------ مجلة علوم الرافدين، المجلد 17، العدد 10، خاص بعلوم الحياة, ص15-30، 2006 ------

# تأثير التداخل بين منظمات النمو و مركب السلفانيل امايد في تكوين كالس السيقان والمعلقات الخلوية في نباتات اللوز

**امجد عبد الهادي محمد** **عبد المطلب سيد محمد**

*قسم علوم الحياة*

*كلية العلوم*

*جامعة الموصل*

(تاريخ الاستلام 2006/5/18 , تاريخ القبول 2006/9/4)

## الملخص

وجد ان استحداث ونمو كالس سيقان اللوز *Prunus amygdalus* Batsch. حدد بنوعية وتركيز عدد من منظمات النمو المستخدمة في هذه الدراسة. وان افضل الاوساط المشجعة لنمو الكالس هو الوسط الغذائي MS الصلب المدعم باضافة 4-10 مولار NAA و 5-10 مولار BA ، وبلغ معدل الوزن الطري 3.73غم بعد 60 يوماً من الزراعة مقارنة بباقي الاوساط المستخدمة. وتؤكد النتائج في هذا المضمار أن اضافة مركب السلفانيل امايد بتراكيز متعددة إلى الوسط الامثل لنمو الكالس أدى إلى تشجيع لنموه بعد مرور 60 يوماً بشكل متباين حسب التراكيز المستخدمة.

وتشير النتائج إلى أن افضل وسط مشجع لانشاء مزارع المعلقات الخلوية ونموها كان وسط MS السائل الحاوي على 8-10 مولار NAA و 8-10 مولار BA بدلالة حصول أعلى كثافة للخلايا (53.5 × 105 خلية / سم3) في اليوم السابع من التحضين متبوعا بتكوينها لبادئات الكالس (50.2 %). واتضح من الدراسة بان اضافة مركب السلفانيل امايد كان لها دوراً محفزاً لانشاء مزارع المعلقات الخلوية وتؤكد نتائج الدراسة بان اضافة 100 مايكرومولار منه إلى وسط MS الحاوي على 4-10 مولار BA ادت إلى افضل نسبة لاستحداث الكالس بمقدار 80.31 % عند زراعة المعلق الخلوي بطريقة بيركمان.

---

# Effect of Interaction Between Growth Regulators and Sulfanilamide on Stem Parts Callus Initiation and Suspension Culture of Almond Plants

**Amjad A. Mohammad Abdul_Mutallib S. Mohammad**
*Department of Biology*
*College of Science*
*University of Mosul*

**ABSTRACT**

Callus growth was affected by the types and concentration of growth regulators used. The best medium sustained callus growth was MS medium supplemented with 10-4 molar NAA and 10-5 molar BA. The callus fresh weight in such medium reached about 3.73 gm after 60 days of subculture as compared with other medium used.

The growth of the cultures was affected by the type and concentration of growth regulator used as well as the sulfainlamide added. The best medium sustained suspension cultures growth was MS containing 10-8 molar NAA and 10-8 molar BA with cell density reaching about (53.5x105 Cell/Cm3) after 7 days of incubation. Callus initiation was about (%50.2) from the cells embedded in agar as compared with %80.31 by the addition 100 µM sulfanilamide to MS medium containing 10-4 molar BA.

---

## المقدمة

يعد استحداث الكالس من العمليات الاساس في الزراعة النسيجية، ويعتمد استحداثه من الاجزاء النباتية المختلفة (السيقان، البذور، الجذور، الاوراق، القمم النامية للسيقان، المتوك، حبوب اللقاح، ... الخ) على ظروف الزراعة متمثلة بنوع القطعة النباتية ومصدرها، الوسط الغذائي المستخدم و منظمات النمو المستخدمة (Street , 1977 ; الكناني، 1987) . ان التوازن في نسب أضافة منظمات النمو في الوسط الغذائي يؤثر في نسب استحداث الكالس. وسرعة استحداثه اعتماداً على المحتوى الداخلي من منظمات النمو الداخلية في القطعة النباتية. ومن المحتمل احياناً استحداث الكالس دون الحاجة لاضافة منظمات النمو الى الوسط الغذائي لكن لفترة محددة (محمد، 1982 ; Dodds and Roberts, 1985 ; الكناني، 1987). يؤثر ايضاً التوازن بين الاوكسينات والسايتوكاينينات في هذه العملية ( Skoog and Miller,1957; Angelini and Allavena, 1989; Mizuguchi et al., 1994).

ومع التطور الحاصل في مجال زراعة الانسجة النباتية، استخدمت منظمات نمو مصنعة بوصفها محفزات او مثبطات للنمو حيث تسلك سلوكا فسلجياً مشابهاً لسلوك منظمات النمو الطبيعية. وقد اثبت مركب السلفانيل اماید دوراً مهماً في مجال زراعة الانسجة النباتية بوصفه مشجعاً للتفرعات الخضرية والجذور من قطع سيقان الكمثرى والتفاح والفجل والحبة السوداء (محمد واخرون، 2000 ; سليمان، 2001 ; النعيمي، 2004).

تعد تقانة المزارع الخلوية احدى التقانات المهمة في مجال زراعة الانسجة النباتية فهي توفر انظمة جيدةً لدراسة نمو الخلايا النباتية وتخصصها والمسارات الايضية المختلفة في النبات وحـث الانزيمـات والتعبير الجيني (Lendevai et al., 2002) .

ونظراً لما للأشجار الخـشبية المعمـرة بـصورة عامـة والنباتـات الخـشبية بـصورة خاصـة من اهمية اقتصادية واحتواء العديد منها على محتوى عالٍ من المواد الـصيدلانية والمركبـات المهمـة اقتصادياً (Forest , 1969 ; يوسف وسلوم، 1987). لذلك تهدف الدراسة الحالية ايجاد افضل الاوسـاط المشجعة لنمو الكالس بوجود منظمات النمو القياسية بالاضافة الى مركب السلفانيل امايـد فـضلا عـن استخدام تقنية زراعة المعلقات الخلوية لبيان تاثير مركب السلفانيل امايد في انتاج المزارع الخلوية لنبـات اللوز.

## المواد وطرائق العمل

تم استخدام عدد من منظمات النمو القياسية (الاوكسينات والسايتوكاينينات) فـضلاً عـن اسـتخدام مركب السلفانيل امايد لبيان تاثيرها في نمو الكالس وانشاء المزارع الخلوية لنبات اللوز. أجريـت جميـع التجارب في مختبر زراعة الانسجة النباتية في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل.

### قياس نمو الكالس

أشارت التجارب التمهيدية بان افضل وسط لنمو كالس نبات اللوز هو وسط MS الـصلب الحـاوي على 4-10 مولار NAA 5-10 مولار BA بعد 60 يوماً من النمو، أضيف اليه بعد ذلك مركب السلفانيل امايد وبالتراكيز (25 ، 50 ، 75 ، 100 ، 150 ، 175) مايكرومولار لدراسة تاثير المركـب علـى نمـو الكالس فضلاً عن استخدام 2,4-D و BA وبالتراكيز (0 ، 4-10 ، 5-10 ، 7-10 ، 8-10) مولار لكل منهما على حدى تداخلاتهما مع بعض وبعد اختيار الافضل لنمو الكالس بعد 30 ، 60 يوماً من النمو، اضيفت اليه نفس التراكيز المذكورة من مركب السلفانيل امايد لدراسة تاثيره على نمو الكالس بعد 60 يوماً مـن النمو. حدد الوزن الطري للكالس النامي على اوساط الاستحداث بايجاد الفروقات بـالوزن بـين القنـاني الزجاجية وهي حاوية على الوسط الغذائي فقط ووزنها بعد زرع الكالس بعد مرور 60 يوماً من الزراعة.

### انشاء مزارع المعلقات الخلوية

استخدم الوسط الغذائي MS السائل الحاوي علـى تراكيـز مختلفـة مـن NAA و2,4-D و BA وبالتراكيز (3-10 ، 4-10 ، 5-10 ، 7-10 ، 8-10) مولار لكل منهما على حدى وحدد الوسط الافضل لنمو المزارع الخلوية للاوساط الغذائية السائلة الحاوية على BA (4-10 مولار) اضيف اليه مركب الـسلفانيل امايد وبتراكيز (25 ، 50 ، 75 ، 100 ، 150 ، 175) مايكرومولار لدراسة تاثيره على انـشاء المـزارع

الخلوية و نموها . كما استخدم الوسط الغذائي MS السائل الحاوي على NAA و BA وبالتراكيز (0 ، 10-4 ، 10-5 ، 10-7 ، 10-8) مولار لكل منها على حدى وتداخلاتهما مع بعض في انشاء المزارع الخلوية، وبعد تحديد الافضل وهو وسط MS السائل الحاوي على 10-8 مولار لكل من NAA وBA اضيف اليه مركب السلفانيل اميد وبالتراكيز المذكورة اعلاه لغرض دراسة تاثير المركب على استحداث و نمو المزارع الخلوية.

**انشاء المزارع الخلوية ونموها**

نُقل 1 غم تقريباً من كالس السيقان لنبات اللوز الهش وباعمار مختلفة الى دوارق زجاجية تحوي كل منها على تقريباً 25ml من الوسط الغذائي السائل، اغلقت فوهتها برقائق الالمنيوم وغلفت بالبارافيلم ونقلت إلى الحاضنة الهزازة Shakering incubater من نوع Burnswich بظروف الظلام التام ودرجة حرارة 22±1م وسرعة دورانية 130 دورة / دقيقة رفعت الدوارق بعد مرور 5 ايام من الزراعة وتركت بحالة ساكنة داخل منضدة انسياب الهواء الطبقي لفترة 2-3 ساعة (Gresshoff , 1980) واعيد زراعتها بسكب الوسط الغذائي القديم ورشحت باستخدام مرشحات معدنية خاصة ذات فتحات (10-25 µm) لعزل الكتل الخلوية الكبيرة غير المفككة وتسمح بمرور الخلايا المنفردة او التجمعات الخلوية الصغيرة الى قنانٍ زجاجية جديدة معقمة، اضيف الى الخلايا المفككة وسط غذائي سائل جديد بنفس مكونات الوسط الغذائي السائل القديم واكمل الحجم الى25 سم3. أعيدت القناني الى جهاز الحاضنة الهزازة. اخذت عينات بعد مرور(24، 48 ، 72 ، 96 ، 120) ساعة من النمو لتقدير كثافة المعلق الخلوي والتعرف على نمو الخلايا وانقساماتها وبلوغها الطور النشط (Log phase). ومن اجل تحديد نمو مزرعة المعلق الخلوي لغرض زراعتها لاحقاً . استخدمت طريقة Hinton and Maulood لتقدير كثافة المعلق الخلوي وذلك باخذ 0.05 سم3 من عينة المعلق الخلوي بوساطة Micropipet ووضعها على شريحة ثم وضعت قطرة من صبغة Trypan Blue (المحضرة باذابة 0.2 غم من الصبغة في 100 سم3 ماء مقطر) لغرض تقدير الحيوية وكثافة الخلايا والتمييز بين الخلايا الحية عن غير الحية ( Hinton and Maulood, 1979 ; Paul, 1970) حسبت اعداد الخلايا في 30 حقل مجهري انتخبت عشوائياً وقدرت اعداد الخلايا في 1 سم3 من المعلق الخلوي.

**زراعة المعلق الخلوي بطريقة Bergmann او الطمر بالاكار**

تعد طريقة Bergmann (Bergmann, 1960) من اكثر الطرق الشائعة الاستعمال في زراعة الخلايا المفردة (محمد وعمر، 1990)، تضمنت الطريقة مزج 50ml من المعلق الخلوي عند بلوغه الطور النشط (Log phase) الحاوي على الخلايا المفردة مع نفس الحجم من الوسط الغذائي المضاعف الحاوي على الاكار بنسبة (1:1)، و مزج الخليط وتوزيعه بشكل متساوٍ على الاطباق وتركت داخل منضدة

انسياب الهواء الطبقي لحين تـصلب الوسـط غلقـت الاطبـاق بـصورة جيـدة باسـتخدام البـارافيلم وحفظت في حاضنة النمو بدرجة حرارة 22 ±1 م لمدة (70) يوماً في الظلام (Uchiyama et al., 1993 ; بواص، 2004 ; النعيمي، 2004) وفحصت الاطباق بصورة دورية لمشاهدة الانقسامات للخلايا المفردة وتكوين المستعمرات الخلوية وتم حساب نسبه تكوين بادئات الكالس.

## النتائج

### معدلات الاوزان الطرية للكالس

#### تاثير اضافة NAA و BA بتراكيز مختلفة على الوزن الطري لكالس سيفان اللوز

شجعت اضافة NAA وBA بتراكيز مختلفة نمو كالس نبات اللوز بدرجات متباينة اعتمـاداً علـى التراكيز المستخدمة بعد مضي 60 يوماً من الزراعة. وعموماً ازداد الوزن الطري بمرور الوقت ليصبح معدل الوزن الطري للكالس النامي على وسط MS الصلب لوحده بعد مرور 60 يوماً من الزراعة بمقدار 1.54 غم (الشكل، 1 -1) وبلغ اعلى معدل للوزن الطري للكالس النامي على وسط MS الصلب الحاوي على 4-10 مولار NAA و5-10 مولار BA مقدار 3.73غم بعد مرور 60 يوماً من الزراعة (الـشكل، 1-2) ثم وسط MS الصلب المضاف اليه 5-10 مولار NAA و5-10 مولار BA حيث بلغ معدل الوزن الطري للكالس 2.67 غم (الشكل،1-3).

#### تاثير اضافة 2,4-D و BA بتراكيز مختلفة على الوزن الطري لكالس سيفان اللوز

حفزت اضافة تراكيز مختلفة من 2,4-D وBA نمو كالس نبات اللوز. وعموماً كان نمو الكالس بعد مرور 60 يوماً من الزراعة بدرجة اقل مما هو عليه في حالة استخدام NAA وBA وتشير النتائج الـى ان الوسط الغذائي الحاوي على 5-10 مولار BA أعطى اعلى معدل للوزن الطري بمقدار 2.34 غم بعد مرور 60 يوماً من الزراعة (الشكل، 1-4). ويليه الوسط الغذائي المدعم بـ 7-10 مولار 2,4-D و 5-10 مولار BA بمعدل وزن طري للكالس 1.8075 غم (الشكل، 1-5).

#### تاثير اضافة تراكيز مختلفة من مركب السلفانيل امايد مع التراكيز المثلى لمنظمات النمو على الوزن الطري

أظهرت النتائج ان اضافة تراكيز مختلفة من مركب السلفانيل امايد الـى التركيـز الامثـل وهـو وسط MS الصلب الحاوي على 4-10 مولار NAA و 5-10 مولار BA لنمو الكالس الـى تثبـيط نمـو الكالس بدرجات متباينة. وبلغ اعلى معدل للوزن الطري في الوسط الغذائي المدعم بـ 25 مـايكرومولار سلفانيل امايد بمقدار 2.587 غم بعد 60 يوماً من الزراعة (الشكل،1-6). مقارنة بالوسط المـضاف اليـه

10-4 مولار NAA و 5-10 مولار BA (الشكل، 1-2). وبدرجة اقل حفز الوسط المدعم بـ 175 مايكرومولار نمو الكالس بمقدار 2.1775 غم بعد مرور 60 يوماً (الشكل،1-7) .

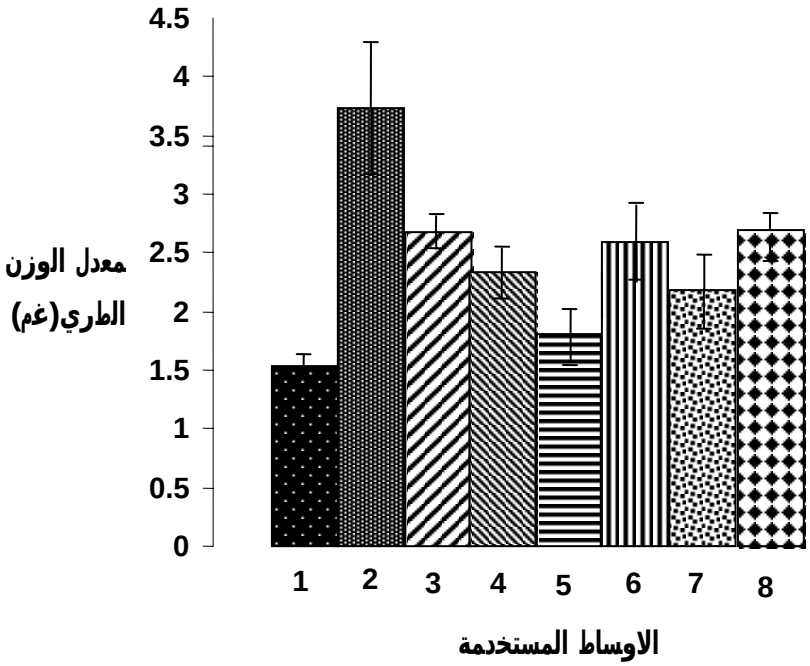
في حين ادت ان اضافة مركب السلفانيل امايد وبتراكيز متعددة الى الوسط الامثل وهو MS الصلب الحاوي على 5-10 مولار BA شجعت نمو الكالس وادت الى زيادة معدلات الوزن الطري بدرجة كبيرة بعد مرور 60 يوماً من الزراعة، عند مقارنتها مع معدل الوزن الطري للوسط الامثل الحاوي على 5-10 مولار BA بمقدار 2.34 غم بعد 60 يوماً من الزراعة (الشكل، 1-3). وبلغ اعلى معدل للوزن الطري لكالس نبات اللوز بعد مرور 60 يوماً من الزراعة بمقدار 2.79 غم على الوسط الغذائي المدعم بـ 175 مايكرومولار سلفانيل امايد (الشكل، 1-8). وبدرجة اقل حفز الوسط المدعم بـ 75 مايكرومولار اذ بلغ معدل الوزن الطري للكالس النامي بمقدار 2.685 غم بعد 60 يوماً من الزراعة (الشكل، 1-9).

**انشاء مزارع المعلقات الخلوية المشقة من كالس سيفان اللوز**

اظهرت النتائج استجابة جيدة لتكوين مزارع المعلقات الخلوية وتبين ذلك من خلال الفحوصات المجهرية الدورية لعينات المعلقات الخلوية للتعرف على بدء الانقسام وزيادة اعداد الخلايا ومن ثم انتهاء عمر المزرعة الخلوية، فضلاً عن نجاح زراعة خلايا المعلق الخلوي للتراكيز المثلى بطريقة الطمر في الاكار (Bergmann, 1960) ، على وسط MS الصلب الحاوي على تراكيز مختلفة من منظمات النمو النباتية المستخدمة .

**تاثير اضافة تراكيز مختلفة من NAA و BA و 2,4-D الى وسط انشاء مزارع المعلقات الخلوية ونموها من كالس سيفان اللوز**

تشير النتائج في الشكل (2) أن افضل الاوساط لانشاء المزارع الخلوية هو الوسط السائل الحاوي على 3-10 مولار NAA، ووصلت اعلى كثافة للخلايا في اليوم التاسع من الحضانة، وبلغت اعداد الخلايا مقدار 16.9 ×105 خلية / سم3 من عينة المعلق الخلوي (الشكل، 2-2)، واتصفت الخلايا بكثافتها القليلة وشكلها البيضوي نوعاً ما او الكروي. وعند زراعتها بطريقة الطمر في الاكار اعطت نسبة استحداث للكالس 46.68%، واتصفت المستعمرات بحجمها الصغير ولونها البني الغامق.



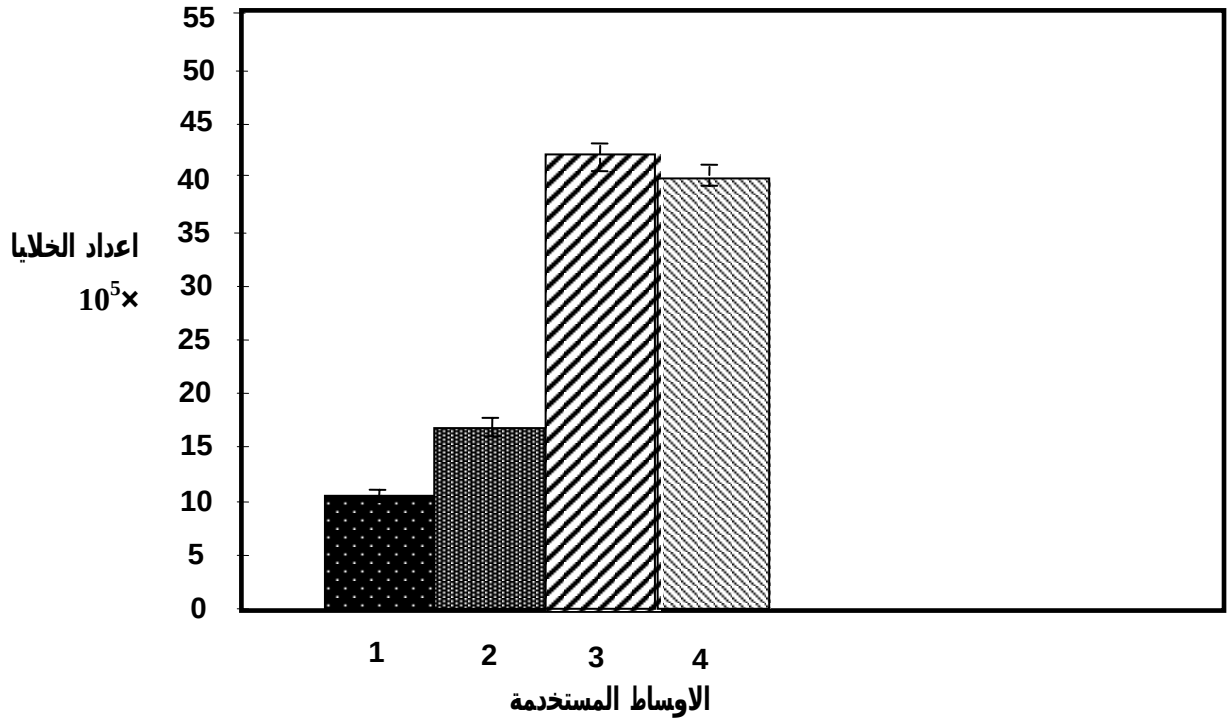

الشكل 1 : معدلات الاوزان الطرية (غم) لكالس نبات اللوز بعد مرور 60 يوماً من الزراعة على وسط MS الصلب الحاوي على تراكيز مختلفة من منظمات النمو المختلفة. كل معاملة تمثل معدل خمس مكررات.

1- وسط MS الخالي من منظمات النمو.
2- وسط MS الحاوي على 4-10 مولار NAA +5-10 مولار BA
3- وسط MS الحاوي على5-10 مولار NAA +5-10 مولار BA
4- وسط MS الحاوي على 5-10 مولار BA
5- وسط MS الحاوي على 7-10 مولار 2,4-D +5-10 مولار BA
6- وسط MS الحاوي على 4-10 مولار NAA+5-10 مولار BA + 25 مايكرومولار سلفانيل امايد
7- وسط MS الحاوي على4-10 مولار NAA +5-10 مولار BA +175 مايكرومولار سلفانيل امايد
8- وسط MS الحاوي على 5-10 مولار BA + 175 مايكرومولار سلفانيل امايد
9- وسط MS الحاوي على 5-10 مولار BA + 75 مايكرومولار سلفانيل امايد
I الخط العامودي يمثل الخطأ القياسي لمتوسط المعاملات

في حين ادت اضافة تراكيز مختلفة من 2,4-D حفزت انشاء مزارع المعلقات الخلوية بصورة جيدة فضلاً عن الانقسامات الجيدة للخلايا وبلغت اعلى كثافة للخلايا في اليوم السابع من الحضانة على وسط MS السائل المضاف اليه 3-10 مولار. وبلغت اعداد الخلايا 41.9×105 خلية / سم3 (الشكل،

3-2)، واتصفت الخلايا بكثافتها الجيدة وتكوينها مستعمرات صغيرة الحجم. وبلغت نسبة استحداث الكالس 55.31 % عند زراعتها بطريقة بيركمان، واتصفت المستعمرات النامية في الطبق بحجمها المتوسط ولونها البني المصفر.

بينما ادت اضافة BA بتراكيز مختلفة إلى وسط MS السائل إلى تحفيز قليل لانشاء المزارع الخلوية ماعدا الوسط المضاف اليه 4-10 مولار BA. وبلغت أعلى كثافة للخلايا مقدار 39.07 ×105 خلية / سم3 من عينة المعلق الخلوي في اليوم السابع من الحضانة(الشكل، 2-4)، واتصفت الخلايا بكثافتها العالية وتكوينها مستعمرات متوسطة الحجم. واعطت نسبة استحداث للكالس 48.31%، واتصفت المستعمرات بحجمها المتوسط ولونها الاخضر الداكن.




الشكل 2: نمو المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان نبات اللوز النامي على وسط MS السائل الحاوي على منظمات النمو القياسية بعد 7، 9 ايام من النمو. كل معاملة تمثل معدل خمس مكررات.

1- وسط MS الخالي من منظمات النمو
2- وسط MS الحاوي على 3-10 مولار NAA
3- وسط MS الحاوي على 3-10 مولار 2,4-D
4- وسط MS الحاوي على 4-10 مولار BA
I = الخط العامودي يمثل الخطأ القياسي لمتوسط المعاملات

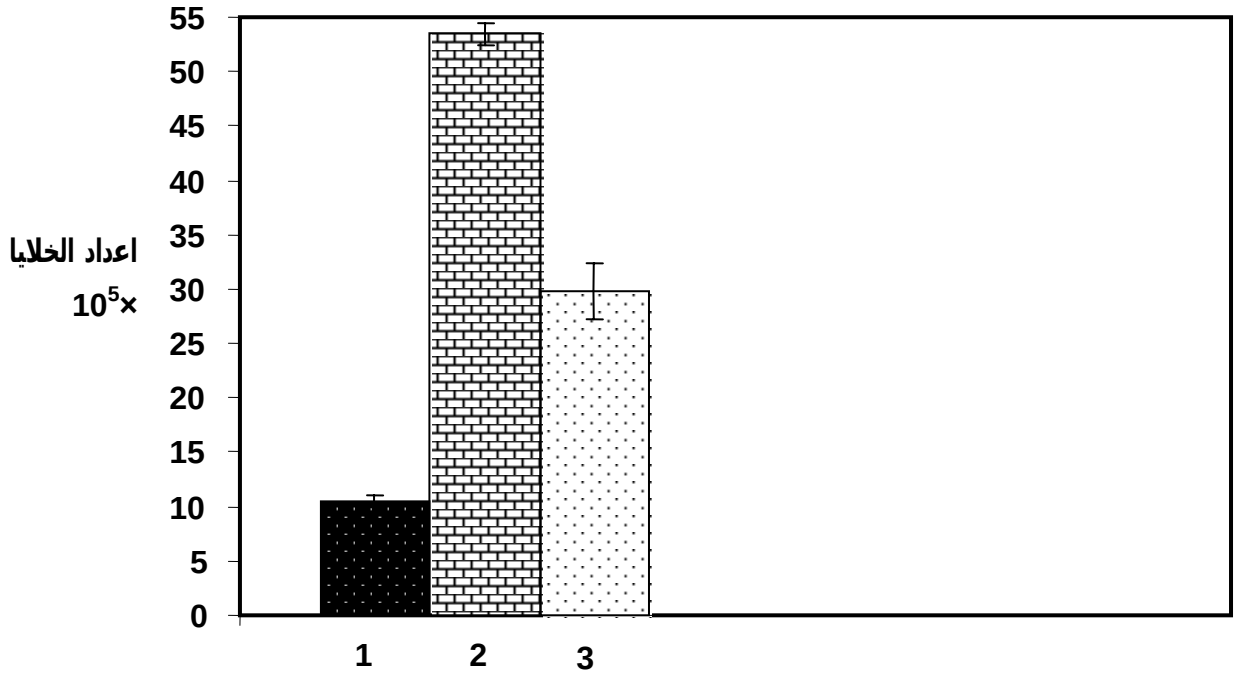
**تاثير اضافة BA , NAA بتراكيز مختلفة الى وسط انشاء مزارع المعلقات الخلوية ونموها لكالس نبات اللوز**

ادت اضافة كل من NAA و BA إلى الوسط الغذائي السائل بتراكيز مختلفة إلـى نـشوء مـزارع المعلقات الخلوية متباينة في اعداد الخلايا وفترات وصولها إلى الطور النـشط ( Log phase ). وحفـز وسط MS لوحده تكوين المزارع الخلوية ولكن بشكل متوسط ووصلت اعلى كثافة للخلايـا فـي اليـوم السابع من الحضانة ،وبلغت اعداد الخلايا مقدار 10.5×105 خلية / سم3 (الشكل، 3-1)، واتصفت الخلايا بكثافتها القليلة وشكلها الكروي او المستطيل. وعند زراعتها بطريقة بيركمان اعطـت نـسبة اسـتحداث للكالس بمقدار 36.2 % وتميزت المستعمرات بكونها صغيرة الحجم وبلونها البني المصفر.

ووجد أن الاوساط الغذائية السائلة الحاوية على 7-10 مولار NAA بوجود تراكيز مختلفة من BA حفزت تكوين مزارع المعلقات الخلوية بشكل جيد (الشكل، 3-3). وتشير النتائج إلى اعلى كثافـة خلويـة لنظام المعلقات الخلوية وصلت في يوم السابع في وسط MS السائل الحاوي على 8-10 مـولار NAA و 8-10 مولار BA. وبلغت اعداد الخلايا 53.5 × 105 خلية / سم3 (الشكل، 2-3). وتبـين ذلـك خـلال الفحص المجهري الدوري لعينات المعلق الخلوي، واتصفت الخلايا بكثافتها العالية وبتكوينها مستعمرات كبيرة وبلغت نسبة استحداث الكالس 50.2 % وامتازت المستعمرات بحجمها المتوسـط ولونهـا البنـي الداكن.

**تاثير اضافة تراكيز مختلفة من مركب السلفانيل امايد مع 4-10 مولار BA الـى الوسـط الغـذائي السائل لانشاء مزارع المعلقات الخلوية لكالس نبات اللوز ونموها**

شجع إضافة مركب السلفانيل امايد وبالتراكيز المختلفة بوجود 4-10 مولار BA انقسام الخلايا فـي المزارع الخلوية. ويبدو واضحاً أن وسط MS السائل المدعم بـ 100 مايكرومولار سلفانيل امايـد هـو الافضل في انشاء المعلقات الخلوية . اذ أعطت افضل كثافة للخلايا في اليوم السابع من الحضانة وبلغـت اعداد الخلايا مقدار 40.3 ×105 خلية / سم3 (الشكل، 4-2). مقارنة مـع 39.07 ×105 خليـة / سـم3 بالوسط الامثل (4-10 مولار BA)، الا أن خلاياها كانت بكثافة عالية وامتازت بتكوين مستعمرات كبيرة مقارنة بباقي التراكيز المستخدمة. وعند زراعتها على الاطباق في الوسط الصلب بطريقة بيركمان أعطت نسبة استحداث للكالس بمقدار 80.31 % وامتازت المستعمرات المتكونة بحجمها الكبير ولونها الاخـضر الداكن.



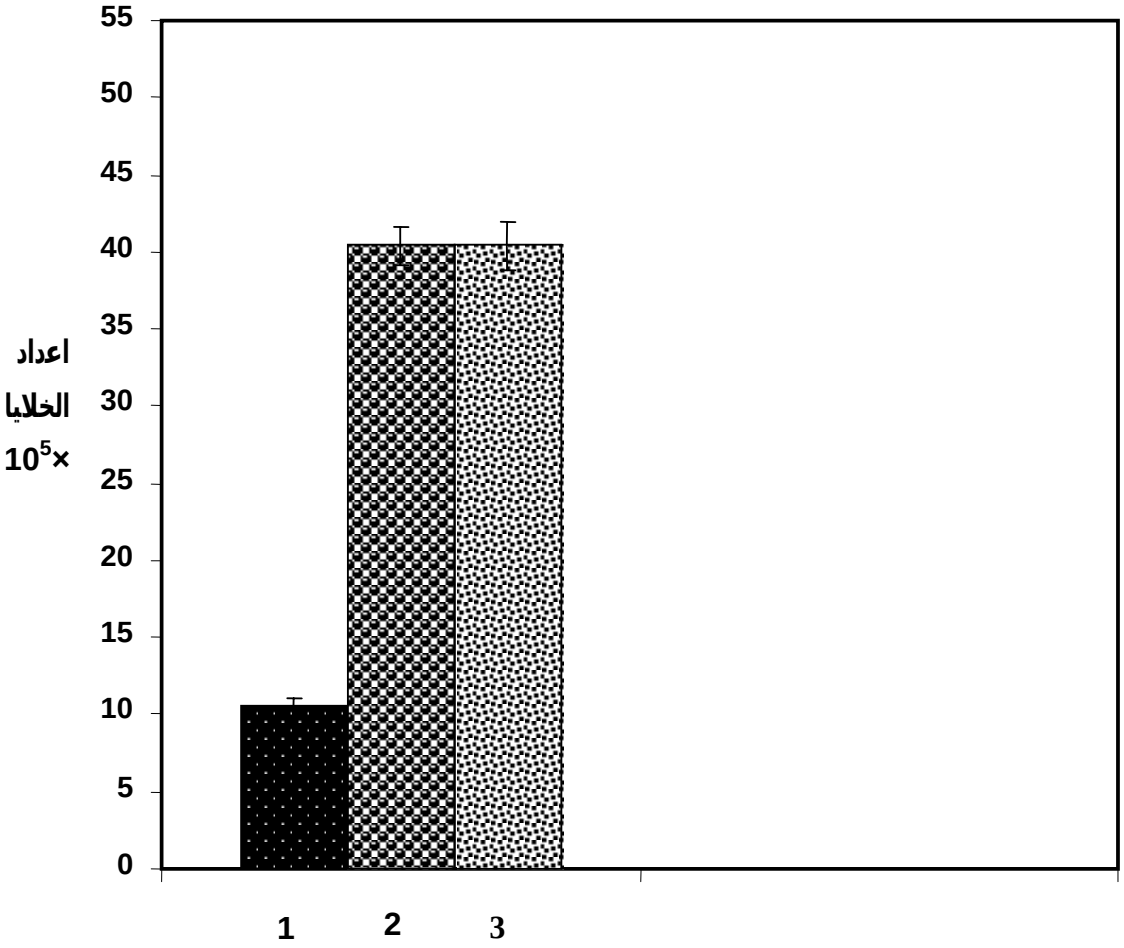

الشكل 3 : نمو المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان نبات اللوز النامي على وسط MS السائل الحاوي على منظمات النمو القياسية بعد 7 ايام من النمو . كل معاملة تمثل معدل خمس مكررات.

1- وسط MS الخالي من منظمات النمو
2- وسط MS الحاوي على10-8 مولار NAA + 10-8 مولار BA
3- وسط MS الحاوي على 10-7 مولار NAA + 10-5 مولار BA
I = الخط العامودي يمثل الخطأ القياسي لمتوسط المعاملات

**تاثير اضافة تراكيز مختلفة من مركب السلفانيل اميد مع 10-8 مولار NAA و 10-8 مـولار BA الى الوسط الغذائي السائل لانشاء مزارع المعلقات الخلوية**

وجد أن اضافة مركب السلفانيل اميد وبتراكيز مختلفة حفزت وبشكل جيد تكوين مزارع المعلقات الخلوية ولكن بدرجة اقل عند مقارنتها بالوسط الغذائي الامثل. وان اضافة 100 مايكرومولار من مركب السلفانيل اميد شجعت استجابة نمو المزارع الخلوية بدرجة افضل من باقي التراكيز. اعطت اعلى كثافـة للخلايا في اليوم السابع من الحضانة، وبلغت اعداد الخلايا مقدار 40.3×105 خلية / سم3 من عينة المعلق الخلوي (الشكل، 4-3). وتميزت الخلايا بكثافتها العالية وبتكوينها مستعمرات جيدة، مقارنة مع 53.5×105 خلية / سم3 للوسط الامثل ( 10-8 مولار لكل من NAA وBA ). وبلغت نسبة استحداث الكـالس بعـد

زراعة المعلق الخلوي بطريقة الطمر في الاكار 56.5% وامتازت المستعمرات النامية على هذا الوسـط بحجمها المتوسط ولونها البني الداكن.




الشكل 4 : نمو المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان نبات اللوز النامي على وسط MSالسائل الحاوي على منظمات النمو القياسية بعد 7 ايام من النمو . كل معاملة تمثل معدل خمس مكررات.

1- وسط MS الخالي من منظمات النمو.

2- وسط MS الحاوي على 10-4 مولار BA + 100 مايكرومولار سلفانيل امايد.

3- وسط MS الحاوي علـى10-8 مـولار NAA + 10-8 مـولار BA + 100 مـايكرومولار سلفانيل امايد.

I = الخط العامودي يمثل الخطأ القياسي لمتوسط المعاملات.

## المناقشة

تم في الدراسة قياس نمو الكالس، اذ يحدد نمو الكالس في انظمة زراعة الانسجة النباتية عادة بقياس التغيرات في الوزن الطري، الوزن الجاف، محتوى الخلايا من البروتينات والحـوامض النوويـة خـلال

فترات النمو المختلفة (Street, 1977 ; محمد و الصالح، 1996). وتعد منظمـات النمـو الاوكـسينات والسايتوكاينينات مهمة جداً في هذا المضمار، اذ تؤثر بصورة عامة على بناء البروتينـات والحـوامض النووية (Centeno et al., 1996 ; Kraus et al., 1993) من خلال تاثيرها على فعالية بعض الانزيمـات المهمة في بنائها . ويبدو واضحاً من نتائج هذه الدراسة بان نمو الكالس لنبات اللوز تحدد بدرجة كبيـرة على اساس الوزن الطري للكالس بنوعية وتركيز منظمات القياسية والمصنعة في الاوساط الغذائية بعـد مرور 30 ، 60 يوماً من بدء الزراعة.

وتشير الدراسة بان وزن الكالس ازداد لحد ما معتمداً على وجود تراكيز مختلفة من NAA وBA وبعد 60 يوماً من الزراعة واصبح الوسط الغذائي الحاوي على 4-10 مولار NAA و 5-10 مولار BA الافضل في تشجيع نمو الكالس. وهذا يشير إلى أنه عند ثبوت التركيز العالي لـ BA (5-10 مولار) فان الوزن الطري للكالس الافضل يعتمد على تراكيز الاوكسين في الوسط الغذائي. وذلـك لان الـ BA وبتركيز 5-10 مولار ربما يعمل نوعاً من الموازنة بين منظمات النمو في الوسط الغذائي مسببا زيـادة في امتصاص منظمات النمو الاخرى وهذا بدوره يعمل على زيادة بناء البروتين والانقسام الخلوي مـسبباً زيادة في الوزن الطري (Dodds and Roberts, 1985).

حيث أن الموازنة مابين الشحنات الموجبة والسالبة على طرفي الغشاء الخلوي تعمل علـى زيـادة امتصاص منظمات النمو الاخرى ومن ثم الارتفاع بمستوى البناء الحيـوي (محمـد و أخـرون، 1997) وباستخدام 2,4-D بدلاً من NAA وبنفس التراكيز وبعد مرور 60 يوماً من الزراعة، وجد بـان افـضل وسط لنمو الكالس هو المضاف اليه 5-10 مولار، ويليه الوسط المجهز بـ 7-10 مولار 2,4-D و 5-10 مولار BA، وهذا مما يؤيد أن السايتوكاينين يعمل على زيادة نمو الكالس (Dodds and Roberts , 1985 ; محمد و أخرون، 1997) وبعد تحديد افضل التراكيز لنمو الكالس وهما وسطي MS الحاويين على 10- 4 مولار NAA و 5-10 مولار BA _ 5-10 مولار BA تم اضافة مركـب الـسلفانيل امايـد اليهمـا وبتراكيز متعددة.

وبعد مرور 60 يوماً من الزراعة وجد أن وسط MS المضاف اليه 4-10 مولار NAA و 10- 5 مولار BA و المدعم بـ 25 مايكرومولار سلفانيل امايد اعطى افضل نمو للكالس يليه الوسط المـدعم بـ 175 مايكرومولار. وبالنسبة لوسط MS المجهز بـ 5-10 مولار BA فكان الوسط المدعم بـ 175 مايكرومولار سلفانيل امايد الافضل تشجيعاً لنمو الكالس ، يليه الوسط الغذائي المدعم بـ 75 مـايكرو مولار. ومما تقدم يتضح أن لمركب السلفانيل امايد تاثيراً كبيراً على نمو كالس نبات اللوز وبشكل متباين، و من المتوقع ان يكون مركب السلفانيل امايد تداخل بطريقة ما في عمل الاوكسينات و الـسايتوكاينينات الموجودة اصلاً في القطعة النباتية او المضافة إلى الوسط الغذائي لتشجيع انقسامات الخلايا عـن طريـق زيادة البروتينات والاحماض النووية ( Mohammad et al., 1991 ) . او يمكـن القـول أن لمركـب السلفانيل امايد تاثيراً على موقع جيني معين مسؤول عن بناء انزيمات تؤثر على ليونة الجدار من خـلال

زيادة عملها مما يؤدي إلى زيادة الامتصاص وتحفيز الانقسام للخلايا النباتية عند حد معين (محمد واخرون، 2000).

واشارت نتائج الدراسة إلى ان نمو المعلقات الخلوية لكالس نبات اللوز حددت بصورة متباينة حسب تراكيز منظمات النمو المضافة إلى الوسط الغذائي. وادت اضافة NAA بتراكيز متعددة إلى الاوساط الغذائية السائلة الى تشجيع انشاء المزارع الخلوية بصورة قليلة. وبلغت اعلى كثافة خلوية في الوسط السائل الحاوي على 3-10 مولار في اليوم التاسع من الحضانة log phase. ويتضح بان التركيز العالي جداً من NAA هو الافضل في انشاء المزارع الخلوية من التراكيز المنخفضة. وهذا يعود إلى نوع وتركيز منظمات النمو المضافة إلى الوسط الغذائي فضلاً عن المحتوى الداخلي واستجابة الخلايا النباتية وعمرها ( Brisa and Segura , 13 ) وادت اضافة 2,4-D بدلاً من NAA وبنفس التراكيز الى انشاء مزراع خلوية مناسبة والافضل هو الوسط الغذائي الحاوي على 3-10 واتضح ذلك من خلال الفحص المجهري . وهذا يثبت أن 2,4-D يشجع التكاثر الغزير للخلايا في المزارع الخلوية (النعيمي، 2004 ; Kamo , 1987).

وباستخدام BA بدلاً من 2,4-D في الوسط الغذائي السائل وبنفس التراكيز، وجد أن الافضل في انشاء ونمو المزارع الخلوية هو وسط MSالسائل المجهز بـ 4-10 مولار ، وهذا مما يؤكد أن BA يحفز تكوين المستعمرات الخلوية بالتراكيز العالية (Poli et al. , 1989 ; Street,1977). وربما يعزى ذلك إلى أن السايتوكاينين هو المسؤول عن انقسام الخلايا اذ يحفز البناء الحيوي لـ RNA والبروتين وربما تحفز بعض الانزيمات التي لها دور واضح في المسارات الايضية المرتبطة بالخلايا ( 1977 , Street ; Poli et al. , 1989).

ويبدو واضحا من نتائج هذه الدراسة أن الوسط الغذائي المجهز بـ 8-10 مولار NAA و8-10 مولار BA هو الافضل حيث اعطى أعلى كثافة خلوية بعد مرور سبعة ايام من، ويبدو واضحاً أن التراكيز المنخفضة لكل من NAA و BA شجعت افضل نمو للمزارع الخلوية لكالس نبات اللوز. وتشير بعض الابحاث إلى أن التراكيز الواطئة من الاوكسينات حفزت لحد ما النمو بصورة جيدة (صالح، 1990 ;العاني، 1990) وبوجود السايتوكاينينات حفزت عملية توسع الخلايا وانقساماتها المتتالية (صالح، 1990) توازن نسبيتهما ادت إلى افضل كثافة خلوية لكالس نبات اللوز.

اما وسط MS الخالي من منظمات النمو فوجد انه شجع وبصورة قليلة نمو المزارع الخلوية وتشير نتائج اضافة مركب السلفانيل امايد وبتراكيز متعددة إلى بعض الاوساط الغذائية المثلى لنمو المعلقات الخلوية ومنها الوسطين الغذائيين السائلين الحاويين على 4-10 مولار BA، 8-10 مولار NAA و 8-10 مولار BA لكل منهما على حدى إلى أن تركيز 100 مايكرومولار ادى إلى زيادة ملحوظة في اعطاء اعلى كثافة خلوية للخلايا في اليوم السابع من الحضانة في الطور النشط. وتؤكد هذه النتائج الدور التشجيعي لهذا المركب وبتركيز 100 مايكرومولار في الانقسام الخلوي لخلايا اللوز واستمرار قابليتها

على الاحتفـاظ بطاقتهـا الكامنـة التـي تحفزهـا علـى الانقـسام وكمـا فـي النباتـات الاخـرى ( Wareing and Philips , 1978 ; محمد واخرون، 1996 ; محمد واخرون، 2000).

واعتمادا على نتائج هذه الدراسة يمكن الاستنتاج ان الدراسة حققت استحداث المزارع الخلوية لنبات اللوز اعتمادا على نوعية منظمات النمو المضافة ومركب السلفانيل امايد، ودورها فـي كثافـة الخلايـا المستخدمة كبادأت لإستحداث الكالس.

## المصادر العربية


بواص، مناهل فوزي، 2004. مشتقات مركبات الجالكون كمنظمات نمو بديلة عن الـسايتوكاينينات فـي استحداث الكالس لنبات الخس .L *Lactuca sativa* ونموه وتمايزه. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

سليمان، ازهار حسين علي، 2001 . دور بعض منظمات النمو ومركبات الترايازول والسلفانيل امايد في نمو وتمايز الكالس ومحتوى فيتامين C في نبات الفجل .L *Raphanus sativus*. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

صالح، مصلح محمد سعيد، 1990. فسيولوجيا منظمات النمو النباتية. مطبعة جامعة الموصل، العراق.

العاني، طارق علي، 1990. فسلجة نمو النبات وتكوينه. دار الحكمة للطباعة والنشر، بغداد، العراق.

الكناني، فيصل رشيد ناصر، 1987. زراعة الخلايا والانسجة النباتية. مطبعة جامعة الموصل، العراق.

محمد، عبد المطلب سيد، 1982. الهرمونات النباتية، فسلجتها وكيماؤها الحيوية (مترجم). مطبعة جامعـة الموصل، العراق.

محمد، عبد المطلب سيد، الصالح، هناء سعيد وعبود، ساجدة عزيز، 2000. دور مركب السلفانيل امايـد في زيادة الافرع الخضرية لنبات الخس والتفاح والكمثرى بطريقة زراعة الانسجة. مجلـة علـوم الرافدين، 11 (1) : ص15-36.

محمد، عبد المطلب سيد والصالح، هناء سعيد وايوب، مقداد توفيق، 1997. تحـضير نـوع جديـد مـن الاوكسينات المصنعة مختبريا ودوره في الزراعة النسيجية لنبات الخس. مجلة علوم الرافـدين، 9 (2) : ص14-24.

محمد، عبد المطلب سيد عبود، ساجدة عزيز والصالح، هناء سعيد، 1996. مركب السلفانيل امايـد لـيس مثبطا وانما مشجعا للتفرعات الخضرية في زراعة الانسجة. بحث متقدم لديوان رئاسة الجمهوريـة الموجه من جامعة الموصل الى وزارة التعليم العالي والبحث العلمي بموجب الكتـاب 15س/1225 في 1996/8/28.

محمد، عبد المطلب سيد والصالح، هناء سعيد، 1996. استحداث ونمو الكالس واخلاف الافرع الخـضرية من المرستيم القمي لنبات الفستق .L *Pistacia vera* . مجلة علوم الرافدين، 7 : ص11-24.

محمد، عبد المطلب سيد وعمر، مبشر صالح، 1990. المفاهيم الرئيسة في زراعـة الخلايـا والانـسجة والاعضاء للنبات. مطبعة جامعة الموصل، العراق.

النعيمي، مها محمد طه، 2004 . تاثير تداخل بعض منظمات النمو والسلفانيل امايد في اسـتحداث ونمـو الكالس والمزارع الخلوية لنبات الحبة السوداء *Nigella sativa* L. رسالة ماجستير، كلية العلـوم، جامعة الموصل، العراق.

يوسف، يوسف حنا وسلوم، عبد الجبار حسن، 1987. انتاج الفاكهة النفضية (2). مديرية الكتب للطباعـة والنشر، جامعة الموصل، العراق.

## المصادر الاجنبية

Angelini, R.P. and Allavena, A., 1989. Plant Regeneration from Immature Cotyledon Explant Cultures of Bean *Phaseolus coccineus* L.. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 19: pp.167-174.

Bergmann, L., 1960. Growth and Division of Single Cells of Higher Plants in vitro. J. Gen. Physiol. 43: pp.841-851.

Brisa, M.C. and Segura, J., 1989. Morphogenic of Potential of Mechanically Isolated Single Cells from *Digitalis obscura* L. Callus. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 19: pp.129-139.

Centeno, M.L., Rodriguez, A., Feito, I. and Frenandez, B., 1996. Relationship Between Endogenous Auxin and Cytokinin Levels and Morphogenic Responses in *Actinidia deliciosa* Tissue Cultures. Plant Cell Repts. 16: pp.58-62.

Dodds, J.H. and Roberts, I.W., 1985. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge Univ. Press. London, New York.

Forest, G.I., 1969. Studies on the Polyphenol Metabolism of Tissue Culture Derived from Tea Plant *Camellia sinensis* L.. Biochem. J. 113: pp.765-772.

Fuji, T. and Nito, N., 1972. Studies on the Compatibility of Grafting of Fruit Tress. I. Callus Fusion Between Rootstock and Scion. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 41 (1): pp.1-10 .

Gresshoff, P.M., 1980. In Vitro Culture of White Clover Callus, Suspension, Protoplasts Culture and Plant Regeneration. Bot. Gaz. 141: pp.157-164.

Hartmann, H.T. and Kester, D.E., 1975. Plant Propagation Principles and Practices. 3rd - ed. Prentice_ Hall, Inc. Englewood, Cliffs, N.J. U.S.A.

Hinton, G.C.F. and Maulood, B.K., 1979. A Modified Membrane Filtration Method for Phytoplankton Enumeration in Marine and Fresh Water Ecosystem. Trop. Eco. 192: 194 p.

Kamo, K.K., 1987 . Suspension Cultures from Embryogenic Callus. Plant Sci. 45: 111 p.

Kraus, T.E., Hofstra, G. and Fletcher, R.A., 1993. Regulation of Senescence by Benzylamino Purine and Uniconazole in Intact and Excised Soybean Cotylendons. Plant Physiol. Biochem. 13.: pp.834-827

Lendevai, A., Nikovics, K., Bako, L., Dutits, D. and Gyorgey, J., 2002. Synochronization of *Oryza sativa* L.. C.V. Taipei-309 Cell Suspension Culture. Acta. Biol. 46 (3-4): pp.39-41.

Mizuguchi, S., Ohkawa, M. and Ikekawa, T., 1994. Effects of Naphthaleneacetic Acid and Benzyladenine on the Growth of White Callus and Formation of Bulblet from Callus Induced from Mother-Scale of *Lillium*. J. Jap. Soc. Horti. Sci. 63: pp.131-137.

Mohammad, A.M.S., Abood, S.A. and Al-Saleh, H.S., 1991. Effect of Folate Analogous on Protein, RNA and DNA Contents of *Lettuce* callus . Iraqi , J. Biol. Sci. 11: pp.5-23.

Paul, J., 1970. Cell and Tissue Culture. Cancer Res. 4th - ed. London.

Poli, F., Bonora, A., Vannina, G.L., Bruni, A. and Fasulo, M.P., 1989. Callus Formation, Cell Suspension Culture and Plant Regeneration in *Ranunculs serbicus* Vis.J. Plant Physiol. 135: pp.637-639.

Skoog, F. and Miller, C.O., 1957. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue Cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: pp.118-130.

Street, H.E., 1977. Plant Tissue and Cell Culture. Black Well Scientific Publication. Oxford. London. Edinburgh. Melbourne .

Uchiyama, T., Numata, M., Terada, S. and Hosino, T., 1993. Production and Composition of Extracellular Polysaccharide from Cell Suspension Culture of Mentha. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 32: pp.153-159.

Wareing, P.F. and Philips, I.D.J., 1978. The Control of Growth and Differentiation of Plant. 2nd ed. Pergamon Press. Oxford.