انتاج نباتات الهيل *Elettaria cardamomum* Maton. بمرحلة واحدة من الاجنة المحفزة خارج الجسم الحي

عبد الله نجم النعيمي وجدان عباس سليمان النائب
كلية التربية/ قسم علوم الحياة / جامعة الموصل وزارة العلوم والتكنولوجيا /العراق

الخلاصة

أستخدمت بذور الهيل *Elettaria cardamomum* Maton. المحفزة اجنتها باوساط تحفيز مختلفة، وكان أفضلها في الإكثار الدقيق وسط التحفيز 2,4-D+MS ٠.٥ ملغم/لتر لفترة٢٠يوماً اذ كونت كالس عند نقلها الى وسط الاستحداث BA+MS ٤.٠ملغم/لتر+NAA ١.٠ملغم/لتر والذي تمايز إلى نباتات كاملة بمرحلة واحدة بنسبة ٧٥% وبلغ عددها ٥٤ نباتاً بمعدل ١٨نباتاً/قطعة كالس بعد ٢١٠ يوماً من الزراعة. كذلك اظهرت البذور المحفزة اجنتها في وسط التحفيز2,4-D+MS ٢٥.٠ملغم/لتر لفترة٢٠ يوماً والنامية على وسط الاستحداث BA+MS ٢.٥ ملغم/لتر+NAA ١.٠ملغم/لتر قابلية لتكوين كالس الاجنة الذي تمايز هو الاخر الى نباتات كاملة بمرحلة واحدة تميزت بالتبكيّر مقارنة بالوسط السابق، بلغ عددها ٤٥ نباتاً بمعدل ١٥ نباتاً/قطعة كالس بعد٢١٠ يوماً من الزراعة وبلغت نسبة استجابة قطع الكالس للتمايز ٦٠%. وانتجت مزارع كالس اجنة بذور الهيل المحفزة بوسط التحفيزMS+ 2,4-D ٢٠.٠ ملغم/لتر لفترة ٢٠ يوماً والنامية على وسط الاستحداث BA+MS ١.٥ملغم/لتر+2,4-D ١.٠ ملغم/لتر بعد ٥٢ يوماً من الزراعة وبنسبة ٥٠% وقد اعطى اعلى معدل للوزن الطري ٢.٧٦غم بعد ١٢٠ يوماً من الزراعة، وتم اقلمة جميع النباتات الناتجة من كالس الاجنة وبنجاح بعد تقسيتها.

المقدمة

الهيل *Elettaria cardamomum* Maton. نبات عشبي معمر (Ağaoğlu واخرون،٢٠٠٦) من ذوات الفلقة الواحدة (Islam،٢٠٠٤) ينتمي الى العائلة الزنجبيلية Zingiberaceae (Jamal واخرون، ٢٠٠٦) ينمو في الظل ويحتاج رطوبة ثابتة وحرارة بحدود ٢٢ْم ويتضررفي درجات الحرارة المنخفضة١٠ْم، ينمو في غابات الامطارالاستوائية ويحتاج مدارات دافئة لتكوين البذور(Stuchey، ١٩٩٩وChristma ،٢٠٠٦)،تحوي بذوره زيوتاً طيارة وهي المادة المرغوبة جداً تجارياً(Sarathkumara واخرون١٩٨٥، Parthasarathy, ٢٠٠٥) ثمنها باهض وهي التي تسبب الرائحة المميزة للهيل(Grieve، ٢٠٠٦) وقد جرت دراسات قليلة في مجال الزراعة النسيجية والإكثار الدقيق لنباتات العائلة الزنجبيلية خاصة الهيل بالرغم من اهميته الطبية والاقتصادية، وتمكنت احدى الدراسات من الحصول على افرع خضرية من براعم رايزومات نباتات الهيل الحبشي *Aframomum corrorima* عند زراعتها على وسط (MS) (Murashige و Skoog، ١٩٦٢) الصلب المجهز بتراكيز من Thidiazuron (TDZ) متداخلاً مع Benzyl adenine (BA) أوImazalil (IMA) أو Paclobutraz (PBZ) (Tefera وWannakrairoj ،٢٠٠٦).

ان هدف هذه الدراسة الحصول على نباتات كاملة وباعداد كبيرة مشابهة للام باستخدام تقنية الزراعة النسيجية للاجنة واختصار الزمن.

مواد البحث وطرائقه

الاوساط الغذائية: حُضر الوسط الغذائي MS الصلب مختبرياً وأُضيف اليه ٣٠ غم سكروز، وعُدل الاس الهيدروجيني pH في حدود٥.٧ صُلب الوسط بإضافة ٨غم من الآكار/لتر، ثم عُقم بجهاز المعقام Autoclave لفترة ٢٠ دقيقة،واستخدم اما باضافة تراكيز مختلفة من منظمات النمو او بدون منظمات نمو.

تعقيم البذور: تم الحصول على بذور نباتات الهيل *E. cardamomum* M. من السوق المحلية في مدينة الموصل والمستوردة من شركة ®Del-Tropico، والتي عُقمت بغمرها بمحلول الكحول الاثيلي تركيز ٩٦% لفترة دقيقتين مع التحريك المستمر ثم نُقلت الى محلول القاصر التجاري (هايبوكلورايت الصوديوم)

مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني ٢٠٠٨
تاريخ تسلم البحث ٢٠١٠/٦/٢٠ وقبوله ٢٠١٠/١٠/٤

NaOCl بتركيز ٦% المخفف بالماء المقطر بنسبة ١:١ (حجم:حجم) لفترة خمس دقائق، ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات (٥ دقائق/مرة)، تمت كافة عمليات الزراعة تحت ظروف معقمة.

تحفيز الاجنة واستحداث الكالس منها وتمايزه

أ- تحفيز الاجنة:زُرعت البذورالمعقمة سطحياً على اوساط تحفيز الاجنة MS الصلبة المجهزة بتراكيز عالية من 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ٣٠,٢٠و٤٠ و٥٠ ملغم/لتر، وحُضنت في غرفة التنمية في ظروف الظلام التام بدرجة حرارة ٢٥ ± ٢ْم، لفترة ٤٠و٣٠و٢٠ و٥٠ يوماً لكل منها، ثم نُقلت بعدها الى وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو، وحُضنت في الظروف السابقة نفسها.

ب- استحداث كالس الاجنة وتمايزه

زراعة البذور المحفزة اجنتها على اوساط الاستحداث المجهزة بـ BA مع 2,4-D:على ضوء الفقرة السابقة (أ) أنتخبت اوساط التحفيز المجهزة بـ 2,4-D بالتراكيز ٣٠و ٢٠ ملغم/لتر لتحفيزالاجنة اذ زُرعت عليها البذور المعقمة سطحياً وحُضنت العينات في غرفة التنمية في الظروف السابقة المذكورة في الفقرة (أ) ولنفس الفترات الزمنية في ثم نقلت الى أوساط استحداث الكالس MS الصلبة المجهزة بتراكيز مختلفة من BA ٠.٥و١.٠و٢.٠و٢.٥و٣.٠و٣.٥ و٤.٠ملغم/لتر متداخلة مع١.٠ملغم/ لتر 2,4-D وكذلك ٣.٠و٤.٠ ملغم/لتر من BA متداخل مع ١.٥ملغم/ لتر 2,4-D وحُضنت العينات في غرفة التنمية في الظروف السابقة نفسها.

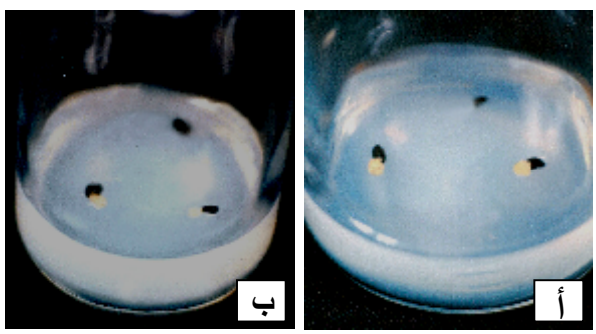
زراعة البذور المحفزة اجنتها على اوساط الاستحداث المجهزة بـ BA مع NAA: زَرعت البذور المعقمة سطحياً على اوساط تحفيز الاجنة MS الصلبة المجهزة بتراكيز اخرى من 2,4-D ٥و١٠ و٢٥ و٣٠ ملغم/لتر، وحُضنت العينات في غرفة التنمية في الظروف السابقة المذكورة في الفقرة (أ) ولنفس الفترات الزمنية، ثم نُقلت الى أوساط الاستحداث MS الصلبة المجهزة بتراكيز من BA ١.٥ و٢.٠ و٢.٥ و ٣.٠و٣.٥و٤.٠ ملغم/لتر متداخلة مع ١.٠ملغم/لتر NAA، كذلك ٣.٠ و٤.٠ ملغم/لتر من BA متداخل مع ١.٥ ملغم/لتر NAA وحُضنت العينات في غرفة التنمية في الظروف السابقة نفسها ثم بعد ظهور الافرع الخضرية نقلت الى ظروف الضوء ١٦ساعة والظلام ٨ساعات.

تقدير الوزن الطري لكالس الاجنة المحفزة : قُدر الوزن الطري لانواع الكالس بعد مرور ٩٠و ١٢٠يوما من الزراعة، وتم الوزن في جو تام التعقيم بوضع قطع الكالس في اطباق بتري معقمة.

النتائج والمناقشة

تحفيز الاجنة واستحداث الكالس منها وتمايزه

أ- تحفيز الاجنة:اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان افضل فترة زمنية لتحفيز اجنة بذور الهيل هي ٢٠ يوماً



الشكل (١) اجنة بذور الهيل المحفزة باوساط التحفيز أ، ب والنامية على وسط MSO بعد ١٢٠ يوماً من الزراعة.

أ – وسط MS + 2,4-D ٢٠.٠ ملغم/ لتر

ب - وسط MS + 2,4-D ٣٠.٠ ملغم/ لتر

وافضل وسط هو وسط التحفيز MS+2,4-D ٢٠.٠ ملغم/لتر الذي شجع استحداث الكالس بعد نقل الاجنة المحفزة الى وسط MSO الصلب، اذ يعتبر 2,4-D أكثر الاوكسينات فعالية في استحداث ونمو الكالس

(Roy وDe، ١٩٩٠)، وقد بدأ استحداث الكالس بعد ٤٩ يوماً من الزراعة وكانت نسبة الاستحداث٥٨.٣% والذي تميز بقوامه الهش ولونه الابيض ونموه الضعيف وكميته القليلة اذ بلغ معدل الوزن الطري ٠.٤غم بعد ١٢٠ يوماً من الزراعة (الشكل١. أ)، كذلك شجع وسط التحفيزMS+2,4-D ٣٠.٠ ملغم/لتر لاستحداث كالس الاجنة ولكن بكمية اقل ٠.٢غم مقارنة بالوسط السابق بعد نقل الاجنة المحفزة الى وسط MSO الصلب وبنسبة لاستحداث بلغت٢٥%، بعد مرور ٥٨ يوماً من الزراعة، وتميز كذلك بقوامه الهش ولونه الابيض ونموه الضعيف حتى بعد مرور١٢٠ يوماً من الزراعة (الشكل١ب)، في حين لوحظ ان الاوساط المجهزة بتراكيز عالية من 2,4-D ٤٠ و٥٠ ملغم/لتر لم تحفز الاجنة على استحداث الكالس منها، اذ ربما يعزى السبب في ذلك إلى أن 2,4-D خاصة في التراكيز العالية منه يثبط بقوة تكوين الكالس (Staba، ١٩٨٢).

ب- استحداث كالس الاجنة وتمايزه

زراعة البذور المحفزة اجنتها على اوساط الاستحداث المجهزة بـ BA مع 2,4-D : أظهرت نتائج الجدول (١) ان تداخل BA مع 2,4-D شجع استحداث الكالس من الاجنة المحفزة في الوسط المجهز بـ ٢٠.٠ملغم/لتر 2,4-D عند نقلها الى وسط الاستحداث BA+MS ١.٥ملغم/لتر+ 2,4-D ١.٠ملغم/لتر في

الجدول (١) : تحفيز نمو اجنة بذور الهيل على وسطي التحفيز[MS + 2,4-D(٢٠.٠او٣٠.٠) ملغم/لتر] واستحداث كالسها على اوساط الاستحداث MS الصلبة المجهزة بتراكيز متباينة من BA مع 2,4-D بعد مرور٩٠ و١٢٠ يوماً من الزراعة.

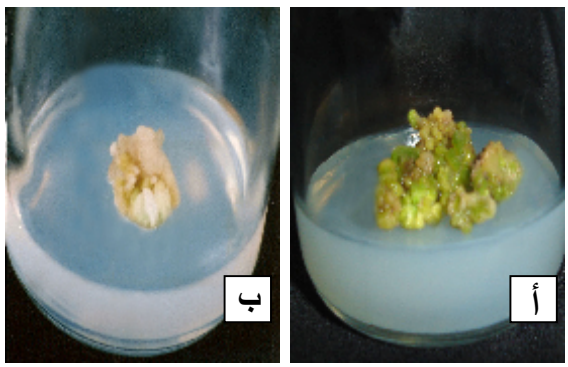
اوساط التحفيز		2,4-D (ملغم/لتر)							
		٢٠			٣٠				
اوساط الاستحداث		فترة الزراعة (يـوم)							
		٩٠			١٢٠	٩٠			١٢٠
BA	2,4-D (ملغم / لتر)	بدء الاستحداث (يـوم)	الاستحداث *(%)	معدل الوزن الطري للكالس (غم)	معدل الوزن الطري للكالس (غم)	بدء الاستحداث (يـوم)	الاستحداث *(%)	معدل الوزن الطري للكالس (غم)	معدل الوزن الطري للكالس (غم)
٠.٠	٠.٠	٦٩	٢٥	٠.١٨	٠.٢٠	٥٧	١٦.٦	٠.١٦	٠.٢٠
١.٠	١.٥	٥٢	٥٠	٠.٩٥	٢.٧٦	٥٠	٤١.٧	٠.٣٤	٠.٣٨
١.٠	٢.٠	٧٢	٢٥	٠.٣٣	٠.٤١	٥٩	٣٣.٣	٠.١٧	٠.٢٥
١.٠	٢.٥	٥٣	١٦.٦	٠.١٢	٠.١٧	٣٣	٣٣.٣	٠.١١	٠.١٦
١.٠	٣.٠	٥٣	٣٣.٣	٠.٢٥	٠.٣٩	٨٨	٤١.٧	٠.٢٩	٠.٨١
١.٠	٣.٥	٥٥	١٦.٦	٠.٣٠	٠.٤١	٥١	٤١.٧	١.٣٤	١.٤٩
١.٠	٤.٠	٥٤	٤١.٧	٠.٠٨	٠.١٦	٤٥	٢٥	٠.٦٦	٠.٩٥
١.٥	٣.٥	٦١	٣٣.٣	٠.١١	٠.١٩	٦٠	٢٥	٠.٨٤	٠.٣٨
١.٥	٤.٠	٨٧	٤١.٧	٠.٠٣	٠.١٠	٥٩	٣٣.٣	٠.٢٠	٠.٧٨

* عدد المكررات ١٢ بذرة / وسط

قل فترة زمنية لبدء الاستحداث ٥٢ يوما وبنسبة ٥٠%، كما اعطى اعلى معدل للوزن الطري اذ بلغ ٢.٧٦غم بعد ١٢٠ يوماً من الزراعة ربما يعود السبب في ذلك إلى التوازن بين هرمونات النمو الداخلية ونوع وتركيزمظمات النمو المضافة (Acquaah، ٢٠٠٤) وتميز الكالس بقوامه المتماسك ولونه الاخضر الزاهي (الشكل ٢.ب), ومن الجدير بالذكر استمرار نمو هذا الكالس لاكثر من سنة.

كذلك اظهرت نتائج الجدول(١) ان تحفيز الاجنة بـ ٣٠ ملغم/لترD-2,4 ثم نقلها الى اوساط الاستحداث، اعطت اعلى نسبة لاستحداث ٤١.٧% بعد٥١ يوماً من الزراعة على وسط BA+MS

٣.٥ملغم/لتر+ 2,4-D ١.٠ملغم/لتر، وافضل نمو اذ بلغ معدل الوزن الطري ١.٤٩غم بعد ١٢٠ يوماً من الزراعة وتميز بقوامه المتماسك ولونه الكريمي الفاتح (الشكل٢. ب). لم تشجع هذه الاوساط على تمايز هذا الكالس إلى افرع خضرية أو جذور، من المحتمل أن طول فترة بقاء الكالس على الأوساط الغذائية المجهزة بـ 2,4-D أضعف قدرته على التمايز (Reinert وBacks،١٩٦٨)، ويعتقد أن 2,4-D يثبط بلوغ الأجنة من خلال إنتاج الاثيلين داخل الأنسجة إذ أن التراكيز العالية من الاثيلين تؤدي إلى زيادة فعالية أنزيم الـ Cellulase أوالـ Pectinase او كلاهما مما يسبب تحطم الكتل الجنينية قبل أن تنشأ القطبية في الأجنة الأولية، وهذه القطبية ضرورية لكي يحدث التطور اللاحق للأجنة (سلمان، ١٩٨٨).



الشكل (٢) زراعة بذور الهيل المحفزة اجنتها على اوساط مجهزة بـ BA مع 2,4-D واستحداث الكالس منها بعد ١٢٠ يوماً من الزراعة.
أ - اجنة البذور المحفزة بالوسط MS + 2,4-D ٢٠.٠ ملغم/ لتر والنامية على وسط MS+BA ١.٥ملغم/لتر + 2,4-D ١.٠ ملغم/لتر.
ب- أجنة البذور المحفزة بالوسط MS + 2,4-D ٣٠.٠ ملغم/ لتر والنامية على وسط MS+ BA ٣.٥ملغم/لتر+ 2,4-D ١.٠ملغم/لتر.

زراعة البذور المحفزة اجنتها على اوساط الاستحداث المجهزة بـ BA مع NAA :

1- اجنة البذور المحفزة بالوسط MS + 2,4-D ٥.٠ ملغم/ لتر: بينت نتائج الجدول(٢) ان استخدام ٥.٠ ملغم/ لتر 2,4-D لتحفيز الاجنة شجع استحداث الكالس منها عند نقلها الى اوساط الاستحداث المجهزة بـ BA مع NAA وخاصة وسط MS+BA ٤.٠ ملغم/ لتر+NAA ١.٥ ملغم/ لتر بعد ٤٨ يوماً من الزراعة وبنسبة استحداث بلغت ٣٣.٣% والذي اعطى افضل نمو اذ بلغ معدل الوزن الطري ١.٣٢غم بعد مرور ٩٠ يوما من الزراعة وتميز الكالس بقوامه الهش ولونه الكريمي ولكن بعد مرور ١٠٨ يوما من الزراعة ضمن فترة ١٢٠ يوماً توقف عن النمو مع تناقص وزنه الى١.٠١ وتغير قوامه ولونه اذ اصبح متماسك كريمي غامق، كذلك لوحظ ان وسط MS الصلب المجهز بـ BA ٤.٠ ملغم/ لتر+ NAA ١.٠ ملغم/ لتر اعطى افس نسبة الاستحداث للوسط السابق بعد ٤٠ يوماً من الزراعة وبلغ معدل وزنه الطري ١.٠٠غم بعد مرور ١٢٠ يوماً من الزراعة وتميز بقوامه الهش ولونه الابيض، أما بقية الاوساط فكانت استجابتها لاستحداث الكالس متباينة ما بين ٨.٣%– ٣٣.٣% باستثناء وسط MS الصلب المجهز بـ BA ٣.٥ ملغم/لتر+NAA ١.٠ ملغم/لتر لم يشجع اطلاقاً على استحداث الكالس، في حين ان وسط المقارنة MSO الصلب شجع استحداث كالس الاجنة بنسبة ٣٣.٣% بعد ٤٩ يوماً من الزراعة والذي تميز بقوامه الهش ولونه الابيض ونموه الضعيف بعد مرور ١٢٠ يوماً من الزراعة.

على ضوء نتائج الجدول (٢) اظهرت نتائج الجدول (٣) القدرة العالية لكالس الاجنة للتمايز الى نباتات عند نقلها الى اوساط مجهزة بـ BA مع NAA اذ شجعت وبنسب متباينة على التمايز إلى أفرع خضرية ومن ثم نباتات بمرحلة واحدة على الوسط نفسه ربما يرجح سبب ذلك الى نوع وتركيزمنظمات النمو المستخدمة (Bretagneواخرون،١٩٩٤) خاصة وسط الاستحداث MS+BA ٤.٠ ملغم/لتر+NAA ١.٠ملغم/لتر إذ كونت ٧٥% من قطع الكالس افرعاً خضرية بعد ١٨ يوماً من بدء استحداثه (٥٨ يوماً من بدء الزراعة على وسط الاستحداث)، والتي جذرت على الوسط نفسه لتكون نباتات كاملة بمرحلة واحدة عندما اصبح معدل عمرها ١١٢ يوماً من الزراعة، ومع زيادة فترة النمو كانت عملية التمايز مستمرة وعدد النباتات بتزايد ليصل ٥٤ نباتاً بعد ٢١٠ يوماً من الزراعة بمعدل ١٨ نباتاً/قطعة كالس مستجيبة للتمايز ومن الجدير بالذكر

ان قطع الكالس استمرت بتكوين الافرع الخضرية التي تحولت الى نباتات كاملة على الوسط نفسه ليصل عددها الكلي بعد مرور ٢٧٠ يوماً من الزراعة ١٤١ نباتاً بمعدل ٤٧نباتاً/قطعة

الجدول (٢) : لاستحداث كالس اجنة بذور الهيل المحفزة بالوسط 2,4-D + MS ٥.٠ ملغم/لتر والنامية على اوساط الاستحداث MS الصلبة المجهزة بتراكيز متباينة من BA مع NAA بعد مرور ٩٠ و ١٢٠ يوماً من الزراعة.

فترة الزراعة (يوم)	٩٠			١٢٠
مظلمات النمو (ملغم / لتر)	بدء الاستحداث (يوم)	الاستحداث *(%)	معدل الوزن الطري للكالس (غم)	معدل الوزن الطري للكالس (غم)
NAA BA				
٠.٠ ٠.٠	٤٩	٣٣.٣	٠.٠٨	٠.١١
١.٠ ١.٥	٤٦	١٦.٦	٠.١٤	٠.٢٩
١.٠ ٢.٠	٥١	٢٥	٠.٢٢	٠.٣٠
١.٠ ٢.٥	٤٨	٨.٣	٠.٢٧	٠.٤٤
١.٠ ٣.٠	٥٨	١٦.٦	٠.٠٧	٠.٣٧
١.٠ ٣.٥	-	-	-	-
١.٠ ٤.٠	٤٠	٣٣.٣	٠.٨٠	١.٠٠
١.٥ ٣.٥	٥٤	٣٣.٣	٠.٠٧	٠.٠٩
١.٥ ٤.٠	٤٨	٣٣.٣	١.٣٢	١.٠١

* عدد المكررات ١٢ بذرة / وسط - عدم الاستجابة

الجدول(٣) : نشوء نباتات بمرحلة واحدة من كالس اجنة بذورالهيل المحفزة بالوسط MS +2,4-D ٥.٠ ملغم/لتر والنامية على وسط الاستحداث BA+MS ٠.٤ملغم/لتر+NAA ١.٠ ملغم/لتر بعد مرور ٦٠و ١٢٠و ١٥٠و ٢١٠و ٢٧٠ يوماً من الزراعة.

عدد الاجنة المحفزة المستجيبة لاستحداث الكالس	النسبة المئوية *(%)	عدد قطع كالس الاجنة المستجيبة للتمايز	الفترة الزمنية (يوم)	العدد الكلي للنباتات المتكونة / فترة زمنية
4	٣٣.٣	٣ (٧٥%)	٦٠	٣
			١٢٠	١٢
			١٥٠	١٨
			٢١٠	٢١
مجموع النباتات المتكونة بمرحلة واحدة بعد ٢١٠ يوماً من الزراعة				٥٤ نباتاً
معدل عدد النباتات المتكونة بمرحلة واحدة لكل قطعة كالس بعد ٢١٠يوماً من الزراعة				١٨ نباتاً
مجموع النباتات المتكونة بمرحلة واحدة بعد ٢٧٠ يوماً من الزراعة				١٤١ نباتاً

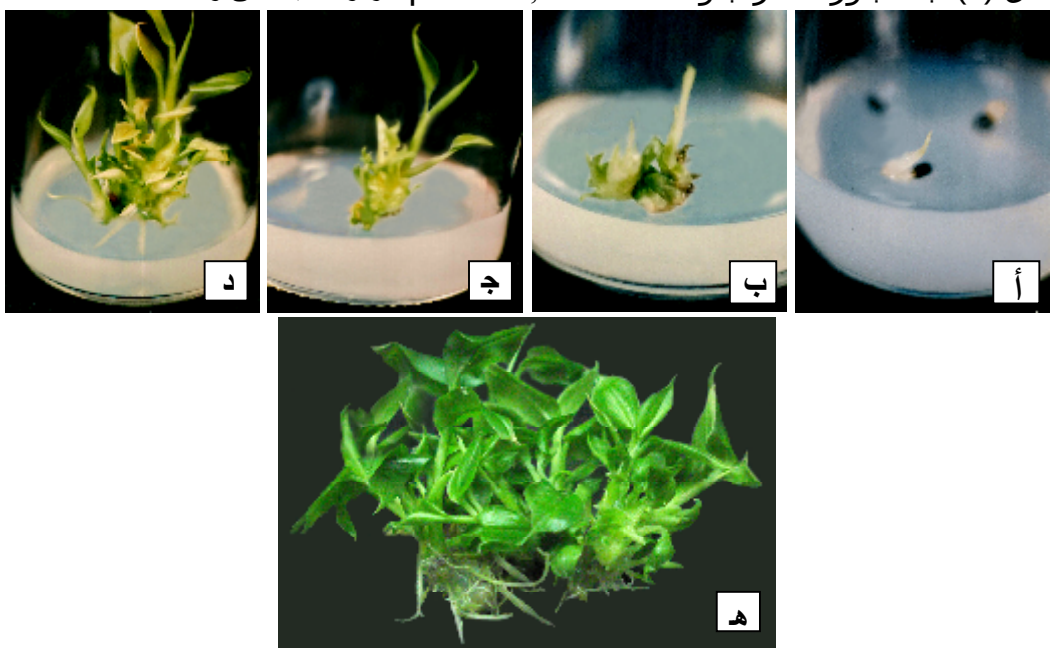
* عدد المكررات ١٢ بذرة / وسط

كالس مستجيبة للتمايز وهذا يؤكد دور الاوكسينات والسايتوكاينينات في اخلاف ونمو الأفرع الخضرية والجذور (Centeno واخرون،١٩٩٦) والموازنة بينهم ضرورية من اجل تحديد اتجاه النمو والتمايز (Bryant وChiatante، ١٩٩٨)، فخلال مراحل عمليات الزراعة النسيجية ابتدأت الاجزاء باستحداث الكالس ولغاية الحصول على نباتات كاملة على الوسط نفسه من خلال التوافق في تغير مستوى الهرمونات النباتية الداخلية بمرورالوقت مع تغير مستوى منظمات النمو في الوسط، إذ أن المحتوى الداخلي من الهرمونات النباتية التي كانت مناسبة لاستحداث الكالس لايبقى محتفظا بنفس المستوى بمرور الوقت وهذا

التغير في النسب أدى إلى التمايز وتكوين نباتات كاملة بمرحلة واحدة وقد يعزى تاثير NAA في عمليات التمايز الى سرعة تحلله في الوسط فيحصل تمايز للكالس(الحديدي،٢٠٠٢)، وتعد ظاهرة تمايز الكالس الى نباتات كاملة على الوسط نفسه ظاهرة مرغوبة في تقنية زراعة الأنسجة من حيث توفير الوقت والجهد والكلفة الاقتصادية وهذا يتفق مع ما توصلت اليه بعض الدراسات النعيمي (١٩٩٧) على التبغ *Nicotiana tabacum*، ويونس (١٩٩٧)على الداتورة *Datura innoxid* وكذلك حياوي (٢٠٠١) على التبغ *Nicotiana tabacum* L.

ويمثل (الشكل٣ .أ وب وج و د و هـ) مراحل تمايز كالس الاجنة على الوسط السابق بعد ٦٠و ١٢٠و ١٥٠و ٢١٠و ٢٧٠ يوماً من الزراعة، كما بينت نتائج الدراسة الحالية ان بقية اوساط الاستحداث المجهزة بتراكيز متباينة من BA مع NAA المذكورة في الجدول (٢) لم تشجع تمايز الكالس وكذلك وسط المقارنة MSO الصلب.

الشكل (٣) أجنة البذور المحفزة بالوسط MS+2,4-D ٥.٠ ملغم/لتر والنامية على وسط الاستحداث MS



+ BA ٤.٠ ملغم/لتر + NAA ١.٠ ملغم/لتر.

أ- بعد ٦٠ يوماً من الزراعة، ب- بعد ١٢٠ يوماً من الزراعة، ج - بعد ١٥٠ يوماً من الزراعة د- بعد ٢١٠ يوماً من الزراعة (لاحظ تحول بعض الأفرع الخضرية إلى نباتات بمرحلة واحدة)، هـ- بعد ٢٧٠ يوماً من الزراعة.

٢- اجنة البذور المحفزة بالوسط MS + 2,4-D ١٠.٠ ملغم/ لتر: من الملاحظة للتجربة ان زراعة بذور الهيل المحفزة اجنتها بوسط التحفيز MS + 2,4-D ١٠.٠ ملغم/لتر، لم يشجعها لاستحداث الكالس في معظم اوساط الاستحداث المجهزة بـ BA مع NAA باستثناء الاوساط المجهزة بـ ٢.٠و ٣.٠و ٤.٠ ملغم/ لتر BA مع ١.٠ ملغم/لتر NAA وكذلك ٤.٠ ملغم/لتر BA مع ١.٥ ملغم/ لتر NAA شجعت تكوين الكالس بنسبة قليلة تراوحت مابين ٨.٣%- ١٦.٦% وبفترات زمنية تراوحت ما بين ٤٨-١٠١يوماً وبكميات قليلة جداً ولم يستمر بالنمو ولم يتمايز، كما اظهرت ان وسط المقارنة MSO الصلب شجع استحداث كالس الاجنة بنسبة ٢٥% بعد ٤٤ يوماً وبكمية قليلة جدا، وتميز الكالس بقوامه الهش ولونه الابيض او الكريمي ونموه الضعيف.

٣- اجنة البذور المحفزة بالوسط MS + 2,4-D ٢٥.٠ ملغم/ لتر: اظهرت نتائج الجدول (٤) ان أفضل نسبة للاستحداث الكالس من اجنة بذور الهيل المحفزة بوسط التحفيز MS+2,4-D ٢٥.٠ ملغم/ لتر، كانت ٤١.٧% على وسط الاستحداث MS +BA ٢.٥ ملغم/ لتر+NAA ١.٠ ملغم/ لتر اذ بدأ استحداث الكالس بعد ٢٤ يوماً من الزراعة، وبلغ معدل وزنه الطري ٣.١٢غم بعد ٩٠ يوماً من الزراعة، وتميز بقوامه الهش ولونه الابيض وبعد ١٢٠ يوماً من الزراعة تناقص معدل وزنه الطري واصبح ٢.٩٩غم كذلك تغير لونه

الى البني، كما اشارت النتائج الى ان زيادة تركيز BA الى ٣.٠ ملغم/لتر مع بقاء مستوى NAA ١.٠ ملغم/لتر شجع هو الاخر استحداث الكالس ولكن بنسبة اقل ٣٣.٣% وفترة طويلة ٣٤ يوماً من الزراعة، وبلغ معدل وزنه الطري ١.٣٩ غم بعد ١٢٠ يوماً من الزراعة وتميز بقوامه الهش وتراوح لونه ما بين الابيض والاخضر الفاتح، كذلك اظهرت النتائج ان بقية الانسجة بضمنها المقارنة شجعت استحداث الكالس بنسب تراوحت بين ٨.٣ % - ٣٣.٣ % وبمدد زمنية مختلفة، باستثناء الوسطين المجهزين بـ ١.٥ و٤.٠ مع ١.٠ و١.٥ ملغم/ لتر BA مع NAA، على التوالي، لم يشجعا استحداث الكالس، ويبدو ان الوسط الذي اعطى افضل نمو واكبر كمية كالس الجدول (٤) كذلك أعطى أعلى نسبة تكوين للنباتات بمرحلة واحدة إذ بلغت نسبة تجاوب قطع كالس الاجنة المستحدث للتمايز ٦٠% (الجدول٥) وبلغ مجموع النباتات المتكونة ٤٥ نباتاً بمعدل ١٥ نباتاً/قطعة كالس مستجيبة للتمايز بعد ٢١٠ يوما من الزراعة، علماً ان اول فرع خضري تكون بعد ٣٢ يوماً من بدء استحداث الكالس (بعد ٩٦ يوماً من الزراعة على وسط الاستحداث) وجذرت هذه الافرع الخضرية مكونة نباتات بمرحلة واحدة، عندما اصبح معدل عمرها ٧٨ يوماً، ولوحظ الزيادة في طول النباتات المتكونة واعدادها مع زيادة فترة النمو، ويمثل (الشكل٤. أ ، ب ، جـ ، د) مراحل تمايز كالس اجنة بذور الهيل على الوسط السابق بعد ٦٠ و١٢٠و١٥٠و٢١٠ يوماً من الزراعة، كذلك اظهرت نتائج هذه الدراسة ان زيادة مستوى BA الى ٣.٠ ملغم/لتر في وسط MS اطلب مع بقاء NAA بالتركيز نفسه ١.٠ ملغم/لتر شجع هو الاخر تمايز الكالس الى نباتات بمرحلة واحدة ولكن

الجدول (٤) : استحداث كالس اجنة بذور الهيل المحفزة بالوسط 2,4-D + MS ٢٥.٠ ملغم/لتر والنامية على اوساط الاستحداث MS الصلبة المجهزة بتراكيز متباينة من BA مع NAA بعد مرور ٩٠و ١٢٠ يوماً من الزراعة.

فترة الزراعة (يوم)	٩٠			١٢٠
مظلمات النمو (ملغم / لتر) NAA	مظلمات النمو (ملغم / لتر) BA	بدء الاستحداث (يوم)	الاستحداث *(%)	معدل الوزن الطري للكالس (غم)	معدل الوزن الطري للكالس (غم)
٠.٠	٠.٠	٢٧	٣٣.٣	٠.٢٩	٠.٤٤
١.٠	١.٥	-	-	-	-
١.٠	٢.٠	٣٤	٨.٣	٠.١٥	٠.٢١
١.٠	٢.٥	٢٤	٤١.٧	٣.١٢	٢.٩٩
١.٠	٣.٠	٣٤	٣٣.٣	٠.٨٩	١.٣٩
١.٠	٣.٥	٢٢	٢٥	٠.٣٧	٠.٩٩
١.٠	٤.٠	٢٤	١٦.٦	٠.٤٣	٠.٤٥
١.٥	٣.٥	٤٦	٨.٣	٠.١٦	٠.١٩
١.٥	٤.٠	-	-	-	-

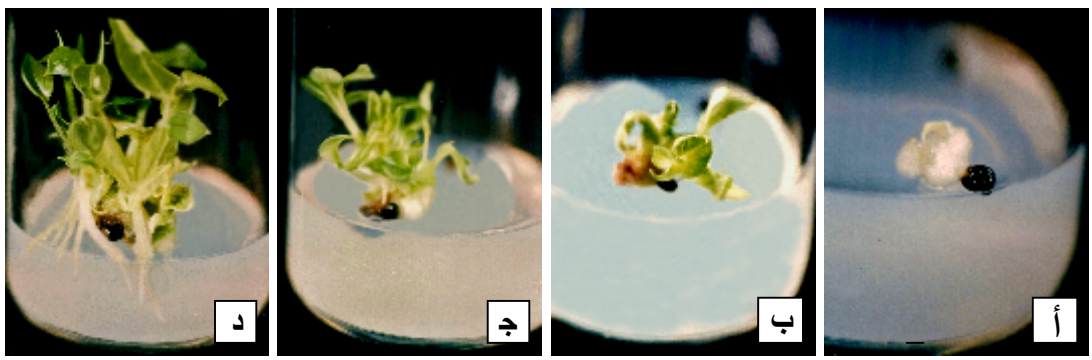
* عدد المكررات ١٢ بذرة / وسط - عدم الاستجابة

الجدول (٥): نشوء نباتات بمرحلة واحدة من كالس اجنة بذور الهيل المحفزة بالوسط 2,4-D + MS ٢٥.٠ ملغم/ لتر والنامية على اوساط الاستحداث MS الصلبة المجهزة بتراكيز متباينة من BA مع NAA بعد مرور ٦٠و١٢٠و١٥٠و٢١٠ يوماً من الزراعة.

مظلمات النمو (ملغم / لتر) NAA	مظلمات النمو (ملغم / لتر) BA	عدد الاجنة المحفزة المستجيبة لاستحداث الكالس (من ١٢ بذرة)*	النسبة المئوية *(%)	عدد قطع كالس الاجنة المستجيبة للتمايز	الفترة الزمنية (يوم)	العدد الكلي للنباتات الناتجة /فترة زمنية
١.٠	٢.٥	٥	٤١.٧	٣(٦٠%)	٦٠	٣
					١٢٠	٦

					١٥٠	٢١
					٢١٠	١٥
مجموع النباتات المتكونة بمرحلة واحدة بعد ٢١٠ يوماً من الزراعة						٤٥
معدل عدد النباتات المتكونة بمرحلة واحدة/قطعة كالس بعد ٢١٠يوماً من الزراعة						١٥
١.٠	٣.٠	٤	٣٣.٣	٢(٥٠%)	٦٠	٠.٠
					١٢٠	٦
					١٥٠	٠.٠
					٢١٠	٢
مجموع النباتات المتكونة بمرحلة واحدة بعد ٢١٠ يوماً من الزراعة						٨
معدل عدد النباتات المتكونة بمرحلة واحدة/قطعة كالس بعد ٢١٠يوماً من الزراعة						٤
١.٠	٣.٥	٣	٣٣.٣	١ (٢٥%)	٦٠	٠.٠
					١٢٠	٢
					١٥٠	١
					٢١٠	٠.٠
مجموع الافرع الناتجة بعد ٢١٠ يوماً						٣
معدل عدد الافرع الناتجة لكل قطعة كالس بعد ٢١٠ يوماً من الزراعة						٣

* عدد المكررات ١٢ بذرة / وسط



الشكل (٤) أجنة البذور المحفزة بالوسط 2,4-D+ MS ٢٥.٠ ملغم/ لتر والنامية على وسط الاستحداث BA+MS ٢.٥ملغم/لتر + NAA ١.٠ملغم/لتر
أ- بعد ٦٠ يوماً من الزراعة، ب- بعد ١٢٠ يوماً من الزراعة، جـ - بعد ١٥٠ يوماً من الزراعة، د- بعد ٢١٠ يوماً من الزراعة.

بنسبة اقل من الوسط السابق بلغت٥٠ % وبلغ مجموعها ثمانية نباتات بمعدل اربعة نباتات/قطعة كالس مستجيبة للتمايز بعد٢١٠ يوماً من الزراعة، علماً ان تمايز الافرع من الكالس بدأ بعد ٣٣ يوماً من بدء استحداث الكالس والتي جذرت مكونة نباتات عندما اصبح عمرها ٩٩ يوماً كمعدل عام، اما عند رفع BA الى ٣.٥ملغم /لتر مع بقاء NAA فقد شجع تمايز قطع الكالس الى افرع خضرية بنسبة اقل ٣٣.٣% اذ بلغ مجموعها ثلاثة افرع خضرية لم تجذر على الوسط نفسه ولم تتحول الى نباتات.

٤- اجنة البذور المحفزة بالوسط 2,4-D + MS ٣٠.٠ ملغم/ لتر: في المحاولة الجربة لاجنة المحفزة بوسط التحفيز2,4-D+ MS ٣٠.٠ملغم/ لتر، أبدت استجابة قليلة جدا لاستحداث الكالس في غالبية اوساط الاستحداث المجهزة بتراكيز متباينة من BA مع NAA المستخدمة في هذه الدراسة، اذ تراوحت نسب الاستحداث ما بين٨.٣%الى ٣٣.٣% وخلال فترة زمنية ٣١-٦٣ يوماً من بدء نقل البذور الى اوساط الاستحداث، وتميز الكالس الناتج بنموه الضعيف وكمياته القليلة جداً، اذ إنه حال استحداثه توقف عن النمو وتغير لونه الى البني بعد ان كان ذا قوام هش ولون ابيض، باستثناء وسط MS الصلب المجهز بـ BA ٣.٠

ملغم /لتر +NAA١.٠ ملغم/ لتر وكذلك بوسط المقارنة MSO اذ لوحظ توقف نمو الكالس المستحدث بعد مرور 30 يوما من بدء استحداثه، وكذلك بينت نتائج هذه الدراسة عدم قدرة هذا الكالس على التمايز.

PRODUCTION OF CARDAMOM PLANTS (*Elettaria cardamomum* Maton.) IN ONE – STEP REGENERATION OF EMBRYOS STIMULATED *IN VITRO*

Abdullah Najim Alniemi
Biology Dept.,College of Education
University of Mosul - IRAQ

Wijdan Abbas Sulaiman Alnieb
Ministry of Science and Technology
IRAQ

ABSTRACT

stimulated embryos were excised from *Elettaria cardamomum* Maton. Seeds. The best of these were obtained from micropropagation MS + 2,4-D 5.0 mg/L for 20 days, and grown on the initiation medium MS+ BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L.They were differentiated to form plants in one–step regeneration with a number of 54 plants in an average of 18 plants/callus piece after 210 days of culture and in a response percentage of 75%.Cardamom seed embryos, stimulated on the medium MS+2,4-D 25.0 mg/L for 20 days and subsequently cultured on initiation medium MS+BA 2.5 mg/L + NAA 1.0 mg/L.They showed an ability to produce callus which were differentiated to plants in one–step regeneration earlier in comparision with a number of 45 plants, at an average of 15 plants/callus piece after 210 days of culture and in a response percentage of 60%.This study succeeded in obtaining callus from immature embryos, removed from cardamom seeds, stimulated by the medium MS+2,4-D 20.0 mg/L and then grown on initiation medium MS+BA 1.5 mg/L +2,4-D 1.0 mg/L after 52 days post- culture in a percentage of 50%.The best of average fresh weight of callus was 2.76 gm after 120days of culture. The regenerated plants from tissue culture were successfully acclimatized after being hardened.

المصادر

الحديدي، محمد علي حسين (٢٠٠٢). زراعة الخلايا النباتية (ليديان كيت)، دار الفكر للطباعة والنشر. عمان. الاردن.

حياوي، سهام أحمد محمود (٢٠٠١). الفعالية المضادة للجراثيم في النيكوتين المستخلص من نباتات التبغ *Nicotiana tabacum* L. البذرية والكالس والنباتات المتكونة منه والكشف عن الروتين في الكالس. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة الموصل. العراق.

سلمان، محمد عباس(١٩٨٨).أساسيات زراعة الخلايا والأنسجة النباتية، مطبعة جامعة الموصل. العراق.

النعيمي، عبد الله نجم (١٩٩٧). إنتاج نباتات التبغ من كالس الأوراق والسيقان بمرحلة واحدة. مجلة التربية والعلم ٢٦: ٤٢-٤٦.

يونس، اواب وعد الله (١٩٩٧).محتوى القلويدات في الكالس والنباتات الناتجة منه في النبات البري الداتورة *Datura innoxid Mill*. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة الموصل. العراق.

Acquaah, G. (2004). Understanding Biotechnology. Pearson Education Inc., U.S.A.

Ağaoğlu, S.; N. Dostbil and S.Alemdar (2006). Antimicrobial effect of seedextract of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). YYÜ Vet. Fak., Derg ,16 (2): 99 - 101.

Bretagne, B.; Mch.Chupeau; Y. Chupeau, and G. Fouilloux (1994). Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source. Plant Cell Repts., 14 : 120.

Bryant, J. A. and D. Chiatante (1998). Plant Cell Proliferation and its Regulation in Growth and Development, John Wiley and Sons Ltd., pp. 45 - 48.

Centeno, M.L.; A.Rodriguez ; I. Fetio and B. Fresnadez (1996). Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in Actinidia deliciosa tissue cultures.Plant Cell Repts.,16:58-62.

Christman, S. (2006). Floridata: *Elettaria cardamomum*. Floridata. com. Lc. Tallahassee. Florida, U.S.A. , pp. 2-3.

Grieve, M. (2006). Cardamons, Botanical: *Elettaria cardamomum* Maton. A Modern Herbal, Ind., 1- 4.

Islam, A. (2004). Genetic diversity of the genus *Curcuma* in Bangladesh and further biotechnological approaches for *in vitro* regeneration and long-term
conservation of C. longa germplasm. Ph. D., Biol. Univ. Hannover, Dhaka, Bangladesh.

Jamal, A.; K. Javed; M. Aslam and M.A. Jafri (2006). Gastroprotective effect of cardamom, (*Elettaria cardamomum* Maton). fruits in rats. J. Ethnopharmacol., 103 (2): 149-153.

Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473 - 497.

Parthasarathy, V.A. (2005). Biochemical characterization of cardamom (*Elettaria cardamomum*) accessions and database of chemical compounds and metabolic pathways in cardamom volatatile oil (Abstracts of M.Sc. and Ph.D. Dissertations on Spice Crops) IISR., 8: 23.

Reinert, J. and D. Backs (1968). Control of totipotency in plant cells growing *in vitro*. Nature, 220: 1340 - 1341.

Roy, A.T. and D.N. De (1990). Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explant of (*Calotropis gigantea* L.) Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 20: 223 - 229.

Sarathkumara, S.J.; E.V. Paciasothy and E.R. Jansz (1985). Some studies on the effect of maturity and storage on the chlorophyll content and essential
oils of the cardamom fruit (*Elettaria cardamomum* Maton). J. Sci. Food and Agricu., 36 (6): 491-198.

Staba, E.J. (1982). Plant Tissue Culture As a Source of Biochemicals. CRC press, Inc., Florida U.S.A.

Stuchey, M. (1999). The Complete Spice Book Paper Back. Mountain Vally Growess. Inc.

Tefera, W. and S.T. Wannakrairoj (2006). Synergistic effects of some plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of korarima(*Aframomum*
corrorima (Braun) Jansen). African J. Biotechnol.,5 (10): 1894 -1901.