مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (37) العدد (2) 2015
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (37) No. (2) 2015

دراسة الاستجابة الوراثية لبعض أصناف الحمص (*Cicer arietinum* L.) لتكوين الكالس أحادي الصيغة الصبغية مخبرياً

الدكتور صالح قبيلي *
الدكتور نزار معلا **
نبراس داؤد ***

(تاريخ الإيداع 10 / 12 / 2014. قبل للنشر في 26 / 3 / 2015)

□ملخّص □

أجري هذا البحث في مخبر زراعة الأنسجة بكلية الزراعة، جامعة تشرين، لما للحمص من أهمية غذائية واقتصادية كبيرة، حيث استخدم صنفان من الحمص الشتوي (غاب 4، غاب5) وصنفان ربيعيان (ILC263، ILC1929) وزرعت في أصص حتى موعد الإزهار، حيث أخذت البراعم الزهرية قبل تفتحها و غسلت بالماء المقطر والكحول ثلاث مرات. تم فصل المتوك ومعاملتها بدرجات حرارة أولية (4 مْ لمدة 48 ساعة و 35 مْ لمدة 12 ساعة) غسلت بعدها بمحلول هيبو كلوريت الصوديوم Naocl 2% لمدة 15 دقيقة، بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم حيث زرعت على بيئة موراشيج وسكوك MS المزودة بـ 1 و 3 و 5 ملغ/ل من أوكسين 2,4,D وكذلك 0.1 و 0.2 و 0.3 ملغ/ل من سيتوكينين بنزيل أمينو بيورين BAP كل على حدة وبالتفاعل بينهما وحضنت تحت ظروف 27 مْ و75 % من الرطوبة و شدة ضوئية 1500 لوكس لمدة 16 ساعة. كان الهدف الرئيس للبحث دراسة تأثير كل من المعاملة الحرارية الأولية ونوعية وتركيز الهرمون المستخدم على إنتاج كالس من متوك أصناف الحمص المستخدمة، بينت النتائج اختلاف الاستجابة الوراثية للأصناف للمعاملة الحرارية والهرمونية بشكل مفرد، حيث كان الصنف غاب 5 الأكثر استجابة لتكوين الكالس ، بينما أشارت النتائج إلى أن أعلى نسبة لتكوين الكالس كانت 40% عند المعاملة بدرجة حرارة 4 مْ للصنف غاب 4 وغاب 5، في حين أن الصنف ILC263 أبدى أقل استجابة وفي جميع المعاملات المفردة لمنظمات النمو.

أظهرت النتائج الدور الكبير والمحفز لاستخدام الهرمونين معاً مع المعاملة الحرارية، حيث تفوق كل من الأصناف غاب 5 و غاب 4 و ILC1929 إذ بلغت النسبة إلى 80% و60% على التوالي.

الكلمات المفتاحية: الحمص ، زراعة المتك ، المعاملة الحرارية ، منظمات النمو .

* **أستاذ– قسم المحاصيل الحقلية – كلية الزراعة – جامعة تشرين – سورية**
** **دكتور– قسم المحاصيل الحقلية– تقانات حيوية– كلية الزراعة – جامعة تشرين – سورية**
*** **طالب دراسات عليا (ماجستير) – قسم المحاصيل الحقلية – كلية الزراعة – جامعة تشرين – سورية**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (37) العدد (2) 2015
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (37) No. (2) 2015

Study the genetic response of some varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to form a callus Haploid in vitro

Dr. Saleh Qoubailie [*]
Dr. Nizar Moualla [**]
Nibras Daoud [***]

(Received 10 / 12 / 2014. Accepted 26 / 3 /2015)

□ ABSTRACT □

This research was conducted at the Laboratory of Tissue Culture, Faculty of Agriculture, Tishreen University. Because of the importance of the food and economic of chickpea, two Winter chickpea cultivars (Ghab 4, Ghab 5) and two Vernal chickpea cultivars were used (ILC263, ILC1929) and planted in pots until flowering, so the floral buds were picked before opened and washed with distilled water and alcohol three times. Anthers were separated and treated at preliminary temperatures (4 C̊ for 48 hours, and 35 C̊ for 12 hours), then it washed with a solution of hypochlorite of sodium(Naocl 2%) for a period of 15 minute, and washed with distilled sterilized water ,then where planted on the environment Murashige and Skoog (MS) equipped with 1, 3 and 5 mg/L of auxin 2,4, D, as well as 0.1, 0.2 and 0.3 mg /L of Cytokinin Benzyl Amino Purine(BAP) individually and with interaction between them and incubated under conditions of 27 C̊ and 75% of the humidity and the intensity of 1500 Lux of light for 16 hours. The main objective of research was to study the effect of both preliminary heating treatment , quality and concentration of used hormone on producing callus from used chickpea cultivars anthers. Results showed difference in cultivars response in the treatment of both temperature and single hormone, so Ghab 5 cultivar was the most responsive to the formation of callus, while the results indicated that the highest percentage of the formation of callus was 40% when treated at 4 C̊ of Ghab 4 and Ghab 5 cultivars, while ILC263 cultivar showed less response in all the individual treatments for growth regulators.

As well as results showed that the significant and catalyst role for using of hormones together with heat treatment, where each of Ghab 5, Ghab 4 and ILC1929 cultivars were the superiority, by the arrival of the percentage of 80% and 60%, respectively.

Key words: chickpea, anthers culture, heat treatment, plant growth regulators.

[*]**Professor, Department of Agronomy - Faculty of Agriculture - Tishreen University – Syria**
[**]**Doctor, Department of Agronomy – Plant Biotechnology- Faculty of Agriculture- Tishreen University– Syria .**
[***]**Postgraduate student- Department of Agronomy- Faculty of Agriculture- Tishreen University– Syria.**

مقدمة:

يعد الحمص من أهم البقوليات الغذائية استهلاكاً وشعبية في الوطن العربي وبعض الدول الآسيوية والإفريقية وحتى في بعض الدول الأوروبية ويعتبر مصدراً هاماً للبروتين في البلدان النامية، حيث تحوي البذور على نسبة مرتفعة من البروتينات ذات النوعية الجيدة (رقية و سعد، 2005).

ينتمي الحمص للفصيلة البقولية Leguminosae والجنس *Cicer* الذي يضم 14 نوعاً أهمها النوع المزروع *Cicer arietinum* L.

يزرع الحمص لإنتاج البذور بشكل أساسي ويستخدم في تغذية الإنسان ويستهلك الحمص في منطقة البحر الأبيض المتوسط بشكل منتجات غذائية تقليدية مختلفة كالحمص الأخضر (الميلانة) والحمص المنقوع والمسلوق أو الحمص المقلي (الفلافل) بالإضافة إلى الحمص بالطحينة الذي يقدم كمقبلات غذائية (Billedo and Fuentes, 1990).

تمتلك بذور الحمص أهمية علفية كبيرة وتستخدم بذور الحمص الصغيرة الحجم كعلف للحيوانات، ويمكن أنّ يستخدم الحمص الأخضر للعلف الطازج أو لصنع السيلاج أو الدريس، يدخل الحمص في الدورات الزراعية وخاصة مع الحبوب ويحسن الوضع الغذائي للتربة من خلال تثبيت الآزوت الجوي فيها ويستخدم كسماد أخضر (رقية و البودي، 1996).

تحتل سورية المرتبة العاشرة عالمياً والأولى عربياً من حيث الإنتاج والثانية من حيث المساحة بعد المغرب حيث بلغت المساحة المزروعة عام 2010 حوالي 74.8 ألف هكتار أنتجت 68.1 ألف طن بمردود قدره 910كغ/هـ (المجموعة الإحصائية السورية الزراعية، 2010).

ويحتل الحمص (*Cicer arietinum*) المرتبة الثالثة من حيث الإنتاج بين المحاصيل البقولية وإنتاجية الحمص محدودة وغير مستقرة حول العالم وذلك بسبب تأثره بإجهادات أحيائية واللاأحيائية (Anwar *et. al,* 2009). وعلى الرغم من الاهتمام بأبحاث التربية التقليدية والتجارب الزراعية الواسعة لتحسين إنتاجية الحمص إلا أنّ هذا التحسين لم يتحقق حتى الآن حيث ما تزال الغلة منخفضة وذلك بسبب عدة عوامل أهمها ضيق القاعدة الوراثية للحمص وقلة التباينات الوراثية بين الأصناف المزروعة بالإضافة إلى قدم الطرز الوراثية المزروعة والنمو الخضري المفرط لهذه الأصناف وبالنظر إلى الإمكانيات والتوقعات التي تقدمها التقانة الحيوية فإن الجهود توجه للاستفادة من هذه التقانات لتحسين الإنتاجية من خلال تطوير المقاومة للأمراض وإيجاد أصناف عالية الغلة في الحمص (Naz *et. al*, 2007).

استخدمت تقنية زراعة الأنسجة لإنتاج نباتات أحادية الصيغة الصبغية (Haploid) ونباتات أحادية مضاعفة Doubled haploid (DH) من خلال استحداث الكالس الأحادي الصيغة الصبغية وأصبحت وسيلة قيمة متعارف عليها لتساعد في تحسين النبات حيث أنها تساعد بشكل فعال في انتخاب نباتات متفوقة وفي الحقيقة أنّ نباتات أحادية الصيغة الصبغية والنباتات الأحادية المضاعفة (DH) كلاهما يمثل وسيلة فعالة لتسريع برامج تربية النبات ولتقصير الوقت المطلوب ولزيادة كفاءة الانتخاب (Germana, 2011).

يسمح إنتاج الكالس الأحادي بالحصول على النباتات الأحادية والنباتات الأحادية المضاعفة (DH) وبالتالي تشكيل السلالات المتجانسة من آباء غير متجانسين في جيل واحد وتمثل السلالات DH سلالات طبيعية ذات إخصاب طبيعي (Germana, 2010 ; Malhikarjuna *et. al*, 2005 ; Sidhu and Davies , 2005).

وإضافة لما سبق وجد Szarejko and Forster (2006) أنّ تقنية الـ DH تمتلك عدة ميزات هامة لتحريض وتثبيت الطفرات، والقدرة على تثبيت الطفرات عن طريق إنتاج سلالات الـ DH هي العنصر الرئيسي وخصوصاً أنّ الطفرات المحرَّضة هي في الأغلب متنحية ولايمكن أنّ تُكتشف حتى الجيل الطفري الثاني M_2 على الأقل.

على الرغم من الأهمية الزراعية والغذائية للبقوليات إلا أنّ تقنية إنتاج النباتات الأحادية الصيغة الصبغية والنباتات DH ما زالت في مراحلها التطورية الأولى وحاليا لا يوجد أي برنامج تحسين وراثي لأي نوع من هذا الجنس يستخدم نباتات الـ DH كعنصر أساسي روتيني في برامج التربية وبالمقارنة مع فصائل أخرى من مغطاة البذور ولهذا فإن التطور باتجاه هذا الهدف بطيء وجهود الباحثين للحصول على النباتات DH في البقوليات بلغت ذروتها في ثمانينيات القرن الماضي ومع إدراك قيمة النباتات أحادية الصيغة بالنسبة للأبحاث حول المؤشرات الجزئية وحول الخرائط الوراثية أصبح هناك اهتمام حثيث للاهتمام بتقنية أحادية الصيغة في البقوليات (Croser *et. al,*, 2009 ; Sidhu and Davies, 2005 ,2006)، ومن هنا تأتي مبررات هذا البحث.

أهمية البحث وأهدافه:

نظراً لضيق القاعدة الوراثية لأصناف الحمص الموجودة في سورية ولضرورة الحصول على تباينات وراثية جديدة ولأهمية النباتات الأحادية في برامج التربية فإن أهمية البحث تبرز من خلال عدم وجود نظام خاص لاستحداث الكالس الأحادي باستخدام تقنية زراعة المآبر في الحمص وعدم وجود بيئات غذائية قياسية من أجل ذلك، ولذلك الهدف الأساسي لهذا البحث هو:

دراسة تأثير المعاملات الحرارية للبراعم الزهرية في تحفيز تكوين الكالس الأحادي وتحديد التركيز الهرموني الأفضل لتحفيز تشكل الكالس مع بيان الاستجابة الوراثية للطراز الوراثي المستخدم كنبات مانح لحبوب الطلع.

طرائق البحث ومواده:

1 . المادة النباتية:

تم الحصول على بذور الأصناف المستخدمة في الدراسة من المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا) في بداية عام 2012.

استخدم في الدراسة أربعة أصناف من الحمص: صنفان شتويان هما: غاب4 – غاب5 وهي سلالات حديثة تمّ انتخابها بالتعاون بين الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية السورية ومنظمة إيكاردا وتتميز بطول موسم نموها وتحملها للصقيع ومقاومتها لمرض الأسكوكايتا، وصنفان ربيعيان هما: ILC263 وهو صنف تركي – ILC1929 وهو صنف سوري محلي.

جدول (1): الأصناف المستخدمة في البحث ومنشأ ونسب وموعد زراعة هذه الأصناف

الصنف	المنشأ	النسب	موعد الزراعة
غاب 4	–	X89TH258/(FLIP85-122C x FLIP 82-150C) x FLIP 86-77C	شتوي
غاب 5	–	X81TH199/ILC202(WH) x ILC3355	شتوي
ILC263	تركي	–	ربيعي
ILC1929	سوري (محلي)	–	ربيعي

2 . مكان تنفيذ التجربة:

نفذت التجربة في مخبر زراعة الأنسجة النباتية في قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، خلال الموسم الزراعي 2012 . 2013.

3 . بيئة الزراعة:

استخدمت بيئة موراشيج وسكوغ (MS) المحتوية على العناصر الغذائية الكبرى والصغرى اللازمة بالإضافة إلى الكربوهيدرات (السكروز) مع إضافة فيتامين الثيامين (Thiamine) والبيريدوكسين (Pyridoxine) بتركيز 1 مغ/لتر لكل منهما (Murashige and Skoog, 1962).

4 . منظمات النمو النباتية:

استخدم هرمونان نباتيان، تمت إضافتهم إلى بيئة التغذية بثلاث تراكيز من كل هرمون، وهما:

. الأكسين: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D) حيث استخدم بثلاث تراكيز هي: 1 . 3 . 5 مغ/لتر

. السايتوكينين: بنزايل أمينو بيورين(BAP) 6- benzylaminopurine حيث استخدم بثلاث تراكيز هي: 0.1 . 0.2 . 0.3 مغ/لتر

5 . زراعة الأصناف:

زرعت بذور الأصناف المانحة للمآبر موضوع الدراسة في أصص تحت ظروف الحقل بحيث تزرع بذرة في كل أصيص مع مراعاة إجراء عمليات الترقيع للبذور غير النابتة بنباتات من نفس الصنف زرعت جانبياً، وأجريت عمليات الخدمة للنباتات حتى وصلت لمرحلة بداية الإزهار حيث أخذت البراعم الزهرية قبل تفتحها بحيث تكون الأبواغ في بداية المرحلة التطورية وحيدة النواة وهذه المرحلة تتوافق مع طول براعم 3 – 4 مم.

6 . المعاملة الأولية للبراعم الزهرية والتعقيم:

عرضت مجموعة من البراعم الزهرية لمعاملات حرارية قبل زراعتها على البيئات الغذائية حيث تم تعريضها لدرجتي حرارة مختلفتين:

. درجة حرارة منخفضة 4 مْ لمدة 48 ساعة

. درجة حرارة مرتفعة 35 مْ لمدة 12 ساعة

أما المجموعة الأخرى من البراعم الزهرية لم تخضع لأي معاملة حرارية واعتبرت كشاهد في البحث. أجري تعقيم سطحي للبراعم الزهرية وذلك بتغطيسها لمدة 3 دقيقة في NaOcl بتركيز 5% w/v ثم تغسل البراعم بالماء المعقم ثلاث مرات.

7 . تحضير بيئات الزراعة وتعقيمها:

خلال البحث تم تحضير ثلاث أوساط غذائية أساسية متشابهة في تركيبها ولكن تختلف في نوع الهرمون المضاف للبيئة حيث استخدمت بيئة MS (Murashige and Skoog, 1962) المجهزة مسبقاً على شكل مسحوق تجاري بحيث تضاف 2.3 غ/لتر واستخدم سكر السكروز بتركيز 25 غ/لتر والأجار كمادة مصلبة للبيئة بتركيز 7 غ/لتر ثم إضافة الثيامين والبيريدوكسين كفيتامينات منشطة بتركيز 1 مغ/لتر وضبطت درجة الـPH عند 5.8 باستخدام مقياس الـPH وأعطي هذا الوسط الرمز M وبعد تجهيز الوسط الغذائي جرى تعقيم البيئة الغذائية باستخدام جهاز الأوتوكلاف (التعقيم الحراري الرطب) على الدرجة 121مْ لمدة 20 دقيقة، بعد ذلك أدخلت البيئات الغذائية إلى حجرة الزراعة المعقمة وأضيف إليها الهرمونات المعقمة بواسطة المرشحات ثم وزعت البيئات في مرطبانات وأنابيب اختبار ووضعت في الحاضنة لمدة 48 ساعة لاختبار كفاءة التعقيم.

أضيف إلى الوسط الغذائي M الأوكسين 2,4 D فقط بثلاث تراكيز هي: 1 . 3 . 5 مغ/لتر وأعطي الرمز M_1 وأضيف السايتوكينين BAP إلى الوسط الغذائي M بثلاث تراكيز هي: 0.1 . 0.2 . 0.3 مغ/لتر وأعطي الرمز M_2، و أضيف الهرمونين الأوكسين 2,4 D والسايتوكينين BAP معاً وبالتراكيز الثلاثة السابقة لكل منهما إلى الوسط الغذائي M وأعطي مزيج الهرمونين معاً الرمز T على الشكل التالي:

T_1: 2.4D(1mg/L) +BAP(0.1 mg/L)
T_2: 2.4D(1mg/L) +BAP(0.2 mg/L)
T_3: 2.4D(1mg/L) +BAP(0.3 mg/L)
T_4: 2.4D(3mg/L) +BAP(0.1 mg/L)
T_5: 2.4D(3mg/L) +BAP(0.2 mg/L)
T_6: 2.4D(3mg/L) +BAP(0.3 mg/L)
T_7: 2.4D(5mg/L) +BAP(0.1 mg/L)
T_8: 2.4D(5mg/L) +BAP(0.2 mg/L)
T_9: 2.4D(5mg/L) +BAP(0.3 mg/L)

8 . عزل المآبر:

عزلت المأبر من البراعم الزهرية باستخدام الملقط بعد إزالة كافة المحيطات الزهرية الأخرى وذلك ضمن حجرة الزراعة.

9 . زراعة المآبر على الوسط الغذائي:

زرعت المآبر داخل حجرة الزراعة المعقمة في مرطبانات وأنابيب اختبار تحوي وسط الزراعة المجهز مسبقاً.

10 . تصميم التجربة:

نفذت التجربة وفق التصميم كامل العشوائية Complet Random Desigen.

11 . ظروف التحضين:

بعد زراعة المآبر على الوسط الغذائي وضعت في الحضانة على درجة حرارة 27±2 مْ ورطوبة 75% لمدة 16 ساعة بشدة إضاءة 1500 لوكس.

النتائج والمناقشة:

أولاً: دور المعاملة الحرارية والأوكسين 2.4 D في تحفيز الاستجابة:

1. التأثير على تشكيل الكالس:

تشير النتائج الموجودة في الجدول رقم (3) إلى أن تأثير المعاملة الحرارية المرتفعة والمنخفضة وتركيز الأوكسين 2,4 D على استحداث الكالس الأحادي من متوك أصناف الحمص الأربعة المستخدمة في الدراسة حيث توضح النتائج أن المعاملة الحرارية المنخفضة +4 مئوية لمدة 48 ساعة أثرت بشكل إيجابي على استجابة أصناف الحمص لاستحداث الكالس من المتوك باستخدام ثلاث تراكيز من الأوكسين 2,4 D مقارنة مع الشاهد حيث سجل الصنف غاب4 أعلى استجابة 40% بوجود تركيز 3مغ/لتر من 2,4D في حين سجل الصنف غاب5 أعلى استجابة 40% عند التركيز 1مغ/لتر من 2,4D و 20% عند التركيز 3مغ/لتر في حين أن الصنفين ILC1929 و ILC263 سجلا أعلى استجابة 20% عند التركيز 5مغ/لتر من 2,4D، ويعزى هذا الاختلاف في الاستجابة لاختلاف التركيب الوراثي للأصناف المستخدمة حيث أنها تعود لمناطق نشوء مختلفة ولآباء مختلفين جدول (2).

أما المعاملة الحرارية المرتفعة +34 مْ لمدة 12 ساعة فقد كان تأثيرها أقل مقارنة مع المعاملة الحرارية المنخفضة حيث سجل كل من الأصناف غاب5، غاب4 و ILC1929 استجابة قدرها 20% بوجود التراكيز 1،3 و5 مغ/لتر من 2,4D على التوالي. في حين أن الصنف ILC263 لم يسجل أي استجابة لاستحداث الكالس تحت نفس الظروف مقارنة مع الشاهد.

وبالتالي نجد أن المعاملة الحرارية أثرت بشكل إيجابي على استجابة المتوك لتكوين الكالس الأحادي مقارنة مع الشاهد وكان تأثير المعاملة الحرارية المنخفضة أفضل من المعاملة الحرارية المرتفعة وهذا يتفق مع نتائج Grewal et. al, (2010) حيث أشار إلى دور معاملات الإجهاد ومنها المعاملة بالحرارة المنخفضة +4م في تحفيز الاستجابة لاستحداث الكالس الأحادي من المآبر المزروعة، وكذلك بين Croser *et. al*, (2006) أن إجهادي الحرارة والبرودة هما الطريقة الأكثر فعالية لتحفيز التطور البوغي في الحمص.

جدول(2): تأثير المعاملة الحرارية وتركيز الهرمون 2,4 D على استحداث الكالس من المآبر المزروعة لأصناف الحمص الأربعة (%)

المعاملة الحرارية	الصنف	تراكيز الهرمون 2,4 D (mg/l)		
		1	3	5
+4° C	غاب4	−	++	−
	غاب5	++	+	−
	ILC1929	−	−	+
	ILC263	−	−	+
+34° C	غاب4	−	+	−
	غاب5	+	−	−
	ILC1929	−	−	+
	ILC263	−	−	−

الشاهد	غاب4	–	–	–
	غاب5	–	–	–
	ILC1929	–	–	–
	ILC263	–	–	–

–، +، ++ تشير إلى 0، 20، 40% (على التوالي) من المآبر المزروعة شكلت كالس

2. التأثير على وزن الكالس المتشكل:

تشير النتائج الموجودة في الجدول (4) إلى تأثير كل من المعاملة الحرارية المنخفضة والمرتفعة وتركيز الأوكسين 2.4 D على وزن الكالس المتشكل من زراعة مآبر أصناف الحمص الأربعة.

من الجدول (4) نلاحظ أن المعاملة بالحرارة المنخفضة +4م أثرت بشكل إيجابي على وزن الكالس المستحدث خاصة للصنف غاب 5 بوجود التركيز 1 و 3 مغ/لتر من الأوكسين 2.4 D حيث حصلنا على وزن 2.6 و 1غ للكالس على التوالي، بينما سجل الوزن الأكبر عند الصنف غاب 4 تحت درجة الحرارة +4م وبتركيز هرمون 3 مغ/لتر، مقارنة مع الشاهد.

أما باستخدام المعاملة الحرارية المرتفعة (+34م) فكان تأثيرها أقل تحفيزاً لتشكل الكالس عند أغلب الأصناف حيث سجل الصنف غاب 4 (2غ) للكالس عند استخدام الأوكسين 2.4 D بتركيز 3 مغ/لتر والصنف غاب 5 أعطى وزن 1.3غ عند التركيز 1مغ/لتر، أما الصنفILC1929 فقد سجل وزن 1.2غ عند التركيز 5 مغ/لتر بينما الصنف ILC263 لم يسجل أي استجابة مقارنة مع الشاهد، ويعود ذلك لاختلاف الاستجابة الوراثية للأصناف الأربعة كونها ذات مناشئ مختلفة وتراكيب وراثية مختلفة جدول(2).

وبالتالي فإن المعاملة الحرارية المنخفضة أثرت بشكل إيجابي على زيادة وزن الكالس المستحدث مقارنة مع المعاملة الحرارية المرتفعة والشاهد وهذا يتفق مع نتائج (Ochatt *et. al,* 2009) حيث وجد أن إخضاع البراعم الزهرية لفترة برودة قبل الزراعة حسن بشكل معنوي استجابة المآبر لتشكيل الكالس الأحادي (Haploid) في الحمص.

جدول(3): تأثير المعاملة الحرارية وتركيز الهرمون 2,4 D على وزن الكالس المستحدث من المآبر لأصناف الحمص الأربعة (غ).

المعاملة الحرارية	الصنف	تراكيز الهرمون 2,4 D (mg/l)		
		1	3	5
+4° C	غاب4	–	5.2	–
	غاب5	2.6	1	–
	ILC1929	–	–	1.8
	ILC263	–	–	1.3
+34° C	غاب4	–	2	–
	غاب5	1.3	–	–
	ILC1929	–	–	1.2

	ILC263	–	–	–
الشاهد	غاب4	–	–	–
	غاب5	–	–	–
	ILC1929	–	–	–
	ILC263	–	–	–

ثانياً: دور المعاملة الحرارية والسايتوكينين BAP في تحفيز الاستجابة:

1 . التأثير على تشكيل الكالس:

تشير النتائج الموجودة في الجدول (5) لتأثير المعاملة الحرارية المرتفعة والمنخفضة وتركيز السايتوكينين BAP على استحداث الكالس الأحادي من متوك أصناف الحمص الأربعة المستخدمة في الدراسة حيث توضح النتائج أن تأثير الـ BAP على تحفيز استحداث الكالس كان منخفضاً مقارنة مع الأوكسين 2.4 D فكانت استجابة معظم الأصناف منخفضة سواء مع المعاملة الحرارية المنخفضة أو المرتفعة حيث مع المعاملة الحرارية المنخفضة سجل الصنفان غاب 5 و ILC1929 استجابة منخفضة 20% عند التركيز 0.2 مغ/لترأما باقي الأصناف لم تحدث أي استجابة عند أي تركيز من BAP.

أما مع المعاملة الحرارية المرتفعة +34م فقط الصنف غاب 5 أظهر أستجابة منخفضة 20% عند التركيز 0.1 مغ/لتر من BAP أما باقي الأصناف لم تحدث أي استجابة، ومن خلال هذه النتائج نجد أن دور السايتوكينين في تحفيز استحداث الكالس الأحادي كان منخفضاً سواء مع المعاملة الحرارية المنخفضة أو المرتفعة مقارنة مع دور الأوكسين وهذا يعود إلى أن للأوكسينات الدور الكبير في تكوين الكالس حيث أنه بدون الأوكسين تنقسم الخلايا مرات قليلة ثم يموت معظمها (Huda *et. al,* 2001).

جدول(4): تأثير المعاملة الحرارية وتركيز الهرمون BAP على استحداث الكالس من المآبر لأصناف الحمص الأربعة (%)

المعاملة الحرارية	الصنف	تراكيز الهرمون BAP (mg/l)		
		0.1	0.2	0.3
+4° C	غاب4	–	–	–
	غاب5	–	+	–
	ILC1929	–	+	–
	ILC263	–	–	–
+34° C	غاب4	–	–	–
	غاب5	+	–	–
	ILC1929	–	–	–
	ILC263	–	–	–

الشاهد	غاب4	–	–	–
	غاب5	–	–	–
	ILC1929	–	–	–
	ILC263	–	–	–

– ،+ تشير إلى 0، 20% (على التوالي) من المآبر المزروعة شكلت كالس

2. التأثير على وزن الكالس المتشكل:

تشير النتائج الموجودة في الجدول (6) لتأثير المعاملة الحرارية المرتفعة والمنخفضة وتركيز السايتوكينين BAP على وزن الكالس الأحادي المستحدث من متوك أصناف الحمص الأربعة المستخدمة في الدراسة حيث كانت الاستجابة منخفضة فقد سجل الصنفان غاب5 و ILC1929 أفضل استجابة تحت تأثير المعاملة الحرارية المنخفضة وكان وزن الكالس المتشكل 2 و 4غ على التوالي أما مع المعاملة الحرارية المرتفعة فقط الصنف غاب 5 سجل استجابة منخفضة حيث كان وزن الكالس المتشكل 1.1غ أما باقي الأصناف فلم تحدث أي استجابة مقارنة مع الشاهد، ومن هنا نجد أن السايتوكينين أثر بشكل منخفض في زيادة وزن الكالس الأحادي المتشكل مقارنة مع تأثير الأوكسين وهذا يعزى إلى دور الأوكسين 2.4 D في إحداث الانقسامات وزيادة عدد الخلايا (Khan *et. al,* 2011).

جدول(5): تأثير المعاملة الحرارية وتركيز الهرمون BAP على وزن الكالس المستحدث من المآبر لأصناف الحمص الأربعة (غ).

المعاملة الحرارية	الصنف	تراكيز الهرمون BAP (mg/l)		
		0.1	0.2	0.3
+4° C	غاب4	–	–	–
	غاب5	–	2	–
	ILC1929	–	4	–
	ILC263	–	–	–
+34° C	غاب4	–	–	–
	غاب5	1.1	–	–
	ILC1929	–	–	–
	ILC263	–	–	–
الشاهد	غاب4	–	–	–
	غاب5	–	–	–
	ILC1929	–	–	–
	ILC263	–	–	–

ثالثاً: دور المعاملة الحرارية والهرمونين معاً في تحفيز الاستجابة:

1 . التأثير على تشكيل الكالس:

تشير النتائج الموجودة في الجدول (7) إلى تأثير المعاملة الحرارية المنخفضة والتفاعل بين الأوكسين والسيتوكينين المضافين للبيئة الغذائية بالتراكيز T_1 . T_2 . T_3 . T_4 . T_5 . T_6 . T_7 . T_8 . T_9 . المذكورة سابقاً على تكون الكالس من المآبر المزروعة لأصناف الحمص الأربعة، فنجد أن أعلى استجابة كانت (80 %) عند الصنف غاب 5 عند التركيز T_1 بينما سجل أدنى استجابة (20%) عند التركيز T_6 أما عند التراكيز T_2 . T_3 . T_4 فقد سجل (60%) وعند التركيز T_5 سجل (40%) أما عند التراكيز T_7. T_8 . T_9 فلم يحدث أي استجابة.

أما الصنف غاب 4 فقد سجل أعلى استجابة (60%) عند التركيز T_4 واستجابة متوسطة (40%) عند التراكيز T_1 . T_5 واستجابة منخفضة (20%) عند التراكيز T_2 . T_6 ولم يحدث أي استجابة عند التراكيز T_3 . T_7. T_8 . T_9 .

أما الصنف ILC 1929 فقد سجل أعلى استجابة (60%) عند التراكيز T_1 . T_4 واستجابة متوسطة (40%) عند التراكيز T_2 . T_3 . T_5 واستجابة منخفضة (20%) عند التركيز T_6 ولم يحدث أي استجابة عند التراكيز T_7. T_8 . T_9 .

أما الصنف ILC 263 فقد كانت استجابته لاستحداث الكالس الأحادي منخفضة فكانت (20%) عند التراكيز T_1 . T_4 أما عند باقي التراكيز لم يحدث أي استجابة.

ويمكن أن تعزى هذه الاختلافات في الاستجابة بين الأصناف الأربعة كونها تمثل تراكيب وراثية مختلفة ذات مناطق نشوء مختلفة ونسب مختلف (جدول 1)، وبالتالي نجد أن وجود الأكسين 2.4 D والسيتوكينين BAP معاً في البيئة الغذائية أثر بشكل كبير على تحفيز الاستجابة لتكوين الكالس الأحادي لدى الأصناف المدروسة وهذا يتفق مع Huda *et. al,* (2001).

جدول(6): تأثير إضافة الهرمونين 2,4 D و BAP معاً إلى البيئة الغذائية بثلاث تراكيز لكل منهما على استحداث الكالس من المآبر لأصناف الحمص الأربعة (%)

	الصنف	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6	T_7	T_8	T_9
المعاملة الحرارية +4 مْ	غاب4	++	+	-	+++	++	+	-	-	-
	غاب5	++++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
	ILC1929	+++	++	++	+++	++	+	-	-	-
	ILC263	+	-	-	+	-	-	-	-	-

–،+ ،++،+++،++++ تشير إلى 0، 20، 40، 60، 80 % (على التوالي) من المآبر المزروعة شكلت كالس

2. التأثير على وزن الكالس المتشكل:

تشير النتائج الموجودة في الجدول (8) إلى تأثير المعاملة الحرارية المنخفضة والتفاعل بين الأوكسين والسيتوكينين المضافين للبيئة الغذائية بالتراكيز T_1 . T_2 . T_3 . T_4 . T_5 . T_6 المذكورة سابقاً على وزن الكالس الأحادي المتشكل من المآبر المزروعة لأصناف الحمص الأربعة، حيث سجل الصنف غاب 5 أعلى استجابة فكان وزن الكالس

الأحادي 17غ عند التركيز T_1 وسجل الأوزان 15.3 ، 10.8 ، 9.7 ، 7.5 ، 2غ عند التراكيز T_2 . T_4 . T_3 . T_5 . T_6على التوالي، أما عند التراكيز T_7. T_8. T_9 لم يسجل أي استجابة.

أما الصنف غاب 4 فسجل أعلى استجابة وكانت 10.7 غ عند التركيز T_1 وسجل الأوزان 9.2، 8.6، 5، 4، عند التراكيز T_4. T_5 . T_2 . T_6 ولم يسجل أي استجابة عند التراكيز T_3. T_7. T_8. T_9.

في حين أن الصنف ILC 1929 فقد سجل أعلى استجابة 11.2 غ عند التركيز T_1 وسجل الأوزان 10.2، 8.1، 6.3، 6، 4.2، عند التراكيز T_2 . T_4 . T_5 . T_3 . T_6 على التوالي أما عند التراكيز T_7. T_8. T_9 لم يسجل أي استجابة.

أما الصنف ILC 263 فقد سجل استجابة منخفضة حيث أعطى الأوزان 4.6، 2.7غ عند التراكيز T_1. T_4 على التوالي أما مع باقي التراكيز لم يشكل أي استجابة.

هذه النتائج توضح أن التراكيز المنخفضة من الأوكسين والسيتوكينين ساهمت بشكل إيجابي في تحفيز الاستجابة لتشكيل الكالس الأحادي من المتوك في حين أن زيادة التراكيز تؤدي إلى تخفيض الاستجابة وبالتالي انخفاض وزن الكالس المستحدث وهذا يتفق مع نتائج Vessal *et. al,* (2002) حيث وجد أن بدء تشكل الكالس من متوك صنفين إيرانيين من الحمص كان متأثر معنوياً بتراكيز الأوكسين والسيتوكينين وأن زيادة تراكيز الهرمونات يقلل الاستجابة.

جدول(7): تأثير إضافة الهرمونين 2,4 D و BAP معاً إلى البيئة الغذائية بثلاث تراكيز لكل منهما على وزن الكالس المستحدث من كل مآبر أصناف الحمص الأربعة (غ)

المعاملة الحرارية	الصنف	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6	T_7	T_8	T_9
+4 مْ	غاب4	10.7	5	-	9.2	8.6	4	-	-	-
	غاب5	17	15.3	9.7	10.8	7.5	2	-	-	-
	ILC1929	11.2	10.2	6	8.1	6.3	4.2	-	-	-
	ILC263	4.6	-	-	2.7	-	-	-	-	-

الاستنتاجات والتوصيات:

1. تباين الاستجابة الوراثية للأصناف المدروسة لتكوين الكالس أحادي الصيغة الصبغية بزراعة المتوك.
2. كان للمعاملة الحرارية المنخفضة (+4مْ) دوراً إيجابياً في زيادة تكوين الكالس الأحادي لمعظم الأصناف المدروسة.
3. بينت النتائج أن استخدام خليط الأكسين والسيتوكينين كان له دوراً إيجابياً في الكالس لمعظم أصناف الحمص المدروسة مقارنة مع استخدام كل منها بشكل مفرد.
4. سُجلت أعلى استجابة لتكوين الكالس الأحادي عند الصنف غاب 5 مقارنة مع باقي الأصناف بينما سجل الصنف ILC 263 أدنى استجابة.

المراجع:

1 . رقية ، نزيه ؛ سعد ، فؤاد. محاصيل الحبوب والبقول، منشورات جامعة تشرين، 2005.

2 . رقية ، نزيه ؛ البودي، أحمد. محاصيل البقول، منشورات جامعة تشرين، 1996.

3 . المجموعة الإحصائية السنوية السورية لعام 2010.

1- Anwar F., Sharmila P., Saradhi P. P.(2009) *No more recalcitrant: Chickpea regeneration and genetic transformation.* In: African Journal of Biotechnology V. 9(6), 8 February 2010 P. 782-797.

2- Bellido L., Fuentes M.,(1990) *Cooking quality of chickpea, Options Mediterraneennes*- Serie Seminire 9 : 113-125.

3- Croser J.S., Lulsdorf M.M., Davies P.A., Clarke H.J., Bayliss K.L., Mallikarjuna N., Siddique K.H.M.(2006) *Toward Doubled Haploid Production in the Fabaceae: Progress, Constraints, and Opportunities*. In: Critical Reviews in Plant Sciences,V. 25: 2006 P.139–157.

4- Croser J. S., Lulsdorf M.M., Grewal R.K., Usher K.M., Siddique K.H.M.(2009) *Isolated microspore culture of chickpea (Cicer arietinum L.): induction of androgenesis and cytological analysis of early haploid divisions.* In: In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant V. 47, N. 3 2009, P. 357-368.

5- Germana` M.A. (2010) *Anther culture for haploid and doubled haploid production.* In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture V. 104, N. 3, 2010 P.283-300.

6- Germana` M.A. (2011) *Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding.* In: Plant Cell Rep (2011) 30: P. 839–857.

7- Huda S., Islam R., Bari M.A., Asaduzzaman M. (2001) *Anther culture of chickpea*. Int. Chickpea & Pigeonpea Newsl. 8:24-26; 2001.

8- Khan S., Ahmad F., Ali f., Khan H., (2011). *Callus induction via different groth regulators from cotyledon explants of indigenous chickpea (Cicer arietinum L.) cultivars KK-1 and Hassan 2K.* In: African journal of Biotechnology Vol. 10(40) 2011 P. 7825-7830.

9- Mallikarjuna N., Jadhav D., Clarke H., Coyne C., Muehlbauer F.(2005) *Induction of Androgenesis as a Consequence of Wide Crossing in Chickpea.* In: An Open Access Journal published by ICRISAT, December 2005, V. 1(1).

10- Murashige T., Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.* Physiologia Plantarum 15 : P.473 - 497.

11- Naz S., Ali A., Siddique A.F., Iqbal J. (2007) *Multiple Shoot Formation form Different Explants of Chickpea (Cicer arietinum L.)*. In: Pak. J. Bot., 39(6): 2007 P. 2067-2073.

12- Ochatt S., Pech C., Grewal R., Conreux C., Lulsdorf M., Jacas L. (2009) *Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae)*. In: Journal of Plant Physiology Volume 166, Issue 12, 15 August 2009, P. 1314-1328.

13- Sidhu P., Davies P. (2005) *Pea anther culture: callus initiation and production of haploid plants*, Proceedings of the Australian Branch of the IAPTC&B, Perth, Western Australia, 21-24th September, 2005.

14- Szarejko I. and Forster B. P. *Doubled haploidy and induced mutation.* In: Euphytica,Volume 158, Number 3, P. 359-370.

15- Vessal S.R., Bagheri A., Safarnejad A. (2002) *The possibility of in vitro haploid production in chickpea (Cicer arietinum L.)*. J. Sci. Technol. Agric. Nat. Resour. V.6 2002 P. 67-76;.