تأثير ليزر الهليوم – نيون على نمو كالس السيقان القرصية للثوم*Allium sativum* ومحتواه من الحامض النووي DNA

مزاحم قاسم الملاح و قتيبة شعيب النعمة و مرا أسامة الكاتب

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

(تاريخ الاستلام: ١٧ / ٢ /٢٠٠٨ ، تاريخ القبول: ٢٩ / ٦ / ٢٠٠٨)

الملخص:

استحدثت مزارع كالس السيقان القرصية لنباتات الثومGarlic (*Allium sativum*) في وسط MS الصلب المدعم بإضافة ١،٠ ملغم / لتر من BA ، ٠،٥ ملغم / لتر من NAA و ٠،٣ ملغم / لتر من 2,4-D. حفزت عملية تعريض هذا النسيج غير المتمايز لجرعات من أشعة الليزر هليوم – نيون بقدرة ١ ملي واط زيادة في الأوزان الطرية للقطع المعاملة. ومن النتائج البارزة لهذه الدراسة حصول زيادة في كميات الحامض النووي الكلي DNA في خلايا هذا النسيج النباتي غير المتمايز عند تقديره بالمطياف الفوتومتري. وقد سجلت هذه الزيادة في الحامض النووي في بعض العينات المعاملة الضعف أو أكثر أحيانا عند مقارنتها بكمياته في العينات الضابطة فضلا عن أن عينات الكالس المعاملة لم تتأثر مظهريا بهذه المعاملة واستمرت بنموها.

المقدمة:

يعد الإشعاع واحدا من أكثر العوامل المؤثرة في المكونات الحيوية للخلية مثل البروتينات والأحماض النووية والدهون والكاربوهيدرات وغيرها (١) وأشارت دراسات عديدة إلى استخدام مصادر إشعاع مختلفة مثل أشعة كاما وأشعة x والأشعة فوق البنفسجية إضافة إلى الليزر ودراسة تأثيراتها على خلايا النبات والحيوان. فقد تطرقت إحدى هذه الدراسات إلى تأثيرات أشعة كاما والأشعة فوق البنفسجية على مستويات البروتين والحامض النووي والزيت الطيار في كالس نبات البقدونس (٢) ونبات زهرة الشمس (٣). وبالنسبة لاستخدامات الليزر مع الأنظمة النباتية فهناك دراسات محدودة تناولت تأثيرها، فقد أشارت إحدى البحوث إلى تأثير أشعة الليزر في زيادة تركيز احد المركبات الثانوية Lipid peroxidation في كالس نباتات الحنطة (٤). وأكدت دراسة أخرى إلى إمكانية استخدام ليزر الهليوم– نيون في إصلاح الأضرار الفسيولوجية الناتجة من استخدام الأشعة فوق البنفسجية مع بادرات الباقلاء (٥). ومن الدراسات الحديثة لاستخدام الليزر كأداة وتقنية للحصول على خلايا مفردة من مقاطع الأنسجة بتقنية تسمى Laser capture micro dissection (LCM) إذ أمكن استخلاص الحامض النووي RNA باستخدام هذه التقنية (٦). وهناك تطبيقات أوسع لاستخدام أشعة الليزر مع الخلايا الحيوانية وخلايا الإنسان أيضا فتشير إحدى هذه الدراسات إلى أن استخدام ليزر أشباه الموصلات والذي يبعث شعاع في منطقة IR أدى إلى زيادة محتوى الحامض النووي DNA في بعض الخلايا الجرثومية (٧).

وتهدف الدراسة الحالية إلى التعرف على تأثيرات تعريض مزارع كالس السيقان القرصية المستحدثة نسيجيا من نبات الثوم لأشعة الليزر على الأوزان الطرية ومحتوى الحامض النووي DNA في الكالس المعامل.

مواد العمل وطرائقه:

المادة النباتية:

عقمت الفصوص الجافة لنباتات الثوم (Garlic) *Allium sativum* المتوفرة في السوق المحلية تعقيما سطحيا بغسلها بمحلول مسحوق التنظيف لمدة ١٠ دقائق ثم بالماء الجاري عدة مرات ثم غمرت في الكحول الأثيلي ٩٦% لمدة ٣ دقائق، رفعت الفصوص من الكحول وأزيلت أغلفتها الخارجية (القشور)، بعدئذ غمرت الفصوص المقشرة في الكحول الاثيلي ٩٦% لمدة ٥ دقائق أخرى نقلت بعدها إلى محلول ٣% هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl (القاصر التجاري) لمدة ٢٠ دقيقة ثم غسلت الفصوص جيدا بالماء المعقم ثلاث مرات لإزالة أثار المادة المعقمة ووضعت على سطح ورق ترشيح معقم للتخلص من الماء الفائض (٨).

وضعت الفصوص المعقمة كاملة على سطح وسط MS الصلب (٩) الخالي من منظمات النمو في قنانٍ حجم ١٠٠ مل تحوي ٢٥ مل من الوسط المذكور بمعدل فصين/ قنينة. حفظت العينات في غرفة الزرع في ظروف ظلام تام لمدة ٧ أيام بدرجة حرارة ٢٥ ± ٢ درجة سيليزية ومن ثم نقلت البادرات النامية إلى نظام الإضاءة المتعاقب ١٦ ساعة ضوء / ٨ ساعات ظلام وشدة إضاءة ٢٠٠٠ لوكس (١٠).

انتجت مزارع الكالس من السيقان القرصية المستأصلة من بادرات الثوم المعقمة بعمر أسبوعين المزروعة على سطح وسط MS الصلب الحاوي على ١،٠ ملغم/لتر BA و٠،٥ ملغم/لتر NAA و ٠،٣ ملغم/لتر 2,4-D (١٠). وحفظت العينات في غرفة الزرع تحت ظروف الإضاءة والظلام المتعاقبين وبشدة إضاءة ٢٠٠٠ لوكس.

تعريض كالس السيقان القرصية لأشعة الليزر:

استخدمت مزارع كالس السيقان القرصية النامية على وسط الاستحداث عند بلوغها شهرين من العمر. أخذت مجموعة قطع من هذا الكالس المتماسك ووضعت في قنانٍ زجاجية معقمة (٠،٥ غم / قنينة) وبمعدل ٤ مكررات لكل معاملة. عرضت هذه العينات لأشعة الليزر باستخدام جهاز توليد أشعة الليزر هليوم نيون He-Ne (Griffin, Germany) الموجود في مختبر الليزر / قسم الفيزياء / كلية التربية، بقدرة ١ ملي واط وطول موجي ٦٣٢,٨ نانوميتر.

وعرضت مجموعات من عينات الكالس لأشعة الليزر وفق الأتي:

- المجموعة الأولى: قطع كالس بدون معاملة (عينات مقارنة).
- المجموعة الثانية: قطع كالس عرضت لأشعة الليزر لمدة نصف ساعة.
- المجموعة الثانية: قطع كالس عرضت لأشعة الليزر لمدة ساعة واحدة.
- المجموعة الثانية: قطع كالس عرضت لأشعة الليزر لمدة ساعتين.

وبعد الانتهاء من تعريض جميع العينات للمعاملات المحددة وضعت قطع الكالس المعاملة وغير المعاملة (المقارنة) على سطح وسط الاستحداث عينه وحفظت بنفس الظروف السابق ذكرها.

حسبت معدلات الأوزان الطرية لعينات الكالس المعرضة لأشعة الليزر في المجاميع الأربعة بعد مرور شهرين من زراعة القطع على أوساط الاستحداث.

استخلاص الحامض النووي DNA:

استخدمت الطريقة القياسية (١١) في استخلاص الحوامض النووية من العينات النباتية، حيث سحق غرام واحد من كالس السيقان القرصية بعمر شهرين في هاون خزفي صغير مبرد بدرجة ٤ درجة سيليزية بوجود ١٠ مل من الكحول ألمثيلي ٩٦% المحفوظ بدرجة ٤ درجة سيليزية. نبذ المزيج مركزيا (Hettich EBA 3S) عند درجة ٤ درجة سيليزية بسرعة ١٥٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٧ دقائق، أهمل الراشح وغسل الراسب بالكحول ألمثيلي ٩٦% المبرد عدة مرات وأعيد غسل الراسب بحامض البركلوريك (PCA) بتركيز ٠,٢ مولار عدة مرات أخرى، عزل الراسب بإجراء النبذ المركزي بسرعة ٢٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٠ دقائق. أضيف إلى الراسب ١٠ مل من الكحول الأثيلي ٩٦% ثم نبذ المحلول مركزيا بسرعة ٢٠٠٠ دورة /دقيقة / ١٠ دقائق. أضيف إلى الراسب ١٠ مل من مزيج الكحول الاثيلي / الايثر بنسبة ١:٢ (حجم:حجم) ووضع بدرجة حرارة ٥٠ درجة سيليزية لمدة ٣٠ دقيقة. ثم طرد المزيج مركزيا كما في الخطوة السابقة. أضيف إلى الراسب ١٠ مل من حامض البركلوريك بتركيز ٥%، وترك المحلول مدة ٤٥ دقيقة في فرن بدرجة ٧٠ درجة سيليزية. بعدها ترك المحلول في درجة ٤ درجة سيليزية مدة ٢٤ ساعة. طرد المحلول مركزيا (Hettich EBA 3S)، بسرعة ٢٥٠٠ دورة / دقيقة / ١٥ دقيقة بجهاز الطرد المركزي، اخذ الرائق وأكمل الحجم النهائي إلى الحجم القياسي بمحلول ٥% من حامض البركلوريك.

تحديد الكمية الكلية من الحامض النووي DNA:

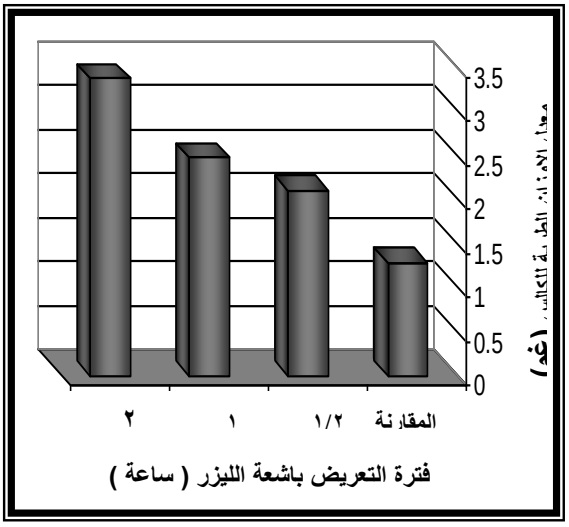
اتبعت الخطوات القياسية في تحديد كمية الحامض النووي DNA (١٢ و ١٣) باستخدام كاشف الأمين ثنائي الفينول Diphenyl amine reagent الذي حضر بإذابة ١ غم منه في ١٠٠ مل من حامض ألخليك الثلجي. حددت كمية الحامض النووي DNA بأخذ ١ مل من الرائق الحاوي على الحوامض النووية وأضيف له ٢ مل من كاشف الأمين ثنائي الفينول. مزج الخليط جيدا ثم أضيف إليه ٠,١ مل من المحلول المائي للأستيلديهايد Acetaldehyde بتركيز ٠,٦ ملغم / مل ثم ترك المحلول مستقرا مدة ٢٤ ساعة بدرجة ٢٥–٢٨ درجة سيليزية. قدرت كمية الحامض النووي DNA من الفرق بين شدة الكثافة الضوئية للمحلول عند الطول ألموجي ٧٠٠ نانوميتر وعند الطول ألموجي ٥٩٥ نانوميتر باستعمال المطياف الضوئي (CECILL – CE 1011, France) ومقارنة كمية الحامض النووي مع المنحني القياسي DNA.

النتائج:

تقدير الأوزان الطرية للكالس المعرض لأشعة الليزر:

أظهرت النتائج سهولة استحداث الكالس من قطع السيقان القرصية في وسط الاستحداث. وقد استلزم تحفيز قطع السيقان لاستحداث الكالس أسبوعين بينما اكتمل تكوينه بعد ٦ أسابيع من الاستحداث. واتصف الكالس بقوامه المتماسك ولونه الأبيض المائل إلى الاصفرار.

وأظهرت نتائج حساب معدلات الأوزان الطرية للكالس المعرض لأشعة الليزر حصول زيادات في الأوزان الطرية لقطع الكالس المعرضة قياساً بنظيراتها في عينة المقارنة. وتناسبت الزيادة في الأوزان الطرية طرديا مع زيادة أمد التعريض للأشعة (الشكل ١).



الشكل (١): تأثيرات التعريض لأشعة الليزر على معدلات الأوزان الطرية لكالس الساق القرصي للثوم *Allium sativum*

تقدير كمية الحامض النووي DNA الكلي:

أشارت النتائج إلى حصول زيادة في كمية الحامض النووي DNA الكلي في عينات كالس السيقان القرصية المعرضة لأشعة الليزر مقارنة بكميته في قطع الكالس غير المعاملة (الجدول ١).

الجدول (١): كميات الحامض النووي DNA الكلي في عينات كالس السيقان القرصية للثوم المعرضة لأشعة الليزر.

المعاملات	كمية DNA ملغم / غم وزن طري
كالس بدون تعريض (مقارنة)	٢٤
كالس معرض لأشعة الليزر	
لمدة ١/٢ ساعة	٣٨
لمدة ١ ساعة	٥٢
لمدة ٢ ساعة	٨٣

ويلاحظ أن الزيادة الحاصلة في كمية الحامض النووي DNA قد سجلت ارتفاعا ملحوظا في جميع فترات التعريض لأشعة الليزر، ومن الملاحظات المهمة هي بقاء الكالس حيا مستمرا في نموه في جميع العينات المعرضة للأشعة. إلا أن هذا التأثير لم ينعكس على تمايز هذا الكالس أو تشجيع تكوين الأعضاء أو الأجنة.

المناقشة:

لقد اقترنت أنظمة الزراعة النسيجية في النباتات بمجموعة من التقانات الحديثة ومن ضمنها تقانة التحفيز الكهربائي (١٤) التي أظهرت تأثيرات ايجابية في أنظمة نباتية متباينة. ومن خلال مراجعة المصادر لوحظت

تطبيقات واسعة لاستخدامات الليزر في مجالات صناعية وطبية مختلفة، إلا أن استخدامها في مجال زراعة الأنسجة النباتية كان محدودا جدا. فقد أشارت إحدى الدراسات (١٥) أن تعريض مزارع كالس النباتات النامية في المنطقة الاستوائية حفزت تكوين الأعضاء في أنسجة كالس الكرز. ولحظت هذه الدراسة إن العينات المعرضة لمستويات أو جرع منخفضة من إشعاع الليزر حفزت تكوين الأعضاء من كالس التفاح والنخيل في الوسط ألزرعي. ويعتقد أن الزيادة المنخفضة في كميات الحامض النووي DNA في هذه الدراسة قد يعزى إلى فترات التعريض كانت منخفضة بدلالة عدم موت عينات الكالس وإنما انعكس تأثيرها على تشجيع تخليق الحامض النووي الذي يعد معيارا دقيقا لحصول النمو.

ولحظت الدراسة ذاتها (١٥) أن حزمة الليزر إذا استخدمت بصورة غير موجهة إلى العينة فإنها تكون غير كفوءة في تحفيز أنظمة الكالس المعروفة بصعوبة تمايزها أو عدمه. وهذا قد يعزى إلى عدم حدوث تغير في التنظيم الهيكلي لأنسجة الكالس الذي يمتاز بضعف تمايزه أو مقدرته على التشكل. إن الزيادة الحاصلة في كميات الحامض النووي DNA في كالس الثوم من المحتمل أن يفسر إلى حدوث التداخل بين نوعي الموجات مع الجزء السطحي من الكالس مما أدى إلى عدم تكون الأفرع الخضرية من محيط خلايا الكالس الموجودة في مقدمة هذه القطع، واقتصر التأثير على زيادة الحامض DNA في كالس الثوم. وهذا يدعو إلى الاعتقاد أن الحزم المستخدمة من الليزر أدت إلى كبح أو إخماد فعل الجينات المسيطرة في المزارع النسيجية كما حصل مع ثلاثة أنواع من المزارع النسيجية لنباتات القطن والرز والصنوبر وأكدته فحوصات المجهر الاليكتروني الماسح باستخدام الليزر واختبارات (Si RNA) المسببة لإحداث الاستنساخ المتأخر (١٦).

شكرنا إلى الدكتور عبد الغفور إبراهيم عبد الله لتسهيل العمل في مختبر الليزر في قسم الفيزياء وعلى آراءه ومناقشته المفيدة.

المصادر:

١. خليل، احمد محمد. الإشعاع المؤين. منشورات جامعة اليرموك. (١٩٩٠).

٢. الزيدي، رغد نواف جرجيس. تأثيرات أشعة كاما وفوق البنفسجية في المزارع النسيجية ومحتوى البروتين، الأحماض النووية والزيت الطيار لنباتات البقدونس *Petroselinum crispum* . رسالة ماجستير. جامعة الموصل. (٢٠٠٥).

٣. ألعقيدي، تغريد نواف احمد. تأثير أشعة كاما في إحداث التغايرات في محتوى البروتين والزيت والأحماض الدهنية وكالس زهرة الشمس *Helianthus annus* وتمايزه. رسالة ماجستير. جامعة الموصل. (٢٠٠٤).

4. Salyaev, R. K.; Dudareva, L. V.; Lankevich, S. V.; Ekimova, E. G. and Sumtsova, V. M.,. Effect of low-intensity laser radiation on the lipid peroxidation in Wheat callus culture. Russian J. of Plant Physiol. 50: 498-50. (2003).

5. Qi, Z.; Yue, M.; Han, R. and Wang, X.,. The damage repair role of He-Ne laser on plants exposed to different intensities of ultraviolet-B radiation. Photochem. & Photobiol. 75: 680-686. (2002).

6. Kerk, N. M.; Ceserani, T.; Tausta, S. L.; Sussex, I. M. and Nelson, T. M.,. Laser capture microdissection of cells from plant tissues. Plant Physiol. 132: 27-35. (2003).

7. Bermudez, D.; Carrasco, F. and Perez de Vargas, I.,. Effect of IR laser radiation on germ cell DNA content after one cycle of the seminiferous epithelium. Arch Androl. 31: 177-181. (1993).

8. Barandiarn, X. Onion T.C, Plant–tc Mothly Archive. 2: 56-57. (1997).

9. Murashige, T. and Skoog, F.,. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479. (1962)

١٠. الجميلي، عبير عبد الغني محمد. كفاءة تكوين نباتات الثوم Allium sativum من مزارع كالس اوراق البراعم والسيقان القرصية مع عزل مركب الاليسين. رسالة ماجستير. جامعة الموصل. (٢٠٠٥).

11. Edward, k.; Johnston, C. and Thompson, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR amalysis. Nucl. Acids Res. 19 (6): 1349. (1991).

12. Giles, K. W. and Mayer, A.,. An improved Diphenyl Amine Reagent for estimation of DNA Concentration. Nature. 20: 93. (1965)

13. Giles, K. W. and Mayer, A., Determination of DNA Concentration with Diphenyl Amine Reagent. Method of Enzymol. Academic Press. Inc. New York, 12 163. (1967).

١٤. الملاح، مزاحم قاسم. ابتكار جهاز التثقيب الكهربائي(الجهاد١) وتطبيقاته في زراعة الانسجة النباتية. براءة اختراع ٣٠٣٣. جهاز التقييس والسيطرة النوعية، جمهورية العراق. (٢٠٠٢).

15. Budagovsky, A. V.; Evseyeva, R. P. and Muratova S. A.,. Holographic induction of morphogenesis in callus tissues of top fruit plants. 9th International Conference on Agricultural Biotechnology. Ravello (Italy). 6-10 July, (2005).

16. Wei, T.; Douglas, A. W.; Benjamin, Y.; Ronald, J. N. and Xin-Hua, H.,. Efficient delivery of small interfering RNA to plant cells by a nanosecond pulsed laser-induced stress wave for posttranscriptional gene silencing. Plant Science. 171(3): 375-381. (2006).

The effect of Helium - Neon laser on growth of disk stem calli of garlic (*Allium sativum*) and its DNA content

M. K. Al-Mallah , Q. S. Al-Ne'ma , M. O. Al-Kateb

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

(Received 17 / 2 / 2008 , Accepted 29 / 6 / 2008)

Abstract

Disc stem callus culture of Garlic (*Allium sativum*) were initiated on solidified MS medium supplemented with 1.0 mg / L Benzyl adenine, 0.5 mg / L Naphthalene acetic acid and 0.3 mg / L 2,4-dichlorophenoxy acetic acid. Results indicated that exposure of these undifferentiated tissue to helium - neon laser ray increased the fresh weight of these tissues. More over, deoxy ribonucleic acid (DNA) content also increased twice or three times when measured by spectrophotometer. The increase of DNA content in this case had many positive applications in cell and plant tissue culture.