إخلاف النباتات من كالس أصول الحمضيات المستحث من أجزاء الباردات المزروعة خارج الجسم الحي

محمد عباس سلمان[*] و عماد احمد محمد الحافظ[**]

[*] كلية الزراعة/ جامعة بغداد

[**] الشركة العامة للبستنه والغابات– وزارة الزراعة

الخلاصة

انجزت هذه الدراسة للحصول على خطوط الكالس الجنيني لثلاثة أصول من الحمضيات (النارنج والبرتقال البذري المحلي والسوينكل سترومیلو) وذلك بزراعة قطع السيقان والأوراق والفلقات والسويقة الجنينية العليا المأخوذة من بادرات بعمر 6–8 اسابع ومزروعة خارج الجسم الحي. تخلف النارنج مقارنة مع البرتقال والسوينكل سترومیلو في قابليته على تكوين الكالس من الأجزاء النباتية المعزولة من البادرات البذرية واتضح ان السويقة الجنينية العليا هي أفضل الأجزاء النباتية في تكوين الكالس بعد ستة أسابيع من الزراعة في وسط MT المجهز بـ(ملغم/لتر) NAA 2.5 +2,4-D 0.25 +K 0.5 وان أفضل وسط لتكوين الأجنة هو MT المجهز بـ BA 0.25+ NAA 0.1 +ME 500. ولم يحصل تغاير في العدد الكروموسومي للنباتات الناتجة (2n=2x=18).

In vitro plant regeneration of citrus rootstocks indused callus from explants of young seedlings

Mohammed A. Salman[*] and Imad A. M. Al-Hafidh[**]

[*] College of Agriculture/ Baghdad University

[**] The General State of Horticulture and Forestry

Abstract

Assay were performed to obtain embryogenic callus lines from three citrus rootstocks(sour orange, sweet orange, and swingle stirumelo)by growing stem and leaf segments, cotyledons, and epicotyls explants excised from *in vitro* young seedling of 6-8 weeks old.

It was evident that epicotyls was the best explants in callus production following six weeks of culture on MT medium supplemented with (mg/l) NAA (2.5), 2,4-D (0.25) and K (0.5) . However, the best medium for embryogenesis contained BA (0.25), NAA (0.1) and ME (500). No differences in chromosomal number were observed in the plants obtained from different propagation methods (2n=2x=18).

البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثاني

2, 4- D= 2 , 4 – dichlorophenoxy acetic acid; IBA= 3- indole-butyric acid; NAA= α- naphthalene acetic acid; BA= 6- benzyladenine or 6- benzylaminopurine; ME= Malt extract; MS= Murashige and Skoog Medium; MT Murashige and Tuker Medium.

المقدمة

إن إنتاج الحمضيات في العراق يعد محدوداً على المستوى العالمي إذ بلغ معدل إنتاجية الشجرة الواحدة 26.82 كغم لسنة 2000 ،استناداً إلى الجهاز المركزي للإحصاء ، وهو منخفض مقارنة بالإنتاج العالمي، ولعل السبب في ذلك يعود إلى تداخل عوامل عديدة من أهمها قسوة الظروف الجوية وانخفاض إنتاجية الأصناف المحلية مما يتطلب توفير عناية خاصة للأشجار إذ اعتاد المزارعون زراعة الحمضيات تحت ظلال أشجار النخيل الأمر الذي يحد من التوسع في زراعتها فضلاً عن ضعف نمو الأشجار ومن ثم انخفاض إنتاجيتها. إن تحسين نوعية وإنتاجية الحمضيات في العراق يتطلب إجراء العديد من الدراسات التي من ضمنها إعداد برامج تربية تهدف إلى إيجاد أصناف وأصول ذات مواصفات جيدة.

إن قابلية أي صنف من أصناف الحمضيات على استحثاث تكوين الكالس الجنيني واحتفاظ الكالس بقدرته على النمو لمدد طويلة بإعادة زراعته دورياً من دون إن يفقد القابلية على تكوين الأجنة وإخلاف النباتات يعد الأداة الأساسية في الدراسات المتعلقة بعزل وزراعة ودمج البروتوبلاست (1و2)وانتخاب الخلايا الظافرة (3) ونقل الجينات وحفظ المصادر الوراثية وإنشاء بنوك الجينات (4) وهذا يتطلب توفر طريقة عمل واضحة لإخلاف النباتات من الكالس(2).

إن ندرة الدراسات الخاصة باستحثاث تكوين الكالس وإخلاف الأجنة والنباتات من كالس الحمضيات في العراق قادتنا إلى إجراء هذا البحث لكي يعد كنقطة شروع نحو دراسات قادمة تستعمل فيها التقانات الحديثة في تربية الحمضيات.

المواد وطرائق العمل

1− مصدر الأجزاء النباتية

استخلصت بذور النارنج Sour orange (*Citrus aurantium* L.) والبرتقال المحلي البذري Sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) والسوينكل ستروميلو Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf x *Poncirus trifoliatal* Raf.) من ثمار تامة النضج وعقمت سطحياً بغمرها في تركيز 95% (حجم / حجم) كحول اثيلي Ethanol ولمدة 10 دقائق ثم تمريرها على اللهب. تمت إزالة أغلفة البذرة وزرعت الأجنة في أنابيب اختبار بأبعاد 15 × 180 ملم تحتوي على 10 مللتر من الوسط MS (5) الأساس الخالي من منظمات النمو ومضافاً إليه 3% سكروز . حضنت الزروعات في درجة حرارة 26 $\pm$ 1°م وشدة إضاءة 2000 لوكس لمدة 16 ساعة يومياً. بعد 6−8 أسابيع استعملت البادرات النامية مصدراً للبراعم الجانبية (العقد) وقطع السيقان (السلاميات) والأوراق.

2− استحثاث أنسجة الكالس من أجزاء البادرات

استحثاث أنسجة الكالس من قطع السيقان (السلاميات)

أخذت قطع السيقان أو السلاميات بطول 5 ملم من بادرات النارنج والبرتقال والسوينكل ستروميلو وزرعت بشكل أفقي في تماس مع الوسط الغذائي. جرى تنفيذ 4 معاملات تضمنت منظمات النمو المبينة في الجدول أدناه المضافة إلى وسط MT (6) كوسط أساس.

عدد المعاملات وأنواع وتركيز منظمات النمو المستعملة في استحثاث تكوين الكالس من السلاميات

ت	منظمات النمو (ملغم / لتر)			
	2,4-D	**NAA**	**K**	**BA**
1	0.0	5.0	0.5	0.0
2	0.0	10.0	0.5	0.0
3	0.25	2.5	0.5	0.0
4	0.0	0.1	0.0	10.0

بعد ستة أسابيع من الزراعة جرى نقل الكالس المتكون إلى وسط جديد يحتوي على مكونات الوسط السابق نفسه ولمدة ستة أسابيع أخرى لملاحظة نمو الكالس.

استحثاث الكالس من قطع السيقان (السلاميات) والأوراق والفلقات والسويقة العليا

اعتماداً على نتائج التجارب السابقة ، درست قابلية أجزاء أخرى لاستحثاث الكالس فضلاً عن قطع السيقان (السلاميات) إذ قطعت الفلقات والوريقات من الجانبين عرضياً وزرعت في تماس مع الوسط الغذائي (MT + 2.5 ملغم/ لتر NAA + 0.25 ملغم/ لتر 2,4-D + 0.5 ملغم/ لتر k) ، أما السويقة الجنينية العليا فقد أخذت من بادرات بعمر 3 أسابيع وقطعت بطول 5 ملم وزرعت أفقيا في تماس مع الوسط أيضا.

في جميع تجارب استحثاث الكالس زرعت 10 مكررات لـ 20 جزءً نباتياً في كل معاملة على 10 مل من الوسط داخل أنابيب بأبعاد 20 × 150 ملم وحضنت الزروعات في الظلام في درجة حرارة 26 ± 1ْم واجري التقييم بعد ستة أسابيع وفق المؤشرات المرئية الآتية وطبقاً الى Carputo وآخرين (7) :

1 = لا توجد استجابة.

2 = بعض الكالس في نهايتي الجزء النباتي.

3 = كلا نهايتي الجزء النباتي فيها كالس مع جزء منه فوق سطح الجزء النباتي.

4 = الكالس يحيط بالجزء النباتي مع إمكانية مشاهدة الجزء النباتي .

5 = كل الجزء النباتي تحول إلى كالس.

3 – إدامة الكالس :

جمع الكالس المستحث من التجربة الآنفة الذكر وأعيدت زراعته كل ستة أسابيع في وسط MT مضافاً اليه (ملغم / لتر) NAA 0.5 ، 2,4-D 0.25 و 0.5 K . جرى زراعة 10 مكررات لكل نوع من الكالس وبواقع 200 ملغم لكل مكرر من الكالس وأخذت النتائج على أساس النسبة المئوية للبقاء والتدهور .

4– استحثاث نشوء الأجنة اللاجنسية أو تكوين الأعضاء من الكالس :

اختبرت تراكيز 0.25 ، 0.5 ، 1 و 2 ملغم/ لتر من الـ BA بوجود 0.1 ملغم/ لتر NAA و 500 ملغم / لتر ME مع الوسط MT في نشوء الأجنة اللاجنسية أو تحفيز تكوين الأعضاء من أنسجة الكالس . تمت زراعة 200 ملغم من الكالس ، بواقع 10 مكررات لكل معاملة ، داخل دوارق حجمية سعة 100 مل ويحتوي على 25 مل من الوسط وحضنت الزروعات في درجة حرارة 26 ± 1ْ م وشدة إضاءة 1000 لوكس

لمدة 16 ساعة يومياً . أخذت النتائج بعد ثلاثة أشهر من الزراعة المتضمنة إعادة الزراعة subculture بعد كل شهر.

5- التجذير :

تم تجذير النباتات الناتجة في وسط مكون من نصف تركيز املاح MS المجهز بـ (ملغم/لتر) 0.5 NAA + 0.1 IBA + 3% Sucrose طبقا الى (8).

6- الدراسات الكروموسومية :

لغرض دراسة ثبات العدد الكروموسومي للنباتات الناتجة من زراعة الأنسجة مقارنة مع الأصل الذي أخذت منه ، جرى الفحص المجهري لخلايا قمم الجذور وبعد وضعها في ماء بارد (6 °م) لمدة 24 ساعة ثم تثبيتها بوساطة ايثانول : حامض الخليك (3 : 1) لمدة 24 ساعة ايضاً ومن ثم تصبيغها بوساطة Lactopropionic orcein لمدة 3 ساعات استناداً إلى (9). وحضرت الصبغة طبقاً إلى (10) .

7- التحليل الاحصائي :

نفذت التجارب السابقة باستعمال التصميم التام التعشية (CRD) تجربة عامليه (4X3) وقورنت المتوسطات استناداً إلى الفرق المعنوي الأصغر (L.S.D) وعلى مستوى احتمال 5% أو 1% (11).

النتائج والمناقشة

1- تأثير النوع والوسط في تكوين الكالس من قطع السيقان

تشير النتائج المبينة في جدول(1) إلى وجود اختلافات معنوية بين الأنواع في قابليتها على تكوين الكالس من قطع السيقان(السلاميات) ، إذ انخفض معدل مقياس تكوين الكالس في النارنج (2.81) عما هو عليه في البرتقال والسوينكل سترومیلو. ولم تلاحظ أية فروقات معنوية بين تأثير نوع الوسط في تكوين الكالس ولم يكن هناك فرق معنوي للتداخل بين نوع الأصل والوسط. كما تشير النتائج إلى أن إعادة زراعة الكالس بعد ستة أسابيع على الوسط السابق نفسه (زراعة ثانوية subculture) أسفرت عن حدوث تدهور وموت في كالس النارنج ولجميع المعاملات ، وكذلك في البرتقال والسوينكل سترومیلو حصل الشيء نفسه باستثناء المعاملة رقم 1 إذ بقي الكالس محافظاً على لونه الأبيض ولكن نموه بطيء جداً . من الجدير بالذكر أن تقليل تراكيز الـ NAA والـ BA إلى النصف في الزراعة الثانوية لم يؤثر في تغيير النتيجة وهي تدهور وموت الكالس. بينما تقليل تركيز الـ NAA إلى 0.5 ملغم/ لتر (المعاملة رقم 1) أدى إلى تحسن تدريجي في نمو كالس البرتقال والسونكل باستمرار إعادة الزراعة كل 4 أسابيع على الوسط نفسه ، وتحسن في نسجه الكالس التي أصبحت أقل تماسكاً friable . وفي النارنج اختلف التأثير ، ففي أول نقله إلى الوسط الحاوي على تركيز قليل من NAA (0.5 ملغم/ لتر) يظهر تحسن في نمو الكالس يليه تدهور تدريجي بعد كل إعادة زراعة على الوسط نفسه .

تم اعتماد الوسط الأول (MT + 2.5 ملغم/ لتر NAA + 0.25 ملغم/ لتر 2,4-D + 0.5 ملغم/ لتر k) كأفضل وسط لاستحثاث تكوين الكالس من قطع السيقان . إن هذا الوسط مقارب للوسط الذي استعمله (12) والمتكون من وسط معدل لـ MS (4.5 % سكروز) + 2.5 ملغم/ لتر NAA + 0.25 ملغم/ لتر 2,4-D + 0.25 ملغم/ لتر K . كما تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصلت إليه (13) من تدهور كالس النارنج

بعد نقله إلى تراكيز مختلفة من NAA و BA ، وتتفق أيضاً مع (14) بتدهور كالس البرتقال بعد إعادة زراعته على الوسط السابق نفسه.

2- تأثير النوع والجزء النباتي في استحثاث تكوين الكالس

تم اختبار تأثير وسط MT + (ملغم / لتر) NAA 2.5 و 2,4-D 0.25 و K 0.5 في استحثاث تكوين الكالس من الأوراق والفلقات والسويقة الجنينية العليا فضلاً عن قطع السيقان (جدول 2) وأظهرت النتائج وجود فروقات معنوية بين الأصول في تأثيرها في تكوين الكالس ، إذ تراجع النارنج معنوياً في قابليته على تكوين الكالس (3.150) مقارنة بالبرتقال والسوينكل سترومیلو . كما أظهرت النتائج وجود فروقات معنوية بين الأجزاء النباتية في قابليتها على تكوين الكالس ، وبمقارنة معدلات مقياس تكوين الكالس يتضح أن السويقة الجنينية العليا هي الأحسن (4.167) والتي اختلفت معنوياً عن الأجزاء النباتية الأخرى . ولم تلاحظ أية فروقات معنوية للتداخل بين عاملي نوع الأصل والجزء النباتي .

في هذه الدراسة أظهرت الفلقات أقل مقدرة على تكوين الكالس (2.717) على العكس من السويقة الجنينية العليا وكلاهما اختلف معنوياً عن قطع السيقان والأوراق (جدول 2) بينما في دراسات أخرى وجد أن أعلى نسبة للكالس تكونت في الفلقات والسويقة الجنينية العليا (15و16). ووجد (17) أن قطع السيقان كونت أعلى نسبة من الكالس في الليمون المخرفش (*C. jambhiri*) في حين كانت الفلقات في اللالنكي كليوباترا هي الأفضل . وإن سبب هذه الاختلافات في النتائج يعود إلى تأثير نوع الأصل والصنف والبيئة ومكونات الوسط الغذائي وتمثل اللوحة (1) استحثاث نشوء الكالس في الزراعة الأولية .

لوحة (1) : استحثاث الكالس من أجزاء البادرات :

الأعلى : السويقة العليا في السوينكل سترومبلو

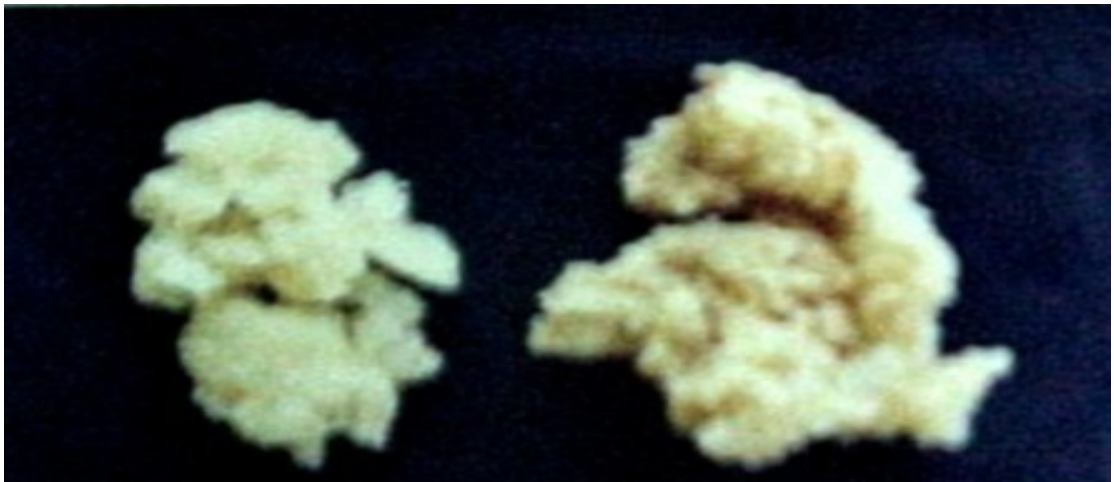
الأسفل : السلامية في البرتقال بعد ستة أسابيع من الزراعة على وسط MT + 2.5 ملغم/ لتر NAA + 0.25 ملغم/ لتر 2,4-D + 0.5 ملغم/ لتر K

3- إدامة وحفظ الكالس

إن الكالس الناشئ من الأجزاء النباتية المشار إليها في الفقرة المذكورة آنفاً تعاد زراعته ، بعد إزالة ما تبقى من الجزء النباتي ، على الوسط السابق نفسه لكن بتقليل تركيز NAA إلى 0.5 ملغم/ لتر . يتضح من خلال النتائج في جدول (3) أن كالس النارنج لم يتبقَ منه شيء بعد النقلة الثالثة ولجميع الأجزاء النباتية المستعملة. بينما في البرتقال كان نمو كالس السويقة العليا وقطع السيقان (السلامية) جيداً ويبدو التحسن واضحاً بعد النقلة الثالثة ، وانتهى كالس الفلقة بعد النقلة الثالثة ، وانخفضت نسبة بقاء كالس الورقة بعد النقلة الأولى ولكنها ارتفعت بعد النقلة الثانية والثالثة بكمية قليلة جداً من الكالس (مكرر واحد) . في السوينكل سترومبلو أيضاً ، لوحظ التحسن في نمو كالس السويقة وقطع السيقان بعكس كالس الفلقة الذي تدهور بعد النقلة الأولى وكالس الورقة بعد النقلة الثانية .

استمر العمل على تنمية كالس قطع السيقان والسويقة والورقة في البرتقال ، وكالس السويقة وقطع السيقان في السوينكل سترومبلو على الوسط نفسه كل 6 أسابيع من دون حدوث تدهور يذكر في جميع خطوط الكالس . واستمر العمل على تنمية الكالس الناشئ من السويقة في السوينكل سترومبلو والبرتقال لمدة سنة تقريباً كل ستة أسابيع على الوسط نفسه .

وفضلاً عما ذكر ، هناك بعض الملاحظات التي وردت خلال هذه الدراسة ، إذ تبين أن الكالس المستحث من أجزاء البادرات لا يتكيف لمنظمات النمو وهذا يتفق مع ما وجده (18) . وان إطالة مدة بقاء الكالس داخل الوسط أكثر من ستة أسابيع تؤدي إلى تدهور وتلون الكالس (لوحة 2). كما أن تجهيز الوسط بتركيز 10% (حجم / حجم) عصير البرتقال سبب موت الكالس . وعند مقارنة نتائج هذه الدراسة مع دراسات أخرى نجد أن (9) تمكنوا من تنمية الكالس الناشئ من سلاميات ألسندي لمدة سنتين على وسط MS المحور والمجهز على 0.5 ملغم/ لتر NAA و 0.25 ملغم/ لتر لكل من الـ 2,4-D والـ K . كما وجد Duran-Vila وآخرون (14) أن كمية الكالس تتقلص بعد كل إعادة زراعة subculture وينتهي الكالس بعد ثلاث نقلات ، ولكن أمكن حفظ بعض الخطوط من الكالس لمدة أكثر من سنتين بعد تجهيز الوسط بعصير البرتقال تركيز 10% (حجم / حجم) .



لوحة (2) تلون الكالس الأبيض إلى اللون البني بعد أكثر من ستة أسابيع من الزراعة

4- استحثاث نشوء الأجنة اللاجنسية من الكالس

اتضح من خلال نتائج التجربة (جدول 4) ان تراكيز الـ BA 1 و 2 ملغم/ لتر ، في وسط استحثاث نشوء الأجنة ، غير مؤثرة وان التراكيز المؤثرة هي 0.25 و 0.5 ملغم/ لتر على التوالي . ومن البيانات يتضح أيضاً ان البرتقال أفضل من السوينكل سترومبلو بالاستناد إلى مقياس النسبة المئوية لتكوين الأجنة .

تمثل اللوحة (3) مراحل نشوء الأجنة من الكالس للسوينكل سترومبلو في وسط MT + 0.25 ملغم/ لتر BA + 0.1 ملغم/ لتر NAA + 500 ملغم/ لتر ME . في نهاية الشهر الأول من الزراعة يتحول لون الكالس من الأبيض إلى الأخضر وتتغير النسجة من الناعمة إلى نسجة حبيبية ، ويزداد حجم الكالس إلىأربعة أضعاف تقريباً . بعد الشهر الثاني تتكون نتوءات كروية الشكل خضراء اللون على السطح الخارجي من الكالس ، مع استمرار نمو الكالس وزيادة حجمه . قبل نهاية الشهر الثالث ، يزداد حجم النتوءات لتكون أجنة كروية وبيضوية . هذه الأجنة أمكن إنباتها على وسط MT + 1.5 ملغم/ لتر GA_3 وبعد شهرين من الزراعة أنتجت أفرعاً من دون جذور (لوحة 3) . نقلت الأفرع إلى وسط بنصف تركيز املاح MS (3 % سكروز) مضافا اليه 0.5 ملغم/ لتر NAA + 1.0 ملغم/ لتر IBA لتشجيع التجذير (8).

جدول (4) تأثير نوع الوسط ومنظمات النمو في النسبة المئوية للزروعات التي تكونت فيها الأجنة اللاجنسية في أصلين من الحمضيات

نوع منظمات النمو والتراكيز (ملغم / لتر)	النــوع	
	البرتقال المحلي	السوينكل سترومبلو
	% للأجنة اللاجنسية	% للأجنة اللاجنسية
(500)ME + (0.1) NAA +(0.25) BA	80	50
(500)ME + (0.1) NAA +(0.5) BA	60	50
(500)ME + (0.1) NAA +(1.0) BA	30	0
(500)ME + (0.1) NAA +(2.0) BA	0	0

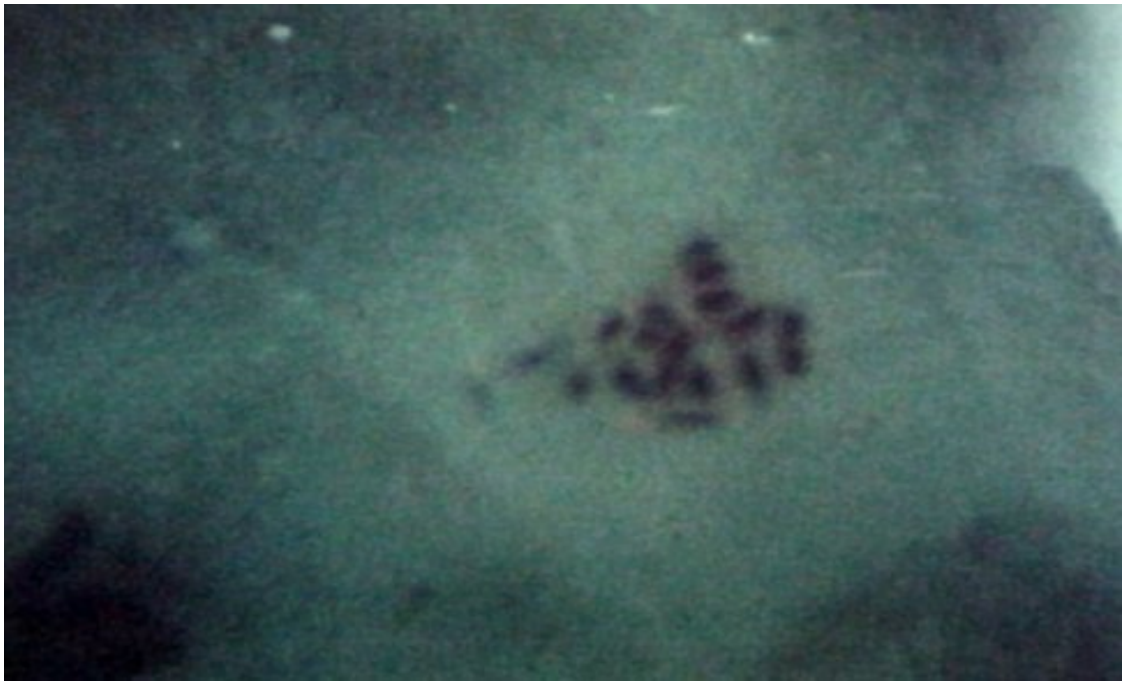
لاحظ العديد من الباحثين أهمية التوازن بين الـ BA والـ NAA في نشوء وتطور الأجنة اللاجنسية وكذلك الأعضاء من الكالس ، وقد يستعمل الـ ME أيضاً بتراكيز تتراوح بين 500 و 1500 ملغم/ لتر . لقد وجد (12) أفضل وسط لتكوين الأفرع من الكالس هو MS المحور المجهز بـ (ملغم/ لتر) 0.25 BA +

NAA 0.1 + ME 500 . في حين حصل (18) على أجنة من الكالس باستعمال تراكيز 1000 – 1500 ملغم/ لتر ME ، وحصل على أعلى نسبة من الأجنة والأفرع من الكالس باستعمال 5 ملغم / لتر BA + 1 ملغم/ لتر NAA ، وحصل إنبات للأجنة باستعمال 1 ملغم/ لتر GA_3 أو NAA . بينما وجد (17) أن نقل الكالس إلى وسط MS بنصف القوة وبوجود 5 ملغم/ لتر BA فقط أدى إلى تحفيز تكوين الأفرع من الكالس .

لوحة (3) مراحل نشوء ونمو الأجنة اللاجنسية من الكالس

5- دراسة العدد الكروموسومي

استناداً إلى الفحوصات المجهرية التي أجريت على قمم الجذور وبأخذ 5 مناطق مختلفة من كل شريحة ، لم يتضح حصول تضاعف في العدد الكروموسومي ، وهذا يعني وجود تطابق في نوع النباتات الناتجة من الزراعة النسيجية مع النوع الذي اشتقت منه على ضوء الدراسة الخلوية التي أجريت وذلك لكون أن جميع النباتات الناتجة كانت ثنائية العدد الكروموسومي ($2n = 2\times 18 =$) . وهذا يتفق مع (20 و 21).



لوحة (4) : الطور الاستوائي Metaphase في الانقسام الخيطي Mitosis لقمم جذور البرتقال الناتج من زراعة الأنسجة (2n = 2 x = 18)

المصادر

1- Kobayashi, S., Ohgawara, T., Saito, W. , Nakamura, Y. and Omura, M. 1997. Production of triploid somatic hybrids in citrus. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 66: 453-458.

2- Hidaka , T. 1995. A shuttle callus system. Application of tissue culture in citrus. Acta Horticulture, 392. pp. 39-48.

3- Ollitrault, P. 1992. Somatic embryo - grafting : a promising technique for *Citrus* breeding and propagation. Numero special Agrumes, p. 213-218.

4- Hidaka, T., and Omura, M. 1993. Transformation of citrus protoplasts by electroporation. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 62 : 371-376.

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

6- Murashige, T., and Tucker, D.P.H. 1969. Growth factor requirement of citrus tissue culture . Proc. First Intl. Citrus Symp. 3: 1155-1161.

7- Carputo, D., Cardi, T., Chiario, T., Ferraiolo, G. and Frusciant, L. 1995. Tissue culture response in various wild and cultivated *Solanum* germplasm accessions for exploitation in potato breeding. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 41 : 151-158.

8- الحافظ، عماد احمد محمد. 2002. اكثار و اخلاف اصول من الحمضيات خارج الجسم الحي. اطروحة دكتوراه/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد.

9- Oiyama, I. 1981. A technique for chromosome observation in root tip cells of *Citrus* . Bull. Fruit Tree Res. Stn. 3: 1-7.

10- Dyer, A. F. 1963. The use of lacto-propionic orcein in rapid squash methods for chromosome preparations . Stain Technol.
38 : 85-90

11- الراوي، خاشع محمود ومحمد خلف الله عبد العزيز. 1980. تصميم وتحليل التجارب الزراعية، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي– جامعة بغداد .

12- Chaturvedi, H.C., and Mitra, G.C. 1974. Clonal propagation of *Citrus* from somatic callus cultures. HortScience, 9: 118-120.

13- هاني، مي عبد الكريم. 1988. توالد النباتات من براعم وسلاميات واجنة الحمضيات المزروعة خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير . كلية الزراعة . جامعة بغداد.

14- Duran-Vila , N., Ortega, V. and Navarro, L. 1989. Morphogenesis and tissue cultures of three citrus species. Plant Cell Tissue Organ Cult. 16 : 123-133.

15- Gill, M.I.S., Singh, Z., Dhillon, B.S. and Gosal, S.S. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration on calluses drived from seedling

explants of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour. x *Citrus deliciosa* Tanora). J. Hortic. Sci., 69 (2) : 231-236.

16- Gill, M.I.S., Singh, Z., Dhillon , B.S. and Gosal, S.S. 1995. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). Scientia Hort. 63 : 167-174.

17- Grewal, H.S., Dhatt, A.S. and Gosal, S.S. 1994. Plant regeneration from callus culture in *Citrus* . Plant Tissue Cult. 4 (1) : 9-16.

18- Beloualy, N. 1991. Plant regeneration from callus culture of three *Citrus* rootstocks. Plant Cell, Tissue and Organ Culture.24:29-34

19- Chaturvedi, H.C. , Chowdhury, A. R. and Mitra, C.C. 1974. Morphogenesis in stem-callus tissue of *Citrus grandis* in long-term cultures . A biochemical analysis . Curr. Sci. 43 (5) : 139 – 142 . In : Hani (1988**).**

20- Kobayashi, S. 1987. Uniformity of plants regeneration from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. Theor Appl. Genet., 74 : 10-14 .

21- Hidaka, T., and Omura, M. 1989. Control of embryogenesis in *Citrus* cell culture : Regeneration from protoplasts and attempts to callus bank. Bull. Fruit Tree Res. Stn. B. 16 : 1-17.

جدول (1) تأثير الوسط الغذائي ومنظمات النمو و الأصل والتداخل بينهما في استحثاث الكالس من قطع السيقان (السلاميات) بعد ستة أسابيع من الزراعة

رقم التوليفة	نوع الوسط ومنظمات النمو (ملغم/لتر)	نوع الأصل									المعدل
		النارنج المحلي (أ)			البرتقال المحلي			السوينكل ستروميلو			
		استحثاث الكالس (أ)	مظهر ولون الكالس	إعادة الزراعة (ب)	استحثاث الكالس (أ)	مظهر ولون الكالس	إعادة الزراعة (ب)	استحثاث الكالس (أ)	مظهر ولون الكالس	إعادة الزراعة (ب)	
1	0.25 + NAA 2.5 + MT K 0.5 + 2,4-D	3.05	شبه متماسك أبيض	تدهور تلون بني	4.05	شبه متماسك أبيض	نمو بطئ جداً	3.85	شبه متماسك أبيض	نمو بطئ جداً	a 3.65
2	K 0.5 + NAA 5 + MT	2.50	متماسك أبيض مصفر	تدهور تلون بني	3.25	متماسك أبيض مصفر	تدهور تلون بني	3.25	متماسك أصفر مخضر	تدهور تلون بني	a3.00
3	0.5 + NAA 10 + MT K	2.80	متماسك أبيض مصفر	تدهور تلون بني	3.85	متماسك أبيض مصفر	تدهور تلون بني	3.35	متماسك أصفر مخضر	تدهور تلون بني	a3.33
4	0.1 + BA 10 + MT NAA	2.90	متماسك أخضر	تدهور تلون بني	3.60	متماسك أخضر	تدهور تلون بني	3.30	متماسك أخضر	تدهور تلون بني	a3.26
	المعـدل	b2.81			a3.68			a3.43			

LSD 5% لمقياس استحثاث الكالس في نوع الأصل = 0.401

(أ) المقياس من 1 إلى 5 مفصل في المواد وطرائق العمل.

(ب) إعادة الزراعة subculture على نفس الوسط السابق .

LSD غير معنوي للتداخل بين الأصل والوسط .

جدول 2 : تأثير نوع الأصل والجزء النباتي والتداخل بينهما في استحثاث الكالس بعد ستة أسابيع من الزراعة في وسط MT + 2.5 ملغم/ لتر NAA + 0.25 ملغم/ لتر 2,4-D + 0.5 ملغم/ لتر K *

نـــوع الأصل	الجزء النباتي				المعدل
	السلامية	الورقة	الفلقة	السويقة	
النارنج المحلي	3.200	3.050	2.550	3.800	b3.150
البرتقال المحلي	4.050	4.100	2.900	4.300	a3.838
السوينكل ستروميلو	3.950	3.700	2.700	4.400	a3.688
المعدل	b3.733	b3.617	c2.717	a4.167	

LSD 5% لمقياس استحثاث الكالس في نوع الأصل = 0.328

LDS 5% لمقياس استحثاث الكالس في الجزء النباتي = 0.379

LSD غير معنوي للتداخل بين الاصل والجزء النباتي

*** أخذت قطع السلاميات والأوراق والفلقات من بادرات بعمر 6 أسابيع . أما السويقة العليا فقد أخذت من بادرات بعمر 3 أسابيع . 10 مكررات في 20 سلامية ، ورقة ، فلقة ، وسويقة لكل معاملة .والمقياس من 1 إلى 5 (مفصل في المواد وطرائق العمل) .**

جدول (3) : النسبة المئوية لبقاء الكالس survival بعد 6 أسابيع من كل نقلة subculture إلى وسط MT + 0.5 ملغم/ لتر NAA + 0.25 ملغم/ لتر 2,4-D + 0.5 ملغم/ لتر K

نـوع الأصل	النسبـة المئويـة للبقـاء (عدد المكررات المنسوبة إليها النسبة المئويـة)											
	النقلـة الأولى				النقلـة لثانية				النقلـة الثالثة			
	السلامية	الورقة	الفلقة	السويقة	السلامية	الورقة	الفلقة	السويقة	السلامية	الورقة	الفلقة	السويقة
النارنج المحلي	40.00 (10)	0.00 (10)	0.00 (10)	50.00 (10)	20.00 (4)	0.00 (0)	0.00 (0)	42.85 (7)	0.00 (1)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (3)
البرتقال المحلي	80.00 (10)	20 (10)	30.00 (10)	100.00 (10)	80.00 (10)	50.00 (2)	0.00 (3)	100.00 (10)	100.00 (10)	100.00 (1)	0.00 (0)	100.00 (10)
السوينكل ستروميلو	60.00 (10)	0.00 (10)	10 (10)	90.00 (10)	75.00 (8)	0.00 (0)	0.00 (1)	90.00 (10)	100.00 (10)	0.00 (0)	0.00 (0)	100.00 (10)