تأثير الملوحة في استحثاث الكالس من بادرات الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. خارج الجسم الحي

جنان عباس يحيى، زهرة نوري الحطاب، واجدة خزعل القاضي، اخلاص عبد الكريم الكعبي

اشواق عبد الرزاق ، عمار خالد سبع

وزارة العلوم و التكنولوجيا- دائرة البحوث الزراعية

مركز التقانات الغذائية و الاحيائية/ قسم الهندسة الوراثية، بغداد و العراق

الملخص

استخدم صنف الفلفل الحلو المحلي في الدراسة .زرعت بذور الفلفل المعقمة على اوساط زرعيه لإنباتها والحصول على البادرات. تفوق معنويا الوسط الغذائي (MS) بكامل قوته مضافا له 1 ملغم / لتر جبريلين والاكار على الوسط الحاوي على 7 غم /لتر اكار والماء المقطر والوسط الحاوي على MS و 7غم/لتر اكار فقط في نسبة الانبات . حيث بلغت نسبة الانبات للوسط (MS) مع 1ملغم/لتر GA3 الى (86.7%) مقارنة ب (55%) و (23.3%) للوسطين الاخرين. وتفوقت معاملة استخدام الاوراق معنويا في الوزن الطري و الجاف للكالس المستحث منها مقارنة بالاجزاء الاخرى اذ بلغت 0.248 غم و 0.034 غم على التوالي في حين اعطت السويقة الجنينية السفلى اقل معدل للوزن الطري و الجاف حيث بلغ 0.198 غم و 0.017 غم على التوالي.

كما اظهرت النتائج ان الملوحة العالية اثرت سلبا في نمو الكالس حيث تفوقت معاملة المقارنة 6 ديسيمنز/ متر(EC 6) على المعاملتين الاخرتين بالوزن الطري و الجاف حيث بلغت معدلاتها 198.69 و 21.97 ملغم على التوالي مقارنة ب 132.70 و 11.36ملغم في المعاملة 10 ديسيمنز/ متر (EC 10) لكل من الوزن الطري و الجاف على التوالي .

الكلمات الدالة:

شد ملحي، سويقة جنينية، جبريلين

Effect of salinity on callus Induction from seedling of sweet pepper *Capsicum annuum* L. *in vitro*

Jenan A. Al Ani, Zahra N. Al Hattab, Wajida K. Al Qaudhy, ., Ekhlas A. Al Kaaby, Ashwaq A. , Ammar K. S.

Ministry of Science and Technology,

Genetic Engineering Department, Baghdad, Iraq

Abstract

The local sweet pepper cultivar was used in this study. Sterilized seeds were growing on different germination media to germinate and obtaining seedling. Full strength MS medium supplemented with1 mg/L GA3 and agar was superior as compare to medium containing 7 gm/l agar and distilled water and MS medium with agar ,the germination percentage reached (86.7%) as compare to (55% and 23.3%) for both last two medium respectively. Moreover The results showed that the leaves gave significant differences in the fresh and dry weight of the induced calli, they were 0.248 g and 0.034 g respectively compared with 0.198 g and 0.017 g respectively for the calli produced from the hypocotyls. The results showed that the salinity had negative effect on callus growth. The control treatment with 6 ECdS.m^{-1} gave the highest calli fresh and dry weight 198.69 mg and 21.97 mg compared with 132.70 mg and 11.36 mg for 10 ECdS.m^{-1} treatments.

Keywords: Salt stress, hypocotyls, GA3

المقدمـــــــة

يضم الجنس *Capsicum* خمسة انواع مزروعة و 26 نوع برية. يعتبر الفلفل الحلو *Capsicum annuum* L. (Pepper) الاكثر انتشاراً من بين تلك الانواع وذلك لقيمته الغذائية العالية و اهميته الاقتصادية في العديد من الدول. ساعدت طرق التربية التقليدية على تحسين بعض صفات الفلفل عن طريق التهجين مع الانواع البرية فقد تم نقل صفة زيادة الانتاج و المقاومة للامراض من الانواع البرية الى النوع المستزرع (1،9). الا ان التهجين قد يؤدي الى نقل صفات اخرى غير مرغوبة او قد يؤدي الى العقم، لذا لا بد من استخدام طرق التربية الاخرى لتحسين الفلفل.

ان تقنية زراعة الانسجة تساعد على تحسين بعض الصفات و بفترة زمنية قصيرة مقارنة بالطرق التقليدية. وقد تم استخدام هذه التقنية بنجاح لاستحثاث الكالس من اجزاء مختلفة من نبات الفلفل واخلاف نباتات منه (2, 3, 6,7) .

في العراق تعد الملوحة من اهم المشاكل التي تؤثر في زراعة الخضر و منها الفلفل. توفر تقنية زراعة الانسجة وسطاً متجانس لانتخاب السلالات الخلوية المتحملة للملوحة ومن ثم اخلاف نباتات منها قد تحمل صفة التحمل للملوحة عند زراعتها في الحقل. لذا تهدف الدراسة الحالية الى استحثاث الكالس من اجزاء مختلفة من نبات الفلفل الحلو المحلي وتعريضه للشد الملحي ومن ثم اخلاف نباتات من الكالس المتحمل للشد الملحي بغية الحصول على نباتات منه ذات تحمل للملوحة افضل من النبات الام.

المواد وطرائق العمل

استخدمت البذور الناضجة لنبات الفلفل البارد (الحلو) من الصنف المحلي وأجريت الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لمركز التقانات الغذائية و الاحيائية في دائرة البحوث الزراعية / وزارة العلوم والتكنولوجيا.

عقمت البذور بغمرها اولاً بالكحول الاثيلي C_2H_5OH بتركيز 95 % لمدة دقيقتين، بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم ثم غمرت بمحلول القاصر (20%) الحاوي على هايبوكلورات الصوديوم NaOCl بتركيز 6 % لمدة 20 دقيقة مع التحريك المستمر ثم غسلت البذور بعدها بالماء المقطر المعقم لثلاث مرات متتالية ولمدة 15 دقيقة (5 دقائق لكل مرة) لإزالة الأثر المتبقي من المادة المعقمة وأجريت عمليات التعقيم والزراعة داخل جهاز انسياب الهواء الطبقي Laminar air flow cabinet .

للحصول على بادرات معقمة تم زراعة البذور على ثلاث اوساط زرعية مختلفة في اطباق بتري . استخدم الماء المقطر و 7 غم/لتر اكار فقط في الوسط الاول ، وفي الوسط الثاني استخدمت مكونات الوسط (MS) (5) كامل القوة مع 7 غم/لتر اكار، ام الوسط الثالث فقد احتوى على مكونات الوسط (MS) كامل القوة مع 7 غم/لتر اكار مضاف له حامض الجبريلين (GA3) بتركيز 1 ملغم/ لتر.

استخدمت البادرات كما موضح في الشكل رقم (1) بعمر 14 يوم لاستحثاث الكالس حيث زرعت القمم النامية بطول 0.5 – 1 سم ، والأوراق و السويقة الجنينية السفلى على انفراد في الوسط الغذائي المتكون من MS كامل القوة مضافاً له اندول حمض الخليك (IAA) و الكاينتين بتركيز 2 ملغم/لتر لكل منهما.

بعد مرور 40 يوم على الزراعة تم حساب الوزن الطري و الجاف للكالس المستحث من الاجزاء المختلفة بغية اختيار الافضل منها من حيث كمية الكالس المستحث و نوعيته. نفذت التجارب بالتصميم التام التعشية (CRD) بعشرة مكررات لكل جزء نباتي وحللت النتائج وقورنت المعدلات باستخدام اقل فرق معنوي (LSD) وبمستوى احتمال (0.05) .

ولدراسة تأثير الملوحة في نمو الكالس و محاوله الحصول على نباتات متحملة للملوحة ، زرعت 100 ملغم من الكالس المستحث على اوساط زرعية مماثلة لوسط استحثاث الكالس الا انها زودت بتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (10,8,6) ديسي سيمنز/م . وبعد 40 يوم من الزراعة تم تقدير الوزن الطري و الجاف للكالس.

النتائج و المناقشة

اظهرت النتائج (جدول 1) تفوقا معنويا لوسط الانبات الحاوي على الجبريلين على الوسطين الاخرين في معدل انبات بذور الفلفل حيث بلغت النسبة 86.7 % مقارنة ب 23.3% في الوسط الحاوي على الماء المقطر فقط مع الاكار و 55% للوسط الحاوي على املاح الوسط الغذائي MS مع الاكار. كما يبين الشكل (2) يبين الاختلافات في انبات البذور في الاوساط المختلفة.

ان استخدام الجبريلين ساعد على تحسين نسبة الانبات في التجربة الحالية. من المعروف ان بذور الفلفل تقل نسبة انباتها بمرور الوقت و حاول العديد من الباحثين تحسين نسبة الانبات عن طريق نقع البذور في درجة حرارة ثابته و اضافة هايبوكلورات الصوديوم بتراكيز واطئه وكان لدرجة الحرارة 25 درجة مئوية الاثر الاكبر في تحسين الانبات (4) كما استخدمت عدة انواع من المحاليل الملحية ووجد ان التأثير للضغط الاوزموزي وليس لنوع الملح المستخدم (8). في الدراسة الحالية وجود الاملاح الخاصة بالوسط الزرعي MS ساعد على تحسين نسبة الانبات مقارنة بالماء المقطر الا ان الجبريلين هو الافضل.

اما بخصوص استحثاث الكالس فقد تفوقت الاوراق معنويا بالوزن الطري و الجاف على الاجزاء الاخرى بمعدل 0.248 غم و 0.034غم لكل منهما على التوالي. و اعطت السويقة الجنينية السفلى اقل معدل للوزن الطري و الجاف مقارنة بالاجزاء الاخرى حيث كانت 0.198 غم و 0.017 غم لكل منهما على التوالي(جدول 2). ويبين شكل (3) الكالس المستحث من الاجزاء المختلفة.

في التجربة الثانية تم اختيار الكالس المستحث من الاوراق والقمة النامية والسويقة الجنينية وزرع كوزن ثابت (100 ملغم) من هذا الكالس على الاوساط الملحية. اظهرت النتائج لتجربة تحمل الملوحة ان الملوحة العالية اثرت سلبا في نمو الكالس حيث تفوقت معاملة المقارنة على المعاملتين الاخرى بالوزن الطري و الجاف حيث بلغت معدلاتها 198.69 و 21.97 ملغم على التوالي مقارنة ب 132.70 و 11.36ملغم في المعاملة10 ديسي سيمنز/ م (EC10) لكل من الوزن الجاف و الطري على التوالي (جدول 3) . ويبين الشكل (4) الكالس المستحث على الاوساط الملحية المختلفة و يلاحظ ان الكالس في الوسط الملحي 10 ديسي سيمنز/ م (EC10) كان اكبر حجما الا ان الوزن الجاف كان واطيء مما يدل على ان خلايا الكالس كانت تمتص الماء من الوسط الزرعي لمعادلة الضغط الاوزموزي الناتج عن الملوحة العالية. من متابعة نمو هذا الكالس لوحظ انه يتحول الى اللون الاسود بعد ثلاث اسابيع ثم تموت الخلايا و لا تخلف نباتات.

اثناء نمو وتطور الكالس المستحث تلونت بعض خلايا الكالس بلون احمر وقد استمر نمو و انقسام هذه الخلايا (شكل5). وقد حصلت هذه الظاهرة في الكالس المعرض للشد الملحي 8ديسي سيمنز /م (EC8) تم نقل جزء من هذا الكالس الى وسط الاخلاف الا انه لم يكون نبات بعد وتجرى الان محاوله لتغيير وسط الاخلاف بغية الحصول على نبات فلفل احمر الاوراق كما هو الحال في اللهانة ذات اللون البنفسجي الداكن.

المصادر

1-Berkmortel van den L G 1977. Breeding pepper for resistance to a strain of TMV *Capsicum* 77 Cr3me; in *Congress Eucarpia Piment,* 5-8 Juillet, (ed.) *E Pochard* pp 89-92

2-Berljako J. 1999. *In vitro* Plant Regeneration from Pepper *Capsicum annuum* L. (cv. 'Soroksari') Seedling Explants. Plant Physiology, Phyton (Horn, Austria) 39 (3): 289- 292.

3-Christopher T. and Rajam M.V. 1996. Effect of genotype, explant and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. Plant Cell Org. Tiss. Cult. 46:245-250.

4-Khak E.M. and Passam H. C. 1992. Sodium hypochlorite concentration, temperature and seed age influence germination of sweet pepper. Hort Sience 27(7) 821-823.

5-Murashige.T, Skoog.F(1962).A revised medium For rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant physiol, 15:473-497

6-Prakash A. H., Sankara Rao K. and Udaya Kumar, M. 1997. Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum* L. cv. California Wonder. J. Biosci., Vol. 22, No 3, 339-344.

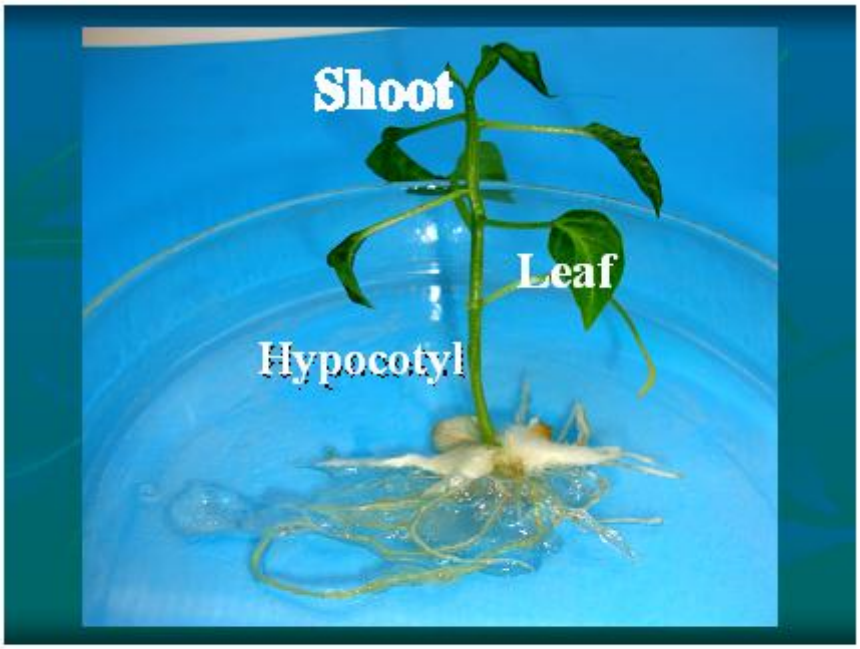
7-Rodeva V. N., Irikova T. P., Todorova V.J. 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): Comparative study on effect of the genotype. Biotechnol. & Biotechnol. E.q. 18/2004/3 34- 38.

8-Smith P.T. and Cobb B.G. 1991. Accelerated germination of pepper seed by priming with salt solutions and water. Hort. Sience 26(4): 417-419.

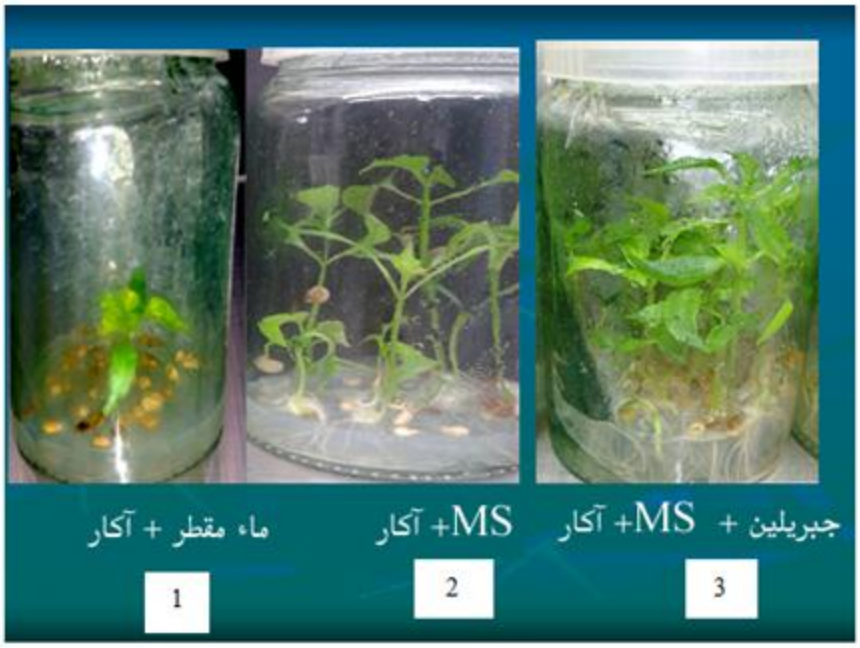
9-Tanksley S. D. and Iglesias-Olivas J.1984. Inheritance and transfer of multiple-flower character from *Capsicum chinese* into *Capsicum annuum; Euphytica* **33** 769–777

جـــــــــدول (1) تأثير نوع الوسط الغذائي في نسبة انبات بذور نبات الفلفل الحلو

المعاملة	الانبات %
ماء مقطر + اكار	23.3
MS + اكار	55.0
MS + جبريلين+ اكار	86.7
$L.S.D_{(0.05)}$ = 7.89	



شكل رقم (1): بادرة نبات الفلفل الحلو بعمر 14 يوم



شكل (2) انبات بذور القلقل في الاوساط الزرعية المختلفة (1) ماء مقطر + اكار (2) MS + اكار (3) جبريلين + MS + اكار

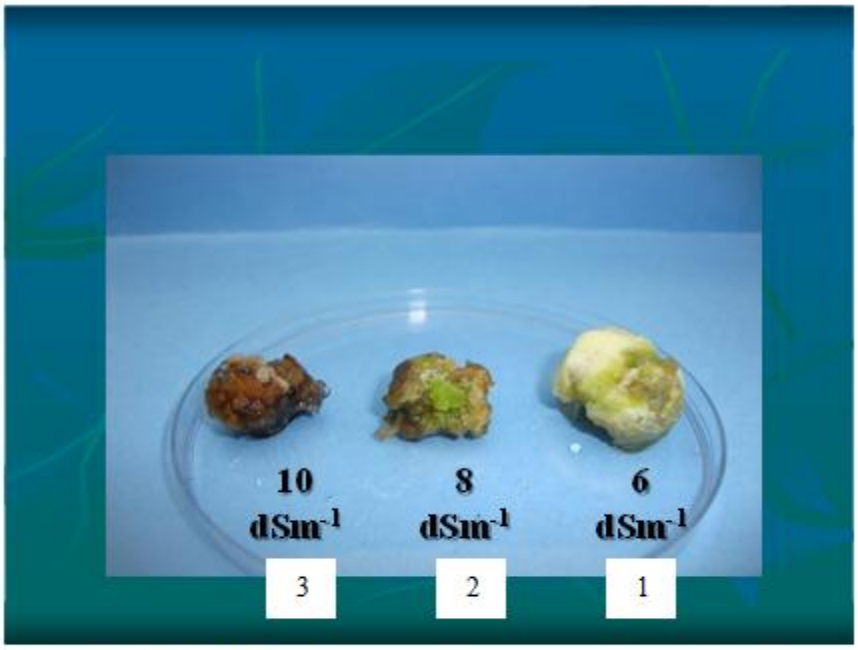
جـــدول (2) الوزن الطري والجاف للكالس المستحدث من الاجزاء النباتية المختلفة لنبات الفلفل الحلو بعد مرور 40 يوما من الزراعة خارج الجسم الحي

الجزء النباتي	الوزن الطري (غم)	الوزن الجاف (غم)
القمة النامية	0.236	0.024
الاوراق	0.248	0.034
السويقة الجنينية	0.198	0.017
$L.S.D_{(0.05)}$	0.007	0.004

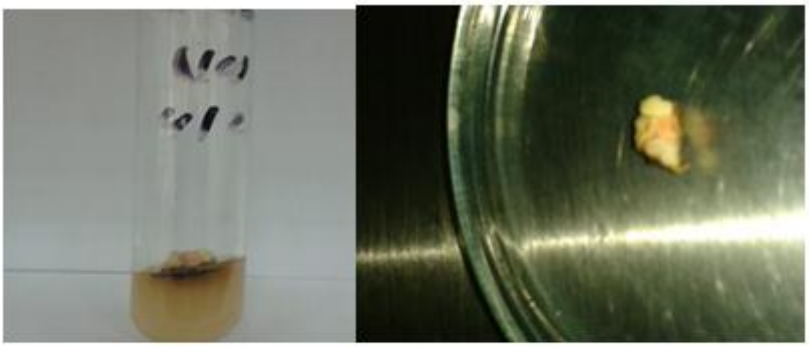
شكل (3) الكالس المستحدث من الاجزاء المختلفة لنبات الفلفل الحلو (1) الاوراق (2) السويقة الجنينية السفلى (3)القمة النامية بعد 40 يوم من الزراعة

جـــدول (3) تأثير الملوحة في الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من نبات الفلفل الحلو

المستوى الملحي ديسي سيمنز/م	الوزن الطري (ملغم)	الوزن الجاف (ملغم)
6	198.69	21.97
8	175.03	18.38
10	132.70	11.36
L.S.D. (0.05)	4.72	1.26



شكل (4) الكالس المستحدث من نبات الفلفل النامي على الاوساط الملحية (1) EC 6 (2) EC 8 (3) EC 10



شكل (5) الكالس الاحمر اللون النامي على الوسط EC 8