مجلة جامعة الملك سعود، م ٢٥، العلوم الزراعية (١)، ص ص ٥٣-٦٥، الرياض (٢٠١٣م/ ١٤٣٤هـ)

تأثير هرمون حمض السلسليك على زيادة مقاومة كالوس نبات الرقي *Citrullus lanatus* L. للفطر *Macrophomina phaseolina*

نديم أحمد رمضان[١] ، عدنان محمود عبدالله [٢]، بادية عبدالرزاق ملاعبيدة [١]

(١) *قسم علوم الحياة- كلية العلوم - جامعة الموصل - الموصل العراق*

(٢) *قسم علوم الحياة - كلية التربية - جامعة الموصل - العراق*

(قدم للنشر في ١٥/ ١/ ١٤٣٢هـ ؛ قبل للنشر في ١٦/ ١/ ١٤٣٣هـ)

الكلمات المفتاحية . مقاومة *Citrullus lanatus* L. ، حمض السلسليك ، الفينايل الألنين آمونيا لاييز، الكتاليز ، الحامض الأميني البرولين

ملخص البحث . استحدث الكالس من أجزاء الفلق لنبات الرقي *Citrullus lanatus L* في أوساط MS الحاوية على تراكيز متباينة من منظمات النمو. وكان الوسط MS المحتوي على ١,٠ ملغم / لترBA و ٠,٥ ملغم / لتر NAA الأفضل. أمكن انتخاب قطع كالس متحملة لرواشح الفطر *Macrophomina phaseolina* عند التركيز ١٥٪ من مزارع الكالس المضاف اليها رواشح الفطر بتراكيز ٠,٠، ٠,٥، ١٠,٠، ١٥,٠ و ٢٠,٠ ٪ راشحا فطريا على الرغم من سمية الراشح المتمثلة باكتساب الكالس اللون البني وانخفاض حيويته ووزنه الطري. أظهر الكالس المنتخب زيادة في فاعلية إنزيمات الفينايل الألنين أمونيا لاييز Phenylalanine Ammonia –Lyase (PAL) والكتاليز Catalase وتركيزالحامض الأميني البرولين في مستخلصها الخلوي. أدت إضافة تراكيز ١٠ ، $١٠^{٢}$ ، $١٠^{٣}$ و $١٠^{٤}$ مايكرومول من حامض السلسليك إلى وسط نمو الكالس ولفترات زمنية ٨، ١٦، ٢٤ و ٤٨ ساعة أعقبها تنمية الكالس بوسط يحوي ١٥٪ راشح فطري إلى زيادة متدرجة في حيوية ووزن الكالس الطري وانخفاض في درجة تلون الكالس. وتميزت التراكيز $١٠^{٣}$ و $١٠^{٤}$ مايكرومول من حامض السلسليك وفترة المعاملة ٢٤ ساعة، كما ازداد نشاط إنزيم PAL وانخفض نشاط إنزيم الكتاليز بشكل متناسب مع تراكيز حامض السلسليك في الوسط الغذائي. من النتيجة يستنتج أن حامض السلسليك يرفع مقاومة كالس الرقي لتحمل تأثير رواشح الفطر *M. phaseolina* السامة من خلال حث الكالس على إنتاج إنزيم PAL والحامض الأميني البرولين.

المقدمة

نبات الرقي *Citrullus lanatus* L. من العائلة القرعية Cucurbitaceae ويعد من محاصيل الخضر المهمة كونه مصدرا غنيا بالعديد من العناصر المعدنية والفيتامينات فضلا عن احتوائه على العديد من المركبات الكيميائية ذات التأثير العلاجي مثل Beta- carotein و Lycopene (Edwards *et al.* , 2003). يصاب النبات بالعديد من الأمراض المتسببة عن الفطريات والبكتريا ويعد الفطر *Macrophomina phaseolina* من اهم الفطريات الممرضة المستوطنة بالتربة، وتسبب مرض التعفن الفحمي لأكثر من ٥٠٠ عائل نباتي ومعظمها نباتات اقتصادية(Su وآخرون، ٢٠٠١). ينتج هذا الفطر العديد من السموم داخل وخارج الخلايا أهمها Phaseolinone الذي يحدث أعراض مرضية عند معاملة النبات به مشابهة للأعراض التي يحدثها الفطر ذاته (Suchandra *et al.*, 2000) فضلا عن سموم asperlin، isoasperlin، phomenon، phaseolacton، phaseolinic acid. وان كفاءة الفطر على أحداث المرض يعتمد على قابليته على انتاج هذه السموم (Mahato *et al.*, 1987 ; Dhar *et al.*, 1982). يعد استخدام المبيدات الفطرية الكيميائية غير فعال في القضاء نهائيا على هذه الفطريات فضلا على ما تسببه من أضرار للأحياء غير المستهدفة ممايؤدي إلى الإخلال في التوازن الإحيائي في بيئة التربة، وظهور سلالات مقاومة لهذه المواد فضلا عن اضرارها على البيئة وصحة الإنسان والحيوان (Bharath *et al.*, 2005). تعد تعزيز وإستحثاث المقاومة الذاتية في النبات من أفضل الوسائل البديلة للمكافحة الكيميائية. وتستحث المقاومة في النبات باستخدام المثيرات elicitors الخارجية، ومنها حامض السلسليك Salicylic Acid (SA)وقد أشير إليه بالعديد من الأمراض التي تسببها الفيروسات (Enyedi *et al.*, 1992) والبكتريا (Palva *et al.*, 1994) والفطريات (Cai *et al.*, 1996). أن استحثاث المقاومة في النبات باستخدام SA يرتبط بتكوين العديد من بروتينات الحماية Pathogenesis Related Protein (PRP)) والتي أشير إليها لأول مرة من قبل Vanloon و Kammen (١٩٧٠) عندما لاحظوا توقف انتشار فيروس موزائيك التبغ TMV على أوراق نبات التبغ وعزا ذلك إلى إنتاج أوراق النبات العديد من المركبات الكيميائية استجابة للحساسية المفرطة Hypersensitive response. حاليا PR-Proteins تشمل جميع البروتينات التي يستحث النبات على تكوينها عند تعرضه إلى تأثير المسببات المرضية (Vanloon *et al.*, 1994)،والتي تكسب النبات مقاومة ذاتية تدعى بالمقاومةالتركيبيةالمستحثة (Structural Acquired Resistance (SAR ،وتكون إما بروتينات تركيبية وإما انزيمات كانزيمات الفينايل الألنين أمونيا لايز (PAL)– Phenylalanine Ammonia Lyase ، الكتاليز Catalase،البيروكسيديز Peroxidase والحامض الأميني البرولين (Lubova ; 2000،Vanloon *et al.*, 1999) ومركبات Phytoalexins وبروتينات الحساسية المفرطة (Enyedi *et al.*, 1992). يعد إنزيم PAL مهما في سلسلة بناء الفينولات من مادة الأساس الحامض الاميني Phenylalanine والتي تعتبر من المكونات الأساسية في مقاومة النبات للمسببات المرضية (Lu *et al.*, 2006). إنزيم الكتاليز من إنزيمات الأكسدة والاختزال، ويكمن عمله في تقليل تراكيز مادة H_2O_2 السامة عند تراكمها في الخلايا النباتية عند

تعرضها للمسببات المرضية (Byun و Choi *et al.* 2003) شارت الدراسات إلى أن إمكانية اعتماد هذه الإنزيمات مؤشرا لمقاومة النبات عندما لاحظوا ارتفاع تراكيزها في خلايا النبات المقاوم لمسببات الأمراض. (Lubova *et al.*, 1999 ; Lu *et al.*, 1999 ، Byun *et al.*, 2006 و Choi *et al.*, 1999 ،) تبين من المصادر عدم وجود أي اعمال تشير إلى استخدام SA لاستحثاث المقاومة في كالس أو نبات الرقي للفطر *M. phaseolina* أو رواشحه السامة، وعليه اقترحت هذه الدراسة لتحديد تأثير SA في استحثاث المقاومة الذاتية في كالس نبات الرقي لرواشح الفطر *M. phaseolina* السامة.

مواد وطرائق العمل

مصدر الفطر واختبار قدرته الإمراضية وتجهيز رواشحه السامة الخام

عزل الفطر *M. phaseolina* من نباتات رقي مصابة بمرض التعفن الفحمي من قضاء الحمدانية / محافظة نينوى.تم تنقية الفطر بأتباع تقانة الجرثومة المنفردة Single spore technique (Nelson *et al.*, 1994). شخص الفطر بحسب (Thirumalachar *et al.*, 1953). تم إكثار وحفظ العزلة النقية للفطر على وسط Potato – Sucrose – Agar (PSA) الصلب.

اختبرت كفاءة عزلة الفطر النقية على إحداث التعفن للبذور وموت بادرات الرقي، وذلك بإزالة الشوائب من التربة المزيجية المستخدمة، عقمت التربة بالمؤصدة ووضعت في أصص بلاستيكية قطر الواحدة منها ١٥ سم وسعة ٢,٠ كغم معقمة مسبقا بغمرها بمحلول ٣٪ هايبوكلورات الصوديوم، مزجت تربة الطبقة السطحية لكل أصيص بمحتويات طبق زجاجي قطر ٩ سم يحوي مزرعة نقية للفطر نامي في وسط PSA الصلب بعمر ١٠ أيام، مع استمرار السقي وحسب الحاجة لتأقلم الفطر وانتشاره بشكل جيد (Saydam *et al.*, 1973) بعدها زرعت ٥٠ بذرة وبواقع ٥ بذور/ أصيص مع وجود ٥ أصيص غير ملقحة للمقارنة، استمرت عملية السقي ومتابعة العينات لمدة ٣٠ يوما.

جهز الراشح الفطري بحسب Sutherland و Pegg (١٩٩٥). نمى الفطر على الوسط الغذائي السائل الملائم لإنتاج السموم الفطرية (Paker *et al.*, 1981). وزع ٥٠ مل من الوسط في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ مل، ولقح محتوى كل دورق بقرصين قطر٠,٥ سم أخذت من المزرعة الفطرية النامية على وسط PSA الصلب بعمر ١٠ أيام. حضنت الدوارق عند درجة حرارة ٢٥±٢ °م وبوضع ثابت ولمدة ٢٠ يوما، رشحت محتويات الدوارق من خلال الشاش ثم أجري الطرد المركزي للراشح عند ٤ °م وبسرعة ١٢٠٠٠ دورة/ دقيقة ولمدة ٢٠ دقيقة للتخلص من بقايا الأبواغ والغزل الفطري، ورشحت المفرزات مرة أخرى باستخدام Millipore filter (0.22 µm)، احتفظ بالراشح في قناني زجاجية عند -١٠ °م لحين الاستخدام.

تجهيز بادرات الرقي المعقمة واستحداث وحفظ الكالس

عقمت بذور الرقي صنف Niagara التي تم الحصول عليها من السوق المحلي بغمرها في الكحول الاثيلي ٧٠ ٪ لمدة دقيقتين، بعدها إزيلت الأغلفة الخارجية الصلبة للبذور المقشرة، وعقمت بغمرها بمحلول هايبوكلوريت الصوديوم ٣٪ لمدة ١٥ دقيقة. غسلت البذور بالماء المعقم ثلاث مرات(٣ دقائق/ مرة)

وزرعت في دوارق زجاجية سعة ١٠٠ مل احتوت ٢٠ مل من الوسط الغذائي MS (Murashige, 1962 و Skoog) الصلب الخالي من منظمات النمو. حضنت العينات في غرفة النمو عند درجة حرارة ٢٥ ± ٢ °م لمدة أربعة أيام في ظروف الظلام أعقبتها ظروف الإضاءة (١٦ ساعة ضوء / ٨ ساعات ظلام وشدة إضاءة ١٥٠٠ لوكس). أزيلت البادرات الجيدة بعمر ١٠ أيام وأخذت أجزاء الفلق بمساحة ٠,٥ سم^{٢} تقريبا.

زرعت قطع الفلق المأخوذة من البادرات المعقمة في دوارق زجاجية سعة ١٠٠ مل احتوت ٢٥ مل من وسط MS الصلب المدعم بتراكيز(٠,٠، ٠,١، ٠,٥، ١,٠) ملغم / لترمن NAA ومتداخلة مع BA تراكيز(٠,٠، ٠,٥، ١,٠، ٢,٠، ٣,٠، ٤,٠) ملغم / لتر. حضنت العينات في غرفة النمو عند ٢٥± ٢°م وظروف التعاقب الضوئي. تم إكثار الكالس وإدامته بإعادة زراعته على أفضل وسط للاستحداث (MS + ١,٠ ملغم / لتر BA + ٠,٥ ملغم / لتر NAA). قطع الكالس إلى أجزاء بوزن ١ غم تقريبا وزرعت في الوسط الجديد بواقع قطعة / دورق / ٢٥ مل من وسط غذائي، وأعيدت الزراعة كل ٣٠ يوما.

اختبار سمية رواشح الفطر في كالس الفلق

أضيفت الرواشح المائية للفطر *M. phaseolina* والمعقمة بالفرز الغشائي بتراكيز (٠,٠، ٠,٥، ١٠,٠، ١٥,٠ و ٢٠,٠ ٪) حجم: حجم وبظروف معقمة إلى وسط استحداث وإدامة الكالس (MS + ١,٠ ملغم / لتر BA + ٠,٥ ملغم / لتر NAA) بعد تعقيمه وتبريده إلى درجة مايقرب من ٥٠ °م مع تهيئة عينة قياس أضيف للوسط الماء المقطر بدلا من الراشح الفطري. وزع الوسط في أطباق بتري زجاجية قطر٩ سم بمعدل ٢٥ مل / طبق. وضعت على الوسط ١٠ قطع من الكالس بعمر ٣٠ يوما ووزن ١,٥ غم تقريبا / طبق وبثلاثة مكررات لكل معاملة، حضنت العينات في درجة حرارة ٢٥± ٢ °م وظروف الظلام ولمدة ٢٠ يوما. حددت درجة سمية الراشح في الكالس برمز + (كالس اكتسب اللون البني) و - (كالس لم يتلون). فضلا عن تأثير الراشح في درجة نمو ووزن الكالس. التجربة أعيدت مرتين (Thakur *et al.*, 2002).

معاملة كالس الفلق بحامض السلسليك ورواشح الفطر

أضيف حامض السلسليك الى وسط نمو وإدامة الكالس عند درجة حرارة ٥٠°م إلى أن وصل التركيز إلى (١٠، ١٠^{٢}، ١٠^{٣} و ١٠^{٤}) مايكرومول، ضبطت الأس الهيدروجيني للوسط إلى pH ٥,٨، عقم الوسط ووزع في أطباق بتري زجاجية قطر ٩ سم بمعدل ٢٥ مل / طبق. وضع في كل طبق ١٠ قطع من الكالس جيدة النمو بوزن ١,٥ غم تقريبا وبعمر ٣٠ يوما، وبثلاث مكررات لكل معاملة. حضنت العينات في غرفة النمو وظروف التعاقب الضوئي ذاتها ولمدة (٨، ١٦، ٢٤ و٢٨) ساعة. نقل الكالس المعامل بتراكيز من SA وفترات زمنية مختلفة إلى أطباق بتري جديدة تحوي وسط نمو وإدامة الكالس المضاف إليه تركيز ١٥ ٪ من رواشح الفطر المعقمة بالفرز الغشائي، وبعد ٢٠ يوما من التحضين احتسب أعداد قطع الكالس الحية / الميتة، والوزن الطري للكالس المعامل كما حددت درجة تلون الكالس باللون البني وحسب المستويات الخمسة المشار إليها في (Jin *et al.*, 1996).

تحديد فاعلية بعض الأنزيمات في الكالس المعامل بحامض السلسليك ورواشح الفطر

جهز المستخلص الخلوي الرائق لعينات الكالس المعامل بتراكيز من رواشح الفطر وحامض السلسليك بحسب طريقة (الصوفي، ٢٠٠٨). حددت فاعلية أنزيم (PAL) بدلالة قياس تركيز حامض السيناميك (Cinnamic acid) المتكون نتيجة تحليل الحامض الأميني فينايل الألنين Phenylalanine في مزيج التفاعل بفعل الإنزيم PAL بوساطة جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية وعند الطول الموجي ٢٩٠ نانوميتر(Beaudoin– Eagan و Thorpe،1985).

تم قياس فاعلية إنزيم الكتاليز Catalyase في المستخلص الخلوي بحسب طريقة Goth (1991). بدلالة قياس شدة الامتصاصية للضوء من قبل المعقد الأصفر المتكون نتيجة تفاعل مادة H_2O_2 مع مولبيدات الأمونيوم عند الطول الموجي ٤٥٠ نانوميتر باستخدام المطياف الضوئي.

اعتمدت طريقة Bates *et al.* (1993) في قياس تركيز الحامض الأميني البرولين في الكالس المعامل بالراشح الفطري وبـ SA. وذلك بمعاملة ٠,٥ غم من الكالس بـ ١٠ مل من محلول Sulfo Salicylic acid تركيز ٣٪ مع استخدام النهايدران Ninhydrin acid وحامض الخليك الجليدي Glacial acetic acid، تم تحديد شدة الامتصاصية للضوء للمركب ذات اللون الوردي عند الطول الموجي ٥٢٠ نانوميتر.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج زراعة أجزاء الفلق في أوساط الاستحداث أن لهذه الأجزاء قابلية لتكوين الكالس في معظم الأوساط الغذائية المستخدمة، وبلغت نسبة الاستحداث ١٠٠ ٪ في الوسط MS + ١,٠ ملغم / لتر NAA+ ٠,٥ ملغم / لتر BA.

سمية رواشح الفطر في نسيج الكالس

اختبر تأثير فعل رواشح الفطر و SA المضاف إلى وسط نمو وادامة الكالس (MS + ١,٠ ماغم / لتر BA + ٠,٥ ملغم / لتر NAA) في حيوية الكالس ووزنه الطري ودرجة اكتسابه اللون البني. إذ تبين نتائج الجدول رقم (١) الأثر السمي لرواشح الفطر في نسيج الكالس من خلال أنخفاض أعداد وأوزان قطع الكالس المزروعة، وكان الانخفاض متناسبا مع زيادة تراكيز الراشح الفطري في الوسط الغذائي، كان لتركيز الراشح ٥٪ تأثير محدود بدلالة تمكن نسبة كبيرة من قطع الكالس المعاملة بالراشح من البقاء حية والنمو، في حين ماتت جميع قطع الكالس عند التركيز ٢٠٪ راشح بدلالة توقفها عن النمو وانخفاض أوزانها وانكماش أحجامها.

يلاحظ كذلك فعل الرواشح السامة في شدة اكتساب الكالس اللون البني، إذ بدأ تلون الكالس بعد ٤–٨ أيام من المعاملة بالراشح، وأن معدل درجة تلون الكالس ازداد من ٠,١، ٠,٨، ٢,٢، ٣,٥، ٤,٥ والمتناسبة مع زيادة تراكيز رواشح الفطر من ٥، ١٠، ١٥، ٢٠ ٪ في الوسط. تبين من النتائج أن هناك علاقة إيجابية بين درجة اللون البني للكالس وتراكيز رواشح الفطر في الوسط الغذائي (الشكل رقم ١).

الجدول رقم (١). تأثير رواشح الفطر *M.phaseolina* في حيوية والوزن الطري ودرجة تلون كالس فلق الرقي *C. lanatus* بعد ٢٠ يوما من المعاملة

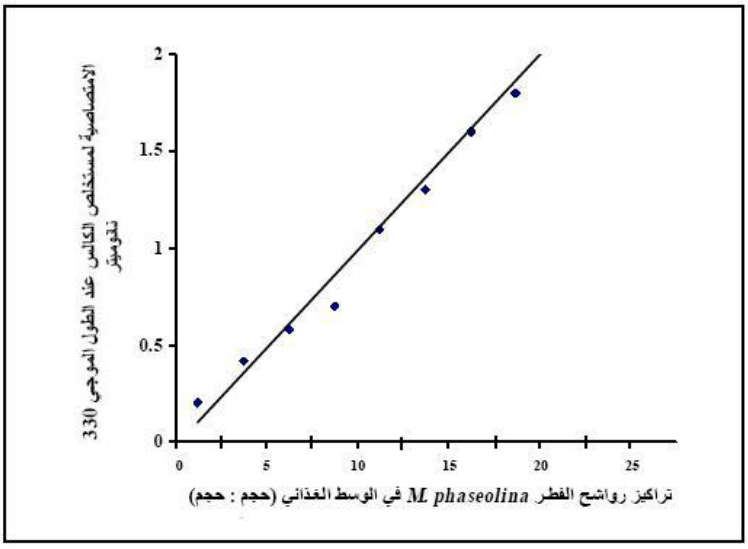
تركيز رواشح الفطر	عدد قطع الكالس الحية..٪	الوزن الطري للكالس (غم)	درجة اللون البني الممتص عند ٣٣٠ نانوميتر
0	96	2.317 (a)	1.0 (a)
5	83	1.881 (b)	1.9 (b)
10	36	1.642 (C)	2.7 (C)
15	6	1.591 (d)	3.2 (d)
20	0.0	1.451 (e)	4.5 (e)

*= عدد قطع الكالس الموزونة ١٠ لكل معاملة.

الأرقام المتبوعة بأحرف متشابهة (مشتركة) لا يوجد اختلاف بينها

درجة تلون الكالس = ١- كالس أبيض سليم، ٢-كالس سطحه الخارجي بني فاتح، .٣-الكالس بأكمله بني.

٤-كالس بني غامق مع نمو محدود، .٥- كالس بني غامق مسود وتوقف في النمو واختزال بالوزن والحجم.



الشكل رقم (١). العلاقة بين الامتصاصية عند الطول الموجي ٣٣٠ نانوميتر لمستخلص الكالس الاسيتوني (٨٠٪) وتراكيز رواشح الفطر *M. phaseolina* بعد ٢٠ يوما على وسط MS. كل قراءة معدل لـ ٣ مكررات.

اختبر تأثير السموم في إحداث الإصابة المرضية إما بإضافتها إلى النبات وإما بحقنها في النبات. في حين اعتمدت هذه الدراسة وأخرى مماثلة درجة حساسية كالس النبات لرواشح وسموم الفطر كمؤشر لفعل السموم في أحداث المرض. إذ اتسم الأثر السمي لرواشح الفطر *M. phaseolina* في نسيج الكالس بانخفاض أعداد قطع الكالس الحية وأوزانها والمتناسب مع زيادة تراكيز الراشح في الوسط، وقد

يعزى السبب إلى المكونات السامة المفرزة من قبل الفطر وتأثيرها المباشر في تثبيط فاعلية نفاذية الأغشية الخلوية والعمليات الأيضية المختلفة في الخلايا النباتية مؤدية إلى انخفاض كفاءة الخلايا على الانقسام والنمو أو موتها (Nemec1995). أشارت دراسات عديدة إلى التأثير السمي لرواشح الفطريات في كالس النباتات، فعلى سبيل المثال فاعلية رواشح الفطر *F. oxysporum* في كالس نبات الرقي والزنجبيل (الصوفي، ٢٠٠٨؛ Prachi *et al.*, 2002) وكالس فول الصويا المعامل برواشح الفطرF.solani (Jin *et al.*, 1996) وكالس الطماطم المعامل برواشح كل من الفطر *F. oxysporum* و*F.solan* (رمضان وآخرون ، ٢٠٠٢).

بينت نتائج الدراسة أن لتراكيز رواشح الفطر أثرا في درجة تلون الكالس باللون البني، بدلالة تحول قطع الكالس إلى البني الغامق عند التركيز ٢٠٪ وبدرجات أقل عند التراكيز الأخرى، فقد أشار كل من Jin *et al.* 1996 و Sutherland و Pegg(1995) عند اختبارهم سمية رواشح الفطر *F.solani* و *F.oxysporum* من كالس نبات فول الصويا والطماطم إلى إمكانية اعتماد درجة تلون الكالس باللون البني مؤشرا لحيوية الكالس كونها صفة ثابتة ولايمكن استرجاعها عند نمو الكالس في وسط خالٍ من الرواشح. وقد ذكرت أبحاث أخرى نتائج مقاربة مع كالس نباتات وفطريات مختلفة مثل كالس الزنجبيل والفاصوليا المعامل برواشح الفطر *F.oxysporum* (Prachi *et al.*, 2002 ؛ Svabova و Griga، 1997).

استحثاث المقاومة بـحامض السلسليك

توضح نتائج الجدول (٢) فعل تراكيز حامض السلسليك وفترة المعاملة في تعزيز مقاومة الكالس لرواشح الفطر. وجد أن لفترة المعاملة تأثيراً واضحاً في حيوية الكالس النامي في وسط يحوي رواشح الفطر بتركيز ١٥٪ فقط والخالي من SA، إذ انخفضت أعداد قطع الكالس وأوزانها الطرية بشكل متناسب مع طول فترة المعاملة. في حين لم تؤثر فترة المعاملة في درجة تلون الكالس، وبقيت وبمستويات عالية ولجميع فترات المعاملة. يلاحظ من النتائج كذلك أن وجود تراكيز SA أدى بشكل عام إلى زيادة في حيوية ونمو الكالس بدلالة زيادة أعداد قطع الكالس الحية وأوزانها الطرية والمتناسب مع زيادة تراكيز SA في الوسط. وكانت أفضل النتائج عند فترة المعاملة ٢٤ ساعة وتراكيز $١٠^{٣}$ و $١٠^{٤}$ مايكرومول إذ بلغت أعداد القطع ٧٣ و ٨٣ وأوزانها الطرية ٢,١١٨ و ٢,١١٣ وعلى التوالي ، وبدأ التأثير السلبي لفترة المعاملة ٤٨ ساعة ، إذ انخفضت أعداد قطع الكالس الحية، وتناسب الانخفاض مع أوزانها الطرية ولجميع تراكيز SA. أما درجة تلون الكالس فقد تبين أن لتراكيز SA وفترة المعاملة دوراً في درجة تلون الكالس، إذ انخفضت شدة تلون الكالس مع زيادة تراكيز SA وفترة المعاملة، وكان أقل شدة تلون عند المعاملة بتركيز ١٠ مايكرومول SA لمدة ٢٤ ساعة، وسجلت التراكيز $١٠^{٢}$ و $١٠^{٤}$ ميكرومول وفترة المعاملة ٤٨ ساعة، تأثيراً سميا بدلالة ارتفاع درجة تلون الكالس في هذه المعاملة.

أشارت الدراسات إلى صعوبة تحديد التركيز الأمثل بـ SA وفترة المعاملة التي تكسب الخلايا المقاومة ودون أن تسبب التسمم لها؛ وعليه فقد استخدمت هذه

الدراسة تراكيز من SA وفترات تعرض مختلفة لتحديد الأمثل منها. فقد بينت النتائج أن التراكيز ١٠^{٣} و ١٠^{٤} مايكرومول وفترة المعاملة ٢٤ ساعة كانت مناسبة بدلالة زيادة حيوية والوزن الطري فضلا عن انخفاض في درجة تلون الكالس. في حين سببت فترة المعاملة ٤٨ ساعة أعراضاً سمية متمثلة بزيادة درجة تلون الكالس باللون البني وانخفاض أوزانها. فقد أشار Prachi *et al.*, (1996) إلى نتائج مقاربة في كالس الزنجبيل المعامل بسموم الفطر *F.oxysporum*، وكالس نبات الرز المعامل برواشح الفطر Pyriculari grisea (Cai *et al.*, 1996).

الجدول رقم (٢). تأثير المعاملة المسبقة بتراكيز من SA ورواشح الفطر *M.phaseolina* تركيز ١٥٪ ولفترات زمنية مختلفة في الحيوية والوزن الطري (غم) ودرجة تلون كالس فلق نبات الرقي *C. lanatus* بعد ٢٠ يوما من المعاملة

معاملة SA (ساعة)	تراكيز SA (مايكرومول)														
	0 (0)			10 (1)			100 (2)			1000 (3)			10000 (4)		
	% C.S	F.W	C.B.R	% C.S	F.W	C.B.R	% C.S	F.W	C.B.R	% C.S	F.W	C.B.R	% C.S	F.W	C.B.R
0 V0	6	1.615(e)	4.3(a)	10	1.534(d)	4.5(a)	10	1.528(c)	4.5(a)	13	1.506(a)	4.4(a)	13	1.511(b)	4.5(a)
8 V8	6	1.643(a)	4.5(c)	13	1.792(e)	3.6(b)	23	1.675(c)	3.1(c)	26	1.714(d)	2.9(c)	33	1.663(b)	3.2(c)
16 V16	3	1.597(a)	4.5(b)	16	1.765(c)	2.2(a)	26	1.682(b)	2.3(a)	60	1.763(c)	2.1(a)	76	1.817(d)	1.9(a)
24 V24	0	1.518(a)	4.4(d)	20	1.784(b)	2.1(bc)	36	1.813(c)	1.6(ab)	73	2.118(e)	1.8(b)	83	2.113(d)	1.3(a)
48 V48	0	1.537(b)	4.5(b)	16	1.816(c)	1.8(a)	33	1.841(d)	1.9(a)	60	2.073(e)	2.3(a)	56	1.124(a)	2.0(a)

* كل قراءة معدل لثلاثة مكررات ولكل مكرر ١٠ قطع كالس.

إذا حملت الأرقام حروفاً متشابهة أفقياً لا يوجد اختلاف بينها (مقارنة بين ٠ ، ١٠ ، ١٠٠ ، ١٠٠٠ ، ١٠٠٠٠)

إذا حملت الأرقام حروفاً متشابهة عمودياً لايوجد اختلاف بينها (مقارنة بين ٠ ، ٨ ، ١٦ ، ٢٤، ٤٨)

C.S ٪ = النسبة المئوية لقطع الكالس الحية، F.W = الوزن الطري لـ ١٠ قطع كالس، C.B.R = درجة تلون الكالس: ١- كالس أبيض سليم، ٢- كالس سطحه الخارجي بني فاتح، ٣- نسيج الكالس بأكمله بني، ٤- كالس بني غامق مع نمو محدود، ٥- كالس بني غامق مسود وتوقف في النمو.

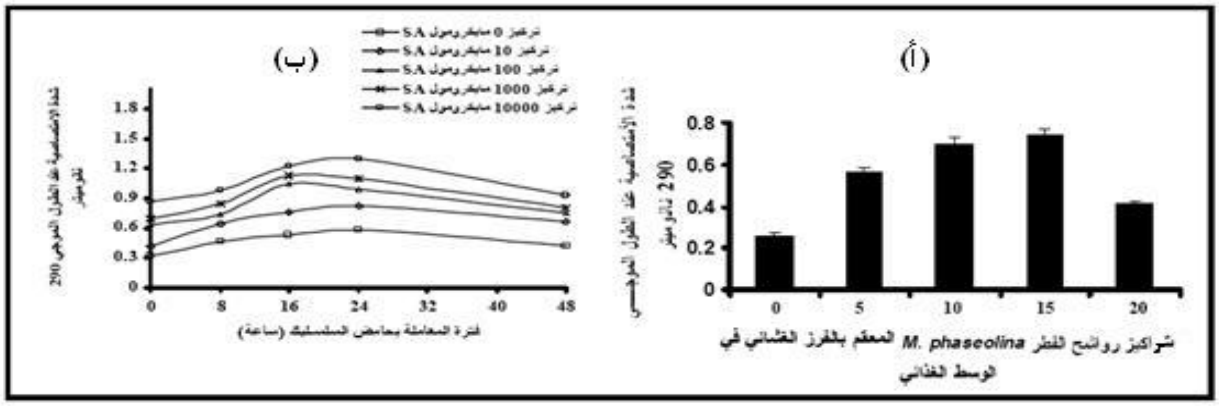
تحديد فاعلية بعض دلائل المقاومة المكتسبة في مستخلص الكالس المعامل برواشح الفطر *M. phaseolina* وحامض السلسليك

فاعلية إنزيم الفينايل الألنين أمونيالاييز (PAL)

أظهر الكالس المعامل بتراكيز مختلفة من رواشح الفطر فقط نشاطاً متباينا لإنزيم PAL. إذ يلاحظ من الشكل (٢أ) ان أفضل نشاط والمعبر عنه بشدة الامتصاصية عند الطول الموجي ٢٩٠ نانوميتر كان في مستخلص الكالس المعامل بتراكيز ١٠ و١٥ ٪ راشح فطري قياسا بعينة القياس النامية في وسط خالي من الرواشح وانخفضت فاعلية الأنزيم في الكالس المعامل بتركيز ٢٠٪ راشح فطري.

تبين من معاملة الكالس بتراكيز من حامض السلسليك وتركيز ١٥٪ راشح فطري ولفترات زمنية مختلفة أن لهذا الحامض دوراً في تحفيز خلايا الكالس على إنتاج إنزيم PA L، اذ أزداد نشاط الانزيم بشكل متناسب مع زيادة تراكيز SA في الوسط الغذائي (الشكل ٢ ب). في حين كان لزيادة فترة المعاملة بـ SA

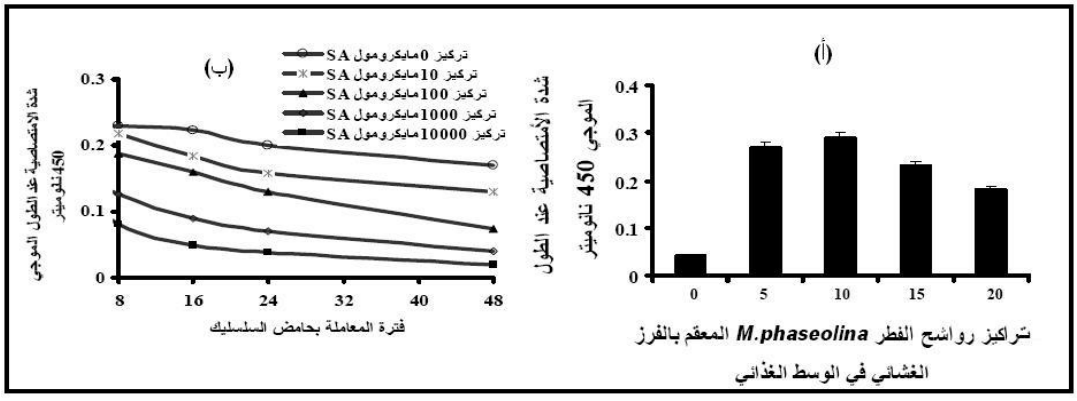
دور إيجابي في زيادة فاعلية الإنزيم إذ كان أعلى نشاط للإنزيم ولجميع تراكيز SA عند فترات المعاملة ١٦ و ٢٤ ساعة، بعدها انخفض نشاط الإنزيم عند الفترة ٤٨ ساعة.



الشكل رقم (٢). نشاط إنزيم PAL في مستخلص كالس الرقي *C. lanatus* المعامل برواشح الفطر *M. phaseolina* وحامض السلسليك.
(أ). أنشاط إنزيم PAL في المستخلص الخلوي للكالس المعامل بتراكيز مختلفة من رواشح الفطر، (ب). تأثير معاملة الكالس لفترات متباينة بتراكيز SA وتركيز ١٥٪ راشح فطري على نشاط انزيم PAL.

فاعلية إنزيم الكتاليز

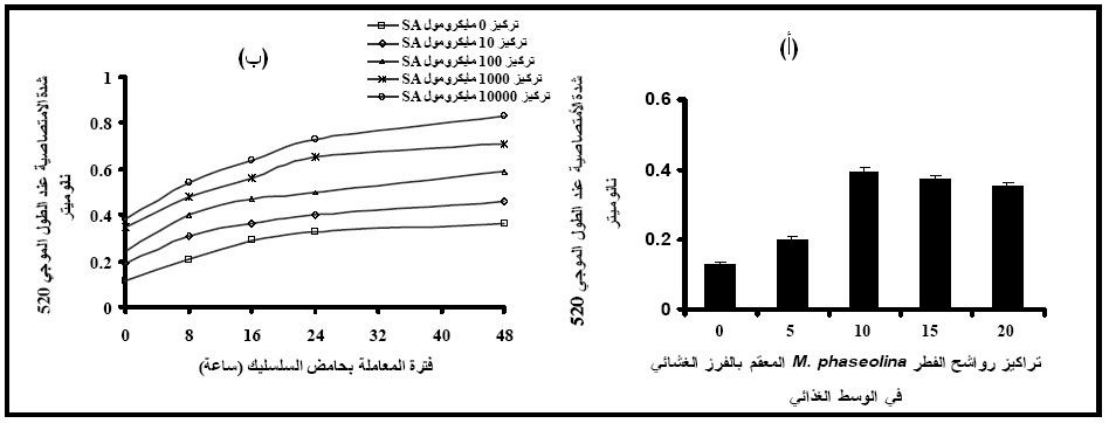
توضح النتائج في الشكل (٣أ) أن لرواشح الفطر تأثيراً واضحاً في فاعلية الإنزيم في مستخلص الكالس المعامل بتراكيز متباينة من رواشح الفطر. وكان نشاط الانزيم والمعبر عنه بشدة الامتصاصية عند الطول الموجي ٤٥٠ نانوميتر جيدا ومتقاربا في مستخلص الكالس المعامل بتراكيز ٥ و ١٠ ٪ راشح فطري قياسا بعينة القياس، وبدأ النشاط بالانخفاض التدريجي مع زيادة تراكيز الراشح في الوسط الغذائي. من جهة أخرى لوحظ أن إضافة تراكيز من SA إلى الوسط الغذائي ولفترات زمنية مختلفة كان له أثر سلبي في نشاط إنزيم الكتاليز، إذ انخفض نشاط الإنزيم تدريجيا، وكان الانخفاض متناسبا مع زيادة تراكيز SA في الوسط الغذائي وطول فترة المعاملة (الشكل ٣ب). وكان أقل نشاط للإنزيم في المستخاص الخلوي للكالس المعامل بتراكيز ١٠[٤] مايكرومول SA وفترة المعاملة ٢٤ و ٤٨ ساعة.



الشكل رقم (٣). نشاط إنزيم الكتاليز في مستخلص كالس الرقي *C. lanatus* المعامل برواشح الفطر *M. phaseolina* وحامض السلسليك.
(أ) . نشاط إنزيم الكتاليز في المستخلص الخلوي للكالس المعامل بتراكيز مختلفة من رواشح الفطر، (ب). تأثير معاملة الكالس لفترات متباينة بتراكيز SA وتركيز ١٥٪ راشح فطري على نشاط إنزيم الكتاليز.

تركيز الحامض الاميني البرولين

يوضح الشكل رقم (٤أ) ارتفاع في تركيز البرولين في مستخلص الكالس، وكانت الزيادة في التركيز متناسبة مع زيادة تراكيز الراشح في الوسط، والمعبر عنه بشدة الامتصاصية عند الطول الموجي ٥٢٠ نانوميتر. وسجلت أعلى التراكيز في البرولين في مستخلص عينات الكالس النامية في وسط يحوي ١٠- ٢٠ ٪ راشح فطري. في حين لم تؤد معاملة الكالس بتراكيز من SA ولفترات زمنية مختلفة إلى فروقات واضحة في تركيز البرولين في مستخلصات الكالس، إذ بقيت التراكيز مقاربة إلى التراكيز التي سجلت في مستخلصات الكالس المعامل برواشح الفطر فقط (الشكل رقم ٤ب).



الشكل رقم (٤). تركيز الحامض الأميني البرولين في مستخلص كالس الرقي *C. lanatus* المعامل برواشح الفطر *M. phaseolina* وحامض السلسليك. (أ) . تركيز الحامض الأميني البرولين في المستخلص الخلوي للكالس المعامل بتراكيز مختلفة من رواشح الفطر، (ب). تأثير معاملة الكالس لفترات متباينة بتراكيز SA وتركيز ١٥٪ راشح فطري على تركيز الحامض الأميني البرولين.

إن الزيادة في نشاط إنزيمات PAL والكتاليز وتركيز الحامض الأميني البرولين في مستخلص خلايا الكالس المعامل برواشح الفطر والمتناسب مع تراكيز رواشح الفطر في الوسط يؤكد ملاءمة استخدام هذه العوامل بوصفها مؤشرا لاكتساب خلايا الكالس صفة التحمل أو المقاومة، أشار العديد من الدراسات في كالس ونباتات مختلفة إلى هذه العوامل، مثل الخيار (Lubova *et al.*, 1999)، والرقي (الصوفي،٢٠٠٨)، واللوبيا (Amaresh *et al.*, 2007)، وقد يعزى سبب هذا الارتفاع في تراكيز هذه المواد إلى فعل المركبات السامة في الراشح في خلايا الكالس؛ مما قد يسبب رد فعل من الخلايا بإنتاج هذه العوامل لتعزيز مقاومتها. أما الانخفاض في نشاط هذه الإنزيمات في خلايا الكالس المعامل بتركيز ٢٠٪ راشح فطري فيعزى إلى موت الخلايا واكتسابها اللون البني.

أدت إضافة SA إلى وسط نمو الكالس إلى ارتفاع في نشاط إنزيم PAL وانخفاض في نشاط إنزيم الكتاليز في مستخلص خلايا الكالس، وقد يعزى هذا إلى ارتباط SA بإنزيم الكتاليز وتثبيط عمله؛ مما يؤدي إلى زيادة في تراكيز بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الذي يعمل على

حث الخلايا على إنتاج البروتينات المرتبطة بالإمراضية، ومنها إنزيمات PAL ، والحامض الأميني البرولين (Vanloon, 2000 ؛ Achuo *et al.*, 2004)، اكدت دراسات أجريت على نباتات وفطريات مختلفة هذه النتائج كما في الرز (Cai *et al.*, 1996) واللوبيا (Amaresh *et al.*, 2007) والتبغ (Palva *et al.*, 1994).

المراجع

أولاً: المراجع العربية

الصوفي، بلقيس يحيى نجم. " تكوين نباتات الرقي من مزارع الكالس Citrullus lanatus L. وتحديد بعض دلائل المقاومة للفطر Fusarium oxysporum "، *رسالة ماجستير*، كلية التربية، جامعة الموصل، (٢٠٠٨).

رمضان ، نديم أحمد و الملاح ، مزاحم قاسم و عبدالله ، عدنان محمود. انتخاب نباتات الطماطم المقاومة للذبول الفيوزارمي *F. solani* و*Fusarium oxysporum* بواسطة زراعة الأنسجة. *المجلة العراقية* لعلم الأحياء. ٢ (٢): (٢٠٠٢)، ٢٦١-٢٧١.

ثانياً: المراجع الإنجليزية

Edwards , A. J. ; Vinyard , B. T. and Wiley , E. R. "Consumption of watermelon juice increases plasma concentration of lycopene and beta-carotene in humans". *Nutration*. 4: (2003) , 133.(abst.).

Su , G. S. O. ; Schneider , R. W. and Russian, J. S. "Host specialization in charcoal fungus *Macrophomina phaseolina*". *Phytopathology*.91: (2001),120- 126.

Suchandra , S. ; Santosh , K. M. And Kazi , A. I. "A virulent mutants of *Macrophomina phaseolina* and *Aspergillus fungatus* initiate infection in *Phaseolus mungo* in the presence of phaseolinone: leramisole gives protection". *Bio Sci*. 25: (2000),73- 80.

Mahato , S. B. ; Siddiqui , K. A. ; Bhattacharya , G. ; Ghosal , T. ; Miyahara , K. ; Sholichin, M. And Kawasaki , T. "Structure and stereochemistry of phaseolinic acid: Anew acid from *Macrophomina phaseolina*". *J. Nat. Prod*.50: (1987),245- 247.

Dhar , T. K. ; Siddiqui , K. A. and Ali , E. "Structure of phaseolinone , a novel phytotoxin from *Macrophomina phaseolina*". *Tet. Lett*. 23: (1982), 5459- 5462.

Bharath , B. G. ; Lokesh , S. and Shetty , H. S. "Effects of fungicides and bioagents on seed mycoflora growth and yield of watermelon Integrative". *Bio Sci*. 9: (2005),75- 78.

Enyedi , A. J. ; Yalpani , N. ; Silverman , P. and Raskin , I. "Localization , conjugation , and function of salicylic acid in tobacco during the hyper sensitive reaction to tobacco mosaic virus". *Proc. Nat. Sci. USA*. 89: (1992), 2480- 2484.

Palva , T. K. ; Hurtig , M. ; Saindrenan , P. and Palva , E.T. "Salicylic acid induced resistance to *Erwinia carotovora* sub sp. *carotovora* in tobacco".*Mol. Plant- Microbe Interac*.7: (1994), 356- 363.

Cai , X. Z. ; Zheng , Z. ; Cai , X. Z. and Zheng, Z. "Effect of exogenous salicylic acid on resistance of rice seedling to blast". Chinese Rice Research. News letter, 4: (1996), 8- 9.

Van loon , L. C. and Kammen , A. V. "Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble proteins from *Nicotiana tabacum* Var- samsun. and "samsun NN". *Virology*. 401: (1970), 199- 211.

Van loon , L. C. ; Pierpoint , W. S. ; Boller , T. and Conejevo ,V. "Recommendations formaing plant pathogenesis related proteins". *Plant Mol. Biol. Rep*.12: (1994), 245- 264.

Van loon , L. C. "*Systemic induced Resistance*". In Slusarenko A , Fraser RSS and Van Loon L. C. (eds) Mechanism of Resistance to plant Diseases Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. (2000), 521-574.

Luhova, L. ; Jancova , D. ; Frebort , I. ; Lebeda , A. ; Sebela , M. ; Kristkova, E. and Pec, P. "Amine oxidase , peroxidase, catalase and acid phosphatase activities in powdery mildew

Widholm, J. M. "Phytotoxicity of culture filtrate from *Fusarium solani* the causal agent of sudden death syndrome of soybean". *Plant Dis*.80: (1996), 922- 927.

Beaudoin-Eagan, L. D. and Thorpe,T. A. "Tyrosion and phenlalanine ammonialyase activities during shoot intiation in tobacco callus". *Plant Physiol*. 78: **(**1985), 438-441.

Goth, L. " A simple method for determineation of serum catalase and revision of reference range". *Clin. Chem. Acta*.196: (1991), 143-152.

Bates, L. S. ; Waldren , R.P. and Teare , L. D. "Rapid determination of free proline for water stress studies". *Plant Soil* . 39: **(**1973), 205-207.

Nemec , S. "Stress- Relation compound in xylum fluid of blight diseased citrus containing *Fusarium solani* naphthazarin toxin and their effect on the host". *Can. Microb*. 41: (1995), 515-524.

Prachi ;Sharma,T. R. and Singh ,B. M. "Salicylic acid induced insensitivity to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *zingiberi* in the calli of *Zingiber officinale* Roscoe". *Eur. J. Plant Pathol*. 108: (2002), 31-39.

Svabova , L. and Griga , M. "Utilization of some fusarium filtrates in resistance breeding programme of peas". *Cereal Res*. 25: (1997), 847- 848.

Amaresh , C. ; Raghvendra , S. ; Archana , D. and Pradeep , S. "Change in phenylalanine ammonia lyase activity and isozyme patterns of polyphenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhance resistance in cowpea against *Rhizoctonia solani*". *Acta Physiol. Plant*. 29: (2007), 361-367.

Achuo , E. A. ; Audenert , K. ; Mezianc , H. and Hofte , M. C. "The salicylic acid dependet defence pathway is effective against different pathogens". *Acta Hortic*. 482: (2004), 309- 311.

Umebese , C. E. ; Olatimilehin , T. O. and Ogunsusi, T.A. "Salicylic acid protects nitrate reductase activity, Growth and proline in Amaranth and Tomato plants during water deficit". *Am. J. Agric. Biol. Sci*. 3: (2009), 224- 229.

infected plants of *Cucumis sativus*". *Hyto. Ann. Rev. Bot*. 39: (1999), 235-241.

Lu , B. B. ; Du , Z. ; Ding , R. X. ; Zhang , L. ; Yu , X. J. ; Liu , C.H. and Chen , W. S. "Characterization of a differentally expressed phenylalanine ammonia lyase gone (li PAL) after genome duplication from tetraploid isatis indigotica fort Integr". *Plant Biol*. 48: (2006), 1439- 1449.

Byun , H. and Choi , S. "Activation of disease resistance related enzymes by treatment of hydrogen peroxide and benzoic acid in cucumber (*Cucumis sativus* L.) ". *Hortic. Sci*. 44: (2003) ,27- 29.

Nelson, P.E. ; Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. *Fusarium species-illustrated Manual for Identification*. University Park, Pennsylvania State University Press. (1983), 193 pp.

Thirumalachar , M. J. "Pycnidial state of charcoal rotinciting fungus of its nomenclature". *Phytopathology*.43: (1953), 608- 610.

Saydam , C. ; Copeu , M. and Segin , E. "Studies on inoculation techniques of cotton wilt caused by *Verticillium dahliae* kleb. I. Inverstigation on the laboratory inoculation techniques". *Turk. Phytopathology*. 2: (1973), 69- 75.

Sutherland, M.L. and Pegg, G.F. "Purification of a toxine from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.Race1". *Physiol. Mol. Plant Pathol*.46: (1995),243- 254.

Paker , R. A. ; Tatum , J. H. and Nemec , S. "Toxins production by *Fusarium solani* from fibrous root of blight disease dicitrus". *Phytopathology*. 71: (1981), 951-954.

Murashige ,T. and Skoog , F. "Arevised medium for growth and bioassays with tobacco tissue culture". *Physiol. Plant*. 15: (1962), 473-479.

Thakur , M. Sharma, D. R. and Sharma, S. K. "*In Vitro* selection and regeneration of carnation (*Dianthus carytophyllus* L.)plant resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*". *Plant Cell Rep*. 20: (2002) , 825-828.

Jin , H. ; Hartman , G. L. ; Nickell , D. and

Effect of Salicylic Acid Hormone to Increase Resistance of *Citrullus lanatus* L. callus to *Macrophomina phaseolina*

Nadeem A. Rhmadan[1] ; Adnan M. Abdullah [2] ; Badia A.R. Malla Obeeda [1]

(1) Department of Biology/College of Science/University of Mosul / Mosul / Iraq.
(2) Department of Biology/College of Education/University of Mosul/Mosul/ Iraq.

(Received 15/1/1432H; accepted for publication 16/1/1433H)

***Key words*:** Resistance , *Citrullus lanatus* , salicylic acid, PAL , Catalase , Proline amonia acid

Abstract : In this study callus was stimulated from cotyledons explants of *Citrullus lanatus* L. seedling on MS media containing different concentrations of growth regulators. Medium containing 1.0 mg / L BA and 0.5 mg / L NAA was the most favorable for callus induction. Selection of tolerant callus to the culture filtrate for virulent strains of *Macrophomina phaseolina* was examined for culture of cotyledons medium that contain the concentrations 0.0 , 5.0 , 10.0 , 15.0 and 20.0 % of fungal filtrates. The concentration which allowed selection was 15%. The clear toxic effect of fungus filtrate on callus represented by increased brown rating and decreased of persent survival and fresh weight. The resistance callus showed a high level of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and catalase enzymes activity, also increased the concentrations of free amino acid praline. Salicylic Acid (SA) was used to induce tolerant in the callus culture of *C. lanatus* against culture filtrate of *M. phaseolina*. The treatment of callus culture with different concentrations 10 , 10^2 , 10^3 and 10^4 µ mole of SA and different duration 8 , 16 , 24 and 48 hours befor growth callus with medium containing 15% fungal filtrate was increased callus survival and fresh weight. Exogenous application of SA resulted in increased of PAL , but decreased in catalase enzymes activity. The concentrations 10^3 and 10^4 µ mole of salicylic acid and 24 hours duration was favorable for induce resistance. SA may result in the induction of resistance to *M.phaseolina* by inducing increased activity of PAL enzyme and proline amino acid.