

تأثير عديد السكريات الخارجي EPS المعزول من بكتريا *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* في تكوين العقد في نبات الفاصوليا واستحداث الكالس من بادرات نباتي الفاصوليا وزهرة الشمس

نجوى ابراهيم البرهاوي وشفاء مهدي صالح

قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، جمهورية العراق

المخلص :

٠,٢ ملغم / لتر من EPS فضلاً عن زيادة المحتوى البروتيني لنباتات الفاصوليا النامية في وسط NF المدعم بـ ٠,٠٥ ، ٠,١ ، ٠,٢ ، ٠,٤ ، ٠,٨ ملغم / لتر من EPS . كذلك بينت النتائج ان لعديد السكريات الخارجي تأثير تحفيزي واضح في استحداث الكالس من الأجزاء المختلفة لبادرات زهرة الشمس و بالذات عندما استخدم متداخلاً مع البززين ادنين (BA) في وسط MS الصلب حيث بلغت نسبة استحداث الكالس ١٠٠% من قطع السيقان تحت الفلقة والجذور . كما ان استخدام عديد السكريات الخارجي لوحده في وسط MS الصلب ساعد في حث القطع النباتية لكل من الفاصوليا وزهرة الشمس على البدء باستحداث الكالس إضافة الى تحفيزها على تكوين الجذور .

الكلمات الدالة: *Rhizobium leguminosarum* biovar *Phaseoli*, callus , Exo - polysacchrides (EPS)

المقدمة:

النباتات غير البقولية ومنها التبغ *Nicotiana tabacum* (٨) . وتمكن الزهيري (٩) من استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقة و قطع الجذور لنبات البرسيم *Trifolium repens* في وسط MS الصلب المدعم بـ ٤ ملغم / لتر ، ٦ ملغم / لتر من عديد السكريات الدهنية المعزول من بكتريا *Rhizobium leguminosarum* biovar *Phaseoli* .

وعلى ضوء الدراسات السابقة الذكر والخاصة باستخدام عديد السكريات الدهني في الزراعة النسيجية للنباتات ونظراً لقلّة او انعدام الدراسات الخاصة باستخدام عديد السكريات الخارجي EPS في مجال الزراعة النسيجية للنبات أجريت الدراسة الحالية بهدف التعرف على تأثير EPS في استحداث الكالس لاحد النباتات البقولية متمثلاً بنبات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* واحد النباتات غير البقولية وهو زهرة الشمس *Helianthus annuus* L. إضافة الى دراسة دور EPS المستخلص من بكتريا *Rhizobium leguminosarum* biovar *Phaseoli* في تكوين العقد الجذرية على جذور نبات الفاصوليا .

المواد وطرائق العمل:

عزل بكتريا *Rhizobium leguminosarum* bv- *phaseoli* من العقد المتكونة على جذور نباتات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* تم فصل العقد المتكونة على جذور نباتات الفاصوليا *P. vulgaris* النامية في الحقل مع أخذ جزء صغير من الجذر وغسلت العقد بالماء الجاري لتخليصها من التربة العالقة بها ، بعدها غمرت في الكحول الايثيلي بتركيز ٧٠ % مدة دقيقة واحدة (١٠). ثم غسلت بالماء المقطر المعقم

تهدف هذه الدراسة الى إمكانية استخدام مركبات عديد السكريات الخارجي (EPS) Exo - polysacchrides المستخلص من بكتريا *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* عاملاً أساسياً لتكوين العقد الجذرية على جذور نباتات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* ، إضافة الى استخدامه كعامل محفز لاستحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقة لبادرات الفاصوليا و قطع السيقان تحت الفلقة و الفلق و الجذور لبادرات زهرة الشمس *Helianthus annuus* . أظهرت النتائج التأثير التحفيزي لعديد السكريات الخارجي في تكوين التراكيب الشبيهة بالعقد الجذرية على جذور نباتات الفاصوليا وكان واضحاً جداً حيث بلغت نسبة تكوين هذه التراكيب ٤٨,٠ % في NF الصلب المدعم بـ

يضم جنس الرايزوبيوم *Rhizobium* انواعاً كثيرة معروفة باهميتها البايولوجية في تثبيت النتروجين الجوي من خلال علاقتها التعايشية عالية التخصص مع نباتات العائلة البقولية Leguminosae (١) . يحتوي سطح بكتريا الرايزوبيوم على العديد من المركبات الكاربوهدراتية منها Exo polysacchrides (EPS) - Lipopolysacchrides ، Capsular polysacchrides و B - 1 , 2 - glucans (4,3,2) . ان Exo - polysacchrides (EPS) عبارة عن مركبات ذات طبيعة حامضية خارج خلوية ذات أوزان جزيئية عالية تحتوي على وحدات متكررة يتراوح عددها ٦ - ٩ من سكر السداسي Hexose ولا ترتبط مع بعضها بأواصر كلايكوسيدية Glucosidic linkage توجد بشكل سلاسل خطية Alpha or Beta linear او متفرعة Branched إضافة الى معوضات غير كاربوهدراتية هي Succinate او Pyruvate او Acetate ، أما طبيعتها الحامضية فتعزى الى احتوائها على حوامض عضوية هي Uronic , Pyruvate ketals , Succinate (٥) .

تتلخص وظيفة EPS الأساسية في حماية الخلية من الضغوط البيئية ولها دور مهم في ارتباط بكتريا الرايزوبيا بجذور النباتات البقولية ومن ثم تكوين العقد الجذرية أثناء العلاقة التعايشية التي ينتج عنها تثبيت النتروجين الجوي الى الامونيا (٦). أجريت دراسات عديدة حول استخدام المركبات الكاربوهدراتية لبكتريا الرايزوبيوم في مجال الزراعة النسيجية لبعض النباتات البقولية وغير البقولية . حيث أشارت العديد من الدراسات الى استخدام عديد السكريات الدهنية LPS في هذا المجال حيث وجد ان المركب Lipo-chitooligosaccharide والمعروف أحياناً بعوامل تكوين العقد له دور مهم بشكل Phytohormone في النباتات البقولية (٧) . إضافة الى

لقت بادرات الفاصوليا بعمر يومين بغمر مجموعها الجذري في ٢ مل من لقاح بكتريا *R. leguminosarum bv. phaseoli* وتركته فيه لمدة ٢٠ دقيقة، ثم نقلت وزرعت بشكل صف واحد على سطح Nitrogen (NF) Free medium الصلب (١٣)، في اطباق بتري بمعدل ٤ بادرات / طبق ، غلقت الاطباق بالبارافيلم ووضعت بصورة عمودية في غرفة النمو عند درجة حرارة ٢٥±٢ م لمدة ٢٤ ساعة في ظروف الظلام التام ثم نقلت الى ظروف الضوء والظلام المتعاقبي (١٦ ساعة ضوء / ٨ ساعات ظلام).

تنمية بادرات الفاصوليا على وسط NF الصلب المدعم بعديد السكريات الخارجي المعزول من بكتريا *R. leguminosarum bv-phaseoli*
نميت بادرات الفاصوليا بعمر يومين على سطح وسط NF الصلب المدعم بالتراكيز (٠,٠٥، ٠,١، ٠,٢، ٠,٤، ٠,٨ ملغم / لتر) من مركب EPS والمضافة الى الوسط المعقم بعد تعقيمها بجهاز المعقم عند الظروف الاتية (١٢١ م، ضغط ١ جو، لمدة ٥ دقائق)، في اطباق بتري وبمعدل ٤ بادرات / طبق، ثم سدت الاطباق باحكام باستخدام البارافيلم وحضنت بشكل عمودي في غرفة النمو عند ظروف الضوء والظلام المتعاقبين (١٦ ساعة ضوء / ٨ ساعات ظلام). وعند درجة حرارة ٢٥±٢ م، شدة الاضاءة ٢٠٠٠ لوكس لمدة ٢٥-٣٠ يوم.

تقدير المحتوى البروتيني:

قدر المحتوى البروتيني لبادرات الفاصوليا الملقحة ببكتريا *R. leguminosarum biovar Phaseoli*، وغير الملقحة، والنامية في وسط NF الصلب المدعم بعديد السكريات الخارجي EPS (٠,٠٥-٠,٨ ملغم / لتر)، اعتماداً على طريقة Biuret method (١٤) وتم حساب المحتوى البروتيني للعينات (ملغم / غم) باستخدام طريقة المقارنة القياسية (١٥).

التعقيم السطحي للبذور:

عقمت بذور الفاصوليا سطحياً باعتماد طريقة الكاتب (١٦). حيث وضعت البذور في محلول هيبوكلورات الصوديوم المحلي بعد تخفيفه بالماء بنسبة ١ حجم منه : ا حجم ماء ولمدة ١٠ دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات وتم تخليصها من الماء الزائد بنقلها الى ورق ترشيع معقم. أما بذور زهرة الشمس فقد عقيمت باعتماد الطريقة الواردة في (١٧).

زراعة البذور وتنمية البادرات:

نقلت بذور الفاصوليا المعقمة سطحياً الى قناني زجاجية تحتوي على ٢٠ مل من وسط MS (١٨). الصلب الخالي من منظمات النمو وبمعدل ١-٢ بذرة / قنينة وحفظت البذور في غرفة النمو في ظروف الظلام التام مدة ٣ أيام ثم نقلت الى نظام الاضاءة والظلام المتعاقبي (١٦ ساعة ضوء / ٨ ساعات ظلام) عند درجة ٢٥±. بنفس الطريقة زرعت بذور زهرة الشمس.

استحداث الكالس من السيقان تحت الفلقية لبادرات الفاصوليا:

اخذت بادرات الفاصوليا السليمة الخالية من الملوثات بعمر ١٠ أيام وقطعت سيقانها تحت الفلقية Hypocotyles الى قطع بطول ١ سم تقريبا وزرعت في قناني زجاجية حجم ١٠٠ مل تحتوي على ٢٠ مل من

بعدها غمرت في محلول ٣ % هيبوكلورات الصوديوم NaOCl لمدة ١٥ دقيقة وغسلت مرة ثانية بالماء المقطر المعقم ثم نقلت الى طبق بتري حاوي على ورق ترشيع معقم لتخليصها من الماء الزائد. نقلت العقد الى وسط YEM Yeast Extract Mannitol agar (١١). ووضعت في حاضنة النمو عند درجة ٢٨±٢ م لمدة ٢٤ ساعة لاختبار كفاءة التعقيم. في اليوم التالي اخذت العقد غير الملوثة وسحقت في ١٠ مل من وسط YEM السائل المعقم باستخدام Homogenizar ثم نقلت منه حملة لوب loop الى وسط YEM الصلب وزرعت بطريقة التخطيط للحصول على مستعمرات منفردة ووضعت مقلوبة في الحاضنة عند درجة حرارة ٢٨+° م.

استخلاص عديد السكريات الخارجي (Exo- Polysaccharides (EPS)

اعتمدت طريقة (١٢) في عزل EPS. حيث لقع ١٠٠ مل من الوسط YEM السائل ببكتريا *Rhizobium* ثم وضع في الحاضنة الهزازة عند درجة ٢٨±٢ م. ثم اضيف ١٠% من مادة Na₂ EDTA الى المزارع النامية واعيدت الى الحاضنة وتركته فيها مدة ٣٠ دقيقة، بعدها اجري طرد مركزي للمزارع بسرعة ٦٠٠٠ دورة / دقيقة ولمدة ١٠ دقائق. نقل الجزء الرائق الى دورق نظيف واطيف اليه الاسيتون بنسبة ١ حجم من الجزء الرائق الى ٣ حجم اسيتون ووضعت الدورق في الثلجة عند درجة ٤ م لمدة ٢٤ ساعة. ثم جفف المستخلص بوضعه في فرن بدرجة ٣٣ م لمدة ٣ أيام. نقل المستخلص الى قنينة زجاجية معقمة لحين استخدامه.

اختبار التخصص العائلي لبكتريا *Rhizobium leguminosarum bv-phaseoli*

تم التأكد من العلاقة التخصصية لبكتريا *R. leguminosarum bv. phaseoli* تجاه عائليها النباتي المعروف نبات الفاصوليا *P. vulgaris* بدلالة قدرتها على الاصابة وتكوين العقد الجذرية عليه.

تحضير اللقاح البكتيري:

تم تحضير اللقاح البكتيري باخذ حملة لوب من بكتريا *R. leguminosarum bv. phaseoli* المعزولة والنامية على سطح وسط YEM الصلب الى دورق سعته ٥٠ مل حاو على ٢٥ مل من الوسط الغذائي YEM السائل، وضع الدورق في الحاضنة الهزازة بسرعة ١٥٠ دورة / دقيقة عند درجة ٢٨±٢ م لمدة ٢٤ ساعة، ثم حصدت البكتريا النامية باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة، واعيد تعليق البكتريا المترسبة باضافة ٥ مل من وسط YEM السائل، وبذلك اصبح اللقاح جاهزا لاستخدامه في تلقيح بادرات الفاصوليا.

مصدر البذور:

تم الحصول على بذور الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* وبذور زهرة الشمس *Helianthus annuus L.* من الاسواق المحلية.

تلقيح بادرات الفاصوليا *P. vulgaris* بلقاح بكتريا *R. leguminosarum bv. phaseoli*

ان العلاقة التعايشية المتخصصة المعروفة بين بكتريا *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* ونبات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* التي تحقق في هذه الدراسة تعزى الى مركبات الفلافونويدس (١٩). كما تكونت تراكيب تشبه العقد على جذور هذه البادرات بعد ٥ أيام من نموها على وسط NF المدعم بعديد السكريات الدهنية الخارجي (EPS) المعزول من بكتريا *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* بما يقارب ٣ عقد / نبات عند جميع التراكيز المستخدمة ، الجدول (٢). كما ارتفع محتواها البروتيني قياساً بالمحتوى البروتيني للنباتات النامية في الوسط الصلب غير المدعم بعديد السكريات الخارجي ، وينسب زيادة بلغت ٥,٩ ، ٥,٩ ، ١٢,٢ ، ١٣,٧ ، ١٨,٩ على التعاقب بزيادة تركيز EPS المضاف للوسط (٠,٥ - ٠,٨ ملغم / لتر) . وتعزى زيادة المحتوى البروتيني للبادرات قياساً بعينة المقارنة ، الى ان مركب EPS والذي يسلك فعل الأوكسين والذي بدوره له تأثير في مضاعفة DNA مع وفرة RNA (٢٠) على أساس ان المعلومات الوراثية تبدأ DNA و mRNA وتنتهي ببناء البروتينات (٢١) .

من ناحية أخرى تشوهت الشعيرات الجذرية السليمة لهذه البادرات بعد يومين من تلقيحها بالبكتريا (الشكل ١ ، a ، b) ، بعد نموها على وسط NF المدعم بجميع التراكيز (٠,٥ - ٠,٨ ملغم / لتر من عديد السكريات الخارجي (شكل ١ ، c) كما تميزت العقد الجذرية المتكونة على نباتات الفاصوليا الملقحة بالبكتريا المتخصصة لها *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* بشكلها الكروي (الشكل ١ ، d) ، في حين كانت التراكيب المشابهة للعقد (المتكونة على جذور هذه النباتات النامية على وسط NF المدعم بعديد السكريات الخارجي) ، ذات اشكال متباينة ومختلفة نوعاً ما عن شكل العقد الجذرية المتكونة على البادرات الملقحة بالبكتريا ، الا ان احجامها كانت تكبر بزيادة تركيز EPS المضاف للوسط (شكل ١ ، e ، f ، g ، h ، i).

وسط MS الصلب المدعم بعديد السكريات الخارجي لوحده وبالتراكيز التالية :

EPS : ٠,٠٥ ، ٠,١ ، ٠,٢ ، ٠,٤ ، ٠,٨ (ملغم / لتر) .

كذلك زرعت القطع في وسط MS الصلب المدعم بالتراكيز السابقة من عديد السكريات الخارجي مع وجود البنزايلا أدنين BA بتركيز ٣,٠ ملغم / لتر . اضافة الى معاملة السيطرة control المتمثلة بوسط MS الصلب الحاوي على ١,٠ ملغم / لتر نفتالين حامض الخليك NAA و ٣,٠ ملغم / لتر BA وهذا يمثل أفضل وسط لاستحداث الكالس من السيقان تحت الفلجية لنبات الفاصوليا حسب ما ورد في دراسة الكاتب (١٦).

استحداث الكالس من الاجزاء المختلفة لبادرات زهرة الشمس:

أخذت بادرات زهرة الشمس السليمة وقطعت سيقانها تحت الفلجية الى قطع بطول ١ سم تقريبا أما الاوراق الفلجية Cotyledones فقطعت الى قطع بمساحة ٠,٥ سم تقريبا . زرعت القطع بنفس الطريقة الواردة في استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلجية لبادرات الفاصوليا وعلى نفس الاوساط السابقة الذكر . اضافة الى معاملة السيطرة المتمثلة بزراعة القطع النباتية في وسط MS المجهد ب ١,٠ ملغم / لتر NAA و ٢,٠ ملغم / لتر BA الذي عد أفضل وسط لاستحداث الكالس من السيقان تحت الفلجية لبادرات زهرة الشمس (١٤) . كذلك زرعت القطع في وسط MS الصلب المدعم بعديد السكريات الخارجي وبالتراكيز آنفة الذكر + BA بتركيز ٢,٠ ملغم / لتر .

النتائج و المناقشة:

تكونت العقد الجذرية على بادرات الفاصوليا بعد أسبوع واحد من تلقيحها ببكتريا *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* وبلغ معدل اعدادها ١-٥ عقدة / نبات بعد ٢٥ يوماً من التلقيح . كما ارتفع المحتوى البروتيني لهذه النباتات (٥,٩ ملغم / غم) ونسبة زيادة بلغت (٢٧,١ %) الجدول (١) .

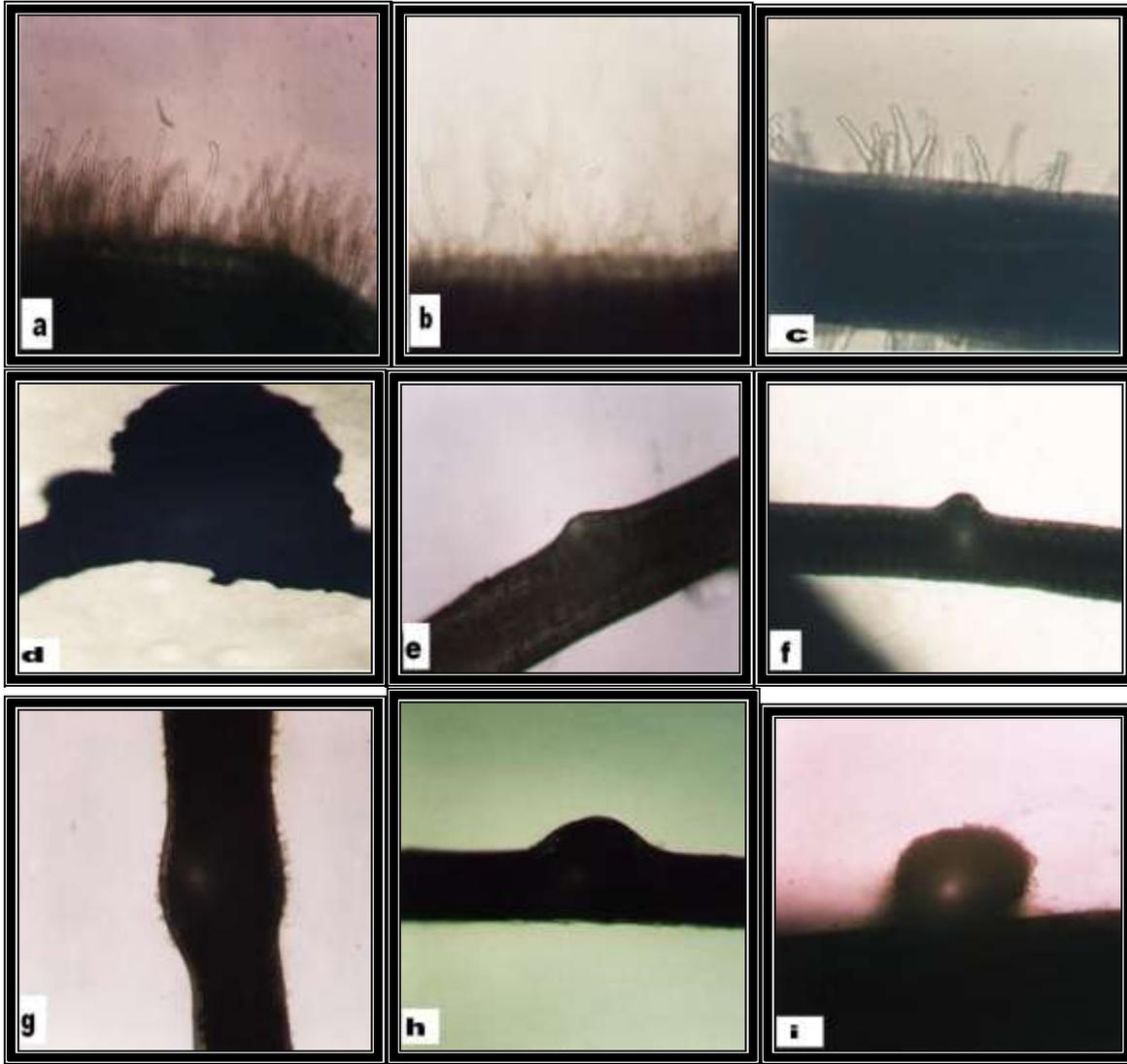
الجدول (١): العقد الجذرية والمحتوى البروتيني لبادرات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* الملقحة ببكتريا *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli*

بادرات الفاصوليا	عدد البادرات المكونة للعقد	عدد العقد/ نبات	% للبادرات المكونة للعقد	المحتوى البروتيني ملغم / غم	% لزيادة المحتوى البروتيني
غير الملقحة	٠,٠	٠,٠	٠,٠	٤,٣	-
الملقحة	١٨,٠	٥,١	٧٢	٥,٩	٢٧,١

القيم الواردة أعلاه تمثل معدل ٢٥ مكرر / معاملة

الجدول ٢ : تأثير إضافة عديد السكريات الخارجي EPS المعزول من بكتريا *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* الى وسط NF الصلب على تكوين التراكيب المشابهة للعقد على جذور نباتات الفاصوليا ومحتواها البروتيني

تركيز EPS ملغم /لتر	عدد البادرات المكونة للعقد	عدد التراكيب المشابهة للعقد / نبات	النباتات المكونة للتراكيب المشابهة للعقد %	المحتوى البروتيني (ملغم / غم)	% الزيادة المحتوى البروتيني
٠,٠	٠,٠	٠,٠	٠,٠	٤,٣	-
٠,٠٥	١١,٠	٣,٢	٤٤,٠	٤,٦	٥,٩
٠,١	١٠,٠	٢,٩	٤٠,٠	٤,٦	٥,٩
٠,٢	١٢,٠	٣,٢	٤٨,٠	٤,٩	١٢,٢
٠,٤	١٠,٠	٢,٨	٤,٠	٥,١	١٣,٧
٠,٨	١١,٠	٢,٨	٤٤,٠	٥,٣	١٨,٩



الشكل (١): الشعيرات الجذرية السليمة والمشوهة والعقد الجذرية والتراكيب المشابهة للعقد المتكونة على نباتات الفاصوليا الملقحة وغير الملقحة ببكتريا *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* النامية في وسط NF الصلب المدعم بالتراكيز المختلفة من EPS .
 (a) الشعيرات الجذرية السليمة على بادرة الفاصوليا غير الملقحة بالبكتريا. (b) الشعيرات الجذرية المشوهة على بادرة الفاصوليا الملقحة بالبكتريا *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli*. (c) الشعيرات الجذرية المشوهة على بادرة الفاصوليا النامية في وسط NF الصلب المدعم ب EPS بتركيز ٠,٨ ملغم / لتر. (d) العقدة الجذرية المتكونة على نبات الفاصوليا في b. أشكال مختلفة للتراكيب المشابهة للعقد المتكونة على نبات الفاصوليا النامية في وسط NF الصلب المدعم بالتراكيز المختلفة من EPS: (e) تركيز ٠,٠٥ ملغم / لتر. (f) ٠,١ ملغم / لتر. (g) ٠,٢ ملغم / لتر. (h) ٠,٤ ملغم / لتر. (i) ٠,٨ ملغم / لتر.

خالية من البكتريا (26) . في حين يفسر تكوينها باعداد قليلة نسبياً قياساً لعينة المقارنة التي تحلل EPS بفعل الانزيمات المحللة Hydrolases او انزيم chitinase التي ينتجها النبات (٢٧) .
 أظهرت النتائج ان استخدام EPS لوحده في وسط MS الصلب شجع قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات الفاصوليا على البدء باستحداث الكالس في كافة التراكيز المستخدمة حيث بدأت القطع بالزيادة في الحجم بعد ١٥ يوم من الزراعة على هذه الأوساط ، الا ان هذه القطع تتحول الى الكالس بشكل كامل . كما ان بعض القطع المزروعة في وسط MS الصلب المدعم ب ٠,٠٥ و ٠,٤ ملغم / لتر من EPS كونت جذوراً بعد ٢٠ يوماً من الزراعة (شكل ٢ ، a) وبلغت نسبة تكون الجذور ٦٢,٥ % و ٥٠ % على التوالي الجدول (٣) .

ان الفعالية البيولوجية لعديد السكريات الخارجي المستخلص في هذه الدراسة و المضاف الى وسط NF الصلب تتمثل بقدرته على تحفيز تشويه الشعيرات الجذرية ثم تكوين التراكيب الشبيهة بالعقد الجذرية على بادرات الفاصوليا غير الملقحة وبالشكل المماثل لتأثير التراكيز المنخفضة جداً لعديد السكريات الدهنية النقية المستخلصة من بكتريا *Sinorhizobium meliloti* في تشويه الشعيرات الجذرية وتكوين العقد على بادرات الجت (٦,22). وقد تعزى هذه الحالة الى تفعيل عديد السكريات دورة خلايا قشرة الجذور على الانقسام (٢٣) . وازدياد فعالية الجينات النباتية وخاصة Enod 12 (24) . ودورها المحفز على انتاج بعض أنواع الفلافونويد (٢٥) الذي بدوره يثبط انتقال الأوكسجين في مرحلة انقسام خلايا القشرة لتكوين العقد الأولية التي تتطور الى عقد كاملة

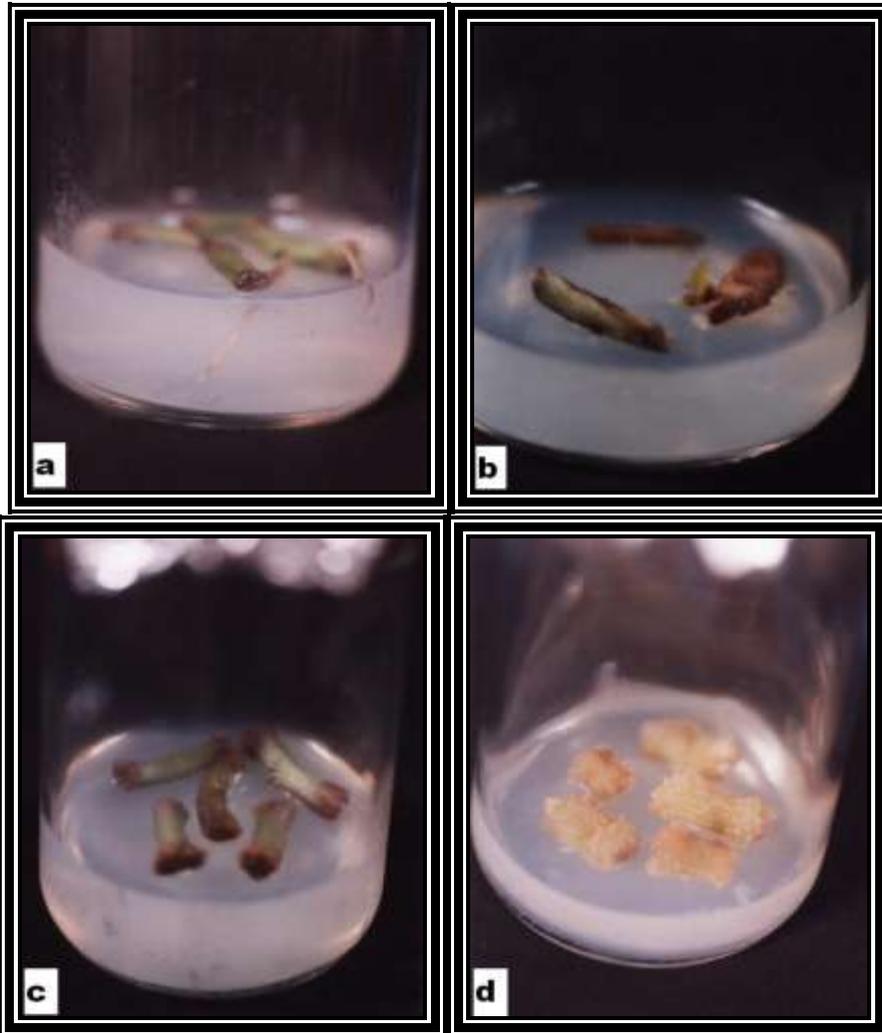
الاستحداث الحاصل من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات الفاصوليا (١٦) ونبات زهرة الشمس (١٧). اذ تماثلت نتائجها مع الدراستين السابقتين في نجاح الاستحداث اضافة الى القدرة على التمايز. اما تكون الجذور من القطع النباتية فربما يعزى الى الفعل الاوكسيني لمركب عديد السكريات الخارجي حيث انها مركبات ذات طبيعة حامضية (٥). والمعروف عن الاوكسينات انها حوامض عضوية.

وتكون فرع خضري من قطع السيقان تحت الفلقية بعد ١٠ أيام من زراعتها على وسط MS الصلب الحاوي على ٠,١ ملغم / لتر من EPS (شكل ٢ b). وادت اضافة EPS مترافقاً مع البنزائل ادنين بتركيز ٣,٠ ملغم / لتر الى وسط MS الصلب وكفاءة التراكيز المستخدمة (٠,٠٥، ٠,١، ٠,٢، ٠,٤، ٠,٨، ٠,٤، ٠,٨ ملغم / لتر) الى حيث قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات الفاصوليا الى البدء بتكوين الكالس الا ان هذه القطع لم تتحول باكملها الى الكالس (الشكل ٢ c) قياساً بعينة المقارنة (الشكل ٢ d،

الجدول (٣): تأثير عديد السكريات الخارجي EPS في تكوين الجذور على السيقان تحت الفلقية لبادرات الفاصوليا في وسط MS الصلب.

MS + EPS ملغم / لتر	عدد القطع المزروعة	عدد القطع المكونة للجذور	% تكوين الجذور
٠,٠٥	٨	٥	٦٢,٥
٠,١	٨	٠	٠
٠,٢	٨	٠	٠
٠,٤	٨	٤	٥٠
٠,٨	٨	٠	٠
Control 1	٨	٠	٠
Control 2	٨	٠	٠

شجعت النتائج اعلاه على استخدام مركب EPS في مجال الزراعة النسيجية لاستحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات الفاصوليا ومن الأجزاء المختلفة لبادرات زهرة الشمس ومقارنته مع



الشكل (٢): استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات الفاصوليا في وسط MS الصلب المدعم بعديد السكريات الخارجي والبنزائل ادنين.

(a) قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات الفاصوليا بعد ٢٠ يوماً من زراعتها على وسط MS الصلب المدعم بـ ٠,٤ ملغم / لتر من EPS. (b) قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات الفاصوليا بعد ١٠ أيام من زراعتها على وسط MS الصلب الحاوي ٠,١ ملغم / لتر من EPS ويلاحظ بداية تكون الفرع الخضري. (c) قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات الفاصوليا بعد ١٥ يوماً من زراعتها على وسط MS الصلب المدعم بـ ٣,٠ ملغم / لتر BA و ٠,٨ ملغم / لتر EPS. (d) السيقان تحت الفلقية (المقارنة) بعد ٢٠ يوماً من زراعتها على وسط MS الصلب الحاوي ١,٠ ملغم / لتر NAA و ٣,٠ ملغم / لتر BA.

الكالس من قطع الجذور لبادرات زهرة الشمس *H. annuus* حيث بدأت هذه القطع بالتحول الى اللون الاخضر مع تكوين كالس بني (شكل ٣، e). اما معاملة المقارنة المتمثلة بزراعة قطع السيقان تحت الفلقية على وسط MS الصلب المجهز بـ ١ ملغم / لتر NAA و ٢,٠ ملغم / لتر BA فقد بدأت القطع بتكوين كالس هش لونه ابيض مخضر (الشكل ٣، f). وبينت النتائج ان استخدام EPS بكافة تراكيزه (٠,٠٥، ٠,١، ٠,٢، ٠,٤، ٠,٨، ١ ملغم / لتر) مترافقاً مع ٢,٠ ملغم / لتر BA كان محفزاً بشكل واضح في استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية وقطع الجذور لبادرات زهرة الشمس *H. annuus* حيث بلغت نسبة الاستحداث ١٠٠% من هذه القطع في كافة التراكيز (جدول ٥).

وتحولت قطع السيقان تحت الفلقية بأكملها الى كالس هش بلون ابيض مخضر بعد ١٣ يوماً من الزراعة (شكل ٣، g). اما الجذور فتحولت الى كالس هش ابيض و بنفس الفترة الزمنية (شكل ٣، h).

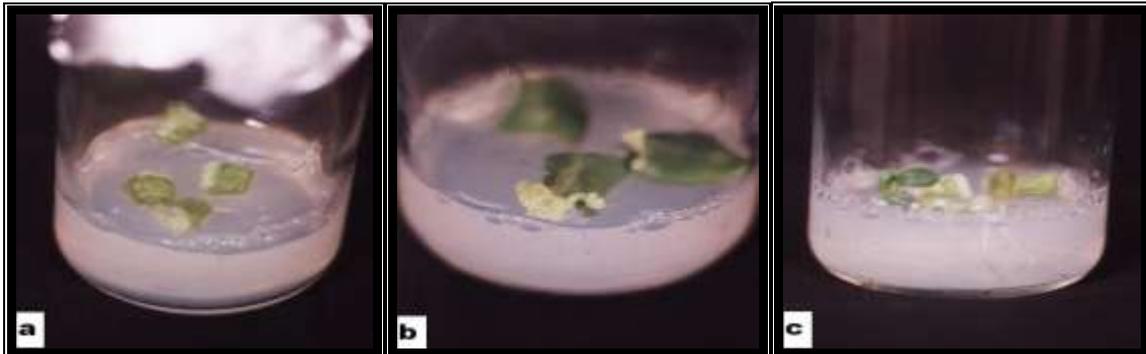
وزادت الفلق بالحجم بشكل كبير جداً وأعطت كالس اخضر متماسك في أماكن الجروح (شكل ٣، i). وكان وسط MS الصلب الحاوي على ٢,٠ ملغم / لتر BA و ٠,٨ ملغم / لتر EPS ملائماً للتمايز حيث تكون فرع خضري واحد من قطع السيقان تحت الفلقية بعد ١٣ يوماً من زراعتها على هذا الوسط (شكل ٣، j). ان القابلية العالية التي ابدتها القطع النباتية لاستحداث الكالس في وسط MS الصلب المجهز بتراكيز من EPS لوحده او مترافقاً مع BA تعزى الى اختلال التوازن الهرموني بين داخل الخلايا وخارجها (٢٨). وهذا يعلّل نجاح الاستحداث بوجود EPS متداخلاً مع BA او بشكل منفرد على افتراض سلوكه كأوكسين. ومن الممكن مستقبلاً اجراء العديد من الدراسات المتعلقة باستخدام EPS في الزراعة النسيجية لنباتات تعود لعوائل اخرى او استخدامه متداخلاً مع الاوكسينات للوصول الى تأثيره البايولوجي وتحديد سلوكه بشكل دقيق.

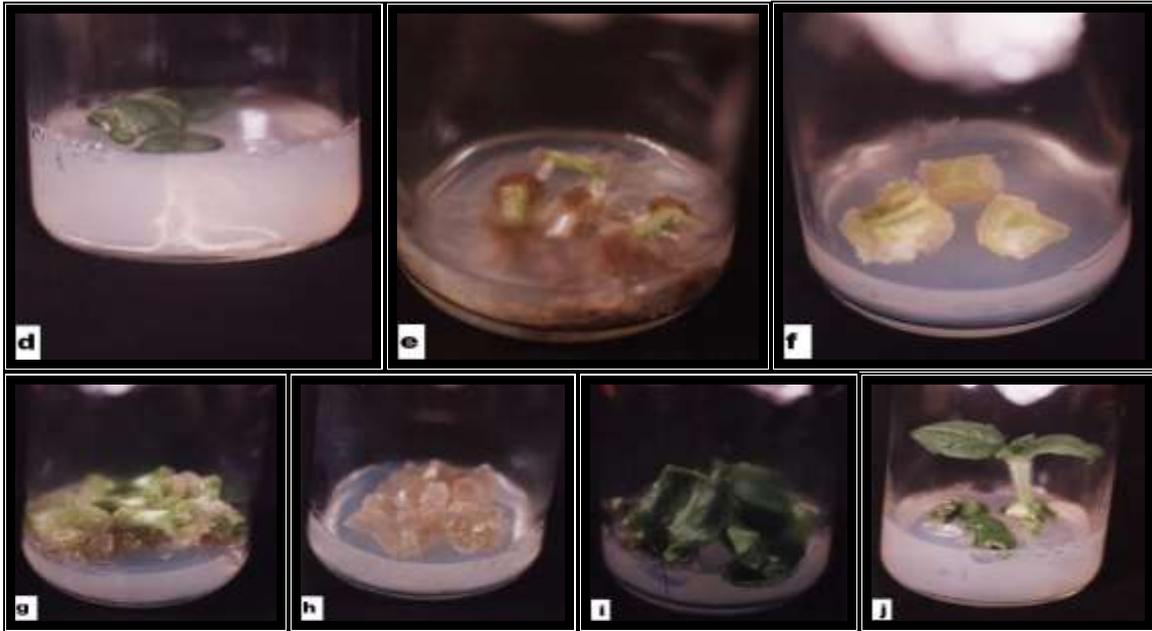
أشارت النتائج ان استخدام EPS لوحده في وسط MS الصلب وبكافة التراكيز المستخدمة ادى الى تحفيز واضح في استحداث الكالس من الأجزاء المختلفة لبادرات زهرة الشمس. حيث بدأت قطع السيقان تحت الفلقية بتكوين الكالس بعد ٥ أيام من الزراعة (شكل ٣، a)، وبلغت نسبة استحداث الكالس من هذه القطع ١٠٠% في اغلب الأوساط المستخدمة (جدول ٤). وكان وسط MS الصلب المدعم بـ ٠,٠٥ ملغم / لتر من EPS أفضل وسط لاستحداث الكالس من الأوراق الفلقية حيث بدأت القطع بتكوين كالس اخضر متماسك بعد ١٢ يوم الزراعة (شكل ٣، b).

الجدول (٤): تأثير عديد السكريات الخارجي في استحداث الكالس من أجزاء بادرات زهرة الشمس *Helianthus annuus* L. في وسط MS الصلب.

MS EPS + ملغم / لتر	عدد القطع المزروعة / عدد القطع المكونة لكالس			% استحداث الكالس
	سيقان تحت فلقية	فلق	جذور	
٠,٠٥ + MS	١٠/١٠	٣/١٠	٠/١٠	١٠٠
٠,١ + MS	٩/١٠	٤/٨	٠/٨	٩٠
٠,٢ + MS	١٠/١٠	٠/٨	٤/١٠	١٠٠
٠,٤ + MS	٠/١٠	٠/٨	٠/١٠	٠
٠,٨ + MS	١٠/١٠	٢/١٠	٠/١٠	١٠٠
Control	١٠/١٠	٨/١٠	٣/١٠	٨٠
MSO	٠/٨	٠/٨	٠/١٠	٠

بالإضافة الى التحفيز الواضح لعديد السكريات الخارجية في استحداث الكالس، أظهرت النتائج ان لهذه المركبات تحفيز واضح في تكوين الجذور من قطع بادرات زهرة الشمس وكان أفضل وسط محفز لتكوين الجذور من قطع السيقان تحت الفلقية والأوراق الفلقية هو وسط MS الصلب الحاوي على ٠,٨ ملغم / لتر من EPS (شكل ٣، c، d)، في حين كان وسط MS الصلب المدعم بـ ٠,٤ ملغم / لتر من EPS أفضل وسط لاستحداث





الشكل (٣): استحداث الكالس من الأجزاء المختلفة لبادرات زهرة الشمس *H. annuus* في وسط MS الصلب لمدعم بعديد السكريات الخارجي EPS

و BA

(a) الأوراق تحت الفلجية لبادرات زهرة الشمس بعد ٥ أيام من زراعتها على وسط MS الصلب المدعم بـ ٠,٢ ملغم / لتر من EPS. قطع السيقان تحت الفلجية لبادرات بعد ٢٠ يوماً من زراعتها على وسط MS الصلب المدعم بـ ٠,٤ ملغم / لتر من EPS. (c) قطع السيقان تحت الفلجية بعد ١٢ يوم من زراعتها على وسط MS الصلب المدعم بـ ٠,٨ ملغم / لتر من EPS. (e) قطع الجذور لبادرات زهرة الشمس بعد ١٢ يوم من زراعتها على وسط MS الصلب المدعم بـ ٠,٤ ملغم / لتر من EPS. (f) قطع السيقان تحت الفلجية بعد ٥ أيام من زراعتها على وسط MS الصلب الحاوي ١,٠ ملغم / لتر من NAA و ٢,٠ ملغم / لتر BA (المقارنة). (g) استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلجية بعد ١٣ يوم من زراعتها على وسط MS الصلب المدعم بـ ٠,٤ ملغم / لتر من EPS و ٢,٠ ملغم / لتر BA. (h) الكالس المستحدث من قطع الجذور بعد ١٣ يوم من زراعتها على وسط MS الصلب المدعم بـ ٠,٤ ملغم / لتر من EPS و ٢,٠ ملغم / لتر BA. (i) الأوراق الفلجية بعد ١٣ يوم من زراعتها على وسط MS الصلب الحاوي ٠,١ ملغم / لتر من EPS و ٢,٠ ملغم / لتر BA. (j) الفرع الخضري من قطع السيقان تحت الفلجية بعد ١٣ يوم من زراعتها على وسط MS الصلب المدعم بـ ٢,٠ ملغم / لتر من EPS و ٠,٨ ملغم / لتر من BA.

الجدول (٥): استحداث الكالس من الأجزاء المختلفة لبادرات زهرة الشمس *H. annuus* في وسط MS الصلب الحاوي على تراكيز مختلفة من EPS و

٢,٠ ملغم / لتر BA .

% استحداث الكالس			عدد القطع المزروعة / عدد القطع المكونة لكالس			MS + EPS BA ملغم / لتر تحت فلجية
ساق	فلج	جذور	ساق	فلج	ساق	
١٠٠	٥٠	١٠٠	٦/٦	٣/٦	١٠/١٠	٠,٠٥ + 2.0
١٠٠	٣٣,٣	١٠٠	٨/٨	٢/٦	١٠/١٠	٠,١ + 2.0
١٠٠	٢٠	١٠٠	٨/٨	٥/٦	٨/٨	٠,٢ + 2.0
١٠٠	٣٣,٣	١٠٠	٦/٦	٢/٦	٨/٨	٠,٤ + 2.0
١٠٠	٢٠	١٠٠	٦/٦	١/٥	٨/٨	٠,٨ + 2.0
١٠٠	٦٠	١٠٠	٨/٨	٣/٥	١٠/١٠	Control
						MS + ١ملغم / لتر NAA + ٢ملغم / لتر BA

المصادر :

- 1-Berkum , P. V. and Eardly , B. D. (1998) . Molecular evolutionary systematics of the Rhizobiaceae . In the Rhizobiaceae Spaink et al. (Els) . Klumer Academic publishers . Netherlands .
- 2-Leigh , J. A . and Walker , G. C. (1994) . Exopolysaccharides of *Rhizobium* : synthesis , regulation and symbiotic function.Trends in Gen . , 10 : 63 - 67.
- 3- Martinez – Romero , E. and Palacios , R. (1992).The *Rhizobium* genome . Critical Reviews in Plant Science , 9 : 59 -93.
- 4- Denari'e , J. ; Debelle , F. and Prome , J. (1996). *Rhizobium* lipo – chito -oligosaccharide nodulation factors : Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis . Ann . Rev . Biochem . , 65 : 503 – 35 .
- 5-Gray , X. J. ; Zhan , H . ; Levery , S. B. ; Battisti , L. ; Rolfe , B. G. and Leigh , J. A. (1991).Heterologous

- الشمس *Heliamths annus* L. وتكوين الكالس في قطرات ا
لالكار المتعددة. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.
(٢٠٠٥). الموصل .
- 18- Murashige T. and Skoog, F. (1962) . A revised
medium for rapid growth and bioassays with
tobacco culture . *Physiol Plant* , 15 : 473 - 497 .
- 19- Palacios , R. Flores, M. , Martinez, E. and
Quinto(1995). *Rizobium phaseoli* : Nitrogen fixation
genes and DNA reiteration In: Nitrogen Fixation
Research Progress. (Eds., H.j. Evans, P.
J. Bottomley, and W.E. Newton). Dordrecht, Nijoff.
PP.137-179.
- 20- Taiz , L. and Zeiger, E. (1991) . *Plant Physiology*. The
Benjamin Cummings Publishing
Company, Inc. Redwood City, California
- ٢١- عيد العظيم ، محمد كاظم . علم فسلجة النبات ، الجزء الثالث ،
(١٩٨٥) . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة الموصل ،
كلية الزراعة ، مديرية مطبعة جامعة الموصل، العراق .
- 22- Najwa.I. AL-Barhawi, and Mozahim K. AL-Mallah,
(2006). Evidence for the functional activity of lipo-
oligosaccharide and N- acetyl-D-glucosamine
on nodulation of *Medicago* and
Trifolium. J. Aaru. Edu., (Under Publication).
- 23- Yang , W. C. ; De Blank , C. ; Meskiene , I . ;
Hirt, H.; Bakker , J. ; Van Kammen, A. ; Franssen , H
. and Bisseling , T . (1994) . *Rhizobium* Nod
factors reactivate the cell cycle during infection and
nodule primordium formation, but the cycle only
completed in primordium formation. *Plant
Cell*, 6: 1415-1426.
- 24- Cohn , J. ; Day , R. B. and Stacey, G. (1998).
Legume nodule organogenesis. *Trends Plant Sci.* , 3
: 105 - 110.
- 25- Saviour'e , A. ; Magyar , Z. ; Pierre , M. ; Brown , S.
; Schultze , M. ; Dudits , D. ; Kondorosi , A . and
Kondorosi , E . (1994) . Activation of cell cycle
machinery and the isoflavonoid biosynthesis
pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal
molecules in *Medicago* microcallus suspension.
EMBO . J. , 13 : 1093 - 1102 .
- 26- Denari'e , J . and Cullimore, J . (1993) . Lipo -
oligosaccharide nodulation factors : A new class of
signaling molecules mediating recognition and
morphogenesis. *Cell* , 74 : 951-954.
- 27- Schroder, G.; Waffenschmidt.; Weiler, E.W. and
Schroder, J. (1984). T-region of Ti-Plasmids codes
from enzyme synthesizing indole-3-actinic
acid. *Eur. J. Biochem.*, 138: 387-391.
- 28- Staehelin, C. ; Schultze, M. ; Kondorosi, E. and
Kondorosi, A. (1995). Lipo-chitoooligosaccharide
nodulation signals from *Rhizobium meliloti* induce
their rapid degradation by the host plant alfalfa. *Plant
Physiol.*, 108: 1607-1614.
- exopolysaccharide production in *Rhizobium Sp* .
strain NGR 234 and consequence for nodule
development *J. Bacteriol.*, 173: 3066-3077.
- 6- Frayse , N. ; Lindner, B. Kaczynski, Z. ; Sharypova,
L; Holst, O. ; Niehaus, K. , and Poinso, V.
(2005). *Sinorhizobium meliloti* strain 1021
produces a low molecular mass capsular
polysaccharide that is a homopolymer of 3- deoxy-
D -mano- Oct- 2- ulosonic acid harboring a
phospholipid anchor . *Glycobiol.* , 15: 101-108.
- 7- Vande Sande, K.; Pawlowski, K.; Czaja, I.; Wieneke , U
; Schell, J. ; Walden, R. ; Matvienko , M . ; Wellink
 , J. ; Vankammen , A . ; Freanssen , H . and
Bisseling , T . (1996) . Modification of
phytochrome response by a peptide encoded by
ENOD40 of legumes and nonlegume. *Science* ,
273 : 370 - 373 .
- 8 - Schell , J. Schmidt , T. and Walden , R. 1998) . Lipo
- chito - oligosaccharide (LCO's) as growth
hormones. *Notice. Irend. Plant Sci.* , 3 : 130 .
- ٩- عمر ، عبد العزيز احمد الزهيري . دلائل التخصص العائلي والتحول
الوراثي ، بين نباتات البرسيم الابيض و بكتريا Rhizobia التعايشية
و *Agrobacterium* المهندسة وراثياً . رسالة ماجستير ، كلية
التربية ، جامعة الموصل . (٢٠٠٢) . الموصل .
- 10 - Burdass , D. (2002) . *Microbes in the environment* .
In : *Society for General Microbiology* . (Ed., H.
Janet), SGM, Marlborough House , Basingstoke
Road , Spencers Wood, Reading RG7.1AG.
- 11- Vincent , J. M. (1970). *A Manual for the practical
study of Root Nodule Bacteria* . IBP. Handbook No.
15. Oxford : Blackwell Scintific
publications , Oxford, pp 113-131.
- 12- Ervin , S. E. , and Hubbell , D. H. (1985) . Root hair
deformations associated with fractionated extract
from *Rhizobium trifoli* . *Appl. Environ.
Microbiol.*, 49: 61-68.
- 13- Fahraeus, G. (1957). The infection of clover root hairs
by nodule bacteria studied by a simple glass slide
technique *J. Gen. Microbiol.*, 16 : 374-381.
- 14- Henry, R. J.; Cannon, D.C. and Winkelman,
J.W. (1974). *Clinical Chemistry Principles and
Techniques*, 2nd ed. , Harper and Row , p. 321-323.
- ١٥- مؤيد، قاسم العباجي و ثابت ، سعيد الغبشة . اسس الكيمياء
التحليلية . (١٩٨٣) ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، مطبعة
جامعة الموصل، العراق .
- ١٦- مرا، اسامة أحمد الكاتب. استخلاص وتنقية وتقدير فعالية انزيمي
البيروكسيد واليوريز من كالس نبات الفاصوليا. *Phaseolus
vulgaris L* رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.
(٢٠٠٥). الموصل .
- ١٧- وجدان ، سالم قاسم يحيى العبيدي ، المعاملة الحرارية والصدمة
الكهربائية في تحفيز انقسامات المزارع الخلوية في نباتات زهرة

Effect of Exo - polysacchrides (EPS) isolated from *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* on nodules formation of *Phaseolus vulgaris* L. and callus initiation from *Phaseolus vulgaris* and *Helianthus annus* L. seedlings

Al- Barhawe, N. E. and Salih , S. M.

Department of Biology, College of Education , University of Mosul , Mosul ,Iraq

Abstract

The aim of this study is to show the possibility of using Exopolysacchrides (EPS) which is isolated from *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* as a principle factor in nodules formation on the roots of *Phaseolus vulgaris* plants . In addition to use these compounds in callus induction from the hepocotyles explants of *Phaseolus vulgaris* seedlings and from hypocotyles , cotyledons and roots explants of *Helianthus annus* seedlings .

The stimulation effect of EPS on the formation of nodules shaped structures was very clear since the percentage of these structures formation was 48% in nitrogen free medium (NF) supplemented with 0.2 mg/L

(EPS) . In addition to increase the protein content of *Phaseolus vulgaris* plants wich grown in NF medium containing (0.05-0.1 ,0.2,0.4 ,and 0.8) mg /L EPS . The results showed the success of callus induction from different explants of *Helianthus annus* seedlings especially when it is used with Benzyl adenine (BA) , in agar solidified MS medium and the percentage of callus formation was 100% from hypocotylys and roots explants . Also the using of EPS alone in MS agar solidified medium helped callus induction and root formation from explants of *Helianthus annus* and *Phaseolus vulgaris* seedling.