



جامعة الموصل  
كلية التربية

استحثاث المقاومة في كالس ونباتات اللوبيا  
*Vigna unguiculata* (L.) Walp .  
بحامض  
السالسليك للفطر *Rhizoctonia solani*

**إسراء محمود صالح الطائي**

رسالة ماجستير  
علوم حياة / نبات

بإشراف

الأستاذ المساعد

**الدكتور عدنان محمود عبدالله الملاح**

## الخلاصة

تهدف الدراسة الحالية الى تقويم تأثير مركب الاستحاثات الكيميائي حامض السالسليك (SA) ( Salicylic acid ) وعامل المكافحة الاحيائي الفطر *Trichoderma viride* في زيادة المقاومة الذاتية لكالس ونبات اللوبيا *Vigna sinensis* لمرض تعفن الجذور وموت البادرات المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani kuhan* ورواشحه السامة من خلال تطبيق احدى تقنيات الزراعة النسيجية فضلاً عن الاختبارات الحقلية .بدلالة الكشف عن نشاط انزيمات البيروكسيديز Peroxidase والفينايل الانين امونيا لايبز Phenylalanine Ammonia Lyase والكتاليز Catalase بوصفها دلائل لاكتساب خلايا الكالس والنبات صفة التحمل او المقاومة . اوضح اختيار القدرة الامراضية للفطر *R.solani* المعزول من نباتات لوبيا مصابة بمرض التعفن كفاءته في احداث تعفن معظم البذور وموت بادرات اللوبيا حديثة النمو .

بينت النتائج فاعلية رواشح المزرعة التركيبية الخام للفطر في خفض نسبة انبات البذور , فضلاً عن قدرة الرواشح الخام في احداث الاصابة المرضية عند معاملة بادرات اللوبيا بالرواشح من خلال ظهور اعراض المرض المتمثلة بذبول الاوراق السفلية واصفرارها وتلون الجذور باللون البني مع حدوث تحلل لانسجة البشرة والقشرة اسفل الساق وتخصرها بشكل واضح وبالتالي موت البادرات بعد ( 48 - 56 ) ساعة من المعاملة مقارنة بتلقيح البادرات بالفطر ذاته .

استحدث الكالس في هذه الدراسة من قطع الفلق والسيقان تحت الفلقية لنبات اللوبيا , اذ زرعت قطع السيقان تحت الفلقية والفلق على وسط MS الصلب المدعم بانواع متباينة من منظمات النمو كالاوكسينات مثل ( 2,4-D و NAA ) بالتراكيز ( 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 ملغم / لتر ) ومتداخلة مع الساييتوكاينينات مثل ( BA و Kin ) بالتراكيز ( 0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 , 1.5 ) , وكان لقطع السيقان تحت الفلقية كفاءة جيدة في استحداث الكالس في معظم الاوساط , اذ بلغت 75 % وكان الوسط MS المدعم (2.0 ملغم / لتر 2,4-D و 0.1 ملغم / لتر BA) افضل وسط لاستحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية باعطائه نسبة استحداث 100 % ,في حين كانت نسبة استحداث الكالس من قطع الفلق في مجمل الأوساط المستخدمة 60 % , وكان الوسط MS المحتوي على (1.0 ملغم / لتر 2,4-D و 0.5 ملغم / لتر BA ) افضل وسط لاستحداث الكالس من قطع الفلق باعطائه نسبة استحداث 100 % , كما تبين أن كالس السيقان تحت الفلقية المستحدث في الوسط الحاوي على 2,4-D كان متماسكاً في حين كان هشاً في حالة كالس الفلق المستحدث على ذات الوسط . أظهرت نتائج زراعة قطع الكالس المستحدث من قطع السيقان تحت الفلقية والفلق قابلية على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية في عدد من اوساط التمايز والمتكونة من الوسط MS المضاف اليه تراكيز مختلفة من NAA ( 0.0 , 0.3 , 0.6 ملغم / لتر ) ومتداخلة مع BA بالتراكيز ( 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 ملغم /

لتر ) واعطت الاوساط المدعمة بالتراكيز 2.0 و 3.0 ملغم / لتر BA اعداد جيدة من الافرع الخضرية في كلا نوعي الكالس, وامتاز الوسط المتكون من (MS + 3.0 ملغم / لتر BA + 0.6 ملغم / لتر NAA) بكفاءته في حث كلا نوعي الكالس على التمايز .

امكن الحصول على قطع حية من مزارع الكالس المضاف اليها رواشح الفطر الخام السامة بالتراكيز ( 0.0 , 5.0 , 10.0 و 15.0 % ) , وكان افضل التراكيز المناسبة للحصول على قطع الكالس المتحملة او المقاومة للراشح 10 و 15 % .بدلالة تحمل اقل من 20 % من قطع الكالس المزروعة لتأثير الراشح , مع ملاحظة التأثير السمي لمحتويات رواشح الفطر في الكالس متمثلة باختزال احجامها واكتسابها اللون البني . تمكنت هذه الدراسة من الحصول على نباتات لوبيا كاملة من تمايز كالس قطع السيقان تحت الفلقية والفلق واعطى كالس السيقان تحت الفلقية نسبة تمايز 43.75 % في حين كانت النسبة 26% في حالة الفلق . وكان الوسط المتكون من (MS + 3.0 ملغم / لتر BA + 0.6 ملغم / لتر NAA) الافضل في تمايز كلا نوعي الكالس . واطهرت الافرع الخضرية قابلية على تكوين الجذور في وسط MS الصلب المدعم 1.0 ملغم / لتر IBA . كما نجحت عدد من النباتات المتكونة تحمل ظروف النقل الى التربة والظروف البيئية .

اظهرت نتائج قياس فاعلية انزيمات البيروكسيديز والفينايل الانلين آمونيا لايبز PAL والكتاليز في المستخلص الخلوي للكالس المعامل بالتراكيز من رواشح الفطر ارتفاع متدرج في نشاط هذه الانزيمات وكانت الزيادة متناسبة مع زيادة تركيز الراشح في الوسط الغذائي مقارنة بعينات القياس النامية في وسط خالي من الراشح . أدت إضافة تراكيز من حامض السالسليك الى الوسط الغذائي لنمو الكالس الى زيادة في نشاط انزيمات البيروكسيديز و PAL في حين حصل انخفاض تدريجي في نشاط انزيم الكتاليز مقارنة بعينات القياس .

كانت نتائج عملية معاملة نباتات اللوبيا بحامض السالسليك في التجربة الحقلية متوافقة مع نتائج التجربة المختبرية , اذ لوحظ زيادة في نشاط انزيمات البيروكسيديز و ال PAL في مستخلص اوراق وسيقان النباتات, وكان أعلى نشاط لهذه الانزيمات في الاربعة ايام الاولى من المعاملة , في حين أدت المعاملة إلى انخفاض في نشاط أنزيم الكتاليز قياساً بعينة المقارنة.

أدت عملية تلقيح نباتات اللوبيا بعزلة الفطر *R.solani* الممرضة والمعاملة مسبقاً بحامض ال SA الى ارتفاع في نشاط انزيمات البيروكسيديز و PAL في حين لم يلاحظ فرق واضح في نشاط أنزيم الكتاليز قياساً بعينة المقارنة الغير ملقحة بالفطر . ادت عملية تلقيح تربة نباتات اللوبيا بالفطر المقاوم الحيوي *T.viride* او بعزلة الفطر الممرض *R.solani* كل على انفراد او سوية , الى زيادة في فاعلية انزيمات البيروكسيديز و PAL والكتاليز في مستخلص اوراق

وسيقان النباتات , وكان افضل نشاط لهذه الانزيمات بعد 10 ايام من عملية التلقيح , ولم يلاحظ فروقات كبيرة في نشاط هذه الانزيمات بين مستخلص الاوراق والسيقان , مقارنة بعينة القياس .  
حققت هذه الدراسة نجاحاً في الحصول على نباتات لوبيا كاملة من تمايز كالس قطع السيقان تحت الفلقية والفلق باستخدام تقنية الزراعة النسجية . كما ايدت نتائج هذه الدراسة الاراء القائلة بإمكانية استخدام المثبرات الكيميائية elicitors مثل SA والاحيائية في زيادة المقاومة الذاتية للنبات لمقاومة السلالات الممرضة لمسببات الامراض . كما رسخت امكانية اعتماد أنزيمات البيروكسيديز و PAL و الكتاليز كدلائل مقنعة وحيدة لاكتساب النبات درجة من التحمل أو المقاومة .

## Abstract

This study aims to estimate the effect of inducing chemical compound SA ( Salicylic acid ) and the biocontrolling fungus *T.viride* in increasing acquired resistance of the callus and plant of cowpea (*Vigna sinensis*) to root rot and seedling damping off disease caused by *Rhizoctonia solani* Kuhan and its toxic filtrate using one of the tissue culture techniques in addition to field experiments . With the emphasize , that some chemical compound were used as indicators of tolerance and acquired resistance such as Peroxidase, phenylalanine ammonia lyase ( PAL ) and catalase .

The pathogenicity test showed that this fungus had an effect in causing seed rot and seedling damping off .

Results showed that the filtrate of fungus culture decreased seed germination , and caused pathogenicity of the cowpea seedlings , and this was clear through the symptoms appeared on the plants such as lower leaf yellowing and wilting with yellowish colouration and brownish color of the roots , decay of epidermis and cortex at the lower part of the stem with constriction and eventually the death of seedlings after 48-56 hours of treatment compared with those inoculated with the fungus .

Callus were regenerated from cotyledons and hypocotyls of the cowpea plants , when they were cultured on Murashige & Skoog medium ( MS) supplemented with variety of auxin and cytokinins such as 2,4-D and NAA at 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 mg / L in combination with cytokinin such as BA and Kinetin at 0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 , 1.5 mg / L . The hypocotyls have a good efficiency of callus regeneration in most media used , which reached 75% , and that was clear when MS medium supplemented with 2.0 mg / L 2,4-D with 0.1 mg /L of BA which was superior in callus formation which reached 100% , while it was 60% from the cotyledons.

It is worth to demonstrate that the hypocotyls callus produced on the medium containing 2,4-D was compact, while it was friable when produced from the cotyledons on the same medium. Meanwhile the results showed that the callus derived from hypocotyls and cotyledons have the ability for differentiation and vegetative shoot regeneration when cultured on MS medium with different concentration of NAA 0.0 , 0.3 , 0.6 mg / L in combination with BA at 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 , mg / L . The 3.0 mg / L of BA + 0.6 mg / L NAA was so efficient in callus induction for differentiation in both types of callus the compact and the friable .

While the media supplemented with 2.0 and 3.0 mg / L BA produced high numbers of shoots in both types of callus which gave complete normal plant at a rate of 43.75% and 26% from both hypocotyls and cotyledons respectively.

Living callus pieces were obtained from callus cultures treated with toxic fungus *R. solani* filtrates at 0.0 , 5.0 , 10.0 , 15.0 % , and the most suitable concentration for obtaining the resistant and tolerable callus were 10 and 15% . It is obvious that 20% of the callus tolerated the effect of the filtrate. The toxic effect of the filtrates caused a reduction in the callus size , weight brown coloration and reduced differentiation .The shoot regenerated roots on MS medium with 1.0 mg / L IBA , the plantlets were weaned and transplanted to soil successfully .

The results of measurements of the enzyme activities such as peroxidase, phenylalanine ammonia lyase and catalase in the cell extract of the callus treated with fungus filtrate demonstrated a gradual increase in the activities of these enzymes which was proportional with the increase of filtrate concentration in the medium compared with the control which is devoid of filtrate .

The addition of salicylic acid to the callus medium led to an increase in the activity of peroxidase and PAL enzymes whereas it caused a gradual decrease of the catalase enzyme compared with the control . The field experiment results was in harmony with the laboratory experiment when the plants were treated with salicylic acid . An increase in the activities of peroxidase and PAL enzymes of the leaf and stem extracts, and the highest activity of these enzymes was in the first four days of treatment , which there was a decrease in the catalase activity in comparison with the control .

The inoculation cowpea plants with the pathogenic isolate of *Rhizoctonia solani* pretreated with SA caused an increase in the activities of peroxidase and PAL enzymes , while there were no any clear change in the catalase enzyme activity , compared with the control .

Inoculation of the cowpea plants with the biocontrol fungus *Trichoderma viride* or with the pathogenic isolate of *Rhizoctonia solani* alone or in combination led to an increase in the activity of peroxidase , PAL and catalase enzymes in the filtrates of plant leaves and stems .

The best activity appeared after 10 days of inoculation. There were no significant differences in the activity of these enzymes between the leaf and stem extracts compared with the control.

Good success has been achieved through this study by obtaining complete normal cowpea plants from the differentiation of hypocotyl and cotyledon callus using tissue culture techniques. On the other hand, the results of these studies supported the ideas of using chemical elicitors such as SA and biological inducers for increasing plant auto resistance against the pathogenic strains. Also stressed on the potentiality of depending on these enzymes as the only indicators for acquired resistance tolerability of plants.



# **Induction of Resistance in Callus and *Vigna unguiculata* (L.) Walp . Plantas by Salicylic acid against *Rhizoctoni solani***

**Esraa Mahmood Salih AL-Tayi**

**M.Sc. Thesis  
Biology / Plant**

**Supervised By  
Assistant Professor  
Dr.Adnan Mahmood Abdulla AL-Mallah**

**2011 A.D.**

**1432 A.H.**