

تكوين الافرع العرضية من كالس نبات القرنفل صنف Marie Chabud باستخدام مستويات مختلفة من الاوكسينات والسايوتوكاينينات خارج الجسم الحي

عباس فاضل علوان
المعهد التقني المسيب

الخلاصة :

نفذ البحث في مختبر زراعة الانسجة لدراسة تأثير موعد زراعة الجزء النباتي واطرافه مستويات مختلفة من الاوكسين NAA مع او بدون اضافة الـ BA في تكوين الكالس لنبات القرنفل صنف Marie Chabud وتكوين الافرع العرضية من الكالس خارج الجسم الحي ، اذ نفذت ثلاثة تجارب . في التجربة الاولى والثانية تم زراعة الاجزاء النباتية المختلفة لنبات القرنفل (الورقة ، العقدة) وبموعين مختلفين 2008/4/1 والموعود الثاني 2008/6/1 على الوسط الغذائي M.S باستخدام مستويات مختلفة من NAA (0 , 0.5 , 1 , 1.5 , 2 ملغم / لتر) . وفي التجربة الثالثة تم دراسة تأثير مستويات مختلفة من (BA) في عدد النموات واطوالها الناتجة من الكالس والمتكون من الاوراق والعقدة وبخمس مستويات (0 , 0.5 , 1 , 1.5 , 2 ملغم/لتر) . استخدام التصميم العشوائي الكامل C.R.D لهذه التجارب وبمعدلات تكرارات لكل تجربة .

اظهرت النتائج من التجربة الاولى والثانية وجود فروقات معنوية بين التراكيز المختلفة من الـ NAA ونوع الجزء النباتي المستخدم وموعده اخذ حيث تبين بان التركيز 1.5 ملغم /لتر من NAA قد تفوق معنويا عند زراعة الورقة مسجلا اعلى وزن للكالس والذي بلغ 2.449 غم في حين سجلت العقدة عند التركيز نفسه 2.231 غم. اما في التجربة الثالثة فقد تفوق التركيز 1.5 ملغم / لتر (BA) مسجلا اعلى عدد من النموات الناشئة وقد بلغ عددها 7.12 واعلى معدل من الاطوال بلغ 6.67 سم وقد تفوقت معنويا على بقية المعاملات .

Abstract :

This research was carried out in plant tissue culture laboratory to investigate the effect of date of explant and addition of different levels of auxin NAA with or without addition of BA on callus formation of *Dianthus var. Marie chabaud* on Shoots Proliferation formation from callus *In vitro*. Three experiments were conducted . In the first and second experiment , the explants (leaf and nod) planted for two different dates 1/4/2008 and 1/6/2008 using different levels of NAA (0 , 0.5 , 1 , 1.5 , 2 mg/l) . In second experiment studied the effect different levels of (BA) on the number of shoots produced from calus that resulted from leaves and nods with five levels (0 , 0.5 , 1 , 1.5 , 2 mg/l) using CRD design with 10 replicates of each experiment. Results showed the significant differences between the concentrations of NAA and the kind of explant and the planting date which the concentration of 1.5 mg/l of NAA surpassed significantly in leaf planting wich gave the highest weight of callus by 2.449g. while the nods gave 2.231g. at the same concentration , while in the third Experiment, the concentration 1.5 mg/l BA gave the highest numbers of vegetative shoots wich were 7.12 , and higher average of length was 6.67 cm which is significantly surpassed on other treatments .

المقدمة :

نبات عشبي يعود إلى العائلة *caryophyllaceous* يصل ارتفاعه إلى 50سم أو أكثر وحسب الصنف أوقاه ضيقة وطويلة وأزهاره مختلفة الأحجام والأشكال والألوان (السلطان وآخرون ، 1992) . تشكل أزهار القرنفل اعلى صادرات القطف في الأسواق الهولندية لعام 2003 وقد بلغت 100، 331 ، 3 مليار يورو (FAO ، 2003) انتشرت زراعته في أوروبا في القرن السادس عشر وانتقلت زراعته إلى أمريكا في القرن التاسع عشر وانتشرت زراعته على نطاق واسع في الحدائق المنزلية والعامة لمنظره الجميل ورائحته العطرية التي تتميز بها أزهاره (الربيعي ، 1986) . وتملك امانة بغداد مشتلا نموذجيا في انتاج الازهار الصالحة للقطف وعلى مدار السنة (مراديان والعباسي ، 1986) والفترة التخزينية لازهار بعض اضافة تتراوح 2-3 اسابيع بعد القطف (الحيصه وآخرون ، 2006) . يتكاثر بالطريقتين الجنسية (

(البذور) والخضرية بواسطة العقل وأكثر الطرق الشائعة تعتمد على الصنف والموسم (صافي، 2004) استخدمت تقنية زراعة الانسجة النباتية في اكثاره الا ان هذه التقنية تتأثر بعدة عوامل منها ما يتعلق بالوسط الغذائي واخرى تتعلق بالعامل الفسيولوجي للنبات و تتفاوت نسبة النجاح من موسم الى اخر وحسب طبيعة وعمر الجزء النباتي ودرجة تفتح الخشب في العديد من النباتات (Zacarias و Reid 1990) وتلعب منظمات النمو دورا مهما في نمو وتطور الجزء النباتي المزروع وان الزيادة او النقصان عن الحد المثالي يؤثر على استجابة القرنفل عند زراعة نسيجيا (Black, 1983) وقد اجريت محاولات عديدة ناجحة لاكثر نبات القرنفل عبر تشجيع تكوين الاعضاء Orgagenesis من خلال تنشئة الكالس اذ وجد (Onamu 2003). ان زراعة العقد والقمة النامية بعمر سنة أعطت أفضل النتائج في نمو الافرع الخضرية وذكر (Salehi 2006) عند زراعته لـ13 صنفا مستخدما العقده المفردة لنبات القرنفل أعطت نباتات جيدة. وجد (Rupali 2001) عند زراعة القمة النامية للحصول على أفرع عن طريق تنشئة الكالس ان افضل توليفة للوسط الغذائي M.S المجهز بـ 2ملغم/لتر لكل من Kin و NAA قد أعطت نسبة عالية من الكالس وكونت أفرعا عندما نقلت على وسط مجهز (0.2 ملغم/لتر BA, 0.5 ملغم/لتر من NAA) واستخدم (Archara, Kothari 2002) لتكوين الكالس 0.5 ملغم/لتر BA و 0.5 ملغم/لتر NAA، تمكن Winarto وآخرون (2004) من استحداث كالس على وسط M. مضافا اليه 0.5 - 2 ملغم/لتر لكل من BA و 2 - 4.0 ملغم/لتر NAA وآخرون (2007) من تنشئة كالس نبات القرنفل من العقدة عند زراعتها في وسط M.S مضاف اليه 2 ملغم/لتر NAA و 2 ملغم/لتر Kin واعلى نسبة تمايز كانت على وسط كامل مجهز 2 ملغم/لتر BA و 0.5 ملغم/لتر NAA. ويهدف البحث الى دراسة تنشئة الكالس لنبات القرنفل للحصول على أعلى نسبة تمايز للنباتات الناشئة من الكالس والتي تحمل نفس الصفات الوراثية للنبات الأصل.

المواد وطرائق للعمل :

نفذ البحث في ظلّة ومختبر زراعة الانسجة في المعهد التقني / المسيب للموسم 2007/2008 لدراسة تأثير موعد اخذ الجزء النباتي (الاوراق والعقد) وإضافة مستويات مختلفة من NAA في تكوين الكالس . زرعت بذور القرنفل صنفا Marie chaboud من انتاج شركة Royaltlewr الفرنسية (Angers France) في 15/9/2007 في الظلة الخشبية وذلك في صناديق فلينية ذات (200) خليه مليئة بالبيتموس. نقلت النباتات النامية بعد وصولها الى ارتفاع مناسب إلى سنادين صغيرة قطر (10سم) مليئة بالزجاج النهري + بيتموس (1:1) في 15/11/2007 ثم نقلت بعد شهرين الى سنادين بلاستيكية اكبر قطر (25سم) لتكون مهيئة لأخذ النماذج منها (صورة 1) وقد شملت الدراسة ثلاثة تجارب في مختبر زراعة الأنسجة وكالاتي :

التجربة الأولى:

نفذت تجربة عامليه (2×5) ومثل العامل الأول موعين لأخذ الجزء النباتي (الورقة) ، الموعد الاول في 2008/4/1 والموعد الثاني 2008/6/1 أما العامل الثاني فكان اضافة الاوكسين NAA بخسمة مستويات هي (0.5 , 1 , 1.5 , 2 ملغم / لتر) الى الوسط الغذائي MS (Skoag, Marashag, 1962) مع او بدون اضافة الـ BA الى الوسط الغذائي MS لكل المعاملات.

و بعد اجراء عملية تعقيم الجزء النباتي (الورقة) بمعاملتها بمحلول هايپوكلوريت الصوديوم NaOCl بتركيز 1% ولمدة 25 دقيقة (salehi, 2006). زرعت الأجزاء النباتية في أنابيب الزراعة الحاوية على الوسط الغذائي (MS) بواقع (جزء واحد / انبوبة وبعشرة مكررات ثم حضنت الزروعات في غرفة النمو تحت شدة اضاءة 1000 لوكس لمدة 16 ساعة ضوء يوميا يعقبها 8 ساعات ظلام تحت درجة حرارة المختبر (26[±] 1 م) وبعد حوالي ثمانية اسابيع اخذت القراءات لوزن الكالس المتكون.

التجربة الثانية

في هذه التجربة استخدم الجزء النباتي العقدة بدلا من الورقة واجريت عليها نفس خطوات التجربة الاولى.

التجربة الثالثة

نفذت هذه التجربة لدراسة تأثير اضافة مستويات مختلفة من السايبتوكاينين (BA) الى الوسط الغذائي (MS) في معدل عدد النموات الخضرية المتكونة من زراعة الكالس المتكون من الاوراق في التجربة السابقة ، حيث تم نقل الكالس الى انابيب الاختبار وقد تم إضافة الـ BA بخسمة مستويات الى الوسط (MS) وهي 0, 0.5, 1, 1.5, 2 ملغم/لتر. استخدام التصميم العشوائي الكامل لكلا التجريبتين ولعشرة مكررات (أنابيب) بواقع (كالس/ أنبوبة) واستخدم اختبار اقل فرق معنوي LSD تحت مستوى 0.05 لمقارنة المتوسطات (الراوي وخلف الله ، 1980).

النتائج والمناقشة

1- التجربة الاولى/ الجزء النباتي / الورقة

يتضح من نتائج جدول (1) ان لاضافة الأوكسين NAA الى الوسط الغذائي MS تأثيرا معنويا في انتاج الكالس من زراعة جزء من الورقة ، اذ تفوقت جميع تراكيز الـNAA على معاملة المقارنة التي لم تعطي كالس ، وحقق التركيز 1.5 ملغم NAA / لتر اعلى معدل لوزن الكالس بلغ 3.136 غم وبذلك تفوق على المعاملات كافة معنويا . وربما يعود ذلك الى ان تركيز 1.5 ملغم NAA / لتر هو الانسب في تحفيز خلايا الورقة على انتاج الكالس ، وتتفق هذه النتائج مع A-Iantcheva وآخرون (2005) . ويلاحظ ان لموعد اخذ الجزء النباتي تأثيرا معنويا في هذه الصفة اذ أعطى الموعد 4/1 اعلى معدل لوزن الكالس بلغ 2.050 غم وبذلك تفوق معنويا على الموعد 6/1 الذي لم يعطي سوى 1.322 غم . وربما يعود سبب ذلك الى ان درجات الحرارة في شهر نيسان (بداية الربيع) تكون مناسبة جدا للنمو وانقسام الخلايا مما شجع على تكوين الكالس. وتتفق هذه النتائج مع A-Iantcheva وآخرون (2005) .

جدول (1) تأثير اضافة تراكيز مختلفة من الـNAA للوسط الغذائي (MS) وموعد اخذ الجزء النباتي (الورقة) في انتاج الكالس (غم) لنبات القرنفل صنف marie chaubed

متوسط تأثير الـNAA	موعد اخذ الجز النباتي		تركيز NAA ملغم/لتر
	6 / 1	4 / 1	
0	0	0	0
0.788	0.496	1.080	0.5
1.422	1.034	1.809	1
3.136	2.896	3.376	1.5
2.584	2.185	2.982	2
	1.322	2.050	متوسط الموعد
التداخل	الموعد	تركيز NAA	
1.674	0.718	0.783	ا.ف.م 0.05

كما ظهر ان للتداخل بين العاملين (تركيز الأوكسين NAA مع موعد اخذ الجزء النباتي) تأثيرا معنويا في انتاج الكالس اذ حقق تداخل 1.5 ملغم NAA/لتر للموعد الأول (4/1) اعلى معدل لوزن الكالس بلغ 3.376 غم بينما لم تعطي معاملة المقارنة كالس .

ومن نتائج جدول (2) يلاحظ ان بالرغم من إضافة الـBA للوسط الغذائي ولكل المعاملات فان انتاج الكالس سلك نفس السلوك كما في المعاملات التي قبلها (بدون إضافة BA) واستجابة لجميع المعاملات. فيلاحظ ان تركيز الأوكسين NAA 1.5 ملغم/لتر قد حقق أعلى معدل لوزن الكالس بلغ 2.194 غم في حين لم تعطي معاملة المقارنه الكالس . كما ان الموعد الأول (4/1) قد تفوق معنويا على الموعد الثاني باعطاءه أعلى معدل لوزن الكالس بلغ 1.437 غم مقابل 0.851 غم للموعد الثاني (6/1) . كما ظهر بان تداخل 1.5 ملغم NAA للموعد الأول قد حقق أعلى معدل بلغ 2.890 غم في حين لم تعطي معاملة المقارنة كالس. تتفق هذه النتائج مع Omama وآخرون (2003)

جدول (2) تأثير إضافة الـ (NAA) للوسط الغذائي MS (بثبات الـ BA بتركيز 1 ملغم / لتر) وموعد اخذ الجزء النباتي (الورقة) في انتاج الكالس (غم) لنبات القرنفل صنف marie chaubaud

متوسط تأثير NAA	موعد اخذ الجز النباتي		تركيز NAA ملغم/لتر
	6 / 1	4 / 1	
0	0	0	0
0.846	0.640	1.052	0.5
1.876	1.431	2.321	1
2.449	1.864	3.033	1.5
1.866	1.310	2.422	2
	1.049	1.766	متوسط الموعد
التداخل	الموعد	تركيز NAA	ا.ف.م 0.05
2.180	0.708	1.071	

التجربة الثانية / الجزء النباتي / العقدة

نشير النتائج في جدول (3) الى ان لإضافة الأوكسين NAA الى الوسط الغذائي تأثيرا معنويا في انتاج الكالس من العقدة اذ تفوقت جميع تراكيز NAA على معاملة المقارنة التي لم تعطي كالس . وقد حقق التركيز 1.5 ملغم NAA/لتر أعلى معدل لوزن الكالس بلغ 2.194 غم وبذلك تفوق على جميع المعاملات معنويا في هذه الصفة . كما كان لموعد اخذ العقدة تأثيرا معنويا في هذه الصفة اذ تفوق الموعد الثاني 6/1 بتحقيقه أعلى معدل بلغ 1.274 غم مقابل 0.776 غم للموعد الأول (4/1) وقد يرجع السبب الى ان درجات الحرارة المناسبة في الموعد الأول تشجع على نمو البراعم أكثر مما تدفع الجزء النباتي الى تكوين الكالس تتفق هذه النتائج مع Aamir وآخرون (2008) . وظهر ان للتداخل بين العاملين تأثيرا معنويا في وزن الكالس المتكون من العقدة اذ حقق تداخل 1.5 ملغم NAA/لتر في الموعد الثاني أعلى معدل لوزن الكالس بلغ 2.841 غم وبذلك تفوق على المعاملات كافة عدا تداخل 2 ملغم NAA/لتر لذات الموعد . ومن نتائج جدول (4) يتضح ان للتركيز 1.5 ملغم NAA/لتر قد أعطى أعلى معدل لوزن الكالس بلغ 2.231 غم في حين لم تعطي معاملة المقارنة الكالس .

وتجدر الإشارة هنا الى ان معاملة المقارنة (المضاف لها BA بتركيز 1 ملغم/لتر) قد أعطت أعلى نسبة لنمو البراعم من العقد (التكشف) في حين في المعاملات السابقة التي لم يضاف لها BA لم تحقق النمو ولا تكوين الكالس . كما كان لموعد اخذ العقدة تأثير معنوي في هذه الصفة اذ تفوق الموعد الثاني 6/1

جدول (3) تأثير إضافة الـ (NAA) للوسط الغذائي (MS) وموعد اخذ الجزء النباتي (العقدة) في انتاج الكالس (غم)
لنبات القرنفل صنف marie chabaud

متوسط تأثير NAA	موعد اخذ الجز النباتي		تركيز NAA ملغم/لتر
	6 / 1	4 / 1	
0	0	0	0
0.426	0.499	0.352	0.5
0.959	1.012	0.905	1
2.194	1.841	1.547	1.5
1.547	1.019	1.075	2
	1.274	0.776	متوسط الموعد
التداخل	الموعد	تركيز NAA	ا.ف.م 0.05
1.226	0.411	0.501	

جدول (4) تأثير إضافة الـ (NAA) للوسط الغذائي (MS) وموعد اخذ الجزء النباتي (العقدة) في انتاج الكالس (غم)
لنبات القرنفل صنف marie chabaud

متوسط تأثير NAA	موعد اخذ الجز النباتي		تركيز NAA ملغم/لتر
	6 / 1	4 / 1	
0	0	0	0
0.617	0.672	0.561	0.5
1.212	1.564	0.860	1
2.231	2.890	1.572	1.5
1.659	2.057	1.260	2
	1.437	0.851	متوسط الموعد
التداخل	الموعد	تركيز NAA	ا.ف.م 0.05
1.753	0.510	0.862	

باعطاه أعلى معدل بلغ 1.437 غم مقابل 0.851 للموعد الأول 6/1 وهنا تجدر الإشارة إلى ان اغلب نماذج الموعد الأول اتجهت الى نمو البرعم من العقدة لملائمة درجات الحرارة في هذا الموعد .

التجربة الثالثة / زراعة الكالس وتوليد الأفرع العرضية :

تشير النتائج في جدول (5) ان لاضافة الـ BA الى الوسط الغذائي (MS) تأثيرا معنويا في عدد النموات المتكونة في نسيج الكالس وأطولها اذ حقق المستوى 1.5 ملغم BA/لتر اعلى معدل لعدد النموات الناتجة وأطولها بلغ 7.12 نمو و 6.67 سم على التوالي وبذلك تفوق معنويا على مستوى 0.5 ملغم BA/لتر وعلى معاملة المقارنة التي أعطت اقل معدل للصفين بلغ 1.70 نمو و 2.13 سم على التوالي . وقد يعود ذلك الى ان المستوى 1.5 ملغم BA/لتر هو الأنسب في إحداث التأثير الإيجابي في انقسام الخلايا وتمايزها الى أفرع .

يستنتج من هذه الدراسة وحسب ظروف هذه التجربة انه اذا اريد الحصول على نسبة جيدة من الكالس لاستخدامه في تجارب اخرى تكميلية سواء للتمايز او دراسة بعض المركبات المهمة في نبات القرنفل صنف (maerie chabaud) فيمكن استخدام الجزء النباتي (الورقة) اذ تستوصل في الربيع وتزرع في وسط MS المجهز بـ 1.5 ملغم NAA، وذلك لاعطائها أعلى إنتاج للكالس ثم نقله في وسط MS المجهز بالـ BA بتركيز 1.5 ملغم/لتر لتحفيز نشوء الأفرع العرضية.

جدول (5) تأثير إضافة مستويات مختلفة من الـ BA في عدد النموات الناتجة من نسيج الكالس وأطولها .

تركيز BA ملغم/لتر	عدد النموات الناتجة	طول النموات الناتجة (سم)
0	1.70	2.13
0.5	2.60	3.52
1.0	4.20	4.73
1.5	7.12	6.67
2	6.10	5.48
ا.ف.م 0.05	3.84	3.62

المصادر

الحبيصة ، خالد ، منال الحياوي ، يزيد حوامده ، 2006 ، الدليل الفني لإنتاج القرنفل لأغراض التصدير

- الراوي ,خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله .تصميم وتحليل التجارب الزراعية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي , مطبعة الموصل , العراق . 1980 .
- الربيعي , نائر ياسين خضير , 1986 , تأثير السماد النتروجيني وعدد الافرع على الإنتاج الكمي والنوعي لأزهار القرنفل , رسالة ماجستير , كلية الزراعة , جامعة بغداد .
- السلطان , سالم محمد , طلال محمود الجليبي , محمد داود الصواف , 1992 , الزينة , وزارة التعليم العالي والبحث العلمي , جامعة الموصل .
- صافي , محمود , 2004 , القرنفل الإكثار والزراعة , العناية والإنتاج , المركز الوطني للبحوث الزراعية ونقل التكنولوجيا , نشرة رقم , 172 , 2004 , الأردن .
- مراديان , نوبار اوانيس , صبري حسن العباسي , 1986 , دراسة بعض أصناف القرنفل من حيث إنتاجيتها للأزهار في مواسم زراعة مختلفة , مجلة العلوم الزراعية العراقية المجلد (1)19 , 1988 .
- Aamir, A. , Humera A. , S. Naz , M.Rauf and J.Iqbal . 2008 . An Efficient protocol for In vitro propagation of carnation (*Dianthus Caryophyllus* L.) . Pakistan . Pak. J. Bot., 40 (1) : 111 – 121 .
- Iantcheval , A . ; M. Vlahoval , B. Atanassova and A. Atanassov . 2005. Plant regeneration via direct organogenesis and somatic embryogenesis of tow new bulgarian spray carnation cultivars, Sofia , Bulgaria2 15 Biotechnol. & Biotechnol.
- Archana K., S.L. Kothar .2002. High efficiency adventitious shoot bud formation and plant regeneration from leaf explants of *Dianthus chinensis* L.India.Scientia Horticulturae 96 . 205 – 212 .
- Winartoa,B.; M.A. Azizb, Rashidb and M.R. Ismailb .2004. effect of permeable vessel closure and gelling agnt on reduction of hyperhydricity In vitro culture of carnation a Indonesian ornamental plants .
- Black, J. 1983. Tissus culture propagation of date palm in vitro . plants Today. (5-6): 82-86 .
- FAO. 2003 . Corporate Document Repository , small – scale post - harvest handling practices – Amanual for horticultural crops, transportation horticulttural crops
- Salehi, H. . 2006 . Can a general shoot proliferation and rooting medium be used for a number of carnation cultivars. African Journal of Biotechnology , Vol . 5, No. 1 , Jan, pp. 25-30 .
- Mehta R. ; S. Sarita ; N. Amarjit K. 2007 . In Vitro selection and biochemical characterization of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) calls culture tolerant to Alternaria Dianthi Indian Journal of Plant Physiology , vol. 12 , n°2,pp.120-126.
- Rupali . 2001 . In vitro selection and biochemical characterization of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Callus culture tolerant to Alternaria dianthi .
- R. Onamu , S.D. Obukosia , N. Musembi and M.J. 2003 . Hutchinson efficacy of Thidaiazuron in vitro propagation of carnation shoot tips: influence of Dose and Duration of Exposure African Crop Science Journal , Vol. 11 . No . 2 , pp. 125 - 132 .
- Zacarias , L., and Reid , M. S. (1990) Role of growth regulators in the senescence of Arabidopsis thaliana leaves . Physiol . Plant . 80 : 549 – 554 .