مقاومة كالس العصفر *Carthamus tinctorius* L. والافرع الناشئة منه للشد الملحي (1)

ازهار ذنون ادريس
قاسم محمود الحمداني
قسم المحاصيل الحقلية / كلية الزراعة والغابات/ جامعة الموصل

Email:

الخلاصة

طبقت الدراسة في سنة 2013-2014 في مختبر زراعة الانسجة لقسم المحاصيل الحقلية/ كلية الزراعة والغابات/ جامعة الموصل لغرض انتاج كالس ونباتات مقاومة للملوحة، اظهرت النتائج قابلية استحداث كالس الاوراق من نبات العصفر (*Carthamus tinctorius* L.) بنسبة عالية بلغت 100% عند تواجد الـ 2,4-D لوحده أو متداخلا مع الـ BA في وسط MS المدعم بمستويات ملح كلوريد الصوديوم (0.05 و 0.1 و 0.2 مولاري) عدا التركيز (0.3 مولر) الذي خفض نسبة الاستحداث معنوياً. نتائج تقدير البرولين المتجمع في كالس الاوراق كمؤشر على مقاومة الملوحة اظهرت ارتفاع محتوى البرولين بشكل كبير في كافة مستويات الملوحة المستخدمة (0.05-3.0 مولاري) لأكثر من 30 مايكروغرام/غرام وزن طري، مقابل 2.3 و 2.8 مايكروغرام/غم وزن طري في معاملة المقارنة بعد 4 و 8 اسابيع من المعاملة على التوالي أي بمقدار أكثر من 10 اضعاف وجوده في المقارنة.

وبينت نتائج مقاومة الملوحة ان الافرع الناشئة من كالس طرف الساق والأوراق أظهرت مقاومتها للملوحة بعد أربعة أسابيع من نقل الأفرع إلى وسط النمو والتضاعف المزود بملح كلوريد الصوديوم واستطاعت من النمو وأظهرت تحملها للوسط المحتوي على 0.2 مولاري من NaCl، ولم يلاحظ أي فروقات معنوية لعدد الأفرع خلال الاسابيع الاربعة على الوسط الملحي (0.1 مولاري)، وتميزت الأفرع الناشئة من كالس الأوراق بتحملها للملوحة فلم يختلف عدد الأفرع معنوياً على جميع الأوساط من (0.0-0.2 مولاري) وأظهرت مقاومة مستمرة لمدة أربعة أسابيع. نتائج تداخل الملح مع الجزء النباتي اظهرت أن أفرع كالس الأوراق كانت أكثر تحملاً للملوحة من الأفرع الناشئة من كالس طرف الساق بزيادة الملوحة حيث لم يتأثر عدد الأفرع لكالس الأوراق معنوياً بزيادة التركيز. وأظهر تأثير الوقت أنه لم يكن معنوياً في خفض عدد الأفرع في الجزئين النباتيين، كما لوحظ وجود زيادة في طول الأفرع الناشئة من كل من طرف الساق والأوراق في أوساط الملوحة المستخدمة كافة وقد أكد ذلك تداخل الفترة الزمنية هذه الزيادة مما يشير الى اكتساب الأفرع مقاومة للشد الملحي.

الكلمات المفتاحية:

تاريخ تسليم البحث: 2018/2/21، تاريخ القبول: 2019/5/16

المقدمة

ان المحاولات لتطوير قابلية مقاومة النباتات للشد يعتبر ذو اهمية كبيرة لزيادة انتاج المحاصيل. حيث يمكن الحصول على نباتات متحملة للملوحة باستخدام ملح كلوريد الصوديوم كعامل انتخابي في الاوساط المحتوية على اجزاء نباتية، الاجزاء القادرة على تحمل العوامل المنتخبة سوف تبقى حية وتنمو بشكل فعال وتعتبر خلاياها مقاومة لعوامل الانتخاب، تؤخذ لاعادة تكاثرها لاحقا لتكوين نباتات منها تعمل بقدرتها الذاتية على مقاومة الملوحة (Mahmood وآخرون 2012؛ Ashraf و Harris، 2004). ان الملوحة الان اصبحت واسعة الانتشار في مناطق عديدة من العالم وقد تسبب ملوحة خطيرة وجدية لاكثر من 50% من الاراضي المزروعة ضمن حدود سنوات 2050 (Wang وآخرون 2003). لذا فان استخدام عوامل محفزة لمقاومة النبات للملوحة يعتبر واحد من افضل الطرق الكفوة في استثمار وزيادة كفاءة العديد من الهكتارات في الترب الملحية والترب الجافة وشبه الجافة في العالم، وتعتبر تقنية زراعة الانسجة من احدث الادوات العملية لتطوير نباتات مقاومة للجفاف والملوحة، هذه التقنية يمكن ان تدار تحت ظروف مسيطر عليها من مساحة ووقت محدد (Kelley و Sakhanokho، 2009) ولها امكانية اختيار مختلف ضغوط الشد وباقل كلفة

(1) البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

ختبرية. النباتات تحت الشد الملحي تطور اليات بايوكيميائية وجزئية للحماية وقد أوضح Rai وآخرون (2011) ان الليات البايوكيميائية الرئيسية تشمل كل من :

1- تحفيز الانزيمات المضادة للاكسدة 1-Induction of antioxidative enzymes

2- تحفيز الاتزان الايوني 2-induction of ion homeostasis

3- بناء مواد مذابة عضوية منسجمة 3-Synthesis of compatible organic solutes

هذه الليات تسمح لها في التكيف وتضمن لها ضبط وتعديل الازموزية عن طريق تجمع المواد المذابة مثل البرولين والكلايسين (Ghoulam وآخرون، 2001 و Lu وآخرون 2007 ، He وآخرون 2009). واثناء التعرض للملوحة يحفز شد تأكسدي ينشأ عنه عدد من اشكال التفاعلات الاوكسجينية (Ros) السامة خلويا مما يحفز جسيمات البيروكسيسوم على تحطيم الايض الطبيعي خلال عمليات الاكسدة فيلحق ضررا بالليدات والبروتينات والاحماض النووية (Foyer و Noctor ، 2005 و Demiral و Turkan ، 2009). وينتج عنها الجذور الحرة مثل اصول السوبر اوكسايد (O_2^-) ، بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2)، جذر الهيدروكسيل (OH^+)، الاوكسجين المفرد (1O_2). واثناء تحرر هذه الاشكال فان الخلايا النباتية تطور نظام دفاعي معقد من مضادات الاكسدة باشكال انزيمية مثل (SOD) Superoxide dismutase enzyme ، Ascorbate ، peroxidase (APX) ، peroxidase (GPX) ، Glutathione reductase (GR) ، Catalase (CAT) ... الخ و باشكال غير انزيمية مثل مركبات (Ascorbate ، Glutathione ، α -tocopherol ، carotenoids ، Flavonoids .. الخ) لحماية نفسها من الشد الملحي (Hossain وآخرون، 2007 ، Turkan و Demiral ، 2009).

كما ان الملوحة تسبب اجهادات ايونية ناتجة من تغير نسب Na^+/K^+ يقود الى زيادة تركيز ايون الصوديوم Na^+ و Cl^- بالخلايا والذي يعتبر ضار للنبات ، لذلك فان النباتات تحافظ على نسبة مرتفعة من البوتاسيوم (Na^+/K^+) في سايتوبلازم خلاياها من خلال تحفيز التفاعلات المؤدية الى زيادة تركيز ايون الهيدروجين ليتبادل مع K^+ والذي يعتبر المفتاح لنمو النبات تحت التركيز العالي من الملح (Yamaguchi و Blumwald، 2005).

المواد وطرائق العمل

اولا : - تحضير اوساط الزراعة وانتاج البادرات المعقمة :

أهم الاوساط المستخدمة هو وسط MS (Murashige و Skoog، 1962) والذي حضر باذابة المكونات الداخلة في تركيبه (ملحق 1) إذابة تامة في حجم من الماء المقطر وأضيف الاكار بمقدار 7 غم/لتر لتصليب الوسط واضيف السكر (30غم/لتر) الى الوسط وضبط الرقم الهيدروجيني pH في حدود 5.8-5.9 ، وعقم الوسط الغذائي بعد إضافة منظّمات النمو باستخدام جهاز الضغط البخاري Autoclave عند درجة حرارة 121م وضغط 1,04 كغم/سم² لمدة 10-15 دقيقة حسب حجم الوسط الغذائي وقد اعتمد هذا الوسط في انتاج الكالس وتمايظه بعد تعديل مكوناته من منظّمات النمو.

وتم تعقيم البذور لانتاج البادرات المعقمة باستخدام القاصر التجاري Fas الحاوي على 6% من هايپوكلورايت الصوديوم NaOCl في تعقيم بذور العصفور بحجم 1 ماء : 1 معقم (أي بتركيز 3%) لمدة 10-15 دقيقة ، ثم غسلت البذور بالماء المعقم ثلاث مرات (5 دقائق/مرة) لإزالة آثار المادة المعقمة ثم نشرت البذور على ورق ترشيع معقم للتخلص من الماء الفائض عنها. نقلت البذور المعقمة بملقط معقم إلى أنابيب اختبار سعة 100 مل تحتوي 15 مل من وسط MS الصلب وبمعدل 3 بذور/أنبوبة. أغلقت الأنابيب بأغطيتها وحفظت في ظروف ظلام تام لمدة ثلاثة أيام وبدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ C$ ، بعدها نقلت البادرات الناتجة إلى ظروف 16 ساعة ضوء / 8 ساعة ظلام وفي شدة إضاءة 2000 لوكس في الحاضنة المعدة لهذا الغرض . اما القطع النباتية المستأصلة من الاجزاء النباتية لبادرات نامية بالحقل ، فقد عقمت وفق ما ذكر سابقا في تعقيم البذور باستخدام المادة المعقمة ذاتها (6% هايپوكلورايت الصوديوم NaOCl) وبنفس طريقة تعقيم البذور ولمدة 10-15 دقيقة (حسب حالة ونوع الجزء النباتي) .

ثانيا- مقاومة كالس العصفروالأفرع الناشئة منه للملوحة بـ NaCl :

2. 1- استحداث كالس اوراق العصفرو على الاوساط الملحية من Nacl :

بعد تعقيم الاوراق وفق ما جاء بالفقرة السابقة نقلت بواسطة ملقط معقم وزرعت على اوساط الاستحداث المبينة ادناه في اوعية زجاجية بسعة (100مل) تحتوي 50 مل من وسط MS الصلب (والمعقم مسبقا) والمدعم بالتدخلات التالية من اوساط الاستحداث تحت الملوحة :

وسط MS الصلب المدعم بتدخل البنزائل ادينين BA: 0.0 ، 0.5 ، 1.0 ملغم/لتر ، متاخلا مع الاوكسين 2,4-D : 0.0 ، 0.3 ملغم/لتر ، متاخلا مع ملح كلوريد الصوديوم (NaCl) : 0.0 ، 0.05 ، 0.1 ، 0.2 ، 0.3 مولار (M) . كافة عمليات التعقيم والزرع تمت في ظروف حاضنة الزرع ذات الأجواء المعقمة Laminar airflow cabinet ,

2.2 - محتوى البرولين Prolin المتجمع في كالس الأوراق المستحدث تحت الأوساط الملحية من كلوريد

الصوديوم Nacl

قدر البرولين حسب طريقة Bates (1973) باستخدام كاشف الننهايدرين وتم باخذ وزن 0.5 غم من الكالس المستحدث من الاوراق بعمر اربعة اسابيع واعيد تقدير البرولين من نفس الكالس النامي على اوساط الاستحداث (المذكور سابقا) بعد ثمانية اسابيع , وتم قراءات الامتصاصية على جهاز السبكتروفوتوميتر عند طول موجي (520 نانوميتر nm) مستعملا التلوين كبلانك Blank.

حسب البرولين من المنحنى القياس للبرولين المبين بالشكل (1) والذي تم تحضيره بالتراكيز (0.0 , 0.2 , 0.4 , 0.6 , 0.8 , 1.0 و 1.2 بوحدة المايكرومول/غم وزن طري ثم عدلت النتائج الى وحدة المايكروغرام/غم وزن طري (µg/g F.w) وذلك باعتماد الوزن الجزيئي للبرولين (115.5).

Conc.(µg/g)	Absorbance
0.0	0.0
0.2	0.391
0.4	0.785
0.6	1.189
0.8	1.591
1.0	1.99
1.2	2.388

correlation coefficient = 0.999

R.square(%) = 0.99997909

Slope = 0.5014

Intercept = 0.00302108

X= 0.5014 Y + 0.003021

شكل (1) منحنى البرولين القياسي

3. 2 : قابلية تحمل الأفرع الناشئة من طرف الساق والأوراق على النمو في أوساط الملوحة

تم دراسة قابلية الأفرع الناشئة من كالس طرف الساق ومن كالس أوراق نباتات العصفر على النمو في أوساط الملوحة لكلوريد الصوديوم NaCl. وذلك بنقل قطع الكالس المولد للأفرع وبعدد معلوم من الأفرع الى وسط النمو والتضاعف المكون من وسط MS الصلب المدعم بتداخل منظمات النمو والتي شملت : البنزائل أدنين BA (2.0 ملغم/لتر) والاكسين NAA (0.2 ملغم/لتر) مع مستويات مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم NaCl هي : 0.0 , 0.05 , 0.1 , 0.2 , 0.3 ملغم/لتر (M).

حفظت العينات في حاضنة الزرع تحت ظروف اضاءة 2000 لوكس وبتعاقب 16 ساعة ضوء / 8 ساعة ظلام ودرجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$. وبعد 1-4 أسابيع من نمو الأفرع اخذت القياسات بحساب عدد الأفرع الخضرية وطولها والتي لا تزال نامية ومقاومة للملوحة بالتراكيز المذكورة سابقا خلال الاسابيع؛ الاول الى الرابع من تاريخ النقل لهذه الاوساط. استخدم التصميم العشوائي الكامل في تنفيذ التجارب واعتمد اختبار دنكن عند مستوى احتمالية 5% في تحليل البيانات.

النتائج والمناقشة

اولا - مقاومة كالس العصفر للأوساط الملحية من كلوريد الصوديوم NaCl

3. 1. 1- استحداث ونمو كالس الأوراق على الأوساط الملحية من كلوريد الصوديوم NaCl

تم دراسة استحداث الكالس تحت الاوساط الملحية من كلوريد الصوديوم (NaCl) في الاوراق لانها تمثل المواقع المهمة لحدوث أغلب العمليات الحيوية للنبات ففيها تجري عمليات التمثيل الغذائي من تنفس لانتاج مركبات الطاقة وعمليات البناء وانتاج الكثير من المواد الأولية وانتاج الهرمونات النباتية مثل السايتوكاينين والجبرلين التي تنشط في الفلق والاوراق حديثة التكوين. كما ان اول مظاهر التأثير بالملوحة يظهر على الاوراق.

أظهرت النتائج (الجدول 1) قابلية استحداث كالس الأوراق في جميع مستويات الملوحة ومن كافة تداخلات منظمات النمو فيها ولم تظهر الاستجابة في الوسط الخالي من (D-2,4), إن وجود الاوكسين D-2,4 شجع استحداث الكالس بنسبة 100% في جميع تداخلاته مع مستويات الملوحة من (0.05 إلى 0.2 ملغم/لتر), الا ان الاستجابة قلت مع زيادة تركيز الملح الى 0.3 ملغم/لتر. لقد أوضحت نتائج Patil (2012) أن وزن أوراق العصفر يزداد في المستوى الواطئ من كلوريد الصوديوم , وأن العصفر يتحمل التراكيز الأعلى من الملح وذلك عن طريق تخزين المعادن السامة في بعض أجزاء النبات والعناصر الكبرى الأساسية في الأوراق مما يشير إلى وجود آلية للتنظيم داخل خلايا النبات.

التحليل الاحصائي حول تأثير الـ D-2,4 بين بوضوح دور الـ D-4, 2, الفعّال في استحداث الكالس حيث تفوق معنويًا في نسبة الاستحداث التي بلغت 96.6% مقارنة بـ 28.6% عند عدم وجوده. ان تأثير تداخل مستويات الملوحة مع الـ D-2,4 بين بوضوح أن المستويات المنخفضة من الملح (0.0 و 0.05 و 0.1) كانت الأفضل معنويًا في استحداث كالس الأوراق فقد بلغت نسبة الاستحداث 100%, أما تأثير تراكيز BA فكان (0.5 ملغم/لتر) أفضلها وعند تداخل تراكيز الـ BA مع الـ D-2,4 (0.3 ملغم/لتر) فان نسبة الاستحداث ازدادت بشكل معنوي مقارنة بعدم وجود D-2,4.

ويبدو أن خلايا الجزء النباتي لكي تقاوم الشد الازموزي للملح فانها تحفز عملية تبادل الأيونات بين خلايا الجزء النباتي والوسط الغذائي من خلال تحفيز فعالية انزيم ضخ الهيدروجين (H^+/ATPase) وهذا يخلق تدرج اينيوني يدعم عمليات انتقال وتبادل الايونات من اجل المحافظة على نسبة مرتفعة من Na^+/K^+ في محلولها الخلوي مع ازالة ايونات الصوديوم Na^+ الى خارج الخلية او تجزئتها بشكل حويصلات معزولة ميكانيكيا (Yamaguchi و Blumwald, 2005 و Rai وآخرون 2011) وأن تجمع الأيونات الموجبة داخل الخلايا يشكل ضغطاً ازموزياً لسحب الماء والمغذيات والهرمونات الى داخل الخلايا, لقد لاحظ Kakaci وآخرون (2013) أن أعلى معدل لنمو كالس العصفر حصل في الوسط الواطئ الملوحة (20 ملغم/لتر) بينما التراكيز العالية (160 ملغم/لتر) سببت أدنى نمو للكالس , الا ان الباحث Munns

الجدول (1): قابلية استحداث ونمو كالس أوراق العصفور (Safflower (Carthamus tinctorius بعد أربعة أسابيع من النمو في وسط MS الصلب المدعم بتداخلات مختلفة من منظمات النمو مع مستويات من ملح كلوريد الصوديوم NaCl

استحداث كالس الأوراق (%)							
تأثير BA	تأثير الملح	التداخل بين الملح و BA	2.4-D(ملغم/لتر)		BA (ملغم/لتر)	Nacl مولار	
			0.3	0.0			
		50.0 و	أ 100	ط 0.0	0.0**	0.0	
		67.5 ج	أ 100	ز 35.0	0.5		
		69.0 ج	أ 100	ز 38.0	1.0		0.05
		50.0 و	أ 100	ط 0.0	0.0*		
		79.5 أ	أ 100	هـ 59.0	0.5		
		76.0 ب	أ 100	و 52.6	1.0		
		50.0 و	أ 100	ط 0.0	0.0	0.1	
		75.5 ب	أ 100	و 51.0	0.5		
		75.0 ب	أ 100	و 50.0	1.0		
		50.0 و	أ 100	ط 0.0	0.0	0.2	
		70.5 ج	ب 93	و 48.0	0.5		
		62.5 د	ب 90 ج	ز 35.0	1.0		
		50.0 و	أ 100	ط 0.0	0.0	0.3	
		58.5 هـ	د 80	ز 37.0	0.5		
		55.5 هـ	ج 86	ح 25.0	1.0		
		62.16 ج			أ 96.60	ب 28.66	تأثير 2.4-D
	أ 100				ز 24.3	0.0	تأثير تداخل الملح مع 2.4-D
	أ 100				د 37.0	0.05	
	أ 100				هـ 33.6	0.1	
	ب 94.3				و 27.6	0.2	
	ج 88.6				ح 20.6	0.3	
50.0 ج			أ 100	هـ 0.0	0.0	تأثير تداخل BA مع 2.4-D	
أ 70.3			ب 94.6	ج 46.0	0.5		
ب 67.6			ب 95.2	د 40.0	1.0		
المعدلات المشتركة بنفس الحرف لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية 5%.							

(2002) بين أن الكالس تحت الشد الازموزي العالي من NaCl كانت له القدرة على التكيف للإجهاد المتكون في وسط الزراعة , ويلاحظ من الشكل (2) ان الكالس الناتج من تداخل الملح مع منظمات النمو (2,4-D) ظهر بسرعة خلال 4-7 أيام وبدأ لونه مصفرًا مائل إلى الاخضرار وازداد حجمه بسرعة في المستويات المنخفضة من الملح NaCl.

NaCl -A بتركيز 0.05 مولاري	NaCl -B بتركيز 0.1 مولاري

NaCl -C بتركيز 0.2 مولاري	NaCl -D بتركيز 0.3 مولاري

تكوين مزارع كالس أوراق العنبر بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الأوساط الملحية من كلوريد الصوديوم NaCl	

الشكل (2) تكوين مزارع كالس أوراق نبات العنبر على وسط MS المحتوي على البنزاييل أدنين BA بتركيز (1.0 ملغم/لتر) والاكسين 2.4-D (0.3 ملغم/لتر) مع مستويات مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم NaCl وهي كما يلي :

A- استحداث كالس الأوراق بوجود ملح كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 0.05 مولاري

B- استحداث كالس الأوراق بوجود ملح كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 0.1 مولاري

C- استحداث كالس الأوراق بوجود ملح كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 0.2 مولاري

D - استحداث كالس الأوراق بوجود ملح كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 0.3 مولاري

2.1.3- محتوى البرولين Prolin المتجمع في كالس الأوراق المستحدث تحت الأوساط الملحية من كلوريد الصوديوم NaCl :

النتائج في جدول (2) تُظهر تأثير مستويات الملوحة ومنظمات النمو على تجمع البرولين في كالس أوراق العصفور فقد بينت الدراسة ارتفاع محتوى البرولين المتجمع في كالس الأوراق خلال أربعة وثمانية أسابيع بشكل معنوي وكبير جداً عند وجود الملح (NaCl) بكافة مستوياته (0.05 إلى 0.3 مولاري) في وسط الزراعة , وأشار تداخل الملح مع الـ BA أن البرولين انخفض الى ادنى مستوياته (2.06 مايكروغرام/غم وزن طري) عند عدم وجود كل من الملح (المستوى 0.0 مولاري) و الـ BA (المستوى 0.0 ملغم /لتر) حيث كان افضل مستوى للـ BA هو 0.5 ملغم /لتر الذي رفع محتوى البرولين الى الى اعلى قيمة بلغت 38.3 مايكروغرام/غم وزن طري).

تأثير الملح احصائياً بين ارتفاع محتوى البرولين إلى أكثر من 30 مايكروغرام/غرام وزن طري في مستويات الملوحة المستخدمة من 0.05 إلى 0.3 مولاري خاصة المستوى 0.05 مولاري الذي رفع محتوى البرولين الى 36.8 مايكروغرام/غرام وزن طري مقارنة بـ 2.45 مايكروغرام/غرام وزن طري في المستوى 0.0 مولاري من الملح وهذا يشير إلى حصول اجهاد اوزموزي داخل خلايا كالس الجزء النباتي النامية في اوساط الملوحة اعلاه , لأن البرولين يزداد كوسيلة دفاعية داخل الخلايا تؤدي إلى زيادة مقاومة خلايا النبات للاجهاد (Bates ، 1973) و (Pusham و Rangasamy, 2000) الذين اشاروا الى ان الخلايا المقاومة للملوحة يرتفع فيها محتوى البرولين.

ان المحافظة على مستويات مرتفعة من البرولين خلال 4 و 8 أسابيع تحت الاوساط الملحية يدل على مقاومة خلايا كالس العصفور لحالات الاجهاد الازموزي فهو لم يتغير كثيراً حتى الاسبوع الثامن لكن تأثير الوقت احصائياً بين بأن البرولين تراجعت كمياته مع زيادة الوقت معنوياً دلالة على تكيف الكالس للنمو في الاوساط الملحية ومقاومته للاجهاد الازموزي للملح, فقد بين الباحث Munns (2002) أن الكالس تحت الضغط أو الشد الازموزي العالي من NaCl كانت له القدرة على التكيف للاجهاد المتكون في وسط الزراعة.

أما تأثير تداخل تراكيز الملح مع الفترة فأكد أن المستويات الملحية كافة (0.05 إلى 3.0 مولاري) سببت زيادة معنوية للبرولين مقارنة مع الاوساط الخالية من الملح سواءً بعد 4 او 8 اسابيع . أما تأثير تداخل الـ BA مع الوقت فقد بين ان تراكيز BA (0.5 و 1.0 ملغم/ لتر) خفضت من معدل تجمع البرولين بمرور الوقت بعد 4 و 8 أسابيع وربما يشير ذلك الى اشتراك الـ BA في التنظيم الازموزي وتجمع المواد الايضية التي تساعد في سحب الماء الى داخل الخلايا وتقلل من صنع البرولين بمرور الوقت.

هناك عدد من البحوث أشارت إلى حصول تغيرات عديدة في الاحماض الامينية و البروتينات تحت الشد الملحي , وفي نبات Alfalfa ارتفع محتوى البرولين الى 10 اضعاف عند تعرضه لملح NaCl بتركيز 171 مليمولار (M 0.171=) لمدة 3 الى 5 ايام , كما لوحظ ان محتوى البرولين يزداد من 3 الى 10 اضعاف في الخلايا المعرضة لتركيز 400 ملي مولار mM من الـ NaCl (=0.4 مولار M) في المعلقات الخلوية للجذور المحبة للملوحة (Petrusa و Winicov, 1997). بين Hare وآخرون (1998) ان للبرولين دور ايجابي في اعادة تنظيم الازموزية في ظروف الاجهاد الملحي ويحافظ على الخلايا من الاكسدة , و على تركيبها الخلوي لذلك فإنه يساهم في زيادة نمو النبات وإدامة استطالة الخلايا وفتح الثغور وزيادة البناء الضوئي .

الجدول(2): محتوى البرولين في كالس أوراق العصفور (Safflower (Carthamus tinctorius الناشئ على وسط MS الصلب المدعم بتداخل D(0.3-2.4 ملغم/لتر) مع مستويات مختلفة من BA و ملح كلوريد الصوديوم .

محتوى البرولين في كالس الأوراق(مايكروغرام/غم وزن طري) $\mu\text{g} / \text{g f.w}$						
تأثير BA	تأثير الملح	تداخل الملح مع BA	2.4-D (0.3 ملغم/لتر)		BA (ملغم/لتر)	Nacl (مولار)
			بعد ثمانية أسابيع	بعد أربعة أسابيع		
		2.06 س	2.18 ت	1.95 ث	0.0	0.0
		2.70 م	4.25 ر	1.15 خ	0.5	
		2.587 ن	2.88 ش	2.30 ت	1.0	
		35.08 د	32.89 ك	37.26 هـ	0.0	0.05
		38.30 أ	37.61 د	38.99 جـ	0.5	
		37.04 جـ	42.21 أ	31.86 ل	1.0	
		37.66 ب	39.79 ب	35.53 ز	0.0	0.1
		34.16 هـ	34.27 ط	34.04 ط	0.5	
		32.43 ح	29.67 ن	35.19 ح	1.0	
		31.45 ي	26.91 س	35.99 و	0.0	0.2
		33.70 و	34.16 ط	33.24 ي	0.5	
		31.05 ك	24.38 ص	37.72 د	1.0	
		31.92 ط	24.04 ق	39.79 ب	0.0	0.3
		28.01 ل	24.96 ف	31.05 م	0.5	
		32.89 ز	26.22 ع	39.56 ب	1.0	
			25.76 ب	28.93 أ	تأثير الفترة	
			3.105 ط	1.80 ي	0.0	تأثير تداخل الملح مع الفترة
			37.57 أ	36.04 جـ	0.05	
			34.58 هـ	34.92 هـ	0.1	
			28.48 ز	35.65 د	0.2	
			25.07 ح	36.80 ب	0.3	
27.63 أ			25.16 هـ	30.11 أ	0.0	تأثير تداخل BA مع الفترة
27.37 ب			27.05 د	27.69 جـ	0.5	
27.20 ب			25.07 و	29.33 ب	1.0	
المعدلات المشتركة بنفس الحرف لكل عمود لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية 5%.						

المعدلات المشتركة بنفس الحرف لكل عمود لا تختلف معنويًا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية 5%.

ثانياً: قابلية مقاومة الأفرع الناشئة من كالس العصفور لملوحة كلوريد الصوديوم Nacl

1.2.3. تأثير الملوحة على عدد الأفرع الناشئة من طرف الساق وأوراق نباتات العصفور

يشير الجدول (3) إلى تفوق معنوي لعدد الأفرع الناشئة من الساق في معاملة المقارنة (المستوى 0.0 مولاري من ملح Nacl) على عدد الأفرع الناشئة من كالس الأوراق لهذه المعاملة خاصة في الأسبوع الـ 3 و 4 من نقل الكالس المولد للأفرع إلى وسط النمو، بينما انخفض عدد الأفرع في الأسبوع الـ 3 و 4 عند استخدام التراكيز 0.1 و 0.2 مولاري من ملح Nacl. ويلاحظ في التركيز الأقل (0.1 مولاري) أن الانخفاض لم يكن معنويًا لعدد الأفرع خلال أسابيع النمو للجزئين النباتيين. أما في التركيز الأعلى من الملح (0.2 مولاري) فإن عدد الأفرع الناشئة من كالس طرف الساق قد انخفضت معنويًا في الأسبوع الـ 3 و 4 من نقل الكالس ولم يختلف عدد الأفرع الناشئة من كالس الأوراق معنويًا وأظهرت مقاومة مستمرة لمدة أربعة أسابيع.

نتائج التحليل الاحصائي لدراسة تأثير التداخل , بينت ان تأثير التداخل للجزء النباتي أظهرت تفوق في عدد الافرع لطرف الساق على عدد الافرع الناشئة على كالس الاوراق وبصورة معنوية. تداخل الفترة مع الجزء النباتي أظهر هذه النتيجة في زيادة عدد الأفرع لطرف الساق مقارنة بعدد الأفرع للأوراق, أما تداخل الملح مع الجزء النباتي فبين أن زيادة الملوحة أدت إلى خفض الافرع مع زيادة التركيز معنوياً في طرف الساق بينما لم تكن معنوية للجزء النباتي من الأوراق. وأظهر تأثير الفترة أنه لم يكن معنوياً في خفض عدد الافرع لاحظ الجدول (3), وهذه النتائج تؤكد مقاومة الأفرع المكتسبة من الشد الملحي على الاستمرار بالنمو في اوساط ملحية مختلفة . ان عدم تاثر النبات معنوياً بالملح بمرور الوقت في صفة عدد الافرع يشير الى مقاومة النبات للملوحة بدليل ان طول الافرع لن يتوقف بل استمرت الزيادة بالطول مع الوقت (الجدول4) , ربما لحصول طفرات وراثية ادت إلى تغيرات في محتوى البروتين والانزيمات تؤثر في التوازن الهرموني للنبات (Alina وآخرون, 1985 و 1994Zhang).

2.2.3. تأثير الملوحة على طول الافرع الناشئة من طرف الساق وأوراق نباتات العصفور

النتائج في جدول (4) تظهر تأثير الملوحة على طول الأفرع الناشئة من كالس طرق الساق وأوراق نبات العصفور فقد تزايد طول الافرع بمرور الوقت في الاوساط الخالية من الملح وبلغ طول الافرع لكالس طرق الساق (3.8 سم) في الاسبوع الرابع ولم يختلف معنوياً عن طول الافرع الناشئة من الأوراق (3.9 سم). أما في الأوساط الملحية فلاحظ وجود زيادة في طول الافرع ايضاً حيث بلغ طول الأفرع (3.5 و 3.3 سم) على التوالي في كل من طرف الساق والأوراق في الوسط المحتوي على (0.1 مولاري) من ملح كلوريد الصوديوم , وفي التراكيز العالية من الملح (0.2 مولاري) تراوح طول الأفرع بين 5.2 و 3.0 سم في الاسبوع الرابع لطرف الساق الأوراق على التوالي. وعلى الرغم من وجود تباطؤ في نمو الافرع بالأوساط عالية الملوحة الا ان استمرار نموها على الاوساط الملحية كافة يشير الى تكيفها للنمو في هذه الاوساط المنتخبة (الشكل 3).

تداخل الملح مع الجزء النباتي أظهر أن زيادة الملوحة إلى (0.2 مولاري) سبب انخفاض في طول الافرع الناشئة من طرف الساق معنوياً بينما لم تكن معنوية في حال الأفرع الناشئة من الأوراق ان تأثير الوقت أظهر وجود اختلافات معنوية خلال اسابيع النمو تشير إلى زيادة طول الافرع مع الوقت بين (2.1 سم الاسبوع الأول) و (3.3 سم للاسبوع الرابع).

ان عدم تأثر الافرع بالمدة الزمنية لتعرض الافرع للملوحة بكافة التراكيز من كلوريد الصوديوم يعطي مؤشر واضح على مقاومة الافرع الناتجة من زراعة الانسجة للملوحة هدف الدراسة.

لقد بين Munns (2002) أن الكالس تحت الشد الازموزي العالي من NaCl له القدرة على التكيف للإجهاد المتكون في وسط الزراعة.

الجدول(3) تأثير الملوحة على عدد الأفرع الناشئة من كالس طرف الساق وأوراق نباتات العصفر
(*Safflower (Carthamus tinctorius L.)*) بعد أربعة أسابيع من نقل الأفرع الى وسط
النمو والتضاعف المحتوي على مستويات من ملح كلوريد الصوديوم Nacl .

تأثير الفترة	تأثير الملح	تداخل الملح مع الفترة	عدد الأفرع الناشئة من كالس:		الوقت (اسبوع)	ملح Nacl (مولاري)	
			الأوراق	طرف الساق			
		2.5 ب	2.0 ج	3.0 ب	الاول**	*0.0	
		2.5 ب	2.0 ج	3.0 ب	الثاني		
		2.8 أ	2.0 ج	3.6 أ	الثالث		
		3.0 أ	2.0 ج	4.0 أ	الرابع		
		2.5 ب	2.0 ج	3.0 ب	الاول	0.1	
		2.5 ب	2.0 ج	3.0 ب	الثاني		
		2.5 ب	2.0 ج	3.0 ب	الثالث		
		2.3 ب	2.0 ج	2.6 ب	الرابع		
		2.5 ب	2.0 ج	3.0 ب	الاول	0.2	
		2.5 ب	2.0 ج	3.0 ب	الثاني		
		2.0 ج	2.0 ج	2.0 ج	الثالث		
		1.8 ج	1.6 ج	2.0 ج	الرابع		
				1.96 ب	2.93 أ	تأثير الجزء النباتي	
		2.5 أ		2.0 ب	3.0 أ	الاول	تداخل الفترة مع الجزء النباتي
		2.5 أ		2.0 ب	3.0 أ	الثاني	
		2.5 أ		2.0 ب	2.9 أ	الثالث	
		2.4 أ		1.9 ب	2.9 أ	الرابع	
	2.7 أ		2.0 د	3.4 أ	0.0	تداخل الملح	
	2.5 ب		2.0 د	2.9 ب	0.1	مع الجزء	
	2.2 ج		1.9 د	2.5 ج	0.2	النباتي	

المعدلات المشتركة بنفس الأحرف لا تختلف معنويًا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية 5%. * وسط MS خالي من الملح. ** الاسبوع الاول هو الاسبوع الخامس من الزراعة وهو الاسبوع الذي نقل فيه الكالس المتميز الحامل للأفرع الى وسط النمو والتضاعف (وسط MS مع BA 2.0 ملغم/لتر و NAA 0.2 ملغم/لتر). اخذت القياسات في نهاية كل اسبوع .

الجدول (4) تأثير الملوحة على طول الأفرع الناشئة من كالس طرف الساق وأوراق نباتات العصفور *Safflower (Carthamus tinctorius L.)* بعد أربعة أسابيع من نقل الأفرع الى وسط النمو والتضاعف المحتوي على مستويات من ملح كلوريد الصوديوم NaCl .

تأثير الفترة	تأثير الملح	تأثير تداخل الملح مع الفترة	طول الأفرع الناشئة من كالس : (سم)		الوقت (اسبوع)	ملح Nacl (مولاري)
			الأوراق	طرف الساق		
		2.0 ح	2.0 ك	2.0 ك	الاول**	*0.0
		2.3 ز	2.3 ح ط ي	2.3 ح ط ي	الثاني	
		2.7 ده	2.8 د ه	2.5 وز	الثالث	
		3.8 أ	3.9 أ	3.8 أ	الرابع	
		2.1 ح	2.0 ك	2.1 ي ك	الاول	0.1
		2.5 هو	2.6 ه و ز	2.5 وز	الثاني	
		2.8 ج	2.8 د ه	2.9 ج د	الثالث	
		3.4 ب	3.3 ب	3.5 ب	الرابع	
		2.1 ز	2.1 ي ك	2.1 ي ك	الاول	0.2
		2.4 وز	2.5 وز	2.3 ح ط ي	الثاني	
		2.6 ه	2.7 د ه و	2.4 ز ح ط	الثالث	
		2.8 ج د	3.0 ج	2.5 وز	الرابع	
			2.65 أ	2.57 ب	تأثير الجزء النباتي	
		2.1 د		2.1 و	الاول	تداخل الفترة مع الجزء النباتي
		2.4 ج		2.3 ه	الثاني	
		2.7 ب		2.6 د	الثالث	
3.3 أ		3.2 ب	الرابع			
	2.7 أ	2.7 أ	2.6 أ	0.0	تداخل الملح مع الجزء النباتي	
	2.7 أ	2.7 أ	2.7 أ	0.1		
	2.5 ب	2.6 أ	2.3 ب	0.2		

المعدلات المشتركة بنفس الأحرف لا تختلف معنويًا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية 5%. * وسط MS خالي من الملح. ** الأسبوع الأول هو الأسبوع الخامس من الزراعة وهو الأسبوع الذي نقل فيه الكالس المتميز الحامل للأفرع إلى وسط النمو والتضاعف (وسط MS مع 2.0 BA ملغم/لتر و 0.2 NAA ملغم/لتر). أخذت القياسات في نهاية كل أسبوع .

1- الأفرع الناشئة من تمايز كالس طرف الساق :	
A : قبل نقلها الى الوسط الملحي	B : بعد 4 اسابيع من نقلها للوسط الملحي

2- الأفرع الناشئة من تمايز كالس الاوراق :	
A : قبل نقلها الى الوسط الملحي	B : بعد 4 اسابيع من نقلها للوسط الملحي

الشكل (3): مقاومة الأفرع الناشئة من كالس طرف الساق (1) والاوراق (2) للملوحة

الشكل (3): قابلية نمو وتحمل الأفرع الناشئة من كالس الأجزاء المختلفة لنباتات العصفر Safflower (*Carthamus tinctorius*) للملوحة بعد أربعة أسابيع من نقل الأفرع على وسط MS الصلب المدعم بالبنزائل أدنين BA (2.0 ملغم/لتر) و NAA (0.2 ملغم/لتر) مع ملح كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 0.2 مولاري:

- 1- الأفرع الناشئة من تمايز كالس طرف الساق 2- الأفرع الناشئة من تمايز كالس الاوراق وان :
- A : الأفرع الناشئة من تمايز الكالس عند نقلها الى الوسط الملحي (عمر 4 اسابيع من تمايز الأفرع)
- B : الأفرع النامية على الوسط الملحي بعد 4 اسابيع من نقلها الى الوسط الملحي (عمر 8 اسابيع).

الملحق (1)

مكونات وسط MS (Murashige & Skoog, 1962)

المكونات	التركيز (ملغم/لتر)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
H ₃ BO ₃	6.2
KH ₂ PO ₄	170
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Na ₂ -EDTA	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Thiamine-HCl (B1)	0.1
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl (B6)	0.5
Glycine	2.0
Myo-inositol	100
Sucrose	30.0 غم
Agar	6.0 غم
pH	6.0-5.8

Resistance Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Callus and its branches to salinity Stress

Azhar thanoon Edres and Kasim Mahmoud Al-Hamdani
Dep. of Crop / College of Agric. and forestry / Mosul Aniversity
Email:

ABSTRACT

The study was implemented in the year 2013-2014 in the tissue culture laboratory of the field crops department/ faculty of agriculture and forestry for the purpose of producing callus and saline resistant plants , the results showed capability to initiation leaves callus with high levels which was 100% at present 2,4-D alone or its interaction with BA in medium of MS, which supported by sodium chloride salt levels (0.0, 0.05, 0.1 and 0.2 Molar) except a concentration (0.3 molar) which significantly reduced the initiation ratio.

The estimation results of proline acomulation in leaves callus as an indicator of salinity resistance showed that the proline content was significantly higher at all levels of salinity used (0.05-0.3 molar) for more than 30 µg/g frish whight compared to 2.3 and 2.8 µg / g After 4 and 8 weeks of treatment any more than 10 times its presence in control tretment.

Salinity resistance results showed that branches forming from callus of shoot tip and leaf showed resistance to salinity after four weeks of transfer of branches to growth medium and multiplication which suplimented with sodium chloride salt. Although the number of branches decreased slightly in the fourth week, they were able to grow and showed tolerance to the medium content of 0.2 molar NaCl, while no significant differences were observed in the number of branches during the four weeks on the saline medium (0.1 molar). The number of branches arising from leaf callus did not differ significantly in all medium (0.0-0.2) and showed continuous resistance for four weeks. Results of interaction salt with the plant part showed that increased salinity led to the reduction of branches with a significantly increased concentration of the tip stem and were not significant for the branches of the callus leaves. The effect of the time showed that it was not significant in reducing the number of branches in the two parts of the plant. It was also noticed that there was an increase in the length of the branches of each of the stem tip and leaves callus in the medium containing (0.1 molar NaCl). In high concentrations of salt (0.2 molar) It continued to grow in all saline medium, suggesting that salts may be resistant to saline stress, possibly for genetic mutations that have adapted to growth in these medium,

Received:21/2/2018, Accepted:16/5/2019

المصادر

- Alina, B. A., Baimukhasheva and Klyshev, L. K. (1985). Ribosomal proteins of Pea chloroplasts in chloride salinity. Fiziol. Biokhim Kul'T Rast, 17 (1):76-80.
Ashraf M, Harris P J C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Sci. 166, 3-16.

- Bates, L. S.; Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39:205-207 .
- Foyer, C. H., Noctor, G., (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: are-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28, 1056-1071.
- Ghoulam, C., Ahmed, F., Khalld, F., (2001). Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 47, 139-150.
- Hare, P. D.; Crees, W. A. and Staden, J. V. (1998). Dissecting the role of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.*, 21:535-553.
- He, S., Han, Y., Wang, Y., Zhai, H., Liu, Q., (2009). *In vitro* selection and identification of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants tolerant to NaCl. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 96, 69-74.
- Hossain, Z., Mandal, A. K. A., Datta, S. K., Biswas, A. K., (2007). Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line. *J. Biotechnol.* 129, 658-667.
- Kakaei, M., M. Mansouri, M. R. Abdollahi and F. Morad I (2013). Effect of NaCl and PEG induced osmotic stress on callus growth parameters of two safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultures. *International Journal of Agriculture and crop sciences*, 6(3): 127-132.
- Lu, S., Peng, X., Guo, Z., Zhang, G., Wang, Z., Wang, C., Pang, C., Fan, Z., Wang, J., (2007). In vitro selection of salinity tolerant variants from triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* and *C. dactylon*) and their physiological responses to salt and drought stress. *Plant Cell Rep.* 26, 1413-1420.
- Mahmood I, Razzaq A, Ashraf M, Hafiz IA, Kaleem Sh, Qayyum A, Ahmad M. (2012). *In vitro* Selection of Tissue Culture Induced Somaclonal Variation of Wheat for Drought Tolerance. *J. Agric. Res*; 50 (2):177-188
- Munns R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress, *Plant Cell Environ.* 25, 239-250.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassaya with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum.* 15: 473-497.
- Patil, N.M.(2012).Adaptions in Response to salinity in Safflower Cv. Bhima.Asian . *J.crop science*,(4):50-62.
- Petrusa,K. M and Winicov, I.(1997). Proline status in salt tolerant and salt sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. *Plant Physiol. biochemistry.* 35:303
- Pusham, R. and S. R. S. Rangasamy,(2000). Effect of salinity on protein and proline content of callus and seedling of rice. *Crop Research Hisar.*20,192–196.
- Rai, M. K. ., R. K. Kali., R. Singh., M. P. Gangola and A. K. Dhawan (2011). Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection- an overview of the recent progress *Environmental and Experimental Botamy*, 71: 89-98.
- Sakhanokho, H. F., Kelley, R. Y., (2009). Influence of salicylic acid on *in vitro* propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv 'Luna Red'). *Afr. J. Biotechnol.* 8, 1474-1481.
- Turkan, I., Demiral, T., (2009). Recent developments in understanding salinity

- tolerance. Environ. Exp. Bot. 67, 2-9.
- Wang W, Vinocur B, Altman A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta, 218, 1-14.
- Yamaguchi, T., Blumwald, E., (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. Trends Plant Sci. 10, 615-620.
- Zhang, J, X. (1994). Can early Wilting of old leaves account for much of the ABA accumulation in flooded pea ?. J. Exp. Bot., 45: 1335-1342.