استحداث الكالس واسترجاع النبات من الأجنة الناضجة في الذرة البيضاء الحبية *Sorghum bicolor* L. Monech

هبة السعيد[1] فهد البيسكي [2]، وعدنان قنبر[2]

الملخّص

نُفّذ البحث في مخبر زراعة الأنسجة التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية خلال العامين 2011 – 2012 بهدف استحداث الكالس من الأجنة الناضجة لثلاثة أصناف محلية من الذرة البيضاء الحبية واسترجاع النبات من الكالس وتجذير النموات المسترجعة وتقسية النبات للحصول على نبات قادر على متابعة النمو في البيت البلاستيكي. أظهرت النتائج أن أفضل تركيز لتعقيم النبات وإدخاله هي استخدام هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز 5% مدة 20 دقيقة، بينما أدت إضافة 2 مغ/ل من 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) إلى وسط MS إلى زيادة نسبة استحداث الكالس ورفع معدل الكالس الجنيني. وقد ازدادت نسبة الاسترجاع وعدد النموات المسترجعة بعد إضافة 1.5 مغ/ل من TDZ(Thidiazuron) و1.5 مغ/ل من BAP (6-benzyl adenine) و1مغ/ل من IAA (Indole-3-acetic acid) وكانت إضافة 1 مغ/ل من NAA (1-naphthylacetic acid) هي المُثلى في زيادة عدد الجذور وطولها.

الكلمات المفتاحية: الذرة البيضاء الحبية، أجنة ناضجة، الكالس، استرجاع النبات، 2,4-D، TDZ

[1]طالب ماجستير، [2] باحث في الهيئة العامة للتقانات الحيوية، [3] أستاذ مساعد في كلية الزراعة، جامعة دمشق، ص. ب. 30621، سورية.

Callus induction and plant regeneration from mature embryo in grain Sorghum (*Sorghum bicolor.L Monech*)

Al-Saeed, H.[(1)], F. Al-Biski[(2)] and A. Kanbar[(3)]

Abstract

This Research was conducted in the laboratory of tissue culture affiliated to the National Commission of Biotechnology (NCBT) during the period between 2011 -2012 for induction of callus from mature embryos for three local Genotypes of grain Sorghum, regeneration of the plant from callus, rooting plantlets and acclimatization in order to get a plant capable to grow in greenhouse. The best concentration for sterilizing the plant and entering it in use was 5% NaOCL for 20 minutes. The addition of 2 mg/l of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) to MS medium caused an increase in the ratio of callus induction and embryogenic callus. The regeneration and the number of (Thidiazuron), plantlets were raised after addition of 1.5 mg/l from TDZ (6-benzyl adenine) and 1mg/l from IAA(Indole-3-acetic 1.5mg/l from BAP (1-naphthylacetic acid) was the best in acid). The addition of 1mg/l from NAA order to enhance both number and length of the roots.

Keyword: *Sorghum bicolor*, Mature embryo, Callus, 2,4-D, regeneration, TDZ.

[(1)] MSc student, [(2)] Dr. Researcher, National Commission for Biotechnology, [(3)] Associate Professor, Dep. Field Crops, Fac. Agric, Damascus Univ., Syria.

المقدمة

تنتمي الذرة البيضاء [*Sorghum bicolor* L. Moench] للفصيلة Poaceae (Snowden، 1995). وتعد من المحاصيل النجيلية المهمة، فهي تصنف خامس المحاصيل الحبية بعد الأرز والقمح والذرة الصفراء والشعير من حيث المساحة العالمية والإنتاج، وتعدُّ الذرة البيضاء من نباتات الـC4 التي توصف بأنها ذات كفاءة عالية في عملية التمثيل الضوئي ومن ثم هي قادرة على تكوين كتلة حيوية كبيرة (Antonopoulou وزملاؤه، 2008؛ Liu وزملاؤه، 2009)، وللذرة البيضاء قدرة عالية على النمو في مدى واسع من الظروف المناخية القاسية(House، 1995).

تستخدم الذرة البيضاء في الطعام وصنع الخبز أو علفاً للحيوانات، وتدخل في العديد من المجالات الصناعية، كصناعة النشاء والكحول وسكر الغلوكوز(Sasaki وAntono، 2009)، وتصنيع المكانس من نورة أصناف ذرة المكانس (نمر، 2009). ونظراً إلى أهمية هذا المحصول فقد تركزت البحوث على إمكانية تحسينه بالتقانات الحيوية كالنقل المورثي (Transgenic) وزراعة الأنسجة (Tissue culture). ولإتمام النقل المورثي لابُدّ من دراسة إمكانية إسترجاع النبات (Jha وزملاؤه، 2009). كما يعدُّ استرجاع النبات من الكالس شيئاً مهماً إذْ يعطي العديد من الطرز الوراثية (Clones) (Eudes وزملاؤه، 2003)، يمكن الإفادة منها في عملية التحسين الوراثي للنبات، وقد وُجد أنّ معدل حدوث الطفرة في خلايا الكالس كان 30% أمّا في الظروف الحقلية فكان بمعدل 0.00001%. ومن الممكن انتخاب هذه الطفرات في مرحلة الكالس إذْ حصل Smith وزملاؤه (1983) على كالس مقاوم للملوحة من خلال تعريض الكالس لأوساط إجهاد ملحية مختلفة وانتخاب المتحملة منها، ومع أن الذرة البيضاء تعدُّ من أصعب النباتات في زراعة الأنسجة (Casas، 1997؛ Shrawat وLÖrz، 2006) فمن الممكن الحصول على الكالس من العديد من الخزعات النباتية (الأجنة الناضجة والأجنة غير الناضجة والغلاف الزهري) تعد الأجنة الناضجة أفضل هذه الخزعات إذْ يمكن تخزينها والحصول عليها في أي وقت من السنة (Kishore وزملاؤه، 2006؛ Zhao وزملاؤه، 2008)، مع العلم أنّ معدل تشكل الكالس الجنيني أقل ب 10% عند استخدام الأجنة الناضجة عن الأجنة غير الناضجة (Mackinnon وزملاؤه، 1986) تؤدي منظمات النمو النباتية دوراً أساسياً في زراعة الأنسجة عند الحبوب (Baskaran وSmith، 1990). وغالباً يكون للأوكسين 2,4-D الدور الأكثر تأثيراً بالنسبة إلى استحداث الكالس وفي تكوين الكالس الجنيني في بعض النباتات أحادية الفلقة (Rube وزملاؤه، 1994؛ Vikrant وRashid، 2003؛ Jogeswar وزملاؤه، 2007). وقد تؤدي الزيادة الكبيرة من2,4-D إلى كالس غير مرغوب فيه وطري وتقلّل من معدل استرجاع النبات (Mendoza وKaeppler، 2002)، وغالباً ما يكون تركيز 1-3 مغ/ل من 2,4-D هو الأفضل لتشكيل كالس جنيني في الحبوب (Bi وزملاؤه، 2007)، وقد وجد Pola وزملاؤه (2009) أنَّ أفضل وسط لاستحداث

الكالس هو MS (Murashige وSkoog، 1962) مضافاً إليه 2.5 مغ/ل من 2,4-D وحقق أعلى نسبة لتشكل الكالس الجنيني. كما بين Gupta وزملاؤه (2006) أنّ وسط استحداث الكالس يجب أن يحوي على سيتوكينين قوي مثل الكينتين فضلاً عن 2,4-D. وقد لوحظ في عدة بحوث أجريت على نباتي القمح والذرة أن التركيز المرتفع من Kintin (≤ 0.6 مغ/ل) يكون له تأثيرٍ سلبي في تشكل الكالس، وعند تخفيض تركيزه كان له دور مهم في إبقاء الكالس جنينياً (Mastellar وHoleden، 1970؛ Wernicke وBrettell، 1982؛ Lazard وزملاؤه، 1983). إنّ تخفيض نسبة السكروز في وسط الاستحداث تعطي كالساً مائي القوام طرياً وتقلل من نسبة تشكل الكالس الجنيني (Zhao وزملاؤه، 2010). تختلف قدرة النبات على تكوين الكالس واسترجاع النبات باختلاف الصنف والخزعة النباتية والوسط الغذائي (Elhag وButler، 1992). وقد راوحت نسبة الاسترجاع بين الأصناف المختلفة من الذرة البيضاء الحبية بين 26-69 % (Kresovich وزملاؤه، 1987). أوضح Vasil وVasil, (1986) أنّ اختلاف الاستجابة ناجم عن الاختلاف في التعبير التي تعتمد على التوزع الزماني والمكاني وفيزيولوجية التطور ومرحلته عند الصنف.

بيَّن Zhao وزملاؤه (2010) أن نسبة تشكل النموات واسترجاع النبات تتأثر بالخلائط الهرمونية المختلفة وتركيز الهرمونات. وقد وجد Sairam وزملاؤه (2000) أنّ أفضل وسط لاسترجاع النبات من الكالس هو وسط MS (Murashige وSkoog، 1962) مع إضافة 2 مغ/ل من بنزيل أدينين BA و 0,5 مغ/ل من إندول أسيتيك أسيد IAA. وقد أظهر Shan وزملاؤه (2000) أنّ TDZ قادر على رفع نسبة الاسترجاع في النبات، كما أنّ له دوراً خاصاً في استرجاع نباتات الأعشاب. إذْ أعطى نسبة عالية من الاسترجاع عند استخدامه مع 2,4-D. وقد تم الحصول على العديد من النموات عند استخدام 10µM من TDZ (Gupta وConger، 1998). وكانت أعلى نسبة استرجاع حصل عليها Pola وزملاؤه (2008) عند استخدام مزيج هرموني مكون من 1.5 مغ/ل من TDZ و1.5 مغ/ل منBAP و1 مغ/ل من IAA (Indole-3-acetic acid).

تختلف نسبة التجذير باختلاف الصنف النباتي والهرمونات المستخدمة وتركيب الوسط الغذائي، إذ يعدُّ الاختيار الأمثل لنوع الأوكسين النباتي وتركيزه العامل الأهم في قدرة العينات النباتية على التجذير (Vuylsteke، 1989). إن إضافة NAA (1-naphthylacetic acid) بتركيز 1مغ/ل كانت هي الفُضلى في الحصول على الجذور من حيث عدد الجذور وثخانتها مع استخدام ½ MS (Kishor وزملاؤه، 2006؛ Maheswari وزملاؤه، 2006). وقد بيّنت البحوث أنّ استخدام وسط MS الممدد إلى النصف أو الثلث يزيد من نسبة تجذير العينات النباتية المزروعة بالنسج (Meenakshi وزملاؤه، 2001؛ Dipti وزملاؤه، 2005).

تُعدُّ عملية التقسية (نقل العينات من الأنابيب إلى الظروف الطبيعية) من أكثر المراحل حساسيةً ودقةً وأهميةً في زراعة الأنسجة (المعري، 1995). فقد تختلف المدة اللازمة للانتقال من المرحلة غير ذاتية التغذية إلى المرحلة ذاتية التغذية باختلاف النبات. يجب أن تجري العملية بعناية فائقة، كما يجب تأمين مستلزمات نجاحها من حيث توفير النباتات جيدة النمو الصالحة لعملية النقل التي تمتاز بمجموع خضري وجذري جيدين، فضلاً عن توفير الشروط الجوية المناسبة من حرارة وإضاءة ورطوبة مع بيئات مناسبة لاستمرار نمو النبات وتطوره. لذلك لابد من القيام بعملية التقسية في ظروف البيوت المحمية التي يجري فيها التحكم بشروط النمو المطلوبة كلّها (Kyte و Kleyn، 1996).

كان الهدف الرئيسي من تنفيذ هذا البحث هو أمثلة أوساط استحداث الكالس من الأجنة الناضجة من أصناف محلية في الذرة البيضاء الحبية وأمثلة أوساط الاسترجاع وأوساط التجذير بهدف الحصول على نباتات مقساة ناتجة عن خلايا الكالس.

مواد البحث وطرائقه

نُفّذ البحث في مخبر التقانات الحيوية النباتية التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية، في دمشق، في الجمهورية العربية السورية خلال العامين 2011-2012.

المادة النباتية: أُجري البحث على ثلاثة أصناف من الذرة البيضاء المحلية والمعتمدة التي تم الحصول عليها من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، في دمشق، في الجمهورية العربية السورية.

الجدول (1) الصفات الشكلية والفينولوجية للأصناف المدروسة من الذرة البيضاء الحبية (البحوث الزراعية، 2011).

الرقم المسلسل	اسم السلالة أو الصنف	المصدر	طول العثكول (سم)	لون الحبوب	شكل العثكول	طول النبات(سم)	عدد الأيام حتى الإزهار(يوم)
1	إزرع- 3	محلي	24	أبيض	نصف متفرق	180	69
2	إزرع-7	محلي	26	كريمي	نصف مندمج	120	70
3	رزينية	محلي	25	أبيض	نصف متفرق	215	62

مراحل الاجراء:

المرحلة التأسيسية (التعقيم السطحي): غسلت البذور بالماء الجاري ثم غمرت بالكحول الايتيلي تركيز 70% مدة دقيقة مع التحريك، ثم عوملت بهيبوكلوريت الصوديوم بأربعة تراكيز مختلفة (0-3-4-5) مدة (15–20) دقيقة لكل تركيز، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات متتالية؛ وذلك بمعدل 5 دقائق لكل مرة. وزرعت العينات النباتية في وسط MS (1962) المضاف إليه 30غ/ل سكروز و7 غ/ل آجار وبدرجة حموضة (pH) 5.8، وذلك ضمن أنابيب اختبار بحجم 2.5× 20 سم تحوي 12 مل من

الوسط المغذي، ثم عُقمّت الأنابيب في جهاز التعقيم الرطب Autoclave على حرارة 121°س وضغط 1.04 كغ/سم^2 مدة 20 دقيقة (Indra وKrishnaveni، 2009).

حُضّنت الأنابيب المزروعة بغرفة النمو على درجة حرارة 22 °س وإضاءة 16 ساعة/8 ظلام وشدة ضوئية 3000 لوكس، علماً أن عدد الأنابيب المزروعة في هذه المرحلة بلغ 25 أنبوباً لكل معاملة تعقيم، كررت التجربة ثلاث مرات لتأكيد النتيجة، وسجلت في هذه المرحلة النسب المئوية للعينات السليمة والنسب المئوية للعينات النامية من العينات السليمة.

مرحلة استحداث الكالس: نُزع الجنين الناضج من البذرة وزُرع في وسط MS(Murashige وSkooge، 1962) المضاف له تراكيز مختلفة من 2,4 - D (2,4 - dichlorophenoxyacetic acid) (0، 0.5، 1، 1.5، 2، 2.5) وKinitin بتركيز (0، 0.5) في أطباق بتري قطر 9 سم وارتفاع 1.5سم، وزُرعت 5 أجنة في كل طبق وثلاثة أطباق لكل معاملة، وحضنت الأطباق في الظلام ودرجة الحرارة 25 م° ونقلت كل أسبوعين إلى وسط جديد وأخذت القراءة بعد 6 أسابيع. حُدّد التركيز الأمثل من المزيج الهرموني 2,4-D وKinitin من خلال دراسة نسبة استحداث الكالس وتشكل الكالس الجنيني .

مرحلة استرجاع النبات: نُقل الكالس الجنيني إلى وسط MS المعدّل وأُضيف كازئين هيدروليسات 500 مغ/ل والبرولين 600 مغ/ل وزرعً في أطباق بتري قطر 9 سم وارتفاع 1.5 سم حيث زُرعت 3 خزعات في الطبق، وكان التحضين على درجة حرارة حرارة 22 °س وإضاءة 16 ساعة وظلام 8 ساعات وشدة ضوئية 3000 لوكس.

مرحلة التجذير: نُقلت النموات المتشكلة في المرحلة السابقة عندما وصل طولها نحو 3 سم إلى وسط التجذير وهو وسط ½ MS(1992) مضاف إليه NAA (0، 0.5، 1، 1.5، 2) مغ/ل في أنابيب بحجم 2.5× 20 سم تحوي 12 مل من الوسط المغذي، ثم عُقّمت الأنابيب في جهاز التعقيم الرطب على حرارة 121°س وضغط 1.04 كغ/سم^2 مدة 20 دقيقة. حُضّنت الأنابيب المزروعة في غرفة النمو على درجة حرارة 22 °س وإضاءة 16 ساعة وظلام 8 ساعات وشدة ضوئية 3000 لوكس، ووزعت النباتات على 12 أنبوب في كل معاملة وأخذت قراءات (عدد الجذور، وطول المجموع الجذري) بعد أربعة أسابيع من التحضين. بعد الحصول على نبات كامل في الأنبوب ذوي مجموع خضري ومجموع جذري جيد نقلت النباتات إلى أصص تحوي تورب رطب معقم، وعوملت الجذور بمبيد فطري (دومينو) بتركيز 1 مغ/ل، ثم غطيت بأكياس نايلون شفاف للمحافظة على الرطوبة وحضنت في الظروف السابقة الذكر. صُمّمت التجربة وفق التصميم العشوائي الكامل البسيط وأُجري التحليل الإحصائي للنتائج باستخدام برنامج SPSS، وقُورنت المتوسطات بحساب أقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 1%.

النتائج والمناقشة

المرحلة التأسيسية (التعقيم السطحي): تعدُّ عملية التعقيم السطحي من أهم الخطوات التي يعتمد عليها نجاح الزراعة النسيجية أو إخفاقها، ويتوقف نجاحها على عدة عوامل هي: الوقت اللازم للتعقيم ونوع المادة المستخدمة في التعقيم وتركيزها والجزء النباتي المراد تعقيمه، تبيّن النتائج (الجدول2) أنّ زيادة تركيز هيبو كلوريت الصوديوم أدّت إلى زيادة نسبة العينات السليمة وذلك إلى حد معين حيث تفوق التركيز 4% من هيبوكلوريت صوديوم مدة 20 دقيقة على كل من الشاهد و(التركيز3% مدة 15 و20 دقيقة) و(التركيز 4% مدة 15دقيقة) ولم يكن هناك فروق معنوية بينها وبين المعاملة (5% مدة15 و20 دقيقية) وذلك من حيث عدد النباتات السليمة ونسبة الإنبات، ولوحظ أيضاً تفوق المعاملة (3% هيبوكلوريت صوديوم مدة 20 دقيقة) على المعاملة (3% مدة 15 دقيقة) وكذلك تفوق المعاملة (4% مدة 20 دقيقة) على المعاملة (4% مدة 15 دقيقة)، من خلال ذلك نجد أن زيادة الوقت اللازم للتعقيم بالنسبة إلى التركيز المنخفض من (NaOCl) أدى إلى كفاءة أكبر لعملية التعقيم في الصنف ازرع 3. أمَّا بالنسبة إلى الصنف ازرع7 فكانت أفضل معاملة هي المعاملة (5% مدة 20 دقيقة)؛ وكذلك الصنف رزينية؛ وهذا يؤيد ما توصل إليه (Indra و Krishnaveni، 2009).

الجدول (2) تأثير تركيز هيبوكلوريت الصوديوم ومدة استخدامه في تعقيم حبوب الذرة البيضاءالحبية.

المعاملة		ازرع 3		ازرع 7		رزينية	
تركيز NaOCl	الزمن (الدقيقة)	النباتات النامية%	النباتات السليمة%	النباتات النامية%	النباتات السليمة%	النباتات النامية%	النباتات السليمة%
0	0	24.00^{c} ±2.30	0.00^{d} ±.00	20.00^{d} ±2.30	$.00^{e}$ ±.00	6.66^{c} ±3.33	0.00^{c} ±0.00
%3	15	46.66^{b} ±3.52	4.00^{d} ±2.30	42.66^{c} ±4.80	5.33^{e} ±3.52	84.00^{b} ±4.61	17.33^{bC} ±3.52
%3	20	80.00^{a} ±4.61	74.66^{c} ±2.30	45.33^{c} ±5.33	9.00^{e} ±2.64	82.00^{b} ±4.16	26.66^{b} ±4.80
%4	15	86.66^{a} ±3.52	81.33^{bc} ±4.80	42.66^{c} ±2.66	42.66^{d} ±2.66	96.00^{a} ±4.00	82.66^{a} ±10.41
%4	20	86.66^{a} ±3.52	89.33^{ab} ±1.33	66.66^{b} ±3.52	66.66^{c} ±3.52	88.66^{ab} ±2.40	88.00^{a} ±6.11
%5	15	81.3333^{a} ±8.1103	87.0000^{ab} ±2.5166	68.0000^{b} ±2.3094	56.6667^{b} ±1.7638	97.333^{a} ±2.6666	97.33^{a} ±2.66
%5	20	82.66^{a} ±4.80	97.33^{a} ±1.33	98.33^{a} ±1.66	97.33^{a} ±2.66	100^{a} ±0.00	98.66^{a} ±1.33
LSD1%		**19.67**	**11.33**	**14.63**	**11.03**	**14.27**	**21.84**

الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

مرحلة استحداث الكالس: بدأ الكالس بالظهور بعد 6 إلى 8 أيام من زراعة الأجنة (الجدول3) على وسط الاستحداث، وكان الكالس في البداية ذا قوام طري وكميته قليلة، ولكن بعد النقل تحسنت خواص الكالس وأصبح أكثر تماسكاً، وبعد 45 يوماً من الزراعة تكوّن الكالس الجنيني وأُخذت القراءات.

الجدول (3) تأثير تركيز 2,4-D و في نسبة تشكل الكالس ونسبة تشكل الكالس الجنيني.

المعاملات		ازرع 3		ازرع 7		رزينية	
2,4-D	KIN	نسبة تشكل الكالس الجنيني %	نسبة تشكل الكالس	نسبة تشكل الكالس الجنيني %	نسبة تشكل الكالس	نسبة تشكل الكالس الجنيني %	نسبة تشكل الكالس
0	0	0.00^{d} ±0.00	0.00^{d} ±0.00	0.00^{c} ±0.00	0.00^{e} ±0.00	0.00^{e} ±0.00	0.00^{e} ±0.00
0	0.5	0.00^{d} ±0.00	0.00^{d} ±0.00	0.00^{c} ±0.00	0.00^{e} ±0.00	0.00^{e} ±0.00	0.00^{e} ±0.00
0.5	0	16.66^{c} ±6.66	50.00^{c} ±5.77	10.00^{bc} 5.773	50.00^{cd} ±5.77	13.33^{de} ±3.33	40.00^{d} ±5.77
0.5	0.5	23.33^{bcd} ±3.33	43.33^{c} ±3.333	0.00^{c} 0.00	40.00^{d} ±5.77	26.66^{d} ±6.66	63.33^{c} ±3.33
1	0	33.33^{bc} ±8.81	76.66^{ab} ±8.81	33.33^{a} 6.66	73.33^{ab} ±6.66	53.33^{bc} ±3.33	73.33^{bc} ±3.33
1	0.5	26.66^{bc} ±8.81	66.66^{b} ±3.33	3.33^{c} ±3.33	70.00^{abc} ±5.77	30.00^{d} ±5.77	70.00^{bc} ±5.77
1.5	0	40.00^{bc} ±0.00	73.33^{a} ±3.33	33.33^{ab} ±6.66	80.00^{ab} ±5.77	53.33^{bc} ±3.33	76.66^{ab} ±8.81
1.5	0.5	43.33^{ab} ±8.81	83.33^{ab} ±3.33	20.00^{b} ±5.77	76.66^{ab} ±3.33	70.33^{ab} ±5.77	76.66^{abc} ±3.33
2	0	66.66^{a} ±6.66	90.00^{a} ±5.77	43.33^{a} ±3.33	90.00^{a} ±5.77	73.33^{a} ±3.33	93.33^{a} ±3.33
2	0.5	63.33^{a} ±8.81	86.66^{a} ±3.33	3.33^{c} ±3.33	66.66^{bc} ±3.33	50.00^{c} ±5.77	86.66^{ab} ±3.33
2.5	0	46.66^{ab} ±6.66	83.33^{ab} ±3.33	0.00^{c} ±0.00	80.00^{ab} ±5.77	20.00^{d} ±5.77	93.33^{a} ±3.33
2.5	0.5	43.33^{ab} ±6.66	80.00^{ab} ±5.77	0.00^{c} 0.00	86.66^{ab} ±3.33	26.66^{d} ±3.33	86.66^{ab} ±3.333
LSD1%		**25.53**	**17.85**	**15.69**	**21.19**	**17.44**	**17.02**

الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات

ويتضح من الجدول (3) أن أفضل الأوساط لاستحداث الكالس كان الوسط الحاوي على 2 مغ/ل من 2,4-D وهذا يوافق ما حصل عليه Mangula وزملاؤه (2000). وبيّنت العديد من البحوث أن للأوكسين 2,4-D الدور الأساسي في استحداث الكالس وتشكيل الكالس الجنيني وهذه النتيجة بالنسبة إلى العديد من النباتات أحادية الفلقة (Rueb

وزملاؤه، 1994؛ Vikrant وRashid، 2003؛ Jogeswaret وزملاؤه، 2007)، بينما أدّت إضافة الكينتين بتركيز 0.5 مغ/ل إلى خفض نسبة استحداث الكالس ونسبة الكالس الجنيني، وهذا مطابق لما حصل عليه (Mastellar وHolden، 1970؛ Wernick وBretell، 1982؛ Lazar وزملاؤه، 1983) إذ بيّنوا الأثر السلبي للكينتين في استحداث الكالس ونسبة الكالس الجنيني.

الجدول (4) تأثير المعاملات الهرمونية المختلفة في نسبة استرجاع النبات وعدد النباتات المسترجعة.

المعاملات						ازرع3			ازرع 7		
KIN	NAA	TDZ	BAP	IAA	عدد الجذور	عدد النموات	نسبة الاسترجاع%	عدد الجذور	عدد النموات	نسبة الاسترجاع%
0	0	-	-	-	7.75^{de} ±.1.93	$.00^{b}$ ±.000	$.00^{b}$ ±.00	6.00^{c} ±.2.67	$.00^{c}$ ±.00	$.00^{c}$ ±.00
0	0.5	-	-	-	2.50^{ef} ±1.04	$.00^{b}$ ±.00	$.00^{b}$ ±.00	2.75^{c} ±.47	$.00^{c}$ ±.00	$.00^{c}$ ±.00
0	1	-	-	-	0.00^{f} ±0.00	$.00^{b}$ ±.00	$.00^{b}$ ±.00	26.25^{a} ±7.73	$.00^{c}$ ±.00	$.00^{c}$ ±.00
0.5	0.5	-	-	-	12.50^{d} ±1.04	0.00^{b} ±0.00	0.00^{b} ±0.00	32.50^{a} ±2.32	0.75^{c} ±0.75	2.50^{c} ±2.50
1	0.5	-	-	-	24.75^{a} ±2.05	2.25^{b} ±1.43	5.00^{b} ±2.88	3.00^{c} ±.40	12.00^{b} ±3.08	20.00^{ab} ±4.08
-	-	0.5	0.5	0.5	12.00^{c} ±1.08	0.00^{b} ±0.00	0.00^{b} ±.00	18.50^{b} ±1.32	0.00^{c} ±0.00	0.00^{c} ±.00
-	-	1	1	0.5	6.75^{d} ±1.37	0.00^{b} ±0.00	0.00^{b} ±0.00	11.75^{bc} ±1.18	4.25^{c} ±2.65	12.50^{b} ±7.50
-	-	1.5	1.5	0.5	7.00^{d} ±1.47	0.00^{b} ±0.00	0.00^{b} ±0.00	2.25^{c} ±0.47	16.25^{b} ±3.14	25.00^{a} ±5.00
-	-	1	0.5	1	19.50^{ab} ±1.29	0.00^{b} ±0.00	0.00^{b} ±0.00	19.25^{ab} ±0.75	1.50^{c} ±0.95	5.00^{b} ±2.88
-	-	1	1	1	16.25^{bc} ±1.31	0.00^{b} ±0.00	0.00^{b} ±0.00	17.25^{ab} ±2.49	3.25^{c} ±1.43	10.00^{b} ±4.08
-	-	1.5	1.5	1	2.50^{ef} ±2.50	12.50^{a} ±3.37	20.00^{a} ±4.08	2.75^{c} ±1.79	24.00^{a} ±2.85	32.50^{a} ±4.78
LSD1%					**5.67**	**4.27**	**5.82**	**14.07**	**7.20**	**14.37**

الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

أمَّا بالنسبة لصفة عدد الجذور، فقد تفوقت المعاملتين الحاوية على 0.5 و1مغ/ل من NAA على بقية المعاملات، وهذه نتيجة متوقعة للدور المعروف للأوكسينات في عملية التجذير (George وزملاؤه، 2008). ولم نتمكن من الحصول على أي نبات مسترجع من الصنف رزينية من خلال جميع المعاملات المستخدمة وقد يعزى ذلك إلى الاختلاف في التركيب الوراثي مع بقية الأصناف المدروسة (Vasil وVasil، 1986).

الاسترجاع: أظهرت النتائج في الجدول (4) أنّ أفضل وسط لاسترجاع النبات من حيث نسبة الاسترجاع وعدد النباتات المسترجعة كان الوسط الحاوي على 1.5 مغ/ل من TDZ و1.5 مغ/ل من BAP و1 مغ/ل من IAA، وهذا يوافق ما حصل عليه (Pola وزملاؤه، 2009). وقد بَيّن Shan وزملاؤه (2000) أن TDZ قادر على رفع نسبة الاسترجاع، ولكن لم يكن بين المعاملة السابقة الذكر والمعاملة الحاوية على 1.5مغ/ل من TDZ و1.5 مغ/ل من BAP و0.5 مغ/ل من IAA بالنسبة إلى نسبة الاسترجاع وعدد النباتات المسترجعة في الصنف ازرع 7، وهذا يخالف ما حصل عليه (Pola وزملاؤه، 2009). إنّ هذا الاختلاف ناتج عن تباين الاستجابة بين الأصناف حيث بيّن Zhao وزملاؤه (2010) أنّ نسبة تشكل النموات تتأثر بالخلائط الهرمونية المختلفة وتركيز الهرمونات وكذلك يعتمد على الصنف.

التجذير: أظهرت النتائج (الجدول 5) تفوق المعاملة 1مغ/ل من NAA معنوياً من حيث عدد الجذور وطول الجذر مقارنة بالشاهد وبقية المعاملات بالنسبة إلى الصنفين ازرع3 وازرع7، وهذا يوافق ما حصل عليه Maheswari وزملاؤه (2006) وKishore وزملاؤه (2006) إذ ازداد عدد الجذور معنوياً بإضافة منخفضة من أوكسين NAA (Vuylsteke، 1989)، كما أدّى استخدام الأوكسين بتركيز عالٍ إلى زيادة إنتاج الإتيلين المثبط للنمو (George، وزملاؤه، 2008). ولوحظ تفوق الصنفً ازرع 7 من حيث عدد الجذور وطول الجذر على الصنف ازرع3، إذ تختلف القدرة على التجذير باختلاف الطراز الوراثي (Dale وDeambrogio، 1979).

الجدول (5) تأثير تركيز هرمون NAA في تجذير العينات وعدد الجذور.

المعاملات	ازرع3		ازرع 7	
NAAمغ/ل	طول الجذر (سم)	عدد الجذور	طول الجذر (سم)	عدد الجذور
0	3.20 c ±.37	2.20 b ±.20	3.30 c ±.37	1.80 ±.20c
0.5	5.40 b ±.50	3.00 b ±.31	8.40 ab ±1.02	3.80 b ±.37
1	6.20 ab ±.37	4.60 a ±.50	9.86 a ±.55	5.60 ±.40a
1.5	7.30 a ±1.39	3.20 b ±.20	6.10 db ±1.02	4.20 ab ±.37
2	4.30 c ±.30	3.20 b ±.37	2.00 c ±0.31	4.00 ±.44b
LSD1%	**1.81**	**2.74**	**2.99**	**1.39**

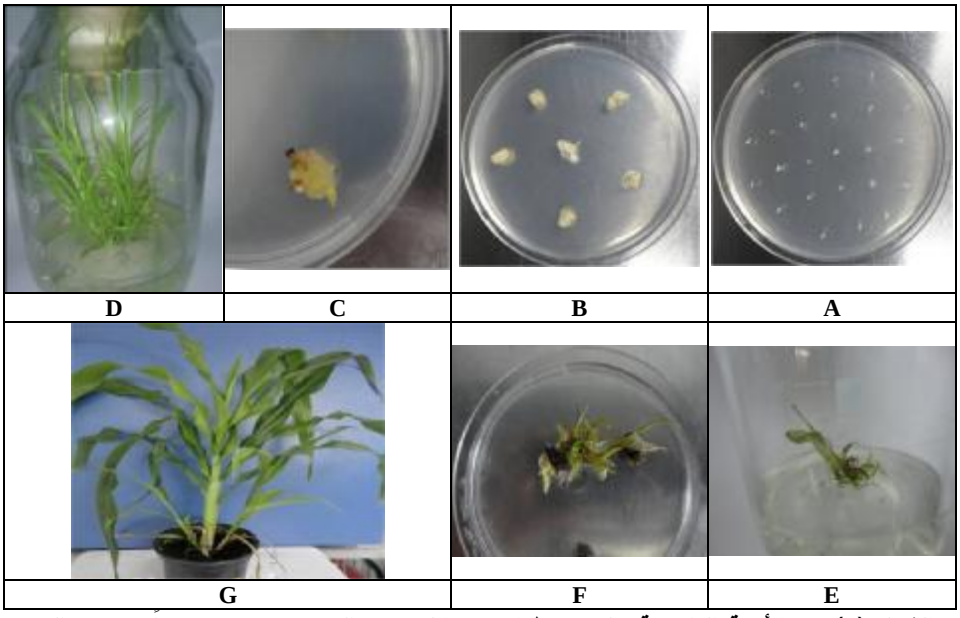
الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

مرحلة التقسية: نقلت النباتات في هذه المرحلة التي حققت نمواً مقبولاً من مرحلة التجذير إلى أصص صغيرة وقسيّت تدريجياً، إذْ جرت المحافظة على رطوبة نسبية عالية

لضمان نجاح عملية التقسية مع استخدام المبيد الفطري في مياه الري للسيطرة على بعض الفطريات التي ظهرت خلال عملية التقسية. إذْ لوحظ أن الري أكثر من مرة كل 7-10 أيام ودون استخدام مبيد فطري أدى إلى انتشار الفطريات انتشاراً كبيراً على سطح التورب، ومن ثم إخفاق التقسية؛ لذلك عوملت النباتات مرة كل أسبوعين بمبيد فطري جهازي (دمينو) 0.5 مل/ل وسُقيت مرة أسبوعياً بمحلول MS ¼ خلال المدة التي وُجد فيها النبات ضمن غرفة النمو، وبعد نجاح عملية التقسية تابعت النباتات نموها في البيت البلاستيكي، وبلغت نسبة نجاح عملية التقسية 85% للصنف ازرع 3 و80% للصنف ازرع7.

واستنتج أنَّ الأوكسين 2,4-D بتركيز 2مغ /ل كان الأفضل في مرحلة استحداث الكالس، وأظهرت الأصناف الثلاثة المدروسة استجابة لهذا التركيز، وكان استخدام1.5 مغ/ل من TDZ و1.5 مغ/ل من BAP و1مغ/ل منIAA؛ وذلك بالنسبة إلى الصنفين ازرع3 وازرع7، في حين لم يُبدِ الصنف رزينية استجابة في مرحلة الاسترجاع.

3 واقترح بضرورة متابعة الدراسة على الصنف رزينية وتجريب خلائط أخرى من الهرمونات، وتطبيق هذه النتائج في عمليات التحسين الوراثي للذرة البيضاء، وخاصة تقنية التباين الوراثي الجسمي.



الشكل (1) A: الأجنة الناضجة على وسط الاستحداث، B: كالس بعمر 30 يوماً، C: كالس جنيني وبداية تشكل البرعم الخضري D-E: النبيتات المسترجعة من الكالس، F: النباتات في مرحلة الاكثار، G: النبات بعد التقسية.

References المراجع

المعري، خليل. 1995. إكثار النخيل بواسطة تقنيات زراعة الأنسجة النباتية، كلية الزراعة، جامعة الملـــك فيصل، السعودية.

ر، يوسف 2009. كتاب عملي الحبوب والبقول، كلية الزراعة، نشورات جامعة دمشق.

Antonopoulou, G., H. Gavala, I. Skiadas, K. Angelopoulos, and G. Lyberatos. 2008. Biofuels generation from sweet sorghum: Fermenatative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. ioresour. echnol. 99:110-119.

Bhaskaran, S. and R. H. Smith. 1990. Regeneration in cereal tissue culture: A review. Crop Sci., 30: 1328-1336.

Bi, R., Kou, M. M., Chen, L. G., Mao, S .R and H. G. Wang. 2007. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of Triticum. Plant Breed. 126: 9-12.

Casas, A. M., A. K. Kononowicz, T. G. Haan, L. Zhang, D. T. Tomes, A. Bressan, and P. M. Hasegawa. 1997. Transgenic sorghum plants obtained after microprojectile bombardment of immature inflorescences. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 33: 92-100.

Dale, P. J., E. Deambrogio. 1979. Acomparison of callus induction and plant regeneration from different explants of *Hordeum vulgare*. Zeitschift fur pflanzenphysiologie 94: 65- 77.

Dipti, T., R. B. Ghorade, M. Swati, B. V. Pawar, and S. Ekta. 2005. Rapid multiplication of Turmeric by micropropagation. Annual Plant Phisiology, 19: 35-37.

Elhag, H., and L. G. Butler. 1992. Effect of genotyope, explant age and medium composition on callus production and plant regeneration from immature embryos of sorghum. Arab. Gulf J. Sci. Res., 10 : 109-119.

Eudes, F., S. Acharya, A. Laroche, L. B. Selinger and K. J. Cheng. 2003.A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. Plant cell Tiss. Org.Cult.73:147-157.

George E. F., M. A. Hall, G.-J. D. Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1. The Background, Springer, Dordrecht

Gupta, S. D. and B. V. Conger. 1998. In vitro differentiation of multiple shoot clumps from intact seedlings of switch grass. In Vitro Cellular Developmental Biology of Plant 34:196–202.

Gupta, S., V. K. Khanna, S. Rameshwar, and G. K. Garg. 2006. Strategies for overcoming genotypic limitations of in vitro regeneration and determination of genetic components of variability of plant regeneration traits in Sorghum. Plant Cell Tissue Organ Culture. 86: 379–388.

House, L. R. 1995. Sorghum:One of the world's great cereals.Afr.Crop Sci.J.3:135-142.

Indra, A. and S. Krishnaveni. 2009. Effect of hormones, explants and in vitro culturing of Sorghum. J Biochem Tech. 1(4):96-103

Jha. P., C. B. Yadav, V. Anjaiah, and V. Bhat. 2009. In vitro plant regeneration through somatic embryogenesis and direct shoot organogenesis in Pennisetum glaucum (L.) R. Br. In Vitro Cell. Dev. Biol. -plant. 45:145-154.45:145-154.

Jogeswar, G., D. Ranadheer, V. Anjaiah, and P. B. K. Kishor. 2007. High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of Sorghum bicolor (L.) Moench from immature inflorescence explants. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant, 43: 159-166.

Kishore, S. N., K. B. R. S. Visarada, A.Y. Lakshmi, E. Pashupatinath, S. V. Rao, and N. Seetharama. 2006. In vitro culture methods in Sorghum with shoot tip as the explant Material. Plant Cell Rep. 25: 174–182.

Kresovich, S. Mc., Gee, R.E., Panellia, L., Reilley, A.A and Miller, F.R. 1987. Application of cell and tissue culture techniques for the genetic improvement of sorghum, Sorghum bicolor (L.). Moench. Progress and Potential. Adv. Agron., 41: 147-170

Kyte, L. and J. Kleyn. 1996. Plant from test tubes–An introduction to micropropagation, 3rd edn, Timber Press, Portland.

Lazar, M., G. Collins, and W. Vian. 1983. Genetic and environmental effectson the growth and differentiation of wheat somatic cell cultures. J Hered.74: p. 353.

Liu, G. S., Q. Y. Zhou, S. Q. Song, H. C. Jing, W. B. Gu, X. F. Li, M. Su and R. Srinivasan, 2009. Research advances in to germplasm resources and molecular biology of the energy crop sweet sorghum. China Bull Bot. 44:253-261.(in Chinese English abstract).

MacKinnon, C., G. Gunderson, and M.W. Nabors. 1986. Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus cultures of sweet sorghum. Plant Cell Rep. 5: 349-351.

Maheswari, M., N. Jyothilakshmi, S. K. Yadav, Y. Varalaxmi, A. Vijayalakshmi, M. Vanaja and B. Venkateswarlu .2006. Efficient plant regeneration from shoot apices of Sorghum. Biol. Plantarum 50:741-744.

Manjula, S. M., M. S. Kuruvinashetti and C. C. Harti. 2000. Regeneration establishment andevaluation of soma clones in Sorghum bicolor (L.) Moench. Euphytica. 115: 173-180.

Mastellar, V. and D. Holden. 1970. The growth and organ formation from callus tissue of sorghum. Plant Physiol. 45: 362-364.

Meenakshi, N., G. S. Sulikeri, V. Krishnamoorthy. and V. H. Ramakrishna. 2001. Standardization of chemical environment for multi shoot induction of Turmeric (*Curuma longa* L) for *in vitro* clonal propagation. Crop Research, 22: 449-453.

Mendoza, M. G and H. F. Kaeppler. 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (Triticum aestivum L.). In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 38: 39-45.

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

Pevalek, K. B. and Jelaska, S. 1987. Microclonal propagation of Prunus avium. Acta Hort. 212:599-601.

Pola, S., N. S. Mani, and T. Ramana. 2008. Plant tissue culture studies in Sorghum bicolor: immature embryo explants as the source material. Int J Plant Prod 2:1-14.

Pola, S., N. S. Mani, and T. Ramana. 2009. Mature embryo as a source material for efficient regeneration response in Sorghum (Sorghum bicolor L. Moench.). Seed Sci J, 26:93-104.

Rueb, S., M. Leneman, R. A. Schilperoort, and L. A. M. Hensgens. 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos(Oryza sativa L.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 36: 259-264.

Sairam, R.V., N. Seetharama, and T. S. Rani. 2000. Regeneration of sorghum from shoot tip cultures and field performance of the progeny. Plant Cell Tissue and Organ Culture 61: 169-173.

Sasaki S., B. A. Antonio. 2009. Sorghum in sequence. Nature 457, 547–548.

Sears, R.G. and E. L. Deckard. 1982. Tissue culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration. Crop Sci., 22 : 546-550

Shan , X., D. Li, R. Qu. 2000. Thidiazuron promotes in vitro regeneration of wheat and barley. In index/D8704G8361LN2105.pdf of Plant 36:207-210.

Shrawat, A. K., H. Lörz. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. Plant Biotechnol. J. 4: 575-603.

Smith, R. H., S. Bhaskaran, and K. Schertz. 1983. Sorghum plant regeneration from aluminum selection media. Plant cell reports.2:129-132.

Snowden, J. D. 1955. The wild fodder sorghums of the genus Eu-sorghum, J.Linn.Soc.Lond. P:55-1

Vasil, I.K. and V. Vasil. 1986. Regeneration in cereals and other grass species. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant (Vasil, I.K. ed.,), Academic Press, New York. P: 121-150.

Vikrant and A. Rashid, 2003. Somatic embryogenesis or shoot formation following high 2,4-D pulse-treatment of mature embryos of Paspalum scrobiculatum. Biol. Plant, 46: 297-300.

Vuylsteke, D. R. 1989. Shoot tip culture for the propagation, conserva- tion and exchange of *Musa germplasm*. Practical Manuals for Handling Crop Germplasm *In Vitro* 2. Rome, International Board for Plant Genetic Resources.

Wernicke, W. and R. Brettell. 1982. Morphogenesis from cultured leaf tissue of Sorghum bicolor culture initiation. Protoplasma.111:19-27.

Zhao, L. M., S. J. Liu, and S. Q. Song. 2008. Efficient induction of Callus and plant regeneration from seeds and mature embryos of sweet sorghum. Chinese Bull Bot. 25: 465-468.

Zhao, L., L. Liu, and S. Song. 2010. Optimization of callus induction and plant regeneration from germinating seeds of sweet sorghum (*Sorghum bicolor L Mmonech*). Afric. J. Biotechnol. 9(6):2367- 2478.

Received	**2012/12/20**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2013/05/26**	**قبول البحث للنشر**