تاثير المرحلة التطورية للبويغات ونوع الوسط الغذائي ومنظمات النمو في استحثاث الكالس الأحادي من زراعة متوك الباقلاء *Vicia faba*

Effect of the Developmental Stage of Microspores, Growth Regulator and Medium type on Callus indication from Broad bean *Vicia faba* Anthers Culture

ستار عبد الله شلاهي ضحى ميسر مجيد إيمان نعمان إسماعيل
مركز بحوث التقنيات الإحيائية / جامعة النهرين
Sattar Abdullah Shlahi Duha M. Majeed Eman Numan Ismail
Biotechnology Research Center\ University of Al-Nahrain

المستخلص:

أخذت المتوك من البراعم الزهرية للباقلاء صنف Aquadlce إذ حددت كل المراحل التطورية للبويغات وحسب طول البراعم الزهرية ، زرعت المتوك على وسط Schenk and Hildebrandt (SH) المعدّل بأضافة تركيبة الحديد المستخدم في وسط Murashige and Skoog (MS) ومتحلل الكازين 400 ملغم/ لتر وبعض الأحماض الامينية كما اضيفت إليه توليفات مختلفة من منظمات النمو : كاينتين، نفثالين حامض الخليك ،4،2- ثنائي كلوريد فينوكسي حامض الخليك (2,4-D + NAA + Kin) على الترتيب وبنزيل ادنين (2,4-D + NAA + BA) وبتراكيز مختلفة . كانت افضل توليفة لاستحثاث الكالس في الوسط المعدل SH وبالتوليفة (2,4-D + NAA +BA) وللبراعم الزهرية بطول 8-7.1 ملم التي تحوي بويغات microspores احادية النواة uninucleate، وبنسبة استحثاث للكالس 50%، استخدمت ثلاثة تراكيز (0 ، 1 ، 2) ملغم/ لتر من حامض الاسكوربيك لتفادي إفراز المركبات الفينولية في الوسط الغذائي فكان للتركيزين (1 ، 2) تأثير ايجابي في اختزال المواد الفينولية من الوسط عما هو عليه في التركيز (0) إذ ظهرت المواد الفينولية في الوسط الغذائي ، كما فحص الكالس المستحث خلوياً فكانت نتائج الفحص أن الخلايا المستحثة من براعم زهرية طولها 2.5-6.4 ملم تحوي 12 كروموسوم= 2n ، في حين كان عدد الكروموسومات في الخلايا المستحثة من براعم طولها 6.5-8 ملم هو6 كروموسوم = n احادية غالبا مع وجود بعض الخلايا الثنائية ، 12 كروموسوم ، في نفس قطعة الكالس .

Abstract

Anthers were taken from bean flower buds of the variety Aquadlce and microspore developmental stages were determined according to flower bud sizes. Anthers were cultured on modified Schenk and Hildebrandt medium (SH) supplemented with EDTA ferric monosodium salt to the SH medium which was taken from formulation of Murashige and Skoog (MS), casein hydrolysate 400 mg/l, some amino acids, and different combinations of growth regulators; kinetin and naphthalene acetic acid and 2, 4- dichlorophenoxyacetic acid (Kin + NAA + 2, 4-D) and benzyl adenine (BA + NAA + 2,4-D) in different concentrations. The combination (BA + NAA + 2, 4-D) used with flower bud sizes (7.1-8) mm, containing uninucleate microspores, gave better callus induction (50%). It was also found that the concentrations [1.0, 2.0] mg/l of ascorbic acid were better to prevent the accumulation of phenols in the medium than the concentration [0.0] mg/l. The cytological analysis revealed that the number of chromosomes in callus induced from flower bud sizes (2.5-6.4) mm contained diploid (2n=12 chromosomes), whereas chromosomes in callus induced from flower bud sizes (6.5-8.0) mm contained haploid (n=6 chromosomes) with the presence of some diploid cells (12 chromosomes).

كلمات مفتاحية: المرحلة التطورية للبويغات، كالس، وسط غذائي SH، الباقلاء، متحلل الكازين، زراعة متوك.

Key words: Microspores developmental stage, callus, SH medium, faba bean, casein hydrolysate, anther culture.

المقدمة

تعد المحاصيل البقولية ذات اهمية تغذوية عالية لاحتوائها عل نسب مرتفعة من البروتين مقارنة بالمحاصيل الاخرى ، ولهذا فقد حضيت باهتمام مربو النبات لاستنباط اصناف جديدة ذات مواصفات زراعية وانتاجية ونوعية جيدة . وان احدى هذه الطرق الحديثة في تحسين هذه المحاصيل هو انتاج نباتات احادية العدد الكروموسومي من زرا عة المتوك او البويضات غير المخصبة ومضاعفتها للحصول على نباتات نقية وتشير المصادر الى عدم وجود طريقة معتمدة protocol لانتاج نباتات احادية العدد الكروموسومي في الباقلاء [1،2]. إن زراعة المتوك والبويغات خارج الجسم الحي تقنية حديثة لإنتاج نباتات أحادية العدد ا لكروموسومي يمكن مضاعفتها لتعطي نباتات نقية (متجانسة وراثيا) [3] مع ذلك فان محاصيل اقتصادية قليلة من البقول استخدم فيها تقانة زراعة المتوك والبويغات لإنتاج النباتات الاحادية المجموعة الكروموسومية مثل الحمص [4]، البزاليا [5] وفول الصويا [3] وبعض أنواع الترمس [6] ولم يذكر [2] في قائمتهم إمكانية الحصول على نبيتات احادية العدد الكروموسومي في الباقلاء.

تعد الباقلاء (2n=12 كروموسوم) [7] من محاصيل البقول المهمة في العالم لكونها مصدر ممتاز للبروتين ، ومحصول مهم يستخدم للاستهلاك البشري ووالحيواني وهي ايضاً تلعب دوراً كبيراً في التثبيت الحيوي للنتروجين الجوي [8] إلا إن البحوث التي أجريت عليها في مضمار زراعة المتوك والبويغات نادرة جداً مثل [9] في 1978 و [10] في 1980 إذ استخدما تقانة زراعة الأنسجة لزراعة متوك الباقلاء للحصول على نسيج الكالس ولم يتمكن من ذلك الا الاخير [10].

إن من بين العوامل المهمة لنجاح زراعة المتوك هي المرحلة التطورية المناسبة للبويغات اذ تعد من اكثر المعلمات (parameters) الحاسمة لنجاح البويغات في تكوين الأجنة عند بداية الزراعة [11] ، مع ان ظروف النمو مؤثرة في الشكل المظهري للنباتات الواهبة فبالامكان ارتباط المراحل لتطور البويغ مع صفات النبات الشكلية الأخرى [12] ، فقد أكد كل من [9،11،13] انه توجد علاقة وثيقة بين مرحلة تطور البويغات في المتوك وحجم البرعم الزهري .

هناك عوامل كثيرة مؤثر في الاستجابة لزراعة المتوك من هذه العوامل التركيب الوراثي والحالة الفسلجية وظروف النمو للنباتات الواهبة وعوامل اخرى ولكن أهم هذه العوامل المرحلة التطورية للبويغات داخل المتوك وكذلك المركبات الأساسية للوسط الغذائي لزراعة المتوك [14] ولكن لا يوجد وسط غذائي مناسب لزراعة متوك جميع الأنواع النباتية وإنما لنوع واحد من الأنواع النباتية أو يكون متخصص لتركيب وراثي واحد فقط، لذلك لا يمكن التوصية باستخدام وسط غذائي وحيد لزراعة المتوك بشكل عام [15].

اجري البحث بهدف إيجاد المرحلة التطورية المثلى لتحول مسار تطور البويغات الى الانقسام واستحثاث الكالس الأحادي المجموعة الكروموسومية وإيجاد وسط غذائي مناسب لهذا الغرض .

المواد وطرائق العمل

زراعة البذور

زرعت بذور الباقلاء صنف Aquadlce في الحقل للموسمين 2009 و 2010 لغرض الحصول على البراعم الزهرية من النباتات الناتجة واستخدامها في تحديد المرحلة التطورية للمتوك لغرض زراعتها .

جمع وتثبيت البراعم الزهرية

جمعت البراعم الزهرية باطوال مختلفة مع الأخذ بنظر الاعتبار إزالة البراعم المتقدمة بالعمر إذ ثبتت في محلول كارنوي المتكون من حامض ألخليك الثلجي : كلوروفورم: كحول مطلق (6:3:1) على الترتيب وحفظت في الثلاجة لمدة (1 -30) يوم لحين التصبيغ وتحضير الشرائح إذ صنفت قبل تصبيغها حسب طول البرعم الزهري وباطوال تتراوح(2.5-2.9)ملم وبزيادة مقدارها 0.4 ملم ولغاية طول 13 ملم .

التصبيغ وتحضير الشرائح

استخدمت الطريقة المعدلة من قبل [13] في تصبيغ البراعم الزهرية (المتوك) بصبغة الاورسين الخلي 5% المؤلفة مع 6 عياري من HCl لتحديد المراحل التطورية لخلايا البويغات الصغيرة microspores (حسب الأطوال المصنفة أعلاه) إذ وضعت البراعم الزهرية في محلول الصبغة على درجة حرارة 60 ±1 م في حمام مائي لمدة 2 دقيقة ثم هرست على شريحة زجاجية في قطرة من صبغة الاورسين الخلي 1%، تحت الغطاء الزجاجي وتم الفحص تحت المجهر الضوئي والتصوير على القوة تكبير 800 مرة.

التعقيم

غسلت البراعم الزهرية بماء الحنفية الجاري لمدة (30-60) دقيقة ثم غطست في كحول اثيلي 70% لمدة 30 ثانية بعدها غمرت في محلول هايبوكلورات الصوديوم 0.6% مع التحريك المستمر لتعقيم السطوح الخارجية للبراعم الزهرية لمدة 10 دقائق، ثم أزيل تأثيره بغسل البراعم الزهرية بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لمدة 5-10 دقائق لكل مرة [13] .

الأوساط الغذائية المستخدمة

استخدم الوسطان الغذائيانSH [16] وMS [17] واضيف إلى الاول 100 ملغم/لتر مايو اينوسيتول بدل 1000 ملغم/لتر . كما استخدم وسط SH المعدّل (نتائج تحت النشر) باضافة تركيبة الحديد المستخدمة في الوسط MS ومتحلل الكازين 400 ملغم/ لتر وبعض الاحماض الامينية (cys ,arg, gly,asp) (10 ، 10 ، 15 ، 5)ملغم /لتر على الترتيب.

وأضيف إليهما توليفات مختلفة من منظمات النمو كما في الجدول (1) كما اضيف الى الوسط SH المعدل توليفات مختلفة من منظمات النمو [9، 18] كما في الجدول (1) . كماأضيف السكروز بواقع 3% وعدل الـpH للاوساط الغذائية الى 5.8 واضيف الاكاروز بواقع 0.6% وعقم بالمؤصدة ، ثم اخرجت وبردت الى درجة حرارة 50م بعدها اضيف اليها حامض الاسكوربيك المعقم (خلال مرشحات دقيقة 0.22 مايكرون) بتركيزين (1 ، 2) ملغم/لتر فضلاً عن معاملة المحايد ثم صبت الاوساط في اطباق بتري ذات الاستخدام الواحد بقطر 50 ملم .

جدول (1): الهرمونات المضافة الى الوسطين الغذائيين MS و SH لاستحثاث الكالس من متوك الباقلاء.

السايتوكانينات (ملغم / لتر)	الاوكسينات (ملغم / لتر)			المصدر
	NAA	2,4-D	IAA	[9]
Kin(0.2)	0.0	0.0	0.0	[9]
Kin(0.2)	0.1	0.0	0.0	[9]
Kin (0.2)	0.0	5.0	0.0	[9]
Kin (0.2)	0.1	5.0	0.0	[9]
BA (10)	0.5	1.0	0.0	[18]
BA (0.0)	0.0	0.0	0.0	-----
BA (0.5)	0.0	0.0	1.0	-----
BA (2)	0.0	0.0	0.5	-----
BA (2)	0.0	0.0	0.0	-----

طريقة الزراعة

أستئصلت المتوك تحت مجهر التشريح من البراعم الزهرية في اطباق بتري معقمة تحوي قطرات من محلول حامض الاسكوربيك المعقم خلال مرشحات دقيقة .اجري عمل الاستئصال في ظروف معقمة داخل كابينة الزراعة ذات الهواء الطبقي . زرعت المتوك في أطباق بتري بواقع 10 متوك لكل معاملة وبمعدل (3)اطباق . حضنت الزروعات في الضوء الازرق بشدة إضاءة : 250 لوكس ، وفترة اسبوعين [13] ثم نقلت الى الضوء الأحمر بشدة إضاءة :275 لوكس وبتعاقب ضوئي 16ساعة ضوء \8 ظلام ، ودرجة حرارة 25 ±1 م لحين استحثاث الكالس ، واعيدت زراعة المتوك كل 4 اسابيع لغرض اكثاره .

تثبيت وتصبيغ نسيج الكالس

ثبت نسيج الكالس المستحث من المتوك بنفس المحلول (كارنوي) وحفظ بنفس طريقة تثبيت البراعم الزهرية لحين التصبيغ والفحص . استخدمت نفس طريقة تصبيغ البراعم الزهرية اعلاه في تصبيغ نسيج الكالس إلا إن المدة الزمنية كانت 5 دقائق في محلول الصبغة وعلى درجة الحرارة نفسها .

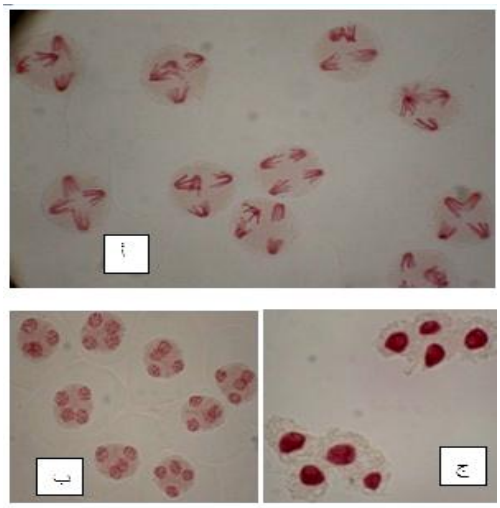
النتائج والمناقشة

علاقة طول البرعم الزهري بالمرحلة التطورية للمتوك

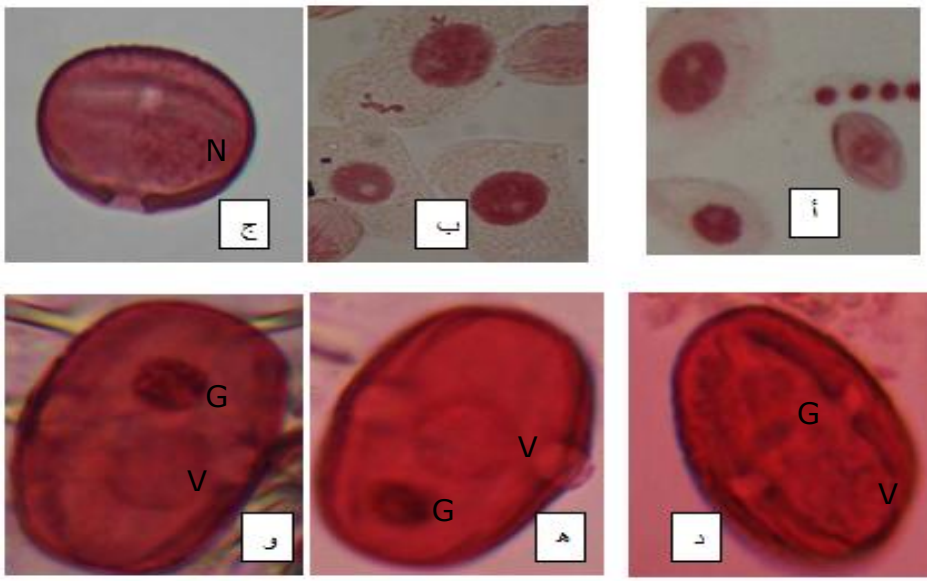
اظهرت نتائج الفحص الخلوي المبينة في الشكلين (1 ، 2) ان لطول البرعم الزهري لنبات الباقلاء علاقة وثيقة بمرحلة تطور حبة اللقاح داخل المتك اذ تبين ان اطوال البراعم الزهرية (2.5– 6.4)ملم تحوي في متوكها على خلايا امية مولدة للبويغ اتmicrospore mother cell ثنائية المجموعة الكروموسومية أوما قبلها وعليه تم التوسع في زيادة اطوال البراعم الزهرية في مرحلة البحث الثانية حتى طول 13 ملم ، كذلك بين الفحص الخلوي

وجود اكثر من مرحلة في بعض المتوك الشكل (2 :أ) . اما عن المرحلة الاولى للبويغات فكانت في متوك البراعم الزهرية بطول (6.5 -7) ملم والتي تحوي الرباعيات كما في الشكل (1: أ ، ب ، ج) ، في حين كانت المرحلة الثانية للبويغات في متوك البراعم الزهرية بطول (7.1 – 7.9)ملم الشكل (2: أ ، ب) ، كما كانت المرحلة الثالثة للبويغات في متوك البراعم الزهرية بطول (8 –9.4) ملم كما في الشكل (2:ج) ، واحتوت المتوك في البراعم الزهرية بطول (9.5 – 10.4)ملم على بويغات في المرحلة الرابعة كما في الشكل (2: د) ، اما المرحلة الخامسة بجميع اطوارها فكانت في متوك البراعم الزهرية بطول (10.5 – 11.5)ملم كما في الشكل (2: هـ) واحتوت بقية الاطوال حتى13 ملم على خلايا تحوي النشأ المرحلة السادسة الشكل (2:و) .

إن النتائج في أعلاه تتفق مع نتائج [13،11] كما في بقوليات اخرى اذ وجدوا ان لطول البرعم الزهري علاقة وثيقة بمراحل تطور حبوب اللقاح في حين لا تتفق هذه النتائج مع نتائج [9] اذ وجد ان ج ميع مراحل تطور البويغات في نبات الباقلاء هي في الاطوال (1– 4)ملم للبراعم الزهرية في جميع الاصناف التي استخدمها . ان امتداد المراحل التطورية للبويغات في المتوك في هذا البحث الى طول 13 ملم للبراعم الزهرية على ما يبدوا يرجع الى تأثير المحتوى الوراثي للصنف Aquadlce المستخدم في هذا البحث .



الشكل (1): يبين مراحل تكون الرباعيات في متوك البراعم الزهرية بطول 6.5- 7 ملم: أ-الخلايا في الطور الانفصالي الاخير من الميوز،ب- الخلايا في الطور النهائي من الميوز والكروموسومات الستة واضحة في كل خلية بنوية، ج- البويغات الرباعية في مرحلة تكونها المبكر (قوة التكبير 800 مرة).



الشكل (2): يبين مراحل تطور البويغات وحسب طول البرعم الزهري : أ- خلايا احادية النواة الحوصلية (النواة مجوفة) + الرباعيات، ب- النواة الحوصلية أكثر وضوحا ، ج- خلية احادية النواة (N) والنواة قريبة من الجدار مع تكون جدار الخلية، د- خلية ثنائية النواة في بداية الانقسام غير المتناظر والنواة الخضرية في الطرف الأسفل (V) والمولدة في الأعلى (G)، هـ- خلية ثنائية النواة فيها النواة الخضرية اكبر من المولدة، و-خلية ثنائية والنشأ مترسب فيها (قوة التكبير 800 مرة).

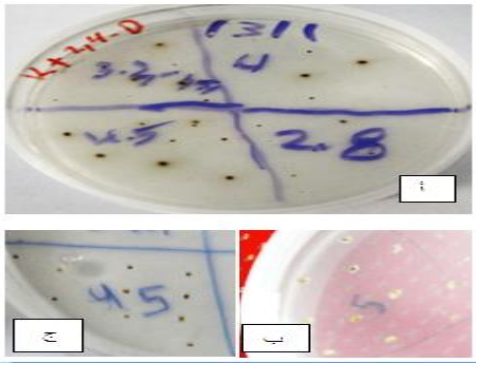
تأثير مكونات الوسط الغذائي

تأثير حامض الاسكوربيك في تثبيط المواد الفينولية واستحثاث الكالس

أظهرت النتائج إن لإضافة حامض الاسكوربيك بتركيز (1 ، 2) ملغم/لتر تأثير ايجابي في تثبيط انتاج المواد الفينولية التي تفرزها انسجة الباقلاء بشكل عام ومتوك نبات الباقلاء مقارنة بمعاملة المحايد التي ظهرت المواد الفينولية في اوساطها الغذائية غير المضاف إليها حامض الاسكوربيك والمنزرعة بمتوك الباقلاء كما في الشكل (3: أ، ب، ج) .

أما بشأن حامض الاسكوربيك وتأثيره كفيتامين مضاف إلى الوسط الغذائي في استحثاث الكالس فلم يكن له اي تأثير ايجابي وبكلا التركيزين [1 ، 2] ملغم/لتر .

يستنتج من هذا أن حامض الاسكوربيك بالتركيز الادنى (1)ملغم/لتر له تأثير ايجابي في خفض أو منع تكوين المركبات الفينولية المنتجة بواسطة جدران المتوك او المتراكمة نتيجة استخدام تراكيز مرتفعة من BA 10 ملغم/لتر في البحث الحالي والتي تعمل على تثبيط نمو الخلايا والاجزاء النباتية [19] وذلك لكونه من مضادات الأكسدة [18] . لذا توجب إضافة حامض الاسكوربيك إلى الوسط مع إن اضافته لم يكن لها تاثير يدعم استحثاث الكالس .



الشكل (3): تأثير إضافة حامض الاسكوربيك أ- إفراز المركبات الفينولية بشكل هالة حول المتك المأخوذ من براعم زهرية بطول (2.8- 4.5) ملم نتيجة عدم إضافة حامض الاسكوربيك، ب- عدم وجود المركبات الفينولية بسبب إضافة حامض الاسكوربيك والمتوك المأخوذة من برعم زهري بطول (5) ملم باللون الأخضر، ج- المتوك المأخوذة من برعم زهري بطول (4.5) ملم كما تظهر باللون البني وبدون مركبات فينولية.

تأثير الوسطين MS و SH في استحثاث الكالس

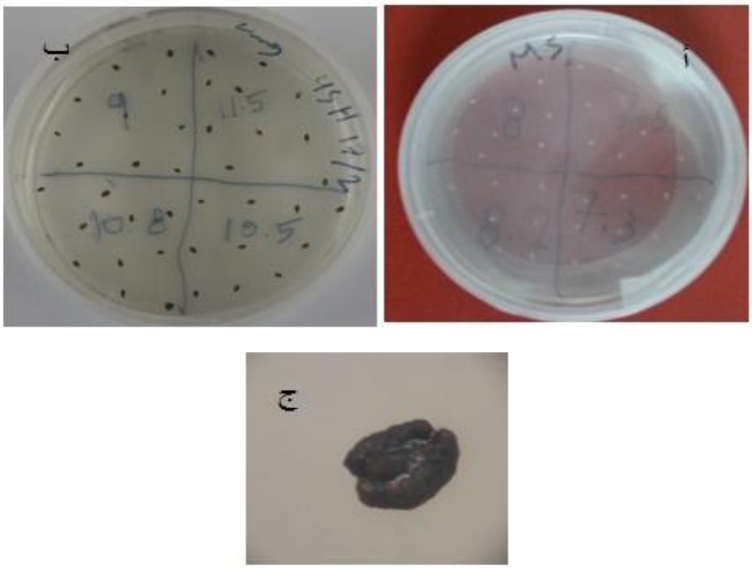
أظهرت النتائج أن استخدام الوسطين MS و SH كلٌ على حدة لم يكن لهما تأثير ايجابي يذكر في استحثاث الكالس من متوك نبا ت الباقلاء وبجميع مراحل التطور للبويغات المذكورة سابقاً باستثناء بعض الانتقاخات البسيطة نتيجة انقسام خلوي محدود في بعض المتوك المزروعة وخصوصاً للاطوال (3– 5) ملم للبرعم الزهري والتي لم تستمر أو تتطور لاستحثاث الكالس فضلاً عن المحافظة على اللون الأخضر للمتوك المزروعة في الوسطين MS و SH أو التحول إلى اللون البني [9] في الغالب كما في الشكل (3: ج) .

يستنتج من هذا أن الوسطين غير فعالين بصورة مستقلة بمكوناتهما المذكورة في المواد وطرائق العمل لاستحثاث الكالس من متوك الباقلاء للصنف المستخدم على الرغم من ارتفاع تراكيز الفيتامينات للوسط SH وارتفاع تركيز الحديد في الوسط MS مقارنة بتركيز الحديد في الوسط SH [16 ، 17] . عليه استخدم وسط معدل (نتائج تحت النشر) يجمع بين مكونات الوسطين إذ أضيف حديد الوسط MS إلى مكونات الوسط SH للاستفادة منه في استحثاث الكالس وكذلك الاستفادة من ارتفاع تراكيز الفيتامينات للوسط SH .

تأثير توليفة الهرمونات المضافة الى الوسطين MS و SH

أظهرت النتائج أن توليفة الهرمونات 2,4-D + NAA + K وبجميع تراكيزها المذكورة في الجدول (1) كانت سلبية في استحثاث الكالس من متوك الباقلاء المزروعة على كلا الوسطين MS و SH ولجميع اطوال البراعم الزهرية كما مبين في الجدول (2) والشكل (4: أ ، ب) .

أما عن توليفة IAA + BA وبجميع تراكيزها المذكورة في الجدول (1) كانت النتائج سلبية ولم تختلف عن سابقتها ايضاً في استحثاث الكالس من المتوك لنبات الباقلاء ولجميع اطوال البراعم الزهرية في كلا الوسطين MS و SH ، الا انه عند توليف BA مع كل من NAA و 2,4-D كما في الجدول (1) [18] فان 70% من المتوك المزروعة على الوسط SH تحفزت للانتفاخ ولكنها لم تتطور الى كالس فيما بعد الشكل (4: ب) .



الشكل (4): تأثير توليفات الهرمونات المضافة إلى الوسطين MS و SH :أ، ب- المتوك بنفس حجمها الاولي قبل الزراعة، ج- المتك منتفخ بلون بني وبحجم اكبر من حجمه الاولي قبل الزراعة (وهو مكبر 20 مرة) على الوسط SH مجهز بتوليفة 10 ملغ \ لتر BA + 0.5 من كلا (NAA+ 2,4-D).

تختلف متطلبات زراعة المتوك خارج الجسم الحي كما وجد في بحوث اخرى سابقة على انواع نباتية مختلفة سواء كانت من نفس العائلة البقولية [3، 4،13] او غيرها [6،15] او حتى على محصول الباقلاء [9 ،10] اذ تحتاج الى وسط غذائي متوافق مع توليفة من منظمات النمو المتوازنة التراكيز [9 ، 13] وملائمة لاستجابة الطراز الوراثي genotype للنبات الواهب للمتوك المزروعة [6، 9، 13] .

ان عدم استجابة المتوك المزروعة على الوسطين MS و SH لاغلب توليفات منظمات النمو على ما يبدو يعود الى ان متوك الباقلاء معقدة وتعتمد في استجابتها على نوع وتركيز منظم النمو من الاوكسينات والسيتوكاينينات وتوافقها مع الوسط الغذائي المستخدم وهذه النتائج في البحث الحالي اكدتها نتا ئج بحوث اخرى سابقة [5، 9، 13] او تعود الى الطراز الوراثي المستخدم لمحصول الباقلاء Aquadlce فان التوليفة المكونة من 2,4-D+NAA+Kin (0.2+ 0.1+ 5.0) ملغم/ لتر على الترتيب كان لها تاثير ايجابي نسبيا عند استخدامها من قبل بعض الباحثين [9] اذ اعطت بعض الانقسامات الخلوية والنمو الخضري لمتوك الباقلاء.

ان الانتفاخ الحاصل في المتوك عند اضافة التوليفة الحاوية 2,4-D+NAA+BA (10+ 0.5 + 0.5) ملغم/ لتر على الترتيب الى الوسط SH قد يعود الى قدرة التوليفة لاستحثاث بعض الانقسامات في البويغات microspores داخل المتوك والتي توقفت لاحقا نتيجة افتقار الوسط الغذائي الى بعض المكونات العضوية الظرورية لاستمرار النمو [5، 21] .

جدول (2): يبين تأثير توليفات الهرمونات في استحثاث الكالس من متوك الباقلاء المزروعة في الوسطين MS و SH

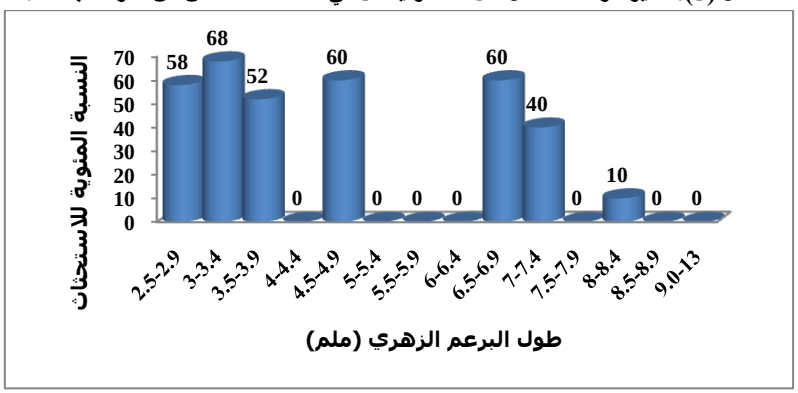
المصدر	توليفة الهرمونات (ملغرام / لتر)	الأوساط الغذائية	
		MS	SH
[9]	0.0) + NAA (0.0) + Kin(0.2)(2,4-D	-	-
[9]	2,4-D (0.0) + NAA (0.1) + Kin(0.2)	-	-
[9]	+ Kin (0.2) + NAA (0.0)) 2,4-D (5	-	-
[9]	2,4-D (5) +NAA (0.1) + Kin(0.2)	-	-
[18]	2,4-D (0.5) + NAA (0.5) + BA (10)	-	*~
.....	IAA (0.0) + BA (0.0)	-	-
.....	BA (0.5) + IAA (1)	-	-
.....	IAA (0.5) + BA(2)	-	-
.....	IAA (0.0) + BA (2)	-	-

***يشير الرمز ~ إلى وجود انتفاخات بسيطة للمتوك المزروعة، كما يشير الرمز- لعدم الاستجابة.**

تأثير استخدام الوسط المعدل SH في استحثاث الكالس من متوك الباقلاء

أظهرت النتائج إن استخدام وسط SH المعدلّ في استحثاث الكالس من متوك الباقلاء كان ايجابياً اذ يبين الشكلين (5، 6) استحثاث الكالس وبمعدل نسبة مئوية 50% عند اضافة توليفة منظمات النمو الحاوية 2,4-D +NAA+BA (10+ 0.5 +0.5) ملغم/لتر على الترتيب ولكل اطوال البراعم الزهرية كما يبينه الجدول (3) اما اعلى نسبة استحثاث لـلكالس فكانت لطول البرعم الزهري (3– 3.4)ملم وبلغت 68% واقل نسبة استحثاث فكانت لطول البرعم الزهري 8– 8.4 ملم وبلغت 10% وبخصوص نسبة الاستحثاث لبقية الاطوال للبراعم الزهرية فتراوحت بين (40-60)% كما في الشكل (6) إن استجابة المتوك للوسط المعدل SH في استحثاث الكالس يعود الى زيادة تركيز الفيتامينات والمكونات العضوية الاخرى الظرورية لخ لايا نبات الباقلاء [18] وكذلك نسبة الحديد المستخدم في الوسط الحالي (وهي النسبة المستخدمة في جميع الأوساط لزراعة المتوك) عما هو عليه في وسط SH الاصلي اذ ان له اهمية كبيرة في انقسام الخلايا الاحادية [20] ، اذ تحتاج البويغات في المتوك لتحويل مسارها androgenesis إلى المواد العضوية [5 ،21] وخصوصا في الباقلاء لكون متوكها معقدة وصعبة الاستجابة للانقسام وتكوين الكالس [9] .

الشكل (5): تأثير الوسط المعدلSH + التوليفة 5 في استحثاث الكالس من متوك الباقلاء.



الشكل (6): تأثير الوسط SH المعدلّ مع التوليفة [18] في استحثاث الكالس من المتوك وحسب طول البرعم الزهري

تأثير توليفات الهرمونات المستخدمة مع الوسط المعدل SH في استحثاث الكالس من متوك الباقلاء

اظهرت النتائج ان المتوك في جميع اطوال البراعم الزهرية لنبات الباقلاء صنف Aquadlce لم تستجب ولجميع التوليفات الاربعة 1-4 جدول (3) الا بعض الانتفاخات البسيطة في المتوك للبراعم الزهرية بطول 8 ملم في التوليفة الحاوية Kin(0.2) + NAA (0.0) + 2,4-D (0.0) ، وتحول لون المتوك الى اللون البني الماخوذة من براعم بطول (3-12)ملم الا في طول 12.5 ملم كان فيه لون المتوك اخضر في التوليفة 2 و 80% للمتوك من طول البرعم الزهري بطول 5 ملم انتفخت في التوليفة(5) 2,4-D+ Kin (0.2) + NAA (0.0) ، في حين كانت نسبة 15% من المتوك المزروعة على الوسط المعدلّ SH منتفخة والماخوذة من براعم زهرية بطول 10.8 ملم ، وانتفاخ 12.5% للمتوك من براعم زهرية بطول ملم3.6 ، و 6.5 % للمتوك الماخوذة من طول 3.9 ملم ونسبة انتفاخ 38% في المتوك الماخوذة من طول براعم زهرية 4.2 ملم في التوليفة (5) 2,4-D +NAA(0.1) + Kin(0.2) ، ان جميع هذه الانتفاخات لم تستمر فيها المتوك ولم تتطور الى كالس وتحول لون المتوك الى البني في الغالب ، في حين اعطت التوليفة 2,4-D (0.5) + NAA (0.5) + BA (10) نتائج جيدة لاستحثاث الكالس من متوك الباقلاء الماخوذة من بعض اطوال البراعم الزهرية والمبينة في الشكل (5) .

إن تضافر فعل التوليفة BA (10) + NAA (0.5) + 2,4-D (0.5) كأمثل توليفة لاستحثاث الكالس الجنيني [18] مع مكونات الوسط المعدل يشير الى حاجة المتوك الى مستويات مناسبة من الهرمونات والمواد العضوية المضافة الى الوسط الغذائي لاستحثاث الكالس [9] .

جدول (3): تأثير الوسط المعدلّ SH وتوليفة الهرمونات المستخدمة في استحثاث الكالس من متوك الباقلاء.

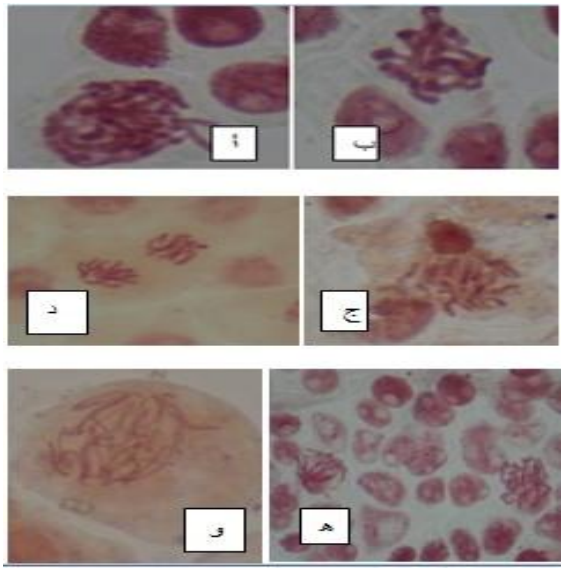
المصدر	توليفة الاوكسينات (mg/l)	السايتوكاينينات(mg/l) BA (10)	K (0.2)
[9]	NAA (0.0) + 2,4-D (0.0)	.....[3]	-[2]
[9]	NAA (0.1) + 2,4-D (0.0)	.....	-
[9]	NAA (0.0) + 2,4-D (5)	.....	-
[9]	NAA (0.1) + 2,4-D (5)	.....	-
[18]	NAA (0.5) + 2,4-D (0.5)	+++++[1]	.....

يشير كل رمز + الى الاستجابة بنسبة 10%.
يشير الرمز – الى عدم الاستجابة اي ان نسبة الاستحثاث هي 0%.
يشير الرمز ..... الى عدم وجود ارتباط السايتوكاينين بتراكيز الاوكسينات المقابلين للرمز.

نتائج الفحص الخلوي للكالس المستحث

أظهرت النتائج في الفقرة 1 من البحث الحالي ان البراعم الزهرية بطول (6.5-2.5)ملم قد حوت خلايا ثنائية المجموعة الكروموسومية وان الكالس المستحث من متوك هذه البراعم الزهرية هو من الاطوال (5.4-2.5) ملم، وعند فحصه خلوياً ظهر انه يحتوي على خلايا ثنائية المجموعة ا لكروموسومية كما في الشكل (7:أ، ب) أي انها توكد نتيجة الفحص الخلوي قبل زراعة المتوك وهي مطابقة لما وجدهُ [7] (2n = 12 كروموسوم) .

اما بشأن اطوال البراعم الزهرية (6.5– 8.4) ملم فان الكالس المستحث من متوكها احتوى على خلايا احادية المجموعة الكروموسومية haploid (n =6 كروموسوم) في الغالب كما مبين في الشكل (7: ج، د) ، وكذلك بعض الخلايا الثنائية diploid كما مبين في الشكل (7: هـ، و) هذا يدل على ان افضل مرحلة لزراعة المتوك هي مرحلة الخلايا احادية النواة uninucleate الموجودة في البراعم الزهرية بالاطوال المذكورة اعلاه وتتفق هذه النتائج مع نتائج كل من [1 ،13] في بقول أخرى، أما المرحلة ثنائية النواة binucleat فلم تستجب لاستحثاث الكالس . ان الخلايا الثنائية النواة تكون محاطة بجدار exine السميك الذي يقيدها فيزيائياً فضلاً عن عدم استجابتها للانقسام والنمو الخضري [9] ، أما في حالة خلايا الكالس ثنائية المجموعة الكروموسومية فهي ناتجة عن الانقسام الخلوي الخيطي واندماج النوى خلال نمو الكالس الذي يكون مصدره بطبيعة الحال بنصف العدد الكروموسومي [22] .



الشكل (7): نتائج الفحص الخلو ي للكالس المستحث من متوك الباقلاء : أ+ ب- خلايا ثنائية المجموعة الكروموسومية،ج – الخلية أحادية المجموعة الكروموسومية في طور الانفصال المبكر، د- الخلية أحادية المجموعة الكروموسومية في طور الانفصال المتأخر، هـ- تحوي خلية ثنائية على جهة اليمين وخلية احادية في طور الانفصال، و- خلية فيها اندماج نووي (قوة التكبير 800 مرة).

الاستنتاج

امكانية اعتماد المتوك الماخوذة من نباتات باقلاء واهبة نامية في الحقل لزراعتها خارج الجسم الحي *in vitro* والحصول على نسيج الكالس الاحادي العدد الكروموسومي .

استخدام الوسط الغذائي SH المعدل مع توليفة منظمات النمو الحاوية 2,4-D+NAA+BA(10+ 0.5 +0.5) ملغم/ لتر على الترتيب كان كفؤا في استحثاث نسيج الكالس لنبات الباقلاء .

اضافة حامض الاسكوربيك الى الاوساط الغذائية كان ايجابيا في التخلص من المركبات الفينولية التي تفرزها جدران المتوك .

المصادر

1. Croser, J.; M. Lulsdorf; P. Davies; H. Clarke; K. Bayliss; N. Mallikarjuna and K. Siddique. 2006. Toward Doubled Haploid Production in the Fabaceae: Progress, constraints, and Opportunities. Crit. Review in Plant Sciences. 25:2 (19): 139-157.
2. Wedzony, M.; B. P. Forster; I. Zur; E. Golemiec; M. Szechynska- Mebda; E. Dubas and G. Gotebiowska. 2009. Progress in Duobled Haploid Technology in Higher Plant.In:Touraev, A., B. P. Forster and S. M. Jain. Advances in Haploid Production in Higher Plants.Springer Science + Business Media B.V.pp:1-30.
3. Cardoso, M.B.; E.K. Santos; E. C. Mundstock and M.H.B. Zanettini. 2004. Initial Segmetation Patternsof Microspores and Pollen Viabilityin Soybean Cultured Anthers: Indicationof Chromosome Doubling. 47(5):703-712.
4. Croser, J. 2002. Haploid and Zygotic Embryo Culture of Chickpea (*Cicerarietinum*) Ph.D thesis, The Joint Centre for Crop Improvement, The institute of landand Food Resources, The University of Melbourne.pp:209.
5. Sidhu, P. and P. Davies.2005. Pea Anther Culture: Callus Initiation and Production of Haploid Plants.http//www.Pir.sa.gov.au/-data/assets/pdf-file/0016/45043/ss1-davies-pea-ant.
6. Baylsis, K.L.; J.M. Worth and W.A. Cowling. 2004. Pro- Embryos of *Lupinusspp.* Produced from Isolated Microspore Culture. Ast. J. Agr. Resour. 55:589-593.
7. Bhat, T. A.; S. Parveen and A. H. Khan. 2007. Meiotic Studies in TwoVarieties of *Vicia faba* L. (Fabaceae) after EMS Treatment. Asian J. Plant Sciences. 6 (1):51-55.
8. Jelenic, S.; P.T. Mitrikeski; D. Papes and S. Jelaska. 2000. Agrobacterium – MediatedTransformation of Broad Bean*Viciafaba*. Food Technol. Biotechnology. 38:167- 172.
9. Paratasilpin, T. 1978.Vegetative Development of Field Bean Pollen Cultured *in Vitro.* J. Sci. Soc.Thil, 4:139-145.
10. Hesemann, C. U. 1980. Haploid Cell in Callus from Anther Culture of *Vicia faba* Z. Pflanzenuchty. 84:18-27.
11. Lauxen, M.S; E. Kaltchuk-santos; C.Y. Hu; S.M. Callegari-Jacques and M.H. Bodanese- Zanettini. 2003. Association Between Floral Bud Size and Developmental Stage in Soybean Microspores: Implication for Anther Culture. Brazillian Archives of Biology and Technology. 46 (4): 515-520.
12. Rezanjad, F. 2007. The Effect of Air Pollution on Microsporogenesis, Pollen Development and Soluble Pollen Proteins in *Spartium junceum* L. (Fabaceae). Turk.J.Bot, 31:183-191.
13. شلاهي , ستار عبد الله .2010 . دراسة تأثير بعض العوامل في استحثاث الكالس من متوك نبات الفاصوليا . مجلة ديالى للعلوم الصرفة. 6 (4):209- 226 .

14. Smykal, P. (2000). Pollen Embryogenesis – The Stress Mediated Switch from Gametophytic to Sporophytic Development- Current Statusand Future Prospects. Biologia Plantarum. Brazillian Archives of Biology and Technology. 43 (4): 481-489.

15. Atanassov, A.; N. Zagorska; P. Boyadjiev, and D. Djilianov. 1995. *Invitro* Production of Haploid Plant.Word Journal of Microbiology. 11: 400 – 408.

16. Schenk, R. U., and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous plant Cell Culture. Can. J. Bot. 50: 199-204.

17. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised Medium for RapidGrowth and Bioassay with TobaccoTissue Culture. Physiol. Plant. 15:473 – 497.

18. Bahgat, S.; O. A. Shabban; O. El-Shihy; D. A. Lightfoot and H. A. El-Shemy. 2008. Establishment of the Regeneration System for *Vicia faba* L. Curr. Lssues. Mol. Boil. 11(1): 147-54.

19. 19. Aly, H. M.A. and K. Hattori. 2007. Histological Observations on Regeneration in Faba Bean Cotyledon (*Vicia faba* L.) Cultured Invitro.Asian J. of Plant Sciences. 6(5):723-731.

20. حسن ، احمد عبد المنعم .2007 . التكنولوجيا الحيوية وتربية النبات تطبيقات مزارع الأنسجة والهندسة الوراثية في مجال الإنتاج الزراعي والتحسين الوراثي للنباتات . الدار العربية للنشر والتوزيع ط1ع ص:783.

21. Nitsch, J.P. and C. Nitsch.1969. Haploid Plant form Pollen Grains. Science1 N-Y, 163:85-87.

22. الكناني ، فيصل رشيد ناصر . 1987 . زراعة الأنسجة والخلايا النباتية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . كلية العلوم ـ جامعة الموصل ـ العراق .229-236 .