تأثير منظمات النمو في إستحثاث الكالس لأصل الحمضيات الفولكاماريانا خارج الجسم الحي

سارة رائد خلف الخزعلي
باحث
محمد شهاب حمد
استاذ
saraalkazali16@gmail.com
قسم البستنة وهندسة الحدائق – كلية الزراعة – جامعة بغداد

المستخلص

نفذ البحث في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لكلية الزراعة – جامعة بغداد خلال المدة من شباط حتى تشرين الأول، 2015 تضمنت الدراسة تأثير توليفات مختلفة من منظمات النمو النباتية نفثالين حامض الخليك (NAA)، الثيدازورون (TDZ)، سبيرمدين (Spd.) و2,4–داي كلوروفينوكسي حامض الخليك (2,4–D)، بنزل ادنين (BA) في استحثاث الكالس من فلقات البذور لاصل الحمضيات الفولكاماريانا *Citrus volkameriana*، عقمت البذور بتركيز 0.1 % من كلوريد الزئبق ولمدة 15 دقيقة ثم زرعت على الوسط الغذائي MS المجهز بتراكيز (0.0، 1.5،3.0) ملغم لتر$^{-1}$ NAA بالتداخل مع تراكيز (0.0 ، 0.05 ، 0.1) ملغم لتر$^{-1}$ TDZ وتركيز (0.0 ،0.5 ،1.0) ملغم لتر$^{-1}$ Spd. والوسط الغذائي MS المجهز بتراكيز (0.0 ، 1.5 ، 3.0) ملغم لتر$^{-1}$ 2,4–D بالتداخل مع تراكيز (0.0 ، 1.0 ،2.0) ملغم لتر$^{-1}$ وتراكيز (0.0 ، 0.5، 1.0) ملغم لتر$^{-1}$ Spd. إذ اعطى التداخل بين تركيز 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ NAA وتركيزي (0.05 ،0.1) ملغم لتر$^{-1}$ TDZ والتداخل بين تركيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA وتركيزي (0.05 ، 0.1) ملغم لتر$^{-1}$ TDZ وعند جميع تراكيز Spd. اعطى اعلى معدل في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس بلغت 100 % في حين اعطى الوسط الغذائي المجهز بتركيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4–D بالتداخل مع جميع تراكيز BA و Spd. اعلى نسبة مئوية لاستحثاث الكالس بلغت 100%. واشارت النتائج الى تفوق الوسط الغذائي المزود بتركيز 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ NAA بالتداخل مع تركيز 0.1 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ وتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ Spd. في اعطاء اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ (668.8، 44.59) ملغم على التوالي . بينما تفوق الوسط المزود بتركيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4–D بالتداخل مع تركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ Spd. في الوسط الخالي من BA في اعطاء اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ (709.2 ، 47.28) ملغم على التوالي.

كلمات مفتاحية: نفثالين حامض الخليك ، 2,4–داي كلوروفينوكسي حامض الخليك ، بنزل ادنين ، ثيدازورون ، سبيرمدين.

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 47(3): 723-731, 2016 Al- Khazali & Hamad

INFLUNCE OF GROWTH REGULATORS ON CALLUS INDUCTION OF *CITRUS VOLKAMERIANA IN VITRO*

S.R. KH . Al- Khazali *
Researcher
M. S. Hamad
Prof.
saraalkazali16@gmail.com
Dept. of Horticulture and landscaping Coll. of Agric. , Univ. of Baghdad

ABSTRACT

This research was conducted in the plant tissue culture Lab. College of Agriculture / University of Baghdad from February to October 2015. The aim of the study was investigating the influences of combinations of Naphthalene acetic acid (NAA) , Thidiazuron (TDZ) Spermidine (Spd.) and 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) , Benzyl adenine (BA) on callus induction and adventitous shoot regeneration originated from cotyledon of *Citrus volkameriana* seeds. Seeds were disinfested with 0.1 % of $HgCl_2$ for 15 minutes. The MS medium supplemented with (0.0,1.5 , 3.0) mg L^{-1} NAA in combination with (0.0, 0.05, 0.1) mg L^{-1} TDZ and (0.0, 0.5 ,1.0) mg L^{-1} Spd. and MS medium supplemented with (0.0, 1.5 , 3.0) mg L^{-1} 2,4-D in combination with (0.0 ,1.0 , 2.0) mg L^{-1} BA and (0.0 ,0.5 , 1.0) mg L^{-1} Spd. the interaction between 1.5 mg L^{-1} NAA and (0.05 , 0.1) mg L^{-1} TDZ and the interaction between 3.0 mg L^{-1} NAA and (0.05 ,0.1) mg L^{-1} TDZ with all concentrations of Spd. gave the highest percentage of callus induction 100 % . While the MS medium supplemented with 3 mg L^{-1} of 2,4-D in combination with all concentrations of BA and spd. gave the highest percentage 100 % of callus induction. Results showed that MS medium supplemented with 1.5 mg L^{-1} NAA in combination with 0.1 mg L^{-1} TDZ and 1.0 mg L^{-1} spd. gave the highest values of fresh and dry weight of callus (668.8, 44.59) mg respectively . While the MS medium supplemented with 3 mg L^{-1} 2,4-D in combination with 1.0 mg L^{-1} spd. And 0.0 mg L^{-1} BA gave the highest values of fresh and dry weight of callus (709.2 , 47.28) mg respectively.

Keywords : Naphthalene acetic acid , 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid acid, Benzyl adenine, Thidiazuron , Spermidine.
***Part of M.Sc. thesis of the first author**

المقدمة

تعد الحمضيات من اشجار الفاكهة المستديمة الخضرة التي تتميز بوجود الغدد الزيتية في معظم أجزاء النبات مما تكسبها الرائحة العطرية المميزة وثمارها من نوع Hesperidium وهي تعود الى العائلة السذبية Rutaceae التي تضم عدد من الأجناس اهمها الجنس *Citrus* الذي يشمل اكثر من 162 نوع والذي يضم اربعة مجاميع هي مجموعة البرتقال و اليوسفي والكريب فروت والمجموعة الحامضية وكل مجموعة تضم عدداً من الأنواع التي تشتمل على العديد من الأصناف والسلالات .وكذلك الجنس *Poncirus* ومن اهم انواعه البرتقال الثلاثي الأوراق والجنس *Fortunella* ومن اهم انواعة الكمكوات (5 و8) يعد أصل الحمضيات الفولكاماريانا من اصول الحمضيات التي تستعمل على نطاق واسع في المناطق المعروفة بزراعة الحمضيات في العالم نظراً للمواصفات العالية لهذا الاصل وتأثيرها الايجابي على الطعوم النامية عليهِ وانهُ متوافق مع معظم انواع الحمضيات فضلاً عن مقاومتهُ لمرض التدهور السريع Tristeza (4 و 17) إتجهَ الباحثون مؤخراً الى انتاج الاصول الخالية من الاصابة الفايروسية عن طريق زراعة المرستيم القمي والاجنة النيوسيلية اضافة الى نشوء الكالس بأستخدام تقنية زراعة الانسجة والتي يمكن بواسطتها أكثارالاصول الجيدة باعداد كبيرة دون التقيد بكمية البذور وموعد توافرها وزراعتها . واستخدمت منظمات النمو النباتية في توظيف زراعة الأنسجة النباتية في الأنتاج التجاري للنباتات المهمة أقتصادياً ،وتم استحثاث الكالس بنجاح في الحمضيات بأضافة منظمات النمو المختلفة (12) إن استحثاث نسيج الكالس وتمايزهُ هي واحدة من طرائق الإكثار الخضري خارج الجسم الحي أذ تعد طريقة كفوءة في اخلاف النباتات منهُ والتي تسمح في أنتاج أو أعطاء أعداد كبيرة وسريعة من نبيتات الحمضيات ذات الحيوية العالية وبفترة قصيرة وتعد البذور مصدراً جيداً في الحصول على نباتات خالية من الأمراض لأن الملوثات (المسببات المرضية) لاتصل الى البذور الا بعد الأصابة الحادة أو العدوى الشديدة (15) ان النجاحات الكبيرة في مجال زراعة الانسجة النباتية تحققت من خلال تنشئة الكالس على اجزاء نباتية مختلفة وفي تنمية خلايا مفردة او مجاميع من الخلايا الى كتل من نسيج الكالس جعلت من الممكن اتباع هذه الطريقة في اكثار وتحسين النبات على نطاق واسع (20) يمكن تقسيم مسار نشوء الكالس من قطعة النسيج النباتي المزروع على وسط غذائي الى ثلاث مراحل هي ، التحفيز ، والانقسام ، والتمايز تسيطر منظمات النمو النباتية على نشوء وتطور نسيج الكالس ، إذ تحفز الأوكسينات المضافة للوسط الغذائي على إنتاج الكالس، كما إن لمنظمات النمو النباتية دوراً فعالاً في تنظيم عمليات الأنقسام الخلوي واستطالة الخلايا وتمايز نسيج الكالس (3) وبناءاً على ذلك فإن البحث الحالي يهدف الى إنشاء مزارع لأنسجة الكالس لأصل الحمضيات الفولكاماريانا بإستخدام فلقات البذور واضافة توليفات مختلفة من منظمات النمو (NAA ، 2,4-D ، TDZ ، BA ، و .Spd الى الوسط الغذائي MS.

المواد والطرائق

نفذت هذه الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية الكائن في بناية الدراسات العليا– كلية الزراعة – جامعة بغداد ، للفترة (شباط – تشرين الاول 2015) جلبت بذور أصل الفولكاماريانا من الهيئة العامة للبستنة والغابات واختيرت البذور النظيفة الجيدة. عقمت البذور في قناني سعة 250مل داخل كابينة الزراعة المعقمة مسبقاً بالكحول الأثيلي 70% سطحياً بأضافة الكحول الأثيلي (ايثانول) اليها بتركيز 70 % مع الرج المستمر لمدة 30 ثانية في المرحلة الاولى بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات (18) وفي المرحلة الثانية اضيف محلول كلوريد الزئبق $HgCl_2$ بتركيز 0.1 % لمدة 15 دقيقة الى البذور الموضوعة داخل القناني بعد ان تم تحضير هذا المحلول بإذابة 1غم من $HgCl_2$ في لتر ماء مقطر. مع اضافة (2–3) قطرات من المادة الناشرة (الصابون السائل) لغرض تقليل الشد السطحي وزيادة نفاذية مادة التعقيم بإستخدام مضخة التفريغ الهوائي Vaccum pump عن طريق خلخلة الضغط في المحيط الخارجي للقناني التي يتم فيها التعقيم . غسلت البذور بعدها بالماء المقطر المعقم بعد وضعها داخل الـ Vaccum ثلاث مرات لضمان إزالة بقايا المادة المعقمة من البذور بعدها نقلت البذور الى اطباق بتري معقمة إستخدم وسط Murashige وSkoog(MS) (11) الجاهز بوزن 4.3 غم لتر$^{-1}$ المنتج من قبل شركة (Duchefa الهولندية) في استحثاث الكالس

واضيفت الى الوسط الغذائي المراد تحضيره كل من الفيتامينات ومنظمات النمو النباتية بعد ان تم تحضيرها كمحاليل اساس اضيفت الأوكسينات (NAA،2,4-D) والسايتوكاينينات (BA، Kin. ،TDZ) ومتعدد الامين (Spd.) خلال تنفيذ البحث بالتراكيز المطلوبة على وفق كل تجربة واضيف السكروز والمايوانيستول مع الأشارة الى أستخدام الماء المقطر في تحضيرمحاليل الاساس والوسط الغذائي بعد أضافة جميع مكونات الوسط عُدل الرقم الهيدروجيني pH للوسط إلى 5.7 بواسطة محلول واحد عياري من هايدروكسيد الصوديوم او حامض الهيدروكلوريك قبل اضافة الاكار وزع الوسط الغذائي في قناني الزراعة سعة 200 مل بمقدار 50 مل / قنينة واغلقت جيداً ، وعقمت بجهاز المؤصدة Autoclave على درجة حرارة 121 م° وضغط 04 كغم سم^{2} لمدة 15 دقيقة ، وبعد انتهاء مدة التعقيم أخرجت القناني من المؤصدة ووضعت في غرفة الزراعة وتركت لتبرد وتكون جاهزة للزراعة نقلت البذور المعقمةً الى اطباق بتري معقمه داخل منضدة انسياب الهواء الطبقي لغرض الزراعة .أزيلت الأغلفة الصلبة للبذور وبعد الحصول على الفلقات زرعت في الاوساط الغذائية التي تحتوي على توليفات مختلفة من منظمات النمو النباتية (الاوكسينات ، السايتوكاينينات ، متعدد الامين (Spd.)).

تم استخدام التوليفات التالية في الوسط الغذائي:

1 . درس تأثير التداخل بين NAA بتراكيز (0 ، 1.5 ، 3) ملغم لتر$^{-1}$ مع تراكيز TDZ (0، 0.05، 0.1) ملغم لتر$^{-1}$ و .Spd (0 ، 0.5 ، 1) ملغم لتر$^{-1}$ في استحثاث الكالس المضافة الى وسط MS الحاوي على 0.5 ملغم لتر $^{-1}$ كاينتين .

2. درس تأثير التداخل بين 2,4-D بتراكيز (0 ،1.5، 3) ملغم لتر$^{-1}$ مع تراكيز BA (0،1، 2) ملغم لتر$^{-1}$ و.Spd (0 ،0.5 ، 1) ملغم لتر$^{-1}$ في استحثاث الكالس الكالس المضافة الى وسط MS الحاوي على 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ كاينتين، تم تحضين الأجزاء النباتية في الظلام الكامل وعلى درجة حرارة 25 م° ± 2 ، وبتعاقب يومي 16 ساعة ضوء و 8 ساعات ظلام لمدة ستة اسابيع بعدها سجلت النتائج المتعلقة بالنسبة المئوية لتكوين الكالس والوزن الجاف والطري لكلا التوليفتين ونفذت التجربة كتجارب عاملية بأستخدام التصميم العشوائي الكامل CRD بإستخدام البرنامج الأحصائي Genstat حسب اختبار اقل فرق معنوي LSD تحت مستوى احتمال 0.05 (2) وبواقع 10 مكررات لكل معاملة إذ تم زراعة فلقتان في كل قنينة على اعتبار الفلقة الواحدة مكرر.

النتائج و المناقشة

تأثير منظمات النمو في نسبة الاستجابة لأستحثاث الكالس

من نتائج جدول 1. يمكن ملاحظة التأثيرات المختلفة للتوليفات المكونة من NAA ، TDZ و.Spd المضافة الى الوسط الغذائي في نسبة استجابة فلقات البذور لأصل الحمضيات الفولكاماريانا لأستحثاث الكالس ، فقد اظهرت النتائج تفوق التركيزين (1.5 و 3.0) ملغم لتر$^{-1}$ NAA بإعطاء اعلى نسبة مئوية لاستحثاث الكالس بلغت 97% لكل من التركيزين التي تفوقت معنوياً على الوسط الخالي من NAA اذ اعطى نسبة 26 % وتبين نتائج الجدول نفسه الى تفوق الوسط الحاوي على التركيز 0.1 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ معنوياً في النسبة المئوية لأستحثاث الكالس اذ بلغت 82% التي اختلفت معنوياً عن معاملة المحايد. اما عن تراكيز .Spd تظهر نتائج الجدول الى التفوق المعنوي للتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ .Spd اذ اعطى نسبة 85% على التركيز 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ ومعاملة المحايد اذ اعطيا نسبة 69% و67 %على التوالي . وكان للتداخل الثنائي بين NAA وTDZ تأثير معنوي في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس فتشير نتائج الجدول ذاتهُ الى تفوق التركيزين (1.5 و3.0) ملغم لتر$^{-1}$ NAA بالتداخل مع التركيزين (0.05 ، 0.1) ملغم لتر$^{-1}$ TDZ على التوالي بإعطاء اعلى نسبة مئوية لإستحثاث الكالس بلغت 100 % لكلا التركيزين والتي لم تختلف معنويا عن التركيزين (1.5 ، 3.0) ملغم لتر$^{-1}$ NAA في الوسط الخالي من TDZ إذ بلغت 92 % لكل منهما وفي الجدول نفسهُ تشير بيانات التداخل الثنائي بين NAA و.Spd الى تفوق التركيزين (1.5 ، 3.0) ملغم لتر$^{-1}$ NAA بالتداخل مع تركيزي (0.0 و1.0) ملغم لتر$^{-1}$ .Spd بإعطاء اعلى نسبة مئوية لإستحثاث الكالس بلغت 100 واعطى التداخل الثنائي بين التركيز 0.1 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ و التركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ .Spd اعلى نسبة مئوية بلغت 96 % التي اختلفت معنوياً على جميع

التداخلات الثنائية الاخرى ماعدا معاملة التداخل بين تركيز 0.05 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ وتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ .Spd اذ اعطى نسبة 92 % اما بخصوص تأثير التداخل الثلاثي بين تراكيز NAA،TDZ و .Spd في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس فتشير النتائج الى التفوق المعنوي لأغلب التداخلات الثلاثية في النسبة المئوية اذ اعطت نسبة 100 % بتداخل تركيزي (1.5 و 3.0) ملغم لتر$^{-1}$ NAA مع تراكيز TDZ و .Spd ولم تختلف هذه النسبة معنوياً مع نسبة التداخل بين تركيز 0.1 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ و تركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ .Spd في الوسط الخالي من الاوكسين NAA اذ اعطت نسبة 88 %.

جدول 1. تأثير تراكيز منظمات النمو (NAA و TDZ و .Spd) والتداخل بينهم في النسبة المئوية % لأسحثاث الكالس من فلقات بذور اصل الحمضيات الفولكاماريانا بعد ستة اسابيع من الزراعة في الوسط MS

تركيز NAA×TDZ ملغم لتر$^{-1}$	تراكيز .Spd ملغم لتر$^{-1}$ 1.0	0.5	0.0	تراكيز TDZ ملغم لتر$^{-1}$	تراكيز NAA ملغم لتر$^{-1}$
8	0	25	0	0.0	
25	75	0	0	0.05	0.0
46	88	0	50	0.1	
92	100	100	75	0.0	
100	100	100	100	0.05	1.5
100	100	100	100	0.1	
92	100	100	75	0.0	
100	100	100	100	0.05	3.0
100	100	100	100	0.1	
12		21		(0.05)L.S.D	
معدل NAA ملغم لتر$^{-1}$					
26	54	8	17	0.0	تراكيز
97	100	100	92	1.5	Spd X NAA
97	100	100	92	3.0	ملغم لتر$^{-1}$
7		12		(0.05) L.S.D	
معدل TDZ ملغم لتر$^{-1}$					
64	67	75	50	0.0	تراكيز
75	92	66	67	0.05	Spd.×TDZ
82	96	67	83	0.1	ملغم لتر$^{-1}$
7		12		(0.05) L.S.D	
	85	69	67	معدل .Spd ملغم لتر$^{-1}$	
		7		(0.05)L.S.D	

تبين نتائج جدول 2 . ان لتراكيز NAA تأثيراً معنوياً في معدل الوزن الطري والجاف للكالس ، إذ تفوق الـ NAA عند التركيز 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ فأعطى اعلى معدل في الوزن الطري والجاف للكالس الذي بلغ 242.3 ، 16.15 ملغم على التوالي والذي اختلفا معنوياً عن بقية المعاملات. بينما أعطى TDZ عند التركيز 0.1 ملغم لتر$^{-1}$ اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ 168.0 ، 11.19 ملغم على التوالي . قياساً بمعاملة المحايد التي بلغت 53.7 ، 3.58 ملغم على التوالي إلا أنه لم يختلف معنويا عن التركيز 0.05 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ الذي بلغ 166.9، 11.13 ملغم على التوالي . وتبين النتائج في الجدول نفسهُ الى تفوق التركيز 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ من .Spd في أعطاء اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ 192.9 ، 12.86 ملغم الذي تفوقا معنوياً عن التراكيز الأخرى من .Spd . أما عن تأثير التداخل بين تراكيز الـ NAA و الـ TDZ فقد تفوقت المعاملة 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ من الـ NAA و 0.1 ملغم لتر$^{-1}$ من الـ TDZ في إعطاء اعلى معدل للوزن الطري والجاف بلغ 438.5 ، 29.24 ملغم على التوالي والذي اختلف معنوياً عن جميع التداخلات المختلفة الأخرى وكان للتداخل بين تراكيز NAA و.Spd تأثير معنوي في معدل الوزن الطري للكالس اذ أظهرت نتائج الجدول نفسهُ تفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ NAA و0.5 ملغم لتر$^{-1}$ .Spd في أعطاء اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ 344.2 ، 22.95 ملغم على التوالي والذي اختلف معنوياً عن بقية التداخلات الثنائية الاخرى وكان لتداخل التركيز 0.05 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ مع التركيز 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ .Spd تأثير معنوي في معدل الوزن الطري والجاف للكالس اذ اعطى 344.6 ، 22.97 ملغم على التوالي والذي أختلف معنوياً عن جميع التداخلات الاخرى. اما بخصوص التداخل الثلاثي ما بين تراكيز الـ NAA و

تراكيز الـ TDZ و تراكيز الـ . Spd كان لها تأثير معنوي في صفة الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من الفلقات لبذور اصل الحمضيات الفولكاماريانا. فيشير الجدول في ذلك الى تفوق التركيز 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ NAA بالتداخل مع التركيز 0.1 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ و التركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ .Spd معنوياً على جميع التداخلات الثلاثية الأخرى فأعطى اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ 668.8، 44.59 ملغم على التوالي وكان اقلها 3.8، 0.25 ملغم وزن طري وجاف على التوالي للكالس عند التركيز 0.0 ملغم لتر$^{-1}$ لكل من NAA ،TDZ وتركيز0.5 ملغم لتر$^{-1}$ .Spd. تشير النتائج في الجدول (3) الى تفوق التركيز3.0 ملغم لتر$^{-}$2,4-D ^{1} بإعطاء اعلى نسبة مئوية لاستحثاث الكالس إذ بلغت 100 % التي لم تختلف معنوياً عن التركيز1.5 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D اذ بلغت النسبة 96 % بينما اختلف التركيزان معنوياً معاملة المحايد وتوضح بيانات الجدولُ الى تفوق الوسط الغذائي الحاوي على تركيز2 ملغم لتر$^{-1}$ BA معنوياً على تركيز 1 ملغم لتر$^{-1}$BA والوسط الغذائي الخالي منه اذ أعطى اعلى نسبة مئوية بلغت 85 %. وتشير نتائج الجدول الى تفوق التركيز1.0 ملغم لتر$^{-1}$.Spd معنوياً على التركيزين الاخرين منهُ إذ اعطى نسبة مئوية بلغت 85 % بينما كان للتداخل الثنائي بين تركيز 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D مع (1.0 ، 2.0) ملغم لتر $^{-1}$ BA وتركيز3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D مع تراكيز (0 ، 1.0 ، 2.0) ملغم لتر $^{-1}$ BA تأثير معنوي في النسبة المئوية اذ اعطى اعلى نسبة بلغت 100 % التي تفوقت على جميع التداخلات الثنائية الاخرى ويظهر من الجدول ذاتهُ ان التداخل الثنائي بين تراكيز 2,4-D و.Spd لها تأثير معنوي في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس اذ بلغت 100 % عند تداخل التراكيز (1.5 , 3.0) ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D مع تركيزي (0.5 ، 1.0) ملغم . لتر$^{-1}$ .Spd على التوالي وتركيز 3 ملغم لتر$^{-}$ ^{1}2,4-D في الوسط الخالي من Spd وتشير نتائج الجدول نفسهُ الى ان التداخل الثنائي بين 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 1.0ملغم لتر$^{-1}$ .Spd اعطى اعلى نسبة مئوية لاستحثاث الكالس بلغت 100 % الذي اختلف معنوياً عن التداخلات الثنائية الاخرى اما بخصوص التداخل الثلاثي بين تراكيز 2,4-D و BA و .Spd فتشير نتائج الجدول الى التفوق المعنوي لتركيزي (1.5 , 3.0) ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D وتركيزي (0.5 ،1.0) ملغم لتر $^{-1}$ .Spd وعند جميع تراكيز BA بإعطاء اعلى نسبة مئوية بلغت 100%. تشير نتائج الجدول 4. الى ان للأوكسين 2,4-D تأثيراً معنوياً في معدل الوزن الطري والجاف للكالس إذ اعطى التركيز 3.0 ملغم لتر$^{-}$ ^{1} اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ 371.3، 24.74 ملغم على التوالي الذي تفوق معنوياً عن التراكيز الاخرى وكان ادناها عند معاملة المحايد إذ بلغ معدل الوزن الطري والجاف 12.7، 0.84 ملغم على التوالي بينما كان لتركيز 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA تأثيراً معنوياً في معدل الوزن الطري والجاف للكالس فأعطى معدل بلغ،16.44 ملغم على التوالي و الذي اختلف معنوياً عن تراكيز الـ BA الأخرى وكان اقلهُ عند معاملة المحايد إذ بلغ 166.9، 11.12 ملغم على التوالي . أما عن تأثير تراكيز .Spd فأعطى التركيز 1.0 ملغم لتر$^{-}$ ^{1} اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ 219.4 ، 14.62 ملغم الذي لم يختلف معنوياً عن معاملة المحايد واختلفت معنوياً عن تركيز 0.5 ملغم لتر$^{-}$ ^{1} .Spd إذ اعطت 204.8، 13.65 ملغم على التوالي . أما عن تأثير التداخل الثنائي بين تراكيز 2,4-D وتراكيز BA فأعطى تركيز 3.0 ملغم لتر$^{-}$ ^{1} 2,4-D وتركيز 0.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA (معاملة المحايد) اعلى معدل للوزن الطري والجاف بلغ 449.8 ، 29.98 ملغم على التوالي والذي أختلف معنوياً عن جميع التداخلات الثنائية الأخرى . وبلغ اقل معدل للوزن الطري والجاف للكالس في الوسط الخالي من 2,4-D و BA إذ بلغ 1.7، 0.11 ملغم على التوالي. اما بخصوص التداخل بين تراكز 2,4-D وتراكيز .Spd فأن اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ 430.8 ،28.71 ملغم على التوالي عند تركيز 3.0 ملغم لتر$^{-}$ ^{1} 2,4-D وتركيز 0.0 ملغم لتر$^{-}$ ^{1} .Spd الذي اختلف معنوياً عن جميع التداخلات الثنائية الاخرى . اما عند التداخل بين تراكيز BA وتراكيز .Spd فيشير الجدول نفسهُ الى تفوق الوسط الغذائي المجهز بـ 2.0 ملغم لتر$^{-}$ ^{1} BA والخالي من Spd . معنوياً في اعطاء اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ 340.5 ، 22.53 ملغم.على التوالي والذي تفوق معنوياً على باقي

التداخلات الثنائية الاخرى اما بخصوص التداخل الثلاثي بين تراكيز 2,4-D و BA و.Spd فتشير النتائج الى حصول اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ 709.2، 47.28 ملغم على التوالي كان عند التداخل الثلاثي بين تركيز 3.0 ملغم لتـــــر$^{-1}$ 2,4-D وتركيز 0.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA وتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ .Spd.

جدول 2. تأثير تراكيز منظمات النمو (NAA و TDZ و .Spd) والتداخل بينهم في معدل الوزن الطري والجاف (ملغم) للكالس المستحث من فلقات بذور اصل الحمضيات الفولكاماريانا بعد ستة اسابيع من الزراعة في الوسط MS.

تراكيز NAA ملغم لتر$^{-1}$	تراكيز TDZ ملغم لتر$^{-1}$	الوزن الطري تراكيز .Spd ملغم لتر$^{-1}$			NAA×TDZ ملغم لتر$^{-1}$	الوزن الجاف تراكيز .Spd ملغم لتر$^{-1}$			NAA×TDZ ملغم لتر$^{-1}$
		0.0	0.5	1.0		0.0	0.5	1.0	
	0.0	0.0	3.7	0.0	1.2	0.00	0.25	0.00	0.08
0.0	0.05	24.5	0.0	0.0	8.2	1.62	0.00	0.00	0.54
	0.1	17.5	0.0	11.2	9.6	1.09	0.00	0.74	0.61
	0.0	152.9	110.1	13.6	92.2	10.18	7.35	0.91	6.15
1.5	0.05	46.3	461.2	80.8	196.1	3.09	30.74	5.39	13.07
	0.1	668.8	461.2	185.6	438.5	44.59	30.75	12.38	29.24
3.0	0.0	141.9	46.3	15.0	67.7	9.46	3.09	0.99	4.51
	0.05	177.5	572.5	139.5	296.5	11.84	38.16	9.31	19.77
	0.1	62.5	81.2	23.8	55.8	4.18	5.42	1.58	3.73
L.S.D (0.05)			31.5		10.5		2.10		1.21
					معدل NAA ملغم لتر$^{-1}$				معدل NAA ملغم لتر$^{-1}$
NAA	0.0	14.0	1.2	3.7	6.3	0.90	0.08	0.25	0.41
×	1.5	289.3	344.2	93.3	242.3	19.28	22.95	6.23	16.15
Spd. ملغم لتر$^{-1}$	3.0	127.3	233.3	59.4	140.0	8.49	15.56	3.96	9.34
L.S.D (0.05)			18.1		10.5		1.21		0.70
					معدل TDZ ملغم لتر$^{-1}$				معدل TDZ ملغم لتر$^{-1}$
TDZ	0.0	98.3	53.4	9.5	53.7	6.55	3.56	0.63	3.58
×	0.05	82.7	344.6	73.3	166.9	5.52	22.97	4.90	11.13
Spd. ملغم لتر$^{-1}$	0.1	249.6	180.8	73.5	168.0	16.62	12.06	4.90	11.19
L.S.D(0.05)			18.1		10.5		1.21		0.70
معدل .Spd ملغم لتر$^{-1}$	52.1	143.5	192.9			9.56	12.86	3.48	
L.S.D (0.05)			10.5				0.70		

جدول 3. تأثير تراكيز منظمات النمو (2,4-D و BA و .Spd) والتداخل بينهم في النسبة المئوية % لأسحثاث الكالس من فلقات بذور اصل الحمضيات الفولكاماريانا بعد ستة اسابيع من الزراعة في الوسط MS

تراكيز 2,4-D ملغم لتر$^{-1}$	تراكيز BA ملغم لتر$^{-1}$	تراكيز .Spd ملغم لتر$^{-1}$			تركيز 2,4-DxBA ملغم لتر$^{-1}$
		0.0	0.5	1.0	
	0.0	13	25	0	13
0.0	1.0	0	0	63	21
	2.0	63	0	100	54
	0.0	63	100	100	88
1.5	1.0	100	100	100	100
	2.0	100	100	100	100
	0.0	100	100	100	100
3.0	1.0	100	100	100	100
	2.0	100	100	100	100
L.S.D(0.05)			20		12
					معدل 2,4-D ملغم لتر$^{-1}$
	0.0	25	8	54	29
تراكيز Spd X 2,4-D	1.5	88	100	100	96
ملغم لتر$^{-1}$	3.0	100	100	100	100
L.S.D (0.05)			12		7
					معدل BA ملغم لتر$^{-1}$
	0.0	59	75	67	67
Spd.×BA ملغم	1.0	67	67	88	74
لتر$^{-1}$	2.0	88	66	100	85
L.S.D (0.05)			12		7
معدل Spd. ملغم لتر$^{-1}$		71	69	85	
L.S.D(0.05)			7		

جدول 4. تأثير تراكيز منظمات النمو (2,4-D ، BA ،Spd.) في معدل الوزن الطري والجاف (ملغم) والتداخل بينهم للكالس المستحث من فلقات بذور اصل الحمضيات الفولكاماريانا بعد ستة اسابيع من الزراعة في الوسط MS

تراكيز 2,4-D ملغم لتر$^{-1}$	تراكيز BA ملغم لتر$^{-1}$	الوزن الطري تراكيز Spd. ملغم لتر$^{-1}$			2,4-D×BA ملغم لتر$^{-1}$	الوزن الجاف تراكيز Spd. ملغم لتر$^{-1}$			2,4-D×BA ملغم لتر$^{-1}$
		0.0	0.5	1.0		0.0	0.5	1.0	
	0.0	1.3	3.8	0.0	1.7	0.09	0.25	0.00	0.11
0.0	1.0	0.0	0.0	14.5	4.8	0.00	0.00	0.96	0.32
	2.0	16.2	0.0	78.2	31.5	1.09	0.00	5.21	2.10
	0.0	22.8	37.5	87.5	49.3	1.51	2.50	5.84	3.28
1.5	1.0	42.5	385.0	461.2	296.3	2.84	25.68	30.70	19.74
	2.0	545.0	415.0	286.2	415.0	35.82	27.60	19.08	27.50
	0.0	292.0	348.2	709.2	449.8	19.46	23.21	47.28	29.98
3.0	1.0	540.2	443.7	120.0	368.0	36.01	29.59	8.01	24.54
	2.0	460.1	210.1	217.5	295.9	30.67	14.01	14.50	19.73
L.S.D (0.05)			34.9		20.1		2.33		1.35
معدل 2,4-D ملغم لتر$^{-1}$					معدل 2,4-D ملغم لتر$^{-1}$				معدل 2,4-D ملغم لتر$^{-1}$
2,4-D	0.0	5.8	1.3	30.9	12.7	0.39	0.08	2.06	0.84
Spd. ملغم لتر$^{-1}$	1.5	203.4	279.2	278.3	253.6	13.39	18.59	18.54	16.84
	3.0	430.8	334.0	348.9	371.3	28.71	22.27	23.26	24.74
L.S.D (0.05)			20.1		11.6		1.35		0.78
معدل BA ملغم لتر$^{-1}$					معدل BA ملغم لتر$^{-1}$				معدل BA ملغم لتر$^{-1}$
BA	0.0	105.3	129.8	265.6	166.9	7.02	8.65	17.70	11.12
×Spd. ملغم لتر$^{-1}$	1.0	194.2	276.2	198.6	223.0	12.95	18.42	13.23	14.87
	2.0	340.5	208.4	194.0	247.6	22.53	13.87	12.93	16.14
L.S.D (0.05)			20.1		11.6		1.35		0.78
معدل Spd. ملغم لتر$^{-1}$		213.3	204.8	219.4			14.17	13.65	14.62
L.S.D (0.05)			11.6					0.78	

المناقشة

تعد تركيبة الوسط الغذائي ونوع منظم النمو وتركيزهُ من اكثر العوامل المحددة لاستحثاث الكالس واخلاف الافرع منه . فقد استخدمت فلقات البذور للحمضيات في تحقيق هذا الهدف وان الكالس الهش هو من اكثر الانواع تحفيزاً لنشوء البراعم العرضية للعديد من الانواع النباتية(9 و16 و21). إتصف الكالس الناتج من زراعة الفلقات لبذور اصل الحمضيات الفولكاماريانا في الاوساط الغذائية على NAA و2,4-D والسايتوكاينين BA و TDZ و .Spd بلونهُ الكريمي ومظهرهُ الهش واختلفت كمية الكالس الناتجة اعتماداً على نوع الاوكسين وتركيزهُ ونوع السايتوكاينين وتركيزهُ ومتعدد الامين السبيرمدين وتركيزهُ (12 و 14) فمن نتائج الجداول (1 ، 3) يمكن ملاحظة ان تركيز3 ملغم لتر$^{-1}$ من الاوكسين NAA اعطى نسبة مئوية لاستحثاث الكالس بلغت 97 % بينما اعطى تركيز 3 ملغم لتر $^{-1}$ من الاوكسين 2,4-D نسبة 100 % في استحثاث الكالس وهذا يرجع الى دور 2,4-D المباشر في زيادة أنقسام خلايا الجزء النباتي المزروع وحثهُ على تكوين الكالس بوجود التركيز الامثل من السايتوكاينين المستخدم (20) ويتضح ايضاً من الجداول (2 ، 4) أن أعلى معدل للوزن الطري والجاف المستحث من فلقات البذور في توليفة الوسط الغذائي MS الحاوي على 1.5 ملغم لتر $^{-1}$ NAA و 0.1 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ اضافة الى تركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ .Spd بلغ ملغم 668.8، 44.59 ملغم على التوالي بينما كان اعلى معدل للوزنين الطري والجاف في توليفة الوسط MS الخالي من BA والحاوي على 3.0 ملغم لتر $^{-1}$ 2,4-D و1.0 ملغم لتر$^{-1}$ .Spd بلغ709.2، 47.28 ملغم على التوالي . إذ يعتبر2,4-D من اكثر الاوكسينات فعالية في استحثاث الكالس من الاجزاء النباتية المختلفة يليه NAA ويسبب زيادة في حجم الكالس يصاحبهُ زيادة في عدد الخلايا واستطالتها(3) ولربما يستنتج من ذلك بإن الاجزاء الفلقية للبذور تختلف في احتياجاتها لنوع وتركيز منظمات النمو لغرض تشجيع استحثاث الكالس فيها . وقد يعود السبب في الزيادة الحاصلة في معدل الوزن الطري

والجاف للكالس والاختلافات في النسبة المئوية لاستحثاثهُ الى تأثير منظمات النمو المضافة وبوجود مستوى محدد من السايتوكاينين و متعدد الامين .Spd في تشجيع الخلايا على الانقسام والاتساع عند التوليفة الملائمة لمنظمات النمو النباتية فالاوكسين يزيد من ليونة الجدار الخلوي مما يقلل من مقاومة الجدار للشد وهذا يؤدي الى زيادة الضغط الانتفاخي إذ ينتج عنه نفوذ كبير لمكونات الوسط الغذائي الى داخل الخلية ، كما ان المعاملة بالاوكسين يلازمها تحفيز تكوين أنواع من الحامض النووي RNA الضرورية لبناء الانزيمات والبروتينات المؤثرة في النمو (1، 5 ،10، 19) إن التوازن بين الاوكسين والسايتوكاينين اضافة الى البولي امين ضروري في استحثاث الكالس إذ يعمل السايتوكاينين بوجودهُ مع الاوكسين والبولي أمين كمفتاح لبدأ الانقسام الخلوي وهذا ما أكدهُ (3 و7) أن استجابة القطع النباتية يعتمد على المستوى الداخلي وكمية الامتصاص لمنظمات النمو المستخدمة للوصول الى مستوى مناسب لتكوين الكالس ونموهُ مما ينعكس ذلك على الوزن الطري والجاف للكالس (6 و 13).

REFERENCES

1.AlKhafaji, M. A. 2014. Plant Growth Regulators Applications and Horticultural Uses. Faculty of Agriculture. The Ministry of Higher Education and Scientific Research Baghdad University . Iraq.

2.Alsahookie, M. M. and K. M. Wuhaib. 1990. Application on Design and Analysis of Experiments. Univ. of Baghdad, pp:488.

3.George, E. F.; M.A. Hall and G.J. De Klerk .2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1. The Background, 3rd Edition, Published by Springer, Dordercht. The Netherlands. pp.118-182.

4.Kacar , Y.A. ; Y.Y.Mendi ; O. Simsek ; T. Yesiloglu and M. Boncuk. 2011. *In vitro* plant regeneration of *Carrizo citrange* and Cleopatra mandarin by organogenesis. Acta Hort. 892:305-310.

5. Kamruzzaman , M. ; A. Akther. ; Md.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 (*Citrus reticulate* Balanco) (*Citrus medica* L.). 14(15),: 1290- 1296.

6.Kasprzyk – Pawelec , A. ; J. Pietrusiewicz ; E. Szczuka and M. Curie-Sklodowska . 2015 . *In vitro* regeneration induced in leaf explants of *Citrus limon* L. Burm cv. 'Primofiore' University in Lublin Acta Sci. Pol. Hortorum Cuhure , 14 (4) ; 143-153

7.Kazmi , S. K. ; S. Khan ; N. Kabir ; Dr . A. A. Mirbahar ; Raziq and N. Kauser . 2015 . Embryogenic Callus induction Somatic embryogenesis , regeneration and histological studies of Kinnow mandarin (*Citrus reticulate* Blanco L.) from nucellar embryo and epicotyl region. Pakistan J. of Botany 47 (1) :305-310

8.Ladaniya, M. 2008. *Citrus* Fruit, Technology and Evalution, Academic Press.

9.Laskar, M. A.; M. Hynniewta and C. S.Rao. 2009.*In vitro* propagation of *Citrus indica* Tanaka- An endangered progenitor species. 1nd j. Biotechnol 8:311-316.

10.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

11.Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioasseys with tobacco tissue culture. Physiol. Planta ., 15(3): 473–479.

12.Ramdan , R.; N.Handaji .; H.Beyahia and M. Ibriz. 2014. Influence of growth regulators on callus induction from embryos of five *Citrus* roots tocks.J.Appl.Biosci.73: 5959 – 5965.

13.Rattanpal, H. S.; G. Kaur. and M. Gupta. 2011. *In vitro* plan regeneration in rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) by directorganogenesis. Afr. J. Biotech., 10(63), 13724–13728.

14.Sarma , C. ; A. Borthakur ; S. Singh; M.K. Mod and P. Sen .2011. Efficient *in vitro* plant regeneration from cotyledonary explants of *Citrus reticulata* L. Blanco. Ann. Biol. Res., 2(6), 341–348

15.Savita , B. S. ; G.S Virk. ; A. K. Nagpal . 2011. An efficient plant regeneration protocol from callus cultures of *Citrus jambhiri* Lush. Physiol. Mol. Biol. Plants, 17(2), 161–169.

16.Savita , V. ; G.S. Virk ; A. Nagpal .2010. Effect of explant type and different plant growthregulators on callus induction and plantlet regeneration in *Citrus jambhiri* Lush. Environ. We Int. J. Sci. Tech., 5, 97–106.

17.Schinor , E.H. ; F.A. De Azevedor ; F.A. De Assis and B. M.Mendes . 2011. *In vitro* organogenesis in some *Citrus species* . Rev , Bras Frutic. 33: 526 – 531

18.Taha , H.S.; M. K. El-Bahr and M. M. Seif-El-Nasr . 2009 b. *In vitro* studies on Egyptian *Catharanthus roseus* (L.). Effect of Biotic and Abiotic stress on Indol Alkaloids Production . J.Appl. Sci. Res. ; 5(10): 1826-1831.

19.Taiz , L. and E. Zeiger . 2010. Plant Physiology. Sinauer Assciates, Inc. Publishers. Sunderland

20.Trigiano , R.N. and D .j . Gray. 2005 . Plant Development and Biotechnology .CRC Press LLC.

21.Vibhute , M. ; M.K. Tripathi ; R. Tiwari . ; B.S. Baghel and Tiwari .2012. Interspecific morphogenic ability differences in *Citrus journal* of Agricultural. Technology . 8(2): 625-638.