انتخاب نباتات قرنفل *Dianthus caryophyllus* L. متمايزة من مزارع كالس الفلق مقاومة لفطر *Fusarium oxysporum*

عدنان محمود عبد الله
قسم علوم الحياة/كلية التربية

نديم احمد رمضان
قسم علوم الحياة/كلية العلوم

خزعل علي امين
قسم علوم الحياة/كلية التربية

جامعة الموصل

الاستلام 04/03/2007
القبول 09/05/2007

Abstract

In this study callas stimulated from cotyledons explants of carnation seedlings cultured on MS media supplemented with 0.1 mg/L of BA and 0.5 mg/L of 2,4-D was used . The ability of cotyledons callus for regeneration on MS media supplemented with different concentrations (0.5-3.0) mg/L of BA combined with different concentrations (0.1-1.0) mg/L of NAA or 2,4-D was tested . The best regeneration medium was MS with 2.5 mg/L of BA and 0.5 mg/L of NAA . Selection of resistant callus to the virulent strains of *Fusarium oxysporum*. f.sp. *diunthi* was examined from culture medium contained the concentrations 2.5, 5.0 , 7.5, 10.0 12.5,15.0,17.5 . 20.0 and 25% of fungal filtrates. The concentrations which allowed selection after three cycles (20 days /cycle) of selection were 12.5 and 15.0% . The resistant callus showed a high level of peroxidases enzymes activity . Carnation plants which regenerated from callus of cotyledons were resistant the toxic effect of fungal filtrate, in spite of reduction of the regeneration ability of the resistant callus up to 43.7% compared with the control plants . Carnation plant regenerated from tolerante callus exhibited clear resistance when inoculated with the virulent fungi .

الخلاصة

استخدم الكالس المستحدث من الفلق لنبات القرنفل النامي في وسط MS الحاوي على 0.1 ملغم / لتر BA و 0.5 ملغم / لتر 2,4-D . أبدى الكالس قابلية على التمـايز وتكـوين الافرع الخضرية في أوساط MS المدعمة بتراكيز 0.5- 3.0 ملغم / لتر ومتداخلة مع 0.1- 1.0 ملغم / لتر من NAA أو 2,4-D ، وكان الوسط الحاوي على 2.5 ملغم / لتر من BA و 0.5 ملغم / لتر NAA أفضل وسط لتمايز الكالس . امكن انتخاب مزارع كـالس مقاومـة لرواشح الفطر *Fusarium oxysporum*. f.sp. *diunthi* من مزارع الكالس المضاف اليها

الرواشح بتراكيز 2.5 ، 5.0 ، 7.5 ، 10.0 ، 12.5 ، 15.0 ، 17.5 ، 20 ، 25% راشحاً فطرياً بعد ثلاثة مراحل انتخاب (20 يوماً / مرة) وخاصة عند التركيزين 12.5 و 15.0%. تمكنت قطع الكالس المنتخبة من ايقاف نمو الفطر باتجاهها فضلاً عن ابدائها زيادة ملحوظة في نشاط انزيم البيروكسيديز في مستخلصها الخلوي . ادى تمايز الكالس المنتخب المقاوم لرواشح الفطر في الحصول على نباتات قرنفل كاملة على الرغم من الانخفاض في قابلية الكالس المقاوم على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية الى 43.7% قياساً بمعاملة المقارنة . وعلى الرغم من عدم وجود اختلافات كبيرة في مجموعة نباتات القرنفل المقاومة عن مثيلاتها نباتات المقارنة . الا ان النباتات المتمايزة من الكالس المقاوم للرواشح اظهرت مقاومة عند تلقيحها بالفطر الممرض.

المقدمة

القرنفل *Dianthus carophllus* L. نبات عشبي معمر يزرع في الحدائق وأزهاره تصلح للقطف ويعتبر من النباتات الاقتصادية على مستوى عالمي (1) ، يصاب النبات بالعديد من الامراض المتسببة عن البكتريا والفطريات والفايروسات ويعد مرض الذبول المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporum*. F.sp. *diunthi* من الامراض المؤثرة في كمية ونوعية الازهار (2) ، ولصعوبة القضاء النهائي على المرض باستخدام المبيدات الكيميائية فضلاً عن تأثيرها الضار على البيئة (3) فقد استخدمت طرائق عديدة ومنها التربية التقليدية بهدف استنباط أصناف نباتية مقاومة عن طريق التهجين لنقل صفة المقاومة من نبات مقاوم الى آخر حساس للاصابة (4) الا ان هذه الطريقة تمتاز بصعوبتها واستغراقها فترة زمنية طويلة فضلاً عن صعوبة تحديد ونقل المادة الوراثية المسؤولة عن صفة محددة مثل المقاومة (1) . وبالنظر لتقدم تقانة زراعة الانسجة فقد وظفت في انتاج نباتات خالية من المسببات المرضية او مقاومة لامراض النبات (5) . استخدمت مزارع الكالس والمعلق الخلوي في الحصول على النباتات المقاومة ، فقد تمكنت احدى الدراسات من انتاج نباتات الحنطة المقاومة للسم deoxynivalendol المنتج من الفطر *Fusarium graminearum* بإضافة تراكيز من السم الى الوسط الغذائي (6) وبالطريقة ذاتها انتخبت نباتات Gladiolus المقاومة لسم Fusaric acid المنتج من الفطر *F. oxysporum* المسبب لمرض التعفن والذبول الوعائي (7) . أشارت دراسات اخرى الى افضلية استخدام الرواشح السامة الخام لمسببات الامراض للحصول على النباتات المقاومة ، فقد تمكنت احدى الدراسات من انتاج نباتات لهانة مقاومة للعديد من الامراض من خلال تعريض الكالس او المعلق الخلوي لرواشح الفطريات (8) . كما انتجت العديد من النباتات الاقتصادية المقاومة لمرض الذبول الوعائي المسبب عن الفطر *F. oxysporum* بإضافة رواشح الفطر الخام الى الوسط الغذائي كالبطاطا (9) والطماطة

(10) والبازلاء (11) والجت(12) والخيار (13) والقرنفل (14) . وبالطريقة ذاتها انتخبت نباتات فول الصويا المقاومة لمرض موت البادرات بمعاملة كالس النبات برواشح الفطر F. solani (15) . اشارت دراسات عديدة الى ملاءمة الوسط MS الحاوي على Benzyl Amino Purine (BAP) و Naphthalene Acetic Acid (NAA) في تمايز كالس الاوراق والقمم النامية لنبات القرنفل (16) في حين ذكرت دراسة اخرى ان الوسط MS المدعم بـ kinetin و NAA كان مناسباً لتمايز كالس سيقان القرنفل (17) .

تعتبر مجموعة أنزيمات البيروكسيديز من أنزيمات الأكسدة والأختزال وان اهم عمل لانزيمات البيروكسيديز هو التقليل من تراكيز بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 السامة المتراكمة في الخلايا النباتية عند تعرضها الى جهد خارجي غير ملائم كأمراض النبات (18). اشارت الدراسات الى امكانية اعتماد انزيمات البيروكسيديز مؤشراً جيداً لامتلاك خلايا النبات صفة المقاومة او التحمل . فقد لوحظت زيادة متسارعة من تراكيز هذا الانزيم في النباتات المقاومة عند تعرضها لجهد خارجي (19) . تشير العديد من المصادر الى انتاج مجموعة من النباتات الاقتصادية القاومة للفطر *F. oxysporum* مع ملاحظة قلة الدراسات المهتمة في الحصول على نباتات زينة مقاومة لمرض الذبول المسبب عن هذا الفطر . يهدف البحث الحالي الى الحصول على نباتات قرنفل مقاومة لفطر *F. oxysporum* باستخدام احدى تقنيات الزراعة النسيجية .

مواد العمل وطرائقه

مصدر الكالس . اكثاره وادامته

استخدم الكالس المستحدث من الاوراق الفلقية لنبات القرنفل النامي في وسط MS (20) الصلب المدعم بـ 0.1 ملغم / لتر(Benzyl Adenine (BA و 0.5 ملغم / لتر 2,4-Dichloro Phenoxy Acedic Acid (2,4-D) والمستحصل عليه من دراسة سابقة (22) . تم اكثار الكالس وادامته بإعادة زراعته على الوسط ذاته . قطع الكالس الى اجزاء بروزن 1 غرام تقريباً وزرعت على الوسط الجديد بواقع قطعة / دورق /30 مل من الوسط . حضنت العينات عند درجة حرارة 25 ±2°م وشدة إضاءة 1500 لوكس ونظام تعاقبي 16 ساعة ضوء / 8 ساعات ظلام . واعيدت الزراعة كل 30 يوماً .

انتاج النباتات الكاملة من تمايز الكالس

اختبر وسط MS الصلب المدعم بتراكيز (0.0 ، 0.1 ، 0.5 ، 1.0) ملغم / لتر لكل من NAA او 2,4-D ومتداخلة مع تراكيز (0.5 ، 1.0 ، 1.5 ، 2.0 ،2.5 ، 3.0) ملغم / لتر من BA . في تشجيع الكالس على التمايز وتكوين الافرع الخضرية . نقل الكالس

بمعدل 1 غم / قطعة وبعمر 30 يوماً الى دوارق حجم 100 مل احتوت 30 مـل مـن احـد الاوساط المختبرة ، وبمعدل 8 قطع كالس لكل معاملة . حضنت الدوارق في ظروف التعاقب الضوئي نفسه . كما اختبر الوسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو واخرى مدعمة بـ 0.5 أو 1.0 ملغم / لتر من 2,4-D ملغم / لتر لتكوين الجذور من الافرع الخضرية المتمايزة من كالس الاوراق الفلقية ، اذ استأصلت الافرع الخضرية المتكونة من الكالس وأزيلت عنهـا بقايا الوسط الغذائي ونقلت الى دوراق زجاجية احتوت 30 مل من احد الاوساط المختبـرة ، حضنت العينات في ظروف التعاقب الضوئي نفسها.

مصدر الفطر وتجهيز رواشحه السامة

تم الحصول على العزلة النقبية للفطر *Fusarium oxysporum*. f.sp. *diunthi* من د. نديم احمد رمضان / قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل نامية على وسـط (Potato – Sucrose – Ager (PSA) (21) . اتبعت الطريقة القياسية لاستخلاص الرواشح الفطرية السامة(23) . نمي الفطر على الوسط الغذائي السائل الخاص بانتاج السموم الفطريـة (24) وزع 50 مل من الوسط في دوارق زجاجية حجم 250 مل ولقح محتـوى كـل دورق بقرصين من المزرعة الفطرية النامية على الوسط PSA قطر 0.8 سـم بعمـر 10 أيـام . حضنت الدوارق عند درجة حرارة 27 ±2°م مع عدم التحريك ولمدة 20 يومـاً . رشـحت محتويات الدوارق من خلال الشاش ثم اجرى البند المركزي للراشـح 4°م وبـسرعة 12000 دورة / دقيقة ولمدة 20 دقيقة للتخلص من بقايا الابواغ والعزل الفطري ، ورشحت المفرزات مرة اخرى باستخدام Millipor Filter (0.2) . ثم حفظت الرواشح فـي قناني زجاجيـة عند –10°م لحين الاستخدام .

معاملة كالس الفلق برواشح الفطر *F. oxysporum*

أتبعت الطريقة المباشرة والسريعة في انتخاب الكالس المقاوم (17) . أضيفت الرواشح المعقمة بالترشـيح بتراكيـز 2.5 ، 5.0 ، 7.5 ، 10.0 ، 12.5 ، 15.0 ، 17.5، 20.0 و 125.0 % (حجم : حجم) الى اوساط نمو وادامة الكالس بعد تعقيمه وتبريده الـى درجـة 50°م تقريباً . وزع الوسط الحاوي على الراشح في اطباق بتري زجاجية قطر 9 سم بمعـدل 25مل/ طبق . وضعت 10 قطع من الكالس بعمر 30 يوماً بوزن 1 غـرام علـى الوسـط، حضنت العينات عند درجة حرارة 25 ± 2 مْ وظروف التعاقب الضوئي نفسها ولمدة 20 يوم . نقلت قطع الكالس الحية الى الوسط نفسه والحاوي على تراكيز الراشـح الـذي تـم عنـده الانتخاب 15% راشح فطري . واعيدت زراعة قطع الكالس الحية ثلاث مرات متتاليـة فـي

الوسط ذاته وبمعدل 20 يوم لكل مرة . تم اكثار وادامة الكالس المنتخب المقاوم برواشح الفطر بنقلة الى دوارق زجاجية حجم 100 مل احتوت 30 مل من الاوساط الصلبة المستخدمة لنمو الكالس والمضاف اليها الرواشح المعقمة بتراكيز 10% من الوسط وبمعدل 2 قطعة/ دورق . واعيدت زراعة الكالس كل 40 يوماً على الاوساط ذاتها .

اختبار مقاومة الكالس المعامل برواشح الفطر

اعتمدت طريقة المزرعة الثنائية (25) لاختيار مدى تحمل الكالس المنتخب المقاوم لرواشح الفطر في الحد من نمو الغزل الفطري . جهزت أطباق بتري زجاجية قطر 9 سم تحتوي 20 مل من وسط زابكس دوكس (21) والمضاف اليه 8 غم آكار و 0.4 ملغم / لتر 2,4-D و 1.0 ملغم / لتر من Kinetine (kin.) ، وضع في مركز الطبق وبشكل مقلوب قرص قطرة 0.3 سم اخذ من مزرعة حديثة لفطر *F. oxysporum* ووضعت قطع من الكالس المعامل والمتحمل للراشح حول القرص وعلى ابعاد 2.5 سم من حافة القرص الفطري. حضنت الاطباق عند درجة 25°م وبظروف الظلام ولمدة 5 أيام .

استخدمت المعادلة $\frac{D-R}{D}$ في احتساب درجة تثبيط النمو الفطري . (25) حيث

D : معدل البعد بين مركز القرص الفطري وحافة قطعة الكالس المقاوم لرواشح الفطر.

R : نصف قطر المستعمرة الفطرية (سم)

قياس فاعلية انزيم البروكسيديز في الكالس المقاوم

جهز المستخلص الخلوي الرائق لخلايا الكالس المقاوم لرواشح الفطر بحسب الحمداني (26) . اعتمدت الطريقة اللونية (Colorometric Method) لقياس نشاط انزيم البيروكسيديز في المستخلص الخام لخلايا الكالس المقاوم (27) . يحضر مزيج التفاعل المكون من [1 مل (0.1 مولار من محلول المنظم صوديوم فوسفات عند الأس الهيدروجيني pH.6.0) + 1 مل (15 مليمول من مادة كواروكول Guarocol) + 1 مل (3.0 مليمول من بيروكسيد الهيدروجين H_2o_2)] بعدها يضاف للمزيج (0.05) مل من المستخلص الخام للانزيم ، يمزج سريعاً وتقاس شدة الامتصاصية الضوئية بجهاز المطياف الضوئي spectrophotometer نوع (CECIL1021Violet) عند الطول الموجي 470 نانوميتر.

تكوين النباتات الكاملة من تمايز الكالس المعامل بالراشح ونقلها الى التربة واقلمتها

نقل كالس الفلق المنتخب والمتحمل لرواشح الفطر وبمعدل 1 غم / قطعة وبعمر 40 يوماً الى دوارق حجم 100 مل احتوت 30 مل من وسط (MS + 0.5 ملغم / لتر NAA + BA 2.5) . حضنت العينات في ظروف التعاقب الضوئي نفسها . تم حث الافرع الخضرية المتمايزة على تكوين الجذور . حيث استأصلت وغرست في دوراق زجاجية تحتوي 30 مل من وسط (MS + 0.5 ملغم / لتر 2,4-D) . حضنت العينات في ظروف التعاقب الضوئي ذاتها . اخذت النباتات ذات المجموعة الجذرية المناسبة ورفعت من الوسط الغذائي بعناية وغسلت جذورها بالماء جيداً للتخلص من الاكار وغرست في سنادين بلاستيكية سعة 2 كغم احتوت على مزيج التربة والبتموس 1:1 حجم : حجم المعقمين بالمؤصدة . تركت السنادين بظروف الحاضنة والتعاقب الضوئي لمدة 6 أيام بعدها غطيت باغطية بلاستيكية شفافة ومثقبة ووضعت في منطقة مضاءة جيداً وعند درجة حرارة المختبر ولمدة 4 أيام ثم أزيلت الاغطية عنها واستمرت العناية بالنباتات .

اختبار تحمل النباتات الناتجة من الكالس للتلقيح بالفطر *F. oxysporum*

تهيأت اللقاح الفطري . جهز وسط مستخلص البطاطا والسكروز السائل ووزع في دوراق 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 . حضنت الدوارق عند درجة حرارة 27°م وبظروف الظلام لمدة 10 أيام بعدها نقلت الى ظروف الاضاءة المستمرة ولمدة 5 أيام لتحفيز الفطر على تكوين الأبواغ التكاثرية . جمعت محتويات الدوارق بعد فترة التحضين خلطت جيداً بأستخدام الخلاط الكهربائي وبالسرعة القصوى لمدة دقيقة واحدة . استخدمت النباتات الناتجة من الكالس المعامل برواشح الفطر والتي نجحت اقلمتها لهذا الاختبار . اذ 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 (28) .

النتائج

تكوين المجاميع الخضرية من كالس الفلق

اوضحت نتائج الاختبارات كفاءة كالس الفلق ، على تكوين الافرع الخضرية في معظم اوساط التمايز المختبرة ، والمكونة من الوسط MS المضاف اليها تراكيز 0.5-3.0 ملغم / لتر من BA ومتداخلة مع تراكيز 0.0 – 1.0 ملغم / لتر من NAA و D , 2-4

وان الاوساط الحاوية على NAA مع BA كانت مشجعة على تكوين الافرع الخضرية . اذ بلغت نسبة الافرع المتكونة في مجمل هذه الاوساط 67.5% وامتاز الوسط المتكون من MS المضاف اليه 0.5 ملغم / لتر NAA + 2.5 ملغم / لتر BA عن باقي الاوساط في تشجيعية للكالس على التمايز وبلغت نسبة الافرع المتكونة 162.5 % (الشكل 1ـA) وقد اعتمد هذا الوسط في التجارب اللاحقة. في حين كانت نسبة التمايز ضعيفة في الاوساط الحاويـة علـى 2,4-D و BA (الجدول1)

الجدول (1) تكوين الأفرع الخضرية المجاميع الخضرية من تمايز كـالس الفلـق لبـادرات القرنفل في وسـط MS الـصلب المحتـوي علـى تراكيـز مختلفـة مـن (NAA، 2,4-D) و BA بعد مرور 50 يوماً

الاوكسينات (ملغم / لتر)		الافرع الخضرية المتكونة %					
		تراكيز BA ملغم / لتر					
		0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0.0		0	12.5	25.0	12.5	25.0	37.5
NAA	0.1	12.5	25.0	62.5	62.5	125.0	137.5
	0.5	12.5	12.0	25.0	112.5	162.5	137.5
	1.0	0	0	25.0	50.0	137.5	125.0
2,4-D	0.1	0	0	25.5	62.0	62.5	75.0
	0.5	0	12.5	12.5	25.5	50.0	50.0
	1.0	0	0	0	25.0	25.0	50.0

تجذير الافرع الخضرية المتكونة

اظهرت الافرع الخضرية الناتجة من كالس الاوراق الفلقية قابلية على تكوين الجذور في وسط التجذير ، وكان معدل نسبة تجذير الافرع المتمايزة فـي مجمـل الاوسـاط 65 % (الجدول 2) كما يبين الجدول ان الوسط المتكون من MS الصلب المحتوي على 0.5 ملغم / لتر 2,4-D كان ملائماً في تشجيعه تكوين الجذور للافرع الخضرية .

الجدول (2) قابلية تجذير الافرع الخضرية الناتجة من كالس فلق بادرات القرنفل في وسـط MS الصلب المحتوي على تراكيز مختلفة من 2,4-D

تركيز 2,4-D	عدد الافرع الخضرية المنقولة للتجذير	عدد الافرع الخضرية المكونة للجذور	التجذير %
0	10	6	60
0.5	10	8	80
1.5	9	5	55.5

انتخاب الكالس المتحمل لرواشح الفطر من مزارع كالس الاوراق الفلقية لباردات القرنفل

تبين نتائج الجدول (3) انخفاض اوزان قطع الكالس المزروعة على وسـط الادامـة (MS + 0.1 ملغم / لتر BA + 0.5 ملغم / لتر 2,4-D) مع زيادة تركيز رواشح الفطر في الوسط الغذائي . وظهر التأثير بشكل واضح عند سالتراكيز 12.5 و 15.0 % راشح فطـري حيث توقفت تقريباً قابلية الكالس على النمو والزيادة في الحجم بدلالة بقاء اوزان قطع الكالس والبالغة 40 قطعة لكل معاملة مقاربة لأوزانها قبل المعاملة فضلاً عن اكتساب الكـالس لونـاً بنياً (الشكل 1-B) وقد اعتمدت هذه التراكيز فقط في عملية انتخاب قطع الكالس المتحمـل لفعل الراشح ، واستبعدت التراكيز المنخفضة (2.5 – 10.0 %) لتأثيرها المحدود في نمـو الكالس ، حيث كانت مشابهة لعينة المقارنة (الشكل 1-C) كما اهملت جميع قطـع الكـالس المعاملة بالتراكيز 17.5 – 25% راشح فطري لتوقفها عن النمو وانخفاض اوزانهـا بـشكل كبير وموتها واكتسابها اللون البني المسود (الشكل 1- D) .

الجدول (3) انتخاب الكالس المتحمل من مزارع نمو وادامة كالس الفلق للقرنفـل الحاويـة على رواشح الفطر *F.oxysporum* المعقمة بالترشيح (بدلالة وزن الكالس / غم) بعد 20 يوماً من التحضيين .

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	25.0
0.958	2.17	1.95	1.12	1.01	0.97	0.94	0.86	0.74	0.70	0.69

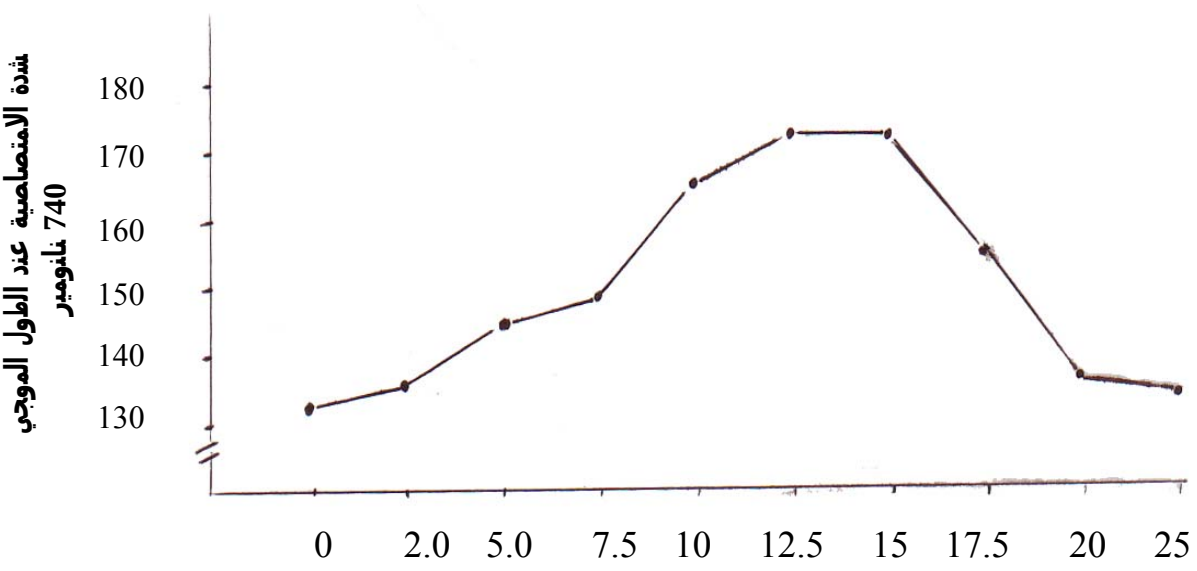
* عدد القطع الموزونة من كل معاملة 10 قطع .

تحديد النشاط الحيوي للكالس المتحمل في تثبيط نمو الفطر *F.oxysporum* بطريقة المزرعة الثنائية .

بينت نتائج اختبار النشاط الحيوي للكالس المتحمل ، عدم قابلية الكالس غير المعامل بالراشح على الحد من نمو الفطر . فقد تمكن الفطر من النمو حول وعلى قطع الكالس خلال 4-5 أيام من الزراعة . في حين تمكنت قطع الكالس المحتملة والمنتخبة من مزارع الكالس المعاملة برواشح الفطر عرقلة ومنع وصول الفطر الى قطع الكالس، فقد بلغ معدل المسافة التي توقف عندها الفطر 3.2 ملم من قطع الكالس المتحمل .

قياس فاعلية انزيم البيروكسيديز

أظهرت نتائج الاختبار تبايناً في نشاط انزيم البيروكسيديز في عينات الكالس المقاومة المعاملة بتراكيز مختلفة من الراشح الفطري حيث يبين (الشكل 2) زيادة في نشاط الانزيم في مستخلص الكالس مع زيادة تراكيز الراشح الفطري في الوسط الغذائي. وكان أعلى نشاط للانزيم معبراً عنه بشدة الامتصاصية عند الطول الموجي 470 نانوميتر في عينة الكالس المعاملة بـ 12.5 و 15 % راشحاً فطرياً .



تراكيز راشح الفطر المعقم بالفرز الغشائي في الوسط الغذائي

الشكل (2) فاعلية انزيم البيروكسيديز في المستخلص الخلوي لكالس الفلق لنبات الفرنفل النامي من اوساط تحتوي تراكيز مختلفة من رواشح الفطر *F.oxysporum*

تكوين النباتات من تمايز الكالس المتحمل لرواشح الفطر ونقلها الى التربة

اعتمد الوسط MS_+ 2.5 ملغم / لتر BA + 0.5 ملغم / لتر NAA لتمايز كـالس الفلق المتحمل لرواشح الفطر وتكوين الأفرع الخضرية (الشكل 1 – E). تظهر نتائج الجدول (4) التأثير المثبط لرواشح الفطر في قابلية الكالس على التمايز . إذ انخفضت اعداد الافـرع الخضرية المتكونة من الكالس المتحمل برواشح الفطر الى 43.7% مقارنة بعينات المقارنـة غير المعاملة بالراشح 162.5% . واحتاج كالس المقارنة 40-50 يوماً من الزراعة لتكـوين الافرع الخضرية في حين كانت الفترة اطول 60-70 يوماً فـي عينـات الكـالس المتحمـل لرواشح الفطر فضلاً عن النمو البطيء للأفرع الخضرية الناشئة من الكالس المتحمل .

الجدول(4) تكوين الافرع الخـضرية مـن تمـايز الكـالس المتحمـل لرواشـح الفطـر *F.oxysporum* المستحدث من فلـق بادرات القرنفـل فـي اوساط التمـايز بعد 70 يوماً .

معاملة الكالس	العدد الكلي للقطع المستخدمة	العدد الكلي للأفرع الخضرية المتكونة	تكوين الأفرع الخضرية %
* مقارنة	8	13	162.5
** المتحمل	32	14	43.7

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

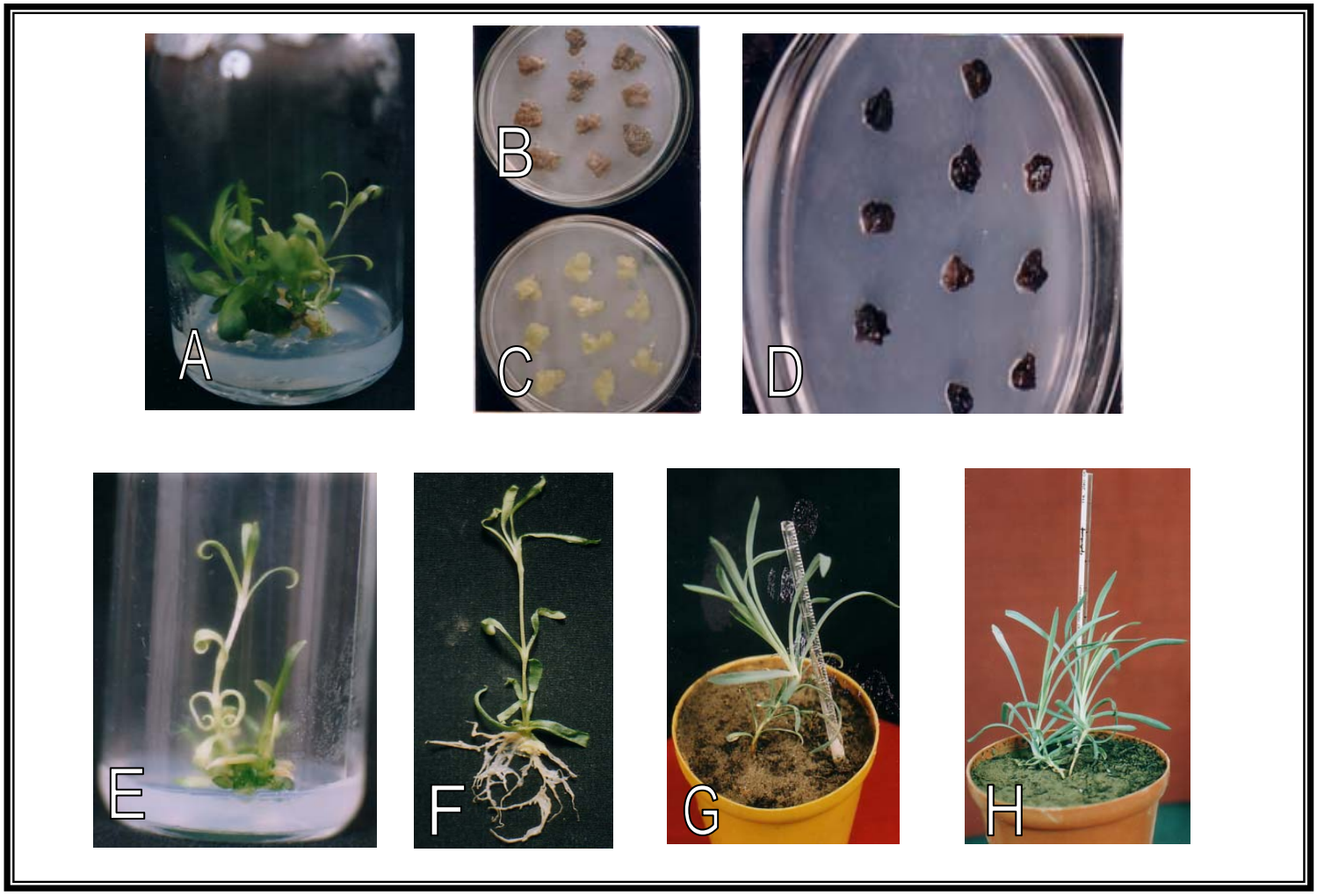
كما أظهرت الافرع الخضرية الناتجة من الكالس المتحمل للرواشح قابلية على التجذير في الوسط MS + 0.5 ملغم / لتر 2,4-D ، وكانت نسبة التجذير 69.2% (الجـدول 5) ، نقلت الافرع الخضرية المتكونة بطول 5-7 سم والحاوية على 3-4 عقد الى وسط التجـذير اعلاه (الشكل 1- F) ، وتكونت الجذور بعد 9-12 يوماً في معظم الافـرع الخـضرية ، وتمكنت اغلبية النباتات المتكونة من التأقلم لظروف البيئة عند نقلها الى التربة .

الجدول (5) تجذير الافرع الخضرية الناتجة من تمايز كالس الفلق لبادرات القرنفل المتحمل لرواشح الفطـر *F.oxysporum* *في وسط* MSالصلب الحـاوي علـى 0.5 ملغم / لتر 2,4-D

معاملة الكالس	عدد الافرع المنقولة/ المجذرة	التجذير %	النباتات الكاملة المنقولة الى التربة
المقارنة	8/11	72.7	6
المتحمل	9/13	69.2	8

اختبار قابلية النباتات الناتجة من الكالس المتحمل للرواشح الاصابة بفطر *F.oxysporum*

اظهرت نتائج اختبار القدرة الامراضية ان النباتات الناتجة من الكالس المقاوم لرواشح الفطر كانت مقاومة للاصابة بالفطر المرض ذاته . حيث تم تلقيح النباتات الثمانية الناتجة من الكالس المقاوم لرواشح الفطر بالمعلق الفطري والبوغي لمزرعة فطرية حديثـة ، وتمكنـت خمسة نباتات منها مقاومة الفطر وبقاءها سليمة ولم تلاحظ اختلافات واضحة فـي الـصفات المظهرية بين النباتات المقاومة (الشكل G-1) وعينات المقارنة الناتجة من الكـالس غيـر المعامل بالراشح (الشكل 1- H) والبذور باستثناء بطء نموها والاصفرار السريع لـلاوراق السفلية.



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

A. تمايز كالس الفلق في الوسط (MS + 2.5 ملغم / لتر BA + 0.5ة ملغم / لتر NAA) بعمر 50 يوماً

B. كالس فلق نبات القرنفل في وسط النمو (MS + 0.5 ملغم / لتر 2,4-D + 0.1 ملغم / لتر BA) مضاف اليها 12.5 % راشح فطري .

C. كالس الفلق في وسط النمو الخالي من الراشح الفطري .

D. كالس الفلق في وسط النمو المحتوي على 20% راشح فطري .

E. تمايز كالس الفلق المتحمل لرواشح الفطر في وسط التمايز (A) بعمر 70 يوماً .

F. تجذير الافرع الخضرية من (A ، E) في وسط التجـذير (MS + 0.5 ملغـم / لتـر 2,4-D) بعمر 15 يوماً .

G. نبات قرنفل مقاوم للفطر *F.oxysporum* بعمر 80 يوماً .

H. نبات قرنفل ناتج من الكالس غير المعامل (المقارنة) بعمر 65 يوماً .

المناقشة

ان القابلية الجيدة لكالس الفلق على التمايز وتكوين الافرع الخضرية في الوسـط MS الصلب الحاوي على تراكيز عالية نسبياً من BA ومنخفضة من NAA او 2,4-D قد يعزى الى نوع الجزء النباتي المستخدم مقترناً بمحتواه الداخلي من منظمات النمو على المـستويات المضافة منها الى الوسط الغذائي وعلى محتواه من الخلايا القابلة للتمايز . توصلت العديد من الدراسات على نبات القرنفل الى نتائج مقاربة لمـا لـوحظ (16، 22 ، 29) . وان اعـادة زراعة الكالس عدة مرات على وسط الاستحداث ذاته كان ضرورياً للحصول علـى الكـالس الهش (30) . اشارت عدد من الدراسات الى وجود تشابه في سلوك خلايا كـالس القرنفـل الحساس لمرض التعفن والذبول من حيث حساسيتها للسموم النقية او للرواشح الخام للفطريات من ناحية وما تظهره النباتات المتمايزة من الكالس المقاوم للرواشح من مقاومة عند تلقيحهـا بالفطريات الممرضة من ناحية اخرى (14،17) . اشارت العديد من الدراسات علـى نبـات القرنفل (14،30) والكلاديولس (7) والحنطة (6) الى افـضلية اسـتخدام ومعاملـة الكـالس وبالذات الهش منه بدلاً من المتماسك او القطع النباتية برواشح المسببات المرضـية الـسامة بهدف انتخاب كالس متحمل او مقاوم للرواشح يتمايز بعدئذٍ الى نباتات كاملة مقاومـة للفطـر الممرض ذاته ، فضلاً عن هذا فقد ذكرت دراسات (2،10،13) ان استخدام رواشح مسببات الامراض الخام بهدف انتخاب خلايا مقاومة لامراض النبات يكون اكثر كفاءةً مـن اسـتخدام السموم النقية لهذه المسببات نظراً لاحتواء الرواشح الخام على العديد من المـواد الكيميائيـة كالسموم والانزيمات المحللة للجدر الخلوية والمركبات الفينولية والتي تـشترك جميعـاً فـي احداث المرض . لقد تطلب عملية الحفاظ واكثار مزارع الكالس المنتخبة المقاومـة لتراكيـز 12.5 و 15% راشح فطري الاستمرار في ادامته على اوساط مضاف اليهـا تراكيـز مـن الرواشح مقاربة للتراكيز الذي تم عنده الانتخاب لتعزيز قدرة الكالس على النمو في ظـروف التواجد المستمر لتأثير الراشـح الـسام (6 ، 7 ، 15) . ان الزيـادة فـي نـشاط انـزيم البيروكسيدير في مستخلص خلايا الكالس المنتخب والمتناسب مع تراكيز رواشح الفطر فـي الوسط الغذائي يؤكد ملاءمة استخدام هذا العامل بوصف مؤشراً لاكتساب الخلايا صفة التحمل او المقاومة ، ولوحظت نتائج مشابهة لما ذكر في دراسة على نبات الخيار (18) والطماطـة (25) . ان قابلية الكالس المقاوم المنتخب على التمايز وتكوين الافـرع الخـضرية والبالغـة 43.7% تعد نسبة مقبولة مقارنة مع نتائج دراسات مماثلة (2،17) على الرغم من اختلافهـا عن قابلية التمايز في عينات المقارنة ، وقد يكون سبب هذا التباين الى وجود المركبات السامة في الراشح الفطري وتثبيطها لعملية التمايز (6) او ربما يعزى الى تـراكم هـذه المركبـات السامة في داخل الخلايا مسببةً اخلالاً بعملية الانقسام والتمايز (12) وقد اشـارت دراسـات

اجريت على نبات القرنفل (2،14،17) نتائج مشابهة لما لوحظ . وعلى الـرغم مـن عـدم ملاحظة اختلافات مظهرية كبيرة بين النباتات الناتجة من الكالس المقاوم ونظيراتها في عينات المقارنة، الا انها اظهرت مقاومة عند تلقيحها بالفطر الممرض ، وقد تعزى هذه المقاومة من النباتات الى انتاج مجموعة خلاياه المقاومة عدد من المركبات الفينولية والسكريات المتعـددة والتي اكسبت خلايا الكالس صفة التحمل (او المقاومة) ترتب عن تمايزها نباتـات قرنفـل أظهرت مقاومة لهذا الفطر (14،30) ، او ربما بسبب الزيادة في انتـاج ونـشاط انزيمـات البروكسيديز والتي قد يؤدي تراكمها في خلايا الكالس الى اكسابها صـفة المقاومـة وعنـد تمايزها كونت نباتات مقاومة للفطر (25) . ان استخدام تقنية اضافة السموم النقية او الرواشح الخام لمسببات الامراض الى اوساط نمو الكالس وادامته في العديد من الدراسات ونجاحها من الحصول على نباتات مقاومة للامراض كالطماطة (10) وفول الصويا (15) والكلاديولس (7) مما شجع على استخدام هذه الطريقة في الدراسة الحالية بهدف الحصول على نباتات قرنفـل مقاومة لمرض التعفن والذبول الوعائي.

المصادر

1. Cuellar , S. ; Bilbao, O.; Castro , C.; Nustez , C.; Rodriguez LE.;Mosquera, T. Acta Hort. 482: 291- 297 (1999) .
2. Mosquera, T.; Angarita , A.; Montes de Gomez , V. Acta Hortoic. 307:257-263. (1992) .
3. Lahden pera, ML. Acta Hort. 216:85-92. (1987) .
4. Arus, P.; Llaurado, M.; Pera , J. Acta Hort. 307 : 57-64 (1992).
5. Dodds , J.H. Robert , L.W.I. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambrifdge Univ. Press London . (1985) .
6. Abdalla , M.Y.; Motawei, M.I.; Barakat , M.N.; and Al-Rokaibah, A.A. Alex.J. Agric . Res . 47: 67-75 . (2002) .
7. Remott, P.G.; loffer , J.M.; and Vanvolten doting , L. Euphytica 96:237-245.(1997).
8. Sacristan , M.D. Thear . Appl. Genet. 16:193-200 (1982) .
9. Carlson , P. Science 180: 1366-1368 . (1973) .
10. Toyoda , H.; Tanaka, N.and Hirai , T. Ann. Phytopathol . Soc. Jap. 50:53-62. (1984) .
11. Mcphee-Kevin, K.E.;Tullu , A.; Kraft , J.M. and Muehlbauer, F.J. J.Am. Soc . Hort . Sci . Alex . 124:28-31. (1999) .
12. Binarova , P.; Nedelink, J.; Fellner , M. and Nedbalkova , B. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 22:191-196. (1990) .
13. Malepszy, S.; Elkazzaz, A. Acta Hort. 280 : 455- 458 . (1990).
14. Mosquera , T.; Rodriguez, L.E.; Bernal , C. and lopez , F. Acta Hort . 482: 309-311 . (1999) .

15. Jin, H.; Hartman , G.L.; Huang , Y.H.; Nickell , C.D. and Widholm , J. M. Phytopathology , 86: 714-718 (1996).
16. Pareek , A; Kantia , A. and kothari , S.L Indian J. of Biotechology , 3: 263-266 . (2004) .
17. Thakur , M.; Sharma , D.R. and Sharma , S.K. Plant Cell Repts. 20 : 825-828 . (2002) .
18. Byun, H. and Choi, S. Hort . Sci ., 44 : 287 – 291. (2003) .
19. Hung , S.H.; Yu , C.W. and Lin , C.H . Bot . Bull . Acad . Sci., 46 : 1-10 . (2005) .
20. Murashige , T.; Skoog , F. Physiol . Plant 15 : 473 – 479 . (1962) .
21. Pitt, J.I. and Hocking , A. D. Fungi and Food spoilage . Academic Press . Australia . (1985) .
22. النزال ، فراس حميد خضير . استحداث وتمايز كالس القرنفل *Dranthus caryophyllus* وتأثير المركبات الفينولية المستخلصة منه على فطريات الذبول الفيوزارمي . رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل. (2005) .
23. Sutherland , M. L. and Pegg, G. F. Physiol . Mol. Plant Pathol . 40 : 423 – 436 . (1992) .
24. Paker , R.A.; Tatum , J. H. and Nemec , S. Phytopathology 71 : 951 – 954 . (1981).
25. Storti , E.; Latil , C.; Salti , S.; Bettini , P.; Bogani , P.; Pellegrini , M.G.; Simeti , C. ; Monlnar , A . and Buratt . M. Theor . Appl. Genet . 84: 123-128 . (1992) .
26. الحمداني ، انسام احمد سعدون ، أنتخاب نباتات خيار *Cucumis sativus* , L مقاومة للتعفن وموت البادرات المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل (2006) .
27. Kim , Y.H. and Yoo , Y.J. Enz . Micro. Tech ., 18: 531- 535 . (1996).
28. Baayen , R.P.; Demaat , Al. Neth.J. Plant Pathol . 93:3-13. (1987) .
29. Hoque , M. I.; Hashem , R.; Khatun , M. and Sarker , R.H.C . Plant Tissue Culture . 6 : 99-106 . (1996) .
30. Arai , M; Takeuchi , M. Plant Cell and Tissue Organ Cult. 34: 287-293 . (1993).