, Y., Khan, S.M., Hou, L.X., Bolen, D.W., 1992. Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry*. 31, 5278-5283.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*. 101, 7-12.
- Sponchiado, B.N., White, J.W., Castillo, J.A., Jones, P.G., 1989. Root growth of four common bean cultivars in relation to drought tolerance in environments with contrasting soil types. *Experimental Agriculture*. 25, 249-257.
- Strader, L.C., Monroe-Augustus, M., Bartel, B., 2008. The IBR5 phosphatase promotes Arabidopsis auxin responses through a novel mechanism distinct from TIR1-mediated repressor degradation. *BMC Plant Biology*. 8, 1-15.
- Tognetti, V.B., Muhlenbock, P.E.R., Van Breusegem, F., 2012. Stress homeostasis-the redox and auxin perspective. *Plant, Cell & Environment*. 35, 321-333.
- Woodward, A.W., Bartel, B., 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*. 95, 707-735.
- Zahir, Z.A., Arshad, M., Azam, M., Hussain, A., 1997. Effect Of an auxin precursor tryptophan and Azotobacter inoculation on yied And chemical composition of potato under fertilized conditions. *Journal of Plant Nutrition*. 20, 745-752.
- Zolman, B.K., Bartel, B., 2004. An Arabidopsis indole-3-butyric acid-response mutant defective in PEROXIN6, an apparent ATPase implicated in peroxisomal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101, 1786-1791.