إنتاج نباتات من كالس سيقان بادرات الماش *Vigna radiata*

رشا فوزي عبد الرزاق
قسم علوم الحياة / كلية التربية
جامعة الموصل

الاستلام	القبول
٢٠١١ / ٠٩ / ٠٥	٢٠١١ / ١٢ / ٠٨

Abstract

The present study include callus initiation from leaves and stems explants of *Vigna radiata* seedlings by using solidified Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different concentrations of Naphthalene acetic acide NAA (0.5,1.0,2.0)mg/L and benzyl adenin BA (0.1,0.2,0.3,0.5,1.0,2.0)mg/L. The results showed that Ms medium which contains 2.0 mg/l of NAA was the best one for callus initiation from leaves while solidified MS medium containing 0.5 mg/L NAA and 2.0 mg/L BA was superior for callus induction from stem. The callus produced from stems and leaves has been maintained on solidified MS medium supplemented with 0.2 mg/L Kin and 0.2 mg/L 2,4-D for shoot regeneration, MS media containing 0.5mg/L NAA and different concentration of BA (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, and 5.0)mg/L were used. The results indicated that MS medium with 5.0 mg/L BA was the best one for shoot regeneration. Moreover, ther was a difficulty in rooting the regenerated shoots, Since they failed to produce roots in the rooting media which were used except solidified MS medium supplemented with 2mg/L NAA.

الخلاصة

تناولت الدراسة الحالية استحداث الكالس من قطع سيقان وأوراق بادرات الماش *Vigna radiata* باستخدام وسط موراشيج وسكوك MS الصلب المجهز بتراكيز مختلفة من نفثالين حامض الخليك Naphthalene acetic acid NAA (٠.٠، 0.5، 1.0، 2.0) ملغم/لتر والبنزايل ادنين BA (٠.٠، 0.1، 0.2، 0.3، 0.5، 1.0، 2.0) ملغم/لتر. أشارت النتائج ان

وسط MS الحاوي على 2.0 ملغم/لتر NAA كان أفضل الأوساط المستخدمة لاستحداث كالس الاوراق بينما تفوق وسط MS الصلب الحاوي على 0.5 ملغم/لتر NAA و2.0 ملغم/لتر BA على بقية الاوساط المستخدمة بمقدرته المتميزة لا ستحداث كالس السيقان، تمت ادامة الكالس الناتج من السيقان والاوراق على وسط MS الصلب الحاوي 0.2 ملغم/لتر Kin مع 0.2 ملغم/لتر2,4-D ولغرض إنتاج الافرع الخضرية استخدمت الاوساط الحاوية على NAA (0.5ملغم/لتر) وBA (0.5، 1.0، 2.0، 3.0، 4.0، 5.0) ملغم/لتر وتبين ان وسط MS الصلب الحاوي على 5.0ملغم/لتر BA كان أفضل الأوساط المستخدمة لإنتاج الأفرع الخضرية من كالس السيقان. كما لوحظ صعوبة واضحة في تجذير الافرع الخضرية عند نقلها الى أوساط التجذير الا ان وسط MS الصلب الحاوي على ٢ ملغم/لتر NAA كان أفضل أوساط التجذير.

المقدمة

ينتمي نبات الماش *Vigna radiata* الى العائلة البقولية Leguminocae [١] ويعد من المحاصيل المهمة لارتفاع قيمته الغذائية واحتواءه على ٢٩% بروتين اضافة الى استخدامه كأعلاف حيوانية [٢] بالرغم من كثرة الدراسات حول استحداث الكالس من اجزاء بادرات الماش [٣] اشار بعض الباحثين ان كالس الماش أحياناً يعاني انخفاضا في معدل نموه وقد اكدت بعض الدراسات وجود صعوبة واضحة في تماي ز الكالس المستحدث من نبات الماش [4] وتمكنت احدى الدراسات من التغلب على صعوبة الحصول على مزارع الكالس من الاجزاء النباتية بإستحداثه من الاجنة الجسمية [٥، ٦] واللجوء في احيان اخرى لاستخدام الاجزاء الفتية لنبات الماش لاستحداث الكالس وتكوين الافرع الخضرية [٧] وتناولت دراسة اخرى تأثير وسطي B5 و MS الحاويين على تراكيز متباينة من منظمات النمو لتكوين المزارع النسيجية والافرع الخضرية [٨] وتناولت دراسة اخرى تأثير اضا فة منظمات النمو و Thidiazuron في استحداث الكالس من قطع النباتات المستأصلة من بادرات الماش ومن ثم تمايز الكالس الناتج [٩] هذا وقد استخدمت بكتريا Agrobacterium لاحداث التحول الوراثي لنبات الماش وانتاج نباتات ذات صفات مرغوبة [١٠] ونظرا لصعوبة تمايز كالس نب ات الماش والحصول على نباتات كاملة هدفت الدراسة الحالية الى التوصل الى الاوساط الملائمة لانتاج الافرع الخضرية من كالس هذا النبات ومن ثم تجذيرها للحصول على نباتات كاملة.

المواد وطرائق العمل

تنمية البادرات السليمة الخالية من الملوثات

استخدمت بذور نبات الماش *Vigna radiata* والتي تم الحصول عليها من الاسواق المحلية وعقمت بغمرها في محلول من الماء المقطر وكلوريد الزئبق يك $HgCl_2$ بتركيز ١% وبمعدل ١ حجم مادة معقمة : ١ حجم ماء مقطر ولمدة ٥ دقائق [٩] زرعت البذور على وسط MS [11] الصلب الخالي من منظمات النمو في قناني ز جاجة وبمعدل ٥ بذور لكل قنينة وكانت نسبة انبات البذور ١٠٠ % بعد ان حفظت البذور في غرفة الزرع بدرجة حرارة ٢٥± ٢°م وظروف ظلام في الثلاثة ايام الاولى من الزراعة بعد انباتها نقلت الى ظروف إضاءة ١٦ ساعة ضوء و ٨ ساعات ظلام وبشدة ٢٠٠٠ لوكس وبدرجة الحرارة ذاتها.

استحداث الكالس

استخدمت البادرات السليمة الخالية من الملوثات النامية على وسط MS الصلب (الشكل A:١) بعمر ٧ أيام كمصدر للأجزاء النباتية اذ قطعت الأوراق و السيقان بطول اسم لكل منها بإستخدام مشرط معقم وزرعت هذه القطع في قناني زجاجية بحجم ١٠٠ مل تحتوي كل منها على ٢٥ مل من وسط MS الصلب المدعم بالبنزايل ادنين BA بالتراكيز (2.0,1.0,0.5,0.3,0.2,0.1,0.0) ملغم/لتر مع نفثالين حامض الخليك NAA وبالتراكيز (2.0,1.0,0.5,0.0) ملغم/لتر وزرعت القطع بمعدل ١٠ قطعة/ جزء نباتي/ معاملة ثم حفظت العينات في غرفة الزرع في نفس الظروف المذكورة سابقا.

تكوين الأفرع الخضرية

بعد اكتمال استحداث الكالس بمرور ٣٠ يوما تمت ادامة الكالس الناتج دوريا كل ٢-٤ أسابيع واستخدمت الأوساط الحاوية على تراكيز متساوية من كل من Kin و2,4-D (0.5,0.2,0.0) ملغم/لتر لكاوساط ادامة، ثم نقل الكالس المستحدث من قطع الس يقان والاوراق بوزن ١ غم/قطعة وزرعت على وسط MS الصلب المجهز ب ٠.٥ ملغم/لتر NAA مع BA بتراكيز (5.0,4.0,3.0,2.0,1.0,0.5) ملغم/لتر وبمعدل ٦ قطع/معاملة ثم حفظت العينات في غرفة الزرع في نفس الظروف المذكورة سابقا.

تجذير الأفرع الخضرية

استؤصلت الافرع الخضرية المتكونة وازيلت عنها بقايا الكالس وغرست قواعد الافرع المقطوعة في ٢٥ مل من MS الصلب الخالي من منظمات النمو و كذلك MS الصلب الحاوي على اوكسين NAA وبتراكيز (2.0,1.0,0.5,0.4,0.3,0.2,0.1) ملغم/لتر بمعدل ٦ افرع/معاملة لغرض تجذيرها وحفظت العينات في نفس الظروف المذكورة سابقا.

النتائج والمناقشة

اظهرت اجزاء السيقان و الاوراق المستأصلة من نبات الماش استجابة متباينة لاستحداث الكالس في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز مختلفة من منظمات النمو اذ اعطت قطع السيقان اعلى استجابة تلتها قطع الاوراق وبمدة زمنية (١٥-٢٠) يوما على التوالي وبينت نتائج زراعة قطع سيقان نبات الماش ان وسط MS الصلب الحاوي على NAA بتركيز ٠.٥ ملغم/لترو BA بتركيز ٢.٠ ملغم/لتر كان أفضل الاوساط المستخدمة وبنسبة استحداث بلغت ١٠٠ % وامتاز الكالس الناتج بقوامه الهش و لونه الابيض المائل الى الخضرة (الشكل B:١) على حين اظهرت بقية المعاملات نسب استحداث مختلفة باختلاف التركيز المستخدم (جدول ١) كما اظهرت النتائج ان نسبة استحداث الكالس من قطع الاوراق المزروعة على وسط MS الحاوي على NAA بتركيز ٢.٠ ملغم/لتر كانت 100% وامتاز الكالس الناتج بقوامه الصلب ولونه الاخضر البراق (الشكل C:١) وأبدت قطع الاوراق ابدت استجابة اقل عند زراعتها على الاوساط الحاوية على تداخلات من NAA و BA.

الجدول (١): استحداث الكالس من قطع السيقان والاوراق لنبات الماش *Vigna radiata* في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من منظمات النمو.

منظمات النمو ملغم / لتر		عدد القطع المنتجة للكالس		الاستحداث %	
NAA	BA	سيقان	اوراق	سيقان	اوراق
٠.٥	٠.٠	٣	٨	٣٠	٨٠
١.٠	٠.٠	٥	٩	٥٠	٩٠
٢.٠	٠.٠	٢	١٠	٢٠	١٠٠
٠.٥	٠.١	٥	٨	٥٠	٨٠
٠.٥	٠.٢	٦	٧	٦٠	٧٠
٠.٥	٠.٣	٧	٦	٧٠	٦٠
٠.٥	٠.٥	٧	٥	٧٠	٥٠
٠.٥	١.٠	٩	٤	٩٠	٤٠
٠.٥	٢.٠	١٠	١	١٠٠	١٠
٠.٠	٠.٠	٠	٠	٠	٠

- عدد القطع المزروعة ١٠ قطع

ان الاستجابة التي ابدتها نباتات الماش *Vigna radiata* لنظام الزراعة النسيجية تمثلت بصعوبة استجابة قطع السيقان و الأوراق لاستحداث الكالس الا انه لوحظ ان استجابة

قطع السيقان كانت افضل من قطع الاوراق [١٣,١٢] وهذا يوضح ان استح داث الكالس من نبات الماش يعتمد على نوع الجزء النباتي وعلى التوافق بين المحتوى الداخلي للخلايا من الهرمونات النباتية مع ال تراكيز المضافة من منظمات النمو الى الاوساط الغذائية المستخدمة ويؤثر تأثيرا واضحا في حيوية الخلايا وزيادة عددها [١٥,١٤].

واظهرت النتائج ان الوسط MS الصلب الحاوي على ٠.٢ من كل من Kin و ٢,٤-D معا انتخب كأفضل وسط للادامة في حين لوحظ بطء نمو الكالس في بقية اوساط الادامة.

واوضحت النتائج (جدول ٢) ان كالس السيقان اظهر افضل قابلية على تكوين الافرع الخضرية في وسط MS الصلب الحاوي على BA وبتركيز ٥.٠ ملغم/لتر مقارنة ببقية الأوساط المستخدمة (الشكل1 : D: E).

ربما يعود السبب في الحصول على الافرع الخضرية من هذا الجزء الى الأعداد الكبيرة من الخلايا المرستيمية ذات النشاط المتميز بالنمو والانقسام وكذلك لاحتوائها على مستويات عالية من الهرمونات النباتية الداخلية والتي بتوازنها مع ما موجود من منظمات نمو في وسط التمايز ادت الى حث الكالس على تكوين الافرع الخضرية [١٦] فضلا عن ان الطاقة الكامنة للخلايا و عددها مما يدعم معدلات انقسامها وتكون الكالس وتمايزه [١٨,١٧]. كما لوحظ عدم استجابة كالس الاوراق على تكوين الافرع ال خضرية في كافة الاوساط المستخدمة الا ان الوسط MS الصلب الحاوي على ٠.٥ ملغم/لتر NAA و ١.٠ ملغم/لتر BA كان مشجعا فقط لإنتاج الجذور.

ربما تعزى قابلية التمايز واعادة تكوين الافرع الخضرية الى عدة عوامل منها مصدر الجزء النباتي ونمطه الجيني والوسط الغذائي [١٩ , ٢٠] . ودور منظمات النمو في الوسط الغذائي ومصدر الجزء النباتي و نوع النبات في تحفيز عملية التمايز [٢١].

الجدول (٢) : تكوين الافرع الخضرية من تمايز كالس سيقان نبات الماش *Vigna radiata* في وسط MS المدعم بتراكيز متباينة من NAA و BA

منظمات النمو ملغم / لتر		عدد الافرع الخضرية المتكونة / معاملة	
NAA	BA	كالس السيقان	كالس الاوراق
٠.٠	٠.٥	٠	٠
٠.٠	٠.١	٠	٠
٠.٠	٢.٠	٠	٠
٠.٠	٣.٠	١٢	٠
٠.٠	٤.٠	٣٦	٠
٠.٠	٥.٠	٤٨	٠
٠.٥	١.٠	٠	٠

٠.٥	٢.٠	٠	٠
٠.٥	٣.٠	٠	٠

- عدد قطع الكالس ٦ / معاملة
- وزن القطعة الواحدة ١ غم

ونقلت الافرع الخضرية الى وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو والحاوي على NAA بتراكيز (2.0,1.0,0.5,0.4,0.3,0.2,0.1,0.0) ملغم/لتر لغرض التجذير الا انه لوحظ صعوبة واضحة في تجذير تلك الافرع الخضرية (جدول ٣) الان وسط MS الصلب الحاوي على ٢.٠ ملغم/لتر كان أفضل الاوساط في تكوين المجموع الجذري بعد ١٥ يوم من نقل الافرع الخضرية مقارنة ببقية الاوساط المستخدمة (الشكل F:١)

الجدول (٣): تجذير الافرع الخضرية المتكونة من سيقان نبات الماش *Vigna radiata* في وسط MSالصلب الحاوي تراكيز متباينة من NAA.

منظمات النمو NAA (ملغم/لتر)	عدد الافرع الخضرية المكونةللجذور	المدة الزمنية (يوم)
٠.٠	٠	_
٠.١	٠	_
٠.٢	٠	_
٠.٣	٠	_
٠.٤	١	٢٠
٠.٥	٣	٢٠
١.٠	٤	٢٠
٢.٠	٦	١٥

- عدد الافرع الخضرية المستخدمة ٦/معاملة

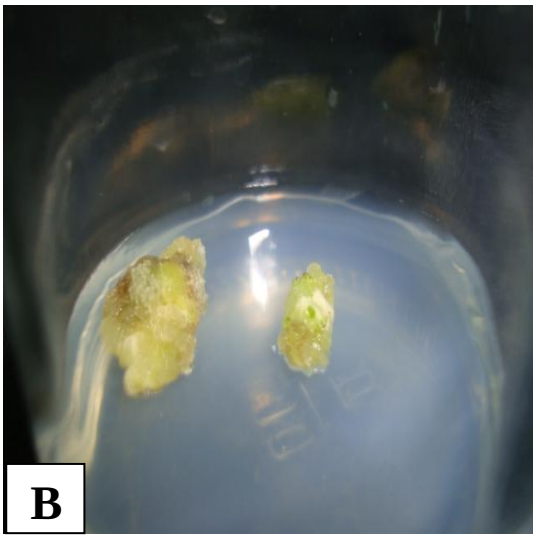
وأشارت النتائج الى صعوبة امكانية تجذير الافرع الخضرية على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو و انم ا احتاج الى اضافة الاوكسينات مثل NAA بتراكيز مختلفة [٢٢] ربما يعزى ذلك الى قلة المحتوى الداخلي لهذه الفرع الخضرية من الاوكسينات اولعدم توافق المضاف من الاوكسينات بهذه التراكيز الى الوسط الغذائي [٨].

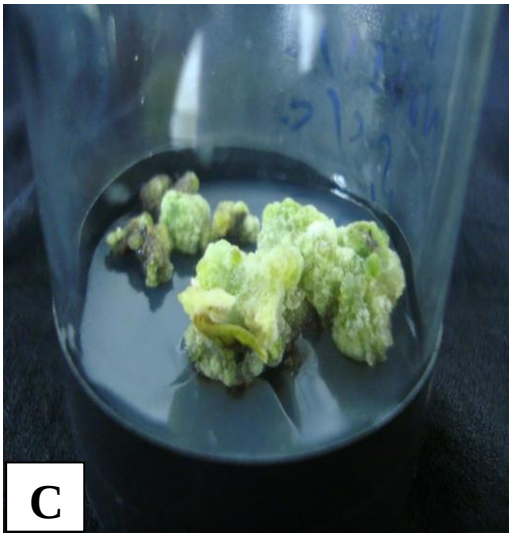
الشكل (١): انتاج نباتات من كالس سيقان نبات الماش *Vigna radiata*
A : بادرات نبات الماش بعمر ٧ ايام نامية على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو.
B : الكالس المستحدث من قطع السيقان بعد مرور ١٥ يوما.
C : الكالس المستحدث من قطع الاوراق بعد مرور ٢٠ يوما.

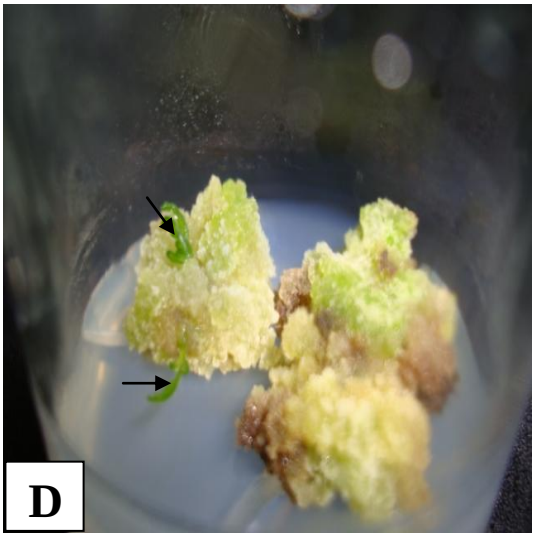
D : بداية نشوء الافرع الخضرية المتكونة من كالس السيقان على وسط MS الصلب الحاوي على 5.0 ملغم/لتر BA بعد مرور ١٥ يوما.

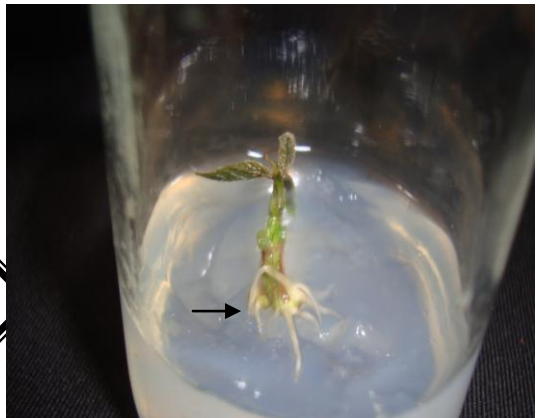
E : الافرع الخضرية متكونة من كالس السيقان على وسط MS الصلب الحاوي على 5.0 ملغم/لتر BA بعد مرور 30 يوم.

F : الافرع الخضرية المكونة للجذور على وسط MS الصلب الحاوي ٢ ملغم/لتر NAA بعد مرور ١٥ يوم من نقلها.









المصادر

1) Teli N.P., Moheshwari V.L., Procceding of a symposim, Warangal, India., 53:26-27 (1999).

2) Avenido R. A. and Hattori K., J. Breeding Science., 51:137-142 (2001) .

3) Suhita B. and Sarmistha S. R., J. *In vitro* Cellular & Developmental Biology Plant., 35: 76-78 (1999).

4) Srinath R., Parbhavati P. and Kaviraj C. P., Indian. J. of Biotechnology., 4:556-560 (2005).

5) Girija S., Ganapathi A. and Ananthakrishnan G., J. Biology., 38:1241-1244 (2000).

6) Kailash C., Singh M., Rathores M. S. and Shekhawat N. S., J. Published online., 24: 206-210 (2009).

7) Muthukumer B., Mariamma M. and Gnanam A., J. Plant Cell Tissue and Organ Culture., 42:2- 4 (1995).

8) Vljayan S. Beena M. R. and Kirit P. B., J. of Plant Biochemistry and Biotechnology., 42: 67 -70 (2006).

9) Amutha S., Muruganatham M. and Ganapathi A., J. *In vitro* Cellular & Developmental Biology Plant ., 42:26-30 (2006).

10) Potjamarn S., Sontichai C., Hyeon J., Jack M. and Aree W., J. Scince & Technology.,1:2 - 6 (2004).

11) Murashige T. and Skoog F., Physiology Plant.,15:473- 497(1962).

12) Jaiwal P. K . and Gulati A ., J. Euphytica .,86:167-170 (1995).

13) Parbhavati P., "Selection of salinity tolerant cells lines and regeneration of plantlest in *Vigna radiate* (L.), PhD Gulbarga University, Gulbarga (1999).(In Enghlish).

14) Hartman H.T., Kester D. E. and Davies F. T., "Plant Propagation Principles and Practices" .5th ed. Prentice .Hall Iner. Limited, London, U. K. (1990).

15) Amutha S., Ganapathi A. and Muruganatham M., J. Plant Cell, Tissue and Organ Culture., 72:203-207 (2003).

16) Hartman H.T., Kaster D.E., Davis F.T. and Generver R.L., Printice – Hall. New Jersey, U.S.A (2002).

17) Patel M. B., Bhardwaj R. amd Joshi A. Indian. J. Exp. Biology., 29:619-622 (1991).

18) Sita L., Leela L., Naresh B. and Prathibha D., J. Plant Biotechnology., 23:409-411 (2006) .
19) Anju G. and Pawan K. J., J. Plant Cell, Tissue and Organ Culture., 23:1-7 (2004).
20) Mendoza A., Kazumi B.H. and Futsuhara Y., Japan. J. Plant Cell, Tissue and Organ Culture., 42:145-149 (1992).
21) Helena M., J. Plant Cell, Tissue and Organ Culture., 11:233-240 (1987).
22) Taylor J. L .S. and Staden J., Plant Growth Regulation., 18: 165-168 (2010).