مجلة الخليج العربي للبحوث العلمية 20 (2) ، ص ص 101-105 (2002)

(Ref. 2005)

بحث أصلي

ع عبد الحافظ ، ع حسن بلو

تشكل البراعم العرَضية من القطع الورقية لزهرة الربيع *Bellis perennis* ولسان الثور *Borago officinalis*

المستخلص: تحقق تجديد البراعم العرضية من القطع الورقية للنباتين الطبيين، زهرة الربيع *Bellis perennis* ولسان الثور *Borago officinalis* المزروعة في وسط موراشيغي وسكوك المدعم بتركيز مختلف من الأوكسينات والسيتوكينيات. حيث بلغ عدد البراعم المتولدة من كل قطعة ورقية في نبات زهرة الربيع7.5 برعم في وسط يحوي 2مغ.ل-1من بنزيل أمينو بيورين Benzylaminopurine (BAP) ، و1 مغ.ل-1من أندول حمض الزبدة acid Indolebuteric(IBA).

تم إكثار البراعم المتولدة من القطع الورقية في أوساط جديدة، فكان المعدل13.2 برعم في كل زجاجة في وسط يحوي1 مغ.ل-1 من (BAP) , و1.0 مغ.ل-1 من أندول حمض الخل Indoleacetic acid (IAA) أمكن تجذير بعض البراعم في وسط يحوي 0.5 مغ.ل-1 من (IAA)، و نقلها إلى التربة بنجاح . أما في نبات لسان الثور ، فقد تم الحصول على برعم واحد أو برعمين فقط من كل قطعة ورقية في وسط يحوي 2 مغ.ل-1من (BAP) , و0.5 مغ.ل-1 من (IAA) ، حيث تمايزت البراعم ، إما بشكل مباشر من القطعة المزروعة أو بعد تشكل الكالوس عليها.أعطت البراعم الناتجة معدل تكاثر منخفض أيضاً وقدره 3 براعم.

كلمات مدخلية:براعم عرضية، قطع ورقية، زهرة الربيع، لسان الثور، تجدد، الأوكسينات، السيتوكينيات ، تركيز.

Adventitious Bud Formation from Leaf Segments of *Bellis perennis* and *Borago officinalis*

A A Hafez, A H Bello

Abstract: Adventitious bud formation was achieved from leaf segments of two important medicinal plants: *Bellis perennis* and *Borago officinalis* on Murashige and Skoog's medium supplemented with a various concentrations of Auxins and Cytokinins. In the case of *Bellis perennis*: high regeneration rate of 7.5 bud /segment was obtained from each leaf segment on medium containing 2 mg.l-1 of BAP and 1 mg.l-1 of IBA. Regenerated buds from leaf segments were multiplicated on new media. Proliferation rate of buds was 13.2 bud/sample in presence of 1 mg.l-1 BAP and 0.1 mg.l-1 IAA. Rooting of some regenerated buds were established on medium containing 0.5 mg.l-1 of IAA. The rooted plantlets were successfully transferred to the soil. In the case of *Borago officinalis*: the regeneration rate of bud/segment was obtained on medium containing 2 mg.l-1 of BAP and 0.5 mg.l-1 of IAA. Low proliferation rate of buds was obtained (3 bud/sample).

Keywords: Budformation, Leaf segments, *Bellis Perennis*, *Borago officinals*, Auxins, Cytokinins, consentration.

المقدمة

تتضمن زراعة الأنسجة النباتية Plant Tissue Culture مجموعة من الطرق تشكل جزءاً من علم التقانة الحيوية النباتية Plant Biotechnology، وفي الوقت الحاضر فإن تقنيات الإكثار الدقيق الذي يشمل تشكل البراعم العرَضية:Bud Formation Adventitious ، أو تكاثر السوق: Shoot Proliferation هو الأكثر إستخداماً من بين تقنيات زراعة الأنسجة (Thorpe, 1995 .(Vasil, 1994; Brown and

لقد أصبح بالإمكان، خلال الثلاثين سنة الأخيرة، تجديد النبيتات Plantlets من قطعة نباتية أو من الكالوس Callus في كثير من الأنواع النباتية، حيث يمكن أن تظهر البراعم الخضرية أو الجذور على أي جزء من النبات مباشرة أو بعد تشكل الكالوس، عند إعطاء محرض مناسب (Brown and Thorpe, 1995; Deklerk *et al.*, 1997). في بحوث سابقة على تشكل البراعم العرضية من القطع الورقية لبعض النباتات، تمايزت البراعم من القطع الورقية لنبات التوت *Morus alba* (Oka and Ohyama, 1981) ، وتحقق التجديد النباتي من ورقة النبات الطبي *Clerodendrum colebrookianum* (Mao *et al.*, 1995). وتجددت أوراق البقلة *Portulaca oleracea* سوقاً وجذوراً عرضية (Subburam, 1996 Thangavel and) ، وتم تحريض تشكل البراعم العرضية من قطع ورقة نبات الفليفلة الحمراء *Capsicum annuum* 1996) (Christophe and Rajam, ونبات زيتون بوهيميا (and Maloupa, 1995) *Elaeagnus angustifolia* .(*Economou*

النباتين موضع الدراسة في هذا البحث هما نباتين طبيين مهمين، فنبات زهرة الربيع *Bellis perennis* من الفصيلة المركبة *Asteraceae* ويستخدم في علاج الأمراض التنفسية والجلدية ، وهو منشط لنمو الأطفال ومقشع (Oury, 1984) ومن الأجنة الناضجة للنبات و المهدد بالإنقراض *Picea chihuahuana* (Lopez - Escamill *et al* . 2000) .

عبد المنعم عبد الحافظ
كلية المعلمين – قسم العلوم
الجوف ص.ب: 269
المملكة العربية السعودية
هاتف:00664-6256588

أما نبات لسان الثور *Borago officinalis* فهو من الفصيلة الحمحمية *Boraginaceae* سجل تواجده في الأراضي الخصبة حول دمشق، وذكر أنه مهدد بالإنقراض (Mouterde,1983) ، أوراق لسان الثور وأزهاره منشطة للكظر وإفراز الأدرينالين ومدرة للحليب ومضادة للروماتيزم، أما البذور فتستخدم لعلاج الأكزيما ولتنظيم زمن الحيض (Ody,1993). إذن الأهمية الطبية لهذين النباتين، وعدم وجود بحوث سابقة على زراعة أنسجتهما في الأدوات الزجاجية على حدّ علمنا، يضاف إلى ذلك أن النبات الثاني مهدد بالانقراض، قد يعطي أهمية كبيرة لهذا البحث.

المواد وطرق العمل

إستخدمت قطع ورقية مأخوذة من نباتات لسان الثور *Borago officinalis* نامية في البيت الزجاجي، وقطع ورقية من نباتات زهرة الربيع *Bellis perennis* نامية في الحقل، حيث عقّمت بهيبوكلوريت الصوديوم NaOCl تركيز 1% لمدة 15 دقيقة، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات.

وإستخدم وسط موراشيغي وسكوك الأساسي (Skoog, 1962 Murashige and) والذي يحوي الأملاح المعدنية الأساسية ،مضافاً إليه 0.5 مغ.ل$^{-1}$ من كل من الفيتامينات: الثيامين والبيرودوكسين وحمض النيكوتين، و 100 مغ.ل$^{-1}$ من الميواينوزيتول، و30 غ.ل$^{-1}$ من السكروز كما هو موضح في جدول (1).

ضُبطت درجة حموضة الوسط على ±5.8 و 0.1 بواسطة ماءات الصوديوم NaOH أو حمض كلور الماء HCl النظاميين قبل إضافة الأغار، ثم أضيف الأغار بمقدار 8 غ.ل$^{-1}$. تم توزيع الوسط على زجاجات أرلنماير سعة 125 مل بمقدار 50 مل من الوسط في كل منها ، وعقّمت في الصاد الموصد Autoclave في درجة حرارة 121 م°، وضغط 1.4 كغ. سم^{2}، ولمدة 20 دقيقة. تمت الزراعة في غرفة العزل Laminar Air Flow بعد تعقيمها بالأشعة فوق البنفسجية لمدة نصف ساعة. حيث زرعت قطعة أو قطعتان من الأوراق في كل زجاجة.

حضنت المزارع في غرفة النمو Growth Chamber بدرجة حرارة 27°م± 1°م وفي فترة إضاءة 16 ساعة بشدة ضوئية 1000 لوكس تتناوب مع 8 ساعات ظلام، ولمدة من 5 – 6 أسابيع. تم تقدير النمو في نهاية كل تجربة بتسجيل عدد القطع الورقية المتجددة إلى براعم عرضية، وعدد البراعم المتشكلة على كل قطعة مزروعة، وبأخذ الوزن الرطب للقطعة المزروعة مع البراعم المتشكلة عليها. ومن ثم كان إيجاد المتوسطات الحسابية والنسب المئوية والأخطاء المعيارية لمختلف المعاملات.

نتائج البحث

1- نبات زهرة الربيع *Bellis perennis*

كانت نسبة تلوث النبات منخفضة ولم تتجاوز 10%، و نسبة تشكل البراعم العرَضية من القطع الورقية مرتفعة، حيث كان التجديد من حوالي 90% من القطع المزروعة بعد تشكل الكالوس عليها.

ويوضح الجدول رقم (2) عدد البراعم المتولدة من كل قطعة ورقية ووزن هذه القطعة :

جدول (1):تحديد المعاملات التي طبقت على كل نبات وعدد الزجاجات (المكررات) لكل معاملة:

النبات	التجربة	المعاملة(مغ . ل$^{-1}$)	عدد المكررات
زهرة الربيع	تشكل البراعم العرضية	Kin 1+NAA 1	10
		BAP 1+IBA 1	10
		BAP 2+IBA 1	10
	إكثار البراعم	BAP 1 + IAA 0.5	5
		BAP 0.1 + IAA 0.5	5
		BAP 0 + IAA 0.5	5
لسان الثور	تشكل البراعم العرضية	BAP 2 + IAA 0.5	10
		BAP 2 + NAA 0.5	10
		BAP 0.1 + NAA 2	10
	إكثار البراعم	BAP 2 + IAA	5

MS: Murashige and Skoog
BAP: Benzylaminopurine
NAA: Naphthaleneacetic acid
IAA: Indoleacetic acid
IBA: Indolebuteric acid
Kin: Kinetin

الجدول (2): عدد البراعم المتولدة من كل قطعة ورقية ووزن هذه القطعة.

المعاملة (مغ.ل$^{-1}$)	عدد البراعم المتولدة / قطعة *	وزن القطعة (غ)	الكالوس	الجذور
Kin 1 + NAA 1	0.48 ± 1.9	1.35	+	+
BAP 1 + IBA 1	0.99 ± 6.6	1.57	+	-
BAP 2 + IBA 1	0.93 ± 7.5	1.93	+	-

* المتوسط الحسابي لعشر قطع ± الخطأ المعياري.
+ ظهرت الاستجابة في بعض المزارع.
– لم تظهر الاستجابة.

تم الحصول على IBA و2 مغ.ل$^{-1}$ من BAP وهو أعلى بقليل من عدد البراعم المتولدة بوجود 1 مغ.ل$^{-1}$ على معدل مرتفع وقدرة7.5 برعم / قطعة ورقية متجددة، وذلك بوجود1 مغ.ل$^{-1}$ من كل منهما (6.6 برعم / قطعة)، وكان متوسط وزن القطعة مع البراعم المتولدة عليها في نهاية التجربة هو 1.93 غ. أنظر الشكل رقم (1).

شكل رقم (1): تشكل البراعم العرضية من القطع الورقية بوجود 1 أو 2 مغ.ل$^{-1}$ من BAP.

تم إكثار البراعم الناتجة بزرع كل برعم على وسط يحوي 0.5 مغ.ل$^{-1}$ من IAA و0 أو 0.1 أو 1 مغ.ل$^{-1}$ من BAP فحصلنا على النتائج المبينة في الجدول رقم (3):

وكان الحصول على معدل إكثار مرتفع: Multiplication Rate High وقدره 13.2 برعماً لكل زجاجة، وذلك بوجود 1مغ.ل$^{-1}$ من BAP مع متوسط للوزن الرطب قدره 5.59 غ / زجاجة.تشكلت الجذور على البراعم المتولدة في وسط يحوي 0.5 مغ.ل$^{-1}$ من IAA فقط، وأمكن نقل بعض النبيتات المجذّرة من الأواني الزجاجية إلى مزارع مائية Hydroponics ثم إلى التربة.

2- نبات لسان الثور *Borago officinalis*

تلوثت وإسودت أكثر من نصف القطع الورقية المزروعة، ومن المزارع الباقية تم الحصول على النتائج المبينة في الجدول رقم (4).

لقد تحققت أعلى نسبة لتجديد البراعم العرَضية وقدرها 5 - 20 = 25% من القطع الورقية المزروعة على وسط يحوي0.5 مغ.ل$^{-1}$من IAA و 2 مغ.ل$^{-1}$ منBAP وبمعدل برعم أو برعمين فقط من كل قطعة ورقية متجددة. و تمايزت البراعم، إما بشكل مباشر من النبات أو بعد تشكل الكالوس عليها.أنظر الشكل رقم (2).

شكل رقم (2): تشكل البراعم العرضية من القطع الورقية لنبات لسان الثور.

أما في الوسط الحاوي على 2 مغ.ل$^{-1}$ من NAA و 0.1 مغ.ل$^{-1}$من BAP فقد إنخفضت نسبة التجديد إلى 1/20= 5% فقط، بينما كان معدل تشكل الكالوس على القطع المزروعة مرتفعاً وقدره 18/20 = 90%، كذلك 25% من القطع المزروعة في هذا الوسط شكلت جذوراً عرضية.

الجدول (3): إكثار البراعم المتولدة باستخدام BAP بوجود 0,5 مغ.ل$^{-1}$ من IAA

تركيز BAP (مغ.ل$^{-1}$)	عدد البراعم/ زجاجة *	الوزن الرطب (غ / زجاجة)	الكالوس	الجذور
0	0.24 ± 1.4	0.37	-	++
0.1	1.07 ± 7.6	4.01	+	+
1	1.23 ± 13.2	5.59	+	-

* المتوسط الحسابي لخمسة مكررات ± الخطأ المعياري.
++ ظهرت الإستجابة في كل المزارع.
+ ظهرت الإستجابة في بعض المزارع.
– لم تظهر الإستجابة.

الجدول (4): تجديد البراعم العرَضية من القطع الورقية لنبات لسان الثور.

المعاملة (مغ.ل$^{-1}$)	القطع التي شكلت الكالوس *		القطع التي كونت سوقاً		القطع التي كونت جذوراً	
	العدد	النسبة %	العدد	النسبة %	العدد	النسبة %
BAP 0.1 + NAA 2	18	90	1	5	5	25
BAP 2 + NAA 0.5	15	75	4	20	2	10
BAP 2 + IAA 0.5	11	55	5	25	3	15

* العدد الكلي للقطع المفحوصة هو 20

أعطت البراعم الناتجة معدل تكاثر قدره 2 أو 3 برعم / زجاجة عند زراعتها في نفس الوسط الحاوي على BAP:IAA بتركيز 2 : 0.5 مغ.ل$^{-1}$ مع تشكل الكالوس حول قاعدة البرعم، (أنظر الشكل رقم (3)).

شكل رقم (3): إكثار البراعم في نبات لسان الثور.

مناقشة النتائج

1- نبات زهرة الربيع *Bellis perennis*

يتفق تشكل الكالوس على القطع المزروعة ثم نشوء السوق منها مع نتائج (Cattopadhyay *et al.*, 1995)، وتدل الدراسات النسيجية المجهرية ، على أن أي تشكل للأعضاء لابد أن يكون مسبوقاً بتشكل للكالوس مهما كان ضئيلاً وغير مرئي بالعين المجردة. ويتفق هذا مع ما أشار إليه الأستاذ الدكتور نزار مراد آغا ضمن ملاحظاته في إتصالنا به.

كان متوسط عدد البراعم المتولدة من القطعة الورقية مرتفعاً وقدره (7.5 برعم / قطعة)، وكذلك معدل تكاثر البراعم المتولدة كان مرتفعاً وقدره(13.2 برعم / زجاجة)، وهذا يعني الحصول على حوالي ربع مليون برعم(250.000) برعم من قطعة ورقية واحدة خلال فترة ستة أشهر من الزراعات المتتالية على أوساط جديدة.

وهذه النتائج هي أفضل ممّا تمّ الحصول عليها في نباتات أخرى، حيث لم يتحقق التجديد الساقي من قطع الورقة في النبات الطبي *Tanacetum* (Keskitalo *et al.*, 1995).

2- نبات لسان الثور *Borago officinalis*

يتفق تمايز البراعم العرضية مباشرة من قطع الأوراق، مع نتائج كل من الباحثين (Sujatha, 1997; and Smith, 1996; Thangavel and Suburam, 1996;Shibili).

وقد أشار (Deklerk *et al.* 1997) إلى أن تجديد الأعضاء من الخلايا الجسمية المتمايزة، يمكن أن يحصل مباشرةً دون تشكل الكالوس، إذا كانت الإنقسامات الخلوية قليلة، أو بشكل غير مباشر بعد تشكل الكالوس إذا كانت الإنقسامات الخلوية وافرة.

يتوافق تمايز البراعم بوجود سيتوكينين بتركيز أعلى من الأوكسين، مع نتائج كل من (Skoog and Miller, 1957) على نبات التبغ *Nicotiana tabacum* و(Christopher and Rajam, 1996) على نبات الفليفلة الحمراء. أما تشكل البراعم على أوساط تحوى سيتوكينين بتركيز أقل من الأوكسين، يختلف مع النتائج المشار إليها ولكنه يتفق مع نتائج (Brito *et al.*, 1995) على نبات *Carparia biflora* ، وربما يعود إلى إحتواء الأنسجة على سيتوكينين داخلي يعوض عن نقص تركيزه في الوسط، وفق إفادة الأستاذ الدكتور حمزة قاسم حمزة.

يتوافق تشكل الجذور على القطع الورقية المزروعة أو على الكالوس المتشكل عليها بوجود NAA بتركيز مرتفع، مع نتائج(Keskitalo *et al.*, 1995).

كان متوسط عدد البراعم المتولدة من كل قطعة ورقية منخفضاً (1 – 2 برعم / قطعة)، كذلك كان معدل تكاثر البراعم المتولدة منخفضاً وقدره(3 براعم / زجاجة)، لكن هذا المعدل مشابه لنتائج (Edson *et al.*, 1996) الذي حصل على 2.3 برعم / قطعة بوجود 0.04 ميكرومول من BAP وذلك على نبات *Hackelia venusta* من الفصيلة الحمحمية نفسها. وقد يعود ذلك إلى تباين القدرة الذاتية لمختلف النباتات والأنسجة على التجديد والنمو في مزارع الأنسجة ،كما هو الحال في إختلاف مقدرة السوق النباتية على التجذير.

الشكر

يشكر الباحثان كلاً من :

الأستاذ الدكتور/ حمزة قاسم حمزة والأستاذ الدكتور / نزار مراد آغا على التوجيهات والملاحظات القيمة، والأستاذ الدكتور / محمد نبيل شلبي والأستاذ / نابغ غزال أسود لتحديدهما النباتين موضوع الدراسة .

References

Brito A. E. R. M., Costa M. S. and Handro W., (1995) Morphogenesis and Plant regeneration in Leaf explants and callus tissues of *Carparia biflora* cultured in vitro. Brazilian J. of Plant Physiology, **7**(2):171-174.

Brown D. C. W. and Thorpe T. A., (1995) Crop improvement through tissue culture. World J. of Microbiology & Biotechnology, **11**:409-415..

Chattopadhyay S., Datta S. K. and Mahato S. B.,(1995) Rapid micropropagation for *Mucuna pruriens f. pruriens* L. Plant Cell Reports,**15** (3/4) :271-273.

Christopher T. and Rajam M. V., (1996) Effect of genotype, explant, and medium on in vitro regeneration of red pepper. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **46** (3):245-250.

Deklerk G. J., Schmitt B. A., Lieberei R. and Neumann K. H., (1997) Regeneration of roots, shoots and embryos: Phsiological, biochemical and moecular aspects. *Biologia Plantarum* (Prague). **39** (1): 53-66.

Economou A. S. and Maloupa E. M., (1995) Regeneration of *Elaeagnus angustifolia* from leaf segments of in vitro-derived shoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **40**: 285-288.

Edson J. L., Brusven A. D. L., Everett R. L. and Wenny D. L., (1996) Minimizing growth regulators in shoot culture of an endangered Plant, *Hackelia venusta* (Boraginaceae). In vitro cellular & Developmental Biology-Plant, **32** (4):276-277.

Keskitalo M., Kanerva T. and Pehu E., (1995) - Development of in vitro procedures for regeneration of petiole and leaf explants and production of protoplast-derived callus in *Tanacetum vulgare* L. (Tansy). Plant Cell Reports, **14**:261-266.

Lopez-Escamilla, A.L. Olguin-Santos, L. P., Marques J., Chavez V. M. and Bye, R., (2000) Adventitious bud formation from mature embryos of *Picea chihuahuana* Martinez . , an endangered mexican sprucre tree . Annals of Botany , **86:** 921-927.

Mao A. A., Wetten A., Fay M. and Caligari P. D. S., (1995) In vitro propagation of *Clerodeum colebrookianum* Walp., A potential natural anti-hypertension medicinal plant. Plant Cell Reports, **14**:493-496.

Moutede P., (1983)- Nouvelle flora du Liban et de la Syrie. Tome 3. Texte. Dar el Mashreq, Beirut, pp.567.

Murashige, T. and Skoog, F., (1962) A revised medium of rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, **15:** 473-794.

Ody P., (1993) The complete medicinal herbal. First American edition, Dorling Kindersely, New york, 192p.

Oka S., and Ohyama K., (1981) In vitro initiation of adventitious buds and its modification by high concentration of benzyladenine in leaf tissues of mulberry (*Morus alba*). Can. J. Bot., **59:** 68-74 .

Oury P. (1984), Encyclopedie des Plantes et Fleures Medicinales. Tome 3, Edition Alliance, Paris, p.155.

Shibli R. A. and Smith M. A. L., (1996) - Direct shoot regeneration from *Vaccinium pahalae* (Ohelo) and *V. myrtillus* (Bilberry) leaf explants. HortScience, **31** (7):1225-1228.

Skoog F. and miller C. O., (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol., **11**:118-131.

Sujatha M., (1997) - In vitro adventitious shoot regeneration for effective maintenance of male sterile niger (*Guizotia abyssinnica* L. f. Cass). Euphytica, **93** (1):89-95.

Thangavel P. and Subburam V., (1996) Regeneration potential of leaves of the medicinal plant, *Portulaca oleraceae* Linn. Advances in Plant Sciences, **9** (2):105-109.

Vasil I. K., (1994) Automation of plant propagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **39:** 105-108.

Received 25/04/2000, in revised form 20/09/2001