دور التداخلات المشتركة من(BA) و (2,4-D) في نمو وتمايز كالس نباتات الحبة السوداء (*Nigella sativa* L.) وعلاقتها بمحتوى المركبات الفعالة فيه

رحاب عبد الجبار البكر هناء سعيد الصالح

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2004/11/9 ، تاريخ القبول 2005/4/6)

الملخص

تضمنت الدراسة بيان دور بعض منظمات النمو القياسية لاستحداث و نمو وتمايز كـالس نبـات الحبة السوداء *Nigella sativa L.*، واستخدام البنزل أدنـين Benzyl Adenine (BA) مـع (2,4– D) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid وبالتراكيز (10^{-3}, 10^{-4},10^{-6},10^{-8},10^{-10}) مولار لكل منهمـا على انفراد وتداخلاتهماالمشتركة مع بعضها.واظهرت النتائج ان افضل الاوساط المشجعة لاستحداث ونمو الكالس هي الحاوية على 10^{-6} مولار 2,4 – D لوحده حيث بلغ الوزن الطري للكـالس النـامي عليهـا (3.58)، (12.89) غم في الاعمار 45 و 75 يوما على التوالي، وتبين من النتـائج ان افـضل تكـوين للافرع الخضرية كان على الاوساط المجهزة 10^{-10} مولار2,4-D مع 10^{-6} مولارBA، الاان نموالجذورلم يلاحظ الاعند وصول الكالس الى عمر 100 يوم وعلى الاوساط الحاوية على 10^{-8}و10^{-6} مـولار 2,4-D لوحده. واثبتت تقنية كروماتوكراف السائل ذو الاداء الفائق (HPLC) أن محتوى الكالس مـن المركبـات الفعالة يكاد يكون مساويا أو أكثر من محتواها في البذور ،حيث وجد ان كمية المواد المفصولة من عينة الكالس حسب زمن الأحتباس Retention time والذي تراوح مابين 4-14 دقيقة كانت مقاربة جداً لكمية المواد المفصولة من مستخلص البذور (الطور الذائب بالكحول) اعتماداً على مساحة القمم المفصولة.

Role of Interaction of BA and 2,4– D in the Growth and Differentiation of the Callus of (*Nigella sativa* L.) Plants and Their Relation with the Level of Its Effective Compounds

Rehab A. Al-Baker **Hana S. Al-Saleh**
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

This study demonstrated the role of some standard growth regulators in the induction, growth and differentiation of callus of *Nigella sativa* L.. Benzyl Adenine (BA) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) were used with concentrations (10^{-3}, 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10}) molar for each separately on one hand and their interference's. The results show that the best media for the induction and growth of callus are those which contain 2,4-D (10^{-6})M as the fresh weight of the growing callus reached (3.58), (12.89) gm at 45,75 days respectively. Also best differentiation among shoots was with the media supplying 2,4-D (10^{-10})M with BA (10^{-6})M. But, the root growth was not observed before the callus reached the age of 100 days on the media which contain 2,4-D alone. This study explored the content of the callus of black seed plant like the active compounds and their comparison with the seeds contents. This was carried out using high performance liquid chromatographic technique HPLC. This technique proved that the callus content of active compounds almost equal or higher than those in the seeds bearing in mind that callus content differs according to the used growth regulator,it was found that compounds separated according to their Retention time which ranged between 4to 14 mint ,these compounds were closely similar (according to the separated peaks) those compounds separated from the seed extract (Alcohol soluble phase).

المقدمة

على الرغم من تقدم التقنيات الطبية والصيدلانية والصناعية الحديثة الا ان الانسان لـم يـستطع ان يستغني عن النبات للعلاج بل على العكس ازدادت الحاجة له بشكل لم يسبق له مثيـل (قابيـل، 1998). وتسعى بعض المختبرات المهتمة بصناعة الادوية الى الاستفادة من التقنيات المختلفة لزراعـة الانـسجة النباتية في الحصول على بعض المركبات الكيمياوية النـباتية التـي تـدخل فـي الـصناعات الدوائيـة المـختلفة وذلـك لما تقدمه هذه التقـنية من فوائد عـديدة مقترنة بالنبات الطبي، (سـلمان, 1988). اذ يمكن الحصول على هذه المركبات بكميات اكبر وبدرجة نقاوة عالية قد تفوق تلك المفصولة مـن النبـات الكامل، وكذلك فان إنتاجها يكون مستمراً وغير معتمد على موسم زراعتها، فضلاً عن امكانية الـسيطرة التامة على إنتاج عـدد من المركبات المهمة والخطرة الاستخدام كتـلك المستخـدمة في الـتـخديـر كالمـورفـين (محمد وعمر، 1990) ومن الجدير بالذكر في هذا المجال ان إنتاج المواد الطبية والعقاقير وغيرها عن طريق زراعة الأنسجة يتأثر بعدة عوامل منها طبيعة الجزء المـستخدم للزراعـة explant

ومصدره وكمية إنتاجه للمادة الفعالة ومكونات الوسـط الغذائي المسـتخدم للـزرع وظـروف حفـظ الزروعات من اضاءة وتهوية وحرارة (Collin, 1987; Dixon, 1985) والتي تؤثر بشكل مباشر علـى النواتج الاولية النباتية (Youssef et al., 1998) وبالتالي تؤثر على المواد الايضية الثانوية التي تخـتلف حيوياً وتشتق من المواد الايضية الاولية (Bhalsing and Maheshwari, 1998) ومن العوامل المـؤثرة على انتاج العقاقير الطبية في هذا المجال نوع وتركيز منظمات النمو المـضافة الـى الوسـط الغـذائي المستخدم وخاصة الاوكسينات والسـايتوكاينينات المؤثرة في نمو وتمايز المـزرعة النباتيـة وفي بنـاء النواتج الايضية الثانوية وكذلك نوع الجزء النباتي المستخدم في الزراعة (Collin, 1987). واصبح مـن الصعب استخلاص المواد الطبيعية (المواد الايضية الثانوية) بسهولة من النبات وبشكل نقي نتيجة لتعرض البيئات الطبيعية للنباتات البرية لمخاطر حقيقية فضلاً عن العديد من حالات عدم الاستقرار البيئي، لذلـك اتاحت تقنيات الزراعة النسيجية البديل المناسب المحتمل للزراعة التقليدية للنباتات التي تعد المصدر لهذه المركبات الايضية الهامة (الكناني، 1987، Bhalshng Maheshwari, 1998، Youssef et al., 1998).

المواد وطرائق العمل

عقمت بذور الحبة السوداء *Nigella sativa L.*، تعقيما سطحيا بغمرها أولا بمحلـول 96% مـن الكحول الاثيلي لمدة دقيقتين، نقلت بعدئذ الى محلول هايبوكلورايـت الـصوديوم (NaOCl) Sodium hypochlorite المخفف مع الماء المقطر من المحلول الرئيسي المركز (6.4%) وبنسبة (1حجم:2حجـم) (قاصر:ماء) ولفترة 4-5 دقائق, أعقبها غسل البذور بالماء المقطرالمعقم5-7 مرات لإزالة آثار المعقمات المستعملة سابقا،(البكر، 2002)، زرعت البذور المعقمةعلى وسـط Arnon و Hagland (Arnon and Hagland, 1940, 1944) الصلب المعقم لإنبات البذور وتنمية البادرات، واستخدمت قطع السيقان الحاوية على عقدة واحدة وقطع أخرى خالية من العقـدة بطول 1-1.5 سم من البادرات وبعمـر 21–24 يـوم وبمعدل ثلاث قطع/قنينة، زرعت على وسط MS (Murashige and Skoog, 1962) الـصلب المجهـز بمـستويات مختلفـة مـن Benzyl Adenine (BA)، 2,4- Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) وبتراكيز (10^{-3},10^{-4},10^{-6},10^{-8},10^{-10}) مولار لكل منها على حدا وتـداخلاتهما، وزع الوسـط الغـذائي بالتساوي على القناني المستخدمة للزراعة بواقع 20 مل/قنينة. نقلت القناني الزجاجية الحاوية على القطع النباتية المزروعة الى حاضنة النمو بشدة أضاءة 1500 لوكس,وبتعاقب يومي 16ساعة ضوء و8 ساعات ظلام وبدرجة حرارة 22°م. وتمت إدامة الكالس المستحدث من قطع بادرات الحبـة الـسوداء وتحديـد استجابة القطع النباتية لاستحداث الكالس وتكوين الافرع الخضرية والجذور بعـد مرور 45 و 75 يومـاً من زرعها على الوسط الغذائي.

تحضير المستخلصات الكحولية لكالس وبذور الحبة السوداء:

اتبعت طريقة الباحث Grand et al.. (1988) المحورة عن الطريقة الاساسية (Verpoorte et al., 1982)، في تحضير المستخلص الكحولي، واستخدم كالس الحبة السوداء النامي على وسط MS الحاوي على 10^{-6} مولارمن منظم النمو 2,4- D باعتباره التركيز الامثل لتحفيز استحداث الكالس في هذه الدراسة.واستخدم 20 غم من الكالس بعمر تراوح بين 100-110 يوم في تحضير المستخلص، اخذ 0.1 غم من مستخلص الكالس المجفف وأذيب في2.5 مل من محلول 60 % ميثانول، ثم رسبت المواد العالقة فيه بالطرد المركزي بسرعة 5000 د/د ولمدة 5 دقائق.أما بالنسبة للبذور وبسبب ارتفاع نسبة الزيوت في المستخلص أيضا تم الترسيب بنفس الظروف المذكورة أعلاه وفصل المستخلص الى جزء زيتي وجزء ذائب في الكحول، وتم اختبار كل عينة بصورة منفردة في تقنية الكروماتوكرافيا لتشخيص المركبات فيها ومقارنة ذلك مع العينة السابقة من الكالس.

فصل المركبات الفعالة في كالس وبذور الحبة السوداء باستخدم جهاز الكروماتوكراف السائل ذو الأداء الفائق :- High-Performance Liquid Chromatography / HPLC

تم الكشف عن وجود المركبات الفعالة بصور عامة في كالس وبذورالحبة السوداء بوساطة جهاز HPLC المجهزمن شركة (LKB)، باستخدام عمود فصل نوع:

Partisile 10 silica (250 × 5) mm

الطور المتحرك Mobile phase**:** استخدم الكحول المثيلي Methanol 60 % ليمثل الطور المتحرك الذي يحمل العينة أثناء الفصل ويساهم في نزول العينات خلال عمود الفصل بعد ان تم ترشيحه وطردت جميع الغازات منه باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية Sonicator. وبمعدل جريان Flow rate = 0.4 مل/دقيقة ومدى الامتصاصية Absorbanse range =0.02 وعند طول موجي Wave length = 252 نانوميتر، وقورن وقت ظهور المركبات (زمن الأحتباس) Retention time في مستخلص الكالس مع وقت ظهور المركبات في مستخلصات البذور.

النتائج

اولا- تأثير BA و 2,4-D في استحداث الكالس:

اظهرت قطع بادرات الحبة السوداء (الحاوية على عقدة والخالية منها) المزروعة على الاوساط الحاوية علىBA وD 2,4– بتراكيز مختلفة استجابة متفاوتة في الفترة الزمنية اللازمة لاستحداث الكالس تراوحت بين 12-25 يوماً (الجدول 1). ووجد ان افضل استجابة حصلت في القطع المزروعة على الاوساط الغذائية المجهزة بـ 10^{-6} مولار منD 2,4– سواء لوحده او مع تراكيز BA، واستغرقت فترة زمنية تراوحت بين 12-18 يوماً كذلك فان الاوساط المضاف اليها 10^{-6}و10^{-8}و10^{-10} مولار

2,4-D مع 10^{-3},10^{-4},10^{-6} مولار BA كانت محفزة لاستحداث الكالس من القطع النباتية المزروعة في فترة زمنية قليلة نسبياً (الجدول 1). ولوحظ ان القطع النباتية المزروعة على الاوساط الغذائية الحاوية على 10^{-3} مولار من2,4- D لوحده ومع جميع تراكيز BA المستخدمة لم يحصل فيها استجابة مطلقاً وانما علنت القطع من ذبول وموت خلال 10 ايام الاولى من الزراعة.

الجدول 1: الفترة الزمنية (بالايام) اللازمةلاستحداث الكالس من قطع سيقان بادرات نبات الحبة السوداء في اوساط MS بوجود BA و 2,4- D.

إستحداث الكالس (بالأيام)					2,4-D (مولار) / BA (مولار)	
10^{-10}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-3}		
16	14	12	13	---		
16	17	15	17	---	16	10^{-3}
14	15	12	15	---	16	10^{-4}
15	16	13	20	---	---	10^{-6}
25	25	18	22	---	---	10^{-8}
25	25	18	22	---	---	10^{-10}

عدد المكررات 5 لكل معاملة. --- : لا يوجد تحفيز

ثانيا: تأثير BA و 2,4- D على الوزن الطري للكالس:

بينت النتائج ان افضل الاوساط المشجعة لاستحداث ونمو الكالس هي الاوساط المجهزة بـ 10^{-6} مولار 2,4– D سواء لوحده او بوجود التراكيز المختلفة من BA، حيث تراوح الوزن الطري للكالس النامي على هذه الاوساط 3-4 غرام بعد مرور 45 يوماً من بدء الزراعة، اما بقية الاوساط فانها حفزت نمو الكالس وبدرجة اقل، ولم تحصل استجابة لاستحداث ونمو الكالس من القطع المزروعة على الاوساط الحاوية 10^{-3} مولار 2,4– D سواء لوحده او بوجود التراكيز المختلفة من BA (الجدول 2). واكدت النتائج حصول اكبر زيادة في الوزن الطري للكالس بعد مرور 75 يوماً من بدء الزراعة في الاوساط الغذائية المجهزة بتركيز 10^{-6} مولار من 2,4-D لوحده حيث بلغ وزن الكالس النامي عليها مقدار 12.8 غرام، تليها الاوساط المجهزة بـ10^{-6} مولار 2,4-D مع جميع تراكيز BA خاصة 10^{-10} مولار منه، وتأتي بعدها الاوساط الحاوية على 10^{-4} مولار 2,4– D مع 10^{-8},10^{-10} مولار BA وكذلك الاوساط الحاوية على 10^{-8} مولار 2,4- D مع 10^{-3} مولار BA ولوحظت زيادة في الوزن الطري للكالس النامي على بقية الاوساط بصورة عامة ولكن بدرجة اقل (الجدول 3). وعموماً تميز الكالس النامي على الاوساط المضاف اليها 2,4- D و BA بقوامه اللازج الكثير التفكك ولونه الاخضر البراق (الصورة 1) يميل في بعض العينات الى الاصفر ، كما تميز الكالس النامي على الاوساط الغذائية

المجهزة بـ 10^{-4} مولار 2,4-D سواء لوحده او بوجود جميـع تـراكيز BA بلونه الاصـفر الـداكن واستمر وجود هذا اللون في الكالس منذ بداية تكوينه حتى الاعمار الاخيرة من النمو.

الجدول 2: معدل الوزن الطري للكالس (غرام) وتمايز الافرع الخضرية لنبات الحبة السوداء بعد مضي (45) يوماً من الزراعة على اوساط (MS) الغذائية المجهزة بتراكيز مختلفة من الـ BA و 2.4 -D.

2,4D M / BA M	10^{-3}		10^{-4}		10^{-6}		10^{-8}		10^{-10}	BA
	التمايز	الوزن الطري	التمايز	الوزن الطري	التمايز	الوزن الطري	التمايز	الوزن الطري	التمايز	الوزن الطري
		---		1.337 ±0.178		3.585 ±0.324	*	0.914 ±0.701	*	0.502 ±0.282
التركيز	التمايز	الوزن الطري								
10^{-3}				---		3.742 ±0.199	**	0.8 ±0.232	*	0.983 ±0.453
10^{-4}			*	1.357 ± 0.161		3.0 ±0.155	*	0.655 ±0.105	*	2.122 ±0.347
10^{-6}				0.374 ±0.05		4.308 ±0.225	*	0.992 ±0.202	**	0.7 ±0.079
10^{-8}				1.242 ±0.287	*	4.224 ±0.728	*	0.322 ± 0.013	*	0.274 ±0.033
10^{-10}				0.788 ±0.083	*	3.238 ±0.428	*	0.402 ±0.051	*	0.335 ±0.026

M: مولار ، --- : لايوجد تحفيز للكالس .

* : تكوين افرع خضرية قليل ، ** : تكوين افرع خضرية جيد ،

الجدول 3: معدل الوزن الطري للكالس(غرام) وتمايز الافرع الخضرية والجذور لنبات الحبة السوداء بعد مضي (75) يوماً من الزراعة على اوساط (MS) الغذائية المجهزة بتراكيز مختلفة من الـ BA و 2.4 -D.

2,4-D M / BA	10^{-3}		10^{-4}		10^{-6}		10^{-8}		10^{-10}	
	التمايز	الوزن الطري	التمايز	الوزن الطري	التمايز	الوزن الطري	التمايز	الوزن الطري	التمايز	الوزن الطري
M		---		4.923 ± 0.481	♦	12.891 ±0.803	♦ *	2.376 ± 0.239		1.23 ±0.237
10^{-3}		---		---		6.216 ±0.272	***	4.375 ±0.192	***	1.045 ±0.081
10^{-4}		---		1.655 ±0.028		5.183 ±0.044	**	3.696 ±0.021	**	3.605 ±0.211
10^{-6}		---		1.34 ±0.019		5.069 ±0.104	**	2.754 ±0.093	***	2.556 ±0.043
10^{-8}		---		7.163 ±0.139		9.5 ±0.029		0.522 ±0.023		0.73 ±0.013
10^{-10}		---		5.91 ±0.032		11.763 ±0.107		0.64 ±0.032		0.616 ±0.018

M: مولار ، --- : لايوجد تحفيز للكالس .

* : تكوين افرع خضرية قليل ، ** : تكوين افرع خضرية جيد ، *** : تكوين افرع خضرية جيد جداً.

♦ : تكوين جذور بعد مرور 100 يوم لنمو الكالس

ثالثا: تأثير BA و 2,4– D في تكوين الافرع الخضرية والجذور:

امتازت قطع بادرات الحبة السوداء (الحاوية على عقدة) النامية على اوساط MS الغذائية المجهزة بتراكيز مختلفة من BA و2,4– D بقدرتها على تكوين الافرع الخضرية فقط وبدرجات مختلفة وخاصة خلال الاعمار المختلفة من النمو45 و 75 يوماً، وتميزت الأوساط المضاف إليها 10^{-8} و10^{-10} مولار من 2,4-D لوحده بكونها الأفضل في تحفيز تمايز الأفرع الخضرية من القطع النباتية المزروعة خلال مرحلة 45 يوماً وكذلك الأوساط المجهزة بالتراكيز المختلفة BA لوحده أو مع التركيزين المذكورين أعلاه من 2,4-D، ولوحظ تكوين الافرع الخضرية في بعض الاوساط الحاوية على 10^{-6} و 10^{-4} مولار من 2,4– D مع وجود مستويات مختلفة من BA (الجدول 2). واستمرت الاوساط الغذائية بتحفيزها لتكوين الافرع الخضرية الى عمر 75 يوماً وكانت افضلها الاوساط الحاوية على 10^{-8}و 10^{-10} مولار 2,4– D مع 10^{-3},10^{-6} مولار BA وكذلك الاوساط المضاف اليها 10^{-3} مولار BA لوحده (الجدول 3).وفي عمر75 يوماً لم يحصل تمايز للكالس النامي على الاوساط المجهزة بـ 10^{-6} مولار 2,4– D لوحده وبوجود BA (الصورة 1– a ، c) ,وتميزت منها الاوساط الحاوية على 10^{-10} مولار 2,4-D مع 10^{-6} مولار BA بتحفيزها افضل نمو للافرع الخضرية وصولاً الى عمر 100 يوم (الصورة 1-d).وبصورة عامة لم تتميز القطع النباتية المزروعة على الاوساط الغذائية المجهزة بـ 2,4– D لوحده ومع BA بتحفيزها لتكوين الجذورخلال الاعمار45 و 75 يوماً من النمو، ولوحظ تكوين الجذور من الكالس النامي على الاوساط المجهزة بـ 10^{-8} و10^{-6}مولار 2,4- D لوحده عند وصول الكالس الى عمر 100 يوم واستمر نمو هذه الجذور وبنفس المعدل بعد مرور اكثر من 30 يوماً على هذه المرحلة، ولم تحصل زيادة في نموها (الصورة 1-b).

رابعا:تشخيص المركبات الفعالة في مستخلصات كالس وبذور الحبة السوداء باستخدام تقنية الكروماتوكراف السائل ذو الاداء الفائق (HPLC):

اشارت النتائج الى وجود تباين في زمن نزول المواد الفعالة (زمن الاحتباس) مع وجود تماثل في بعضها (الجدول4) فوجد ان عينة مستخلص البذور (الجزء الزيتي) تراوح زمن الاحتباس فيها بين9-18 دقيقة وبلغ عدد قمم الامتصاص المحسوسة (7 peaks) وبتراكيز مختلفة، وكانت الفترات (9.1 ، 13.6 ، 14.9) دقيقة متميزة عن البقية من حيث تركيز المادة (الشكل1-A). اما نتائج امرار عينة مستخلص البذور (الجزء الذائب بالكحول) فاشارت الى تأخير زمن نزول هذه العينة حيث تراوحت بين 2-21 دقيقة وبلغ عدد قمم الامتصاص المحسوسة خلالها (8) وبتراكيز مختلفة ايضاً (الشكل 1-B) وقد تطابق زمن النزول لعدد من القمم في هذه العينة مع عينة الكالس بشكل كبير، حيث انها تطابقت معها في قمم الامتصاص في زمن 5-7 دقيقة و بتركيز عالي وكذلك في الفترة 9 و11 دقيقة (الشكل1-C). وبصورة عامة نجد ان مستخلص الكالس النامي على وسط MS المجهز بمنظم النمو

2,4- D وبتركيز 10^{-6} مولار قد تطابق بصورة كبيرة جداً من حيث عدد المواد المفصولة وكمياتها مع مستخلص البذور (الطورالذائب بالكحول).ونجدانخفاض نسبة تطابق المستخلص الزيتي للبذور مع مستخلص الكالس وربما يعود ذلك الى حاجته الى مذيب اكثر فعالية من الميثانول لتسهيل تشخيص المركبات الفعالة فيه. وبهذا دلت النتائج على امكانية الحصول على المواد الفعالة من كالس الحبة السوداء وبتراكيز قد تصل نسبة اعلى من البذور نفسها.

الجدول 4: زمن الاحتباس(بالدقائق) للمركبات الفعالة في مستخلصات كالس وبذور الحبة السوداء.

نوع المستخلص الوقت بالدقيقة	مستخلص البذور الطور الزيتي	مستخلص البذور الطور الذائب بالكحول	مستخلص الكالس *
2		2.16	
4			4.4
5		5.08	5.07
6		6.66	6.02 6.99
7		7.96	7.47
9	9.10	9.35	9.48
10	10.50		
11		11.26	11.39
13	13.65		
14	14.95		14.57
15		15.29	
16	16.12		
17	17.18		
18	18.24		
20			20.70
21		21.39	
24			24.02
عدد قمم الامتصاص الرئيسية المحسوسة	7	8	10

* مستخلص الكالس النامي على وسط MS المجهز بتركيز 10^{-6} مولار من 2,4- D بأعتباره الوسط الامثل لنمو الكالس.

الصورة 1: تأثير إضافة تراكيز مختلفة من 2,4- D و BA في تكوين الافرع الخضرية والجذور ونمو كالس الحبة السوداء على اوساط MS بعد مرور 100 يوم من بدء الزراعة:

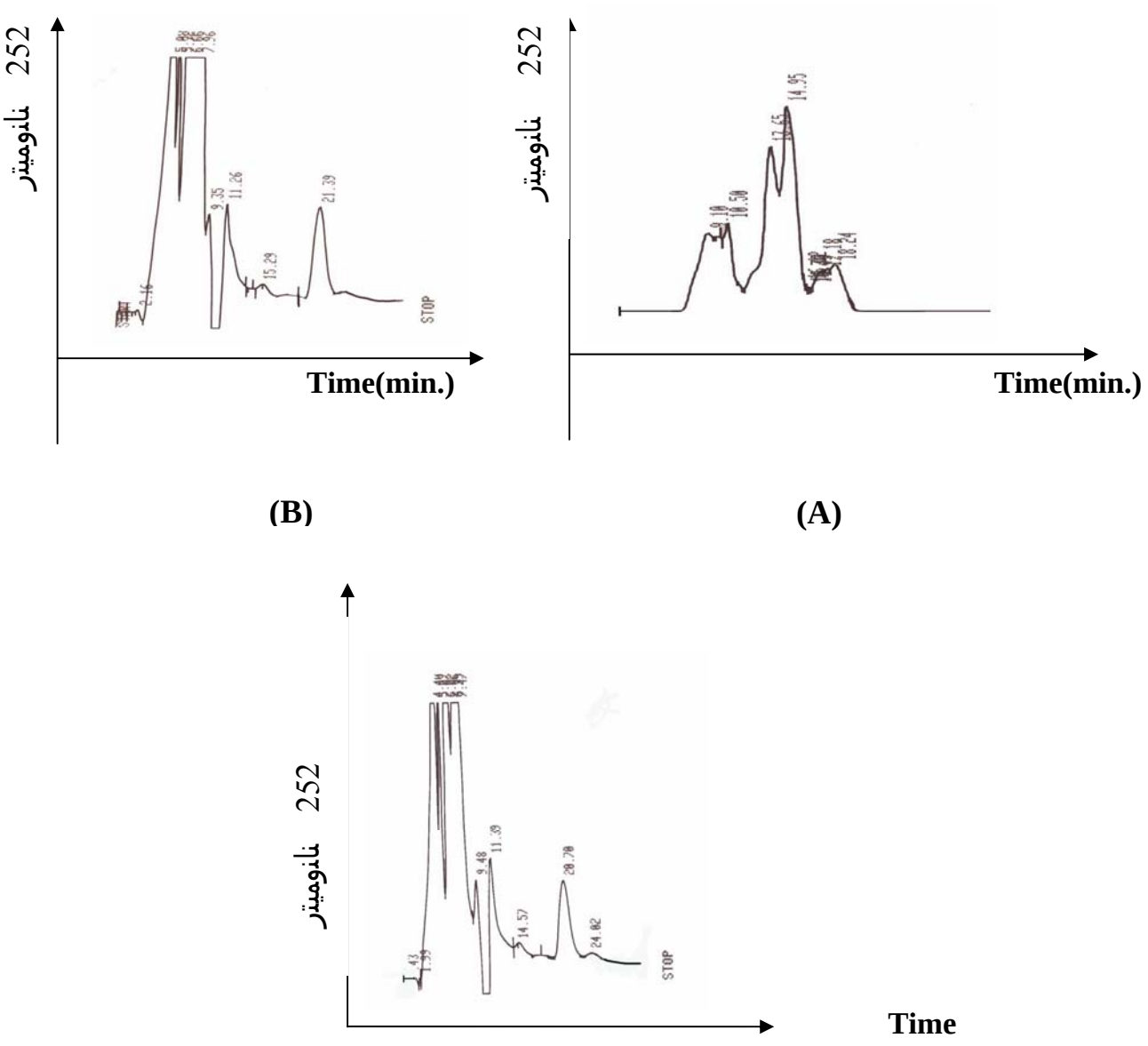
a .الكالس المشتق من قطع السيقان النامية في وسط MS مضافا إليه 10^{-6} مولار2,4-D: لاحظ تكـوين كالس هش ذو لون أخضر براق. **b** .الكالس المشتق من قطع السيقان النامية في وسط MS مضافا إليـه 10^{-8} مولار 2,4-D: لاحظ تكوين الجذور. **c**. الكالس المشتق من قطع السيقان النامية فـي وسـط 10^{-6} مولار 2,4-D + 10^{-10} مولار BA: نمو كالس أخضرمصفر هش. **d** . قطع السيقان (الحاويةعلى عقدة) النامية في وسط MS مضافا إليه 10^{-10} مولار 2,4-D + 10^{-6} مولار BA: تكوين أفرع خضرية.

مستخلص الكالس وربما يعود ذلك الى حاجته الى مذيب اكثر فعالية من الميثـانول لتـسهيل تـشخيص المركبات الفعالة فيه. وبهذا دلت النتائج على امكانية الحصول على المواد الفعالة من كالس الحبة السوداء وبتراكيز قد تصل نسبة اعلى من البذور نفسها.

الجدول 4: زمن الاحتباس(بالدقائق) للمركبات الفعالة في مستخلصات كالس وبذور الحبة السوداء.

نوع المسخلص الوقت بالدقيقة	مستخلص البـذور الطور الزيتي	مستخلص البذور الطور الذائب بالكحول	مستخلص الكـالس *
2		2.16	
4			4.4
5		5.08	5.07
6		6.66	6.02 6.99
7		7.96	7.47
9	9.10	9.35	9.48
10	10.50		
11		11.26	11.39
13	13.65		
14	14.95		14.57
15		15.29	
16	16.12		
17	17.18		
18	18.24		
20			20.70
21		21.39	
24			24.02
عدد قمم الامتصاص الرئيسية المحسوسة	7	8	10

* مستخلص الكالس النامي على وسط MS المجهز بتركيز 10^{-6} مولار من 2,4- D بأعتباره الوسط الامثل لنمو الكالس.



الشكل 1: المركبات الفعالة المفصولة في مستخلصات كالس وبذور الحبة السوداء بأستخدام تقنية االـ HPLC:

A عينة مستخلص بذورفي الطور الزيتي. B-عينة مستخلص بذور في الطور الذائب بالكحول.

C -عينة مستخلص الكالس النامي على الوسط القياسي.

المناقشة

اوضحت النتائج دور 2,4– D في تحفيزه النشط لاستحداث ونمو وتمايز كالس نبات الحبة السوداء، والذي حقق أفضل استجابة لاستحداث الكالس بتركيز 10^{-6} مولار لوحده او بوجود تراكيز مختلفة من BA (الجدول 1)، كذلك فان هذه الاوساط تميزت بتحفيزها لنمو الكالس واعطت أفضل الاوزان الطرية للكالس النامي عليها (12.89 و 11.76) غرام على التوالي في عمر 75 يوماً (الجدول 3) كما اشارت الى ذلك نتائج دراسات عديدة على نباتات اخرى حيث ان وجود 2,4-D مع السايتوكاينين له تأثير واضح على استحداث ونمو الكالس منها كما في التبغ (Murashige and Skoog, 1962) وفول الصويا (Moore and Colline, 1993). وبينت نتائج الدراسة في هذا المجال انه كلما ارتفع تركيز BA مع ثبات 2,4– D عند التركيز 10^{-6} مولار فان ذلك ادى الى انخفاض الوزن الطري للكالس، وهذا يطابق ماحدث في كالس نبات الحبة السوداء (النعيمي, 2004; Youssef et al., 1998) انه عند رفع تركيز Kinetin عن تركيز 2,4- D في وسط الزراعة قل الوزن الطري للكالس، وبشكل عام بينت نتائج هذه الدراسة ان زيادة تركيزD 2,4– عن 10^{-6} مولار او انخفاضه سبب تثبيط نمو الكالس، وتشير معظم الدراسات الى ان هذا الأوكسين يكون فعالاً عموماً عن التراكيز 10^{-5}-10^{-7} مولار في مزارع الانسجة النباتية المختلفة (Staba, 1982) كما ان زيادة تركيزه الى 10^{-4} مولار سواء لوحده او بوجود BA سبب تثبيط نمو الكالس. ولم يحدث أي تحفيز في القطع النباتية المزروعة على الاوساط المضاف اليها 10^{-3} مولار من– 2,4 D سواء لوحده أو بوجود تراكيز مختلفة من BA وحدث موت للقطع خلال 10 أيام الاولى من الزراعة، كذلك سجلت الحالة نفسها عند وجود 10^{-4} مولار 2,4– D مع 10^{-3} مولار BA، ومن المعروف ان زيادة تركيز الاوكسين عن الحد الاقصى يثبط النمو بدلاً من تحفيزه (العاني، 1990) وعموماً تعد التراكيزالعالية من الاوكسينات سامة للنبات (Raven et al., 1986) كما ان استخدام الـ 2,4–D يجب ان يكون محدوداً لانه يسبب استحداث طفرات في خلايا الكالس (Schmauder and Doebel, 1991; Pierik, 1987) وتميز الكالس النامي على الاوساط الغذائية المجهزة بـ 2,4– D و BA بقوامه المفكك الهش ولزوجته ولونه الاخضر البراق (الصورة 1) ولوحظ تلون الكالس باللون الاصفر الشديد المائل الى البني في الاوساط الحاوية على 10^{-4} مولار 2,4– D سواء لوحده أو بوجود الـ BA ومنذ مرحلة النمو 45 يوماً وصولاً الى عمر 100 يوم علماً ان تلون الكالس بهذا اللون ليس دليلاً على موته لانه استمر خلال الاعمار 45 و 75 يوماً ولكن بمعدلات قليلة اعتماداً على مستوى منظمات النمو المضافة في الوسط (الجداول2 و3)، وقد أشار الباحثان (Banerjee and Gupta, 1975) الى تغير لون كالس الحبة السوداء بالرغم من استمرار نموه الى اللون الاسود بعد مرور فترة طويلة من النمو على اوساط النمو المجهزة بـ 0.5 ملغم 2,4– D وحليب جوز الهند، الا ان الكالس المتكون في المراحل الاولى تميز بلونه الابيض وقوامه الهش .يعتبر الـ 2,4– D من أكثر الاوكسينات فعالية في نمو الكالس، الا ان هذا الاوكسين يخمد وبقوة تكوين الاعضاء في مزارع الكالس ويعتبر مهماً في المحافظة

على مزارع الكالس (Staba, 1982) وبالرغم من ذلك فقد لوحظ تكون الافـرع الخضرية وبشكل جيـد من الكالس النامي بوجود 2,4-D مع BA (الصورة 1-d) ان هذا يشير الى تميز دور الـ BA في تحفيز نمو الافرع الخضرية، ومما يؤكد هذا الكلام هو أن انخفاض مستوى BA سبب قلة الافـرع الخـضرية المتكونة (الجدول 3). وقد يعود السبب الى ان الحالة الاولى تمثل الحالة المثلى لنمو الافـرع الخـضرية وهي حالة التوازن التي تؤدي الى تمايز الافرع الخضرية في هذا النبات وان أي خلل فيها يـؤثر علـى معدل التمايز.ان عدم إمكانية الكالس النامي على الاوساط المجهزة بكل من 2,4-D وBA لتكوين الجذور لحين مرور100 يوم ،يعزى إلى أن نمو الكالس لفترة طويلة على الاوساط الغذائية يسبب تراكم الاوكسين في خلايا الكالس وقد يشجع هذا نمو الجذور اوقد يكون سبب ذلك الى ان نسبة 2,4- D المضافة الـى الوسط كانت متلائمة مع المحتوى الداخلي من الاوكسينات Endogenous Hormones للقطعة المزروعة والذي ادى الى بلوغ الاوكسين مستواه الامثل لتحفيز استحداث الجذور في هذا النبات (Mok and Mok, 1994; Scott, 1972).

ان لمنظمات النمو النباتية المضافة الى وسط الزراعة وخصوصاً الاوكسينات والسايتوكينات تـأثير على عملية نمو وتمايز المزارع وكذلك فانها تؤثر على عملية بناء نواتج الايض الثانوي كمـا ان نـوع وتركيز منظم النمو يؤثر على تكوين نواتج الايض الثانوي، فقد تؤدي الى زيادة بناء مواد معينة او تقليل بناء مواد اخرى حسب الموازنة بين الاوكسينات والسايتوكاينينات المضافة الى وسط النمو، فعند التراكيز العالية منها قد تـشجع بنـاء مـواد معينـة وفـي التراكيـز الواطئـة تـشجع بنـاء مـواد اخـرى (Collin, 1987 ; Staba, 1982)، وبينت نتائج الفصل الكمي الدقيق باسـتخدام تقنيـة الكرومـاتوكراف السائل ذو الاداء الفائق (HPLC) ان الاختلاف في وقت نزول المواد المفصولة من مستخلـصي بـذور الحبة السوداء (الطور الزيتي والطور الذائب بالكحول) يشير إلى اختلاف المواد المكونة لكـلا الطـورين وان فصل مستخلص البذور الى طورين عند اجراء الاختبار جعل عملية التشخيص اكثر وضوحاً وقلـل مـن التداخل بين المـواد المـوجودة في كلا الطـورين (الشكل1– A و B). وبصورة عامة لـوحظ ان بعض المواد وجدت في مستخلص الكالس بكميات اقل من مستخلص البـذور (الطورالـذائب بـالكحول) واخرى وجدت بكمـيات مساوية او اكثر من محتوى مستخلص البذور (الشكل1–C) كما وجد ان كميـة المواد المفصولة حسب زمن الأحتباس Retention time والذي تراوح مابين 4-14 دقيقة كانت مقاربـة جداً لكمية المواد المفصولة من مستخلص البذور (الطور الذائب بالكحول) اعتماداً علـى مـساحة القمـم المفصولة، وتبين ان نزول مجموعة من المركبات خلال هذه الفترة الزمنية كان بكميات كبيرة في عينـة المستخلص وهذا يدل على ان معدل بناء هذه المواد المجهولة التركيب داخل خلايا الكالس مقارب لمعـدل بناءها في البذور، وان بناءها في خلايا الكالس اعتمد الى حد ما على وجود 2,4– D كاوكسين. وبـذلك يمكن القول ان خلايا كالس نبات الحبة السوداء لها القدرة على بناء المركبات الفعالة التي تنتج وتتـراكم في البذور وبمستويات تصل الى حدود مساوية لتلك في البذور، كما ان هناك العديد من الدراسات التـي

اجريت حول تأثير الاوكسين 2,4- D او منظمات النمو الاخرى على بناء نواتج الايض الثانوي وبينت هذه الدراسات ان لمنظمات النمو تأثير على الفعالية الانزيمية المسؤولة عن عملية بناء نواتج الايض الثانوي (Sugano and Ogawa, 1981 ; Gordon and Flood, 1980) وبذلك فان تقنية الزراعة النسيجية للنباتات الطبية توفر امكانية انتاج المركبات الفعالة طبياً بشكل او باخر، وان القدرة المرستيمية totipotency للخلايا النباتية خارج الجسم الحي in vitro وفرت امكانية الحصول على المركبات الثانوية التي يتم بنائها في خلايا النبات الطبيعي in vivo (Bhalsing and Maheshwari, 1998)، وإن فشلت الزراعة في انتاج المركبات الفعالة بشكل مباشر فيمكن استغلال هذه التقنية باكثار النبات الطبي او الاجزاء النباتية المسؤولة عن انتاج المركبات الفعالة فيه بواسطة الزراعة النسيجية له (Staba, 1982) ويمكن القول اعتماداً على نتائج هذه الدراسة ان كالس الحبة السوداء يعتبر مصدر غني بالمركبات الفعالة طبياً والمعروفة والمشخصة سابقاً في بذور الحبة السوداء، الا ان تشخيص انواع هذه المركبات لم يتم التعرف عليه في هذه الدراسة.

المصادر العربية

البكر، رحاب عبد الجبار حامد، 2002. دور بعض منظمات النموالقياسية والمصنعة حديثاً في استحداث ونمو وتمايز الكالس من نبات الحبة السوداء *Nigella sativa L* ومستوى المركبات الفعالة فيه. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.

سلمان، محمد عباس، 1988. اساسيات زراعة الخلايا والانسجة النباتية. مطبعة جامعة بغداد، العراق.

العاني، طارق علي، 1990. فسلجة نمو النبات وتكوينه. دارالحكمة للطباعةوالنشر، بغداد.

قابيل، طارق يحيى 1998. نباتات حسب الطلب. مجلة العربي ،481: 114-119.

الكناني، فيصل رشيد ناصر1987. زراعة الانسجة والخلايا النباتية. جامعة الموصل، مطبعة جامعة الموصل، العراق.

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

النعيمي، مها محمد طه، 2004. تأثير تداخل بعض منظمات النمو والسلفانيل أمايد في استحداث ونمو الكالس والمزارع الخلوية لنبات الحبة السوداء *Nigella sativa L*. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.

المصادر الأجنبية

Arnon, D.I. and Hogland, D.R., 1940. Crop induction in artificial culture solution and soil with special reference to factors influencing yields and absorption of organic nutrients. Soil Sci., Vol.50, 463 p..

Arnon, D.I. and Hagland, D.R., 1944. The investigation of plant nutrition by artifcial culture methods. Biol. Rev., Vol.19, pp.55-67.

Banerjee, S. and Gupta, S., 1975. Embryoid and plantlet formation from stock cultures of *Nigella* tissues. Physiol. Plant., Vol.34, pp.243-245.

Bhalsing, S.R. and Maheshwari, V.L., 1998. Plant tissue culture-a potential source of medicinal compounds. J. Sci. Industrial Res., Vol.27, pp.703-708.

Collin, H.A., 1987. Determinants of yield of secondary products in plant tissue cultures. Academic Press Inc., London, Ltd.

Dixon, R.A., 1985. Plant cell culture. IRL Press, Oxford, U.K.

Gordon, A.J. and Flood, A.E., 1980. 2,4 -Dichlorophenoxy acetic acid and the De novo synthesis of invertase in chicory root tissue .Phytochemistry, Vol.19, pp.505-508.

Grand, A., Verpoort, R., Wondergem, P.A. and Ponsset, ,J.L., 1988. Anti-infections phytotherapies of the tree-Savannah Sengal (west-Africa), 11- Antimicrobial activity of 33 species. J. Ethanopharmacol., Vol.22, pp.25-31.

Mok, D.W.S. and Mok, M.C., 1994. Cytokinins chemistry, activity and function. CRC Press, Inc, Florida.

Moore, P.J. and Colline, G.B., 1993. Transformation in soybean (*Glycine max* L.). Biotech. Agri. Forestry., Vol.23, pp.228-236.

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

Pierik, R.L.M., 1987. In vitro culture of higher plants. Martinus Nighoff Publishers. Canada.

Raven, P.H., Evert, R.F. and Eichhor, S.E., 1986. Biology of plants 4th. Ed., Worth Publishers, INC.

Schmauder, H.P. and Doebel, P., 1991. *Nigella* spp : in vitro culture, regeneration, and the formation of secondary metabolites. Biotech. Agri. Forestry, Vol.15, pp.311-338.

Scott, T.K., 1972. Auxins and roots .Ann. Rev. Plant Physiol., Vol.23, pp.235-258.

Staba, E.J., 1982. Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Inc. Florida.

Sugano, N. and Ogawa, Y., 1981. Effect of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid on the activity of O-Methyltransferase in carrot cell culture .Phytochemistry, Vol.20(4), pp.617-619.

Verpoorte, R., Tginastoi, A., Vandoorne, H. and Svendsen, A.B., 1982 . Medicinal plant of surinam, 1-Antimicrobial activity of some medicinal plants. J. Ethanopharmacol., Vol.5, pp.221-226.

Youssef, A.A., Rady, M.R. and Ghanem, S.A., 1998. Growth and some primary products in callus cultures of *Nigella sativa* as influenced by various cultural conditions and salt stress. Fitoterapia, LXIX (4), pp.329-336.