

تأثير الإجهاد الجفافي على بعض المكونات الخلوية لكالس الحلبة *Trigonella foenum graesum* L.

عمار رضا عيسى

إيلاف عبد الأمير الربيعي

يسرى أسماعيل حسين الطائي

Yusra.ismail91@yahoo.com

الخلاصة:

اجريت التجربة في مختبر زراعة الانسجة في كلية العلوم - جامعة بابل خلال العام 2016 لدراسة تأثير تراكيز البولي اثلين كلايكول (0، 3، 6 و 9 %) على بعض المكونات الخلوية لكالس الحلبة المستحث من البذور في الوسط الغذائي MS (Murashige and Skoog) الجاهز، واجري التحليل الاحصائي وفق التصميم العشوائي الكامل وبثلاثة مكررات. بينت النتائج ان فعالية انزيم APX و CAT والبرولين ازدادت بشكل معنوي بزيادة تراكيز البولي اثلين كلايكول وبلغت نسبة الزيادة 67.61 ، 67.59 و 70.87 % على التوالي عند التركيز 9% قياسا بمعاملة المقارنة، ومن جانب اخر ان المعاملة بالتراكيز PEG ادت الى زيادة في الكربوهيدرات وبشكل معنوي للتركيزين 6 و 9 % PEG بالمقارنة مع معاملة المقارنة وبلغت نسبة الزيادة 18.45 % عند التركيز 9 % قياسا بمعاملة المقارنة. الكلمات المفتاحية: الاجهاد الجفافي ، الحلبة ، الكالس ، انزيم

Effect of Drought Stress on Some Cellular Components of Callus *Trigonella foenum graesum* L.

Yusra I. H. Al-taei

Elaf A. Alrubaie

Ammar R. Obayes

Abstract:

The experiment was conducted in the laboratory of tissue culture in the Science College – University of Babylon in 2016 to study the effect of PEG concentration (0, 3, 6 and 9 on some cellular components of fenugreek callus induced from plant seeds on ready MS (Murashige and skoog) media .Factorial experiment within a complete randomized design with 3 replication were adopted terminate means were compared using last significant difference (L.S.D) of 0.01 probability level. The results showed that the effectiveness of APX , CAT and proline were increased by increasing PEG concentration they gave 67.61, 67.59 and 70.87 % respectively, at the highest (9%). On the other hand, increasing drought concentrations led to a significant increase in carbohydrate at concentration of 6 and 9 % PEG compared with the control treatment, with a percentage increase of 18.45 % at concentration 9%.

Keywords: drought stress , fenugreek, callus, enzyme

المقدمة:

الطبية دور مهم في حياة الإنسان كونها مصدر مهم للعديد من الأدوية والمواد الصيدلانية ، وتكمن أهميتها الطبية في قدرتها على انتاج العديد من المركبات الكيميائية ذات الخصائص الصيدلانية العلاجية (2). لقد

يعد نبات الحلبة من أقدم النباتات الطبية المعروفة لقابليته على خفض نسبة السكر والكوليسترول في الدم وتثبيط نمو الخلايا السرطانية (1) للنباتات

1.04 كغم/سم² لمدة 15 دقيقة و بعد نهاية التعقيم أخرجت وحفظت في الثلاجة لحين الزراعة.

تم تهيئة الجزء النباتي المستعمل بوضع كمية مناسبة من البذور في علبة وغسلت بالماء المقطر ثلاث مرات للتخلص من الغبار والشوائب العالقة، ثم نقلت الى كابينة انسياب الهواء الطبقي - Air flow cabinet laminar وعقمت بغمرها بـ 1.5 % هيبوكلورات الصوديوم مع التحريك لمدة 7 دقائق. غسلت بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقة واحدة لثلاث مرات وتعقم كذلك بـ 70 % الكحول الإيثيلي مع الرج لمدة 30 ثانية ثم غسلت بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقة واحدة لثلاث مرات لإزالة الكحول الإيثيلي، ثم وضعت البذور في طبق بتري حاوي على ورقة ترشيح معقمة من أجل إزالة المياه العالقة (4). وزرعت البذور المعقمة بشكل مقلوب داخل انابيب الزراعة في كابينة انسياب الهواء الطبقي. حضنت انابيب الزراعة بعد اكمال الزراعة في غرفة النمو لمدة أربعة أسابيع على درجة حرارة 25±2 °م لغرض استحثاث الكالس. واختبر تحمل الكالس للإجهاد الجفافي وذلك بنقل الكالس المستحث الى انابيب تحتوي على الوسط الغذائي نفسه المستعمل في تنشئة الكالس بعد اضافة بولي اثلين كلايكول PEG وبتراكيز 0، 3، 6 و 9% وكذلك نقل الى وسط الغذائي المستعمل فيه تراكيز PEG لمدة شهرين وبعد ذلك تم تقدير الصفات التالية :

تقدير فعالية أنزيم الاسكوربيت بيروكسيديز APX

قدرت فعالية انزيم الاسكوربيت بيروكسيديز APX حسب طريقة (5)

تقدير فعالية أنزيم (Catalase) CAT

تم تقدير فعالية الانزيم حسب طريقة (6) وهذه الطريقة تعتمد على كمية امتصاص المحلول بيروكسيد الهيدروجين والمحلول المنظم فوسفيت البوتاسيوم عند طول موجي 240 نانوميتر ، pH=7.

تقدير النسبة المئوية للكربوهيدرات الذائبة الكلية (ملغم/غم)

تم تقدير محتوى الكالس من الكربوهيدرات الذائبة الكلية بطريقة الفينول - حامض الكبريتك اذ تم استخلاص السكريات الذائبة وقدرت بواسطة جهاز المطياف الضوئي الموجود عند الطول الموجي 488 نانوميتر حسب طريقة (7)

تقدير البرولين Proline (ملغم / غم)

وفرت الزراعة النسيجية أمكانية الحصول على المركبات المهمة اقتصادياً والمركبات الطبية التي من الصعوبة تحضيرها في المختبر فضلاً عن كلفتها العالية عند تصنيعها (3).

إن الجفاف ونقص المياه من المشاكل المزمنة التي تعاني منها الكثير من دول العالم ، اذ تعد من أهم المشاكل التي تواجه التوسع الزراعي في جميع أنحاء العالم وان اثر الإجهاد المائي الذي يتعرض له النبات ينعكس بشكل سلبي على الإنتاج النباتي. إن ما يقال عن أن الحرب القادمة هي حرب على موارد المياه أصبحت تتكشف يوماً بعد يوم كحقيقة واقعة في أغلب الدول العربية والأفريقية التي تعاني من ندرة في المياه بسبب وقوعها ضمن المنطقة الجافة وشبه الجافة من الكرة الأرضية .

ولأهمية الحلبة الطبية واحتوائه على مركبات ثانوية تدخل في الصناعات الصيدلانية ونتيجة الحاجة المتزايدة لهذه المركبات ، يمكن توظيف تقنية زراعة الأنسجة النباتية واستخدام الهرمونات وإضافة المحفزات الى الوسط الغذائي لزيادة إنتاج المركبات الثانوية الفعالة ، ولذلك اجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير الاجهاد الجفافي على بعض المكونات الخلوية لكالس الحلبة باستعمال الماء المعالج مغناطيسياً.

المواد وطرائق العمل :

اجريت الدراسة في مختبر زراعة الانسجة في كلية العلوم - جامعة بابل خلال العام 2016 لدراسة تأثير الاجهاد الجفافي على بعض المكونات الخلوية لكالس الحلبة. تم تحضير الوسط الغذائي باستعمال الوسط الغذائي MS (Murashige and skoog) الجاهز (المجهد من شركة Himedia) والمحتوي على السكر والاكثار بعد اضافة 1 ملغم/لتر من 2,4-D و 1 ملغم/لتر من BA ثم وضع على الخلاط المغناطيسي من اجل الذوبان الكامل للمكونات الوسط . ثم تم ضبط pH الوسط إلى 5.6-5.8 بمحلول 1 عياري من حامض الهيدروكلوريك (HCl) أو 1 عياري من محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) ومن ثم وزع الوسط في أنابيب الزراعة وبواقع 10 مل لكل أنبوبة. أغلقت الأنابيب ونقلت إلى جهاز التعقيم بالبخار (Autoclave) على درجة حرارة 121 م وضغط مقداره

يبين جدول 1 ملحق 1 ان المعاملة بالتراكيز PEG ادت الى زيادة في فعالية انزيم APX وبشكل معنوي لكل التراكيز وبلغت نسبة الزيادة 67.61 % عند التركيز 9 % قياسا بمعاملة المقارنة ، وتتفق هذه النتائج مع (10) ويرجع السبب في ذلك الى بأن العديد من الانزيمات المضادة للأكسدة ومنها CAT و SOD و APX تزداد فعاليتها تحت ظروف الاجهاد الجفافي. وقد تعزى زيادة فعالية هذه الانزيمات في الكالس النامي تحت مستويات الأجهاد المائي PEG الى كونها أحد الوسائل لمقاومة ظروف الإجهاد التي تؤدي إلى استحثاث الجهد التأكسدي المتمثل بزيادة جذور الأوكسجين الفعالة (ROS) الضارة للنبات، فتقوم الخلايا بزيادة إنتاج الأنزيمات المضادة للأكسدة لما لها من أهمية في التخلص منها (11).

تم تقدير البرولين حسب طريقة (8) . وتمت مقارنة القراءات الناتجة من جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 520 نانوميتر مع المنحنى القياسي للبرولين النقي .

التصميم والتحليل الاحصائي :

تم تطبيق تجربة وفق التصميم العشوائي الكامل (CRD)، (9). تم تحليل البيانات باستعمال البرنامج التحليل الاحصائي (الجنستات) وقورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي Least Significant Differences (L.S.D) عند مستوى احتمال (0.01) .

النتائج والمناقشة :

فعالية انزيم APX

جدول 1 : تأثير تراكيز PEG في انزيم APX و CAT (مايكرومول/ بروتين/ دقيقة) بعد شهرين من الزراعة الكالس بالاجهاد الجفافي

Table 1: Effect concentration of PEG in the enzyme APX and CAT (micromoles / protein / min) after two months of callus Agriculture on drought stress

انزيم CAT Enzyme CAT	انزيم APX Enzyme APX	تراكيز PEG concentration of PEG
0.01167	0.0417	0
0.02200	0.0786	3
0.02300	0.0821	6
0.04017	0.1435	9
0.01246	0.01246	ا. ف. م 0.01

الجزئيات المرسله للأشارات المهمة جداً وتنتج تحت ظروف الأجهاد وتسبب تحفيز وأنتاج مضادات الأكسدة (12). كما أن عوامل الأجهاد تسبب في ارتفاع فعالية الأنزيمات التي تعمل على إزالة سمية ROS مثل أنزيم CAT والتي تمنع تحطيم الخلايا. (13). اذ يعمل الكتلز بالتخلص من بيروكسيد الهيدروجين فضلا عن ما يعمله انزيم APX من نفس الفعل عبر تفاعل الاسكوربيك مع البيروكسيد وانتاج الماء (14).

فعالية انزيم CAT :

يبين جدول 1 ملحق 1 ان المعاملة بالتراكيز PEG ادت الى زيادة في فعالية انزيم CAT وبشكل معنوي لكل التراكيز وبلغت نسبة الزيادة 67.59 % عند التركيز 9 % قياسا بمعاملة المقارنة وتتفق هذه النتائج مع (10) ويرجع السبب الى أن أستحثاث عوامل الأكسدة في الخلايا النباتية كأستجابة لعوامل الأجهاد وفي العادة تؤدي الى تخليق جزئيات ترسل إشارة لتتنشيط مجموعة من الأنزيمات المضادة للأكسدة ، وان H_2O_2 واحدة من

جدول 2 : تأثير تراكيز PEG في الكربوهيدرات و البرولين (ملغم/غم) بعد شهرين من الزراعة الكالس بالإجهاد الجفافي

Table 2: Effect concentration of PEG in Carbohydrates and Proline (mg/g) after two months of callus Agriculture on drought stress

البرولين Proline	الكربوهيدرات Carbohydrates	تراكيز PEG concentration of PEG
0.3413	0.2448	0
0.5633	0.2591	3
0.7613	0.3094	6
1.1193	0.3186	9
0.04606	0.01391	ا.ف.م 0.01

يبين جدول 2 ملحق 1 ان المعاملة بالتراكيز PEG ادت الى زيادة في البرولين وبشكل معنوي لكل التراكيز وبلغت نسبة الزيادة 70.87 % عند التركيز 9 % قياساً بمعاملة المقارنة يرجع السبب في ذلك الى ان حامض البرولين يزداد بزيادة تراكيز الملوحة حيث يعمل على تعديل الازموزية بين الفجوة و سايتوبلازم الخلية (16)، وان مواد بناء البرولين في الخلايا (الكلوتاميت والاورنثين) يزداد تحولها الى حامض البرولين عن طريق زيادة الفعاليات الانزيمية الداخلة في بنائه (17)، ويزيد تراكمه تحفيز انزيمات بناءه Vizpyrroline و Pyrroline و carboxylic acid synthetase و carboxylic acid reductase وهذه العملية مسيطرة عليها جينات تدعى بالجينات المنظمة للازموزية (Osmotically regulated gene)، (18).

ملحق 1: جدول تحليل التباين متمثلاً بمتوسطات المربعات (M.S) للصفات المدروسة

Appendix 1: Table of analysis of variance represented with means squares (M.S) for studied traits

برولين	كربوهيدرات	CAT	APX	D.F	S.O.V
0.57672	0.003947	4.597	0.005864	3	C
0.01194	0.001088	6.850	0.000874	16	ERROR

- المصادر:
- 3- Purohit, S. S. 1999. Agriculture Biotechnology. Agro Botanical. J. N. V. Yas Nagrr, Bikaner, India, P: 833.
- 4-Awika, J. M.; and Rooney, L. W. 2004. Sorghum phytochemical and their potential aspects on human health. Photochemistry, 65(9):1199-1221.
- 5- Nakana, Y. and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase is

- 1- Suboh, S. M.; Bילו, Y.Y. and Aburjiai, T. A. 2004. Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability of oxidatively stressed human erythrocytes. Phytothapy, Res., 18(4):280-284.
- 2- Taylor, V. E.; Brady, L. R. and Robbers, J. E. 1988. Pharmacognosy 3 ed. Lea and Febiger. Philadelphia.

- growth characteristics in sunflower (*Helianthus annuus*) seeds exposed to static magnetic field. *J Plant Physiol.*, 167(2) 149-56.
- 14- Sergio, L. ; Paola, A.D. ; Cantore, V. ; Pieralice, M. ; Cascarano, N.A. ; Bianco, V.V. and Venere, D.D. 2012. Effect of salt stress on growth parameters, enzymatic antioxidant system, and lipid peroxidation in wild chicory (*Cichorium intybus* L.). *Acta Physiol. Plant.*, doi:10.1007/s11738-012-1038-3
- 15- Greenway, H. and Munns , R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31: 149-190.
- 16- Kavi Kishor, P.B. ; Sangam ,S. ; Amrutha , R.N. ; Laxmi, P.S.; Naidu, K.R. ; Rao, S. ; Reddy, K.J. ; Theriappan, P. and Sreenivasulu, N. 2005 . Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.*, 88(3): 424-438.
- 17- Kumar, S. ; Reddy, A. M. and Sudhakar, C. 2003. NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. *Plant Sci.*, 165: 1245-1251.
- 18- Sairam, R. K. and Tyagi, A. 2004 . Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.*, 86(3): 407-417.
- spinach chloroplast. *Plant Cell.physiol.*, 22:867-880.
- 6- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*, *Methods Enzymo* . 105:121-126.
- 7- Herbert, D. ; Phillips, P . J . and Strange, R . E . 1971 . Determination of total carbohydrate. In : Norris , J . R . and Robbins , D . W . (eds.) *Methods in Microbiology* . chapter 3. pp.209-344. Academic Press , New York .
- 8- Bates, L. S.; Waldren, R. P.; and Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil.*, 39:205-207.
- 9- الراوي ، خاشع محمود وعبد العزيز محمود خلف الله . 2000 . تصميم وتحليل التجارب الزراعية . دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل . العراق .
- 10- Pant, N. C. ; Agarrwal, R. and Agarwal, S. 2014. Mannitol-induced drought stress on calli of *Trigonella foenum-graecum* L. Var. RMT-303. *Indian Journal of Experimental Biology*, 52:1128-1137.
- 11- Mittal, S. ; Kumari, N. ana Sharma, V. 2012. Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant Physiol. Biochem.*, 54:17-26.
- 12- Herrera-Santoyo, J.; López-Delgado, H. and Mora-Herrera, M. E. 2007 .Stress in callus of *Hippocratea excelsa*: catalase activity, hydrogen peroxide content and canophyllol accumulation. *APR*. 32(4):253-256.
- 13- Nagarajan. S; Vashisth. A; .2010 . Effect on germination and early