استحداث الكالس وتجديد النباتات من الأجنة الناضجة لبعض أصناف القمح القاسي السورية *Triticum durum* Desf.

فهد البيسكي* وسيم محسن** رمزي مرشد***

(الإيداع: 10 آيلول 2020، القبول: 5 تموز 2020)

الملخص:

نُفّذ البحث في مخبر التقانات الحيوية النباتية، التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية – وزارة التعليم العالي، بهدف استحداث الكالس من الأجنة الناضجة لأربعة أصناف من القمح القاسي السورية وتجديد النباتات من الكالس. أظهرت النتائج بأن نسبة استحداث الكالس الأعلى معنوياً كانت في الصنف Bouhoth.11 (76.11%)، في حين كانت الأدنى معنوياً في الصنف Bouhoth.7 (54.16%)، كما كان متوسط نسبة تشكل الكالس الجنيني الأعلى معنوياً عند التركيز 2 مغ.ل$^{-1}$ 2,4–D لدى الأصناف Doma.1، Bouhoth.7، Bouhoth.11 و Cham.3 (73.33، 70، 68.57 و66.66 %، على التوالي). أما بالنسبة لمتوسط نسبة تجديد النباتات الأعلى معنوياً فقد لوحظ عند استعمال 1 مغ.ل$^{-1}$ من BAP و0.1 مغ.ل$^{-1}$ من IAA (47.50 %). وكان متوسط عدد النموات المتشكلة الأعلى معنوياً عند استعمال 1 مغ.ل$^{-1}$ منBAP و0.1 مغ.ل$^{-1}$ من IAA (11.21%)، ولم يلحظ وجود فروقات معنوية بين الأصناف من حيث متوسط عدد النموات المتشكلة. تشير النتائج إلى أن نسبة استحداث الكالس تتحدد بشكلٍ رئيس بتركيز الأوكسين 2,4–D في وسط الاستحداث، ولابدّ من إضافة كمياتٍ متوازنة من الأوكسين والسيتوكينين، شريطة أن تكون نسبة السيتوكينين/الأوكسين أكبر من الواحد لتحسين نسبة التجديد وعدد النموات المتشكلة.

الكلمات المفتاحية: القمح ، الأجنة الناضجة، منظمات النمو، الكالس.

* باحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وزارة التعليم العالي – دمشق.

** باحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية.

***أستاذ مساعد في قسم علوم البستنة – كلية الزراعة – جامعة دمشق.

Callus induction and plant regeneration from mature embryos of some Syrian durum wheat *Triticum durum* Desf.. varieties

Fahed Albisk* **Wasim Mohsen**** **Ramzi Murshed*****

(Received: 10 September 2020, Accepted: 5 July 2020)

Abstract:

This work was conducted in the laboratory of plant biotechnology affiliated to the National Commission of Biotechnology (NCBT) – Ministry of Higher Education, in order to produce callus from the mature embryos of four Syrian durum wheat varieties and plant regeneration from this callus. The results indicate that the significantly highest percentage of callus induction was inBouhoth.11 (76.11), while the lowest was in Bohooth.7 (54.16%). The rate of embryonic callus formation was significantly the highest with the application of 2 mg of 2,4-D in Doma.1, Bouhoth.7, Bouhoth.11 and Cham.3 varieties (73.33, 70, 68.57 and 66.66%, respectively). The plant regeneration rate was significantly the highest with the application of 1 mg.l^{-1}of BAP and 0.1 mg.l^{-1} of IAA (47.50%). The shoots formation rate was significantly the highest with the application of 1 mg.l^{-1}of BAP and 0.1 mg.l^{-1} of IAA (11.21%).There were no significant differences between the varieties in terms of the number of formed shoots. Results indicate that the percentage of the callus induction is determined by the concentration of 2,4-D in the induction media. It is very essential to add balanced amounts of both auxin and cytokinin, but the cytokinin to auxin ratio should be more than one to improve the regeneration percentage and the number of formed shoots.

Keywords: Wheat, mature embryos, growth regulators, callus.

1–المقدمة Introduction:

يُعد محصول القمح من أكثر المحاصيل أهمية وانتشاراً في العالم، ويُشكل الغذاء الأساسي في بلاد شمال أفريقيا وأوروبا وأمريكا الجنوبية والشمالية واستراليا وبعض دول آسيا وأفريقيا. بلغت المساحة المزروعة بالقمح عالمياً 220.1 مليون هكتار، وبلغ الإنتاج 749.5 مليون طناً، بمردود وسطي قدره 3405 كغ/هكتاراً (FAOSTAT، 2016). يتبع القمح الفصيلة النجيلية *Poaceae*، والقبيلة *Triticeae* وتحت القبيلة *Triticnae*، والجنس *Triticum*، وتُصنّف كل الأنواع التابعة لهذا الجنس تبعاً لعدد الصبغيات إلى الأنواع الثنائية 2n=14، الأنواع الرباعية 2n=28 (وينتمي إليها القمح القاسي *Triticum durum Desf.*) والأنواع السداسية 2n=42 (وينتمي إليها القمح الطري *Triticum aestivum* L.).

إن الحصول على طرز وراثية عالية الإنتاجية ومتحملة للإجهادات اللاأحيائية لا يتفق مع بطء برامج التربية التقليدية، لذلك كان لابد من البحث عن آلية سريعة لإحداث تغير في التركيب الوراثي، وتعد التغيرات الجسمية النسيلية Somaclonal variation من أسرع الطرق لتحقق من ذلك (Chahal و Gosal، 2002). كما تعد زراعة الأنسجة النباتية من التقانات المهمة في عمليات التحسين الوراثي، إذْ فتحت مجالاً غير محدود في التطبيقات الزراعية، وتطورت استخداماتها خلال العقود الأخيرة تطوراً كبيراً شملت عدداً كبيراً من النباتات، كما توسعت فوائدها التطبيقية في تطوير واستنباط سلالات جديدة (Buiatti وزملاؤه، 1984).

يُطلق على السلالات ذات التراكيب الوراثية الجديدة بالسلالات الخلوية Cali clones لأنّها ناتجة عن تمايز الكالس تحت ظروف الزراعة المخبرية. وقد تمّ تعريف هذه السلالات باسم السلالات الكالوسية (الخلوية) (1976، Skirvin). وقد وضع العالمان Larkin و Scowraft (1981) تعريفاً دقيقاً لهذه السلالات مشترطين في هذه التسمية أن تكون تلك السلالات ناتجة عن الاختلافات الجسمية في القطع النباتية المزروعة تحت ظروف الإجهاد ضمن الظروف البيئية المخبرية، فقد وُجد أن التباينات الوراثية الناتجة عن زراعة الخلايا تكون بمعدل 30% بالمقارنة مع الطفرات الطبيعية تحت الظروف الخارجية التي لا تتجاوز 0.00001% (Maliga، 1984؛ Smith وزملاؤه، 1993).

على الرغم من أنّ القمح من النباتات صعبة الإكثار والتجديد في زراعة الأنسجة، فمن الممكن الحصول على الكالس من العديد من الخزعات النباتية مثل الأجنة الناضجة، والأجنة غير الناضجة والغلاف الزهري (Casas وزملاؤه، 1997؛ Shrawat و LÖrz، 2006) حيث تُعد الأجنة الناضجة Mature embryos أفضل هذه الخزعات، فهي تدخل في طور النمو العشوائي غير المتمايز أسرع من الأجنة غير الناضجة، وبالتالي تعطي نسبة عالية من استحداث الكالس (Stale و Lnze، 2001)، كذلك يمكن تخزينها والحصول عليها في أي وقت من السنة (Kishore وزملاؤه، 2006؛ Zhao وزملاؤه، 2008)، مع العلم أنّ معدّل تشكل الكالس الجنيني أقل بنحو 10% عند استعمال الأجنة الناضجة بالمقارنة مع الأجنة غير الناضجة (Mackinnon وزملاؤه، 1986). ويمكن أن تختلف التباينات الوراثية الجسمية باختلاف الطراز الوراثي أو المجموعة الصبغية الأساسية وتضاعفاتها، أو باختلاف منظمات النمو الداخلة في تركيب الوسط المغذي، أو مدّة الزراعة (Biswas وزملاؤه، 2002).

تؤدي منظمات النموالنباتية دوراً أساسياً في زراعة الأنسجة النباتية (Bhaskaran و Smith، 1990)، وغالباً ما يكون للأوكسين 2,4–D الدور الأهم في استحداث الكالس، وتكوين الكالس الجنيني، بحسب النتائج التي تمّ الحصول عليها في بعض النباتات أحادية الفلقة (Rueb وزملاؤه، 1994؛ Vikrant و Rashid، 2003؛ Jogeswar وزملاؤه، 2007). وقد تؤدي الزيادة الكبيرة من 2,4–D إلى إعطاء كالس غير مرغوب فيه، وتؤثر سلباً في معدل تجديد النبات (Mendoza و Kaeppler، 2002)، وغالباً ما يكون تركيز 1–3 مغ.ل$^{-1}$ من 2,4–D هو الأفضل لتشكيل كالس جنيني في الحبوب (Bi وزملاؤه، 2007). وقد وجد Pola وزملاؤه (2009) أنّ أفضل وسط لاستحداث الكالس هو وسط MS (Murashige و Skoog،

1962)، مضافاً إليه 2.5 مغ. ل$^{-1}$ من 2,4–D، حيث حقق أعلى نسبة لتشكل الكالس الجنيني. وقد وجد Sairam وزملاؤه (2000) أنّ أفضل وسط لتجديد نبات الذرة البيضاء من الكالس هو وسط MS مع إضافة 2 مغ . ل$^{-1}$ من بنزيل أدينين (BA) و0.5 مغ.ل$^{-1}$ من إندول أسيتيك أسيد (IAA). وقد بين Shan وزملاؤه (2000) أنّ Thidiazuron (TDZ) قادر على رفع نسبة التجديد في النبات. وكانت أعلى نسبة تجديد حصل عليها Pola وزملاؤه (2008) عند استعمال مزيج هرموني مكون من 1.5 مغ.ل$^{-1}$ من TDZ و1.5 مغ.ل$^{-1}$ من مركب 6–benzyl adenine (BAP) و1 مغ . ل$^{-1}$ من Indole–3–acetic acid (IAA) في نبات القمح.

ونظراً لأهمية ايجاد تباينات وراثية جديدة باستمرار لمتابعة عملية التحسين الوراثي في تطوير برامج تربية سريعة وفعالة ودقيقة، واستخدامها في برامج التحسين الوراثي الهادفة للوصول إلى طرز متحملة للإجهادات البيئية لذلك كان لابد من البحث عن آلية سريعة لاحداث تغير في التركيب الوراثي، ذلك فقد هدف البحث الى تحديد الوسط الأمثل لاستحداث الكالس والكالس الجنيني من الأجنة الناضجة لأصناف القمح القاسي السورية وتجديد النباتات منه للحصول على نباتات متباينة وراثياً بهدف استعمالها في عمليات التحسين الوراثي مستقبلاً.

2–مواد البحث وطرائقهِ Materials and Methods

نُفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية النباتية التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق، حيث استعمل في تنفيذ هذا البحث أربعة أصناف من القمح القاسي (Doma.1، Bouhoth.7، Bouhoth.11 و Cham.3)، والتي تمَّ الحصول عليها من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية.

طهرت حبوب أصناف القمح القاسي بالكحول الإيتيلي (70%) مدّة دقيقة واحدة مع التحريك، ثم عوملت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) بتراكيز مختلفة (0، 1، 3، 4 و 5%) مدّة 15 و20 دقيقة مع إضافة محلول TWEEN–20 لزيادة فعّالية وكفاءة عملية التطهير وتخفيف التوتر السطحي. ثم غُسلت البذور بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات متتالية بمعدّل 5 دقائق لكل مرة. زُرعت العينات النباتية في وسط MS، المضاف له 30 غ.ل$^{-1}$ سكروز و 7 غ.ل$^{-1}$ آجار بدرجة حموضة (pH) 5.8.

بلغ عدد الأنابيب المزروعة 32 أنبوباً من كل معاملة من كل صنف، وسجّلت في هذه المرحلة النسب المئوية للعينات السليمة، والنسب المئوية للعينات النامية من العينات السليمة.

تمّ في مرحلة استحداث الكالس استئصال الأجنة الناضجة من البذور وزراعتها على الوسط المغذي MS المضاف له تراكيز مختلفة من منظمات النمو النباتية من الأوكسين (2,4–D) (0، 1، 2، 3، 4 و5 مغ.ل$^{-1}$)، والأوكسين IAA (Indol acitice acid) بتركيز 0.2 مغ. ل$^{-1}$، ضمن أطباق بتري بقطر 9 سم، وتمّت زراعة 5 أجنة في كل طبق وبمعدل ثمانية أطباق لكل معاملة. وحضّنت الأطباق في الظلام عند درجة حرارة 24±2 م°، ورطوبة نسبية 70%، ونقلت كل أسبوعين إلى وسط جديد، وأخذت القراءة بعد مرور 6 أسابيع. وتمّ تحديد التركيز الأمثل من المزيج الهرموني 2,4–D و IAA من خلال دراسة نسبة استحداث الكالس وتشكل الكالس الجنيني وحجم الكالس المتشكّل (Nasircilar وزملاؤه، 2006).

في مرحلة تجديد النباتات، تم نقل الكالس الجنيني إلى وسط MS المعدل، 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 حيث تحرر هذه المواد الآزوت ببطء ويبقى متوفراً للنبات)، حيث تمّت دراسة تأثير منظمات النمو النباتية من السيتوكينين بنزيل أمينو بيورين (BAP) بتراكيز مختلفة (0، 0.5، 1، 2 و3 مغ.ل$^{-1}$) والأوكسين IAA بتركيز 0.1 مغ.ل$^{-1}$، لتحديد المزيج الهرموني الأفضل من خلال دراسة تأثيره في نسبة تجديد النبات، وفي عدد النموات المتشكلة من الكالس، وكانت الزراعة في أطباق بتري بقطر 9 سم وارتفاع 1.5 سم، حيث زرع 3–5 خزعات في الطبق، وحُضّنت على درجة حرارة حرارة 24 م°،

ورطوبة نسبية 70%، و16 ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام وشدة ضوئية 3000 لوكس (Nasircilar وزملاؤه، 2006). وأخذت قراءات نسبة التجديد وعدد النموات المتشكلة.

التصميم التجريبي والتحليل الإحصائي: صُممت التجربة وفق التصميم العشوائي التام (RCD)، وحُللت النتائج باستخدام برنامج XLSTAT.2016 وأجري تحليل التباين (Two way ANOVA) باستخدم اختبار Fisher، حيث تمت مقارنة المتوسطات وحساب قيمة أقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 1%.

3–النتائج والمناقشة:

المرحلة التأسيسية (التطهير السطحي):

تأثير التراكيز المختلفة من هيبوكلوريت الصوديوم وزمن التطهير في نسبة الإنبات:

تُعد عملية التطهير السطحي من أهم الخطوات التي يعتمد عليها لنجاح أو فشل الزراعة النسيجية، ويتوقف نجاح هذه العملية على عدة عوامل، أهمها الوقت اللازم للتطهير، ونوع وتركيز المادة المستعملة في التطهير، والجزء النباتي المراد تطهيره. وقد تمّ في هذا البحث استعمال مادة هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) نظراً لفعاليتها في عمليات التطهير السطحي في العديد من النباتات المزروعة مخبرياً (Pevalek و Jelaska ، 1987؛ المعري، 1995). وقد بيّنت النتائج وجود فروقات معنوية في نسبة الإنبات بين تراكيز محلول هيبوكلوريت الصوديوم، والأصناف والتفاعل المتبادل بينهما، بينما لم يلاحظ وجود فروقات معنوية بين زمني التطهير السطحي، في حين لوحظ وجود فروقات معنوية بين تفاعل المتغيرات الثلاثة المدروسة (الجدول 1). كان متوسط نسبة الإنبات الأعلى معنوياً عند تركيزي محلول هيبوكلوريت الصوديوم (4 و5%) وبفروقات معنوية بينها، حيث تفوق التركيز 5 % معنويا بقيمة بلغت 84.84%، تلاها وبفروقات معنوية التراكيز 1، 3 و4 % (70.20، 58.06 و26.34%، على التوالي)، في حين كانت نسبة الإنبات الأدنى معنوياً في معاملة الشاهد (بدون هيبوكلوريت الصوديوم) (17.85%). وكانت نسبة الإنبات الأدنى معنوياً في الأصناف Doma.1 و Bouhoth.11 (44.02 و45.46 %، على التوالي) وبدون فروقات معنوية بينهما، بينما كانت الأصناف الأعلى معنوياً في نسبة الانبات Bouhoth.7 و Cham.3 (60.05 و56.60 %، على التوالي) وبدون فروقات معنوية بينهما.ويُلاحظ بالنسبة إلى تفاعل تركيز هيبوكلوريت الصوديوم وزمن التعقيم والأصناف المدروسة، أنّ نسبة الإنبات كانت الأعلى معنوياً في الصنف Bouhoth.7 عند التركيز 5 % من هيبوكلوريت الصوديوم مدّة 20 دقيقة بقيمة بلغت 97.32%، في حين كانت نسبة الإنبات الأدنى معنوياً في معاملة الشاهد في الأصناف الأربعة المدروسة. تُشير النتائج إلى أهمية التطهير السطحي للبذور بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم لفترة لا تقل عن 15 دقيقة لتحسين نسبة الإنبات من خلال القضاء على جميع المسببات المرضية، ويُعزى التباين في نسبة الإنبات بين الأصناف المدروسة بشكلٍ رئيس إلى التباين في حيوية البذور، ويمكن أن يؤدي التطهير السطحي دوراً مهماً في المحافظة على سلامة النبيتات لاحقاً. وقد زادت نسبة الإنبات مع زيادة تركيز هيبوكلوريت الصوديوم وزمن التطهير، ولم تؤثر الزيادة في تركيز هيبوكلوريت الصوديوم في حيوية البذور، ويعود ذلك إلى وجود الغلاف الذي يحمي جنين البذرة من الضرر (السعيد،2013).

الجدول رقم (1): تأثيرالتراكيزالمختلفة من هيبوكلوريت الصوديوم وزمن التطهير في نسبة الإنبات.

تركيز NaOCl	الزمن (دقيقة)	نسبة الإنبات (%)				
		Cham3	Doma1	Bouhoth11	Bouhoth7	متوسط التراكيز
0	15	21.43^{qr}	18.75^{r}	24.14^{opq}	7.29^{s}	18.29^{F}
	20	21.42^{qr}	17.85^{r}	22.36^{pqr}	8.04^{s}	17.42^{F}
1	15	32.21^{lm}	21.43^{qr}	26.86^{nop}	9.82^{s}	22.58^{F}
	20	36.46^{kl}	27.68^{mno}	29.46^{mn}	26.79^{nop}	$.3010^{E}$
3	15	51.78^{h}	40.18^{jk}	43.75^{ij}	83.93^{cd}	54.91^{D}
	20	71.43^{e}	44.64^{ij}	46.43^{i}	82.14^{d}	61.16^{CD}
4	15	80.3^{d}	42.86^{ij}	44.64^{ig}	92.85^{ab}	65.18^{C}
	20	84.82^{cd}	61.61^{g}	66.07^{fg}	88.39^{bc}	75.22^{B}
5	15	82.14^{d}	69.64^{ef}	67.86^{ef}	96.43^{a}	79.02^{B}
	20	83.93^{cd}	95.54^{a}	83.04^{d}	97.32^{a}	89.95^{A}
متوسط الأصناف		56.60^{A}	44.02^{B}	45.46^{B}	60.05^{A}	–
متوسط فترة التطهير	15	53.58^{AB}	38.57^{C}	41.45^{BC}	59.59^{A}	48.21^{A}
	20	59.61^{A}	49.46^{ABC}	49.47^{ABC}	60.54^{A}	54.77^{A}
متوسط التركيز	%0	21.43^{JK}	18.30^{K}	23.25^{IJK}	7.69^{L}	17.85^{E}
	%1	34.33^{H}	24.55^{IJ}	28.16^{I}	18.30^{K}	26.34^{D}
	%3	61.60^{E}	42.41^{G}	45.08^{G}	83.04^{C}	58.06^{C}
	%4	82.59^{C}	52.23^{F}	55.35^{F}	90.63^{B}	70.20^{B}
	%5	83.03^{C}	82.58^{C}	75.44^{D}	96.87^{A}	84.48^{A}
LSD		(%1)				
تركيز هيبوكلوريت الصوديوم		5.07				
زمن التطهير		6.76				
الأصناف		9.38				
تفاعل زمن التطهيرو تركيز هيبوكلوريت الصوديوم		6.92				
تفاعل تركيز هيبوكلوريت الصوديوم والأصناف		5.35				
تفاعل زمن التطهير والأصناف		13.25				
تفاعل زمن التطهير والأصناف وتركيز هيبوكلوريت الصوديوم		4.58				
CV		1.96				

*يشير اختلاف الأحرف الصغيرة في السطر الواحد إلى الفروق المعنوية بين المعاملات ضمن الصنف الواحد، ويشير اختلاف الأحرف الكبيرة في العمود الواحد إلى الفروق المعنوية بين الأصناف عند مستوى ثقة 99%.

تأثير التراكيز المختلفة من هيبوكلوريت الصوديوم وزمن التطهير في نسبة النباتات السليمة:

بيّنت النتائج وجود فروقات معنوية في نسبة النباتات السليمة ما بين تراكيز محلول هيبوكلوريت الصوديوم المختلفة وزمني التطهير السطحي والأصناف المدروسة والتفاعل المتبادل بينهم، حيث يُلاحظ من الجدول (2) أنّ متوسط نسبة النباتات السليمة كانت الأعلى معنوياً عند تركيز محلول هيبوكلوريت الصوديوم 5 % بقيمة بلغت 84.96 %، في حين كانت نسبة النباتات السليمة الأدنى معنوياً في معاملة الشاهد (0.00%). وتفوق التطهير السطحي لمدة 20 دقيقة معنوياً على التطهير لمدة 15 دقيقة بقيمة بلغت 42.06 %. وكان متوسط نسبة النباتات السليمة الأعلى معنوياً في الأصناف Bouhoth.7 و Cham.3 (49.18، 46.96 %، على التوالي)، وبدون فروقات معنوية بينها، بينما كانت نسبة النباتات السليمة الأدنى معنوياً في الأصناف Bouhoth.11 و Doma.1 (29.19، 26.00 %، على التوالي). ويُلاحظ بالنسبة إلى تفاعل تركيز هيبوكلوريت الصوديوم **وزمن التطهير والأصناف المدروسة، أنّ نسبة النباتات السليمة كانت الأعلى معنوياً في الصنف Bouhoth.7 عند التركيز 5 % من هيبوكلوريت الصوديوم لمدّة 20 دقيقة بقيمة بلغت 99.11 %، تلاه وبدون فروقاتٍ معنوية الأصناف Cham.3 و Bouhoth.11 (86.61 و82.14 %، على التوالي)، في حين كانت نسبة النباتات السليمة الأدنى** معنوياً في معاملة الشاهد (بدون هيبوكلوريت الصوديوم) عند زمني التعقيم (0.00%) في الأصناف الأربعة المدروسة. تُشير هذه النتائج إلى أهمية التطهير السطحي للبذور، حيث يجب أن لا يقل تركيز مادة هيبوكلوريت الصوديوم في المحلول عن 5%، ومدّة التعقيم عن 20 دقيقة لضمان سلامة أكبر نسبة ممكنة من النبيتات خلال مرحلتي الإنبات واسترساء البادرات. تتوافق نتائجنا مع ما توصل إليه Indra و Krishnaveni (2009) و Pola وزملاؤه (2009).

الجدول رقم (2): تأثير التراكيز المختلفة من هيبوكلوريت الصوديوم وزمن التطهير في نسبة النباتات السليمة.

تركيز NaOCl	الزمن (الدقيقة)	نسبة النباتات السليمة (%)				
		Cham3	Doma1	Bouhoth11	Bouhoth7	متوسط التراكيز
0	15	0.00^{s}	0.00s	0.00^{s}	0.00^{s}	0.00^{F}
	20	0.00^{s}	0.00s	0.00^{s}	0.00^{s}	0.00^{F}
1	15	6.25^{qr}	5.36^{rs}	8.92^{opqr}	16.07^{lmn}	9.15^{E}
	20	8.01^{pqr}	8.93^{opqr}	12.50^{mnop}	27.68^{k}	24.55^{D}
3	15	49.10^{g}	11.61^{nopq}	14.28^{mno}	29.46^{jk}	15.85^{E}
	20	71.43^{f}	17.86^{lm}	20.54^{l}	46.43^{g}	39.06^{C}
4	15	76.78^{def}	33.92^{hij}	39.29^{h}	81.25^{cd}	57.81^{B}
	20	84.82^{bc}	32.14^{ijk}	36.61^{hi}	87.50^{b}	60.26^{B}
5	15	86.60^{bc}	72.3^{ef}	77.68^{de}	97.32^{a}	83.48^{A}
	20	86.61^{bc}	77.89^{d}	82.14^{bcd}	99.11^{a}	86.43^{A}
متوسط الأصناف		46.96^{A}	26.00^{B}	29.19^{B}	49.18^{A}	–
متوسط فترة التطهير	15	35.54^{BC}	24.64^{C}	28.04^{C}	46.14^{AB}	33.49^{B}
	20	58.39^{A}	27.36^{C}	30.36^{C}	52.14^{A}	42.06^{A}
متوسط التركيز	0	0.00^{J}	0.00^{J}	0.00^{J}	0.00^{J}	0.00^{E}
	%1	27.68^{EF}	7.14^{IJ}	10.71^{HI}	21.87^{FG}	16.85^{D}
	%3	39.73^{D}	14.73^{JHI}	17.41^{GH}	37.94^{D}	27.46^{C}
	%4	80.80^{BC}	33.04^{DE}	37.95^{D}	84.37^{B}	59.04^{B}
	%5	86.61^{B}	75.11^{C}	79.91^{BC}	98.21^{A}	84.96^{A}
LSD		(%1)				
تركيز هيبوكلوريت الصوديوم		6.21				
زمن التطهير		8.13				
الأصناف		11.10				
تفاعل زمن التطهيرو تركيز هيبوكلوريت الصوديوم		8.19				
تفاعل تركيز هيبوكلوريت الصوديوم والأصناف		7.94				
تفاعل زمن التطهير والأصناف		15.56				
تفاعل زمن التطهير والأصناف وتركيز هيبوكلوريت الصوديوم		5.49				
CV		1.96				

*يشير اختلاف الأحرف الصغيرة في السطر الواحد إلى الفروق المعنوية بين المعاملات ضمن الصنف الواحد، ويشير اختلاف الأحرف الكبيرة في العمود الواحد إلى الفروق المعنوية بين الأصناف عند مستوى ثقة 99%.

مرحلة استحداث الكالس:

بدأ الكالس بالظهور بعد 4 إلى 7 أيام من زراعة الأجنة الناضجة على وسط الاستحداث وكان الكالس في البداية ذو قوام طري وكميته قليلة، ولكن بعد النقل تحسّنت خواص الكالس وأصبح أكثر تماسكاً.وتكوّن الكالس الجنيني بعد 45يوماً من الزراعة، حيث سجلت قراءات نسبة تشكّل الكالس (كتلة خلوية غير متمايزة لها قدرة كبيرة على الانقسام والنمو بشكلٍ عشوائي) ونسبة تشكّل الكالس الجنيني.

تأثير التراكيز المختلفة من أوكسين 2,4–D في استحداث الكالس:

تبيّن النتائج في الجدول (3) وجود فروقات معنوية في نسبة استحداث الكالس ما بين تراكيز منظم النمو 2,4–D المختلفة والأصناف والتفاعل المتبادل بينهما، حيث يُلاحظ أنّ متوسط نسبة استحداث الكالس كان الأعلى معنوياً عند التراكيز 2 و3 مغ.ل$^{-1}$ من 2,4–D (89.58 و92.77%، على التوالي) وبدون فروقات معنوية فيما بينها، ويلاحظ تفوق التركيز 1 مغ.ل$^{-1}$ معنوياً من حيث نسبة استحداث الكالس على التركيز 5 مغ.ل$^{-1}$بقيمة بلغت 73.33%، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند المعاملة الشاهد (بدون 2,4–D). تؤكد هذه النتائج أنّ نسبة استحداث الكالس تتحدد بشكلٍ رئيس بوجود الأوكسين 2,4–D في وسط الاستحداث. وكانت نسبة استحداث الكالس الأعلى معنوياً في الأصناف Bouhoth.11، Doma.1 و Cham.3 (76.11، 64.23 و60.23 %، على التوالي) وبدون فروقات معنوية فيما بينها، بينما تفوق الصنف Bouhoth.11 معنوياً على الصنف Bouhoth.7 بقيمة بلغت 76.11 %، في حين كانت نسبة استحداث الكالس الأدنى معنوياً في الصنف Bouhoth.7 (54.16%). مما يشير إلى وجود تباين وراثي في كفاءة استحداث الكالس ما بين الأصناف المدروسة. ويُلاحظ أنّ نسبة الاستحداث كانت الأعلى معنوياً عند التراكيز 1، 2 و3 مغ.ل$^{-1}$ في الأصناف Bouhoh.11 (100، 100، 96.66 %، على التوالي) و Doma.1 (72.22، 91.66 و82.22 %، على التوالي) .

بيّنت العديد من الأبحاث أنّ للأوكسين 2,4–D الدور الأساسي في استحداث وتشكيل الكالس، وخاصةً الأنواع النباتية أحادية الفلقة Monocotyledons (Jogeswar وزملاؤه، 2007؛ Vikrant و Rashid، 2003). تتوافق هذه النتائج مع ما حصل عليه Rashid وزملاؤه (2009) حيث بيّنوا أنّ زيادة استحداث الكالس بوجود الأوكسين 2,4–D ناجم عن دوره في تشجّيع الانقسام الخلوي الميتوزي، حيث يعمل الأوكسين على زيادة معدل اصطناع الأحماض النووية RNA، كما ينشط عمل الأنزيمات التي تعمل على تنشيط التفاعلات الكيميائية اللازمة لتأمين المواد الضرورية للانقسام الخلوي، مثل تنشيط عمل أنزيم RNA Polymerase (Morel وزملاؤه، 1968). فالأوكسين يسرع الدورة الخلوية وتخليق بنى الكالس لكن كلما ازداد تركيز الأوكسين المستخدم كلما قل الحصول على نباتات متجددة (Stale و Lnze، 2001). أما بالنسبة لتباين استجابة الأصناف لاستحداث الكالس فقد بيّنت العديد من الدراسات تباين نسبة استحداث الكالس باختلاف الأنواع، وحتى الأصناف المدروسة التابعة للنوع نفسه (Elhag و Butler، 1992).

الجدول رقم (3): تأثير تراكيز مختلفة منأوكسين 2,4-D في نسبة استحداث الكالس في أصناف القمح القاسي المدروسة.

الأصناف	نسبة استحداث الكالس (%)						متوسط الأصناف
	تركيز 2,4-D (مغ.ل$^{-1}$)						
	0	1	2	3	4	5	
Cham.3	0.00^{g}	63.33^{de}	91.66^{a}	82.22^{abc}	62.49^{de}	51.66^{ef}	60.23^{AB}
Doma.1	0.00^{g}	72.22^{bcd}	94.44^{a}	88 .88^{ab}	63.88^{de}	66.66^{cde}	64.35^{AB}
Bouhoth.11	0.00^{g}	96.66^{a}	100.00^{a}	100.00^{a}	73.33^{bcd}	86.66^{ab}	76.11^{A}
Bouhoth.7	0.00^{g}	61.10^{de}	72.21^{bcd}	100.00^{a}	59.52^{de}	38.88^{f}	54.16^{B}
متوسط	0.00^{D}	73.33^{B}	89.58^{A}	92.77^{A}	63.12^{BC}	60.97^{C}	–
LSD						(1%)	
تركيز 2,4-D						10.27	
الصنف						16.20	
تفاعلD-2,4 والأصناف						19.46	
C.V						1.97	

*يشير اختلاف الأحرف الصغيرة في السطر الواحد إلى الفروق المعنوية بين المعاملات ضمن الصنف الواحد، ويشير اختلاف الأحرف الكبيرة في العمود الواحد إلى الفروق المعنوية بين الأصناف عند مستوى ثقة 99%.

تأثير المستويات المختلفة من 2,4-D في تشكل الكالس الجنيني:

بيّنت النتائج وجود فروقات معنوية في نسبة تشكل الكالس الجنيني ما بين تراكيز منظم النمو 2,4-D المختلفة، والأصناف المدروسة والتفاعل المتبادل بينهما، حيث يُلاحظ من الجدول (4) أنّ نسبة تشكل الكالس الجنيني كان الأعلى معنوياً كانت عند تركيز 2 مغ.ل$^{-1}$ 2,4-D (71.66%)، كما يلاحظ تفوق التركيز 3 مغ.ل$^{-1}$ معنوياً على التراكيز 4 و5 مغ.ل$^{-1}$ بقيمة بلغت 52.50%، في حين فشلت تماماً عملية تشكل الكالس الجنيني عند معاملة الشاهد. وتُشير هذه النتائج إلى أهمية وجود الأوكسين 2,4-D في وسط استحداث الكالس لتشجيع تشكل الكالس الجنيني، لكن حتى مستوىً معين، حيث تؤثر زيادة تركيز 2,4-D أكثر من 2 مغ.ل$^{-1}$ سلباً في نسبة تشكل الكالس الجنيني، ويُلاحظ بالمقابل أنّ وجود تركيز منخفض جداً من 2,4-D يؤثر سلباً في نسبة الكالس الجنيني. ولم تظهر نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية بين الأصناف المدروسة، أما بالنسبة للتفاعل بين الأصناف وتراكيز 2,4-D، فقد كانت نسبة تشكل الكالس الجنيني الأعلى معنوياً عند التركيز 2 مغ.ل$^{-1}$ 2,4-D لدى الأصناف Doma.1، Bouhoth.7، Bouhoth.11 وCham.3 (73.33، 70، 68.57 و66.66 %، على التوالي) وبدون فروقات معنوية فيما بينها. يُلاحظ مما تقدم، أنّ العوامل الوراثية المسؤولة عن تشكل الكالس الجنيني تختلف عن تلك المسؤولة عن استحداث الكالس. وتتوافق هذه النتائج مع ماتوصّل إليه Haliloglu وزملاؤه (2006)، حيث بيّن أنّ أعلى نسبة لتشكّل الكالس الجنيني كانت عند استعمال تركيز 2 مغ.ل$^{-1}$ 2,4-D، ومع ما

توصّل إليه Rashid وزملاؤه (2009) من أن أفضل نسبة لتشكل الكالس الجنيني كانت عند التركيزين 2 و3 مغ.ل$^{-1}$ 2,4-D.

الجدول رقم (4): تأثير تراكيز مختلفة من أوكسين 2,4-D في نسبة تشكل الكالس الجنيني في أصناف القمح المدروسة.

الأصناف	نسبة تشكل الكالس الجنيني (%)						متوسط الأصناف
	تركيز 2,4-D (مغ.ل$^{-1}$)						
	0	1	2	3	4	5	
Cham.3	0.00^{i}	30.00^{fg}	66.66^{ab}	46.66^{de}	36.66^{ef}	26.66^{fg}	34.44^{A}
Doma.1	0.00^{i}	33.33^{ef}	73.33^{a}	53.33^{cd}	36.66^{ef}	13.33^{hi}	35.00^{A}
Bouhoth.11	0.00^{i}	32.00^{f}	68.57^{ab}	56.66^{bc}	26.66^{fg}	23.33^{fg}	35.55^{A}
Bouhoth.7	0.00^{i}	30.00^{fg}	70.00^{ab}	53.33^{cd}	33.33^{ef}	16.66^{gh}	34.85^{A}
متوسط التراكيز	0.00^{E}	30.83^{C}	71.66^{A}	52.50^{B}	33.33^{C}	20.00^{D}	–
LSD						(1%)	
تركيز 2,4-D						6.17	
الصنف						11.87	
تفاعل2,4-D والأصناف						13.61	
C.V						1.97	

*يشير اختلاف الأحرف الصغيرة في السطر الواحد إلى الفروق المعنوية بين المعاملات ضمن الصنف الواحد، ويشير اختلاف الأحرف الكبيرة في العمود الواحد إلى الفروق المعنوية بين الأصناف عند مستوى ثقة 99%.

مرحلة التجديد:

تأثير تركيز السيتوكينين BAP والأوكسين IAA في نسبة تجديد النبات من الكالس:

تبيّن نتائج في الجدول (5) وجود اختلافات في نسبة تجديد النباتات ما بين التراكيز المختلفة من منظم النمو BAP والأصناف المدروسة والتفاعل المتبادل بينها، حيث يُلاحظ أنّ نسبة تجديد النباتات الأعلى معنوياً كانت عند استعمال 1 مغ.ل$^{-1}$ BAP و0.1 مغ.ل$^{-1}$IAA (47.50%)، في حين كانت الأدنى معنوياً في معاملة الشاهد (بدون منظمات النمو) (2.50%)، ما يؤكّد أهمية وجود BAP في تجديد النباتات من الكالس، ولكن زيادة تركيزه عن حدٍ معين تؤثر سلباً في نسبة تجدد النباتات. ولم يلاحظ وجود أي فروقات معنوية من حيث نسبة التجديد ما بين الأصناف المدروسة. أما بالنسبة للتفاعل المتبادل بين الأصناف المدروسة والتراكيز المختلفة من منظم النموBAP، فكانت نسبة التجديد الأعلى معنوياً في الأصناف Doma.1 وBouhoth.7 عند المعاملة 1 مغ.ل$^{-1}$ BAP و0.1 مغ.ل$^{-1}$IAA (56.66 و53.33 %، على التوالي)، بينما كانت الأدنى معنوياً في الشاهد. وتشير هذه النتائج إلى أنّ العامل الأهم المحدد في تجديد النباتات من الكالس هو وجود السيتوكينين في وسط التجديد (BAP)، فللسيتوكينينات القدرة على تشكيل البراعم من الأنسجة غير المتمايزة (الكالس)، ويعود ذلك إلى دور الستوكينينات في الانقسام الخلوي، فقد دلّت الأبحاث على أنها تنشط اصطناع البروتينات اللازمة للانقسام الخلوي كما تشجع تشكل الـRNA والـ DNA. ولكن تؤثر زيادة تركيزه عن حدٍ معين سلباً في نسبة التجديد، ما يشير إلى أهمية المحافظة على التوازن الهرموني بين الأوكسين والسيتوكينين في وسط التجديد. وقد وجد في بعض التجارب أنه ليس للسيتوكينين تأثير فعال دون وجود الأوكسين معه بتوازن هرموني يؤثر بشكل نشيط في الانقسام الخلوي (Morel وزملاؤه، 1968).

الجدول رقم (5): تأثير تركيز السيتوكينين BAP والأوكسين IAA في نسبة تجديد النباتات في أصناف القمح المدروسة

الأصناف	نسبة تجديد النباتات (%)						
	التراكيز مغ.ل$^{-1}$						متوسط الأصناف
	0	0	1	2	3	BAP	
	0	0.1	0.1	0.1	0.1	IAA	
Cham.3	0.00g	0.00g	43.33^{bc}	36.66^{cd}	20.00^{ef}	–	20.00^{A}
Doma.1	0.00^{g}	16.66^{ef}	56.66^{a}	36.67^{cd}	20.00^{ef}	–	26.00^{A}
Bouhoth.11	8.57^{fg}	28.00^{de}	36.66^{cd}	16.66^{ef}	3.33^{g}	–	18.00^{A}
Bouhoth.7	0.00^{g}	10.00^{fg}	53.33^{ab}	33.33^{cd}	16.66^{ef}	–	23.45^{A}
متوسط التراكيز	2.50^{D}	13.67^{C}	47.50^{A}	30.83^{B}	15.00^{C}	–	–
LSD (%1)							
تركيز BAP	7.41						
الصنف	10.43						
تفاعل	12.68						
C.V	1.98						

*يشير اختلاف الأحرف الصغيرة في السطر الواحد إلى الفروق المعنوية بين المعاملات ضمن الصنف الواحد، ويشير اختلاف الأحرف الكبيرة في العمود الواحد إلى الفروق المعنوية بين الأصناف عند مستوى ثقة 99%.

تأثير تركيز السيتوكينينBAP والأوكسين IAA في عدد النموات المتشكلة من الكالس:

بيّنت النتائج وجود فروقات معنوية في عدد النموات المتشكلة من الكالس ما بين التراكيز المختلفة من منظم النمو BAP والأصناف المدروسة والتفاعل المتبادل فيما بينها، حيث يُلاحظ من الجدول (6) أنّ عدد النموات المتشكلة كان الأعلى معنوياً عند استعمال 1 مغ.ل$^{-1}$ BAP و0.1 مغ.ل$^{-1}$ IAA (11.21%)، في حين كان الأدنى معنوياً في معاملة الشاهد (بدون منظمات النمو) (3.67%). مما يؤكّد أهمية وجود BAP في تشكل النموات، ولكن تؤثر زيادة تركيزه عن حدٍ معين سلباً في عدد النموات. كما بينت النتائج عدم وجود فروقات معنوية من حيث عدد النموات المتشكلة ما بين الأصناف المدروسة. أما بالنسبة للتفاعل المتبادل بين الأصناف المدروسة والتراكيز المختلفة من منظم النمو BAP، فكانت نسبة التجديد الأعلى معنوياً في الأصناف Cham.3، Doma.1، Bouhoth.7 وBouhoth.11 عند المعاملة 1 مغ.ل$^{-1}$ BAP و0.1 مغ.ل$^{-1}$IAA (11.83، 11.33، 11.33 و10.33%، على التوالي) وبدون فروقات معنوية فيما بينها، في حين كانت الأدنى معنوياً في معاملة الشاهد (بدون منظمات النمو).

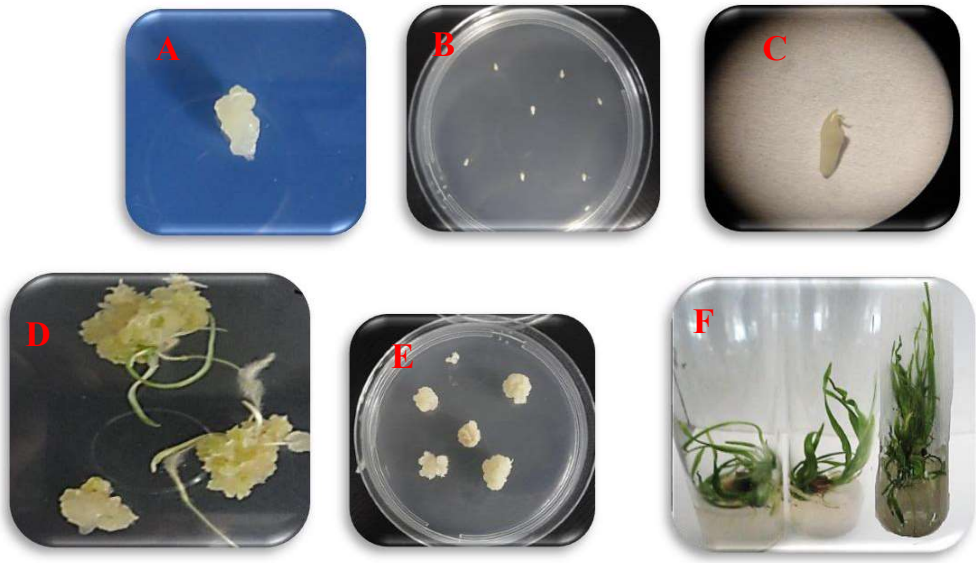
أظهرت النتائج في الجدول رقم (5،6) أنّ أفضل وسط لتجديد النبات من حيث نسبة التجديد وعدد النموات المتشكلة من الكالس، كان الوسط المغذي المضاف إليه 1 مغ.ل$^{-1}$ BAP و0.1 مغ.ل$^{-1}$ IAA، وهذا يوافق ما حصل عليه Rashid وزملاؤه (2009)، ويخالف ما حصل عليه Shah وزملاؤه (2003)، الذي بيّن أنّ أفضل وسط لتجديد النبات من الكالس

هو وسط MS المضاف له 2 مغ.ل$^{-1}$ BAP و0.1 مغ.ل$^{-1}$ IAA. وبيّن Elhag و Butler (1992) أنّ مقدرة النبات على تكوين الكالس وتجديد النبات تختلف باختلاف الصنف، والخزعة النباتية، والوسط المغذي. وبيّن Zhao وزملاؤه (2010) أنّ نسبة تشكل النموات تتأثر باالمزائج الهرمونية المختلفة وتركيز منظمات النمو في الخليط، والمادة الوراثية المدروسة، ولوحظ انخفاض نسبة تجديد النبات وعدد النموات بزيادة تركيز BAP وثبات تركيز IAA، كما أنّ BAP هو الهرمون الأكثر فعّالية لتعزيز تشكل النموات، ويعود السبب إلى أنّ السيتوكينينات، وخاصةً BAP، توقف السيادة القمية وتشجع نمو البراعم الجانبية، وتحفز الإنقسام والنمو العرضي لها، ويعزز وجود كل من السيتوكينينات والأوكسينات تكون النموات ونموها في العديد من الأنواع (George، 1993)، كما أن التفاعل بين BAP و IAA بتركيز منخفض له تأثير فعّال في تكوين النموات، حيث أن وجود إثنين من هرمونات النمو المختلفة ضرورياً لنجاح تكوين نموات النبات في زراعة الأنسجة، و يعدُ التفاعل بين السيتوكينين والأوكسين الأكثر أهمية لتنظيم نمو النبات. يؤدي الأوكسين عند إضافته بتركيز منخفض في مرحلة تشكل النموات دوراً هاماً حيث يزيد نفاذية الخلية والضغط الحلولي ويشجع تكوين البروتينات، كما أنّ وجود تركيز مرتفع من السيتوكينين مع تركيز منخفض من الأوكسين يحفز نمو النبات وتكوين النموات في العديد من الأنواع (Pierik، 1987). وبيّن Skoog و Miller (1957) أنّه للتحكم في تجديد النبات من الكالس لا بدّ من إضافة كمياتٍ متوازنة من الأوكسين والسيتوكينين ولا بد أن تكون نسبة السيتوكينين/الأوكسين أكبر من الواحد. وقد يعود انخفاض نسبة التجديد إلى مصدر الخزعة النباتية التي استحدث منها الكالس. وقد بيّن Mackinnon وزملاؤه (1986) أنّ نسبة التجديد في الكالس المستحدث من الأجنة الناضجة تكون أقل منها في الأجنة غير الناضجة، فالأجنة الناضجة تدخل في طور النمو العشوائي غير المتمايز أسرع من الأجنة غير الناضجة وبالتالي تعطي نسبة عالية من استحداث الكالس في حين تحتاج إلى وقت أطول لتشكيل الكالس الجنيني وتجديد النبات من الكالس أقل من نسبة تجدد النبات من كالس الأجنة غير الناضجة. ولكن سهولة الحصول على الأجنة الناضجة وتوافرها على مدار العام هو ما دعا لاستعمالها كمصدر للكالس.

الجدول رقم (6): تأثير تركيز السيتوكينين BAP والأوكسين IAA في عدد النموات المتشكلة في أصناف القمح المدروسة.

الأصناف	عدد النموات المتشكلة						
	التركيز مغ.ل$^{-1}$						متوسط الأصناف
	0	0	1	2	3	BAP	
	0	0.1	0.1	0.1	0.1	IAA	
Cham.3	0.00^{h}	0.00^{h}	11.83^{a}	9.00^{c}	2.83^{fg}	–	4.73^{A}
Doma.1	0.00^{h}	3.83^{ef}	11.33^{ab}	8.17^{cd}	2.67^{fg}	–	5.20^{A}
Bouhoth.11	0.34^{h}	8.33^{cd}	10.33^{b}	4.33^{e}	0.33^{h}	–	4.73^{A}
Bouhoth.7	0.00^{h}	2.50^{g}	11.33^{ab}	7.50^{d}	4.17^{e}	–	5.28^{A}
متوسط التراكيز	0.09^{D}	3.67^{C}	11.21^{A}	7.25^{B}	2.50^{C}	–	–
LSD	(%1)						
تركيز BAP	1.18						
الصنف	2.28						
تفاعل BAP، والأصناف	1.32						
C.V	1.98						

*يشير اختلاف الأحرف الصغيرة في السطر الواحد إلى الفروق المعنوية بين المعاملات ضمن الصنف الواحد، ويشير اختلاف الأحرف الكبيرة في العمود الواحد إلى الفروق المعنوية بين الأصناف عند مستوى ثقة 99%.



الشكل رقم (1): مراحل استحداث الكالس والكالس الجنيني والتجديد والأقلمة

A: جنين مستأصل B:أجنة ناضجة بعد يوم من زراعتها على الوسط الغذائي،C :كالس بعد 15 يوم من زراعة الأجنة الناضجة على وسط MS المضاف له3--2 مغ.ل$^{-1}$

D : كالس جنيني، E: بداية تجديد النموات من الكالس،F: نباتات متجددة من الكالس.

الاستنتاجات:

1. تُعد عملية تطهير البذور بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز 5 % مدّة 20 دقيقة فعّالة في الحد من نمو المسببات المرضية التي يمكن أن تؤثر سلباً في إنبات البذور واسترساء النباتات.
2. تتحدد نسبة استحداث الكالس والكالس الجنيني بشكلٍ رئيس بوجود المركب 2,4-D، وتتأثر بالتركيب الوراثي. وتؤثر زيادة 2,4-D عن 3 مغ.ل$^{-1}$ سلباً في تشكّل الكالس، ويجب ألاّ يقل تركيزه عن 1 مغ.ل$^{-1}$.
3. تتحدد نسبة تجديد النباتات بشكلٍ رئيس بوجود السيتوكينين BAP وتتأثر باختلاف تركيزه، وتؤثر زيادة السيتوكينين BAP عن 2 مغ.ل$^{-1}$ سلباً في نسبة التجديد، ويجب ألاّ يقل تركيزه عن 1 مغ.ل$^{-1}$.
4. يتحدد عدد النموات المتشكلة بالسيتوكينين BAP وبالتركيب الوراثي. كما تؤثر زيادة السيتوكينين BAP عن 2 مغ.ل$^{-1}$ سلباً في عدد النموات المتشكلة، ويجب ألاّ يقل تركيزه عن 1 مغ.ل$^{-1}$.

المراجع: References

1. السعيد، هبة. (2013). استخدم التباين الوراثي الجسمي والانتخاب الخلوي في مزارع الكالس لتحين الملوحة في الذرة البيضاء ، رسالة ماجيستير. كلية الزراعة جامعة دمشق، 82 صفحة.

2. Bhaskaran, S. and R. H. Smith. 1990. Regeneration in cereal tissue culture: A review. Crop Sci., 30: 1328-1336.
3. Bi, R., Kou, M.M., Chen, L.G., Mao, S.R. and Wang, H.G. (2007). Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. Plant Breed. 126: 9-12.

4. Biswas, B., A. Chowdhurry, Bhattacharya and B. Mandal. (2002). In vitro screening for increasing drought tolerance in rice. In Vitro Cell Development Biology of Plant 38: 525-530.
5. Buiatti, E., Barchielli, A., Geddes, M. et al. (1984) Risk factors in maleinfertility: a case-control study. Archs Environ. Hlth, 4, 266–270.
6. Casas, A. M., Kononowicz, A.K., Haan, T.G., Zhang, L., Tomes, D.T., Bressan, R. A.and Hasegawa, P.M. (1997). Transgenic sorghum plants obtained after microprojectile bombardment of immature inflorescences. In Vitro Cell. Dev.
7. Chahal. C.S. and S.S. Gosal. (2002). Principals and procedures of –plant breeding. Alpha Science International. United Kingdom. 604.
8. Elhag, H., and Butler, L. G. (1992). Effect of genotype, explant age and medium composition on callus production and plant regeneration from immature embryos of sorghum. Arab. Gulf J. Sci. Res., 10: 109-119.
9. FAOSTAT. Food and agriculture organization of the United Nations. (2016). http://faostat.fao.org/.
10. George, E.F.(1993). Plant propagation by tissue culture. Part 1. TheTechnology. Exegetics Ltd., Edington, wilts, England, pp. 89-91.
11. Haliloglu, K. (2006). Efficient regeneration system from wheat leaf base segment.. BiologiaPlantarum, vol. 50, no. p. 326-330.
12. Indra AP, Krishnaveni S (2009). Effect of hormones, explants and genotypes in in-vitro culturing of Sorghum. J Biochem Tech 1:96-103.
13. Jogeswar, G., Ranadheer, D., Anjaiah, V. and Kishor, P.B.K. (2007). High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of Sorghum bicolor (L.) Moench from immature inflorescence explants. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant, 43: 159-166.
14. Kishore, S.N., Visarada, K.B.R.S., Lakshmi, A.Y., Pashupatinath, E., Rao, S.V. and Seetharama, N. (2006). In vitro culture methods in Sorghum with shoot tip as the explants material. Plant Cell Rep. 25: 174–182. DOI 10.1007/s00299-005-0044-y.
15. Larkin, P. J. and Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.
16. Mackinnon, C., Gunderson, G. and Nabors, M. W. (1986). Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus cultures of sweet sorghum. Plant Cell Rep. 5: 349-351.
17. Maliga, P. (1984). Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 519-542.

18. Mendoza, M. G. and Kaeppler, H. F. (2002). Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (Triticum aestivum L.). In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 38: 39-45.
19. Morel, G., C. Matin and C. Muller. 1968. Laguuerison des pommes De terre atteintes irus. de maladies a virus. Ann. Physiol., Veg.10(2): 113-139.
20. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-97.Theor and Appli. Genetic. 90 (1):129-134.
21. Nasircilar, A. G., K. Turgut and K. Fiskin. (2006). Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different Wheat Genotypes. Pak. J. Bot.38: 637-645.
22. Pevalek, K. B. and Jelaska, S. (1987). Microclonal propagation of prunus avium. Acta Hort., 212:599-601.
23. Pierik, R. L. M. (1987). Storage of plant material in vitro. In: In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Pp. 296-300.
24. Pola, S., Mani, N.S. and Ramana, T. (2008). Plant tissue culture studies in Sorghum bicolor: immature embryo explants as the source material. Int. J. Plant Prod.,2:1-14.
25. Pola, S., Mani, N.S. and Ramana, T. 2009. Mature embryo as a source material for efficient regeneration response in Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench.). Seed Sci J 26:93-104.
26. Rashid, U., S. Ali.,G. M. Ali, N. Ayub and M. S. Masood. (2009). Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistan bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Electronic Journal of Biotechnology ISSN, vol.12. no.3, p.1-12.
27. Rueb, S., Leneman, M., Schilperoort, R. A and Hensgens, L. A. M. (1994). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 36: 259-264.
28. Sairam, R.V., Seetharama, N and Rani, T.S. (2000). Regeneration of sorghum from shoot tip cultures and field performance of the progeny. Plant Cell Tissue and Organ Culture 61: 169 - 173.
29. Shah, M. I., M.Jabeen and I.Ilham. (2003). In vitro callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat *(Triticum aestivum L.)*. Pakistan Journal of Botany, vol. 35, no. 2, p. 209-217.
30. Shan, X., Li, D., QU, R. (2000). Thidiazuron promotes in vitro regeneration of wheat and barley. In index/D8704G8361LN2105. pdf of Plant 36:207-210.

31. Shrawat, A. K., Lörz, H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. Plant Biotechnol. J. 4: 575-603.
32. Skirvin, R.M. and Janick, J. 1976. Tissue culture –induced variation in scented pelargonium sp.J.Amer.Soc.Hortic.sci. 101:281-290.
33. Skoog, F and Miller. C.O.(1957). Chemical regulation of growth and organformation in plant tissue cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-131.Smith, R.H., R.R. Duncan & S. Bhaskaran, 1993. In vitro selection and somaclonal variation for crop improvement.In: D.W. Buxton (Ed.). Proc. 1st Int'l Crop Sci. Congress, July 1992, Ames, IA. Crop.Sci.Soc. America, Madison, WI pp. 629-632.
34. Smith, R.H., R.R. Duncan & S. Bhaskaran, 1993. In vitro selection and somaclonal variation for crop improvement.In: D.W. Buxton (Ed.). Proc. 1st Int'l Crop Sci. Congress, July 1992, Ames, IA. Crop.Sci.Soc. America, Madison, WI pp. 629-632.
35. R.H., R.R. Duncan & S. Bhaskaran, 1993. In vitro selection and somaclonal variation for crop improvement.In: D.W. Buxton (Ed.). Proc. 1st Int'l Crop Sci. Congress, July 1992, Ames, IA. Crop.Sci.Soc. America, Madison, WI pp. 629-632.
36. Vikrant, S. and Rashid, A. (2003). Somatic embryogenesis or shoot formation following high 2,4D pulse-treatment of mature embryos of Paspalum scrobiculatum. Biol. Plant, 46: 297-300.
37. Zhao, L. M., Liu, S. J and Song, S. Q. (2008). Efficient induction of Callus and plant regeneration from seeds and mature embryos of sweet sorghum. Chinese Bull Bot. 25: 465-468.
38. Zhao, L., Liu, L. and Song, S. (2010). Optimization of callus induction and plant regeneration from germinating seeds of sweet sorghum (Sorghum bicolorL.Moench).African Journal of Biotechnology vol. 9(6).