انتاج نباتات الجزر *Daucus carota* L. من كالس المعلقات الخلوية

Efficient Regeneration of Carrot (*Daucus carota* L.) plants from cell suspension derived-callus

أمجد عبد الهادي محمد مزاحم قاسم الملاح*

كلية العلوم/ جامعة الموصل
* كلية التربية/ جامعة الموصل

Amjad Abdul-Hadi Mohammed **Mozahim Kassim Al-Mallah***

College of Science/ University of Mosul
*College of Education/ University of Mosul

الملخص

نجحت الدراسة الحالية في انشاء مزارع المعلقات الخلوية للجزر المشتقة من كالس سيقانه في الوسط السائل MS الحاوي 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ لكل من NAA و BA. وبلغت كثافتها 3.4 X 10^{5} خلية مل$^{-1}$ في اليوم الثالث من انشائها. واستمرت خلاياها حين طمرها في قطرات الاكار المتعددة Multiple Drop Array (MDA) من متابعة انقساماتها وتكوينها المستعمرات الخلوية وانتاجها اعداد كبيرة من منشأت الكالس، مكونةً مزارع من الكالس. وعند نقله إلى وسط التمايز الصلب (MS + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA +1.5 ملغم لتر$^{-1}$BA) تشكل مانتان وثلاثة وسبعون فرعاً، والتي جذرت بسهولة بعد ثلاثة أسابيع من غرسها في الوسط الصلب MSO. وتأقلمت النبيتات الناتجة بنجاح في ظروف غرفة الزروعات وتعذر نقلها الى ظروف الحقل بسبب الظروف البيئية غير المناسبة في الحقل حينها. واحتوت انسجة كالس المعلقات الخلوية 82.62 مايكروغرام من ألانثوسيانين لكل غم وزن طري، و0.555 ملغم بيتا-كاروتين لكل 100غم وزن طري عند الفترة الثالثة من استخلاصه مقارنةً بكمياتها المحسوبة في كالس السيقان والبالغة 52.4 مايكروغرام غم$^{-1}$ و1.988 ملغم غم$^{-1}$ على التوالي.

الكلمات المفتاحية: نباتات الجزر، قطرات الاكار المتعددة، كالس المعلقات الخلوية، البيتا-كاروتين، الانثوسيانين

Abstract

This study succeeded in establishment carrot cell suspension cultures from stem callus in liquid MS medium containing 1.0 mg L^{-1} of each NAA and BA. Its density approach 3.4 ×10^{5} cell ml^{-1} at the third day of culture. These cells ,continued, when embedded in agar drop using Multiple Drop Array (MDA) technique, in division and forming cellular colonies which producing numerous callus primordia that developed to callus cultures. When transferred to the solid differentiation medium (MS+ 1.0 mg L^{-1} NAA+ 1.5 mg L^{-1} BA), two hundreds and seventy-three shoots produced. They readily rooted in agar-solidified MSO medium after three weeks and adapted in conditions of culture room. They were not transferred to field due to the unfavorable environmental conditions at that time. Cell suspension-derived callus tissues contained 82.62 µg anthocyanin gm^{-1} of callus fresh weight, and 0.555 mg beta-carotene 100 gm^{-1} of callus fresh weight in the third period of extraction compared with their quantity calculated in stems callus which recorded 52.4 µg gm^{-1} and 1.988 mg gm^{-1} respectively.

Key words: carrot plants, Multiple Drop Array, cell suspension callus, beta-carotene, anthocyanin

المقدمة

تنتمي نباتات الجزر (carrot) *Daucus carota L.* الى العائلة الخيمية Apiaceae family، وتنتظم ازهارها بشكل خيمة لتشكل النورات بنوعيها المحدودة وغير محدودة النمو. ويتميز الجزر باحتواء جذوره الخازنة على الكاروتينات التي تحمي صبغة الكلوروفيل (الاساسية في عملية البناء الضوئي) من التحطم بالأشعة فوَق البنفسجية ومنها صبغة البيتا-كاروتين التي تعد مصدراً لفيتامين A [2،1]، والانثوسيانين وهي من الصبغات المهمة التي تكسب الازهار والثمار الوانها ولها دور في منع تحطم الانزيمات وتثبط نمو الخلايا السرطانية [3،1].

تعد مزارع المعلقات الخلوية من الانظمة الحيوية المهمة في مجال زراعة الأنسجة النباتية بسبب تطبيقاتها الحيوية، اذ توفر نظاماً جيداً لدراسة نمو الخلايا وتخصصها, ودراسة المسارات الايضية المختلفة ووظائف الأنزيمات والتعبير الجيني [5،4]. وتمتاز بقدرتها العالية على النمو والانقسام في الوسط الغذائي السائل وملائمتها للحصول منها على نباتات خصوصاً في الأنواع التي تظهر صعوبة في تمايز كالسها. واشارت احدى الدراسات الى انتاج نباتات الباقلاء من تمايز كالس المعلقات الخلوية المشتقة من سيقانها على الرغم من صعوبة انتاجها من كالس السيقان نفسه [6]. ونجحت دراسة اخرى في زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان الخس بطمرها في قطرات الاكار لاختبار سلوك عدد من مشتقات الترايازولات [7].

وتتيح خلايا المعلقات الخلوية المشتقة من الكالس فرصة انتاج نباتات متغايرة وراثيا اذ تمثل نظاما مستقبلا للمادة الوراثية DNA باستقطابها المباشر DNA-Direct uptake او غير المباشر بوجود بعض العوامل الكيميائية مثل مركب PEG (Polyethylene glycol) أو الصدمة الكهربائية (التثقيب الكهربائي) Electrical shock (Electroporation) التي تساعد في تضمين المادة الوراثية في جينوم الخلية المستقبلة [8]. وكشفت دراسة حديثة [9] تفوق كالس الحلبة المحول وراثيا الناتج من الزراعة المرافقة لخلايا المعلقات الخلوية مع بلازميدات Ri بوجود المعاملة الكهربائية باحتوائه كميات من الدايوسجينين تفوق كمياته في عينة الكالس (المقارنة). وبينت

دراسة أخرى أن زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان نباتات فول الصويا *Glycine max* والمحضنة مع بلازميدات Ri شجعت الانقسام المبكر لخلايا المعلقات الخلوية وتكون الكالس في قطرات الاكار[10].

وتهدف الدراسة الحالية لإنشاء مزارع خلوية نموذجية للجزر وانتاج النباتات الكاملة من الكالس المشتق منها وقياس مركبات البيتا-كاروتين والانثوسيانين في انسجة كالسها ومقارنتها في عينات كالس السيقان.

المواد وطرائق العمل

انتاج بادرات الجزر المعقمة من بذور الصنف المحلي

أخذت بذور الجزر (البرتقالي اللون) من السوق المحلية وغسلت بالماء لمدة 15 دقيقة بعدئذٍ غمرت في محلول 3% حجم: حجم من القاصر التجاري " فاس" (شركة بابل لصناعة الصابون والمنظفات بغداد- العراق) لمدة 5 دقائق. ومن ثم غسلت بالماء المعقم ثلاث مرات بمعدل دقيقة واحدة/مرة [11]، ووضعت على ورقة ترشيح معقمة لازالة الماء الفائض عنها. زرعت البذور المعقمة سطحيا على سطح 30 مل من وسط MS [12] الحاوي 3% سكروز و 0.8% اكار (الملحق.1). في قنانٍ سعة 100 وبمعدل بذرتين/قنينة. حفظت العينات في غرفة الزروعات في ظروف الظلام بدرجة حرارة 25±2 درجة سيليزية. وبعد انباتها ، نقلت إلى ظروف التعاقب الضوئي 16 ساعة ضوء باستخدام انابيب فلورسنت (Toshiba lighting and technology corporation, Tokyo, Japan) وبشدة اضاءة 1500 لوكس.

تكوين مزارع كالس السيقان وادامته

أخذت قطع السيقان باطوال 1.5-2.0 سم من بادرات الجزر المعقمة بعمر اربعة اسابيع وزرعت بمعدل 2 قطعة/طبق على سطح 30 مل من وسط MS الصلب مدعما باضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA ، 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA + 1.0 ملغ لتر$^{-1}$ BA [13].

انشاء مزارع المعلقات الخلوية من كالس السيقان

نقل غرام واحد من كالس السيقان الهش بعمر ثلاثين يوما النامي على وسط الاستحداث MS + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA وقطعة مماثلة من الكالس النامي على الوسط MS +1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA الى مجموعة دوارق زجاجية سعة 100 مل تحوي كل منها 30 مل لاحد الوسطين السائلين اعلاه [14]. وضعت العينات في الحاضنة الهزازة Shaking incubator, New (Brunswick, USA) في الظلام عند 25 درجة سيليزية وبسرعة دورانية 100 دورة/دقيقة [15]. رفعت العينات من الحاضنة بعد 24 ساعة ورشحت بامرارها عبر مناخل بلاستيكية دقيقة حجم 46 µm (PGMG, Nott. Univ. UK) معقمة لازالة الكتل الخلوية غير المتفككة وأعيدت المزارع الى الحاضنة الهزازة بالظروف السابقة.

تقدير كثافات مزارع المعلقات الخلوية

سحب 100 مايكروليتر من كل من مزارع المعلقات الخلوية النامية بعد 24 ،48 ، 72، 96 ساعة من تحضينها، ووضعت على شريحة الهيموسايتوميتر(Paul Marienfeld GmbH and Co. KG, Germany) لتحديد كثافة المعلق الخلوي وملاحظة نمو الخلايا وانقساماتها عند كل مرحلة عمرية وحساب إعداد الخلايا في ملليتر واحد [16].

زراعة المعلقات الخلوية بطمرها في قطرات الاكار المتعددة (MDA)

مزج ملليتر واحد من مزارع المعلقات الخلوية النامية على وسطي استحداثها لكل كثافة بصورة منفردة مع حجم مماثل من محلول 1.5% اكار معقم ذائب بصورة جيدة حرارته 40 درجة سيليزية في انبوبة معقمة. يُسحب المزيج باستعمال ماصة زجاجية معقمة ووزع بشكل قطرات متساوية الحجم تقريبا 0.4 مل في قواعد اطباق بتري بلاستيكية قطرها 5.0 سم. تركت الاطباق مفتوحة لحين تصلب القطرات اعقبها اضافة 2.0 مل من الوسط الغذائي السائل المماثل لوسط الاستحداث [16]. وضعت اغطية الاطباق وسدت بالبارافيلم وحفظت في غرفة الزروعات عند 25 درجة سيليزية ومدة 16 ساعة اضاءة بشدة 700 لوكس.

التقاط منشأت الكالس المتكونة في القطرات واكثارها

فحصت خلايا المعلق الخلوي المطمورة في قطرات الاكار يوميا بالمجهر الاعتيادي لتحديد بدء انقساماتها ومتابعة سلوكها وتكوينها للمستعمرات الخلوية وتطورها الى منشآت الكالس. وبعد بزوغ منشأت الكالس من القطرات ومشاهدتها بالعين المجردة نقلت بوساطة ملقط معقم الى سطح 30 مل من وسط MS الصلب في قنانٍ سعتها 100 مل مدعمة باضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA لتكوين مزارع الكالس وادامتها [17] وحفظت العينات في غرفة الزروعات.

تكوين الأفرع الخضرية وتجذيرها

نقل غرام واحد من الكالس المتكون في الفقرة السابقة إلى سطح 30 مل من وسط MS الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA و 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA المُنتخب في قنانٍ سعة 100 مل.

استؤصلت مجاميع الأفرع الخضرية المشتقة من كالس المعلقات الخلوية عند بلوغها 2.5 – 3.0 سم طولا حاوية ثلاثة أوراق فأكثر بوساطة مشرط حاد معقم. وغرست قواعد الأفرع المستأصلة منفردة بصورة قائمة في 30 مل وسط MSO الصلب. حفظت العينات في غرفة الزروعات بنفس الظروف السابقة.

أقلمة النباتات المتكونة من كالس المعلقات الخلوية ونقلها إلى التربة

أُزيلت جميع النباتات ذات المجاميع الجذرية الجيدة من اوساطها، وغسلت جذورها من بقايا الوسط بالماء المقطر. زرعت منفردة في اوعية سعتها 120مل تحوي 30غم مزيج تربة معقمة مع البتموس (1:1 ، وزن: وزن). غطيت النباتات المنفردة بتثبيت وعاء بلاستيكي مماثل يستند على الوعاء الحاوي على النبات مع السماح بفراغ صغير بين العلبتين. حفظت العينات في غرفة الزروعات في ظروف 25±2 درجة سيليزية وتحت اضاءة خفيفة بلغت شدتها 700 لوكس والعناية بها. وبدأ تضاعف الافرع الخضرية دلالة على نمو النبات وثباته، رفع الوعاء العلوي وبقيت النباتات داخل غرفة الزرع لمدة ثلاثة ايام بعدها نقلت إلى سنادين كبيرة تحوي المزيج ذاته مع بقائها في غرفة الزروعات لعدم مناسبة ظروف الحقل لنمو نباتات الجزر حينها.

تقدير البيتا-كاروتين والانثوسيانين في الكالس

أُخذ 25 غم من كالس المعلقات الخلوية النامي على وسط MS + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA ووزن مماثل من كالس السيقان النامي على وسط MS + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA. ووضعت في درجة حرارة 4 سيليزية لمدة ثلاثة ايام [18]. ثم وضعت العينات بصورة منفردة في قنانٍ سعة 250 مل واضيف اليها 100 مل من كحول 96% ، ونقلت القناني الى حمام مائي بدرجة 60 درجة سيليزية مع الرج كل 10 دقائق. وأُخذ 5 مل من العينات عند كل ساعة ولمدى اربعة ساعات ووضعت في قنانٍ جديدة وأُضيف اليها 20 مل من بتروليوم الاثير Petroleum ether ثم أُكمل الحجم إلى 50 مل بالماء المقطر. لوحظ ظهور طبقتين عليا وسفلى [19]. أُخذ الرائق وقُرأ طيفيا (Spectrophotometer CECIL, Scaning instructions, Aquarus, German) عند الطول الموجي 450nm وحُسبت كمية البيتا-كاروتين حسب المعادلة الاتية:

$$\beta\text{-Carotene} = \frac{A \times d \times v}{E_{1cm}^{1\%} \times w}$$

حيث ان:

A= absorbancy
d=dilution
$E_{1cm}^{1\%}$=Coefficient of absorbancy (2592 for petroleum-ether)
W=weight of sample (g)
V=volume (ml)

وقدرت كمية الانثوسيانين في نصف غرام من كالس المعلقات الخلوية النامي على وسط MS + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA ووزن مماثل من كالس السيقان النامي على وسط MS + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA. بوضعها في انبوبة زجاجية سعتها 15.0 مل وسُحق الكالس باستخدام ملقط الى قطع صغيرة. ولغرض الاستخلاص اضيف اليه 5.0 مل من محلول ميثانول يحوي 1% HCl عند °م. رُجت الانابيب بواسطة vortex ونبذت مركزيا بسرعة 15000دورة/20 دقيقة عند نفس درجة الحرارة السابقة. سحب الرائق وقُرأ طيفيا عند طول موجي 528 نانوميتر، وحسبت كمية الانثوسيانين حسب المعادلة:

($E1^{1\%}$ cm= 680 at 528nm) [20]

النتائج

إنشاء مزارع المعلقات الخلوية

أظهرت النتائج تبايناً في كفاءة الوسطين المستخدمين في انشاء المعلقات الخلوية، وتفوق وسط MS السائل والمدعم بإضافة 1.0ملغم لتر$^{-1}$ لكل من NAA و BA على الوسط الاخر في دعم انقسامات خلايا المعلقات الخلوية وبدلالة اعداد الخلايا المفردة المتحققة في مزارعها جدول (1).

جدول (1): كثافات المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان بادرات الجزر *Daucus carota* L. في نوعين من وسط MS السائل خلال اربعة ايام من التحضين

الوسط المستخدم (ملغم لتر$^{-1}$)	اعداد الخلايا (x 10^5 خلية مل$^{-1}$)			
	اليوم الاول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع
1.0 + NAA 1.0 + MS BA	1.9	2.6	3.4	2.5
NAA 1.0 + MS	1.4	1.6	1.9	0.6

ويلاحظ من الجدول أعلاه أن أعداد الخلايا في هذه المزارع لاربعة ايام من التحضين في كلا الوسطين تعكس دور NAA الاساسي في انشاء المعلقات الخلوية. واظهرت الفحوصات المجهرية لعينات من هذه المعلقات الخلوية وفرة الخلايا المفردة المكونة للمعلقات وقلة الكتل الخلوية مع تفوق الوسط الاول.

استحثاث منشأت الكالس من خلايا المعلقات الخلوية المزروعة

أظهرت النتائج تبايناً واضحاً في النواتج المتحققة من زراعة الكثافات المتباينة من المعلقات الخلوية في قطرات الاكار جدول (2).

جدول(2): كثافة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان بادرات الجزر *Daucus carota* L. بطمرها في قطرات الاكار المتعددة

الوسط المستخدم ملغم لتر$^{-1}$	الكثافات المزروعة x 10^5 خلية مل$^{-1}$	الاعداد الكلية للقطرات المزروعة	الاعداد الكلية للقطرات المستحدثة للكالس	الاعداد الكلية لمنشأت الكالس	تكوين منشأت الكالس %
MS + 1.0 NAA + BA 1.0	1.9	50	0	0	0
	2.6	50	6	19	12
	3.4	50	21	30	42
	2.5	50	4	4	8

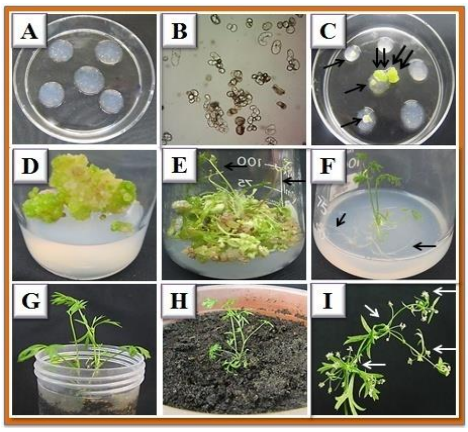
وعموماً فقد باشرت الخلايا انقساماتها الاولى بعد ثلاثة ايام من زراعتها مكونة الخلايا البنوية والتي واصلت انقساماتها المتعاقبة مكونة المستعمرات الخلوية متطورة الى منشأت الكالس بعد اسبوعين من زراعتها.

وفشلت زراعة جميع الكثافات في الوسط MS + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA بتقانة قطرات الاكار المتعددة وعدم بلوغها مرحلة تكوين منشأت الكالس وخلال ستون يوما. ونظراً لتحقيق كثافة الزرع 3.4 x 10^{5} خلية مل$^{-1}$ اعلى نسبة لاستحداث منشأت الكالس فقد اعتمدت في التجارب اللاحقة.

تكوين مزارع كالس المعلقات الخلوية وإدامتها

أظهرت نتائج نقل منشأت الكالس من قطرات الاكار الى سطح الوسط الصلب MS + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA+ 1.0 ملغم لتر$^{-1}$BA استمرارها بنموها بصورة اعتيادية في ذات الوسط الغذائي مما يؤكد ملائمته لنموها ولاستحداث المعلقات الخلوية.

وأوضحت متابعة الكثافة المثلى 3.4 x 10^{5} خلية مل$^{-1}$ وفرة خلاياها المفردة وقلة الكتل الخلوية المتجمعة. واظهرت الفحوصات المجهرية لخلاياها المطمورة في قطرات الاكار شكل (1A). انها باشرت انقساماتها بعد ثلاثة ايام، ولوحظت بعض الخلايا البنوية واخرى باشرت انقسامها الثاني والثالث شكل (1B). ونجحت خلايا هذه المزرعة في مواصلة انقساماتها المتتالية مكونة اعداد من المستعمرات الخلوية متطورة بعد اسبوع من نشوئها الى قطع دقيقة بيضاء اللون شكل (1C) المؤشرة بسهم مفرد لم تلبث ان تطورت بعد 45 يوما من زراعتها الى قطع صغيرة خضراء اللون من الكالس والتي ازدادت في احجامها مسببة تشقق الاكار وبزوغها وعندئذٍ امكن ملاحظتها بالعين المجردة شكل (1 C) المؤشرة بسهم مزدوج. ونتجت عن نقل هذه المنشأت مزارع من الكالس اتصف بلونه الاخضر المصفر وبنيته الهشة شكل (1 D). أُديمت هذه المزارع كل 35 يوماً على نفس الوسط عند الحاجة لاعادة زراعته.



شكل (1): زراعة المعلقات الخلوية لكالس سيقان الجزر *Daucus carota* L. بطمرها في قطرات الاكار المتعددة وانتاج النباتات الكاملة واقلمتها

(A) زراعة الكثافة 3.4 x 10^{5} خلية مل$^{-1}$ من المعلق الخلوي مطمورة في قطرات الاكار بعد يوم من زراعتها
(B) خلايا غير منقسمة واخرى منقسمة وتكوين خلايا رباعية بعد أحد عشر يوماً من الزراعة
(C) منشأت الكالس المتكونة في قطرات الاكار (المؤشرة باسهم مفردة) مع ملاحظة حجم تلك المتكونة في القطرة المركزية (المؤشرة بسهم مزدوج) بعد 45 يوما من الزراعة
(D) مزرعة كالس المعلقات الخلوية بعمر 45 يوماً الناتجة من نقل المنشأت في (C) النامية في الوسط MS +1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA+1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA
(E) تمايز الكالس في (D) وانتاج الافرع الفتية بعد 70 يوما من نقل الكالس على وسط التمايز MS +1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA+1.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA
(F) تجذير الافرع المستأصلة في (E) في الوسط MSO بعمر 33 يوما (لاحظ تكون الجذور المؤشرة بسهم مفرد)
(G) نبات جزر في (F) بعمر 30 يوما نامٍ في مزيج التربة والبتموس في وعاء بلاستيكي
(H) النبات في (G) بعمر 30 يوما نامٍ في سندانه سعة خمسة كيلوغرام من مزيج التربة والبتموس
(I) نبات الجزر في (H) بعمر 100 يوم حاملاً مجموعة من النورات الخيمية غير المحدودة النمو (المؤشرة باسهم)

تمايز كالس المعلقات الخلوية وتكوينه للافرع الخضرية

أظهرت نتائج نقل قطع متعددة من كالس المعلقات الخلوية بوزن غرام واحد لكل منها الى سطح وسط التمايز الصلب MS+1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA+ 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA المنتخب في هذه الدراسة قدرته على التمايز وتكوينه مجموعة من الافرع جدول (3).

جدول (3): تمايز كالس المعلقات الخلوية وتكوين نبيتات الجزر *Daucus carota* L.

اوساط التمايز (ملغم لتر$^{-1}$)	اعداد قطع الكالس المزروعة / المتمايزة	اعداد الافرع الخضرية الناتجة	معدل عدد الافرع/ قطعة	مدة تكوين الافرع (يوم)	تكوين الافرع %
MSO (المقارنة)	0/50	0	0	0	0
MS + NAA 1.0+ BA 1.0	63/100	273	4.3	50	63

وامتازت الأفرع بلونها الأخضر وقلة ارتفاعاتها عند بداية تكونها واستطالتها وزيادة اعدادها مع استمرار بقائها في الوسط شكل (E1). في حين لم يشجع وسط MSO تمايز مثل هذه الأفرع من هذا الكالس بعد 90 يوماً.

تجذير الأفرع الخضرية

جُذرت الأفرع الناتجة عن كالس المعلقات الخلوية عند غرسها في وسط MSO الصلب بعد 21 يوماً من زراعتها وبمعدل 66%. وبلغت معدلات اطوال الجذور 3.4سم، وامتازت بنحافتها وبلونها الابيض شكل (1F) في المراحل الاولى من تكوينها.

نجاح أقلمة نبيتات الجزر المتمايزة من كالس المعلقات الخلوية

نجحت اقلمة نباتات الجزر الناتجة من كالس المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان في المزيج المتكون من الرمل: البتموس (1:1) وزن: وزن شكل (1G)، واستمرار نموها عند نقلها الى سنادين حجم خمسة كغم تحوي المزيج نفسهُ شكل (1H). وتعذر نقلها الى ظروف الحقل لعدم مناسبتها. واتصفت هذه النباتات بكبر حجم مجاميعها الخضرية وبإنتاجها النوعين من النورات المحدودة وغير المحدودة النمو وبإعداد مناسبة شكل (1I).

كمية البيتا- كاروتين والانثوسيانين في مستخلصات كالسي المعلقات الخلوية والسيقان للجزر

كشفت النتائج عن وجود البيتا-كاروتين في كالس المعلقات الخلوية النامي على الوسط MS + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA وزيادة كميته بزيادة وقت الاستخلاص وحتى الساعة الثالثة محققة اقصاها في الفترة الثالثة للاستخلاص، اعقبها الانخفاض في القيمة المسجلة جدول (4).

جدول (4): كمية البيتا- كاروتين في مستخلصات كالس المعلقات الخلوية للجزر *Daucus carota* L. في اوقات الاستخلاص المختلفة

العينات (ملغم لتر$^{-1}$)	وقت الاستخلاص (ساعة)			
	1	2	3	4
	الكمية (ملغم / 100 غم)			
كالس المعلقات الخلوية النامي على وسط MS + BA 1.0 + NAA 1.0	0.408	0.486	0.555	0.481
كالس السيقان النامي على وسط MS + 1.0 NAA (المقارنة)	1.308	1.832	1.988	1.926

وتشير بيانات الجدول الى انخفاض محتوى البيتا- كاروتين في هذا النوع من الكالس في مستخلصاته الكحولية عند مقارنته بكميته في مستخلصات كالس السيقان.

في حين تفوق كالس المعلقات الخلوية باحتوائه 82.62 مايكروغرام غم$^{-1}$ من الانثوسيانين عن كالس السيقان في احتوائه 52.4 مايكروغرام غم$^{-1}$.

المناقشة

ان نجاح انشاء المعلقات الخلوية من الكالس وتداولها والتحكم بكثافاتها وزراعتها يعزى الى سهولة انفصال الخلايا بسبب بنيته الهشة وكثرة الخلايا المفردة فيها ويُفسر تواصل انقساماتها وتكوينها مُنشأت الكالس بسبب وفرة احتياجاتها الغذائية في الاوساط الزرعية الحاوية على NAA وBA [21] وان عدم إنشائها عند تواجد NAA لوحده قد يعزى الى ضعف انقساماتها او انعدامها احياناً في الكثافات المزروعة بقطرات الاكار جميعها. ان اختلاف وسط ادامة كالس السيقان عن وسط ادامة كالس المعلقات الخلوية بالرغم من اتخاذها مساراً اعتيادياً في نموهما على وسط MS يكمن في اختلاف منظمات النمو المدعمة للوسط الغذائي، والتي اتضحت معالمها ايضاً في الكثافات الخلوية المتحققة في كلا الوسطين، كما لوحظ في هذا النوع النباتي الجزر [15] ونباتات القرنفل [22]. ان اعداد نباتات الجزر المتكونة من الكالس المشتق من المعلقات الخلوية قد يدعم احتمال استنسالها من خلايا مفردة او مجموعة منها [23]. وقد تستثمر مثل هذه الخلايا لاستنسال خطوط خلوية معينة لانتاج نباتات متباينة في مواصفاتها كما حصل في بعض الانواع التابعة للعائلة الخيمية [24،25] او مفتاحاً للتغلب على مشكلة انتاج النباتات من انواع الكالس الذي يصعب تمايزه [17]. ويرجح تفوق كالس السيقان عن كالس المعلقات الخلوية في كميات البيتا-كاروتين الى نشاط المسارات الايضية في خلاياه واسهام درجة حرارة الاستخلاص في فك ارتباط البيتا-كاروتين الموجودة طبيعياً عن البروتين وتحررها وذوبانهُ مما زاد من كمياتها المحسوبة [18،19]. في حين أعزى بعض الباحثين [26] الكمية القليلة نسبيا من البيتا-كاروتين في كالس المعلقات الخلوية للجزر الى ان نشاط خلايا المعلقات الخلوية للجزر التي لا تماثل انواع اخرى من النباتات بسبب الفعالية العالية لانزيم الاستيريز Esterases وحساسيته لبعض منظمات النمو دون غيرها مسبباً انخفاضاً في نشاط الخلايا المكونة لهذا الكالس، وقد يفسر هذا الافتراض المحتوى العالي للانثوسيانين في انسجة كالس المعلقات الخلوية مع ظهور العلاقة العكسية بين كمية الانثوسيانين والوزن الرطب للكالس كما في نباتات الزعرور الاحادي المدقة *Crataegus monogyna* [27] ونباتات الزعرور السينائي *Crataegus sinaica* [28]. خصوصاً وان البنزايل ادنين له دوراً في تشجيع بناء هذه الصبغة في خلايا نباتات الفراولة [20].

المصادر

1. Grotewold, E. (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. Ann. Rev. Plant Biol. 57:761-780.
2. Cinar, I. (2004). Carotenoid pigment loss of freeze-dried plant samples under different storage conditions. Lebensmittel Wissenschaft and Technologie. 37: 363–367.
3. Simpson, M. G. (2010). Plant Systematics, 2nded. Elsevier-Academic Press.USA
4. Lendevai , A., K. Nikovics, L. Bako, D. Dutits and J. Gyorgey. (2002). Synochronization of *Oryza sativa* L. cv. Taipei-309 cell suspension culture. Acta. Biol. 46: 39-41.
5. Mustafa, N.R., Winter, W., Iren, V. and Verpoorte, R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. Nature Prot. 6: 715- 742.
6. الجواري، سهلة محمد زيدان شعيب. (2004). الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان مع بلازميدات Ri في الحصول على نباتات الباقلاء *Vicia faba* L. المحولة وراثيا. اطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة الموصل.

7. البياتي، جميلة هزاع رشيد نجم، محمد، عبد المطلب سيد. (2005). مشتقات من الترايازولات محضرة مختبرياً بدلاً عن السايتوكاينينات القياسية في استحداث ونمو الخلايا المفردة والمعلقات الخلوية لنبات الخس (*Lactuca sativa* L.) . مجلة علوم الرافدين. 16 : 210-217.

8. Davey, M.R., Anthony, P., Power, J.B. and Lowe, K.C. (2005). Plant protoplast: status and biotechnological perspectives. Biotech. Adv. 23:131–171.

9. المهداوي، مثنى محمد إبراهيم. (2013). التلاعب الوراثي والكهربائي لنباتات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* L. مع عزل الدايوسجنين والترايكونيلين من المزارع النسيجية المختلفة. اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل.

10. زيدان، سهلة محمد ، رشيد، جميلة هزاع والنعمة، قتيبة شعيب. (2006). تعريض المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا للمعاملة الكهربائية او مزجها مع بلازميدات Ri في تكوين الكالس في قطرات الاكار المتعددة. مجلة التربية والعلم، 18:80-92.

11. الملاح، مزاحم قاسم ومحمد، امجد عبد الهادي. (2012). انتقال جينات T-DNA المحمولة على بلازميدات Ri من بكتريا*Agrobacterium rhizogenes* R1601 بوساطة الحقن المباشر والزراعة المرافقة الى أنسجة الجزر *Daucus carota* L. وتكوين مزارع الجذور الشعرية المحورة وراثياً. المجلة العراقية للتقانات الحياتية. 11: 227-239.

12. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-479.

13. Mohammed, A. A. and Al-Mallah, M. K. (2013). Determination of β-carotene in carrot (*Daucus carota* L.) plants regenerated from stems callus. Raf. J. Sci. 24: 72-36.

14. Morris, P. and Fowler, M.W. (1981). A new method for the production of fine plant cell suspension culture. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 1:15-24.

15. Latif, Z. k., Idrees, A.N. and Riazuddin, S. (2007). Indigenous production of synthetic seeds in *Daucus carota*. Pak. J. Bot. 39:849-855.

16. Davey, M.R. and Anthony, P. (2010). Plant Cell Culture Essential Methods. Wiley-BlackWell, UK.

17. Dixon, R.A. (1985). Plant Cell Culture, A Practical Approach. IRL. Press. Oxford. U.K.

18. Dutta, D., Raychaudhuri, U. and Chakraborty, R. (2005). Retention of carotene in frozen carrots under varying conditions of temperature and time of storage. Afr. J. Biotech. 4 :102-103.

19. Fikselova, M., Šilhar, S., Mareček, J. and Frančakova, H. (2008). Extraction of carrot (*Daucus carota* L.) carotenes under different conditions. Czech J. Food Sci. 26: 268–274.

20. Mori, T. ; Sakura , I. M. ; Sekim, M. and Furusaki, S. (1993). Use of axin an cytokinin to regulate anthocyanin production and composition in suspension cultures of strawberry cell. J. Sci. Food Agric. 65:271-276.

21. Hartmann, H.T. , Kester, D.E., Davies, I.T. and Geveve, R.L. (2002). Plant Propagation Principle and Practices. 7th ed., Pearson Education, Inc., New York.

22. زيدان، سهلة محمد، رشيد، جميلة هزاع والنعمة، قتيبة شعيب. (2007). تكوين نباتات القرنفل من الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية بطريقة الطمر في قطرات الاكار المتعددة. مجلة التربية والعلم. 19: 76-84.

23. Thakur, M., Sharma, D.R. and Sharma, S.K. (2002). *In vitro* selection and regeneration of carnation *Dianthus caryophyllus* L. Plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. Plant Cell Repts. 20: 825-828.

24. Imani, J., Berting, A., Nitsche, S., Schaefer, S., Gerlich, W.H. and Neumann, K.H. (2002). The integration of a major hepatitis B virus gene into cell-cycle synchronized carrot cell suspension cultures and its expression in regenerated carrot plants. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 71:157- 164.

25. Baranski, R. (2008). Genetic transformation of carrot (*Daucus carota*) and other *Apiaceae* species. Transgenic Plant J. 2:18-38.

26. Shea, E.M., Skaria, A. and Carpita, N. C. (1988). Growth of carrot cell suspension cultures in medium containing amino acid conjugates of Indoleacetic acid. J. Plant Physiol.132: 298-302.

27. Bahorun, T., Aumjaud, E., Ramphul, H., Rycha, M., Luximon-Ramma, A., Trotin, F. and Aruoma, O. (2003). Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. Mol. Nut. Food Res. 47:191-198.

28. Maharik, N., Elgengaihi, S. and Taha, H. (2009). Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* Boiss. Internat. J. Acad. Res. 1:30-34.