

بررسی اثر غلظت‌های مختلف پتاسیم در مقاومت به شوری گیاه لوبیا در کشت بافت

حمزه امیری و دکتر حمید فهیمی
گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران
(دریافت: ۸۰/۳/۱؛ پذیرش: ۸۱/۱۲/۷)

چکیده

اثر غلظت‌های مختلف NaCl و KCl در کشت بافت گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) مورد مطالعه قرار گرفت. در این بررسی از محیط کشت MS با غلظت‌های هورمونی مناسب و از قطعات جدا کشت محور زیر لپه استفاده گردید.

نتایج بدست آمده نشان داد که افزایش غلظت NaCl و KCl دارای اثرات نامطلوبی روی رشد می‌باشند، بطوریکه با افزایش KCl و NaCl در محیط کشت، اندیس کالوس، وزن تر و وزن خشک، نسبت وزن تر به وزن خشک و مقدار پروتئین کل کاهش می‌یابند درحالیکه مقدار پرولین افزایش می‌یابد. این بررسی‌ها نشان داد که در غلظت‌های یکسان اثرات نامطلوب KCl روی رشد بمراتب بیشتر از NaCl می‌باشد.

اندازه‌گیری مقدار عناصر سدیم، پتاسیم و کلسیم نشان داد که با افزایش NaCl و یا KCl در محیط بترتیب مقدار سدیم و پتاسیم در کالوسها افزایش می‌یابد. همچنین بین K^+ و Na^+ در غلظت‌های پائین‌تر اثرات آنتاگونیستی دیده می‌شود. افزایش NaCl در محیط تا ۲۵ میلی‌مولار سبب افزایش کلسیم و بعد از آن سبب کاهش مقدار کلسیم کالوسها می‌گردد. درحالیکه افزایش KCl در محیط کشت تقریباً بطور پیوسته مقدار کلسیم کالوسها را کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: غلظت‌های مختلف پتاسیم، مقاومت به شوری، گیاه لوبیا، بافت

مقدمه

شوری خاک یک مسئله محدودکننده جهانی در تولید محصولات کشاورزی محسوب می‌شود و در حدود ۴۰٪ زمینهای سطح کره زمین بوسیله شوری بالقوه متأثر می‌شوند (Wignarajah, 1990). بطور کلی فراوانی نمکهای محلول در محیط ریشه به دو طریق می‌تواند بر رشد گیاه اثر بگذارد. اولاً، غلظت زیاد یونها ممکن است اثرات سمی داشته باشند و ثانیاً وجود املاح اضافی در محیط پتانسیل آب در محیط کشت را کاهش داده و جذب آب توسط ریشه گیاه را با مشکل مواجه می‌کند (Cachorro *et al.*, 1993).

واکنش گیاهان مختلف نسبت به شوری متفاوت است بعنوان مثال چغندر قند و اسفناج جزء مقاوم‌ترین و پیاز و نخود از جمله حساس‌ترین گیاهان زراعی نسبت به شوری هستند. لوبیا نیز جزء گیاهان حساس به شوری بوده و با توجه به نقش ارزنده این گیاه در تغذیه انسان و دام، تحقیقات فراوانی در مورد چگونگی مقاومت این گیاه به شوری در شرایط مختلف صورت گرفته است (Botella, 1997; Cachorro *et al.*, 1993; Ismail, 1996; Lowry *et al.*, 1951). (Marschner, 1989; Murashige & Skoog, 1962; Ranard & Guerrier, 1997).

با توجه به نقش حیاتی پتاسیم در گیاهان در این تحقیق برهم‌کنش KCl و NaCl در کشت بافت لوبیا مورد بررسی قرار گرفته‌است تا مشخص شود که آیا پاسخهای گیاه لوبیا به ترکیب NaCl و KCl در محیط کشت در سطح سلولی، در کشت بافت و در سطح گیاه کامل هماهنگ است یا خیر.

مواد و روشها

بذر لوبیا قرمز رقم ناز از موسسه اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید. بذرها بعد از سترون شدن در وایتکس ۳۰٪ بمدت ده دقیقه در پتری دیشهای محتوی آب و آگار ۰/۷ درصد کشت شدند. بعد از ده روز دانه‌رست‌هایی (Seedling) بوجود آمدند که از بخشهای مختلف آنها جهت کشت بافت استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده در این بررسی محیط MS بود (Murashige & Skoog, 1962). در مطالعات کشت بافت ابتدا می‌بایستی بهترین تیمار هورمونی را بدست آوریم برای این منظور از غلظتهای مختلف ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی گرم در لیتر از ۲-۴ دی کلروفنوکسی استیک اسید (4-D و 2) و کینتین (Kin) استفاده شد. نمونه‌ها به دو دسته تقسیم شده و یک گروه در تاریکی کامل و گروه دیگر در روشنایی با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵°C قرار داده شدند. بعد از یکماه با استفاده از

اندازه‌گیری اندیس کالوس (Callus Index) بهترین تیمار هورمونی مشخص گردید. در این مرحله از برگ‌های لپه‌ای و محور زیرلپه استفاده شد. بعد از بدست آوردن بهترین تیمار هورمونی اقدام به کشت قطعات جداکشت محور زیر لپه در این تیمار هورمونی و در غلظت‌های مختلف ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ میلی‌مولار از NaCl و ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میلی‌مولار از KCl شد. در این مرحله نیز نمونه‌ها به دودسته تقسیم شدند که یک گروه در تاریکی کامل و گروه دیگر درروشنائی با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. بعد از ۴۵ روز اندیس کالوس محاسبه و نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری وزن تر، وزن خشک، مقدار پروتئین و مقدار پرولین مورد آنالیز قرار گرفتند. جهت استخراج پروتئین کالوسها از تامپون تریس-گلیسین با نسبت ۱:۲ بافر به کالوس استفاده شد و نمونه همگن‌شده بعد از سانتریفیوژ شدن کالوسها در دمای ۴°C و بمدت ۴۵ دقیقه و در دور ۱۷۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و از محلول روشنار جهت سنجش پروتئین استفاده شد. اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌ها با روش Folin-Lowry انجام شد (Lowry et al., 1951). برای استخراج پرولین نیز ۰/۲ گرم وزن تر کالوس را در ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳٪ به خوبی سائیده شد و هموژن حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ صاف گردید. سنجش مقدار پرولین توسط روش Bate و همکاران صورت‌گرفت (Bates et al., 1973). و تعیین مقدار عناصر Na، K و Ca بعد از هضم کالوسهای خشک شده بوسیله روش خاکستر مرطوب (Wet Ashing) بوسیله دستگاه جذباتمی صورت‌گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از اندازه‌گیری اندیس کالوس قطعات جداکشت در تیمارهای هورمونی مختلف نشان‌داد که بجز در تیمارهای صفر از 2,4-D و Kin در بقیه تیمارها کالوسهای نسبتاً خوبی بدست می‌آید. همچنین در قطعات جداکشت برگ لپه‌ای در تیمار هورمونی ۰/۷۵ mg/Lit 2,4-D و Kin=۲/۵ mg/Lit ریشه‌زایی مشاهده شد (شکل ۱).

این بررسیها نشان‌داد که در مورد محور زیرلپه بهترین تیمار هورمونی برای رشد کالوسها 2,4-D=۵ mg/Lit و Kin=۲/۵ mg/Lit است (شکل ۲).

لذا در بررسیهای بعدی از محور زیرلپه و از این تیمار هورمونی استفاده شد. نتایج حاصل از کشت قطعات محور زیرلپه در غلظتهای مختلف NaCl و KCl نشان داد که اندیس کالوس، وزن تر، وزن خشک و مقدار پروتئین با افزایش NaCl و KCl در محیط کشت کاهش می‌یابد، اما مقدار پرولین افزایشی را نشان می‌دهد. همین بررسیها نشان داد که کاهش شاخصهای فوق

در اثر افزایش KCl در محیط کشت در کلیه تیمارهای NaCl بطور پیوسته صورت می‌پذیرد (شکل ۵).

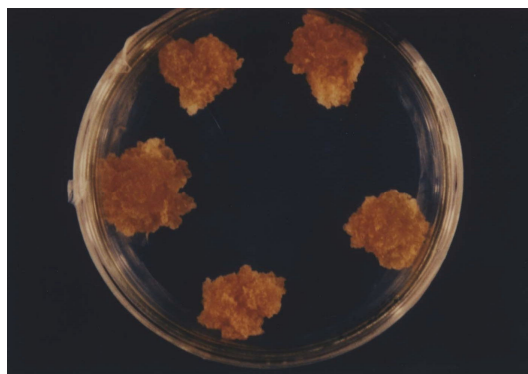
در حالیکه در مورد افزایش NaCl در محیط کشت در تیمارهای مختلف KCl نتایج تا حدودی متفاوت است بطوریکه در غلظتهای پائین KCl (۱۵ میلی‌مولار) افزایش NaCl تا غلظت ۷۵ میلی‌مولار تا حدودی سبب بهبود شرایط رشد کالوسها می‌گردد، در حالیکه در غلظتهای بالاتر KCl محیط کشت افزایش NaCl بطور پیوسته سبب کاهش شاخصهای رشد (شکل ۳) و افزایش پرولین می‌شود (شکل ۴).

نتایج حاصل از سنجش عناصر معدنی Na, Ca و K در کالوسهای حاصل از محور زیرپه در غلظتهای مختلف NaCl و KCl نشان می‌دهد که با افزایش NaCl در محیط کشت مقدار سدیم بطور پیوسته افزایش می‌یابد. در حالیکه افزایش KCl در محیط کشت سبب کاهش مقدار سدیم بافتها می‌شود (شکل ۶). اندازه‌گیری مقدار پتاسیم نیز نشان می‌دهد که با افزایش KCl در محیط کشت مقدار پتاسیم افزایش می‌یابد، در حالیکه با افزایش NaCl در محیط کشت در کلیه تیمارهای KCl مقدار پتاسیم کاهش می‌یابد (شکل ۷).

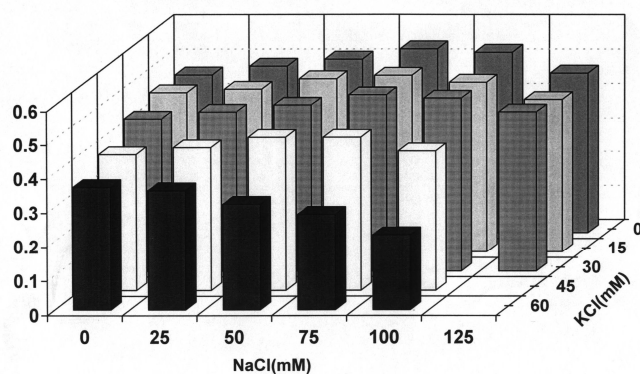
اندازه‌گیری مقدار کلسیم کالوسها نشان داد که با افزایش NaCl و KCl محیط کشت مقدار کلسیم کالوسها کاهش می‌یابد (شکل ۸). نتایج حاصل از کالوسهای قرار گرفته در روشنائی و تاریکی تفاوت چندانی با هم نداشتند.



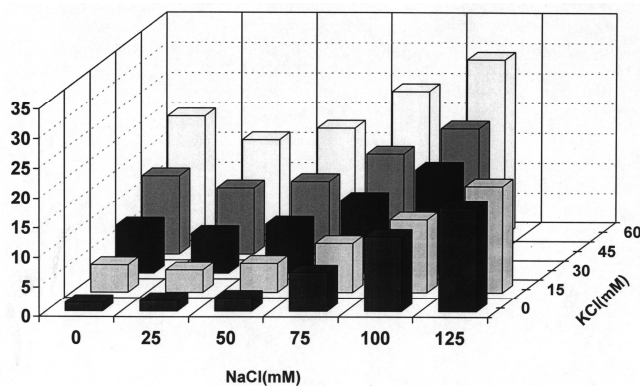
شکل ۱- ریشه‌زایی در کالوسهای حاصل از برگ لپه‌ای لوبیا در تیمار هورمونی $2/5 = \text{Kin}$ میلی گرم در لیتر. $4, 2 = \text{D}$ و $7/5$



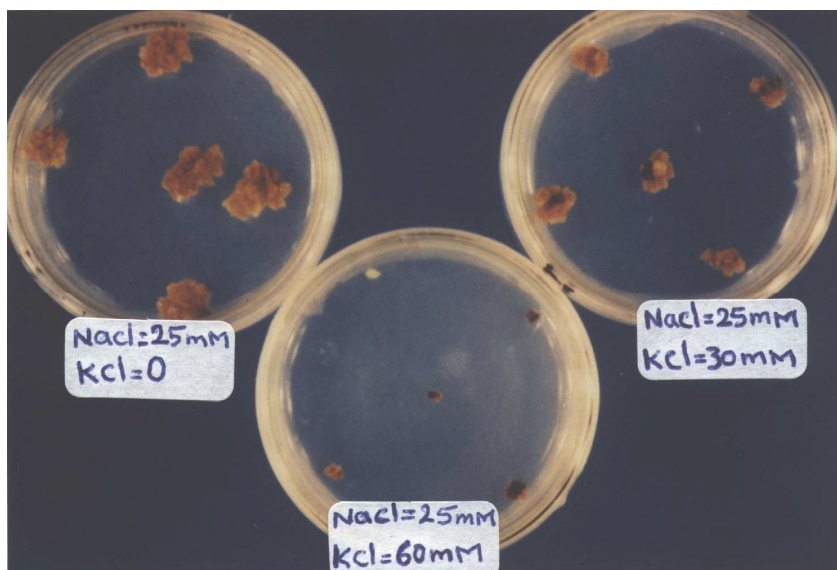
شکل ۲- کالوسهای حاصل از بهترین تیمار هورمونی بکار برده شده.



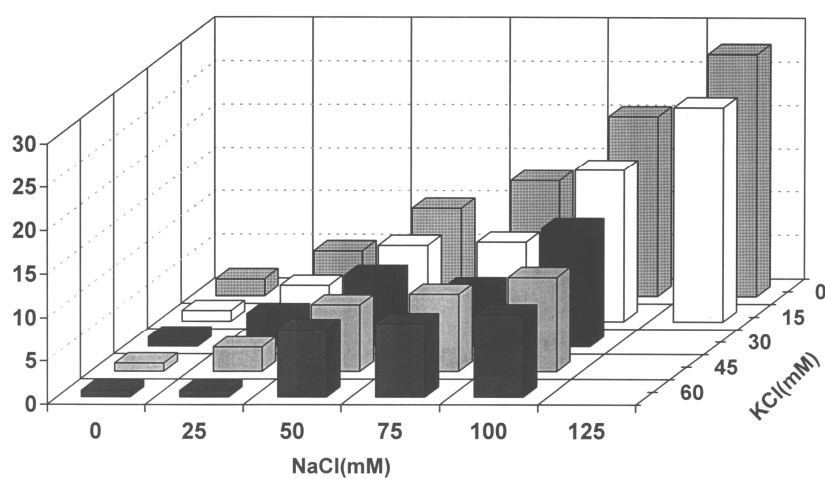
شکل ۳- تغییرات مقدار پروتئین کل کالوسهای حاصل از محور زیرپه لوبیا در مقادیر مختلف NaCl و KCl محیط کشت.



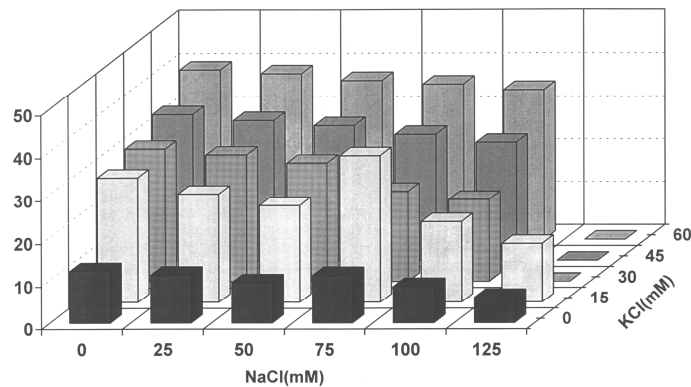
شکل ۴- تغییرات مقدار اسید آمینه پرولین کالوسهای حاصل از محور زیرپه لوبیا در مقادیر مختلف NaCl و KCl محیط کشت.



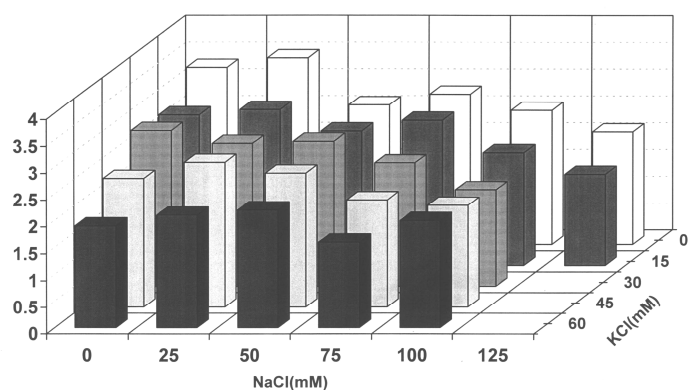
شکل ۵- تغییرات اندازه کالوسهای حاصل از محور زیر لپه لوبیا در اثر افزایش KCl در محیط کشت در تیمار ۲۵ = NaCl میلی مولار.



شکل ۶- تغییرات مقدار سدیم کالوسهای حاصل از محور زیر لپه لوبیا در غلظتهای مختلف NaCl و KCl محیط کشت.



شکل ۷- تغییرات مقدار پتاسیم کالوسه‌های حاصل از محور زیر لپه لوبیا در غلظت‌های مختلف NaCl و KCl محیط کشت.



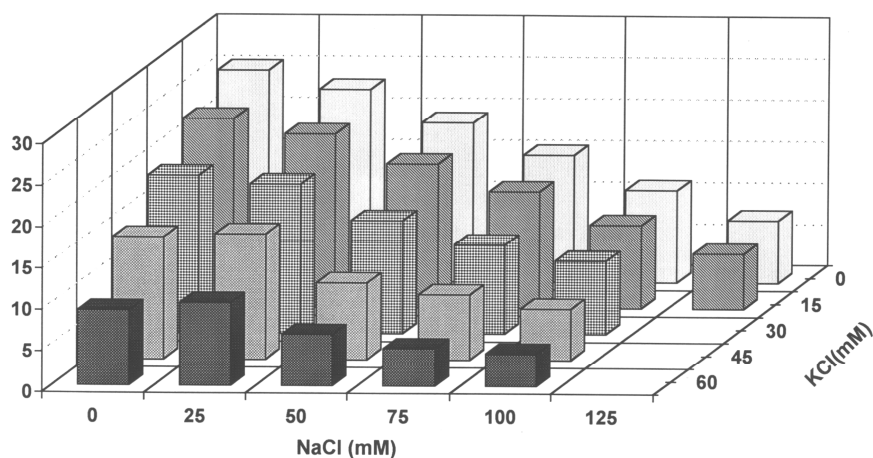
شکل ۸- تغییرات مقدار کلسیم کالوسه‌های حاصل از محور زیر لپه لوبیا در غلظت‌های مختلف NaCl و KCl محیط کشت.

بحث

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که افزایش NaCl و KCl سبب کاهش اندیس کالوس، وزن تر، وزن خشک و مقدار پروتئین بافتها می‌شود. همین نتایج نشان می‌دهد که کاهش شاخصهای فوق‌الذکر در غلظت‌های هم اسمز KCl شدیدتر از NaCl است. این امر شاید به این دلیل باشد که در هنگامیکه Cl بصورت KCl به محیط کشت اضافه می‌شود انباشت آن بیشتر از زمانی است که بصورت NaCl به محیط کشت اضافه می‌شود (Ranard & Guerrier, 1997). بنابراین می‌توان

نتیجه گرفت که کاهش شاخصهای رشدی در اثر افزایش NaCl و KCl تا حدود زیادی مربوط به انباشت کلر در سلولها است.

این بررسیها نشان می دهد که با افزایش NaCl و KCl در محیط کشت نسبت $\frac{\text{Fresh weight}}{\text{dry weight}}$ کالوسها کاهش می یابد (شکل ۹). این موضوع نشان می دهد که همزمان با افزایش دو نمک NaCl و KCl محیط کشت پتانسیل آب محیط کاهش می یابد و جذب آب توسط سلولها با مشکل مواجه می شود، در نتیجه سلولها مقدار مواد محلول خود را افزایش می دهند. کاهش مقدار پروتئینها در اثر افزایش NaCl و KCl در محیط کشت می تواند ناشی از رقابت بین Cl^- و NO_3^- برای جذب باشد که بعد از احیاء می تواند در ساختار آمینواسیدها وارد شود (Ranard & Guerrier, 1997; Younis *et al.*, 1994).



شکل ۹- تغییرات نسبت $\frac{\text{Fresh weight}}{\text{dry weight}}$ کالوسهای حاصل از محور زیر لپه لوبیا در غلظتهای مختلف NaCl و KCl محیط کشت.

افزایش پرولین در اثر افزایش NaCl و KCl در محیط کشت با توجه به نقش این آمینو اسید در افزایش فشار اسمزی سلولها و کمک به جذب آب توسط سلولها طبیعی به نظر می رسد (Younis *et al.*, 1994; Ranard & Guerrier, 1997; Ismail, 1996). اندازه گیری مقدار عناصر در بافتها نشان می دهد که بین K^+ و Na^+ اثرات ناسازگاری وجود دارد که می تواند ناشی از

رقابت این دو یون برای تصاحب جایگاههای اتصال در ناقلها و یا ناشی از اختلالی باشد که Na^+ و Cl^- روی گزینش پذیری سلولها بوجود می‌آورند (Botella, 1997).
درمورد کلسیم نیز مشاهده می‌شود که در تیمار $\text{KCl}=0$ ، با افزایش غلظت NaCl تا 25mM ، کلسیم کالوسها افزایش و بعد از آن با افزایش NaCl کاهش می‌یابد، درحالیکه در سایر تیمارهای KCl افزایش غلظت NaCl باعث کاهش مقدار کلسیم کالوسها می‌شود. افزایش فوق‌الذکر درمقدار کلسیم تا غلظت 25mM از NaCl شاید مربوط به فعالیت پمپ ATPase و H^+ واکوئلی که فعالیتش توسط آنیونها تحریک می‌شود، باشد. فعالیت پمپ ATPase و H^+ واکوئلی شیب الکتروشیمیایی لازم جهت ورود کاتیونهایی مثل Ca^{2+} به درون واکوئل بوسیله پاد بر $\text{H}^+ / \text{Ca}^{2+}$ را فراهم می‌آورد. کاهش بعدی درمقادیر کلسیم در سایر تیمارهای NaCl و KCl ممکن است بدلیل رقابت بین Ca^{2+} از یک طرف و K^+ و Na^+ از طرف دیگر برای تصاحب جایگاههای اتصال باشد (Ayala *et al.*, 1996; Marschner, 1989).
درنهایت می‌توان گفت که بکاربردن نمکهای پتاسیم برای مقاومت به شوری می‌بایستی با دقت بیشتری صورت پذیرد بطوریکه نمکهای نظیر KNO_3 و K_2SO_4 در بهبود شرایط رشد گیاه لوبیا در شرایط شور اثرات مفیدی را نشان می‌دهد درحالیکه بکار بردن KCl اثرات نامناسب شوری را تشدید می‌کند.

References

- Ayala, F., O'leary, J.W., Schumaker, K.S. (1996). Increase vacuolar and plasma membrane H^+ -ATPase activities in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl . J. of Experimental Botany, **47**(294), 25-32.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., and Tear, I.P. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, **39**, 205-207.
- Botella, M.A. (1997). Salinity induced potassium deficiency in maize plant. Plant Physiology, **50**, 200-205.
- Cachorro, P., Ortiz, A., Cerda, A. (1993). Growth, water relation and solute composition of *Phaseolus vulgaris* L. under salin condition. Plant Science, **95**, 23-29.
- Ismail, A.M. (1996). Interaction of NaCl salinization and KNO_3 fertilization on physiology of bean plants. Acta Agronomica Hongarica, **44**(3), 221-227.
- Lowry, O.H., Nira, J.R., Lewis, F., and Rose, J.R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
- Marschner, H. (1989). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. Oval Road, London. 254-267.

- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, *Plant Physiol.* **15**, 473-479.
- Ranard, M., Guerrier, G. (1997). Is proline a compatible solute in calli from NaCl-sensitive *Lycopersicon esculentum* and NaCl-tolerant *L. pennellii*? *Plant Physiology*, **150**, 331- 337.
- Wignarajah, K. (1990). Growth response of *Phaseolus vulgaris* to varying salinity regimes. *Environmental and Experimental Botany*, **30(2)**, 141-147.
- Younis, M.E., Abbas, M.A., Shukry, W.M. (1994). The combined effects of salinity and CaNO_3 or KNO_3 on growth and metabolism of *Phaseolus vulgaris*. *Egyptian J. Physiol. Science*, **18(2)**, 393-406.