دور منظمات النمو النباتية في استحثاث الكالس واخلاف نبيتات تركيبين وراثيين من الجت

إبراهيم عبد الله حمزة رنين جواد علي*
أستاذ مساعد باحث
قسم المحاصيل الحقلية – كلية الزراعة – جامعة بغداد
qweenrose98@gmail.com

المستخلص

نفذت تجربة في المختبر المركزي لزراعة الانسجة النباتية – الدراسات العليا – كلية الزراعة – جامعة بغداد للمدة من تموز 2015 إلى تموز 2016 بهدف معرفة تأثير منظمات النمو في استحثاث الكالس من أجنة تركيبين وراثيين للجت (PAC-78001 والمحلي) باستعمال تقانة زراعة الأنسجة النباتية بترتيب التجارب العاملية على وفق التصميم العشوائي الكامل (CRD). عقمت البذور بتركيز 4.5% من محلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl لمدة 15 دقيقة، بعدها زرعت البذور على وسط MS خالي من منظمات النمو لتحفيز الاجنة، عند بداية ظهور الجذير استأصلت الاجنة لكل من التركيبين الوراثيين وزرعت في وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من 2,4-D (0 و1 و2 و3 و4) ملغم لتر$^{-1}$ وزرع الكالس المستحث من الأجنة في وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من .Kin (0 و0.25 و0.50 و0.75 و1) ملغم لتر$^{-1}$ لتحديد التركيز الأفضل منه. بعدها نقل الكالس إلى وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من BA (0 و1 و2 و3 و4) ملغم لتر$^{-1}$ لغرض تشجيع اخلاف النبيتات من الكالس. اظهرت النتائج أن أفضل تركيز من 2,4-D و.Kin 2 ملغم لتر$^{-1}$ و0.5 ملغم لتر$^{-1}$ بالتتابع اللذان اعطيا أعلى متوسط وزن طري وجاف للكالس المستحث بلغا 204.65 و21.50 ملغم لتر$^{-1}$ بالتتابع، واعطى التركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ من BA أعلى متوسط لاخلاف النبيتات من الكالس بلغ 5.5 نمو خضري أنبوبة$^{-1}$.

الكلمات المفتاحية: منظمات النمو النباتية، الوزن الطري والجاف للكالس، اخلاف النبيتات

***البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.**

ROLE OF PLANT GROWTH REGULATORS IN CALLUS INITIATION AND PLANTLETS REPRODUCING OF TWO ALFALFA CULTIVARS

I. A. Hamza R. J. Ali*
Assist. Prof. Researcher
Dept. of Field Crops – Coll. of Agric. Univ. of Baghdad
qweenrose98@gmail.com

ABSTRACT

An experiment was conducted at the central lab of Graduate studies - College of Agriculture, University of Baghdad during 2015-2016. The objective was to study the effect of growth regulator on inducing callus from embryos of two alfalfa cultivars (PAC-78001 and local) variety by tissue culture technique using factorial experiments according to CRD. Seeds sterilized by NaOCl at 4.5% for 15 minutes, then, cultured on MS media free of growth regulators to embryo induced. The embryos were cultured on MS media at different concentrations of 2,4-D (0, 1, 2, 3 and 4) mg Li^{-1}. Induced callus from embryos was cultured on MS media supplementing with Kin. at 0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1 mg Li^{-1} to determine the best concentration. The results showed that best concentration of 2,4-D and Kin were 2 and 0.5 mg L^{-1} respectively which gave highest callus fresh weight and callus dry weight (204.65 and 21.50) mg Li^{-1}, respectively. BA at 2 mg Li^{-1} gave the highest plantlets reproducing from callus amounted 5.5 vegetative growth tube^{-1}.

Key words: PGRs, callus fresh and dry weight, plantlets reproducing

***Part of M.Sc. thesis of the second author.**

المقدمة

تعد منظمات النمو النباتية مركبات عضوية فعالة تبنى طبيعيا في النبات أو تصنع تجاريا ، وتستعمل بكميات قليلة لتسبب تغيرا في نمو النبات وتطوره عندما تضاف في مراحل معينة من نمو النبات ، وهي أما تكون محفزات أو مثبطات نمو (19) ، ولعل أكثر منظمات النمو استعمالا في زراعة الأنسجة النباتية الأوكسينات والسايتوكاينينات، فالأوكسينات عبارة عن حوامض عضوية ضعيفة ذات حلقة أندولية غير مشبعة ولها دورا مؤثرا في العمليات الحيوية داخل النباتات بتراكيز قليلة جدا (9) ، إذ تؤثر في تحفيز استطالة الأنسجة والأعضاء النباتية، فضلا عن دورها في تحفيز الانقسام الخلوي ولاسيما الأنسجة المرستيمية وخلال نشوء الكالس وفي التمايز. أما السايتوكاينينات فهي عبارة عن قواعد نتروجينية ذات أوزان جزيئية عالية تعطي بالتراكيز الواطئة عددا من التأثيرات الفسيولوجية، إذ أنها تشجع الخلايا النباتية وتمايزها ونمو البراعم الأبطية (4) ، فضلا عن دورها في العمليات الفسيولوجية والأيضية والكيموحيوية مثل الدورة الخلوية والتشكل الظاهري والانقسام الخلوي وتأخير شيخوخة الورقة وتحفيز حركة المغذيات وتشجع اكتمال تكوين البلاستيدات الخضراء (25) . اشار Noaman و Ahmad (18) إلى أن استخدام 2,4-D بتركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ في استحثاث الكالس من أوراق الجت بعمر 3 أسابيع والمزروعة في وسط MS المحور والمجهز بفيتامينات B_5 في ظروف تحضين 16 ساعة اضاءة و8 ظلام لمدة 15 يوما اعطت أعلى متوسط للكالس المستحث ، ولاحظ El-Fiki وآخرون (6) أن زراعة الأوراق الفتية تفوقت عل قطع الساق بأعلى متوسط للكالس المستحث بعد ثمانية أسابيع من الزراعة لثلاثة أصناف من الجت المزروعة في وسط MS المجهز بالتراكيز 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ من NAA و1.5 ملغم لتر$^{-1}$ من BA والمحضنة في درجة حرارة 25 م و16 ساعة اضاءة و8 ظلام ، وبين Lila و Ali (15) أن تركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D و NAA و Kin. مع 1 غم لتر$^{-1}$ من خميرة الخبز قد حفز تكوين الكالس من قطع ساق الجت بعد 4–6 أسابيع من تحضينها في درجة حرارة 25 م ، واشار Petolescu وآخرون (20) إلى أن استخدام التركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ من Kin. مع فيتامينات B_5 أعطت أفضل النتائج لاستحثاث الكالس من الأوراق الفلقية والجذور والساق لبادرة الجت . نفذ هذا البحث بهدف معرفة تأثير منظمات النمو في استحثاث الكالس واخلاف النبيتات من أجنة تركيبين وراثيين من الجت باستخدام تقانة زراعة الأنسجة النباتية .

المواد وطرائق العمل

نفذت تجربة عاملية على وفق التصميم العشوائي الكامل في مختبر زراعة الأنسجة النباتية – الدراسات العليا – كلية الزراعة – جامعة بغداد للمدة من بداية شهر تموز 2015 حتى شهر تموز 2016 بهدف معرفة تأثير تراكيز مختلفة من 2,4-D والكاينتين لاستحثاث تركيبين وراثيين من الجت واخلاف النباتات . غسلت بذور التركيبين الوراثيين للجت (المحلي و PAC-78001) بماء الاسالة الجاري لمدة 5 دقائق قبل البدء بالزراعة لغرض التخلص من الشوائب والأتربة العالقة بها ، بعدها نقلت البذور إلى منضدة الزراعة (Limener ari flow cabeant منضدة انسياب الهواء الطبقي) لاجراء عملية التعقيم السطحي للبذور باستعمال محلول القاصر التجاري هايبوكلورات الصوديوم NaOCl بالتركيز 4.5% واضافة قطرتين من المادة الناشرة Tween 20 مع الرج المستمر لمدة 15 دقيقة (10) ، بعدها غسلت البذور المعُقمة بالماء المقطر المُعقم ثلاث مرات لازالة المتبقي من المادة المعقمة، وسُجلت نسبة التلوث بعد أسبوع من الزراعة، بعد ذلك زرعت البذور في وسط MS الخالي من منظمات النمو الجاهز من شركة High media بوزن 4.33 غم لتر$^{-1}$ في مراحل الزراعة جميعها والمُجهز بـ 30 غم لتر$^{-1}$ سكروز (17) ، واكمل الحجم إلى 800 مل وعُدل الاس الهيدروجيني pH إلى 5.70 باستعمال هيدروكسيد الصوديوم NaOH أو حامض الهيدروكلوريك HCl واحد عياري واكمل الحجم إلى 1000 مل واضيف 7 غم لتر$^{-1}$ من Agar، وعُقم الوسط في جهاز التعقيم البخاري (المؤصدة) (Autoclave) بدرجة 121 م وضغط 1.04 كغم سم$^{-2}$ ولمدة 15 دقيقة لغرض تحفيز نمو الأجنة . استئصلت الأجنة النامية لبذور الجت بمجرد ملاحظة ظهور الجذير بعد 48 ساعة بأجراء عملية الضغط الخفيف على البذرة من جهة الجنين باستعمال شفرات جراحية ، وزرع الجنين بشكل مقلوب على وسط MS المجهز بتراكيز 1 و2 و3 و4 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D لغرض تشجيع الأجنة على استحثاث الكالس ،

وكان أفضل تركيز من 2,4-D في هذه التجربة هو 2 ملغم لتر$^{-1}$ ، بعدها حضر وسط حاوي على تراكيز مختلفة من Kin. (0 و0.25 و0.50 و0.75 و1) ملغم لتر$^{-1}$ وكان أفضل تركيز للكاينتين في هذه التجربة هو 0.50 ملغم لتر$^{-1}$ بهدف الوصول إلى أفضل توازن من الاوكسينات والسايتوكاينينات التي تعمل على استحثاث الكالس (الجدول 1) ، وحضنت في ظلام تام وعلى درجة حرارة 25 مْ ± 2 بعد 4 أسابيع وسجل الوزن الطري والجاف للكالس بمتوسط عشرة تكرارات لكل معاملة وتركيب وراثي من الجت .

جدول 1. مكونات الوسط الغذائي MS لاستحثاث الكالس من أجنة بذور الجت

المادة	التركيز (ملغم لتر$^{-1}$)
MS	4330
Myo-inositol	100
2,4-D	(1 ، 2 ، 3 ، 4)
Kin.	(0 ، 0.25 ، 0.50 ، 0.75، 1)
Thiamine-HCl	0.4
Glycine	2
Nicotinc acid	2
Pyrodoxine – HCl	0.5
Sucrose	30000
Agar	7000

زرع الكالس باستخدام تراكيز مختلفة من BA (0 و1 و2 و3 و4) ملغم لتر$^{-1}$ وذلك لتحديد أفضل تركيز من BA للاخلاف (الجدول 2) ، وحضنت الزروعات على اضاءة 16 ساعة و8 ظلام لمدة ستة أسابيع وسجل عدد النموات الخضرية المحفزة بواقع عشرة تكرارات لكل تركيز وتركيب وراثي .

جدول 2. مكونات الوسط الغذائي المستعمل في اخلاف النبتات من الكالس

المادة	التركيز (ملغم لتر$^{-1}$)
MS	4330
Sucrose	30000
Myo-inositol	100
BA	(0 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4)
مجموعة فيتامينات MS	0.5
Thiamine-HCl	0.1
NAA	1
GA_3	0.5
Casaen hadrolest	150
Agar	7000

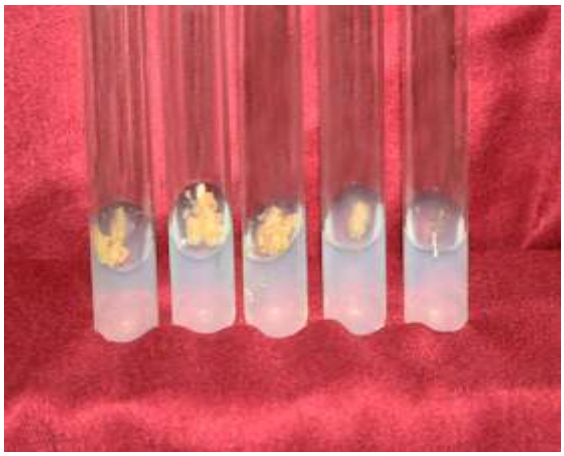
قياس الوزنين الطري والجاف

استعمل الميزان الألكتروني الحساس في تحديد الوزن الطري، إذ استخرج الكالس من القناني المزروعة فيها ووضعت على ورق الترشيح وازيلت بقايا الوسط الغذائي باستعمال شفرة جراحية وحسب الوزن الطري للكالس ، وجففت النموات في الفرن الكهربائي على درجة حرارة 70 مْ لمدة 48 ساعة ولحين ثبات الوزن لتحديد الوزن الجاف (1) . حللت النتائج باستخدام البرنامج الاحصائي Genestate، وقورنت المتوسطات بحسب اختبار أقل فرق معنوي (LSD) وعلى مستوى احتمال 0.05 (7) .

النتائج والمناقشة

تأثير تراكيز 2,4-D والتراكيب الوراثية في الوزن الطري للكالس المستحث من أجنة الجت في وسط MS المضاف إليه 0.5 ملغم .Kin لتر$^{-1}$ بعد خمسة أسابيع من الزراعة

يلاحظ من الشكل 1 تأثير تراكيز 2,4-D (0 و1 و2 و3 و4) ملغم لتر$^{-1}$ من اليمين إلى اليسار بالتتابع في وزن الكالس الطري للتركيب الوراثي PAC-78001 بعد خمسة أسابيع من الزراعة في وسط MS.



شكل 1. تأثير تراكيز 2,4-D من اليمين إلى اليسار (0 و1 و2 و3 و4) ملغم لتر$^{-1}$ في وزن الكالس الطري للتركيب الوراثي PAC-78001 بعد خمسة أسابيع من الزراعة

يظهر من نتائج الجدول 3 أن 2,4-D المضاف إلى الوسط الغذائي كان له تأثير معنوي في استحثاث الكالس من أجنة التركيبين الوراثيين للجت ، وتفوقت أجنة التركيب الوراثي PAC-78001 بأعلى متوسط استحثاث للكالس 99.32 ملغم واقله تحقق في التراكيب الوراثي المحلي 80.38 ملغم. كما تبين النتائج أن الوسط الغذائي MS الخالي من الأوكسين لم يحفز الأجنة المزروعة لاستحثاث الكالس ، في حين اظهرت استجابة لاستحثاث الكالس في الاوساط الغذائية المجهزة بالمنظم 2,4-D وتفوق الوسط الغذائي المجهز بتركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D معنوياً في استحثاث الكالس بلغ 155.35 ملغم واختلف معنوياً عن المعاملات

الأخرى جميعها، وأقله تحقق في الوسط الغذائي المجهز بتركيز 4 ملغم من 2,4-D بلغ 92.20 ملغم واختلف عن المعاملات الأخرى جميعها. إن سبب انخفاض وزن الكالس المستحث يعزى إلى تأثير التراكيز العالية من الأوكسينات إذ تحدث تثبيط في نمو الخلايا (3) . يوضح الجدول 3 وجود تداخل معنوي بين عاملي الدراسة وهذا دليل على اختلاف استجابة التركيبين الوراثيين بتغير تراكيز 2,4-D ، إذ تفوق التركيب الوراثي PAC-78001 المزروع في الوسط الغذائي المجهز بتركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ معنوياً واعطى أعلى متوسط لاستحثاث الكالس 175.40 ملغم في حين أن أقل متوسط لاستحثاث الكالس تحقق في التركيب الوراثي PAC-78001 المزروع في الوسط الغذائي المجهز بتركيز 1 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D، ولم تعط معاملة المقارنة للتركيبين الوراثيين للجت أي وزن للكالس. إن سبب عدم استجابة الأجنة لاستحثاث الكالس في الوسط الخالي من الأوكسين قد يعزى إلى دور الأوكسين في تحفيز الخلايا على الانقسام وتكوين الكالس (8) .

تأثير تراكيز 2,4-D والتراكيب الوراثية في الوزن الجاف للكالس المستحث من أجنة الجت في وسط MS المضاف إليه 0.5 ملغم .Kin لتر$^{-1}$ بعد خمسة أسابيع من الزراعة

تشير نتائج الجدول 4 إلى تفوق أجنة التراكيب الوراثي PAC-78001 معنوياً بأعلى متوسط وزن جاف للكالس بلغ 10.28 ملغم مقارنة بالتراكيب الوراثي المحلي الذي حقق 8.52 ملغم . كما توضح النتائج في الجدول نفسه تفوق 2,4-D عند التركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ معنويا بأعلى متوسط وزن جاف للكالس بلغ 15.65 ملغم وأقله كان عند التركيز 4 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D بلغ 9.95 ملغم ولم تحقق معاملة المقارنة أي وزن جاف يذكر للكالس . أما بالنسبة للتداخل بين تراكيز 2,4-D والتراكيب الوراثية كان معنويا وهذا دليل على اختلاف استجابة التركيبين الوراثيين بتغير تراكيز 2,4-D ، فقد تفوق التركيب الوراثي PAC-78001 المزروع في الوسط الغذائي MS المجهز بالتركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D بلغ 16.80 ملغم والذي اختلف معنوياً عن بقية التداخلات الأخرى باستثناء التركيز 3 ملغم لتر$^{-1}$ للتركيب الوراثي نفسه في حين كان أقل متوسط وزن جاف للكالس في التركيب PAC-78001 المزروع في الوسط الغذائي MS المجهز بالتركيز 1 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D إذ بلغ 7.30 ملغم واختلف معنويا عن التداخلات الأخرى جميعها .

تأثير تراكيز .Kin والتراكيب الوراثية في الوزن الطري للكالس المستحث في أجنة الجت في الوسط الغذائي MS المضاف إليه 2 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D بعد خمسة أسابيع من الزراعة

تبين نتائج الجدول 5 أن أعلى متوسط للوزن الطري للكالس المستحث من أجنة الجت كان للتركيب الوراثي PAC-78001 الذي اعطى 142.04 ملغم واختلف معنوياً عن التركيب الوراثي المحلي الذي اعطى 132.58 ملغم وزن طري للكالس. كما تشير النتائج إلى تفوق التركيز 0.50 ملغم لتر$^{-1}$ من .Kin معنويا بأعلى متوسط وزن طري للكالس 204.65 ملغم واقلهُ تحقق في معاملة المقارنة التي اعطت 42.85 ملغم. أما التداخل بين التراكيب الوراثية للجت وتراكيز الكاينتين فيوضح الجدول 5 وجود تداخل معنوي في هذه الصفة وهذا دليل على اختلاف استجابة التركيبين الوراثيين بتغير تراكيز 2,4-D ، فقد تفوقت أجنة التركيب الوراثي PAC-78001 المزروع في الوسط الغذائي MS المجهز بالتركيز 0.50 ملغم لتر$^{-1}$ من .Kin بإعطائه أعلى متوسط وزن طري للكالس بلغ 219.40 ملغم والذي اختلف معنويا عن بقية التداخلات وأقله تحقق في التركيب الوراثي المحلي المزروع في الوسط الخالي من .Kin وبلغ 34.50 ملغم.

تأثير تراكيز .Kin والتراكيب الوراثية في الوزن الجاف للكالس المستحث في أجنة الجت في الوسط الغذائي MS المضاف إليه 2 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D بعد خمسة أسابيع من الزراعة

تشير نتائج الجدول 6 إلى تفوق التركيب الوراثي PAC-78001 معنوياً في متوسط الوزن الجاف للكالس المستحث من الأجنة وبلغ 14.68 ملغم مقارنة بالتركيب الوراثي المحلي الذي اعطى أقل متوسط وزن جاف للكالس بلغ 13.92 ملغم. كما يلاحظ من نتائج الجدول نفسه أن لتراكيز .Kin تأثيراً معنوياً في متوسط الوزن الجاف للكالس، إذ اعطى التركيز 0.50 ملغم .Kin لتر$^{-1}$ اعلى متوسط وزن جاف للكالس بلغ 21.50 ملغم واختلف معنوياً عن بقية المعاملات في حين حققت معاملة المقارنة أقل وزن جاف للكالس بلغ 4.95 ملغم

واختلفت معنويا عن المعاملات الاخرى جميعها . أما عن تأثير التداخل الثنائي بين تراكيز .Kin والتراكيب الوراثية فقد اعطت أجنة التركيب الوراثي PAC-78001 المزروع في الوسط الغذائي المجهز بتركيز 0.50 ملغم لتر$^{-1}$ من .Kin أعلى متوسط وزن جاف للكالس بلغ 23.30 ملغم لتر$^{-1}$ واختلف معنوياً عن بقية التداخلات بينما كان اقله في معاملة المقارنة للتركيب الوراثي المحلي الذي اعطى 4.30 ملغم كالس جاف واختلفت معنويا عن بقية المعاملات .

الجدول 3. تأثير تراكيز 2,4-D في الوزن الطري للكالس (ملغم) المستحث من أجنة بذور تركيبين وراثيين من الجت بعد خمسة أسابيع من الزراعة في وسط MS المجهز بتركيز 0.5 ملغم .Kin لتر$^{-1}$

التركيب الوراثي	تراكيز 2,4-D (ملغم لتر$^{-1}$)					المتوسط
	0	1	2	3	4	
PAC-78001	0.0	60.00	175.40	163.70	97.50	99.32
المحلي	0.0	84.40	135.30	95.30	86.90	80.38
$LSD_{0.05}$			3.12			1.39
المتوسط	0.0	72.20	155.35	129.50	92.20	
$LSD_{0.05}$			2.21			

الجدول 4. تأثير تراكيز 2,4-D في الوزن الجاف للكالس المستحث من أجنة بذور تركيبين وراثيين من الجت بعد خمسة أسابيع من الزراعة في وسط MS المجهز بتركيز 0.5 ملغم .Kin لتر$^{-1}$

التركيب الوراثي	تراكيز 2,4-D (ملغم لتر$^{-1}$)					المتوسط
	0	1	2	3	4	
PAC-78001	0.0	7.30	16.80	16.70	10.60	10.28
المحلي	0.0	8.80	14.50	10.0	9.30	8.52
$LSD_{0.05}$			0.46			0.21
المتوسط	0.0	8.05	15.65	13.35	9.95	
$LSD_{0.05}$			0.33			

جدول 5. تأثير تراكيز .Kin المختلفة في الوزن الطري للكالس (ملغم) المستحث من أجنة بذور تركيبين وراثيين من الجت المزروع في وسط MS المجهز بتركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D بعد خمسة أسابيع من الزراعة

التركيب الوراثي	تراكيز .Kin (ملغم لتر$^{-1}$)					المتوسط
	0	0.25	0.50	0.75	1.0	
PAC-78001	51.20	168.70	219.40	183.70	87.20	142.04
المحلي	34.50	143.80	189.90	174.40	120.30	132.58
$LSD_{0.05}$			4.48			2.00
المتوسط	42.85	156.25	204.65	179.05	103.75	
$LSD_{0.05}$			3.17			

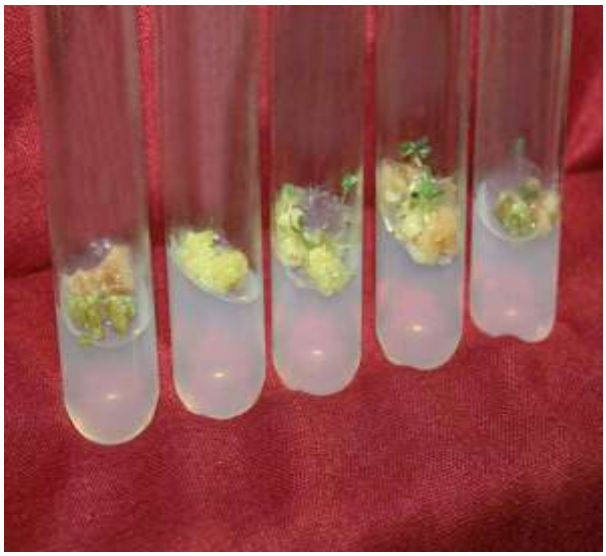
جدول 6. تأثير تراكيز .Kin المختلفة في الوزن الجاف للكالس (ملغم) المستحث من أجنة بذور تركيبين وراثيين من الجت المزروع في وسط MS المجهز بتركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D بعد خمسة أسابيع من الزراعة

التركيب الوراثي	تراكيز .Kin (ملغم لتر$^{-1}$)					المتوسط
	0	0.25	0.50	0.75	1.0	
PAC-78001	5.60	17.40	23.30	17.80	9.30	14.68
المحلي	4.30	15.10	19.70	17.90	12.60	13.92
$LSD_{0.05}$			0.76			0.34
المتوسط	4.95	16.25	21.50	17.85	10.95	
$LSD_{0.05}$			0.53			

يعد 2,4-D من أكثر الأوكسينات فعالية في تحفيز استحثاث الكالس من الأجزاء النباتية يليه NAA ، كما يعتقد أن لمُنظم النمو 2,4-D تأثيرا تحفيزيا لاستحثاث الكالس بسبب زيادة في حجم الكالس تصاحبها زيادة عدد الخلايا (انقسام الخلايا) وكذلك زيادة توسع الخلايا المصاحبة لزيادة المحتوى المائي الذي له علاقة بزيادة حجم الخلية واستطالتها (9) ، وقد يعود السبب في الزيادة الحاصلة في متوسط الوزن الطري والجاف إلى تأثير منظمات النمو المضافة وبوجود مستوى ثابت من السايتوكاينين في تشجيع الخلايا على الانقسام والاتساع عند التوازن الملائم لمنظمات النمو (12 و16) . إن استجابة الأجنة المزروعة لاستحثاث الكالس تعتمد بصورة عامة على المستوى الداخلي لمنظمات النمو وكمية امتصاصها للوصول إلى توازن مناسب لتكوين الكالس ونموه، وتعد الأجنة ذات قدرة عالية على تكوين الكالس ومصدراً جيداً في زراعة الأنسجة النباتية. إن الكالس يتكون عادة من انقسامات عديدة للخلايا تنقسم بدورها محورياً ومحيطياً لتغير من قطبية الخلية (فقدان التمايز) لقسم منها ، ويمكن أن تستمر بالانقسام والتوسع مكونة نسيج الكالس ، وأن الزيادة في الوزن الطري والجاف للكالس هي انعكاس للتغيرات في المحتويات المختلفة لخلاياه معتمدة على نموه في الوسط الغذائي المستعمل والذي يعتمد بالأساس على منظمات النمو المضافة ، إذ يرافق عملية انقسام خلايا الكالس زيادة في المحتويات المهمة لادامة الانقسام والنمو مثل الكربوهيدرات والبروتينات والأحماض الأمينية مع تغيرات داخلية تؤدي إلى انقسام الخلايا ثم تخصصها (13) ، وتعطي ظاهرة تكوين الكالس المحفز بوساطة منظمات النمو دليلاً قوياً على عملية تخصص الخلايا النباتية وعدم فقدان طاقتها الكامنة Cell Pectentialities (21) . اشار عدد من الباحثين إلى أهمية التحضين في الظلام (2 و14) وهذا يعود إلى دور الظلام في منع أكسدة بعض المركبات التي تتأثر بالضوء مثل الأوكسينات ، إذ يعمل الضوء على تثبيط أنزيم IAA-Oxidase ، كما أن التحضين في الظلام ربما يؤدي إلى تثبيط أكسدة المواد الفينولية بوساطة أنزيمات الأكسدة التي يحفزها الضوء ، كما يعتقد أن تحضين الأجزاء النباتية في الظلام يؤدي إلى رقة الجدران الخلوية وقلة سمكها مما يؤدي إلى زيادة نفاذ المواد ولاسيما منظمات النمو إلى داخل الأنسجة من ثم زيادة الاستجابة لاستحثاث الكالس (24) . على ضوء النتائج المتحصل عليها يظهر أن التراكيب الوراثية اختلفت معنويا في قابليتها على تكوين الكالس وقد يفسر ذلك اختلاف محتواها من الهرمونات الطبيعية فضلا عن الاختلافات الوراثية، إذ أن استجابة النسيج المزروع قد تكون تحت سيطرة عدد من الجينات (11) . كذلك اظهرت التوليفة المتكونة من 2 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D و0.50 ملغم لتر$^{-1}$ من .Kin كفاءتها في استحثاث الكالس ، وقد يعود ذلك إلى تأثيرها في تشجيع الخلايا على الانقسام والاتساع (23) ، إذ يعد تنظيم الأوكسين وموازنة السايتوكاينين عاملا مساعدا في السيطرة على الانقسام وتكوين الأعضاء في زراعة الأنسجة ، وهذا يتفق مع ما توصل إليه باحثين آخرين (15 و18 و20) في الجت .

اخلاف النبيتات من الكالس المزروع على تراكيز مختلفة من BA

يبين الشكل 2 تأثير تراكيز BA (0 و1 و2 و3 و4) ملغم لتر$^{-1}$ من اليمين إلى اليسار بالتتابع في أعداد النبيتات المتمايزة من كالس التركيب الوراثي PAC-78001 بعد 8 أسابيع من الزراعة في وسط MS . تظهر نتائج الجدول 7 عدم وجود فروقا معنوية بين كالس التركيبين الوراثيين في عدد النبيتات المتمايزة .



شكل 2. تأثير تراكيز BA من اليمين إلى اليسار (0 و1 و2 و3 و4) ملغم لتر$^{-1}$ في أعداد النبيتات المتمايزة من كالس التركيب الوراثي PAC-78001 بعد ثمانية أسابيع من الزراعة في وسط MS

جدول 7. تأثير تراكيز BA في أعداد النبيتات المتمايزة من كالس التركيبين الوراثيين للجت غير المعاملة بمستخلص ثمار الحنظل

التركيب الوراثي	تراكيز BA (ملغم لتر$^{-1}$)					المتوسط
	0	0.25	0.50	0.75	1.0	
PAC-78001	1.0	4.0	6.0	0.0	0.0	2.2
المحلي	0.0	3.0	5.0	0.0	0.0	1.6
LSD $_{0.05}$			3.0			غ.م
المتوسط	0.5	3.5	5.5	0.0	0.0	
LSD $_{0.05}$			1.9			

تبين نتائج الجدول 7 التفوق المعنوي للتركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ من BA بأعلى متوسط للنبيتات المتمايزة بلغ 5.5 نمو خضري واختلف معنويا عن المعاملات الأخرى ولاسيما التركيزين 3 و4 ملغم لتر$^{-1}$ من BA اللذان لم يعطيا أي نبيتات متمايزة تذكر، وقد يعود السبب إلى أن التراكيز العالية من السايتوكاينين تثبط تمايز النبيتات (22) . أما عن تأثير التداخل بين التراكيب الوراثية للجت وتراكيز BA فقد تفوق كالس التركيب الوراثي PAC-78001 المزروع في الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ من BA بأعلى متوسط بلغ 6.0 نمو خضري قياسا بالتراكيز العالية من BA في كلا التركيبين الوراثيين والتركيب الوراثي المحلي عند معاملة المقارنة التي لم تعطِ أي نبيتات متمايزة تذكر ، وقد يعزى ذلك إلى أن التراكيز العالية من BA قد تؤدي إلى تثبيط نمو الخلايا وربما توقفها عن الانقسام والاتساع (5) .

REFERENCES

1. Al-Sahaf, F. H. 1989. Plant Nutrition Application. Dar Al-Kutob Publ., Mosul Univ. Ministry of Higher Edu., and Scientific Res, Iraq.
2. Altaf, N.; S. Abdul Rehman; I. A. Bhattil and L. Ali 2009. Tissue culture of citrus cultivars. Ejeafche. 8(1): 43-51 .
3. Attia, H. G. and K. A. Jadoo. 1999. Practical and Theoretical Phyto-Growth Regulaters. Scientific Research and High Education. Baghdad, Iraq. p.11-20.
4. Delloloio, R. 2007.Cytokininus determine (Arabidopsis) root-meristem size by controlling cell differentiation. Curr. Biol.17: 678-682.
5. Develin, R. and F. Wethum. 1998. Plant Physiology. Translated. M. M. Sharaqi, A. Khuder, A. S. Salma and N. Kamel. Al-Dar Al-Arabiya, Publ. Edn 2. p. 641-673.
6. El-Fiki, A. A.; A. I. H. Sayed and A. A. M. Abdel-Hameed. 2005. Combined effect of gamma radiation and mannitol on callus formation and regeneration in alfalfa (Medicago sativa L.). Intl. J. Agric., Biol. 7(6): 966-972.
7. Elsahookie, M. M. and K. M. Wuhaib. 1990. Experiment Design and Analysis Application. Coll. of Agric., Univ. of Baghdad, Ministry of Higher Edu. and Scientific Res.
8. George, E. F. 1996. Plant Propagation by Tissue Gulture Part 2. 2nd Edn. p. 543-1333.
9. George, E. F.; M. A. Hall and G. J. De Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. I. The Background. 3rd Edn. Publ. Springer, Dordercht. The Netherlands. p. 118-182.
10. Harten, A. M.; C. J. J. M. Raemakers; E. Jacobsen and G. Y. P. Kiu. 2004. Direct organogenesis and somatic embryogenesis in mature cotyledon explant of winged bean (*Psophocarpus tetagonoiobus* L.) DCI using cytokinine-based media. Plant Genetic Resources. News Letter Issue. 131: 63-69.
11. Jia, H.; J. Yu; D. Yi; Y. Cheng; W. Xu; L. Zhang and Z. Ma. 2009. Chromosomal intervals responsible for tissue culture response of wheat immature embryos. Plant Cell Tissue Organ. Cult. 97: 159-165 .
12. Kamruzzaman, M.; A. Akther; M. O. Faruq; A. Pervin; S. Myti and S. H. Prodhan. 2015. Establishment of an efficient callus induction method from leaf and stem in Kinnow mandarin and citron (citus reticulate Balanco) (Citus medica L.). 14(5): 1290-1296.
13. Kasprzyk-Pawelec, A.; J. pietrusiewicz; E. Szczuk and M. Curie-Sklodowska. 2015. In vitro regeneration cv. Primofiore. Univ. in Lublin Acta. Sci. Pol. Hortorum Cuhure. 14(4): 143-153.
14. Kazmi, S. K.; S. Khan; M. Kabir; A. A. Mirbahar; A. Raziq and N. Kauser. 2015. Embryogenic callus induction somatic

embryogenesis, regeneration and histological studies of Kinnow mandarin (citrus reticulate L.). J. Bot. 47(1): 305-310.
15. Lila, A. and A. Ali. 2006. The effects of ascorbic acid on salf induced alfalfa (*Medicago sativa* L.) in vitro culture . Blokemistri. 18(2): 63-69.
16. Mohamed, S. A.; A. Gomaa and N. Danial. 2014. In vitro regeneration and somatic embryogenesis in citrus. Plant Tissue Cult., Biotech. 24(2): 247-262.
17. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Planta. 15: 473-497.
18. Noaman, M. M. and E. Ahmad. 2004. Development of alfalfa tolerant to salinity stress using organogenesis technique. Biotechnol. 3(2): 136-139.
19. Paridaen, A. 2009. Investigating the Use of Plant Growth Regulators in New Zealand and Australia. Australian Univ. Crop Competition New Zealand Study Tour Project Report.
20. Petolescu, C.; S. Giulca; A. Lazar; P. Irina and V. Giancarla. 2010. Assessment variability of alfalfa regenerates using RAPD molecular markers. J. of Hortic., Forest., Biotechnol. 14(3): 172-176.
21. Saini, H. K.; M. S. Gill and M. L. S. Gill. 2010 . Direct shoot organogenesis and plant regeneration in rough Lemon (Citrus jambhiri Lush.). lndian J. Biotech. 9: 419-423.
22. Salman, M. A. 1988. Principles of Plant Cell and Tissue Culture. Mosul Univ., Ministry of Higher Edu. and Scientific Res.
23. Shukri, W. M. and R. M. Al-Meaqel. 2013. Plant Cell and Tissue Culture. Al-Mutanabi Lab., Al-Damam, KSA.
24. Trigiano, R. N. and D. J. Gray. 2005. Plant Development and Biotechnology. CRC Press, Inc. p. 11-71.
25. Yassin, B. T. 2001. Principles of Plant Physiology. Dar Alkutob, Univ. of Qatar. pp. 634.