استخدام حامض السلسليك في تحفيز مقاومة كالس الاوراق الفلقية لنبات الكتان.*Linum usitatissimum* L لراشح الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*

بادية عبدالرزاق ملاعبيدة
كلية العلوم – جامعة الموصل

تاريخ تسليم البحث : 2010/6/16 ؛ تاريخ قبول النشر : 2010/11/4

ملخص البحث :

استحدث الكالس من زراعة الاوراق الفلقية لنبات الكتان في أوساط Murashige & Skoog (MS) الحاوية على تراكيز متباينة من منظمات النمو، حيث كان وسط MS المدعم بـ 1.0 ملغم / لتر لكل من Adenine Benzyl (BA) و Naphthalene Acetic Acid (NAA) أفضلها. أمكن أنتخاب مزارع كالس متحمل لراشح عزلة من الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* عند تركيز 10 % من مزارع الكالس المضاف اليها تراكيز 0.0، 5.0، 10.0، 15.0 و 20 % راشحا فطريا على التوالي. وتمكن الكالس المقاوم من التمايز وتكوين الافرع الخضرية وكان الوسط MS المضاف اليه 1.0 ملغم BA / لتر + 0.5 ملغم NAA / لتر الافضل. وتكونت الجذور من الافرع الخضرية في وسط MS الخالي من منظمات النمو. كما وأبدت النباتات الناتجة من الكالس المقاوم ، مقاومة عند تلقيحها بالفطر الممرض. وبينت النتائج ايضا أن معاملة الكالس بتراكيز 10، 10^2، 10^3 و 10^4 مايكرومول من حامض السلسليك ولفترات زمنية 4، 8، 12، 24 و 28 ساعة أعقبها معاملة الكالس بتركيز 10 % راشح الفطر ولفترة 15 يوما زيادة متدرجة في اكتساب الكالس اللون البني والمتناسب مع تراكيز حامض السلسليك في الوسط وفترة المعاملة. كما لوحظ أن أفضل فاعلية للأنزيم بيروكسيديز كان في مستخلص خلايا الكالس المعامل بتركيز 10^4 مايكرومول من حامض السلسليك ولفترة 24 ساعة بوجود 10 % راشح فطري في حين أنخفض النشاط لأنزيم كتاليز مع زيادة تراكيز حامض السلسليك في الوسط وفترة المعاملة وكان أعلى نشاط للأنزيم عند تركيز 10 مايكرومول من حامض السلسليك وفترة 4 ساعات مع وجود 10 % راشح فطري.

Salicylic Acid Induced Tolerance of Cotyledons Callus of *Linum usitatissimum* L. to Culture Filterate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*

Badia Abdul- Razzak Malla Obaida
College of Science - University of Mosul

Abstract:

callus was stimulated from cotyledons explants of *Linum usitatissimum* seedlings on Murashige & Skoog (MS) media containing different concentrations of growth regulators. Medium containing 1.0 mg / L of Benzyl Adenine (BA) and Naphthalene Acetic Acid (NAA) was the best for callus induction. Following the testing of media containing the concentrations of 0.0 , 5.0 , 10.0 , 15.0 and 20.0 % culture filterate of an isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* . The medium containing 10.0 % culture filterate was selected as the best medium for regeneration of filterate – tolerant callus. Regenerated stems formed roots on MS medium. Plants from tolerant callus exhibited resistance to toxic filterate callus grown on the medium containing 10% fungus filterate for 15 days following treatment with 10 , 10^2 , 10^3 and 10^4 µ mole of salicylic acid for 4 , 8 , 12 , 24 and 28 hours showed an increase in brown colour darkness with the increase of salicylic acid concentration and treatment period. The highest peroxidase activity was found in callus cells extracts treated with 10^4 µ mole salicylic acid for 24 h and cultured on the medium containing 10.0 % culture filterate, whereas catalase activity was decreased with the increase of salicylic acid concentration in the medium and the treatment period. The highest recorded enzyme activity was found when 10 µ mole / L salicylic acid was used for 4 hours with 10 % fungus filterate.

المقدمة:

يتبع نبات الكتان *Linum usitatissimum* L. العائلة الكتانية Linaceae ويعد من النباتات الاقتصادية والغذائية على مستوى العالم لغنى بذوره بالزيت والبروتين، كما تستعمل بقايا بذوره بعد استخلاص الزيت منها علفا جيدا للحيونات (طيفور ورشيد، 1990). يصاب هذا النوع النباتي بالعديد من مسببات الامراض من البكتريا والفطريات والفايروسات ويعد مرض الذبول المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* والذي يصنف ضمن الفطريات الناقصة Deuteromycetes (Imperfect fungi) من الامراض المؤثرة في كمية ونوعية الحاصل (Rutkowska وآخرون، 2003). وعلى الرغم من أستخدام المبيدات بأنواعها وبشكل واسع لمكافحة هذه الامراض ومسبباتها إلا أنها لم تعط نتائج مشجعة فضلا عن تأثيرها الضار على البئية، تبعا لذلك فقد أستخدمت طرائق عديدة ومنها التربية التقليدية بهدف أستنباط أصناف نباتية مقاومة لمسببات مرضية معينة إلا أن صعوبة هذه الطريقة وطول الفترة اللازمة للحصول على هذه الاصناف وما يترتب عليها من أرتفاع في التكاليف أدى إلى تركيز الجهود في العقود الاخيرة على استخدام المركبات الكيميائية مثل Salicylic Acid (SA)، Jasmonic Acid (JA) والـ Ethylene التي تستحث المقاومة في النبات ضد العديد من مسببات الامراض (Agrios،2005 ؛ Anand واخرون، 2008). يساهم حامض السلسليك في زيادة مقاومة النباتات كونه يلعب دورا مهما في تنشيط وحث الجينات المسؤولة عن صفة المقاومة في النباتات في التعبير عن نفسها من خلال إنتاج العديد من البروتينات التركيبية والانزيمية كأنزيمات البيروكسيديز Peroxidase والكتاليز Catalase والحامض الاميني برولين Proline Amino Acid والتي تسمى مجتمعة بروتينات الحماية Pathogenesis Related Protein (PRP) والتي تكسب النبات صفة المقاومة المكتسبة Structural Acquired Resistance (SAR) عند تعرضها إلى جهد خارجي غير مناسب (Durner واخرون ،1997 ؛ Matthew واخرون، 1999 ؛ Anand واخرون، 2008). أشارت دراسات عديدة إلى أفضلية أستخدام حامض السلسليك في تحفيز عدد من النباتات على مقاومة المسببات المرضية، فقد تمكنت أحدى الدراسات من أنتاج نباتات خيار *Cucumis sativus* (cucumber) مقاومة للفطر *Sphaerotheca fuliginea* بأضافة تراكيز من حامض السلسليك إلى المحلول الغذائي للنباتات (Conti واخرون، 1996). وبذات الطريقة أنتجت نباتات بازلاء *Pisum sativum* (pea) ونباتات فلفل *Capsicum annuum* (pepper) مقاومة للفطر *Rhizoctonia solani* (Amaresh ، واخرون 2007 ؛ Rajkumar واخرون، 2008). أوضح Spltzer و Enyedi (1999) أن رش نباتات الطماطة *Lycopersicom esculentum* (tomato) بحامض السلسليك أكسبها صفة المقاومة للفطر *Alternaria*

solani. كما وجد Prachi واخرون (2002) أن لحامض السلسليك فعالية في حث كالس نبات الزنجبار (ginger) *Zingiber officinale* على مقاومة رواشح الفطر *F.oxysporum* . كما إن أضافة تراكيز من SA إلى وسط نمو كالس نبات القطن *Gossypium hirsutum* (cotton) أعقبها معاملته برواشح الفطر *Verticillum dahliae* ادى إلى اكسابه صفة المقاومة (Zhang واخرون،2003). كذلك اشارت دراسات عديدة إلى أن معاملة العديد من النباتات الاقتصادية بحامض السلسليك ادى إلى تحفيزها على مقاومة المسببات المرضية كالتبغ *Nicotiana tabacum* (tobacco) (Conroth واخرون،1995) والحمص *Cicer arietinum* (chickpea) (Saikia واخرون، 2003) والبطاطا *Solanum tuberosum* (potato) (جبرو حسون، 2008). يهدف البحث الحالي إلى أختبار فعالية حامض السلسليك في حث كالس نبات الكتان على أنتاج بعض دلائل المقاومة للفطر وامكانية أعتمادها مؤشرا لاكساب النبات صفة المقاومة للفطر *f . sp. lini* *.F.oxysporum*

مواد العمل وطرائقه

تجهيز بادرات الكتان المعقمة واستحداث الكالس وادامته

عقمت بذور الكتان التي تم الحصول عليها من السوق المحلي، بغمرها في محلول هايبوكلوريت الصوديوم 6% لمدة (10) دقائق. بعدها غسلت بالماء المعقم ثلاث مرات (3 دقائق/مرة). زرعت البذور في انابيب اختبار حجمها (70 مل) تحتوي على (15 مل) من الوسط الغذائي الصلب MS (Murashige و Skoog، 1962) وبمعدل (بذرتين/انبوبة). وحضنت الانابيب في حاضنة النمو عند درجة حرارة 25 ± 2°م وظروف الظلام التام مدة 3 أيام، نقلت بعدها الى ظروف التعاقب الضوئي (16 ساعة ضوء / 8 ساعات ظلام وشدة إضاءة 1500 لوكس). اعتمدت البادرات السليمة غير الملوثة كمصدر للقطع النباتية (الاوراق الفلقية) بمساحة 0.5 سم^2.

زرعت قطع الاوراق الفلقية المستأصلة من البادرات المعقمة في دوارق زجاجية سعة (100 مل) احتوت (30 مل) من وسط MS الصلب المدعم بتراكيز (1.0، 2.0، 3.0 ملغم BA / لتر) ومتداخلة مع تراكيز (0.5، 1.0 ملغم NAA / لتر). تم إكثار الكالس وادامته بإعادة زراعته على أفضل وسط للاستحداث (MS + 1.0 ملغم لكل من BA و NAA / لتر). قطع الكالس الى أجزاء بوزن (1 غم) تقريبا وزرعت على الوسط الجديد بمعدل قطعة / دورق / 30 مل من الوسط

وبواقع8 دوارق/معاملة. حفظت العينات في ظروف التعاقب الضوئي نفسها، واعيدت الزراعة كل 30 يوما.

انتاج النباتات الكاملة من تمايز الكالس

أختبر وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من BA و NAA المستخدمة نفسها في تشجيع الكالس على تكوين الافرع الخضرية. نقل الكالس بمعدل (1 غم / قطعة) وبعمر 30 يوما الى دوارق حجم (100 مل) احتوت (30 مل) من الاوساط المختبرة، وبمعدل (8 قطع كالس لكل معاملة) بواقع (4 دوارق / معاملة). حضنت الدوارق في ظروف التعاقب الضوئي نفسها. كما اختبر الوسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو لتكوين الجذور من الافرع الخضرية المتمايزة من كالس الاوراق الفلقية، إذ أستاصلت الافرع الخضرية المتكونة من الكالس وازيلت عنها بقايا الوسط الغذائي ونقلت الى دوارق زجاجية احتوت 30 مل من الاوساط المختبرة، حضنت العينات في ظروف التعاقب ذاتها.

مصدر الفطر وتجهيز رواشحه السامة

عزل الفطر *F.ox. lini* الشكل (A-1) من بذور نبات الكتان. نقي بأتباع تقانة السبور المنفرد Single spore isolation technique (Riker و Riker ، 1936). شخص الفطر بالاعتماد على الاسس المتبعة في التصنيف (Nelson واخرون ، 1983) وتم التأكد من دقة التشخيص من قبل الدكتور عدنان محمود عبدالله / قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة الموصل ، تم إكثار وإدامة الفطر على وسط Potato – Sucrose – Agar (PSA). اتبعت الطريقة القياسية لاستخلاص الرواشح الفطرية السامة (Sutherland و Pegg، 1992). نمي الفطر على الوسط الغذائي السائل زابكس – دوكس (Pitt و Hocking، 1985). وزع الوسط في دوارق زجاجية حجم 250 مل (50 مل / دورق) ولقح محتوى كل دورق بقرصين من المزرعة الفطرية النامية على وسط PSA قطر (0.8 سم) بعمر 10 أيام. حضنت الدوارق عند درجة حرارة (27± 2°م) مع عدم التحريك ولمدة 20 يوما. رشحت محتويات الدوارق من خلال الشاش ثم اجري النبذ المركزي لها عند 4°م وبسرعة (12000 دورة / دقيقة) ولمدة 20 دقيقة للتخلص من بقايا الابواغ والغزل الفطري، رشحت المفرزات مرة أخرى بأستخدام مرشحات بكتيرية غشائية Millipore filter (ذات ثقوب بقطر 0.22 مايكرومتر). ثم حفظت المفرزات في قناني زجاجية عند −10 °م لحين الاستخدام.

تحضير كالس الاوراق الفلقية المعامل برواشح الفطر (*F.ox. lini*)

اتبعت الطريقة السريعة والمباشرة (Thakur واخرون، 2002) لتحديد اعلى تركيز يمكن ان يتحمله الكالس من رواشح الفطر السامة. أضيفت الرواشح المعقمة بالترشيح بتراكيز (0.0، 5.0، 10.0، 15.0، 20.0) % (حجم : حجم) الى وسط نمو وادامة كالس الاوراق الفلقية MS + 1.0 ملغم لكل من BA و NAA / لتر بعد تعقيمه وتبريده الى درجة (50 °م) تقريبا. وزع الوسط الحاوي على الراشح في اطباق بتري زجاجية قطر (9 سم) بمعدل (25 مل / طبق). وضعت 10 قطع من الكالس بعمر 30 يوما بوزن ما يقارب (1 غم) على الوسط، حضنت العينات عند درجة حرارة (25± 2 °م) وظروف التعاقب الضوئي ذاتها ولمدة 20 يوما.

اختبار تحمل النباتات الناتجة من الكالس للتلقيح بالفطر (*F.ox. lini*)

تهئية اللقاح الفطري

جهز وسط البطاطا والسكروز (PS) السائل ووزع في دوارق زجاجية حجم (250 مل) بمعدل (50 مل/ دورق) ثم لقح محتوى كل دورق بقرصين قطر 0.8 سم من مزرعة فطرية نامية على وسط PSA الصلب بعمر 7 أيام. حفظت الدوارق عند درجة حرارة 27 °م وبظروف الظلام لمدة 10 أيام نقلت بعدها الى ظروف الاضاءة المستمرة ولمدة 5 أيام لتحفيز الفطر على تكوين الابواغ التكاثرية. استخدمت النباتات الناتجة من الكالس المعامل برواشح الفطر والتي نجحت اقلمتها لهذا الاختبار. إذ لقح كل نبات بمزج (5 مل) من المعلق الفطري والبوغي بالتربة القريبة والملاصقة للنبات مع احداث خدوش بواسطة ابرة معقمة اسفل الساق عند مستوى سطح التربة وتركت النباتات تحت المشاهدة مع سقيها وحسب الحاجة (Baayen واخرون، 1987).

إضافة حامض السلسليك إلى وسط نمو كالس الاوراق الفلقية

اضيف حامض السلسليك الى وسط نمو وادامة الكالس بالتراكيز (10، 10^2، 10^3، 10^4) مايكرومول، عدلت دالته الهيدروجينية pH إلى 5.8، وزع الوسط بعد تعقيمه وتبريده الى 50 °م تقريبا في اطباق بتري قطر 9 سم بمعدل (25 مل / طبق). زرعت على الوسط 10 قطع من الكالس بعمر 30 يوما ووزن 1.5 غم / طبق تقريبا بواقع 3 أطباق / معاملة. حفظت الاطباق في حاضنة النمو بظروف التعاقب الضوئي ذاتها ولفترات زمنية (4، 8، 12، 24، 28) ساعة. نقلت قطع الكالس الى دوارق زجاجية سعة 100 مل احتوت على أعلى تركيز من الراشح تحمله

الكالس (10 % راشح فطري). حضنت العينات لمدة 15 يوما في ظروف التعاقب الضوئي المشار اليها (Prachi واخرون، 2002).

تحديد بعض دلائل المقاومة في مستخلص الكالس المعامل برواشح الفطر وبحامض السلسليك

أستخلص الراشح الخلوي لعينات الكالس المضاف اليها تراكيز رواشح الفطر وحامض السلسليك وذلك بسحق (1 غم) من الكالس جيدا بوجود 2 مل من المحلول المنظم فوسفات الصوديوم ذو الدالة الهيدروجينية pH 7.0 بجهاز (Homogenizer, LABSCO-R 25) المبرد رشح المزيج خلال عدة طبقات من الشاش المبرد ونبذ الراشح بأستخدام جهاز النبذ المركزي المبرد بسرعة (3000 دورة / دقيقة) ولمدة 5 دقائق وعند درجة حرارة 4 □م، أخذ المحلول وأحتفظ به في ظروف التجميد عند درجة −8 □م لحين الاستخدام (الحمداني، 2006).

اعتمدت الطريقة اللونية (Colorometric Method) لقياس نشاط الانزيم بيروكسيديز في المستخلص الخام (Kim و Yoo، 1996). يحضر مزيج التفاعل المكون من 1 مل تركيزه (0.1 مولر من المحلول المنظم فوسفات الصوديوم ذو الاس الهيدروجيني pH6.0) +1 مل (15 مليمول كواروكول Guarocol) + 1 مل (3.0 مليمول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2) بعدها يضاف للمزيج (0.05) مل من المستخلص الخام للانزيم، يمزج سريعا وتقاس الامتصاصية الضوئية بجهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 470 نانوميتر.

حددت فاعلية الانزيم كتاليز Catalyase في المستخلص الخلوي كما ذكر Goth (1991). بدلالة قياس الامتصاصية للضوء للمعقد الاصفر المتكون نتيجة تفاعل H_2O_2 مع مولبيدات الامونيوم عند الطول الموجي 450 نانوميتر باستخدام المطياف الضوئي.

النتائج والمناقشة

استحداث الكالس من قطع الاوراق الفلقية

أظهرت نتائج زراعة قطع الاوراق الفلقية المستأصلة من بادرات نبات الكتان المعقمة (الشكل 1−B) على أوساط الاستحداث أن لهذه القطع درجة عالية من الاستجابة لتكوين الكالس في معظم الاوساط الغذائية المستخدمة وبلغت نسبة الاستحداث 84 % وكان الوسط MS + 1.0 ملغم لكل من BA و NAA / لتر الافضل في تكوين الكالس، وأكتمل تحول الجزء النباتي كليا إلى كالس بعد (17− 20 يوما) وأمتاز الكالس بلونه الاصفر المخضر (الشكل 1− C).

تكوين النباتات الكاملة من كالس الاوراق الفلقية

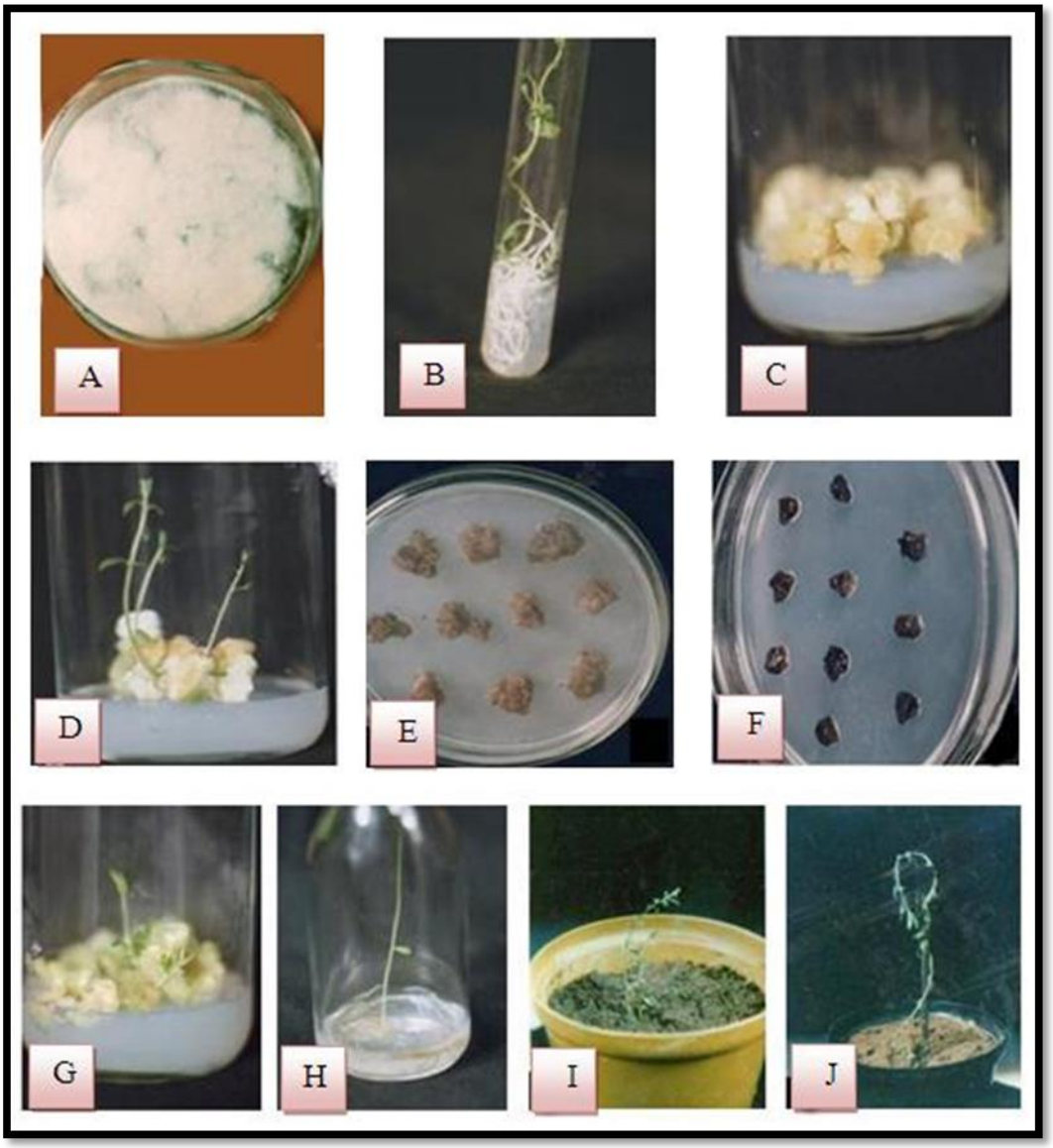
بينت النتائج المدونة في الجدول (1) كفاءة كالس الاوراق الفلقية على تكوين الافرع الخضرية في أوساط MS المحتوية على تراكيز مختلفة من BA و NAA. وتفوق الوسط (MS + 1.0 ملغم BA / لتر + 0.5 ملغم NAA / لتر) عن باقي الاوساط بأعطائه 30 فرعا خضريا وكانت المدة الزمنية اللازمة لنشوء الافرع الخضرية 16 – 20 يوما من نقلها إلى أوساط التمايز (الشكل 1– D).

الجدول (1) : تكوين الافرع الخضرية من كالس الاوراق الفلقية لبادرات الكتان في وسط MS الصلب المحتوي على تراكيز مختلفة من BA و NAA.

NAA (ملغم / لتر)	عدد الأفرع الخضرية المتكونة ملغم BA / لتر			
	0.0	1.0	2.0	3.0
0.0	0*	3	7	10
0.5	0	30	14	18
1.0	0	6	16	21

* الارقام في الجدول تمثل متوسط 4 مكررات.

كما وأظهرت الافرع الخضرية المتكونة قابلية جيدة على تكوين الجذور في وسط MS الخالي من منظمات النمو، إذ بلغت نسبة التجذير (87.5 %). إن الاستجابة الجيدة لاجزاء الاوراق الفلقية قد ترجع إلى نوع الجزء النباتي المستخدم مقترنا بمحتواه الداخلي من منظمات النمو على المستويات المضافة منها إلى الوسط الغذائي وعلى محتواه من الخلايا القابلة للانقسام لتكوين الكالس، توصلت العديد من الدراسات على نبات الكتان إلى نتائج مماثلة (الحسو، 2004 ؛ Chen و Dribnenk، 2004). إن تكوين الافرع الخضرية من كالس الاوراق الفلقية في وسط MS المضاف اليه BA و NAA يؤكد ملائمة هذا الوسط ومنظمات النمو المضافة في تمايز الكالس. وقد أشارت دراسات في نبات الكتان إلى هذه الحالة (الحسو،2004 ؛ Burbulis واخرون، 2009).



الشكل (1) : تكوين نباتات الكتان المقاومة والناتجة من كالس الاوراق الفلقية المقاومة لرواشح الفطر(*F.ox. lini*)

A- مزرعة الفطر نامية على وسط PSA بعمر 7 أيام .

B- بادرة كتان بعمر (15) يوما نامية في وسط MS.

C- الكالس المتكون من قطع الاوراق الفلقية بعمر (20) يوما في الوسط :
(MS + 1.0 ملغم BA و NAA / لتر).

D- تمايز كالس الاوراق الفلقية في الوسط :
(MS + 1.0 ملغم BA / لتر + 0.5 ملغم NAA / لتر) وتكوين الافرع الخضرية بعمر (20)يوما.

E- كالس الاوراق الفلقية المتحمل لرواشح الفطر تركيز 10 %.

F- كالس الاوراق الفلقية المتأثر برواشح الفطر تركيز15 – 20 %.

G- تمايز كالس الاوراق الفلقية في وسط التمايز (D) والحاوي على 10 % راشح فطري.

H- تجذير الافرع الخضرية في وسط MS الخالي من منظمات النمو.

I- نبات الكتان الكامل المقاوم للتلقيح بالفطر والناتج من تمايز الكالس المتحمل لرواشح الفطر.

J- نبات الكتان الناتج من الكالس غير المعامل برواشح الفطر (المقارنة).

أنتخاب الكالس من مزارع كالس الاوراق الفلقية لبادرات الكتان المضاف اليها رواشح الفطر (*F.ox. lini*)

تشير نتائج الجدول (2) إلى أنخفاض أوزان قطع الكالس المزروعة على وسط الادامة (MS + 1.0 ملغم لكل من BA و NAA / لتر) مع زيادة تراكيز رواشح الفطر في الوسط الغذائي. وظهر التأثير بشكل واضح عند التركيز 10 % راشح فطري حيث توقفت تقريبا قابلية الكالس على النمو والزيادة في الحجم بدلالة بقاء أوزان قطع الكالس والبالغة 30 قطعة لكل معاملة مقاربة لأوزانها قبل المعاملة فضلا عن اكتساب الكالس لونا بنيا فاتحا (الشكل E -1) وقد اعتمدت هذه التراكيز فقط في عملية انتخاب قطع الكالس المتحمل لفعل الراشح، واستبعد التركيز المنخفض 5 % لتأثيره المحدود في نمو الكالس، كما أهملت جميع قطع الكالس المعاملة بالتراكيز (15 و 20 %) راشح فطري لتوقفها عن النمو وانخفاض أوزانها بشكل كبير واكتسابها اللون البني المسود(الشكل F -1).

الجدول (2) : تأثير أضافة رواشح الفطر (*F.ox. lini*) في نمو كالس الاوراق الفلقية للكتان *L. usitatissimum* (بدلالة وزن الكالس/ غم) بعد 20 يوما من التحضين.

تراكيز رواشح الفطر % *معدل وزن الكالس (غم)					** وزن الكالس قبل المعاملة (غم)
20.0	15.0	10.0	5.0	0.0	
0.65*	0.70*	0.86*	1.15*	1.98*	0.950

* * الارقام في الجدول هي معدل وزن 10 قطع (3 مكررات).

* تعني أن هناك فرق معنوي بين متوسط وزن الكالس المعامل برواشح الفطر مع وزن الكالس قبل المعاملة عند مستوى معنوية 0.05 .

وقد يفسر حصول انخفاض في أوزان واحجام الكالس المعامل في الراشح واكتسابه اللون البني إلى وجود الإنزيمات والسموم في الراشح الفطري مثل Fusaric acid ، Fusarubin، Fumonisinو Lycomarsimine والتي سببت خللا في العمليات الفسلجية ومنها نفاذية الاغشية والعمليات الايضية مما يؤدي إلى إنخفاض كفاءة الخلايا على الانقسام والنمو(Nemec ، 1995 ؛ Jin واخرون ، 1996 ؛ Seo واخرون، 1996).أشارت العديد من الدراسات على نباتات الطماطة (رمضان واخرون ،2002) والخيار (الحمداني، 2006) والرقي (الصوفي، 2008) إلى الاثر السمي الواضح لرواشح الفطر في نمو الكالس وإعطائه اللون البني

تكوين النباتات الكاملة من تمايز كالس الاوراق الفلقية المتحمل لرواشح الفطر ونقلها إلى التربة

اعتمد الوسط (MS + 1.0 ملغم BA / لتر + 0.5 ملغم NAA / لتر) لتمايز الكالس المتحمل لرواشح الفطر وتكوين الافرع الخضرية (الشكل 1– G). تظهر نتائج الجدول (3) التأثير المثبط لرواشح الفطر في قابلية الكالس على التمايز. إذ انخفضت أعداد الافرع الخضرية المتكونة من الكالس المتحمل لرواشح الفطر إلى (64 %) مقارنة بعينات المقارنة غير المعاملة بالراشح (216.6 %).

وأحتاج كالس المقارنة (25 يوما) من الزراعة لتكوين الافرع الخضرية في حين كانت الفترة أطول 35 يوما في عينات الكالس المتحمل لرواشح الفطر فضلا عن النمو البطيء للأفرع الخضرية الناشئة من الكالس المتحمل.

إن انخفاض قابلية الكالس المقاوم على التمايز مقارنة بعينة القياس قد يكون بسبب تأثير المركبات السامة الموجودة في الراشح واثرها في تثبيط كفاءة الخلايا على الانقسام وتكوين الافرع الخضرية أو بسبب اثر السموم في الاخلال بالعمليات الايضية الضرورية لعملية الانقسام والتمايز (Binarova واخرون، 1990). سجلت نتائج مقاربة لما لوحظ في كالس فول الصويا (Jin واخرون، 1996) والطماطة (رمضان واخرون، 2002) والقرنفل (Thakur واخرون، 2002).

الجدول (3) : تكوين الأفرع الخضرية من تمايز الكالس المتحمل لرواشح الفطر (*F.ox. lini*) المستحدث من الاوراق الفلقية لبادرات الكتان في أوساط التمايز بعد 35 يوما.

معاملة الكالس	العدد الكلي للقطع المستخدمة	العدد الكلي للأفرع الخضرية المتكونة	تكوين الأفرع الخضرية %
***مقارنة**	12	26	216.6
**** المتحمل**	25	16	64

*** المقارنة : كالس غير معامل برواشح الفطر.**

**** كالس معامل برواشح الفطر.**

كما أظهرت الأفرع الخضرية الناتجة من الكالس المتحمل للرواشح قابلية على التجذير في الوسط MS الخالي من منظمات النمو، وقد كانت نسبة التجذير 73.3 % (الجدول 4)، ومن ثم نقلت الأفرع الخضرية المتكونة بطول (5–7 سم) إلى وسط التجذير، وتكونت الجذور

بعد 6–7 أيام في معظم الأفرع الخضرية (الشكل 1– H)، وتمكنت أغلبية النباتات المتكونة من التأقلم لظروف البيئة عند نقلها إلى التربة.

إن قابلية الافرع الخضرية الناتجة من الكالس المتحمل للرواشح على تكوين الجذور تعد مقبولة مقارنة مع نتائج دراسات مماثلة (رمضان واخرون، 2002 ؛ الحمداني ، 2006) على الرغم من اختلافها عن قابلية التجذير في عينات المقارنة، وقد يرجع سبب هذا التباين إلى وجود المركبات السامة في الراشح الفطري وتثبيطها لعملية التجذير (Thakur واخرون، 2002) أو ربما يعزى إلى تراكم هذه المركبات السامة في داخل الخلايا مسببة اضطراب بالعمليات المتعلقة بالانقسام والتمايز (Binarova واخرون، 1990). وقد أشارت دراسة Rutkowska واخرون (2003) والتي أجريت على نبات الكتان إلى نتائج مشابهة.

الجدول (4) : تجذير الأفرع الخضرية الناتجة من تمايز كالس الاوراق الفلقية لبادرات الكتان المتحمل لرواشح الفطر (F.ox. lini) في وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو.

معاملة الكالس	عدد الأفرع المنقولة / المجذرة	التجذير %	النباتات الكاملة المنقولة إلى التربة
المقارنة	21 / 24	87.5	10
المتحمل	11 / 15	73.3	8

أختبار قابلية النباتات الناتجة من الكالس المتحمل للرواشح للأصابة بالفطر (*F.ox. lini*)

أظهرت نتائج اختبار القدرة الأمراضية أن النباتات الناتجة من الكالس المقاوم لرواشح الفطر كانت مقاومة للأصابة بالفطر الممرض ذاته. حيث تم تلقيح النباتات الثمانية الناتجة من الكالس المقاوم لرواشح الفطر بالمعلق الفطري والبوغي لمزرعة فطرية حديثة، وتمكنت خمسة نباتات منها مقاومة الفطر وبقاءها سليمة ولم تلاحظ اختلافات واضحة في الصفات المظهرية بين النباتات المقاومة (الشكل1– I) وعينات المقارنة الناتجة من الكالس غير المعامل بالراشح (الشكل1–J) بأستثناء صفة أرتفاع النباتات حيث كانت النباتات الناتجة من الكالس المعامل بالراشح أقصر من مثيلاتها الناتجة من الكالس الغير المعامل. إن إظهار النباتات الناتجة من الكالس المنتخب المقاوم لرواشح الفطر صفة المقاومة عند تلقيحها بالفطر الممرض ذاته، قد يرجع إلى قابلية الخلايا المقاومة على تكوين عدد من المركبات الفينولية Phenols والسكريات

المتعـددة Polysaccharides والتـي اكسـبت خلايـا الكـالس صـفة التحمـل أو المقاومـة (Binarova واخرون،1990 ؛ Thakur واخرون،2002)، أو ربما بسبب الزيادة في أنتاج ونشاط أنزيمات البيروكسيديز، الكتاليز والحامض الاميني برولين والتي قد يؤدي تراكمها في خلايا الكالس إلى إكسابها صفة المقاومة ومن ثمّ تكوينها نباتات مقاومة للفطر (Storti واخرون، 1992).

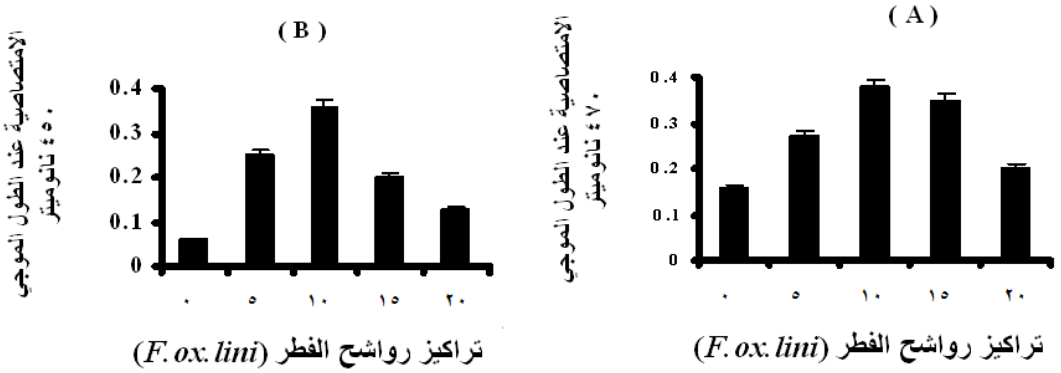
تحديد فاعلية بعض دلائل المقاومة في مستخلص الكالس المضاف اليه تراكيز رواشح الفطر

- فاعلية الأنزيم بيروكسيديز

أظهرت نتائج الاختبار تباينا في نشاط الأنزيم بيروكسيديز في عينات الكالس المعاملة بتراكيز مختلفة من الراشح الفطري حيث يبين الشكل (2 – A) زيادة في نشاط الانزيم في مستخلص الكالس مع زيادة تراكيز الراشح الفطري في الوسط الغذائي ليصل أعلى نشاط له في عينة الكالس المعاملة بـ 10% راشح فطري والمعبر عنه بالامتصاصية عند الطول الموجي 470 نانوميتر.

- فاعلية الأنزيم كتاليز

تبين النتائج في الشكل (2– B) ارتفاع نشاط الانزيم في مستخلص الكالس المعامل بتراكيز من الراشح الفطري في الوسط والمعبرعنه بالامتصاصية عند الطول الموجي (450 نانوميتر). وكان أعلى نشاط للانزيم في عينات الكالس المعاملة بتركيز 10 % راشح فطري.



الشكل (2) : نشاط الإنزيم بيروكسيديز (A) والإنزيم كتاليز (B) في المستخلص الخلوي لكالس الكتان المعامل بتراكيز من رواشح الفطر (F.ox. lini)

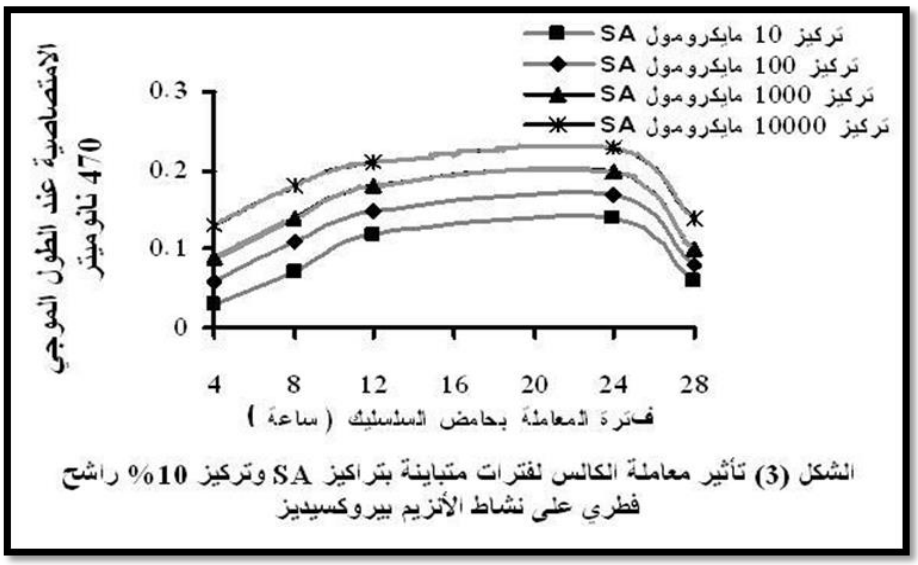
تعزى الزيادة في نشاط الانزيمين بيروكسيديز وكتاليز في مستخلص خلايا الكالس والمتناسبة مع زيادة تراكيز رواشح الفطر في الوسط الغذائي إلى جهد المركبات السامة في الراشح الفطري. أشارت العديد من الدراسات التي أجريت على نباتات مختلفة إلى نتائج مشابهة لما لوحظ مثل الخيار (Luhova واخرون، 1999) والفاصوليا (Broetto واخرون، 2005) والرقي (الصوفي، 2008).

فاعلية حامض السلسليك في زيادة كفاءة الكالس لتحمل رواشح الفطر (*F.ox. lini*)

أدت معاملة كالس الاوراق الفلقية للكتان بتراكيز من حامض السلسليك إلى تغيير لون الكالس من الاخضر المصفر إلى الكريمي والبني الفاتح مع زيادة فترة المعاملة وتراكيز SA في الوسط الغذائي. وأن تغيير اللون هذا ورد ذكره في دراسة Prachi واخرون (2002) عند معاملة كالس نبات الزنجبار بحامض السلسليك.

فاعلية SA في نشاط الأنزيم بيروكسيديز

أظهرت النتائج أن إضافة تراكيز من حامض السلسليك وتركيز 10 % راشح فطري ولفترات متباينة أدى إلى تحفيز الكالس على زيادة أنتاج الأنزيم بيروكسيديز وكانت متناسبة مع زيادة تركيز SA في الوسط الغذائي وفترة المعاملة. وكان أعلى نشاط للأنزيم عند تركيز 10^4 مايكرومول من SA وفترة معاملة 24 ساعة بعدها بدأ نشاط الأنزيم بالانخفاض مع زيادة فترة المعاملة إلى(28 ساعة) (الشكل3).

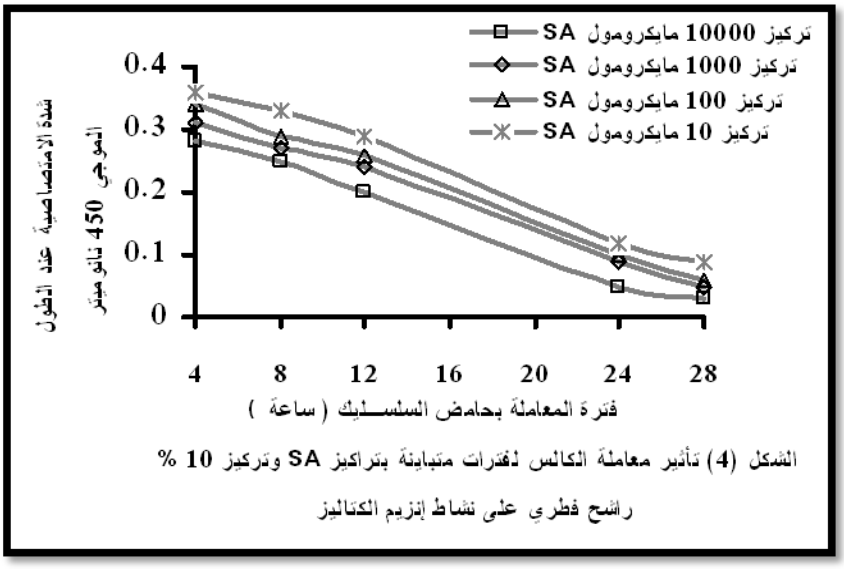


الشكل (3) تأثير معاملة الكالس لفترات متباينة بتراكيز SA وتركيز 10% راشح فطري على نشاط الأنزيم بيروكسيديز

وقد أشير إلى تأثير حامض السلسليك في ارتفاع نشاط الانزيم بيروكسيديز في كالس نبات الزنجبار المضاف إلى وسطه الغذائي تراكيز من حامض السلسليك تبعها تعريضه لرواشح الفطر *F. oxysporum* وكان أعلى نشاط للأنزيم في عينات الكالس المعاملة بتركيز 10^4 مايكرومول من حامض السلسليك (Prachi واخرون، 2002). وأشارت دراسة Amaresh واخرون (2007) إلى دور SA في تحفيز نباتات البازلاء الملقحة بالفطر *Rhizoctonia solani* على زيادة أنتاج الانزيم بيروكسيديز. وأدت معاملة نباتات القمح بحامض السلسليك قبل تلقيحها بالفطر *Septoria nodorum* إلى أنتاج تراكيز متزايدة من الانزيم بيروكسيديز (Troshina واخرون، 2007). وقد أوضحت بعض الدراسات أن دور حامض السلسليك في هذا المجال قد يرجع إلى تحفيزه لاليات المقاومة الطبيعية في الخلايا النباتية من خلال حث مختلف الوظائف الفسيولوجية (Agrios، 2005 ؛ Papova واخرون،1997).

فاعلية SA في نشاط الانزيم كتاليز

تبين من النتائج أن إضافة تراكيز من حامض السلسليك أدى إلى انخفاض نشاط الانزيم كتاليز، حيث يلاحظ الاستمرار في انخفاض فاعلية الانزيم في مستخلصات الكالس مع زيادة تراكيز SA في الوسط الغذائي وفترة المعاملة (الشكل 4). وكان أعلى نشاط للأنزيم عند تركيز 10^4 مايكرومول SA وفترة معاملة 4 ساعات.



الشكل (4) تأثير معاملة الكالس لفترات متباينة بتراكيز SA وتركيز 10 % راشح فطري على نشاط إنزيم الكتاليز

وقد ذكرت العديد من الدراسات أن فعالية SA في تحفيزالنباتات على المقاومة قد ترجع إلى تثبيطه للانزيم كتاليز ممايؤدي إلى زيادة تركيز بيروكسيد الهيدروجين الذي يعمل على حث النباتات على أنتاج بروتينات الحماية (Raskin، 1992 ؛ Conroth واخرون، 1995 ؛ Bokshi و Jobling، 2002). لوحظت نتائج مماثلة لما ورد ذكره في العديد من الدراسات

التي أجريت على نباتات مختلفة، فقد لوحظ إنخفاض مستويات الانزيم كتاليز في نباتات التبغ المعاملة بحامض السلسليك (Conroth واخرون، 1995؛ Takahashi وآخرون، 1997). كما عزيت مقاومة نباتات فول الصويا لمرض تعفن الجذور إلى انخفاض نشاط الانزيم كتاليز (Tenhaken و Rübel، 1997). إن التوجه الحديث لاستخدام المركبات الكيميائية كحامض السلسليك في تعزيز المقاومة الذاتية لكالس نباتات مختلفة مثل الزنجبار (Prachi واخرون، 2002) والقطن (Zhang وآخرون، 2003) شجع على استخدام حامض السلسليك في الدراسة الحالية بهدف معرفة مدى كفاءته في تحفيز خلايا الكالس على انتاج الانزيمات التي سجلت في دراسات عديدة أنها ذات أهمية في إكساب النباتات الناتجة من الكالس نوعا من التحمل أو المقاومة لرواشح الفطر (*F.ox. lini*).

المصادر

1. جبر، كامل سلمان و ابراهيم خليل حسون. (2008). تقويم فعالية بعض مركبات الاستحثاث الكيميائية والعوامل الاحيائية في مقاومة مرض تقرح ساق البطاطا / البطاطس تحت ظروف البيت الزجاجي والحقل. مجلة وقاية النبات العربية. 26 (1) : 50-57.
2. الحسو، زينة يحيى قاسم سلطان. (2004). تأثيرات اشعة كاما في محتوى الزيت والاحماض الدهنية في الكالس والتباتات الناتجة في نباتات الكتان *Linum usitatissimum*. رسالة ماجستير كلية التربية. جامعة الموصل. الموصل. العراق.
3. الحمداني، انسام احمد سعدون.(2006).أنتخاب نباتات خيار *Cucumis sativus L.* مقاومة للتعفن وموت البادرات المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* بتقانة الزراعة النسيجية. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.
4. رمضان، نديم أحمد و مزاحم قاسم الملاح و عدنان محمود عبدالله . (2002). أنتخاب نباتات الطماطة المقاومة للذبول الفيوزارمي *Fusarium oxysporum* و *F. solani*بواسطة زراعة الانسجة. المجلة العراقية لعلم الاحياء. 2(2): 261-271.
5. الصوفي، بلقيس يحيى نجم. (2008). تكوين نباتات الرقي من مزارع الكالس وتحديد بعض دلائل المقاومة للفطر *Citrullus lanatus L.* ، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.
6. طيفور، حسين عوني و رزگار حمدي رشيد . (1990). المحاصيل الزيتية. دار الكتب للطباعة والنشر جامعة الموصل. الموصل. العراق.
8. Agrios , G.N. (2005). Plant Pathology. Academic Press, New York .
9. Amaresh , C. ; Raghvendra , S. ; Archana , D. and Pradeep , S. (2007). Change in phenylalanine ammonia lyase activity and isozyme

patterns of polyphenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhance resistance in cowpea against *Rhizoctonia solani*. Acta Physiol. Plant. 29:361-367.

10. Anand , A. ; Kang , L. ; Tang , Y. and Mysore , K.S. (2008). Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiology. 146 : 703-715.
11. Baayen,R.P. ; De Maat, AL. (1987). Passive transport of micro conidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation after root inoculation.Neth. J. Plant Pathol. 93: 3-13.
12. Binarova, P. ; Nedelnik, J. ; Fellner, M. And Nedbalkova,B.(1990). Selection for resistance to filtrates of *Fusarium* spp. In embryogenic cell suspension culture of *Medicago sativa* L. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 22: 191-196.
13. Bokshi, A. and Jobling, J. (2002). Enhancing the natural disease resistance of potatoes. Fruit and Vegetables Magazine. 11: 46-47.
14. Broetto ,F. ; Marchese, J. A. ; Leonardo ,M. and Regina ,M. (2005).Fungal elicitor- mediate changes in polyamine content, phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in bean cell culture. Gen. Appl. Plant Physiol. 31: 235-246. Gen. Appl. Plant Physiol. 31:235-246.
15. Burbulis, N. ; Blinstrubiene, A. and Kupriene, R.(2009). Regeneration of adventitious shoots of linseed (*Linum usitatissimum* L.)from hypocotyls explants. Zemdirbyste Agriculture. 96(3): 168-175.
16. Chen, Y. and Dribnenki,P. (2004).Effect of medium osmotic potential on callus induction and shoot regeneration in flax anther culture,. Plant Cell Reports. 23 (5): 272-276.
17. Conroth M. U. ; Chen , Z.X. ; Ricigliano , J. R. and Klessing , D.F.(1995). Two inducers of plant defense resposes. 2-6-

dichloroisonicutinic acid and salicylic acid inhibit catalase activity in tobacco. Procceeding of the National Academic of Sciences of the United States of America. 92: 7143-7147.

18. Conti,G.G. ; Pianezzola, A. ;Arnoldi , A. ; Violini , G. and Mffi , D. (1996). Possible involvement of salicylic acid in systemic acquired resistance of *Cucumis sativus* against *Sphaerotheca fuliginea*. Euro. J. Plant Pathol. 102:537-544.

18. Durner, J. ; Shah, J. Klessig ,D.F. (1997).Salicylic acid and plant disease resistance in plant. Trends Plant Sci. 2:266-274.

19.Goth, L. (1991). A simple method for determineation of serum catalase and revision of reference range. Chin. Chim. Acta.196: 143-152.

20.Jin , H. ; Hartman , G. L. ; Nickell , C. D. and Widholm, J. M. (1996). Characterization and purification of a phytotoxin produced by *Fusarium solani* , the causal a gent of soybean sudden death syndrome. Phytopathology. 86:277-282.

21. Kim,Y.H. and Yoo, J.Y.(1996). Peroxidase production from carrot hairy root cell culture. Enz. Microb. Tech. 18: 531-535.

22.Luhova, L. ; Kristkova, E. and Pec, P. (1999). Amine oxidase , peroxidase, catalase and acid phosphatase activities in powdery mildew infected plants of *Cucumis sativus*. Phyto-Ann. Rei Bot. 39: 235-241.

23. Matthew, E.S. and Alexander, J.E.(1999). Salicylic acid nuduces rasistance to *Alternaria solani* in Hydroponically growth Phytopathol. 89:722-727.

24.Murashige ,T. and Skoog , F. (1962). Arevised medium for growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

25.Nelson, P.E. ; Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. (1983). "*Fusarium* species-illustrated Manual for Identification" University Park, Pennsylvania State University Press. 193 pp.

26.Nemec , S. (1995).Stress- Relation compound in xylum fluid of blight diseased citrus containing *Fusarium solani* naphthazarin toxin and their effect on the host. Can. Microb. 41:515-524.

27.Papova, L. ; Pancheva, T. and Uzunova, A.(1997). Salicylic acid : Properties, Biosynthesis and Physiological Role. Bulgarian Journal of Plant Physiology. 23(1): 85-93.

28.Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1985). Fungi and Food Spoilage. Academic Press. Australia.

29.Prachi ;Sharma,T. R. and Singh ,B. M. (2002). Salicylic acid induced insensitivity to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *zingiberi* in the calli of *Zingiber officinale* Roscoe. Euro. J. Plant Pathol. 108:31-39.

30.Rajkumar, M. ; Lee, k. j. and Freitas, H. (2008). Effects of chitin and salicylic acid on biological control activity of *Pseudomonas* spp. Against damping off of pepper. South African J. Bot. 74:268-273.

31.Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plant. Annual Review of Plant Physiology.43: 439-463.

32. Riker, A . J . Riker, R . S. (1936). Introduction to Research on Plant Diseases. 117 pp. J . S. Swift Co., Inc., St. Louis and New York.

33. Rutkowska , K. I. ; Mankowska, G. ; Luksezewicz, M.(2003). Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plant from anther culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum*. Plant Cell Reports. 22(2) : 110-116.

34. Saikia , R. ; Singh , t. ; Kumar , R. ; Srivastava , J. ; Srivastava , A.K. ; Singh , K. And Arora ,D.K.(2003). Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas flurescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. Microbiological Research. 158: 203-213.

35. Seo, J . A . ; Kim, J . C . and Lee, Y. W. (1996). Isolation and characterization of two new type furonisins produced by *Fusarium oxysporum*. Natural Products, 59: 1003- 1005.
36. Spltzer, M.E. and Enyedi, A.J. (1999).Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. Phytopathology. 89:722-727.
37. Storti, E. ; Latil, C. ; Salti, S. ; Bettini, P. ; Bogani, P. ; Pellegrini, M.G.; Simeti, C.; Monlnar,A. And Buiatt, M. (1992). The *In Vitro* physiological phenotype of tomato resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Theor. Appl. Genet. 84: 123-128.
38. Sutherland, M.L. and Pegg, G.F. (1992). The Basis of host recognition in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Physiol. Mol. Plant Pathol.40 : 823-436.
39. Takahashi, H. ; Chen, Z. ; Du, H. ; Liu, Y. and Klessing, D.F.(1997). Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plant with severely reduced catalase levels. Plant Journal.11: 993-1005.
40. Tenhaken, R. and Rübel, C. (1997). Salicylic acid is needed in hypersensitive cell death in soybean but does not act as a catalase inhibitor. Plant Physiolog.115: 291-298.
41. Thakur , M. Sharma, D. R. and Sharma, S. K. (2002). *In Vitro* selection and regeneration of carnation (*Dianthus carytophyllus* L.)plant resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Plant Cell Rep. 20:825-828.
42. Torshina, N.B. ; Yarullina, L.G. ; Valeev, A.S. and Maksimov, I.V. (2007). Salicylic acid induces resistance to *Septoria nodorum* Berk. in wheat. Plant Physiology. 34(5): 451-456.
43. Zhang , L.J. ; Hua , Z.X. ; Lin , T.H. ; Wei , Z.J. and Ming , Y.J. (2003). Increase of β-1,3- Glucanase and Chitinase activities in cotton callus cells treated by salicylic acid and toxin of *Verticillium dahliae*. Acta Botanica Sinica. 45 (7) : 802-808.