بررسی اثرات کلرید سدیم وکلرید کلسیم بر رشد ومحتوی یونی کالوس لیموترش (*Citrus aurantifolia* (Chritm.) Swing.) در شرایط درون شیشه ای

شهرام دانشمندی (۱)، محمود دژم (۲)
۱ و۲- مربی واستادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد فسا

این پژوهش به منظور مطالعه برهمکنش یون های کلسیم و سدیم در کشت ریزنمونه های کالوس لیموی آب انجام شد. ریزنمونه های کالوس روی محیط کشت پایه موراشیگی و اسکوک(MS) به همراه ۷/۵ گرم در لیتر آگار، ۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA)، ۱ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید(NAA)، ۱ میلی گرم در لیتر ۲و٤-دی (2,4-D) به همراه غلظت های مختلف کلرید سدیم (۰، ۱/۲۵ ، ۲/۵و۵ گرم در لیتر) و کلرید کلسیم (٤٤۰ و ۱۹۱۰ میلی گرم در لیتر) در قالب طرح کاملاً تصادفی کشت گردیدند. در پایان آزمایش وزن تر و خشک و میزان یون های سدیم، کلسیم و پتاسیم نمونه ها اندازه گیری گردیدند. در این پژوهش با افزایش غلظت کلرید سدیم، وزن تر و خشک نمونه ها کاهش یافت و میزان سدیم داخلی افزایش و غلظت کلسیم و پتاسیم ریز نمونه ها کاهش یافتند. با افزایش غلظت کلرید کلسیم، وزن تر و خشک و غلظت کلسیم نمونه ها افزایش و غلظت سدیم کاهش یافت و تغییر معنی داری در غلظت پتاسیم مشاهده نشد. آنالیز اثر متقابل سدیم و کلسیم نشان داد که در حضور غلظت بالای کلرید کلسیم، کاهش وزن تر و خشک نمونه ها با افزایش غلظت کلرید سدیم روند کندی دارد به طوری که وزن تر وخشک نمونه ها در غلظت های ۱/۲۵ و ۵ گرم در لیتر سدیم تفاوت معنی دار نداشتند. همچنین در غلظت بالای کلرید کلسیم نسبت به غلظت پایین آن، با افزایش غلظت کلرید سدیم سرعت تجمع یون سدیم و میزان کاهش یون های کلسیم و پتاسیم روندی آهسته و کند داشتند.

کلمات کلیدی: مرکبات، شوری ، کشت بافت.

مقدمه:

شوری یکی از مهمترین تنش های محیطی می باشد و نقش آن در کاهش رشد و عملکرد بسیاری از گیاهان مشخص و روشن می باشد. گونه های مرکبات از حساس ترین گیاهان به شوری می باشند و تنش شوری منجر به کاهش رشد، عملکرد و بروز طیف وسیعی از ناهنجاری ها در آنها می گردد(۷و۸). از آن جا که تکثیر مرکبات به شیوه پیوند می باشد، پایه ها نقش اساسی و مهمی را ایجاد در تحمل به شوری دارا می باشند. برای انتخاب صحیح پایه های متحمل به شوری، شناخت و درک مکانیسم های تحمل و اثرات شوری بر فیزیولوژی گیاه(پایه) اهمیت زیادی دارد. در سال های اخیر، فنون درون شیشه ای کشت سلول ها و بافت های گیاهی توسعه زیادی پیدا کرده است و به دلیل کنترل دقیق تمامی عوامل تأثیرگذار و وجود محیط کشت معین و مشخص، در بسیاری از مطالعات فیزیولوژیکی منجمله مطالعه اثرات شوری و مکانیسم های تحمل شوری در گیاهان، از این فنون استفاده می گردد(۷و۸). هدف از این پژوهش، استفاده از فنون درون شیشه ای و استقرار کشت های سلولی و کالوس لیموی آب، به منظور مطالعه اثرات شوری وبرهمکنش یونهای سدیم وکلسیم بود.

مواد وروش‌ها:

بذر های جداشده میوه های رسیده لیموترش پس از شستشوی اولیه، پوسته های بیرونی و درونی آنها جدا گردید و سپس با محلول هیپو کلریت سدیم با غلظت ۰/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی شدند. سپس در لوله های آزمایش حاوی محیط کشت پایهMS (٦) کشت گردیدند. پس از تولید گیاهچه ها، ریز نمونه هایی از قسمت محور رو لپه آنها با طول ۰/۵سانتی متر تهیه شد. برای تولید کالوس، ریز نمونه ها به صورت افقی بر روی محیط کشت در درون پتری دیش های پلاستیکی قرار گرفتند. در این مرحله از محیط کشت پایه MS همراه با ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D ،۱ میلی گرم در لیتر NAA و۱ میلی گرم در لیتر BA استفاده شد. پس از گذشت یک ماه ریز نمونه های کشت شده تقسیم شده و توده ای از بافت کالوس

تولید کردند. در این مرحله ریز نمونه هایی (قطعاتی) از کالوس با وزن ۳۰ میلی گرم جدا گردید و برای انجام تیمارهای شوری مورد استفاده گرفتند. محیط کشت مورد استفاده در این مرحله همانند محیط کشت قبلی برای تولید کالوس بود با این تفاوت که غلظت های مختلف کلرید سدیم (NaCl) ویاکلریدکلسیم(CaCl 2.2 H 2O) به آن اضافه شد.غلظت های کلرید سدیم شامل۰ ،۱/۲۵، ۲/۵و ۵ گرم در لیتر بود و کلرید کلسیم در دو غلظت ۴۴۰ و ۱۹۱۰ میلی گرم در لیتر استفاده شد. پس از گذشت ۴۰ روز نمونه ها مورد بررسی قرار گرفتند و وزن تر و وزن خشک آنها اندازه گیری شد. برای اندازه گیری غلظت یون های کلسیم، سدیم و پتاسیم، ابتدا نمونه ها به صورت خاکستر در آورده شد و توسط اسید کلریدریک ۲ نرمال عصاره گیری شد. در عصاره بدست آمده سدیم و پتاسیم به روش شعله نور سنجی و کلسیم به روش تیتراسیون با EDTA اندازه گیری شد(۳). این پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت فاکتوریل انجام شد و داده های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار MSTATC مورد تجزیه آماری قرار گرفتند و میانگین نتایج با آزمون دانکن در سطح ۵ مقایسه شدند.

نتایج وبحث:

نتایج این پژوهش نشان داد که اثرات متقابل کلرید سدیم و کلرید کلسیم روی وزن تر و خشک و علظت یون های سدیم،کلسیم وپتاسیم درکالوس لیموی آب معنی دار شده است(جدول یک). در غلظت پایین کلرید کلسیم (۴۴۰ میلی گرم در لیتر) با افزایش غلظت کلرید سدیم از صفر به ۵ گرم در لیتر به تدریج وزن تر و خشک نمونه ها کاهش یافتند و موجب اختلاف معنی دار بین تیمار ها شدند. اگر چه در غلظت بالای کلرید کلسیم (۱۹۱۰ میلی گرم در لیتر)با افزایش غلظت کلرید سدیم، وزن تر و خشک کاهش یافت ولی روند کاهش وزن تر و خشک بسیار آهسته بود به طوری که بین غلظت های ۲/۵،۱/۲۵و ۵ گرم در لیتر کلرید سدیم اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. بنابراین از نتایج حاصله ملاحظه می شود که حضور غلظت های بالایی از کلسیم می تواند از اثرات منفی کلرید سدیم بر رشد و وزن ریز نمونه ها جلوگیری نماید.

جدول یک –اثر متقابل غلظت های مختلف کلرید سدیم و کلرید کلسیم روی وزن تر و خشک ومیزان یون های سدیم،کلسیم وپتاسیم درکالوس لیموی آب

غلظت های کلرید سدیم (NaCl) به گرم+ غلظت های کلرید کلسیم(CaCl2) به میلی گرم	وزن تر (میلی گرم)	وزن خشک (میلیگرم)	غلظت سدیم (میلی گرم در کیلوگرم وزن خشک)	غلظت کلسیم (میلی گرم در کیلوگرم وزن خشک)	غلظت پتاسیم (میلی گرم در کیلوگرم وزن خشک)
CaCl2 440 + NaCl 0	228.32 ab*	20.767 ab	1768 e	3742 c	11570 a
CaCl2 440 + NaCl 1.25	147.04 c	11.500 dc	7312 c	3977 c	11060 ab
CaCl2 440 + NaCl 2.5	133.55 cd	10.583 d	8769 bc	4563 c	9406 abc
CaCl2 440 + NaCl 5	88.46 d	7.543 d	10770 a	4142 c	7533 c
CaCl2 1910+ NaCl 0	253.61 a	23.957 a	1222 e	16020 a	11040 ab
CaCl2 1910+ NaCl 1.25	174.58 bc	17.017 bc	5352 d	11690 b	8687 bc
CaCl2 1910+ NaCl 2.5	178.27 bc	17.017 bc	5522 d	10410 b	10630 ab
CaCl2 1910+ NaCl 5	186.32 bc	18.083 ab	10170 ab	11070 b	7941 c

* در هر ستون میانگین های با حروف مشابه از نظر آماری در سطح ۵ درصد با آزمون دانکن اختلاف معنی داری ندارند.

در رابطه با میزان یون سدیم موجود در نمونه ها، با افزایش غلظت کلرید سدیم، هم در حضور غلظت پایین و هم غلظت بالای کلرید کلسیم، میزان سدیم نمونه ها افزایش یافتند. هر چند روند افزایش و تجمع سدیم در نمونه ها در حضور غلظت بالای کلرید کلسیم آهسته و کند بود و میزان کمتری تجمع سدیم مشاهده شد به طوری که در برخی تیمار ها، تفاوت معنی دار بود. در رابطه با یون کلسیم در مجموع اثرات غلظت های پایین و بالای کلرید کلسیم بسیار مهم و معنی دار بود و افزایش غلظت کلرید سدیم نیز تغییر معنی داری در آن ایجاد نکرد. با افزایش کلرید سدیم، میزان پتاسیم داخلی هم در غلظت پایین و هم در غلظت بالای کلرید کلسیم کاهش یافت به طوری که بیشترین کاهش در غلظت پتاسیم در حضور ۵ گرم در لیتر کلرید

سدیم دیده شد. در آزمایشات متعددی بر روی مرکبات (١،٢ و٧) و گونه های گیاهی دیگر (٤و٥) در شرایط کشت درون شیشه ای یا آزمایشات گلخانه ای نتایج مشابهی حاصل شده است.

منابع:

١-دژم,م., م.خوشخوی وا.شکافنده.١٣٨٤.اثرغلظت های مختلف کلرید سدیم وکلرید کلسیم در کشت درون شبشه ای شاخساره های پرتقال.خلاصه مقالات چهارمین کنگره علوم باغبانی ایران,مشهد,صفحه٥٣٥

2. Ben-Hayyim,G. and J. Kochba.1982.Growth characteristics and stability of tolerance of *Citrus* callus cells subjected to NaCl stress.Plant Sci.Lett.27:87-94.

3. Jones, J.B., B. Wolf and H. A.Mills.1990.Organic matter destruction procedures. In: Plant Analysis Handbook. Micro-macro Publishing Inc. Athens, GA.

4. Kent, L.M. and A. Lauchli. 1985. Germination and seedling growth of cotton:Salinity – calcium interaction.Plant Cell Environ. 8:155-159.

5. Lucchesini, M. and C. Vitagliano. 1993. Effects of NaCl and $CaCl_2$ in *Prunus cerasifera* tissue culture. Acta Hort. 336:109-113.

6. Murashige, T. and F.Skoog. 1962. Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant.15:473-497.

7. Speigel-Roy, P. and E.E. Goldschmidt. 1996. Biology of *Citrus*, Cambridge University Press.U.K. 230 p.

8 .Storey, R. and R.R. Walker. 1999. *Citrus* and salinity, Sci. Hort. 78:39-81.

The effects of sodium chloride (NaCl) and calcium chloride ($CaCl_2$) on growth and ionic contents of lime (*Citrus aurantifolia* (Chritm.) Swing.) callus *in vitro*

Daneshmandi,Sh. and Dejam, M.

Instructor and Assistant Professor of Islamic Azad University, Fasa Branch, Iran

Abstract

Experiments were conducted in order to study the calcium-sodium interactions in epicotyl-derived callus of lime *in vitro*. The callus explants were cultured on Murashige and Skoog basal medium with 1 mg/L BA,1 mg/L NAA,1 mg/L 2,4-D and 0, 1.25, 2.5 and 5 g/L NaCl and 440 and 1910 mg/L $CaCl_2$ in compeletly randomized design. The results showed that with increasing NaCl, fresh and dry weights of calli decreased and sodium content of calli increased and calcium and potassium contents decreased. With increasing $CaCl_2$, fresh and dry weight and calcium contents of samples increased, sodium contents were decreased and no significant differences were observed in potassium contents. The analysis of sodium-calcium interaction showed that in the presence of high concentrations of $CaCl_2$, with increasing NaCl, the decrease in fresh and dry weights had slow rates, so that the fresh and dry weights of samples had no significant differences in 1.25 and 5 g/L NaCl. Also in high concentration of $CaCl_2$, the accumulation of sodium and depletion of calcium and potassium had slow rates with increasing NaCl concentrations.

Keywords: *Citrus*, salinity, tissue culture