استحداث وتمايز كالس نبات الشمر (الرزنايج) *Foeniculum vulgare* (Mill) وتكوين نباتات كاملة منه

عبد الله نجم النعيمي سهام احمد محمود مرا اسامة احمد الكاتب
قسم علوم الحياة – كلية التربية
جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2005/11/27 تاريخ القبول 2006/6/6

ABSTRACT

This study carried out the induction of callus from the explants (leaves, stems and roots) of the medicinal plants *Foeniculum vulgare* Mill (Fennel) by using MS medium which contained different concentration of growth regulators of Naphthalene acetic acid and Benzyl adenine (NAA + BA) or Indole acetic acid and Kinetine (NAA + Kin). The results indicated that solid MS medium with 1.0 mg/L from each of NAA and BA was the best for the induction and growth of callus. The callus of the explants used were amenable to regenerate and produce numerous shoots. Leaf callus gave the highest percentage of regeneration, then callus of stems and roots. Also, the results showed the one step regeneration occured for all the callus in the MS medium, especially, MS medium contained (NAA 1.0 mg/L + BA 1.0 mg/L). The regenerants were rooted in MS medium contained 1.0 mg/L of NAA or 2,4-D.

الخلاصـــة

تناولت الدراسة الحالية استحداث الكالس من الاجزاء (الاوراق، الـسيقان والجـذور) لنباتات الرزنايج (الشمر) *Foeniculum vulgare* Mill (Fennel) الطبية باستخدام وسـط MS الصلب المجهز بتراكيز متباينة من منظمات النمو (NAA و BA) او (IAA و Kin). وتبين ان وسط MS الصلب الحاوي 1.0 ملغم/لتر من كل من نفثالين حامض الخليك NAA والبنزايل ادنين BA كان افضل الاوساط المستخدمة لاستحداث الكالس وادامته. واظهر كالس الاجزاء المختلفة لنبات الرزنايج قابلية عالية على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية في الوسط

الزرعي، وقد اعطى كالس الأوراق اعلى نسبة لتكوين الافرع الخضرية، يليه كالس السيقان ثم الجذور. فضلاً عن حصول ظاهرة تكوين الافرع الخضرية بمرحلة واحدة One Step Regeneration ولانواع الكالس جميعا، وكان افضل وسط للتمايز هو وسط MS الحاوي 1.0 ملغم/لتر من كل من NAA و BA ، كذلك جذرت الافرع الخضرية في وسط MS الحاوي 1.0 ملغم/لتر من NAA او 2,4-D.

المقدمة

ينتمي نبات الشمر (الرزنايج) *Foeniculum vulgare* Mill الى العائلة المظلية Umbelliferae ، ويعد من النباتات الطبية المهمة لاحتوائه على الزيوت الطيارة والزيت العطري الموجود في البذور والاوراق والثمار (1).

وفي مجال الزراعة النسيجية والاكثار الخضري الدقيق فقد كان هنالك اهتمام كبير بالنباتات الطبية والنباتات المنتجة للزيوت الطيارة (2) ومن هذه النباتات الشمر Fennel (3) اذ تم الاكثار الخضري الدقيق لنبات الشمر عن طريق زراعة الانسجة التي شملت زراعة الاجزاء النباتية المشتقة من البادرات النامية في ظروف معقمة ثم تكوين الاعضاء الخضرية من كالس الشمر (4). وفي دراسة أخرى تناولت تأثير إضافة منظمات النمو في استحداث الكالس من قطع النبات المستأصلة من بادرات Fennel وثم تمايز الكالس الناتج (5) وفي الدراسة نفسها أختبر استحداث الكالس من الاجنة الجسمية. كما تناولت احدى الدراسات اختبار استحداث الاجنة الجسمية في صنفين من كالس نبات الشمر في وسط MS الصلب المدعم باضافة 1ملغم/لتر 2,4-D فقط او 0.3 ملغم/لتر Kin (6).

كما درس تأثير منظمات النمو في مستوى البولي امين في الأنسجة خلال استحداث الاجنة الجسمية للشمر Fennel (7). وأيضاً تأثير حامض الجبرلين في تعزيز إنتاج الاجنة الجسمية لنبات الشمر (8) وفي دراسة اخرى استحدث كالس نبات الشمر من زراعة المتوك وحبوب اللقاح على وسط MS الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم/لتر 2,4-D (9). كذلك دُرست أشكال الكالس المستحدث من زراعة أجزاء نباتات الشمر خارج الجسم الحي وميزات هذا الكالس المستحدث (10).

هدفت الدراسة الى التعرف على استجابة نبات الرزنايج (الصنف المحلي) في نظام الزراعة النسيجية ومدى قابلية هذا النبات على تكوين نباتات كاملة من الكالس نظراً لأهمية هذا النبات الطبي ولقلة او انعدام وجود دراسات عن الزراعة النسيجية لهذا النبات في القطر حسب المعلومات المتوفرة عنه.

مواد وطرائق العمل

مصدر البذور وإنتاج البادرات

وُفِرت بذور الشمر *Foeniculum vulgare* من السوق المحلية وعقمت بغمرها في محلول من الماء المقطر وهايبوكلورايت الصوديوم NaOCl بتركيز 6%و بمعدل 1 حجم مادة معقمة: 2 حجم ماء ولمدة 10 دقائق (11). زرعت البذور المعقمة على سطح 20 مل من وسط MS الصلب (12) الخالي من منظمات النمو في انابيب اختبار بمعدل بذرتين في كل انبوبة، وحفظت العينات في غرفة الزرع بدرجة حرارة 25 ± 2° م وظروف ظلام في الأسبوع الاول من الزراعة. بعد انباتها نقلت الى ظروف اضاءة 16 ساعة يومياً وبشدة 2000 لوكس وتحت الظروف أنفسها في اعلاه.

استحداث الكالس وحساب وزنه الطري

استعملت البادرات السليمة النامية في وسط MS الصلب في ظروف معقمة (الشكل1، A) بعمر 25 يوماً بوصفها مصدرا للاجزاء النباتية، اذ قطعت الاوراق والسيقان والجذور بطول 1سم لكل منها باستخدام مشرط معقم، زرعت الاجزاء النباتية في دوارق زجاجية حجم 100-125 مل والحاوية وسط MS الصلب المدعم بالبنزايل ادنين BA (بتراكيز 0.0 ، 0.5، 1.0 ملغم/لتر) مع نفتالين حامض الخليك NAA و (بالتراكيز 0.0 ، 0.5 ، 1.0 ملغم/لتر) واستخدمت التراكيز أنفسها مع استبدال البنزايل ادنين BA بالكاينتين kin والنفثالين حامض الخليك NAA بالاندول حامض الخليك IAA. وتمت الزراعة بمعدل 10 قطع /جزء نباتي/معاملة ويحسب الوزن الطري للكالس بعمر (21) يوماً.

تمايز الكالس

نقل الكالس المستحدث من قطع السيقان ، والاوراق والجذور بوزن 1 غم/قطعة على سطح 40-50 مل من اوساط التمايز المتضمنة وسط MS الصلب الحاوي تداخلات من البنزايل ادنين BA بتراكيز (0.5 و1.0 ملغم/لتر) مع نفثالين حامض الخليك NAA وبالتراكيز (0.0 ، 0.5 و1.0 ملغم /لتر) وبمعدل 6 قطع /معاملة وحفظت العينات في الحاضنة في الظروف السابقة الذكر.

تجذير الافرع الخضرية وتكوين النباتات الكاملة

استؤصلت الافرع الخضرية المتكونة وازيلت عنها بقايا الكالس وقطعت عند قاعدتها بوساطة مشرط حاد معقم ونقلت الى دوارق زجاجية حاوية 25 مل من وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو او MS الصلب الحاوي NAA بتراكيز 0.5 و 1.0 ملغم/لتر او وسط MS الصلب الحاوي 1.0 ملغم/لتر من IAA او 2,4-D لغرض تجذير هذه الأفرع الخضرية. وكان عدد الأفرع الخضرية المنقولة إلى أوساط التجذير 3 قطع / معاملة.

النتائج

أظهرت جميع الأجزاء النباتية المستأصلة من نباتات الشمر (الرزنايج) استجابة واضحة ومتباينة لاستحداث الكالس في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز مختلفة من منظمات النمو، اذ اعطت قطع السيقان اعلى استجابة ثم قطع الاوراق وبمدة زمنية (15- 21) يوما تلتها قطع الجذور وبمدة زمنية (21 - 28) يوماً.

واظهرت نتائج زراعة قطع سيقان نبات الشمر على وسط MS الحاوي لتداخلات مختلفة من منظمات النمو ان نسبة الاستحداث بلغت 100% في الاوساط الحاوية لتداخلات كل من (NAA وBA) او (IAA و Kin) وبالتراكيز (0.5، 1.0) ملغم /لتر. وتراوحت نسبة الاستحداث بين 50-70 % في الاوساط الحاوية لـ NAA او BA حسب و 30-60. % في الاوساط الحاوية لـ IAA او Kin حسب وبالتراكيز (0.5 ، 1.0) ملغم/لتر من مجموع المعاملات المستخدمة. ولم تظهر معاملة المقارنة الخالية من منظمات النمو اي تحفيز لاستحداث الكالس (الجدول 1).

كما اظهرت النتائج ان نسبة استحداث الكالس من قطع الاوراق على وسط MS الحاوي لتراكيز مختلفة من منظمات النمو بلغت 100% في الاوساط الحاوية لتداخلات كل من NAA و BA وبالتراكيز (0.5 و 1.0) ملغم / لتر. وتراوحت نسب الاستحداث من 20-50 % في الاوساط الحاوية لـ NAA او BA وبالتراكيز (0.5 و 1.0) ملغم/لتر وعند استبدال NAA بـ IAA و BA بـ Kin بلغت نسبة الاستحداث 100% في وسط MS الحاوي لـ 1.0 ملغم / لتر Kin وتداخله مع (0.5 و 1.0) ملغم / لترIAA.

الجدول (1): استحداث الكالس من قطع سيقان واوراق وجذور نباتات الشمر *Foeniculum vulgare* (Mill) في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من منظمات النمو

منظمات النمو (ملغم /لتر)		عدد القطع المنتجة للكالس			الإستحداث %		
NAA	BA	سيقان *	أوراق	جذور	سيقان	أوراق	جذور
0.0	0.0	0	0	0	0	0	0
0.0	0.5	5	3	0	50	30	0
0.0	1.0	6	5	3	60	50	30
0.5	0.0	5	2	0	50	20	0
0.5	0.5	10	10	5	100	100	50
0.5	1.0	10	10	8	100	100	80
1.0	0.0	7	4	2	70	40	20
1.0	0.5	10	10	7	100	100	70
1.0	1.0	10	10	9	100	100	90
IAA	**Kin**						
0.0	0.0	0	0	0	0	0	0
0.0	0.5	3	2	0	30	20	0
0.0	1.0	6	4	2	60	40	20
0.5	0.0	3	1	0	30	10	0
0.5	0.5	10	7	4	100	70	40
0.5	1.0	10	10	7	100	100	70
1.0	0.0	5	3	2	50	30	20
1.0	0.5	10	8	5	100	80	50
1.0	1.0	10	10	8	100	100	80

*عدد قطع الكالس المزروعة 10/ معاملة

في حين تراوحت نسب الاستحداث بين 10-40 % في الاوساط الحاوية لـــIAA او Kin فقط. وبلغت نسبة الاستحداث 70 % و 80 % في الوسطين الحاويين لـ 0.5 ملغم/لتر Kin وتداخله مع (0.5 و 1.0) ملغم / لتر IAA على التوالي (الجدول 1). فـــي حـــين لـــم تستجب اية قطعة في وسط MS الخالي من منظمات النمو.

وأظهرت نتائج (الجدول 1) انخفاض نسبة استحداث الكالس من قطع الجـــذور فـــي أوساط MS الحاوية تراكيز متباينة من NAA و BA حيث كانت أعلى نـــسبة لاســـتحداث الكالس في وسطي MS المدعمين بإضافة 1 ملغم/لتر BA وتداخله مع 1.0 و0.5 ملغم / لتر NAA إذ بلغت نسبة الاستحداث 90 % و 80% على التوالي. وبلغت هذه النسب 80 % و

70% على التوالي عند استبدال BA بـــ Kin و NAA بـــ IAA وبـنفس التراكيـز. وانخفضت هذه النسب في الأوساط الأخرى لتتراوح بين 20-70% فيما لم تعـط معاملـة المقارنة و المعاملات الحاوية 0.5 ملغم/لتر من أحد منظمات النمو اية استجابة (الجدول 1).

ومن نتائج هذه الدراسة تبين ان وسط MS المدعم بـ1.0 ملغـم / لتر مـن كل من (BA و NAA) كان أفضل الأوساط المستخدمة لاستحداث الكالس بدلالة نسبة الاسـتحداث العالية 100 % للسيقان والأوراق و 90 % للجذور.

وبدلالة الوزن الطري للكالس الناتج مقارنة بالأوساط الأخرى، بلـغ وزن الكـالس المستحدث من قطـع الأوراق (2.75) غـم والـسيقان (1.9) غـم والجـذور (1.2) غـم. واتصف الكـالس المستحدث مـن قطع الأوراق والسيقان والجذور بلونه الأخـضر الفـاتح وقوامه الهش (الشكل 1 B ، C ، D على التوالي).

وقد رافقت مرحلة تكوين الكالس في وسط MS المدعم بتراكيز متباينة من منظمـات النمو عملية تكوين الأفرع الخضرية من كالس الاوراق والسيقان والجذور في الوسط نفسه اي بمرحلة واحدة (الشكل 1 E ، F ، G) على التوالي.

أوضحت نتائج اختبارات قدرة الكالس على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من NAA و BA ان كالس الأوراق اظهر أعلى قابلية على تكوين الأفرع الخضرية، يليه كالس السيقان ثم الجذور (الجدول 2). كمـا لـوحظ مـن النتائج ان الوسط MS الحاوي 1.0 ملغم/لتر من كل من NAA و BA كان الأفـضل فـي تمايز كالس الأجزاء النباتية المستخدمة لنبات الشمر مقارنة بالأوساط الأخرى المستخدمة في هذه الدراسة (الجدول 2). أما وسط MS الحاوي 0.5 او 1.0 ملغم/لتر NAA فقـد كـان مشجعاً لإنتاج الجذور فقط.

الجـدول (2): تكـــوين الأفرع الخضرية من تمايز كالس أجزاء نباتات الشمر *Foeniculum vulgare* (Mill) في وسط MS الصلب المدعم بتراكيز متباينة من منظمات النمو(NAA و BA)

منظمات النمو (ملغم /لتر)		عدد الأفرع الخضرية المتكونة/ معاملة		
NAA	BA	كالس الأوراق*	كالس السيقان	كالس الجذور
0.0	0.5	5	4	–
0.0	1.0	15	8	3
0.5	0.5	9	6	2
0.5	1.0	26	18	6
1.0	0.5	12	10	2
1.0	1.0	36	30	9
مجموع الأفرع المتكونة		103	76	22

عدد قطع الكالس 6/ معاملة.

وزن القطعة الواحدة 1غم.

أظهرت النتائج ان التجذير حصل عند نقل الأفرع الخضرية الى الوسط MS الصلب الحاوي 1.0 ملغم / لتر NAA او 2,4-D إذ تكونت نباتات كاملة وكانت نسبة الأفـرع المجـذرة 100% ، وعددها 6 افرع في حين لم تجذر الأفرع الخضرية في الوسط MS الصلب الحاوي 0.5 ملغم / لتر NAA او 1.0 ملغم / لتر IAA .

الشكل (1): تكوين نباتات من كالس الأجزاء المختلفة لنباتات الشمر (الرزنايج) *Foeniculum vulgare* Mill في وسط MS الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم/لتر من كل من NAA و BA.

A: بادرات نبات الشمر بعمر 25 يوم نامية في وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو.

B: الكالس المستحدث من قطع الاوراق بعد مرور 15 يوماً.

C: الكالس المستحدث من قطع السيقان بعد مرور 15 يوماً.

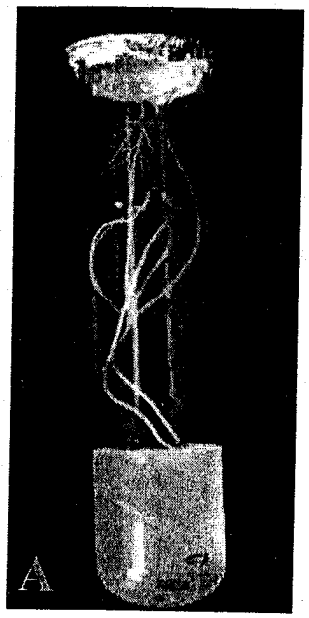
D: الكالس المستحدث من قطع الجذور بعد مرور 21 يوماً.

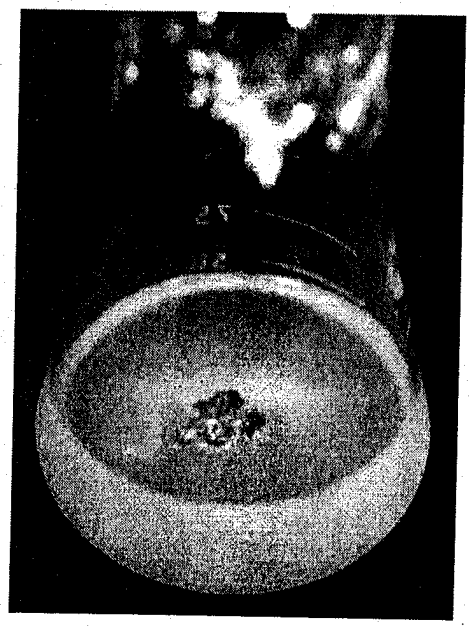
E: افرع خضرية متكونة من كالس الاوراق في وسط الاستحداث وبمرحلة واحدة بعد مرور 14 يوماً على استحداث الكالس.

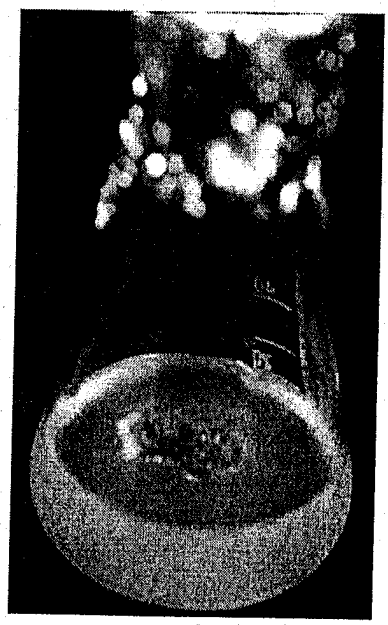
F: افرع خضرية متكونة من كالس السيقان في وسط الاستحداث وبمرحلة واحدة بعد مرور 14 يوماً على استحداث الكالس.

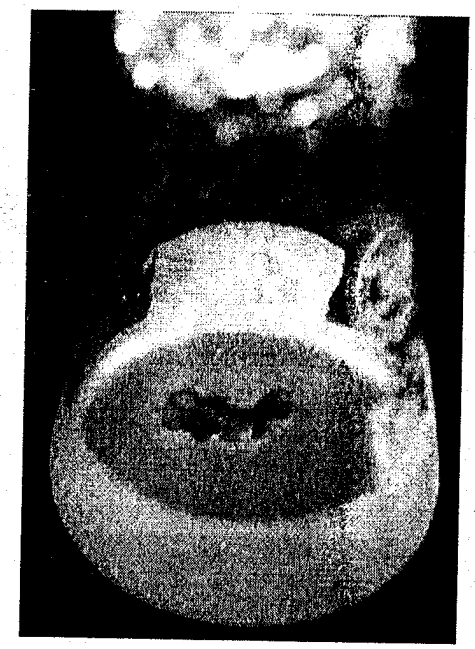
G: افرع خضرية متكونة من كالس الجذور في وسط الاستحداث وبمرحلة واحدة بعد مرور 21 يوماً على استحداث الكالس.

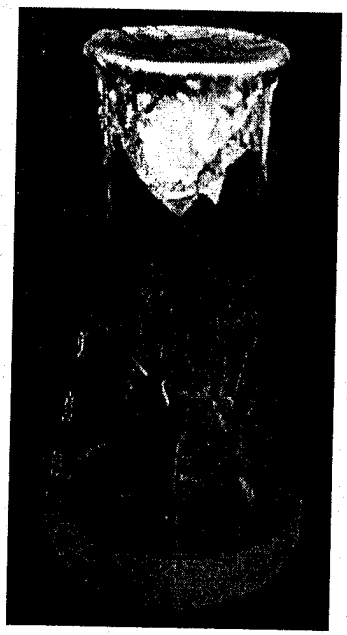
H: قابلية الافرع الخضرية المتكونة من كالس الاوراق على تكوين المجموع الجذري في وسط MS الصلب الحاوي 1.0 ملغم/لتر NAA.

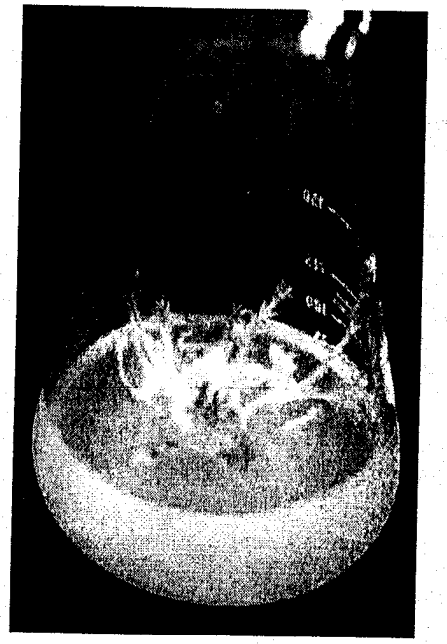

A

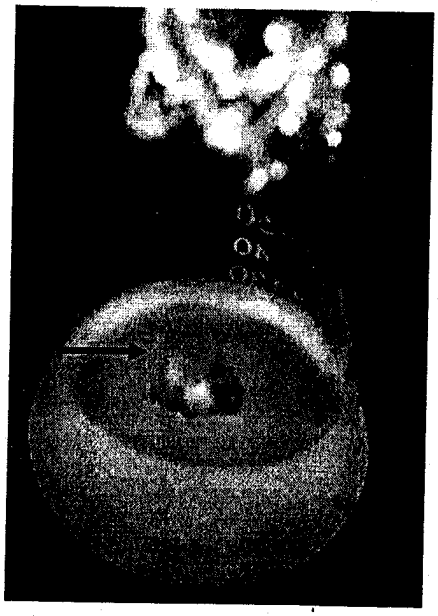


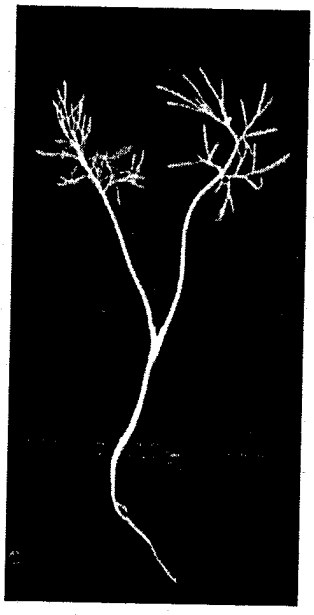












المناقشة

عموماً أشارت نتائج الدراسة الحالية الى الاستجابة الجيدة لنباتات الشمر (الرزنايج) *Foeniculum vulgare* لنظام الزراعة النسيجية متمثلة بنجاح السيقان، والأوراق والجذور في استحداث الكالس. وكانت أعلى استجابة لاستحداثه من قطع السيقان تلتها قطع الأوراق ثم الجذور، وجاءت هذه النتائج مطابقة لنتائج نبات اليانسون الذي ينتمي لنفس العائلة المظلية (13). وهذا يوضح ان استحداث الكالس يعتمد على نوع الجزء النباتي وعلى التوافق بين المحتوى الداخلي للخلايا من الهرمونات النباتية والمضاف من منظمات النمو الى الاوساط الغذائية المستخدمة (14 ، 15)، فضلاً عن الطاقة الكامنة للخلايا وعددها مما يدعم معدلات انقسامها لتكوين الكالس (16) .

وعلى الرغم من التباين في مستوى منظمات النمو المضافة فإنها لم تسبب ظهور اختلافات في بنية كالس الجزء النباتي المعين وتركيبه، وهذا يؤكد الدور البارز للجزء النباتي من حيث كونه عاملاً محدداً في استحداث الكالس (5) .

ان القابلية العالية للكالس الناتج من قطع الأوراق والسيقان والجذور على التمايز واعادة تكوين الأفرع الخضرية يعزى الى عدة عوامل منها مصدر الجزء النباتي ونمطه الجيني والوسط الغذائي وهذا ما لوحظ في احدى الدراسات التي تناولت عدد من النباتات الطبية منها نبات الشمر (4) .

وكانت أعلى نسبة للتمايز في وسط MS المدعم باضافة 1 ملغم / لتر من كل من NAA و BA وهذا يتفق مع بعض الدراسات التي اشارت الى دور منظمات النمو في الوسط الغذائي ومصدر الجزء النباتي فضلاً عن نوع النبات في تحفيز عملية التمايز (5 ، 13).

ان تمايز كالس الأوراق في المرتبة الأولى ثم السيقان والجذور قد يعزى ذلك الى استجابة هذا الكالس لظروف الوسط المستخدم واحتوائه على مستويات معينة من منظمات النمو مقارنة بباقي الأجزاء النباتية المستخدمة او قدرة خلاياه على التمايز (14) او ربما يعزى الى طبيعة الجزء النباتي كمصدر للكالس وكذلك نوع وتركيز منظمات النمو في الوسط الغذائي (17) .

كما بينت النتائج القابلية العالية لقطع الاوراق والسيقان والجذور على تكوين الكالس وانتاج الافرع الخضرية في الوسط نفسه وبمرحلة واحدة دون الحاجة الى نقل الكالس الى اوساط التمايز وهي ظاهرة مرغوبة في الزراعة النسيجية، ويبدو ان بعض النباتات التي لها استخدامات طبية تمتاز بقدرة متميزة على انتاج نباتات كاملة في مرحلة واحدة مثل نبات

عنيب الذيب (18) والحلبة (19) فضلا عن نبات اليانسون (13) الذي ينتمي الى نفس العائلة المظلية.

وان القابلية العالية للكالس على انتاج النباتات في مرحلة الاستحداث قد يعزى الى النمط الوراثي لخلايا هذا النبات والى الاستجابة العالية لنباتات ذوات الفلقتين لنظم الزراعة النسيجية مقارنة بنباتات ذوات الفلقة الواحدة (20).

ان عملية التجذير للأفرع المتكونة في هذه الدراسة لم تتم إلا بإضافة احد الاوكسينات NAA او 2,4-D بتركيز 1ملغم/لتر الى وسط MS الصلب، وربما يعزى الى قلة احتواء هذه الافرع الخضرية من الاوكسينات او لتوافق المضاف من هذه الاوكسينات بهذه التراكيز الى الوسط الغذائي في دعم عملية تكوين الجذور، وهذا ما لاحظته بعض الدراسات (9 ، 21).

المصادر

1. Piccaglia R. and Marotti M., J.Agric food chem. Jan 239-1:44-49 (2001).
2. Bajaj Y. P. S., Medicinal and aromatic plants II .Berlin, Springer – Verlag (1989).
3. Peter KV., Indian–Journal of Agricultural sciences, 68:8 special Issue, 527-532 (1998).
4. Sajina A. , Geetha S. P. , Minoo D. , Rema S., Calicut India. 8:79-86 (1997).
5. Anzidei M., Bennici A., Schiff S., Tani C., Mori B., Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 61(1):69-79 (2000).
6. Theiler–Hedtrich and Kagi A.C., ISHS Acta Horticulturae 300. V1 No.58 Italy (1992).
7. Maatar A. and Hunault G., Sciences de la Vie 320(3):245-251 (1997).
8. Hunault G. and Maatar A., Plant cell tissue and organ cultre. 41(2): 171-176 (1995).
9. Matsubara S. , Dohya N., Murakami K., ISHS Acta Horticulturae 392 V(1) N 32(1995).

10. Anzidei M and Vivona L. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 45(3): 263-268 (1996).

11. حياوي، سهام احمد محمود. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل (2001).

12. Murashige T. and Skoog F., Physiol. plant . 15:473-797 (1962).

13. النعيمي، عبد الله نجم ومحمود، سهام احمد. مجلة التربية والعلم، 17(1):95-109 (2005).

14. Hartmann H. T., Kester D. E. and Davies F. T., Plant propagation, principles and practices. 5th ed. Prentice. Hall Inter. Limited, London, U. K. (1990).

15. Bela J. and Shetty K., J. Food Biochem. 23(1):17-32 (1999).

16. Negrutui I., Jacobs M. and Dorina C., Z. Pflanzen Physiol., 86:113-124 (1978).

17. Dixon R. A., Plant Cell Culture, IRL Press. Oxford, U. K. (1985).

18. Salih S. M. and Al- Mallah M. K., Dirasat Agricul. Sci., 27:64-71 (2000).

19. ياسين، جاسم محمد والملاح، مزاحم قاسم. مجلة التربية والعلم، 46: 17 -27 (2000).

20. Lazzeri, P. A; Suengo, J; Williams, E. G. and Collins, G. Plant Cell Reports. 7: 517 – 520 (1988).

21. يونس، اواب وعد الله. محتوى القلويدات في الكالس والنباتات الناتجة منه في النبات البري الداتوره *Datura innoxia* Mill. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل (1997).