دراسة تأثير بعض العوامل في استحثاث الكالس من متوك نبات الفاصوليا

ستار عبد الله شلاهي
مركز بحوث التقنيات الاحيائية، جامعة النهرين، بغداد, العراق.

المستخلص

حددت المرحلة التطورية الافضل لخلايا البويغات الصغيرة (microspores) بتطوير طريقة تصبيغ سريعة باستخدام صبغة اورسين- HCl اذ كانت المرحلة الافضل لاعطاء الكالس هي مرحلة الثالثة . اما عن ظروف زراعة المتوك المختبرة فقد استخدمت درجة حرارة 3 م كمعاملة تمهيدية من 1-13 يوم، والوسط الغذائي الاساس المستخدم هو MS بحالتيه السائلة (مع الفايكول وبدونه) وشبه الصلبة (باضافة الاكار بتركيز 0.8% أو الاكاروز بتركيز 0.5%)، وباستخدام البنزيل ادنين (BA) بالتركيزين 0.5، 1 ملغم/ لتر واندول حامض الخليك (IAA) بالتراكيز 0.1، 0.5 ، 1 ملغم/لتر، وبدون هرمونات، فضلا عن اختبار الفحم المنشط بالتراكيز (0.1، 0.3 ، 0.5%) والكولجسين (25 ملغم/لتر) وتراكيز مختلفة من السكروز [3،4، 5، 6 %]، كما استخدم متحلل الكازين وبعض الاحماض الامينية. وبخصوص ظروف الاضاءة اختبر الظلام والضوء (الابيض والاحمر). اظهرت النتائج أن معاملة البرودة كانت سلبية مقارنة بالسيطرة. اما بالنسبة لحالة الوسط فأن الحالة الصلبة كانت هي الافضل من السائلة وخصوصا عند استخدام الاكاروز، وبالنسبة للفحم المنشط والكولجسين فلم يعطي استخدامهما أي نتيجة ايجابية في استحثاث الكالس، أما بالنسبة لتراكيز السكروز فقد كان افضل تركيز هو 4 % اذ أعطى نسبة استحثاث 33.3%، وبخصوص نوع الضوء فقد كان الضوء الاحمر هو الافضل في نجاح استحثاث الكالس (5 %) من الابيض والظلام .

الكلمات المفتاحية: استحثاث الكالس، زراعة المتوك، الاكاروز، الاورسين، الكولجسين، الفحم المنشط.

DIYALA JOURNAL FOR PURE SCIENCES

Abstract

The best microspores developmental stage was determined by adopting a new rapid taining method using orcein- HCl stain. It was found that the third stage was better the stage for callus induction. For anther culture conditions the pretreatment temperature (3̊C) was applied for 1-13days,basal MS media were used as liquid (with or without ficoll) and solid (with 0.8% agar or 0.5% agarose), hormones with BA: 0.5 and 1mg/l and IAA: 0.1,0.5 and1mg/l) or without hormones, activated charcoal (0.1,0.3 and 0.5%), colchicines(25 mg/l),too different concentration from sucrose [3,4,5,6%].Casein hydrolysate , amino acids and lighting conditions full darkness and light (white and red).

The result showed that the pretreatment temperature gave less callus induction than the control treatment. The solid media gave better callus induction than liquid media especially when agarose was used. Whereas activated charcoal treatment and colchicine (added to the media) did not induce callus formation and the sucrose (4%) gave better callus induction (33.3%). The results also revealed that the red light gave callus induction (5%) better than the white light and darkness.

المقدمة:

تعد زراعة المتوك والبويغات طريقة للحصول على نباتات احادية المجموعة الكروموسومية تستخدم لانتاج خطوط (نباتات) نقية ومتجانسة وراثيا لبرامج تربية المحاصيل. كذلك تكون النباتات الأحادية مادة ضرورية ومثالية في مجال : الوراثة، والبايولوجي الجزيئي، والتقانة الاحيائية [1].ان مضاعفة هذه الاحاديات المنتجة عن طريق زراعة المتوك تكون طريقة سريعة وملائمة وعملية لاغلب انواع المحاصيل مقارنة بطريقة التربية التقليدية في الحصول على خطوط (نباتات) نقية متجانسة الصفات الوراثية، كما وتعد زراعة المتوك مصدر من مصادر انتاج التغايرات الوراثية، فضلاً عن كونها اسلوب ناجح في المحافظة على الطفرة الوراثية المستحثة سواءاً كانت سائدة ام متنحية [2]. وبالرغم مما تلعبه انواع العائلة البقولية Fabaceae من دور رئيسي في الانتاج الزراعي، الا انها لم تحض بما حضيت به العوائل الاخرى (النجيلية والباذنجانية) فيما يتعلق بتطوير طرائق مضاعفة الاحاديات في العالم الا مؤخرا [3]، اما على الصعيد المحلي فان تقانة زراعة المتوك لم تحض الا بنزر قليل ومتناثر من البحوث والدراسات، فقد عمل كل من [4 ، 5] على زراعة متوك الحنطة و[6]

على الحنطة والترتيكيل، في حين عمل [7] على زراعة متوك الباذنجان.وعليه ولما لمحصول الفاصوليا (22 كروموسوم) من اهمية اقتصادية في البلد فقد عمدنا الى دراسة بعض العوامل المؤثرة في نجاح زراعة متوك الفاصوليا خارج الجسم الحي.

هدف البحث: ان هدف البحث هو تحديد افضل الظروف التي يمكن من خلالها الحصول على نسيج الكالس من متوك نبات الفاصوليا ليكون لبنة اولى للحصول على نباتات احادية المجموعة الكروموسومية يمكن مضاعفتها للحصول على خطوط نقية لاستخدامها في تربية وتحسين الفاصوليا.

المواد وطرائق العمل

تحديد المرحلة التطورية للمتوك

زراعة البذور : زرعت البذور الفاصوليا صنف Strike انتاج شركة Pop veriend of seeds المستورد من قبل القطاع الخاص في الموسمين 15-30\ 8 \ 2008 و15 \ 3-7\4 لعام 2009 لغرض الحصول على البراعم الزهرية من النباتات الناتجة واستخدامها في تحديد المرحلة التطورية للمتوك وكذلك لغرض زراعة المتوك.

جمع وتثبيت البراعم الزهرية: بعد ازهار نباتات الفاصوليا جمعت البراعم الزهرية بمراحل مختلفة في الساعة 8-9 صباحا لزيادة نشاط الخلايا في هذا الوقت وكذلك للتخلص من زيادة شدة الضوء التي تعمل على تفتح المتوك (مع الاخذ بنظر الاعتبار ازالة البراعم المتقدمة بالعمر) اذ ثبتت في محلول كارنوي (1: 3: 6) حامض الخليك الثلجي :كلوروفورم: كحول مطلق على الترتيب وحفضت في الثلاجة لحين التصبيغ وتحضير الشرائح (1-30) يوم اذ صنفت قبل تصبيغها حسب طول البرعم الزهري الى :

(2-2.9 ؛ 3-3.5 ؛ 3.6-3.9 ؛ 4-4.5 ؛ 4.6-5) ملم.

التصبيغ وتحضير الشرائح : طورت الطريقة المستخدمة من قبل [8] على قمم الجذور لاستخدامها في تصبيغ البراعم الزهرية (المتوك) وذلك باختبار صبغة الاورسين الخلي (2 و5%) المؤلفة مع (1، 6) عياري من HCl وكما في الجدول (1) لتصبيغ المتوك وتحديد المراحل التطورية لخلايا البويغات الصغيرة microspores (حسب الاطوال المصنفة اعلاه) اذ

وضعت البراعم الزهرية في محلول الصبغة على درجة حرارة 60 ±1 م في حمام مائي لمدة (1-2) دقيقة ثم هرست على شريحة زجاجية في قطرة من صبغة الاورسين الخلي 1%، تحت الغطاء الزجاجي وتم الفحص والتصوير على القوة تكبير 400 مرة.

زراعة المتوك

معاملة التبريد التمهيدية : وضعت البراعم الزهرية بعد جمعها باطوال مختلفة في طبق زجاجي كبير مع 5 مل من الماء المقطر (في طبق صغير وضع في مركز الطبق الكبير) وتم اغلاق الطبق الزجاجي الكبير بالشريط الشمعي parafilm كما في الشكل (1) وحفظ في الثلاجة على درجة حرارة 3 م لمدة (1-13) يوم لاختبار تأثير معاملة البرودة على نجاح استحثاث الكالس من المتوك.

التعقيم: عرضت البراعم الزهرية المعاملة بالبرودة وغير المعاملة (السيطرة) الى تيار ماء الحنفية الجاري لمدة (30-60) دقيقة (حسب قوة الماء وتوفره) ثم غطست في كحول اثيلي 70% لمدة 30 ثانية بعدها غمرت في محلول مخفف بالماء المقطر المعقم والكلوراكس التجاري بتراكيز مختلفة وفترات زمنية مختلفة ايضا جدول (2) مع التحريك المستمر لتحديد افضل تركيز وباقل مدة زمنية لاعتماده فيما بعد في تعقيم السطوح الخارجية للبراعم ، ثم ازيل تأثير الكلوراكس بغسل البراعم الزهرية بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لمدة (5-10) دقائق لكل مرة.

الوسط الغذائي المستخدم: استخدم الوسط الغذائي MS [9] المجهز بكميات مختلفة من متحلل الكازين وبعض الاحماض الامينية كما في الجدول (3) ، بدون هرمونات ، او بأضافة BA بالتركيزين 0.5 ، 1 ملغم/ لتر بالتداخل مع الاوكسين IAA بالتراكيز 0.1 ، 0.5 ، 1 ملغم / لتر [8] ، بالحالتين السائلة وشبه الصلبة (بالاكار بتركيز 0.8 % أو الاكاروز بتركيز 0.5 %) ، اما السكروز فقد اختبرت نسب مختلفة منه [3 ، 4 ، 5 و6 %] مع الوسط III؛ فضلا عن اضافة الكولجسين بتركيزين هما (0.0 ، 25) ملغم/ لتر مع الوسط III جدول (3) والمصلب بألاكار، كما اختبر الفحم المنشط بالنسب (0.0 ، 0.1، 0.3، 0.5 %) مع الوسط III المصلب بالاكار 0.8% (للحد من تأثير الاكار الضار للمتوك)، كما استخدمت الحالة السائلة للوسط III المذكور سابقا باضافة مادة الفايكول بتركيز 50 ملغم/ لتر لتعويم المتوك، وعدل الـ pH للوسط الغذائي الى 5.8.

طريقة الزراعة: أستئصلت المتوك بعد تشريح البراعم الزهرية تحت مجهر التشريح في ظروف معقمة (كابينة الزراعة ذات الهواء الطبقي) وزرعت في أطباق بتري بواقع 10 متوك لكل معاملة وبمعدل (2-4) مكررات (حسب توفر كل طول للبراعم الزهرية) علما أنه قد زرع المتك مع وبدون الخويط في الوسط III في حالتيه الصلبة والسائلة ، و حضنت المتوك المزروعة في الوسط III في الظلام أوالضوء (الابيض بشدة اضاءة: 1000 لوكس، والاحمر بشدة اضاءة:100 لوكس) وبتعاقب ضوئي 16 ساعة ضوء \8 ظلام ، ودرجة حرارة 25 م $\pm$ 1 ، كما استخدمت مدة 4 اسابيع لاعادة زراعة الكالس المستحث.

النتائج والمناقشة

طريقة التصبيغ:

جربت توليفة (الاورسين – HCl) المستخدمة من قبل [8] لتصبيغ النهايات الجذرية في تصبيغ المتوك لنبات الفاصوليا وهي بداخل البراعم الزهرية الا ان ميزة تصلب المتوك في العائلة البقولية بعد التثبيت تتطلب معاملات كثيرة وطويلة لتطرية جدران المتوك كما وجده [10] لذلك عمدنا الى تطوير هذه الطريقة (اورسين– HCl) وكما ذكر في المواد وطرائق العمل. اظهرت نتائج الفحص الخلوي ان افضل توليفة بين صبغة الاورسين الخلي و حامض الهيدروكلوريك هي توليفة [6:4] صبغة 5%: 6N HCl [حجم : حجم] على الترتيب الشكل (2) بأغلب اجزاءه مقارنة بالشكل (2 : و) المستخدم في تصبيغه التوليفة [6:4] صبغة 5%: 1N HCl [حجم : حجم] على الترتيب، اما التوليفة المستخدمة من قبل [8] فان المتوك تكون صلبة و صعبة الهرس نتيجة استخدام المثبت الى درجة تحطم الغطاء الزجاجي، كما اظهرت النتائج ان العلاقة بين حجم البرعم الزهري والمدة الزمنية للتصبيغ كانت عكسية اذ تزداد المدة الزمنية كلما قل حجم البرعم الزهري (وبالتالي المتك) حتى تبلغ (2) دقيقة او اكثر. ان كفاءة توليفة [5% اورسين – 6N HCl] ترجع الى ارتفاع تركيز الصبغة من جهة وفعالية حامض 6N HCl في تفكيك جدران المتوك المصبوغة مما يسهل دخول الصبغة المذكورة من جهة اخرى وبالتالي سهولة هرس المتك عند تحضير الشرائح الخلوية. من هذا يستنتج انه بالامكان اعتماد هذه الطريقة في تحضير الشرائح الخلوية للبراعم الزهرية سواء في تحديد المرحلة التطورية للبويغات او لفحص الانقسام الميوزي لسهولتها من جهة وسرعتها من جهة اخرى.

علاقة طول البرعم الزهري بالمرحلة التطورية للمتوك:

أظهرت نتائج الفحص الخلوي التي يبينها الشكل (2) ان لطول البرعم الزهري علاقة وثيقة بمرحلة تطور حبة اللقاح داخل المتك اذ تبين ان البراعم التي يكون طولها (2-2.9 ملم) تحوي خلايا ذات عدد احادي الكروموسومات (11 كروموسوم) وخلايا الرباعيات (مرحلة اولى) كما في (2: ب، ج) في حين كان طول البراعم (3-3.5 ملم) يحوي المرحلة الثانية والثالثة كما في (هـ، و) ، اما بالنسبة لطول البرعم (3.6-3.9 ملم) فانه يحوي المرحلة الرابعة كما في (ح)، وتميز طول برعم (4-4.5 ملم) بالمرحلة الخامسة الاولية في (ي) والمتوسطة في (ك) والمتأخرة في (م) وكانت المرحلة السادسة لغاية الطول 5 ملم (ف).

زراعة المتوك

التعقيم:

أظهرت النتائج عدم وجود فروق بين معاملات التراكيز المختلفة للكلوراكس [10،20،30%] في محلول التعقيم ولجميع الفترات الزمنية اذ كانت نسبة التلوث منعدمة (0.0%) وكما مبين في الجدول (4) وعليه فقد أعتمدت المعاملة (10%) كلوراكس بمدة 10 دقائق لتعقيم السطوح الخارجية للبراعم الزهرية قبل عملية تشريحها واستخراج المتوك لغرض زراعتها على الاوساط الغذائية.ان تعريض البراعم الزهرية الى تيار ماء الحنفية الجاري قد ساعد في ازالة الكثير من مسببات التلوث مما ادى الى امكانية تقليل تركيز الكلوراكس في محلول التعقيم والمدة الزمنية المستخدمة للتعقيم.

تاثير طريقة الزراعة :

أظهرت النتائج ان بقاء الخويط الحامل للمتك يكون سلبيا في استحثاث الكالس من المتوك مقارنة مع حالة ازالته كما في الشكل (3: د، هـ، و) اذ ان نشوء الكالس يستحث من النهاية الطرفية للخويط بالنسبة للوسط السائل والصلب على حد سواء كما في الشكل (3: أ، ز). وقد يرجع ذلك الى كون خلايا الخويط هي في حالة طبيعية (ثنائية المجموعة الكروموسومية) مما يجعل فرصة استجابتها للوسط الغذائي الملائم لحالتها الطبيعية [8 ، 11] وبالتالي تكون منافسة للخلايا

الاحادية المجموعة الكروموسومية.من هذا يستنتج ان بقاء الخويط مع المتك عند الزراعة ذا تأثير سلبي على استحثاث الكالس من المتوك .

تأثير البرودة التمهيدية

أظهرت النتائج ان تأثير معاملة البرودة التمهيدية بدرجة حرارة 3 م ولمدة (1-13) يوما كانت سلبية مقارنة مع السيطرة (متوك مأخوذة من الحقل مباشرة) كما يبينه الشكل (3 : ح)، اذ كانت العلاقة عكسية بين المدة الزمنية لمعاملة البرودة (3 ْم) المستخدمة مع نجاح استحثاث الكالس من المتوك ولجميع المراحل التطورية للمتوك (اطوال البراعم الزهرية) المستخدمة . ان متوك الفاصوليا على ما يبدو من المحاصيل التي لاتتأثر بمعاملة البرود [7 ، 12] على الاقل في حدود ظروف بحثنا الحالي.من هذا يستنتج ان اخذ البراعم الزهرية من الحقل مباشرة لاستخدامها في زراعة المتوك لنبات الفاصوليا هو افضل من تعريضها لمعاملة البرودة التمهيدية للحصول على نسيج الكالس

تأثير مكونات الوسط الغذائي

تأثير الهرمونات:

اظهرت النتائج عدم استجابة المتوك لاستحثاث الكالس في حالة الوسط الخالي من الهرمونات ، اما في حالة استخدام BA و IAA فقد اعطى ارتفاع تركيز BA على IAA استجابة ضعيفة كما في الشكل (3: ك) في حين كان لارتفاع تركيز هرمون IAA الاثر في استجابة المتوك لاستحثاث الكالس كما في الشكل (3 : ح).ان النتيجة الايجابية لاستجابة المتوك في حالة ارتفاع تركيز IAA هي بسبب كون هذا الاوكسين يعمل على تشجيع الخلايا النباتية بشكل عام على استحثاث الكالس وخلايا نبات الفاصوليا بشكل خاص [8 ، 11]. يمكن ان يستنتج ان انعدام الهرمونات في الوسط الغذائي المستخدم لاستحثاث الكالس له اثر سلبي مقارنة بأستخدام الهرمونات اذ تكون أيجابية.

تأثير استخدام الفحم المنشط والكولجسين:

اظهرت النتائج عدم كفاءة الفحم المنشط في نجاح استحثاث الكالس من المتوك وبجميع تراكيزه المستخدمة اذ كانت نسبة استحثاث الكالس (0.0 %) كما يبينه الشكل (3: ج)، ولجميع المراحل التطورية المستخدمة في زراعة المتوك على الوسط الحاوي للفحم المنشط.ان التأثير السلبي للفحم المنشط بالرغم من كونه يستخدم في زراعة المتوك بشكل واسع [7 ، 13] ربما يرجع الى ان التراكيز المستخدمة في بحثنا الحالي غير كافية للحد من الاضرار التي يسببها الاكار اذ يحتوي على مركبات مثبطة لاستجابة البويغات (microspores) [13].اما عن استخدام الكولجسين كمحفز لاستحثاث الكالس من متوك الفاصوليا فان النتيجة كانت في الاسبوع الاول هي ان المتوك المأخوذة من براعم بطول 2.6 ملم انتفخت وكان لونها ابيض، اما المتوك (3 – 3.5 ملم للبرعم) فقد تميزت بالانتفاخ مع تلونها بالون البني، وفي حالة المتوك (3.6 – 4 ملم للبرعم) ايضا تميزت بالانتفاخ وتلونت باللون الكريمي الباهت وكذلك حصل بالنسبة لطول (4 – 4.5 ملم للبرعم) الا ان اللون كان فاتح جدا، ان هذه النتيجة كانت حتى الاسبوع الاول ولكن النمو لم يستمر فيما بعد وفقدت المتوك حيويتها لاحقا الشكل (3 : ب).

ان النتيجة النهائية للمتوك المزروعة على الوسط الحاوي للكولجسين ربما تكون بسبب عدم اعادة زراعتها على وسط خالي من الكولجسين بعد فترة اسبوع او بسبب استخدام الاكار في تصلب الوسط المذكور اذ ان الاكار يعمل على الاضرار بحياة المتوك لما يحتويه من مواد ضارة بها [13].

تاثير الاوساط السائلة:

اظهرت النتائج ان الحالة السائلة للوسط الغذائي لم تكن ذات جدوى ايجابية في استحثاث الكالس من متوك نبات الفاصوليا الافي حالة مفردة واحدة وبنسبة 2.5 % عند استخدام الفايكول لتعويم المتوك كما يظهر في الشكل (3 : أ، ي)، وهذا يرجع الى الظروف اللاهوائية للوسط نتيجة لانغمار المتوك بعد مدة من زراعتها في الاوساط السائلة [14] اما في حالة استخدام الفايكول فأن التركيز المستخدم لتعويم المتوك فوق سطح الوسط لم يكن بالمستوى المطلوب ايضا.

تأثير الوسط الصلب:

اظهرت النتائج ان الوسط II لم يعطي اي نتيجة ايجابية لاستحثاث الكالس من المتوك اذ كانت النسبة للاستحثاث هي (0.0 %)، وكذلك الحال بالنسبة الى الوسط I اذ كانت نسبة الاستحثاث للكالس هي (1%). وعليه فقد عدل عن استخدام الاكار في تصلب الوسط وتم استبداله بالاكاروز فيما بعد.ان النتيجة اعلاه ربما يكون سببها هو استخدام الاكار في تصلب الوسطين (I ,II) الذي يحتوي على مواد مثبطة لاستجابة البويغات في داخل المتوك [13]. اما بالنسبة لتراكيز السكروز المختلفة المستخدمة مع الوسط III والمصلب بالاكاروز فان افضل استجابة كانت عند استخدام تركيز سكروز 4% وكما هو مبين في الجدول (5) وبطول (3− 3.5 ملم) وهي المرحلة التطورية الثانية والثالثة اذ بلغت النسبة 33.3 % كما يبينه الشكل (3: ح) وهذا يدل على ان تركيز 4 % سكروز في الوسط الغذائي يوفر افضل ضغط ازموزي [8] لاستجابة المتوك الفاصوليا في استحثاث الكالس اذ يعتمد امتصاص ايونات النترات والامونيوم على تركيز السكروز في الوسط الغذائي، فالتراكيز المثلى للسكر تعمل على زيادة تأثير السايتوكاينين لتحفيز الخلايا للانقسام [15]، في حين يؤدي انخفاض النسبة لـ(3 %) الى نقص في مستوى الكاربون الذي يجهز الخلايا بالطاقة والذي يعد غير كافي بالنسبة لمتوك الفاصوليا للاستمرار بالنمو اما في حالة ارتفاع نسبة السكروز الى (5 و6 %) فانه سوف يرتفع الضغط الازموزي الى مستويات متطرفة تكون نتيجتها سلبية على استمرار خلايا نبات الفاصوليا المزروعة نسيجيا بالنمو بشكل عام وللمتوك بشكل خاص [8].مما سبق يستنتج ان استخدام الاكار في زراعة المتوك قد ثبط من استجابة المتوك المزروعة وبالتالي لاينصح باستخدامه في هذا المجال، كذلك يمكن ان يصنف نبات الفاصوليا ضمن النباتات التي تحتاج زراعة متوكها الى تراكيز واطئة من السكروز (2-4%)، كذلك يمكن اعتماد طول البرعم الزهري كمؤشر في زراعة المتوك وتحت ظروف الحقل.

الزراعة الثانوية (أعادة الزراعة):

اظهرت النتائج ان المدة المستخدمة لاعادة زراعة الكالس المستحث من المتوك لنبات الفاصوليا هي 4 اسابيع غير مناسبة اذ ان الكالس قد فقد الحياة بهذه المدة لذلك فقد تم تقليل المدة الى اسبوعين لغرض المحافظة على الكالس المستحث من المتوك.اما عن الاوساط المستخدمة في الزراعة الثانوية فقد نجحت جميع الاوساط المذكورة في الجدول (3) في المحافظة على استمرار الكالس حيا وبمدة اعادة زراعة اسبوعين حتى في حالة استخدام الاوساط المصلبة بالاكار.من

هذا يستنتج ان الكالس المستحث من متوك الفاصوليا لايتحمل مدة بقاء طويلة (4 اسابيع) في وسط الزراعة، وكذلك عدم تأثير الاكار بعد استحثاث الكالس.

تأثير الضوء والظلام في استحثاث الكالس من المتوك

اظهرت النتائج ان التحضين في الظلام كان ذا تأثير سلبي مقارنة بالتحضين بالضوء كما في الشكل (4: ط، ك) اذ كان الضوء ذا تاثير ايجابي في تحفيز المتوك على استحثاث الكالس وخصوصا عند استخدام الضوء الاحمر (5%) اذ كان اكثر ايجابية من الضوء الابيض (1%) كما في الشكل (4: ك).على ما يبدو ان الظلام وخلافا لما هو معروف كان سلبي التأثير وقد يعود ذلك الى النمط الوراثي للصنف المستخدم (Strike) للفاصوليا، اما عن تفوق الضوء الاحمر على الابيض فقد وجد ان للضوء الابيض تأثير مثبط لاستجابة المتوك مقارنة بالضوء الاحمر وذلك ربما يكون بسبب ان الطول الموجي للضوء الاحمر يعمل على ايقاف استمرار عمليات نضج حبوب اللقاح اذ يعمل على تثبيط عمل بروتين الفايتوكروم وبالتالي تحول البويغات الى حالة Androgenesis [16،17].

الاستنتاجات والتوصية:

من دراستنا لبعض العوامل المؤثرة في زراعة المتوك لنبات الفاصوليا بأمكاننا استنتاج الاتي:

- بالامكان اعتماد طريقة التصبيغ المستخدمة في هذا البحث في تحضير الشرائح الخلوية للبراعم الزهرية سواء في تحديد المرحلة التطورية للبويغات او لفحص الانقسام الميوزي لسهولتها من جهة وسرعتها من جهة اخرى.
- ان بقاء الخويط مع المتك عند الزراعة ذا تأثير سلبي على استحثاث الكالس من المتوك .

- ان اخذ البراعم الزهرية من الحقل مباشرة لاستخدامها في زراعة المتوك لنبات الفاصوليا هو افضل من تعريضها لمعاملة البرودة التمهيدية للحصول على نسيج الكالس، كما يمكن اعتبار طول البرعم الزهري كمعيار لمرحلته التطورية ونجاح استجابته لتكوين الكالس.

- ان تجهيز الوسط الغذائي بمنظمات النمو النباتية كان ضروريا لاستحثاث الكالس من متوك نبات الفاصوليا.

- ان استخدام الاكار في زراعة المتوك قد ثبط تكوين الكالس من متوك نبات الفاصوليا ولم يؤثر على ادامته فيما بعد.

- يمكن ان يصنف نبات الفاصوليا ضمن النباتات التي تحتاج زراعة متوكها الى تراكيز واطئة من السكروز (2-4%).

- ان افضل مدة زمنية لاعادة زراعة الكالس المستحث من متوك نبات الفاصوليا هو اسبوعين فقط وليس اكثر (4 اسابيع) .

التوصية : يمكن ان يوصى بتجربة الاكاروز مع تركيبة الوسط I، II؛ وكذلك استخدام تراكيز اعلى من 50 ملغم / لتر من الفايكول لتعويم المتوك فوق سطح الوسط السائل، فضلا عن تجربة توليفة فيتامينات وسط B_5 مع الوسط III والتي تكون تراكيزها أعلى مما مستخدم في الوسط MS وهرموني الكاينتين و 2,4-D في استحثاث الكالس.

المختصرات:

وسط موراشيك وسكوك	MS
البنزيل ادنين	BA
اندول حامض الخليك	IAA
حامض الهيدروكلوريك	HCl
ثنائي الكلور فينوكسي حامض الخليك	2,4-D

المصادر

[1] Atanassov A.; Zagorska, N.; Boyadjiev, P.; Djilianov, D. (1995), In vitro production of haploid plants. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11, 400-408.

[2] Maluszynski,M.; Kasha,K.J.; Forter,B.P.; Szarejko,I.(2003). Doubled haploid production in crop plants.(a manual). Kluwer academic publishers.p,3&351.

[3] Croser,J.; Lulsdorf,M.; Davies,P.; Clarke,H.; Bayliss,K.; Mallikarjuna,N.; Siddique,K.(2006). Toward doubled haploid production in Fabaceae: Progress, Constraints, and Opportunities. Critical Review in Plant Sciences,25(2), 139-157 (19).

[4] الجنابي، خزعل خضير وشريف، لبيد ونابي، نوزاد.(1990). استعمال نباتات احادية المجموعة الكروموسومية الناتجة من زراعة المتوك خارج الجسم الحي في تربية الحنطة.1. تطوير خطوط جديدة من الحنطة قابلة للتهجين مع الشعير البري. مجلة العلوم الزراعية العراقية.م (21). عدد (3)،:64-71.

[5] التكريتي، سهيلة عائد ابراهيم.(2000). التحليل الوراثي التبادلي وانتاج خطوط نقية بتقنية زراعة المتوك لتراكيب وراثية من الحنطة في المنطقة الوسطى من العراق. اطروحة دكتوراة .كلية الزراعة. جامعة بغداد.العراق.

[6] يوسف، شذى عايد. والجنابي، خزعل. ونصرالله، عادل يوسف.(1998). استجابة متوك الحنطة (*Triticum aestivum* L.) و الترتيكيل للزراعة النسيجية. المؤتمر العلمي الثاني لكلية الزراعة. جامعة الانبار.ص:5.

[7] Ali, A. K.(2008). Some factors affecting the success of anther culture of Solanum melongena L. in vitro. M.Sc. thesis, Al- Nahrin University.Iraq.

[8] شلاهي، ستار عبدالله.(2003) التطفير الكيميائي لنبات الفصوليا (Phaseolus vulgaris L.) خارج الجسم الحي (In vitro). رسالة ماجستير . كلية العلوم. جامعة بغداد. العراق.

[9] Murashige,T. and Skoog, F.(1962).A revised medium for rapid groth and bioassay with tobacco tissue . Physiol.Plant,15: 473- 497.

[10] علوان، عبد الرضا اكبر.(1977). دراسة كروموسومية وتصنيفية لانواع مختلفة من العائلة القرنية Leguminosae . رسالة ماجستير . كلية العلوم. جامعة بغداد. العراق.

[11] طه، آلاء جبار.(2002). استخدام اشعة كاما (كوبالت) وزراعة الانسجة في استحداث تغايرات وراثية في نبات وانسجة كالس الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* L. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية. العراق.

[12] Munoz, L. C.; Baudoin, J. P.(1994). Influence of the cold pretreatment and carbon source on callus induction from anthers in Phaseolus. Bean Improvement Cooperative Annual Report.37, 129-130.

[13] دكسون، آر. أي. (2002). زراعة الخلايا النباتية مدخل عملي. ترجمة د. محمد علي حسين الحديدي. دار الفكر للطباعة والنشر والتوزيع. عمان، ص: 60- 72.

[14] Lyne, R.L., Bennett, R. I and Hunter, C. P(1985). In Plant Cell Culture In crop Improvement, Sen, S. K. and Giles, K. L.(eds). Plenum Press, New York, P,169.

[15] George, E. F. and Sherrington, P. D.(1984).Plant propagation by tissue culture. In: Some factors affecting the success of anther culture of Solanum melongena L.in vitro. M.Sc. thesis, Ali, A.K.(2008). Al- Nahrin University.Iraq.

[16] Chahal, G. S. and Gosal,S. S. (2002). Principles and procedures of plant breeding. Alpha Science International.(Ltd)., Pangbourne, UK, 604.

[17] محمد، عبد العظيم كاظم.(1985).علم فسلجة النبات. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة الموصل . العراق، ج3،ص:1157.

جدول (1) توليفات صبغة الاورسين الخلي مع حامض HCl (حجم:حجم).

		صبغة الاورسين الخلي	
الحامض		%2	%5
	1 عياري	8:2	0:0
	6 عياري	4:6	4:6

جدول (2) تركيز الكلوراكس في محلول التعقيم والفترات الزمنية المستخدمة في تعقيم البراعم الزهرية.

	تركيز الكلوراكس في محلول التعقيم		
	10%	20%	30%
المدة الزمنية بالدقائق	10	10	10
	20	20	20
	30	30	30

الجدول (3) المركبات العضوية المضافة الى الوسط MS بالـ(ملغم / لتر).

المضافات

Inos	Trp	Cys	Gly	Asp	Tyr	Glu	CH	رمز الوسط
150	0.0	0.0	100	100	100	0.0	100	I*
150	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	400	0.0	II
150	10	10	10	10	0.0	0.0	0.0	III

- استخدم الاكار Agar Agar,Type 1(HIMEDIA) في تصليب الوسطين I ,II.

جدول (4) نسبة التلوث باستخدام تراكيز مختلفة من الكلوراكس وبفترات زمنية مختلفة.

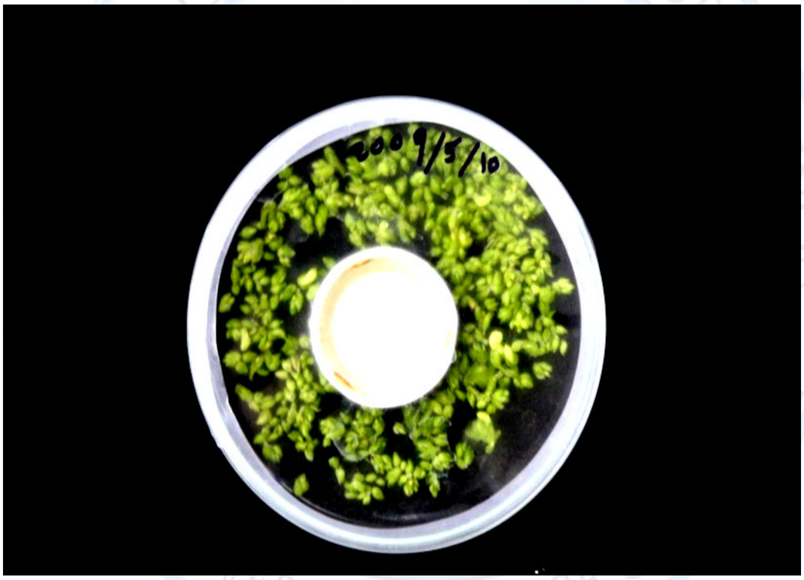
تركيز الكلوراكس في محلول التعقيم			الفترة الزمنية بالدقيقة
30%	%20	10%	
–	–	–	10
–	–	–	20
–	–	–	30

الجدول (5) تأثير تراكيز مختلفة من السكروز في الوسط الغذائي في استجابة المتوك لاستحثاث الكالس \ طول البراعم الزهرية.

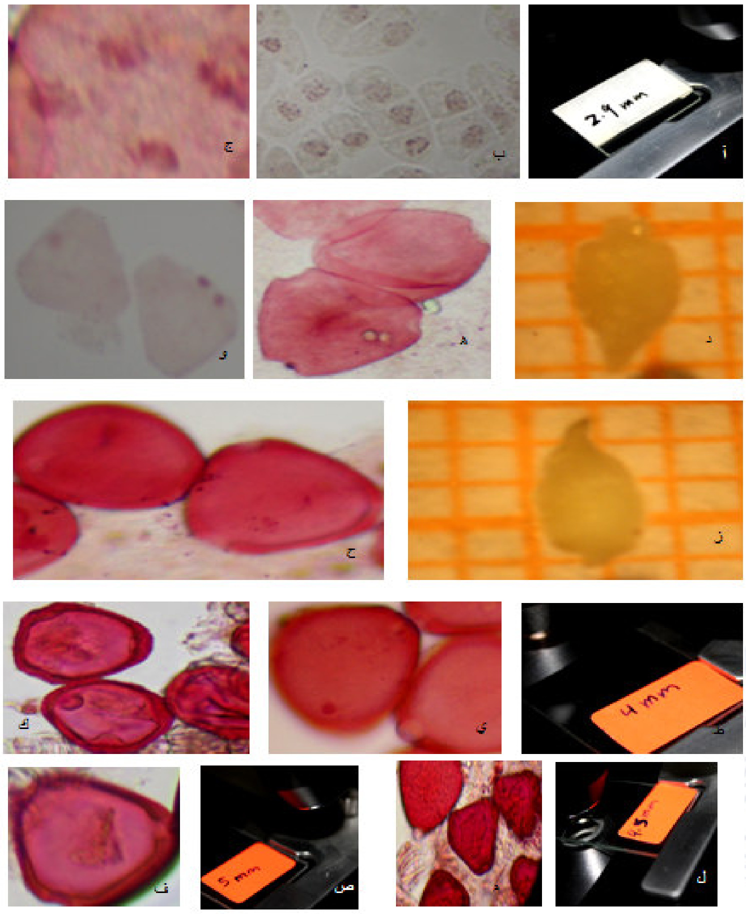
طول البرعم الزهري

		3.5 –3	3.9-3.6	4.5-4	5-4.6
	% 3	–	–	!	–
تركيز	% 4	++	–	+!*	–
السكروز في	% 5	–	–	–	–
الوسط	% 6	–	–	–	–
(نسبة مئوية)					

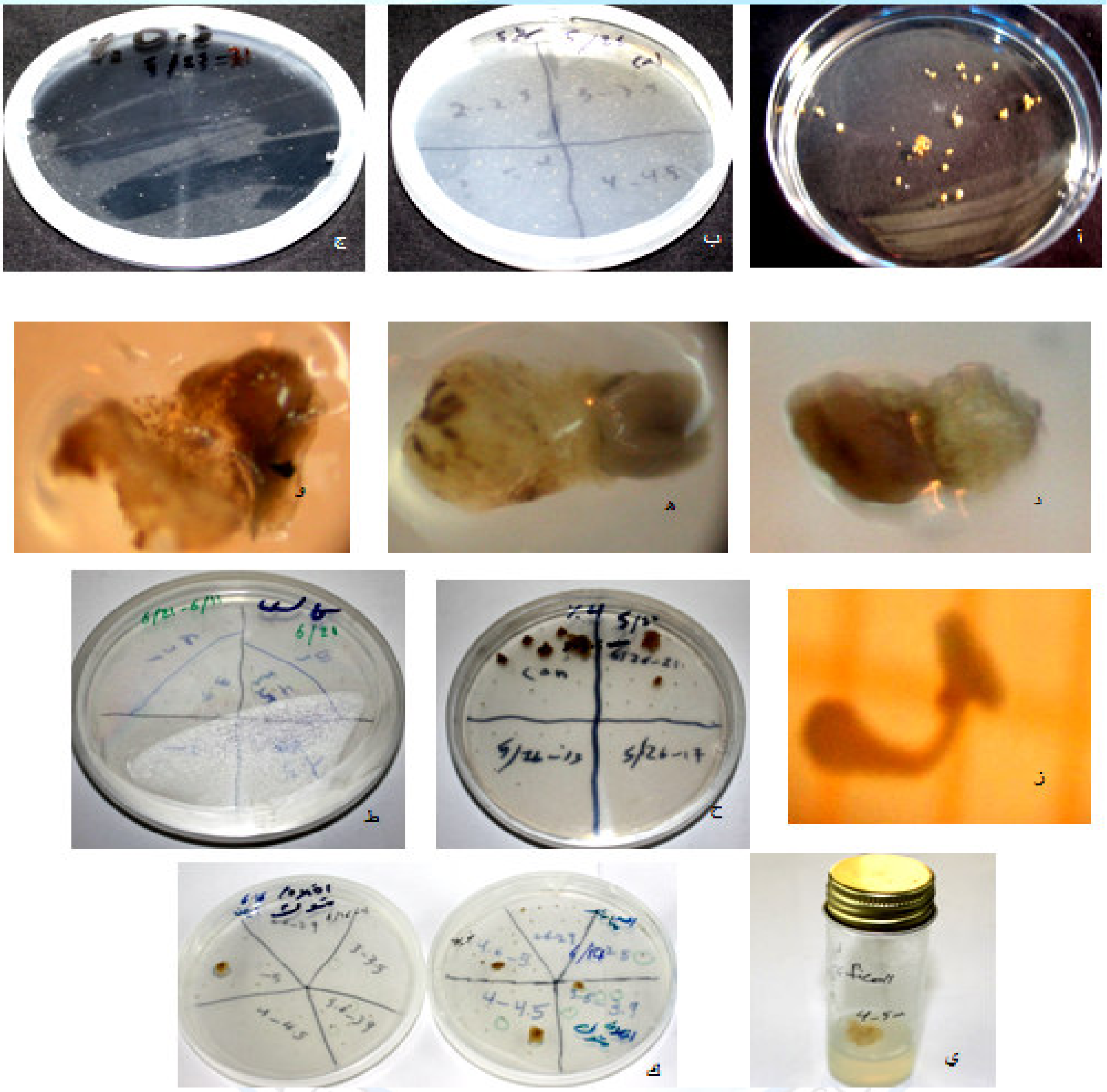
* يمثل الرمز + مستوى استجابة 10 %، ! مستوى استجابة اقل من 10%، في حين – استجابة معدوم



الشكل (1) طريقة تعريض البراعم الزهرية المختلفة الاطوال لمعاملة البرودة .



الشكل (2) يبين العلاقة بين طول البرعم الزهري والمراحل التطورية لخلايا البوغيات الصغيرة



الشكل (3) يبين مدى استجابة المتوك لظروف الزراعة ونجاحها في استحثاث الكالس.