استجابة بذور اللالنكي كليمنتاين للإنبات وتكوين الكالس وإنتاج القلويدات والهورمونات خارج الجسم الحي

Response of Clementine Mandarin seeds for germination and callus initiation and Alkaloids, hormones production *in vitro*

اياد عاصي عبيد وسام مالك داود * نور صبري ناصر*
كلية الزراعة / جامعة ديالى
* كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

Ayad Assi Obaid *Wessam Malek Dawood * Nour Sabry Nasser
College of Agriculture/ Univ. of Diyala
*College of Education and pure Science/ Univ. of Diyala

المستخلص

نفذ البحث في مختبرات زراعة الأنسجة النباتية التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق ، كلية الزراعة ، جامعة ديالى ، وهدف البحث الى دراسة تاثير بعض منظمات النمو النباتية والمجال المغناطيسي في نمو البادرات ونشوء كالس اللالنكي كليمنتاين *Citrus retciulata* L. Blanco في الوسط الغذائي MS ، كما درس تأثير زيادة كثافة خطوط الفيض المغناطيسي لمغانط معدنية بشدة 200 ملي تسلا ، وذلك بزيادة عدد المغانط الى 3 مغناطيس ، في إنتاج بعض منظمات النمو النباتية والقلويدات من كالس اللالنكي. اظهرت النتائج ان زراعة البذور على وسط مجهز بالكاينتين بتراكيز (0, 1, 2, 3, 4) ملغم/لتر تفوق معاملة المقارنة في معدل طول الرويشة إذ بلغت 30 ملم ، تفوق الوسط المجهز بالكاينتين بتركيز 4 ملغم / لتر في زيادة معدل عدد الفروع بعد مرور 8 أسابيع من الزراعة إذ بلغ أعلى معدل للفروع 1.7 فرع/ بادرة . بينت النتائج أن معاملة 2 ملغم/لتر 2,4-D تفوقت في نشوء الكالس ونموه في حين ان التداخل بين 2,4-D وTDZ ادى الى انخفاض نشوء الكالس ونموه . واظهرت النتائج ايضا زيادة كمية الهورمونات النباتية والقلويدات في كالس اللالنكي ، حيث ارتفعت كمية kinetin بنسبة 23.5 % قياسا بتركيزه في الكالس غير المعرض للمجال المغناطيسي في حين انخفضت كمية ABA و GA وIAA في الكالس المعرض للمجال المغناطيسي ، أما نتائج القلويدات فقد ادى تعريض الكالس الى المجال المغناطيسي الى زيادة كمية , Synephrine Tyramine and Octapamine وانخفاض كمية Ephedrine قياسا بالكالس غير المعرض له .

Abstract

This study was conducted in plant tissue culture Lab. Horticulture Dept., College of Agriculture, Diyala University to evaluated the effect of plant growth regulators, North and South pole of magnetic field on common mandarin (*Citrus reticulata* L. Blanco) seedling growth and callus initiation. Seeds were cultured on solidified MS medium to study the impact of increasing magnetic field flood on the production of some plant growth regulators, alkaloids callus initiation. Results can be summarized as follows: Kinetin at concentrations (0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0) mg/L for 8 weeks of treatment showed that the control treatment gave taller roots (30) mm while the treatment 4.0 mg/L gave the highest number of shoots 1.7 shoot/ seedling. In the magnetic field experiment, the effect of north and south pole of magnetic field 200 mT for six periods (0 , 2 , 6, 11 , `14 , 18) days, showed that the treatment of 18 days gave the best shoot length 22mm. When the medium supplemented with 2mg/ l 2,4-D enhances callus initiation, while the combine of 2,4-D and TDZ reduced the rate of initiation and growth of callus. The production of hormones and alkaloids from mandarin callus exposed to1, 2 or3 magnets recorded the highest amount of Kin in the presence of 3 magnets giving 125.45 µg/ g while the highest amount of ABA, GA , IAA was found in control callus which gave (91.61, 76.25, 51.18)µg/ g respectively. Alkaloids yield showed the presence

الكلمات المفتاحية : بذور اللالنكي ، كليمنتاين ، إنبات ، كالس ، القلويدات ، هرمونات

of Octapamine in the treatment of 3 magnets yielding 73.74 µg/g. The highest amount of Synephrine reached 366.99 µg/ g in the treatment of 3 magnets while the amount of Tyramine recorded 79.02 µg/ g in the treatment of two magnets. Ephedrine was higher in the callus that not being exposed reached 219.99 µg/ g.

المقدمة

تعد أشجار الحمضيات من النباتات الاستوائية المهمة اقتصادياً وهي تنتمي الى العائلة السذبية Rutaceae تأقلمت في المناطق تحت الاستوائية والمناطق الدافئة وغيرت بعض خصائصها بما يلائم بيئتها الجديدة [1] ان توظيف تقنية زراعة الأنسجة النباتية في الإكثار السلالي السريع للعديد من النباتات قد احدث طفرة كبيرة في زيادة عدد النباتات المنتجة بشكل مستمر وعلى مدار السنة[2] فضلا عن إنتاج مركبات الايض الثانوي المفيدة في ظل ظروف مسيطر عليها واستخراج مواد فعالة ذات استخدامات طبية من كالس النباتات [3] ونظراً لما للأشجار الخشبية المعمرة من أهمية في النواحي الاقتصادية واحتواء قسم منها على بعض المواد الصيدلانية ذات الاهمية الطبية والاقتصادية [4] . لذا استخدمت تقنية زراعة الأنسجة النباتية في إنتاج المركبات الطبية طيلة أيام السنة دون التقيد بموسم النمو [5] .

بينت بعض الدراسات إمكانية إكثار اللالنكي باستخدام السويقة الجنينية العليا على وسط MT [6] مجهزاً بالـ BAP إذ وجد أن تركيز 2 ملغم/لتر شجع تكون الفروع [7] ، كما وجد [8] ان زراعة بذور منزوعة الغلاف من الليمون الحامض المحلي على وسط MS مضاف الـ .Kin يؤدي الى تحسين نمو البادرات، كذلك بين ان زراعة بذور اللالنكي على وسط MS مضاف اليه 2,4-D ، BA أدى الى تشجيع تكون الكالس [9] . وقد توصل بعض الباحثين الى إمكانية استخلاص القلويدات من اشجار الحمضيات النامية في الحقل [10] ، فضلاً عن إمكانية استخراج القلويدات من كالس نبات *Ephedra strobilacea* Bung [11]. واظهرت بعض الدراسات اهمية تعريض الاجزاء النباتية المزروعة خارج الجسم الحي الى المجال المغناطيسي في تحسين إخلاف الفروع و تجذيرها وزيادة محتوى الأوراق من الكلوروفيل لبعض انواع أشجار الفاكهة [12،13] . اجريت هذه الدراسة لعدم توفر معلومات سابقة لتحديد تاثير المجال المغناطيسي في انتاج القلويدات والهورمونات من كالس اشجار اللالنكي فضلا عن دراسة دور بعض منظمات النمو في إنبات البذور منزوعة الغلاف ونمو البادرات .

المواد وطرائق البحث

اجريت الدراسة في مختبرات زراعة الأنسجة النباتية التابعة لقسم البستنة وهندسة الحدائق كلية الزراعة / جامعة ديالى . استخدم التعقيم السطحي لبذور ثمار اللالنكي كليمنتاين وذلك بغمرها في محلول هايبوكلورات الصوديوم تركيز5% (NaOCl)ولمدة 25 دقيقة ثم غسلت البذور اربع مرات بماء مقطر ومعقم لمدة 5 دقائق في كل مرة للتخلص من آثار مادة التعقيم . ازيل الغلاف الخارجي للبذور بتقشيرها للتخلص من القشرة الخارجية والداخلية لتسريع إنباتها [8] استعملت أملاح الوسط الغذائي MS [14] ، إستبدل الحديد Fe- EDTA بالحديد المخلبي Fe-EDDHA [15] وتم تعديل رقم الدالة الهيدروجينية PH (5.7) ، وزع الوسط الغذائي في قناني زجاجية سعة 125 مل وبواقع 20 مل لكل قنينة ، وغطيت القناني الزجاجية بورق الألمنيوم ثم عقمت على درجة حرارة 121م وضغط 1.04 كغم/سم^2 ولمدة 20 دقيقة .

عقمت جميع الادوات من ملاقط ومشارط وأطباق بتري والماء المقطر وأوراق الترشيح باستخدام جهاز المؤصدة Autoclave على درجة حرارة 121م وضغط 1.04 كغم/سم^2 لمدة 30 دقيقة فضلاً عن استخدام الكحول الاثيلي بتركيز 95% في تعقيم منضدة انسياب الهواء الطبقي و 70% لتعقيم الأيدي أثناء العمل [16] .

أجريت التجربة لتحديد تأثير Kinetin (6-furfuryl amino purine) في إنبات بذور اللالنكي ونمو بادراته بعد مرور 4 و8 أسابيع من الزراعة إذ أضيفت .Kin الى الوسط الغذائي قبل التعقيم بالتراكيز (0 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4) ملغم / لتر. وعرضت البذور المزروعة على وسط خالي من منظم النمو للمجال المغناطيسي لبيان اثره في نمو البادرات من خلال استخدام مغانط معدنية بيضوية الشكل بشدة 2000 كاوس/قطعة مغناطيس ولمدد تعريض مختلفة هي (0 ، 2 ، 6 ، 11 ، 14،18) يوماً .

اضيف منظم النمو الثيادازورون thidiazuron TDZ الى الوسط الغذائي MS بالتراكيز (1،0.5،0،3) ملغم/لتر زرعت بذور اللالنكي وبواقع بذرة واحدة في قنينة الزراعة وبعشرة مكررات لكل تركيز لدراسة تأثير استخدام TDZ في طول الرويشة (ملم) وطول الجذير (ملم) ونسبة تكون الكالس وحجم الكالس ولون الكالس وقوامه، واخذت القراءات بعد مرور 4 أسابيع من الزراعة . كما درس نوعين من الأوكسينات NAA Nephthalin acetic acid للتراكيز (1،2،3) ملغم/لتر و 2,4-D Dichlorophenoxy acetic acid بالتراكيز ((0.5،1، 2) ملغم/لتر كل على انفراد

وبواقع 10 مكررات لكل تركيز وبواقع بذرة واحدة لكل مكرر اخذت القراءات بعد مرور 4 اسابيع من الزراعة لطول الرويشة (ملم) وطول الجذير (ملم) وعدد الأوراق المتفتحة ونسبة تكون الكالس وحجم الكالس ولونه وقوامه . بناءً على نتائج التجارب السابقة ولاجل اكثار الكالس أضيفت TDZ بالتركيزين 0.5 ،1 ملغم / لتر متداخلا مع 2,4- D بالتراكيز 0.5 ، 1 و 2 ملغم/لتر لدراسة تأثيرهما في نمو الكالس وحجمه والوزن الطري للكالس المتكون بعد مرور4 أسابيع من الزراعة .

درس تأثير كثافة خطوط الفيض المغناطيسي في كمية بعض الهرمونات والقلويدات المنتجة من كالس اللالنكي المزروع على وسط MS مجهزة بتركيز 2 ملغم/لتر 2,4-D ، عرض الكالس الى المجال المغناطيسي للقطب الشمالي والجنوبي من خلال استخدام المغانط المعدنية المستخدمة في التجارب السابقة وبشدة 2000 كاوس/قطعة مغناطيس لمدة 10يوم وشملت المعاملات (مقارنة ، بدون تعريض ، 1مغناطيس ، 2 مغناطيس ، 3 مغناطيس) وقد ثبتت القطع المغناطيسية على السطح الخارجي للقناني الزجاجية بوساطة الشريط اللاصق الشفاف على بعد 3 سم عن البذرة قدرت الهورمونات والقلويدات في الكالس باستخدام جهاز High Performance liquid chromatography (HPLC) .

استخدم التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design) CRD) في تنفيذ التجارب [17] وتم اختبار معنوية الفروق بين المتوسطات وفق اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى احتمال 5٪ واستعمل البرنامج الجاهز SAS [18] لتحليل البيانات وقورنت متوسطات قيم القلويدات والهورمونات المقدرة من الكالس وفق اختبار t عند مستوى احتمال 5% .

النتائج والمناقشة

1- تأثير الكاينتين في إنبات البذور ونمو بادرات اللالنكي كليمنتاين

نسبة الإنبات: بينت النتائج في جدول (1) ان هناك فروقا" معنوية في نسبة الإنبات بين المعاملات إذ تفوقت البذور المزروعة على الوسط الخالي من .Kin أو مضاف له 1 ملغم / لتر .Kin في نسبة الإنبات اذ بلغتا 80% و 60% على التوالي، في حين كانت أقل نسبة إنبات في معاملة 2 ملغم / لتر وبلغت 20% . وبلغت نسبة الإنبات 30،40 % لكل من معاملتي 3 ، 4 ملغم/لتر على التوالي والتي لم تختلف بينها معنويا".

طول الرويشة : بينت النتائج ان طول الرويشة تفوق في معاملة المقارنة الخالية من الكاينتين بعد مرور 4 أسابيع من الزراعة إذ بلغ متوسط طولها 18 ملم وبفارق معنوي عن جميع المعاملات في حين بلغ أقل متوسط لطول الرويشة 6.5 ملم في معاملة 2 ملغم/لتر . أما بعد مرور 8 أسابيع من الزراعة فقد بينت النتائج انه لا توجد هناك فروق معنوية بين المعاملات إذ بلغ أعلى متوسط طول 19 ملم في المعاملة الخالية من الهرمون وتلتها معاملة 2 ملغم/لتر وبلغت 15 ملم في حين بلغ أقل متوسط لطول الرويشة 11.75ملم في معاملة 1 ملغم/لتر جدول (1) .

طول الجذير : بينت النتائج جدول (1) ان أعلى متوسط لطول الجذير بلغ 27 ملم في معاملة المقارنة وتفوقت معنويا على معاملة 1 ملغم/لتر إذ بلغ متوسط جذورها 13.5 ملم وبفارق معنوي عن معاملتي 2 و3 ملغم /لتر إذ بلغت 4 و9 ملم على التوالي . أما بعد مرور 8 أسابيع فقد تفوقت معاملة المقارنة الخالية من Kin في زيادة طول الجذير إذ بلغ متوسطها 30 ملم وبفارق معنوي عن باقي المعاملات الاخرى اما أقل متوسط لطول الجذير كان 9 ملم في معاملة 3 ملغم / لتر. في حين بلغ معدل طول الجذير14،9.3 ،12 ملم في معاملة 1،3،4 ملغم / لتر على التوالي والتي لم تختلف فيما بينها معنويا" .

عدد الأوراق المتفتحة :بينت نتائج صفة عدد الأوراق المتفتحة ان المعاملات لم تؤثر معنوياً في متوسطات هذه الصفة بعد مرور 4 أسابيع من الزراعة وبلغ أعلى متوسط لعدد للأوراق المتفتحة في معاملة المقارنة 4.6 ورقة/بادرة في حين بلغ أقل متوسط لعدد الأوراق 2.5 ورقة في معاملة 2 ملغم/لتر . أما بعد مرور 8 أسابيع من الزراعة فلم تظهر فروقا معنوية بين المعاملات وبلغ أعلى متوسط لعدد الأوراق 7.2 ورقة/ نبات في معاملة المقارنة وتلتها معاملة 2 ملغم / لتر إذ بلغت 7 ورقة /بادرة في حين بلغ أقل متوسط لعدد الأوراق 3.8 في معاملة 1 ملغم / لتر (جدول1 و شكل 1) .

عدد الأفرع : بينت نتائج التجربة ان إضافة الكاينتين الى الوسط الغذائي بتركيزي 3،4 ملغم/لتر شجع تفتح البراعم الجانبية وتكوين الفروع بعد مرور 8 أسابيع من الزراعة إذ أعطتا 1.5 و1.7 فرع/بادرة على التوالي في حين لم تنجح معاملات المقارنة و1،2 ملغم/لتر في تحفيز تفتح البراعم الجانبية للفروع ولم تظهر نتائج التحليل الإحصائي فروقا معنوية بين المعاملات (جدول1 و شكل1) .

جدول (1): تأثير تراكيز الكاينتين في نمو بادرات اللالنكي كليمنتاين بعد مرور 4 و8 أسابيع من الزراعة على وسط MS الصلب

	بعد مرور4 أسابيع				بعد مرور8 أسابيع			
المعاملات ملغم/لتر المقارنة	نسبة الإنبات %	طول الرويشة (ملم)	طول الجذير (ملم)	عدد الأوراق المتفتحة	طول الرويشة (ملم)	طول الجذير (ملم)	عدد الأوراق المتفتحة	عدد الأفرع (ملم)
	80 أ	18.0 أ	27.0 أ	4.6 أ	19.0 أ	30.0 أ	7.2 أ	1.0 أ
1	60 أ	8.5 ب	13.5 أ	3.0 أ	11.8 أ	14.0 ب	3.8 أ	1.0 أ
2	20 ب	6.5 ب	4.0 ب	2.5 أ	15.0 أ	6.0 ب	7.0 أ	1.0 أ
3	30 ب	10.0 ب	9.0 ب	2.7 أ	14.3 أ	9.3 ب	6.3 أ	1.5 أ
4	40 ب	10.5 ب	11.8أ ب	3.8 أ	14.3 أ	12.00 ب	4.67 أ	1.7 أ

*الأرقام التي تحمل أحرف متشابهة لاتختلف فيما بينها معنويا في العمود الواحد حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5%.

شكل(1): تضاعف بادرات اللالنكي كليمنتاين للمعاملة بالكاينتين بعد مرور 8 أسابيع من الزراعة

يلاحظ من نتائج التجربة تفوق الأوساط الخالية من .Kin أو المضاف لها تركيز قليل منها 1 ملغم/ لتر وهذا قد يعود الى تأثير استجابة الجزء النباتي بالمستوى الداخلي من منظمات النمو وكذلك بكمية منظمات النمو المضافة الى الوسط الغذائي [19]، أما عن دور الكاينتين في تحفيز تفتح البراعم الجانبية قد يعود الى ان الكاينتين هو احد السايتوكاينينات التي تلعب دوراً مهماً في تحفيز انقسام الخلايا وزيادة نشاط البراعم الجانبية من خلال تقليل السيادة القمية ودورها في نقل المغذيات الى الأنسجة الفعالة [20] وهذه النتيجة مشابهة لما توصل اليه [8] عند زراعة بذور الليمون الحامض المحلي في وسط غذائي يحتوي على .Kin بتركيز 3 ملغم/للتر . وكذلك [21] عند زراعة أطراف فروع وبراعم جانبية لنبات اللالنكي إذ وجدوا ان تركيز 1.5 ملغم / لتر.Kin قد تفوق في تكوين الفروع وزيادة عددها .

2- تأثير المجال المغناطيسي في نمو بادرات اللالنكي

نسبة الإنبات : أظهرت النتائج في جدول (2) ان تعريض البادرات اللالنكي كليمنتاين الى مجال مغناطيسي لم يسبب زيادة معنوية في نسبة الإنبات وادى الى انخفاض نسبة الانبات ، إذ بلغ أعلى متوسط لنسبة الإنبات 80% في معاملة المقارنة في حين بلغ أقل متوسط لها في معاملتي 11 ، 14 يوم مدة تعريض إذ أعطتا نسبة انبات 40% لكل منهما .

طول الرويشة (ملم) : أظهرت النتائج طول الرويشة ان هناك فروقا" معنوية بين المعاملات إذ أعطت معاملة 18 يوم مدة تعريض أعلى متوسط لطول الرويشة وبلغ 22.4 ملم وبفارق معنوي عن معاملة 11 يوم تعريض والتي أعطت أقل متوسط لطول الرويشة وبلغ 13.8 ملم في حين بلغ متوسط طول الرويشة للبادرات غير المعرضة للمجال المغناطيسي 19 ملم . وأعطت المعاملات 2 ،6 ،14 يوم مدة تعريض متوسط طول للرويشة بلغ 17.8 ،16 ،18 ملم جدول (2).

طول الجذير (ملم): أظهرت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات بالنسبة لصفة طول الجذير إذ بلغ أعلى متوسط لطول الجذير 35.5 ملم في معاملة 6 يوم مدة تعريض في حين أعطت المعاملة 11 يوم مدة تعريض أقل متوسط لطول الجذير وبلغت 18.8 ملم وأعطت معاملة المقارنة (بدون تعريض) 30.5 ملم جدول (2) .

عدد الأوراق المتفتحة : يلاحظ من جدول (2) عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات بالنسبة لصفة عدد الأوراق المتفتحة إذ بلغ اعلى متوسط لعدد الأوراق 5.4 ورقة /بادرة في معاملة 18 يوم مدة تعريض في حين كان أقل متوسط للأوراق 3.8 ورقة/بادرة لكل من معاملتي المقارنة ،2 ،6 يوم مدة تعريض جدول (2) .

ان الزيادة التي لوحظت في طول الرويشة وعدد الأوراق قد يعزى إلى الدور الذي يلعبه المجال المغناطيسي في خفض مقاومة الجدران الخلوية لاستطالة الخلايا خلال عملية النمو [22] فضلا عن دور المجال المغناطيسي في زيادة امتصاص العناصر المعدنية وزيادة تركيزها في الأوراق [23] . أشارت بعض الدراسات الى ان تعريض الأجزاء

المزروعة خارج الجسم الحي الى المجال المغناطيسي كان فعالاً في تحسين حالة النمو الخضري ومنها ما وجده [13] عندما عرضوا أجزاء نباتية من الكستناء الى شدة مجال مغناطيسي 25 ملي تسلا ولمدة ساعة واحدة أفضل تأثير للنمو بيد ان [24] توصل الى ان التعريض للمجال المغناطيسي بشدة(0.04،0.3) ملي تسلا لمدة 96 ساعة أدى الى انخفاض معدل النمو الخضري لثلاثة أصناف من النعناع (*Mintha spicata* ، *Mintha villosa* ، *Mintha xpiperita*) مكثرة خارج الجسم الحي ، في حين ان [25] وجدوا انخفاض الوزن الطري للأفرع الناتجة من تضاعف الفروع عند زيادة مدة التعريض من 2.2 الى 19.8 ثانية من شدة مجال مغناطيسي (2.9– 4.6) ملي تسلا .

جدول (2): تأثير المجال المغناطيسي في نمو بادرات اللالنكي كليمنتاين بعد مرور 4 أسابيع من الزراعة على وسط MS

المعاملات مدة التعريض(يوم)	نسبة الإنبات%	طول الرويشة (ملم)	طول الجذير (ملم)	عدد الأوراق
المقارنة (بدون تعريض)	80 أ	19.0 أ ب	30.5 أ	3.8 أ
2	60 أ	17.8 أ ب	29.8 أ	3.8 أ
6	60 أ	16.0 أ ب	35.5 أ	3.8 أ
11	40 أ	13.8 ب	18.8 أ	4.8 أ
14	40 أ	18.0 أ ب	26.8 أ	5.0 أ
18	70 أ	22.4 أ	30.4 أ	5.4 أ

***الأرقام التي تحمل أحرف متشابهة لاتختلف فيما بينها معنويا في العمود الواحد حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5%.**

3- تأثير إضافة TDZ في إنبات البذور ونشوء الكالس

أظهرت النتائج في جدول (3) ان إضافة الثيادازورون الى الوسط الغذائي أدى الى تحفيز نشوء الكالس من الفلقات ولم يؤدي الى إنبات البذور فقد أعطت معاملة 1 ملغم/لتر أعلى نسبة لتكون الكالس بلغت 70% تلتها معاملة 2،3 ملغم /لتر إذ أعطتا نسبة 60% ، في حين ان المعاملة الخالية من الهرمون لم تستجيب الزروعات لتكوين الكالس إذ ان 70% من البذور حصل فيها إنبات وكونت بادرات . أما بالنسبة لحجم الكالس المتكون فان معاملة 2 ملغم / لتر اعطت اعلى متوسط لحجم الكالس أما باقي المعاملات التي نجحت في تحفيز نشوء الكالس فأدت الى تكون كالس قليل وان قوام الكالس نصف هش ذو لون أصفر مخضر .

الثيادازورون منظم نمو يصنف من أشباه السايتوكاينينات والذي يستخدم في إخلاف النبات في الزراعة النسيجية فضلاً عن دوره في نشوء الكالس نتيجة تحفيزه لإنتاج الاثلين [26] . ووجد في النباتات الخشبية ان تركيز القليل من TDZ يحفز نمو البراعم الابطية والجانبية وان زيادة التركيز الى حدود معينة يثبط النمو ويحفز نشوء الكالس [27] وقد اتفقت دراسات عدة على ان إضافة الثيادازورون الى النبات يحفز في نشوء الكالس ومنها ما وجده [15] ، ان إضافة TDZ الى الوسط الغذائي أدى الى تكون كالس متوسط الحجم لعقد خوخ صنف بيضاوي عند تركيز 1 ملغم / لتر وكالس ذي حجم كبير عند استخدام تركيز 0.6 ملغم / لتر .

جدول (3): تأثير الثيادازورون TDZ في إنبات البذور ونشوء كالس اللالنكي كليمتاين بعد مرور 4 أسابيع من الزراعة على وسط MS

المعاملات (ملغم/لتر)	نسبة الإنبات %	نسبة تكون الكالس %	* حجم الكالس
المقارنة (صفر)	70 أ	0 ب	-
0.5	صفر	40 أ	+
1	صفر	70 أ	+
2	صفر	60 أ	++
3	صفر	60 أ	+

***الأرقام التي تحمل أحرف متشابهة لاتختلف فيما بينها معنويا في العمود الواحد حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5%.**

***(- عدم تكون كالس ، + قليل " بحجم حبة العدس " ، ++ متوسط " بحجم حبة الحمص)**

4- تأثير إضافة NAA و 2,4-D في إنبات البذور ونشوء الكالس

نسبة الإنبات :أظهرت نتائج التحليل الإحصائي في جدول (4) وجود فروقاً معنوية في نسبة الإنبات بين المعاملات إذ أعطت معاملة 1 ملغم / لتر NAA أعلى نسبة للإنبات وبلغت 80% وبفارق معنوي عن معاملتي 1 ملغم / لتر 2,4-D التي أعطت نسبة إنبات 20% ومعاملة 2 ملغم / لتر 2,4-D التي أدت الى نشوء الكالس من البذور دون إنباتها في حين أعطت معاملات 2 و 3 ملغم / لتر NAA و 0.5 ملغم/لتر 2,4-D نسبة إنبات بلغت 60 و 50 و 40 % على التوالي .

طول الرويشة : بينت النتائج في جدول (4) ان أعلى متوسط لطول الرويشة بلغ 4.8 ملم في معاملة 1 ملغم/لتر NAA تلتها معاملة 2 ملغم/لتر NAA إذ أعطت متوسط طول رويشة 3.8 ملم في حين بلغ أقل متوسط لطول الرويشة 2 ملم في معاملة 1 ملغم/لتر 2,4-D ولم تظهر نتائج التحليل الاحصائي فروقا"معنوية بين المعاملات .

طول الجذير : بينت نتائج في صفة طول الجذير ان أعلى متوسط بلغ 7.1 ملم في معاملة 1 ملغم/لترNAA في حين بلغ أقل متوسط لطول الجذير 4.5 ملم في معاملة 1ملغم/لتر 2,4-D وأعطت معاملات (2،3) ملغم/لتر NAA 0.5 ،1 ملغم/لتر 2.4-D متوسط طول جذير بلغ 4.8 . 4.8. 5. 4.5 ملم على التوالي ولم تظهر نتائج التحليل الاحصائي فروقا معنوية بين المعاملات جدول (4) .

عدد الأوراق المتفتحة : بينت نتائج ان معاملتي 2 و3 ملغم /لتر NAA حفزت تفتح الأوراق إذ بلغ متوسط عدد الأوراق المتفتحة 1.5 ورقة/بادرة في معاملة 2 ملغم / لتر NAA وتلتها معاملة 3 ملغم / لتر NAA إذ بلغ متوسط عدد الأوراق المتفتحة 0.8 ورقة في في حين فشلت باقي المعاملات في تحفيز تفتح الأوراق جدول (4) .

نسبة تكون الكالس: بينت النتائج ان معاملة 2 ملغم / لتر 2,4-D تفوقت على باقي المعاملات إذ أعطت أعلى نسبة لتكون الكالس وبلغت 80% تلتها معاملة 1 ملغم / لتر 2,4-D إذ بلغت نسبة تكون الكالس 60% وبفارق معنوي عن معاملة 3 ملغم / لتر NAA التي أعطت نسبة 10% في حين فشلت معاملات 1 و 2 ملغم / لتر NAA و 0.5 ملغم / لتر 2.4-D في تحفيز نشوء الكالس (جدول 4 وشكل 2).

حجم الكالس وصفاته : بينت النتائج ان حجم الكالس المتكون كان جيد جدا في معاملة 2 ملغم / لتر 2,4-D قياساً بمعاملات 1 ملغم / لتر 2,4-D و 3 ملغم / لتر NAA واللتان أعطتا كالس متوسط وصغير الحجم على التوالي و يتميز كالس اللالنكي انه نصف هش ولونه أصفر فاتح (جدول 4 وشكل 2) .

جدول (4): تأثير NAA و 2,4-D في نمو البادرات ونشوء كالس اللالنكي كليمنتاين بعد مرور 4 أسابيع من الزراعة على وسط MS

المعاملات (ملغم/لتر)	نسبة الإنبات	طول الرويشة (ملم)	طول الجذير (ملم)	عدد الأوراق المتفتحة	نسبة تكون كالس	* حجم كالس
1 NAA	80 أ	4.8 أ	7.1 أ	صفر ب	صفر جـ	-
2 NAA	60 أب	3.8 أ	4.8 أ	1.5 أ	صفر جـ	-
3 NAA	50 أب	3.4 أ	4.8 أ	0.8 أ	10 ب	+
0.5 2.4-D	40 أب	3.5 أ	5.0 أ	صفر ب	صفر جـ	-
1 2.4-D	20 ب	2.0 أ	4.5 أ	صفر ب	60 أ	++
2 2.4-D	صفر جـ	صفر ب	صفر ب	صفر ب	80 أ	++++

*الأرقام التي تحمل أحرف متشابهة لاتختلف فيما بينها معنويا في العمود الواحد حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5%.

* حجم الكالس (- عدم تكون كالس ، + قليل ، ++ متوسط ، +++ جيد .++++ جيد جدا")

شكل (2): نشوء الكالس ونموه على وسط MS مجهز بتركيز 2 ملغم/لتر 2,4-D

تعد الأوكسينات من منظمات النمو التي تستخدم في تحفيز الخلايا على الانقسام غير المنتظم والذي يؤدي الى تكون كتل من الخلايا غير المتخصصة إذ ان معظم الأوكسينات ولا سيما 2,4-D ضروري لحث الكالس [28] ، كما ان التركيز العالي من الأوكسين يمكن ان يكون مثبطاً للنمو إذا زاد عن الحد الأقصى لحاجة القطعة النباتية .

توصل العديد من الباحثين الى ان إضافة 2,4-D الى الوسط الغذائي يحث على تحفيز نشوء الكالس في الحمضيات منها ما وجده [29] عند زراعتهم لأفرع من النارنج على وسط MS مجهز بتراكيز من 2,4-D ، وتوصل [30] الى ان زراعة أجزاء نباتية مختلفة من الليمون المخرفش على وسط MS مجهز بتركيز 1.5 ملغم / لتر 2,4-D هو الأفضل لحث الكالس . وتوصل [31] الى ان أفضل وسط لنشوء الكالس هو المجهز بـ 4 ملغم/لتر 2,4-D إذ بلغت 98.66% في حين بلغت النسبة 60.28% عند تركيز 4 ملغم/لتر NAA .

5 - تأثير تداخل TDZ و 2,4-D في نشوء الكالس

نسبة تكون الكالس : بينت النتائج في جدول (5) ان أعلى نسبة لتكون الكالس بلغت 40 % في معاملة 2 ملغم / لتر 2,4-D + 0.5 ملغم / لتر TDZ تلتها معاملتي (1 ملغم / لتر 2,4-D + 0.5 ملغم / لتر TDZ) و (2 ملغم / لتر 2,4-D + 1 ملغم / لتر TDZ) إذ بلغت 30% لكل منهما في حين بلغت أقل نسبة 10% في جميع المعاملات الأخرى .

الوزن الطري للكالس : بينت النتائج ان هناك فروقاً معنوية بين المعاملات في صفة الوزن الطري للكالس إذ بلغ أعلى وزن طري 350 ملغم في معاملة 2 ملغم / لتر 2,4-D + 0.5 ملغم / لتر TDZ وبفارق معنوي عن معاملتي (0.5 ملغم / لتر 2,4-D + 0.5 ملغم / لتر TDZ) و (1ملغم/لتر 2,4-D +1ملغم/لتر TDZ) إذ أعطتا 90 و 40 ملغم على التوالي ، وأعطت معاملتي 2 ملغم / لتر 2,4-D + 1 ملغم / لتر TDZ و 1 ملغم / لتر 2,4-D + 0.5 ملغم / لتر TDZ وزناً طريا بلغ 270 و 250 ملغم على التوالي جدول (5) .

يعد TDZ من منظمات النمو التي تستخدم في إخلاف النبات في الزراعة النسيجية فضلاً عن دوره في نشوء الكالس نتيجة لتحفيزه لإنتاج الاثلين [26] ، وقد أشارت الدراسات ان دوره في تحفيز نشوء الكالس ، ومنها ما وجده [15] كما ذكر سابقاً . وأشارت أيضاً العديد من الدراسات الى دور 2,4-D في تحفيز نشوء الكالس ومنها ما وجده [29،31] . أما الدراسات التي أشارت الى دور التداخل TDZ مع 2.4-D في تحفيز نشوء الكالس ونموه فتعد قليلة وتشير نتائج الدراسة الى ان تداخلها لم يكن مثالياً في نشوء الكالس وتطوره قياساً باستخدامها منفرداً نتيجة عدم توافر الحالة الهرمونية المثالية لنشوء الكالس ونموه .

جدول (5): تأثير تداخل TDZ و 2.4-D في إنتاج الكالس بعد مرور 4 أسابيع من زراعة البذور على وسط MS

المعاملات (ملغم/لتر)		نسبة تكون الكالس	الوزن الطري (ملغم)	حجم الكالس
2.4-D	TDZ			
0.5	0.5	10 أ	90 ب جـ	+
1	0.5	30 أ	250 أب	++
2	0.5	40 أ	350 أ	+++
0.5	1	10 أ	170 أب جـ	+
1	1	10 أ	40 جـ	+
2	1	30 أ	270 أ	++

*الأرقام التي تحمل أحرف متشابهة لاتختلف فيما بينها معنويا في العمود الواحد حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5%.

*+كالس قليل ، ++ متوسط ، +++ جيد

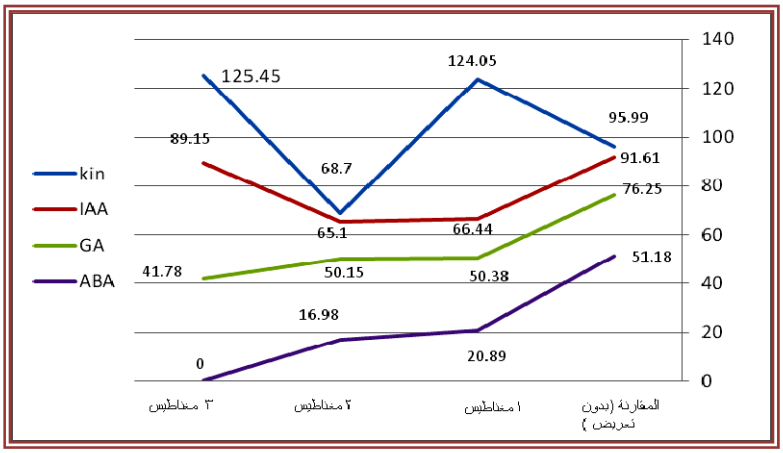
6- تأثير كثافة خطوط الفيض المغناطيسي في محتوى كالس اللالنكي من Kinetin، IAA، GA، ABA

الكاينتين Kinetin : بينت النتائج الموضحة في شكل (3، 4) ان تعريض الكالس الى المجال المغناطيسي أدى الى زيادة كمية الكاينتين في الكالس إذ بلغت أعلى كمية 125.45 مايكرو غرام/غرام وزن طري من الكالس عند التعريض الى 3 مغناطيس وبفارق معنوي عن باقي المعاملات في حين بلغت كميته 95.99 مايكرو غرام/غرام وزن طري عند عدم التعريض للمجال المغناطيسي (المقارنة) وبلغت كميته (124.05،68.7) مايكروغرام/غرام في معاملتى 1،2 مغناطيس على التوالي .

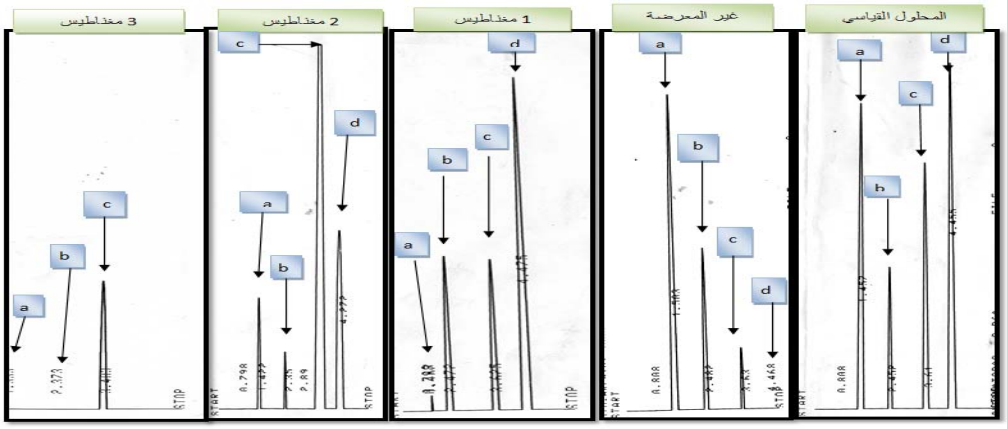
أندول حامض الخليك Indole acetic acid: بينت النتائج ان تعريض الكالس الى مجال مغناطيسي أدى خفض معنوي في كمية IAA مع زيادة عدد المغانط إذ بلغت كميته 91.61 مايكرو غرام / غرام في الكالس غير المعرض للمجال المغناطيسي تلتها معاملة 3 مغناطيس إذ بلغت كمية 89.15 في حين أقل قيمة بلغت 66.44، 65.11 مايكرو غرام/غرام في معاملة 1،2 مغناطيس على التوالي.

الجبرلين Gibbrellic acid : يلاحظ من النتائج ان كمية GA انخفضت عند زيادة كثافة الفيض المغناطيسي بزيادة عدد المغانط وبشكل معنوي إذ بلغت كميته 76.25 مايكرو غرام/غرام في الكالس غير المعرض الى المجال المغناطيسي في حين بلغت أقل كمية 41.78 مايكرو غرام/غرام في معاملة 3 مغناطيس وبلغت كميتها في معاملتي 1و2 مغناطيس 50.38 و50.15 على التوالي .

حامض الابسسك Abscisic acid : أدى تعريض الكالس للمجال المغناطيسي الى انخفاض معنوي في كمية ABA إذ بلغت أعلى كمية له في الكالس غير المعرض للمجال المغناطيسي إذ بلغ 51.18 مايكروغرام/غرام تلتها معاملة التعريض الى 1 مغناطيس إذ أعطت 20.89 مايكروغرام/غرام وبلغت كميته 16.98 مايكروغرام/غرام عند تعريض الى 2 مغناطيس في حين لم يظهر هرمون ABA في الكالس المعرض الى 3 مغناطيس .



شكل(3): تأثير كثافة خطوط الفيض المغناطيسي في إنتاج الهورمونات النباتية من كالس اللالنكي كليمنتاين المزروع على وسط MS مضاف له 2 ملغم/لتر 2.4-D . (بينت نتائج اختبار t وجود فروقا معنوية بين معاملات التعريض عند مستوى احتمال 5% لجميع الهورمونات المدروسة). قيم L.S.D لمستويات المجال المغناطيسي ، [Kin. 7.69] [IAA 10.94] [ABA GA 7.30] 2.74]



شكل(4): تأثير كثافة خطوط الفيض المغناطيسي في إنتاج الهورمونات النباتية من كالس اللالنكي كليمنتاين المزروع على وسط MS مجهز بتركيز2ملغم/لتر 2,4-D (ABA -d,GA–c,IAA -b,Kin. -a)

7- تأثير كثافة خطوط الفيض المغناطيسي في إنتاج القلويدات من كالس اللالنكي كليمنتاين .

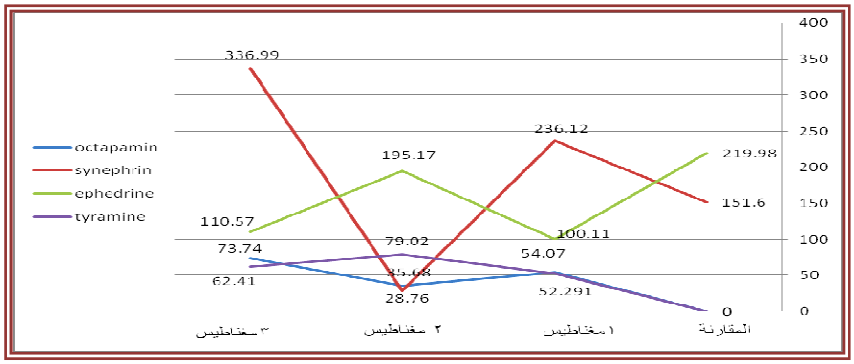
Octapamine : بينت النتائج الموضحة في شكل (6،5) ان الكالس غير المعرض للمجال المغناطيسي لم يعط اي تركيز لمركب Octapamine في جهاز HPLC في حين تفوقت معنويا في معاملة 3 مغناطيس واعطت أعلى قيمة لقلويد Octapamine بلغت 73.74 مايكروغرام/غرام وزن طري في حين بلغت قيمته(54.08 ، 35.68)مايكرو غرام/غرام في معاملتي 1 مغناطيس و 2 مغناطيس على التوالي .

Synephrine : بينت النتائج ان أعلى قيمة لمركب Synephrine بلغت 336.99 مايكروغرام/غرام عند تعريض الكالس الى 3 مغناطيس في حين بلغ كميته 151.60 في كالس غير المعرض الى مجال مغناطيسي وبلغ كميته (236.12 و 28.76)مايكرو غرام/غرام في معاملتي (2،1) مغناطيس على التوالي ، ولم يظهر اختبار t فروقا معنوية بين المعاملات شكل (5) .

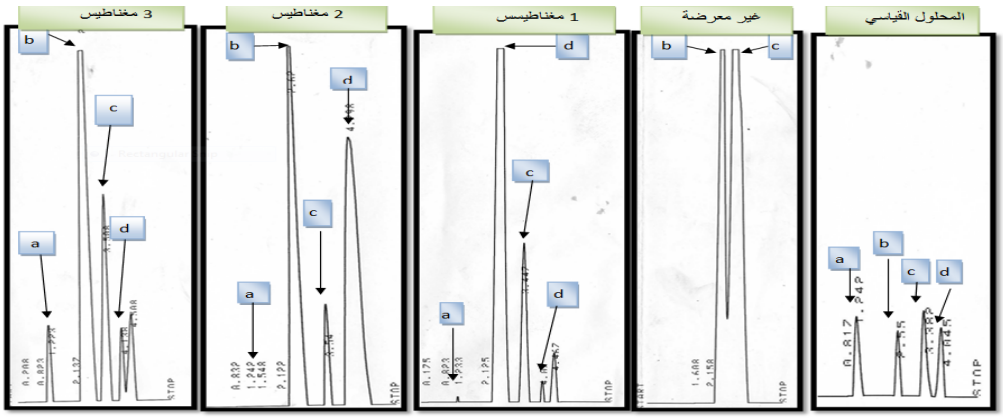
Ephedrine : أدى تعريض الكالس الى مجال مغناطيسي ادى الى انخفاض محتوى الكالس من Ephedrine وبفارق معنوي إذ بلغت كميته 219.98 مايكرو غرام/غرام في الكالس غير المعرض للمجال المغناطيسي في حين انخفض في معاملات 1 و 2 و 3 مغناطيس إذ بلغت قيمته (110.57 ،195.17 ،100.11) مايكرو غرام/غرام على التوالي شكل (5).

Tyramine: وجد ان الكالس غير المعرض الى مجال مغناطيسي لم يعط اي قراءة لمركب tyramine وذلك لانخفاض تركيزه في الكالس في حين بلغت أعلى كمية له 79.02 مايكروغرام/غرام وزن طري في معاملة 2 مغناطيس تلتها معاملة 3 مغناطيس إذ بلغت كميته 62.41 مايكروغرام/غرام وبفارق معنوي بين المعاملات.

قد يعود سبب زيادة تركيز القلويدات (Octapamine و Synephrine و Tyramine) الى ان القلويدات من المركبات التي يفرزها النبات كوسيلة دفاعية في ظروف الاجهاد التي يتعرض لها النبات [4] وان تعريض الكالس لكثافة فيض مغناطيسي عالية والتي أدت الى انخفاض كمية GA_3 و IAA شكل (3) قد تكون ادت الى زيادة تركيز القلويدات في الكالس ، وقد وذكر [4] وجود علاقة عكسية بين مستويات الأوكسين داخل النبات وتركيز القلويدات إذ ان العوامل التي تؤدي الى خفض الأوكسين تؤدي الى زيادة القلويد داخل أنسجة النبات .



شكل (5): تأثير كثافة خطوط الفيض المغناطيسي في إنتاج القلويدات Octapamine ، Synephrine ، Ephedrine، Tyramine من الكالس المزروع على وسط MS مضاف له 2 ملغم/لتر 2,4-D. قيم L.S.D لمستويات المجال المغناطيسي [Octapamine 4.96] [Synephrine 2.88] [Ephedrine 5.21] [Tyramine 8.28]



شكل (6): تأثير كثافة خطوط الفيض المغناطيسي في إنتاج بعض القلويدات من كالس اللالنكي كليمنتاين المزروع على وسط MS مجهز بتركيز 2 ملغم/لتر 2,4-D (Tyramine -d, Ehedrine-c , Synephrine-b , Octapamine -a)

المصادر

1. الجميلي ، علاء عبد الرزاق و جبار عباس حسن . 1989. انتاج الفاكهة. وزارة التعليم العالي . جامعة بغداد . العراق

2. الرفاعي ، عبد الرحيم توفيق وسمير عبد الرزاق الشوبكي .2007 . زراعة الأنسجة والاكثار الدقيق ،المكتبة المصرية في الاسكندرية .

3. Sree, N. V., P. Udayasri, V.V. Aswani,Y. Kumar, B. Ravi Babu, Phani K. Y. and V. Varma M. 2010. Advancements in the production of secondary metabolites. Journal of Natural products. 3:112-123.

4. Ramawat, K. G. 2004. Plant Biotechnology. S. Chand and Company LTD New Delhi, India.

5. Park, S. U., M. R. Uddian, H. xu, y. k. kim and s. y. lee. 2008. Iotechnological applications for rosmarinic acid Production in plant. Afr. J. of biot. 7(25): 4954- 4965.

6. Murashige, T. and D. P. Tucker .1969 .Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proc. First. Int. citrus Symp., 3: 1155-1161.

7. Zeng, L., Haifeng X., Y. Zeng, A. Luan and H. Wang. 2009. High efficiency *in vitro* plant regeneration from epicotyl explants of ponkan Mandarin in *(Citrus reticulata* L. Blanco). *In vitro* cell. Der. Bio1. plant.45: 559-564.

8. قصاب باشي ،عمار زكي .2007. تحفيز نمو اجنة بذور الليمون الحامض المحلي *Citrus limon* L. Brumf. خارج الجسم الحي .مجلة زراعة الرافدين 34(2): 13-21.

9. Altaf, N., A. Khan and L. Ali. 2009. *In vitro* culture of kinnow explants. Pak.j. Bot . 41(2):597-602.

10. Teng, WY, YL. Huang, C. Shen, R L. Hung, R S. Chung and C. Chen. 2005. Cytotoxic Acridone alkaliods from the stem bark of *Citrus maxima*. Journal of Chines Chemical Society. 52(6):1253-1255.

11. Mosavi, B., A. Parsaeimehr and N. Irvani. 2011. Influennces of growth regulators on callus induction, ephedrine and Pseudoephedrine contents and chemical analysis of mature embryo of Ephedra strobilacea Bunge.AAB Bioflux, volum Issue1.

12. Lucchesini, M., A. M. Sabatini, C. Vitagliano and P. Dario .1992. The pulsed electro-magnetic field stimulation effect on development of *Prunus cerasifera in vitro* derived plantlets. Acta Horti.,1(39):131-136.

13. Ruzic, R., I. A. Jeglic and D. Fefer.1993. Various effects of pulsed and static magnetic fields on the development of *Castanea sativa* Mill. in tissue culture. Electro and Magnetobiol. 12(2):165-17.

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

15. عبيد ، اياد عاصي .2009. تأثيرات الوسط الغذائي والمجال المغناطيسي في الاكثار والصفات التشريحية لأصل الخوخ *Prunus persica* L.Batsch صنف محلي بيضاوي بالزراعةالنسيجية. أطروحة دكتوراه جامعة الموصل، العراق.

16. سلمان ، محمد عباس .1988. أساسيات زراعة الخلايا والأنسجة النباتية .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

17. الراوي، خاشع محمود و عبد العزيز محمد خلف الله .1980. تصميم وتحليل التجارب الزراعية وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، كلية الزراعة والغابات ، جامعة الموصل .

18. SAS. 1996. Statistical Analysis System, Release7, SAS. Institute. Inc. Cary. N.C. USA.

19. محمد ، عبد المطلب و مبشر صالح عمر (1990) .المفاهيم الرئيسة في زراعة الخلايا والأنسجة والأعضاء للنبات . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، مطبعة جامعة الموصل ، العراق .

20. Devlin, R.M. 1973. Plant Physiology. Affiliated eastwest press PVT. New Delhi.

21. Mukhtar, R., M. M. Khan, B. Fatima, M. Abbas and A. Shahid .2005. *In vitro* regeneration and multiple shoot induction *in Citrus reticulata*. L. Blanco. international. J. of Agriculture &Biology.7 (3):414-416.

22. Mc-Queen, M. and S. Cosgrove (1994) .Disruption of hydrogen bonding between plant cell polymers by proteins that induce wall extension. Proc. Natt. Aead. Sci., USA., 91 : 6574 – 6578.

23. Estiken, A. and M. Turan. (2004). Alternating magnetic field effects on yield and plant nutrient element composition of strawberry (*Fragaria ananassa* CV. Camarosa). Acta Agri. Scandinavicasection B-soil and plant Sci. 54(3): 135-139.

24. Criveanu, H. R. and G. Tralunga. (2006). Influence of magnetic fields of variable intensity on behaviour of some medicinal plants. J. of Central European Ageiculture.7 (4): 643- 648.

25. Atak, C., O. Emiroglu, S. Alikamanoglu and A. Rzakoulieva. (2003). Stimulation of regeneration by magnetic field in soybean (*Glycine max* L. Merrill) tissue cultures, J. of Cell and Molecultar Biology, 2:113-119.

26. Davies, J. P. 1995. Plant Hormones. Carnell University, New York U. S. A.

27. Huntsman, A. and E. J. Preece.1993.Thidiazuron: Apotent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 33(2):105-119.

28. Thomas, T.D. and R. Chutervedi. 2008. Endosperm culture: a novel method for triploid plant production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 93:1-14.

29 . الشنطاوي ، محمد ورضا شبلي وعماد عبيدات ومحمد عجلوني .1998. اكثار البرتقال الحامض بواسطة زراعة الأنسجة و اقلمته خارج الانابيب. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. 14: 120-134.

30. Ali, S. and B. Mirza. 2006. Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.):effect of explant type and hormone concentration. Acta ot. Croat. 65(2):137-146.

31. Sativa, V., G. S. Virk and A. Nagpal. 2010. Effect of explants type and different plant growth regulators on callus induction and plantlet regeneration in *Citrus jambhiri Lush*. Environ We Int. J. Sci. Tech. (5):97-106.