تأثير 2,4-D والـBA والجزء النباتي في استحثاث كالس نبات البلادونا خارج الجسم الحي

Effect of 2,4-D, BA , and explant on *Atropa belladonna* callus induction in vitro

نورا جبر جاسم الساعدي
كلية الزراعة – جامعة بغداد

ظافر هادي حسين الكعبي
كلية الزراعة- جامعة بغداد

المستخلص

نفذ البحث في مختبر زراعة الانسجة النباتية - كلية الزراعة – جامعة بغداد، خلال الفترة من حزيران 2011 ولغاية تشرين الاول 2011. استخدمت في البحث ثلاثة اجزاء نباتية (القمة النامية ، الاوراق الفلقية والسويقة الجنينية السفلى) مأخوذة من بادرات نبات البلادونا (*Atropa belladonna*)، مع تراكيز مختلفة من BA بالتراكيز (0 و0.2 و0.8)ملغم .لتر$^{-1}$ و2,4-D بالتراكيز(0 و1.5و3.0و4.5)ملغم.لتر$^{-1}$ ، بهدف تحديد الجزء النباتي الامثل والتركيز الافضل لكل من BA و2,4-D المؤدي الى الحصول على افضل كالس . اظهرت النتائج تفوق التركيز 0.8 ملغم . لتر$^{-1}$ من BA معنويا" في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 40.42 ملغم و4.417 ملغم على التوالي . اما عن تراكيز 2,4-D فقد تفوق التركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ 2,4-D في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 64.35 ملغم و 6.958 ملغم على التوالي . واشارت نتائج البحث الى تفوق القمة النامية معنويا" على بقية الاجزاء النباتية الاوراق الفلقية – السويقة الجنينية السفلى في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 44.23 ملغم و4.615 ملغم على التوالي وعن تأثير التداخل فقد تبين ان افضل كالس هوالذي تم الحصول عليه من زراعة القمة النامية في الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA مع التركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D حيث بلغ معدل للوزن الطري والجاف 167.12 ملغم و17.625ملغم على التوالي .

Abstract

The research was conducted at the plant tissue culture lab.- College of Agriculture – University of Baghdad during the period from June 2011 to October 2011. Three different explants were taken from *Atropa belladonna* seedlings grown on medium contain BA and 2,4-D in concentrations to determine the suitable explant, and the typical concentration of each of BA and 2,4-D leading to the best callus induction. Results showed that BA at 0.8mg.l^{-1} was superior in giving higher fresh and dry weight of induced callus, (40.42 mg and 4.417 mg respectively). 2,4-D that led to higher fresh and dry callus weight, (64.35mg and 6.958 mg respectively). The explants that resulted in inducing higher fresh and dry weights of callus was shoot tips (44.23 mg and 4.615 respectively). The interaction of these three factors levels showed that the best callus was induced by culturing the shoot tip on medium supplied with 0.8 mg.l^{-1} BA , and 1.5 mg.l^{-1} 2,4-D that resulted a fresh and dry weights of 167.12 and 17.625 mg respectively.

المقدمة

يعد نبات البلادونا *Atropa belladonna* من النباتات الطبية المهمة والمستعملة في الطب والصيدلة ينتمي هذا النبات الى العائلة الباذنجانية Solanaceae (1) وينمو على شكل شجيرة يصل ارتفاعها 1.5 م الاوراق كبيرة بيضاوية الشكل والنبات دائم الخضرة و يعد وسط اوربا وجنوبها الموطن الاصلي للنبات ومنه انتشر الى وسط اسيا وغربها وصولا الى الهملايا والى المغرب والجزائر جنوبا" .ويعد النوع Belladonna من اهم انواع الجنس *Atropa* اما اهم مكوناته الفعالة فهي قلويد Atropine و قلويد Hyoscyamine اللذان يعملان على تسكين الالام الناتجة من تقلص العضلات اللاارادية كما يستعمل كمهدئ ويقلل افراز اللعاب وانه يعمل على تثبيط الجهاز العصبي المركزي (2)

تحتل النباتات الطبية والتي منها نبات البلادونا اهمية طبية واقتصادية كبيرة لاحتوائها على قلويدات من مجموعة التروبان Tropane alkaloids اذ تبلغ نسبة الاتروبين 2.7-15.2% من الهيوسيامين الذي تبلغ نسبته 82.8-97.3% من القلويدات الكلية في النبات (3).

يعد الكالس نسيج غير متمايز ينشأ نتيجة للجروح التي تحدث للانسجة والاعضاء واشار (4) تمر وبين (5) الى اهمية تحضين الكالس في الظلام ويعود دور الظلام في منع اكسدة المركبات الحساسة للضوء مثل الهرمونات الداخلية كالاوكسينات فضلا" عن دور الظلام في تثبيط اكسدة المواد الفينولية وكذلك يؤدي الى زيادة في رقة جدران الخلايا وقلة سمكها مما يؤدي الى زيادة في نفاذية المواد ولاسيما منظمات النمو الى داخل الانسجة المزروعة ومن ثم استجابة الاجزاء النباتية لاستحثاث الكالس

(6). ينتج نسيج الكالس من خلايا القشرة الخارجية للجزء النباتي حيث ان الخلايا المنقسمة تولد ضغطا" على البشرة يمزق خلايا الكالس المكشوفة والمتكونه حديثا" وان الانقسام المستمر للخلايا ينتج عنه نسيج كالس على الجزء النباتي (7).

تعد الاوكسينات من المركبات الواسعة الاستعمال في زراعة الانسجة النباتية (8) حيث تعمل على استطالة الخلايا وانقسامها وتكوين الكالس عند تداخلها مع السايتوكاينينات وان من اكثر الاوكسينات الفعالة التي تستعمل في زراعة الانسجة النباتية في مجال استحثاث الكالس هو 2,4-D الذي يحفز تكوين الكالس الذي يحفز تكوين الكالس وتثبيط تكوين الاعضاء (9). توصل (10) الى ان اضافة الـ 2,4-D بالتركيز 1 ملغم. لتر$^{-1}$ الى وسط MS المستخدم في استحثاث الكالس من الاجزاء النباتية لنبات *Saliva officinals* كان الاكثر تأثيرا" في زيادة الوزن الطري والجاف للكالس المستحث اذ بلغ 0.2116 غم و 0.0195 غم على التوالي. وبالنسبة للسايتوكاينينات فقد وجد انها تساعد في استحثاث الكالس ونموه وتزيد من قابليته على التمايز الى نموات خضرية (11) وبين (3) ان اضافة المستويات العالية من الـ BA (1-5) ppm قد ادت الى تطور القمم النامية في نبات البلادونا *Atropa belladonna* وتوصل (12) الى ان استخدام تركيز عالي من الاوكسينات وقليل من السايتوكاينينات يعطي افضل نسيج للكالس . ويعتمد انتاج الكالس ايضا" على نوع الجزء النباتي المستخدم ومكونات الوسط الغذائي فمن خلال الجزء النباتي المزروع يتم الحصول على مظاهر مختلفة من الكالس فقد يكون صلب او هش القوام واحيانا" يبدو ذو لون اصفر او ابيض او اخضر اعتمادا على القطعة النباتية المستخدمة في استحثاثة (13) و توصلت (14) الى ان القمة النامية كانت افضل الاجزاء النباتية في استحثاث الكالس مقارنة بالاوراق الفلقية والسويقة الجنينية السفلى لنبات الخشخاش *Pavaver somniferum* وتوصلت (1) عند دراستها على نبات البلادونا *Atropa belladonna* ان القمة النامية افضل الاجزاء النباتية في استحثاث الكالس .

المواد وطرائق العمل

نفذ البحث في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم البستنة – كلية الزراعة – جامعة بغداد خلال الفترة من حزيران 2011 ولغاية تشرين الاول 2011 وتضمن البحث اجراء الخطوات التالية :

1- تعقيم وزراعة البذور لانتاج البادرات

عقمت بذور نبات البلادونا بأستعمال التركيز 4.5%من هايبوكلورات الصوديوم NaOCL ولمدة 15 دقيقة ثم زرعت في وسط MS وبنصف قوة املاحة وبعد مرور 2-3 اسبوع من زراعة البذور استأصلت الاجزاء النباتية (قمة نامية ، اوراق فلقية، سويقة جنينية سفلى) (1) .

2- استحثاث الكالس

حضرت الاوساط الغذائية الخاصة بأستحثاث الكالس من خلال تحضير املاح الوسط الغذائي MS حيث سحبت الاملاح وبواقع 10ملغم. لتر$^{-1}$ واضيفت الفيتامينات مع اضافة توليفات من منظمات النمو والمتمثلة بـ2,4-D (2,4-Dichloro phenoxy acetic acid) بالتراكيز (0 و1.5 و3.0 و4.5) ملغم. لتر$^{-1}$ والـ BA بالتراكيز (0 و0.2 و0.8) ملغم. لتر$^{-1}$ وزرعت فيها الاجزاء النباتية (القمة النامية و الاوراق الفلقية و السويقة الجنينية السفلى) والمستأصلة من بادرات نبات البلادونا بهدف تحديد افضل تراكيز من منظمات النمو وافضل جزء نباتي لاستحثات الكالس ونفذت المعاملات بواقع عشرة مكررات للمعاملة الواحدة.

3- قياس الوزن الطري والجاف للكالس المستحث

تم قياس الوزن الطري والجاف للكالس المستحث بعد خمسة اسابيع من الزراعة اذ تم استخراج قطع الكالس المستحث وازيلت بقايا الوسط الغذائي العالقة به بأستخدام شفرة جراحية ثم اخذ الوزن الطري وجففت قطع الكالس على درجة حرارة 70م^{o} بأستخدام جهاز Oven وبعدها تم اخذ الوزن الجاف للكالس.

4- استخدم التصميم العشوائي الكامل CRD وبتجارب عاملية وبعشرة مكررات لكل معاملة وتمت مقارنة المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 (15).

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج الجدول (1أ و1ب) تفوق التركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس المستحث الطري والجاف اذ بلغ 64.35 ملغم و 6.96 ملغم على التوالي، في حين بلغ اقل معدل لوزن الكالس الطري والجاف عند زيادة تركيز هرمون 2,4-D الى التركيز 4.5 ملغم. لتر$^{-1}$ اذ اعطى 14.29 ملغم معدل وزن طري و 1.51 ملغم معدل وزن جاف ومن نتائج الجدول ايضا" يظهر تفوق التركيز 0.8 ملغم.لتر$^{-1}$ من BA معنويا" في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 40.42 ملغم و 4.42 ملغم على التوالي ، في حين كان اقل معدل لوزن الكالس الطري والجاف عند التركيز 0 ملغم. لتر$^{-1}$ منBA اذ اعطى 9.31 ملغم معدل وزن طري و 1.01 ملغم معدل وزن جاف في حين لم يعطي التركيز 0 ملغم .لتر$^{-1}$ من الـ2,4-D اي معدل يذكر لوزن الكالس الطري والجاف .

اما تأثير التداخل بين تراكيز 2,4-D وBA فقد اظهرت نتائج الجدول نفسه الى تفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D مع 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 107.92 ملغم و 11.96 ملغم على التوالي يليه الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D والتركيز 0.2 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA اذ اعطى معدل وزن طري للكالس بلغ 68.96 ملغم ومعدل وزن جاف للكالس بلغ 7.08 ملغم، وبلغ اقل معدل لوزن الكالس الطري والجاف عند الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 4.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من2,4-D و0 ملغم. لتر$^{-1}$ منBA اذ اعطى 2.92 ملغم معدل وزن طري و 0.33 معدل وزن جاف .

تشير نتائج الجدول (2أ-2ب) الى تفوق القمة النامية Shoot tip معنويا" على بقية الاجزاء النباتية (الاوراق الفلقية – السويقة الجنينية السفلى) في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 44.23 ملغم و 4.61 ملغم على التوالي في حين اعطت السويقة الجنينية السفلى اقل معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 15.02 ملغم و1.69 ملغم على التوالي وعن تراكيز BA يلاحظ من نتائج الجدول ايضا" تفوق التركيز 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ BA معنويا" في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 40.42 ملغم و 4.42 ملغم على التوالي يليه التركيز 0.2 ملغم. لتر$^{-1}$ BA الذي اعطى معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ 37.23 ملغم و 3.96 ملغم على التوالي .

جدول (1أ -1ب) تأثير تراكيز 2,4-D والـBA والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من الاجزاء النباتية لبادرة البلادونا بعد خمسة اسابيع من الزراعة.

1أ – الوزن الطري				
تراكيز2,4-D ملغم . لتر$^{-1}$	تراكيزBA ملغم . لتر$^{-1}$			
	0	0.2	0.8	المعدل 2,4-D
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1.5	16.17	68.96	107.92	64.35
3.0	18.17	56.50	37.25	37.31
4.5	2.92	623.4	16.50	14.29
L.S.D 0.05 2,4-DXBA	6.112			3.529
معدل BA	9.31	37.23	40.42	
BA 0.05 L.S.D	3.056			
1ب- الوزن الجاف				
2,4-Dملغم / لتر	BA ملغم . لتر$^{-1}$			
	0	0.2	0.8	المعدل 2,4-D
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1.5	1.83	7.08	11.96	6.96
3.0	1.88	6.21	4.04	4.04
4.5	0.33	2.54	1.67	1.51
2,4-DXBA 0.05 L.S.D	0.684			0.395
معدل BA	1.01	3.96	4.42	
L.S.D.0.05 BA	0.342			

و يظهر من نتائج الجدول نفسه تفوق القمة النامية المزروعة في الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 62.97 ملغم و 6.63 ملغم على التوالي ،في حين اعطت السويقة الجنينية السفلى والتي زرعت في الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 0 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA اقل معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 1.97 ملغم و 0.25 ملغم على التوالي. من الاسباب التي ادت الى تفوق القمة النامية على بقية الاجزاء النباتية الاخرى في استحثاث الكالس الى محتواهل العالي من الاوكسينات الداخلية مقارنة مع الاوراق الفلقية والسويقة الجنينية السفلى هذا فضلا" عن كونها عبارة عن خلايا مرستيمية نشطة (4 و16) ، ويؤكد هذا ماتوصلت اليه (14) التي وجدت تفوق القمة النامية على الاجزاء النباتية الاخرى في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف عند دراستها على نبات الخشخاش *Pavaver somniferum* ولاتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه (17) اللذين وجدوا ان استحثاث الكالس كان من الاوراق الفلقية والسويقة الجنينية السفلى ومن جذور نبات *Hyoscyamus muticus* L.

جدول (2أ-2ب) تأثير تراكيز BA ونوع الجزء النباتي والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للكالس المستحث بعد خمسة اسابيع من الزراعة

2أ- الوزن الطري				
BAملغم / لتر	الاجزاء النباتية			
	القمة النامية	الاوراق الفلقية	السويقة الجنينية السفلى	المعدل BA
0	15.94	10.03	1.97	9.31
0.2	53.78	37.69	20.22	37.23
0.8	62.97	35.41	22.87	40.42
L.S.D 0.05 التداخل	5.293			3.056
معدل الاجزاء	44.23	27.71	15.02	
L.S.D.0.05 BA	3.056			
2ب- الوزن الجاف				
BAملغم / لتر	الاجزاء النباتية			
	القمة النامية	الاوراق الفلقية	السويقة الجنينية السفلى	المعدل BA
0	1.66	1.13	0.25	1.01
0.2	5.56	4.00	2.31	3.96
0.8	6.63	4.13	2.50	4.42
L.S.D 0.05 التداخل	0.593			0.342
معدل الاجزاء	4.61	3.08	1.69	
L.S.D.0.05 BA	0.342			

يظهر من نتائج الجدول (3أ- 3ب) ان معاملة المقارنة لم تظهر اي استجابة لمعدل الوزن الطري والجاف للكالس ولجميع الاجزاء النباتية المزروعة ويلاحظ من نتائج الجدول ايضا" تفوق التركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D معنويا" على بقية التراكيز في اعطاء اعلى معدل لوزن والكالس الطري والجاف بلغ 64.35 ملغم و 6.96 ملغم على التوالي يليه التركيز 3.0ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D والذي اعطى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 37.31 ملغم و 4.04 ملغم على التوالي، وعن تأثير الاجزاء النباتية يظهر من نتائج الجدول نفسه تفوق القمة النامية معنويا" في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 44.23 ملغم و4.61 ملغم على التوالي تليها الاوراق الفلقية التي اعطت معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 27.71 ملغم و 3.08 ملغم على التوالي .

وعن تأثير التداخل بين تراكيز 2,4-D والاجزاء النباتية فقد اظهرت نتائج الجدول نفسه تفوق القمة النامية والمزروعة في الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ 2,4-D معنويا" في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 104.67 ملغم و10.92 ملغم على التوالي يليه الاوراق الفلقية المزروعة في الوسط الغذائي المجهز بالتركيز1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D اذ اعطى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 62.25 ملغم و 7.04 ملغم على التوالي في حين كان اقل معدل لوزن الكالس الطري والجاف عند الاوراق الفلقية والمزروعة في الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 4.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ2,4-D اذ بلغ 9.21 ملغم و1.04 ملغم على التوالي .

جدول (3أ -3ب) تأثير تراكيز 2,4-D ونوع الجزء النباتي والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للكالس المستحث بعد خمسة اسابيع من الزراعة

3أ- الوزن الطري				
2,4-Dملغم . لتر$^{-1}$	الاجزاء النباتية			
	القمة النامية	الاوراق الفلقية	السويقة الجنينية السفلى	المعدل 2,4-D
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1.5	104.67	62.25	26.12	64.35
3.0	51.83	39.38	20.71	37.31
4.5	20.42	9.21	13.25	14.29
L.S.D 0.05 التداخل	6.112			3.529
معدل الاجزاء	44.23	27.71	15.02	
L.S.D.0.05اجزاء	3.056			
3ب- الوزن الجاف				
2,4-Dملغم . لتر$^{-1}$	الاجزاء النباتية			
	القمة النامية	الاوراق الفلقية	السويقة الجنينية السفلى	المعدل 2,4-D
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1.5	10.92	7.04	2.92	6.96
3.0	5.50	4.25	2.38	4.04
4.5	2.04	1.04	1.46	1.51
L.S.D0.05 التداخل	0.684			0.395
معدل الاجزاء	4.61	3.08	1.69	
L.S.D.0.05الاجزاء	0.342			

من نتائج الجدول (4أ) يتضح ان معاملة المحايد control من الـ 2,4-D لم تظهر اي استجابة لاستحثاث الكالس وذلك عند تداخلها مع تراكيز الـ BA ومع الاجزاء النباتية الثلاثة . ويظهر من نتائج الجدول ايضا" ان الوسط الغذائي والذي زرعت فيه القمة النامية والمجهز بالتركيز 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ BA مع التركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D قد اعطى اعلى معدل لوزن الكالس الطري بلغ 167.12 ملغم يلية الوسط الغذائي الذي جهز بالتراكيز 0.2 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA و التركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ 2,4-D حيث اعطى معدل لوزن الكالس الطري والمستحث من القمة النامية بلغ 118.12 ملغم، في حين يلاحظ ان الوسط الغذائي والذي تم استحثاث الكالس فيه من الاوراق الفلقية والمجهز بالتركيز 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA والتركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D قد اعطى معدل لوزن الكالس الطري بلغ 97.00 ملغم ويلاحظ ايضا" ان اعلى معدل لوزن الكالس الطري والمستحث من السويقة الجنينية السفلى كان عند الوسط الغذائي والمجهز بالتركيز 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ منBA والتركيز1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D بلغ 59.63 ملغم.

اظهرت نتائج الجدول ان اقل معدل وزن طري للكالس والمستحث من القمة النامية والمزروعة في الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 0 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ BA والتركيز 4.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D اذ بلغ 6.25 ملغم في حين كان اقل معدل لوزن الكالس الطري والمستحث من السويقة الجنينية السفلى عند الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 0 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA والتركيز 3.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D اذ بلغ 7.88 ملغم.

اظهرت نتائج الجدول (4ب) تفوق الوسط الغذائي الذي زرعت فيه القمة النامية والمجهز بالتركيز 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA والتركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الجاف بلغ 17.63 ملغم يليه الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 0.2 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA والتركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D في اعطاء معدل لوزن الكالس الجاف والمستحث من القمة النامية بلغ 11.88 ملغم . وقد اظهرت نتائج الجدول نفسه ان الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 0 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA والتركيز والتركيز ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D قد اعطى اقل معدل لوزن الكالس الجاف والمستحث من القمة النامية بلغ 0.75 ملغم.

ومن نتائج الجدول نفسه يظهر تفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA والتركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الجاف والمستحث من الاوراق الفلقية بلغ 11.75 ملغم ،يليه الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 0.2 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA والتركيزين 1.5 و 3.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D والذين اعطيا معدل وزن جاف للكالس والمستحث ايضا" من الاوراق الفلقية بلغ 7.13 ملغم في حين كان اقل معدل لوزن الكالس الجاف عند الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA والتركيز 4.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D اذ بلغ 1.13 ملغم .

وعن الاوساط الغذائية التي زرعت بها السويقة الجنينية السفلى فقد اظهرت نتائج الجدول (4ب) تفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ منBA والتركيز 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الجاف بلغ 6.50 ملغم في حين اعطى الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 0 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA والتركيز 3.0 ملغم. لتر$^{-1}$من 2,4-D اقل معدل لوزن الكالس الجاف والمستحث من السويقة الجنينية السفلى بلغ 1.00 ملغم .

ومن النتائج يتضح ان التراكيز الواطئة من 2,4-D كانت الاكثر تأثيرا" في استحثاث الكالس وقد يعود السبب في ذلك الى ان التراكيز العالية ادت الى تقليل معدل انقسام الخلايا (18) اضافة الى ماتوصل اليه العديد من الباحثين في ان التراكيز العالية من 2,4-D قد ادت الى موت نسيج الكالس وذلك نتيجة لتحرر الاثلين بكميات كبيرة مؤديا" الى حدوث انقسامات سريعة للخلايا وحدوث حالة اختلال النمو ومن ثم موت نسيج الكالس (19) . ولوحظ ايضا" ان التراكيز العالية من الاوكسينات تحدث تثبيط في نمو الخلايا وعلى العكس من ذلك تحدث التراكيز الواطئة تشجيع نمو الخلايا النباتية ، فضلا" عن تأثيرها على الصفيحة الوسطى للخلايا مما يساعد على اتساع الجدار الخلوي لحين الوصول الى التركيز الامثل من الاوكسين (20). ويعد الـ 2,4-D من الاوكسينات الاكثر فعالية في تهيئة الخلايا على الانقسام وتكوين الكالس (13).

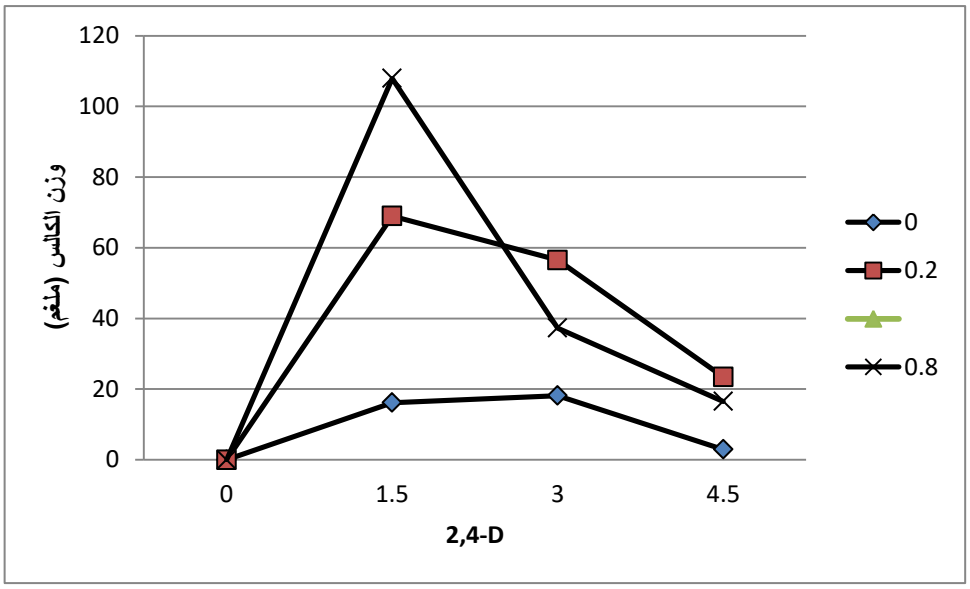
يلاحظ ان النمو الجيد للكالس يكون من خلال التوازن بين تراكيز الاوكسينات والسايتوكاينينات وان الزيادة في تراكيز اي منهما على حساب الاخر سوف يؤثر سلبا" في نمو الكالس (21 و6) ، ويعد BA من اكثر السايتوكاينينات استخداما" في مجال زراعة الانسجة النباتية لما له من فعالية مقارنة بـKin و2ip لاحتوائة على اكثر من اصرة مزدوجة واحدة (22) اذ يعمل السايتوكاينين بوجود الاوكسين مفتاحا" لبدء الانقسام الخلوي وان وجود كلا المنظمين في وسط الزراعة ضروري جدا" لاستحثاث الكالس (23).

جدول 4 أ – تأثير تراكيز BA و 2,4-D ونوع الجزء النباتي والتداخل بينهم في معدل الوزن الطري للكالس بعد خمسة اسابيع من الزراعة

BA ملغم. لتر$^{-1}$	2,4-D ملغم. لتر$^{-1}$	الاجزاء النباتية			معدل BA
		القمة النامية	الاوراق الفلقية	السويقة الجنينية السفلى	
0	0	0.00	0.00	0.00	9.31
	1.5	28.75	19.75	0.00	
	3.0	28.75	17.87	7.88	
	4.5	6.25	2.50	0.00	
0.2	0	0.00	0.00	0.00	37.23
	1.5	118.12	70.00	18.75	
	3.0	68.25	65.75	35.50	
	4.5	28.75	15.00	26.62	
0.8	0	0.00	0.00	0.00	40.42
	1.5	167.12	97.00	59.63	
	3.0	58.50	34.50	18.75	
	4.5	26.25	10.12	13.12	
L.S.D0.05 للتداخل		10.586			3.056
معدل الاجزاء		44.23	27.71	15.02	
L.S.D 0.05 للاجزاء		3.056			

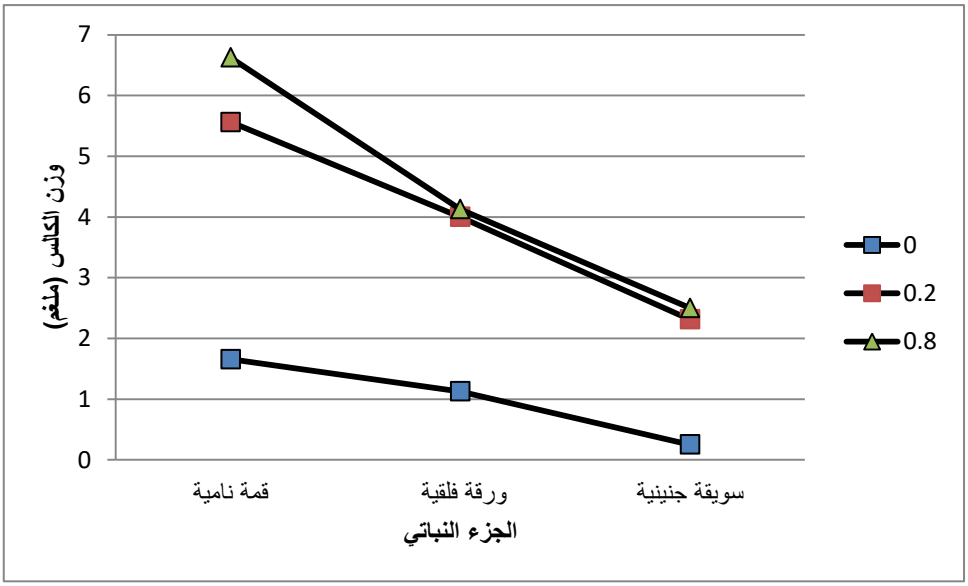
جدول 4 ب – تأثير تراكيز BA و 2,4-D ونوع الجزء النباتي والتداخل بينهم في معدل الوزن الجاف للكالس بعد خمسة اسابيع من الزراعة .

BA ملغم. لتر$^{-1}$	2,4-D ملغم. لتر$^{-1}$	الاجزاء النباتية			معدل BA
		القمة النامية	الاوراق الفلقية	السويقة الجنينية السفلى	
0	0	0.00	0.00	0.00	1.01
	1.5	3.25	2.25	0.00	
	3.0	2.63	2.00	1.00	
	4.5	0.75	0.25	0.00	
0.2	0	0.00	0.00	0.00	3.96
	1.5	11.88	7.13	2.25	
	3.0	7.50	7.13	4.00	
	4.5	2.88	1.75	3.00	
0.8	0	0.00	0.00	0.00	4.42
	1.5	17.63	11.75	6.50	
	3.0	6.38	3.63	2.13	
	4.5	2.50	1.13	1.38	
L.S.D0.05 للتداخل		1.185			0.342
معدل الاجزاء		4.61	3.08	1.69	
L.S.D 0.05 للاجزاء		0.342			



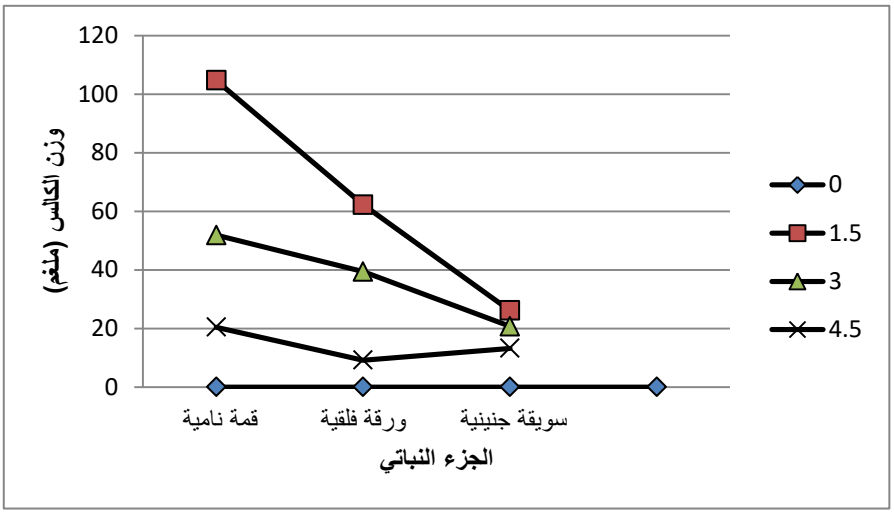
شكل(1) تأثير التداخل الثنائي بين تراكيز الـ2,4-D والـBA في النسبة المئوية للكالس المستحث

يبين الشكل(1) تفوق المعاملة 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D متداخلة مع التركيز 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA بنسبة وزن للكالس المستحث بلغ56.49 % عن المعاملة 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D متداخلة مع التركيز 0.2 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA. في حين تفوقت المعاملة 3 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D مع التركيز 0.2 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA على المعاملة 3.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D مع 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA بنسبة كالس مستحث بلغت 51.67% ويلاحظ انخفاض معدل الكالس المستحث عند التركيز4.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D متداخلا" مع التركيز0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA مقارنة مع نفس التركيز من 2,4-D وعند التركيز 0.2 ملغم. لتر$^{-1}$ منBA بنسبة 42.18%.



شكل(2) تأثير التداخل الثنائي بين تراكيز BA والاجزاء النباتية الثلاثة في النسبة المئوية للكالس المستحث.

يبين الشكل (2) تفوق التركيز 0.8 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA في معدل وزن الكالس المستحث من القمة النامية عن نفس التركيز منBA للكالس المستحث من الاوراق الفلقية بنسبة 43.76% ويلاحظ من الشكل ايضاً ان التركيز 0.2 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA تفوق في معدل وزن الكالس المستحث من القمة النامية عن الكالس المستحث من الاوراق الفلقية بنسبة 29.92%.



شكل (3)تأثير التداخل الثنائي بين تراكيز 2,4-D والاجزاء النباتية الثلاثة في نسبة الكالس المستحث .

يوضح الشكل تفوق القمة النامية عند التركيز 1.5 ملغم / لتر من 2,4-D على الاوراق الفلقية عند نفس التركيز من 2,4-D في معدل وزن الكالس المستحث بنسبة68.14 % وكذلك تفوقت الاوراق الفلقية عند التركيز 1.5 ملغم / لتر على القمة النامية عند التركيز3.0 ملغم / لتر بنسبة 16.73% وانخفضت نسبة الكالس المستحث عند السويقة الجنينية السفلى عند التركيز 4.5 ملغم / لتر عن القمة النامية عند نفس التركيز من الهرمون بنسبة 35.11%.

المصادر

1- الساعدي ، نورا جبر جاسم .2011. انتاج بعض قلويدات التروبان من كالس نبات البلادونا *Atropa belladonna* خارج الجسم الحي *In vitro* .رسالة ماجستير –كلية الزراعة –جامعة بغداد.

2- سعد الدين ,شروق محمد كاظم وعادل يوسف نصر الله ومدحت الساهوكي .2005 .نمو وحاصل وقلويدات البلادونا *Atropa belladonna*.L تاثير مواعيد الزراعة والشتل في صفات نمو وحاصل النباتات في الحقل المكشوف ,مجلة العلوم الزراعية العراقية 36(1):75-80 .

3- Tripathi , L. and J. N. Tripathi . 2003 . Role of biotechnology in medicin , Tropical Journal of pharmaceutical research , Vol .2, NO.2, PP . 243- 253.

4- محمد ,عبد المطلب سيد وعمر ,مبشر صالح .1990 .المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا الانسجة والاعضاء للنبات ,جامعة الموصل ,وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ,العراق .

5- George, E.F.and P.D.Sherrington.1993.Plant propagation by tissue culture .Second Edition Exegetics Ltd. England.

6- Hedden .P and G. Stephen. 2006.Plant Hormone signaling

7- Ramawat , K.G. 2004. Plant biotechnology .Printed in New Delhi .India.p :50-62.

8- George ,E .F, M.A.Hall, and G.J.Klerk . 2008 .Plant propagation by tissue culture practices . 3rd edition . Part plant growth regulators. Auxins their analogues and inhibitors , pp 175,185, 186 .

9- Hopkins , W.G. 1999 .Introduction to plant physiology ,2nd ed ,Johnwiley and Sons. Inc.USA.

10- المرسومي ,حيدر عماد رشيد .2010 .تاثير مكونات الوسط الغذائي والجزء النباتي المزروع في تكوين الكالس وانتاج بعض المركبات ذات الاستعمالات الطبية في نبات المريمية Saliva officinalis رساله ماجستير قسم البستنة– كلية الزراعة – جامعة بغداد.

11- Wei , Z.M. and Xu . 1990 .Regeneration of fertile plant from embryogenic suspension culture protoplasts of (*Sorghum vulgarel*.) . Plant cell rep .,9:51- 53.

12- Slater , A., N. Scotee and M. R. Wand – Fowler .2003.Plant Biotechnology (the Genetic main Pulation of plants) Oxford University press

13- فهمي ,فكري جلال محمد .2003. زراعة الانسجة النباتية –كلية الزراعة جامعة اسيوط .ص 137-142 .

14- المختار ,سراب عبد الهادي .2008 .دراسة انتاج بعض القلويدات المورفينية من نبات الخشخاش Papaver somniferanm. خارج الجسم الحي .رساله ماجستير قسم البستنة – كلية الزراعة– جامعة بغداد .

15- الساهوكي ،مدحت ووهيب ،كريمة احمد .1990 . تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب . وزاره التعليم العالي والبحث العلمي .العراق

16- Taiz,L. and E.Zeiger . 2006. Plant physiology . Sinauer assciates , Inc . Publishers.Sunderland .

17- Ibrahim , A .I . ,A.E. K . Mostafa , A. M. Amira and A. E. Asmaa .2009. Alkaloids production and Organogenesis from callus of Hyoscyamus muticus L . In vitro . Journal of Applied sciences Research, 5 (1): 82-92.cairo,Egypt.

18- Trigiano ,R.N. and D.J.Gray. 2000. Plant tissue culture concepts and laboratory Exercises CRC Press LLC.

19- Corchete, M.P., J.M. Sanchez ,M.C.Cacho ,M.Moran and J.F.Tarrag . 1990. Cardionlide content in cultures derived from root and leaf callus of Digitalis thapisi L. J. Plant physiol .137:196-200

20- Cellaropra ,E.R. and R . Honkariv . 1984. Vegetative propagation of some Medicinal plants Through Tissue culture . Plant tissue and culture application to crop Improvement .Czech Acad .Sci. prague.pp.515-516.

21- Mineo,L.1990.Plant tissue culture techniques .C.A. Goldman,Editor .pp:151-174.

22- Krishnamurthy ,K.V, D.A.Godbole and A.F.Mascarenhas . 1984.Studies on a drought resistant legume :the moth bean vigna acouitifoliu -1- protoplast culture and organo genesis .plant cell Rep . 3:30-32.

23- Goodwin ,M. 1985.Introduction to plant biochemistry .Second edition pergamon press. New York.