Rafidain Journal of Science
Vol. 30, No. 3, pp.1-15, 2021

DOI: 10.33899/rjs.2021.168910

https://rsci.mosuljournals.com

ISSN: 1608-9391
e-ISSN: 2664-2786

Received:26/8/2020
Accepted:11/11/2020

تأثير تراكيز مختلفة من نترات الفضة في انبات بذور اشجار اللوسينيا *Leucaena leucocephala* ونمو بادراتها واستحداث كالسها

***رشا محمد صالح الحمزة** ****ازهار حسين علي الشهواني**

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

***E-mail: Mudher.1985@gmail.com**
****E-mail: azhaarh.ali1972@uomosul.edu.iq**

الملخص

اجريت الدراسة الحالية لبيان دور نترات الفضة $AgNO_3$ في انبات بذور اشجار اللوسينيا *Leucaena leucocephala* ونمو بادراتها وبيان تأثيرها في مؤشرات نموها من ارتفاع للساق وطول للجذر وعدد التفرعات الخضرية والاوراق لكل بادرة، وكذلك دورها في استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية والاوراق للبادرات. اذ استخدمت تراكيز متباينة من نترات الفضة (12,10,8,6,4,2) ملغم لتر$^{-1}$، واظهر استمرار نمو البادرات النامية على الاوساط الغذائية من MS والمدعمة بتراكيز $AgNO_3$ المختلفة الى تباين في استجابة هذه البادرات من حيث طول الساق والجذر للبادرة. اما بالنسبة للتفرعات التي نشأت بعد الاوراق الفلقية وعدد الاوراق لهذه التفرعات فقد تباينت ايضا نتيجة استخدام التراكيز المختلفة من النترات، تضمنت الدراسة ايضا بيان دور منظمات النمو في استحداث الكالس من قطع السيقان الاوراق ومقارنته بالكالس النامي على نفس الاوساط الغذائية والمزودة بتراكيز من نترات الفضة.

الكلمات الدالة: اشجار اللوسينيا، نترات الفضة، انبات البذور، نمو البادرات، استحداث كالس.

المقدمة

تعد اشجار اللوسينيا *Leucaena leucocephala* من النباتات الطبية التي تنتمي للبقوليات الشجرية الاستوائية وشبه الاستوائية (Benjakul *et al.*, 2014)، المثبتة للنيتروجين (Shaik *et al.*, 2009)، واوراقها مصدر غني بالكاروتينات والفيتامينات، ويعد محتواها من بروفيتامين أ (Provitamin A) من أعلى المعدلات المسجلة على الإطلاق في الأنواع النباتية (Chanchay and Poosaran, 2009). تسهم اشجار اللوسينيا في برامج الترميم لاستعادة الأراضي المتدهورة وتحسين التربة وتقليل التآكل واستقرار الرمال (Campbell *et al.*, 2019). ولقد استخدمت كمضادات للبكتريا (Ilham *et al.*, 2015)، وتمتاز بامتلاكها خصائص مضادة للأورام والاكسدة والالتهابات، مضادة للهستامين، كما تعمل على خفض الكوليسترول (Zayed *et al.*, 2018).

نظرا للأهمية الطبية والاقتصادية لاشجار اللوسينيا فقد نالت اهمية عند الباحثين في مجال الزراعة النسيجية بهدف اكثارها السريع وتحسين صفاتها (Kataria *et al.*,2013). وأشارت احدى الدراسات الى أخذ برعم جانبي من النباتات النامية في البيت الزجاجي وزراعته على وسط MS مضاف اليه تراكيز من (BA وNAA وKinetin) ولوحظ ان وجود (BA وNAA) في الوسط اعطى افضل نمو خضري في حين عند اضافة (BA وKinetin) الى وسط MS الحاوي على نصف تركيز الاملاح أعطى جذور عرضية (Goyal and Felker, 1984)، بينما اشارت احدى الدراسات الى امكانية الحصول على كالس اللوسينيا جيد النمو وذلك باستخدام وسط MS مدعم بـ(BAوNAA) (Pardha,1995). وهدفت دراسات اخرى الى معرفة تأثير التراكيز المختلفة من (2,4-D و NAA و Kn) على استحداث الكالس، ولوحظ ان التراكيز المنخفضة من 2,4-D اعطى افضل كالس وافضل نمو جنيني من الاسبوع الاول من الزراعة واتصف الكالس بلون ابيض وبهيئة هشة، بعدها تحول الكالس الى اللون الابيض المصفر وبطبيعة متماسكة (Sapsuha and Dan Kustantinah, 2011). وايضا تم التعرف على استجابة النمو ومورفولوجيا الكالس الجنيني لاشجار اللوسينيا المستحث من الأجنة بمختلف الأعمار باستخدام تراكيز مختلفة من 2,4-D (Manpaki *et al.*, 2018). وامكن الحصول على الأعضاء الخضرية عن طريق تكوين الكالس لنبات اللوسينيا اولا، بزراعة الاجزاء الفلقية، السيقان تحت الفلقية وقطع من الجذر على وسط MS يحتوي على تراكيز مختلفة من منظمات النمو (BA و NAA و2,4-D). كذلك ثبت ان جزيئات الفضة لها تأثيرات واضحة على نمو البادرات (Tahoori *et al.*, 2018). منها بادرات *Brassica juncea*، وبادرات الطماطة (Kim *et al.*,2017). وان أيونات الفضة المضافة بشكل نترات دورًا مهمًا في تعزيز تكوين الاجنة الجسدية Somatic Embryogenesis وتكوين الأعضاء Organogenesis في نبات الملفوف الأبيض(Cristea *et al.*, 2012). وتم الحصول على الكالس من النوعين المدمج والمفكك من قطع Cotyledon و Hypocotyl، مع تكوين براعم خضرية فقط من الكالس المفكك الناتج من Cotyledon، بينما كالس Hypocotyl لم يعط اي براعم خضرية، وأدى نقل قطع cotyledon إلى وسط الاستحداث الذي يحتوي على تراكيز منخفضة من BA إلى استحداث الكالس وتكوين مجموع خضري من قطعة Cotyledon بنسبة تصل إلى 100٪ (Latief *et al.*, 2018). ووجد ان الجذور تعد افضل الاجزاء النباتية في انتاجها للكالس من نبات اللوسينيا (Idol *et al.*, 2019).

تهدف الدراسة الحالية لمعرفة تأثير نترات الفضة كمحفز غير حيوي Abiotic elicetor على انبات البذور ونمو بادرات اشجار اللوسينيا *Leucaena leucocephala* والتغييرات المورفولوجية لهذه البادرات، وكذلك في استحداث الكالس ونموه.

المواد وطرائق العمل

التعقيم السطحي للبذور

تم الحصول على البذور من الاشجار النامية في حدائق جامعة الموصل، تم اختيار البذور الكاملة جيدة النمو والسليمة.

نقعت البذور بالماء المقطر الساخن لمدة يومين قبل زراعتها (Seng, 2015)، وعقمت بغمرها في محلول الكحول الاثيلي (95%) لمدة دقيقتين. مع التحريك المستمر، ثم غمرت بمحلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl (القاصر التجاري)6.4%

المخفف مع الماء المقطر وبنسبة (2 :1) لمدة 12دقيقة (Goyal *et al.*,1985). مع الاستمرار بالتحريك، بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم (3–5) مرات وجففت في طبق بتري زجاجي حاوي على أوراق ترشيح معقمة.

وضعت البذور المعقمة على سطح وسطMS الصلب (المقارنة) ثم الى وسط MS مضافا اليه تراكيز متعددة من نترات الفضة(12,10,8,6,4,2) ملغم لتر$^{-1}$ وبمعدل 4 بذور لكل قنينة لغرض الانبات ومتابعة نمو بادراتها. حفظت جميع العينات في حاضنة النمو في الظلام وبدرجة حرارة 2±22 م˚.

انبات البذور

تم مراقبة الانبات لحساب المدة الزمنية لبدء انبات بذور اللوسينيا *Leucaena leucocephala* على الاوساط الحاوية على نترات الفضة وكذلك وسط المقارنة MSO.

النسبة المئوية للإنبات

حسبت النسبة المئوية لإنبات بذور اللوسينيا *Leucaena leucocephala* بعد 5 ايام من الزراعة وذلك حسب المعادلة:

نسبة الانبات المئوية= عدد البذور النابتة/عدد البذور المزروعة الكلي * 100

مؤشرات نمو البادرات:

حساب طول الجذر والساق:

تم قياس طول الجذر وارتفاع الساق للبادرات جميعها بعد مرور 20 يوماً من الزراعة بواسطة شريط القياس، وحساب معدلاتها ولكافة المعاملات.

حساب عدد التفرعات الخضرية وعدد الاوراق

تم حساب عدد الاوراق الاوراق الفلقية وكذلك تحديد ابعاد الورقة من خلال قياس الطول والعرض، وحساب عدد التفرعات الخضرية لكل بادرة وفي كل المعاملات الخاضعة للدراسة.

استحداث الكالس من الاجزاء النباتية لبادرات اشجار اللوسينيا

فصلت قطع السيقان تحت الفلقية والاوراق من البادرات النامية على وسط MS بعد 20 يوماً ووضعت على سطح وسط MS حاويا على 2,4-D بتراكيز (1.5,1.0,0.5) ملغم لتر$^{-1}$، BA بتراكيز (2.0,1.0,0.5) ملغم لتر$^{-1}$متداخلة مع NAA بتراكيز (2.0,1.0,0.5) ملغم لتر$^{-1}$، و2,4-D مع BA بذات التراكيز اعلاه متداخلة مع بعضها لاستحداث الكالس. ثم انتخبت أفضل الاوساط لأستحداث الكالس، واضيف اليها (12,10,8,6,4,2) ملغم لتر$^{-1}$من نترات الفضة لمقارنة استحداث الكالس، مع استخدام الوسط القياسي MSO للمقارنة. حفظت جميع العينات بحاضنة النمو وبدرجة حرارة 2±22 م˚ وبظروف التعاقب الضوئي 16 ساعة ضوء و8 ساعات ظلام.

النتائج

تأثير مدة التعقيم السطحي وكفاءته على أنبات البذور

اعطى التعقيم السطحي كفاءة عالية في الحصول على بذور غير ملوثة وحققت نسبة انبات 100% منتجة بادرات سليمة وجيدة النمو.

تأثير استخدام تراكيز من نترات الفضة على انبات بذور اشجار اللوسينيا

اظهرت النتائج في (الجدول 1) تباين في زمن انبات بذور اللوسينيا المزروعة على الاوساط الغذائية والمضاف اليه تراكيز نترات الفضة (12,10,8,6,4,2 ملغم/ لتر$^{-1}$) وتفوق الوسط الحاوي (2 ملغم/ لتر$^{-1}$) من حيث زمن الانبات بعد يوم واحد فقط مقارنة بوسط المقارنة MSO الذي استغرقت فيه البذور للإنبات (4) يوم وحققت نسبة انبات 100%، أما بقية الاوساط الحاوية على تراكيز الفضة فتباينت في فترة ونسبة انبات البذور فيها وحسب (الجدول 1) من خلال ملاحظة كفاءتها وحيويتها الشكل (1)

وكان اضعف وسط مشجع لانبات البذور هو الوسط المزود بتركيز(12 ملغم/ لتر$^{-1}$) من $AgNO_3$ أذ استغرقت (10) أيام وكانت النسبة المئوية للإنبات (30%).

الجدول 1: تأثير استخدام تراكيز مختلفة من نترات الفضة $AgNO_3$ على زمن انبات بذور اللوسينيا *Leucaena leucocephala* والنسبة المئوية للانبات للبذور المزروعة على اوساط MS الصلبة والمعقمة.

الصلب MS الوسط الغذائي		مدة الانبات (يوم)	النسبة المئوية للإنبات%
MSO المقارنة		4	100
مزودا بتراكيز من نترات الفضة ملغم لتر$^{-1}$	2	1	100
	4	2	98
	6	3	96
	8	3	98
	10	3	95
	12	10	30

* عدد المكررات 3 لكل معاملة.

الشكل 1: يوضح نمو بادرات بذور اللوسينيا *Leucaena leucocephala* النامية على وسط MS المدعم بتركيز 2 ملغم/ لتر$^{-1}$ من نترات الفضة مع وسط المقارنة MSO.

تأثير تراكيز من نترات الفضة على مؤشرات نمو البادرات

طول الجذر والساق

يوضح (الجدول 2) تباين في ارتفاع سيقان واطوال جذور البادرات النامية على اوساط MS الصلبة بتباين تراكيز نترات الفضة المضافة الى الوسط . حيث وجد بأن التركيز2 ملغم/ لتر$^{-1}$ كان الافضل تشجيعيا من حيث تأثيره على استطالة ساق البادرات أذ بلغ معدل ارتفاع الساق (8.6) سم مقارنة ببقية التراكيز، بينما معدل ارتفاع الساق للبادرات في وسط المقارنة بلغ (6.0) سم، في حين ثبط التركيز 12 ملغم لتر$^{-1}$ معدل ارتفاع الساق حيث بلغ (2.4) سم بينما تباينت الارتفاعات لبقية التراكيز. اما بالنسبة لطول الجذر فقد تباينت معدلات الطول ايضا حسب تراكيز نترات الفضة المضافة لوسط MS أذ بلغ اعلى معدل

لطول الجذر(4.8) سم عند تركيز (6 ملغم/لتر$^{-1}$) من نترات الفضة في وسط MS واقل معدل لطول الجذر كان (2.0) سم عند تركيز12 ملغم/لتر$^{-1}$)، في حين سجل (3.0) سم في وسط المقارنة MSO الخالي من اضافة نترات الفضة وهي مقاربة لمعدل طول الجذر في المعاملات(8 و10 ملغم/لتر$^{-1}$) من نترات الفضة على التوالي الشكل(2).

الجدول 2: مؤشرات النمو لبادرات اشجار اللوسينيا *Leucaena leucocephala* النامية على الاوساط الغذائية MS الصلبة والمزودة بتراكيز مختلفة من نترات الفضة

الصلب MS الوسط الغذائي		معدل طول الساق (سم)	معدل طول الجذر (سم)
MSO المقارنة		6.0	3.0
مزودا بتراكيز من نترات الفضة (ملغم لتر$^{-1}$)	2	**8.6**	4.3
	4	6.3	3.6
	6	5.3	**4.8**
	8	4.3	3.0
	10	3.3	3.0
	12	2.4	2.0

- عدد المكررات 3 لكل معاملة.

تأثير استخدام تراكيز من نترات الفضة لتكوين الافرع الخضرية للبادرات

يظهر (الجدول 3) دور التراكيز المختلفة من نترات الفضة في تكوين تفرعات خضرية للبادرات بالإضافة الى تغير عدد الاوراق على هذه التفرعات واختلافها من خلال طول الورقة وعرضها وذلك حسب التراكيز المستخدمة ومقارنتها مع الوسط القياسي MSO الخالي من $AgNO_3$، اذ يلاحظ ان التركيز المضاف اليه (8ملغم/ لتر$^{-1}$) من $AgNO_3$ كان واضحا من حيث عدد الافرع التي وصلت الى معدل 6 تفرعات مقارنة بالوسط القياسي MSO، الذي أنتج معدل 3 أفرع بينما اقل التراكيز التي اعطت معدل عدد تفرعات3 هو تركيز (12ملغم/ لتر$^{-1}$). بينما كان عدد الاوراق 11،13 على التوالي للتراكيز (8 و12 ملغم/ لتر$^{-1}$) على التوالي مقارنة بالوسط القياسي MSO الذي أعطى معدل عدد اوراق 10 الشكل (2).

الجدول 2: عدد الافرع الخضرية وعدد الاوراق ومساحة الاوراق لبادرات اشجار اللوسينيا *Leucaena leucocephala* النامية على الاوساط الغذائية MS الصلبة والمزودة بتراكيز مختلفة من نترات الفضة

الصلب MS الوسط الغذائي		معدل عدد التفرعات	معدل عدد الاوراق	مساحة الورقة سم^2
MSO المقارنة		3	10	0.21
مزودا بتراكيز من نترات الفضة (ملغم لتر$^{-1}$)	2	4	11	**0.36**
	4	4	12	0.12
	6	4	10	0.15
	8	**6**	**13**	0.24
	10	5	10	0.12
	12	3	11	0.06

- عدد المكررات 3 لكل معاملة.

تركيز 12 ملغم/ لتر−1 تركيز 8 ملغم/ لتر-1 معاملة المقارنة MSO

الشكل 2: بادرات اشجار اللوسينيا *Leucaena leucocephala* النامية على اوساط MS الغذائية الصلبة والمجهزة بتراكيز مختلفة من نترات الفضة $AgNO_3$ مع معاملة المقارنة وذلك بعد اسبوعان من النمو.

استحداث الكالس من قطع السيقان والاوراق لبادرات اشجار اللوسينيا

اشارت النتائج الى ان استخدام منظمات النمو BA و NAA و2,4-D بتراكيز معينة سواء كانت لوحدها او بتداخلات معينة كان له اثر واضح في تشجيع استحداث ونمو الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية والاوراق لبادرات اشجار اللوسينيا المزروعة على وسط MS الصلب، واتخذ الكالس أنماطاً وألواناً متباينة وذلك حسب نوع منظم النمو المضاف ومصدر القطعة النباتية explant المستخدمة.

- **تأثير اضافة منظم النمو 2,4-D لوحده في وسط MS الغذائي الصلب:**

بينت النتائج المدرجة في (الجدول 4) الى قدرة 1.0 ملغم/ لتر−1 من 2,4-D لوحده في تحفيز استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية فقط وبنسبة بلغت 50.45 % بعد 19 يوما. واتصف الكالس الناتج بكونه متماسك القوام وذا لون اصفر. في حين ان وسط MSO الخالي من منظمات النمو شجع استحداث الكالس بنسبة 80.54% بعد 15 يوما وكان الكالس اصفر اللون ذا قوام متماسك الشكل (3).

- **تأثير اضافة BA وNAA الى وسط MS الغذائي الصلب:**

ان اضافة تراكيز مختلفة من كل من BA وNAA ومتداخلة مع بعضها الى وسط MS، ادت الى حدوث استجابة لاستحداث الكالس من قطع سيقان بادرات اشجار اللوسينيا بنسب متقاربة نوعا ما، حيث بلغت نسبة الاستحداث 90% في الوسط المدعم بتراكيز (0.5 و1.0 ملغم/ لتر$^{-1}$) منBA وNAA على التوالي، اما في الوسط الثاني وبالتداخلات (1.0 ملغم/ لتر$^{-1}$) منBA و(0.5 ملغم/ لتر$^{-1}$) من NAA فكانت نسبة الاستحداث 80.39%، بينما استخدام التركيز و(2.0 ملغم/ لتر$^{-1}$) لكل من BA وNAA فقد بلغت 90.69%، واتصف الكالس الناتج بكونه ذا قوام متماسك واصفر اللون الشكل (3)، وعند زراعة قطع الاوراق بديلا عن قطع سيقان تحت الفلقية نجد ان الوسط MS المزود بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$BA و0.5 ملغم لتر$^{-1}$ NAA شجع استحداثه بنسبة 80.76%، وكذلك الوسط الحاوي على 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ لكل من NAA وBA ادى الى استحداثه بنسبة 90.24% واتخذ الكالس القوام المتماسك واللون الاخضر الشكل (3).

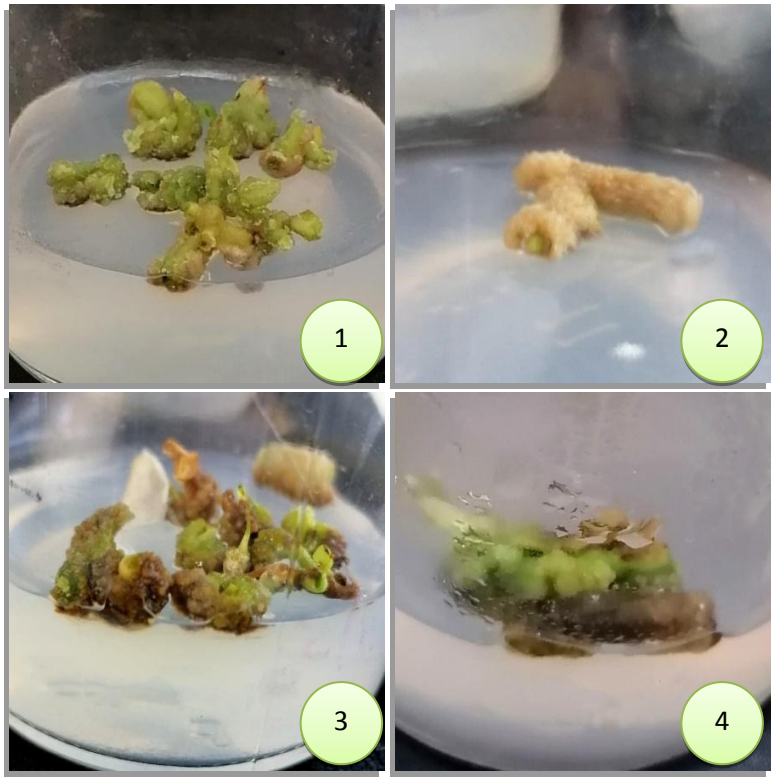
- **تأثير اضافة منظمي النمو BA و2,4-D الى وسط MS الغذائي الصلب:**

وضحت نتائج استحداث الكالس المدرجة في (الجدول 4) تأثير استخدام BA بتراكيز متداخلة مع 2,4-D، هذا التباين في تراكيز منظمات النمو المستخدمة قيد الدراسة سواء كانت من السايتوكاينينات او الاوكسينات، ادى الى حدوث تباين في نسب الاستحداث للكالس من قطع البادرات المزروعة، اذ اظهرت النتائج ان اعلى نسبة لاستحداث كالس قطع السيقان تحت الفلقية المستأصلة من بادرات اشجار اللوسينيا وبطول 1 سم تقريبا، كانت في وسط MS المدعم بإضافة منظمي النمو BA و2,4-D بتركيز (1.5 ملغم/ لتر$^{-1}$) لكل منهما اذ وصلت نسبة الاستحداث 90.85%، بينما اقل نسبة استحداث وهي 40.14% ظهرت في وسط MS المجهز بتركيز (1.0 ملغم/ لتر$^{-1}$) لكل من BA و2,4-D (الجدول 4) وامتاز الكالس بقوامه المتماسك ولونه الأصفر الشكل (3). ولبيان مدى استجابة قطع الاوراق المأخوذة من بادرات اشجار اللوسينيا لاستحداث الكالس، ظهر ان افضل استجابة لاستحداث الكالس الاخضر المتماسك والبالغة 90.95% كانت عند اضافة تركيز 1.5 ملغم/ لتر$^{-1}$ لكل من BA و2,4-D، اما اقل استحداث للكالس فظهر بنسبة 30.98% في الوسط المدعم بتركيز 1.0 ملغم/ لتر$^{-1}$ لكل من BA و2,4-D.

الجدول 4: النسبة المئوية لاستحداث الكالس من الاجزاء النباتية المأخوذة من بادرات اشجار اللوسينيا *Leucaena leucocephala* النامية على وسط MS الصلب مدعما بإضافة تراكيز مختلفة من منظمات النمو

الوسط الغذائي حاويا على منظمات النمو (ملغم/ لتر$^{-1}$)	قطع السيقان تحت الفلقية		قطع الاوراق	
	استحداث الكالس (%)	زمن الاستحداث (يوم)	استحداث الكالس (%)	زمن الاستحداث (يوم)
MSO	80.54	15	50.75	20
MS +2,4-D (0.5) mg/ L	0	0	0	0
MS +2,4-D (1.0) mg/ L	50.45	19	0	0
MS +2,4-D (1.5) mg/ L	0	0	0	0
MS +BA (0.5) mg/ L + NAA (1.0) mg/ L	90.18	13	0	0
MS +BA (1.0) mg/ L + NAA (0.5) mg/ L	80.39	14	80.76	18
MS +BA (2.0) mg/ L + NAA (2.0) mg/ L	90.69	12	90.24	16
MS +BA (0.5) mg/ L + 2,4-D (0.5) mg/ L	70.55	17	80.39	15
MS +BA (0.5) mg/ L + 2,4-D (1.0) mg/ L	80.28	13	60.89	17
MS +BA (1.0) mg/ L + 2,4-D (0.5) mg/ L	50.64	20	50.26	21
MS +BA (1.0) mg/ L + 2,4-D (1.0) mg/ L	40.14	22	30.98	21
MS +BA (1.5) mg/ L + 2,4-D (1.5) mg/ L	90.85	13	90.95	12

+ عدد المكررات 3 لكل معاملة

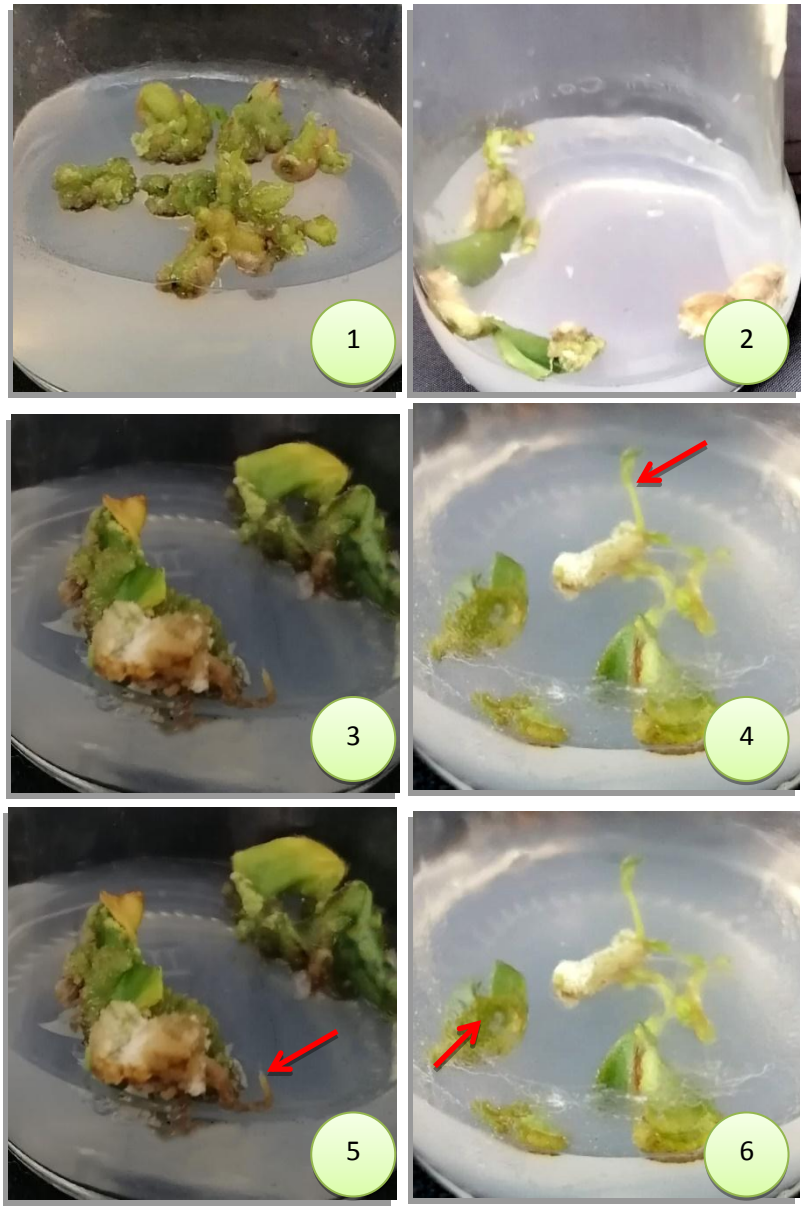


الشكل 3: استحداث الكالس من قطع السيقان والأوراق لبادرات أشجار اللوسينيا بدون إضافة $AgNO_3$
1: معاملة المقارنة MSO عمر 15 يوم، 2: معاملة 2,4-D عمر 19 يوم،
3: معاملة NAA + BA عمر 12 يوم، 4: معاملة 2,4-D + BA عمر 13 يوم

استحداث الكالس من قطع السيقان والاوراق لبادرات اشجار اللوسينيا بعد اضافة $AgNO_3$

- **تأثير اضافة منظم النمو 2,4-D بتركيز 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ لوحده مع اضافة تراكيز من $AgNO_3$ الى الوسط MS:**

من الشكل (4) و (الجدول 5) يتضح ان نسبة استحداث الكالس لقطع السيقان تحت الفلقية والاوراق المأخوذة من بادرات اشجار اللوسينيا كانت ضعيفة مقارنة ببقية المعاملات لمنظمات النمو قيد الدراسة، حيث سجلت نسب مختلفة لاستحداث الكالس من القطع تحت الفلقية للسيقان وذلك نتيجة لإضافة نترات الفضة للوسط الزرعي، حيث بلغت اعلى نسبة استحداث 60% عند تركيز (8 ملغم/ لتر$^{-1}$) وكان الكالس الناتج هشاً وابيض اللون وبعد فترة من النمو حصل تمايز وادى لتكوين افرع خضرية من الكالس. بينما قطع الاوراق المستأصلة من بادرات اشجار اللوسينيا والمزروعة على وسط MS الصلب المدعم بنفس تراكيز نترات الفضة (2,4,6,8,10,12) ملغم/ لتر$^{-1}$ مع وجود 2,4-D (1.0 ملغم/ لتر$^{-1}$) فلم يحدث فيها اي استجابة.



الشكل 4: استحداث الكالس من قطع السيقان والأوراق لبادرات أشجار اللوسينيا مع إضافة $AgNO_3$

1: معاملة المقارنة MSO عمر 15 يوم، 2: معاملة 2,4-D + 4ملغم لتر$^{-1}$ من $AgNO_3$ عمر 18 يوم، 3: معاملة 2,4-D + 2ملغم/ لتر$^{-1}$ من $AgNO_3$ عمر 14 يوم، 4: معاملة BA + NAA + 6 ملغم/ لتر$^{-1}$ من $AgNO_3$ عمر 14 يوم

الجدول 5: النسبة المئوية لاستحداث الكالس من الاجزاء النباتية المأخوذة من بادرات اشجار اللوسينيا *Leucaena leucocephala* النامية على وسط MS الصلب المزود ب1.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D مع $AgNO_3$ بتراكيز مختلفة

وسط MS حاوي 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D مع تراكيز مختلفة من $AgNO_3$	قطع السيقان تحت الفلقية		قطع الاوراق	
	استحداث الكالس (%)	زمن الاستحداث (يوم)	استحداث الكالس %	زمن الاستحداث (يوم)
MSO	80.54	15	50.75	20
MS +(2) mg/ L	60.46	16	0	0
MS +(4) mg/ L	50.34	18	0	0
MS +(6) mg/ L	0	0	0	0
MS +(8) mg/ L	50.65	19	0	0
MS +(10) mg/ L	0	0	0	0
MS +(12) mg/ L	0	0	0	0

+ عدد المكررات 3 لكل معاملة.

- **تأثير اضافة BA وNAA الى وسط MS الغذائي الصلب مع وجود تراكيز مختلفة من $AgNO_3$:**

من خلال النتائج المدرجة في (الجدول 6)، والتي توضح ان اضافة التركيز (2.0 ملغم/ لتر$^{-1}$) من كل من BA وNAA الى الاوساط الزرعية كمنظمات نمو لاستحداث الكالس من قطع السيقان والاوراق لبادرات اللوسينيا مع اضافة نترات الفضة $AgNO_3$ بتراكيز (2,4,6,8,10,12 ملغم/ لتر$^{-1}$) كعامل Elicitor نجد ان نسبة الاستحداث للكالس من قطع السيقان والاوراق تباينت وذلك حسب التراكيز المستخدمة من نترات الفضة، اذا اظهرت اعلى نسبة استحداث للكالس من قطع السيقان تحت الفلقية المأخوذة من بادرات اشجار اللوسينيا وبطول (1) سم عند تركيز 8 ملغم/ لتر$^{-1}$ من نترات الفضة حيث كانت نسبة الاستحداث 90.84% والكالس الناتج اظهر نمطا للنمو من قوام هش ولون ابيض، وبعد فترة من النمو حصل تمايز للكالس ادى لتكوين جذور. بينما تركيز 6 ملغم لتر$^{-1}$ من نترات الفضة كانت نسبة الاستحداث 70.78% وحدث تمايز للكالس وتكوين أفرع خضرية.

ولبيان مدى استجابة قطع الاوراق لاستحداث الكالس عند استخدام BA وNAA مع تراكيز نترات الفضة عند زراعتها على اوساط MS، كانت اعلى استجابة للاستحداث بلغت 60.54% وذلك عند التركيز 8 ملغم لتر$^{-1}$ من نترات الفضة والكالس كان هش القوام وابيض اللون الشكل (4).

الجدول 6: النسبة المئوية لاستحداث الكالس من الاجزاء النباتية المأخوذة من بادرات اشجار اللوسينيا *Leucaena leucocephala* النامية على وسط MS الصلب المزود بـNAA+BA مع $AgNO_3$ بتراكيز مختلفة

وسط MS حاوي 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA وNAA لكل منهما مع تراكيز مختلفة من $AgNO_3$	قطع السيقان تحت الفلقية		قطع الاوراق	
	استحداث الكالس %	زمن الاستحداث (يوم)	استحداث الكالس %	زمن الاستحداث (يوم)
MSO	80.54	15	50.75	20
MS +(2) mg/ L	80.74	14	0	0
MS +(4) mg/ L	70.75	15	50.65	20
MS +(6) mg/ L	70.78*	14	50.89	21
MS +(8) mg/ L	90.84**	12	60.54	17
MS +(10) mg/ L	50.65	18	50.87	19
MS +(12) mg/ L	60.77	16	50.52	20

+ عدد المكررات 3 لكل معاملة. * تمايز للكالس وتكوين افرع خضرية. ** تمايز للكالس وتكوين جذور

- **تأثير اضافة BA و2,4-D الى وسط MS الغذائي الصلب مع وجود تراكيز مختلفة من $AgNO_3$:**

من خلال (الجدول7) نلاحظ ان اعلى نسبة استحداث لكالس قطع السيقان تحت الفلقية المستأصلة من بادرات اشجار اللوسينيا بلغت 90.33% عند اضافة 4 ملغم/ لتر$^{-1}$ من نترات الفضة، بينما تركيز 6 ملغم/ لتر$^{-1}$ بلغت نسبة الاستحداث 80.46% واستمر الكالس بالنمو والتطور الى تكوين براعم خضرية اعطت فيما بعد مجموع خضري وأمتاز الكالس بقوامه الهش ولونه الابيض الشكل (4).

اما بالنسبة لاستجابة الاوراق المستأصلة من البادرات للاستحداث، نجد ان أفضل استجابة وهي 80.96% فكانت عند التركيز4 ملغم/ لتر$^{-1}$ والكالس الناتج امتاز بالصلابة واللون الاخضر المصفر.

الجدول 7: النسبة المئوية لاستحداث الكالس من الاجزاء النباتية المأخوذة من بادرات اشجار اللوسينيا *Leucaena leucocephala* النامية على وسط MS الصلب المزود بـBA+2,4-D مع $AgNO_3$ بتراكيز مختلفة

وسط MS حاوي 1.5 ملغم/ لتر$^{-1}$ 2,4-D وBA لكل منهما مع تراكيز مختلفة من $AgNO_3$	قطع السيقان تحت الفلقية		قطع الاوراق	
	استحداث الكالس %	زمن الاستحداث (يوم)	استحداث الكالس %	زمن الاستحداث (يوم)
MSO	80.54	15	50.75	20
MS +(2) mg/ L	70.79	18	0	0
MS +(4) mg/ L	90.33	12	80.96	17
MS +(6) mg/ L	80.46*	15	50.78	20
MS +(8) mg/ L	60.65	17	50.17	19
MS +(10) mg/ L	80.76	16	0	0
MS +(12) mg/ L	50.87	19	50.24	19

+ عدد المكررات 3 لكل معاملة. * تمايز للكالس وتكوين افرع خضرية.

المناقشة

بينت النتائج ان فترة التعقيم لها دور كبير في عملية انبات البذور وتنمية البادرات فيما بعد للحصول على بادرات سليمة وغير ملوثة تماما (Goyal *et al.*, 1985)، ووجد ايضا ان عملية نقع البذور في الماء المقطر الساخن لمدة يومين مهمة جدا لكسر سبات البذور والحصول على انبات جيد وذلك كون البذور لديها غلاف بذري سميك قد يؤخر الانبات (Seng, 2015; Sirisha *et al.*, 2008).

ان التباين واضح في زمن الانبات والنسبة المئوية للإنبات، أذ تبين ان الوسط المزود بأيونات الفضة هو الافضل مقارنة مع وسط MSO (Almutairi and Alharbi, 2015)، مما يؤكد دور أيون الفضة في تسهيل تغلغل الماء والمغذيات من خلال طبقة البذور وتسريع الانبات، والتي تعمل على تنشيط الجنين (Noshad *et al.*, 2019).هذه الطريقة يمكن أن تسرع من زمن انبات النبات وخاصة الأشجار ذات غلاف البذور الصلب (Savithramma *et al.*, 2012) وثبت ان التركيز العالي من$AgNO_3$ ادى الى تأخر في انبات البذور وانخفاض في نسبة الانبات ايضا، وربما يعود السبب لوصول التركيز لحد السمية بالنسبة للبذور (Sahandi *et al.*, 2011). لقد وجد الباحثون ان ايون الفضة أظهر تأثيرًا كبيرًا على إنبات البذور مما أدى إلى تخليق البروتين والكربوهيدرات وخفض إجمالي محتويات الفينول وفعالية كل من انزيمي الكاتاليز والبيروكسيديز (Khan *et al.*, 2019)، وعند متابعة تأثير نترات الفضة على مؤشرات النمو من حيث طول الساق للبادرة وطول الجذر وعدد التفرعات في المجموع الخضري وعدد الاوراق في هذه التفرعات، نجد ان المعاملة بتراكيز منخفضة من نترات الفضة يعطى معدل نمو بادرات مرتفع بشكل ملحوظ، وهذا يتفق مع دراسة سابقة على نمو البراعم العرضية للنخيل، قد يعزى السبب لدور نترات الفضة في اختزال غاز الاثيلين الناتج من نمو البادرة والذي قد يسبب تواجده داخل قناني الزرع الى اعاقة في نمو واستطالة البادرات (Al-Mayahi, 2010) ، وأظهرت نتائج دراسة اخرى عن نبات الطماطم المعالج بنترات الفضة النانوية معدلات نمو معنوية

متضمنة زيادة في ارتفاع النبات، واختلاف في محصول الطماطم، والكتلة الحيوية الطازجة، وعدد الفروع/ نبات (Noshad *et al.*, 2019). أذ تتفاعل جزيئات الفضة مع النباتات مسببة العديد من التغيرات الشكلية والفسلجية، وذلك اعتمادًا على خصائص نترات الفضة، وان فعالية جزيئات الفضة تتحدد من خلال تركيبها الكيميائي، وحجمها، وتفاعلها، والأهم من ذلك التركيز الذي تكون فعالة فيها، وكذلك الأنواع النباتية والحجم والخصائص الفيزيائية والكيميائية لتلك الجزيئات (Kumar *et al.*, 2009)، لقد اقترح الباحثون من النتائج التي توصلوا إليها آثارًا إيجابية وسلبية لجزيئات الفضة على نمو النبات وتطوره، وتختلف فعاليتها من نبات إلى نبات اخر، أذ أفاد الباحثون أن طول الجذر يقل في نبات الشعير والبازلاء، ولكن لم يؤثر سلبا في نبات الزينيا، ووجد ان جزيئات الفضة تؤثر على نمو الجذور عن طريق تحويل او منع اشارات الاثيلين (Anantasaran and Kanchanapoom, 2008)، أدى استخدام الفضة إلى زيادة معدل نمو نباتات القطن والتبغ ولسان الثور (طول الجذر، ومساحة الأوراق) وتحسين السمات الكيميائية الحيوية، منها محتوى الكلوروفيل والكربوهيدرات والبروتينات والإنزيمات المضادة للأكسدة (Sahandi *et al.*, 2011)، كذلك أدى اضافة ايون الفضة بطريقة الرش اما بشكل AgNPs او $AgNO_3$ ،إلى زيادة طول الجذر والساق وعدد الجذور والوزن الطري والجاف للنبات وايضا زيادة ملحوظة في مساحة الورقة وعدد الأوراق والوزن الطري والجاف للأوراق، وأظهرت معاملات AgNPs و$AgNO_3$ نتائج مهمة ويمكن اعتبارها استراتيجية لإنتاج الأفلاتوكسينات في نباتات الأرز (Ejaz *et al.*, 2018).

لقد وجد الباحثون ان استحداث الكالس يخضع لآليات تنظيمية معقدة من خلال ايقاف دورة الخلية الانقسامية في الخلايا النباتية المتمايزة وإعادة اكتساب القدرة التكاثرية للخلايا كصفة اساسية لاستحداث الكالس (Ikeuchi *et al.*, 2013). وان التغاير الظاهر الذي عكسته القطع النباتية المختلفة في استجابتها لاستحداث الكالس والفترة الزمنية الضرورية التي تفوقت فيها قطع السيقان تحت الفلقية على الاوراق ربما يعود الى عدة اسباب منها مصدر القطعة النباتية وحجمها وعمرها الفسلجي فضلا عن نوع خلايا القطعة المستأصلة وهذا من شانه ان يعمل على زيادة الاستجابة لاستحداث الكالس ونموه فيما بعد (Manpaki *et al.*, 2018) جنبًا إلى جنب مع وجود الهرمون الداخلي أو عند اضافة منظم النمو الخارجي لكون منظمات النمو النباتية تعتبر من العوامل المهمة في استحداث الكالس ونموه، حيث تمتلك الخلايا النباتية خاصية مهمة وهي قدرتها على الاستجابة للنمو عند إضافة تراكيز من منظمات النمو(Latief *et al.*, 2018). ان اضافة الاوكسينات لوحدها الى الاوساط الغذائية مثل 2,4-D لم يكن مشجعا بشكل كاف لاستحداث الكالس (Manpaki *et al.*, 2018). واتضح ان استخدام NAA و BA في اوساط MS كان له تأثير محفز لاستحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية لاشجار اللوسينيا، مما يدل على ان طبيعة منظمات النمو والتراكيز المستخدمة منها والتوليفات فيما بينها تؤدي دوراً مهماً في استحداث الكالس في البقوليات الخشبية (Mamun *et al.*, 2004). واكد الباحثون امكانية نمو كالس أشجار اللوسينيا وزيادة حجمه على الاوساط الغذائية باستخدام BA مع الكاينتين واتصف الكالس الناتج بقوام هش (Latief *et al.*, 2018). ووجد ان التراكيز المنخفضة من BA ادت لتكوين براعم خضرية من قطع hypocotyls صاحبه نمو جذور نحيلة استجابةً لوجود NAA، وقطع hypocotyls من اللوسينيا كونت كالس لوجود BA غي نهايتيها عند زراعتها على الاوساط الغذائي (Sirisha *et al.*, 2008; Rastogi *et al.*, 2008). أشارت احدى الدراسات الى نمو القط ع المستأصلة بسرعة على معظم تركيزات BA و NAA في الاوساط الغذائية وذلك في غضون أسبوع من الزرع، حيث انتفخت القطع وظهرت العديد من البراعم الاولية من المجموع الخضري (Goyal *et al.*, 1985). ووجد ان قطع السيقان تحت الفلقية لنبات *Albizia lebbeck*، هي الافضل لاستحداث الكالس وذلك عند زراعتها على الاوساط الغذائية المزودة بتراكيز من BA,NAA لا سيما اذا كان تركيز BA عالياً مع تركيز منخفض من NAA (Mamun *et al.*, 2004). وأظهرت نتائج دراسة اخرى أن قطع السيقان لانواع من اشجار الاكاسيا *Acacia* Species هي أفضل مصدر لبدء الكالس باستخدام منظمي النمو BA وNAA، في حين أن قطع الأوراق تظهر بداية الكالس ولكن مع وقت

أطـول ومتوسـط نمـو أقـل، قـد يكـون هـذا بسـبب احتـواء السـاق علـى نسـبة عاليـة مـن الخلايـا البرنكيميـة مقارنـةً بـالأوراق (Al-Salih *et al.*, 2013).

المصادر

Al-Mayahi, A. (2010). The effect of amino acids and silver nitrate in the growth and organogenesis of adventitious buds for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Showaithy by *in vitro*. *Dam. Uni. J. Agri. Sc*., **26**(2), 97-110.

Almutairi, Z.; Alharbi, A. (2015). Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. *J. Adv. in Agri*., **4**(1), 280-285.

Al-Salih, H.; Fathi, R.; Godbold, D.; Davey, J. (2013). Uptake of uranium by callus cultures of two acacia species. *Raf. J. Sci*., **24** (1), 31-43.

Anantasaran, J.; Kanchanapoom, K. (2008). Influence of medium formula and silver nitrate on in vitro plant regeneration of *Zinnia* cultivars. *Songklanakarin J. Sci. Technol*., **30**(1),1-6.

Benjakul, S.; Kittiphattanabawon, P.; Sumpavapol, P.; Maqsood, S. (2014). Antioxidant activities of Lead (*Leucaena leucocephala*) seed as affected by extraction solvent, prior dechlorophyllisation and drying methods. *J. Food Sci. Technol*., **5**(11), 3026-3037.

Campbell, S.; Vogler, W.; Brazier, D.; Vitelli, J.; Brooks, S. (2019). Weed leucaena and its significance, implications and control. *J. of Trop. Grasslands-Forrajes Trop.***7**(4), 280-289.

Chanchay, N.; Poosaran, N. (2009). The reduction of mimosine and tannin contents in leaves of *Leucaena leucocephala*. *As. J. Food Ag-Ind. Special Issue*,**137-144**.

Cristea, T.; Leonte, C.; Brezeanu, C.; Brezeanu, M.; Ambarus, S.; Calin, M.; Prisecaru, M. (2012). Effect of $AgNO_3$ on androgenesis of *Brassica oleracea* L. anthers cultivated in vitro. *Afric. J. Biotech*., **11**(73), 13788-13795.

Ejaz, M.; Raja, N.; Mashwani, Z.; Ahmad, M.; Hussain, M.; Iqbal, M. (2018). Effect of silver nanoparticles and silver nitrate on growth of rice under biotic stress. *IET Nanobiotech*., **1,**1751-8741.

Goyal, Y.; Bingham, I.; Felker, P. (1985). Propagation of the tropic tree, *Leucaena leucocephala* 67, by *In Vitro* bud culture. *P. Cell Tis. Org. Cu*., **4,** 3-10.

Idol, T.; Youkhana, A.; Santiago, R. (2019). Vegetative and micropropagation of Leucaena. *J. Trop. Grasslands-Forrajes Trop*., **7**(2), 87-95.

Ikeuchi, M.; Sugimoto, K.; Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The P. Cell*, **25,** 3159-3173.

Ilham, Z.; Hamidon, H.; Rosji, N.; Osman, N. (2015). Extraction and quantification of toxic compound mimosine from *Leucaena leucocephala. Pro. Ch*., **16,** 164-170.

Kataria, N.; Yadav, K.; Kumari, S.; Singh, N. (2013). Micropropagation: an important tool for conserving forest trees. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci*., **36** (1),17-26.

Khan, I.; Raza, M.; Bin Khalid, M.; Awan, S.; Raja, N.; Zhang, X.; Min, S.; Wu, B.; Hassan, M.; Huang, L. (2019). Physiological and biochemical responses of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) seedlings exposed to silver nitrate ($AgNO_3$) and silver nanoparticles (AgNPs). *Int. J. Environ. Res. Public Heal*., **16,** 1-17.

Kim, D.; Gopal, J.; Sivanesan, I. (2017). Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. *RSC Adv. J*., **7,** 36492–36505.

Kumar, V.; Parvatam, G.; Ravishankar, G. (2009). $AgNO_3$ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Elec. J. Biotech*., **12**(2), 1-15.

Latief, M.; Karti, P.; Prihantoro, I. (2018). "Adaptation of Acid-Tolerant *Leucaena leucocephala* cv. Tarramba Calluses after Gamma Irradiation on Regenerative Media". 3rd Annual Applied Science and Engineering Conference (AASEC 2018).

Mamun, A.; Matin, M.; Bari, M.; Siddique, N.; Sultana, R.; Rahman, M.; Musa, A. (2004). Micropropagation of woody legume (*Albizia lebbeck*) through tissue culture. *Pak. J. Bio. Sci*., **7**(7), 1099-1103.

Manpaki, S.; Prihantoro, I.; Karti, P. (2018). Growth response of leucaena embryogenic callus on embryo age differences and auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *JITV*., **23**(2), 95-102.

Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A Revised medium for rapid growth and Bio-Assays with tobacco cultures. *Physiol. P*., **15,** 473-479.

Noshad, A.; Hetherington, C.; Iqbal, M. (2019). Impact of AgNPs on seed germination and seedling growth: A focus study on its antibacterial potential against *Clavibacter michiganensis* subsp. Michiganians Infection in *Solanum lycopersicum*. *J. Nanomat., Article* ID 6316094, **12** pages.

Pardha, S. (1995). Production and selection of somaclonal variants of *Leucaena leucocephala* with high carbon dioxide assimilating potential. *J. En. Con. Man*., **36(**9),759-762.

Rastogi, S.; Rizvi, S.; Singh, R.; Dwivedi, U. (2008). In Vitro regeneration of *Leucaena leucocepala* by organogenesis and somatic embryogenesis. *Bio. Planta*., **52** (4), 743-748.

Sahandi, S.; Sorooshzadeh, A.; Rezazadeh, H.; Naghdibadi, H. (2011). Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of borage. *J. Med. P. Re*., **5**(5), 706-710.

Sapsuha, Y.; Dan Kustantinah, D. (2011). In vitro Callus Induction and Somatic Embryogenesis of *Leucaena leucocephala*. *Berita. Biologi*.**, 10**(5), 627-629.

Savithramma, M.; Al-Mefleh, N.; Chandler, P. (2012). Morphology, productivity and forage quality of *Leucaena leucocephala* as influenced by irrigation under field conditions. *Agrofor. Syst*., **86,** 73–81.

Seng, J. (2015). Effects of Different Basal Media and Complex Additives Interaction on *in Vitro* Seed Germination and Seedling Growth of Petai Belalang (*Leucaena leucocephala*). Master Thesis. University Malaysia Sarawak. (In English).

Shaik, N.; Arha, M.; Nookaraju, A.; Gupta, S.; Srivastav, S.; Yadav, A.; Kulkarni, P.; Abhilash, O.; Vishwakarma, R.; Singh, S.; Tatkare, R.; Chinnathambi, K.; Rawal, S.; Khan, B. (2009) Improved method of in vitro regeneration in *Leucaena leucocephala* – a leguminous pulpwood tree species. *Physiol. Mol. Biol. P*., **15(**4), 311-318.

Sirisha, V.; Prashant, S.; Ranadheer, D.; Ramprasad, P.; Shaik, N.; Arha, M.; Gupta, S.; Srivastava, S.; Yadav, A.; Kulkarni, P.; Abhilash, O.; Khan, B.; Rawal, S.; Kishor, P. (2008). Direct shoot organogenesis and plant regeneration from hypocotyl explants in selected genotypes of *Leucaena leucocephala*-A leguminous pulpwood tree. *In. J. Biotech*.,**7**, 388-393.

Tahoori, F.; Majd, A.; Nejadsattari, T.; Ofoghi, H.; Iranbakhsh, A. (2018). Effects of silver nitrate ($AgNO_3$) on growth and anatomical structure of vegetative organs of liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) under *in vitro* condition. *P. Omc. J.*, **11**(3), 153-160.

Zayed, M.; Sallam, S.; Shetta, N. (2018). Review article on *Leucaena leucocephala* as one of the miracle Timbers trees. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*., **10**(1),1-7.

Effect of Different Concentrations of Silver Nitrate $AgNO_3$ on *Leucaena leucocephala* Seeds Germination and Seedling Growth in MS Culture Media and Callus Induction

Rasha M. Salih **Azhaar H. Al-Shahwany**
Department of Biology / College of Science / University of Mosul

ABSTRACT

The current research work was carried out to verify the role of $AgNO_3$ silver nitrate in the germination and growth of seedlings of *Leucaena leucocephala* trees and to demonstrate the effects on seedlings growth indicators such as stem height, root length, number of vegetative branches and number of leaves per seedling, as well as the induction of callus from stem and leaf explant, In presence and absence of silver nitrate in MS culture media. As well as different concentrations of silver nitrate were used, the continuous growth of seedlings that were grown on MS media and supported by different concentrations of $AgNO_3$ showed to a variation in the response in terms of stem high and root length of seedling. As for the branches that arose after the cotyledon leaves and the number of leaves for these branches, they also varied as a result of using different concentrations of nitrates. Variation of the incidence of callus with the type of plant growth regulators and their concentrations used in this research, The study also included an explanation of the role of growth regulators in creating callus from cutting the stem and leaves and comparing it with callus growing on the same nutrient media and supplied with concentrations of silver nitrate.

Keywords: leucinia, $AgNO_3$, seed germination, seedling growth, callus induction.