

الإضافتان التدريجية والمباشرة لملاح كلوريد الصوديوم ودور البرولين في التقليل من آثارهما
في صنفين من نبات الحنطة (*Triticum aestivum* L.) المستزرع نسيجيا

حسين خلف الكعبي* و لمى حسين عبد القادر* و حسن عبد الكريم قاسم**

* جامعة البصرة – كلية التربية للعلوم الصرفة – قسم عوم الحياة ** المديرية العامة لتربية محافظة البصرة

المستخلص

اجريت تجارب مختبرية في مختبر الزراعة النسيجية لقسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة-جامعة البصرة وذلك لغرض اختبار تاثير اضافة ملح كلوريد الصوديوم بصورة مباشرة وبصورة تدريجية ودور اضافة الحامض الاميني البرولين الى الوسط الغذائي في استحثات الكالس ونسب انبات الاجنة الجسمية لصنفي نبات الحنطة دور 99 و تموز2.

استعمل في التجارب الوسط الغذائي المتكون من املاح MS (Murashige and Skoog,1962) والمضاف اليه المواد التالية: السكروز و اورثو- فوسفات الصوديوم الحامضية و المايواينوسيتول و كبريتات الاديئين و ثيامين حامض الخليك وذلك وفق (Tisserat(1981). كما اضيف الاوكسين-D،4،2 بتركيز 4 ملغم.لتر¹ والاكاز بتركيز 5 ملغم.لتر¹.

تمت اضافة ملح كلوريد الصوديوم لوحده بالتراكيز 0 و 0.5% و 1% و 1.5% كما تمت اضافته بذات التراكيز مع وجود الحامض الاميني البرولين بتركيز 50 ملغم.لتر¹ بصورة مباشرة (تمت زراعة وزن معين من الكالس بعد تكونه في كل من التراكيز اعلاه لمدة شهر) وبصورة تدريجية (تم نقل ذات الوزن من الكالس من التركيز المنخفض الى التركيز الذي يليه بعد بقاءه فيه لمدة شهر).

اثبتت النتائج ان اضافة ملح كلوريد الصوديوم الى الوسط الغذائي ادى الى خفض معنوي في الوزن الطري للكالس الجنيني عند التركيزين 1% و 1.5% فيما سبب التركيز 0.5% زيادة معنوية فيه بالمقارنة مع السيطرة. كما اظهرت النتائج تفوق الصنف تموز2 على الصنف اباء99 في معدل الوزن الطري للكالس الجنيني. اما بالنسبة الى دور البرولين فقد بينت النتائج ان دوره كان ايجابيا اذ سبب زيادة معنوية في الوزن الطري للكالس الجنيني في كلا نوعي الاضافة بالمقارنة مع الوسط الخالي من البرولين ومعاملة السيطرة.

كما اوضحت النتائج ان تاثير الملوحة في النسب المئوية لانبات الاجنة الجسمية كان مماثلا لتاثيرها في الوزن الطري للكالس الجنيني اذ سببت خفضا معنويا فيها عند التراكيز 1% و 1.5% بالمقارنة مع السيطرة ولكن لم تظهر فروق معنوية بين الصنفين في هذه النسب.

الكلمات المفتاحية: كلوريد الصوديوم، البرولين، الحنطة، الاضافة التدريجية، الاضافة المباشرة، الكالس، الاجنة الجسمية.

المقدمة

الحنطة الناعمة (*Triticum aestivum* L.) ، نبات عشبي من العائلة النجيلية (Poaceae) التي تضم 450 جنساً و المنتشرة في مختلف أنحاء العالم . ويندرج ضمن أقدم وأهم المحاصيل على مستوى العالم لكونها المادة الأساسية في غذاءه والمصدر الاساس للطاقة إذ توفر للشخص البالغ أكثر من (25%) من حاجته للبروتين (Gooding and Davies, 1997) و أكثر من (50%) من حاجته للطاقة (Dukes et al., 1995).

إن احد المشاكل الأساسية التي تواجه التوسع في زراعة وأنتاج الحنطة في العالم و في العراق و لا سيما في المناطق الاروائية هو ارتفاع مستوى الملوحة في التربة , وعلى هذا الأساس وضع علماء النبات برامج بحثية لإستنباط ضروب ذات تحمل للملوحة للعديد من المحاصيل الاستراتيجية , إذ إن الملوحة عامل رئيسي محدد لمعدل أنتاج محصول الحنطة في المناطق القاحلة وشبه القاحلة للعالم , إذ إن أكثر من 800 مليون هكتار من مساحة الأرض الكلية متأثر بالملوحة في كافة أنحاء العالم (FAOSTAT, 2008) و هذه تشكل أكثر من (6%) من مساحة الأرض الكلية .

ومما تجدر الإشارة اليه ان حوالي(20%) من الأراضي المزروعة في العالم متأثرة بالملوحة بدرجات متفاوتة وهذا يؤدي الى فقدان مايقارب 50% من الحاصل الزراعي (Zhu et al., 2001). ويعد العراق في مقدمة البلدان العربية والآسيوية المتأثرة أراضيها بالملوحة (Batanony, 1996).

للملوحة تأثيرات ضارة في العمليات الفسلجية في النبات وتؤدي الى تخفيض نمو و تطور النبات (Tester and Davenport, 2003) . هذه التأثيرات الضارة تستحث بوساطة اعاققة تدفق الماء و المغذيات الى النباتات (التأثير الازموزي) او من خلال تراكم الأيونات السامه (التأثير الايوني)(Apse and Blumwald, 2002) . يبدأ التأثير الأزموزي مباشرة بعد ازدياد تركيز الاملاح في التربة او الوسط الغذائي. كما يعد التأثير الأزموزي هو المساهم الأساس في تخفيض نمو النبات في المراحل المبكرة و يظهر ذلك من خلال الأنخفاض في تكوين الأوراق الجديدة وفي تمددها وفي تطور البراعم الجانبية الذي يؤدي الى تقليل تكون الفروع الجانبية في النبات (Munns and Tester, 2008). وعندما يزداد تركيز الملح في وسط النمو فإن الجهد الأزموزي للوسط ينخفض و يعيق تدفق الماء و المواد الغذائية من خلال أغشية خلايا الجذر مؤدياً الى تقليص عام في نمو النبات و تطوره (Volkamar et al., 1998).

هنالك عدد من الطرق الحيوية و غير الحيوية لتقليل مشكلة ملوحة التربة و تحسين الأنتاج الزراعي في الظروف الملحية . تتضمن الطرق غير الحيوية الشائعة غسل الأملاح من الترب Leaching of salts و إدارة المحاصيل Managing crops و التحسين الكيماوي للتربة (Chemical amelioration of soil , Goyal et al., 1999) و تعد هذه التقانات غالية و مجهدة و توفر الحل لفترة قصيرة الأمد (El-Hendawy et al., 2009) , لذا تم اللجوء الى الطرق الحيوية و منها زراعة الخلايا والأنسجة النباتية خارج الجسم الحي والتي تعد من الوسائل المفيدة لدراسة آليات التحمل الملحي على مستوى الخلية النباتية , إذ إنها توفر تطبيقات ممكنة لأختيار

الخلايا المتحملة للملوحة في الوسط الزراعي ومن هذه الخلايا المتحملة يمكن انتاج نباتات تكون أكثر مقاومة للملوحة من النبات الأم (Abdel- Hady *et al.*, 2001) .

وبالنظر الى التأثيرات الضارة للشدود البيئية ومنها تراكم الأملاح فقد طورت النباتات من وسائل الحماية والوقاية ضد هذه التأثيرات ومنها تصنيع ومراكمة مواد ذائبة تعرف بالحاميات الأزموزية osmoprotectants في خلاياها لغرض مواجهة الشدود المختلفة كالجفاف او التراكيز الملحية المرتفعة وغيرها ، وبصورة عامة فأن زيادة تراكيز هذه الذائبات لا يثبط أو يؤثر في الأيض الخلوي. و من هذه الذائبات التي لوحظت في النباتات الحامض الأميني البرولين (Chen and Morata,2002) . و يعتبر البرولين أحد اهم الحاميات الأزموزية والذي يرتبط مباشرة بتنظيم الجهد لأزموزي للخلية النباتية لمواجهة الأجهاد الملحي او المائي و يعتمد تراكم البرولين تحت ظروف الأجهاد البيئي على نوع النبات ومستوى الأجهاد و يعرف بمنحه النبات القدرة على تحمل الشد الأزموزي (Ashraf *et al.*, 2005).

تعتبر تقانة زراعة الأنسجة النباتية من الوسائل المستخدمة حديثاً لمعرفة حدود التحمل الملحي للخلايا و الأنسجة النباتية المزروعة خارج الجسم الحي و لإنتاج سلالات متحملة للملوحة (Zair *et al.*, 2003). و قد جذبت زراعة الخلية و الأنسجة النباتية خارج الجسم اهتماماً كبيراً في السنوات الأخيرة لأنها توفر وسائل لدراسة العمليات الفسلجية و الوراثة للنباتات إضافة الى القدرة على تربية الأصناف المحسنة التي تنتج بوساطة هذه التقانة. ان استعمال هذه التقانة يوفر العديد من المزايا التي لم تكن متوفرة من قبل في طرق التربية التقليدية وأهمها سهولة إجراء الانتخاب على المستوى الخلوي الذي يتيح فصل الخلايا التي تحمل الصفة المرغوبة وإمكانية تقييم النباتات الناتجة في مراحل مختلفة من النمو والتطور وكذلك دراسة مقدرة النبات على توريث الصفة ودرجة ثباتها من خلال فحص ودراسة النسل الناتج من هذه النباتات (مهدي و حمد، 2006).

ونظرا الى ان التأثيرات السلبية للملوحة و المشاكل الناتجة عنها قد أصبحت خطراً يهدد الأقتصاد الزراعي على مستوى العالم و بالأخص إنتاج الحبوب و على وجه التحديد في العراق لكون محصول الحنطة يعد محصولاً إقتصادياً رئيساً فيه , ولقلة الدراسات حول التحمل الملحي لنبات الحنطة تحت ظروف الزراعة النسيجية , عليه فقد أستهدفت الدراسة الحالية ما يلي :

- 1- إستحثاث تكوين الكالس من البذور الناضجة لصنفي الحنطة إباء99 و تموز2.
- 2- دراسة تأثير إضافة تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم (بصورة تدريجية ومباشرة) في الوزن الطري للكالس وفي نسب إنبات الاجنة الجسمية.
- 3- دراسة دور اضافة الحامض الأميني البرولين في تقليل أثر الملوحة خلال مرحلتي تكون الكالس والاجنة الجسمية.

مواد العمل و طرائقه

أجريت الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة في قسم علوم الحياة - كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة البصرة للفترة من أيلول 2009 إلى أيلول 2010.

تم اتباع الخطوات التالية:

اختيار الجزء النباتي Explant

تم اختيار بذور صنفين من الحنطة هما إباء99 و تموز2، وتم جلبهما من محطة فحص وتصديق البذور التابعة لوزارة الزراعة في أبي غريب.

التعقيم السطحي للبذور Surface Sterilization

وضعت البذور الناضجة في الكحول الأيثلي (70%) لمدة ثلاث دقائق مع التحريك الهادئ وغُسلت بعد ذلك بالماء المقطر و المعقم , ثم نقلت الى محلول القاصر التجاري Clorox الحاوي على 5% من هايبوكلورات الصوديوم Sodium hypochlorite لمدة ثلاثين دقيقة مع التحريك وأضيفت قطرة واحدة من مادة Tween-20 لكل 100 سم³ من المحلول. ثم غُسلت البذور بعد ذلك بالماء المقطر والمعقم ثلاث مرات في الأقل . أجريت هذه العملية على منضدة انسياب الهواء الطبقي Laminar air flow cabinet المعقمة مسبقاً بالكحول الأيثلي (70%).

تحضير الوسط الغذائي Preparation of the nutrient medium

استعمل الوسط الغذائي المحضر من قبل Murashige and Skoog(1962) المتكون من مجموعة من الأملاح اللاعضوية والمعروف اختصاراً بـ MS والمجهز من شركة phytotechnology الأمريكية بصورة مسحوق جاهز اذ أخذ 4.32غم من المسحوق لتحضير لتر واحد من المحلول كامل القوة. اضيف الى المحلول المواد التالية:

السكروز 30غم.لتر⁻¹ و اورثوفوسفات الصوديوم الحامضية 170ملغم.لتر⁻¹ و المايواينوسيتول 100ملغم.لتر⁻¹ و كيرينات الادينين 40ملغم.لتر⁻¹ و ثيامين حامض الهيدروكلوريك 0.5ملغم.لتر⁻¹. وذلك وفق Tisserat(1981). كما اضيف الاوكسين 2,4-D بتركيز 4 ملغم.لتر⁻¹.

و وضع المحلول على سخان مزود بخلاط مغناطيسي Magnetic stirrer hot plate و ضبط الرقم الهيدروجيني (pH) بحيث يساوي 5.8 باستخدام جهاز Digital pH meter وتمت معايرة الوسط بوساطة هيدروكسيد البوتاسيوم 0.1N او حامض الهيدروكلوريك 0.1N. أُضيفت بعد ذلك مادة الأكار Agar بتركيز 7 غم.لتر⁻¹. سخن الخليط حتى 92 درجة سيليزية. وزع الوسط الغذائي بعد ذلك في أنابيب اختبار من نوع Pyrex قياس 24x150 ملم بواقع 10 سم³ لكل أنبوبة و أغلقت الانابيب بسدادات من القطن و غُلفت برفائق الألمنيوم (Aluminum foils) لتصبح جاهزة للتعقيم . عُقمت الأنابيب لمدة 20 دقيقة في جهاز المعقم (Autoclave)

وعلى درجة حرارة 121 درجة سيليزية و ضغط 0.1 ميكاباسكال. أُستخرجت الأنابيب بعد الانتهاء من التعقيم و رجت لمجانسة محتوياتها وتركت لتبرد وتتصلب حتى موعد الزراعة.

استزراع الأجزاء النباتية و إستحداث الكالس

زُرعت الأجزاء النباتية المعقمة بعد تعقيمها في الأوساط التي حضرت مسبقاً , بمعدل أربع بذرات لكل أنبوبة و بواقع عشرة مكررات لكل معاملة و لكلا الصنفين . و أُجريت هذه العملية داخل منضدة إنسياب الهواء الطبقي المعقمة , وقد عُقمت الأدوات المستعملة في الزراعة بالكحول الأثيلي (70%) و باستمرار في أثناء فترة الزراعة . ثم حُضنت الزروعات في غرفة النمو (Growth room) عند درجة حرارة 25 ± 2 درجة سيليزية في الظلام.

مرحلة إكثار الكالس

ابتدا تكون الكالس بعد 7-10 ايام وبعد مرور 4 أسابيع من تكون الكالس ازدادت كتلته وحجمه في كلا الصنفين , و أُجريت عليه عملية الزراعة ثانوية Sub culture وذلك بتقطيعه إلى عدة أجزاء ونقله إلى أوساط غذائية جديدة بنفس المواصفات لغرض إكثاره وزيادة كميته . حُضنت الزروعات في غرفة النمو عند درجة حرارة 25 ± 2 درجة سيليزية لمدة 16 ساعة ضوء و 8 ساعات ظلام.

إضافة ملح كلوريد الصوديوم الى الوسط الغذائي بصورة تدريجية

أخذ 0.1 غم من الكالس المكثّر ووضع في التركيز الملحي 0.5% من كلوريد الصوديوم في البداية لمدة شهر تم بعدها حساب وزنه الطري ثم نقل 0.1 غم من هذا الكالس الى وسط غذائي جديد بنفس المواصفات حاوي على 1% من الملح و هكذا بالنسبة للتركيز 1.5%، مع معاملة السيطرة (بالوسط الغذائي الخالي من الملح) والذي يستبدل بعد مرور ذات المدة التي يستبدل فيها الوسط الحاوي على الملح .

إضافة ملح كلوريد الصوديوم الى الوسط الغذائي بصورة مباشرة

تم فيها استزراع ذات الوزن من الكالس 0.1 غم في كل التراكيز الملحية المذكورة في تجربة الاضافة التدريجية بصورة مباشرة و لمدة شهر.

ويعني ذلك ان معدلات الوزن الطري لمعاملتي السيطرة ومعاملة التركيز الملحي 0.5% كانتا متماثلتين في نوعي الاضافة لانهما ابتداء في ذات الوقت.

اضافة الحامض الاميني البرولين الى الوسط الغذائي

ولغرض تحديد دور التداخل بين البرولين وكلوريد الصوديوم فقد تمت اضافة البرولين بتركيز 50 ملغم/لتر¹ الى كلا الوسطين المعاملين بملح كلوريد الصوديوم بطريقتي الاضافة التدريجية والاضافة المباشرة وتمت مقارنة ذلك مع كلا نوعي الاضافة دون وجود البرولين في الوسط الغذائي.

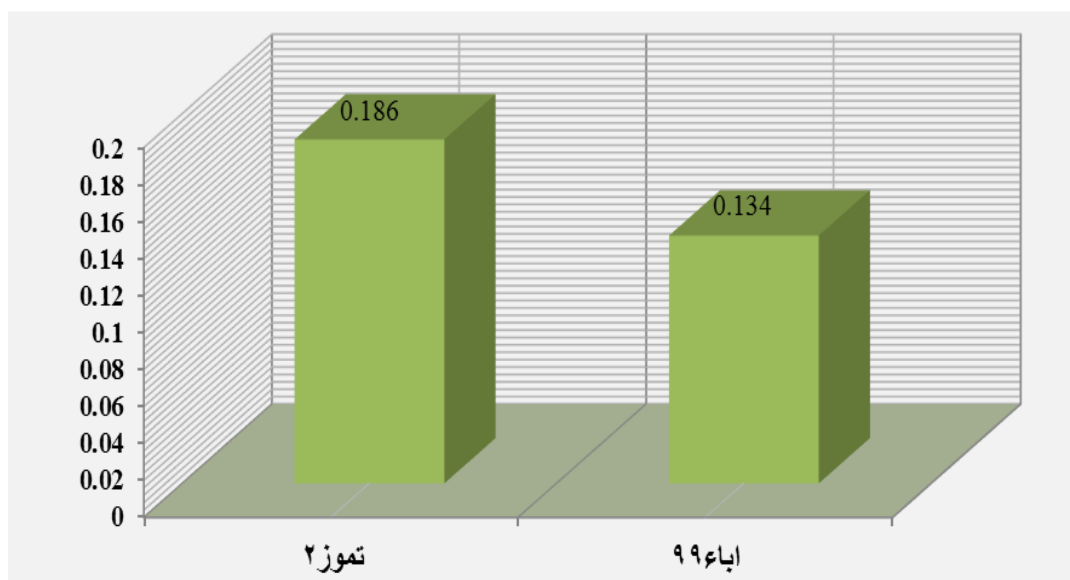
التحليل الأحصائي

استعمل تصميم القطاعات العشوائية الكاملة Randomized complete block design لتجربة عاملية Factorial experiment بعاملين (4×2) هما صنفى الحنطة × تراكيز الملح بوجود او عدم وجود البرولين. وبعد الحصول على جدول تحليل التباين تمت مقارنة المتوسطات باستعمال اختبار اقل فرق معنوي المعدل *RLSD* عند مستوى احتمال 0.05 (الساهوكي و وهيب، 1990) وقد استعمل البرنامج الاحصائي GENSTAT في الحصول على النتائج كافة.

النتائج و المناقشة

تأثير إضافة ملح كلوريد الصوديوم في معدل الوزن الطري للكالس الجنيني لصنفى الحنطة في الوسط الخالي من البرولين عند الأضافة التدريجية والمباشرة

أظهرت النتائج في الشكل (1) التفوق المعنوي للصنف تموز 2 على الصنف اباء 99 في معدل الوزن الطري للكالس الجنيني بعد أربعة أسابيع من الزراعة كمعدل للأضافة بملح كلوريد الصوديوم . إذ سجل الصنف تموز 2 أعلى معدل للوزن الطري والذي بلغ 0.186 غم بالمقارنة مع 0.134 غم للصنف اباء 99.



شكل (1) تأثير الصنف عند الأضافة التدريجية والمباشرة لكلوريد الصوديوم في الوزن الطري (غم) للكالس الجنيني لنبات الحنطة في الوسط الخالي من البرولين

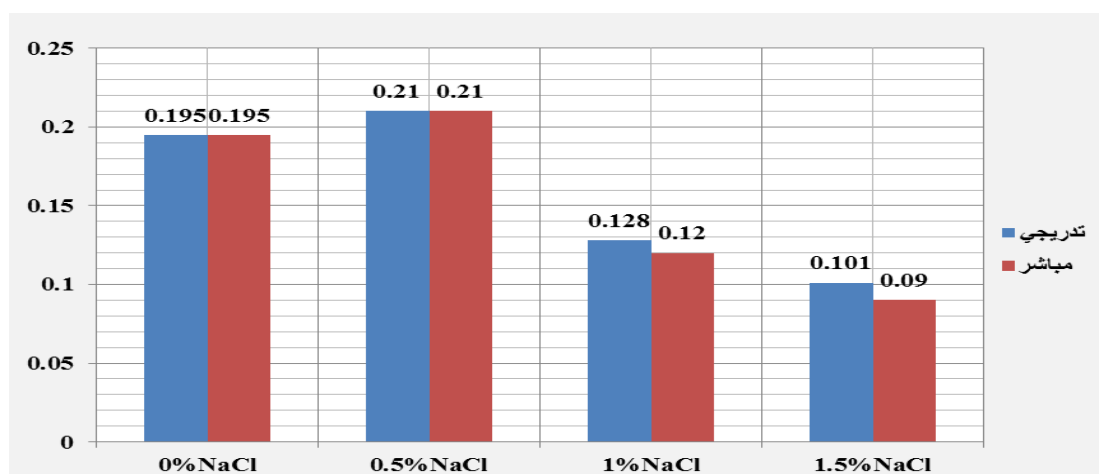
RLSD = 0.001

كما و يلاحظ من الشكل (2) أن الأضافتين التدريجية و المباشرة بملح كلوريد الصوديوم قد سببتا خفضاً

معنوياً في معدل الوزن الطري للكالس الجنيني ولاسيما عند التركيزين 1% و 1.5% بالمقارنة مع معاملة

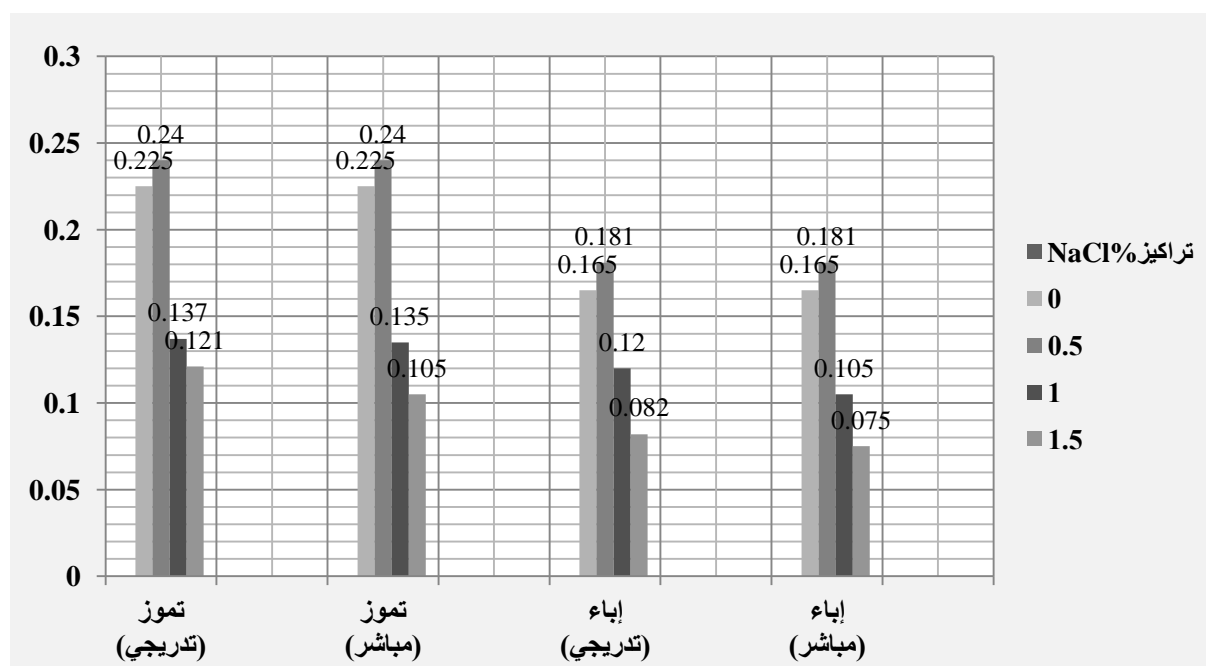
السيطرة وان الانخفاض كان أكثر وضوحا في حالة الأضافة المباشرة. كما و يلاحظ أن المعاملة بالتركيز 0.5

% قد أدت الى زيادة معنوية في معدل الوزن الطري عند نوعي الأضافتين بالمقارنة بمعاملة السيطرة .



شكل(2) تأثير التراكيز الملحية لكوريد الصوديوم عند الأضافة التدريجية والمباشرة في الوزن الطري(غم) للكالس الجنيني لنبات الحنطة في الوسط الخالي من البرولين , $RLSD=0.002$

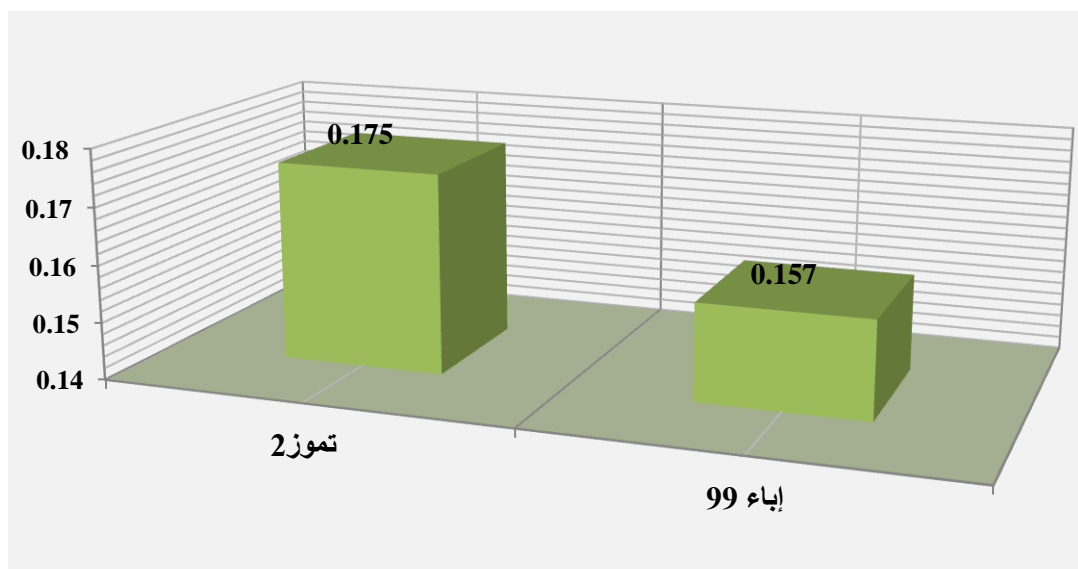
وفيما يخص بين الصنفين والأضافتين التدريجية والمباشرة بملح كلوريد الصوديوم (شكل3)فإن معاملة التداخل بين الصنف تموز2 و المعاملة 0.5% قد حققت أعلى وزن طري بلغ 0.240 غم و بفارق معنوي عن بقية التداخلات ، كذلك فإن معاملة التداخل بين الصنف اباء99 و المعاملة المباشرة 1.5% أعطت أقل معدل للوزن الطري إذ بلغ عندها 0.075 غم والتي أختلفت معنويًا مع بقية التداخلات .



شكل(3) تأثير التداخل بين التراكيز الملحية ونوعي الأضافة والصنف في الوزن الطري للكالس الجنيني (غم) لنبات الحنطة في الوسط الخالي من البرولين ، $RLSD= 0.003$

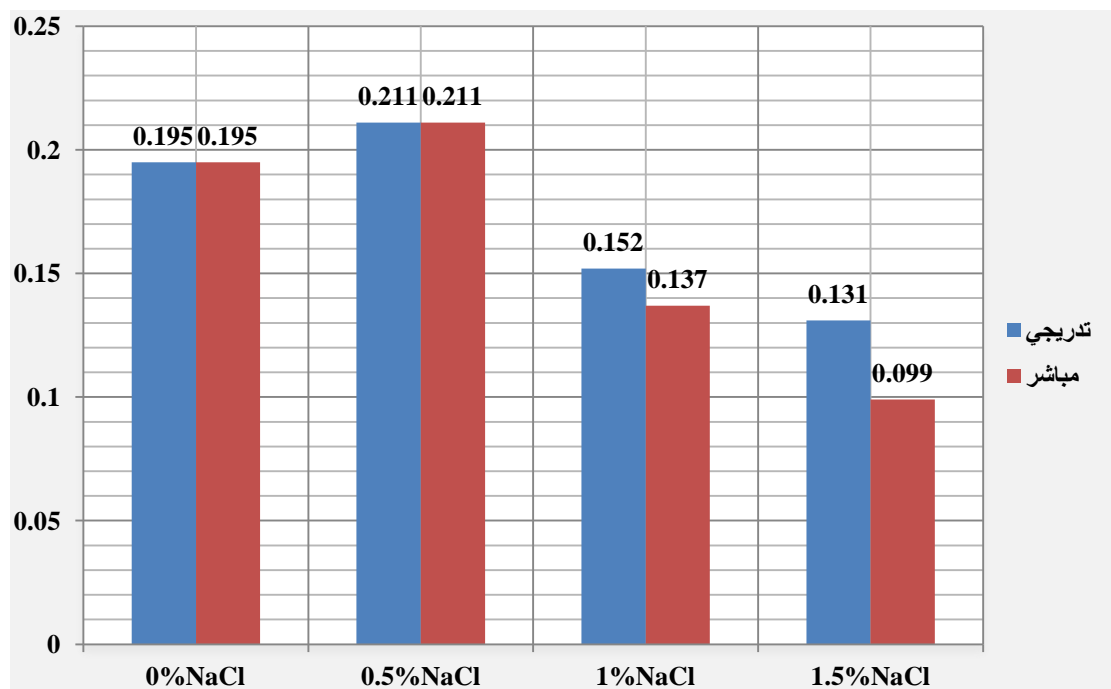
تأثير إضافة ملح كلوريد الصوديوم في معدل الوزن الطري للكالس الجنيني لصنفي الحنطة في الوسط الحاوي على البرولين عند المعاملتين التدريجية والمباشرة

أشارت النتائج المبينة في الشكل (4) أن الصنف تموز2 قد تفوق معنوياً أيضاً على الصنف اباء99 في معدل الوزن الطري للكالس الجنيني في كلا المعاملتين بعد اضافة البرولين الى الوسط الغذائي. كما يلاحظ في الشكل ذاته ان وجود البرولين قد ادى الى زيادة معنوية في معدل الوزن الطري للكالس الجنيني لكلا الصنفين وفي كلا نوعي المعاملة ولاسيما للصنف اباء99 عند المقارنة بالوزن الطري المتحقق في حالة عدم وجود البرولين اذ بلغ الوزن الطري للصنف اباء99 0.158غم عند وجود البرولين بينما بلغ 0.134 غم عند انعدام البرولين كمعدل للمعاملتين التدريجية و المباشرة.



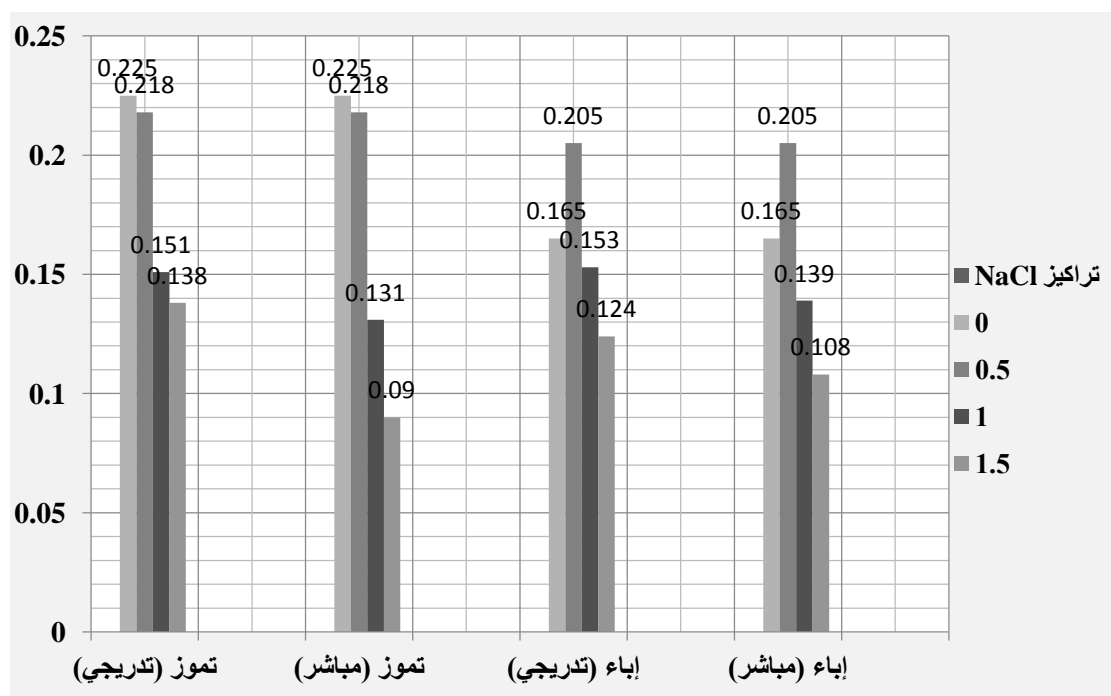
شكل (4) تأثير الصنف عند الأضافة التدريجية والمباشرة لكلوريد الصوديوم في الوزن الطري (غم) للكالس الجنيني لنبات الحنطة في الوسط الحاوي على البرولين ، $RLSD = 0.001$

كذلك بينت النتائج (شكل5) أن اضافة البرولين عند المعاملتين الملحيتين التدريجية والمباشرة أدى الى حدوث زيادة معنوية في الوزن الطري للكالس الجنيني و لاسيما عند التركيز 0.5% بالمقارنة مع معاملة السيطرة. في حين سببت هذه المعاملات انخفاضاً في معدل الوزن الطري عند التركيزين 1% و 1.5% وسجل التركيز 1.5% أقل معدل وزن طري بلغ 0.099 غم عند المعاملة المباشرة ولكنه كان متفوقاً في ذلك على الوزن الطري المسجل لذات المعاملة في حالة عدم وجود البرولين والذي بلغ 0.090غم.



شكل(5) تأثير التركيز الملحية عند الأضافة التدريجية والمباشرة لكلوريد الصوديوم في الوزن الطري (غم) للكالس الجنيني لنبات الحنطة في الوسط الحاوي على البرولين ، $RLSD= 0.002$

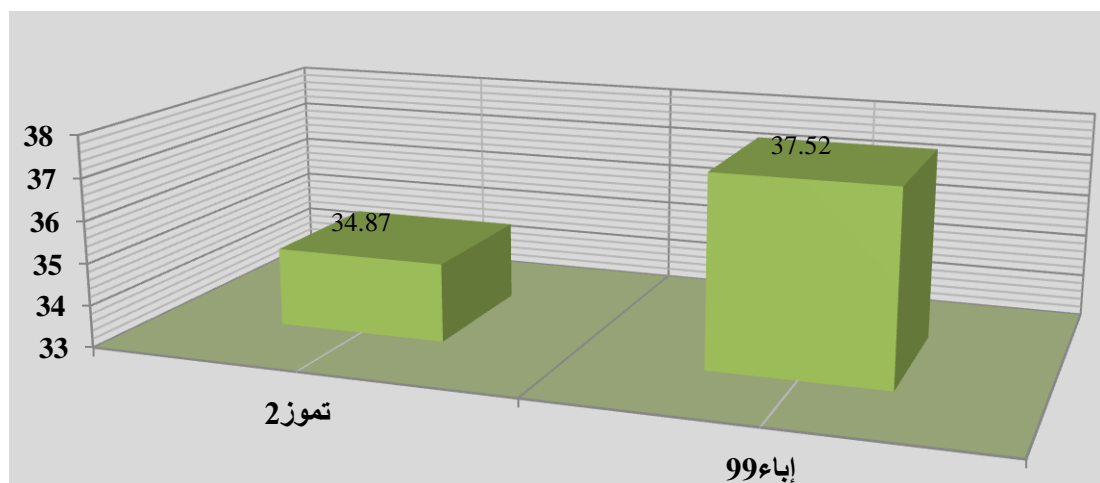
وبينت نتائج التداخل للمعاملتين مع الصنفين (شكل6) ان اعلى إنخفاض معنوي في معدل الوزن الطري كان عند التداخل بين الصنف اباء99 و التركيز 1.5% من الملح عند المعاملة المباشرة في حين حققت معاملة التداخل بين الصنف تموز2 ومعاملة السيطرة اعلى معدلات التداخل وبصورة معنوية عن بقية المعاملات.



شكل(6)تأثير التداخل بين التراكيز الملحية ونوعي الأضافة والصنف في الوزن الطري(غم) للكالس الجنيني لنبات الحنطة في الوسط الحاوي على البرولين ، $RLSD= 0.003$

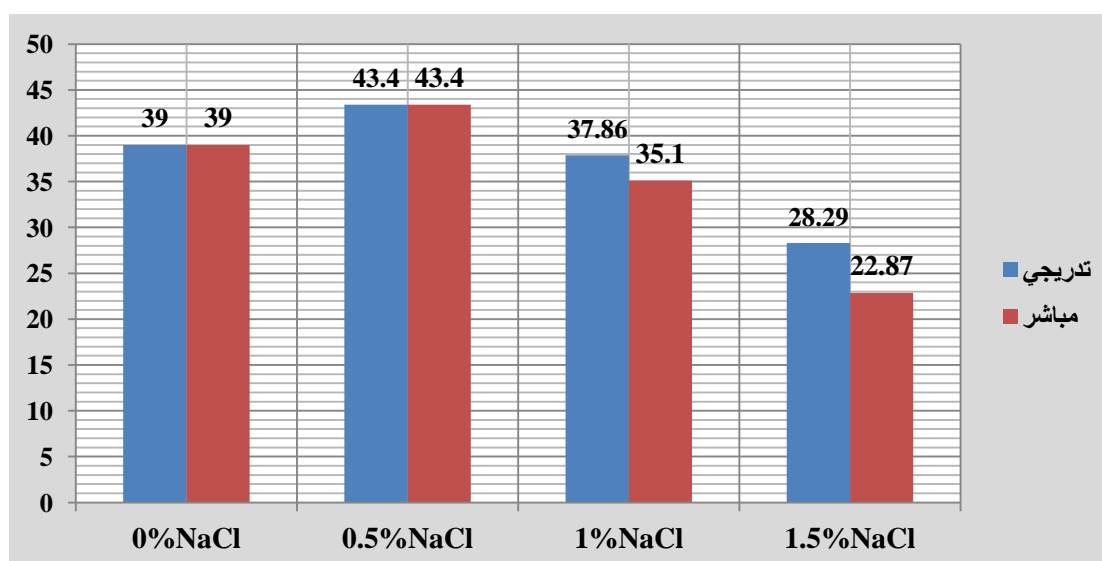
تأثير إضافة ملح كلوريد الصوديوم في معدل النسبة المئوية لإنبات الأجنة الجسمية لصنفي الحنطة في الوسط الخالي من البرولين عند المعاملتين التدريجية والمباشرة

أوضحت النتائج المعروضة في الشكل (7) عدم وجود فروق معنوية بين الصنفين تموز2 و اباء 99 في النسبة المئوية لإنبات الاجنة الجسمية في الوسط الخالي من البرولين كمعدل للمعاملتين .



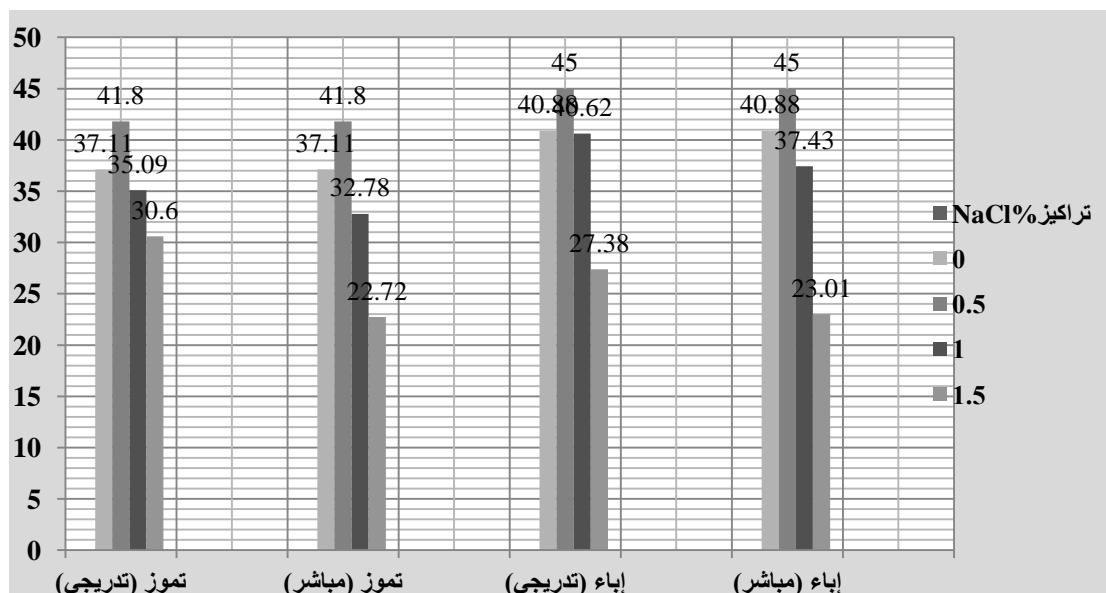
شكل (7) تأثير الصنف عند الأضافة التدريجية والمباشرة لكلوريد الصوديوم في النسبة المئوية (%) لإنبات الأجنة الجسمية لنبات الحنطة في الوسط الخالي من البرولين ، $RLSD= N.S$

كما يوضح الشكل (8) ان الفروق لم تكن معنوية في النسبة المئوية لإنبات الاجنة الجسمية بين التركيز 0.5 % ومعاملة السيطرة في كلا نوعي المعاملة، بينما حدث انخفاض معنوي في نسب انبات الاجنة الجسمية عند التركيزين 1% و 1.5% وكانت اقل نسبة لإنبات الاجنة الجسمية عند التركيز 1.5% في حالة المعاملة المباشرة والتي بلغت 22.87%.



شكل (8) تأثير التراكيز الملحية عند الأضافة لتدريجية والمباشرة لكلوريد الصوديوم في النسبة المئوية (%) لإنبات الجنة الجسمية لنبات الحنطة في الوسط الخالي من البرولين ، $RLSD=4.65$

و تبين من نتائج التداخل للمعاملتين مع الصنفين (شكل9) ان اعلى انخفاض معنوي في النسبة المئوية لإنبات الأجنة كان عند التداخل بين الصنف تموز2 و التركيز 1.5% عند الماملة المباشرة ، في حين حققت معاملة التداخل بين الصنف اباء99 و التركيز 0.5% أعلى قيمة للنسبة المئوية للإنبات وبفارق معنوي عن بقية التداخلات.



شكل(9) تأثير التداخل بين التراكيز الملحية ونوع الأضافة لكلوريد الصوديوم والصنف في النسبة المئوية (%) لأنبات الأجنة الجسمية لنبات الحنطة في الوسط الخالي من البرولين ، $RLSD=0.6.55$

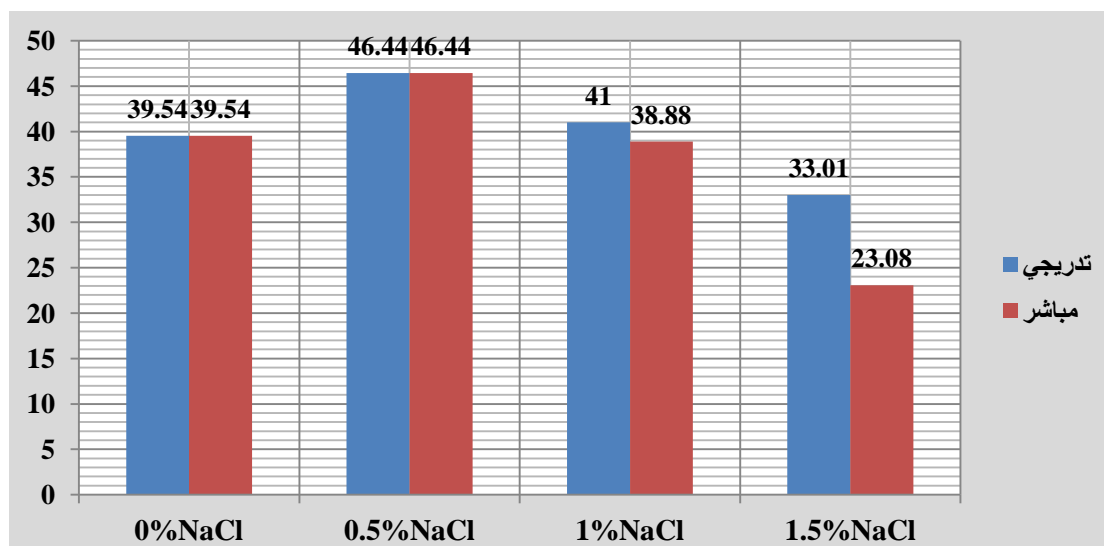
تأثير إضافة ملح كلوريد الصوديوم في معدل النسبة المئوية لإنبات الأجنة الجسمية لصنفي الحنطة في الوسط الحاوي على البرولين عند المعاملتين التدرجية والمباشرة

لوحظ من النتائج المعروضة في شكل (10) عدم ظهور فرق معنوي بين الصنفين اباء99 و تموز2 في معدل نسب إنبات الأجنة الجسمية في الوسط الحاوي على البرولين لكلا نوعي المعاملة.



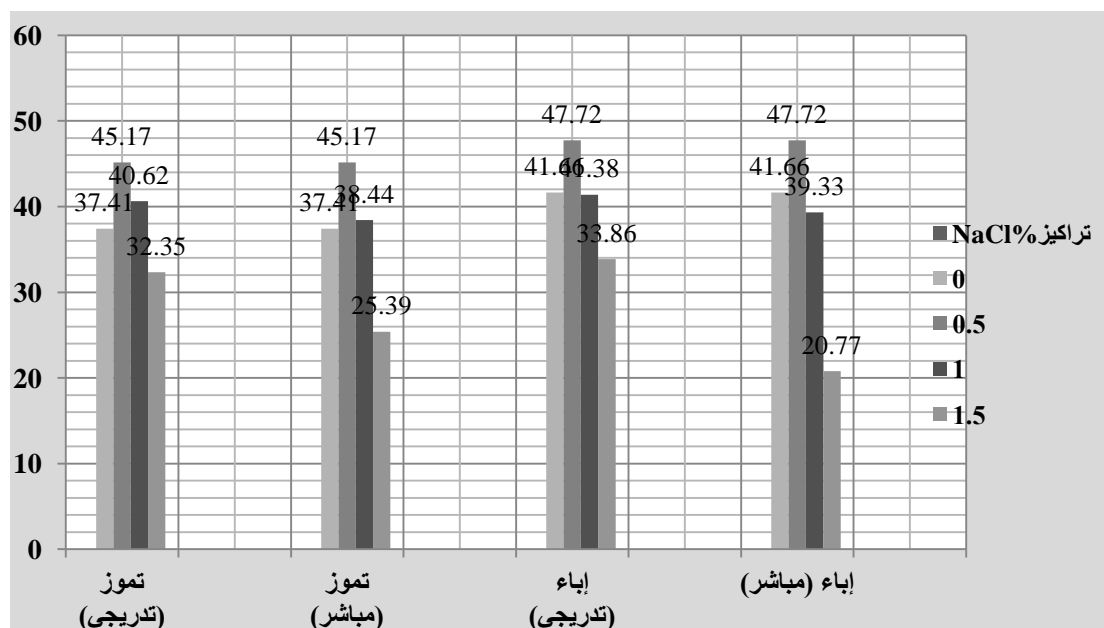
شكل(10) تأثير الصنف عند المعاملة التدرجية والمباشرة لكلوريد الصوديوم في النسبة المئوية (%) لأنبات الأجنة الجسمية لنبات الحنطة في الوسط الحاوي على البرولين ، $RLSD=N.S.$

كما و يلاحظ من الشكل (11) أن المعاملة بملح كلوريد الصوديوم بالتركيز 0.5% بوجود البرولين قد أدت الى زيادة معنوية في نسبة الإنبات بالمقارنة مع معاملة السيطرة، إذ بلغت النسبة 46.44% كما ويلاحظ ان التركيز 1.5% قد سبب خفصاً معنوياً في معدل نسبة الإنبات بلغ اقصاه (23.08%) وذلك في حالة المعاملة المباشرة.



شكل (11) تأثير التراكيز الملحية عند الأضافة التدريجية والمباشرة لكلوريد الصوديوم في النسبة المئوية (%) لانبات الأجنة الجسمية لنبات الحنطة في الوسط الحاوي من البرولين ، $RLSD = 2.73$

و تبين من نتائج تداخل نوعي المعاملة مع الصنفين (شكل12) حدوث أعلى انخفاض معنوي في نسبة الإنبات بتداخل الصنف اباء99 و التركيز 1.5% عند المعاملة المباشرة في حين حققت معاملة التداخل بين الصنف اباء99 و التركيز 0.5% أعلى نسبة إنبات للأجنة الجسمية.



شكل (12) تأثير التداخل بين التراكيز الملحية ونوعي الأضافة لكلوريد الصوديوم والصنف في النسبة المئوية (%) لانبات الأجنة الجسمية لنبات الحنطة في الوسط الحاوي على البرولين ، $RLSD = 3.89$

ومن الجدير بالملاحظة ان اضافة البرولين الى الوسط الغذائي سببت فروقا معنوية في نسب انبات الاجنة الجسمية عند التراكيز الملحية كافة وعند التداخل بين الصنفين ونوعي المعاملة بالمقارنة مع النسب المتحققة عند عدم وجوده في الوسط الغذائي.

أظهرت النتائج المبينة في هذه الدراسة حدوث زيادة في معدل الوزن الطري للكالس الجنيني وفي نسب انبات الاجنة الجسمية عند التركيز 0.5% من ملح كلوريد الصوديوم , وهذا يتفق مع ما توصل اليه الكعبي (2004) على نبات النخيل و محمد (2009) على نبات الرز من إن التراكيز المعتدلة للأملاح تؤدي الى زيادة في الوزن الطري للكالس و ربما يعود السبب فيها الى أن المستويات المنخفضة من ملح كلوريد الصوديوم تكون ضرورية لتحفيز الفعاليات الحيوية اللازمة للنمو لانه يستحث خلايا الانسجة النباتية على إمتصاص الماء والايونات الضرورية للنمو لخفض قيمة الجهد المائي للخلايا ومن ثم المحافظة على الجهد الضغطي وعلى التوازن الايوني كذلك فان زيادة امتصاص العناصر الغذائية تعتبر وسيلة من وسائل التأقلم لظروف الشد الملحي (Munns , 2002 ; Zuoine and El-Hadrami, 2004).

وقد أظهرت الدراسة حدوث انخفاض في الوزن الطري للكالس عند التراكيز العالية من الأملاح للصنفين اباء99 و تموز2 وكان الانخفاض أكثر وضوحا عند التركيز 1.5% من كلوريد الصوديوم وهذا يتفق مع ما توصل إليه عدة باحثين منهم محمد (2009) على نبات الرز و Patade *et al.* (2008) على نبات قصب السكر.

ويُعزى سبب انخفاض الوزن الطري بارتفاع تركيز الملح في الوسط الغذائي إلى عدة أسباب منها: التأثير الازموزي والتأثير الأيوني (Sairam and Tygai, 2004) إذ تؤدي زيادة تراكيز الأملاح إلى خفض جاهزية الماء للخلايا وتؤثر في نموها ، كما تؤدي زيادة تركيز الملح إلى إنخفاض في الجهد الازموزي في وسط النمو (Rahmanzadeh *et al.*, 2008) . كذلك فإن الملوحة تؤثر في تخليق البروتينات اللازمة لنمو الخلايا من خلال تثبيطها لبعض الانزيمات المسؤولة عن بناء البروتينات وكذلك انخفاض في الحامض النووي RNA الضروري لتخليق البروتين ، فضلاً عن تثبيطها للعمليات الايضية في الخلية (Munns,2002).

تبين من نتائج الدراسة أن تأثير ملح كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي على نمو الكالس قد يكون تأثيراً ازموزياً بسبب عدم ظهور أعراض السمية الأيونية على الكالس مثل توقف النمو . إذ استمر الكالس بالنمو والانقسام حتى في التراكيز العالية من الملح ولكن بمعدلات أبطأ مقارنة مع التراكيز المعتدلة , أو قد يكون تأثيراً غذائياً بسبب اضطراب امتصاص الأيونات المعدنية أو امتصاص أيون معين لا يحتاجه الكالس على حساب ايون آخر ضروري للنمو (Tuteja, 2005) .

و بينت النتائج أن اضافة البرولين الى الوسط الحاوي على ملح كلوريد الصوديوم قد سببت زيادة معنوية في معدل الوزن الطري للكالس الجنيني لصنفي الحنطة اباء99 و تموز2 و يمكن أن يكون ذلك عائداً الى دور البرولين في التنظيم الأزموزي إذ يعمل البرولين كمنظم ازموزي داخل الساييتوبلازم ضد التراكيز العالية للايونات الموجودة بالفجوة (El- Enany, 1995) و المحافظة على عملية التوازن بين الفجوة والساييتوبلازم من جهة

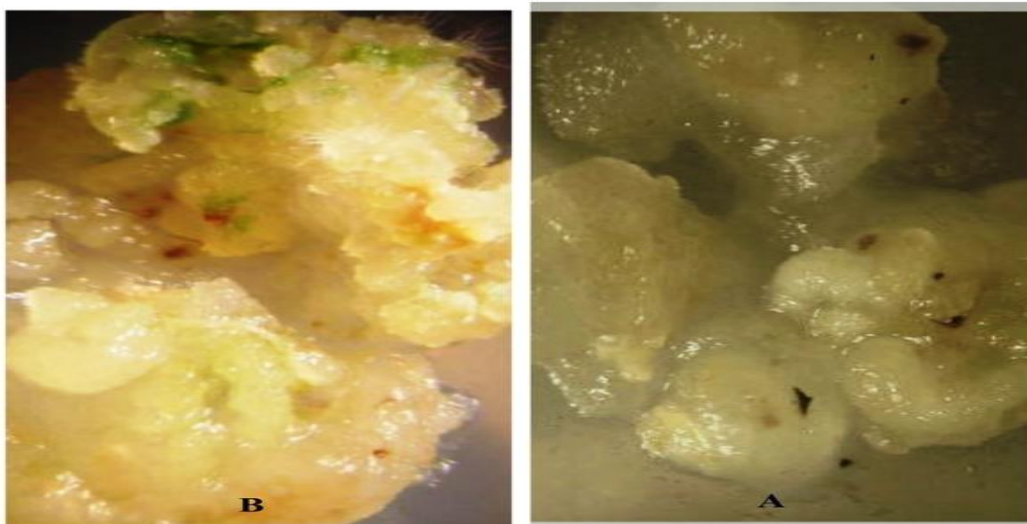
وبين الفجوة والساييتوبلازم والمحيط الخارجي من جهة اخرى (Delauney and Verma, 1993) إضافة الى كونه عامل وقاية Protective للعضيات الخلوية و الأنزيمات (Solomen *et al* ,1994) في الساييتوبلازم ، كما أنه يعد مصدراً لتجهيز وسط النمو بالنيتروجين الذي يكون مصدره عضوياً والذي يكون اكثر جاهزية للامتصاص من قبل الانسجة (Smith *et al*.1992) , و يساعد ايضا على ابعاد الجذور الاوكسجينية الحرة ومن ثم يساعد على زيادة فعالية نشاط الانزيمات الضرورية للنمو (Parida and Dass, 2005) , كما يُعد مصدراً للطاقة و اخيراً فان البرولين يلعب دوراً مهماً في ايقاف نشاط الأنزيمات المحللة مثل الأنزيمات المكونة للثايلين التي يزداد نشاطها تحت الظروف الملحية (Chrominiski *et al* . 1999).

هنالك أختلافات بين الأصناف التي تنتمي الى نوع واحد في تاتها بالملوحة و يعتمد ذلك على الأختلافات الفسلجية والوراثية في معدلات دخول الأملاح و نقلها و تجمعها و توزيعها في الصنف . و ربما يعود الاختلاف بين الصنفين اباء99 و تموز2 في الوزن الطري للكالس الجنيني إلى الاختلافات الوراثية بين الصنفين في تحملهما للملح وفي قدرتهما على امتصاص الأيونات. وهذا ما أكدته (Dornelles *et al* . (1997) و دزه يي (2002) عند دراستهم أستحثاث الكالس من أصناف عدة من نبات الحنطة تحت ظروف الشد الملحي. إذ ان الأصناف المختلفة تعطي استجابات مختلفة عند تعرضها لعوامل الشد المختلفة، و ربما يرجع ذلك الى إختلاف مكونات أغشية الخلايا في هذه الأصناف والتي اثرت بوضوح في التبادل الأيوني داخل الانسجة المزروعة (Munns,2002).

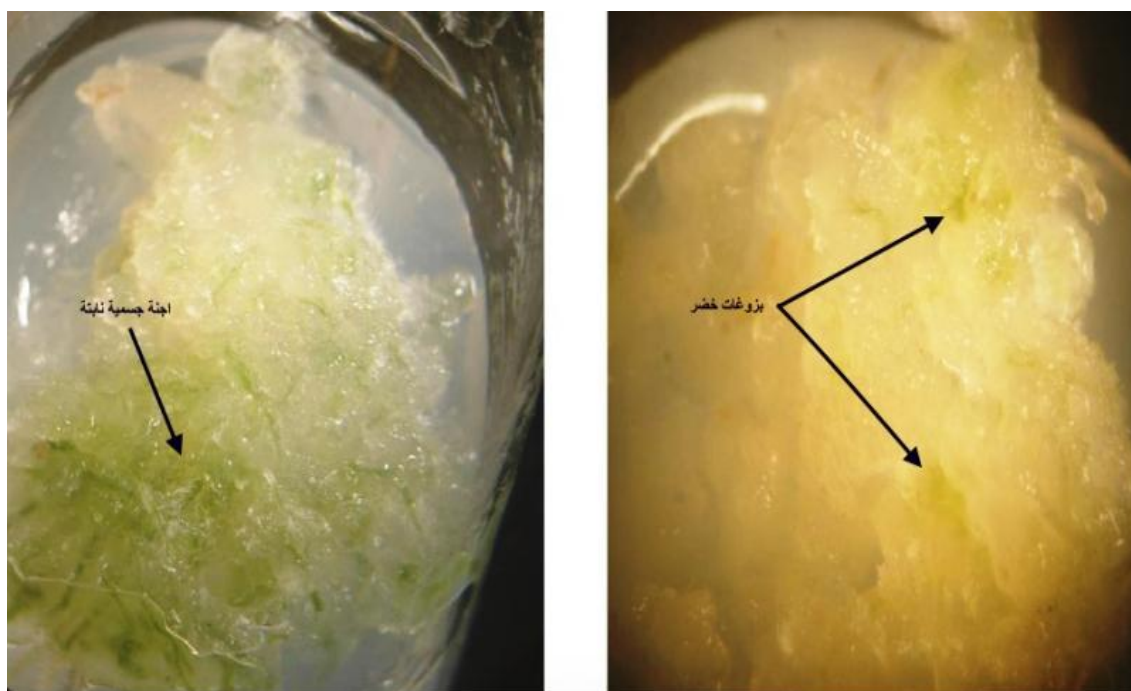
ومن النتائج التي توصلت اليها الدراسة الحالية هو ان الإضافة التدريجية لكوريد الصوديوم كانت اقل اثرا من الإضافة المباشرة له عند وجود او عدم وجود البرولين وربما يعود السبب في ذلك الى ان بقاء النسيج النباتي في التركيز الملحي المعتدل قد حفزه على تكوين المركبات المنظمة للازموزية كالبرولين وغيره من المواد في خلاياه مما جعل هذه الخلايا اكثر قدرة على تحمل التراكيز العالية من الملح عند نقل النسيج اليها بالمقارنة مع تلك التي توضع في التراكيز المرتفعة بصورة مباشرة (الكعبي،2004).

التغيرات المظهرية والتركييبية بعد زراعة الاجزاء النباتية

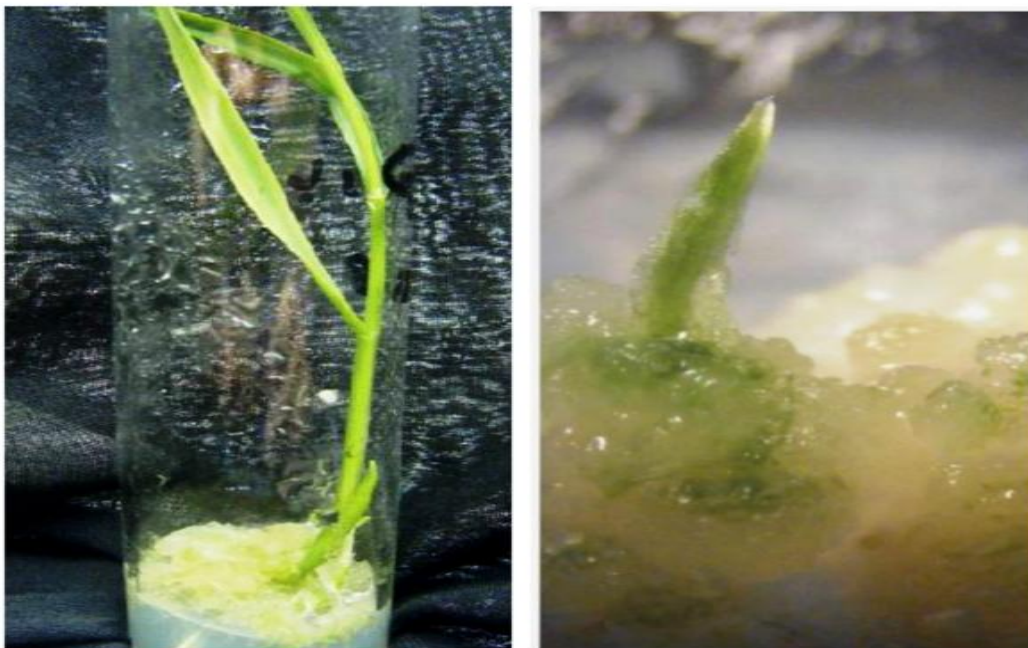
بعد استزراع الاجزاء النباتية (البذور) على الوسط الغذائي حدثت جملة من التغيرات المظهرية والتركييبية عليه اذ ابتدا تكون الكالس الاولي بعد فترة 7- 10 يوم من الاستزراع وكان هذا الكالس هشاً لونه ابيض الى مصفر وخالي من العقد (صورة A1) ثم تطورت بعد ذلك العقد في هذا الكالس بعد اسبوع من ذلك واصبح متماسكا وتحول لونه الى الاصفر (صورةB1). ومن هذه العقد تكونت الاجنة الجسمية على شكل بزوغات خضر ثم ابتدا انباتها بعد ذلك اذ يمثل كل بزوغ اخضر جنيبا جسميا قابل للانبات (صورة 2) ثم حدثت عملية الانبات لهذا الجنين و تظهر صورة3 بداية تكون المجموع الخضري ثم تكون النبيئات.ان المراحل السالفة الذكر تتداخل فيما بينها اذ يمكن ملاحظة الكالس الاولي والجنيني في ذات الانبوبة او ملاحظة البزوغات الخضر مع جنين نابت او اجنة نابتة مع نبيئات كما في صورة 3.



صورة (1) A الكالس الأولي و B الكالس الجنيني لنبات الحنطة



صورة (2) من اليمين البروغات الخضر. ومن اليسار الأجنة النابتة للكالس الجنيني لنبات الحنطة



صورة (3) من اليمين بداية تكون المجموع الخضري، من اليسار النبتة الكاملة لنبات الحنطة

المصادر العربية والاجنبية

- الساهوكي، مدحت و وهيب كريمة احمد. 1990. تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق.
- الكعبي، حسين خلف زاير. 2004. تأثير كلوريد الصوديوم والبرولين في الإكثار الدقيق لنخلة التمر (*Phoenix dactylifera L.*) صنف برحي. أطروحة دكتوراه. كلية التربية. جامعة البصرة.
- دزوي، اردلان احمد سليمان. 2009. دراسة تأثير الشد الملحي واشعة كما في بعض المكونات الخلوية في خمسة تراكيب وراثية من الحنطة الناعمة (*Triticum aestivum L.*) خارج الجسم الحي *in vitro*. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية. العراق.
- محمد، مريم جاسم . 2009. إستخدام تقنية زراعة الأنسجة في تقييم صنف الرز (*Oryza sativa L.*) عنبر وياسمين لظروف الاجهاد الملحي. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة البصرة. العراق.
- مهدي، الفاتح محمد و حمد سعد ال سعد. 2006. التقانة الحيوية الزراعية: التداعيات والمحاذير والاستعداد بحوث ودراسات مختبر زراعة الانسجة النباتية. الدوحة. قطر. ص 6-12.
- Abdel-Hady, M.S.; K. Fahmy and A.H.M. Hassan. 2001. Wheat genotypic and somaclonal variation in relation with *in vitro* selection for salt tolerance. Egypt. J. Appl. Sci., 16 (3): 68-93.
- Apse, M. P., and E. Blumwald. 2002. Engineering salt tolerance in plants. Current Opinion in Biotechnol., 2:146-150.

- Ashraf, M. Y. ; K. Akhtar ; G. Sarwar and Ashraf M. 2005. Role of rooting system in salt tolerance potential of different guar accessions. Agron. Sust. Develop., 25: 243-249.
- Batanony, K.H. 1996. Ecophysiology of halophytes and their traditional use in the arab world .in Halophytes and biosaline agriculture edited by choukr-allah, R.;Malcolm,C.V.and Hamdy,A.Marcel Dekker, New York U.S.A.pp.73-94.
- Chen, T. H. and N. Murata. 2002. Enhancement of tolerance of a biotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. Curr. Opin. Plant Biol., 5: 250-257
- Chrominiski, A. ; S. Malls ; D. J. Weber and B.N. Smith. 1999. Proline effect acc to ethylene conversion under salt and water stresses in the halophyte *Allenrolfiera occidentals*. Plant Growth Reg. Abs., 17: 1254-1257.
- Delauney, A. J. and D. P. S. Verma. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant. J., 4: 215-223.
- Dornelles , A. C. ; I. F. C. Fernando ; L.C. Fedderizzi ; C. E. Lange ; C.L. Handel and F. Bered. 1997 . Genetics of regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. Brazil. J. Genetics. 20 : 393 – 397 .
- Dukes, J. ; R.B. Tom and R. Writz. 1995. Cross cultural and nutritional values of bread. Ceral Foods world. 40:384-385.
- El-Enany, A. E. 1995. Proline effects on shoot organogenesis and protein synthesis in salinity stressed tomato culture. JIAS, 8: 1-7.
- El-Hendawy, S. E. ; Y. Ruan ; Y. Hu and U. Schmidhalter. 2009. A comparison of screening criteria for salt tolerance in wheat under field and controlled environmental conditions. J. Agron. Crop Sci., 195: 356-367.
- FAO. 2008. FAO Land and Plant Nutrition Management Service.
- Gooding, M.J. and W.P. Davies. 1997. Wheat production and utilization systems, quality and environment. Royal agric. College Cirencester. UK. Cambridge. PP: 147-165.

- Goyal, S. S. ; S. K. Sharma ; D. W. Rains and A. Lauchli. 1999. Long term reuse of drainage waters of varying salinity for crop irrigation in a cotton-safflower rotation system in the San Joaquin valley of California: A nine year study. J. Crop Produc., 2:181-213.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant. Cell and Envi., 25:239-250.
- Munns, R. and M. Tester. 2008. Mechanism of salinity tolerance. Ann. Rev. Plant Biotechnol., 59. 651-681.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Parida, A. K. and A. B. Dass. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants. A review. Ecotoxicot. Env. Safety. 60: 324-349.
- Patade Y.V. ; S. Penna and A.B. Vishwas. 2008. Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus cultures. Plant Growth Regul., 55:169–173.
- Rahmanzadeh, S. ; K. Kazemitabar ; S. Yazdifar and A. T. Jafroudi. 2008. Evaluation of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars response to salinity stress through greenhouse experiment and tissue culture technique. Asian J. Plant Sci., 7 (2): 207-212.
- Sairam, R.K. and A. Tygai. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Curr. Sci., 86:407-421.
- Smith, M. ; A.L. Sopmer ; R.A. Shibli and S.L. Kinght. 1992. Effect of NaCl salinity on dwarf tomatoto , shoot and root growth responses. J. Plant Nut., 15:2329-2341.
- Solomen, A.; S. Beer; Y. Waisel ; G. Jones and G. Paleg. 1994. Effects of NaCl on the carboxylating activity of rubisco from (*Tamarix jordanis*) in the presence and absence of proline-related compatible solutes Physiol.Plant., 90:198-204.

- Tester, M. and R. Davenport. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. Ann. Bot., 91: 503-527.
- Tisserat , B. 1981 .Production of free living date palm through tissue cultur. Date Palm J., 1:43-4.
- Tuteja, N. 2005. Unwinding after high salinity stress ii. Development of salinity tolerant plant without effecting yield. Plant J. (India).24:219-229.
- Volkamar, K. M. ; Y. Hu and H. Steppuhn. 1998. Physiological responses of plants to salinity: A review. Canad. J. Plant Sci., 78:19-27.
- Zair, I. ; A. Chalya ; K. Sabournji ; M. Tittahsen and H. Chlyah. 2003. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 73:237-244.
- Zuoine, J. and I. EL-Hadrami. 2004. Somatic embryogenesis in (*Phoenix dactylifera* L.) : Effect of exogenous supply of sucrose on proteins , sugar, phenolics and peroxidase activities during embryogenesis cell suspension culture . Biotechnol., 3(2): 114-118.

The gradual and sudden additions of sodium chloride salt and the role of proline in minimizing their effects on two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars cultured *in vitro*

Hussein K. Al-Kaaby*, Luma H. Abdul-Qadir* and Hassan A. Qassim**

***Department of Biology, College of Education for Pure Sciences, University of Basrah.**

****Ministry of Education, Basrah General Directory.**

Abstract

Series of experiments were conducted at Plant Tissue Culture Laboratory, Biology Department, College of Education for pure sciences, University of Basrah to estimate the effect of adding sodium chloride salt (NaCl) in gradual and direct manner and the role of adding proline to the nutrient medium on callus induction and somatic embryos germination percentage of two wheat cultivars named Ebaa'99 and Tamuz2.

MS medium (Murashige and Skoog, 1962) was used as nutrient medium with the addition of sucrose, sodium hydrogen orthophosphate, myoinositol, adenine sulfate and thiamine acetic acid (Tisserat, 1981). The auxin 2,4-D (4 mg.l⁻¹) and agar (5 g.l⁻¹) were also added to the nutrient medium.

NaCl was added alone and in mixing with proline (50 mg.l⁻¹) at concentrations of 0, 0.5%, 1% and 1.5% either directly where a weighed amount of callus was cultured suddenly on each of the previous salt concentrations for one month or gradually were the same weighed amount of callus were transferred from the lower to the higher concentration after one month of culturing.

Results indicated that NaCl at 1% and 1.5% caused a significant decrease in callus fresh weight while there was a significant increase in the fresh weigh at 0.5% of the salt compared to the control treatment. Proline addition to the nutrient medium caused a significant increase in callus fresh weight when compared with control treatment and proline-free medium. Salt effect and proline role on somatic embryos germination percentage was identical to their effect on callus fresh weight except that there is no significant difference between the cultivars understudy in their germination percentage as average for NaCl concentration with or without proline in each type of additions.

Key words: NaCl, Proline, Wheat, Gradual addition, sudden addition, Callus, Somatic embryos.