دور منظم النمو حامض البنتاداينويك Pentadienoic Acid (PDA) بوجود عدد من منظمات النمو القياسية في استحداث ونمو وتمايز كالس نبات الحبة السوداء *Nigella sativa* L.

رحاب عبد الجبار حامد البكر هناء سعيد عبد الله الصالح
قسم علوم الحياة -كلية العلوم - جامعة الموصل
موصل - العراق

تاريخ الاستلام 2005/3/8
تاريخ القبول 2005/6/6

ABSTRACT

The effect of Pentadienoic acid (PDA) as a synthetic growth regulator, on the induction, growth and differentiation of callus from stem segments of seedlings of black seed *Nigella sativa L.*was carried out. PDA was used at the concentrations 10^{-4}, $10^{-6}$and 10^{-8} molar alone, or with the optimal concentration of Benzyl Adenine (BA) which is 10^{-3} molar,and that for Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 10^{-6} molar. The results showed that the addition of PDA alone to the nutritional medium disencourage the induction of callus , However when PDA was added along with the optimal concentrations of the standard growth regulators, the best growth of callus obtained on the medium supplied with(10^{-6}) molar of each of 2,4-D and PDA.The fresh weight of callus reached (25.6) gm at 100 days age .It was found also that the addition of BA with PDA encourages growth of shoots since the first stage of the growth, with the stimulation of the callus growth also ,but the presence of 2,4-D with PDA does not encourage any differentiation except the induction and growth of the callus.

الخـــــــــلاصة

تضمنت الدراسة معرفة تاثير منظم النمو حامض البنتـــادادينويك Pentadienoic Acid (PDA) من نوع الاوكسينات مصنع محليا في استحداث ونمو وتمايز الكالس من قطـــع الســـيقان لبادرات نبات الحبة السوداء،وقد اختبرت التراكيز (10^{-4},10^{-6},10^{-8}) مولار وحده وتداخلاته مـــع التركـــيز الامثـــل لكـــل مـــن 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 10^{-6} مولارو Benzyl adenin(BA) 10^{-3} مولار. وبينت النتائج ان اضافة مركب PDA وحده الـــى الوسط الغذائي لم يشجع استحداث الكالس مطلقا ، وعند أضافته مع التراكيز المثلى من كل مـــن BA و 2,4-D, حصل افضل نمو للكالس على الاوساط المجهزة بـــ10^{-6} مولار لكل من 2,4-D و

الكالس ايضا ، الا ان وجود 2,4-D مع PDA لم يحفز أي تمايز وانما حفز استحداث ونمو الكالس فقط.

المقدمة

تستخدم الاوكسينات والسايتوكاينينيات عادة في انظمة زراعة الانسجة النباتية جميعا ، لما لها من دور في استحداث الكالس واختلاف الجذور والافرع الخضرية ونموها (1). ويعتمد استحداث الكالس أساسا على نوعية منظمات النمو المضافة الى الوسط الغذائي فضلا عن نوع الجزء النباتي المستخدم وحجمه (2) ، وتعد فكرة استخدام منظمات نمو مصنعة جديدة مهمة جدا لاستخدامها في مختلف انظمة زراعة الانسجة لاهميتها في استحداث الكالس ونمو الاجزاء النباتية المزروعة وتمايزها وانها افضل من تلك الطبيعية لفوائدها العديدة ، إذ تعد اقتصادية واكثر ثباتا نسبيا فضلا عن فوائد عديدة اخرى (3). واستنادا الى نتائج عدد من الدراسات الحديثة ، التي اكدت امكان استبدال منظمات النمو القياسية بمركبات مصنعة محليا تقوم بالدورنفسه الذي تؤديه منظمات النمو القياسية المعروفة ، ولما لذلك من اهمية اقتصادية ومردود مادي كبير يشجع على تطوير تقنية الزراعة النسيجية (3 و 4) ، تناولت هذه الدراسة نوع من منظمات النمو (الاوكسينات) المصنعة محليا وحديثا هو PDA ، لبيان دوره في نظام الزراعة النسيجية لنبات الحبة السوداء وتحديد التراكيز المثلى له بوجود التراكيز المثلى من منظمات النمو القياسية (2,4-D , BA) .

مواد وطرائق العمل

استخدمت بذور الحبة السوداء *Nigella sativa* L. (Family: Ranunculaceae) ، وتم الحصول عليها من الاسواق المحلية وصنفت في المعشب النباتي التابع لقسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة الموصل. و بعد التأكد من حيوية البذور، تم تخليصها من الشوائب والاتربة العالقة بها ، عقمت البذور وزرعت حسب ما ذكر سابقا (5) .وزرعت البذور المعقمة على وسط Arnon و Hogland (6 و 7) الصلب المعقم و الخاص بإنبات البذور وتنمية البادرات ، واستخدمت قطع السيقان الحاوية لعقدة واحدة وأخرى خالية من العقدة بطول (1–1.5) سم من البادرات وبعمر 21–24 يوما ، وبمعدل ثلاث قطع في كل قنينة ، زرعت العينات على وسط MS الصلب (8) ، المجهز بمستويات مختلفة من Benzyl Adenine (BA) و (2,4-D) Dichlorophpnoxyacetic acid واستخدمت التراكيز 10^{-4} ، 10^{-6} ، 10^{-8} مولارمن منظم النمو Pentadienoic acid (PDA) (3) ، لوحده أو تداخلاته مع BAو2,4-D بالتراكيز 10^{-3} ، 10^{-6} مولار على التوالي ،وهي تمثل التراكيز المناسبة لتحفيز استحداث الكالس ونموه من قطع بادرات نبات الحبة السوداء ،وحسب ما وجد في دراسة سابقة (5). نقلت الدوارق الزجاجية الحاوية القطع النباتية المزروعة الى حاضنة النموبشدة إضاءة 1500 لوكس وتعاقب يومي 16

ساعة ضوء و8ساعات ظلام وبدرجة حرارة 22 م. وتم متابعة استحداث الكالس ونموه ومتابعة إدامته، كما تم تحديد استجابة القطع النباتية لتكوين الافرع الخضرية والجذور بعد مرور (45 ، 75 ، 100) يوما من زرعها على الوسط الغذائي ،بمعدل خمسة مكررات لكل معاملة.

النتـــــائج

أ.تأثير PDA مع 10^{-6}مولار من2,4-D و10^{-3}مولار من BA في استحداث الكالس:

تراوحت المدة الزمنية لاستحداث الكالس من القطع النباتية المزروعة على الاوساط الغذائية المجهزة بـ PDA مع منظمات النمو 2,4-Dو BA ما بين (15–18) يوما (الجدول 1) . وبينت النتائج ان القطع النباتية المزروعة على اوساط MS المجهزة بالتراكيز المختلفة للـ PDA وحده لم يحصل فيها استحداث للكالس مطلقا ،وانما حصل تكوين افرع خضرية حسب ،من القطع الحاوية لعقدة ولم يستمر نموها بعد مرور 45 يوما .وكذلك فيما يخص القطع النامية على اوساط MSالغذائية الخالية من منظمات النمو (وسط مقارنة) التي تحفزت لتكوين افرع خضرية وجذور كذلك ولم يستمر نموها بعد مرور45 يوما. كما كانت لهذه القطع القدرة على تكوين ازهار ضعيفة لم يستمر نموها حتى الوصول الى عمر45 يوما (الجدول 1).اما في حالة وجود BAأو2,4-Dمع PDA فكانت الفترة تازمنية لأستحداث الكالس 15 يوما ماعدا في حالة وجود8-10 و3-10 مولار من PDA

الجدول 1: المدة الزمنية (بالايام) اللازمة لاستحداث الكالس من قطع السيقان لبادرات نبات الحبة السوداء المزروعة على اوساط (MS) المجهزة بتراكيز مختلفة من PDA مع التراكيز 10^{-6}و10^{-3} من 2,4-D و BA.

فترة استحداث الكالس			PDA (مولار) / تركيز منظمات النمو (مولار)	
10^{-8}	10^{-6}	10^{-4}		
0	0	0		
18	15	15	10^{-3}	BA
15	15	15	10^{-6}	2,4-D
		0	وسط MS خالي من منظمات النمو	

ملاحظة :عدد المكررات 5 / معاملة.

ب. تأثير PDA و 10^{-6}مولار من2,4-D و10^{-3}مولار من BA في الوزن الطري للكالس:

حسب الوزن الطري للكالس من معدل خمسة مكررات بعد مضي (45 ، 75 ، 100) يوماً من زراعة القطع النباتية على وسط MS المضافة إليه تراكيز مختلفة منPDA مع التراكيز 10^{-6} و10^{-3} مولار من2,4-D وBA على التوالي، ولخصت جميع النتائج في الجداول (2 و3 و4).

واشارت النتائج الى اختلاف التركيز المحفز من PDA لتكوين الكالس باختلاف منظم النمو القياسي المستخدم معه فقد وجد ان افضل تركيز له مع BA هو 10^{-4} مولار حيث بلغ الوزن الطري للكالس مقدار (3.185) غرام في عمر 45 يوماً ، وكذلك دلت النتائج على ان افضل تركيز للـ PDA عند اضافته مع التركيز الامثل 2,4-D هو 10^{-6} مولار (الجدول 2). وبدا واضحاً ان الوزن الطري للكالس ازداد بزيادة المدة الزمنية للنمو (75) يوماً وفي عموم الاوساط المستخدمة ، وكانت افضلها الاوساط المجهزة بـ PDA مع 2,4-D وخاصة الوسط المضاف اليه 10^{-6} مولارمن كل من PDA و 2,4-D ، ثم تليها الاوساط الحاوية 10^{-4} مولار PDA مع10^{-3} مولار BA (الجدول 3).

واستمر الكالس بالنمو وبمعدلات متزايدة عند وصوله الى عمر 100 يوم من الزراعة ،وفي الاوساط جميعاً،وبلغ اقصاه في الاوساط الغذائية المجهزة بـ10^{-6} مولار من كل من PDA و2,4-D فقد بلغ (25.67) غرام ، اما الاوساط الحاوية ل 10^{-4} مولار PDA مع 10^{-3} مولار BA فبلغ الوزن الطري للكالس النامي عليها (13.12) غرام (الجدول 4). وتميز الكالس النامي على الاوساط الحاوية ل PDA مع منظمات النمو القياسية بقوامه اللزج المتماسك ولونه الاخضر ،الذي يميل في عدد من العينات الى الاصفر او الاصفر الداكن كما في الاوساط الحاوية PDA مع BA (الصورة 2) ، ويميل في عينات اخرى الى اللون الاخضر البراق كما في الاوساط الحاوية PDA مع 2,4-D (الصورة 3).

ج.تأثير PDA مع 10^{-6}مولار من2,4-D و10^{-3}مولار من BA في تكوين الافرع الخضرية والجذور :

بينت النتائج ان القطع النباتية النامية على الاوساط الغذائية الحاوية ل P DA وحده وبتراكيزه المستخدمة جميعاًكونت افرعاً خضرية ضعيفة وخلال المرحلة الاولى من التحفيز 45 يوماً ،ولم يستمر نموها لاحقاً ، وكذلك الامر فيما يخص القطع المزروعة على اوساط MS الخالية من منظمات النمو (الصورة 1). واشارت النتائج الى ان إضافة 10^{-3} مولار من BA مع التراكيز المختلفة من PDA حفزت تكوين الافرع الخضرية ، ومنذ المرحلة الاولى من النموحتى أنها تفوقت في تحفيزها هذا على الاوساط الحاوية ل BA او PDA وحده، اما الكالس النامي على الاوساط الحاوية على 10^{-6} مولار 2,4-D مع PDA فلم يحصل فيه تمايز (الجدول 2). ويمكن القول عموما أن اضافة 10^{-3} مولار BA مع تراكيز PDA الى الوسط الغذائي حفز تكوين الكالس على نحو جيد نوعاً ما مع تكوين افرع خضرية بسرعة ومنذ المرحلة الاولى للنمو (الصورة 2).اما الاوساط المجهزة بـ10^{-6} مولار 2,4-D مع PDA فانها حفزت تكوين الكالس وكونت افرعاً خضرية ضعيفة لم يستمر نموها 45 يوماً (الصورة 3).

واشارت النتائج الى ان زيادة المدة الزمنية لنمو الكالس على هذه الاوساط الى(75) يوماً ادت الى زيادة تحفيزها لنمو الكالس وتمايزه ، وكانت افضل الاوساط المشجعة لنمو الافرع الخضرية وعلى نحو متميزهي الاوساط الحاوية 10^{-4} و 10^{-6} مولار PDA مع 10^{-3} مولار BA ، (الجدول 3). واستمر نمو الكالس في الاوساط المضاف اليها 10^{-6} مولار من 2,4-D وبمعدلات متزايدة ولكن من دون تحفيز أي تمايز فيه. وفي عمر 100 يوم بينت النتائج أن افضل الاوساط المشجعة لنمو الافرع الخضرية هي الحاوية 10^{-4} و 10^{-6} مولار PDA مع 10^{-3} مولار BA. الا ان اضافة 2,4-D الى الوسط الغذائي مع PDA لم يحفز أي تمايز (الجدول 4).ولوحظ تكون الازهار في المرحلة الاولى من النمو وفي الاوساط الحاوية 10^{-6} و 10^{-8} مولارمن PDA وحده (الجدول 2).

المناقشة

إن اضافة مركب PDA وحده الى الوسط الغذائي انه لم يحفز استحداث الكالس من قطع بادرات الحبة السوداء الحاوية لعقدة واحدة وانما حفزبدرجةمحدودة تكوين الافرع الخضرية والجذور في مختلف التراكيز ، ولم يستمر نموها الى عمر 45 يوماً. واشارت النتائج الى اختلاف التركيز المحفز من PDA باختلاف منظم النمو المستخدم معه ، وجدعموما ان اضافة10^{-6} مولارمن كل من PDA و 2,4-D شجع افضل تحفيز لنمو الكالس ، وبلغ اعلى معدل للوزن الطري (25.6) غم في عمر 100 يوم (الجدول4) ، الا انه لا يقارن بالوزن الطري للكالس عند وجود 2,4-D وحده في الوسط الغذائي الذي بلغ الوزن الطري عنده مقدار (44.4) غم(5) ، وقد يعود السبب في ذلك الى ان وجود 2,4-D في الوسط الغذائي بتركيز 10^{-6} مولار يعد المستوى الامثل لتحفيز نشوء الكالس وان زيادة التركيز على ذلك او انخفاضه يقلل التحفيز.

وكذلك الامر عند اضافة منظمات نمو اخرى معه الى الوسط الغذائي ، إذ تسبب تثبيطاً في فعاليته ، وهذا ما لوحظ كذلك عند اضافة BA معه.كما ان اضافة PDA مع التركيز الامثل من BA حفز استحداث الكالس كذلك ولكن بمعدلات اقل من حالة اضافته مع 2,4-D ، وجد عموماً ان PDA يعمل على نحو مشابه لعمل الاوكسين (3) فقد اثبت سابقاً ان الاوكسين يعمل على زيادة ليونة الجدران الخلوية من خلال زيادة تحفيز ايونات الهيدروجين ثم أنه بعد ذلك يحفز استحداث الكالس او التخصص لتكوين جذور او افرع خضرية (9 ، 10 و 11). ووجد ان اضافة BA مع PDA الى الوسط الغذائي شجع تكوين الافرع الخضرية على نحو جيد ومنذ المرحلة الاولى للنمو حتى عمر 100 يوم (الصورة 2) ولم يلاحظ حدوث اختلاف واسع بين التراكيز المستخدمة من PDA مع BA في تحفيز النمو، ولوحظ تكون الازهار منذ المرحلة الاولى للنمو (الجدول 2) وقداستمر نموها الى عمر (75) يوماً ، اذ كونت ثماراً، الا انها لم تكون البذور و ان اضافة 2,4-D مع PDA الى الوسط الغذائي لم تحفز مطلقاً أي تمايز سواء لافرع خضرية أو جذور ، وهذا يؤكد القدرة التثبيطية 2,4-D لعمليات التمايز(12).

الجدول (2). معدلات الأوزان الطرية (بالغرام) للكالس وتمايز الافرع الخضرية من قطع السيقان لبادرات نبات الحبة السوداء بعد مضي (45) يوماً من الزراعةعلى اوساط (MS) الغذائية المجهزة بتراكيز مختلفة من PDA والتراكيز المثلىمن BA و2,4-D.

PDA (مولار) / منظمات نموقياسية (تراكيز مثلى) مولار		10^{-4}		10^{-6}		10^{-8}	
BA	10^{-3}	الوزن الطري(غم) ±(SE)	التمايز	الوزن الطري(غم) ±(SE)	التمايز	الوزن الطري(غم) ±(SE)	التمايز
2,4-D	10^{-6}	0	*	0	* ◆	0	* ◆
		3.185 ± 0.652	***	**2.715** ± 0.517	***	2.27 ± 0.678	**
		1.745 ± 0.335	-----	**2.478** ± 0.427	-----	1.734 ±0.356	-------

--- : لايوجد تحفيز للكالس . ** : تكوين افرع خضرية جيد ، *** : تكوين افرع خضرية جيد جدا . ◆ : تحفيز التزهير

الجدول (3). معدلات الأوزان الطرية (بالغرام) للكالس وتمايز الافرع الخضرية من قطع السيقان لبادرات نبات الحبة السوداء بعد مضي (75) يوماً من الزراعة على أوساط (MS) الغذائية المجهزة بتراكيز مختلفة من PDA والتراكيز المثلى منBA و2,4-D.

PDA مولار / منظمات نمو قياسية (تراكيز مثلى) مولار		10^{-4}		10^{-6}		10^{-8}	
BA	10^{-3}	الوزن الطري(غم) ±(SE)	التمايز	الوزن الطري(غم) ±(SE)	التمايز	الوزن الطري(غم) ±(SE)	التمايز
		0	---	0	---	0	---
		9.242 ± 0.7758	****	7.14 ± 0.6201	****	4.203 ± 0.9726	***
2,4-D	10^{-6}	9.292 ± 0.889	---	**15.106** ± 0.762	---	14.736 ± 0.502	---

---- : لايوجد تحفيز للكالس ***: تكوين افرع خضرية جيد جداً **** : افضل نمو للافرع الخضرية

الجدول (4). معدلات الأوزان الطرية (بالغرام) للكالس وتمايز الافرع الخضرية من قطع السيقان لبادرات نبات الحبة السوداء بعد مضي (100) يوم من الزراعة على اوساط (MS) الغذائية المجهزة بتراكيز مختلفة من PDA والتراكيز المثلى منBA و2,4-D.

منظمات نمو قياسية / PDA (مولار)	(تراكيز مثلى) مولار	10^{-4} الوزن الطري(غم) ±(SE)	10^{-4} التمايز	10^{-6} الوزن الطري(غم) ±(SE)	10^{-6} التمايز	10^{-8} الوزن الطري(غم) ±(SE)	10^{-8} التمايز
		0	---	0	---	0	---
BA	10^{-3}	13.122 ± 0.326	****	10.17 ± 0.261	****	8.25 ± 0.403	***
2,4-D	10^{-6}	12.65 ± 0.971	---	**25.672** ± 1.602	----	20.476 ± 0.892	---

----- : لايوجد تحفيز للكالس

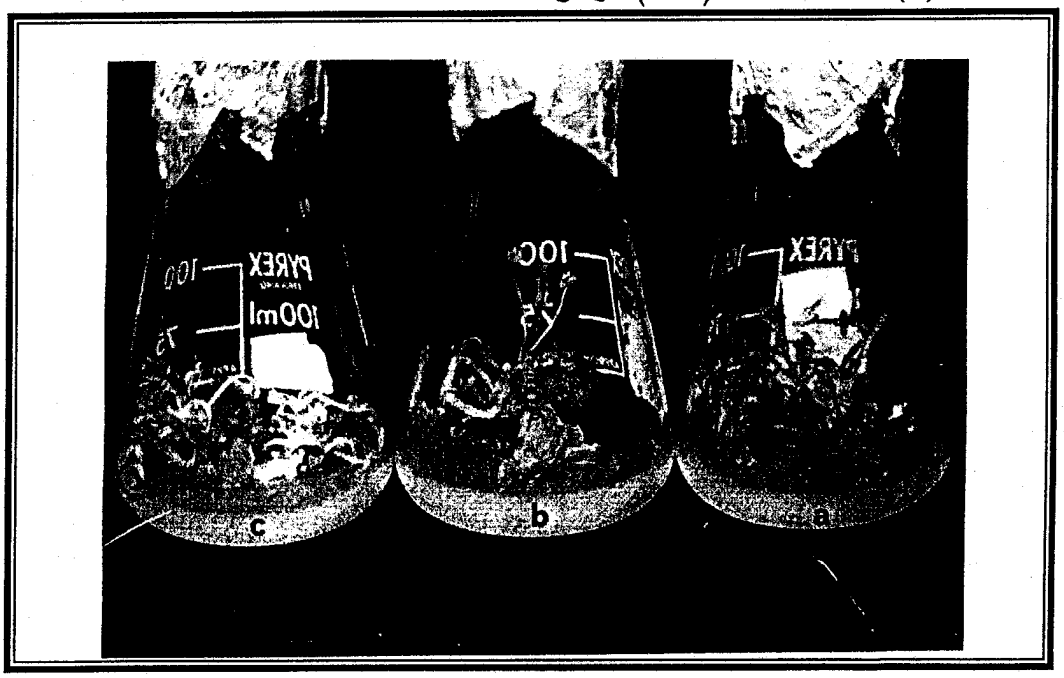
*** : تكوين افرع خضرية جيد جداً

**** : افضل نمو للافرع الخضرية

الصورة (1) : تأثير استخدام تراكيز مختلفة من PDA في تحفيز قطع السيقان لبادرات الحبة السوداء النامية على اوساط (MS)لتكوين الكالس أو التمايز، بعد مرور (45) يوماً من بدء الزراعة:-

(a) (MS) فقط (b) PDA + MS (10^{-4}) مولار (c) PDA + MS (10^{-6}) مولار

(d) PDA +MS (10^{-8}) مولار



الصورة (2) : استحداث الكالس ونموه وتكوين الافرع الخضرية من قطع بادرات نبات الحبة السوداء بعد مرور (45) يوماً من بدء الزراعة

(a) PDA +MS (10^{-4}) مولار + BA (10^{-3}) مولار (b) PDA + MS (10^{-6}) مولار + BA (10^{-3}) مولار

(c) PDA + MS (10^{-8}) مولار + BA (10^{-3}) مولار

الصورة (3) : تأثير استخدام تراكيز مختلفة من PDA مع 2,4-D في تحفيزإستحداث الكالس من قطع سيقان بادرات الحبة السوداء بعد مرور (45) يوماً من بدء الزراعة:

(a) PDA + MS (10^{-4}) مولار + 2,4-D (10^{-6}) مولار.

(b) PDA + MS (10^{-6}) مولار + 2,4-D (10^{-6}) مولار.

(c) PDA + MS (10^{-8}) مولار + 2,4-D (10^{-6}) مولار.

المصادر

1.Centeno M.L. , Rodriguez A. , Fetio I. and Fresnandez B., Plant Cell Repts., 16: 58-62(1996).

2.Street H.E., Plant Tissue and Cell Culture". Blackwell Scientific Publication. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne (1977).

3.محمد ، عبد المطلب سيد ؛ الصالح ، هناء سعيد وايوب ، مقداد توفيق. انتاج منظم نمو جديد (PDA) وتأثيره على كالس زهرة الشمس. (براءة اختراع) رقم **(2789)** ، الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية **(1999)**.

4.بولص ، مناهل فوزي. اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، العراق (2004).

5.البكر ، رحاب عبد الجبار حامد. رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، العراق(2002).

6.Arnon D.I. and Hogland D.R., Soil Sci., 50: 463 (1940).

7.Arnon D.I. and Hogland D.R., Biol. Rev. 19: 55-67(1944).

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

9.Vanderhoef L.N. , Lu T.S. and Williams C.A., .Plant Physiol., 59:1004-1007(1977) .

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

11.Mohammad A.M.S. and Hassan H.A., J. Univ. Kuwait (Sci.),15:69-77. (1988).

12.سلمان ، محمد عباس. اساسيات زراعة الخلايا والانسجة النباتية.مطبعة جامعة بغداد، العـراق .(1988)