Influence of nutrient media ,explants and auxins on Callus induction from *Papaver somniferum in vitro*

تأثير الوسط الغذائي والجزء النباتي والاوكسين في استحثاث الكالس من نبات الخشخاش *Papaver somniferum* خارج الجسم الحي

د.محمد شهاب حمد	د.ابراهيم عبد الله حمزة	سراب عبد الهادي المختار
كلية الزراعة / جامعة بغداد	كلية الزراعة / جامعة بغداد	وزارة العلوم والتكنولوجيا

المستخلص

اجريت الدراسة في مختبرات زراعة الانسجة النباتية – كلية الزراعة – جامعة بغداد خلال عامي 2006-2007. اظهرت النتائج عدم تسجيل اي حالة تلوث عند تعقيم بذور الخشخاش بأستخدام تركيز 3% من هايبوكلورات الصوديوم NaOCL لمدة 15 دقيقة. وبينت النتائج ان وسط MS المجهز بتركيز 2 ملغم/ لتر من 2,4-D اعطى اعلى معدل للوزن الطري والجاف في استحثاث الكالس من القمة النامية بلغ (239.40، 22.50) ملغم على التوالي مقارنة مع نفس التركيز من 2,4-D في وسط B5 الذي اعطى (155.60، 14.80) ملغم لمعدل الوزن الطري والجاف للكالس على التوالي.

تفوق الوسط MS المجهز بتركيز 3ملغم/ لتر من 2,4-D معنوياً في معدل الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من الاوراق الفلقية فبلغ (137.30، 13.10) ملغم على التوالي مقارنة بالوسط B5 الذي اعطى معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ (122.60، 11.80) ملغم على التوالي لنفس التركيز ولنفس الاوكسين.

اعطى الكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى في وسط MS المجهز بتركيز 4 ملغم/ لتر من 2,4-D اعلى معدل في الوزن الطري والجاف للكالس المستحث بلغ (39.60، 3.70) ملغم بينما اعطى الوسط نفسه المجهز بتركيز 4 ملغم/ لتر NAA معدل وزن طري وجاف بلغ (24.00، 2.10) ملغم على التوالي. تفوقت القمة النامية معنوياً على الاوراق الفلقية والسويقة الجنينية السفلى اذ اعطت اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ [(90.3، 8.5) و (69.1، 6.5) و (5.4، 0.5)] ملغم على التوالي.

Abstract

A study was conducted in the tissue culture lab., College of Agriculture- University of Baghdad during 2006 and 2007.

Supplemented with results indicated that no sign of contamination was recorded when seeds of *Papaver somniferum* were sterilized with 3% sodium hypochlorite (NaOCL) for 15 minuts. The results also showed that MS medium modified with 2 mg/L 2,4-D gave the highest values of fresh and dry weight callus (239.40, 22.50) mg respectively, compared with B5 medium supplemented with the same auxin concentration which gave (155.60, 14.80) mg for both fresh and dry weight callus respectively.

MS medium supplemented with 3 mg/L 2,4-D was superior in both fresh and dry weight callus and gave (137.30, 13.10) mg respectively, compared with B5 medium at the same concentration of 2,4-D that gave (122.60, 11.80) mg for both fresh and dry weight callus respectively.

The callus which was induced with 4 mg/L 2,4-D gave the highest values (39.60, 3.70) mg for both fresh and dry weight callus respectively, while MS medium supplemented with 4 mg/L of NAA gave (24.00, 2.10) mg for both fresh and dry weight callus respectively. Shoot tip was superior than cotyledons and hypocotyls in inducing callus initiation (90.3 8.5) mg and (69.1, 6.5) mg and (5.4, 0.5) mg for both fresh and dry weight callus inducted from shoot tip, cotyledons and hypocotyls respectively.

المقدمـــــة //

يعتمد نشوء الكالس والذي هو عبارة عن خلايا برنكيمية غير متمايزة تنشأ على مناطق القطع او الجروح للاجزاء النباتية على مكونات الوسط الغذائي والجزء النباتي المستخدم. وبذلك يتم الحصول على مظاهر مختلفة للكالس قد يكون صلب او هش القوام واحياناً يبدو ذو لون اصفر او ابيض او اخضر اعتماداً على نوع النبات المستخدم (1، 2). وتشير المصادر الى ان للوسط الغذائي تأثير كبير في نشوء الكالس وادامته اعتماداً على مكونات الوسط الغذائي من جهة ونوع ومصدر الجزء النباتي المستخدم من جهة اخرى. وبسبب ان الخلايا والانسجة المزروعة تعيش في حالة رمية معتمدة في ذلك على مايوفره لها الوسط الغذائي وليس لها القدرة على تصنيع غذائها بنفسها (3، 4، 5، 6).

وقد اشار بعض الباحثين الى ان استخدام القمة النامية والاوراق الفلقية اظهر استجابة عالية في استحثاث الكالس لنبات الخشخاش (7، 8، 9) وهذا ما اكده (10). ويعد تعقيم الجزء النباتي Explant المستخدم في الزراعة النسيجية من اهم الخطوات التي يعتمد عليها نجاح برنامج زراعة الانسجة والتي تعني القضاء على جميع الاحياء المجهرية التي يمكن ان ترتبط بنمو الجزء النباتي المزروع على الوسط الغذائي والتي تؤدي الى هلاكه، وتختلف نوع المعاملة وتركيزها وفترة التعقيم تبعاً لنوع الجزء النباتي (11، 12، 13).

ومن المهم خلق توازن دقيق بين تراكيز الاوكسينات والسايتوكاينينات في الوسط الغذائي لاستحثاث ونمو وادامة الكالس من الاجزاء النباتية المستخدمة (14، 15، 16، 17، 18، 13) فقد وجد كل من (5 ، 8، 16) ان الوسط الغذائي MS (19) المجهز بالتراكيز 2-3 ملغم/لتر من 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) و 0.2-0.5 ملغم/لتر من الكاينتين Kinetin كان افضل من الوسط الغذائي B5 (20) في استحثاث وادامة الكالس من الاجزاء النباتية المستخدمة. وقد اوصى الكثير من الباحثين بضرورة اعادة زراعة الكالس بعد 4-5 اسابيع مع اهمية التحضين بالظلام (14، 15، 2، 21).

وبناءاً على ماتقدم فان اهمية البحث الحالي تتضح من خلال انشاء مزارع نسيجية من اجزاء نباتية مختلفة من بادرات نبات الخشخاش على اوساط غذائية مختلفة وانواع وتراكيز مختلفة من منظمات النمو لتحديد الجزء الامثل من البادرات والاوساط الغذائية ومنظمات النمو وتراكيزها في نشوء واستحثاث الكالس ومن ثم استخلاص بعض القلويدات المورفينية (المورفيين والكودائيين)لاستخدامها في الاغراض الصيدلانية .

المواد وطرائق العمل

نفذت هذه التجارب في مختبرات زراعة الانسجة النباتية – كلية الزراعة – جامعة بغداد للمدة من تشرين الاول 2006 ولغاية تشرين الثاني 2007.

تعقيم مواد واداوت العمل

عقمت جميع الادوات المستخدمة في الزراعة من ملاقط ومشارط واطباق بتري من خلال وضعها في حاويات معدنية Canister اضافة الى تعقيم الماء المقطر المستخدم في غسل الاجزاء النباتية باستخدام الموصدة Autoclave على درجة حرارة 121°م وتحت ضغط 1.04 كغم/سم^2 لمدة 30 دقيقة

1- تحضير البذور وتعقيمها

غسلت البذور بالماء والزاهي ونقلت الى منضدة انسياب الهواء الطبقي laminar airflow hood ثم غمرت البذور المراد تعقيمها بمادة هايبوكلورات الصوديوم NaOCl بالتراكيز (0.0، 1.5، 3.0، 4.5 او 6.0)% للمدد (5، 10، 15) دقيقة مع التحريك المستمر في اطباق بتري معقمة وغسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لضمان ازالة التأثير الضار للمادة المعقمة من اسطح البذور. بعدها نقلت البذور الى اطباق بتري معقمة ومزودة بورق الترشيح المعقم ومرطب بـ1/2 قوة املاح MS السائل وبواقع عشرة بذور لكل طبق ولكل تركيز ولكل مدة زمنية. واحكم غلقها بالورق الشمعي para film وحضنت في ظلام تام على درجة حرارة 25±2م°وقد تم حساب النسبة المئوية لتلوث البذور بعد 5 ايام من الزراعة .

2- تحضير الوسط الغذائي

استعمل املاح الوسط الغذائي MS (19) و B5 (20) واضيف الى املاح الوسطين الغذائيين كل من الفيتامينات ومنظمات النمو والسكروز والاكار جدول (1) وعدل الرقم الهيدروجيني pH الى 5.7 بمحلول واحد عياري من هيدروكسيد الصوديوم او حامض الهيدروكلوريك قبل اضافة الاكار في حالة الاوساط الصلبة، وكذلك اضيف الاوكسين 2,4-D و NAA (Naphthalene acetic acid) كل على حدة وبالتراكيز (0، 1، 2، 3، 4) ملغم/لتر لايجاد التركيز المناسب لاستحثاث الكالس من الاجزاء النباتية (قمة نامية، اوراق فلقية، سويقة جنينية سفلى) لبادرات الخشخاش بعمر اسبوع وسخن الوسط الغذائي بواسطة جهاز الخلاط المغناطيسي الحراري وبعد ان اصبح الوسط متجانساً وزع في انابيب الزراعة ثم عقمت بجهاز الموصدة على درجة حرارة 121°م وتحت ضغط 1.04 كغم/سم^2 لمدة 20 دقيقة.

جدول 1. مكونات الوسطين الغذائيين من المركبات العضوية الخاصة باستحثاث الكالس

المادة	محتوى الوسط الغذائي ملغم/لتر	
	MS	B5
الاملاح	قوة كاملة	قوة كاملة
Pyrodoxine-HCl	0.5	1.00
Glycine	2.0	-
Nicotinic acid	0.5	1.00
Thiamine-HCl	0.1	0.01
Myo-inositol-	0.1	0.10
NAA, 2,4-D	حسب التراكيز المستخدمة بالتجربة	حسب التراكيز المستخدمة بالتجربة
Kinetin	0.5	0.5
Sucrose	30000	20000
Agar	7000	7000

3- الاجزاء النباتية المستخدمة

وضعت بذور الخشخاش المعقمة عند افضل تركيز من الفقرة (2) على الجسر الورقي وبواقع 25 بذرة تقريباً لكل انبوب وحضنت البذور في الظلام التام لمدة 48 ساعة بعدها حضنت على 16 ساعة اضاءة و 8 ساعات ظلام وعلى درجة حرارة 25±2ْم لمساعدة البادرات على النمو. وبعد 7 ايام اخذت البادرات واستأصل منها القمة النامية بطول 1 ملم والاوراق الفلقية بطول 4 ملم والسويقة الجنينية السفلى بطول 5 ملم (22). وزرعت على الاوساط الغذائية المعدة لاستحثاث الكالس وبواقع عشرة مكررات لكل معاملة وحضنت الزروعات في الظلام التام على درجة حرارة 25±2ْم وسجلت النتائج بعد خمسة اسابيع من الزراعة والتي شملت الوزنين الطري والجاف للكالس المستحث (3 2).

4- قياس الوزن الطري والجاف للكالس

قيس الوزن الطري والجاف للكاس بعد خمسة اسابيع من الزراعة بأستخدام ميزان حساس، حيث استخرجت قطع الكالس الطري ووضعت على ورق ترشيح وازيلت بقايا الوسط الغذائي الملتصقة بها وحسب الوزن الطري. جففت قطع الكالس الطري في فرن كهربائي Oven على درجة حرارة 70ْم ووزنت عند ثبات الوزن، وقد استخدم معيار الوزن الطري والجاف للكالس المستحث في مرحلة النشوء لتحديد افضل جزء نباتي وافضل وسط غذائي وافضل نوع وتركيز من الاوكسينات.

5- التحليل الاحصائي

نفذت جميع التجارب باستخدام التصميم العشوائي الكامل CRD وبتجارب عاملية وحللت النتائج بأستخدام البرنامج الاحصائي (SAS) (24) وقورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي LSD وعلى مستوى احتمال 0.05.

النتائج والمناقشة

يتضح من البيانات في الجدول (2) الى وجود فروقات معنوية في نسبة التلوث عند تداخل المدة مع تراكيز هايبوكلورات الصوديوم فبلغت 100% عند جميع مدد التعقيم في معاملة المحايد. واقلها كان في مدد التعقيم (10، 15) دقيقة عند التركيزين (4.5 و 6.0)% ومدة 15 دقيقة عند التركيز 3% من NaOCl فبلغت 0.0%. ولوحظ ان زيادة مدة التعقيم الى (15) دقيقة عند التركيز (4.5 و 6.0)% من NaOCl قد ادت الى تأخير انبات البذور مقارنة بالمدة (15) دقيقة عند التركيز 3% من NaOCl التي اعطت اقل نسبة تلوث بلغت 0.0% دون التأثير على الانبات. ان تأثير NaOCl كمادة معقمة للانسجة النباتية يعود الى حامض HOCl الذي يعد مادة مؤكسدة قوية اذ يتكون هذا الحامض نتيجة ذوبان الكلور بالماء. ان هذه النتائج تتفق مع نتائج عدد من الباحثين الذين استعملوا NaOCl في تعقيم بذور الخشخاش (10) الذي وجد ان استعمال (3%) من NaOCl لمدة (15) دقيقة اعطى اقل نسبة تلوث عند تعقيم البذور. ولم تتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه (7) الذين وجدوا ان استخدام تركيز 1% من NaOCl لمدة 20 دقيقة اعطى اقل نسبة تلوث عند تعقيم بذور الخشخاش.

جدول 2. تأثير تراكيز مختلفة من هايبوكلورات الصوديوم والمدد في النسبة المئوية لتلوث بذور الخشخاش بعد خمس ايام من الزراعة

تركيز NaOCl% / مدة المعاملة (دقيقة)	0	1.5	3	4.5	6	المعدل
5	100.0	100.0	76.0	32.0	0.0	61.6
10	100.0	78.0	28.0	0.0	0.0	41.2
15	100.0	26.0	0.0	0.0	0.0	25.2
أ.ف.م 0.05	7.1					4.1
المعدل	100.0	68.0	34.7	10.7	0.0	
أ.ف.م 0.05	3.2					

تبين نتائج الجدول (3 أ و ب) الى وجود فروقات معنوية في نوع الوسط الغذائي للوزنين الطري والجاف للكالس المستحث من القمة النامية . اذ تفوق الوسط الغذائي MS واعطى اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ (108.15، 10.14) ملغم على التوالي . ويوضح الجدول نفسه الى وجود فروقات معنوية عند تداخل الوسط الغذائي مع نوع الاوكسين في الوزنين الطري والجاف للكالس اذ تفوق الوسط MS المجهز بالـ 2.4-D واعطى اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ (128.78، 12.16) ملغم على التوالي وبلغ اقلة في الوسط الغذائي B5 المجهز بالـ NAA واعطى معدل وزن طري وجاف بلغ (60.82، 5.72) ملغم على التوالي .ويشير الجدول نفسه الى وجود فروق معنوية بين تراكيز الاوكسين المختلفة وبغض النظر عن نوع الاوكسين اذ تفوق التركيز 2 ملغم / لتر واعطى اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ (148.37،14.02) ملغم على التوالي والذي تفوق معنويا" على بقية المعاملات .

وتشير نتائج الجدول (3 أ و ب) الى وجود فروقات معنوية عند تداخل نوع الوسط الغذائي مع تراكيز الاوكسين في معدل الوزنين الطري والجاف للكالس .اذ تفوق الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 2 ملغم /لتر من الاوكسين واعطى اعلى معدل وزن طري وجاف بلغ (169.90، 16.00) ملغم على التوالي .

وتبين نتائج الجدول نفسه الى وجود فروقات معنوية عند تداخل نوع الوسط الغذائي مع نوع الاوكسين وتركيزه في الوزنين الطري والجاف للكالس المستحث من زراعة القمة النامية (23). اذ تفوق الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 2 ملغم/ لتر من 2,4-D فأعطى اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ (239.40، 22.50) ملغم على التوالي مقارنة مع نفس التركيز من 2,4-D في وسط B5 الذي اعطى (155.60، 14.80) ملغم لمعدل الوزن الطري والجاف للكالس على التوالي، وبلغ اقله عند التركيز 1 ملغم/لتر NAA المجهز الى الوسط B5 اذ عطى معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ (25.0، 2.4) ملغم على التوالي. اما معاملة المحايد فلم تعط اي استجابة تذكر.

جدول(3). تأثير الوسط الغذائي وتركيز الاوكسين والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للكالس (ملغم) المستحث من القمة النامية لبادرة الخشخاش بعد خمسة اسابيع من الزراعة.

3.أ.الوزن الطري

نوع الوسط الغذائي	نوع الاوكسين	تركيز الاوكسين (ملغم /لتر) 0	1	2	3	4	نوع الوسط x نوع الاوكسين	معدل الوسط الغذائي
MS	2,4-D	0.00	197.80	239.40	119.20	87.50	128.78	108.15
	NAA	0.00	57.00	100.40	180.90	99.3	87.52	
MS X تركيز الاوكسين		0.00	127.40	169.90	150.05	93.40		
B5	2,4-D	0.00	99.20	155.60	108.20	56.00	83.80	72.31
	NAA	0.00	25.00	98.10	115.40	65.60	60.82	
B5 X تركيز الاوكسين		0.00	62.10	126.85	111.80	60.80		
نوع الاوكسين Xتركيزه	2,4-D	0.00	148.50	197.50	113.70	71.75		
	NAA	0.00	41.00	99.25	148.15	82.45		
معدل تركيز الاوكسين		0.00	94.75	148.37	130.92	77.1		
أ.ف.م 0.05		الوسط الغذائي= 6.57		نوع الوسط Xنوع الاوكسين =20.40				
		تركيز الاوكسين =10.39		نوع الوسط X تركيز الاوكسين =29.91				
		نوع الاوكسين =6.57		نوع الاوكسين X تركيز الاوكسين =22.44				
		نوع الوسط X نوع الاوكسين X تركيز الاوكسين =20.79						

3.ب.الوزن الجاف

نوع الوسط الغذائي	نوع الاوكسين	تركيز الاوكسين (ملغم /لتر) 0	1	2	3	4	نوع الوسط x نوع الاوكسين	معدل الوسط الغذائي
MS	2,4-D	0.00	18.70	22.50	11.20	8.40	12.16	10.14
	NAA	0.00	5.40	9.50	16.70	9.00	8.12	
MS X تركيز الاوكسين		0.00	12.05	16.00	13.95	8.70		
B5	2,4-D	0.00	9.30	14.80	10.40	5.30	7.96	6.48
	NAA	0.00	2.40	9.30	10.70	6.20	5.72	
B5 X تركيز الاوكسين		0.00	5.85	12.05	10.75	5.75		
نوع الاوكسين Xتركيزه	2,4-D	0.00	14.00	18.65	10.80	6.85		
	NAA	0.00	3.90	9.40	13.70	7.60		
معدل تركيز الاوكسين		0.00	8.95	14.02	12.25	7.22		
أ.ف.م 0.05		الوسط الغذائي= 0.61		نوع الوسط Xنوع الاوكسين =2.OO				
		تركيز الاوكسين =0.97		نوع الوسط X تركيز الاوكسين =2.78				
		نوع الاوكسين =0.61		نوع الاوكسين X تركيز الاوكسين =2.10				
		نوع الوسط X نوع الاوكسين X تركيز الاوكسين =1.94						

يستنتج ان التركيز 2 ملغم/ لتر من 2,4-D و 0.5 ملغم/لتر كاينتين في وسط MS كان التركيز الامثل الذي اعطى اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس المستحث من القمة النامية وقد يعزى السبب الى تاثير منظمات النمو في تشجيع الخلايا على الانقسام والاتساع فضلاً عن تأثيرها على الصفيحة الوسطى للخلايا مما يساعد على اتساع الجدار الخلوي وذلك عند الوصول الى التوازن الامثل بين الاوكسين والسايتوكاينين اذ يعمل السايتوكاينين بوجوده مع الاوكسين كمفتاح لبدء الانقسام الخلوي اما عند زيادة التركيز فأنه سوف يؤدي الى الاخلال بالتوازن الامثل مما يؤدي الى انخفاض معدل وزن الكالس وقد يعود السبب في انخفاض معدل وزن

الكالس عند ارتفاع تركيز الـ2,4-D في وسط النمو الى دور هذا الاوكسين في تحفيز انتاج غاز الاثيلين الذي يقلل من معدل انقسام الخلايا (3 2) وهذا يتفق مع ماحصل عليه روز به ياتي (23 ، 5، 8) في دور الاوكسين وبوجود السايتوكاينين على تحفيز الخلايا على الانقسام والذي يتمثل بتكوين الكالس.
ويوضح الجدول (4 أ و ب) الى وجود فروقات معنوية عند تداخل نوع الوسط الغذائي مع نوع الاوكسين في الوزنين الطري والجاف للكالس المستحث من الاوراق الفلقية لبادرة الخشخاش في الوزنين الطري والجاف بلغ (82.36، 7.80) ملغم على التوالي في الوسط الغذائي MS المجهز بالاوكسين 2,4-D مقارنة بالوسط الغذائي B5 الذي اعطى معدل وزن طري وجاف بلغ (6.66،7.80) ملغم على التوالي في الوسط MS المجهز بنفس الاوكسين ويشير الجدول نفسه الى وجود فروقات معنوية عند تداخل نوع الوسط الغذائي مع تراكيز الاوكسين المختلفة وبغض النظر عن نوع الاوكسين . اذ تفوق الوسط الغذائي MS المجهز بالتركيز 3 ملغم /لتر من الاوكسين اعطى اعلى معدل وزن طري وجاف بلغ (128.70، 12.15) ملغم على التوالي واختلفا معنويا " عن بقية المعاملات بأستثناء التركيز 3 ملغم / لتر من الاوكسين المجهز للوسط الغذائي B5 اذ اعطى معدل وزن طري وجاف بلغ (113.30،10.85) ملغم على التوالي وكان اقل معدل وزن طري وجاف للكالس في الوسط الغذائي نفسه المجهز بالتركيز 1 ملغم / لتر من الاوكسين بلغ (30.50، 2.65) ملغم على التوالي ولم تعط معاملة المحايد اي استجابة تذكر لاستحثاث الكالس من الاوراق الفلقية .
ويشير الجدول (4 أ و ب) الى وجود فروقات معنوية بين المعاملات عند تداخل الوسط الغذائي مع نوع الاوكسين وتركيزة في معدل الوزنين الطري والجاف . اذ تفوق الوسط الغذائي MS المجهز بالـ 2,4-D عند التركيز 3 ملغم / لتر واعطى معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ (137.30 ،13.10) ملغم على التوالي واختلف معنويا" عن المعاملات الاخرى بأستثناء التركيز 2 ملغم/ لتر من الـ 2,4-D المجهز للوسط الغذائي نفسه .اذ اعطى معدل وزن طري وجاف بلف (133.90، 12.70) ملغم على التوالي . بينما بلغ اقله في الوسط الغذائي B5 المجهز بالاوكسين NAA عند التركيز 1 ملغم / لتر في معدل الوزنين الطري والجاف بلغ (12.00، 1.00) ملغم على التوالي .
تبين النتائج في الجدول (4 أ و ب) الى تفوق الوسط الغذائي MS المجهز بالـ2,4-D عند التركيز 3 ملغم/لتر الذي اعطى اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ (137.3، 13.1) ملغم على التوالي مقارنة بالوسط B5 الذي اعطى معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ (122.60، 11.80) ملغم على التوالي عند نفس التركيز ولنفس الاوكسين. بينما بلغ اقله في الوسط B5 المجهز بـ NAA عند التركيز 1 ملغم/لتر بلغ (12، 1) ملغم وزن طري وجاف على التوالي في الكالس المستحث من الاوراق الفلقية . اما معاملة المحايد فلم تعط اي استجابة تذكر. من خلال ماتقدم من نتائج وجد ان الوسط MS تفوق على الوسط الغذائي B5 وبوجود الاوكسين في معدل الوزنين الطري والجاف للكالس المستحث من القمة النامية والاوراق الفلقية وقد يعزى سبب التفوق الى محتوى الوسط MS العالي من العناصر الغذائية وخاصة النتروجين الذي يدخل في بناء الاحماض الامينية والنووية والمرافقات الانزيمية (15، 26) مما يشجع نمو وتطور الجزء النباتي المزروع كما ان زيادة نسبة استحثاث الكالس قد يرجع الى زيادة تركيز السكروز بالوسط الغذائي MS وهو المصدر الكربوهيدراتي الذي يزود الخلية بالطاقة اللازمة للنمو والبقاء (27، 16) وهذا يتفق مع ماتوصل اليه كل من (3) على نبات الداتورا و (28) على نبات الخشخاش.

جدول 4. تأثير الوسط الغذائي ونوع وتركيز الاوكسين والتاخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للكالس (ملغم)المستحث من الاوراق الفلقية لبادرة الخشخاش بعد خمسة اسابيع من الزراعة .

4.أ.الوزن الطري

نوع الوسط الغذائي	نوع الاوكسين	تركيز الاوكسين (ملغم /لتر) 0	1	2	3	4	**نوع الوسط x نوع الاوكسين**	**معدل الوسط الغذائي**
MS	2,4-D	0.00	55.00	133.90	137.30	90.60	**83.36**	**75.77**
	NAA	0.00	34.00	76.00	120.10	110.80	**68.18**	
MS X تركيز الاوكسين		0.00	44.50	104.95	128.70	100.70		
B5	2,4-D	0.00	49.00	96.00	122.60	86.00	**70.72**	**62.45**
	NAA	0.00	12.00	67.90	104.00	87.00	**54.18**	
B5 X تركيز الاوكسين		0.00	30.50	81.95	113.50	86.50		
نوع الاوكسين Xتركيزه	2,4-D	0.00	52.00	114.95	129.95	88.30		
	NAA	0.00	23.00	71.95	112.05	98.90		
معدل تركيز الاوكسين		0.00	37.50	93.45	121.00	93.60		
أ.ف.م 0.05		الوسط الغذائي= 4.65		نوع الوسط Xنوع الاوكسين =12.00				
		تركيز الاوكسين =7.35		نوع الوسط X تركيز الاوكسين =16.17				
		نوع الاوكسين =4.65		نوع الاوكسين X تركيز الاوكسين =12.86				
		نوع الوسط X نوع الاوكسين X تركيز الاوكسين =14.70						

4.ب.الوزن الجاف

نوع الوسط الغذائي	نوع الاوكسين	تركيز الاوكسين (ملغم /لتر) 0	1	2	3	4	**نوع الوسط x نوع الاوكسين**	**معدل الوسط الغذائي**
MS	2,4-D	0.00	5.00	12.70	13.10	8.20	**7.80**	**7.04**
	NAA	0.00	2.90	6.90	11.20	10.40	**6.28**	
MS X تركيز الاوكسين		0.00	3.95	9.80	12.15	9.30		
B5	2,4-D	0.00	4.30	9.10	11.80	8.10	**6.66**	**5.91**
	NAA	0.00	1.00	6.30	9.90	8.60	**5.16**	
B5 X تركيز الاوكسين		0.00	2.65	7.70	10.85	8.35		
نوع الاوكسين Xتركيزه	2,4-D	0.00	4.65	10.90	12.45	8.15		
	NAA	0.00	1.95	6.60	10.55	9.50		
معدل تركيز الاوكسين		0.00	3.30	8.75	11.50	8.82		
أ.ف.م 0.05		الوسط الغذائي= 0.42		نوع الوسط Xنوع الاوكسين =1.00				
		تركيز الاوكسين =0.76		نوع الوسط X تركيز الاوكسين =1.56				
		نوع الاوكسين =0.42		نوع الاوكسين X تركيز الاوكسين =1.22				
		نوع الوسط X نوع الاوكسين X تركيز الاوكسين =1.35						

ويشير جدول (5 أ و ب) الى وجود فروقات معنوية عند تداخل الوسط الغذائي مع الاوكسين اذ تفوق الوسط الغذائي MS المجهز بالـ 2,4-D واعطى اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى بلغ (13.52 ، 1.20) ملغم على التوالي . مقارنه بالوسط الغذائي B5 الذي لم يعط اي استجابة تذكر لاستحثاث الكالس . اظهر الجدول نفسه تفوق الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 4 ملغم / لتر من الـ 2,4-D معنويا" على بقية المعاملات واعطى اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى بلغ (39.60، 3,70) ملغم على التوالي مقارنة بالوسط الغذائي نفسه المجهز بتركيز 4 ملغم / لتر من الـ NAA والذي اعطى معدل وزن طري وجاف بلغ (24.00، 2.10) ملغم على التوالي . والذي لم يختلف معنويا" عن الوسط الغذائي نفسه المجهز بتركيز 3 ملغم / لتر من الـ 2,4-D والذي اعطى معدل وزن طري وجاف بلغ (18.00، 1.50) ملغم على التوالي .

واظهر الجدول (5 أ وب) تفوق الوسط MS المجهز بتركيز 4 ملغم/ لتر من 2,4-D معنوياً على بقية المعاملات واعطى اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس المستحث بلغ (39.6، 3.7) ملغم على التوالي مقارنة بالوسط B5 الذي لم يعط اي استجابة تذكر بينما اعطى الوسط MS المجهز بتركيز 4 ملغم/لتر NAA معدل وزن طري وجاف بلغ (24.0، 2.1) ملغم على التوالي.
ومن خلال كل ما سبق عرضه من نتائج وجد ان 2,4-D تفوق على الـ NAA في معدل الوزنين الطري والجاف للكالس ولكافة الاجزاء النباتية المستخدمة لاستحثاث الكالس وقد يعود السبب الى تأثير السلسلة الجانبية في الاوكسين فقد وجد ان طبيعة مجموعات الاحلال في الحلقة وموقعها لها تأثير في نشاط المركب . اي ان طول السلسلة الجانبية لمجموعة الخلات المتصلة بذرة الاوكسجين المرتبطة بذرة الكاربون الاولى لحلقة الفنيل قد زادت من نشاط الاوكسين وكذلك وجود ذرتي الكلور في الـ 2,4-D قد زادت من نشاط وفعالية هذا الاوكسين (30) وتؤيد الدراسة التي قام بها (14 ، 1) هذه النتائج بأن الـ2,4-D كان الافضل في استحثاث الكالس مقارنة بالاوكسينات الاخرى.

يتضح من بيانات الجدول (4) تفوق القمة النامية معنوياً على الاوراق الفلقية والسويقة الجنينية السفلى اذ اعطت اعلى معدل وزن للكالس المستحث والذي بلغ 90.3 ملغم وزن طري و 8.5 ملغم وزن جاف. كما يبين الجدول نفسه تفوق الاوراق الفلقية على السويقة الجنينية السفلى في معدل وزن الكالس المستحث والذي بلغ 69.1 ملغم وزن طري و 0.5 ملغم وزن جاف.

من هذا يستدل ان القمة النامية هي الجزء النباتي الافضل لاستحثاث الكالس وقد يعود السبب الى كون خلاياها مرستيمية نشطة اضافة الى محتواها العالي من الاوكسينات الداخلية مقارنة بالاوراق الفلقية والسويقة الجنينية السفلى (2) وهذا مايتفق مع ما اكده (9) في نبات الخشخاش.

جدول 5. تاثير الوسط الغذائي ونوع الاوكسين وتركيزة والتاخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للكالس (ملغم) المستحث من السويقة الجنينية لبادرة الخشخاش بعد خمسة اسابيع من الزراعة

5.أ.الوزن الطري								
نوع الوسط الغذائي	نوع الاوكسين	تركيز الاوكسين (ملغم /لتر)					نوع الوسط x نوع الاوكسين	معدل الوسط الغذائي
		0	1	2	3	4		
MS	2,4-D	0.00	0.00	10.00	18.00	39.60	13.52	10.76
	NAA	0.00	0.00	0.00	16.00	24.00	8.00	
MS X تركيز الاوكسين		0.00	0.00	5.00	17.00	31.80		
B5	2,4-D	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	NAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
B5 X تركيز الاوكسين		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
نوع الاوكسين Xتركيزه	2,4-D	0.00	0.00	5.00	9.00	19.00		
	NAA	0.00	0.00	0.00	8.00	12.00		
معدل تركيز الاوكسين		0.00	0.00	2.50	8.50	15.90		
أ.ف.م 0.05		الوسط الغذائي= 2.07		نوع الوسط Xنوع الاوكسين =5.24				
		تركيز الاوكسين =3.28		نوع الوسط X تركيز الاوكسين =4.59				
		نوع الاوكسين =3.28		نوع الاوكسين X تركيز الاوكسين =7.02				
		نوع الوسط X نوع الاوكسين X تركيز الاوكسين =6.56						

5.ب.الوزن الجاف								
نوع الوسط الغذائي	نوع الاوكسين	تركيز الاوكسين (ملغم /لتر)					نوع الوسط x نوع الاوكسين	معدل الوسط الغذائي
		0	1	2	3	4		
MS	2,4-D	0.00	0.00	0.80	1.50	3.70	1.20	0.95
	NAA	0.00	0.00	0.00	1.40	2.10	0.70	
MS X تركيز الاوكسين		0.00	0.00	0.40	1.45	2.90		
B5	2,4-D	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	NAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
B5 X تركيز الاوكسين		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
نوع الاوكسين Xتركيزه	2,4-D	0.00	0.00	0.40	0.75	1.85		
	NAA	0.00	0.00	0.00	0.70	1.05		
معدل تركيز الاوكسين		0.00	0.00	0.20	0.72	1.42		
أ.ف.م 0.05		الوسط الغذائي=0.17		نوع الوسط Xنوع الاوكسين =o.45				
		تركيز الاوكسين =0.27		نوع الوسط X تركيز الاوكسين =0.95				
		نوع الاوكسين =0.17		نوع الاوكسين X تركيز الاوكسين =0.45				
		نوع الوسط X نوع الاوكسين X تركيز الاوكسين =0.54						

جدول 6. معدل وزن الكالس الطري والجاف المستحث من الاجزاء النباتية بعد خمسة اسابيع من الزراعة.

الجزء النباتي	الوزن الرطب (ملغم)		الوزن الجاف (ملغم)	
	المعدل	اختبار T	المعدل	اختبار T
القمة النامية	90.3	13.8	8.5	1.7
الاوراق الفلقية	69.1		6.5	
القمة النامية	90.3	11.3	8.5	1.6
السويقة الجنينية السفلى	5.4		0.5	
الاوراق الفلقية	69.1	8.2	6.5	0.1
السويقة الجنينية السفلى	5.4		0.5	

المصـــادر //

1- George, E.F. and P.D. Sherrington. (2008). Plant propagation by tissue culture. Fourth edition. Ltd. England.

2- Trigiano, R.N. and D.J. Gray. (2000). Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. CRC. Press LLC

3- الجبوري، اسراء ازهر سلمان. (2007). دراسة بعض انواع الايض الثانوي خارج الجسم الحي في نبات السالفيا *Salvia afficinalis* وتأثيرها في تثبيط نمو بعض انواع البكتريا، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة النهرين. العراق.

4- Aurelia, S.; I. lusarkiewicz; P. Aleksandro and K. Zygmunt. (2007). Influence of cultivar, explant source on *In Vitro* growth of *Cannabis sativa*. Plant Genet. 47:145-151.

5- Cheng, H.; L.J. Yu; Q.Y. Hu;S.C.Chen and Y.P. Sun. (2006). Establishment of callus and cell suspension cultures of *Corydalis saxicola* Arabe medicinal plant . College of Life Science & Technology. China Z. naturforch. 61(3-4): 251-256.

6- Friesen, L.J.; K.K. Kartha; N.L. Leuno and D.D. Songstad. (1991). Cryoprespevation of *Papaver somniferum* cell suspention cultures. Plant Medica. 57(1): 53-55.

7- Chitty, J.A.; R.S. Allen and P.J. Larkin. (2003). Genetic transformation in commereial Tasmanian cultivar of opium poppx *Papaver somniferum* and movement of transgenic pollen in the field. Functional plant Biology, 30, 1045-1058.

8- Ilahi, I and E.G. Ghauri. (2004). Regeneration in cultures of *Papaver somniferum* as influenced by growth hormones and temperature, Plant Cell, Tissue and Organic Culture 38, p.81-83.

9- Nadaska, M. and K. Erdelsky. (1991). Specific activity in elictor-treated callus culture of *Papaver somniferum* during growth period. Biologia, 46, 577-582.

10- Partk, S.U. and P.J. Facchini. (2002). Agrobecterium rhizogenes-mediated transformation of *Papaver somniferum* and California poppy. Journal of Experimental Botany. Vol. 51, No. 347, pp. 1005-1016.

11- Catapan, E., M.F. Otuki and A.M. Viana. (2000). *In vitro* culture of *Phyllanthus stipulatus.* Botanica. Vol. 24. No. 1.

12- Tripathi, L. and J.N. Tripathi. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical. Pharmaceutical Research, Vol. 2, No. 2, pp. 243-253.

13- Xie, D. and Y. Hong. (2001). *In vitro* regeneration of *Acacia*. Plant Cell, Tissue and Organic Culture. 66: 167-173.

14- Al-Hattab, Z. N.; E. Al-Kateeb; W.K.AL-Quadhy and G. Mahdi. (2000). Effect of growth hormones on Tropane Alkaloids production in *Datura* callus culture. IBN Al-Haitham for Pure and Appl. Sci. Vol. 12 (1).
15- Huan, L.V., T. Takamura and M.Tanaka. (2004). Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *cymbidium* orchid. Plant Science, 166, (6). 1443-1449.
16- Lee, K.J. and B.Y. Yi. (2007). Rapid multiplication of Basil; Factors affecting callus formation and plant regeneration. Acta Horticulture 625.
17- Nessler, C.L. (2007). Somatic emberyogenesis in the (Opium poppy) *Papaver somniferum* , Phytochemistry Reviews, 6:1, 79.
18- Rani, G.; G.A. Virk and A. Nagpal. (2003). Callus induction and plantlet regeneration in *Withania somniferum, In vitro* cellular and developmental biology-Plant Volume 39, Issue 5.
19- Murashige, T. and F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacoo tissue culture. Physiol. Plant. 15: 437-497.
20- Gamborg, O.L.; R.A. Miller and K.O. Ojima. (1968). Nutrient requirement of suspention cultures of soya been root cells. Exp. Cell Res. 50, 151-158.
21- Wakhlu, A.S; B. Brijmohan. (2000). Callus formation and plant regeneration of *Coryphantha eleplantidens In vitro* cellular and development, Biology-Plang, Volume 36, (3), 211-21
22- Stern, K.; R. Shelley and E. Janes. (2003). Introductory, plant Biology. Ch; 8, P. 1470.
23- روزبه ياني، شيرين عبد الكريم امين. (2007). استحداث وتحفيز زيادة انتاج بعض نواتج الايض الثانوي في المزارع النسيجية لنبات الروجة *Hypericum perforatum*، اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية. العراق.
24- SAS, (2002). STAT User Guide for Personal Computer SAS. Institute Inc, Cary, N.C. USA
25- Sateesh, M.K. (2003). Biotechnology-5. New age International publishers.
26- Ramawat, k.G. (2004). Plant biotechnology. S. Chand and Company LTD, Ram Nagar, New Delhi.
27- Krueger, R.J. and D.P. Carew. (2004). *Catharanthus roseus* tissue culture: The effect of precursors on growth and alkaloids production. L.I. Odia 4:327-331.
28- يونس، اواب وعد الله ومزاحم قاسم الملاح. (2001). تغير استجابة نبات الداتورا *Datura innoxia* للزراعة النسيجية في ثلاثة انواع من الوسط الغذائي، مجلة التربية والعلوم، المجلد 3 العدد 6 ص 44-45
29- Kaya, N. and B. Locjwood. (1996). A study of the alkaloids in callusing plant tissue of *Papaver somniferum*. Tr.J. of Agriculture and Forestry, 23: 377-381.
30- Taiz, L. and E. Zeiger. (2006). Plant physiology. 4th edition, Inc. Publisher, Sunderland.

.