تحفيز المقاومة المكتسبة وانتخاب نباتات عباد/دوار الشمس (*Helianthus annus* L.) مقاومة للفطر *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. من مزارع كنب/كالوس السوق تحت الفلقية

نديم أحمد رمضان[1]، عدنان محمود عبد الله[2] وبادية عبد الرزاق ملاعبيدة[1]

(1) قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، العراق؛ (2) قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، العراق، البريد الالكتروني: nadeemramadan@yahoo.com

الملخص

رمضان، نديم أحمد، عدنان محمود عبد الله وبادية عبد الرزاق ملاعبيدة. 2011. تحفيز المقاومة المكتسبة وانتخاب نباتات عباد/دوار الشمس (*Helianthus annus* L.) مقاومة للفطر *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. من مزارع كنب/كالوس السوق تحت الفلقية. مجلة وقاية النبات العربية، 29: 43-50.

استحدث الكالوس من أجزاء السوق تحت الفلقية والجذور لنبات عباد/دوار الشمس في مستنبتات موراشيج وسكوغ MS الحاوية على تراكيز متباينة من منظمات النمو. وأبدت السوق تحت الفلقية قابلية أفضل من الجذور في تشكيل الكنب/الكالوس وكان المستنبت المحتوي على 1.0 مغ/ليتر لكل من BA و NAA أفضلها. أمكن انتخاب قطع كالوس متحملة لرشاحات الفطر *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. عند التركيز 10% من مزارع تنمية كالوس السوق تحت الفلقية على مستنبت MS المضاف إليه رشاحات الفطر بتراكيزمختلفة (5، 10، 15 و 20%، كل على حدة). أظهر الكالوس المنتخب المتحمل لرشاحات الفطر زيادة في فاعلية أنزيمات الكتالاز والفينيل ألانين أمونيالاز فضلاً عن ارتفاع تركيز حامض البرولين في المستخلص الخلوي. وتمايز الكالوس المتحمل وتكونت الأفرع الخضرية بصورة أفضل على مستنبت MS المضاف إليه 2.0 مغ/ليتر BA و1.0 مغ/ليتر NAA. كما وتكونت الجذور من الأفرع الخضرية في مستنبت MS الخالي من منظمات النمو. وأبدت بعض النباتات الناتجة من الكالوس المتحمل مقاومة للفطر الممرض عند إعدائها به اصطناعياً.

كلمات مفتاحية: برولين، عباد/دوار الشمس، فينيل ألانين أمونيالياز، كالوس، كتالاز، مقاومة، تحمل، *Macrophomina phaseolina*.

المقدمة

يعتبر عباد/دوار الشمس (*Helianthus annuus* L.) الذي ينتمي إلى العائلة المركبة Asteraceae من النباتات المهمة اقتصادياً وغذائياً لاحتواء بذوره على تراكيز عالية من الزيت والبروتين (3). يصاب هذا النوع النباتي بأمراض مختلفة تسببها البكتيريا والفطور إضافة إلى الفيروسات. ويعد تعفن الجذور الفحمي المتسبب عن الفطر *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. من أكثرها أهمية، فهو يؤثر في الإنتاج كماً ونوعاً (11)، حيث ينتج الفطر سموماً فطرية مختلفة داخلية وخارجية، ومن أهمها Phaseolinone الذي يحدث أعراضاً مرضية عند معاملة النبات به مشابهة للأعراض التي يحدثها الفطر ذاته (30)، فضلاً عن سموم أخرى مثل: Asperlin، Isoasperlin، Phaseolacton، Phaseolinic acid و Phomenon (12، 20). وتعتمد قابلية الفطر على إحداث المرض على قابليته على إنتاج هذه السموم (20). وقد أمكن انتخاب نباتات قمح مقاومة للسم Deoxynivalendol المنتج من الفطر *Fusarium graminearum* Schwabe عند إضافة تراكيز منه إلى مستنبت النمو (4) ونباتات الطماطم/البندورة المقاومة للسم Fusaric acid المفرز من الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder and H.N. Hans (34). وأشارت دراسات سابقة أخرى إلى أفضلية استخدام الرشاحات السامة الخام لمسببات الأمراض للحصول على النباتات المقاومة. وبناء عليه فقد أنتخبت نباتات البازلاء والقرنفل المقاومة لمرض الذبول المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* race 1 & 2 بعد إضافة رواشح الفطر الخام إلى المستنبت الغذائي (21، 32)، ونباتات فول الصويا المقاومة للفطر *F. solani* (Mart.) Sacc. (16). تستحث عادة النباتات من قبل عامل خارجي غير مناسب كمسببات الأمراض مثلاً، على تكوين مركبات كيميائية طبيعية أو تركيبية مختلفة تقاوم بواسطتها الممرضات، وتدعى بالمقاومة المستحثة (المكتسبة) Acquired Resistance (AR). وتعد أنزيمات فينيل ألانين أمونيالياز Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL)، الكتالاز، والحامض الأميني البرولين جزءاً من هذه المركبات (13). ويعد أنزيم PAL مهماً في سلسلة بناء الفينولات من الحامض الأميني Phenylalanine الذي يعد مكوناً أساسياً في مقاومة النبات لمسببات الأمراض (18). وبينت نتائج دراسات مرجعية عديدة ارتفاعاً في تركيز أنزيم PAL ونشاطه في النباتات المقاومة عند إصابتها بمسببات الأمراض (28، 29). كما يعتبر أنزيم الكتالاز أحد أنزيمات

الأكسدة والاختزال المهمة، وهو يعمل على خفض تراكيز بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) السامة المتراكمة في الخلايا النباتية عند تعرضها للإجهادات الأحيائية (10). وأوضحت بعض الدراسات المرجعية إمكانية اعتماد هذا الأنزيم كمؤشر لمقاومة النباتات، فقد لوحظ ارتفاع تركيزه في النباتات المقاومة المعداة بمسببات الأمراض (19). كما أشارت عدد من الدراسات إلى أهمية تراكم البرولين الحر والبروتينات الغنية بالبرولين في أنسجة النباتات المصابة بالأمراض (17، 24). ويهدف هذا البحث إلى الحصول على نباتات عباد/دوار الشمس مقاومة للفطر *M. phaseolina* بتقنية زراعة الأنسجة (إنتاج الكالوس وإكثاره)، وإمكانية اعتماد بعض أنزيمات الأكسدة والإختزال كمؤشرات للدلالة على اكتساب النباتات صفة المقاومة. استخدمت المزارع النسيجية كمزارع الكالوس والمعلق الخلوي في الحصول على النباتات المقاومة.

مواد البحث وطرائقه

تجهيز بادرات عباد/دوار الشمس المعقمة واستحداث الكالوس وحفظه

طهرت بذور عباد/دوار الشمس (الصنف المحلي)، بغمرها في محلول هيبوكلوريت الصوديوم 3% لمدة 15 دقيقة، ثم غسلت البذور بعدها بالماء المعقم ثلاثة مرات (3 دقائق/مرة). زرعت البذور في دوارق زجاجية سعة 100 مل احتوت 20 مل من مستنبت موراشيج وسكوغ (MS) (22) الصلب الخالي من منظمات النمو بمعدل 4 بذور/دورق. حضنت العينات في غرفة النمو عند درجة حرارة 25±2 ºس لمدة أربعة أيام تحت ظروف الظلام ثم الإضاءة (16 ساعة ضوء/8 ساعة ظلام وشدة إضاءة 1500 لوكس). اعتمدت البادرات المطهرة مصدراً للأجزاء النباتية (قطع الجذور والسوق تحت الفلقية بطول 1 سم).

زرعت قطع الجذور والسوق تحت الفلقية المطهرة، كل على حدة، في دوارق زجاجية سعة 100 مل احتوت 25 مل من مستنبت MS الصلب المدعم بتراكيز مختلفة (0.0، 1.0، 2.0 و 3.0 مغ/ليتر) من Benzyl Adenine (BA) ومتداخلة مع (NAA) Naphthalene Acetic Acid بثلاثة تراكيز (0.0، 0.5 و 1.0 مغ/ليتر). تم إكثار الكالوس وحفظه بإعادة زراعته على مستنبت (MS + 1.0 مغ/ليتر لكل من BA و NAA). قطع الكالوس إلى أجزاء بوزن 1 غ تقريباً وزرعت في المستنبت الجديد بواقع قطعة/دورق/25 مل مستنبت غذائي. حضنت العينات عند ظروف غرفة النمو والتعاقب الضوئي ذاتها، وأعيدت الزراعة كل 30 يوماً.

تكوين النباتات الكاملة من تمايز الكالوس

اختبر المستنبت MS الصلب المحتوى على التراكيز والتوليفات من BA و NAA المستخدمة ذاتها في تشجيع الكالوس على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية. نقل الكالوس بمعدل 1 غ/قطعة وبعمر 30 يوماً إلى دوارق حجم 100 مل واحتوت 25 مل من أحد المستنبتات المختبرة وبمعدل 8 قطع كالوس لكل معاملة. كما استخدم المستنبت MS الخالي من منظمات النمو لحث الأفرع الخضرية ذات الأطوال المناسبة (3–5 سم) على تكوين الجذور. إذ نقلت الأفرع الخضرية إلى دوارق زجاجية احتوت 25 مل من المستنبت. حضنت جميع العينات تحت ظروف غرفة النمو والتعاقب الضوئي ذاتها.

مصدر الفطر وتجهيز رشاحاته السامة الخام

تم عزل الفطر *M. phaseolina* من نباتات عباد/دوار الشمس مصابة بمرض التعفن الفحمي، ثم نقي وحضرت منه مستعمرات وحيدة البوغ (23). وشخص الفطر وفقاً لتوصيف Thirumalachar (33)، ثم كوثر على مستنبت بطاطا/بطاطس سكروز آجار (PSA). جهز الراشح الفطري وفقاً للطرائق المرجعية (31)، بعد تنمية الفطر الممرض على المستنبت الغذائي السائل الملائم لإنتاج السموم الفطرية (6). وزع 50 مل من المستنبت في دوارق زجاجية سعة 250 مل ولُقح محتوى كل دورق بقرصين من مستعمرة الفطر الممرض قطر 0.5 سم على مستنبت PSA بعمر 7 أيام. حُضنت الدوارق عند درجة حرارة 27±2 °س لمدة 20 يوماً. ثم رُشحت محتويات الدوارق من خلال الشاش المعقم، عرضت الرشاحات للطرد المركزي عند درجة حرارة 4°س وبسرعة 12000 دورة/دقيقة ولمدة 20 دقيقة وذلك للتخلص من بقايا الأبواغ والغزل الفطري. عرضت الرشاحات مرة أخرى لعملية ترشيح باستخدام مرشحات ذات ثقوب دقيقة Millipore filter (0.22 ميكروميتر)، واحُتفظ بالراشح في أوعية زجاجية عند درجة حرارة –10 °س لحين الاستخدام.

معاملة كالوس السوق تحت الفلقية برشاحات الفطر *M. phaseolina*

اتُبعت طريقة Thaker وآخرون (32) السريعة والمباشرة في انتخاب الكالوس المتحمل لرشاحات الفطر. أُضيفت الرشاحات المعقمة بتراكيز (5، 10، 15، 20% حجم:حجم) إلى مستنبت إكثار الكالوس وحفظه (MS+ 1.0 مغ/ليتر لكل من BA وNAA) بعد تعقيمه وتبريده إلى درجة حرارة 50 °س. وزع المستنبت الحاوي على الراشح في أطباق بتري زجاجية قطر 9 سم بمعدل 25 مل/طبق. وضعت 10 قطع من الكالوس بعمر 30 يوماً بوزن 0.2 غرام/قطعة تقريباً على المستنبت. وحضنت عند درجة حرارة 25±2 °س وتحت ظروف التعاقب الضوئي ذاتها، ولمدة 20 يوماً. أُعيدت زراعة قطع

الكالوس الحية في أفضل مستنبت انتخاب حاو على 10% راشح فطري وكرر لثلاثة مرات متعاقبة بمعدل 20 يوماً. كوثر الكالوس المنتخب وحفظ بنقله إلى دوارق زجاجية سعة 100 مل احتوت 25 مل من مستنبت حفظ الكالوس المحتوي على 10% راشح فطري بمعدل قطعتين/دورق، وأُعيدت زراعة الكالوس مرة كل 30–35 يوماً.

تحديد فاعلية بعض مؤشرات المقاومة في المستخلص الخلوي للكالوس

جهز المستخلص الخلوي الرائق من عينات الكالوس المعامل بتراكيز رشاحات الفطر وفقاً للطرائق المرجعية (1). حددت فاعلية إنزيم فينيل ألانين أمونيالياز (PAL) بدلالة قياس تركيز حامض السينناميك المتكون نتيجة تحليل الحامض الأميني فينيل ألانين في مزيج التفاعل بفعل الأنزيم PAL بوساطة جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية وعند طول موجة 290 نانوميتر (8). وقيست فاعلية أنزيم الكاتالاز في المستخلص الخلوي وفقاً لطريقة Goth (15)، وبدلالة قياس شدة امتصاص الضوء من قبل المعقد الأصفر المتكون نتيجة تفاعل مادة بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) مع موليبدات الأمونيوم وعند طول موجة 450 نانوميتر باستخدام المطياف الضوئي. اتُبعت طريقة Bates وآخرون (7) في قياس تركيز البرولين في الكالوس المعامل بالراشح، وذلك بمعاملة 0.5 غ من الكالوس بـ 10 مل من حمض Sulfosalcy تركيز 3% مع استعمال حامض النينهايدرين (Ninhydrin acid) وحامض الخليك الثلجي (Glacial acetic acid). تم قراءة شدة امتصاص الضوء للمركب الوردي اللون وعند طول موجة 520 نانوميتر.

اختبار تحمل النباتات الناتجة من الكالوس عند تلقيحها بالفطر *M. phaseolina*

تهيئة اللقاح الفطري – جهز مستنبت PSA السائل ووزع في دوارق زجاجية بمعدل 250 مل/دورق، ثم لقح محتوى كل دورق بقرصين قطر 1 سم من مزرعة فطرية بعمر 10 أيام نامية على مستنبت PSA الصلب. حضنت الدوارق عند درجة حرارة 27 °س ولمدة 10 أيام. خلطت محتويات الدوارق بالخلاط الكهربائي وبالسرعة القصوى 100 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة. استخدمت النباتات الناتجة من الكالوس المعامل برشاحات الفطر والتي نجحت أقلمتها لهذا الاختبار، ولقح كل نبات بمزج 5 مل من المعلق الفطري وذلك عن طريق إضافتها إلى التربة القريبة والملاصقة للنبات مع إحداث خدوش بوساطة إبرة معقمة أسفل الساق عند مستوى سطح التربة، وتركت النباتات تحت المشاهدة مع سقيها وفقاً للحاجة (5).

النتائج والمناقشة

تكوين النباتات الكاملة بدءاً من كالوس السوق تحت الفلقية

أظهرت نتائج زراعة أجزاء السوق تحت الفلقية والجذور في مستنبتات الاستحداث المدروسة قابلية هذه الأجزاء لتكوين الكالوس في معظم المستنبتات المختبرة، و بنسب بلغت 86 و 70%، على التوالي. وكان المستنبت MS + 1.0 مغ/ليتر لكل من BA و NAA هو الأفضل.

تبين نتائج الجدول 1 قابلية كالوس الأجزاء تحت الفلقية على تكوين الأفرع الخضرية في مستنبتات MS المحتوية على تراكيز مختلفة من BA و NAA، ولوحظ زيادة أعداد الأفرع الخضرية المتكونة مع زيادة تراكيز BA في المستنبت المغذائي. وكان المستنبت MS + 2.0 مغ/ليتر من BA + 1.0 مغ/ليتر من NAA الأفضل بإعطائه 22 طرداً خضرياً. وكانت المدة الزمنية اللازمة لنشوئها 15–20 يوماً من نقلها إلى مستنبتات التمايز. وقد استبعد كالوس الجذور من التجارب لانعدام قابليته على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية في جميع مستنبتات التمايز المختبرة وفي جميع المعاملات.

جدول 1. تكوين الأفرع الخضرية من كالوس السوق تحت الفلقية لبادرات عباد/دوار الشمس في مستنبت MS الصلب المحتوي على تراكيز مختلفة من BA وNAA.

Table 1. Formation of vegetative branches from hypocotyl stems callus of sunflower seedlings in MS solid medium containing different concentrations of BA and NAA.

عدد الأفرع الخضرية المتكونة No. of vegetative shoots produced				NAA (مغ/ليتر)
BA (mg/L)		BA (مغ/ليتر)		
3.0	2.0	1.0	0 .0	NAA (mg/L)
14	11	5	0	0.0
17	12	3	0	0.5
18	22	4	0	1.0

وأظهرت الأفرع الخضرية المتكونة قابلية جيدة على تكوين الجذور في مستنبت MS الخالي من منظمات النمو، وبلغت نسبة التجذير 90%. وتعزى الاستجابة الجيدة لأجزاء السوق تحت الفلقية والجذور لاستحداث الكالوس إلى طبيعة الجزء النباتي المستخدم في الإكثار ومدى التوافق بين محتواه الداخلي من منظمات النمو والتراكيز المضافة إلى المستنبت، إضافة إلى اختلاف عدد الخلايا التي لها القابلية على الانقسام في كلا الجزئين والقادرة على تكوين الكالوس، وهذا ما أشار إليه كذلك باحثون آخرون على نبات عباد/دوار الشمس (2، 25). وأكد تكون الأفرع الخضرية من كالوس

السوق تحت الفلقية في مستنبت MS الحاوي على BA وNAA ملاءمة هذا المستنبت ومنظمات النمو المضافة لتمايز الكالوس. وقد أشارت دراسات أخرى في هذا النبات إلى هذه الحالة (2، 26). وقد يعزى سبب تمايز كالوس السوق تحت الفلقية وانعدامه في حالة الجذور إلى اختلاف نوعية الكالوس المتشكل ومصدره وأنواع منظمات النمو المستخدمة وتراكيزها وتداخلها مع مستواها الداخلي في النبات (35).

انتخاب الكالوس المتحمل لرشاحات الفطر من مزارع كالوس السوق تحت الفلقية للبادرات

بينت النتائج (جدول 2) نمو الكالوس على مستنبت الإكثار والحفظ (MS + 1.0 مغ/ليتر لكل من BA وNAA) المحتوي على 0.0 و 5.0% راشح فطري وزيادة أوزان قطعه. وقد ظهر التأثير السلبي لراشح الفطر بصورة واضحة عند التركيز 10%، وازداد التأثير السلبي في نمو الكالوس مع زيادة تركيز الراشح في المستنبت الغذائي، وتوقف الكالوس عن النمو تقريباً، إذ بقي وزن قطع الكالوس ثابتاً والبالغة 10 قطع لكل معاملة مشابهة لأوزانها قبل المعاملة، فضلاً عن اكتساب الكالوس لوناً بنياً فاتحاً (شكل 1–A). واعتمد هذا التركيز فقط في عملية انتخاب قطع الكالوس المتحمل، وأهمل التركيز 5% لتأثيره المحدود، كما أهملت التراكيز 15 و 20% بسبب موت جميع قطع الكالوس بسبب توقفها عن النمو وانخفاض أوزانها وتلونها باللون البني الغامق المسود (شكل 1–B).

جدول 2. انتخاب الكالوس المتحمل من مزارع كالس السوق تحت الفلقية لعباد/دوار الشمس المحتوية على رشاحات الفطر *M. phaseolina* بعد 20 يوماً من التحضين.

Table 2. Selection of tolerant callus from stems callus culture of sunflower hypocotyls on *M. phaseolina* exudates, 20 days after incubation.

تراكيز رشاحات الفطر (%) Concentration of fungal filtrates (%)	الوزن الوسطي لقطع الكالوس (غ)* Mean weight of callus segments (g)*
0.0	1.943
5.0	1.311
10.0	1.067
15.0	0.675
20.0	0.608
وزن الكالوس قبل المعاملة (غ) Weight of callus before treatment (g)	1.115

*عدد قطع الكالوس الموزونة من كل معاملة كان 10 قطع
* No. of callus pieces weighed in each treatment=10 pieces.

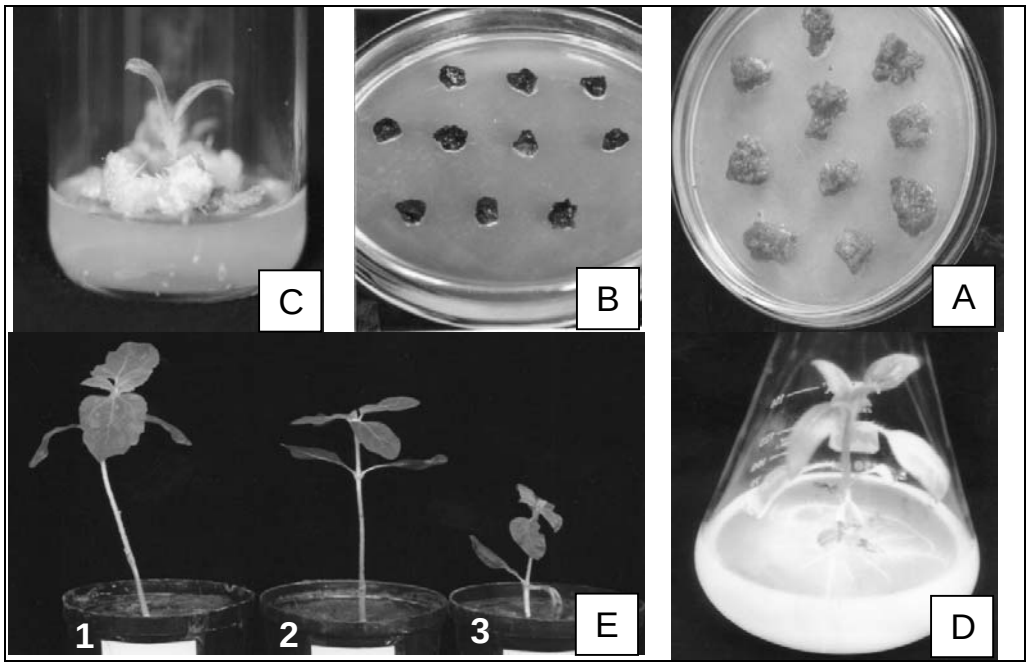
وقد يعزى سبب توقف الكالوس عن النمو وانخفاض أوزانه عند معاملته بتراكيز عالية من رشاحات الفطر إلى تأثير المركبات السامة الموجودة في الرشاحات والمفرزة من قبل الفطر فضلاً عن تأثير هذه المركبات في شكل الكالوس وإكسابه لوناً بنياً. ولوحظت نتائج مشابهة على نباتات القرنفل (32) وفول الصويا (16) والخيار (1).

تحديد فاعلية بعض مؤشرات المقاومة المكتسبة في مستخلص الكالوس المعامل برشاحات الفطر

فاعلية أنزيم الفينيل ألانين أمونياليـاز (PAL) – أظهر الكالوس المعامل بتراكيز مختلفة من رشاحات الفطر نشاطاً متباينـاً لأنـزيم PAL، إذ يلاحظ من الشكل 2–A أن أفضل نشاط، والمعبر عنه بقيمة شدة امتصاصية الضوء عند طول موجة 290 نانوميتر، كان في مستخلص الكالوس المعامل بـ 10% راشح فطري، مقارنة مع الشاهد الخالي من الرشاحات الفطرية، وانخفاض فاعلية الأنزيم في عينات الكالوس المعامل بالتراكيز الأخرى.

فاعلية أنزيم الكتالاز – بينت النتائج (شكل 2–B) اختلاف نشاط أنزيم الكتالاز في المستخلص الخلوي للكالوس المعامل بتراكيز متباينة من رشاحات الفطر، وكان نشاط الأنزيم، والمعبر عنهُ بقيمة شدة إمتصاصية الضوء عند طول موجة 450 نانوميتر، متقارباً مع الشاهد في المستخلصين الخلويين للكالوس المعامل بتركيزين 5 و 10% راشح فطري ثم بدأ نشاط الأنزيم بعدها بالانخفاض مع زيادة تراكيز الراشح في المستنبت الغذائي.

تركيز الحامض الأميني البرولين – بينت النتائج (شكل 2–C) ارتفاع تراكيزالبرولين في عينات الكالوس مع زيادة تراكيز الراشح الفطري في المستنبت، والمعبر عنه بقيمة شدة امتصاصية الضوء عند طول موجة 520 نانوميتر، وظهر أعلى تركيز للبرولين عند عينات الكالوس المعاملة بتراكيز 10 و 15% راشح فطري. أكد زيادة نشاط أنزيمات PAL والكتالاز وتراكيز الحامض الأميني البرولين في مستخلص خلايا الكالوس المنتخب المتحمل لرشاحات الفطر عند التركيز 10% ملاءمة استخدام هذه العوامل باعتبارها مؤشراً جيداً للدلالة على اكتساب خلايا الكالوس صفة التحمل أو المقاومة. ويعزى سبب ارتفاع تراكيز هذه المواد إلى الجهد الذي أحدثته المركبات السامة في الراشح الفطري. وكانت نتائج دراسات مرجعية سابقة قد أشارت إلى تفاعل مماثل لهذه المؤشرات على نباتات مختلفة مثل الفاصولياء (9) والفلفل (24).



شكل 1. (A) إنتاج نباتات عباد/دوار الشمس المتحملة لرشاحات الفطر *M. phaseolina* عند تركيز 10% من كالوس السوق تحت الفلقية؛ (B) شكل ولون كالوس السوق تحت الفلقية المتأثر برشاحات الفطر تركيز 15 و20%؛ (C) تمايز كالوس السوق تحت الفلقية في مستنبت MS المدعم بـ 2.0 مغ/ليتر BA + 1.0 مغ/ليتر NAA والحاوي على 10% راشح فطري؛ (D) تجذير الأفرع الخضرية في مستنبت MS الخالي من منظمات النمو؛ (E) 1: نبات عباد/دوار الشمس ناتج من البذور (شاهد)، 2: نبات عباد/دوار الشمس متمايز من كالوس غير معامل برشاحات الفطر، 3: نبات عباد/دوار الشمس الكامل المقاوم للعدوى بالفطر الممرض والناتج من تمايز الكالوس المتحمل لرشاحات الفطر.

Figure 1. (A) Production of tolerant sunflower plants to *M. phaseolina* at 10% concentration from hypocotyls callus; (B) Callus form and color produced from hypocotyls treated with 10 and 20% culture filtrate; (C) Differentiation of callus on solid agar MS medium supplemented with 2.0 mg/L BA + 1.0 mg/L NAA with 10% culture filtrate; (D) Root formation in MS medium free from growth regulators; (E) 1: Sunflower plant formed from seeds (control), 2: Sunflower plant differentiated from callus grown on medium without culture filtrate, 3: Resistant sunflower plant to the pathogenic fungus selected from tolerant callus treated with culture fungal filtrate.

تكوين النباتات من كالوس السوق تحت الفلقية المتحمل لرشاحات الفطر ونقلها إلى التربة

اعتمد المستنبت الصلب MS + 2.0 مغ/ليتر BA + 1.0 مغ/ليتر NAA في تحفيز الكالوس المتحمل لرشاحات الفطر على تكوين الأفرع الخضرية. بينت النتائج (جدول 3) تأثير رشاحات الفطر في كفاءة الكالوس على التمايز، وانخفضت نسبة أعداد الأفرع الخضرية المتكونة من الكالوس المتحمل لرشاحات الفطر إلى 70% مقارنة مع الشاهد غير المعامل بالراشح 240%. وبلغت المدة الزمنية اللازمة لتكوين الأفرع الخضرية من الكالوس المتحمل 35 يوماً وهي أطول نسبياً من المدة الزمنية في حالة الشاهد (25 يوماً)، فضلاً عن النمو البطيء للأفرع الخضرية الناشئة من الكالوس المتحمل (شكل 1-C).

جدول 3. تكوين الأفرع الخضرية من الكالوس المشتق من السوق تحت الفلقية لبادرات عباد/دوار الشمس المتحمل لرشاحات الفطر *M. phaseolina* في مستنبت التمايز بعد 30 يوماً من التحضين.

Table 3. Formation of vegetative shoots from callus tolerant to *M. phaseolina* filtrates from hypocotyls of sunflower seedling in differentiation medium, 30 days after incubation.

معاملة الكالوس Callus treatment	العدد الكلي للقطع المختبرة Total No. of pieces tested	العدد الكلي للأفرع الخضرية المتكونة Total No. of formed vegetative shoots	النسبة المئوية (%) للأفرع الخضرية المتكونة Percentage of vegetative Shoots formed
شاهد Control	10	24	240
كالوس معامل براشح الفطر Callus not treated with fungal filtrate	27	19	70

بينت النتائج (جدول 4) قابلية الأفرع الخضرية الناتجة من كالوس السوق تحت الفلقية المتحمل لرشاحات الفطر على تكوين الجذور في مستنبت MS الخالي من منظمات النمو، وكانت نسبة التجذير 82.6%. نقلت الأفرع الخضرية المتكونة بطول 3–5 سم إلى مستنبت التجذير، وتكونت جذورها بعد 7–10 أيام في معظم الأفرع الخضرية (شكل D1-) وتمكن بعض من النباتات المتكونة من التكيف لظروف البيئة عند نقلها إلى التربة.

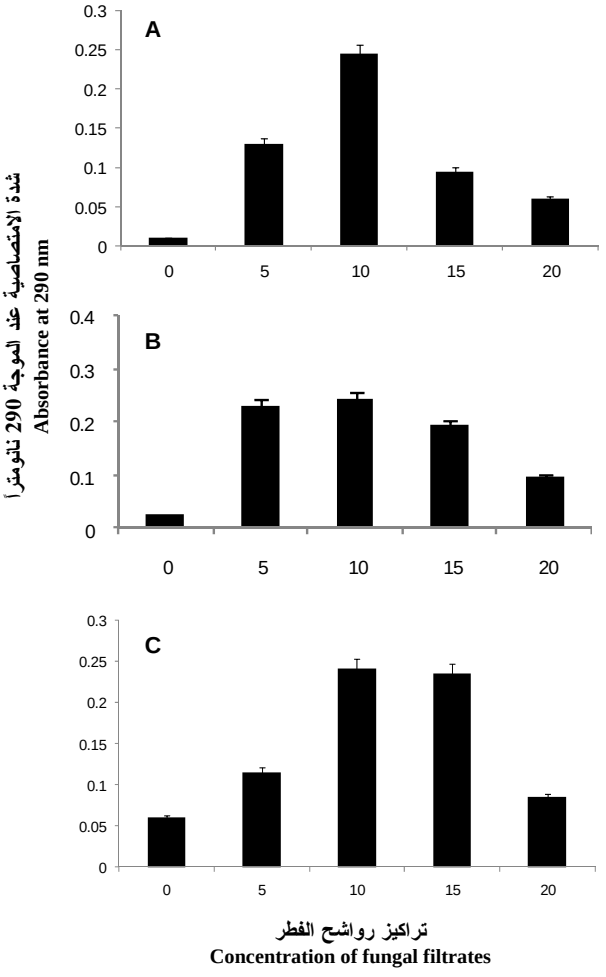
جدول 4. تجذير الأفرع الخضرية الناتجة من كالوس السوق تحت الفلقية لبادرات عباد/دوار الشمس المتحمل لرشاحات الفطر *M. phaseolina* في مستنبت MS الصلب الخالي من منظمات النمو.

Table 4. Rooting of vegetative shoots derived from stem hypocotyls callus of sunflower seedlings tolerant to *M. phaseolina* exudates in MS solid medium without growth regulators.

كالوس معامل Treated callus	عدد الأفرع المنقولة No. of transferred shoots	النسبة المئوية (%) للتجذير Rooting rate (%)	عدد النباتات الكاملة المتأقلمة في التربة No. of adapted plants in soil
شاهد Control	40	90	22
المتحمل Tolerant	23	82 .6	13

اختبار القدرة الإمراضية للكشف عن قابلية النباتات الناتجة من الكالوس المتحمل للإصابة بالفطر *M. phaseolina*

أظهرت نتائج اختبار القدرة الإمراضية لمجموعة النباتات الناتجة من الكالوس المتحمل والتي نمت في تربة ملقحة اصطناعياً بالفطر الممرض قابلية 3 نباتات فقط من مجموع 13 نبات على مقاومة الفطر الممرض وبقائها حية (شكل E3 –1). تمايزت هذه النباتات من خلايا اكتسبت نوعاً من المقاومة نتيجة معاملتها برشاحات الفطر السامة أما البقية فقد نشأت من خلايا عوملت برشاحات لكنها لم تكتسب صفة التحمل أو المقاومة. ولم يلاحظ وجود اختلافات واضحة في الصفات المظهرية بين النباتات المقاومة وعينات الشاهد الناتجة من الكالوس غير المعامل بالراشح (شكل E2-1) والناتجة من البذور (شكل E1-1). ويستثنى من ذلك صفة ارتفاع النبات، إذ كانت النباتات الناتجة من البذور أطول نسبياً من مثيلاتها الناتجة من الكالوس المعامل بالراشح أو غير المعامل. تكونت الأفرع الخضرية من الكالوس المتحمل المنتخب وبنسبة 70% مقارنة بعينة الشاهد، وهذه نتيجة مقبولة نسبة إلى دراسات مماثلة (1، 32). يعزى سبب هذا التباين في القدرة على تكوين الأفرع إلى وجود المركبات السامة في الراشح الفطري، وتراكم هذه المركبات في داخل الخلايا مسببة خللاً بعملية الإنقسام والتمايز (4). وكانت بعض الدراسات السابقة التي أجريت على نبات عباد/دوار الشمس قد أشارت إلى نتائج مقاربة (11). وقدعزت دراسات سابقة المقاومة المكتسبة للنباتات الناتجة من إكثار الكالوس المتحمل للسموم إلى إنتاج خلايا مقاومة لعدد من المركبات كالفينولات وعديدات السكريات التي أكسبت خلايا الكالوس صفة التحمل أو المقاومة، وترتب عن تمايزها نشوء نباتات عباد/دوار الشمس مقاومة للفطر الممرض (27).



شكل 2. نشاط أنزيم PAL (A) وانزيم الكتالاز (B) وتركيز الحامض الأميني البرولين (C) في المستخلص الخلوي لكالوس عباد/دوار الشمس المعامل بتراكيز مختلفة من رشاحات الفطر.

Figure 2. Effect of PAL (A), catalase (B), and the amino acid proline (C) in the callus extract of sunflower callus treated with different concentrations of fungal filtrates.

كما عزت دراسات أخرى زيادة مقاومة النباتات إلى زيادة إنتاج ونشاط أنزيمات PAL والكتالاز والحامض الأميني البرولين والتي أدى تراكمها في خلايا الكالوس إلى إكسابها صفة المقاومة وبالتالي تكوينها نباتات متحملة أو مقاومة (14). لقد تحققت نجاحات عديدة باستخدام تقانة إضافة السموم النقية أو الراشح الخام لمسببات الأمراض إلى مستنبتات النمو، وتم الحصول على نباتات مقاومة للأمراض كالقرنفل (32) وفول الصويا (16) الأمر الذي شجع على استخدام هذه الطريقة في الدراسة الحالية والتي أدت إلى الحصول على نباتات عباد/دوار الشمس مقاومة لمرض التعفن الفحمي المتسبب عن الفطر *M. phaseolina*.

Abstract

Ramadan, N.A., A.M. Abdallah and B.A. Malaabeeda. 2011. Enhancement of Acquired Resistance and Selection of Sunflower (*Helianthus annus* L.) Plants Resistant to the Pathogen *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Obtained from Hypocotyls Stem Callus Culture. Arab Journal of Plant Protection, 29: 43-50.

Callus formation was stimulated from explants hypocoptyls of *Helianthus annus* seedlings on Ms media containing different concentrations of growth regulators. The hypocotyl stems explants responded better than roots in callus formation on a medium containing 1.0 mg/L of BA and NAA. Resistant callus to *Macrophomina phaseolina* was selected from hypocotyls in cultures containing different concentrations (5.0, 10.0, 15.0 and 20.0%, separately) of fungal filtrates. The tolerant callus to 10% fungal filtrate showed a high level of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and Catalase enzymes activity. The results also showed that free amino acid proline in cell extracts of tolerant callus was increased. MS medium with 2.0 mg/L of BA and 1.0 mg/L of NAA was the best regeneration medium for tolerant callus form hypocotyls. Regenerated shoots formed roots on MS medium without growth regulators. Sunflower plants regenerated from tolerant callus exhibited resistance when inoculated with the pathogenic fungus.

Keywords: Proline, *Helianthus annus*, phenylalanine ammonia lyase, callus, catalyase, resistance, tolerance, *Macrophomina phaseolina*.

Corresponding author: ***Nadeem Ramadan, Department of Biology, Faculty of Science, Mousel University, Iraq, Email: nadeemramadan@yahoo.com***

المراجع

1. **الحمداني، انسام أحمد سعدون.** 2006. انتخاب نباتات خيار *Cucumis sativus* L. مقاومة للتعفن وموت البادرات المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* بتقانة الزراعة النسيجية. رسالة ماجستير كلية التربية، جامعة الموصل، العراق. 94 صفحة.
2. **العقيدي، تغريد نواف.** 2004. تأثير أشعة جاما في إحداث التغايرات في محتوى البروتين والزيت والأحماض الدهنية في كالس زهرة الشمس وتمايزه. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق. 103 صفحة.
3. **طيفور، حسين عوني ورزگار حمدي رشيد.** 1990. المحاصيل الزيتية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل، العراق. 316 صفحة.

References

4. **Abdalla, M.Y., M.I. Motawei, M.N. Barakat and A.A. Al-Rakaibah.** 2002. *In-vitro* selection for resistance to *Fusarium graminearum* in wheat by tissue culture and RAPD technique. Alexandria Journal of Agricultural Research, 47: 7-75.
5. **Baayen, R.P. and A.L. De Maat.** 1987. Passive transport of micro conidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation after root inoculation. Netherlands Journal of Plant Pathology, 93: 3-13.
6. **Baker, R.A., J.H. Tatum and S. Nemec.** 1981. Toxins production by *Fusarium solani* from fibrous roots of blight- diseased citrus. Phytopathology, 71: 951-954.
7. **Bates, L.S., R.P. Waldren and L.D. Teare.** 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.
8. **Beaudoin-Eagan, L.D. and T.A. Thorpe.** 1985. Tyrosion and phenlalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. Plant Physiology, 78: 438-441.
9. **Broetto, F., J.A. Marchese, M. Leonardo and M. Regina.** 2005. Fungal elicitor-mediated changes in polyamine content, phenylalanine-ammonia lyase and peroxidase activities in bean cell culture. General Applied Plant Physiology, 31: 235-246.
10. **Byun, H.J. and S.J. Choi.** 2003. Activation of disease resistance related enzymes by treatment of hydrogen peroxide and benzoic acid in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 44: 287-291.
11. **Day, J.P. and M.V. Mac Donald.** 2008. Plant-Pathogen interaction of sunflower and *Macrophomina phaseolina In-Vitro* and *In-Vivo*. Plant Pathology, 44: 261-269.
12. **Dhar, T.K., K.A. Siddiqui and E. Ali.** 1982. Structure of phaseolinone, a novel phytotoxin from *Macrophomina phaseolina*. Tetrahedron Letters, 23: 5459-5462.
13. **Dixon, R.A. and C.J. Lamb.** 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. Annual Review of Plant Physiology, 41: 339-367.
14. **Dmitriev, A., M. Tena and J. Jorrin.** 2003. Systemic acquired resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Tsitol Genet, 37: 9-15.
15. **Goth, L.** 1991. A simple method for determin-ation of serum catalase and revision of reference range. Clinica Chimica Acta, 196: 143-152.
16. **Jin, H., G.L. Hartman, D. Nichell and J.M. Widholm.** 1996. Phytotoxicity of culture filtrate from

regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). African Journal of Biotechnology, 53: 621-624.

27. **Radwan, O., S. Mouzeyar, J.S. Venisse, P. Nicolas and M.F. Bouzidi.** 2005. Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. Journal of Experimental Botany, 56: 2683-2693.
28. **Ryals, J.A., U.H. Neuenschwander, M.G. Willits, A. Molina, H.Y. Steiner and M.D. Hunt.** 1996. Systemic acquired resistance. Plant Cell, 8: 1809-1819.
29. **Smith-Becker, J., E. Marios, E.J. Huguet, S.L. Midlands, J.J. Sims and N.T. Keen.** 1998. Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stem. Plant Physiology, 116: 231-238.
30. **Suchandra, S., S.K. Mishra and K.A.I. Siddiqui.** 2000. A virulent mutants of *Macrophomina phaseolina* and *Aspergillus funmigatus* initiate infection in *Phaseolus mungo* in the presence of phseolinone; leramisole gives protection. Journal of Bioscience, 25: 73-80.
31. **Sutherland, M.L. and G.F. Pegg.** 1992. The basis of host recognition in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici.* Physiological and Molecular Plant Pathology, 40: 423 -436.
32. **Thakur, M., D.R. Sharma and S.K. Sharma.** 2002. *In vitro* selection and regeneration of carnation (*Dianthus carytophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianth*. Plant Cell Reports, 20: 825-828.
33. **Thirumalachar, M.J.** 1953. Pycnidial stage of charcoal rot inciting fungus, with a discussion on its nomenclature. Phytopathology, 43: 608-610.
34. **Toyoda, H., H. Hayashi, K.Yamamoto and T. Hirai.** 1984. Selection of resistant tomato calli to fusaric acid. Annual Phytopathological Society of Japan, 50: 538-540.
35. **Weber, S., R. Horn and W. Friedt.** 2000. High regeneration Potential *in vitro* of sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines derived from interspecific hybridization. Euphytica, 116: 271-280.

Fusarium solani the causal agent of sudden death syndrome of soybean. Plant Disease, 80: 922-927.

17. **Kauss, H., K. Seehaus, R. Franke, S. Gilbert, R.A. Dietrich and N. Kroeger.** 2003. Silica deposition by a strongly cationic proline-rich protein from systemically resistant cucumber plants. The Plant Journal, 33: 87-95.
18. **Lu, B.B., Z. Du, R.X. Ding, L. Zhang, X.J. Yu, C.H. Liu and W.S. Chen.** 2006. Cloning and characterization of a differentially expressed phenylalanine ammonialyase gene (liPAL) after genome duplication from tetraploid *Isatis indigotica* Fort. Journal of Integrative Plant Biology, 48: 1439-1449.
19. **Lubova, L., D. Jancova, I. Frebort, A. Lebeda, M. Sebela, E. Kristkova and P. Pec.** 1999. Amino oxidase, peroxidase, catalase and acid phosphatase activities in powdery mildew infected plants of *Cucumis sativus.* Phyton, 39: 235-241.
20. **Mahato, S.B., K.A.I. Siddiqui, G. Bhattacharya, T. Ghosal, K. Miyahara, M. Sholichin and T. Kawasaki.** 1987. Structure and stereochemistry of phaseolinic acid – a new acid from *Macrophomina phaseolina*. Journal of Natural Products, 50: 245-247.
21. **McPhee, K.E., A. Tullu, J.M. Kraft and F.J. Muehlbauer.** 1999. Resistance to *Fusarium* wilt race 2 in the *Pisum* core collection. Journal of the American Society of Horticulture Sciences, 124: 28-31.
22. **Murashige, T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473–479.
23. **Nelson, P.E., T.A. Toussoun and W.F.O. Marasas.** 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA. 193 pp.
24. **Oncel, L., A.S. Ustnne and Y. Keles.** 1996. Prolin accumulation in peppers (*Capsicum annum* L.) resistant and susceptible to root rot (*Phytopathora capsici* Leon). Turkish Journal of Botany, 20: 489-495.
25. **Ozyigit, I.I., N. Gozukirmizi and B.D. Semiz.** 2006. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of sunflower. Russian Journal of Plant Physiology, 53: 621-624.
26. **Ozyigit, I.I., N. Gozukirmizi and B.D. Semiz.** 2007. Genotype dependent callus induction and shoot

Received: September 23, 2009; Accepted: August 3, 2010

تاريخ الاستلام: 2009/9/23؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2010/8/3