استخدام بعض منظمات النمو في استحداث وتمايز الكالس لإعادة تكوين نباتات القديفة القزمية cv.nana *Tagetes patula*

٢- تمايز الكالس وتكوين الأفرع الخضرية

قاسم محمود الحمداني
قسم المحاصيل/كلية الزراعة والغابات/جامعة الموصل

الخلاصة

أظهرت هذه الدراسة قابلية كالس نباتات القديفة القزمية *T. patula cv.nana* على التمايز وتكوين النباتات على الأوساط المعقمة خارج الجسم الحي بمرحلة واحدة وبمرحلتين, فقد أمكن الحصول على التمايز العضوي للأفرع الخضرية بطريقتين , الأولى من التمايز المباشر للكالس المستحدث على وسط MS المدعم بـ ٥ ملغم\لتر لكل من BA و IAA بعد ٢٣ يوم من الزراعة , والطريقة الثانية من التمايز غير المباشر على وسط MS المزود بـ ٣ ملغم/لتر BA مع NAA بتركيز ٠,٥ ملغم\لتر , حيث ظهرت الأفرع الخضرية بعد (٤-٦)أيام من نقل الكالس الناتج من المرحلة الأولى وهو بعمر ٢١ يوم إلى نفس الوسط أو نقله إلى وسط MS المحتوي ٥ ملغم\لتر BA مع ٠,١ملغم/لتر 2,4-D . وتم تجذير الأفرع الناتجة في وسط MS الخالي على ٠,٥ ملغم /لتر من NAA . وأقلمت النباتات الناتجة من كالس الأوراق وكانت بنسبة ٨٧% , وعندما نقلت إلى الحقل أظهرت نموا سريعا ومتفوقا على النباتات الناتجة من البذور في مراحل نموها الأولى .

المقدمة

ذكر عدد من الباحثين منهم Ketel (١٩٨٦) أن استحداث الكالس وتمايزه يتباين بشكل كبير ضمن أنواع جنس القديفة، و وضح أن التمايز المورفولوجي لأنواع القديفة : *T.erecta* و *T. patula* و *T. minuta* في الأوساط الزراعية Hoagland و BMN (Breteler) واخرون١٩٧٩) ووسط Steiner اظهر فروقاً معنوية في قابلية تمايز الكالس المشتق من الأنواع المذكورة. فقد اظهر كالس النوع *T.erecta* تفوقاً في تمايزه على وسط Hoagland بلغ ٦٣%، بينما لم يظهر كالس الأنواع الأخرى تمايزاً ملحوظاً في الأوساط المختبرة. وبين Misra و Datta (٢٠٠١) أن النوع الأفريقي *Tagetes erecta* كان أكثر الأنواع استجابة للإكثار السريع مقارنة بالأنواع الأخرى، حيث تمكنت قطع أوراق هذا النوع من تكوين مزارع الكالس والتمايز مباشرة لتكوين الأفرع الخضرية في وسط MS المدعم بـ ٤,٤٤ مايكرومولر(BA(muM مع ٢,٨٥ muM من IAA وكذلك في وسط MS المدعم بنفس التركيز من BA مع الجبرلين(GA_3) بتركيز ١٤,٤٣ muM (٥ملغم\لتر) , وأوضح الباحثان أن الجبرلين لعب دورا فعالا في ظهور الأفرع وأشارا إلى احتمال أن يعمل الجبرلين كبديل عن الاوكسين وان نسبته إلى السايتوكاينين مهمة لتحفيز الأفرع الخضرية بصورة مباشرة .

فيما أشار Ziv (١٩٩١) وDebergh وآخرون (١٩٩٢) أن التوازن الهورموني بين BA و IAA كان مهما لتحفيز نشوء الأفرع وان زيادة تركيز BA شجعت التكوين الجنيني embryogenesis ولكن بدون زيادة عدد الأفرع الخضرية . وتوافق Mohamed واخرون (٢٠٠٠) من إنتاج نباتات القديفة *T. minuta* من تمايز كالس الأوراق الفلقية في وسط MS المحتوي على المانيتول مع ٣ ملغم/ لتر IAA و١٠ ملغم/لتر من BA. وتمكن الحمداني (٢٠٠٥) من الحصول على نباتات القديفة *Tagetes patula* من التمايز المباشر لكالس قطع الأوراق والأوراق الفلقية على وسط MS المحتوي على٥ ملغم/لتر لكل من BA و IAA . تناولت دراستنا في هذا البحث استخدام مدى واسع من منظمات النمو لغرض استحداث الكالس وتمايزه لإعادة تكوين نباتات القديفة القزمية الصنف *Tagetes patula* cv. nana بالزراعة النسيجية والتي تمتاز بأنها ذات أطوال قصيرة لا تتجاوز ٣٠ سم والأزهار بنية اللون تظهر مبكرة .

تاريخ تسلم البحث ١٧ / ١٢/ ٢٠٠٧ وقبوله ١٨ / ٣ / ٢٠٠٩

مواد البحث وطرائقه

تحضير أوساط الزراعة : حضر وسط MS (Murashige و Skoog, ١٩٦٢) بإذابة المكونات الداخلة في تركيبه إذابة تامة في حجم من الماء المقطر وأضيف الاكار بمقدار ٧ غم/لتر لتصليب الوسط وعوض السكروز من ٣٠ غم/لتر إلى تركيز ٢٠ غم/ لتر (Ketel , ١٩٨٦) وضبط الـ pH في حدود ٥,٨-٥,٩ ,

وعقم الوسط الغذائي بعد إضافة منظمات النمو باستخدام جهاز الضغط البخاري Autoclave . وقد اعتمد هذا الوسط في زراعة الكالس لغرض التمايز والحصول على نباتات القديفة , وهو يوسط MS بنصف قوته التركيبية الحاوية ١٠ غرام/لتر سكروز لاستخدامه في زراعة البذور وإنتاج البادرات المعقمة.

إنتاج البادرات المعقمة : استخدم القاصر التجاري Fas الحاوي على ٦% من هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl في تعقيم بذور القديفة Marigold (*Tagetes patula* cv.nana) والمنتجة من قبل شركة (Ed Hume Seed, Inc. Puyallup. U.S.A).

بتعقيم البذور بنسبة ١ : ١ حجم ماء: حجم هايبو (أي بتركيز ٣%) لمدة ١٥ و٢٠ دقيقة ، ثم غسلت البذور بالماء المعقم ثلاث مرات ٥ دقائق/مرة لإزالة آثار المادة المعقمة ثم نشرت البذور على ورق ترشيح معقم للتخلص من الماء الفائض عنها. نقلت البذور المعقمة بملقط معقم إلى أنابيب اختبار سعة ١٠٠ مل تحتوي ١٥ مل من وسط MS طالب بنصف قوته التركيبية وبمعدل ٣ بذور/ أنبوبة. غطيت الأنابيب بأغطيتها وحفظت في ظروف ظلام تام لمدة ثلاثة أيام وبدرجة حرارة ٢٥±٢°م، بعدها نقلت البادرات الناتجة إلى ظروف ١٦ ساعة ضوء/ ٨ ساعة ظلام وفي شدة إضاءة ٢٠٠٠ لوكس في غرفة النمو.

كافة عمليات التعقيم سواء للبذور أو القطع النباتية وعمليات نقلها ونقل الكالس تمت في ظروف معقمة باستخدام كابينة الزرع ذات الأجواء المعقمة Laminar airflow cabinet .

تمايز الكالس لتكوين الأفرع الخضرية: تضمنت عملية التمايز وضع قطع من الكالس المستحصل بوزن ١غم/قطعة، وكذلك وضع قطع من أجزاء النبات (الأوراق والسيقان) على أوساط التمايز المشتملة على MS المدعم بالتداخلات المشتركة بين BA مع الاوكسينات كل من؛ نفثالين حامض الخليك (NAA) و ثنائي كلورو فينوكسي حامض ألخليك (2,4-D) واندول حامض ألخليك(IAA) بالتراكيز التالية :

تداخل BA بالتراكيز: صفر ، ١,٠ ، ٢,٠ ، ٣,٠ ، ٤,٠ ، ٥,٠ ملغم/لتر مع كل من الاوكسينين NAA و2,4-D بالتراكيز: صفر , ٠,٠٥ ، ٠,١ ، ٠,٥ ملغم/ لتر. ومع الاوكسين IAA بالتراكيز: ٠,٣ ، ٠,٤ و٠,٥ ملغم / لتر . حفظت العينات المزروعة على هذه الأوساط في ظروف غرفة النمو بدرجة حرارة ٢٥±٢°م وشدة إضاءة ١٥٠٠ لوكس وبتعاقب يومي ١٦ ساعة ضوء/ ٨ ساعة ظلام.

تجذير الأفرع الخضرية : نقلت الأفرع الخضرية المتكونة على الكالس بعد ٢-٣ أسبوع من ظهورها وبطول ٢-٤ سم وتحتوي على عدد من الأوراق ثم غرست وضعت قائم في وسط التجذير المكون من نصف وسط MS الطالب والمدعم بإضافة NAA وحفظت في ظروف التحضين المشار إليها في الفقرة السابقة , وتم متابعة نمو الأفرع وتسجيل القياسات التالية : عدد الأفرع المنقولة للتجذير , عدد الأفرع المكونة للجذور, , نسبة تجذير الأفرع ومدة التجذير(يوم) .

أقلمة النباتات الناتجة من الكالس ونقلها للتربة : عند بلوغ النبيتات المتكونة طول ٤-٥ سم واحتوائها على ٣-٥ أوراق بعد ٢-٣ أسابيع من تجذيرها أزيلت من الوسط الغذائي وغسلت جذورها جيداً بالماء المعقم للتخلص من بقايا الوسط الغذائي ثم غرست في تربة رملية معقمة ومغسولة بالماء المعقم ، وغطيت بأكياس نايلون مثقبة لمدة ٧ أيام، بعدئذ رفعت الأكياس عنها لتستمر بالنمو في ظروف غرفة الزرع بدرجة حرارة ٢٥±٢°م وشدة إضاءة ٢٠٠٠ لوكس، وبعد ٣ أسابيع نقلت إلى الحقل وتم متابعة نمو هذه النباتات وتسجيل القياسات التالية : عدد النبيتات المنقولة إلى التربة , عدد النباتات المتأقلمة ونسبة النباتات المتأقلمة .

مقارنة الخصائص المظهرية للنباتات الناتجة : تم دراسة بعض الصفات المظهرية للنباتات الناتجة من الكالس ومقارنتها مع صفات النباتات الناتجة من البذور وقد شملت القياسات كل من : ارتفاع النبات (سم) , عدد الأوراق / نبات , عدد السلاميات, وعدد الأفرع / نبات , طول الأفرع (سم) فترة ظهور أول فرع (يوم). واستخدم التصميم العشوائي الكامل في تحليل النتائج (الراوي , ١٩٨٠)

النتائج والمناقشة

تمايز الكالس لتكوين الأفرع الخضرية : أظهرت النتائج قابلية أوراق وسيقان نباتات القديفة القزمية *Tagetes patula* cv.nana على تكوين الأفرع الخضرية من تمايز الكالس بصورة مباشرة وغير مباشرة , وقد امتازت الأوراق بقابلية استجابة أفضل من السيقان في توليد الأفرع الخضرية وقد تولدت الأفرع الخضرية بصورة مباشرة من الكالس الناشئ على القطع النباتية بعد ٢٣ يوم من استحداثه في وسط النمو والتمايز المكون من وسط MS المدعم بتداخل الـ BA مع الاوكسين IAA بتركيز ٠,٥ ملغم/ لتر لكل منهما والذي أعطى أعلى استجابة لتكوين الأفرع الخضرية بلغت ٦٥% وبمعدل ٣ أفرع لكل قطعة من الأوراق

وتم الحصول على ٣٦ فرع من ١٣ قطعة مستجيبة ,لكن هذا التداخل لم يكن فعالا لتكوين الأفرع من قطع الساق حيث انخفضت الاستجابة إلى أقصاها (١٠%) .(الجدول ١)

ا لجدول(١): قابلية تمايز كالس أوراق وسيقان نباتات القديفة القزمية *T. patula* nana على وسط MS

الجزء النباتي	تداخل منظمات النمو في وسط MS(ملغم/لتر)	العدد الكلي للقطع المختبرة	العدد الكلي للقطع المستجيبة	القطع المستجيبة %	العدد الكلي للأفرع المتكونة	معدل عدد الأفرع / قطعة	مدة نشوء الأفرع ومرحلة تكونها (يوم)
الأوراق	NAA٠,٥+BA٣	٢٠	١٢ أب	٦٠ ب	٣٦,٠ب	٣ أ	٢٦ب ج 2SR(٢١+٥)
	2,4-D٠,٠٥+BA٤	٢٠	٠,٠ و	٠,٠ ح	٠,٠ ز	٠,٠ج	٠,٠ و
	2,4-D٠.١+BA٥	٢٠	١١ب	٥٥ ج	٢٢,٠ ج	٢ ب	٢٥ج د 2SR(٢١+٤)
	IAA٥ +BA٥	٢٠	١٣ أ	٦٥ أ	٣٩,٠ أ	٣ أ	٢٣ هـ 1SR (٢٣)
السيقان	NAA٠,٥+BA٣	٢٠	٤ د	٢٠ و	٨,٠ هـ	٢ ب	٢٨ أ 2SR (٢١+٧)
	2,4-D٠,٠٥+BA٤	٢٠	٧ ج	٣٥ د	٢١,٠ ج	٣ أ	٢٨ أ 2SR(٢١+٧)
	2,4-D٠,١+BA٥	٢٠	٦ ج	٣٠ هـ	١٣,٨ د	٢,٣ب	٢٧ أب 2SR(٢١+٦)
	IAA٥ +BA٥	٢٠	٢ هـ	١٠ ز	٤,٠ و	٢ ب	٢٤ دهـ 1SR(٢٤)
متوسط تأثير الأجزاء النباتية	الأوراق	٢٠	٩,٠٠ أ	٤٥,٠ أ	٢٤,٢ أ	٢,٠ أ	١٨,٥ أ
	السيقان	٢٠	٤,٧٥ب	٢٣.٧ب	١١,٢ب	٢,٣ أ	٢٦,٥ب

المعدلات المشتركة بنفس الأحرف في كل عمود لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية 0%.
الصلب المدعم بتداخلات مختلفة من مظلمات النمو.
* المقارنة (وسط MS خالي من مظلمات النمو)لم تستجيب فيه الأوراق والسيقان . 1SR و 2SR : تعني التمايز بخطوة واحدة وبخطوتين One and Two Step Regeneration

إن التمايز المباشر الذي تم الحصول علية بخطوة واحدة One Step Regeneration من كالس أوراق نباتات القديفة القزمية لوحظ أيضا من قبل بعض الباحثين على أنواع أخرى من نباتات جنس القديفة , فقد لاحظ Misra و Datta (٢٠٠١) حصول التمايز المباشر للأفرع الخضرية من الكالس الناشئ على قطع أوراق القديفة الأفريقية *Tagetes erecta* في وسط MS المدعم بتداخلات واطئة من BA (١ ملغم/لتر) مع الاوكسين IAA بتركيز٠,٥ ملغم/لتر وعندما ازداد تركيز الـ BA إلى الضعف شجع التمايز الجنيني لكنه لم يغير عدد الأفرع , وذكر الباحثان أن هذا النوع من القديفة يمتلك قابلية تكوين جنيني عالية بحيث انه كون الأفرع الخضرية بوجود BA بتركيز ١ملغم/لتر مع الجبرلين بتركيز ٥ملغم/لتر وبدون أي أوكسين, لكن الباحثان ذكرا أن الجبرلين يمكن أن يعمل كبديل عن الاوكسين. إن التمايز المباشر لوحظ أيضا في نبات البابونج *Roman chamomile* من قبل Echeverrigaray وآخرون (٢٠٠٠) , ولوحظ في نبات الأقحوان Chrysanthemum من قبل Chakrabarty (٢٠٠٠) وهما من نباتات العائلة المركبة Asteraceae أيضا .

وتمكنت الدراسة الحالية من الحصول على نباتات القديفة القزمية بخطوتين Two Step Regeneration عن طريق التمايز غير المباشر لكالس قطع الأوراق والسيقان باستخدام تداخل BA بتركيز٣ ملغم\لتر مع NAA بتركيز ٠,٥ملغم \لتر , وكذلك باستعمال تداخل BA بتركيز ٥ملغم \لتر مع ٠,١ملغم /لتر 2,4-D , فقد لوحظ أن الكالس الفتي والمتكون بعد٢١-٢٣ يوم على هذه الأوساط عندما أعيدت زراعته Reculture على نفس الأوساط وخاصة الوسط المكون من ٥ ملغم\لتر BA و٠,١ ملغم \ لتر 2,4-D بدأ بتكوين الأفرع الخضرية بعد ٤-٧ أيام وبمعدل٢-٣ أفرع لكل قطعة مستجيبة, ولوحظ تفوق الأوراق على قطع السيقان في استجابتها وفي العدد الكلي للأفرع المتكونة عليها مع انخفاض المدة اللازمة لتكون الأفرع الخضرية من كالس قطع الأوراق مقارنة بالسيقان,إلا أن الـ BA كان له التأثير الأفضل لتكوين الأفرع الخضرية من قطع الساق خاصة عند استخدامه لوحده بتركيز٤ ملغم\لتر في وسط الاستحداث ثم نقل الكالس المتكون بعد٢١ يوم إلى نفس الوسط(٤ملغم\لتر) مضافا إليه ٠,٠٥ ملغم \لتر 2,4-D ,الجدول (١). هذه النتائج

في الحقيقة تبين أهمية كل من الجزء النباتي وما يحتويه من منظمات نمو ومستوياتها , فقد لعب نوع ومستوى منظمات النمو في الوسط الغذائي دور فعال في حث التمايز المورفولوجي والجنيني لتوالد الأفرع , حيث لم تؤثر التراكيز الواطئة من BA(١-٢ملغم/لتر) عند تداخلها مع الاوكسينات (2,4-D وNAA وIAA) بالتراكيز المستخدمة في هذا البحث على العكس من التراكيز العالية (٣- ٥ ملغم\ لتر)BA, وقد ذكر بعض الباحثين تأثر نباتات جنس القديفة بمكونات الوسط الغذائي ولو أن بعض الأنواع تمتلك قابلية تكوين جنيني embryogenesis عالية ومختلفة عن الأنواع الأخرى مثل النوع *Tagetes* erecta (Ketel, ١٩٨٥) في حين أن النوع *T. minuta* أنتجت نباتات القديفة *T.minuta* من تمايز كالس الأوراق الفلقية خلال ستة أشهر من النمو في وسط MS المحتوي على ٦٠ مايكرومولار مانيتول مع ٣ ملغم/ لترIAA و١٠ ملغم/لتر من BA (Mohamed وآخرون ٢٠٠٠). وأشار كل من Ziv (١٩٩١) وDebergh وآخرون(١٩٩٢) أن التوازن الهورموني بين BA و IAA يكون مهما لتحفيز نشوء الأفرع وان زيادة تركيزBA يشجع التمايز الجنيني وان التراكيز العالية تكون مثبطة لتكوين الأفرع والواطئة لم تشجع ظهور الأفرع .

تجذير الأفرع الخضرية : النتائج بينت قابلية الأفرع الخضرية الناتجة من الكالس على التجذير خلال مدة ٦-٨ أيام على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو , وقد لوحظ ابتداء ظهور الجذور بعد ٦ أيام من نقل الأفرع إلى وسط MS الحاوي ٠.٥ ملغم/لتر من NAA والذي أدى بدوره إلى تقليل مدة التجذير مع زيادة عدد الجذور (الشكل ١-c) مسببا ارتفاع نسبة التجذير إلى ١٠٠% و٩١,٦ للأفرع الناتجة من كالس الأوراق والسيقان على التوالي (الجدول ٢) .

الجدول (٢) :قابلية الأفرع الخضرية الناتجة من كالس الأوراق والسيقان على التجذير في وسط MS الحاوي٠.٥ ملغم/لترNAA , وأقلمة نبيتات القديفة.*T.patula* nana للنمو في التربة

منشأ الكالس المكون للأفرع	عدد الأفرع المنقولة للتجذير	عدد الأفرع المكونة للجذور	تجذير الأفرع (%)	مدة التجذير (يوم)	عدد النبيتات المنقولة إلى التربة	عدد النباتات المتأقلمة	النباتات المتأقلمة (%)
الأوراق	١٤	١٤أ	١٠٠أ	٦ أ	٨	٧ أ	٨٧ أ
السيقان	١٢	١١ب	٩١.٦ب	٦ أ	٨	٦ب	٧٥ب

المعدلات المشتركة بنفس الأحرف في كل عمود لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية 5%.

إن نباتات القديفة تمتاز بقابلية جيدة لتكوين الجذور عادة وقد يعود ذلك إلى تركيبها الوراثي والذي يمكنها من إنتاج الهورمونات النباتية المناسبة خاصة الاوكسينات لتكوين الجذور والتي تحتاجها عادة في إنتاج مركبات الأيض الثانوي كالثايوفين الذي تمتاز بتكوينه هذه النباتات(Margl,٢٠٠٢).

أقلمة النباتات الناتجة من الكالس ونقلها للتربة : أوضحت نتائج الدراسة الحالية قابلية النبيتات الصغيرة بعمر ٣-٤ أسابيع من تاريخ تجذيرها وبطول ٤-٥سم واحتوائها على٣-٥ أوراق أنها قادرة على متابعة النمو في التربة تحت ظروف غرفة الزرع بدرجة حرارة ٢٥±٢°م وإضاءة ٢٠٠٠ لوكس، داخل أصص صغيرة بحجم ٢كغم تحتوي تربة رملية معقمة ومغسولة بالماء المعقم ، وهذا ما ساعد على نجاح الأقلمة إضافة إلى تغطية النباتات بأكياس نايلون مثقبة لمدة ٧ أيام للحفاظ على الرطوبة ، بعدئذ رفعت الأكياس عنها لتستمر بالنمو , وقد بلغت نسبة الاقلمة ٨٧% و٧٥% في كل من النباتات الناتجة من قطع الأوراق وقطع الساق على التوالي(الجدول ٢) .

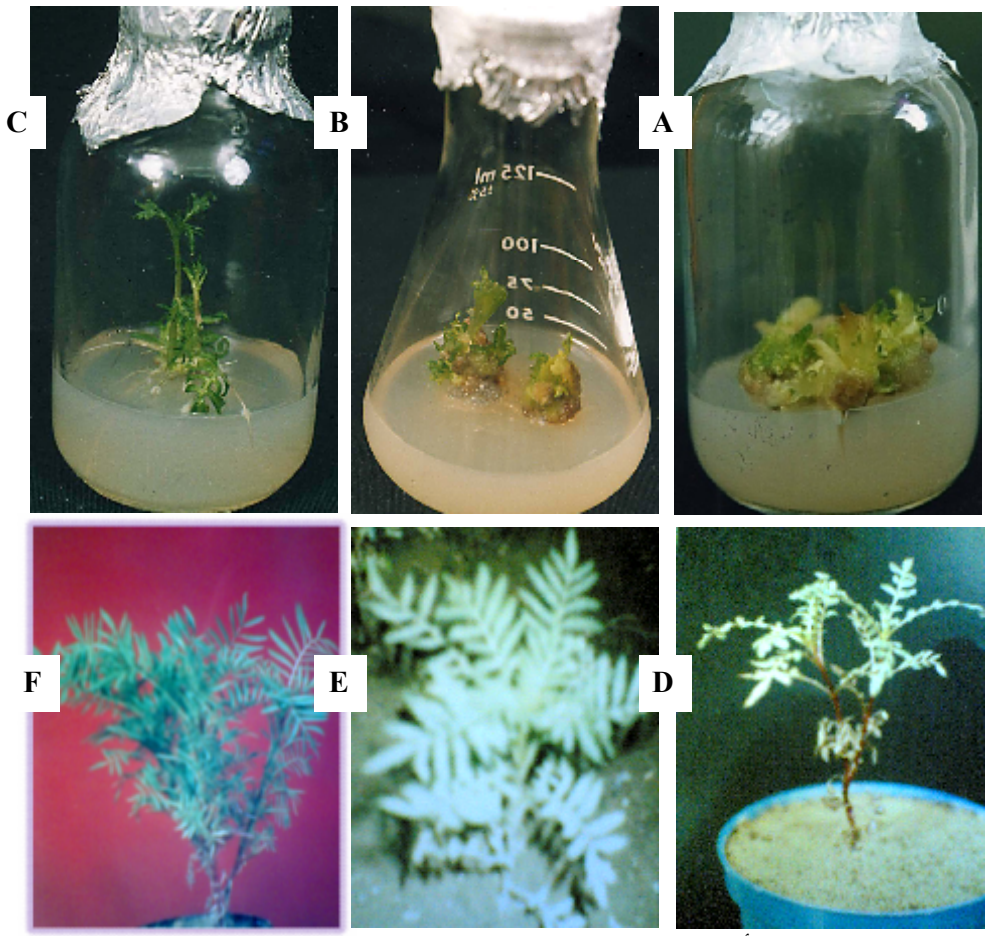
مقارنة الخصائص المظهرية لنباتات القديفة الناتجة من الكالس والنباتات الناتجة من البذور: اظهرت النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة تفوقا في الخصائص المظهرية لهذه النباتات في مرحلة النمو الخضري خاصة في الأسابيع الأولى بعد نقلها إلى تربة الحقل واستمرت بهذا التفوق لمدة اكثر من شهرين من النمو تحت ظروف متماثلة مع نباتات المقارنة البذرية في الحقل , فقد لوحظ حصول زيادة معنوية في ارتفاع النباتات مع زيادة في عدد الأوراق والسلاميات, وظهرت الأفرع في وقت مبكر بعد ٤٨ يوم من نقلها إلى التربة في حين تأخر ظهور الأفرع في نباتات المقارنة بنفس العمر والناتجة من البذور إلى ٥٦ يوم , كما لوحظ ارتفاع عدد الأفرع معنويا في النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة مع زيادة معنوية في أطوال الأفرع الناتجة منها (جدول ٣).

الجدول (٣) : الخصائص المظهرية لنباتات القديفة *T. patula* nana الناتجة من الكالس والنباتات الناتجة من البذور بعمر ١٠ أسابيع , نامية في ظروف الحقل.

منشأ النباتات	طول النبات (سم)	عدد الأوراق /نبات	عدد سلاميات النبات	عدد الأفرع /نبات	طول الأفرع (سم)	فترة ظهور أول فرع (يوم)
النباتات الناتجة من الكالس	٢٥ أ	٣٠ أ	١٥ أ	٣,٣ أ	٧ أ	٤٨ أ
النباتات الناتجة من البذور	٢٢ب	٢٦ب	١٣ب	١,٦ب	٣ب	٥٦ب

المعدلات المشتركة بنفس الأحرف في كل عمود لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية 5%.

وربما يرجع ذلك إلى ارتفاع محتواها من الهورمونات النباتية التي اكتسبتها من وسط الزراعة إضافة إلى قابليتها في تصنيع الهورمونات النباتية خاصة الاوكسينات وقد لوحظ انحناء ساق بعض النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة عند نموها في الأصص خلال الأسابيع الأولى من النمو في التربة (شكل١- D), والذي قد يشير إلى تحرر الأثلين الذي يصاحب ارتفاع مستوى الاوكسينات ويسبب مثل هذا الانحناء(محمد,١٩٨٥و Datta Misra ,٢٠٠١) وبين الباحثان الأخيران أن إضافة نترات الفضة كان مفيدا لزيادة تكون الأفرع مع تمدد كامل للورقة ونمو جيد للأفرع المتكونة لان هذه المادة تعمل كمثبط مباشر للاثلين. لذلك بمرور الوقت تحسن أداء النباتات لانخفاض محتوى الاوكسين, مما أدى إلى زيادة كفاءتها في النمو لملائمة المحتوى الداخلي من الهورمونات النباتية بعد ذلك حيث أظهرت النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة التي نقلت إلى تربة الحقل كفاءة عالية في النمو(شكل١-E) . لقد بين العديد من الباحثين حصول تغايرات جسمية في النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة وذكروا بان التغيرات الجسمية تنتج من عدة عوامل منها ما يتعلق بمصدر المادة النباتية والنمط الجيني للنبات ونوع القطعة المزروعة والتجمع الخلوي فيها وعدد مرات الإدامة ووسط الزراعة خاصة منظمات النمو المضافة التي ترتبط بشدة مع قوة التكوين الجنيني Embryogenic potential للقطع النباتية من خلال تغييرها لمحتوى الهرمونات الداخلي مؤدية إلى تغايرات مظهرية مختلفة(Ivanova وآخرون،١٩٩٤), ومنها ارتفاع النبات وطول الأفرع وعددها ونوعية الأزهار ولونها والتناسق وتغير شكل الورقة والتقزم وفقدان الصبغة (Hammerschlag، ١٩٩٢). ومن التغايرات المظهرية مقاومة الأمراض وإنتاج النباتات المتحملة للظروف البيئية فقد استطاع (Mohamed وآخرون ٢٠٠٠) من إنتاج نباتات القديفة *T. minuta* متحملة للجفاف من تمايز كالس الأوراق الفلقية خلال ستة اشهر من النمو في وسط MS المحتوي على ٦٠ مايكرومولار من المانيتول مع ٣ ملغم/لتر IAA و١٠ ملغم/لتر من BA.



الشكل(١) تمايز الكالس من أوراق نباتات القديفة القزمية *T. patula* nana على وسط MS اطلب الهدعم بتداخلات مختلفة من منظمات النمو , وأقلمة النباتات الناتجة للنمو في ظروف الحقل :
A- تكوين الأفرع الخضرية بمرحلتين من كالس الاوراق الناشئ على وسط MS الصلب المحتوي٣ملغم/لتر من BA مع ٠,٥ ملغم/لتر NAA بعد اربعة ايام من اعادة زراعة نفس الكالس على وسط MS المحتوي ٥ ملغم/لتر BA مع ٠,١ ملغم/لتر 2,4-D . **B-** تكوين الأفرع الخضرية بمرحلة واحدة من كالس الأوراق الناشئ على وسط MS الصلب المحتوي ٥ ملغم/لتر لكل من BA و IAA بعد ٢٣ يوم من الزراعة . **C-** تجذير الأفرع الخضرية على وسط MS الصلب المحتوي ٠.٥ ملغم/لتر NAA. **D-** نبات القديفة ناتج من تمايز الكالس بعمر ٧ أسابيع نامي تحت ظروف الأقلمة في غرفة التنمية. **E-** نبات آخر من نباتات القديفة الناتجة من تمايز الكالس بعمر ٩ أسابيع نامي في ظروف تربة الحقل.**F** نبات القديفة ناتج من البذور بعمر ١٠ أسابيع نامي في ظروف الحقل.

APPLYING SOME GROWTH REGULATORS IN THE INITATION AND DIFFERENTIATION OF CALLUS TO REGENERATION OF DWARF MARIGOLD (*Tagetes patula* cv. nana) plants

2- CALLUS DIFFERENTIATION AND SHOOT REGENERATION

Kasim Mahmoud Al-Hamdani
Dept. of Crop/ College of Agric. and Forestry, Univ. of Mosul, Iraq

ABSTRACT

This study showed the differentiation capability of dwarf *Tagetes patula* cv. nana callus to regenerated of plants directly and indirectly on in vitro aseptic medium, whereas was obtained of shoot organogenesis by two methods. The first by direct differentiation of callus which initiated on solidified MS medium

containing 5mgL^{-1} of each of BA and IAA after 23 days of culture ,the second method was from indirect differentiation of callus on MS medium supplemented with 3mgL^{-1} BA with 0.5 mgL^{-1} NAA .The shoot arise after four days of transplanting of callus (21 days age) to same medium or to MS medium containing 5mgL^{-1} of BA with 0.1mgL^{-1} 2,4-D**.** The producing shoots were readily rooted on MS medium containing 0.5mgL^{-1} of NAA. , and subsequently the plantlet producing from leaves callus were adapted(77.8%) to the environmental conditions through transplanting them in soil. they were showed faster growth in the first vegetative growth stage compared with seed plants.

المصادر

الحمداني، قاسم محمود محمد (٢٠٠٥).تكوين نباتات القديفة *Tagetes patula* L.بالزراعة النسيجية والحصول على الجذور الشعرية المحولة وراثيا ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601 وتقدير محتواها من الزيت العطري والثايوفين . اطروحة دكتوراه .جامعة الموصل .

الراوي ، خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله (١٩٨٠). تصميم وتحليل التجارب الزراعية ، مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل .

محمد، عبد العظيم كاظم (١٩٨٥). علم فسلجة النبات. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.

Breteler,H , CH. H. Hanisch ten Cate. and P. Nissen (1979).Time-course of nitrate uptake and nitrate reductase activity in nitrogen-depleted dwarf bean. Physiol. Plant. 47:49-55.

Chakrabarty, D., A. K. A. Mandal. and S. K. Datta (2000). Retrieval of new coloured chrysanthemum through organogenesis from sectorial chimera. Curr.Sci. 78:1060-1061 .

Debergh, P., J. Aitken-Christie., D. Cohen., B. Grout., S. Von Arnold., R. Zimmerman., and M. Ziv (1992). Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 30:135-140.

Echeverrigaray, S., F. Fracaro., L.B. Andrade., S. Biasio., and L. Atti-Seratini (2000). In vitro shoot regeneration from leaf explants of *Roman Chamomile*.Plant Cell Tiss. Organ Cult. 60:1-4.

Hammerschlag, F.A. (1992). Somaclonal variation. In: Hammerschlag, F.A. and Litz, R.E. (eds.). Biotechnology of Perennial Fruit Crops. C.A.B. International. U.K. PP. 35-56.

Ivanova, A., M. Velcheva., P.Denchev., A. Atanssov, and A. Van. Onklelen (1994). Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in Medicago spp. Physiol. Plant. 92:85-89.

Ketel, D.H. (1986).Morphological differentiation and occurrence of thiophenes in leaf callus cultures from *Tagetes* species: Relation to the growth medium of the plants. Physiol. Plant. 66:392-396.

Ketel, D.H., H. Breteler., and B. de Groot (1985). Effect of explant origin on growth and differentiation of calli from *Tagetes* species. J. plant physiol. 118:327-333.

Margl, L., A. Tei., I. Gyurjan., and M.Wink (2002). GLC and GLC-MS analysis of thiophene derivatives in plants and in In vitro cultures of *Tagetes patula* (Asteraceae).Z. Naturforsch. 57: 63-71.

Misra, P. and S.K. Datta (2001). Direct differentiation of shoot buds in leaf segments of white marigold (*Tagetes erecta* L.). In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 37:466-470.

Mohamed, M.A.H., P.J.C. Harris., and J. Henderson (2000). *In vitro* selection and characterisation of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. Plant Sci. 159:213-222.

Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-479.

Ziv, M. (1991). Vitrification morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh, P. C.; Zimmerman, R. H., eds. Micropropagation± technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 45-69.