مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (38) العدد (1) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (38) No. (1) 2016

تأثير بعض منظمات النمو النباتية في إكثار بادرات متحملة للملوحة عند فول الصويا [*Glycine max* (L.) Merrill] الصنف Sb-44

الدكتور دانيال العوض*

الدكتور جورج ديب**

(تاريخ الإيداع 22 / 4 / 2015. قبل للنشر في 21 / 1 / 2016)

□ ملخّص □

يهدف هذا البحث إلى دراسة تأثير بعض منظمات النمو النباتية (الهرمونات النباتية) في إكثار بادرات من فول الصويا الصنف Sb-44 متحملة للملوحة في الزجاج (في المختبر).

تمّ إنبات البذور في أطباق بتري على وسط Murashinge and Skoog (MS) الصلب والمضاف إليه NaCl (100 ميلي مول/لتر) و BAP (6- بنزيل أمينو بيورين) (1 مغ/لتر) لمدة 10 أيام. تمّ عزل العقد الفلقية والبراعم القميّة من البادرات المتحمّلة للملوحة ومن ثم زرعت في الزجاج على وسط MS الصلب الذي يحوي NaCl (100 ميلي مول/لتر) وتراكيز مختلفة من BAP وNAA (نفتالين حمض الخل).

تمّ الحصول على أعلى استجابة (71.42%) للعقد الفلقية وأفضل متوسط لعدد البراعم المتشكلة على هذه الأخيرة (3.20) على الوسط MS4 المضاف إليه BAP (1 مغ/لتر) + NAA (0.5 مغ/لتر).

كانت أفضل نتيجة لعينات البراعم القمية التي أنتجت براعماً 68.57 % ، وأفضل متوسط لعدد البراعم المتشكلة بكل عينة 2.43 على الوسط MS2 الذي يحوي BAP (0.5 مغ/ل)+NAA (0.1 مغ/ل) .

تمت استطالة البراعم وتجذيرها أيضاً على الوسط الشاهد MS بدون إضافة هرمونات نباتية وبنسبة 95% . نقلت البادرات المجذرة إلى أصص تحوي تورب، ورويت بماء ملحي(100 ميلي مول/لتر) وتمت أقلمتها في الشروط المخبرية. نمت معظم النباتات المتحملة للملوحة إلى مرحلة النباتات الكاملة بنسبة 80% خلال 13-14 أسبوعاً.

الكلمات المفتاحية: فول الصويا – بادرات – تحمّل الملوحة – انتخاب في الزجاج – عقد فلقية – برعم قمّي – تكاثر.

* أستاذ – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية .

** أستاذ – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية .

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (38) العدد (1) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (38) No. (1) 2016

Effect of some plant growth regulators on salt tolerant seedling multiplication of Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivar Sb-44

Dr. Daniel Al Awad [*]
Dr. George Dib **

(Received 22 / 4 / 2015. Accepted 21 / 1 /2016)

□ ABSTRACT □

The objective of this research is to study the effect of some plant growth regulators (plant hormones) on *in vitro* salt tolerant seedling multiplication. Seeds were germinated in Petri dishes on solid Murashinge and Skoog (MS) medium supplemented with NaCl (100 mM) and BAP (6-Benzylamino Purine) (1 mg\L) for 10 days. Cotyledonary nodes and apical buds were isolated from salt tolerant seedling and cultured *in vitro* on solid MS medium containing NaCl (100 mM\L) and different concentrations of BAP and NAA (Naphthalene acetic acid).

The highest response (71.42%) of cotyledonary nodes (CN) and the best mean number of buds (3.20) formed per (CN) were obtained on medium with BAP (1 mg\L) + NAA (0.5 mg\L).

The best result of apical buds explants producing buds 68.57% and the best mean number of buds per explant 2.43 were on medium with BAP (0.5 mg\L) + NAA (0.1 mg\L).

buds were elongated, as well as rooted on control MS medium without plant hormones with 95%.

The rooted plantlets were transfered into pots with soil, irrigated with saline water (100 mM\L) and acclimatized at laboratory conditions. Most salt tolerant plants grew to maturity with 80% in 13-14 weeks.

Keywords: Soybean – seedling- Salt tolerant – *In vitro* selection – Cotyledonary node – apical bud – multiplication.

[*] **Professor, Departmet of plant biology , Faculty of Sciences ,Tishreen University, Lattakia, Syria**
****Professor, Departmet of plant biology , Faculty of Sciences, Tishreen University, Lattakia, Syria**

مقدمة:

يُعد فول الصويا [*Glycine max* (L.) Merrill] الذي ينتمي إلى الفصيلة القرنية Leguminosea من النباتات المهمة اقتصادياً، ومصدراً للزيوت والبروتينات ذات النوعية العالية ويحتوي فيتامينين A و D (Radhakrishnan and Kumari, 2009) ومستقلبات ثانوية مثل السبونينات، الايزوفلافونيدات والمركبات الفينولية (Sakthivelu *et al*., 2008). يلعب دوراً في تثبيت الآزوت الجوي (Burris and Roberts, 1993).

تعاني النباتات غير المتحملة للملوحة في البيئة المالحة من سمية شوارد Cl^- وNa^+ ومن عجز مائي بالإضافة إلى تخرب الليبيدات والبروتينات والحموض النووية في الخلايا (Hernandez *et al*., 2000; Queiros *et al*., 2007) . تعدّ الملوحة من إحدى المشاكل الرئيسة في الإنتاج الزراعي(Flower, 2004) ، و من أحد العوامل التي تؤثر في نمو النبات وإنتاجيته (Hamwieh and Xu, 2008) . تؤثر العوامل البيئية في نمو وتطور النباتات (Gunian, 2010) لذلك تعد صفة تحمل الملوحة من الصفات المرغوبة عند النبات وذلك لتحسين الإنتاجية في المناطق المالحة والجافة. أشار Hasegawa *et al*. (1994) و Tal (1994) إلى أهمية زراعة الأنسجة في الزجاج لتحسين النباتات من ناحية تحمّلها للملوحة.

توجد صعوبة في اختبار تحمّل الملوحة في الحقل بسبب اختلاف التراكيز الملحية من منطقة إلى أخرى (Bakheet *et al*., 2006) . بالمقابل بين Aazami *et al* (2010) إمكانية اختبار تحمّل الملوحة للنبات بشكل سريع وفي مراحل مختلفة من النمو باستخدام تقانة الزراعة في الزجاج(في المختبر) مقارنة بالطرائق التقليدية. تمّ استخدام تقانة الزراعة في الزجاج بهدف الحصول على نباتات متحمّلة للملوحة عند نباتات مختلفة وذلك بدءاً من زراعة : الخلايا المتحمّلة للملوحة (Nabors *et al*., 1980; Binh *et al*., 1994 ; Queiros *et al*.,2007) ، أجزاء من الساق والأوراق على أوساط مختلفة التراكيزالملحية (Mathur *et al*., 1980)، البراعم القميّة (Cano *et al*., 1998) ، الكالوس (ثفنات) المتحملة للملوحة (Veraplakorn *et al*., 2013 ; Abdi *et al*., 2011 ; Liu and Staden, 2000; Rao *et al*.,2005;)، العقد الفلقية (Aazami *et al*., 2010) و البراعم الجانبية (Gunian, 2010).

تتطلب الأنواع النباتية التي يتم تكاثرها في الزجاج أنواع مختلفة من منظمات النمو وبتراكيز مختلفة (Namli *et al*., 2010) .تمّت دراسة تأثير تراكيز مختلفة لمنظمات النمو النباتية في تشكّل البراعم والحصول على نباتات عند أصناف مختلفة من فول الصويا وذلك من زراعة أجزاء مختلفة من النبات مثل العقدة الورقية الأولى (1990, Kim *et al*.)، السويقة الجنينية السفلى (Tripathi,. and Tiwari , 2003) ، العقدة الفلقية(Janani and Kumari , 2013) البرعم القمي (Soto *et al*. , 2013) ، وعند أصناف مختلفة لنباتات أخرى (Naeem *et al*, 2004; Gubis *et al*, 2004; Devi *et al*., 2008; Park *et al*., 2011). بيّنت دراسات متعددة أن لل BAP والـNAA دور مهم في تشكل البراعم الخضرية حيث تمت دراسة تأثير BAP في تشكل البراعم عند أصناف أخرى من فول الصويا وذلك بدءاً من زراعة العقد الفلقية (Wright *et al*., 1986)، العقد الساقية والسويقات الجنينية (Dan and Reichert, 1998) ومن أنصاف البذور الناضجة والعقد الفلقية (Paz *et al*., 2006) وتبين أن التركيز 5 ميكرو مول/لتر لعب دوراً مهماً في تحسين تشكل البراعم الخضرية .

ترافق هذا البحث مع دراسة أخرى حول تأثير الملوحة في إنبات البذور ونمو البادرات المزروعة في المختبر لصنفين من فول الصويا Sb-44، Sb-172. وتبيّن أن الصنف الأول كان أكثر تحمّلاً بنسبة 16%، لذلك تمّ

اختياره لهذه الدراسة. وكانت نسبة نمو البادرات في التركيز 100 أفضل منها في التركيز 150 ميلي مول/لتر لذلك اخترنا التركيز الأول لاستخدامه في إنبات البذور ومن ثم انتخاب البادرات المتحمّلة للملوحة والنامية بشكل جيد في هذا التركيز وذلك لإكثارها في الزجاج .

أهمّية البحث وأهدافه:

تأتي أهمية البحث من الأهمية الاقتصادية لنبات فول الصويا ومن أهمية انتخاب البادرات المتحملة للملوحة وإكثارها في الزجاج ومن ثم إمكانية زراعة النباتات الناتجة في بيئة مالحة.

ويهدف البحث إلى:

1 -انتخاب البادرات المتحملة للملوحة والمزروعة في الزجاج.

2 -دراسة تأثير تراكيز مختلفة من بعض منظمات النمو في إكثار البادرات المنتخبة.

3 -الحصول على نباتات كاملة متحملة للملوحة.

طرائق البحث و مواده:

المادة النباتية:

تمّ استخدام بذور الصنف Sb–44 من فول الصويا والتي تمّ الحصول عليها من الهيئة العامة للبحوث الزراعية – دوما – دمشق وذلك لإنباتها ونموها إلى مرحلة متقدمة.

وسط الاستنبات:

تم استخدام الوسط المغذي MS (Murashinge and Skoog, 1962) كوسط أساسي. أضيف إلى هذا الوسط في حالة الإكثار تراكيز مختلفة من BAP (6 – Benzyl amino purine)، NAA (Naphtalene acetic acid) بوجود NaCl بتركيز 100 ميلي مول/لتر. بينما تمّت إضافة NaCl (100 ميلي مول/لتر) و BAP (1 مغ/لتر) في حال إنبات البذور. تمّ استخدام الوسط الأساسي المضاف إليه فقط NaCl (100 ميلي مول/لتر) في تجذير ونمو البراعم.

ضُبطت درجة الـ pH على 5.7 وأضيف إلى الوسط الآغار آغار بتركيز 8 غ/لتر. تمّ توزيع الوسط الذي يحوي فقط NaCl في أنابيب اختبار زجاجية قبل التعقيم وذلك بعد التسخين والغليان بينما وزع الوسط المضاف إليه منظمات النمو و NaCl بعد التعقيم في أطباق بتري قطر (9 سم) وتمّ ذلك داخل غرفة تعقيم وتنقية الهواء Laminar Flow Hood.عُقّمت هذه الأوساط والأدوات المستخدمة في الزراعة بوساطة جهاز التعقيم (أوتوكلاف) بدرجة حرارة 121 ولمدة 20 دقيقة.

تعقيم البذور، تحضير العينات وزراعتها:

نُقعت بذور الصنف المستخدم في ماء عادي لمدة ساعة ثم تمّ تعقيمها بالكحول الإتيلي 70% لمدة دقيقة واحدة، وغُمرت بعد ذلك برشاحة هيبوكلوريت الكالسيوم 8% لمدة 20 دقيقة، غُسلت البذور بعد الانتهاء ثلاث مرات بالماء المقطر والمعقم.

زُرعت البذور لمدة 10 أيام في أطباق بتري التي تحوي وسط MS الصلب والمضاف إليهNaCl (100 ميلي مول/لتر) و BAP بتركيز (1 مغ/لتر) وذلك لإنباتها والحصول على بادرات في مرحلة متقدمة من النمو. تمّ انتخاب البادرات المتحملة للملوحة ومن ثم عُزلت منها العقد الفلقية والبراعم القميّة لزراعتها على أوساط الإكثار.

تصميم التجربة:

تم إستخدام قطع عشوائية بسيطة حيث زرعت 40 عقدة فلقية على كل وسط من الأوساط المستخدمة ووزعت هذه العقد في 8 أطباق بتري لكل وسط وبمعدل 5 عينات في كل طبق . تم تطبيق التصميم التجريبي نفسه على البراعم القمية أي زراعة 40 برعماً قمياً على كل وسط ، وزعت هذه البراعم أيضاً في 8 أطباق بتري . تمّ إختيار العينات بشكل عشوائي من البادرات النامية في الأطباق والمتحملة للملوحة .

حُضنت جميع الزراعات في حاضنة نمو (16 ساعة إضاءة/8 ساعات ظلام) وبدرجة حرارة 25±1 مْ وشدّة إضاءة تتراوح بين 2500–3000 لوكس. دُرست النتائج من حيث النسب المئوية للعينات التي تكاثرت ومتوسط عدد البراعم المتشكلة عليها وتمت مقارنتها إحصائياً.

الدراسة الإحصائية:

تمّت مقارنة النتائج باستخدام البرنامج SPSS لإجراء تحليل التباين الأحادي ANOVA ولإجراء اختبار LSD لمعرفة أقل فرق معنوي بين المتوسطات وذلك على مستوى ثقة 95%.

النتائج والمناقشة:

1 – تأثير التراكيز المختلفة من BAP وNAA في تشكل البراعم الخضرية من العقد الفلقية:

تمّ انتخاب البادرات المتحملة للملوحة والنامية في أطباق بتري (الشكل 1–A) ومن ثم عُزلت منها العقد الفلقية وزرعت على أوساط مختلفة من حيث تراكيز منظمات النمو النباتية المستخدمة (الجدول 1).

تبين النتائج أنه لم يتم تشكل براعم خضرية على وسط MS الأساسي الذي لا يحوي منظمات النمو (شاهد). وكانت النسبة المئوية للعقد الفلقية التي شكلت براعماً خضرية 45.71% على الوسط المغذي المضاف إليه BAP 1 مغ/لتر (MS1) وارتفعت النسبة المئوية إلى 71.42 في الوسط المغذي (MS4) الذي يحوي BAP (1 مغ/ل) + NAA (0.5 مغ/ل) وأعطى هذا الوسط أفضل النتائج (الشكل 1–B).

وانخفضت النسبة المئوية إلى 62.85% في حال انخفاض تركيز BAP إلى 0.5 مغ/ل (MS3) وإلى 54.28% عندما ارتفع تركيز BAP في الوسط إلى 2 مغ/ل (MS5) وذلك مع بقاء التركيز نفسه لـ NAA 0.5 مغ/ل. وكانت النسبة المئوية في الوسط (MS2) 57.14% أقل منها في الوسط (MS3) (62.85) عندما انخفض تركيز NAA إلى 0.1 مغ/ل.

تشير هذه النتائج إلى دور التراكيز المختلفة للـ BAP والـ NAA في تشكل البراعم الخضرية وتشير أيضاً إلى أن الوسط الذي يحوي مزيجاً للاثنين معاً كان أفضل من الوسط الزرعي المضاف إليه فقط BAP.

أما فيما يتعلق بمتوسط عدد البراعم المتشكلة من كل عقدة، بيّنت النتائج أن الوسط MS4 أيضاً كان أفضل من بقية الأوساط حيث كان متوسط عدد البراعم فيه 3.20 (الشكل 1–B) وانخفض هذا الأخير إلى 2.49 في حال انخفاض تركيز BAP (MS3) وإلى 1.9 في حال ارتفاع تركيزه (MS5) وأصبح 2.51 في MS2 و2.21 بغياب NAA (MS1).

توجد فروق واضحة بين نسبة تشكّل البراعم الخضرية من العقد الفلقية على الوسط الشاهد وبقية الأوساط ، وتوجد فروق معنوية بين متوسط عدد البراعم الخضرية على أفضل وسط (MS4) ومتوسطات عدد البراعم الخضرية المتشكّلة على بقية الأوساط التي تم فيها زيادة تركيز BAP (MS5) أو انخفاضه (MS2، MS3) وكذلك في حال انخفاض NAA (MS2) أو عدم وجوده (MS1). (الجدول 1).

الجدول 1: تأثير التراكيز المختلفة لمنظمات النمو النباتية (BAP وNAA) في تشكل البراعم الخضرية وعددها من العقد الفلقية المزروعة على الأوساط المغذية.
تُشير الأحرف غير المشتركة إلى وجود فروق معنوية بين متوسطات عدد البراعم المتشكلة.

رمز الوسط	الوسط المغذي	النسب المئوية للعقد الفلقية التي شكلت براعماً خضرية	متوسط عدد البراعم الخضرية المتشكلة من كل عقدة
MS0	MS (دون منظمات النمو) شاهد	0	a 0
MS1	BAP+MS (1 مغ/لتر)	45.71	b 2.21±0.4
MS2	BAP+MS (0.5 مغ/لتر)+NAA (0.1 مغ/لتر)	57.14	c 2.51±0.5
MS3	BAP+MS (0.5 مغ/لتر)+NAA (0.5 مغ/لتر)	62.85	c 2.49±0.2
MS4	BAP+MS (1 مغ/لتر)+NAA (0.5 مغ/لتر)	71.42	d 3.20±0.3
MS5	BAP+MS (2 مغ/لتر)+NAA (0.5 مغ/لتر)	54.28	b 1.9±0.4
LSD %			0.22

B

A

D

C

الشكل 1: انبات البذور وإكثار البادرات المتحملة للملوحة باستخدام زراعة العقد الفلقية والبراعم القمّية، تجذير البادرات الناتجة واستطالتها.

A. إنبات البذور على وسط MS الصلب الذي يحوي BAP (1 مغ/لتر)+ 100 ميلي مولNacl / ليتر لمدة 10 أيام ونمو البادرات المتشكلة.

B. إكثار العقد الفلقية على وسط MS الصلب الذي يحوي BAP (1 مغ/لتر)+NAA (0.5 مغ/لتر) +100 ميلي مول Nacl / ليتر . تشكّل البراعم الخضرية بعد 4 أسابيع من الزراعة.

C. إكثار البراعم القمّية على وسط MS الصلب الذي يحوي BAP (0.5 مغ/لتر)+NAA (0.1 مغ/لتر) +100 ميلي مول Nacl / ليتر . تشكّل البراعم الخضرية بعد 4 أسابيع من الزراعة.

D. تجذير ونمو البراعم المتشكلة من الإكثار على وسط MS الصلب الخالي من الهرمونات النباتية والذي يحوي 100 ميلي مول Nacl / ليتر بعد 3 أسابيع من الزراعة.

تبين في دراسة حديثة أيضاً عند أحد الأصناف الكوبية لفول الصويا أن النسب المئوية للعقد الفلقية التي أعطت براعماً خضرية كانت 41.2% بوجود BAP بتركيز 1.5 مغ/ل، ولوحظ أن العينات المأخوذة من بذور نابتة ومزروعة لمدة 6 أيام أعطت نتائجاً أفضل من حيث النسب المئوية للعينات التي شكلت براعماً ومن حيث عدد البراعم المتشكلة على كل عينة (Soto *et al.*, 2013). حصل Janani and Kumar (2013) على براعم خضرية في الزجاج بدءاً من زراعة العقد الفلقية عند أحد أصناف فول الصويا (JS335) وكانت أفضل النتائج من حيث النسبة المئوية لاستجابة العقد 53.3% ومن حيث متوسط عدد البراعم 4.66% وذلك بإضافة BAP بتركيز 15 ميكرومول/ل (3.375 مغ/ ل) إلى MS الأساس وهذا التأثير الإيجابي للتركيز المرتفع لـ BAP لايتوافق مع نتائجنا أيضاً .

تتفق نتائجنا مع دراسة أخرى من حيث دور تركيز الـ BAP في تحسين نتائج الزراعة بينما لاتتفق من حيث إنخفاض تركيز NAA وذلك في تشكل البراعم حيث لوحظ تزايد النسب المئوية لتشكل البراعم على المحاور الجنينية المزروعة في الزجاج عند أحد أنواع اللوبياء من 41.67 بوجود BAP (0.25 مغ/ل) إلى 100% على الوسط الذي يحوي BAP (1 مغ/ل) بمشاركة NAA (0.10 مغ/ل) ، وتزايد أيضاً عدد البراعم المتشكلة على كل محور من 1.78 إلى 10.33 في الوسطين السابقين على التتالي (Aazami *et al.*, 2010). بيّن Rao and Patil (2012) عند نوع آخر من اللوبياء أن إضافة BAP بتركيز 1 مغ/ل و2 مغ/ل إلى الوسط MS أدت إلى تشكل براعم خضرية على الكالوس المتحملة للملوحة والناتجة من زراعة الفلقات وكانت النسب المئوية للعينات التي أعطت البراعم 21.66% و26% على التتالي، وارتفعت هذه النسب إلى 30.10% و40.13% بإضافة NAA (0.25 مغ/ل) و (0.5 مغ/ل).لاحظنا في تجاربنا ارتفاع النسب المئوية للعقد الفلقية التي شكلت براعماً خضرية بوجود NAA (0.5 مغ/ل) مع BAP (1 مغ/ل) وهو الوسطالأفضل MS 5 مقارنة بالوسط MS1 الذي يحوي BAP (1 مغ/ل) . ولاحظ هذا الباحث أيضاً إرتفاع متوسط عدد البراعم المتشكلة على العينات المزروعة من 2.90 بوجود فقط BAP (1 مغ/ل) إلى12.80 بوجود BAP (1مغ/ل) + NAA (0.25 مغ/ل).نلاحظ في الحال الأخيرة تحسين النتيجة بإضافة NAA وهذا يتفق مع بحثنا حيث لاحظنا ارتفاع متوسط عدد البراعم المتشكلة على العقد الفلقية المزروعة من 2.21 بوجود BAP (1 مغ/ل) إلى 3.20 بإضافةNAA إلى الوسط (MS 4).

2 - تأثير التراكيز المختلفة لـBAP وNAA في تشكل البراعم الخضرية من البراعم القميّة:

تمّ عزل البراعم القمية من البادرات المتحملة للملوحة وزرعت على الأوساط نفسها التي استخدمت لزراعة العقد الفلقية (الجدول 2).تبيّن النتائج في هذا الجدول عدم تشكّل البراعم الخضرية على الوسط MS (الشاهد) الذي لا يحوي منظمات النمو، وعندما تمت إضافة 1 مغ/ل من BAP (MS1) كانت النسبة المئوية للبراعم القميّة التي شكّلت براعماً خضرية 42.85% وكان متوسط عدد البراعم المتشكلة من كل برعم قمي 1.55. أعطى الوسط MS2 الذي يحوي BAP (0.5 مغ/ل)+NAA (0.1 مغ/ل) أفضل نتيجة من حيث النسبة المئوية للعينات التي شكلت براعماً خضرية (68.57%) ومن حيث متوسط عدد البراعم المتشكلة على العينات المزروعة (2.43) (الشكل 1-C). تبيّن أن زيادة تركيز NAA (0.5 مغ/ل) في الوسط MS3 أدت إلى انخفاض النسبة المئوية للبراعم المتشكلة (60%) ومتوسط عدد البراعم المتشكلة على كل عينة (2.12)، وانخفضت النتائج أيضاً في الوسطين MS4 و MS5 مع زيادة تراكيز BAP و NAA.

الجدول 2: تأثير التراكيز المختلفة لمنظمات النمو النباتية (BAP وNAA) في تشكل البراعم الخضرية وعددها من البراعم القميّة المزروعة على الأوساط المغذية.

تشير الأحرف غير المشتركة إلى وجود فروق معنوية بين متوسطات عدد البراعم المتشكلة.

رمز الوسط	الوسط المغذي	النسب المئوية للبراعم القمية التي شكلت براعماً خضرية	متوسط عدد البراعم الخضرية المتشكلة من كل برعم قمي
MS0	MS (دون منظمات النمو) شاهد	0	a 0
MS1	BAP+MS (1 مغ/لتر)	42.85	b 1.55±0.2
MS2	BAP+MS (0.5 مغ/لتر)+NAA (0.1 مغ/لتر)	68.57	d 2.43±0.2
MS3	BAP+MS (0.5 مغ/لتر)+NAA (0.5 مغ/لتر)	60	c 2.12±0.3
MS4	BAP+MS (1 مغ/لتر)+NAA (0.5 مغ/لتر)	48.57	c 2.04±0.4
MS5	BAP+MS (2 مغ/لتر)+NAA (0.5 مغ/لتر)	40	b 1.43±0.4
LSD %			0.18

يوجد فروق بين النسبة المئوية للشاهد (0%) والنسب المئوية لبقية الأوساط من حيث تشكّل البراعم الخضرية من البراعم القمية ، وأشارت الدراسة الإحصائية إلى وجود فروق معنوية بين متوسط عددها على أفضل وسط (MS2) ومتوسطات عددها على بقية الأوساط حيث تمّت زيادة تركيز BAP وتركيز NAA، و يوجد فرق معنوي أيضاً بين (MS2) والوسط (MS1) الذي يحوي فقط BAP . (الجدول 2).

بينت دراسات أخرى أهمية السيتوكينين BAP والأوكسينات في تشكل البراعم الخضرية في الزجاج. لاحظ Martins and Sondahl (1983) أنه تشكلت براعم متعددة بدءاً من زراعة البراعم القميّة عند أصناف مختلفة من الفاصولياء وذلك على الوسط الذي يحوي فقط BAP وتحسنت النتائج بإضافة NAA ولكن كانت أفضل النتائج على الوسط الذي يحوي BAP والأوكسين 2.4-D (ثنائي كلوروفينوكسي حمض الخل) وهذا يتفق مع دراستنا من حيث تحسين النتائج بإضافة NAA أيضاً.

يلعب السيتوكينين BAP بمفرده أو بالمشاركة مع NAA دوراً مؤثراً في تشكل البراعم الخضرية وتكاثرها عند أنواع مختلفة من جنس *Hypericum* (Blaskesly and Constantin, 1992). وبيّن Santarem (2003) أن البراعم القميّة المزروعة على الوسط الذي يحوي مزيجاً من BAP و NAA أعطت 4.06 برعماً لكل عينة مزروعة وذلك عند *Hypericum Perforatum* L. وهذا يتوافق مع دراستنا من حيث تأثير المزيج NAA مع BAP في تشكل البراعم. بالمقابل تبين في دراسة أخرى أن NAA لم يلعب دوراً إيجابياً في زيادة عدد البراعم الخضرية المتشكلة على كل عينة من البراعم القميّة للنوع *Hypericum retusum* والمزروعة على وسط MS المضاف إليه 0.5 مغ/ل من BAP ولكن انخفضت النسبة بإضافة NAA 0.25 مغ/ل (Namli *et al.*, 2010).

حصل Oana *et al.* (2008) على أعلى نسبة مئوية لتشكّل البراعم الخضرية على الوسط الذي يحوي BAP (2 مغ/ل) بالمشاركة مع NAA (0.1 مغ/ل) وذلك على نبات *Origanum vulgare*. كانت أفضل نتيجة في تجاربنا 68.57% على الوسط BAP (0.5 مغ/ل) مع NAA (0.1 مغ/ل) بينما أدى ارتفاع تركيز BAP إلى 2 مغ/ل وإرتفاع تركيز NAA إلى 0.5 مغ/ ل إلى انخفاض النتيجة .

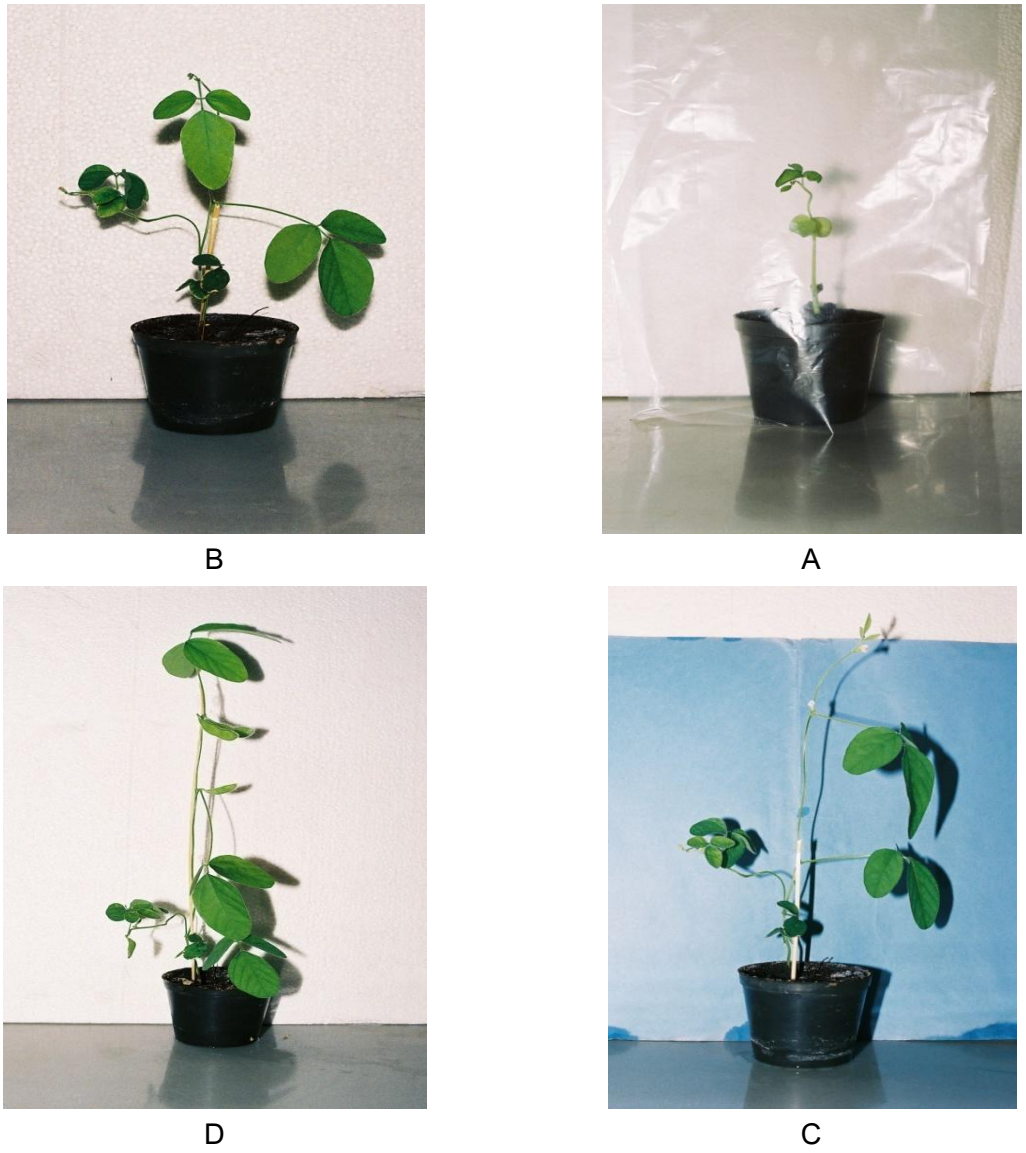
تؤدي إضافة السيتوكينين إلى الأوكسين إلى انقسام خلوي سريع وبالتالي تشكّل عدد كبير من الخلايا غير المتمايزة وذلك عند نبات القمح (Mendoza and Kaeppler, 2002).

أشارت نتائجنا إلى دور مصدر العينة المزروعة في تشكل البراعم حيث تبين أن العقد الفلقية أعطت نسبة مئوية للبراعم المتشكلة عليها في الوسط MS4 أعلى من نسبة البراعم المتشكلة على البراعم القمية المزروعة على الوسط نفسه . بالمقابل كانت نتائج زراعة البراعم القمية على MS2 أفضل من نتائج زراعة العقد الفلقية على الوسط نفسه . بالإضافة إلى ذلك أشارت نتائجنا إلى دور التراكيز الهرمونية في تشكل البراعم وهذا يتوافق مع أبحاث أخرى أشارت إلى دور مصدر العينة المزروعة في تشكل البراعم حيث لوحظ أن الفلقات أعطت أعلى نسبة من البراعم وتلتها العقد الفلقية ومن ثم السويقة الجنينية السفلية وذلك عند نبات *Ocimum basilicum* L. (Asghari *et al.*, 2012). حصل Bicca dode *et al.* (2003) على أفضل نسبة من البراعم الخضرية (66.7%) وأكبر عدد من البراعم المتشكلة على كل عينة (3.46) من الفلقات للنوع نفسه المذكور وذلك على الوسط الزرعي MS المضاف إليه BAP (5 مغ/ل)+NAA (0.2 مغ/ل).

تعود هذه الاستجابات المختلفة للعينات المزروعة إلى إختلاف نسبة الهرمونات الداخلية في النسج النباتية (Close and Gallagher-Ludeman, 1989) وإختلاف النمط الوراثي عند الأصناف .

3 - تجذير البراعم المتشكلة وأقلمة البادرات الناتجة:

تمّ نقل البراعم المتشكلة من الإكثار إلى أنابيب زجاجية تحوي وسط MS الصلب و NaCl بتركيز 100 ميلي مول/لتر بدون إضافة أوكسينات وذلك بهدف تجذيرها ونموها (الشكل 1-D)، نمت وشكلت معظم البادرات جذوراً وكانت نسبة التجذير 95% ومن ثم نقلت هذه البادرات بعد غسل جذورها من الآغار، إلى أصص صغيرة تحوي تربة (تورب) وتمت تغطيتها بأكياس نايلون شفافة، ثُقبت تدريجياً، لمدة أسبوع وذلك لتأمين الرطوبة لها وأقلمتها مع الوسط الخارجي (الشكل 2-A). رُويت هذه البادرات بالماء العادي الذي يحوي NaCl بتركيز 100 ميلي مول/لتر. ونمت بشكل طبيعي بنسبة 80% إلى مرحلة الإزهار ومن ثم إلى مرحلة تشكّل الثمار (الشكل 2-B، C، D) .



الشكل 2: أقلمة وتطور البادرات الناتجة من الإكثار.

A. بادرة بعد نقلها من الأنبوب الزجاجي مغطاة بكيس نايلون شفاف ومثقّب.

B. نمو البادرة في الشروط المخبرية بعد نزع الكيس الشفاف عنها.

C. تطور البادرة من المرحلة الإعاشية إلى مرحلة الإزهار.

D. تطور البادرة من مرحلة الإزهار إلى مرحلة الإثمار (14 أسبوعاً بدءاً من زراعة البذور).

الاستنتاجات والتوصيات :

الاستنتاجات

1 -إمكانية إكثار بادرات فول الصويا المتحملة للملوحة في الزجاج (في المختبر) باستخدام العقد الفلقية والبراعم القمية والحصول على نباتات كاملة متحمّلة للملوحة.

2 -ارتفعت نسبة إكثار العقد الفلقية والبراعم القمية حسب ظروف تجربتنا بإضافة NAA إلى الوسطالذي يحوي BAPو كان الوسط الأفضل لإكثار العقد الفلقية هو MS + BAP (1مغ/ل) + NAA (0.5 مغ/ل)، ولإكثار البراعم القمية هو MS + BAP (0.5 مغ/ل)+NAA (0.1 مغ/ل). وأدت زيادة التراكيز وإنخفاضها إلى إنخفاض نسب النتائج .

3 -كانت استجابة العقد الفلقية من حيث تشكل البراعم الخضرية أفضل من استجابة البراعم القمية .

4 -كانت توجد فروق معنوية بين الوسط الأفضل لإكثار العقد الفلقية MS4 والأوساط الأخرى، وبين الوسط الأفضل لإكثار البراعم القمية MS2 وبقية الأوساط .

-التوصيات:

1 -دراسة أصناف أخرى من فول الصويا وتطبيق تراكيز أخرى من الملوحة.

2 -استخدام تقانة الزراعة في الزجاج لزراعة العقد الساقية والساق والسويقة الجنينية بهدف الإكثار والمقارنة بالعينات المدروسة.

3 -دراسة مدى التحمل للملوحة عند البادرات الناتجة من تشكل الكالوس (الثفنة) لأجزاء مختلفة من النبات.

المراجع:

1- AAZAMI, M.A.; TORABI, M. and SHEKAI, F. Response of some Tomato cultivars to Sodium Chloride stress under *In Vitro* culture condition. African J. of Agri. Research. 5(18), 2010, 2589-2592.

2- AASIM,M.; KHAWAR,M.KH and ÖZCZN,S. Efficint *In vitr*o propagation from preconditioned embryonic axes of Turckish cowpea (*Vigna nuguiculata* L.) cultivar Akkiz. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 62 (4), 2010, 1047-1052.

3- ABDI, G., HEDAYAT, M. and KHUSH-KHUI, M. Development of NaCl-tolerant line in *tanacetum cinerariaefolium* (Trevir.) Schultz-Bip through shoot organogenesis of selected callus line.J, Biol., Environ, SCi., 5 (15), 2011, 111- 119.

4- ASGHARI, F.; HOSSIENI, B.; HASSANI, A.; SHIRZAD, H. Effect of explants source and different hormonal combinations on direct regeneration of basil plants (*Ocimum basilicum* L.) A.J.A.E. 3(1), 2012, 12-17.

5- BEKHEET, S.A.; TAHA, H.S. and SOLLIMAN, M.E. Salt tolerance in tissue culture of onion (*Allium cepa* L.). Arab. J. Biotech. 9(3), 2006, 467-476.

6- BICCA DODE, L.; BOBROWSKI, V.L.; BRAGA, F. JB.; SEIXAS, F.K.; SCHUCH, M.W. *In Vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). Acta Sci., 2, 2003, 435-437.

7- BINH, D.Q; HESZKY, L.E. and SIMON-KISS, I. *In Vitro* studies on salt tolerance in rice (*Oryza stiva* L.) in FAO MedNet Rice: Breeding and Biotechnology group, CIHEAM, Montpellier, 1994, 53-54.

8- BLASKESLEY, D. and CONSTANTINE, D. Uptake and metabolism of 6-benzyadenine in shoot cultures of arange of species. Plant cell tissue and organ culture, 28, 1992, 183-186.

9- BURRIS, .H. and ROBERTS, G.P. Biological Nitrogen fixation. Annu. Rev. Nutr., 13, 1993, 317-335.

10- CANO, E.A.; ALFOCEA, F.P. and MORENO, V. Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. Plant cell, Tiss. And organ cul., 53, 1998, 19-26.

11- CLOSE, K.R.; and GALLAGHER-LUDEMAN, L.A. Structure activity relationships of auxin-like plant growth regulators and genetic influences on the culture induction responses in maize (*Zea mays* L.). Plant Sci, 61, 1989, 245-252.

12- DAN,Y. and REICHERT, N.A Organogenic regeneration of soybean from hypocotyle explants. *In Vitro* cellular and developmental biology-plant, 34, 1998, 14-21.

13- DEVI, R.; DHALIWAL, M.S.; KAURA, A. and GOSAL, S.S. Effect of growth regulators on *in vitro* morphogenic response of tomato. Indian J. Biotech., 7, 2008, 526-530.

14- EL SAYED, H.E.A. Isolation and characterization of NaCl resistant callus of field pea (*Pisum sativum* L.) to salinity. Agric-and Bio.J. of North America, 2(6),2011, 964-973.

15- FLOWERS, T.J. Improving crop salt tolerance. Journal of Exper. Bot., 55, 2004, 307-319.

16- GUBIS, J.; LAJCHOVA, Z.; FARAGO, J. and JUREKOVA, Z. Effect of growth regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Biologia, Batislava, 59(3), 2004, 405-408.

17- GUNIAN GARG. *In Vitro* screening of *Catharanthus roseus* L. Cultivars for salt tolerance using physiological parameters. Inter. Jour. Of Environ. Sci. and Develop., 1(1), 2010, 24-30.

18- HAMWIEH, A and XU, D. Conserved salt tolerance quantitative trait locus (QTL) in wild and cultivated Soybean. Breeding science, 58, 2008, 355-359.

19- HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; NELSON, D.E.; SAMARAS, Y. and RHODES, D. Tissue culture in the improvement of salt tolerance in plants. In: Monographs on theoretical and applied genetic: breeding plants with resistance to problem solis. 1994.

20- HERNANDEZ, J.A; JIMENEZ, A.; MULLINEAUX, P. and SEVILLA, F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. Plant cell environ. 23, 2000, 853-862.

21- JANANI, C. and KUMARI, B.D.R. *In vitro* plant regeneration from cotyledonary nod and half seed explants of *Glycine max* L. (JS335), Annals of Biol. Research, 4(11), 2013, 60-66.

22- KIM, J, LAMOTTE, C.E. and Hack, E. plant regeneration *in vitro* from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings. J. Plant physiol, 136(6), 1990, 664-669.

23- LIU, T., and STADEN, J.V. Selection and characterization of sodium chloride-tolerant callus of *Glycine max* (L.) Merr. C V Acme. Plant growth Reg., 31, 2000, 195-207.

24- MARTINS, I.S. and SONDAHL, M. R. Multiple shoot Formation from shoot apex cultures of *phaseolus VuLgaris* L. J. plant physiol. , 115, 1984, 205-208.

25- MATHUR, A.K.; GANAPATHY. P.S. and JOHRI, B.M. Isolation of sodium chloride-tolerant plantlets of *Kickxia ramosissima* under *in vitro* conditions. Z. p flanzenphysiol., Bd., 99, 1980, 287-294.

26- MENDOZA, M.G. and KAEPPLER, H.F. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *In vitro* cell Dev. Pl. 38, 2002, 39-45.

27- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium fo rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15, 1962, 473-497.

28- NABORS, M.W. GIBBS, S.E; BENSTEIN, C.S. and MEIS, M.E. NaCl-tolerant tobacco plants form cultured cells. Z. Pflanzen physiol, 97, 1980, 13-17.

29- NAEEM, M.; BHATTI, I. AHMAD, R.H., and ASHRAF, M.Y. Effect of some growth hormones (GA3, IAA and Kinetin) on the morphology and early or delayed initiation of bud of lentil (*Lens culinaris* Medik). Pak. J. Bot., 36(4), 2004, 801-809.

30- NAMLI, S.; AKBAS, F.; ISIKALAN, C.; TILKAT, E.A. and BASARAN, D. The effect of different plant hormones on multiple shoots of *Hypericum retusum* Auche, Plantomics journal, 3 (1), 2010, 12-17.

31- OANA, C.T.; MARCELA, F.; MARIA, P. Consideration regarding the effects of growth regulators over the *in vitro* morphogenetic reaction at origanum vulgare L. J. Plant develop., 15, 2008, 133-138.

32- PARK, W.T.; KIM, Y.K.; KIM. Y.S.; PARK, N.I.; LEE, S.Y. and PARK, S.U. *In Vitro* plant regeneration and micropropagation of *Liriope Platyphylla*. Plant omics journal, 4(4), 2011, 199-203.

33- PAZ, M.M.; MARTINEZ, J .C.; KALVIG, A.B.; FONGR, T.M. and WANG, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *agrobactrium*_mediated soybean transformation. Plant cell reports 25, 2006, 206-213.

34- QUEIROS, F.; FIDALGO, F.; SANTOS, I. and SALEMA, R. *In Vitro* selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. Biologia planetarium. 51(4), 2007, 728-734.

35- RADHAKRISHNAN, R. and RANJITHA KUMARI, B.D. Changes in protein content in micropropagated and conventional Soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.). World J. of Agr. Scien., 5(2) 2009, 186-189.

36- RAO, S. and PATIL, P. *In vitro* selection of salt tolerant calli lines and regeneration of salt tolerant plantlets in Mung bean (*Vigna radiata* L. WILCZEK). In Biotech. Molecular studies and novel applications for improved quality of human life, intech, 2012, 250P.

37- RAO, S.; PATIL, P. and KAVIRAJ, C.P. Callus induction and organogenesis from varios explants in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Indian J. of Biotech. 4, 2005, 556-560.

38- SAKTHIVELU, G.; AKITHA DEVI, M.K.; GIRIDHAR, P.; RAJASEKARAN, T.; RAVISHANKAR, G.A. Drought-induction alterations in growth, osmotic potential and *In Vitro* regeneration of Soybean cultivars. Gen. Appl. Plant physio., 34(1-2), 2008, 103-112.

39- SANTAREM, E. R and ASTARIT, L. V. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. Brazilian J, of pl. physiol, 15(1), 2003, 43-47

40- SOTO, N.; FERREIRA, A.; DELGADO, C. and ENRIQUEZ, G.A. *In Vitro* regeneration of soybean plants of the Cuban incasoy-36 variety. Biotech. Aplicada, 30 (1), 2013, 1-8.

41- TAL, M. *In Vitro* selection for salt tolerance in crop plants: theoretical and practical considerations. *In Vitro* cell Dev. Biol. 30, 1994, 175-180.

42- TRIPATHI, M. and TIWARI, S. Epigenesis and high frequency plant regeneration from soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] hypocotyls plant tissue cult., 13(1), 2003, 61-73.

43- VERAPLAKORN, V.; NANAKORN, M.; KAVEETA, L.; SUWAN WONG, S. and BENNETT, I.J. Variation in ion accumulation as a measure of salt tolerance in seedling and callus of *Stylosanthes guianensis*. Theor. And experi. Plant physio., 25(2), 2013, 109-118.

44- WRIGHT, M.S.; KOEHLER, S.M.; HINCHEE, M.A. and CARNES, M.G. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max* (L.) Merr. Plant cell reports, 5, 1986, 150-154.

45- TRIPATHI,M. and TIWARI,S. Epigenesis and Frequency plant Regeneration fom Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Hypocotyls, 2003, Plant Tissue Cult, 13 (1), 61-73.