تكوين نباتات القديفة *Tagetes patula* بالزراعة النسيجية

مزامح قاسم الملاح
قسم علوم الحياة
كلية التربية

عمار عمر الاطرقجي
قسم البستنة
كلية الزراعة والغابات

قاسم محمود الحمداني
قسم المحاصيل
كلية الزراعة والغابات

الخلاصة

استخدم في هذه الدراسة تداخلات مختلفة من منظمات النمو شملت البنزاييل أدنين (BA) والاكسينات نفتالين حامض ألكليك (NAA) واندول حامض ألكليك (IAA) وثنائي كلوروفينوكسي حامض ألكليك (2,4-D) وأظهرت النتائج أن الأوراق الفلقية والأوراق والسيقان والجذور المستأصلة من نباتات القديفة Marigold نوع *Tagetes patula* أبدت قابلية عالية لتكوين الكالس خاصة الأوراق والجذور التي امتازت بنسبة استحداث عالية بلغت ٩٥.٨ و ١٠٠ على التوالي في وسط MS المحتوي ٥ ملغم/ لتر لكل من BA و IAA مع وجود ٠.٥ ملغم/ لتر 2,4-D. وتم الحصول على نباتات القديفة من تمايز كالس الأوراق الفلقية والأوراق على وسط MS بوجود BA و IAA بتركيز ٥ ملغم/ لتر لكل منهما، وقد أعطى كالس قطع الأوراق أعلى استجابة بلغت ٧٧.٥% ووصل معدل عدد الأفرع الخضرية في كالس القطع المستجيبة من الأوراق والأوراق الفلقية إلى ١.٧١ و ٢.٠٣ فرع لكل قطعة. وأدت إضافة الجبرلين (GA₃) بتركيز ١٠ ملغم/لتر وخفض IAA إلى ٣ ملغم/لتر إلى زيادة عدد الأفرع الخضرية من ٤ إلى ٦ فروع/قطعة، وأظهرت النباتات الناتجة اختلافات مظهرية محدودة.

المقدمة

عرفت نباتات القديفة منذ أمد طويل وانتشرت من موطنها الأصلي في المكسيك وأواسط أمريكا إلى مناطق العالم المختلفة كنباتات حدائق حولية تنماز بأريج عطري قوي يظهر عند لمس أزهارها أو أوراقها التي تكون متقابلة على الساق الرئيسي، ذات حافات مسننة، والورقة مقسمة بعمق يصل إلى العرق الرئيسي فتظهر مركبة ريشية (Gilman، ١٩٩٩)، أزهارها مفردة وقد تكون مزدوجة، وكل زهره في الحقيقة عبارة عن نوره زهرية قرصية الشكل، ألوانها تختلف حسب الأنواع فمنها البيضاء، والصفراء، والذهبية والحمراء أو البنية. صنفت نباتات القديفة والتي يصل عددها حاليا المائة نوع، في ثلاث مجاميع رئيسية هي: مجموعة نباتات القديفة الفرنسية French Marigold وأهمها نوع *Tagetes patula* ومجموعة نباتات القديفة الأفريقية African Marigold وأهمها نوع *Tagetes erecta* المعروف بالجعفري، ومجموعة نباتات القديفة ثلاثية المجموعة الكروموسومية Triploid Marigold، وعادة تختلف هذه الأنواع في أطوالها وأقطارها ولون أزهارها (Kessler، ٢٠٠٤). تنتمي نباتات جنس القديفة إلى العائلة المركبة Asteraceae والتي تضم العديد من النباتات المهمة اقتصادياً وطبياً ويزرع الكثير منها لأغراض الزينة كالداليا والعنبر والقديفة والأقحوان والاستر (سعد، ١٩٧٥). لقد وصفت القديفة بأنها نباتات متعددة الأغراض نظراً لأهميتها الطبية والزراعية بسبب احتوائها على مركبات الثايوفين فضلاً عن أهميتها التجارية كونها احد نباتات الزينة (Vasudevan وآخرون، ١٩٩٧). وحديثاً اتجهت الدراسات للإفادة من تقنية الزراعة النسيجية لزيادة أعدادها باعتماد الإكثار السلالي السريع. فقد ذكرت بعض الدراسات أن النوع الأفريقي *Tagetes erecta* كان أكثر الأنواع استجابة للإكثار السلالي السريع مقارنة بالأنواع الأخرى، حيث تمكنت أوراق هذا النوع من تكوين مزارع الكالس والتمايز مباشرة لتكوين الأفرع الخضرية في وسط MS المحتوي على BA و GA₃ فقط (Datta و Misra، ٢٠٠١)، وبينت الدراسة أن الأفرع الناتجة تطورت وتضاعف عددها عند إضافة ١.١ مايكرومولار من BA مع ٢٩.٤ مايكرومولار من نترات الفضة في وسط MS الصلب، وجذرت هذه الأفرع الخضرية بوجود ٠.٢٧ مايكرومولار من NAA في وسط MS الصلب، وتفاوتت النباتات الناتجة بأعداد الأزهار وعدد البذور/زهرة وقصر الفترة اللازمة للتهجير قياساً بالنباتات البذرية. واستطاع Mohamed وآخرون (٢٠٠٠) من إنتاج نباتات القديفة *T. minuta* متحملة للجفاف من تمايز كالس الأوراق الفلقية خلال ستة أشهر من النمو في وسط MS المحتوي على المانيتول مع ٣ ملغم/لتر IAA و ١٠ ملغم/لتر من BA.

أصبحت تقنية زراعة الأنسجة النباتية من التقانات المهمة ليس في مجال الإكثار السلالي وإنما توفر إمكانية لإحداث تغييرات وراثية والحصول على أصناف جديدة وتعديل بعض الأصناف الموجودة أصلاً من خلال استعمال التقنية الحيوية، لذا تناولت الدراسة الحالية استخدام عدد من منظمات النمو وبمستويات متعددة لتكوين نباتات القديفة *Tagetes patula* بالزراعة النسيجية ودراسة التغيرات الجسمية الحاصلة فيها .

مواد البحث وطرائقه

إنتاج البادرات المعقمة: استخدم القاصر التجاري الحاوي على ٦% من هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl في تعقيم بذور القديفة *Tagetes patula* Marigold (Hume Seed, Inc. Puyallup. U.S.A)، باستعمال تخفيفات منه بحجم ١ : ٠.١ و ٢ حجم ماء لمدة ٥ و ١٠ و ١٥ دقيقة، غسلت البذور بالماء المعقم ثلاث مرات (٥ دقائق/ مرة) لإزالة آثار المادة المعقمة منها ونشرت على ورق ترشيح معقم للتخلص من الماء الفائض عنها. نقلت البذور المعقمة وبمعدل ٣ بذور/أنبوبة إلى أنابيب اختبار سعة ١٠٠ مل احتوت ١٥ مل من وسط MS الصلب (Murashige و Skoog، ١٩٦٢) بنصف قوته التركيبية لكل المكونات باستثناء خفض تركيز السكر من ٣٠ غم/لتر إلى ٢٠ غم/لتر وفقاً لما ذكره Ketel (١٩٨٦)، أغلقت الأنابيب بأغطيتها وحفظت في ظروف ظلام تام لمدة ثلاثة أيام وبدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ، بعدها نقلت البادرات الناتجة إلى ظروف ١٦ ساعة ضوء/ ٨ ساعة ظلام وفي شدة إضاءة ٢٠٠٠ لوكس في غرفة الزرع، بينما أعتمد وسط MS بكامل قوته التركيبية في استحداث الكالس ونموه وتمييزه .

تكوين مزارع الكالس وإدامتها: استخدمت بادرات القديفة المعقمة بعمر ٤-٦ أسابيع النامية في وسط MS الصلب بنصف قوته التركيبية للحصول على الأجزاء النباتية، إذ استؤصلت الأوراق الفلقية بأكملها بينما أخذت قطع الأوراق بمساحة ١.٠ سم^٢ تقريباً، وقطع السيقان بطول ١.٥ سم فيما أخذت الجذور بشكل خصل كل منها احتوى على ٤-٥ جذور ليفية بطول ٢-٤ سم، وضعت العينات المختلفة على أوساط الاستحداث في أوعية زجاجية سعة ١٠٠ مل احتوت ٥٠ مل من وسط MS بكامل قوته التركيبية المدعم بتداخلات مشتركة من البنزايلا أدنين BA مع الاوكسينات:

BA : ٠.٠ و ٢.٠ و ٣.٠ و ٤.٠ و ٥.٠ ملغم / لتر مع NAA : ٠.٠ و ٠.١ و ٠.٥ و ١.٠ ملغم / لتر
BA : ٠.٠ و ١.٠ و ٢.٠ و ٣.٠ و ٥.٠ ملغم / لتر مع 2,4-D : ٠.٠ و ٠.٠٥ و ٠.١ و ٠.٥ ملغم / لتر
BA : ٠.٠ و ٣.٠ و ٥.٠ ملغم / لتر مع IAA : ٠.٠ و ٢.٠ و ٣.٠ و ٥.٠ ملغم / لتر
BA : ٠.٠ و ٥.٠ ملغم / لتر مع IAA : ٠.٠ ملغم / لتر + 2,4-D : ٠.٠٥ ملغم / لتر

حفظت العينات المزروعة في ظروف غرفة الزرع بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ وشدة إضاءة ١٠٠٠ لوكس وبتعاقب ١٦ ساعة ضوء/ ٨ ساعة ظلام. تمت إدامة مزارع الكالس عند الحاجة إليها كل ٣ أسابيع، إذ اخذ الكالس المتكون على أوساط الاستحداث الملائمة وأزيلت منه البقع البنية الميتة وقسم إلى قطع بوزن ١ غم تقريباً ووضع كل منها على سطح ٥٠ مل من وسط الإدامة المناسب.

تمايز الكالس لتكوين الأفرع الخضرية والجذور: وضعت مجموعة قطع من الكالس بوزن ١ غم/قطعة، على أوساط التمايز المشتملة على MS بكامل قوته التركيبية والمدعم بالتداخلات المشتركة بين BA مع NAA و IAA بالتراكيز المذكورة في الفقرة أعلاه، وحفظت العينات في غرفة الزرع عند درجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ مع زيادة شدة الإضاءة إلى ١٥٠٠ لوكس ، كما نقلت قطع من الكالس عند بدء التمايز إلى وسط MS المدعم بتركيز ٥ ملغم/لتر من BA متداخلاً مع ٣ ملغم/لتر IAA والجبرلين GA₃ بتركيز ١٠ ملغم/لتر، استؤصلت الأفرع الخضرية المتكونة بعد أسبوعين من ظهورها وبطول ٣-٤ سم ثم غرست بوضع قائم في وسط التجذير المكون من وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو أو المدعم بإضافة ٠.٥ ملغم/لتر NAA وحفظت في الظروف المشار إليها في الفقرة السابقة.

أقلمة النباتات الناتجة من الكالس ونقلها للتربة: أزيلت النباتات المتكونة عند بلوغها طول ٤-٥ سم واحتوائها على ٣-٥ أوراق بعد ٢-٣ أسابيع من تجذيرها من الوسط الغذائي وغسلت جذورها جيداً بالماء

المعقم للتخلص من بقايا الوسط الغذائي ثم غرست في تربة رملية معقمة ومغسولة بالماء المعقم ، وغطيت بأكياس بلاستيكية مثقبة لمدة ٧ أيام، بعدئذ رفعت الأكياس عنها لتستمر بالنمو في ظروف غرفة الزرع ، وبعد ٣ أسابيع نقلت إلى الحقل وتم متابعة نموها ودراسة صفاتها المظهرية .

الفروقات المظهرية بين النباتات البذرية والنباتات الناتجة من الكالس: قورنت مجموعة من الصفات المظهرية للنباتات الناتجة من الكالس مع نظيراتها من النباتات الناتجة من البذور بالعمر نفسه في مرحلتين هما مرحلة النمو الخضري بعد ٣ أشهر ومرحلة النمو الزهري بعد ٦ أشهر من النمو في الحقل، وقد شملت هذه الصفات كل من أطوال النباتات وعدد السلاميات وعدد الأوراق وعدد الوريقات/ورقة مركبة وعدد وطول الأفرع والمدة اللازمة لظهورها ومدة تفتح الزهرة بعد ظهورها وقطر الزهرة وطولها وعدد الأزهار وعدد البذور فيها. استخدم التصميم العشوائي الكامل في تنفيذ التجربة، وأُعيد اختبار دكن متعدد الحدود عند مستوى احتمالية ٥% في تحليل البيانات (الراوي وخلف الله، ١٩٨٠).

النتائج و المناقشة

كفاءة التعقيم السطحي للبذور وإنتاج البادرات المعقمة: أظهرت نتائج سلسلة من تجارب التعقيم السطحي للبذور كفاءة محلول ٢% من هايوكلورايت الصوديوم لمدة ١٥ دقيقة في الحصول على بذور معقمة تمكنت من إنتاج بادرات سليمة بنسبة ٩٦% على وسط MS الصلب بنصف قوته التركيبية الحاوي على ١٠ غم/لتر من السكر، وقد اعتمدت هذه البادرات عند بلوغها عمر ٤-٦ أسابيع مصدرًا للأجزاء النباتية المستعملة في تجارب هذه الدراسة.

تكوين مزارع كالس الأجزاء المختلفة وإدامتها: أظهرت النتائج عموماً استجابة قطع الأوراق الفلقية والأوراق والسيقان لاستحداثها الكالس مع تفوق واضح للأوراق والجذور (الجدول ١)، وتؤكد النتائج امتلاك قطع الأوراق الفلقية قابلية واضحة لتكوين الكالس إذ بلغت نسبة استحداثه ٨١.٣% في وسط MS الحاوي على BA و IAA بتركيز ٥ ملغم/لتر لكل منهما بوجود 2,4-D بتركيز ٠.٠٥ ملغم/لتر، فيما أظهرت الأوساط الأخرى استجابات متباينة لاستحداث الكالس كان أفضلها تداخل BA ٥ ملغم/لتر مع 2,4-D بتركيز ٠.٠٥ ملغم/لتر والذي أدى إلى استجابة بلغت ٨٠.٥%، وقد اعتمد هذا التداخل في إدامة الكالس مرة كل ثلاثة أسابيع، وامتاز كالس الأوراق الفلقية بقوامه المتماسك وبطء نموه على وسط الاستحداث وظهوره بلون أصفر.

أما قطع الأوراق فقد تفوقت في استحداثها للكالس قياساً بالأجزاء النباتية الأخرى إذ بلغت نسبة استحداثه ٩٥.٨% على وسط MS الصلب المدعم بـ ٥ ملغم/لتر لكل من BA و IAA بوجود ٠.٠٥ ملغم/لتر من 2,4-D، أعقبها المعاملتان المتضمنة كل منهما ٥ ملغم/لتر BA إلى جانب 2,4-D بتركيز ٠.٠٥ ملغم/لتر أو NAA بتركيز ٠.٥ ملغم/لتر فقد تفوقتا أيضاً في استحداثهما للكالس لتصل إلى ٩٣.٢% و ٩١.٣%، على التوالي (الجدول ١). وأظهرت النتائج أن الوسط MS الصلب المحتوي على ٥ ملغم/لتر BA مع ٠.٠٥ ملغم/لتر من 2,4-D كان مناسباً لإدامة هذا الكالس، وهو الوسط نفسه المستخدم في إدامة كالس الأوراق الفلقية وقد تبين حاجته إلى إعادة الزراعة كل ثلاثة أسابيع، وتميز كالس الأوراق بقوامه المتماسك أيضاً لاسيما عند زيادة مستوى BA من ٣ إلى ٥ ملغم/لتر، وظهوره بلون أصفر (الشكل ١- أ).

وأبدت قطع السيقان استجابتها لاستحداث الكالس بنسبة بلغت ٩٠.٠% على وسط MS المضاف إليه BA و IAA ٥ ملغم/لتر لكل منهما مع 2,4-D بتركيز ٠.٠٥ ملغم/لتر، ولوحظ أن الإبقاء على مستوى BA مع خفض تركيز NAA إلى ٠.١ ملغم/لتر أدى إلى خفض نسبة الاستحداث بينما شجعت زيادة تركيزه إلى ٠.٥ ملغم/لتر استحداث الكالس إلى ٧٢.٥% خلافاً لتأثير 2,4-D الذي شجع المستوى المنخفض منه استحداث الكالس بنسبة ٧٧.٣% (الجدول ١)، واتصف كالس السيقان هو الآخر بقوام متماسك خاصة على أوساط MS الحاوية على BA، وتمت إدامة كالس السيقان على وسط إدامة كالس الأوراق نفسه بعد ثلاثة أسابيع من النمو في الوسط الأول الذي حفز فيه.

وتشير النتائج في الجدول ذاته أن استحداث الكالس من الجذور المستأصلة من البادرات المعقمة في أوساط MS المحتوية على 2,4-D بالتراكيز ٠.١ و ٠.٥ ملغم/لتر لم تشجع استحداث الكالس بينما شجعت المستويات المنخفضة منه ٠.٠٥ ملغم/لتر تكوين الكالس بنسبة ١٠٠% بوجود BA بتركيز ٥ ملغم/لتر أو بوجود كل من BA و IAA بتركيز ٥ ملغم/لتر لكل منهما، وكذلك اظهر التداخل بتركيز ٠.٥ ملغم/لتر NAA مع ٥ ملغم/لتر BA استحداثاً للكالس بنسبة ١٠٠%، واتصف كالس الجذور بقوامه الهش في جميع التداخلات المستخدمة من منظمات النمو وظهر بلون أصفر مبيض قليلاً (الشكل

١- ب)، وتمت إدامة كالس الجذور على نفس الوسط المستخدم لإدامة كالس الأوراق والأجزاء الأخرى كل ٣ أسابيع .

الشكل (١): تكوين مزارع الكالس على وسط MS الصلب المدعم بتداخلات مختلفة مشتركة من منظمات النمو، والتمايز المباشر للأفرع الخضرية من كالس الأوراق الفلقية والأوراق لإنتاج نباتات القديفة *Tagetes patula* .

- (أ): كالس قطع الأوراق بعمر ثلاثة أسابيع في أوساط الاستحداث الصلبة: الوسط الأول: BA + MS ٥ ملغم/لتر + NAA ٥.٥ ملغم/لتر، الوسط الثاني: BA + MS ٥ ملغم/لتر + 2,4-D ٥.٥ ملغم/لتر، الوسط الثالث: BA + MS ٥ ملغم/لتر + IAA ٥ ملغم/لتر + 2,4-D ٥.٥ ملغم/لتر.
- (ب): كالس الجذور بعد ثلاثة أسابيع من النمو في أوساط الاستحداث الصلبة المذكورة في (أ).
- (ج): كالس الأوراق بعمر خمسة أسابيع نام على وسط الإدامة (BA+MS ٥ ملغم/لتر + 2,4-D ٥.٥ ملغم/لتر).
- (د): كالس الجذور بعمر خمسة أسابيع نام على وسط الإدامة المذكور في (د).
- (هـ): تكون الأفرع الخضرية من كالس الأوراق الفلقية بعد أربعة أسابيع من الزراعة في وسط الاستحداث والتمايز المكون من وسط MS المدعم به ملغم/لتر لكل من BA و IAA.
- (و): تكوين الأفرع الخضرية من كالس الأوراق بعد أربعة أسابيع من الزراعة في وسط (هـ).
- (ز): تمايز كالس الأوراق بعد نقله إلى وسط MS المحتوي على الجبرلين GA₃ بتركيز ١٠ ملغم/لتر مع BA بتركيز ٥ ملغم/لتر + IAA ٣ ملغم/لتر (لاحظ زيادة عدد الأفرع الخضرية من ٤-٦ فرع/قطعة).
- (ح): تجذير الأفرع الخضرية الناتجة من كالس الأوراق في (هـ ، و) بعد أسبوعين من نقلها إلى وسط التجذير المكون من MS + ٥.٥ ملغم/لتر من NAA.

وعموماً أنصف كالس القديفة بسهولة تكونه وسرعة نموه عند نقله إلى وسط الإدامة لاسيما كالس الأوراق (الشكل ١- ج) وكالس الجذور (الشكل ١- د)، وفي حالة تركه لفترة طويلة أكثر من ستة أسابيع على نفس وسط الإدامة تظهر عليه علامات الاسمرار وتكون الجذور مبكرة لاسيما في أوساط MS الصلبة الخالية من 2,4-D .

إن نظام استحداث الكالس في هذه النباتات تطلب توازنا مناسباً من الاوكسينات والساييتوكاينينات المضافة إذ إن الكالس المستحدث صاحبه ظهور الجذور خلال أسبوعين من تكوينه، وهذا بعد ذاته يمثل مشكلة تعيق نمو الكالس وتحد من تمايزه لتكوين الأفرع الخضرية، وقد تفسر هذه النتائج وفقاً لحتواء نباتات القديفة على مستويات مرتفعة من الاوكسينات والتي تعد مهمة في أيض هذه النباتات ودورها في تكوين الجذور التي تحتاجها النباتات عادةً لإفراز مركبات الثايوفين بصورة طبيعية، فقد لاحظت بعض الدراسات (Ketel، ١٩٨٦ و Ketel وآخرون، ١٩٨٥) أن تداخل البنزاييل أدنين BA مع NAA شجع استحداث الكالس مع ظهور الجذور والأفرع الخضرية في الوقت نفسه على الكالس خلال ٢-٣ أسابيع من الزراعة. إن وجود الاوكسين 2,4-D في وسط استحداث الكالس في الدراسة الحالية شجع تكوين الكالس ونموه فضلاً عن منعه تكوّن الجذور في مزارع الكالس حتى في المستوى ٠.٠٥ ملغم/لتر، وقد يعزى ذلك إلى قابليته في تشجيع انقسام الخلايا فضلاً عن احتمال دخوله منافساً ضمن المستوى الداخلي لإندول حامض الخليك واحتلال مواقع ارتباطه داخل الخلية فيلغي دوره في تحفيز التجذير، أو تنظيم نمو الجذور (محمد، ١٩٨٥). إن نجاح نباتات القديفة في استحداث الكالس خاصة في الأوساط المحتوية على 2,4-D وبوجود BA لوحده أو مع IAA ربما يعزى إلى الطاقة الكامنة Totipotency للخلايا مقترنة بتأثير التركيب الوراثي للخلايا ومستوى الهرمونات والفيتامينات فضلاً عن توافق الوسط الغذائي والإضافة الخارجية لمنظمات النمو بالتراكيز الملائمة التي تعزز انقسام خلايا الأجزاء النباتية المختلفة والتي تباينت قابليتها اعتماداً على مصدرها فكانت أفضلها الأوراق والجذور ربما لكونها مواقع رئيسة في بناء العديد من المركبات الضرورية كالهرمونات النباتية والإنزيمات إلى جانب مركبات الايض الثانوي (Margl وآخرون، ٢٠٠٢).

تمايز كالس الأوراق الفلقية والأوراق والسيقان والجذور وتكوين الأفرع الخضرية: أظهرت النتائج قابلية كالس الأوراق والأوراق الفلقية والسيقان على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية والجذور في مرحلة واحدة One Step Regeneration على وسط MS المدعم بإضافة ٥ ملغم/لتر لكل من BA و IAA، وقد كان هذا الوسط مناسباً لتكوين النباتات من كالس الأوراق الفلقية (الشكل ١- هـ) ومن كالس الأوراق (الشكل ١- و)، ولوحظ انخفاض قابلية كالس السيقان على التمايز وفشل الكالس المشتق من الجذور على تكوين الأفرع الخضرية في هذا الوسط. لقد بينت النتائج أن كالس الأوراق والأوراق الفلقية أظهر قابلية جيدة لتكوين الأفرع الخضرية خلال مدة ١٤-١٨ يوم من الزراعة في وسط MS المحتوي على ٥ ملغم/لتر لكل من BA و IAA إذ أظهرت الأوراق الفلقية استجابة بنسبة ٦٧.٥% مع ازدياد معدل تكوين الأفرع الخضرية في الكالس المشتق منها إلى ٢.٠٣ فرع/قطعة، بينما أعطى كالس الأوراق أعلى استجابة بلغت ٧٧.٥% ووصل معدل عدد الأفرع الخضرية في كالس القطع المستجيبة إلى ١.٧١ فرع لكل قطعة (الجدول ٢)، في حين أظهر كالس قطع السيقان انخفاضاً معنوياً في نسبة استجابته ومعدل تكوينه للأفرع الخضرية بلغ ٢٣.٨% و ١.١٠ على التوالي.

ولوحظ سرعة نمو وتطور الأفرع الخضرية لكالس الأوراق الفلقية والأوراق بعد أربعة أسابيع من ظهورها، كما لوحظ أن نقل كالس الأوراق في بداية نشوء الأفرع إلى وسط التمايز المدعم بإضافة ١٠ ملغم/لتر من الجبرلين GA₃ بوجود ٥ ملغم/لتر BA و IAA بتركيز ٣ ملغم/لتر أدى إلى ازدياد عدد الأفرع الخضرية ليبلغ ٤-٦ فرع/قطعة (الشكل ١- هـ). ونجحت الأفرع الخضرية الناتجة من الكالس من تكوين مجاميع جذرية جيدة في وسط MS الخالي من منظمات النمو، واستلزم تجذيرها ٨ أيام فيه، وانخفضت هذه المدة إلى ٦ أيام باستخدام وسط MS الحاوي ٠.٥ ملغم/لتر من NAA والذي شجع بدوره زيادة عدد الجذور (الشكل ١- ح) وارتفاع نسبة التجذير إلى ١٠٠%.

أقلمة النباتات الناتجة من الكالس للنمو في التربة: أوضحت النتائج وجود بعض الصعوبات في أقلمة النباتات الصغيرة للظروف الجديدة والتي أدت إلى موت بعضها بعد يوم أو يومين من زراعتها في التربة، وأمكن التحكم بهذه الحالة باستخدام التربة المعقمة والمغسولة جيداً بالماء المعقم ثم إزالة بقايا الكالس والوسط الغذائي العالق في قواعد الأفرع المجذرة، فضلاً عن تغطية النباتات بأكياس بلاستيكية شفافة مثقبة لمدة ٧ أيام مما أدى إلى نجاح أقلمتها وبنسبة تأقلم ٦٥.٠% للنباتات الناتجة من كالس الأوراق الفلقية و ٧٦.٣% للنباتات الناتجة من كالس الأوراق.

مقارنة الفروقات المظهرية بين النباتات الناتجة من الكالس والنباتات البذرية: امتازت النباتات الناتجة من الكالس (الشكل ٢- أ) بقابلية نمو جيدة بعد نجاح أقلمتها في التربة وترتب عنه تفوقها في زيادة ارتفاع النبات وعدد سلامياته وأوراقه مقارنة بنظيراتها من النباتات الناتجة من البذور (الشكل ٢- ب).

(ب)، فقد ظهرت التفرعات عليها بعد ٤٠ يوماً من نقلها إلى التربة بينما تأخر ظهور الأفرع في النباتات البذرية لأكثر من ٧٠ يوماً وازداد طول هذه الأفرع خلال مرحلة النمو الخضري ليصل إلى ١١ سم بعد ثلاثة أشهر بينما كان طولها ٣ سم في النباتات البذرية بنفس العمر (الجدول ٣).

الجدول (٢): التكوين المباشر للأفرع الخضريّة بمرحلة واحدة من كالس الأوراق الفلجية والأوراق والسيقان لنباتات القديفة *Tagetes patula* في وسط MS الصلب المدعم به ملغم/لتر لكل

من IAA و BA

مصدر الكالس	العدد الكلي للقطع المستخدمة	العدد الكلي للقطع المستجيبة	القطع المستجيبة (%)	العدد الكلي للأفرع المتكونة	معدل عدد الأفرع/ قطعة مستجيبة	مدة نشوء الأفرع (يوم)
الأوراق الفلجية*	٨٠	٥٤ ب	٦٧.٥ ب	١١٠ أ	٢.٠٣ أ	١٤ أ
الأوراق	٨٠	٦٢ أ	٧٧.٥ أ	١٠٦ أ	١.٧١ أ	١٤ أ
السيقان	٨٠	١٩ ج	٢٣.٨ أ	٢١ ب	١.١٠ ب	١٨ ب

* شملت المقارنة الأوراق الفلجية، والأوراق، والسيقان على وسط MS خالي من منظمات النمو ولم تظهر أية استجابة. المعدلات المشتركة بنفس الأحرف في كل عمود لا تختلف معنوياً حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية ٥%.

الجدول (٣): مقارنة الصفات المظهرية بين مجموعة من نباتات القديفة *Tagetes patula* الناتجة من الكالس وأخرى من النباتات الناتجة من البذور في مرحلتَي النمو الخضري والزهرى.

الصفات المظهرية		مرحلة النمو الخضري (٣) شهر		مرحلة النمو الزهري (٦) شهر	
		النباتات الناتجة من الكالس	النباتات البذرية	النباتات الناتجة من الكالس	النباتات البذرية
طول النبات (سم)	١٨.٠ أ	١٤.٠ ب	١٤.٠ ب	٦٧.٦ أ	٦٧.٦ أ
عدد السلاميات	١٥.٠ أ	٩.٠ ب	٩.٠ ب	٣٥.٠ أ	٣٥.٠ أ
عدد الأوراق	٤٧.٠ أ	٢٦.٠ ب	٢٦.٠ ب	١٦٨.٠ أ	١٦٨.٠ أ
عدد الوريقات/ ورقة مركبة	١٧.٠ أ	١٥.٠ ب	١٥.٠ ب	١٩.٦ أ	١٩.٦ أ
عدد الأفرع / نبات	١.٦ أ	١.٣ أ	١.٣ أ	٢٤.٦ أ	٢٤.٦ أ
طول الأفرع (سم)	١١.٠ أ	٣.٠ ب	٣.٠ ب	٩.٦ أ	٩.٦ أ
المدة اللازمة لظهور أول فرع (يوم)	٤٠.٠ أ	٧٢.٠ ب	٧٢.٠ ب	٧٢.٠ ب	٧٢.٠ ب
المدة لتفتح الزهرة بعد ظهورها (يوم)	-	-	-	١٣.٠ ب	١٣.٠ ب
عدد الأزهار الكلية / نبات	-	-	-	٢١.٠ أ	٢١.٠ أ
قطر الزهرة (سم)	-	-	-	٣.٢ أ	٣.٢ أ
طول الزهرة مع الحامل الزهري (سم)	-	-	-	٨.٨ أ	٨.٨ أ
عدد البذور/ زهرة	-	-	-	٦٧.٠ أ	٦٧.٠ أ

المعدلات المشتركة بنفس الأحرف لكل صفة في كل مرحلة لا تختلف معنوياً حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية ٥%.

ولوحظ بتقدم عمر النباتات اختفاء الكثير من الفروق المظهرية بين مجموعتي النباتات، فعند بلوغها خمسة أشهر من عمرها تباينت صفاتها المظهرية بشكل كبير حيث تفوقت النباتات البذرية كثيراً في معظم الصفات المدروسة فيما أظهرت النباتات الناتجة من الكالس تغيرات مظهرية تمثلت باختزال هذه الصفات بشكل معنوي في نموها الخضري والزهرى فظهرت متقدمة (الشكل ٢- ج) مقارنة بالنباتات البذرية (الشكل ٢- د) والتي تغلبت في أطوالها وعدد أوراقها المركبة وعدد أفرعها الذي تضاعف ليصل إلى ٢٤ فرع في مرحلة الأزهار (الجدول ٣). ولم تتكشف الأزهار عن فروق في لون الزهرة الذي امتاز بكونه أحمر مطرز باللون الأصفر في الأوراق التوجيهية وسط الزهرة في كلا المجموعتين ولكن اختزلت المدة اللازمة لتفتح الزهرة بعد ظهورها معنوياً من ١٣ يوم في النباتات البذرية إلى ١٠ أيام في النباتات الناتجة من الكالس، واختزل حجم الأزهار المتمثل بقطر الزهرة وطولها إلى ٢.٥ و ٤.٨ سم، على التوالي في النباتات الناتجة من الكالس (الشكل ٢- هـ) مقارنة

بقطر ٣.٢ سم وطول ٨.٨ سم في النباتات البذرية (الشكل ٢- و) وانعكس ذلك الانخفاض على عدد وحجم البذور في النباتات الناتجة من الكالس مقارنة بالنباتات البذرية .
إن القابلية العالية لكالس الأوراق الفلقية وأوراق القديفة على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية والجذور بمرحلة واحدة One step regeneration في هذه الدراسة يماثل ما حصل في أنواع أخرى من القديفة، فقد لحظت بعض الدراسات حدوث التمايز المباشر لكالس أوراق نباتات القديفة نوع *T. erecta* و *patula* (Ketel وآخرون ، ١٩٨٥) والقديفة نوع *T. minuta* (Mohamed وآخرون، ٢٠٠٠) وكذلك في القديفة *T. erecta* (Misra و Datta، ٢٠٠١)، وقد ذكرت هذه الدراسات أن سبب تفوق كالس الأوراق على التمايز قد يعزى إلى تأثيره بالتركيب الوراثي لهذه الأنواع مقترناً بنوع ومستوى منظمات النمو المضافة وبمصدر الجزء النباتي وعمره الفسلجي، وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن قطع الأوراق المأخوذة من بادرات بعمر أكثر من شهر تطلب وجود ٣ ملغم/لتر من IAA مع BA لتمايز الكالس المشتق منها بينما احتاجت القطع المستأصلة من بادرات فنية إلى ٥ ملغم/لتر من IAA، وأوضحت بعض الدراسات أهمية نوع وسط التمايز، فقد لاحظ Ketel (١٩٨٦) أن القديفة *T. erecta* أظهرت تمايزاً بنسبة ٦٣% على وسط Hoagland بينما اظهر هذا النوع والأنواع الأخرى *T. patula* و *T. minuta* تمايزاً محدوداً في جميع أوساط التمايز المختبرة الأخرى .

إن التغيرات الجسمية Somaclonal variations التي لحظت في نباتات القديفة الناتجة من الكالس في الدراسة الحالية تمثلت بقصر المدة اللازمة لظهور الأفرع الخضرية وتفتح ألنوره الزهرية مع اختزال العديد من الخصائص المظهرية خلال نموها في الحقل لمدة ٦ أشهر لاسيما أطوال النباتات وحجم ألنوره الزهرية، وقد أشارت بعض الدراسات إلى حصول تغيرات جسمية مماثلة في نباتات القديفة نوع *T. erecta* الناتجة من الكالس متمثلة أيضاً بقصر المدة اللازمة لظهور النورات الزهرية وتفتحها مع اختزال طول وقطر ألنوره الزهرية (Misra و Datta، ٢٠٠١). وكذلك التغيرات التي ظهرت في نباتات الاستر *Aster cardifolius* الناتجة من الزراعة النسيجية كاختلاف حجم وشكل النورات الزهرية وتغير لونها من الأبيض إلى الوردي مع تغيرات في عدد الكروموسومات (Cammareri وآخرون، ٢٠٠٢). لقد أشارت إحدى الدراسات Larkin و Scowcroft (١٩٨١) إلى أهمية التغيرات الجسمية والجينية والتي تحصل في النباتات المتميزة من أي شكل للمزارع النسيجية أثناء مسارها المتعاقب في الأوساط الغذائية وغالباً ما تكون هذه التغيرات قابلة للتوريث وأحياناً تكون مشابهة لتلك التغيرات الحاصلة في النباتات المتميزة من خلايا معرضة لعوامل مطفرة، وإن قسماً منها ثابتة لحصولها في المستوى الكروموسومي نتيجة لعمليات النقل والتضمين والتضاعف والعبور في الحامض النووي (DNA) والتي قد تحصل عند إعادة انتظام الكروموسومات (Jain، ٢٠٠١). وتتأثر التغيرات الجسمية بعدة عوامل منها ما يتعلق بمصدر المادة النباتية والنمط الجيني للنبات ونوع القطعة المزروعة والتجمع الخلوي فيها وعدد مرات الإدامة ووسط الزراعة خاصة منظمات النمو المضافة التي ترتبط بشدة مع قوة التكوين الجنيني Embryogenic potential للقطع النباتية من خلال تغييرها لمحتوى الهرمونات الداخلي مؤدية إلى تغيرات مظهرية مختلفة (Ivanova وآخرون، ١٩٩٤) منها ارتفاع النبات وطول الأفرع وعددها ونوعية الأزهار ولونها والإنتاج والتناسق ومقاومة الأمراض وتحمل الظروف البيئية وغيرها من التغيرات المظهرية كفقْدان الزغب أو ظهوره وتغير شكل الورقة والتقزم وفقدان الصبغة (Hammerschlag، ١٩٩٢).

لقد استغلّت ظاهرة التغيرات الجسمية القابلة للتوريث في تربية وتحسين النباتات وساعدت في انتخاب النباتات المتميزة وإكثارها لإنتاج سلالات ذات صفات مرغوبة خاصة المتعلقة بإنتاج المواد ذات الأهمية الطبية والاقتصادية (Hartmann وآخرون ، ١٩٩٠)، كما أفادت هذه الظاهرة في الحصول على النباتات المتحملة للظروف البيئية والمقاومة للأمراض، فقد أمكن إنتاج نباتات قصب السكر

بمحتوى عالٍ من السكريات ومقاومة لمرض التبقع وإنتاج نباتات البطاطا المقاومة للآفات الزراعية (Evans، ١٩٨٩) .

الشكل (٢) مقارنة الصفات المظهرية بين نباتات القديفة *Tagetes patula* الناتجة من الكالس والنباتات الناتجة من البذور.

(أ) نبات قديفة ناتج من كالس الأوراق بعد أربعة أسابيع من نقله إلى التربة.
(ب) نبات القديفة البذري بعمر أربعة أسابيع نامي في التربة.

(ج) نبات ناتج من كالس الأوراق بعمر ستة أشهر في مرحلة الأزهار.

(د) نبات بذري بعمر ستة أشهر في مرحلة الأزهار.
(هـ) أزهار ذات لون احمر مطرز بالأصفر من نباتات القديفة الناتجة من كالس الأوراق بعمر ستة أشهر.
(و) أزهار حمراء مطرزة بالأصفر من نباتات القديفة البذرية بعمر ستة أشهر.

FORMATION OF *Tagetes patula* L. PLANTS BY TISSUE CULTURE

Kasim M. Al- Hamdani

Ammar O. Al- Atrakchii

Mozahim K. Al-Mallah

Dept. of Field Crops

Dept. of Horticulture

Dept. of Biology

College of Agric. and Forestry, Mosul Univ., Iraq

College of Education

ABSTRACT

The present study succeeded in the initiation of callus from different explants of axenic *Tagetes patula* Marigold seedlings using Murashige and Skoog medium MS supplemented with 5 mg/L benzyladenine BA and 0.5 mg/l naphthalene acetic acid NAA or with 0.05 mg/L 2,4-dichlorophenoxy acetic acid 2,4-D alone or together with indole acetic acid IAA 5 mg/l. The results confirmed the differentiation capability of callus to produce plants in agar solidified MS medium containing 5 mg/L of BA and IAA. Cotyledons and leaf callus exhibited their spontaneous formation of intact plants in one step. Also *Tagetes* plants were produced from differentiated of other cultures of cotyledons and leaf callus in agar solidified MS medium containing 10 mg/L of gibberellic acid GA₃ and 3 mg/L of IAA with 5 mg/L of BA. The produced plants were readily rooted, and subsequently were adapted to the environmental conditions through transplanting them in soil. These plants showed Somaclonal variations including plants height, number of leaves, branching system with

reduction of flower size and their pedicle length as well as number of seeds, but flowers kept their red color.

المصادر

- الراوي ، خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله (١٩٨٠). تصميم وتحليل التجارب الزراعية ، مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل .
- سعد، شكري إبراهيم(١٩٧٥).تصنيف النباتات الزهرية. الهيئة المصرية العامة للكتاب. فرع الإسكندرية.
- محمد، عبدالعظيم كاظم (١٩٨٥). علم فسلجة النبات. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.
- Camareri, M. ; A. Errico ; E. Filippin ; S. Esposito and C. Conicella, (2002). Induction of variability in Chimeric *Aster cordifolius* 'white Elegans' through Somaclonal variations. Euphytica. 128:19-25.
- Evans, D.A. (1989). Somaclonal variation-genetic basis and breeding applications. Trends in Genet. 5:46-50.
- Gilman, E.F. (1999). *Tagetes patula*-French Marigold. Institutes of Food and Agricultural Sciences. Fact sheet FPS-571, EDIS Web sit at <http://edis.ifas.uft.edu>.
- Hammerschlag, F.A. (1992). Somaclonal variation. In: Hammerschlag, F.A. and Litz, R.E. (eds.). Biotechnology of Perennial Fruit Crops. C.A.B. International. U.K. PP. 35-56.
- Hartmann, H.T.; D.E. Kester and F.T. Davies (1990). Plant Propagation, Principles And Practices. 5th Ed. Prentice Hall Inter Limited, London. U.K.
- Ivanova, A.; M. Velcheva; P. Denchev; A. Atanssov and A. Van. Onklelen (1994). Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago spp*. Physiol. Plant. 92:85-89.
- Jain, S.M. (2001). Tissue culture-derived variations in crop improvement. Euphytica. 118:153-166.
- Kessler, J.R. (2004). Greenhouse Production of Marigolds. ACES Publication.
- Ketel, D.H. (1986). Morphological differentiation and occurrence of thiophenes in leaf callus cultures from *Tagetes* species: Relation to the growth medium of the plants. Physiol. Plant. 66:392-396.
- Ketel, D.H.; H. Breteler and B. de Groot (1985). Effect of explants origin on growth and differentiation of calli from *Tagetes* species. J. plant physiol. 118:327-333.
- Larkin, p. and W. Scowcroft (1981). Somaclonal variations a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60:197-214.
- Margl, L.; A. Tei; I. Gyurjan and M. Wink (2002). GLC and GLC-MS analysis of thiophenes derivatives in plants and in *In vitro* cultures of *Tagetes patula* (Asteraceae). Z Naturforsch. 57: 63-71.
- Misra, P. and S.K. Datta (2001). Direct differentiation of shoot buds in leaf segments of white marigold (*Tagetes erecta* L.). *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant. 37:466-470.
- Mohamed, M.A.H.; P.J.C. Harris and J. Henderson (2000). *In vitro* selection and characterization of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. Plant Sci. 159:213-222.

- Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Vasudevan, P.; S. Kashyap and S. Sharma (1997). *Tagetes*: A Multipurpose Plant. *Bioresearch Techno.* 62: 29-35.