اكثار نبات قصب السكر *Saccharum officinarum* L.
من الكالس المولد للأعضاء خارج الجسم الحي

حليمة جبار عبد الرزاق* عباس مهدي جاسم** مؤيد فاضل عباس**

* قسم التطور الإلاحيائي في شمال غرب الخليج وشط العرب/مركز علوم البحار/ جامعة البصرة، بصرة-العراق

**قسم البستنة وهندسة الحدائق/ كلية الزراعة/ جامعة البصرة، بصرة العراق

Email: halema.hansen@gmail.com

الخلاصة

تم إكثار صنفين من قصب السكر (*S.officinarum* L.) خارج الجسم الحي عن طريق إنتاج الكالس من زراعة البراعم الطرفية في وسط MS مجهز بالاوكسين 2,4-dichlorophenoxyacetic acid بتركيز 3 ملغم/لتر. تم الحصول على الكالس المولد للأعضاء Organogenic callus عند نقل الكالس الأولي إلى وسط غذائي مكون من أملاح MS ومجهز بالسايتوكاينين (Benzil adnine)BA والكاينتين Kinetin بتركيز 0.5 ملغم/لتر لكل منهما وحضنت الزروعات بدرجة حرارة 25 ± 2 م° وإضاءة لمدة 16 ساعة و 8 ساعات ظلام. أخذت الأفرع العرضية Adventitious Shoots الناتجة من الكالس المولد للأعضاء وزرعت في وسط التجذير المجهز بنصف القوة من أملاح MS والاوكسين نفثالين حامض الخليك NAA بتركيز 0.5 ملغم/لتر والسايتوكاينين البنزل ادنين BA بتركيز 0.5 ملغم/لتر. حضنت الزروعات لمدة ثمانية أسابيع تحت ظروف الإضاءة السابقة بعدها تم الحصول على نباتات كاملة اجتازت مرحلة الأقلمة بنجاح.

كلمات مفتاحية: زراعة انسجة، محاصيل زراعية، منظمات نمو نباتية.

المقدمة

يعد قصب السكر *S. officinarum* L. من النباتات الاستوائية المعمرة المنتمية إلى العائلة النجيلية (Poaceae). وهو من النباتات رباعية الكربون (C4 plant), تتحدد زراعته بصورة عامة بخط عرض 30 درجة شمال وجنوب خط الاستواء وفي المناطق الساحلية الحارة والدافئة وتفشل زراعته خارج هذا النطاق (Hussain, 2004). ولكون قصب السكر من المحاصيل الصناعية المهمة على مستوى عالمي إذ إن حوالي 70% من الإنتاج العالمي للسكر يأتي من هذا المحصول لذلك صنف على

إنهُ محصول تجاري في أكثر من 60 بلد على امتداد العالم (Subbarao and Shaw,1985). تستعمل مخلفات إنتاج وتصنيع القصب كخامات لبعض الصناعات مثل صناعة الخشب الحبيبي وصناعة عجينة الورق ويستعمل المولاس كبيئة ملائمة لنمو ونشاط الكائنات الدقيقة الخاصة بالتخمر الهوائي واللاهوائي وإنتاج خميرة الخبز وحامضي ألستريك والخليك وهو مصدر مهم لإنتاج الكحول الاثيلي (المنظمة العربية للتنمية الزراعية,1997)، وأصبح حالياً من المحاصيل المهمة لإنتاج الوقود الحيوي (Bio fuel) (Dawson and Boopaphy, 2008). ولغرض الحفاظ على سلالات قصب السكر الجيدة يتم اكثارها خضريا بتقانة زراعة الأنسجة النباتية بهدف تقليل المدة الزمنية لإكثار هذا النبات والمحافظة على صفاته الوراثية الجيدة كما تؤدي هذه الطريقة من الإكثار إلى إنتاج نباتات خالية من الفيروسات بالدرجة الرئيس ويمكن الاكثار السريع للنبات عن طريق انتاج الكالس وإخلافه الى نباتات كاملة، وللاوكسينات دور مهم في انتاج الكالس وإخلافه , كما أوضح Mamum *et al.* (2004) إن الأوكسين 2,4-D وبتركيز 3 ملغم/لتر تفوق معنوياً على جميع الأوكسينات الأخرى المستخدمة لاستحثاث الكالس وهي IBA وIAA و NAA. ومن ناحية أخرى بين Gandonou *et al.* (2005) أن الكالس الأولي لقصب السكر ظهر في وسط MS المجهز بـ 3 ملغم/لتر من 2,4-D وأن إخلاف النبات من الكالس حدث في وسط MS الخالي من منظمات النمو والمجهز ببِروتين الحليبCh وأن عملية إخلاف النبات تعتمد على الصنف وقد اختبر Ali *et al.* (2010) تسعة أصناف من قصب السكر لاستحثاث الكالس عن طريق زراعة قطع من الأوراق الفتية في وسط MS مجهز بسبعة تراكيز من 2,4-D تراوحت من 1–5 ملغم/لتر إضافة إلى 1 ملغم/لتر من الكاينتين وقد وجدوا أن أعلى نسبة من إخلاف النبات لوحظت في وسط MS المجهز بـ 500 ملغم/لتر من Ch، كما بين إن أفضل تطور للجذور حصل في وسط MS بنصف القوة والمجهز بـ 4–5 ملغم/لترمن NAA و 500 ملغم/لتر من Ch.

المواد وطرق العمل

أُجريت التجربة في مركز أبحاث النخيل جامعة البصرة حيث جهز صنفين من قصب السكر *S. officinarum* L. هما CO331 و CP72-2086 وقد تم الحصول عليها من الشركة العامة لصناعة السكر في ميسان.

أ–مصدر الجزء النباتي

اخذت البراعم الطرفية Shoot tip وبطول 2-4 ملم والمفصولة من نباتات قصب السكر بعمر سبعة أشهر والنامية في الحقل التابع لمصنع قصب السكر في ميسان بوصفها مصدراً للجزء النباتي .فُصل

البرعم الطرفي من النبات ووضع في محلول مضاد للأكسدة (Antioxidant solution) الذي يتكون من حامض الستريك وحامض الاسكوربك بتركيز 150 و 100 ملغم/لتر على التوالي ولمدة 10 دقائق (Tisserat and Zaid,1983). بعدها أُجريت له عملية التعقيم في منضدة انسياب الهواء الطبقي (Laminar air flow cabinet) باستعمال القاصر التجاري 20% (حجم/حجم) ونسبة المادة الفعالة فيه 5-6% مع إضافة قطرتين من المادة الناشرة (Tween 20) ولمدة 10 دقائق أخرى ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات (عشرة دقائق لكل مرة) لإزالة آثار المادة المعقمة وبذلك أصبحت الأجزاء النباتية جاهزة للزراعة في الوسط الغذائي .

ب -تهيئة الوسط الغذائي لاستحثاث الكالس المولد للأعضاء

استعمل في هذه الدراسة وسط غذائي مكون من مجموعة أملاح MS (Murashige & Skoog, 1962) تم الحصول عليها من شركة Zist Arman Sabz (ZAS) استعملت بتركيز 4،6 غم/لتر. زرعت البراعم الطرفية المعقمة في وسط غذائي MS الحاوي على تراكيز مختلفة من الاوكسين 2 , 4 D- وهي على التوالي 0،0 و1،5 و3،0 و4،5 ملغم/لتر. إذ تم تجزئة الوسط الغذائي المُعد في بداية التجربة إلى أربعة أجزاء بعدها أُضيف الأُوكسين بالتراكيز المذكورة أعلاه ثم كررت الزروعات بواقع 10 مكررات لكل معاملة وامتدت هذه التجربة ستة أسابيع فقط. درست المؤشرات الاتية:

1- النسبة المئوية للكالس المتكون وحسب المعادلة

عدد الانابيب التي حصلت بها استجابة /عدد الانابيب الكلية × 100

2- الوزن الطري للكالس

وعلى هذا الأساس اختير المستوى الأُمثل من الاوكسين في استحثاث الكالس Callus induction.

ج -مرحلة توالد الأعضاء من الكالس

في هذه المرحلة تم زراعة الكالس في اوساط غذائية مشابهة لما هو في اوساط الكالس، مزودة بالسايتوكاينين BA مضافاً اليه Kinetin كلاً منهما بتركيز0،5 ملغم/لتر إذ تم زراعة 100 ± 10 ملغم من الكالس تقريباً في أنبوبة الزراعة وحضنت الزروعات بدرجة حرارة 25 ± 2 مْ وإضاءة 1000 لوكس لمدة 16 ساعة و 8 ساعات ظلام.

د- مرحلة التجذير

أخذت الأفرع العرضية المتوالدة من الكالس المعرض إلى المعاملات المختلفة وزرعت في الوسط الغذائي المذكور في الجدول 1 خالي من الأوكسين D – 4 , 2 ومضافاً اليه الأوكسين NAA بتركيز 0،5

ملغم/لتر والسايتوكاينين BA بتركيز 0،5 ملغم/لتر في وسط غذائي مكون من أملاح MSوبنصف القوة وحضنت الزروعات على إضاءة 1000 لوكس لمدة 16 ساعة و 8 ساعات ظلام ولمدة ثمانية أسابيع.

هـ- أقلمة النبيتات ونقلها إلى التربة

أُجريت عملية الأقلمة وفقاً الخطوات التالية :-

1- غسل النبيتات بالماء الجاري للتخلص من بقايا الوسط الغذائي.

2- قطع النبيتات بالقرب من القمة النامية لتشجيع نمو الافرع الجانبية لوحة (1).

3- وضع النبيتات في المبيد الفطري Elsa بتركيز 1غم/لتر لمدة نصف ساعة.

4- زراعة النبيتات في الأصص الحاوية على الوسط الزراعي المكون من خليط من الرمل والبتموس والبرلايت بنسبة 1:1:2 ثم وضعها في كابينة مجهزة بجهاز مرطاب Humidiefer لوحة (2).

لوحة (1): قطع النبياتات من القمة النامية

جدول (1): مكونات الوسط الغذائي المستخدم في استحثاث الكالس لصنفين من قصب السكر

اسم المادة	الكمية ملغم/ لتر
Sucrose السكروز	3000
Sodium hydrogen اورثوفوسفات الصوديوم الحامضيه Orthophosphate	170
Mesoinositol ميزواينوسيتول	100
Thiamine-Hcl ثيامين	0‘5
Casein hydrolysate	1000
Glysine كلايسين	5
2 , 4 – Dichlorophenoxy acetic acid 2 , 4 – D اوكسين	0
	1‘5
	3
	4‘5
Agar آگار	6000
Polyvinyl pyrrolidone PVP	2500

لوحة (2): كابينة مجهزة بجهاز المرطاب

النتائج والمناقشة

1- استحثاث الكالس

يوضح الجدول 2 تأثير المعاملة بالاوكسين 2,4-D في النسبة المئوية للكالس المتكون من البراعم القمية المزروعة في الأوساط الغذائية. إذ يلاحظ من الجدول أن أعلى نسبة مئوية لتكوين الكالس تم الحصول عليها من المعاملة 3 ملغم/لتر من 2,4-D لوحة (3-أ) بلغت 73% و 80% للصنفين على التوالي بفارق معنوي عن المعاملات 0, 0 ، 1.5 أو 4.5 ملغم/لتر أما اقل نسبة كانت بتأثير المعاملة 1.5 ملغم/ لترفي الصنف CO331 أما تأثير معاملة المقارنة فلم تسجل اي استجابة لاستحثاث الكالس وإنما حصل نمو خضري للبرعم القمي ولكلا الصنفين.

جدول (2): تأثير المعاملة بالاوكسين 2,4-D في النسبة المئوية للكالس المتكون من البراعم الطرفية لصنفين من قصب السكر.

الصنف	تركيز 2,4-D ملغم/لتر			
	0	1.5	3	4.5
CO331	0	35	73	59
CP72-208	0	54	80	62
$X^2=5.99$*				

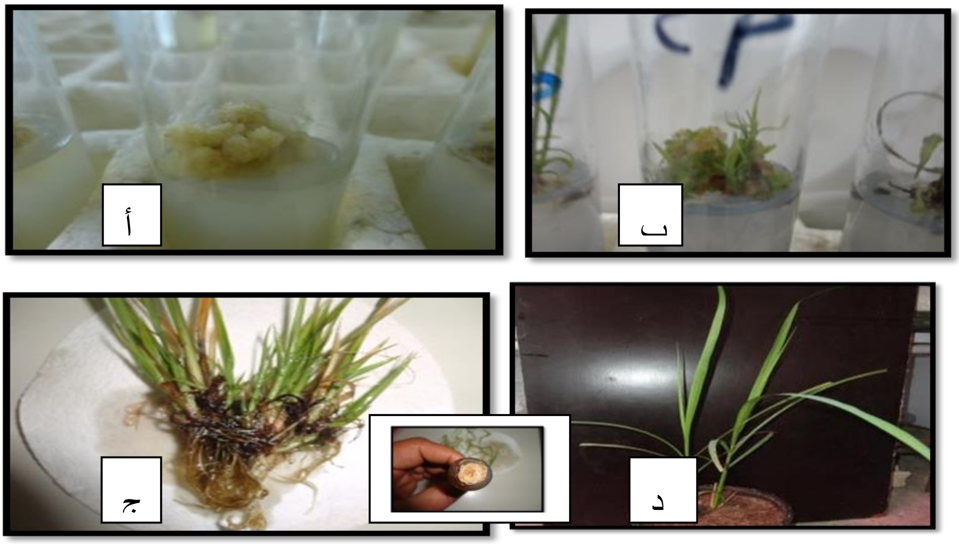
*نفذت التجربة حسب اختبار مربع كاي

يتضح من النتائج الدور المهم للأوكسين 2,4-D في استحثاث الكالس إذ أن غياب هذا الأوكسين في معاملة المقارنة أثر في استحثاث الكالس وذلك بعدم تحفيز الخلايا البرنكيمية على الانقسام وهذا يبين أهمية الأوكسين في عملية انقسام الخلاياCell division واستطالتها Cell elongation، إذ يعمل على تحفيز تكوين الحامض النووي الرايبوزي mRNA عن طريق نشاطه بعملية أكسدة المواد الغذائية وتكوين الإنزيمات المتعلقة بالنمو مثل إنزيمات التنفس التي ينتج عنها طاقة عالية متمثلة بمركب ادينوسين ثلاثي الفوسفات ATP واستفادة النسيج النباتي من هذه الطاقة في عملية الانقسام والنمو (صالح، 1991 و المعري،1995). اذ وجد أن كمية كافية من الكالس الأولي تصل إلى 70% ممكن الحصول عليها من مبادئ الأوراق الفتية لصنفين من قصب السكر وهما V78-1 و V75-6 عند زراعتهما في وسط MS يحتوي على 13 مليمولار من 2,4-D (Marcano *et al.*, 2002). وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه(2007) Kaure *et al.* فقد بينوا إن إستخدام الـ 2,4-D بتركيز 4 ملغم/ لتر نتج عنه نسبة عالية من كالس قصب السكر صنف Coj 83، وان الخلايا بحاجة الى الاوكسينات وذلك للتحول من مرحلة فقدان التمايز Dedifferentiation لتبدأ بالانقسام والتمايز. بين Schiavo *et al* (1989) ان وجود الاوكسينات يحفز الـ DNA ليصبح اكثر تشبعا بالميثانول وهذه العملية ضرورية لإعادة قدرة الخلايا على التمايز Redifferentiation.

2- توالد الاعضاء ونشوء الافرع العرضية

عند نقل الكالس المتكون إلى وسط أخر مكون من أملاح MS ومزود بالسايتوكاينين BA بنزل ادنين والكاينتين Kn بتركيز0,5 ملغم/لتر لكليهما حدثت عملية توالد الأعضاء ونشوء الأفرع العرضية لوحة (3-ب). ويتضح من اللوحة (3-ج) أن إضافة الاوكسين NAA بتركيز 0.5 ملغ/لتر والسايتوكاينين BA بتركيز 0.5 ملغم/لتر إلى الوسط الغذائي المجهز بنصف القوة من أملاح MS أدى إلى تجذير الأفرع العرضية المتوالدة من الكالس والحصول على نبيتات كاملة جاهزة للنقل إلى مرحلة الأقلمة وهذا يعود للتاثير الكبيرة للسايتوكانينات على الجزء النباتي المزروع بالموازنة مع الأوكسينات فقد تكون مفيدة في إستحثاث الكالس من جهة وتزيد في قابلية التمايز من جهة أخرى ولها الدور المهم في نمو النبات بعد الاقلمة لوحة (3-د)، وان التوازن بين الاوكسينات والسايتوكاينينات في الوسط الغذائي يحفز نشوء الافرع الخضرية (Bekeat,2013)، وجاءت النتائج متفقة مع ما ذكره Mamun *et al*, (2004) بأن الوسط المزود بالاوكسينين IBA+NAA (Indol butric acid) بتركيز 0.5 ملغم/لتر لكليهما في وسط MS كان الافضل في تجذير الافرع المتوالدة من كالس نبات قصب السكر، كما اختبر Baksha *et al.*(2003) تأثير منظمات نمو مختلفة في تجذير الأفرع الخضرية المتوالدة من كالس

قصب السكر، ووجدوا أن أفضل تجذير لوحظ عند إستخدام وسط غذائي مكون من أملاح MS مجهز بـ 5 ملغم/لتر من NAA و 50 غم/لتر سكروز. اوضحا Mazri and Maziani (2015) ان ظاهرة تكوين الاعضاء Organogensis في النسيج النباتي يمر بعدة تغيرات على مستوى النسيج النباتي اذ يحدث تكوين تراكيب احادية القطب جذور او افرع خضرية بدائية تكون مرتبطة بالنسيج الاصلي وان تكوين الافرع الخضرية يمر بسلسلة من المراحل هي: مرحلة استحثاث البراعم و مرحلة التضاعف ومرحلة الاستطالة و مرحلة التجذير والاقلمة. ان الوصول الى الحجم النهائي للجذر يتم تنظيمه بواسطة العديد من الاشارات Signal وقد اوضح الباحثان Hu and Hai (2003) الميكانيكية الجزيئية لهذه الاشارات وبينا ان الجين ARGOS المعروف في نبات *Arabidopsis* و المسؤول عن الحجم النهائي للعضو النباتي يتم حثه بدرجة عالية بواسطة الاوكسينات، وهذا يدل على كفاءة الاوكسينات عندما تكون تراكيزها كافية لاستحثاث و تكوين الجذور من خلال حث و تنشيط عملية بناء الببتيدات المتعددة (Friedman *et al.*, 1985). اشارت بعض الدراسات ان الاوكسين يعمل على تحفيز الجينات التي يقوم السايتوكاينين بالسيطرة على تعبيرها الجيني وان نواتج التعبير الجيني للجينات المنظمة تؤدي دورا اساسيا في العمليات البيولوجية ومنها انقسام الخلايا (خير الله، 2007).



لوحة (3): أ- استحثاث الكالس عند المعاملة 3 ملغم \ لتر2,4-D , ب- عملية توالد الأعضاء ونشوء الأفرع العرضية، ج- تجذير الأفرع بإضافة الاوكسين NAA بتركيز 0.5 ملغم/لتر والسايتوكاينين BA بتركيز 0.5 ملغم/ لتر، د- مرحلة الأقلمة

شكر وتقدير

شكري وتقديري الى الاستاذ الدكتور مالك حسن (قسم الاحياء البحرية-مركز علوم البحار- جامعة البصرة) لمساعدته المتواصلة في انشاء مختبر الزراعة النسيجية في المركز، كما اتقدم بالشكر الجزيل الى مركز ابحاث النخيل للدعم المتواصل خلال فترة اجراء البحث.

المصادر

خير الله، حسام الدين سعد الدين محمد (2007). الإكثار الدقيق لصنفين من نخيل التمر Phoenix dactylifera L. باستخدام النورة الزهرية ودارسة الثبات الوارثي باستخدام مؤشرات تباين طول قطع الـ DNA المتضاعفة RFLP أطروحة دكتوراه، كلية الزارعة-جامعة بغداد- العراق.

المعري، خليل وجيه (1995). إكثار النخيل بواسطة تقنية زراعة الأنسجة النباتية، جامعة دمشق- كلية الزراعة- دمشق.

صالح، مصلح محمد سعيد (1991). فسيولوجيا منظمات النمو النباتية، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة صلاح الدين-جمهورية العراق، الطبعة الأولى.

Ali, S.; Iqbal, J. and Khan, M. S. (2010). Genotype independent *in vitro* regeneration system in elite verities of sugarcane. Pak. J. Bot. 42:3783-3790.

Baksha, R.; Alam, R.; Karim, M. Z.; Paul, S. K.; Hossain, M. A.; Miah, M. A. and Rahman, A.B.M.M. (2002). *In vitro* shoot tip culture of sugarcane (*Saccharum officinarum*) Variety Isd 28. Biotechnology 1: 67-72.

Bekheat, S. (2013). Direct Organogenesis of Date Palm Phoenix dactylifera L. for Propagation of True - to – Type Plants. Sci. Agri. 4 (3), 85-92.

Dawson, L. and Boopaphy, R. (2008).Cellulosic ethanol bagasse. Bioresource Tech., 3(2):452-460.

Friedman, R.; Arie, A. and Uriel, B. (1985). Polyamines and Root formation in Mung Bean hypocotyls cuttings. Plant Physio. . 79, 80-83.

Gandonou, Ch.; Errabii, T.; Abrini, J.; Idaomar, M.; Chibi, F. and Skali-Senhaji, N. (2005). Effect of genotype on callus induction and

plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). African Journal of Biotechnology 4: 1250-1255.

Hu, Y, Q. and Hai, N.C. (2003). The *Arabidopsis* Auxin-Inducible ene *ARGOS* Controls Lateral Organ Size, Plant Cell, 15(9): 1951–1961.

Hussain, A. (2004). Biochemical and molecular investigation of somaclonal variants in sugarcane (*Saccharum officinarum*) cv. Col. (54), Ph D. Thesis, School of Biological Sciences University of Punjab pp.310

Kaur, A; Malhotra, P.K. and Gosal, S.S. (2007). Establishment of efficient tissue culture systems for genetic transformation in sugarcane. Indian J. Crop. Science 2(1):131-133.

Mamun, M.A.; Sikdar, M.B.; Paul, D.K.; Rahman, M.M. and Islam, M.R. (2004). *In vitro* Micropropagation of Some Important Sugarcane Varieties of Bangladesh. Asian Journal of Plant Sciences 3: 666-669.

Marcano, A.K.; Guevara, M.P.; Oropeza, M. and De-Garcia, E. (2002). Improvement of somatic embryogenesis process in sugarcane Venezuelan cultivars. Acta Scientific Venezuelan 53: 251-257.

Mazri, M. A. and Meziani, R. (2015).Micropropagation of Date Palm: A Review. Cell Dev. Biol. 4:3.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growthand bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Schiavo, LO.; Pitto, L. and Giuliano, G. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation hormones and hypomethylating droug Theor. Appl. Genet. 77 :325-331.

Subbarow, M. and Shaw, M. (1985). A review of research on sugarcane soils of Jamaica. Proceedings: West Indies Sugar techno. p 343-355

Tisserat, B. and Zaid, A. (1983). *In vitro* shoot-tip differentiation *Phoenix dactylifera* L. Date Palm J. 2 (2): 163-182.

Micropropagation of sugarcane *Saccharum officinarum* Plant via Organogensis callus *in vitro*

Haleemah J. AL-Arady* ; Abbas M. Jasim and Muayad F. Abbas ****

***Dept. Biological Development in NW Arabian Gulf & Shatt Al-Arab– Marine Science Center-University of Basra**
****Dept. Horticulture and landscaping, College of Agriculture, University of Basrah, Basrah, Iraq**

Abstract

Propagation of sugarcane *Saccharum officinarum* (L) Plant via *in vitro* by callus production through the culture of shoot tips on MS medium supplemented by 2,4- D 3 mg/L. Organogenic callus were produced by culturing callus on MS medium contained BA and kinetin at 0.5 mg/L for both of them. Incubation of culture was at 25 c and photoperiod at 16 hr and darkness for 8 hrs. Adventitious shoots were cultured on rooting medium contained MS salts at half concentration and NAA 0.5 mg/L , BA 0.5 mg/L and incubated for 8 weeks. Then plantlets were produced and successfully acclimatized.

Key words: Tissue culture, Agriculture Crop, Plant growth regulator.