Effect of different types and concentrations of Sugars and Benzyl adenine (BA) on the shoot formation of *Euphorbia tirucalli* L. grown *in vitro*

تأثير أنوع وتراكيز مختلفة من السكريات والبنزيل أدنين (BA) في تفتح ألافرع الخضرية لنبات قرن الغزال *Euphorbia tirucalli* L. المزروع نسيجياً خارج الجسم الحي .

سهام عبد الرزاق سالم الجبوري
قسم تقنيات الإنتاج النباتي / الكلية التقنية /المسيب

الخلاصة

جرى اختبار ثلاثة سكريات مختلفة هي السكروز Sucrose والكلوكوز Glucose والمانيتول Mannitol وبثلاثة تركيز (3و5و7)% باضافتها مع او بدون BA(0.0 او1.0او3.0 او5.0 او7.0) ملغم/ لتر إلى الوسط الغذائي MS، إذ تمت زراعة العقد الحاوية على البراعم الجانبية على هذه التوليفات المختلفة .

أظهرت ان التركيز 3% لجميع السكريات والتركيزين5 و7 % من سكر المانيتول قد فشلت في نمو الأفرع وبدون أي إضافات للـ (BA) .وأعطت التوليفة المكونة من 5% كلوكوز +5 ملغم /لتر BA أعلى معدل لعدد الأفرع المتفتحة والذي بلغ 2.36 فرع ، في حين كـانت التوليفة المكـونة من7% كلوكوز +5 ملغم /لتر(BA) هي الأفضل معنويا في معدل طول الأفرع إذ أعطت معدلا بلغ 37.25 ملم . وكانت استجابة العقد ضعيفة جدا وصلت في معظمها إلى الصفر في الوسط الحاوي على سكر المانتيول والـ (BA) .

Summary

Three different sugars : sucrose , glucose and mannitol in three concentrations (3,5 and 7)%were examined with or without addition of BA (0.0,1.0,3.0,5.0 or 7.0) mg/L to the MS nutrient medium, on which the single noedes containing lateral buds were cultured .

The results showed that no shoot proliferation without BA treatment ,even when all types of sugars were used at a concentration of 3% or mannitol at a concentration of 5% and 7% .

The highest mean number of shoot (2.36) was found when a combination of 5% glucose +5mg/L BA was used , whilest the shoot elongation has significantly been induced (37.25mm) when a combination of 7% glucose+ 5mg/L BA was used . Mostly no response was found when mannitol used with any combination of BA .

Key words : *in vitro* , *Euphorbia tirucalli* L. sucrose , glucose , mannitol and benzyl adenine (BA , MS)

المقدمة Introduction

يعود نبات قرن الغزال *Euphorbia tirucalli* L الى العائلة Euphorbiaceae وهو من النباتات العصارية التي تعيش في المناطق الاستوائيسة وشبة الاستوائية في شرق أفريقيا وجنوب أمريكا وشرق آسيا والهند ، وتعد افريقيا الموطن الاصلي لهذه النباتات . ولهذا النبات تسميات مختلفة منها قرن الغزال وشجيرة الاقلام وشجيرة الحليب ونبات النفط [1] ، ويكون جذعها الرئيسي وافرعها القديمة خشبية في حين تكون الافرع اليافعة خضر واسطوانية الشكل تحمل اوراقاً قليلة وصغيرة جداً تتساقط بصورة مبكرة مما ادى الى تسميتها بشجيرة الاقلام ، وتستخدم كنبات زينة او في عمل الاسيجة الخارجية الحية [3,2] .

وأشار [4] إلى أن المادة الحليبية السامة (التي تخرج عند جرح النبات) مع بعض الإضافات الاخرى تصبح مادة مكافئة لبعض مشتقات النفط اي لها فائدة من الناحية الاقتصادية خاصة وان هذه النباتات تنمو في أراضي غير صالحة لزراعة اغلب المحاصيل .

يعد النبات بأكمله طاردا للحشرات وان استخدام المادة الحليبية بكميات محدودة تدخل في بعض العلاجات التقليدية، إذ تستخدم لمعالجة السرطان والاكزيما والربو والام المفاصل وغيرها فضلا عن كونها مصدرا مهما لإنتاج الفيتامينات والمركبات الستيرويدية والمبيدات الحشرية [6,5] .

ونظرا للأهمية الاقتصادية والطبية لهذه النباتات ولكون أكثارها بالعقل يستغرق وقتا طويلا فضلا عن فشل معظمها في النمو، فان التجربة الحالية تهدف إلى إيجاد طريقة مناسبة لإكثار هذه النباتات في وسط معقم خارج الجسم الحي *in vitro* لإنتاج إعداد كثيرة منها في وقت قصير للاستفادة من الأفرع الناتجة في الاستخدامات المختلفة .

المواد وطرائق العمل Material and Methods

أخذت لأفرع بطول 5 سم وغسلت بماء الحنفية الجاري وباضافة الصابون السائل ثم شطفت وتركت تحته لمدة 20 دقيقة ثم نقلت الى كابينة إنسياب الهواء الطبيقي حيث غمرت الافرع في محلول كلوريد الزئبق بتركيز 0.1% لمدة5 دقائق ، وغسلت بعدها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لمدة 3 دقائق لكل مرة .

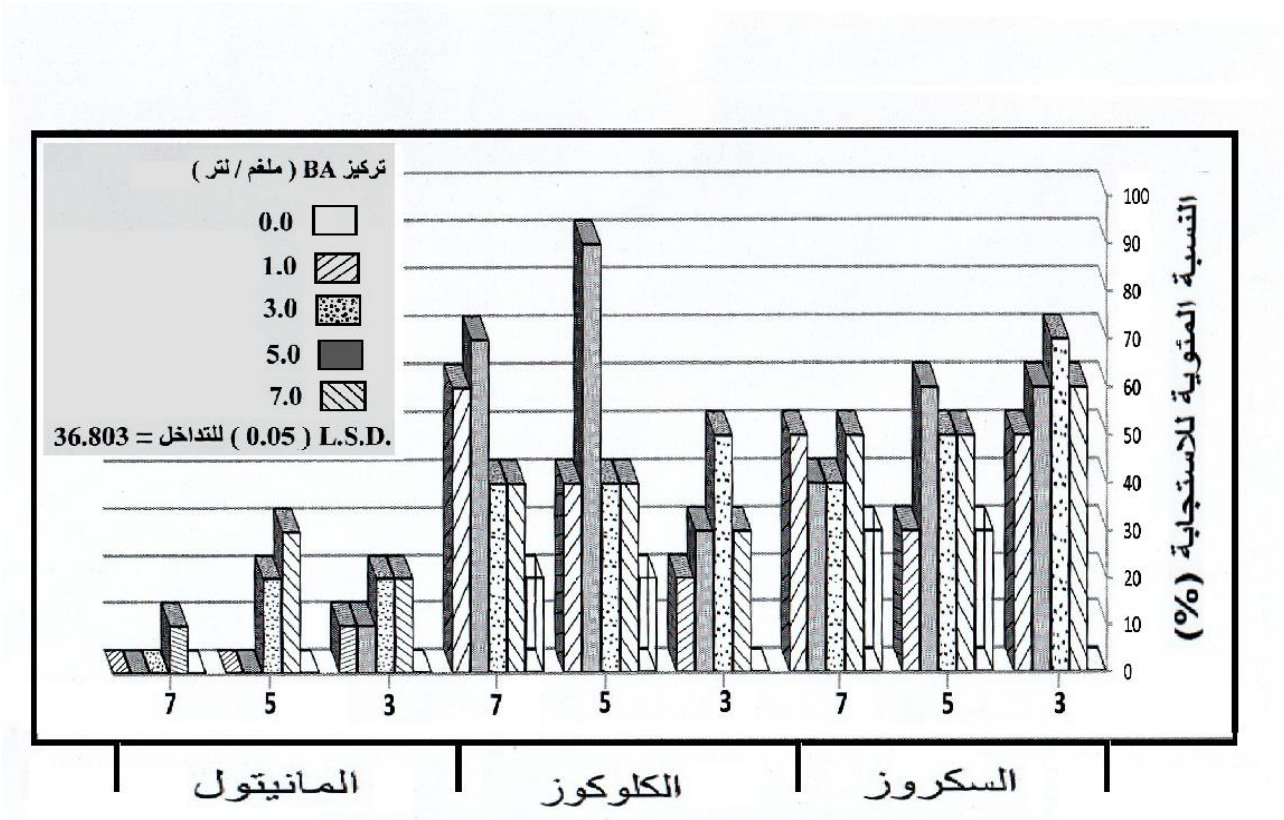
قطعت الأجزاء النباتية بطول2 سم تقريبا حاوية على عقدة واحدة وفيها البرعم الجانبي وزرعت في أنابيب زجاجية حاوية على وسط Murashige and Skoog (MS) [7] المعقم والمجهز بثلاثة تراكيز (3و5و7)% لثلاثة سكريات هي السكروز و الكلوكوز والما نيتول بدون أو مع إضافة الـ(BA) بتراكيز (0.0او1.0 او 3.0او 5.0 او 7.0) ملغم /لتر وبواقع 10 مكررات لكل تركيز . حضنت المزارع تحت درجة حرارة 25 ±2 º م وشدة إضاءة 1000 لوكس لمدة 16 ساعة /يوم . أخذت النتائج بعد مرور 45 يوما من تاريخ الزراعة .

أجري التحليل الإحصائي للنتائج باستخدام التصميم العشوائي الكامل Completely randomized design (CRD)، وقورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي Least significant differences (LSD) على مستوى احتمالية 0.05 [8].

النتائج والمناقشة Results and Discussion

يتبين من النتائج الموضحة في الشكل (1) أن جميع العقد لم تستجب للتفتح في الوسط الحاوي على التركيز 3 % لجميع السكريات فضلا عن التركيزين5 و7 % من سكر المانيتول وبدون اي إضافات هرمونية. وكانت أعلى استجابة بلغت 90% عند معاملة التداخل5% كلوكوز +5 ملغم /لتر BA والتي

اختلفت معنويا عن جميع المعاملات ، في حين أعطت معاملات التداخل المكونة من3% مانيتول + 5 ملغم /لتر BA و3% مانيتول +7 ملغم /لتر BA و7% مانيتول +1 ملغم /لتر BA ادنى استجابة بلغت 10%. وكانت الاستجابة صفرا عند التراكيز العالية منهما .



شكل (1) : تأثير نوع السكر وتركيزه والـ(BA) في النسبة المئوية لأستجابة البراعم الجانبية للتفتح .

وتظهر النتائج (الجدول 1) أن معدل عدد الأفرع المتفتحة في كل عقلة كان منخفضا معنويا (صفر) في معظم المعاملات غير المجهزة بـ BA ، وازداد عند التوليفة المكونة من 5% كلوكوز +5ملغم/لتر BA والتي فاقت معنويا جميع المعاملات الأخرى .

كما تشير نتائج الجدول نفسه إلى أن التوليفة المكونة من 7% كلوكوز +5ملغم/لتر BA أعطت أعلى معدل لطول الأفرع بلغ 37.25ملم والذي فاق معنويا جميع المعاملات قيد الدراسة (صورة 1- أ).

ومن خلال النتائج المبينة أعلاه فقد تم اعتماد التوليفة المكونة من 5% كلوكوز +5ملغم/لتر BA كأفضل توليفة في تنشئة وتضاعف الأفرع . واعتماد التوليفة المكونة من 7% كلوكوز + 5 ملغم /لتر BA للحصول على اطول الفروع .

كما بينت النتائج عدم كفاءة سكر المانيتول في تحفيز تفتح الأفرع وانخفاض معدل عدد وطول الأفرع المتفتحة لنبات قرن الغزال مقارنة بالسكروز و الكلوكوز وهذا يتفق مع [9] الذين استخدموا المانيتول بعدة تراكيز ووجدوا أن معظمها ثبط وبصورة كاملة تكوين الأفرع للنباتات التي قاموا بدراستها . وتوضح الصورة (1 - ب) تضاعف الأفرع الخضرية في الوسط المعقم *in vitro* .

يتبين مما ذكر في أعلاه أن الأجزاء النباتية المزروعة خارج الجسم الحي تحتاج إلى السكريات كمصدر للطاقة او الكاربون . ويعتمد نوع السكر المضاف وتركيزه على الجزء النباتي المزروع و الغرض من الزراعة [10] . وان التمايز الذي يحصل في النسيج النباتي يؤدي الى تكوين الأوعية الناقلة الذي يعتمد على نوعية الكاربوهيدرات المضافة إلى الوسط الغذائي ، إذ أن إضافة السكر إلى المزارع ينشط في عملية التكشف والحصول على أفرع من المزارع النسيجية [11] .

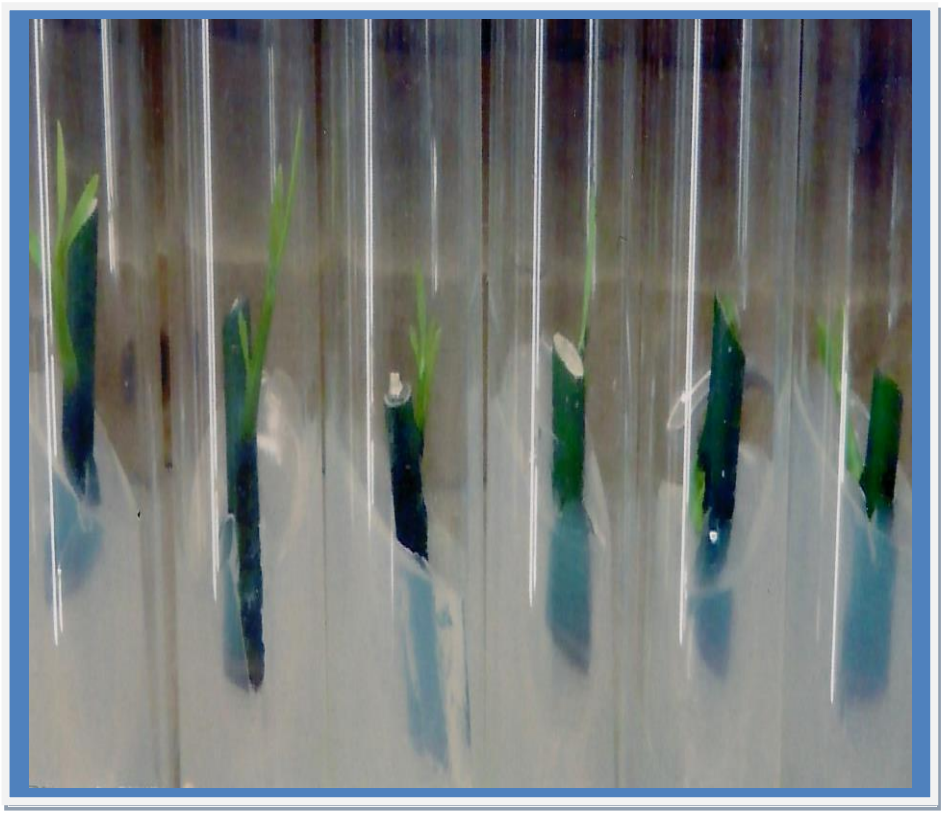
ووجد أن السكروز يتحول في الوسط الغذائي إلى كلوكوز وفركتوز . ويستهلك الكلوكوز بصورة أسرع من الفركتوز وهذا يفسر سرعة استجابة الأفرع للتفتح وإنتاج معدلات أعداد وطول للأفرع الناتجة أعلى مما في السكروز وذلك بإضافة الكلوكوز مباشرة إلى الوسط الأمر الذي يؤدي الى استهلاكه بسرعة من قبل الأجزاء النباتية كمصدر للطاقة والكاربون وبالتالي سرعة تمايز وتكشف الأفرع من الأنسجة النباتية المزروعة [10] .

كما أن إضافة السايتوكاينين (BA) يساهم وبشكل كبير في تحفيز تكوين الأفرع ، إذ قد يعود السبب إلى حصول التوازن الهرموني للنسيج النباتي لأحداث الاستجابة المطلوبة من خلال دفع الجزء النباتي إلى الانقسام والنمو وتكوين أكثر من فرع خضري واحد بعد كسر السيادة القمية مؤديا إلى نشوء الأفرع الخضرية الجانبية ويساعد في نموها بشكل جيد [12] . وتزداد فعالية BA في زيادة عدد الأفرع عند تداخله مع السكر في الوسط الغذائي [13] .

يستنتج من هذه التجربة امكانية الحصول على توليفة مناسبة من نوع السكر وتركيزه وBA في تفتح وتضاعف الأفرع الخضرية لنبات قرن الغزال .

جدول (1) : تأثير نوع السكر وتركيزه وBA في معدل عدد وطول الأفرع(ملم) المتفتحة من كل عقلة لنبات قرن الغزال من العقد المزروعة على الوسط الغذائي MS بعد مرور 45 يوماً .

نوع السكر	تركيزه (%)	تركيزBA (ملغم/لتر)	معدل عدد الافرع المتفتحة /عقدة	معدل طول الافرع المتفتحة (ملم)
السكروز	3	0.0	ـــــ	ـــــ
		1.0	0.62	16.83
		3.0	1.30	15.75
		5.0	1.57	15.85
		7.0	0.88	21.40
	5	0.0	0.45	14.75
		1.0	0.61	20.83
		3.0	1.13	20.42
		5.0	0.74	30.50
		7.0	0.32	21.33
	7	0.0	0.30	20.66
		1.0	0.66	20.00
		3.0	0.50	18.80
		5.0	0.57	21.75
		7.0	0.60	10.90
	3	0.0	ـــــ	ـــــ
		1.0	0.40	28.00
		3.0	0.81	24.00
		5.0	0.92	22.66
		7.0	0.99	23.00
الكلوكوز	5	0.0	0.21	11.00
		1.0	0.91	29.75
		3.0	1.03	26.17
		5.0	2.36	28.56
		7.0	1.64	22.00
	7	0.0	0.65	14.00
		1.0	0.70	14.50
		3.0	1.02	29.00
		5.0	1.94	37.25
		7.0	1.21	23.16
المانيتول	3	0.0	ـــــ	ـــــ
		1.0	0.20	3.00
		3.0	0.31	3.00
		5.0	0.12	6.00
		7.0	0.11	5.00
	5	0.0	ـــــ	ـــــ
		1.0	0.30	2.33
		3.0	0.24	6.00
		5.0	ـــــ	ـــــ
		7.0	ـــــ	ـــــ
	7	0.0	ـــــ	ـــــ
		1.0	0.13	3.00
		3.0	ـــــ	ـــــ
		5.0	ـــــ	ـــــ
		7.0	ـــــ	ـــــ
L.S.D(0.05) لنوع السكر×تركيزه×تركيزBA			0.492	4.556



صورة (1) :(أ) تفتح البراعم الجانبية لنبات قرن الغزال،من اليمين إلى اليسار:3%سكروز+5ملغم/لتر BA ، 3%سكروز+3ملغم/لتر BA ،5%سكروز +3ملغم/لتر BA ،5%كلوكوز+7ملغم/لتر BA ، 5%كلوكوز+5ملغم/لتر BA ، 7% كلوكوز + 5ملغم/لتر BA .

(ب) تضاعف الأفرع الخضرية على وسط MS المجهز بـ 5% كلوكوز +5ملغم/لتر BA .

Reference: **المصادر**

1_Ohyama , K.; Uchida ,Y.;Misawa ,N.; Komano , T.; Fujita , M. and Ueno , T. 1984. Oil body formation in *Euphorbia tirucalli* L. cell suspension cultures . Plant Cell Rep ., 3:21_ 22.

2_Vander - Velde , N.2003. The vascular plants of Majuro Atoll , Republic of Marshall Islands . Smithsonian Institution , Atoll Research Bulletin,503:1-141.

3 _Lorence , D.H. and Wagner , W.L. 2008. Flora of the Marquesas Islands. National Tropical Botanical Garden and the Smithsonian Institution .Online database .

4 _Calvin , M. 1980. Hydrocarbons from plants : Analytical methods and observations . Naturewissen schaften , 67:525_533.

5_Wu, T.; Lin,Y,; Haruna ,M.;Pan , D.;Shingu ,T.; Chen Y.;Hsu ,H.;Nakano , T . and Lee ,K. 1991. Antitumor agents ,119. Kansuiphorins A and B , two novel antileukemic diterpene esters from *Euphorbia kansui* ,J.Nat .Prod., 54:823_829.

6_Taylor , L . 2005. Aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.) . The healing power of rain forest herbs . Online database .

7_ Murashige ,T. and Skoog , F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures . Physiol . Plant . , 15: 473_ 497.

8 _*الراوي ، خاشع محمود و خلف الله ، عبد العزيز* .1980. *تصميم وتحليل التجارب الزراعية . جامعة الموصل . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جمهورية العراق .*

9 _ Mohamed , M.A.H.;Harris , P.J.C. and Henderson , J. 2000. *In vitro* selection and characterisation of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta* .Plant Sci ., 159(2) ; 213_ 222.

10 _ الرفاعي ، عبد الرحيم توفيق والشوبكي ، سمير عبد الرازق . 2007. زراعة الأنسجة والإكثار الدقيق للنبات . الطبعة الأولى . المكتبة المصرية للطباعة والنشر والتوزيع . الإسكندرية .

11 _الحميري ، مي عبد الله رزوقي . 2010 . تاثير BA و 2,4 - D والسكروز على نشوء الكالس الناتج من زراعة نسيج الجويزة لبذورالبرتقال . C*itrus sinensis* Osbeck .*رسالة ماجستير . الكلية التقنية _المسيب . هيئة التعليم التقني .*

12 _ Kandamudi ,R.;Murthy , K.S. and Pullaiah , T. 2009. Euphorbiaceae – a critical review on plant tissue culture. Tropical and Subtropical Agrosystems , 10:313 – 335 .

13 _Grinblat , U.1972. Differentiation of *Citrus* stem *in vitro* . J. Amer .Soc .Hort . Sci., 97(5):599_603.