تأثير بعض منظمات النمو النباتية في استحداث ونمو وتمايز كالس نبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L.

فراس حميد خضير
قسم علوم الحياة / كلية العلوم
جامعة الموصل

د. خزعل علي امين
قسم علوم الحياة / كلية التربية
جامعة الموصل

الاستلام 18 / 08 / 2011
القبول 03 / 04 / 2012

SUMMARY

The current study evaluated the effect of some growth regulators on initiation, growth and differentiation of (*Dianthus caryophyllus* L.) callus.The results showed that callus could be initiated when (BA,IAA) and (BA,NAA) added to MS medium. Variation in callus initiation were recorded according to the source from which the explants took which were (stem, leaves, cotyledons, roots and hypocotyls) it was shown that the best initiation of callus took place on MS1 (MS +BA 0.1mg/L+ 0.5 2,4-D mg/L) and MS2 (MS+BA 0.1mg/L + IAA0.1mg/L).

Callus derived from cotyledons and leaves exhibit differentiation the best ratios for shoot formation from cotyledons leaves was MS(BA 1.0 mg/l +IAA 0.05mg/l) and (MS + BA 3.0mg/l + IAA0.1mg/l) for callus derived from leaves. results showed that use the auxins IBA, NAA, and IBA enhanced rooting of the regenerated shoots. Rooting percentage reached 100%. when 1.0 mg/l of IBA added to MS medium. the rooted plants were successfully acclimatized and transferred to the soil.

الخلاصة:-

توصلت الدراسة الحالية إلى معرفة تأثير بعض منظمات النمو النباتية في استحداث ونمو وتمايز كالس نبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L.. إذ أظهرت النتائج حدوث تباين في استحداث الكالس من الأجزاء النباتية المختلفة (السيقان، الأوراق, الأوراق الفلقية، الجذور، السيقان تحت الفلقية) عند إضافة تراكيز مختلفة من (2,4-D,BA) و (IAA,BA),

اذ وجد ان أفضل وسطين لاستحداث الكالس و بنسبة عالية وبمدة زمنية قصيرة هما وسط MS1 (MS+ 0.1 BA ملغم/لتر + 2,4-D 0.5 ملغم/لتر) ووسط MS2 (MS + BA 0.1 ملغم/لتر + IAA 0.1 ملغم/لتر). كما تم الحصول على نباتات القرنفل الكاملة من كالس الأوراق والأوراق الفلقية وكان أفضل وسط للتمايز وسط MS الحاوي على (BA 1.0ملغم/لتر + IAA 0.05 ملغم/لتر) بالنسبة للأوراق الفلقية ووسط MS الحاوي على(BA 3.0 ملغم/لتر + IAA 0.1 ملغم/لتر) للأوراق. وأوضحت النتائج أيضاً ان استخدام الاوكسينات ,IAA (NAA, IBA) بتراكيز مختلفة أعطت تباينا في نسبة تحذير الأفرع الخضرية واتضح ان IBA هو أفضل الاوكسينات المستخدمة لغرض التجذير اذ بلغت نسبة التجذير 100% في وسط MS مضافا اليه IBA بتركيز 1.0 ملغم/لتر. وقد نجحت نباتات القرنفل الناتجة من الزراعة النسيجية عند اقلمتها وزراعتها في التربة من الوصول إلى مرحلة التزهير. ولوحظ تفوق النباتات الناتجة من الكالس على النباتات البذرية من حيث طول الساق ومساحة الأوراق وعددها والعقد وعدد الافرع الخضرية.

المقدمة:-

القرنفل نبات عشبي معمر من عائلة *Caryophyllaceae* جنس *Dianthus* موطنة الأصلي منطقة البحر الأبيض المتوسط (1). يعد واحدا من أهم أزهار القطف المهمة اقتصاديا في العالم وذلك لجمال ألوانها ورائحتها المميزة (2). إذ بلغت مبيعات كندا في عام (2004) في عيد الأم أكثر من (38) مليون دولار(3). وفي قطرنا العراقي لوحظ في السنوات الأخيرة اقبال متزايد في اقتناء الإزهار الطبيعة ومنها أزهار القرنفل بسبب التطور الاجتماعي والثقافي والحضاري. وقد استعمل القرنفل *Dianthus* حديثا لإغراض طبية بسبب رائحته العطرية النفاذة المحفزة للشهية فضلا عن تأثيره الهاضم والطارد للغازات والمضاد للغثيان والتقيؤ ومسكن لألام الأسنان ومطهر عام كما ان للزيت العطري تأثير مضاد لبعض أنواع الجراثيم والفطريات (4). استخدمت تقنية الزراعة النسيجية في هذه النباتات لغرض الاكثار الخضري و التخلص من الفايروسات والفطريات وفي انتاج العديد من المركبات الفينولية والقلويدية ذات القيمة الصيدلانية (5). اذ بدات الزراعة النسيجية لهذا النبات من قبل العالم Stone عام 1963 بزراعة القمة النامية على اوساط غذائية وحصل منها على نبات قرنفل كامل (6) كما تمكن Earle و Langhams(7) من الحصول على كالس نبات القرنفل عند زراعة المرستيم ألقمي على وسط MSالمزود بـ0.5 ملغم/لتر من (2,4-D).

وأشار الباحث Thakur وآخرون (8) الى استحداث الكالس من سيقان نبات القرنفل في وسط (MS) المدعم بمنظمات نمو 0.5 ملغم/لتر (NAA) و0.5 ملغم/لتر (2,4-D) وتمايز هذا الكالس على الوسط الحاوي على 0.5 ملغم/لتر (NAA) و2.0 ملغم/لتر Kinetin، وقد

وجد Shabde و Murashige (9) ان ABA و GA3 له تأثير مشجع في تكوين الافرع الخضرية لنبات القرنفل. في حين تمكنت أحدى الدراسات من زراعة الخلايا المعلقة لكالس القرنفل و الحصول على أفرع خضرية منه (10). وقد استخدمت تقنية التحول الوراثي في انتاج نباتات قرنفل محولة وراثيا وامتازت هذه النباتات بمقاومتها العالية للمسببات المرضية (11،12). تهدف الدراسة الحالية الى استخدام عدد من منظمات النمو النباتية ومعرفة التركيز الأمثل لاستحداث ونمو وتمايز الكالس من الأجزاء المختلفة لنبات القرنفل فضلا عن استخدام عدد من الاوكسينات لتجذير الأفرع الخضرية واختيار أفضلها.

المواد وطرائق العمل:-

1- مصدر البذور:-

استخدم في هذه الدراسة بذور نبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L التي تم الحصول عليها من الأسواق المحلية.

2- الوسط الغذائي وتعقيمة:-

استخدم وسط Murushige and Skoog.1962 (MS) (13) في إنبات البذور واستحداث الكالس وتمايزه، واستخدم الوسط بعد إضافة 8.0غرام/لتر من الاكار و30 غرام/لتر سكروز. وضبط الرقم الهيدروجيني pH بحدود (5.8-6.0) وتم التعقيم باستخدام جهاز المؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121م° وضغط 1.04 كغم/سم^2 لمدة 20 دقيقة.

3- زراعة البذور وإنتاج البادرات المعقمة:-

تمت عملية التعقيم السطحي لبذور القرنفل (*Dianthus caryophyllus* L) باستخدام محلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl (القاصر التجاري) مع الماء المقطر وبنسب مختلفة (1:1) و (2:1) ولمدد زمنية (10،15) دقيقه، ثم غسلت البذور بالماء المقطر عدة مرات لإزالة اثار المعقم منها ونقلت إلى طبق بتري حاوي على أوراق ترشيح معقمة لغرض تجفيفها من الماء العالق بها ثم زراعتها في أنابيب زجاجية حاوية على وسط MS خالي من منظمات النمو ونقلت الى غرفة الزرع ووضعت تحت ظروف الظلام التام لمدة 3 ايام في درجة حرارة 25± 2 م° وبعد الإنبات نقلت الى ظروف الحاضنة الاعتيادية (16 ساعة ضوء /8 ساعة ظلام) وشدة إضاءة 2000 لوكس.

4- زراعة الأجزاء النباتية واستحداث الكالس:- استخدمت البادرات المعقمة الناتجة من تنمية البذور الفقرة (3) بعمر 3-4 أسابيع كمصدر للحصول على الأجزاء النباتية المختلفة (الاوراق، السيقان، الاوراق الفلقية، الجذور، السيقان تحت الفلقية) والتي قطعت بطول 1سم^2 ونقلت الى

دوارق زجاجية سعة 100 مل تحتوي 25 مل من وسط (MS) الصلب المدعم بتداخلات متباينة مختارة من الاوكسينات والسايتوكاينينات ذات التراكيز المختلفة، حيث تضمنت استخدام BA بتركيز (0.0,0.05,0.1,0.5,0.0,2.0،1،3.0) متداخلا مع 2,4-D بتركيز (0.1،0.0,0.5) و متداخلاً مع IAA (0.0,0.05,0.1). وتمت الزراعة بواقع 5 قطع/ جزء نباتي/ معاملة بعدها حفظت العينات في غرفة الزرع بدرجة حرارة 25±2مْ وبتعاقب ضوئي 16 ساعة ضوء/ 8 ساعة ظلام وشدة اضاءة 2000 لوكس. تم تقدير الوزن الطري للكالس النامي على افضل وسطين غذائيين منتخبين من الاوساط المستخدمة سابقا وذلك باخذ 1غم منه بعد مرور 30 يوما من بدء الزراعة.

5- تمايز الكالس وتكوين نباتات كاملة

يتضمن مرحلتين هما:

1.5- إنتاج الافرع الخضرية من الكالس

نقلت قطع الكالس المستحدث من (السيقان، الأوراق، الأوراق الفلقية،السيقان تحت الفلقية، الجذور)، بوزن 1غم/قطعة الى وسط MS الصلب الحاوي على تراكيز مختلفة من BA (0.05,0.06,0.1,0.0,1.0,3.0)ملغم/لتر متداخلة معIAA (0.05,0.06,0.1,0.0,1.0,3.0) ملغم/لتر ثم حضنت العينات في الظروف المشار اليها في الفقرة(4). وبواقع 3مكررات/معاملة.

2.5- تجذير الافرع الخضرية

اخذت الافرع الخضرية الناتجة من تمايز الكالس وازيلت عنها بقايا الكالس من القاعدة، ثم نقلت الى قناني زجاجية حاوية على وسط MS الصلب الحاوي على تراكيز مختلفة (0.05، 0.1، 0.5، 1.0، 3.0)ملغم/لتر من الاوكسينات (IBA,NAA,IAA) كلا على انفراد، وحضنت في نفس الظروف المذكورة اعلاه.

بعدها تم نقل النباتات الكاملة المتكونة من الزراعة النسيجية الى سنادين حاوية على تربة مزيجية معقمة. غطيت هذة السنادين بعد الزرع باكياس نايلون مثقبة لمدة 3-4 ايام، اعقبها رفع هذه الاغطية ونقلها الى البيت الزجاجي للاعتناء بها ومتابعة نموها.

تمت المقارنة بين النباتات الناتجة من الكالس والنباتات الناتجة من البذور بعمر 30 يوما في بعض من الصفات المدروسة شملت طول الساق ومساحة وعدد الأوراق والعقد والافرع الخضرية.

النتائج:-

1- كفاءة التعقيم السطحي لبذور القرنفل وانتاج نباتات سليمة:-

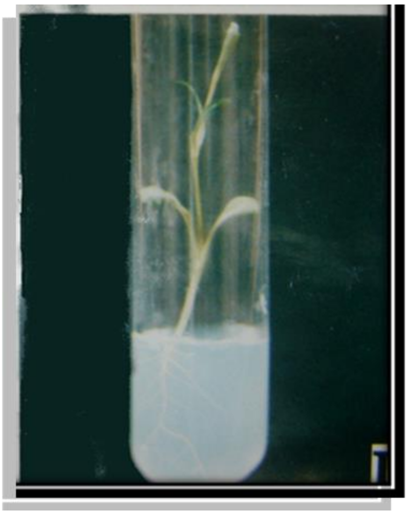
بينت النتائج الواردة في الجدول(1) ان افضل فترة زمنية لتعقيم لبذور بمحلول هايبوكلورايت الصوديوم كانت 15 دقيقة عند استخدام التخفيف (1:1) حجم: حجم من محلول

هايبوكلورات الصوديوم المخفف **بالماء**، اذ بلغت كفاءة التعقيم 92% لذلك اعتمدت هذه النسبة في التعقيم خلال الدراسة.

الجدول(1): كفاءة تعقيم بذور نباتات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. في محلول هايبوكلورات الصوديوم

المادة المعقمة (حجم:حجم)	مدة التعقيم (دقيقة)	عدد البذور المستخدمة	عدد النباتات السليمة (غير ملوثة)	كفاءة التعقيم(%)
2:1	10	50	42	84
2:1	15	50	45	90
1:1	10	50	45	90
1:1	15	50	46	92

وقد اعتمدت نباتات القرنفل التي بعمر 3–4 اسابيع كمصدر للاجزاء النباتية المختلفة لغرض استحداث الكالس منها (الشكل1)



الشكل (1): نبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* بعمر 15 يوم الناتج من زراعة البذور على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو

2- إنشاء مزارع الكالس

1.2– تأثير إضافة منظمي النمو (BA و2,4-D) في استحداث الكالس من الأجزاء النباتية المختلفة:– أشارت النتائج إلى ان تأثير كل من BA و 2,4-D في استحداث ونمو الكالس من الأجزاء النباتية لنبات القرنفل أظهرت تباينا في نسبة الاستحداث باختلاف تراكيزها وبفترات زمنية مختلفة ويوضح الجدول 2 ان زراعة القطع النباتية المختلفة اعطت اعلى استجابة في استحداث الكالس في وسط MS الحاوي على BA بتركيز0.1 ملغم/لتر مع 2,4-D بتركيز 0.5

ملغم/لتر، اذ بلغت نسبة استحداث الكالس 100% من قطع السيقان والأوراق الفلقية والسيقان تحت الفلقية في حين انخفضت نسبة الاستحداث في الجذور الى 86.6%، لذلك اعتمد هذا الوسط لادامة الكالس وحساب وزنه الطري وكوسط للمقارنة في هذة الدراسة ورمز له بوسط (MS_1).

الجدول (2): استحداث الكالس من الأجزاء النباتية المختلفة لنباتات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. في وسط MS الصلب المزود بتراكيز متباينة BA و 2,4-D

السيقان تحت الفلقية	الجذور	الأوراق الفلقية	الأوراق	السيقان	2,4-D	BA
استحداث الكالس (%)					منظمات النمو (ملغم /لتر)*	
–	–	–	–	--	0.0	0.0
80.0	733	86.6	86.6	100	0.1	0.05
93.3	66.6	100	93.3	100	0.1	0.1
33.3	40.0	100	100	86.6	0.1	0.5
40.0	33.3	46.6	46.6	53.3	0.1	1.0
–	–	66.6	53.3	60.0	0.1	2.0
–	–	–	–	–	0.1	3.0
86.6	80.0	73.3	100	93.3	0.5	0.05
100	86.6	100	100	100	0.5	0.1
86.6	66.6	93.3	93.3	100	0.5	0.5
60.0	26.6	73.3	53.3	60.0	0.5	1.0
40.0	6.60	40.0	20.0	40.0	0.5	2.0
20.0	6.60	–	6.60	13.3	0.5	3.0

* معدل 5قطع نباتية/ جزء نباتي/ معاملة

– لم يحدث استحداث للكالس

2.2- تأثير إضافة منظمي النمو (BA, IAA) إلى وسط MS لاستحداث الكالس من الأجزاء المختلفة للقرنفل:- أظهرت النتائج في الجدول (3) تباينا في استحداث ونمو كالس الأجزاء النباتية المختلفة باختلاف تركيز كل من BA و IAA وبمدد زمنية مختلفة ويلاحظ من خلال النتائج ان زراعة القطع النباتية المختلفة أعطت أفضل استجابة في استحداث الكالس في وسط MS الحاوي على (0.1 IAA +0.1BA) ملغم/لتر. اذ بلغت فيه نسبة استحداث الكالس100% من قطع السيقان والأوراق الفلقية والسيقان تحت الفلقية مع اختلاف في الفترات اللازمة للاستحداث، بينما كانت نسبة استحداث الكالس في قطع الجذور 93.3% في حين أظهرت الأوراق استجابة اقل بلغت 86.6% لذلك اعتمد هذا الوسط اساسا في استحداث الكالس وادامته وحساب وزنه الطري وبوصفه وسط للمقارنة في هذة الدراسة ورمز له بوسط (MS_2).

الجدول (3): استحداث الكالس من الأجزاء النباتية المختلفة لنباتات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. في وسط MS الصلب المزود بتراكيز متباينه من BA و IAA

منظمات النمو		استحداث الكالس (%)				
BA (ملغم/ لتر)*	IAA	السيقان	الأوراق	الأوراق الفلقية	الجذور	السيقان تحت الفلقية
0.0	0.0	–	–	–	–	–
0.05	0.05	100.0	66.6	86.6	86.6	93.3
0.1	0.05	80.0	60.0	80.0	100.0	100.0
0.5	0.05	93.3	66.6	60.0	46.6	100.0
1.0	0.05	60.0	40.0	73.3	60.0	80.0
2.0	0.05	–	–	46.6	40.0	-
3.0	0.05	–	–	–	–	–
0.05	0.1	80.0	73.3	100.0	100.0	73.3
0.1	0.1	100.0	86.6	100.0	93.3	100.0
0.5	0.1	100.0	66.6	46.6	80.0	60.0
1.0	0.1	60.0	46.6	–	60.0	53.3
2.0	0.1	–	–	–	40.0	–
3.0	0.1	–	–	–	60.0	–

* معدل 5 قطع نباتية/جزء نباتي/معاملة

– لم يحدث استحداث للكالس

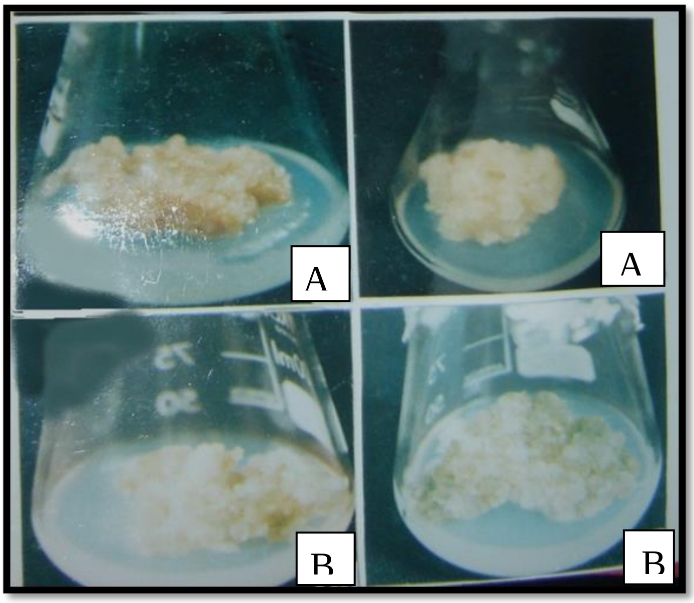
3- تقدير الوزن الطري للكالس

أشارت النتائج في الجدول (4) الى ان نمو الكالس كان متفاوتا بين الاجزاء النباتية المختلفة، اذ لوحظ تفوق قطع كالس الجذور على كالس بقية الاجزاء عند زراعته على وسط MS_1 الشكل (A.2). اذ بلغ وزنه الطري (2.179)غم يليه كالس السيقان تحت الفلقية (1.779) غم الشكل(B.2). في حين كان الوزن الطري لكالس السيقان تحت الفلقية افضل من بقية كالس الاجزاء النباتية الأخرى، اذ بلغ وزنه الطري 2.100 غم في وسط MS_2 الشكل(C.2) يلية كالس الجذور (1.462)غم. الشكل(D.2).

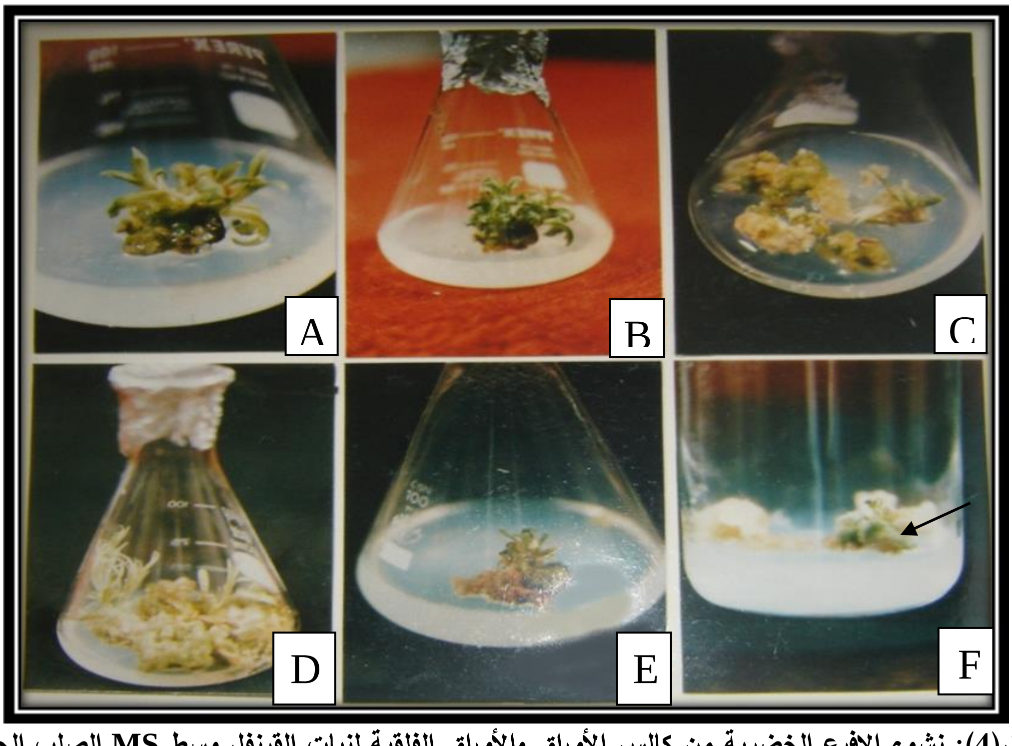
الجدول(4): معدلات الأوزان الطرية لكالس أجزاء نباتات القرنفل بعد 45 يوما في وسطي MS_1 و MS_2

مصدر الكالس	معدل الوزن الطري / (غم)	
	MS1	MS2
السيقان	1.285	1.255
الأوراق	1.402	1.335
الأوراق الفلقية	1.692	1.375
الجذور	2.179	1.462
السيقان تحت الفلقية	1.779	2.100

*1غم/جزءنباتي/معاملة وبثلاث مكررات



الشكل(2): مزارع كالس الأجزاء المختلفة لنباتات القرنفل بعمر 45 يوم المزروعة على كل من الوسطين المنتخبين (MS1 من جهة اليمين) (MS2 من جهة اليسار) A-كالس الجذور B- كالس السيقان تحت الفلقية



الشكل(4): نشوء الافرع الخضرية من كالس الأوراق والأوراق الفلقية لنباتات القرنفل وسط MS الصلب الحاوي على تراكيز مختلفة من لBA و IAA

B,A− نشوء الافرع الخضرية من كالس الأوراق بعمر 10،4 ايام على التوالي في وسط MS المزود (BA 3.0 ملغم/لتر+0.1IAA ملغم/لتر) D,C- نشوء الافرع الخضرية من كالس الأوراق الفلقية بعد 11،4 ايام على التوالي من زراعة كالس الأوراق الفلقية في سط MS المزود (BA 1.0 ملغم/لتر+0.05IAA ملغم/لتر):E- نشوء الافرع الخضرية من كالس الأوراق الفلقية بعد 7 ايام من زراعة في وسط MS المزود (BA 2.0 ملغم/لتر+0.05IAA ملغم/لتر):F- نشوء الافرع لخضرية من كالس الأوراق الفلقية بعد 6 ايام من الزراعة في وسط MS المزود (BA 1.0 ملغم/لتر+0.06IAA ملغم/لتر)

4- تمايز الكالس وتكوين نباتات كاملة

يتطلب تكوين النباتات من الكالس المرور بمرحلتين:

1.4- تكوين الافرع الخضرية:-أظهرت النتائج في الجدول (5) ان الكالس المستحدث له قدرة متباينة على تكوين الافرع الخضرية مع تباين اعدادها اعتمادا على مصدر الكالس المستخدم وتركيز كل من BAو IAA المضاف الى الوسط الغذائي. فبينما لوحظ عدم قدرة قطع كالس الجذور والسيقان و السيقان تحت الفلقية على التمايز فقد وجد ان وسط MS الحاوي على (BA 3.0 ملغم/لتر+I AA 0.1 ملغم/لتر) كان له تاثير في تمايز كالس الأوراق بنسبة100% وبمدة زمنية تتراوح 7-8 ايام (الشكل4.A.B). وقد لوحظ من جهة اخرى التفوق البارز لكالس الأوراق الفلقية في نشوء الافرع الخضرية في وسط MS الحاوي على (BA 1.0 ملغم/لتر+IAA 0.05 ملغم/لتر) اذ بلغت نسبة انتاج الافرع الخضرية 200% وبمدد زمنية تتراوح بين 10-15 يوم من زراعة قطع الكالس على وسط التمايز (الشكل4.C.D) بينما بلغت النسبة في كالس الأوراق على نفس الوسط 75% وبمدد زمنية تراوحت بين 5-8 ايام من زراعة قطع الكالس (الشكل4.D). اما الوسط MS الحاوي على (BA 2.0 ملغم/لتر+ IAA 0.05 ملغم/لتر) فقد حفز على تكوين الافرع الخضرية في كالس الأوراق الفلقية بنسبة 150% (الشكل4.E) و (BA 1.0 ملغم/لتر+IAA 0.06 ملغم/لتر)بنسبة 25% (الشكل4.F).

الجدول(5): تكوين الافرع الخضرية من كالس الأوراق والأوراق الفلقية لنباتات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. في وسط التمايز MS الصلب المدعم بتراكيز مختلفة من BA و IAA

IAA+BA+MS (ملغم/لتر)*	كالس الأوراق الفلقية			كالس الأوراق		
	العدد الكلي للأفرع الخضرية	إنتاج الأفرع الخضرية (%)	المدة الزمنية (يوم)	العدد للافرع الخضرية	إنتاج الأفرع الخضرية (%)	المدة الزمنية (يوم)
0.0+0.0+MS	–	–	–	–	–	–
0.05 +1.0	40	200	15–10	15	75	8-5
0.06 +1.0	5	25	7-5	–	–	–
0.05 +2.0	30	150	9-8	–	–	–
0.1 +3.0	–	–	–	20	100	8-7

* 3 مكررات / معاملة / جزء نباتي

2.4- تجذير الافرع الخضرية

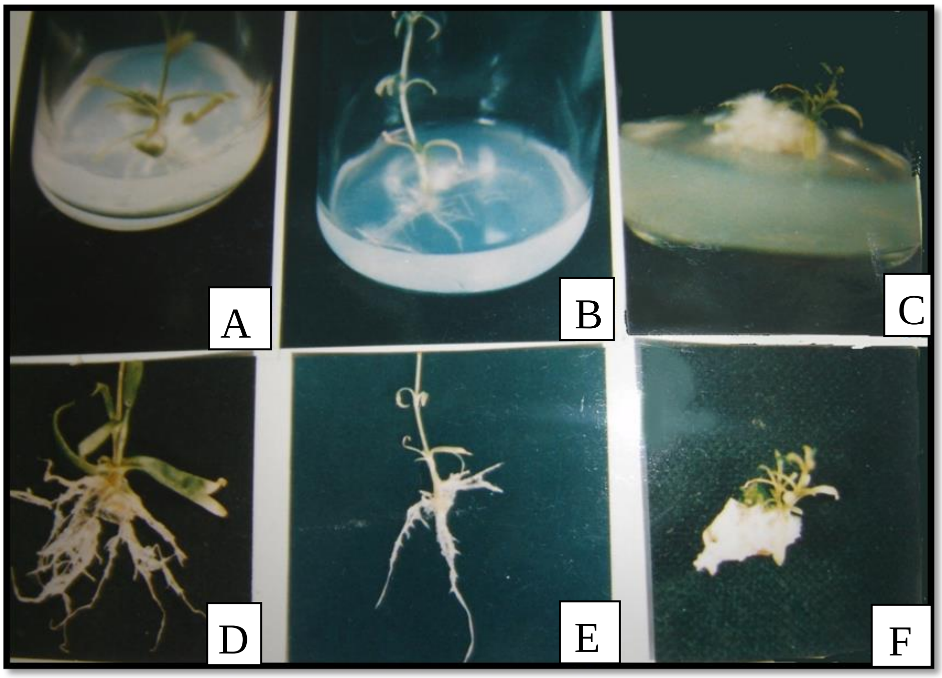
اظهرت النتائج ان نسبة تجذير الافرع الخضرية ومعدل عدد الجذور واطوالها اختلفت باختلاف التراكيز المتباينة من NAA,IAA,IBA وبمدد زمنية مختلفة (الجدول6). اذ لوحظ ان

نسبة التجذير بلغت 100% عند استخدام وسط MS الحاوي على IBA بتركيز 1.0 ملغم/لتر. كما لوحظ زيادة في معدل عدد الجذور 6.6 جذر وبمعدل طول جذر بلغ 4.8 سم وخلال مدة زمنية بلغت9 ايام من بدء زراعة الافرع الخضرية (الشكل5. A,D). كما لوحظ ايضا ان استخدام IAA بنفس التركيز 1.0 ملغم/لتر ادى أيضاً الى زيادة في نسبة التجذير ولكن بنسبة 83% (الشكل5. E,B) ونفس النسبة عند استخدام التركيز الواطئ 0.05 ملغم/لتر من NAA وبمعدل 2.0 جذر وبطول 1.7سم وبمدة زمنية استغرقت 10 ايام (الشكل5. F,C). نقلت بعد ذلك النباتات الى سنادين حاوية على تربة معقمة. وأظهرت النتائج قدرة نبات القرنفل على التأقلم لظروف التربة في المختبر وكذلك عند نقلها الى البيت الزجاجي والوصول إلى مرحلة التزهير (الشكل6).

الجدول(6): تجذير الافرع الخضرية الناتجة من كالس اوراق نبات القرنفل *Dianthus caryophllus* في وسط MS الصلب المضاف اليه تراكيز متباينة من IBA.IAA.NAA بعد 4 أسابيع من زراعة الافرع الخضرية

نوع منظم النمو	تركيز منظمات النمو النباتية (ملغم/لتر)*	التجذير (%)	معدل عدد الجذور	معدل طول الجذر (سم)	المدة الزمنية (يوم)
IAA	0.0	–	–	–	–
	0.05	33.3	0.3	0.2	20
	0.1	50.0	0.6	0.3	12
	0.5	66.6	1.0	0.6	17
	1.0	83.3	2.6	3.0	11
	3.0	66.6	1.0	1.1	16
NAA	0.05	83.3	2.0	1.7	10
	0.1	66.6	1.8	1.5	11
	0.5	33.3	1.3	0.2	15
	1.0	50.0	1.0	1.4	12
	3.0	33.3	0.6	0.3	16
IBA	0.05	33.3	0.3	1.1	17
	0.1	33.3	0.6	0.9	20
	0.5	50.0	2.6	1.2	11
	1.0	100	6.6	4.8	9
	3.0	66.6	1.6	1.1	18

*معدل ستة مكررات /معاملة



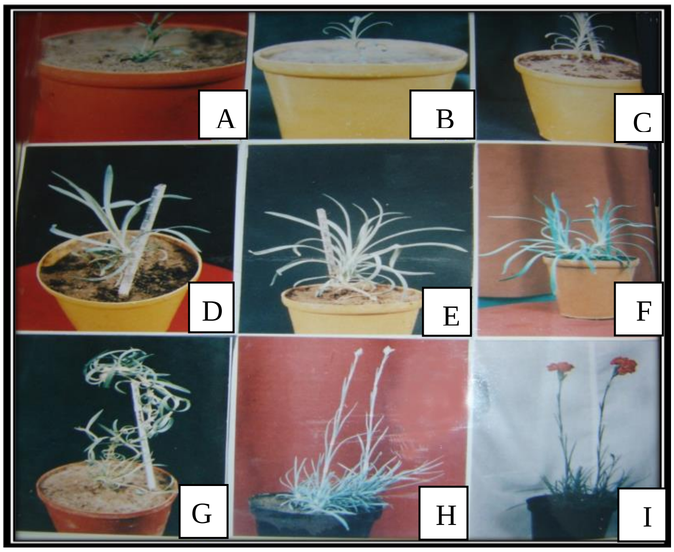
الشكل (5): تجذير الافرع الخضرية الناتجة من تمايز كالس نبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* على وسط MS الصلب الحاوي على اوكسينات (IBA,IAA,NAA) بعد أربعة أسابيع من زراعة الافرع الخضرية

A و D وسط MS الحاوي على IBA بتركيز 1.0 ملغم/لتر:

E و B وسط MS الحاوي على IAA بتركيز 1.0 ملغم/لتر

F و C وسط MS الحاوي على NAA بتركيز 0.05 ملغم/لتر

F و E و D تمثل المقارنة بين عدد الجذور واطوالها باستخدام اوكسينات مختلفة.



الشكل (6): اقلمة النباتات القرنفل الناتجة من مزارع كالس

– نبات متمايز من كالس ا بعمر6 اشهر من نقله الى التربة والوصول الى مرحلة البراعم الزهرية A

– نبات متمايز من كالس الأوراق بعمر7 اشهر من نقله الى التربة والوصول الى مرحلة التزهير B وتكوين ازهار

5- مقارنة الصفات المظهرية بين النباتات البذرية و النباتات الناتجة من الكالس:-

لوحظ من خلال المقارنة بين النباتات الناتجة من الكالس والنباتات الناتجة من البذور بعمر 30 يوما ان هناك فروقا واضحة في الصفات المظهرية. اذ اظهرت النتائج في الجدول (7) ان هناك تفوقا للنباتات الناتجة من الكالس مقارنة بالنباتات الناتجة من البذور في بعض من الصفات المدروسة وشملت طول الساق ومساحة الورقة وعدد الأوراق والعقد والافرع، بينما لم يلاحظ اية فروقات تذكر في طول السلامية لكلا النوعين من النباتات علما ان النباتات الناتجة من الكالس زهرت بعد 28 أسبوعا من زراعة النبات في السنادين.

الجدول(7): مقارنة عدد من الصفات المظهرية بين نباتات القرنفل الناتجة من البذور والكالس بعمر30 يوم

الصفات	النباتات الناتجة من البذور	النباتات الناتجة من الكالس
طول الساق (سم)	2.0	4.5
مساحة الورقة (سم^2)	1.3	2.8
طول السلامية	1.0	1.0
عدد الأوراق (زوج)	3.0	6.0
عدد العقد	2.0	4.6
عدد الافرع (زوج)	1.0	2.0

تمثل القيم المذكورة أعلاه معدل (3) نباتات

المناقشة:-

ان نجاح استحداث الكالس من الاجزاء النباتية يعود الى استجابتها السريعة لظروف النمو والعوامل المحفزة الاخرى لنشوء الكالس كمنظمات النمو (14) الا ان نسبة استحداث ونمو الكالس في الاجزاء النباتية المختلفة قد تباينت مع اختلاف انواع وتراكيز منظمات النمو المضافة الى الوسط الغذائي والسبب يعود الى نوع القطع النباتية المزروعة ومحتواها من الهرمونات الداخلية ومدى توافقها مع منظمات النمو المضافة الى الوسط الغذائى (15).

ان زيادة تراكيز (BA مع IAA) و (BA مع 2,4-D) أدت إلى انخفاض نسب استحداث الكالس مع زيادة تراكيز (BA) المضافة الى الوسط الغذائي وهذا يتفق مع ما شار إليه (16)، وربما يعزى ذلك الى ان استحداث الكالس يعتمد على نسبة معينة من الاوكسينات والسايتوكاينينات في الوسط الغذائي وان اختلاف التوازن بينهما يؤثر في نشوء الكالس (15) او بسبب التراكيزالعالية من (BA) وعدم توافقها مع المحتوى الداخلي من الهرمونات النباتية للقطع النباتية المستخدمة مسببا تاخير او احيانا توقف حدوث الانقسامات المتكررة مما يترتب عليها انخفاض في قابليتها في استحداث الكالس(17). ان استخدام وسط (MS) مضافا اليه

(3.0BAملغم/لتر+2,4-D 0.1ملغم/لتر) وأيضا وسط (3.0BAملغم/لتر+IAA 0.05ملغم/لتر) ووسط (3.0BAملغم/لتر+IAA 0.1ملغم/لتر) لم يعطي إي استجابة في استحداث الكالس من جميع الأجزاء باستثناء قطع الجذور.

ان التفاوت بين وزن الكالس في وسطي (MS1 و MS2) وفي جميع الأجزاء النباتية المختلفة ماعدا كالس السيقان تحت الفلقية ربما يعزى السبب الى ان (2,4-D) اكثر فعالية من (IAA) في تحفيز نمو الكالس (18) وذلك لان (IAA) يتحلل ضوئيا بانزيم ($IAA_{oxidase}$) فضلا عن دخوله في تفاعلات جانبية تلغي تأثيره (19) او قد يكون السبب ان (2,4-D) يتلف ويمنع تكوين الصفيحة الوسطى مما يساعد على اتساع الجدار الخلوي وهذا يوضح السبب الذي يجعل (2,4-D) يزيد من تكوين الكالس (20) وهذا يتفق مع ما اشار اليه (21) بان ال 2,4 –D و BA حفز انتاج كالس نبات القرنفل بنسبة كبيرة. ان تشجيع وسط MS الصلب الحاوي على التراكيز مختلفة من (BA وIAA) لكالس الأوراق والأوراق الفلقية على تكوين الافرع الخضرية في نبات القرنفل وعدم قدرتها على التمايز في قطع كالس الجذور والسيقان والسيقان تحت الفلقية. قد يعزى الى نوع القطعة النباتية وتوازن منظمات النمو النباتية وتوفر المستويات المثلى من منظمات النمو للتمايز فضلا عن كفاءة وقدرة الخلايا المؤهلة للتمايز (22 و 23) او ربما يعود الى محتواها من الهرمونات الداخلية ومستوى منظمات النمو المضافة الى الوسط الغذائي (24). وقد أشارت دراسات اخرى الى فاعلية كل من (TDZ و IAA) في تمايز كالس نبات القرنفل (21)، في حين اشارت دراسات اخرى الى التاثير المحفز لـ BA وNAA في إنتاج المجاميع الخضرية من كالس الأوراق والقمم النامية (25) وكالس السيقان لنبات القرنفل (26) بينما اشارت دراسات اخرى الى فاعلية(BAP و NAA) في تمايز كالس نبات القرنفل(27).

وبالنظر لعدم تشجيع وسط (MS) الخالي من منظمات النمو على التجذير تم استخدام وسط(MS) المزود بتراكيز مختلفة من الاوكسينات (IAA أو NAA أو IBA) كلا على حدى والتي جميعها كانت مشجعة لتجذير الافرع الخضرية لكالس الأوراق وربما يعود السبب في ذلك الى ان الاوكسينات تعمل على تنشيط انقسام الخلايا وزيادة حجمها وتكوين مبادىء الجذور وتعمل على سرعة تجمع المركبات المساعدة للتجذير في قواعد الفرع الخضري (28) وهذا ما اشارت له دراسات اخرى الى نجاح تجذير الافرع الخضرية لنبات القرنفل (29) القرنفل الصيني (30) باستخدام الاوكسينات الثلاثة اعلاه. وقد اشارت النتائج الى ان نسبة التجذير واطوال الجذور والمدة الزمنية اللازمة للتجذير كانت متباينة باختلاف نوع وتركيز الاوكسينات المضافة الى الوسط وربما يعزى ذلك التباين الى مستوى المحتوى الداخلي من الاوكسينات المضاقة (19). وعموما نجد ان (IBA) كان افضل من (NAA او IAA) من حيت نسبة الاستحداث.

والسبب هو ان (IBA) يتحلل ببطء نسبيا بواسطة الانزيمات التي تحطم الاوكسينات وهي صفة مرغوبة لبقاء الاوكسينات فترة اطول في الانسجة (31) وهذا يتفق مع ما توصل اليه (32) بان (IBA) يعد الافضل في تجذير الافرع الخضرية لكالس نبات القرنفل.

ان نجاح عملية تجذير النباتات الناتجة من كالس القرنفل واقلمتها تفسر بقدرة النباتات المتكونة من الكالس على تحمل الظروف البيئية وهذا يعززه نتائج دراسات اخرى في نجاح اقلمة نبات القرنفل (33)، القرنفل الصيني (30). ان تفوق النباتات الناتجة من الكالس على النباتات البذرية من حيث الطول الساق ومساحة الورقة وعدد الافرع والعقد والأوراق قد يعزى الى وجود اختلافات وراثية تؤدي الى حدوث انشطار قسم من الكروموسومات او بسبب اعادة انتظامها بسبب مرورها على أوساط غذائية مختلفة (34).

المصادر:-

1) Jurgen A.; Witt T. and Gattsberger G., Biochemical Systematic and Ecology, 31:345-357 (2003)

2) Kanwar J.K. and Kumar S., Hort. Sci., 36:140-146(2009)

3) Newman K., "Carnation Campaign"..175 Bloor Street East, Toronto. (2005)

4) العاني، لمياء محمد نوري، منى جاسم، زينب ياسين والخماس عبد الهادي عبد الحميد. مجلة الدواء العربي، 2:90-101(2001)

5) Brar M.S.; Al-khayri M. and Klingaman G.L.. Arkansas Academy Sci., 49: 30-33(1995).

6) Sansavini S. and Cantliffe D. "Plant Biotechnology Applied to Horticultural Crops". Agricultural Research Center, Biotechnology, Department, Gembloux-Belgium. (1998).

7) Earle E.D. and Langhams R.W., Hortsciences, 10:608-610 (1975).

8) Thakur M.; Sharma D.R. and Sharma S. K., Plant Cell Repts., 20:825-828. (2002).

9) Shabde M. and Murashige T., American j. of Botany, 64(4), 443-448 (2004).

10) Ruffoni B.; Massabo F. and Volp I., Acta horticulture. 34(1) (1992).

11) Steijl H.; Niemann G.J. and Boon J.J., Physiological and Molecular Plant Pathology, 55:297-311. (1999).

12) Kanwar J.K. and Kumar S., Advances in Applied Science Research, 2011, 2 (2): 357-366 (2011).

13) Murushige I. and Skoog F., Physiol. Plant., 15: 437 – 449. (1962).

14) KALLAK H.; REI DLA M.; HILPUS I.; VIRU MAE K., Plant Cell, Tissue and Organ Culture, *51*: 127–135. (1997).

15) Collin H.A. and Edward G.S., "Plant cell" association with bio – scientific publishers ltd., UK.(1998).

16) الشمري، فراس حميد والصالح، هناء سعيد.، وقائع المؤتمر العلمي الأول لعلوم الحياة، جامعة الموصل –العراق (2009).

17) صالح، شفاء مهدي والملاح، مزاحم قاسم. مجلة التربية والعلم،28: 13–23 (1988).

18) Colli S. and Kerbaury G. B., Tissue and organ culture, 33(1):39-44. (1993).

19) Dodds J. H. and Robert L. W. "Experiments in plant tissue culture". 1st Ed. Cambridge university press, New York. (1982).

20) الكناني، فيصل رشيد ناصر "زراعة الأنسجة والخلايا النباتية". دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل (1987).

21) Kanwar J. K. and Kumar S., Hort. Sci., 36 (4): 140–146.(2009).

22) Purohit S.S. "Agricultural Biotechnology". Printed at Anis of fest Press, New Delhi. (1999).

23) FRE Y. L. and JANIC K. J., Journal of the American Society for Horticultural Sciences,116: 1108–1112 (1991).

24) Gulati A. and Jawal K.P., Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 29:199-205. (1992).

25) Simard M. H.; Frerriere N.M. and Silvy A. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 29:37-42 (1992).

26) Mehta R.; Sharma S. and Nath A.K Indian Journal of Plant Physiology, 12(2): 120-126 (2007).

27) Hoque M. I.; Hashem R.; Khatun M. and Saker R.H., Plant Tissue Culture, 6(2):99-106 (1996).

28) Farooq A.; Mandal B.B. and Sandhya G., Appl. Biol. Res. 10: 193-201. (2008).

29) Kharrazi K.; Nemati I. H. Tehranifar A.; Bagheri A.; and Sharifi A., J. Biol. Environ. Sci., 5(13): 1-6 (2011).

30) kantia A. and Kothari S.L., Scientia Horticulture, 96:205-212. (2002).

31) وصفي، عماد الدين. "منظمات النمو والازهار". الكتبة الاكاديمية، القاهرة. (1995).

32) Ajitabh B. and Madhumita C. T., "Micropropagation of Carnation". LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG.(2010).

33) Ilahi I.; Aziz, f. and Jabeen M.,Pak.J.Bol., 27 (2):411-415.(1995)

34) Arous S.; Boussaid M. and Marrakchi M., J. Appl. Hort., 3 (1): 17-22. (2001).