التحفيز الوراثي لصفة تحمل الملوحة في المزارع النسيجية لنبات الفلفل *Capsicum annuum*L.

Induction of Genetic Variation for Salt Tolerance in Tissue Culture of *Capsicum annuum*L.

بشرى محمد جابر علوش هدى عناية ماهود حسين
كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
Bushra M. Alwash Huda E. Hussein
College of Science for women /Baghdad University

E-mail: Bushra @yahoo.com

الملخص

تمت دراسة تأثيرBA بالتراكيز 4,3,2,1,0 وIAA بالتراكيز 2,1.5,1,0.5,0 في استحثاث الكالس من الاجزاء النباتية (السيقان، الاوراق) المأخوذة من بادرات نبات الفلفل. كما درس تأثير تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 0.25, 0.02, 0.15,0.1,0.05,0 في نمو الكالس وفي اخلاف نباتات متحملة للملوحة ومن ثم التحقق من وجود التغاير الجيني في النباتات الناتجة باستخدام تقنية PCR-RAPD باستخدام خمسة بادئات لمواقع جينية تتصف بأنها جينات متحملة للملوحة. أظهرت النتائج بأن التركيز 2ملغم.لتر-1IAAو 4ملغم.لتر-1BA المضاف الى وسط MS قد أعطى أفضل استجابةفي استحثاث الكالس. وأشارت النتائج الى انخفاض معنوي في معدل الوزن الطري والجاف للكالس بزيادة التركيز الملحي في الوسط الغذائي. كما ازداد تركيز حامض البرولينوالكربوهدرات معنوياً في نسيج الكالس بزيادة التركيز الملحي. اما بخصوص اخلاف النباتات من الكالس المعرض للشد الملحي فقد أظهرت النتائج بأن نسبة الاخلاف قد انخفضت معنوياً بزيادة التركيز الملحي في الوسط الغذائي، كما تفوق الوسط المكون من الرمل والبتموس بنسبة 1:3 معنوياً في أقلمة النبات وبلغت نسبة النجاح 79%. واظهرت نتائج تفاعلات PCR-RAPD أن وجود تتابع القواعد لجميع البادئات المستخدمة في جنيوم عينة الملوحة.

كلمات مفتاحية: الفلفل الاخضر، جينات تحمل الملوحة، PCR

Abstract

Study the effect of BA at concentrations of (0.0,1,2,3and4)mg/L. and IAA at concentrations (0.0,0.5,1,1.5,2)mg/L. in callus induction from pepper plant explants (leaves, stem) as well as the effect of (0.0, 0.05, 0.1,0.15,0.2,0.25) NaCl on callus growth and regeneration salt tolerance plants studied. (PCR-RAPD) technique was used for tested salinity tolerance genes. The best medium for callus induction was MS medium modified with (2 mg/L. IAA+ 4 mg/L.BA). Results showed significantly decreased in fresh and dry weight of callus with increasing salt concentration on MS medium. The results showed increased proline and carbohydrate content in callus with increasing salt concentrations on MS medium. Lower percentage of callus regeneration was recorded with increased salt concentration on MS medium. Agricultural medium consisted of sand and peat moss at 3:1 v/v ratio. The best agricultural medium for plants acclimation 79%. The salt genotype samples have all sequence of primers which code for salinity genes with five primers for loci of salinity tolerance.

Key words: Capsicum annuum, Salinity tolerance genes, PCR.

المقدمة

تعد الملوحة من المشاكل المهمة التي تواجه العالم والوطن العربي، كونها تحد من الانتاج النباتي في المناطق الجافة وشبه الجافة في العالم. ومشكلة الملوحة واسعة الانتشار في العراق فحوالي 70% من اراضيه متأثرة بالملوحة، ويشير[1] الى عدم وجود عامل مؤثر في الانتاج النباتي في العراق قدر تأثير الملوحة فيه، ان انتشار الاملاح حول ملايين الهكتارات من الاراضي الزراعية الى أراضٍ غير صالحة للزراعة، إن تحسين قابلية النبات على تحمل الملوحة في المحاصيل الزراعية بإمكانه أن يخفف من مشاكل الزراعة في الترب والمياه المالحة، وقد تطورت خلال العقود القليلة الماضية تقنية زراعة الأنسجة النباتية التي ركزت في جزء منها على دراسة ميكانيكيات تحمل الملوحة على مستوى الخلية النباتية وتطوير أصناف متحملة عن طريق انتخاب الخلايا التي تقاوم الملوحة وتنمو في التراكيز العالية وإكثارها [2]. ويعد نبات الفلفل الحلو sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) الذي ينتمي الى العائلة الباذنجانية solanaceae من النباتات الحساسة للملوحة اذ ينمو الفلفل في مختلف أنواع الاراضي جيدة الصرف التي تتراوح من الرملية الفقيرة الى المزيجية الخصبة [3]. ويهدف هذا البحث الى زيادة قابلية نبات الفلفل *Capsicum annuum*على تحمل الملوحة من خلال استعمال طريقة زراعة الخلايا وتمايزها خارج الجسم الحي. وقد استخدمت في العراق تقنيات زراعة الأنسجة النباتية خارج الجسم الحي في تقييم تحمل النبات للإجهاد الملحي ومنها اشجار البرتقال المحلي [4]، العنب [5]، زهرة الشمس [6]، البنجر السكري، [7] والنارنج [8].

المواد وطرق العمل

استخدمت البذور الناضجة من نبات الفلفل sweet pepper، عقمت بأستخدام هايبوكلورات الصوديوم بالتراكيز 0.0 و 1.5 و 2 و2.5 % مع قطرات من المادة الناشرة (Tween 20) ولثلاثة أوقات زمنية 5 و10 و 15 دقيقة. غسلت البذور بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات ولمدة خمس دقائق في كل مرة لإزالة تأثير المادة المعقمة. اجريت جميع العمليات داخل جهاز تعقيم الهواء الطبقي. زرعت البذور مباشرة في قناني زجاجية (Universal Vials) التي تحتوي على الوسط الغذائي MS الخالي من منظمات النمو بمقدار 7 سم^{3}و بمعدل بذرة واحدة في كل قنينة. حضنت الزروعات في غرفة النمو تحت شدة اضاءة قدرها 1000 لوكس ولمدة أضاءة 8/16 ساعة ضوء/ظلام وبدرجة حرارة 25 ± 2 م سجلت النسب المئوية للتلوث والانبات بعد سبعة أيام من الزراعة.

استحثاث الكالس

أخذت البادرات النامية من زراعة البذور المعقمة في القناني الزرعية واستؤصلت منها الاجزاء المستخدمة بالزراعة وهي (الاوراق، السيقان)، اذ قطعت الأوراق والسيقان الى عدة قطع صغيرة بطول 1سم كل قطعة باستخدام الشفرات الجراحية المعقمة مع أحداث خدش وتشقق في الجزء المراد زراعته، وزرعت كل قطعة في قنينةالزرعية الحاوية على الوسط الغذائي MS والمزود بالـ BA بالتراكيز0.0و 1 و 2 و3 و 4ملغم . لتر$^{-1}$ وIAA بالتراكيز 0.0 و0.5 و 1 و 1.5 و 2 ملغم.لتر$^{-1}$ وبعشرة مكررات لكل توليفة من توليفات منظمات النمو. أجريت عملية الزراعة داخل كابينة الهواء الطبقي ثم نُقلت الزروعات الى غرفة التحضين وحضنت الزروعات في الضوء 1000 لوكس لمدة 16 ساعة يومياً. تم قياس الوزن الطري للكالس بعد شهر من الزراعة.

زراعة الكالس على الأوساط الملحية

حضرت أوساط غذائية جديدة تحتوي على وسط MS وأضيف له 2 ملغم.لتر$^{-1}$IAA و4 ملغم.لتر$^{-1}$BA وتراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم (NaCl) 0.0 و 0.05 و 0.1 و 0.15 و 0.2 و 0.25 %. زرع 50 ملغم من الكالس في كل قنينة زجاجية وبواقع عشرة مكررات لكل تركيز من تراكيز الملح وحُضنت الزروعات في الضوء تحت نفس الظروف. تم قياس الوزن الطري والجاف بعد شهر من الزراعة. وكذلك تم تقدير الحامض الاميني البرولين في نسيج الكالس حسب طريقة [9]. وتم تقدير تركيز الكربوهيدرات في نسيج الكالس اعتماداً على طريقة [10].

اخلاف النبيتات واقلمتها

حضر وسط غذائي لإخلاف النباتات من نسيج الكالس يحتوي على نفس مكونات الوسط السابق مضاف اليه0.1 ملغم .لتر$^{-1}$ من IAA و 2 ملغم .لتر$^{-1}$ من BA لغرض تحفيز نمو الافرع الخضرية ثم نقلت الافرع الخضرية المتكونة بعد شهر من زراعة الكالس في هذا الوسط الى وسط MS الخالي من ملح (NaCl) والمزود بـ 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ منIBAو0.1 ملغم.لتر$^{-1}$ من BAو 0.1 ملغم .لتر$^{-1}$ من GA_3 لغرض تحفيز نمو الجذور وسجلت النتائج بعد مرور شهر من الزراعة. اختيرت الافرع المجذرة ونقلت إلى أوساط زراعية لغرض الأقلمة، زرعت في أصص بلاستيكية معقمة حاوية على خلطات مختلفة من البتموس Peat Moss والرمل بنسب مختلفة اشتملت1:3و1:2 و0:1 رمل فقط حجم.حجم$^{-1}$والمعقمة قبل الزراعة بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121م وضغط 1.5 بار لمدة ساعة واحدة للتخلص من المسببات المرضية. وضعت في غرفة الحضن وغطيت بأغطية بلاستيكية شفافة لمدة 10أيام للمحافظة على مستوى عالٍ من الرطوبة يحيط بالبادرات مع مراعاة السقي بالماء المالح بصورة منتظمة بعدها تم تثقيب الأغطية بشكل متساوٍ للسماح بتبادل الغازات وزيادة الثقوب تدريجيا ثم رفعت الاغطية بشكل تدريجي ثم رفعت كلياً بعد مرور12 يوما وتمت مراقبة البادرات لمدة شهرين.

تحضير تفاعلات الـ PCR-RAPD

استخدمت خمسة بادئات لمواقع تتصف بأنها جينات متحملة للملوحة من شركة Alpha DNAبطول bp24-17 وجدول (1) يبين تتابعات البادئات المستخدمة في هذه الدراسة. تم اخذ 3 غم من اوراق النبيتات لكل من معاملة السيطرة ومعاملة التركيز الملحي0.05 الذي أعطى أعلى نسبة في إخلاف النباتات المتحملة للملوحة، وعزل الدنا منها باستعمال عدة استخلاص الـ DNA (Genomic DNA Mini Kit) المصنع من قبل شركة Bioneer الكورية ووفقاً لتعليمات الشركة .الطول الموجي260وتم تقدير كمية DNA (ul/ng) للعينتين المدروسة بأستخدام جهاز Spectrophotometer بوجود الاشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 260 نانوميتر. استخدم 50نانوغراممن DNA لكل عينة لتفاعل (PCR) وبلغ حجم التفاعل الكلي 40 UL.تم تمرير نواتج التضاعف عبر هلال الاكاروز بتركيز 1% في جهاز الترحيل الكهربائي لمدة ساعة واحدة بوجود المحلول IXTBE واستخدمت صبغة بروميد الاثيديوم بتركيز 1% ثم قرأت النتائج بالأشعة فوق البنفسجية باستخدام كاميرا رقمية.

جدول (1): التسلسل النيكلوتيدي للبادئات المستخدمة في تقنية PCR- RAPD

ت	التسلسل النيكلوتيدي
Pr1	5-GGACTGGAGT-3
Pr2	5-TGCGCCCTTC-3
Pr3	5-TGGGGGACTC-3
Pr4	5-GTAGACCCGT-3
Pr5	5-AGCATGGCTC-3

وحللت البيانات احصائياً حسب التصميم العشوائي الكامل Complete Random Design (CRD) وبعدد مكررات بحسب ماورد في المواد وطرائق العمل. حلّلت النتائج باستعمال البرنامج الإحصائي Statistical Analysis System (SAS) واستعمال أقل فرق معنوي L.S.D. لمقارنة المتوسطات الحسابية للمعاملات عند مستوى احتمالية 0.05.

النتائج والمناقشة

نتائج التعقيم

أظهرت نتائج التعقيم ان التركيز2% لمدة 15 دقيقة من NaOCl كان ذا كفاءة عالية في التعقيم.وان التركيز 2% من NaOCl لمدة 15 دقيقة قد أعطى أقل نسبة تلوث 0.0 % مع أعلى نسبة إنبات 100% ولم يظهر أي تأثير سلبي للمادة المعقمة لذا اعتمد هذا التركيز في تعقيم البذور في التجارب اللاحقة.

استحثاث الكالس

تبين نتائج جدول (2) الى ان هناك زيادة واضحة حصلت في معدل الوزن الطري للكالس ضمن كافة تراكيز IAA المضافة الى الوسط الغذائي مقارنة بالمعاملة الخالية من هذا الأوكسين، إذ أعطى التركيز 2ملغم.لتر$^{-1}$ اعلى معدل للوزن الطريللكالس بلغ 71.6 ملغم، كما يلاحظ ان معاملة المقارنة الخالية من IAA لم يظهر فيها أي استجابة لاستحثاثالكالس مما يدل على أهمية الاوكسين المضاف الى الوسط في استحثاث الكالس وتحفيزه على النمو والذي يؤدي بدوره الى زيادة الكالس[11]. والملاحظ هنا الى ان معدل الوزن الطري قد بدأ يزداد بزيادة تركيز IAA في الوسط الغذائي الا ان الزيادة لم تكن معنوية احصائياً.

ويوضح جدول (2) ان اضافة BA الى الوسط الغذائي قد أثر في معدل الوزن الطري للكالس مقارنة بمعاملة المقارنة. فقد أعطى التركيز 3 ملغم.لتر$^{-1}$ أعلى معدل لوزن الكالس الطري بلغ 66.6 ملغم والذي لم يختلف معنوياً عن التراكيز الملحية الاخرى، لكن اختلف معنوياً عن معاملة المقارنة. وانخفض هذا المعدل بزيادة تركيز BA في الوسط لكنه بقي معنوياً مقارنة بمعاملة المقارنة التي أعطت أدنى معدل للوزن الطري للكالس بلغ 17.0 ملغم ولم يحدث فيها استحثاث جيد للكالس من الجزء النباتي المزروع.

ويلاحظ من نتائج الجدول نفسه ان التداخل بين تراكيز BA وIAA قد أثر في معدل الوزن الطري للكالسفقد تفوق وسط MS المزود بـ 2 ملغم.لتر$^{-1}$ IAAو4ملغم.لتر$^{-1}$BA في اعطاء أعلى معدل للوزن الرطب للكالس بلغ 95 ملغم ولم يختلف معنوياً عن بقية التداخلات لكن اختلف معنوياً عن وسط MS المزود بـ 2 ملغم.لتر$^{-1}$BA و0.5 ملغم/لترIAA الذي أعطى اقل معدل للوزن الرطب للكالس بلغ 60 ملغم.

ويعود السبب الى التداخل بين دور السايتوكاينين المعروف في تشجيع إنقسام الخلايا ودور الأوكسين التحفيزي على الإنقسام بوجود السايتوكاينين وبهذا أدى التداخل إلى حدوث زيادة في إنقسام الخلايا وتكون نسيج الكالس، ويعتقد إن دور السايتوكاينين يرجع إلى منعه أكسدة الأوكسين الطبيعي IAA مما أدى إلى الحفاظ على مستواه الداخلي في الجزء المزروع [12].

واخيراً فان الاوراق كانت افضل في استحثاث الكالس من الجذور والمأخوذة كلها من البادرات النامية في قناني الزراعة لمدة شهر، ربما يعود السبب لكون خلاياها مرستيمية قادرة على النمو والانقسام فضلاً عن احتوائها على مستويات عالية من الاوكسينات الداخلية التي تحفز انقسام الخلايا [13].

جدول (2): تأثير تراكيزمختلفة من BA وIAA (ملغم . لتر$^{-1}$) والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري للكالس (ملغم).

IAA (ملغم.لتر$^{-1}$)	BA(ملغم . لتر$^{-1}$) 0	1	2	3	4	المعدل
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	20.0	62.0	60.0	70.0	75.0	57.4
1.0	23.0	72.0	80.0	90.0	70.0	67.0
1.5	22.0	75.0	78.0	86.0	76.0	67.2
2.0	20.0	70.0	85.0	88.0	95.0	71.6
المعدل	17.0	55.8	60.6	66.6	63.2	
	للتداخل: 34.9	20.2 : BA		14.7 : LSD IAA		

تأثير ملح NaCl في معدل الوزن الطري والجاف للكالس

تشير نتائج جدول (3) الى ان للتراكيز الملحية المضافة الى الوسط الغذائي تأثيراً معنوياً في معدل الوزن الطري للكالس، فقد انخفض معدل الوزن بزيادة التركيز الملحي في الوسط الغذائي إذ أعطى التركيز الملحي 0.25% أقل معدل للوزن الطري وبلغ 50.24 ملغم وأختلف معنوياً عن التراكيز الأخرى جميعها. أما أعلى معدل للوزن الطري فقد تحقق عند التركيز الملحي 0.00% وبلغ 94.16 ملغم واختلف معنوياً عن التراكيز الأخرى جميعها. اما بخصوص تأثير الملوحة في معدل الوزن الجاف للكالس فتشير نتائج جدول (3) وجود تأثيرات معنوية لتراكيز الملوحة في هذه الصفة إذ انخفض معدل الوزن الجاف وبشكل عام بزيادة تركيز الملح في الوسط الغذائي، وتفوقت معاملة المقارنة في هذه الصفة معنوياً على المعاملات جميعها اذ بلغ الوزن الجاف للكالس 10.16 ملغم. أما أقل معدل للوزن الجاف فقد تحقق في الوسط الغذائي الذي يحتوي على 0.25% من ملح NaCl وبلغ 3.20 ملغم. ويُعزى سبب انخفاض الوزن الطري والجاف للكالس بارتفاع تركيز الملح NaCl في الوسط الغذائي إلى التغيرات الحاصلة في العلاقات المائية للخلايا مما يتطلب إعادة تنظيم الخلايا لجهدها الازموزي بشكل يؤمن لها التأقلم مع الظروف الملحية الجديدة التي تسبب انخفاضاً في جاهزية الماء والمواد الغذائية فيه مما يؤثر سلباً في نمو وتكوين خلايا الكالس وهذا ماأكده [14].

جدول (3): تأثير التراكيز NaCl في معدل الوزن الطري والجاف للكالس (ملغم)المزروع على وسط MS والحاوي على 2 ملغم. لتر1-من IAA و4 ملغم.لتر$^{-1}$ من BA

التركيز الملحي	الوزن الطري ملغم	الوزن الجاف ملغم
0.00	94.16	10.16
0.05	86.50	8.28
0.10	72.64	6.56
0.15	60.80	5.18
0.20	52.20	4.24
0.25	50.24	3.20
المعدل	69.42	6.27
LSD	5.53	1.87

تأثير التراكيز الملحية في تركيز الحامض الاميني البرولينوالكربوهدرات في نسيج الكالس

يلاحظ من جدول (4) ان الحامض الأميني البرولين ازداد في كالس نبات الفلفل بزيادة التركيز الملحي، إذ أعطى التركيز 0.25% اعلى معدل للبرولين بلغ13.04 ملغم .غرام$^{-1}$ واختلف معنوياً عن التراكيز الملحية جميعها، في حين بلغ تركيز الحامض الأميني البرولين في معاملة المقارنة 2.1 ملغم . غرام$^{-1}$ واختلف معنوياً عن بقية التراكيز الملحية.ويُعزى سبب الزيادة في الحامض الأميني البرولين عند تعريض خلايا الكالس إلى مستويات من كلوريد الصوديوم بتراكيز 0.0 و 0.05 و 0.10و 0.15 و 0.20و 0.25% قد تعود هذه الزيادة إلى الاختلال في التوازن الأزموزي داخل الخلية، ولمعالجة هذا التوازن تقوم الخلايا بزيادة إنتاج الحامض الأميني البرولين في السايتوبلازم المعرض للإجهاد الملحي لخلق حالة من التوازن بين الفجوة والسايتوبلازم من جهة وبين الفجوة والسايتوبلازم والمحيط الخارجي من جهة ثانية [15] أو يعمل بوصفه عامل وقاية Protective للعضيات الخلوية والأنزيمات في السايتوبلازم، فضلاً عن أن البرولين يمكن استغلاله بوصفه مصدراً للطاقة في الخلية [16]. ويمكن ان يعد تجمع البرولين أحدى العمليات غيرالمباشرة التي تؤدي الى تحمل الاجهاد الملحي من خلال عمله منظم للأزموزية في السايتوبلازم [17].

أما فيما يخص تركيز الكربوهيدرات تشير نتائج جدول (4) الى تفوق التركيز الملحي 0.25% معنوياً على بقية التراكيز الأخرى إذ بلغ معدل تركيز الكربوهيدرات 84.53 ملغم.غرام$^{-1}$ واختلف معنوياً عن بقية التراكيز الملحية، في حين بلغ معدل تركيز الكربوهيدرات في معاملة المقارنة 50.92

ملغم.غرام$^{-1}$ واختلفت معنوياً عن التراكيز الملحية الأخرى.ويمكن تفسير زيادة تركيز الكربوهيدرات في نسيج الكالس على اساس تحلل السكريات المتعددة إلى سكريات أحادية أوثنائية في حالات الاجهاد فقد تعمل هذه السكريات مع البرولين على تنظيم الجهد الأزموزي في الخلايا أثناء تعرضها للإجهاد لما ينعكس في قدرتها على تحمل الإجهاد، وكذلك لأهمية السكريات الأحادية والثنائية في إدامة العمليات الأيضية. ويمكن ان تكون ظروف الإجهاد الملحي سبباً في زيادة محتوى الخلايا من السكريات ومجموعة من مركبات أخرى تكون مرافقة لها وذلك لعدم استخدام التراكيز الملحية المثبطة لنمو الكالس لهذه الكربوهيدرات كاستجابة منها للتكيف لظروف الإجهاد [18]. وقد كانت هذه النتائج متفقة مع نتائج كل من [19،20].

جدول (4): تأثير التراكيز الملحية (%) في معدل تركيز البرولين ملغم.غرام$^{-1}$ والكربوهيدرات ملغم.غرام$^{-1}$ في نسيج الكالس

التركيز الملحي	تركيز حامض البرولين	تركيز الكربوهيدرات
0.00	2.10	50.92
0.05	3.09	51.83
0.10	3.74	62.33
0.15	7.67	81.48
0.20	10.04	82.09
0.25	13.04	84.53
المعدل	6.61	68.86
LSD	0.72	1.06

تأثير التراكيز الملحية في اخلاف النباتات من الكالس واقلمتها

تشير نتائج جدول (5) ان التراكيز الملحية قد أثرت في قابلية كالس نبات الفلفل على اخلاف النباتات، حيث بدأت نسبة الاخلاف بالانخفاض بزيادة التركيز الملحي في الوسط الغذائي وبلغت نسبة الاختلاف ً0.0% في الوسط الغذائي ذي التركيز الملحي 0.25%، في حين أعطت معاملة المقارنة أعلى نسبة أخلاف بلغت 90%. ان انخفاض نسبة اخلاف الكالس مع زيادة التراكيز الملحية في وسط الاخلاف قد يعود الى التأثيرات المباشرة وغير المباشرة لملح كلوريد الصوديوم عند المستوى الجزيئي لخلايا الأنسجة المزروعة مؤدياً الى انخفاض معدل انقسامها وتوسعها اعتماداً على تركيز الملح المجهز للوسط الغذائي،فالأضرار المباشرة للملوحة العالية تتمثل في التأثير في العمليات الأيضية ونفاذية غشاء الخلية. أما التأثيرات غير المباشرة فهي نقص توفر الماء للنبات نتيجة لانخفاض الجهد الأزموزي لمحلول التربة وذلك لارتفاع تركيز محلول التربة، مما يقلل من انتقال الماء للنبات من التربة ذات الجهد الازموزي العالي بجانب نقص العناصر الغذائية وهذا يتفق مع مابينه[20]. اما بخصوص أقلمة النباتات فأن النتائج في جدول (6) تشير الى ان الوسط الزرعي قد أثر معنوياً في أقلمة النباتات، فقد تفوق الوسط المتكون من الرمل والبتموس بنسبة 1:3 معنوياً على الوسطين الاخرين فقد أعطى أعلى نسبة نجاح في اقلمةالنبيتات بلغت 79%، في حين أعطى الوسط المتكون من الرمل فقط أقل نسبة نجاح في أقلمة النبيتات بلغت 30%. إن هذه الاختلافات قد تعود الىأن وسط البتموس يحتفظ بالرطوبة وذو محتوى جيد من العناصر الغذائية، ونسجة خفيفة وتهوية جيدة للجذور، وقد يرجع سبب انخفاض نسب النجاح في وسط التربة الرملية فقط الى عدم احتفاظ هذا الوسط بالرطوبة فضلاً عن افتقاره للمواد الغذائية وهذا ماأكدته [21]. ومن الجدير بالذكر إن أحد أسباب نجاح الأقلمة هو إضافة المبيد الفطري إلى ماء السقي مما كان له أثره في تقليل الإصابة بالفطريات بشكل كبير وهذا ماأكدته [22].

أما فيما يخص تأثير التراكيز الملحية في نسبة نجاح الاقلمة فقد تفوقت معاملة المقارنة في أعطاء أعلى نسبة لأقلمة النباتات بلغت 73.33% وأختلفت معنوياً عن التركيزين الملحيين 0.15 و0.20 % ولكن لم تختلف معنوياً عن التركيزين الملحيين 0.05 و0.10 %، في حين أعطى التركيز الملحي 0.20% أقل نسبة في أقلمة النباتات بلغت 33.33%. ان الاختلافات بين الاوساط الملحية في نسبة نجاح النباتات المتأقلمة قد تعود الى ان النباتات الناتجة من الاوساط الغذائية ذات الشد الملحي العالي تكون صغيرة الحجم وضعيفة النموو هذا يتفق مع مابينه [23].

جدول (5): تأثير التراكيز الملحية في النسبة المئوية لإخلاف نباتات الفلفل من الكالس

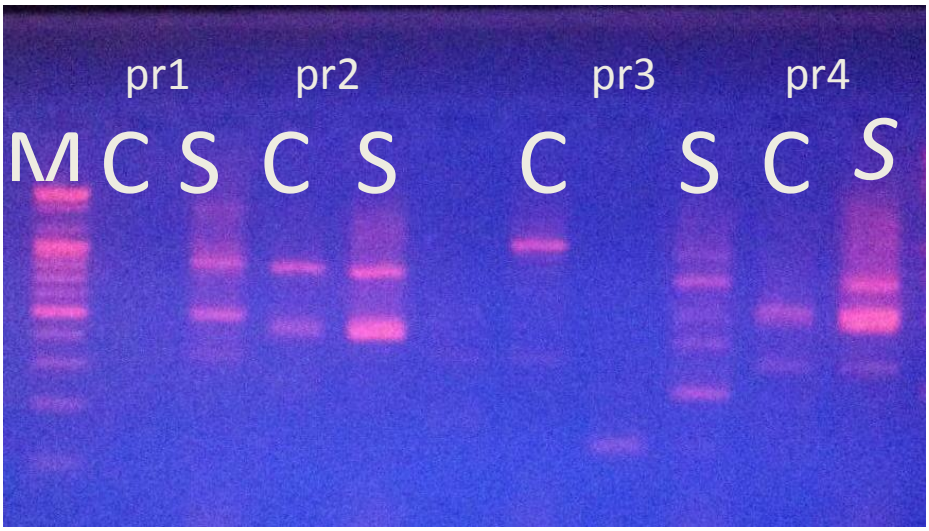
التركيز الملحي	نسبة الإخلاف
0.00	%90
0.05	%60
0.10	%40
0.15	%20
0.20	%20
0.25	%0.0
المعدل	%38.33

جدول (6): تأثير الوسط المستخدم والتراكيز الملحية في نسبةأقلمةنبيتات الفلفل المكثرة خارج الجسم الحي.

نوع التربة (رمل : بتموس)	التركيز الملحي (%)					المعدل
	0.0	0.05	0.1	0.15	0.2	
1:2	60	50	50	40	30	46
1:3	100	85	80	70	60	79
0:1	60	40	30	10	10	30
المعدل	73.33	58.33	53.33	40	33.33	
LSD 0.05	نوع التربة 10.39 التركيز الملحي 20.84 التداخل 31.32					

نتائج تفاعلات PCR-RAPD

استخلاص الدنا DNA أعطى كميات مناسبة من الدنا الكلي حيث تراوحت الكمية المستخلصة ما بين 300-450 مايكروغرام من 3 غرام من اوراق النبيتات وتم قياس تركيز ونقاوة الدنا وقد بلغت 1.2 للعينتين (المقارنة، الملوحة) وهذا يدل على كفاءة طريقة الاستخلاص المتبعة لان عزل كمية من DNA وبنقاوة مناسبة من النباتات تكون اصعب نسبياً من الكائنات الاخرى لوجود الجدار السميك المحيط بالغشاء الخلوي، فضلاً عن احتواء بعض النباتات على كمية عالية من المواد الفينولية والسكريات المتعددة التي قد تثبط تفاعلات الـPCR[24]. أظهرت نتائج تفاعلات RAPD للعينتين من نبات الفلفل الحلو *Capsicum annuum* احدهما عينة من معاملة المقارنة التي لم تعرض للملوحة 0.00% العينة الثانية من معاملة الملوحة (المعرضة للشد الملحي بـ NaCl بتركيز ملحي 0.05 والتي أعطت أعلى نسبة في إخلاف النباتات باستخدام خمسة بادئات ادى الى تشخيص عدد من الحزم المنتجة من (2-5) حسب البادئ. انتج البادئان 4 و5 أعلى عدد من الحزم وكذلك اعطت عينة الملوحة (المعرضة لملح NaCl) بتركيز 0.05 حزماً لجميع البادئات وهذا يشير الى وجود تتابع القواعد لجميع البادئات المستخدمة في جنيومهذه العينة في حين لم تتكون أي حزمة في جنيومعينة المقارنة (غير معرضة لملح NaCl) في البادئات1 و3 وهذا يشير الى ان عدم وجود تتابع القواعد لهذين البادئين في جنيوم هذه العينة شكل (1). وان هذه النتائج تشير الى وجود اختلافات وراثية متباينة بين العينتين (المقارنة و الملوحة) من نبات الفلفل الحلو وهذا يمكن ان يؤدي الى تجمع جينات تحمل الملوحة فيجنيوم عينة الملوحة (المعرضة للشد الملحي)، وهذا سيزيد من الجهد الجيني للعينات الناتجة من الشد الملحي. وعلى هذا الاساس فمن المعقول تنمية كالس نبات الفلفل في تراكيز مختلفة من الملوحة (NaCl).



شكل (1): الترحيل الكهربائي لحزم DNA المتضاعفة بتقانة PCR-RAPD للعينتين من نبات الفلفل لخمسة بادئات S(pr1-pr5):
معاملة الشد الملحيC: معاملة السيطرة Ladder :M

المصادر

1. Hardan, D.H. (1970). Salinity is a national problem in Iraq. FAO. Salinity UNDP Seminar, Baghdad.

2. Shah MI, Jabeen M, Elahi I. (2003). *In vitro* callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticumaestivum*L.).

3. حسن، احمد عبد المنعم. (2001). إنتاج الفلفل والباذنجان، الدار العربية للنشر والتوزيع. القاهرة – مصر. 336 صفحة.

4. ألطه، هدى عبد الكريم عبد الودود. (2008). استعمال تقنية زراعة الأنسجة النباتية في إكثار نباتات مقاومة للملوحة من اشجار البرتقال المحلي *Citrus sinensis*L. اطروحة دكتوراه. قسم البستنة والنخيل. كلية الزراعة. جامعة البصرة. جمهورية العراق.

5. الدهيماوي، عبد الكاظم جواد موسى. (2009). تقييم تحمل ثلاثة أصناف من العنب *Vitisvinifera* L. لملح كلوريد الصوديوم خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة الكوفة. جمهورية العراق.

6. الطحان، سمر فؤاد. (2009). تقويم الكالس المستحث من ثلاثة تراكيب وراثية من زهرة الشمس لتحمل كلوريد الصوديوم خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير. قسم علوم الحياة. كلية العلوم للبنات. جامعة بغداد. جمهورية العراق.

7. حمد الله، ماجد شايع. (2013). الكشف عن وجود قابلية تحمل الملوحة في بعض تراكيب البنجر السكري باستخدام تقانة PCR. مجلة العلوم الزراعية العراقية. 44 (2): 194 – 199.

8. ناجي، ضرغام باسم ومسلم عبد علي. (2013). تقويم تحمل اصول الحمضيات لتحمل تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم في مرحلة تضاعف الأفرع خارج الجسم الحي. مجلة الكوفة للعلوم الزراعية. 5 (1): 66 –89.

9. Bates, L., Walderen, R. and Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39:205-207.

10. Herbert, D., Phillip P.S, and Strange, R. (1971). Methods in Microbiology. In Norris, J. and Robbins, D. (eds.). Acads Press, London, New York.

11.عيسى، طالب أحمد. (1990). فسيولوجيا نباتات المحاصيل (مترجم). وزارة التعليم العالي – جامعة بغداد.

12.عبدول، كريم صالح. (1987). منظمات النمو النباتية، الجزء الأول، مطبعة جامعة الموصل، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، العراق.

13. Grout, B.W.W. (1990). Meristem tip culture. In: Plant Cell and Tissue Culture, V.6 by Pollard, J.W. and J.M. Walker. Human press Clifton. New Jersey. 81-91.

14. Rains, D.W., Croughan, T.P. and Stavarek, S.J. (1980). Selection of salt tolerance plants using tissue culture. In Rains, D.W., R.C. Valentine and A. Hollaender. Genetic Engineering of Osmoregulation. Plenum Press New York. 279-292.

15. Delauney, A.J. and Verma, D.P. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The plantJournal. 4(2): 215-223.

16. Solomen, A. S., Beer, Y., Waisel, G. Jones, and Paleg, G. (1994). Effects of NaCl on the carboxyl ting activity of Rubisco from (Tamarixjordanis L.) in the presence and absence of proline –related compatible solutes. Physiool. Plant. 90: 198-204.

17. Watad, A.A., Reinhold, L. and Lerner, H.P. (1983). Comparsion between a stable NaCl Selected Nicotina cell line and the wild type, K^+ , Na^+ and proline pools as a function of salinity. Plant Physiol. 73: 624-629.

18. Xu, C. and Huang, B. (2010). Differential proteomic responses to water stress induced by PEG in two creeping bentgrass cultivars differing in stress tolerance. J. Plant Physiol. 167: 1477-1485.

19.الكعبي، حسين خلف، عباس مهدي جاسم ومريم جاسم محمد. (2010). التحمل الملحي لصنفين من الرز *Oryza sativa* L. عند الزراعة خارج الجسم الحي، مجلة ابحاث البصرة (العلميات). 36 (3): 1817 – 2695.

20.محمود، باقر سجاد ومسلم عبد علي عبد الحسين. (2011). تأثير الإجهاد المائي على مستويات إنزيمات البيروكسيديزوالكتليزوالبروتينات والكربوهدرات في كالس صنفي العنب Amber Queen و Cardinal خارج الجسم الحي. مجلة الكوفة للعلوم الزراعية. 3 (2): 143-150.

21. Munnus, R. (2002). Comparative Physiology of salt and water stress. Plant,Cell and Env. 25:239-250.

22.الحسني، انسام زهير جاسم. (2013). الاكثار الخضري لنبات *Spilanthesa cmella* L. Murr. خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير. كلية العلوم للبنات. جامعة بغداد.

23.الجبوري، عبد الجاسم محسين، علي عبيد الطائي و رنا عزيز الرومي. (2003). تأثير الاجهاد الملحي في نمو الكالس واستحداث النباتات لأربعة اصناف من حنطة الخبز *Triticume astivum* L. ، مجلة الزراعة العراقية (عددخاص) 8(4) .

24. Pandey, R.N., Adams, R.P. and Flournoy, L.E. (1996). Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant poly saccharides. Plant Mol. Biol. Rep. 14: 17-22.