------مجلة علوم الرافدين، المجلد 21، العدد 3، ص56-72، 2010------

دور تداخل بعض منظمات النمو والسلفانيل امايد في استحداث ونمو المزارع الخلوية لنبات الحبة السوداء *Nigella sativa* L.

مها محمد طه النعيمي
المعهد التقني
الموصل

هناء سعيد الصالح
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
جامعة الموصل

E-mail :hanasa59@yahoo.com

(تاريخ الاستلام 1/ 3 / 2010 ؛ تاريخ القبول 26 /4 / 2010)

الملخص

اشتملت الدراسة إنشاء المزارع الخلوية لنبات الحبة السوداء*Nigella sativa* L. بوجود منظمات النمو 2,4-D و Kin فضلا عن استخدام مركب السلفانيل أمايد لاختبار دوره كمشجع للنمو في هذا المجال .

وبينت النتائج أن أفضل الأوساط المشجعة لإنشاء المزارع الخلوية هو الوسط المدعم بـ 10^{-5} و 10^{-9} مولار لكل من 2,4,D و Kin، على التوالي، وأعطى أعلى نسبة لاستحداث الكالس بلغت 95.74 % مقارنة مع 98.8 % للوسط القياسي. كما أكدت النتائج أن استخدام 75مايكرومولار من مركب السلفانيل أمايد له تأثير تشجيعي لإنشاء المزارع الخلوية لنبات الحبة السوداء حيث بلغت نسبة استحداث الكالس 93.1 %عند استخدامه مع 10^{-5} و10^{-9} مولار لكل من 2,4,D وKing، على التوالي. كذلك عند إضافة 100 مايكرومولار من السلفانيل أمايد مع10^{-5}و 10^{-7} مولار من 2,4-D و Kin بلغت نسبة استحداث الكالس 92.9%. واستكمالا لأهداف الدراسة تم تشخيص وقياس مركب الثايمول في المزارع الخلوية باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) ومقارنة مستواه فيها مع العينة القياسية للثايمول، وأثبتت النتائج أن محتوى المزارع الخلوية السائلة منه يكاد يكون مساويا، وفي أحيان أخرى يتعدى محتواها عينة المقارنة، وبينت النتائج أن وجود مركب السلفانيل امايد في الوسط الغذائي اعطى نتائج افضل من حيث مستوى الثايمول في المزارع الخلوية.

The Role of Interaction of some Growth Regulators with Salfanilamide on Initiation and Growth of Cell Suspension Culture of Black Seed *Nigella sativa* L.

Maha M. AL-Noaimy
Technical Institute
Mosul

Hana S. AL-Saleh
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The study included the establishment of cell suspension culture of *Nigella sativa* L. by the presence of the plant growth regulators (2,4-D and Kin) and sulphanilamide. Results showed that the best enhancement media to initiate cell suspension cultures were media containing 2,4-D and Kin at 10^{-5} , $l0^{-9}$ molar alternatively which gave the highest rate 95.74 % of callus initiation compared with 98.8 % obtained from the standard media 10^{-6} molar 2,4-D. the results appeared to approve that the usage of sulphanilamide has the enhancement influence to form the suspension cultures of *Nigella sativa* when it used with 2,4-D and Kin.

The rate of the callus initiation reached 93.1% in the media containing 75 micromolar sulphanilamide with 10^{-5}, 10^{-9} molar for 2,4-D and Kin alternatively, it was noticed a good growth in the media containing 100 micromolar of sulphanilamide with 10^{-5}, 10^{-7} molar for each 2,4-D and Kin, the callus initiation reached 92.9% .

In order to complete achieving the study to find out the contents of cell cultures from the effecting compound (Thymol) comparing them by the thymol extract (control sample). The finding of the cell suspension cultures by using thin layer chromatography (TLC) proved that cell suspension was about to be equal and in some other times it surpass its contents in the comparison compound (Thymol) of the control treatment.Generally, it is clear that the existence of (sulphanilamide) in the nutrient media had given the best results when tested by the (TLC) for the thymol content in cell suspension cultures.

المقدمة

نبات الحبة السوداء *Nigella sativa*L.، يعود إلى الفصيلة (العائلـة) Ranunculaceae (الـشقيقية) واسمه الشائع هو حبة البركة أو الكمون الأسود لهذا يعرف النبات بـ Black Cumin وتـسمى بالفارسـية (شونيز) وقد عرفت عند قدماء المصريين وذكروها كثيـراً فـي كتابـاتهم (Rahman and Malik, 1985; البكر،2002) ونبات الحبة السوداء نبات عشبي حولي ومصنف أنه نبات صالح للأكل، ويعد حوض البحـر المتوسط الموطن الأصلي للنبات وتنتشر زراعته في جنوب أوربا وغرب آسيا وشمال أفريقيـا ولـم تـنجح زراعته في أواسط أوربا، وتشير البحوث إلى أنها تنمو في أواسط شرق آسيا وكذلك الهند (حسين، 1981 ; Alansari *et al.*, 1988 ; Rahman and Malik , 1985).

تعد تقنية المزارع الخلوية المعلقة أحد أساليب الزراعة النسيجية المهمة، وتستعمل مزارع الخلايا المعلقة على نطاق واسع كأنظمة نموذجية لدراسة مسارات الفعاليات الأيضية الثانوية وحث الأنزيمات والتغيير الجيني وكمصدر لتنقية الأنزيمات (Lendevai *et al.*, 2002; Chen and Kuc, 1999)، وتتميز المزارع الخلوية المعلقة بانقساماتها السريعة المتتالية في فترة قصيرة نسبياً وهو ما يوفر إمكانية دراسة وتتبع دورة الخلية في الظروف القياسية، وقد أظهرت نتائج عدد من الدراسات على المزارع الخلوية السائلة أن الكالس المشتق من السيقان والأوراق من الممكن أن يولد معلقات خلوية قادرة على النمو في البيئة السائلة ولها القابلية على التواصل وإنشاء نباتات ثنائية المجموعة الكرموسومية (May and Leaver, 1993)، ويستحصل على معظم المزارع المعلقة بنقل كتل الكالس الهش المفتت إلى بيئة سائلة متحركة لها تركيب البيئة نفسها التي استعملت لنمو الكالس (Engvild, 1974)، وأن الحجم الكبير للقاح الابتدائي المستخدم له فائدة حيث يؤمن عدد كاف من الخلايا المفردة أو كتل خلوية صغيرة تطلق في البيئة الغذائية لتوفر كثافة خلوية عالية ملائمة للنمو اللاحق (الحديدي، 2002)، ومنذ المحاولات الأولى لزراعة المعلقات الخلوية فقد تمكن العالم Muli وجماعته عام 1954 من الحصول على معلقات خلوية لنبات التبغ كذلك تم الحصول بنجاح على معلقات لمزارع خلوية للعديد من النباتات مثل الجزر والجميز والرز (محمد وعمر، ;Lendevai *et al.*, 2002 1990).

استخدم مركب السلفانيل أمايد لأثبات دوره في الزراعة النسيجية حيث تم في الآونة الأخيرة إثبات دور هذا المركب في تشجيع تكوين الأفرع الخضرية من القطع النباتية لسيقان التفاح والكمثرى المزروعة على أوساط MS (محمد آخرون، 2000)، كذلك أثبت الباحثون دور هذا المركب في تشجيع تكوين الجذور للأفرع الخضرية للتفاح والكمثرى واختزال الفترة الزمنية لتجذير النبات وأقلمته للظروف الطبيعية (محمد والصالح، 2000)، ومن هذا المنطلق استخدم هذا المركب لبيان دوره في مزارع المستنبتات الخلوية لنبات الحبة السوداء. ولدعم دور منظمات النمو في تكوين المزارع الخلوية جاءت هذه الدراسة للتحري عن منظمات نمو قياسية هي (2,4-D وKin) و بتراكيز مختلفة إضافة لاستخدام مركب السلفانيل أمايد لتأكيد دوره في تحفيز نمو الكالس ومقارنة ذلك في إنشاء ونمو المزارع الخلوية.

المواد وطرائق العمل

استخدم الكالس المستحدث من قطع السيقان للبادرات النامية على وسط إنبات البذور وتنمية البادرات (Arnon and Hoagland, 1940) في ظروف معقمة كمصدر لإنشاء المزارع الخلوية، وتم تنمية الكالس على وسط MS مضافا إليه 10^{-6} مولار من 2,4-D وحسب ماذكرت (النعيمي، 2004).

إنشاء ونمو المزارع الخلوية

تمت بنقل 1.5غم من الكالس الهش الفتي وبعمر 60 يوما إلى دورق زجاجي حجم 100 سم^3 حـاوي على30 سم^3 من الوسط الغذائي السائل MS المضاف إليه السكروز بتركيز 35 غم / لتر مع منظمات النمـو المستخدمة في الدراسة وكما موضح أدناه:

2,4-D 10^{-5} مولار
2,4-D 10^{-5} مولار + Kin 10^{-7} مولار
2,4-D 10^{-5} مولار + Kin 10^{-9} مولار
2,4-D 10^{-5} مولار + Kin 10^{-11} مولار
2,4-D 10^{-7} مولار + Kin 10^{-5} مولار
السلفانيل امايد 75 مايكرومولار
السلفانيل امايد 75 مايكرومولار + 2,4-D 10^{-5} مولار
السلفانيل امايد 100 مايكرومولار + 2,4-D 10^{-5} مولار
السلفانيل امايد 75 مايكرومولار + 2,4-D 10^{-5} مولار + Kin 10^{-9} مولار
السلفانيل امايد 100 مايكرومولار + 2,4-D 10^{-5} مولار + Kin 10^{-7} مولار
السلفانيل امايد 75 مايكرومولار + Kin 10^{-7} مولار
القياسي 2,4-D 10^{-6} مولار

وحفظت الدوارق في الحاضنة الهـزازة (shaker incubater) مـن شـركة (Burn Swich USA) وبدرجة حرارة (20±1)^{o}م وسرعة دورا نية 150 دورة /دقيقة (Khafagi, 1998)، رفعـت الـدوارق مـن الحاضنة الهزازة بعد مرور5 أيام من الزراعة، وتركت بحالة ساكنة لفترة 4 ساعات، وأعيدت عملية الزرع بسكب الوسط الغذائي القديم ورشحت باستخدام مرشحات معدنية ذوات فتحات دقيقة (100-250 Mm) والتي تسمح بمرور الخلايا المفككة وتعمل على عزل الكتل الخلوية الكبيرة غير المفككة وبعد الترشيح أكمل الحجم إلى 25 سم^3 بإضافة كمية من نفس الوسط وأعيدت الدوارق إلى الحاضنة الهزازة، ثم أخـذت عينـات بعـد مرور (24, 48, 72, 96, 120) ساعة (بعد الترشيح) لتقدير كثافة المعلق الخلوي والتعرف على نمو الخلايا وانقسامها وبلوغها الطور النشط Log phase من أجل تحديد مزرعة المعلق الخلوي لغرض زراعته لاحقـاً. وتم حساب إعداد الخلايا في المعلق بأتباع المعادلة:

$$\text{خلية / سم}^3 = \frac{\text{مساحة غطاء الشريحة × مجموعة الخلايا في 30 حقل}}{\text{مساحة 30 حقل مجهري ×حجم العينة (0.05)سم}^3}$$

زراعة المعلق الخلوي بطريقة بيركمان (Bergman) أو الطمر في الاكار

استخدمت طريقة بيركمان لسنة 1966 ,1977 لزراعة المعلق الخلوي في وسط غذائي حاوي علـى الاكار (محمد وعمر، 1990)، أخذت الخلايا في المعلق الخلوي الطور النشط Log phase، حيث تم مـزج الراشح الحاوي على الخلايا المفردة أو الكتل الخلوية الصغيرة مع الوسط الغذائي MS المعقم الحاوي علـى الاكار وبنسبة (1:1) (راشح : وسط غذائي MS) وبإضافة الاكار بنسبة (1%) (حفظ الوسط الغـذائي MS المدعم بمنظمات النمو المستخدمة في الدراسة في حمام مائي بدرجة حرارة 40 ^{o}م لضمان بقاء الاكار بحالة سائلة)، ووزع المزيج داخل أطباق بتري وتم أحكام غلقها باستخدام البارافيلم وحفظت فـي حاضـنة النمـو بدرجة حرارة (20 ± 1)^{o}م لمدة 70 يوما مع متابعة النمو و ملاحظة الانقسامات الخلويـة وبدايـة ظهـور المستعمرات و تم حساب نسبة استحداث الكالس عن طريق المعادلة :

$$\text{(\%) نسبة استحداث الكالس} = \frac{\text{عدد المستعمرات المنشئة للكالس}}{\text{عدد المستعمرات الكلية}} \times 100$$

تشخيص مركب الثايمول في عينات المزارع الخلوية

تم انتخاب التراكيز المثلى من 2,4-D وKin والتركيز الأمثل من مركب السلفانيل امايد التي أعطـت أفضل تحفيز لاستحداث المزارع الخلوية من كالس نبات الحبة السوداء، وتم تحضير المستخلصات الكحولية منها حسب طريقة (Verpoorte *et al.*, 1982) لفصل الثايمول من مستخلصات المعلقـات الخلويـة، وتـم تشخيص الثايمول باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC وحسب الطريقة المـذكورة مـن قبـل النعيمي، 2004.

النتائج والمناقشة

تأثير 2,4-D و Kin في إنشاء المزارع الخلوية لنبات الحبة السوداء

حددت التراكيز المثلى من(2,4-D و Kin) المحفزة لاستحداث ونمو الكالس مـن قطـع الـسيقان لبادرات نبات الحبة السوداء من دراسة سابقة (النعيمي، 2004). وتم استخدامها في إنشاء المزارع الخلويـة لنبات الحبة السوداء في هذه الدراسة وكان أفضل الأوساط المشجعة في إنشاء هذه المزارع هو وسـط MS المجهز بـ 10^{-6} مولار من 2,4-D باعتباره الوسط القياسي لاستحداث ونمو كالس نبات الحبـة الـسوداء، وبلغت أعلى كثافة للخلايا في اليوم التاسع log phase من بدء الزراعة ووصل عدد الخلايـا 4.57×10^{6} خلية /سم^{3} من عينة المعلق الخلوي السائلة (الجدول 1)، وتم الحصول على أعلى نسبة لاستحداث الكـالس بلغت حوالي 98.8 % في الوسط القياسي (الجدول2)، وتميزت المستعمرات بكونها كبيرة الحجم وقوامهـا

لزج ولونها أخضر لامع(الشكل 1 -أ). وقد يعود السبب إلى أن أوكسين 2,4-D ربما يشجع التكاثر الغزير للخلايا في المزارع النسيجية والخلوية (Kamo, 1987 ؛ الحديدي، 2002)

وبمقارنة بقية تراكيز منظمات النمو المستخدمة في الدراسة مع التركيز القياسي (10^{-6} من 2,4-D) كانت أفضل الأوساط المشجعة لإنشاء المزارع الخلوية هي أوساط MS الغذائية المجهزة 10^{-5} مولار من 2,4-D سواء لوحده أو تداخلاته مع Kin بالتراكيز (10^{-9} ، 10^{-11}) مولار، وبلغ عدد الخلايا 1.76 × 10^{6} خلية/سم^{3} في الطور النشط في وسط MS المجهز بـ 10^{-5} مولار من 2,4-D الجدول (1)، وتم الحصول على نسبة جيدة لاستحداث الكالس 82.5 % (الجدول2) بعد مضي 72 يوماً من بدء الزراعة، وتميزت بادئات الكالس بكونها ذات لون أخضر براق (الشكل1-ب)، وبالمقارنة تحققت أعلى نسبة لاستحداث الكالس 95.74% في وسط MS المدعم بـ 10^{-5} و 10^{-9} مولار من2,4-D و Kin، على التوالي، وبلغ أعلى عدد للخلايا في عينة المعلق الخلوي السائلة 4.13 × 10^{6} خلية/سم^{3} في اليوم الثامن من بدء الزراعة (Log Phase) ودخلت الخلايا طور التوقف في اليوم التاسع حيث بلغ عدد الخلايا 4.03 × 10^{6} خلية/سم^{3} جدول (1)، يليه وسط MS المجهز بـ 10^{-5} ، 10^{-11} مولار من كل من 2,4-D و Kin على التوالي والذي كانت نسبة استحداث الكالس النامي عليه 80.3% (الجدول 2) وتميزت مستعمرات الكالس النامية في هذه الأوساط بكونها ذات لون أخضر فاتح (الشكل1_د،ه) أما الوسط الحاوي على 10^{-5}و10^{-7} مولار من كل من 2,4-D و Kin على التوالي فكانت النسبة المئوية لاستحداث الكالس واطئة 26.11 % واتصفت مستعمرات الكالس بكونها ذات لون اخضر براق (الشكل 1 _ج). أما الوسط الغذائي المجهز بـ 10^{-7} ، 10^{-5} مولار من كل من 2,4-D و Kin، على التوالي، فقد كانت نسبة استحداث الكالس أقل ما يكون بالمقارنة مع التراكيز المذكورة آنفاً وبلغت نسبة الاستحداث 24.09% وبلغ أعلى عدد للخلايا في اليوم السابع من بدء الزراعة 1.84 × 10^{6} خلية/سم^{3} جدول (1) ، واتصفت مستعمرات الكالس كونها صغيرة الحجم جداً وصلبة وذات لون بني غامق. (الشكل1 _و). وهذا الاختلاف في نسب الاستحداث يعود لوجود السايتوكاينين فهو مسؤول عن انقسام الخلايا والية العمل تعود أساسا لتحفيز البناء الحيوي للـ RNA والبروتين وربما تحفز بعض الأنزيمات التي لها دور واضح في المسارات الأيضية المرتبطة بالخلايا (Street, 1977; Poli *et al.*, 1989). أما عند استخدام السايتوكانين بتركيز أعلى من الاوكسين لوحظ ان هناك فروقا شاسعة في نسبة استحداث الكالس مقارنة مع بقية التراكيز المذكورة آنفاً وانخفضت نسبة استحداث الكالس (24.0 % و 26.11%)، إن استجابة الخلايا لنوع وتركيز محدد من منظمات نمو معينة له دور أساس في تحديد درجة نمو تلك الخلايا,علما انه ذكر أن أفضل نمو للمعلقات الخلوية لنبات *Digitalis obscura* كان عند رفع تركيز السايتوكاينين أعلى من تركيز الأوكسين (Segura and Brisa , 1989).

تأثير مركب السلفانيل أمايد في إنشاء المزارع الخلوية للحبة السوداء *Nigella sativa*

تم تحديد أفضل التراكيزمن مركب السلفانيل امايد المحفزة لاستحداث الكالس (75و100مايكرومولار) (النعيمي والصالح ، 2010)، واستخدمت لإنشاء المزارع الخلوية لنبات الحبة السوداء، وعند استخدام وسـط MS المضاف إليه 75 مايكرو مولار من مركب السلفانيل أمايد مـع 10^{-5} مـولار مـن 2,4-D و 10^{-9} مولار من Kin. لوحظ وصول أعلى عدد للخلايا في اليوم الثامن من بدء الزراعة 2.7 × 10^{6} خليـة/سـم^{3} (الجدول 1) ووصلت نسبة استحداث الكالس إلى 93.10% (الجدول 2) وتميزت بادئـات الكـالس بلونهـا الأخضر الغامق وكبر حجمها (الشكل 2 _ه)، كذلك تم استخدام وسط MS الحـاوي علـى 100 مـايكرو مولار من السلفانيل أمايد مع 10^{-5} ، 10^{-7} مولار من كل من 2,4-D و Kin، على التوالي، ووصلت نـسبة استحداث الكالس 92.9 % وبلغ أعلى عدد للخلايا 2.07 × 10^{6} خلية/سم^{3} في اليوم التاسـع (Log Phase) من بدء الزراعة جدول (1 و2) وتميزت مستعمرات الكالس بلونها الأخضر الـداكن وقوامهـا المتماسـك (الشكل 2 _و) .وأعتبر وسط MS الحاوي على السلفانيل أمايد بتركيز 75 مايكرو مولار مع 10^{-5} مولار من 2,4-D من الأوساط المشجعة لإنشاء المزارع الخلوية لكالس نبات الحبة السوداء حيث وصـلت أعلـى كثافة للخلايا 3.21 × 10^{6} خلية/سم^{3} في اليوم التاسع جدول (1)، وكانت نسبة استحداث الكـالس 82.88% جدول (2) وتميزت مستعمرات الكالس بلونها الأخضر البراق وحجمها المتوسط وبقوامها المتماسك الـشكل (2 ، ب)، وأوضحت النتائج أن استخدام نفس التركيز المذكور من 2,4-D مع 100 مـايكرو مـولار مـن السلفانيل أمايد في الوسط الغذائي كان مثبطاً لإنشاء المزارع الخلوية فبلغت أقصى كثافة للخلايا فـي اليـوم الثامن 7.61 × 10^{5} خلية/سم^{3} (الجدول1) ووصلت نسبة استحداث الكالس 4.5 % الجدول (2) والشكل 2 _(ج) وعند استبدال Kin بدلاً من 2,4-D مع السلفانيل أمايد في الوسط الغذائي فقد حفز تركيـز 10^{-7} مولار منه مع 75 مايكرو مولار من السلفانيل أمايد استحداث المزارع الخلوية بدرجة متوسطة ووصـلت نسبة استحداث الكالس نحو 50.3% وبلغ أعلى عدد للخلايا في اليوم السابع 1.01 × 10^{6} خلية/سم^{3} ، جدول (1)، واتصفت مستعمرات الكالس بلونها الأصفر وقوامها الصلب (الشكل 2 _د) ، أما عند إضـافة مركـب السلفانيل أمايد لوحده وبتركيز 75 مايكرو مولار لاختبار أنشاء المزارع الخلوية لنبات الحبة السوداء فقـد لوحظ من النتائج التي حصلنا عليها والمؤشرة في الجداول (1 ، 2) أن أعلى عدد للخلايا بلـغ 1.95 × 10^{6} خلية/سم^{3} في اليوم التاسع من بدء الزراعة، وكانت نسبة استحداث الكالس 87.5 %. إن هذه الـنتائج تؤكـد الـدور الـتشجيعي لهذا الـمركب في الانقسام الـخلوي لخلايا نبات الـحبة الـسوداء واستمرار قابليتهـا على الاحتفاظ بطاقتها الـجينية الـكامنة (genetic potentiality) الـتي تحفزها على الانقسام (Wareing and Philips, 1978)، ان استخدام كل من (2,4–D و Kin) لوحدهما مع الـسلفانيل أمايد في إنشاء مزارع الـمستنبتات الـخلوية وتميز الـتركيز 75 مايكرو مولار من الـمركب مع 10^{-5} مـولار مـن(2,4 –D) بكونه مشجعاً لإنشاء المزارع الـخلوية وبلغت نـسبة الاسـتحداث 82.88 % (الجـدول 2) وهـذا يؤكـد

دورالسلفانيل امايد بسلوكه كسايتوكاينين يعمل على زيادة الانقسامات الـخلوية بوجود الاوكـسين (محمـد وأخرون، 2000) أما عند استخدام نفس الـتركيز من 2,4–D مع 100 مايكرو مولار من الـ ـمركب فقـد لوحظ انخفاضاً حاداً في مستوى إنشاء المزارع الـخلوية و تكوين مستعمرات الـكالـس حيث بلغت نسبة الاستحداث 4.5% ووصل أعلى عدد للخلايا في الـطور الـنشط الـى 7.61×10^5 (الجدول 1) وربمـا يعود الـسبب هنا إلى نشاط الـخلايا الـمشتقة منها أصلاً المزرعة الـخلوية وكثافة الـخلايا وكذلك سلوك الـخلايا الـنباتية في اسـتجابتها أثنـاء تغييـر فـي مـستويات تراكيـز منظمـات الـ ـنمو الـ ـنباتية (Poli *et al.*, 1989) .كذلك أستخدم مركب الـسلفانيل أمايد لوحده في الـوسط الـغذائي مرة ومـع Kin بتركيز 10^{-7} مولار مرة أخرى وتبين أن نسبة اسـتحداث الـكالـ ـس بلغـت 87.5% ,50.3% علـى الـتوالـي (الجدول 2) وقد يعود الـسبب إلى أن بعض الـمركبات الـكيميائية والـتي تـسلك بـدورها سايتوكاينينات تعمل على تحفيز بعض الأنزيمات الـمسؤولة عن بناء الاوكسين الـذي يـؤدي دوره علـى الـمستوى الـجيني (Huang *et al.*, 1988, 1989).

فصل المركبات الفعالة بتقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

أكدت نتائج الـفصل باستخدام تقنية كروماتوكرانيا الـطبقة الـرقيقة (TLC) لمستخلصات المـزارع الـخلوية النامية في أوساط تختلف في محتواها من منظمات الـنمو وجـود تـشابه كبيـر لمحتـوى هـذه الـمستخلصات من المواد الفعالة المختلفة مقارنة بعينة الثايمول القياسـي (علمـاً أن الثـايمول هـو أحـد المركبات الرئيسية الفعالة المستخلصة من بذور نبات الحبة السوداء)

وأظهرت النتائج في جدول (3) أن هناك تطابقاً تقريبياً لقيم Rf مع عينة المقارنة، وبلغت قـيم Rf لها (0.281) وهذا يشير إلى مدى التشابه الكبير للمركبات الفعالة المفصولة من المزارع الخلوية مع الثايمول القياسي.

إن عينات المزارع الخلوية أعطت بعد الفصل بقعة مفصولة واحدة لكل تركيز وهـذا يطـابق عينـة المقارنة وهنا إشارة إلى تأكيد قدرة خلايا كالس نبات الحبة السوداء على إنتاج الثايمول بمستوى يـساوي أو يزيد على محتوى الثايمول (المقارنة) فالمدة الزمنية التي يمر بها النبات خلال زراعة الخلية أو النسيج وما تتعرض له أثناء عمليات الزراعة أو الإدامة على الوسط الغذائي قد تزيد من كمية المواد الفعالة في الكـالس أو المزارع الخلوية (Pierik ,1987) .

وبصورة عامة وجد أن المعلق الخلوي النامي بوجود أوكسين 2,4-D أو مركب السلفانيل آمايد أعطى أعلى تطابق تقريبي لقيم معدلات مسافات الجريان مع عينة الثايمول القياسي، وهذا يشير إلى أن الزيادة فـي كثافة المعلق الخلوي رافقتها زيادة في إنتاج المركبات الفعالة ويؤكد الدور التحفيزي لمـنظم النمـو 2,4-D ومركب السلفانيل آمايد في كلتا الحالتين ومن المؤكد أن نوع وتركيز الهرمـون النبـاتي المتـوفر للخلايـا المستزرعة يعد العامل الأكثر أهمية وتأثير على إمكانيات الخلايا لتكوين النواتج الأيضية الثانوية، وقد وجـد

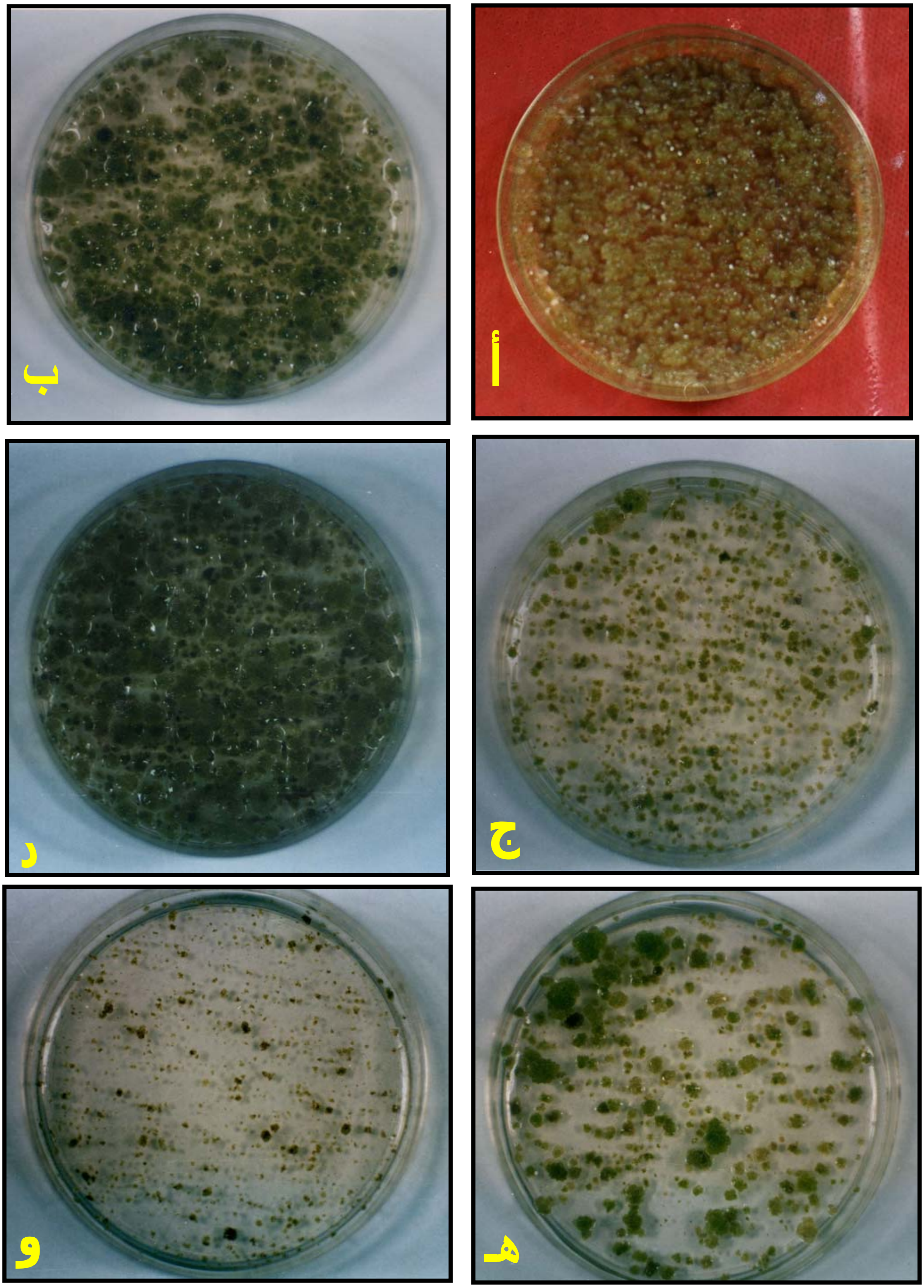
أن مستوى التضاعف الكروموسومي في الخلايا النباتية المنقسمة في المزرعة النسيجية يعتمد على مستوى ونوع الهرمونات النباتية المستخدمة في الوسط الغذائي وان الاختلافات في مستوى التضاعف الكروموسومي يترتب عليه عدد من الاختلافات في الخلايا قد تنعكس على زيادة قدرة هذه الخلايا في تكوين المركبات الأيضية الثانوية. (Schmauder and Doebel, 1991 ؛ الحديدي، 2002) .

الجدول 1: أعداد الخلايا في 1 سم^3 من عينة المعلق الخلوي لكالس نبات الحبة السوداء *Nigella sativa* L. النامي في أوساط MS الغذائية المجهزة بالتراكيز المثلى لمنظمات النمو (2,4-D و Kin) ومركب السلفانيل أمايد.

الفترة الزمنية بالأيام / التراكيز المثلى لمنظمات النمو	6	7	8	9	10
2,4-D 10^{-5} مولار	$10^5 \times 9.60$	$10^6 \times 1.70$	$10^6 \times 1.76$	$10^6 \times 1.70$	$10^6 \times 1.70$
2,4-D 10^{-5} مولار + kin 10^{-7} مولار	$10^6 \times 2.11$	$10^6 \times 2.02$	$10^6 \times 2.29$	$10^6 \times 2.21$	$10^6 \times 2.23$
2,4-D 10^{-5} مولار + kin 10^{-9} مولار	$10^6 \times 2.78$	$10^6 \times 4.07$	$10^6 \times 4.13$	$10^6 \times 4.03$	$10^6 \times 4.01$
2,4-D 10^{-5} مولار + kin 10^{-11} مولار	$10^6 \times 1.69$	$10^6 \times 2.92$	$10^6 \times 2.98$	$10^6 \times 2.86$	$10^6 \times 2.80$
2,4-D 10^{-7} مولار + kin 10^{-5} مولار	$10^6 \times 2.56$	$10^6 \times 1.84$	$10^6 \times 1.62$	$10^6 \times 1.60$	$10^6 \times 1.42$
السلفانيل امايد 75 مايكرومولار	$10^5 \times 9.2$	$10^5 \times 9.40$	$10^6 \times 1.90$	$10^6 \times 1.95$	$10^6 \times 1.94$
السلفانيل امايد 75 مايكرومولار + 2,4-D 10^{-5} مولار	$10^6 \times 2.01$	$10^6 \times 2.21$	$10^6 \times 3.2$	$10^6 \times 3.21$	$10^6 \times 3.15$
السلفانيل امايد 100 مايكرومولار + 2,4-D 10^{-5} مولار	$10^6 \times 3.31$	$10^6 \times 4.96$	$10^6 \times 7.61$	$10^6 \times 7.41$	$10^6 \times 7.35$
السلفانيل امايد 75 مايكرومولار + 2,4-D 10^{-5} مولار + k 10^{-9} مولار	$10^6 \times 1.62$	$10^6 \times 1.86$	$10^6 \times 2.70$	$10^6 \times 2.62$	$10^6 \times 2.59$
السلفانيل امايد100 مايكرومولار + 2,4-D 10^{-5} مولار + k 10^{-7} مولار	$10^6 \times 1.08$	$10^6 \times 1.29$	$10^6 \times 2.04$	$\times 2.070$ 10^6	$10^6 \times 2.05$
السلفانيل امايد 75 مايكرومولار + k 10^{-7} مولار	$10^5 \times 8.01$	$10^6 \times 1.01$	$\times 1.006$ 10^6	$10^5 \times 9.99$	$10^5 \times 9.93$
القياسي 2,4-D 10^{-6} مولار	$10^6 \times 1.51$	$10^6 \times 3.09$	$10^6 \times 4.52$	$10^6 \times 4.57$	$10^6 \times 4.55$

الجدول 2 : النسبة المئوية لاستحداث الكالس من زراعة المعلق الخلوي لنبـات الحبـة الـسوداء *Nigella sativa* L. في وسط MS المضاف إليه التراكيز المثلـى لمنظمـات النمـو (2,4-D و Kin) ومركب السلفانيل أمايد.

التركيز	النسبة المئوية لاستحداث الكالس(%)
2,4-D 10^{-5} مولار	82.5
2,4-D 10^{-5} مولار + Kin 10^{-7} مولار	26.11
2,4-D 10^{-5} مولار + Kin 10^{-9} مولار	95.74
2,4-D 10^{-5} مولار + Kin 10^{-11} مولار	80.3
2,4-D 10^{-7} مولار + Kin 10^{-5} مولار	24.09
السلفانيل امايد 75 مايكرومولار	87.5
السلفانيل امايد 75 مايكرومولار + 2,4-D 10^{-5} مولار	82.88
السلفانيل امايد 100 مايكرومولار + 2,4-D 10^{-5} مولار	4.5
السلفانيل امايد 75 مايكرومولار + 2,4-D 10^{-5} مولار + Kin 10^{-9} مولار	93.10
السلفانيل امايد 100 مايكرومولار + 2,4-D 10^{-5} مولار + Kin 10^{-7} مولار	92.9
السلفانيل امايد 75 مايكرومولار + Kin 10^{-7} مولار	50.3
الوسط القياسي 2,4-D 10^{-6} مولار	98.8


أ
ب
ج
د
هـ
و

الشكل 1 : استحداث بادئات الكالس من زراعة المعلقات الخلوية بطريقة الطمر بالاكار بعد مرور 70 يوما من بدء الزراعة وحسب التراكيز التالية :

أ- MS + 2,4-D 10^{-6} مولار.

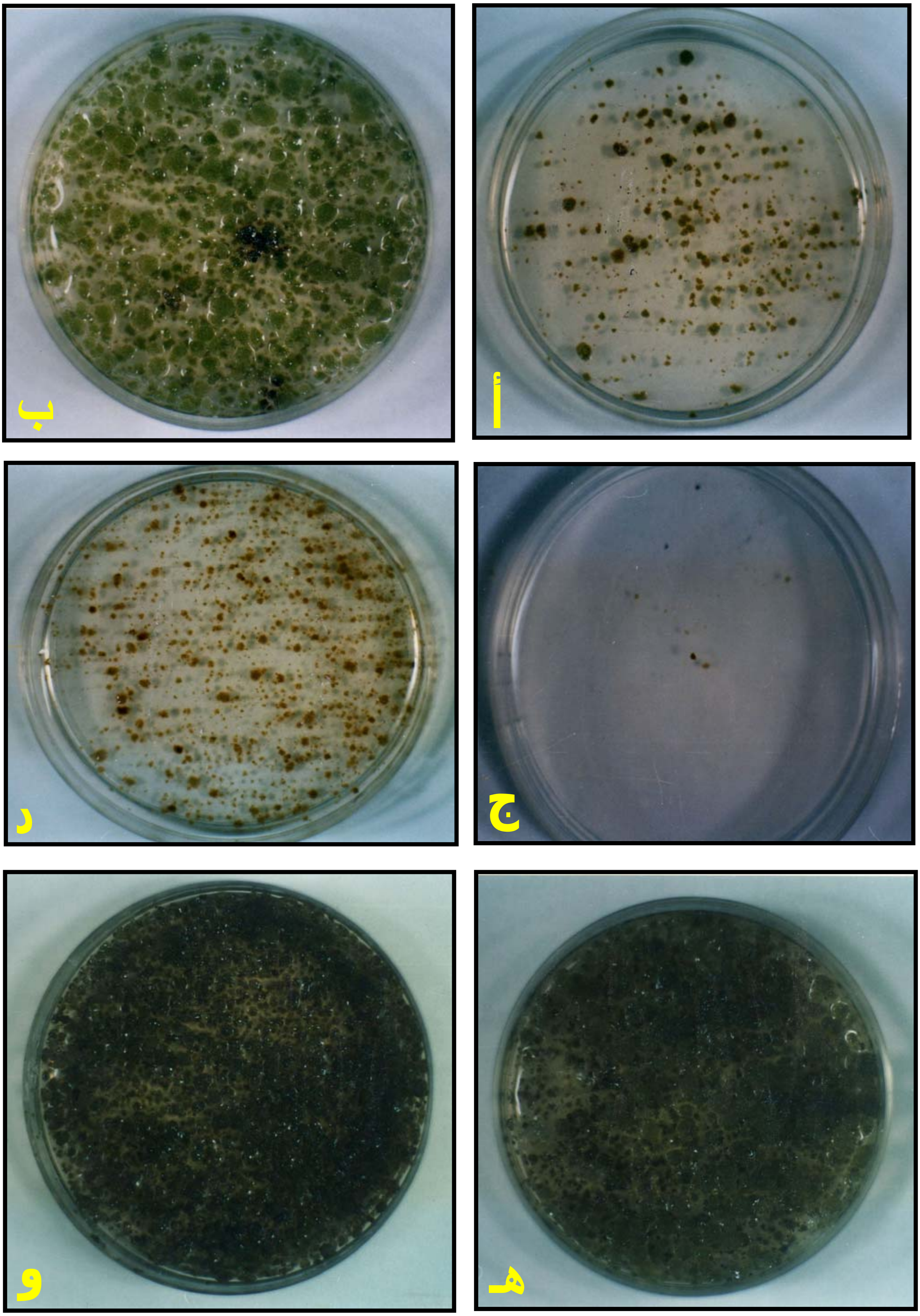
ب- MS + 2,4-D 10^{-5} مولار.

ج- MS +2,4-D 10^{-5} + Kin 10^{-7} مولار.

د- MS +2,4-D 10^{-5} + Kin 10^{-9} مولار.

ه- MS +2,4-D 10^{-5} + Kin 10^{-11} مولار.

و- MS +2,4-D 10^{-7} + Kin 10^{-5} مولار.

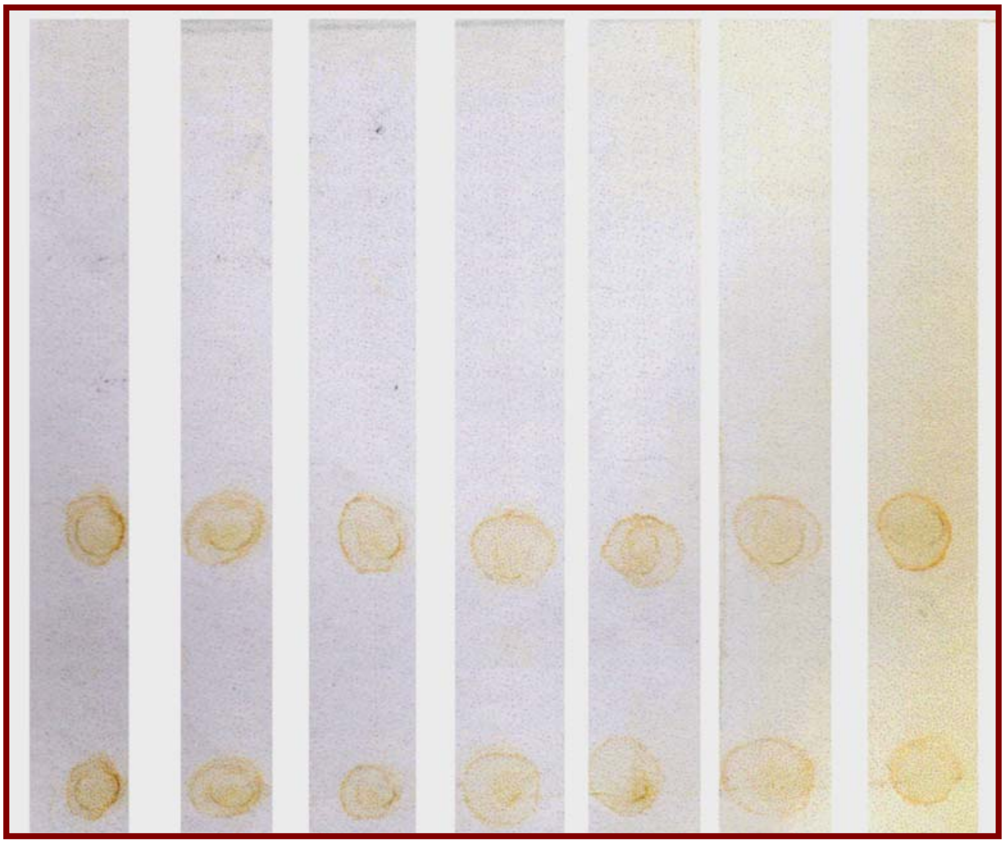

أ
ب
ج
د
هـ
و

الشكل 2 : استحداث بادئات الكالس من زراعة المعلقات الخلوية بطريقة الطمر بالاكار بعـد مـرور 70 يوما من بدء الزراعة وحسب التراكيز التالية :

أ- السلفانيل أمايد 75 مايكرومولار .
ب- 2,4-D (10^{-5}) مولار + السلفانيل أمايد 75 مايكرومولار.
ج- 2,4-D (10^{-5}) مولار + السلفانيل أمايد 100 مايكرومولار.
د- Kin 10^{-7} مولار + السلفانيل أمايد 75 مايكرومولار.
ه- 2,4-D (10^{-5}) مولار +Kin (10^{-9}) مولار + السلفانيل أمايد 75 مايكرومولار.
و- 2,4-D (10^{-5}) مولار +Kin (10^{-7}) مولار + السلفانيل أمايد 100 مايكرومولار.

الجدول 3: معدلات مسافات الجريان Rate–flow للبقع المفصولة من عينات المستنبتات الخلوية لنبات الحبة السوداء.

العينات	قيمة Rf
المستنبت الخلوي النامي في وسط MS المجهز ب100 مايكرومولار سلفانيل امايد+ 10^{-5} مولار من 2,4-D + 10^{-7} مولار Kin	0.281
المستنبت الخلوي النامي في وسط MS المجهز ب75 مايكرومولار سلفانيل امايد+ 10^{-5} مولار من 2,4-D + 10^{-9} مولار Kin	0.281
المستنبت الخلوي النامي في وسط MS المجهز ب75 مايكرومولار سلفانيل امايد	0.235
المستنبت الخلوي النامي في وسط MS المجهز ب75 مايكرومولار سلفانيل امايد+ 10^{-5} مولار من 2,4-D 10^{-9} مولار Kin	0.235
المستنبت الخلوي النامي في وسط MS المجهز ب 10^{-5} مولار من 2,4-D	0.281
المستنبت الخلوي النامي في وسط MS المجهز ب 10^{-5} مولار من 2,4-D و 10^{-9} Kin	0.251
مستخلص الثايمول القياسي (المقارنة)	0.281



الشكل 3 : فصل المستنبتات الخلاوية لنبات الحبة السوداء *Nigella sativa* باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC).

A- مستخلص الثايمول القياسي (المقارنة)

B- المستنبت الخلوي النامي في وسط MS المجهز 100 مايكرومولار سلفانيل امايد $+10^{-5}$ مولار من 2,4-D + 10^{-7} مولار Kin.

C- المستنبت الخلوي النامي في وسط MS المجهز 75 مايكرومولار سلفانيل امايد+ 10^{-5} مولار من 2,4-D + 10^{-9} مولار Kin.

D- المستنبت الخلوي النامي في وسط MS المجهز 75 مايكرومولار سلفانيل امايد.

E- المستنبت الخلوي النامي في وسط MS المجهز 75 مايكرومولار سلفانيل امايد+ 10^{-5} مولار من 2,4-D 10^{-9} مولارKin .

F- المستنبت الخلوي النامي في وسط MS المجهز 10^{-5} مولار من 2,4-D.

G- المستنبت الخلوي النامي في وسط MS المجهز 10^{-5} مولار من 2,4-D و 10^{-9} Kin

المصادر العربية

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

الحديدي، محمد علي حسين، (2002). زراعة الخلايا النباتية، ترجمة. دار الفكر للطباعة والنشر.

حسين، فوزي طه قطب، (1981). النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها. دار المريخ للنشر.

محمد، عبد المطلب سيد وعمر، مبشر صالح، (1990). المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والأنسجة والأعضاء للنبات، مطبعة جامعة الموصل، العراق.

محمد، عبد المطلب سيد والصالح، هناء سعيد (2000). دور مركب السلفانيل في استحداث الجذور للأفرع الخضرية لنباتي التفاح والكمثرى بطريقة زراعة الأنسجة. *مجلة علوم الرافدين*، **10** (2)، 1-15.

محمد، عبد المطلب ؛الصالح، هناء سعيد وعبود، ساجدة عزيز، (2000). دور مركب السلفانيل آمايد في زيادة الأفرع الخضرية لنبات الخس والتفاح والكمثرى بطريقة زراعة الأنسجة، *مجلة علوم الرافدين*، **11** (1)، 15-36.

النعيمي، مها محمد طه، (2004). تأثير تداخل بعض منظمات النمو والسلفانيل امايد في استحداث ونمو الكالس والمزارع الخلوية لنبات الحبة السوداء *Nigella sativa* L. رسالة ماجستير، كلية العلوم. جامعة الموصل، العراق.

النعيمي، مها محمد طه و الصالح ،هناء سعيد، (2010). تأثير2,4-D و K وتداخلاتهما مع السلفانيل أمايد في إستحداث ونمو الكالس لنبات الحبة السوداء *Nigella sativa L.* ".(قيد النشر).

المصادر الأجنبية

Arnon, D. I. ; Hogland, D. R. (1940). Crop induction in artificial culture solution and soil with special references to factors influencing yields and absorption of organic nutrients. *Soil Sci*., **50**, 463.

Chen, H. J. ; Kuc, J. (1999). Ca^{+2}-dependent excretion of salcylic acid in tobacco cell suspension culture. *Bot. Bull. Acad. Sci*, **40**, 267-273.

Engvild, K. C. (1974). Growth and planting of cell suspension cultures of *Datura innoxia*. *Physiol. Plant*. **32**, 390-393.

Huang, L. C.; Huang, B. L. ; Chen, W. L. (1989). Tissue culture investigation of bamboo. V. Recovery of callus from protoplast of suspension-cultured Bambusa cells. *Bot. Bull. Aca. Sinica*. **31**: 29-34.

Huang, L. C.; Chen, W. L. ; Huang, B. L. (1988). Tissue culture investigation of bamboo. III. A method for viable protoplast isolation from Bambusa cells of liquid suspension culture. *Bot. Bull. Aca. Sinica* **30**, 49-57.

Kamo, K. K. (1987). Suspension cultures from embryogenic callus. *Plant Sci*. **45**, 111.

Khafagi, I. K. (1998). Screening in vitro cultures of some SIAI medicinal plants for their antibiotic activity. *J. Union Arab Biol*, **5**, 95-108.

Lendevai, A. Nikovics, K.; Bako, L.; Dutits, D. ; Gyoryey, J. (2002). Synochronization of *Oryza sativa*. L. C. V. Taipei-309 cell suspension culture. *Acta. Biol*. **46**(3-4), 39-41.

May, M. J. ; leaver, C. J. (1993). Oxidative stimulation of glutathion synthesis of *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol.* **103**, 621-627.

Pierik, R. L. M. (1987). "In vitro Culture of Higher Plants". Martinus Nigh off publishers. Canada.

Poli, F.; Bonora, A.; Vannia, G. L.; Bruni, A. ; Fasulo, M. P. (1989). Callus formation, cells suspension culture and plant regeneration in *Ranunculus serbiacus* vis. *J. Plant Physiol*. **135**, 637-639.

Rahman, A.; Malik, S.; Ahmed, S.; Chaudhry, M. I. (1995). Nigellidine a new alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Lett*., **36**(12), 1493-1496.

Segura, J. ; Brisa, M. (1989). Segura, J. ; Brisa, M. (1989). Morphogenic potential of mechanically isolated single cells from *Digitalis obscura* L. callus. *Plant Cell. Tiss. Org. cult*. **19**, 129-139.

Schmauder, H. P. ; Doebel, P. (1991). *Nigella* spp, in vitro cultures, regeneration and the formation of secondary metabolites. *Biotech, Agricult. And Forest*., **15**, 311-338.

Street, H. E. (1977). "Plant Tissue and Cell culture". Black Well Scientific Publication. Oxford, London, Endinburgh, Melbourne.

Verpoorte, R.; Tginastoi, A.; Vandoorne, H. ; Svendsen, A. B. (1982). Medicinal plant of surinam. 1-Antimicrobial activity of some medical plants. *J. Ethanoph*., **5,** 221-226.

Wareing, P. F. ; Philips, I. D. J. (1978). The Control of Growth and Differentiation of Plant. 2nd ed. Pergamon press Oxford. UK