Rafidain Journal of Science
Vol. 29, No.2, pp. 39-50, 2020

DOI : 10.33899/rjs.2020.165364

https://rsci.mosuljournals.com

ISSN: 1608-9391
e-ISSN: 2664-2786

Received 27/4/2020
Accepted 3/6/2020

اخلاف نباتات البروكلي (*Brassica oleracea* var. italica) من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية لبادراتها

صفوان جاسم سلطان **امجد عبد الهادي محمد***

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل / العراق

***E-mail:** amjsbio33@uomosul.edu.iq

الملخص

انتجت الدراسة الحالية نباتات البروكلي (*Brassica oleracea* var. italica) من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية لبادراتها ونجاح اقلمتها ونقلها الى التربة. واوضحت النتائج تباين نسب استحداث الكالس مع تباين نوع منظمات النمو النباتية Naphthalene acetic acid (NAA)، 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)، Indole-3-butyricacid (IBA)، Benzyl adenine (BA) وتراكيزها المستخدمة في هذا البحث. وكان لتداخل IBA مع BA الدور البارز في زيادة نسب الاستحداث. حيث تفوق وسط Murashige and Skoog (MS) الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA بتسجيلها نسبة استحداث 100% بعد 11 يوما من الزراعة، وباستمرار نموه انتج مزارع كالس نموذجية. وأدت ادامة الكالس على ذات الوسط الى التكوين التلقائي للأفرع الخضرية بلغ عددها 142 فرعاً ناتجة من 50 قطعة كالس. جذرت تلك الافرع الخضرية المتمايزة بسهولة في وسط MSO بكامل قوته التركيبية بنسبة 100%، ومع استمرار نموها وتكوينها مجاميع جذرية كفوءة تمت اقلمتها بنجاح الى التربة ضمن سنادين في البيت الزجاجي.

الكلمات الدالة: نبات البروكلي، مزارع الكالس، التمايز التلقائي للأفرع الخضرية، الاقلمة.

المقدمة

يشير مصطلح زراعة الانسجة النباتية plant tissue culture الى زراعة اي جزء نباتي معقم خارج الجسم الحي *in vitro* في اوساط غذائية صناعية تحت ظروف مسيطر عليها وخالية من الملوثات وتنميتها في حاضنة النمو (الصميدعي، 2015). وتملك هذه التقانة العديد من التطبيقات الهامة في مجال الاكثار الخضري، اذ اتاحت امكانية الحصول على اعداد كبيرة من النباتات المتماثلة وراثيا، ذات مميزات مرغوبة وخالية من الامراض كبديل عن طرق الاكثار التقليدية (Torres,1989). وايضاً في تقليل الصعوبات التي تعترض تنمية واكثار النباتات (Bejoy *et al.*, 2012). وفي الوقت الحاضر اتجه العلماء الى الاهتمام بتقانة زراعة الانسجة لعدد من النباتات الطبية لتأمين مركبات طبية وصيدلانية طبيعية وبنوعية وكمية جيدة على مدار العام دون التأثر بفصول السنة (Malabadi *et al.*, 2011). وفتحت زراعة الانسجة النباتية ابواباً مشرعة لانبثاق الثورة الخضراء الثابتة التي استخدمت فيها التحويرات الجينية والتقانات الحياتية المختلفة من اجل توظيفها في مجال تربية وتحسين النباتات كماً ونوعاً (Collen and Edward, 1998).

تعود نباتات البروكلي *Brassica oleracea* var. italica الى العائلة الصليبية *Brassicaceae* ويسمى في الانكليزية *Broccoli* ، *Asparagus Italian* ، *Sporouting Cauliflower* كما يُعرف ايضاً باسم *Calabrese* في المملكة المتحدة (عمر واخرون، 2013). ويُعد البروكلي من محاصيل الموسم الشتوي ويزرع على مدار العام اذ يحتاج الى جو معتدل مائل الى الدفء اثناء مرحلة النمو الخضري والى جو يميل الى البرودة خلال فترة تكون الرؤوس، ويتميز بتحمله الارتفاع والانخفاض في درجات الحرارة، ويكون اقصى انتاج لهذا النبات ما بين شهري كانون الثاني واذار (حسن، 2004). يزرع نبات البروكلي من اجل نوراته التي تتراوح الوانها ما بين اللون الاخضر الى البنفسجي المخضر التي تؤكل وهي في طور البراعم الزهرية الخضرية مع حواملها السميكة الغضة، ويعد من اغنى محاصيل العائلة الصليبية مقارنة بالمحاصيل الاخرى (القرنابيط واللهانة واللهانة الصينية) من الناحية الغذائية واكثرها استخداماً من الناحية العلاجية في معظم بلدان اوربا، اذ تحتوي على العديد من الفيتامينات مثل فيتامين(A, B1, B2, B5, B6, B17, E) والعناصر المعدنية والكاروتين الذي يتحول فيما بعد الى فيتامين A داخل جسم الانسان (Thapa and Rair, 2012). كما يُعد البروكلي من الخضروات ذات المحتوى العالي من فيتامين C وحامض الفوليك والنياسين والريبوفلافين والكاروتينات (Yoldas *et al.*, 2008). ويُعد مصدراً غنياً بمركب السلفورافان (Sulforaphane) الذي يملك خصائص مضادة للسرطان وذلك لاحتوائه كميات كبيرة من الكلوكوزينوليت (Glucosinolates) والتي اثبتت قدرتها على اختزال الخلايا السرطانية اذا لوحظ ان بإمكانها خفض خطر الاصابة بمرض السرطان بنسبة تصل الى 45% كما يسهم ايضاً في منع الاصابة بالعمى مع تقدم السن، العمى الشيخوخي، (Yagishita *et al.*, 2019). وكذلك يحتوي على المركب Indole 3- Carbinol المضاد للأكسدة ويمنع الاصابة بسرطان الثدي والقولون فضلاً عن تعزيز وظائف الكبد (Owis, 2015).

وللأهمية الغذائية والطبية لنباتات البروكلي فقد اجريت عليها العديد من البحوث لغرض زيادة انتاجها وتحسين صفاتها الزراعية من مزارعها النسيجية، وتمكنت احدى الدراسات من استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية لنبات البروكلي في وسط MS الحاوي على NAA 1.0 ppm او الحاوي على تداخلات من NAA 1.0 ppm و0.5 ppm BAP، وان افضل وسط لتمايز الافرع الخضرية كان وسط MS الحاوي على BAP 5.0 ppm لوحده (Tilaar , 1990). وفي دراسة اخرى نقلت قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات البروكلي بعمر7 ايام الى وسط MS حاوياً على تراكيز مختلفة من IBA و BAP واظهرت النتائج الى ان افضلها لاستحداث الكالس هو الوسط المدعم بإضافة 3.5 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و3.5 ملغم لتر$^{-1}$ BAP. وتمايز هذا الكالس الى افرع خضرية في الاسبوع الثالث على وسط MS الحاوي على 0.25 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و2.5 ملغم لتر$^{-1}$ BAP ومن ثم تجذيرها على وسط MS الحاوي على 0.25 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و1.5 ملغم لتر$^{-1}$ BAP وانتاج النباتات الكاملة منها (Sharif Hossain *et al.*,2016a). واظهرت نتائج وضع قطع من فلق بادرات البروكلي بعمر 14 يوم على وسط MS

مدعماً بإضافة منظمات نمو مختلفة، الى تكوين افرع خضرية مباشرة من تلك الفلق وان اعلى نسبة بلغت 90% على وسط MS + 2.0 ملغم لتر $^{-1}$ BAP و0.5 ملغم لتر $^{-1}$ NAA، في حين بلغ اعلى معدل لعدد الافرع في كل قنينة 1.15 على وسط MS الحاوي BAP 1.0 ملغم لتر $^{-1}$ (Nazirwan,2015).

وتهدف الدراسة الحالية الى امكانية استحداث الكالس من قطع سيقان تحت الفلقية والاوراق لبادرات نبات البروكلي *Brassica oleracea* var. italica وانتاج مزارعه، واخلاف النباتات من مزارع الكالس المستحدثة ومن ثم اقلمتها.

المواد وطرائق العمل

تعقيم بذور نبات البروكلي سطحياً وانتاج البادرات المعقمة

جهزت بذور نبات البروكلي (*Brassica oleracea* var. italica) من الاسواق المحلية لمحافظة اربيل/ العراق وعقمت سطحياً بغمرها في محلول الكحول الاثيلي 70% مع التحريك المستمر لمدة دقيقتين، بعدئذ غمرت في 2% من محلول هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl (القاصر التجاري /العملاق / صنع في الاردن) لمدة عشر دقائق. غسلت بعدها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات/ دقيقة (Kim *et al.*,2013). ولغرض التخلص من الماء الفائض عنها وضعت على ورقة ترشيح معقمة. وزرعت البذور المعقمة سطحياً بوضعها على سطح 30 سم^3 من وسط MS(Murashige and Skoog,1962) الصلب الخالي من منظمات النمو في قناني سعتها 100 سم^3 وبمعدل 4–5 بذور/ قنينة. حفظت العينات في غرفة الزرع Culture room في ظروف الظلام التام وبدرجة حرارة 24±2 سيليزية. وبعد ظهور الجذير والرويشة نقلت البادرات الناتجة الى ظروف الضوء المتعاقب 16ساعة ضوء / 8 ساعة ظلام وبشدة 2000 لوكس.

استحداث الكالس من الاجزاء النباتية لبادرات نبات البروكلي

رفعت بادرات نبات البروكلي *Brassica oleracea* var. italica السليمة بعمر 15 يوما من الوسط الغذائي. وعزلت سيقانها تحت الفلقية بطول 1.5 سم تقريباً وفصلت اوراقها. ولغرض استحداث الكالس وضعت 3-4 من الاجزاء النباتية اعلاه المأخوذة من البادرات كلا على حدة على سطح 30 سم^3 من وسط الاستحداث في قناني زجاجية بحجم 100 سم^3 وذلك باعتماد مكونات وسط MS اساساً ومدعماً بإضافات من منظمات النمو NAA، IBA، 2,4-D و BA لوحدها او متداخلة فيما بينها استنادا الى بحوث سابقة او منتخبة في هذه الدراسة وكما يلي:

MSO	
MS+ 1.0 mg L^{-1} NAA	
MS+ 2.0 mg L^{-1} NAA	
MS+ 1.0 mg L^{-1} BA MS+ 1.5 mg L^{-1} BA MS+ 2.0 mg L^{-1} BA	(Sharif Hossain *et al.*, 2016a)
MS+1.5 mg L^{-1} 2,4-D	
MS+2.0 mg L^{-1} 2,4-D	
MS + 1.0 mg L^{-1} NAA +1.0 mg L^{-1} BA MS + 1.0 mg L^{-1} NAA +2.0 mg L^{-1} BA	(Azis *et al.*, 2015)
MS + 2.0 mg L^{-1} NAA +1.0 mg L^{-1} BA	
MS + 2.0 mg L^{-1} NAA +2.0 mg L^{-1} BA	
MS + 1.0 mg L^{-1} 2,4-D +2.0 mg L^{-1} BA	
MS + 1.5 mg L^{-1} 2,4-D +1.5 mg L^{-1} BA	
MS + 1.5 mg L^{-1} 2,4-D +2.0 mg L^{-1} BA	
MS + 2.0 mg L^{-1} 2,4-D +1.5 mg L^{-1} BA	
MS + 2.0 mg L^{-1} 2,4-D +2.0 mg L^{-1} BA	
MS + 1.0 mg L^{-1} IBA +2.0 mg L^{-1} BA MS + 1.5 mg L^{-1} IBA +1.5 mg L^{-1} BA MS + 2.0 mg L^{-1} IBA +1.5 mg L^{-1} BA	(Sharif Hossain *et al.*, 2016b)

حُفظت جميع العينات في ظروف تنمية البادرات.

تكوين مزارع كالس السيقان تحت الفلقية وادامتها

نُقل الكالس المستحدث من القطع النباتية المستجيبة والمزروعة على بعض الاوساط الغذائية الى ذات الاوساط لغرض انتاج مزارعه وتمت ادامتها دوريا كل 20–25 يوما.

تجذير الافرع الخضرية المتكونة تلقائياً

استؤصلت الافرع الخضرية المتكونة تلقائياً من الادامة الدورية للكالس النامي على الوسط الغذائي MS ومدعماً بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA بطول 2– 2.5 سم وحاوية على 2–3 ورقة باستخدام مشرط حاد معقم ووضعت بصورة قائمة داخل 30 سم^3 من وسط MSO او 1/2 MSO الصلب، حفظت العينات في غرفة الزروعات.

اقلمه نباتات البروكلي المتمايزة من كالس السيقان تحت الفلقية الى التربة

ازيلت النباتات الكاملة المتكونة في الاوساط الغذائية من الوسط وغسلت بالماء المقطر لإزالة بقايا الوسط ووضعت داخل اوعية بلاستيكية شفافة مثقبة من الاسفل تحتوي 20 غم من تربة مزيجية وبتموس معقمة بنسبة 1:1، غطيت النباتات بوعاء اخر مع السماح بفراغ صغير بينهما. حفظت الاوعية في غرفة الزروعات بذات الظروف السابقة مع ملاحظة عدم جفاف التربة بالحفاظ على درجة عالية من الرطوبة لتجنب جفاف النباتات وموتها. وبعد زيادة عدد الافرع الخضرية ونموها ازيلت الاغطية وتركت النباتات داخل غرفة الزروعات لمدة 3–4 ايام ثم نقلت مع تربتها الى سنادين كبيرة سعتها واحد كيلو غرام واكملت بتربة من نفس المزيج وأُبقيت لمدة اسبوع في غرفة الزروعات ثم نقلت الى ظروف البيت الزجاجي.

النتائج

كفاءة التعقيم السطحي للبذور وانتاج البادرات المعقمة

ابدت طريقة التعقيم السطحي لبذور البروكلي كفاءتها بدلالة الحصول على بذور معقمة نسبة انباتها 100% وانتجت بادرات سليمة خالية من الملوثات عند زراعتها في وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو. استخدمت هذه البادرات الناتجة بعمر 15 يوماً مصدراً للحصول على قطع السيقان تحت الفلقية والاوراق لاستحداث الكالس.

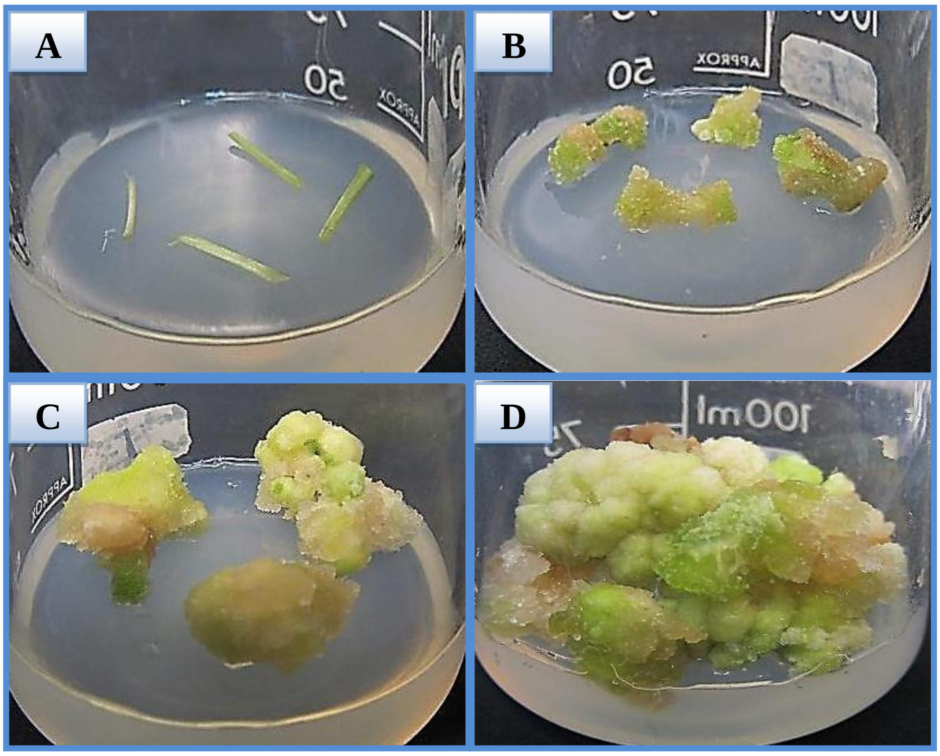
استحداث وتكوين مزارع الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية والاوراق

اظهرت قطع السيقان تحت الفلقية والاوراق المستأصلة من بادرات البروكلي المعقمة قدرة متباينة لاستحداث الكالس عند زراعتها على سطح وسط MS الصلب باختلاف تراكيز منظمات النمو المستخدمة NAA وIBA و2,4-D وBA (الجدول 1). وتشير بيانات الجدول انعدام القدرة الذاتية لقطع السيقان والاوراق في استحداثها للكالس عند وضعها على وسط MSO.

وارتقى وسط MS المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA على باقي الاوساط في قدرته التشجيعية لقطع السيقان تحت الفلقية المزروعة على الوسط الشكل(A.1) لاستحداث الكالس بنسبة 100%، واستمرت خلايا الكالس المستحدثة بانقساماتها المتتالية مكونة كتلاً صغيرة من الكالس بعد 11 يوماً من الزراعة الشكل (B.1)، وتطورت لتنتج كتلاً اكبر حجماً بعد 18 يوما من زرعها على الوسط اتسمت ببنيتها الهشة ولونها الاخضر المصفر الشكل (C.1). واستمرت بالنمو لتنتج مزارع نموذجية من الكالس يمتاز بكتلته المتماسكة ولونه الاخضر المصفر بعد 30 يوما من الزراعة الشكل (D.1).

الجدول 1: استحداث الكالس من الاجزاء النباتية المستأصلة من بادرات نبات البروكلي *Brassica oleracea* var. italica النامية على وسط MS الصلب مزوداً بمنظمات نمو مختلفة

الوسط الغذائي مزوداً بمنظمات النمو (ملغم لتر$^{-1}$)	السيقان تحت الفلقية			الاوراق		
	عدد القطع المزروعة / المستجيبة	استحداث الكالس (%)	مدة الاستحداث (يوم)	عدد القطع المزروعة/ المستجيبة	استحداث الكالس (%)	مدة الاستحداث (يوم)
MSO(المقارنة)	0/20	0	0	0/20	0	0
MS+1.0 NAA	14 /24	58.33	17	5/15	33.33	23
MS+ 2.0 NAA	20/28	71.42	16	0/14	0	0
MS+ 1.0 BA	4/24	16.66	25	0/12	0	0
MS+1.5 BA	10/32	31.25	16	0/12	0	0
MS+2.0 BA	0 /25	0	0	0 /12	0	0
MS+1.5 2,4-D	18/33	54.54	13	8/15	53.33	14
MS+2.0 2,4-D	27/36	75	14	0/12	0	0
MS+ 1.0 NAA + 1.0 BA	21/30	70	19	0/15	0	0
MS+ 1.0 NAA + 2.0 BA	15/27	55.55	25	0/15	0	0
MS+ 2.0 NAA+ 1.0 BA	18/30	60	18	0/12	0	0
MS+ 2.0 NAA+ 2.0 BA	24/33	72.72	21	6/15	40	23
MS+ 1.0 2,4-D + 2.0 BA	20/24	83.33	18	0/12	0	0
MS+ 1.5 2,4-D+ 1.5 BA	18/24	75	13	8/12	66.66	16
MS+ 1.5 2,4-D + 2.0 BA	18/24	75	21	0/15	0	0
MS+ 2.0 2,4-D + 1.5 BA	16/32	50	18	3/15	20	14
MS+ 2.0 2,4-D + 2.0 BA	24/33	72.72	15	0/15	0	0
MS+ 1.0 IBA + 2.0 BA	78/78	100	11	2/14	14.28	18
MS+ 1.5 IBA + 1.5 BA	60/66	90.90	12	0/15	0	0
MS+ 2.0 IBA + 1.5 BA	52/60	86.66	14	0/15	0	0



الشكل 1: تكوين مزارع كالس السيقان تحت الفلقية لنبات البروكلي *Brassica oleracea* var. italica النامي على وسط MS الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA

A: قطع السيقان تحت الفلقية للبادرات المزروعة على سطح وسط MS الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA

B: استحداث الكالس وتكوينه كتلاً صغيرة من القطع في (A) بعمر 11 يوماً

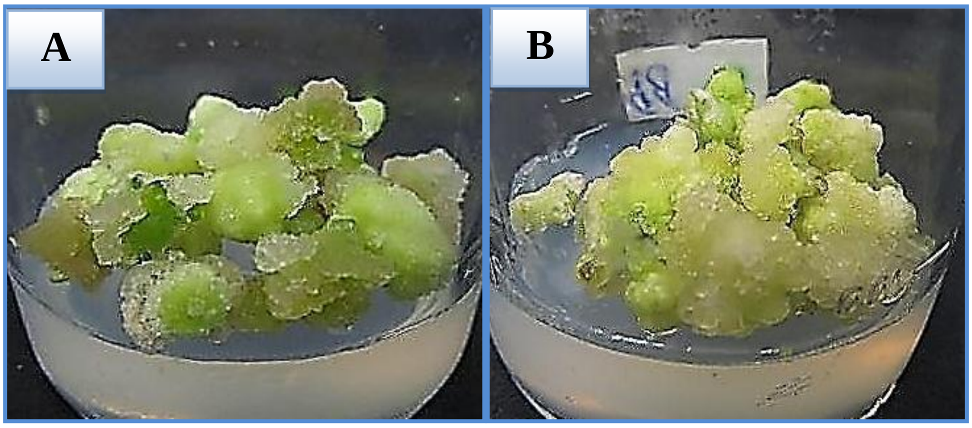
C: تطور حجم كتل الكالس في (B) بعمر 18 يوماً

D: استمرار نمو الكتل في (C) وتكوينها مزرعة كالس السيقان تحت الفلقية بعمر 30 يوماً

يتبعهُ الوسط MS حاوياً 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ لكل من IBA وBA، ووسط MS مدعما بإضافة 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و1.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA في تكوينهم للكالس وبنسبة 99.90%، 86.66% على التوالي، مع الاستمرار في النمو ليكونا مزرعتين من الكالس كانتا اقل كفاءة واستغرقتا مدة زمنية اكثر من الوسط الامثل اعلاه بلغت 45 يوماً الشكل (2. A , B).

وكان لإضافة الاوكسينات الى الاوساط الحاوية على BA فقط دوراً هاماً في تحفيز استحداث الكالس. اذا كانت نسبته في وسط MS الحاوي على 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA فقط صفر%. ولكن سجلت النسب في ذات الوسط ولكن بعد دعمه بإضافة 2.0 ، 1.0ملغم لتر$^{-1}$ لكل من NAA و 2,4-D على حدى 72.72% ، 33 .83 % على التوالي.

واعطت قطع الاوراق استجابة ضعيفة لاستحداث الكالس. اذ لم تنتج الا في 6 اوساط فقط أفضلها كان في وسط MS + 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ لكل من 2,4-D و BA وبنسبة 66.66 % وابدى الكالس فيها ضعفاً في النمو وبدأ بالتوقف بعد مدة قصيرة ولم تنتج مزارع من الكالس.



الشكل 2: انتاج مزارع كالس السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات البروكلي *Brassica oleracea* var. italica ويعمر 45 يوما والنامية على سطح وسط MS الصلب الحاوي على:
A– 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA
B– 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA

التكوين التلقائي للأفرع الخضرية من كالس السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات البروكلي *Brassica oleracea* var. italica

من الملاحظات المميزة في هذه الدراسة وبعد 10 ايام من اعادة الزراعة الاولى لكالس السيقان تحت الفلقية والنامي على وسط MS الحاوي 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ IBA + 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA على ذات الوسط هو انفراده بقدرته للتكوين التلقائي للأفرع الخضرية. تكشفت بنشوء نموات خضرية تطورت لاحقاً الى أفرع خضرية بعد 20 يوماً تحمل اوراق حقيقة الشكل (3.A). واظهرت عمليات نقل 50 قطعة من الكالس استجابة 35 منها (النسبة المئوية 70%) لتمايز الافرع الخضرية وبعدد كلي للأفرع 142، بلغ معدل اعدادها 4.05 فرع / قطعة واطوالها 2-3 سم وبوجود 3 -4 ورقة على كل فرع.

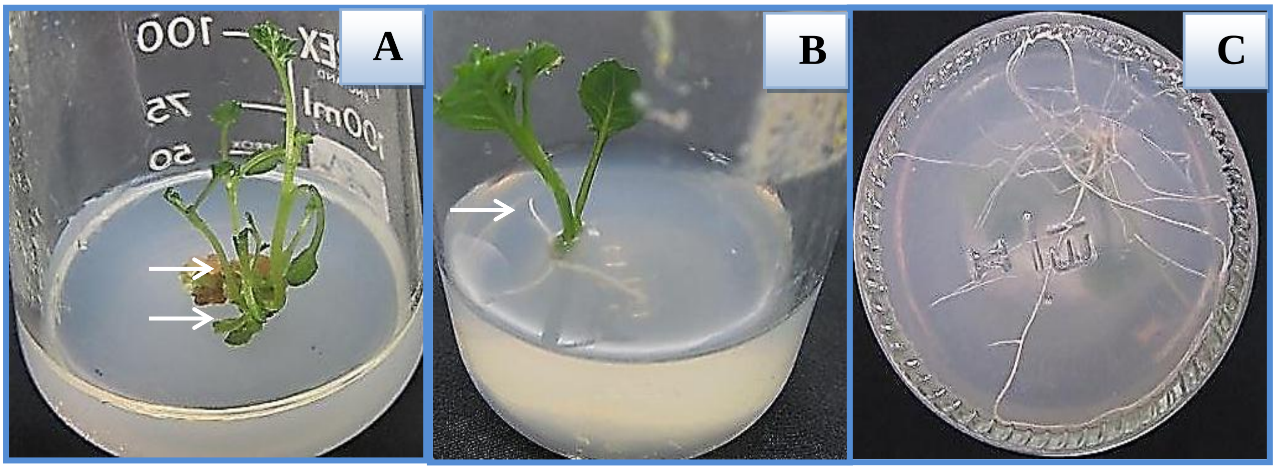
تجذير الافرع الخضرية المتكونة تلقائيا

اظهرت البيانات سهولة تجذير الافرع الخضرية المتمايزة تلقائياً من كالس السيقان تحت الفلقية المستأصلة والمزروعة عمودياً داخل وسط MSO الصلب بكامل او نصف قوته التركيبية (الجدول 2)

الجدول 2: تجذير الافرع الخضرية المتمايزة تلقائياً للبروكلي *Brassica oleracea* var. italica وتكوين النباتات الكاملة في الوسط الزرعي

الوسط الغذائي	الافرع الخضرية المغروسة/المجذرة	معدل عدد الجذور / فرع	التجذير (%)	مدة التجذير (يوم)
MSO	22/22	5.42	100	12
MSO 1/2	9/18	3.66	50	17

تفوق وسط MSO بكامل قوته التركيبية في نشوء الجذور من الافرع الخضرية المغروسة فيه وبنسبة 100% بعد 12 يوماً منتجة نباتات كاملة الشكل (B.3). استمرت الافرع بالنمو مكونة شبكة من الجذور واتصفت بأشكالها الخيطية المتفرعة ولونها الابيض بعد 18 يوما الشكل (3.C). في حين ابدى وسط MSO بنصف قوته التركيبية قدرة مختزلة الى النصف في تكوين الجذور وابدت الجذور تأخيراً في نشوئها.



الشكل 3: تكوين نباتات البروكلي الكاملة من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية لبادراتها تحت الفلقية وتجذيرها في الوسط الزرعي

A– التكوين التلقائي للأفرع الخضرية من كالس السيقان تحت الفلقية النامي على وسط MS الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA (لاحظ اعداد الافرع) بعمر 20 يوماً

B– تجذير احد الافرع المستأصلة من (A) في وسط MSO بكامل قوته التركيبية بعد 12 يوماً (لاحظ الجذور المتكونة)

C– تطور الجذور في (B) بعد 21 يوم من نشوئها وتكوين نبات البروكلي الكامل في الوسط الزرعي

اقلمه نباتات البروكلي الناتجة من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية ونقلها الى التربة

اظهرت عملية اقلمه نباتات البروكلي الناتجة من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية نجاحها من خلال رفعها من الوسط الغذائي الشكل (A.4)، وغرسها في اوعية بلاستيكية شفافة مثقبة من الاسفل تحوي على تربة مزيجية وبتموس بنسبة 1:1 الشكل (B.4). وبعد استمرار نموها وحفاظها على نشاطها على مدى عشرة ايام، ازيلت عنها الاغطية ونقلت النباتات مع تربتها الى سنادين حاوية على ذات المزيج الشكل (C.4) وحفظت في ظروف غرفة الزروعات، ثم نقلت الى البيت الزجاجي لمتابعة نموها وقد اظهرت هذه النباتات قدرتها على تحمل الظروف البيئية والنمو.

الشكل 4: اقلمه نباتات البروكلي *Brassica oleracea* var. italica المتمايزة من كالس السيقان تحت الفلقية لبادراتها

A– نموذج لاحد نباتات البروكلي الكاملة والمنزوعة من وسط تجذيرها

B– النبات في (A) نامي في مزيج التربة والبتموس في وعاء بلاستيكي بعمر17 يوماً

C– نبات البروكلي بعمر 40 يوم نامي في مزيج التربة والبتموس داخل سندانه سعتها واحد كيلوغرام في ظروف البيت الزجاجي

المناقشة

تعتمد كفاءة عملية تعقيم البذور على عدم تلوثها وانتاجها بادرات سليمة وذات حيوية عالية (Sen *et al*., 2013). ان التباين الواضح الذي اظهرته القطع النباتية المختلفة في استجابتها لاستحداث الكالس والفترة الزمنية اللازمة التي تفوقت فيها قطع السيقان تحت الفلقية على الاوراق ربما يعزى الى عدة عوامل منها وراثية او غير وراثية مثل مصدر القطعة النباتية وحجمها وعمرها الفسيولوجي اضافة الى ما تحتويه هذه القطعة من اعداد الخلايا المؤهلة للانقسام فضلا عن محتواها الداخلي من الهرمونات النباتية (Neumann *et al*., 2009). وهذا ما اوجدته دراسة سابقة اجريت على ثلاثة انواع تابعة للعائلة الصليبية الى ان أفضل جزء نباتي لتكوين الكالس هو السيقان تحت الفلقية (AL-Naggar *et al*., 2010). ان اضافة الاوكسينات بأنواعها الثلاثة NAA ، 2,4-D، IBA الى الاوساط الغذائية لوحدها او متداخلة مع BA كان له الدور البارز في استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية وهذا ما اتفق مع عدد من الدراسات السابقة (Dubey and Gupta ,2014 ; Azis *et al*., 2015)، وهذا يماثل نتائج الدراسة التي اجراها الباحثون (Khan *et al*., 2010) على ستة انماط مختلفة من جنس *Brassica* اذ بينت ان النسب الافضل لتشكيل الكالس سُجلت عند استخدام الوسط الزرعي MS المضاف اليه BA بالاشتراك مع تراكيز مختلفة من الاوكسينات. وكذلك ما توصلت اليه الدراسات على نبات البروكلي الى ان أفضل وسط لاستحداث الكالس من الاجزاء النباتية المختلفة هو وسط MS الحاوي على تداخلات بتراكيز مختلفة من منظمات النمو IBA و BA (Sharif Hossain *et al*., 2016c ; 2016a). ويعتمد سلوك القطع النباتية لاستحداث الكالس على التوافق بين محتواها الداخلي من الهرمونات النباتية ومنظمات النمو المضافة الى الوسط (Azis *et al*., 2015 ; Juan *et al*., 2010). وقد يعزى التكوين التلقائي للأفرع الخضرية على وسط نمو الكالس ذاته الى النمط الوراثي للصنف النباتي المستخدم وبرهاناً على الطاقة الكامنة الذاتية Totipotency لخلاياه في تكوينها للأفرع الخضرية بالإضافة الى مستويات منظمات النمو داخل نسيج الكالس (Parray *et al*., 2018 ; Rajoriya *et al*., 2018 ; محمد ويحيى، 2018). ان سهولة تجذير الافرع الخضرية في وسط MSO بكامل قوته التركيبية قد يفسر بتواجد الاوكسينات الداخلية في القطع النباتية بكميات تمنحها القدرة على تكوين الجذور

فضلا عن دعم المكونات الكاملة من الوسط (Jennifer *et al*., 2004 ; Mohammed and Al-Mallah, 2013 ; Handayani, 2014).

شكر وتقدير

يتقدم الباحثان بالشكر والتقدير الى قسم علوم الحياة وعمادة كلية العلوم في جامعة الموصل والى كل من ساهم في إتمام هذا البحث.

المصادر العربية

حسن، أحمد عبد المنعم (2004). إنتاج الخضر الثانوية وغير التقليدية. سلسلة محاصيل الخضر: تكنولوجيا الإنتاج والممارسات الزراعية المتطورة. الجزء الاول، الطبعة الاولى، الدار العربية للنشر والتوزيع، القاهرة، مصر.

الصميدعي، كاظم محمد ابراهيم (2015). تطبيقات في التقانات الأحيائية النباتية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة النهرين، دار الكتب للطباعة والنشر، العراق.

عمر، سامال جلال؛ سليمان، سلام محمود؛ كريم، لقمان غريب؛ قادر، بختيار عبدالله؛ عبد المجدي، قيوم عبدالكريم (2013). تأثير بعض منظمات النمو النباتية في نمو وحاصل البروكلي صنف (Corvet-F1). مجلة جامعة كوية، (26)،261–276.

محمد، امجد عبد الهادي؛ يحيى، رنا طارق (2018). تمايز نباتات الترمس الابيض *Lupinus albus* من كالس السيقان تحت الفلقية لبادراتها. **27**(5) فرع النبات/ عدد خاص بالمؤتمر العلمي الثالث لعلوم الحياة، 95–102.

المصادر الاجنبية

Al-Naggar, A.; Shabana, R.; Rady, M.; Ghanem, S.; Saker, M.; Reda, A.; Matter, M.; Eid, S. (2010). *In Vitro* callus initiation and regeneration in some canola varieties. Internet *J. Academic Res*., **2**, 6-12.

Azis, N.A; Hasbullah, N.A.; Rasad, F.M.; Daud, N.F.; Amin, M.A.M.; Lassim, M.M. (2015). Organogenesis and growth response of *Brassica oleracea* var. italica through *in vitro* culture. International Conference on Agricultural, Ecological and Medical Sciences (AEMS-2015) April 7-8, 2015 Phuket (Thailand). 4-6.

Bejoy, M.; Dan, M.; Anish, N.; Nair, A.R.; Radhika, B.; Manesh, K. (2012). Micropropagation of an Indian ginger (*Curcuma vamana* Sabu and Mangaly): a wild relative of turmeric. *Biotechnol*., **11**(6), 333-338.

Collen, H. A.; Edwards, S. (1998). "Plant Cell Culture". BIOS Scientific publishers LTD. UK.

Dubey, S.K.; Gupta, A.K. (2014). Callus induction and shoot proliferation from seedling explants of different mustard genotypes. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*., **3**, 858-864.

Handayani, T. (2014). Regeneration of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *bejo*) from hybrid mature seed and molecular analysis of regenerants. *2nd International Conference on Agricult. and Biotechn*., **79**(11), 57-6.1

Jennifer, N.; Janet, P.S.; Jerry, D.C. (2004). "Hormone Biosynthesis, Metabolism and its Regulation". In: Plant Hormones, Biosynthesis and Signal Transduction and Action, Peter, J.D. (Ed.). Kluwer Academic Publishers, UK., pp. 36-62.

Juan, L.; Lihua, W.; Jing, L.; Junhui, W. (2010). Effect of different plant growth regulators on callus induction in *Catalpa bungei*. *Afric. J. Agri. Res*., **5**, 2699-2704.

Khan, M.; Robin, A.A.H.K.; Nazim-Ud-Dowla, M.; Talukder; S.; Hassan, L. (2010). *In vitro* regeneration potentiality of *Brassica* genotypes in differential growth regulators. *Bangladesh J. Agricult. Res*., **35**, 189-199.

Kim, S.J.; Park, W.T.; Uddin, M.R.; Kim, Y.B.; Nam, S.Y.; Jho, K.H.; Park, S.U. (2013). Glucosinolate biosynthesis in hairy root cultures of broccoli (*Brassica oleracea* var. italica). *Nat. Prod. Commun.*, **8**(2), 217-20.

Malabadi, R.B.; Teixeira da Silva, J.; Nataraja, K.; Vijaya, K. S.; Mulgund, G.S. (2011). Induction of somatic embryogenesis in mango (*Mangifera indica* L.). *Internat. J. Biol. Technol.*, **2**, 12-18.

Mohammed, A. A.; Al-Mallah, M.K. (2013). Determination of β-carotene in Carrot (*Daucus carota* L.) Plants Regenerated from Stems Callus. *Raf. J. Sci.*, **24**(3), 72-36.

Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-479.

Nazirwan (2015). *In vitro* shoot generation from cotyledon explant of *Brassica Oleracea* using BAP and NAA. Internat. *J. Sci. Res.*, **6**(39), 1795-1797.

Neumann, K.; Kumar, A.; Imani, J. (2009). "Plant Cell and Tissue Culture – A tool in Biotechnology". Springer-Verlag Berlin, Germany.

Owis (2015). Broccoli The green beauty: A review. *J. Pharm. Sci. Res.*, **7**(9), 696-703.

Parray, J.A.; Kamili, A.N.; Jan, S.; Mir, M.Y.; Shameem, N.; Ganai, B.A.; Abd_Allah, E.F.; Hashem, A.; Alqarawi, A.A. (2018). Manipulation of plant growth regulators on phytochemical constituents and DNA protection potential of the medicinal plant *Arnebia benthamii*. *Bio. Med. Res*. Internat., 1-8. Open access.

Rajoriya, P.; Singh, V.K.; Jaiswal, N.; Lall, R. (2018). Optimizing the effect of plant growth regulators on *in vitro* micro propagation of Indian red banana (*Musa acuminata*). *J. Pharmacognosy and Phytoch*., **1**, 628-634.

Sen, M.K.; Jamal, M.A.M.; Nasrin, S. (2013). Sterilization factors affect seed germination and proliferation of *Achyranthes aspera* cultured *in vitro*. *Environment Experiment Biol*., **11**, 119–123.

Sharif Hossain, A. B. M.; Haq, I.; Ibrahim, N.A.; Aleissa, M.S. (2016a). Callus cellproliferation from broccoli leaf slice using IBA and BAP *in vitro* culture: Its biochemical and antioxidant properties. *Elsevier, Data in Brief*, **6**,214–220.

Sharif Hossain, A. B. M.; Haq, I.; Aleissa, M.S.; Ibrahim, N.A.; Rashid, K.B. (2016b). Callus cell proliferation and explants regeneration using broccoli shoot tip *in vitro* culture: biochemical and antioxidant properties. *British J. App. Sci. Technol*.,**13**(5), 1-8.

Sharif Hossain, A. B. M.; Haq, I.; Ibrahim, N.A.; Aleissa, M.S. (2016c). Cell proliferation using broccoli leaf cutting *in vitro* culture: Its biochemical and antioxidant properties. *British Biotechnol. J*.,**11**(2), 1-9.

Thapa, U.; Rair, R. (2012). Evaluation of sprouting broccoli (*Brassica oleraceae* var. italic) genotypes for growth, yield and quality. Internat. *J. Agricult. Sci*., **4** (7), 284-286.

Tilaar, W. (1990). Mikropropagasi Brokoli *(Brassica oleracea* L.var italica*)* dan Studi Aktivitas Enzim Proeksidase, Katalase dan Glutamatdehidrogenase selama Pembentukan Plantlet. S2 Thesis, Institute Technology Bandung/ Bandung/ Indonesian.

Torres, K.C. (1989). "Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops". Chapman and Hall. New York.

Yagishita, Y.; Fahey, J.W.; Dinkova-Kostova, A.T.; Kensler, T.W. (2019). Broccoli or sulforaphane: Is It the Source or Dose That Matters? *Molecules*, **24**(19), 3593.

Yoldas, F.; Ceylan, S.; Yagmur, B.; Mordogan, N. (2008). Effect of nitrogen fertilizer on yield quality and nutrient content in broccoli. *J. Plant Nutr*., **31**, 1333– 1343.

Regenerated of Broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) Plants from Differentiation of the Hypocotyl Stems Callus of its Seedlings

Safwan J. Sultan **Amjad A. Mohammed**
Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul

ABSTRACT

The current study produced broccoli plants (*Brassica oleracea* var. italica) from the differentiation the hypocotyl stems callus of its seedlings and succeed of their adaptation and transferred to the soil. The results showed the difference in ratio of callus initiation with different type of plant growth regulators Naphthalene acetic acid (NAA), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Indole-3-butyricacid (IBA), Benzyl adenine (BA) and their concentrations which used in this study. The interaction of IBA and BA had an efficient role of increasing the initiation ratios. Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1.0 mg L^{-1} IBA and 2.0 mg L^{-1} BA superiority in registered initiation ratio reached 100% after 11 days of the cultivation, and with its continued growth it produced typical callus cultures. The continued of callus subculture on the same initiation medium led to spontaneous production of 142 shoots produced from 50 pieces of callus. These regenerated shoots easily rooted in the MSO medium with full strength at ratio 100%, and with continued growth and formation of efficient root groups, they were successfully adapted to the soil within the pots in the greenhouse.

Keywords: broccoli, callus cultures, spontaneous differentiation of shoots, adaptation.