دور المعاملة الحرارية في تحفيز الانقسام الخلوي وتكوين الكالس من زراعة المعلقات الخلوية لنباتات زهرة الشمس *Helianthus annuus* في قطرات الاكار المتعددة

جميلة هزاع رشيد وجدان سالم قاسم
قسم علوم الحياة – كلية التربية - جامعة الموصل -العراق

الخلاصة

نجحت الدراسة الحالية في انشاء المعلقات الخلوية المشتقة من الكالس الهش لقطع السيقان تحت الفلقية لبادرات زهرة الشمس *Helianthus annuus* L. المستحدث في وسط MS الصلب المضاف اليه ٢ملغم/ لتر من البنزايل ادنين Benzyl adenine (BA) ، ١ملغم/ لتر من نفثالين حامض الخليك (NAA) Naphthaleneacetic acid. اظهرت نتائج زراعة كثافات مختلفة من مزارع المعلقات الخلوية بالطمر في الاكار بتقانة قطرات الاكار المتعددة Multiple Drop Array (MDA) والمضاف اليها الوسط السائل ، حدوث انقسامات خلاياها وتكوينها للمستعمرات الخلوية وتطورها الى بدايات الكالس التي نقلت بنجاح الى وسط الادامة. وتراوحت نسبة تكوين المستعمرات الخلوية ٢٧.٨-٣٤.١ % ونسبة تكوين بدايات الكالس ٣٠.٣-٤٠.٢%. وتناول هذا العمل دراسة تاثير المعاملة الحرارية بتعريضها للدرجات ٢٥,٣٠,٣٥,٤٠,٤٥, ٥٠ ْم لفترات قصيرة المدى ٥ , ١٠ دقيقة واخرى طويلة المدى ١٥ , ٢٠ دقيقة. واقتصرت معاملة البرودة على درجة الصفر المئوي على انقسامات خلايا المعلقات الخلوية المزروعة بتقانة قطرات الاكار ، واظهرت النتائج ان المعاملة الحرارية شجعت انقسامات الخلايا اذ باشرت الخلايا بانقسامها الاول مبكرا وخلال ٢-٥ ايام. وان تعريض خلايا مزارع المعلقات الخلوية لنبات زهرة الشمس للمعاملة الباردة ادى الى اخفاق الخلايا في مباشرة انقسامها.

المقدمة

توفر مزارع المعلقات الخلوية نظاما جيدا لدراسة سلوك خلايا النبات بسبب وجود اعداد كبيرة من الخلايا المفردة في الوسط الغذائي السائل المستخدم في انشاء هـذه المزارع ، كما انها توفر مجالا كبيرا لمتابعة انقسام الخلايا المفردة وتوسعها وتخصصها (Gamborg و Wetter، ١٩٧٥). تمتاز نباتات زهرة الشمس عموما بسهولة استجابتـها لاستحداث الكالس من اجزائها المختلفة في الوسط الزرعي المدعم باضافة الكاينتين و ٢ ،٤ ثنائي كلوروفينوكس حامض الخليك (Mohammad و Hassan، ١٩٨٨) .

اشارت مجموعة من الدراسات الى اهمية زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من البروتوبلاست او مـن الكالس . ويعتمد نجاح هذه التقانة على كثافة الخلايا المزروعة ونـوع الوسـط الزرعي المسـتخدم (Kassnyanski و Menezel ، ١٩٩٣). لقد استخدمت تقانة قطرات الاكار المتعددة Multiple-drop-array (MDA) في زراعة بروتوبلاست الخلايا النباتية (Dixon ، ١٩٨٥) ، اذ اتبعت في زراعة بروتوبلاست السيقان تحت الفلقية لزهرة الشمس لانتاج الكالس والاجنة (Samaj واخرون ، ١٩٩٣) . وكذلك في التغلب على مشكلة صعوبة تمايز كالس الاجزاء النباتية ، فقد امكن الحصول على نباتات من كالس المعلقات الخلوية لسيقان الباقلاء (الجواري ، ٢٠٠٤). تشير مجموعة من الادلة المتـزايدة الـى التاثيـرات

الايجابية للمعاملة الحرارية في بعض الانظمة النباتية وتحفيزها للمسارات الايضية في الخلية متمثلة في بناء وتراكم بروتينات جديدة يطلق عليها Heat Shock Protein (HSP) (Lee واخرون ، ٢٠٠٠). فضلا عن الادلة التي تشير الى ان الصدمة الحرارية تحفز عملية الاكسدة وتشجع بناء انزيمات مانعة للاكسدة في عدد من النباتات حيث ان تعريض مزارع المعلقات الخلوية لنبات زهرة الشمس حتى درجة حرارة ٤٠°م مدة ٣ ساعات ادى الى بناء بروتينات جديدة (Mita واخرون ، ١٩٩٧). هدفت الدراسة الحالية الى معرفة تأثير المعاملات الحرارية المختلفة على انقسامات خلايا المعلقات الخلوية لنبات زهرة الشمس وتكوين مزارع الكالس منها باعتماد تقانة قطرات الاكار المتعددة.

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني
تاريخ تسلم البحث ٢٠٠٥/١٢/١٨ وقبوله ٢٠٠٦/٣/٢٩

مواد البحث وطرائقه

انتاج البادرات المعقمة: زرعت بذور زهرة الشمس(Sunflower (*Helianthus annuus* L. المعقمة سطحياً بوضعها على سطح ٥٠ سم^3 من وسط MS (Murashige و Skoog ، ١٩٦٢) الصلب الخالي من

منظمات النمو في قنينة بحجم ٢٥٠ سم^3 بمعدل ٣ بذور /قنينة ، وحفظت العينات في غرفة الزرع في ظروف ظلام تام ودرجة حرارة ٢٥ ± ٢°م مدة ثلاثة ايام حتى ظهور الجذير والرويشة ، بعدئذ نقلت العينات النباتية الى ظروف الضوء والظلام المتعاقب ١٦ ساعة ضوء/ ٨ ساعات ظلام وشدة اضاءة ١٥٠٠ لوكس لحين بلوغها اسبوعاً واحداً من العمر لاستخدامها مصدرا للاجزاء النباتية.

انشاء مزارع المعلقات الخلوية من كالس السيقان تحت الفلقية وادامتها: اخذت قطع بوزن ١ غم من كالس السيقان تحت الفلقية الهش الفتي بعمر ٢١ يوما والنامي في وسط الاستحداث المنتخب (MS + ١ ملغم/لتر NAA + ٢ ملغم/لتر BA) . ووضعت في دورق زجاجي حجم ١٠٠ سم^3 حاو على ٢٥ سم^3 من وسط MS السائل المضاف اليه ١ ملغم/لتر NAA و٢ ملغم/لتر BA ، سدت فوهات الدوارق بطبقتين من رقائق الالمنيوم ووضعت في الحاضنة الهزازة Shaking incubator New Brunswick USA) في ظروف ظلام تام ودرجة حرارة ٢٥±٢°م وبسرعة دورانية ١٥٠ دورة/دقيقة (Morris و Fowler ، ١٩٨١). رفعت الدوارق من الحاضنة بعد ٢٤ ساعة ورشحت من خلال منخل دقيق معقم ذي فتحات بقطر 46 µm (Plant Genetic Manipulation Group.Nott.Univ.UK) لازالة الكتل الخلوية غير المفككة والسماح بمرور الخلايا المفككة المفردة واعيدت المزارع الى الحاضنة بنفس الظروف السابقة(Gresshoff ، ١٩٨٠). اديمت مزارع المعلقات الخلوية كل اربعة ايام برفع الدوارق الزجاجية من الحاضنة ووضعها على نحو مائل مستندة الى جانب كابينة الزرع مدة ٢-٣ ساعات لاستقرار الخلايا وركودها. اعقبها التخلص من الوسط السائل عن طريق سكبه بعناية دون فقد الخلايا المستقرة ، بعدئذ اضيف الى الخلايا المترسبة ٥٠ سم^3 من وسط MS السائل المضاف اليه NAA بتركيز١ ملغم/ لتر و ٢ ملغم/لتر BA. سدت فوهات الدوارق الزجاجية واعيدت الى الحاضنة الهزازة بنفس الظروف السابقة.

تحديد كثافات مزارع المعلقات الخلوية: اخذ ١.٠ سم^3 من مزرعة المعلق الخلوي بأعمار ٢٤ و٤٨ و٧٢ و٩٦ ساعة من التحضين باستخدام ماصة دقيقة حجم ١٠٠ مايكروليتر ووضع على شريحة الهيموسايتوميتر (Labsco,W.Germany) وحسبت اعداد الخلايا في كل مرحلة من عمر المزرعة (Hinton وMoulood ، ١٩٧٩).

تقدير حيوية واحجام خلايا المعلقات الخلوية: وضعت عينة عشوائية من مزرعة المعلق الخلوي بحجم ١.٠ سم^3 على شريحة زجاجية وفحصت بالمجهر الضوئي الاعتيادي المجهز بعدسة عينية تحتوي على تدريجات قياسية Ocular micrometer لقياس احجام الخلايا (Mehmet ، ٢٠٠٠). قدرت نسبة حيوية خلايا المعلقات الخلوية باتباع الطريقة القياسية (Kanai و Edwards ، ١٩٧٣) باستخدام صبغة الايفان الزرقاء Evan blue (BDH chemical Ltd. Poole, England). واعتمدت الصيغة الاتية لحساب نسبة الحيوية.

$$\% \text{ الحيوية} = \frac{\text{المجموع الكلي للخلايا-عدد الخلايا الميتة}}{\text{المجموع الكلي للخلايا}} \times ١٠٠ \quad (\text{Paul ، ١٩٧٠})$$

تعريض المزارع الخلوية للمعاملة الحرارية: اخذت ٥ عينات حجم سم^3 / عينة من مزرعة المعلق الخلوي بكثافة اليوم الرابع من عمر المزرعة التي تراوحت بين ٣.٧-٨.٥ × ١٠ ^{3} خلية/ سم^3 ووضعت كل منها في انبوبة اختبار معقمة ، عرضت العينات لدرجات حرارية مختلفة منتخبة عشوائياً ٢٥و٣٠ و٣٥ و٤٠ و٤٥ و٥٠°م مدة ٥ و١٠ دقائق ممثلة المعاملات الحرارية قصيرة المدى ومدة ١٥ و٢٠ دقيقة ممثلةً المعاملات الحرارية (Hong واخرون ، ٢٠٠٣). تعرض انبوبة الاختبار الحاوية على العينة النباتية للمعاملة الحرارية المطلوبة بغمرها باستثناء فوهتها المقفلة في حمام مائي مثبتاً على الدرجة الحرارية المطلوبة (Irina واخرون ، ٢٠٠٢) وبعد انتهاء مدة التعريض ، ترفع الانبوبة من الحمام المائي وتوضع مباشرة في وعاء حاوٍ على ماء بدرجة حرارة الغرفة ، وعرضت خمسة عينات اخرى بنفس الحجم لدرجة الصفر المئوي بوضع الانابيب التي تحتويها في مبروش الثلج الموجود في الثلاجة ولمدد زمنية امدها صفر و٥ و١٠ و١٥ و٢٠ دقيقة. وبعد الانتهاء من تعريض جميع العينات يتم الاعداد لزراعتها.

زراعة المعلقات الخلوية بتقانة قطرات الاكار المتعددة: اخذ ١ سم^3 من مزرعة المعلق الخلوي بكثافة اليوم الرابع من عمر المزرعة ٣.٧- ٨.٥ × ١٠ ^{3} خلية / سم^3 ووضع في انبوبة اختبار معقمة واضيف اليه١ سم^3 من محلول ٣% من الاكار السائل المعقم مسبقا والموجود في حمام مائي بدرجة ٤٠°م. مزج الخليط جيدا بصورة سريعة لتجنب تصلبه ، وزع المزيج بشكل قطرات متماثلة الحجم بمعدل٨- ١٢ قطرات/طبق بتري بلاستيكي قطر ٩سم (Sterilin, UK). تركت الاطباق مفتوحة داخل كابينة الزرع لاتمام تصلب القطرات اعقبه اضافة ٦ مل من وسط MS السائل المضاف اليه ١ ملغم/ لتر NAA و٢ ملغم/ لتر BA

لكل طبق مع مراعاة عدم غمر القطرات بالوسط السائل (Dixon ، ١٩٨٥). غلقت الاطباق وسدت بالبارافيلم وحفظت العينات في ظروف درجة الحرارة ٢٥ ±٢°م وشدة اضاءة ٧٠٠-٨٠٠ لوكس في نظام الاضاءة المتعاقب ، فحصت الخلايا دوريا لملاحظة بدء الانقسام. اديمت مزارع المعلقات الخلوية المطمورة في الاكار مرة كل اربعة ايام بازالة الوسط السائل القديم من الاطباق بواسطة ماصة معقمة والتعويض عنه باضافة ٦ مل من الوسط الجديد ذاته الى حين ظهور بدايات الكالس.

النتائج والمناقشة

تكوين مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية وادامتها: اظهرت النتائج ان الوسط MS+ ١ ملغم/ لتر NAA +٢ ملغم/ لتر BA الصلب كان مشجعاً لاستحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية بنسبة ١٠٠% وتكوينه لمزارع الكالس الهش واعتمد وسط الاستحداث وسطاً لادامة الكالس. ان نباتات زهرة الشمس امتازت بسهولة استحداثها للكالس من قطع سيقانها تحت الفلقية باستخدام وسط MS معززاً بالاضافات المناسبة من منظمات النمو اذ تمكن الباحثون من استحداث الكالس من السيقان تحت الفلقية والاجنة (Muller واخرون ، ١٩٩٨). ان الحصول على مزارع الكالس بسهولة في العديد من الانواع النباتية لا يعني بالضرورة سهولة تمايزه. فعلى سبيل المثال تعد نباتات الفلفل سريعة في استحداثها للكالس وصعبة في تمايزها (Al-Mallah و Yozbacki ،٢٠٠١) بينما امتازت نباتات عنيب الذيب *Solanum nigrum* التابعة للعائلة الباذنجانية بسهولة تكوين الكالس وسرعة تشكل هذا الكالس وانتاج النباتات منه (Al-Mallah و Salih ،٢٠٠١). واوضحت نتائج انشاء مزارع المعلقات الخلوية ان هذا الكالس الهش كان مناسبا جدا للحصول على هذه المزارع في وسط MS السائل لسهولة تفككه مما ادى الى الحصول على كثافات عالية من الخلايا فقد اشارت مجموعة من الدراسات الى نجاح الوسط السائل االمدعم بتداخلات متنوعة من NAA, BA في تكوين مزارع المعلقات الخلوية من كالس الاوراق الفلقية لزهرة الشمس (Siefert و Grossmann ، ١٩٩٧) وكذلك الوسط MS السائل المدعم بتداخلات من البنزايل ادنين BA ٢ ، ٤ ثنائي كلوروفينوكسي حامض الخليك في تكوين مزارع المعلقات الخلوية من كالس السيقان تحت الفلقية لزهرة الشمس.

حساب كثافات مزارع المعلقات الخلوية :اظهرت نتائج حساب كثافات مزارع المعلقات الخلوية طيلة عمر المزرعة ان كثافة المزرعة عند انشائها كانت ٣.٠×١٠^{3} خلية/سم^{3} ازدادت الى ٨.٥×١٠^{3} خلية/سم^{3} في اليوم الرابع. اعقبها عدم تزايد كثافة الخلايا مع تقدم عمر المزرعة في اليومين الخامس والسادس (الجدول١) واعتمدت كثافة اليوم الرابع فقط في كافة تجارب زراعة المعلقات الخلوية كما سيرد لاحقاً.

حساب احجام وحيوية خلايا المعلقات الخلوية: اظهرت النتائج ان احجام خلايا المعلقات الخلوية المنتخبة عشوائياً تراوحت بين ٤٤.٥-٤٦.٤ µm بينما تراوحت حيوية خلايا المعلقات الخلوية في اليوم الرابع بين ٩٠-٩٧% (الجدول ٢).

انقسامات خلايا المعلقات الخلوية في قطرات الاكار المتعددة: اظهرت النتائج انشاء مزارع من المعلقات الخلوية حاوية على اعداد كبيرة من الخلايا المفككة (الشكل١.أ) واظهرت زراعة كثافة اليوم الرابع من المزرعة البالغة ٧.٣ - ٨.٥×١٠^{3} خلية/سم^{3} مباشرة خلاياها بالانقسام الاول بعد ٥ ايام من الزراعة وتكونت الخلايا البنوية المتساوية في الحجم (الشكل١.ب) وحصول الانقسام الثاني بعد ٢٤ ساعة على حدوث الانقسام الاول وتكوينها المرحلة ثلاثية الخلية (الشكل١.جـ) لتتطور بعد يومين الى المرحلة رباعية

الجدول (١): كثافات مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات زهرة الشمس النامية في وسط MS السائل المضاف اليه ١ ملغم/لتر NAA و٢ ملغم/لتر BA لمدة اسبوع من نموها.

عمر المزرعة (يوم)	الكثافة (×١٠^{3}خلية/سم^{3})	عمر المزرعة (يوم)	الكثافة (×١٠^{3}خلية/سم^{3})
الاول	٣.٠*	الرابع	٨.٥
الثاني	٥.٣	الخامس	٨.٥
الثالث	٧.٦	السادس	٨.٥

*تمثل القيم الواردة في الجدول معدل ٣ مكررات/ عينة

الجدول (٢): احجام وحيوية خلايا المعلقات الخلوية في اليوم الرابع من العمر المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات زهرة الشمس باستخدام صبغة الايفان الزرقاء.

العينات	الحيوية(%)	حجم الخلايا(µm)	العينات	الحيوية(%)	حجم الخلايا (µm)
العينة الاولى	٩٠*	٤٥.٦*	العينة الثالثة	٩٤	٤٦.٤
العينة الثانية	٩٢.٢	٤٤.٥	العينة الرابعة	٩٧	٤٤.٤

*تمثل القيم الواردة في الجدول معدل ٣ مكررات/عينة

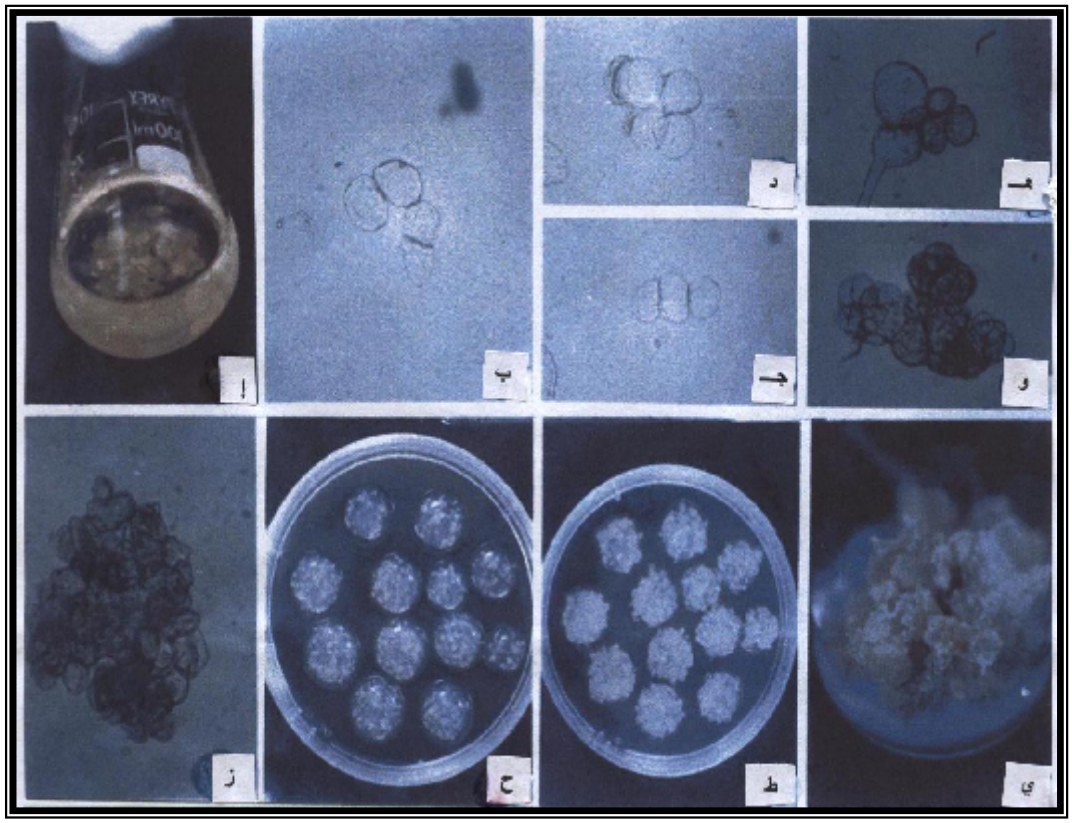
الخلية (الشكل١.د). التي امتازت بحيويتها (الشكل١.هـ). وتوالت الانقسامات الخلوية مبتدئة بنشوء المستعمرات الخلوية (الشكل١.و) في اليوم العاشر من الزراعة وزيادتها بالحجم (الشكل ١.ز) لتتطور بعد ٥ ايام من تكوينها اولى بادئات الكالس التي تمثل قطعا صغيرة من الكالس مطمورة في قطرات الاكار الصلب (الشكل١.ح) لتبلغ نسبة استحداث هذا الكالس ٤١.٦% وازدادت احجام هذه البادئات من الكالس بعد ٦٠ يوما من الزراعة (الشكل١.ط) واتصف الكالس المطمور في القطرات بقوامه الهش وبلونه الاخضر الفاتح.

تكوين الكالس من زراعة المعلقات الخلوية المعرضة للمعاملة الحرارية قصيرة المدى: عموما اظهرت نتائج زراعة خلايا المعلقات الخلوية بكثافة اليوم الرابع من عمر المزرعة المعرضة مسبقاً للمعاملات الحرارية في قطرات الاكار الصلب والمضاف اليها الوسط السائل قدرة هذه الخلايا في تحمل المعاملات الحرارية المعرضة لها بدلالة دخولها في الانقسامات الخلوية بصورة مبكرة. وتشير النتائج (الجدول ٣) ان المعاملة ٣٠°م/٥ دقائق سببت انخفاض في اعداد المستعمرات الخلوية وزيادة اعداد بادئات الكالس التي اتصفت بصغر حجمها. بينما اظهرت المعاملة ٣٠°م/١٠ دقائق تأثيراً مشابهاً. وادى رفع درجة الحرارة الى ٣٥°م ولنفس فترات التعريض الى سلوك الخلايا المعاملة سلوكاً مماثلاً لسلوكها في المعاملة السابقة واشارت النتائج ايضاً الى حدوث تأثيرات مشجعة لهذه المعاملات انعكست في زيادة اعداد المستعمرات الخلوية ترتب عنها زيادة اعداد بادئات الكالس باستثناء المعاملة ٥٠°م لمدة ٥ دقائق اذ ادت الى انخفاض واضح في اعداد بادئات الكالس المتكونة مقترنة بصغر احجامها.

الجدول (٣): تاثير المعاملات الحرارية قصيرة المدى في انقسامات خلايا مزارع المعلقات الخلوية لنباتات زهرة الشمس *Helianthus annuus* المطمورة في قطرات الاكار المتعددة.

المعاملة (°م / دقيقة)	القطرات المزروعة	المستعمرات الخلوية	بادئات الكالس	القطرات المستحدثة	استحداث الكالس (%)
المقارنة *	١٢٠	١٤٧	٤١	٥٠	٤١.٦
٥/٣٠	١١٠	١٠٧	٤٣	٥٠	٤٥.٤
١٠/٣٠	١١٠	١١٣	٤٩	٦٧	٦٠.٩
٥/٣٥	١٣٠	٦٧	٣٢	٥٩	٤٥.٣
١٠/٣٥	١٣٠	٥٥	٢٩	٦٦	٥٠.٧
٥/٤٠	١١٠	١١٥	٩٧	٧٠	٦٣.٦
١٠/٤٠	١١٠	٢١١	١١٧	٨٧	٧٩.٠
٥/٤٥	١٣٠	١٨٣	١٦٤	٨٣	٧٧.٠
١٠/٤٥	١٣٠	١٧٢	١٤٨	١٠١	٧٧.٦
٥/٥٠	٧٠	١٨٥	١٤٣	٤٥	٦٤.٢
١٠/٥٠	٧٠	٩٥	٨٤	٢٩	٤١.٤

القيم الواردة في الجدول تمثل الاعداد الكلية لمعدلات ٥ مكررات/ معاملة.
المقارنة تمثل العينات التي لم تعامل بالحرارة.



الشكل (1): زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات زهرة الشمس بطريقة الطمر في قطرات الاكار المتعددة.

(أ): مزرعة المعلق الخلوي المشتق من الكالس الهش بعمر ٢١يوم في وسط MS السائل المضاف اليه١ ملغم/لتر NAA و ٢ ملغم/لتر BA. (ب): الانقسام الاول لخلايا مزارع المعلقات الخلوية وتكوين خليتين بنويتين بعد ٥ ايام من الزراعة. (جـ): مواصلة الانقسام الخلوي للخلية في(ب) وتكوينها مرحلة ثلاثية الخلايا. (د): تطور الخلية في (جـ) وتكوينها مرحلة رباعية الخلية. (هـ): خلايا المعلق الخلوي مصبوغة بصبغة الايفان الزرقاء (لاحظ تلون الخلايا باللون الازرق دلالة على موت هذه الخلايا). (و): بدء تكوين المستعمرات الخلوية الناتجة من المرحلة (هـ) من استمرار الانقسامات الخلوية. (ز): تطور المستعمرات الخلوية. (ح): تكوين بادئات الكالس في قطرات الاكار بعد ٣٠ يوما من الزراعة. (ط): زيادة حجم بدايات الكالس المتكونة في (ح) مسببة تشقق قطرات الاكار وانفصالها عنه بعد ٦٠ يوما من الزراعة. (ي): قطع الكالس بعد نقلها من قطرات الاكار الى وسط الادامة بعمر ٧٥ يوما. (قوة التكبير x٤٠).

تكوين الكالس من زراعة المعلقات الخلوية المعرضة للمعاملة الحرارية طويلة المدى: اظهرت النتائج (الجدول ٤) ان تعريض مزارع المعلقات الخلوية للدرجات الحرارية ٣٠, ٣٥ , ٤٠ , ٥٠ْم ولفترات ١٥ و٢٠ دقيقة /معاملة شجعت عموماً انقسامات الخلايا وصولاً الى تكوين المستعمرات الخلوية التي تطورت لاحقاً الى بادئات كالس باستثناء الدرجة الحرارية ٥٠ْم وللفترتين ١٥ و ٢٠ دقيقة حيث سببت انخفاضاً واضحاً وبالذات للفترة الثانية على التوالي. وتميزت بادئات الكالس المتكونة من المعاملة ٣٠ْم / ١٥ دقيقة بكبر حجمها قياساً بعينة المقارنة واتصفت بلونها الأخضر المائل الى الابيض بينما تلك المتكونة من المعاملة ٣٠°م/ ٢٠ دقيقة اتصفت بلونها الاخضر الفاتح.

وبالنسبة للمعاملة ٣٥°م/ ١٥ و ٢٠دقيقة فقد بدأت الخلايا المزروعة انقسامها بعد خمسة ايام من الزراعة اعقبه انقسامها الثاني بعد اربع وعشرين ساعة من حدوث الانقسام الاول. وتوالت بقية انقساماتها لتنتهي بتكوين المستعمرات الخلوية في اليوم الحادي عشر من الزراعة، وظهرت بدايات الكالس في اليوم الثامن عشر من الزراعة في حين كان ظهورها في المعاملة الحرارية قصيرة المدى ٣٥°م/ ٥ و ١٠ دقيقة في

الجدول (٤): تاثير المعاملات الحرارية طويلة المدى في انقسامات خلايا مزارع المعلقات الخلوية لنباتات زهرة الشمس *Helianthus annuus* المطمورة في قطرات الاكار المتعددة.

المعاملة (°م / دقيقة)	القطرات المزروعة	المستعمرات الخلوية المتكونة	بادئات الكالس المتكونة	القطرات المستحدثة للكالس	استحداث الكالس (%)
المقارنة *	١١٠	١٤٠	٤.٥٦٠ ± ٣٦	٤٥	٤٠.٩
١٥/٣٠	١٠٠	١٩٦	٦.٧٦٠ ± ١٥٦	٤٣	٤٣.٠
٢٠/٣٠	١٠٠	١١٤	٤.٨٤٧ ± ٩٨	٥٠	٥٠.٠
١٥/٣٥	١٢٥	١٨٥	٦.٣٤٨ ± ١٦٢	٥٦	٤٠.٠
٢٠/٣٥	١٢٥	١٩٦	٥.٥٩٤ ± ١٠٧	٤٥	٣٦.٠
١٥/٤٠	١٣٠	١٦٠	٣.٨٤٧ ± ٧٨	٤٠	٣٠.٧
٢٠/٤٠	١٣٠	١٥٠	٢.٦٨٣ ± ٨٤	٤٥	٣٤.٦
١٥/٤٥	١٥٠	١٤٨	٥.٠١٨ ± ١٣٠	٤٠	٥٣.٣
٢٠/٤٥	١٥٠	١٦٩	٢.٧٨٣ ± ١٥٠	١٠٠	٦٧.٠
١٥/٥٠	٥٥	٥	٢ ±صفر	١٠	١٨.١
٢٠/٥٠	٥٠	صفر	صفر	صفر	صفر

القيم الواردة في الجدول تمثل الاعداد الكلية لمعدلات ٥ مكررات/ معاملة.
المقارنة تمثل العينات التي لم تعامل بالحرارة. ± الانحراف القياسي.

اليوم الرابع عشر من الزراعة. واتصفت بدايات الكالس المتكونة في المعاملة ٣٥°م/١٥ دقيقة بلونها الاخضر الزاهي. وقد شجعت المعاملة ٣٥°م/ ٢٠ دقيقة تكوين هذه البادئات ليصل عددها ١٠٧ قطعة اتصفت بلونها الاخضر الزاهي بينما تلك الناتجة من المعاملة ٤٠°م/١٥ دقيقة اتصفت بلونها الاخضر الفاتح. ان التأثير الايجابي للمعاملات الحرارية كافة لانقسام خلايا المعلقات وتكوينها اعداد كبيرة من المستعمرات الخلوية وبدايات الكالس قد يعزى الى تأثيرها في بناء بروتينات خاصة في خلايا المعلقات الخلوية لنبات زهرة الشمس (Coca واخرون ، ١٩٩٦). او من المحتمل ان يعزى تاثيرها في زيادة نفاذية الجدار الخلوي لعنصر الكالسيوم والمواد الغذائية (Mita واخرون ،١٩٩٧) والتي تؤدي الى زيادة في انقسامات الخلايا (Thompson واخرون ،١٩٨٩).

وقد يفسر انحراف المعاملة الحرارية ٥٥°م/٢٠ دقيقة في عدم تشجيعها انقسام خلايا المعلقات الخلوية الى حدوث تلف للبروتينات كما حصل في تعريض خلايا المعلقات الخلوية لنبات الجزر لدرجات حرارية عالية ٥٠ , ٥٥ , ٦٠ °م مدة ٣٠ دقيقة التي ادت الى موتها بسبب تلف بروتينات الخلايا وتحطيم انزيماتها (Soloman واخرون ،١٩٩٩).

زراعة المعلقات الخلوية المعاملة بالبرودة في قطرات الاكار المتعددة: اظهرت نتائج زراعة خلايا المعلقات بالكثافة ٣.٧-٨.٥ ×١٠ ^{٣} خلية/سم ^{٣} والتي سبق تعريضها لدرجات حرارية منخفضة عدم تشجيع هذه المعاملة لانقسامات الخلايا. ومن المتوقع ان يكون سبب توقفها عن الانقسام عند تعريضها لمعاملات البرودة حصول نقصان في انسيابية المواد الغذائية الى داخل الخلايا (Mura و Los ،١٩٩٧) او ربما يسبب تصلب جدرانها كما حدث في المعلقات الخلوية لنبات الجت (Monroy واخرون ،١٩٩٣). يستنتج من هذه الدراسة انها وضعت بروتوكولاً واضحاً لتسخير المعاملة الحرارية في تحفيز انقسام مزارع المعلقات الخلوية والذي قد يكون مناسباً في التغلب على مشكلة عدم انقسام الخلايا في بعض الانظمة النباتية.

ROLE OF HEAT SHOCK IN STIMULATION DIVISION OF SUNFLOWER *Helianthus annuus* AND CALLUS FORMATION IN AGAR MULTIPLE DROP ARRAY

J. H. Rasheed W. S. Kassim
Dept. of Biology, College of Education, Univ. of Mosul, Iraq

ABSTRACT

In this study, cultures of friable callus derived from hypocotyls explants of *Helianthus annuus* L. seedlings were readily obtained. It was observed that Murashige & Skoog medium supplemented with (BA) Benzyl adenine and (NAA) Naphthaleneacetic acid with different concentration encouraged the formation of callus. This friable callus used in obtaining cell suspension cultures in liquid MS medium containing 1.0 mg/ L BA, 2.0 mg /L NAA. The cells started their first division after 24hours and continued their division. Density of these cells reached to 7.33-8.50 x 10^3 cell / ml at the fourth day of age. The results of culturing cell suspension by embedding them in agar using Multiple Drop Array (MDA) technique proved the suitability of this method. Cells begin the first division within 5-6 days and continued their division until the formation of cell colonies, Which then developed to form callus primordia. The work have studied the effect of exposing cell suspension to heat shock. The treated suspensions were cultured by following MDA technique. Results indicated that heat shocked cell begin the first division at 2-5 days and increase the total number of cell colonies and callus primordias compared to the untreated samples (control).

المصادر

الجواري، سهلة محمد زيدان (٢٠٠٤). الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان مع بلازميدات Ri في الحصول على نباتات الباقلاء *Vicia faba* L. المحولة وراثيا.اطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة الموصل.

Al-Mallah, M.K. and G.S.Al-Yozbacki (2001). In vitro callus induction from *Capsicum annum* seedling (sweet and chilipepper). J. Biotechnology Res., 3:34-44.

Al-Mallah, M.K. and S.M. Salih (2001). *Agrobacterium rhizogenes* as a natural vector for genetic transformation of *Solanum nigrum* L. Plants. The first Scientific Conference, National Board for Biotechnological Research. 18-19 Sept. 2001, Baghdad, Iraq.

Coca, M.A.; C. Almoguera,; T.L Thomas,.and J. Jorano (1996). Differential regulation of small heat shock gene in plant: analysis of water-stress-inducible and developmentally activated sunflower promoter. Plant Mol. Biol. 31: 836-870.

Dixon, R.A.(1985). Plant Cell Culture, A Practical Approach. IRL Press, Oxford. Washington DC.

Gamborge, O.L. and L.R. Wetter (1975). Plant Tissue Culture Methods. Published by the National Research Council of Canada.

Gresshoff, P. M.(1980). In vitro culture of whit clover :callus ,suspension, protoplast culture, and plant regeneration. Bot..Gaz 115 : 157-164.

Hinton, G.C.F. and B.K. Moulood (1979). A modified membrane filtration in marine and water ecosystem. Tropical Ecology.197: 192-194.

Hong, T.L. L. Bing, L.Zhong, L. Xiao,; L. Rui,; S. Da-Ye, and G. Ren (2003). Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat. Plant Physiol. 132: 1186-1195.

Irina, I.P., A.V. Roman, and S. Friedrich (2002). Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expresion and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis.* Plant Physiol. 129: 838- 853.

Kanai, R. and G.E. Edwards (1973). Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C3, C4 and CAM plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two phase system. Plant Physiol. 52: 84-90.

Kasnyanski, S. and L. Menezel (1993). Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyle protoplast of sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plant Cell Repts. 12: 260- 263.

Lee, B.H, S.H.Won, S. Lee. and M. Miyao (2000). Expression of the chloroplast- localized small heat shock protein by oxidative stress in rice. Gene. Bio. 245: 283-290.

Mehmet, B. (2000). Protoplast isolation in Lupin (*lupinus mutabilis* sweet) determination of optimum explant sources and isolation conditions. Turk. J. Bot. 30: 177-185.

Mita, G.; G. Nocco,; C.Leuci, V. Greco, P. Rampiro,and C. Perrotta (1997). Secreted heat shock proteins in sunflower suspension cell cultures. Plant Cell Repts. 16: 792-796.

Mohamad, A.M.S. and H.A. Hassan (1988). Effect of some standard and prospective growth regulators on sunflower callus. Initiation and growth. J. Univ. Kuwait (Sci). 15:69-77.

Monroy, A.F., S. Farhan and R S. Dhindsa (1993). Cold- induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation and gene expression. Plant

Physiol. 102: 1227-Morris, P. and M.W.Flower (1981). A new method for the production of fine plant cell suspension culture. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 1: 15-24.

Muller, A., C.Shuster, M. Iser, S. Fürst, M. Jach, and D.Hess (1998). Regeneration from different explants of sunflower *Helianthus annuus* and first transformation experiments. Proceeding of the fourth European Conference on Sunflower Biotechnology. 20: 66-78.

Mura, P. and D. A. Los (1997). Membrane fluidity and temperature perception. Plant Physiol. 45:875-879.Murashiga, T. and F.Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. Physiol. Planta. 15:473-479.

Paul, J.(1970). Cell and Tissue Culture. London,Univ.Press, U.K.Samaj, J., A. Okolot, M. Bobak, and Y.U. Gleba (1993). Increase of callus and embryoid production from hypocotyls protoplast of sunflower *Helianthus annuus* L. by culture in microdrops. Biologica Planta36: 183-190.

Siefert, F. and K. Grossmann (1997). Induction of chitinase and beta-1,3-glucose activity in sunflower suspension cell in response to an elicitor from *Phytophora megasperma* L. Spp. glycinea. Evidence for regulation by ethylene and 1-minocyclopropre-1-carboxylic acid. J. Exp. Bot. 48: 2023-2029.

Soloman, M.,B.Belenghi, M.Delledon and E.Menachem (1999). The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plant. Plant Cell Repts.11: 431-444.

Thompson, J.A., R.Abdullah,W.H.Chen, and K.M.Gartland(1989). Enhanced protoplast division in rice (*Oryza sativa*) following heat shock treatment. J.Plant.Physiol. 127: 367-370.