مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (8) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (8) 2013

تشكّل الثفنات (الكالوس) والتكاثر الخضري في الزجاج *In vitro* من المحاور الجنينية لصنفين من فول الصويا

الدكتور دانيال العوض*

(تاريخ الإيداع 18 / 8 / 2013. قبل للنشر في 24 / 9 / 2013)

□ ملخّص □

كان الهدف من هذا البحث هو دراسة تأثير بعض الهرمونات النباتية(منظمات النمو النباتية) BAP,NAA,2,4-D والنمط الوراثي في تشكل الثفنات (الكالوسات) والبراعم في الزجاج من المحاور الجنينية لبذور صنفين من فول الصويا (sb-44, sb-172). تمت زراعة المحاور الجنينية على الوسط المغذي الأساسي MS والوسط المضاف إليه 1، 2 و3 مغ/ل من BAP بمفرده وبالمشاركة مع NAA (0.5 مغ/ل). حضنت الزراعة في الدرجة 25±1 مْ وتحت فترة ضوئية لمدة 16 ساعة (2000-2500 لوكس) و8 ساعات ظلام. تمّ تسجيل أعلى نسبة مئوية 92.5% لتشكل الكالوس وأعلى متوسط 4.63 لعدد الكالوسات على الوسط MS الذي يحوي BAP (3 مغ/ل) وNAA (0.5 مغ/ل). وتم الحصول على أعلى نسبة مئوية 67.5% وأعلى متوسط 3.38 لعدد البراعم على الوسط MS المضاف إليه BAP (1 مغ/ل) وNAA (0.5 مغ/ل) عند الصنف sb-44.

ازدادت النسبة المئوية لتشكل الكالوس بينما تناقصت النسبة لتشكل البراعم مع كل زيادة لتركيز BAP عندما استخدم بمفرده. تمت ملاحظة زيادة إيجابية على جميع الأوساط بمشاركةNAA(0.5 مغ/ل) أو 2.4-D (0.5 مغ/ل) عند الصنفين المستخدمين في هذه الدراسة.أظهرت هذه الدراسة تأثير اختلاف النمط الوراثي في تشكل الكالوس والبراعم.تمّ تشكل الجذور على جميع البادرات المزروعة على وسط MS من دون هرمونات نباتية.

تمت أقلمة النباتات المجذرة بنقلها إلى أصص تحوي تربة مغذية (تورب)وريّها بالماء في ظروف مخبرية . تمّ الحصول على نباتات بحالة خضرية جيدة استمر نموّها إلى مرحلة النضج خلال 12-13 أسبوعاً.

الكلمات المفتاحية: فول الصويا – المحاور الجنينية – تشكل الثفنات– تشكل البراعم.

الاختصارات:

- MS: MURASHIG and SKOOG.
- BAP: 6-بنزيل أمينوبيورين.
- NAA: نافتالين حمض الخل.
- 2,4-D: ثاني كلوروفينوكسي حمض الخل.
- IAA: اندول حمض الخلّ.

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

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (8) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (8) 2013

In Vitro Callus formation and propagation from embryonic axes of two cultivars of Soybean

Dr. Daniel Al Awad*

(Received 18 / 8 / 2013. Accepted 24 / 9 /2013)

□ ABSTRACT □

The objective of this research isto study the in vitro effect of some plant hormones (growth regulators) BAP,NAA, 2,4-D, and genotype on callus and bud formation from embryonic axes of two Soybean cultivar seeds (sb-44, sb-172).

The embryonic axes were cultured on MS basal medium and MS supplemented with 1, 2, 3 mg/l BAP alone and in combination with 0.5 mg/l NAA.The cultures were maintained at 25 C°±1 with photoperiod of 16 hours light (2000-2500 lux) and 8 hours dark.The highest percentage92.5% and mean average 4.63 of callus formation were recorded on MS medium containing BAP (3 mg/l) and NAA (0.5 mg/l).

The highest percentage 67.5% and average 3.38 of buds formation were obtained on MS medium supplemented 1 mg/l BAP and 0.5 mg/l NAA in cultivar sb-44.

The percentage of callus formation increased, while the percentage of bud formation decreased with each increase in BAP concentration when used alone. A positive increase was observed in all mediums in the combination of 0.5 mg/l NAA or 0.5 mg/l 2. 4-D in the two cultivars used in this study.

This study showed the genotypic difference effect on callus and bud formation.Roots were formed from allplantlets cultured on MS medium without plant hormones.Rooted plantlets were transferred into pots with nutrient soil, irrigated with water, and adapted tolaboratory conditions. Good plants grown to maturity were obtained in 12-13 weeks.

Keywords: Soybean, embryonicaxes, callus formation, buds formation

Abbreviations:
MS: Murashig and Skoog, BAP: Benzylaminopurine, NAA: Naphthalenacetic acid, 2,4-D: 2.4-Dichlorophenoxy acetic acid, IAA:Indolacetic acid

***Associate professor, Department of plant biololgy, Faculty of sciences , Tishreen University, Lattakia, Syria**

مقدّمة:

ينتمي فول الصويا[*Glycinemax*(L.) Merr.] إلى الفصيلة القرنية Leguminosea، وتعدّ بذوره مصدراً مهمّاً للبروتين والزيت وخاصة بالنسبة إلى العالم الثالث (TRIPATHI and TIWARI,2003)، وتستخدم أيضاً علفاً للدواجن وفي المزارع المائية (JOYNER *et al.*,2010).تمّ استخدام تقانة الزراعة في الزجاج بهدف الحصول على نباتات جديدة انطلاقاً من زراعة المرستيم القمّي لنباتات عدّة تنتمي إلى الفصيلة القرنية (KARTHA *et al.*1981; AASIM *et al.*2008)، الأجنّة عند فول الصويا (TILTON and RUSSELL,1984)، جزء من المحور الجنيني متصل مع فلقة عند الفاصولياء (FRANKLIN *et al.*,1991)، محاور أجنة ناضجة للفول السوداني (KENTLY,1991MC)، السويقة السفلية للمحور الجنيني عند البازلاء (NIELSEN *et al.*,1991) وفول الصويا (TRIPATHI and TIWARI,2003) ومن محاور جنينية لبادرات عمرها 7 أيام عند فول الصويا (KUMARI *et al*,2006). تمّ الحصول على ثفنات (كالوسات) Callus ومن ثم على نباتات جديدة انطلاقاً من زراعة أنصاف بذور (فلقة مع محور جنيني) وذلك عند أحد أصناف فول الصويا (RADHAKRISHNAN and RANJITHAKUMARI,2007) ومن زراعة محاور جنينية مع فلقة لبذور ناضجة لنبات اللوبياء (ODUTAYO *et al.*,2005) وأشارت دراسات أخرى إلى وجود فروق بين الأنماط الوراثية عند فول الصويا من حيث قدرتها على تشكل أجنة جسمية وإنتاج نباتات جديدة (KOMATSUDA and OHYAMA,1988; BAILEY *et al.*,1993; HOFMANN *et al.*2004) ومن حيث تشكل البراعم الخضرية عند دوار الشمس (ABDOLI,2003,2007).

أهمية البحث وأهدافه:

يُعدّ فول الصويا من المحاصيل الاقتصادية، ويلاقي اهتماماً كبيراً من حيث دراسة إنتاجيته وتأتي أهمية البحث من خلال إكثاره مخبرياً باستخدام تقانة الزراعة في الزجاج ويهدف هذا البحث إلى:

1-إكثار الصنفين sb-44 وsb-172 خضرياً وذلك باستخدام تقانة زراعة المحاور الجنينية في الزجاج.

2-تحديد الصنف الأفضل من حيث إنتاج الثفنات والبراعم في الزجاج.

3-دراسة تأثير بعض الهرمونات النباتية(منظمات النمو النباتية)في تشكل الثفنات والبراعم.

طرائق البحث و مواده:

-**المادة النباتية:** تمّ استخدام صنفين من بذور فول الصويا وهما sb-44 وsb-172 وتمّ الحصول عليهما من هيئة البحوث الزراعية في دوما (دمشق).

-**الوسط المغذي:** استخدم الوسط المغذي الأساسيMS (Murashig and Skoog,1962) الذي يتضمن عناصراً معدنية كبرى وصغرى إضافة إلى حمض النيكوتين (0.5 مغ/ل)، البيريدوكسين (0.5 مغ/ل)، التيامين (0.1 مغ/ل)، الميوانوزيتول (100 مغ/ل)، الغليسين (2 مغ/ل) والسكروز (30 غ/ل).

أضيف إلى هذا الوسط تراكيز مختلفة من بعض الهرمونات النباتية (BAP, 2,4-D, NAA) بينما تمّ استخدام الوسط دون هرمونات بهدف استطالة وتجذير البراعم الناتجة من الإكثار. ضُبطت درجة الحموضة لهذه الأوساط على 5.8 باستخدام NAOH 0.1 نظامي أو HCl0.1 نظامي وذلك قبل التعقيم ثم أضيف الآغار بمعدل 8 غ/ل.

تمّ تسخين هذه الأوساط حتى الغليان ومن ثم عقمت في جهاز التعقيم (Autoclave) بدرجة حرارة 121 مْ لمدة 20 دقيقة. وزّعت الأوساط المعقّمة في أطباق بتري (9 سم) معقّمة مسبقاً داخل جهاز تعقيم وتنقية الهواء Laminar Flow Hood وذلك في حالة دراسة تشكل الثفناتوالبراعم بينما تمّ توزيع الوسط الذي لا يحوي هرمونات نباتية في أنابيب اختبار (15 × 2 سم) ومن ثمّ عُقّمت.

-تعقيم البذور:

تمّ اختيار بذور متقاربة بالحجم لكل صنف ووضعت في الماء لمدة ساعتين ثم غمرت في الكحول الإتيلي 70% لمدة دقيقتين ، وبعد ذلك غمرت في رشاحة هيبوكلوريت الكالسيوم بتركيز 8% لمدة 20 دقيقة. غُسلت بعد ذلك ثلاث مرات في الماء المقطر المعقّم. تمّت هذه المراحل، ماعدا المرحلة الأولى، والعمليات اللاحقة في جهاز تنقية وتعقيم الهواء.

-تحضير المحاور الجنينية وزراعتها:

وضعت البذرة على ورق ترشيح معقّم ضمن طبق بتري زجاجي ثم فتحت طولياً بعد إزالة غلافها وذلك باستخدام ملقط ومشرط معقمين. نزع المحور الجنيني بعد إبعاد الفلقتين وزرع على الوسط المغذي في طبق بتري (الشكل 1-A). تمّت زراعة 40 محوراً جنينياً على كل وسط مغذٍ. حُضنت الأطباق لمدة تتراوح بين 4-6 أسابيع في درجة حرارة 25±1 وتحت إضاءة شدتها تتراوح بين 2000-2500 لوكس لمدة 16 ساعة في اليوم.

-الدراسة الإحصائية:

أخضعت المعطيات للتحليل الإحصائي بواسطة البرنامج الإحصائي SPSS وتم إجراء تحليل التباين الأحادي (ANOVA) لاختبار وجود فرق معنوي بين متوسطات الأوساط وحساب أقل فرق معنوي LSD على مستوى ثقة 95% ومعنوية 0.05.

النتائج والمناقشة:

1-تأثير تراكيز الهرمونات النباتية المستخدمة (2,4-D, NAA, BAP) في تشكّل الكالوسات للصنفين المدروسين:

تمت دراسة تأثير أوساط مختلفة (الجدول 1) في تشكّل الكالوس للصنف الأول sb-44 وتبيّن أنه تمّ تشكّلها على جميع الأوساط المستخدمة ماعدا الشاهد (MS0) ولكن لوحظ أن سرعة الانقسام الخلوي وحجوم الثفنات اختلفت من وسط مغذٍّ إلى آخر وكانت أفضل النتائج على الوسط BAP+MS (3 مغ/ل)+NAA (0.5 مغ/ل) والذي يرمز له MS6 إذ بلغت النسبة المئوية لتشكّل الكالوس 92.5% ومتوسط عدد الكالوسات 4.63 ويليه الوسط BAP+MS (2مغ/ل)+NAA (0.5 مغ/ل) والذي يرمز له بـ MS5 إذ كانت النسبة المئوية لتشكّل الكالوس 90% ومتوسط عدد الكالوسات 4.5 (الشكل 1).

لاحظنا وجود فروق معنوية واضحة بين الوسط MS6 والأوساط MS1، MS2 وMS3 المكونة من الوسط الأساسي BAP+MS فقط بتراكيز (1 مغ/ل)، (2 مغ/ل) و(3 مغ/ل) على الترتيب وكذلك بين الوسط MS5 والأوساط MS1، MS2 وMS3.

وكانت النسبة المئوية لتشكّل الكالوس على الوسطMS7 المكوّن منBAP+MS (3مغ/ل)+2,4-D (0.5مغ/ل) 82.5%. وكان متوسط عدد الكالوسات 4.13 ولكن لم يوجد فرق معنوي بين هذا الوسط والوسط

MS6الذي يحوي التركيز نفسه من BAP وتركيزاً من NAA مماثلاً لتركيز 2,4-D في MS7 وكذلك لم يوجد فرق بين هذا الأخير والأوساط الأخرى باستثناء MS1.تشير هذه النتائج إلى التأثير الواضح للـ NAAفي النسب المئوية للكالوسات المتشكّلة ومتوسط عدد الكالوسات.

وبيّنت الدراسة أيضاً بالنسبة إلى الصنف الثاني sb-172 (الجدول 2) أن الوسط MS6 كان الأفضل من حيث النسبة المئوية للكالوسات المتشكلة (90%) ويليه MS5 (85%) ومن حيث متوسط عدد الكالوسات المتشكلة في أطباق بتري (4.5) ويليه الوسط MS5 (4.25).وكان يوجد فروق معنوية بين الوسط MS6 والأوساط MS1، MS2، MS3 وMS4 وكذلك بين MS5 والأوساط MS1، MS2 وMS3.

جدول 1: تأثير التراكيز المختلفة (مغ/ليتر) للـBAP بمفرده وبالمشاركة مع الـNAAوالـ2,4-D في النسب المئوية لتشكل الكالوس وفي متوسط عدد الكالوسات المتشكلة في أطباق بتري للصنف sb-44 بعد 4 أسابيع من الزراعة.

رمز الوسط	الوسط المغذي	النسبة المئوية للكالوسات المتشكلة	متوسط عدد الكالوسات المتشكلة والانحراف المعياري SD
MS0	MS (دون هرمونات نباتية)	0	0
MS1	BAP+MS (1 مغ)	60	3±0.76A
MS2	BAP+MS (2 مغ)	67.5	3.38±0.74 AB
MS3	BAP+MS (3 مغ)	70	3.5±0.76 AB
MS4	BAP+MS (1 مغ)+NAA (0.5 مغ)	77.5	4±0.75 BC
MS5	BAP+MS (2 مغ)+NAA (0.5 مغ)	90	4.5±0.75 C
MS6	BAP+MS (3 مغ)+NAA (0.5 مغ)	92.5	4.63±0.74 C
MS7	BAP+MS (3 مغ)+2.4-D (0.5 مغ)	82.5	4.13±0.84 BC
%5 LSD			0.77

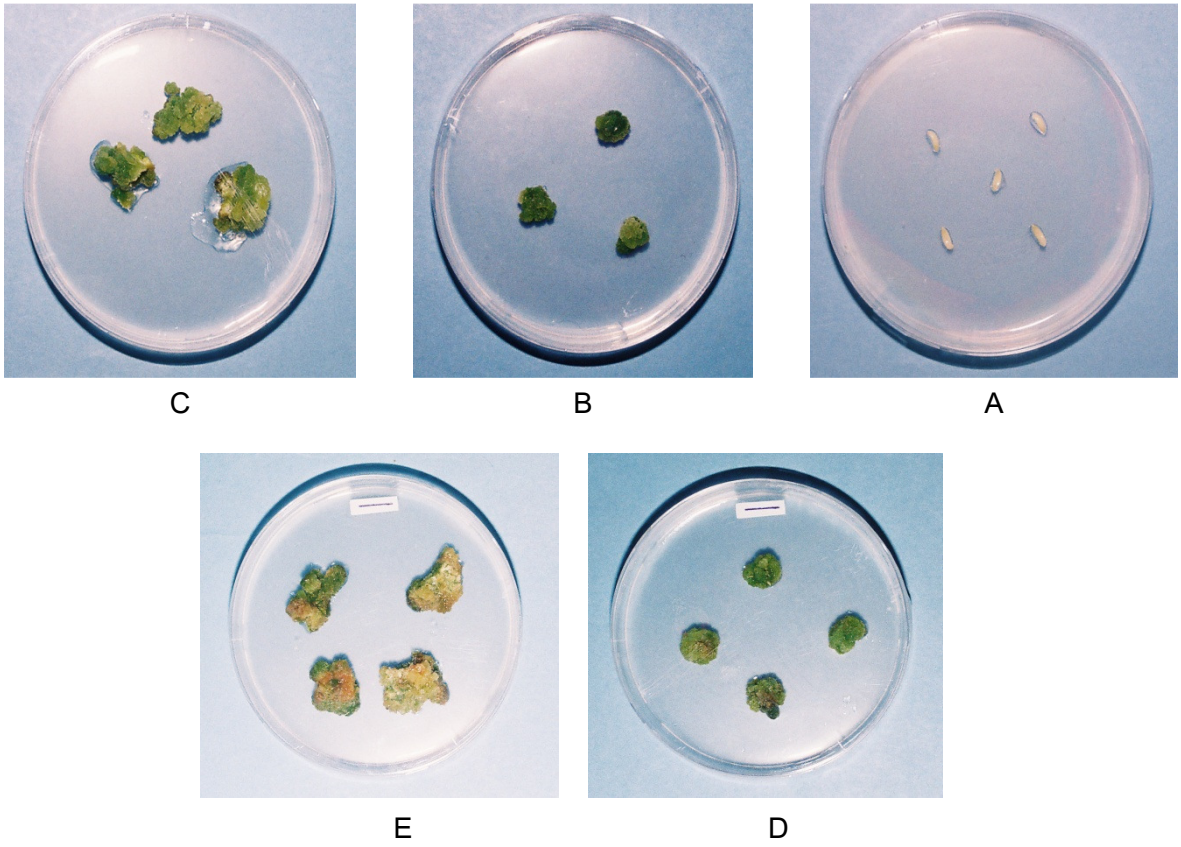
جدول 2: تأثير التراكيز المختلفة (مغ/لتر) للـBAP بمفرده وبالمشاركة مع الـNAA أو الـ2,4-D في النسب المئوية لتشكل الكالوس وفي متوسط عدد الكالوسات المتشكلة في أطباق بتري للصنف sb-172 بعد 4 أسابيع من الزراعة.

رمز الوسط	الوسط المغذي	النسبة المئوية للكالوسات المتشكلة	متوسط عدد الكالوسات المتشكلة والانحراف المعياري SD
MS0	MS (دون هرمونات نباتية)	0	0
MS1	BAP+MS (1 مغ)	57.5	2.88±0.65 A
MS2	BAP+MS (2 مغ)	62.5	3.13±0.65 AB
MS3	BAP+MS (3 مغ)	67.5	3.38±0.52 ABC
MS4	BAP+MS (1 مغ)+NAA (0.5 مغ)	72.5	3.63±0.75 BCD
MS5	BAP+MS (2 مغ)+NAA (0.5 مغ)	85	4.25±0.71 DE
MS6	BAP+MS (3 مغ)+NAA (0.5 مغ)	90	4.50±0.54 E
MS7	BAP+MS (3 مغ)+2.4-D (0.5 مغ)	80	4±0.93 CDE
%5 LSD			0.69

لاحظنا أيضاً وجود فرق معنوي بين MS4 الذي يحوي BAP (1 مغ/ل) وANA (0.5 مغ/ل) والوسط MS1 الذي يحوي التركيز نفسه من BAP (1 مغ/ل) ولكن دون الأوكسين NAA وذلك من حيث النسبة المئوية لتشكّل الكالوسات ومتوسط عدد الكالوسات.وهذا يشير إلى دور NAA الإيجابي عندما تمت إضافته إلى هذه الأوساط.

لم يلاحظ وجود فروق معنوية بين الوسط MS7 الذي يتألف من BAP (3 مغ/ل) و2,4-D (0.5 مغ) والأوساطMS3،MS4، MS5 وMS6، ولكن كان يوجد فرق معنوي بين MS7 وبين الوسطين MS1 وMS2 . اضافة إلى ذلك كانت النسبة المئوية لتشكل الكالوس عندMS7 80% أعلى من الوسطين الأخيرين ،ولاحظنا أيضا زيادة النسبة المئوية من 67.5 إلى 80بالمقارنة بـ MS3 الذي يحوي التركيز نفسه من BAP (3 مغ/ل) ولكن من دون 2,4-D وهذا يشير إلى دور 2,4-D في تحسين النتائج .

بيّنت النتائج أن استجابة الصنف الأول sb-44 (الجدول 1) للأوساط المغذّية كانت أفضل من استجابة الصنف الثاني sb-172 (الجدول 2) وذلك من حيث النسب المئوية للكالوسات ومتوسط عدد الكالوسات وهذا يشير إلى دور النمط الوراثي في الاستجابة.



الشكل 1: تشكّل الكالوس على بعض الأوساط المستخدمة من زراعة المحاور الجنينية للصنفsb-44.

A.محاور جنينية (بداية الزراعة) مزروعة على الوسط MS:MS6 +BAP (3 مغ)+NAA (0.5 مغ)

B.كالوسات بعد 3 أسابيع من الزراعة على الوسط MS6.

C.كالوسات بعد 6 أسابيع من الزراعة على الوسط MS6.

D.كالوسات بعد 4 أسابيع من الزراعة على الوسط MS.MS7 +BAP (3 مغ/ل)+2.4-D (0.5 مغ)

E. كالوسات بعد 6 أسابيع من الزراعة على الوسط MS7. - = 1 سم

2-تأثير تراكيز الهرمونات النباتية المستخدمة في تشكّل البراعم الخضرية للصنفين المدروسين:

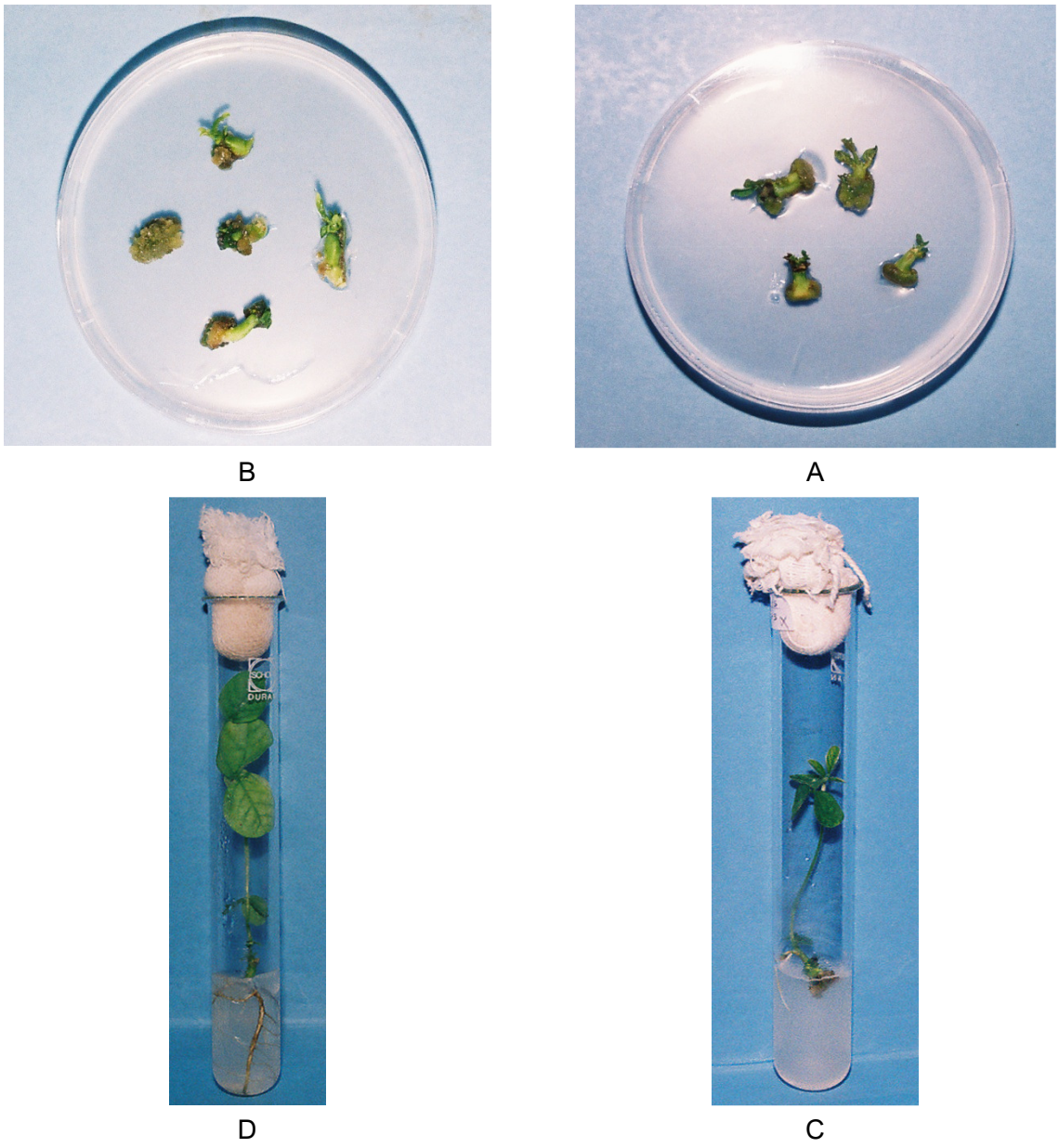
بيّنت الدراسة أن أفضل النتائج لتشكّل البراعم كانت على العينات المزروعة على الوسط MS4 المكوّن من BAP+MS (1 مغ/ل)+NAA (0.5 مغ/ل) وذلك للصنفين المستخدمين (الشكل 2). كانت النسبة المئوية للبراعم المتشكلة 67.5% ومتوسط عدد البراعم المتشكلة في الأطباق 3.38 بالنسبة إلى الصنف 44-sb(الجدول3).

بينما كانت 57.5% ومتوسط عدد البراعم المتشكّلة 2.88 بالنسبة إلى الصنف 172-sb (الجدول 4). بيّنت الدراسة الإحصائية أنه كان يوجد فروق معنوية بين نتائج الوسط MS4 (الجدول 3) وبقيّة الأوساط ماعدا MS5 إذ تراوحت النسب المئوية عند هذه الأوساط بين 32.5%-50% ومتوسط عدد البراعم المتشكلة 1.63-2.5. لا توجد فروق معنوية بين الوسط MS7 المكوّن من BAP+MS (3 مغ/ل)+2,4-D (0.5 مغ/ل) والأوساط MS1، MS2 وMS3 التي لا تحوي الأوكسين 2,4-D.

جدول 3: تأثير التراكيز المختلفة (مغ/لتر) للـBAP بمفرده وبالمشاركة مع الـNAAأو الـ2,4-D في النسب المئوية لتشكل البراعم وفي متوسط عدد البراعم المتشكلة في أطباق بتري للصنف 44-sb بعد 4 أسابيع من الزراعة.

رمز الوسط	الوسط المغذي	النسبة المئوية للبراعم المتشكلة	متوسط عدد للبراعم المتشكلة والانحراف المعياري SD
MS0	MS (دون هرمونات نباتية)	0	0
MS1	BAP+MS (1 مغ)	40	2±0.93 AB
MS2	BAP+MS (2 مغ)	35	1.75±0.71 AB
MS3	BAP+MS (3 مغ)	32.5	1.63±52 A
MS4	BAP+MS (1 مغ)+NAA (0.5 مغ)	67.5	3.38±0.92 D
MS5	BAP+MS (2 مغ)+NAA (0.5 مغ)	57.5	4.88±0.65CD
MS6	BAP+MS (3 مغ)+NAA (0.5 مغ)	50	2.5±53BC
MS7	BAP+MS (3 مغ)+2.4-D (0.5 مغ)	37.5	1.88±0.65AB
%5 LSD			0.72

أشارت النتائج أيضاً بالنسبة إلى الصنف 172-sb (الجدول 4) أنه كان يوجد فروق معنوية بين MS4 وبقيّة الأوساط باستثناء MS5 وتراوحت النسب المئوية عند هذه الأوساط بين 27.5%-40%. وتراوح متوسط عدد البراعم المتشكلة بين 1.38-2 وكذلك تبيّن أنه لا يوجد فروق معنوية بين الوسط MS7 وMS1 ، MS2 وMS3.أظهرت النتائج بالنسبة إلى الصنفين المستخدمين أنه بزيادة تركيز الـ BAP من 1 مغ/ل إلى 3 مغ/ل عندما استخدم بمفرده زادت النسبة المئوية للكالوسات المتشكلة ومتوسط عدد الكالوسات في أطباق بتري بينما تناقصت النسبة المئوية لتشكل البراعم ومتوسط عدد البراعم المتشكلة. ولاحظنا زيادة النسب المئوية للكالوسات وللبراعم المتشكلة وزيادة في متوسط عدد الكالوسات والبراعم عندما تمت إضافة الأوكسين NAA إلى الأوساط MS1، MS2 وMS3 وذلك عند الصنفين المستخدمين.



الشكل 2: تشكل البراعم الخضرية ونموها وتجذيرها .

A- تشكّل براعم خضرية من محاور جنينية مزروعة على الوسط MS4:
MS + BAP (1 مغ/ل)+NAA (0.5 مغ/ل) للصنف44-sb.محاور أعطت برعمين وأخرى أعطت 3 براعم وذلك بعد 5 أسابيع من الزراعة.

B- تشكل براعم خضرية من محاور جنينية مزروعة على الوسط MS4 للصنف 172-sb.محاور أعطت برعماً واحداًوأخرى أعطت برعمين وذلك بعد 5 أسابيع من الزراعة.

C- بادرة بعد أسبوع من زراعتها في الأنبوب على الوسط MS من دون هرمونات نباتية للصنف 44-sb.

D- بادرة بعد 3 أسابيع من زراعتها في الأنبوب على الوسط MS من دون هرمونات نباتية للصنف 44-sb.

جدول 4: تأثير التراكيز المختلفة (مغ/ل) للـBAP بمفرده وبالمشاركة مع الـNAA أو الـ2,4-D في النسب المئوية لتشكل البراعم وفي متوسط عدد البراعم المتشكلة في أطباق بتري للصنف sb-172 بعد 4 أسابيع من الزراعة.

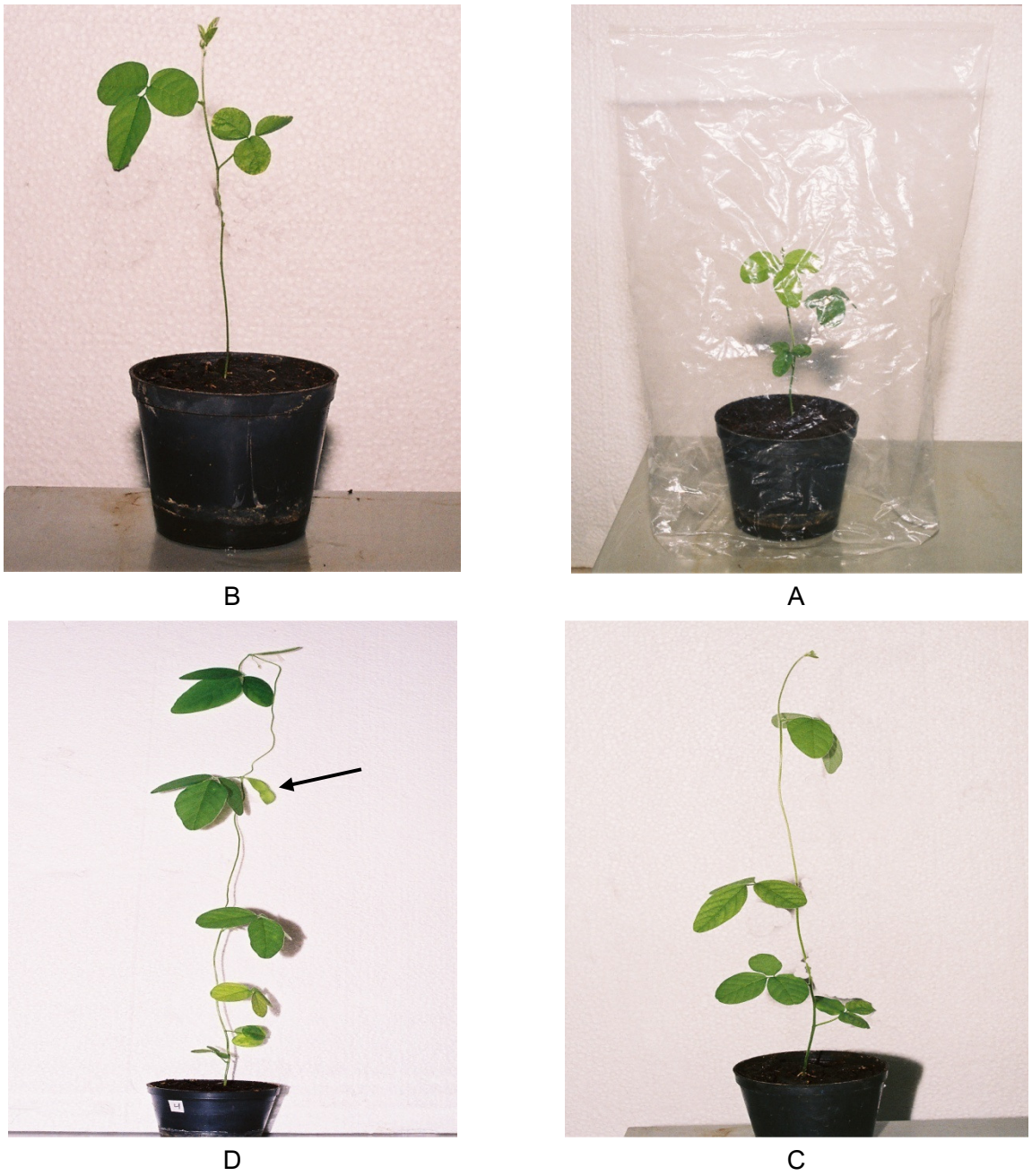
رمز الوسط	الوسط المغذي	النسبة المئوية للبراعم المتشكلة	متوسط عدد البراعم المتشكلة والانحراف المعياري SD
MS0	MS (دون هرمونات نباتية)	0	0
MS1	BAP+MS (1 مغ)	35	1.75±0.47 AB
MS2	BAP+MS (2 مغ)	30	1.50±0.53 AB
MS3	BAP+MS (3 مغ)	27.5	1.38±0.52 A
MS4	BAP+MS (1 مغ)+NAA (0.5 مغ)	57.5	2.88±0.65 D
MS5	BAP+MS (2 مغ)+NAA (0.5 مغ)	50	2.50±0.54 CD
MS6	BAP+MS (3 مغ)+NAA (0.5 مغ)	40	2±0.53 BC
MS7	BAP+MS (3 مغ)+2.4-D (0.5 مغ)	35	1.75±0.47 AB
%5 LSD			0.54

وهذا يشير إلى أن الـNAA عامل مهم في الوسط المغذي لتشكل الكالوس والبراعم الخضرية .إضافة إلى ذلك كان التركيز 1 مغ/ل للستوكينين BAP بالمشاركة مع NAA أفضل من بقية التراكيز وهذا يبين أيضاً دور التركيز الهرموني المناسب في تشكل البراعم.

لاحظنا من خلال مقارنة النتائج في الجدول 3 للصنف sb-44 بالنتائج الموضحة في الجدول 4 للصنف sb-172 أن استجابة الصنف الأول كانت أفضل من استجابة الصنف الثاني وهذا يشير إلى دور النمط الوراثي في تشكّل البراعم.تم نقل البراعم التي تشكلت في الأطباق إلى أنابيب تحوي الوسط المغذي الأساسي MS من دون هرمونات نباتية وذلك بهدف استطالة هذه البراعم. لاحظنا تشكّل الجذور للبادرات النامية على هذا الوسط وهذا يشير إلى أن هذه البادرات شكلت كميات كافية من الأوكسينات اللازمة لعملية التجذير (الشكل 2).

3- الأقلمة :

تمت أقلمة النباتات التي تمّ الحصول عليها بنزعها من الأنابيب وغسل جذورها من الآغار ومن ثم زرعها في أصص تحوي تربة مغذية (تورب)، وسقيت بمياه عادية ثم تمت تغطيتها بأكياس نايلون شفافة مثقّبة لمدة أسبوع، نزعت هذه الأخيرة وتركت الأصص في المختبر. نمت هذه النباتات ووصلت إلى مرحلة الإثمار (الشكل 3).



الشكل 3: أقلمة وتطور البادرات بعد زراعتها في الأصص .

A- نبات مغطى بكيس نايلون (أقلمة) بعد أسبوع من زراعته في الأصيص.
B- نبات بعد نزع الكيس عنه (أسبوعان من الزراعة في الأصيص).
C- نمو النبات بعد 4 أسابيع من الزراعة في الأصيص.
D- نبات مثمر (السهم يشير إلى الثمرة) بعد 6 أسابيع من الزراعة في الأصيص.

هناك دراسات عدة أشارت إلى دور بعض الأوكسينات وبعض السيتوكينينات ودور النمط الوراثي في تشكل الكالوس والبراعم الخضرية عند أنواع وأصناف مختلفة من النباتات وكانت نتائجنا تتوافق مع بعضاً منها وتختلف مع البعض الآخر وذلك من حيث دور الأوكسين NAA والسيتوكينين BAP وتأثير النمط الوراثي في هذه الدراسة.

تمّ الحصول على براعم خضرية عدة انطلاقاً من زراعة محاور جنينية متصلة بفلقة واحدة بعد نزع السويقتين الجنينيتين العلوية والسفلية عند أحد أصناف الفاصولياء وكانت أفضل النتائج عندما تم استخدام BAP بتراكيز تتراوح بين 15-25 ميكرومول (FRANKLIN *etal.*,1991).

ولاحظMOHAMED*et al.*(1992) أن أفضل النتائج لتشكل البراعم الخضرية من زراعة المحاور الجنينية لأصناف أخرى من الفاصولياء كانت على الوسط MS المضاف إليه 5 أو 10 ميكرومول BAP، ولم يشاهد تشكل البراعم على الوسط الذي يحويNAA بمفرده بل تشكلت كالوسات على الوسط المضاف إليه NAA وBAP لمختلف التراكيز المستخدمة.

وفي دراسة أخرى على زراعة المحاور الجنينية عند أحد أصناف فول الصويا بين KUMARI *et al* (2006) تأثير BAP (2.22 ميكرومول) و2,4-D (180.8 ميكرومول) في تشكل الأجنة الجسمية وتأثير تراكيز مختلفة من BAP وANA في إنبات هذه الأجنة. وحصل VASUDEVAN *et al.* (2007) على براعم خضرية بشكل مباشر من زراعة محاور جنينية لنبات الخيار والتي تمّ أخذها بعد يومين من إنبات بذوره وذلك على الوسط MS الذي يحوي BAP (4.44 ميكرومول) بالمشاركة مع NAA(1.59 ميكرومول).

بيّن ANDRES*et al.* (2010) تأثير BAP (5 مغ/ل) والأدنين سولفات (20 أو 40 مغ/ل) في تشكل البراعم على المحاور الجنينية المزروعة في الزجاج لأصناف عدة لنبات الفاصولياء وحصل على أفضل النتائج بوجود التراكيز المذكورة بالنسبة إلى بقية التراكيز المستخدمة.

أظهرت نتائجAASIM*et al.*(2010) عندما زرع محاور جنينية لأحد أصناف اللوبياء أن نسبة تشكل الكالوسات كانت 100% على الوسط MS بوجود BAP بمفرده أو معNAA لجميع التراكيز المستخدمة ولكن لاحظ تناقص نسبة تشكّل البراعم من 41.67 إلى 8.33 بزيادة تركيز BAP من 0.25 إلى 1 مغ/ل، وإن إضافة NAA (0.1 مغ/ل) إلى التراكيز المستخدمة أدت إلى زيادة النسبة المئويةمن 44.44 إلى 100% بوجود BAP (1 مغ/ل).

وفي دراسات لأجزاء نباتية أخرى لاحظ MARTINS and SONDAHL (1983) تشكل الكالوس على الوسط الذي يحوي BAP (2.5 ميكرومول) و2,4-D (0.05-0.10 ميكرومول)، وتشكل البراعم على الوسط المضاف إليه BAP (1، 2 و5 ميكرومول) بالمشاركة مع 2,4-D (0.025، 0.05 و0.1 ميكرومول) وذلك من زراعة البراعم القمية عند الفاصولياء.

وتمّ الحصول على كالوسات من زراعة السويقات الجنينية السفلية لأنواع مختلفة لنبات الترمس Lupinus وذلك على الوسط MS الذي يحوي 2,4-D (2 مغ/ل) وkin (2 مغ/ل)،وعلى الوسط Ms المضاف إليه BAP (2 مغ/ل) +NAA(0.2مغ/ل) ، وتشكّلت براعم خضرية على الوسط MS بوجود BAP (2 مغ/ل)+IAA (2 مغ/ل) (CHRISTINE,1985). وتمّ الحصول على الكالوس وأجنّة جسمية انطلاقاً من زراعة أجنّة فتية لأصناف مختلفة من فول الصويا وكانت أفضل نتيجة 60% على الوسط MSالذي يحوي 2,4-D (20 ميكرومول) بينما تمّ تشكل البراعم الخضرية على الوسط المضاف إليه BAP (13.3 ميكرومول) وNAA (0.2 ميكرومول) (BARWALE*et al.*,1986). وبيّنت دراسة MUHAMMED *et al.*(1999) على زراعة بذور أحد هجن دوار الشمس أن أفضل

نسبة مئوية لتشكل الكالوس كانت 88.88 وذلك على الوسط MS بوجود BAP (2 مغ/ل)+NAA(2 مغ/ل) وكانت أفضل نسبة مئوية لتشكل البراعم 61.11% على الوسط نفسه. وتراوحت نسبة تشكل الكالوسات عند أصناف أخرى من دوار الشمس بين 89–100% بإضافة 2.4–D (1 مغ/ل) إلى MS وذلك من زراعة السويقات الجنينية السفلية المأخوذة بعد 10 أيام من إنبات البذور (OZYIGIT *et al.*,2007).

أشار BONACIN *et al.* (2000) عند أصناف مختلفة لفول الصويا إلى التركيز الأفضل من NAA (10 مغ/ل) وإلى الصنف الأفضل لتشكل الأجنة الجسمية من زراعة الفلقات.

وبينت دراسة أخرى عند أصناف مختلفة أيضاً لفول الصويا أن النسب المئوية لتشكل الأجنة الجسمية من زراعة الفلقات كانت تختلف من صنف إلى آخر وتمت الإشارة إلى الصنف الأفضل لاستخدامه في زراعة الأنسجة وذلك على الوسط MS الذي يحوي 2,4–D (20 مغ/ل) (HATANAKA *et al.*,2004).

لاحظ ODUTAYO *et al.* (2005) أن النسبة المئوية للبراعم المتشكلة على الكالوسات النامية على الوسط MS الذي يحوي BAP (1 ميكرومول) كانت 45.5% بينما أنتجت الكالوسات المزروعة على الوسط MS بوجود BAP (4 ميكرومول) نسبة مئوية 87.5% من البراعم المتشكلة وذلك من زراعة أنصاف أجنة فتية للوبياء *Vignaunguiculata*L..

وبيّن GOWHER *et al.* (2007) في نتائجه لزراعة الأوراق لصنفين مختلفين من نبات التبغ *Nicotianatabacum*L. أنه ارتفعت نسبة تشكل البراعم الخضرية، عندما ارتفع تركيز الستوكينين BAP في الوسط، من 25% على الوسط MS المضاف إليه BAP (1 مغ/ل) وNAA(0.2 مغ/ل) إلى 44.12% على الوسط MS الذي يحوي BAP (2 مغ/ل) وNAA (0.2 مغ/ل). إضافة إلى ذلك أشار أيضاً إلى اختلاف الاستجابة للصنفين من حيث تشكل الكالوس وتشكل البراعم وذلك على الوسط المستخدم نفسه.

لاحظ ASGHARI *et al.* (2012) عندما درس تأثير تراكيز مختلفة من BAP في تشكل البراعم عند نبات *Ocimumbasilicum*L. أن النسبة المئوية ارتفعت من13.33 %بوجودBAP (1 ميكرومول) إلى 30% بإضافة BAP (10 ميكرومول) وذلك عند زراعة السويقات الجنينية السفلية، وارتفعت النسبة من 20% إلى 93.33% عندما تمت زراعة الفلقات بوجود التراكيز نفسها.

الاستنتاجات والتوصيات :

1–أدت زيادة تركيز السيتوكينين BAP من 1 مغ/ل إلى 3 مغ/ل إلى زيادة النسبة المئوية لتشكل الكالوس بينما أدت إلى انخفاض نسبة تشكل البراعم.

2–أدت إضافة NAA (0.5 مغ/ل) إلى الوسط MS وبالمشاركة مع BAP إلى تحسين نتائج تشكل الكالوسات وكانت أفضل النتائج على الوسط Ms6 ، وتحسين نتائج تشكل البراعم حيث كانت أفضل النتائج على الوسط Ms4.

3–كانت استجابة الصنف sb–44 لتشكل الكالوسات والبراعم أفضل من استجابة الصنف sb–172.

4–تُعدّ هذه التقانة مصدراً آخراً للإكثار الخضري غير الجهاز الإعاشي وخاصة في حالة عدم إنبات البذور.

5–يمكن استخدام الأوساط الفضلى لحالتي الإكثار وتشكل الكالوس إذا كان الهدف من العمل الحصول على مستخلصات ثانوية.

المراجع :

1. AASIM,M.; KHAWAR,K.M. and ÖZCAN, S. Vitro Micropopagation from shoot meistemes of Turkish cowpea (*VignaUnguiculata* L.) C. AKKIZ. Bangladesh J. Bot. 37(2), 2008, 149-154.
2. AASIM,M.; KHAWAR,M.KH and ÖZCZN,S. Efficint*In vitr*o propagation from preconditioned embryonic axes of Turckish cowpea (*Vignanuguiculata* L.) cultivar Akkiz. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 62 (4), 2010, 1047-1052.
3. ABDOLI,M.; MOIENI,A. And DEHGHANI,H. Effects of cultivar and Agar concentration on *In vitro* shoots organogenesis and Hyperhydricity in sunflower (*HelianhusAnnuus* L.) Pak.J. Bot., 39(1), 2007, 31-35.
4. ABDOLI,M.; MOIENI,A.; DEHGHANI,H. Effects of genotype and cotyledon section on organogenesis in sunflower. IRAN.J.ofBiotec.1(4), 2003, 234-238.
5. ANDRES,M.G.A.; VALVERDE,J.M.; FONSECA,P.R. and MELARA,M.V. Plant Biotech. 13 (1), 2010, 1-7.
6. ASGHARI,F.; HOSSIENI,B.; HOSSIENI,A.; SHIRZAD,H. Effect of explants source and different hormonal combinations on direct regeneration of basil plants (*Ocimumbasilicum* L.). Aust. J. Agr. Engin., 3 (1), 2012, 12-17.
7. BAILEY,M.M.; BOERMA,H.R. and PARROTT,W.A. Genotype effect on Proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In vitro* cell. Dev. Biol.29, 1993, 102-108.
8. BARWALE,B.U.; KERNS,R.H. and WIDHOLM,J.M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Plant a, 1986, 473-481.
9. BONACIN,A.G.; DI MAURO,O.A.; DE OLIVEIA,C.R. and PERECIN,D. Induction of somatic embryogenesis in Soybean: Physicochemical factors influencing the development of somatic embryos. Genet. Mol. Biol. 23, 2000, 1-8.
10. CHRISTINE,S. Studies on shoot regeneration of Lupins (*Lupius spp*.). Plant cell reports, 4, 1985, 126-128.
11. DROSTE,A.; DE SILVA,M.A.; DE SOUZA,F.L.; STROHM,W.B.; NETO,B.L.; BENCKE,M.; SAUNER,V.M. and ZANETTINI,B.H.M. Pesq. A groupec.bras.,Brasillia, 45 (7), 2010, 715-720.
12. FRANKLIN,I.C; TRIEU,N.T; GONZALES,A.R. and DIXON,A.R. Plant regeneration from seeding explants of geen bean (*Phaseolus vulgaris* L) via organogenesis. Plant cell, tissue and organ culture 24, 1991, 199-206.
13. HATANAKA,T.; YOSHIHARA,S.; IMOTO,S.; UCHIDA,N. And TSUGAWA,H. Tanbaguro: A new model genotype of Soybean for tissue culture study. Proceedings of the 4th international crop science congress. Brisbane, Australia, 26 Sept-1 Oct, 2004.
14. HOFMANN,N.; NELSON,L.R. and KORBAN,S.S. Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of Soybean. Plant cell, tissue and organ culture 77, 2004, 157-163.
15. JOYNE,Y.E.; BOYKIN,S.L. and LODHI,A.M. Callus Induction and Oganogenesis in Soybean (*Glycine max* (L.) Mercv.Pyramid from Mature Cotylrdons and Embryos. The open plant science J, 4, 2010, 18-21.
16. KARTHA,K.K; PAHI.K.; LEUNG,N.L; MROGINSK, L.A. Plant regeneration from meristems of grain legumes: Soybean, Cowpea, Peanut, Chickpea, and bean, Canadian Journal of Botany, 59 (9), 1981, 1671-1679.

17. KOMATSUDA,T and OHYAMA,K. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in Soybean *Glycine max*. Theor. Appl. Genet.75, 1988, 695-700.
18. KUMARI,R.D.B.; SETTU,A and SUJATHA,G. Indian Journal of Biotechnolog.5, 2006, 243-245.
19. MARTINS,S.I.; SONDAHL,R.M. Multiple shoot formation from shoot Apex cultues of *Phaseolus vulgaris* L. J.pl.phys. 115, 1984, 205-208.
20. MC KENTLY,A.H. Direct somatic embryogenesis fom axes mature peanut embryos. *In vitro* cell. Dev. Biol. 27, 1991, 197-200.
21. MOHAMED,F.M.; Read,E.P and COYNE,P.D. Plant regeneration from *in vitro* culture of embryonic Axis explants in common and tepary beans. Amer.Soc. Hort. Sci. 117(2), 1992,332-336.
22. MUHAMMED,A.; SAJID,M.; HUSSAIN,I. And QURAISHI,A. *In vitro* morphogenesis from seeds of Helianthus Annuus L. Pakistan J. Of Biological sciences,2 (4), 1999, 1432-1434.
23. MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture .physio. Plant.,15, 1962, 473 – 497.
24. NIELSEN,S.V.S.; Poulsen,B.G. and LARSEN,E.M. Regeneration of shoots from pea (*Pisumsativum*) hypocotyls explants. Physiologia planetarium 82, 1991, 99-102.
25. ODUTAYO,O.I.; AKINRIMISI,F.B.; OGUNBOSOYE,I and OSO,R.T. Multiple shoot induction from embryo derived callus cultures of cowpea (*VignaUnguiculata* L.) Walp. Afric,J. Of Biotech. 4 (11), 2005, 1214-1216.
26. OZYIGIT,L.I.; GOZUKIRMIZI,N. And SEMIZ,D.B. Gnotype dependent callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus*L.). Af.J. of Biotechnolog. 6 (13), 2007, 1498-1502.
27. RADHAKRISHNAN,R. and RANJITHAKUMARI. Callus induction and plant regeneration of Indian Soybean (*Glycinemax*(L.) Merr.cv.CO_3) via half seed explants culture. Journal of Agricultural Technology 3 (2), 2007, 287-297.
28. TILTON,V.R. and RUSSELL,S.H. *In vitro* culture of immature Soybean embryos.J. Plant physiol.,115, 1984, 191-200.
29. 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.
30. VASUDEVAN,A.; SELVARAJ,N.; GANAPATHI,A.; CHOI,C.W.. MANICKAVASAGAM,M. And KASTHURIRENGAN,S. Direct plant regeneration from cucumber embryonal axis. Biology.Plant.51, 2007,521-524.
31. GOWHER,A., HADI,F., ZAHIR,A.H.A.; TARIQ,M. and ALI KHAN,M. Callus induction and *In vitro* complete plant regeneration of different cultivars of Tobacco (*Nicotianatabacum* L.) on media of different hormonal concentration. Biotechnology, 6 (4), 2007, 561-566.