بررسی اثر غلظت یون کلسیم بر سمّیت کلرور سدیم در کشت " درون شیشه " بافت کوتیلدون چغندرقند

A STUDY ON THE EFFECT OF CA ION CONCENTRATION ON NACL TOXICITY IN SUGAR BEET COTYLEDONARY TISSUE IN VITRO CULTURE

نسرین یاوری و پروانه هاشمی

موسسه تحقیقات چغندرقند

چکیده

بافت کوتیلدونی جوانه ۲۱ روزه بذر چغندرقند که در کشت " درون شیشه " باززایی خوبی نشان داده است، در این مطالعه برای بررسی اثر غلظت یون کلسیم بر سمّیت کلرور سدیم استفاده شد. ریز نمونه‌ها در محیط غذایی PGO حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4- D، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاربنی‌سیلین، ۳٪ ساکارز و ۰/۹٪ آگار کشت شد. کلرور سدیم و کلرور کلسیم به ترتیب در ۷ سطح (۳۵۰-۳۰۰-۲۵۰-۲۰۰-۱۵۰-۱۰۰-۰ میلی مول) و ۴ سطح (۱۰-۶-۳-۱ میلی مول) به محیط افزوده شد. آزمایش شامل ۲۸ تیمار، هر یک دارای ۱۵×۴ ریز نمونه بوده است. غلظتهای فزاینده تنش شوری، غلظتهای یون کلسیم و اثر متقابل این دو عامل بر تعداد جوانه باززایی شده، وزن تر و خشک بافت کوتیلدونی تاثیر معنی‌دار (کمتراز ۱٪) داشته است. بالاترین غلظت یون کلسیم (۱۰ میلی مول) با کاهش تاثیر تنش شوری، توانایی باززایی و مقدار ماده خشک بافت را بهبود بخشیده است.

مقدمه

افزایش تدریجی املاح محلول خاک در اکثر اراضی زراعی کشور مشاهده می‌شود که پی‌آمد آن کاهش حاصلخیزی و بهره برداری زراعی است(۱). از این رو علاوه بر اعمال روشهای اصلاحی از طریق مدیریت صحیح خاک و آب، اصلاح ارقام برای تحمل به شوری می‌تواند محدودیت زراعت در زمینهای شور را تاحد زیادی برطرف نماید(۵).

آزمایشهای مرتبط با تعیین میزان تحمل به شوری و بررسی تنوع ژنتیکی در میان لاینها و ارقام زراعی و گونه‌های وحشی چغندرقند نشان داده است که به طور کلی میزان تحمل به شوری در چغندرقند بسیار بالاست اما این میزان در سطوح بسیار بالای نمک در میان لاینهای چغندرقند متفاوت است (۴ و 16).

گیاه چغندرقند *Beta vulgaris L. var Saccharifera* به تیره اسفناج *(Chenopodiaceae)* تعلق دارد(7). گیاهان هالوفیت این تیره در حضور نمک، یونهای سدیم و کلر را به میزان زیاد جذب و در برگهای خود متراکم می‌کنند. این گیاهان از مکانیزم انباشتن یون‌های نمک در اندامهای خود به منظور تطبیق با پتانسیل آبی پایین در خاک استفاده می‌کنند. در این گیاهان اجزاء نمک در واکوئل‌ها جداسازی می‌شود تا سیتوپلاسم و اندامکهای

درونی سلول در مجاورت سطح پایین‌تری از نمک به فعالیت عادی آنزیمی و متابولیک ادامه دهند. در سیتوپلاسم سلول نیز تنظیم اسموزی به وسیله مواد آلی محلول چون ترکیبهای ازتی : گلیسین بتائین و پرولین به اجرا در می‌آید(15).

اغلب گیاهان گلیکوفیت در شرایط شور قادر به تولید مواد آلی برای تنظیم میزان جذب آب به درون سلولها نیستند و در نتیجه با کاهش "ترگر" روبرو می‌شوند. از سوی دیگر تراکم اجزاء نمک دربافت منجر به مسمومیت یونی، اختلال در تغذیه گیاه و آسیب رسانی به آنزیمها و اندامهای درون سلول می‌شود(15).

نقش کلسیم در اتباط با حفظ کنترل تراکم یون‌های نمک در درون بافتها، فعالیت غشاء سلولی و تنظیم تبادل یونی مناسب مطرح می‌شود. این عنصر به عنوان یکی از اجزاء ساختمان لایه میانی دیواره سلولی دارای اهمیت است. کلسیم در ریشه در حال رشد گیاهان به مقدار زیاد یافت می‌شود و نمایانگر آن است که این عنصر به مقدار زیاد در تقسیم سلولی مورد نیاز است. وجود عنصر کلسیم در سلولها موجب می‌شود تا به روش انتخابی عناصر مغذی دیگر را جذب کنند(11).

نقش کلسیم در کنترل جذب سدیم نخستین بار توسط LaHaye and Epstein بر روی گیاه لوبیا، که حساس به شوری است، به اثبات رسیده است. استفاده از این عنصر در سطوح ۳ و ۱۰ میلی مول توانست از جذب زیاد سدیم جلوگیری کند. در تحقیق دیگری Lauchli and Kent توانستند با افزودن ۱۰ میلی مول کلسیم اثر ۲۰۰ میلی مول نمک کلرید سدیم را بر روی پنبه خنثی کنند که در این مورد مکانیزم تاثیر کلسیم در حفظ نسبت مناسب K^+/Na^+ در ریشه عنوان شده است(15). در آزمایشی که بر روی گیاه سورگوم در تنش شوری انجام شده، وجود کلسیم به میزان ۵ میلی مول در محیط رشد حاوی ۲۰۰ میلی مول کلرید سدیم موجب حذف Na^+ از ریشه گیاهان در شرایط تنش شده است. درحالی که در سطوح پایین کلسیم، با کاهش تراکم K^+ در ریشه، تنظیم فرآیند جابه جایی یونهای پتاسیم و سدیم انجام نگرفته است (9).

بسیاری از مکانیزم‌های مرتبط با تحمل شوری در گیاهان در سطح سلولی عمل می‌کند، از این رو می‌توان با قرار دادن سلولها در معرض تماس با عامل موتاژن در غلظتی که به طور عادی همه سلولها را از رشد باز می‌دارد، موتان‌های مورد نظر را شناسایی کرد. سلولی را که بتواند در چنین شرایطی ازدیاد شود، به عنوان یک موتان احتمالی شناخته می‌شود. چنین سلولهایی سپس به گیاه باززایی می‌شوند و می‌تواند مورد مطالعات بعدی قرار گیرند. در سال ۱۹۷۸ به کارگیری شرایط کشت بافت گیاهی برای دستیابی به لاین سلولی مقاوم به مسمومیت NaCl در گیاه یونجه با موفقیت به اجرا در آمد (10). در سال ۱۹۸۰، Nabors و همکاران موفق شدند لاین مقاوم به شوری را در گیاه توتون *(Nicationa tabacum L.)* با استفاده از کشت سوسپانسیون سلولی بدست آورند و در سال ۱۹۸۱ میلادی Smith and Mc Comb، در بررسی اثر نمک تا سطح ۲۵۰ میلی مول بر رشد کالوس چهارگونه گیاهی شامل دو گلیکوفیت و دو هالوفیت، یک همبستگی مثبت بین جوابگویی دو

گلیکوفیت (لوبیا و چغندرقند) و بافت کالوس بدست آمده در کشت بافت مشاهده کردند(19).

در بهره‌گیری از تکنولوژی کشت بافت چغندرقند، مسئله باززایی گیاه کامل، از بافتها به ویژه بافت کالوس، با مشکلاتی روبرو بوده است و از حدود نیمه دهه ۸۰ میلادی بافت برگ، دمبرگ گیاه، کوتیلدون و هیپوکوتیل جوانه بذری به منظور تولید کالوس در شرایط " درون شیشه " در گیاه چغندرقند مورد مطالعه گسترده قرار داشته است (7,14,20). در سال ۱۹۹۰ میلادی، کشت دمبرگ چغندرقند حاصل از کشت " درون شیشه " در بررسی مقاومت به شوری به کار رفته است و گیاهان باززایی شده پس از انتقال به خاک شور مقاوم بودند(12). در همین سال از کشت بافت کوتیلدونی چغندرقند در بررسی غلظت بازدارنده رشد و باززایی برخی از آنتی بیوتیکها به منظور ارزیابی خصوصیت آنها به عنوان ژن مارکر در تولید گیاه ترانسژنیک چغندرقند استفاده شده است (8). در سال ۱۹۹۳ میلادی بافت کوتیلدونی جوانه بذری چغندرقند در ایجاد بافت کالوس باززا و باززایی یکنواخت گیاه معرفی شده است (13).

با توجه به نتایج تحقیقات فوق، استفاده از سیستم کشت بافت در برنامه سلکسیون برای مقاومت به تنش شوری در چغندرقند با جوابگویی مثبت همراه است و علاوه براین باززایی گیاهان یکنواخت از بافت کوتیلدونی این گیاه در پیشرفت برنامه سلکسیون در شرایط " درون شیشه " موثر خواهد بود. نقش کلسیم در کاهش سمّیت تنش شوری در گیاهان باید مورد توجه دقیق قرار گیرد زیر با توجه به نتایج اعلام شده در تحقیقات فوق‌الذکر با تامین این عنصر در محیط رشد گیاه نهایتاً قدرت استقرار و تولید در گیاهان در شرایط تنش شوری افزایش می‌یابد.

این مقاله به مطالعه‌ای که در زمینه مقاومت به عامل تنش (کلرور سدیم) در کشت بافت کوتیلدونی جوانه بذری ۲۱ روزه چغندرقند انجام گرفته اختصاص دارد که طی آن تاثیر غلظت یون کلسیم بر سمیت کلرور سدیم در سطوح مختلف، بااندازه‌گیری میزان باززایی جوانه و تولید ماده خشک مورد بررسی قرار گرفته است.(۶)

مواد و روشها

محلول غذایی PGO دارای ۳٪ ساکارز، ۰/۹٪ آگار و هورمونهای NAA, BA به ترتیب به میزان ۰/۲۵ و ۰/۰۵ میلی‌گرم و آنتی بیوتیک کاربنی سیلین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر حاوی نمک کلرور سدیم در هفت سطح ۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۳۵۰ میلی‌مول و چهار سطح کلسیم ۱، ۳، ۶ و ۱۰ میلی‌مول تهیه شد. محلول‌ها پس از تنظیم pH (pH = 5.9) توسط فیلتر میکرونی در زیر هود استریل، استریلیزه و با حجم مناسب محلول آگار اتوکلاو شده مخلوط و درون پتری دیش، توزیع شد. در تهیه بافت ریز نمونه، از جوانه بذری ۲۱ روزه استفاده شد. با این توضیح که بذور، قبلاً در ظرف پلاستیکی استریل روی محلول غذایی حاوی

آگار کشت شده و در دمای C ۴° تازمان نمونه‌برداری نگهداری شده بود. جوانه‌ها در این مرحله از رشد دارای برگهای اولیه (کوتیلدون) کامل هستند. جوانه در فاصله ۳-۲ میلی متر پایین‌تر از نقطه مریستمی قطع و کوتیلدون‌ها به کمک دوپنس استریل از یکدیگر جدا شد. هریک از قسمتها به عنوان یک ریز نمونه در محیط کشت قرار گرفت.

آزمایش در قالب یک طرح فاکتوریل برای بررسی اثر دو عامل کلرورسدیم و کلررو کلسیم به اجرا در آمد. برای هر سطح نمک و یون کلسیم در هر پتری دیش (اندازه ۹ سانتی‌متر)، ۱۵ ریز نمونه در ۴ تکرار کشت شد. ظروف کشت در شرایط کنترل شده با دمای C ۲۵°، دوره روشنایی ۱۶ ساعت و نور ۲۰۰۰ لوکس نگهداری شد. یادداشت برداریها به صورت هفتگی و به مدت سه هفته ادامه یافت و بروز تغییرات ظاهری دربافت شامل تغییر رنگ، سخت شدن و نکروز یادداشت شد. در پایان آزمایش تعداد کل جوانه باززایی شده در هر تیمار مورد شمارش قرار گرفت. وزن تر و خشک بافت، با توزین بافت در پتری دیش خالی از پیش توزین شده، قبل و پس از حرارت دادن در آون (دمای C ۸۰° به مدت ۲۴ ساعت)، برای هر تیمار تعیین و ثبت و میانگین‌ها برای کلیه صفات اندازه‌گیری شد و با استفاده از آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

طی اجرای آزمایش، علائم ظاهری بروز تنش شوری در بافت ریز نمونه و جوانه‌های باززایی شده یادداشت برداری شد. بافت اولیه به طور کلی تا سطح ۲۵۰ میلی مول کلرور سدیم به رنگ سبز با لکه‌های زرد رنگ و در سطوح بالاتر کلرور سدیم به رنگهای سبز کم رنگ و یا زرد رنگ مشاهده شد. رنگ جوانه‌های باززایی شده در تیمار بدون عامل تنش و در کلیه سطوح کلسیم به طور کامل به رنگ سبز باقی بوده است. با افزایش میزان شوری تا سطح ۲۵۰ میلی مول کلرور سدیم و یک میلی مول کلسیم، جوانه‌های باززایی شده به رنگ زرد سبز مشاهده شد. جوانه‌هایی که در سطوح بعدی باززایی شدند به طور کلی به رنگ کاملاً زرد باقی‌ماندند.

جدول تجزیه واریانس صفات مورد بررسی (جدول شماره ۱) نشان می‌دهد که تاثیر تنش کلرور سدیم، حضور یون کلسیم و اثر متقابل این دو عامل بر روی صفات اندازه‌گیری شده در تعداد جوانه باززایی شده، وزن تر و وزن خشک تیمارها با اطمینان ۹۹٪ تفاوت معنی‌دار ایجاد کرده است.

سخت شدن (ویتریفیکاسیون) بافت ریز نمونه، نخست در سطح ۱۵۰ میلی مول کلرور سدیم و تیمار ۶ میلی مول کلسیم ظاهر و سپس در کلیه سطوح بالاتر مشاهده شد. نکروز شدن بافت اولیه از ۳۰۰ میلی مول نمک کلرور سدیم و بالاتر و در کلیه غلظتهای کلسیم مشاهده شد.

با وجود علائم بروز تنش در بافت اولیه و جوانه‌های باززایی شده، قابلیت باززایی در بافت ریز نمونه تا آخرین غلظت تنش شوری (۳۵۰ میلی مول کلرور سدیم) حفظ شد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱- جدول آنالیزواریانس برای تعداد جوانه‌باززایی شده، وزن تر و وزن خشک‌بافت

Table 1- Analysis of Variance for No.of regenerated shoots ,fresh and dry weight of the tissue.

میانگین مربعات MS			منبع تغییر
وزن خشک Dry Weight(g)	وزن تر Fresh Weight(g)	تعداد جوانه باززائی شده No.Reg.shoots	S.O.V
0.14**	53.114**	451.365**	کلرورسدیم NaCl
0.021**	6.42**	30.576**	یون کلسیم Ca^{++}
0.009**	2.051**	15.750**	کلرورسدیم× یون کلسیم NaCl x Ca^{++}
0.001	0.143	0.594	خطا Error
9.18%	7.25%	8.62%	C.V.

جدول شماره ۲- مقایسه‌اثرسطوح مختلف‌کلرورسدیم‌برتعدادجوانه‌باززایی شده، وزن‌ترو وزن خشک بافت

Table 2- Comparison of the effect of NaCl concentrations No.of regenerated shoots , fresh and dry weight of the tissue (Duncan's test)

میانگین وزن‌خشک mean Dry Weight(g)	میانگین وزن تر mean Fresh Weight(g)	میانگین‌تعداد جوانه باززایی شده mean No.Reg.shoots	تیمار سطوح تیمارکلرورسدیم NaCl(mM)
0.576 a	9.105 a	19.94 a	0
0.574 a	7.992 b	15.88 b	100
0.435 b	5.900 c	11.38 c	150
0.346 c	4.552 d	10.25 d	200
0.319 cd	3.690 e	3.375 e	250
0.281 de	3.239 e	1.500 f	300
0.251 e	2.076 f	0.250 g	350

جدول شماره ۳- مقایسه اثرسطوح مختلف کلسیم برتعداد جوانه باززایی شده ، وزن تر و وزن خشک بافت

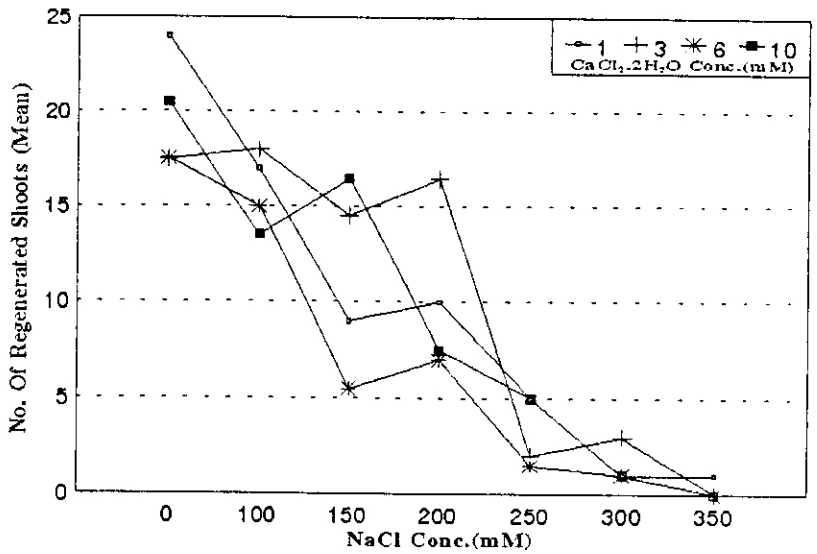
Table 3- Comparison of the effect of Ca ion Concertrations on No.of regenerated shoots, fresh and dry weight of the tissue (Duncan's test)

میانگین وزن خشک mean Dry Weight(g)	میانگین وزن تر mean Fresh Weight(g)	میانگین‌تعدادجوانه باززایی شده mean No.Reg.shoots	تیماریون کلسیم Ca^{++} (mM)
0.433 a	6.078 a	9.571 ab	1
0.391 b	5.206 b	10.21 a	3
0.346 c	4.421 C	6.821 c	6
0.420 ab	5.184 B	9.143 b	10

جدول ۴- مقایسه میانگین تعداد جوانه باززایی شده ، وزن تر و وزن خشک بافت در اثر متقابل کلرورسدیم × یون کلسیم در غلظتهای متفاوت (توسط آزمون دانکن ۱٪)

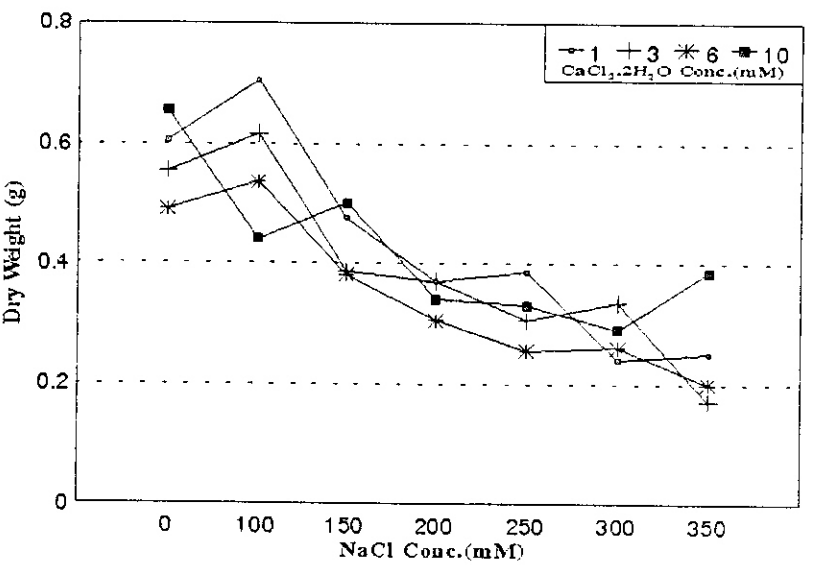
Table 4- Comparison of interaction effect of NaCl x Ca^{++} at different concentrations on No.of regenerated shoots, fresh and dry weight of the tissue at 1% level (duncan's test)

میانگین وزن خشک mean Dry Weight(g)	میانگین وزن تر mean Fresh Weight(g)	میانگین تعداد جوانه باززائی شده mean No.Reg.shoots	کلرورسدیم×کلسیم (mM) $NaClxCa^{++}$
0.605 bc	10.57 a	24.0 a	Ca1 Na0
0.555 cd	8.220 cd	17.50 c	Ca3
0.490 de	7.125 ef	17.57 c	Ca6
0.655 ab	10.51 a	20.50 b	Ca10
0.705 a	9.764 ab	17.00 cd	Ca1 Na100
0.615 abc	9.110 bc	18.00 c	Ca3
0.535 cde	7.515 de	15.00 def	Ca6
0.440 efg	5.580 ghij	13.50 f	Ca10
0.475 def	6.175 fg	9.00 gh	Ca1 Na150
0.385 fgh	5.705 ghi	14.50 ef	Ca3
0.380 fgh	4.625 ijkl	5.50 ij	Ca6
0.500 de	7.095 ef	16.50 cde	Ca10
0.370 gh	5.850 gh	10.00 g	Ca1 Na200
0.370 gh	4.970 hijk	16.50 cde	Ca3
0.305 hi	3.650 lm	7.00 hij	Ca6
0.340 hi	3.740 lm	7.50 hi	Ca10
0.385 fgh	4.530 jkl	5.00 jk	Ca1 Na250
0.305 hi	3.230 mn	2.00 lm	Ca3
0.255 ijk	3.030 mn	1.50 lm	Ca6
0.330 hi	3.970 klm	5.00 jk	Ca10
0.240 ijk	3.250 mn	1.00 lm	Ca1 Na300
0.335 hi	3.730 lm	3.00 kl	Ca3
0.260 ijk	2.925 mn	1.00 lm	Ca6
0.290 hij	3.050 mn	1.00 lm	Ca10
0.250 ijk	2.410 no	1.00 lm	Ca1 Na350
0.170 k	1.475 o	0.00 m	Ca3
0.200 jk	2.075 no	0.00 m	Ca6
0.385 fgh	2.345 no	0.00 m	Ca10



شکل ۱ - اثر متقابل کلرورسدیم × کلرورکلسیم بر میانگین تعداد جوانه باززایی شده

Fig 1- Interaction effect of NaClxCaCl2 on No. of regenerated shoots.



شکل ۲ - اثر متقابل کلرورسدیم × کلرورکلسیم بر میانگین وزن خشک بافت کوتیلدونی چغندرقند

Fig 2- Interaction effect of NaCl and CaCl2 on dry weight of sugar beet cotyledonary tissue.

در جدول شماره ۲ تیمارهای هفت سطح کلرور سدیم از نظر تاثیر بر صفات اندازه‌گیری شده، با استفاده‌از آزمون دانکن (DMRT)[1] در هفت گروه دسته بندی شده است. ملاحظه می‌شود که عامل تنش از سطح صفر تا ۳۵۰ میلی مول به تدریج باعث کاهش تعداد جوانه شده است .

تاثیر این عامل بر وزن تر بافت در تیمارهای ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مول نمک کلرور سدیم یکسان مشاهده می‌شود در حالی که تراکم ماده خشک در سطح ۲۵۰ میلی مول این نمک در گروه بالاتری قرار گرفته است. یک وضعیت معکوس در مقایسه سطوح صفر و ۱۰۰ میلی‌مول کلرور سدیم وجود دارد، به طوری که با وجود تفاوت معنی‌دار وزن تر بافت در این دو تیمار، تولید ماده خشک یکسان است.

در جدول شماره ۳، گروهبندی میانگینها نشان می‌دهد که افزایش یون کلسیم در محیط رشد بافت تاثیر یکنواخت بر صفات اندازه‌گیری شده نداشته است. به این ترتیب که تعداد جوانه باززایی شده در سطح تیمار دوم کلسیم (۳ میلی مول) بالاترین و سطح اول کلسیم (۱ میلی مول) کمترین تعداد بوده است. تیمارهای سطوح ۱۰ و ۶ میلی مول به ترتیب در گروه بعدی قرار گرفته‌اند. وزن تر بافت برای چهار تیمار غلظت کلسیم، به سه گروه دسته بندی می‌شود. به طوری که به ترتیب بالاترین وزن به پایین‌ترین غلظت کلسیم (۱ میلی مول) اختصاص یافته، در حالی که دو سطح ۳ و ۱۰ میلی مول کلسیم در گروه دوم قرار گرفته‌اند و با هم تفاوت معنی‌دار نشان نداده و سطح ۶ میلی مول کلسیم در گروه آخر قرار گرفته است.

از نظر میزان تولید ماده خشک در بافت، همان گونه که در جدول شماره ۳ مشاهده می‌شود سطوح مختلف تیمار کلسیم به چهار گروه تقسیم می‌شود. بالاترین سطح کلسیم (۱۰ میلی مول) با اختلاف کمی بعد از پائین‌ترین سطح کلسیم (۱ میلی مول) قرار گرفته است و با وجود اینکه گروه‌بندی برای وزن تر دو سطح ۳ و ۱۰ میلی مول کلسیم را در یک گروه قرار گرفته، تولید ماده خشک در سطح ۱۰ میلی مول بیشتر بوده است.

گروه‌بندی اثر متقابل دو عامل کلرور سدیم و یون کلسیم در جدول شماره ۴ مشاهده می‌شود. در این گروه‌بندی، ۲۸ تیمار آزمایشی، از نظر تعداد جوانه باززایی شده به ۱۹ گروه، از نظر وزن تر به ۱۹ گروه و از نظر وزن خشک به ۱۶ گروه تقسیم شده‌اند. گروه‌بندی حاصل از اثر متقابل تیمارها، تاثیر حضور غلظتهای مختلف کلسیم را در غلظتهای فزاینده کلرور سدیم به عنوان عامل بالقوه برای کاهش تنش کلرور سدیم نشان می‌دهد. در این گروه‌بندی، تاثیر متفاوت حضور یون کلسیم در درون هر سطح از غلظت عامل تنش قابل ملاحظه است.

در ترکیب سطح صفر کلرور سدیم با سطوح مختلف کلسیم، برای باززایی جوانه، حداقل و حداکثر غلظتهای یون کلسیم بیشترین تاثیر را داشته است. در سطح ۱۵۰ میلی مول کلرور سدیم، سطح ۱۰ میلی مول

1- Duncans Multiple Range Test

کلسیم جوابگویی را به میزان غلظت ۱۰۰ میلی مول کلرور سدیم × ۶ میلی مول کلسیم نزدیکتر کرده است، در حالی که در غلظت ۲۰۰ میلی مول کلرور سدیم، سطح ۳ میلی مول کلسیم‌اثر بهتری نشان داده است (شکل ۱).

با افزایش شوری تا غلظت ۲۵۰ میلی مول، سطوح اول و چهارم کلسیم در یک گروه و سطوح دوم و سوم کلسیم در گروه دیگر قرار گرفته‌اند. در غلظت ۳۰۰ میلی مول کلرور سدیم تعداد جوانه باززایی شده در سطح ۳ میلی مول کلسیم بالاترین و در سه سطح دیگراین عنصر مشابه بوده‌است. درآخرین غلظت کلرور سدیم (۳۵۰ میلی مول) سطح یک میلی مول کلسیم در گروه اول و سه سطح دیگر کلسیم در گروه دوم جای گرفته‌اند.

تعداد گروههای اثرات متقابل غلظتهای متفاوت کلسیم و غلظتهای فزاینده کلرورسدیم در مورد صفات وزن تر و وزن خشک با صفت جوانه زنی اختلاف دارد (جدول شماره ۴). برای وزن تر بافت، ترتیب گروه‌بندی تقریباً مشابه با ترتیب گروه‌بندی صفت تعداد جوانه باززایی شده است، در حالی که تغییرات وزن خشک در تیمارهای هر سطح کلرور سدیم × کلسیم تفاوت بیشتری را نشان می‌دهد. در غلظتهای بالای عامل تنش، در بالاترین غلظت کلسیم (۱۰ میلی مول) مقدار ماده خشک بیشتری تولید شده است (شکل ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق با افزایش یون کلسیم در محیط رشد کشت بافت، علائم ظاهری تنش مانند : زردی، سخت شدن و نکروز شدن بافت‌ها که در اثر عامل تنش شوری یا نمک کلرور سدیم به وجود می‌آید، مشاهده نشده است. حضور کلسیم در غلظتهای متفاوت توانسته است تاثیر تدریجی سمیت کلرور سدیم رابر روی بافت زنده تغییر دهد و در نتیجه تولید ماده خشک را در بافت کشت شده تحت شرایط تنش شوری افزایش دهد.

در این بررسی اثر متقابل غلظتهای فزاینده کلرور سدیم و کلسیم در محیط رشد بافت کوتیلدونی در کشت " درون شیشه"، نتایج یکنواختی را برای صفات اندازه‌گیری شده در هر سطح از غلظتهای فزاینده شوری نشان نداده است، اما به طور کلی از غلظت ۱۵۰ میلی مول کلرور سدیم، افزایش غلظت کلسیم توانسته است تولید ماده خشک بافت را در حد قابل توجهی افزایش دهد.

میزان کاهش ماده خشک در اثر افزایش نمک را می‌توان ناشی از مصرف انرژی برای حفظ "ترگر" و اجتناب از مسمومیت یونی دانست. مطالعه اثر تنش شوری در گیاه یونجه نیز نشان داده است که گیاه در حضور نمک انرژی بیشتری صرف فرآیند تنظیم اسموزی می‌کند تا در برابر از دست رفتن آب بافت‌های خود در محیط شور مقاومت کند. از این رو مصرف انرژی بیشتر موجب کاهش میزان رشد می‌شود و در سطوح بالای نمک با افزایش میزان مصرف انرژی ، کارآیی فتوسنتز در تبدیل قند به ماده خشک کاهش می‌یابد(18).

در سال ۱۹۷۷، Goldner et al. و همکاران در آزمایشی اثر آب دریا، محلولهای مختلف املاح نمک

و مانیتول را، بر میزان رشد و رنگ کالوس هویج حاصل از کشت بافت نشان دادند که محدود شدن رشد اساساً در اثر افزایش فشار اسموزی و از بین رفتن رنگ و بروز بافت نکروزه در نتیجه مسمومیت حاصل از اثر نمک ها بوده است(19). همچنین در سال ۱۹۹۴ میلادی Oritz و همکاران در مطالعه خود بر روی تاثیر کلسیم بر رشد گیاه لوبیادر محیط شور به این نتیجه رسیدند که افزایش یون کلسیم در محیط رشد گیاه لوبیا موجب ادامه رشد گیاه و حفظ آب در برگ گیاه شده است(17).

باتوجه به نتایج تحقیقات یاد شده، اثر مثبت یون کلسیم برمیزان ماده خشک در بافت کوتیلدونی چغندر قند ، در غلظت‌های بالای نمک ، می‌تواند ناشی از نقش مثبت کلسیم در حفظ فعالیت آنزیمی و متابولیک سلول، کنترل فعالیت غشاء سلولی و جلوگیری از مسمومیت حاصل از تراکم بیش از حد اجزاء نمک در درون بافت تلقی شود. در این بررسی، ایجاد جوانه در سطح ۳۵۰ میلی مول نمک حاکی از قدرت مقاومت بافت چغندر قند در تنش شوری است و نتایج این آزمایش بانتایج بدست آمده از تحقیق دیگری که در سال ۱۳۷۱ بر روی تنش شوری برای ازدیاد جوانه چغندر قند در کشت " درون شیشه " اجرا شده است، مطابقت دارد. در تحقیق فوق نیز ازدیاد جوانه از مریستم جانبی تا سطح ۲٪ نمک (۳۵۰ میلی مول) مشاهده شده بود(16).

قابل ذکر است که در سال ۱۹۹۳، Lauchli و Zhong گیاه پنبه را در محیط تنش شوری مطالعه کردند و به نقش مثبت کلسیم در خنثی کردن اثر تنش با برقراری یک نسبت مشخص بین یونهای Na و Ca در محیط رشد گیاه پی بردند(21). به نظر می‌رسد با وجود تحمل پذیری بسیار زیاد به تنش شوری دربافت چغندرقند و نتایج مثبت حضور کلسیم در کاهش تاثیر عامل تنش، نقش این عنصر در محدود نمودن اثر نمک را می‌توان در مطالعات آینده مورد توجه قرار داد که در این صورت اثر متقابل این دو عامل باایجاد نسبت‌های مختلف یونهای Na و Ca باید مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری بی‌دریغ آقای عبدالرسول غفاری مسئول محترم بخش آمار و کامپیوتر موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و کارکنان پر تلاش آن بخش به خاطر اجرای محاسبات آماری و تهیه جداول و شکلها قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱- قبادیان، عطاءالله. سیمای فلات ایران، دانشگاه شهید با هنر کرمان سال ۱۳۶۹.

۲- مصباح، محمود و نسرین یاوری. ۱۳۶۹. مروری بر موقعیت کشت invitro در اصلاح چغندرقند از ابتدا تا سال ۱۹۹۰ میلادی. بازنگری: دکتر پریچهر احمدیان تهرانی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، کرج.

۳- مصباح، محمود. ۱۳۷۰ . بررسی مناسبترین روش ازدیاد غیر جنسی intvitro در ژنوتیپهای مختلف چغندرقند (جنس *Beta*)، پایان نامه فوق لیسانس. گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

۴- مصباح، محمود و نسرین یاوری. ۱۳۷۰. نتایج بررسی میزان تحمل به شوری در لاینهای مختلف چغندرقند در شرایط گلخانه‌ای، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، کرج.

۵- مصباح، محمود، نسرین یاوری و رحیم قلی‌زاده. ۱۳۷۰. خلاصه‌ای از اهمیت، تکنیکها و کارهای انجام شده در ارتباط با ایجاد گیاهان مقاوم به شوری. بازنگری دکتر پریچهر احمدیان تهرانی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند. کرج.

۶- یاوری، نسرین و پروانه هاشمی. ۱۳۷۳. گزارش دوره بیوتکنولوژی و تولید بذر چغندرقند در دانمارک، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، کرج.

7-Atanassov, A.I., 1987. Sugar Beet. In: Handbook of Plant Cell Culture vol.4. (Eds.) Evans, Sharp and Ammirato. Macmillan Publishing Co. pp: 652- 676

8-Catlin Dave W., 1990. The effect of antibiotics on the inhibition of callus induction and plant regeneration from cotyledons of sugar beet *(Beta vulgaris L.)*, Plant cell Reports 9: 285- 288

9-Colmer, T.D., T.W-M Fan, Higashi R.M., and A. Lauchli, 1994. Interactions of Ca2+ and NaCl stress on the ion relations and intracellular pH of Sorghum bicolor root tips: An invivo 3ip- NMR study. Journal of Experimental Botany. vol.45. 277: 1037- 1044

10-Croughan, T.P., Stavarek S.J., and D.W., Rains, 1978. Selection of a NaCl Tolerant Line of Cultured Alfalfa Cells, Crop Science. Vol.18: 959- 963

11-Donhue, R.L., Raymond W.M. and J.C. Shickluna, 1987. Soils- An Introduction to Soils and Plant Growth, Prentice Hall of India, New Delhi, pp: 230- 231

12-Freytag, A.H., S.C., Anand, A.P. Rao- Arelli, and L.D. Owens, 1990. Salt tolerant sugar beet progeny from tissue cultures challenged with multiple salts. Plant Cell Reports 8: 647- 650

13-Jacq, B., T. Tetu, R.S., Sangwan, A. Delaat and B.S. Sangwan- Norreel, 1993. Efficient Production of Uniform Plants from Cotyledon Explants of sugar beet *(Beta vulgaris L.)*, Plant Breeding 110: 185- 191.

14-Krens, F.A. and Jamar, D., 1985. The Role of Explant Source and Culture Condition on Callus Induction and Shoot Regeneration in sugar beet (Beta vulgaris L.), J. Plant Physiol. Vol.134: 651- 655

15-Lauchli, A. and Epstein, E., 1984. Mechanisms of salt tolerance in plants. California Agric. Berkeley, Oct. p. 18.

16-Mesbah, M. N. Yavari and I. Alimoradi, 1992. High Salt Tolerant Shoots of a Monogerm Diploid Sugar Beet Genotype Obtained In vitro. XIII th EUCARPIA Congress, Book of Poster Abstracts. pp: 685- 686

17-Ortiz, A., V., Martinèz and A. Cedra 1994. Effects of osmotic shock and calcium on growth and solute composition of Phaseolus vulgaris plants. Physiologia Plantarum 91: 468- 476

18-Rains, D.W., 1984. Metabolic energy cost for plant cells exposed to salinity. California Agriculture. Berkeley, Oct. p.22

19-Tal. M., 1983. Selection for stress tolerance In: Hand Book of Plant cell Culture. Vol.1. Evans et.al. (Eds) Macmillan Publishing Co. pp: 461- 488

20-Tetu, T., R.S. Sangwan and B.S. Sangwan- Norreel 1987. Hormonal Control of Organogenesis and Somatic Embryogenesis in *Beta vulgaris* Callus. Journal of Experimental Botany. Vol. 38. 188: 506- 517

21-Zhong, H. and Lauchli. A., 1993. Spatial and Temporal Aspects of Growth in the Primary Root of Cotton Seedlings: Effects of Nacl and CaCl2. Journal of Experimental Botany. Vol. 44. 261: 763- 777