تحفيز تكوين الكالس وظهور النموات الخضرية في نبات الهوهوبا *Simmondsia chinesis* (Link) Schn. خارج الجسم الحي *in vitro*

In vitro Callus induction and Shoot proliferation in Jojoba *Simmondsia chinesis* (Link) Schn.

د . نبيل خلف العاني أشواق شنان عبد* د . كاظم محمد ابراهيم
اروى عبد الكريم توفيق**

قسم التقانة الاحيائية- كلية العلوم/ جامعة النهرين
*مركز بحوث التقنيات الاحيائية / جامعة النهرين
**كلية العلوم للبنات

المستخلص:

تعتبر شجرة الهوهوبا من النباتات المهمة على الصعيد الاقتصادي لاحتواء بذورها على نسبة عالية من الزيت الشمعي ، إذ يمتلك هذا الزيت صفات كيميائية وطبيعية مهمة أدخلته في العديد من الاستعمالات الصناعية والتجارية وبعض الاستعمالات الطبية ، لذا تم وضع النبات قيد الدراسة المختبرية وتنفيذ تجربة عملية تداخلت فيها الاوكسينات والسايتوكاينينات والجبرلينات لمعرفة أفضل توليفة منهم في تأثيرها على استجابة البراعم المزروعة للتكشف والنمو الخضري واستحثاث الكالس على الأجزاء النباتية المتكونة . وقد تم استخدام BA بتركيز(2 أو5) ملغم/لتر ، Kin بتركيز (2.15 أو 5) ملغم/لتر، NAA بتركيز(0.018 ، 1، 2 أو 5) ملغم/لتر وأخيرا GA3 بتركيز(0.1 أو 0.2) ملغم/لتر . وقد أظهرت النتائج إن أعلى نسبة مئوية لاستحثاث الكالس على الأجزاء النباتية المزروعة كان (50 و 70)% على التوالي عند المعاملتين (2) ملغم/لتر BA و (2) ملغم/لتر لكل من BA و NAA . كما ارتفعت النسبة المئوية لاستجابة الأفرع الخضرية للنشوء وطولها المتكونة عند المعاملتين المتضمنتين إضافة كل من Kin و NAA مع GA3 بتركيزيه (0.1 أو 0.2) ملغم/لتر بنسة (40 و44)% على التوالي ، على الرغم من ان طول الافرع الخضرية كان (2 و2.5) سم مما يشير إلى ضرورة تحقيق التوازن المتبادل بين منظمات النمو المختلفة ليؤدي إلى ظهور الافرع بصورة طبيعية ومتوازنة .

Abstract

From economic site; jojoba *Simmondsia chinesis* (Link) Schn. is very important shrub as its seeds contain high percent of oily wax. This wax composes natural and chemical charachteristics which makes shrub to be involved in many trade, manufacture and medical uses. In this study several interactions between auxins and cytokinins and gibbrellin were implemented to find out the best concentration for callus induction, vegetative growth and differentiation for experiments. BA at(2 or 5) mg/l, NAA at (0.018, 2, 2, 5) mg/l and GA_3 at (0.1 or 0.2) mg/l were used.Results showed that highest percent for callus induction were

(50 and 70) % respectively in the treatment (2) mg/l BA and (2) mg/l for both BA and NAA. The results revealed that using Kin. plus NAA with (0.1 or 0.2) mg/l GA_3, was the best concentration lead to high percent of differentiation for vegetative shoot were (40 and 44) % respectively. However, the length of vegetative shoots were (2 and 2.5) cm respectively, this indicates the importance of the balance between these phytohormones required for shoot growth.

المقدمة :

يطلق على نبات الهوهوبا عدة أسماء منها الهوهوبا (Hohoba) ، الجوجوبا (Jojoba) ، جوز الماعز (Goat nut) ، البندق البري وغيرها من الأسماء ، أما اسمه العلمي فهو *Simmondsia chinesis* (Link) Schneider ، ويصنف ضمن العائلة (Simmondsiaceae) . والشجيرة من النباتات المعمرة تصل فترة حياتها (100- 200) عام ، موطنها الأصلي جنوب غرب أريزونا وكاليفورنيا وشمال المكسيك أي في المنطقة المشتركة بين الولايات المتحدة الأمريكية والمكسيك [1،2] . النبات شجيرة متفرعة يصل ارتفاعها ما بين (1-3) متر وأوراقها متطـــاولة الشكل ، متقابلة وذات طـــبقة شمعية سميكة cuticle (كيوتكل) تمكنها من الاحتفاظ بالرطوبة . أزهارها ذات لون اصفر مخضر وتنشأ في إبط الأوراق وتكون فاقدة للبتلات ويتلقح النبات عن طريق الرياح لان النبات ثنائي المسكن (dioecious) . أما فترة التزهير فتستمر من آذار وحتى حزيران . تبدأ الشجيرة عادة بإنتاج البذور بعد السنة الثانية أو الثالثة من زراعتها وعادة ما تكون هذه البذور متغايرة في الحجم وتصنف عادة إلى صغيرة ومتوسطة وكبيرة الحجم . تختلف الأزهار الذكرية عن الأنثوية بكبر حجمها وترتيبها بهيئة عناقيد زهرية ، أما الأنثوية فتكون صغيرة وتحمل بصورة منفردة عند العقد الورقية [3،4] ويختلف الجنسين في محتواهما البروتيني وبعض المركبات الثانوية مثل Geranoil ، Caryophin و Menthol ، فضلا عن الفروقات الكيمياحيوية التي تم ملاحظتها بين بروتوبلاست خلايا الأوراق وخلايا الكالس إذ تميزت الأولى بغزارة الكلوروبلاست اما الثانية فتميزت بتضاعف حجم البرتوبلاست ، في حين تماثلت نسب البروتين والدهون الكلية في كلا الخليتين (الأوراق والكالس) [5] . وتتمتع هذه النبتة بمواصفات مهمة كإحتياجها القليل إلى الماء وقدرتها العالية على تحمل العطش والملوحة لدرجة تجعلها مناسبة لجو الصحراء ، كما تمتاز بقلة حاجتها للرعاية من ناحية التسميد والتقليم والخدمة وقلة إصابتها بالأمراض وعدم حاجتها للرش الوقائي ، ويتم إكثار هذا النبات بعدة طرق أهمها زراعة البذور بصورة مباشرة في التربة على عمق من (2-5) سم ، إلا أن النباتات الناتجة قد تكون متغايرة وراثيا ، أما الطريقة الثانية فهي الإكثار الخضري (العقل) إذ تتيح الطريقة الأخيرة التحكم في نسبة النباتات المؤنثة إلى المذكرة ، ويفضل أن تتراوح نسبة النباتات المؤنثة عند الزراعة ما بين (90-95)% ، بينما تكون نسبة (5-10)% المتبقية نباتات مذكرة لتنتج ما يكفي من حبوب لقاح لتلقيح الأزهار المؤنثة [1، 3، 6] .

وترجع أهمية هذا النبات لمحتواه الجيد من البروتينات ، الكلايكوسايدات ، الاسترات ، الاحماض ، والكحولات الدهنية ، والاهم من هذا كله هو احتواء بذوره على نسبة عالية من الزيت

(50%) من وزنها [7، 8، 9] ويتكون هذا الزيت من (97%) شمع و (3%) احماض دهنية وكحولية حرة فضلا عن احتوائه على مواد مانعة للتأكسد . يتميز هذا الزيت بان جزيئاته تتكون من سلسلة كربونية طويلة بعكس الزيوت النباتية التي تتكون من الاحماض الدهنية والكلسرين ، الامر الذي يجعل زيت الهوهوبا ليس دهنا بل هو شمع سائل ذهبي فاتح لا يحتاج إلى تنقية أو تكرير وله درجة حفظ جيدة لوجود مواد طبيعية مضادة للأكسدة ، وله معدل لزوجة عالي ونقطة وميض واشتعال ودرجة ثبات عالية . قليل التطاير ويتحمل درجات الحرارة المرتفعة ، كما يعد زيته من الدهون قليلة الطـــاقة (Low energy fat) [9، 10] ولهذه الصفات الطبيعية والكيميائية فقد استعمل هذا الزيت السائل في الآلات التي تعمل في درجات حرارة وضغوط عالية وفي الآلات ذات الحركة الدقيقة لتخفيف الاحتكاك بين التروس والمحاور ، كما استخدم في صناعة مواد التجميل كزيوت الشعر والشامبوات والصابون وكريمات الوجه ومرطبات البشرة ، فضلا عن استخداماته الصيدلانية كمثبط لنمو بعض أنواع البكتريا والفيروسات (مضاد للالتهابات (Anti-inflammatory) ويستخدم أيضا في برامج الحمية (لتقليل الوزن) لاحتوائه على مركب (Simmondsin) كما يستخدم في الطهي وفي صناعة حبر الطباعة والورنيش ، ويستخدم الشمع أو (الزيت المهدرج منه) في تلميع الأرضيات والأثاث والسيارات وللتغليف الواقي لمحاصيل الفاكهة والخضر ، وفي صناعة النسيج والبلاستيك ، أما كسب الزيت(بقايا البذور) فقد استخدم كمصدر غذائي للحيوانات لاحتوائه على (20)% بروتين فضلا عن الكاربوهيدرات والألياف ، وكسماد للأراضي الزراعية لاحتوائه على نسبة نتروجـــــين عالية [9، 11، 12، 13، 14، 15، 16] . ولأهمية النبات فقد حاول العلماء توظيف تقنية زراعة الأنسجة النباتية في إكثاره خارج الجسم الحي [17، 18، 19، 20] .

لذا فان هدف البحث دراسة تأثير بعض المعاملات الهرمونية على استحثاث الكالس الذي قد يكون مصدر لنشوء الزروعات فضلا عن كونه مصدرا مهما لمواد الايض الأولية والثانوية كما هدفت الدراسة أيضا إلى معرفة تأثير هذه المعاملات الهرمونية في تحفيز ظهور النموات الخضرية .

المواد وطرائق العمل :

تم الحصول على الأجزاء النباتية من الشجيرات المزروعة في حديقة جامعة بغداد (الجادرية) ، استخدمت العقل الساقية الحاوية على البراعم كمزدرع (Explants) [21] لنبات الهوهوبا بجنسيه الذكري والأنثوي (مع ملاحظة الإبقاء على جزء بسيط من سويق الورقة بعد إزالة الأوراق [22] . عقمت الأجزاء النباتية بوضعها تحت ماء حنفية جاري لمدة لا تقل عن ساعة واحدة ثم نقلت إلى منضدة تعقيم الهـــواء الطبـــقي ، وغسلت بالكحول الاثيلي 70% لمدة دقيقة واحدة ، ثم عقمت سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم التجاري (تركيز 5.25%) وبنسبة تخفيف (1:1) مع ماء مقطر معقم ، ثم أضيفت قطرات من المادة الناشرة tween 20 ، وبعدها غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات [23] لازالة تأثير المادة المعقمة . قطعت إلى طول (1) سم وزرعت في قناني زجاجية (vials) ذات أبـــعاد (25x150) ملم . وقد استخدم الوسط ألزرعي (MS) [24] بعد إضافة السكروز بمقدار (30)غم/لتر وتعديل اسه الهيدروجيني إلى (5.7) .أضيف الاكار بمقدار (6) غم/لتر بعد تعقيمه في جهاز الموصدة الكهربائي على درجة حرارة(121)م وضغط 1.04 كم/م3

لمدة (15) دقيقة ، وقد أضيفت منظمات النمو إلى الوسط المذكور لدراسة مرحلتين من تطور النبات هما:

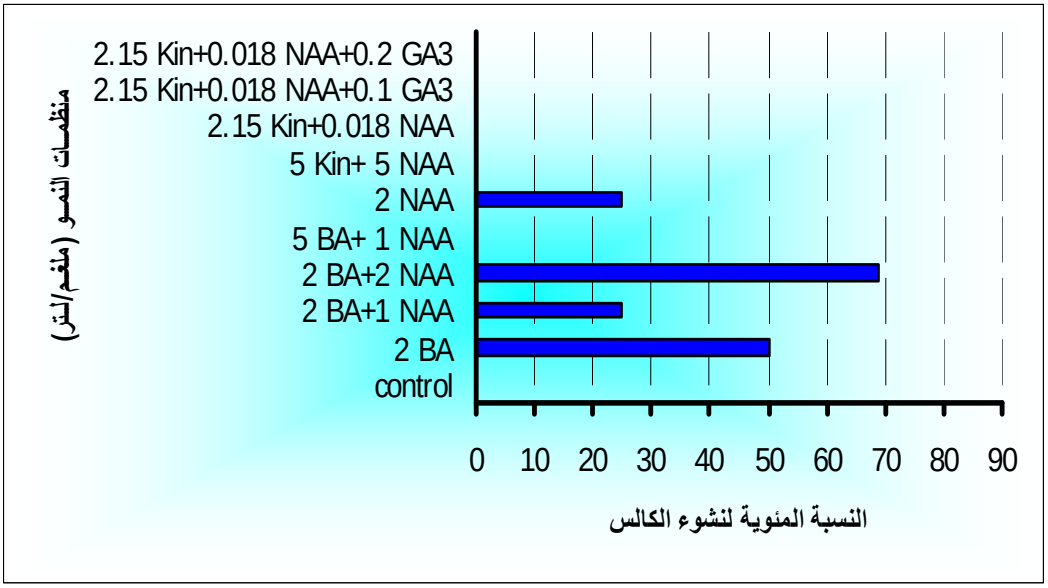
1– مرحلة النشوء (مرحلة تكوين الأجزاء الخضرية): تم إضافة منظمات النمو BA بتركيز(2 أو 5) ملغم/لتر و Kin بتركيز(2.15 أو 5) ملغم/لتر و NAA بتراكيز (0.018، 1، 2 أو5) ملغم/لتر أو GA3 بتركيز(0.1 أو 0.2) ملغم/لتر إلى الوسط ألزرعي (MS) بصورهم المفردة والمتداخلة لدراسة تأثيرها في تحفيز البراعم الابطية على النمو . استخدم (15) مكررا لكل من النباتات الذكرية والأنثوية أي بواقع (30) مكرر لكل معاملة . حضنت الزروعات على درجة حرارة (28 – 25) وفترة إضاءة (16) ساعة/يوم ولمدة شهرين تم بعدها تدوين الملاحظات الخاصة بمؤشرات النمو .

2 – مرحلة التجذير:

اختبرت منظمات النمو BA بتركيز(0.5 أو1) ملغم/لتر ، Kin بتركيز(1) ملغم/لتر، NAA بتركيز(1 أو 2) ملغم/لتر ، IAA بتركيز(1) ملغم/لتر و BA بتركيز(1و5) ملغم/لتر بصورهم المفردة والمتداخلة بعد إضافتها إلى الوسط الزرعي (MS) باختلاف قواه الملحية (MS ، 1/2MS ، 1/4MS ، 1/3MS و 1/5MS) لدراسة قابلية الزروعات على التجذير ، وقد أهملت النتائج بعد شهرين من زراعتها لعدم استجابة الزروعات في تكوين المجموع الجذري .

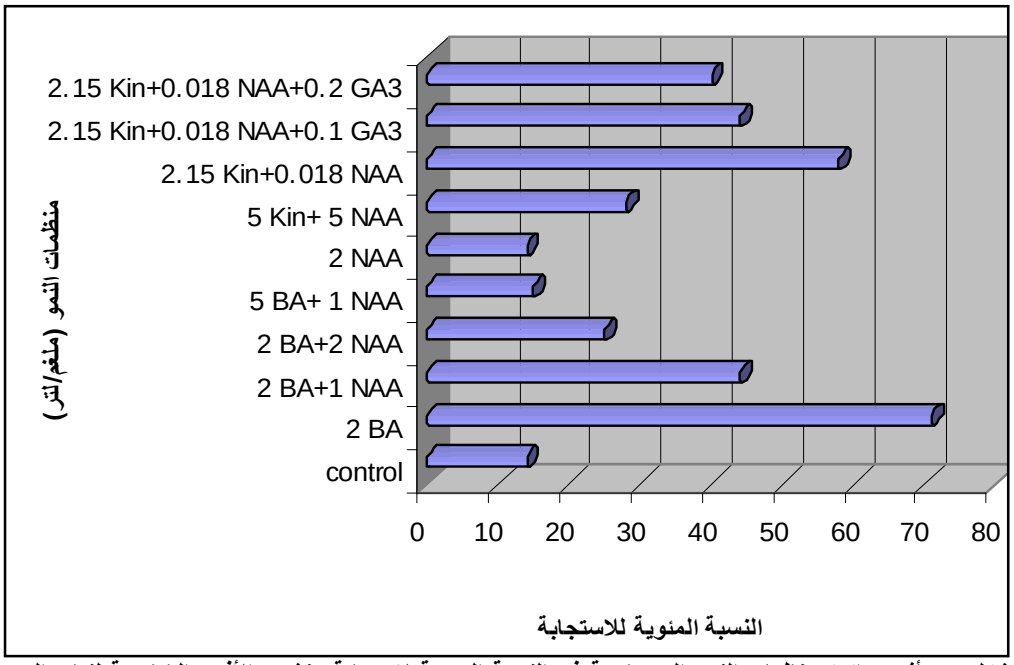
النتائج والمناقشة

يوضح الشكل (1) النسبة المئوية لنشوء وتكوين خلايا الكالس ، فقد أعطت المعاملة المتكونة من تركيز (2) ملغم /لتر لكل من BA و NAA أعلى نسبة في نشوء الكالس والبالغة (70)% ، تليها المعاملة المتضمنة إضافة تركيز (2) ملغم /لتر من BA والتي أعطت نسبة نشوء (50)% ، ويجب الإشارة إلى أن الكالس المتكون كان صغير الحجم ، صلبا ، ابيض اللون وكان نشوءه بعد الأسبوع السابع من زراعة الاجزاء النباتية على الوسط ألزرعي . وتعد طريقة تكوين خلايا الكالس لغرض تحفيزها على عملية إعادة الإخلاف Regeneration إحدى الطرق المتبعة في عمليات الإكثار خارج الجسم الحي ، وقد تمكن الباحثون [18] من النجاح في إكثار نبات الهوهوبا خارج الجسم الحي بعد استحثاث خلايا الكالس وتحفيزها على الإخلاف لتكوين نبيتات جديدة .



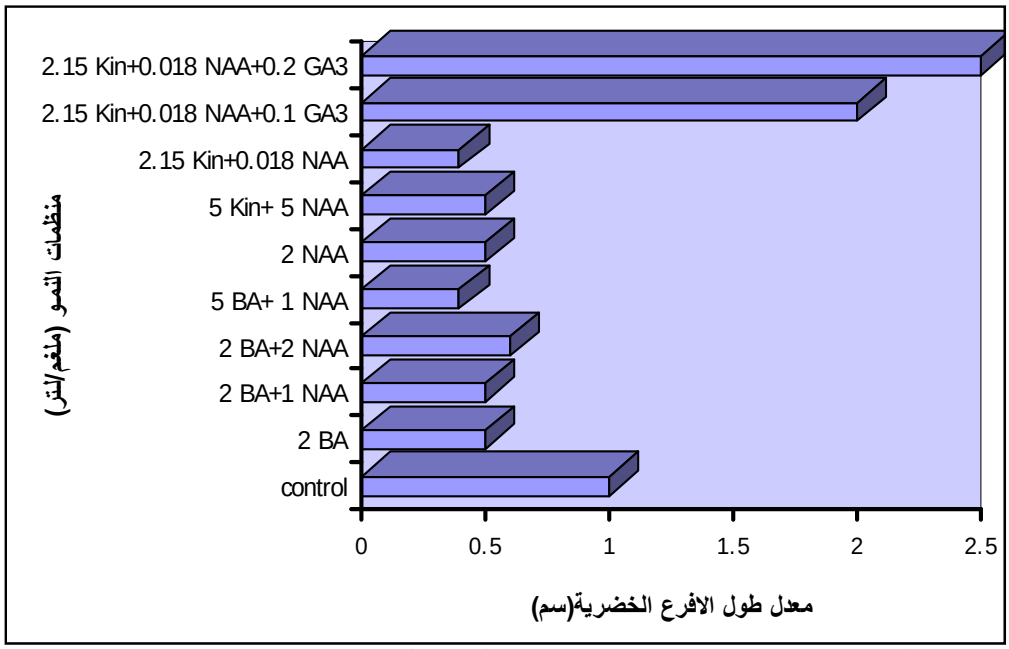
شكل(1) تأثير تراكيز منظمات النمو المستخدمة في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس لنبات الهوهوبا بعد شهرين من الزراعة على وسط (MS)

كما يبين الشكل (2) تباين تأثير منظمات النمو النباتية في النسبة المئوية لنشوء الأفرع الخضرية المتكونة على الأجزاء الخضرية لنبات الهوهوبا ، إذ حصل تأثير ايجابي واضح عند إضافة BA بتركيز(2) ملغم /لتر، وكذلك عند إضافة كل من BA و NAA بتركيز(2) ملغم/لتر لكل منهما ، إذ بلغت نسبة الاستجابة (71 و 44) % على التوالي ، كما أدت إضافة منظمي النمو Kin بتركيز(2.15) ملغم/لتر وNAA بتركيز(0.018) ملغم/لتر إلى إعطاء نسبة استجابة (58)% تلتها المعاملتين المتمثلتين بإضافة GA3 بتركيز(0.1 و0.2)% ملغم/لتر إلى التراكيز الأخيرة المذكورة لكل من Kin و NAA إذ بلغت نسبة الاستجابة للنشوء (44 و40) % على التوالي . ومن النتيجة السابقة الذكر ممكن أن نشير إلى نجاح معظم توليفات منظمات النمو في رفع نسبة الاستجابة لنشوء الأفرع الخضرية مقارنة مع معاملة السيطرة والتي لا تزيد فيها نسبة الاستجابة على (14)% .

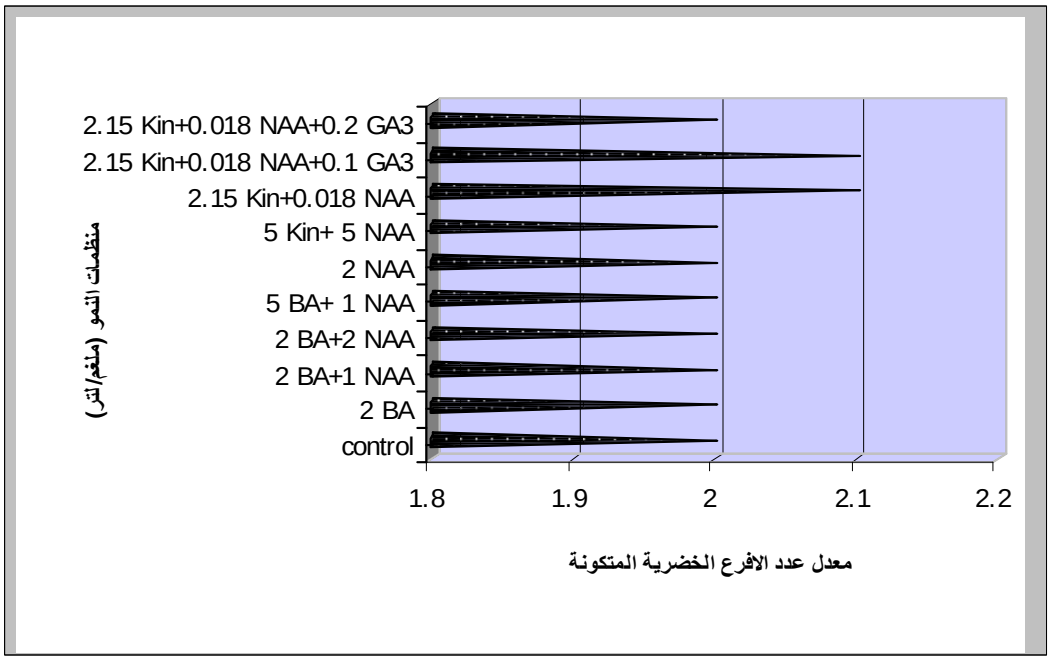


شكل(2) تأثير تراكيز منظمات النمو المستخدمة في النسبة المئوية لاستجابة ونشوء الأفرع الخضرية لنبات الهوهوبا بعد شهرين من الزراعة على وسط (MS).

أما الشكل (3) فيوضح تأثير منظمات النمو المستخدمة قيد الدراسة في تأثيرها على طول الأفرع الخضرية المتكونة ، فقد أدت المعاملتين المتضمنتين إضافة GA3 مع كل من Kin و NAA إلى زيادة طول الأفرع حيث بلغ معدل اطوالها (2 و 2.5) سم ، مما يزيد من شأن هاتين المعاملتين لارتفاع كل من نسبة الاستجابة لنشوء الأفرع ومعدل هذه الأفرع الخضرية المتكونة مقارنة مع سائر المعاملات شكل(4) والتي لوحظ فيها انخفاض معدل أطوال الأفرع الخضرية على الرغم من ازدياد نسبة النشوء فيها مقارنة مع معاملة السيطرة والتي لا تزيد فيها نسبة الاستجابة عن (14)% . ويعود ذلك للدور الكبير الذي تلعبه منظمات النمو عند إضافتها للاوساط الزرعية إذ تعمل الاوكسينات على إمداد الخلايا بالماء وكذلك المساعدة على تنشيط إنتاج الاحماض الامينية خاصة RNA مساعدة بذلك على استطالة الخلايا وكبر حجمها كذلك الجبرلينات التي تعمل على زيادة نمو الخلايا واتساعها طوليا. أما السايتوكاينينات فتقوم بزيادة تخليق الحامض النووي DNA وحامل RNA(mRNA) وتعمل على زيادة حجم الخلايا عن طريق زيادة عرضها [25] . اما الشكل(4) فيوضح معدل عدد الأفرع الخضرية المتكونة ، ويتبين منه ان المعدل (2) كان ثابتا عند جميع تراكيز منظمات النمو المستخدمة قيد الدراسة ، إذ تم نشوء الأفرع من العقد الابطية للأوراق فقط . وقد اتفقت نتيجة هذا البحث مع [22] في تفضيل استخدام منظم النمو GA3 مع الاوكسينات والسايتوكاينينات ضمن معاملات إكثار نبات الهوهوبا باستخدام تقنية الإكثار خارج الجسم الحي . لوجوب تحقيق التوازن المتبادل بين هذه الهرمونات ليؤدي في النهاية إلى تكوين نموات خضرية طبيعية تشبه نباتات الأم [25] .



شكل(3) تأثير تراكيز منظمات النمو المستخدمة في معدل أطوال الأفرع الخضرية المتكونة (سم) لنبات الهوهوبا بعد شهرين من الزراعة على وسط (MS)



شكل(4) تأثير تراكيز منظمات النمو المستخدمة في معدل عدد الأفرع الخضرية المتكونة (التضاعف) لنبات الهوهوبا بعد شهرين من الزراعة على وسط (MS)

المصادر:

1- Benzioni, A. (1997). Jojoba. New Crop Fact Sheet. www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/jojoba.html

2- Stone, W.S. (1993). Simmondsiaceae (jojoba family). Jepson Flora Project, University of Calfornia.

3- Meyer, S.E.(2000) *Simmondsia chinensis* (Link) Schn., Simmondsiaceae-Jojoba family: 1-4. www.nsl.fs.fed.us/wpsm/Simmondsia.pdf

4- Shaker, S.T. (2005). Molecular differentiation of Jojoba. A thesis of M.Sc in Biotechnology. College of Science. Al-Nahrain University . Iraq.

5- Cantrel, C., Salomon, T.G., Brown, S.C., Marie, D. and Dubacq, J.P. (1991). Isolation and Biochemical Characteristics of Jojoba *Simmondsia chinensis* (Link) Schn. Plant and Cell Physiology, 32 (7): 959-967.

6- Low, C.B. ; Hackett, W.P. (1981). Vegetative propagation of jojoba. Calif. Agric., 35:3-4.

7- Evans, W.C. (1999). Trease and Evans‘ Pharmacognosy. 14ed., Saunders Company Ltd.

8- Tada, A., Jin, Z.L., Sugimoto, N., Sato, k., Yamazaki, T. and Tanamoto, K. (2005). Analysis of the constituents in jojoba wax used as a food additive by LC/MS/MS. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 46 (5): 198-204.

9- Naqvi, H.H. and Ting, I.P. (1990). Jojoba, A unique liquid wax producer from the American desert. pp. 247-251. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), Advances in new crops. Timber Press, Portland, OR. D:\Jojoba A Unique Liquid Wax Producer from the American Desert.htm

10- Verschuren, P. M. (1989). Evaluation of jojoba oil as a low- energy fat. 1. A 4-week feeding study in rats. Food and Chemical Toxicology, 27 (1):35-44

11- Habashy, R.R., Abdel-Naim, AB., Khalifa, A.E. and Al-Azizi, M.M. (2005). Anti-inflammatory effects of jojoba liquid wax in experimental models. Pharmacol. Res., 51 (2): 95-105.

12- Boozer, C.N. and Herron, A.J.(2006). Simmondsin for weight loss in rats. Int. J. Obesity, 30 (7): 1143-1148.

13- Lein, S., Van Boven, M., Holser, R., Decuypere, E., Flo, G. and Lievens, S. (2002). Simultaneous determination of carbohydrates and simmondsins in jojoba seed meal (*Simmondsia chinesis*) by gaschromatography. J. of Cromatography (2) : 257-264

14- Perez-Gil, F., Sangines, G.L., Torreblanca, R.A., Grande, M.L. and Carranco, J.M. (1989). Chemical

composition and content of antiphysiological factors of jojoba (*Simmondsia chinesis*) residual meal. Arch. Latinoam Nutr., 39 (4): 591-600.

15- Medina Juarez, L.A. and Trejo Gonzalez, A. (1989). Elimination of toxic compounds, biological evaluation and partial characterization of the protein from jojoba meal (*Simmondsia chinensis* [Link] Schn.). Arch. Latinoam Nutr., 39 (4): 576-590.

16- Dimmit, M.A. (2000). Simmondsiaceae (jojoba family). Arizona-Sonora Desert Museum.

17- Hamama, L., Baaziz, M. and Letouze, R. (2001). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of jojoba. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 65: 109-113

18- Hamama, L., Baaziz, M. and Letouze, R. (2003). Regeneration of Jojoba by somatic embryogenesis, control of embryo formation, Polyamine content and role of the age of explants and growth Regulators. Acta Horticulturae 616: 313-320.

19- Scaramuzzi, F. and D′Ambrosio, A. (1988). Organogensis and propagation *" in vitro "* of *Simmondsia chinensis* (Link) Schn. (Jojoba) from vegetative fragments. Acta Horticulturae 227(1): 411-413.

20- Liorente, B.E. and Apostolo, N.M. (1997). Effect of different growth regulators and genotype on *in vitro* Propagation of Jojoba. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. (Abstract).

21- Agrawal, V., Prakash, S. and Gupta,S.C. (2004). Effective Protocol for *in Vitro* shoot Production Through Nodal Explants of *Simmondsia chinensis*. Biologia Plantarum, 45 (3):435-449

22- Jacoboni, A. and Standardi, A. (1987). Tissue culture of Jojoba (*Simmondsia chinensis*, Link). Acta Horticulturae (ISHS) 212(2): 557-560.

23- توفيق ، أروى عبد الكريم (2005) . دراسة صفة تحمل الملوحة في خمسة أصناف من الرز باستخدام تقنية زراعة الأنسجة النباتية. أطروحة ماجستير . كلية العلوم - قسم علوم الحياة (نبات)- الجامعة المستنصرية . العراق .

24- Murashige, T. and Skoog, T. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15 : 473-497.

25- أبو زيد ، الشحات نصر (2000). الهرمونات النباتية والتطبيقات الزراعية . الطبعة الثانية . الدار العربية للنشر والتوزيع ، القاهرة .