مجلة تكريت للعلوم الصرفة، مجلد – ١٣، عدد – (١) ٢٠٠٨ ، ١٤ – ٢١

# استحداث وتمايز كالس نبات الكزبرة *Coriandrum sativum* L. واختبار فعاليته المضادة للجراثيم

**سهام احمد محمود**

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

*Sahmad_mah@ Yahoo.com*

**الملخص:**

اشتملت الدراسة الحالية استحداث الكالس من الأجزاء المختلفة (الأوراق، السيقان، الأوراق الفلقية، السيقان تحت الفلقية، الجذور) لنباتات الكزبرة *Coriandrum sativum* L. باستخدام وسط MS الصلب المجهز بتراكيز متباينة من منظمات النمو ( NAA و BA ) ، ( IAA و Kin ، (D- ٢،٤ وBA ) ، (D. ٢،٤ وKin ) .وتبين ان وسط MS الصلب الحاوي ١،٠ ملغم / لتر من البنزايل أدنين BA و ٠،٥ ملغم / لتر من نفثالين حامض الخليك NAA كان أفضل الأوساط المستخدمة لاستحداث الكالس وإدامته . واظهر كالس الأجزاء المختلفة لنباتات الكزبرة عدا كالس الجذور قابلية على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية في الوسط الزرعي وقد أعطى كالس السيقان أعلى نسبة لتكوين الأفرع الخضرية يليه كالس السيقان تحت الفلقية ثم كالس الأوراق الفلقية وكالس الأوراق على التوالي .وكان أفضل أوساط التمايز هو وسط MS الصلب الحاوي ١،٠ ملغم / لتر من BA و ٠،١ ملغم / لتر NAA . وجذرت الأفرع الخضرية في وسط MS الصلب بنصف قوته التركيبية والحاوي ٠،٥ ملغم / لتر D- ٢،٤ . وتم ايضاً دراسة تأثير المستخلص الكحولي لكل من أوراق النبات البذري وكالس الأوراق ضد أربعة أنواع من البكتريا وهي *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeroginosa* و باستعمال طريقة اختبار الحساسية ( طريقة الانتشار بالاقراص ) حيث تبين ان للمستخلصات تأثيراً مثبطاً تختلف درجته باختلاف نوع المستخلص وتركيزه ونوع البكتريا .

**الكلمات الدالة:** نبات الكزبرة ، زراعة نسيجية.

## المقدمة:

ينتمي نبات الكزبرة Coriander الى العائلة المظلية Umbelliferae واسمه العلمي *Coriandrum sativum* L. وتحتوي الكزبرة على ٢،٠ - ٢،٦ % زيوت طيارة اهمها لينالول Linalool (Coriandrol) ، بورنيول borneol وكافور camphor وجيرانيول Geraniol وليمونين Limonene والفا– بينينpinenes . alpha كما تحتوي الكزبرة ايضاً ١١ ـ ٢١ % زيوت دهنية اهمها حامض اوليك oleic acid وحامض البتروسيلينيك petroselinic acid ولينولينيك Linolenic acid بالاضافة الى مركبات الكومارين والصمغ والتانين وسكريات وبروتين ونشأ [١ ] كما تحتوي الكزبرة على الفلافينويدات مثل كورستين Quercitin ، kaempferol ،epigenin ،rhamnetin ومركبات فينولية و caffeic acid و chlorogenic acid . ليس هذا فقط فالكزبرة تحتوي على العديد من العناصر الغذائية المهمة حيث تعتبر مصدر جيد للالياف النباتية ومصدر مهم للحديد والمنغنيسيوم والمنغنيز والأجزاء المستخدمة من النبات هي البذور والأوراق . وتعتبر الكزبرة من النباتات الطبية المهمة حيث زيتها العطري يُحفز العصارات المعوية لذلك تستخدم في معالجة مشاكل سوء الهضم وتقلصات المعدة والأمعاء وفقدان الشهية وتعتبر الكزبرة طاردة للغازات والديدان ومدرّة للبول والعرق وتستخدم في معالجة الإسهال والمغص وقرح الفم والتشنجات العضلية والآم المثانة والحمى والزحار والصداع وتعمل على تنبيه وزيادة إفرازات الغدد الجنسية لدى الرجال والنساء كما ان شاي الكزبرة يقلل الآم الحيض والولادة وتستعمل خارجياً لمعالجة الروماتزم والآم المفاصل والطفح والجذام وتستخدم ايضاً لمعالجة مشاكل التنفس والتهاب الحنجرة ومعالجة السعال والآم الصدر والزكام والاضطرابات البلعومية ومعالجة الأنفلونزا التي لا يصحبها تعرّق كما تعتبر مقشع ومحلل للافرازات العصبية [٢ ] وتستخدم لتحسين نكهة الادوية والمستحضرات الطبية وتستخدم في صناعة العطور ومستحضرات التجميل .

كما ان للكزبرة تأثير مريح للأعصاب وإزالة التوتر العصبي [٣ ] وللكزبرة تأثير في ايض اللبيد والدهون وتأثير ذلك على سرطان القولون [٤ ] وقديماً كانت تسمى النبات المضاد لمرض السكر anti ـ diabetic ولقد اثبتت البحوث العلمية الحديثة ذلك [٥ ] وتعتبر ايضاً مضاد للأكسدة [٦ ] وتعمل على تخفيض مستوى الكولسترول [٧ ] ولها تأثير مثبط على عدد من البكتريا المرضية والفطريات [٨ ] حيث ثبت ان لزيتها الطيار فعالية مضادة للجراثيم [٩ ] .

ونظراً لأهمية نبات الكزبرة كواحد من النباتات الطبية المنتجة للزيوت الطيارة والأحماض الدهنية فقد تناولته بحوث التقنيات الحياتية والزراعة النسيجية [١ ] اذ ان انتاج المواد الطبية عن طريق الزراعة النسيجية يعد بديلاً لاسلوب الزراعة التقليدية لغرض الانتاج الصناعي لمختلف المواد الايضية الضرورية[١٠ ].

ولقد تم استحداث الكالس من الأجزاء المختلفة لبادرات الكزبرة وتكوين أفرع خضرية منه [١١] وقد استحدث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية للاجنة الجسمية النامية على وسط MS وبحث ايضاً تمايز هذا الكالس [١٢] . كما تم انتاج أفرع خضرية ونباتات كاملة من مزارع الخلايا المعلقة المشتقة من كالس الاجنة الجسمية لنبات الكزبرة [١٣] .تم إنتاج البذور من النباتات الناتجة من كالس الكزبرة وبلغت نسبة انبات هذه البذور تحت ظروف معقمة ٨٢ % [١٤] كما درس تأثير تراكيز منظمات النمو على استحداث وتطور الاجنة الجسمية لنبات الكزبرة[١٥] وتعد الأجنة الجسمية أفضل مصدر لانتاج اعداد كبيرة من نباتات الكزبرة [١٦ ] كما استخدمت

مزارع الخلايا المعلقة كمصدر لانتاج حامض البتروسيلينيك petroselinic acid [١٧] .

ولقد انتجت نباتات كاملة من الكالس المشتق من بروتوبلاست قطع سيقان الكزبرة [١٨ ] وتوصل الباحثون الى مرحلة التزهير وتكوين البذور لنباتات الكزبرة الناتجة من الزراعة النسيجية وخارج الجسم الحي [١٩ ] . كما جرت دراسة قابلية خلايا كالس الأجزاء المختلفة للكزبرة على مقاومة الجفاف [٢٠ ] .

تهدف الدراسة الحالية الى معرفة مدى استجابة الأجزاء المختلفة لنبات الكزبرة (الصنف المحلي) لنظام الزراعة النسيجية من حيث استحداث الكالس واختبار مدى قابلية هذا الكالس على التمايز وتكوين نباتات كاملة منه وكذلك تهدف الدراسة الى معرفة الفعالية التثبيطية لمستخلص الكالس ضد بعض أنواع الجراثيم المرضية .

**المواد وطرائق العمل:**

**مصدر البذور وانتاج البادرات:**

تم الحصول على بذور الكزبرة *Coriandrum sativum* L. من السوق المحلية وبعد اختبار حيوية انباتها عقمت بغمرها في محلول من الماء المقطر وهايبوكلورات الصوديوم NaOCl بتركيز ٦ % وبمعدل ١ حجم مادة معقمة : ٢ حجم ماء مقطر ولمدة ١٠ دقائق. زرعت البذور المعقمة على سطح ٢٠ مل من وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو في انابيب اختبار بمعدل بذرتين في كل انبوبة ، وحفظت العينات في غرفة النزرع بدرجة حرارة ٢٥ ± ٢ °م وظروف ظلام في الأسبوع الاول من الزراعة . بعد انباتها نقلت الى ظروف اضاءة ١٦ ساعة يومياً وبشدة اضاءة ٢٠٠٠ لوكس وتحت نفس ظروف الحاضنة اعلاه .

- **استحداث الكالس وحساب وزنه الطري**

استعملت البادرات السليمة النامية في وسط MS الصلب في ظروف معقمة وبعمر ٤٥ يوماً كمصدر للاجزاء النباتية (الأوراق، السيقان، الأوراق الفلقية، السيقان تحت الفلقية والجذور) . اذ قطعت السيقان والسيقان تحت الفلقية والجذور بطول ١ سم لكل منها اما الأوراق والأوراق الفلقية فقطعت بمساحة ٠,٥ سم$^{٢}$ لكل منها ، زرعت هذه الأجزاء في دوارق زجاجية حجم ١٠٠ مل والحاوية ٤٠ مل / دورق وسط MS الصلب المدعم بتراكيز مختلفة من منظمات النمو والتي تضمنت استخدام البنزايل أدنين BA (بتراكيز ٠,٢٥ ، ٠,٥ ، ١,٠ ملغم / لتر ) مع نفتالين حامض الخليك NAA ( وبالتراكيز ٠,١ ، ٠,٥ ، ١,٠ ملغم / لتر ) واستخدمت التراكيز انفسها مع استبدال البنزايل أدنين BA بالكاينين Kin والنفتالين حامض الخليك NAA بالاندول حامض الخليك ، بالاضافة الى وسط يحوي ٢,٤D ( بتركيز ٠,٥ ملغم / لتر مع BA او Kin بتركيز ١,٠ ملغم / لتر ) فضلاً عن معاملة المقارنة (٠,٠ ) وتمت الزراعة بمعدل ١٠ قطع / جزء نباتي / معاملة ويحسب الوزن الطري للكالس بعمر ٣٠ يوماً .

- **تمايز الكالس**

نقل الكالس المستحدث من قطع الأجزاء النباتية ( الأوراق ، السيقان ، الأوراق الفلقية ، السيقان تحت الفلقية والجذور ) بوزن ١غم / قطعة على سطح ٤٠ . ٥٠ مل من أوساط التمايز المتضمنة وسط MS الصلب الحاوي بنزايل أدنين بتركيز (١,٠ ملغم / لتر وتداخله مع نفتالين حامض الخليك NAA وبالتراكيز(٠,١،٠,٥، ١,٠ ملغم / لتر ) كما استخدمت التراكيز أنفسها مع استبدال BA بـ Kin و NAA بـ IAA وبمعدل ٦ قطع / معاملة وحفظت العينات في الحاضنة في الظروف السابقة الذكر .

- **تجذير الأفرع الخضرية وتكوين النباتات الكاملة**

استؤصلت الأفرع الخضرية المتكونة وازيلت عنها بقايا الكالس وقطعت عند قاعدتها بوساطة مشرط حاد معقم ونقلت الى دوارق زجاجية حاوية ٤٠ مل من كل من وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو او MS الصلب الحاوي NAA او D ٢,٤. او IAA وبالتركيز ١,٠ ملغم / لتر ووسط MS وبنصف قوته التركيبية خالياً من منظمات النمو او مضافاً له ( ٠,٥ ، ١,٠ ملغم / لتر ) NAA او D . ٢,٤ لغرض تجذير هذه الأفرع الخضرية.وكان عدد الأفرع الخضرية المنقولة الى أوساط التجذير ٣ قطع / معاملة .

- **تحضير المستخلص الكحولي لأوراق وكالس أوراق نبات الكزبرة :**

تم تحضير المستخلص الكحولي بأذابة (٢٠ ) غم من النموذج النباتي (الأوراق ، كالس الأوراق) في (٢٠٠ ) سم٣ من الكحول الاثيلي بتركيز (٩٥ % ) داخل حمام ثلجي ، رُج المزيج جيداً وترك في الثلاجة مدة (٢٤ ) ساعة ثم رُشح المزيج خلال عدة طبقات من الشاش ثم مرر خلال قمع بخنر بعدها وضع في جهاز المبخر الدوار Rotary vaccum evaporator بدرجة حرارة لاتزيد عن (٤٠)م° وبعد تبخر الايثانول تكونت طبقة ثخينة من المستخلص الذي جفف بالتجفيد ثم وضع المستخلص في قناني زجاجية وحفظ بالتجميد حسب طريقة الباحث[٢١].

- **البكتريا المستخدمة**

استخدمت اربعة انواع من البكتريا المرضية الموجبة والسالبة لصبغة كرام وهي : *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* و *Pseudomouas aeroginosa* والتي تم الحصول عليها من مختبرات الاحياء المجهرية لقسم علوم الحياة / كلية التربية .

- **تعقيم المستخلص الكحولي وتحضير التخافيف منه :**

حضرت التخافيف التالية من المستخلصات الكحولية (٢٠٠ ،١٠٠ ، ٢٥،٥٠ ، ١٢,٥ ،٦,٢٥، ٣,١٢٥ ملغم / سم$^{3}$ )حيث تم اذابة ١غم من المستخلص في (٥ ) سم$^{3}$ من مادة (DMSO ) وعقمت بطريقة البسترة واعتبر هذا المستخلص قياسي بتركيز ٢٠٠ ملغم / سم$^{3}$ واستخدم لاحقاً لتحضير التخافيف النصفية منه . ثم حضرت اقراص من ورق الترشيح ( NO. ١,٠Whatman ) وبقطر ٠,٥ سم$^{3}$ والمشبعة بالتراكيز اعلاه وذلك باضافة ٠,١ سم$^{3}$ من كل تركيز الى قنينة حاوية على ١٠ اقراص معقمة [٢٢ ]

- **طريقة اختبار الحساسية ( طريقة الانتشار بالاقراص ):**

اتبعت طريقة [٢٣ ] ، اذ تم تلقيح وسط المرق المغذي بمستعمرات مفردة من الجراثيم الاربعة التي سبق ذكرها اعلاه كلا على حدى وحضنت بدرجة حرارة ٣٧° م مدة ١٨ ساعة ، خففت المزارع الجرثومية بالمحلول الفسلجي لمقارنته مع انبوب السيطرة القياسي الذي يعادل ١٠^٨خلية / سم^٣ ثم نقل (٠,١ ) سم^٣ من المعلق الجرثومي المخفف الى وسط الاكارالمغذي ونشر على سطح الطبق باستخدام مسحة قطنية معقمة ، ثم حضنت الاطباق بدرجة ٣٧ °م لمدة ٣٠ دقيقة لكي يحصل التشرب . ولاجل دراسة تأثير المستخلص النباتي في نمو الجراثيم تم تثبيت الاقراص المشبعة بهذه التخافيف في الاطباق المزروعة بوساطة ملقط معقم وبمعدل (٣ مكررات / نوع ) .

حضنت بعدها الاطباق بدرجة ٣٧° م ولمدة ٢٤ ساعة تم بعدها قياس قطر المنطقة الخالية من النمو باستخدام مسطرة شفافة ومدرجة لبيان حساسية الجراثيم للمستخلص . تم استخدام المضادين الحيويين Chloramphenicol , Tetracycyclin بوصفها عينة سيطرة موجبة للجراثيم وذلك حسب ما يستخدم في مختبر الصحة العامة والمعتمد على فحوصات منظمة الصحة العالمية .

**النتائج والمناقشة:**

اظهرت جميع الأجزاء النباتية المستأصلة من نباتات الكزبرة استجابة متباينة لاستحداث الكالس في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز مختلفة من منظمات النمو .اذ اعطت قطع السيقان تحت الفلقية ثم قطع السيقان أعلى استجابة وبمدة زمنية ٢١ .٢٨ يوماً تلتها قطع الأوراق الفلقية وبمدة ٢٥ . ٣٠ يوماً ، اما قطع الأوراق فكانت استجابتها اقل وبمدة زمنية اطول وصلت ٢٨ .٣٥ يوماً ، في حين ان استجابة قطع الجذور كانت منخفضة جداً استغرقت ٣٨ . ٤٥ يوماً .

وهذا يؤكد ما جاء في دراسة [١٨ ] من ان قطع السيقان تحت الفلقية أفضل جزء لاستحداث الكالس من نبات الكزبرة . وقد يعود السبب الى ان استحداث الكالس يعتمد على نوع القطعة النباتية المستخدمة ومصدرها [١٢ ] .

واظهرت نتائج الجدول (١ ) في عمليات استحداث الكالس ان وسط MS الحاوي تراكيز متباينة من BA و NAA كانت مشجعة مع وجود اختلاف في المدد الزمنية اذ لوحظ ان أفضل المعاملات كان باستخدام وسط MS الحاوي BAو NAA بالتراكيز (١,٠ ، ٠,٥ ) ملغم / لتر على التوالي حيث تراوحت النسبة بين ٧٠ – ١٠٠% لجميع الأجزاء النباتية المستخدمة عدا الجذور حيث كانت نسبة استحداثها ٤٠ % . يليه وسط MS الحاوي ١,٠ ملغم / لتر من كل من BA و NAA يتبين من ذلك استحداث الكالس يعتمد ايضاً على التوافق بين المحتوى الداخلي للخلايا من الهرمونات النباتية والمضاف من منظمات النمو الى الأوساط الغذائية المستخدمة[١٤ ].

وعند استبدال السايتوكاينين BA بـ Kin والاوكسين NAA بـ IAA وباستخدام وسط MS ايضاً ( الجدول ١ ) اظهرت النتائج ان أفضل المعاملات كانت باستخدام وسط MS الحاوي ١,٠ ملغم / لتر من كل من Kin و IAA للاجزاء النباتية ( السيقان تحت الفلقية ، الأوراق الفلقية ، الأوراق ) على التوالي . يليه الوسط MS الحاوي (١,٠ ملغم / لتر Kin و ٠,٥ ملغم / لتر IAA لقطع السيقان والجذور . ولقد بينت نتائج دراسات سابقة ان استخدام Kin مع IAAيشجع استحداث الكالس [١١ ].

وعند استخدام الكاينين Kin بتركيز ١,٠ ملغم / لتر مع الاوكسين D - ٢،٤ بتركيز ٠,٥ ملغم / لتر بلغت نسبة الاستحداث أعلى مما هي عليه باستخدام Kin مع IAA وبنفس التركيز لجميع الأجزاء النباتية المستخدمة باستثناء الجذور وقد يعزى ذلك الى نوع وتركيز منظمات النمو في الوسط الغذائي .

وعند استبدال Kin بـBA مع ٢،٤D وبنفس التراكيز (١,٠ ، ٠,٥ ) ملغم / لتر على التوالي كانت نسبة الاستحداث أعلى مما هي عليه باستخدام Kin مع D- ٢،٤ لجميع الأجزاء النباتية عدا قطع السيقان حيث كانت استجابتها متساوية . هذه النتائج تُعزى الى توافق اضافة الاوكسين D- ٢،٤ مع السايتوكاينينات BA او Kin لتعطي نسب استحداث جيدة [١٥ ].ولم يشجع وسطMS الخالي من منظمات النمو على استحداث الكالس ولجميع الأجزاء النباتية المستخدمة . وهذا يؤكد ان استخدام الاوكسينات والسايتوكاينينات كمنظمات نمو وبتراكيز مختلفة لها دور مهم وبارز في استحداث الكالس ونموه ونشوء الأفرع الخضرية وتكوين الجذور خاصة NAA وD٢،٤ و IAA وBA وKin [٢٤].

على ضوء نتائج هذه الدراسة ( الجدول ١ ) لوحظ ان أفضل معاملة لاستحداث الكالس ونموه من الأجزاء النباتية المستخدمة كانت وسطMS المدعم بـ (١,٠ ، ٠,٥ ) ملغم / لتر BA و NAA على التوالي لذلك اعتمدت هذه المعاملة اساساً لاستحداث الكالس وإدامته.

وعند وزن الكالس تبين ان كالس الأوراق كان الاعلى اذ بلغ وزنه الطري (٣,١ ) يليه كالس الأوراق الفلقية (٢,٧ ) غم وكالس السيقان تحت الفلقية (٢,٤ ) غم ثم كالس السيقان ٢,٢ غم اما كالس الجذور فكان وزنه اقل من بقية الأجزاء اذ بلغ (٢,٠ ) غم .

واتصف الكالس المستحدث من اجزاء نبات الكزبرة بلونه الاخضر البراق ( الشكل A . ٢ ، ٥ ، ٨ ، ١١ ) باستثناء كالس الجذور حيث كان لونه ابيض(الشكل A . ١٤ ) كما كان قوام جميع أنواع الكالس هشاً . حيث يعتمد لون الكالس اساساً على نوع الجزء النباتي المستخدم [٢٥ ].

**الجدول (١):** استحداث الكالس من قطع* الأجزاء النباتية المختلفة لنباتات الكزبرة *Coriandrum sativum* في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من منظمات النمو

| منظمات النمو ملغم/ لتر | | النسبة المئوية لاستحداث الكالس % | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| BA+ NAA | | الأوراق | السيقان | الأوراق الفلقية | السيقان تحت الفلقية | الجذور |
| ٠,٠ | ٠,٠ | ٠ | ٠ | ٠ | ٠ | ٠ |
| ٠,١ | ٠,٢٥ | ٠ | ١٠ | ٠ | ١٠ | ٠ |
| ٠,١ | ٠,٥ | ٠ | ٢٠ | ١٠ | ٢٠ | ٠ |
| ٠,١ | ١,٠ | ١٠ | ٣٠ | ٢٠ | ٤٠ | ٠ |
| ٠,٥ | ٠,٢٥ | ١٠ | ٢٠ | ٢٠ | ٣٠ | ٠ |
| ٠,٥ | ٠,٥ | ٤٠ | ٥٠ | ٥٠ | ٥٠ | ٠ |
| ٠,٥ | ١,٠ | ٧٠ | ٨٠ | ٨٠ | ١٠٠ | ٤٠ |
| ١,٠ | ٠,٢٥ | ٢٠ | ٣٠ | ٢٠ | ٣٠ | ٠ |
| ١,٠ | ٠,٥ | ٣٠ | ٤٠ | ٦٠ | ٥٠ | ١٠ |
| ١,٠ | ١,٠ | ٤٠ | ٦٠ | ٦٠ | ٨٠ | ٢٠ |
| Kin + IAA | | | | | | |
| ٠,١ | ٠,٢٥ | ٠ | ٠ | ٠ | ٠ | ٠ |
| ٠,١ | ٠,٥ | ٠ | ٠ | ٠ | ٢٠ | ٠ |
| ٠,١ | ١,٠ | ٠ | ٣٠ | ١٠ | ٣٠ | ٠ |
| ٠,٥ | ٠,٢٥ | ٠ | ٠ | ٠ | ١٠ | ٠ |
| ٠,٥ | ٠,٥ | ٣٠ | ٣٠ | ٣٠ | ٤٠ | ٠ |
| ٠,٥ | ١,٠ | ٢٠ | ٥٠ | ٤٠ | ٥٠ | ٢٠ |
| ١,٠ | ٠,٢٥ | ٠ | ٢٠ | ١٠ | ٢٠ | ٠ |
| ١,٠ | ٠,٥ | ١٠ | ٢٠ | ٣٠ | ٣٠ | ٠ |
| ١,٠ | ١,٠ | ٣٠ | ٤٠ | ٥٠ | ٦٠ | ١٠ |
| BA ٢،٤.D | | | | | | |
| ٠,٥ | ١,٠ | ٦٠ | ٦٠ | ٧٠ | ٧٠ | ٢٠ |
| Kin ٢،٤ .D | | | | | | |
| ٠,٥ | ١,٠ | ٥٠ | ٦٠ | ٥٠ | ٦٠ | ١٠ |

*عدد قطع الكالس المزروعة ١٠ / معاملة

أوضحت نتائج قدرة الكالس على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من منظمات النمو ان كالس السيقان أظهر أعلى قابلية على تكوين الأفرع الخضرية ( الشكل A . ٦ )يليه كالس السيقان تحت الفلقية (الشكلA . ١٢ )، كالس الأوراق الفلقية (الشكل A . ٩ )، كالس الأوراق (الشكلA . ٣ )على التوالي في حين لم يستجب كالس الجذور للتمايز وتكوين الأفرع الخضرية من جميع المعاملات الجدول (٢ ) . ويمكن ان يكون سبب التمايز هو طبيعة خلايا الجزء النباتي وطبيعة الخلايا الاولى المنقسمة التي تكون ضرورية لتكون الأفرع الخضرية (٢٦ ) .

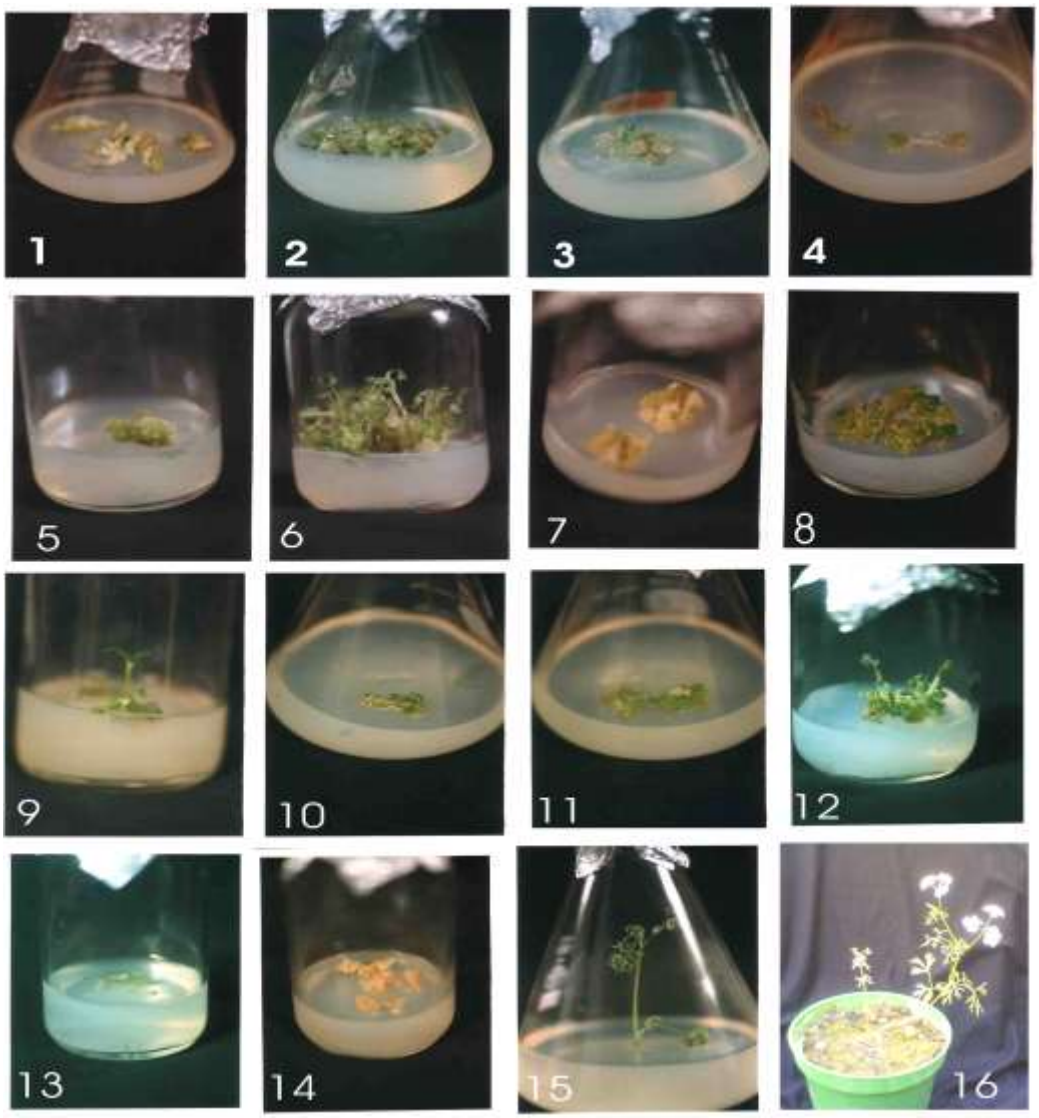
كما تبين ان وسط MS المدعم بـ (٠,١ ، ١,٠ ) ملغم / لتر من NAA وBA كان الافضل في تمايز كالس الأجزاء النباتية المستخدمة لنبات الكزبرة مقارنة بالاوساط الاخرى وقد يكون التمايز عائداً الى نوع وتركيز منظمات النمو المستخدمة اذ لوحظ ان الامتزاج بين منظمات النمو يُحفز تكوين الأفرع الخضرية 13[ ] .

وأظهرت النتائج صعوبة تجذير الأفرع الخضرية الناتجة من الكالس اذ حصل تجذير الأفرع فقط على وسط MS بنصف قوته التركيبية والمضاف اليه ٠,٥ ملغم / لتر D. ٢،٤ بعد ١٠ ايام من نقل الأفرع الخضرية الى هذا الوسط ( الشكلA . ١٥ ) كما تؤكد مصادر اخرى[١٢ و١٨ ] تجذير الأفرع الخضرية وتكوين نباتات كاملة على وسط MS بنصف قوته التركيبية ولقد تم اقلمة النبات الناتج من الكالس في التربة وبنجاح فوصل الى مرحلة التزهير (الشكل A. ١٦ ).

**الجدول (٢ ):** تكوين الأفرع الخضرية من تمايز كالس* اجزاء نباتات الكزبرة . *Coriandrum sativum* L في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من منظمات النمو .

| منظمات النمو ملغم/ لتر | | عدد الأفرع الخضرية المتكونة / معاملة | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| BA | NAA | الأوراق | السيقان | الأوراق الفلقية | السيقان تحت الفلقية | الجذور |
| ٠,١ | ١,٠ | ١١ | ٢٦ | ١٤ | ١٩ | ٠ |
| ٠,٥ | ١,٠ | ٥ | ٢١ | ٩ | ١٣ | ٠ |
| ١,٠ | ١,٠ | ٨ | ١٥ | ١٢ | ١٠ | ٠ |
| Kin | IAA | | | | | |
| ٠,١ | ١,٠ | ٢ | ١٠ | ٨ | ١٥ | ٠ |
| ٠,٥ | ١,٠ | ٦ | ٩ | ٤ | ١٠ | ٠ |
| ١,٠ | ١,٠ | ٧ | ١٣ | ٧ | ١١ | ٠ |

- عدد قطع الكالس ٦ / معاملة وزن القطعة الواحدة ١ غ




**الشكل (A )**: استحداث وتمايز كالس الأجزاء المختلفة لنباتات الكزبرة *Coriandrum sativum* L في وسط MS الصلب

١- تحفز قطع الأوراق لتكوين الكالس على وسط MS الحاوي (١,٠ ، ٠,٥ ) ملغم / لتر BA , NAA على التوالي .

٢- الكالس المستحدث من قطع الأوراق بعد مرور ٢٨ يوماً .

٣- أفرع خضرية متكونة من كالس الأوراق على وسط MS الحاوي ١,٠ ملغم / لترمن كل من BA و NAA .

٤- تحفز قطع السيقان لتكوين الكالس على وسط MS الحاوي ( ١,٠ ، ٠,٥ ) ملغم / لتر BA و NAA على التوالي .

٥- الكالس المستحدث من قطع السيقان بعد مرور ٢١ يوماً .

٦- أفرع خضرية متكونة من كالس الأوراق على وسط MS الحاوي (١,٠ ،٠,٥ ) ملغم / لتر BA و NAA .

٧- تحفز قطع الأوراق الفلقية على وسط MS الحاوي( ١,٠ ، ٠,٥ ) ملغم / لتر BA و NAA على التوالي .

٨- الكالس المستحدث من قطع الأوراق الفلقية بعد مرور ٢٥ يوماً .

٩- أفرع خضرية متكونة من كالس الأوراق الفلقية على وسط MS الحاوي ١,٠ ملغم / لتر من كل من BA و NAA .

١٠- تحفز قطع السيقان تحت الفلقية لتكوين الكالس على وسط MSالحاوي (١,٠ ، ٠,٥ ) ملغم / لتر BA و NAA على التوالي.

١١- الكالس المستحدث من قطع السيقان تحت الفلقية بعد مرور ٢١ يوماً .

١٢- أفرع خضرية متكونة من كالس السيقان تحت الفلقية على وسط MS الحاوي ١,٠ ملغم / لتر من كل من BA و NAA .

١٣- تحفز قطع الجذور لتكوين الكالس على وسط MS الحاوي (١,٠ ،٠,٥ ) ملغم / لتر BA و NAA على التوالي .

١٤- الكالس المستحدث من قطع الجذور بعد مرور ٣٨ يوماً .

١٥- تجذير الأفرع الخضرية المتكونة من الكالس في وسط MS بنصف قوته التركيبية والحاوي ٠,٥ ملغم / لتر D. ٢،٤ .

١٦- اقلمة النبات الناتج من الكالس في التربة .

تشير النتائج ان المستخلص الكحولي لكالس أوراق الكزبرة له تأثيراً مضاداً لنمو الجراثيم يفوق تأثير المستخلص الكحولي لأوراق النبات ، وهذا التأثير يعتمد على تركيز المستخلص ونوع البكتريا المرضية.

حيث تبين نتائج الجدول (٣ ) ان لمستخلص الكالس تاثيراً مثبطاً قوياً ضد كل من بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* ، فقد كان للتراكيز ٢٠٠ و ١٠٠ ملغم / سم$^3$ . تأثيراً قوياً فاق تأثير المضادات الحياتية المستعملة للمقارنة ، اما التراكيز الاقل منها كان لها تأثير لكن اقل من تأثير المضادات الحياتية (الشكل B ـ ١ ، ٢، ٣ ).ان التركيز ٢٠٠ ملغم / سم$^3$ كان اكثر التراكيز تاثيراً في جميع الجراثيم المستعملة وقد يعزى سبب ذلك الى ان جدران البكتريا لها القابلية على تنفيذ التراكيز العالية بصورة أعلى من ما هو عليه في التراكيز الواطئة .

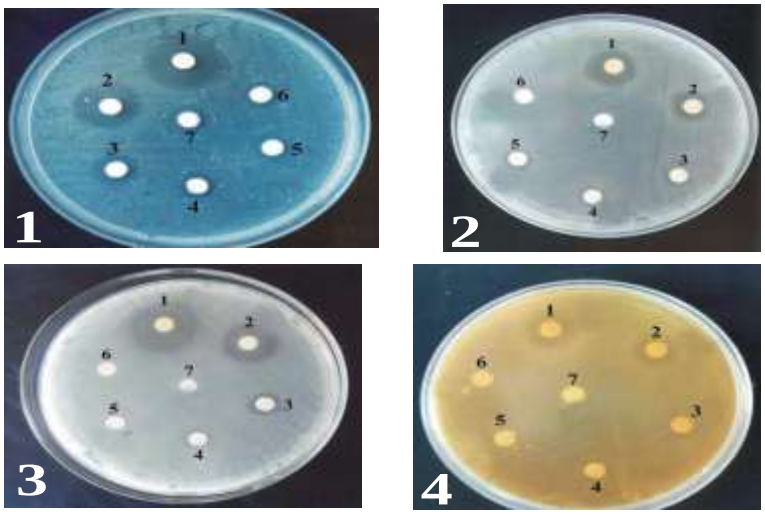
اما المستخلص الكحولي للاوراق فقد كان له تأثيراً مثبطاً ضد البكتريا المذكورة اعلاه لكن اقل من تأثير المضادات الحياتية المستعملة واقل من تأثير مستخلص الكالس وقد يعود السبب في ذلك الى ان المادة الفعالة لهذا النبات تكون موجودة في مزارع الكالس بصورة أعلى مما هو عليه في أوراق النبات البذري .

وبالنسبة لتأثير مستخلص الكالس على بكتريا *Pseudomonas aeroginosa* فقد اظهر التركيز ٢٠٠ ملغم / سم$^3$ تأثيراً أعلى من تأثير المضاد الحيوي Chloramphenicol واقل من تأثير المضاد الحيوي Tetracycline اما التركيز ١٠٠ ملغم / سم$^3$ كان تأثيره مساوياً لتأثير Chloramphenicol و اقل من تأثير Tetracycline (الشكلB . ٤ )،في حين لم يلحظ أي تأثير يذكر لمستخلص الأوراق ضد هذه البكتريا .وفي دراسات سابقة ثبت ان لمستخلصات الكزبرة فعالية مضادة لانواع مختلفة من الجراثيم المرضية [٢٧ ] واظهر المستخلص الكحولي فعالية اكبر ضد هذه الجراثيم عندما فصل الى مكوناته بواسطة المذيبات العضوية [٢٨ ] .وقابلية الكزبرة في القضاء على البكتريا تكمن في احتوائها على الزيوت الطيارة والزيوت الدهنية حيث ثبت ان الزيوت المستخلصة من بذور الكزبرة [٢٩ ] ومن أوراق الكزبرة [٣٠ ] لها تأثير مثبط ضد الجراثيم خصوصاً بكتريا *Salmonella typhi* يفوق تأثير المضاد الحيوي Gentamicin .

**الجدول (٣):** الفعالية التثبيطية لمستخلصات الأوراق وكالس أوراق نبات الكزبرة *Corindrum sativum* L. ضد بعض أنواع الجراثيم المرضية . ( قطر * دائرة التثبيط مقاساً بالملم ).

| نوع المعاملة | الجراثيم المرضية | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *S. aureus* | *B. subtilis* | *E. coli* | *P. aeroginosa* |
| تركيزا لمستخلص الكحولي لكالس أوراق الكزبرة | | | | |
| ٢٠٠ | ٢٣ | ١٥ | ٢٢ | ١٢ |
| ١٠٠ | ١٩ | ١٣ | ١٥ | ١٠ |
| ٥٠ | ١٠ | ٨ | ٩ | ٠ |
| ٢٥ | ٧ | ٦ | ٦ | ٠ |
| تركيز المستخلص الكحولي لأوراق الكزبرة ملغم / سم٣ | | | | |
| ٢٠٠ | ١٤ | ٩ | ١١ | ٠ |
| ١٠٠ | ١١ | ٦ | ٨ | ٠ |
| ٥٠ | ٧ | ٠ | ٦ | ٠ |
| ٢٥ | ٠ | ٠ | ٠ | ٠ |
| Chloramphenicol 30 mg / disk | ١٨ | ١٢ | ٩ | ١٠ |
| Tetracy cline 30 mg /disk | ١٥ | ١١ | ١٢ | ١٣ |

• معدل قطر دائرة التثبيط حسب باستخدام ثلاث مكررات .




١. تأثير مستخلص كالس الاوراق بتراكيز مختلفة* ضد جرثومة *Staphylococcus aureus* .

٢. تأثير مستخلص كالس الاوراق بتراكيز مختلفة* ضد جرثومة *Bacillus subtilis* .

٣. تأثير مستخلص كالس الاوراق بتراكيز مختلفة* ضد جرثومة *Escherichia coli* .

٤. تأثير مستخلص كالس الاوراق بتراكيز مختلفة* ضد جرثومة *Pseudomonas aeroginosa* .

* الأرقام ١،٢،٣،٤،٥،٦،٧ تشير الى التراكيز ٢,٠، ١,٠، ٠,٥٠، ٠,٢٥، ٠,١٢، ٠,٠٦، ٠,٠٣ ملغم/قرص على التوالي.

**المصادر:**


1. T. Nagata and y . Ebizuka . Berlin, Springer – Verlag . 2002 .
2. J. Duke , The Green pharmacy . Rodale Press . 1997 .
3. A . Vafaei and A. Taherian . Iranian Journal of pharmaceutical Research 2 : 46 – 47 (2004).
4. V. Chithra and S . Leelamma . J.Ethnopharmacol 71 ,3(2000) : 457 – 463 .
5. A. M . Gray and P. R. flatt .J .Nutr 81 ,3, (1999) : 203-209 .
6. V . Chithra and S . Leelamma . Indian J . Biochem Biophys 36 , 1 , (1999) : 59 – 61 .
7. M. C. Morris and F.Y. Li - New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 28, 3 (2000) : 213 -217 .
8. V . I . Tyutyunnik and N.V. Glumova. Mikologiya I fitopatologiya .21 , 5 , (1987) : 451-455.
9. M . Syed and M. Hanif . Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research 29 , 3, (1986) :183-188 .
10. S . R . Bhalsing and V. L .Maheshwari . J.Sci & Ind.Res. 57(1998):703-708
11. N. V. Kataeva and E. A. Popowich . Plant – cell ,- Tissue and organ culture 34 , 2, (1993) : 141-148.
12. R. Stephen and N. Jayabalan . Indian .J. Exp Biol 39,4, (2001):387-389 .
13. Kim Sukweon ; M. Park ; J. R. Liu ; S. W. Kin and M. K. Park. Plant-Cell-Reports. 15 ,10, (1996) :751-753.
14. R. R. Chen ; J. T. Zhang ; B. P. Li ; S. S. Guo ; J. p. Hao ; and X. M. Zhou.Chinese-Journal of Biotechnology.7,2, (1992):127-134 .
15. A. Mujib ; S. Bandyopadhyay ; S. Banerjee and P. D. Ghosh . Horticultural- Journal 3,1, (1990):59-62 .
16. R. Stephen and N. Jayabalan. XVI International Botanical Congress.Abs.Nu.5372 . 1999.
17. S. W. Kim and M. K. Park . phytochemistry oxford 42 ,6, (1996): 1581- 1582 .
18. B. P. Li ; J.T. Zhang and R.H. Chen . Acta Botanica sinica 33 ,12, (1991):932-937 .
19. R. Stephen and N. Jayabalan . Current science Bangalore 74 ,3, (1998): 195-197.
20. R. Stephen ; R. J. Mary and N. Jayablan . Calicut , India . 122-125 . 1997.
21. A. Grand ; P. A.Woudergem ; R .Verpoortes and J.L. Pousset . J.Ethnopharmacol .,22(1988) :25-31.
22. S. K Waage and P. A. Hedin . Phytochemistry 24(1985):243-245 .
23. A. W. Bauer ; W. M. Kirby ; J. C. Sherris and M. Turck . Amer .J.clin Pathol . 45(1966):493-496 .
24. M. Arapetyan ; L. Martyniak ; F. pank . Proceeding .International symposium .Breeding research on medicinal and aromatic plants .Quedlinburg . Germany . 1996 .
25. J. H. Dodds and L.W . Roberts . Cambridge Univ . Press . London , New york . 1985 .
26. J. Samaj ; M. Boback ; M. Ovecka ; A. Blehova and A. Pretova. Veda Press . Bratislava . p 122 .1997.
27. M. Elgayyar ; F. Draughon ; D. Golden . J. food protect 64 (2001):1019 -1024.
28. S. K. Kang and D. K. Yong. . Brazil sci 97(2000) : 2632-2636 .
29. M. B. Stefanini ; R. O. Figueiredo ; L. C. Ming ; and A.F. Junior . Acta Hortculturae 597 .V.1 N.47. 2003.
30. I. Kubo ; K. Fujita ; A. Kubo ; K. Nihei and T. Ogura . J . Agric food chem. 52 ,11, (2004):33329 – 3332 .

# Initiation and Diffrentiation Of *Coriandrum sativum* L. Callus and its antimicrobial activity

**Seham Ahmad Mahmood**

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

## Abstract :

In this study callus was initiated from different explants (Leaves, stems, hypocotyles,cotyledones and roots) of *Coriandrum sativum* plants in Solidified Murashige and Skoog (MS ) medium . supplemented with different concentrations of (NAA ,BA), (IAA ,Kin) (2,4-D ,BA) and (2,4 –D , Kin ) . It was showen that solidified (MS ) medium containing 1.0 mg \L BA and 0.5 mg\L NAA was the best one for callus initiation and maintenance subculturing . Callus initiated from different explants except roots have the ability to produce shoots and stem callus gave the highest ratio of regeneration then the hypocotyls callus ,and callus of cotyledones and finally leaves Callus . In addition solidified MS medium supplemented with 1.0 mg \L BA and 0.1 mg \L NAA was the most suitable for shoots formation . All shoots were rooted in solidified half strength MS medium containing 0.5 mg \L 2,4 –D . Also in this study the effect of alcoholic extract of leaves of seed born plants and leaves Callus was studied against *Staphylococcus aureus* , *Bacillus subtilis* , *Escherichia coli* , *Pseudomonas aeroginosa* by using sensitivity test . It was shown that the extracts have an inhibitory effect which differs according to the type and concentration of the extracts and also the type of bacteria.