تأثير Sodium Azide في قابلية الكالس لتحمل الملوحة في محصول فول الصويا *Glycine max* L. خارج الجسم الحي

كاظم محمد إبراهيم* هاشم كاظم محمد العبيدي** سعدية حسن محمود**

الملخص

استؤصلت الفلقات وأجنة البذور الناضجة لتركيبين وراثيين من فول الصويا *Glycine max* L. هما طاقة 2 و**Lee74** وزرعت بعد تعقيمها على الوسط الغذائي (**MS**) المحور المزود بالفيتامينات ومنظمات النمو المختلفة لنشوء الكالس. عرض الكالس المستحدث إلى مستويات ملحية مختلفة مكونة من خليط أملاح كلوريد الصوديوم والكالسيوم والمغنيسيوم بنسبة **2**: **2** :**1** على التوالي وبالمستويات **50**، **100**، **150**، **200** و**250** مليمول بعد إضافتها إلى الوسط الغذائي.

أظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين التركيبين الوراثيين في استجابتهما لمستويات من **Sodium Azide** (**SA**)، كما لوحظ حدوث زيادة في معدل الوزن الطري والجاف للكالس عن معاملة المحايد بالتراكيز **0.05 – 0.5** مليمول وهذه الزيادة تناسبت عكسياً مع زيادة مستويات **SA**، واعتبر التركيز **1**مليمول **SA** هو الحد القاتل للخلايا وان التركيز **0.5** مليمول **SA** هو الحد تحت القاتل للخلايا والتركيز الذي اعتمد في معاملة الكالس به للحصول على التغايرات. كما لوحظ أن مدة الغمر **90** دقيقة في محلول **SA** هي الأفضل لأن زيادتها إلى **120** دقيقة سببت تفتت الكالس.

زرع الكالس المعامل **0.5** مليمول **SA** لمدة **90** دقيقة على وسط غذائي يحتوي على مستويات ملحية (**0–250**) مليمول. أظهرت النتائج أن قابلية الكالس على تحمل الملوحة قد زادت بعد هذه المعاملة حيث لوحظ ارتفاع معدل الزيادة بالوزن الطري للكالس المعامل **SA** على نظيره غير المعامل به.

عومل كالس التركيبين الوراثيين بمحلول **SA** بتركيز **0.5** مليمول او بدونه لمدة **90** دقيقة وزرع الكالس المعامل بكل تركيز على وسط غذائي يحتوي على **200** مليمول من الخليط الملحي. أظهرت النتائج تفوق معاملة **SA** بصورة منفردة معنوياً على المعاملات الأخرى في معدل الوزن الطري والجاف للكالس لكنها لم تختلف معنوياً عن معاملة المحايد الخالية من **SA** والملوحة، كما تفوقت معاملة **SA** مع الملوحة معنوياً على معاملة الملوحة منفردة.

المقدمة

يعد محصول فول الصويا **Soybean** (*Glycine max* L.) من ذوات الفلقتين. عدد الكروموسومات فيه (**2n = 40**) وهو من محاصيل العائلة البقولية المهمة اقتصادياً في العالم وذلك لكثرة استخداماته والتي منها استخلاص الزيت الفائق النوعية واستخدامه في العليقة الحيوانية. تصل نسبة البروتين في حبوبه إلى **40%** والزيت إلى **20%** ويضم بروتين فول الصويا الحوامض الأمينية الأساسية كافة التي يحتاجها الإنسان والحيوان (**14**)، كما يحتوي فول الصويا على الحامض الأميني **Lysine** الذي يضاف إلى بروتين الحبوب الأخرى والتي تفتقر له (**5**).

كما أصبح بالإمكان الاستفادة من قشور قرنات فول الصويا في إنتاج أنزيم **Peroxidase** الذي يعد اقل تكلفة وأكثر ثباتاً من تلك المنتجة من البكتريا والفطريات، ولهذا الأنزيم تطبيقات عملية في الغذاء والفحص والتشخيص والتحليل في الأبحاث الطبية (**6**).

البحث مستل من أطروحة الدكتوراه للباحث الثاني.

* كلية العلوم –جامعة النهرين– بغداد، العراق.

** كلية العلوم– الجامعة المستنصرية – بغداد، العراق.

بلغت استيرادات الوطن العربي من فول الصويا عام 1999 حوالي 371.93 ألف طن بقيمة 96.17 مليون دولار، إما المساحة المزروعة في العراق حتى عام 1999 فقد بلغت 1.26 ألف هكتار بإنتاجية قدرها 436.51 كغم/ هـ. وصل مجمل إنتاج المحصول في العراق عام 1999 إلى 550 طناً (3)، يعد نبات فول الصويا من النباتات المتوسطة التحمل للملوحة (9)، كما أكد الساهوكي (4) تأثر إنتاجية المحصول سلباً عند زراعته في الترب المالحة وهذه تعد من المشاكل الأساسية في العراق خاصة في وسطه وجنوبه، وهناك مساحات كبيرة اعتبرت غير منتجة بسبب تراكم الأملاح فيها.

إن زراعة نباتات محدودة التحمل للملوحة أو الحساسة يتطلب منها استخدام طاقة كبيرة لتحمل الإجهاد الملحي مما يؤثر سلباً في معدلات النمو والإنتاجية (27).

تعد تقنية زراعة الأنسجة النباتية واحدة من طرائق الإكثار السريع وحل لبعض المشاكل التي تواجه زراعة المحاصيل إضافة إلى استخدام المطفرات في تحسين صفات النبات عن طريق استحداث تغايرات وراثية من خلال تعريض الخلايا إلى بعض المطفرات ثم زراعتها على أوساط ذات شد ملحي وانتخاب الخلايا القادرة على النمو والإخلاف (22). إن استخدام هذه التقنيات ساعد في الحصول على نباتات متحملة للملوحة كما في نباتات الكوليوس (12، 16), الحمضيات (25)، الحنطة (1), الرز (5) وغيرها من النباتات.

وكما أسلفنا أن فول الصويا يعد من المحاصيل الستراتيجية والحساسة للملوحة وعليه فان هدف البحث هو تحسين صفات المحصول لهذه الصفة عن طريق استحداث الكالس لتركيبين وراثيين من فول الصويا هما طاقة 2 وLee74 باستخدام البذور الناضجة لكونها مصدراً متوفراً بصورة دائمية للحصول على الكالس وإنتاج خطوط من الخلايا Cell lines متحملة للملوحة من خلال استخدام SA كمطفر كيميائي لاستحداث ولزيادة التغايرات الوراثية باتجاه زيادة تحمل النبات للملوحة.

المواد وطرائق البحث

غسلت البذور الناضجة لتركيبين وراثيين من فول الصويا هما طاقة 2 وLee74 بالماء المقطر المعقم لعدة مرات ثم وضعت في أطباق بتري معقمة تحتوي على الكحول الأثيلي بتركيز 96% مع التحريك لمدة 2 دقيقة ثم نقلت إلى أطباق تحتوي على محلول هايبوكلورات الصوديوم 2.4% مع التحريك لمدة 10 دقائق ثم غسلت البذور ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم.

نفذت جميع العمليات في ظروف معقمة باستخدام منضدة الهواء الطبقي Laminar air flow hood. أجريت عملية استئصال الأجنة والفلق من البذور الناضجة وبواقع جنين واحد أو فلقة واحدة/ أنبوبة زراعة، وزرعت على وسط الكالس المكون من أملاح MS (21) مضافاً إليه 0.5 ملغم/ لتر Pyridoxine– HCL، 2.0 ملغم/لتر Glycine، 0.5 ملغم/لتر Nicotinic acid، 0.1 ملغم/لتر Thiamin– HCl، 100 ملغم/لتر Myo–Inositol، 150ملغم/لتر Asparagine، 3 ملغم/لتر 2,4-D، 0.1 ملغم/لتر Kinetin، 30000 ملغم/لتر Sucrose، 7000ملغم/لتر Agar. عدل الرقم الهيدروجيني pH للوسط الغذائي إلى 5.8 باضافة قطرات من NaOH او HCL (1مولاري). عقم الوسط بجهاز الموصدة Autoclave في درجة حرارة 121م وضغط 1.04كغم/سم^2 لمدة 20 دقيقة. حضنت الزروعات داخل غرفة النمو وفي الظلام على درجة حرارة 25±1م. بدأ الكالس بالتكون بعد 10 أيام من الزراعة، وبعد أربعة أسابيع نقل الكالس المستحدث إلى وسط جديد يحتوي على ها مكونات الوسط الأول وحضنت الزروعات تحت نفسها الظروف السابقة، وبعد أربعة أسابيع أخرى تكونت كمية كافية من الكالس لتنفيذ تجارب الملوحة والتطفير.

زراعة الكالس على الأوساط الملحية

نقل وزن ثابت من الكالس (200 ملغم) إلى أوساط غذائية تحتوي على نفسها مكونات وسط استحداث الكالس مضافاً له مستويات مختلفة من خليط أملاح NaCl، $CaCl_2$، $MgCl_2$ بنسبة 2 : 2 : 1 على التوالي وهذه النسبة مقاربة لنسبة الأملاح بالترب العراقية (11)، وقد أضيفت بالمستويات 50، 100، 150، 200 أو 250 مليمول إلى الوسط الغذائي حيث كان التوصيل الكهربائي (EC) للوسط الغذائي 6.02، 8.91، 13.17، 17.54، 22.70 و27.20 ديسي سيمنز/م على التوالي، والجدير بالذكر أن مستوى الملوحة. لا يعني أن الوسط الغذائي خالٍ من الأملاح وإنما لم يزود بأي مستوى من خليط الأملاح.

أجريت التجربة بعشرة مكررات لكل تركيب وراثي ولكل مستوى ملحي وحضنت الزروعات تحت نفسها الظروف السابقة، وبعد أربعة أسابيع حسبت الزيادة بالوزن الطري للكالس ورسم منحنيي التثبيط في نمو الكالس لتحديد LD 50 و LD 100 لكل تركيب وراثي وحدد المستوى الملحي الذي ستتم زراعة الكالس عليه لتنفيذ تجارب التطفير.

معاملة الكالس بمحلول SA

حضرت محاليل من SA وبتراكيز 0، 0.05، 0.1، 0.5 و 1 مليمول ووضعت في أطباق بتري معقمة داخل منضدة انسياب الهواء الطبقي لغمر الكالس فيها ولمدة 30، 60، 90 أو 120 دقيقة ثم أخرج الكالس وغمر بالماء المقطر المعقم لمدة 30 دقيقة للتخلص من أثار المادة المطفرة. ثم اخذ وزن ثابت من الكالس بمقدار 200 ملغم وزرع على وسط جديد يحتوي على مكونات الوسط المستخدم نفسه في إدامة الكالس وبواقع 8 مكررات لكل تركيب وراثي ولكل تركيز ولكل مدة زمنية. حضنت الزروعات تحت الظروف المشار إليها سابقاً، وحسب معدل الوزن الطري والجاف للكالس بعد أربعة أسابيع من الزراعة لتحديد التركيز الملائم من SA ومدة الغمر الملائمة.

زراعة الكالس المعامل SA على الأوساط الملحية

حضر محلول SA بتركيز 0.5 مليمول (وهو التركيز الأمثل من SA) وغمر الكالس فيه لمدة 90 دقيقة (وهي المدة الزمنية الأمثل لغمر الكالس بمحلول SA) ثم استخرج الكالس وغمر في ماء مقطر معقم لمدة 30 دقائق ثم اخذ وزن ثابت من الكالس (200 ملغم) وزرع على أوساط غذائية حاوية على المستويات الملحية 0، 50، 150، 200 أو 250) مليمول وبواقع 10 مكررات لكل تركيب وراثي ولكل مستوى ملحي. حضنت الزروعات تحت الظروف نفسها وبعد أربعة أسابيع حسب مقدار الزيادة في معدل الوزن الطري للكالس ورسم منحنى التثبيط في النمو لكالس كل تركيب وراثي لمقارنته مع منحنى التثبيط في النمو الأول للكالس المزروع على المستويات الملحية المختلفة وغير المعامل SA.

تأثير SA والملوحة في نمو الكالس

حضر محلول من SA بتركيزين 0 و 0.5 مليمول، وبعد معاملة الكالس به حسب الطريقة المبينة سابقاً. زرع الكالس المعامل بكل تركيز من التركيزين أعلاه على وسط غذائي حاوٍ على 0 أو 200 مليمول من الخليط الملحي وبذلك نفذت أربع معاملات مختلفة لكل تركيب وراثي وهي:

1- كالس غير معامل SA ومزروع على وسط خالٍ من الملوحة (المحايد للمعاملة 3).
2- كالس معامل SA ومزروع على وسط خالٍ من الملوحة. (المحايد للمعاملة 4).
3- كالس غير معامل SA ومزروع على وسط ملحي.
4- كالس معامل SA ومزروع على وسط ملحي.

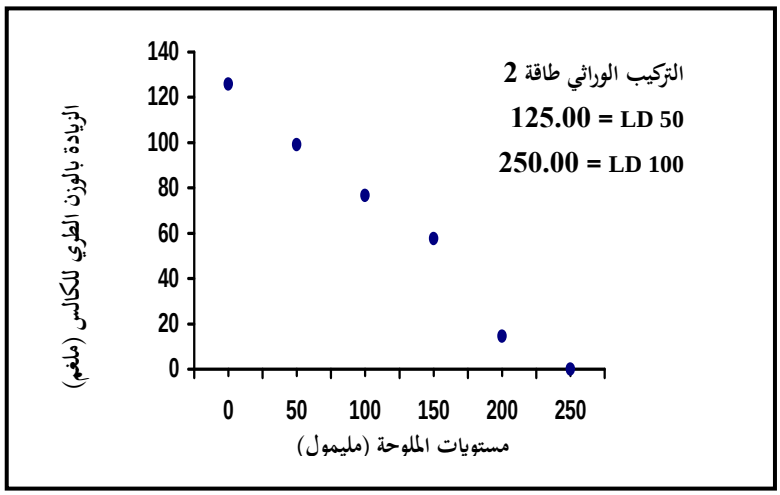
نفذت التجربة بثمانية مكررات لكل معاملة ولكل تركيب وراثي. حضنت الزروعات تحت الظروف المشار إليها سابقاً وبعد أربعة أسابيع تم حساب الوزن الطري والجاف للكالس.

نفذت التجارب باستخدام تصميم القطاعات العشوائية الكاملة **RCBD** وبتجارب عاملية وتم تحليل النتائج ومقارنتها إحصائياً حسب اختبار **LSD** وعلى مستوى احتمال **0.05** (**30**).

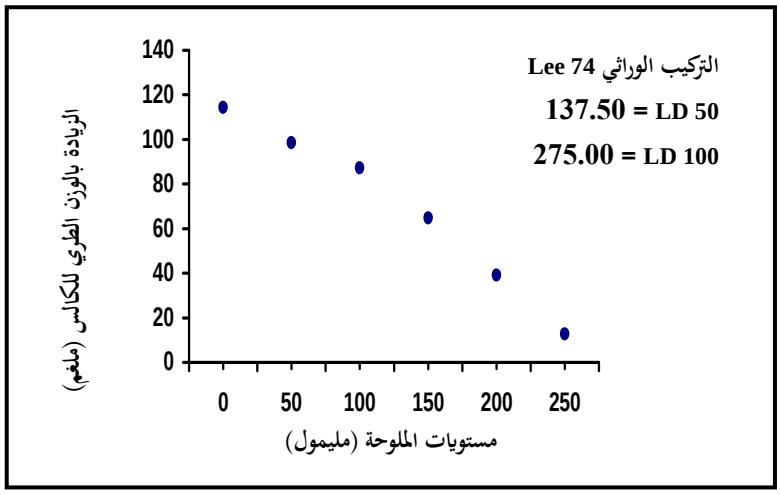
النتائج والمناقشة

تأثير المستويات الملحية في معدل الزيادة في الوزن الطري للكالس

أظهرت النتائج وجود تأثير معنوي للمستويات الملحية في معدل الزيادة بالوزن الطري للكالس ويوضح الشكلان (**1** و **2**) منحنيي التثبيط في النمو للكالس المستحدث من الفلقة للتركيبين الوراثيين طاقة **2** و**Lee74** النامي على مستويات ملحية مختلفة حيث يتضح من الشكلين أن الحد القاتل (**LD100**) للتركيب الوراثي طاقة **2** هو **250** مليمول من الخليط الملحي. والحد القاتل للتركيب الوراثي **Lee74** هو **275** مليمول، ويتبين من خلال الشكلين أن **LD 50** للتركيبين الوراثيين طاقة **2** و **Lee 74** هو **125.00** و **137.50** مليمول على التوالي.



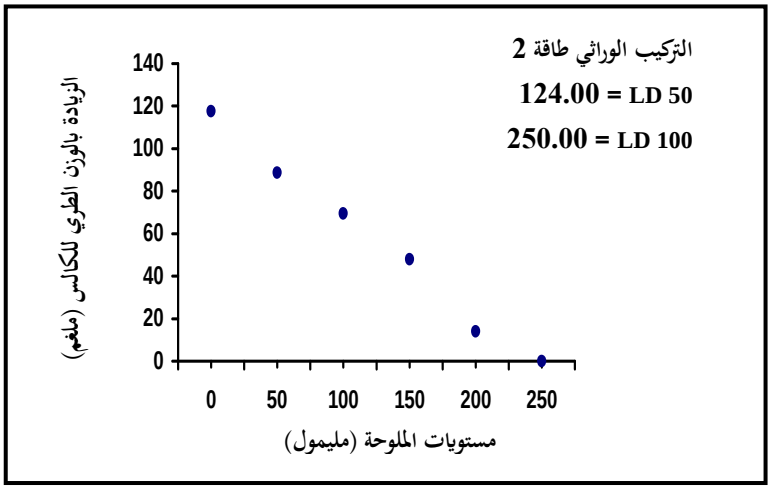
شكل **1**: منحنى التثبيط في نمو الكالس المستحدث من الفلقة للتركيب الوراثي طاقة **2** النامي على مستويات مختلفة من الملوحة



شكل **2**: منحنى التثبيط في نمو الكالس المستحدث من الفلقة للتركيب الوراثي **Lee 74** النامي على مستويات مختلفة من الملوحة

ويوضح الشكلان (3 و4) منحنيي التثبيط في النمو للكالس المستحدث من الجنين للتركيبين الوراثيين طاقة 2 و74 Lee النامي على مستويات ملحية مختلفة حيث يلاحظ بأن الحد القاتل LD 100 لكلا التركيبين الوراثيين طاقة 2 و74 Lee هو 250 مليمول من الخليط الملحي وLD 50 فهما 124 و125 مليمول على التوالي.

أن الاختلاف بين التركيبين الوراثيين من فول الصويا في معدل الزيادة بالوزن الطري للكالس المستحدث من الفلقة قد يعود إلى الاختلاف بين التركيبين في استجابتهما لتكوين الكالس بسبب اختلاف التركيب الداخلي ومحتوى الفلق من الأحماض الأمينية وهذا ما أكده Arora (7). كما أن انخفاض معدل الزيادة بالوزن الطري للكالس بزيادة المستويات الملحية في الوسط الغذائي قد يعود إلى زيادة الإجهاد الملحي في الوسط الغذائي وبالتالي يتطلب من الخلايا إعادة تنظيم جهدها الازموزي للتأقلم مع الظروف الملحية الجديدة مما سبب انخفاضاً في جاهزية الماء والمواد الغذائية الذائبة فيه، وهذا أثر سلباً في نمو وتطور الخلايا مما أدى إلى انخفاض معدل الزيادة بالوزن الطري للكالس وهذا ما أكده Rains وجماعته (28) في دراستهم على نمو وتطور الكالس في نبات الرز المزروع على أوساط ملحية، كما أن زيادة المستويات الملحية في الوسط الغذائي قد سبب اضطرابات أيونية داخل الخلية مما يتطلب من الأخيرة استهلاك طاقة كبيرة للتكيف مع الظروف البيئية ذات المستوى الملحي العالي وهذا ما أكده Croughan وجماعته (13) في دراستهم على نبات الجت و Sesek وAnkica (29)، Mirodjagh وArzani (19) في دراستهم على نبات الحنطة حيث لاحظوا انخفاضاً في الوزن الطري للكالس كلما زادت التراكيز الملحية في الوسط الغذائي.



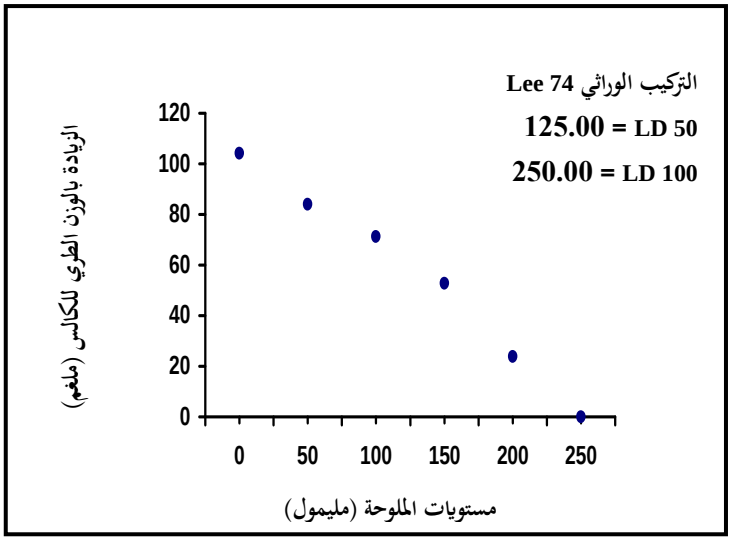
شكل 3: منحنى التثبيط في نمو الكالس المستحدث من الجنين للتركيب الوراثي طاقة 2 النامي على مستويات مختلفة من الملوحة

تأثير SA في معدل الوزن الطري للكالس

يوضح الجدول (1) تأثير تراكيز SA في معدل الوزن الطري للكالس إذ لم تظهر فروق معنوية بين التركيبين الوراثيين طاقة 2 وLee74 وصلت معدلاتها إلى 315.76 و 329.30 ملغم على التوالي بعد أربعة أسابيع من الزراعة.

كما توضح النتائج في الجدول نفسه تفوق معاملة التركيز 0.05 مليمول SA معنوياً على بقية المعاملات من SA إذ بلغ المعدل 383.20 ملغم، أما أقل المعدلات فكان في معاملة التركيز 1 مليمول SA وبلغ 243.87 ملغم.

ولم تظهر تداخلات معنوية بين التراكيب الوراثية وتراكيز SA إلا أن أعلى المعدلات حدثت في التركيب الوراثي Lee 74 بالتركيز 0.05 مليمول وبلغت 408.25 ملغم أما أقل المعدلات فكانت في التركيب الوراثي طاقة 2 في التركيز 1 مليمول وبلغت 237.83 ملغم.



شكل 4: منحنى التثبيط في نمو الكالس المستحدث من الجنين للتركيب الوراثي **Lee 74** النامي على مستويات مختلفة من الملوحة

جدول 1: معدل الوزن الطري للكالس (ملغم) المعامل بتراكيز مختلفة من **SA** (مليمول) بعد أربعة أسابيع من الزراعة علماً أن الوزن الابتدائي للكالس **200** ملغم

التراكيب الوراثية	تراكيز SA (مليمول)					المعدل
	0.0	0.05	0.1	0.5	1.0	
طاقة 2	322.50	358.16	329.91	330.41	237.83	315.76
Lee 74	318.91	408.25	348.66	320.75	249.91	329.30
المعدل	320.70	383.20	339.29	325.58	243.87	
LSD (0.05)	التراكيب الوراثية = N.S التراكيز = 21.59 التراكيب الوراثية × التراكيز = N.S					

ومن الجدير بالذكر أن الكالس الناتج من معاملة التركيز **1** مليمول **SA** للتركيبين الوراثيين تلون باللون البني الغامق ثم تعرض إلى التدهور والممات.

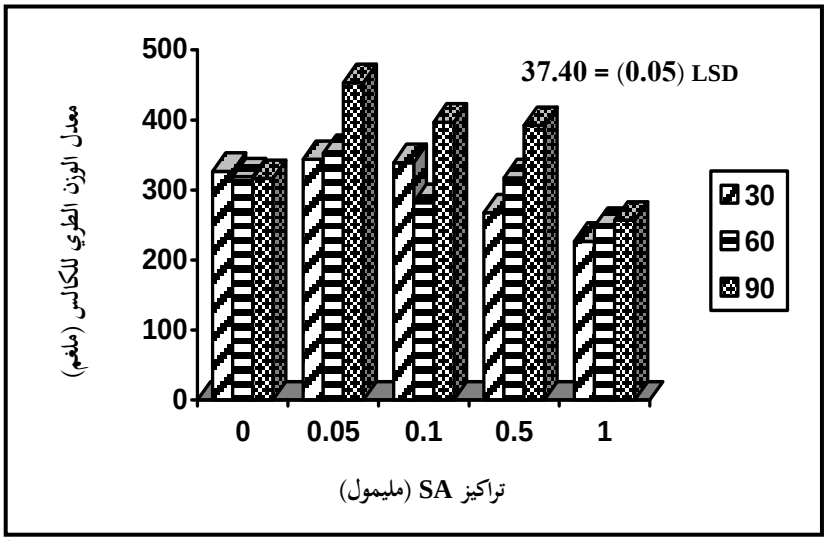
ويوضح الجدول (**2**) تأثير مدة الغمر في محلول **SA** حيث تفوقت معاملة **90** دقيقة معنوياً على بقية المدد وأعطت أعلى معدل وزن طري للكالس بلغ **363.05** ملغم، أما أقل المعدلات فكانت في المدة **30** دقيقة وصلت إلى **300.77** ملغم ولم تختلف هذه المدة معنوياً عن المدة **60** دقيقة والتي أعطت معدل وزن **303.77** ملغم.

ولم تظهر تداخلات معنوية بين التراكيب الوراثية ومدة الغمر إلا أن أعلى المعدلات كان في مدة الغمر **90** دقيقة للتركيبين الوراثيين قيد الدراسة إذ بلغ المعدل **363.05** ملغم لكل منهما. أما أقل المعدلات فقد ظهر في التركيب الوراثي طاقة **2** في مدة الغمر **30** دقيقة إذ بلغ المعدل **287.90** ملغم. علماً أن الغمر لمدة **120** دقيقة استبعد من التحليل الإحصائي وذلك لتفتت الكالس عند غسله بالماء وعدم صلاحه للزراعة.

ويوضح الشكل (**5**) تأثير التداخل بين تراكيز **SA** ومدة الغمر في محلول **SA** حيث تظهر النتائج تفوق التركيز **0.05** مليمول لمدة **90** دقيقة معنوياً على بقية التداخلات إذ بلغ المعدل **453.25** ملغم أما أقل المعدلات فكان في التركيز **1.0** مليمول لمدة **30** دقيقة وصل فيها إلى **226.87** ملغم.

جدول 2: معدل الوزن الطري للكالس (ملغم) المغمور بمدد مختلفة (دقيقة) في محلول SA بعد أربعة أسابيع من الزراعة علماً أن الوزن الابتدائي للكالس 200 ملغم

التراكيب الوراثية	مدة الغمر (دقيقة)			المعدل
	30	60	90	
طاقة 2	287.90	296.35	363.05	315.76
Lee 74	313.65	311.20	363.05	329.30
المعدل	300.77	303.77	363.05	
LSD (0.05)	التراكيب الوراثية = N.S مدة الغمر = 16.72 التراكيب الوراثية × مدة الغمر = N.S			



شكل 5: تأثير التداخل بين تراكيز SA (مليمول) ومدة الغمر في محلول SA (دقيقة) في معدل الوزن الطري للكالس بعد أربعة أسابيع من الزراعة علماً أن الوزن الابتدائي للكالس 200 ملغم

ويبين الجدول (3) تأثير التداخل الثلاثي بين التراكيب الوراثية وتراكيز SA ومدة الغمر حيث لم تظهر تداخلات معنوية فيما بينها إلا أن أعلى المعدلات ظهر في التركيب الوراثي Lee74 بتركيز 0.05 مليمول SA بمدة غمر 90 دقيقة بلغ 456.75 ملغم أما أقلها فكان في التركيب الوراثي طاقة 2 في التركيز 1 مليمول بمدة غمر 30 دقيقة وصل إلى 204.25 ملغم.

تأثير SA في معدل الوزن الجاف للكالس

تبين النتائج في الجدول (4) تأثير التراكيز المختلفة من SA في معدل الوزن الجاف للكالس حيث لم تظهر فروق معنوية بين التركيبين الوراثيين طاقة 2 و Lee74 إذ بلغ معدل الوزن الجاف 45.70 و47.68 ملغم على التوالي.

كما تبين النتائج تفوق التركيز 0.05 مليمول من SA معنوياً على بقية التراكيز المستخدمة حيث بلغ معدل الوزن الجاف في هذا التركيز 55.54 ملغم، أما أقلها فكانت في معاملة 1 مليمول SA وبمعدل 35.37 ملغم.

ولم تظهر تداخلات معنوية بين التراكيب الوراثية وتراكيز SA إلا أن أعلى المعدلات ظهر في التركيب الوراثي Lee74 بتركيز 0.05 مليمول SA وصل معدل الوزن الجاف إلى 59.08 ملغم، أما أقل المعدلات فكانت في التركيب الوراثي طاقة 2 بتركيز 1 مليمول SA وكان 34.41 ملغم.

جدول 3: تأثير التداخل الثلاثي بين التراكيب الوراثية وتراكيز SA (مليمول) ومدة الغمر (دقيقة) في معدل الوزن الطري للكالس بعد أربعة أسابيع من الزراعة علماً أن الوزن الابتدائي للكالس 200 ملغم

التراكيب الوراثية	تراكيز SA (مليمول)	مدة الغمر (دقيقة)		
		30	60	90
طاقة 2	0.0	329.00	324.75	313.75
	0.05	312.25	312.50	449.75
	0.1	345.25	261.25	383.25
	0.5	248.75	338.75	403.75
	1.0	204.25	244.50	264.75
Lee 74	0.0	324.25	313.25	319.25
	0.05	375.50	392.05	456.75
	0.1	332.75	303.00	410.25
	0.5	286.25	295.75	380.25
	1.0	249.50	251.50	248.75
LSD (0.05)	التراكيب الوراثية × التراكيز × مدة الغمر = N.S			

جدول 4: معدل الوزن الجاف للكالس (ملغم) المعامل بتراكيز مختلفة من SA (مليمول) بعد أربعة أسابيع من الزراعة

التراكيب الوراثية	تراكيز SA (مليمول)					المعدل
	0.0	0.05	0.1	0.5	1.0	
طاقة 2	46.66	52.00	47.66	47.75	34.41	45.70
Lee 74	46.16	59.08	50.41	46.41	36.33	47.68
المعدل	46.41	55.54	49.04	47.08	35.37	
LSD (0.05)	التراكيب الوراثية = N.S التراكيز = 3.16 التراكيب الوراثية × التراكيز = N.S					

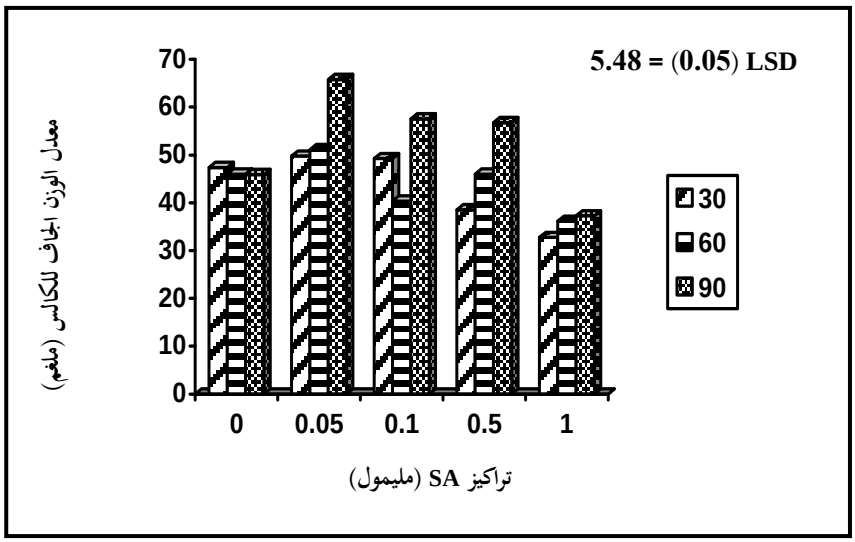
وتوضح النتائج في الجدول (5) تأثير مدة الغمر في محلول SA في معدل الوزن الجاف للكالس إذ تفوقت مدة الغمر 90 دقيقة في محلول SA معنوياً على باقي المدد بلغ فيها معدل الوزن الجاف 52.62 ملغم، أما مدتا الغمر 30 و60 دقيقة فلم تختلفا معنوياً عن بعضهما حيث بلغ معدل الوزن الجاف فيهما 43.52 و 43.92 ملغم على التوالي.

كما لم تظهر تداخلات معنوية بين التراكيب الوراثية ومدة الغمر إلا أن أعلى المعدلات كانت في التركيب الوراثي Lee 74 بمدة الغمر 90 دقيقة حيث وصل المعدل فيها إلى 52.65 ملغم، أما أقلها فكانت في التركيب الوراثي طاقة 2 وبمدة غمر 30 دقيقة إذ بلغ المعدل 41.60 ملغم.

جدول 5: معدل الوزن الجاف للكالس (ملغم) المغمور بمدد مختلفة (دقيقة) في محلول SA بعد أربعة أسابيع من الزراعة

التراكيب الوراثية	مدة الغمر (دقيقة)			المعدل
	30	60	90	
طاقة 2	41.60	42.90	52.60	45.70
Lee 74	45.45	44.95	52.65	47.68
المعدل	43.52	43.92	52.62	
LSD (0.05)	التراكيب الوراثية = N.S مدة الغمر = 2.45 التراكيب الوراثية × مدة الغمر = N.S			

يوضح الشكل (6) تأثير التداخل بين تراكيز SA ومدة الغمر في معدل الوزن الجاف للكالس والذي يبين تفوق معاملة التركيز 0.05 مليمول SA ولمدة 90 دقيقة معنوياً على بقية التداخلات حيث بلغ المعدل 65.76 ملغم، أما أقلها فظهرت في التركيز 1 مليمول SA ولمدة غمر 30 دقيقة بلغت 32.75 ملغم.



شكل 6: تأثير التداخل بين تراكيز SA (مليمول) ومدة الغمر في محلول SA (دقيقة) في معدل الوزن الجاف للكالس بعد أربعة أسابيع من الزراعة

يبين الجدول (6) تأثير التداخل الثلاثي بين التراكيب الوراثية وتراكيز SA ومدة الغمر حيث لم تظهر تداخلات معنوية فيما بينها. ظهر أعلى المعدلات في التركيب الوراثي Lee74 عند التركيز 0.05 مليمول SA في مدة الغمر 90 دقيقة بلغ 66.25 ملغم، أما أقلها فكان في التركيب الوراثي طاقة 2 وفي التركيز 1 مليمول SA ولمدة غمر 30 دقيقة بلغ 29.25 ملغم.

واستناداً إلى ما تم الحصول عليه من نتائج عن معدل الوزن الطري والجاف للكالس فقد عُدَّ التركيز 0.5 مليمول SA هو التركيز الأمثل لمعاملة الكالس وأنه الحد تحت القاتل الذي قد يسمح باستحداث التغايرات التي ربما قد تكون وراثية على اعتبار أن تركيز 1 مليمول SA قد سبب تلون الكالس باللون البني الغامق ومن ثم التدهور والممات، كما عدت مدة الغمر 90 دقيقة هي المدة الأفضل لغمر الكالس في محلول SA لأن زيادتها إلى 120 دقيقة سببت تفتت الكالس عند غسله للتخلص من أثار المادة المطفرة.

إن زيادة معدل الوزن الطري والوزن الجاف للكالس في التراكيز القليلة (0.05 – 0.5) مليمول من SA قد يعزى إلى التأثير التحفيزي لهذه التراكيز في نمو وتطور خلايا وأنسجة الكالس للتركيبين الوراثيين من فول الصويا، أما سبب انخفاض معدل الوزن الطري والجاف للكالس بالتراكيز العالية من SA ربما يعود إلى التأثير الضار لهذا المطفر في تكوين الحامض النووي RNA المسؤول عن عملية بناء البروتين في الخلية (18) أو قد يعود السبب إلى التأثير الضار المباشر وغير المباشر لهذا المطفر بالتراكيز العالية ابتداءً بجزيئات الماء وانتهاءاً بإعاقة عملية بناء البروتين والإضرار الناتجة في الكروموسومات والقواعد النتروجينية مسببة إعاقة نمو وانقسام الخلايا وقد يصل إلى توقفهما (10). إضافة إلى أن التراكيز العالية قد تؤثر كيميائياً في المادة الحية داخل الخلية من خلال تكوين الجذور الحرة والتي تسبب ضرراً بالأغشية الخلوية في العضيات فتزيد من نفاذية الغشاء الخلوي ومن ثم حدوث تسرب لبعض المواد الغذائية والايضية مما يؤدي إلى موت الخلايا (24). كما قد يؤدي هذا المطفر إلى تغيير مستوى فعالية بعض منظمات النمو النباتية المرتبطة بانقسام واستطالة الخلايا مثل (الأوكسينات والسايتوكاينينات والجبريلينات) وبالتالي اضطراب العمليات الأيضية مما يؤثر لاحقاً في النمو وقد يؤدي في النهاية إلى موت الجزء المعامل SA خاصة عند التراكيز العالية (31).

وهذه النتائج تتفق مع **Odeigah** وجماعته (**23**) في محصول اللوبياء و**Montalvan** و**Ando** (**20**) في محصول الرز و**Hajduch** وجماعته (**15**) في محصول فول الصويا الذين استخدموا مطفر **SA** ووجدوا له تأثيرات ايجابية فسيولوجية في المؤشرات المدروسة لكل محصول.

جدول **6**: تأثير التداخل الثلاثي بين التراكيب الوراثية وتراكيز **SA** (مليمول) ومدة الغمر (دقيقة) في معدل الوزن الجاف للكالس بعد أربعة أسابيع من الزراعة

التراكيب الوراثية	تراكيز **SA** (مليمول)	مدة الغمر (دقيقة)		
		30	60	90
طاقة 2	0.0	47.75	47.00	45.25
	0.05	45.25	45.50	65.25
	0.1	50.00	37.50	55.50
	0.5	35.75	49.00	58.50
	1.0	29.25	35.50	38.50
Lee 74	0.0	47.00	45.00	46.50
	0.05	54.25	56.75	66.25
	0.1	48.50	43.25	59.50
	0.5	41.25	43.00	55.00
	1.0	36.25	36.75	36.00
LSD (0.05)	التراكيب الوراثية × التراكيز × مدة الغمر = N.S			

تأثير SA في قابلية الكالس على تحمل الملوحة

يوضح الجدول (7) تأثير **SA** في قابلية الكالس المستحدث من الفلقة للتركيبين الوراثيين من فول الصويا لتحمل الملوحة بعد إعادة زراعته على المستويات الملحية **0 –250** مليمول من الخليط الملحي، فقد عدَّ معدل الزيادة بالوزن الطري للكالس المعامل **0.5** مليمول **SA** كمؤشر لتحمل الملوحة وتبين النتائج عدم وجود فروق معنوية بين التركيبين الوراثيين طاقة **2** و **Lee74** إذ بلغت الزيادة في معدل الوزن الطري للكالس **98.73** و **101.86** ملغم على التوالي.

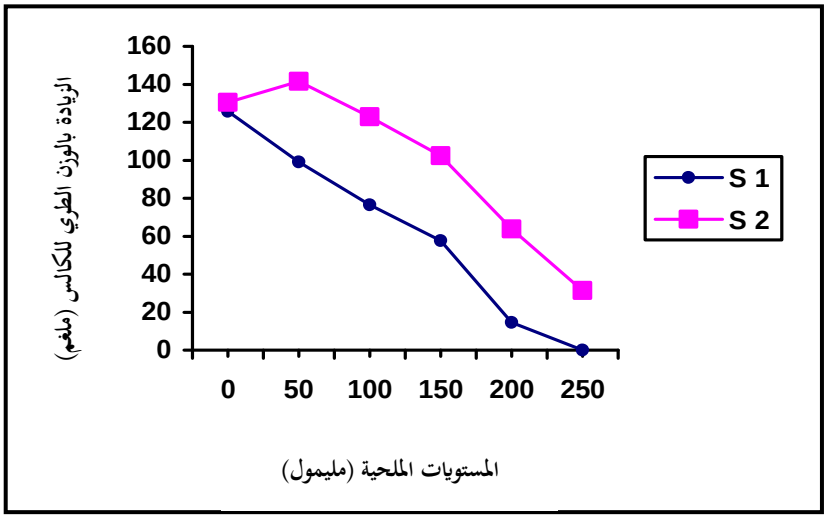
كما تبين النتائج في الجدول نفسه تفوق معاملة **50** مليمول من الخليط الملحي معنوياً على المستويات الملحية الأخرى حيث بلغ معدل الزيادة بالوزن **141.80** ملغم ثم بدأت بالانخفاض بزيادة المستويات الملحية غير أن معاملة **100** مليمول من الخليط الملحي التي أعطت معدل زيادة **126.10** ملغم لم تختلف معنوياً عن معاملة المحايد التي أعطت **125.00** ملغم، أما أقل معدل زيادة بالوزن فكان في معاملة **250** مليمول من الخليط الملحي والتي أعطت معدل زيادة وزن **37.20** ملغم.

كما ظهرت تداخلات معنوية بين التراكيب الوراثية والمستويات الملحية حيث أعطى التركيب الوراثي **Lee74** في معاملة **50** مليمول من الخليط الملحي أعلى معدل زيادة بالوزن الطري للكالس بلغ **142.00** ملغم واختلفت عن جميع التداخلات الأخرى عدا معاملة **50** مليمول من الخليط الملحي للتركيب الوراثي طاقة **2** إذ بلغ المعدل **141.60** ملغم، أما أقل المعدلات فكان في التركيب الوراثي طاقة **2** في معاملة **250** مليمول خليط ملحي معطياً معدل زيادة وزن **31.40** ملغم.

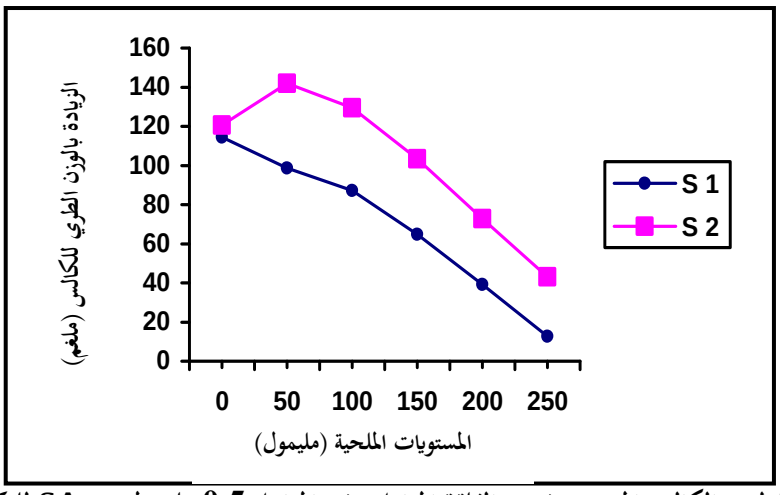
جدول 7: معدل الزيادة في الوزن الطري للكالس (ملغم) المستحدث من الفلقة والمعامل 0.5 مليمول SA، بعد أربعة أسابيع من الزراعة على المستويات الملحية المختلفة

التراكيب الوراثية	المستويات الملحية (مليمول)						المعدل
	0	50	100	150	200	250	
طاقة 2	130.40	141.60	122.80	102.40	63.80	31.40	98.73
Lee 74	120.60	142.00	129.40	103.40	72.80	43.00	101.81
المعدل	125.50	141.80	126.10	102.90	68.30	37.20	–
LSD (0.05)	التراكيب الوراثية = N.S المستويات الملحية = 6.00 التراكيب الوراثية × المستويات الملحية = 8.49						

يوضح الشكلان (7 و8) منحنيي التثبيط في نمو الكالس المستحدث من الفلقة والمعامل 0.5 مليمول من SA لكل تركيب وراثي بعد زراعته على المستويات الملحية 0 – 250 مليمول حيث يظهر الشكلان الفرق في معدل الزيادة بالوزن للكالس المعامل وغير المعامل SA بعد أربعة أسابيع من الزراعة.



شكل 7: منحنيا التثبيط لنمو الكالس المستحدث من الفلقة المعامل وغير المعامل 0.5 مليمول من SA للتركيب الوراثي طاقة 2 والمزروع على مستويات ملحية مختلفة: S 1 = منحنى التثبيط في نمو الكالس غير المعامل SA
S 2 = منحنى التثبيط في نمو الكالس المعامل SA



شكل 8: منحنيا التثبيط لنمو الكالس المستحدث من الفلقة المعامل وغير المعامل 0.5 مليمول من SA للتركيب الوراثي Lee74 والمزروع على مستويات ملحية مختلفة. S1=منحنى التثبيط في نمو الكالس غير المعامل SA
S 2 = منحنى التثبيط في نمو الكالس المعامل SA

يوضح الجدول (8) تأثير SA (0.5 مليمول) في معدل الزيادة بالوزن الطري للكالس المستحدث من الجنين والمزروع على مستويات ملحية 0 – 250 مليمول من الخليط الملحي حيث يتضح من الجدول عدم وجود فروق معنوية بين التركيبين الوراثيين طاقة 2 وLee 74 إذ بلغ معدل الزيادة بالوزن 84.26 و 81.86 ملغم على التوالي.

كما توضح النتائج في الجدول نفسه تأثير المستويات الملحية في معدل الزيادة بالوزن الطري للكالس إذ أعطت معاملة 50 مليمول أعلى معدل للزيادة بلغ 117.60 ملغم واختلف معنوياً عن المستويات الملحية الأخرى ولم تختلف عن معاملة المحايد التي بلغ معدل الزيادة فيها 112.50 ملغم وكانت أقل المعدلات في المستوى الملحي 250 مليمول حيث بلغ معدل الزيادة بالوزن فيه 25.40 ملغم.

جدول 8: معدل الزيادة في الوزن الطري للكالس (ملغم) المستحدث من الجنين والمعامل 0.5 مليمول SA، بعد أربعة أسابيع من الزراعة على المستويات الملحية المختلفة

التراكيب الوراثية	المستويات الملحية (مليمول)						المعدل
	0	50	100	150	200	250	
طاقة 2	121.00	123.20	104.60	82.00	52.40	22.40	84.26
Lee 74	104.00	112.00	105.20	86.20	55.40	28.40	81.86
المعدل	112.50	117.60	104.90	84.10	53.90	25.40	
LSD (0.05)	التراكيب الوراثية = N.S المستويات الملحية = 6.18 التراكيب الوراثية × المستويات الملحية = 8.74						

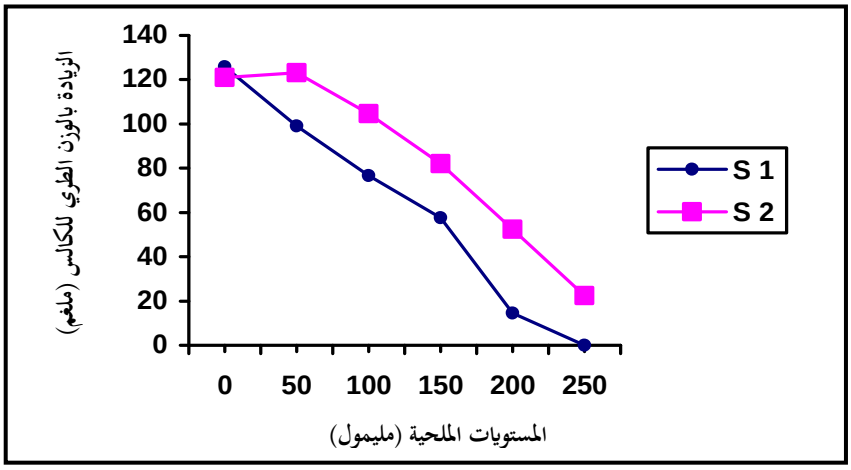
كما ظهرت تداخلات معنوية بين التراكيب الوراثية ومستويات الملوحة في معدل الزيادة بالوزن الطري للكالس المستحدث من الجنين وتفوق التركيب الوراثي طاقة 2 بمستوى الملوحة 50 مليمول معنوياً على التداخلات الأخرى عدا معاملة المحايد للتركيب الوراثي نفسه إذ بلغ معدل الزيادة 123.20 و121.00 ملغم على التوالي. أما أقل المعدلات فكانت في التركيبين الوراثيين طاقة 2 و Lee74 بالمستوى الملحي 250 مليمول بلغت معدلاتهما 22.40 و28.40 ملغم على التوالي ولم يختلفا معنوياً عن بعضهما.

يوضح الشكلان (9 و10) منحنيي التثبيط في نمو الكالس المستحدث من الجنين والمعامل 0.5 مليمول SA لكل تركيب وراثي بعد زراعته على مستويات ملحية مختلفة 0 –250 مليمول حيث يوضح الشكلان الفرق في معدل الزيادة في وزن الكالس المعامل وغير المعامل SA (0.5 مليمول) بعد أربعة أسابيع من الزراعة.

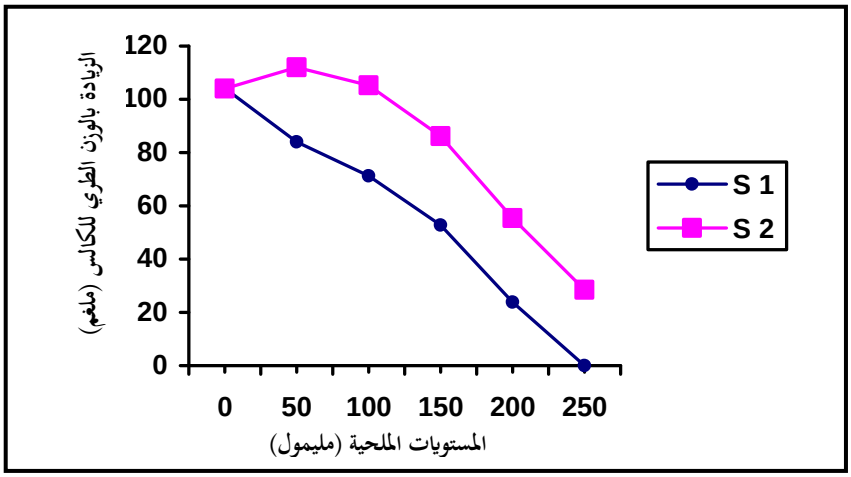
يتضح مما تقدم أن قابلية الكالس على تحمل الملوحة قد ازدادت بعد معاملته 0.5 مليمول من SA بشكل واضح. قد يعزى هذا إلى ظهور تغايرات قسم منها متحملة للملوحة خاصة في المستويات الملحية الواطئة وهذا يفسر لنا سبب تفوق الزيادة في معدل الوزن الطري للكالس في المستوى الملحي 50 مليمول معنوياً على باقي المستويات الملحية (جدول 7 و 8). لذا يمكن أن يكون SA مسؤولاً عن التأثير في الجينات المرتبطة بعملية النمو حيث ينعكس هذا التأثير على فعالية ونشاط الأنزيمات التي لها علاقة بالانقسام الخلوي واستطالة الخلايا وذلك يعتمد في شدة قوته على تركيز SA وطريقة المعاملة به (26). إن استخدام SA كمطفر معروف للحصول على خلايا طافرة ذات نسبة إنبات عالية وصفات جيدة من حيث أطوال النباتات وعدد القرنات في اللوبيا (23)، عدد البذور ومعدل عدد التفرعات ومعدل وزن مائة حبة في فول الصويا (15)، أطوال النباتات في الشعير (24).

تأثير SA والملوحة في نمو الكالس

يوضح الجدول (9) تأثير معاملة الكالس 0.5 مليمول SA أو 200 مليمول من الخليط الملحي أو كليهما في معدل الوزن الطري للكالس، ويتضح من الجدول عدم وجود فروق معنوية بين التركيبين الوراثيين طاقة 2 وLee74 إذ بلغت معدلات الوزن الطري فيهما 283.81 و 287.87 ملغم على التوالي.



شكل 9: منحنيا التثبيط لنمو الكالس المستحدث من الجنين المعامل وغير المعامل 0.5 مليمول من SA للتركيب الوراثي طاقة 2 والمزروع على مستويات ملحية مختلفة: S1=منحنى التثبيط في نمو الكالس غير المعامل SA.
S 2 = منحنى التثبيط في نمو الكالس المعامل SA.



شكل 10: منحنيا التثبيط لنمو الكالس المستحدث من الجنين المعامل وغير المعامل 0.5 مليمول من SA للتركيب الوراثي Lee74 والمزروع على مستويات ملحية مختلفة: S1=منحنى التثبيط في نمو الكالس غير المعامل SA
S 2 = منحنى التثبيط في نمو الكالس المعامل SA

جدول 9: تأثير معاملة الكالس 0.5 مليمول SA، 200 مليمول من الخليط الملحي، أو كليهما في معدل الوزن الطري للكالس للتركيبين الوراثيين طاقة 2 و Lee74 بعد أربعة أسابيع من الزراعة

التراكيب الوراثية	المعاملات				المعدل
	المحايد	0.5 مليمول SA لوحده	200 مليمول الخليط الملحي لوحده	0.5 مليمول SA + 200 مليمول خليط ملحي	
طاقة 2	323.25	330.25	220.75	261.00	283.81
Lee 74	319.25	320.00	242.00	270.25	287.87
المعدل	321.25	325.12	231.37	265.62	-
LSD (0.05)	التراكيب الوراثية = N.S المعاملات = 12.56 التراكيب الوراثية × المعاملات = N.S				

وتظهر النتائج تفوق معاملة استخدام 0.5 مليمول من SA لوحده معنوياً على باقي المعاملات إذ بلغ معدل الوزن الطري 325.12 ملغم لكنها لم تختلف معنوياً عن معاملة المحايد التي أعطت معدل وزن 321.25 ملغم، أما أقل

المعدلات فكان في المعاملة بالمستوى الملحي **200** مليمول والتي أعطت أقل معدل وزن بلغ **231.37** ملغم. ولم تظهر تداخلات معنوية بين التراكيب الوراثية والمعاملات المختلفة إلاّ أن أعلى المعدلات تحقق في التركيب الوراثي طاقة **2** المعامل **0.5** مليمول **SA** منفرداً حيث بلغ المعدل **330.025** ملغم، أما اقل المعدلات فكان في التركيب الوراثي طاقة **2** في المستوى الملحي **200** مليمول وصل إلى **220.75** ملغم. كما يوضح الجدول (**10**) تأثير معاملة الكالس **0.5** مليمول **SA** أو **200** مليمول من الخليط الملحي أو كليهما في معدل الوزن الجاف للكالس.

جدول **10**: تأثير معاملة الكالس **0.5** مليمول **SA**، **200** مليمول من الخليط الملحي، أو كليهما في معدل الوزن الجاف للكالس للتركيبين الوراثيين طاقة **2** و**Lee74** بعد أربعة أسابيع من الزراعة

التراكيب الوراثية	المعاملات				المعدل
	المحايد	**0.5** مليمول **SA** لوحده	**200** مليمول الخليط الملحي لوحده	**0.5** مليمول **SA** + **200** مليمول خليط ملحي	
طاقة **2**	**46.75**	**48.25**	**32.00**	**37.75**	**41.18**
Lee 74	**46.50**	**47.00**	**35.25**	**39.25**	**42.00**
المعدل	**46.62**	**47.62**	**33.62**	**38.50**	
LSD (0.05)	التراكيب الوراثية = **N.S** المعاملات = **1.82** التراكيب الوراثية × المعاملات = **N.S**				

يظهر من النتائج السابقة عدم وجود فروق معنوية بين التركيبين الوراثيين قيد الدراسة إذ بلغ المعدل **41.18** ملغم للتركيب الوراثي طاقة **2** و **42.00** ملغم للتركيب الوراثي **Lee74**.

كما تبين النتائج تفوق معاملة **0.5** مليمول من **SA** لوحده معنوياً على بقية المعاملات عدا معاملة المحايد والتي بلغ معدل الوزن الجاف فيها **47.62** و **46.62** ملغم على التوالي، وأقل معدل للوزن الجاف كان عند إضافة **200** مليمول من الخليط الملحي فقط حيث بلغ معدل الوزن الجاف فيه **33.62** ملغم.

كما تظهر النتائج عدم وجود تداخلات معنوية بين التراكيب الوراثية والمعاملات المختلفة إلاّ أن أعلى المعدلات كان في التركيب الوراثي طاقة **2** والمعامل **0.5** مليمول **SA** لوحده إذ بلغ المعدل **48.25** ملغم كما أن أقل معدل للوزن الجاف ظهر في التركيب الوراثي طاقة **2** وفي معاملة **200** مليمول من الخليط الملحي بلغ **32.00** ملغم.

واستناداً إلى النتائج أعلاه للوزن الطري والجاف للكالس، يتضح تفوق معاملة **SA** لوحده معنوياً على المعاملات الأخرى لكنها لم تختلف عن معاملة المحايد وهذا يفسر بان الزيادة التي حدثت عند اختبار الكالس على مستويات ملحية (**0 –250**) مليمول بعد معاملته **SA** (الأشكال **7**، **8**، **9**، **10**) لم تكن نتيجة تأثير تحفيزي **SA** فقط وان الزيادة المتحصل عليها في الوزن الطري من اختبار الكالس (المعامل **SA**) والمزروع على مستويات ملحية ربما يكون نتيجة حدوث تغايرات أدت إلى الحصول على خلايا ذات قابلية أعلى لتحمل الملوحة، وهذا ما يؤكده تفوق المعاملة **SA** مع الملوحة معاً والتي أعطت معدل وزن اختلف معنوياً عن معاملة الملوحة منفردة (جدول **9** و **10**). أو قد تكون هذه الزيادة في الوزن الطري ناتجة عن حدوث تغايرات جسمانية (**Somaclonal variation**) جراء عمليات أعادة الزراعة المتكررة للكالس، وهذه ما أكده **Basu** وجماعته (**8**) و **Jain** (**17**) من أن أعادة زراعة الكالس لعدة مرات يمكن أن تصبح مصدراً مهماً للتغايرات الوراثية باتجاه تحمل الملوحة أو تحسين صفات النبات.

المصادر

1- الجبوري، عبد الجاسم محيسن؛ علي عبد الأمير الصالحي؛ هاشم كاظم محمد العبيدي؛ أخلاص عبد الكريم الكعبي ومحمد أحمد كريم وقاسم محمد زامل (**2001**). تربية الحنطة ***Triticum aestivum*** لتحمل الملوحة باستخدام تقنية زراعة الأنسجة وأشعة كاما. مجلة أبحاث التقانة الحيوية، **3** (**2**): **5 – 21**.

2- المهداوي، حسين عبيد خضير (1999). تأثير التداخل الوراثي والبيئي في الحاصل ومكوناته وبعض الصفات الأخرى لحصول فول الصويا. أطروحة دكتوراه – كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

3- المنظمة العربية للتنمية الزراعية (2000). الكتاب السنوي للإحصاءات الزراعية العربية، 20.

4- الساهوكي، مدحت مجيد (1991). فول الصويا إنتاجه وتحسينه. كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

5- التكريتي، شذى عايد يوسف (2002). تقويم وإخلاف نباتات الرز المتحملة للملوحة باستخدام تقانات مختلفة. أطروحة دكتوراه– كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

6- عبد العال، زيدان السيد (2000). ثورة الهندسة الوراثية. كلية الزراعة– جامعة الإسكندرية، جمهورية مصر العربية.

7- **Arora, S. K. (1983). Chemistry and Biochemistry of Legumes. 1st ed. Edward Arnold Limited, 121–122.**

8- **Basu, S.; G. Gangopadhyay; B. Mukherjec and S. Gupta (1997). Plant regeneration of salt adapted callus of Indica rice (var. Basmati 370) in saline conditions. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 50:153–159.**

9- **Bernstein, I. and H. E. Hayward (1964). Effect of salinity on mineral composition and growth of plant. Plant Anal. Fert. Probl. Collog, 4: 25 – 45. (cited by Levitt, 1980, p:372).**

10- **Britt, A. B. (1999). Molecular genetics of DNA repair in higher plants. Trends. Plant Sci., 4 (1): 20 – 25.**

11- **Buringh, P. (1960). Soils and Soil Conditions in Iraq. Ministry of Agriculture. Baghdad. Neenman and Zonen Press, Netherlands.**

12- **Collin, H. A.; F. M. Burton; K. M. Ibrahim and J. C. Collins (1990). Transmission of salt tolerance from tissue culture to seed progeny in *Coleus blumei*. International Association for Plant Tissue Culture. Abstracts VIIth. International Congress on Plant Tissue and Cell Culture.**

13- **Croughan, T. P.; S. J. Stavarek and D. W. Rains (1981). *In vitro* development of salt resistant plants. Environ. Exp. Bot. 21: 317– 324.**

14- **Gianessi, L. P. and J. E. Carpenter (2000). Agricultural Biotechnology: Benefits of Transgenic soybeans. National Center for Food and Agricultural Policy. Washington. USA.**

15- **Hajduch, M. F.; F. Dobro; B. Bhmov and A. Pietov (1999). Effect of different mutagenic treatments on morphological trait of M2 generation of soybean. Soybean Genetics Newsletter. 26 [Online Journal]. URL.**

16- **Ibrahim, K. M.; J. C. Collins and H. A. Collin (1990). *In vitro* selection using regenerating cultures of *Coleus blumei*. International Association for Plant Tissue Culture. Abstract VIIth. International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, Holland.**

17- **Jain, S. M. (2001). Tissue culture– derived variation in crop improvement. Euphytica, 118:153 –166.**

18- **Maliga, P. (1980). Resistant mutants and their use in genetic manipulation. Int. Rev. Cyt. Suppl., 11: 381 – 392.**

19- **Mirodjagh, S. S. and A. Arzani (1999). Assessment of durum wheat (*Triticum turgidum* Var. durum) cultivars for *in vitro* salt tolerance. J. Genetic Studies, 2: 185.**

20- **Montalvan, B. and A. Ando (1998). Effect of gamma–radiation and sodium azide on quantitative characters in rice (*Oryza sativa* L.). Genet. Mol. Biol., 21(1): Saopaulo.**

21- **Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Physiol. Plant, 15: 473 – 497.**

22- Novak, F. (1991). *In vitro* mutation system for crop improvement. 327 – 342. In Plant Mutation Breeding for Crop Improvement, 2. IAEA. Vienna.

23- Odeigah, P. G. C.; A. O. Osanginpeju and G. O. Myers (1998). Induced mutations in cowpea *Vigna unguiculata* (Leguminous): Dept. of Agronomy. M. B. Sturgis Hall. Louisiana State Univ. Baton Rouge. LA. 70803, USA.

24- Pearson, O. W.; R. A. Nilan and C. Sander (2002). The effect of sodium azide on the cell cycle of the embryonic barley shoot. Program in genetics, D. of Agronomy and Soils, Washington State Univ. Pullman, Washington 99163. USA.

25- Piqueras, A. and E. Hellin (1990). Selection of salt tolerant embryogenic callus line of *Citrus limonum*. International Association for Plant Tissue Culture. Abstracts VIIth. International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam. Holland.

26- Prasad, G. (2003). Increased frequency and wider spectrum of mutation induced by presoaking and combined mutagen treatments in barley. BGN. 17: 1 – 3.

27- Rains, D. W. (1979). Salt transport by plants in relation to salinity. Ann. Rev. Plant Physiol, 23: 367–388.

28- Rains, D. W.; T. P. Croughan and S. J. Stavarek (1980). Selection of salt – tolerant plants using tissue culture. In: Rains, D. W.; R. C. Valentine and A. Hollaender. Genetic Engineering of Osmoregulation. Plenum Press New York, 279 – 292.

29- Sesek, S. and K. Ankica (1997). Use of callus culture in selection of wheat genotypes tolerant to high salt (NaCl) concentrations. Selekcija Isemenarstvo, Vol. IV. Broj 1 – 2. STR. 55 – 59. Novisal.

30- Steel, R. C. and J. Torrie (1980). Principles and procedures of statistics. McGraw – Hill Book Comp.

31- Van Harten, A. M.; C. J. J. M. Raemakers; E. Jacobsen and G. Y. P. Klu (2004). Direct organogenesis and somatic embryogenesis in mature cotyledon explant of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) DC1 using cytokinine – based media. Plant Genetic Resources. News Letter Issue, (131): 63 – 69.

EFFECT OF SODIUM AZIDE ON THE ABILITY OF *Glycine Max* L. CALLUS TO SALT TOLERANCE *In Vitro*

K. M. Ibrahim* H. K. M. Al–Aubaidi S. H. Mahmod****

ABSTRACT

Cotyledons and embryos excised from mature seeds of two soybean (*Glycine max* L.) varieties Taka 2 and Lee 74 were cultured on modified (MS) medium supplemented with different growth regulators for callus initiation.

Callus was then exposed to different concentrations of salt mixtures, namely NaCl, $CaCl_2$ and $MgCl_2$ in a ratio of 2:2:1 at concentrations of 0, 50, 100, 150, 200 or 250 mM added to the culture medium. Callus cultures were exposed to the chemical mutagene Sodium Azide (SA) at concentrations 0, 0.05, 0.5 or 1 mM for 30, 60, 90 or 120 min. Results showed no significant differences between the two *varieties* in their response to SA. The treatment with SA led to an increase in fresh and dry weight of the callus at (0.05 and 0.5 mM) compared with untreated one.

Treatment with 1 mM was considered as a lethal and 0.5 mM as a sub lethal, therefore the later was adopted to generate variation for a period of 90 minutes. Exposure of callus for 120 minutes resulted in a very friable callus. Callus cultures treated with 0.5 mM of SA for 90 minutes were cultured on modified MS medium containing (0 – 250) mM salt mixtures. Results showed that salt tolerance in callus cultures increased as expressed in callus fresh weight compared with the untreated callus. In a separate experiment, callus cultures were treated with (0 or 0.5) mM of SA for 90 minutes, then grown on MS medium supplemented with (200) mM of salt mixture. Results revealed that fresh and dry weight of calli were higher in SA treated cultures only. SA treated callus combined with salinity treatment was significantly higher than those treated with salinity only.

Part of Ph.D thesis of the second author.

*** College of Sci., Al-Nahrain Univ., Baghdad, Iraq.**

****College of Sci., Al-Mustansiriya Univ., Baghdad, Iraq.**