المجلة الليبية للعلوم الزراعية
المجلد (17) : العددان (1-2) 2012
ورقة أصيلة

تأثير نوع المستأصل وحامض الجبرليك (GA_3) على الإكثار الدقيق لثلاثة هجن من الفلفل *Capsicum annuum L.*

زهير مصطفى بن سعد[1]، عبدالسلام محمد بن حميدة[2] وأمنة على البوزيدي[1]
1 - قسم البستنة- كلية الزراعة – جامعة طرابلس 2 - مركز البحوث الزراعية والحيوانية

المستخلص

أجريت تجربتـــان لدراسة تأثير نوع المستأصل: العقد المفردة (single nodes) و القمة الخضـــرية (shoot tips)، و حامض الجبرليك Gibberellic acid (GA_3) بتركيز 0.0، 0.05، 0.1، 0.5 و1.0 ملغم/ لتر في الوسط الغذائي موراشيج وسكوغ (Murashige and Skoog,1962) (MS) على ألإكثار الدقيق لثلاثة هجن من الفلفل *Capsicum annuum L*. وهي Ziad×38 وZiad×254 وNizar×24. أشارت النتائج إلى أن مستأصل القمة الخضرية تفوق معنويا في عدد البراعم النامية وطول النمو الخضري وعدد الجذور المتكونة بعد أربعة أسابيع من الاستزراع في هجين Nizar×24، أما في الهجينين Ziad×38 وZiad254x فقد تفوقت القمة الخضرية معنويا في عدد البراعم على الهجين Nizar×24. هذا و أشارت النتائج إلى عدم فعالية حامض الجبرليك في تشجيع النمو الخضري, إضافة إلى عدم وجود فروق معنوية بين الهجن او تركيزات حامض الجبرليك في نسبة تجذير الأفرخ الخضرية، أما في عدد الجذور فان الهجين Ziad×38 تفوق على الهجينين الآخرين, وتفوق في صفة طول الجذور الهجين Nizar×24 على Ziad×38 وZiad×254.

الكلمات الدالة: الفلفل, *Capsicum annuum L* , نوع المستأصل و حامض الجبرليك (GA_3).

المقـــدمة

يعدّ الفلفل من محاصيل الخضر التي تنتشر زراعتها بشكل واسع في العالم وذلك لأهميته الغذائية بسبب احتوائه على فيتامين أ وحامض الاسكوربيك (فيتامين ج) كما يعتبر فاتحا للشهية، ويدخل في الكثير من الصناعات الغذائية والمنتجات الطبية بسبب احتوائه على مادة الكابسيسين (Capsaicin). بلغ إنتاج الفلفل في ليبيا سنة 2010 حسب تقدير منظمة الأغذية والزراعة 24,005 طن من مساحـــــة إجمالية تقدر بـ 1720 هكتارا (, FAOSTAT 2010)، هذا ولا تتوفر أي إحصائيات عن إنتاج بذور هذا المحصول محليا.

يتكاثر الفلفل طبيعيا عن طريق البذور ويعدّ التلقيح الخلطي أحد العوائق في إنتاج البذور والمحافظة على

للاتصال: زهير مصطفى بن سعد
قسم البستنة-كلية الزراعة- جامعة طرابلس
هاتف: 218925229227 + بريد إلكتروني: zmbensaad@yahoo.com
استلمت:13/ 3/ 2012م أجيزت: 5/ 4/ 2012م

الصفات المحصولية والإنتاج التجاري للبذور في الفلفل (Ashrafazzaman *et al.,* 2009). وتعتمد ليبيا اعتمادا كبيرا على استيراد بذور هجن هذا المحصول لقلة عدد المتخصصين والعمالة المدربة في هذا المجال لإجراء تلقيحات محددة بين الخطوط النقية، وبذلك فإن إنتاج هجن الفلفل في هذه الظروف يتطلب استخدام تقنيات الإكثار الدقيق في إكثار الخطوط النقية أو الهجن المنتجة محليا، وستحظى هذه التقنيات بأهمية كبيرة في ليبيا.

تعد تقنية زراعة الأنسجة إحدى الوسائل التي يحاول الباحثون اللجوء إليها لإكثار الفلفل، حيث أن الفلفل ليس له وسيلة تكاثر خضرية طبيعية ويعد هذا حافزا للبحث في تطبيق تقنيات الزراعة النسيجية لما تتمتع به من مزايا مثل الحصول على نباتات بأعداد كبيرة وخالية من الأمراض، ومطابقة للتركيب الوراثي (البحر وآخرون،1999). ويعدّ الفلفل من الأجناس النباتية صعبة الاستجابة للزراعة النسيجية مقارنة ببعض أنواع العائلة الباذنجانية مثل البطاطس والطماطم والتبغ (Kumar *et al.,* 2005) مما يجعله متأخراً من حيث تطبيق التقنيات الحيوية الحديثة. إن وجود بروتوكول للتوالد في الفلفل يتميز بالكفاءة والقابلية للتطبيق في العديد من أصناف الفلفل يعد من الأساسيات في تطبيقات التقنيات الحيوية والتي تهدف في النهاية إلي الإكثار الدقيق وتحسين هذا المحصول.

لقد نشر أول تقرير علمي عن التوالد في الفلفل بواسطة Gunay and Rao,(1987)، ومنذ ذلك الحين توالت الدراسات ولكن ببطء بسبب صعوبة التوالد في هذا النوع النباتي. وتم تحقيق التوالد في الفلفل عن طريق تكوين الأفرخ العرضية والإبطية باستخدام عدة أنواع من المستأصلات النباتية مثل السويقة السفلى االفلقات والأوراق الصغيرة (Mok and Norzu-laani, 2007 و Sanatombi and Sharma, 2007 و Grozeva *et al.,* 2009)، وكذلك بتكوين الأجنة الجسمية (Steinitz *et al*., 2003) ولكن لم تتحقق نفس الاستجابة عند تطبيقها على أصناف أخرى، مما يشير إلى أن التوالد في الفلفل يعتمد بشكل كبير على الصنف (Ochoa-Alejo and Ireta-Moreno,1990 و Rodeva *et al.,* 2006) وأن الظروف المناسبة للتوالد يجب دراستها بعناية لكل صنف، هذا واستمرت جهود العلماء لحل مشكلة صعوبة التوالد في الفلفل والتوصل إلى نظام توالد ذو كفاءة عالية في الإكثار الدقيق على مستوى تجاري. لقد توصل الباحثان (Sanatombi and Sharma, 2007) إلى بروتوكول للإكثار الدقيق في بعض أصناف الفلفل في الهند يتميز بالكفاءة العالية مقارنة باستخدام البذور، كما توصل Husain *et al.,*(1999) إلى بروتوكول ذي كفاءة عالية للإكثار الدقيق لإحدى أصناف فلفل الزينة صنف Holiday cheer في حين توصل عدد من الباحثين إلى بروتوكول للإكثار الدقيق من الفلقات في الفلفل الناقوسي باستخدام الوسط السائل بنظام الغمر المؤقت (Grozeva *et al.,*2009).

بينت مجموعة من الدراسات أهمية منظمات النمو في انتاج أفرخ الفلفل وبعض المنظمات له تأثير سلبي على نمو الأفرخ فمثلا لوحظ تشوه أو تقزّم الأفرخ في تجارب توالد الفلفل (Steinitz *et al.,*2003)، ومن ناحية أخرى كان التأثير ايجابيا (Ashrafazzaman *et al.,*2009) باستخدام حامض الجبرليك بتركيز 2.0 مليجرام/لتر حيث لوحظت استطالة الأفرخ، كما أكد (Chen *et al.,* 2005) أن إضافة حامض الجبرليك كان عاملا إيجابيا في استطالة الأفرخ، وأن الأفرخ الخضرية كان لها معدل تجذير عالي عند استخدام اندول حامض البيوتيريك IBA indole-3-butyric acid مقارنة بالأوكسينات الأخرى. ولذلك تهدف هذه الدراسة لمعرفة تأثير نوع المستأصل وتركيزات حامض الجبرليك (GA_3) على تشجيع النمو الخضري في المزارع النسيجية لثلاثة هجن من الفلفل.

مواد وطرائق البحث

أجريت تجربتان لدراسة تأثير نوع المستأصل وتركيز حامض الجبرليك على تشجيع النمو الخضري لثلاثة هجن من الفلفل وهي Ziad×38، Ziad×254 و Nizar×24. أجرى التعقيم السطحي لبذور هجن الفلفل بعد غسلها بالماء الجاري، وذلك بغمرها في محلول الإيثانول تركيز 70 % لمدة دقيقة واحدة متبوعا بالغسيل في ماء مقطر ومعقم لمدة دقيقة قبل غمرهما في محلول

هيبوكلوريت الصوديوم (كلوركس التجاري يحتوي على 4.5 % مادة فعالة) بنسبة 30 % (حجم/حجم)، مع 3 قطرات من مادة ناشرة (Tween 20) «»-Polyoxy ethylene (20) sorbitan monolaurate . نقلت البذور إلى انابيب طولها 10سم وقطرها 1.5سم تحتوي على وسط موراشيج وسكوج MS) Murashige and Skoog, 1962) شبه الصلب (اجار 0.7 %) ووضعت الوحدات التجريبية في غرفة نمو بها مصدر ضوئي من أنابيب فلورسنت شدتها 24 ميكرومول/م^{2}ث لفترة ضوئية مدتها 16 ساعة ودرجة حرارة 22-25°م. قطعت المستأصلات وهي القمة الخضرية والعقد المفردة من البادرات بعد 5 أسابيع من الزراعة (مرحلة 4 ورقات حقيقية) لإجراء الدراسة المشتملة على تجربتين:

التجربة الاولى: قطعت المستأصلات (العقد المفردة والقمة الخضرية) بطول 1سم من البادرات المعقمة حيث احتوت العقد المفردة على برعم إبطي واحد. زرعت المستأصلات في أنابيب استزراع بها 5 مل من الوسط الغذائي MS يحتوي على أحد التركيزات الآتية من حامض الجبرليك: 0.0، 0.05، 0.1، 0.5 و1.0ملغم/لتر. وزعت الأنابيب عشوائيا في غرفة النمو تحت الظروف السابق ذكرها. سجلت البيانات المتمثلة في طول النمو الخضري، عدد البراعم النامية وعدد الجذور.

التجربة الثانية: من نتائج التجربة الأولى اتضح بصفة عامة أن القمة الخضرية قد تفوقت على العقد المفردة في معظم البيانات المسجلة، ولذلك استخدمت القمة الخضرية في هذه التجربة. استؤصلت القمة الخضرية من نفس هجن الفلفل وزرعت على نفس مكونات الوسط الغذائي MS المستخدم في التجربة السابقة، وسجلت البيانات المتمثلة في نسبة تجذير الأفرخ النامية وعدد وطول الجذور. أجريت أقلمة النباتات بزراعتها في أطباق استزراع تحتوي على وسط إنماء معقم يتكون من بيتموس ورمل بنسبة 1:1 (حجم/حجم)، ووضعت تحت ظروف المختبر بدرجة حرارة 22-24°م مع تخفيض الرطوبة النسبية تدريجيا باستخدام غطاء لدائن (بولي ايثيلين) شفاف لمدة أسبوعين.

اتبع التصميم كامل العشوائية بعشرة مكررات، حيث درس في التجربة الأولى عاملان وهما نوع المستأصل (قمة خضرية وعقد مفردة) وتركيز حامض الجبرليك (0.0،0.05،0.1،0.5و1.0ملغم/لتر) بعدد 100 وحدة تجريبية لكل هجين. أما التجربة الثانية فقد احتوى التصميم على عاملين هما نوع الهجين وتركيز حامض الجبرليك (كما سبق) وبعدد 150 وحدة تجريبية. حللت البيانات حصائيا باستخدام برنامج حاسوب (Minitab Statistical Software, 2000) وحساب أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى 5 %. وعند وجود فروق معنوية عزلت المتوسطات باستخدام اختبار دنكن (Duncan) متعدد الحدود (Duncan, 1955).

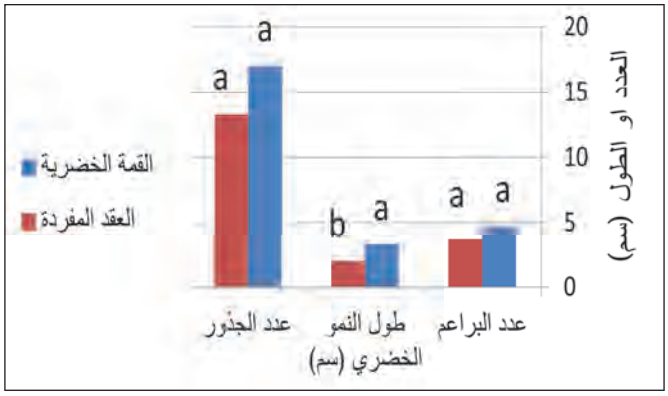
النتائج والمناقشة

أشارت نتائج التجربة الأولى إلى تفوق القمة الخضرية على العقد المفردة معنويا في عدد البراعم وطول النموات الخضرية النامية (الأفرخ) وعدد الجذور (الشكل 1) حيث بلغ عدد البراعم 4.6 و1.9، وطول الأفرخ 4.2 و1.9 سم، وعدد الجذور 18.4 و 5.0 على التوالي في الهجين Nizar ×24.

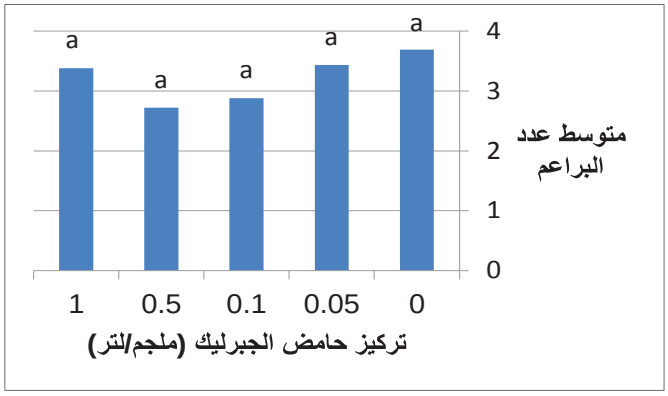
وهذا يتفق مع العديد من الدراسات حيث أشار الباحثون (Ramírez- Malagón and Ochoa-Alejo,1996 و Sanatombi and Shar-ma,2008) إلى وجود اختلافات من حيث استجابة المستأصلات في الفلفل مثل السويقة الجنينية السفلى وقطع الأوراق والقمة الخضرية في المزارع النسيجية. مما تتفق هذه النتائج مع (Sanatombi and Shar-ma, 2008) حيث تحصل على نفس العدد من البراعم لكل مستأصل باستخدام منظم النمو Zeatin. أما الباحثون (Jabeen *et al.*,2005) فقد وجدوا أن القمة الخضرية حققت اعلى استجابة في تكوين الأفرخ العرضية في الطماطم مقارنة بالسويقة الجنينية السفلى أو قطع الأوراق.

هذا وقد لوحظ بشكل عام إن نفس الاتجاه من حيث الاستجابة في الهجين Ziad×38 والهجين Ziad×254 حيث تفوقت القمة الخضرية على العقد المفردة في عدد الجذور وطول النموات ألخضرية بينما لم توجد فروق معنوية في عدد البراعم (الشكل 2 و3).

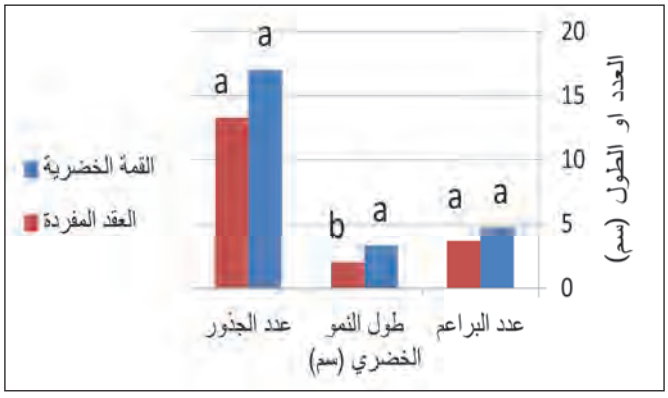
أما من حيث تأثير حامض الجبرليك على عدد البراعم



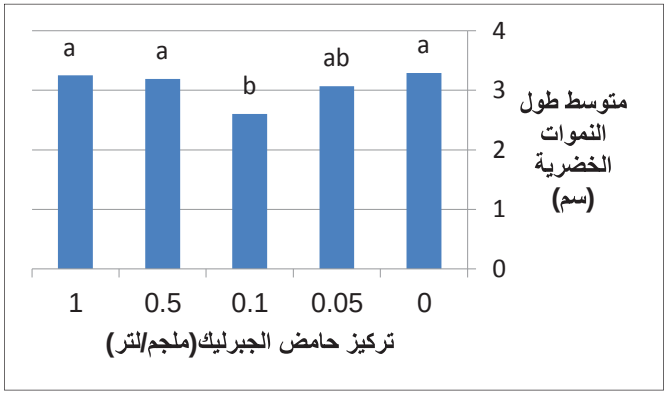
الشكل 1. تأثير نوع المستأصل (القمة الخضرية والعقد المفردة) على عدد البراعم النامية وطول النموات الخضرية وعدد الجذور في هجين Nizar×24.



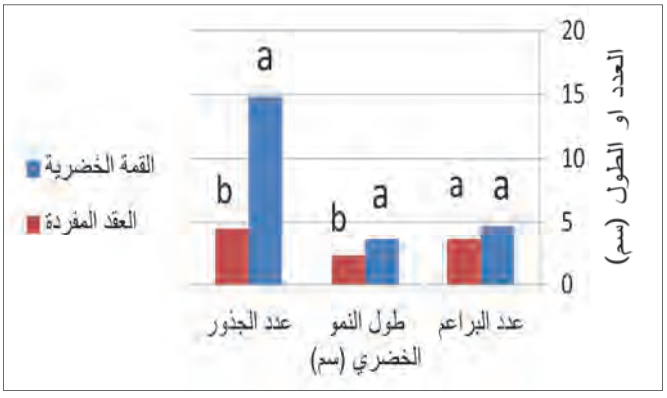
الشكل 4 . تأثير حامض الجبرليك على عدد البراعم النامية من القمة الخضرية لهجين Nizar×24 .



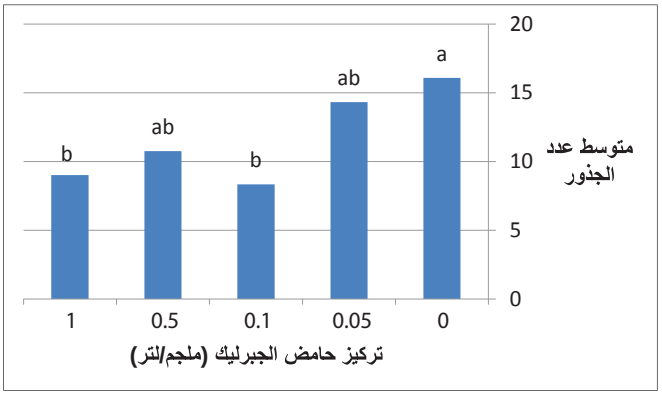
الشكل 2. تأثير نوع المستأصل (القمة الخضرية والعقد المفردة) على عدد البراعم النامية وطول النموات الخضرية وعدد الجذور في هجين Ziad×38.



الشكل 5. تأثير حامض الجبرليك على طول النموات الخضرية النامية من القمة الخضرية لهجين Nizar×24.



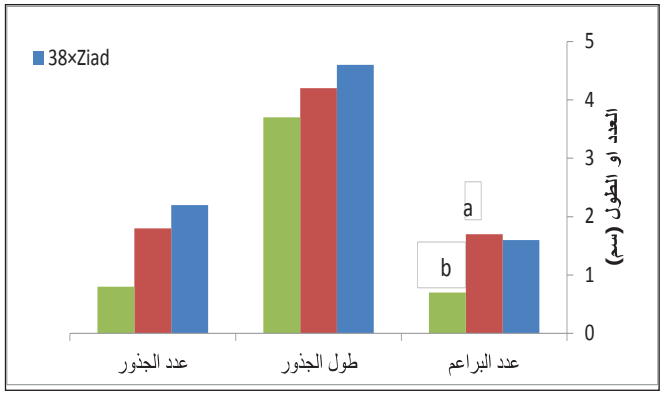
الشكل 3. تأثير نوع المستأصل (القمة الخضرية والعقد المفردة) على عدد البراعم النامية وطول النموات الخضرية وعدد الجذور في هجين Ziad×254



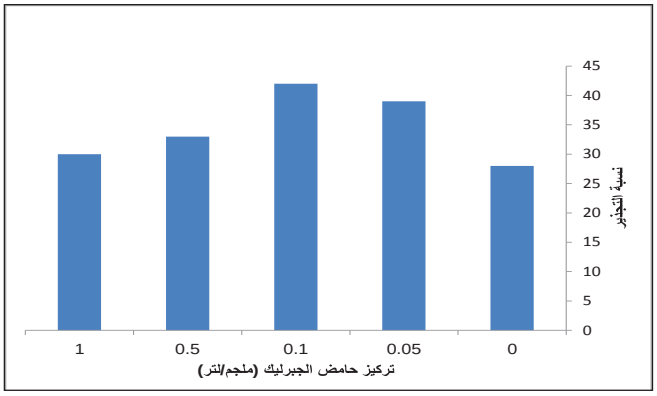
الشكل 6. تأثير حامض الجبرليك على متوسط عدد الجذور المتكونة من القمة الخضرية لهجين Nizar×24

في هجين 24xNizar اتضح من النتائج عدم وجود فروقات معنوية بين تركيزات حامض الجبرليك (الشكل 4)، أما طول النموات الخضرية فقد لوحظ وجود بعض الفروقات المعنوية إلا أن تركيزات حامض الجبرليك لم تؤد إلى زيادة معنوية مقارنة بالشاهد (الشكل 5) وهذا لا يتفق مع نتائج (Chen *et al.*, 2005) حيث وجدوا أن إضافة حامض الجبرليك كان عاملا حاسما في استطالة الأفرخ وقد يكون تفسير ذلك اختلاف الهجن المستخدمة في هذه الدراسة.

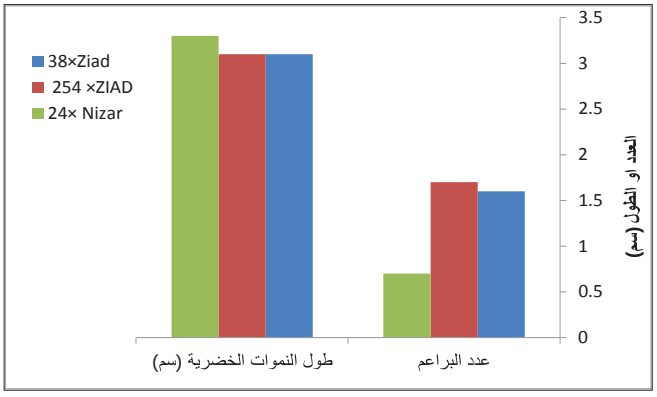
وفيما يتعلق بعدد الجذور فقد تبين أن زيادة تركيز



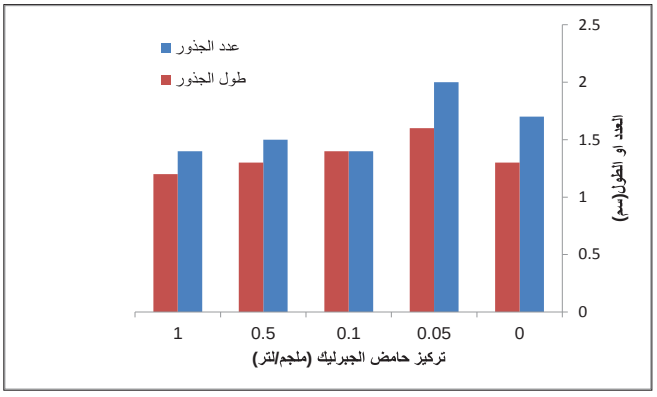
الشكل 7. تأثير هجن الفلفل على متوسط عدد البراعم وطول الجذور (سم) وعدد الجذور بعد أربعة أسابيع من الاستزراع (متوسط تركيزحامض الجبرليك).



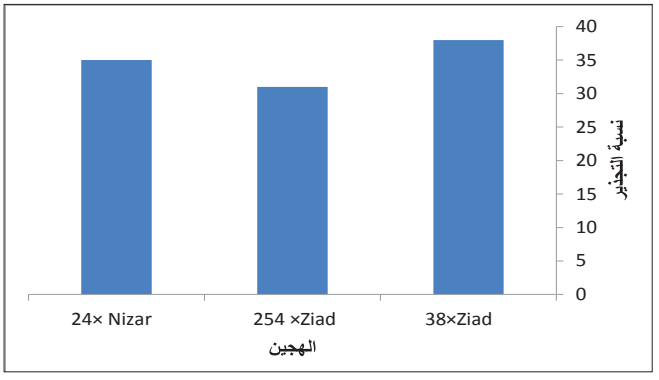
. الشكل10 . تأثير حامض الجبرليك على نسبة التجذير بعد أربعة أسابيع من الاستزراع (متوسط الهجن).



الشكل 8. تأثير هجن الفلفل على متوسط عدد البراعم وطول النموات الخضرية (سم) وعدد الجذور بعد أربعة أسابيع من الاستزراع (متوسط تركيزحامض الجبرليك).



الشكل 11. تأثير حامض الجبرليك على متوسط عدد وطول الجذور (سم) بعد أربعة أسابيع من الاستزراع (متوسط الهجن).



الشكل 9. تأثير حامض الجبرليك على متوسط عدد وطول الجذور (سم) بعد أربعة أسابيع من الاستزراع (متوسط الهجن).

حامض الجبرليك قد أدت إلى انخفاض في عدد الجذور (الشكل6). هذا وقد سجل نفس الاتجاه في الهجينين Ziad×38 و Ziad×254.

نتائج التجربة الثانية من الدراسة أوضحت تأثير كل من الهجن وتركيز حامض الجبرليك على عدد البراعم، طول الأفرخ، نسبة التجذير وعدد وطول الجذور. فمن حيث عدد البراعم، عدد الجذور وطول الجذور فان الهجينين Ziad×38 و Ziad×254 قد تفوقا على الهجين 24xNizar حيث بلغ عدد البراعم 1.6 و 1.7 وعدد الجذور 2.2 و 1.8 وطول الجذور 4.6 و 4.2 سم على التوالي, وفي هجين 24xNizar بلغ 0.7، 0.8 و3.8 سم (الشكل7) مع عدم وجود فروق معنوية في طول الأفرخ (الشكل 8)، ونسبة التجذير بين الهجن الثلاثة(الشكل 9). نستنتج من هذه النتائج أن التركيب الوراثي يلعب دورا في استجابة المستأصلات للزراعة للنسيجية وهذا يتفق مع ما ذكره (Mock and Nor-zulaani,2007) و(Ochoa- alejo and Ireat-Moreno,1990) و (Rodeva *et al.*, 2006) حيث أشاروا إلى أن التوالد في الفلفل يعتمد على التركيب الوراثي.

الشكل 12. أقلمة هجن الفلفل (يمين) ونباتات هجين Ziad×254 (يسار) بعد شهر من الأقلمة.

وقد أوضحت النتائج أن حامض الجبرليك لم يظهر أي تأثيرات معنوية فيما يتعلق بنسبة التجذير (الشكل 10) حيث تراوحت نسبة التجذير بين 28 إلى 42 %، مع وجود فروق معنوية في عدد وطول الجذور(الشكل 11) حيث وجد أن تركيز 0.05 ملغم/لتر من حامض الجبرليك أعطى أعلى عدد للجذور وبفروق معنوية عن التركيزات التي تراوحت بين 0.1 – 1.0 ملغم/لتر، و تراوح عدد الجذور بين 1.4 - 1.5 جذر لكل نبات مع عدم وجود فروق معنوية في عدد الجذور للأفرخ المزروعة على وسط يحتوي على حامض الجبرليك بتركيز 0.05 ملغم/لتر والأفرخ المزروعة على وسط خال من حامض الجبرليك حيث بلغ عدد الجذور 1.7 جذر لكل نمو نبات. أما فيما يتعلق بطول الجذور فإنه لا توجد فروق معنوية بين معاملة الشاهد والمعاملات التي يتراوح فيها تركيز حامض الجبرليك بين 0.05-0.5 ملغم/لتر إذ تراوح الطول بين 1.3- 1.6 سم مع وجود فروق معنوية بين تركيز 1.0 و 0.05 ملغ/لتر وقد بلغ طول الجذور 1.2، 1.6 سم على التوالي.

من هذه النتائج نستنتج بصفة عامة أن القمة الخضرية أعطت أفضل استجابة للنمو الخضري في الهجن الثلاثة من العقد المفردة، وان وجود حامض الجبرليك في الوسط الغذائي قد يكون له تأثير تثبيطي على نسبة التجذير وعدد الجذور وطول الجذور وهذا يتفق مع ما ذكره (كريشنا مورثي،1978) من أن حامض الجبرليك يثبط تكوين الجذور العرضية على العقل الساقية كما يتفق مع ما وجده (Gaspar *et al.*,1996b) من أن إضافة حامض الجبرليك إلى الوسط الغذائي يقلل من تكوين الجذور والأفرخ العرضية والأجنة الجسمية. أخيرا تمت أقلمة النباتات بنجاح (الشكل12).

المراجع

1. البحر، محمد كمال، فؤاد عبد الرحيم احمد ومحمود محمد صقر.1999. التكنولوجيا الحيوية النباتية – زراعة الأنسجة والهندسة الوراثية. الشركة العربية للنشر والتوزيع. الطبعة الأولى. القاهرة. ص:21.

2. كريشنا مورثى، ه.ن.1978. منظمات النمو النباتية واستعمالاتها في الزراعة. «ترجمة محمد ميلود خليفة». معهد الإنماء العربي. ص101.

3. Ashrafazzaman, M., Hossain, M.M., Ismail, M.R., Haque, M.S., Shahiduall, S.M. and Uz-zaman, S. 2009. Regeneration potential of seedling explants of chilli *(Capsicum annuum)*. Afr. J. of Biotechnol. Vol. 8 :591-596.

4. Chen, Q, Z., L. Dong, W. Liu, Z. Deng and L. Tang. 2005. Effects of exogenous plant growth regulator on in vitro regeneration of cotyledonary explants in pepper. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj, xxxiii.25-32.

5. Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F-tests. Biometrics 11:1–42.

6. Food and Agriculture Organization.2010. FAOSTAT 2010. < http://faostat.fao.org/>. Retrieved 30 March 2012.

7. Gaspar, T.; C. Kevers; C. H. Pene; H. Greppin; D.M. Reid; and T. A. Thorpe. 1996b. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue cultures. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 32:272–28.

8. Grozeva, S.; V. Rodeva; and S. Kintzios. 2009. Successful regeneration of sweet pepper *(Capsicum annuum)* in an airlift bioreactor: effect of medium phase and genotype. The Open Hort. J. 2:70-75.

9. Gunay, A.L.; and P. S. Rao. 1978. In vitro plant regeneration from hypocotyle and cotyledons explants of red pepper. Plant Sci. Lett. 11:365-372.

10. Husain, S.; A. Jain and S. L. Kothari.1999. Phenylacetic acid improves bud elongation and in vitro plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum L*. Plant Cell Rep. 19(1): 64-68.

11. Jabeen, N.; Z. Chaudhry ; H. Rashid and B. Mirza. 2005. Effect of genotype and explant type on in vitro shoot regeneration of tomato *(Lycopersicon esculentum* Mill.) Pak. J. Bot. 37(4): 899-903.

12. Kumar, V.; H.B. Gururaj; B. C. Narasimha; P. Giridhar; and G. A. Ravishankar. 2005. Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annuum* L. Sci. Hort. 106: 237–246.

13. Minitab Statistical Software. 2000. Release 13.1, Minitab Inc.

14. Mok, S. H.; and K. Norzulaani. 2007. Troubleshooting for recalcitrant bud formation In *Capsicum annuum* var. Kulai. Asia Pacific J. of Mol. Biol. and Biotechnol. Vol. 15(1): 33-38.

15. Murashige, T.; and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

16. Ochoa –Alejo, N.; and L. Ireta-Moreno. 1990. Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyls tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured in vitro. Sci. Hort. 42: 21-28.

17. Ramírez-Malagón, R.; and N. Ochoa-Alejo.1996. An improved and reliable chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. Plant Cell Rep.16:226–231.

18. Rodeva V.; G. Stanislava; and V. Todorova. 2006. In vitro answer of' Bulgarian pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. Genetika. Vol. 38(2): 129- 136.

19. Sanatombi, K.; and G. J. Sharma. 2007. Micropropagation of *Capsicum frutescens* L. using axillary shoot explants. Sci. Hort. 113: 96–99.

20. Sanatombi, K.; and G. J. Sharma. 2008. In vitro plant regeneration in six cultivars of *Capsicum* spp. using different explants. Biol. Plant.52:141–145.

21. Steinitz,B.; M.kusek;Y.Tabib;I.Paran; and A.Zelcer.2003.Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 39:296–303.

22. Thorpe,T.A.;and T.Murashige.1970. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus culture. Can. J. of Bot. 48:277-285.