

تأثير كلوريد الصوديوم وخليط من كلوريد الصوديوم وكلوريد الكالسيوم في الوزن الطري والمحتوى المعدني وتجمع البرولين في كالس نخلة التمر (*Phoenix dactylifera L.*) صنف برحي المزروعة خارج الجسم الحي

حسين خلف الكعبي و لمى حسين عبد القادر

قسم علوم الحياة/ كلية التربية - جامعة البصرة

ISSN-1817-2695

(الاستلام 2007/1/31، القبول 2007/3/29)

الخلاصة:

أجريت تجربة مختبرية لدراسة تأثير كلوريد الصوديوم بالتراكيز (0، 1، 2، 3)% وخليط من كلوريد الكالسيوم بالتراكيز (0.5، 1)% مع كلوريد الصوديوم بنفس التراكيز المذكورة اعلاه، في الوزن الطري ومحتوى الكالس من أيونات الصوديوم و البوتاسيوم و الكالسيوم والحامض الأميني البرولين. استخدمت في التجربة البراعم القمية لصنف نخيل التمر (برحي) والتي تمت زراعتها في وسط غذائي يتكون من مجموعة الأملاح اللاعضوية MS ومجموعة من المواد المضافة إليها وباستخدام الأوكسين NAA (Naphthaleneacetic acid) و السايبتوكاينين 2iP (2-isopentenyl-adenine) لغرض تكوين الكالس واكثاره. أوضحت نتائج التجربة أن زيادة تركيز كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي سبب خفصاً معنوياً في الوزن الطري للكالس الأولي وفي تراكيز البوتاسيوم والكالسيوم كما سبب زيادة في تراكيز كل من الصوديوم و الحامض الأميني البرولين بصورة معنوية. كما أوضحت النتائج أن إضافة كلوريد الكالسيوم بالتراكيز (0.5 و 1)% كان له أثر معنوي في التقليل من تأثير كلوريد الصوديوم، إذ سبب زيادة في الوزن الطري للكالس الأولي ترافقت مع زيادة في تراكيز البوتاسيوم والكالسيوم وخفص في تراكيز الصوديوم والبرولين.

الكلمات المفتاحية: نخلة التمر، الكالس، كلوريد الصوديوم، كلوريد الكالسيوم، البرولين.

المقدمة:

تعد مشكلة تملح التربة إحدى المشاكل الحادة التي تعمل على الحد من نمو وانتاج النبات لاسيما في المناطق الجافة وشبه الجافة arid and semi-arid regions، حيث تنمو نخلة التمر *Phoenix dactylifera L.* ومن ناحية أخرى فإن المزارع الخلوية أو النسيجية، أصبحت تعد من أكثر الأنظمة التي يميل الباحثين الى استخدامها كنظام خلوي لدراسة استجابة الخلايا لمختلف ظروف الشد البيئي والتي تتضمن التغيرات الفسلجية و الكيموحيوية [1]. وتشير العديد من الدراسات الى أن النباتات النامية في البيئات المالحة قد طورت العديد من الآليات في الأصناف الحساسة عن المتحملة منها مابين مراكمة العناصر المعدنية واحتوائها ضمن الفجوات ومراكمة أنواع معينه من الأحماض الأمينية (البرولين و الكلوتامين) و التي زيادة فعالية بعض الأنزيمات المضادة للأكسدة [2]. أوضحت العديد من الدراسات أثر عنصر الكالسيوم في التخفيف أو التقليل من الأذى أو الضرر الذي تحدثه ظروف الشد البيئية المختلفة (كالحرارة العالية [3] والبرد [4] والشد الجفافي [5] والشد الملحي [6]) وبالنظر الى ان معظم الدراسات التي أجريت خارج الجسم الحي *in vitro* على أنسجة نخلة التمر قد ركزت باتجاه أكتارها [7] و [8]. ولقلة الدراسات الفسلجية عن تأثير الشد الملحي Salte stress في نخلة التمر المستزرعة خارج الجسم الحي، لذا فإن هذه الدراسة تهدف الى دراسة سلوك كالس نخلة التمر المنمأة خارج الجسم الحي تحت ظروف الشد الملحي من خلال بعض القياسات الفسلجية كالمحتوى المعدني من عناصر الـ (Na, Ca, K) ومحتوى الأنسجة من الحامض الأميني البرولين فضلا عن الوزن الطري و دراسة أثر الكالسيوم في التقليل من أثر الشد الملحي.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods:

أجريت الدراسة في مركز أبحاث النخيل التابع الى جامعة البصرة خلال الفترة من آذار 2001 لغاية كانون الأول 2001.

1- الأجزاء النباتية Explants:

أستخدم في هذه الدراسة نخيل التمر صنف (البرحي) وهو أحد الأصناف الشائعة في جنوب العراق إذ تم اختيار فسائل بعمر (2-4) سنوات للحصول على البرعم القمي shoot tip والذي تم أستئصاله مع طبقة لحمية بطول (1) ملم تقريبا للمساعدة على تماسك الأوراق [9]. ثم وضعت البراعم الطرفية في المحلول المضاد للأكسدة والذي يتكون من

حامض الستريك بتركيز (150 ملغم/لتر) و حامض الأسكوربيك بتركيز (100 ملغم/لتر). وبعد إخراج البراعم من المحلول المضاد للأكسدة تمت تجزئتها الى أربعة أجزاء متساوية تقريبا [10]. ثم وضعت في محلول التعقيم السطحي من القاصر التجاري الذي يتكون من هابوكلورات الصوديوم والذي تم تخفيفه الى (20%) مع إضافة قطرة واحدة من المادة الناشرة (Tween-20) وذلك لمدة (15) دقيقة مع التحريك المستمر . وبعد ذلك أستخرجت أرباع البراعم الطرفية وغسلت لثلاث مرات بالماء المقطر والمعقم وتم إجراء العمليات بكاملها على منضدة الزرع المسماة منضدة إنسياب الهواء الطبقي Laminar air flow cabinet والتي عقت مسبقا والتي عقت مسبقا بالكحول الأيثلي بتركيز (70%)

2- تكوين الكالس Callus formation :

لغرض الحصول على الكالس، زرعت أرباع البراعم الطرفية في وسط MS المعد من قبل [11] والمزود ب [30] غم/لتر سكروز ، 3 غم/لتر فحم منشط ، 40 ملغم/لتر سلفات الأذنين، 5 ملغم/لتر ثيامين، 170 ملغم/لتر أورثوفوسفات الصوديوم الهيدروجينية، 100 ملغم/لتر ميزواينوسيتول وذلك وفقا ل [12]. كما أضيف الأوكسين NAA بتركيز (30 ملغم/لتر) والسيتوكابنين 2iP بتركيز (3 ملغم/لتر) وفقا ل [13]، وعدل الرقم الهيدروجيني pH للمحلول عند مستوى 5.7 قبل إضافة الأكار والذي تمت إضافته بتركيز (8 غم/لتر) لغرض تصليب الوسط الزرعي، تم بعد ذلك تعقيم الوسط الغذائي باستخدام جهاز المعقم Autoclave في درجة حرارة (121 م) وضغط (1.05) كغم/سم² لمدة ربع ساعة . حضنت أرباع البراعم الطرفية بالظلام وعند درجة حرارة (27±2 م°) مع مراعاة تجديد الوسط الغذائي كل أربعة أسابيع لغرض الحصول على كمية كافية من الكالس، وقد أستغرقت هذه العملية حوالي ستة أشهر .

3- المعاملات الملحية Salt treatments :

بعد الحصول على كمية كافية من الكالس تمت إضافة المعاملات التالية الى الوسط الغذائي عند تحضيره : كلوريد الصوديوم بتركيز (0 ، 1 ، 2 ، 3) % لوحده إضافة الى خليط كلوريد الكالسيوم بالتركيز (0 ، 0.5 ، 1) % مع كل تركيز من التراكيز السابقة لكلوريد الصوديوم . وتمت تنمية الكالس عند هذه التراكيز لمدة شهر . تم استخدام (20) مكرر لكل معاملة .

4- قياسات النمو والتقدير الكيمياوية Growth and chemical analysis :

بعد إنتهاء فترة التجربة تم إجراء مايلي :

1- قياس الوزن الطري Fresh weight :

تم أخذ الوزن الطري لأنسجة الكالس لجميع المعاملات بطريقة الوزن المباشر لقطع الكالس، إذ تم اختيار خمسة مكررات من كل معاملة ووزنها باستخدام الميزان الحساس بعد غسلها بالماء المقطر لتخليصها من بقايا الوسط الغذائي ووضعها على ورق ترشيح للتخلص من قطرات الماء الزائدة .

2- المحتوى المعدني Mineral content :

تم هضم الكالس بعد تجفيفه باستخدام خليط من حامضي الكبريتيك والبيركلوريك المركزين وفقا ل [14]، وأستخدم الراشح لتقدير أيونات الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم . إذ قدر الصوديوم والبوتاسيوم باستخدام جهاز flam photometer بينما قدر الكالسيوم باستخدام جهاز atomic absorption spectrophotometer .

3- الحامض الأميني البرولين Proline :

تم تقدير نسبة الحامض الأميني البرولين باستخدام طريقة كروماتوغرافيا الورقة الصاعدة paper chromatography وذلك حسب طريقة [15] وتم قياس شدة الامتصاصية على الطول الموجي 440nm .

5- التحليل الأحصائي : صممت التجربة وفقا للتصميم العشوائي الكامل، وبعد الحصول على جدول تحليل التباين تمت مقارنة المتوسطات باستخدام إختبار أقل فرق معنوي المعدل R.LSD وعند مستوى إحتمال [16] .0.05 .

النتائج Results :

1- الوزن الطري Fresh weight :

تظهر النتائج المبينة في جدول (1) أن إضافة كلوريد الصوديوم الى الوسط الغذائي أدى الى إنخفاض معنوي في الوزن الطري للكالس الأولي مقارنة بالسيطرة . كما أن إضافة كلوريد الكالسيوم بالتركيزين (0.5%) و (1%) سبب زيادة معنوية في الوزن الطري للكالس الأولي مقارنة بمعاملات كلوريد الصوديوم وحده . كما يظهر الجدول عدم وجود فروق معنوية بين معاملي كلوريد الكالسيوم في مقدار الزيادة في الوزن الطري . أما بالنسبة للتداخل فيظهر الجدول نفسه أن أقل معدل للوزن الطري كان عند المعاملة (3%) من كلوريد الصوديوم بينما كان أعلى معدل له عند معاملة التداخل (2% كلوريد الصوديوم +1% كلوريد الكالسيوم) .

2- المحتوى المعدني Mineral content :

أ- الصوديوم : تظهر النتائج المبينة في جدول (2) أن إضافة كلوريد الصوديوم الى الوسط الغذائي أدت الى زيادة معنوية في تركيز الصوديوم في الكالس الأولي بينما سبب إضافة كلوريد الكالسيوم بالتركيزين (0.5%) و (1%) خفضا معنوي في تركيز الصوديوم في الكالس مقارنة بمعاملات كلوريد الصوديوم وحده . وفيما يخص معاملات التداخل يظهر الجدول أن أعلى تركيز للصوديوم كان عند المعاملة (3%) من كلوريد الصوديوم بينما سجلت معاملة التداخل بين (3% كلوريد الصوديوم +1% كلوريد الكالسيوم) أقل معدل في تركيز الصوديوم في الكالس ويفارق معنوي عن بقية المعاملات .

ب- **البوتاسيوم:** يوضح الجدول (3) أن زيادة تراكيز كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي سببت خفضاً معنوياً في تركيز البوتاسيوم في الكالس الأولي بينما كان لإضافة كلوريد الكالسيوم بالتركيزين (0.5%) و (1%) تأثير معنوي في زيادة تركيز البوتاسيوم مقارنة مع معاملات كلوريد الصوديوم وحده. ويظهر الجدول نفسه أن أقل تركيز للبوتاسيوم قد سجل عند المعاملة (3%) من كلوريد الصوديوم بينما حققت معاملة التداخل بين (2% كلوريد الصوديوم + 0.5% كلوريد الكالسيوم) أعلى تركيز للبوتاسيوم في الكالس الأولي وبفارق معنوي عن المعاملات الأخرى.

ج- **الكالسيوم:** تبين النتائج في جدول (4) أن إضافة كلوريد الكالسيوم بالتركيزين (0.5%) و (1%) إلى الوسط الغذائي أدى إلى زيادة معنوية في تركيز الكالسيوم في الكالس الأولي بالمقارنة مع معاملات كلوريد الصوديوم لوحده، كما يوضح الجدول أن إضافة كلوريد الكالسيوم بالتركيز (1%) إلى الوسط الغذائي سبب أعلى زيادة في تركيز الكالسيوم وبفارق معنوي عن المعاملات الأخرى. كما أن زيادة تراكيز كلوريد الصوديوم أدت إلى خفض معنوي في تركيز الكالسيوم في الكالس الأولي بالمقارنة مع السيطرة.

كما يوضح الجدول نفسه أن معاملتي التداخل (3% كلوريد الصوديوم + 0.5% كلوريد الكالسيوم) و (3% كلوريد الصوديوم + 1% كلوريد الكالسيوم) حققتا أعلى نسبة لتجمع الكالسيوم في الكالس الأولي مقارنة مع المعاملات الأخرى كافة.

د- **الحامض الأميني البرولين:** توضح النتائج البيئية في الجدول (5) أن زيادة تركيز كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي سببت زيادة معنوية في تركيز البرولين في الكالس الأولي بالمقارنة مع السيطرة. بينما سببت إضافة كلوريد الكالسيوم بالتركيزين (0.5%) و (1%) خفضاً في تركيزه وكان أعلى انخفاض في تركيز البرولين عند المعاملة (1%) من كلوريد الكالسيوم وبفارق معنوي، كما يظهر الجدول نفسه أن أعلى تركيز للبرولين في الكالس الأولي كان عند المعاملة (3%) من كلوريد الصوديوم وبفارق معنوي عن بقية المعاملات.

المناقشة Discussion:

أوضحت نتائج هذه الدراسة أن زيادة تركيز كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي أدت إلى إنخفاض معنوي في الوزن الطري للكالس الأولي وهي من النتائج المصاحبة لزيادة تركيز الأملاح وقد تمت ملاحظتها في المزارع النسيجية من قبل [17] وربما يعود السبب في ذلك إلى التأثير الأزموذي، فعند زيادة تركيز كلوريد الصوديوم يتأثر نمو الخلايا نتيجة لإنخفاض إمتصاص الماء [18].

كما أشارت نتائج هذه الدراسة إلى حدوث إضطراب في تراكيز الأيونات وهو ما يعرف بالتأثير الأيوني للأملاح إذ سببت زيادة تركيز كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي زيادة في تركيز الصوديوم وخفضاً في تركيز الكالسيوم والبوتاسيوم، وقد تمت ملاحظة مثل هذا الاضطراب في تجمع الأيونات من قبل [19] والذي يمكن أن يعود السبب فيه إلى ظاهرة التضاد الأيوني أو إلى تنافس الأيونات فيما بينها على مواقع الأمتصاص [20].

كما بينت نتائج الدراسة أن زيادة تركيز كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي سببت زيادة معنوية في تركيز الحامض الأميني البرولين ويتفق هذا مع ما توصل إليه [21] إذ أن هذا الحامض الأميني يتراكم عند تعرض النبات إلى حالات الأجهاد البيئية ومنها الملوحة وذلك لغرض المحافظة على الجهد المائي للخلية وللمساعدة في التنظيم الأزموذي داخل الخلية. وأوضحت هذه الدراسة أن إضافة كلوريد الكالسيوم إلى الوسط الغذائي كان له أثراً مشجعاً في زيادة الوزن الطري للكالس الأولي والذي ترافق مع خفض في تركيز الصوديوم وزيادة في تركيز البوتاسيوم والكالسيوم، وقد أشارت دراسات عديدة إلى هذا الدور المشجع للكالسيوم في تقليل تأثير الإجهاد باختلاف أنواعه على النبات ومنها [22]. وقد أوضحت الدراسات أن السبب في ذلك ربما يعود إلى دور الكالسيوم في المحافظة على الغشاء الخلوي ومنع تضرره تحت ظروف الإجهاد البيئية [23]، كما أن نقصه من المزارع النسيجية أدى إلى جعل الغشاء الخلوي أكثر عرضة للإصابة بالجروح ووجوده جعل الغشاء الخلوي مكتمل التكوين [24].

ويمكن الاستنتاج من الدراسة الحالية أن إضافة كلوريد الكالسيوم بأي من التركيزين (0.5% أو 1%) قد ساهم في تقليل تأثير الملوحة على الكالس الأولي إذ حدثت زيادة معنوية في الوزن الطري للكالس الأولي نتيجة لهذه الإضافة. لذا توصي باستخدام كلوريد الكالسيوم بأي من التركيزين أعلاه في دراسات مستقبلية لإنتاج وتكوين خلايا مقاومة للملوحة يمكن لها أن تنمو وتتطور إلى نباتات كاملة تحت ظروف زيادة الملوحة في التربة أو ماء الري التي هي من مشاكل الزراعة في جنوب العراق.

جدول (1) تأثير كلوريد الصوديوم و(كلوريد الصوديوم + كلوريد الكالسيوم) في الوزن الطري للكالس الأولي (غم)

لصنف النخيل (برحي)

التركيز الملحية %	كلوريد الصوديوم	كلوريد الصوديوم+0.5% كلوريد الكالسيوم	كلوريد الصوديوم+1% كلوريد الكالسيوم
0	0.323	0.323	0.323
1	0.320	0.337	0.356
2	0.303	0.346	0.380
3	0.243	0.313	0.341
المعدل	0.297	0.327	0.342

RLSD للتداخل=0.04

RLSD للمعاملات=0.01

جدول (2) تأثير كلوريد الصوديوم و(كلوريد الصوديوم + كلوريد الكالسيوم) في تركيز الصوديوم (ملغم/غم وزن جاف)

في الكالس الأولي لصنف النخيل (برحي)

التراكيز الملحية%	كلوريد الصوديوم	كلوريد الصوديوم+0.5% كلوريد الكالسيوم	كلوريد الصوديوم+1% كلوريد الكالسيوم
0	1.067	1.067	1.067
1	1.180	1.050	1.043
2	2.177	1.140	1.107
3	3.223	0.887	0.783
المعدل	1.911	1.036	1.00

RLSD للتداخل = 0.191

RLSD للمعاملات = 0.057

جدول (3) تأثير كلوريد الصوديوم و (كلوريد الصوديوم + كلوريد الكالسيوم) في تركيز البوتاسيوم (ملغم/غم وزن جاف)

في الكالس الأولي لصنف النخيل (برحي)

التراكيز الملحية%	كلوريد الصوديوم	كلوريد الصوديوم+0.5% كلوريد الكالسيوم	كلوريد الصوديوم+1% كلوريد الكالسيوم
0	1.847	1.847	1.847
1	1.180	2.310	2.430
2	1.170	2.697	2.410
3	0.820	2.253	2.197
المعدل	1.254	2.276	2.221

RLSD للتداخل = 0.259

RLSD للمعاملات = 0.116

جدول (4) تأثير كلوريد الصوديوم و (كلوريد الصوديوم + كلوريد الكالسيوم) في تركيز الكالسيوم (ملغم/غم وزن جاف)

في الكالس الأولي لصنف النخيل (برحي)

التراكيز الملحية%	كلوريد الصوديوم	كلوريد الصوديوم+0.5% كلوريد الكالسيوم	كلوريد الصوديوم+1% كلوريد الكالسيوم
0	15.833	15.833	15.833
1	15.000	18.400	18.450
2	10.000	19.867	20.940
3	6.833	22.567	23.110
المعدل	11.916	19.166	20.583

RLSD للتداخل = 1.324

RLSD للمعاملات = 0.74

جدول (5) تأثير كلوريد الصوديوم و (كلوريد الصوديوم + كلوريد الكالسيوم) في تركيز البرولين (مايكروغرام/غم وزن جاف) في

الكالس الأولي لصنف النخيل (برحي)

التراكيز الملحية%	كلوريد الصوديوم	كلوريد الصوديوم+0.5% كلوريد الكالسيوم	كلوريد الصوديوم+1% كلوريد الكالسيوم
0	1.183	1.183	1.183
1	1.497	1.247	1.317
2	2.047	1.307	1.380
3	3.910	2.787	2.320
المعدل	2.159	1.631	1.550

RLSD للمعاملات = 0.434

RLSD للتداخل = 0.111

المصادر *References*

- 1- A. Leone ; A. Costa ; M. Tucci and S. Grillo . Cells physiol. Plant 92 : 21-30 , (1994) .
- 2- J.M. Al-khayri . Biol. Plant 38: 79-82 ,(2002) .
- 3- A. Cooke. ; A. Cookson and M.J. Ealns Shaw . New physiologist . 102: 491-497 , (1986) .
- 4- R. Arora. and J.P. Palta . 1988 .. Plant Physiol. 87: 622-628 , (1988) .
- 5- C. Bowler. and Fluhr Trends plant Sci. 5:241-234, (2000) .
- 6- G. Cramer. ; R.A. Lauchli and V.S. Polito . Plant Physiol, 79: 207-211, (1985) .
- 7- J. Vermandi. and L. Navaro . Plant Cell. Tiss. Org. Cult., 45: 159-164, (1996) .
- 8- J.M. Al-Khayri. and A.M. Al-Bahrany Scientia Hor., 89: 291-29, (2001)
- 9- B. Tisserat. , USDA, 1-60, (1988) .
- 10- A.A. Mater. Date Palm J., 4: 137 - 152 , (1986) .
- 11- T. Murashige. and F. Skoog. Physiol. Plant. 15: 473 - 497 , (1962) .
- 12- B. Tisserat.,Date Palm J., 1: 43-54, (1981) .
- 13- A.M. Jassim . J.Bas. Res. 24: 1-6, (2000) .
- 14- M.S. Cresser . and J.W. Persons. Analytica. Chimica Acta. 109:431-436,(1979) .
- 15- J.B. Harborne . Chapman Hull, London . (1973).
- 16- K.M. Al-Rawi . and A.M. Khalaf Allah .Mosule Univ. (1980) .(In Arabic).
- 17- M.K. El-Bahr,; Kh. A. Okasha and S.A. Bekheet. Arab Univ. J. Agric. Sci., 9: 782-792., (2001) .
- 18- T.J. Flowers, and A.R. Yeo. Longman Sci. and Tech., (1988) .
- 19- M. Tester, New Physiol. 114 : 305-310 . (1990) .
- 20- M.A. Hamoud,; S.A. Ghanem; M.K. El-Bahr; A.Abo-Shadey and M.M.Saker. Egypt.J.Hort., 20(2): 337-353, (1993) .
- 21- A. Chrominski , S.Malls, D.J. Weber and B.N. Smith . Plant Growth Reg.Abs.,17: 1254-1257, (1991) .
- 22- E.A. Abdel-Rahim,; O.M. Abdel-Fattah; H.A. El-Shemy and M.B. Abdel Samei. 1st. Int. Conf. Date palm, Al-Ain, UAE. (1998) .
- 23- P.K. Hepler, and R.O. Wayne . Anne. Rev. Plant Physiol. 36: 397- 400,(1985) .
- 24- G.P. Yang,; A.L. Gao and J.H. Chen . Bull.Plant Physiol. 29:179-181, (1993) . .

Effect of NaCl and a mixture of (NaCl + CaCl₂) on fresh weight, mineral content and proline accumulation in the callus of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) c.v. Barhi cultured *in vitro* .

Hussein K. Al-Kabby and Luma H. Adul-Qader

Biol. Dep. Coll. Edu. Univ. Bas.

Abstract

Laboratory experiments were conducted to study the effect of different concentrations of NaCl solution (0 , 1 , 2 , 3)% and mixture of NaCl with previous concentrations with two concentrations of CaCl₂ (0.5 , 1)% on fresh weight, callus content of sodium , potassium , calcium ions and the amino acid (proline) .Explants used was shoot tip of date palm cv. (Barhi) cultured *in vitro* using “MS” medium with some additives and using NAA(naphthaleneacetic acid) and 2iP(2-isopentenyl-adenine) growth regulators for callus induction and multiplication .Results showed that increasing NaCl concentration Caused a decrease in fresh weight, calcium and potassium concentration In the primary callus whearase it cause an increase in sodium and proline cotent .Results showed also that addition of CaCl₂ cause a significant increase in fresh weight a compaind with increasing concentrations of potassium, calcium and cause decreasing concentration of sodium and proline in the primary callus .

Key words : date palm, callus, NaCl, CaCl₂, proline .