تأثيربادئات الفنيل النين،البرولين،والسكروز في إنتاج كالس نبات السجاد Coleus blumei Benth

كاظم محمد إبراهيم الصميدعي * طارق علي العاني** غصون صائب العبيدي**

استلام البحث 11، كانون الاول، 2009
قبول النشر 9، ايار ، 2010

الخلاصة:
وظفت تقاتة زراعة الانسجة النباتية بهدف[دراسة زيادة انتاج الكالس من نبات السجاد بأضافة بادئات الفنيل النين ,البرولين بالتراكيز(0.0, 1.0, 10او 20)ملغم/لتر والسكروز بالتراكيز (30, 40او 50) غم/لتر الى وسط MS المصلب وحاوي على توليفتي منظمي النمو 2.4-D والـ BA بالتراكيز (0.5او 1.0) ملغم/لتر والذي اعتبر وسط ادامة اول و (0.1او 1.0) ملغم/لتر اذ اعتبر وسط ادامة ثاني في تجارب منفردة ولكل بادئة. بلغ اعلى معدل وزن طري للكالس 1117.80 ملغم بتركيز 50 غم/لتر من البادئة السكروز وفي وسط الادامة الثاني والتي شهدت تفوقا معنويا على جميع المعاملات إذ لم يلاحظ فرقا معنويا كبيرا عند تضمين البادئة البرولين او الفنل النين في معدل الوزن الطري للكالس.

الكلمات المفتاحية: أستحثاث كالس نبات السجاد ،تأثيرالاحماض الأمينية على أستحثاث الكالس،تأثير السكروز على أستحثاث الكالس

المقدمة:

نبات السجاد *Coleus blumei* احد اهم نباتات الزينة، فهو ينتمي الى العائلة الشفوية Labiatae. وتكون معظم نباتات هذه العائلة اعشاب حولية عطرية تحتوي على زيوت طيارة وشجيرات واشجار معمرة تضم العائلة 200 جنس و3500 نوع .يتميز نبات السجاد باوراق مبرقشة متباينة الالوان .ويتكاثر بالبذور والعقل الطرفية[1].

تعد تقانة زراعة الانسجة النباتية وسيلة مهمة لاكثار العديد من النباتات بكميات كبيرة ومدة زمنية قصيرة[2].ودخلت هذه التقانة في مجالات دراسة فسيولوجيا النبات وزيادة نواتج الايض الثانوية .Secondary products [3].ضمنت تقانة زراعة الانسجة النباتية الاستمرار في انتاج النباتات على مدار السنة وعدم الاقتصارعلى موسم زراعي معين كما هو الحال عند زراعة النباتات بالطريقة التقليدية[4،5].

هدفت الدراسةالى زيادة انتاج الكالس والذي يعرف على انه خلايا برنكيمية غير متمايزة غالباً سائبة وغير منتظمة تنشأ على مناطق القطع او الجروح في الاجزاء النباتية اما طبيعا واما في مزارع الانسجة النباتية[6]. هدف الدراسة توظيف تقانة زراعة الانسجة النباتية لغرض زيادة انتاج الكالس باستخدام ثلاث بادات وهي الفنيل النين, البرولين والسكروز وبتراكيز مختلفة.

المواد وطرائق العمل:

اخذت بذور نبات السجاد صنف Rainbow. وعقمت سطحيا بالكحول الاثيلي بتركيز 70% وزرعت بمعدل بذرة واحدة في كل قنينة وبواقع عشر مكررات على الوسط الغذائي (MS) [7].بعد الانبات تم الحصول على البادرات المعقمة والتي قطعت وزرعت على الوسط ذاته مع اضافة توليفات مختلفة من منظمي النمو(BA,2,4-D) لدراسة التوليفات الاكثر فعالية في استحثاث الكالس. شملت منظمات النمو المجهزة BA,2,4-D) اذ كانت تراكيزألأوكسين2,4-D(0.0, 0.1, 0.5, 1.0أو 2.0) ملغم/لتر اما السايتوكاينين BA اضيف بالتراكيز (0.0, 0.1, 0.5, 1.0او 2.0) ملغم / لتر وبواقع ثمانية مكررات لكل تركيز وسجلت نتائج استحثاث الكالس بعد مرور 21 يوما من الزراعة.

بعد تحديد التوليفات التي اعطت اكبر كمية كالس والتي كانت عند التوليفتين (BA,2,4-D) بالتراكيز (0.5,1.0)و(1.0,0.1) ملغم/لتر وهاتين التوليفتين كانتا الاكثر فعالية في استحثاث الكالس وادامته وزيادة كميته لذلك اعتبرتا التوليفتين المثلتين. نقلت قطع الكالس وتحت ظروف التعقيم الى وسط زرعي جديد حاو على تلك التوليفات لغرض إدامته وزيادة كميته وبقيت في هذه المرحلة مدة ثلاثة اسابيع. اعيدت ا لزراعة باستعمال ثلاث

*قسم التقانة الاحيائية /كلية العلوم/ جامعة النهرين
**قسم علوم الحياة/كلية العلوم للبنات/جامعة بغداد الأحيائية

تراكيز لثلاث بادئات هي الحامض الاميني الفنيل النين بالتراكيز (0.0,1.0, 10أو 20)ملغم/لتر والحامض الاميني البرولين بالتراكيز (0.0,1.0, 10أو 20)ملغم/لتر والسكروز بالتراكيز (30, 40أو 50) غم/لتر في تجارب منفصلة وباستعمال التوليفتين المثلثين

النتائج والمناقشة:

تاثير اضافة البادئة الفنيل النين الى وسطي الادامة الاول والثاني في الوزن الطري للكالس

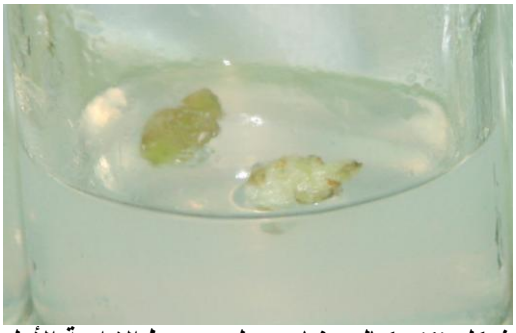
تُشير النتائج المبينة في الجدول(1) إلى أن أعلى معدل وزن طري للكالس تم الحصول عليه عندما كان تركيز PA 1 ملغم/لتر إذ بلغ 674.60 ملغم والذي تفوق معنوياً على معاملة السيطرة وبقية مستويات PA المضافة. أن الوزن الطري للكالس سجل انخفاضاً غير معنوي مع زيادة تركيز PA إلى 10 و20 ملغم/لتر. تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه الباحث [8] في تجاربه على استحثاث الكالس من نباتات مختلفة إذ توصل إلى أن اضافة البادئة PA بالتركيز 1 ملغم/لتر أدى إلى زيادة كمية الكالس.

تبين نتائج الجدول الى عدم وجود فروق معنوية بين وسطي الإدامة الأول والثاني بسبب تأثر إنتاج الكالس ونوعيته بمصدر النتروجين لذلك تضاف البادئات من الأحماض الأمينية إلى الأوساط الزرعية لزيادة إنتاج الكالس لأنها تزيد العمليات الأيضية للنتروجين العضوي وهو أكثر امتصاصاً وتمثيلاً من النتروجين اللاعضوي المضاف إلى الوسط ألزرعي [9].

أما ألتداخل بين PA ونوع الوسط فقد سجل تركيز 1.0 ملغم/لتر في الوسط الأول أعلى وزن طري للكالس بلغ 715.90 (شكل 1) ملغم وجاء التركيز نفسهُ في الوسط الثاني بالمرتبة الثانية 633.30 ملغم، وكلاهما تفوقا معنوياً على المعاملة 20 ملغم/لتر ولكلا الوسطين إذ بلغَ الوزن الطري للكالس عند الوسط الأول 281.90 ملغم وعند الثاني بلغ اقل وزن طري 281.10 ملغم. تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه [10] في تجاربهم على نبات السجاد .

جدول(1): تأثير إضافة PA إلى وسطي الإدامة في الوزن الطري للكالس (ملغم) بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على وسط (MS).

تركيز PA (ملغم/لتر)	الوسط الأول	الوسط الثاني	المعدل
0.0	443.10	404.30	423.70
1.0	715.90	633.30	674.60
10	382.60	358.30	370.45
20	281.90	281.10	281.50
المعدل	455.88	419.25	
LSD 0.05	PA = 233.13 الوسط = NS PA × الوسط = 329.7		



شكل (1): كالس نامي على وسط الإدامة الأول والمزود بـ 1.0 ملغم/لتر من PA وبعمر ثمانية أسابيع.

تأثير إضافة البادئة البرولين إلى وسطيّ الإدامة في الوزن الطري للكالس

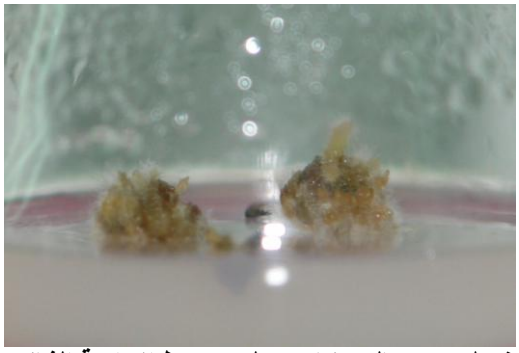
توضح نتائج الجدول(2)أن أعلى معدل وزن طري للكالس بلغَ 962.35 ملغم تحقق عند اضافة 1 ملغم/لتر من البرولين التي تفوقت معنوياً على المعاملات جميعها ومن ضمنها معاملة السيطرة التي بلغ معدل الوزن الطري للكالس عندها 491.70 ملغم. وكان أقل وزن طري عند المعاملة 20 ملغم/لتراذ بلغ 207.95 ملغم. ان انخفاض معدل الوزن الطري للكالس عند تضمين الوسط بتراكيز عالية من البرولين يتفق مع [11] الذين لاحظوا أن اضافة البرولين الى الوسط بتركيز 20 ملغم/لتر أدى الى تغيير لون الكالس الى أسمر باهت وبدأ يقل نموه، وبالتركيزين 40–80 ملغم/لتر أصبح لونهُ بنياً غامقاً وتوقف نموه، وعند تركيز 100 ملغم/لتر أصبح لون الكالس أسوداً داكناً وتوقف نموه تماماً.كما أظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية في معدل الوزن الطري للكالس لوسطي الإدامة الأول والثاني إذ بلغ في الوسط الأول 513.15 ملغم والثاني 506.95 ملغم. لوحظ تداخلات معنوية بين مستويات البرولين والوسط الغذائي اذ تفوقت المعاملة 1 ملغم/لتر من البرولين في وسطي الإدامة الأول والثاني معنوياًعلى بقية المعاملات التوليفية إذ بلغ الوزن الطري 1085.90 ملغم فيما يخص الوسط الثاني(شكل 2)في حين بلغ 838.80 ملغم فيما يخص الوسط الأول(شكل 3) ولم يختلفا معنوياً عن بعضهما لكنهما تفوقا معنوياً على بقية المعاملات. يعمل البرولين في المزارع النسيجية على تحفيز تكوين السايتوكاينين الذي بدوره يحفز على الانقسام[12]. أما أقل وزن طري في الوسط الثاني فكان عند المعاملة 20 ملغم/لتر من البرولين اذ بلغ 140.10 ملغم.

لوحظ من نتائج الجدول السابق أن أنسب تركيز للبادئة برولين الذي أعطى أعلى معدل وزن طري للكالس بلغ 1 ملغم/لتر بينما توصل[13] إلى أن زيادة وزن الكالس وإدامته كان بحاجة إلى

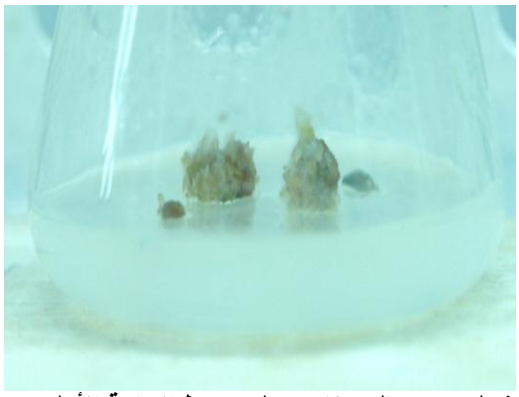
بادئة البرولين بالتركيز 8.34 ملغم/لتر في الوسط الزرعي MS لكالس نبات الحنطة (*Triticum aestivum*).

جدول (2): تأثير البرولين ووسطي الإدامة في الوزن الطري للكالس (ملغم) بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على وسط MS

تركيز البرولين (ملغم/لتر)	الوسط الأول	الوسط الثاني	المعدل
0.0	517.60	465.80	491.70
1	838.80	1085.90	962.35
10	420.40	336.00	378.20
20	275.80	140.10	207.95
المعدل	513.15	506.95	
LSD 0.05	البرولين= 201.88 الوسط= NS تركيز البرولين×الوسط= 285.51		



شكل(2): كالس نامي على وسط الإدامة الثاني والمزود بـ 1.0 ملغم/لتر من البرولين بعد إعادة الزراعة وبعمر ثمانية أسابيع.



شكل (3): كالس نامي على وسط الإدامة الأول بعد إعادة الزراعة والمزود بـ 1.0 ملغم/لتر من البرولين وبعمرثمانية أسابيع

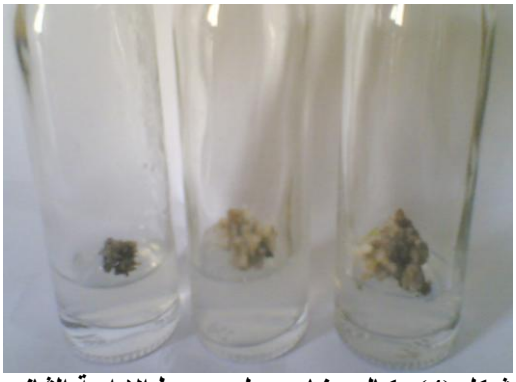
تأثير إضافة السكروز إلى وسطي الإدامة في الوزن الطري للكالس

تبين نتائج الجدول(3) والشكل (4) وجود فروق معنوية في معدل الوزن الطري للكالس، إذ شهد ت المعاملة 50 غم/لتر من البادئة سكروز تفوقاً معنوياً على المعاملات جميعها إذ بلغ معدل الوزن الطري للكالس 936.40 ملغم وهذا يتفق مع [14] من أن زيادة تركيز السكروز في الوسط الزرعي لنبات السجاد يؤدي إلى زيادة كمية الكالس.

جدول (3): تأثير السكروز ووسطي الإدامة في الوزن الطري للكالس (ملغم) بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على وسط (MS).

السكروز (غم/لتر)	الوسط الأول	الوسط الثاني	المعدل
30	637.80	288.20	463.00
40	653.20	520.80	587.00
50	755.00	1117.80	936.40
المعدل	682.00	642.30	
LSD 0.05	السكروز= NS 268.55 تركيز السكروز× الوسط= 379.79		

لم يلاحظ فرق معنوي بين وسطيّ الإدامة الأول والثاني في معدل الوزن الطري للكالس إذ بلغ في الأول 682.00 ملغم وفي الثاني 642.30 ملغم. لوحظت فروق معنوية عند التداخل بين تركيز السكروز ووسطي الإدامة الأول والثاني إذ بلغَ معدل الوزن في المعاملة 50 غم/لتر سكروز في وسط الإدامة الثاني 1117.80 ملغم والتي تفوقت معنوياً على جميع التداخلات بضمنها المعاملة التي تلتها في الوزن وهي المعاملة 50 غم/لتر سكروز في وسط الإدامة الأول إذ بلغ 755.00 ملغم. تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه [15] . بزيادة تركيزظ السكروز الى 5% زاد الوزن الطري للكالس كما وتتفق النتيجة مع [16] . في تجاربهم على نفس النبات.



شكل (4): كالس نامي على وسط الإدامة الثاني والمزود بـ 30، 40 أو 50 غم/لتر سكروز من اليسار إلى اليمين وبعمر ثمانية أسابيع.

أهم ألأستنتاجات

نستنتج من البحث بامكانية زيادة الوزن الطري للكالس عند إضا فة السكروز, إذ تعمل هذه البادئة على زيادة نشاط أيونات النترات وألأمونيا

المصادر:

1. الكاتب، يوسف منصور 2000. تصنيف النباتات البذرية. دار الكتب للطباعة والنشر. الطبعة الثانية. جامعة بغداد. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جمهورية العراق.
2. Devi, P. 2003. Principles and Methods in Plant Molecular Biology, Biochemistry and Genetics. 3rd ed. Updesh Purohit Pub., Jodhpur, India.
3. Ramanchandra, R. S. and Ravishnkar G. A. 2002. Plant cell culture. Chemical factories for secondary metabolites. Biotech. Adv., 20:101-153.
4. Mulabagal, V. and Tsay H. S. 2004. Plant cell culture an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int. J. Appl. Sci. Eng., 2(1):29-48.
5. Mehrabani, M., Mohammadreza A., Alireza,G. Nasrlah D. and Seyyed J. 2005. Production of rosmarinic acid in *Echium amoenum* Fish. C. A. Mey. Cell cultures Sch. Pharm - Shaheed Beheshti. Uni. Med. Sci. and Health services.
6. Aurelia, S., Lusarkiewicz,J. P. and Zygmunt K. 2007. Influence of cultivar, explants source on *in vitro* growth of *Cannabis sativa* L. Plant Genet., 47:145-151.
7. Murashige, T. and Smith R. H. 1970. *In vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. American J. Bot. 57:562-568.
8. Haq, N. 2007. *In vitro* production of bioactive compounds from medicinal and aromatic plant. ICUC. Univ. Southampton, U. K.
9. Zouine, J. and Hadrami E. L. 2006. Date Palm embryogenic suspension culture: Effect of 2,4-D, glutamine and BA supplements. 3rd Inter. Date Palm Conf., Abu-Dhabi. UAE.
10. Gumuscu, A., Cocu,S. Uranbey, S. Jpek, A. Caliskan, M. and Arslan N. 2008. *In vitro* micro–propagation of endangered ornamental plant- Rauschert. African Biotech., 7(3):234-238
11. Virupakshi, S., Manjunatha B.R. and Naik G. R. 2002. *In vitro* flower induction in callus from a juvenile explants of sugarcane, *Saccharum officinarum* L. Var. Coc. 671. Current Sci., 83:10-25.
12. Shetty, K., Shetty, GA. Nakazaaki, Yoshioka,Y. K. Asano Y. and Oosawa K. 1992. Stimulation of benzyl adenine-induced *in vitro* shoot organogenesis *Cucumis melo* L. by proline salicylic acid and aspirin. Plant Sci., 84:193-199.
13. Tahiliani, S. and Kothari S. L. 2004. Increased copper content of the medium improves plant regeneration from immature embryo derived callus of wheat (*Triticum aestivum*). J. Plant Bioch. and Biotech., 13:85-88.
14. Raven, P. H., Evert, R. F. and Eichorn S. E. 2003. Biology of Plants (6th). W. H. Freeman and Company, Worth Publishers, New York.
15. Ulbrich, B., Weisner W. and Arens H. 1985. Large scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. In Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. Springer. Berlin. 293-303.
16. Dennis, T. T. and Boban Ph. T. 2005. Induced high frequency shoot *indica* (form. F.) Merrill. *In Vitro* Cell. and Dev. Bio. Plant., 41(2):124-128.

Effect of the Precursors Phenylalanine Prolin and Sucrose by Increasing the Callus Production of Coleus blumei Benth

Kadum M. I. Alsumadei* ***Tarek A. Al-ani*****
Ghussun S. Alubaidi**

*Biological Accuracy department Al Nahrain University
**Biological department/Biology- of Education for Women University of Baghdad.

Abstract:

Tissue culture techniques were used for the purpose of studding the increasing of callus production from *Coleus blumei* Benth. Addition of the precursors phenyl alanine, proline at the concentrations 0.0,1,10,20 mg/l and sucrose at 0.0,30,40,50 g/l subsequently were added to Murashig and Smith medium (MS) supplemented with the combination 2,4-D,BA at (0.5,10) mg/l which considerd as first maintenance medium and (0.1,1.0)mg/l as second maintenance medium. The highest callus fresh weigh (1117.80)mg after the addition of 50g/l of the precursor sucrose at the second maintenance medium which was significantly higher than all other treatments .