مجلة جامعة بابل / العلوم / العدد (3) / المجلد (14) : 2007

تأثير الشد الملحي في نمو و إخلاف النباتات من كالس الحنطة المزروع خارج الجسم الحي

علي ياسر حافظ العيساوي

كلية التربية للبنات –جامعة الكوفة

الخلاصة

درس تأثير ملح كلوريد الصوديوم بالتراكيز (0 و 0.25 و 0.50 و 0.75 و1.0و 1.25 و 1.50) % في نسيج الكالس المستحدث من السويقة فوق الفلقية لصنفين من الحنطة *Triticum aestivium* L. هما (مكسيباك وإباء 91). اتبع الأسلوب التدريجي في رفع كفاءة تحمل خلايا الكالس لتراكيز الملح بإعادة زراعة الكالس المتحمل على أوساط غذائية ذات تراكيز متزايدة من الملح وانتخاب المتحمل منها.

أعتمد الوزن الطري ومحتوى خلايا الكالس من الحامض الأميني البرولين كمؤشر لتأثير كلوريد الصوديوم في أنسجة الكالس ، وكانت النتائج كما يأتي:–

1– انخفاض عدد قطع الكالس المتحملة للملوحة مع زيادة تراكيز الملح في الوسط الغذائي.

2– انخفاض الوزن الطري لكالس أصناف الحنطة بزيادة تراكيز الملح.

3– وجد أن كمية الحامض الأميني البرولين قد ازدادت بزيادة تراكيز الملح وتفوق التركيز 0.75% NaCl . ولم يتميز أي من صنفي الحنطة عن الآخر في هذه الصفة.

4– أما تأثير كلوريد الصوديوم في قابلية الكالس على التمايز والاخلاف لنباتات كاملة، فقد تفوقت فيها معاملة المقارنة، وانخفضت أعداد النباتات الناتجة من تمايز الكالس المنتخب المتحمل للملوحة.

Abstract

This study was conducted to test the effect of different concentration of Sodium Chloride NaCl (0.0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0,1.25, 1.50)% on callus tissue initiation and growth from epicotyl of two cultivais Triticum aestivium L Maxipak and Ipa 91.

Using step by step technique for selecting the tolerant callus, by callus fresh weight and prolin content were used as parameters for determine the effect of sodium chloride on callus tissue.

The result can be summarized by following points:

1- Reduced number of tolerant calls pieces with increased NaCl levels.
2- Fresh weight of calls also was reduced by increasing NaCl content.
3- In general prolin concentration increasing significantly in 0.75%NaCl level.

The number of plant regeneration was reduced with the increase of sodium chloride concentration in the medium .

المقدمة

للملوحة تأثير واضح في نمو وإنتاجية كثير من النباتات ومنها نباتات الأصناف التي تعود للنوع الواحد. إن زراعة النباتات في الترب ذات الشد الملحي العالي يتطلب صرف طاقة كبيرة من قبل النبات لتحمل الشد الملحي وهذا يكون على حساب معدلات النمو والإنتاج، إذ ينخفض معدل نموها وإنتاجيتها بزيادة الشد الملحي (Baalbaki *et al.*, 2000) .

يعد العراق واحدا من البلدان التي تأثرت أراضيه بالملوحة وبدرجة كبيرة خاصة الإروائية منها، بحيث أصبحت الملوحة من المشاكل التي تعيق حركة التطور الزراعي وسببت وانخفاض شديد في الإنتاج(Al-Khfaf and Hummadi,1994)، وعلى هذا الأساس اهتمت العديد من مراكز البحوث ومربي النباتات في العالم والأقطار العربية، إلى وضع برامج بحثية لزيادة تحمل المحاصيل الزراعية للتراكيز الملحية واستنباط أصناف ذات تحمل للملوحة في العديد من النباتات باستخدام طرائق التربية التقليدية وغير التقليدية (Tiwari and Dwived,2000) ، ونظرا للتقدم الكبير في تقنيات الزراعة النسيجية ، فقد استخدمت لتحقيق هذه الغاية ، إذ يتم تعريض ملايين الخلايا المفردة أو التجمعات الخلوية الصغيرة (Belal *et al.*, 1990) أو قطع الكالس إلى مستويات مختلفة من الملوحة ومن ثم انتخاب الخلايا أو قطع الكالس القادرة على التحمل والنمو واخلاف نباتات كاملة منها . إن استخدام هذه التقنية قد ساعد في الحصول على تراكيب وراثية جديدة متحملة للملوحة في عدد من النباتات كالتبغ (Binzel *et al.*, 1985) والرز (Kim *et al.*, 1988) والطماطة (Rus *et al.*, 2000) .

تهدف هذه الدراسة إلى اختبار تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم في نمو وتطور أنسجة الكالس المستحدث من الساق فوق الفلقية لصنفين من الحنطة فضلا عن تقدير الحامض الأميني (البرولين) واعتماده كمؤشر لتحديد مدى تحمل كالس صنفي الحنطة قيد الدراسة لمستويات الملوحة المختلفة وانتخاب المتحمل منها ومحاولة إخلاف نباتات منها متحملة للملوحة.

المواد وطرائق العمل

1- البذور:

تم الحصول على بذور صنفي نبات الحنطة *Triticum aestivium* L. من سايلو حبوب الكوفة في محافظة النجف ، عقمت البذور بغمرها بمحلول 70% كحول الأثيلي لمدة 0.5 دقيقة بعدها غمرت في محلول 3% هايبوكلورات الصوديوم لمدة 5 دقائق ، غسلت البذور بالماء المقطر المعقم وزرعت في أنابيب الزراعة بحجم 50 مل الحاوية الوسط الغذائي (MS) (Murashige and Skoog,1962) الصلب الخالي من منظمات النمو بمعدل 2 بذرة / أنبوبة ، حفظت الزروعات في حاضنة النمو بدرجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة (10 أيام) تحت ظروف الظلام، اعتمدت البادرات غير الملوثة لأخذ الأجزاء النباتية وهي السويقة فوق الفلقية لزراعتها .

2- استحداث الكالس وزراعته في الوسط الملحي

زرعت قطع السويقة فوق الفلقية بطول 0.3 سم على الوسط الغذائي المكون من أملاح الأساس للوسط MS مضافاً له الفيتامينات الخاصة بالوسط B5 المدعم بـ(1.5 ملغم/ لتر) نفثالين حامض الخليك (NAA) و1.0ملغم/ لتراندول حامض البيوتاريك و(0.5 ملغم / لتر) بنزايل أدنين (BA)، فضلا عن(8 غم/ لتر) أكار و(40 غم / لتر) سكروز وعدلت الدالة الهيدروجينية إلى 5.8 (Gamborg *et al.*, 1968) .

بعد تجانس الوسط بالتسخين والتحريك وزع في قناني زجاجية سعة 100 مل بمعدل 25 مل / قنينة ، عقم الوسط بجهاز Autoclave عند درجة حرارة 121 مْ وضغط 1 جو ولمدة 20 دقيقة، ثم زرعت القطع النباتية على سطح الوسط بمعدل قطعتين لكل قنينة وحفظت الزروعات بالحاضنة وبظروف

التعاقب الضوئي 16 / 8 ساعة إضاءة وظلام وشدة إضاءة 2000 لوكس. أديم الكالس بإعادة نقله على الوسط ذاته كل 30 يوما، ولأجل انتخاب قطع الكالس المتحملة للملوحة أضيف NaCl النقي وبتركيز 0.25 % إلى الوسط الزرعي. عقم الوسط ووزع في أطباق بتري قطر الواحد منها(9 سم) بمعدل (25 مل/طبق) وزرع على سطح كل طبق(10 قطع) من الكالس بمعدل وزن(50 ملغم/ قطعة) وبواقع(15 مكرر) لكل صنف، حفظت الزروعات في ظروف التعاقب الضوئي وبعد 20 يوما رفعت قطع الكالس الحية وأعيد زراعتها على الوسط ذاته مع زيادة تركيز الملح إلى 0.50% واستمرت عملية الانتخاب ونقل قطع الكالس الحية كل 20 يوما على الوسط ذاته، مع الاستمرار بزيادة تراكيز الملح إلى (0.75, 1.0, 1.25, 1.50) % . ولترسيخ صفة التحمل لدى قطع الكالس المنتحية، تم إعادة زراعتها على التركيز الذي تم عنده الانتخاب 1.25% ولمرتين ، أخذت النتائج بعد نهاية كل فترة تحضين وشملت الملاحظات نمو وتطور الكالس والزيادة في وزنه الطري باستخدام ميزان كهربائي حساس.

3- تقدير الحامض الأميني البرولين في الكالس :-

قدرت كمية الحامض الأميني البرولين في خلايا الكالس المستحدث من السيقان فوق الفلقية لصنفي الحنطة والمعرضة للشد الملحي باستخدام المطياف الضوئي Spectrophotometer 600 عند الطول الموجي 520 نانوميتر ومقارنتها مع المنحنى القياسي لتقدير كمية الحامض الأميني البرولين وفق طريقة (Bates *et al.*, 1973) .

4- اخلاف النباتات الكاملة من تمايز الكالس المتحمل للشد الملحي:-

أعيدت زراعة الكالس في الوسط الغذائي الذي يحتوي على التركيز 1.25% NaCl ، ثم نقل الكالس إلى الوسط الخالي من NaCl والمتكون من (أملاح الأساس للوسط MS مضافاً إليه الفيتامينات الخاصة بالوسط B5 + 1.0 ملغم/ لتراندول حامض البيوتاريك IBA + 2.0 ملغم / لتر BA + 40 غم/لتر سكروز + 8 غم/ لتر أكار والخاص بإخلاف النباتات من الكالس .

وبعد 11-14أسبوعا من الزراعة بدأت النموات الخضرية بالظهور، نقلت الأفرع الخضرية المتكونة بطول(1-2 سم) إلى وسط جديد يحتوي(0.5 ملغم / لتر IBA) فقط لتشجيع الأفرع الخضرية على التجذير وعند وصول البادرات إلى طول مناسب (5-7 سم) تم أخذها من الوسط وغسلت الجذور جيدا بالماء لتخليصها من بقايا الوسط الغذائي وبعد ذلك عقمت وزرعت في أصص بلاستيكية احتوت على مزيج من الرمل والبيتموس وغطيت بأغطية بلاستيكية شفافة لضمان وصول الضوء والحفاظ على مستوى عالي من الرطوبة ، رفعت الأغطية بعد5 أيام وبعد مرور 10 أيام أخرى نقلت إلى البيت البلاستيكي لتنمو بشكل طبيعي . استخدم التصميم العشوائي الكامل CRD وحللت النتائج إحصائيا .

النتائج

1-تأثير تراكيز كلوريد الصوديوم في استحداث ونمو الكالس المستحدث من صنفي الحنطة

تبين النتائج في الجدول (1) تأثر الكالس المستحدث من السويقة فوق الفلقية ولصنفي الحنطة المعاملة بتراكيز كلوريد الصوديوم، إذ وجد انخفاض في أعداد قطع الكالس المتحملة للملح مع زيادة تراكيزه في الوسط، وعند التركيز 1.5% NaCl لم تتمكن أي من قطع الكالس المعاملة من تحمل فعل الملح بعد 4-2 أيام من الزراعة بدلالة توقفها عن النمو واكتسابها اللون البني الغامق ويشير الجدول نفسه إلى ان التركيز 1.25% كان له تأثير محدود في نمو الكالس إن تمكنت معظم القطع المعاملة من تحمل هذا التركيز والنمو

وازداد التأثير السلبي للملح مع زيادة تركيزه في الوسط ليبلغ أقصاه عند التركيز 1.25% ، إذ انخفضت نسبة القطع الحية المتحملة للملح إلى 38 و 30.3 % مقارنة بعينة القياس 97.5 % و 95% للصنفين مكسباك وإباء 91 على التوالي .

جدول (1) انتخاب قطع الكالس المتحمل لتراكيز ملح كلوريد الصوديوم لصنفين من الحنطة.

تراكيز NaCl %	الأصناف					
	مكسيباك			إباء 91		
	عدد القطع المعاملة	عدد القطع الحية المنتحية	القطع الحية المنتحية %	عدد القطع المعاملة	عدد القطع الحية المنتحية	القطع الحية المنتحية %
0	40	39	97.5	40	38.0	95.0
0.25	150	145	96.4	150	137	91.3
0.50	143	115	80.4	135	100	74.0
0.75	112	80	71.4	98	68	69.3
1.0	75	44	58.6	64	38	59.3
1.25	42	16	38.0	36	11	30.3
1.50	5	0	0	5	0	0

2- تأثير تراكيز كلوريد الصوديوم في الوزن الطري لكالس اصناف الحنطة:-

تشير النتائج في الجدول (2) إن أعلى معدل للوزن الطري للكالس كان في كالس معاملة المقارنة الخالية من الملح و لكلى الصنفين من الحنطة ، وبدأ وزن الكالس بالانخفاض مع زيادة تركيز الملح في الوسط الغذائي لتبلغ أقل نسبة زيادة بالوزن عند التركيز 1.25% حيث كان معدل الوزن الطري للكالس في هذه المعاملة ولصنفي الحنطة ماكسيباك و إباء 91 كما يلي : 0.599 غم و 0.582 غم مقارنة بمعاملة القياس 0.780 غم و 0.760 غم على التوالي. أما بالنسبة للزيادة الكلية في الوزن فقد كانت كما يلي: 16.52 % و 14.08 % مقارنة بعينة القياس 35.89% و 34.21 % وللصنفين مكسباك وإباء 91 على التوالي. كما يشير الجدول ان التركيز 1.50 % NaCl كان قاتلا لقطع الكالس بدلالة توقفها عن النمو واكتسابها اللون البني الغامق.

جدول (2) تأثير ملح كلوريد الصوديوم في الوزن الطري (غم) لكالس الحنطة بعد 20 يوما من نمو الكالس .

تراكيز ملح NaCl	الأصناف					
	مكسيباك			إباء 91		
	عدد القطع المعاملة	معدل الوزن الطري للكالس(غم)	الزيادة الكلية في الوزن %	عدد القطع المعاملة	معدل الوزن الطري للكالس(غم)	الزيادة الكلية في الوزن %
0	40	0.780	35.89	40	0.760	34.21
0.25	150	0.675	25.92	150	0.661	25.35
0.50	143	0.647	22.79	135	0.655	23.66
0.75	112	0.643	22.29	98	0.630	23.60
1.0	75	0.633	21.1	64	0.604	17.21
1.25	42	0.599	16.50	35	0.582	14.08
1.50	5	0.253	1.20	5	0.582	0.008

3- تأثير ملح كلوريد الصوديوم في تركيز الحامض الأميني البرولين (جزء بالمليون) في نسيج كالس صنفي الحنطة.

أظهرت نتائج الجدول (3) إلى عدم وجود اختلافات معنوية بين صنفي الحنطة في محتواها من حامض البرولين ، كما يلاحظ ان لتراكيز كلوريد الصوديوم تأثير معنوي حيث كانت معاملة المقارنة تحتوي على أقل تركيز من الحامض وبلغ 0.39 جزء بالمليون . ثم بدأ تركيز البرولين بالزيادة مع زيادة تراكيز الملح ليصل إلى أعلى معدل لتركيز البرولين في الكالس النامي عند تركيز الملح(75)% واختلف معنوياً عن جميع المعاملات ، بعدها بدأ معدل تركيز البرولين بالانخفاض عند التراكيز الملحية العالية، ويوضح الجدول كذلك وجود تداخل بين الأصناف وتراكيز الملح ، حيث كانت أعلى كمية للبرولين في الصنف مكسباك وعند التركيز (75)% وبلغ 1.85 جزء بالمليون وأقلها عند التركيز 1.50% وعند الصنف ذاته وبلغ 0.46 جزء بالمليون .

جدول (3) تأثير ملح كلوريد الصوديوم في تركيز الحامض الأميني البرولين (جزء بالمليون) في نسيج كالس أصناف الحنطة.

تراكيز ملح NaCl %	الأصناف		متوسط التراكيز
	مكسيباك	إباء (91)	
0	0.37 K	0.41 J	0.39 F
0.25	0.96 G	0.89 G	0.92 D
0.50	1.72 C	1.53 E	1.62 B
0.75	1.85 A	1.78 B	1.81 A
1.0	1.24 F	1.65 D	1.44 C
1.25	0.82 H	0.91 G	0.86 D
1.50	0.46 J	0.81 I	0.51 E
متوسط الأصناف	01.06 A	1.10 A	

4- تأثير ملح كلوريد الصوديوم في تمايز الكالس وإخلاف النباتات:-

تبين النتائج في الجدول (4) التأثير الواضح لملح كلوريد الصويوم في كفاءة تمايز الكالس وتكوين الأفرع الخضرية، إذ انخفضت أعداد الأفرع الخضرية الناتجة من الكالس المتحمل للملح ولصنفي الحنطة قيد الدراسة ، وبلغت النسبة المئوية للأفرع الخضرية المتكونة من الكالس المتحمل 28.4 و25 % في حين كانت في كالس المقارنة غير المعاملة بالملح 155 و 140 % فرع خضري ولصنفي مكسباك وإباء 91 و على التوالي، فضلا عن ذلك فقد كانت الفترة الزمنية اللازمة لتكوين الفرع الخضري من الكالس المتحمل(- 100 90) يوما من الزراعة وهي أطول من الفترة الزمنية في حالة المقارنة(70–8) يوما مع بطء في نمو الأفرع الناتجة من الكالس المتحمل ، فقد استغرق الفرع (7–10سم) 50 يوما في حين كانت 30 يوما في عينةالمقارنة. كما يشير الجدول نسه إلى قابلية الأفرع الخضرية المتكونة من الكالس المتحمل للملوحة على تكوين الجذور ، ولم يلاحظ اختلافات كبيرة في نسب التجذير بين الفرع الناتجة من الكالس المتحمل للملوحة والمقارنة ، كما تمكنت البادرات المتكونة من التأقلم لظروف البيئة عند نقلها إلى التربة.

جدول (4) إخلاف نباتات كالس صنفي الحنطة (المتحمل) لملح كلوريد الصوديوم .

الأصناف	طبيعة قطع الكالس	عدد القطع المستخدمة	عدد الأفرع الخضرية	الأفرع الخضرية %	عدد الأفرع الخضرية المكونة للجذور	التجذير %	عدد النباتات الكاملة
مكسيباك	المقارنة	20	31	155	27	87	22
	المتحمل	13	5	38.4	4	80	3
إباء(91)	المقارنة	20	28	140	25	89.2	18
	المتحمل	8	5	25	2	100	1

المناقشة

أظهرت هذه التجربة ان زيادة تركيز كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي ، أدى إلى انخفاض واضح في عدد قطع الكالس المتحملة للملوحة ووزنها الطري لصنفي الحنطة قيد الدراسة ، وقد يعزى هذا الانخفاض إلى التغيرات الحاصلة في العلاقات المائية للخلايا وإعادة جهدها الأزموزي للتأقلم بزيادة تركيز الملح، فضلا عن انخفاض جاهزية الماء والمواد الغذائية في الوسط بسبب زيادة تراكيز الملح، وبالتالي انعكس سلبياً في عدد ووزني قطع الكالس المزروعة وهذه النتائج جاءت متطابقة مع ما أشار إليه (Barakat and Abdelatif,1996) .

أما زيادة كمية الحامض الأميني البرولين في الكالس النامي على أوساط تحتوي على مستويات ملحية معتدلة (0.5–1.0) % مقارنة لبقية المستويات الملحية فهو مؤشر لقابلية الخلايا على التحمل للشد الملحي وهذا ما توصل إليه (Rus *et al.*, 2000).

إن قابلية كالس الحنطة المتحمل والمنتخب عند تركيز الملح 1.25% على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية والجذرية قد يرجع إلى حصول بعض التغيرات الفسلجية أو الوراثية في بعض خلايا الكالس نتيجة تعرضها ونموها في أوساط غذائية رفع تركيزها من الملح تدريجيا ولفترة طويلة نسبيا مما قد أكسب هذه الخلايا نوعا من التحمل أو التأقلم لهذه التراكيز الملحية وجعلها قادرة على النمو والتمايز إلى نباتات كاملة وقد حصل كل من (Jaiswal and Singh,2001) و (Belal *et al.*, 1990) على نتائج مماثلة ، أما انخفاض أعداد المجاميع الخضرية المتميزة من الكالس المتحمل للملوحة قد يعزى إلى إنتاج وتراكم بعض المركبات العرضية والتي تكون نتيجة الفعاليات الأيضية غير المتوازنة بسب نمو الخلايا تحت الجهد الملحي كالحامض الأميني البرولين وبعض المركبات الفينولية (Chen *et al.*,1998) والتي يؤدي تراكمها داخل الخلايا إلى الإخلال في فعالية النظام الأنزيمي والهرموني داخل الخلايا والتي قد تؤدي إلى انخفاض قابليتها على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية .

وفي ضوء هذه الدراسة نستنتج إمكانية الاستفادة من تقنية الزراعة النسيجية في تقييم الأصناف المختلفة لتحمل الجهد الملحي وانتخاب كالس متحمل للتراكيز ملحية معينة ومحاولة اخلافهما إلى نباتات كاملة متحملة للملوحة.

References

Al-Kafaf,S.K., Hummadi,B. (1994): Barley shoot, root growth and nutrients composition as effected by salinity and water stress. Basrah. J. Agric. Sci.,5,(1): 29-39.

Bates,L.S., Wildern.R.R. and Teary.j.D. (1973): Rabid determination of free prolin for water stress studies .Plant soil.,39:205-207.

Barakat, M.N. and Abde-latif, T.H.(1996): In vitro selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration .Euphtica.,91:127-140.

Baalbaki, R.Z., Zuray, K.R.N., Adlan, M.A.M. and Saxena,M.C.(2000): Effect of nitrogen source and salinity levels of salt accumulation of two chiepe a genotype. J. of plant nutrition .,23:805-814.

Belal,A.H.,Kammail,M.S. and Karora,M.M.(1990): Growth of culture alfafa (*Medicago sabira*) cell in response to sodium chloride . Proc., 4th Conf., Egypt Sci., Crop science , univ.-Cairo , Faculty of Agric.,11:693-702.

Binzel.M.L., Hasegawa,P.M., Handag,A.K. and Bressan.R.A.(1985): Adaptation of tobacco cell to NaCl. Plant physiol.79:118-125

Chen,D.M., Keiper, F.J. and Defilippis,L.T.(1998): Physiological changes accompanying the induction of salt tolerance in *Eucalyptus microcorys* L. shoot in tissues cultures.J.Plant Physiol.,153:555-563.

Gambrog,O.L. ,Miller , R.A. and Ojima,K.(1968): Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cell. Exp. Cell, Res.,50:151-158.

Jaiswal,R. and Singh,N.P.(2001): Plant regeneration from NaCl tolerant calls/ cell lines of *Chick peat* . International *Chick peat* and *Pigeon pea* news letter.,8:21-23.

Kim, Y.H.,Chung,T.V. and Chai,W.Y.(1988): Increased regeneration from NaCl tolerant callus ric.Euphytica.,39:207-212.

Murashige, T. and Skoog,F.(1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues calture . Physiol. Plant.,15:473-497.

Rus,A., Panoff,M., Perez-Alfocea,F. and Boarin,M.C.(1999): NaCl responses in tomato calli and whole plants. J.Plant Physiol.,155:27-733.

Rus,A., Segunda,R., Enrique,O.A., Maria,C. and Boarin,M.C.(2000): Long-term culture modifies the salt responses of callus lines of salt- tolerant. and salt sensitive tomato species. Plant Physiol.,157:413-420.

Tiwari,S. and Dwivedi ,V.K.(2000): Stability studied in *Chick peat* . Annals of agricultural research.,21:114-118.