



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي
والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

تقييم المعاملات المسبقة بأشعة ليزر الدايدود وحامض الفولك في
الإنبات ونمو بادرات البازلاء *Pisum sativum* L. وكالسه تحت

الإجهاد الملحي

اطروحة دكتوراه
تقدمت بها الطالبة
إيمان طه ياسين سلطان

الى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات
نيل شهادة الدكتوراه فلسفة في اختصاص
علوم الحياة / نبات

بإشراف
أ.د. ساجدة عزيز عبود

الخلاصة

شمل البحث دراسة تأثير ملح كلوريد الصوديوم بتركيز 0،50،100،150،200،250 و300 ملي مول في انبات بذور ونمو بادرات وكالس البازلاء *Pisum sativum L.* وتطورها، وأظهرت النتائج ان الزيادة في تركيز ملح كلوريد الصوديوم في الوسط الزراعي أدى الى خفض نسبة إنبات البذور، وزيادة مدة إنباتها مسبباً بطأً في سرعة الإنبات وإنخفاضاً في معدل أطوال كل من الجذير والرويشة وفي أوزانهم الرطبة والجافة، إضافة الى إنخفاض في فعالية إنزيم الالفا- اميليز خلال مراحل الإنبات المختلفة في التركيز 200 ملي مول من الملح إستناداً لمعاملة المقارنة. سببت الملوحة أيضاً إنخفاضاً في معدل نمو النبات (ارتفاع النبات وطول الجذر، عدد تفرعات الساق والجذر والأوزان الرطبة والجافة للنبات). رافقت زيادة كلوريد الصوديوم في وسط Arnon الغذائي إنخفاضاً تدريجياً في تركيز الكلوروفيل الكلي للأوراق في تراكيز الملح المختلفة. أشارت النتائج أيضاً الى التأثير السلبي للملوحة على الأوزان الرطبة والجافة للكالس النامي على وسط MS (Skoog و Murashige) الصلب المجهز بتركيز 1.0 ملغم/ لتر لكل من BA و NAA، وشمل التأثير أيضاً تضرر الأغشية الخلوية للكالس وحيويته، سببت الملوحة أيضاً زيادة كمية الكربوهيدرات الكلية الذائبة ومستوى البرولين في أنسجة أوراق البادرات بعمر 20 يوماً والكالس بعمر 21 يوماً، بينما كان هناك إنخفاض واضح في كمية البروتين في تلك الأنسجة.

تضمن البحث دراسة تأثير أشعة ليزر الدايدود الحمراء عند الطول الموجي 650 نانوميتر وبقدرة 50 ملي واط/ سم² في مدد مختلفة 2،4،6،8 و10 دقائق لكل منها على حدى في انبات البذور ونمو البادرات وكالس نبات البازلاء *Pisum sativum L.* وتطورها تحت الإجهاد الملحي. أظهرت النتائج ان تعريض بذور البازلاء لأشعة الليزر في مدد مختلفة أحدث زيادة واضحة في مؤشرات النمو المدروسة قياساً بمعاملة المقارنة وتفوقت معاملة البذور بأشعة الليزر مدة 10 دقائق على بقية المعاملات في زيادة سرعة الإنبات ومعدل أطوال كل من الجذير والرويشة وأوزانها الرطبة والجافة، إضافة الى زيادة الوزن الرطب والجاف للمجموع الجذري والخضري للبادرات قياساً بمعاملة المقارنة. أسفرت نتائج البحث أيضاً عن زيادة في معدل الأوزان الرطبة والجافة للكالس المعرض لأشعة الليزر في مدد مختلفة بعد مدة نمو 21 يوماً على وسط MS الصلب المجهز بتركيز 1.0 ملغم/ لتر من BA و NAA لكل منهما. برهنت الدراسة امكانية معالجة التأثيرات السلبية لملاح كلوريد الصوديوم بتركيز 200 ملي مول على مؤشرات نمو انبات البذور ونمو بادرات البازلاء وكالسه بتعريض البذور وعينات الكالس مسبقاً لأشعة الليزر مدة 10 دقائق، فقد سببت زيادة واضحة في نسبة الإنبات وسرعته، فعالية إنزيم الالفا- اميليز خلال مراحل الإنبات المختلفة ومعدل أطوال كل من الجذير والرويشة ومعدل أوزانها الرطبة والجافة. أدى التعريض مسبقاً لأشعة الليزر مدة 10 دقائق أيضاً الى زيادة في معدل نمو البادرات (ارتفاع النبات، طول الجذر، عدد

تفرعات الساق والجذر، والأوزان الرطبة والجافة للمجموع الخضري والجذري) مع زيادة كمية الكلوروفيل الكلي في الأوراق، تشير النتائج أيضاً الى التأثير الايجابي لأشعة الليزر مدة 10 دقائق في معدل الأوزان الرطبة والجافة للكالس بعمر 21 يوماً مع التقليل من نسبة تضرر الأغشية الخلوية واستعادة الكالس لحيويته، أيضاً سببت الأشعة زيادة محتوى الأوراق والكالس من البروتينات والسكريات الذائبة والبرولين قياساً مع المعاملة بالملح فقط.

ان نقع بذور البازلاء *Pisum sativum* L. بمحلول حامض الفوليك بتركيز 20 مايكرومول حفز من إنباتها واختزل التأثيرات السلبية للملحة، سجلت النتائج زيادة في سرعة إنبات البذور المعاملة بحامض الفوليك قياساً بسرعة إنبات البذور المعاملة بكلوريد الصوديوم 200 ملي مول مع رفع نشاط إنزيم الالفا-اميليز في اليوم الخامس من الإنبات الى 1476 وحدة/ سم³ قياساً بمعاملة المقارنة 1404 وحدة/ سم³ ومسببة أيضاً استعادة نشاط الإنزيم للبذور المعاملة بالمحلول الملحي سابقاً. في حين خفض من التأثير السمي لكلوريد الصوديوم 200 ملي مول في معدل أطوال كل من الجذر والرويشة ومعدل أوزانها الرطبة والجافة. سببت إضافة حامض الفوليك الى الأوساط الزرعية لنمو البادرات زيادة مؤشرات نموها (ارتفاع الساق، طول الجذر، عدد تفرعات كل من الساق والجذر ومعدل الأوزان الرطبة للمجموع الخضري والجذري) إضافة الى زيادة محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي. أظهرت النتائج حصول زيادة واضحة في معدل الأوزان الرطبة والجافة للكالس المعامل بحامض الفوليك مع إختزال لتأثير الملح في تلك المعدلات، إضافة الى ذلك قلل حامض الفوليك من نسبة تضرر الأغشية الخلوية للكالس واستعادة حيويته، ان وجود حامض الفوليك في أوساط النمو الحاوية على الملح زاد من محتوى أنسجة الأوراق والكالس من البروتين والسكريات الذائبة والبرولين.

أدى تعريض الكالس لأشعة الليزر مدة 10 دقائق او تنميته على أوساط حاوية على 20 مايكرومول حامض الفوليك الى تحفيز الفعالية للإنزيمات الثايمدليلت سنثيز والداي هيدروفوليت رديكتيز والسيرين هيدروكسي ميثايل ترانسفيريز، ورافقها زيادة في بناء أحماض DNA، RNA والفوليك قياساً بمعاملة المقارنة. كان لأشعة الليزر وحامض الفوليك دور في التغلب على التأثيرات السلبية للملحة في فعالية الإنزيمات المذكورة في أعلاه والأحماض النووية والفوليت.

أجري التكاثر الدقيق للباذلاء *Pisum sativum* L. من قطع السيقان الحاوية على العقد للبادرات المزروعة على أوساط MS المزودة بـ 1.0 ملغم/ لتر من BA و NAA و 20 مايكرومول من حامض الفوليك، العديد من الأفرع الخضرية القصيرة، وظهرت قطع السيقان الحاوية على العقد على الأوساط الزرعية الحاوية على 2.0 ملغم/ لتر من BA فقط، عدداً قليلاً من الأفرع الخضرية الطويلة بعد خمسة أسابيع من النمو. ان معاملة قطع السيقان الحاوية على العقد بأشعة الليزر مدة 10 دقائق او إضافة حامض الفوليك بتركيز 20 مايكرومول الى الأوساط الزرعية الحاوية على 2.0 ملغم/ لتر من BA فقط، زاد من عدد الأفرع الخضرية إستناداً لمعاملة المقارنة، بينما المعاملة بالملحة بتركيز 200 ملي مول

أعطت تأثير سلبي في تكوين الأفرع الخضرية. أمكن تجذير الأفرع الخضرية الناتجة من قطع السيقان الحاوية على العقد المعاملة بالليزر أو حامض الفوليك أو معاملة المقارنة باستعمال أوساط MS بنصف قوتها التركيبية والحاوية على 1.0 ملغم/ لتر من NAA. نجحت أقلمة معظم النباتات عند زراعتها في التربة.

تم التحري عن وجود جين *PsDn1* في كالس البازلاء باستعمال تقنية PCR. أظهرت النتائج وجود حزمة واحدة حادة للـ DNA المعزول من كالس البازلاء المعامل بـ 200 ملي مول من كلوريد الصوديوم، الليزر مع الملح وحامض الفوليك مع الملح تراوح حجمها الجزيئي بين 650 - 700 زوج قاعدي، في حين ظهرت أكثر من حزمة للـ DNA المعزول من كالس معاملة المقارنة، الليزر وحامض الفوليك التي تراوحت حجمها الجزيئية بين 550-800 زوج قاعدي.

Summary

The research included study the effect of sodium chloride (NaCl) salt with concentrations 0,50,100,150,200,250 and 300 mM in seed germination and development of seedlings and callus growth of *Pisum sativum* L. The results showed increasing salt concentration in culture medium led to decrease the percentage of seeds germination and increasing the duration of germination which caused slow germination speed and decreasing in the lengths rate of each radical and coleoptile with their fresh and dry weights. Moreover the activity of α -amylase was decreased during different germination stages at 200 mM of NaCl according to the control. Salinity also caused a decrease in the rate of plant growth (plant height, root length, number of stem, root branches, fresh and dry weights of plant). With increase the solution NaCl in a medium was accompanied with a gradual decrease in total chlorophyll concentration of leaves. The results also indicated the negative effect of salinity in fresh and dry weights, cell membranes and viability of callus which grown on agar-solidified MS (Murashige, Skoog) medium provided with 1.0 mg/l of each BA and NAA. Also salinity caused an increase in the amount of total soluble carbohydrates, level of proline in the leaves and callus tissues at the age of 20 days and 21 days old respectively, while a clear decrease in the total amount of protein in those tissues occur.

The research included study the effect of the red diode laser radiation at wave length 650 nm and power 50 mw/cm² for different periods of time 0, 2,4,6,8 and 10 minutes in the seed germination, growth and development of seedlings and callus of *Pisum sativum* L. plant. The results showed that seeds exposed to laser radiation for different periods of time caused a clear increased in all studied growth parameters as compared with the control treatment. Also which seeds exposed to 10 minutes of laser outperformed on the rest of the treatments in germination speed, rate of the radical and coleoptile lengths and

B

their fresh and dry weights. Moreover to increase in the rate of fresh and dry weight of seedlings. The results showed also that exposing callus explants to the laser radiation for different periods of time caused an increase in the rate of their fresh and dry weights after 21 days of growth on MS medium supplement with 1.0mg/l of BA and NAA for each one. The present study demonstrated the possibility of treating the negative effects of sodium chloride at the concentration 200mM on the growth indicators of seedlings and callus of *Pisum sativum* by pretreatment of seeds and callus with laser radiation for 10 minutes. This led to increase in the percentage and speed of seeds germination, the activity of α -amylase enzyme during different germination stages and increasing in the lengths rate of each of the radical and coleoptile and their fresh and dry weights, increase in plant growth rate (plant height, root length, number of stem and root branches ,fresh and dry weight of plant) with an increase in the leaves content of chlorophyll. The results also indicated a positive effect of laser radiation in fresh and dry weights, decreasing membrane damage in addition to re-viability of callus with an increasing the amount of total soluble carbohydrates ,level of proline and protein content in seedling leaf tissues at the age of 20 days and callus is 21 days old according to salinity treatment.

Soaking *Pisum sativum* L. seeds with 20 μ M folic acid improves seeds germination and reduces the negative effects of salinity. The results of the study recorded an increase in the germination speed of seeds treated with folic acid compared with salt treatment at 200mM. The treatment of seeds with folic acid caused an increase in α -amylase enzyme to 1476 unit/cm³ compared with 1404 unit/cm³ of control at fifth day of germination, also causing the recovery of enzyme activity of seeds treated with salt. Soak the seeds in folic acid solution reduced the toxic effect of sodium chloride 200mM in the rate lengths of each radical and coleoptile and their fresh and dry weights. The addition of folic acid to the cultured media containing NaCl caused an increase in growth parameters of plant (plant height, root length, number of stem and root branches ,fresh and dry weight of plant) as well as an increase in chlorophyll content of leaves compared with the plants grown in media containing NaCl only. The results showed that there was a clear increase in the rate of fresh and dry weight of

C

callus treated with folic acid and reducing the effect of NaCl on those treatments. In addition folic acid reduced the percentage of the cell membrane damage of callus and regained its vitality. The presence of folic acid in growing media containing the salt increased the content of leaves and callus of the protein, soluble sugar and prolein.

Exposed calli to laser radiation for 10 minutes or cultured them on media supplied with 20 μ M of folic acid stimulated the activity of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase and serinehydroxymethyl transferase accompanied them with an increase in DNA, RNA and folic acid contents. Laser and folic acid had a role in overcoming the negative effects of salinity on the activity of the showed positive impacts in enhancing the activity of the above mentioned enzymes.

Micropropagation was performed by using nodale explants of *Pisum sativum* L. Short multiple shoots were produced from stem node explants cultured on MS medium containing 1.0 mg/l of BA and NAA and 20 μ M of folic acid, but when cultivating them on MS medium containing 2.0 mg/l of BA only, they gave long and few vegetative branches after five weeks of growth. The treatment of stem nodes with laser radiation for 10 minutes before cultured or by adding folic acid to MS media, increased the number of vegetative branches compared to control. While salinity had a negative effect on the formation of vegetative branches. Only plantlets formed from stem nodes treated with laser and folic acid and control treatment successfully rooted on half strength MS media supplied with 1.0 mg/l of NAA. Most plantlets were acclimatized successfully when planted in the soil.

The presence of *PsDn1* gene in *Pisum sativum* callus was investigated by using Polymerase chain reaction (PCR) technique. PCR screening shows the presence of one PCR fragment belong to isolated DNA from callus which treated with 200 mM of NaCl ,laser and NaCl and folic acid with NaCl compared with more than one bands found in control, laser and folic acid treatments. DNA bands were diverse in molecular size about 650-700pb for salt treatments and 550-800pb for control, laser and folic acid treatments.

University of Mosul

College of Science



**Assessment of diode laser radiation and folic acid
pretreatments on germination, seedlings and callus
growth of *Pisum sativum* L. plant under salinity
stress**

Eman Taha Yassin Sultan

Ph.D. Thesis
in
Biology/Botany

Supervised by Professor
Dr. Sajida Aziz Abood