زيادة قدرة نبات السيسبان *Sesbania rostrata* على تحمل الكادميوم والرصاص بالزراعة النسيجية
Enhancemant of *Sesbania rostrata* Capability for Cadmium and Lead Tolerance by Tissue Culture

التفات فاضل شحاذه كاظم محمد ابراهيم* علي هاشم الموسوي
كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
* كلية التقنيات الحيوية/ جامعة النهرين
Altefat Fadhel Al-Taee Kadhim M. Ibrahim * Ali Hashim Al-Moousawi
College of Science for Women/ Baghdad University
* College of Biotechnology/ Al-Nahrain University

E-mail: laf084@yahoo.com

الملخص

نفذت عدة تجارب لغرض دراسة تحمل نبات السيسبان *Sesbania rostrata* للكادميوم والرصاص على مستوى النبات الكامل ومزارعه النسيجية. أستحث الكالس وأديم على وسط موراشيج وسكوج 1962 والمجهز 0.3 ملغم/لترمن الكاينتين و2.0 ملغم/لتر من حامض 2,4 داي مثيل فينوكسي بإستعمال الفلق كمصدر لنشوء الكالس أضيفت تراكيز مختلفة من الكادميوم أوالرصاص بصورة مباشرة أو تدريجية الى الوسط الغذائي كعوامل تلوث لغرض دراسة تأثير هذه الملوثات في نمو النبات ومزارعه النسيجية. ومن ثم عزل خطوط الخلايا المتحملة وإختبار قابليتها للإخلاف. أظهر الكالس تحملاً للإضافة التدريجية أكثر من الإضافة المباشرة، اذ بلغ تركيز الكادميوم والرصاص 27، 24 جزء بالمليون على التوالي عند إضافة 1.0، و2.0 ملغم/لتر من الكادميوم والرصاص على التوالي. وتضمنت الدراسة تأثير السايتوكاينين بنزل ادنين (BA) والأوكسين نفثالين حامض الخليك (NAA) في نشوءالأفرع من الكالس المتحمل للملوثات حيث أعطى أعلى نسبة 78،76% للكالس المتحمل للرصاص والكادميوم على التوالي عند تداخل 0.7 ملغم/لتر BAو0.2 ملغم/لتر NAA. ودرس تأثير الأوكسين اندول حامض الخليك (IBA) في تجذير الأفرع المتحملة للملوثات حيث أعطى التركيز 0.7 ملغم/لتر أعلى نسبة تجذير بلغت 70،66% للأفرع المتحملة للرصاص والكادميوم على التوالي، تضمنت الدراسة تأثير الملوثات في إرتفاع النبات والاوزان الطرية اذ تفوقت الأوزان الطرية للمجموع الخضري على الأوزان الطرية للمجموع الجذري عند التراكيز 1.0، 2.0 جزء بالمليون للكادميوم والرصاص بلغا 8.7 و 7.5غم على التوالي. أعلى تركيز لتراكم الكادميوم بلغ 12.5 جزء بالمليون في المجموع الخضري، في حين لوحظ بان الرصاص 10.5جزء بالمليون في المجموع الجذري.

الكلمات المفتاحية: الزراعة النسيجية، الكاديميوم Cd، الرصاصPb، نبات السيسبان

Abstract

Several experiments were carried out to study cadmium and lead tolerance at the tissue culture or whole plant levels of *Sesbania rostrata*. Callus was induced and maintained on Murashige and Skooge, 1962 medium (MS) supplemented with 0.3 mg/l Kinetin and 2 mg/l 2,4- dichloro phenoxy acetic acid (2,4-D). Using cotyledons as the source for callus induction. Different concentration of cadmium and lead directly or gradually were added to the culture medium as contaminants. Selected tolerant cell lines were subjected to regeneration. Callus showed better tolerance to gradual exposure than direct addition. The concentration of cadmium and lead recorded to 27 and 24 ppm when 1.0 and 2.0 mg/ of cadmium and lead respectively. The study included the effect of cytokinins (benzyl adenine) and auxin (Naphthalene acetic acid) in the regeneration of shoot from callus tolerant to pollutants reached 78 and 76% for Callus tolerant to lead and cadmium respectively, when the combination of 0.7 mg/l benzyl adenine and 0.2 mg /l naphthalene acetic acid was supplemented to the medium. The effect of auxin (indole butyric acid) on rooting of shoots was studied. The concentration 0.7 mg/l gave highest percentage of rooting amounted to 70 and 66% in the medium supplement with lead and cadmium respectively. The study was also included effect of pollutants on plant height and fresh weights shoot fresh weight was superior at the concentration 1.0 and 2.0 ppm of cadmium and lead recording 8.7 and 7.5 g respectively. Maximum cadmium accumulation reached 12.5 ppm in shoot while, 10.5ppm for lead was in roots.

Key words: tissue culture, cadmium, lead, *Sesbania rostrata.*

المقدمة

ان التلوث بالعناصر الثقيلة شائع في المدن الصناعية، اذ تنتشر الملوثات في الهواء والتربة والماء وتسبب مشاكل كثيرة بالتراكيز العالية منها وتسبب آثار ضارة في النظم البيئية وتشكل خطرا على صحة الإنسان والأحياء الأخرى. كما يمكن أن تدخل السلسلة الغذائية عن طريق المنتجات الزراعية أو مياه الشرب الملوثة وهذا يؤدي الى تراكمها عبر السلسلة الغذائية [1] ان عنصر الكادميوم (Cd) والرصاص (Pb) من العناصر الثقيلة المسببة أضرار للصحة العامة، وتجد طريقها للتربة بطرائق مختلفة كالأسمدة الكيميائية ومخلفات

المياه الثقيلة واستخدام المياه الصناعية فيسقي المزروعات وغيرها كثير، لايمكن لكل النبات أن يحول العناصر الثقيلة إلى شكل غيرسام داخل خلاياه بصورة طبيعية [2]. وهناك عدد من التقنيات لازالة او التقليل من التلوث بالمعادن الثقيلة منها المعالجة النباتية (Phytoremediation) والتي هي أحدى الطرق البيئية التي تزيل التلوث من العناصر الثقيلة بوسائل عدة تتبعها النباتات والكائنات الدقيقة التي تعيش في محيطها وخاصة في منطقة الجذور (Rhizosphere). وهي تقانة رخيصة وسليمة بيئياً وتصلح لإزالة الملوثات من المواقع الملوثة كمواقع الطمر الصحي وهي طريقة سريعة وتقلل من سمية هذه المواقع [3]. اثبتت الدراسات الحديثة بأن نبات السيسبان له القدره على سحب المعادن الثقيلة مثل الكادميوم والنحاس من الترب واستصلاحها [4]. لذا هدفت الدراسة الحالية الى اختبار قدرة نبات السيسبان (الذي نجحت زراعتة في كافة أنحاء العراق) لاستصلاح التربا لملوثة بالمعادن الثقيلة عن طريق الزراعة النسيجية من خلال اختبار تحمل الكالس لتراكيز مختلفة من ملوثات العناصر الثقيلة وقياس تراكم الملوثات فيها، وعزل خطوطا لخلايا المتحملة العناصر الثقيلة وانتاج نباتات كاملة.

المواد وطرق العمل

تعقيم البذور

عقمت بذورالنبات بمادة القاصرالتجاري بتركيز 1.75% لمدة 5 دقائق وبعدها غسلت ثلاث مرات بالماء المعقم المقطر[5].

تحضير الوسط الغذائي Murashige وSkoog

استعمل وسط MS [6] ثم اضيف السكروز بمقدار 30 غم/لتر والمايونستول بمقدار 100 ملغم/لتر وأضيف منظمات النمو الى الوسط حسب الهدف من التجربة وبالتراكيز المبينة ازاء كل منها. واضيف 8 غم/ لتر من مادة الاكار الى الوسط الغذائي بعدها مزجت مكونات الوسطا لغذائي على الصفيحة الساخنة الممغنطة (Hot plat magnetic stirrer) لإذابة مكونات الوسط الغذائي في درجة حرارة 90-100 م. وزع الوسط مباشرة في الأوعية المخصصة للزراعة (Universal Tubes) بأبعاد 8 × 2.5 سم ووضع 5 مل من الوسط الغذائي لكل انبوبة. واغلقت الدوارق بالقطن الطبي ورقائق الالمنيوم بعدها عُقمت بجهاز المؤصدة (Autoclave) في درجة حرارة 121 م وضغط 1.5 بار لمدة 15 دقيقة وتركت لمدة ثلاثة أيام في درجةحرارة الغرفة لمراقبة التلوث قبل زراعتها بالاجزاء النباتية.

زراعة البذور وانتاج البادرات المعقمة

زرعت البذور المعقمة في قناني الزراعة Universal Tube الحاوية على وسط MS خال من منظمات النمو، حضنت في غرفة النمو تحت شدة أضاءة قدرها 1000 لوكس ولمدة أضاءة 8/16 ساعة ضوء/ظلام وعلى درجة حرارة 25م ولمدة اسبوعين.

نشوء مزارع الكالس

نقلت البادرات المعقمة إلى أطباق زجاجية معقمة وتحت ظروف تامة التعقيم وفصلت الاوراق الفلقية، وقطعت ومن ثم زرعت في وسط MS مجهز بتوليفات مختلفة من منظمات النمو للتحري عن التوليفة الأكثر فعالية في استحثاث الكالس. شملت منظمات النمو المضافة الاوكسين (2,4-D) بالتراكيز 0.0، 0.5، 1.0، 2.0 و2.5 ملغم/لتر أما السايتوكاينين فقد اضيف الكاينتين بالتراكيز 0.0، 0.1، 0.3، 0.7 و 1.0 ملغم/لتر وبواقع 9 مكررات لكل تركيز وسجلت نتائج إستحثاث الكالس كنسبة مئوية بعد مرور 28 يوماً منا لزراعة. بعد تحديد التوليفات التي أعطت أكبر كمية كالس، نقلت قطع الكالس وتحت ظروف التعقيم إلى وسطٍ زرعي جديد حاوٍ على تلك التوليفات لغرض إكثاره وإدامته.

ادامة الكالس

نُقِل الكالس المستحث من الأوراق الفلقية لنبات السيسبان بعد 28 يوماً من النمو الى أوساط غذائية جديدة حاوية على مكونات وسط نشوء وهو ذات الوسط الذي استعمل في إستحثاث الكالس.

زراعة الكالس في اوساط تحتوي معادن ثقيلة

وزن 35 ملغم من كالس الورقة الفلقية وزرع في أوساط غذائية جديدة تحتوي على مكونات وسط إستحثاث الكالس ذاته المجهز بتركيز 2.0ملغم/لتر من 2,4-D مع 0.3 ملغم/لتر من KIN وأضيف اليه المعادن الثقيلة التي اشتملت على الكاديميوم بتراكيز 0.0، 0.1، 0.5، 1.0 و 1.5 جزء بالمليون والرصاص بتراكيز0.0، 0.5، 1.0، 2.0 و 2.5 جزء بالمليون مباشرة أو بصورة تدريجية، اجريت التجربة بواقع تسع مكررات لكل تركيز.

تقدير الكاديميوم والرصاص في الكالس المعرض للمعادن الثقيلة

وزن 0.2 غم من الكالس المجفف مسبقا ولمدة يومين على درجة 65 مئوية، ووضعت في انبوبة اختبار سعة 15 مل ثم اضيف لها 5 مل من حامض النتريك المركز HNO_3 مع 1 مل من حامض البيروكلوريك $HCLO_3$ بتركيز 70% و 0.5 مل من حامض الكبريتيك H_2SO_4 بتركيز 70% وتركت العينة لمدة 24 ساعة لأتمام الهضم. قدرت تراكيزالكاديميوم والرصاص بواسطة جهازالامتصاص الذري **[7]**.

انتخاب خلايا الكاس المتحملة للمعادن الثقيلة

حددالمستوى 1.0 جزء بالمليون من الكادميوم و2.0 جزء بالمليون من الرصاص والمضاف بصورة تدريجية كمستويات يمكن زراعة الكالس عليها للحصول على خلايا متحملة وعدة تراكيز تحت القاتلة.

إعادة زراعة الخلايا المتحملة للمعادن الثقيلة

زرع الكالس المتحمل للكادميوم عند التركيز 1.0 جزء بالمليون والكالس المتحمل للرصاص عند التركيز 2.0 جزء بالمليون كل على حدة وعلى أوساط خالية منها،ثم اختبرت انسجة الكالس في أوساط احتوت تراكيز من0.0 الى 1.0 جزء بالمليون بالنسبة للكادميوم واوساط احتوت تراكيز 0.0 الى 2.0 جزء بالمليون بالنسبة للرصاص بصورة تدريجية، وتم قياس تراكيزالكادميوم والرصاص بواقع تسع مكررات لكل تركيز.

الإخلاف Regeneration

إنتاج الأفرع الخضرية من الكالس المتحمل للكادميوم والرصاص: استعمل benzyl adenine (BA) بالتراكيز 0.0،0,5،0,7،1.5 و2.0 ملغم/لتر وNaphthalene acetic acid(NAA) بالتراكيز 0.0،0,1،0,2، 0.5 و 0.7 ملغم/لتر في نشوءالافرع من الكالس المتحمل للكاديميوم والرصاص حضنت في غرفة النمو تحت شدة أضاءة قدرها 1000 لوكس ولمدة أضاءة 8/16 ساعة ضوء/ظلام وعلى درجة حرارة 25 مول مدة ست أسابيع.

تجذيرالأفرع الخضرية الناتجة من الكالس المتحمل للكادميوم والرصاص

اضيف الاوكسين IBA بتراكيز0.0، 0.1، 0.5، 0.7 و 1.0ملغم/لتر في تجذيرالافرع.

حساب تركيزالمعادن الثقيلة في النبيتات

تم تقديرتركيزالمعادن الثقيلة في نسيج النبات للجزئين الخضري والجذري كلاعلى حدة بعد تجفيف النبات في الفرن بحسب الطريقة التي وصفها [8].

النتائج والمناقشة

تأثير منظمات النمو والتداخل بينها في نشوء الكالس

يتبين من جدول (1) ان لتراكيز 2,4-D ملغم/لتر تأثيراً معنوياً في نسبة إستجابة الكالس من الاوراق الفلقية لنبات السيسبان إذ بلغت الإستجابة اقصاها عندالتركيز 2.0 ملغم/لتر بلغ 43.10% وتلاه 27.56% للتركيز 2.5ملغم/لتر من 2,4-D في حين إنعدم نشوء الكالس في باقي التراكيزالمنخفضة. ويتضح من الجدول ذاته ان الفروق في متوسط نشوء الكالس كانت معنوية بإختلاف تراكيزKIN وبلغت أعلى نسبة 30.10%عند التركيز 0.3 ملغم/لترمن KIN في حين اقل نسبة نشوء للكالس بعد معاملة السيطرة كان 8.06% عند التركيز 1.0 ملغم/ لتر من KIN.

جدول (1): النسبة المئوية للأستجابة على تكوين الكالس من الأوراق الفلقية لنبات السيسبان في وسط MS مجهز بتراكيز مختلفة من 2,4-D وKIN (ملغم/لتر) بعد 28 يوم من الزراعة.

2,4-D (ملغم/لتر)	KIN (ملغم/لتر)					المتوسط
	0.0	0.1	0.3	0.7	1.0	%
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2.0	0.0	25.5	100	70.0	20.0	43.10
2.5	0.0	30.0	50.5	37.0	20.3	27.56
المتوسط%	0.0	11.10	30.10	21.40	8.06	---

LSD 0.05: لـ 2,4-D: 8.317 لـKIN: 8.317 ، للتداخل: 14.722

ومن خلال متابعة نتائج تأثيرالتداخل بينD -2,4وKIN في نسبة نشوءالكالس من الأوراق الفلقية تبين حصول زيادة معنوية بلغت أقصاها 100 % عند تداخل 2.0 ملغم/لتر من 2,4-D مع 0.3 ملغم /لترمنKIN.

تأثير تراكيز 2,4-D و KIN في متوسط الوزن الطري للكالس

أظهرت نتائج جدول (2) ان لتراكيزD-2,4 (ملغم/لتر) تأثيراً معنوياً في متوسط الوزن الطري (ملغم) للكالس الناشئ من الأوراق الفلقية لنبات السيسبان،اذ بلغ اعلى متوسط 307,29ملغم عند التركيز 2.0 ملغم/لترD-2,4 وتلاها التركيز 2.5 ملغم/لتر محققاً 219.32 ملغم من 2,4-D في حين انعدمت الإستجابة في باقي التراكيزالمنخفضة.

جدول (2):الوزن الطري للكالس (ملغم) المنمى في وسط MS مجهز بتراكيز مختلفة من 2,4-D و KIN(ملغم /لتر) بعد 28 يوم (وزن الكالس الطري الاولي 35 ملغم n=9)

2,4-D	KIN (ملغم/لتر)					المتوسط
(ملغم/لتر)	0.0	0.1	0.3	0.7	1.0	
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2.0	0.0	195.01	620.50	520.05	200.90	307.29
2.5	0.0	240.01	445.50	215.85	195.22	219.32
المتوسط	0.0	87.00	213.20	147.18	79.22	---

LSD 0.05 : لـ 2,4-D: 39.57 لـKIN: 39.57 ، للتداخل: 68.42

وتبين في الجدول ذاته ان الفروق في متوسطات الوزن الطري كانت معنوية بإختلاف تراكيز KIN وبلغ أعلى متوسط 213.20 ملغم عند التركيز 0.3 ملغم/لتر KIN، في حين بلغ أقل متوسط 79.22 ملغم بعد معاملة السيطرة عند التركيز 1.0 ملغم/لتر من KIN. أما بالنسبة لتأثير التداخل بين 2,4-D و KIN في متوسطات الوزن الطري للكالس فقد كان معنوي وبلغ أقصى متوسط له 620.50 ملغم عند التداخل بين 2 ملغم/لتر من 2,4-D و0.3 ملغم/لتر من الـ KIN.

تأثير تراكيز 2,4D–وKIN في متوسط الوزن الجاف للكالس

حصلت زيادة في متوسط الوزن الجاف للكالس الناشئ من الاوراق الفلقية جدول (3)، اذ أعطى أعلى متوسط للوزن الجاف196.14 ملغم عند التركيز 2.0 ملغم/لتر من 2,4-D وتلاه 73.44 للتركيز 2.5 ملغم/لتر من D-2,4، ويلاحظ ان الفروقات في متوسطات الوزن الجاف للكالس كانت معنوية بأختلاف تراكيزKIN اذ بلغ أعلى متوسط 60.42 ملغم عند التركيز 0.3 ملغم/لتر.وحقق التداخل

بين 2,4 -D وKIN تأثيرا معنوياً،اذ أعطى اعلى متوسط بلغ 110.07 ملغم عند التداخل بين 2.0 ملغم/لتر من 2,4-D و 0.3 ملغم/لتر من KIN. تبين من جدول (1) ان إضافة 2,4- D الى الوسط الغذائي بتراكيز اعلى من المستوى المثالي يؤثرسلباً في عمل الإنزيمات المسؤولة عن بناء الجدران الخلوية مما يؤثر في الخصائص الميكانيكية لها، والتأثير في انقسام الخلايا وتكوين الكالس. إن إضافة كل من الأوكسين والسايتوكاينين ضروري لأستحثاث الكالس اذ يعمل السايتوكاينين بوجود الأوكسين كمفتاح لبدء الإنقسام الخلوي تشجع السايتوكينيات على بناء البروتينات الضرورية لانقسام السايتوبلازم وبالتالي تؤدي الى نمو الخلايا النباتية [9].

جدول (3): الوزن الجاف للكالس (ملغم) المنمى في وسط MS مجهز بتراكيز مختلفة من 2,4-D و KIN ملغم /لتر بعد 28 يوم (وزن الكالس الطري الاولي 35 ملغم n= 9).

2,4-D	KIN (ملغم/لتر)					المتوسط
(ملغم/لتر)	0.0	0.1	0.3	0.7	1.0	
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2.0	0.0	53.60	192.01	147.05	88.05	96.14
2.5	0.0	100.09	110.07	96.05	61.02	73.44
المتوسط	0.0	30.73	60.42	48.62	29.81	---

LSD 0.05: للـ 2,4-D: 18.63 للـKIN: 18.63 ، للتداخل: 32.09

وهذا يتفق مع ما توصل اليه [10] في ان إضافة 2.0 ملغم لتر من 2,4-D مع 0.5 ملغم/لتر من BA، علماً ان التوليفة 2.0 ملغم/لتر من 2,4-D مع 0.3 ملغم/لتر من KIN أعتمدت في نشوء وإدامة الكالس الناشئ من الأوراق الفلقية لنبات السيسبان.

تأثير تراكيز الكادميوم والرصاص في أنسجة الكالس

أظهرت نتائج جدول (4) ان لتراكيزالكادميوم المختلفة تأثير معنوي في متوسطات تراكم الكادميوم في أنسجة الكالس الناشئ من الأوراق الفلقية لنبات السيسبان أذ بلغ أعلى متوسط 22.5 جزء بالمليون عند التركيز 1.0 جزء بالمليون من الكادميوم في حين أقل متوسط بعد معاملة السيطرة كان 8.5 جزء بالمليون عند التركيز 1.5 جزء بالمليون، اما بالنسبة لتأثير الإضافة فقد كان التأثير معنوي اذ بلغ أعلى متوسط 13.8 جزء بالمليون عند إضافة الكادميوم بصورة تدريجية تلاها المتوسط 10.5 جزء بالمليون عند إضافة الكادميوم بصورة مباشرة. وأثر التداخل معنوياً في مقدار تراكم الكادميوم في أنسجة الكالس وبلغ أعلى متوسط 27.0 جزء بالمليون عند التركيز 1.0 جزء بالمليون من الكادميوم أثناء الإضافة بصورة تدريجية في حين بلغ أقل متوسط بعد معاملة السيطرة كان 7.0 جزء بالمليون عند التركيز 1.5 ملغم/لتر من الكادميوم عند الإضافة المباشرة.

جدول (4): تراكيز الكادميوم والرصاص في أنسجة كالس نبات السيسبان المجهز بـ 2.0 (ملغم/لتر)2,4-D مع 0.3 KIN.

نوع المعدن	التركيز (جزء بالمليون)	التركيز الممتص بواسطة الكالس ppm عند الاضافة المباشرة	عند الاضافة بصورة تدريجية	المتوسط
	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.1	13.0	14.0	13.5
Cd	0.5	15.0	18.0	16.5
	1.0	18.0	27.0	22.5
	1.5	7.0	10.0	8.5
	المتوسط	10.5	13.8	---
LSD		للتركيز: 5.29	للاضافة: 2.57	للتداخل: 8.33
	0.0	0	0	0.0
	0.5	11.0	12.0	11.5
Pb	1.0	14.0	17.0	15.5
	2.0	16.0	24.0	20.0
	2.5	9.0	13.0	11.0
	المتوسط	10.0	13.2	
LSD 0.05		للتركيز: 4.94	للاضافة: 2.36	للتداخل: 6.48

بينت النتائج وجود تأثير معنوي على المستوى 0.05 لتراكيز الرصاص في متوسط تراكمه في أنسجة كالس نبات السيسبان، اذ بلغ أعلى متوسط تركيز 20.0 جزء بالمليون عند التركيز 2.0 جزء بالمليون من الرصاص تلاها المتوسطات 15.5، 11.5 و11 جزء بالمليون عند التراكيز 1.0، 0.5، و2.5 جزء بالمليون من الرصاص على التوالي والتي تفوق تجميعها على معاملة السيطرة. سجلت فروقات معنوية لتأثير الإضافة حيث كان أعلى متوسط 13.2 جزء بالمليون عند إضافة الرصاص بصورة تدريجية، في حين كان أقل متوسط بعد معاملة السيطرة 10.0 جزء بالمليون عند إضافة الرصاص بصورة مباشرة للكالس.

اما بالنسبة لتأثير التداخل بين تركيز الرصاص والإضافة تحقق أعلى متوسط 24.0 جزء بالمليون عند إضافة 2.0 ملغم/لتر من الرصاص بصورة تدريجية في حين أقل متوسط بعد معاملة السيطرة كان 9.0 جزء بالمليون عند إضافة الرصاص بتركيز 2.5جزء بالمليون وبصورة تدريجية.

الإخلاف

تأثير تراكيز NAA و BA في نشوء الأفرع من الكالس: بينت النتائج الموضحة في جدول (5) بأن أفضل توليفة لنشوء الأفرع من الكالس سواء كان متحمل للكادميوم اوالرصاص او الملوحة هي التوليفة المكونة من 0.7 ملغم/لتر من BA و0.2 ملغم/لتر من NAA حيث أعطت أعلى نسبة لنشوء الأفرع بلغت 92% للكالس غير المعرض للأجهاد و 76% للكالس المتحمل للكادميوم و 78% للكالس المتحمل للرصاص، وان أقل نسبة مئوية لنشوء الأفرع هي 0.0% عند معاملة السيطرة وعند التوليفة المكونة من 1.5 ملغم/لتر BA و0.5 ملغم/لتر NAA. ويلاحظ من النتائج أهمية الأوكسين في نشوء وتطور البراعم العرضية على الأنسجة المزروعة وهذا قد يعود الى دورالأوكسين المعروف التآزري مع السايتوكينينات في تمايز الأنسجة المزروعة [11].

جدول (5): النسبة المئوية لتكوين الافرع من كالس متحمل للكادميوم عند تركيز1.0جزء بالمليون، كالس متحمل للرصاص عند التركيز 2.0 (جزء بالمليون).

BA (ملغم/لتر)	NAA (ملغم/لتر)	النسبة المئوية لتكوين الافرع %		
		كالس معاملة سيطرة	كالس متحمل للكادم ليوم	كالس متحمل للرصاص
0.0	0.0	0	0	0
0.5	0.1	66	53	55
0.7	0.2	92	76	78
1.5	0.5	41	15	25
2.0	0.7	0	0	0

ويلاحظ من الجدول ذاته ان الكالس فشل في التمايز عند التوليفة المكونة من 2.0 ملغم/لتر BA و0.7 ملغم/لتر NAA اذ ان أضافة الأوكسين وخصوصاً العالية يؤثر سلباً في أستجابة الجزء النباتي [12]. كما ان إعادة زراعة الكالس (Re Culture) على الوسط نفسه ادى الى تحول لون الكالس الى اللون البني دون تكوين فروع وهذا يتفق مع [13]عند زراعة الكالس الناشئ من اجزاء ورقة نبات الصبار في ان الكالس فقد قدرتة على الإخلاف. ربما يرجع السبب في ذلك وبحسب ما أشار [14]، الى تدهور قابلية تكوين الأعضاء أونشوء الاجنة في الكالس، نتيجة تغير التوازن الهرموني داخل الخلايا أو الانسجة مما ادى الى توقف تلك الخلايا عن التمايز وتكوين الأجنة والاعضاء.

تأثير IBA في نسبة تجذير الأفرع لنبات السيسبان

أظهرت نتائج جدول (6) ان لتراكيز IBA المختلفة تأثير على نسبة تجذير الأفرع الناتجة من كالس الأوراق الفلقية لنبات السيسبان والمتحمل للكادميوم والرصاص والملوحة، حيث ان أعلى نسبة مئوية للتجذير هي 70% للأفرع المتحملة للرصاص و 66% للأفرع المتحملة للكادميوم عند وجود 0.7 ملغم/ لتر من IBA. تلاه التركيز 0.5 ملغم/لتر من IBA والذي أعطى 48%، 52% للرصاص والكادميوم على التوالي. في حين أقل نسب تجذير بعد معاملة السيطرة كانت 25 و 28% للأفرع المتحملة للكادميوم و الرصاص على التوالي عند وجود 1 ملغم/ لتر من IBA. يلاحظ بأن التراكيز العالية من الأوكسين تكون ذات تأثير تثبيطي لعملية التجذير الذي قد يرجع الى الزيادة التي تحدث في بناء الأثيلين في أنسجة الجذور ومن ثم تثبيط نموها وتطورها. تؤدي الأوكسينات دوراً رئيساً في تجذير الأفرع وتختلف فيما بينها من حيث فعاليتها في احداث التأثير الفسلجي المطلوب ويعتمد التأثير الذي تحدثه على نوع النبات والتركيز المستعمل فضلاً عن مستويات الأوكسين الداخلية في النسيج النباتي[15]. ان انقسام خلايا مناشئ الجذور (Root primoridial) يعتمد على الأوكسين طبيعياً كان او مضافاً اي ان التأثيرات الفسيولوجية للأوكسينات تكمن في زيادة أنقسام الخلايا وانها تحول الخلايا البالغة الى خلايا مرستيمية وبذلك يتكون مرستيم الجدار العرضي الذي تنقسم خلاياه لتكوين الجذور [16].

جدول (6): نسبة التجذير من كالس متحمل للكادميوم عند تركيز 1 (جزء بالمليون)، كالس متحمل للرصاص عند التركيز 2 (جزء بالمليون).

IBA (ملغم/لتر)	النسبة المئوية للتجذير %		
	الأفرع الناتجة من كالس غير معرض للإجهاد	الأفرع الناتجة من كالس متحمل للكادميوم	الأفرع الناتجة من كالس متحمل للرصاص
0.0	0	0	0
0.1	56	45	48
0.5	71	48	52
0.7	96	66	70
1	38	25	28

تأثير المعادن الثقيلة في الأوزان الطرية والجافة لنباتات السيسبان

يتبين من جدول (7) ان تأثير تركيز الكادميوم ادى الى انخفاض غير معنوي في ا لأوزان الطرية للمجموع الخضري لنبيتات السيسبان المتحملة للكادميوم والناتجة من الزراعة النسيجية، والذي بلغ أقصاه 6.9 غم عند معاملة السيطرة تلاه 5.6 غم عند التركيز 1.0ملغم/لتر من الكادميوم، اما بالنسبة للوزن الطري للمجموع الجذري فلم يكن هناك فرق معنوي اذ بلغ أقصى متوسط 3.2 غم عند التركيز 1.0 ملغم/لتر من الكادميوم والذي تفوق على معاملة السيطرة والتي بلغت 2.7 غم. اما بالنسبة لتأثير الكادميوم في الوزن الجاف للمجموع الخضري لنبيتات السيسبان الناتجة من الزراعة النسيجية فقد تبين من الجدول ذاته بأن التأثيرغير معنوي اذ بلغ أعلى متوسط 2.5 غم عند معاملة السيطرة في حين بلغ 2.1 غم عند التركيز 1.0 ملغم/لتر من الكادميوم، اما بالنسبة لتأثير تركيز الكادميوم على الوزن الجاف للمجموع الجذري فقد لوحظ ان التأثيرغيرمعنوي وان أعلى متوسط كان 1.6 غم عند التركيز 1.0 ملغم/لتر من الكادميوم والذي تفوق على معاملة السيطرة والتي بلغت 1.2 غم وزن جاف للمجموع الجذري. اما في ما يخص الإرتفاع فقد تبين من

جدول (7) ان تأثير الكادميوم في إرتفاع النبيتات الناتجة من الزراعة النسيجية كان معنوي وان أعلى متوسط إرتفاع كان 9.5 سم عند معاملة السيطرة.

جدول (7): تأثير تراكيز المعادن الثقيلة في الاوزان الطرية والجافة لنبيتات السيسبان الناتجة من الزراعة النسيجية بعد 6 اسابيع من التجذير.

نوع المعدن	تركيز المعدن	الوزن الطري		الوزن الجاف		الإرتفاع
		المجموع الخضري	المجموع الجذري	المجموع الخضري	المجموع الجذري	(سم)
Cd	0.0	6.9	2.7	2.5	1.2	9.5
	1.0	5.6	3.2	2.1	1.6	8.2
	0.05 LSD	2.28	1.79	1.04	0.63	0.74
Pb	0.0	5.2	2.7	2.1	0.9	9.8
	2.0	4.1	3.2	1.9	1.2	8.3
	0.05 LSD	1.95	1.96	0.68	0.77	0.69

تبين من متابعة النتائج في جدول (7) بأن التأثير غير معنوي في الأوزان الطرية للمجموع الخضري لنبيتات السيسبان الناتجة من الزراعة النسيجية اذ بلغ أقصى متوسط 5.2 غم عند معاملة السيطرة والتي تفوقت على المعاملة الحاوية على 2.0 ملغم/لتر من الرصاص والتي اعطت 4.1 غم وزن طري للمجموع اخضري، اما تأثير تركيز الرصاص على الوزن الطري للمجموع الجذري ايضاً لم يكن معنوي اذ بلغ أقصاه عند التركيز 2.0 جزء بالمليون من الرصاص والذي أعطى 3.2 غم والذي تفوق على معاملة السيطرة والتي بلغت 2.7 غم وزن طري للمجموع الجذري. ويلاحظ من الجدول ذاته بأن تأثير تركيز الرصاص ايضاً لم يكن معنوي في الأوزان الجافة للمجموع الخضري اذ تفوقت معاملة السيطرة والتي أعطت أعلى متوسط بلغ 2.1 غم على المعاملة الحاوية على 2.0 جزء بالمليون من الرصاص والتي أعطت 1.9 وزن جاف للمجموع الخضري، لوحظ ايضاً بأن تأثير تركيز الرصاص في الوزن الجاف للمجموع الجذري لم يكن معنوي وبلغ أقصى متوسط 1.2 غم عند التركيز 2.0 جزء بالمليون من الرصاص والذي تفوق على معاملة السيطرة. اما بالنسبة لتأثير تركيز الرصاص في إرتفاع نبيتات السيسبان الناتجة من الزراعة النسيجية فقد كان معنوي اذ بلغ أقصى متوسط 9.8 عند معاملة السيطرة.

تأثير تراكيز المعادن الثقيلة في نبيتات السيسبان

أظهرت نتائج التحليل الكيميائي للكادميوم للمحتوى الخضري لنبيتات السيسبان المتحمل للكادميوم والناتجة من الزراعة النسيجية جدول (8) كان لها تأثيرمعنوي، اذ بلغ أقصى متوسط 11.2 جزء بالمليون عند المعاملة 1.0 جزء بالمليون والتي تفوقت على معاملة السيطرة. اما تأثير تركيز الكادميوم في المجموع الجذري فقد كان معنوياً، اذ بلغ محتوى المجموع الجذري للكادميوم 6.7 جزء بالمليون عند التركيز 1.0 جزء بالمليون من الكادميوم والذي تفوق على معاملة السيطرة ان قدرة النبات على تحمل الملوحة مرتبط بقدرته على التخلص من المعادن المتجمعة وهذه الآلية تجري عن طريق النمو السريع وزيادة الكتلة الحيوية مع زيادة محتوى الخلايا من الماء وهذا يتفق مع [17].

جدول(8): تراكيز المعادن الثقيلة والصوديوم والبوتاسيوم في الاجزاء الخضرية والجذور لنبيتات السيسبان الناتجة من الزراعة النسيجية بعد 6 اسابيع من التجذير.

نوع المعدن	تركيز المعدن جزء بالمليون	المحتوى	
		المجموع الخضري	المجموع الجذري
Cd	0.0	0.0	0.0
	1.0	11.2	6.7
	0.05 LSD	4.327	2.095
Pb	0.0	0.0	0.0
	2.0	6.9	9.1
	0.05 LSD	2.71	3.66

اما بالنسبة للتحليل الكيميائي للرصاص في المجموع الخضري لنبيتات السيسبان المتحملة للرصاص فقد بينت النتائج بأن هناك فرق معنوي اذ أعطى التركيز 2.0 جزء بالمليون متوسط بلغ 6.9 جزء بالمليون، اما بالنسبة لتأثير تركيز الرصاص في المجموع الجذري فالتأثير أيضاً معنوي حيث أعطى متوسط بلغ 9.1 جزء بالمليون عند التركيز 2.0 جزء بالمليون والذي تفوق على معاملة السيطرة.

المصادر

1. Tiwari, S., Singh, S. N. and Garg, S. K. (2013). Induced phytoremediation metals from fly ash mediated by plant growth promoting rhizobacteria. J. of Environ. Biol. 34: 717-727.
2. Bhalerao, Satish A. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi: apotential biotechnological tool for phytoremediation of heavy metal contaminated soils. Inter. J. of Sci. and Natural. 4(1): 1-15.
3. Singh, H. (2006). Myco-remediation.John Wiley and Sons,Inc.Hoboken.New Jersey :592.
4. Chen, F., Fang, W. and Yang, Z. (2009). Cadmium and copper uptake and acculation by *Sesbania rostrate* seedling, a N-fixing annual plant implications for the mechanism of heavy metal tolerance. Front. Biol. China, 4(2): 200-206.
5. Purohit, S. S. (2003). Laboratory Manual of Plant Biotechnology. Agro. India, pp. 24-29.

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

7. Achakzai, Abdul Kabir K., Mojeed, O. L. and Oladele, J. B. (2012). Effect of mycorrhizal inoculation on the growth and phytoextraction of heavy metals by maize grown in oil contaminated soil . Pak. J. Bot., 44(1): 221-230.

8. Cresser, M. S. and Persons, J. W. (1979). Sulfuric – perchloric acid digestion of plant materials for the determination of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, sodium and magnesium. Anal. Chimica. Acta. 109: 431-436.

9. العاني، طارق علي. (1990). فسلجة نمو النبات وتكوينه، جامعة بغداد، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جمهورية العراق.

10. Goodwin, M. (1985). Introduction to Plant Biochemistry. (2 nd Ed). Pergamon Press. New York. P: 149.

11. Ibrahim, K. M. and Yousir, S. A. (2009). *In vivo* and *In vitro* studies on heavy metal tolerance in *Sesbania grandiflora* L. Biotechnology Research Center. 3(2): 48-64.

12. Skoog, F. and Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *In vitro* Symp. Soc. Exp. Biol., 11:118-131.

13. المؤمن، هديل مكي حبيب. (2008). إكثارنبات الصبار *Aloe vera* خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير، كليةالعلوم للبنات، جامعة بغداد، جمهورية العراق.

14. Raven, P. H., Event, R. F. and Eichhorn, S. E. (2004). Biology of plants. 7th. Edition. Puplished by W. H. Freeman, University of Wisconsin.

15. Negrutiu, I. and Jacobs, M. (1978). Restoration of the morphogentic capacity in long term callus cultures of Arabidopsis thaliana, Z. Pflanzen Physiol. 90: 431-441.

16. Hartmann, H. T., Keaster, D. E., Davies, F. T. and Generver, R. L. (1997). Plant Propagation: Principles and Practices. (6th Ed.) Prentic- Hall Iner., EdiUSA. P: 283.

17. الوهيبي، محمد بن حمد. (2008). ظاهرة تراكم العناصر الثقيلة في النباتات مراجعة مختصرة. المجلة السعودية للعلوم البيولوجية 14 (2) 73-96.