تأثير المالتوز والكازايين في استحثاث الكالس لنبات الرز صنفي عنبر وفرات المستزرع خارج الجسم الحي (Oryza sativa L.)

ا.م.د. عبد الامير رحيم عبيد
جامعة البصرة / كلية الزراعة

الخلاصة :

أجريت الدراسة الحالية في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع إلى قسم علوم الحياة –كلية التربية للعلوم الصرف –جامعة البصرة وقد تضمنت الدراسة دراسة تأثير الماتوز والكازايين في استحثاث الكالس لنبات الرز صنفي عنبر وفرات المزروعة خارج الجسم الحي وقد أُستعمل الماتوز بتركيز 30 غم/لتر والكازايين بتركيز 0.5غم/لتر أضيف إلى الوسط الغذائي MS والمزود بالاوكسين 2,4-Dبتركيز 8 ملغم/لتر بالإضافة إلى المواد المتواتر استخدامها في الزراعة النسيجية وقد تم استعمال وسط آخر بنفس المكونات مضاف إليه السكروز بتركيز 30غم /لتر وخالي من المالوز والكازايين وقد أظهرت نتائج البحث وجود تأثير معنوي للماتوز والكازايين في الاختبارات التالية 1 - سرعة استحثاث الكالس 2 -النسبة المئوية لاستحثاث الكالس 3– وزن الكالس الطري 4- لون الكالس

وقد توصلت الدراسة إلى إن الوسط الغذائي الحاوي على الماتوز والكازايين هو الأفضل قي سرعة استحثاث الكالس وفي النسبة المؤوية لاستحثاث الكالس وفي وزن الكالس الطري وفي نوعية الكالس

الكلمات المفتاحية ،المالتوز ، السكروز ، الزراعة النسيجية ، الكالس ، ظاهرة الاسمرار

المقدمة :

يعود نبات الرز(*Oryza Sativa* L.) إلى العائلة النجيلية Poaceae والى الجنس Oryza الذي يظم أكثر من 25 نوعاً (Ray,1985).

يعد الرز من أهم المحاصيل الغذائية في العالم اذ يحتل المرتبة الثالثة بعد الحنطة والذرة الصفراء في صنوف المحاصيل الغذائية في العالم وهو غذاء أساس للسكان خصوصاُ في الدول الأسيوية إذ يمثل

الغذاء الرئيسي لنصف سكان آسيا وثلث سكان العالم وهو يغطي نصف الأراضي الصالحة للزراعة في معظم الدول الأسيوية وأن أكثر من 90% من الرز يُنتج ويستهلك من قبل الإنسان في آسيا(Rujakumui, 1013) .

يعتمد نجاح زراعة الأنسجة النباتية على ثلاث عوامل رئيسية هي مكونات الوسط الغذائي واختيار الجزء النباتي والسيطرة على الظروف الفيزيائية المحيطة ، وان توفير هذه العوامل يؤدي إلى نشوء وتطور الأعضاء وان الوسط الغذائي يعتمد على نوع وتركيز مكوناته ونوع وتركيز مصدر الكربون والهرمونات النباتية الداخلة في تكوينه (Ratana *etal*., 2012)

تعد عملية استحثاث الكالس الخطوة الرئيسة في نجاح زراعة الأنسجة النباتات إذ تعتمد عليها جميع الخطوات اللاحقة من تكون الأجنة الجسمية وإنباتها وتكون النباتات ومن أهم المشاكل التي تواجه زراعة الأنسجة هي ظاهرة التلون البني (الاسمرار Prowninig) وان ظاهرة الاسمرار تحدث بسبب احتواء الأنسجة على مواد فينوليه وان هذه الظاهرة مرتبطة ارتباطاً وثيقاً بنوع الجزء النباتي وعمر النسيج ، والاسمرار يودي إلى تثبيط نمو الكالس ومن ثم عدم تطوره إلى المراحل اللاحقة (Hoque and Mansfield,2004 ;Maeda *etal*.,2002) ولأجل التقليل من ظاهرة الاسمرار فقد تم التفكير باستعمال سكر الماتوز كمصدر للطاقة والكازايين في الوسط الغذائي المعد لاستحثاث الكالس لما لهما من دور في في خفض نسبة المواد الفينولية و بالتالي الحد من ظاهرة الاسمرار ولعدم وجود دراسة على النطاق المحلي بهذا الخصوص فقد أجريت الدراسة الحالية والتي تهدف إلى اختبار دور الماتوز والكازايين في استحثاث الكالس وتقليل الاسمرار لنبات الرز صنفي عنبر وفرات خارج الجسم الحي

المواد وطرائق العمل :

أُجريت هذه الدراسة في مختبر الزراعة النسيجية التابع إلى قسم علوم الحياة - كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة البصرة على بذور صنفين من الرز هما صنف العنبر العراقي المعروف وصنف الفرات وهو صنف تايلندي يتميز بحبته البيضاء الناصعة ورائحته الزكية وقد استزرع حديثاً في العراق وثبت نجاح زراعته. وقد جُلبت البذور من محطة أبحاث الرز في المشخاب - محافظة النجف الاشرف .

التعقيم السطحي للبذور :

وضُعت البذور في وعاء زجاجي يحتوي على القاصر التجاري (Clrox) والحاوي على هايبوكلورات الصوديوم Sodium hypochlorite بتركيز 5% ولمدة 30 دقيقة مع التحريك

المستمر بين الحين والآخر ، وأضيفت قطرة واحدة من المادة الناشرة Tween-20 لكل 100 سم^3 من المحلول ، بعدها استخرجت من محلول التعقيم وغسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات ، أجريت هذه العملية على منضدة انسياب الهواء الطبقي Faminar Air Flow Cabinet المعقمة مسبقاً بالأيثانول تركيز 70 %.

الوسط الغذائي الرابع (M4) = MS+ 2,4-D+فوسفات الصوديوم +كلايسين +سكروز +كازايين

:

تحضير الوسط

تم استعمال الوسط الغذائي MS (1962) Murashige and Skoog بتركيز 4.6 غم والمضاف اليه مجموعة فيتامينات Gambrog المحضرة من قبل Gambrog *et al.*,(1986) والمجهزة من قبل شركة Phytotechology laboratories الأمريكية.كما تم إضافة الأوكسجين 2,4-D بتركيز 8 ملغم /لتر والاوكسينIBA بتركيز 2ملغم / لتر وفوسفات الصوديوم الحامضية بتركيز 8 ملغم/لتر والحامض ألأميني الكلايسين بتركيز4ملغم/لتر والكزاايين بتركيز 5ملغم/لتر واستعمل المالتوز والسكروز كمصدر للطاقة وبتركيز 30 غم/لتر وضبط الرقم الهيدروجيني (PH) للوسط عند (5.7-5.8) باستعمال جهاز Diggital PH-meter وتمت المعايرة بواسطة حامض الهيدروكلوريك او هيدروكسيد الصوديوم (0.1N). وأضيف الاكار بتركيز 5 غم /لتر لأجل تصلب الوسط ،وقد تم تحضير وسطين غذائيين.

الوسط الغذائي الأول (M1) = MS+ 2,4-D +IBA+ فوسفات الصوديوم+كلا يسين +مالتوز+كزايين

الوسط الغذائي الثاني (M2)= MS+2,4-D +IBA + فوسفات الصوديوم +كلا يسين +سكروز.

استزراع البذور واستحثاث الكالس لصنفي الرز عنبر وفرات :

زُرعت البذور المعقمة في الأوساط الغذائية التي سبق تضيرها بمعدل أربعة بذرات لكل أنبوبة وبواقع (10) مكررات لكل وسط ولكل صنف . أجريت هذه العملية داخل منضدة انسياب الهواء الطبقي المعقمة ، وقد عقمت أدوات الزراعة كافة من ملاقط وإطباق بالكحول الأثيلي 70% وباستمرار أثناء الزراعة ثم حُضنت الزروعات في غرفة النمو Growth Room في الظلام وعلى درجة حرارة (25 $^{+}$ 2) مْ وتم مراقبة الزروعات يومياً وبعد 5- 12 يوم بدأ تكون الكالس .

وقد تم حساب النسبة المئوية لاستحثاث الكالس حسب المعادلة التالية :

$$\text{النسبة المئوية للكالس المستحث (\%)} = \frac{\text{عدد البذور المستحثة}}{\text{عدد البذور المزروعة}} \times 100$$

أما حساب سرعة تكون الكالس فقد تم بحساب عدد البذور التي كونت كالس في كل يوم وضرب العدد في اليوم التي كونت فيه الكالس ثم جمع الحاصل كله أثناء فترة استحثاث الكالس ويقسم على نسبة الإنبات التي حصلنا عليها وبذلك نحصل على عدد الأيام الأزمة لاكتمال استحثاث الكالس

وحسب المعادلة التالية :-

$$\text{سرعة استحثاث الكالس} = \frac{\text{حاصل جمع(عدد البذور المستحثة X اليوم الذي أُستحثت فيه)}}{\text{النسبة المؤوية للاستحثاث}}$$

أما لحساب الوزن الطري للكالس المستحث فقد تم انتخاب عشرة أنابيب وبصورة عشوائية لكل صنف وتم حساب الوزن الطري للكالس باستعمال ميزان كهربائي حساس واخذ المعدل .

التحليل الإحصائي

أستخدم في التحليل الإحصائي التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (C. R. D.) وكانت التجربة عامليه Factorial Experiment بعاملين هما عدد الأصناف x نوع الوسط الغذائي وبعد الحصول على جدول تحليل التباين تمت المقارنة بين المتوسطات باستخدام اختبار أقل فرق معنوي المعدل Revised Least Significant Difference Test (R.L.S.D.) و بمستوى احتمال 0.05 (الراوي و خلف آلله، 1980).

النتائج والمناقشة

جدول (1)تأثير الوسط الغذائي والصنف في النسبة المؤوية لاستحثاث الكالس لنبات الرز صنفي عنبر وفرات

الوسط الغذائي / الصنف	M1	M2	التأثير الرئيسي للصنف
عنبر	92	84	88
فرات	80	66	73
التأثير الرئيسي للوسط الغذائي	86	75	

R.L.S.D المعدل عند مستوى 5% للصنف 3.39، للوسط 3.39 ، للتداخل 4.80

يتضح من النتائج المبينة في جدول رقم (1) وجود فرق معنوي في النسبة المؤوية لاستحثاث الكالس تبعاً لنوع الوسط الغذائي المعد فقد تفوق الوسط M1 معنوياً على الوسط M2 إذ بلغ معدل النسبة المؤوية لاستحثاث الكالس 86 % في حين بلغ معدل النسبة المؤوية لأستحاث الكالس في وسط سكروز 75% .

أما تأثر الصنف فقد كان معنوياً أيضا فقد تفوق الصنف عنبر منوياً على الصنف فرات إذ بلغت النسبة المؤوية لأستحاث الكالس عند الصنف عنبر 88% في حين بلغت النسبة المؤوية لاستحثاث الكالس عند الصنف فرات 73% وهذا يعود إلى الاختلافات الوراثية بين الأصناف .

إما بالنسبة إلى التداخل بين الوسط والصف فقد كان معنوياً أيضا إذ بلغت أعلى نسبة لاستحثاث الكالس عند الوسط M1 والصنف عنبر إذ بلغت النسبة المؤوية لاستحثاث الكالس 92% في حين بلغت اقل نسبة مؤوية لأستحثاث الكالس عند الوسط M2 والصنف فرات وهي 66%. وهذا يتفق مع ما توصل إلية وهذا تفق مع ما توصل الية (Abdulmannan *et al*., 2013)مع صنفي من الرز و

(Revathi and Agrumugam,2011)مع خمسة أصناف من الرز الهندي و Nqavi (2005) *et al* ., مع صنفين من الرز الإيراني

و (Tam and Lang 2003) مع اثنا عشر صنف من الرز.فقد أشاروا إلى وجود فروق معنوية في النسبة المؤوية لاستحثاث الكالس بين الأصناف المدروسة .

جدول (2)تأثير الوسط الغذائي والصنف في سرعة استحثاث الكالس لنبات الرز صنفي عنبر وفرات(يوم)

الوسط الغذائي / الصنف	M1	M2	التأثير الرئيسي للصنف
عنبر	5.12	7.32	6.22
فرات	7.82	10.44	9.13
التأثير الرئيسي للوسط الغذائي	6.47	8.88	

R.L.S.D المعدل عند مستوى 5% للصنف0.456 ، للوسط 0.456، للتداخل 0.645

يتضح من النتائج المبينة في الجدول (2) وجود فرق معنوي في سرعة استحثاث الكالس تبعاً لنوع الوسط الغذائي فقد تفوق الوسط الغذائي M1على الوسط الغذائي M2 معنوياً إذ بلغ معدل سرعة استحثاث الكالس 6.47 يوم في حين بلغ معدل سرعة استحثاث الكالس عند الوسط M2 8.88 يوم

إما تأثير الصنف فقد كان معنوياً أيضا إذ تفوق الصنف عنبر معنوياً على الصنف فرات اذ بلغ معدل سرعة استحثاث الكالس عند الصنف عنبر 6.22 بالمقارنة مع سرعة استحثاث الكالس عند الصنف فرات اذ بلغ معدل سرعة استحثاث الكالس 8.26 يوم وهذا يرجع الى الاختلاف الوراثي بين الأصناف

إما بالنسبة للتداخل بين الوسط الغذائي والصنف فقد تفوقت الوسط M1 والصنف عنبر معنوياً على بقية المعاملات إذ بلغت سرعة استحثاث الكالس 5.12 يوم في حين كانت سرعة استحثاث الكالس عند الوسط A2 والصنف فرات 10.44يوم وهذا يتفق مع ما توصل إلية (Abdulmanan ,*etal*.,2013 و Libin *etal*., 2012 وJabair etal., 2008 وSummart *etal*., 2008 و Zaidi *et al*., 2006 و2002 Thadavong *etal*.,) .فقد لاحظوا وجود فروق معنوية في سرعة استحثاث الكالس بين الأصناف المدروسة .

جدول (3) تأثير الوسط الغذائي والصنف في وزن الكالس الطري لنبات الرز صنفي عنبر وفرات (غم)

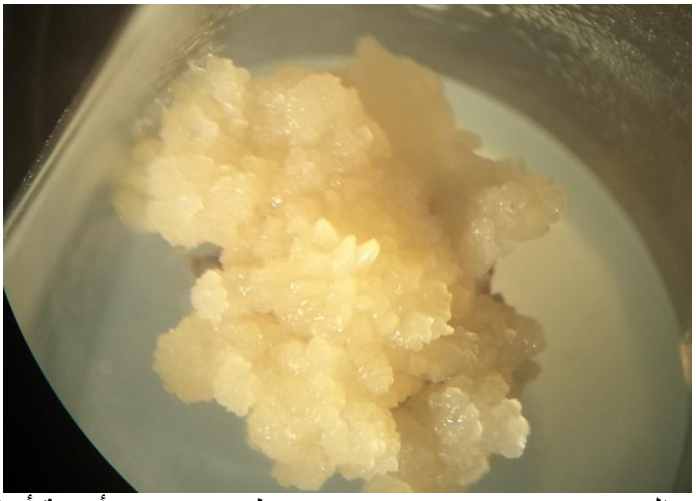
الوسط الغذائي / الصنف	M1	M2	التأثير الرئيسي للصنف
عنبر	0.78	O.54	0.66
فرات	0.32	0.18	O.25
التأثير الرئيسي للوسط الغذائي	O.55	0.36	

R.L.S.D المعدل عند مستوى 5%للصنف 0.078 ، للوسط 0.078 ،للتداخل 0.11

يتضح من النتائج المبينة في الجدول رقم (3)وجود فرق معنوي في وزن الكالس الطري تبعاً لنوع الوسط الغذائي فقد تفوق الوسط M1 معنوياً على الوسط M2 إذ بلغ معدل وزن الكالس الطري عند الوسط M1 0.55 غم مقارنةً بالوسط M2 إذ بلغ معدل وزن الكالس الطري 0.36 غم وهذا يتفق مع ما توصل إلية مع خمسة أصناف من الرز الهندي.

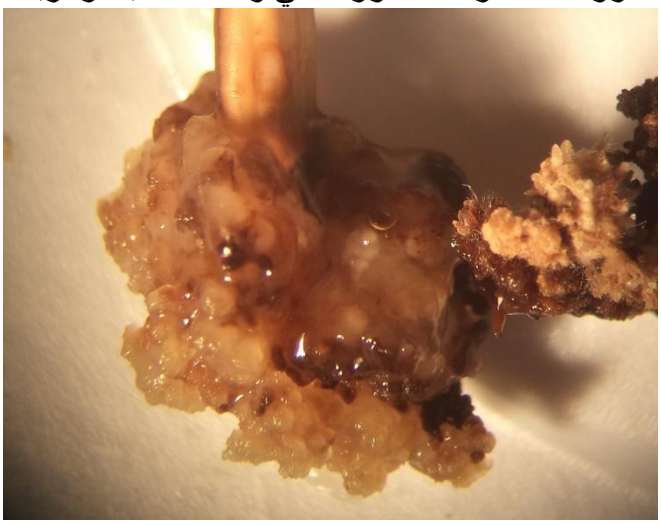
إما تأثير الصنف فقد تفوق الصنف عنبر معنوياً على الصنف فرات إذ بلغ معدل وزن الكالس عند الصنف عنبر 0.66 غم بالمقارنة مع وزن الكالس عند الصنف فرات إذ بلغ 0.25 وهذا يرجع إلى الاختلاف بالعوامل الوراثية بين الأصناف.

إما بالنسبة للتداخل بين الوسط الغذائي والصنف فقد تفوقت معاملة الوسط مالتوز والصنف عنبر معنوياً على بقية المعاملات إذ بلغ وزن الكالس 0.78غم في حين بلغ اقل وزن للكالس عند معاملة الوسط سكروز والصنف فرات وهذا يتفق مع ما توصل إلية (Ratana *etal*.,2012 و Roy and mandal 2005 ,) فقد أشاروا إلى وجود فروق معنوية في وزن الكالس الطري بين الأصناف المدروسة .



لوحة (1) كالس نبات الرز صنف عنبر مستزرع في وسط M1 بعمر أربعة أسابيع

لوحة (2) كالس نبات الرز صنف فرات مستزرعة في وسط M1 بعمر أربعة أسابيع



لوحة(3) كالس نبات الرز صنف عنبر مستزرعة في وسط M2 بعمر أربعة أسابيع

لوحة (4) كالس نبات الرز صنف فرات مستزرعة في وسط M2 بعمر أربعة أسابيع.

يتضح من الصور المبينة في للوحه رقم (1 و 2) وجود اختلاف واضح في المظهر الخارجي وفي لون الكالس الطري لنبات الرز صنف عنبر وفرات على التوالي في الوسط الغذائي الحاوي على المالتوز كمصدر للطاقة والكازايين اذ يلاحظ تلون الكالس باللون الأبيض المائل إلى ألكريمي الفاتح وان الكالس في حالة نمو ونشاط جيد وان الكالس على شكل كتل عقدية أي إن الكالس في طور الكالس العقدي أو الكالس الجنيني بالمقارنة مع الكالس النامي في وسط خالي من المالتوز والكازايين والذي يحتوي على السكروز كمصدر للطاقة اللوحتين (3و 4) كما يلاحظ تلون الكالس باللون ألكريمي الداكن ووجود ظاهرة التلون البني (ألاسمرار Browning) والتي يعزى سببها إلى تراكم المواد الفينولية مثل حامض كلوروجينيك Chlorogenic acid والفلوروكلوسينول Phoroglucinol والفلورولزين Plorolzin وغيرها التي تلعب دور مثبط لنمو وتطور والتي تعد من أهم المشاكل التي تواجه علية زراعة الأنسجة النباتية (Hoque and Mansfield,2004 و Al Maari and Al.Chamdi 1995) مما يعتقد ان للمالتوز والكازايين دور مهم في التقليل من ظاهرة التلون البني .وهذا يشير إلى إن استعمال المالتوز كمصدر للطاقة والكازايين أفضل من استعمال السكروز وهذا يتفق ما توصل إليه(Rattana, 2012 و Carsono and Yoshida 2006)

المصادر :

الراوي، خاشع محمود وخلف الله، محمد عبد العزيز. (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل. صفحة 488.

المصادر الأجنبية :

Ali,M.F.(2008).Callus induction andregeneration of local rice (Oryza sativa L.) variety Topa.Asian J.of plant Sci,7(5):514-517.

Abdulmanan, M.; Sarker, T.; and Alam,M.(2013). Indirect plant regeneration in aromatic rice (oryza Sativa L.) Vri Kaliyira and Chininigura. Acta Agri Slovenica.,101(2):231-239.

Carsono .N.and Yoshida. T.(2006).Identification of Callus Induction Potential of 15 Indonesian Rice Genotypes.

Gambrog, O. L.;Miller ,R.A,and Ojima ,K.(1968).Nutrint requirement of suspension cultures of soybean root cells .Exp .cell Res.50;151-158.

Hogan, J.T. (1970). Footnote Facts on Rice. Rice. J. 73:5-10.,

Hoque, Md.E. and J.W. Mansfield. (2004). Effects of Genotype and Explants Age on Callus Induction and Subsequent Plant Regeneration from Root- Derived Callus Of Indica Rice Genotypes. Plant Cell Tiss. Org. Cult.78: 217-223.

Al-Maarri K.and Al-Ghamdi,A.S.(1995).In vitro micropropagation of Grape(Vitis vinifera L .) cv . Banaty and Khalas ,Arab. Univ.J.Agric. Sci.,3(1)169-183.

Libin,A.;King,P.J.;Ong,K.H.;Chubo,J.K.and Sipen,P.(2012)Callus induction and plant regeneration of Sarawak rice (Oryza SativaL.) variety Biris.African J.of Agri Research,7(30):4260-4265.

Khaleda, L., A. M. A. Ahmed, L.W. Mazan and M. Al-Forkan. (2007). Identification of Callus Induction and Plant Regeneration Responsiveness in Presence of Nacl in *in vitro* Culture of some Deepwater Rice (*Oryza sativa L.*) Cultivars. Asian Journal Plant Sci 6 (1): 36-41.

Khush,G.S.(2005) .What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030 .plant Mol.Bio.,59:1-6.

Maeda,E.; T. Sato and K. Suzuki. (2002). Microtopography and Shoot-Bud Formation of Rice. (*Oryza sativa L.*) Callus. Plant Biotech. 19: 69-80.

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

Naqvi, S.M ;Razia .Z and Rashid .H(2005). Tissue culture studies in rice (*Oryza sativa* L.) cvs, Basmati 385 and Super basmati .Pak.J. Bot., 37(4)823 – 828.

Rajakumar , R.(2013) .A study on effect of salt stress in the seed germination and biotical parameters of rice (*Oryza sativa* L.)under in vitro conition . Asion J.of plant Sci 3(1):20-25

Ratana ,k.;Theerakulpisut, p. and Bunnag,S.(2012) .The effect of plants on callus induction and plant regeneration in rice (Oryza sativa L.). Asian j,of plant Sci.,11:182-189.

Roy ,B. and Mandal ,A.B.(2005). Anther response in Indca rice and variations in major agronomic characters among the and roclones of ascented cultivar karnal Local. African J.Exp .Biotechnal.,4(3):235-240.

Revvathi, S. and Arumugam Pillai,M.(2011).In vittro callus induction in rice (*Oryza sativa* L.).Plant Biology,1(5);13-15.

Summart,J.Panichajakul,S.;Prathepha,P and Thanonkeo ,P.(2008).Callus induction and influence of culture condition and medium on growth of the aromatic rice ,Khao Dawk Mali 105,cell culture .World Applied Sci J. 5(2):246-251.

Tam, D. M., N. T. Lang. (2003). In vitro Selection for Tolerance in Rice.Omonrice 11:68-73.

Thadavong,S.;Sripichitt,P.;Wongyai,W. and Jompuk,P.(2002).Callus induction and plant regeneration from mature embryos of glutinous rice (*Oryza sativa* L.) cultivar TDKI. Kasetsart J.Natural Sci .36:334-344.