

استفاده از مانیتول به عنوان عامل تنش خشکی در مرحله جوانه زنی بذر و رشد
اولیه گیاهچه چغندر قند در کشت درون شیشه
Utilization of mannitol as drought stress agent in sugar beet seed
germination and early growth stages *in vitro*

نسرین یآوری^۱، سید یعقوب صادقیان^۲، محمود مصباح^۲

چکیده

بذرهای پنج لاین متحمل، دو لاین حساس و دو لاین نسبتاً متحمل به تنش خشکی چغندر قند، شسته و ضد عفونی گردید، سپس خشک شده، و در محیط آب و آگار در شرایط درون شیشه کشت شد. این بررسی در قالب آزمایش فاکتوریل با سه تکرار و ۲۰ عدد بذر در هر تیمار در دو محیط بدون تنش خشکی و سه سطح تنش خشکی با استفاده از غلظت‌های صفر، ۰/۲ و ۰/۳ مولار (فشار اسمزی حدود صفر، ۵- و ۷- بار) مانیتول اجرا شد. صفات درصد جوانه زنی بذر، طول ریشه جوانه بذری، وزن تر و خشک کوتیلدون و وزن ریشه جوانه بذری پس از پایان دوره ۲۸ روزه آزمایش برای تیمارها اندازه‌گیری شد و مقادیر نسبی هر یک از صفات نسبت به شرایط بدون تنش به دست آمد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تفاوت‌های مشاهده شده میان لاینها برای درصد جوانه زنی بذر، وزن تر کوتیلدون و ریشه و طول ریشه معنی‌دار بوده است. در بین لاین‌های مورد آزمایش و بین سطوح تنش تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. تنوع ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها به جز مقادیر وزن خشک برای کلیه صفات مشاهده شد. لاین‌های متحمل از نظر درصد جوانه زنی و میزان رشد جوانه بذری در شرایط بدون تنش برتر بودند. نتایج آزمایش نشان داد که در انتخاب ژنوتیپ‌های بالقوه متحمل می‌توان از نتایج حاصل از ارزیابی تحمل به تنش خشکی در مراحل اولیه رشد گیاهچه چغندر قند بهره برد.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، جوانه زنی، مانیتول، درون شیشه، چغندر قند، گیاهچه

مقدمه

افزایش جمعیت جهان روند کاهش، منابع آب شیرین و شور شدن زمین‌های زراعی بررسی امکان ایجاد گیاهان متحمل در شرایط نامناسب محیطی را ضروری ساخته است. در بسیاری از گیاهان زراعی جوانه‌زنی بذر و رشد اولیه گیاهچه از حساس‌ترین مراحل به تنش‌های محیطی محسوب می‌شوند (Cook 1979).

به منظور بررسی اثرات کمبود آب و شوری بر روی رشد گیاهچه بذری سویا از محلول‌های حاوی پلی اتیلن گلیکول (PEG 4000) و نمک کلرور سدیم به عنوان عوامل ایجاد تنش‌های محیطی استفاده شده است (Khajeh Hosseini et al. 2000) هر دو ترکیب استفاده شده موجب کاهش رشد گیاهچه گردید. اما اثر PEG به عنوان عامل تنش خشکی شدیدتر بوده است، کاهش پتانسیل آب موجب کاهش رشد در بذره‌های جوانه زده و توقف رشد گیاهچه گردید به طوری که این تأثیر در ساقه بیش از ریشه مشاهده شده است.

در همین زمینه مطالعاتی برای تشخیص عوامل مؤثر محیطی و فیزیولوژیکی در ارتباط با القاء کننده در برابر تنش‌های غیرزیستی در چغندر قند انجام شده است. یکی از این تحقیقات که در ارتباط با جوانه زدن بذر ژنوتیپ‌های چغندر قند در حضور نمک کلرور سدیم در دماهای متفاوت انجام گرفته، نشان داده است عوامل محیطی در میزان تأثیر تنش شوری در این مرحله از رشد گیاه مؤثرند به طوری که افزایش دما از

۱۵-۱۰ درجه به ۳۵-۲۵ درجه سانتیگراد موجب افزایش تأثیر تنش شوری شده است (Mahmoud et al. 1981).

بررسی دیگری نشان داده است، تنش خشکی تفاوت معنی‌دار در میزان ماده خشک کل، عملکرد ریشه، عملکرد شکر خالص شده و ناخالصی‌های ریشه در میان ژنوتیپ‌های چغندر وحشی و چغندر قند ایجاد می‌کند (Sadeghian et al. 2000). از محلول مانیتول برای تشخیص تحمل جوانه بذری چغندر قند به فشار اسمزی در آزمایش جوانه زنی از سطح ۳- تا ۱۵- بار در کاغذ مورد استفاده قرار گرفته، نشان داده است که مانیتول می‌تواند به عنوان عامل ایجاد تنش خشکی به کار گرفته شود (حبیبی ۱۳۷۲).

استفاده از عامل تنش‌های غیرزیستی برای انتخاب در شرایط کشت «درون شیشه» گیاهان با نتیجه مطلوبی همراه بوده است (Wenzel and Foroughi-Wehr 1993). پیش از این در تحقیقی به کارگیری مانیتول به عنوان ماده‌ای برای ایجاد فشار اسمزی تعیین شده در محیط رشد گیاه در کشت درون شیشه بر روی رشد کال گیاه *Brassica juncea* گزارش شده است. نتایج این تحقیق نشان داده است، حضور عوامل ایجادکننده تنش در محیط کشت می‌تواند واکنش القاء کننده تحمل در بافت‌های گیاه را نمایان سازد (Ganopadhyay et al. 1997).

هدف از اجرای تحقیق حاضر، بررسی امکان استفاده از محلول مانیتول به عنوان عامل گزینش

با اندازه گیری تعداد بذرهای جوانه زده و صفات رشد اولیه گیاهچه ثبت شد. تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت‌های ثبت شده برای درصد جوانه‌زنی بذر در ژنوتیپ‌های مختلف و پاسخ به افزایش غلظت مانیتول در میان ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۱).

رشد گیاهچه ژنوتیپ‌های مورد بررسی، برای طول ریشه، وزن تر کوتیلدون و ریشه تفاوت معنی‌دار نشان داده است. در بین ژنوتیپ‌ها تفاوتی در مقادیر وزن خشک اندام‌ها مشاهده نشد اما در بین دو سطح تنش تفاوت مشاهده شده وزن خشک معنی‌دار بوده است (جدول ۱). به بیان دیگر در ژنوتیپ‌های مورد آزمایش تنش خشکی بر میزان جوانه‌زنی و رشد گیاهچه کاهش معنی‌داری در مقایسه با شرایط بدون تنش ایجاد کرده است. جوانه‌زنی بذر در ژنوتیپ‌های ۱۹۱، ۷۱۱۲ و ۱۸۱ با بیشترین حساسیت در دو سطح تنش مواجه بوده است، در حالی که بذر BP-Karaj، ۱-۴۳۶ و ۶۹-۷۲۱۹ تحمل نسبتاً ثابتی نشان داده‌اند. نسبت درصد رشد جوانه هر ژنوتیپ در شرایط تنش در مقایسه با شرایط بدون تنش خشکی این تفاوت‌ها را در ژنوتیپ‌ها بهتر نشان می‌دهد (شکل ۱).

در هر دو سطح تنش خشکی ایجاد شده با غلظت‌های مانیتول، گیاهچه‌های متحمل کارآیی زیستی بهتری نشان داده‌اند و توانسته‌اند درصد جوانه‌زنی را حفظ و به رشد خود ادامه دهند، اما توزیع بیوماس در کوتیلدون‌ها و ریشه متفاوت می‌باشد.

ژنوتیپ‌ها یا لاین‌های چغندر قند متحمل به تنش خشکی در مرحله جوانه زنی و رشد اولیه جوانه بذری در شرایط کشت دورن شیشه بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذرهای نه ژنوتیپ چغندر قند که واکنش آنها به تنش خشکی در یک آزمایش مزرعه‌ای شناخته شده است (جدول ۱) پس از درجه‌بندی، شستشو با آب معمولی، ضد عفونی و خشک شدند. تعداد ۲۰ عدد بذر از هر ژنوتیپ در هر تیمار در محیط آب آگار بدون عامل تنش (محیط کنترل) و حاوی دو سطح ۰/۲ و ۰/۳ مولار (فشار اسمزی حدود ۵- و ۷- بار) مانیتول در سه تکرار کشت گردید و در دمای 26 ± 2 درجه سانتیگراد در تاریکی نگهداری شد.

درصد جوانه‌زنی (%، وزن تر و خشک کوتیلدون و ریشه (به ترتیب CFW، CDW، RFW و RDW) و طول ریشه (RL) در پایان دوره آزمایش (۲۸ روز) اندازه گیری گردید. مقدار هر یک از میانگین صفات در هر ژنوتیپ در تیمارهای تنش نسبت به تیمار بدون تنش محاسبه شد. داده‌های آزمایش به صورت فاکتوریل در سه تکرار با استفاده از نرم افزار SAS مورد محاسبه آماری قرار گرفته است (SAS Inst. Inc. 1996).

نتایج و بحث

توانایی جذب آب برای جوانه زنی و ادامه رشد جوانه بذری در شرایط کمبود آب در کشت دورن شیشه

جذب آب توسط بذرها، تفاوت میان ژنوتیپ‌ها را مشخص نمی‌سازد.

نتایج آزمایش‌های انجام شده با سطح تنش اسمزی حدود ۵- و ۷- بار توانسته است تفاوت ژنوتیپ‌ها را در توانایی جذب آب توسط بذر و جوانه‌زنی نمایان سازد. این آزمایش‌ها همچنین نشان داده است که بذر گیاه چغندر قند برای جوانه‌زنی تحت شرایط تنش خشکی در وهله اول نیاز به جذب آب کافی و نرم کردن پوسته سخت خود دارد در حالی که ادامه رشد گیاهچه به افزایش فشار اسمزی محیط حساسیت کمتر نشان می‌دهد. در همین رابطه مشاهده شد که تعداد بسیار محدودی از بذره‌های جوانه زده ژنوتیپ‌های حساس ۱۹۱ و ۱۸۱ توانستند به در شرایط تنش به رشد خود ادامه دهند (شکل ۲- الف - ت) نتایج این بررسی که برای نخستین بار و در ایران انجام گرفته است نشان می‌دهد که اجرای آزمایش بررسی میزان تحمل به تنش خشکی در مراحل جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه بذری چغندر قند می‌تواند در برنامه به‌نژادی گیاه برای تشخیص ژنوتیپ‌های بالقوه متحمل به عنوان روش تکمیلی مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

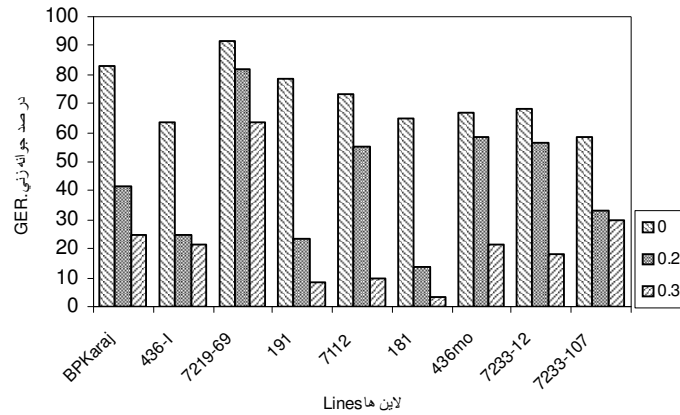
تشکر و قدردانی

اعتبار اجرای این طرح از محل یک پروژه ملی مصوب شورای عالی پژوهش‌های علمی کشور به شماره ۱۴۹۲ تأمین گردید که موجب تشکر و قدردانی می‌باشد. بدینوسیله از خانم کبری خدابخشی که در اجرای عملیات و خانم مهرانگیز بیگدلی که در اجرای عملیات و ثبت داده‌های حاصل از این تحقیق با جدیت همکاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

(شکل ۲ الف - ت) در اینجا ژنوتیپ‌های ۶۹-۷۲۱۹، BP. Karaj، ۱-۴۳۶، ۱۲-۷۲۳۳، ۱۰۷-۷۲۳۳ به ترتیب بهترین جواب‌گویی را نشان داده‌اند.

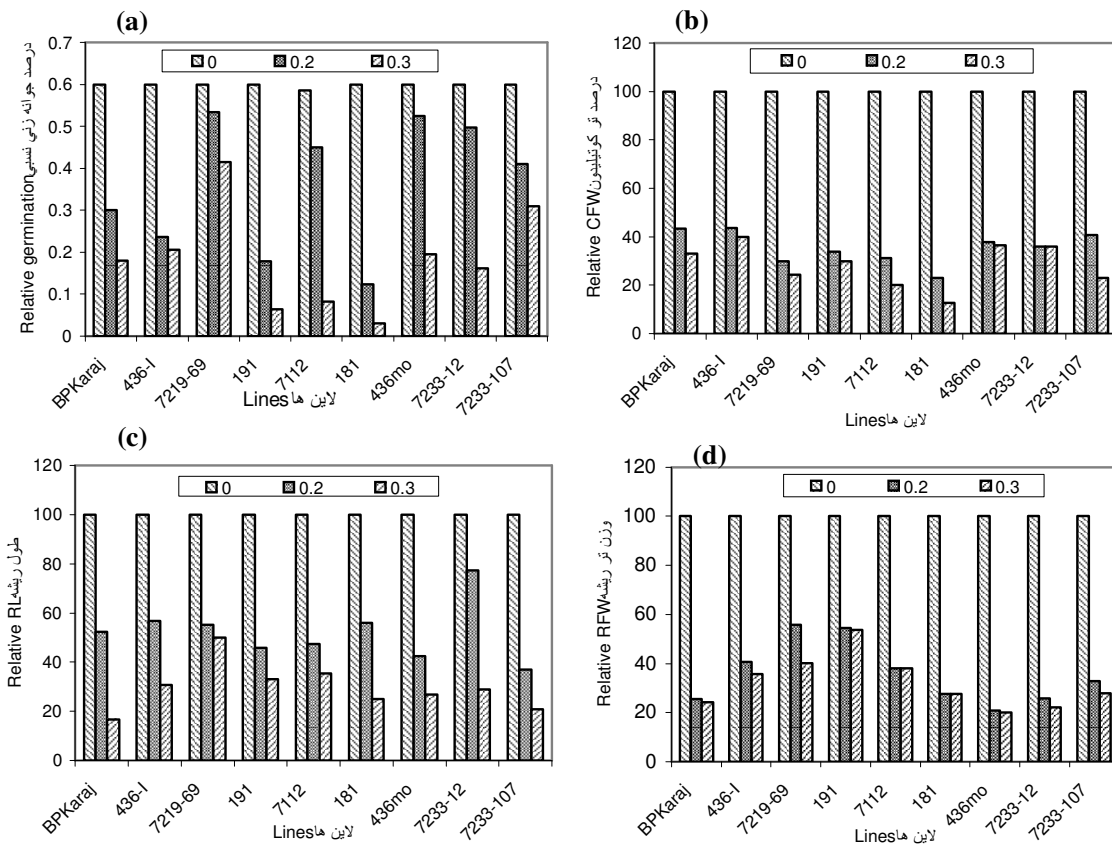
به منظور حفظ سطح آب مورد نیاز در بافت گیاهی و یا فعال سازی اعمال ویژه‌ای در گیاه در شرایط تنش خشکی، مکانیزم‌های کنترل ژنی یا فیزیولوژیک وجود دارد (Blum 1976). جوانه‌زنی بذر با خروج ریشه از پوسته بذر و نفوذ آن به داخل محیط اطراف تکمیل می‌گردد. جوانه‌زنی در اثر افزایش طولی سلولی واقع می‌شود و تقسیم سلولی و رشد ریشه‌چه را که متعاقباً آغاز می‌شود در برنمی‌گیرد. آزمایش‌های انجام شده بر روی بذر *Brassica oleracea var.italica* در محیط جوانه‌زنی با فشارهای اسمزی فزاینده نشان داده است که حساسیت به تنش در این دو مرحله بسیار متفاوت است (Bewley and Black 1985). نتایج این آزمایش نشان داده است کاهش میزان جوانه‌زنی با افزایش تنش اسمزی از صفر به ۸- بار افزایش می‌یابد و در فشار ۱۴- بار متوقف می‌گردد، اما رشد ریشه چه در پتانسیل اسمزی ۸- بار آغاز و در ۱۶- بار کاهش محسوس می‌یابد و در ۲۲- بار متوقف می‌شود.

در اجرای این بررسی، در آزمایش‌های اولیه نتایج جوانه‌زنی بذر چغندر قند با غلظت‌های فزاینده مانیتول نشان داده بود (داده‌ها ارائه نشده است) که استفاده از مانیتول برای افزایش فشار اسمزی زیادتر از ۸- بار تا سطح ۱۲- بار به علت کاهش شدید قدرت



شکل ۱ - درصد جوانه زنی بذر در ژنوتیپ‌های چغندر قند در تیمارهای تنش خشکی

Fig. 1 Seed germination percentage of sugar beet genotypes in drought stress treatments: 0.0, 0.2 and 0.3 M mannitol



شکل ۲ - مقایسه نسبت رشد گیاهچه ژنوتیپ‌های چغندر قند در شرایط تنش به عنوان درصدی از رشد گیاهچه در شرایط کنترل (a) درصد جوانه‌زنی (b) درصد وزن تر کوکتیلدون‌ها (CFW) (c) درصد طول ریشه (RL) (d) درصد وزن تر ریشه (RFW)

Fig. 2 Seedlings of nine sugar beet lines compared for the relative germination % (a), relative growth % for CFW (b), relative growth % for RL (c), and relative growth % for RFW (d)

جدول ۱ - جدول آنالیز واریانس داده ها برای جوانه زنی، وزن تر و خشک برای کوتیلدون CDW و CFW، ریشه RDW و RFW و طول ریشه گیاهچه بذری در سه سطح مانیتول

Table 1 Mean squares from analysis of variance of sugar beet genotypes tested for the germination rate (Ger.) the CFW, CDW, RFW, RDW and RL characteristics of seedlings at three levels of mannitol concentrations

متغیرها Source of variation	درجه آزادی DF	جوانه زنی Germination	وزن تر کوتیلدون CFW	وزن خشک کوتیلدون CDW	وزن تر ریشه RFW	وزن خشک ریشه RDW	طول ریشه RL
تکرار Replication	۲	۲۵۵/۸۶۴	۰/۰۰۵۲۶	۰/۰۰۰۲۶	۰/۰۰۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۵۴/۵۸۳
لاین Variety	۸	۱۸۷۳/۶۸۸***	۰/۰۴۲۹**	۰/۰۰۰۰۳	۰/۰۰۰۱۱**	۰/۰۰۰۰۵	۱۱۷/۵۴۴**
مانیتول Mannitol	۲	۱۶۷۷۵/۳۰۸***	۰/۸۷۱۹***	۰/۰۰۳۰۴***	۰/۰۹۲***	۰/۰۰۰۲۲**	۴۶۰/۵۱۳***
لاین * مانیتول Variety * Mannitol	۱۶	۳۹۹/۹۶۴***	۰/۰۱۳۵۶	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۵	۰/۰۰۰۰۵	۴۳/۲۱۷
خطا Error	۵۲	۶۴۳۸/۲۷۲	۰/۷۷۵۵	۰/۰۰۰۸۸	۰/۰۱۸۸	۰/۰۰۰۱۶۸	۱۸۲۸/۹۳۵

** و *** معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ درصد

** and *** significant at 0.01 and 0.001 percent of probability levels

References

منابع مورد استفاده

- حیبی، د. ۱۳۷۲. انتخاب پروژنی‌های مقاوم به خشکی و شوری چغندر قند در مرحله جوانه اولیه - پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی.
- Bewley JD, Black M (1985). *Seeds Physiology of Development and Germination*. Plenum Publishing Corporation, N.Y. pp : 124-125.
- Blum A (1996). Constitutive traits affecting plant performance under stress. pp. 131-135. In: G.O. Edmeades, M Banziger, HR Mickelson CB Pena-Valdivia, (Eds). *Developing drought and low N tolerant Maize*. Proc. Symp. CIMMYT, El-Batan.
- Cook RE (1979). Patterns of juvenile morbidity and recruitment in plants. In: O.T. Solbrig, S. Jain, G.B. Johnson, and P.H. Raven (Eds). *Topics in plant population Biology*, 207-301. Columbia Univ. Press. Los Angles.
- Gangopadhyay G, Basu S, Gupta S (1997). *In vitro* selection and physiological characterisation of NaCl – and mannitol – adapted callus lines in *Brassica juncea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50 : 161-169.
- Khajeh Hosseini M, Bingham I, Powell AA (2000). The effects of reduced water availability and salinity on the early seedling growth of soybean. *Proceeding of the Third International Crop Science Congress*, 17-21 August 2000, Humburg.
- Mahmoud EA, and Hill MI (1981). Salt tolerance of sugar beet at various temperatures. *New Zealand Agricul Res*, 24 (1) : 67-71.
- Sadeghian SY, Fazli H, Taleghani DF, Mesbah M (2000). Genetic variation for drought stress in sugar beet. *Sugar Beet Res* 37(3) : 55-77.
- SAS Institute. Inc (1996) *Getting started with PROC ANOVA*. SAS Institute, Inc. Cary. NC
- Wenzel G, Foroughi-Wehr B (1993) *In vitro* selection. In: *Plant Breeding : Principles and prospects*. Edited by Hayward Md, Bosemark NO, Romagosa I. Chapman & Hall, London p. 353-370