تأثير الكلايكول المتعدد الاثيل في نمو الكالس المستحث من نباتات الطماطة

Lycopersicon escolentum mill صنف Super Regina

اشواق عبدا لرزاق العبيدي، زهرة نوري الحطاب، واجدة خزعل القاضي، اخلاص عبدالكريم الكعبي،

سمر فؤاد الطحان، جنان عباس العاني

وزارة العلوم و التكنولوجيا- دائرة البحوث الزراعية

مركز التقانات الغذائية و الاحيائية/ قسم الهندسة الوراثية

Mobil – 7901602347 Zahramost55@yahoo.com

المستخلص:

استخدمت تقانة زراعة الانسجة لاستحثاث الكالس من القمم النامية لبادرات الطماطة ***Lycopersicon escolentum*mill**. حيث زرعت البذور المعقمة لصنف الطماطة Super Reginaالمستورد على وسط (MS) الغذائي تحت ظروف معقمه و بعد مرور 4 اسابيع تم استئصال القمم النامية للبادرات وزرعت على و سط زرعي مزود1 ملغم / لتر BA و 0.6ملغم/ لترIBAلاستحثاث الكالس. نقل الكالس المتكون الى اوساط غذائية مزودة بتراكيز (60 ,40 ,0,20غم /لتر) من الكلايكول المتعدد الاثيل (PEG-6000).

اظهرت النتائج وجود علاقة عكسية بين الوزن الطري و تركيز ال PEG حيث ان اعلى معدل للوزن الطري تحقق في معاملة المقارنة و قد بلغ 0.35 غم في حين اعطت معاملة 60غم/لترمن PEG اقل معدل للوزن الطري بلغ 0.19 غم. حيث اظهر التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين معاملة المقارنة والمعاملات الاخرى على مستوى معنوية (P)0.05. اما الوزن الجاف فقد انخفض الى النصفباضافة الPEG بالتركيزين 60, 20غم /لتر اذ بلغ 0.02غم لكلا المعاملتينمقارنة بالمحايد الذي بلغ 0.04غم .

اظهرت النتائج و جود اختلافات معنوية بين المعاملات المختلفة و المقارنة في محتوى الكالس من الحامض الاميني البرولين. وقد ازداد تركيزه بزيادة تركيز ال PEG و تفوقت المعاملتين 40 و 60غم/ لتر PEGحيث بلغ تركيزه 3.89 و 5.61 ميكروغرام / غرام من الوزن الجاف على التوالي مقارنة بمعاملة المقارنة التي بلغت 1.78 ميكروغرام / غرام. ولم تتفوق المعاملة 20 غم/ لترPEG معنوياً على معاملة المقارنة. ان زيادة البرولين في خلايا الكالس يعد وسيلة دفاعية و احدى اليات التحمل للشد الرطوبي.

الكلمات المفتاحية:

PEG ،الطماطة، برولين، وزن طري، وزن جاف،كالس

The effect of PEG on callus growth of Tomato plants

Lycopersicon escolentum mill

Ashwaq A., Zahra N. Al Hattab Wajida K. Al Qaudhy, , Ekhlas Al Kaaby, Sammer F. Al Tahhan,Jenan A. Al Ani

Mobil – 7901602347 Zahramost55@yahoo.com

Abstract

Tissue culture technique was used to induce calli from shoot tips of tomato (Super Regina CV.) plants. Sterilized seeds were grown in test tubes on MS medium under sterilized condition in the growth room. Four weeks later, shoot tips were excised and cultured on MS medium supplemented with 0.6 mg/lIBA and 1mg/lBA to induce callus. The produced calli were transferred to MS medium supplemented with 0, 20, 40, 60 gm/l Polyethylene Glycol (PEG-6000). The results showed that there is negative correlation between calli fresh weight and PEG concentration. The highest average fresh weight,was for the calli that were grown in the control treatment and it was 0.35 g. While the lowest average fresh weight, was for the calli that were grown on 60 g/l PEG treatment and it was 0.19 g. Statistical analysis showed significant differences between the treatments and the control at (P=0.05).Reduction in dry weight to half was detected in the presenceof PEG of 20 and 60 g/l and it was 0.02 g for both 20 and 60 g/l PEG treatments.Moreover the results showed significant differences among the different treatments in the proline content of the calli. The amount of proline increased as the PEG concentration increased. The 60 and 40 g/l PEG treatments surpassed the other treatments in the proline content which was 3.89 and 5.61 µg / g of callus dry weight compared with 1.78 µg / g for the control. High proline concentration in the tissue indicates the ability of the tissue to use this mechanism to tolerate drought stress.

المقدمة:

تعد الطماطة *Lycopersicon escolentum* من اهم محاصيل الخضر من العائلة الباذنجانيةSolanaceae على المستوى المحلي والعالمي.حيث تزرع في اغلب مناطق العالم لأهمية ثمارها ذات القيمة الغذائية العالية و قدرة المحصول على التواجد في الظروف البيئية المختلفة. و حسب تقرير FAOSTAT وصل انتاج الطماطة العالمي الى 126 مليون طن في عام 2007. وان الصين تأتي بالمركز الاول بالانتاج و بعدها الولايات المتحدة الامريكية ثم تركيا (5)ازداد الانتاج العالمي في عام 2010 ووصل الى 150 مليون طن (6).

تبين الدراسات ان انتاج الطماطة يتأثر بالجفاف بدرجة كبيرة(12). و لقد استخدمت عدة طرق لانتاج نباتات ذات قدرة عالية على تحمل الجفاف منها التهجين و طريقة

التطعيم على الاصول البرية المتحملة لظروف الشد الرطوبيالتي تحتاج الى عدة اجيال من الانتخاب(10,9,7).و اظهرت الدراسات ان تقنية زراعة الانسجة تساعد في تسريع برامج التربية و قد استخدمت بنجاح لاستحثاث صفة التحمل للشد الرطوبي في محاصيل مختلفة حيث توفر هذه الطريقة بيئة متجانسة للانتخاب (1,4)تستخدم مادة الكلايكول المتعدد الاثيل بتراكيز مختلفة لتحقيق مستوى الشد الرطوبي المطلوب للانتخاب خارج الجسم الحي.

لذا يهدف البحث الحالي الى دراسة تأثير الشد الرطوبي في الكالس المستحث من القمم النامية لبادرات صنف الطماطة Super Regina .

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

أجريت هذه الدراسة في مختبرات زراعة الانسجة النباتية ، وزارة العلوم والتكنولوجيا/دائرة البحوث الزراعية – في الزعفرانية. استخدم الصنف Super Regina المنتج من قبل الشركة الامريكية و المستورد من قبل القطاع الخاص وقد امتاز هذا الصنف برغبة المزارعين في زراعته لصفاتهالانتاجية ونوعيتهالمرغوبة.واستخدم في الدراسة الحالية و ذلك لان الدراسة التي اجرتها دائرة زراعة كربلاء اظهرت اهمية الصنف وامكانية زراعته في العراق و انه ذو مردود اقتصادي عالي بالنسبة للمزارع لما يحويه هذا الصنف من مواصفات جيدة فهو ذو ثمار صلبة تتحمل التسويق،غير محدود النمو،مقاوم للحرارة،ومرغوب من قبل المستهلك وان اضافة صفة التحمل للجفاف له سيؤدي إلى زيادة المساحة المزروعة منه في المناطق الشحيحة المياه.

.

غسلت بذور الطماطة الناضجة والمعفرة بالماء المقطر عدة مرات ، ووضعت في اطباق معقمة حاوية على الكحول الاثيلي بتركيز 95% لمدة دقيقتين مع التحريك المستمر لازالة الشعيرات والطبقه الشمعية ، وبعد ذلك غسلت البذور بالماء المقطر لإزالة الكحول منها ثم غمرت في محلول القاصر المحلي بتركيز 50% و الحاوي على هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 6% ولمدة 10 دقائق ثم غسلت بالماء المقطرالمعقم ثلاث مرات لازالة تأثير المادة المعقمة. نفذت جميع العمليات في ظروف معقمة بأستخدام منضدة تعقيم الهواء الطبقي(Laminar air flow hood) .

زرعت البذور المعقمة في انابيب حاوية على وسط (MS) الغذائيالخالي من منظمات النمو والمكون من الاملاح العضوية وغير العضوية و الفيتامينات للحصول على بادرات معقمة (8). عدل الأس الهيدروجيني pH للوسط الغذائي الى 5.7 وعقم بجهاز التعقيم الرطب Autoclave بدرجة حرارة 121م° وضغط 1.04 كغم/سم^2 لمدة 20 دقيقة. تمت زراعة البذور في الوسط الغذائي تحت ظروف معقمة باستخدام منضدة تعقيم الهواء الطبقي وبواقع 4-5 بذرة في كل انبوبة زراعة ، ثم حضنت الزروعات بدرجة حرارة 25± 1م° واضاءة لمدة 16 ساعة يومياً و شدة اضاءة 1000 لوكس . بعد تكشف البادرات تم تقطيعها و زراعة القمم النامية على الوسط الزرعي المذكور اعلاه مع اضافة 1ملغرام/ لتر BA و 0.6 ملغم/ لترIBA لاستحثاث الكالس.

بعد اربعة اسابيع من الزراعة نقل الكالس المستحث الى وسط غذائي جديد يحتوي على نفس مكونات وسط الاستحثاث لاكثار الكالس وحضنت الزروعات في نفس الظروف السابقة.لدراسة تأثير الكلايكول متعدد الاثيل Polyethylene Glycol (PEG-6000) على الكالس المتكون استخدم وسط زرعي جديد يحتوي على نفس مكونات وسط الاكثار مع اضافة مادة الكلايكول متعدد الاثيل Polyethylene Glycol (PEG-6000) بتراكيز (0 ،20،40،60 غرام/لتر) لتعريض الكالس المستحث للشد الرطوبي بواقع (4) مكررات لكل معاملة (10انابيب اختبار لكل مكرر) حيث تم وضع100 ملغم من الكالس في كل انبوبة ، ثم حضنت الزروعات في نفس الظروف السابقة بعد مرور (40) يوم من الزراعة تم حساب الوزن الطري للكالس ثم جفف في فرن كهربائي بدرجة حرارة 70م° ولمدة72ساعة وقدر الوزن الجاف له.

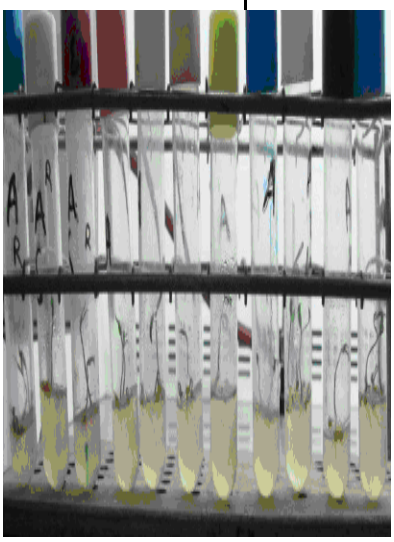
قدر تركيز البرولين في الكالس الجاف لجميع المعاملات حسب طريقة3(). حيث أضيف 5 مل من حامض السلفوسالسيلكacid Sulfosalicylic تركيز 3% لكل 100ملغم من نسيج الكالس الجاف وسحق الخليط جيداً في هاون خزفي لحين تجانس الخليط. نبذ مركزيا بواسطة جهاز النبذ المركزي بسرعة 2000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق، أخذ 2 مل من الراشح وأضيف اليه 2 مل من محلول النهايدرين (Ninhydrin) وسخن في حمام مائي على درجة حرارة 100 ْم لمدة 30 دقيقة وترك حتى يبرد. قدرت كمية البرولين بواسطة جهاز المقياس الطيفي Spectrophotometer عند طول موجي 520 نانوميتر وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة وقورنت مع المنحنى القياسي للبرولين.

نفذت جميع التجارب باستخدام التصميم العشوائي الكامل وجرى تحليل النتائج ومقارنتهاحصائيا حسب اختبار اقل فرق معنوي (L.S.D) وعند مستوى احتمالية5%.

النتائج و المناقشة

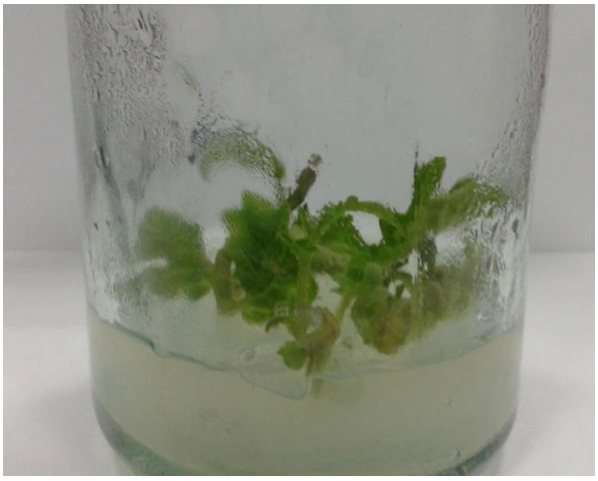
اظهرت النتائج ان طريقة التعقيم المستخدمة كانت عالية الكفاءة حيث لم يظهر اي تلوث في الانابيب المزروعة كما انها لم تؤثر على حيوية البذور حيث كانت نسبة انبات بذور الطماطة صنف Super Regina100% في انابيب الزراعة و كانت البادرات قوية النمو(شكل 1). و قد استخدمت القمم النامية لتلك البادرات لاستحثاث الكالس مباشرة دون الحاجة الى التعقيم (شكل 2) . اظهرت القمم النامية المزروعة على الوسط الزرعي المزود ب (1ملغرام/ لتر BA و 0.6 ملغم/ لترIBA) بدأ تكوين الكالس على مكان القطع بعد مرور اسبوع على الزراعة وتميز الكالس باللون الاخضر الباهت المائل الى الاصفرار. كما استمر نمو القمم النامية حيث تكشفت الاوراق و استخدمت تلك النموات مرة اخرى كمصدر لاستحثاث الكالس على نفس الوسط الزرعي بعد عزل الكالس منها و نقله الى وسط الاكثار (شكل 3).

ساعد وسط الاكثار على بدء الكالس بالنمو السريع فقد تكونت كمية كبيرة منه بعد مرور 4 اسابيع من الزراعة حيث تم تنفيذ التجربة المتعلقة بظروف الشد الرطوبي بزراعة 100 ملغم من الكالس في الانبوب الواحد (شكل4). ان هذه الطريقة في استحثاث الكالس وفرت مصدر نباتي معقم على مدار العام لاستحثاث الكالس دون الحاجة الى تعقيم البذور و انباتها للحصول على البادرات المعقمة.



شكل (1) انبات بذور الطماطة صنف Super Regina في الوسط الغذائي (MS) الخالي من منظمات النمو

شكل (2) القمم النامية لنبات الطماطة صنف Super Regina مزروعة علىالوسط الغذائي لاستحثاث الكالس

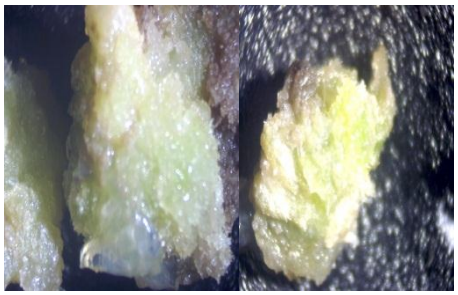


شكل (3) الكالس المستحث من مكان قطع القمم النامية لنبات الطماطة صنف Super Regina

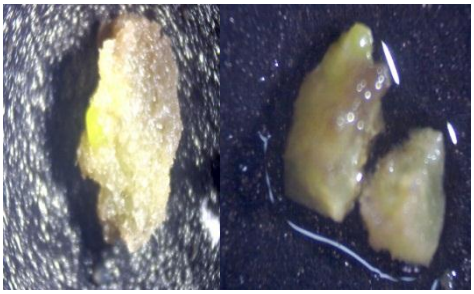
يبين جدول (1) و شكل (4) تأثير التراكيز المختلفة من الPEGفي الوزن الطري لكالس الطماطة صنف Super Regina بعد مرور 4 اسابيع على زراعته. حيث اظهرت النتائج وجود علاقة عكسية بين الوزن الطري و تركيز ال PEG حيث ان اعلى معدل للوزن الطري تحقق في معاملة المقارنة و قد بلغ 0.35 غم في حين ان اقل معدل للوزن الطري كان لمعاملة 60 ملغم /لترPEG وقد بلغت 0.19 غم. و اظهر التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين المعاملات و المقارنة عند مستوى الاحتمالية 0.05.

اما الوزن الجاف فقد انخفض الى النصف بوجود الPEG بالتركيزين 20, 60غم /لتر اذ بلغ 0.04 غم لمعاملة المقارنة و 0.02 غم/ لتر لكل من المعاملتين 20, 60 غم/ لتر (جدول 1).

ان الكالس المتكون قد يحتوي على نسبة من المتغايرات الوراثية و التي تعرف بال Somaclonal variations والتي يعتمد عليها مربي النبات في انتاج نباتات ذات صفات مرغوبة . كما ان وجود ال PEG في الوسط الزرعي يوفر وسط انتخابي متماثل لانتخاب الكالس المتحمل للجفاف. ان الكالس الذي ينمو بوجود تراكيز عالية من ال PEG قد تكون له القدرة على تحمل الجفاف حيث ان الPEG يولد شد رطوبي في الوسط الزرعي يجعل الكالس غير قادر على امتصاص الماء من الوسط الزرعي. و هذا الظرف مشابه الى شحة المياه بالتربة التي تؤدي الى تعرض النبات الى الجفاف. كما ان هذه الصفة تنتقل الى النبات الذي يتم اخلافه منه.



020



60 40

شكل(4) كالس الطماطة مزروع على وسط غذائي مزود بتراكيز مختلفة من الPEG

جدول (1) تأثير التراكيز المختلفة من الكلايكول المتعدد الاثيلي PEG في الوزن الطري والجاف للكالس

تراكيزPEG غم/لتر	الوزن الطري (غم)*	الوزن الجاف (غم)*
0.0	0.35	0.04
20	0.28	0.02
40	0.23	0.03
60	0.19	0.02
ا.ف.م(0.05)	0.07	غ.م

*كل رقم يمثل معدل عشرة مكررات

كما اظهرت النتائج المتعلقة بتقدير كمية الحامض الاميني البرولين في الكالس المعرض للشد الرطوبي و جود اختلافات معنوية بين المعاملات المختلفة و المحايد في محتوى الكالس منه (جدول 2). و قد ازدادت كمية البرولين بزيادة تركيز ال PEG و تفوقت المعاملتين 40 و 60غم/ لتر PEGحيث بلغت 3.89 و 5.61 ميكروغرام لكل غرام من الوزن الجاف على التوالي مقارنة بمعاملة المحايد التي بلغت 1.78 ميكروغرام لكل غرام. ولم تتفوق المعاملة 20 غم/ لترPEG معنوياً على معاملة المحايد حيث بلغت 1.78 ميكروغرام لكل غرام من الوزن الجاف. وقد يكون هذا التركيز غير مؤثر في احداث شد على النبات.

ان الخلايا النباتية تحتاج الى توازن في المحتوى المائي لها. ولتحقيق ذلك تمتص تلك الخلايا الماء اللازم من الوسط الذي تعيش فيه اما اذا لم يتوفر الماء كما في حالة الشد الرطوبي فان الخلية تقلل احتياجها من الماء عن طريق تجميع بعض المواد مثل السكريات و الايونات و الاحماض الامينية و الاحماض العضوية في السايتوبلازم وهذه تثبط عمل الانزيمات لذا تتخلص منها الخلية بوضعها في الفجوات. الا ان هنالك بعض المواد التي تتجمع في السايتوبلازم و لا تتعارض مع عمل الانزيمات مثل المانيتول و السوربتول و الحامض الاميني البرولين . ان تصنيع هذه المواد في الخلية عند تعرضها للشد الرطوبي يساعد على زيادة تحملها للجفاف (11). ان انتخاب الخلايا التي تنمو في التراكيز العالية من ال PEG و اخلاف نباتات منه قد يساعد على تحسين صفة التحمل للجفاف في صنف الطماطة Super Regina. وقد استخدمت تقنية زراعة الانسجة في انتخاب العديد من النباتات ذات الصفات

المرغوبة عن طريق تعريض الكالس الى ظروف ملائمة للانتخاب مثل الشد الملحي او الرطوبي او بعض المسببات المرضية (2 ,4).

جدول (2) تأثير تراكيز مختلفة من الكلايكول المتعدد الاثيلي PEG في محتوى الكالس من الحامض الاميني البرولين (مايكروغرام/غم) وزن جاف

تراكيز الكلايكول المتعدد الاثيلي PEG غم/لتر	محتوى الكالس من البرولين (µg / g)
0.0	1.78
20	2.97
40	3.89
60	5.61
L.S.D (0.05)	0.377

المصادر:

1. Abdel-Raheem, A.T., Ragab, A. R., Kasem, Z.A., Omar, F. D. & A.M. Samera 2007. In vitro selection for tomato plants for drought tolerance via callus culture under polyethylene glycol (PEG) and mannitol treatments. African Crop Science Conference Proceedings 8 : 2027- 2032.
2. Azevedo R. A. , Carvalho R. F., Cia M. C. and Gratao P. L. 2011. Sugarcane under Pressure: An Overview of Biochemical and Physiological Studies of Abiotic Stress Tropical plant biology, 4 (1) : 42-51.
3. Bates, L.S.; R. Waldren, and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil. 39:205-207.
4. Chaudhry Z., Abbas S., Yasmin A., Rashid H., Ahmed H. and Anjum M.A. 2010. Tissue culture studies in tomato (Lycopersicon esculentum) Var. Moneymaker Pak. J. Bot., 42(1): 155-163.

5. FAO Statistic 2008. Production year report 2008.
6. FAO Statistic 2011. Production year report 2011.
7. Fischer, I., Camus-Kulandaivelu, L., Allal, F. and Stephan, W. 2011. Adaptation to drought in two wild tomato species: the evolution of the *Asr* gene family. New Phytologist, 190: 1032–1044.
8. Murashige, T., and Skoog,F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Phsiol. Plant 15: 473-497.
9. Rivero, R. 2003. Role of Grafting in Horticultural Plants under Stress Conditions. Food, Agriculture & Environment. 1:70-74.
10. Tuberosa, R. and SalviS., 2006. Progress in breeding wheat for yield and adaptation in global drought affected environments. Crop Sci., 42: 1444-1446.
11. Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2006. "Engineering drought tolerance in plants:Discovering and tailoring genes unlock the future." Curr. Opin. Biotech. 17: 113-122.
12. Wahb-Allah, M., A. Abdullah, A. Al Sadon andA. I Abdullah. 2011. Drought Tolerance of Several Tomato Genotypes under Greenhouse Conditions. World Applied Sci. J. 15 (7): 933-940.