

تضاعف اطراف الافرع وعقد نبات الاقحوان *Calendula officinalis* L. ونشوء وتمايز الكالس خارج الجسم الحي

بشار زكي قصاب باشي
قسم البستنة وهندسة الحدائق / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل – العراق
خولة محمود يحيى
E-mail: Bashybashar@yahoo.com

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة في مختبر زراعة الخلايا والانسجة النباتية التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق / كلية الزراعة والغابات/ جامعة الموصل، لإكثار نبات الاقحوان *Calendula officinalis* L. صنف Lemon Queen خارج الجسم الحي من تضاعف اطراف الافرع والعقد المأخوذة من الحقل وزراعتها على وسط MS المجهز بالتراكيز (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0) ملغم/لتر BA، الافرع الناتجة من الزراعة النسيجية زرعت على وسط MS المجهز بالتراكيز (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0) ملغم/لتر IBA كما تمت زراعة اجزاء الاوراق على وسط MS المجهز بـ 0.1 ملغم/لتر 2,4-D لاستحداث الكالس، الكالس الناتج زرع على وسط MS المجهز بالتراكيز (0.0, 0.1, 0.5, 1.0) ملغم/لتر BA متداخلا مع IBA بالتراكيز (0.0, 0.1, 0.5, 1.0) ملغم/لتر. تشير النتائج ان افضل استجابته للتضاعف تم الحصول عليها من زراعة اطراف الافرع على وسط MS المجهز بـ 1.5 ملغم/لتر BA اذ اعطت 7.8 فرع /جزء نباتي وبطول 2.7 سم مقارنة بالعقد التي اعطت اعلى معدل لعدد الافرع 3.6 فرع /جزء نباتي وبطول 2.8 سم وذلك من زراعتها على وسط MS المجهز بـ 1.0 ملغم/لتر BA وذلك بعد ثمانية اسابيع من الزراعة، كما تم الحصول على نسبة تجذير 70 % وبعد جذور 8.8 جذر /جزء نباتي وذلك من زراعة اطراف الافرع الناتجة من الزراعة النسيجية على وسط MS المجهز بـ 0.5 ملغم/لتر IBA، وتم الحصول على اعلى وزن رطب للكالس 15.9 غم من زراعته على وسط MS المجهز بـ 1.0 ملغم/لتر IBA وكذلك الوسط المجهز بـ 0.5 ملغم/لتر BA متداخلا مع 1.0 ملغم/لتر IBA وتم الحصول على اعلى معدل لعدد الافرع 4.0 فرع /جزء نباتي من زراعة الكالس على الوسط المجهز بـ 0.5 ملغم/لتر BA متداخلا مع 0.5 ملغم/لتر IBA، وكان اعلى معدل لعدد الجذور 10.2 جذر/ جزء نباتي من زراعة الكالس عند الوسط المجهز بـ 0.1 ملغم/لتر BA مع 0.1 ملغم/لتر IBA وذلك بعد ثمانية اسابيع من الزراعة.

الكلمات الدالة: تضاعف، كالس، BA ، IBA ، الاقحوان، *Calendula officinalis* L.

تاريخ تسلم البحث: 2012/6/24 ، وقبوله: 2012/10/15.

المقدمة

يعد نبات الاقحوان *Calendula officinalis* L. من الحوليات الشتوية التابع للعائلة المركبة Asteraceae وهو من النباتات ذات الاهمية الاقتصادية والطبية (الشحات 1986، عرموش 1999). موطنه الاصلي حوض البحر الابيض المتوسط وينمو برياً في جنوب ووسط اوربا وشمال افريقيا وكندا ويزرع في معظم انحاء الوطن العربي واسبانيا والمانيا والولايات المتحدة وهولندا والمجر (سعد الدين 1986، أحمد واخرون، 1993 و1998، Blumenthal). للاقحوان اصناف عديدة منها Plamen و Balla orang و Eifflev و Gelber Riese و Pacific و Font Queen و Mullifora orbiculatu و Moench وغيرها من الاصناف (Novak و اخرون، 1999 و Laflamme ، 2000)، وفي العراق يوجد صنفان هما Orange King ذو الازهار البرتقالية و Lemon Queen ذو الازهار الصفراء موضوع الدراسة (رسول، 1984). يتراوح ارتفاع النبات بين 45-75 سم، الاوراق بسيطة ملعقية الشكل مستطيلة طولها 10-20 سم وعرضها نحو 3-5 سم لونها اخضر ذات شعيرات دقيقة وكثيفة منتشرة على سطحها، الاوراق ذات وضع متبادل على الساق، الأزهار نورة هامية ذات محور رئيسي ينتهي بقرص زهري مستدير قطره 3-7 سم، الثمار معقوفة تحتوي على بذور طولها 8 ملم وعرضها 1-2 ملم لونها اصفر رمادي يتكاثر النبات بالبذور (Bailey، 1975). وتعد النباتات الطبية علاج شاف لكثر من حالة مرضية تصيب الانسان لكثرة المركبات والمعادن والفيتامينات التي تحتويها اذ تستعمل ازهار الاقحوان لعلاج التهابات الفم والقروح المعوية والجروح ولتنقية الدم وادرار البول (جاد، 1992). اوضحت الدراسات الكيميائية وجود عدة مجاميع فعالة في نبات الاقحوان منها التربينات والفلافونات والكومارين وزيتون عطرية وكاروتينات واحماض امينية، بالاضافة الى

المستخلصات النقية لمختلف اجزاء النبات والمستخدمه في البحوث الصيدلانية لاحتوائها على مضادات سرطانية ومضادات بكتيرية وفطرية ومضادات للتسمم (Muley واخرون، 2009). تزايد الاهتمام بالزراعة النسيجية واعتمادها بديل عن الزراعة التقليدية في اكثر النباتات وانتاج المواد الطبية من مصادرها النباتية بعيداً عن التأثيرات البيئية والمحددات الموسمية للانتاج و تعرض هذه النباتات في الحقل المفتوح لمخاطر الافات الزراعية ما يؤثر سلباً على المنتج الطبي كما ونوعاً (Bhalsing and Maheshwari ، 1998) كما أتاحت تقنية الزراعة النسيجية امكانية الحصول على المركبات الطبية بدرجة عالية من النقاوة ودورة انتاج سريعة مع توفر امكانية التحكم في المسارات الايضية لانتاج المركبات الدوائية (Purohit)، اذ اشار كل من Giridhar و Ravishankar (2004) إلى أن زراعة اطراف افرع نبات *Vanilla planifolia* على وسط MS المدعم بـ 2.0 ملغم / لتر BA ادى الى الحصول على 17 فرع / جزء نباتي. وفي دراسة لكل من Archana و Paratkar (2004) وجد ان زراعة اطراف افرع نبات *Eclipta alba* Hassk على وسط MS المجهز بـ BA بتركيز تراوحت ما بين 0.1 – 0.5 ملغم / لتر ان التراكيز المنخفضة من الـ BA (0.1 ملغم / لتر) ادت الى الحصول على تضاعف وتجزير للاجزاء المزروعة في حين ان التراكيز العالية من الـ BA (0.5 ملغم / لتر) اعطت افضل استجابة للتضاعف. وفي دراسته وجد Benniamin واخرون (2004) ان افضل تضاعف للافرع 4.4 فرع/ جزء نباتي تم الحصول عليه من زراعة العقدة لنبات *Crataeva magna* L. على وسط MS المجهز بـ 2.0 ملغم / لتر BA وبمعدل طول افرع بلغ 63.2 ملم وان زراعة اطراف الافرع الناتجة من الزراعة النسيجية على وسط MS بنصف تركيز الاملاح والمجهز بـ 2.0 ملغم / لتر IBA اعطى نسبة تجذير جيدة وأن 64% من النباتات الناتجة نجحت بالوصول الى الحقل بعد أقلمتها. وذكر Bertoni واخرون (2006) في دراسة لاكثر نبات الاقحوان بالزراعة النسيجية ان زراعة اطراف الافرع على وسط MS مزود بـ 1.0 ملغم / لتر BA اعطى 2.03 فرع / جزء نباتي بينما اعطى التركيز 1.0 ملغم / لتر Kin 1.4 فرع / جزء نباتي ولوحظ ان هذا التركيز من الـ Kin ادى الى زيادة ملحوظة في طول الافرع وان زراعة اطراف الافرع الناتجة من الزراعة النسيجية على وسط MS بنصف تركيز الاملاح والمزود بـ 1.0 ملغم / لتر IBA جذرت بنسبة 80%. وذكر كل من Kumar و Kanwar (2007) أن زراعة أجزاء من ورقة الجيربييرا *Gerbera jamesonii* على وسط MS المجهز بالتراكيز (1.0, 1.5, 2.0) ملغم / لتر 2,4-D كونت افضل كمية كالس من الزراعة على الوسط المجهز بـ 1.5, 2.0 ملغم / لتر 2,4-D وان اعلى عدد افرع 9.0 فرع / جزء نباتي تم الحصول عليها من زراعة الكالس على وسط MS المجهز بـ 3.0 ملغم / لتر BA .

اجريت هذه الدراسة بهدف تضاعف اطراف افرع وعقد نبات الاقحوان صنف Lemon Queen باستخدام تراكيز مختلفه من BA ثم تجذير الافرع الناتجة من التضاعف بالاضافه الى استحداث الكالس وتمايظه او زيادة كميته لاستخدامه في دراسات لاحقه لتقدير بعض المواد الفعاله في الكالس الناتج.

مواد البحث وطرائقه

اخذت اجزاء نباتية متمثلة باطراف الافرع والعقد والورقة من نباتات الاقحوان النامية في الحقل التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق واجريت عليها عملية التعقيم باستخدام مسحوق الغسيل لمدة 15 دقيقة بعدها غسلت بالماء الجاري ثم عقت بـ كلوريد الزئبق تركيز 0.05 % لمدة 15 دقيقة مع التحريك المستمر ثم غسلت الاجزاء بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات دقيقتان لكل مرة بعدها قطعت كل من اطراف الافرع والعقد ليصبح طولها 1.0 - 1.25 سم وزرعت على وسط MS الصلب المزود بـ 30 غرام / لتر سكروز و 6 غم / لتر أكار وثبت الـ pH عند 5.7±1، وتمت اضافة منظمات النمو حسب الهدف من كل تجربة، واستخدم الـ BA بالتراكيز (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0) ملغم / لتر لمرحلتى النشوء والتضاعف في حين اضيف حامض اندول بيوتيريك (IBA) بالتراكيز (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0) ملغم / لتر الى وسط MS لتجذير الافرع الناتجة عن التضاعف بالاضافة الى زراعة اجزاء من الاوراق بطول 1.5- 2.0 سم وعرض 0.5 سم حاوية على العرق الوسطي على وسط MS المزود بـ 2,4-D بالتراكيز (0.0, 0.1, 0.2, 0.5) ملغم / لتر بهدف استحداث كالس، الكالس الناتج من زراعة اجزاء الورقة بعمر اربعة اسابيع اعيدت زراعته على وسط MS المزود بالتراكيز (0.0, 0.1, 0.5, 1.0) ملغم / لتر BA متداخلاً مع IBA بالتراكيز (0.0, 0.1, 0.5, 1.0) ملغم / لتر واعيدت زراعته مرتين على نفس الاوساط السابقه لأربعة أسابيع لكل مرة، تمت الزراعة في قناني سعة 100 مل احتوت على 20 مل من وسط الزراعة وتم تعقيم الوسط بجهاز المؤسدة على درجة حرارة 121 م° وضغط 1.04 كغم / سم² ولمدة 20 دقيقة، حفظت الزروع في غرفة التنمية على درجة حرارة 25±1 م° واضاءة 16 ساعة ضوء الى 8 ساعات ظلام بالتعاقب يومياً مجهزه من انابيب فلورسنت البيضاء عند شدة اضاءه 1000 لوكس نفذت تجارب النشوء والتضاعف والتجذير باستخدام التصميم العشوائي الكامل C R D في حين نفذت تجارب

تخصص الكالس باستخدام التصميم العشوائي الكامل للتجارب العامليه وكل معاملة كررت عشرة مرات وكل مكرر احتوى جزء نباتي واحد واستخدم اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5% للمقارنه بين المعاملات المختلفه لكل تجريبه.(داؤد وعبد الياس، 1990).

النتائج والمناقشة

يبين الجدول (1) تأثير BA في نشوء وتضاعف اطراف افرع نبات الاقحوان اذ ان جميع معاملات BA استجابت للتضاعف وبقارق معنوي عن نباتات المقارنة الا انها لم تختلف معنويا فيما بينها وتم الحصول على أعلى معدل لعدد الافرع 4.9 فرع / جزء نباتي من زراعة اطراف الافرع عند المعاملة 2.0 ملغم/ لتر BA في حين أعطت معاملة المقارنة أعلى معدل لطول افرع 2.15 سم وتوقفت معنويا على معدلات باقي المعاملات المدروسة وأعطت معاملة 1.0 ملغم / لتر BA أعلى معدل لعدد الاوراق 5.4 ورقة / جزء نباتي وذلك بعد أربعة أسابيع من الزراعة (مرحلة النشوء)، ومن اعادة الزراعة لاربعة أسابيع اخرى (مرحلة التضاعف) اعطت معاملة 1.5 ملغم / لتر BA أعلى معدل لعدد الافرع 7.8 فرع/جزء نباتي وتوقفت معنويا على معاملة المقارنة وان جميع معاملات BA توقفت معنويا على معاملة المقارنة، وتم الحصول اعلى معدل لطول افرع وأعلى معدل لعدد الاوراق 5.2 سم و10.6 ورقة/جزء نباتي على التوالي من الاجزاء المزروعة عند معاملة المقارنه.

الجدول (1): تأثير BA في نشوء وتضاعف اطراف افرع نبات الاقحوان *Calendula officinalis* L صنف lemon Queen المأخوذة من الحقل من زراعتها على وسط MS الصلب.

Table(1): Effect of BA on initiation and multiplication of *Calendula officinalis* L. cv.lemon Queen shoot tips drived from field cultured on solid MS media.

بعد ثمانية اسابيع (مرحلة التضاعف) After eight weeks (Multiplication)			بعد اربعة اسابيع (مرحلة النشوء) After four weeks (initiation)			BA ملغم / لتر BA mg/l
عدد الاوراق على طول فرع Number Of leaves	طول اطول فرع (سم) Shoot length (cm)	عدد الافرع Shoots number	عدد الاوراق على طول فرع Number Of leaves	طول اطول فرع (سم) Shoot length (cm)	عدد البراعم المتفتحة Shoots number	
10.6 a	5.2 a	2.1 b	4.5 ab	2.15 a	1.5 b	0.0
7.1 b	2.25 b	5.5 a	4.0 b	1.26 b	3.7 a	0.5
9.1 ab	2.43 b	6.7 a	5.4 a	1.48 b	3.9 a	1.0
7.7 b	2.7 b	7.8 a	4.6 ab	1.09 b	4.4 a	1.5
7.3 b	2.4 b	6.0 a	5.2 ab	1.39 b	4.9 a	2.0

الارقام ذات الحروف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنويا فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5%.

ويبين الجدول (2) تأثير المعاملات المختلفة في نشوء وتضاعف عقد نبات الاقحوان اذ تم الحصول على اعلى معدل لعدد الافرع 2.9 فرع / جزء نباتي من الزراعة عند المعاملة 1.0 ملغم / لتر BA و هذه بدورها تفوقت معنويا على باقي المعاملات، وأعطت معاملة 1.5 ملغم / لتر BA أعلى معدل لطول افرع 2.69 سم في حين أعطت معاملة المقارنة أعلى معدل لعدد الاوراق 7.2 ورقة / جزء نباتي وذلك بعد اربعة اسابيع من الزراعه، ومن مراجعة بيانات مرحلة التضاعف يبين الجدول ان معاملة 1.0 ملغم / لتر BA اعطت اعلى عدد من الافرع 3.6 فرع / جزء نباتي في حين تم الحصول على أعلى معدل لطول افرع 3.04 سم وأعلى معدل لعدد الاوراق 8.4 ورقة / جزء نباتي من الزراعة على الوسط المزود بـ 1.5 ملغم/ لتر BA.

قد تفسر نتائج الجدولين (1) و(2) في تضاعف الاجزاء المزروعه على اساس ان BA هو أحد الساييتوكاينينات التي تلعب دورا في القضاء على السيادة القمية وبالتالي زيادة عدد الافرع ونتيجة لحصول حالة التوازن ما بين الهرمونات الداخلية ومنظمات النمو المضافة تم الحصول على اعلى القيم وان زيادة التركيز تؤدي الى تقليل القيم لعدد الافرع لان تأثيره يصبح عكسيا

(Smith، 2000). كما يبين الجدولين ان اطراف الافرع استجابت للتضاعف بشكل اكبر مقارنة مع العقد ربما يعود السبب الى ان اطراف الافرع كانت تحتوي براعم ابويه بعدد اكبر مما موجود في العقد.

الجدول (2): تأثير BA في نشوء وتضاعف عقد نبات الاقحوان *Calendula officinalis* L cv lemon Queen المأخوذة من الحقل من زراعتها على وسط MS الصلب.

Table(2): Effect of BA on initiation and multiplication of *Calendula officinalis* L cv. lemon Queen nod derived from field cultured on solid MS media.

بعد ثمانية اسابيع (مرحلة التضاعف) After eight weeks(Multiplication)			بعد اربعة اسابيع (مرحلة النشوء) After four weeks(initiation)			BA ملغم / لتر BA mg/l
عدد الاوراق على اطول فرع Number Of leaves	طول اطول فرع (سم) Shoot length (cm)	عدد الافرع Shoots number	عدد الاوراق على اطول فرع Number Of leaves	طول اطول فرع (سم) Shoot length (cm)	عدد الافرع Shoots number	
7.5 a	2.96 a	3.0 a	7.2 a	1.57 bc	1.0 b	0.0
7.2 a	2.7 a	2.2 ab	3.6 b	1.59 bc	1.5 b	0.5
7.9 a	2.8 a	3.6 a	5.9 a	2.09 b	2.9 a	1.0
8.4 a	3.04 a	3.2 a	5.9 a	2.69 a	1.6 b	1.5
3.7 b	1.43 b	2.2 b	2.6 b	1.17 c	1.8 b	2.0

الارقام ذات الحروف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنويا فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5%.

ويبين الجدول (3) تأثير IBA في تجذير اطراف الافرع الناتجة من الزراعة النسيجية من زراعتها على وسط MS كامل تركيز الاملاح اذ اعطت معاملة 0.5 ملغم / لتر IBA اعلى نسبة تجذير 70% وهذه المعاملة بدورها اعطت اعلى معدل لعدد الجذور 8.8 جذر / جزء نباتي واعلى معدل لطول أطول جذر 4.14 سم وذلك بعد اربعة اسابيع من الزراعة، قد تفسر هذه النتائج على أساس ان IBA هو أحد الاوكسينات التي تلعب دورا في انقسام واستطالة الخلايا وتكوين مبادئ الجذور وبالتالي تحسين النسبة المئوية للتجذير وزيادة عدد الجذور وأطولها (Hartmann وآخرون، 2002).

يبين الجدول (4) تأثير BA في تمايز كالس نبات الاقحوان اذ تم الحصول على اعلى معدل وزن رطب للكالس 5.4 غم من معاملة 0.5 ملغم/لتر BA، في حين اعطت معاملة 1.0 ملغم/لتر BA اعلى نسبه مؤويه 15% للاجزاء التي اعطت افرع وهذا التركيز بدوره مع معاملة 0.5 ملغم/لتر BA اعطى اعلى معدل عدد افرع 1.0 فرع /جزء نباتي، في حين اعطت معاملة 1.0 ملغم/لتر BA اعلى معدل لطول أطول فرع 1.05 سم، وتم الحصول اعلى نسبه مؤويه للاجزاء التي كونت جذور 47.5% والتي بدورها اعطت اعلى معدل لعدد الجذور 5.07 جذر /جزء نباتي في حين تم الحصول على اعلى معدل لطول أطول جذر 3.87 سم من معاملة 0.1 ملغم/لتر BA وذلك بعد اربعة اسابيع من الزراعة، كما يبين الجدول ان اعادة الزراعة لاربعة اسابيع اخرى ادت الى زيادة الوزن الرطب للكالس اذ تم الحصول على اعلى وزن رطب 10.25 غم من زراعة الكالس عند معاملة 0.5 ملغم/لتر BA، واعطت معاملة 1.0 ملغم/لتر BA اعلى نسبه مؤويه 15% لتكوين الافرع و اعطت معاملة 0.5 ملغم/لتر BA اعلى معدل لعدد الافرع 2.0 فرع /جزء نباتي والتي تفوقت معنويا على باقي المعاملات المدروسة، واعطت معاملة 1.0 ملغم/لتر BA اعلى معدل لطول أطول فرع 1.42 سم، واعطت معاملة 0.1 ملغم/لتر BA اعلى نسبه مؤويه لتكوين الجذور 47.5%، واعطت معاملة 0.1 ملغم/لتر BA اعلى معدل لعدد الجذور 6.17 جذر /جزء نباتي، واعطت معاملة 1.0 ملغم/لتر BA اعلى معدل لطول أطول جذر 4.75 سم.

الجدول (3) : تأثير IBA في تجذير اطراف الافرع الناتجة من الزراعة النسيجية لنبات الاقحوان *Calendula officinalis* L صنف Lemon Queen بعد اربعة اسابيع من الزراعة على وسط MS الصلب.

Table (3) : Effect of IBA on rooting of shoot tips of *Calendula officinalis* L cv.lemon Queen derived in vitro after four weeks cultured in solid MS medium.

طول اطول جذر (سم) Root length (cm)	عدد الجذور Root number	التجذير % Rooting %	IBA ملغم / لتر IBA mg/l
2.59 ab	0.9 b	% 50	0.0
4.14 a	8.8 a	% 70	0.5
1.04 b	3.4 b	% 60	1.0
0.9 b	1.8 b	% 40	1.5
0.79 b	1.6 b	% 40	2.0

الأرقام ذات الحروف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنويًا فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5%.

يبين الجدول (5) تأثير IBA في تمايز كالس نبات الاقحوان اذ تم الحصول على اعلى وزن رطب للكالس 7.5 غم من معاملة 1.0 ملغم / لتر IBA واعطت معاملة المقارنه اعلى نسبه مئوية 12.5% للاجزاء التي كونت افرع وهذه بدورها اعطت اعلى معدل لعدد الافرع 1.25 فرع / جزء نباتي وبمعدل طول لاطول فرع 0.67 سم، واعطت معاملة 0.1 ملغم / لتر IBA اعلى نسبه مئوية لتكوين الجذور 52.5% وهذه بدورها اعطت اعلى معدل لعدد الجذور 6.85 جذر / جزء نباتي وبمعدل طول 2.93 سم وذلك من زراعة الكالس لمدة اربعة اسابيع، ومن اعاده الزراعة لاربعة اسابيع اخرى تم الحصول على اعلى وزن للكالس 14.8 غم من الزراعة على الوسط المزود ب 1.0 ملغم / لتر IBA واعطت معاملة المقارنه ومعاملة 0.1 ملغم / لتر IBA اعلى نسبه مئوية لتكوين الافرع 10%، واعطت معاملة المقارنه اعلى معدل لعدد الافرع 1.5 فرع / جزء نباتي وبمعدل طول 1.2 سم، وبلغت النسبه مئوية للاجزاء التي كونت جذور 55% من زراعة الكالس عند الوسط المجهز ب 0.1 ملغم / لتر IBA وهذه المعامله بدورها اعطت اعلى معدل لعدد الجذور 8.25 جذر / جزء نباتي، في حين تم الحصول على اعلى معدل لطول اطول جذر 4.65 سم من معاملة المقارنه ومعاملة 0.5 ملغم / لتر IBA

يبين الجدول (6) التأثير المشترك لكل من IBA و BA في تمايز كالس نبات الاقحوان (الناتج من مزارع اجزاء الورقه عند معاملة 0.1 ملغم / لتر 2,4-D)، اذ تم الحصول على اعلى وزن كالس 8.5 غم من الزراعة على الوسط المجهز ب 0.5 ملغم / لتر BA مع 1.0 ملغم / لتر IBA وان 30% من الاجزاء المزروعة كونت افرع وذلك من الزراعة عند المعاملتين 1.0 ملغم / لتر BA او معاملة 1.0 ملغم / لتر BA مع 0.1 ملغم / لتر IBA وهذه المعاملتين بدورها اعطت اعلى معدل لعدد الافرع 2 فرع / جزء نباتي والتي تفوقت معنويًا على باقي المعاملات المدروسة وتم الحصول على اعلى معدل لطول أطول فرع 3.0 سم من الزراعة على الوسط المزود ب 1.0 ملغم / لتر BA مع 0.1 ملغم / لتر IBA والتي تفوقت معنويًا على باقي المعدلات للمعاملات المدروسة، 70% من الاجزاء النباتية كونت جذور من الزراعة على وسط MS المزود ب 0.5 ملغم / لتر BA مع 0.1 ملغم / لتر IBA وتفوقت معاملة 0.1 ملغم / لتر BA مع 0.1 ملغم / لتر IBA معنويًا على باقي المعدلات المدروسة لصفة معدل عدد الجذور اذ اعطت 9.0 جذر / جزء نباتي بينما اعطت معاملة 0.1 ملغم / لتر BA اعلى معدل لطول أطول جذر 6.9 سم والتي تفوقت معنويًا على باقي المعاملات المدروسة وهذا كان بعد اربعة اسابيع من الزراعة، ومن اعاده زراعة الكالس recultur لاربعة اسابيع اخرى اعطت معاملة 1.0 ملغم / لتر IBA لوحده ومعاملة 0.5 ملغم / لتر BA مع 1.0 ملغم / لتر IBA اعلى وزن رطب للكالس حيث بلغ 15.9 غرام لكلا المعاملتين.

كما تبين ان اعاده الزراعة ادت الى زيادة معدلات عدد الافرع والجذور المتكونة على المعاملات التي كونت افرع وجذور وتم الحصول على اعلى معدل لعدد الافرع 4 فرع / جزء نباتي من الزراعة على الوسط المكون من 0.5 ملغم / لتر BA مع 0.5 ملغم / لتر IBA والتي تفوقت معنويًا على باقي المعاملات المدروسة وتم الحصول على اعلى معدل لطول أطول فرع 3.5 سم من معاملة 1.0 ملغم / لتر BA مع 0.1 ملغم / لتر IBA وتم الحصول على اعلى نسبة مئوية للاجزاء التي كونت الجذور 70% وذلك من زراعة كالس عند الوسط المزود ب 0.5 ملغم / لتر BA مع 0.1 ملغم / لتر IBA في حين تم الحصول على اعلى معدل لعدد الجذور 10.2 جذر / جزء نباتي من معاملة 0.1 ملغم /

الجدول (4): تأثير BA في تمايز كالس نبات الاقحوان *Calendula officinalis* L. صنف Lemon Queen والناتج من زراعة اجزاء الورقه على وسط MS المزود ب0.1 ملغم/لتر 2,4-D. Table (4): Effect of BA on callus differentiation of *Calendula officinalis* cv. lemon Queen produced from leaves cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/ l 2,4-D.

(After eight weeks) (بعد ثمانية اسابيع من الزراعة)							(After four weeks) (بعد اربعة اسابيع من الزراعة)							BA ملغم / لتر BAmg/l
طول اطول جذر (سم) Root Length (cm)	عدد الجذور number of roots	الاجزاء التي كونت جذور % rooted explants (%)	طول اطول فرع (سم) Shoot length (cm)	عدد الافرع Shoots number	الاجزاء التي كونت افرع % Explants produced shoots (%)	الوزن الرطب للكالس (غم) Callus F.W. (mg)	طول اطول جذر (سم) Root Length (cm)	عدد الجذور number of roots	الاجزاء التي كونت جذور % rooted explants (%)	طول اطول فرع (سم) Shoot length (cm)	عدد الافرع Shoots number	الاجزاء التي كونت افرع % Explants produced shoots (%)	الوزن الرطب للكالس (غم) Callus F.W. (mg)	
3.57b	5.23c	%32.5	0.0d	0.0d	%0.0	9.8a	2.6c	3.82c	%32.5	0.0d	0.0c	%0.0	4.67ab	0.0
4.7a	6.17a	%47.5	0.37c	0.25c	% 0.25	9.67a	3.87a	5.05b	%42.5	0.25c	0.25b	%2.5	4.73ab	0.1
3.37c	4.52d	%42.5	1.3b	2.0a	%7.5	10.25a	1.85d	3.82c	%42.5	0.7b	1.0a	%7.5	5.4a	0.5
4.75a	5.72b	%47.5	1.42a	1.0b	%15	9.92a	3.06b	5.07a	%47.5	1.05a	1.0a	%15	4.55b	1.0

الارقام ذات الاحرف المتشابهه ضمن العمود الواحد لاتختلف معنويا فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 %.

الجدول (5) : تأثير IBA في تمايز كالس نبات الاقحوان *Calendula officinalis* L. صنف Lemon Queen والناتج من زراعة اجزاء الورقه على وسط MS المزود ب0.1 ملغم/لتر 2,4-D. Table (5): Effect of IBA on callus differentiation of *Calendula officinalis* L. cv. Lemon Queen produced from leaves cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/l 2,4-D.

(After eight weeks) (بعد ثمانية اسابيع من الزراعة)							(After four weeks) (بعد اربعة اسابيع من الزراعة)							IBA ملغم/لتر IBA Mg/l
طول اطول جذر (سم) Root Length (cm)	عدد الجذور number of roots	الاجزاء التي كونت جذور % rooted explants (%)	طول اطول فرع (سم) Shoot length (cm)	عدد الافرع Shoots number	الاجزاء التي كونت افرع % Explants produced shoots (%)	الوزن الرطب للكالس (غم) Callus F.W.(mg)	طول اطول جذر (سم) Root Length (cm)	عدد الجذور number of roots	الاجزاء التي كونت جذور % rooted explants (%)	طول اطول فرع (سم) Shoot length(cm)	عدد الافرع Shoots number	الاجزاء التي كونت افرع % Explants produced shoots (%)	الوزن الرطب للكالس (غم) Callus F.W.(mg)	
4.65a	4.7b	%45	1.2b	1.5a	%10	4.8d	3.28a	3.75c	%45	0.67b	1.25a	%12.5	2.39d	0.0
3.95b	8.25a	%55	1.25a	0.75c	%10	7.9c	2.93b	6.85a	% 52.5	0.87a	0.75a	%10	3.5c	0.1
4.65a	4.0c	%45	0.62c	1.0b	%2.5	12.07b	2.92b	4.2b	% 45	0.45c	0.25b	%2.5	5.95b	0.5
3.17c	3.75c	%25	0.0d	0.0d	%0.0	14.8a	2.32c	3.12d	% 22.5	0.0d	0.0c	%0.0	7.5a	1.0

الارقام ذات الاحرف المتشابهه ضمن العمود الواحد لاتختلف معنويا فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 %

الجدول (6): تأثير BA و IBA في تمايز كالس نبات الاقحوان *Calendula officinalis* الناتج من زراعة اجزاء الورقة على وسط MS المزود بـ 0.1 ملغم / لتر 2,4-D.
Table(6): Effects of BA and IBA on callus differentiation of *Calendula officinalis* cv.lemon Queen produced from leaves cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/ l 2,4-D.

(After eight weeks) (بعد ثمانية اسابيع من الزراعة)							(After four weeks) (بعد اربعة اسابيع من الزراعة)							IBA ملغم / لتر IBAmg/l	BA ملغم / لتر BAmg/l
طول اطول جذر(سم) Root Length (cm)	عدد الجنور number of roots	الاجزاء التي كونت جذور (%) rooted explants (%)	طول اطول فرع (سم) Shoot length (cm)	عدد الافرع Shoots number	الاجزاء التي كونت افرع (%) Explants produced shoots(%)	الوزن الرطب للكالس (غم) Callus F.W. (mg)	طول اطول جذر(سم) Root Length (cm)	عدد الجنور number of roots	الاجزاء التي كونت جذور (%) rooted explants (%)	طول اطول فرع (سم) Shoot length (cm)	عدد الافرع shoots number	الاجزاء التي كونت افرع (%) Explants produced shoots(%)	الوزن الرطب للكالس (غم) Callus F.W. (mg)		
3.1L	4.25i	%40	0.0f	0.0e	%0.0	1.9g	2.15gh	2.75k	%40	0.0f	0.0c	%0.0	1.09f	0.0	0.0
4.4g	9.6b	%50	0.0f	0.0e	%0.0	7.7de	3.2e	7.6b	%50	0.0f	0.0c	%0.0	3.9ef	0.1	
4.5f	4.6h	%30	0.0f	0.0e	%0.0	13.7a-c	3.9d	4.0g	%30	0.0f	0.0c	%0.0	6.5c	0.5	
2.3o	2.5n	%10	0.0f	0.0e	%0.0	15.9a	1.5ij	1.0n	%10	0.0f	0.0c	%0.0	7.2a-c	1.0	
7.5a	6.4d	%40	1.5d	1.0d	%10	4.6fg	6.9a	6.0d	%40	1.0ce	1.0b	%10	2.3f	0.0	0.1
5.3d	10.2a	%50	0.0f	0.0e	%0.0	7.8de	4.6c	9.0a	%40	0.0f	0.0c	%0.0	3.05ef	0.1	
3.6i	5.3g	%50	0.0f	0.0e	%0.0	11.8bc	2.3g	3.6j	%50	0.0f	0.0c	%0.0	6.9a-c	0.5	
2.5m	2.8m	%50	0.0f	0.0e	%0.0	14.5ab	1.7ij	2.2m	%40	0.0f	0.0c	%0.0	6.7bc	1.0	
4.8e	4.6h	%40	1.2e	3b	%10	5.2fe	2.8f	3.7i	%40	0.5e	2a	%10	3.5ef	0.0	0.5
3.7h	5.7f	%70	1.5d	1d	%10	7.8de	1.8hi	3.8h	%70	0.5e	1b	%10	3.9ef	0.1	
3.5j	3.8k	%50	2.5b	4a	%10	12.1bc	2.3g	3.8h	%50	1.8b	1b	%10	5.7cd	0.5	
1.5p	4.0j	%10	0.0f	0.0e	%0.0	15.9a	0.5k	4.0g	%10	0.0f	0.0c	%0.0	8.5a	1.0	
3.2k	3.6l	%60	2.2c	2.0c	%30	7.5f	1.3j	2.6L	%60	1.2c	2.0a	%30	2.7f	0.0	1.0
2.4n	7.5c	%50	3.5a	2.0c	%30	8.5de	2.14gh	7.0c	%50	3.0a	2.0a	%30	3.2ef	0.1	
7.0b	6.1e	%50	0.0f	0.0e	%0.0	10.7cd	3.2e	5.4e	%50	0.0f	0.0c	%0.0	4.7de	0.5	
6.4c	5.7f	%30	0.0f	0.0e	%0.0	13.0a-c	5.6b	5.3f	%30	0.0f	0.0c	%0.0	7.6ab	1.0	

الارقام ذات الاحرف المتشابهه ضمن العمود الواحد لاتختلف معنويا فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5% 0

لتر BA مع 0.1 ملغم / لتر IBA والتي تفوقت معنويا على باقي المعاملات المدروسة. قد تفسر هذه النتائج على اساس ان عملية تمايز الكالس من العمليات التي تلعب منظمات النمو دورا رئيسيا فيها اذ ان زيادة نسبة الساييتوكاينينات الى الاوكسينات تؤدي الى تكوين الافرع في حين ان زيادة نسبة الاوكسينات الى الساييتوكاينينات تؤدي الى تكوين الجذور وان حالة التوازن بين الاوكسينات والساييتوكاينينات تؤدي الى تكوين الجذور والافرع معا (سيد محمد، 1990). وقد تفسر نتائج اعطاء معاملة المقارنه للجذور على اساس ان القطعه النباتيه كانت تحتوي على اوكسين داخلي مما شجع تكوين الجذور على الجزء النباتي كذلك الحال بالنسبه للمعاملات المزوده بالبنزاييل ادنين BA والخاليه من IBA.

SHOOT TIPS AND NODDS MULTIPLICATION, CALLUS INTIATION AND DIFFERENTIATION OF *CALENDULA OFFICINALIS* L. CULTURE IN VITRO

Bashar z. A.Kasab Bashi
Horticulture Dept., College of Agriculture and Forestry, Mosul University. Iraq
E-mail: Bashybashar@yahoo.com

Khaula M. Y. AL-Nooh

ABSTRACT

This investigation was carried out in the laboratory of cells and plant tissue culture at department of Horticulture and Landscape Design, College of Agriculture and Forestry, Mosul university, to propagate *Calendula officinalis* L. cv. Lemon Queen in vitro by multiplication shoot tips and nodes taken from field culture on MS medium supplemented with (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0) mg /l BA, shoot produced in vitro cultured on MS medium supplemented with (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0) mg/l IBA, moreover parts of leaves had been cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg /l 2,4-D for callus initiation, callus cultured on MS medium supplemented with (0.0, 0.1, 0.5, 1.0) mg/l BA interacted with (0.0, 0.1, 0.5, 1.0) mg/l IBA for differentiation. Data refer that best multiplication 7.8 shoots/explants with 2.7 cm length were obtained from cultured shoot tip driven from field cultured on MS medium supplemented with 1.5 mg/l BA after eight weeks compared with nodes which gave 3.6 shoots / explants with 2.8 cm length from cultured on MS medium supplemented with 1.0 mg/l BA after eight weeks, highest rooting 70% with highest roots number 8.8 obtained from shoot tips produced in vitro cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg /l IBA, highest fresh weight of callus 15.9 gm was initiated from callus cultured on MS medium supplemented with 1.0 mg /l IBA or from callus cultured on medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 1.0 mg /l IBA, 4.0 shoot /explant regenerated from callus cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l IBA, 10.2 root /explant obtained from callus cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg /l BA after eight weeks.

Keywords: multiplication, callus, BA, IBA, *Calendula*, *Calendula officinalis* L..

Received: 24/6/2012, Accepted: 15/10/2012.

المصادر

احمد، جمال الدين فهمي والسيد عبد الغفور عوض والسعدي، محمد بدوي (1993). النباتات الطبية والعطرية، مطابع مركز كمبيوتر كلية الصيدلة، جامعة القاهرة 211-99.

جاد، عبد المجيد محمد (1992). المعجم الموسوعي للنباتات الطبية والعطرية والغذائية وغيرها، مكتبة المعارف الحديثة، الاسكندرية 257-273.

داوود، خالد محمد و زكي عبد الياس (1990). الطرق الأحصائية للأبحاث الزراعية. مطابع التعليم العالي / جامعة الموصل.

رسول، حمزة رسول (1984) نباتات الزينة، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة صلاح الدين، العراق 56-57.

سعد الدين، شروق محمد كاظم (1986). الاعشاب الطبية، (ترجمة) الطبعة الاولى، دار الشؤون الثقافية العامة، وزارة الثقافة والاعلام، بغداد، العراق.

سيد محمد، عبد المطلب ومبشر صالح عمر (1990). المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والانسجة والاعضاء النباتية، مديرية دار الكتب للطباعة والنشر /جامعة الموصل – العراق.

الشحات، نصر أبو زيد (1986). النباتات والاعشاب الطبية، دار البحار، بيروت، لبنان .

عرموش، هاني (1999). الاعشاب في كتاب الاستخدامات الطبية والعلاجية والتجميلية التصنيعية، دار النقاش، بيروت – لبنان ط1 166-167.

Archana J.G. ; G.T. Paratkar. (2004) Micropropagation of *Eclipta alba* Hassk. An approach to shorten the protocol. *Indian Journal of Biotechnology*. (3): 128-132.

Bailey, L. H. (1975). Manual Of Cultivated Plants. Fifteenth Printing Macmillan Publishing Company. Inc.

Benniamin A.; V.S. Manickam ; M Johson and L.H. Joseph. (2004). Micropropagation of *Crataeva magna* (lour). A medicinal plant. *Indian Journal of Biotechnology*. (3): 136-138.

Bertoni, B.W. ; Dmiao filho, C.F. ; Moro, J.R. ; Franca S.C. ; Pereira, A.M.S. (2006) Micropropagation of *Calendula officinalis* L.Rev. *Brasilian Plant Medical, Botucatu*, 8(2):48 – 54.

Bhalsing, S.R. and V.L. Maheshwari.(1998). Plant tissue culture. a potential source of medicinal compounds *J. Scient. Indust. Res.* 57:703-708.

Blumenthal, M.)1998).The Complete German Commission E Monographs Therapeutic Guide To Herbal Medicines Integrative Medicine Communication.Wissench. Verlagsges. Stuttgart.pp. 119-121.

Giridhar P. and G.A. Ravishankar. (2004). Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. under influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk. *Indian Journal of Biotechnology*. (3): 113-118.

Hartmann, H.T. ; D.E. kester ; F.T. Davies and R.L. Geneve (2002). Plant Propagation Principles and Practices. 7th. ed., Prentice Hall. Inc., New Jersey.USA.

Kumar S. and Kanwar J.K. (2007). Plant regeneration from cell suspensions in *Gerbera Jamesonii* Bolus. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*.(15):157-166.

Laflamme, P.(2000). Special Crops. Academic Press. London, 15-18.

Muley B.P. ; S.S. Khadabad ; and N.B. Banarase.(2009). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis*

Linn (Asteraceae) *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (5): 455-465.

Novak, J.K ; Iitterl - Eglseer and ch. Franz. (1999). Genotype X environment interaction in *Calendula officinalis* L. *Acta. Horticulture*. 502: 67-70.

Purohit, S.S.(1999) Agricultural Biotechnology. Agro Botanica, J.N. Vyas Nagrr. Bikaner, India.

Smith R.H.(2000).Plant Tissue Culture, Academic Press.Harcourt Science and Technology Company. San Diego.