Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 2, June 2018, pp. (199 - 213)
ISSN: 1992 - 0849 (Print), 2616 - 6801 (Online)

تأثير استخدام مختلف التوليفات الهرمونية في استحداث وتمايز كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات الجت *Medicago Sativa*

رغد نواف جرجيس الزيدي[1]، عبد الله نجم عبد الله النعيمي[2]، نجوى ابراهيم خليل البرهاوي[3]
[1،2،3]قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق.
[1]raghadnawaf@Yahoo.com, [2]abdullahnajim@yahoo.com, [3]najwa_ibrahim @yahoo.com

الخلاصة

تضمن البحث دراسة تاثير بعض منظمات النمو على استحداث ونمو وتمايز كالس نباتات الجت *Medicago sativa*، واظهرت نتائج البحث تميز اوساط MS المدعمة بمنظمات النمو الاتية Kin (0.1 ملغم/لتر)+ 2,4-D (0.5 ملغم/لتر) و Kin (2.0 ملغم/لتر) + 2,4-D (1.0 ملغم/لتر)، في استحداث الكالس من اوراق وجذوربادرات نباتات الجت *Medicago sativa* وبنسبة 90 و100% على التعاقب، ومن جانب آخر تمكن الوسط المدعم Kin (2.0 ملغم/لتر) + 2,4-D (2.0 ملغم/لتر) من استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية لهذه البادرات، فضلاً عن تكوين الافرع الخضرية عليها وبأعداد وصلت لغاية 24 فرع وبنسبة مئوية بلغت 20%، وبمرحلة واحدة.

الكلمات الدالة: منظمات النمو، *Medicago sativa*، استحداث وتمايز الكالس.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 2, June 2018, pp. (199 - 213)
ISSN: 1992 - 0849 (Print), 2616 - 6801 (Online)

Effect of Using Different Compensation of Growth Regulators on Hypocotyls Callus Intiation and Differentiate of *Medicago Sativa*

[1]Raghad Nawaf Al-zaidy, [2]Abdullah Najim Abdullah Al-niemi,
[3]Najwa Ibraheem Khalil Al-Barhawi
[1,2,3] Department of Biology, College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.
[1]raghadnawaf@Yahoo.com, [2]abdullahnajim@yahoo.com, [3]najwa_ibrahim @yahoo.com

Abstract

The effect of some growth regulators on intiation ,grwth and differtiate of Alfalfa callus was studied .The search results showed a distinction MS media supplemented with growth regulators such as Kin (0.1 mg\l) +2,4-D(1.0 mg \l) were distinguished in promoting callus formation from leaves and roots of Medicago sativa plants at ratio 90 and 100% successively. On the other hand the medium Kin (2.0mg\L) +2,4-D (2.0mg\L) formed callus from hypocotyl stem of seedlings in addition to formation of regeneration branches at number reached to 24 and of ratio 20% in one period.

Keywords: growth regulators, Medicago sativa, callus intiation and differentiate

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 2, June 2018, pp. (199 - 213)
ISSN: 1992 - 0849 (Print), 2616 - 6801 (Online)

1. المقدمة

تمتلك النباتات البقولية أهمية كبيرة في مجال أقتصاديات النتروجين وتوفير الغذاء ومختلف الصناعات لكونها من أهم المصادر للأحماض الأمينية الأساسية لتكوين البروتينات والزيوت النباتية [1]، وقد تطورت تقانات الزراعة النسيجية في السنوات الماضية في مختلف المجالات المتعلقة بالنبات، ولاسيما مع نباتات العائلة البقولية بهدف استحداث الكالس من الأجزاء النباتية المختلفة وانتاج نباتات كاملة منه. وأشارت مجموعة من الدراسات التي تناولت الأنواع البقولية الإقتصادية إلى امكانية تكوين الكالس من أوراق نباتات الجت *Medicago sativa* [2]، وأدى اعتماد النباتات المتمايزة من الكالس والمعلقات الخلوية الى حدوث تغييرات في إعادة انتظام التركيب الوراثي مما يترتب عليه ظهور إختلافات جسمية Somaclonal Variation (SCV) واسعة استعملت في مجالات تربية وتحسين النباتات[3]. أختبرت أحدى الدراسات قابلية نباتات الجت *M.sativa* ، على إستحداث كالس أجزائها النباتية المختلفة وتمايزها، وكان أول تمايز لنباتات الجت من الأجنة الجسمية قد سجله [4]، تلى ذلك استعمال العديد من البروتوكولات الناجحة التي تضمنت تمايز كالس نباتات الجت من الأجزاء المختلفة[5]. كما أكدت العديد من الدراسات أن تمايز نباتات الجت يعتمد بدرجة كبيرة على النمط الوراثي للنبات [6] والتلاعب في مختلف الظروف المؤثرة في إستحداث الكالس وتمايزه كدرجة الحرارة والضوء ومكونات الوسط الغذائي وانتخاب النمط الذي يمتلك القابلية على التمايز[7]، واستعمال مختلف التداخلات لايجاد نظام يضمن نجاح عملية تمايز الكالس وتكوين النباتات الكاملة، إذ تمكن[8] من استحداث كالس نباتات الجت من الأجنة الجسمية Somatic embryo وتمايزه باستعمال الوسط MS المدعم بـ(1µm) ABA و 50mm كلوتامين و5% سكروز واستعمال هذه الأجنة لتكوين البذور الصناعية Artificial seed [9] وتمكنت إحدى الدراسات من أنتاج النباتات من الكالس المشتق من المبايض ومختلف الأجزاء النباتية للجت حين تنميتها على وسط Blayds basal medium المدعم بالتراكيز (0.8 µm من NAA و 2 غم/ لتر من خلاصة الخميرة ومختلف التداخلات من NAA و 2iP [10] وأشارت دراسة أخرى إلى أهمية أيونات الأمونيوم في تحفيز التمايز لكالس المعلقات الخلوية لنباتات الجت *M.sativa* [11], وتوصلت الدراسة التي اجراها[12] الى استحداث كالس البروتوبلاست لنباتات الجت المعزول من الأوراق والأجنة الجسمية وتمايزه واستعمال البروتوبلاست المعزول أداة للتحول الوراثي بدمج بروتوبلاست الأنواع المختلفة كهربائيا، وأشارت دراسة أخرى إلى استحداث كالس الجت من قطع الأوراق والجذور [13]. يهدف البحث الى بيان افضل توليفات هرمونات النمو النباتية لاستحداث وتمايز كالس السيقان تحت الفلقية لبادرات نباتات الجت *Medicago sativa* .

2. المواد وطرائق العمل:

التعقيم السطحي لبذور الجت Medicago sativa:

غسلت بذور نباتات الجت بالماء ثم عقمت سطحياً بغمرها في محلول 2% هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl (القاصر التجاري المخفف) لمدد غمر متباينة (5 و 10 و15) دقيقة وبعدها غسلت بالماء المعقم جيداً لإزالة آثار المعقم. ووضعت البذور المعقمة على ورق ترشيح معقم لإزالة الماء الفائض العالق بها [14].

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 2, June 2018, pp. (199 - 213)
ISSN: 1992 - 0849 (Print), 2616 - 6801 (Online)

انبات بذور الجت في الوسط الغذائي والحصول على البادرات الملقحة:

زرعت بذور الجت في قناني زجاجية حجم (250) مل تحتوي كل منها على (50) مل من وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو، ونقلت العينات الى غرفة النمو بدرجة حرارة (25±2) °م وظروف ظلام في اليومين الأولين وبعد انباتها نقلت الى ظروف الضوء والظلام المتعاقبين، (16 ساعة ضوء و 8 ساعات ظلام) وشدة إضاءة 2000 لوكس.

تكوين مزارع كالس أجزاء بادرات الجت وأدامتها:

جهزت قطع السيقان تحت الفلقية والجذور بأطوال (1 و2) سم على التوالي، والأوراق بمساحة (0.5) سم^2 بعد قطع حافاتها من بادرات الجت (العراقي) بعمر 25–30 يوماً ووضعت بمعدل 3 قطع/ دورق بحجم 100 مل على سطح 30 مل لمجموعة من أوساط الأستحداث المعتمدة على أملاح MS و B5 واللذين يعدان وسطين اساسيين مدعمين بإضافات من منظمات النمو (NAA,BA,2,4-D,Kin) بتراكيز متباينة تتراوح مابين (0.1 – 4.0) ملغم/ لتر، وحضنت العينات في غرفة التنمية في نظام الظلام والضوء التعاقبي (16 ساعة ضوء و 8 ساعة ظلام).

تقدير ألأوزان الرطبة للكالس :

استعمل وسط استحداث الكالس نفسه في ادامته وتقدير الأوزان الرطبة بوزن 1 غم/ قطعة، ونقلت الى دوارق زجاجية وحفظت تحت ظروف الأستحداث المشار اليها نفسها ، وحدد الوزن الرطب للكالس من حساب فرق وزن الدوارق الزجاجية ومحتوياتها قبل الزراعة الثانوية للكالس وبعدها على وسط ألاستحداث نفسه بعد 30 يوماً.

تمايز كالس السيقان تحت الفلقية الى نباتات الجت الكاملة

تكوين الأفرع الخضرية:

أخذت قطع بوزن غرام واحد من كالس السيقان تحت الفلقية ووضعت على سطح 30 مل من أوساط التمايز المتكونة من أملاح وسط MS الصلب مضافاً اليها تداخلات متعددة مشتركة من منظمات النمو المستخدمة في البحث ، وبمعدل 3 قطع/ دورق يحوي على 50 مل من الوسط وحفظت في غرفة الزرع وبالظروف السابقة الذكر.

تكوين المجاميع الجذرية للأفرع الخضرية الناتجة من كالس السيقان تحت الفلقية:

ازيلت قطع السيقان المتمايزة واستؤصلت الافرع الخضرية الفلقية بطول 2.5–3 سم باستعمال بمشرط حاد معقم ثم عزلت قواعد هذه الأفرع منفردة بصورة قائمة في مجموعة من اوساط التجذير المستعملة وكالآتي:

MS0, 1/2MS0, 1/2 MS + (0.5, 1.0,1.5) mgL^{-1} NAA , 1/2 MS + (0.5, 1.0,1.5), mgL^{-1} kin , \1/2 MS + (0.5, 1.0,1.5) mgL^{-1} IAA , 1/2 MS + (0.5, 1.0) mgL^{-1} BA, 1/2 MS + 1.0 mgL^{-1} NAA+ 1.0 mgL^{-1}2,4-D+1.0 mgL^{-1} IAA , 1/4 MS + (0.5, 1.0,1.5) mgL^{-1} NAA , 1/4 MS + (0.5, 1.0,1.5) mgL^{-1} kin , 1/4 MS + (0.5, 1.0,1.5) mgL^{-1} IAA , 1/4 MS + (0.5, 1.0) mgL^{-1} BA , 1/4 MS + 1.0 mgL^{-1} NAA+ 1.0 mgL^{-1}2,4-D+1.0 mgL^{-1} IAA.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 2, June 2018, pp. (199 - 213)
ISSN: 1992 - 0849 (Print), 2616 - 6801 (Online)

3. النتائج والمناقشة

أظهرت بيانات غمر بذور الجت في محلول هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl بتركيز 2% لمدد زمنية مختلفة (5، 10، 15) دقيقة وتعقيمها سطحياً وتكوينها للبادرات السليمة أظهرت أعلى نسبة لانبات البذور في المدة5 دقائق، وبلغت (100) %،في وسط MS الصلب بعد 24 ساعة من الانبات، ولوحظ ان استعمال المدد الزمنية (10، 15) دقيقة أدى الى موت عدد كبير من البادرات حين شروعها في الإنبات .أبدت قطع الاجزاء النباتية (الأوراق ، السيقان تحت الفلقية والجذور) لبادرات الجت قابلية متباينة لاستحداث الكالس في مدة تراوحت ما بين (19–35) من زراعتها على مجموعة من أوساط الإستحداث متمثلة بأملاح وسط MS الصلب المدعم بتداخلات متباينة من منظمات النمو الجدول1 وتشير البيانات الواردة في الجدول إلى الدور الأساسي للتداخلات المشتركة بين الأوكسين والسايتوكاينين في استحداث الكالس، إذ أظهرت النتائج تفوق الوسط kin0.1 ملغم.لتر$^{-1}$+2,4–D1.0 ملغم.لتر$^{-1}$+MSعن بقية الأوساط المنتخبة بدلالة نسبته 90% المتحققة في استحداث كالس الاوراق، في 21 يوماً من زراعتها تلاه الوسطkin0.2 ملغم.لتر$^{-1}$+2,4–D1.0 ملغم.لتر$^{-1}$+MSعن بنسبة استحداث 83.3% وكذلك الوسطkin 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$+2,4–D2.0 ملغم.لتر$^{-1}$+MS عن بقية التداخلات المنتخبة لاستحداث كالس السيقان تحت الفلقية بعد 19 يوما من زراعتها والوسط kin 2.0ملغم.لتر$^{-1}$+2,4–D1.0 ملغم.لتر$^{-1}$+MS عن بقية الاوساط المختبرة لاستحداث كالس الجذور بنسبة استحداث 100% بعد 20 يوما من زراعتها فضلا عن تسجيل الوسط kin 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$+2,4–D0.5 ملغم.لتر$^{-1}$+MS نسبة استحداث 90% بعد 21 يوما من زراعتها على الوسط . واظهرت النتائج فشل التداخلات الأخرى من منظمات النمو كالتداخلات بين BA & NAA في تحقيق نسب استحداث عالية للكالس، إذ بلغت أعلى نسبة استحداث فيها لكالس الجذور 53.3% تلاه كالس السيقان تحت الفلقية 40% حين تنمية هذه الاجزاء على وسطBA2.0ملغم.لتر$^{-}$ ^{1}+4.0NAA ملغم.لتر$^{-1}$+MS في حين فشلت في تحقيق أي نسبة استحداث لكالس الاوراق في التداخلات المذكورة انفاً.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 2, June 2018, pp. (199 - 213)
ISSN: 1992 - 0849 (Print), 2616 - 6801 (Online)

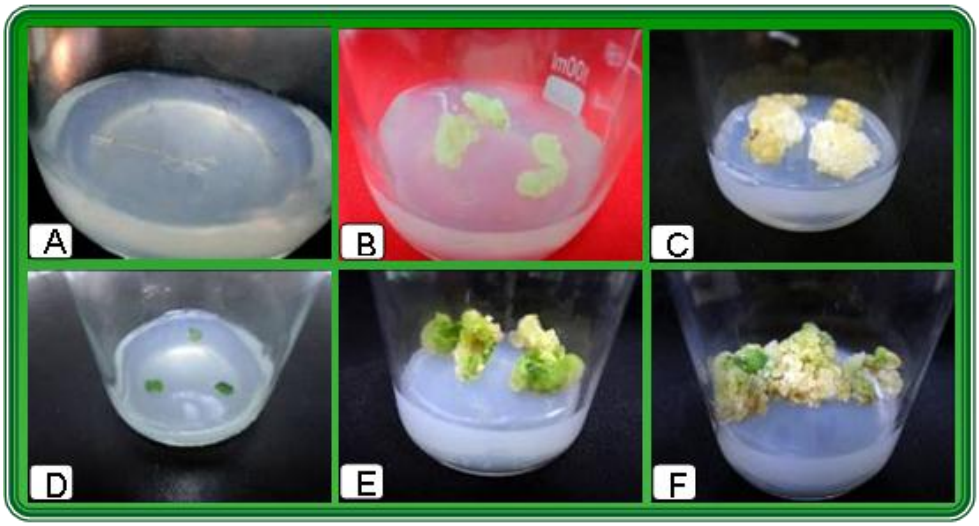
الجدول 1 تأثير مجموعة من تداخلات منظمات النمو في وسط الاستحداث MS الصلب في تكوين مزارع كالس الاجزاء النباتية المستأصلة من بادرات الجت *M.sativa* المعقمة.

أوساط الإستحداث ملغم.لتر$^{-1}$	الاجزاء النباتية					
	الاوراق		السيقان تحت الفلقية		الجذور	
	إستحداث الكالس (%)	مدة الإستحداث (يوم)	إستحداث الكالس (%)	مدة الإستحداث (يوم)	إستحداث الكالس (%)	مدة الإستحداث (يوم)
MSO (المقارنة)	–	–	–	–	–	–
MS+0.1 2,4-D+0.5Kin	60	29	–	–	–	–
MS+0.5 2,4-D+0.5Kin	70	28	–	–	–	–
MS+0.5 2,4-D+1.0Kin	60	32	–	–	–	–
MS+0.5 2,4-D+2.0Kin	–	–	46.6	35	73.3	27
MS+0.25 2,4-D+3.0Kin	–	–	–	–	50	28
MS+0.5 2,4-D+3.0Kin	30	33	10	33	90	21
MS+1.0 2,4-D+0.1Kin	90	21	–	–	–	–
MS+1.0 2,4-D+0.2Kin	83.3	26	–	–	–	–
MS+1.0 2,4-D+0.5Kin	50	31	–	–	–	–
MS+1.0 2,4-D+2.0Kin	80	24	55	31	100	20
MS+1.0 2,4-D+3.0Kin	50	32	26.6	30	93.3	19
MS+1.5 2,4-D+3.0Kin	–	–	73.3	25	–	–
MS+2.0 2,4-D+2.0Kin	30	34	83.3	19	–	–
MS+2.0 2,4-D+2.0Kin+2.0NAA	–	–	63	30	33.3	30
MS+0.5NAA+1.0BA	–	–	16.6	32	30	35
MS+4.0NAA+2.0BA	–	–	40	29	53.3	28

عدد القطع المزروعة 30 قطعة/ معاملة

من ناحية اخرى، لوحظ استحثاث قطع هذه الاجزاء وانقساماتها المتتالية منتجة كتلاً خلوية عديدة غير متمايزة ترتب عنها اختفاء معالم الجزء النباتي بالكامل. واتصفت مزرعة كالس الاوراق ببنيته المتماسكة ولونه الاخضر ووفرة كميته الشكل1, في حين اتصف كالس السيقان تحت الفلقية والـجذور ببنيته الهشة ولـونه الكريمي.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 2, June 2018, pp. (199 - 213)
ISSN: 1992 - 0849 (Print), 2616 - 6801 (Online)



الشكل 1 تكوين مزارع الكالس من جذور واوراق نباتات الجت *M. sativa*

A. قطع جذور الجت بعمر اربعة اسابيع في الوسط MS +2,4-D 1.0+ Kin 2.0
B. مزرعة كالس الجذور بعمر (30) يوماً
C. مزرعة كالس الجذور بعمر (45) يوماً
D. قطع الاوراق بعمر اربعة اسابيع في الوسط MS +2,4-D 1.0+ Kin 1.0
E. مزرعة كالس الاوراق بعمر (30) يوماً
F. مزرعة كالس الاوراق بعمر (45) يوماً

بينت النتائج أن أفضل وسط لادامة كالس الأوراق كان وسط MS الصلب مدعماً بـkin 0.1 ملغم.لتر$^{-1}$+2,4-D1.0 ملغم.لتر$^{-1}$، في حين كان أفضل وسط لادامة كالس السيقان تحت الفلقية هو وسط MS الصلب مدعماً بـ 2.0kin ملغم.لتر$^{-1}$+2,4-D2.0 ملغم.لتر$^{-1}$، أما أفضل وسط لادامة كالس الجذور فكان وسط MS الصلب مدعماً بـ2.0kin ملغم.لتر$^{-1}$+2,4-D 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$، وذلك لاحتفاظ كالس الأجزاء النباتية بحيويته بإستمرار زراعته على هذه الأوساط وإعيدت الزراعة كل شهر إعتماداً على بدء ظهور البقع البنية وجفاف الوسط الغذائي وتشققه. وتظهر نتائج الجدول 2 أن معدل الأوزان الطرية لكالس الأجزاء المختلفة على الأوساط المنتخبة لنمو كالس كل جزء نباتي واستحداثه ولثلاثة مكررات في مدة نمو 30 يوماً .

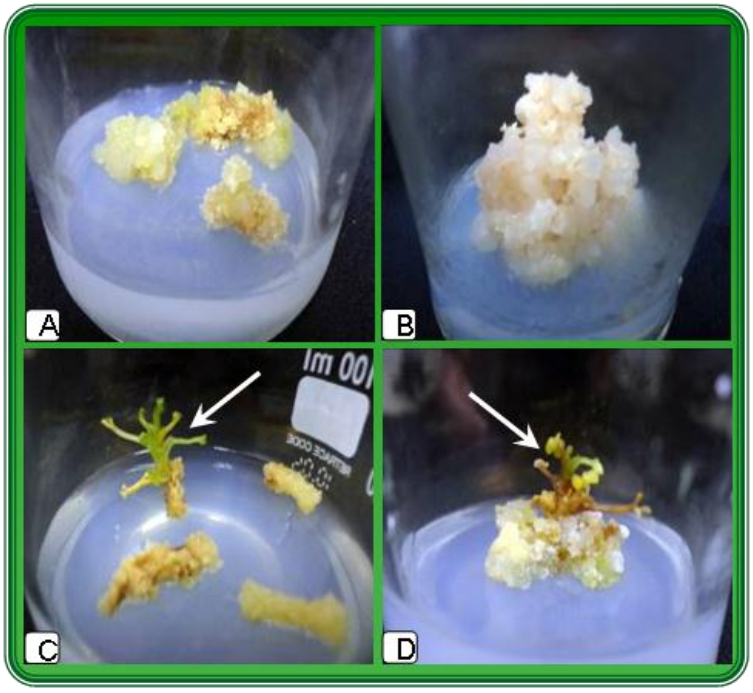
الجدول 2 تقدير الأوزان الطرية لكالس الأجزاء المختلفة لنباتات الجت على وسط MS الصلب مدعماً بإضافة التراكيز المنتخبة لكل جزء نباتي خلال فترة نمو 30 يوماً.

مصدر الكالس	الوسط الغذائي (ملغم.لتر$^{-1}$)	معدل الوزن الطري (غم)
الأوراق	MS +2,4-D 1.0+Kin 0.1	3.0
السيقان تحت الفلقية	MS +2,4-D 2.0+Kin 2.0	2.5
الجذور	MS +2,4-D 1.0+Kin 2.0	2.7

* الارقام تمثل معدل ثلاثة مكررات/ معاملة

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 2, June 2018, pp. (199 - 213)
ISSN: 1992 - 0849 (Print), 2616 - 6801 (Online)

وبينت نتائج استعمال وسط B5 الصلب (الحاوي على التداخلات نفسها من منظمات النمو السابقة في وسط MS) انه لايلائم تكوين الكالس من قطع الأوراق والسيقان تحت الفلقية والجذور، وقد ظهرت على هذه القطع علامات الإسوداد والذبول والموت بعد 10–12 يوماً من الزراعة على هذا الوسط. كما اظهر الوسط 2.0kin ملغم.لتر$^{-1}$+2,4-D 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$+MS، مقدرة متميزة على استحداث الكالس من السيقان تحت الفلقية وعلى تكوين الأفرع الخضرية منه بمقدار 3 أفرع لكل قطعة كالس كما في الشكل 2 وبنسبة مئوية قدرت بحوالي 20% وبمرحلة واحدة One step regeneration في مدة 23 يوماً من زراعة قطعة السيقان تحت الفلقية على سطح الوسط المذكور الجدول3. في حين فشلت بقية الأوساط في دعم تمايز كالس هذا الجزء النباتي وبقية الأجزاء الأخرى (الأوراق، الجذور، العقد الجذرية)، إذ باشرت قطع كالس السيقان تحت الفلقية بتكوين تراكيب دقيقة خضراء اللون تطورت مع استمرار نموها الى أفرع خضرية بعد 23 يوماً من الزراعة على سطح الوسط المذكور وأظهرت النتائج كفاءته في إنتاج هذه الأفرع الخضرية.



الشكل 2 تكوين مزارع كالس السيقان تحت الفلقية وتمايز نباتات الجت في الوسط الزرعي

A. مزرعة كالس السيقان تحت الفلقية بعمر (30) يوماً في الوسط MS +2,4–D 2.0+ Kin 2.0
B. مزرعة كالس السيقان تحت الفلقية بعمر شهرين في الوسط MS +2,4–D 2.0+ Kin 2.0
C. تكوين الافرع الخضرية الفتية (الجزء المؤشر) بعمر (15) يوماً من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية في (B)
D. تكوين الافرع الخضرية الفتية (الجزء المؤشر) بعمر (30) يوماً من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية في الوسط MS +2,4-D 2.0+ Kin 2.0

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 2, June 2018, pp. (199 - 213)
ISSN: 1992 - 0849 (Print), 2616 - 6801 (Online)

الجدول 3 تكوين الأفرع الخضرية لنباتات الجت *M.sativa* من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية بمرحلة واحدة.

أوساط التمايز (ملغم/لتر)	عدد قطع الكالس المزروعة/ المتمايزة	عدد الأفرع الكلية	معدل عدد الأفرع /قطعة	مدة بدء تكوينها (يوم)	التمايز (%)
MS0(المقارنة)	0.0/30	0.0	0.0	0.0	0.0
MS+ 2,4-D 2.0+Kin 2.0	8/40	24	3	23	20

أظهرت نتائج المقارنة بين مجموعتين من النباتات, الناتجة أولها من كالس السيقان تحت الفلقية وثانيهما من البذور, حصول اختلافات مظهرية واضحة كما في الجدول 4.

الجدول 4 الصفات المظهرية للنباتات الناتجة من مزارع كالس السيقان تحت الفلقية ونظيرتها الناتجة من البذور.

الصفات	النباتات الناتجة من كالس السيقان تحت الفلقية	النباتات البذرية
إرتفاع النبات (سم)	7	15
عدد الأفرع	6	3
عدد الأوراق	12	9
سمك الساق	سميك	رفيع أو أقل سمكاً

كما لوحظ من نتائج استعمال وسط MS 1/2 + MSO الصلب الحاوي على مختلف التداخلات الوارد ذكرها في المواد وطرق العمل إخفاقها في تجذير الافرع الخضرية الناتجة من كالس السيقان تحت الفلقية. أشارت نتائج هذه الدراسة الى استجابة نباتات الجت *M.sativa* لنظام الزراعة النسيجية من نجاح قطع اجزاء البادرة الثلاثة (الاوراق، السيقان تحت الفلقية، الجذور) وبكفاءة عالية لكن بصورة متباينة لعمليات استحداث الكالس، وربما يرجع هذا التباين الى الدور المعروف لمنظمات النمو في استحداث الكالس من مختلف القطع النباتية وتحفيزه لانتاج النباتات الكاملة منه [15]، وظهر ذلك واضحاً من فشل القطع النباتية الثلاث في استحداث كالسها على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو، في حين تميز الوسط MS المدعم بتراكيز متباينة من السايتوكاينينات والاوكسينات في استحداث كالس الاجزاء النباتية المختلفة، إذ حفز وجود هذين النوعين من منظمات النمو انقسام الخلايا واستحداث الكالس [16]. سجلت أعلى نسب الاستحداث للاجزاء الثلاثة عند استعمال التداخلات المشتركة من Kin, 2,4-D وجاءت هذه النتائج متوافقة مع ما أشار اليه نتائج عدد من الباحثين من استعمال المنظمات المارة بتداخلات مشتركة لاستحداث كالس الاجزاء المختلفة لنباتات الجت *M. Truncatula* [17]، لا تعني سهولة الحصول على الكالس من اوراق وجذور نباتات الجت في هذه الدراسة بالضرورة سهولة تمايزه، اذ اشارت العديد من الدراسات الى سهولة استحداث كالس مختلف الاجزاء النباتية وصعوبة تمايز كالسها كما هو الحال في صعوبة تمايز كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات زهرة الشمس [18] وكذلك الحال في نباتات البنجر

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 2, June 2018, pp. (199 - 213)
ISSN: 1992 - 0849 (Print), 2616 - 6801 (Online)

السكري *Beta vulgaris* التي أظهرت صعوبة واضحة في استحداث كالسه وتمايزه واعادة تكوين النباتات منه [19]، وكذلك الحال لنباتات الفلفل *Capsicum annum* التي تتميز بسرعة استحداث كالسها وصعوبة تمايزه [20] وفول الصويا *Glycine max* [21]، وعلى العكس من ذلك فقد تمكن [22] من انتاج نباتات بازلاء متمايزة من كالس الاوراق والسيقان على وسط MS الحاوي على 2.0 ملغم/لتر BA و 4.0 ملغم/لتر IAA، وايضاً انتاج نباتات من كالس نباتات *Vigna unguiculata* [23] ويفسر صعوبة تمايز كالس الاوراق والجذور الى النباتات الكاملة في وسط MS المدعم بمختلف التوليفات الهرمونية في هذه الدراسة وفي نباتات بقولية أخرى الى عوامل عديدة منها ما يتعلق بتركيب الوسط الغذائي ومحتواه من منظمات النمو [24] هذا فضلا عن نوع الوسط الغذائيB5 [25] أو MS [26] واختلاف الجزء النباتي [13] والنوع النباتي [27] والظروف المؤثرة كدرجة الحرارة والضوء وانتخاب النمط الذي يمتلك القابلية على التمايز [7]، وترتبط عملية التمايز بنوع النسيج المختار وطريقة استحداثه، كاستعمال المعلقات الخلوية [28] او البروتوبلاست المشتق من الكالس [29] او لاختلاف خلايا الجزء النباتي عن اخر اوالى الحالة الفسيولوجية للخلايا النباتية في وسط الاستحداث المستعمل مع منظمات النمو[30] أو الى مصدر القطعة النباتية والظروف البيئية المحيطة من ضوء ودرجة حرارة أو عوامل أساسية مهمة من المواد الغذائية ومنظمات النمو [31].أن تعبير الكالس المشتق من السيقان تحت الفلقية عن قدرته في التمايز على وسط الاستحداث وتكوينه للافرع الخضرية في هذه الدراسة وبصورة متماثلة مع ماذكره [32]، ربما يرجع الى الطاقة الكامنة التي تمتلكها الخلايا المكونة لهذا الكالس واستجابته العالية تجاه تركيز منظمات النمو المنتخبة (2.0 ملغم/لتر 2,4-D+ 2.0 ملغم/لتر Kin) وتوجهه الى التمايز، إذ تعطي المستويات المتوازنة افضل استحداث لنمو الكالس و تمايزه [33] وللاوكسين دور رئيس في تحفيز الاستجابة النباتية بالتأثير في زيادة ليونة جدار الخلية لنباتية وزيادة نفاذيتها مما يحفز انقسام الخلايا وتمايزها بالتأثير في ايض الاحماض النووية، ويختلف تركيز الاوكسين اللازم لتحفيز مختلف المراحل المتطورة بحسب الجزء النباتي والنمط الوراثي للنبات المستعمل [34] في حين يعمل السايتوكاينين على تمكين الخلايا من الانقسام وتكوين نسيج الكالس غير المتخصص، وتفسر القابلية العالية لكالس السيقان تحت الفلقية على التمايز وتكوين النباتات بمرحلة واحدة في وسط الاستحداث نفسه بأحتوائه على الخلايا المرستيمية المتميزة بقابليتها العالية على الانقسام ومستواها الهرموني الذي يتوازن مع ما هو مضاف من منظمات النمو الى وسط MS للوصول الى حالة التوازن الهرموني لانتاج النباتات بمرحلة واحدة [35]، الا أن الافرع المتكونة أبدت صعوبة في تجذيرها على الرغم من استعمال مختلف المعاملات من الاوساط ومنظمات النمو كوسط MS0، 1/2MS0، 1/4MS0 والمدعمة بمختلف التوليفات الهرمونية فقد تعذر تجذيرها وأقلمتها ومن المحتمل ان يعزا فشلها الى حالة فسيولوجية معينة [36].ويرجح تفوق الوسط MS على نظيره وسط B5 في عمليات استحداث وتمايز كالس الاجزاء النباتية لاختلاف مكونات الوسطين وتراكيز الاحماض الامينية فيها[8].

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 2, June 2018, pp. (199 - 213)
ISSN: 1992 - 0849 (Print), 2616 - 6801 (Online)

المصـــادر:

[1] قاسم عبدالامير عجام، ***" في التطور الزراعي تعايش بكتريا الرايزوبيا والبقوليات، أسسه وتطبيقاته"*** ، دار الشؤون الثقافية العامة، وزارة الثقافة والاعلام، مطابع دار الشؤون الثقافية العامة، (1986).

[2] Chou W. and Wang C. Y. ***"Effect of ethylene callus differentiation of alfalfa Medicago sativa L)"***, Weed .Sci .Bull., 19, 53 (1998).

[3] Pierik R. B. M.. ***" In vitro culture of Higher Plants"***, Kluwer Academic publishers. Boston, (1987).

[4] Saunders J.W. and Bingham E .T. ***"Production of alfalfa plants from callus tissue",*** Crop Sci., 12, 804 (1972).

[5] Matheson S. L.; Nowak J. and Maclen N.L., ***"Selection of regenerative genotypes from highly productive cultivars of alfalfa"***. Euphytica, 45, 105 (1990).

[6] Samac D.A.; Mesfin T.; Melinda D.; Purev S. and Stephen J.T.***," A comparison of constitutive promoters for expression of transgenic in alfalfa"***. Trangenic Research, 13, 349 (2004).

[7] Crea F.; Bellucci M.; Damani F. and Arcioni S., ***"Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa (Medicago sativa L.CV. Adriana)"***, Euphytical, 81, 151 (1995).

[8] Hindson S., MCElroy A.R. and Potelance C., ***"Media and genotype effects on the development and conversion of somatic Alfalfa (Medicago sativa L.) embryos"*** . In vitro cellular and Development Biology, Plant, 34(3), 181 (1998).

[9] T. Senaratha, B. Mckersie and S. Bowley***. "Desiccation tolerance of Alfalfa (Medicago sativa L) somatic embryos.Influence of abscisic acid stress pre-treatment and drying rates"***, Plant Sci., 65, 235 (1989).

[10] Saunders J.W. and Bingham E.T., ***"Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of Medicago sativa"***, Amer. J. Bot., 62(8), 850 (1975).

[11] Walker K.A. and Sato S. J., ***"Morphogenesis in callus tissue of Medicago sativa: The role of ammonim ion in somatic embryogenesis",*** Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1, 109 (1981).

[12] Monteiro M.; Beatriz A. G.; Maria J.V.; Carlos A. D. and Maria L. C., ***"Plant regeneration from protoplasts of Alfalfa (Medicago sativa) VIA somatic embryogenesis"***, Scientia Agri., (2003), 60, 683 (1981).

[13] عبدالله نجم النعيمي ، مزاحم قاسم، عبدالمطلب الملاح، سيد محمد." ***انتاج نباتات من كالس الاجزاء النباتية المختلفة لبادرات الجت Medicago sativa*** ". مجلة التربية والعلم، 26، 33 (1996).

[14] علياء حازم عبد الرزاق القصيمي، " ***الفعالية البايولوجية لعديد السكريات الدهنية المستخلصة من بكتريا S.meloloti على تكوين العقد الجذرية واستحداث الكالس وانقسامات خلايا المعلقات الخلوية لبادرات الحلبة Trigonella foenum- graecum*** " رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل – العراق.14 (2006).

[15] فيصل رشيد ناصر الكناني، " ***زراعة الانسجة والخلايا والنباتية*** ، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل، الموصل– العراق (1987).

[16] Devlin R.M. and Witham F. ***"Plant Physiology"***. 4th ed., Wadsworth Publishing Company Belmont California, (1983).

[17] Shah S. H.; Wainwright S.J. and Merrett M.J., ***"Regeneration and somaclonal variation in Medicago sativa and Medicago media",*** Pakistan Journal of Biological Sciences, 6(9), 816 (2003).

[18] Gongshe L. and Fuxiong W., ***"Bud regeneration by suspension culture of sunflower "***. J. Plant Bio., 49, 212 (2000).

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 2, June 2018, pp. (199 - 213)
ISSN: 1992 - 0849 (Print), 2616 - 6801 (Online)

[19] قتيبة شعيب محمد صالح النعمة، **" *التحفيز الكهربائي في تكوين الجذور الشعرية المحولة وراثياً وزراعة انسجة نباتات البنجر السكري Beta vulgaris L* "**, رسالة ماجستير، كلية التربية, جامعة الموصل, الموصل – العراق (2001).

[20] AL-Mallah M.K. and Al-Yozbaki G.S. ***"In vitro callus induction from capsicum annum seedlings (sweet and chili pepper)",*** J. Biot. Res., 3, 34 (2001).

[21] عبدالله نجم النعيمي، جميلة هزاع رشيد، **" *استحداث الكالس من الاجزاء النباتية المختلفة لبادرات فول الصويا Glycine max L لصنفي Weber 84 و William* "**. مجلة التربية والعلم، 3، 53 (1996).

[22] بادية عبدالرزاق جمال، عدنان محمود عبد الله، **"*انتخاب نباتات بازلاء Pisum sativum L متمايزة من مزارع كالس الاوراق والسيقان ومقاومة لف Fusatium solani*"**، مجلة التربية والعلم، 21، 38 (2008).

[23] Odutayo O.I., Akinrimis F.B., Ogvnbosoye I. and Oso R.T., ***"Multiple shoot induction from embryo derived callus cultures of Cowpea (Vigna unguiculata.) walp"*** . African Journal of Biotechnology 4, 1214 (2005).

[24] محمد عباس سلمان، **" *أساسيات زراعة الخلايا والانسجة النباتية* "**، دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل ،الموصل –العراق(1988) .

[25] Gamborg D.L.; Miller R.A. and Ojima K., ***"Nuutrient requirements of suspension culture of soybean root cells"***. Exp Cell Res., 50, 151 (1968).

[26] Murashige T. and Skoog F., ***"A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures"***. Physiol. Plant, 15, 473 (1962).

[27] Zagorksa N.; Dimitrove B. and Polin G. P. R.. ***"Regeneration and characterization of plants obtained from anther cultures in Medicago sativa. L."***, In Vitro Cell Dev. Biol. Plant, 33, 107 (1997).

[28] Mariza M.; Beatriz A.G.; Maria J.V.; Carlos A.O.; Maria L. and Carneiro V., ***"Plant regeneration from protoplasts of Alfalfa (Medicago sativa) VIA somatic embryogenesis",*** Scientia Agricola, 60, 683 (2003).

[29] Geetha S.P.; Nirmal B. K.; Rema J.; Ravindran P. N. and Peter K. V., ***" Isolation of protoplasts from cardamom (Elettaria cardamomum) and giner (zingiber officinale Rose) "***, J. of Spices and Aromatic Crops, 9 (1), 23 (2000).

[30] Grant M.E. and Fuller K.W., ***"Tissue culture of root cells of Vicia faba"***, J. Exp. Bot., 19, 667 (1968).

[31] عبدالمطلب سيد محمد، مبشر صالح عمر، ***" المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والانسجة والاعضاء للنبات"*** ، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل ، الموصل – العراق (1990).

[32] Das L. and Bhowal M., ***"In vitro cultivation of Medicago sativa L. –A Fodder Crop through Indirect Organogenesis"*** .Journal of Global Biosciences., 4(8), 3260 (2015).

[33] Hartmann H. T., Keter D.E., Davies F.T. and Geneve R. L. ***"Plant Propagation Principles and Practice"***. 7th ed., Prentice-hall Upper Saddle River, N. J, (2002).

[34] Rose R. J. and Nolan N. K. ***"Regeneration of Medicago truncatula from protoplast isolated from protoplasts isolated from kanamycin-resistant plants"***. Plant Cell Rep., 14, 349 (1995).

[35] Hoori F.; Ehsanpour A.A. and Mostajeran A.. ***"Comparison of somatic embryogenesis in Medicago truncatula"*** . Pakistan J. of Biological Sciences, 10, 481 (2007).

[36] Anwar F.; Sharmila P. and Saradhi P., ***"No more hurdle: in vitro chickpea rooting and cent percent transplantation"***, Aus. J. Bas. and Appl. Sci., 3(3), 2491 (2009).