ISSN: (3007-0384)
E-ISSN: (3007-0392)
مجلة وهج العلوم للعلوم الصرفة
المجلة متاحة على الرابط
https://uomosul.edu.iq/womeneducation/jwups/

Effects of exposing Strawberry *Fragaria ananassa Duch* callus to ultrasonic waves on biomass, protein content, anthocyanin levels, and vitamin C.

Waad Mahmood AL-Hamdani[a]*, Jamella Hazaa Rasheed[b]

[a,b] College of Education for Pure Sciences, University of Mosul, Mosul, Iraq

***Corresponding author e-mail:** waad.21esp46@student.uomosul.edu.iq

***Keywords*:**
Strawberry, Callus, ultrasonic waves, Anthocyanin, Protin

ARTICLE INFO
Article history:
Received: 2024/5/27
Accepted: 2024/7/30
Available online: 1/1/2025

Email:
journal.purescience.ge@uomosul.edu.iq

ABSTRACT

The current study was able to detect the supportive effects of *Fragaria ananassa* D growing on Murashige & Skoog solid (MS) medium supplemented with the addition of 1.0 mg L^{-1} 6-Benzyladenin(BA) + 4.0 mg L^{-1} 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) exposed to ultrasonic sound waves affected some growth characteristics and chemical and physical properties of callus. These waves were used at a frequency of 47.6 KHz at four times: 10, 20, 30, 40 minutes. Data were taken for two age stages, 15 and 30 days of callus growth, and the levels of anthocyanin pigment, protein content, and vitamin C were estimated. The data confirmed an increase in fresh weight and protein content in all treatments, and the duration of exposure was 40 minutes longer than the rest, as an increase in callus mass, anthocyanin pigment levels, and protein content was achieved, recording 2.30 grams. And 3.60 mg/g and 2.22 mg/g, respectively, at the age of 15 days of exposure. The results indicated a decrease in anthocyanin pigment, reaching 1.50 mg/g, with an increase in protein content to 2.75 mg/g, after 30 days of exposure, while there was a decrease in vitamin C levels compared to samples of unexposed callus for the two age stages, 15-30 days

© 2024JWUPS, College of Education for Girls, University of Mosul.

Alma' rifa Journal of Humanities

تاثيرات تعريض كالس نبات الشليك *Fragaria ananassa Duch* للموجات الصوتية فوق السمعية في الكتلة الحيوية والمحتوى البروتيني ومستويات الانثوسيانين وفيتامين C

وعد محمود جاسم، جميلة هزاع رشيد
كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة الموصل

الخلاصة

تمكنت الدراسة الحالية من الكشف عن الاثار الداعمة لكالس الشليك *Fragaria ananassa* D النامي على وسط (MS) الصلب Murashige & Skoog المدعم بأضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ 6-Benzyladenin(BA) + 4.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) المعرض للموجات الصوتية فوق السمعية على بعض صفات النمو والخصائص الكيميائية والفيزيائية للكالس، وظفت هذه الموجات بتردد 47.6 KHz بواقع أربعة أوقات 10، 20، 30، 40 دقيقة. واخذت البيانات لمرحلتين عمريتين 15، 30 يوما من نمو الكالس وقدرت مستويات صبغة الانثوسيانين والمحتوى

البروتيني وفيتامين C وأكدت البيانات زيادة الوزن الطري والمحتوى البروتيني في كل ألمعاملات وارتقت مدة التعرض 40 دقيقة عن البقية اذ تحققت زيادة في كتلة الكالس ومستويات صبغة الانثوسيانين والمحتوى البروتيني مسجلة 2.30 غم و3.60 ملغم/غم و2.22 ملغم /غم على التوالي في المرحلة العمرية 15 يوم من التعرض. وأشارت النتائج حصول انخفاض في صبغة الانثوسيانين اذ بلغ 1.50 ملغم/غم مع ازدياد المحتوى البروتيني 2.75 ملغم/غم وذلك بعد 30 يوما" من التعرض، بينما حصل انخفاض في مستويات فيتامين C قياسا" بعينات الكالس غير المعرض وللمرحلتين العمريتين 15–30 يوما.

الكلمات المفتاحية: الشليك، الكالس، الموجات الصوتية، الانثوسيانين، بروتين

1- المقدمة

يعد الشليك من الفواكه الواسعة الانتشار ينتمي الى العائلة الوردية Rosaceaeموطنه الأصلي أمريكا واوربا واسيا، الثمار غنية بفيتامين C والمواد الكيميائية النباتية مثل الكالوتانين والايلاجيتانين والانثوسيانين وحمض السالساليك وغيرها من المواد ولها فوائد طبية مختلفة مثل تنظيم وظائف القلب ومضادات الاكسدة ومنظم لضغط الدم ورافع للكولسترول المفيد ومقاوم لسرطان المرىء [1]. ان قصر دورة حياة نبات الشليك ووصوله الى مرحلة الإنتاج خلال مدة زمنية قصيرة وسهولة اكثاره شجعت العديد من الباحثين في مجال زراعة الانسجة النباتية على استعمال هذا النبات لدراسة العوامل المؤثرة في الاكثار الدقيق له وكوسيلة لدراسة الامراض الفايروسية وسبل التخلص منها بزراعة الانسجة [2] وتعد الموجات الصوتية فوق السمعية موجات ميكانيكية تقع خارج مدى السمع لدى الانسان بتـــــردد 20 –200 هيرتز ولا يمكن للاذن البشرية تحسسها [3] واستخدمت بشكل واسع في مجالات عديدة منها دعم مزارع الانسجة النباتية لتأثيراتها الناجحة في تنشيط الانقسامات الخلوية، وتعديل التمثيل الغذائي الخلوي، وزيادة الكتلة الحية من خلال فعالياتها في نقل الكواشف والاشارات الكيميائية بين الجدران الخلوية والاغشية داخل الخلايا ودورها في بناء البروتينات ومسخ الاحماض النووية [4] وتفسر تأثيرات الموجات الصوتية فوق السمعية في الانسجة النباتية الى تكوين تجاويف في الانسجة المعرضة يطلق عليها التجاويف السمعية Acoustic Cavitation وتأثيراتها في نفاذية الخلايا وتحفيــزها نشاط الانزيمات المؤكسدة مثل انزيمات الاوكسـديز والكتاليز والبيروكسديز [5]. وهذا شجع الباحثين لاستخدام الموجات الصوتية فوق السمعية كوسيلة فيزيائية لتحفيز خلايا النبات او الكالس [6,7] وهناك دراسة اكدت تأثير الموجات الصوتية على نمو نباتات االشليك عند تعريضها لتردد 1000 هيرتز أدى الى زيادة انتاج المستقبلات الثانوية كوسيلة دفاعية وكذلك تأثيرها في الاوزان الرطبة وعدد الافرع وعمليات الايـض التي تأثرت بالموجات الصوتية [8].

2- مواد العمل وطرائقه

2-1 انتاج مزارع الكالس

جهزت قطع الأوراق المفصولة من بادرات الشليك المعقمة وزرعت على سطح وسط MS الصلب المدعم بأضافة 1.0 ملغم/لتر BA + 4.0 ملغم/لتر 2,4-D [9]. في قنان زجاجية معقمة سعة 100 مل وسدت باغطيتها وحضنت في غرفة الزرع في ظروف التعاقب الضوئي 8/16 ساعة ضوء/ظلام على التوالي، شدة اضاءة 2500 لوكس، ودرجة حرارة 25±2م° لمدة شهرين لاستخدامها في اختبارات التعريض للموجات الصوتية فوق السمعية.

2-2 تعريض الكالس للصدمة الصوتية فوق السمعية:

اخذ 1.0 غم من كالس الاوراق بعمر شهرين في قنان زجاجية معقمة وضعت العينات في حوض جهاز الموجات فوق السمعية (Barasonic 221, Germany) بوجود الماء[10]. عرضت عينات الكالس للترددKHz 47.6 ولمدة 10، 20، 30، 40 دقيقة مع ثبات درجة الحرارة عند 25±2 م° وعند انتهاء مدة التعريض رفعت العينات بعدئذ زرعت عينات الكالس المعرض على نفس وسط الاستحداث بواقع 3 مكررات فضلا عن عينات المقارنة في ظروف غرفة الزرع المشار اليها سابقا.

2-3 تقدير الاوزان الطرية:

اخذت عينات الكالس المعرض للصدمة الصوتية فوق السمعية وسجلت اوزانها الرطبة بعد 15، 30 يوما من نموها، بأخذ الكالس ووزنه بواسطة ميزان حساس معقم داخل كابينة الزرع المعقمة، وسجلت البيانات قبل ارجاعها الى نفس وسط الاستحداث.

2-4 تقدير المحتوى البروتيني:

قدر محتوى البروتينات الكلية في الكالس المعرض والغير معرض للصدمة باعتماد الطريقة القياسية [11]. طحن غرام واحد من الكالس المعرض وعينة مماثلة من الكالس الغير معرض في هاون خزفي مبرد بصورة مستقلة يحتوي 5.0 مل من ثالث كلوريد حامض الخليك TCA 5%، نبذ الخليط مركزيا عدة مرات بعدها اخذ الراشح واضيف اليه 0.5 مل من كاشف فولن وقيس المحتوى البروتيني بواسطة المطياف الضوئي (UV Spectrophotometer) عند طول موجي 650 نانومتر.

2-5 تقدير مستويات الانثوسيانين:

اخذ غرام واحد من الكالس المعرض والغير معرض بصورة مستقلة واضيف اليه 5.0 مل من محلول الاستخلاص (المتكون من ايثانول 95% وحامض 1.5 N HCL بأحجام 15: 85 على التوالي) ومزج الخليط جيدا ونبذ بوساطة جهاز الطرد المركزي (3 دقائق بسرعة 3000 دورة/دقيقة) اخذ الرائق وقيست صبغة الانثوسيانين بواسطة المطياف الضوئي عند طول موجي 535 نانومتر وطبقت الصيغة الرياضية في ادناه في حساب مستوى الصبغة [12].

$$\text{الانثوسيانين} = \frac{\text{قراءة الجهاز X حجم المحلول الكلي}}{\text{حجم العينة X 98.2}} \times 100$$

2-6 تقدير فيتامين C

قدر محتوى الكالس مـــــن فيتامين C حسب طريقة [13]اخذ غرام واحد من الكالس الرطب واضافة حامض الاكساليك ذات 0.25 مولارتي مع 1 مل من حامض الهيدروكلوريك(HCL) N1 وتم التسحيح عن طريق محلول صبغة Dichlorophenolindophenol 2.6(باذابة 0.21 غم من بيكاربونات الصوديوم ($NaHCO_3$) في 250 مل ماء مقطر) واضافة 0.25 من Dichlorophenolindophenol 2.6.

3- النتائج

3-1 دور صدمة الموجات الصوتية فوق السمعية في الاوزان الرطبة للكالس:

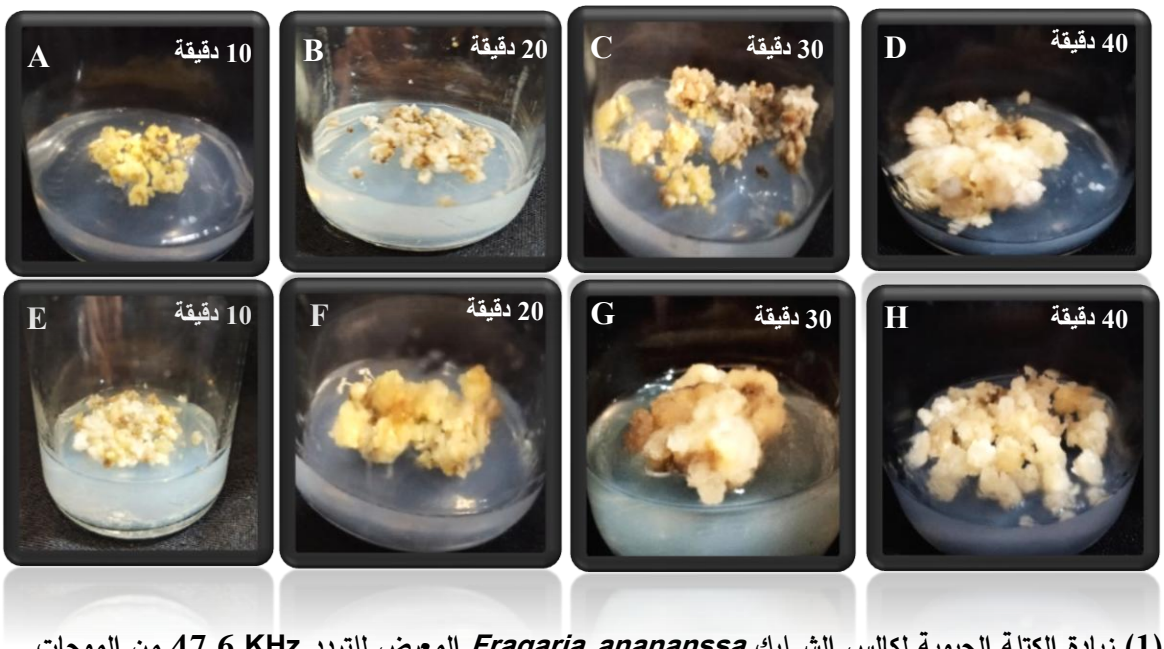
بينت النتائج (الجدول 1) حصول زيادة في الاوزان الطرية للكالس المعرض لصدمة الموجات الصوتية فوق السمعية عند التردد 47.6 KHz مقارنة بعينات المقارنة الغير معرضة النامي على وسط الاستحداث عينه بعد 15 و30 يوما من التعرض لهذه الموجات.

الجدول (1) الزيادة الحاصلة في الاوزان الطرية لكالس الشليك *Fragaria ananassa* المعرض للموجات الصوتية بتردد 47.6 KHz والنامي على الوسط MS الصلب + 0.1 ملغم BA + 4.0 ملغم 2,4-D

	15 يوما	30 يوما
مدة التعرض (دقيقة)	الوزن الطري (غم)	الوزن الطري (غم)
10	1.50	2.10
20	1.65	2.25
30	1.90	2.40
40	2.30	2.75
المقارنة	1.50	2.00

عدد المكررات 3/معاملة

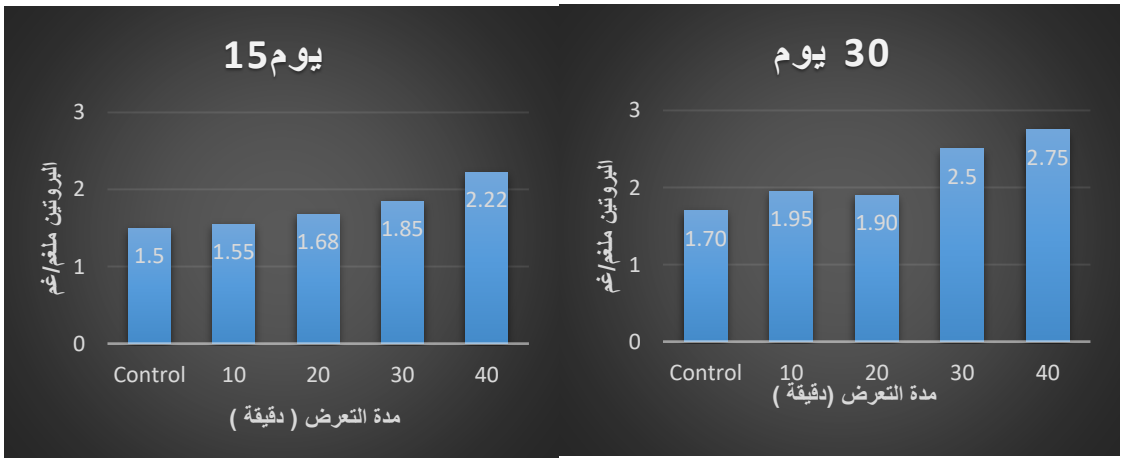
وسجلت اعلى معدلات الاوزان الطرية عند التعريض للصدمة 40 دقيقة عن بقية المعاملات وعن الكالس غير المعامل. وبينت المشاهدات العينية (الشكل1) تغير لون الكالس بعد تعرضه للصدمة الصوتية فوق السمعية من اللون الأصفر الى الأسمر نتيجة تراكم صبغة الانثوسيانين.



الشـكل (1) زيادة الكتلة الحيوية لكالس الشـليك *Fragaria anananssa* المعرض للتردد 47.6 KHz من الموجات الصوتية فوق السمعية (A,B,C,D) بعمر 15 يوما (E,F,G,H) بعمر 30 يوما.

3-2 قياس المحتوى البروتيني:

أظهرت البيانات ان صـدمة الموجات الصـوتية فوق السـمعية حفزت حصـول زيادة واضـحة في المحتوى البروتيني للكالس المعرض للصـدمة قياسـا" بنظيره في عينات المقارنة الغير معرضـة للصـدمة وبينت النتائج (الشـكل2) دور مدة التعريض 40 دقيقة عن بقية المعاملات فقد سـجل المحتوى البروتيني 2.22 ملغم/غرام عند المرحلة العمرية 15 يوما وزيادته بشكل واضح 2.75 ملغم/غم في المرحلة العمرية 30 يوم.

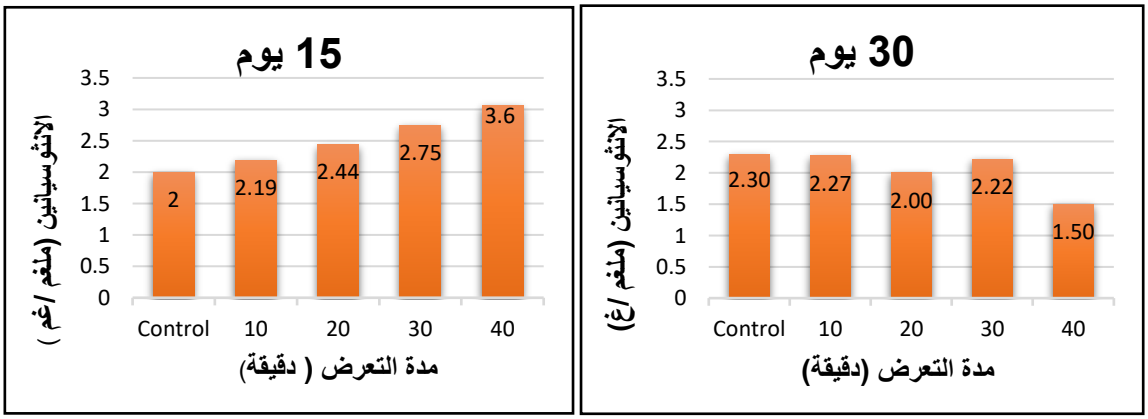


الشـكل (2) تأثير تعرض كالس الشـليك *Fragaria ananassa* لصـدمة الموجات فوق السـمعية بترددKHz 47.6 االنامي على وسط MS الصلب + 0.1 ملغم BA + 4.0 ملغم 2,4-D على المحتوى البروتيني.

ان التباين في دور الموجات الصوتية فوق السمعيه عند تعريض مزارع نسيجية مختلفة يكمن في حيوية الكالس اعتمادا" على مدة التعريض كما في نبات البتونيا [14]، وافضت العديد من الدراسات عن مجموعة من التفسيرات لدورها في دعم الكتلة الحيوية للكالس ومحتواه البروتيني الى احداثها تجاويفا" دقيقة جدا" وتسمى بالتجاويف الصوتيه (Acoustic cavitation) في الاغشية الخلوية البلازمية، وقد يمتد تأثيرها الى اغشية العضيات مانحة الخلايا المعرضة لهذه الصدمة فرصة افضل في استقطاب الاحتياجات الغذائية من الوسط [15]، ومن المحتمل ان يفسر انخفاض معدلات نمو الانسجة المعرضة للصدمة لفترات طويلة الى الضرر الفيزيائي الذي تحدثه ترددات هذه الموجات وقد ينجم عنه تضرر الاغشية الخلوية بشكل لا يمكن اصلاحة [16]. وفسر العديد من الباحثين ان الزيادة في نمو الكالس الى زيادة محتوى الخلية من الاحماض النووية والبروتينات اللازمة للانقسامات الخلوية مما شجع بعض الانشطة الفسيولوجية وانعكاس تأثيرها في زيادة الاوزان الرطبة ومحتويات البروتين [17]، وتناغمت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسات سابقة وظفت صدمة الموجات الصوتية فوق السمعية في تعريض الكالس، وتفسر زيادة الكتلة الحيوية والمحتوى البروتني للكالس المعرض الى امتصاص العناصر الغذائية من الوسط عند زيادة فترات التعرض، وذكرت دراسة أخرى [7] ان الدور الداعم لصدمة الموجات الصوتية فوق السمعية زيادة الكتلة الحيوية والمحتوى البروتيني لكالس الاقحوان عند تعريضة للصدمة 10 دقيقة مع زيادة في تركيز الاحماض النووية RNA و DNA، وأشارت احدى الدراسات [6] الى الدور الداعم للموجات الصوتية فوق السمعية للكتلة الحيوية لكالس الحمص ومحتواه البروتيني عند تعرضها لمدة 40 دقيقة.

3-3 تقدير صبغة الانثوسيانين:

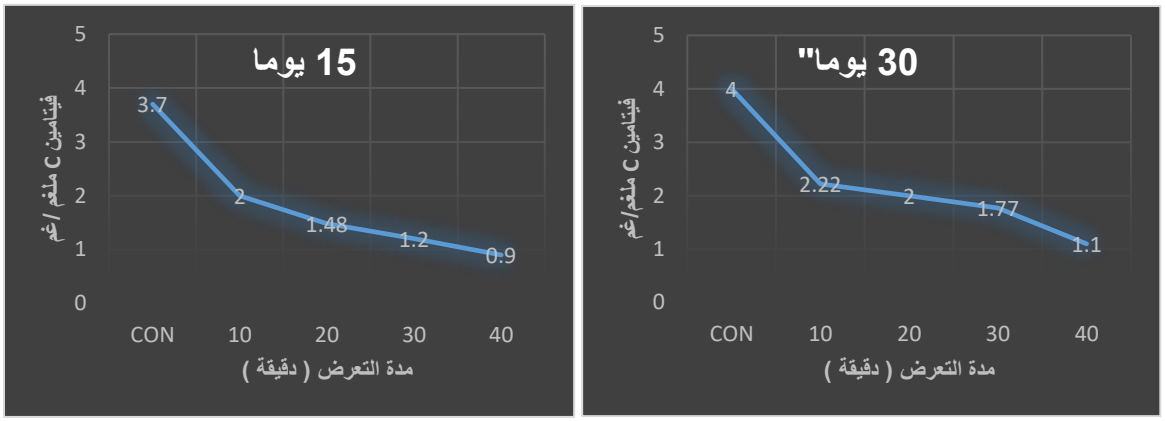
اشارت البيانات (الشكل 3) حصول زيادة في صبغة الانثوسيانين للكالس المعرض للصدمة الصوتية فوق السمعية في جميع المعاملات عند المرحلة العمرية 15 يوما متبوعا" بارتفاعها مع زيادة مدة التعرض الى 40 دقيقة وتسجل تركيز الانثوسيانين 3.60 ملغم/غرام بينما مستواها تدريجيا عند وصولها للمرحلة العمرية 30 يوما مسجلا" 1.50 ملغم/غم في نفس مدة التعرض.



الشكل (3) قياسات مستوى الانثوسيانين في كالس الشليك *Fragaria ananassa* المعرضة للموجات الصوتية فوق السمعية عند التردد 47.6 KHz

3-4 تقدير فيتامين C

اشارت النتائج الواردة (الشكل 4) انخفاضا"ملحوظا" في مستويات فيتامين C في الكالس المعرض للموجات الصوتية فوق السمعية في كافة المعاملات مقارنة بعينات السيطرة الغير معرضة والتي احتفظت بمستويات عالية من فيتامين C.



شكل (4) كمية فيتامين C الكلية في كالس الشليك *Fragaria ananassa* المعرض لمعاملات الموجات الصوتية فوق السمعية بالمرحلة العمرية 15 يوم و30 يوم النامي على وسط MS + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA + 4.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D.

ولوحظ في الدراسة الحالية ارتفاع مستويات الانثوسيانين في الكالس المعرض مسبقا للموجات الصوتية فوق السمعية في الأسبوعين الاولين اذ بلغت 3.06 ملغم/غم وحصول انخفاض تدريجيي في المرحلة العمرية 30 يوما نتيجة شدة الضوء اذ يؤدي الى اتلاف الخلايا الموجودة على سطح الكالس مما تسبب في انخفاض معدل نمو الخلايا وانخفاض بناء الانثوسيانين[18]. وحصول انخفاض في تركيز فيتامين C في الكالس المعرض للصدمة الصوتية في المرحلتين العمرتين 15-30 يوما" والذي يعزى لتراكم أنواع الاوكسجين التفاعلية الذي يؤثر سلبا" على السلامة الخلوية وتحفيز الانزيمات التقويضية في النظام الضوئي [19].

4- الاستنتاجات

من نتائج هذه الدراسة تبين ان الموجات الصوتية فوق السمعية لها تأثير إيجابي على زيادة الاوزان الطرية والمحتوى البروتيني في المرحلتين العمريتين15-30 يوما" وزيادة صبغة الانثوسيانين للكالس المعرض للصدمة بعمر 15 يوما" وانخفاضه تدريجيا" بعد ذلك اما فيتامين C فانخفضت نسبته في الكالس المعرض بكلا المرحليتن العمريتين , مما شجع العلماء على إمكانية استخدام هذه التقنية في التكنولوجية الحيوية النباتية.

5- شكر وتقدير

المؤلف يقدم اسمى كلمات الشكر والعرفان لقسم علوم الحياة كلية التربية للعلوم الصرفة على مساعدتهم لانجاح هذا المشروع. والشكر موصول لمجلة وهج العلوم لمساعدتهم في نشر هذا البحث.

6- المصادر

[1] R. Rapuru, S. Bathula, and l. Kaliappan, "Phytochemical constituents and pharmacological activities of Strawberry," 2022, pp. 320. DOI: 10.5772/intechopen.103973.

[2] P. Boxus, "Rapid production of virus-free strawberry by in vitro culture," *Acta Horticulture*, vol. 66, no. 4, pp. 35–38, 1976. DOI: 10.17660/ActaHortic.1976.66.4.

[3] S. Kentish and H. Feng, "Application of power ultrasound in food processing," *Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 5, pp. 263–284, 2014. DOI: 10.1146/annurev-food-030212-182537.

[4] V. Gaba, K. Kathiravan, S. Mutha, S. Sima, X. Xia, and G. Ananthakrishnan, "The uses of ultrasound in plant tissue culture," *Plant Tissue Culture Engineering*, vol. 6, pp. 417–426, 2008. DOI: 10.1007/978-1-4020-3694-1_22.

[5] W. K. Yeoh and A. Ali, "Ultrasound treatment on phenolic metabolism and antioxidant capacity of fresh-cut pineapple during cold storage," *Food Chemistry*, vol. 206, pp. 247–253, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.07.074.

[6] A. F. AL-Taee and J. H. Rasheed, "Expression of heat shock protein HSP90 in genomic-DNA of Chickpea (Cicer arietinum L.) callus by heat shock treatment," *Academic Journal of Research and Scientific Publishing*, vol. 3, no. 33, pp. 121–139, 2022. DOI: 10.52132/Ajrsp.e.2022.33.6.

[7] I. N. AL-Abasi and M. K. AL-Mallah, "Engineering of high production of salicylic acid in genetically modified tissues of marigold *Calendula officinalis L.* by rol C genes," *Journal of African Biotechnology*. DOI: 10.5897/AJB2022.17494.

[8] H. Ozkurt and O. Altuntas, "Quality parameter level of strawberry fruit in response to different sound waves at 1000 Hz with different dB values (95, 100, 105 dB)," *Agronomy Journal*, vol. 8, pp. 1–13, 2018. DOI: 10.3390/agronomy8070127.

[9] A. M. Noori, "In vitro propagation of strawberry *Fragaria ananassa* Duck," Ph.D. dissertation, College of Agriculture and Forestry, University of Mosul, Iraq, 2021.

[10] H. C. Zhao *et al.*, "Effect of sound stimulation on *Dendranthema morifolium* callus growth," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 29, pp. 143–147, 2003. DOI: 10.1016/S0927-7765(02)00184-4.

[11] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Ranall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, pp. 265–275, 1951. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.

[12] S. H. Ranganna, *Handbook of Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products*. Tata McGraw-Hill Education, 1986.

[13] S. Sadasivam and A. Manickam, *Biochemical Methods*, Revised. New Delhi, India: New Age International Publishers, 2005, pp. 8–9.

[14] V. Bohm, N. L. Putpitasari-Nienaber, M. G. Ferruzzi, and S. J. Schwartz, "Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of alpha-carotene, beta-carotene, lycopene, and zeaxanthin," *Agricultural Journal and Food Chemistry*, vol. 50, pp. 221–226, 2002. DOI: 10.1021/jf010888q.

[15] K. S. Suslick, *Ultrasound: Its Chemical, Physical, and Biological Effects*. New York, NY, USA: VCH Publishers, 1990. DOI: 10.1121/1.398864.

[16] H. T. Liu *et al.*, "Contribution of PIP2-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves," *Journal of Plant Physiology*, vol. 163, pp. 405–416, 2006. DOI: 10.1016/j.jplph.2005.04.027.

[17] M. K. AL-Mallah and S. M. Salih, "Electroporation increased growth of callus, regeneration capability, and protein content of *Solanum nigrum L.* plants," *Rafidain Journal of Science*, vol. 14, pp. 35–42, 2003.

[18] M. Nakamura, Y. Takeuchi, K. Kazuhiko, M. Minora, and S. Shintra, "High anthocyanin accumulation in the dark by strawberry *Fragaria ananassa* callus," *Biotechnology Letters*, vol. 21, pp. 695–699, 1999. DOI: 10.1023/A:1005558325058.

[19] J. Wang, J. Wang, J. Ye, S. K. Vanga, and V. Raghavan, "Influence of high-intensity ultrasound on bioactive compounds of strawberry juice: profiles of ascorbic acid, phenolics, antioxidant activity, and microstructure," *Food Control*, vol. 96, pp. 128–136, 2019. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.09.007.