اثر سطوح مختلف شوری روی برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی و رشد سلول‌های سه رقم سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) در شرایط درون‌شیشه‌ای

Effect of Different Levels of Salinity on some Physiological and Cells-growth Characteristics in Three Potato (*Solanum tubrosum* L.) Cultivars *In Vitro*

معصومه عامریان[۱*] و محمود اثنی‌عشری[۲]

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۰۸

چکیده

روش‌های کشت بافت به‌طور وسیعی به‌منظور اصلاح محصولات، به‌ویژه برای انتخاب گیاهان متحمل به شوری استفاده می‌شوند. شوری مهم‌ترین تنش غیرزیستی است که بر عملکرد گیاهان در سراسر جهان تأثیر می‌گذارد. در این تحقیق ویژگی‌های فیزیولوژیکی و رشد سلول‌های سه رقم سیب‌زمینی (آگریا، مارفونا و سانته) در ۶ سطح شوری مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا پینه‌ها از میان‌گره‌های ساقه روی محیط‌کشت نیمه‌جامد موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی دو گرم در لیتر 2-4,D و ۰/۴ گرم در لیتر کینتین تولید شدند. سپس پینه‌ها به محیط‌کشت‌های مایع دارای همان ترکیبات هورمونی انتقال یافتند و پس از یک واکشت، سیستم کشت سلول‌های معلق مستقر گردید. سلول‌های حاصل نهایتاً در محیط‌کشت‌های مایع حاوی غلظت‌های صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم قرار داده شدند. این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه‌ی کاملا تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. در غلظت‌های مختلف کلریدسدیم در محیط‌کشت مایع، میزان وزن تر و خشک، پرولین، کربوهیدرات‌های محلول کل، پروتئین محلول کل، غلظت سدیم و پتاسیم سلول‌ها اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک، میزان پرولین، کربوهیدرات‌های محلول کل، پروتئین‌های محلول، وزن خشک و غلظت سدیم سلول‌ها افزایش و میزان وزن تر و غلظت پتاسیم آن‌ها کاهش یافت. واکنش سه رقم سیب‌زمینی به سطوح مختلف شوری متفاوت بود. رقم سانته بیش‌ترین میزان تجمع پرولین، قندهای محلول کل، پروتئین محلول کل و پتاسیم را داشت. این نتیجه می‌تواند بیانگر تحمل بیشتر این رقم نسبت به تنش شوری اعمال شده باشد.

واژه‌های کلیدی: کشت سلول‌های معلق، پنبه، پرولین، کربوهیدرات، کلرید سدیم

۱. استادیار، گروه تولیدات گیاهی (گیاهان دارویی و معطر)، دانشکده کشاورزی سنقر، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲. استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

*: نویسنده مسئول Email: masoomehamerian@yahoo.com

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از محصولات مهم اقتصادی است که در سطح وسیعی در جهان کشت می‌گردد. سیب‌زمینی چهارمین منبع تأمین‌کننده‌ی غذای مردم جهان بعد از گندم، برنج و ذرت می‌باشد (*احمد*[1] و همکاران، 2014). سیب‌زمینی در ۱۴۰ کشور کشت می‌شود که بیشتر این کشورها در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان قرار دارند. در این مناطق کمبود آب یا آب‌های شور مهم‌ترین عامل محدودکننده‌ی رشد و تولید محصول می‌باشد (*شاه‌زمن*[2] و همکاران، 2015).

شوری یکی از عمده‌ترین عوامل محدودکننده تولید محصولات در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان است. در این مناطق کمبود آب و بارندگی محدود، گرمای زیاد، تبخیر و تعرق بالا، کیفیت پایین آب‌های کشاورزی و یا روش‌های غلط کشاورزی و مدیریت ضعیف در سیستم‌های آبیاری این مشکل را جدی‌تر ساخته است. با کاهش منابع آب، استفاده از آب‌های شور و یا آب‌هایی با کیفیت پایین اجتناب‌ناپذیر خواهد بود (*جوآن*[3] و همکاران، 2007؛ *احمد* و همکاران، 2014). شوری به‌عنوان یک عامل محیطی محدودکننده‌ی رشد و نمو و تولید محصول در گیاهان می‌باشد. کاهش رشد و عملکرد گیاه سیب‌زمینی تحت شرایط تنش شوری مشاهده شده است. اگرچه سیب‌زمینی در گروه گیاهانی با حساسیت متوسط به شوری قرار می‌گیرد؛ اما این مقاومت در بین ارقام و گونه‌های سیب‌زمینی متفاوت است (*سیلوا*[4] و همکاران، 2001؛ *احمد* و همکاران، 2014؛ *شاه‌زمن* و همکاران، 2015). بنابراین مطالعه میزان مقاومت به شوری در این گیاه برای به‌نژادگران، فیزیولوژیست‌ها و مهندسان ژنتیک بسیار حائز اهمیت است.

کشت درون‌شیشه‌ای روشی مؤثر جهت ایجاد تنوع ژنتیکی و بررسی فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک تحت تنش شوری در سطح سلولی و نیز ارزیابی تحمل به شوری یا گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به شوری در گیاهان به‌حساب می‌آید (*لانگ*[5] و همکاران، 2005؛ *مرشد*[6] و همکاران، 2015؛ *ست*[7] و همکاران، 2015). هم‌چنین کشت‌های درون شیشه‌ای یک محیط یکنواخت و منظمی را برای بررسی میزان مقاومت و سازوکارهای مقاومت به شوری را فراهم می‌کنند. این‌گونه کشت‌ها یک محیط جایگزین مؤثر برای جلوگیری از برهمکنش‌های پیچیده‌ی محیط و خاک است که موجب بررسی دقیق‌تر پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه و سلول به تنش شوری می‌گردد (*اکول عامد*[8] و همکاران، 2007). درک بهتر مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک دخیل در مقاومت به شوری یک کلید برای توسعه راهکارهای انتخاب، غربالگری و به‌نژادی گیاهان مقاوم به شوری می‌باشد (*پرز-سالومو*[9] و همکاران، 2016). هم‌چنین ارزیابی تحمل به شوری گیاهان در سطح مزرعه و گلخانه مستلزم صرف هزینه و وقت زیادی است که به همین منظور می‌توان از روش‌های کشت بافت استفاده کرد. هم‌چنین نمونه‌های درون شیشه‌ای قادرند مدت زمان طولانی‌تری زنده باشند که انتخاب لاین‌های سلولی متحمل انجام گیرد. استفاده از کشت بافت (انتخاب درون شیشه‌ای) و انتقال ژن برای انتخاب و جدا کردن لاین‌های متحمل در مدت زمان کوتاه و فضای کم امکان‌پذیر است (*رای*[10] و همکاران، 2011). انتخاب لاین‌های سلولی متحمل به شوری و بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی از این نوع لاین‌های در چند گونه از گیاهان مانند گندم (*براکات* و *عبدل- لطیف*[11]، 1996)، سیب‌زمینی (*اوکات*[12] و همکاران، 1999)، برنج (*لوتس*[13] و همکاران، 1999؛ سالیم و مختار[14]، 2005) و آفتابگردان (*آلواریز*[15] و همکاران، 2003) با موفقیت انجام شده است.

گیاهان برای مقابله با تنش شوری نیاز به تطابق اسمزی نیز دارند. برای رسیدن به این منظور مولکول‌های قابل حل و سازگار در سلول سنتز می‌شوند که به‌عنوان اسمولیت و محافظ اسمزی عمل می‌نمایند. این مولکول‌ها موجب پایین آوردن فشار اسمزی درون سلول شده و به جذب آب درون سلول کمک می‌نمایند. علاوه‌بر این دارای خاصیت جاروب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد نیز هستند. پرولین یکی از این مواد است که تجمع آن یکی از معمول‌ترین پاسخ‌ها به تنش کم آبی و شوری می‌باشد. پرولین به‌عنوان یک ماده سازگار و یک محافظ اسمزی برای آنزیم‌های سیتوسلی و اندامک‌های سلول عمل می‌کند. هم‌چنین به‌عنوان یک منبع کربن و نیتروژن برای بهبود اثرات تنش و رشد بعدی، پایدارکننده غشاهای زیستی و ماکرومولکول‌های آزاد و حتی یک مولکول علامت‌دهنده مرتبط با تنش عمل می‌نماید (*پاتادا*[16] و همکاران، 2008).

1. Ahmad
2. Shah Zaman
3. Juan
4. Silva
5. Lang
6. Murshed
7. Seth
8. Aqueel Ahmad
9. Pérez-Salamó
10. Rai
11. Barakat and Abdeei
12. Ochatt
13. Lutts
14. Saleem and Mukhtar
15. Alvarez
16. Patada

قندها به دو شیوه از سلول محافظت می‌کنند. در شیوه‌ی نخست، گروه‌های هیدروکسیل قندها ممکن است به‌منظور حفظ و ادامه واکنش‌های آب‌دوست در غشاها و نیز پروتئین‌های موجود در گیاه در طی دهیدراتاسیون جایگزین آب شوند. از این رو قندها، از طریق پیوندهای هیدروژنی با پروتئین‌ها و غشاها واکنش نشان داده و از این طریق از تغییر پروتئین‌ها جلوگیری می‌کنند. در شیوه دوم، قندها نقش اساسی در کریستاله کردن ایفا می‌کنند. منظور از کریستاله کردن، تشکیل بلورهای بیولوژیک در سیتوپلاسم سلول‌های دهیدراته شده است (*وانگ*[1] و همکاران، 1996). گیاه تحت تنش شوری با مشکل کم‌آبی نیز مواجه می‌شود.

در گیاه سیب‌زمینی افزایش میزان پرولین و قندهای محلول کل و هم‌چنین کاهش میزان پتاسیم و وزن تر تحت تنش شوری گزارش شده است (دانشمند و همکاران، ۱۳۹۰؛ دانشمند، ۱۳۹۳؛ پاتلری *ساکسیلا* و *دوی پراساد*[2]، 1994؛ *هما*[3]، 2016).

با توجه به اهمیت گیاه سیب‌زمینی و نیز موقعیت جغرافیایی بیشتر مناطق ایران به‌عنوان مناطق خشک و نیمه‌خشک، مطالعه‌ی اثر تنش شوری بر گیاه سیب‌زمینی بسیار با ارزش است. برای اصلاح گیاه سیب‌زمینی شناخت مکانیسم مقابله با تنش شوری و نیز تشخیص اثر تنش شوری بر روی فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیسمی گیاه نخستین گام به‌شمار می‌آید. بنابراین، تحقیق حاضر با هدف ارزیابی اثر تنش شوری بر روی شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیک سلول‌های سه رقم سیب‌زمینی جهت ارزیابی و غربال اولیه این ارقام، در کشت مایع صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

موادگیاهی و شرایط رشد

غده‌های سه رقم سیب‌زمینی شامل آگریا، مارفونا و سانته از مرکز آموزش و تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان و مرکز آموزش و تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرج تهیه گردیدند. از ساقه‌ی ارقام کاشته شده در شرایط گلخانه به‌عنوان منبع گیاهی جهت تولید پینه استفاده شد و قطعاتی به‌طول ۱/۵-۱ سانتی‌متر به‌عنوان ریزنمونه تهیه گردید. ریزنمونه‌ها با محلول هیپوکلریت‌سدیم به غلظت دو درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی گردیدند و بلافاصله چهار بار توسط آب مقطر استریل جهت زدودن هیپوکلریت‌سدیم شستشو داده شدند. همه ریزنمونه‌ها در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت ۱۶ ساعت فتوپریود با استفاده از لامپ فلورسنت سفید سرد به‌مدت ۴-۳ هفته نگه‌داری گردیدند.

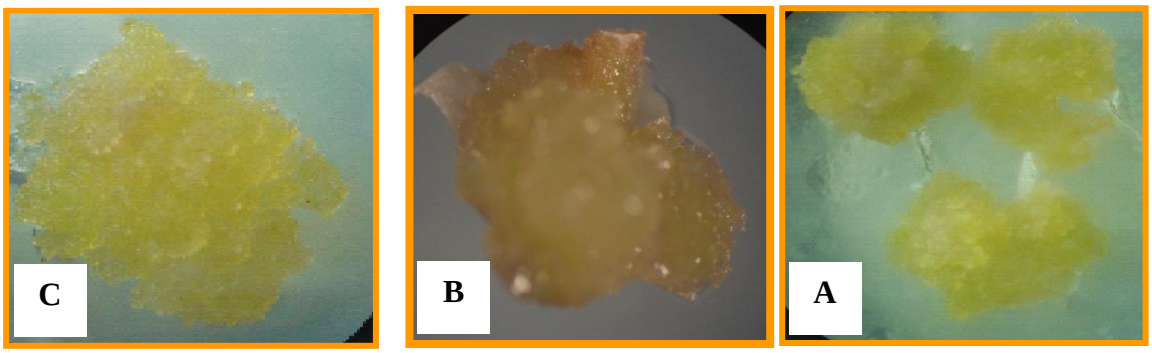
ایجاد پینه[4] و استقرار کشت سلول‌های معلق در محیط مایع

ریزنمونه‌های هر سه رقم سیب‌زمینی روی محیط‌کشت نیمه‌جامد *موراشیگ* و *اسکوگ*[5] (MS) حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2-4,D و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین برای تولید پینه قرار داده شدند. پس از یک هفته در اطراف سطوح برش ریزنمونه پینه مشاهده گردید. پینه‌ها بعد از چهار هفته از ریز نمونه جدا شده و روی محیط‌کشت مشابه قرار گرفتند. پس از دو بار واکشت کردن پینه کافی به‌دست آمد.

در تمامی ریزنمونه‌های ساقه گیاهان گلخانه‌ای بعد از ۲۰-۱۵ روز روی محیط‌کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2-4,D و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین تشکیل بافت پینه‌ای مشاهده گردید (شکل ۱).

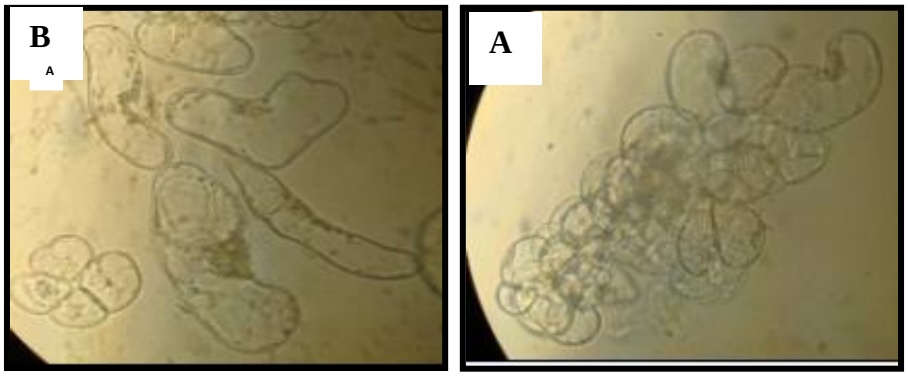
حدود دو گرم از پینه‌های ایجاد شده مربوط به هر رقم در داخل یک فلاسک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتر که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت مایع با همان ترکیب هورمونی (فاقد آگار) بود، قرار داده شدند. ارلن مایرها نهایتاً روی انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۱۰-۱۰۰ دور در دقیقه مستقر شدند. شرایط نگه‌داری سوسپانسیون‌های سلولی از نظر نور و دما عیناً مشابه شرایط پینه‌زایی بود. پس از پنج بار واکشت کردن سیستم کشت استقرار یافته، سوسپانسیون سلولی محتوی مقادیر کافی سلول در حال رشد فراهم گردید.

1. Wang
2. Potluri Sasikala and Devi Prasad
3. Homma
4. Callus
5. Murashige and Skoog (MS)



شکل ۱: پینه‌های ترد تولید شده از ریزنمونه‌های ساقه‌ی ارقام آگریا (A)، سانته (B) و مارفونا (C) روی محیط‌کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2-4,D و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین

Fig. 1: Friable callus produced from internodes explants of potato, cv. Agria (A), Marfona (B) and Sante (C) on MS medium supplemented with 2 mg L^{-1} 2,4-D and 0.4 mg L^{-1} Kinetin



شکل ۲: تنوع در شکل و اندازه سلول‌های سیب‌زمینی در کشت مایع (بزرگنمایی ۴۰ برابر)

Fig. 2: Diversity in shape and size of potato cells in suspension-culture (×40 magnification)

تیمارهای شوری

پس از استقرار سوسپانسیون سلولی در محیط‌کشت مایع به شرح فوق، سلول‌ها در محیط‌کشت MS با همان ترکیبات هورمونی پینه‌زایی به‌علاوه غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌مول کلریدسدیم به‌منظور بررسی واکنش سلول‌های هر سه رقم سیب‌زمینی به نمک واکشت شدند. شش غلظت نمک با سه تکرار برای هر تیمار از غلظت نمک در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری پارامترهای رشد و فیزیولوژی سلول‌ها

به‌منظور اندازه‌گیری پارامترهای رشد و فیزیولوژی سلول‌های قرار گرفته در معرض شوری، عصاره‌گیری از کشت سوسپانسیون به‌عمل آمد. مقادیر پرولین و قندهای محلول کل از روش *پاکوایِن* و *لچاسر*[1] (1979) و میزان پروتئین محلول کل از روش *برادفورد*[2] (1976) تعیین گردید.

اندازه‌گیری برخی از عناصر غذایی

به‌منظور اندازه‌گیری میزان عناصر سلول‌های سه رقم سیب‌زمینی از روش نمونه‌های هضم شده (*وسترما*[3]، 1990) استفاده گردید.

طرح آماری

این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد که در آن اثر رقم (در ۳ سطح) و شوری (در ۶ سطح) روی صفات اندازه‌گیری شده‌ی در سلول‌های سیب‌زمینی (وزن تر و خشک، میزان پرولین، قندهای محلول کل، پروتئین محلول کل و برخی عناصر غذایی) مورد مطالعه قرار گرفت. فرض‌های تجزیه واریانس قبل از تجزیه واریانس داده‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (۹/۱) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

1. Paquin Lechasser
2. Bradford
3. Westterma

نتایج و بحث

ایجاد پینه و استقرار کشت مایع

واکنش ریزنمونه‌های سه رقم به تیمار پینه‌زایی متفاوت بود و بیش‌ترین درصد تشکیل پینه در رقم مارفونا و کم‌ترین آن در رقم سانته مشاهده شد که این وضعیت ناشی از تفاوت ژنتیکی بین رقم‌ها می‌باشد. *شمیما*[1] و همکاران (2003) به نتایج مشابهی در بررسی پینه‌زایی ارقام مختلف سیب‌زمینی دست یافتند.

در کشت سوسپانسیون دو نوع سلول مشاهده شد. سلول‌های کروی و سلول‌های کشیده که با افزایش تعداد واکشت‌ها تعداد هر دو نوع سلول افزایش یافت [شکل ۲ (A)]. رنگ کدر محیط‌کشت در انتهای هر واکشت حاکی از تشکیل خوشه‌های سلولی بود که نمایانگر رشد مطلوب سلول‌ها در محیط‌کشت می‌باشد [(شکل ۲ (B)].

اثر تنش شوری بر پارامترهای رشد

براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، رقم اثر معنی‌داری بر روی وزن تر و خشک سلول‌ها نداشت اما شوری اثر معنی‌داری (در سطح یک درصد) بر وزن تر و خشک سلول‌ها نشان داد. اثر متقابل بین رقم و تنش شوری اثر معنی‌داری (در سطح پنج درصد) بر روی وزن خشک سلول‌ها داشت.

در بررسی اثر متقابل مشخص شد که بیش‌ترین مقدار وزن خشک سلول‌ها مربوط به محیط فاقد نمک در رقم آگریا بود که اختلاف معنی‌داری با رقم‌های مارفونا و سانته در همان محیط نداشت و کم‌ترین آن متعلق به تیمار ۵۰ میلی‌مول کلریدسدیم در رقم مارفونا بود (شکل ۳).

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش غلظت نمک در محیط‌کشت مایع وزن تر سلول‌ها کاهش و وزن خشک آن‌ها افزایش یافت. به‌طوری‌که کم‌ترین وزن تر سلول‌ها در تیمار ۲۵۰ میلی‌مول کلریدسدیم بود که اختلاف معنی‌داری با ۲۰۰ میلی‌مول کلریدسدیم نداشت. البته سطوح بالای نمک از نظر میزان وزن تر سلول‌ها اختلاف معنی‌داری با هم نشان ندادند. بیش‌ترین وزن تر سلول‌ها در محیط فاقد نمک مشاهده گردید (شکل ۴).

شوری سبب کاهش رشد سلول‌ها شده که در نهایت کاهش وزن تر آن‌ها را به دنبال دارد. کاهش رشد سلول‌ها با افزایش غلظت نمک در گندم (*ارزانی و میر اجاقی*[2]، 1999)، برنج (*باسو*[3] و همکاران، 2002)، یونجه (*نومن و احمد*[4]، 2004) و نیشکر (*گاندنو*[5] و همکاران، 2005) و با افزایش وزن خشک آن‌ها در گندم (*فرخ*[6]، 2002) گزارش شده است.

کاهش میزان رشد گیاه تحت تنش شوری می‌تواند به دلائلی چون مهار تقسیم و گسترش سلولی و یا حتی مرگ سلولی، کمبود آب و یا سمیت نمک همراه با جذب زیادی یون‌هایی مثل سدیم و کلر، عدم تعادل مواد غذایی و اختلال در جذب و انتقال یون‌هایی مثل پتاسیم و کلسیم، دخالت در فرایندهای طبیعی سلول به‌ویژه فرایندهای دخیل در تولید انرژی مثل فتوسنتز و تنفس باشد (*شیبلی*[7] و همکاران، 2007). کاهش رشد سلول‌ها در غلظت‌های مختلف نمک ارتباط مستقیم با میزان سدیم و ارتباط معکوس با میزان پتاسیم در سلول‌های سیب‌زمینی دارد (شکل ۸ و ۹).

در گیاهچه‌های سیب‌زمینی رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای نیز کاهش رشد و وزن تر در غلظت‌های مختلف نمک (*زانگ*[8] و همکاران، 2001؛ سیلوا و همکاران، 2001؛ محمود و *رازیدین*[9]، 2002؛ *هما*، 2016؛ *پالینو*[10] و همکاران، 2016) و افزایش وزن خشک (*پاتریسیا* و *ماریا*[11]، 2001) گزارش شده است. این‌که چرا تنش شوری باعث تجمع بیشتر مواد خشک در سلول می‌شود احتیاج به مطالعات بیشتر به‌ویژه در سطح مولکولی دارد. البته می‌توان افزایش وزن خشک سلول‌ها را به مکانیسم‌های عمده اجتناب از تنش شوری در سلول‌های سیب‌زمینی نسبت داد.

به‌طورکلی می‌توان گفت که کاهش وزن تر سلول‌های سیب‌زمینی به‌دلیل کاهش میزان رشد سلول‌های تحت تنش شوری باشد که با کمبود آب و یا سمیت نمک همراه با جذب زیادی یون‌هایی مثل سدیم و کلر همراه است. افزایش وزن خشک سلول‌های سیب‌زمینی نیز می‌تواند به‌دلیل افزایش تجمع پرولین، قندهای محلول کل و پروتئین محلول کل به‌عنوان اسمولیت‌های سازگار باشد.

1. Shamima
2. Arzani and Mirodjagh
3. Basu
4. Noaman and Ahmad
5. Gandonou
6. Farrukh
7. Shibli
8. Zhang
9. Mahmood and Raziuddin
10. Paulino
11. Patricia and Maria

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس اثر شش سطح شوری روی برخی از ویژگی‌های رشد سلول در سه رقم سیب‌زمینی

Table 1: Analysis of variance of the effect of 6 level of salinity on some cell growth traits in three potato cultivars

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Means of square	
		وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight
رقم Cultivar	2	0.109^{ns}	0.004^{ns}
سطح تنش Stress level	5	4.733^{**}	0.041^{**}
رقم × سطح تنش Cultivar × Stress level	10	0.414^{ns}	0.003^{*}
اشتباه آزمایش Error	36	0.078	0.001

ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

ns, * and **: Non- significant and significant at the 5% and 1% level of probability, respectively

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس اثر شش سطح شوری بر انباشت متابولیت‌های سازگاری (پرولین، قندهای محلول کل و پروتئین محلول کل) در سه رقم سیب‌زمینی

Table 2: Analysis of variance of the effect of 6 level of salinity on accumulation of compatible metabolites (proline, total soluble carbohydrates and total soluble protein) in three potato cultivars

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Means of square		
		پرولین Proline	قندهای محلول کل Total soluble carbohydrates	پروتئین‌های محلول کل Total soluble protein
رقم Cultivar	2	257.808^{**}	22660.856^{ns}	1617.680^{**}
سطح تنش Stress level	5	3002.845^{**}	1058865.471^{**}	8158.731^{**}
رقم × سطح تنش Cultivar × Stress level	10	91.207^{**}	12185.578^{ns}	168.065^{**}
اشتباه آزمایش Error	36	3.371	7002.482	10.041

ns و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

ns and **: non- significant and significant at the 1% level of probability, respectively

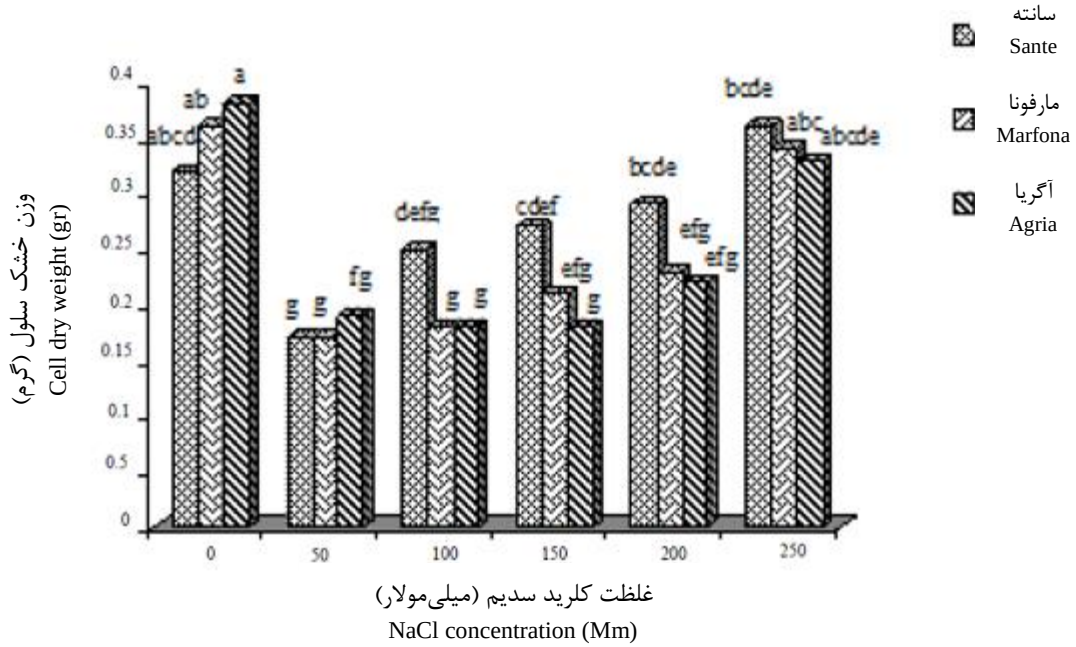
جدول ۳: نتایج تجزیه واریانس اثر شش سطح شوری بر میزان برخی عناصر غذایی در سه رقم سیب‌زمینی

Table 3: Analysis of variance of the effect of 6 level of salinity on the amount of some of minerals in three potato cultivars

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Means of square	
		سدیم Sodium	پتاسیم Potassium
رقم Cultivar	2	0.007^{**}	0.010^{**}
سطح تنش Stress level	5	0.700^{**}	0.260^{**}
رقم × سطح تنش Cultivar × Stress level	10	0.001^{ns}	0.001^{**}
اشتباه آزمایش Error	36	0.001	0.001

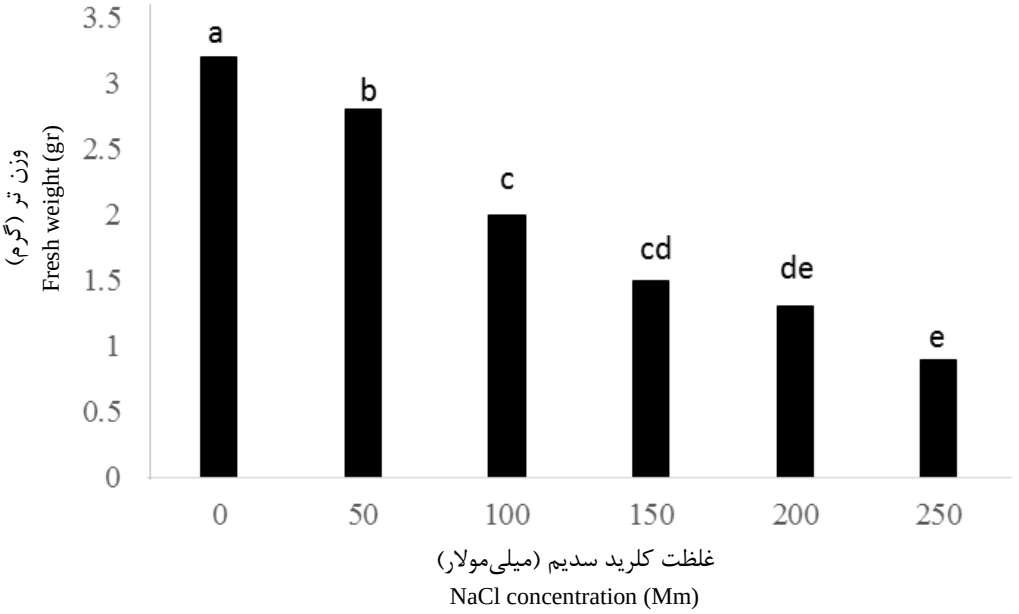
ns و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

ns and **: non- significant and significant at the 1% level of probability, respectively



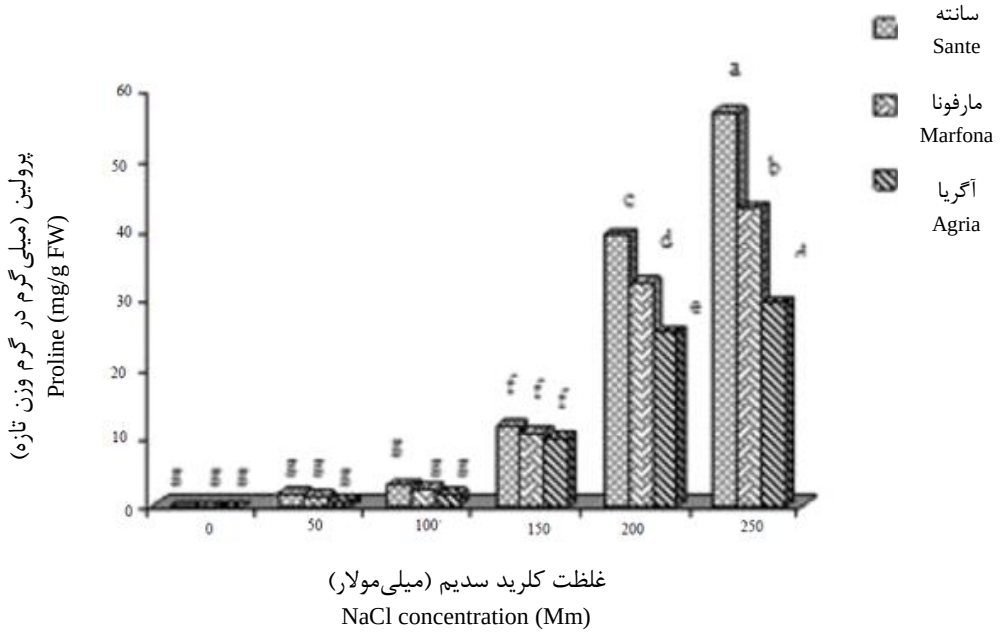
شکل ۳: اثر سطوح مختلف شوری بر وزن خشک سلول‌های سه رقم سیب‌زمینی

Fig. 3: The effect of different levels of salinity on cell dry weight of three potato cultivars



شکل ۴: اثر سطوح مختلف شوری بر وزن تر سلول‌های سیب‌زمینی

Fig. 4: The effect of different levels of salinity on cells fresh weight of potato cells



شکل ۵: اثر سطوح مختلف شوری بر میزان پرولین در سلول‌های سه رقم سیب‌زمینی

Fig. 5: The effect of different levels of salinity on the amount of in the proline cells of three potato cultivars

اثر تنش شوری بر مؤلفه‌های فیزیولوژیکی پرولین

طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) تنش، رقم و اثر متقابل بین این دو عامل اثر معنی‌داری (در سطح یک درصد) بر میزان پرولین سلول‌ها داشتند.

مقایسه میانگین‌ها (شکل ۵) نشان داد که با افزایش غلظت نمک، میزان پرولین سلول‌ها افزایش یافت. هم‌چنین واکنش سه رقم سیب‌زمینی از نظر میزان پرولین تحت شرایط تنش متفاوت بود. اثر متقابل بین شوری و رقم نیز نشان داد که تیمار ۲۵۰ میلی‌مول کلریدسدیم در رقم سانته بیش‌ترین میزان پرولین و رقم‌های آگریا، مارفونا و سانته در محیط فاقد نمک کم‌ترین میزان پرولین را تولید کردند که اختلاف معنی‌داری با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مول نمک در هر سه رقم مشاهده نشد.

افزایش غلظت پرولین، فراوان‌ترین و عمومی‌ترین عکس‌العملی است که به محض آبکشیدگی[1] ناشی از کمبود آب یا کاهش پتانسیل اسمزی، نه تنها در گیاهان بلکه در جلبک‌ها، باکتری‌ها، بی‌مهرگان دریایی و پروتوزوآ مشاهده شده است (*دلانی* و *ورنا*[2]، 1993). به‌رغم تحقیقات وسیعی که برای روشن شدن نقش پرولین در بهبود اثرات زیان‌آور تنش‌های غیرزنده در گیاهان به‌عمل آمده اما اهمیت فیزیولوژیکی و نقش بیولوژیکی پرولین هنوز به میزان کافی روشن نشده است (*امینی* و *احسان‌پور*[3]، 2003؛ *منصور*[4] و همکاران، 2005).

تکسریا[5] و همکاران (2006) میزان پرولین را در لاین‌های سلولی سیب‌زمینی تحت تنش شوری مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که افزایش میزان پرولین در مقایسه با تیمار شاهد در واکنش به شوری روی می‌دهد. اگرچه تلاش‌های فراوانی برای مرتبط ساختن انباشت پرولین در شرایط تنش شوری با میزان حساسیت و تحمل به شوری در گونه‌های مختلف انجام گرفته است اما مدارک قانع‌کننده‌ی زیادی در تأیید این ادعا وجود ندارد. برای انباشت پرولین در گیاهان آستانه‌ای از شوری وجود دارد. به‌عبارت دیگر تا زمانی‌که غلظت نمک در محیط و به تبع آن کاتیون‌های یک ظرفیتی به‌ویژه سدیم در بافت به حد مشخصی نرسد، انباشت پرولین صورت نمی‌گیرد (*جوزف*[6] و همکاران، 2015). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که در غلظت بیش از ۱۰۰ میلی‌مول کلریدسدیم پرولین افزایش می‌یابد و اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مول نمک وجود ندارد، که احتمالاً به غلظت سدیم مرتبط است (شکل ۹). تجمع پرولین آزاد در سلول تحت شرایط تنش شوری، در بسیاری از گونه‌های گیاهی نظیر سیب‌زمینی ترشی (*هنگ-لوگو*[7] و همکاران، 1999)، گندم (*فرخ*، 2002؛ *دمیر* و *اوکالین*[8]، 2002)، سیب‌زمینی (*رهنما*[9]، 2004)، گوجه‌فرنگی (*امینی* و

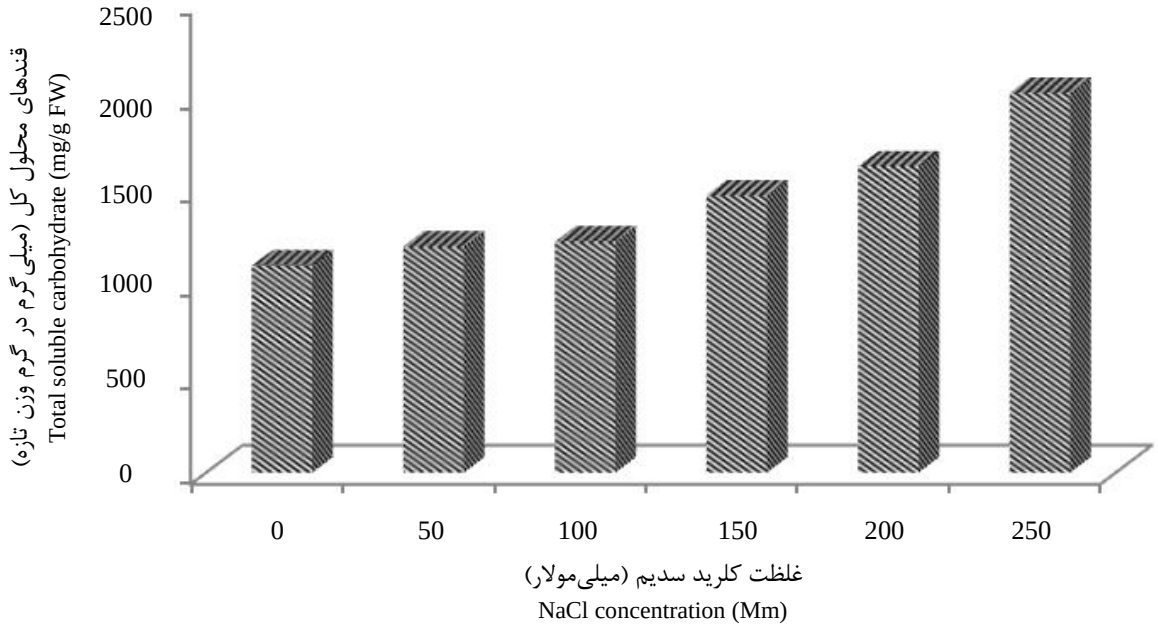
1. Water deficit stress
2. Delauney and Verna
3. Amini and Ehsanpour
4. Mansour
5. Teixeira
6. Joseph
7. Heng-Logo
8. Demir and Oçalikan
9. Rahnama

احسان‌پور، 2005) و نیشکر (*تکسریا*[1] و همکاران، 2006؛ *پاتاد*[2] و همکاران، 2006) گزارش شده است.

اگرچه نقش پرولین در افزایش مقاومت به تنش‌ها در پژوهش‌های زیادی تأیید شده است، اما در استفاده از آن به‌عنوان یک شاخص مقاومت گزارش‌های ضد و نقیضی وجود دارد (*مونرال*[3] و همکاران، 2007). *عزیز*[4] و همکاران (1999) نشان دادند که تجمع پرولین حتی به مقدار کم ممکن است برای کاهش یا جلوگیری از اثرات شوری روی متابولیسم سلول مفید باشد. اختلاف در میزان تجمع پرولین طی تنش شوری بین رقم‌های یک گونه گیاهی مشاهده می‌شود و نیز لاین‌های سلولی متحمل پرولین بیشتری نسبت به لاین‌های حساس انباشته می‌کنند (*پاتاد* و همکاران، 2006). از طرفی *میسرا* و *گاپتا*[5] (2005) نشان دادند که در برنج لاین‌های حساس دارای پرولین بیشتری نسبت به لاین‌های متحمل هستند. *رهنما* (2002) نیز گزارش کردند که تجمع پرولین شاخص مناسبی برای تعیین میزان مقاومت به تنش شوری نمی‌باشد.

منبع متابولیکی تجمع پرولین در پتانسیل‌های پایین آب کاملاً روشن نیست، ولی آنچه مسلم است، سنتز این ماده افزایش می‌یابد.

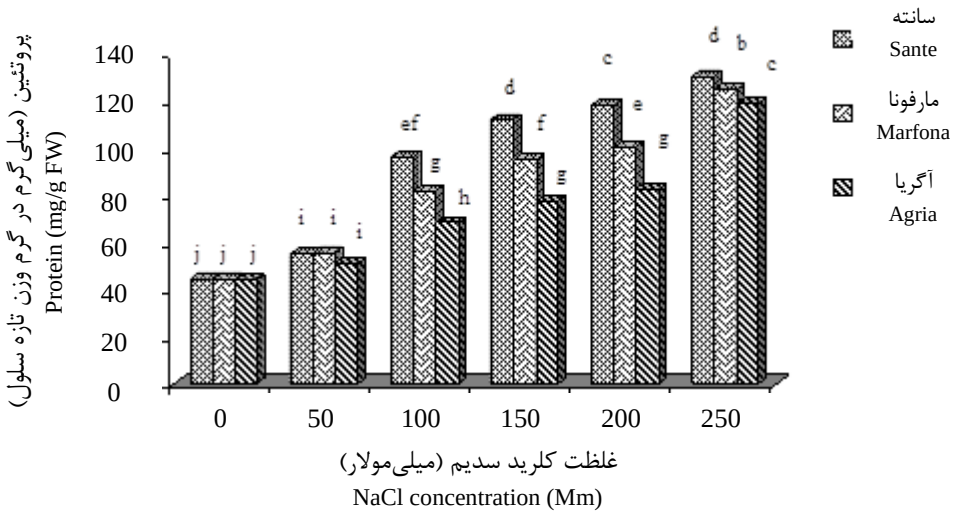
اما به نظر می‌رسد که مقدار پرولین می‌تواند به‌عنوان شاخص مناسبی برای ارزیابی تحمل سلول‌های ارقام سیب‌زمینی به تنش شوری در شرایط درون شیشه‌ای منظور گردد که به‌دنبال آن نقش اسمولیتی پرولین تأیید می‌شود. تنظیم اسمزی در سلول‌های سیب‌زمینی عمدتاً به‌وسیله انباشت پرولین تحقق می‌یابد. بدیهی است پژوهش‌های بیشتری لازم است تا بتوان تحمل به شوری در سطح سلولی و شرایط تجمع پرولین در شرایط درون شیشه‌ای را به تحمل در گیاه کامل و در شرایط مزرعه تعمیم داد. چنانچه آزمایش‌های مزرعه‌ای مؤید نتایج فوق باشند، احتمال این‌که مقدار پرولین بتواند شاخصی مناسب برای ارزیابی تحمل بوته‌های سیب‌زمینی در شرایط شوری به حساب آید را به شدت قوت می‌بخشد.



شکل ۶: اثر سطوح مختلف شوری بر میزان قندهای محلول کل در سلول‌های سیب‌زمینی

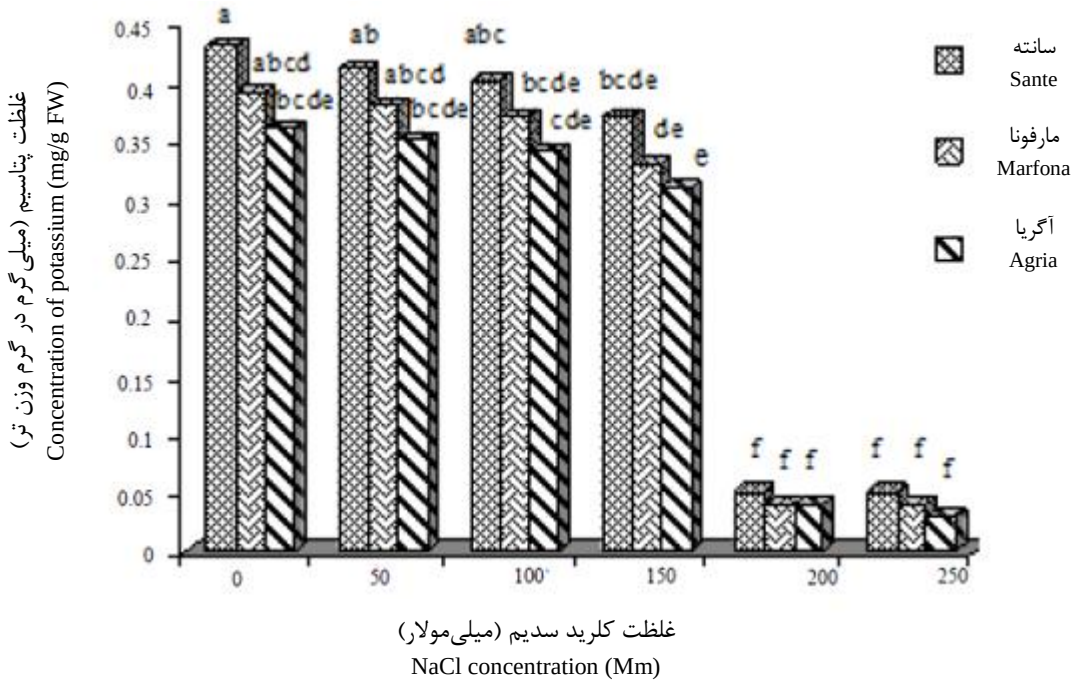
Fig. 6: The effect of different levels of salinity on total soluble carbohydrate in the cells of potato

1. Teixeira
2. Patade
3. Monreal
4. Aziz
5. Misra and Gupta



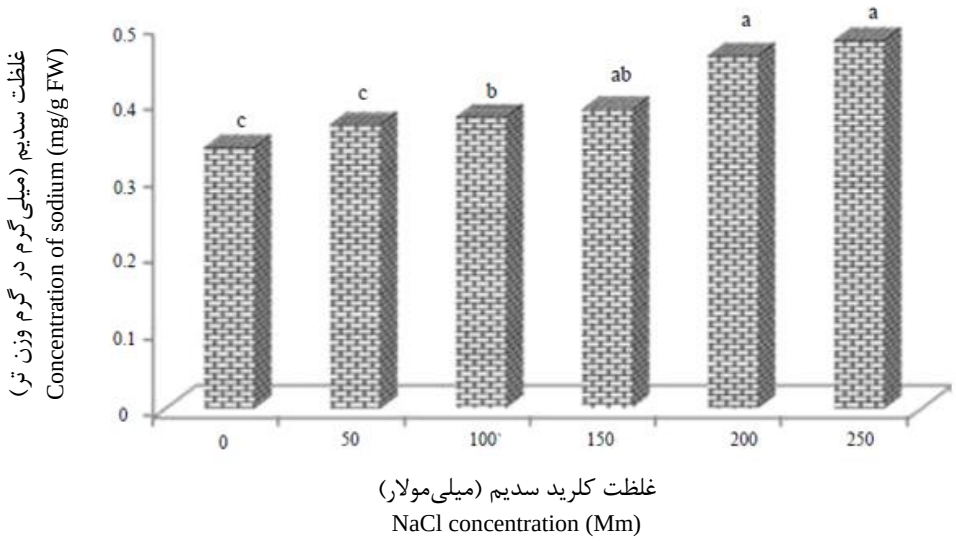
شکل ۷: اثر سطوح مختلف شوری بر میزان پروتئین محلول در سلول‌های سه رقم سیب‌زمینی

Fig. 7: The effect of different levels of salinity on total soluble protein in the cells of three potato cultivars



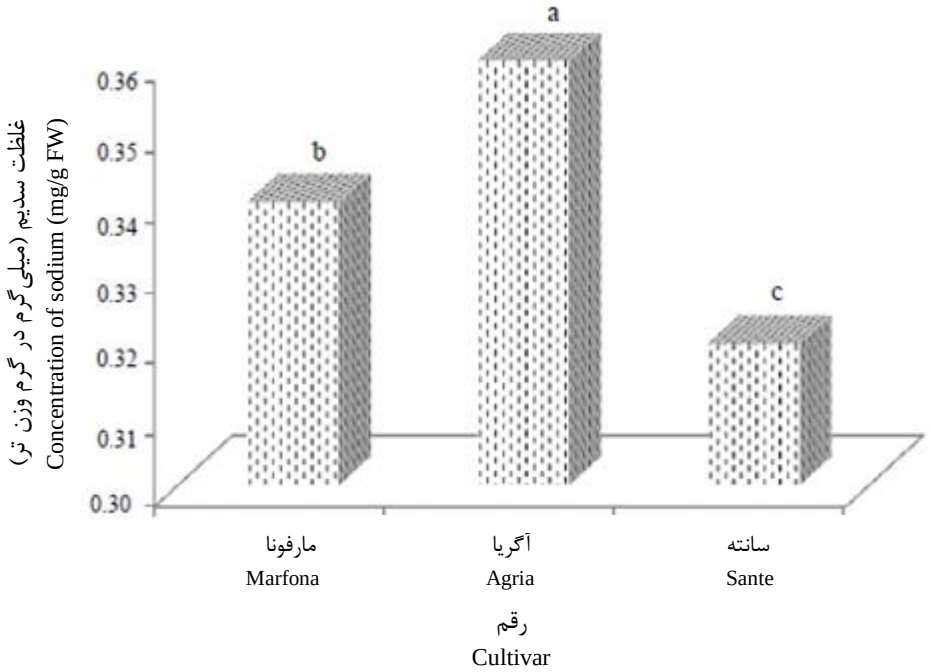
شکل ۸: اثر سطوح مختلف شوری بر غلظت پتاسیم در سلول‌های سه رقم سیب‌زمینی

Fig. 8: The effect of different levels of salinity on potassium concentration of in the cells of three potato cultivars



شکل ۹: اثر سطوح مختلف شوری بر غلظت سدیم در سلول‌های سیب‌زمینی

Fig. 9: The effect of different levels of salinity on the sodium concentration in the cells of potato



شکل ۱۰: مقایسه سه رقم سیب‌زمینی از نظر تجمع سدیم در سلول‌ها

Fig. 10: Comparison of three potato cultivar in terms of sodium accumulation in the cells

قندهای محلول کل

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که شوری اثر معنی‌داری (در سطح یک درصد) بر میزان قندهای محلول کل سلول‌ها داشت. رقم و اثر متقابل بین رقم و سطح شوری اثر معنی‌دار بر میزان قندهای محلول کل نشان ندادند.

مقایسه میانگین‌ها (شکل ۶) نیز بیانگر این بود که با افزایش شدت تنش بر میزان قندهای محلول کل افزوده شد که بیش‌ترین و کم‌ترین میزان قندهای محلول کل به‌ترتیب مربوط به تیمار ۲۵۰ میلی‌مول کلریدسدیم و محیط فاقد نمک بود.

در سلول‌های گیاهان عالی به‌منظور گریز از پلاسمولیز و برقراری تورژسانس، تحت تأثیر برخی از تنش‌های محیطی ازجمله خشکی و شوری، مولکول‌های درشت‌تر نظیر نشاسته به مولکول‌های کوچکتری مانند گلوکز شکسته می‌شوند. این امر موجب منفی‌تر شدن پتانسیل آب در سلول‌ها و تنظیم اسمزی می‌شود (حیدری شریف آباد، ۱۳۸۰). میزان ساکارز و قندهای احیاءکننده در لاین‌های سلولی کلم بروکسل[1] در هر دو محیط جامد و مایع مشابه بود و با افزایش غلظت نمک، افزایش یافت (*الاو-موتیل*[2] و همکاران، 2003).

1. Broccoli
2. Elavumoottil

مکانیسم‌هایی که سبب تجمع کربوهیدرات‌های محلول در سلول‌های تحت تنش شوری می‌شوند متفاوت هستند. مطالعات فیزیولوژیکی نشان می‌دهند که متابولیسم کربوهیدرات‌ها در واکنش به تنش شوری تغییر می‌کند (حیدری شریف آباد، ۱۳۸۰). تحت شرایط تنش شوری، تولید رادیکال‌های آزاد در گیاهان افزایش می‌یابد و انباشت الکل‌های قندی ممکن است تا حدودی پروتئین‌ها را در مقابل آسیب اکسیداتیو رادیکال‌های آزاد محافظت نماید (*بوهنرت* و *شن*[1]، 1999). چنین به‌نظر می‌رسد که افزایش قندهای محلول کل در سلول‌های سیب‌زمینی تحت شرایط شوری، به حفظ تنظیم اسمزی و در نهایت حفظ تورژسانس و فشار آماس سلول کمک می‌کند. افزایش میزان قندهای محلول در اثر شوری توسط *پیکوراس*[2] و همکاران (1996) در لیمو، *هنگ-لوگو*[3] و همکاران (1999) در سیب‌زمینی ترشی، *فرخ* (2002) در گندم، *الاو-موتیل* و همکاران (2003) در کلم بروکسل و *امینی* و *احسان‌پور* (2005) در گوجه‌فرنگی گزارش گردیده است.

پروتئین محلول کل

طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) شوری، رقم و اثر متقابل بین آن دو بر میزان پروتئین محلول کل سلول‌ها اثر معنی‌داری (در سطح یک درصد) داشتند.

مقایسه میانگین‌ها (شکل ۷) نشان داد که با افزایش شدت تنش مقدار پروتئین محلول کل افزایش یافت. تحت شرایط تنش بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار پروتئین محلول کل سلول‌ها به‌ترتیب در رقم سانته و آگریا مشاهده شد. اثر متقابل بین شوری و رقم نشان داد که بیش‌ترین میزان پروتئین محلول کل مربوط به تیمار ۲۵۰ میلی‌مول کلریدسدیم در رقم سانته و کم‌ترین آن مربوط به رقم آگریا در محیط فاقد نمک بود که اختلاف معنی‌داری با ارقام سانته و مارفونا در همان محیط نداشت.

در مورد اثر تنش شوری روی میزان پروتئین محلول کل در گیاهان مختلف و اندام‌های مختلف گزارشات متناقضی وجود دارد. نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر با یافته‌های *راماگوپال*[4] (1986) در ذرت، *پاتلری ساکسیلا* و *دوی پراساد* (1994) در سیب‌زمینی، *هنگ-لوگو* و همکاران (1999) در سیب‌زمینی ترشی، *دمیر* و *اوکالین* (2002) در نخود، *فرخ* (2002) در گندم و *جیانگ*[5] و همکاران (2006) در کتان و *نیک‌نام*[6] و همکاران (2006) در شنبلیله مطابقت دارد. درصورتی‌که تحقیقات *دبوبا* و همکاران (2006) کاهش مقدار پروتئین محلول کل در شرایط تنش شوری را در گوجه‌فرنگی نشان می‌دهد. *علی*[7] (1999) و *دمیر* و *اوکالین* (2002) معتقدند که افزایش غلظت پرولین عامل افزایش میزان پروتئین در شرایط تنش شوری می‌باشد. هم‌چنین قندها با پروتئین‌ها و غشاءها از طریق پیوند هیدروژنی اثر متقابل دارند، به همین دلیل از تخریب پروتئین‌ها جلوگیری می‌کنند.

جذب عناصر غذایی

طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) شوری و رقم اثر معنی‌داری (در سطح یک درصد) بر میزان سدیم و پتاسیم سلول‌ها داشت. اثر متقابل بین رقم و سطوح شوری فقط روی میزان عنصر پتاسیم معنی‌دار (در سطح یک درصد) بود.

بررسی تغییرات پتاسیم (شکل ۸) نشان‌دهنده‌ی روند کاهشی آن در سلول‌ها در اثر شوری بود. اثر متقابل بین دو عامل نشان داد که بیش‌ترین میزان پتاسیم مربوط به رقم سانته در محیط عاری از نمک بود که اختلاف معنی‌داری با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مول نمک در این رقم و هم‌چنین رقم مارفونا در محیط عاری از نمک و ۵۰ میلی‌مول کلریدسدیم نداشت و کم‌ترین میزان پتاسیم در آگریا و ۲۵۰ میلی‌مول کلریدسدیم مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با ۲۰۰ میلی‌مول نمک و رقم‌های مارفونا و سانته در محیط‌های ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌مول کلریدسدیم نشان نداد.

مقایسه میانگین‌های مربوط به عنصر سدیم (شکل ۹) نشان داد که مقدار سدیم سلول‌ها با افزایش سطوح شوری افزایش یافت، به‌طوری‌که بیش‌ترین غلظت سدیم در محیط حاوی ۲۵۰ میلی‌مول نمک بود که اختلاف معنی‌داری با سایر سطوح بالای کلریدسدیم نداشت و کم‌ترین آن در محیط فاقد نمک مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با ۵۰ میلی‌مول نمک نشان نداد. بیش‌ترین غلظت سدیم در رقم آگریا اندازه‌گیری شد و کم‌ترین غلظت آن در رقم سانته مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با رقم مارفونا نداشت (شکل ۱۰).

یکی از اثرات شوری بر متابولیسم گیاهی، اختلالات تغذیه‌ای است. افزایش غلظت‌های سدیم و کلر در محیط خارجی می‌تواند موجب کاهش فعالیت یونی و تولید نسبت‌های زیاد سدیم به کلسیم، سدیم به پتاسیم و سدیم به منیزیم گردد (*گراتان* و *گریو*[8]، 1999). پتاسیم و کلر نقش کلیدی در انتخاب

1. Bohnert and Shen
2. Piqueras
3. Heng-Logo
4. Ramagopal
5. Jiang
6. Niknam
7. Ali
8. Grratan

لاین‌های متحمل به شوری در نیشکر داشته‌اند (*کریستوف*[1] و همکاران، 2006).

یکی از مهم‌ترین اثرات افزایش شوری بالا رفتن غلظت سدیم در داخل گیاه است. در این شرایط جذب پتاسیم توسط سلول‌ها به‌علت رقابت با سدیم کاهش می‌یابد. به‌هم خوردن نسبت‌های یونی در گیاه تحت تنش شوری حاصل تداخل جذب سدیم با پتاسیم است. تشابه شعاع یون هیدراته سدیم و پتاسیم عمل تمایز دو یون مذکور را برای پروتئین‌های ناقل مشکل ساخته و بدین‌وسیله اساس سمیت یون سدیم برای گیاه فراهم می‌گردد. پتاسیم به‌عنوان یک اسمولیت غیرآلی در سلول‌های گیاه مورد نیاز است و جذب و تجمع آن ممکن است هزینه کمتری نسبت به سنتز ترکیبات آلی داشته باشد (*عزیز* و همکاران، 1999؛ *امینی* و *احسان‌پور*، 2005؛ و *وراپلکون*[2] و همکاران، 2013).

کاهش غلظت پتاسیم و افزایش مقدار سدیم در سلول تحت تنش شوری توسط *نومن* و *احمد*[3] (2004) در یونجه، *بارکاتا و ابدی* (2005) در گندم، *کریستوف*[4] و همکاران (2006) در نیشکر و *سامارت*[5] و همکاران (2010) در برنج گزارش شده است.

در پژوهش حاضر، کاهش غلظت پتاسیم در غلظت‌های بیش از ۱۵۰ میلی‌مول نمک (شکل ۸) احتمالاً به این دلیل است که در غلظت‌های پایین کلریدسدیم، سدیم سبب افزایش جذب پتاسیم می‌شود، اما با افزایش غلظت نمک (افزایش میزان سدیم) جذب آن را کاهش می‌دهد و میزان جذب سدیم به علت رقابت با پتاسیم افزایش می‌یابد (*لیو* و همکاران[6]، 2000).

نتیجه‌گیری کلی

سلول‌های سیب‌زمینی به تنش ناشی از نمک حساس هستند و این حساسیت به صورت کاهش وزن تر و افزایش وزن خشک آن‌ها نمود پیدا کرد. افزایش وزن خشک سلول‌ها را می‌توان به مکانیسم‌های عمده اجتناب از تنش شوری در سلول‌های سیب‌زمینی نسبت داد. نتایج نشان داد که رقم سانته در مقایسه با دو رقم دیگر از توانایی بیشتری در تنظیم اسمزی سلول‌های خود از طریق انباشت اسمولیت‌های سازگار (پرولین، قندهای محلول کل، پروتئین محلول کل و پتاسیم) تحت شرایط شوری برخوردار است. سلول‌های رقم سانته در شرایط درون‌شیشه‌ای متحمل‌ترین رقم از این حیث ارزیابی شد و در سلول‌های رقم آگریا کم‌ترین میزان تحمل مشاهده شد. بدیهی است پژوهش‌های بیشتری لازم است تا بتوان تحمل به شوری در سطح سلولی و در شرایط درون‌شیشه‌ای را به تحمل در گیاه کامل و در شرایط مزرعه تعمیم داد.

1. Christophe
2. Veraplakorn
3. Noaman and Ahmad
4 Christophe
5. Summart
6. Liu

منابع

حیدری شریف آباد، ح. ۱۳۸۰. گیاه، خشکی و خشکسالی. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران. ۲۰۰ صفحه.

دانشمند، ف.، آروین، م. ج. و منوچهری کلانتری، خ. ۱۳۹۰. پاسخ گونه‌های سیب‌زمینی خودرو به تنش شوری در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۴ (۱): ۶۵-۷۸

دانشمند، ف. ۱۳۹۴. تأثیر آسکوربیک اسید در کاهش تنش اکسیداتیو حاصل از تنش شوری در سیب‌زمینی. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۷ (۳): ۴۱۷-۴۲۶

Ahmad, R., Hussain, J., Jamil, M., Kim, M. M., Kwak, S.S., Maroof Shah, M., El-Hendawy, S. E., Al-Suhaibani, N. A. and Rehman, A. 2014. Glycinebrtaine synthesizing transgenic potato plants exhibit enhanced tolerance to salt and cold stresses. Pakistan Journal of Botany, 46 (6): 1987-1993.

Ali, P. S. 1999. Prolin accumulation protein patten and photosynthesis in bacopa monnida vegeneration grown under NaCl stress. Bioloyia Plantrum, 42 (1): 89-95.

Alvarez, L., Tomaro, L. M. and Benavides, P. M. 2003. Changes in polyamines, praline and ethylene in sunflower callus treated with NaCl. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 58: 67-72.

Amini, F. and Ehsanpour, A. A. 2005. Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na/K changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under *In vitro* salt stress. African Journal of Biotechnology, 2 (5): 133-135.

Aqueel Ahmad, M. S., Javed, F. and Ashraf, M. 2007. Iso osmotic effect of NaCl and PEG on growth, cations and free proline accumulation in callus tissue of two Indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. Plant Growth Regulation, 53: 53-63.

Arzani, A. and Mirodjagh, S. S. 1999. Response of dueum wheat cultivars to immature embryo culture callus induction and *In vitro* salt stress. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 58: 67-72.

Aziz, A., Martin-Tanguy, J. and Larher, F. 1999. Salt stress-induced praline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. Plant Science, 145: 83-91.

Barakat, M. and Abdeei, T. H. 2005. *In vitro* selection of wheat callus tolerance high levels of salt and plant regeneration. Euphytica, 91 (2): 127-140.

Basu, S., Gangopahyaya, G. and Mukharjee, B. B. 2002. Salt tolerance in rice *in vitro*: Implicatio of accumulation of Na, K and praline. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69: 55-64.

Bohnert, H. J. and shen, B. 1999. Transformation and compatible solutes. Scientia Horticulturae, 78: 237-260.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Annals of Chinical Biochemistry, 72: 248-54.

Christophe, G., Tomader, E., Jamal, B., Mohamed, D. and Nadia, S. E. 2006. Selection of callus cultures of sugarcane (*Saccharum* sp.) tolerant to NaCl and their response to salt stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 87: 1.

Debouba, M., Gouia, H., Valadier, M. H., Ghorbel, M. H. and Suzuki, A. 2006. Salinity-induced tissue-specific diurnal changes in nitrogen assimilatory enzymes in tomato seedlings grown under high or low nitrate medium. Plant Physiology and Biochemistry, 44: 409-419.

Delauney, A. J. and Verna, D. P. S. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant Journal, 4: 215-223.

Demir, Y. and Oçalikan, I. 2002. Effect of NaCl and Proline on Bean Seedlings Cultured *In vitro*. Biologia Plantarum, 45: 4.

Elavumoottil, O. C., Martín, P. J. and Moreno, M. L. 2003. Changes in sugars, sucrose synthase activity and proteins in salinity tolerant callus and cell suspension cultures of *Brassica oleracea* L., Biologia Plantarum, 46: 1.

Farrukh, J. 2002. *In vitro* salt tolerance in Wheat. II. Organic solute accumulation in callus. International Journal of Agriculture and Biology, 4: 462-464.

Gandonou, Ch., Abrini, J. and Idaomar, M. 2005. Response of sugarcane varities to embryogenic callus induction and *In vitro* salt stress. Biotechnology, 4 (4): 350-354.

Grratan, S. R. and Grieve, G. M. 1999. Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. In: Hadbook of plant and crop stress. Pessarakli, M. (Ed). 203-229.

Heng-Logo, W., Ping-Du, L., Li-Fei, L. and Jong-Ching, S. 1999. Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures. Botanica Bulletin-Academia Sinica Journal, 40: 219-225.

Homma, S. 2016. Effect of salinity stress on growth parameters of potato genotypes. African Journal of Basic and Applied Sciences, 8 (4): 185-192.

Jamil, M., Kim, M. D., Kwak, S. S., El-Hendawy, M. M. S. and Rehman, S. U. 2014. Glucinebetaine synthesizing transgenic potato plants exhibit enhanced tolerance to salt and cold stresses. Pakistan Journal of Botany, 46 (6): 1987-1993.

Jiang, L., Duan, L., Tian, X., Wang, B., Zhang, H., Zhang, M. and Li, Z. 2006. NaCl salinity stress decreased *Bacillus thuringiensis* (Bt) protein content of transgenic Bt cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings. Environmental and Experimental Botany, 55: 315-320.

Joseph, E. A., Radhakrishnam V. V. and Mohanan, K. V. 2015. A Study on the accumulation of proline-an osmoprotectant amino acid under salt stress in some native rice cultivars of North Kerala, India. Universal Journal of Agricultural Research, 3 (1): 15-22.

Juan, F., Oscar, A. and Margarita, R. 2007. Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. Plant Physiology and Biochemistry, 45: 812-821.

Toriyama, k. 2005. Rice is life Scentific perspectives for the 21st century. Int. Rice Res. Inst, 133 pp.

Liu, T., Van Staden, J. and Cress W. A. C. 2000. Salinity induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of soybean (*Glycine max* (L.) cv. Aceme)) roots. Plant Growth Regulation, 30 (1): 49-54.

Lutts, S., Bouharmont, J. and Kinet, J. M. 1999. Physiological characterization of salt-resistance rice (*Oryza sativa*) somaclones. Australian Journal of Botany, 47: 835-849.

Mahmood, R. and Raziuddin, T. 2002. *In vitro* of salt on the vigor of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantles. Biotechnology, 1: 2-4.

Mansour, M. M. F. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. Biologia Plantarum, 43: 491-500.

Misra, N. and Gupta, A. K. 2005. Effect of salt stress on praline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. Plant science, 169: 331-339.

Monreal, J. A., Jimenez, E. T., Remesal, E., Morillo-Velarde, R., Garcıa-Maurino, S. and Echevarrıa, C. 2007. Proline content of sugar beet storage roots: Response to water deficit and nitrogen fertilization at field conditions. Environmental and Experimental Botany, 60: 257-267.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium-for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologiae Plantarum, 15: 473-497.

Murshed, R., Najla, S., Albiski, F., Kassem, I., Jbour, M. and Al-Said, M. 2015. Using growth parameters for *In-vitro* screening of potato varieties tolerant to salt stress. Journal of Agricultural Science and Technology, 17: 483-494.

Niknam, V., Razavi, N., Ebrahimzadeh, H. and Sharifizadeh, B. 2006. Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents, and antioxidant enzymes in seedlings and calli of two Trigonella species. Biologia Plantarum, 50: 4.

Noaman, M. M. and Ahmad, E. 2004. Development if Alfalfa tolerant salinity stress using organogenesis technique. Biotechnology, 3 (2): 136-139.

Ochatt, S. J., Marconi, P. L., Radice, S., Arnozis, P. A. and Caso, O. H. 1999. *In vitro* recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 55: 1.

Paquin, R. and Lechasser, P. 1979. Observation sur une method de dosage de la proline libre dans les extraits de plants. Canadian Journal of Botany, 57: 1851-1854.

Patade, V. Y., Suprasanna, P. and Bapat, V. A. 2006. Selection for abiotic (salinity and drought) stress tolerance and molecular characterization of tolerance lines in sugarcane. The National Conference on Biotechnological Aspects Towards Cultivation, Utilization and Disease Management of Plants. Issue. 273.

Patade, V. Y., Suprasanna, P. and Bapat, V. A. 2008. Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus cultures. Plant Growth Regulation, 55: 169-173.

Patricia, L. M. and Maria, P. B. 2001. Growth and physiological characterization of regeneration potato plants affected by NaCl stress. Journal of Crop and Horticultural Science, 29: 45-50.

Paulino de Oliveira, C., Zanuto Douradinho, G., Bortolazzo, G. and Fábio Steiner, F. 2016. Initial sprout growth of potato seed minitubers under salt stress. Revista de Agricultura Neotropical, Cassilândia-MS, 3 (1): 7-10.

Pérez-Salamó, L., Boros, B. and Szabados, L. 2016. Screening stress tolerance traits in *Arabidopsis* cell cultures. Environmental Responses in Plants,: 235-246.

Piqueras, A., Hernández, J., Olmos, E., Hellín, E. and Sevilla, F. 1996. Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45: 1.

Potluri Sasikala, D. P. and Devi Prasad, P. V. 2002. Salinity effect on *In vitro* performance of some cultivars of potato. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 6 (1): 1-6.

Rahnama, H. 2004. The effect of NaCl on proline accumulation potato seeding and calli. Acta Physiologiae Plantarum, 26 (3): 263-270.

Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P. and Dhaean, A. K. 2011. Developing stress tolerant plants through *In vitro* selection-An overview of the recent progress. Enviromental and Experimental Botany, 71 (1): 89-98.

Ramagopal, S. 1986. Protein synthesis in a maize callus exposed to NaCl and mannitol. Plant Cell Reports, 5 (6): 430-434.

Saleem, M. Y. and Mukhtar, M. 2005. Induced mutation and *In vitro* techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). Int. J. Environ. Sci. Tech., 2 (2): 141-145. .

Seth, R. and Kendurkar, S. V. 2015. *In vitro* screening: An effective method for evaluation of commercial cultivars of tomato towards salinity stress. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4 (1): 725-730.

Shah Zaman, M., Ali, G. M., Muhammad, A., Farooq, Kh. and Hussain, I. 2015. *In vitro* screening of salt tolerance in potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. Sarhad Journal of Agriculture, 31 (2): 106.

Shamima, N., Monzur, M. and Anjumanra, K. 2003. Induction and evalution of somaconal variation in potato. Biological Science, 3 (2): 183-190.

Shibli, R. A., Kushad, M., Yousef, G. G. and Lila, M. 2007. Physiological and biochemical responses of tomato micro shoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation. Plant Growth Regulation, 51: 159-169.

Silva, J., Otoni, W. C., Martinez, C. A., Dias, L. M. and Silva, M. A. P. 2001. Microtuberization of Andean potato species (*Solanum* spp.) as affected by salinity. Scientia Horticulturae, 89: 91-101.

Summart, J., Thanomkeo, P., Panichajakul, P. and McManus, M. T. 2010. Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus culture. African Journal of Biotechnology, 9 (2): 145-152.

Teixeira, J., Pereira, S., Queirós, F. and Fidalgo, F. 2006. Specific roles of potato glutamine synthetase isoenzymes in callus tissue grown under salinity: molecular and biochemical responses. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 86 (1): 1-7.

Teixeira, J., Pereira, S., Queirós, F. and Fidalgo, F. 2006. Specific roles of potato glutamine synthetase isoenzymes in callus tissue grown under salinity: molecular and biochemical responses. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 86: 1.

Veraplakorn, V., Nanakorn, M., Kaveeta, L, Suwanwong, S. and Bennett, I. J. 2013. Variation in ion accumulation as a measure of salt tolerance in seedling and callus of *Stylosanthes guianensis.* Theoretical and Experimental Plant Physiology, 25 (2): 106-115.

Wang, Z., Quebedeaux, B. and Stutte, G. W. 1996. Partitioning of (14C) glucose into sorbitol and other carbohydrates in apple under water stress. Australian Journal of Plant Physiology, 23: 245-251.

Westterma, L. R. and Constabel, F. 1990. Plant tissue culture metbods 2deev. Ed. Sasatoon: National Research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory.

Zhang, Y., Abdulnour, J. E., Donelly, D. J. and Barthakur, N. N. 2001. Effects of NaCl stress on yield of potato plants derived from previously saline conditions. HortScience, 36: 770-771.

Effect of Different Levels of Salinity on some Physiological and Cells-growth Characteristics in Three Potato (*Solanum tubrosum* L.) Cultivars *In Vitro*

Amerian[1*], M. and Esna-Ashari[2], M.

Abstract

Tissue culture methods are widely used for crop breeding specialty for the selection of salt-tolerant plants. Salinity is one of the major abiotic stresses affecting agricultural production worldwide. In this study, the effect of different levels of salinity on some physiological and cells-growth characteristics in the cells of three potato cultivars (Agria, Marfona and Sante) in suspension culture was studied. Calli were produced from the stem internodes of plants cultured on the semi-solid MS media containing 2 mg L^{-1} 2,4-D and 0.4 mg L^{-1} Kinetin. Growing cells were then sub-cultured on the same culture media followed by transferring them into the liquid media containing 0, 50, 100, 150, 200 and 250 mM NaCl. Study was performed in a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications. The amount of proline, total soluble carbohydrate, total soluble protein and the concentration of Na^+ and K^+ as well as the fresh and dry weight of the cells were measured. The results showed that by increasing salinity, the amount of proline, total soluble carbohydrates and total soluble protein as well as dry weight and Na^+ concentration of the cells were increased, while their fresh weight and K^+ concentration decreased. Three potato cultivars had different reactions to different levels of salinity. Sante cultivar has the highest accumulation of proline, total soluble carbohydrates, total soluble protein and potassium. This indicates that the above cultivar is more to lerant to salinity than the other cultivars.

Keywords: Suspension culture, Calli, Proline, Carbohydrate, Sodium chloride

1. Assistant Professor, Department of Plant Production (Medicinal and Aromatic Plant), Faculty of Sonqor Agriculture, Razi University, Kermanshaeh
2. Professor, Department of Horticultal Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan
*: Corresponding author Email: masoomehamerian@yahoo.com