

المحتوى الايوني للكالس المشتق من اصل الحمضيات تروير سترانج المنمى على وسط ملحي شيماء سلمان نعمة

قسم البستنة وهندسة الحدائق - كلية الزراعة - جامعة الكوفة - العراق

المستخلص

اجري البحث لتقييم تاثير ملح كلوريد الصوديوم في المحتوى الايوني لكالس اصل الحمضيات تروير المزود بتراكيز من ملح كلوريد MS خارج الجسم الحي . زرع الكالس في الوسط الغذائي Citrus sp. سترانج الصوديوم (0 ، 50 ، 100 ، 150 ملي مول) لمدة اربعة اسابيع . و اوضحت النتائج أن مستويات كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي أثرت في المحتوى الأيوني للكالس خارج الجسم الحي لاصل الحمضيات تروير سترانج وأن هناك تبايناً في تراكم الأيونات المختلفة باختلاف تركيز الملح في الوسط . بزيادة ملوحة الوسط قل تركيز ايونات النتروجين و الفسفور والبوتاسيوم والكالسيوم والمغنيسيوم في حين ازداد تركيز الصوديوم اعلى التأثيرات في المحتوى الايوني . NaCl والكلوريد في الكالس . وقد اظهر التركيز 150 ملي مول

- كلمات مفتاحية :- كالس – تروير سترانج – اصول الحمضيات – اجهاد ملحي – خارج الجسم الحي

Ionic contents of troyer citrange callus grown under salt stress.

Shymaa Selman Neamah

**Department of Horticulture And Landscape Design - Faculty
of Agriculture - - University of Kufa-Iraq**

Abstract

This experiment was carried to evaluate the effect of NaCl levels on mineral uptake of callus citrus rootstock (troyer citrange) cultured *in vitro* conditions. The calli were cultured on MS culture media supplemented with NaCl (0, 50, 100 or 150 mM) for four weeks. NaCl concentrations in the medium showed significant effect on nutrients levels of callus tissues of troyer citrange. As salinity level in the medium increased, the N, P, K, Ca, and Mg concentrations in plant tissue decreased significantly in callus while Na and Cl concentrations in callus tissue were significantly increased. The 150 mM NaCl gave the highest effect on nutrients accumulation in callus compared to the other concentrations.

Keywords : Citrus root stock ,Callus ,Troyer citrange ,invitro salt stress .

المقدمة

تواجه زراعة الحمضيات في العراق العديد من المشاكل و لاسيما في مناطق زراعتها في المنطقتين الوسطى والجنوبية من العراق ومنها إرتفاع ملوحة التربة ومياه الري . إذ تصنف الحمضيات على أنها Salt sensitive نباتات حساسة للملوحة ، وتتباين درجة التأثير وفقا للأصول المطعم عليها الانواع المختلفة من الحمضيات، اذ تتفاوت انواعها في مدى قابلية انسجتها على تحمل السمية الناتجة عن تراكم ايونات الكلوريد أو الصوديوم أو كلاهما (6). ونظرا لانتشار الاصناف التجارية للانواع على الاصول Citrus التابعة لجنس الحمضيات المناسبة لذا فان اختيار الاصل المناسب والاكثر تحملا للملوحة لتطعيم الأصناف الملائمة من الحمضيات للزراعة في هذه المناطق بات من الأهمية نظرا للتزايد المستمر للملوحة سنويا ، والتي تعمل على خفض نمو وانتاج النباتات نتيجة التأثير الاوزموزي أو الأخلال بالتوازن الغذائي والهرموني والانزيمي أو التأثير السمي للايونات (11) .

اجريت العديد من الدراسات في اختبار تحمل الحمضيات للملوحة تحت الظروف الحقلية (5) التي اشارت الى تاثر المحتوى المعدني للحمضيات عند ريها بمياه مالحة. وفي السنوات السابقة استعملت تقنيات الزراعة خارج الجسم الحي (زراعة الأجنة وزراعة الكالس وزراعة البراعم والأفرع المتضاعفة) في دراسة ميكانيكية وفسلجة تحمل الملوحة في المحاصيل الزراعية المختلفة ومنها الحمضيات فضلا عن انتخاب السلالات الخلوية المتحملة لها لما تتميز به هذه التقنيات من إمكانية أكثر النباتات خارج الجسم الحي بمساحة صغيرة وبوقت قليل نسبيا وبأعداد كبيرة ، فضلاً عن غرلة اعداد كبيرة من النباتات او باستعمال

اجزاء منها في مساحة صغيرة وسرعة إعطاء النتائج نسبياً والسيطرة الكاملة على الظروف البيئية التي قد تتداخل تأثيراتها مع نتائج اختبارات الملوحة في الحقل (18) . وقد استعملت في العراق تقنيات زراعة الأنسجة النباتية خارج الجسم الحي في دراسة تأثير الملوحة في نمو الكالس ومحتواه من بعض العناصر الغذائية المنمى في اوساط حاوية على ملح كلوريد الصوديوم للزروعات النسيجية لاشجار الفاكهة مثل التفاح (3) والبرتقال المحلي(2).

Troyer يعد اصل تروير سترانج (Citrange (*C. sinensis* X *Poncirus trifoliata* الهجين الناتج عن تضريب البرتقال *Citrus sinensis* L.(Osbeck) مع البرتقال *Poncirus trifoliata* L. الثلاثي الاوراق من الاصول المستعملة في تطعيم الحمضيات لما يتميز به من ميزات منها مقاومته للتصمغ بدرجة كبيرة ومقاوم لمرض التدهور السريع. ووفقا لما (فان مواصفات هذا الاصل 23 (Sauls ذكره من حيث قوة النمو و حجم الثمرة و الحاصل و التكيف لظروف التربة غير الجيدة تكون بين اصلي النارج و سونكل ستروميلو، لكن يعاب عليه ولنيماتودا exocortis حساسيته للمرض الفايروسي الحمضيات . ومن خلال مراجعة الدراسات المحلية السابقة تبين ان هذا الاصل لم يحظ بالاهتمام المناسب من حيث دراسة تحمله للملوحة التي تعد مشكلة مهمة في مناطق زراعة الحمضيات في العراق لذا اجري البحث لدراسة تأثير ملح كلوريد الصوديوم في محتوى كالس الاصل تروير سترانج المنمى في وسط غذائي مزود بتراكيز مختلفة منه خارج الجسم الحي من العناصر الغذائية ، لما له اهمية في مجال انتخاب السلالات الخلوية المتحملة

للملوحة فضلا عن استخدامها في برامج التربية والتحسين .

المواد وطرائق العمل

نفذت الدراسة في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق – كلية الزراعة- جامعة الكوفة من نيسان 2013م الى تشرين الثاني 2013 م .

مصدر الحصول على الكالس

كالس اصل الحمضيات تروير سترانج أستعمل الذي تم الحصول عليه من المختبر المذكور والمشتق اصلا من زراعة الفلق المستاصلة من (MS Murashig) بذوره على الوسط الغذائي (2, 4-D) المزود ب 1 ملغم / لتر (Skoog, 1962, و 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (D) وفقا لما (BA) +benzyl adenine 0.75 ملغم واخرون (24) Singh.) جاء به

أخذ وزن ثابت من الكالس (50 ملغم)

الجاهز (مجهز MS وزرع على الوسط الغذائي (مع إضافة مستويات HIMEDIA من شركة (0 ، 25 ، 50 ، 75 ملي NaCl مختلفة من ملح (مول) . اذ زرعت كل قطعة كالس في انبوبة ويواقع JMS زجاجية تحتوي 10 مل من وسط عشرون تكرارا لكل تركيز بحيث تمثل كل قطعة تكرار. حفظت العينات المزروعة على هذه الاوساط لمدة 4 اسابيع في ظروف غرفة الزرع م وشدة اضاءة 1000 لوكس $\pm 2^\circ$ بدرجة حرارة 25 وبتعاقب 16 ساعة ضوء/ 8 ساعة ظلام.

نفذت التجربة باستعمال التصميم

العشوائي الكامل

(Completely Randomized Design)

وقورنت المتوسطات حسب اختبار دانكن (CRD)

(Duncan test) عند مستوى احتمال 0.05.

أخذت نماذج الكالس بعد انتهاء فترة التحضين وأجريت لها عمليات الغسل والتجفيف الهوائي والطحن ثم عملية الهضم باستعمال حامض الكبريتيك المركز والبيروكلوريك وفق الطريقة (8) Parsons و Gresser المقترحة من قبل وبعد تجهيز المستخلصات للنماذج النباتية تم تقدير ما يأتي:-

1- النتروجين الكلي (%) بطريقة كدال (7).

2- تقدير الفسفور (%) باستعمال موليبيدات الامونيوم والقياس بالمطياف الضوئي Spectrophotometer (20).

3- تم تقدير تركيز أيوني الصوديوم واليوتاسيوم إستناداً الى الطريقة التي وصفها Croughan وآخرون (9) باستعمال جهاز Flame photometer .

4- قياس الكالسيوم والمغنسيوم (%) تم قياسها بجهاز الأمتصاص الذري Atomic Absorption Spectrophotometer.

5- الكلوريد (%) وذلك بواسطة بالتسحيح مع نترات الفضة بطريقة Chapman و Pratt (7)

النتائج والمناقشة

يلاحظ من الجدول (1) أن تركيز النتروجين أنخفض بصورة معنوية في الكالس مع زيادة مستويات ملح كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي ، إذ سببت التراكيز العالية للملح (100 و150 ملي مول) انخفاضا معنويا في نسبة النتروجين في الكالس و بلغت اقل نسبة له في 1.12 الوسط الغذائي المزود في 150 ملي مول (%) في 1.74% , في حين سجلت أعلى نسبة

الى تأثير الملوحة السلبية على إمتصاص النتروجين على NO_3^- والـ Cl^- ، من خلال المنافسة بين أماكن نقل الأيونات في الخلية وازاحة إمتصاص النترات أو بشكل غير مباشر من خلال تغيير خواص النفاذية للأغشية البلازمية بواسطة التأثير على بروتينات الأغشية (16).

الوسط الغذائي المزود ب 0 ملي مول والتي تفوقت معنويًا عن باقي المعاملات باستثناء التركيز 50 مليمول.

ان هذا الانخفاض في محتوى الكالس من النتروجين النامية تحت المستويات العالية من ملح كلوريد الصوديوم (100 و 150 مليمول) قد يعود

جدول (1) المحتوى الايوني من النتروجين والفسفور والبوتاسيوم لكالس اصل الحمضيات تروير سترانج بعد 4 اسابيع من زراعته على الوسط الغذائي المزود بتراكيز مختلفة من ملح

NaCl

البوتاسيوم(%)	الفسفور(%)	النتروجين (%)	تركيز ملح كلوريد الصوديوم
0.914 a	0.171 a	1.74 a	0
0.731 ab	0.153 b	1.61 a	50
0.510 bc	0.143 bc	1.24 b	100
0.320 c	0.140 c	1.12 b	150

الماء والايونات او ربما يعود الى التأثير التنافسي إذ يعمل الكلوريد على تقليل $H_2PO_4^-$ و Cl^- بين الى الخلايا (22) . $H_2PO_4^-$ دخول

ويتضح أن زيادة مستويات كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي أدت الى انخفاض معنوي للبوتاسيوم في الكالس فقد بلغت أقل نسبة له عند أعلى مستوى لكلوريد الصوديوم في الوسط (0.914 %) مقارنةً ب(0.320)الغذائي فسجل (NaCl.%) لمعاملة المقارنة (0 مليمول

(وجود تأثير 1 تبين النتائج الواردة في الجدول) من معنوي للتركيز الملحية في محتوى الكالس الفسفور اذ وجد أن محتوى الكالس من الفسفور قد في الوسط NaCl قل معنويًا مع زيادة نسبة ملح الغذائي حيث اختلفت التراكيز فيما بينها معنويًا ملي مول الذين لم 150 و 100 بأستثناء التركيزين يختلفا فيما بينهما معنويًا . وقد يرجع تأثير ملوحة الوسط في خفض نسبة الفسفور في الكالس الى رفع الجهد الازموزي لوسط النمو ومن ثم يصعب دخول

إنَّ سبب إنخفاض أيونات البوتاسيوم في الكالس المعرض للإجهاد الملحي مع زيادة تراكيز في الوسط الغذائي قد يعزى إلى أنَّ NaCl ملح إلى الوسط الغذائي سوف يعمل NaCl إضافة ملح على زيادة سالبية الجهد المائي للوسط الغذائي لذلك تعمل الخلية على زيادة ضغطها الأزموزي عن طريق دخول الأيونات إلى داخل الخلايا من الوسط الغذائي ولكون تركيز أيونات الصوديوم هي السائدة في الوسط الغذائي مما يؤثر سلباً في عملية دخول أيونات البوتاسيوم إلى داخل الخلايا المعرضة للإجهاد الملحي نتيجة التنافس بين هذين الأيونين (18) antagonism بعملية التضاد .

الصوديوم والكلوريد والكالسيوم والمغنيسيوم
تأثر تركيز الصوديوم معنوياً بأزدياد مستويات كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي حيث أزداد بأعلى كمية عند مستوى 150 ملي مول (%) مقارنة 0.143 كلوريد الصوديوم فسجل (%) . وتتفق هذه النتائج 0.008 بمعاملة المقارنة) وآخرون (21) و Pérez-Tornero مع ما وجده وآخرون (12) في أصول الحمضيات من [Ghaleb](#) حيث زيادة تجمع الصوديوم في الأنسجة المعرضة بزيادة التركيز المستعمل NaCl لملح وقد يعود سبب إرتفاع كمية الصوديوم في الكالس إلى زيادة تركيز أيونات الصوديوم على حساب بقية الأيونات في الوسط الغذائي المستخدم نتيجة لإضافة ، إذ تقوم الخلايا NaCl تراكيز مختلفة من ملح الموجودة في الكالس المزروع بالسماح لهذه الأيونات بالدخول إليها لزيادة جهدها الأزموزي نتيجة الإجهاد الملحي مما يؤدي إلى تراكم هذه الأيونات في سايتوبلازم وفجوات الخلايا المعرضة للإجهاد الملحي وذلك لتعطيل ميكانيكية الاختيارية النفاذية للغشاء البلازمي وبما إن إمتصاص

الصوديوم يتم بصورة حرة دون بذل طاقة فيزداد (أو إنَّ زيادة 18 تراكم الصوديوم في الخلايا .) تركيز الملح في وسط النمو أدى الى حالة عدم التوازن في المواد الغذائية وبالتالي حدوث حالة المنافسة بين الأيونات وحيث أنَّ أيون الصوديوم كان الأقوى في المنافسة بين الأيونات وخاصة لأيون البوتاسيوم في النظام الغشائي وهذا يؤدي الى زيادة تراكم الصوديوم.

كما يلاحظ من الجدول نفسه أن نسبة ايونات الكلوريد في الكالس أزدادت معنوياً بأزدياد مستويات كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي، إذ سبب أعلى تركيز NaCl ملي مول ملح 150 التركيز مقارنة بالتراكيز الأخرى ، إذ بلغت نسبة الكلوريد % واختلفت بقية التراكيز 0.274 المتجمعة فيه معنوياً عن بعضها البعض الأخر، في حين اعطى % . 0.067 التركيز 0 ملي مول اقل نسبة بلغت وتتفق هذه النتائج مع ما وجده عبدالحسين (4) و Pérez- (25) في التفاح و Sotiropoulos وآخرون Montoliu وآخرون (21) و Ghaleb (20) وآخرون (12) في أصول الحمضيات من حيث زيادة تجمع الكلوريد في بزيادة التركيز NaCl الأنسجة المعرضة لملح المستعمل .

إن تراكم الكلوريد في الكالس نتيجة لزيادة الملوحة في الوسط الغذائي قد يعود لوجوده بكميات كبيرة فيه ، إن التراكيز الملحية العالية تؤثر على نفاذية الأغشية البلازمية مسببه تعطيل دورها الإختياري لنفاذية العناصر الغذائية وهذا ينعكس ايجاباً في إمتصاص وتراكم كميات عالية من ايونات Cl.(15)

جدول (2) المحتوى الأيوني من الصوديوم والكلوريد والكالسيوم والمغنيسيوم لكالس اصل الحمضيات تروير سترانج بعد 4 اسابيع من زراعته على الوسط الغذائي المزود بتراكيز مختلفة NaCl من ملح

المغنيسيوم %	الكالسيوم %	الكلوريد %	الصوديوم %	تركيز ملح كلوريد الصوديوم
0.027 a	0.146 a	0.067 d	0.008 d	0
0.024 b	0.131 b	0.165 c	0.093 c	50
0.023 bc	0.123 bc	0.221 b	0.127 b	100
0.021 c	0.116 c	0.274 a	0.143 a	150

ملي مول الذي لم يختلف عن التركيز 100 ملي مول

اقل تركيز للمغنيسيوم في نسيج الكالس.

وقد يعود سبب الإنخفاض المعنوي للكالسيوم والمغنيسيوم في الكالس الى التنافس بين الأيونات لوجود تراكيز عالية من الصوديوم في الوسط الغذائي . تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه كل Habibi (10) و Antonii و Dionisio من (14) في اصول الحمضيات . Amiri و

المصادر

- 1- الراوي ، خاشع محمود و خلف الله ، عبدالعزيز 1980. تصميم وتحليل التجارب الزراعية . جامعة الموصل. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق.
- 2- الطه ، هدى عبد الكريم عبد الودود 2008. إستعمال تقنية زراعة الأنسجة

وتشير نتائج الجدول (2) إلى التأثير المعنوي

لاختلاف مستويات ملحوة الوسط الغذائي في صفة المحتوى الأيوني للكالس من الكالسيوم التي انخفضت بزيادة مستوى ملح كلوريد الصوديوم في الوسط ، إذ سجل اقل معدل عند التركيز (150 ملي مول) الذي اختلف عن باقي التراكيز باستثناء التركيز 100 ملي مول، بينما كان تركيز الكالسيوم الأعلى عند التركيز 0 ملي مول .

من نتائج الجدول نفسه يلاحظ حصول إنخفاض في معدل نسبة المغنيسيوم في الكالس بزيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي ، إذ كان أعلى تركيز في معاملة المقارنة التي اختلفت عن جميع التراكيز الاخرى ، في حين اعطى التركيز 150

- Tolerant Crops,pp: 627-642.Newyork,USA.
- 7- Chapman, H.D. and Pratt, P.F. 1961. Methods of Analysis for Soil, Plants and Water. Division of Agricultural Science, University of California .USA.
- 8- Cresser , M. S. and Parsons, J. W. 1979 . Sulphuric-perchloric acid of digestion of plant material for determination of nitrogen , phosphorus , potassium , calcium and magnesium . Analytical Chimica Acta.,109: 431-436 .
- 9- Croughan, T.P. ; Stavarek, S.J. and Rains, D.W. 1978. *In vitro* development of salt resistant plants. Environmental and Experimental Botany, 21 (3/4) : 317- 324.
- 10- Dionisio, RM,and Antonii C. 1997. Citrus response to salinity: Growth and nutrient uptake. Tree Physiol. 17: 141- 150.
- 11- Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany, 55(396) : 307-319.
- 12- Ghaleb, W.Sh. ; Sawwan,J.S. ; Akash M.W. and Al-نباتية في إكثار نباتات مقاومه للملوحة من أشجار البرتقال المحلي *Citrus sinensis* (L.) Osbeck .cv. Local orange اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة البصرة . جمهورية العراق.
- 3- شلش، جمعه سند 1999 . قابلية أصول التفاح المكثرة خارج الجسم الحي على تحمل الملوحة (NaCl) . اطروحة دكتوراه - كلية الزراعة - جامعة بغداد -العراق .
- 4- عبد الحسين ، مسلم عبد علي (2005) .(توظيف تقنية التطهير خارج الجسم الحي في تحسين تحمل أصلي التفاح MM 106 وعمارة Omara لملح كلوريد الصوديوم . أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة . جامعة بغداد . العراق.
- 5- Al-Yassin, A.2004. Influence of salinity on citrus: A review paper. Journal of Central European Agriculture, 5(4):263-271.
- 6- Ben Hayyim, G. and Moore, G.A.2007. Recent advances in breeding *Citrus* for drought and saline stress tolerance. *In*: Jenks, M.A., P.M. Hasegawa and S.M. Jain (eds.), Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops, pp: 627–642. Advance in Molecular Breeding Toward Drought and Salt

- 17- Montoliu, A.; Lopez-Climen, M.F; Arbona, V; Perez-Clemente, R.M, and Gomez-Cadenas, A. 2009. A novel *in vitro* tissue culture approach to study salt stress responses in citrus. *Plant Growth Regul.* 59: 179-187.
- 18- Munns, R. and Tester, R. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59 : 651–681.
- 19- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- 20- Page, A.L. , R.H. Miller and D.R. Keeney. 1982. Method of Soil analysis. Part 2, 2nd ed. Agron. 9. Publisher, Madison, Wisconsin , USA
- 21- Pérez-Tornero, O. ; Tallón, C. I. ; Porras, I. and Navarro, J. M. 2009. Physiological and growth changes in micropropagated *Citrus macrophylla* explants due to salinity. [Journal of Plant Physiology](#), [166 \(17\)](#) : 1923–1933.
- Abdallat, A.M.. 2010 . *In vitro* response of two *Citrus* rootstocks to salt stress. *International Journal of Fruit Science* ,[10\(1\)](#):40-53.
- 13- Greenway, H. and R. Munns. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31: 149-190.
- 14- Habibi, F. and Amiri ,M.E. 2013. Influence of *in vitro* salinity on growth, mineral uptake and physiological responses of two citrus rootstocks. *International journal of Agronomy and Plant Production*, 4 (6);1320-1326,
- 15- Javid, M. G. ; Sorooshzadeh, A. ; Moradi, F. ; Sanavy, S. A. M. M. and Allahdadi, I. 2011. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6):726-734.
- 16- Meloni, D.A., Gulotta, M.R., Martinez, C.A and Oliva M.A. 2004 . The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*. *Braz. J. Plant Physiol.*, 16(1):39-46.

- 22- Pessarakli, M. 1999. Hand Book of Plant of Crop Stress. Second Edition, University of Arizona.U.S.A.
- 23-Sauls, J.W. (2008). Rootstock and Scion Varieties. Texas citrus and sub-tropical fruits. <http://aggie-horticulture.tamu.edu/citrus/>
- 24-Singh, S. B. ; G. S. Virk, and Nagpal A.K. 2011. An efficient plant regeneration protocol from callus cultures of *Citrus jambhiri* Lush. *Physiol Mol Biol Plants* , 17(2):161–169.
- 25- Sotiropoulos TE. 2007. Effect of NaCl and CaCl₂ on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M4 cultured *in vitro*. *Biol Plant*, 51(1): 177-180.