مجلة الدراسات التربوية والعلمية - كلية التربية - الجامعة العراقية
العدد الثالث والعشرون - المجلد التاسع - علوم الحياة - آب 2024 م
doi.org/10.52866/esj.2023.09.23.17

تأثير مستويات مختلفة من الاوكسين D- 2,4 في استحثاث الكالس لنبات اكليل الجبل *Rosemarinus officinalis* L. ومحتواه من المركبات الكيميائية الفعالة

نور عبد المنعم نجم ، سهام عبد الرزاق سالم
الجامعة العراقية / قسم علوم الحياة
Nooralmuslih5@gmail.com Sihamsalim21@gmail.com

مستخلص

تم تنفيذ هذه الدراسة في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم علوم الحياة في كلية التربية ، وللفترة من أيلول 2023 ولغاية أيار 2024 بهدف دراسة تأثير الاوكسين 2,4-D في استحثاث كالس نبات اكليل الجبل ومحتواه من المركبات الفعالة ، اذ تضمنت الدراسة استعمال خمسة مستويات مختلفة من الاوكسين 2,4-D شملت 0.0 ، 0.5 ، 1.0 ، 2.0 ، 3.0 ، 4.0 ملغم.لتر$^{-1}$. تبين من خلال النتائج ان لجميع المستويات باستثناء المستوى 4.0 ملغم .لتر$^{-1}$ تأثيراً إيجابياً في زيادة الوزن الطري للكالس ، وكان لجميع المستويات ايضاً تأثير معنوي في زيادة الوزن الجاف للكالس . كما وتبين ان للمستوى 2.0 ملغم. لتر$^{-1}$ تأثيراً معنوياً في زيادة المركبات الكيميائية الفعالة .

كلمات مفتاحية : كالس ، اكليل الجبل ، 2,4-D ، Rosmarinic acid .

The effect of different levels of auxin D-2,4 on callus induction of L. *Rosemarinus officinalis* and its content of active chemical compounds.

Noor Abdel Moneim Najem Siham Abdel Razzaqsalim
Iraqi University / Department of Biology
Nooralmuslih5@gmail.com Sihamsalim21@gmail.com

Abstract :

This study was carried out in the plant tissue culture laboratory of the Department of Life Sciences in the College of Education, and for the period from September 2023 to May 2024 with the aim of studying the effect of 2,4-D auxin on the induction of rosemary plant callus and its content of active compounds. The study included the use of five levels Different types of auxin 2,4-D included 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg.L-1. The results showed that all levels except the 4.0 mg.L-1 level had a positive effect on increasing the fresh weight of callus, and all levels also had a significant effect on increasing the dry weight of callus. It was also found that the level was 2.0 mg. L-1 has a significant effect on increasing the active chemical compounds.

Keywords: Callus, rosemary, 2,4-D, Rosmarinic acid .

المقدمة Introduction

يعد نبات اكليل الجبل *Rosemarinus offici-nalis* L. او الروز ماري او حصا البان من النباتات الطبية الشائعة الاستخدام وهو نبات عطري معمر صغير لا يتعدى طوله 1 متر ، موطنه الاصلي حوض البحر الأبيض المتوسط وتنتشر زراعته في عدة أقطار من الوطن العربي بشكل قليل كنبات زينة او نبات طبي له أوراق ضيقة طولية ذات شكل ابري تشبه الاشواك تقريبا سطحها الأعلى اخضر غامق براق ، اما الأسفل فيكون مغطى بشعيرات دقيقة بيضاء عند دعكها او حرقها تعطي رائحة عطرية شذية مميزة . ويعد هذا النبات من التوابل الطبيعية والاعشاب الطبية من مجموعة النباتات التي تحتوي على مضادات اكسدة من أهمها Rosmaridi-phenal و Rosmarinic acid و Rosmaridiquinone والتي تعتبر مضادات اكسدة طبيعية (زنكنة ،2015) . تعد عملية استحثاث الكالس من الجزء النباتي المزروع في الوسط الغذائي المناسب له من العمليات المهمة و تمر هذه العملية بثلاث مراحل : هي التحفيز Induction والانقسام Division والتمايز Differentiation .

تعد تقنية زراعة الخلايا و الانسجة النباتية Plant cells and tissues culture افضل طريقة لتكثير النبات سواء لأغراض التحسين أو الإنتاج بجميع اشكاله كالإنتاج الخضري والثمري او انتاج المواد الفعالة كما انها تعد تقنية فعالة في التكنولوجيا الاحيائية الحديثة حيث يتم الحصول على المركبات المهمة طبياً واقتصادياً وبنسب غالبا ما تكون أعلى من نسبتها في النبات الأم عن طريق زراعة مزارع نسيج الكالس كما انها تقنية سريعة لا تأخذ مساحات كبيرة ويمكن الإنتاج على مدار السنة دون التقيد بموسم نمو النبات، كذلك يمكن توظيف هذه التقنية في التغيرات الوراثية لخلايا الكالس لإنتاج سلالات جديدة تمتاز بان لها إنتاجية عالية للمركبات الفعالة (الصميدعي ،2017 و Salim واَخرون، 2021) .

تتم طريقة زراعة الانسجة النباتية اما بزراعة المرستيم القمي او قطع السيقان لبادرات النبات او من الفروع الخضرية من الفلق غير الناضجة او من قطع الأوراق النباتية (عبود ،2005). تؤدي تقنية زراعة الانسجة النباتية الى التغلب على الكثير من المشاكل والمعوقات التي تواجه عمليات الاكثار والإنتاج ومنها تقليل الوقت وتقليل مساحة الأرض المطلوبة والتغلب على نقص حيوية البذور والاصابة بالامراض الفايروسية والفطرية وغيرها من الأوبئة ، إضافة الى تحفيز عملية التخليق الحيوي للمركبات الفعالة في النبات وبالتالي زيادة تراكمها وانتاجها (Omar at el ; 2022) .

المواد وطرائق العمل

نفذت هذه الدراسة في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم علوم الحياة في كلية التربية/ الجامعة العراقية وللفترة من أيلول 2023 ولغاية أيار 2024 بهدف استحثاث الكالس من الأجزاء النباتية ودراسة الفعالية المضادة للاكسدة والمركبات الفعالة من كالس نبات اكليل الجبل .

تم الحصول على نباتات اكليل الجبل في شهر أيلول من محافظة بغداد وكردستان العراق / أربيل ونقلت الى كلية التربية/ الجامعة العراقية حيث تم العناية بها. وفصلت الاوراق من الاغصان حديثة التكوين وجرى غسلها وتنظيفها وتعقيمها لاعتمادها في نشوء الكالس، حيث تمت الزراعة على وسط MS (Murashige وSkoog، 1962) مضافاً اليه تراكيز مختلفة من الاوكسين 2,4-D وهي 0.0 ، 0.5، 1.0 ، 2.0، 3.0 ، 4.0 ملغم. لتر$^{-1}$ بالإضافة الى معاملة المقارنة التي تضمنت وسط (MS) بدون إضافة بهدف تحديد افضل تركيز الاوكسين 2,4-D يعطي اكبر كالس مستحث واكثر

محتوى من المواد الكيميائية الفعالة .

تحضير الوسط الغذائي

استعمل في هذه التجربة الوسط الغذائي المعروف MS (Murashige و Skoog، 1962) على هيئة مسحوق جاهز المكونات المجهز من شركة HI me-dia Ltd. لزراعة الأجزاء النباتية واستحثاث نسيج الكالس. حيث وزن 4.7 غم من المسحوق الجاهز للوسط الغذائي، وكذلك إضافة السكروز (30 غم لتر-1) اذ يعتبر مصدرا للكاربون والطاقة، حيث تم مزج المكونات جيداً في جهاز الخلط المغناطيسي الحراريHot plate Magnetic Stirrer لإذابتها، ثم أضيف منظم النمو 2,4-D بخمسة تراكيز كلٌ على حده وتم اكمال الحجم إلى لتر بالماء المقطر، و تم تعديل الدالة الهيدروجينية للوسط (pH) إلى 0.1 ± 5.7 بمحلول من حامض الهيدروكلوريك ش (HCl أو محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH)0.1عياري .

ثم تم إضافة الاكار (Agar-Agar) بمقدار 7 غم لتر-1 إلى الاوساط التي تم تحضيرها، ووضعت في جهاز الخلط المغناطيسي الحراري وسخن الى درجة الغليان لاذابته وليتجانس الوسط الغذائي وبعدها تم صب تراكيز الاوساط مباشرة في أنابيب الزراعة (Glass screw vials) بواقع 10 مل لكل انبوبة وغلقت باحكام بواسطة الغطاء الخاص بها ومن ثم تم التعقيم في جهاز المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة °121م وضغط مقداره 1.04 كغم . سم-2 لمدة 25 دقيقة، وبعدها أخرجت الانابيب الحاوية على الوسط الغذائي المعقم وتركت لتبرد ويتصلب الوسط في درجة حرارة الغرفة لحين استعمالها .

تعقيم أدوات ومستلزمات الزراعة النسيجية

عقمت جميع الأدوات المستعملة في عملية الزراعة من ملاقط وأطباق زجاجية ومشارط بعد تغطيتها برقائق الالمنيوم بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121 م° وتحت ضغط 1.04 كغم سم-2 لمدة 20 دقيقة وبعد إخراجها وضعت في فرن التجفيف بدرجة حرارة 70 م° لمدة 24 ساعة، وعند إجراء عملية الزراعة تم غمرها بكحول الايثانول (٪96) وإمرارها على اللهب لتعقيمها اثناء إجراء زراعة الأجزاء النباتية. وكما عُقم الماء المقطر لاستعماله في تحضير محاليل التعقيم وغسلت الأجزاء النباتية بعد التعقيم. اما كابينة انسياب الهواء الطبقي فقد عُقمت برش جدرانها الداخلية وأرضيتها بمحلول الايثانول (٪70) ومسحها بقطعة قطن نظيفة و تشغيلها قبل 30 دقيقة من استعمالها مع استخدام الأشعة فوق البنفسجية .

التعقيم السطحي لأجزاء النبات

فصلت أفرع من النبات بواسطة شفرة جراحية حادة وقطعت الى أجزاء نباتية حاوية على اوراق بطول 1سم، ومن ثم وضعت في دورق مخروطي سعة 250 مل لغرض غسلها جيداً بعد اضافة بعض قطرات من المنظف السائل، ثم وضعت تحت الماء الجاري لمدة 15 دقيقة لإزالة الأتربة والملوثات السطحية لتنقل بعد ذلك إلى كابينة انسياب الهواء الطبقي للمباشرة بعملية التعقيم، بعدها أجريت تجربة التعقيم حيث غمرت الاجزاء النباتية (الأوراق) في دوارق زجاجية تحتوي على250مل تحتوي على 100 مل من محلول التعقيم (كلوريد الفضة) بتركيز 0.1 ٪ لمدة 5 دقائقمع التحريك المستمر ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لمدة 5 دقائق في كل مرة لضمان إزالة تأثير المادة المعقمة من سطح الأجزاء النباتية .

زراعة الاجزاء النباتية وتنشئة مزارع الكالس

زرعت الأجزاء النباتية بعد تعقيمها على وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من الاوكسين (D-2,4) 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid التي تضمنت 0.0 ، 0.5 ، 1.0 ، 2.0 ، 3.0 ،4.0 ملغم.لتر$^{-1}$ لاستحثاث الكالس وبواقع عشرة مكررات لكل تركيز.

ثم حضنت الزروعات في غرفة النمو بدرجة حرارة 25 ±2 م° واضاءة لمدة 16 ساعة و 8 ساعات ظلاماً اخذت النتائج بعد 30 – 40 يوماً من الزراعة كما يلي :

أ – النسبة المئوية لاستحثاث الكالس (٪) =
عدد الأجزاء النباتية المكونة للكالس / العدد الكلي للاجزاء المزروعة × 100

ب- الوزن الطري للكالس (ملغم): ويكون باستخراج الكالس من اوعية الزراعة وغسله بالماء المقطر للتخلص من بقايا الوسط العالقة به ثم يوضع على ورق ترشيح للتخلص من الماء يوزن باستعمال الميزان الحساس .

ج- الوزن الجاف للكالس (ملغم) : يكون بوضع الكالس في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 60م° لمدة 48 ساعة ثم يوزن باستعمال الميزان الحساس .

التحليل الكروماتوكرافي

اجري التحليل في مختبرات وزارة العلوم والتكنولوجيا / دائرة البيئة والمياه باستخدام جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الدقة High Performance Liquid Chromatography (HPLC) لتشخيص المركبات الكيميائية الفعالة والمقارنة بينها في عينة الورقة و الكالس كماً ونوعاً (Ahmed et al; 2013)

التحليل الاحصائي

حللت النتائج وفق التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Desrgn (CRD) (الراوي وخلف الله 1980) وبالاستعانة ببرنامج التحليل SAS ومن ثم اختبار المعنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود على مستوى احتمال 0.05 .

النتائج والمناقشة

يلاحظ من خلال نتائج الجدول (1) تأثير أضافة تراكيز من الـ 2,4-D الى وسط الزراعة في استحثاث الكالس تفوق جميع مستويات الـ 2,4-D على التركيز الخامس (4 ملغم.لتر–1) الذي اعطى اقل وزن طري للكالس بلغ 142.9 ملغم . ومن الجدير بالملاحظة ان التركيز 2 ملغم.لتر$^{-1}$ قد اعطى اكبر وزن طري للكالس بلغ 264.3 ملغم لكن بدون فروق معنوية مع بقية التراكيز، قد يعود السبب الى زيادة التمثيل الغذائي في هذا التركيز وزيادة تصنيع المواد الغذائية .

ويوضح الشكل (1) استحثاث الكالس من ورقة اكليل الجبل على التراكيز 2 ملغم . لتر–1 من 2-D,4

كما ويتبين من الجدول فيما يخص الوزن الجاف تفوق جميع التراكيز المستعملة بوزن جاف عالي مقارنة بمعاملة المقارنة التي أعطت اقل وزن جاف بلغ 15.7ملغم ويلاحظ زيادة الوزن الجاف للكالس في التركيز 2 ملغم . لتر$^{-1}$ من بين جميع التراكيز الأخرى المتفوقة وبدون فروق معنوية عنها والذي يعود الى زيادة التمثيل الغذائي الذي أدى الى زيادة الوزن الطري لكالس هذه المعاملة وبالتالي زيادة الوزن الجاف لها .

جدول (1) تأثير إضافة تراكيز مختلفة من 2,4-D لوسط الزراعة في الوزن الطري والجاف للكالس

التراكيز / الاوزان	0.0 ملغم/ لتر$^{-1}$	0.5 ملغم/ لتر$^{-1}$	1.0 ملغم/ لتر$^{-1}$	2.0 ملغم/ لتر$^{-1}$	3.0 ملغم/ لتر$^{-1}$	4.0 ملغم/ لتر$^{-1}$
الوزن الطري (ملغم)	188.6 a	182.5 a	221.1 a	264.9 A	164.9 A	142.9 b
الوزن الجاف (ملغم)	15.7 b	18.0 a	20.3 a	22.3 A	19.3 A	19.5 a

التحليل الكيميائي للعينات النباتية والكالس

يلاحظ من نتائج الجدول (2) الفرق في المحتوى الكيميائي بين ورقة نبات اكليل الجبل الاعتيادية وبين الكالس المستحث على التركيز (2.0) ملغم/ لتر$^{-1}$ اذ لوحظ ان المعاملة بهذا التركيز أدت الى زيادة في تراكم كل من المواد (Luteolin ، Gallic acid ، Apigenin ، Rosemaric acid , p- Coumaric) اذ بلغت (23.6 ، 30.6 ، 15.9 ، 68.9 ، 33.6) ppm بالتتابع مقارنة بعينة الورقة. يعود السبب في ذلك الى ان الوسط غني بالعناصر والمواد المغذية التي تؤدي الى نشوء الكالس وتراكم المواد الفعالة فيه ولما للاوكسين المستعمل من فعالية في تحفيز زيادة تراكم تلك المواد قيد الدراسة .

جدول (2) التحليل الكيميائي لورقة وكالس نبات اكليل الجبل بتقنية HPLC

المركب(ppm)	عينة الكالس	عينة الورقة
luteolin	23.6	20.8
Gallic acid	30.6	27.9
Apigenin	15.9	12.5
Rosemaric acid	68.9	60.4
p- Coumaric	33.6	29.8

مضادات الاكسدة (DPPH)

يتبين من خلال نتائج الجدول (3) الذي يشير الى كبح الجذور الحرة من قبل فيتامين C بعدة مستويات ومقارنته بعينة الورقة والكالس وبعدة تراكيز أيضا الى ان الزيادة في تركيز فيتامين C تؤدي الى زيادة كبح نشاط الجذور الحرة ، اذ أبدى التركيز (500 ppm) من فيتامين الى اكبر نسبة كبح للجذور الحرة بلغت (74.25) ppm مقارنة بالتركيز (30 C (ppm الذي اعطى اقل نسبة كبح بلغت (12.25) ppm ، اما فيما يتعلق بعينة الورقة والكالس فقد لوحظ تفوق عينة الكالس بجميع التراكيز على كل من عينة الورقة وعينة فيتامين C ، فقد ابدى التركيز 500 ppm من عينة الكالس اعلى نسبة كبح للجذور الحرة بلغت (84.56) ppm مقارنة بالتركيز 30 ppm الذي اعطى اقل نسبة كبح بلغت (20.58) ppm ، ربما يعود السبب في ذلك الى زيادة تراكم المواد الفعالة المضادة للأكسدة في عينة الكالس .

جدول (3) يبين نتائج مضادات الاكسدة في ورقة وكالس نبات اكليل الجبل

% AA	ppm 30	ppm 60	ppm 120	ppm 250	ppm 500
Vit C	12.25	22.89	41.58	63.59	74.25
عينة الكالس	20.58	39.98	55.49	70.58	84.56
عينة الورقة	19.25	37.44	52.44	69.55	80.25

المصادر

1- **الراوي، خاشع محمود وعبدالعزيز محمد خلف الله(1980)**. تصميم تحليل التجارب الزراعية . مطبعة دار الكتاب للطباعة والنشر . جامعة الموصل. العراق .

2- الصميدعي ، كاظم محمد ابراهيم. 2017. تطبيقات في التقانات الاحيائية النباتية . جامعة النهرين . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.العراق .

3-**زنكنة ، بشرى سعدي رسول (2015)**. التأثير التأزري للزيت العطري المستخلص من أوراق اكليل الجبل وبذور الحبة السوداء في التركيب الكيميائي والصفات الفيزيائية ومؤشرات الاكسدة للحم الدجاج المفروم والمخزن بالتبريد .مجلة كلية الزراعة – جامعة بغداد ، المجلد(7) :1.

4- **عبود ، ساجدة عزيز (2005) . تكثير نبات اللوز** Amygdalus communis L. **بطريقة زراعة الانسجة النباتية . مجلة علوم الرافدين ، المجلد 16 ، العدد 8 ، خاص بعلوم الحياة . ص100 .**

5-Abboud,R.C. and Greige-Gerges H. (2017). Interaction of Trierpenoids with Human Serum Albumin A Review. Chemistry and Physics of Lipids, 70207:26-112.

6-Ahmed, M; Saeed, F, et al**, (2013).** Evaluation of Insecticidal and Antioxidant activity of selected Medicinal plants Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2(3): 153-158.

7-Omar A. M; Elshahawy, M,E.-F; Zeawail, M,A. ;Hamza, A,A. and M A. Elateeq. (2022) Improving the Production of Total Phenolics and Flavonoids and the Antioxidant Capacity of Echinacea purpurea Callus through Biotic**.**

8- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A resived medium for rapid growthand bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15:473-497