

تأثير الماء الممغنط في الأجهاد المائي من خلال أستحداث كالس نبات الحلبة

Trigonella foenum graesum L.

إيلاف عبد الأمير الربيعي

بشير عبد الحمزة العلواني

كلية العلوم - جامعة بابل

elafalrubaie89@yahoo.com

basilwami@yahoo.com

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى استحداث كالس نبات الحلبة خارج الجسم الحي على وسط MS باستعمال توليفة لمنظمي النمو 2,4-D بالتراكيز (0.5,1,1.5) mg/L و BA بالتراكيز (0.5,1,1.5)mg/L للوصول الى افضل توليفة واستعمالها في التجارب اللاحقة , وكانت نتائج في التوليفة المستعملة والتي اعطت اعلى وزن طري هي BA 1 mg/L + 2,4-D 1 mg/L . وتضمنت الدراسة تأثير الأجهاد المائي PEG وبالتراكيز (0,3,6,9%) وكذلك تأثير الماء الممغنط مع الأجهاد المائي (%3+1000G., %6+1000G., %9+1000G.) وكانت أفضل النتائج من خلال الوزن طري هي 3% و %3+1000G. وأوضحت النتائج أن الأجهاد المائي أدى الى نتائج مختلفة في الاوزان الطرية والجافة في الطور التراكمي مسببا نقصاً في الاوزان الطرية والجافة لكافة التراكيز ماعدا تركيز 3% الذي اعطى زيادة معنوية في الوزن الطري والوزن الجاف وبفرق معنوي عن معاملة السيطرة و بقية التراكيز . أدى الأجهاد المائي مع الماء الممغنط في الوسط الغذائي ادى الى حدوث نقص في الاوزان الطرية ماعدا تركيز (%3+1000 G.) الذي اعطى زيادة في الوزن الطري و حافظ الماء الممغنط على الأوزان الجافة .

الكلمات المفتاحية: كالس , نبات الحلبة , الأجهاد المائي , الأجهاد المائي مع الماء الممغنط , زراعة الأنسجة النباتية.

Abstract

This study aimed to induce callus form *Trigonella foenum graecum* L. *in vitro* on MS medium after supplying it with different combinations of auxin 2,4-D cytokinin BA. The results showed that BA 1mg/L +2,4-D 1mg/L was the best combination which gave the highest callus compared to other treatments. The effect of adding water stress (PEG) to medium in different concentrations (0,3, 6, 9%) and adding water stress with magnetic water (%3+1000G., %6+1000G., %9+1000G.) were the best results, which gave the highest weight is (%3 and %3+1000G.). Effect of PEG in the media led to a decrease in fresh and dry weight of callus for all samples except at %3 which was showed significant increase in the weight. The addition of PEG and magnetic water on the media cause reduction in fresh weights except the concentration of %3+1000 G. which gave increasing in fresh weight. the magnetic water was kept the dry weight .

Key words: callus , *trigonella foenum graecum* L., water stress , water stress with magnetic water, plant tissue culture.

المقدمة

للنباتات الطبية دور مهم في حياة الإنسان كونها مصدر مهم للعديد من الأدوية والمواد الصيدلانية , وتكمن أهميتها الطبية في قدرتها على انتاج العديد من المركبات الكيميائية ذات الخصائص الصيدلانية العلاجية (Taylor *et al.*, 1988). ولهذه النباتات قابلية على تجميع هذه المركبات الكيميائية والتي تسمى بمركبات الأيض الثانوي (Wink, 2003) . لقد وفرت الزراعة النسيجية أمكانية الحصول على المركبات المهمة اقتصادياً والمركبات الطبية التي من الصعوبة تحضيرها في المختبر فضلاً عن كلفتها العالية عند تصنيعها (Purohit, 1999). وهناك فوائد عديدة لأننتاج المركبات بتقنية الزراعة النسيجية مقارنة بأستخلاصها من النبات الكامل, حيث يمكن الحصول على المركبات بنقاوة عالية من المزارع النسيجية تفوق تلك المواد المستخلصة من النبات الكامل وأنتاجها سريع ولايعتمد على موسم للزراعة ولايحتاج الى مساحات شاسعة من الاراضي فضلاً عن

أنتاج سلالات مهمة عالية الإنتاج ومقاومة للأمراض والظروف الصعبة (Discosmo and Misawa, 1995).

نبات الحلبة (*Trigonella foenum-graecum* L.) من العائلة البقولية Fabaceae المعروفة بأنتاجها للقلويدات والفينولات والصابونينات وذات فائدة علاجية وفعالية بايولوجية مهمة . وأثبتت نبات الحلبة قابليته العالية على خفض نسبة السكر والكوليسترول وله قدرة تثبيطية للخلايا السرطانية (Suboh *et al.*, 2004). وقد استخدمت بذور الحلبة لعدة قرون لاستخراج المركبات الطبية المهمة منها: مثل الصابونينات (yamogenin و diosgenin) , و الصمغ والزيت الطيارة و القلويدات (choline و trigonelline) (Aasim *et al.*, 2010).

ظهرت حديثاً التقنية المغناطيسية بوصفها وسيلة فعالة في تكييف خواص المياه لأغراض الأنتاج النباتي والصناعي والبشري بما يؤدي الى تحسين هذه الخواص (فهد وجماعته, 2005). تعمل التقنية المغناطيسية على أحداث تركيز مكثف للمجال المغناطيسي من خلال جدران الأنبوب لتصل للماء وتسهم في معالجته, إذ يعمل الحقل المغناطيسي على إحداث تغيير في خواص الماء سواء كانت الفيزيائية منها أم كيميائية بسبب تأثيره في الروابط الهيدروجينية للماء, إذ يعمل المجال المغناطيسي في تكسيرها وجعل الماء أكثر سيولة (الجوزي, 2006).

كما يلعب المجال المغناطيسي دوراً في الوظائف الحيوية للكائنات الحية كافة ويبدو هذا الدور واضحاً من خلال تأثير الماء المعالج مغناطيسياً على الأنسجة النباتية , إذ يسبب زيادة في نمو النبات وزيادة الأنتاجية (Ahmet,2003).

وبالنظر لأهمية الحلبة الطبية وأحتوائه على مركبات ثانوية مهمة تدخل في الصناعات الصيدلانية ولكن أنتاجها قليل مقارنة بالطلب والحاجة المتزايدة لهذه المركبات , لذلك يتوجب توظيف تقنية زراعة الأنسجة النباتية, وأستخدام الهرمونات, وأضافة المحفزات الى الوسط الزراعي التي تزيد من إنتاج المركبات الثانوية الفعالة وأكثر نبات الحلبة نسيجياً ,حتى تتمكن من أستثمار مزارعه النسيجية طوال السنة في أنتاج المركبات الصيدلانية المهمة. تهدف الدراسة الحالية الى معرفة تأثير تراكيز مختلفة من 2,4-D و BA وتأثير الأجهاد المائي (PEG) والأجهاد المائي (PEG) مع الماء الممغنط في الأوزان الطرية والجافة.

المواد وطرائق العمل

جمع بذور النبات وتعقيمه:

جمعت بذور الحلبة *Trigonella foenum graecum* L. من السوق المحلية في محافظة بابل وشخصت في معشب كلية العلوم / جامعة بابل . وضعت كمية مناسبة من البذور في قارورة وغسلت بالماء المقطر ثلاث مرات للتخلص من الغبار والشوائب العالقة, ثم نقلت الى كابينة انسياب الهواء الطبقي laminer air flow – cabinet اذ جرى تعقيمه عن طريق غمرها بـ 15% هيبوكلورات الصوديوم مع التحريك لمدة 7 دقائق. ثم غسلت بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقة واحدة لثلاث مرات وعقمت بعدها بـ 70% الكحول الإيثيلي ورجت لمدة 30 ثانية ثم غسلت بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقة واحدة على ثلاث مرات لإزالة الكحول الإيثيلي, ثم وضعت البذور في طبق بتري حاوي على ورقة ترشيح معقمة من أجل ازالة المياه العالقة (Awika and Rooney,2004).

زراعة البذور

بعد تحضير وسط MS وتعقيم البذور أخذت ثلاث بذرات و زرعت في أنابيب الزراعة الحاوية على 10 ml من وسط MS المجهز بتركيز مختلفة من منظمات نمو النبات 2,4-D بالتراكيز (0.5,1,1.5) mg/L و BA بالتراكيز (0.5,1,1.5) mg/L وتم وضع ثلاثة بذور في كل أنبوبة زجاجية وبمعدل 15 مكرر لكل توليفة من 2,4-D و BA لغرض استحثاث الكالس, ثم حضنت تحت ظروف إضاءة (16 ساعة يومياً) و درجة حرارة $24 \pm 2^\circ \text{C}$.

طور استحثاث الكالس

استخدمت تقنية زراعة الأنسجة النباتية وفقاً لـ Hirata وجماعته (1990) لغرض استحثاث الكالس من بذور الحلبة, ثم نقل الكالس الى وسط جديد لغرض تحفيز إنتاج الأيض الثانوي ودراسة بعض المؤشرات الحيوية للنبات

تقدير الوزن الطري

بعد 15 يوم من زراعة البذور على وسط MS ، بدأ الاستحثاث في ظهور الكالس وبعد 45 يوم تم أكتمال نمو الكالس إذ تم حساب الوزن الطري للكالس المستحث من البذور لجميع التراكيز 2,4-D و BA المستخدمة في التجربة , إذ أستخرج الكالس من أنابيب الزجاج وتم قياس الوزن الطري باستخدام الميزان الكهربائي الحساس بعد إزالة بقايا الوسط العالقة على الكالس عن طريق الغسل بالماء المقطر .

تقدير الوزن الجاف

وضع الكالس الطري في أطباق بتري كل طبق يحتوي على 6 قطع من أنسجة الكالس لكل توليفة من 2,4-D و BA ، وتم تحديد الأوزان الجافة للكالس بعد تجفيفها في الفرن بدرجة حرارة 40°C لمدة 24 ساعة.

طور تراكم الكالس

الأجهاد المائي

تحضير وسط الأجهاد المائي PEG

أستخدمت أفضل توليفة لمنظمات النمو $1 \text{ ml/L}(2,4\text{-D}) + 1 \text{ ml/L}(\text{BA})$ وأضيف للوسط PEG (Polyethylene glycol 4000) بتركيز مختلفة (0,3, 6,9%) ثم وضع الوسط على الصفيحة الساخنة لمدة 5 دقائق لضمان الذوبان الكامل للمكونات , وتم تعديل pH الوسط إلى 5.8 باستخدام هيدروكسيد الصوديوم أو حامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.1 N قبل إضافة الاكار .

زراعة الكالس على وسط الأجهاد المائي PEG

أخذ 250 mg من الكالس الطازج واعيدت زراعته على اوساط حاوية على PEG بالتراكيز المختلفة (0,3,6,9%), وتم زراعة 15 مكرر لكل من تراكيز PEG, وتمت عملية الزراعة تحت ظروف معقمة وقياس الوزن الطري والجاف بعد 6 اسابيع من الزراعة .

الأجهاد المائي PEG مع الماء الممغنط

تحضير الماء المعالج مغناطيسياً

تم تحضير الماء المعالج مغناطيسياً عن طريق تمرير الماء المقطر بجهاز منغنون تم تصنيعه محلياً في جامعة النهرين في بغداد بشدة فيض مغناطيسي مقداره (1000) كاوس والذي تم اختيارها اعتماداً على دراسة (جبار , 2014).

تحضير وسط الأجهاد المائي PEG الذائب بالماء المعالج مغناطيسياً

أستخدمت أفضل توليفة وهي (1 ml/L(2,4-D) + 1 ml/L(BA) وتم إذابة الوسط بالماء الممغنط (1000) كاوس وأضيف للوسط PEG بتركيز مختلفة (3%, 6%, 9%) ثم وضع الوسط على الصفيحة الساخنة لمدة 5 دقائق لضمان الذوبان الكامل للمكونات , وتم تعديل pH الوسط إلى 5.8 باستخدام هيدروكسيد الصوديوم أو حامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.1 N قبل إضافة الاكار .

زراعة الكالس على وسط الأجهاد المائي PEG مع الماء الممغنط

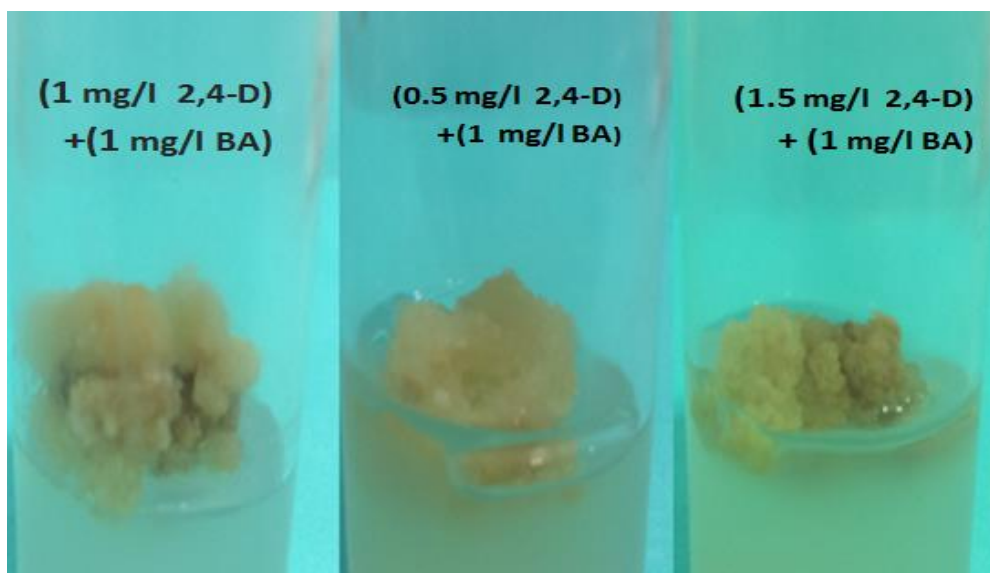
أخذ 250 mg من الكالس الطازج واعيدت زراعته على اوساط حاوية على PEG بالتركيز المختلفة (0%, 3%, 6%, 9%) مع الماء الممغنط (1000G.) وتم زراعة 15 مكرر لكل من تراكيز PEG (1000G.) وتمت عملية الزراعة تحت ظروف معقمة وقياس الوزن الطري والجاف بعد 6 اسابيع من الزراعة.

النتائج والمناقشة

تأثير التداخل بين تراكيز BA و 2,4-D في الوزن الطري والجاف لإستحثات وإدامة كالس الحلبة يتبين من الجدول 1 والشكل 1 إن لتراكيز BA و 2,4-D تأثير معنوي في إستحثات الكالس من بذور الحلبة, فعند إجراء التداخل بين منظمي النمو وبالتركيز (1 mg/L (BA) + 1 ml/L (2,4-D) تحقق أعلى وزن طري للكالس بلغ 2.39 g . وتليه التوليفة (1 mg/L(BA) + 1 ml/L(2,4-D) إذ بلغ وزن الكالس 1.92 g في حين أنخفض الوزن الطري للكالس عند التوليفة (0.5 2,4-D + 1.5 BA) mg/l وبلغ 0.73 g حيث أختلف معنوياً عن جميع المعاملات 2,4-D و BA . وكان الكالس هش وذو لون كريمي كما في الشكل 1. جدول(1) تأثير التداخل بين تراكيز 2,4-D و BA في الوزن الطري لكالس نبات الحلبة (g).

التراكيز mg/l		الوزن الطري (g)
2,4-D	BA	
0.5	0.5	1.26
	1	1.76
	1.5	0.73
1	0.5	1.64
	1	2.39
	1.5	1.07
1.5	0.5	1.47
	1	1.92
	1.5	0.87
L.S.D. (0.05)		0.252

وقد أظهرت نتائج الجدول 2 أن أعلى وزن جاف للكالس بلغ 0.226 g عند التوليفة 1ml/L(BA) + 1.5 mg/L (2,4-D) وهي تختلف معنوياً عن بقية المعاملات ، وتليه التوليفة (BA) 1.5 mg/L + 1 (2,4-D) إذ بلغ الوزن الجاف 0.185 g وكان أقل وزن جاف للكالس بين التوليفات عند التركيز (BA) + 1.5ml/L (2,4-D) + 0.5 mg/l إذ بلغ 0.08 g وأختلف معنوياً عن جميع المعاملات .



شكل (1) تأثير التداخل بين تراكيز 2,4-D و BA في الأوزان الطرية للكالس نبات الحلبة على وسط الزراعة MS.

جدول 2 تأثير التداخل بين تراكيز 2,4-D و BA في الأوزان الجافة للكالس نبات الحلبة .

التراكيز mg/l		الوزن الجاف (g)
2,4-D	BA	
0.5	0.5	0.119
	1	0.172
	1.5	0.070
1	0.5	0.159
	1	0.226
	1.5	0.090
1.5	0.5	0.138
	1	0.185
	1.5	0.080
L.S.D. (0.05)		0.033

أن تساوي النسب بين هرمونات النمو الأوكسين والساييتوكاينين المضافة للوسط الزراعي MS كان له دور مهم في الحصول على أفضل وزن طري وجاف لكالس الحلبة. إذ يحصل النمو الجيد للكالس في وسط الزراعة بفعل التوازن الفسيولوجي ما بين الأوكسين والساييتوكاينين وإن الزيادة في تركيز الأوكسين أو الساييتوكاينين واحد على حساب الآخر يؤثر في أستحداث الكالس ويقلل من نموه (Mineo,1990). كما أشار Centeno وجماعته (1996) الى ضرورة التوازن الهرموني بين الأوكسينات و الساييتوكاينينات في أستحداث ونمو الكالس, والذي يفسر زيادة معدل الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من بذور الحلبة. وذكر Carew و Krueger (1977) الى أن توليفات 2,4-D و BA ضرورية لأستحداث ونمو الكالس في نبات عين البزون. وأن إضافة كلا منظمي النمو الى وسط الزراعة MS مهم وضروري لأستحداث الكالس إذ يعمل الساييتوكاينين بوجود الأوكسين كمفتاح لبدء الأنقسام الخلوي . إن أختلاف أستجابة الأجزاء النباتية المزروعة بسبب النسب المضافة من الأوكسين الى الساييتوكاينين قد يعود الى أختلاف محتوى هذه الأجزاء الداخلية من الهرمونات الحاوية عليها وهذا يؤثر بدوره في الوصول الى التركيز الأمثل لأستحداث الكالس من الأوكسين والساييتوكاينين أو كليهما عند إضافتهما الى الوسط الغذائي (Goodwin,1985). وبين Schmulling (1997) أن التعبير الجيني يمكن أن يحدث تغيير ملحوظ في أستجابة الساييتوكاينينات , إذ يتم تنظيم جينات الساييتوكاينينات في كثير من الأحيان بأضافة المحفزات (الهرمونات) مثل الأوكسينات وأن أنتاج هذه الجينات التي تم تنظيمها يلعب دوراً مهماً في تنوع العمليات البايولوجية مثل أنقسام الخلايا ونمو البلاستيدات الخضراء. وقد يكون السبب في زيادة معدل الوزن الطري يرجع لوجود BA في وسط النمو نظراً لدور الساييتوكاينينات في أنقسام الخلايا وفي تصنيع البروتينات المهمة وزيادة أمتصاص الماء ونمو الكالس (Mohamed,1990). ذكر Shahab–ud–din وجماعته (2011) أن الوسط المجهز بالتركيز 1 mg/l BA و 1 mg/l NAA أعطى أعلى معدل وزن طري للكالس المستحث لنبات *Solanum tuberosum* .

أما الأوكسين فله دور مباشر في توسع الخلية من خلال زيادة بعض الفعاليات الأنزيمية والتي تكون مسؤولة عن مرونة جدار الخلية وزيادة النفاذية (Mohamed,1990). وهذه النتائج تتفق مع ما أشار له Rezaeian (2011) في أن أعلى نمو لكالس الحلبة تم تحديده عند إضافة تركيز 1 mg/l 2,4-D خلال 45 يوم. وكذلك أشار Jaime (2014) الى إمكانية تحفيز و زيادة كالس نبات *Dianthus caryophyllus* L. عند أستعمال التوليفات 1mg/l BA و 1mg/l 2,4-D مع 0.5 mg/l NAA على الوسط الغذائي MS.

تأثير الأجهاد المائي (PEG) في الوزن الطري والجاف لكالس نبات الحلبة

تشير النتائج في الجدول 3 والشكل 2 الى أن إضافة PEG للوسط الغذائي MS وبالتركيز (0,3,6,9%) أدى الى أنخفاض معنوي في الوزن الطري لكالس الحلبة ($P \leq 0.05$) , فقد أعطت المعاملة (3%) PEG أعلى معدل معنوي للأوزان الطرية للكالس إذ بلغت 1.64 g ولكنها أعطت وزناً أقل مقارنة مع معاملة السيطرة الكالس النامي على وسط MS خالي من PEG حيث بلغت 2.39 g وتختلف معنوياً عن باقي المعاملات ($P \leq 0.05$), وتليها المعاملة (6%) PEG إذ بلغت قيمتها (1.32) g , وبلغت أدنى قيمة للوزن الطري للكالس (0.95) g عند تجهيز الوسط بتركيز (9%) PEG وتختلف معنوياً ($P \leq 0.05$) كلا المعاملتين مقارنة مع معاملة السيطرة. وهذه النتائج تتفق مع (El-Shafey et al., 2009) , Hussein and safi– (naz, 2013). وأظهرت النتائج المبينة في الجدول 3 أن قيم الوزن الجاف تتناسب مع قيم الوزن الطري للكالس النامي على الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز مختلفة من PEG , ويلاحظ كذلك أختلاف معنوي في تراكيز الPEG في الوزن الجاف فيما بينها, وكانت أعلى قيمة للكالس عند التركيز (3% PEG) إذ بلغ وزنه 0.166

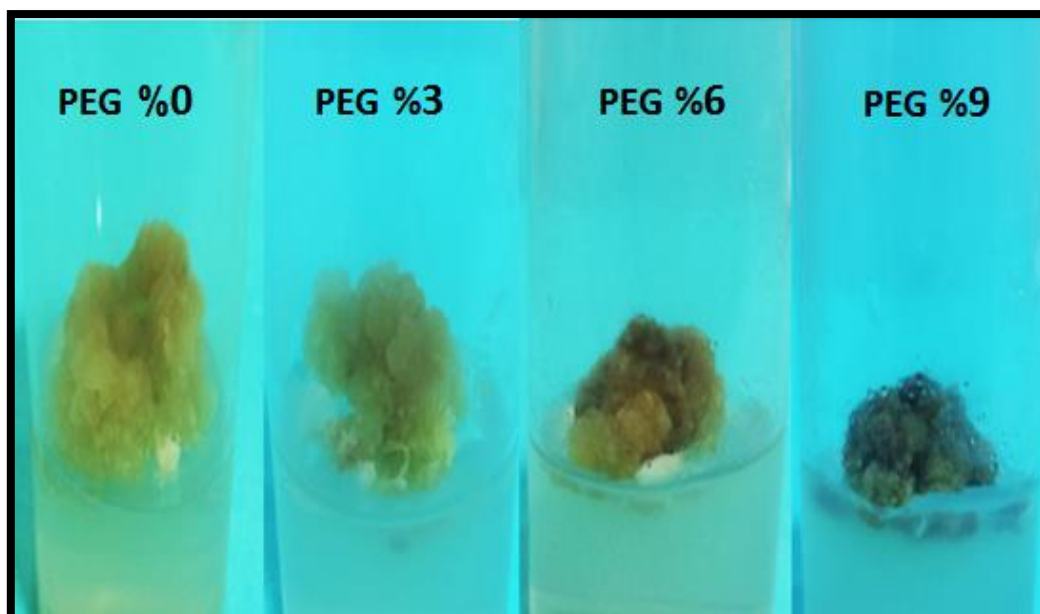
g وهي تختلف معنوياً عن معاملة السيطرة والتي بلغ وزنها 0.226 g , ثم تلاها تركيز (6%PEG) إذ بلغ وزنه 0.133 g , بينما أعطت المعاملة (9%PEG) أقل وزن جاف إذ بلغ وزنه 0.1 g . وكل المعاملات قلت معنوياً مقارنة مع معاملة السيطرة والشكل 2 يوضح الأختلافات المظهرية للكالس الجاف لنبات الحلبة. وهذه النتائج تتفق مع (Ulan *et al.*, 2013 , Sakthivelu *et al.*,2008) .

جدول (3) تأثير الأجهاد المائي (PEG) في الوزن الطري والجاف لكالس نبات الحلبة.

%PEG	(g) الوزن الطري	الوزن الجاف (g)
0%	2.39	0.226
3%	1.64	0.166
6%	1.32	0.133
9%	0.95	0.1
L.S.D. (0.05)	0.295	0.038

تشير نتائج الدراسة الحالية الى انخفاض الوزن الطري والجاف للكالس بسبب التأثير السلبي للتركيز العالية لأجهاد الجفاف PEG المضاف الى وسط الزراعة والذي يسبب نقص الماء في الوسط الغذائي وبالتالي يسبب اختزال أنقسام الخلايا مما يؤدي الى انخفاض نمو خلايا الكالس (Sakthivelu *et al.*,2008 ;Ehsanpour and Razavizadeh, 2005) .

أن أجهاد الجفاف يسبب تكوين الجذور الحرة في الخلية والتي يسبب تلفاً في غشاء الخلية وتغيرات فسيولوجية ومن ثم انخفاض نمو الكالس (Tahir *et al.*, 2003) . أن تفسير انخفاض الوزن الطري والجاف للكالس بزيادة تركيز الPEG يرجع الى انخفاض أنقسام الخلايا ومن ثم تخلخل في توازن الخلية بسبب فقدان حجمها (أنكماشها) وعدم توازن المغذيات بسبب قلة أخذ الماء وقلة المحتوى الكلي للماء في الخلية وزيادة الأيونات المنحلة مع زيادة الأجهاد (Lokhande *et al.*, 2010). كما أن إضافة الPEG كأجهاد جفاف ولجميع تراكيزه قيد الدراسة يقلل من الوزن الطري والجاف إذ يعود ذلك الى قلة الماء الممتص من الوسط الغذائي وتغيير جهد الماء الذي يكون مهم في نقل المواد الغذائية ويقلل أيضاً من فعالية الأنزيمات المهمة للنبات التي تثبط بأجهاد الجفاف (Lotfi *et al.*,2010) . يتغير لون الكالس بعد 6-8 أسابيع من التعرض لأجهاد الجفاف إذ يتغير لون الكالس الى البني ومن ثم الى الأسود (El-Aref,2002). ويرجع اللون البني للكالس الى تتابع فقدان الماء والنتاج من التعرض الى أجهاد مائي أو الى المحتوى العالي من الفينولات التي لها دور في لون النسيج البني (Hassanein,1999). لقد أشار Hussein و Safi-naz (2013) الى انخفاض الوزن الطري والجاف لنبات الحلبة عند تعرض أنواع مختلفة لنبات الحلبة لأجهاد الجفاف.



شكل (2) كالس نبات الحلبة في وسط الزراعة MS المجهز بالـ PEG.

تأثير الماء الممغنط في الأجهاد المائي (PEG) من خلال الوزنين الطري (g) والجاف (g) لكالس نبات
الحلبة

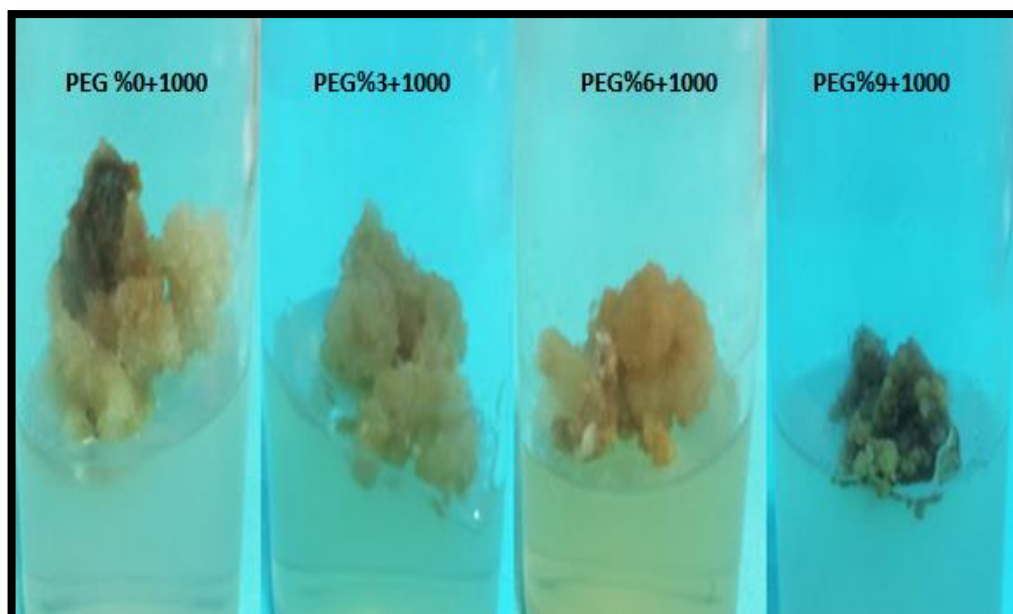
بينت النتائج في الجدول 4 والشكل 3 أن إضافة الماء الممغنط أثر في الأجهاد المائي إذ سبب انخفاضاً معنوياً في الوزن الطري والجاف لكالس الحلبة ، إذ بلغ أعلى معدل للوزن الطري 1.93 g عند التركيز (G.+1000%3) وهو يختلف معنوياً مقارنة مع معاملة السيطرة لكالس النامي على وسط لم يعامل بالPEG ومضاف له ماء ممغنط بشدة (1000 G.) فقط والذي بلغ وزنه 2.53 g حيث تختلف معنوياً عن باقي المعاملات ، وتليها المعاملة (G.+1000%6) إذ بلغت 1.51 g ، وبلغ أقل معدل وزن طري لكالس 1.07 g عند المعاملة (G.+1000%9) إذ تختلف كلتا المعاملتين أختلافاً معنوياً مقارنة مع معامل السيطرة. أما الأوزان الجافة فيلاحظ من الجدول 4 أن الماء الممغنط أثر في المحافظة على الوزن الجاف ولم يختلف معنوياً عن معاملة السيطرة، إذ بلغت المعاملة (G.+1000%3) أعلى معدل للأوزان الجافة 0.186 g ولم تختلف معنوياً عن معاملة السيطرة (G.+1000%0) التي بلغت 0.238 g ، وتليها المعاملة (G.+1000%6) بلغت قيمتها 0.156 g ، أما المعاملة (G.+1000%9) فكانت تمثل أقل قيمة للوزن الجاف من بين الأوزان الجافة إذ بلغ وزنها 0.11 g ولم تختلف كلتا المعاملتين أختلافاً معنوياً مقارنة مع معاملة السيطرة. والشكل 3 يوضح الأختلافات المظهرية لكالس الحلبة المنمى في الماء الممغنط مع تراكيز مختلفة من الـ PEG . وهذه النتائج تتفق مع (Wani et al.,2010 ;Verma et al., 2013).

جدول (4) تأثير الماء الممغنط في الأجهاد المائي (PEG) من خلال الوزن الطري (g) والجاف (g) لكالس نبات الحلبة.

ماء ممغنط	% PEG	الوزن الطري (g)	الوزن الجاف (g)
1000 G.	0%	2.53	0.238
	3%	1.93	0.186
	6%	1.51	0.156
	9%	1.07	0.11
L.S.D. (0.05)		0.248	0.143

بينت النتائج أن إضافة العوامل للأحيائية الى وسط الزراعة النسيجية يقلل من الوزن الطري والجاف للكالس بسبب تأثير التراكيز العالية لمعاملات الأجهاد المضافة للوسط MS على نمو الكالس وتؤدي الى نقصان في نمو خلايا الكالس المعرضة لهذه الأجهادات (Radman *et al.*, 2003). لقد بين Karmakar وجماعته (2014) أن تعرض نبات الحلبة لأجهاد الجفاف بأضافة PEG للوسط الغذائي MS وبتركيز مختلفة مع إضافة أجهادات أخرى أدى الى انخفاض في الأوزان وفي نمو الجذور والأنبات ونقصان أنقسام الخلايا, يرافقها زيادة في الأنزيمات المضادة للأكسدة. إذ أن تعرض الكالس لعوامل الأجهاد ينتج كميات كبيرة من الجذور الحرة والتي يكون لها تأثير سلبي وضار على كالس النبات إذ تؤدي الى نقصان الوزن الطري والجاف لخلايا الكالس (Cheeseman, 2006).

تكون أستجابة النبات لأجهاد الجفاف عكسية ويرجع ذلك الى تأثير الأجهاد على التمثيل الضوئي والكاربوهيدرات (Alhadi *et al.*, 1999). ويؤثر الاجهاد المائي في عملية غلق الثغور وعلى تبادل CO₂ (Ben Ahmed *et al.*, 2009). ويؤثر الأجهاد المائي في الحالة الأوزمزية للأنسجة النباتية, وأن تعديل النبات للحالة الأوزمزية يعد تكيف فسيولوجي مهم لمقاومة النبات لأجهاد الجفاف (Chaves *et al.*, 2003), ويؤثر أيضاً في بناء البروتين (Alhadi *et al.*, 1999). يؤدي أجهاد الجفاف عادة الى الأكسدة بسبب غلق الثغور والذي يتسبب في انخفاض التمثيل الضوئي بشكل كبير (Ben Ahmed *et al.*, 2009). وبين EI-Shafey وجماعته (2009) أن من أسباب انخفاض الوزن الجاف للكالس المتعرض لأجهاد الجفاف بواسطة الPEG هو أستهلاك العناصر N و C في التنظيم الأوزموزي وفي الأصلاح ودفاع النبات. كما أشار Selim و EI-Nady (2011) الى أن أستخدام المعالجة بالماء الممغنط لنبات الطماطة كانت الأفضل في التغلب على أجهاد الجفاف وتحسين الأنبات ونمو النبات بشكل أفضل.



الشكل (3) يبين كالس نبات الحلبة في وسط الزراعة MS المجهز بالـ PEG مع الماء الممغنط.

المصادر

- الجوذري ، حياوي عطية. (2006). اثر التكيف المغناطيسي لمياه الري والسماذ البوتاسي في بعض الصفات الكيماوية للتربة ونمو حاصل الذرة الصفراء .رسالة ماجستير.جامعة بغداد ، كلية الزراعة ، قسم علوم التربة والموارد المائية . ع ص147 .
- جبار ، عامر راضي عبد الحسين .(2014). تأثير الماء المعالج مغناطيسياً في بعض الصفات المظهرية والكيماوية في عقل نبات الماش (*Phaseolus aureus Roxb.*) . رسالة ماجستير جامعة بابل.
- Aasim, M.; Hussain, N.; Muhammed, U. E.; Zubair, M.; Bilal, S. H.; Saeed, S.; Rafique, T. S. and Sancak, C. (2010). In vitro Shoot using different cytokinins. *Afric. J. Biotech.*, 9(42):7174-7179.
- Ahmet, E.,(2003). Effects of magnetic fields on yield and growth in strawberry, Camarosa. *J. Hort. Sci. Biotec.*, 78, 145–147.
- Alhadi, F.A., B.T. Yasseen and M. Jabr, (1999). Water stress and gibberellic acid effects on growth of fenugreek plants. *Irrigation Science*, 18 (4): 185-190.
- Awika, J. M.; and Rooney, L. W. (2004). Sorghum Phytochemical and their potential aspects on human health. *Photochemistry.*, 65(9):1199-1221
- Ben Ahmed, C., N. Ben Rouina, F. Sensory, M. Boukhris and F. Ben Abdalah, (2009). Changes in Gas exchanges, proline accumulation and antioxidative enzyme activity in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environ Exper. Bot.*, 67: 347-352.
- Bourgau, F.; Gravot, A.; Milesi, S. and Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5):839-851.
- Carew, D. P. and Krueger, R. J. (1977). *Catharanthus roseus* tissue culture: the effects of medium modifications on growth and alkaloid production. *J. Nat. prod.* 40(4): 326-336.
- Centeno, M. L.; Rodviques, A.; Feito, I. and Fernade, s. (1996). Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinideliciosa* tissue culture. *Plant-cell-Rep.* 16:58-62.

- Chaves, M.M., J.P. Maroco and J.S. Pereria, (2003). Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. *Func. Plant Biol.*, 30: 239-264.
- Cheeseman, J.M. (2006). Hydrogen peroxide concentration in leaves under natural condition. *J. Experiment botany*, 57(10): 2435-2444.
- Discosmo, F. and Misawa, M. (1995). Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*, 13(3):425-453.
- Ehsanpour, A.A., and Razavizadeh, A. (2005). Effect of UV-C on drought tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) callus. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 1(2): 107-110.
- El-Aref, H.M., (2002). Employment of maize immature embryo culture for improving drought tolerance. Proceeding of the 3rd Scientific Conference of Agriculture Science, Faculty of Agriculture, Assiut University, October 20-22, Assiut, Egypt, pp: 463-477.
- El-Shafey, N. M.; Hassaneen, R. A.; Gabr, M. M. A. and El-Sheihy, O. (2009). Pre-exposure to gamma rays alleviates the harmful effect of drought on the embryo-derived rice calli. *Australian Journal of Crop Science*. 3(5):268-277.
- Goodwin, M. (1985). Introduction to Plant Biochemistry. (2nd Ed). Pergamon Press. New York, P: 1-3.
- Hassanein, A. M., (1999). Alteration in protein and esterase patterns of peanut in response to salinity stress. *Biol. Plant*, 42 : 241-248.
- Hirata, K.; Yamanaka, A.; Karano, N.; Miyamoto, K. and Miura, Y. (1990). Production of indol alkaloids in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus*. *Agric. Biol. Chem.* 51:1311-1317.
- Hussein, M.M. and Safi-naz S. Zaki. (2013). Influence of water stress on photosynthetic pigments of some Fenugreek varieties. 9(8): 5238- 5245.
- Jaime, A. (2014). Callus Induction From 15 Carnation (*Dianthus Caryophyllus* L.) Cultivars. (21) 15-21.
- Karmakar, N., Chakravarty A., Bandopadhyay, P.K. and Kanti Das, P.(2014). Response of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seedlings under moisture and heavy metal stress with special reference to antioxidant system. 13(3):434-440.
- Lokhande, V. H.; Nikam, T. D. and Penna, S. (2010). Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 102:17-25.
- Lotfi, N., K. Vahdati, B. Kholdebarin, and A. Reza,. (2010). Soluble Sugars and proline accumulation play a role as effective indices for drought tolerance screening in persian walnut (*Juglans regia* L.) during germination. *Issue Fruits*, 65 : 97-112.
- Mineo, L. (1990). *Plant Tissue Culture Techniques*, C.A. Gold Man Editor, PP:151-174.
- Mohamed, A. K. (1990). *Plant Physiology*, second part, Higher Education Press, Baghdad University, Iraq.
- Purohit, S.S. (1999). *Agriculture Biotechnology*. Agro Botanical. J. N. V. Yas Nagrr, Bikaner, India, P: 833.
- Radwan, S. S.; Kokate, C. K. (1980). Production of higher levels of trigonelline by cell cultures of *Trigonella foenum-graecum* than by the differentiated plant. 147, Issue 4, pp 340-344.
- Rezaeian, S. (2011). Assessment of Diosgenin Production by *Trigonella foenum-graecum* L. *in vitro* Condition. 6, Issue: 5, 261-268.

- Sakthivelu, G., Devi, M.K.A., Giridhar, P., Rajasekaran, T., Ravishankar, G.A., Nedev, T., and Kosturkova, G. (2008). Drought-induced alterations in growth, osmotic potential and *in vitro* regeneration of soybean cultivars. *General and Applied Plant Physiology Special Issue* 34 (1-2): 103- 112.
- Schmülling, T.; Schäfer, S. and Romanov, G. (1997). Cytokinins as Regulators of Gene Expression. *Physiol Plant.*, 100:505-519.
- Selim, H. and M. El-Nady, (2011). Physio-anatomical responses of drought stressed tomato plants to magnetic field. *Acta Astronautica*, pp: 1-9 69, Issues 7-8, :387-396.
- Shahab-ud-din, I.N.; Sultan, M.A.; Kakar, A.; Yousafzai, F.A.; Sattar, F.; Ahmmad, S.M.; Ibrahim, M.; Hassanullah and Arif, B. (2011). The Effect of Different Concentrations and Combination of Growth Regulators on the Callus Formation of Potato (*Solanum Tuberosum*) Explants. 3(5)499-503.
- Suboh, S. M.; Bילו, Y.Y. and Aburjiai, T. A. (2004). Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytotherapy, Res.*, 18(4):280-284.
- Tahir, F. M.; Ibrahim, M. and Hamid, K. (2003). Effect of drought stress on vegetative and reproductive growth behavior of mango (*Mangifera India L.*). *Asian J Plant Sci* 2(4):116-118.
- Taylor, V.E.; Brady, L.R.; and Robbers, J.E. (1988). *Pharmacognosy. Economic Bot.*, 50(1): 3_9.
- Ulan, M.Y.S.W.; Depari, E.T.V.B. and Fingky, P.T. (2013). Effect of drought stress induced by Polyethylene glycol (PEG6000) on callus of *Helianthus annuus L. CV. BERASTAGI*. *Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation*. 2(3):73-78.
- Verma, D.; Ansari, M.W.; Agrawal, G.K.; Rakwa, R.; Shukla, A. and Tuteja, N. (2013). *In vitro* selection and field responses of somaclonal variant plants of rice cv PR113 for drought tolerance. *Plant Signaling & Behavior*. 8(4):1-5.
- Wani, S.H., Sofi, P.A., Gosal, S.S., and Singh, N.B. (2010). *In vitro* screening of rice (*Oryza sativa L*) callus for drought tolerance. *Communications in Biometry and Crop Science*. 5(2): 108–115.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 64(1):3-19.