تأثير تراكيز2,4-D في انتاج الزيوت النباتية Linoleic acid and Oleic acidمن كالس نبات زهرة الشمس.L *Helianthus annus*

سهام عبد الرزاق سالم عمر حمد عبيد
سنا قاسم ناصر معروف
الكلية التقنية/المسيب – قسم تقنيات الأنتاج النباتي

المستخلص:
نفذت هذه الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع للكلية التقنية / المسيب بهدف معرفة تأثير تراكيز مختلفة من 2,4-Dihydroxyphenoxy acetic acid (2,4-D) في أنتاج الزيوت النباتية Linoleic acid and Oleic acid من كالس بذور زهرة الشمس.L *Helianthus annus*
زرعت البذور المعقمة بعد ازالة غلافها على وسط MS المعقم والمجهزبـ 2,4-Dبالتراكيز (2.0,1.5,1.0,0.5,0.2,0.1,0.0) ملغم/لتر وأخذت النتائج بعد 40 يوما من الزراعة.
اظهرت النتائج تفوق التركيزين (1.5و1.0) ملغم/لتر 2,4-D معنويا" في متوسط الوزن الطري للكالس مقارنة ببقية التراكيز اذ أعطيا (20.2 و20.6) غم على التتابع، في حين لم تعط معاملة السيطرة أية أستجابة لتكوين الكالس.
وكان للتركيزين نفسيهما تأثير معنوي في زيادة متوسط الوزن الجاف معنويا" مقارنة ببقية التراكيز اذ أعطيا متوسطا" بلغ (5.8 و6.1) غم على التتابع.
و بينت النتائج ايضاأن أعلى كمية لزيت Oleic acid كانت عند التركيز 2.0 ملغم/لتر 2,4-D حيث بلغت 0.68ملغم/غم وزن جاف والتي اختلفت معنويا" عن بقية التراكيز باستثناء التركيز 1.5ملغم/لتر (0.60ملغم/غم وزن جاف)، بينما اعلى كمية لزيت Linoleic acid كانت عند التركيز 1.0 ملغم /لتر 2,4-D اذ بلغت 0.80 ملغم /غم وزن جاف والتي فاقت معنويا " جميع التراكيز , في حيث انخفضت هذه الكمية معنويا في التراكيز المرتفعة من 2,4-D وصولا" الى اقل كمية عند التركيز 2.0 ملغم /لتر 2,4-D والتي بلغت 0.40 ملغم /غم وزن جاف.نستنتج من ذلك أن كمية الزيت النباتي تزداد في الكالس بزيادة تركيز 2,4-D في الوسط الغذائي مقارنة بالسيطرة.

المقدمة:
يعد نبات زهرة الشمس .L *Helianthus annus* احد اهم النباتات الزيتية في العالم ينتمي الى العائلة المركبة Compositae استعملها الهنود كدقيق في صناعة الخبز وتكون نسبة الزيت في هذا المحصول حوالي 35-55% . وتتميز زيوت زهرة الشمس بصورة عامة بأنها اقل الزيوت متاعب للهضم وذلك لاحتوائها على مستوى عال من الزيوت غير المشبعة من الـ Oliec acid والـ Lin Oleic acid .كما تحتوي على فيتامين E الضروري لصحة الجلد وخصوصا" الحوامل في الاشهر الاخيرة بالاضافة الى احتواء زيوت زهرة الشمس على فيتامين Dو A المعروفان بفوائدهما للجسم (Cowan , 1990).
يعالج زيت زهرة الشمس اكثر من عشرين مرضا" منها امراض تختص بمناعة الجسم والجهاز الهضمي والجهاز التناسلي والعظام والاعصاب ومحاربة امراض الشيخوخة

والامراض النفسية والامراض الجلدية كثيرة منها الذئبة الحمراء والحزام الناري والاكزيما (Parekh and Chamda , 2008) .ونظرا" للخصائص الغذائية والعلاجية فقد ازداد الطلب على زيادة انتاج زيت زهرة الشمس, الا ان زراعة المحصول حقليا تواجه العديد من المشاكل كالجفاف وملوحة التربة والمبالغ العالية المترتبة على تحضير الارض وزراعتها وحجم المساحةالمزروعة والظروف الجوية غير المناسبة والأمراض المختلفة المتسببة عن الفطريات او الفيروسات والتي تؤدي الى انخفاض في الحاصل المنتج (Sujatha *et al.* , 2012) . اثبت العلماء ان لمنظمات النمو تاثيرا" واضحا" على مكونات الحاصل مثل الكاربوهيدرات والبروتينات مع نوع وكمية منظم النمو المستخدم (Mohammad and Hasan 1988) .لذا جاءت هذه الدراسة لتحديد مدى تأثير منظم النمو 2,4-D في انتاج الاحماض الدهنية Oliec acid و Lin oleic acid في الكالس المنتج من بذور زهرة الشمس .

المواد وطرائق العمل:

تعقيم وزراعة الأجزاء النباتية :

نفذت هذه الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع للكلية التقنية/المسيب خلال سنة 2010-2011 حيث أخذت بذور زهرة الشمس(*Helianthus annus* L.) وغسلت بالماء الجاري جيدا" لأزالة الأتربة والأوساخ ثم نقعت بالماء لمدة 24 ساعة ،بعد ذلك عقمت بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز 1.5% لمدة 15 دقيقة في كابينة أنسياب الهواء الطبقي ، غسلت بعد ذلك بالماء المقطر المعقم مرتين لمدة دقيقتين في كل مرة .أجريت عملية أزالة الغلاف الخارجي للبذور وتم تجريح البذور بالكامل وزرعت على وسط MS المعقم (Murashige and Skoog ,1962) المجهز بتراكيز مختلفة من الأوكسين 2,4-D (2.0,1.5,1.0,0.5,0.2,0.1,0.0) ملغم/لتر.

أستعملت جارات زجاجية بأرتفاع25 سم وقطر فوهتها 2.5 سم حاوية على 30 مل من الوسط الغذائي . تضمنت التجربة زراعة خمس بذور منزوعة الغلاف في كل جارة وبواقع ثلاث جارات لكل تركيز . حضنت الزروعات بدرجة حرارة 25 ± 2 °م وشدة أضاءة 1000 لوكس لمدة 16 ساعة يوميا" . أخذت النتائج بعد 40 يوما" من تأريخ الزراعة .

تقدير الوزن الطري (غم) للكالس المستحث من البذور :

أستخرج الكالس الطري من الجارات الزجاجية بعد مرور 40 يوما" من الزراعة وتم حساب الوزن الطري له بأستخدام الميزان الحساس نوع Mettler 601 ، حيث أعتمد هذا الوزن في أختيار
الوسط الغذائي الأمثل لأستحثاث أنسجة الكالس من بذور نبات زهرة الشمس .

تقدير الوزن الجاف (غم) للكالس المستحث من البذور :

تم حساب الوزن الجاف للكالس بعد أخذ وزنه الطري في الفقرة السابقة وجفف بأستخدام الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 70 °م لمدة 48 ساعة وصولا" الى الجفاف التام . وحسب الوزن الجاف للكالس بأستخدام الميزان الحساس .

استخلاص الزيوت النباتية من أنسجة الكالس وتنقيتها :

تم مزج 5 غم من كالس زهرة الشمس مع 70 مل من بنزين بتروليوم بدرجة حرارة 50-70 ° م ، ثم رج المزيج جيدا"في حمام مائي هزاز لمدة 30 دقيقة ، بعدها تم تبخير المذيب وجفف المستخلص بدرجة حرارة 103 ° م لأزالة بقايا المذيب ثم برد في مكثفات لمدة 30 دقيقة وقيس وزنه . كررت هذه العملية الى أن تم الحصول على وزن ثابت للمستخلص

(Ruter,2002) . تمت تنقية الدهون من الشوائب المختلفة (الأحماض الأمينية و السكريات) بأستخدام عمود حبيبات السيفادكس Sephadex G-25column (Arudi *et al*. ,1983)

التقدير الكمي للدهون:

تم تقدير الدهون باستخدام جهاز High Pressure-Liquid Chromatography (HPLC) حيث استخدم الشكل القياسي لحامض Oleic وهو CH3(CH2)7CH=CH(CH2)7 (Cis-9-Octadecenoic acid) و Elainic acid كشكل قياسي للحامض Linoleic acid من شركة Sigma FT-IR1 (Dias-Guerra, 1991) .

التحليل الاحصائي:

تم تحليل النتائج احصائيا" باستخدام التصميم العشوائي الكامل (CRD) Completely Randomized Design وقورنت المتوسطات حسب قيمة أقل فرق معنوي (LSD) Least Significant Difference وعلى مستوى احتمالية 0.05 (الساهوكي ووهيب, 1990) .

النتائج والمناقشة:

تبين النتائج الموضحة في الجدول (1) ان معاملة السيطرة (الوسط الخالي من الاوكسين) لم تعط أية استجابة لتكوين الكالس .وكانت هناك زيادة معنوية في متوسط الوزن الطري للكالس مع زيادة تركيزD-2,4 المضاف الى الوسط وصولا" الى التركيز 1.5 ملغم/لتر الذي أعطى أعلى متوسط وزن بلغ 20.6 غم والذي فاق معنويا" جميع المعاملات بأستثناء معاملة التركيز 1.0 ملغم/لتر والتي أعطت متوسطا" بلغ 20.2 غم . في حين أنخفض الوزن الطري معنويا" بأزدياد التركيز عن التركيز المثالي. وتوضح الصورة (1) الكالس المستحث من بذور زهرة الشمس .

كما يلاحظ من الجدول ذاته أن تراكيز 2,4-D كانت أيضا" مؤثرة معنويا" في زيادة متوسط الوزن الجاف بزيادة التركيز ، اذا أعطى التركيز 1.0 ملغم/لتر أعلى معدل بلغ 6.1 غم والذي تفوق معنويا" على بقية التراكيز ، ولكنه لم يختلف معنويا" عن التركيز 1.5 ملغم/لتر الذي أعطى معدلا" بلغ 5.8 غم .

جدول (1) :تأثير تراكيز 2,4-D (ملغم/لتر) في متوسط الوزنين الطري والجاف (غم) للكالس المستحث من جميع بذور زهرة الشمس *Helianthus annus* L.

تركيزD-2,4 (ملغم/لتر)	متوسط الوزن الطري (غم)	متوسط الوزن الجاف (غم)
0.0	**0.0**	**0.0**
0.1	**7.2**	**4.0**
0.2	**8.6**	**4.3**
0.5	**16.4**	**5.1**
1.0	**20.2**	**6.1**
1.5	**20.6**	**5.8**
2.0	**18.0**	**5.0**
L.S.D	**0.403**	**0.421**

JMAS
ISSN:2226-4086 Volume: 1 No:2 Sep:2013

- ب -

صورة (1) : تكوين الكالس من بذور نبات زهرة الشمس المزروعة على وسط MS مجهزا بالتركيز 3ملغم/لتر من 2,4-D .
(أ): البذور مزروعة على الوسط أعلاه .(ب): تكوين الكالس من البذور بعد 40 يوما من الزراعة على الوسط أعلاه

يتبين مما تقدم أن عدم قدرة الجزء النباتي على تكوين الكالس في وسط خال من منظمات النمو ربما يعود الى أنخفاض محتواه الداخلي من الأوكسينات التي تكون ضرورية في أستحثاث الكالس ، في حين تزداد قابلية الأجزاء النباتية على تكوين الكالس بأ ستخدام أنواع وتراكيز معينة من الأوكسينات والتي قد تختلف تراكيزها المناسبة لأستحثاث الكالس بأختلاف الجزء النباتي وظروف الزراعة(Yong *et al*.,2000 ;Al-Juboury,2007)

ان زيادة متوسطات الوزنين الطري والجاف للكالس في الوسط الحاوي على 2,4-D مقارنة بمعاملة السيطرة قد يعود الى تأثيره في تشجيع الخلايا على الأنقسام والأتساع في حين ان أنخفاض متوسط هذين الوزنين في التراكيز العالية منه قد يعزى الى أن هذه التراكيز تؤدي الى تثبيط نمو الخلايا وربما توقفها عن الأنقسام والأتساع (الدليمي,1993;2005, Mohammad and Amin).

وتشير النتائج في الجدول (2) الى تأثير تراكيز 2,4-D في كمية الزيوت النباتية المنتجة من الكالس ،اذ يلاحظ تأثير معنوي في كمية زيت Oleic acid بزيادة تركيز 2,4-D تدريجيا" وصولا" الى التركيز 2.0 ملغم/لتر والذي تفوق معنويا" على بقية التراكيز وأعطى أعلى

متوسط لكمية Oleic acid والتي بلغت 0.68 ملغم/غم وزن جاف ، تلاه في ذلك التركيز 1.5 ملغم/لتر اذ أعطى متوسطا" بلغ 0.60 ملغم/غم .في حين لم تعط معاملة السيطرة أي كمية لعدم تكون الكالس .

ومن نتائج الجدول نفسه يلاحظ أن هناك زيادة تدريجية ومعنوية في كمية الزيت Linoleic acid مع زيادة تركيز 2,4-D وصولا"الى التركيز 1.0ملغم/لتر والذي أعطى أعلى متوسط بلغ 0.80 ملغم/غم وزن جاف. وأنخفض هذا المتوسط معنويا" بزيادة التركيز اذ أعطى التركيزان 1.5 و 2.0 ملغم/لتر أقل المتوسطات (0.40و0.46 ملغم/غم وزن جاف على التتابع) لكمية Linoleic acid مقارنة بالتركيز المثالي والتراكيز المنخفضة من 2,4-D .

جدول(2) : تأثير تراكيز 2,4-D (ملغم/لتر) في كمية الزيوت الثابته(ملغم/غم وزن جاف) Oleic acid و Linoleic acid في الكالس المستحث من بذور زهرة الشمس *Helianthus annus* L.

تركيز2,4-D (ملغم/لتر)	Oleic acid	Linoleic acid
0.0	0.0	0.0
0.1	0.12	0.63
0.2	0.18	0.74
0.5	0.19	0.76
1.0	0.20	0.80
1.5	0.60	0.46
2.0	0.68	0.40
L.S.D	0.032	0.021

يتبين مما تقدم أن محتوى Oleic acid قد أزداد مع زيادة تركيز 2,4-D بعكس Linoleic acid الذي أنخفضت كميته بزيادة التركيز .

من الواضح أن منظمات النمو النباتية تؤثر بشكل ملموس في نمو و أيض و تمايز خلايا النبات المزروعة ، اذ أشارت الدراسات الى تأثير منظمات النمو في مستويات النواتج الأيضية اذ يعتقد أنها لا تتفاعل مع المركبات الوسطية لتفاعلات مسالك البناء الحيوية ولكن يبدو أنها تغير من الظروف السايتوبلازمية برفع أو خفض مستويات النواتج المتكونة (Ikenaga et al.,2000) ، وأشارت الدراسات المتعددة الى أن زيادة تركيز 2,4-D في الوسط الغذائي يؤدي الى زيادة منتجات الأيض و تصنيع الأنزيمات الضرورية في مزارع الأنسجة النباتية فقد حفز هذا الأوكسين زيادة المحتوى الكلي لمركبات Ubiquinone و Scopolatin في مزارع التبغ النسيجية ومادة Carotenoid في مزارع الجزر (Ramawat,2004) . وكانت هناك زيادة في أنتاج أنزيمات الـ Peroxidases من المزارع الخلوية بزيادة تركيز 2,4-D الى 4.0 ملغم/لتر في الوسط الغذائي (Agostini et al. ,2000)

وعلى العكس من ذلك فأن تقليل تركيز 2,4-D في الوسط الغذائي يؤدي الى زيادة تراكم منتجات الأيض اذ لوحظ تأثير واضح للـ 2,4-D في تثبيط التمايز وحاصل منتجات الأيض الثانوية لكثير من النباتات ، في حين أزداد محتواها من هذه المركبات بتقليل تركيز 2,4-D في الوسط الغذائي (Ramawat,2004) .

المصادر:

1-الدليمي ,عمر حمد,2005. دراسة اولية في تو ظيف الزراعة خارج الجسم الحي لانتاج نباتات ذرة صفراء .L *Zea mays* متحملة للملوحة . رسالة ماجستير. الكلية التقنية /المسيب, هيئة التعليم التقني , العراق.

2-الساهوكي ,مدحت ووهيب ,كريمة محمد .1990. تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ,جامعة بغداد , مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر, العراق.

3-Agostini, E.; Milrad de Forchetti ,S.and Tiger, H.A.2000.Peroxidase from cell suspension cultures of *Brassica napus* .Biocell., 24(2):133-138.

4-Al-Juboury , S.A.S. 2007. *In vitro* induction of genetic variation in sour orange (*Citrus aurantium* L.) using tissue culture technique. Ph.D.thesis , College of Science,Babylon University.Iraq.

5-Arudi,R.L.;Sutherland ,M.W.and Bielski,B.H.J.1983. Purification of oleic acid and lionleic acid. J.Lipid Res., 24 :485-488.

6-Cowan,M.M.1990.Plant products as antimicrobial agents . Clinical Microbiol. Rev.,12:564-582.

7-Dias-Guerra,M.J.1991.J.Biol.Chem.266,23568,FT-NMR1(1),782: C/Reg Book 1 (1), 549:J/Sax6, 2092/Sigma FT-IR1(1),1443:D/Structure Index 1,78:A:2/Vapor Phase 3,588:A.

8-Ikenaga,T.;Handayani ,R. and Oyama,T.2000.Steroidal saponin production in callus cultures of *Solanum aculeatissimum* Jacq., Plant cell Rep., 19(12) : 1240-1244.

9-Mohammad A.M.and Hassan H.A.1988. Effect of some standard and prospective growth regulators on sun flower callus. II.Changes in protein,RNA,DNA and CarbohyDrate content.J/Univ. Kuwait (Sci.) 15: 281-290.

10-Mohammad,A.M.S. and Amin ,R.M.1993.*In vitro* callus growth and differentiation of *Pistachia vera* L. cv. Kalleghochi. Mutah J. Res. Stud., 8(5): 35-41.

11-Murashige, T.and Skoog, F. 1962. Arevised medium for rapid growth and .bioassays with tobacco tissue cultures. Phsiol. Plant.,15:473-49

12-Parekh,J.and Chamda,S.2008.*In vitro* antifungal activity of methanol extracts of some Indian medicinal plants against pathogenic yeast and moulds.AFri.J.Biotech.7(23):4349-4353.

Ramawat,K.G.2004.Plant Biotechnology.Chand and Company Ltd. New 13Delhi.

14-Ruter ,J.M.2002, Nursery production of tea oil camellia under different light conditions. In:Janick J,Whipkey A(eds) Trends in new crops and New uses(Proc 5th Nat Symp New Crops and New uses : Strength in .Diversity).ASHS,Alexandria, VA,PP:221-224

15-Sujatha ,M.; Vijay ,S.; Vasavi ,S.; Sivaraj ,N.; and Rao ,S.C. 2012.Combination of thidiazuron and 2-isopentenyladenine promotes highly efficient adventitious shoot regeneration from cotyledons of mature sunflower(*Helianthus annus* L.) seeds.Plant Cell,Tiss.,Organ Cult.J. ,111:359-372.

16-Yong ,H. ; Yong-Xun , H . ; Li , L . , Shan – Chun , C . and Jin- Ren , Z. 2000 . Study on the plantlet regeneration from Citrus deformed embryoids . Sou. Chin. Frui. , 29(6) : 13-14.

Effect of 2,4-D concentrations on production of plant oils(Oleic acid and Linoleic acid) from *Helianthus annus* L. callus

Abstract:

This study was conducted at the plant tissue culture laboratory in Technical College / Al-Musaib to investigate the effect of different concentrations of 2,4-Dihydroxy phenoxyacetic acid(2,4-D) in the production of plant fixed oils (Oleic acid and Linoleic acid) by induced callus from *Helianthus annus* L. seeds. Sterilized seeds were cultured after removal of their seed coats on sterile MS
medium supplemented with 2,4-D in the concentrations : 0.0,0.1,0.2,0.5,1.0,1.5, and 2.0 mg/ L. Results were recorded after 40 days of culturing.

Results showed that the contcentrations 1.0 and 1.5 mg /L of 2,4-D were the significant in the average of callus fresh weight compared with other concentrations by giving 20.2 and 20.6 g respectively, while there was no response for callus formation in control treatment

On the other hand ,the highest value of Linoleic acid was 0.80 mg/g dry weight at 1.0 mg/L 2,4-D ,which was a significant as compared with other concentrations, while there was a significant decrease in this value with high concentrations of 2,4-D until reached to the lower value (0.40 mg/g dry weight) at 2.0mg/L 2,4-D.The conclusion is that the plant oils will increase with the increasing of 2,4-D concentration in the medium compared with control.