

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΒΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗΣ *IN VITRO* ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΚΦΥΤΩΝ ΧΟΧΟΜΠΙΑΣ (*SIMMONDSIA CHINENSIS* (LINK) SCHNEIDER)

Π. Ρούσσος και Κ. Ποντίκης

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο
Δενδροκομίας, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 118 55

Περίληψη

Έκφυτα χοχόμπας καλλιεργήθηκαν *in vitro* για τρεις μήνες υπό συνθήκες αλατότητας, προκαλούμενη με την προσθήκη χλωριούχου νατρίου στο υπόστρωμα σε τέσσερις συγκεντρώσεις (0, 0.33%, 0.66% και 0.99% β/ο). Κατά το τέλος της περιόδου καλλιέργειας υπό συνθήκες αλατότητας μετρήθηκαν τόσο η αύξηση των εκφύτων (μετρούμενη ως μέσος αριθμός και μήκος βλαστών ανά έκφυτο και ως συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο), όσο και το ξηρό βάρος των εκφύτων, η συγκέντρωση της προλίνης, και των ιόντων Na^+ , Cl^- και K^+ και της ρίζας NO_3^- στα έκφυτα. Υπολογίστηκαν επίσης ο ρυθμός αύξησης των εκφύτων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας όπως επίσης και ένας συντελεστής ανθεκτικότητας, με βάση της μεταβολές του ξηρού βάρους των εκφύτων, όπως αυτό μετρήθηκε σε μηνιαία διαστήματα. Βρέθηκε ότι κατά τον τρίτο μήνα υπό συνθήκες αλατότητας, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο όπως και το συνολικό μήκος αυτών επηρεάστηκαν αρνητικά από την προσθήκη άλατος στο υπόστρωμα και μάλιστα ο μέσος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο μειώνονταν όσο αυξάνονταν η συγκέντρωση του άλατος. Αντιθέτως, το μέσο μήκος των βλαστών ανά έκφυτο έβαινε αυξανόμενο με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος στο υπόστρωμα. Η συγκέντρωση της προλίνης στα έκφυτα που αναπτύσσονταν σε υπόστρωμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση άλατος ήταν υψηλότερη αυτής των άλλων εκφύτων, ενώ τα έκφυτα που αναπτύσσονταν στις υπόλοιπες τρεις συγκεντρώσεις του άλατος δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους όσον αφορά τη συγκέντρωση της προλίνης. Η συγκέντρωση του Na^+ όπως και του Cl^- στα έκφυτα έβαινε αυξανόμενη όσο αυξάνονταν η συγκέντρωση του άλατος στο υπόστρωμα, ενώ το αντίθετο συνέβαινε με τη συγκέντρωση του K^+ και των NO_3^- . Με βάση το ρυθμό αύξησης των εκφύτων και του συντελεστή ανθεκτικότητας υπό συνθήκες καταπόνησης φαίνεται ότι η χοχόμπα είναι ανεκτική στην ύπαρξη χλωριούχου νατρίου στο υπόστρωμα ανάπτυξης μέχρι μία συγκέντρωση αυτού και για ορισμένο χρονικό διάστημα, πέρα από τα οποία ο ρυθμός ανάπτυξης του φυτού μειώνεται.

Υλικά και Μέθοδοι

Τα έκφυτα χοχόμπας που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αυτό, προέρχονταν από καλλιέργεια ενός έτους που επανακαλλιεργούνταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε υπόστρωμα DKW όπως αυτό περιγράφεται από τους Roussos et al. (1999). Για την έναρξη του πειράματος κομβικά έκφυτα και βλαστοκορυφές καλλιεργήθηκαν για ένα μήνα στο προαναφερθέν υπόστρωμα εφοδιασμένο με BA 4 ppm σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Μετά το μήνα αυτό τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες κάθε ένα ξεχωριστά σε υπόστρωμα εφοδιασμένο με BA 4 ppm και με χλωριούχο νάτριο σε

συγκεντρώσεις 0, 0.33, 0.66 και 0.99% κ.β.. Τα έκφυτα παρέμειναν στο υπόστρωμα αυτό για τρεις μήνες και στο τέλος του σταδίου αυτού μετρήθηκαν ο αριθμός των βλαστών, το μέσο μήκος και το μέσο συνολικό μήκος ανά έκφυτο και το ξηρό βάρος των εκφύτων. Παράλληλα μετρήθηκε η συγκέντρωση της προλίνης των εκφύτων με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Bates (1974) καθώς και το επίπεδο των ιόντων Na^+ , K^+ (με φλογοφωτόμετρο), Cl^- (με ηλεκτρόδιο χλωρίου) και NO_3^- (σύμφωνα με τη μέθοδο του). Προσδιορίστηκε επίσης ο ρυθμός ανάπτυξης των εκφύτων (Makela et al 2003) καθώς και ένας συντελεστής ανθεκτικότητας (Dutta Gupta et al. 1995) σύμφωνα με τους παρακάτω τύπους, στηριζόμενοι στις μεταβολές του ξηρού βάρους των εκφύτων κατά την περίοδο του πειράματος:

$$RGR \text{ (σχετικός ρυθμός ανάπτυξης)} = \frac{\ln(\text{final dry weight}) - \ln(\text{initial dry weight})}{\text{Time}}$$

$$TI \text{ (συντελεστής ανθεκτικότητας)} = \frac{\text{Dry wt. on NaCl medium}}{\text{Dry wt. on NaCl free medium}} \times 100.$$

Το πείραμα σχεδιάστηκε σύμφωνα με το εντελώς τυχαίοποιημένο σχέδιο και τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διασποράς χρησιμοποιώντας τη δοκιμή του Tukey (Tukey HSD) σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

Αποτελέσματα.

Όπως παρατηρείται από τον πίνακα 1, η ύπαρξη άλατος στο υπόστρωμα της βλαστογένεσης επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη των εκφύτων της χοχόμπας. Όσο αυξάνονταν το ποσοστό του άλατος στο υπόστρωμα τόσο μειώνονταν ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο. Αντίθετα η ύπαρξη άλατος στο υπόστρωμα φάνηκε να επιδρά θετικά στην ανάπτυξη των βλαστών, αφού τα έκφυτα που αναπτύσσονταν σε υπόστρωμα με άλας παρουσίασαν μεγαλύτερο μήκος βλαστών ανά έκφυτο. Αντίθετα, το μέσο ολικό μήκος ανά έκφυτο μειώθηκε με την προσθήκη της υψηλής συγκέντρωσης άλατος στο υπόστρωμα, ενώ δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των τριών πρώτων επεμβάσεων. Όσον αφορά το νωπό βάρος των εκφύτων φάνηκε ότι αυτό αυξήθηκε μέχρι το μεσαίο επίπεδο αλατότητας, ενώ στην υψηλή συγκέντρωση άλατος παρουσιάστηκε σημαντική μείωση του νωπού βάρους των εκφύτων.

Πίνακας 1. Επίδραση της αλατότητας στην ανάπτυξη των εκφύτων της χοχόμπας *in vitro*.

Επεμβάσεις NaCl (% β/ο)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (mm)	Μέσο ολικό μήκος βλαστών (mm)	Νωπό βάρος (gr)
Μάρτυρας	16,0 ± 0,2 ¹ c ²	17,0 ± 1,0 a	272,2 ± 15,4 b	4,9 ± 0,1 a
0,33	11,1 ± 0,3 b	22,9 ± 0,4 b	253,7 ± 2,3 b	7,0 ± 1,9 ab
0,66	10,4 ± 1,3 b	25,6 ± 2,2 b	272,4 ± 57,0 b	9,8 ± 1,1 b
0,99	4,2 ± 0,1 a	28,5 ± 0,5 b	119,6 ± 2,0 a	3,4 ± 0,3 a

¹ Μέσος ± τυπικό σφάλμα.

² Αριθμοί ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα εντός της ίδιας στήλης δε διαφέρουν

στατιστικά σημαντικά με τη δοκιμασία του Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Όσον αφορά τη συγκέντρωση της προλίνης στα έκφυτα παρατηρείται από τον πίνακα 2 ότι κατά τον τρίτο μήνα τα έκφυτα που αναπτύσσονταν σε υψηλή συγκέντρωση άλατος είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση προλίνης από αυτά στις άλλες επεμβάσεις. Επίσης παρατηρείται ότι με την αύξηση της αλατότητας αυξανόταν και το επίπεδο του Na^+ και του Cl^- των εκφύτων, ενώ αντίθετα μειώνονταν η συγκέντρωση του K^+ και της NO_3^- , με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων.

Πίνακας 2. Επίδραση της αλατότητας στη συγκέντρωση προλίνης, Na^+ , Cl^- , K^+ και NO_3^- των εκφύτων της χοχόμπας *in vitro*.

Επεμβάσεις NaCl (%)	Προλίνη (mg/ gr Ξ.Β.)	Na^+	Cl^-	K^+	NO_3^-
		mg/g Ξ.Β.			
Μάρτυρας	890,1 ± 15,6 a	2,2 ± 0,1 a	4,4 ± 0,7 a	28,3 ± 0,8 b	24,3 ± 1,3 c
0,33	857,9 ± 1,5 a	28,4 ± 0,1 b	80,4 ± 4,2 b	25,8 ± 0,1 b	16,5 ± 0,6 b
0,66	935,4 ± 66,0 a	54,1 ± 2,0 c	149,8 ± 4,3 c	24,9 ± 0,8 ab	14,0 ± 1,8 ab
0,99	1238,7 ± 145,4 b	63,4 ± 1,1 d	216,9 ± 2,2 d	21,7 ± 0,7 a	9,2 ± 0,7 a

¹ Μέσος ± τυπικό σφάλμα.

² Αριθμοί ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα εντός της ίδιας στήλης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά με τη δοκιμασία του Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Στον πίνακα 3 παρατηρείται ότι ο ρυθμός αύξησης των εκφύτων μειώθηκε σημαντικά στο υψηλότερο επίπεδο άλατος στο υπόστρωμα, ενώ ο μάρτυρας παρουσίασε τον υψηλότερο ρυθμό αύξησης. Επίσης, φάνηκε ότι η χοχόμπα παρουσιάζει σημαντικό βαθμό ανθεκτικότητας στην αλατότητα, μέχρι και το μεσαίο επίπεδο αυτής, αφού στο υψηλότερο επίπεδο ο συντελεστής ανθεκτικότητας παρουσίασε σημαντική πτώση.

Πίνακας 3. Επίδραση της αλατότητας στο ρυθμό αύξησης και στην ανθεκτικότητα των εκφύτων της χοχόμπας *in vitro*.

Επεμβάσεις NaCl (%)	Ρυθμός αύξησης κατά τον 3 ^ο μήνα (g Ξ.Β. /μήνα)	Συντελεστής ανθεκτικότητας
Μάρτυρας	0.95 ± 0.01 ¹	-
0,33	0.74 ± 0.02	110 ± 8 ¹
0,66	0.84 ± 0.04	125 ± 11
0,99	0.38 ± 0.02	50 ± 4

¹ Μέσος ± τυπικό σφάλμα.

Συζήτηση

Η ύπαρξη άλατος στο υπόστρωμα καλλιέργειας μείωσε τον αριθμό και το ολικό μήκος των βλαστών, ενώ αυξήθηκε το μέσο μήκος αυτών και μέχρι ενός επιπέδου και

το νωπό βάρος των εκφύτων. Είναι γνωστό ότι η καταπόνηση άλατος οδηγεί σε μείωση της ανάπτυξης των φυτών, όπως άλλωστε παρουσιάστηκε και με βάση το ρυθμό αύξησης των εκφύτων (Mills and Benzioni 1992). Η αύξηση του μέσου μήκους των βλαστών ίσως να είναι αποτέλεσμα του μικρού αριθμού αυτών στο υψηλό επίπεδο άλατος, όπως φαίνεται άλλωστε και από τον συντελεστή συσχέτισης $r=-0,78$ ($p<0,01$). Η αύξηση μέχρις ορίου του νωπού βάρους ίσως να οφείλεται σε μηχανισμούς του φυτού να μειώσει την αυξημένη συγκέντρωση Na^+ και Cl^- μέσω της απορρόφησης νερού από το υπόστρωμα. Είναι ίσως ο λεγόμενος μηχανισμός «αραίωσης του άλατος μέσω υπερ-ενυδάτωσης» (Hagenmeyer 1996). Φάνηκε όμως ότι ίσως και η προλίνη να παίζει κάποιο ρόλο στην ανοχή στην αλατότητα, όπως άλλωστε συμβαίνει και σε άλλα φυτά, μέσω της ωσμωρυθμιστικής της δράσης (Girija et al. 2002).

Όσον αφορά τη συγκέντρωση των ιόντων K^+ και NO_3^- , υπήρξε σημαντική μείωση αυτών με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος στο υπόστρωμα, το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε πειράματα αλατότητας με άλλα φυτά, ως αποτέλεσμα του ανταγωνισμού στην απορρόφηση Na^+ / K^+ και $\text{Cl}^- / \text{NO}_3^-$ (Grattan and Grieve 1999).

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι η χοχόμπα είναι ανεκτική στην αλατότητα μέχρι ενός επιπέδου χλωριούχου νατρίου, πάνω από το οποίο ο ρυθμός ανάπτυξης του φυτού μειώνεται σημαντικά, ίσως λόγω της αυξημένης απορρόφησης των τοξικών ιόντων Na^+ και Cl^- και της μειωμένης απορρόφησης K^+ και NO_3^- . Σε παρόμοια αποτελέσματα έχουν καταλήξει και οι Mills και Benzioni (1992) και οι Mills et al. (1997).

Βιβλιογραφία.

- Dutta Gupta, S., Auge, R.M., Denchev, P.D. and Conger, B.V., 1995. Growth, proline accumulation and water relations in NaCl-selected and non-selected callus lines of *Dactylis glomerata*. *Environmental and Experimental Botany* **35**, 83-92.
- Girija, C., Smith B.N. and Swamy P.M., 2002. Interactive effects of sodium chloride and calcium chloride on the accumulation of proline and glycinebetaine in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Environ. Exper. Bot.* **47**, 1-10.
- Grattan, S.R. and Grieve, C.M., 1999. Salinity-mineral nutrition relations in horticultural crops. *Sci. Hortic.* **78**, 127-157.
- Hagenmeyer, J., 1996. Salt. In: M.N.V. Prasad (Ed) *Plant Ecophysiology*, John Wiley and Sons Inc, Toronto, pp. 173-206.
- Makela, P., Munns, R., Colmer, T.D. and Peltonen-Sainio, P., 2003. Growth of tomato and an ABA-deficient mutant (sitiens) under saline conditions. *Physiologia Plantarum* **117**, 58-63.
- Mills, D., and Benzioni, A., 1992. Effect of NaCl salinity on growth and development of jojoba clones: II. Nodal segments *in vitro*. *J. Plant Physiol.* **139**, 737-741.
- Mills, D., Wenkart, S. and Benzioni, A., 1997. Micropropagation of *Simmondsia chinensis* (Jojoba). In: Y.P.S. Bajaj (Ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 40, High-Tech and Micropropagation VI, Springer-Verlag, Berlin, pp. 370-393.
- Roussos, P.A., Tolia-Marioli, A., Pontikis, C.A. and Kotsias, D., 1999. Rapid multiplication of jojoba seedlings by *in vitro* culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **57**, 133-137.