

بررسی اثر ترکیب محیط کشت بر تحمل به یخزدگی در سه رقم نخود

فرشته مشیری *، عبدالرضا باقری ** و سعید رضا وصال ***

چکیده

در این تحقیق اثر ساکارز و تنظیم‌کننده‌های رشد بر تحمل به یخزدگی در گیاه نخود بررسی شد. ریزنمونه‌های تولید شده در محیط‌های کشت، پس از واکشت در سه محیط کشت MS، بدون هورمون با ۱۰ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز (به ترتیب الف، ب و ج) و دارای یک میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز (ج)، به مدت ۲۰ روز در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت یک ساعت در هر یک از دماهای صفر، -۴، -۸، -۱۲، -۱۶ و -۲۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط تنش سرمایی قرار داده شدند. میزان تحمل به یخزدگی پس از تجزیه پروبیت براساس نقطه LT_{50} تعیین شد. نتایج نشان داد که تحمل گیاهان به یخزدگی در محیط (الف) بیشتر از سایر محیط‌های کشت بود. لذا اگر به‌گزینی گیاهان در محیط (الف) انجام شود، علاوه بر تفکیک ارقام مختلف، آثار منفی کاهش غلظت ساکارز در محیط کشت و یا نیاز به استفاده از بعضی از تنظیم‌کننده‌های رشد نیز متفی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تحمل به یخزدگی؛ تنظیم‌کننده‌های رشد؛ ساکارز؛ کشت آزمایشگاهی؛ نخود

* - کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، خراسان - ایران

** - استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، خراسان - ایران

*** - مربی پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، خراسان - ایران

مکانیسم‌های تحمل به یخ‌زدگی برای مدت چند روز نقش دارد (۷).

در کشورهای دارای مناطق مرتفع نظیر ایران و در نواحی با زمستان‌های بسیار سرد، نخود در فصل بهار کشت می‌شود. در این شرایط، بارندگی‌های بهاره موجب بروز مشکلات در عملیات آماده‌سازی زمین شده و کشت محصول با تأخیر می‌شود. این امر سبب می‌شود که دوره زایشی گیاه با افزایش درجه حرارت و کاهش نزولات جوی مواجه شود. با تغییر زمان کاشت نخود از بهار به پاییز یا زمستان، کارایی مصرف آب افزایش می‌یابد و سبب می‌شود گیاهان زودکاشت دارای دانه‌های درشت‌تر، دوره گلدهی طولانی‌تر، تعداد شاخه، غلاف و دانه بیشتر باشد (۱ و ۳).

مطالعات متعددی برای گزینش ارقام نخود متحمل به یخ‌زدگی در شرایط مزرعه انجام شده و چندین وارسته نخود و سایر بقولات، شناسایی و معرفی شده‌اند (۳ و ۱۶) ولی چون شرایط تنش در مزرعه، برحسب زمان و مکان متغیر است و نیز وجود درجه حرارت‌های کمتر از ۱۲- درجه سانتی‌گراد قطعی نیست، لذا انتخاب گیاهان متحمل در مزرعه با مشکلات و محدودیت‌هایی همراه است. لذا انتخاب لینه‌های سلولی یا گیاهان متحمل به دماهای کمتر از صفر در شرایط آزمایشگاهی، علاوه بر صرفه‌جویی در زمان و مکان سبب بهبود انتخاب ارقام متحمل می‌شود (۱۱).

خسارت ناشی از یخ‌بندان به‌ویژه در مراحل حساس رشد و نمو گیاهان، از عوامل مهم کاهش عملکرد محصولات زراعی است. فعالیت‌های متابولیکی گیاه در دماهای کمتر از صفر کند و یا متوقف می‌شود. میزان آسیب برحسب طول مدت، میزان تنش ناشی از یخ‌زدگی و همچنین درجه تحمل به یخ‌زدگی نمونه‌های گیاهی متفاوت است (۱). در اغلب گونه‌های گیاهی وجود مکانیسم‌های خاص، آن‌ها را در شرایط یخ‌زدگی محافظت می‌کند. در گونه‌های گیاهی مقاوم به یخ‌زدگی در شرایط کاهش دما، موادی نظیر ساکارز، پرولین، مانیتول، گلیسین و برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد تولید می‌شوند که موجب افزایش تحمل به یخ‌زدگی می‌شوند (۲). بررسی‌ها نشان می‌دهد که تنوع بین وارسته‌های سویا و یونجه برای تحمل به یخ‌زدگی، ناشی از ظرفیت این گیاهان برای تجمع قندهای رافینوز و آبسزیک اسید^۱ (تنظیم‌کننده رشد) می‌باشد (۴ و ۵).

استفاده از قندهای محلول و سایر موادی که خاصیت اسمزی سلول‌ها را افزایش می‌دهند، در افزایش تحمل گیاهان به یخ‌زدگی مؤثر است (۲). علاوه بر ساکارز، برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد نیز توسط گیاه جذب و در مکانیسم‌های تحمل به یخ‌زدگی مؤثر می‌باشند (۹). استفاده از سیتوکینین‌ها نیز تحمل به سرما را در گوجه‌فرنگی، جو و نخودفرنگی افزایش داده‌اند (۹). همچنین در برخی از گونه‌های جنس سولانوم هورمون آبسزیک اسید در فعال شدن

۱ - Abscisic Acid (ABA)

سپس در سه ترکیب محیط کشت MS مختلف، بدون هورمون با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز (الف)، بدون هورمون با ۱۰ گرم در لیتر ساکارز (ب) و با ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به اضافه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز (ج) واکشت^۴ شدند و در اتاقک رشد به مدت دو هفته رشد کردند.

برای یخزدگی گیاهان، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۲۰ روز در دمای (±۱) ۴ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۳۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه با دوره روشنایی ۱۲ ساعت در اتاقک رشد نگهداری شدند تا مکانیسم‌های تحمل به سرما و یخزدگی در آنها فعال شود. سپس در فریزر قابل برنامه‌ریزی دماهای صفر، -۴، -۸، -۱۲، -۱۶ و -۲۰ درجه سانتی‌گراد به صورت پیوسته روی نمونه‌ها اعمال گردید. در هر دما پس از گذشت یک ساعت، تعداد سه نمونه (شیشه کشت) مربوط به هر یک از تیمارهای محیط کشت و رقم از فریزر خارج و پس از ذوب تدریجی یخ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، به اتاقک رشد منتقل شدند. با گذشت یک هفته، برای تعیین میزان خسارت یخزدگی به گیاهچه‌ها از درجه‌بندی زیر و فرمول (۱) استفاده شد:

- ۱ - زنده کامل
- ۲ - سه گره سالم
- ۳ - دو گره سالم

در این تحقیق اثر ترکیب شیمیایی محیط کشت (شامل تنظیم‌کننده‌های رشد و ساکارز) بر مقاومت نخود به یخزدگی بررسی شد تا ترکیب مناسب محیط کشت برای به‌گزینی ارقام متحمل در شرایط آزمایشگاه تعیین شود.

مواد و روشها

در این تحقیق بذور رقم ILC533 (حساس به سرما) و دو رقم ILC482 و بومی قزوین (ارقام متحمل به سرما) (۳) پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد و یک قطره توین ۲۰ به مدت ۱۰ دقیقه، در گلدان‌های پلاستیکی حاوی ماسه استریل کشت و با آب مقطر و محلول غذایی هوگلند ۵۰ درصد به صورت یک روز در میان آبیاری شدند. گیاهچه‌ها تا مرحله سه‌برگی در دمای (±۱) ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی ۱۴ ساعت در گلخانه رشد کردند. برای تهیه گیاهچه‌های استریل در محیط آزمایشگاه از قلمه‌های ساقه استفاده شد تا از القای تنوع سوماتیکی در محیط کشت اجتناب شود. به این منظور قطعاتی از گره‌های دوم و سوم ساقه گیاهان رشد کرده در گلخانه جدا و پس از ضدعفونی سطحی به طریق فوق، در محیط کشت جامد MS^۱ حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP^۲، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA^۳، به اضافه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شدند. نمونه‌ها در اتاقک رشد تحت شرایط دمایی (±۱) ۲۴ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۵۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه با دوره روشنایی ۱۶ ساعت به مدت حدود دو هفته نگهداری و

۱ - Murashing and Skoog

۲ - Benzyl Amino Purine

۳ - Indol Butyric Acid

۴ - Sub Culture

- ۴ - یک گره سالم
 ۵ - قاعده گیاه سالم
 ۶ - مرگ کامل گیاه

در محیط کشت، جوانه‌های جانبی آنها فعال شدند. از هر جوانه جانبی، در مدت دو هفته یک شاخه تا مرحله دو الی سه‌گره‌ای رشد نمود. با انتقال شاخه‌ها به محیط واکشت، در مدت دو هفته قلمه‌ها تا ارتفاع سه الی چهارگره‌ای رشد کردند.

با تعیین میزان خسارت یخزدگی به گیاهچه‌ها، براساس نتایج LT_{50} حاصل در هر یک از سطوح تیمار محیط کشت، مشاهده شد که در محیط کشت (الف) کمترین خسارت و در محیط کشت (ب) بیشترین آسیب ناشی از یخزدگی به گیاهچه‌ها وارد شده است (شکل ۱). تفاوت تأثیر محیط کشت (الف) با محیط کشت‌های (ج) و (ب) برای افزایش ظرفیت تحمل به یخزدگی معنی‌دار بود ($P < 0/5$). در محیط کشت (الف) با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و بدون هورمون، ۵۰ درصد خسارت (LT_{50}) در دمای ۱۴- درجه سانتی‌گراد بوده است. ولی با اضافه نمودن ترکیبات هورمونی در محیط کشت (ج) دمای LT_{50} درحد ۱۳- درجه سانتی‌گراد بود. با کاهش میزان ساکارز در محیط کشت (ب) گیاهان دچار خسارت شده و میانگین LT_{50} ۱/۵ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود.

با استفاده از نتایج تجزیه پروبیت نیز که در شکل (۱) نشان داده شده است، برآورد میزان خسارت در هر یک از دماهای زیر صفر امکان‌پذیر است. افزایش شیب خط در محیط‌های (ب) و (ج) درمقایسه با محیط کشت (الف) نشان می‌دهد که خسارت یخزدگی در دماهای زیر صفر در این دو محیط بیشتر است (شکل ۱).

$$(۱) \quad ۱۰۰ \times (۶/درجه \text{ خسارت}) = \text{درصد خسارت}$$

در فرمول (۱) کسر داخل پرانتز نسبت خسارت وارده شده به یک نمونه را در شرایط یخزدگی درمقایسه با گیاه کاملاً خسارت دیده نشان می‌دهد.

به‌منظور تعیین دمایی که در آن ۵۰ درصد نمونه‌های گیاه دچار آسیب می‌شوند (LT_{50})، ابتدا عدد پروبیت معادل درصد خسارت، برای هر تیمار مشخص و با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTATC رابطه خطی این اعداد با لگاریتم دماهای یخزدگی محاسبه شد. با قرار دادن عدد پروبیت ۵ (معادل ۵۰ درصد خسارت) در هر رابطه، لگاریتم دمای LT_{50} تعیین شد که پس از گرفتن آنتی‌لگاریتم از آنها، دماهای LT_{50} برای هر یک از تیمارها محاسبه شدند. اثر تیمارها به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور تیمار محیط کشت و رقم (هر یک در سه سطح) براساس اعداد LT_{50} در سه تکرار، به کمک برنامه آماری MSTATC تجزیه واریانس شدند و مقایسه‌های مستقل در سطوح تیمار محیط کشت انجام شد. برای ترسیم نمودارها از برنامه Excel 97 استفاده شد.

نتایج و بحث

حدود سه الی چهار روز پس از کشت قلمه‌ها

رطوبت این بافت‌ها زیاد است و پس از یخ‌زدگی، با افزایش آب‌دهی از سلول‌ها، خسارت شدیدتری به گیاه وارد می‌شود (۶). علاوه بر این سازگاری قابل‌القاء بر اثر خوسرمایی با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی کاهش می‌یابد که به‌طور غیرمستقیم تحمل به سرمای گیاهچه‌ها را کمتر می‌کند (۲). به‌نظر می‌رسد با افزایش ساکارز، سازگاری با سرما افزایش می‌یابد که این امر برای یونجه نیز گزارش شده است (۱۲ و ۱۵). همچنین، با تجمع قندها در واکوئل‌ها خاصیت اسمزی سلول‌ها افزایش می‌یابد و سبب افزایش ظرفیت آبی سلول‌های گیاهی می‌شوند و به این ترتیب با کاهش تشکیل یخ در سلول‌های گیاهی، خسارت به گیاه کمتر می‌شود (۱۵).

باتوجه به نتایج حاصل به‌نظر می‌رسد با به‌گزینی در محیط کشت (الف) آثار منفی کاهش غلظت ساکارز در محیط و یا حضور تنظیم‌کننده‌های رشد، قابل‌اجتناب بوده و در این محیط تحمل به یخ‌زدگی افزایش می‌یابد.

تفاوت بین ارقام مورد مطالعه درمقایسه داده‌های LT_{50} معنی‌دار بود ($P < 0/05$) (شکل ۲). مقدار عددی LT_{50} برای رقم ILC533 نسبت به سایر ارقام در دمای بیشتری حاصل شد. در رقم ILC482 و وارسته محلی قزوین، دمای LT_{50} به‌ترتیب حدود دو و چهار درجه سانتی‌گراد کمتر بود. نتایج نشان داد که در بین ارقام مورد بررسی، مقاومت وارسته محلی قزوین به یخ‌زدگی در دماهای زیر صفر بیشتر بوده و حتی مقاومت آن نسبت به رقم ILC482 که به‌عنوان یک وارسته مقاوم گزارش شده است بهتر بود.

درحالتی که ساکارز محیط کشت درحد معمول (۳۰ گرم در لیتر) بود (محیط‌های (الف) و (ج))، وجود تنظیم‌کننده‌های رشد در آن محیط موجب کاهش توانایی تحمل به یخ‌زدگی گیاهچه‌های نخود شد. همچنین با کاهش میزان ساکارز در محیط کشت‌های (الف) و (ب) به‌ترتیب از سه به یک درصد، میزان تحمل به یخ‌زدگی گیاهچه‌های کشت شده در آزمایشگاه کمتر بود که با زیاد شدن LT_{50} ظاهر شده است.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که در سایر گونه‌های گیاهی نیز نتایج مشابه حاصل شده است (۱۳) و (۱۴). به‌عنوان مثال LT_{50} گیاهچه‌های توت‌فرنگی و تمشک در محیط کشت دارای تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و JBA، درمقایسه با محیط کشت بدون هورمون، در دمای کمتر منفی حاصل شد که نشان می‌دهد تحمل گیاهان کشت شده در این محیط نسبت به یخ‌زدگی کمتر است. با کاهش ساکارز از سه به یک درصد نیز تحمل به یخ‌زدگی گیاهچه‌ها کاهش یافت که با افزایش LT_{50} همراه بود.

به‌طور مشابه همبستگی منفی بین کاهش غلظت ساکارز با حضور تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت‌های یونجه و کلزا و کشت‌های سوسپانسیون اوکالیپتوس گزارش شده است (۱۲، ۱۸).

چون در مطالعه حاضر تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده از گروه اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها هستند، احتمالاً، افزایش سرعت رشد، منجر به افزایش بافت‌های جوان گیاه می‌شود که درصد

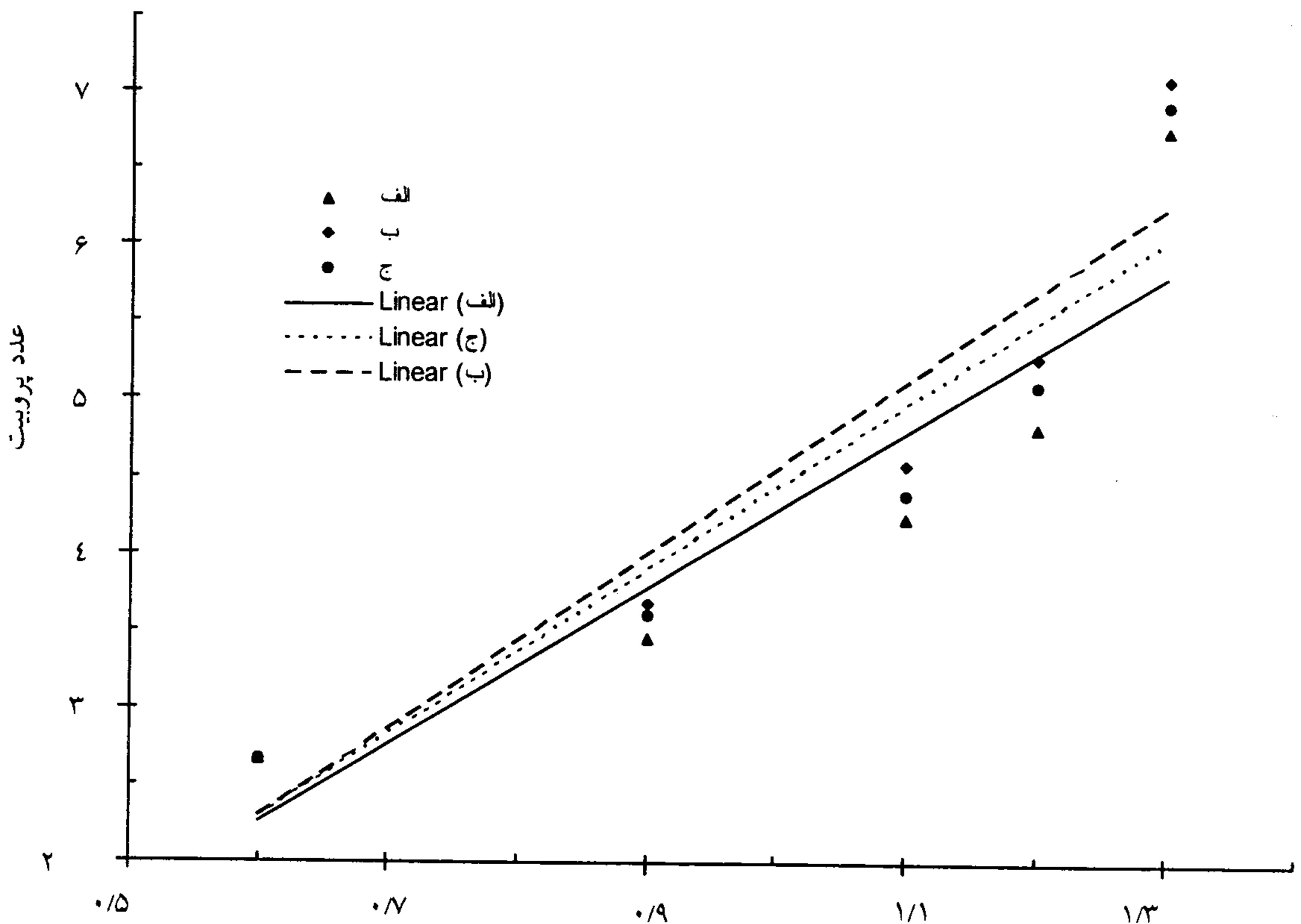
احتمال دارد بتوان انتخاب در آزمایشگاه را به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای انتخاب در مزرعه در نظر گرفت. ولی اگر به‌گزینی در محیط کشت (الف) انجام شود علاوه بر تفکیک ارقام مختلف از یکدیگر، آثار منفی ناشی از وجود برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد قابل اجتناب می‌باشد و با افزایش غلظت ساکارز در محیط می‌توان درجه تحمل به یخ‌زدگی را افزایش داد.

تقدیر و تشکر

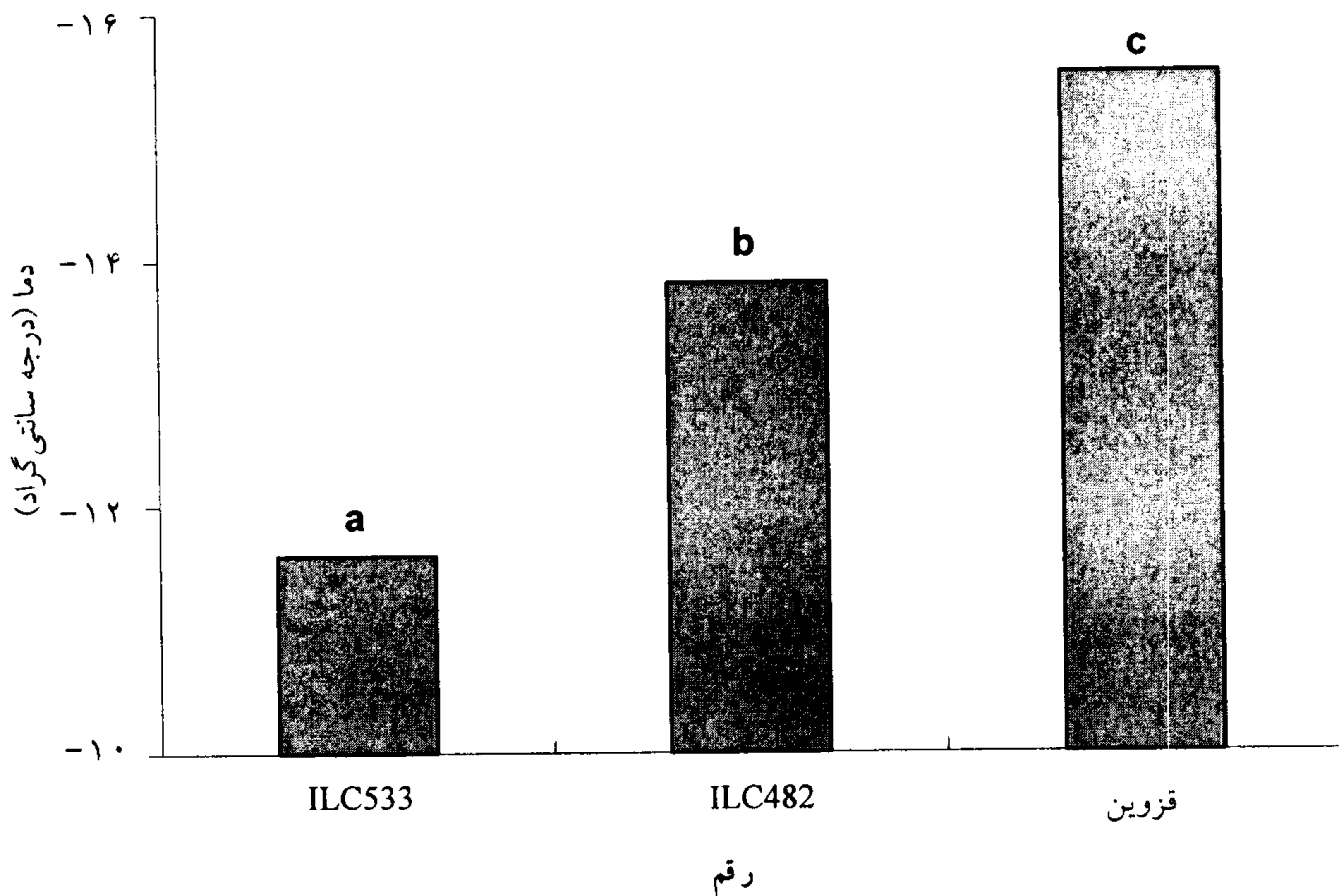
بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد جهت تأمین بودجه و از مسوولان آزمایشگاه‌های کشت بافت و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی جهت فراهم نمودن امکانات اجرایی، سپاسگزاری می‌شود.

میزان تحمل ارقام مختلف نخود در دماهای زیر صفر به عوامل متعدد از جمله توانایی گیاهان برای سازگاری با سرما بستگی دارد. در گیاهچه‌های متحمل در شرایط درجه حرارت کم، درجه غیراشباعی اسیدهای چرب غشا افزایش می‌یابد و کاهش دمای تغییر حالت غشا می‌تواند در ایجاد مقاومت در گیاهان مؤثر واقع شود (۱۷). همچنین افزایش تحمل به یخ‌زدگی در یولاف و کالوس گندم به‌ترتیب با افزایش توانایی در تجمع قندهای آپوپلاستی و سطوح تنظیم‌کننده رشد گیاهی همراه می‌باشد (۸ و ۱۰).

باتوجه به مشابه بودن نتایج این آزمایش با سایر گزارش‌ها در شرایط مزرعه‌ای و گلخانه (۳)، و نیز سهولت عمل، صرف زمان کمتر و حذف عوارض جانبی محیطی در شرایط آزمایشگاهی،



شکل ۱ - مقایسه تحمل به یخ‌زدگی در سه محیط مختلف



شکل ۲ - مقایسه تحمل به سرمای ارقام نخود براساس LT_{50}

مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی. انتشارات

دانشگاه فردوسی مشهد. ۲۴۸ صفحه.

۳ - نظامی، ا. و باقری، ع. ۱۳۸۰. ارزیابی کلکسیون

نخود (*Cicer arietinum* L.) برای تحمل به سرما

در شرایط مزرعه. مجله علوم و صنایع کشاورزی،

جلد ۱۵ (۲): ۱۶۱-۱۵۵.

منابع مورد استفاده

۱ - باقری، ع.، نظامی، ا. و سلطانی، م. ۱۳۷۹. اصلاح

حبوبات سرمدوست برای تحمل به تنش‌ها.

سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی،

تهران، ۳۷۰ صفحه.

۲ - کافی، م. و دامغانی، ع. م. ۱۳۷۹. مکانیسم‌های

4 . Blackman SB, Obendorf RL and Leopold AC (1992) Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of soybean seeds. *Plant Physiol.* 100: 225-230.

5 . Castonguay Y, Nadeau P, Lechasseur P and Chouinard L (1995) Differential

accumulation of carbohydrates in alfalfa cultivars of contrasting winter hardiness. *Crop Sci.* 35: 509-516.

6 . Carter JV and Brenner ML (1996) *Plant Growth Regulators and Low Temperature Stress.* Springer - Verlag Alan R. Liss. Inc., New York P: 445.

- 7 . Chen THH, Li PH and Brenner ML (1983) Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant Physiol.* 71: 362-370.
- 8 . Johnson-Flanagan AM and Singh JAS (1987) Alternation of gene expression during the induction of freezing tolerance in *Brassica napus* suspension cultures. *Plant Physiol.* 85: 699-705.
- 9 . Kuraishi S, Tezuka T, Ushijima T and Tazaki T (1986) Effect of cytokinins on frost hardiness. *Plant Cell Physiol.* 7: 705-706.
- 10 . Livigston OP (1996) The second phase of cold hardening freezing tolerance and fructan isomer changes in winter cereal crowns. *Crop Sci.* 36: 1568-1573.
- 11 . Mckersie BD and Brown DCW (1997) *Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes* 5th Ed. Academic Press, New York PP: 743.
- 12 . Orr W, Singh J and Brown DCW (1985) Induction of freezing tolerance in alfalfa cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 4: 15-18.
- 13 . Palonen P and Buzard D (1997) Screening strawberry cultivars for cold hardiness *in vitro*. *Acta Hort.* 439: 217-220.
- 14 . Palonen P and Buzard D (1998) *In vitro* screening for cold hardiness of raspberry cultivars. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 53: 213-216.
- 15 . Savitch LV Harney T and Hunner NPA (2000) Sucrose metabolism in spring and winter wheat in response to high irradiance, cold stress and cold acclimation. *Physiol. Plantarum* 108: 270-278.
- 16 . Singh KB, Malhotra RS, Halila MH, Knights EJ and Vermo MM (1994) Current status and future strategy in breeding chickpea for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica* 73: 137-149.
- 17 . Steponkus PL (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 35: 543-584.
- 18 . Travert S, Valerio L, Fourate I, Boudet AM and Teulieres C (1997) Enrichment in specific soluble sugars of two eucalyptus cell suspension cultures by various treatments enhances their frost tolerance via a noncolligative mechanism. *Plant Physiol.* 114: 1433-1442.
- 19 . Zhu CH and Liu ZQ (1987) Determination of media lethal temperature using the logistical function. Springer - Verlag Alan R. Liss. Inc., New York. PP: 672.