---- مجلة علوم الرافدين، المجلد 19، العدد 1، ص1-14، 2008 ----

فصل وتشخيص بعض الاوكسينات والسايتوكاينينات في بادرات وكالس نبات الحبة السوداء *Nigella sativa L.*

رحاب عبد الجبار البكر

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2007/8/8، تاريخ القبول 2007/10/1)

الملخص

تضمنت الدراسة الكشف عن محتوى كالس وبادرات الحبة السوداء *Nigella sativa L.* من الاوكسينات والسايتوكاينينات، وتم التحري عن وجود IAA (Indole-3-acetic Acid) و 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid) من الاوكسينات وBA (Benzyl Adenine) والكاينتين Kinetin من السايتوكاينينات، وحضر المستخلص النباتي النقي للكالس والبادرات باستخدام الكحول الاثيلي المطلق 80%، وشخصت منظمات النمو في المستخلصات باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) Thin Layer Chromatography Technique للفصل والكشف عن وجود الاوكسينات والسايتوكاينينات، وتبين من خلال هذه التقنية ان قيمة Rf البقع المفصولة من مستخلص الكالس (0.97 / 0.62 / 0.96) مقاربة لقيمة الـ Rf للبقع المفصولة من العينة القياسية IAA و 2,4-D بالنسبة للاوكسينات وبالنسبة للسايتوكانينيات اذ كانت (0.95 / 0.67 / 0.96) على التوالي. كما بينت النتائج ان قيمة Rf البقع المفصولة من مستخلص البادرات (0.94 / 0.78 / 0.95) مقاربة لقيمة Rf لبقع IAA بالنسبة للاوكسينات والكاينتين والـ BA بالنسبة للسايتوكاينينات (0.95 / 0.74 / 0.96) على التوالي.

كما تم تقدير كمية الـ IAA في مستخلص الكالس والبادرات لنبات الحبة السوداء بطريقة لونية وباستخدام كاشف سالكوسكي Salkoweski، وتبين من خلالها ان محتوى البادرات من IAA يصل الى 0.0205 ملغم / غرام وزن طري (وهي تعادل 20 مايكروغرام) وهو مستوى اعلى من الكالس الذي تبين ان محتواه من IAA وصل الى 0.011 ملغم / غرام وزن طري (وهي تعادل 11 مايكروغرام).

Isolation and Diagnosis of Some Auxins and Cytokinines in Seedlings and Callus of *Nigella sativa* L.

Rehab A. Al-Baker
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

This study included detection the content of callus and seedlings of *Nigella sativa L.* IAA (Indole-3-acetic Acid) and 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid) of Auxins, BA (Benzyl Adenine) and kinetin of the cytokinines, the pure extraction of callus and seedlings were prepared by the use of 80 % Ethanol, diagnosis of plant growth regulators was carried out by using thin layer chromatography technique (TLC) which proved that Rf values of spots separated from callus were (0.97 / 0.62 / 0.96) which were nearly to that Rf values of the spots of standards of IAA, 2,4-D and BA which were (0.95 / 0.67 / 0.96) respectively. Also the results showed that the Rf values of spots separated from seedling extract were (0.94 / 0.78 / 0.95) which were nearly that Rf of IAA, BA and kinetin (0.95 / 0.74 / 0.96) respectively.

colorimetric method depended on salkoweski reagent was used for estimation of IAA in callus and seedling extracts of *Nigella sativa*, the results showed that seedling content of IAA almost reached to 20 Mg/g fresh weight, while callus extract gives 11 Mg/g fresh weight.

المقدمة

يعد النمو في النبات بصورة واضحة عملية منظمة ثابتة الخطوات كما تعد الهرمونـات النباتيـة عوامل مهمة جداً في أكمال فعاليات النمو، ويعرف الهرمون النباتي انه مادة عضوية غير كونهـا مـادة غذائية (المادة التي تجهز كلاً من الكاربون والطاقة والعناصر المعدنية الضرورية) ويكون فعالاً بكميـات قليلة جداً (أي مقدار اصغر من 1 مليمول) وهو يتكون في اعضاء خاصة للنبات وينتقل الى مواقع اخرى ليظهر استجابة كيماحياتية او فسلجية او استجابات شكلية بصورة خاصة، وانـواع الهرمونـات النباتيـة المصنفة هي: الاوكسينات Auxins والسايتوكانينيات Cytokinins والجبريلينات Gibberellins وحامض الابسيسك Abscisic acid ومثبطات النمو كالاثلين وغيره (محمـد، 1982 ; وصـفي، 1998 ; Plant Hormones). والاوكسينات مواد عضوية تنتج بصورة طبيعية في النباتـات الراقيـة (محمـد، 1985). وثبت ان الاوكسينات ينحصر اماكن تكوينها في المناطق المرستيمية وان لها خاصـية الانتقـال القطبـي وتختلف سرعته من (0.5 – 1.5) سم / ساعة تبعاً للنوع والعمر ونوعية النسيج الناقل، وقد يصل تركيز الاوكسين في النبات الى (10-120 ملغم / غرام) مادة جافة وهي كمية ضئيلة جـداً (محمـد، 1982 ; الهرمونات النباتية) ويعد الـ IAA الاوكسين الرئيسي في النبات، ويتكون من مسارات ايضية يكون فيها الحامض الاميني التربتوفان هو البادئ لهذه المـسارات (Davies ، 1995 ؛ حمـزة وعملـة، 1999).

شخص الـ IAA في النباتات من قبل Kogl و Thimann (1934) واعقب ذلك محاولات للعديـد مـن الباحثين في الفسلجة النباتية للكشف عن هذا الاوكسين او غيره في عدد من النباتـات (محمـد، 1982 ; العاني، 1990) والتعرف على ميكانيكية عمله الا انه لحد الان لا توجد دراسة متكاملة توضح ميكانيكيـة عمل IAA بشكل واضح ومتكامل (Nihal et al., 2003). ان نجاح أي بحث في هذا المجال يعتمد على الطريقة الصحيحة لاستخلاص الاوكسين وقياس الكمية المستخرجة، والطرق المستعملة فـي اسـتخلاص الاوكسين تعتمـد علـى اسـتعمال المـذيبات الايثـر الاثيلـي او الكحـول الاثيلـي او الكلوروفـورم (Hillman,1978 ; محمد، 1982).

اما الاكتشاف الرئيسي للسايتوكاينينات فأنه حدث سـنة 1955 مـن قبـل Miller و Skoog و Saltza اذ اثبتوا انه فعال في الانقسام الخلوي لكالس نبات التبغ، ووصفت السايتوكاينينات بانها مـشتقات للادنين من البيورينات ولها مجاميع تتصل في موقع النتروجين رقم -6- من حلقة الادنين، وقد اشـارت البحوث السابقة ان فعالية السايتوكاينينات تتحدد بصورة رئيسية بهذه المجاميع المتصلة بالنتروجين بحلقـة الادنين (Roberts and Whitehouse, 1976 ; محمد، 1982 ; Plant Hormones).

ومن المعروف ان ايض الاوكسينات والسايتوكاينينات يوثر بشكل مباشر في تنظيم النمو والتطور للنبات (Markus et al., 2000 ; Street, 1977). وفي انظمة الزراعة النسيجية يتطلـب نمـو الكـالس وجود توازن بين تركيز الاوكسين والسايتوكاينين المضافة الى الوسط الغذائي الا في حالات خاصة يعتمد نمو الكالس على وجود الاوكسين لوحده وهذه الحالات تفسر علـى ان محتـوى القطعـة النباتيـة مـن السايتوكاينينات عالي بحيث يعتمد على هذا المحتوى في تحفيز استحداث الكالس ونموه، وحالات اخـرى يكون العكس يعتمد نمو الكالس علـى وجـود سـايتوكاينين فقـط اذ ان القطعـة النباتيـة المزروعـة تحـوي مـستوى كـافي مـن الاوكـسين يعتمـد عليـه فـي اسـتحداث الكـالس ونمـوه (Dodds and Roberts, 1985 ; Street, 1977). كما اشارت احدى الدراسات ان النمو ومحتوى IAA في كالس نبات الحبة السوداء يتاثربالضوء ومكونات الوسط الغـذائي (Chattopadhyay et al., 1980)، كما اشارت دراسة اخرى ان محتوى نبات التبـغ مـن IAA يمكـن ان يتـاثر بحـدوث تحـوير فـي الجينات (Shinnosuke et al., 1998).

إن استحداث الكالس ونموه من قطع البادرات لنبات الحبة السوداء تم تناوله في دراسـات سـابقة على وسط MS المجهز بمستويات مختلفة من منظمات النمو وثبت ان افضل وسط لتحفيزه ونمـوه هـو وسط MS المدعم بـ 10^{-6} مولار من 2,4-D فقط بدون وجود السايتوكاينينات، اذ بلغ وزن الكالس بعد مرور (100) يوم (44.4) غرام (البكر، 2002) وان هذه النتيجة دعت الى صياغة هدف لهذه الدراسـة وهو التحري عن محتوى نبات الحبة السوداء متمثلة بالبادرات من السايتوكاينينات والاوكسينات ومقارنته بمحتوى الكالس للنبات نفسه وهذا مما لاشك فيه يخدم في تسليط الضوء على الاوساط المحفزة للنمو فـي الزراعة النسيجية لهذا النبات.

المواد وطرائق العمل

1- تنمية بادرات الحبة السوداء:

عقمت بذور الحبة السوداء حسب طريقة (البكر، 2002) وزرعت على وسط Arnon و Hoagland (Arnon and Hoagland, 1940 , 1944) اجريت جميع الخطوات في جو معقم وخال من الملوثات باستخدام جهاز النقل ذي الجو معقم (Hepaire) وتم تنمية البادرات في حاضنة النمو Growth Chamber بدرجة حرارة (22 ± 1 0 م) والمجهزة بالاضاءة 1500 لوكس وبتعاقب يومي لمدة (16) ساعة ضوء و (8) ساعات ظلام، لحين الحصول على بادرات بعمر (21) يوم.

2- تنمية كالس الحبة السوداء:

تم الحصول على كالس الحبة السوداء بعمر (100) يوم من قطع السيقان لبادرات الحبة السوداء بعد تنميتها وادامتها على وسط MS المدعم بـ 10^{-6} مولار من 2,4-D (علما انها تعادل 0.221 ملغم / لتر) والذي عد الوسط القياسي لاستحداث الكالس ونموه (البكر، 2002).

3- تحضير مستخلص الكالس والبادرات للحبة السوداء:

تم تحضير المستخلص النقي لكالس وبادرات الحبة السوداء باستخدام طريقة محورة عن Wasfy (Wasfy et al.,1975); (Khorshid, 2004) وعلى النحو التالي:

أ- اخذ (20) غرام وزن طري من الكالس والاجزاء الخضرية من البادرات وسحقها كل على حدا باستخدام Homogenizer في (100) مل من الايثانول المطلق، وترك 48 ساعة بدرجة حرارة 5°م.

ب- رشح المستخلص باستخدام ورق ترشيح (No. 2).

ج- تم التخلص من الايثانول من الراشح باستخدام المبخر الدوار بدرجة حرارة 45°م حيث تم التبخير لحين الحصول على مستخلص مركز، بعدها اكمل الحجم الى 60 مل باستخدام ماء مقطر مرتين واضيف اليه 1 مل من محلول 40 % اسيتات الرصاص القاعدي Alkaline lead acetate وقطرات من محلول 22 % اوكزالات البوتاسيوم Potassium oxalate.

د- بعد الاضافة اجري له طرد مركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 12 دقيقة.

هـ اخذ الراشح وقسم الى قسمين متساويين.

و- ضبط الرقم الهيدروجيني pH للقسم الاول الى (3.5) باستخدام HCl (2N)، ثم غسل ثلاث مرات وفصل باستخدام حجم مساوي من Diethyl ether حيث تطرح الطبقة المائية بينما تؤخذ طبقة Diethyl ether وتبخر باستخدام درجة حرارة 30 ^{0}م لحين الجفاف، واضيف الى المستخلص المجفف 15 مل من الكحول المثيلي المطلق، ثم جفف باستخدام المبخر الدوار لحين الحصول على 5 مل بدرجة حرارة 45 ^{0}م وحفظ بالتجميد لتشخيص الاوكسين.

س – يؤخذ القسم الثاني من الراشح في الخطوة (هـ) وضبطت قيمة الـ pH الى (8) باسـتخدام (1%) NaOH وفصل ثلاث مرات مع حجم مساوي من Ethyl acetate كما ذكر في الخطوة (و) لحـين الحصول على مستخلص مركز، وحفظ في التجميد لحين تشخيص السايتوكاينين.

4- التشخيص:

لغرض تشخيص الاوكسينات والسايتوكاينينات من المستخلص النباتي استخدمت تقنية الـ TLC:

أ- فصل IAA باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC):

تم الفـصل حـسب طريقـة (Kaldewey and Stahl, 1964 ; Stahl and Kaldewey, 1961) واستخدمت صفائح كروماتوكراف من نوع (Silica gel , 20x 20 cm) وبسمك 0.2 ملم. اضيفت عينات المستخلصات (البادرات والكالس) المراد فصلها واستخدم IAA و 2,4-D القياسي المحضرين بتركيز (10 ملغم / لتر) لكل منهما كمعاملة سيطرة على بعد (2.5 سم) من بداية الصفيحة باستخدام انابيـب شـعرية على امتداد خط البداية، واعيد تحميلها ثلاث مرات، بعدها تركت الصفيحة لجفـاف العينـات، واسـتخدم محلول الفصل (Chloroform : methanol : 35 % ammonia) (80 : 25 : 0.1 : V : V: V) وضـعت الصفيحة في حوض الفصل وتركت في درجة حرارة الغرفة لحين اكتمال جريان محلـول الفـصل الـى الطرف الاخر للصفيحة (90) دقيقة، رفعت بعد ذلك من الحاوية وتركت لتجف وفحصت تحـت مـصدر للاشعة فوق البنفسيجية، كما استخدم الايودين (Iodin) ايضاً لكشف مواقع البقع، وحسبت قيم معدل مسافة الجريان (Rf) للبقع المفصولة من المستخلصات وقورنت مع المعاملة القياسية.

ب- فصل السايتوكاينينات باستخدام تقنية TLC :

استخدم الـ Kinetin و BA بتركيز (10 ملغم / لتر) كمحاليل قياسية للـسايتوكاينينات بـنفس الخطوات السابقة لكن حـسب طريقـة (Playtis and Leonard, 1971) اذ اسـتخدم محلـول الفـصل (Chloroform : methanol (9:1)) واتبعت نفس الخطوات الـسابقة لتقـدير قيمـة (Rf) لكـل مـن المستخلصات ومعاملة السيطرة.

5- التقدير الكمي للـ IAA في المستخلص النباتي بالطريقة اللونية:

اتبعت طريقة كاشف (Salkowski) لتقدير كمية IAA (حمزة، 1992) حسب الخطوات الاتية:

أ- حضر محلول اصلي من IAA بتركيز (100) ملغم / لتر ثم حضر (10) مل من التراكيز الاتيـة: 0.0 ، 0.5 ، 1.0 ، 10 ، 20 ، 40 ملغم / لتر ، باستخدام الماء المقطر.

ب- أجري اختبار اللون باضافة (2) سم^3 من كل تركيز فضلا عن المستخلصات النباتية (الكالس والبادرات) الى (8) سم^3 من كاشف Salkowski في انبوبة اختبار، وتم مزج المحلولين بلطف لمدة نصف ساعة تماماً.

ج - تم قراءة شدة امتصاص المحاليل للضوء بواسطة جهاز المطياف الضوئي sp-600 Spectrophotometer عند طول موجي (525 نانوميتر).

د- تم تثبيت العلاقة بين شدة الامتصاص والتراكيز المستعملة لعمل المنحني القياسي، ثم عين تركيز IAA في مستخلص البادرات والكالس.

النتائج والمناقشة

اولاً: فصل وتشخيص الاوكسينات في مستخلص كالس وبادرات الحبة السوداء باستخدام تقنية الفصل TLC:

بينت نتائج الفصل باستخدام تقنية الفصل TLC ان قيمة معدل مسافة الجريان (Rf) للبقعة المفصولة من IAA القياسي (10 ملغم / لتر) بلغت (0.95)، اما قيمة Rf للبقعة المفصولة من 2,4-D القياسي (10 ملغم / لتر) كانت (0.67) (الجدول 1). اما مستخلص الكالس فقد لوحظت ثلاث بقع مختلفة وبلغت قيمة الـ Rf لها (0.62 /0.85 /0.97) على التوالي (الجدول 1)، ومن مقارنة قيم الـ Rf يتبين ان البقعة الاولى المفصولة من مستخلص الكالس (0.62) مشابهة تقريباً للبقعة المفصولة من 2,4-D القياسي (0.67) الا ان حجم البقعة المفصولة من 2,4-D القياسي اصغر وذات تألق واضح اكثر من البقعة المفصولة من مستخلص الكالس ذات اللون الفاتح والحجم الاكبر (الصورة 1 ـ ب، ج) وهذا بطبيعة الحال سببه ان 2,4-D القياسي ذات درجة نقاوة عالية وتركيز اكثر من 2,4-D المفصول من مستخلص الكالس وتوضح هذه النتائج ان مستخلص الكالس يحوي على 2,4-D لكن بتركيز اقل من العينة القياسية للـ 2,4-D (10 ملغم/لتر)، ومن المعروف ان فصل الهرمون النباتي النقي او ما يسمى القياسي يعطي نتائج اوضح من نفس المركب فيما اذا استخلص من انسجة حية (محمد، 1982) اضافة لذلك فان تركيز 2,4-D المستخلص من الكالس هو اقل بكثير من ذلك القياسي (10 ملغم/لتر) اذ ان التركيز المضاف الى وسط MS هو (6-10 مولار وهو مايعادل 0.221 ملغم /لتر) (البكر، 2002) علما ان مايصل من منظمات النمو المضافة الى الوسط الغذائي لخلايا الكالس يتحدد بعوامل عديدة منها نشاط الخلايا من حيث معدل النمو والانقسام وعمر الكالس (Street, 1977). اما البقعة الثانية المفصولة من مستخلص الكالس والتي كانت قيمة الـ Rf لها (0.85) (الجدول 1) فهي لا تشابه قيمة الـ Rf سواء للبقعة المفصولة من IAA او 2,4-D، لكنها اقرب الى الـ IAA وهي ربما تمثل احد المركبات الاندولية او ان يكون اوكسين مرتبط حيث ان المسار الحيوي لبناء IAA في الخلايا النباتية الحية يتمثل بعدد من المركبات الاندولية التي بتحولها من صيغة الى اخرى تصل الى تكوين الـ IAA بصيغته النهائية

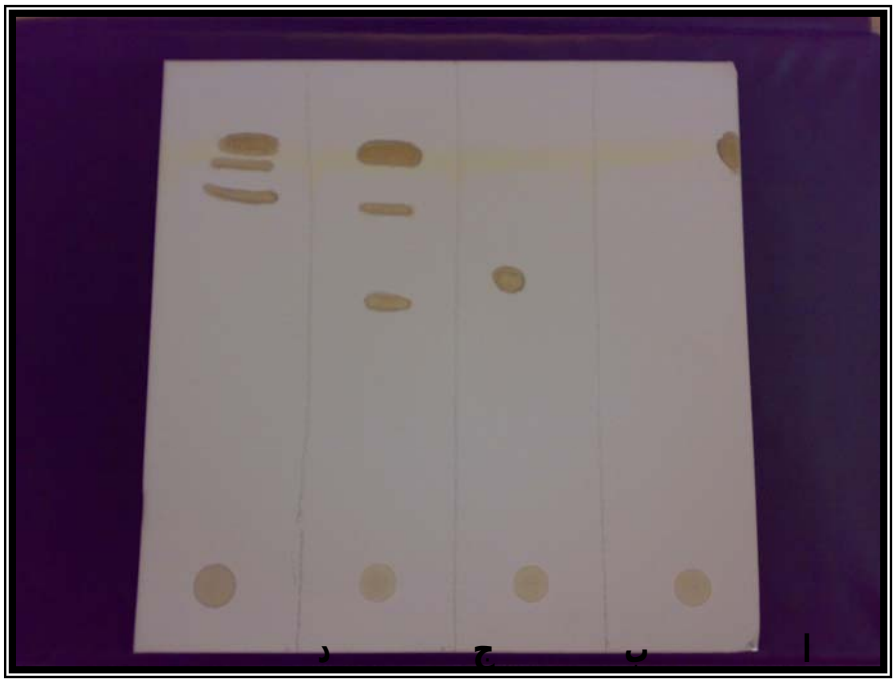
كهرمون نباتي (Nihal et al., 2003) ويمكن القول ان الخلايا النباتية لابـد ان تحتـوي على نسب من هذه المركبات فضلا عن احتوائها على IAA باشكاله المعروفة الحر والمـرتبط (محمـد، 1982) واما البقعة الثالثة المفصولة من مستخلص الكالس فكانت قيمة الـ Rf لها (0.97) وهي قريبا جدا من قيمة الـ Rf للـ IAA القياسي الا ان البقعة المفصولة من الـ IAA القياسي ذات حجم اصغر ولون اعمق (الصورة 1 ـ ج، أ). ويعود محتوى الكالس من IAA الى ما تحمله القطعة النباتيـة المـستحدث منها الكالس من مستوى داخلي من الاوكسين الرئيسي المصنع في النبات طبيعيا (محمد، 1982). وبينت نتائج الفصل والتشخيص لمستخلص البادرات ظهور ثلاث بقع متقاربة وكانـت قيمـة Rf لهـا (0.87 / 0.94 / 0.99) على التوالي (الجدول 1)، ونلاحظ من هذه النتائج ان قيمة Rf للبقعة الاولى لمـستخلص البادرات مشابهة لقيمة Rf البقعة الثانية لمستخلص الكالس وكانت (0.87) والتي لم تشابه قيمة Rf للـ IAA او 2,4-D وهذا يؤكد كون هذه البقعة هي لاحد المركبات الاندولية في النبات كمـا سـبق الكـلام اعلاه. اما البقعة الثانية لمستخلص البادرات فكانت قيمة Rf لها مقاربة لقيمة Rf للـ IAA اذ بلغـت (0.94) (الجدول 1) الا ان بقعة مستخلص البادرات ذات حجم اكبر ولون افتح من تلك المفـصولة مـن IAA القياسي حيث كانت اقل حجماً واعمق لوناً (الصورة 1 ـ د، أ) وهذا يشير الى ان تركيز IAA في مستخلص البادرات اقل من العينة القياسية وهو امر طبيعي اما البقعة الثالثة المفـصولة مـن مـستخلص البادرات فكانت قيمة Rf لها (0.99) وهي بالرغم من كونها غير مشابهة لقيمـة الـ Rf للـ IAA القياسي الا انها قريبة جدا منها. ان هذه النتائج تؤكد ان محتوى البادرات من الاوكسينات هو IAA بشكل رئيسي لانه الاوكسين الطبيعي في النبات (محمد، 1982 ; Plant Hormones).

الجدول 1 : قيمة معدل سرعة الجريان (Rf) للاوكسينات المفصولة من مستخلصات الكالس والبـادرات لنبات الحبة السوداء.

العينة		قيمة الـ Rf للبقع المفصولة
القياسية	IAA (10 ملغم/لتر)	0.95
القياسية	2,4 –D (10 ملغم/لتر)	0.67
الكالس *		0.62 0.85 0.97
البادرات **		0.87 0.94 0.99

* المستخلص النقي لكالس الحبة السوداء النامي على وسط MS القياسي بعمر 100 يوم.

** المستخلص النقي لبادرات الحبة السوداء النامية على وسط Arnon وHoaglandبعمر 21 يوم.



الصورة 1 : فصل الاوكسينات من مستخلصات كالس وبادرات الحبة السوداء باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقةالرقيقة TLC مقارنة بالاوكسينات القياسية.

أ- العينة القياسية لـ IAA بتركيز 10 ملغم/لتر.

ب-العينة القياسية لـ 2,4 –D بتركيز 10 ملغم/لتر.

ج- مستخلص الكالس النامي على وسط MS القياسي بعمر 100 يوم.

د- مستخلص البادرات النامية على وسط Arnon و Hoagland بعمر 21 يوم.

ثانياً: فصل السايتوكاينينات من مستخلص كالس وبادرات الحبة السوداء باستخدام تقنية الفصل TLC:

بينت النتائج ان قيمة Rf للكاينتين القياسي كانت (0.74) وBA القياسي (0.96) (الجدول 2) . اما نتائج فصل مستخلص الكالس فبينت فصل بقعتين وكانت قيمة الـ Rf لهما (0.86 و 0.96) على التوالي (الجدول 2)، ونلاحظ من هذه النتيجة ان البقعة الاولى المفصولة اعطت قيمة Rf مختلفة قليلا من قيمة الـ Rf للكاينتين وهي ربما تكون مركبات مشابهة وهذا يشير ان مستخلص الكالس يحوي على نسبة قليلة من الكاينتين او احد المركبات المشابهة له في التركيب ويعود محتوى كالس نبات الحبة السوداء من الكاينتين الى ماتحمله القطعة النباتية المستحدث منها الكالس من مستوى داخلي من السايتوكاينينات الموجودة طبيعيا في النبات (محمد، 1982) اما البقعة الثانية المفصولة من مستخلص الكالس فهي تتطابق تماماً مع قيمة الـ Rf للـ BA القياسي (0.96) وتقاربها بالحجم الى حد ما الا ان لون البقعة المفصولة يدل على ان العينة القياسية اكثر تركيزا (الصورة 2 ـ أ ، ب ، ج)ً وهذا يشير الى ان مستخلص الكالس يحتوي على نسبة من BA الا انها اقل من العينة القياسية، رغم ان منظم النمو BA لم تتم اضافته الى

وسط MS النامي عليه الكالس حسب ما ذكر (البكر، 2002) الا ان هذه النتائج تـاتي لتؤكـد ان نـسيج الكالس يحمل تراكيز معينة من BA والكاينتين تأتي مما تحتويه القطعة النباتية المزروعة وهـو بطبيعـة الحال يعبر عن نواتج المسارات الايضية الطبيعية للنبات ومنها مسارات بنـاء او هـدم النيوكليوتيـدات (Wareing and Phillips, 1978 ؛ محمد، 1982)، كما ان وجود بعض منظمات النمو النباتية في وسط النمو يؤثر على محتوى الكالس والقطعة النباتية المزروعة من الهرمونات النباتية اذ ان الهرمونات النباتية تتداخل فيما بينها في عملها وان تداخل الهرمونات يمكن تفسيره على اساس تنشيط الجينات والذي يعتمـد عليه اساسا في زيادة الوزن الطري (محمد، 1985). وقد وجدت احدى الدراسـات ان وجـود NAA و Kinetin في الوسط الغذائي يؤثر على مستوى IAA و Polyamine في القطعة النباتية ونسيج الكـالس لنبات *Soybean hypocotyls* (Zin, et al., 1997).

كما بينت نتائج الفصل بالنسبة لعينة البادرات ظهور ثلاث بقع مفصولة وكانت قيمة الـ Rf لهـا (0.78 /0.95 / 0.97) على التوالي (الجدول 2) ونلاحظ ان قيمة Rf البقعة الاولى المفـصولة مقاربـة لـقيمة Rf الكـاينتين (0.74) القياسـي الا انهـا اصـغر حجمـاً واقـل مـن حيـث درجـة اللـون (الصورة 2 ـ أ ، د)، وهذا يشير الى ان محتوى البادرات من الكاينتين اقل من العينة القياسية وهو امـر طبيعي فالكاينتين يوجد طبيعيا في النباتات فضلا عن وجود مركبات تشبه الكاينتين توجد طبيعيا في النبات (محمد، 1982)، كما ان قيمة Rf البقعة الثانية مقاربة لقيمة Rf بقعة BA اذ كانت (0.95) الا ان بقعـة BA اكثر تألقا (الصورة 2 ـ ب ، د) وهذا مما لاشك فيه يدل على ان مستخلص البادرات يحتوي ايضاً على BA كما يمكن ان تحدث بعض التحويرات التي تؤدي الى تكوين انواع اخرى من الـسايتوكاينينات غير الكاينتين (محمد، 1985) لان السايتوكاينينات تشتق اصلا من الادنين (Plant Hormone)، اما البقعة الثالثة فكانت قيمة Rf لها (0.97) وهي قريبة كذلك من قيمة Rf الـ BA والتي قد تعـود الـى BA او بعض مشتقاته، ان وجود BA او بعض مشتقات النيوكليوتيدات والنيوكليوسيدات في الخلايا الحية هو امر معروف وقد اكدت نتائج هذه الدراسة باحتواء نسيج الكالس والبادرات على مستويات من BA والكاينتين، وان مشتقات البيورينات تتواجد في الخلايا النباتية الحية ضمن مسارات ايضية مسؤولة عن بناء او هـدم هذه النيوكليوتيدات (Robert and Whitehouse, 1976 ؛ الجلبي، 1987).

وبشكل عام وجد من خلال الفصل باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة ان قيمة Rf البقع المفصولة من مستخلص الكالس (0.97 / 0.62 / 0.96) مقاربة لـ قيمة الـ Rf للبقع المفـصولة مـن IAA و2,4–D بالنسبة للاوكسينات وBA بالنسبة للسايتوكاينيات (0.96/0.67/0.95) على التوالي.

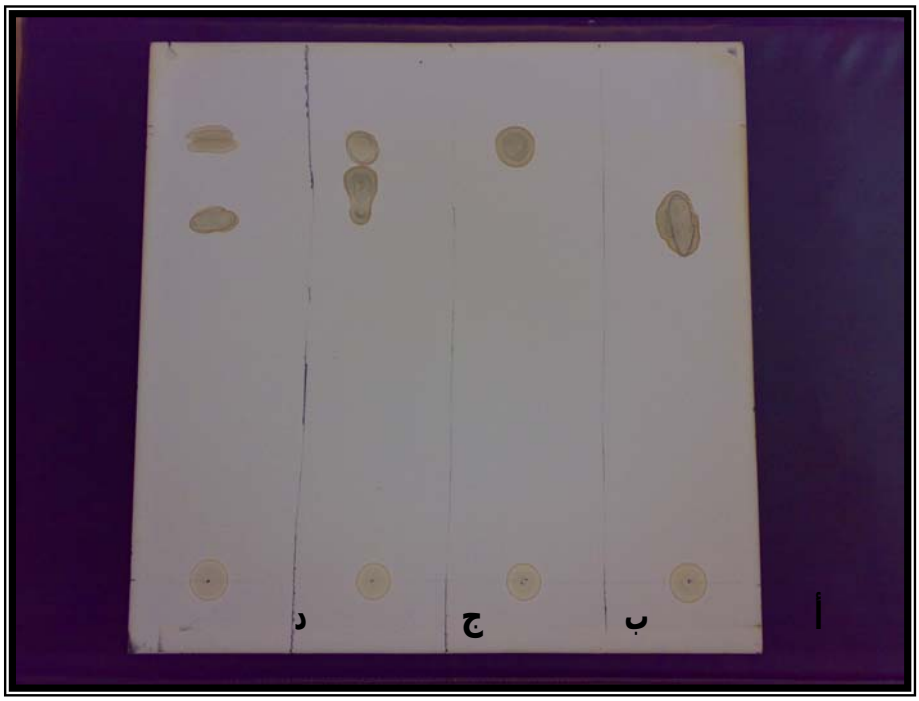
كما بينت النتائج في هذه التقنيـة ان قيمـة الـ Rf للبقـع المفـصولة مـستخلص البـادرات (0.94 / 0.78 / 0.95) مقاربة لـ قيمة الـ Rf للبقـع المفـصولة مـن IAA بالنـسبة للاوكـسينات والكاينيتين والـ BA بالنسبة للسايتوكاينينات (0.95 / 0.74 /0.96) على التوالي.

الجدول 2 : قيمة معدل سرعة الجريان (Rf) للسايتوكاينينات المفصولة من مستخلصات الكالس والبادرات لنبات الحبة السوداء.

العينة		قيمة الـ Rf للبقع المفصولة من كل عينة
القياسية	Kinetin (10 ملغم/لتر)	0.74
القياسية	BA (10 ملغم/لتر)	0.96
الكالس *		0.86 0.96
البادرات **		0.78 0.95 0.97

* المستخلص النقي لكالس الحبة السوداء النامي على وسط MS القياسي بعمر 100 يوم.

** المستخلص النقي لبادرات الحبة السوداء النامية على وسط Arnon وHoagland بعمر 21 يوم.



الصورة 2 : فصل مستخلصات كالس وبادرات الحبة السوداء باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقةالرقيقة TLC مقارنة بالسايتوكاينينات.

أ- العينة القياسية لـ Kinetin بتركيز 10 ملغم/لتر.

ب- العينة القياسية لـ BA بتركيز 10 ملغم/لتر.

ج- مستخلص الكالس النامي على وسط MS القياسي بعمر 100 يوم.

د- مستخلص البادرات النامية على وسط Arnon وHoagland بعمر 21 يوم.

ثالثاً: تقدير كمية IAA باستخدام الطريقة اللونية:

بينت النتائج ان قيم الكثافة الضوئية لمستخلصات الكالس النقي والبادرات بلغت 0.0158 و0.0288 على التوالي (الجدول 3) وبعد تحديد الكثافة الضوئية للتراكيز القياسية من IAA (0.5 -40) ملغم /لتر ومقارنتها بالتراكيز، تبين ان تركيز IAA في كل من الكالس والبادرات بلغ (0.011 و 0.020 ملغم / غم وزن طري) (وهو يعادل 11 و20 مايكروغرام / غم وزن طري) وهذا يشير الى ان محتوى البادرات من الـ IAA اكثر مما هو عليه في نسيج الكالس وهذا يفسر بكون البادرات تمتلك مسارات ايضية متكاملة ومستمرة لبناء هذا الهرمون وغيره من الهرمونات النباتية ويعتمد فيها تركيز الهرمون على عمر النبات الفسلجي، اما الكالس فيعتمد فيه غالبا على المستوى الداخلي من الهرمونات التي تحملها القطعة النباتية المستخدمة في استحداثه وكذلك يعتمد فيه على منظمات النمو المضافة الى وسط الزرع (Staba, 1982 ; محمد، 1985 ; محمد، 1990 ; Davies, 1995).

الجدول 3 : شدة الكثافة الضوئية للتراكيز المختلفة من IAA مقاسة عند طول موجي 525 نانوميتر.

IAA (ملغم/لتر)	شدة الكثافة
0.0	0.006
0.5	0.048
1.0	0.145
10	0.263
20	0.465
40	0.761
مستخلص الكالس *	0.0158
مستخلص البادرات **	0.0288

* المستخلص النقي لكالس الحبة السوداء النامي على وسط MS القياسي وبعمر 100 يوم.

** المستخلص النقي لبادرات الحبة السوداء النامية على وسط Arnon وHoagland وبعمر 21 يوم.

ان مستويات الـ IAA في الخلايا النباتية يتراوح بين تراكيز معينة فقد ذكرت دراسة ان تركيز الاوكسين IAA في النبات يتراوح بين 10- 120 ملغم /غم مادة جافة (الهرمونات النباتية) وذكرت دراسة اخرى ان تركيز الاوكسين IAA في النبات يتراوح بين 1 – 100 مايكروغم /كيلوغرام وزن طري (Botany) كما ذكر ان محتوى النبات من الاوكسين الحر او المرتبط يختلف باختلاف موقع العضو النباتي حيث تبين ان الاوراق والجذور تحتوي عامة على كمية كبيرة من الهرمونات الحرة (Mariusz and Goran, 2001). وفي دراسة اجريت على كالس نبات الجزر *Daucus carota* تم فيها قياس محتوى IAA بطريقة كاشف سالكويسكي تبين فيها ان قيمة الكثافة الضوئية لمستخلص النبات عند

طول موجي 529 نانوميتر كانت 0.09 والتي تقابل 37.6 (نانوغرام/غم نسيج نباتي) من الـ IAA (Puchooa and Ramburn, 2004) وجاء في دراسة على نبات وكالس الرز فصل وشخص فيها الـ IAA باستخدام تقنية الـ HPLC ان مستوى الاوكسين الحر وصل الى (3.8 f.mol) وان الاوكسين المقيد او المرتبط Conjugated auxin تراوح بين (2.9-0.4 f.mol) (Biochem, 2005). ان نتائج هذه الدراسة جاءت لتؤكد مدى مايعتمد عليه استحداث ونمو الكالس مما تحمله القطعة النباتية المأخوذه من نبات الحبة السوداء من مستويات معينة للاوكسينات والسايتوكاينينات. وان نتائج هذه الدراسة تفتح المجال لدراسات مستقبلية يتم فيها التشخيص الدقيق لمستويات الهرمونات النباتية في الحبة السوداء سواءا" في النبات او المزارع النسيجية باستخدام تقنيات HPLC او Atomic absorption.

المصادر العربية

البكر، رحاب عبد الجبار حامد، 2002. دور بعض منظمات النمو القياسية والمصنعة حديثا في استحداث ونمو الكالس من نبات الحبة السوداء *Nigella sativa L.* ومستوى المركبات الفعالة فيه. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

الجلبي، قصي عبد القادر، 1987. الكيمياء الحيوية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل

حمزة، حمزة قاسم، 1992. تجارب مختبرية في الفيزيولوجيا النباتية. منشورات جامعة حلب، كلية العلوم، مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية.

حمزة، حمزة قاسم وعملة، ندى، 1999. اساسيات فيزيولوجيا النبات. منشورات جامعة حلب، كلية العلوم، مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية.

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

محمد، عبد العظيم كاظم، 1985. علم فسلجة النبات (الجزء الثاني). مطبعة جامعة الموصل، العراق.

محمد، عبد المطلب سيد، 1982. الهورمونات النباتية، فسلجتها وكيمياؤها الحيوية (ترجمة). مطبعة جامعة الموصل، العراق.

الهرمونات النباتية. تمكن الحصول على المعلومات من الموقع الالكتروني http://www.yahoo.com. في تاريخ 2007/7/15.

وصفي، عماد الدين، 1998. عماد فسيولوجيا النبات. المكتبة الاكاديمية، القاهرة، مصر.

REFERENCES

Arnon, D.I. and Hogland, D.R., 1940. Crop Induction in Artificial Culture Solution and Soil with Special Reference to Factors Influencing Yields and Absorption of Organic Nutrients. Soil Sci., Vol. 50, 463 p.

Arnon, D.I. and Hogland, D.R., 1944. The Investigation of Plant Nutrition by Artifcial Culture Methods. Biol. Rev. Vol. 19, pp.55-6.

Chattopadhyay, S., Bandyopadhyay, M.N. and Mukherjee, B.B., 1980. Growth and IAA Balance in *Nigella sativa* L. Callus *in vitro* Influenced by Light and Culture Media. Indian J. Exp. Biol., Vol. 18, No. 1, pp.93-95.

Davies, P.J., 1995. The Plant Hormones: their Nature, Occurrence and Functions. In Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, pp.1-12.

Dodds, J.H. and Roberts, L.W., 1985. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University press. U.K.

Hillman, J.R., 1978. Isolation of Plant Growth Substances. Gambridge University Press. London. New York. Melbourne.

http:// www.yahoo.com. Biochem, 2005. Quantification of Indole – 3 – acetic Acid and Amino Acid Conjugates in Rice by Liquid Chromatography Electrospray Ionization-tandem Mas Spectrometry. Bio. Sci. Biotechnol. Biochem. Vol. 69, No. 4, pp.778-83 (ISSN 0916-8451).

http:// www.yahoo.com. Botany, 512: Supplemental Information to your Texts and Literature References.

http:// www.yahoo.com. Plant Hormones, Biology 2402 lecture Notes – Plant Hormones.

Kaldewey, H. and Stahl, E., 1964. Die Quantitative Answertung Dunn Schicht-Chromatographisch Getrennter Auxine in Arena-Tageslicht-Test Planta, Berlin, Vol. 62, pp.22-38.

Khorshid, M.Q., 2004. Control of Rooting Ability in Olive (Olea – europaea L.CV. A shrasi) Cuttings. Ph.D. thesis, Education College, University of Salahaddin – Erbil. Iraq.

Mariusz, K. and Goran, S., 2001. Quantitative Analysis Indole –3– acetic Acid Metabolites in Arabidopsis. Plant Physiol, Vol. 127, pp.1845-1853.

Markus, F., Hans, M., Els, P., Vaclav, M., Harry, V.O. and Thomas, S., 2000. Hormone Autotrophic Growth and Differentiation Identifies Mutant Lines of Arabidopsis with Altered Cytokinin and Auxin Content or Signaling. Plant Physiol, Vol. 122, pp.721-729.

Nihal, D., Sunethra, D., Alan, M.J. and Mark, E., 2003. Auxin Action in a Cell - Free System. Current Biology, Vol. 13, pp.1418-1422.

Playtis, A.J. and Leonard, N.J., 1971. The Synthesis of Ribosyl-Cis- Zeatin and thin Layer Chromatographic Separation of the Cis and Trans Isomers of Ribosyl Zeatin.Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 45, pp.1 – 5.

Puchooa, D. and Ramburn, R., 2004. A Study on the Use of Carrot Juice in the Tissue Culture of *Daucus Carota*. African Journal of Biotechnology; Vol. 3, No. 4, pp.248 – 252.

Roberts , J. and Whitehouse , D.G., 1976. Practical Plant Physiology. Longman. London and New york.

Shinnosuke, K., Yuriko, K., Makota, M., Masanori, T., Tomoaki, S., Isomaro, Y. and Masashi, F., 1998. Alteration of Hormone Levels in Transgenic Tobacco plants Overexpressing the Rice Homeobox Gene *OSH1* . Plant Physiol, Vol. 116, pp.471-476.

Staba, E.J., 1982. Plant Tissue Culture As a Source of Biochemicals. CRC press, Inc. Florida.

Stahl, E. and Kaldewey, H., 1961. Spuren Analyse Physiologisch Aktiver, Einfacher Indolerivate, Hoppe-seyl. Zeitschrift fur Physiology, Sche Chemie, Vol. 323, pp.182 – 191.

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

Wareing, P.F. and Phillips, I.D.J., 1978. The Control of Growth and Differentiation in Plants. 2 nd. Pergamon press. Oxford.

Wasfy, W., Shindy, A. and Orrin, E.S., 1975. Identification of Plant Hormones from Cotton Ovules. Plant Physiol. Vol. 55, pp.550-554.

Zin, H.L., Wei-chang, W. and Sho-Yun, Y., 1997. Effect of Hormone Treatment on Callus Formation and Endogenous Indole-acetic Acid and Polyamine Contents of Soybean Hypocotyl Cultivated in Vitro. Bot. Bull. Acad Sin, Vol. 38, pp.171-176.