تأثير أشعة كاما في نمو كالس نبات الحبة السوداء (*Nigella sativa L.*)

ساجدة عزيز عبود حكمت مصطفى الدليمي

قسم علوم الحياة / كلية العلوم

جامعة الموصل

الاستلام **القبول**

٢٠٠٧ / ١٠ / ٠٧ ٢٠٠٨ / ٠٣ / ٠٣

ABSTRACT

The effect of different doses of gamma rays on the fresh weight and some cell constituents of Black seed *(Nigella sativa L.)* stem callus was investigated.

The results revealed an increase in the fresh weight with an increase in the cellular contents of protein and nucleic acid (DNA, RNA) extracted from radiated callus at doses 5,10, 30 and 50 rad, on the other hand, the high doses (70, 90 rad) led to death more than of 50% of initiating cells of callus.

Shoots formation occurred on radiated callus, at dose 50 rad. In solid MS media, which are provided with 2,4–D(10^{-6} M). Verdure branches that occurred on radiated callus have been rooted by using MS free growth regulators. The plant developed on this medium can be readly transfered to the soil after harding.

الملخص

شملت هذه الدراسة تأثير الجرع المختلفة من أشعة كاما في الوزن الطري وبعض المكونات الخلوية لكالس سيقان نبات الحبة السوداء *(Nigella sativa L.)*. أشارت النتائج إلى زيادة في الوزن الطري للكالس مع زيادة قي المحتوى الخلوي من البروتينات والأحماض النووية (RNA, DNA) المستخلصة من الكالس المشعع بجرع 5 ,10 ,30 و50 راد، هذا من ناحية ومن ناحية أخرى وجد ان الجرع العالية 70 ,90 راد أدت إلى موت أكثر من 50% من خلايا الكالس المستحدثة . سببت الجرعة 50 راد تكوين الأفرع الخضرية في الكالس النامي في وسط MS الصلب والمزود بـ 2,4-D كمنظم نمو، وجذرت الأفرع الخضرية المتكونة في الكالس باستخدام وسط MS الخالي من منظمات النمو ، والنباتات النامية في ذلك الوسط نقلت إلى التربة بعد إجراء عملية التقسية.

المقدمة

أشعة كاما أشعة كهرومغناطيسية ذات أطوال موجية تتراوح بين $^{-9}$١٠×٣ إلى $^{-11}$ ١٠×٣ سم (١) وهي أشعة عديمة الشحنة والكتلة ويمثل ع نصر الكوبلت ^{60}Co المصدر الأساس لها (٢) وتؤثر أشعة كاما على الصفات المورفولوجية والتشريحية والإنتاجية في عدة نباتات. تعد عملية تحديد الحساسية للإشعاع في النباتات أمراً ضرورياً لاختيار الجرعة المناسبة التي تعطي تغيرات وراثية كبيرة من اجل استخدامها لأغراض التربية. أدى استخدام أشعة كاما بجرعات عالية إلى تثبيط إنبات بذور نبات الجزر (٣) وبذور نبات الفجل (٤)، في حين وجد ان الجرعات الواطئة من الأشعة عجلت من سرعة إنبات بذور الخطمية (٥) وزيادة المقاومة للأمراض النباتية (٦) وزيادة محتوى الخلايا من المكونات الخلوية كا لبروتين (٦) والكربوهيدرات والهورمونات النباتية والأحماض النووية (٧) وزيادة في فعالية الانزيمات (٨)، ان هذا التغير في محتوى الخلايا من المركبات لا يؤدي إلى تغير في الصفات التكنولوجية للمحاصيل فقط وإنما يؤدي إلى تحسين الصفات النوعية أيضاً (٩). ووجد عند دمج تقنية الزراعة النسيجية والتشعيع زيادة في نمو خلايا الكالس من حيث الوزن الطري ونسبة الزيت (١٠) والبروتين (١١) مع تشجيع تجذير الأفرع الخضرية وتكوين النباتات الكاملة (١٢) واستطاعت الجرع الإشعاعية العالية من أشعة كاما تحفيز كالس نبات زهرة الشمس على التمايز وتكو ين الأفرع الخضرية ثم تجديرها وتكوين النباتات الكاملة (١٣). لعدم وجود دراسة سابقة تشير إلى تأثير أشعة كاما في نمو كالس نبات الحبة السوداء، لذلك برزت أهمية إجراء دراسة علمية الهدف منها دمج تقنيتي الزراعة النسيجية والتشعيع لغرض الحصول على كالس ون بلقات متغايرة وراثية بقياس بعض المكونات الخلوية الأساسية لخلية الكالس.

مواد العمل وطرائقه

زراعة البذور وتنمية البادرات:

عقمت بذور نبات الحبة السوداء *Nigella sativa L.* بواسطة غمرها بمحلول الكحول الاثيلي ٩٦% لمدة دقيقتين ثم بمحلول هايبو كلورات الكالسيوم (القاصر) المحلي المخفف مع الماء المقطر من المحلول الرئيسي المركز ٦% وبنسبة (1 : 2) لمدة (4 - 5) دقائق (14)، وغسلت البذور جيداً بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات على الأقل وزرعت على وسط Arnon و Hoagland (١٥) ونميت البذور بالظلام في حاضنة النمو تحت درجة حرارة 20± 1 مْ ولمدة ثلاثة أيام ولحين بزوغ الج ذير، ثم نقلت البذور إلى حاضنة النمو تحت شدة إضاءة 1500 لوكس وبدرجة حرارة 20 ± 1مْ .

استحداث الكالس وتنميته:

استحدث الكالس من قطع س يقان نبات الحبة السوداء بعمر ٣٠ يوماً وبطول 1سم تقريباً، وذلك بزراعتها على وسط مورا شي ج وسكوك (١٦) الحا وي على 2,4-D بتركيز 10^{-6} مولار، حضنت الأوساط الغذائية الحاوية على القطع النباتية في ح اضنة نمو بدرجة حرارة 20 ±1 مْ والمجهزة بإضاءة 1500 لوكس وبتعاقب يومي لمدة 16 ساعة إضاءة و 8 ساعة ظلام.

تشعيع الكالس:

عرضت عينات من كالس سيقان نبات الحبة السوداء بوزن 1 غرام تقريباً وبعمر ٣٥ يوماً من نموه على الوسط القياسي بجرع مختلفة من أشعة كاما. واعتمدت عينات من الكالس غير المشعّعة معاملات للمقارنة في هذه الدراسة. استخدم لهذا الغرض جهاز الكوبلت (٦٠) ذو طاقة بمعدل ١.٢٠ مليون الكترون فولت وعلى بعد ٦٥ سم من المصدر ولمدد زمنية وجرع إشعاعية مختلفة كما موضح في المخطط الآتي:-

الجرعة الإشعاعية* (راد)	المدة الزمنية (دقيقة)
٥	٠.٤٥
١٠	٠.٩٠
٣٠	٢.٧١
٥٠	٤.٥١
٧٠	٦.٣١
٩٠	٨.١٢

* تم التشعيع في مستشفى الطب الذري والأورام السرطانية في الموصل.

قياس نمو الكالس:

حدد نمو كالس سيقان نبات الحبة السوداء بقياس الوزن الطري للكالس ومحتوى خلايا ه من المكونات الخلوية الأساسية كالبروتين والأحماض النووية (RNA, DNA) بعد مضي ٣٠، ٦٠، ٩٠ يوماً من بدء تعريض الكالس لأشعة كاما. قدرت كمية الأحماض النووية الكلية لخلايا الكالس حسب طريقة Cherry (17) التي تعتمد على إيقاف فعالية انزيم النيوكل يز وترسيب الأحماض النووية بنوعيها RNA, DNA وإزالة المواد الأخرى كالبروتينات والدهون التي ربما تؤثر في كمية الأحماض النووية. وحدد التركيز الكلي للأحماض النووية بالاعتماد على المنحنى القياس للأحماض النوويّ لخلايا الخميرة النقية . حددت كمية الحامض النووي الديوكسي رايبوزي حسب طريقة Giles و Mayer (18، 19) بتقدير كمية السكر الديوكسي رايبوزي في حامض DNA، ثم حددت كمية DNA بالاعتماد على المنحنى القياسي المحضر من Calf thymus، وحددت كمية الحامض النووي الرايبوزي من ا لفرق بين الكمية الكلية للأحماض النووية وكمية الحامض النووي الديوكسي رايبوزي، حدد المحتوى الكلي لبروتينات خلايا الكالس بطريقة لاوري (20)، التي تعتمد على اختزال كاشف الفولن بواسطة الفينولات أو مواد أخرى إلى ازرق المولبدنم الذي يمكن قياسه لونيا عند الطول المو جي 750nm. حدد التركيز الكلي للبروتينات بالاعتماد على المنحنى القياسي من Bovine serum albumin.

النتائج والمناقشة

استحداث الكالس وتنميته:

أعطت قطع سيقا ن بادرات الحبة السوداء النامية في وسط MS الحاوي على 10^{-6} مولار من 2,4-D استحداث جيد للكالس وهذا يؤكد ان اس تحداث كالس نبات الحبة السوداء ونموه يعتمد على وجود الاوكسينات (14) واستخدم الكالس المستحدث بعد مرور ٣٥ يوماً من الزراعة في الظروف القياسية في هذه الدراسة.

الوزن الطري للكالس:

سجل أعلى وزن طري للكالس عند الجرعة ٥ راد اذ بلغ 12.5 غرام بعد مدة نمو ٩٠ يوماً م ن بدء تعريضه لأشعة كاما ووجد ت أيضاً زيادة في معدل الوزن الطري للكالس عند استخدام الجرع ١٠، ٣٠، ٥٠ راد ولكن بمعدل زيادة قليلة مقارنة بمعدل الوزن الطري للكالس غير المعامل بالأشعة، في حين أدت الجرع العالية ٧٠ و ٩٠ راد إلى تثبيط نمو الكالس وقتل أكثر من ٥٠% من خلاياه (الجدول ١) وهذا ربما يعود إلى كون الإشعاع يعمل على اضطراب في عمل الانزيمات المسؤولة عن تخليق IAA مما يؤدي إلى تغير في مستواه الداخلي وبالتالي اختلال التوازن بين مستوى الهورمونات الداخلية والخارجية (المضافة إلى الوسط الغذائي) مما يسبب أما تنشيط نمو الكالس او تثبيطه حسب الجرعة المعرض لها الكالس (٧)، جاءت هذه النتائج مشابه إلى ما أشارت إليه دراسات أخرى بان الجرع الواطئة حفزت سرعة الانقسام وزيادة نمو الكالس (٢١، ٢٢) في حين أشار البياتي (١٢) بان الوزن الطري لأنسجة كالس نبات فول الصويا يزداد بازدياد جرع أشعة كاما المعرض لها إلى حد ما.

الجدول (١): تأثير جرع مختلفة من أشعة كاما في معدل الوزن الطري لكالس سيقان نباتات الحبة السوداء خلال مدد نمو مختلفة

الجرع الإشعاعية (راد)	معدل الوزن الطري (غرام)		
	عمر الكالس (يوم)		
	٣٠	٦٠	٩٠
معاملة المقارنة (0.0)	**3.216** ± 0-011	**4.552** ± 0.121	**6.211** ± 0.020
٥	**4.25** ± 0.112	**8.720** ± 0.021	**12.500** ± 0.080
١٠	**4.051** ± 0.028	**5.521** ± 0.033	**8.422** ± 0.040
٣٠	**3.550** ± 0.121	**4.891** ± 0.022	**7.823** ± 0.082
٥٠	**3.421** ± 0.011	**4.921** ± 0.102	**6.971** ± 0.103
٧٠	**2.681** ± 0.110	*	*
٩٠	**1.502** ± 0.100	*	*

* موت معظم خلايا الكالس

± الخطأ القياسي

كل قيمة تمثل معدل خمس مكررات

الأحماض النووية الكلية:

كان للتشعيع بأشعة كاما دوراً في زيادة محتوى خلايا كالس نبات الحبة السوداء من DNA عند الجرع الواطئة وأفضلها ٥ راد، في حين سببت الجرع العالية ٧٠، ٩٠ راد إلى انخفاض كبير في كمية DNA مقارنة بمعاملة المقارنة (الجدول ٢) وجد ان أنماط الزيادة او النقصان في كمية DNA بصورة عامة تعكس نفس أنماط الزيادة أو النقصان في كمية RNA في خلايا الكالس (الجدول ٣) وهذا يعزى إلى ان عملية بناء الحامض النووي RNA تعتمد أساساً على كمية الحامض النووي DNA الموجودة في الخلية وان أي تغير بهذه الكمية سوف يؤثر ومن دون شك في كمية RNA (٢٣). أكدت هذه النتائج في دراسات سابقة بان الجرع الواطئة من الأشعة تسبب تحفيز الإنزيمات المشاركة في بناء جزيئة DNA بينما الجرع العالية تؤثر في حلقات البيورين والبريمدين الداخلة في تركيب جزيئة DNA (٧).

الجدول (٢) كمية الحامض النووي الديوكسي رايبوزي المستخلص من كالس سيقان نباتات الحبة السوداء بعد مدد نمو مختلفة من بدء تعريضه لجرع مختلفة من اشعة كاما

الجرع الإشعاعية (راد)	كمية DNA (مايكروغرام/ غرام وزن طري)		
	عمر الكالس (يوم)		
	٣٠	٦٠	٩٠
معاملة المقارنة (0.0)	**9.782** ± 0.021	**13.504** ± 0.032	**20.421** ± 0.052
٥	**12.500** ± 0.011	**18.332** ± 0.090	**28.221** ± 0.038
١٠	**11.523** ± 0.032	**15.54** ± 0.032	**25.412** ± 0.042
٣٠	**10.555** ± 0.081	**13.982** ± 0.002	**21.020** ± 0.066
٥٠	**9.921** ± 0.01	**13.710** ± 0.092	**20.681** ± 0.103
٧٠	**3.221** ± 0.032	**3.112** ± 0.073	**3.014** ± 0.112
٩٠	**2.422** ± 0.071	**2.510** ± 0.120	*

* موت معظم خلايا الكالس

± الخطأ القياسي

كل قيمة تمثل معدل ثلا ث مكررات

الجدول (٣): كمية الحامض النووي الرايبوزي المستخلص من كالس سيقان نباتات الحبة السوداء بعد مدد نمو مختلفة من بدء تعريضه لجرع مختلفة من أشعة كاما

الجرع الإشعاعية (راد)	كمية RNA (مايكروغرام/ غرام وزن طري)		
	عمر الكالس (يوم)		
	٣٠	٦٠	٩٠
معاملة المقارنة (0.0)	**90.821** ± 0.072	**135.339** ± 0.039	**214.421** ± 0.022
٥	**124.210** ± 0.208	**148.720** ± 0.138	**247.165** ± 0.120
١٠	**118.468** ± 0182	**139057** ± 0.022	**239.120** ± 0.002
٣٠	**103.439** ± 0.070	**136.420** ± 0.073	**216.168** ± 0.123
٥٠	**91.210** ± 0.020	**135.92** ± 0.088	**215.037** ± 0.098
٧٠	**32.977** ± 0.021	**33.360** ± 0.072	**30.690** ± 0.003
٩٠	**23.736** ± 0.100	**23.911** ± 0.080	*

* موت معظم خلايا الكالس
± الخطأ القياسي
كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات

البروتين الكلي للكالس :

يوضح الجدول (٤) أن الجرع ٥، ١٠، ٣٠، ٥٠ راد سببت زيادة في محتوى خلايا الكالس من البروتين خلال مدد النمو المختلفة، كما أشار (٢٤) إلى زيادة المحتوى البروتيني لخلايا كالس النباتات البقولية عند معاملتها بأشعة كاما وهذا يعود إلى زيادة في فعالية انزيمات بناء البروتين (٢٥). ويشير الجدول (٤) أيضاً إلى انخفاض كبير في المحتوى البروتيني لخلايا الكالس عند معاملة الكالس بالجرع ٧٠، ٩٠ راد إذ وجد ان مجموعة الأمين هي الجزء الحساس بالنسبة للإشعاع في الأحماض الامينية المكونة للبروتينات ولكنها بدرجة اقل من تأثير السلاسل الجانبية (R)، وان الأشعة بجرعة عالية تسبب إتلاف الروابط الكبريتية في جزيئة البروتين او تسبب حدوث مسخ للبر وتين (Denaturation) نتيجة لإتلاف الروابط الهيدروجينية وبالتالي حدوث تغير في الشكل الفراغي لجزيئة البروتين (٧). يلاحظ من النتائج ان أنماط الزيادة او النقصان في كمية البروتين جاءت مطابقة لحد ما لتلك الأنماط في كمية DNA و RNA (الجدول ٢ و٣) وبذلك يمكن القول بصورة عامة ان الزيادة او النقصان التي حصلت في الوزن الطري خلال مدد النمو وباستخدام الجرع المختلفة يقترن إلى حد ما بالزيادة او النقصان في المحتويات الخلوية الأساسية وذلك لكون عملية انقسام ونمو خلايا الكالس تعتمد بالدرجة الأساس على عملية بناء الأحماض النووية و البروتينات والتي ب دورها تعتمد على فعالية الانزيمات المشاركة في عملية البناء الحيوي لتلك المركبات الخلوية (٢٦، ٢٧).

الجدول (4): كمية البروتين الكلي المستخلصة من كالس سيقان نباتات الحبة السوداء بعد مدد نمو مختلفة من بدء تعريضه لأشعة كاما بجرع مختلفة

الجرع الإشعاعية (راد)	كمية البروتين (ملغرام/ غرام وزن طري)		
	عمر الكالس (يوم)		
	٣٠	٦٠	٩٠
معاملة المقارنة (0.0)	**0.687** ± 0.100	**1.670** ± 0.017	**2.212** ± 0.008
٥	**0.921** ± 0.130	**2.911** ± 0036	**3.812** ± 0.033
١٠	**0.808** ± 0.200	**2.502** ± 0.055	**3.094** ± 0.032
٣٠	**0.790** ± 0.78	**2.021** ± 0.022	**2.604** ± 0.025
٥٠	**0.702** ± 0.100	**1.804** ± 0.073	**2.412** ± 0.002
٧٠	**0.390** ± 0.020	**0.441** ± 0.102	**0.502** ± 0.088
٩٠	**0.301** ± 0.008	**0.322** ± 0.027	*

* موت معظم خلايا الكالس

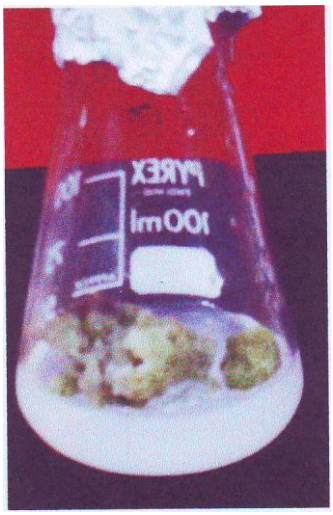
± الخطأ القياسي

كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات

تمايز الكالس:

تمايز كالس نبات الحبة السوداء إلى عدد من الفروع الخضرية بعد فترة نمو ٩٠ يوماً من بدء تعريضه لأشعة كاما بجرعة ٥٠ راد (الصورة أ) مقارنة بعدم تمايز الكالس النامي في الوسط القياسي بدون تشعيع (الصورة ب)، ربما يعود ذلك إلى تأثير الأشعة في مستوى هورمونات النمو الداخلية (٧) او بسبب التغيرات الكيميائية التي سببتها الأشعة في تركيب جزيئات DNA و RNA والبروتين والتي بدورها سببت تغيرات وراثية أي حدوث الطفرات (١٣). وجذرت الأفرع الخضرية الناتجة من الكالس المشعع باستخدام وسط MS خالٍ من منظمات النمو، وتمت عملية الأقلمة للنباتات بنجاح كبير.

(أ)



(ب)

الصورة (أ): تمايز كالس سيقان نباتات الحبة السوداء إلى الأفرع الخضرية في الوسط MS المدعم بـ 10^{-6} مولار من 2,4-D بعد مدة نمو ٩٠ يوماً من بدء تعريضه لأشعة كاما بجرعة ٥٠ راد مقارنة بالكالس غير المشعع (ب).

المصادر :

١) الجنابي، منذر يوسف والهاشمي، سعدية محمود، الكيمياء الإشعاعية دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل (١٩٨٩).

٢) اليامور، خالد يونس، مبادئ في الكيمياء الإشعاعية (مترجم) تأليف: اودورين وسانكستير، مطبعة جامعة الموصل، الموصل (١٩٨٥).

3) Al–Safadi B- and Simon P. W., Tissue Culture Environ. Exp. Bot., 30: 361 – 371 (1990).

4) Peters J. A, Hea K. G. and Handro O. W., J. Plant Cell Physiol., 19 (8): 1483 – 1484 (1978).

٥) العلاف، استبرق ضياء الدين عبد الله، رسالة ماجستير كلية التربية، جامعة الموصل، العراق (٢٠٠٥).

6) Al–Safadi B., Ayoubi Z. and Jawdaty D., Plant Cell Tissue and Organ Culture, 61: 183 – 187. (2000)

٧) محمد، فريد احمد، تطبيق الإشعاع في فسيولوجيا النبات . وقائع الدورة التدريبية حول استخدام الإشعاع والنظائر المشعة في الزراعة وعلوم الأحياء نظمتها الهيئة العربية للطاقة الذرية لتونس ومصرفي القاهرة للمدة ٣ – ١٤ / ٧/ ١٩٩٣.

8) Monzingo A. F., Brekso, A., Ernsl S., Appling D. R. and Robertus J. D., Protein Sci., 9: 1374 – 1381 (2000).

٩) مرتضى، عبد القادر اسكندر، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل (٢٠٠١).

١٠) الحسو، زينة يحيى قاسم، رسالة ماجستير، كلية التربية جامعة الموصل (٢٠٠٤).

11) Omar M. S., Date Plam J., 6 (1): 258 – 264 (1988).

١٢) البياتي، فراس عباس يونس، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل (٢٠٠٢).

١٣) العقيدي، تغريد نواف احمد رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، (٢٠٠٤).

١٤) البكر، رحاب عبد الجبار حامد عبد الله، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق (٢٠٠٢).

15) Arnon D. I. and Hoagland D. R., Biol. Rev., 19: 55 – 67 (1944).

16) Murashige T. and Skoog F., Physiol. Plant. (1962).

17) Cherry J. H., Plant Physiol., 37: 670 – 678 (1962).

18) Giels K. W. and Mayer A., Nature, 20: 93 (1965).

19) Giles K. W. and Mayer A. "Methods in Enzymology". 12: 163 (1967).

20) Lowry O. H., Rosebrough N. J. Furv A. L. and Randall R. J., J. Biol. Chem., 193: 265 – 275 (1951).

21) Badawy E., Sakr S., El-Sharnouby M., Szoke E., Mathe I., Bunden G. and Kery A., Acta Hort, 597: 325 – 328 (2003).

22) Sinha R. and Mallick R., Cytobios, 76 – 187 – 193 (1993).

23) Woolhouse R. W., Sym. Soc. Exp. Biol 21: 179 – 214 (1967).

٢٤) الزهيري، عمر عبد العزيز احمد شهاب، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل (٢٠٠٢).

25) Bajaj Y. P. S., Saettler A. W. and Adams M. W., Radiation Bot., 10: 119 – 124 (1970).

٢٦) محمد، عبد المطلب سيد، ال جلبي، قصي عبد القادر وعبود ساجدة عزي ز، مجلة التربية والعلم، المجلد (١٩)، العدد (٢): (٢٠٠٧).

٢٧) الدليمي، حكمت مصطفى وعبود، ساجدة عزيز، مجلة علوم الرافدين، المجلد ١٧ العدد ٢: ١ – ١٣ (٢٠٠٦).