



بررسی تأثیر شوری روی برخی صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و کشت درون شیشه‌ای گیاه هالوفیت *Salicornia europaea*

علی محمودی^۱ و مریم دانش^۲

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، (نویسنده مسوول: alimahmoudi68@yahoo.com)

۲- دانش‌آموخته دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۱۲

صفحه: ۱۶۱ تا ۱۶۸

چکیده

گیاه سالیکورنیا اروپایی یک گیاه یک ساله و با هالوفیتی بالا از خانواده *Chenopodiaceae* است که به‌عنوان یک گیاه روغنی در کشت با آب دریا مدنظر می‌باشد. این آزمایش با هدف بررسی میزان تحمل شوری و نیز دست‌یابی به تیمار هورمونی بهینه جهت باززایی اندام هوایی انجام شد. بذره‌های گونه *S. europaea* پس از سستشو و ضدعفونی در شرایط کنترل شده نوری و دمایی در پنج سطح شوری صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار با نمک کلرید سدیم در گلدان‌های حاوی خاک استریل و ورمی کمپوست به مدت ۳۰ روز کشت گردیدند و آزمون‌های درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، طول گیاه، وزن تر و خشک گیاه و محتوای آب نسبی انجام شد. برای بررسی کشت درون شیشه‌ای از جوانه نوک ساقه نمونه‌برداری و در محیط پایه MS با غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد BA و NAA در غلظت شوری صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار تحت شرایط کنترل شده آزمایشگاهی کشت گردید و سپس میزان باززایی اندام هوایی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. نتایج نشان داد که شوری بالا در جوانه‌زنی گیاه سالیکورنیا تأثیر کمی دارد و باقی صفات نیز دلالت بر تحمل شوری تا سطوح نسبتاً زیاد داشت و نشان از توانایی بالای گیاه در سازگاری با شوری بود. در کشت درون شیشه‌ای نتایج القا ساقه‌دهی نشان داد اکثر تیمارهای هورمونی به همراه نمک ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به شرایط بدون شوری از رشد و باززایی بهتری بهره‌مند بودند. افزایش هورمون دلیلی بر باززایی بهتر نبود بلکه باید نسبت مناسبی از هورمون‌ها را برای ساقه‌دهی استفاده کرد که در این آزمایش بهترین نسبت ممکن برای ساقه‌دهی ترکیب ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بود که با درصد باززایی ۶۶/۶۷ بیشترین باززایی را به همراه داشت.

واژه‌های کلیدی: باززایی، جوانه‌زنی، سالیکورنیا، شوری، کشت درون شیشه‌ای، محتوای آب نسبی

مقدمه

شوری عامل محدودکننده اصلی مؤثر بر رشد گیاه و بهره‌وری است. شوری بالا و کمبود آب عدم تعادل یون، تنش اسمزی بالا و متعاقب آن تنش‌های ثانویه را به همراه دارد (۲۸). گیاهان نمک دوست به‌عنوان سیستم مدل برای بررسی مکانیسم انطباق با محیط شور مناسب هستند. مکانیسم مولکولی تحمل به شوری در نمک دوست‌ها بطور قابل توجه‌ای بسیار گسترده است و مطالعه مکانیسم مولکولی، بررسی فنی تحمل به تنش غیر زنده را تسهیل می‌کند. گیاه سالیکورنیا اروپایی یک گیاه یک ساله و با هالوفیتی بالا از خانواده *Chenopodiaceae* است که شباهت زیادی به گونه *S. bigelovii* دارد که به‌عنوان یک گیاه روغنی در کشت آبیاری با آب دریا به شمار می‌رود. *S. europaea* به هر حال محدوده گسترش بیشتری نسبت به *S. bigelovii* دارد. این گیاه دارای فواید صنعتی و خوراکی متنوعی می‌باشد. در کشت آبیاری با آب دریا دانه‌های *S. europaea* شامل ۲۸ درصد روغن و ۳۰/۲ درصد پروتئین می‌باشد (۳۲). همچنین همانند *S. bigelovii* درصد بالایی از دانه‌های روغنی در *S. europaea* دارای اسیدهای اشباع نشده می‌باشد (۴۶). نمک‌های موجود در عصاره *Salicornia* حاوی سدیم پایین است و به دلیل دارا بودن عناصر کم مصرف مانند کلسیم، منیزیم و ید که به طور طبیعی در نمک *Salicornia* وجود دارد برای بیماران فشار خون بالا توصیه می‌شود (۷). انعطاف فیزیولوژیکی سالیکورنیا باعث تنوع فنوتیپی آن شده است و

در محیط‌های نامناسب توسعه فراوان یافته است (۱۶). گیاه سالیکورنیا قادر است مستقیماً در خاک حاوی سطح بالایی از شوری جوانه زده و با آب دریا آبیاری گردد و به‌طور طبیعی در سواحل دریا و حاشیه مانداب‌های شور رشد و تکامل یابد (۲۹). گیاه سالیکورنیا نمک موجود در بافت‌های خود را مستقل از نمک محیط تنظیم می‌کند، به طوری که غلظت نمک در شیره این گیاه، مستقل از نمک محیط بوده و با توجه به میزان شوری خاک ممکن است از غلظت نمک در خاک بیشتر یا کمتر باشد (۴۰). برخی پژوهش‌گران به این اعتقاد دارند که گیاه سالیکورنیا از طریق تجمع محلول‌های آلی در سلول‌ها و جوانه‌زنی سریع به مقابله با شوری می‌پردازد (۴۱). البته شوری تنها فاکتور اصلی در تعیین جوانه‌زنی در گیاهان هالوفیت نیست. تعامل میان دما و شوری برای ایجاد شرایط بهینه در تعیین جوانه‌زنی در گیاهان هالوفیت وجود دارد (۲۳). در حال حاضر تکنیک‌های کشت بافت به عنوان ابزاری قوی جهت مطالعه مشکلات اساسی و کاربردی بیولوژی گیاهی در آمده است. علاوه بر آن در سال‌های اخیر این تکنیک‌ها کاربردهای تجاری گسترده‌ای در تکثیر گیاهان مختلف از جمله گیاهان زینتی و دارویی و نیز حذف عوامل بیماری‌زا از گیاهان پیدا نموده است (۵). در کشت بافت از محیط‌هایی مانند B5، DB، MS، MS تغییر یافته، MT، N6، SH، S_z-1، CM و NTH استفاده می‌شود. در محیط کشت از سوکروز به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌شود. این میزان کربن نیز با توجه به اهداف کشت بافت متفاوت است اما میزان

غلظت تیمار شوری اعمال شده روی گیاه سالیکورنیا، برخی از صفات مهم مرتبط با مکانیسم تحمل به شوری پس از ۳۰ روز اعمال تنش بررسی و اندازه‌گیری شد. این صفات شامل خصوصیات مورفولوژیکی (درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، طول گیاه، وزن تر و خشک گیاه) و فیزیولوژیکی (محتوای آب نسبی (RWC)) بود این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت که روش ارزیابی و اندازه‌گیری به شرح زیر می‌باشد. برای اندازه‌گیری درصد جوانه‌زنی از رابطه ۱ استفاده شد (۴۰).

$$PG = \frac{N_i}{N} \times 100 \quad (\text{رابطه ۱})$$

در رابطه ۱، PG = درصد جوانه‌زنی، N_i = تعداد بذرهای جوانه زده در روز n ام (هفتم) و N = تعداد کل بذر است. همچنین برای محاسبه سرعت جوانه‌زنی از رابطه ۲ استفاده شد (۱۱):

$$Vg = \frac{(n_1 t_1 + n_2 t_2 + \dots + n_n t_n)}{N} \quad (\text{رابطه ۲})$$

در رابطه ۲، Vg : سرعت جوانه‌زنی بر حسب تعداد بذر در روز، n_1 = تعداد بذرهای جوانه زده در شمارش اول، n_n : تعداد بذرهای جوانه زده در شمارش n ام، t_1 : زمان شمارش اول (بر حسب روز) و t_n : زمان شمارش n ام (بر حسب روز) است. طول گیاه با استفاده از کولیس دیجیتالی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. وزن تر گیاه سالیکورنیا با ترازوی دیجیتالی حساس^۱ با دقت یک هزارم اندازه‌گیری شد. سپس به‌منظور محاسبه وزن خشک گیاه، ریشه‌ها و اندام هوایی به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. محتوای نسبی آب برگ بر اساس روش ولر و همکاران (۴۳) اندازه‌گیری شد. ابتدا مقدار مشخص نمونه بافت تازه (FW) وزن شد و سپس به مدت چهار ساعت در آب مقطر قرار داده شد پس از پایان این مدت دوباره نمونه وزن شد (TW) سپس نمونه‌ها در پاکت‌هایی درون آون در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند (DW) و با استفاده از آن رابطه ۳ محتوای نسبی آب برگ محاسبه گردید.

$$RWC(\%) = \left[\frac{FW - DW}{TW - DW} \right] \times 100 \quad (\text{رابطه ۳})$$

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. پس از یادداشت‌برداری و اندازه‌گیری صفات، نرمال بودن داده‌ها بررسی و تجزیه واریانس مقدماتی انجام شد و جهت مقایسه میانگین‌ها نیز از روش دانکن در سطح احتمال یک درصد استفاده شد. کلیه تجزیه‌های آماری با نرم‌افزارهای SAS ver 9 و SPSS ver 11.5 صورت گرفت. برای بررسی کشت درون شیشه‌ای جوانه نوک ساقه و گره از گیاه *S. europaea* برش داده شد و با محلول هیپوکلریت سدیم (هیپوکلریت سدیم) دو درصد برای ۱۵ دقیقه استریل و پس از آن ۴-۵ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. برای کشت بافت از محیط پایه MS (۳۱) حاوی آگار هشت درصد (w/v)، سوکروز سه درصد (w/v) و ونکومایسین ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (برای زدودن آلودگی‌های احتمالی باکتریایی از روی

بالای آن در محیط کشت زیان‌آور است (۱۸). گیاهان نمک دوست به دلیل هتروزیگوسیتی و پیچیدگی که در کشت درون شیشه‌ای دارند کشت بافت آنها به خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته است (۴۲). پیش از این، تکثیر آزمایشگاهی *S. europaea* و *S. bigelovii* توسط لی و همکاران (۲۷)، شی و همکاران (۳۸) و نیز جوشی و همکاران (۱۳) مورد مطالعه قرار گرفت، اما ریزازدیادی هالوفیت‌ها در کشت بافت چندان موفق‌آمیز نبوده است. تکثیر آزمایشگاهی *S. bigelovii* با استفاده از کشت نوک ساقه صورت گرفت اما سرعت باززایی بسیار کم بود (۲۷)، با این حال یک روش باززایی از جنین بالغ *S. europaea* توسط شی و همکاران (۳۸) ایجاد شد. کشت بافت هالوفیت آبدار با استفاده از رویان بالغ به دلیل اندازه میکروسکوپی و عدم دسترسی به ریزنمونه در طول سال، امید بخش نبود. ریزازدیادی کارآمد از شورپسند آبدار تاکنون گزارش نشده است ولی توسعه ریزازدیادی سریع و ساده از *S. brachiata* با استفاده از نوک و گره ساقه به‌عنوان ریزنمونه‌ها با موفقیت صورت گرفته است (۱۳). در حالی که گزارش کمی در مورد کشت بافت این گیاه وجود دارد اما وجود بیوپروسپکتین، وجود نمک با عناصر ضروری کم مصرف طبیعی، درصد روغن و دارا بودن منابع ژنی مفید جهت اصلاح گیاهان، این شورپسند را یک نامزد بسیار مناسب و خوب برای اهداف صنعتی معرفی کرده است. همچنین بررسی‌های صورت گرفته در رابطه با پتانسیل تحمل به شوری در گیاهان زراعی نشان می‌دهد هالوفیت‌ها طی سالیان دراز برای سازگاری در اراضی شور تکامل یافته‌اند و توانمندی زیادی جهت رفع نیازهای تغذیه‌ای در محیط‌های با پتانسیل اسمزی بالا دارند که نظر کارشناسان را جهت زراعی نمودن هالوفیت‌ها برانگیخته است.

هدف از تحقیق حاضر دست یافتن به بهترین غلظت شوری ممکن در تکثیر گیاه سالیکورنیا و بررسی وضعیت تکثیر گیاه سالیکورنیا در آن غلظت با بکارگیری ترکیبات هورمونی مناسب، به‌منظور دستیابی به پروتکل بهینه جهت باززایی اندام هوایی در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش بذر گونه *S. europaea* از بانک ژن ملی ایران واقع در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. این تحقیق در آزمایشگاه مرکز سنجش آلودگی و امور آزمایشگاه‌ها و بانک ژن منطقه جنوب کشور در سال ۱۳۹۵ انجام شد. جهت جوانه‌زنی، ابتدا بذرهای در محلول هیپوکلریت سدیم دو درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. بذرهای در آب مقطر استریل شستشو داده شده و سپس در گلدان‌های حاوی خاک استریل و ورمی کمپوست در شرایط کنترل شده نوری (۱۶ ساعت نور در شبانه‌روز با شدت روشنایی ۵۶ میکرومول در ثانیه در متر مربع) و دمایی (۱۸ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب در شب و روز) در پنج سطح شوری صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار با نمک کلرید سدیم (معادل صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دسی‌زیمنس) به مدت ۳۰ روز قرار گرفتند. جهت ارزیابی و شناسایی بهترین

ساعت نور/ تاریکی دوره نوری با چراغ فلورسنت سفید سرد و شدت نور ۳۵ میکرومول در ثانیه در متر مربع به مدت ۲۰ روز نگهداری شدند (۱۴) سپس میزان باززایی گیاه محاسبه گردید.

نمونه‌های گیاهی) در ترکیب با غلظت‌های مختلف بنزیل ۶ آدنین (BA) و اکسین (NAA) (جدول ۱) در دو غلظت مجزا صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl استفاده شد و کشت‌ها تحت شرایط کنترل شده آزمایشگاهی $25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ تحت ۸/۱۶

جدول ۱- محیط‌های کشت گیاهی با غلظت‌های هورمونی متفاوت در دو سطح شوری

شماره	BA	NAA	شماره	BA	NAA
۱	۱	۱	۶	۰	۰/۵
۲	۰/۵	۰	۷	۰	۲
۳	۰/۵	۱	۸	۲	۰
۴	۱	۰/۵	۹	۲	۲
۵	۰/۵	۰	۱۰	۰	۰

محیط کشت گیاهی استفاده شده شامل: نمک‌های کامل محیط کشت MS، ۳۰g/l ساکارز، 400 mg/l ونکومیسین و pH= ۵/۷ در دو سطح شوری صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار بود.

نتایج و بحث

نتیجه تجزیه واریانس نشان داد که بین سطوح مختلف شوری برای صفات محتوای آب نسبی، وزن تر و خشک، طول گیاه، درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد وجود داشت (جدول ۲).

نتایج بررسی مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین طول اندام هوایی مربوط به سطح ۱۰۰ میلی‌مولار بود در صورتی که کمترین مقدار میانگین طول اندام هوایی در سطح ۶۰۰ میلی‌مولار بود (شکل ۱-ا). با افزایش سطح شوری، ارتفاع گیاه کاهش معنی‌داری را نشان داد.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس آزمون درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، طول گیاه، وزن تر و خشک گیاه و محتوای آب نسبی RWC در شرایط تنش شوری

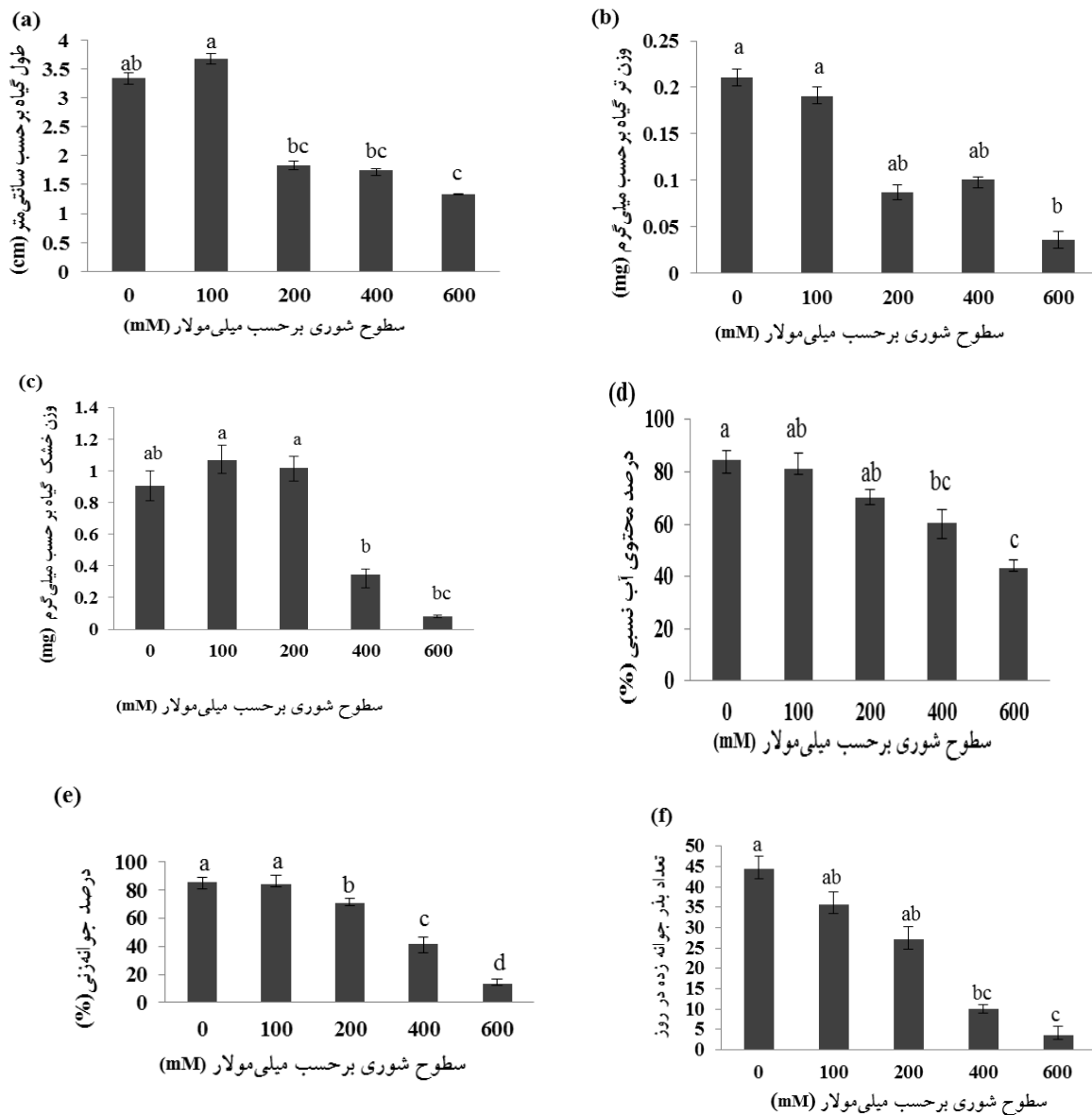
Table 2. Results of variance analysis of germination percentage, germination rate, freshness, plant length, fresh and dry weight of the plant and RWC under salt stress conditions

منابع تغییرات	درجه آزادی	محتوای آب نسبی	وزن تر گیاه	وزن خشک گیاه	طول گیاه	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی
تیمار	۴	۸۴۵/۴۹۰۳**	۰/۴۴۷۲۲*	۰/۰۱۶۳۳۹*	۳/۲۶۶۷*	۲۸۹۲/۱۰**	۸۷۵/۹۳۳۳**
خطای آزمایش	۱۰	۶۸/۵۶۲۵	۰/۰۷۸۲۷۶۸	۰/۰۰۳۰۲۲	۰/۴۴۱۶۶	۱۶/۱۳۳۳	۱۱۰/۰۰

**،*، ns به ترتیب احتمال معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ و غیرمعنی‌دار بودن

هالوفیت بیشترین طول و بهترین پاسخ را به شوری دارد و مناسب‌ترین تیمار جهت درک مکانیسم‌های تحمل شوری در این هالوفیت است (۳۹). کوچک شدن سلول‌ها ممکن است در نتیجه کاهش فشار تورژسانس ناشی از کم شدن محتوای یون‌های سدیم و کلر واکوئل باشد که در اثر کم شدن میزان NaCl اغلب در دیواره سلولی انباشته شده‌اند (۳۵). بیشترین مقدار وزن خشک گیاه سالیکورنیا در سطح صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار بود و بین این دو میزان شوری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. کاهش وزن خشک از تیمار شوری ۲۰۰ میلی‌مولار شروع و تا ۶۰۰ میلی‌مولار به حداکثر خود رسید (شکل ۱-ب). مقایسه میانگین وزن تر گیاه سالیکورنیا، اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف شوری نشان داد، بیشترین مقدار وزن تر مربوط به تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار بود (شکل ۱-ج). آقاله و همکاران (۲) گزارش نمودند که وزن تر دو گونه *S. europaea* و *S. persica* در غلظت شوری ۸۵ و ۱۷۰ میلی‌مولار افزایش قابل توجهی دارد ولی در غلظت‌های بالاتر از آن وزن تر کاهش یافته بود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت.

پارک و همکاران (۳۳) سرعت رشد طول ساقه در *S. europaea* در ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl را بیشتر از مقدار صفر و ۷۰۰ میلی‌مولار NaCl گزارش نمودند. همچنین کاتچینگ و همکاران (۱۵) گزارش نمودند که رشد مطلوب *S. dolichostachya* در شوری ۳۰۰ میلی‌مولار رخ داده و رشد به هنگام افزایش غلظت شوری به ۵۰۰ میلی‌مولار کاهش یافته بود. همچنین نتایج این آزمایش با نتایج آقاله و همکاران (۱) مطابقت داشت؛ آنها گزارش نمودند که رشد ساقه گونه‌های *S. persica* و *S. europaea* تحت غلظت پایین NaCl (۱۰۰ میلی‌مولار) افزایش و سپس با افزایش غلظت NaCl کاهش یافته بود و طول ریشه در هر دو گونه به‌طور پیوسته با افزایش شوری کاهش یافته بود. آیالا و ایوری (۴) نیز گزارش کردند *S. bigelovii* ارتفاع پایین‌تری در سطوح شوری ۵ تا ۲۰۰ میلی‌مولار از خود نشان داد. آن‌ها کاهش رشد گیاه را به اثرات سمی بیش از حد یون‌های پتاسیم، منیزیم و کلسیم توسط ساقه‌ها برای جبران کمبود سدیم نسبت داده‌اند. در گیاه هالوفیت *Aeluropus litoralis* نتایج نشان داد که در سطح شوری ۲۵۰ میلی‌مولار این



شکل ۱- مقایسه میانگین صفات طول گیاه (a)، وزن تر گیاه (b)، وزن خشک گیاه (c)، محتوای آب نسبی (d)، درصد جوانه‌زنی (e) و سرعت جوانه‌زنی (f) در سطوح مختلف شوری در گیاه سالیکورنیا اروپایی

Figure 1. The mean comparison for traits: plant length (a), fresh weight of the plant (b), dry weight of the plant (c), relative water content (d), germination percentage (e) and germination rate (f) in different levels of salinity in *Salicornia europaea*

صفر با اختلاف ناچیزی از تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار بیشترین مقدار آب نسبی در هر سه سطح شوری را به همراه داشت و تیمار ۶۰۰ میلی‌مولار کمترین مقدار آب نسبی را دارا بود (شکل ۱-d). بین تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. خان و همکاران (۲۴) نشان دادند که رشد مطلوب *Salicornia sp* در سطح شوری ۱۷۰ تا ۳۴۰ میلی‌مولار می‌باشد. به نظر می‌رسد که کاهش RWC در تنش شوری با افزایش بالای یون سدیم مرتبط باشد (۴۵). در مشاهدات ما همانند نتایج امیری و همکاران (۳) محتوای آب نسبی تا ۲۰۰ میلی‌مولار شروع به کاهش کرد. محتوای آب نسبی برگ در غلظت متوسط سولفات سدیم کاهش و در

خان و همکاران (۱۹) نیز گزارش کردند که وزن تر مطلوب ساقه گیاه *S. rubra* در غلظت شوری ۲۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد و در غلظت‌های بالاتر از این مقدار کاهش رشد مشاهده گردید. با توجه به مشاهدات کنگ و ژنگ (۲۶) وزن تر و خشک *S. bigelovii* به‌طور معنی‌داری به حداکثر خود با افزایش شوری تا میزان ۲۰۰ میلی‌مولار رسید. در کل تقریباً، با توجه به نتایج مقایسه میانگین در صفت وزن تر و خشک گیاه سالیکورنیا اختلاف زیادی در بین تیمارها مشاهده شد، بدین گونه که با افزایش سطح شوری وزن تر و خشک گیاه تا حدی افزایش و با افزایش بیشتر از حالت بهینه کاهش را به دنبال داشت. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمار

سالیکورنیا اروپایی نمی‌شود ولی شوری زیاد سرعت و درصد جوانه‌نی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد و باعث کاهش جوانه‌نی گیاه می‌شود. با توجه به گزارش‌های صورت گرفته جوانه‌نی بذرهای هالوفیتی تحت شرایط کاهش استرس شوری به طور مطلوب رخ می‌دهد (۲۳،۲۲،۲۱،۹،۴۱). بذرهای هالوفیت‌ها تا حد زیادی توانایی جوانه‌نی تحت شرایط شوری بسیار بالا را دارند (۲۲). گزارشات خان و وبر (۲۲) نشان دادند که جوانه‌نی گیاه *Salicornia pacifica var. utahensis* در تیمار با آب مقطر از ۵۵ درصد به سه درصد در شوری ۸۶۰ میلی‌مولار کاهش یافت. با توجه به این یافته‌ها و قیاس با گیاه *S. europaea* می‌توان اظهار داشت این گیاه توانایی قرارگیری در دسته گیاهان نسبتاً مقاوم در جوانه‌نی را دارد. بذرهای هالوفیتی توانایی حفظ حیات خود در معرض شوری بالا در طولانی مدت را دارند و هنگام کاهش سطح شوری شروع به جوانه‌نی می‌کنند (۲۲،۲۱،۱۷،۹،۱۲،۲۲). کایففر ونگر (۱۷) بذرهای پنج هالوفیت (*Atriplex prostrata*، *Salicornia europaea*، *Hordeum jubatum* و *Spergularia marina*) را در معرض یک دوره طولانی‌مدت شوری قرار دادند و پس از انتقال بذور به آب مقطر، پاسخ بهبودی آن‌ها را بررسی کردند. دانه‌های *Hordeum jubatum* پس از دو سال قرار گرفتن در معرض شوری جوانه نزدند؛ دانه‌های *S. Marina* پس از قرار گرفتن در معرض طولانی شوری تحریک شدند. *Atriplex prostrata* کاهش جوانه‌نی را داشت و *S. europaea* و *S. calceoliformis* با قرار گرفتن در معرض شوری تحریک جوانه‌نی آن‌ها نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود.

سطوح شوری بالاتر ۲۰۰ میلی‌مولار افزایش یافت. مطابق نتایج آن‌ها اختلاف معنی‌داری بین سطوح شوری ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار وجود نداشت درحالی‌که در آزمایش حاضر، این عدم معنی‌داری بین سطوح شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد (۳). محتوای آب نسبی و تنظیم فشار اسمزی دو فاکتور مهم در ارتباط با رشد گیاه به حساب می‌آیند (۳۳) که در پی تنش شوری، کاهش جذب آب یکی از سازکارهای تنظیم اسمزی است. از طرف دیگر افزایش تجمع یون‌ها به ویژه سدیم و کلر می‌تواند در کاهش میزان آب نسبی مؤثر باشد (۳۰). در سلول گیاهی حجم آب و میزان مواد محلول در آن، پتانسیل محلول درون سلولی را تعیین می‌کند (۳۷). در کل با توجه به مشاهدات می‌توان نتیجه گرفت افزایش غلظت شوری باعث کاهش ناچیز محتوای آب نسبی در سطوح متوسط شوری در گیاه سالیکورنیا اروپایی می‌گردد. در آزمون درصد جوانه‌نی بیش‌ترین و کم‌ترین کاهش درصد جوانه‌نی به ترتیب مربوط به سطح شوری ۶۰۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار بود به‌طوری‌که دو سطح صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری نداشتند (شکل ۱- e). در صفت سرعت جوانه‌نی بین تیمارهای صفر با ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار و تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ با ۶۰۰ میلی‌مولار اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بین سایر سطح‌های شوری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و بیش‌ترین کاهش سرعت جوانه‌نی مربوط به سطح ۶۰۰ میلی‌مولار بود (شکل ۱- f). شوری از طریق افزایش فشار اسمزی و به دنبال آن کاهش جذب آب توسط بذور و همچنین به دلیل اثرات سمی یون‌های سدیم و کلر، جوانه‌نی بذور را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۴۰). می‌توان نتیجه گرفت که شوری در غلظت‌های متوسط مانع از جوانه‌نی گیاه

جدول ۳- درصد باززایی *S. europaea*، با سطوح ترکیبی تنظیم‌کننده‌های رشد BA و NAA

Table 3. Regeneration percentage of *S. europaea*, with combined levels of growth regulators BA and NAA

تیمار هورمون (میلی گرم در لیتر)		نمک طعام (میلی مولار)	درصد باززایی	نمک طعام (میلی مولار)	درصد باززایی
NAA	BA				
۰	۰	۱۰۰	۰ ^f	۰	۰ ^f
۰/۵	۰/۵	۱۰۰	۶۶/۶۷ ^a	۰	۳۳/۳۳ ^{cde}
۰/۵	۱	۱۰۰	۳۷/۵ ^{bcd}	۰	۱۲/۵ ^{edf}
۰/۵	۲	۱۰۰	۳۳/۳۳ ^{cde}	۰	۱۲/۵ ^{edf}
۱	۰/۵	۱۰۰	۶۲/۵ ^{ab}	۰	۳۷/۵ ^{bcd}
۱	۱	۱۰۰	۵۸/۳۳ ^{abc}	۰	۲۵ ^{def}
۱	۲	۱۰۰	۳۳/۳۳ ^{cde}	۰	۵۴/۱۷ ^{abc}
۲	۰/۵	۱۰۰	۱۲/۵ ^{edf}	۰	۰ ^f
۲	۱	۱۰۰	۱۲/۵ ^{edf}	۰	۱۲/۵ ^{edf}
۲	۲	۱۰۰	۰ ^f	۰	۴/۱۷ ^{ef}

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری باهم ندارند.

هورمونی مشاهده شد و مقایسه میانگین میان هورمون‌ها و غلظت‌های شوری، تأثیر شوری در تکثیر گیاه سالیکورنیا را نشان داد به‌طوری‌که اکثر کشت‌های با غلظت نمک ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به تیمار شاهد (شوری صفر) از رشد و باززایی بهتری بهره‌مند بودند. این آزمایش نشان داد که

باتوجه به تأثیر شوری در صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک مورد مطالعه، اثر تنظیم‌کننده‌های هورمونی رشد در کشت درون شیشه‌ای برای بررسی بهتر اثر شوری روی این گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نتایج بررسی‌های کشت درون شیشه‌ای، القا ساقه‌دهی در اکثر تیمارهای

میلی مولار نمک طعام گزارش شد (۱۳). به‌طور مشابه، افزایش ساقه‌دهی در گیاه هالوفیت *Crithmum maritimum* با هورمون BA و همچنین ترکیب آن با هورمون NAA گزارش شده است (۱۱). NAA با انواع مختلف سیتوکینین منجر به تولید کالوس و متعاقب آن ساقه‌دهی در گیاه شورپسند *Aster tripolium* شد (۴۲). با این حال در بررسی صورت گرفته در رابطه با تأثیر شوری در کشت درون شیشه‌ای گیاه *Gossypium sp* شوری در تمام سطوح کاهش کالوس‌زایی را به همراه داشت (۶). که نشان از تأثیر منفی شوری در کشت درون شیشه‌ای در گیاهان غیرهالوفیت می‌باشد. گیاه سالیکورنیا به دلیل تحمل زیادی که به شوری در این آزمایش نشان داد و نیز به دلیل مزایای صنعتی و خوراکی، کاشت و بهره‌برداری آن در زمین‌های شورخیز و نیز ریزازدیادی آن در روش‌های کشت درون شیشه‌ای می‌تواند توجیه اقتصادی داشته باشد. به هر حال گزارشات زیادی حاکی از ریزازدیادی گیاه سالیکورنیا از جوانه نوک ساقه صورت نگرفته است. با توجه به هدف این پژوهش در دست یافتن به کشت بهینه درون شیشه گیاه سالیکورنیا و نیز انجام پژوهش‌های تکمیلی با آزمایش‌هایی از قبیل به‌کار بردن غلظت‌ها و هورمون‌های متنوع‌تر به همراه بررسی ریشه‌دهی می‌توان یک پروتکل سریع و ساده برای ریزازدیادی معرفی کرد که علاوه بر دارا بودن توجیه اقتصادی در تکثیر این گیاه، این امکان را برای آنالیزهای بیان ژن برای فهم بهتر پاسخ به شوری در سطح مولکولی و نیز جداسازی ژن مقاومت به شوری در پروژهای اصلاحی گیاهان زراعی فراهم آورد.

افزایش هورمون دلیلی بر باززایی بهتر گیاه نمی‌تواند باشد بلکه باید برای رسیدن به ساقه‌دهی بهینه از نسبت و میزان مناسبی از هورمون‌ها استفاده نمود. در این آزمایش بهترین نسبت ممکن برای ساقه‌دهی از تیمارهای مورد آزمایش ترکیب ۱۰۰ میلی مولار (NaCl) + ۰/۵ میلی گرم بر لیتر (BA) + ۰/۵ میلی گرم بر لیتر (NAA) بود که با درصد باززایی ۶۶/۶۷ بیشترین باززایی و تولید ساقه را به همراه داشت و پس از آن ترکیب ۱۰۰ میلی مولار (NaCl) + ۰/۵ میلی گرم بر لیتر (BA) + ۱ میلی گرم بر لیتر (NAA) باززایی نسبتاً بیشتری از مابقی تیمارها برخوردار بود افزایش بیشتر هورمون NAA و BA (بیش از یک میلی گرم در لیتر) باعث کاهش در باززایی ساقه در این آزمایش شد. پاسخ به باززایی بهتر در سطح شوری ۱۰۰ با نتایج جوشی و همکاران (۱۳) نیز مطابقت داشت که ساقه‌دهی بهتر در غلظت‌های مختلف را در گیاه *Salicornia brachiata* گزارش کرده‌اند. افزایش ساقه‌دهی در غلظت‌های مختلف نمک در گیاه *Salicornia europaea* نیز گزارش شده است (۳۸). به هرحال تشکیل شاخساره‌های کوچک جدید در گیاه هالوفیت *C. maritimum* در غلظت‌های NaCl با کاهش مواجه شد ولی ارتفاع ساقه به طرز قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (۱۱). در مطالعات اخیر صورت گرفته در رابطه با بررسی تأثیر دو هورمون Kn و BA در ترکیب با اکسین‌های مختلف از جمله NAA، IAA و 2,4-D، تأثیر بهتر هورمون BA به اثبات رسید و با توجه به نتایج بهترین ترکیب برای اندام‌زایی ۱۳/۳ میکرومول BA + ۵/۳۷ میکرومول NAA به‌همراه ۲۵۰

منابع

1. Aghaleh, M., V.A. Niknam, H.A. Ebrahimzadeh and K.B. Azavi. 2009. Salt stress effects on growth, pigments, proteins and lipid peroxidation in *Salicornia persica* and *S. europaea*. *Biologia Plantarum*, 53(2): 243-248.
2. Aghaleh, M., V.A. Niknam, H.A. Ebrahimzadeh and K.B. Razavi. 2011. Effect of salt stress on physiological and antioxidative responses in two species of *Salicornia* *S. persica* and *S. europaea*. *Acta Physiologicae Plantarum*, 33(4): 1261-1270.
3. Amiri, B., M.H. Assareh, M. Jafari, B. Rasuoli, H. Arzani and A.A. Jafari. 2010. Effect of salinity on growth, ion content and water status of glasswort (*Salicornia herbacea* L.). *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 8(1): 79-87.
4. Ayala, F. and J.W. O'Leary. 1995. Growth and physiology of *Salicornia bigelovii* Torr. At suboptimal salinity. *International Journal of Plant Sciences*, 156(2): 197-205.
5. Bond, J.E. and M.L. Roose. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Reports*, 18(3-4): 229-234.
6. Ghasemi Bezdi, K. and B. Aidin. 2012. Study of callus formation and salinity tolerance in different explants of Cotton (*Gossypium sp.*) cultivars in vitro. *Journal of Crop Breeding*, 4(102): 94-108 (In Persian).
7. Ghosh, P.K., M.P. Reddy, J.B. Pandya, J.S. Patolia, S.M. Vaghela, M.R. Gandhi, R.J. Sanghvi V.G.S. Kumar and M.T. Shah. 2005. Preparation of nutrient rich salt of plant origin. US patent No, 6: 929-809.
8. Glenn, E., W.O. Leary and W. Carolyn. 1991. *Salicornia bigelovii* Torr: an oilseed halophyte for seawater irrigation. *Science*, 251: 1065-1067.
9. Gul, B. and D.J. Weber. 1999. Effect of salinity, light, and thermo period on the seed germination of *Allenrolfea occidentalis*. *Canadian Journal of Botany*, 77(2): 240-246.
10. Gregorio, B.G., D. Senadhira and R.D. Mendza. 1997. Screening rice for salinity tolerance. *Manuals of plant breeding. Genetics and Biochemistry division, IRRRI discussion paper series*, 22: 1-30.
11. Grigoriadou, K. and E. Maloupa. 2008. Micro propagation and salt tolerance of invitro grown *Crithmum maritimum* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 94: 209-217.
12. Hogan, W.C. 1968. The effect of salinity on the germination and the growth of two halophytes. M.S. Thesis, Ohio University, 38 pp.
13. Joshi, M., A. Mishra and B. Jha. 2012. NaCl plays a key role for in vitro micro propagation of *Salicornia brachiata*, an extreme halophyte. *Industrial Crops and Products*, 35: 313-316.
14. Joshi, M., A. Mishra and B. Jha. 2011. Efficient genetic transformation of *Jatropha curcas* L. by microprojectile bombardment using embryo axes. *Industrial Crops and Products journal*, 33(1): 67-77.
15. Katschnig, D., R. Broekman and J. Rozema. 2012. Salt tolerance in the halophyte *Salicornia dolichostachya* Moss: growth, morphology and physiology. *Environmental and Experimental Botany*, 92: 32-42.

16. Kadereit, G., P. Ball, S. Beer, L. Mucina, D. Sokoloff, P. Teege, A.K. Yaprak and H. Freitag. 2007. A taxonomic nightmare comes true: phylogeny and biogeography of glassworts (*Salicornia* L., *Chenopodiaceae*). *International Bureau for Plant Taxonomy and Nomenclature*, 56(4): 1143-1170.
17. Keiffer, C.W. and I.A. Ungar. 1995. Germination responses of halophyte seeds exposed to prolonged hypersaline conditions. In: Khan, M.A. and Ungar, I.A. (Eds) *Biology of Salt Tolerant Plants*. pp., Department of Botany, University of Karachi, Pakistan, 43-50.
18. Keller, W.A., R. Rajhathy and J. Lacapra. 1975. In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 17(4): 655-666.
19. Khan, M.A., B. Gul and D.J. Weber. 2001. Effect of salinity on the growth and ion content of *Salicornia rubra*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32: 2965-2977.
20. Khan, M.A. and I.A. Ungar. 1996. Influence of salinity and temperature on the germination of *Haloxylon recurvum*. *Annals of Botany*, 78(5): 547-551.
21. Khan, M.A. and I.A. Ungar. 1997. Germination responses of the subtropical annual halophyte *Zygophyllum simplex*. *Seed Science and Technology*, 25: 83-91.
22. Khan, M.A. and B. Gul. 1998. High salt tolerance in germinating dimorphic seeds of *Arthrocnemum indicum*. *International Journal of Plant Science*, 159(5): 826-832.
23. Khan, M.A. and I.A. Ungar. 1998. Germination of salt tolerant shrub *Suaeda fruticosa* from Pakistan: Salinity and temperature responses. *Seed Science and Technology*, 26: 657-667.
24. Khan, M.A., A.I. Unger and A.M. Showalter. 2000. The effect of salinity on the growth, water status, and ion content of a leaf succulent perennial halophyte, *Suaeda fruticosa* (L) Forssk. *Journal of Arid Environments*, 45(1): 73-84.
25. Khan, M. and D. Weber. 1986. Factors influencing seed germination in *Salicornia pacifica* var. *utahensis*. *American Journal Botany*, 73(8): 1163-1167.
26. Kong, Y. and Z. Youbin. 2014. Potential of Producing *Salicornia bigelovii* hydroponically as a Vegetable at Moderate NaCl Salinity. *American Society for Horticultural Science*, 49(9):1154-1157.
27. Lee, C.W., E.P. Glenn and J.W. O'Leary. 1992. In vitro propagation of *Salicornia bigelovii* by shoot-tip cultures. *HortScience*, 27(5): 472.
28. Li, Y., Y. Zhang, F. Feng, D. Liang, L. Cheng, F. Ma and S. Shi. 2010. Overexpression of a *Malus* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene (*MdNHX1*) in apple rootstock M.26 and its influence on salt tolerance. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 102(3): 337-345.
29. Loveland, D. and L. Ungar. 1983. The effect of nitrogen fertilization on the production of halophytes in an inland salt marsh. *American Midland Naturalist*, 109(3): 346-354.
30. Munns, R., R.A. James and A. Läuchli. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 57(5): 1025-1043.
31. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479.
32. O'Leary, J.W., E.P. Glenn, M.C. Watson. 1985. Agricultural production of halophytes irrigated with seawater. *Plant Soil*, 89(1-3): 311-321.
33. Parks, G.E., M.A. Dietrich and K.S. Schumaker. 2002. Increased vacuolar Na⁺/H⁺ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. In response to NaCl. *Journal Experimental Botany*, 53(371): 1055-1065.
34. Park, K.W., J.Y. An, H.J. Lee, D. Son, Y.G. Sohn, C. Kim and J.J. Lee. 2013. The growth and accumulation of osmotic solutes of the halophyte common glasswort (*Salicornia europaea*) under salinity conditions. *Journal of Aquatic Plant Management*, 51: 103-108.
35. Rozema, J. and H. Schat. 2013. Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. *Environmental and Experimental Botany*, 92: 83-95.
36. Shabala, S. and A. Mackay. 2011. Ion transport in halophytes, In: Turkan, S. (eds.) *plant responses to drought and salinity stress Developments in a Post-Genomic Era*. Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd, London, 151-199 pp.
37. Schonfield, M.P., J.C. Richard, B.P. Carver and N.W. Mornhi. 1988. Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Science*, 28(3): 526-531.
38. Shi, X.L., H.P. Han, W.L. Shi and Y.X. Li. 2006. NaCl and TDZ are two key factors for the improvement of in vitro regeneration rate of *Salicornia europaea* L. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(10): 1185-1189.
39. Shahin Kaleybar, B., G. Nematzadeh, S.H.R. Hashemi, H. Askari and S. Kabirnataj. 2013. Physiological and Genetic Responses of Halophyte *Aeluropus litoralis* to Salinity. *Journal of Crop Breeding*, 5(12): 15-29 (In Persian).
40. Soltani, A., S. Galeshi, F. Zenali and N. Latifi. 2001. Germination seed reserve utilization and growth of *Chicpea* as affected by salinity and seed size. *Seed Sci and Technol*, 30(1): 51-40.
41. Ungar, I.A. 1962. Influence of salinity on seed germination in succulent halophytes. *Ecology*, 3(4): 329-335.
42. Uno, Y., S. Nakao, Y. Yamai, R. Koyama, M. Kanechi and N. Inagaki. 2009. Callus formation, plant regeneration, and transient expression in the halophyte sea aster (*Aster tripolium* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 98(3): 303-309.
43. Voltaire, F., H. Thomas and F. Lelièvre. 1998. Survival and recovery of perennial forage grasses under prolonged Mediterranean drought: I. Growth, death, water relations and solute content in herbage and stubble. *The New Phytologist*, 140(3): 439-449.
44. Watkins, C.B., J.M. Brown and F.J. Dromegoole. 1988. Salt-tolerance of the coastal plant, *Tetragonia trigyna* Banks ET Sol. ex Hook. (Climbing New Zealand spinach). *New Zealand journal of botany*, 26(1): 153-162.
45. Yoshie, S.M. and K. Hideo. 1994. Studies on the mechanism of salt tolerance in *Salicornia europaea*. *Japanese Journal of Crop Science*, 63(3): 518-523.
46. Zhao, K.F. and L.T. Feng. 2001. *Halophyte Resources in China*. Science Press, Beijing, 491-498 pp.

Assessment of Salinity Effects on Some Morphological and Physiological Traits and In Vitro Culture of Halophyte Plant (*Salicornia Europaea*)

Ali Mahmoudi¹ and Maryam Danesh²

1- Graduated M.Sc. Student, Faculty of Agriculture, Guilan University,
(Corresponding Author: alimahmoudi68@yahoo.com)

2- Graduated Ph.D. Student, Faculty of Agriculture, Guilan University
Received: September 20, 2017 Accepted: June 2, 2018

Abstract

Salicornia europaea is a halophytic annual plant of the Chenopodiaceae family, which is considered as an oil plant in marine irrigation. This experiment was conducted to determine the effect of salinity and to reach the best hormonal treatment for shoot regeneration. After washing and sterilization, seeds of *S. europaea* were cultured under controlled light and temperature conditions at five salinity levels consisting of 0, 100, 200, 400 and 600 mM of NaCl in plots including sterilized soil and vermicompost for 30 days. Germination percentage, germination rate, plant height, the fresh and dry weight of the plant, and relative water content were then recorded. For in vitro culture, the shoot-tips were excised and cultivated in Murashige and Skoog medium containing combinations of various plant growth regulators (BA and NAA including 0 and 100 mM salinity levels) under laboratory conditions, and then plant regeneration was investigated. These experiments were performed in a completely randomized design (CRD) with three replicates. The results showed that high salinity exerted a low effect on seedlings of the *Salicornia* and the rest of traits indicated high levels of salinity tolerance and showed plant high ability to adapt to salinity. In tissue culture experiment, the results of shoot induction indicated that the hormonal treatments in combination with 100 mM of NaCl provided the better regeneration than that of non-salinity conditions. Increasing use of the hormone were not given the better regeneration results, but it was needed to use a good proportion of hormone level for shoot regeneration. In the present research, the best possible ratio was the combination of 0.5 mg/l⁻¹ NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 + 100mM NaCl, which resulted in 66.67 regeneration percentage.

Keywords: Germination, In vitro culture, Regeneration, Relative water content, *Salicornia*, salinity