

تأثير ظروف الشد الملحي في مؤشرات انبات البذور ونمو البادرات واستحداث كالس البازلاء *Pisum sativum* L. في الاوساط الزراعية

ايمان طه ياسين *ساجدة عزيز عبود

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

*E- mail: azizsajida@yahoo.com

(أستلم 2019/6/27 ؛ فُيل 2019/9/16)

DOI: [10.33899/rjs.2020.164478](https://doi.org/10.33899/rjs.2020.164478)

الملخص

شمل البحث دراسة تأثير ملح كلوريد الصوديوم بتركيز 50,0، 100، 150، 200، 250 و 300 ملي مول في نمو وتطور بادرات وكالس نبات البازلاء *Pisum sativum* L. وظهرت النتائج ان الزيادة في تركيز ملح كلوريد الصوديوم في الوسط الزراعي ادى الى خفض نسبة انبات البذور، وزيادة مدة انباتها مسببا ببطء في سرعة الانبات وانخفاضاً في معدل اطوال كل من الجذير والرويشة وفي اوزانهم الطرية والجافة، اضافة الى انخفاض في فعالية انزيم الالفا- اميليز خلال مراحل الانبات المختلفة في التركيز 200 ملي مول من الملح استنادا لمعاملة المقارنة. سببت الملوحة ايضا انخفاضاً في معدل نمو النبات (ارتفاع النبات وطول الجذر، عدد تفرعات الساق والجذر والاوزان الطرية والجافة للبادرات). رافق زيادة كلوريد الصوديوم في وسط Arnon الغذائي انخفاض تدريجي في كمية الكلوروفيل الكلي للاوراق في تراكيز الملح المختلفة. اشارت النتائج ايضا الى التأثير السلبي للملوحة على الاوزان الطرية والجافة للكالس النامي على وسط MS الغذائي المجهز بتركيز 1 ملغم/ لتر لكل من BA و NAA، وشمل التأثير ايضا تضرر الاغشية الخلوية للكالس وحيويته. اثبتت الدراسة الحالية ايضا تاثيرات ملح كلوريد الصوديوم في زيادة كمية الكربوهيدرات الذائبة الكلية و مستوى البرولين في انسجة اوراق البادرات بعمر 20 يوما والكالس بعمر 21 يوما، بينما كان هناك انخفاض معنوي في كمية البروتين في تلك الانسجة.

الكلمات الدالة: البازلاء، ملح كلوريد الصوديوم، مزارع الكالس، الالفا- اميليز

المقدمة

تعد الملوحة احدى عوامل الاجهادات غير الحيوية abiotic stress التي تؤثر على نمو وانتاجية النبات، ويعد ملح كلوريد الصوديوم NaCl من اكثر الاملاح التي تسبب ملوحة التربة والتي تؤثر سلبا على نمو النبات خلال مراحلها المختلفة، وتختلف تغيرات مورفولوجية عديدة في النبات كاختزال في نسبة الانبات وسرعته وتغير في صفات البادرات الناتجة وكذلك التزهير وحاصل النبات (Whiting and Wilson, 2003) وتسبب ايضا تغيرات فسلجية للعديد من العمليات الايضية المتعلقة بالتنفس والبناء الضوئي وبناء البروتين ونقل الايونات وتركيب الاغشية الخلوية اضافة الى تغيرات وراثية عديدة (مهدي والحمزوي، 2011). وتعد البازلاء من النباتات غير المتحملة للملوحة، حيث تصل نسبة الملوحة التي تتحملها الى 2.0 ديسمنز/م وان تجاوزها يؤثر سلبا في نمو النبات (Whiting and Wilson, 2003)، واكد بعض الباحثين (مهدي والحمزوي، 2011) بان الملوحة سببت انخفاضاً واضحاً في كل من الوزن الطري والجاف للقرنات اضافة الى انخفاض في نسبة البروتينات والكربوهيدرات في بذور نبات البازلاء. وتشير دراسة اخرى الى ان ملح كلوريد الصوديوم احدث تحطيم البروتين واختزال الكلوروفيل مع زيادة في

كل من البرولين والسكريات الذائبة لمقاومة الاجهاد في نباتات البازلاء (هاجر، 2014). ينتمي نبات البازلاء *Pisum sativum* الى العائلة البقولية Fabaceae وهو من المحاصيل التي تكون بذورها غنية بالبروتينات والكروهيديرات (Summerfield and Roberts, 1985) والعديد من العناصر المعدنية والفيتامينات (حسن، 2002).

توجد العديد من الاليات المختلفة التي تبديها النباتات لتحمل وتقاوي الاجهاد الملحي الذي تتعرض له من خلال تغييرات في عملياتها الفسيولوجية والبايوكيميائية مما يسبب العديد من الاختلافات في الخواص التركيبية والوظيفية للنبات، لذا اتجهت معظم الدراسات الى استخدام حلول مناسبة للتقليل من الاثار الناجمة للاجهاد الملحي، وان تقنية زراعة الانسجة النباتية هي احدى هذه الدراسات التي ساعدت في التغلب على الكثير من المشاكل التي تسببها الملوحة لما توفره من وسط متجانس من حيث المحتوى الملحي والظروف البيئية (Rai et al., 2011). وتبنت الدراسة الحالية تقانة زراعة الانسجة في التعرف على بعض التغيرات الحاصلة في نمو بادرات البازلاء وكالسه لغرض استخدامها واعتمادها في تحديد قابلية تحمل النبات للمستويات المختلفة من ملح كلوريد الصوديوم.

مواد وطرائق البحث

التعقيم السطحي للبذور

تم الحصول على بذور البازلاء *Pisum sativum* L. صنف محلي من كلية الزراعة في جامعة الموصل. اخذت مجموعة من بذور البازلاء *P. sativum* L. وغسلت بالماء، وعقمت سطحيا بغمرها في محلول الكحول الايثيلي تركيز 96% لمدة دقيقتين، بعد ذلك نقلت الى محلول القاصر التجاري (هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 6.4%) والمخفف بالماء المقطر بنسبة 2:1 (قاصر: ماء مقطر) مع التحريك المستمر لمدة 20 دقيقة. غسلت البذور بالماء المقطر المعقم اربع مرات لمدة دقيقتين للتخلص من التاثيرات الضارة للمواد المعقمة.

انبات البذور وتطور بادراتها المزروعة في الاطباق

نقلت كمية من البذور المعقمة الى قناني زجاجية حاوية على تراكيز من محلول كلوريد الصوديوم 300,250,200,150,100,50,0 ملي مول وتركت في الظلام مدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 25°م ، ثم اخذت 50 بذرة بشكل عشوائي من كل معاملة، ووزعت على ثلاثة اطباق بلاستيكية بقطر 12سم بداخلها ورق ترشيح مبلل ب 10 سم³ من الماء المقطر. تركت البذور في غرفة الزرع في الظلام بدرجة حرارة (23 ± 2)°م لحين حصول الانبات فيها مع مراعاة بقاء أوراق الترشيح رطبة، وقد تم فيها القياسات التالية:

بدء الانبات

تم حساب المدة اللازمة لبدء انبات بذور البازلاء *P. sativum* L. المعاملة بتراكيز الملح المستخدمة وبالماء المقطر (معاملة المقارنة).

نسبة الانبات

حسبت النسبة المئوية لانبات بذور البازلاء *P. sativum* L. لكل معاملة بعد 10 ايام من الزراعة وفق المعادلة:

$$\text{نسب الانبات} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{عدد البذور المزروعة}} \quad ، \quad (\text{ولي، 1990}).$$

سرعة الانبات

تم تطبيق المعادلة ادناه لتقدير سرعة انبات بذور البازلاء *P. sativum* L. لكل معاملة بعد 10 ايام من الزراعة.

$$\text{سرعة الانبات} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{عدد الايام منذ بدء الانبات}} \quad ، \quad (\text{داود، 2011}).$$

تقدير فعالية انزيم الالفا- اميليز في البذور خلال مراحل الإنبات

إستخلاص الإنزيم

نقعت عينة من بذور نبات البازلاء المعقمة في الماء المقطر وعينة أخرى في محلول كلوريد الصوديوم بتركيز ملي 200 مول مدة 24 ساعة، بعد ذلك نقلت البذور الى أطباق بلاستيكية حاوية على ورق ترشيع مبلل بالماء المقطر مع مراعاة الاستمرار في ترطيب البذور بقليل من الماء ومتابعة فعالية إنزيم الالفا- اميليز خلال مرحلة الانبات.

استخلص انزيم الالفا- اميليز من البذور حسب الطريقة المتبعة من قبل Bialecka و Kepczynski سنة 2010 ومن ثم تقدير وحساب فعالية الانزيم وفق طريقة Bernfeld (1955) باعتماد المنحنى القياسي للمالتوز المحضر. حددت وحدة فعالية الانزيم بأنها كمية الانزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من المالتوز لكل دقيقة من الزمن.

قياس اطوال الجذير والرويشة

تم قياس طول كل من الجذير والرويشة للبادرات بعد مرور عشرة أيام من زراعتها بإستخدام المسطرة المدرجة.

الوزن الطري والجاف للجذير والرويشة

فصلت كل من الجذير والرويشة على حده واخذت الاوزان الطرية لهما ولكل معاملة بعد عشرة أيام من زراعة البذور على الأطباق البلاستيكية باستخدام ميزان حساس. ثم جففت العينات في فرن كهربائي بدرجة حرارة 70°م لمدة 48 ساعة ولغاية ثبات الوزن، ثم اخذت الاوزان الجافة للجذير والرويشة كل على حده.

تأثير ملح كلوريد الصوديوم في نمو وتطور البادات

زرعت البذور المعقمة النامية على سطح الوسط الغذائي Arnon شبه الصلب المعقم (Arnon and Hoagland, 1944) المدعم بتركيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم 300,250,200,150,100,50.0 ملي مول، وبمعدل بذرتين/ قنينة لخمس مكررات. حفظت القناني في غرفة الزرع في الظلام بدرجة حرارة (23 ± 2) °م لحين بزوغ الجذير، ثم نقلت القناني الى ظروف الإضاءة 16 ساعة و 8 ساعات ظلام وبشدة إضاءة 2000 لوكس.

تقدير نمو البادات

بعد مرور مدة 20 يوما من نمو بادرات البازلاء على الأوساط الغذائية الحاوية على ملح كلوريد الصوديوم أُجريت عليها

القياسات التالية:

تقدير ارتفاعات السيقان و اطوال الجذور

تم قياس طول الساق لخمس مكررات لكل معاملة إبتداءً من مستوى سطح الوسط الغذائي وحتى أعلى قمة نامية له ومعدل طول الجذور لنفس البادات.

حساب تفرعات السيقان والجذور

أخذ معدل عدد الأفرع للسيقان والجذور للبادرات لكل المعاملات.

معدل الوزن الطري والجاف

قدر معدل الأوزان الطرية للبادرات (المجموع الخضري والجذري) بعد 20 يوما من نموها على الأوساط الحاوية على ملح كلوريد الصوديوم باستخدام ميزان حساس. تم وضع العينات في أكياس ورقية مثقبة وجففت في فرن كهربائي بدرجة حرارة 70°م ولمدة 24 ساعة ولحين ثبات الوزن، وبعد تبريد العينات وزنت لإيجاد معدل الأوزان الجافة للبادرات لكل معاملة.

تقدير كمية الكلوروفيل الكلي

أُتبعَت طريقة Lichtenthaler (1987) في إستخلاص الكلوروفيل وتقدير كميته في أوراق البادات بعمر 20 يوما من

نموها على اوساط Arnon الحاوية على الاملاح، وفق المعادلة التالية:

كمية الكلوروفيل الكلية (ملغم/سم³) = 20.2 (الامتصاصية عند 645 نانوميتر) + 8.02 (الامتصاصية عند 663 نانوميتر) × الحجم / (1000 × الوزن)

استحداث ونمو الكالس في الأوساط الحاوية كلوريد الصوديوم

زرعت قطع من سيقان نباتات البازلاء *P. sativum* L. المعقمة بعمر 25 يوما وبطول 1 سم تقريبا على الوسط الغذائي MS (Murashige and Skoog, 1962) المجهز بمنظمات النمو BA و NAA بتركيز 1 ملغم/لتر لكل منهما والسكروروز بتركيز 3 % والأكار بتركيز 0.8% مع إضافة ملح كلوريد الصوديوم إلى أوساط الإستحداث بتركيز 300, 250, 200, 150, 100, 50, 0 ملي مول. حضنت الزروع في غرفة الزرع تحت ظروف اضاءة 16 ساعة و 8 ساعات ظلام وبشدة اضاءة 2000 لوكس بدرجة حرارة (22 ± 2)°م. نقلت قطع من الكالس النامي على الأوساط الغذائية الخالية من ملح كلوريد الصوديوم (معاملة المقارنة) بوزن 0.5 غرام تقريبا وبعمر 30 يوما إلى قناني زجاجية حاوية على وسط MS الغذائي المزود أيضا بـ 1 ملغم/لتر من BA و NAA وملح كلوريد الصوديوم بتركيز مختلفة 300, 250, 200, 150, 100, 50, 0 ملي مول. حضنت الزروع في غرفة الزرع تحت الظروف المشار إليها سابقا لاستحداث ونمو الكالس. و بعد فترة نمو استغرقت ثلاثة أسابيع على الأوساط الغذائية السابقة اجري على الكالس القياسات اللاحقة.

تقدير الأوزان الطرية والجافة للكالس

حددت الأوزان الطرية للكالس النامي في الأوساط الحاوية على ملح كلوريد الصوديوم لجميع المعاملات بعد مضي فترة 21 يوما من النمو على تلك الأوساط الغذائية، ثم جففت عينات الكالس لإيجاد الوزن الجاف بوضعها في أكياس ورقية منقبة في فرن كهربائي بدرجة حرارة 60°م لحين ثبوت الوزن، وبعد تبريد العينات أخذت الأوزان الجافة لجميع المعاملات.

تقدير كمية البروتين الكلية الذائبة

قدرت كمية البروتين الكلي في عينات الأوراق المأخوذة من بادرات بعمر 20 يوما والكالس بعمر 21 يوما ولجميع المعاملات حسب طريقة Lowry (1951) وبالإعتماد على المنحنى القياسي المحضر من مصلى البقر BSA.

تقدير كمية الكربوهيدرات الكلية الذائبة

استخلصت الكربوهيدرات الكلية الذائبة في عينات الأوراق والكالس لجميع المعاملات وقدرت كميتها حسب طريقة (Herbert et al., 1971) استخدم الكلوكون كمحلول قياسي.

تقدير كمية البرولين

قدرت كمية البرولين في الأوراق والكالس المعاملة بملح كلوريد الصوديوم حسب الطريقة المتبعة من قبل (Bates et al., 1973)، واعتمد على المنحنى القياسي المحضر من تراكيز متعددة من البرولين.

تضرر أغشية خلايا الكالس

حسبت النسبة المئوية لتضرر أغشية خلايا الكالس بعمر 21 يوما وفقا للمعادلة الآتية:

$$\text{نسبة تضرر الأغشية} = \frac{\text{القراءة الأولى لدرجة التوصيل الكهربائي Ec1}}{\text{القراءة الثانية لدرجة التوصيل الكهربائي Ec2}} \times 100 \quad (\text{Luttsm et al., 1995}).$$

تقدير حيوية الكالس

قيست حيوية الكالس بعمر 21 يوما ولجميع المعاملات بالإعتماد على مدى قدرة خلايا الكالس الحية على إختزال مادة الـ Triphenyltetrazolium chloroide Formazan الحمراء (Towill and Mazur, 1975).

النتائج

انبات البادرات

وجد ان المدة اللازمة لبدء انبات البذور ونسب انباتها قد تباينت بتباين تراكيز ملح كلوريد الصوديوم المستخدمة، حيث سجلت البذور غير المعاملة بالملح (معاملة المقارنة) أعلى نسبة انبات بلغت 100% مع قلة الأيام اللازمة لبدء انبات مقارنة بنسب انبات البذور المعاملة بالملح التي سجلت إنخفاضاً واضحاً في تلك النسب واستغرقت مدة زمنية أطول لبدء انبات كلما زاد تركيز الملح المعامل به البذور، مع الوصول الى نسبة انبات 0% للبذور المعاملة بتركيز 300 ملي مول من الملح (الجدول 1). و يلاحظ من الجدول أيضا ان سرعة انبات المعتمدة على عدد البذور النابتة وعدد الأيام منذ بداية انبات قد إنخفضت أيضا بزيادة تركيز الملح المعامل به البذور مقارنة بسرعة انبات بذور المقارنة.

الجدول 1: التأثيرات الناتجة من نقع بذور البازلاء *P.sativum* في تراكيز مختلفة من محلول كلوريد الصوديوم في انبات البذور بعد فترة نمو 10 أيام

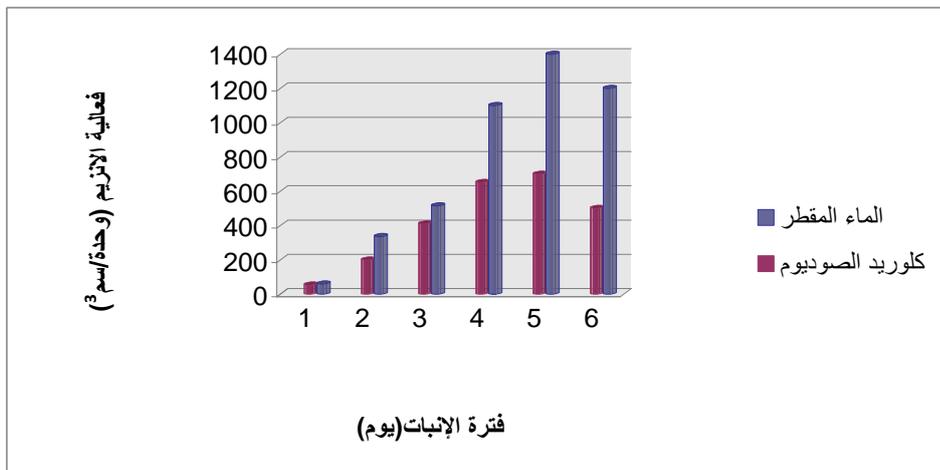
سرعة انبات (بذرة/ يوم)	نسبة انبات (%)	المدة اللازمة لبدء انبات (يوم)	تراكيز كلوريد الصوديوم (ملي مول)
5.0	100	1	معاملة المقارنة
3.8	75	1	50
2.9	58.7	2	100
1.1	22.5	4	150
0.9	18.7	4	200
0.4	8.7	5	250
0	0	*	300

*موت البذور وعدم انباتها

كل قيمة تمثل معدل 50 بذرة لكل معاملة

فعالية إنزيم الالفا- اميليز خلال مراحل انبات البذرة

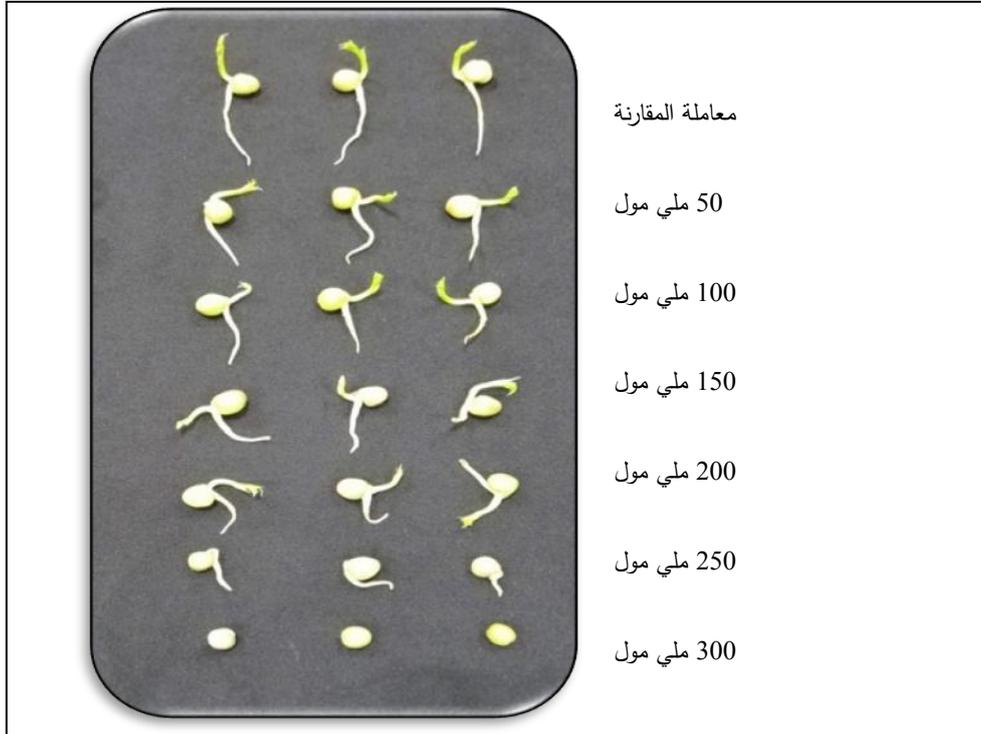
تشير النتائج الشكل (1) الى استمرار زيادة فعالية انزيم الالفا - اميليز المستخلص من بذور البازلاء المنقوعة بالماء المقطر فقط (معاملة المقارنة) خلال مراحل انبات، اذ سجلت الفعالية من يوم الاول 60 وحدة/ سم³ بينما اليوم الخامس من انبات كانت 1400 وحدة/سم³ التي تعد اعلى قيمة لها بعد ذلك اخذت الفعالية بالانخفاض في اليوم السادس، في حين حصل انخفاض واضح في فعالية الانزيم المستخلص من بذور البازلاء المنقوعة في محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 200 ملي مول خلال مراحل انبات مقارنة بفعاليتها في البذور المعاملة بالماء المقطر فقط ، اذ بلغت 700 وحدة/ سم³ في اليوم الخامس من الزراعة.



الشكل 1: فعالية انزيم الالفا- اميليز المستخلص من بذور البازلاء *P.sativum* المنقوعة في 200 ملي مول بمحلول كلوريد الصوديوم والماء المقطر خلال مراحل انبات المختلفة.

نمو الجذير والرويشة

كان تأثير ملح كلوريد الصوديوم في مراحل الانبات واضحاً حيث تأثرت صفة طول الجذير والرويشة بشكل واضح بمعاملات الاجهاد الملحي المستخدمة في هذه الدراسة. سجلت بذور البازلاء المعاملة بالماء المقطر فقط (معاملة المقارنة) اعلى معدل طول للجذير والرويشة، في حين اعطت البذور المعاملة بالمحلول الملحي ادنى قيم لهذه الصفة الشكل (2)، ترتب عنها انخفاض في معدل الاوزان الطرية والجافة للجذير والرويشة (الجدول 2).



الشكل 2: نمو وتطور بادرات البازلاء *P. sativum* الناتجة من البذور المنقوعة بمحاليل كلوريد الصوديوم المختلفة وبالماء المقطر بعد فترة نمو 10 ايام.

الجدول 2: مؤشرات نمو وتطور بادرات نبات البازلاء *P. sativum* النامية من البذور المنقوعة بمحاليل مختلفة من كلوريد الصوديوم والماء المقطر بعد 10 ايام من زراعتها على الاطباق

معدل الوزن الجاف للجذير والرويشة (غم)	معدل الوزن الطري للجذير والرويشة (غم)	معدل طول الرويشة (سم)	معدل طول الجذير (سم)	تركيز كلوريد الصوديوم (ملي مول)
001.1	1.122	3.7	5.1	معاملة المقارنة
0.093	1.080	2.5	3.3	50
0.090	0.990	2.5	3.2	100
0.072	0.680	0.3	2.0	150
0.060	0.500	0.1	0.4	200
0.031	0.400	0.1	0.2	250
*	*	*	*	300

* عدم إنبات البذور

كل قيمة تمثل معدل 10 مكررات

تأثير الملوحة في نمو بادرات البازلاء

يلاحظ من النتائج (الجدول 3) ان معدل اطوال السيقان والجذور للبادرات النامية من البذور المعاملة بمحاليل كلوريد الصوديوم يتناسب عكسيا مع تركيزه، حيث ادت التراكيز 200،150،100 و250 ملي مول منه الى تقزم السيقان و الجذور اضافة الى خفض التفرعات وعدد الاوراق لكل من السيقان والجذور استنادا الى معاملة المقارنة بعد فترة نمو 20 يوما على تلك الاوساط، يلاحظ ايضا من بيانات (الجدول 3) حصول انخفاض كبير في معدل الاوزان الطرية والجافة للبادرات (المجموع الخضري والجذري) بعد 20 يوما من نموها على الاوساط الملحية وجاء هذا الانخفاض متدرج مع تركيز الملح المستخدم، حيث ان زيادة تركيزه الى 250 ملي مول خفض معدل الوزن الطري والجاف للبادرات الى 0.3 غم و 0.05 غم على التوالي، وعند زيادة التركيز الى 300 ملي مول سبب موت البذور وعدم انباتها وتكوينها للبادرات الشكل (3).

الجدول 3: تأثير التراكيز المختلفة لملاح كلوريد الصوديوم في مؤشرات نمو بادرات البازلاء *P.sativum* بعد فترة نمو 20 يوما.

معدل الوزن الجاف للنبات (غم)	معدل الوزن الطري للنبات (غم)	معدل عدد تفرعات الساق	معدل عدد تفرعات الجذر	معدل طول الساق (سم)	معدل طول الجذر (سم)	تركيز كلوريد الصوديوم (ملي مول)
0.400	4.010	5.0	27.0	13.7	14.3	معاملة المقارنة
0.211	2.321	4.2	16.6	10.4	11.0	50
0.150	1.422	3.0	10.3	6.2	8.4	100
0.101	0.921	3.0	4.3	5.1	1.6	150
0.071	0.814	2.0	2.0	4.0	1.3	200
0.050	0.322	1.0	1.0	2.2	1.5	250
*	*	*	*	*	*	300

كل قيمة تمثل معدل 10 مكررات *عدم انبات البذور



300 250 200 150 100 50 0

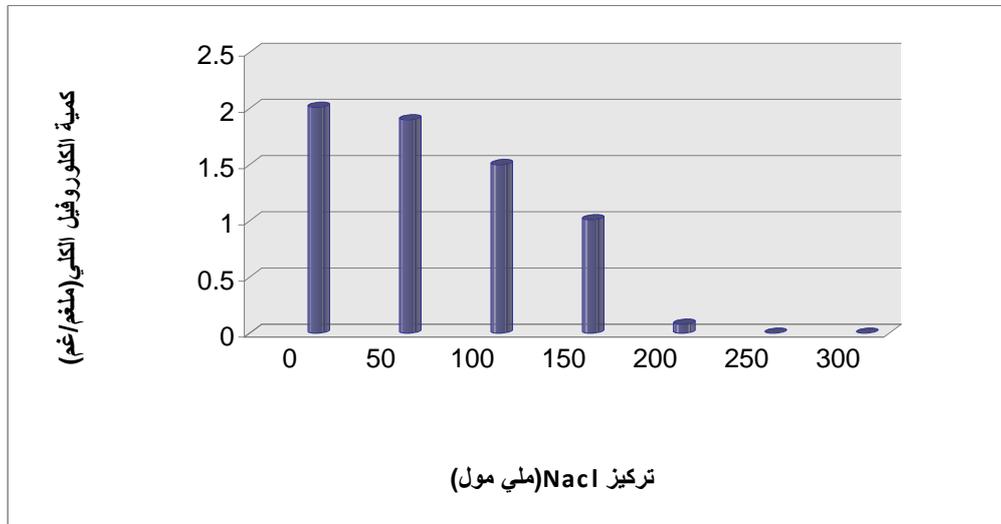
تراكيز ملح كلوريد الصوديوم (ملي مول)

الشكل 3: تأثير اضافة تراكيز متباينة من ملح كلوريد الصوديوم الى الاوساط الزرعية Arnon في الصفات المظهرية لبادرات البازلاء *P.sativum* بعد 20 يوما من نموها.

كمية الكلوروفيل الكلية في الاوراق

تشير النتائج الموضحة في الشكل (4) الى استمرار انخفاض الكلوروفيل في الاوراق مع زيادة تركيز الملح في الوسط، اذ سجلت اعلى قيمة لكمية الكلوروفيل في معاملة المقارنة والتي بلغت 2.1 ملغم/غم اما اقل قيمة سجلت كانت عند التراكيز الملحية

العالية 150 و 200 ملي مول والتي انخفضت الى 1.01 و 0.08 ملغم/ غم على التوالي، وبسبب الاختزال الكبير في الاوراق الذي سببه التركيز 250 ملي مول الشكل (3) لم تسجل اي نتيجة لكمية لكلوروفيل في تلك الاوراق.



الشكل 4: معدل كمية الكلوروفيل المستخلصة من أوراق بادرات البازلاء *P. sativum* النامية على وسط *Arnon* الغذائي المزود بتركيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم بعد فترة نمو 20 يوماً.

تأثير الملوحة على استحداث ونمو الكالس

أظهرت محاولات تنمية قطع سيقان بادرات البازلاء فشلها في استحداث وتكوين الكالس حتى في التركيزات الواطئة من الملح مع تحول لونها الى البني ومن ثم موتها بعد اسبوع من نقلها الى الاوساط الزرعية الحاوية على التركيزات المختلفة من NaCl استنادا الى معاملة المقارنة الشكل (5)، وابتدت قطع الكالس المنقولة الى الاوساط الزرعية المزودة بمنظمات النمو وبملح كلوريد الصوديوم بتركيز مختلفة اكثر تحملا من قطع السيقان وان التركيزات العالية 250 و 300 ملي مول للملح سببت نمواً بطيئاً لقطع الكالس مع اصفرارها وموتها بعد 21 يوماً من الزراعة الشكل (6). واسفر عن التأثيرات السابقة للملوحة انخفاض واضح في معدل الاوزان الطرية والجافة لعينات الكالس بعد 21 يوماً من زراعتها استنادا الى معاملة المقارنة (الجدول 4).

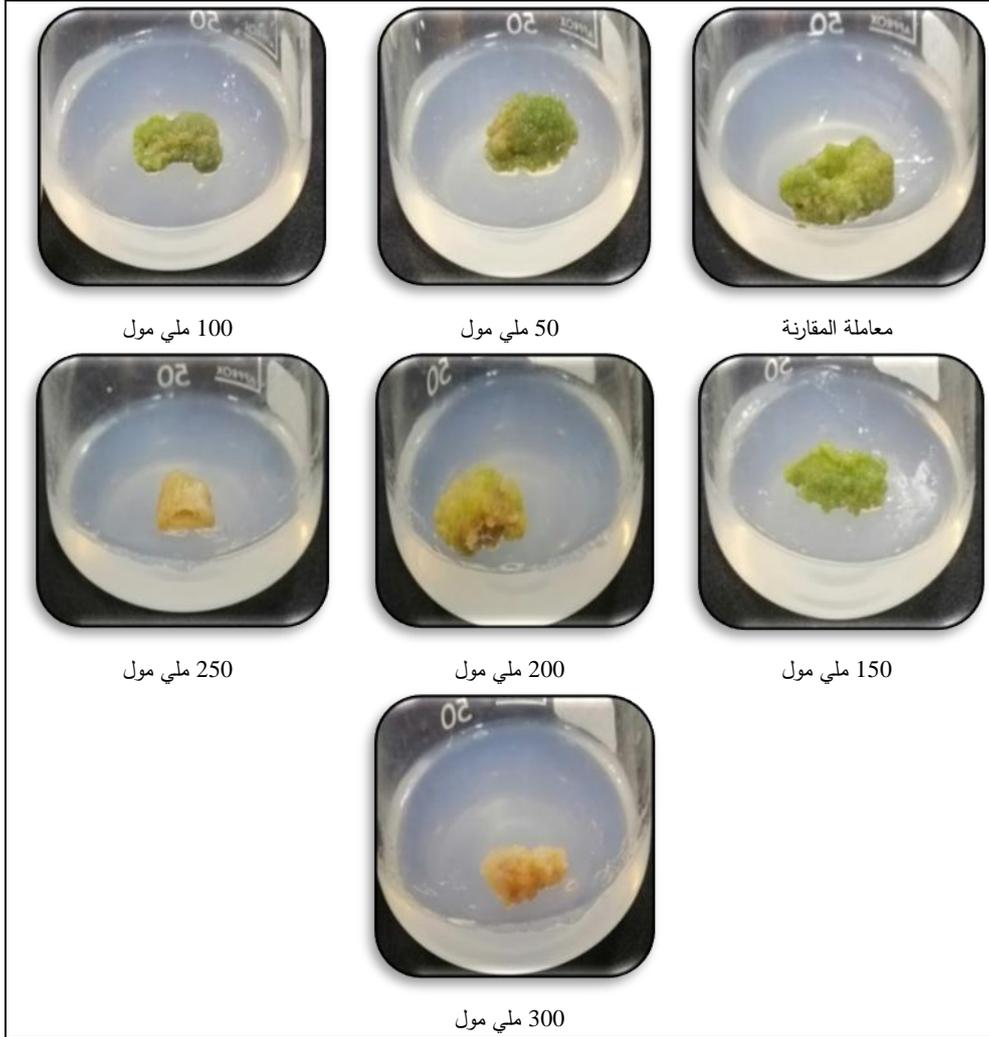


ملح كلوريد الصوديوم (50 ملي مول)



معاملة المقارنة

الشكل 5: الدور السلبي لملح كلوريد الصوديوم في الوسط في استحداث الكالس من قطع سيقان بادرات البازلاء *P. sativum* على وسط MS المدعم بـ BA و NAA بتركيز 1 ملغم/ لتر بعد 21 يوماً من النمو.



الشكل 6: مزارع كالس المشتقة من سيقان البازلاء *P. sativum* بعد 21 يوما من النمو على اوساط MS الغذائية المجهزة بـ BA و NAA بتركيز 1 ملغم/ لتر وتراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم.

نسبة تضرر الاغشية الخلوية لنسيج الكالس

افرزت النتائج التأثيرات السلبية لملاح كلوريد الصوديوم في تلف الاغشية الخلوية لنسيج الكالس، حيث ادى التركيز 300 ملي مول اعلى نسبة تضرر للأغشية بلغت 92% مقارنة بمعاملة المقارنة التي اعطت اقل نسبة 45% (الجدول 4).

حيوية الكالس

تعبّر البيانات المثبتة في (الجدول 4) عن نمط التغيرات الحاصلة في حيوية الكالس بتاثير الملوحة، حيث انخفضت حيويته من 100% لعينات الكالس النامية على الاوساط الخالية من الملح (معاملة المقارنة) الى 9% لتلك العينات النامية على الاوساط المجهزة بـ 300 ملي مول من الملح.

الجدول 4: انعكاس تأثير تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم في مؤشرات نمو كالس البازلاء *P.sativum* لفترة 21 يوما على الاوساط الغذائية المجهزة بـ BA و NAA بتركيز 1ملغم / لتر

حيوية الكالس (%)	تضرر الاغشية (%)	معدل الوزن الجاف (غم)	معدل الوزن الطري (غم)	تركيز كلوريد الصوديوم (ملي مول)
100	45	0.137	1.380	معاملة المقارنة
73	60	0.094	0.964	50
51	72	0.091	0.955	100
35	78	0.082	0.783	150
18	85	0.073	0.562	200
15	88	0.060	0.450	250
9	95	0.052	0.42	300

كل قيمة تمثل معدل خمس مكررات.

كمية البروتينات الكلية الذائبة

تناسبت كمية البروتينات الكلية الذائبة المستخلصة من عينات الاوراق والكالس المعرضة للاجهاد الملحي عكسيا مع تراكيز الملح المضافة الى الاوساط الغذائية، حيث ادى تركيز 250 ملي مول من ملح كلوريد الصوديوم ادى معدل لكمية البروتينات الذائبة في خلايا انسجة الاوراق اذ بلغ 0.254 ملغم / غم قياسا بمعاملة المقارنة التي سجلت 1.023 ملغم/ غم، وان زيادة تركيز الملح اعلى من 200 ملي مول في الوسط سبب اختزال حجم الاوراق بحيث تعذر استخلاص و تقدير البروتينات فيها، وسجلت انسجة الكالس ايضا انخفاضاً في كمية البروتينات بزيادة تركيز الملح، حيث بلغت 0.05 ملغم/ غم عند التركيز 300 ملي مول (الجدول 5).

كمية الكربوهيدرات الذائبة الكلية

انعكس تأثير ملح كلوريد الصوديوم في كمية الكربوهيدرات الذائبة المتراكمة في الاوراق، حيث سجلت اعلى كمية لها في اوراق النباتات النامية على الاوساط الغذائية الحاوية على 200ملي مول من الملح، ايضا ادى رفع تركيز ملح كلوريد الصوديوم المضاف في وسط MS الغذائي الى 200 ملي مول الى حصول زيادة واضحة في تراكم السكريات الذائبة في عينات الكالس المنماة على ذلك الوسط استنادا الى معاملة المقارنة (الجدول 5).

كمية البرولين

أظهرت النتائج ان محتوى خلايا الاوراق والكالس من البرولين ازداد بزيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم، اذ بلغت 75.5 مايكروغرام/100 ملغم وزن طري للاوراق عند التركيز الملحي 200 ملي مول و 89.8 مايكروغرام/100 ملغم وزن طري للكالس عند نفس التركيز مع انخفاض تلك القيم في معاملة المقارنة الى 11.5 مايكروغرام/100 ملغم و 14.6 مايكروغرام / 100ملغم وزن طري على التوالي (الجدول 5). يوضح الجدول ايضا بان محتوى خلايا الكالس من البروتينات الذائبة اقل مما سجل في الاوراق بينما كانت كمية الكربوهيدرات الذائبة والبرولين في الكالس اعلى مما سجل في الاوراق.

الجدول 5: محتوى باورق وكالس بادرات البازلاء *P. sativum* من الكربوهيدرات والبروتينات الذائبة والبرولين في الاوساط المضاف اليها تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم

كمية البرولين (مايكروغرام/100ملغم وزن طري)		كمية السكريات الكلية الذائبة (مايكروغرام/غم وزن طري)		كمية البروتين الكلي (ملغم/غم وزن طري)		تركيز كلوريد الصوديوم (ملي مول)
الكالس	الاوراق	الكالس	الاوراق	الكالس**	الاوراق*	
14.6	11.5	0.411	0.323	1.820	1.023	معاملة المقارنة
30.3	27.6	0.484	0.365	0.840	0.922	50
48.8	43.9	0.633	0.586	0.761	0.811	100
70.5	56.7	0.800	0.765	0.4 63	0.534	150
89.8	75.5	0.899	0.834	0 202	0.254	200
10.4	4.7	0.437	0.431	0.092	0.099	250
8.1	***	0.214	***	0.05	***	300

كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات *اوراق البادرات بعمر 20 يوما نامية على وسط Arnon الغذائي
كالس بعمر 21 يوما نامي على وسط MS الغذائي المجهز بـ 1 ملغم/ لتر من BA و NAA * عدم انبات البذور

المناقشة

عموما أظهرت نتائج هذه الدراسة التأثيرات الواضحة للإجهاد الملحي في الصفات المورفولوجية والفسلجية لبادرات البازلاء خلال مراحل نموه المختلفة. ان انخفاض نسبة انبات البذور مع اطالة الفترة اللازمة لاكمال انباتها في الوسط الزراعي قد يعزى الى حصول حالة عدم التوازن في الجهد المائي داخل البذرة وخارجها مما يؤدي الى قلة في معدلات تشرب البذور للماء، وبالتالي سوف يؤثر على الفعاليات الحيوية للجنين والبذرة، الامر الذي يؤدي الى ابطاء الفعاليات الايضية في الاجنة وعرقلة انباته (Othman *et al.*, 2006) وهذا بدوره ينعكس سلبا على سرعة الانبات، اكدت بعض المصادر (سلاف وخديجة، 2014) ان انخفاض نسب انبات بذور بعض اصناف العائلة النجيلية والعائلة البقولية حدثت بزيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم. كما تثبط الملوحة نشاط الانزيمات المشاركة في تحويل النشا الى السكريات الذائبة في البذور والضرورية لنمو وتطور الجنين ومنها انزيم الالفـ اميليز (Almansouri, 2001). وتتفق نتيجة الانخفاض في فعالية انزيم الالفـ اميليز خلال مراحل انبات بذور نبات البازلاء مع ما وجد من قبل (Liu *et al.*, 2018) ان معاملة بذور الرز بمحلول كلوريد الصوديوم سبب تثبيطاً لفعالية الانزيم خلال مراحل الانبات استنادا الى معاملة المقارنة معللا ذلك بان الملوحة تسبب انخفاضاً في الفعالية البايولوجية للجبرلين الذي له دور في تحفيز جين بناء انزيم الالفـ اميليز في البذور. واكد ذلك ايضا من قبل (Shu *et al.*, 2016) بان الملوحة تقلل من فعالية الجبرلين بينما تزيد من فعالية حامض ABA مما يؤثر على الفعاليات الايضية في البذور. ان الانخفاض في معدلات تشرب البذور للماء و حدوث السمية الايونية التي تعرقل نمو الجنين ينعكس سلبا على نمو المحاور الجنينية وتطورها (خلف وصالح، 2015)، يستمر تاثير ايونات الصوديوم في نمو نبات البازلاء مسببا اختزالا في ارتفاع النبات وطول الجذر وتفرعاتها وانخفاضاً في معدل اوزانه الطرية والجافة. وهذه المؤشرات اشارت اليها احدى الدراسات (هاجر، 2014) بان تراكيز 50 و 150 ملي مول من NaCl سببت تناقصاً في طول كل من الساق والجذر في نبات البازلاء وقد يعود هذا الى التثبيط في عملية انقسام و استطالة الخلايا النباتية (Saffan, 2008). اشارت احدى البحوث (Miljus- Djukic *et al.*, 2013) بان محتوى الكلورفيل في افرع نباتات البازلاء الناتجة من الزراعة النسيجية قد انخفض بزيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم الى 200 ملي مول، ربما يعود ذلك الى تلف اغشية البلاستيدات الخضراء (Ashraf and Bahatti, 2000) وانخفاض في تخليقه تحت الاجهاد المائي بسبب تثبيط نشاط الانزيمات المشاركة في بنائه وقلة امتصاص ايونات المغنسيوم الداخلة في تركيب الكلوروفيل وايونات الحديد المساعدة في تكوين الكلوروفيل (Khan and Frakland, 1983). ويسبب الاجهاد الملحي ايضا تباطؤاً في تخليق البروتينات وزيادة هدمها وتحرير الاحماض الامينية منها بزيادة فعالية انزيم البروتيز protease او زيادة في تكوين ABA (أبو جادالله، 2010). تتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسات اخرى اجريت على كالس نبات الخيار

(Abu-Romman and Suwwan, 2009). اشارت معظم الدراسات ان زيادة الملوحة في وسط النمو تؤدي الى زيادة في محتوى النبات من السكريات غير المختزلة والذائبة، مع خفض محتواه من السكريات المختزلة، اذ ان الاجهاد يسبب تحلل النشا الى سكريات ذائبة احادية او ثنائية، حيث تعمل هذه السكريات مع البرولين على معادلة الضغط الازموزي للخلايا مع الضغط الخارجي الناتج عن الاجهاد لتساهم في زيادة مقاومتها للجفاف وبالتالي الاستمرار في اداء وظائفها الحيوية (Xu and Huang, 2010). يسبب الاجهاد تراكم البرولين في النبات من خلال زيادة نشاط جينات تخليقه من جديد وانخفاض نشاط انزيم البرولين ديهاردوجينيز Proline dehydrogenase الذي يحطم البرولين (ابو جادالله، 2010). يعمل تراكم البرولين على زيادة الجهد الازموزي داخل سيتوبلازم الخلايا النباتية مسببا استمرار دخول الماء من خارج الخلية الى داخلها واستمرار الفعاليات الايضية في الخلايا، وهذا يفسر زيادة تراكم البرولين في خلايا اوراق وكالس نبات البازلاء في وجود ملح الصوديوم في اوساط النمو. و يتفق هذا مع ما ذكره بعض الباحثين (هاجر، 2014) بان ارتفاع ملوحة وسط النمو يؤدي الى ارتفاع تركيز البرولين في اوراق نبات البازلاء عند تركيز 100 ملي مولار و 150 ملي مولار من ملح الصوديوم. وفي كالس نبات الخيار عند التركيز 100ملي مول (Abu-Romman and Suwwan, 2009). يلاحظ ايضا من نتائج هذه الدراسة الحالية بان هناك تأثيراً واضحاً لا يونات الصوديوم على معدلات الاوزان الطرية والجافة لنباتات البازلاء من خلال الانخفاض الكبير فيها بزيادة تركيز تلك الايونات. ان تراكم وتجمع ايونات الصوديوم في خلايا انسجة النبات يؤدي الى اضطرابات في الفعاليات الحيوية المتعددة في النبات خاصة البناء الضوئي (John et al., 1985). ان الانخفاض في معدل الاوزان الطرية والجافة لعينات كالس سيقان نبات البازلاء النامية على الاوساط الغذائية الحاوية على كلوريد الصوديوم يوازي الانخفاض الذي سببه الملح في معدل تلك الاوزان لكالس اوراق البازلاء (العبيدي، 2014)، وذكر اخرون (Muszynsk and Gadyszewsk, 2008) ان التأثيرات السمية لا يونات الملح تؤثر سلباً في عمليات انقسام ونمو خلايا الكالس وهذا بدوره ينعكس على معدل الاوزان الطرية والجافة للكالس. ان ايونات الصوديوم تسبب تلف الاغشية الخلوية لانها تستحث في النبات حالة من الاجهاد التاكسدي محررةً عدداً من الجذور الاوكسجينية عالية السمية التي تتفاعل مع مكونات جدار الخلية مسببه اكسدة الليبيدات وتحطيماً بروتينياً مما يؤدي الى حدوث تسريب في محتويات الخلية وجفاف سريع وبالتالي موت الخلية (Candan and Tarhan, 2003). ان جميع الاضطرابات السابقة التي حصلت في انسجة كالس نبات البازلاء بتأثير ملح كلوريد الصوديوم بدورها انعكست على حيوية ونمو الكالس، حيث انخفضت تلك الحيوية بزيادة تركيز الملح الى 100 ملي مول في الوسط الغذائي الى النصف تقريباً. في حين انخفضت حيوية كالس نبات الخيار الى 33.1% عند التركيز ذاته (Abu-Romman and Suwwan, 2009)، هذا يدل على اختلاف حساسية الكالس لملاح كلوريد الصوديوم باختلاف النبات.

ويمكن الاستنتاج من هذه الدراسة بان كالس نبات البازلاء كان اكثر تحملاً ومقاومة للملوحة من النباتات التي استحدث منها، ويلاحظ ذلك مما اسفرت عنه بيانات فشل استحداث الكالس من قطع السيقان عند زراعتها في اوساط استحداث الكالس الحاوي على تراكيز متعددة من الملح، وهذا يماثل مع ما ورد ذكره من قبل (Smith et al., 1992) ان استجابات نبات الفاصوليا لتأثير ملح كلوريد الصوديوم تختلف عن استجابات كالس، ربما يعود السبب الى كون بعض العمليات التي تحدث في الكالس غير متطابقة مع تلك في النبات الكامل (عبود والدليمي، 2006).

المصادر العربية

أبو جادالله، جابر مختار (2010). فسيولوجيا وبيولوجيا النبات الجزيئية أثناء الإجهاد المائي، الدار العربية للنشر والتوزيع. كلية العلوم جامعة دمياط، مصر.

حسن، احمد عبد المنعم (2002). انتاج الخضر البقولية، الطبعة الاولى. الدار العربية للنشر والتوزيع. جمهورية مصر العربية.
خلف، سرى جمال وصالح، شاكور مهدي (2015). دراسة تأثير الإجهاد الملحي والحراري في نباتات ثلاثية ورباعية الكرون. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية. 15(1)، 69-78.

- داؤد، وسام مالك (2011). التأثير التثبيطي لمستخلص (ابو دميم *Phalaris minor Retz*) في انبات ونمو نباتات الحنطة *Triticum aestivum L.* مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية. **11**(3)، 51-58 .
- سلاف، بوشامة وخديجة بوقزوح (2014). أثر الإجهاد الملحي على أصناف من العائلة البقولية والعائلة النجيلية المعاملة نقعا بالكابنتين أثناء مرحلة الانبات. رسالة ماجستير. جامعة قسنطينة1/الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية.
- عبود، ساجدة عزيز والدليمي، حكمت مصطفى (2006). وجود أنزيم الدااي هيدروفوليت رديكتيز في بادرات وكالس نبات الحبة السوداء (*Nigella sativa L.*) . مجلة علوم الرافدين. **17**(A1)، 26-38.
- العبيدي، هاشم كاظم محمد (2014). استحداث خلايا متحملة للملوحة من نبات البزاليا *Pisum sativum L.* باستخدام تقنية زراعة الانسجة، مجلة علوم المستنصرية. **25**(11)، 9-8.
- مهدي، انتصار حسين والحمزوي، مجيد كاظم عباس (2011). تأثير مستويات الملوحة وفترات الري في مكونات الحاصل والصفات الكيماوية لبذور صنفين من البزاليا *Pisum sativum L.* مجلة القادسية للعلوم الزراعية. **2** (1)، 12-1.
- هاجر، سعيد (2014). أثر التداخل بين Na^+/K^+ على تطور و نمو العقد الجذرية لنبات البازلاء (*pisium sativum L.*) صنف (merveille de kelvedon) النامي تحت ظروف ملحية أثناء مرحلة نمو الشتلة. رسالة ماجستير، جامعة قسنطينة/ الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية.
- ولي، صدر الدين بهاء الدين (1990). اإنبات و سبات البذور. أربيل: جامعة صلاح الدين.

المصادر الأجنبية

- Abu-Romman, S.M.; Suwwan, M.A. (2009). Salt stress- induced responses in cucumber callus. *Dirasat, Agric. Sci.*, **36**(2), 100-108.
- Almansouri, M.; Kinet, J.M.; Lutts, S. (2001). Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and Soil*, **23**, 243-254.
- Arnon, D.L.; Hoagland, D.R. (1944). The investigation of plant nutrition by artificial culture methods. *Biol. Rev.*, **19**, 55-67.
- Ashraf, M.Y.; Bahatti, A.S.(2000). Effect of salinity on growth and chlorophyll content of rice. *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, **43**(2),130-131.
- Bates, L.S; Waldren, R.P.; Teare, J.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, **93**, 205-207.
- Bernfeld, P. (1955)."Methods in Enzymol"., **1**, 149-158.
- Białecka, B.; Kępczyński, J. (2010). Germination, α -, β -Amylase and total dehydrogenase activities of *Amaranthus caudatus* seeds under water stress in the presence of ethephon or gibberellin A3. *Acta Biol. Cracov.*, **52**(1), 7-12
- Candan, N.; Tarhan, L. (2003). The correlation between antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in *Mentha pulegium* organs grown in Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} stress conditions. *Plant Sci.*, **163**, 769-779.
- Herbert, D.; Phipps, P.J.; Strange, R.E. (1971). Chemical analysis of microbial cells. *Methods in Microbiology*, **5**, 209-344.
- John,W.; Downton, S.; James, W.; Grant, R.; Robenson, S.P. (1985). Photosynthetic and stomatal responses of spinach leaves to salt stress. *Plant Physiol.*,**77**,85-88.
- Khan, D.H.; Frakland, B. (1983). Effects of cadmium and lead on radish plants with particular reference to movement of metals through soil profile and plant. *Plant and Soil.*,**70**,335-345.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic bio-membranes. *Methods in Enzymology*, **148**, 350- 382.

- Liu,L.; Xia,W.; Li,H.; Zeng,H.; Wei, B.; Han,S.; Yin,C.(2018). Salinity inhibits rice seed germination by reducing α -Amylase activity via decreased bioactive gibberellin content. *Front Plant Sci.*,**9**,275.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.(1951). Protein measurement with the folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Luttsm,S.; Kinet, J.M.; Bouharmont, J. (1995). Change in plant response to Nacl during development of rice *Oryza sativa* L. Varieties differing in salinity resistance *.J.Exp.Bot.*, **46**,1843-1852.
- Miljus - Djukic, J.; Stanisavljevic, N.; Radovic, S.; Jovanovic, Z.; Mikic, A.; Maksimovic, V. (2013). Differential response of three contrasting pea (*Pisum arvense*, *P. sativum* and *P. fulvum*) species to salt stress: assessment of variation in antioxidation defence and miRNA expression. *AJCS*, **7**(13), 2145-2153.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-477.
- Muszynski, S.; Gadyszewska, B. (2008). Representation of He-Ne laser irradiation effect on radish seeds with selected germination inducers. *Akademicka*, **13**,320-350.
- Othman, Y.; Al-Karaki, G.; Al- Tawaha, A.R.; Al-Horani, A. (2006).Variation germination and ion uptake in genotype barley under salinity conditions. *World J. Agric. Sci.*, **2**, 11-15.
- Rai, M.K.; Kalia, R.K.; Singh,R.; Gangola, M.P.; Dhawan, A.K. (2011). Developing stress plants through in vitro selection – An overview of the recent progress. *Environ. Exp. Bot.*, **71**,89-98.
- Saffan, S.E. (2008). Effect of salinity and osmotic stresses on some economic. *Plants J. Sci.*, **4** (2), 159 – 166.
- Shu, K.; Liu, X. D.; Xie, Q.; He, Z. H. (2016). Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Mol. Plant*, **9**, 34–45.
- Smith, M.A. L.; Spomer, R.A.; Shibli, R.A.; Knight, S.L. (1992). Growth research. *J. Plant Nut.*,**15**,2329-2341.
- Summerfield, R.J.; Roberts, E.H. (1985). Grain Legume Crops. Collins profession and technical book, Mackays of Chatham. *Kent*, 859.
- Towill, L.E.; Mazur, P. (1975). Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. *Can.J.Bot.*,**35**,1097-1102.
- Whiting, D.; Wilson, C. (2003). Colorado Master Gardener. Academic Press Colorado State University. USA.
- Xu, C.; Huang, B. (2010). Differential proteomic responses to water stress induced by PEG in two creeping bent grass cultivars differing in stress tolerance. *J. Plant Physiol.*, **167**, 1477-1485.

The Effect of Salt Stress Conditions in Seed Germination Indicators, Seedlings Growth and Callus Initiation of *Pisum sativum* L. in Culture Media

Eman T. Yaseen

Sajida A. Abood

Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul

ABSTRACT

The research included a study of the effect of sodium chloride salt with concentrations 0,50,100,150,200,250 and 300 mM in growth and development of seedlings and calli of *Pisum sativum* L. seedlings. The results showed that increasing salt concentration in culture medium led to decrease the percentage of seeds germination and increasing the duration of germination which

causing slow germination speed and decreasing in the lengths rate of each of the radical and coleoptile and their fresh and dry weights. Moreover the activity of α -amylase was decreased during different germination stages at 200 mM of NaCl according to the control. Salinity also caused a decrease in the rate of plant growth (plant height, root length, stem and root branches and fresh and dry weights of plant). The enhancement of NaCl in a medium was accompanied with a gradual decrease in total chlorophyll of leaves at different concentrations of salt. The results also indicated a negative effect of salinity in fresh and dry weights of callus, membrane damage and viability of callus which developed on MS medium supplement with 1 mg/l of BA and NAA. The present study demonstrated the effects of NaCl in increasing the amount of total soluble carbohydrates, level of proline in seedling leaf tissues at the age of 20 days and callus is 21 days old while a clear decrease in the total amount of protein in those tissues occur.

Keywords: *Pisum sativum*, Sodium chloride salt, callus culture, α -amylase.