تكوين نباتات خيار *Cucumis sativus* مقاومة للفطر *Rhizoctonia solani* من كالس الفلق والسيقان ♦

(*)أنسام أحمد سعدون

عدنان محمود عبدالله
قسم علوم الحياة / كلية التربية
جامعة الموصل

Abstract

In this study callus stimulated from cotyledons and stem explants of cucumber seedlings on MS media supplemented with 2.0 mg/L of BA and 1.0 mg/ L of NAA for cotyledons , while in stem MS media containing 1.0 mg/L from BA and NAA were used . Selection of resistant callus to the virulent strains of *Rhizoctonia solani* was examined from culture of cotyledons and stem medium contained the concentrations 1.0 , 5.0 , 10.0 , 15.0 , 20 and 25% of fungal filtrates . The best concentrations which allowed selection after three cycles (20 days / cycle) of selections were 10 and 15% . The resistant callus showed a high level of peroxidases enzymes activity . Resistance callus of cotyledons and stems were regenerated on MS medium containing 4.0 mg/L of BA and 0.1 mg/L NAA in spite of reduction of the regeneration ability of the resistant callus up to half in cotyledons and stems compared with the control plants. Regenerated stems formed roots on MS medium without grouth regulators . Cucumber plants regenerated from callus tolerating toxic filtrates exhibited resistance when infected with pathogenic fungi .

الخلاصة

استخدم الكالس المستحدث من أجزاء فلق بادرات الخيار في وسط MS الحاوي على 2.0 ملغم / لتر BA و 1.0 ملغم / لتر NAA وكالس السيقان في وسط MS المدعم بـ 1.0 ملغم / لتر لكل من BA و NAA . انتخبت قطع كالس متحملة لرواشح الفطر *R. solani* من مزارع تنمية كالس الفلق والسيقان المضاف اليهما الرواشح بتراكيز 1.0 ، 5.0 ، 10.0 ، 15.0 ، 20.0 ، 25% راشحاً فطرياً بعد ثلاثة مراحل انتخاب (20 يوماً / مرة) وخاصة عند التراكيز 10 و 15% . أبدت قطع الكالس المنتخبة زيادة في نشاط أنزيم البيروكسيديز في مستخلصها الخلوي . ادى تمايز كالس الفلق والسيقان المنتخب المقاوم لرواشح الفطر السامة في وسط MS المضاف اليه 4.0 ملغم / لتر BA و 0.1 ملغم/ لتر

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4 – 5 أيلول 2007

(*) البحث مستل من رسالة ماجستير الباحث الأول .

NAA في الحصول على مجموعة خضرية على الرغم من الانخفاض في قابلية الكالس المقاوم على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية الى النصف قياساً بمعاملة المقارنة . كما أمكن تجذير الأفرع الخضرية المتكونة في وسط MS الخالي من منظمات النمو . لوحظ وجود اختلافات في مجموعة نباتات الخيار المتمايزة من الكالس المقاوم لرواشح الفطر عن مثيلاتها نباتات المقارنة ، الا ان هذه النباتات أبدت مقاومة عند تلقيحها بالفطر الممرض .

المقدمة

استخدمت تقنية زراعة الانسجة في انتاج نباتات خالية من المسببات المرضية او مقاومة لأمراض النبات [1] . فقد انتجت نباتات الحنطة المقاومة للسم deoxynivalendol المنتج من الفطر *Fusarium graminearum* بإضافة تراكيز من السم الى الوسط الغذائي المستخدم [2] وبالطريقة ذاتها انتجت نباتات الطماطة المقاومة للسم Fusaric acid المفرز من الفطر *F.oxysporum* [3] . واشارت دراسة اخرى الى انتاج نباتات الجت المقاومة للفطر ذاته باضافة رواشح الفطر الخام الى الوسط الغذائي [4] . وظفت مزارع الكالس والمعلق الخلوي في الحصول على النباتات المقاومة ، فقد تمكنت احدى الدراسات من انتاج نباتات فول الصويا مقاومة لمرض موت البادرات بمعاملة كالس النبات برواشح الفطر *F.solani* [5] واخرى مقاومة لمرض التبقع الورقي المسبب عن الفطر *Septoria glyciuea* [6] . اشارت العديد من الدراسات الى انتاج اصناف من النباتات كالخيار [7] والرقي [8] والقرنفل [9] مقاومة لمرض التعفن والذبول المسبب عن الفطر *F.oxysporum* مع ملاحظة قلة الدراسات في الحصول على نباتات خيار مقاومة لمرض التعفن وسقوط البادرات المسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* وعلى الرغم من استخدام طرائق التربية وتحسين النبات بهدف الحصول على اصناف نباتية مقاومة الا انها تحتاج الى مدة زمنية طويلة فضلاً عن صعوبتها ، تعد مجموعة انزيمات البيروكسيديز من انزيمات الاكسدة والاختزال ويكمن نشاطها في اختزال تراكيز بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 السامة المتراكمة في الخلايا النباتية نتيجة تعرضها لجهد خارجي كأمراض النبات [10] اشارت الدراسات الى امكانية اعتماد هذه الانزيمات مؤشراً لامتلاك النبات صفة التحمل او المقاومة [11] . وعليه تهدف الدراسة الحالية الى الافادة من تقانة الزراعة النسيجية في الحصول على نباتات خيار مقاومة للفطر *R.solani* .

مواد العمل وطرائقه

عزل الفطر واستخلاص رواشحه الخام

عزل فطر *Rhizoctonia solani* من نباتات خيار مصابة بمرض التعفن وموت البادرات . نقي باتباع تقنية قمة الهايفا Hyphal Tip Technique وذلك باحاطة مستعمرة فطرية صغيرة نامية في طبق بتري بحلقة زجاجية معقمة قطر 1.2 سم والاستمرار بتحضينها ومراقبة نموها حتى وصول الهايفا الطرفية للفطر الى سطح الحلقة الزجاجية ، عندها استخدمت عدسة مكبرة لقطع اجزاء من نهايات هذه الهايفات ونقلها بعناية الى وسط Potato-Sucrose.Agar (PSA) [12] . اتبعت الطريقة القياسية لاستخلاص الرواشح الفطرية السامة [13] . نمي الفطر على الوسط الغذائي السائل Paker [14] . وزع الوسط في دوارق زجاجية حجم 250 مل (50 مل / دورق) ولقح محتوى كل دورق بقرصين من المزرعة الفطرية النامية على وسط PSA قطر 1 سم بعمر 7 أيام . حضنت الدوارق عند درجة حرارة 27 ± 2°م ولمدة 20 يوماً وبدون تحريك . رشحت محتويات الدوارق من خلال اوراق الترشيح Watman No. 1 ثم اجرى النبذ المركزي للراشح عند 4°م وسرعة 3000 دورة / دقيقة ولمدة 15 دقيقة للتخلص من الغزل الفطري وبقايا الاجسام الحجرية للفطر . رشحت المفرزات مرة أخرى باستخدام Milipor filter (0.2µm) ثم حفظت الرواشح في قناني زجاجية عند – 10°م لحين الاستخدام .

استحداث مزارع كالس الفلق والسيقان وادامتها .

زرعت اجزاء الفلق المعقمة والمستأصلة من بادرات الخيار المعقمة سطحياً ، واجزاء السيقان المأخوذة من البادرات السليمة بعمر 12 يوماً والنامية في الوسط MS [15] الصلب الخالي من منظمات النمو في دوارق زجاجية سعة 100 مل احتوت على وسط MS الصلب المضاف اليه تراكيز 0.5– 3.0 ملغم / لتر من الاوكسينات Naphthalene acetic acid (NAA) أو 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ومتداخلة مع التراكيز نفسها من السايتوكاينينات Benzyladenine (BA) ، حضنت العينات في غرفة النمو عند درجة 25 ± 2°م وشدة اضاءة 1500 لوكس ونظام تعاقبي 16 ساعة ضوء / 8 ساعات ظلام . أديم نمو كالس الفلق على أفضل وسط لاستحداثه ونموه (MS + 2.0 ملغم / لتر BA + 1.0 ملغم / لتر NAA) . في حين زرعت قطع السيقان في الوسط MS المحتوي تراكيز 0.5 – 2.0 ملغم / لتر من BA ومتداخلة مع التراكيز ذاتها من NAA و 2,4-D ، أديم كالس السيقان على الوسط (MS + 1.0 ملغم / لتر BA + 1.0 ملغم / لتر NAA .

قطع الكالس الى اجزاء بوزن 1 غم تقريباً وزرعت على الوسط الجديد بواقع قطعة واحدة / دورق / 30 مل من الوسط واعيدت الزراعة كل 30-35 يوماً .

معاملة كالس الفلق والسيقان برواشح الفطر وعزل المتحمل منه

أتبعت الطريقة المباشرة والسريعة في انتخاب الكالس المقاوم [9] أضيفت الرواشح المعقمة بالترشيح بتراكيز 1.0 ، 5.0 ، 10.0 ، 15.0 ، 20.0 ، 25.0 % (حجم : حجم) الى اوساط استحداث وادامة كالس الفلق والسيقان بعد تعقيمه وتبريده الى درجة 50°م تقريباً ، وزع الوسط الحاوي على الراشح في اطباق بتري زجاجية قطر 9 سم بمعدل 25 مل / طبق. وضعت 10 قطع من الكالس بعمر 35 يوماً بوزن 1.0 غم / طبق تقريباً على الوسط . حضنت العينات بظروف التعاقب الضوئي نفسها لمدة 25 يوماً ، نقلت قطع الكالس الحية عند تركيز الراشح 10% الى وسط جديد يحتوي على الراشح بتركيز 11% وحضنت لمدة 20 يوماً . بعدها نقلت قطع الكالس الحية الى تركيز 12% وحضنت للمدة ذاتها . ولترسيخ صفة التحمل لدى قطع الكالس الحية تم اعادة زراعتها ثلاث مرات متتالية بمعدل 20 يوماً / مرة على نفس الوسط . تم اكثار وادامة الكالس المنتخب المقاوم لرواشح الفطر بنقله الى دوارق حجم 100 مل احتوت 30 مل من الاوساط الصلبة المستخدمة لاستحداث الكالس من الفلق والسيقان والمحتوية على الرواشح المعقمة تركيز 12% مل من الوسط وبمعدل 2 قطعة / دورق واعيدت زراعة الكالس كل 35 يوماً على الاوساط ذاتها .

قياس فاعلية انزيم البيروكسيديز في الكالس المقاوم

جهز المستخلص الخلوي الرائق لخلايا الكالس المقاوم لرواشح الفطر حسب الطريقة المبينة في [16].اعتمدت الطريقة اللونية(Colorometric Method)لقياس نشاط انزيم البيروكسيديز في المستخلص الخام لخلايا الكالس المقاوم[17].حضر مزيج التفاعل المكون من 1 ml (0.1 M of Sodium Phosphate buffer , pH 6.0) + 1 ml (15 mM of Guaiacol) + 1 ml (13 mM of H_2O_2) .

بعدها يضاف للمزيج (0.05) مل من المستخلص الخام للانزيم ، يمزج سريعاً وتقاس شدة الامتصاصية الضوئية بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند الطول الموجي 470 نانوميتر ودرجة حرارة 30°م . كما حضر كفء الكواشف (Blank) باضافة 0.05 مل ماء مقطر بدلاً من الراشح الانزيمي .

انتاج النباتات الكاملة من تمايز الكالس المعامل برواشح الفطر

اختبر وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من NAA ومتداخلة مع تراكيز من BA في تشجيع كالس الفلق والسيقان على تكوين الأفرع الخضرية . نقلت قطع الكالس

المقاوم لرواشح الفطر بوزن 1.0 غم تقريباً / قطعة وبعمر 35 يوماً الى دوارق حجم 100 مل احتوت 30 مل من افضل وسط للتمايز والمكون من (MS + 0.1 ملغم/لتر NAA + 4.0 ملغم / لتر BA) بمعدل قطعتين / دورق وحضنت في ظروف التعاقب الضوئي نفسها. استخدم الوسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو لتحفيز الأفرع الخضرية على تكوين الجذور ، اذ استأصلت الأفرع المتكونة من كالس الفلق والسيقان المعامل وغير المعامل بالرواشح وازيلت عنها بقايا الوسط الغذائي مع احداث خدوش عند قاعدة الفرع الخضري بوساطة مشرط حاد معقم ونقلت الى دوارق زجاجية احتوت 30 مل من الوسط وحضنت العينات في ظروف التعاقب الضوئي . ازيلت النباتات ذات المجموعة الجذرية المناسبة من الوسط الغذائي بعناية وغسلت جذورها بالماء جيداً لتخليصها من الوسط العالق بها. غرست النباتات في سنادين بلاستيكية سعة 2 كغم احتوت مزيج التربة والبتموس بنسبة 2:1 حجم : حجم المعقمين بالمؤصدة وغطيت النباتات باغطية بلاستيكية شفافة ومثقبة وتركت في غرفة النمو ونظام التعاقب الضوئي لمدة سبعة ايام. بعدها نقلت الى منطقة ذات اضاءة مناسبة وبظروف المختبر لمدة 5 أيام ثم رفعت الاغطية البلاستيكية وتمت العناية بالنباتات .

اختبار تحمل النباتات الناتجة من الكالس للتلقيح بالفطر *R. solani*

اتبعت طريقة [18] إذ جهز اللقاح الفطري بغسل كمية من بذور الشعير بالماء الجاري . وضعت البذور في اطباق بتري قطر 9 سم احتوت ورقتي ترشيح وبمعدل 50 بذرة / طبق مع كمية من الماء . عقمت الاطباق بالمؤصدة ثم لقحت بذور كل طبق بثلاثة اقراص قطر 0.5 سم من مزرعة فطرية حديثة نامية في وسط PSA ، حضنت الاطباق عند درجة حرارة 27 ± 2° م وبظروف الظلام حتى أحيطت البذور وغلفت كلياً بالفطر ولمدة 10 ايام . لوثت تربة السنادين بالفطر بوضع 15 بذرة / سندانة في التربة القريبة من السطح وتركت 10 أيام لتأقلم الفطر وانتشاره . وبعد ثبات وتأقلم النباتات الناتجة من الكالس المعامل وغير المعامل بالراشح لظروف التربة ، تم تلقيحها بإزالة كمية من تربة السنادين بعمق 2 سم من المنطقة السطحية واستبدلت بالتربة الملقحة بالفطر مع احداث ثقوب صغيرة بوساطة ابرة معقمة في اسفل الساق . تركت النباتات تحت المشاهدة مع السقي وحسب الحاجة .

النتائج

أظهرت نتائج زراعة قطع الفلق على اوساط الاستحداث ان لقطع الفلق درجة استجابة جيدة لتكوين الكالس في معظم الاوساط المستخدمة وبلغت 68% وكان أفضلها الوسط (MS + 2.0 ملغم/لتر BA + 1.0 ملغم / لتر NAA) ، حيث بلغت نسبة الاستحداث 100% . في حين أبدت قطع السيقان استجابة على نحو اقل من الفلق في استحداثها للكالس على جميع الاوساط بنسبة 57% وكانت نسبة الاستحداث في الوسط (MS + 1.0 ملغم/لتر BA + 1.0 ملغم / لتر NAA) 100% اعتمدت هذه الاوساط لاكثار وادامة كالس الفلق والسيقان على

التوالي واهملت الاوساط الاخرى اما لطول الفترة الزمنية اللازمة لاستحداث الكالس عليها او تشجيعها على تكوين الجذور من الكالس او لصلابة الكالس المتكون كما في الاوساط الحاوية على 2,4-D .

تكوين المجاميع الخضرية من كالس الفلق والسيقان

اظهرت نتائج الاختبارات قابلية كالس الفلق على تكوين الافرع الخضرية في معظم اوساط التمايز المختبرة ، والمتكونة من الوسط MS المدعم بتراكيز 0-1.0 ملغم / لتر من NAA ومتداخلة مع تراكيز 1.0-4.0 ملغم / لتر BA وبلغت نسبة الافرع الخضرية لكالس الفلق في جميع الا وساط 138.2% وتفوق الوسط المتكون من MS + 4.0 ملغم / لترBA + 0.1 ملغم / تر NAA باعطائه نسبة تمايز 350% . واشارت النتائج الى ضعف قابلية كالس السيقان على التميز وتكوين الأفرع الخضرية مقارنة بكالس الفلق (الجدول1) .

الجدول (1) تكوين المجاميع الخضرية من كالس الفلق والسيقان لبادرات الخيار في وسط MS المدعم بتراكيز متداخلة من (NAA , BA) .

مزارع الكالس	العدد الكلي لقطع الكالس المستخدمة	العدد الكلي للأفرع الخضرية	تكوين الأفرع الخضرية (%)	المدة الزمنية (يوم)
الفلق	128	177	138.2	35-25
السيقان	128	88	68.7	40-30

تجذير الافرع الخضرية الناتجة

اظهرت الافرع الخضرية المتكونة من كالس الفلق والسيقان قابلية على التجذير في وسط MS الخالي من منظمات النمو ، إذ بلغت نسبة التجذير في الافرع الخضرية لكالس الفلق 90 % في حين كانت 78% في كالس السيقان (الجدول 2) .

الجدول (2) قابلية تجذير الافرع الخضرية الناتجة من كالس الفلق والسيقان لبادرات الخيار في وسط MS الخالي من منظمات النمو .

منشأ الأفرع الخضرية	عدد الافرع الخضرية المنقولة	عدد الافرع الخضرية المكونة للجذور	التجذير %
كالس الفلق	52	47	90
كالس السيقان	37	29	78

انتخاب الكالس المتحمل لرواشح الفطر من مزارع كالس الفلق والسيقان لباردات الخيار

تظهر نتائج الجدول (3) زيادة في أوزان قطع كالس الفلق المزروعة على وسط الادامة (MS + 2.0 ملغم / لتر BA + 1.0 ملغم / لتر NAA) واوزان قطع كالس السيقان النامية على الوسط (MS + 1.0 ملغم / لتر BA + 1.0 ملغم / لتر NAA) المحتوي على تراكيز 1.0 % راشح فطري . ثم بدأ التأثير التثبيطي للراشح بدلالة انخفاض اوزان قطع الكالس مع زيادة تراكيز الراشح في الوسط الغذائي . وقد ظهر التأثير بشكل واضح ابتداءً من التركيز 10% راشح فطري إذ انخفضت قابلية الكالس على النمو والزيادة في الحجم بدلالة انخفاض اوزان قطع الكالس استناداً الى معاملة المقارنة فضلاً عن اكتسابها لوناً بنياً . وقد عززت قابلية التحمل لهذه القطع بنقلها الى تراكيز 11 % ثم 12% راشح فطري . وقد اعتمد هذا التركيز فقط في عملية انتخاب قطع الكالس المتحمل ، واستبعدت التراكيز المنخفضة (1-5 %) من عملية الانتخاب لتأثيرها الضعيف في نمو الكالس ، وكذلك التراكيز 15-25% بسبب موت جميع قطع الكالس المعاملة بها بدلالة توقف نموها وانخفاض اوزانها واكتسابها اللون البني المسود .

الجدول (3) انتخاب الكالس المتحمل من مزارع كالس فلق وسيقان الخيار الحاوية على رواشح الفطر *R.solani* المعقمة بالترشيح (بدلالة وزن الكالس/ غم) بعد 25 يوماً من المعاملة .

مصدر الكالس	وزن الكالس قبل المعاملة (غم)	معدل وزن قطع الكالس (غم) *						
		تراكيز رواشح الفطر (%)						
		0	1.0	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0
الفلق	0.845	2.21	2.37	1.018	0.763	0.512	0.492	0.481
السيقان	0.782	1.950	2.033	0.821	0.695	0.489	0.467	0.451

* معدل 10 قطع / معاملة .

تحديد فاعلية نشاط انزيم البيروكسيديز .

تبين من نتائج الاختبار الشكل (1) أن الكالس المقاوم لتراكيز مختلفة من رواشح الفطر السامة اظهر نشاطاً متبايناً لانزيم البيروكسيديز إذ لوحظ زيادة في نشاط انزيم البيروكسيديز في مستخلص الكالس مع زيادة تراكيز رواشح الفطر في الوسط الغذائي ، وكان اعلى نشاط معبراً عنه بشدة الامتصاصية عند الطول الموجي 470 نانوميتر في مستخلص الكالس المعامل بـ 15% راشح فطري ، مع انخفاض فاعلية الانزيم في عينات الكالس المعامل بتراكيز 20 و 25% .

تكوين النباتات من كالس الفلق والسيقان المتحمل لرواشح الفطر ونقلها الى التربة

اعتمد الوسط MS + 4.0 ملغم / لتر BA + 1.0 ملغم / لتر NAA الصلب لتمايز وتكوين الأفرع الخضرية من كالس الفلق (الشكل A-2) وكالس السيقان (الشكل B-2) المتحمل لرواشح الفطر . يتضح من نتائج الجدول (4) التأثير المثبط لرواشح الفطر في قابلية الكالس على التمايز . إذ انخفضت نسبة اعداد الافرع الخضرية الناتجة من كالس الفلق والسيقان المتحمل الى 135 و 70% قياساً بعينة المقارنة غير المعامل بالراشح 310 و 140% على التوالي . وكانت المدة الزمنية اللازمة لتكوين الأفرع الخضرية من الكالس المتحمل 45 – 60 يوماً وهي أطول نسبياً من الفترة الزمنية في حالة المقارنة 30–40 يوماً . وكانت الأفرع الناتجة من الكالس المتحمل بطيئة في نموها .

الجدول(4) تكوين الافرع الخضرية من الكالس المتحمل لرواشح الفطر *R. solani* المشتق من فلق وسيقان بادرات الخيار في وسط التمايز بعد 50 يوماً .

مصدر الكالس	المعاملة	العدد الكلي للقطع المستخدمة	العدد الكلي للأفرع الخضرية المتكونة	تكوين الأفرع الخضرية (%)
الفلق	مقارنة *	10	31	310
	متحمل **	20	27	135
السيقان	مقارنة	10	14	140
	متحمل	23	16	70

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

وأظهرت الافرع الخضرية الناتجة من كالس الفلق والسيقان المتحمل لرواشح الفطر كفاءة جيدة على التجذير في الوسط MS الخالي من منظمات النمو . ولم تلاحظ فروقات كبيرة في نسبة تجذير الإفرع الخضرية الناشئة من كلا نوعي الكالس الفلق والسيقان والبالغة 90 و77 % على التوالي وكذلك مع مثيلاتها عينة المقارنة (الجدول 5) نقلت الافرع الخضرية المتكونة بطول 4–7 سم والحاوية على 5–8 أوراق (الشكل C-2) الى وسط التجذير ، وتكونت الجذور بعد 5–10 أيام من نقلها (الشكل D-2) وتمكن عدد من هذه النباتات المتكونة من التأقلم لظروف البيئة عند نقلها الى التربة .

الجدول (5) تجذير الافرع الخضرية الناتجة من كالس فلق وسيقان بادرات الخيار المتحمل لرواشح الفطر *R.solani* .

مصدر الأفرع الخضرية	معاملة الكالس	عدد الأفرع المنقولة	التجذير (%)	مجموع النباتات المنقولة الى التربة
كالس الفلق	مقارنة	5	100	5
	متحمل	20	90	11
كالس السيقان	مقارنة	5	80	3
	متحمل	13	77	7

اختبار القدرة الامراضية للكشف عن مقاومة نباتات الخيار الناتجة من الكالس المتحمل للاصابة بالفطر *R.solani* .

اظهرت نتائج الاختبار والتي تمت بتلقيح التربة التي نمت فيها مجموعة النباتات الناتجة من الكالس المتحمل بالفطر الممرض ، قدرة عدد من هذه النباتات الملقحة مقاومة الفطر وبقاءها سليمة ، وكانت النباتات المقاومة للاصابة بطيئة في نموها مقارنة بالنباتات الناتجة من الكالس غير المعامل وتلك الناتجة من البذور .

مقارنة النباتات المقاومة لفطر *R.solani* والناتجة من الكالس والبذور .

توضح نتائج الجدول (6) وجود بعض الفروقات بين مجموعة النباتات المقاومة للفطر (الشكل E-2) ونباتات المقارنة (الشكل F-2) إذ لوحظ انخفاض واضح في صفات (ارتفاع النبات وعدد الاوراق وعدد الأفرع) في النباتات المقاومة ولم يلاحظ اختلافات ملموسة في صفة عدد الازهار باستثناء التزهير المبكر في النباتات المقاومة ولم تتكون أي ثمرة من جميع النباتات المتكونة .

الجدول (6) مقارنة الصفات المظهرية بين النباتات المقاومة والناتجة من الكالس المقاوم للفطر *R.solani* والنباتات الناتجة من الكالس ومن بذور الخيار .

الصفات المدروسة	مصدر النباتات		
	البذور	كالس غير معامل	كالس مقاوم للراشح
معدل ارتفاع النبات (سم)	* 29.0	16.5	14.0
معدل عدد الأفرع / نبات	2.5	2.4	1.6
معدل عدد الاوراق / نبات	12.0	11.3	5.2
معدل عدد الازهار / نبات	1.5	1.5	1.2

* القيم تمثل معدل 6 نباتات لكل معاملة

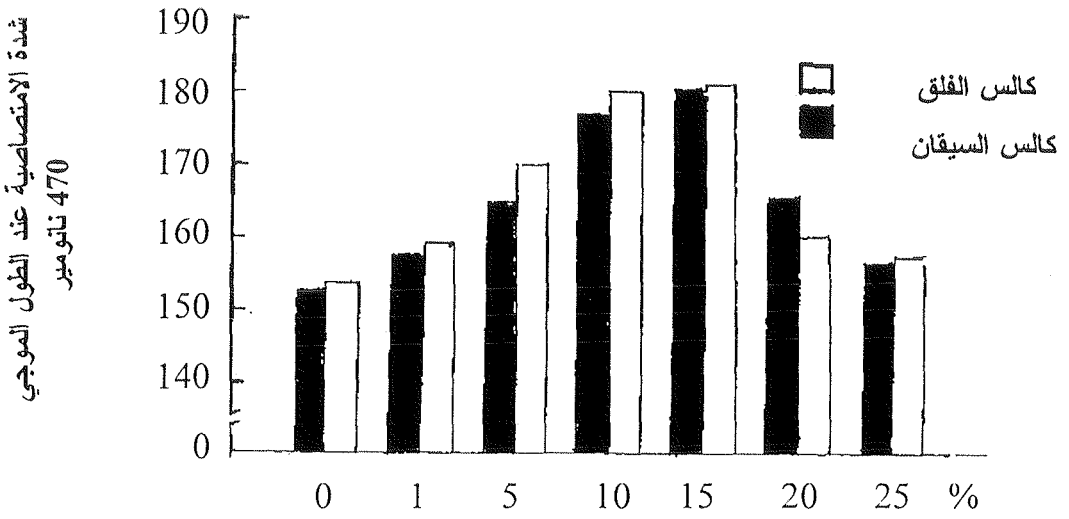
المناقشة

ان الاستجابة المشجعة لاجزاء فلق وسيقان بادرات الخيار لتقانة زراعة الانسجة قد تعزى وبالذات في حالة الفلق الى النمط الوراثي لخلايا الكالس او ربما الى الاختلافات في نوعية الانسجة النباتية والتوافق في محتواها الداخلي من منظمات النمو وما مضاف منها الى الوسط الغذائي فضلاً عن عدد الخلايا الموجودة التي لها القابلية على الانقسام والتمايز . ذكرت العديد من الدراسات التي أجريت على نبات الخيار نتائج مقاربة لما ذكر [7 ، 19] . أشارت العديد من الدراسات الى وجود تقارب كبير بين سلوك كالس نبات الخيار من حيث تأثرها وحساسيتها للسموم النقية او لرواشح الفطريات الخام من جهة وما تظهره النباتات الناتجة من تمايز الكالس المقاوم للراشح من حساسية عند تلقيحها بالفطر الممرض [20] . ولتعزيز صفة التحمل لدى خلايا الكالس المقاوم والمنتخب عند التركيز 10% راشح فطري ، فقد تطلب وكما اشارت العديد من الدراسات الى اهمية رفع تركيز الراشح التدريجي وادامة الكالس بشكل مستمر في الوسط المحتوي على اعلى تركيز تحمله الكالس للحفاظ على قابلية الكالس على النمو في ظروف التأثير المستمر للراشح [2،9] ان الزيادة في نشاط انزيم البيروكسيدير في مستخلص خلايا الكالس المتحمل والمتناسب مع تراكيز رواشح الفطر في الوسط الغذائي يؤيد ملاءمة استخدام هذا العامل بوصفه مؤشراً لاكتساب الخلايا والنبات صفة التحمل او المقاومة، ولوحظت نتائج مشابهة لما ذكر في دراسة على نبات الخيار [11]. ان الكفاءة الجيدة لكالس الفلق والسيقان المقاوم على التمايز والبالغة 135 و 70% على التوالي، تعد نسبة مشجعة قياساً بنتائج دراسات مشابهة [7 ، 19] بالرغم من تباينها عن قابلية التمايز في عينات المقارنة ، وقد يعزى سبب هذه الاختلافات الى تأثير المركبات السامة الموجودة بالراشح وتثبيطها لقابلية خلايا الكالس على الانقسام والتميز او بسبب أثر هذه المواد في الاخلال بنشاط العمليات الايضية الضرورية لعملية الانقسام والتمايز [4 ، 9] لوحظت نتائج مشابهة في تمايز كالس الخيار [7 و 20] او القرنفل [9] . وعلى الرغم من عدم وجود اختلافات مظهرية كبيرة بين نباتات الخيار الناتجة من الكالس المقاوم ونباتات المقارنة، الا انها ابدت مقاومة عند تلقيحها بالفطر الممرض ، وقد تعزى هذه المقاومة الى انتاج مجموعة خلاياه المقاومة عدد من المركبات الفينولية والسكريات المتعددة وانزيمات البيروكسيديز والتي اكسبت خلايا الكالس صفة التحمل ترتب عن تمايزها نباتات خيار مقاومة للفطر [21] .

ان التقدم الذي حققته العديد من الدراسات باستخدام تقنية اضافة السموم النقية او الرواشح لمسببات الامراض في الحصول على العديد من النباتات المقاومة مما شجع على استخدام هذه الطريقة في الدراسة الحالية بهدف الحصول على نباتات خيار مقاومة لمرض التعفن وموت البادرات المسبب عن الفطر *R. solani*.

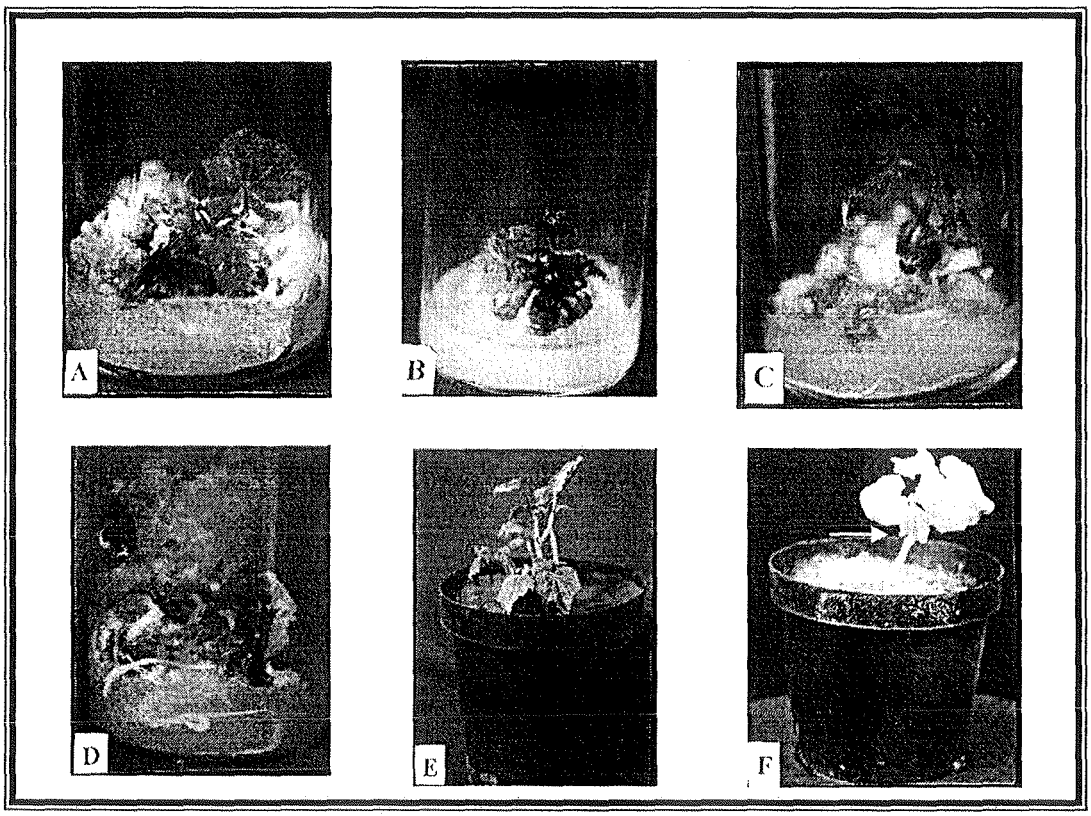
المصادر

1. Dodds , J.H. Robert , L.W.I. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambrifdge Univ. Press London . (1985) .
2. Abdulla , M.Y.; Motawei, M.I.; Barakat , M.N. and Al-Rokaibah, A.A. Alex.J. Agric . Res . 47: 67-75 . (2002) .
3. Toyoda , H.; Hayashi , H.; Yamamoto , K. and Hirai , T., Ann. Phytopathol. Soc. Jap. 50: 538-540 . (1984) .
4. Arcioni, S.;' Pezzotti, M. and Daminani, F. theor . Appl. Genet. 74 : 700-705 (1987) .
5. Jin, H.; Hartman , G.L.; Huang , Y.H.; Nickell , C.D. and Widholm , J. M. Phytopathology , 86: 714-718 (1996).
6. Sony, H.S.; Lim , S.M. and Widholm, J.M. phytopathology , 84: 948-951 . (1994) .
7. El-kazzaz, A.A. and Malepszy, S. Acta Hort ., 284 : 1`21-130 (1992) .
8. Compton, M.E.; Gray , D.J. and Gaba , V.P. plant Cell . Tiss . Org . Cult., 77:231-243 . (2004) .
9. Thakur , M.; Sharma , D.R. and Sharma , S.K. Plant Cell Repts. 20 : 825-828 . (2002) .
10. Byun, H. and Choi, S. Hort . Sci ., 44 : 287 – 291. (2003) .
11. Hung , S. H.; Yu , C.W. and Lin , C.H. Bot. Bull . Acad. Sci., 46: 1-10.; (2005) .
12. وصفي ، عماد الدين . اساسيات امراض النبات والتقنية الحيوية ، المكتبة الاكاديمية ، جامعة الاسكندرية ، مصر . (1993)
13. Sutherland , M. L. and Pegg, G. F. Physiol . Mol. Plant Pathol . 40 : 423 – 436 . (1992) .
14. Paker , R.A.; Tatum , J. H. and Nemec , S. Phytopathology 71 : 951 – 954 . (1981).
15. Murashige , T.; Skoog , F. Physiol . Plant 15 : 473 – 479 . (1962) .
16. الكاتب ، مرا أسامة احمد . استخلاص وتنقية وتقدير فعالية انزيمي البيروكسيديز واليوريز من كالس نبات الفاصوليا . رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل . (1999) .
17. Kim , Y.H. and Yoo , Y.J. Enz . Micro. Tech ., 18: 531- 535 . (1996).
18. Acharya , S. N. Verma, P.R.; Duech, J. and Downey , R.K. Can . Plant Pathol. 6: 325-328 n. (1984) .
19. Ahmed , N . and Anis , M. Yurk . Bot., 29 : 237-240 . (2005) .
20. Malepsdzy, S. and El-kazzaz , Acta Hort., 280: 455-358 . (1990) .
21. Dalisay , R.F. and Kuc, J.A. Physiol . Mol. Plant Pathol., 47: 315-327 . (1995) .



تراكيز راشح الفطر المعقم بالفرز الغشائي في الوسط الغذائي

الشكل (1) فاعلية انزيم البيروكسيديز في المستخلص الخلوي لكالس الفلق والسيقان لنبات الخيار المعامل بتراكيز مختلفة من رواشح الفطر *R. solani*



الشكل (2) تكوين نباتات الخيار المقاومة الناتجة من كالس الفلق والسيقان المقاومين لرواشح الفطر *R. solani*

A. تمايز كالس الفلق المقاوم لرواشح الفطر في وسط (MS + 4.0 ملغم / لتر BA + 1.0 ملغم / لتر NAA) . B. تمايز كالس السيقان المقاوم لرواشح الفطر في الوسط نفسه . C .فرع خضري بطول (4-7) سم يحتوي على 5-8 اوراق ناتج من تمايز كالس الفلق المقاوم لرواشح الفطر مهيأ للازالة والتجذير . D. تجذير الافرع الخضرية من(A و B) في وسط MS الخالي من منظمات النمو . E . نبات الخيار الناتج من تمايز الكالس غير المعامل بالراشح بعد نقله الى التربة (المقارنة).F . نبات الخيار الناتج من الكالس المقاوم للراشح بعد نقله الى التربة . يلاحظ الازهار المبكر(الجزء المؤشر) .