الشد المائي باستعمال المانيتول ودوره في الاكثار الدقيق والاقلمة لصنفين من الرز المستزرع في العراق (*Oryza sativa* L.)

حسين خلف زاير الكعبي

جامعةالبصرة- كلية التربية للعلوم الصرفة- قسم علوم الحياة

E.mail:kabi.zair7@gmail.com

الملخص

اجريت الدراسة في مختبر الزراعة النسيجية لقسم علوم الحياة- كلية التربية للعلوم الصرفة،لغرض دراسة تاثيرالشد المائي الناتج عن اضافة السكر الكحولي المانيتول بالمستويات- ٠,١١٢ و- ٠,٢٢٤ و- ٠,٣٣٦ و-٠,٤٤٨ ميكاباسكال الى الوسط الغذائي، في استحثاث الكالس وتطوره وفي اعداد الاجنة الجسمية المتكونة ونسب انباتها وفي عملية اقلمة النبيتات الناتجة ومتابعة تحولها الى نباتات لصنفين من الرز المستزرع في العراق هما عنبر ٣٣و مشخاب ١. استعملت البذور الناضجة للصنفين كاجزاء نباتية ، اذ استزرعت هذه البذور في الوسط الغذائي المتكون من املاح MS اللاعضوية والتي اضيفت اليها مجموعة فيتامينات B5 بتركيز 1ملغم.لتر$^{-1}$والسكروز بتركيز ٣٠ ملغم.لتر$^{-1}$والاكار بتركيز ٥غم.لتر$^{-1}$كما اضيف اليه منظمي النمو 2,4-dichlorophenoxicacetic acid (2,4-D) وBenzyl adenine(BA).

اوضحت نتائج هذه الدراسة ان الشد المائيبالمانيتول عند المستوىات -٠,١١٢ و-٠,٢٢٤ و -٠,٣٣٦ ميكاباسكال لم يكن له تاثيرا معنويا في الوزن الطري للكالس الجنيني بينما حدث انخفاض معنوي عند المستوى -٠,٤٤٨ميكاباسكال بالمقارنة مع معاملة السيطرة بالوسط الخالي من المانيتول. بينما سبب مستوى الشد -٠,١١٢ ميكاباسكال زيادة معنوية في اعداد الاجنة الجسمية وفي النسب المئوية لانباتها كما انه ساهم في زيادة النسبة المئوية للنباتات المؤقلمة بالمقارنة مع معاملة السيطرة بالوسط الخالي من المانيتول، بينما سببت المستويات الاعلى من الشد خفضا معنويا في هذه المعايير. كما اشارت النتائج الى عدم وجود فروق معنوية بين الصنفين في استجابتهما لتاثيرات الشد المائي.اوضحت النتائج كذلك ان زيادة مستوى الشد المائي بالمانيتول قد ادت الى زيادة معنوية في تركيز ايون الصوديوم والحامض الاميني البرولين والى خفضا معنويا في تركيز ايون البوتاسيوم.تم الاستنتاج من الدراسة ان الشد المائي بالمانيتول عند المستوى -٠,١١٢ ميكاباسكال كان له اثرا ايجابيا في زيادة الوزن الطري للكالس وفي زيادة اعداد الاجنة الجسمية وفي النسب المئويةلانباتها كما انه ساهم في زيادة النسبة المئوية للنباتات المؤقلمة لذا نجد ان من المناسب اضافته الى الوسط الغذائي الخاص بالزراعة النسيجية للرز.

الكلمات المفتاحية: الرز، الشد المائي، المانيتول، الكالس الجنيني، الاجنة الجسمية، الاقلمة.

Water stress induced by mannitol and its role in micropropagation and acclimation of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars

Hussein K. Zair Al-Kaaby

Department of Biology, College of Education for Pure Sciences, University of Basrah

E.mail:kabi.zair7@gmail.com

Abstract

The study was conducted in order to investigate the effects of water stress induced by theaddition of mannitol at four levels (-0.112,-0.224,-0.336 and -0.448 MPa) to the nutrient medium, on callus induction and development, number and germination percent of somatic embryos, percent of successfully acclimated plants in two Iraqi rice cultivars named Ambar33 and Mushkhab1.The explants (mature seeds of the mentioned rice cultivars) were cultured on MS nutrient medium with the addition of: B5 vitamins ($1mg.l^{-1}$), sucrose ($30g.l^{-1}$), agar ($5g.l^{-1}$) and the growth regulators used were 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and Benzyl adenine (BA).The results showed that water stress induced by mannitol at -0.112, -0.224, -0.336 MPa has no significant effect onthe embryogenic callus fresh weight, while there was a significant decrease at -0.448 MPa when compared with the control treatment (mannitol-free nutrient medium). Numbers and germination percent of somatic embryos and percent ofsuccessfullyacclimated plants where increased significantlyat -0.112 MPa while the higher levels of water stress caused a significant decrease in all the previous growth parameters,with no significant differences between the two cultivars. Results reveled that high levels of water stress by mannitol caused a significant increase in proline accumulation and sodium ion concentration, while there was a significant decrease in potassium ion concentration in the embryogenic callus of the two rice cultivars studied. No significant difference were observed between the cultivars regarding to those biochemical parameters.We can conclude from our study that the addition of mannitol at -0.112 MPa to the nutrient medium has a positive effect on embryogenic callus fresh weight, number and germination percent of somatic embryos and on percent of acclimated plants, so we recommend its addition to the nutrient medium used for rice micropropagation.

Key Words: Rice, Water stress, Mannitol, Callus, Somatic embryos, Acclimation.

المقدمة

يعد الرز.*Oryza sativa* L)(من اكثر محاصيل الحبوب اهمية في العالم اذ يعتمد عليه في الغذاء اكثر من نصف سكان الكرة الارضية، ويغطي في قارة اسيا نصف مساحة الاراضي الصالحة للزراعة في بلدان كثيرة.كما ان ٩٠% من انتاجه واستهلاكه يتم في هذه القارة ويعتبر الغذاء الرئيس للسكان فيها(Rajakumar,2013). يمتلك الرز مكانة خاصة لدى المستهلك في العراق وتكثر زراعته في المنطقتين الوسطى والجنوبية وبالرغم من هذه الاهمية الا ان زراعته اخذت بالتقلص بسبب شحة المياه، وعدم صلاحية الاراضي للزراعة نتيجة لزيادة الملوحة. وقد بلغ انتاج العراق من الرز ٣٦١,١ الف طن في العام ٢٠١٢ وهذه الكمية لا تكفي لسد الحاجة المحلية التي تبلغ اضعاف ذلك (الجهاز المركزيللاحصاء،٢٠١٢).

يصنف الرز ضمن النياتات الحساسة للشدين المائي والملحي التي يتاثر نموها سلبا بهما ويتمثل التاثر في التنخر والحروق في الاوراق و التقزم في النمو وانتاج ازهار عقيمة وانخفاض انتاجية المحصول (Khan and Abdullah,2003).

إن النباتات الراقية تكون جالسة Sessile لذا فهي غير قادرة على الهرب من عوامل الشدود غير الحيوية المختلفة كما تفعل الحيوانات، و لذلك فهي معرضة بصورة مستمرة إلى مختلف هذه العوامل دون أية حماية (Yokota *et al*., 2006) و يعتبرالشد المائي واحدا من اهم الشدود غير الحيوية المحددة لنمووانتاجية النباتات. وفي الوقت الحاضر فان ٤٥% من الاراضي الزراعية تتعرض للشد المائي بصورة متواصلة او متقطعة و يعيش في هذه الاراضي ما يقارب٣٨% من سكان الكرة الارضية (Pant *et al*.,2014).

يؤدي الشد المائي الى نقص جاهزية الماءفي التربة او في وسط نمو النبات مما يؤدي إلى خفض انتاجية المحاصيل الزراعية لاسيما في المناطق الجافة و شبه الجافة من العالم و ينتج نقص الماء عن قلة سقوط الأمطار و قلة المياه الجوفية و عندما يتجاوز معدل النتح معدل امتصاص الماء من قبل النبات . أما نقص الماء على المستوى الخلوي فينتج عنه فقدان الإنتفاخ و تغير حجم الخلية و تراكيز الذائبات و الجهد المائي و تضرر الغشاء الخلوي و تركيب البروتينات و العديد من المكونات الخلوية الأخرى(Leung and Giraudat,1998,Hasegawa *et al*,,2000;Castillo *et al*,.2007).

تعتبرصفة تحمل الشد المائي من الصفات المعقدة بسبب انها خاضعة لتحكم جينات متعددة'Multigenicلذا فهيصعبة الاختبارفياجراءلت التربية التقليدية Traditional breeding تحت ظروف الحقل والتي تعتمد على اجراء التضريب Intercrossing بين النباتات لاستحثاث صفة التحمل الملحي او المائي والتي عطت نجاحات محدودة ولم تحقق النتائج المطلوبة منها(Purohit*et al*.,1998)، لذا تم التفكير في استراتيجيات بديلة لاخلاف نباتات ذات تحمل للشدود البيئية المختلفة ومنها الشد المائي ومن هذه الستراتيجيات تقانة زراعة الخلايا والانسجة النباتية التيبرزت كاحدى التقانات التي يمكن الحصول من خلالها على نباتات متحملة للشدود البيئية وذلك عن طريق اضافة عامل شد معين للوسط الغذائي (ملح كلوريد

الصوديوم بالنسبة للشد الملحي والمانيتول او بولي اثيلين كلايكولPEG بالنسبة للشد المائي) ونتيجة لذلك فان الاجزاء النباتية المتحملة لعامل الشد المحدد سوف تبقى حية على مدى فترة الزراعة النسيجية مما يعطي الفرصة لانتخابها والاستمرار في اكثارها وصولا لانتاج نباتات تمتلك صفات التحمل المرغوبة. كما ان هذه التقانة لاتحتاج الى حيز كبير في المكان ويكفي المختبر لاجرائها كما يتم العمل بها تحت ظروف مسيطر عليها ولاتحتاج الى فترة زمنية طويلة كما يحدث في الطرق التقليدية (Purohit*et al*.,1998.) وقد استعملت هذه التقانة بنجاح في تجارب بحثية اشتملت على مئة نوع من الاشجار (Kirdmanee and Mosaleeyanon,2000) وعلى الف صنف من الرز وخمسون صنف من قصب السكر(Cha-Um and Kirdmanee,2008).

أن إستعمال المانيتول ($C_6H_{14}O_6$) وهو سكر كحولي إكتسب أهمية كبيرة في دراسات الشد المائي بسبب انه يحدث جهدا ازموزيا فقط في الوسط الغذائي لكونه مادة غير متأينة لذا لا يكون له أي دور سمي مقارنة بما يحدث إذا أستعملتالأيونات المعدنية لاحداث الشد المائي في الوسط الغذائي(Pant *et al*.,2014). لذا فان دوره ينحصر في التاثير على جاهزية الماء للنبات (Zang and Komatsu, 2007).

ونظرا للاهمية الاقتصادية لنبات الرز كغذاء رئيس للسكان في العراق ولقلة الدراساتحول تحمله للشد المائي وامكانية انتاج اصناف متحملة لهذا النوع من الشدود البيئية منه عن طريق الزراعة النسيجية فقد اجريت هذه الدراسة.

المواد وطرائق العمل

١-الاجزاء النباتية Explants

أُجريت الدراسة في مختبر الزراعة النسيجية في قسم علوم الحياة - كلية التربية - جامعة البصرةللفترة من تشرين الاول ٢٠١٢ الى حزيران ٢٠١٣ على اجزاء نباتية هيبذورصنفين من الرز هماعنبر٣٣ العراقي المعروف ومشخاب١ وهو من الأصناف الهندية الجيدة والتي استزرعت في العراق وثبت نجاح زراعته، وقد جُلبت البذور من محطة ابحاث الرز في المشخاب محافظة النجف الاشرف.

٢-التعقيم السطحي للأجزاء النباتية Surface SterilizationExplants

وضعت البذورالناضجةفي الكحول الأثيلي (٧٠%) لمدة ثلاث دقائق مع التحريك الهادئ وغُسلت بعد ذلك بالماء المقطر و المعقم ، ثم عُقمت سطحياً بواسطة القاصر التجاري Cloroxالحاوي على ٥% من هايبوكلورات الصوديوم Sodium hypochlorite لمدة ثلاثين دقيقة مع التحريك ، وأضيفت قطرة واحدة لكل (100) سم^{3}من المادة الناشرة20-Tween. ثم غُسلت البذور بعد ذلك بالماء المقطر والمعقم ثلاث مرات. أُجريت هذه العملية على منضدة انسياب

الهواء الطبقي Laminar Air Flow Cabinet المعقمة بالايثانول (70%) والتي تحتوي مصباح الأشعة فوق البنفسجية UV-Light.

٣-تحضير الوسط الغذائي Preparation of the nutrient medium

تمتحضير الوسط الغذائي والمتكون من مجموعة المغذيات الصغرى والكبرى و أستخدم لهذا الغرض الوسط االمغذي MS(Murashige and Skoog,1962) والذي يتكون من عدة أملاح والذي تم جلبه بصورة مسحوق جاهز من شركةPhytotechnology Laboratoriesالامريكية والذي أضيف اليه مجموعة فيتامينات B5(Gambrog et al.,1968) بتركيز ١ ملغم.لتر$^{-1}$ وقد جلبت هذه الفيتامينات بصورة مسحوق جاهز من ذات الشركة كما اضيفالسكروز بتركيز ٣٠ غم/لتر.

كما تمت أضافة منظمي النموالاوكسين2,4-D والسايتوكاينين BAبالتركيزين2و ١ ملغم.لتر$^{-1}$ لكل منهما على التوالي للوسط الغذائي عند مرحلة استحثاث الكالس تم بعد تكون الكالس الجنيني خفتراكيز منظمات النمو لتصبح ٠,٥ملغم.لتر$^{-1}$للاوكسين و ٠,٢ ملغم.لتر$^{-1}$ بالنسبة للسايتوكاينين وذلك لغرض تكون الاجنة وانباتها.كما تم ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط عند ٥,٨ بواسطة جهاز pH meterوأضيف بعد ذلك الاكارمن شركة Sigma بتركيز5 غم.لتر$^{-1}$لغرض تصلب الوسط ألزرعي ثم عقم الوسط الغذائي بالمعقام Autoclave تحت ضغط ٠,١ميكاباسكال ودرجة١٢١ سيليزية.

٤- اضافة المانيتول الى الوسط الغذائي

تم تحضير محاليل للمانيتول ذات جهد ازموزي -٠,١١٢ و -٠,٢٢٤ و -٠,٣٣٦ و -٠,٤٤٨ ميكا باسكال (MPa)وذلك باذابة ٥٠ و ١٠٠ و ١٥٠ و٢٠٠ مليمول.لتر$^{-1}$من المانيتول للوصول الى كل من المستويات السابقة على التوالي وبأستعمال معادلة فانت هوف (Pant *et al*.2014):

$$\pi = i\ MRT$$

وتمثل π الجهد الازموزي(بار)، i معامل فانت هوف للتفكك (يساوي ١ بالنسبة للمانيتول)، Mتركيز المانيتول(مولاري)،R ثابت الغازات،T درجة الحرارة المطلقة(كالفن) . ثم حولت الجهود الازموزية الى ميكاباسكال (١ميكاباسكال=١٠ بار) واضيفت هذه المحاليل الى الوسط الغذائي الحاوي على البذور اضافة الى معاملة السيطرة بالوسط الخالي من المانيتول .

٥-استزراع البذور و إستحثاث الكالس لصنفي الرز عنبر٣٣ و مشخاب١

زُرِعت البذور المعقمة في الاوساط الغذائية المحضرة، بمعدل أربع بذرات لكل أنبوبة زجاجية (بايركسقياس 25x110ملم)، و بواقع عشرة مكررات لكل معاملة و لكلا الصنفين . و أُجريت هذه العملية داخل منضدة إنسياب الهواء الطبقي المعقمة ، وقد عُقّمت الأدوات المستخدمة في الزراعة بالكحول الأثيلي(٧٠%) و باستمرار في أثناء فترة الزراعة . ثم حُضنت الزروعات في غرفة النمو Growth Room عند درجة حرارة 25±2°سيليزية في الظلام. وبعد مرورسبعة الى عشرة ايام بدأ تكون الكالس الاولي في الأنابيب لكلا الصنفين.وعند ظهور الكالس تم تعريضه الى شدة اضاءة مقدارها ٣٠٠٠ لوكس قيست بواسطة جهاز Environmental meter 801 ولمدة ١٦ ساعة يومياوقد حددت الفترة بواسطة المؤقت Timer.

٦-مرحلة إكثار الكالس

بعد مرور اربعة أسابيع من تكون الكالس ازدادت كتلته وحجمه في كلا الصنفين ، وأجريت عليه عملية الزراعة الثانوية Sub Culture وذلك بتقطيعه إلى عدة أجزاء ونقله إلى أوساط غذائية جديدة بالمواصفات ذاتهالغرض إكثاره وزيادة كميته ، .وتم تكرار عملية الزراعة الثانوية كل اربعة اسابيع حتى نهاية التجارب.

٧-القياسات التي اعتمادها في التجارب :

١- قياس الوزن الطريللكالسالجنيني: قيس الوزن الطريللكالس المستحث من البذوربعد أربعة اسابيع من زراعتهاباستخدام ميزان الكتروني حساس نوع Sartorius BL2105اذ استخرجت قطع الكالس الجنينيووضعت على ورق ترشيح وأزيلت بقايا الوسط الغذائي الملتصقة بهو حسب الوزن الطري له.ثم اجريت الزراعة الثانوية وذلك بتقطيع ١٠٠ملغم تقريبا من هذا الكالس واجراء الزراعة الثانوية علية في ذات التركيبة السابقة وتحت ذات الشروط بالنسبة الى الاضاءة عدا عن تقليل تراكيز منظمات النموكما تم توضيحه سابقا.

٢- - تقدير البرولين في الكالس الجنيني: أتبعت طريقة (Bates *et al*., 1973) لقياس تركيز البرولين في نسيج الكالس الجنيني المستحث من البذورالناضجه المعامله وغير المعامله بالمانيتول.

٣- تقدير الصوديوم والبوتاسيوم في الكالس الجنيني: أخذ وزن معين من الكالس الجاف الناتج من كل معاملة وتم هضمه وفق طريقة Cresser and Parsons (1979)وأستخدم الراشح لتقدير عنصري الصوديوم و البوتاسيوم وذلك باستعمال جهاز اللهب الضوئي Flame Photometer.

٤-عددالاجنةالجسمية :تم حسابها بعد اربعة اسابيع من تكون الكالس الجنيني اذ ظهرت على صورة تجمعات كروية الشكل Globular aggregations وبزوغات خضر Green spots عند الفحص تحت القوة الصغرى (6.5X) لمجهر التشريح نوع Wild MDG17.

٥-النسبة المئوية للاجنة النابتة: اعتبرت الاجنة التي ابتدا تكون المجموعينالجذري والخضري فيها اجنة نابتة وحسبت النسبة المئوية لانباتهاوفقا للمعادلة التالية:

$$\text{النسبة المئوية للأجنة النابتة} = \frac{\text{عدد الاجنة النابتة}}{\text{عدد الاجنة الكلي}} \times 100\%$$

٧-مرحلة الاقلمة

تطورت الاجنة النابتة بعد ذلك الى نبيتات داخل الانابيب الزجاجية وتم حساب اعدادها ثم اخرجت من الانابيب وغسلت النبيتات المجذرةبالماء الجاري لإزالة بقايا الوسط الغذائي، ثم غمرت بالمبيد الفطري البنليت تركيز ٠,١% لمدة خمس دقائق لوقايتها من الإصابة الفطرية. نقلت بعد ذلك الى انابيب زجاجية مجهزة بنصف القوة من محلول هوكلاند Hoagland المغذي (صورة C٢) والذي جلب بصورة مسحوق جاهز من الشركة الامريكية السالفة الذكر ذاتهاوذلك بوضع نبيتة واحدة في كل انبوبة زجاجية واعتبرت كل انبوبة زجاجية بمثابة مكررلكل معاملة وقد وضعت هذه الانابيب لمدة سبعة ايام داخل كابينة زجاجية تم التحكم بالرطوبة النسبية فيها بواسطة جهاز المرطب Humidifier اذ تم تخفيضها تدريجيا داخل الكابينة .

ثم نقلت النباتات الى سنادين بلاستيكية تحتوي مزيج من الرمل والبتموس بنسبة٢:١ (حجم:حجم) وغطيت بأغطية زجاجية شفافة (صورة D٢) للحفاظ على الرطوبة حول النباتات.و بعد ثلاثة أيام تم رفع الأغطية تدريجيا لمدة ساعة واحدة يوميا طوال الأسبوع الاول ثم زيادتها لمدة ثلاثة ساعات في الأسبوع الثاني، وفي الأسبوع الثالث زيدت الى ست ساعات ، ولحين رفعها كليا في الاسبوع الرابع وتمت عملية السقي بالمحلول المغذي باضافة ٢٥ سم^{٣} منه الى كل سندانة بعد مرور ٤٨ساعة. وفي نهاية الاسبوع الرابع تم احتساب النسبة المئوية للنباتات المؤقلمة وفق المعادلة التالية:

$$\text{النسبة المئوية للنباتات المؤقلمة} = \frac{\text{عدد النباتات المؤقلمة}}{\text{عدد النباتات المتكونة}} \times 100\%$$

التحليل الأحصائي

استعمل تصميم القطاعات العشوائية الكاملة Randomized complete block design لتجربة عامليةFactorial experimentوبعاملين (الاصنافXمستويات الشد المائي) وبعد الحصول على جدول تحليل التباين تمت مقارنة المتوسطات باستعمال اختباراقل فرق معنويRLSDعند مستوى احتمال 0.05 (الساهوكي و وهيب،1990) وتمت جميع العمليات الاحصائية باستعمال الحاسوب عن طريق البرنامج الاحصائي GENSTST.

النتائج والمناقشة

١-التغيرات المظهرية بعد استزراع البذور:

تطور نسيج الكالس الاولي والذي كان هشا غير حبيبي وابيض اللون (صورة A١) بعد مرور سبعة الى عشرة ايام من استزراع البذور ثم بدا تحوله بعد ذلك الى الكالس الجنيني والذي كان حبيبيا و متماسكا بصورةعقد لونها اصفر (صورة A١). تطورت هذه العقد بعد ذلك الى اجنة جسمية كروية الشكل عند الفحص تحت مجهر التشريح تبدا بالتحول الى بزوغات خضر (صورة B١) قبل ان يبتدا انباتها (صورة C١) وثم تتكون البادرات (صورةB٢) ولوحظ ان تكون البادرات ابتدا بالمجموع الخضري (صورة D١) ثم المجموع الجذري (صورة A٢).

٢-تاثير الشد المائي في الوزن الطري للكالس الجنيني لصنفي الرز عنبر٣٣ ومشخاب١

توضح نتائج المبينة في جدول ١عدم وجود فروق معنوية في معدل الوزن الطري للكالس الجنيني عند الشدود المائية -٠,١١٢ و -٠,٢٢٤ و-٠,٣٣٦ ميكاباسكال ومعاملة السيطرة بينما حدث إنخفاض معنوي في معدل الوزن الطري عند مستوى الشد -٠,٤٤٨ ميكاباسكال والذي بلغ ٠,٧١ غم مقارنة بالسيطرة (١,١٩غم). اما بالنسبة للتداخلات بين الصنفين والشدود الازموزية فلم تبلغ مستوى المعنوية الا عند المستوى -٠,٤٤٨ ميكاباسكال وكان اقل وزنطري للكالس عند التداخل بين هذه المعاملة والصنف مشخاب١ والذي بلغ ٠,٦٤غم.

ان انخفاض معدل الوزن الطري تحت تأثير الشد المائي قد يعود الى التاثير الازموزي و الذي يسبب قلة في جاهزية الماء في الوسط الغذائي والذي يؤثر في الجهد الضغطي لخلايا الكالس مما يسبب انخفاضا في انقسامها ونموها (Abdul-Qadir and Al-Kaaby,2011)، كما ان الشد المائي يسبب تاثيرات سلبية على العمليات الحيوية مثل تراكم الذائبات و التوازن الهرموني ويؤدي الى إضطراب في تركيب البروتينات و الاحماض النووية وفي توزيع الايونات في الخلية، وتحتاج

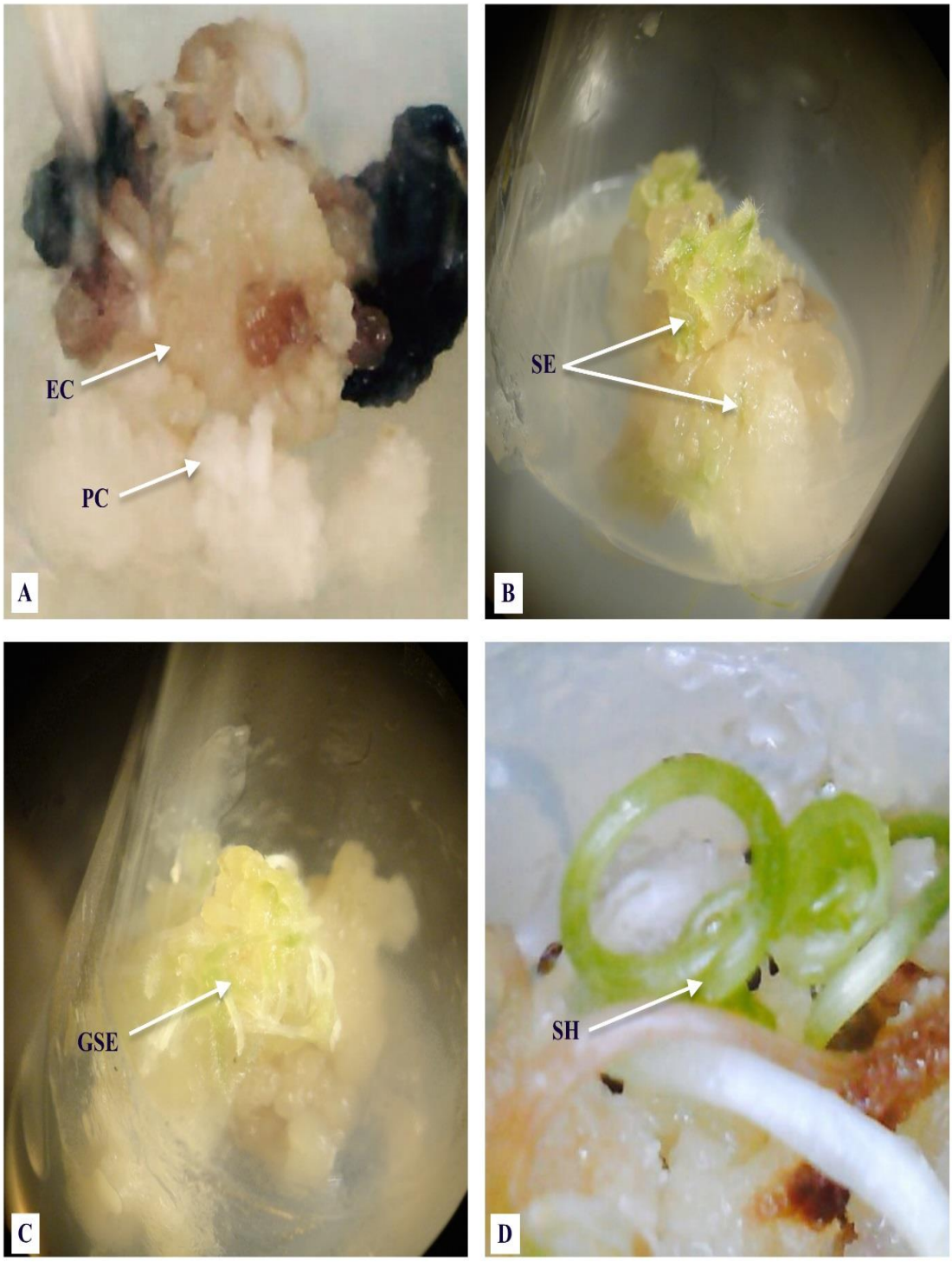
الخلية الى صرف طاقة اضافية للمحافظة على توازن جهدها الازموزي مع الوسط الغذائئ الامر الذي يؤدي الى خفض معدل النمو وربما يؤدي الى السمية الايونية (Yokota *et al*.,2006; Bolarin*et al*.,1995;Flowers and Yeo,1988)

أما عن عدم تأثر الوزن الطري للكالس عند التراكيز الثلاثة الاولى للمانيتول مقارنة مع السيطرة فقد اشارت العديد من الدراسات إلى أن إستخدام عوامل أو مواد تستحث الشد المائي في الأوساط الغذائية عند المستويات المنخفضة قد تكون عوامل مشجعة لنمو الانسجة في مثل هذه الأوساط في حين تكون التراكيز العالية منها عوامل تعمل على تخفيض أوزانها الطرية (Al- Kabby and Abdul-Qadir,2011; Iraqi and Tremblay,2002).وربما يعود السبب في ذلكالى ان المانيتول في تراكيزه المعتدلة ربما يكون مصدر اضافي للطاقة(مع السكروز) في الاوساط الزرعية اذ انه سريع التمثيل من قبل الخلايا(Mohamed andIbrahim,2012).ان مصدر الطاقة الكربوهيدراتي في الاوساط الزرعية يتمثل بالسكروز بصورة رئيسة ولكن عند زيادة تركيزه او اضافة مصدر كربوهيدراتي اخر بتراكيز عالية سوف يرتفع الجهد الازموزي للوسط الغذائي وينخفض امتصاص الماء والمغذيات وبالتالي يثبط النمو(Hadi*et al*.,2014).

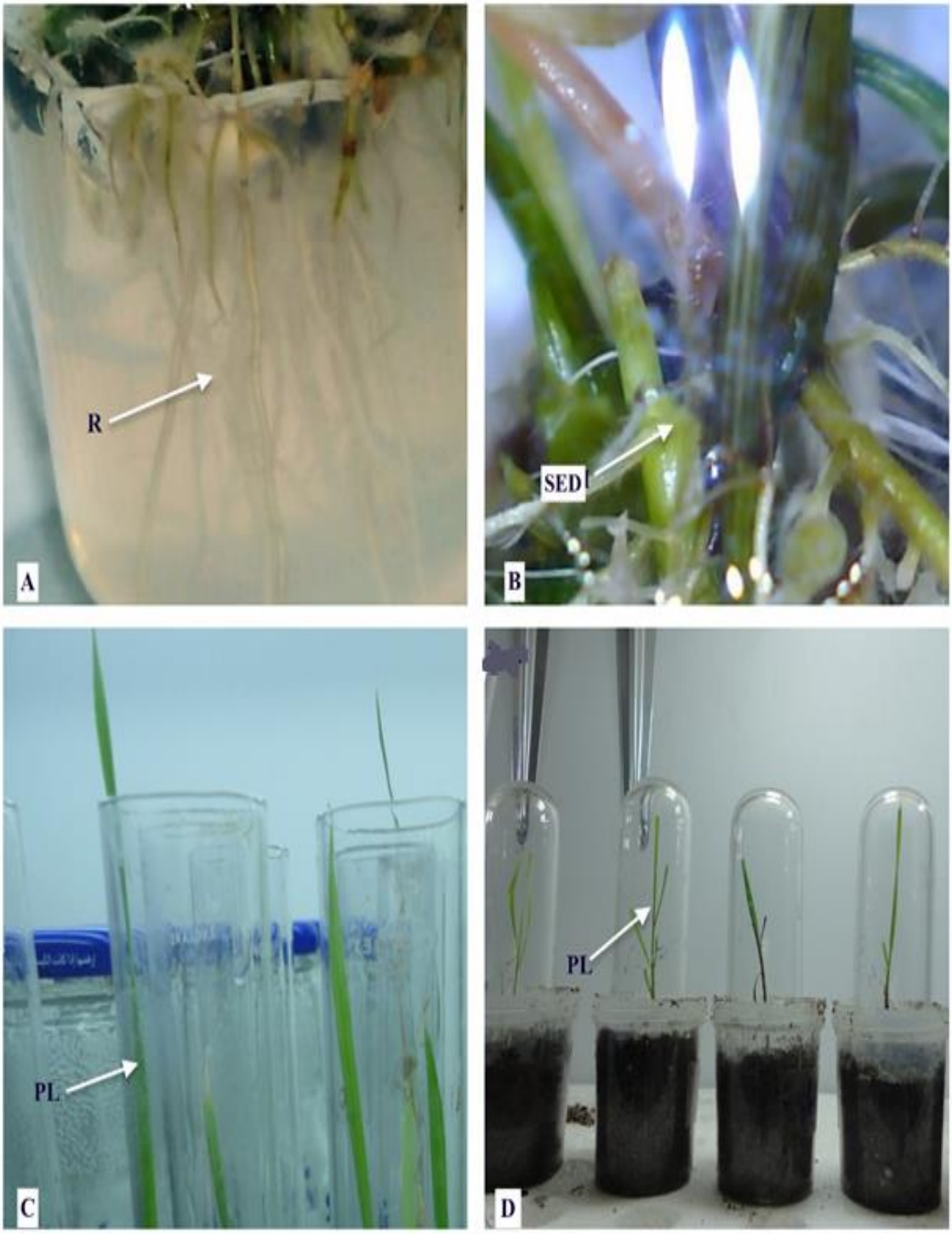
جدول (1) تأثير الشد المائيبالمانيتول في الوزن الطري(غم) لكالس صنفي الرز عنبر٣٣ و مشخاب١

الشد المائي MPa / الصنف	٠	-٠,١١٢	-٠,٢٢٤	-٠,٣٣٦	-٠,٤٤٨	المعدل
عنبر٣٣	١,٢٢	١,٤٦	١,٢٨	١,١٩	٠,٧٩	١,١٨
مشخاب١	١,١٧	١,٤٣	١,١٨	١,١٤	٠,٦٤	١,١٤
المعدل	١,١٩	١,٤٤	١,٢٣	١,١٦	٠,٧١	

R.L.S.D.	للصنف غ.م	للتركيز = ٠,٣٠	للتداخل= ٠,٤٣


EC
PC
A
SE
B
GSE
C
SH
D

صورة١:المراحل المبكرة للاكثارالدقيق للرز:A- الكالس الاولي (PC)، الكالس الجنيني (EC). B- الاجنة الجسمية (SE). C- الاجنة الجسمية النابتة (GSE).D- المجموع الخضري (SH)


R
A
SED
B
PL
C
PL
D

صورة٢ :مراحل تكون النبيتات والاقلممة للرز: A- المجموع الجذري (R). B-البادرات (SED). C- النبيتات في محلول هوكلاند(PL). D- النبيتات في السنادين (PL).

٣-تاثير الشد المائي في تركيز البرولين في الكالس الجنيني لصنفي الرز عنبر33 ومشخاب١:

توضح النتائج في جدول ٢ أن زيادة الشد المائيبالمانيتول في الوسط الغذائي أدى إلى زيادة معنوية في تركيز البرولين في الكالس الجنيني عند المستويين -٠,٣٣٦ و -٠,٤٤٨ميكاباسكال اذ بلغ تركيزه (٢,٨٩ و ٥,٥٠ مايكغم.غم -١وزنا طريا) لكل من المستويين على التوالي بالمقارنة مع معاملة السيطرة، بينما لم تكن الزيادة معنوية عند المستويات الاخرى. كما يظهر الجدول ذاته ان الفروق بين الصنفين لم تكن معنوية في كمية البرولين المتجمعة في الكالس.وفيما يخص التداخل بين الصنفين ومعاملات المانيتول يبين الجدول ان اعلى تركيز للبرولين قد تحقق عند تداخل المستوى -٠,٤٤٨ ميكاباسكال مع الصنف عنبر٣٣ دون ان يكون هنالك فارق معنوي بين الصنفين في معاملات التداخل كافة.

إن زيادة تركيز البرولين تحت تاثير الشدود البيئية ومنها الشد المائي يعتبر من الظواهرالمميزة لهذه الشدود اذ ان هذا الحامض الاميني يصنف ضمن المركبات المنظمة للازموزية Osmolytes او الحاميات الازموزية Osmoprotectants في الخلايا النباتية التي تتعرض للشدود البيئية اذ يتجمع فيهذه الخلايا دون ان يؤثر في عملياتها الايضية(Munns and Tester,2008) ان هذه الزيادة في تركيز البرولين هي استجابة من الخلايا المعرضة للشد المائيللمحافظة على جهدها الازموزي وبالتالي على المحتوى المائي للعصير الخلوي (Hasegawa*et al.*,1986) كما ان البرولين يحافظ على سلامة الاغشية الخلوية والعضيات ويمكن ان يكون مخزنا مصدرا للنتروجين العضوي لبناء الاحماض الامينية والبروتينات بعد انتهاء ظروف الشد المائي (Sairam and Tygai,2004) و تعد زيادة البرولين في الخلية دليل على تحمل النبات للشدود البيئية الملحية و المائية (Kavikishor*et al.*, 1995).

جدول ٢ تأثيرالشد المائي بالمانيتول في تركيز البرولين (مايكغم/غم وزنا طريا) فيالكالس الجنيني لصنفي الرز عنبر٣٣ و مشخاب١

الشد المائي MPa / الصنف	٠	-٠,١١٢	-٠,٢٢٤	-٠,٣٣٦	-٠,٤٤٨	المعدل
عنبر٣٣	١,٤٦	١,٦٠	٢,٢٠	٣,٠٠	٥,٨٩	٢,٨٣
مشخاب١	١,٣٢	١,٥٧	٢,٠٥	٢,٧٩	٥,١١	٢,٥٦

المعدل	١,٣٩	١,٥٨	٢,١٢	٢,٨٩	٥,٥٠	
R.L.S.D.	للصنف غ.م		للتركيز = ٠,٩٦		للتداخل= ١,٣٦	

٤-تاثيرالشد المائيبالمانيتول في تراكيز ايوني الصوديوم والبوتاسيوم في الكالس الجنيني لصنفي الرز عنبر٣٣و مشخاب١

يوضح جدول ٣ ان زيادة الشد المائي في الوسط الغذائي قد سبب زيادة معنوية في تركيز الصوديوم في الكالس الجنيني بالمقارنة مع معاملة السيطرة، ابتداءامن المستوى -٠,٢٤٤ ميكاباسكال والمستويات اللاحقة له وبلغ تركيز الصوديوم اقصاه(٣,٣٦ ملغم/غم وزنا جافا) عند مستوى الشد -٠,٤٤٨ ميكاباسكال.كما يظهر الجدول ذاته ان الفروقات في تركيز الصوديوم بين الصنفين لم تبلغ مستوى المعنوية.كما ان الفروقات في معدلات التداخل بين الصنفين والمانيتول لم تكن معنوية كذلك ويمكن الملاحظة ان اعلى معدل لتركيز الصوديوم كان عند التداخل بين الصنف مشخاب١ ومستوى الشد -٠,٤٨٨ميكاباسكال.

اما بالنسبة لايون البوتاسيوم فيظهر الجدول ٤ ان زيادة الشد المائي قد سببت انخفاضا معنويا فيه عند المستوى -٠,٤٤٨ ميكاباسكال فقط بالمقارنة مع معاملة السيطرة بينما لم يكن الانخفاض معنويا عند بقية المستويات.كما لم تكن الفروق معنوية بين الصنفين قيد الدراسة وكذلك عند التداخل بين الصنفين ومستويات الشد المائي. وتم تسجيل اقل معدل لتركيز البوتاسيوم عند التداخل بين الصنف عنبر ومستوى الشد المائي -٠,٤٤٨ والذي بلغ ٦,٨٨ ملغم /غم وزنا جافا.

جدول ٣تأثير الشد المائي بالمانيتول إلى في تركيزالصوديوم (ملغم/غم وزنا جافا) في كالس صنفي الرز عنبر٣٣ و مشخاب١

الشد المائي MPa / الصنف	٠	-٠,١١٢	-٠,٢٢٤	-٠,٣٣٦	-٠,٤٤٨	المعدل
عنبر3	١,٦٦	١,٧٠	٢,٤٩	٢,٦٦	٣,٢٢	٢,٣٤

مشخاب١	٢,٦٩	٣,٠٠	٣,٠٦	٣,٢٤	٣,٥٠	٣,٠٩
المعدل	٢,١٧	٢,٣٥	٢,٧٧	٢,٩٥	٣,٣٦	
R.L.S.D.	للصنف غ.م		للتركيز = ٠,٤٥		للتداخل= ١,٠٢	

جدول ٤ تأثير الشدالمائيبالمانيتول فيتركيز البوياسيوم (ملغم/غم وزنا جافا) في كالس صنفي الرز عنبر٣٣ ومشخاب١

الشد المائي MPa / الصنف	٠	-٠,١١٢	-٠,٢٢٤	-٠,٣٣٦	-٠,٤٤٨	المعدل
عنبر	10.49	10.56	10.02	10.40	6.88	9.67
مشخاب١	10.37	11.04	11.53	9.75	7.12	9.96
المعدل	10.43	10.80	10.77	10.07	7.00	
R.L.S.D.	للصنف غ.م		للتركيز = 1.42		للتداخل= 2.18	

أن تراكم الأيونات هو من صفات التعرض الشد المائي كما انها طريقة لقياس مدى تحمل النباتات للشدود إذ لوحظ ان تراكم هذه الايونات عند حدود معينة يساهم في التنظيم الأزموزيOsmoregulation في الأنسجة النباتية وذلك عن طريق المحافظة على الجهد الضغطي في خلاياها. كما لوحظ ان زيادة تركيز أيونات الصوديوم في الخلية ودخوله من خلال القنوات المنفذة له في الغشاء البلازمي يؤدي إلى تدفق أيونات البوتاسيوم إلى الخارج بنسبة عالية تعادل ثلاثة أضعاف تدفق أيونات الصوديوم (Tester, 1990)، فيحدث إنخفاض في أيونات البوتاسيوم و زيادة في أيونات الصوديوم وهذه الزيادة في الصوديوم سوف تساهم عند حدود معينة في زيادة الجهد المائي للخلية واستمرار تدفق الماء اليها (Tester and

(Davenport, 2003. وتعتبر مقدرة الخلايا النباتية على الإحتفاظ بنسبة عالية من البوتاسيوم / الصوديوم دليلا على تحمله للشدين الملحي والمائي لانها تبين احتفاظ هذه الخلايا بقابليتها الإختيارية في إمتصاص العناصر (الكعبي، ٢٠٠٤).

٥-تاثير الشد المائي في صفات الاجنة الجسمية لصنفي الرز عنبر٣٣ ومشخاب١

١-اعداد الاجنة الجسمية

تشير النتائج المبينة في جدول ٥ أن هناك إنخفاض معنوي في عدد الأجنة الناتجة عند مستويات الشد المائي-٠,٢٢٤ و -٠,٣٣٦ و -٠,٤٤٨ ميكاباسكال من المانيتول مقارنة بمعاملة السيطرة بينما تفوق المستوى -٠,١١٢ ميكاباسكال على معاملة السيطرة في اعداد الاجنة الجسمية المتكونة إذ بلغ معدل عدد الاجنة الجسمية عنده ١٢٥,٨جنين بالمقارنة مع ١١٠,٨ جنينا. أما عند مقارنة الصنفين فلم تظهر فروق معنوية بينهما، أما بالنسبة إلى معاملات التداخل نجد أن تداخل الصنفين مع المستوى -٠,١١٢ ميكاباسكال قد حقق اعلى معدل لعدد الاجنة الجسمية دون ان يكون هنالك فارق معنوي بين الصنفين.

جدول 5تأثير الشد المائي بالمانيتول في اعداد الاجنة الجسمية المتكونة لصنفي الرز عنبر٣٣ و مشخاب١

الشد المائي MPa / الصنف	٠	-٠,١١٢	-٠,٢٢٤	-٠,٣٣٦	-٠,٤٤٨	المعدل
عنبر	112.3	١٢٥,٠	١٠١,٣	99.6	77.3	103.1
مشخاب١	١٠٩,٤	١٢٦,٦	١٠٣,٧	٩٤,٣	٧٢,١	١٠١,٢
المعدل	١١٠,٨	١٢٥,٨	١٠٢,٥	٩٦,٩	٧٤,٧	
R.L.S.D.	للصنف =1.7		للتركيز = 2.7		للتداخل= 3.9	

٢- النسب المئوية للاجنة النابتة

تبين النتائج الموضحة فيجدول ٦ ان تاثير الشد المائي في النسب المئويةللاجنة الجسمية النابتةللصنفين كان مماثلا لتاثيره في اعدادها، اذ حدثت زيادة معنوية في نسب الانبات عند مستوى الشد -٠,١١٢ ميكاباسكال بالمقارنة مع معاملة

السيطرة بينما حدث انخفاض معنوي في هذه النسبة عند المستويات اللاحقة. كما لم تظهر فروق معنوية بين الصنفين في نسب انبات الاجنة الجسمية لكل منهما. وحقق التداخل بين الصنفين مع التركيز -٠,١١٢ ميكاباسكال اعلى معدل لنسب الانبات.

جدول ٦ تأثير الشد المائي بالمانيتول فيالنسب المئوية للاجنة الجسميةالنابتة لصنفي الرز عنبر٣٣ و مشخاب١

الشد المائي MPa / الصنف	٠	-٠,١١٢	-٠,٢٢٤	-٠,٣٣٦	-٠,٤٤٨	المعدل
عنبر٣٣	66.3	74.1	65.7	67.8	58.4	66.4
مشخاب١	70.2	72.5	63.3	65.2	52.6	64.2
المعدل	68.2	73.3	64.5	66.5	55.5	
R.L.S.D.	للصنف غ.م		للتركيز = 3.1		للتداخل= 4.3	

ان الزيادة في اعداد الاجنة الجسمية وفي النسب المئوية لانباتها عندمستويات الشد المعتدلة بواسطة المانيتول والذي تمت الاشارة اليهما في هذه الدراسة ربما تعود الى انوجود المانيتول في وسط النمو يلعب دوراً مهماً في زيادة كمية الطاقة المتاحة، والذي يؤدي الى زيادة عدد الإنقسامات كما تم توضيحه سالفا. كما ان مستوى الشد المعتدل يكون ضروريا لتطورالاجنة الجسمية اذ انه يستحث تجمع المواد المخزونة و تحوير عملية DNA methylation Stassolla and (Yeung,2003) والذي ينتج عنه اكتمال نمو وتطور الجنين الجسمي ومن ثم تحوله الى بادرات طبيعية، اذ ان هذه المواد المخزونة هي مصدر الغذاء كما انها تساهم في تحمل الجنين الناشيء للشد المائي خلال مرحلة الانباتوتكون البادرات(Coelho and Benedito,2008).

٦-تاثيرالشد المائي في النسب المئوية للنباتات المؤقلمة لصنفي الرز عنبر٣٣ ومشخاب١

تظهر نتائج جدول ٧ تفوق مستوى الشد المائي -٠,١١٢ ميكاباسكال في النسبة المئوية للنباتات المؤقلمة بالمقارنة مع معاملة السيطرة إذ بلغت النسبة لهما ٩٤,٣% و ٧٧,٥% على التوالي بينما لم تتاثر هذه النسبة عند المستوى -٠,٢٢٤ ميكاباسكال ولكنها انخفضت بعد ذلك بشدة وبصورة معنوية عند المستويين -٠,٣٣٦ و -٠,٤٤٨ ميكاباسكال. كما يظهر الجدول التفوق المعنوي للصنف عنبر٣٣ على الصنف مشخاب١ في النسب المئوية للنباتات المؤقلمة. وفي حالة التداخل فيبين الجدول ان تداخل الصنف عنبر٣٣ مع مستوى الشد -٠,١١٢ ميكاباسكال قد حقق اعلى نسبة مئوية للنباتات المؤقلمة والتي بلغت ٩٧,٣% وبفارق معنويعن باقي التداخلات.

جدول ٧ تأثير الشد المائيبالمانيتول في النسب المئوية للنبيتات المؤقلمة لصنفي الرز عنبر٣٣ ومشخاب١

الشد المائي MPa / الصنف	٠	-٠,١١٢	-٠,٢٢٤	-٠,٣٣٦	-٠,٤٤٨	المعدل
عنبر	78.1	97.3	88.0	55.0	30.8	69.8
ياسمين	77.0	91.3	72.6	36.3	27.5	60.9
المعدل	77.5	94.3	80.3	45.6	29.1	
R.L.S.D.	للصنف =3.4		للتركيز = 5.4		للتداخل= 7.7	

ان هذه الزيادة في النسب المئوية للنباتات المؤقلمة لصنفي الرزعند مستوى الشد -٠,١١٢ ميكاباسكال تبدو متوافقة مع الزيادة في اعداد الاجنة الجسمية المتكونة وفي نسب انباتها عند هذا المستوى اذ ان الشد المائي المعتدل وطريقة التقسية Hardening التدريجية للنبيتات من الزجاج الى السنادين المغطاة ثم السنادين المكشوفة قد ساهمت في تطور بادرات طبيعية للصنفين تمتلك من الغذاء والطاقة المخزونة ما مكنها من التطور الى نباتات مؤقلمة يمكن لها ان تعيش تحت ظروف الزراعة الطبيعية(حسين،٢٠١٢).

الاستنتاجات والتوصيات

يمكن الاستنتاج على ضوء الدراسة ان عامل الشد المائي المعتدل بواسطة المانيتول يمكن ان يساهم في زيادة استحثاث الكالس وفي تحيسين صفات الاجنة الجسمية مما ادى الى نجاح عملية الاقلمة لذا نجد ان من الممكن ان يضاف عامل شد مائي لا ايوني الى الوسط الغذائي بمستوى معتدل لانجاح عملية الاكثار الدقيق والاقلمة لنبات الرز.

المصادر References

-الجهاز المركزي للاحصاء.٢٠١٢.المجموعة الاحصائية السنوية- وزارة التخطيط- بغداد.

-الكعبي، حسين خلف زاير.٢٠٠٤. دراسة تاثير كلوريد الصوديوم والبرولين في الاكثار الدقيق لنخلة التمر صنف برحي المزروعة خارج الجسم الحي.اطروحة دكتوراه-كلية التربية-جامعة البصرة- العراق.

-الساهوكي، مدحت و وهيبب، كريمة احمد.١٩٩٠. تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، العراق.

-حسين، وئام مناضل.٢٠١٢.تاثيرمستخلصي البطاطا وعصير الليمونوالمانيتول في نمو واقلمة صنفين من الحنطة (*Triticum aestivum*) خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير-كلية التربية-جامعة البصرة.

-Abdul-Qadir, L.H.; Al-Kaaby, H.K.(2011). The effect of water stress on callus and somatic embryosformation of rice (*Oryza sativa* L.)cv. Jasmine cultured *in vitro*. J. Bas.Res.Sci.37:3-15.

-Al-Kabby, H.K. and Abdul-Qadir.L.H. (2011).Effect of water stress on callus induction from shoot tips of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Bream cultured *in vitro*. Bas.J.Date Palm Res.10:1-14.

-Bates,L.S.; WaldenR.P. andTeare I.D.(1973).Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil,39:205-207.

-Bolarin,M.C.; Santa-CruzA. ; Cayuela F. and Perez-AlfoceaF.(1995).Short term solutes change in leaves and roots of cultivated and wild tomato under salinity.J.Plant Physiol.147:463-468.

-Castillo, E.G.; Toung T.P. ; IsmailA.M. andInubushi K.(2007).Responseto salinity in rice: comparative effects of osmotic and ionic stresses. Plant Prod.Sci.10:159-170.

-Cha-Um,S..; Kirdmanee C.(2008). Assessment of salt tolerance in *Eucalyptus*, rain tree and Thai neem underlaboratory and the field conditions. Pak. J. Bot. 40: 2041-2051.

-Coelho C.M; Benedito V.A.(2008). Seed development and reserve compound accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Seed Sci. and Bioteh. 2:42-52.

-Cresser, M.S. and Parsons J.W.(1979).Sulphuric-perchloric acid digestion of plant material for determination of nitrogen, potassium, calcium and magnesium.AnalyticaChimica Acta.109:431-436.

-Flowers,T.J. and YouA.R.(1988).Ion relation of salt tolerance.In: Solutes transportin plant cells and tissue. (Baker, A.D. and J.L. Hall, eds). Longman:392-416.

-Gambrog, O.L.; Miller,R.A. and Ojma, K.(1968).Nutrient requirements of suspention cultures of soyabean root cells.Exp.Cell.Res.50:151-158.

- Hadi, F.; Ayaz, M.; Ali,S.; Shafiq, M.;Ullah,R. andUllah A. Jan.(2014).Comparative effect of polyethyleneglycol and mannitol induced drought on growth (*in vitro*) of canola (*Brassica napus*), cauliflower (*Brassica oleracea*) and tomato (*Lycopersiconesculentum*) seedlings. Int.J.Bio.sci.4:34-41.

-Hasegawa,P.M.; Bressan R.A.; Zhu, J.K ;Bohnert, H.J.(2000).Plant cellular and molecular responses to high salinity. Ann.Rev.Plant Physio.Mol.Biol.15:463-499.

-Hasegawa,P.M.;Bressan, R.A. and Handa, A.K.(1986).Cellular mechanisms of salinity tolerance. Horti.Sci.21:1317-1324.

-Iraqi, D. and Tremblay, F.M.(2002). Analysis of carbohydrates metabolism, enzyme and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests aregulatory role of exogenous sucrose in embryo development.J.Exp.Bot.52:2301-2311.

-Kavikishor, P.; Hong, Z.;.Miao,G.;.Hu, C.andVerma,, D.(1995). Over expression of 1-Pyrrilone-5- Carboxylate synthetaseincreases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. Plant Physiol., 108: 1387-1390.

-Khan M.A. and Abdullah, Z.(2003). Salinity-sodicity induced changes in reproductive physiology of rice (*Oryzasativa*) under dense soil conditions. Environ. Exp. Bot 49,149-157.

Kirdmanee C. andMosaleeyanon, K.(2000). Environmental engineering for transplant production. In: Transplantproduction in the 21st century (Kubotaand, C. and C. Chun, eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 78-81.

-Leung, J. and Giraudat.(1998).Abscisic acid signal Transduction .Ann .Rev. Mol. Biol.,49:,199-222.

- Mohamed, M. A. and Ibrahim, T.A..(2012). Enhanced*in vitro* production of *Rutagraveolens*L. coumarins and rutin by mannitol and ventilation. Plant Cell Tis. Org. Cult.111: 335 343.

- Munns, R. and Tester, M.(2008).Mechanism of salinity tolerance.Ann.Rev.Plant Biol.,59:651-681.

-Murashige, T. and Skoog, F.(1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.

-Pant, N.S.;Agarwal, R. and Agarrwal, S.(2014).Mannitol-induced drought stress on calli of *Trigonellafoenum-graecum*L.Var. RMt-303.Ind.J.Exp.Bot.52:1128-1137.

-Purohit, M.; Srivastava, S. and Srivastava, P.S.(1998). Stress tolerant plants through tissueculture. In: Srivastava, P.S. (Ed.), Plant Tissue Culture and Molecular Biology:Application and Prospects. Narosa Publishing House, New Delhi, pp. 554–578.

-Rajakumar, R..(2013).A study on effect of salt stress in the seed germination and biochemical parameters of rice (*Oryza sativa* L.) under *in vitro* condition. Asian J. Plant Sci.3:20-25.

-Sairam, R. K. and Tygai, A.(2004).Physiologyand molecular biologyof salinity tolerance in plants. Curr.Sci.86:407-421.

Stasolla, C; E.C. Yeung, E.C.(2003). Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. Plant Cell, Tiss Org.Cult.74:15-35.

-Tester, M.(1990). Plant ion channels: Whole Cell and Single Channel Studies New Physiol.114:305-310.

-Tester, M.andDavenport, R..(2003).Na+-Tolerance and Na+-Transport in Higher plants. Ann.Bot. 91:503-527.

-Yokota,A.;Takahara,K. and Akashi, K.(2006).Water stress. In: Physiology and Molecular Biology of stress tolerance in Plants.(Madhava, K.V.,A.S. Raghavendra, K. JanardhanReddy edts).Springer,Dordrecht, The Netherlands.pp.15-39.

-Zang X; and Komatsu, S.(2007). A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. Phytochem.68, 426-437.