انتخاب نباتات بازلاء *Pisum sativum* L. متمايزة من مزارع كالس الاوراق والسيقان مقاومة لفطر *Fusarium solani*

بادية عبد الرزاق جمال
قسم علوم الحياة/كلية العلوم
جامعة الموصل

عدنان محمود عبد الله
قسم علوم الحياة/كلية التربية
جامعة الموصل

الاستلام 03/05/2006
القبول 05/12/2006

Abstract

Callus was stimulated from leaves and stems explants of Pea seedlings on MS media supplemented with growth regulators. Medium containing 1.5 mg/L BA and 2.0 mg/L NAA was the most favorable for callus induction from leaves. Whereas MS medium containing 2.0 mg/L BA and 4.0 mg/L IAA was the best for stem callus. Selection of resistant callus to the virulent strains of *Fusarium solani* was examined from culture medium that contain the concentration 2.5, 5.0 7.5, 10.0, 12.5. 15.5. 17.5 and 20.0 % of filtrates. The concentration which allowed selection were 10.0 and 12.5 %. Regeneration of pea plants from callus of leaves and stems were resisted the toxic effects of filtrate. In spite of reduction of the regeneration ability of the resistant callus up to 45 and 26% derived from leave and steam respectively compared with control. The chromosome number assay showed no difference between resistant and control plants, Pea plant regenerated from tolerate callus exhibited clear resistance when inoculated with virulent fungi.

الخلاصة

استحدث الكالس من اوراق نبات البازلاء وسيقانه على اوساط MS الحاوية على تراكيز متباينة من منظمات النمو، وابدت الاوراق قابلية افضل من السيقان في استحداث الكالس وكان الوسط MS المحتوي على 1.5 ملغم/لتر BA و 2.0 ملغم/ لتر NAA افضل وسط لاستحداث كالس الاوراق في حين كان الوسط MS الحاوي على 2.0 ملغم/ لتر BA و 4.0 ملغم / لتر IAA ملائماً لاستحداث كالس السيقان. امكن انتخاب قطع كالس مقاومة لرواشح الفطر *F. solani* عند التراكيز 10.0 و 12.5 % من مزارع تنمية الكالس المضاف اليها الرواشح بتراكيز 2.5، 5.0، 7.5، 10.0، 12.5 ، 15.0، 17.5، 20.0 % راشحاً فطرياً. ادى تمايز الكالس المنتخب المقاوم لرواشح الفطر السامة الى الحصول على نباتات

بازلاء مقاومة لرواشح الفطر. وعلى الرغم من انخفاض قابلية الكالس المقاوم على التمايز وتكوين الافرع الخضرية الى 45 و 26 % لكالس الاوراق والسيقان على التوالي قياساً بمعاملة المقارنة لوحظ حدوث تغيرات مظهرية على مجموعة نباتات البازلاء المقاومة متمثلة بانخفاض عدد الافرع والازهار المتفتحة والقرنات، وعلى الرغم من عدم وجود اختلافات في اعداد الكروموسومات في النباتات المقاومة ونباتات المقارنة، الا ان النباتات المتمايزة من الكالس المقاوم للراشح أبدت مقاومة عند تلقيحها بالفطر الممرض.

المقدمة

وظفت تقانة زراعة الانسجة في انتاج نباتات خالية من المسببات المرضية او مقاومة لامراض النبات(1) فقد انتجت نباتات تبغ مقاومة لمرض اللفحة النارية المتسبب عن بكتريا *Pseudomonas tabaci* بمزج السم البكتيري مع الوسط الغذائي المستخدم (2) وانتجت نباتات الحنطة المقاومة للسم deoxynivalendol المنتج من الفطر *Fsuarium graminearum* بإضافة تراكيز من السم الى الوسط الغذائي (3) واشارت دراسة اخرى الى انتاج نباتات الجت المقاومة لمرض الذبول المتسبب عن الفطر *F. oxysporum* بإضافة رواشح الفطر الخام الى الوسط الغذائي ايضاً (4).

استخدمت مزارع الكالس والمعلق الخلوي في الحصول على النباتات المقاومة فقد تمكنت احدى الدراسات من انتاج نباتات لهانة مقاومة للعديد من الامراض من خلال تعريض الكالس او المعلق الخلوي لرواشح الفطريات (5). واشارت دراسة أخرى الى انتاج نباتات فول الصويا مقاومة لمرض موت البادرات بمعاملة كالس النبات برواشح الفطر *F. solani* (6) وبالطريقة ذاتها انتجت نباتات البازلاء المقاومة لمرض الذبول المتسبب عن الفطر *F. oxysporum* (7) واخرى مقاومة لفطر *F. solani* (8) ونباتات قرنفل مقاومة لنفس الفطر بإضافة تراكيز من رواشح الفطر السامة الى وسط نمو الكالس (9). تشير العديد من المصادر الى انتاج مجموعة من النباتات المقاومة للفطر *F. solani* مع ملاحظة قلة الدراسات في الحصول على نباتات بازلاء مقاومة لمرض التعفن المتسبب عن هذا الفطر، وعلى الرغم من استخدام طريقة التربية بهدف استنباط اصناف نباتية مقاومة الا انها كما معروف تمتاز بصعوبتها واستغراقها فترة زمنية طويلة. تهدف الدراسة الى الحصول على نباتات بازلاء مقاومة لفطر *F. solani* باستخدام احدى تقنيات الزراعة النسيجية.

مواد العمل وطرائقه

استخلاص الرواشح الخام من مزارع الفطر

عزل فطر *F. solani* من نباتات بازلاء مصابة بمرض التعفن، نقي باتباع تقانة السبور المنفرد Single spore technique (10) وشخص مختبرياً بالاعتماد على الاسس المتبعة في التصنيف (11).

اتبعت الطريقة القياسية لاستخلاص الرواشح الفطرية السامة (12). نمي الفطر على وسط الغذائي زابكس – دوكس (13) وزع الوسط في دوارق زجاجية حجم 250 مل (50 مل / دورق) ولقح محتوى كل دورق بقرصين من المزرعة الفطرية النامية على وسط Potato – Sucrose-Agar (PSA) قطر 0.5 سم بعمر 7 أيام. حضنت الدوارق عند درجة حرارة 27 ± 2° م لمدة 15 يوماً. رشحت محتويات الدوارق من خلال الشاش ثم اجرى النبذ المركزي لها عند 4° م وبسرعة 12000 g ولمدة 20 دقيقة للتخلص من سبورات الفطر والغزل الفطري. ورشحت المفرزات مرة اخرى باستخدام Millipore filter (0.2 µm),ثم حفظت الرواشح في قناني زجاجية عند –10° م لحين الاستخدام.

استحداث مزارع كالس السيقان والاوراق وادامتها

زرعت قطع السيقان والاوراق المستأصلة من البادرات السليمة بعمر 15 يوماً والنامية في الوسط MS(14) الصلب الخالي من منظمات النمو في دوارق زجاجية سعة 100 مل احتوت على وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من الاوكسينات (NAA) Naphthalene acetic acid)، Indole acetic acid (IAA) ومتداخلة مع السايتوكينينات kinetine (kin)، Benzyladenine (BA) حضنت العينات عند درجة 25 ± 2 م وشدة إضاءة 1500 لوكس ونظام تعاقبي 16 ساعة ضوء/ 8 ساعات ظلام. اديم كالس السيقان على افضل وسط لاستحداثه ونموه والمكون من وسط MS+ 2.0 ملغم /لتر BA+4.0 ملغم / لتر IAA (14) في حين اديم كالس الاوراق ايضاً على وسط MS + 1.5 ملغم / لتر BA + 2.0 ملغم / لتر NAA (15). قطع الكالس الى اجزاء بوزن 1 غم تقريباً وزرعت على الوسط الجديد بواقع قطعة / دورق / 30 مل من الوسط. واعيدت الزراعة كل 35-40 يوماً.

معاملة كالس السيقان والاوراق برواشح فطر الفيوزاريوم

اتبعت الطريقة المباشرة والسريعة في انتخاب الكالس المقاوم (9). أضيفت الرواشح المعقمة بالترشيح بتراكيز 2.5، 5.0، 7.5، 10.0، 12.5، 15.0، 17.5، 20.0 % (حجم/حجم) الى اوساط استحداث وادامة كالس السيقان والاوراق بعد تعقيمه وتبريده الى

درجة 50°م تقريبا، وزع الوسط الحاوي على الراشح في اطباق بتري زجاجية قطـر 9 سـم بمعدل 25 مل / طبق. وضعت 10 قطع من الكالس بعمر 40 يوماً بوزن 1 غم/قطعة علـى الوسط. حُضنت العينات بظروف التعاقب الضوئي نفسها ولمدة 20 يوم. اعيدت زراعة قطـع الكالس الحية في الاوساط نفسها والحاوية على تراكيز 10 % راشح فطـري ثـلاث مـرات متتالية على الوسط ذاته وبمعدل 20 يوماً لكل مرة.

نقل الكالس الحي والنامي على الوسط المعامل بالراشح المعقم الى دوارق حجم 100 مل احتوت 30 مل من الاوساط الصلبة المستخدمة لاستحداث الكالس من الـسيقان والاوراق والمضاف اليهما رواشح معقمة تركيز 10 % مل من الوسـط وبمعـدل 2 قطعـة / دورق. واعيدت زراعة الكالس كل 30-35 يوماً على الاوساط ذاتها.

اختبار مقاومة الكالس المعامل برواشح الفطر

اعتمدت طريقة المزرعة الثنائية (16) لاختبار مدى تحمل الكالس المعامل برواشـح الفطر. جهزت أطباق بتري زجاجية قطر 9 سم تحتوي على 20 مل من وسـط زابكـس - دوكس والمضاف اليه 8 غم آكار و 0.4 ملغم / لتر 2,4-D (2,4-Dichloro Phenoxy Acetic Acid) و 1.0ملغم / لتر من kin. وضع في مركز الطبق وبشكل مقلـوب قـرص قطره 0.3 سم اخذ من مزرعة حديثة لفطر *F. solani* ووضعت قطع من الكـالس المعامـل وغير المعامل حول القرص وعلى أبعاد 2.5 سم من حافة القرص الفطري. حضنت الأطباق عند 25° م وبظروف الظلام ولمدة 5 أيام.

واستخدمت المعادلة $\frac{D-R}{D}$ في احتساب درجة تثبيط النمو الفطري (16) حيث :

D= البعد بين مركز القرص الفطري وحافة قطعة الكالس المقاومة لرواشح الفطر

R= نصف قطر المستعمرة الفطرية (سم)

انتاج النباتات الكاملة من تمايز الكالس المعامل برواشح الفطر

اختير وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة مـن الاوكـسينات (IAA, NAA) متداخلة مع تراكيز من السايتوكايتينات (BA, Kin) في تشجيع الكالس المقاوم لرواشح الفطر على تكوين الافرع الخضرية. نقل كالس السيقان والاوراق بمعدل 1 غم/قطعـة وبعمـر 40 يوماً الى دوارق حجم 100 مل احتوت 30 مل من احد الاوساط المختبـرة، وحـضنت فـي ظروف التعاقب الضوئي نفسها. كما اختبر الوسط MS الصلب الخالي من منظمـات النمـو وأخر مدعم بـ 0.5 ملغم/لتر 2,4-D والوسط MS الصلب بنصف قوته التركيبية والمحتوي على 1.0 ملغم/لتر NAA (17) لتكوين الجذور من الافرع الخضرية المتمايزة مـن كـالس السيقان والاوراق حيث استاصلت الافرع الخضرية المتكونة من الكـالس المعامـل وغيـر

المعامل برواشح الفطر وازيلت عنها بقايا الوسط الغذائي ونقلت الى دوراق زجاجية تحتـوي 30 مل من احد الاوساط المختبرة. حضنت العينات في ظروف التعاقـب الـضوئي نفـسها. اخذت النباتات ذات المجموعة الجذرية المناسبة ورفعت من الوسط الغذائي بعنايـة وغـسلت جذورها بالماء جيداً للتخلص من الاكار وغرست في سنادين بلاستيكية سعة 2 كغم احتـوت على مزيج من التربة والبتموس بنسبة 1:1 حجم :حجم المعقمين بالمؤصدة. تركت الـسنادين بظروف الحاضنة والتعاقب الضوئي لمدة 7 أيام بعدها غطيت بأغطية بلاستيكية شفافة ومثقبة ووضعت في منطقة مضاءة جيداً لمدة 4 أيام ثم ازيلت الاغطية عنها وتمت العناية بالنباتات.

اختبار تحمل النباتات الناتجة من الكالس للتلفيح بالفطر *F.solani*

استخدمت النباتات الناتجة من الكالس المعامل برواشح الفطر والتي نجحت اقلمتها لهذا الاختبار اذ لقحت النباتات بمزج محتويات طبق بتري حاوٍ على مزرعة الفطر النـامي علـى وسط PSA بعمر عشرة أيام مع تربة النباتات واحداث خدوش بواسطة ابرة معقمـة اسـفل السيقان عند مستوى سطح التربة وتركت النباتات تحت المشاهدة مع سقيها وحـسب الحاجـة (18).

النتائج

أظهرت نتائج زراعة قطع الاوراق والسيقان على اوساط الاستحداث المكونـة مـن الوسط MS المدعم بتراكيز 0.5 – 4.0 ملغم/لتر من IAA و NAA ومتداخلة مع تراكيـز 1.0 – 4.0 ملغم/لتر من BA و Kin ان لقطع الاوراق درجة عالية من الاستجابة لتكـوين الكالس في معظم الاوساط المستخدمة وبلغت 93 % عند الوسط الحاوي على BA 1.5 ملغم / لتر و NAA 2.0 ملغم / لتر. في حين ابدت قطع السيقان استجابتها على نحو اقـل مـن الاوراق في استحداثها للكالس على الاوساط ذاتها بلغت 88.8% عند الوسط المدعم بـ 2.0 ملغم/لتر BA و 4.0 ملغم/ لتر IAA. اعتمدت هذه الاوساط فقط في اكثار وادامـة كـالس الاوراق والسيقان على التوالي واهملت الاوساط الاخرى اما لطول الفترة الزمنيـة اللازمـة لاستحداث الكالس عليها او تشجيعها للجذور غير المرغوب بها في عملية الاستحداث.

تكوين المجاميع الخضرية من كالس الأوراق والسيقان

بينت نتائج الاختبارات كفاءة كالس الأوراق على تكوين الافرع الخضرية في معظـم اوساط التمايز المختبرة، والمتكونة من الوسـط MS المـضاف إليهـا تراكيـز 1.0 – 4.0 ملغم/لتر سايتوكاينينات BA او Kin متداخلة مع التراكيز 0.5 – 2.0 ملغم/لتر مـن NAA او IAA. وبلغت نسبة تمايز الأفرع الخضرية المتكونة من كالس الأوراق في جميع الاوساط 74٪ وتفوق الوسط MS+2.0 ملغم/لتر BA + 1.0 ملغم / لتر NAA عن باقي الأوسـاط

في تشجيعه الكالس على التمايز وبلغت نسبة الأفرع المتكونة 160% في حين كانت قابلية كالس السيقان على التمايز ضعيفة نسبياً (الجدول 1). وكذلك شجع الوسط MS+4.0 ملغم /لتر BA+2.0 ملغم /لتر IAA تكوين الافرع الخضرية من كالس السيقان حيث بلغت نسبة الأفرع المتكونة عند استخدامه 66% وقد اعتمدت هذه الأوساط فقط في التجارب اللاحقة.

الجدول (1) تكوين المجاميع الخضرية من تمايز كالس اوراق وسيقان بادرات البازلاء *P.sativum* في اوساط التمايز المختلفة

مزارع الكالس	العدد الكلي لقطع الكالس المستخدمة	العدد الكلي للافرع الخضرية	تكوين الافرع الخضرية (%)	الفترة الزمنية (يوم)
الاوراق	147	109	74.14	22-18
السيقان	132	37	28.03	30-25

تجذير الافرع الخضرية الناتجة

اظهرت الافرع الخضرية المتكونة من كالس الاوراق والسيقان قابلية على تكوين الجذور في وسط التجذير، وكانت نسبة تجذير الافرع المتمايزة من كالس الاوراق 86.8 % في حين بلغت 70.8% في الافرع المتمايزة من كالس السيقان (الجدول 2) وبينت النتائج افضلية وسط MS الصلب بنصف قوته التركيبية والمحتوي على 1.0 ملغم / لتر NAA عن بقية الاوساط الاخرى في تشجيعها تكوين الجذور للافرع الخضرية.

الجدول (2) تجذير الافرع الخضرية الناتجة من كالس الاوراق والسيقان لبادرات البازلاء *P. sativum* في اوساط التجذير المختلفة

منشأ الافرع الخضرية	عدد الافرع الخضرية المنقولة للتجذير	عدد الافرع الخضرية المكونة للجذور	التجذير (%)
كالس الاوراق	61	53	86.8
كالس السيقان	24	17	70.8

انتخاب الكالس المتحمل لرواشح الفطر من مزارع كالس اوراق وسيقان بادرات البازلاء

تشير نتائج الجدول (3) الى انخفاض أوزان قطع كالس الاوراق المزروعة على وسط الادامة (MS + 1.5 ملغم/لتر BA + 2.0 ملغم/لتر NAA) واوزان قطع كالس السيقان

النامية على الوسط (MS + 2.0 ملغم/لتر BA + 4.0 ملغم/لتر IAA) مع زيـادة تركيـز رواشح الفطر في الوسط الغذائي. وقد ظهر التأثير بشكل واضح عند التراكيز 10.0 و 12.5 % راشح فطري حيث انخفضت قابلية الكالس على النمو والزيادة في الحجم بدلالة بقاء اوزان قطع الكالس والبالغة 30 قطعة لكل معاملة مقاربة لاوزانها الاولية قبل المعاملة فـضلاً عـن اكتساب قطع الكالس لوناً بنياً، وقد اعتمدت هذه التراكيز فقط في عملية انتخاب قطع الكـالس المتحمل لفعل الراشح، واستبعدت التراكيز المنخفضة 7.5 - 2.5 % لتأثيرها الضعيف فـي استحداث ونمو الكالس. وبالنظر لموت جميع قطع الكالس المعاملة بالتراكيز مـن 15.0-20 % راشحاً فطرياً بدلالة توقف نموها وانخفاض اوزان قطع الكالس بشكل كبير واكتسابها اللون الاسود فقد اهملت هذه التراكيز في عملية الانتخاب.

الجدول (3) انتخاب الكالس المتحمل من مزارع استحداث وادامة كالس اوراق وسـيقان البازلاء *P. sativum* الحاوية علـى رواشـح الفطـر *F.solani* المعقمـة بالترشيح (بدلالة وزن الكالس/غم) بعد 20 يوماً من التحضين.

منشأ الكالس	وزن الكالس قبل المعاملة	* معدل وزن قطع الكالس (غم)								
		تراكيز رواشح الفطر (%)								
		0.0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0
الاوراق	0.586	0.976	0.959	0.829	0.713	0.567	0.493	0.438	0.405	0.382
السيقان	0.560	1.046	0.982	0.795	0.670	0.582	0.546	0.412	0.389	0.378

*** عدد القطع الموزونة من كل معاملة 10 قطع.**

تحديد النشاط الحيوي للكالس المتحمل في تثبيط نمو الفطر *F.solnai* بطريقـة المزرعـة الثنائية

أظهرت نتائج اختبار النشاط الحيوي للكالس المتحمل عـدم مقـدرة كـالس الاوراق والسيقان غير المعامل بالراشح على تثبيط نمو الفطر. فقد تمكن الفطر من النمو باتجاه قطـع الكالس خلال 5-6 أيام من الزراعة بينما اظهرت قطع الكالس المنتخبة من الاوساط المعاملة بالرواشح الفطرية كفاءة في الحد من نمو الفطر وتوقف نموه على بعد 2-3 ملم مـن قطعـة الكالس المتحمل.

تكوين النباتات من تمايز كالس الاوراق والسيقان المتحمل لرواشح الفطر

استخدم الوسط MS + 2.0 ملغم/لتر BA +1.0 ملغم/لتر NAA في تمايز كـالس الأوراق المتحمل لرواشح الفطر (الشكل 1 A و B) والوسط MS + 4.0 ملغم/لتـر BA +

2.0 ملغم/لتر IAA لتمايز كالس السيقان المتحمل لرواشح الفطر وتكوين الافرع الخـضرية (الشكل 1 C و D). تبين نتائج الجدول (4) التأثير الواضح لرواشح الفطر في كفاءة تمـايز الكالس. اذ انخفضت اعداد الافرع الخضرية الناتجة من كالس الاوراق والـسيقان المتحمـل لرواشح الفطر الى 45 و 26% مقارنة بعينات المقارنة غير المعاملة بالراشـح 160 و61% على التوالي. وكانت المدة الزمنية اللازمة لتكوين الافرع الخضرية من الكالس المتحمـل 60 يوماً من الزراعة وهي اطول من الفترة الزمنية في حالة المقارنة (30-40) يوماً وامتـازت الافرع الخضرية المتمايزة من كالس الاوراق والسيقان على حدٍ سواء ببطء نموها.

الجدول (4) تكوين الافرع الخضرية من تمايز الكالس المتحمل لرواشح الفطر *F.solani* المشتق من اوراق وسيقان بادرات البازلاء *P.sativum* في اوساط التمايز، بعد مرور 60 يوماً

منشأ الكالس	المعاملة	العدد الكلي للقطع المستخدمة	العدد الكلي للافرع الخضرية المتكونة	تكوين الافرع الخضرية (%)
الاوراق	* مقارنة	15	24	160
	** متحمل	24	11	45
السيقان	مقارنة	13	8	61
	متحمل	19	5	26

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

تجذير الافرع الخضرية المتكونة ونقلها الى التربة

اظهرت الافرع الخضرية الناتجة من كالس الاوراق والسيقان المتحمل لرواشح الفطر قابلية جيدة على التجذير في الوسط (MS 1/2 + 1.0 ملغم/لتر NAA) وكانت نسبة التجذير في كلا الحالتين 80% (الجدول 5). نقلت الافرع الخضرية المتكونـة بطـول 8-10 سـم والحاوية على 3-5 أوراق الى وسط التجذير اعلاه (الشكل 1، E) وتكونت الجذور بعد 7 الى 10 ايام من معظم الافرع الخضرية (الشكل 1-F)، وتمكنت معظم النباتات المتكونة مـن التأقلم لظروف البيئة عند نقلها الى التربة.

الجدول (5) تجذير الافرع الخضرية الناتجة من تمايز كـالس اوراق وسـيقان البـازلاء *P.sativum* المتحمل لرواشح الفطر *F.solani*

مصدر الافرع الخضرية	معاملة الكالس	عدد الافرع المنقولة / المجذرة	التجذير (%)	مجموع النباتات المنقولة الى التربة
كالس الاوراق	مقارنة	5/6	83	4
	متحمل	8/10	80	6
كالس السيقان	مقارنة	3/5	60	3
	متحمل	4/5	80	3

اختيار القدرة الامراضية للكشف عن مقاومة النباتات الناتجة من الكالس المتحمل الاصـابة بفطر الفيوزاريوم

بينت نتائج الاختبار ان النباتات المتمايزة من الكالس المقاوم لرواشح الفطـر كانـت مقاومة للاصابة بفطر الفيوزاريوم. اذ زرعت ثمانية نباتات ناتجـة مـن الكـالس المتحمـل لرواشح الفطر في تربة ملقحة بمزرعة فطرية حديثة. حيث تمكنت ستة نباتات منها مقاومـة الفطر وبقاءها سليمة وكانت النباتات المقاومة بطيئة في نموها مقارنة بالنباتات الناتجـة مـن الكالس غير المعامل بالراشح وتلك الناتجة من البذور.

مقارنة بين النباتات المقاومة (المتحملة) لفطر *F.solani* والناتجة من الكالس والناشـئة من البذور

توضح نتائج الجدول (6) وجود العديد من الفروقات المظهرية بين النباتات الناتجة من الكالس المقاوم ونباتات المقارنة الناتجة من الكالس غير المعامل بالراشح وتلك الناتجـة مـن البذور. اذ لوحظ وجود تباين في عدد من الصفات في النباتـات المقاومـة (الـشكل 1 -H) متمثلة في انخفاض معدل عدد الافرع والازهار والقرنات المتكونة فـي النباتـات المقاومـة مقارنة بنباتات المقارنة الناتجة من البذور (الشكل 1-G) وتلك الناتجة مـن الكـالس غيـر المعامل بالراشح (الشكل 1-I). ولم يلاحظ اختلافات في صفة اطوال النباتات وعدد الاوراق باستثناء السقوط المبكر للاوراق السفلية والبراعم الزهرية في النباتات المقاومـة. وتماثلـت النباتات جميعها في احجام ازهارها ولونها الابيض (الشكل 1-H, G). كما تميزت القرنـات الناتجة بصغر حجمها وقلة اعدادها 1-2 قرنة/نبات مع ملاحظة جفافها وسقوطها مبكـراً فـي النباتات المقاومة وتلك الناتجة من الكالس غير المعامل بالراشح.

الجدول (6) مقارنة الصفات المظهرية بين النباتات المقاومة الناتجة من الكالس المتحمل للفطر *F.solani* والنباتات الناتجة من الكالس غير المعامل ومن بذور البازلاء *P.sativum*.

الصفات المدروسة	منشأ النباتات		
	البذور	الكالس غير المعامل	الكالس المقاوم للراشح
ارتفاع المجموع الخضري (سم)	47.5 *	51.4	48.7
عدد الافرع / نبات	3.5	2.5	2.2
عدد الاوراق / نبات	13.6	12.5	11.8
عدد البراعم الزهرية / نبات	14.5	9.6	11.8
عدد الازهار المنفتحة / نبات	11.3	8.2	7.6
عدد القرنات / نبات	2.3	1.2	0.7

- القيم تمثل معدل 4 نباتات لكل معاملة.

المناقشة

ان ظروف الزراعة النسيجية المستخدمة مع نباتات البازلاء كانت مشجعة تبعاً للاستجابة الجيدة التي ابدتها قطع الاوراق والسيقان. وقد تفسر هذه القابلية وبالذات في الاوراق الى النمط الوراثي لخلايا الكالس او ربما الى الاختلافات في نوعية الانسجة النباتية وتباين محتواها الداخلي من منظمات النمو وعلى المستويات المضافة منها الى وسط الاستحداث. توصلت العدلد من الدراسات على نباتات البازلاء الى نتائج مماثلة لما ذكر (17، 21). اشارت العديد من الدراسات الى وجود تشابه كبير في سلوك خلايا كالس البازلاء الحساس لمرض التعفن وموت البادرات من حيث حساسيتها للسموم النقية او للرواشح الخام للفطريات من ناحية وما تبديه مجموعة النباتات الناتجة من تمايز كالسها المقاوم للرواشح من مقاومة عند تلقيحها بالفطريات الممرضة من ناحية اخرى (19، 20). فضلاً عن هذا فقد اشارت العديد من الدراسات الى افضلية استخدام ومعاملة الكالس وبالذات النوع الهش منه بدلاً من القطع النباتية برواشح المسببات المرضية السامة بهدف انتخاب كالس متحمل او مقاوم للرواشح يتمايز بعدئذٍ الى نباتات كاملة مقاومة للفطر الممرض ذاته كما في نباتات البازلاء (8، 21) ونبتات القرنفل (9). لقد استلزمت عملية الحفاظ على مزارع الكالس المنتخبة المقاومة لتركيز 10% من رواشح الفطر الاستمرار في ادامته على اوساط الادامة المدعمة باضافة هذا التركيز من الرواشح مما يعزز بقاء قدرة الكالس على النمو في ظروف التواجد

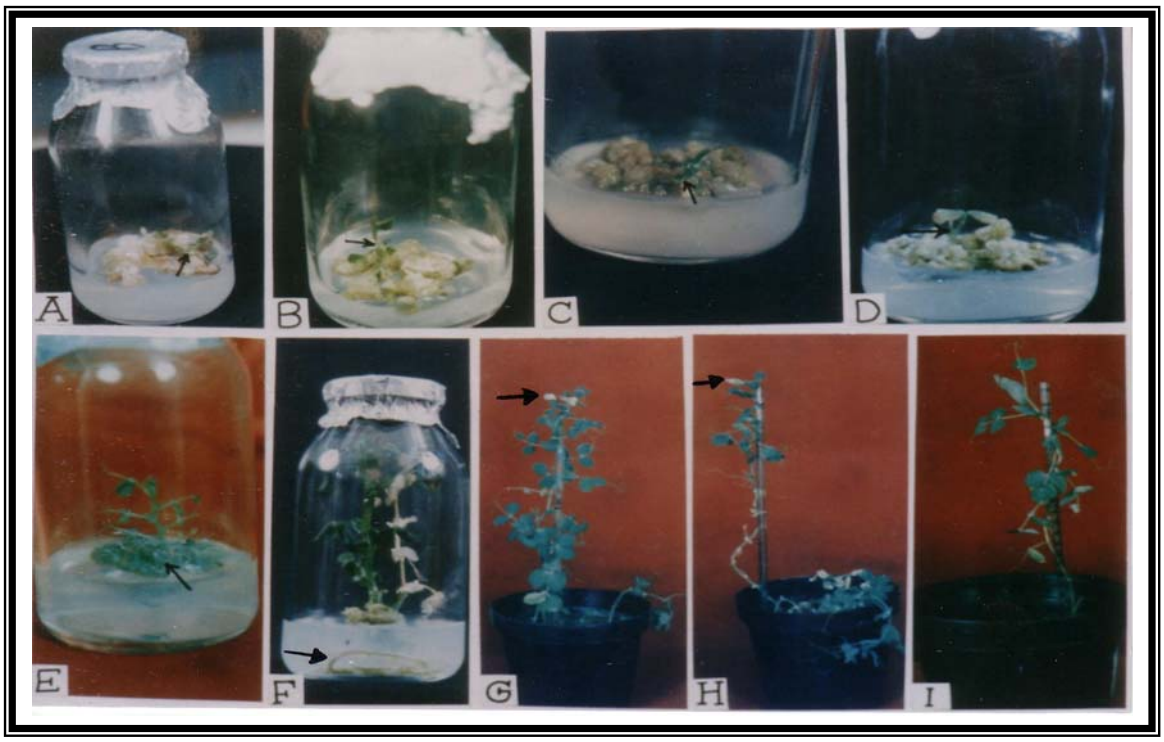
المستمر لتاثير هذا التركيز من الرواشح (3، 7). ان قابلية التمايز التي اظهرها كالس الاوراق والسيقان المقاوم والبالغة 45%، 26% على التوالي، تعد نسبة جيدة قياساً مع نتائج ودراسات مماثلة (8، 21). بالرغم من فروقها الواضحة عن قابلية التمايز في عينات المقارنة. ومن المحتمل ان يعزى حصول هذه الفروقات إلى وجود المركبات السامة في الراشح الفطري وتثبيطها لعملية التمايز وتكوين الافرع الخضرية (3)، او ربما بسبب تراكم هذه المركبات السامة داخل الخلايا مسببة اخلالاً بعملية الانقسام والتمايز (4). وقد حصلت دراسة اخرى على نتائج مماثلة في نباتات البازلاء (19). وعلى الرغم من عدم ملاحظة اختلافات في اعداد الكروموسومات في قمم جذور النباتات الناتجة من الكالس المقاوم للراشح ونظيراتها في عينات المقارنة الا انها اظهرت مقاومة عند تلقيحها بالفطر الممرض. وقد تعزى هذه المقاومة في نباتات البازلاء إلى انتاج مجموعة خلاياه المقاومة عدد من المركبات الفينولية والسكريات المتعددة والتي اكسبت الكالس صفة التحمل (او المقاومة) ترتب عنها تمايز نباتات بازلاء اظهرت مقاومة لهذا الفطر (7). او ربما تشجيع خلايا الكالس المعاملة بالرواشح السامة للفطر على تنشيط وزيادة تراكيز انزيمات البيروكسيديز والكتاليز والتي قد يؤدي تراكمها في خلايا الكالس إلى اكتساب خلاياه صفة المقاومة وانتاج نباتات مقاومة للفطر من تمايزه (6).

ان النجاح الذي حققته العديد من الدراسات في انتاج انواع من النباتات المقاومة للعديد من امراض النبات كالحنطة (3) وفول الصويا (6) والجت (22) بتقنية اضافة السموم النقية او الرواشح الخام لمسببات هذه الامراض إلى اوساط نمو الكالس وادامته فتح افاقاً جديدة في هذا المجال مما شجع على استخدام هذه الطريقة في الدراسة الحالية لانتاج نباتات بازلاء مقاومة لمرض تعفن الجذور.

المصادر

1- Dodds, J. H. and Robert, L.W.I. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge Univ. Press. London. (1985).
2- Carlson, P.. Science 180 : 1366- 1368. (1973).
3- Abdualla, M. Y. ; Motawei, M.I.; Barakat, M. N. and Al-Rokaibah, A.A. Alex. J. Agric. Res. 47 : 67- 75. (2002).
4- Binaravo, P.; Nedelinik, J. ; Fellner, M. and Nedbalkova, B. Plant Cell Tissue and Organ Culture 22: 191-196. (1990).
5- Sacristan, M. D. Theor. Appl. Genet. 61:193 – 200. (1982).
6- Jin, H.; Hartman, G.L.; Huang, Y.H.; Nickell, C.D.and Widholm, J.M. Phytopathology 86:714-718. (1996).
7- Mcphee – Kevin, K.E.; Tullu, A.; Kraft, J. M.and Muehlbauer, F.J.. J.Am. Soc. Hort. Sci.Alex. Va. 124:28-31. (1999).

8- Svabova, L. and Griga, M. Cereal Res. Communication 25 : 847 – 848. (1997).
9- Thakur, M.; Sharma, D.R. and Sharma, S.K. Plant Cell Repts. 20 : 825 – 828. (2002).
10- Nelson, P. E.; Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. "*Fusarium* species-illustrated manual for identification" University park, Pennsylvania : Pennsylvania State University Press. 193 pp. (1983).
11- Booth, C. The Genus *Fusarium* Common Welth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 233 pp. (1971).
12- Sutherland. M. L. and Pegg, G. F. Physiol. Mol. Plant. Pathol. 40 : 423 – 436. (1992).
13- Pitt, J. I. and Hocking, A.D. Fungi and Food Spoilage. Academic Press. Australia. (1985).
14- Murashige, T. and Skoog, F. Physiol. Plant. 15: 473 – 497. (1962).
15- Tyagi, A.P.; Gomai, L. and Byers, B. Breeding and Genetics 33: 59-71. (2001).
16- Storti, E.; Latil, C.; Salti, S.; Bettini, P.; Bogani, P.; Pellegrinin, M.G.; Simeti, C.; Moulnar, A. and Buiatt, M. Theor. Appl. Genet. 84 : 123-128. (1992).
17- Mroginski, L. A. and kartha, K.K.. Plant Cell Repts. 1:64-66. (1981).
18- Saydam, C.; Copeu, M. and Segin, E. J. Tur. Phytopathol. 2 : 69 – 75. (1973).
19- Gretenkort, M. A. and Helsper, J.P.F.G. Plant Pathol. 42: 676-685. (1993).
20- Packa, D. Appl.Genet. 39:171-192. (1998).
21- Svabova, L.; Lebeda, A. and Griga, M. *Fusarium* spp. On peas. several in vitro techniques used in resistance breeding. 3rd European Conference on grain legumes 235-236. (1998).
22- Arcioni, S. ; Pezzotti, M. and Damiant, F. Theor. Appl. Genet. 74: 700-705. (1987).



الشكل (1) تكوين نباتات البازلاء المقاومة الناتجة من تمايز الكالس المتحمل لرواشح الفطر *F.solani*

B, A. تمايز كالس الاوراق المتحمل لرواشح الفطر في الوسط (MS + 2.0 ملغم/لتر BA + 1.0 ملغم/لتر NAA).

D, C. تمايز كالس السيقان المتحمل لرواشح الفطر في الوسط (MS + 4.0 ملغم/لتر BA + 2.0 ملغم/لتر IAA)

E. فرع خضري متمايز محتوي على 3-5 اوراق غرس في وسط التجـذير (MS 0.5 + 1.0 ملغم/ لتر NAA) بعمر 60 يوماً.

F. تجذير الافرع الخضرية من (A، B، C، D، E) في وسط التجـذير (MS 0.5 + 1.0 ملغم/ لتر NAA) بعمر 10 أيام.

G. نبات بازلاء ناتج من البذور في مرحلة التزهير الجزء المؤشر بعمر 80 يوماً.

H. نبات بازلاء مقاوم للفطر *F.solani* بعمر 90 يوماً فـي مرحلـة التزهيـر (الجـزء المؤشر).

I. نبات بازلاء ناتج من الكالس غير المعامل (المقارنة) بعمر 90 يوماً بعد نقله إلى التربة.