

Effect of salt stress on shoot multiplication of *Mentha piperita* L. in some biochemical character , and menthol production *in vitro* .

تأثيرا لإجهاد الملحي في تضاعف نبات النعناع *Mentha piperita* L. وبعض صفاته البايوكيميائية وإنتاج المنثول خارج الجسم الحي *

الدكتور محسن جلاب عباس
كلية العلوم /جامعة الكوفة

م.م.احمد عبد الرضا فيصل المظلوم
كلية العلوم /جامعة الكوفة

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول .

الخلاصة

أجريت تجربة لدراسة تأثير تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم NaCl وهي (0 و 2 و 4 و 6 و 8) غم/لتر أضيفت إلى وسط MS في معدل تضاعف نبات النعناع الفلفلي و بعض الصفات البايوكيميائية للزروعات الناتجة خارج الجسم الحي .أوضحت النتائج بان التركيز المنخفض من ملح NaCl (2)غم /لتر في الوسط الغذائي قد أدى زيادةً معنوية في معدل التضاعف و الوزن الطري والجاف للأفرع و محتوى الكلوروفيل و السكريات الذائبة و البرولين والبيوتاسيوم مقارنة مع معاملة السيطرة و التراكيز العالية من الملح . إما فيما يتعلق بمحتوى الأفرع المتضاعفة من الصوديوم البرولين و الكربوهيدرات و الكلور ، فقد ازداد المحتوى بزيادة تركيز الملح في الوسط الغذائي .

Abstract

An experimental was carried out to study the of peppermint plant () by tissue culture technique. The effect of different concentrations of NaCl (0 , 2 , 4 , 6 , 8) g/ l ed to MS medium on multiplication rate of *Mentha piperita* shoots and on some biochemical properties *In vitro* produced shoots .The Results showed that the lower concentrations of NaCl (2 g/ l) in culture medium caused a significant increase in multiplication rate ; fresh and dry weights of shoots , chlorophylls, potassium ions and menthol content , compared with the control treatment and higher concentrations of salt .

Concerning the multiple shoots content from sodium, chloride , proline and carbohydrates these constituents were increased when the concentrations of NaCl increased in culture medium

المقدمة Introduction

ينتمي جنس النعناع *Mentha* إلى العائلة الشفوية التي تضم 2000 – 5000 نوعا أغلبها تنتج الزيوت الطيارة بشكل تربينات. ويعد جنس النعناع *Mentha* من أهم الأجناس. إذ يضم 30 – 25 نوع وتنبأين أهمية أنواعه ما بين تجاري وطبي. النعناع الفلفلي *Mentha piperita* نبات عشبي و معمّر ينمو النعناع بطول ما بين 30 – 90 سم . وأوراقه ذات حافة مسننة بشكل غير متساوي وقمتها حادة (1) .

ويعتبر هذا النوع هجيناً من النعناع المائي *M. aquatic* والنعناع القرنفلي *M. spicata* . إذ تنتج إزهاره بذورا عقيمة لذا فإن إكثاره جنسياً غير ممكن (2) .

أشارت الدراسات بان للنعناع (Mint) أهميه طبية إذ له قيمة كبيرة لاستعمالاته المتعددة في إنتاج الادويه ومستحضرات التجميل (Cosmetic) وتحسين طعم الاغذية والمشروبات ويستعمل في صناعات عديدة كصناعة الشامبو والصابون ومعاجين الأسنان والحلويات والعلك (3) .

يتكاثر النعناع خضريا بالرايزومات او السرطانات الجذرية (root sucker) اذ ان النعناع الفلفلي لا يمكن اكثره بالبذور (4) .

وتعد زراعة الأنسجة النباتية طريقة مهمه جدا في الإكثار الواسع للنباتات وطورت لتشمل الإكثار التجاري للنباتات (5) . الإكثار الدقيق (Micropropagation) يوفر طريقة جيدة لمضاعفة أعداد الأنواع المنتخبة للحفاظ على صفاتها الوراثية والكيميائية الجيدة للعديد من النباتات الطبية والعطرية والحفاظ عليها (6) . يكثر النعناع باستعمال تقنية زراعة الأنسجة لعدة

أسباب منها التضاعف السريع للنباتات وتربية نباتات المنتخبة و يوفر أيضا نباتات خالية من الأمراض بما في ذلك الممرضات الداخلية (7) .

تعد تقنيات الزراعة خارج الجسم الحي من الوسائل الحديثة المستخدمة لمعرفة حدود التحمل الملحي للخلايا الانسجة النباتية وإنتاج سلالات متحملة للملوحة (11) و يعد العراق من البلدان المتأثرة بالملوحة و تعد أملاح كلوريد الصوديوم و الكالسيوم و المغنسيوم و كبريتات الصوديوم و المغنسيوم من أهم الأملاح الذائبة (9) فان تراكم الأملاح يؤدي إلى انخفاض المردود الاقتصادي من الإنتاج الزراعي وخصوصا في المنطقتين الوسطى و الجنوبية من القطر التي تتميز تربتها بأنها متوسطة إلى شديدة الملوحة. إن اختيار النباتات هي من أفضل الوسائل الناجحة للمساهمة في التخفيف من آثار الملوحة من خلال تحسين التحمل الملحي وان استخدام الطرق التقليدية أعطى نجاحا محدودا لذا لجأ الباحثون إلى تقانة الزراعة النسيجية (10) . .

تؤثر ظروف النمو خارج الجسم الحي (*In vitro*) على التخليق الحيوي للمركبات الثانوية التربينات (8). وأن تراكم هذه المركبات الأيضية في المزارع النسيجية يعتمد على التأسيس الناجح لهذه المزارع مثل اختيار الجزء النباتي، وتركيب الوسط الغذائي والظروف البيئية (12) . لذا كانت من أهداف الدراسة معرفة تأثير الإجهاد الملحي في التضاعف وبعض الصفات البايوكيميائية وإنتاج المنثول لنبات النعناع الفلفلي خارج الجسم الحي .

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

نفذت التجربة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية / قسم البستنة و هندسة الحدائق/ كلية الزراعة / جامعة الكوفة اثناء موسم 2008- 2009 . تمت عملية تعقيم كافة أدوات العمل المستعملة في التجربة من ملاقط وشفرات ومقصات وإطباق زجاجية وأوراق ترشيح وغيرها من متطلبات الدراسة ، بالإضافة إلى الفتاني الزجاجية الحاوية على الوسط الغذائي بجهاز التعقيم (Autoclave) المجهز من شركة Gallenkamp ودرجة 120 م° وتحت ضغط 1.02 كغم / سم² ولمدة 15 دقيقة ، وحفظت بعد التعقيم في جو الغرفة لحين الاستعمال . فضلاً عن تعقيم الشفرات والملاقط والمقصاة بوساطة غمرها في الكحول الايثيلي 96 % داخل جهاز منضدة انسياب الهواء الطبقي و استعمال اللهب لتعقيمها ومن ثم تبريدها بالماء المقطر المعقم قبل الاستعمال. وقبل البدء بالعمل تم تعقيم منضدة انسياب الهواء الطبقي Laminar – air flow cabinet برشها ومسحها بالكحول 70 % من الداخل حتى التشبع ، شغل جهاز UV لمدة 30 دقيقة قبل البدء بعمليات الزرع لضمان التخلص من الملوثات. وأجريت عملية تعقيم وزراعة القطع النباتية داخل هذا الجهاز .

تحضير الوسط الغذائي

استعمل الوسط الغذائي Murashige and Skoog (MS) (13) الجاهز على هيئة مسحوق المنتج من مختبرات Flow في بريطانيا.

لتحضير لتر من الوسط أذيب 4.71 غم من المسحوق الجاهز مضافاً له السكروز (30 غم/لتر) ثم عدل رقم الدالة الهيدروجينية (pH) إلى 5.7 ± 0.1 بمحلول من حامض الهيدروكلوريك (HCl) أو محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) 0.1 عياري ثم أضيف الآجار (Agar – Agar) بمقدار 7 غرام/لتر وأكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر . وضع الوسط بعد ذلك على جهاز الخلط المغناطيسي الحراري Hot plate magnetic stirrer لإذابة الآجار وتجانس الوسط الغذائي ثم صب الوسط مباشرة في أنابيب الزراعة سعة (24 x 150 ملم) بواقع 10 مل/أنبوب وأغلقت فوهة الأنابيب بسدادة قطنية من الداخل وغلفت فوهة الأنبوبة من الخارج برفائق ألمنيوم وعقمت في المعقم (Autoclave) على درجة 120 م° وضغط مقداره 1.02 كغم/سم² لمدة 15 دقيقة . بعدها أخرجت الأنابيب وتركت لتبرد وليتصلب الوسط في درجة حرارة الغرفة.

أخذت الأجزاء النباتية(قمة او عقدة من المزرعة النسيجية الحاوية على التركيز الأمثل من السايبتوكانين بنزابل أدنين 2) ملغم/لتر) للتضاعف وزرعت في وسط التضاعف بعد إضافة ملح كلوريد الصوديوم للوسط الغذائي بمستويات (0 و 2 و 4 و 6 و 8 غم/لتر) وبواقع 10 أنابيب (تكرار) لكل من القمة النامية والعقدة .تحتوي على 10 مل من الوسط في كل أنبويه وحضنت لمدة أربعة أسابيع عند الظروف البيئية نفسها المشار إليها في الفقرة سابقا . بعد انتهاء مدة أربعة أسابيع تم قياس الصفات الآتية :

- 1 - معدل التضاعف (عدد الأفرع/الجزء النباتي المزروع)
- 2 - معدل عدد الأفرع الأطول من 3 سم
- 3 - معدل عدد الأوراق
- 4 - حساب الوزنين الطري و الجاف للأفرع المتضاعفة .
- 5 - تقدير محتوى الأفرع المتضاعفة في وسط MS الحاوي على ملح NaCl من ايون الصوديوم و البوتاسيوم و الكلورايد استناداً إلى ما ورد في (14)
- 6 - تقدير الحامض الاميني برولين Proline

قدرت كمية الحامض الاميني برولين لزروعات النعناع في الأوساط المجهزة بملح NaCl استناداً إلى ورد في (14) إذ أخذ وزن 250 ملغم من الوزن الجاف للأفرع وسحق بالجفنة الخرفية بعد إضافة حامض سلفوساليسليك تركيز 3 % [المحضر بإذابة 3غم من الحامض في 100 مل ماء مقطر] فتحول لون المحلول إلى الأصفر الفاتح وترك مدة من الزمن (لإعطاء

فرصه للحمض لإذابة النموذج النباتي) ثم نبذ المزيج بجهاز الطرد المركزي على 2000 دورة/ دقيقة لمدة عشرة دقائق . سحب 2 مل من الراشح الذي تم فصله بالنبذ المركزي ، وأضيف إليه 2 مل من حمض ألكليك الثلجي و2مل من محلول ننهايدرلين ق (ninhydrin) ، ثم وضعت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 100 °م لمدة نصف ساعة فبدأ ظهور اللون الأحمر وبدرجات متباينة من هذا اللون بحسب تركيز البرولين في العينة ثم تركت لتبرد، وبعد ذلك تم فصل الطبقة الحمراء بإضافة 5 مل من مادة تولولين (Toluene) فبدأ اللون بالصعود إلى طبقة التولولين بعد مدة مناسبة ، ثم سحب 3 مل من هذه الطبقة الملونة (الحلوية على البرولين) ، ثم قيست شدة اللون (الكثافة الضوئية) بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند الطول الموجي 520 نانوميتر وبواقع خمس مكررات لكل معاملة . وتمت مقارنة هذه القراءات مع المنحنى القياسي للبرولين النقي.

7 - تقدير الكلوروفيل الكلي

تم تقدير الكلوروفيل الكلي في الأفرع استنادا إلى ورد في (14)

8 - تقدير الكربوهيدرات الذائبة (السكريات الذائبة)

استعملت طريقة (15) لتقدير السكريات الذائبة في الأفرع الناتجة من أزرعه النسيجية في الاوساط الملحية .

9 - تقدير مركب المنثول

تم عملية تقدير مركب المنثول بوساطة جهاز HPLC التابع إلى دائرة بيئة الديوانية و المجهز من شركة (Konik room TM) الأسبانية وباستعمال عمود فصل نوع (ODS 25 μ m 25× 0.46) . الطور المتحرك Mobile Phase تم باستعمال Diethyl ether في نزول العينات من خلال عمود الفصل بعد أن تم ترشيحه وطرده الغازات منه باستعمال جهاز الترددات فوق الصوتية (Sonicator) وبمعدل جريان (Flow rate) 0.5 مل/دقيقة وعند طول موجي Wavelength 250 نانوميتر. رسم المنحنى لكل عينة ذاتياً بواسطة الحاسوب أخذت قراءات القياس المتضمنة مساحة المنحنى والمدة الزمنية اللازمة للاحتباس Retention Time , ومن زمن الاحتباس أمكن تشخيص المركب المعزول من العينات مقارنة مع زمن الاحتباس للعينة القياسية. وحسبت النسبة المئوية لتواجد مركب المنثول وتقدير كمياته في جميع العينات النباتية بإتباع المعادلتين الآتيتين.

$$\text{النسبة المئوية للمركب} = S / T \times 100$$

S : تمثل مساحة المنحنى لمركب المنثول القياسي (المقارنة) .

T : تمثل مساحة المنحنى لمركب المنثول المعزول من العينات المختبرة .

كمية المركب في العينة = وزن المركب المعزول × النسبة المئوية للمركب / 100.

النتائج Results

تأثير الإجهاد الملحي (Salt stress) في معدل التضاعف و الوزنين الرطب والجاف للزروعات . أظهرت النتائج في جدول (1) بان هناك تأثير معنويًا لتركيز الملح NaCl في معدل تضاعف الأفرع لنبات النعناع الفلفلي ، إذ أعطى التركيز المنخفض من NaCl (2 غم/لتر) أكبر عدد للأفرع مقارنة مع معاملة السيطرة والمعاملات الأخرى . اقل عدد لأفرع النبات كان في تركيز 6 غم/لتر من ملح الطعام . إما بالنسبة لتركيز 8 غم/لتر من NaCl سببت هلاك الزروعات .

من خلال البيانات الموضحة في جدول (2) يلاحظ تأثر الوزنين الجاف والرطب بتركيز الملح NaCl ، إذ يلاحظ إن الملح NaCl قد شجع النمو في التركيز 2 غم/لتر منه، والذي اختلف عند إضافة 6 غم/لتر من الملح إذ أنتج 0.28 غم/نبات ، إلا إن زيادة التركيز الملحي سبب نقصانًا معنويًا في الوزنين الجاف والرطب للزروعات 8 غم/لتر يلاحظ توقف النمو نهائيًا وبالتالي هلاك الزروعات .

كما إن للجزء النباتي دور في وزن النبات الطري و الواضح إن العقدة هي أكثر تحمل من القمة لذا نلاحظ تفوقها في الوزن الطري على الأوزان الطرية للنباتات الناتجة من القمة .

واتفقت نتائج هذه التجربة مع دراسة على النعناع القرنفلي (17) وعلى الباقلاء (18) و على الحلبة (19)

ان العديد من الدراسات تشير الى ان الإجهاد الملحي يؤثر سلبيًا في الوزنين الجاف والرطب (20) على الفجل .

جدول (1) : تأثير تراكيز ملح NaCl والجزء النباتي وتداخلاتهما في عدد الافرع الكليه للنعناع الفلفلي *Mentha piperita*

معدل تأثير التركيز	قمة	عقدة	الجزء النباتي
			التركيز (غم/لتر)
15.34	14.67	16.00	0
22.33	18.33	26.33	2
9.00	8.67	9.33	4
5.17	4.00	6.33	6
	11.42	14.50	معدل تأثير الجزء النباتي
	الجزء النباتي = 1.380 التركيز = 3.391 التداخل = 5.846		LSD 0.05

جدول (2) : تأثير تراكيز ملح NaCl والجزء النباتي وتداخلاتهما في الوزنين الجاف والرطب (غم) للنعناع الفلفلي *Mentha piperita*

معدل تأثير التركيز	الوزن الجاف		الوزن الرطب			صفات النمو
	قمة	عقدة	معدل تأثير التركيز	عقدة	قمة	الجزء النباتي
0.112	0.129	0.094	1.00	1.10	0.89	0
0.172	0.194	0.150	1.74	2.46	1.01	2
0.077	0.079	0.074	0.58	0.71	0.45	4
0.034	0.034	0.034	0.28	0.33	0.23	6
	0.109	0.088		1.15	0.65	معدل تأثير الجزء النباتي
	الجزء النباتي = 0.084 التركيز = 0.119 التداخل = 0.399		الجزء النباتي = 0.221 التركيز = 0.472 التداخل = 0.691			LSD 0.05

تأثير الإجهاد الملحي في محتوى الزر وعات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* من ايونات البوتاسيوم و الصوديوم و الكلور
أوضحت النتائج في جدول (4) ان تركيز K^+ قد تناقص معنوياً مع زيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم اذ أعطت معاملة السيطرة اعلي تركيزا لايون البوتاسيوم جدول (4) . بينما أدت زيادة تركيز الملح إلى زيادة معنوية في تراكيز ايونات الصوديوم و الكلورايد عند مقارنتها مع معاملة السيطرة . وان الجزء النباتي المستعمل له تأثير كذلك اذ أعطت العقدة فيما اكبر من القمة النامية (جدول 3-ب ج) .
واتفقت الكثير من الدراسات على دور الملح NaCl خفض محتوى النبات من البوتاسيوم وزيادة ايونات الصوديوم و الكلورايد (20) على الفجل و (19) على الحلبة. في نباتات أخرى (17) و (21) على الباقلاء, و (22) على الطماطة .

جدول (4): تأثير تراكيز ملح NaCl والجزء النباتي وتداخلاتهما في محتوى لزروعات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* من ايون البوتاسيوم (ملغم/غم وزن جاف)

معدل تأثير التركيز ملغم/غم وزن جاف	قمة	عقدة	الجزء النباتي
			التركيز (غم/لتر)
1.59	1.53	1.64	0
1.41	1.34	1.47	2
1.34	1.28	1.39	4
1.27	1.21	1.33	6
	1.34	1.46	معدل تأثير الجزء النباتي
الجزء النباتي = 0.014			LSD 0.05
التركيز = 0.124			
التداخل = 0.338			

جدول (5): تأثير تراكيز ملح NaCl والجزء النباتي وتداخلاتهما في محتوى زرورات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* من ايون الصوديوم (ملغم/غم وزن جاف)

معدل تأثير التركيز	قمة	عقدة	الجزء النباتي
			التركيز (غم/لتر)
0.174	0.154	0.193	0
0.485	0.476	0.494	2
0.661	0.612	0.710	4
0.748	0.703	0.793	6
	0.486	0.548	معدل تأثير الجزء النباتي
الجزء النباتي = 0.033			LSD 0.05
التركيز = 0.200			
التداخل = 0.492			

جدول (6): تأثير تراكيز ملح NaCl والجزء النباتي وتداخلاتهما في محتوى زرورات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* من الكلورايد (ملغم/غم وزن جاف)

معدل تأثير التركيز	قمة	عقدة	الجزء النباتي
			التركيز (غم/لتر)
1.78	1.48	2.08	0
5.80	5.61	6.00	2
6.61	6.07	7.16	4
8.61	8.53	8.70	6
	5.42	5.98	معدل تأثير الجزء النباتي
الجزء النباتي = 0.22			LSD 0.05
التركيز = 1.92			
التداخل = 3.19			

تأثير الاجهاد الملحي Salt stress لملاح NaCl في تركيزا لحمض الاميني البرولين (Proline) تبين من خلال النتائج في الجدول (7) بأن تراكم البرولين يزداد في أنسجة زروعات النعناع الفلفلي في تركيز 6غم/لتر من ملح NaCl وبفارق معنوي اذ بلغ 0.1757 ملغم/غم وزن جاف وهي اعلى قيمه له . و كان الفارق غير معنوي في تركيز الحمض الاميني البرولين الزروعات الناتجة من القمة او العقدة . تتفق هذه النتائج مع عدد من الباحثين على ان النباتات المعرضة للشد الملحي ويزداد هذا التراكم كلما زاد تركيز NaCl في الوسط الزراعي مع (19) و (23) .

جدول (7): تأثير تراكيز ملح NaCl والجزء النباتي وتداخلاتهما في محتوى زروعات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* من البرولين (ملغم/غم وزن جاف)

معدل تأثير التركيز	قمة	عقدة	الجزء النباتي
			التركيز (غم/لتر)
0.1710	0.1706	0.1714	0
0.1726	0.1721	0.1731	2
0.1741	0.1736	0.1746	4
0.1757	0.1752	0.1761	6
	0.1729	0.1738	معدل تأثير الجزء النباتي
الجزء النباتي = 0.0010			LSD 0.05
التركيز = 0.0021			
التداخل = 0.0022			

تأثير الإجهاد الملحي في المحتوى الكلي للكلوروفيل و الكربوهيدرات الذائبة. دلت النتائج في الجدول (8) بأن NaCl بتركيزه 2 غم/لتر في الوسط الزراعي أدى إلى زيادة الكلوروفيل الكلي مقارنة بمعاملة السيطرة و التركيزين الأعلى (4 و 6 غم/لتر) من الملح NaCl . إما دور الجزء النباتي المستعمل في وسط التضاعف في محتوى الكلوروفيل فقد كان معنوياً أيضاً وتفاوتت الزروعات الناتجة من العقدة على الزروعات الناتجة من القمة في المحتوى الكلي للكلوروفيل . وبشكل عام فان الإجهاد الملحي يؤثر في المحتوى الكلي للكلوروفيل وقد وجد ذلك في دراسة (20) على نبات الفجل.

جدول (8) : تأثير تراكيز ملح NaCl والجزء النباتي وتداخلاتهما في محتوى زروعات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* من لكلوروفيل (ملغم/ 100غم وزن جاف)

معدل تأثير التركيز	قمة	عقدة	الجزء النباتي
			التركيز (غم/لتر)
23.25	22.50	24.00	0
28.29	26.98	29.60	2
20.02	19.50	20.53	4
13.58	15.33	11.83	6
	21.08	21.49	معدل تأثير الجزء النباتي
للجزء النباتي = 0.25			LSD 0.05
التركيز = 2.22			
التداخل = 4.02			

إما فيما يتعلق بتأثير الإجهاد الملحي في تركيز الكربوهيدرات الذائبة فقد أظهرت النتائج في الجدول (9) بأنه كلما زاد تركيز NaCl في الوسط الزراعي أدى إلى زيادة معنوية في محتوى الزروع من المواد الكربوهيدراتية الذائبة وكانت أعلى قيمة في الوسط الذي يحتوي على 6 غم/لتر مقارنة بالمعاملات الأخرى. ومن جانب آخر بينت النتائج بان للجزء النباتي أثره المعنوي في كميته المواد الكربوهيدراتية الذائبة إذ ان كميته الكربوهيدراتية الذائبة التي أنتجتها القمة النامية (shoot tip) كانت أكثر محتوى الزروع الناتجة من العقدة (node) . واتفقت هذه النتائج مع (17) على الباقلاء , و (19) على الحلبة و (24) على الرز.

جدول (9) : تأثير تراكيز ملح NaCl والجزء النباتي وتداخلاتهما في محتوى الكربوهيدرات (ملغم/غم وزن جاف) لزروع النعناع الفلفلي *Mentha piperita*

معدل تأثير التركيز	قمة	عقدة	الجزء النباتي
			التركيز غم/لتر
100	120	80	0
161	162	160	2
216	256	176	4
226	272	180	6
	202	149	معدل تأثير الجزء النباتي
للجزء النباتي = 40 لتركيز = 59 للتداخل = 75			LSD 0.05

تأثير الإجهاد الملحي في تركيز المنثول أظهرت النتائج في جدول (10) بان كمية المنثول قد تأثرت معنويًا في التراكيز الملحية من NaCl وقد أعطى التركيز المنخفض من الملح 2 غم /لتر أعلى قيمة لهذا المركب مقارنة بالتراكيز الأخرى وأقل كميته منه عند التركيز 6 غم /لتر من NaCl كما بينت النتائج إن للجزء النباتي تأثير في تركيز المنثول فقد أعطت . الزروع الناتجة من العقدة أكثر محتوى من المنثول مقارنة مع الزروع الناتجة من القمة . وهذه النتائج اتفقت مع الدراسة على تأثير الإجهاد الملحي على كمية الزيت في نبات الكزبرة (25) . ومن دراسة (36) وضحت نتائجها إن المركبات التربينية الموجودة ضمن الزيوت العطرية essential oils لها القدرة على استبعاد الجذور الحرة , والحفاظ على سلامة الغشاء الداخلي للميتوكوندريا.

جدول (10) : تأثير تركيز ملح NaCl والجزء النباتي وتداخلاتهما في محتوى زروع النعناع الفلفلي *Mentha piperita* من مركب المنثول (ملغم/غم وزن جاف)

معدل تأثير التركيز	قمة	عقدة	الجزء النباتي
			التركيز (غم/لتر)
0.95	0.92	0.98	0
0.99	0.96	1.02	2
0.92	0.90	0.95	4
0.89	0.87	0.91	6
	0.91	0.96	معدل تأثير الجزء النباتي
للجزء النباتي = 0.03 لتركيز = 0.09 للتداخل = 0.12			LSD 0.05

المناقشة Discussion

أوضحت نتائج هذه التجربة بان التركيز المنخفض من ملح 2 غم / لتر قد شجع النمو . وقد فسر(26) إن التركيز 2 غم/لتر قد شجع النبات على امتصاص المغذيات من قبل الخلايا كوسيلة من وسائل التأقلم وبدافع جيني . وأضاف (27) من خلال أبحاثه على نبات *(Sonneratia) mangrove* بأن وجود الإنزيم *(SOD) superoxide dismutase* يعمل بفعالية على التقليل من ضرر الجذر الحر للأوكسجين *free oxygen radical* وازدادت فعاليته في التراكم الملحية الدنيا . ويعود السبب في زيادة النمو وزيادة وزنه الطري في التركيز المناسب للبنزائل أدنين إذ أن (BA) يعمل على الموازنة ما بين الشحنت الموجبة والسالبة على طرفي الغشاء الخلوي وبالتالي زيادة امتصاص منظمات النمو الأخرى التي تؤدي بالتالي إلى الارتفاع بمستوى البناء الحيوي ،منها زيادة بناء البروتين والانقسام الخلوي مؤدياً إلى زيادة الوزن الطري (28) . وإما انخفاض النمو في التركيزين (4 و 6 غم/لتر) قد يعود إلى انخفاض كمية الماء الداخلة للخلية وبذلك يكون السبب ازموياً أو تأثيراً سمياً (10) كما ان للإجهاد دور في خفض العمليات الحيوية للنبات منعكسا ذلك على الوزنين الطري و الجاف (29) .

ويعزى تناقص K^+ وزيادة Na^+ بسبب دخول Na^+ إلى الخلية عبر القنوات المنفذة له في الغشاء البلازمي وتدفق K^+ إلى الخارج بنسبة تعادل ثلاثة أضعاف تدفق Na^+ (20) . وعلل سبب انخفاض K^+ إلى التنافس بين Na^+ المتوفرة بكثرة مع K^+ المحدودة الكمية (21). واتفقت الكثير من الدراسات على دور الملح NaCl خفض محتوى النبات من البوتاسيوم (20) على الفجل و(21) على الفاصوليا

اذ إن لتراكم البرولين نتائج ايجابية على النبات من خلال عمله على زيادة كفاءة النبات لامتصاص K^+ ويزيد من محتوى الكلوروفيل (17) .

ومن خلال ما توصل إليه (30) وجد إن دور البرولين في حماية المايكوتندريا من تأثير NaCl المعيق لعملية النقل الالكترونى في المايكوتندريا .

وأثبتت دراسة (31) على فول الصويا إن فقدان الأوراق للبروتين بسبب عوامل الإجهاد الملحي أو الاجهاد المائي يتم تعويضه من الأحماض الامينية الحرة في السايكوبلازم ويدخل البرولين والاسبارجين بنسبة 41 % من البروتين المعوض من خلال تزويد الوسط الخلوي بالنيتروجين ويرجع سبب تراكم البرولين في السايكوبلازم حيث عمله كمنظم للازموزية بين السايكوبلازم والفجوات دون حدوث ضرر على عمل الإنزيمات والعضيات الخلوية .

وأثبتت دراسة (31) على فول الصويا إن فقدان الأوراق للبروتين بسبب عوامل الإجهاد الملحي أو المائي يتم تعويضه من الأحماض الامينية الحرة في السايكوبلازم ويدخل البرولين والاسبارجين بنسبة 41% من البروتين المعوض من خلال تزويد الوسط الخلوي بالنيتروجين

فسر(33) سبب تأثير الكلوروفيل بالمستويات الملحية العالية من خلال الفحص بالمجهر الالكتروني للبللاستيده الخضراء إن الثالوكويد يكون منتفخا وقلة عدد الكرانا في الخلية.

وقد وضح (34) على نبات البطاطا إن البرولين أكثر تواجدا وتراكما في الأوراق ولذا فله الدور الكبير في دفع الضرر الناتج من الشد الملحي وهذا يعكس على البلاستيدات الخضراء الموجودة في الأوراق إذ لم تتأثر عند التراكيز المنخفضة من NaCl بينما يعمل BA على تنشيط الخلايا وأضاف كما إن هناك ارتباط كبير بين البرولين والنمو وبقاء النبيتات حية .

وربما يعمل النبات إلى زيادة السكريات الذائبة لدورها في الحفاظ على عمل الجينات إذ إن السكريات الذائبة مع البرولين تعمل كسياج واق للجينات لتتمكن الأخيرة من إرسال إشارات إلى الإنزيمات المسؤولة عن حياة الخلية وبالنتيجة ديمومة النبات (35) . ومن دراسة (36) وضحت نتائجها إن المركبات التربينية الموجودة ضمن الزيوت العطرية *essential oils* لها القدرة على استبعاد الجذور الحرة , والحفاظ على سلامة الغشاء الداخلي للمايكوتندريا ولذلك فقد يلجأ النبات إلى زيادة تكوينها عند التراكيز المنخفضة.

المصادر References

- 1 . الكاتب ، يوسف منصور (1988) . تصنيف النباتات البذرية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد . العراق .
- 2 . Tucker, A.O. and Chambers, H.L. (2002). *Mentha Canadensis* L. (Lamiaceae): a relict amphidiploids from the Lower Tertiary, *Taxon*, 51: 703–718.
- 3 . Cappello, G. (2007) . "Peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome : A prospective double blind placebo-controlled randomized trial " *Digestive and liver Disease*, 39 : 536 .
- 4 . Gershenzon, J.; Mc.Conkey, M.E. and Croteau, R. (2000). Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint *Plant Physiol.*, 122: 205–213.
- 5 . George, E. F. ; Hall, M. A. and De Klerk, G. J.(2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* . . The Background, 3rd Ed., Published by Springer, Dordrecht, The Netherlands.

- 6 . Bajaj, X.P.S. ;Furmonanwa, M. and Olszowska ,O.(1998).Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants . Biotechnology in Agriculture and Forestry. J .Med. Aromatic plants, 4:60-103
- 7 . Chaput, M. E.; San, H.; De Hys, L.; Grenier, E.; David, H. and David, A. (1996). How plant regeneration from *Mentha piperita* and *Mentha citrata* Ehrh. Leaf protoplasts affect their monoterpene composition in field condition. J. Plant Physiol., 149: 481–488.
- 8 . Clavo , S. M. (1993). Accumulate of monoterpenes in shoot proliferation culture of *Lavendula latifolia* .Medical plant Science, 91:207-212.
- 9 . الزبيدي ، احمد حيدر . (1989) . ملوحة التربة – الاسس النظرية والتطبيقية – جامعة بغداد . بيت الحكمة – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . العراق .
- 10 . Flowers, T.J. (2004). Improving crop salt tolerance. J. Exp. Bot., 55: 307-319.
- 11 . Zair, I. A.; Chalya,K.; Sabournji , M. and Chlyah, H. (2003). Salt Tolerance Improvement in some Wheat Cultivars after application of *in vitro* Selection pressure . Plant Cell tissue organ Cult., 73:237-244.
- 12 . Scragg, A.H. (1999). Secondary Product from cultured cells and organs 4th Ed., Oxford University Press ,pp. 115-118.
- 13 . Murashige,T. and Skoog F.(1962).A revised medium from rapid growth and bioassays with tabacoo tissue culture .Physiol.Plant, 15:437-497.
- 14 . إبراهيم ,محمد عاطف .حجاج ,محمد نضيف . مصطفى ,إبراهيم درويش .(2000). الطرق العملية لتقدير المكونات الكيميائية في الأنسجة النباتية . منشأة المعارف في الإسكندرية . جمهورية مصر العربية .
- 15 . Dubois , M.; Gills,A.K. ;Hamilton, J. K.; Roloers ,R.A. and Smith, F. (1956) . Colorimetric method for determination of sugar and related substance .Anal.Chem. , 28:350-356.
- 17 . Al-Amier ,H. and CraKer, L.E.(2007). *In-vitro* Selection for Stress Tolerant Spearmint . Whipkey (ed.) ASHS Press ,Alexandria, A .306-311.
- 18 . Gadallah, M.A.A. (2004) .Effects of Proline and Glycinebetaine on *Vicia Faba* Responses to Salt Stress. Netherlands Springer . 42 (2) . 249-257 .
- 19 . Niknam, V. ; Razavi, N. ; Ebrahimzadeh, H. and Sharifzadeh, B. (2006) . Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents, and antioxidant enzymes in seedlings and calli of two *Trigonella* species. Biol. Plant, 50 (4): 591-596,
- 20 . Shaddad, M. A. (1990), The effect of proline application on the physiology of *Raphanus sativus* plants grown under salinity stress .Biologia Plantarum, 32: 104-112
- 21 . Yuncai, H. and Schmidhalter, U. (2005), Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants . Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 168: 541-549.
- 22 . Shibli, R. A.; Kushad, M.; Yousef, G.G. and Lila, M. A. (2007). Physiological and biochemical responses of tomato microshoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation. Plant Growth Regul., 51:159–169.
- 23 . Akihiro, U.; Shono, M. and Takabe. T. (2008) . Altered expression of barley proline transporter causes different growth responses in Arabidopsis. Plant cell Physiol., 227(2):277-286
- 24 . Dubey ,R.S. and Singh, A.K.(2004) . Salinity Induces Accumulation of Soluble Sugars and Alters the Activity of Sugar Metabolising Enzymes in Rice Plants . Springer Netherlands. Biologia Plantarum, 42(2): 233-239
- 25 . Neffati, M. and Marzouk, B.(2009). Erratum to “Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions . Industrial Crops and Products, 29:657.
- 26 . Rains, D. W. and Croughan , T. P.(1986). Isolation and characterization of mutant cell line and plants salt-tolerant : Cell culture and somatic cell Genetic of plants. Acad. Press. New York. pp.537-547.
- 27 . Liao Yan, C. G., (2007).Physiological adaptability of three mangrove species to salt stress Acta Ecologica Sinica, 27: 2208-2214.

- 28 . Dodds, J.H. and Roberts,W. (1985). “Experiments in Plant Tissue Culture”. Cambridge University. Press. U.K.
- 29 . Smith, M.A.L. ; Spomer, L.A. ; Shibli, R.A. and Knight, S.L. (1992).Effect of NaCl salinity on miniature dwarf tomato , shoot and root growth responses , fruit production and osmotic adjustment. J. Plant Nutrition, 15 : 2329-2341
- 30 . Hamilton, E.; William, I. and Heckathorn, S. A. (2001), Mitochondrial adaptations to NaCl Complex is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. Plant Physiology, 126: 1266-1274 .
- 31 . Yasuo, F. Y. (2008). Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*). Dept. of Agricultural Chemistry, Kyushu Univ. Physiologia Plantarum, 61 : 622 – 628 .
- 33 . Fernanda, F. (2009).Effects of long-term salt stress on antioxidant defense systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. Annals of Applied Biology, 145: 185-192.
- 34 . Carlos, A. M.(1999). *In vitro* salt tolerance and proline accumulation in potato (*Solanum tuberosum*.). Plant Sci., 116:177-184
- 35 . Hellmann, H. ; Funck, D.; Rentsch, D. and Frommer, W. B.(2000). Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application. Plant physiology, 123: 79-89.
- 36 . Bakkali F. ; Bakkali, S. and Averbeck, D. (2008) Biological effects of essential oils – A review Food and Chemical Toxicology, 46: 446-475.