# تاثير المرحلة التطورية للبويغات ونوع الوسط الغذائيومنظمات النمو في استحثاث الكالس الأحادي من زراعة متوك الباقلاء*Viciafaba*

**ستار عبد اللهشلاهي،ضحى ميسر مجيد، إيماننعمان إسماعيل**

**مركز بحوث التقنيات الإحيائية/ جامعة النهرين**

**Email:Sattarbio@yahoo.com**

**المستخلص:**

أخذت المتوك من البراعم الزهرية للباقلاء صنف Aquadlce إذ حددت كل المراحل التطورية للبويغات وحسب طول البراعم الزهرية، زرعت المتوك على وسط (SH) Schenk and Hildebrandtالمعدّل بأضافة تركيبة الحديد المستخدم في وسط(MS)Murashige and Skoog ومتحلل الكازين 400 ملغم/ لتر وبعض الأحماض الامينية كما اضيفت إليه توليفات مختلفة من الهورمونات:كاينتين،نفثالين حامض الخليك،2،4- ثنائي كلوريد فينوكسي حامض الخليك (2,4-D + NAA + Kin) على الترتيبو بنزيل ادنين (2,4-D + NAA + BA) وبتراكيز مختلفة. كانت افضل توليفة لاستحثاث الكالس في الوسط المطور SH وبالتوليفة (2,4-D + NAA +BA) وللبراعم الزهرية بطول 7.1-8 ملم التي تحوي بويغاتmicrospores احادية النواة uninucleate، وبنسبة استحثاث للكالس 50%, استخدمت ثلاثة تراكيز 0 و 1 و 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 طولها6.5-8 ملم هو6 كروموسوم = n احادية غالبا مع وجود بعض الخلايا الثنائية، 12 كروموسوم، في نفس قطعة الكالس.

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

**EFFECT OF THE DEVELOPEMENTAL STAGE OF MICROSPORES, GROWTH REGULATOR AND MEDIUM TYPE ON CALLUS INDUCATION FROM BROAD BEAN*Vicia faba*ANTHERSCULTURE**

**Sattar Abdullah Shlahi, DuhaMysireMajeed, EmanNuman Ismail
Biotechnology Research Center, Univ. of Al-Nahrain**

ABSTRACT

Anthers were taken from bean flower buds of the variety Aquadlce and microspore developmentalstages 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 formulationof Murashige and Skoog(MS), casein hydrolysate 400 mg/l, some amino acids, and different combinations of hormones; kinetin and naphthalene acetic acid and 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (K + NAA + 2,4-D) and benzyl adenine (BA + NAA + 2,4-D) in different concentrations.The combination (BA + NAA + 2,4-D) usedwith flower bud sizes (7.1-8) mm, containing uninucleate microspores, gavebetter callus induction (50%).It was also found that the concentrations[1.0 and 2.0] mg/l of ascorbic acidwerebetter 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).

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 النباتات لاستنباط اصناف جديدة ذات مواصفات زراعية وانتاجية ونوعية جيدة. وان واحدو من هذه الطرق الحديثة في تحسين هذه المحاصيل هو انتاج نباتات احادية العدد الكروموسومي من زراعة المتوك او البويضات غير المخصبةومضاعفتها للحصول على نباتات نقية وتشير المصادر الى عدم وجود طريقة protocolلانتاج نباتات احادية العدد الكروموسومي في الباقلاء[1و2]. إن زراعة المتوك والبويغات خارج الجسم الحي تقنيةحديثة لإنتاج نباتات أحاديةالعدد الكروموسومي يمكن مضاعفتهالتعطينباتات نقية (متجانسة وراثيا)[3]مع ذلك فان محاصيل اقتصادية قليلة من البقول استخدم فيها تقانة زراعة المتوكوالبويغات لإنتاج النباتات الاحادية المجموعة الكروموسوميةمثل الحمص[4]،البزاليا[5] و فول الصويا[3]وبعض أنواع الترمس [6]ولم يذكرWedzony وآخرون [2]في قائمتهم إمكانية الحصول على نبيتات احادية العدد الكروموسومي في الباقلاء.

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]إلاإن البحوث التي أجريت عليها في مضمار زراعة المتوك والبويغات نادرة جداً مثلParatasilpin[9]في1978وHesemann[10] في1980 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 (Markers) 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 Lauxenوآخرون[11] و شلاهي [13] وParatasilpin[9] 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 الواهبةوعوامل اخرى ولكنأهم هذهالعواملالمرحلة التطورية للبويغات داخل المتوك وكذلك المركبات الأساسية للوسط الغذائي لزراعة المتوك [14] ولكن لا يوجد وسط غذائي مناسب لزراعة متوك جميع الأنواع النباتيةوإنمالنوع واحد من الأنواع النباتيةأو 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 البذور الباقلاءصنف Aquadlceفي الحقلللموسمين 2009و 2010لغرض 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(1:3:6)على الترتيب وحفظت في الثلاجة لمدة 1 -30يوم لحين التصبيغ وتحضير الشرائح إذ صنفت قبل تصبيغها حسب طول البرعم الزهري وباطوال تتراوح 205-209 وبزيادة مقدارها 0.4 ملم ولغاية طول 13 ملم.

**التصبيغ وتحضير الشرائح**

استخدمت الطريقة المعدلة من قبل شلاهي [13] في تصبيغ البراعم الزهرية (المتوك) بصبغة الاورسين الخلي 5% المؤلفة مع6 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+ 1م في حمام مائي لمدة 2دقيقة ثم هرست على شريحة زجاجية في قطرة من صبغة الاورسين الخلي 1%، تحت الغطاء الزجاجي وتم الفحص تحت المجهر الضوئي والتصوير على القوة تكبير 008 مرة.

**التعقيم**

غسلت البراعم الزهرية بماء الحنفية الجاري لمدة 60-30 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 10-5 دقائق لكل مرة[13].

**الأوساط الغذائية المستخدمة**

استخدم الوسطان الغذائيانMS[17] وSH [16] المضاف إليه 100 ملغم / لتر مايو اينوسيتول بدل 1000 ملغم /لتر. كما استخدم وسطSH المعدل وذلك باضافة تركيبة الحديد المستخدمة في الوسط MS ومتحلل الكازين 400 ملغم/ لتر وبعض الاحماض الامينية ( cys ,arg, gly,asp))10 و 10 و 15 و 5(ملغم / لتر على الترتيب.

وأضيف إليهما توليفات منظمات نمو مختلفة كما في الجدول(1) كما اضيف الىالوسط SH المعدل توليفات منظمات نمو (1-5) كما في الجدول(1). كماأضيفالسكروز بواقع3 % وعدل الـpH للاوساط الغذائية الى 5.8 واضيف الاكاروز بواقع 0.6% وعقم بالمؤصدة، ثم اخرجت وبردت الى درجة حرارة 50مoبعدها اضيف اليها حامض الاسكوربيك المعقم (خلال مرشحات دقيقة 0.22 مايكرون) بتركيزين(1 و 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 SHلاستحثاث 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 الاستئصالفي 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:275لوكس وبتعاقب ضوئي 16ساعة ضوء \8 ظلام ، ودرجة حرارة 25+ 1مOلحين استحثاث الكالس، واعيدت زراعة المتوك كل4 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 الراعم 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) و (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 للبويغاتmicrospore 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 – 10.4ملم 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 السادسةالشكل (2:و).

إن النتائج فيأعلاه تتفق مع نتائج [11و 13]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 جميع 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).**



G

G

G

V

N

V

V

**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 إنلإضافة حامض الاسكوربيك بتركيز 1 و 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 و 2] ملغم/لتر.

يستنتج من هذا أن حامض الاسكوربيك بالتركيز الادنى1 ملغم/لتر له تأثير ايجابي في خفض أو منع تكوين المركبات الفينولية المنتجة بوساطة 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 الوسطمع إناضافته لم يكن لها تاثيريدعم استحثاث الكالس.



**الشكل (3) تأثير إضافة حامض الاسكوربيك أ- إفراز المركبات الفينولية بشكل هالة حول المتك المأخوذ من برام زهرية بطول (2.8- 4.5) ملمنتيجة 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 الوسطينMS 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 نبات الباقلاء وبجميع مراحل التطور للبويغات المذكورة سابقاً باستثناء بعض الانتقاخات البسيطة نتيجة انقسام خلوي محدودفي 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 SHأو 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 الوسطMSمقارنة بتركيز الحديد في الوسط SH[16 و 17]. عليه تم تطوير وسط يجمع بين مكونات الوسطين إذأضيف حديد الوسط MSإلى 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) توليفة 5 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 [13، 3، 4] او غيرها [15، 6] او حتى على محصول الباقلاء [9 ، 10] اذ تحتاج الى وسط غذائي متوافق 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 نتائج بحوث اخرى سابقة [5، 9، 13] او تعود الى الطراز الوراثي المستخدم لمحصول الباقلاء Aquadlce فان التوليفة 4 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 5 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 للبويغات 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**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| رقم التوليفة | توليفة الهرمونات (ملغرام / لتر) | الأوساط الغذائية |
| MS | SH |
| 1 | 2,4-D)0.0) + NAA (0.0) + Kin(0.2) | - | - |
| 2 | 2,4-D (0.0) + NAA (0.1) + Kin(0.2) | - | - |
| 3 | 2,4-D (5(+ NAA (0.0)+ Kin(0.2) | - | - |
| 4 | 2,4-D (5) +NAA (0.1) + Kin(0.2) | - | - |
| 5 | 2,4-D (0.5) + NAA (0.5) + BA (10) | - |  ̴ \* |
| 6 | IAA (0.0) + BA (0.0) | - | - |
| 7 | IAA (1) + BA (0.5) | - | - |
| 8 | IAA (0.5) + BA(2) | - | - |
| 9 | IAA (0.0) + BA (2) | - | - |

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

**تأثير استخدام الوسط المعدلSH 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 للكالس 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 المطور SH في استحثاث الكالس يعود الى زيادة تركيز الفيتامينات والمكونات العضوية الاخرى الظرورية لخلايا نبات الباقلاء [18]وكذلك نسبة الحديد المستخدم في الوسط الحالي (وهي النسبة المستخدمة في جميع الأوساطلزراعة المتوك) عما هو عليه في وسطSH الاصلي اذ ان له اهمية كبيرة في انقسام الخلايا الاحادية [20]، اذ تحتاج البويغات في المتوك لتحويل مسارها androgenesisإلى المواد العضوية [5 و21] وخصوصا في الباقلاء لكون متوكها معقدة وصعبة الاستجابة للانقسام وتكوين الكالس [9].



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

الشكل (6) تأثير الوسط SH المعدلّ مع التوليفة 5 في استحثاث الكالس من المتوك وحسب طول البرعم الزهري.

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

اظهرت النتائج ان المتوك في جميع اطوال البراعم الزهرية لنبات الباقلاء صنف Aquadulce لم تستجب ولجميع التوليفات الاربعة 1-4 جدول (3) الا بعض الانتفاخات البسيطة في المتوك للبراعم الزهرية بطول 8 ملم في التوليفة 1، 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 3، في حين كانت نسبة 15% من المتوك المزروعة على الوسط المعدلّSH منتفخة والماخوذة من براعم زهرية بطول 10.8 ملم، وانتفاخ 12.5% للمتوك من براعم زهرية بطول 3.6، 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 4، ان جميع هذه الانتفاخات لم تستمر فيها المتوك ولم تتطور الى كالس.وتحول لون المتوك الى البني في الغالب، في حين اعطت التوليفة 5 نتائج جيدة لاستحثاث الكالس من متوك الباقلاء الماخوذة من بعض اطوال البراعم الزهرية والمبينة في الشكل (5).

إن تضافر فعل التوليفة 5 كأمثل توليفة لاستحثاث الكالس الجنيني [18] مع مكونات الوسط المطور يشير الى حاجة المتوك الى مستويات مناسبة من الهرمونات والمواد العضوية المضافة الى الوسط الغذائي لاستحثاث الكالس [9].

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

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| رقم التوليفة | توليفة الاوكسينات(mg/l) | السايتوكاينينات( mg/l) |
| BA (10) | K (0.2) |
| 1 | NAA (0.0) + 2,4-D (0.0) | 3..... | -2 |
| 2 | NAA (0.1) + 2,4-D (0.0) | ..... | - |
| 3 | NAA (0.0) + 2,4-D (5) | ..... | - |
| 4 | NAA (0.1) + 2,4-D (5) | ..... | - |
| 5 | 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 ارتباطالسايتوكاينينبتراكيز الاوكسينات المقابلين للرمز.

 **نتائج الفحص الخلوي للكالس المستحث**

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

اما بشأن اطوال البراعم الزهرية 6.5– 8.4 ملم فان الكالس المستحث من متوكها احتوى على خلايا احادية المجموعة الكروموسوميةhaploid ( n =6 كروموسوم) في الغالب كما مبين في الشكل (7: ج، د), وكذلك بعض الخلايا الثنائية diploidكما 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 و13]في بقول أخرى، أما المرحلة ثنائية النواة binucleat فلم تستجب لاستحثاث الكالس. ان الخلايا الثنائية النواة تكون محاطة بجدار exineالسميك 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 الخلوي 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**

1. امكانية اعتماد المتوك الماخوذة من نباتات باقلاء واهبة نامية في الحقل لزراعتها خارج الجسم الحي in vitro والحصول على نسيج الكالس الاحادي العدد الكروموسومي.
2. استخدام الوسط الغذائي SH المحور 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.
3. 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 *Viciafaba* .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 BetweenFloralBudSize and DevelopmentalStage in SoybeanMicrospores: Implication for AntherCulture. Brazillian Archives of Biology and Technology, 46 (4): 515-520.

12. Rezanjad, F. 2007. The Effect of Air Pollution on Microsporogenesis, Pollen Developmentand Soluble Pollen Proteins in *Spartiumjunceum* 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 SporophyticDevelopment- CurrentStatusand FutureProspects. BiologiaPlantarum.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.Aly, H. M.A. andK.Hattori.2007.Histological Observations on Regeneration in Faba Bean Cotyledon (*Viciafaba* 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 PollenGrains. 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.