مشتقات من الترايازولات محضرة مختبرياً بدلا عن السايتوكاينينات القياسية في استحداث ونمو الخلايا المفردة والمعلقات الخلوية لنبات الخس *(Lactuca sativa L.)*

جميلة هزاع البياتي **عبد المطلب سيد محمد**

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2003/7/26 ، تاريخ القبول 2003/11/1)

الملخص

اكتشف إن عدة مواد مشتقة من مركبات الترايازولات محضرة محليا تستخدم عوضا عن السايتوكاينينيات المستوردة في الوسط الغذائي لإنشاء المعلقات الخلوية والخلايا المفردة لنبات الخس. وان إضافة NAA إلى وسط MS الحاوي على مركبات الترايازولات كل على حدة كان له دوراً مشجعاً في إنشاء المعلقات الخلوية وانقسامها وبدرجة تفوق تأثير المنظمات القياسية. وشجعت هذه المركبات انقسام خلايا المعلقات الخلوية وبلغت أعلى كثافة للخلايا بوجود مركب E بتركيز 10^{-4} مولار 21.1×10^3 خلية/سم^3، مقارنة بمقدار 17.0×10^3 خلية/سم^3 بوجود مركب G بتركيز 10^{-10} مولار و 11.7×10^3خلية/سم^3 بوجود مركب F بتركيز 10^{-4} مولار قياساً بمقدار 8.8×10^3خلية / سم^3 في الوسط القياسي خلال فترة (6) أيام من النمو.

وتؤكد نتائج الدراسة الحالية في هذا المضمار إن إضافة مركبات الترايازولات شجعت بدرجة كبيرة لحد ما حيوية الخلايا المفردة وانقسامها بصورة مماثلة للخلايا النامية في الوسط القياسي. وحفزأيضاإضافة مركبات الترايازولات عوضاً عن السايتوكاينينات بوجود NAA انقسام الخلايا النامية في قطرات الاكار مع استمرارها في الانقسام لحين تكوين الكالس. وتراوحت نسبة استحداث الكالس ما بين 18-47% مقارنة بذلك المستحدث على الوسط القياسي (63%). ويمكن تطبيق تقانة الخلايا المفردة باستخدام مركبات مصنعة محليا بوصفها بدائل عن استخدام السايتوكاينينات المستوردة. ومن الممكن تطبيقها في أنظمة الزراعة النسيجية الأخرى للعديد من النباتات أيضا.

Labrotary Prepared Trizoles Derivatives Used Instead of Standard Cytokinin in the Initiation and Growth of Single Cells and Suspension Culture of Lettuce Plant *(Lactuca sativa L.)*

Jamela H. Al-Bayati **Abdul Mutalib S. Mohammad**
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

It was found that different derivatives from Triazoles produced locally can be used instead of the imported cytokinins in the medium for initiation of cell suspension and single cell of lettuce plant.

Addition of NAA to MS media containing the triazoles derivative enhanced greatly the initiation of cell suspension and division better than the effect of standard growth regulators. Moreover, these compounds sustain the cell division in the systems used. The density of the cells in the suspension medium reached 21.1 X 10^3 cell/cm^3 in the presence of compound E, 17.0 X 10^{-3} cell/cm^{-3} with compound G and 11.1 X 10^3 cell/cm^3 with compound F in contrast with 8.8 X 10^3 cell/cm^3 in the standard medium after 6 days of growth.

The results indicate that addition of these compounds increased greatly the viability of the single cell system in the same way as in the case of the standard medium. Addition of these compounds instead of standard cytokinins with NAA stimulates the growth of the cells grown on Agar-Drop system with the formation of callus with the lapse of growth period. The initiation of callus by this method was between18 to 47 % as compared with 63% in the standard medium.

It can be concluded that these prepared compounds can be used as a new growth regulators instead of the standard cytokinins. These compounds can be used in the other tissue culture system for different plants.

المقدمة

إن اتجاهات زراعة الأنسجة النباتية تعتمد لحد ما على الغاية في القيام بها وهي الحـصول علـى الكالس، المزارع الخلوية، النباتات الكاملة في المرستيم، البادئات الورقية، البـراعم الجانبيـة، الجـذور، البروتوبلاست وغيرها من الأجزاء النباتية. حيث يتطور الكالس لتكوين الأفرع الخضرية أو الجـذور او كليهما معاً اعتماداً على منظمات النمو المستخدمة (المعري 1995).

تعد تقنية زراعة المعلقات الخلوية أحد أساليب الزراعة النسيجية المهـمة لبيان دور منظمات النمو في انقسام الخلايا واستحداث الكالس، وتستحدث عادة بنقل قطعة في نسيج الكالس غير المتخصص الـى وسط غذائي سائل يتم تحريكه باستعمال الوسائل المختلفة (Dixon, 1985). ويعد الكـالس الهـش غيـر متماسك القوام مفضلاً في انشاء مزارع المعلقات الخلوية وذلك لان خلاياه تكون غير مرتبطة بعضها مع

البعض ومن الممكن تفكيكها الى تجمعات خلوية صغيرة أو حتى احادية بواسطة التحريك في الوسط الغذائي السائل (محمد وعمر، 1990). وقد أمكن إنشاء العديد من المزارع الخلوية وبكفاءة عالية في العديد من الانواع النباتية، الجزر (Murashige ,1974) والكرفس (Williams and Collin, 1976) ونباتات الرودبيكا (Al-Atabee and Power, 1987).

وعموماً يمكن القول أن منظمات النمو لها دور مهم في انقسام الخلايا واستحداث ونمو الكالس والتغيير بمستوياتها المضافة يؤثر في تمايزه أو الحصول على النباتات الكاملة. وتشير العديد من الدراسات ان بعض المركبات الكيمياوية المعروفة بوصفها مبيدات اعشاب ودورها أو سلوكها كمنظمات نمو (أوكسينات) عند استخدامها بتراكيز واطئة. ومن الامثلة البارزة على ذلك مركب 4,2 –ثنائي الكلورفينوكسي حامض الخليك (2,4-D) ومشتقاته الذي استخدم كاوكسين في استحداث الكالس في انسجة نبات زهرة الشمس (حسن، 1981).

واستخدمت كذلك مركبات كيمياوية محضرة مختبرياً لبيان تأثيرها كمنظمات نمو جديدة (Mohammad and Hassan, 1988a,1988b) فضلا عن استخدام مركبات كيمياوية متعددة (Sulfanilamide) في زيادة التفرعات الخضرية والجذور في قطع نبات الفجل والخس والكمثرى والتفاح (سليمان، 2001؛ محمد والصالح، 2000؛ محمد وجماعته، 2000). فضلا عن استخدام مركبات جديدة من مشتقات مركبات الترايزولات والذى ثبت دورها كسايتوكاينينات خلال تحفيزه لاستحداث ونمو كالس نبات الخس (الوتار، 2000؛ احمد، 2002). ومعظم مركبات الترايازولات تُظهر الفعالية الحيوية والوظيفية من خلال السلسلة الجانبية التي من الممكن ان تكون محورة بشكل إضافي. وتظهر فعالية عالية كمنظمات نمو اعتمادا على التركيب الجزيئي الا انها تختلف اعتماداً على النظام الاختباري المستخدم وان هذه التأثيرات التنظيمية يمكن أن تختلف اعتماداً على التراكيز المستخدمة (Alexieva,et al., 1994 ,Sankhla,et al., 1994).

وعموماً يمكن القول أن مركبات الترايزولات لها دور معين في تنظيم نمو النبات لحد ما ولا يوجد ما يشير الى ان هذه المركبات أو مشتقاتها قد استخدمت فعلا في تقنية زراعة الانسجة. لذلك يعد مهما واساسيا اختبارها لبيان دورها بوصفها منظماً للنمو لاستخدامها كبدائل محضرة محليا عن منظمات النمو القياسية المستوردة. لذا فقد تواصلت الدراسات على اختبار مجموعة من مشتقات مركبات الترايزول المصنعة مختبريا من قبل Noori عام 1999 باضافتها بوجود منظم نمو قياسي أوكسين ودراسة تأثيراتها في استحداث الكالس في زراعة خلايا المعلقات الخلوية المستحدثة من كالس نبات الخس.

استخدم نبات الخس في هذه الدراسة كنظام لاختبار تأثير مركبات الترايزولات وذلك لانه سريع الاستجابة لاستحداث الكالس وتمايزه فضلا عن توفر الظروف المثلى لانشاء زراعة انسجته (Mohammad and Abood, 1989). قدمت حديثا دراسة على مشتقات من مركبات الترايزولات على انها تعمل بصورة مشابهة لتأثير السايتوكاينينات في زراعة الانسجة النباتية (احمد، 2002) لذلك تهدف

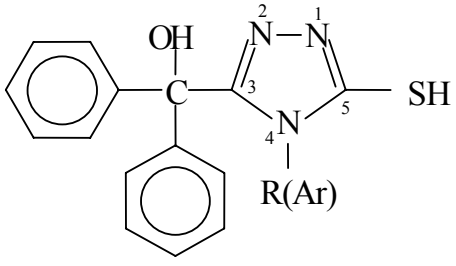
الدراسة الحالية الى تحديد كفاءة مجموعة اخرى من مركبات الترايزولات المصنعة محليا والمختلفة تركيبيا عن تلك المستخدمة سابقا ودورها في انشاء المعلقات الخلوية فضلا عن استخدام تقنية زراعة الخلايا المفردة (single cell culture) للكشف عن فعالية هذه المركبات بصورة مباشرة على الخلية.

مواد وطرائق العمل

استخدمت بذور نبات الخس (*Lactuca sativa L.*) النقية وراثيا للحصول على بادرات معقمة. نميت البذور بعد تعقيمها بالكحول الاثيلي (% 95) والخالية من الملوثات على وسط غذائي معقم (محمد وجماعته، 2000؛ Arnon and Haogland, 1944.) في حاضنة النمو وبدرجة حرارة 2 ± 25 درجة مئوية استحدث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية والحاوية على عقدة واحدة وبطول 0.5 سم وحسب طريقة (Mohammad and Abood, 1989) وسط MS (Murashige and Skoog, 1962) ومضافا اليه NAA بتركيز 3×10^{-4} مولار و BA بتركيز $4x10^{-6}$. وعد هذا الوسط وسطا قياسيا للمقارنة مع الاوساط الاخرى المستخدمة. اضيفت مشتقات مركبات الترايازولات الى الاوساط الغذائية بتركيز 10^{-4} و 10^{-6}، 10^{-8} او 10^{-10} مولار بدلا عن الـ NAA تارة وتارة اخرى عن BA المضافة الى الوسط القياسي.

مشتقات مركبات الترايازولات المستخدمة:

استخدمت مركبات عضوية مشتقة من 1،2،4-ترايازول محضرة مختبريا في قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة الموصل وحسب الطريقة المستعملة من قبل Norri عام 1999 واستخدمت سبعة من هذه المركبات التي لم يتم اختبار فعاليتها الحيوية بوصفها منظمات نمو نباتية في مجال زراعة الانسجة سواء داخل القطر أو خارجه، وحسب المعلومات المتوافرة. ان التركيب الاساس لجميع هذه المركبات العضوية حاوٍ على حلقتي فنيل (phenyl) فضلا عن مجموعة الثايول (SH)، المرتبطة بالحلقة غير المتجانسة. وجميع المركبات العضوية المستخدمة في هذه الدراسة لها نفس التركيب الكيميـاوي الرئيس (الشكل 1)، وتختلف فقط باحلال المجموعات في الموقع رقم (4) في حلقة الترايازول وكما موضح في الجدول (1).



الشكل 1: التركيب الاساس للمركب.

الجدول 1: تشخيص مركبات الترايازول بالطرائق الفيزياوية.

الرمز	الاحلال في الموقع (4) R (Ar)		الوزن الجزيئي M. W.	درجة الانصهار M.P.C°
	الاسم	الرمز الكيمياوي		
A	Methyl	(CH_3)	297	279-280
B	4-Ethyl phenyl	($CH_3CH_2C_6H_4$)	287	237-8
C	Ethyl	(CH_2CH_3)	311	225-6
D	Allyl	($CH=CH_2-CH_3$)	323	196-7
E	Amino	(NH_2)	298	240-1
F	4-chloro phenyl	($CL-C_6H_4$)	293	210-211
G	Phenyl	(C_6H_5)	259	216-7

استحداث مزارع المعلقات الخلوية:

تم اتباع طريقة Fowler و Morris (Morris and Fowler, 1981)، في تحضير المعلقات الخلوية لكالس نبات الخس وذلك بأخذ 1غم من الكالس الهش الفتي وبعمر 21 يوماً والنامي على الوسط القياسي ووضعه في دورق معقم ذي سعة 250 سم^3 حاوٍ على 50 سم^3 من وسط B5 (Gamborg *et al.*, 1968) المضاف اليه NAA بتركيز $3x10^{-6}$ مولار وBA بتركيز $4x10^{-6}$ مولار. كما استخدمت عينة كالس اخرى بوزن اغم ووضعت في دورق زجاجي حجم 250 سم^3، حاو على 50سم^3 من وسط MS القياسي مضافاً اليه NAA بتركيز $3x10^{-6}$ مولار و BA بتركيز $4x10^{-6}$ مولار. استخدمت الطريقة المذكورة سابقاً باضافة المركبات العضوية (الترايازولات) المستخدمة مع NAA بتركيز $3x10^{-6}$ مولار بدلاً عن منظمات النمو المستخدمة الاخرى. حفظت الدوارق بجهاز الحاضنة الهزازة Shaking incubator من نوع New Brunswick USA بظروف ظلام تام ودرجة حرارة 25±2 °م وسرعة دورانية بمقدار 150 دورة لكل دقيقة. رفعت الدوارق من الحاضنة الهزازة بعد مرور 24 ساعة واعيد زرعها وذلك بترك خلايا المعلق الخلوي مدة 4 ساعات بحالة ساكنة (Gresshoff, 1980; Rper, 1979). سكب الوسط القديم ورشحت بواسطة منخل دقيق معقم ذي فتحات بقطر 46 µm (Plant Genet. Manipulation, Group, Nott. Univ. UK) والتي تسمح بمرور الخلايا المفككة المنفردة بهذه الاحجام وكذلك تعمل على عزل الكتل الخلوية الكبيرة غير المفككة. جمعت الخلايا المفردة واكمل الحجم بنفس الوسط إلى 100سم^3 واعيدت إلى الحاضنة الهزازة، ثم اخذت عينات بعد فترة 24، 48، 72 ساعة من النمو لتقدير كثافة المعلق الخلوي للتعرف على نمو الخلايا وانقسامها وبلوغها الطور النشط Log phase من اجل تحديد عمر مزرعة المعلق الخلوي لغرض زراعته لاحقاً.

زراعة المعلق الخلوي بتقنية قطرات الاكار المتعددة:

تتضمن هذه التقنية مزج حجم معين من المعلق الخلوي مع حجم محدد من مزيج الاكار السائل ثم زراعته بشكل قطرات مفردة، مضافاً اليها حجم معين من الوسط الغذائي السائل (Dixon, 1985).

تحضير الاكار السائل:

استخدم مسحوق الاكار (Fluka UK) باذابة 3 غم اذابة كاملة في 100سم^3 من الماء المقطر. عقم المزيج بالمعقام في درجة حرارة 120 °م، وضغط (1كغم/سم^3، 20 دقيقة) ثم حفظ في حمام مائي بدرجة 40 °م لابقائه بحالة سائلة لحين الاستخدام.

تحضير مزرعة المعلق الخلوي:

اخذت عينات من مزرعة المعلق الخلوي الناشئة من الكالس الفتي لنبات الخس المزروعة في الوسط القياسي (المقارنة) وكذلك من الوسط الحاوي على المركبات المستخدمة بوجود NAA بتركيز $3x10^{-6}$ مولار فقط.

استخدمت افضل التراكيز للمركبات العضوية المختلفة والمستخدمة في هذه الدراسة اعتماداً على تأثيراتها في استحداث ونمو الكالس، وكما موضح في الجدول (2).

زراعة المعلق الخلوي في القطرات:

اخذ حجم 1 سم^3 من مزرعة المعلق الخلوي ونفس الحجم من الاكار السائل بدرجة حرارة 40 °م. مزج الخليط جيداً في انبوبة اختبار وبصورة سريعة حرصاً على عدم تصلب الاكار. سحب المزيج ووضع بشكل قطرات متماثلة الشكل يتراوح عددها ما بين 8 إلى 10 قطرة في كل طبق. استخدمت اطباق بتري البلاستيكية وبقطر 5cm لهذه العملية وترك الطبق مفتوحاً داخل كابينة الزرع لاتمام تصلب القطرات . واضيف لكل طبق 3سم^3 من وسط MS السائل القياسي لعينات المقارنة واضيف ايضاً 3 سم^3 من وسط MS السائل المدعم بمزيج من NýAA بتركيز $3x10^{-6}$ مولار والتركيز الامثل لكل مركب من مركبات الترايازول المستخدم (الجدول 1) مع ملاحظة عدم غمر القطرات بالوسط السائل (Dixon, 1985).

الجدول 2: كالس نبات الخس النامي على الاوساط الغذائية الحاوية على التراكيز المثلى لمركبات الترايازولات المستخدمة في استحداث المزارع الخلويةبوجود NAA.

رمز المركب	التركيز (مولار)	تركيز NAA (مولار)
A	10^{-8}	$3x10^{-6}$
B	10^{-10}	$3x10^{-6}$
C	10^{-6}	$3x10^{-6}$
D	10^{-6}	$3x10^{-6}$
E	10^{-4}	$3x10^{-6}$
F	10^{-4}	$3x10^{-6}$
G	10^{-10}	$3x10^{-6}$

غلقت الاطباق بالبارافلم وحفظت العينات بدرجة 25 °م وشدة اضاءة 700-800 لوكس بفترة 16 ساعة ضوء 8 ساعة ظلام، فحصت العينات دورياً لملاحظة بداية الانقسام وتسجيل البيانات اللازمة والبدء بعملية ادامة المزارع.

ادامة مزارع المعلقات الخلوية:

تمت عملية ادامة هذه المزارع بعد بدء الانقسام الاول الذي حدد بعد 3 ايام من الزراعة وتمت الادامة الدورية كل اربعة ايام بازالة الوسط والتعويض عنه بكمية جديدة من الوسط ذاته حتى ظهور بدايات تكوين الكالس.

تكوين الكالس في القطرات:

ظهرت بدايات الكالس في القطرات نتيجة انقسام خلايا المعلق الخلوي انقسامات متتالية اعقبها تطور هذه البدايات إلى قطع صغيرة من الكالس والتي تلاحظ بالعين المجردة، وتمت ازالة هذه القطع بعد مرور شهرين على تكونها في المزرعة.

النتائج

انشاء مزارع المعلقات الخلوية:

استخدم كالس نبات الخس الهش النامي على الوسط القياسي بعمر 21 يوماً لتحضير مزارع المعلقات الخلوية ، واستعملت اوساط MS و B5 السائلة لهذا الغرض . وتشير النتائج إلى فشل وسط B5، في استحداث المعلقات الخلوية على الرغم من كافة المحاولات التي شملت اختبار تراكيز مختلفة من منظمات النمو القياسية NAA و BA، وبالتراكيز القياسية في استحداث الكالس. فضلاً عن اختبار ظروف حفظ العينات من شدة اضاءة، حركة دورانية ذات سرع مختلفة واستخدام اعمار متباينة من الكالس، مقارنة بوسط MS السائل.

استخدام املاح MS في الوسط السائل بوجود منظمات النمو القياسية:

اظهرت النتائج ان وسط MS السائل بكامل قوته التركيبية الحاوي على منظمات النمو القياسية NAA بتركيز $3x10^{-6}$ مولار و BA بتركيز $4x10^{-6}$ مولار، كان مناسباً بصورة واضحة لتكوين المزارع الخلوية من خلال الفحوصات المجهرية الدورية لعينات من مزارع المعلقات الخلوية للتعرف على بدء انقسام الخلايا وزيادة اعدادها.

تشير النتائج إلى ان اعلى معدل لانقسام الخلايا تم بعد مرور 72 ساعة (الشكل 1،2)، وبلغت كثافة الخلايا مقدار 8.8×10^3 خلية /سم^3. وحصل تناقص تدريجي في اعداد هذه الخلايا بزيادة عمر المعلق. بينما لم يحفز استخدام وسط MS الخالي من منظمات النمو خلايا مزارع المعلقات الخلوية على الانقسام مطلقاً.

تأثير اضافة مركبات الترايازول إلى وسط انشاء المزارع الخلوية:

يبدو واضحاً ان اضافة جميع مركبات الترايازولات المستخدمة باستثناء مركب D، عوضاً عن السايتوكاينين (BA) وبوجود NAA بتركيز $3x10^{-6}$ مولار، شجع بدرجة متفاوتة انقسام الخلايا النامية في وسط MS المستخدم في انشاء مزارع المعلقات الخلوية. (الشكل2) فضلاً عن ان اضافة هذه المركبات بالتراكيز المثلى لها في استحداث كالس نبات الخس، ادى إلى زيادة في اعداد خلايا مزارع المعلقات الخلوية من خلال متابعة نموها عن طريق الفحص المجهري الدوري لعينات من هذه المزارع.

تأثير اضافة مركب A:

اظهرت النتائج ان اضافة مركب A إلى وسط MS السائل بتركيز 10^{-8} مولار بوجود NAA ($3x10^{-6}$ مولار)، شجع انقسام خلايا المعلق الخلوي. وبلغت كثافة المعلق الخلوي 8.2×10^3 خلية/سم^3، بعد 24 ساعة من النمو مقارنة بمقدار 6.5×10^3 خلية/سم^3 عند بدء الزراعة. وبدأت اغلبية الخلايا (70%) الانقسام الاول وتواصلت عمليات الانقسام الثاني والثالث في الايام اللاحقة. وبلغت اقصى كثافة لها 9.7×10^3 خلية/سم^3 عند اليوم الثالث. اعقبها بعد ذلك انخفاض تدريجي في معدلات الانقسام (الشكل 2, a).

تأثير اضافة مركب B:

حفزت اضافة مركب B بتركيز 10^{-10} مولار إلى وسط انشاء المعلقات الخلوية انقسام الخلايا بعد 24 ساعة من النمو، وبلغ مقداره 10%. وذلك باستطالتها ودخولها في الانقسام الاول، واستمرت هذه الخلايا بالانقسامات المتتالية حتى بلغت اعلى كثافة لخلايا المزرعة 7.6×10^3 مولار بوجود هذا المركب عند اليوم الثالث. وتوقفت الخلايا عن الانقسام بعد ذلك بدلالة انخفاض كثافة خلايا المعلق في اليوم الرابع والخامس (الشكل 2, b).

تأثير اضافة مركب G:

يشير (الشكل 2, g) إلى ان اضافة مركب g بتركيز 10^{-10} مولار لها تأثير مشابه تماماً لوجود مركب E بتركيز 10^{-4} مولار، في تشجيع انقسام خلايا المعلقات الخلوية.

استحداث الكالس من المعلقات الخلوية المزروعة بتقنية قطرات الاكار المتعددة:

أظهرت الفحوصات التي اجريت على خلايا المعلقات الخلوية المزروعة بهذه التقنية توالي انقسامات خلاياها وتكوينها للمستعمرات الخلوية حتى تكوين بادئات الكالس التي امكن ملاحظتها بالعين المجردة (الصورة 1). وبصورة عامة فقد اظهرت غالبية خلايا المعلقات الخلوية المزروعة بهذه التقنية استجابة واضحة لتأثير مشتقات الترايازول بوجود NAA بتركيز $3x10^{-6}$ مولار، ولظروف التقنية المستخدمة بدلالة الانقسامات الخلوية وتكوين الكالس.

تكوين الكالس في الوسط القياسي:

أشارت النتائج إلى حصول الانقسام الاول في الخلايا بعد مرور 5 ايام من الزراعة وبلغت نسبة الانقسام 80%. وتواصلت هذه الخلايا انقساماتاً متتالية لحين تكوين المستعمرات الخلوية بعد حوالي 30 يوماً من تاريخ الزراعة. وظهرت اولى بادئات استحداث الكالس بعد 45 يوماً. وأمكنت رؤيته بصورة واضحة بعد 60 يوماً. بلغت نسبة استحداث الكالس 63% (الجدول 3). واستمر الكالس المتكون بالزيادة في الحجم محدثاً تشققاً في قطرات الاكار، وامتاز الكالس المتكون بلونه الاخضر الفاتح (الصورة 1،1).

جدول 3: استحداث الكالس لنبات الخس من المعلقات الخلوية النامية في وسط MS السائل بتقنية قطرات الاكار المتعددة بعد 60 يوماً من النمو.

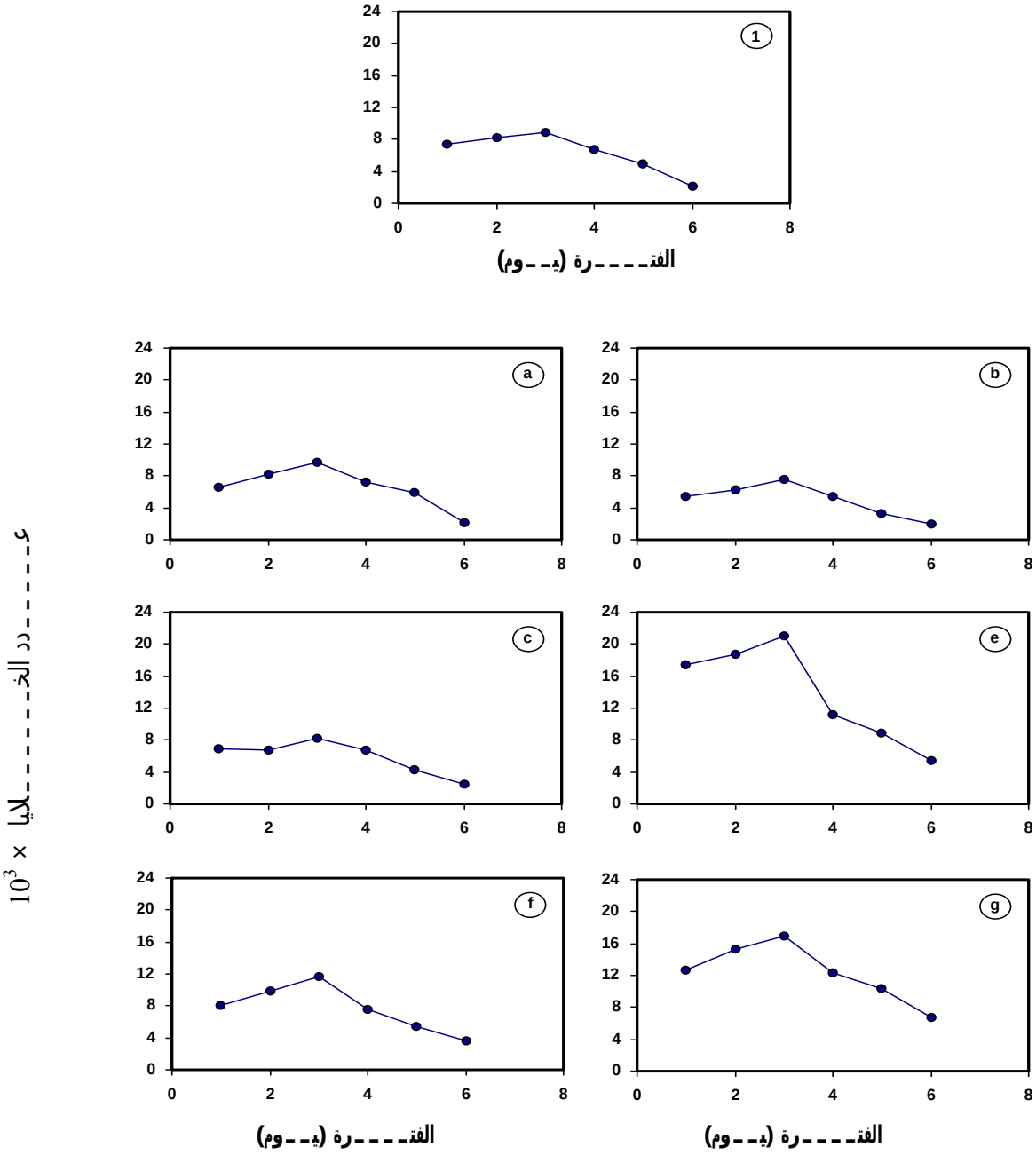
الوسط المستخدم	عدد القطرات المزروعة*	عدد القطرات المستحدث الكالس	الفترة (يوم)	الاستحداث (%)
وسط MS الخالي من منظمات النمو	35	0	60	0
وسط MS الحاوي على منظمات النمو القياسية	35	22	60	63

- معدل عدد القطرات 8-10 قطرة اكار/طبق.

تكوين الكالس باستخدام مركبات الترايازول:

ادى استخدام مركبات الترايازول في زراعة خلايا المعلقات الخلوية بتقنية قطرات الاكار المتعددة، إلى استحداث الكالس من هذه المزارع بصورة متشابهة للوسط القياسي، عدا مركب D (الصورة 1،d). وكانت نسبة استحداث الكالس متفاوتة اعتماداً على نوعية مركبات الترايازول المضافة وتراوحت ما بين 18-47% (الجدول 4). واستغرق استحداث الكالس باستخدام هذه المركبات بين 43-58 يوماً مقارنة بمدة 45 يوماً عند استخدام الوسط القياسي (الجدول 3). واستمرت بادئات الكالس بالنمو والزيادة في الحجم محدثة أيضاً تشققاً في قطرات الاكار ورؤيته بالعين المجردة. وبدا الكالس المتكون باستخدام مشتقات الترايازول A، B، C من النوع الهش في بنيته وامتاز بلونه الاخضر الفاتح (الصورة 1، c،b،a).

في حين كان لون الكالس المستحدث باستخدام المشتقات E، F، G من مركبات الترايازولات يتراوح بين الابيض والاخضر الفاتح، وقوامه الهش (الصورة 1، e، f، g).



الشكل 2: منحنى نمو المعلقات الخلوية لكالس نبات الخس النامية على اوساط MS السائلة والحاوية على منظمات النمو القياسية أو مركبات الترايازولات بوجود NAA بتركيز $3x10^{-6}$ مولار ولفترة ستة ايام من بدء الزراعة.

ملحق توضيحي للشكل (2): (1) مزرعة المعلق الخلوي النامية في وسط MS المدعم بـ NAA بتركيز $3x10^{-6}$ مولار وBA بتركيز $4x10^{-6}$ مولار (المقارنة). (a) مزرعة المعلق الخلوي النامية في وسط MS السائل الحاوي على مركب A بتركيز 10^{-8} مولار بوجود NAA. (b) كما في (a.) وبوجـود مركـب B بتركيز 10^{-10} مولار. (c) كما في (a.) وباضافة مركب C بتركيز 10^{-6} مولار. (d) لم يحفز مركـب D نمو خلايا مزرعة المعلق. (e) كما في (a.) وباضافة مركب E بتركيز 10^{-4} مولار. (f) كمـا فـي (a.) وباضافة مركب F بتركيز 10^{-4} مولار. (g) كما في (a.) وباضافة مركب G بتركيز 10^{-10} مولار.

وقد لوحظ احياناً نشوء الجذور من الكالس المستحدث بوجود مركب F، والكالس المستحدث من الوسط القياسي. رفعت قطع الكالس من قطرات الاكار، ووضعت على سطح اوساط MS الصلب، الحاوية على المنظمات القياسية (المقارنة) تارة، وتارة اخرى بوجود مركبات الترايازولات، وقد تواصلت قطع الكالس بالنمو وزيادة حجمها.

الجدول 4: استحداث الكالس لنبات الخس من المعلقات الخلوية النامية في وسط MS السائل مضافاً اليه منظمات النمو القياسية أو مضافاً اليه مركبات الترايازولات وبالتراكيز المختلفة بعد مضي 60 يوماً من النمو.

الوسط المستخدم	عدد القطرات المزروعة*	عدد القطرات المستحدثة للكالس	الفترة (يوم)	الاستحداث (%)
وسط MS الخالي من منظمات النمو (مقارنة)	35	0	60	0
وسط MS الحاوي على منظمات النمو القياسية (مقارنة)	35	22	45	63
وسط MS الحاوي على مركبات الترايازول				
مركب A	52	19	55	36
مركب B	40	19	57	47
مركب C	37	12	58	32
مركب D	40	0	60	0
مركب E	63	14	48	22
مركب F	22	4	43	18
مركب G	33	8	45	24

* معدل عدد القطرات 8-10 قطرة لكل/طبق.

المناقشة

ان منظمات النمو المتمثلة بمجموعة الاوكسينات والسايتوكاينينات المعروفة منذ زمن بعيد قد أثبتت كفاءتها من خلال النجاحات التي حققتها في زراعة انسجة العديد من الانواع النباتية. ويعد استنباط منظمات نمو مصنعة جديدة (اوكسينات او سايتوكاينينات) مهما جدا لاستخدامها في انظمة زراعة الانسجة لتضاف الى قائمة المنظمات القياسية. لذلك استخدمت في هذه الدراسة مجموعة من مركبات كيميائية مشتقة من مجموعة الترايازولات المصنعة مختبريا للتحري عن تأثيرها في نظام زراعة انسجة الخس.

ويمثل ذلك حلقة اضافية من حلقات التحري في ايجاد منظمات نمو جديدة فضلا عن ما وجد سابقا (احمد، 2002؛ الوتار، 2000 ؛ بواص، 1998).

الصورة (1): استحداث الكالس من المعلقات الخلوية النامية على وسط MS السائل بوجود منظمـات النمو القياسية (NAA و BA) أو مركبات الترايازولات بتقنية قطرات الاكار المتعددة بعد مضي 60 يوماً.

(1) الكالس المتكون (الجزء المؤشر) وتكوين الجذور للمعلقات الخلوية النامية على الوسط القياسي

(a) الكالس المتكون (الجزء المؤشر) للمعلقات الخلوية بوجود مركب A بتركيز 10^{-8} مولار بدلا عن BA.

(b) كما في a. (الجزء المؤشر) بوجود مركب B بتركيز 10^{-10} مولار بدلا عن BA.

(c) كما في a. (الجزء المؤشر) بوجود مركب C بتركيز 10^{-6} مولار بدلا عن BA.

(d) عدم تحفيز مركب الترايازول D لتكوين الكالس وبعمر 60 يوما .

(e) كما في .a (الجزء المؤشر) بوجود مركب E بتركيز 10^{-4}مولار بدلا عن BA .

(f) كما في .a (الجزء المؤشر) بوجود مركب F بتركيز 10^{-4} مولار بدلا عن BA.

(g) كما في .a (الجزء المؤشر) بوجود مركب G بتركيز 10^{-10} مولار بدلا عن BA.

ويعد مهما عند اختيار فاعلية مركب او عدة مركبات كيميائية جديدة في زراعة الأنسجة النباتية الاعتماد بصورة رئيسية على استحداث ونمو وتمايز الكائن لنظام محدد مسبقا الاحتياجات اللازمة لانشائه. فضلا عن ان التحري عن ايجاد منظمات نمو مصنعة جديدة ذات جدوى اقتصادية كبيرة جدا ذلك لانها تمتلك العديد من المميزات المهمة التي تميزها عن منظمات النمو الطبيعية (احمد، 2002) ومن هذه المضمار تم اختبار فعالية سبعة من مشتقات مركبات الترايازولات المحضرة مختبريا بوصفها بدائل عن الاوكسينات او السايتوكانينات في زراعة المعلقات الخلوية والخلايا المفردة لكالس نبات الخس واستخدمت هذه المركبات باضافتها مع تراكيز قياسية من NAA لمعرفة تأثيرها على المعلقات الخلوية لنبات الخس ومقارنة كفاءتها وسلوكها التشجيعي او التثبيطي لذلك النبات على الوسط القياسي . فضلا عن امكانية استخدامها بدلا عن الاوكسينات او السايتوكانينات القياسية المستوردة.

ويعد نظام المعلقات الخلوية من الانظمة المهمة جدا في هذا المضمار وخاصة تقنية زراعة الخلايا المفردة (Single cell culture) وذلك من خلال اعطاء دليل مباشر على تأثير هذه المركبات على المستوى الخلوي مقارنة بتلك النامية على الاوساط القياسية. فضلا عن تأثيرها في استحداث ونمو الكالس كدليل آخر لبيان كفاءتها مقارنة بتلك النامية على الاوساط الغذائية القياسية (Moore, 1979; Salisbury and Ross, 1992). وتشير الدراسة إلى ان تأثير المركبات الكيميائية المضافة من مشتقات الترايازولات قيد الدراسة كان واضحا من خلال دورها المباشر في تحفيز انقسام الخلايا المنشئة لمزارع المعلقات الخلوية باستثناء مركب D. مقارنة بدراسة سابقة تظهر ان معاملة خلايا المعلقات الخلوية لنبات الكرفس بمركب PBZ وثلاثة مركبات اخرى من مشتقات الترايازولات تسبب في انخفاض النمو وتراكم انواع معينة من الستيرولات (Steroles) يرافقها انخفاض في مستوى الستيرولات الاخرى مما يؤدي الى توقف نمو خلاياها (Yates et al., 1993). ان التأثير المشجع لمركبات الترايازولات قيد الدراسة في انشاء المعلقات الخلوية المشتقة في كالس نبات الخس يؤكد ان هذه المركبات ليس لها أي تأثير مثبط لنمو الخلايا وان تراكيزها المضافة مع NAA بالتراكيز القياسية كانت مناسبة جدا لاستمرار انقسام خلايا المعلقات الخلوية. واشارت دراسات اخرى الى ان الحاجة ضرورية لاضافة تراكيز عالية من مركبات الترايازولات للمعلقات الخلوية لنبات الشعير للتغلب على المفعول المثبط للستيرولات (Grossmann, 1992). وتشير دراسة اخرى الى ان تثبيط انقسام الخلايا في المعلقات الخلوية بواسطة تراكيز عالية من مركبات الترايزولات يتحكم من خلال التغيرات الحاصلة بتخليق الستيرولات التي تؤدي الى حصول تحورات في خصائص الاغشية الخلوية (Grossmann, 1992). وعلى الرغم من ان دور الستيرولات في عملية نمو النبات وتطوره غير معروفة بشكل واضح فقد يعزى السبب الى تأثير الترايازولات في تخليق الستيرولات (Davis and Curry, 1991) واعتمادا على ما سبق يمكن ان يفسر دور مركبات الترايازولات (بتراكيزها المحددة قيد الدراسة) على انه السبب الرئيس لحد ما في اظهار سلوك مماثل لسلوك منظمات النمو القياسية وتأثيرها في بناء الستيرولات في المعلقات الخلوية لنبات

الخس. ويبدو واضحا ان انقسام خلايا المعلقات الخلوية المعدة لهذا الغرض بوجود مركبات قيد الدراسة وخاصة الانقسام الأول واستمرارها في الانقسام يماثل ذلك بوجود منظمات النمو القياسية. وتؤكد هذه الدراسة التأثير المشجع لهذه المركبات في الانقسام الخلوي لخلايا نبات الخس وعدم تأثيرها في الحيوية بصورة مشابهة لتلك في الوسط القياسي. وقد يعزى هذا الى توفر الظروف المناسبة لانقسام الخلايا بقابليتها على الاحتفاظ بطاقتها الجينية (genetic potentialities) وكذلك بطاقتها التي تحفزها على الانقسام (Wareing and Phillips, 1978). أوضح العديد من الباحثين في مجال زراعة الخلية والانسجة النباتية ان أي خلية نباتية حرة يمكن ان تتطور الى نبات كامل عن طريق اتباع التقنيات العديدة المستخدمة في زراعة الانسجة اذا ما توفرت لها المتطلبات اللازمة لانقسامها من وسط غذائي مناسب وبوجود تراكيز مناسبة في منظمات النمو القياسية (Dodds and Robert, 1985). وتشير الدراسة الى ان المركبات قيد الدراسة كان لها دور مشجع وملائم لانشاء المزارع الخلوية وبدرجة تفوق وجود منظمات النمو القياسية. اذ احتل مركب E بتركيز 10^{-4} مولار المرتبة الاولى وبلغت اعلى كثافة له 21 x 10^3 خلية/سم^3، بينما احتل مركب Gبتركيز 10^{-10} مولار المرتبة الثانية وبلغت اعلى كثافة له x 10^3 17.0خلية/سم^3، مقارنة بمقدار 8.8 x 10^3 خلية/سم^3 في الوسط القياسي، وتؤكد نتائج هذه الدراسة ان الطريقة المتبعة في زراعة خلايا المعلقات الخلوية بتقنية قطرات الاكار المتعددة (Dixon, 1985) باضافة تراكيز محددة لكل هذه المركبات على حدة مع NAA عوضا عن السايتوكاينين الى الوسط الغذائي المتضمن تحفيز انقسام الخلايا المزروعة واستمرارها في الانقسام وصولاً الى استحداث الكالس، فقد بلغت نسبة استحداث الكالس في الوسط القياسي % 63 مقارنة بمقدار تراوح بين 0-47 % اعتمادا على نوع وتركيز مركبات الترايازولات المضافة الى الوسط الغذائي. ان استمرار انقسام الخلايا واستحداث الكالس في قطرات الاكار لهذه التقنية يؤكد لحد ما حصول حالة الاتزان في مستوى مركبات الترايازولات المضافة الى الاوساط الغذائية وهذا ما يؤيد سلوكها وقيامها بدور السايتوكانين بسبب تشجيعها لانقسام الخلايا وامكانية استخدامها كبدائل للمنظمات القياسية المستخدمة (احمد، 2002؛ الوتار، 2000). ان الطريقة المعتمدة في زراعة خلايا المعلقات الخلوية في هذه الدراسة تشجع انقسام الخلايا المفردة على تكوين الكالس في العديد من النباتات بصورة مماثلة لدرجة كبيرة تمايز الكالس لنبات الجزر المستحدث من زراعة الخلايا المعلقة (Chandra and Soni, 1983). واستنادا الى النتائج السابقة يستنتج ان استجابة خلايا المعلقات الخلوية بتقنية قطرات الاكار المتعددة للانقسام بوجود NAA بالتركيز القياسي ومركبات الترايازولات عوضا عن السايتوكانينات طريقة ملائمة ومناسبة جدا في زراعة الخلايا المفردة ولبيان التأثير المباشر والواضح لمركبات الترايازولات في حيوية وانقسام الخلايا واستمرار الانقسام ومرور الخلية بسلسلة من الانقسامات المتتالية وتكوين المستعمرات الخلوية وصولا الى تكوين الكالس خلال فترة النمو المحددة . وتشير النتائج في هذا المضمار الى ان اضافة مركب F بتركيز 10^{-4} مولار بوجود NAA ادى الى تمايز خلايا المعلق الخلوي الى الكالس والجذور بصورة مماثلة لذلك في الوسط القياسي.

ومما تجدر الاشارة اليه ان الدراسة الحالية تنفرد باستخدام تقنية زراعة الخلايا المفـردة (Single cell culture) والتي تعد من التقنيات الحديثة والمهمة لبيان دور مركبـات الترايـازولات كمنظمـات نمـو محضرة محليا لاستخدامها كبديل او بدائل عن منظمات النمو القياسية والمستخدمة عمومـا فـي انظمـة زراعة الانسجة النباتية.

وبناءا على ما تقدم يمكن الاستنتاج ان هذه الدراسة قد اضافت الى مجموعة منظمات النمو النباتيـة منظمات نمو جديدة محضرة محليا (مختبريا) تناظر القياسـية او تفوقهـا الـى حـد مـا, لاسـتخدامها كسايتوكانينات جديدة في نظام زراعة انسجة نباتات الخس عوضا عن السايتوكانينات القياسية او ربما في انظمة زراعة الانسجة النباتية الاخرى.

شكر وتقدير

نتقدم ببالغ الشكر والتقدير للأستاذ الدكتور موفق ياسين شندالة وللأستاذ الدكتور مقداد توفيق أيوب وللدكتور مؤيد سالم الجوادي لتحضيرهم المواد المستخدمة في الاكتشاف.

المصادر العربية

احمد، اميرة اسماعيل، 2002. استخدام ثمانية مركبات من مشتقات الترايازولات محضرة مختبريا بـدلا من السايتوكانينات القاسية في استحداث كالس نبات الخس (*Lactuca sativa* L.). ونموه وتمايزه. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم. جامعة الموصل، العراق.

المعري، خليل وجيه، 1995. اكثار النخيل بوساطة تقنيات زراعة الانسجة النباتية. جامعة دمشق، سوريا.

الوتار، مي طه حامد، 2000. نجاح احد مشتقات الترايازولات في نمو وتمـايز كـالس نبـات الخـس (*Lactuca sativa* L.). رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

بولص، مناهل فوزي، 1998. حامض بنتادانويك (PDA) كمنظم نمو جديد محضر مختبرياً فـي نمـو وتمايز كالس نبات الخس (*Lactuca sativa* L.). رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصـل، العراق.

حسن، هلياء علي، 1981. تأثير بعض منظمات النمو القياسية منها والمحتملة التأثير على استحداث ونمو كالس نبات عباد الشمس. رسالة ماجستير. كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

سليمان، ازهار حسين علي، 2001. دور بعض منظمات النمو ومركبات الترايازول والسلفانيل اميد فـي نمو وتمايز الكالس ومحتوى فيتامين C في نبات الفجل *Raphanus sativus* . رسـالة ماجـستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

محمد، عبد المطلب سيد، الصالح، هناء سعيد وعبود، ساجدة عزيز، 2000. دور مركب السلفانيل اميد في زيادة الافرع الخضرية لنبات الخس والتفاح والكمثرى بطريقة زراعة الانسجة. مجلة علوم الرافدين، المجلد 11، العدد 1، ص 15-36.

محمد، عبد المطلب سيد والصالح، هناء سعيد، 2000. دور مركب السلفانيل اميد في زيادة الجذور للافرع الخضرية لنباتي التفاح والكمثرى بطريقة زراعة الانسجة. مجلة علوم الرافدين، المجلد 10، العدد 2، ص 1-15.

محمد، عبد المطلب سيد وعمر، مبشر صالح، 1990. المفاهيم الرئيسة في زراعة الخلايا والانسجة والاعضاء للنبات. مطبعة جامعة الموصل، العراق.

المصادر الاجنبية

Al-Atabee, J.S. and Power, J.B., 1987. Plant regeneration from protoplasts of *Dimorphotheca* and *Rudbekia*. Plant Cell Repts., Vol.6, pp.414-416.

Alexieva, V., Sergiev, I., Karanove, E., Golovinsky, E. Stanoeva, E., Haimove, M. and Petrov, G., 1994. Anticytokinin activity of 4-substituted Triazole [4,5-d] pyrimidines and 4-substituted pyrazolo [3,4-d] pyrimidines. J. Plant Growth Regual., Vol.13, pp.123-129.

Arnon, D.I. and Hoagland, D.R., 1944. The investigation of plant nutrition by artificial culture methods. Bio. Rev., Vol.19, pp.55-67.

Chandra, N. and Soni, J.R., 1983. Differentiation in callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota*) and fennel (*Foeniculum vulgare*). Advancing frontiers plant sciences, Proceedings National Symposium on Advancing Frontiers of Plant Sciences, Jodhpur, India., p.134-135.

Davis, T.D. and Curry, E.A., 1991. Chemical regulation of vegetative growth. Crit. Rev. Plant Sci., Vol.10, pp.151-188.

Dixon, R.A., 1985. Plant Cell Culture, A practical approach. IRL PRESS, Oxford. Washington DC.

Dodds, J.H. and Roberts, L.W., 1985. Experiments in Plant Tissue Cultures. Cambridge University Press, UK.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K., 1968. Nutrient requirement of suspension culture of soybean root cells. Exp. Cell Res., Vol.50, pp.151-158.

Gresshoff, P.M., 1980. In vitro culture of white clover: callus, suspension, protoplasts culture, and plant regeneration. Bot. Gaz., Vol.141, pp.157-164.

Grossmann, K., 1992. Plant growth relatedants. Their Mode of Action and Benefit for Physiological Research. p.788-797. In: Karssen C.M., Van Loon, L.C. and Vreugdenhil, D. (eds.). Progress in Plant Growth Regulation, Kluwer Academic Publ. Netherlands.

Mohammad, A.M.S. and Abood, S.A., 1989. Propagation of lettuce (*Lactuca sativa* L.c.v. longiflora) by tissue culture. E. ESCWA, ID, 89 Conf. 1110.

Mohammad, A.M.S. and Hassan, H.A., 1988a. Effect of some standard and prospective growth regulator on sunflower callus. I. Initiation and growth. J. Univ. Kuwait (Sci.), Vol.15, pp.69-77.

Mohammad, A.M.S. and Hassan, H.A., 1988b. Effect of some standard and prospective growth regulators on sunflower callus. II. Changes in protein. RNA. DNA and carbohydrate content. J. Unv. Kuwait (Sci.), Vol.15, pp.281-290.

Moore, T.C., 1979. Physiology and Biochemistry of Plant Hormones. Academic Press, New York.

Morris, P. and Fowler, M.W., 1981. A new method for the production of fine plant cell suspension culture. Plant Cell Tiss. and Org. Cult., Vol.1, pp.15-24.

Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol., Vol.25, pp.135-166.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco cultures. Physiol. Plant., Vol.15, pp.473-479.

Noori, M.S., 1999. Synthetic studies of some new polyfunctional substituted five and six member heterocyclic compounds. Ph.D. Thesis, University of Mosul, Mosul-Iraq.

Rper, W., 1979. Growth and cytology of callus and cell suspension cultures of *Vicia faba*. Z. Pflanzenphyiol., Vol.93, pp.245-257.

Salisbury, F.B. and Ross, C.W., 1992. "Plant Physiology". 4th ed. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California. Advision of Wads Worth, Inc.

Sankhla, D., Davis, T.D., Sankhla, N. and Upadhyaya, A., 1994. In vitro production of flowering shoots in German Red cornation: Effect of uniconazole and gibbererlic acid. Plant Cell Rep., Vol.13, pp.514-518.

Wareing, P.F. and Phillips, I.D.J., 1978. The control of growth and differentiation of plant. 2nd Ed. Pergamon Press. Oxford.

Williams, L. and Collin, H.A., 1976. Growth and cytology of celery plant derived from tissue cultures. Ann. Bot., Vol.40, pp.333-338.

Yates, P.J., Lenton, J.R. and Good, L.J., 1993. Effects of triazole inhibitors of sterol biosynthesis on the free and esterified sterol composition of celery cell suspension culture. Pesticide Sci., Vol.39, pp.257-265.