تأثير بعض منظمات النمو النباتية في تجديد النباتات وتكوين الكورمات الدقيقة في الزعفران المزروع (*Crocus sativus* L.var. Coupe)

سلاف بريدي* د .خليل المعري* د .فهد البيسكي**

الملخص

يهدف البحث الى دراسة تأثير بعض التوافقات الهرمونية النباتية في تجديد النبات بدءًا من الكالوس الجنيني وصولًا إلى تكوين الكورمات الدقيقة مخبريًا في الزعفران المزروع (*Crocus sativus* L. var. Coupe).

إذ استُخدم وسط Murashige) MS و Skoogالمعدل والمضاف له كازئين هيدروليسات 500مغ.ل$^{-1}$والبرولين 600 مغ .ل$^{-1}$، بالإضافة لمنظمات النمو النباتية من السيتوكينين 6-BAPبتراكيز مختلفة(0، 0.5، 1، 1.5، 2، 2.5، 3 مغ.ل$^{-1}$) والأوكسين 2,4-D بتركيز ((0 – 0.175مغ.ل$^{-1}$، لتحديد التوافق الهرموني الأفضل بدراسة تأثيره في نسبة تجديد النبات، وفي عدد النموات المتشكلة من الكالوس، أما في مرحلة تكوين الكورمات، فقد نقلت النموات الناتجة عن المرحلة السابقة وزُرعت على وسط MS يحوي 30 غ.ل$^{-1}$سكروز بالإضافة إلى توافقات هرمونية مختلفة:(MS0) بدون هرمونات، MS1: 1مغ.لIBA^{-1}، MS2: 2مغ.لIBA^{-1}، MS3: 1مغ.ل6-BAP+ 1 مغ.لIBA^{-1}، MS4: 1 مغ.ل6-BAP^{-1} + 0.5مغ. لNAA^{-1}، MS5: 0.5 مع.ل6-BAP^{-1}، MS6: 2 مغ.ل6-BAP^{-1}، MS7: 4مغ.ل.(6-BAP^{-1}

*قسم علوم البستنة _كلية الزراعة _جامعة دمشق.

**الهيئة العامة للتقانة الحيوية_ وزارة التعليم العالي.

بيّنت النتائج التي تم الوصول إليها في هذا البحث، أن متوسط نسبة تجديد النباتات كانت الأعلى معنويًا عند التوافقات الهرمونية ذات التراكيز 1) مغ. ل 0.0 + 6-BAP ‎1- مغ. ل‎2,4-D، 0.5 مغ. ل 0.0 + 6-BAP ‎1- مغ. ل 2,4-D ‎1-و 1 مغ .ل- 1 0.175 + 6-BAP مغ. ل (2,4-D ‎-1 بقيمة بلغت60.38) ،55.19 ، (53.7 % على التتالي وبفروقات معنوية على بقية التوافقات الهرمونية، في حين كان متوسط عدد النموات الأعلى معنويًا عند التوافقات الهرمونية ذات التراكيز 1) مغ. ل 0.0 + 6-BAP ‎1- مغ. ل2,4-D ‎1-، 0.5 مغ. ل 0.175 + 6-BAP ‎1- مغ. ل- 2,4-D ‎1و 0.5مغ. ل 0.00 +6-BAP ‎1- مغ. ل (2,4-D ‎1-بقيم بلغت7.1) ، 6.94و 6.73 نموًا (على التتالي وبفروقات معنوية على بقية التوافقات الهرمونية، أما بالنسبة لتكوين الكورمات فقد تفوق التوافق الهرموني MS1 من حيث النسبة المئوية للكورمات المتشكلة (76.77 %) ومتوسط عدد الكورمات المتشكلة بقيمة بلغت 3.5) كورمات /نبات (بفروق معنوية واضحة مع باقي المعاملات.

الكلمات المفتاحية :الزعفران المزروع، منظمات النمو، التجديد، النموات، الكورمات.

Effect of some Growth Regulators on Shoot Regeneration and Corms Formation in (*Crocus sativus* L. var.Coupe)

Solaf Bredy[*] Dr. K.Almaarri[**] Dr. F.Albiski[**]

Abstract

The aim of this research was studying the effect of plant growth regulators (Auxins and Cytokinins) on plant regeneration and micro corm formation in *Crocus sativus* L.var. Coupe.

We used MS medium (Murashige and Skooge) with Casinehydrolite (500 $mg.l^{-1}$) and proline (600 $mg.l^{-1}$) in addition to 6-BAP (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3) $mg.l^{-1}$ and 2,4-D (0 and 0.175) $mg.l^{-1}$ to determine the best plant growth mixture for plant regeneration and number of shoots whereas we use different medium (MS0: without plant growth, MS1: 1 $mg.l^{-1}$ IBA, MS2: 2 $mg.l^{-1}$ IBA, MS3: 1 $mg.l^{-1}$ BAP+ 1 $mg.l^{-1}$ IBA, MS4: 1 $mg.l^{-1}$ BAP+ 0.5 $mg.l^{-1}$ NAA, MS5: 0.5 $mg.l^{-1}$ BAP,MS6: 2 $mg.l^{-1}$ BAP and MS7: 4 $mg.l^{-1}$ BAP) to determine the best medium for corms formation.

The results revealed that the highest average ratios of shoot regeneration were (60.38, 55.19 and 53.7 %) in the concentration (1 $mg.l^{-1}$ 6-BAP, 0.5 $mg.l^{-1}$ 6-BAP and 1 6-BAP + 0.175 $mg.l^{-1}$ 2,4-D) respectively.

The significantly highest average ratios of shoot numbers at the concentrations (1 $mg.l^{-1}$ 6-BAP, 0.5 $mg.l^{-1}$ 6-BAP + 0.175 $mg.l^{-1}$ 2,4-D and 0.5 $mg.l^{-1}$ 6-BAP) were (7.1, 6.94 and 6.7) shoots/plant respectively.

For micro corms formation percent and corm numbers, the concentration 1 $mg.l^{-1}$ IBA was the best with 76.77 % as a percent corm formation and 3.5 $corms.plant^{-1}$.

Key words: *Crocus sativus*, Growth regulator, Regeneration, Shoots, Corms.

[*] Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, University of Damascus.

[**] National Commission for Biotechnology, Ministry of Higher Education.

المقدمة:

الزعفران.*Crocus sativus* L محصول اقتصادي مهم؛ إذ يعدّ من التوابل الأغلى في العالم؛ وذلك لخواصه العطرية والصباغية والطبية (Poggi وزملاؤه، .(2010

ينتمي الزعفران (.*Crocus sativus* L) إلى العائلة *Iridaceae* من وحيدات الفلقة التي تضم نحو 60 جنسًا و 1500نوعًا.

ويضم الجنس *Crocus* نحو 80 نوعًا حول العالم Vurdu) و Guney،(2004 ، ومعظم هذه الأنواع تنمو نموًا طبيعيًا في الحقول بين الشجيرات والأعشاب أو في الغابات الخفيفة.

ومن بين الأنواع الثمانين التي تنتمي للجنس*Crocus* ، فإن الزعفران .*Crocus sativus* L يعدّ الأكثر خصوصيةً وجاذبية، وقد نتج هذا النوع بسبب طفرة نشأت من النوع البري *Crocus cartwrightianus*، وهو نبات ثلاثي الصيغة الصبغية (2N=3x=24) يتكاثر عن طريق الكورمات الأرضية، عقيم وغير منتج للبذور Darvishi) وزملاؤه،.(2006

وعلى الرغم من قيمته التسويقية العالية والطلب المرتفع عليه، فإن الزعفران بوصفه محصولًا يواجه خطر الانقراض في العديد من دول العالمFernandez) ،(2004 ؛ وذلك نتيجة نقص المساحة المخصصة لزراعته في السنوات الأخيرة، إضافة لأنّه نبات عقيم جنسيًا، فكان لا بدّ من اهتمام متزايد بتقانات زراعة الأنسجة وتقانات الهندسة الوراثية لإكثار الزعفران وراثيًا وتحسينه Ahmad) وزملاؤه، .(2011

كما ذكرنا سابقًا، فإن الزعفران من وحيدات الفلقة في الفصيلة السوسنية، وتعدّ الأبصال والكورمات وحيدة الفلقة صعبة الإكثار مخبريًا عن طريق زراعة الأنسجة) مادة صعبة الاستخدام في تطبيقات زراعة الأنسجة Kamo) (وزملاؤه، (1990، كما أن إكثار النبات عن طريق زراعة الأنسجة في الفصيلة السوسنية أصعب مقارنة مع الفصائل الأخرى مثل الفصيلة البصلية والقلقاسية والزنبقيةHussey) ،.(1975

إضافةً إلى مشكلة التلوث التي تعد مشكلة جدية في حالة الزراعة بالزجاج، لا سيما عند وجود الجزء المراد إكثاره تحت الأرض كما هو الحال في الكورمات، والأبصال،

والريزومات، والدرنات عند استخدامها بوصفها مصدرًا للخزعات النباتية (Mushtaq وزملاؤه،(2014، وأيضًا هناك مشكلات أخرى مثل الأضرار الفيزيائية والسكون قد تجعل من دراسة زراعة الأنسجة عند وحيدات الفلقة أمرًا صعبًا.

خلال العقود القليلة الماضية لوحظت زيادة في نجاح زراعة الأبصال والكورمات من وحيدات الفلقة مخبريًا، وبالنسبة للزعفران، فقد كان هناك العديد من المحاولات والدراسات فيما يتعلق بإكثاره خضريًا مخبريًا في الزجاج سواء كان هذا الإكثار بالطريقة المباشرة (Direct organogenesis)أم غير المباشرة(Indirect Organogenesis) ، أم عن طريق تكوين الأجنة الجسمية .(Somatic embryos) تعد تقانة زراعة الأنسجة النباتية من التقانات الحيوية المهمة؛ إذ برزت أهميّتها بوصفها طريقة بديلة عن الطرق التقليدية في الإكثار، لاسيما النباتات صعبة الإكثار، إلى جانب دورها في التحسين الوراثي للنباتات، وبالتالي زيادة الإنتاج كمًا ونوعًا .

وتعد منظمات النمو النباتية، التي قد تستخدم في هذه التقانة، موادًا طبيعية ينتجها النبات بكميات قليلة أو ضئيلة جدًا في خلايا محددة، وتنتقل إلى أماكن أخرى من النبات لتحدث تأثيرها في أجزاء النبات وتؤثر في النمو النباتي إمّا بالتنشيط أو بالتثبيط، وتضم منظمات النمو كل من الأوكسينات Auxins، والسيتوكينينات Cytokinins. وتلعب دورًا مهمًا في عملية التجديد وتكوين نباتات جديدة بدءًا من الكالوس الجنيني.

يؤثر الأوكسين في العلاقة التآزرية مع السيتوكينينات المستخدمة في الوسط المغذي تأثيرًا كبيرًا على استحداث الكالوس الجنيني، وعلى نضج الأجنة الجسمية أيضًا (Devi وزملاؤه، .(2011 أثبت Ebrahimzadeh وزملاؤه (2000) أن نضج الأجنة الخضرية وإنباتها والقدرة على تجديد النموات يتأثر باختلاف تركيب الوسط الغذائي وتركيز منظمات النمو النباتية والشروط البيئية من حرارة ورطوبة.

كما يؤثر التركيب الوراثي للخزع النباتية المختلفة والطرز الوراثية المختلفة في كفاءة تكون الأجنة الخضرية من الكالوس، الأمر الذي يعزى إلى تفاوت مستوى الهرمونات النباتية

الداخلية ولا سيماً السيتوكينينات؛ إذ يمكن أن يؤثر ذلك في استجابتها لاستحداث الكالوس وتكوين الأجنة الخضرية Kim) وزملاؤه، .(2004

يعد تجديد النبات من الكالوس أمرًا مهمًا؛ إذ يعطي العديد من الطرز الوراثية التي يمكن الاستفادة منها في التحسين الوراثي Eudes) وزملاؤه،(2004 ، ويمكن أن تختلف الطرز الوراثية باختلاف التباينات الوراثية الجسمية أو المجموعة الصبغية الأساسية وتضاعفاتها، أو باختلاف منظمات النمو الداخلة في تركيب الوسط المغذي، أو مدّة الزراعة Biswas) و Mandal، .(2002

وأكد Khaleghi وزملاؤه (2008) بأن إضافة تراكيز منخفضة من الأوكسين NAA بنسبة أقل من السيتوكينين 6-BAP يزيد من معدل النمو والإكثار مقارنة باستخدام السيتوكينين 6-BAP فقط.

كما وجد Sandeep وزملاؤه (2016) أن الوسط المغذي MS مضافًا إليه 4 مغ .ل$^{-1}$ NAA و 4 مغ.ل$^{-1}$ TDZ كان الأمثل للحصول على أعلى نسبة تجديد للنموات وأعلى عدد للنموات المتكونة عن الكالوس المستحدث من خزع الكورمات المزروعة للنوع التركي *C. oliveri* ssp ؛ إذ بلغت نسبة تجديد النموات 70 ٪ من الكالوس، وكان عدد النموات 2.7 نموًا.

أما بالنسبة لعملية إنتاج الكورمات بالزجاج، فقد وجد أن هذه العملية تتأثر بالعديد من العوامل مثل مصدر الخزعة النباتية، تركيب وسط النمو، تركيز أملاح الوسط، منظمات النمو، ومثبطات النمو كالباكلوباترازول والإيمازاليل وتركيز السكروز في وسط النمو ودرجات الحرارة Ahouran) وزملاؤه، .(2012

درس Sharma وزملاؤه (2008) تأثير تراكيز الأملاح المعدنية في وسط النمو؛ إذ وجد أن استخدام التراكيز المنخفضة من الأملاح في وسط النمو أفضل لتكوين الكورمات؛ إذ إن استخدام وسط ½ MS كان أفضل من استخدام وسط MS ، كما وجد أيضًا أن 3 مغ.ل$^{-1}$ من BA في وسط ½ MS حقق أفضل النتائج في هذا المجال؛ إذ يعدّ هذا الهرمون بمفرده أو بوجود هرمونات أخرى من أفضل الهرمونات بتكوين الكورمات عند الزعفران *C. sativus* ، في حين يثبط حمض الأبسيسيك من تكوينها.

كما أكد Ahouran وزملاؤه (2012) ضرورة وجود كل من الأوكسين والسيتوكينين للوصول إلى أكبر عدد من الكورمات الدقيقة عند النوع*Crocus cancellatus*.

كما أدى استخدام NAA مع6-BAP ، أيضًا، إلى نتائج جيدة عند النوع*Crocus vernus* ؛ إذ وجد أن استخدام كل من BA بتركيز 2 مغ.ل $^{-1}$مع NAA بتركيز 0.5 مغ.ل $^{-1}$كان الأفضل بالنسبة لعدد الكورمات وتشكلها Sivanesan)وزملاؤه،.(2014

إن تكوين الكورمات هي عملية مستهلكة للطاقة وترسيب الكتلة الحية في قاعدة النموات المتشكلة يتأثر بتركيز السكروز في الوسط في الزعفران وفي كثير من المحاصيل الأخرى فإن نسبة السكروز/الكربوهيدرات الكلية تلعب دورًا مهمًا في تكوين الكورمات والتراكيز العالية من السكروز (6-9%) مفضلة لتكوين الكورمات وتطورها عند الزعفران Sharma) وزملاؤه، (2008، كما يعدّ السكروز مصدرًا أساسيًا في وسط النمو لتكوين الكورمات؛ إذ لا تتشكل دونه وهذا ما توصل إليه Sivanesan وزملاؤه (2014) في دراساتهم التي أجريت على تكوين الكورمات الدقيقة عند النوع البري*Crocus vernus*.

مبررات البحث: Research Justifications

يعادل سعر الزعفران سعر الذهب في الأسواق العالمية لأنّه أحد أهم المحاصيل الاقتصادية والطبية المهمةFernandez) ، (2004، ومن الواضح أن أغلب الدراسات التي أجريت على الزعفران مخبريًا قد ركزت على إنتاج المواد الفعالة عن طريق التعضي المباشر وغير المباشر، إلا أن هناك القليل من الدراسات المتعلقة بتكوين نباتات كاملة مع جذورها وكورماتها من الزعفران باستخدام تقانات الزراعة بالأنسجة Sharifi) وزملاؤه، .(2010

كما تسهم عملية إعادة التجديد (regeneration) وتشكل النموات عن طريق استحداث الكالوس بدور مهم في الإكثار الخضري (الأجنة الخضرية) وفي مجال التحسين الوراثي للزعفران للوصول إلى طرز أو سلالات جديدة Kher) وزملاؤه،. 2014)

إن وجود نظام زراعة أنسجة فعال عند الزعفران أصبح اليوم ضرورة ملحّة؛ إذ إن الزعفران أصبح مهدداً في كثير من الدول المنتجة لهFernandez) ،.(2004

إضافة لذلك، فإن العقم الجنسي عند الزعفران من جهة، وصعوبة التحسين الوراثي للزعفران عن طريق انتقاء السلالات المتفوقة وطرق التربية التقليدية من جهة أخرى، إضافة إلى الطلب المتزايد على هذا النبات نظرًا لخواصه التابلية والصباغية والطبية، كل ذلك أدى إلى ضرورة البحث عن طرائق بديلة للإكثار واستنباط سلالات جديدة متفوقة من حيث الغلة وعدد الكورمات ونسبة المواد الفعالة التي تحويها.

ومن هنا كانت أهداف هذا البحث:

أمثلة الأوساط المغذية المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتية وتحديد التراكيز المثلى من التوافقات الهرمونية لبعض منظمات النمو النباتيةD -2.4) ، (6-BAP لاستخدامها في عملية التجديد وتشكل النموات والكورمات الدقيقة عند الزعفران.((*Crocus sativus*.L var.coupe

مواد البحث وطرائقهِ :Materials and Methods

نُفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية النباتية التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق وفي مخابر كلية الزراعة بجامعة دمشق خلال الأعوام2018 - 2019 ، حيث استعمل في تنفيذ هذا البحث الزعفران المزروع.((*Crocus sativus*.L var.coupe

في مرحلة تجديد النباتات، نُقل الكالوس الجنيني المستحصل عليه مسبقًا إلى وسط MS (Murashige وSkoog، (1962المعدل، المضاف له كازئين هيدروليسات 500 مغ.ل$^{-1}$ والبرولين 600 مغ .ل)$^{-1}$وهي عبارة عن أحماض أمينية لتزويد الجزء المزروع بمصدر آخر من الآزوت العضوي؛ إذ تحرر هذه المواد الآزوت ببطء ويبقى متوفرًا للنبات)، وقد تمّ في هذه المرحلة دراسة تأثير منظمات النمو النباتية من السيتوكينين 6-BAP بتراكيز مختلفة (0، 0.5، 1، 1.5، 2، 2.5، 3 مغ.ل$^{-1}$)والأوكسين 2,4-D بتركيز ((0 – 0.175مغ.ل$^{-1}$، لتحديد التوافق الهرموني الأفضل بدراسة تأثيره في نسبة تجديد النبات، وفي عدد النموات المتشكلة من الكالوس، وحُضّنت على درجة حرارة حرارة24 م°، ورطوبة نسبية70% ، و 16 ساعة إضاءة و 8ساعات ظلام وشدة ضوئية 3000 لوكس، وأخذت قراءات نسبة التجديد وعدد النموات المتشكلة .

أما في مرحلة تكوين الكورمات، فقد نقلت النموات الناتجة عن المرحلة السابقة وزُرعت على وسط MS يحوي 30 غ.ل-1 سكروز بالإضافة إلى توافقات هرمونية مختلفة:MS0) بدون هرمونات، MS1: 1مغ.ل-1 IBA، MS2: 2مغ.ل-1 IBA، MS3: 1مغ.ل-1 IBA+ 1مغ.ل-1 6-BAP، MS4: 1مغ.ل-1 IBA + 0.5مغ.ل-1 6-BAP، MS5: 0.5مغ.ل-1 NAA، MS6: 2مغ.ل-1 6-BAP، MS7: 4مغ.ل-1 6-BAP) بوجود فترة ضوئية 16 ساعة إضاءة 8 / ساعة ظلام، وشدة ضوئية 3000 لوكس، وأُخذت القراءات بعد 45_ 40 يوم من حيث نسبة النموات المكونة الكورمات وعددها .

التصميم التجريبي والتحليل الإحصائي:

صُممت التجربة وفق التصميم العشوائي التام(CRD) ، وحُللت النتائج باستخدام برنامج 2020 XLSTAT.وأجري تحليل التباين (Two way ANOVA) باستخدام اختبار Fisher ؛ إذ تمت مقارنة المتوسطات وحساب قيمة أقل فرق معنوي LSD عند مستوى ثقة 99%.

النتائج والمناقشة:Results and Discussion

1− مرحلة التجديد:Regeneration Stage

تأثير التراكيز المختلفة من التوافقات الهرمونية من الأوكسين 2,4-D والسيتوكينين 6-BAP في نسبة التجديد يُلاحظ من الجدول (1)أنّ متوسط نسبة التجديد كانت الأعلى معنويًا عند التوافقات الهرمونية ذات التراكيز 1) مغ.ل-1 2,4-D+ 0.0 مغ.ل-1 6-BAP، 0.5 مغ.ل-1 2,4-D + 0.0 مغ.ل-1 6-BAP و1مغ.ل-1 2,4-D +0.175 مغ.ل-1 6-BAP) بقيمة بلغت (60.38، 55.19، 53.7 %) على التتالي وبفروقات معنوية عن بقية التوافقات الهرمونية، في حين كانت نسبة التجديد الأدنى معنويًا للتوافقات الهرمونية ذات التراكيز (3.00 مغ.ل-1 2,4-D +0.0 مغ.ل-1 6-BAP و3.00 مغ.ل-1 2,4-D +0.175 مغ.ل-1 6-BAP) بقيمة بلغت (7.75، 7.25 %) على التتالي ودون فروقات معنوية بينهما، في حين فشلت عملية التجديد تمامًا عند المعاملة الشاهد (بدون 2,4-D و 6-BAP) (0.00 %).

الجدول(1) تأثير تركيز التوافقات الهرمونية من السيتوكينين 6-BAP والأوكسين 2,4-D في نسبة التجديد في الزعفران المزروع *Crocus sativus* L.

نسبة التجديد(%)	المعاملات	
متوسط المعاملات	6-BAPمغ.ل$^{-1}$	2,4-Dمغ .ل$^{-1}$
0.00^{g}	0.00	0.00
55.19^{a}	0.50	0.00
60.38^{a}	1.00	0.00
40.13^{b}	1.50	0.00
28.42^{c}	2.00	0.00
21.10^{d}	2.50	0.00
7.75^{f}	3.00	0.00
3.64^{fg}	0.00	0.175
30.58^{c}	0.5	0.175
53.7^{a}	1.00	0.175
20.07^{d}	1.5	0.175
15.18^{de}	2.00	0.175
10.52^{ef}	2.5	0.175
7.25^{fg}	3.00	0.175
نسبة التجديد(%) LSD 0.01	المتغير	
6.52	المعاملة6-BAP+ 2,4-D	

*يشير اختلاف الأحرف الكبيرة في العمود الواحد بالنسبة لتراكيز التوافقات الهرمونية 6-BAP + 2,4-D) (إلى وجود فروق معنوية بين متوسط نسبة التجديد عند مستوى ثقة.99%

-2مرحلة النموات المتجددة:

تأثير التراكيز المختلفة من التوافقات الهرمونية من الأوكسين 2,4-D والسيتوكينين 6-BAP في متوسط عدد النموات:

يُلاحظ من الجدول (2) أنّ متوسط عدد النموات كانت الأعلى معنويًا عند التوافقات الهرمونية ذات التراكيز 1) مغ.ل 0.0 + 6-BAP 1 -مغ.ل 2,4-D^{-1}، 0.5 مغ.ل 0.175 + 6-BAP 1 -مغ .ل 2,4-D^{-1}و 0.5مغ.ل 0.00 + 6-BAP 1 -مغ.ل (2,4-D^{-1}بقيم بلغت7.1) ، 6.94و 6.73 نموًا (على التتالي وبفروقات معنوية على بقية التوافقات الهرمونية، في حين كان متوسط عدد

النموات الأدنى عند التركيز 3)مغ.ل 6-BAP+0.00 $^{-1}$مغ.ل (2,4-D^{1}بقيمة بلغت 0.59 (نموًا
).

في حين فشلت ًاعملية التجديد تمامًا عند المعاملة الشاهد (بدون 2,4-D و.((0.00 % 6-BAP)

الجدول (2) تأثير تركيز التوافقات الهرمونية من السيتوكنين 6-BAP والأوكسين 2,4-D

في عدد النموات في الزعفران المزروع.Crocus *sativus* L

التراكيز		متوسط عدد النموات
2,4-D مغ . ل$^{-1}$	6-BAP مغ. ل$^{-1}$	متوسط المعاملات
0.00	0.00	0.00^{f}
0.00	0.50	6.73^{a}
0.00	1.00	7.10^{a}
0.00	1.50	4.11^{c}
0.00	2.00	3.14^{d}
0.00	2.50	2.11^{e}
0.00	3.00	0.59^{f}
0.175	0.00	4.56^{c}
0.175	0.5	6.94^{a}
0.175	1.00	5.95^{b}
0.175	1.5	5.87^{b}
0.175	2.00	4.51^{c}
0.175	2.5	3.09^{d}
0.175	3.00	1.93^{e}
المتغير		LSD 0.01 عدد النموات(%)
المعاملة 2,4-D +6-BAP		0.66

* يشير اختلاف الأحرف الكبيرة في العمود الواحد بالنسبة لتراكيز التوافقات الهرمونية + 6-BAP
((2,4-D إلى وجود فروق معنوية بين متوسط عدد النموات عند مستوى ثقة .% 99

تشير هذه النتائج إلى أنّ العامل الأهم المحدد في تجديد النباتات من الكالوس هو وجود السيتوكينين (6-BAP) في وسط التجديد، فللسيتوكينينات القدرة على تشكيل النموات من الأنسجة غير المتمايزة) الكالوس(؛ ويعود ذلك إلى دور الستوكينينات في الانقسام الخلوي؛ إذ تلعب السيتوكينينات دورًا مهمًا في النمو النباتي فهي تؤثر بوصفها عاملًا محفزًا في العديد

من المظاهر الفيزيولوجية في النبات مثل الانقسام الخلوي؛ إذ ينشّط السيتوكينين اصطناع البروتينات اللازمة للانقسام الخلوي، ويشجع تكوين الأحماض النووية الدناDNA والرنا RNA، وينشط عمل بعض الأنزيمات .ولكن تؤثر زيادة تركيزه عن حدٍ معين سلبًا في نسبة التجديد، ما يشير إلى أهمية المحافظة على التوازن الهرموني بين الأوكسين والسيتوكينين في وسط التجديد(المعري، .(2018 وقد وجد في بعض التجارب أنه ليس للسيتوكينين تأثير فعال دون وجود الأوكسين معه بتوازن هرموني يؤثر تأثيرًا نشيطًا في الانقسام الخلوي Morel)وزملاؤه، .(1968

نلاحظ أنّ نسبة تشكل النموات تتأثر بالتوافقات الهرمونية المختلفة وتركيز منظمات النمو، وهذا يتوافق مع Zhao وزملاؤه(2010) ، ويعود ذلك إلى دور الأوكسين في تكوين البراعم وتمايزها ونموها بدءًا من الكالوس؛ إذ يسهم بتكوين الأجنة الخضرية وإنباتها وتكوين النباتات الكاملة بدءًا من نسيج غير متمايز كالكالوس والحصول على سلالات متباينة وراثيًا .وذلك يعود إلى الدور المباشر للأوكسين في الانقسام الخلوي والاستطالة الخلوية من خلال تأثيره في زيادة الجهد الأسموزي الخلوي والنفاذية الخلوية بزيادة معدل تكوين البروتينات، ومن ثمّ زيادة تدفق السوائل الى داخل الخلايا؛ وبالنتيجة ينشط استطالة الخلايا وانقسامها، لذا فإن إضافة الأوكسين في مرحلة الإكثار بتركيز منخفض له دور مهم وفاعل في النمو الأولي للميرستيمات وقمم الأفرع Rossignol) وزملاؤه،(1990 ، إضافة لدوره في الاستطالة الخلوية والطولية للنموات الخضرية المكاثرة بزراعة النسجAloni) ، .(2004

إلى جانب التأثيرات المهمة للسيتوكينينات بتأثيرها في تثبيط السيادة القمية؛ إذ تؤدي المعاملة بالسيتوكينين إلى تشجيع تكوين البراعم الجانبية وزيادة معدل الإكثار، كما تتميز السيتوكينينات بقدرتها على تكوين نموات في أنسجة غير متمايزة مثل الكالوس) المعري، (2018؛ وذلك يعود إلى أن السيتوكينينات تزيد نفاذية الخلية والضغط الحلولي، وتنشط اصطناع البروتينات وتشكيل الأحماض النووية اللازمة للانقسام الخلوي؛ إذ يعد BAP-6 واحدًا من أكثر السيتوكينينات نشاطًا في زراعة الأنسجة النباتية لتشكل النموات من الكالوس،

ويعد من السيتوكينينات غير الطبيعية التي تحفز على التجديد وتشكل النموات من الكالوس (Skoogو Miller، 1975). ويعد وجود السيتوكينين BAP-6 في وسط التجديد العامل الأهم المحدد في تجديد النبات، وهذا يؤكّد أهمية وجوده في تجديد النبات من الكالوس وعدد النموات الناتجة، ولكن تؤدي زيادة تركيزه عن حدٍ معين تأثيرًا سلبيًا في نسبة تجدد النبات وعدد النموات .وقد وجد في بعض التجارب بأنه ليس للسيتوكينين تأثير فعال في الانقسام الخلوي دون وجود الأوكسين معه بتوازن هرموني Morel) وزملاؤه، 1968). كما يعزز وجود اتحاد بين السيتوكينينات والأوكسينات؛ وذلك عند إضافة السيتوكينين بتركيز مرتفع مع تركيز منخفض من الأوكسين في تكون النموات ونموها في العديد من الأنواع (George، 1993).

وقد توصل Skoog و Miller (1987) الى أنه للتحكم في تجديد النموات من الكالوس لابد من اضافة كميات متوازنة من الاوكسين والسيتوكينين إلى وسط التجديد، ولابد أن تكون نسبة السيتوكنين/الاوكسين أكبر من الواحد لتحسين نسبة التجديد وعدد النموات المتشكلة (Srivastava، 2002), وهذا يتوافق مع نتائجنا ومع Khaleghi وزملائه (2008) و Lagramوزملائه.(2017)

3- مرحلة الكورمات الدقيقة:

يلاحظ من الجدول (3) تفوق التوافق الهرموني MS1 ذي التركيز 1 مغ.ل IBA $^{-1}$من حيث نسبة الكورمات المتشكلة وعددها بقيمة بلغت (39.91%) بفروق معنوية واضحة مع باقي المعاملات، في حين كانت معاملة الشاهد (وسط MS خال من الهرمونات) الأقل معنويًا بقيمة بلغت.(5.57%)

بالنسبة لتأثير التوافقات الهرمونية في نسبة تكوين الكورمات، فقد تفوق التوافق MS1 بقيمة بلغت76.77% بفروق معنوية واضحة مع باقي المعاملات، وكان التوافق MS0 الأدنى في نسبة التكوين بقيمة.(10%)

أما من حيث عدد الكورمات فقد حصلنا على أكبر عدد كورمات عند التوافق الهرموني MS1أيضًا بقيمة بلغت 3.05) كورمة .نبات($^{-1}$، في حين كانت المعاملة MS7 الأدنى معنويًا بقيمة بلغت 0.86) كورمة .نبات.($^{-1}$

الجدول (3) تأثير التوافقات الهرمونية المختلفة في نسبة تشكل الكورمات وعددها في الزعفران المزروع *Crocus sativus* L.

الهرمونية التوافقات	الكورمات نسبة تشكل وعدد		
	% الكورمات تشكل	تبات.كورمة /الكورمات عدد	متوسط
MS0	10.00^{g}	1.15^{e}	5.57^{G}
MS1	76.77^{a}	3.05^{a}	39.91^{A}
MS2	65.84^{b}	2.05^{cd}	33.95^{B}
MS3	56.87^{c}	2.91^{ab}	29.89^{C}
MS4	50.54^{d}	2.05^{c}	26.3^{D}
MS5	66.69^{b}	2.38^{bc}	34.53^{B}
MS6	40.20^{e}	1.38^{de}	20.79^{E}
MS7	30.56^{f}	0.86^{e}	15.71^{F}
المتوسط	49.68^{A}	1.98^{B}	--
$LSD_{0.01}$ الكورمات تشكل نسبة	3.32		
$LSD_{0.01}$ الكورمات عدد	0.67		
$LSD_{0.01}$ (والعدد النسبة بين)	0.002		
LSD0.01 المعاملات	1.73		

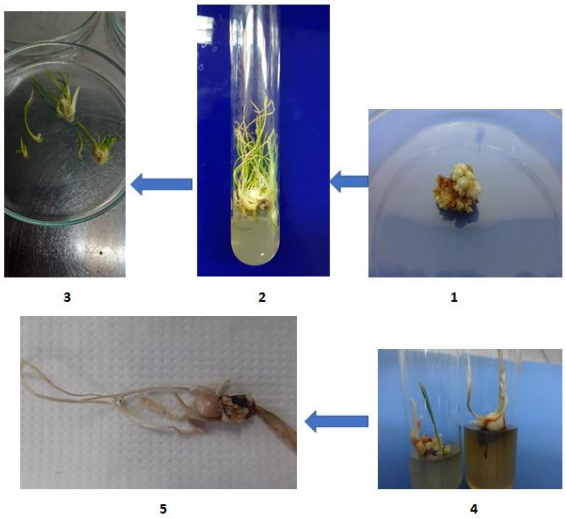
*يشير اختلاف الأحرف الكبيرة في السطر الواحد بالنسبة لتشكل الكورمات وعددها وفي العمود الواحد بالنسبة لتأثير تراكيز التوافقات الهرمونية، واختلاف الأحرف الصغيرة في الأعمدة بالنسبة للتفاعل بين عدد تشكل الكورمات ونسبتها وتركيز التوافقات الهرمونية إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ثقة.99%

توافقت نتائجنا معYildirim) ،(2007 ؛ إذ أعطى التركيز 1 IBA مغ.ل $^{-1}$أفضل عدد بالنسبة لعدد الكورمات وتشكلها .

يلعب نوع الخزعة النباتية، أيضًا، دورًا في تكوين الكورمات عند الزعفران*C. sativus* ؛ إذ وجد أن النموات الوحيدة فقيرة في هذا المجال في حين أن الفروع التي تحوي على نموين

أو أكثر لها قدرة أكبر على تكوين عدد أكبر من الكورمات وبمتوسط وزن أكبر أيضًا (Sharma وزملاؤه، 2008).

ويظهر الشكل (1) المراحل المختلفة لتكوين الكورمات الدقيقة مخبريًا عند الزعفران المزروع:



1 :الكالوس الجنيني، 2:تجديد النموات من الكالوس الجنيني، 3:تجزئة النموات المتجددة لنقلها إلى وسط تكوين الكورمات، 4:بدء تشكل الكورمات الدقيقة، 5:الكورمات الدقيقة.

الشكل (1) مراحل تكوين الكورمات الدقيقة مخبريًا عند الزعفران المزروع *Crocus sativus* L.

وقد خلص البحث إلى النتائج الآتية:

1. تتحدد نسبة تجديد نبات الزعفران بشكلٍ رئيس بوجود السيتوكينين 6-BAP وتتأثر باختلاف تركيزه، وتؤثر زيادة السيتوكينين BAP عن1.5 مغ.ل$^{-1}$سلبًا في نسبة التجديد، ويجب ألاّ يقل تركيزه عن 0.5 مغ.ل$^{-1}$.
2. يتحدد عدد النموات المتشكلة بالسيتوكينين 6-BAP وتؤثر زيادة السيتوكينين 6-BAP عن 1.5مغ.ل$^{-1}$سلبًا في عدد النموات المتشكلة، ويجب ألاّ يقل تركيزه عن 0.5 مغ.ل$^{-1}$.
3. تتحدد نسبة الكورمات المتشكلة وعددها بشكل رئيسي بنوع التوافق الهرموني المستخدم في وسط النمو وتركيزه.

المراجع:

- المعري، خليل .(2018).زراعة الأنسجة النباتية _الجزء النظري، جامعة دمشق، سورية، ص.43_39 .
- Ahmad, M., Zaffar, G., Mir, S.D., Razvi, S.M., Rather, M.A. and Mir, M.R. (2011). Saffron (*Crocus sativus* L.) Strategies for enhancing productivity. Research Journal of Medical Plant, 5(6): 630-649.
- Ahouran, M., R. Hosseini and R. Zarghami. (2012). Corms as a source of explants for the successful clonal propagation of *Crocus cancellatus*, J. Crop Sci. Biotech. 15(1): 47-51.
- Aloni, R.(2004). The induction of vascular tissues by auxin. pp.471-492 in Davies p.J.(ed).Plant Hormoes, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Biswas, A. and A.B. Mandal. 2002. *In vitro* culture response and plantlet regeneration in Indica rice in Bay Islands. International Rice Cong. Sept. 16-20.
- Darvishi, E., Zarghami, R., Mishani, C.A. , Omidi, M. and Sarkhosh, A. (2006). *In vitro* prod ction of Pathogen -free plantlets via meristem culture in saffron (Crocus sativus L.). biotechnology, 5(3): 292-295.
- Devi, K., M. Sharma. M. Singh and P.S. Ahuja.)2011(. *In vitro* cormlet production and growth evaluation under greenhouse conditions in saffron (*Crocus sativus* L.) – A commercially important crop: Engin. Life Sci. 11(1):1-6.
- Ebrahim Zadeh, H., R. Karamian. M.R. Noori-Daloii.)2000(. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlet in saffron, *Crocus sativus* L. Journal of Science Islamic Republic of Iran. 11 (3): 169-173.
- 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 tissue and organ culture. 73:147-157.
- Fernandez, J.-A., (2004). Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Recent Research Developments in Plant Science, 127-159.
- George,E,F.(1993).plant propagation by tissuse culture.part1.the technology,Exegetics Ltd,Edington,Wilts,UK.

- Hussey,G.(1975).Totipotency in tissue culture andcallus of some members of the Liliaceae ,,Iridaceae and Amaryllidaceous. J.Exp.Bot.,26:253-262.
- Kamo, K., Chen, J.and Lawson, R. (1990). The establishment of cell suspension cultures of Gladiolus that regenerate plants. *In Vitro* Cell. Dev. Biol., 26: 425-430.
- Khaleghi, A., A. Khaleghi. P. Azadi. and M. Mii. 2008. Induction of embryogenic callus and plant regeneration from nodes of greenhouse grown plants of Alstroemeria cv. Fuego. Journal of food, Agriculture and environment Vol.6(3&4): 374-377.
- Kher, M.M., Joshi, D., Nekkala, S., Nataraj, M., Raykundaliya, D. (2014). Micropropagation of Pluchea lanceolata (Oliver & Hiern.) using nodal explant. Journal of Horticultural Research, 22(1):35-39.
- Kim, Y.J., T. Park. H.S. Kim. H.K. Park. S.U. Chon and S.J. Yun. 2004.Factors affecting somatic embryogenesis from immature cotyledon of soybean. Journal of Plant Biotechnology. 6: 45-50.
- Lagram ,Khalid., Ben El Caid, Mohamed .,El Aaouam, Souad ., Lachheb, Mohamed ., El Mousadik, Abdelhamid.,Amine , Mohammed .,(2017).In vitro shoots and micro-corms formation through indirect organogenesis of Moroccan saffron (*Crocus sativus* L.).International Society for Horticultural Science.
- Morel, G., C. Matin and C. Muller. (1968). Laguuerison des pommes De terre atteintes irus. de a virus. Ann. Physiol., Veg.10(2): 113-139.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum.15: 473-495.
- Mushtaq, A., Z. Gul. H. Mehfuza. A. Ameeque. N. A. Dar and Z. A. Dar. 2014. Saffron (*Crocus sativus* L.) in the light of biotechnological approaches. Academic journals. 9(2): 2348-2353.
- Poggi, L, M, portela, A, J, pontin, M. A and Molina RV.(2010) .Corm size and incubuation effects on time to flowering and threads yield and quality in Saffron Production in Argentina . Acta Hout 850:193-198.
- Rossignol, M., Santoni, V., Szponrski, W. and Vansuyts, G. (1990). Differential sensitivity to auxin at the plasma membrane level. pp 498-503 in Nigkamp *et al*., .(eds) 1990 (q. v.).

- Sandeep, K. V., K. D. Ashok. S. C. Gunce. U. Emel and G. Ekrem. 2016. Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus specie. Biotechnology Reports.10: 66–74.
- Sharifi G., Ebrahimzadeh H., Ghareyazie, M. Karimi, 2010 .Globular embryo-like structures and highly efficient thidiazuron-induced multiple shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.), In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 46 : 274–280.
- Sharma, K.D., R. Rathour, R. Sharma, S. Goel, T.R. Sharma and B.M. Sing. 2008. *In vitro* cormlet development in *Crocus sativus*. Biol. Plant. 52: 709-712.
- Sivanesan, I., S. Jana. and B. R. Jeong.)2014(. *In vitro* shoot regeneration and microcorm development in *Crocus vernus* (L.) HILL. Pak. J. Bot. 46(2): 693-697.
- Skoog.F and Miller.C.O.(1987).Chemical regulation of growth and organformation in plant tissus cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp.Biol.11:118-131.smith,R.H.,r.r.
- Srivastava,l.M.(2002).plant growth and development hormones and invironment.Academic press,London.
- Vurdu, H. and K. Güney.)2004(. Safran Kırmızı Altın. Gazi Üniversitesi Kastamonu Orman Fakültesi Yayınları, 36 p (in Turkish).
- Yildirim,E.(2007). Development of in vitro micro propagation techniques for saffron (Crocus Sativus L.). Plant Cell Tiss. Org. Cult., v. 11: 159-166.
- Zhao, L., Liu, L. and Song, S. (2010). Optimization of callus induction and plant regeneration from germinating seeds of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench).African Journal of Biotechnology vol. 9(6).