اكثار الحمص خارج الجسم الحي

مها شعبان الراوي*   محمد عبد الخالق الحمداني*   اطياف فؤاد عبد اللطيف *
مصطفى محمد فوزي عبد الرحمن*

تاريخ استلام البحث 12، نيسان، 2009
تاريخ قبول النشر 7، أيلول، 2009

الخلاصة:

زرعت قمم نامية وبراعم إبطيه ومتوك إزهار غير متفتحة واجنة غير ناضجة لنبات الحمص (*Cicer arietinum* L.) في وسط MS بتوليفات هرمونية مختلفة تحت ظروف 25-27 مْ و16 ساعة إضاءة/ يوم ولمدة 6 أسابيع لغرض تحفيز إنتاج الكالس.

أشارت النتائج إلى إن أفضل التراكيز المستخدمة من 2,4-D وBA لتحفيز إنتاج الكالس وإدامته من القمم النامية والبراعم الابطية هي1 و 0.1 ملغم / لتر على التوالي، بينما كانت 2 و 0.5 ملغم / لتر عند استخدام الاجنة غير الناضجة.

اما في حالة المتوك فان وجود 1 و 0.25 ملغم / لترمن 2iP و IAA على التوالي كان ضروريا لتحفيز وانتاج الكالس . لوحظ ان الوسط الحاوي على 1و 3 ملغم / لترمن BA و 2,4-D كان مناسبا لتحفيز انتاج الكالس من البراعم الابطية ومتوك الإزهار والاجنة غير الناضجة.

ان وجود 2 الى 3 ملغم / لترمن IAA و 2 الى 2.5 ملغم / لترمن Kinetin أو 0.1 ملغم / لتر من NAA و 2 (ملغم / لتر) من Kinetin ضروري لتمايز الكالس في الحمص.

وللحصول على نباتات ذات تجذير جيد مع مجموع خضري طبيعي في الوسط الحاوي على 2و 2.5 ملغم / لترمن IAA و Kinetin على التوالي او 0.005-0.05 ملغم / لترمن NAA و BA الأفضل لاخلاف وإدامة نباتات الحمص على ان تستخدم الأملاح الباقية بنصف القوة. تكمن اهمية هذه الطريقة في الاكثار من استعمالها في غربلة وتحسين مقاومة سلالات من الحمص لمرض الذبول الفيوزارمي.

الكلمات المفتاحية: الحمص (*Cicer arietinum* L.)، قمم نامية، براعم ابطية، متوك ازهار غير متفتحة، اجنة غير ناضجة.

المقدمة:

تمثل زراعة الأنسجة النباتية أداة جيده لحل الكثير من المشاكل التي تواجه مربي النبات ومنها الإكثار السريع، فقد وضفت بنجاح على المستوى التجاري بإنتاج إعداد كبيرة من النباتات المتجانسة والمتشابهة أو نباتات خالية من المسببات المرضية وخاصة الفايروسية[2,1].

يعتمد استخدام هذه التقنية من اجل الإنتاج الكثير والسريع على زراعة الأجزاء النباتية خارج الجسم الحي (*In vitro*) وتحفيزها على تكوين أفرع عرضية (adventitious shoots) وأجنة خضرية (asexual embryos) مباشرة على الأجزاء النباتية او بتحسين نمو الأفرع الجانبية (axillary shoots) [4,3]. وعلى الرغم من المديات الواسعة في توظيف هذه التقنية فأن هناك نقصاً في الدراسات الخاصة بمحاصيل البقول، ففي الحمص لوحظ ان وجود 0.35 و 0.45 ملغم / لتر من IAA و BAكان مهما في عملية استحداث الكالس عند زراعة الأوراق الفلقية لبادرات حمص بعمر7 أيام [1]، كما ادى استخدام الوسط MS بنصف القوة إلى تجذير الأفرع التي تكونت على خلايا الكالس بشكل عرضي عند إضافة 0.2 ملغم / لترمن IBA .

[7,6,5] أنتجوا كالس الحمص من زراعة المرستيم القمي والأوراق والعقد والفلقات.

[10,9,8] استخدمو المتوك لأنتاج اجنة ثنائية المجموعة الكروموسومية وقد استأصلوا المتوك من براعم زهرية طولها 4ملم.

اما [13,12,11] فقد استخدموا الكالس لتحسين اصناف مختلفة من الحمص والعدس عن طريق فرز واختيار التغاير الجسمي المطلوب عند حدوثه الذي مكنهم من الحصول على اصناف مقاومة للجفاف والامراض والحشرات.

[15,14] فقد استخدما الكالس بوصفه مصدراً لأستحداث الاجنة والاعضاء لأصناف مختلفة من الحمص ومن ثم إخلاف نباتات حمص كاملة.

هدف البحث : تثبيت تقنية إكثار الحمص بزراعة الأنسجة لتوظيفها مستقبلا في برنامج تربية لمقاومة مرض الذبول االفيوزارمي.

*دائرة البحوث الزراعية / وزارة العلوم والتكنولوجيا.

المواد وطرائق العمل :

الأجزاء النباتية:

قطعت إطراف القمم النامية (1ملم) والبراعم الابطية من نباتات حمص صنف محلي ديالى* عندما بلغت أطوالها 25-30 سم،تحت ظروف معقمة، بينما استؤصلت متوك الازهار في ثلاث مراحل تطورية للازهار. وهي

1-متوك صفراء من ازهار صغيرة غير متفتحة طول الاوراق التويجية فيها 4 ملم.

2-متوك صفراء من ازهار كبيرة غير متفتحة طول الاوراق التويجية فيها 9 ملم.

3-متوك غابرة اللون من ازهار بيضاء قبل تفتحها طول الاوراق التويجية فيها 14 ملم.

زرعت المتوك على الاوساط الغذائية بعد تعقيم الازهار وازالة الاوراق الكاسية والتويجية. استؤصلت الاجنة في مرحلة تكون القرنات وبداية تكون الحبوب سواء مع ام من دون الفلقات .

تعقيم الأجزاء النباتية:

غسلت الأجزاء النباتية المستأصلة من نباتات الحمص بالماء المقطر لمدة عشر دقائق ثم بالكحول الاثيلي تركيز 85%مع مراعاة نسجة الاجزاء المستخدمة إذ استخدمت دقيقة واحدة للقمم النامية والازهار غير المتفتحة وثلاث دقائق للبراعم الابطية والاجنة غير الناضجة عقمت الأجزاء النباتية سطحيا باستعمال نوعين من محاليل التعقيم كل على حده.

أ- محلول هايبوكلورات الصوديوم تركيز 6% للمدة 7 و 10 و 15 و 20 دقيقة.

ب- محلول كلوريد الزئبق بتركيز 0.1% للمدة 10 و 12 و 14 دقيقة.

ثم غسلت بعد ذلك ثلاث الى اربع مرات بالماء المقطر المعقم ولمدة 5-10دقائق قبل زراعتها في الأوساط الغذائية.

الاوساط الغذائية لاستحداث الكالس:

استعمل الوسط الغذائي موراشك وسكوك MS [16]. واضيفت تراكيز مختلفة من منظمات االنمو adenine و (IAA) 3-indoleacetic acid (BA) 6- و (2ip)N^{-6} - isopenten benzyladenine و (2,4-D) 2,4- acid dichlorophenoxyaceticو (NAA) 1- naphthalenacetic acid و (Kinetin) N^{-6} - furfurylamino purine ليتكون لدينا اثني عشرة توليفة غذائية لإنتاج كالس الحمص (جدول 1). عدل الأس الهيدروجيني للأوساط الى 5.8 ووزع في قناني بقطر 6 سم وارتفاع 14 سم بواقع 30 مل / قنينة زرعت الاجزاء النباتية المعقمة في الأوساط الغذائية بواقع عشر قناني لكل توليفة / جزء نباتي مع وجود 4 قطع في القنينة الواحدة. حضنت الزروعات في غرفة نمو وعلى درجة 25-27°م و 16 ساعة إضاءة / يوم بشدة 1000 لوكس وجددت الأوساط كل 6 أسابيع.

$$\textbf{تم حساب معدل الوزن الرطب للكالس لكل تركيز} = \frac{\textbf{مجموع اوزان القطع التي كونت الكالس}}{\textbf{عدد القطع التي كونت الكالس}}$$

اما عند اعادة الزراعة فيتم تقطيع الكالس المتكون الى قطع وزن الواحدة منها 100 ملغرام وتتم زراعتها على الوسط الغذائي وبعد مرور 6 اسابيع يتم تطبيق المعادلة الآتية لحساب معدل الوزن الرطب للكالس لكل معاملة.

$$\textbf{تم حساب معدل الوزن الرطب للكالس لكل تركيز} = \frac{\textbf{مجموع اوزان القطع التي كونت الكالس – مجموع اوزان القطع الابتدائي}}{\textbf{عدد القطع التي كونت الكالس}}$$

*صنف محلي متداول بين مزارعي محافظة ديالى منذ اكثر من 30 عاما.

جدول (1) منظمات النمو المضافة الى الوسط الزرعي موراشك وسكوك المستخدمة في انتاج كالس الحمص

منظمات النمو	التراكيز المضافة (ملغم / لتر)			
1AA:2iP	0.0	0.25:1	0.5:2	1:3
2,4-D:BA	0.0	1:0.1	2:0.5	3:1
NAA:Kinetin	0.0	1:0.1	2:0.5	3:1

الاوساط الغذائية لتمايز خلايا الكالس:

استخدمت مجموع الوسط MS المدعوم بتراكيز مختلفة من المواد ومنظمات النمو والحوامض الامينية وكما يأتي : $NaH_2PO_4 2H2O$ 170 ملغم / لتر و 0.5 (GA3) ملغم /لتر و ادنين سلفيت 40 ملغم/لتر وكلايسين 2 ملغم/لتر وانسيتول 100 ملغم/لتر وحامض النيوكتين 1 ملغم/لتر وبريدوكسين حامض الهيدروليك 1 ملغم/لتر وثايمين 0.4 ملغم /لتر وفحم منشط 300 ملغم/لتر وسكروز 20000 ملغم/لتر واجار 6000 ملغم/لتر. أضيف لهذا الوسط تراكيز مختلفة من منظمات النمو IAAو Kinetin و NAA و IBA)3- (Indolebutyric acidو BA (ملغم / لتر) لتكوين التوليفات الآتية.

أ-Kinetin2+IAA2
ب-Kinetin2.5+ IAA3
ج-Kinetin2+NAA 0.1
د-Kinetin2+IAA2+NAA0.5
هـ-Kinetin2+IBA 0.5
و-Kinetin2+ IBA 1
ز - BA 2
ي- بدون هرمونات

قطع الكالس المنتج في الأوساط الزرعية الى قطع صغيرة وزن القطعة الواحده 100 ملغرام. وزرعت في قناني الأوساط الغذائية الخاصة بتمايز الكالس وبواقع 4 قطع في القنينة الواحدة ألحاوية على 30 مل من الوسط التي كان قطرها 6سم وطولها 14 سم وبواقع عشر قناني لكل وسط. حضنت الزر وعات في غرفة النمو تحت الظروف نفسها ماعدا شدة الاضاءة (2000 لوكس) الى حين تكون الأجنة الجسمية والأعضاء.

تجذير واخلاف النباتات:

استخدم الوسط MS في زراعة الأجنة الجسمية والأعضاء المتطورة من خلايا الكالس بالتوليفات الآتية:

1- نصف قوه املاح MS مع 100 فحم منشط و Kinetin3 و IAA 2 و20000 سكروز ملغم / لتر على التوالي .

2-التوليفة ج المحورة بإضافة ثلاث توليفات (ملغم / لتر) من الاحماض الامينية كلوتامين واسباراجين وارجنين وهي 0.5:0.5:0.5 و 1:1:1 و 2:2:2.

3-نصف قوة املاح MS مع 100 فحم منشط و BA 0.05 و0.005 NAA و 20000 سكروز ملغم / لتر على التوالي.

نقلت الاجنة الجسميه إذ امكن مشاهدة الشكل الكروي والشكل الطوربيدي بالعين المجردة [11] وهي نامية في التوليفة ج، فضلاً عن الاعضاء المتكونة مباشرةً (اوراق وسيقان) من خلايا الكالس بعد تفريدها مع اجزاء خضراء متصلة بها الى الاوساط الغذائية الثلاثة (شكل2 ج) ثم حضنت في غرفة النمو تحت الظروف نفسها لغرض الحصول على نباتات كاملة (المجموع الخضري والجذري).

النتائـج والمناقشة:

الاجزاء النباتية:

تفاوتت استجابة الاجزاء النباتية لانتاج الكالس , اذ أظهرت البراعم الابطية والمتوك الصفراء والاجنة غير الناضجة (شكل (1 أ)) استجابات عالية مقارنة بالقمم النامية (جدول 2)، وقد يعزى ذلك الى كبر الاجزاء النباتية في الحالة الاولى مما زاد في احتمالية نجاحه في الوسط الغذائي مقارنة بصغر حجم القمة النامية(1ملم) . [15,13]

يعزى نجاح انتاج الكالس من زراعة المتوك الصفراء وفشله في حالة زراعة المتوك المستأصلة من الازهار البيضاء (جدول 3) الى ان المتوك الصفراء في حالة انقسام مستمر لتكوين حبوب اللقاح بينما تكون حبوب اللقاح قد تكونت في متوك الازهار البيضاء مما يؤكد أهمية أختيار الجزء النباتي والمرحلة المناسبة لكل نبات فضلاً عن اختيار الوسط الغذائي المناسب [8]. إن انتاج الكالس من زراعة المتوك في هذه الدراسة سوف يخدم برنامج تحسين هذا المحصول إذ يمكن الحصول على نباتات احادية العدد الكروموسومي بوقت قصير ويستطيع مربي النبات ان يحصل على سلالة نقية Pure Line ولكن هذه النتائج تحتاج الى دراسات خلوية مكملة لمعرفة عدد المجموعات الكروموسومية في الجيل الناتج.

ويمكن زيادة كفاءة المتوك في انتاج الكالس عند تحديد الطور الامثل الذي يعتمد على طول الاوراق التويجية[10]. ومن الجديربالذكر ان الاتجاهات الحالية في تقنيات زراعة الانسجة غالبا ماتركز على انتاج الاجنة مباشرة من زراعة المتوك دون المرور بمرحلة الكالس وخاصة في محاصيل البقول [9].

جدول (2) :تاثير الاجزاءالنباتية للحمص (صنف محلي ديالى)ومنظمات النمو في انتاج الكالس

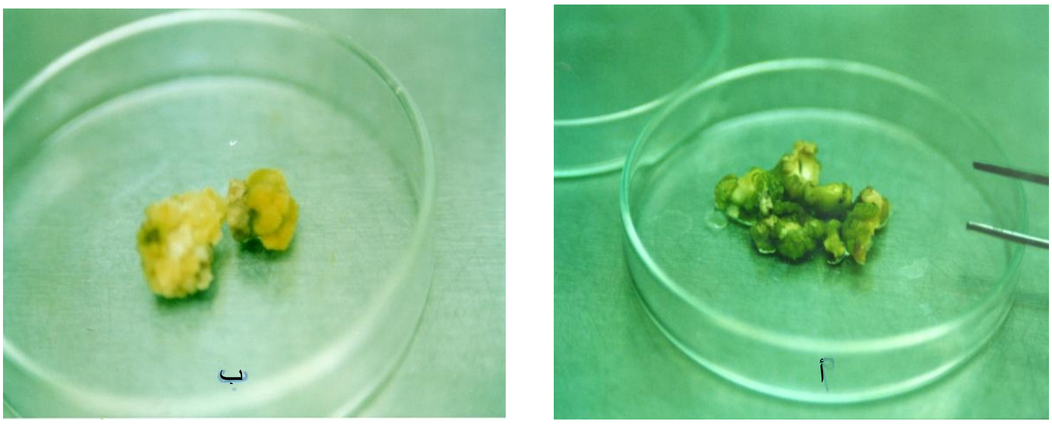
التسلسل	الاوساط الغذائيه ملغم / لتر	القمم النامية		البراعم الابطية		الاجنة غير الناضجة	
		الاستجابة %	الوزن الرطب للكالس mg	الاستجابه %	الوزن الرطب mgللكالس	الاستجابه %	الوزن الرطب mgللكالس
1	**IAA+2iP**						
A	**0+0**	0	0.0	0	0.0	0	0.0
B	**0.25+1**	36	110	60	139	0	0.0
C	**0.5+2**	40	125	66	150	0	0.0
D	**1+3**	48	234	75	300	0	0.0
2	**2,4-D+BA**						
A	**0+0**	0	0.0	0	0.0	0	0.0
B	**1+0.1**	65	375	87	441	50	تضخم
C	**2+0.5**	45	400	80	290	90	678
D	**3+1**	0	0.0	85	360	80	480
3	**NAA+K**						
A	**0+0**	0	0.0	0	0.0	0	0.0
B	**1+0.1**	0	0.0	0	0.0	0	0.0
C	**2+0.5**	0	0.0	0	0.0	0	0.0
D	**3+1**	0	0.0	0	0.0	0	0.0

* اخذت الملاحظات بعد مرور 6 أسابيع من الزراعة

جدول (3): تاثير متوك نبات الحمص (صنف محلي ديالى) ومنظمات النمو في انتاج الكالس

التسلسل	الاوساط الغذائيه ملغم / لتر	متوك صفراء من ازهار صغيرة		متوك صفراء من ازهار كبيرة		متوك غابرة من ازهار كبيرة	
		الاستجابه %	الوزن الرطب mg للكالس	الاستجابه %	الوزن الرطب mgللكالس	الاستجابه %	الوزن الرطب mgللكالس
1	**IAA+2iP**						
A	**0+0**	0	0.0	0	0.0	0	0.0
B	**0.25+1**	60	340	68	251	0	0.0
C	**0.5+2**	61	381	70	273	0	0.0
D	**1+3**	25	136	20	328	0	0.0
2	**2,4-D+BA**						
A	**0+0**	0	0.0	0	0.0	0	0.0
B	**1+0.1**	0	0.0	0	0.0	0	0.0
C	**2+0.5**	0	0.0	0	0.0	0	0.0
D	**3+1**	57	311	50	364	0	0.0
3	**NAA+K**						
A	**0+0**	0	0.0	0	0.0	0	0.0
B	**1+0.1**	0	0.0	0	0.0	0	0.0
C	**2+0.5**	0	0.0	0	0.0	0	0.0
D	**3+1**	0	0.0	0	0.0	0	0.0

*اخذت الملاحظات بعد مرور6 أسابيع من الزراعة.



شكل(1): استجابة الأجنة غير الناضجة لنبات الحمص (صنف محلي ديالى)لمنظمات النمو من اليمين إلى اليسار أ- الجنين مع الفلقات بعد مرور 6 أسابيع من الزراعة ب- تحول كل الجنين والفلقات إلى خلايا الكالس بعد مرور 6 أسابيع أخرى .

تعقيم الاجزاءالنباتية:

تمثل مرحلة التعقيم في الزراعة النسيجية اهم العوامل المحددة لنجاح او فشل هذه التقنية، لذلك اولت هذه الدراسة اهتماما بالغا في وضع برنامج محكم لتعقيم الاجزاءالنباتية للحمص يتضمن المواد والتركيز والمدة (جدول 4) و(جدول5). فعلى الرغم من سلبيات استعمال كلوريد الزئبق فإن الزروعات الحاوية على الأجزاء النباتية المعقمة به قد خلت من أي نوع من التلوث مقارنة بتركيز 6% من محلول هايبو كلورات الصوديوم بغض النظر عن مدة الغمر بالمادة التي بلغت 20 دقيقة كأقصى مدة. وعلى الرغم من كفاءة كلوريد الزئبق في التعقيم فان غمر الاجزاء النباتية بالتركيز 0.1 % لمدة اقل من عشر دقائق لم يكن كافيا لمنع التلوث، لذلك فقد استخدمت 10 لتعقيم القمم النامية والازهار و 12و 14 دقيقة لتعقيم البراعم الابطية والقرنات على التوالي.

احدثت بعض مواد التعقيم ومدة التعقيم فضلاً عن الغسل بالماء تاثيرا سلبيا في استجابة بعض الاجزاء النباتية وخاصة القمم النامية والمتوك.

جدول(4) :تأثير محلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl تركيز 6 % في منع حصول التلوث في الاجزاء النباتية المختلفة للحمص (صنف محلي ديالى) خلال مدة مختلفة

التسلسل	الجزء النباتي	نسبة التلوث %			
		7 دقيقه	10 دقيقه	15دقيقه	20دقيقه
1	القمم الناميه	100	100	95	90
2	الازهار غير المتفتحه	100	100	98	95
3	البراعم الابطيه	100	100	100	100
4	الاجنه غيرالناضجه	100	100	100	100

جدول (5): تأثير محلول كلوريد الزئبق HgCl2 تركيز 0.1 % في منع حصول التلوث في الاجزاء النباتية المختلفة للحمص (صنف محلي ديالى) خلال مدة مختلفة

التسلسل	الجزء النباتي	نسبة التلوث %		
		10دقيقه	12 دقيقه	14دقيقه
1	القمم الناميه	0	0	0
2	الازهار غير المتفتحه	0	0	0
3	البراعم الابطيه	9	0	0
4	الاجنه غير الناضجه	10	8	0

الاوساط الغذائية الخاصة بانتاج الكالس :

سجلت هذه الدراسة تاثر استجابة الاجزاء النباتية في نبات الحمص (صنف محلي ديالى) في تحفيز انتاج الكالس بمكونات الوسط الغذائي من منظمات النمو وعلى الرغم من ان الوسط الغذائي الحاوي على IAA و 2iP قد حفز القمم النامية والبراعم الابطية على انتاج الكالس خلال 6 اسابيع (جدول 2). الا ان الاجنة غير الناضجة لم تتأثر بمكونات هذا الوسط. وعند اعادة زراعة خلايا الكالس المنتجة على الوسط الغذائي نفسه تفقد الخلايا قابليتها على الانقسام الذي ينعكس واضحاً في توقف النمو مع تلون وموت الكالس (جدول6). اما الوسط الحاوي على منظم النمو 2,4-Dو BA فقد سبب في تحفيز انتاج الكالس للقمم النامية والبراعم الابطية والاجنة غير الناضجة (جدول2)، وعند اعادة زراعة هذه الخلايا على الوسط نفسه تستمر بالنمو و التضاعف لمدة زمنية اطول (جدول 6)، مما يؤكد كفاءة منظم النمو 2,4-D في تحفيز انقسام خلايا الكالس مقارنة مع منظم النمو IAA [17].

انحصر اعلى انتاج لخلايا الكالس من الاجنة غير الناضجة بالوسط الحاوي 2 و0.5 مغلم/لتر والوسط الحاوي على 3 و 1 ملغم/لتر من منظمي النمو 2,4-Dو BA على التوالي، اذ وصل معدل الوزن الرطب للكالس 678 mg و480 mg على التوالي (شكل 1ب) بينما حصل تضخم للأجنة فقط عند وجود 1و 0.1 ملغم/لتر من منظمي النمو.

يوضح الجدول 3 عدم وجود أي اختلاف في نسب الاستجابة للمتوك الصفراء سواء اخذت من ازهار صغيرة ام كبيرة بلغت الاوزان الرطبة للكالس المنتج في الوسط الغذائي الحاوي على 3 و 1 ملغم / لتر من منظمي النمو 2,4-D و BA 311mg و 364mg على التوالي , بينما لم يتكون الكالس في الاوساط الحاوية على التراكيز الواطئة من منظمي النمو.

وصل معدل الوزن الرطب للكالس في الاوساط الحاوية 1-2 ملغم/لتر من 2iP مع 0.25 – 0.5 ملغم/لتر من IAA الى 340mg- 381mg للمتوك الصفراء من الازهار الصغيرة و 251mg – 273mg للمتوك الصفراء من الازهار الكبيرة في حين ارتفاع تركيز هذه المنظمات في الوسط الغذائي أعطى معدل للوزن الرطب مقداره 136mg لمتوك الازهار الصغيرة و 328mg لمتوك الازهار الكبيرة ولكن الاستجابة لكلتا المرحلتين كانت واطئة قياساً بالتراكيز القليلة لهذه المنظمات، ولم تستمر خلايا الكالس الناتجة من المتوك بالنمو والتضاعف عند اعادة زراعتها على الوسط الغذائي نفسه الذي

تكونت فيه (جدول7). اما الوسط الغذائي الحاوي على تراكيز مختلفة من NAA وK لم تتأثر الاجزاء النباتية المختلفة للحمص بمكوناته.

يفضل استخدام الأوساط الحاوية على الأوكسين IAA مع السايتوكاينين 2iP لانتاج الكالس من القمم النامية والبراعم الابطية والمتوك والابتعاد عن استخدام الـ 2,4-D وذلك لوجود محاذير كثيرة منها منعه تخصص الخلايا أو قد يسبب بعض التغيرات الوراثية في هذه الخلايا خاصة اذا استعمل لمدة طويلة ولتلافي توقف نمو وانقسام الخلايا عند عدم وجود الـ 2,4-D يفضل اضافة تراكيز منخفضة جدا منه الى وسط IAA مع 2iP بتركيز 0.001 ملغم / لتر (جدول7,6) [17].

جدول(6): تاثير اعادة الزراعه في نمو وانتاج كالس الاجزاءالنباتية للحمص (صنف محلي ديالى)المزروعه في منظمات النمو

التسلسل	الاوساط الغذائيه ملغم / لتر	القمم النامية الوزن الرطب للكالس mg	البراعم الابطية الوزن الرطب للكالسmg	الاجنة الغير ناضجة الوزن الرطب للكالسmg
1	IAA+2iP			
B	0.25+1	98	107	
B*	0.25+1 + 0.001 D	139	145	
C	0.5+2	103	100	
C*	0.5+2 + 0.001 D	143	150	
D	1+3	105	110	
D*	1+3+ 0.001 D	152	161	
2	2,4-D+BA			
B	1+ 0.1	157	165	
C	2+0.5	182	200	298
D	3+1	194	217	250

- الوزن الابتدائي للكالس لكل المعاملات 100 ملغرام
- اخذت الملاحظات بعد مرور 6 أسابيع على الزراعه

* الوسط نفسه مع اضافة 0.001 ملغم/لتر من الـ 2,4-D

جدول (7): تاثير اعادة الزراعه في نمو وانتاج كالس متوك الحمص (صنف محلي ديالى)المزروعه في منظمات النمو

التسلسل	الاوساط الغذائيه ملغم / لتر	متوك صفراء من ازهار صغيرة الوزن الرطب للكالس mg	متوك صفراء من ازهار كبيرة الوزن الرطب للكالسmg
1	IAA+2iP		
B	0.25+1	106	100
B*	0.25+1 + 0.001 D	160	154
C	0.5+2	99	108
C*	0.5+2 + 0.001 D	158	165
D	1+3	107	102
D*	1+3 + 0.001 D	166	169
2	2,4-D+BA		
D	3+1	180	179

- الوزن الابتدائي للكالس لكل المعاملات 100 ملغرام .
- اخذت الملاحظات بعد مرور 6 أسابيع على الزراعه

* الوسط نفسه مع اضافة 0.001 ملغم/لتر من الـ 2,4-D

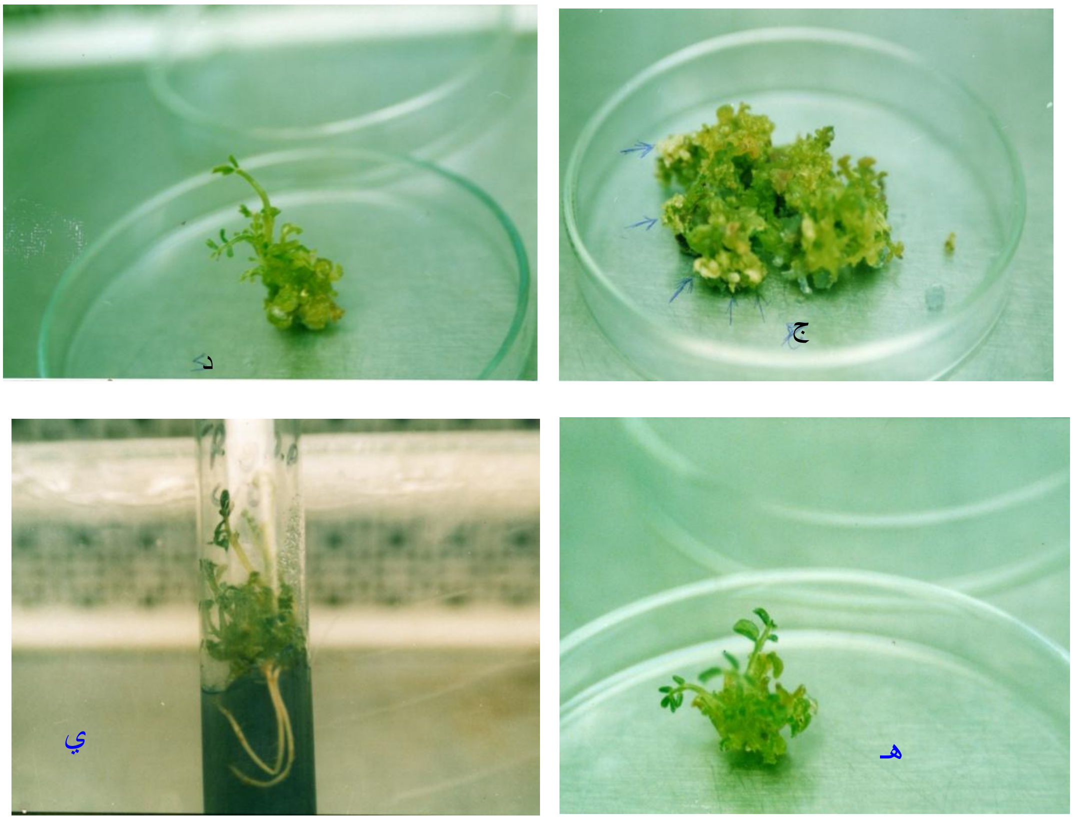
تمايز وتجذير واخلاف النباتات:

تفاوت تاثير توليفات الوسط الغذائي الخاصة بتمايز الكالس الى اعضاء واجنة باختلاف تراكيز الهرمونات المضافة، فالاوساط الغذائية الحاوية على تركيز 2 او 3 ملغم / لتر من IAA و 2 او 2.5 ملغم / لترمن الكاينتين سببت تمايز خلايا الكالس الى سيقان وأفرع ذات اوراق طبيعية (شكل 2 د،هـ) [4]. بينما لوحظ تكون للاجنة الجسمية فقط في التوليفة الغذائية ج الذي يحوي 0.1 و2 ملغم / لترمن NAAوالكاينتين، بينما لم تتطور هذه الاجنة عند اعادة زراعتها على الوسط نفسه. سببت الاحماض الامينية من الكلوتامين الاسبرجين والارجنين المضافة لهذا الوسط تاثيرا واضحا في تحفيز النمو الجنيني وتحسن نمو وتكون الافرع والاوراق وكان افضل تركيز لهذه الحوامض 0.5:0.5:0.5 [11]، ومما تجدر الاشارة اليه ان عملية تمايز او اخلاف الكالس لم تلاحظ في الاوساط الغذائية الاخرى.

اما تجذير الافرع والاجنة النامية فقد اثر تقليل املاح الوسط MS الى نصف القوة في تحفيز الافرع والاجنة النامية لتكوين الجذور فضلاً عن تقليل تراكيز الهرمونات المضافة الذي سبب نمواً للأجنة والقمم والاعضاء المتكونة من تخصص الكالس الى نباتات كاملة جاهزة للنقل الى التربة (شكل2 ي) [11,8].

ان النباتات التي تم الحصول عليها في هذه الاوساط كانت مختلفة المصدر ولهذا اختلفت في نشوئها وتطورها الى نباتات كاملة وهذه

الاوساط المتعددة تحل المشاكل التي تظهر على النباتات فاذا كانت النباتات ابرية الاوراق والافرع رهيفه فالاوساط الحاوية على الكاينتين تعطي نمواً لافرع والاوراق بشكل طبيعي، اما اذا كانت الجذور قليلة وغير سميكة فالو سط الحاوي على BA و NAA سوف يزيد من نمو الجذور وسمكها.ان كثرة الاوساط الغذائية سواء المحفزه على انتاج الكالس ام الخاصة بتميز ونشوء النباتات سوف ترفد برنامج التربية لمقاومة مرض الذبول الفيوزارمي بكثير من الحلول لكثير من المشاكل التي تواجه المربي بهذه التقنية .



شكل(2): تمايز أنسجة الكالس إلى أعضاء وأجنة من اليمين إلى اليسار وتطورها إلى نباتات حمص(صنف محلي ديالى)

إذ ج تمثل تمايز 100 ملغم من كالس الاجنة غير الناضجة الى اعضاء واجنة (←——).
د تمثل كتلة خضراء وقد تمايزت لتكوين قمة نامية وافرع.
هـ تمثل بداية تكون الاوراق الطبيعية على الافرع.
ي تمثل تكون الجذور وزيادة الافرع واخلاف النبات الكامل.

الاستنتاجات:

ان الحصول على اكثار خضري (لاجنسي) سريع للحمص خارج الجسم الحي وبأعداد كبيرة يمكن ان يتم عن طريق تخصص الكالس الناتج من زراعة الاجزاء النباتية المختلفة في الوسط الغذائي MS بالتوليفات الآتية :

1- زراعة قمم نامية وبراعم ابطية وسيقان واوراق في وسط MS بوجود 1 و 0.1ملغم / لتر من 2,4-D وBA.

2-زراعة الاجنة غيرالناضجة مع او من دون الفلقات في وسط MS بوجود 2و 0.5ملغم / لتر من 2,4-D وBA.

3-زراعة المتوك الصفراء المستاصلة من الازهار غير المتفتحة في وسط MS يحتوي 1-3 ملغم/ لتر من 2iP مع 0.25-1 ملغم / لتر من IAA.

4-ادامة خلايا الكالس في وسط MS بوجود 1و 0.1ملغم / لتر من 2,4-D وBA.

5-تمايز الكالس الى افرع واجنة في وسط MS يحتوي 2-3 ملغم / لتر من IAAو 2-2.5ملغم / لتر كاينتين او وسط MS يحتوي 0.1 و 2 ملغم / لترمن NAA والكاينتين.

6-تجذيرالنباتات والافرع في وسط يحتوي نصف قوة املاح MSو3 كاينتين مع 2 IAAملغم / لتر على التوالي او نصف قوة الاملاح و2 ملغم / لتركاينتين مع 0.1 ملغم /

لترNAA مع إضافة 0.5 ملغم / لترلكل من الاحماض الامينية كلوتامين والاسبارجين والارجنين، او نصف قوة الاملاح مع تقليل تركيز الهرمونات الى 0.005من NAAو 0.05 من BA ملغم / لتر على التوالي .

المصادر:

1- Islam, R. Farooqui, H. and Riazuddin, S. 1993. *In vitro* organogenesis of chickpea and its transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. plant- Tissue - Culture(Bangladesh).3(1) :29-3 1.

2- Murashigs, T. and Jones, J.B. 1974. Cell and organ culture methods in virus disease therapy. In R.H. Lawson and M. K. Corbet (eds). Proc.3rd Int. Conf. ornamental Plant Viruses .PP.207-215.ISHS.The. Hagus

3- Naz, S., Ali, A., Siddique, F.A. and Iqbal, J. 2007. Multiple shoot formation from different explants of Chickpea (*Cicer arietinum* L.), Pak. J. Bot., 39(6): 2067- 2073.

4- Altaf, N.A. Tabassum and Ahmad, M.S. 1986. Plant regeneration through callus cultures in chickpea. [NIaAB] Faisalabad (Pakistan). PP.225-228.

5- Brana, K.S. and Wakhlu, A.K. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures. of chickpea (*Cicer arietinum* L.) Plant —Cell-Reports (Germany) 12(9): 52 1-524.

6- Brandt, E.B. and Hess, D. 1994. In vitro regeneration and propagation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) from meristem tips and cotyledon nary nodes. Journal of the Tissue Culture Association. 30(l):75-80.

7- Kumer, V.D. Kirti, P.B. Sachan, J.K.S. and chobra, V.1. 1994. regeneration via somatic embryogenesis in chickpea Plant (*Cicer arietinum* L.) Plant—Cell —Reports (Germany).8(13):468-474.

8- Huda, S., Islam, R. , Bari, M.A. and Asad uzzaman, M. 2001. Anther culture of chickpea, Int. Chickpea & Pigeon pea Newsl.8:24-26.

9- Croser, J. , Lulsdor, M. , Davies, P. , Wilson, J. and Sidhu, P. , Grewal, R. , Allen, K. , Datment, T. , Warkentin, T. ,Vandenberg, A.and Siddique, K. 2005. Haploid embryogenesis from Chickpea &Fildpea- progress towards a routine protocol, Pro. of the Australian Branch of the IAPTC & Perth, Western Australia. 70-82.

10- Vessal, S.R., Bagheri, A. and Safranjad. 2002. The possibity of *in vitro* haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.), J. Sci. Technol. Agric. Nat. Resour. 6:67-76.

11- Altaf, N. 2007. Seed variability in callus regenerated plants of Lentil cultivar Masoor- 85, EJEAFChe. 6(2): 1851-1859.

12- Sahirjram, L. Soneji, J.R. and Bollamma, K.T. 2003. Somaclonal variation is undesirable, *In vitro* Cellular and development Biology plant. 39:55 1-556.

13- Veena, A. and yadav. A. 2006. Efficient *in vitro* regeneration protocol from different ex-plants in a drought tolerant variety BGD 72 of *Cicer aritinum* L. Indain Journal of plant physiology. 11(4):Print Issn: 0019-5502.

14- Sarker, R.H., Tarannum, F. and Hoque , M. I. 2005. *In vitro* direct regeneration of three Indigenous chickpea (*Cicer arietinurm* L.) varieties of Bengladesh, Plant Tissue cult & Biotech. 15(2):135-144.

15- Hussein, S., Ibrahim, and Kiong, A.L. 2006. Somatic embryogenesis an alternatide method *in vitro* mikroproagation Iranian Journal of Biotechnology. 4(3): 156-161.

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

17- Frankin, C. and Dixon, R. 1996. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. Plant Cell Culture. In Pages 1-79 In A practical Approach Oxford University.

Propagation of Chickpea *in vitro*

Maha S .AL Rawi**   ***Mohammed A. AL-Hamdany*

Atyaf F. Abd AL-Lattef**   ***Mustafa M-F. Abd AL-Rahman*

*Agricultural Researches Directorate, Ministry of Science & Technology.

Abstract:

Apical meristems, lateral buds, anthers of immature flowers and immature embryos of chickpea (*Cicer arietinum* L.) were cultured on MS media with different growth regulators and incubated for 6 weeks at 25-27°C with 16 hrs photoperiod for callus initiation. Results indicated that 1 and 0.1 mg/l of 2,4-D and BA were suitable for callus initiation when apical meristems and lateral buds were used. While 2 and 0.5 mg/l of both growth regulators were essential for immature embryos. It was noticed that using chickpea anthers of the MS medium must contain 1mg/l 2ip and 0.5 mg/l IAA. However, MS medium supplemented with 1-3 mg/l of BA and 2,4-D respectively was good for callus initiation from lateral buds, anther and immature embryos.

However, callus differentiations in chickpea were successfully obtained when 2-3 mg/l of IAA, 2-2.5mg/l of kinetin or 0.1 mg/l of NAA and 2 mg/l of kinetin were used. Data of regeneration and culture maintenance revealed that half strength of MS medium supplemented with 2, 2.5 mg/l of IAA and kinetin respectively or 0.005mg/l and 0.05 mg/l of NAA and BA respectively was the best. The importance of this method in propagation were used for improving and screening resistant chickpea germplasm aginst Fusarium wilt disease.