تأثير مكونات الوسط الغذائي والجزء النباتي في استحثاث الكالس لنبات البلادونا خارج الجسم الحي

محمد شهاب حمد نورا جبر جاسم
قسم البستنة/كلية الزراعة/ جامعة بغداد

المستخلص

نفذ البحث في مختبرزراعة الانسجة النباتية التابع لقسم البستنة – كلية الزراعة – جامعة بغداد خلال عامي 2009– 2010. وتضمنت الدراسة زراعة الاجزاء النباتية (القمة النامية – الاوراق الفلقية – السويقة الجنينية السفلى) في الوسطين الغذائيين المعدلين MS وB5 . استخدم نوعان من الاوكسينات هما 2,4-D و NAA وبأربع مستويات لكل اوكسين وهي 0 و 1.5 و3.0 و4.5 ملغم / لتر. تضمنت التجربة دراسة تأثير كل من الاوساط الغذائية او الاجزاء النباتية او الاوكسينات في استحثاث الكالس . اظهرت النتائج عدم تسجيل اي حالة تلوث عند تعقيم بذور البلادونا باستخدام التركيز 4.5 % من هايبوكلورات الصوديوم NaOCL ولمدة 15 دقيقة. كما اظهرت النتائج تفوق الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 1.5 ملغم/لتر 2,4-D مع 0.4 ملغم / لتر من BA في اعطاء اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس والمستحث من القمة النامية بلغ 177.5 و 18.9 ملغم على الترتيب ، مقارنة مع نفس التركيز من 2,4-D في وسط B5 الذي اعطى معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ 110.0و 12.3 ملغم على الترتيب ، واعطى الوسط الغذائي MS والمنجهز بالتركيز 4.5 ملغم / لتر من 2,4-D اقل معدل لوزن الكالس الطري والجاف والمستحث من الاوراق الفلقية بلغ 23.4 و 2.0 ملغم بالتتابع. اعطى الكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى في وسط MS المجهز بتركيز 3.0 ملغم / لتر من 2,4-D اعلى معدل في الوزن الطري والجاف للكالس بلغ 44.3 و 5.0 ملغم بالتتابع ، بينما اعطى الوسط نفسه المجهز بتركيز 3.0 ملغم / لتر NAA معدل وزن طري وجاف بلغ 18.9 و 2.5 ملغم بالتتابع . تفوقت القمة النامية واعطت اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكالس بلغ 45.74 و 5.00 مقارنة مع الاوراق الفلقية والسويقة الجنينية السفلى اللتين اعطتا معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ 38.98 و 3.78 و 17.54 و 2.04 ملغم بالتتابع . يتضح من نتائج التجربة ان افضل وسط غذائي لاستحثاث الكالس من الاجزاء النباتية لنبات البلادونا هو الوسط الغذائيMS وافضل منظم نمو نباتي هو 2,4-D بالمقارنة مع NAA اما افضل الاجزاء النباتية كانت القمة النامية بالمقارنة مع الاوراق الفلقية والسويقة الجنينية السفلى في استحثاث الكالس .

*بحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الثاني .

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences 42 (3): ٥٩-٧٠,2011 Hamad & Jassem.

EFFECT OF MEDIUM COMPONENTS AND EXPLANT ON BELLADONNA CALLUS INDUCTION IN VITRO

M.S.Hamad N.G.Jassem*
Department of Horticulture,College of Agriculture,University of Baghdad

ABSTRACT

An experiment was conducted at the tissue culture lab., Dept of Hort., College of Agriculture ,University of Baghdad during 2009-2010 . Explants (shoot tip – cotyledon – hypocotyls) were cultured on a modified Murashige and Skoog (MS) or Gamborge (B5) medium .Tow kinds of auxins at four levels of either 2,4-dichloro phenoxy acetic acid (2,4-D) or naphthalene acetic acid (NAA) ,were added to medium . Concentration of each auxin were 0 , 1.5 , 3.0 and 4.5 mg / l . The study included effect of each medium components or explants or auxin on callus initiation. Results indicuted that no sign of contamination after sterilization belladonna seeds by using sodium hypo chloride at 4.5% for 15 minutes.MS medium ,complemented with 1.5 mg/l of 2,4-D was superior in giving higher fresh and dry weight, of callus that induced from shoot tip to be 177.7 and 18.9 mg , respectively .In comparison with the same 2,4-D concentration in B5 medium that gave only 110.0 and 12.3 mg of fresh and dry weight, respectively .The MS medium supplied with 4.5 mg/l 2,4-D gave the lowest fresh and dry weight of 23.4 and 2.0 mg callus which is formed the cotyledon, respectively. The callus which induced when cotyledons were explanted on MS medium supplement with 3.0 mg / l 2,4-D gave the highest values 44.3 ,5.0 mg for both fresh and dry weight callus respectively , while MS medium supplemented with 3.0 mg/l NAA gave 18.9 and 2.5 mg for both fresh and dry weight callus, respectively .Shoot tip was superior than cotyledons and hypocotyls in inducing callus initiation 45.74 ,5.00 mg 38.98, 3.78 mg and 17.84 ,2.04 mg for both fresh and dry weight callus inducted from shoot tip , cotyledons and hypocotyls, respectively. We found the best medium for callus induction from belladonna explants is MS medium and the best hormone is 2,4-D compared with NAA and the best explants is shoot tip compared with cotyledon and hypocotyls.

Part of M. Sc. Thesis of the second author.

المقدمة

يعد نبات البلادونا *Atropa belladonna* من النباتات الطبية ويعود للعائلة الباذنجانية Solanaceae ويعتبر وسط اوربا وجنوبها الموطن الاصلي للنبات ومنها انتشر الى وسط اسيا وغربها (7) ، ويعتمد نشوء الكالس الذي هو عبارة عن خلايا برنكيمية غير متمايزة تنشأ على مناطق القطع او الجروح في الاجزاء النباتية (16) . واوضح (10) ان عملية استحثاث الكالس على الجزء النباتي المزروع تمر بثلاث مراحل مهمة وهي التحفيز والانقسام والتمايز.

واشار العديد من الباحثين ومنهم (15) الى اهمية تحضين الكالس في الظلام ويعود ذلك الى دور الظلام في منع اكسدة بعض المركبات الحساسة للضوء مثل الهرمونات الداخلية كالاوكسينات. ينتج نسيج الكالس من خلايا القشرة الخارجية للجزء النباتي وتولد الخلايا المنقسمة ضغطا" على البشرة يمزق خلايا الكالس المكشوفة والمتكونة حديثا" . ان الانسجة الفتية هي الاكثر احتمالا" لنشوء الكالس وقد تم الحصول على الكالس من اجزاء نباتية ذات خلايا عالية التخصص (متمايزة) لاتتميز بنشاط مرستيمي مثل الخشب واللحاء والورقة والثمار والانسجة الاخرى (22) ان اختيار الجزء النباتي للزراعة النسيجية يكون مقترنا" بالهدف المزمع الوصول اليه اعتمادا" على استجابة الجزء النباتي لعملية الزراعة (24) ان التوازن بين نسبة الاوكسين الى السايتوكاينين في البيئة الغذائية والتي يطلق عليها مصطلح auxin/cytokinin ratio يحفز تكوين نسيج الكالس على الاجزاء النباتية المزروعة وتشير الدراسات الى ان للوسط الغذائي تأثير كبير في نشوء الكالس وادامته اعتمادا على مكونات الوسط الغذائي من جهة ونوع ومصدر الجزء النباتي من جهة اخرى (9 ،3،11،12،8،٥) . وقد اشار بعض الباحثين الى ان استخدام القمة النامية والاوراق الفلقية اظهر استجابة عالية في استحثاث الكالس لنبات البلادونا (23،19،١٨) وبناءا على ما تقدم فأن اهمية البحث تتضح من خلال انشاء مزارع نسيجية من اجزاء نباتية مختلفة من بادرات البلادونا لتحديد الجزء النباتي الامثل والمكونات الافضل من الاوساط الغذائية في نشوء واستحثاث الكالس ومن ثم استخلاص بعض قلويدات التروبان لاهميتها الطبية المعروفة لاحقا.

المواد والطرائق

نفذت التجارب في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم البستنة – كلية الزراعة – جامعة بغداد خلال الفترة من اذار 2009 ولغاية اب 2010.

تعقيم مواد و ادوات العمل

اجريت عمليات التعقيم التي شملت تعقيم اطباق بتري من خلال وضعها في حاويات معدنية canisters وتعقيم ملاقط ومشارط الزراعة وكذلك تعقيم الماء المقطر المستخدم في غسل البذور لمدة 30 دقيقة بجهاز الموصدة Auto clave لمدة 30 دقيقة وعلى درجة حرارة 121م° وضغط 1.04 كغم /سم^2 .

تعقيم البذور وزراعتها

تم غسل البذور بالماء لازالة الاتربة والاوساخ العالقة ونقلت الى جهاز Laminar air flow hood . ثم غمرت البذور بالتراكيز المختلفة من NaOCL بالتراكيز 0.0 و 1.5و 3.0 و 4.5 و6.0% و للمدد 5و10و15 دقيقة لكل تركيز و غسلت البذور بعد انتهاء مدة التعقيم بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لضمان ازالة بقايا المادة المعقمة من اسطح البذور .ثم زرعت البذور المعقمة في وسط مجهز بربع قوة املاح MS السائل وبواقع عشرة بذور لكل طبق ومدة زمنية واحكم غلق الطبق بالورق الشمعي و حضنت على درجة حرارة 25 ±2

م° في الظلام وسجلت النتائج بعد سبعة ايام من الزراعة على اساس النسبة المئوية للتلوث.

تحضير الوسط الغذائي

استعمل وسطي MS (21) ووسط B5 (14) اضيفت املاح الوسطين الغذائيين واضيفت الفيتامينات ومنظمات النمو بعد ان تم تحضيرها كمحاليل اساس والسكروز والاكار وكما مبين في جدول 1 الى الوسط الغذائي و عدل pH الوسط الى 5.7 من خلال اضافة قطرات من محلول واحد عياري من هيدروكسيد الصوديوم او حامض الهيدروكلوريك. وكانت تراكيز منظمات النمو المضافة 0 و 1.5 و3.0 و4.5 ملغم / لتر لكل من 2,4-D و NAA كل على حدة مع استخدام تركيز ثابت من السايتوكاينين 0.4 ملغم / لتر BA ، سخن الوسط الغذائي بواسطة الخلاط المغناطيسي الحراري وبعد ان اصبح الوسط متجانسا"وزع في انابيب الزراعة ثم عقمت بجهاز الموصدة على درجة حرارة 121 م° وضغط 1.04 كغم / سم2 لمدة 15 دقيقة .

الاجزاء النباتية المستخدمة : اخذت البادرات الناتجة من زراعة البذور المعقمة عند افضل تركيز من هايبوكلورات الصوديوم واستأصل منها القمة النامية بطول 3 ملم والاوراق الفلقية بطول 5 ملم والسويقة الجنينية السفلى بطول 5 ملم (25) وزرعت على الاوساط الغذائية المجهزة بالتراكيز 0 و 1.5 و 3 و 4.5 ملغم / لتر لكل من 2,4-D و NAA مع 0.4 ملغم / لتر من BA لاستحثاث الكالس وبواقع عشرة مكررات لكل معاملة حضنت الزروعات في الظلام التام على درجة حرارة 25 ±2 م° وسجلت النتائج بعد خمسة اسابيع من الزراعة .

قياس الوزن الطري والجاف للكالس : قيس الوزن الطري والجاف للكالس بعد خمسة اسابيع من الزراعة باستخدام ميزان حساس بعد ازالة بقايا الوسط الغذائي الملتصقة به بأستخدام شفرة جراحية وحسب الوزن الطري. جففت قطع الكالس الطري في فرن كهربائي على درجة حرارة 70م° ووزنت عند ثبات الوزن استخدم معيار الوزن الطري والجاف للكالس المستحث في مرحلة النشوء لتحديد افضل جزء نباتي وافضل وسط غذائي وافضل نوع وتركيز من الاوكسينات .

التحليل والاحصائي : نفذت جميع التجارب بأستخدام التصميم التام التعشية وبتجارب عاملية وقورنت المتوسطات باقل فرق معنوي (2).

جدول 1. مكونات الوسطين الغذائيين من المركبات العضوية الخاصة باستحثاث الكالس

المـادة	محتويات الوسط الغذائي ملغم/ لتر

	MS	B5
الأملاح	قوة كاملة	قوة كاملة
Pyrodoxine- HCl	0.5	1.00
Glycine	2.0	.
Nicotinc acid	0.5	1.00
Thiamine- HCl	0.1	0.01
Myo-inositol	0.1	0.10
NAA, 2,4-D	حسب التراكيز المستعملة بالتجربة	حسب التراكيز المستعملة بالتجربة
BA	0.4	0.4
Sucrose	30000	20000
Agar	7000	7000

النتائج والمناقشة

يبين جدول 2 تأثير NaOCL في تقليل نسبة تلوث بذور البلادونا ، اذ بلغت نسبة التلوث 100% في معاملة المحايد وبزيادة تركيز NaOCL الى 1.5 و3 و4.5 و6 % انخفضت نسبة التلوث معنويا" ووصلت الى 80.0 و 46.6 و 19.6 و4.0% على الترتيب . وسجلت مدة التعقيم فروقات معنوية اذ انخفضت نسبة التلوث بزيادة المدة الزمنية الى 15 دقيقة واعطت نسبة تلوث بلغت 36% بينما وصلت نسبة التلوث 65.0% عند مدة التعقيم 5 دقائق . ظهرت فروق معنوية في نسبة التلوث عند تداخل المدة مع تراكيز هايبوكلورات الصوديوم ، بلغت 100% عند جميع مدد التعقيم في معاملة المحايد ،واقلها كانت في مدة التعقيم 15 دقيقة عند التركيزين 4.5، 6.0 % حيث بلغت 0.0% كما ان غمر البذور لمدة 10دقيقة عند التركيز 0.6% اعطت نسبة تلوث بلغت 0.0% . ان تأثير هايبوكلورات الصوديوم وعمله كمادة معقمة للانسجة النباتية يعود الى حامض Hypoclorous (HOCl) الذي يعد مادة مؤكسدة قوية . تتفق هذه النتائج مع (3) التي وجدت ان استعمال تركيز 4.5 و 6% من هايبوكلورات الصوديوم لمدة (15) دقيقة اعطى اقل نسبة تلوث عند تعقيم بذور نبات الخشخاش *Papaver somniferum* L. وكذلك تتفق مع المرسومي (4) الذي ذكر ان التعقيم بالتراكيز 2 و4 و6% من هايبوكلورات الصوديوم لمدة غمر 15 دقيقة اعطت بذور نظيفة تماما" من التلوث وذلك عند تعقيم بذور نبات المريمية *Salvia officinalis*

جدول 2. تاثير تراكيز هايبوكلورات الصوديوم والمدد الزمنية في النسب المئوية لتلوث بذور البلادونا بعد سبعه ايام من الزراعة

مدة التعقيم	تراكيز هايبوكلورات الصوديوم					المعدل
	0.0	1.5	3.0	4.5	6.0	
5	100	100	80	33	13	65
10	100	80	40	26	0.0	49
15	100	60	20	0.0	0.0	36
أ.ف.م. 0.05	24					11
المعدل	100	80	46.6	19.6	4	
أ.ف.م 0.05	14					

تشير نتائج الجدول 3 الى تفوق الوسط الغذائي MS على الوسط الغذائي B5 في معدل الوزنين الطري والجاف للكالس المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا وبلغ 55.1، 5.9 و36.4 ،4.1 ملغم لكل من الوسطين الغذائيين MS و B5 على الترتيب ويلاحظ تفوق الوسط الغذائي MS والمجهز بالاوكسين 2,4-D عن الوسط الغذائي نفسه والمجهز بال NAA بلغ 67.0 و7.2 ملغم على الترتيب للوزنين الطري والجاف على التوالي كذلك يلاحظ تفوقه عن الوسط الغذائي B5 والمجهز بالاوكسين 2,4-D و NAA في معدل الوزنين الطري والجاف للكالس بلغ في وسط B5 والمجهز بالاوكسين 2,4-D 40.5 و 4.6 ملغم وبلغ في وسط B5 والمجهز بالاوكسين NAA 32.3 و 3.7 ملغم على الترتيب. وعن تأثير التداخل بين نوع الوسط وتركيز الاوكسين يلاحظ تفوق الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 1.5 ملغم / لتر من الاوكسين في معدل الوزنين الطري والجاف للكالس بلغ 129.8 و 13.7 ملغم بالتتابع .

في حين بلغ اقل وزن طري للكالس المستحث عند الوسط الغذائي B5 المجهز بالتركيز 4.5 ملغم /لتر من الاوكسين بلغ 27.9 ملغم في حين بلغ اقل وزن جاف 3.1 ملغم عند الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 4.5 ملغم /لتر من الاوكسين . واوضحت نتائج الجدول نفسه تفوق الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 1.5 ملغم / لتر من الاوكسين 2,4-D في معدل الوزن الطري و الجاف للكالس بلغ 177.5و 18.9 ملغم على الترتيب بينما بلغ اقل معدل للوزنين الطري والجاف للكالس 22.0 و 2.4 ملغم على الترتيب عند الوسط الغذائي MS و المجهز بالتركيز 4.5 ملغم / لتر من 2,4-D .وعن الوسط الغذائي B5 يلاحظ ان اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف للكالس عند التركيز 1.5 ملغم / لتر من 2,4-D بلغ 110.0 و 12.3 ملغم على الترتيب مقارنة مع نفس التركيز من NAA وعند الوسط الغذائي B5 اذ بلغ وزن الكالس الطري والجاف 59.0 و 6.5 ملغم على الترتيب .

اظهرت النتائج ان التراكيز الواطئة من 2,4-D و NAA كانت الاكثر تأثيرا" في استحثاث الكالس وقد يعود السبب في ذلك الى ان التراكيز العالية ادت الى تقليل معدل انقسام الخلايا (27) اضافة الى ماتوصل اليه العديد من الباحثين في ان التراكيز العالية من 2,4-D قد ادت الى موت نسيج الكالس وذلك نتيجة لتحرر الاثلين بكميات كبيرة مؤديا" الى حدوث انقسامات سريعة للخلايا وحدوث حالة اختلال النمو وبالتالي موت نسيج الكالس المتكون (13) وقد لوحظ ان اضافة 2,4-D و NAA الى الوسط الغذائي وبتراكيز اعلى من التركيز المثالي انه يؤثر على عمل الانزيمات المسؤولة عن بناء الجدار الخلوي وتحللها مما يؤثر على الخصائص الميكانيكية للجدار الخلوي والتأثير على انقسام الخلايا وتكوين الكالس (26)

جدول3 . تأثير نوع الوسط الغذائي ونوع وتركيز الاوكسين والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للكالس (ملغم) والمستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا بعد خمسة اسابيع من الزراعة .

الوزن الطري							
نوع الوسط A	نوع الاوكسين B	تركيز الاوكسين ملغم / لتر C				B X A	معدل A
		0.0	1.5	3.0	4.5		
MS	2,4-D	0.0	177.5	68.6	22.0	67.0	
	NAA	0.0	82.0	56.2	34.2	43.1	55.1
C X MS		0.0	129.8	62.4	28.1		
B5	2,4-D	0.0	110.0	27.1	25.0	40.5	36.4
	NAA	0.0	59.0	38.7	30.8	32.3	
C X B5		0.0	84.8	32.9	27.9		
C X B	2,4-D	0.0	143.8	47.9	23.5		
	NAA	0.0	70.8	47.8	32.5		
معدل C		0.0	107.3	47.65	28		
أ.ف.م0.05	A= 4.2			B X A = 6.0			
	C= 6.0			C X A = 8.4			
	B= 4.2			C X B =8.4			
	C X B X A =11.9						

الوزن الجاف							
نوع الوسط A	نوع الاوكسين B	تركيز الاوكسين ملغم / لتر C				B X A	معدل A
		0.0	1.5	3.0	4.5		
MS	2,4-D	0.0	18.9	7.4	2.4	7.2	5.9
	NAA	0.0	8.5	6.0	3.9	4.6	
C X MS		0.0	13.7	6.7	3.1		
B5	2,4-D	0.0	12.3	3.0	3.0	4.6	4.1
	NAA	0.0	6.5	4.5	3.6	3.7	
C X B5		0.0	9.4	3.8	3.3		
C X B	2,4-D	0.0	15.6	5.2	2.7		
	NAA	0.0	7.5	5.3	3.8		
معدل C		0.0	11.55	5.25	3.2		
أ.ف.م0.05	A= 0.4			B XA =0.6			
	C= 0.6			C X A =0.9			
	B= 0.4			C X B =0.9			
	C X B X A =1.2						

تشير نتائج الجدول 4 الى تفوق الوسط الغذائي MS عن الوسط الغذائي B5 في معدل الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من الاوراق الفلقية بلغ 43.08، 4.37 ملغم على الترتيب اما عن تأثير التداخل بين نوع الوسط الغذائي ونوع الاوكسين يلاحظ تفوق الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 2,4-D في معدل الوزنين الطري التركيز 1.5 ملغم / لتر من الاوكسين 62.44 و5.81 ملغم بالتتابع . وتشير نتائج الجدول نفسه الى تفوق الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 1.5 ملغم / لتر من 2,4-D في معدل وزن الكالس الطري والجاف للكالس المستحث من الاوراق الفلقية لبادرة البلادونا بلغ 101.87 و9.00 ملغم على التوالي في حين بلغ اقله في والجاف للكالس وبلغ 50.88 و 4.84 ملغم على الترتيب. اما عن تأثير التداخل

بين نوع الوسط وتركيز والاوكسين فيلاحظ من نتائج الجدول تفوق الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 1.5 ملغم / لتر من الاوكسين في معدل الوزن الطري للكالس بلغ 76.06 ملغم بينما اعطى الوسط الغذائي B5 معدل وزن طري وجاف للكالس وعند الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 4.5 ملغم / لتر من 2,4-D بلغ 23.37 و 2.00 ملغم على الترتيب .وبلغ وزن الكالس الطري والجاف 50.25و5.50 ملغم بالتتابع عند الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 1.5 ملغم / لتر NAA .

جدول4. تأثير نوع الوسط الغذائي ونوع وتركيز الاوكسين والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للكالس (ملغم) والمستحث من الاوراق الفلقية لبادرة البلادونا بعد خمسة اسابيع من الزراعة .

الوزن الطري							
نوع الوسط A	نوع الاوكسين B	تركيز الاوكسين ملغم / لتر C				B X A	معدل A
		0.0	1.5	3.0	4.5		
MS	2,4-D	0.0	101.87	78.25	23.37	50.88	43.08
	NAA	0.0	50.25	63.75	27.12	35.28	
C X MS		0.0	76.06	71.00	25.25		
B5	2,4-D	0.0	95.12	47.13	44.00	46.56	34.59
	NAA	0.0	29.75	33.50	27.25	22.62	
C X B5		0.0	62.44	40.31	35.63		
C X B	2,4-D	0.0	98.50	62.69	33.69		
	NAA	0.0	40.00	48.63	27.19		
معدل C		0.0	69.25	55.66	30.44		
أ.ف.م0.05	3.51 =A		4.96= B X A				
	4.96 = C		7.02 = C X A				
	3.51 = B		7.02 = C X B				
	9.93 = C X B X A						

الوزن الجاف							
نوع الوسط A	نوع الاوكسين B	تركيز الاوكسين ملغم / لتر C				B X A	معدل A
		0.0	1.5	3.0	4.5		
MS	2,4-D	0.0	9.00	8.38	2.00	4.84	4.37
	NAA	0.0	5.50	7.00	3.12	3.91	
C X MS		0.0	7.25	7.69	2.56		
B5	2,4-D	0.0	8.13	2.12	2.37	3.16	2.91
	NAA	0.0	3.50	4.00	3.12	2.66	
C X B5		0.0	5.81	3.06	2.75		
C X B	2,4-D	0.0	8.56	5.25	2.19		
	NAA	0.0	4.50	5.50	3.12		
معدل C		0.0	6.53	5.37	2.66		
أ.ف.م0.05	0.42= A		0.59= B X A				
	0.59= C		0.85 = C X A				
	0.42 = B		0.85 = C X B				
	1.19 = C X B X A						

وقد يعزى السبب في تفوق الوسط الغذائي MS الى محتواه العالي من العناصر الغذائية وخاصة عنصر النتروجين الذي يدخل في بناء الاحماض الامينية والنووية والبروتينات وCo enzymes مما يشجع نمو وتطور الجزء النباتي المزروع اذ يحتوى هذا الوسط على 840.238 ملغم N/ لتر مقارنة مع 374.584 ملغم N /لتر في وسط B5 (17) ، اضافة الى ذلك يحتوي الوسط الغذائي MS على 30 غم / لتر سكروز في حين يحتوي الوسط الغذائي B5 على20 غم / لتر سكروز جدول (1) فقد ذكر Krueger (20) ان الزيادة في استحثاث الكالس قد ترجع الى زيادة السكروز في الوسط الغذائي كونه المصدر الكربوهيدراتي الاساسي للخلية وكذلك يزود الخلية بالطاقة اللازمة للنمو والبقاء فضلا" عن ان الاجزاء النباتية المزروعة خارج الجسم الحي تكون رمية في تغذيتها Heterotrophic وتعتمد على ما يوفره الوسط الغذائي من مركبات عضوية لها. وقد يعود السبب في تفوق 2,4-D معنويا" عن NAA في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف الى تأثير السلسلة الجانبية في الاوكسين فقد وجد ان طبيعة مجموعات الاحلال ومكانها لها تأثير على نشاط المركب اي ان طول السلسلة الجانبية لمجموعة الخلات المتصلة بذرة الاوكسجين المرتبطة بذرة الكربون الاولى لحلقة الفنيل قد زادت من نشاط الاوكسين وكذلك وجود ذرتي الكلور المرتبطتين بذرة الكربون الثانية والرابعة لحلقة الفنيل فينوكسي حامض الخليك زادت من نشاط وفعالية هذا الاوكسين (6) مقارنة بالتركيب الحلقي لمركبNAA الذي يتكون من حلقتين فنيل وتتصل السلسلة الجانبية لمجموعة الخلات بذرة الكربون الاولى من حلقة الفنيل.

اوضحت نتائج الجدول 5 تفوق الوسط الغذائي MS في معدل الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى لبادرة البلادونا بلغ 19.5 و 2.3 ملغم على الترتيب عن الوسط الغذائي B5 الذي اعطى 16.2 و 1.8 ملغم على الترتيب في معدل الوزن الطري والجاف للكالس . ويلاحظ ان معدل الوزن الطري للكالس بلغ 26.4 و18.2 ملغم في كل من الوسط الغذائي MS وB5 بالتتابع والمجهزين 2,4-D بينما بلغ معدل الوزن الجاف للكالس 3.0 و 1.9 ملغم ولكلا الوسطين الغذائيين بالتتابع .وبلغ معدل الوزن الطري والجاف للكالس في الوسط الغذائي MS والمجهز NAA 12.6 و 1.6 ملغم بالتتابع وعن تأثير التداخل بين نوع الوسط الغذائي وتركيز الاوكسين فقد اشارت نتائج الجدول نفسه الى تفوق الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 3.0 ملغم / لتر من الاوكسين حيث اعطى اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 31.6 و 3.8 ملغم على الترتيب في حين اعطى الوسط الغذائي B5 والمجهز بالتركيز 3.0 ملغم / لتر من الاوكسين اقل معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ 12.8 و 1.6 ملغم على الترتيب ويلاحظ ان معاملة المحايد لم تعط اي استجابة تذكر لاستحثاث الكالس ولكلا الوسطين الغذائيين . ويلاحظ تفوق الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 3.0 ملغم / لتر من 2,4-D في معدل الوزن الطري والجاف للكالس بلغ 44.3 و 5.0 ملغم على الترتيب في حين اعطى الوسط الغذائي MS وعند التركيز 3.0 ملغم /لتر NAA معدل وزن طري وجاف للكالس بلغ 18.9 و 2.5 ملغم على الترتيب بينما بلغ معدل الوزنين الطري والجاف للكالس عند الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 4.5 ملغم / لتر 2,4-D 24.9 و 2.6 ملغم على الترتيب وبلغ معدل الوزن الطري والجاف للكالس عند الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 4.5 ملغم / لتر NAA 16.3 و 2.0 ملغم بالتتابع .

جدول5. تأثير نوع الوسط الغذائي ونوع وتركيز الاوكسين والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للكالس (ملغم) والمستحث من السويقة الجنينية السفلى لبادرة البلادونا بعد خمسة اسابيع من الزراعة .

الوزن الطري							
نوع الوسط A	نوع الاوكسين B	تركيز الاوكسين ملغم / لتر C				B X A	معدل A
		0.0	1.5	3.0	4.5		
MS	2,4-D	0.0	36.5	44.3	24.9	26.4	19.5
	NAA	0.0	15.3	18.9	16.3	12.6	
C X MS		0.0	25.9	31.6	20.6		
B5	2,4-D	0.0	42.4	6.3	23.8	18.2	16.2
	NAA	0.0	7.6	19.0	30.0	14.2	
C X B5		0.0	25.0	12.8	26.9		
C X B	2,4-D	0.0	39.4	25.5	24.3		
	NAA	0.0	11.4	18.9	23.1		
معدل C		0.0	25.45	22.2	23.75		
أ.ف.م0.05	A =2.5			B X A = 3.5			
	C = 3.5			C X A = 4.9			
	B = 2.5			C X B = 4.9			
	C X B X A = 7.0						

الوزن الجاف							
نوع الوسط A	نوع الاوكسين B	تركيز الاوكسين ملغم / لتر C				B X A	معدل A
		0.0	1.5	3.0	4.5		
MS	2,4-D	0.0	4.4	5.0	2.6	3.0	2.3
	NAA	0.0	2.0	2.5	2.0	1.6	
C X MS		0.0	3.2	3.8	2.3		
B5	2,4-D	0.0	4.8	0.6	2.4	1.9	1.8
	NAA	0.0	1.0	2.5	3.0	1.6	
C X B5		0.0	2.9	1.6	2.7		
C X B	2,4-D	0.0	4.6	2.8	2.5		
	NAA	0.0	1.5	2.5	2.5		
معدل C		0.0	3.05	2.7	2.5		
أ.ف.م0.05	A = 0.3			B X A = 0.4			
	C = 0.4			C X A = 0.6			
	B = 0.3			C X B = 0.6			
	C X B X A = 0.8						

اشارت نتائج الجدول 6 تفوق القمة النامية على الاوراق الفلقية والسويقة الجنينية السفلى في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس المستحث بلغ 45.74 ملغم وزن طري و 5.00ملغم وزن جاف .ويظهر

الجدول نفسه تفوق الاوراق الفلقية على السويقة الجنينية السفلى في معدل وزن الكالس المستحث والذي بلغ 38.98 ملغم وزن طري و 3.78 ملغم وزن جاف مقارنة بالسويقة الجنينية السفلى الذي بلغ فيها الوزن الطري والجاف للكالس 17.84 و 2.04 ملغم على الترتيب . ومن هذه النتائج يتم التوصل الى ان القمة النامية هي افضل الاجزاء النباتية في استحثاث الكالس. ويعود سبب ذلك الى محتواها العالي من الاوكسينات الداخلية مقارنة مع الاوراق الفلقية والسويقة الجنينية السفلى هذا بالاضافة الى كونها عبارة عن خلايا مرستيمية نشطة (10، 26). ويؤكد هذا ماتوصلت اليه المختار (6) التي وجدت تفوق القمة النامية على الاوراق الفلقية والسويقة الجنينية في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس بلغ 90.30 ملغم وزن طري و 8.50 ملغم وزن جاف.

جدول6 .معدل وزن الكالس الطري والجاف المستحث من الاجزاء النباتية لبادرة البلادونا بعد خمسة اسابيع من الزراعة

الجزء النباتي	وزن طري(ملغم)		وزن جاف(ملغم)	
	المتوسط	T-test	المتوسط	T-test
قمة نامية اوراق فلقية	45.74 38.98	7.60	5.00 3.78	6.74
قمة نامية سويقة جنينية	45.74 17.84	23.12	5.00 2.04	17.63
اوراق فلقية سويقة جنينية	38.98 17.84	14.52	3.78 2.04	15.00
T-table		2.13		

المصادر

١. الخطيب ،اقبال حسن وزينب جليل عواد .2004. انتاج الكلايكوسيدات القلبية من الاوراق النسيجية لنبات زهرة الكشتبان الارجواني *Digitalis purpurea* L. بأستخدام تقنية زراعة الانسجة . مجلة العلوم الزراعية العراقية .٣٥(٦)ص: 83-92.

٢. الساهوكي ، مدحت و كريمة احمد وهيب . 1990 .تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .العراق .

٣. المختار ،سراب عبد الهادي . 2008 .دراسة انتاج بعض القلويدات المورفينية من نبات الخشخاش *Papaver somniferanm.* خارج الجسم الحي .رساله ماجستير – كلية الزراعة – قسم البستنة – جامعة بغداد .ص :50-51

٤. المرسومي ،حيدر عماد رشيد . 2010 .تاثير مكونات الوسط الغذائي والجزء النباتي المزروع في تكوين الكالس وانتاج بعض المركبات ذات الاستعمالات الطبية في نبات المريمية *Saliva officinalis* رساله ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد .ص: 39-40

٥. بكر ،رعد هاشم وعبد الجاسم محيسن الجبوري وحلمي حامد خضير .2001. تأثير كلوريد الصوديوم في نمو مكونات خلايا كالس الجت *Medicago sativa* L. مجلة العلوم العراقية .المجلد 32.العدد 2 .

٦. دفلن ، م، روبرت وفرنسيس ،هـ. ويذام. 1998 .فسيولوجيا النبات ،ترجمة (شراقي ،محمد محمود وخضر ،عبد الهادي وسلامة علي سعد الدين

وكامل ،نادية)،الدار العربية للنشر والتوزيع، الطبعة الثانية ،671-673.

٧. شوفاليه . 2010 . الطب البديل ، التداوي بالاعشاب والنباتات الطبية .ترجمة د.عمر الايوبي ،اشراف د.محمد دبس، جمهورية مصر العربية ، ص66.

٨. عطية ،حاتم جبار و عبد الجاسم محيسن وابراهيم عبد الله الشمري .2002. تأثير الـ2,4-D والكاينتين في تكوين الكالس وتمايز الاعضاء من الاجزاء النباتية لثلاثة اصناف من قصب السكر . مجلة العلوم الزراعية العراقية . المجلد 33. العدد 2.

٩. فهمي ، فكري جلال محمد 2003 . زراعة الانسجة النباتية . كلية الزراعة جامعة اسيوط .ص 137-142 .

١٠.محمد ،عبد المطلب سيد ومبشر صالح عمر . 1990 .المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا الانسجة والاعضاء للنبات .جامعة الموصل ،وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ،العراق.

١١.يونس،اواب وعد الله ومزاحم قاسم الملاح.2001 . تغير استجابة انسجة نبات الداتورة *Datura innoxia* للزراعة النسيجية في ثلاثة انواع من الوسط الغذائي. مجلة التربية والعلوم ،3(6) : 44-53.

12. Ajungla, L. P.P. Patil ,R. B. Barmukh, and T. D. Nikam . 2009. Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root culture of *Datura metel* L. .Indian Journal of Bioticnology , 8 : 317 -322.

13. Corchete, M.P. , J.M.Sanchez .C.Cacho ,M.Moran, and J.F.Tarrag . 1990 . ardionlide content in cultures derived from root and leaf callus of Digitalis thapisi L. J. Plant Physiol .137:196-200

14. Gamborg,O.L.,and .Eveleigh.1968.Culture methods and detection of glucanases in suspension culture of wheat and barley .Bio chem.416:417-42

15.George,E.F.,and P.D.Sherrington . 1993 .Plant Propagation by Tissue Culture .Second Edition ,Exegetics Ltd.England.

16. Hopkins , W.G.1999 .Introduction to Plant Physiology , 2nd ed ,John Wiley and Sons. Inc .USA.PP:110-118.

17.Hopkins ,W.G., and N.P.A.Huner . 2004 . Introduction to Plant Physiology . The University of Western Ontario .PP.67-70.

18.Ibrahim , A .I ,A. E. Kawi , M . A. ,Ahmed , A. M. , Amira and A. Abd EL Aal .2009. Alkaloids production and organogenesis from callus of *Hyoscyamus muticus* L . in vitro. Journal of Applied Science Research, 5 (1): 82-92.

19. Iranbakahsh ,A.R., and G.H.Riazi. 2000. Assay of the time and location of tropane alkaloids biosynthesis in *Datura stramonium* .Pajohesh va Sazandegi, 53:82-89.

20.Krueger ,R.J., and D.P.Carew. 1978 . *Catharanthus roseus* tissue culture :The effects of precursors on growth and alkaloids production.Liodia 41:327-331.

21.Murashige ,T., and F. Skoog . 1962 . Arevised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture .Physiol. Planta ., 15:4473- 497 .

22. Ramawat , K.G. 2004 . Plant Biotechnology , S.Chand and Company LTD ,Ram Nagar ,New Delhi .India .p.58-69.

23. Zaid, R and M .Wink . 2004 .Introduction of tropane alkaloids formation in transformed root culture of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae) . pp. 863-867.

24.Smith , R.H. 2000 . Plant Tissue Culture Techniques and Experiments Academic Press . Inc .San Diego .USA.PP. 200-223.

25.Stern , K. ,R. S. Jansky, and B. Janes . 2003 . Introductory Plant Biology .p. 147 .

26.Taiz ,L and E , Zeiger . 2006 . Plant Physiology . Sinauer Assciates , Inc Publishers. Sunderland . USA .p. 290-300.

27.Trigiano ,R.N., and D.J.Gray. 2000 . Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises . CRC Press LLC,USA.p.44-60.