استخدام بعض منظمات النمو في استحداث وتمايز الكالس لإعادة تكوين نباتات القديفة القزمية cv.nana *Tagetes patula* ١- استحداث الكالس

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

الخلاصة

تناولت الدراسة الحالية استخدام عدد من منظمات النمو شملت البنزايل أدنين (BA) لوحده ومتداخلا مع الاوكسينات، نفثالين حامض الخليك (NAA) و ثنائي كلورو فينوكسي حامض الخليك (2,4-D), وقد أمكن الحصول على الكالس من الأجزاء النباتية المختلفة (الأوراق، السيقان والجذور) وكانت الأوراق أفضل الأجزاء النباتية استحداثا للكالس خاصة باستخدام تداخل BA مع 2,4-D في وسط MS الصلب والتي أعطت نسبة استحداث ١٠٠% في جميع التداخلات المستخدمة لهما كما أن هذا التداخل كان فعالا في استحداث كالس السيقان وبنسبه بلغت ٨٥ % . اما تداخل BA مع NAA فأعطى هو الآخر نسبة استحداث عالية لكالس الأوراق والجذور مع أعلى وزن لكالس الأوراق بلغ ٩,٨٤٧ غم/قطعة بعد ٣٠ يوم من الزراعة على وسط MS المحتوي٥ ملغم/لتر BA مع ٠.١ ملغم / لتر NAA . وسلطاع BA لوحده في تحث الكالس في كافة الأجزاء النباتية بالتراكيز المستعملة وأظهر بالتراكيز ٤ و ٥ ملغم /لتر استحداثا بلغ ١٠٠% في كل من الأوراق والجذور, وشجع بالتركيز٥ ملغم / لتر نمو كالس السيقان والجذور إذ بلغ ٤,٧٨ و٣,٨٧ غم\ قطعة على التوالي بعد ٣٠ يوم من الزراعة.

المقدمة

إن النوع *Tagetes patula* cv. nana هو احد أنواع نباتات جنس القديفة التي تنتمي إلى العائلة المركبة Asteraceae , يمتاز هذا النوع بكونه قصير متقزم لا تتجاوز أطوال نباتاته ٣٠ سم وأوراقها خضراء داكنة ووريقاتها مسننة، والأزهار بقطر يصل إلى ٥ سم ذات ألوان قد تكون بني محمر أو بني مطرز بالاصفر وتلائمها الأجواء المعتدلة الحرارة بين ٢٠-٣٠م(Gilman,١٩٩٩). وغالبا ما يطلق على النوع *Tagetes patula* بمجموعة القديفة الفرنسية French Marigold وهنالك مجموعتين أخريين هما: مجموعة نباتات القديفة الأفريقية African Marigold وأهمها نوع *Tagetes erecta* ، ومجموعة نباتات القديفة ثلاثية المجموعة الكروموسومية Triploid Marigold ، وعادة تختلف هذه النباتات في أطوالها ولون الأزهار وقطرها (Kessler,٢٠٠٤). لقد تركزت غالبية الدراسات المتعلقة بجنس القديفة في مجالات الايض الثانوي وذلك لأهمية هذه النباتات في انتاج مركبات الثايوفين المستعملة كمبيدات حشرية (Nivsarkar وآخرون,٢٠٠١) ومضادات للبكتريا والنيماتود (Vasudevanوآخرون,١٩٩٧ و , Insunza٢٠٠١). وألان الدراسات منكبه في مجال الإنتاج التقني لإيجاد مصادر بديلة من خلال زراعة أنسجة النبات المختلفة في الظروف المعقمة خارج الجسم الحي مثل إنتاج الثايوفين من مزارع الجذور المعدلة وراثيا (Suresh وآخرون, ٢٠٠١؛ والحمداني وآخرون, ٢٠٠٨ , وحل Margl وآخرون (٢٠٠٢) على كالس الجذور ولاحظ ان مزارع الجذور خارج الجسم الحي ومزارع كالس الجذور قادرة على أنتاج مركبات الثايوفين بكفاءة , وتمكن Ketel (١٩٨٦) و Ketel مع آخرون(١٩٨٥) من الحصول على مزارع الكالس من أوراق أنواع القديفة *T. patula* و *T. minuta* و *T. erecta* خلال ٥-٧ أيام على وسط MS المدعم بـ٥ ملغم/لتر من البنزايل أدنين (BA) مع ٠.٥ ملغم/لتر من NAA، وذكرت هذه البحوث أن الأوراق هي أفضل الأجزاء النباتية لاستحداث الكالس القادر على التمايز وان قوة التشكل الجنيني Morphogenic potency تختلف في هذه الأنواع . وبالرغم من التطور الحاصل في تقنية الزراعة النسيجية فما زالت بعض الأنواع النباتية لم تنل نصيبها من الدراسة كما في بعض أنواع جنس القديفة،لذلك تناولت دراستنا في هذا البحث استخدام مدى واسع من منظمات النمو لغرض استحداث الكالس وتمايزه لإعادة تكوين نباتات القديفة القزمية cv.nana *Tagetes patula* .

تاريخ تسلم البحث ١٧ / ١٢ / ٢٠٠٨ وقبوله ١٨ / ٣ / ٢٠٠٩

المواد وطرائق البحث

التعقيم السطحي للبذور والاجزاء النباتية : استخدم القاصر التجاري الحاوي على ٦% من المادة الفعالة (هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl) في تعقيم بذور القديفة Marigold الصنف (*Tagetes patula*

(cv.nana) والمزرعة من قبل شركة (Ed Hume Seed, Inc. Puyallup. U.S.A). باستعمال تخفيفات منه بحجم ١ : ١ و٢ حجم ماء مقطر 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.

تحضير وسط MS مختبريا (Murashige و Skoog, ١٩٦٢) : حضر هذا الوسط بإذابة كل من المكونات الداخلة في تركيبه إذابة تامة في حجم من الماء المقطر وأضيف الاكار بمقدار ٧ غم/لتر لتصليب الوسط وخفض السكروز من ٣٠ غم/لتر إلى تركيز ٢٠ غم/لتر (Ketel , ١٩٨٦). أضيفت منظمات النمو حسب التداخلات والتراكيز المطلوبة للوسط , ثم ضبط الـ pH في حدود ٥,٨-٥,٩ , بعدها نقلت الأوساط إلى جهاز التعقيم بالبخار Autoclave وتم تعقيمها تحت درجة حرارة ١٢١م وضغط ١,٠٤ كغم/سم^2 لمدة ٢٠ دقيقة . وحضر وسط MS بنصف قوته التركيبية الحاوية ١٠ غرام سكروز وهو خالي من منظمات النمو لاستخدامه في زراعة البذور وإنتاج البادرات المعقمة، بينما اعتمد وسط MS بشكل أساسي في استحداث الكالس ونموه وتمايزه .

زراعة البذور وإنتاج البادرات المعقمة : نقلت البذور المعقمة بملقط معقم إلى أنابيب اختبار سعة ١٠٠ مل تحتوي ١٥ مل من وسط MS الصلب بنصف قوته التركيبية وبمعدل ٣ بذور/أنبوبة. أغلقت 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 الزرع Culture room .

إنشاء مزارع الكالس وإدامتها : استخدمت بادرات القديفة المعقمة النامية في وسط MS الصلب بنصف قوته التركيبية وهي بعمر ٤-٦ أسابيع للحصول على الأجزاء النباتية المختلفة ، حيث أخذت الأوراق وقطعت بمساحة ١.٠ سم^2 تقريباً، وأخذت قطع السيقان بطول ١,٥ سم فيما أخذت الجذور بشكل خصل كل منها يحتوي على ٤-٥ جذور ليفية بطول ٢-٤ سم. وضعت القطع النباتية المستأصلة على وسط الاستحداث في أوعية زجاجية بسعة ١٠٠مل تحتوي ٥٠ مل من وسط MS المدعم بتداخلات البنزايل أدنين(BA) مع الاوكسينات الاتية وكما يلي:

تداخل BA وNAA : BA : صفر ، ٢,٠ ، ٣,٠ ، ٤,٠ و٥,٠ ملغم / لتر مع NAA : صفر ، ٠,١ ، ٠,٥ ،ملغم / لتر.

تداخل BA و2,4-D : BA : صفر ، ٢,٠، ٣,٠ ، ٤,٠ و٥,٠ ملغم / لتر مع 2,4-D : صفر ، ٠,١ ، ٠,٥ ملغم / لتر .

كما استخدم BA لوحدة بالتراكيز : صفر ، ١,٠ ، ٢,٠ ، ٣,٠ ، ٤,٠ ، ٥,٠ و١٠ ملغم / لتر .

حضنت العينات المزروعة على هذه الأوساط في ظروف غرفة الزرع بدرجة حرارة ٢٥±٢°م وشدة اضاءة ١٠٠٠ لوكس وبتعاقب ١٦ساعة ضوء/ ٨ساعة ظلام.

تمت إدامة مزارع الكالس عند الحاجة إليها كل ٣ أسابيع تقريباً حيث اخذ الكالس المستحدث على أوساط الاستحداث الملائمة وأزيلت منه الأجزاء البنية الميتة وقسم إلى قطع بوزن ١ غم تقريباً ووضع كل منها على سطح ٥٠ مل من وسط الإدامة المناسب.

حساب الأوزان الطرية للكالس : تم حساب وزن الكالس مباشرة بميزان كهربائي حساس تم وضعه داخل منضدة الزراعة Laminar airflow cabinet المعقمة والمشغلة قبل نصف ساعة من بدء العمل , حيث سجل وزن الكالس بمرحلتين الأولى بعد ١٥ يوم من الزراعة ثم أعيدت زراعة الكالس نفسه بعد إزالة الأجزاء التالفة منه إن وجدت على نفس وسط الاستحداث ولكنه جديد fresh ليمثل بعد ٣٠ يوم كالس المرحلة الثانية . واعتمد التصميم العشوائي الكامل (CRD) في تنفيذ تجارب البحث وقورنت نتائجه بموجب اختبار دنكن تحت مستوى احتمالية 5% (الراوي وخلف الله , ١٩٨٠) .

النتائج والمناقشة

كفاءة التعقيم السطحي للبذور والأجزاء النباتية : أظهرت نتائج التعقيم السطحي للبذور كفاءة محلول هايبوكلورايت الصوديوم (١ حجم معقم : ٢ حجم ماء) لمدة ٢٠ دقيقة في الحصول على بذور معقمة تمكنت من إنتاج بادرات سليمة بنسبة ٩٥% على وسط MS الصلب بنصف قوته التركيبية الحاوي على ١٠ غم/ لتر من السكروز. وقد أعتمدت البادرات السليمة الناتجة مصدراً للأجزاء النباتية المستعملة في تجارب هذه الدراسة.

استحداث الكالس من الأجزاء المختلفة وإدامته : أظهرت النتائج قابلية استحداث الكالس من الأجزاء النباتية المختلفة المستأصلة من بادرات القديفة المعقمة (الأوراق والسيقان والجذور) وقد تفوقت الأوراق في استحداثها للكالس (الجدول ١).

الجدول (١) : قابلية استحداث الكالس من أجزاء نباتات القديفة القزمية *T. patula nana* في وسط MS الصلب المدعم بتداخلات مختلفة من منظمات النمو.

تداخل منظمات النمو في وسط MS (ملغم/لتر) NAA BA		الأوراق		السيقان		الجذور	
		عدد القطع المستجيبة	استحداث الكالس (%)	عدد القطع المستجيبة	استحداث الكالس (%)	عدد الخصل المستجيبة	استحداث الكالس (%)
NAA + BA	٠,١ ٢,٠	*١٧	٨٥ جـ	٥	٢٥ حـ	٢	٢٠ هـ
	٠,١ ٣,٠	٢٠	١٠٠ أ	١٨	٩٠ بـ	١٠	١٠٠ أ
	٠,٥ ٣,٠	٢٠	١٠٠ أ	٢٠	١٠٠ أ	٧	٧٠ د
	٠,١ ٤,٠	٢٠	١٠٠ أ	١٤	٧٠ د	١٠	١٠٠ أ
	٠,٥ ٤,٠	٢٠	١٠٠ أ	١٠	٥٠ و	٩	٩٠ بـ
	٠,١ ٥,٠	٢٠	١٠٠ أ	٢٠	١٠٠ أ	١٠	١٠٠ أ
	٠,٥ ٥,٠	٢٠	١٠٠ أ	١٠	٥٠ و	١٠	١٠٠ أ
2,4-D + BA	2,4-D BA						
	٠,١ ٢,٠	٢٠	١٠٠ أ	١٨	٩٠ بـ	٢	٢٠ هـ
	٠,١ ٣,٠	٢٠	١٠٠ أ	٢٠	١٠٠ أ	١٠	١٠٠ أ
	٠,٥ ٣,٠	٢٠	١٠٠ أ	٢٠	١٠٠ أ	٨	٨٠ جـ
	٠,١ ٤,٠	٢٠	١٠٠ أ	٢٠	١٠٠ أ	١٠	١٠٠ أ
	٠,٥ ٤,٠	٢٠	١٠٠ أ	١٢	٦٠ هـ	٨	٨٠ جـ
	٠,١ ٥,٠	٢٠	١٠٠ أ	٢٠	١٠٠ أ	١٠	١٠٠ أ
	٠,٥ ٥,٠	٢٠	١٠٠ أ	٩	٤٥ زـ	٢	٢٠ هـ
BA لوحده	BA لوحده						
	١.٠	١٢	٦٠ هـ	٥	٢٥حـ	٠,٠	٠.٠ و
	٢.٠	١٨	٩٠بـ	٩	٤٥ زـ	٢	٢٠ هـ
	٣.٠	١٦	٨٠ د	١٠	٥٠ و	١٠	١٠٠ أ
	٤.٠	٢٠	١٠٠ أ	١٠	٥٠ و	١٠	١٠٠ أ
	٥.٠	٢٠	١٠٠ أ	١٦	٨٠ جـ	١٠	١٠٠ أ
	١٠.٠	١٧	٨٥ جـ	٠,٠	٠.طـ	١٠	١٠٠ أ
متوسط تأثير التداخلات	NAA+ BA		٩٧,٨٦ أ		٦٩,٢٨ أ		٨٢,٨٦ أ
	2,4-D+ BA		١٠٠,٠ أ		٨٥,٠٠ أ		٧١,٤٣ أ
	BA لوحده		٨٥,٨٣ بـ		٤١,٦٦ بـ		٧٠,٠٠ أ

المعدلات المشتركة بنفس الأحرف في كل عمود لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية ٥% .
*المقارنة تمثل وسط MS خالي من منظمات النمو لم تحدث فيه أي استجابة . عدد القطع المختبرة كانت ٢٠ قطعة لكل من الأوراق والساق و١٠ خصل للجذور .

حيث أظهرت النتائج أن قطع الأوراق قد تفوقت في استحداثها للكالس قياساً بالأجزاء النباتية الأخرى كالسيقان والجذور عند زراعتها على وسط MS الصلب المدعم بتداخل BA مع كل من NAA او2,4-D خاصة بوجود BA مع 2,4-D فقد حصلت أعلى نسبة لاستحداث الكالس بلغت ١٠٠% ولوحظ من النتائج أن BA لوحدة قادر أيضا على حث الكالس بالتراكيز المستخدمة من٢ إلى ٥ ملغم/ لتر (الجدول ١) . وقد لوحظ ابتداء التحفيز بعد ٧ أيام من الزراعة وتحولت قطع الأوراق إلى كتل من الكالس خلال مدة أسبوعين ثم ازداد حجمه بعد ثلاثة أسابيع من الزراعة (الشكل ٤-A وD). وأظهرت النتائج أن الوسط MS الصلب المحتوي على٥ ملغم/لتر BA مع ٠,١ ملغم/ لتر من 2,4-D كان مناسباً لإدامة هذا الكالس ، وقد

تبين حاجته إلى إعادة الزراعة كل ثلاثة أسابيع. وتميز كالس الأوراق بقوامه المتماسك لاسيما عند زيادة مستوى BA من ٣ إلى ٥ ملغم/لتر، وظهوره بلون اصفر مائل إلى الرمادي في وسط MS المحتوى على NAA وازداد اصفراراً بوجود الـ2,4-D .

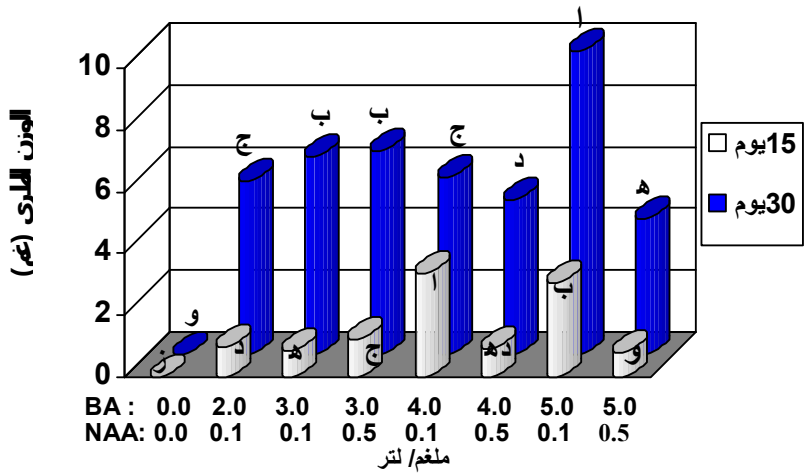
وبينت النتائج استجابة قطع السيقان لاستحداث الكالس ويلاحظ ان تداخل BA مع 2,4- D كان الأفضل في حث الكالس من السيقان وبلغت نسبة الاستحداث الكلي ٨٥ % بينما انخفضت الى ٦٩,٢٨ بوجود BA مع NAA وإلى ٤١,٦٦ بوجود BA لوحدة . ويبدو ان المعاملات المتضمنة استخدام التركيز الواطي ٠,١ ملغم/ لتر من الاوكسينين NAA و2,4-D أدى إلى زيادة استحداث الكالس مقارنة بالتركيز ٠,٥ ملغم/لتر منه خاصة عند رفع مستوى BA ، واتصف كالس السيقان بنمو جيد وبقوام متماسك وبلون اصفر خاصة عند المستويات العالية من BA مثل استخدام ٥ ملغم/ لتر من BA (الشكل٤- B وE). وتمت إدامة كالس السيقان على وسط إدامة كالس الأوراق نفسه بعد ثلاثة أسابيع من النمو في الوسط الأولي الذي حفز فيه.

أوضحت نتائج استحداث الكالس من الجذور المستأصلة من البادرات المعقمة أن وسط MS المحتوية على البنزايل أدنين BA سواء لوحده أو متداخلا مع NAA او 2,4-D شجعت تكوين الكالس خاصة عند تداخل التركيز المنخفض ٠,١ملغم/لتر من الاوكسينين مع BA بالتركيز ٣ و٤و٥ ملغم/لتر حيث بلغت نسبة استحداث الكالس ١٠٠% ولوحظ ان BA لوحده بالتراكيز المشار إليها أعطى الاستجابة نفسها (١٠٠%) (الجدول ١) وقد امتاز كالس الجذور بقوامه الهش ولونه الأصفر باستخدام BA لوحده (الشكل٤- C وF) وكان مائل إلى الرمادي الفاتح بوجود NAA في وسط الزراعة وبلون اصفر فاتح بوجود 2,4-D .

الوزن الطري لكالس الأجزاء المختلفة:

الوزن الطري لكالس الأوراق : أظهرت النتائج قابلية الأوراق للاستحداث و نمو الكالس على وسط MS الصلب في مدى واسع من منظمات النمو فقد اظهر BA بالمستويات المختلفة لهذه التجربة تأثيرا واضحا لزيادة وزن الكالس عند تداخله مع NAA أو 2,4-D او BA لوحده فقط , وأفضل كالس تم الحصول عليه من تداخل BA مع NAA هو باستخدام ٤و٥ ملغم / لتر من BA متداخلا مع ٠,١ ملغم / لتر من NAA في المرحلة الأولى بعد ١٥ يوم من الزراعة فكان وزن الكالس ٣,٣٦٩ و ٣,٠٤٢ غم على التوالي , وفي المرحلة الثانية بعد ٣٠ يوم ازداد وزن الكالس معنويا في جميع التداخلات وبلغ أعلى وزن له ٩,٨٤٧ غم باستخدام تداخل٥ملغم / لتر BA مع ٠,١ ملغم / لتر من NAA (شكل١). أما باستخدام تداخل BA مع 2,4-D فقد أظهرت النتائج تأثر نمو الكالس بمستوى الاوكسين2,4-D فقد شجع التركيز الواطئ من 2,4-D (٠,١ ملغم / لتر) نمو الكالس ليعطي أعلى استجابة لوزن الكالس بوجود المستويات المرتفعة من BA (٤و٥ ملغم / لتر) بعد١٥ يوم من الزراعة وبمرور الوقت ازداد التأثير معنويا لهذه التداخلات وبلغ أعلى وزن للكالس ٣,٨٢ و٤,٨١ غم باستخدام تداخل٤و٥ملغم / لتر BA مع٠,١ ملغم / لتر2,4-D على التوالي (شكل٢) .

أما باستخدام BA لوحده فقد شجع هو الأخر نشوء كالس الأوراق ونموه ولكنه كان بطيئا في المراحل الأولية ثم تزايد مع الوقت متناسبا مع زيادة التركيز من ٣-٥ ملغم/ لتر باستثناء التركيز ٢ ملغم / لتر BA الذي اظهر زيادة في وزن الكالس عند إعادة زراعته ليعطي أعلى وزن للكالس بلغ ٩,٣٧٧غم بعد ٣٠ يوم من الزراعة (شكل٣).النتائج تشير إلى أن قطع أوراق نباتات القديفة القزمية هي من أفضل الأجزاء النباتية لإنتاج الكالس وأنها تستجيب لمدى واسع من منظمات النمو , وان الأجزاء الأخرى كالسيقان والجذور لا تقل أهمية عن الأوراق في إنتاجها للكالس عند أخذها من بادرات نامية في ظروف معقمة .



الشكل(١) الوزن الطري لكالس أوراق نباتات القديفة القزمية *T.patula*.nana المزرع على وسط MS المحتوي على تداخلات مختلفة من BA و NAA بعد (١٥و٣٠ يوم) من الزراعة

المعدلات المشتركة بالأحرف نفسها لكل مرحلة(١٥ او ٣٠ يوم) لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية ٥% .

الوزن الطري للكالس الساق: أظهرت النتائج قابلية سيقان نباتات القديفة القزمية على استحداث و نمو الكالس على وسط MS الصلب في مدى واسع من منظمات النمو فقد شجع تداخل الـ BA مع الاوكسين NAA نشوء ونمو الكالس خلال ١٥ يوم من الزراعة وقد تطور الكالس بشكل أفضل بالتراكيز ٣و٥ ملغم/لتر BA مع ٠,٥ و٠,١ ملغم/ لتر NAA ليصل وزنه إلى ٤,٤١ و٣,٧٨ غم/قطعة بعد ٣٠ يوم من الزراعة على التوالي. أما تداخل BA مع الاوكسين 2,4-D فقد شجع هو الأخر نشوء كالس السيقان بكفاءة في المراحل الأولى بعد ١٥ يوم من الزراعة خاصة بوجود BA بالتراكيز من ٣ إلى ٥ ملغم/لتر, وبعد ٣٠ يوم من الزراعة أظهرت BA بالتركيز ٣ ملغم/لتر مع ٠,١ و٠,٥ ملغم/لتر 2,4-D أفضلية في زيادة وزن الكالس بلغ ٣,٦١ و٣,٥٠ على التوالي وكذلك اظهر مثل هذا التأثير المستوى ٥ ملغم\ لتر BA مع ٠,١ ملغم/ لتر 2,4-D (جدول ٢).

ويلاحظ من النتائج أن نمو كالس السيقان حصل بصورة أفضل عند تداخل المستويات المرتفعة من BA (خاصة ٣ -٥ ملغم/لتر) مع المستويات الواطئة من الاوكسين 2,4-D (٠,١ ملغم/لتر) ربما لسرعة حركة هذا الاوكسين في خلايا وأنسجة النبات وتحفيزه للنمو بمقدار عدة أضعاف الاوكسينات الأخرى (سلمان,١٩٨٨) , كما أن السيقان قد تحتوي كميات مناسبة من الاوكسين الداخلي وان وجود الاوكسين في وسط الزراعة بكميات واطئة يعزز من قابلية الخلايا على الانقسام وان التراكيز العالية غير مشجعة على انقسام الخلايا ونموها ربما لزيادة تحرر الأثلين المصاحب عادة لوجود الاوكسين والذي يكون مثبطا للنمو عند التراكيز الحرجة للاوكسين (عبدول ,١٩٨٧), وهذا ما أكدته الدراسة الحالية حيث أظهرت النتائج إن استحداث الكالس ونموه تم بوجود ١ملغم/لتر BA لوحده في وسط الاستحداث مما يشير إلى قدرة نباتات القديفة والكالس الناشئ منها على تكوين الاوكسين الطبيعي, كما أظهرت النتائج أن وجود BA لوحده بالتركيز ٥ ملغم/لتر في وسط MS أعطى أفضل وزن كالس اساق بلغ ٠,٩٣ غم\ قطعة بعد ١٥ يوم من الزراعة , وبعد ٣٠ يوم من الزراعة أظهرت التراكيز ٤و٥ ملغم/لتر من BA أعلى وزن للكالس بلغ ٤,٦٣ و٤,٧٨ غم/قطعة على التوالي (الجدول ٢).

الجدول(٢) : الوزن الطري لكالس سيقان نباتات القديفة القزمية *T.patula nana* لفترتين من النمو على وسط MS الصلب المدعم بتداخلات مختلفة من منظمات النمو.

تداخل منظمات النمو في وسط MS (ملغم/لتر)		معدل الوزن الطري لكالس السيقان (غم/قطعة) بعد	
NAA	BA	١٥يوم	٣٠ يوم
٠,٠	٠,٠	٠,٠ ط	٠,٠ ي
٠,١	٢,٠	٠,١١ ح	١,٣٩ ح ط
٠,١	٣,٠	٠,١٦ ز ح	٢,٧٢ د ه
٠,٥	٣,٠	٠,٤٣ د ه	٤,٤١ أ
٠,١	٤,٠	٠,١٧ ز ح	٢,١٠ و ز
٠,٥	٤,٠	٠,١٤ ز ح	١,٧٥ ز ح
٠,١	٥,٠	٠,٨٠ ب	٣,٧٨ ب
٠,٥	٥,٠	٠,٣٥ د ه	٢,٥١ ه و
٠,٠	٠,٠	٠,٠ ط	٠,٠ ي
٠,١	٢,٠	٠,١٢ ح	١,٠٢ ح ط
٠,٥	٣,٠	٠,٣٥ د ه	٣,٦١ ب ج
٠,١	٣,٠	٠,٣٤ د ه	٢,٥٣ ز ج
٠,٥	٣,٠	٠,٣٤ ج د ه	٢,٧٦ د ه
٠,١	٣,٠	٠,٣٦ ب ج د ه	١,٩٧ ه و
٠,٥	٣,٠	٠,٣٣ د ه و	٢,٥٦ ه و
٠,١	٥,٠	٠,٣٨ د	٣,١٦ ج د
٠,٥	٥,٠	٠,١٣ ح	١,٢٥ ط
	BA لوحده		
	٠,٠	٠,٠ ط	٠,٠ ي
	١,٠	٠,٤٢ د	٣,١٥ ج د
	٢,٠	٠,٢٦ و ز	٢,٥٤ ه و
	٣,٠	٠,٣٢ ه و	٢,٦٩ د ه
	٤,٠	٠,٦٩ ج	٤,٦٣ أ
	٥,٠	٠,٩٣ أ	٤,٧٨ أ
	١٠,٠	٠,٠ ط	٠,٠ ي
متوسط تأثير التداخلات	NAA+BA	٠,٢٧١ أ	٢,٣٣٢٥ أ
	2,4-D+BA	٠,٢٤٧ أ	٢,٢٣٢٥ أ
	BA لوحده	٠,٣٧٤ أ	٢,٥٤١٤ أ

المعدلات المشتركة بنفس الأحرف في كل عمود لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية ٥% .

	٤,٠ ٠,١	٠,١٤ دهـ	١,١٣ وزح
	٤,٠ ٠,٥	٠,٥٠ ب	١,٤٧ هـ
	٥,٠ ٠,١	١,٦٥ أ	٢,٥٤ ج
	٥,٠ ٠,٥	١,٦٩ أ	٢,٧٩ب
2,4-D+ BA	2,4-D BA		
	٠,٠ ٠,٠	٠,٠ هـ	٠,٠ ط
	٢,٠ ٠,١	٠,١١ د هـ	١,٠٥ زح
	٣,٠ ٠,١	٠,٤٥ ب ج	٢,١٦ د
	٣,٠ ٠,٥	٠,٣٢ ب ج د	٠,٨٨ ح
	٤,٠ ٠,١	٠,٣٣ ب ج د	٢,٠٧ د
	٤,٠ ٠,٥	٠,٢٨ ب ج د	١,٣٣ هـ و
	٥,٠ ٠,١	٠,٤٥ ب ج	٣,٠٢ب
	٥,٠ ٠,٥	٠,١٠ هـ	١,١٦ وز
BA لوحده	BA لوحده		
	٠,٠	٠,٠ هـ	٠,٠ ط
	١,٠	٠,٠ هـ	٠,٠ ط
	٢,٠	٠,٠ هـ	٠,٠ ط
	٣,٠	٠,٢٥ ب ج دهـ	٢,٩٢ب
	٤,٠	٠,٣٠ ب ج د	٣,٠١ب
	٥,٠	٠,٣١ ب ج د	٣,٨٧ أ
	١٠,٠	٠,١٤ د هـ	٢,٢١ د
متوسط تأثير التداخلات	NAA+BA	٠,٥٧٠ أ	١,٦٠٠ أ
	2,4-D+BA	٠,٢٥٧ ب	١,٤٥٨ أ
	BA لوحده	٠,١٤٤ ب	١,٧١٥ أ

الوزن الطري لكالس الجذور: أظهرت جذور نباتات القديفة الفتية النامية في ظروف الزراعة النسيجية بعمر أربعة إلى ستة أسابيع قابلية لاستحداث الكالس على وسط MS بجميع التداخلات المستخدمة لكن الوزن الطري اختلف باختلاف نوع المنظمات المستخدمة ومستوياتها في الوسط , فقد اظهر التداخل ٥ ملغم/ لتر BA مع ٠,١ و٠,٥ ملغم/لتر NAA أفضل كالس للجذور تم الحصول علية بعد ١٥ يوم من الزراعة بلغ ١,٦٥ و١,٦٩ على التوالي (الجدول٣) , وكان الكالس هش وبمرور الوقت تحول لونه الى الرمادي ربما لزيادة ايض الكالس في تكوين المواد الفينولية والاثلين المصاحبة عادة لوجود أو إنتاج الاوكسين في وسط الزراعة (عبدول,١٩٨٧ وKetel,١٩٨٦ ,wiermann ,١٩٨١).

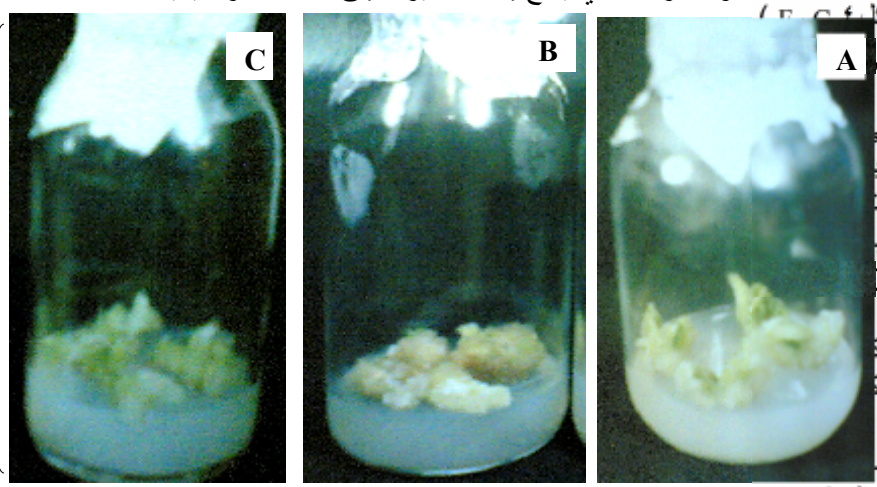
أما باستخدام BA و 2,4-D فان أفضل كالس للجذور تم الحصول علية

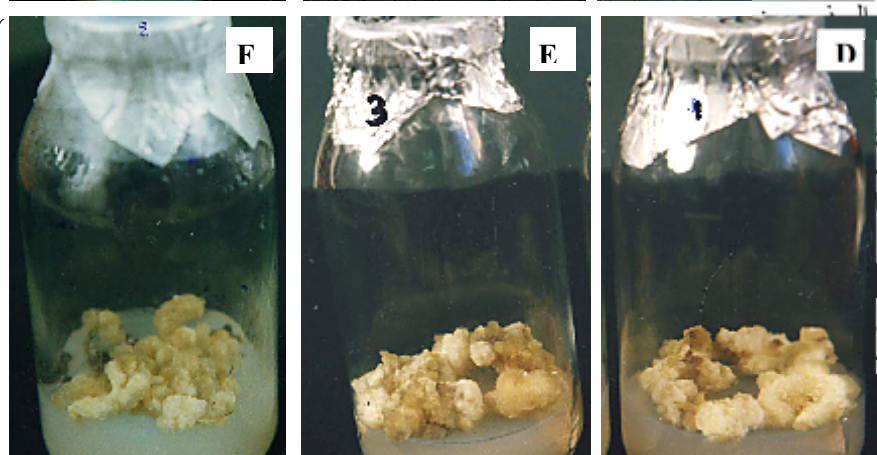
الجدول(٣) : الوزن الطري لكالس جذور نباتات القديفة القزمية *T.patula nana* لفترتين من النمو على وسط MS الصلب المدعم بتداخلات مختلفة من منظمات النمو

غم بعد ٣٠ يوم من الزراعه على التوالي. أما باستخدام BA لوحده فان التراكيز ٤و٥ كانت من أفضل المستويات للحصول على كالس الجذور وبلونه الأصفر الزاهي(الشكل) , حيث بلغ وزنه الكالس ٨٧ للتركيز ٥ ملغم/لتر. مما احتواء نباتات القديفة على المناسب من الهورمونات النبا الاوكسينات لذلك أظهرت الواطئة من 2,4-D أفضلي ونمو الكالس مقارنة بالتراكيز الاوكسينات لان الاوكسينات بتراكيز واطئة , وان التراك منها غالبا ما تسلك سلوك معرقلا لنمو وانقسام الخلايا الحرجة للاوكسين وق (Ketel,١٩٨٦) نشوء ونمو الكالس النامي على أوساط من الاوكسينات دلالة على ق هذه النباتات في تصنيع الطبيعي. ولوحظ من الدراس قطع الجذور المأخوذة من با بالحقل لم تستجب نهائيا الكالس في مظلم الأوساط على العكس من قطع جذو النامية في أوساط الزراع المعقمة ربما لأن النباتات ال

تركة بنفس الأحرف في كل عمود لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية ٥%.

التربة يزداد فيها تخصص الخلايا إلى أنسجة بالغة من الخشب واللحاء والألياف بسرعة وهذا ربما الذي يمنع إعادة تمايزها إلى الحالة المرستيمية .





الشكل (٤) استحداث الكالس من الاجزاء المختلفة لنباتات القديفة القزمية *T. patula* nana على وسط MS الصلب المدعم بتداخلات مختلفة من منظمات النمو:
A- تكوين كالس الأوراق على وسط MS الصلب المحتوي (0 ملغم/لتر من BA + ٠,١ ملغم/لتر NAA), بعمر اسبوعين ,
B- تكوين كالس السيقان على وسط MS الصلب المحتوي (0 ملغم/لتر من BA + ٠,١ ملغم/لتر NAA. بعمر اسبوعين .
C- تكوين كالس الجذور على وسط MS الصلب المحتوي (0 ملغم/لتر من BA فقط) بعمر اسبوعين .
D- تكوين كالس الأوراق على وسط MS الصلب المحتوي (0 ملغم/لتر من BA + ٠,١ ملغم/لتر 2,4-D). بعمر أربعة أسابيع.
E- تكوين كالس السيقان على وسط MS الصلب المحتوي (0 ملغم/لتر من BA + ٠,١ ملغم/لتر 2,4-D. بعمر أربعة أسابيع.
F- تكوين كالس الجذور على وسط MS الصلب المحتوي (0 ملغم/لتر من BA فقط). بعمر أربعة أسابيع .

APPLICATION OF SOME GROWTH REGULATORS IN THE INITATION AND DIFFERENTIATION OF CALLUS TO REGENERATION OF DWARF MARIGOLD (*Tagetes patul*a cv. Nana) plants

1- CALLUS INITATION

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

ABSTRACT

The current study applied many of growth regulators involved: 6-benzyladenine (BA) alone and interacted with the two auxin each of ; naphthalene acetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The callus was obtained from different explants (leaves, stem, and roots).The results showed that leaves were the best explants for callus initiation specially by application of BA with 2,4-D in solidified MS medium which gave 100% initiation percentage of callus in all interaction was used ,this interaction of BA and 2,4-D also was active in initiation of stem callus (85%) **.** The interaction of BA with NAA also gave higher initiation percentage of leaves and roots callus with height weight of leaves callus reached 9.847g/explants after 30 days of growth on MS medium supplemented with 5mgL^{-1} of BA and 0.1mg$L^{-1}$of NAA**.** BA alone by the used concentrations was able to induce the callus in all explants , and showed 100% initiation percentage of leaves and roots callus at 4 and 5 mgL^{-1} concentrations and prompt ,on MS medium with5 mgL^{-1} BA, the growth of stem and roots callus reached to 4.78 and 3.87gm respectively after 30 days of culture .

المصادر

الحمداني , قلم محمود و الهلاح, مزاحم قاسم والاطرقجي ,عمار عمر(٢٠٠٨). عزل وتشخيص مركب الثايوفين Thiophene من نباتات القديفة*Tagetes patula* الناتجة من زراعة الأنسجة ومن الجذور الشعرية المحولة وراثيا.مجلة زراعة الرافدين,المجلد(٣٦) العدد (٣).

سلمان , هد عباس (١٩٨٨).أساسيات زراعة الخلايا والأنسجة النباتية وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .جامعة بغداد.

عبدول , كريم صالح (١٩٨٧).منظمات النمو النباتية , الجزء الأول. دار الكتب للطباعة والنشر .جامعة الموصل.

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

Gilman, E.F. (1999). *Tagetes patula*-French Marigold. Institutes of Food and Agricultural Sciences. Fact sheet FPS-571, EDIS Web sit at http:// edis.ifas.uft.edu.

Insunza, V., E. Aballay.,and J. Macaya (2001). *In vitro* nematicidal activity of aqueous plant extracts on Chilean populations of Xiphinema americanum see synsu lato. Nematropica. 31(1):47-54.

Kessler, J.R. (2004). Greenhouse Production of Marigolds. ACES Publication.

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.

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

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.

Nivsarkar, M., B. Cherian, and H. Padh (2001). Alpha-terthienyl: A plant-derived new generation insecticide. Current Science. 81(6):667-672, 2001 Sep 25.

Vasudevan, P., S. Kashyap, and S. Sharma (1997). Tagetes: A Multipurpose Plant. Bioresource Technol. 62: 29-35.

Suresh, B., T. Rajasekaran., S.R. Rao., K. Raghavarao, and G.A. Ravishankar (2001). Studies on osmolarity conductivity and mass transfer for selection of a bioreactor for *Tagetes patula* L. hairy roots. Process Biochem. 36:987-993.

Wiermann, R. (1981). Secondary plant products and cell and tissue differentiation. – In The Biochemistry of plants. A Comprehensive Treatise (P.K. Stumpf and E.E.Conn, eds).Vol.7, 86-116.Academic Press. New York. ISBN 0-12-675407-1.