Journal homepage
www.ajas.uoanbar.edu.iq
Anbar Journal of Agricultural Sciences
(University of Anbar – Agriculture College)

تأثير 2،4-D و Kinteing في استحثاث الكالس من الورقة الفلقية لنبات زهرة الشمس .Helianthus annuus L

صفا حامد خلف الخاطر **شامل اسماعيل نعمة***

جامعة الأنبار – كلية التربية للعلوم الصرفة **جامعة الأنبار – مركز دراسات الصحراء**

***المراسلة الى:** شامل إسماعيل نعمة، قسم مكافحة التصحر، مركز دراسات الصحراء، جامعة الانبار، الرمادي، العراق.

البريد الالكتروني: ds.dr.shamil@uoanbar.edu.iq

Article info

Received: 2022-09-16
Accepted: 2022-10-18
Published: 2023-06-30

DOI-Crossref:
10.32649/ajas.2023.179728

Cite as:
Al-Khater, S. H. Kh., and S. I. Neamah. (2023). Effect of growth regulators 2,4-d and kintein in the inducation of callus from helianthus annuus l. cotyledon. Anbar Journal of Agricultural Sciences, 21(1): 174-187.

©Authors, 2023, College of Agriculture, University of Anbar. This is an open-access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

الخلاصة

نفذت الدراسة الحالية في مختبر زراعة الانسجة النباتية، مركز دراسات الصحراء/ جامعة الأنبار، بهدف تحديد إمكانية استحثاث الكالس من الورقة الفلقية لنبات زهرة الشمس .*Helianthus annuus* L، من خلال استعمال تراكيز مختلفة من منظم النمو 2,4-D (1.0 و2.0 و3.0 ملغم لتر$^{-1}$) مع تراكيز آخرى من منظم النمو Kintein (0 و0.25 و0.5 و0.75 ملغم لتر$^{-1}$). للحصول على البادرات المعقمة إستعمل محلول NaOCl لتعقيم البذور بأربعة تراكيز هي 0 و2 و4 و6% ولثلاث مدد زمنية هي 5 و10 و15 دقيقة للحصول على البادرات المعقمة. بينت النتائج تفوق التركيز 6.0% من NaOCl عند معامله البذور بهِ لمدة 10 دقائق بتحقيقهِ لأعلى نسبة مئوية للقضاء على التلوث واعلى نسبة مئوية للحصول على البادرات المعقمة بلغت 100% و90% على التوالي. أما لاستحثاث الكالس فقد تم زرعة الجزء النباتي المُستاصل من البادرات المُعقمة في وسط MS مزود بمنظمي النمو قيد الدراسة لمدة 35 يوم. بينت النتائج ان التوليفة 1.0×0.25 ملغم لتر$^{-1}$ حققت أعلى استجابة لتكوين الكالس بلغ 100% وأدنى مدة زمنية لبدء استحثاث الكالس بلغ 5.29 يوم. بينما حققت التوليفة 2.0×0.25 ملغم لتر$^{-1}$ أدنى مدة لاكتمال تكوين الكالس بلغ 25.14 يوم. في حين حققت التوليفة 2.0×0.75 ملغم لتر$^{-1}$ أعلى معدل للوزنين الطري والجاف بلغ 767.0 و53.0 ملغم، بالتتابع.

كلمات مفتاحية: زهرة الشمس، زراعة انسجة نباتية، منظمات النمو النباتية، مزارع الكالس.

EFFECT OF GROWTH REGULATORS 2,4-D AND KINTEIN IN THE INDUCATION OF CALLUS FROM HELIANTHUS ANNUUS L. COTYLEDON

S. H. Kh. Al-Khater[1] S. I. Neamah*[2]
[1]University of Anbar- College of Education for Pure Sciences
[2]University of Anbar- Center of Desert Studies

***Correspondence to:** Shamil Ismail Neamah, Combat Desertification Department, Center of Desert Studies, University of Anbar, Ramadi, Iraq.
Email: ds.dr.shamil@uoanbar.edu.iq

Abstract

The current study was carried out in plant tissue culture lab., in center of desert studies/ University of Anbar, to determine the possibility of inducing callus from the cotyledon of *Helianthus annuus* L. by using different concentrations of growth regulator 2,4-D (1.0, 2.0 and 3.0 mg L^{-1}) with other concentrations of growth regulator Kintein (0 and 0.25, 0.5 and 0.75 mg L^{-1}). NaOCl solution was used to sterilize the seeds at four concentrations of 0, 2, 4 and 6% and for three periods of 5, 10 and 15 min to obtain sterile seedlings. The results showed that the concentration of 6.0% of NaOCl exceeded when treating the seeds for 10 min by achieving the highest percentage for eliminating contamination and the highest mean for obtaining sterile seedlings, which reached 100% and 90%, respectively. As for callus induction, the excised explant of sterile seedlings was cultured in MS media supplied with the growth regulators in the study for 35 days. The results showed that the combination of 0.25×1.0 mg L^{-1} achieved the highest response to callus formation, reached 100%, and the minimum time for the start of callus induction was 5.29 days. In comparison, the combination of 0.25×2.0 mg L^{-1} showed the minimum period for the completion of callus formation was 25.14 days. In contrast, the combination of 0.75×2.0 mg L^{-1} showed the highest fresh and dry weight values of 767.0 and 53.0 mg, respectively.

Keywords: Sunflower, Plant tissue culture, Plant growth regulaters, Callus culture.

المقدمة

تعد المحاصيل الحقلية ذات اهمية كبيرة في الانتاج الزراعي، واذ تزرع بمساحات شاسعة لما لها من اهمية دعم الامن الغذائي والحفاظ على استقرار البلدان. في الوقت الحالي تعاني اغلب بلدان العالم من نقص في الغذاء ناجم عن التغيرات المناخية وما نتج عنها من اثار سلبية في الإنتاج الزراعي، فضلا عن الحروب التي استجدت في الأونة الأخيرة وتداعياتها التي انعكست على معظم بلدان العالم ومنها العراق. صنفت منظمة الأغذية والزراعة العراق من ضمن بلدان العجز الغذائي والذي سيعاني خلال الفترة المقبلة من زيادة في الفجوة الغذائية (6).

يُعد .*Helianthus annuus* L من المحاصيل الاستراتيجية المهمة والمعروفة بفوائدها في مجالي التغذية والصحة لجسم الانسان، إذ تمتاز بمحتواه العالي من الاحماض الدهنية غير المشبعة والفيتامينات والمعادن والألياف الغذائية

فضلاً على احتوائه على بعض المركبات الفعالة مثل Flavonoids و Phytic acid و Tannins و Alkaloids و Phytic acid و Essential oil و Phenols استمدت من خصائصها العلاجية مثل مضاد الأكسدة ومضاد للالتهابات ومضاد للبكتريا ومضاد للفايروسات ومضاد للنقرس، لذا استخدم بشكل واسع في الطب الصيني التقليدي (11).

تُعد زراعة الانسجة النباتية من أهم الأساليب العلمية الحديثة المُتخصصة في إيجاد الطرق البديلة للحد من المشاكل التي يعاني منها القطاع الزراعي من خلال العديد من التطبيقات التي تتيح إنتاج نباتات خالية من المسببات المرضية وإنتاج نباتات بمواصفات إنتاجية عالية وتقنية البذور الصناعية والأكثار السلالي السريع، فضلاً عن استخلاص المواد المهمة صناعياً أو طبياً من مصادرها الطبيعية وإمكانية إنتاج البعض منها تجارياً ويكون ذلك من خلال الحصول على نسيج الكالس من الجزء النباتي المُستعمل في عملية الزراعة النسيجية بالإضافة الى الدور الأساس الذي يلعبهُ نسيج الكالس في التجارب العملية المُتعلقة في تحمل الإجهادات المُختلفة التي يتعرض لها النبات بعيداً عن التجارب الحقلية التقليدية وما تعكسهُ من نتائج غير دقيقة (19).

يعتبر نسيج الكالس الركن الاساس في زراعة الخلايا والانسجة والاعضاء النباتية لما لهُ من أهمية في اجراء التجارب البايولوجية على النبات من ومنهُ تنطلق العلميات المتمثلة بالإكثار غير المباشر الدقيق للنبات أو زراعة المعلقات الخلوية أو إجراء التجارب البايولوجية التي تعكس مدة تأثره بالعوامل الخارجية. يعتمد نشوء الكالس على نوع الجزء النباتي ومصدره وظروف التحضين ومكونات الوسط الغذائي لاسيما منظمات النمو النباتية المتمثلة بالأوكسينات والسايتوكاينينات (9).

نظراً للأهمية التي يتمتع بها نسيج الكالس في التجارب العلمية الخاصة بالبرامج المنبثقة من الزراعة النسيجية، هدفت الدراسة الحالية إلى تحديد أفضل توليفة من منظمي النمو 2,4-D و Kintein للحصول على أكبر كتلة نسيجية يمكن الاعتماد عليها في التجارب النسيجية اللاحقة.

المواد وطرائق العمل

نُفذت تجربة مختبرية في مختبر زراعة الأنسجة النباتية العائد لمركز دراسات الصحراء/ جامعة الأنبار، استعمل فيها الصنف Sakha-53 وهو من الأصناف الزيتية المُتميزة. تضمن العمل المراحل التالية:

تحضير الوسط الغذائي: تم تحضير الوسط الغذائي نوع MS القياسي الموصوف من قبل الباحثان Murashige and Shoog (13) والمُنتج من قبل شركة Caisson الخالي من منظمات النمو النباتية، إذ جرت عملية تحضير الوسط الغذائي بإضافة 4.54 غم/ لتر ماء مقطر بعدها تم إضافة السكروز بمقدار 30 غم. بعدها تم ضبط الأس الهيدروجيني (pH) على درجة 5.7 ±0.1 ثم جرت اضافة مادة Agar بمقدار 7.0 غم لتر$^{-1}$ وترك للوصول الى درجة الغليان التام تحت جهاز Hot plate stirrer، بعد وصولهِ للغليان جرى توزيع الوسط المُعد في Vials وبمقدار 10 مل قنينة$^{-1}$ وتم تغطية القناني بواسطة اغطيتها الخاصة واستعملت 10 مكررات لكل معاملة، ثم جرى تعقيم القناني الزجاجية ومحتواها من الوسط الغذائي في جهاز المؤصدة.

تعقيم ادوات العمل: تم تعقيم مستلزمات العمل الزجاجية والمعدنية، فضلاً عن تعقيم الماء المقطر والوسط الغذائي الذي تم تحضيرهُ في جهاز المؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121°م وضغط 1.04 كغم سم^{2} لمدة 15 دقيقة. كما جرى تعقيم كابينة انسياب الهواء الطبقي التي تجرى فيها عملية الزراعة بالكحول الأثيلي (Ethanol) بتركيز 70%.

تعقيم البذور: اجُريت عملية تعقيم البذور بغسلها لعدة مرات ثم تُركِت تحت الماء الجاري مضافا لها قطرات من الصابون السائل لمدة 30 دقيقة، ثم جرى تعقيمها بالكحول الاثيلي 70% لمدة دقيقة واحدة. بعدها أُدخلت البذور داخل كابينة الزراعة وجرت عملية التعقيم باستعمال NaOCl بالتراكيز (0 و2.0 و4.0 و6.0%) مع إضافة قطرتين من المادة الناشرة Tween مع التحريك المستمر ولمدد مختلفة اشتملت على (5 و10 و15 دقيقة)، بعدها جرى غسل البذور بالماء المقطر المعقم لخمسة مرات مُتتالية للتخلص من اثار المادة المُعقمة, بعد اكمال عملية التعقيم تم زراعة البذور في انابيب الزراعة الحاوية على الوسط الغذائي وبواقع بذرة واحدة لكل Vial وضعت القناني المزروعة داخل غرفة النمو تحت درجة حرارة 25 °م ±1 وشدة اضاءة 1000 لوكس ولمدة 16 ساعة ضوء و8 ساعات ظلام.

إستحثاث الكالس: بعد انبات البذور والحصول على البادرات، أُخُذت الورقة الفلقية وقطعت الى اجزاء بطول 1سم باستخدام الشفرات الجراحية المعقمة مع احداث خدوش في الجزء النباتي المُستعمل للزراعة وُزرعت كل قطعة في قنينة زجاجية تحتوي على وسط MS أُعد وفقاً للطريقة المتبعة في الفقرة السابقة مع مراعاة أن تتم قياس الرقم الهيدروجيني (pH) بعد إضافة منظمات النمو النباتية والمتمثلة بِ 2,4-D بالتركيز 1.0 و2.0 و3.0 ملغم لتر$^{-1}$ مع الكاينتين بالتركيز 0 و0.25 و0.50 و0.75 و1.0 ملغم لتر$^{-1}$. تُركت الزروعات في غرفة النمو على درجة حرارة 25°م± 1، بذات الظروف الفيزيائية المُشار إليها آنفاً.

الصفات المدروسة: النسبة المئوية للقضاء على تلوث البذور: دونت بيانات التجربة بالاعتماد على تركيز المادة المُعقمة ومدة مُعاملتها بهدف الحصول على بذور مُعقمة سطحياً من خلال ملاحظة حدوث التلوث من عدمهِ بالعين المجردة ولمدة 10 ايام من الزراعة، وكما موضح في الشكل 1/أ.

النسبة المئوية للحصول على بادرات مُعقمة: سُجلت نتائج الحصول على بادرات مُعقمة وسليمة بهدف الاستفادة من أجزاءها النباتية لإستحثاث الكالس منها. جمعت البيانات بعد 10 ايام من الزراعة على وسط MS. يوضح الشكل 1/ب نموذج لبادرات مُعقمة بعمر 6 أيام كانت مصدراً للجزء النباتي المُستعمل.

النسبة المئوية لاستجابة تكوين الكالس: تم احتساب نسبة استجابة الاجزاء النباتية المزروعة لتكوين الكالس وفقا للمعادلة الاتية:

$$\text{نسبة الأستجابة (\%)} = \frac{\text{عدد الأجزاء التي كونت الكالس}}{\text{العدد الكلي للأجزاء المزروعة}} \times 100$$

عدد الايام اللازمة لبدء أستحثاث الكالس: تم تسجيل بيانات بدء الاستحثاث ولكل تركيز من تراكيز منظمات النمو من خلال ظهور اللون الابيض على الجزء النباتي المزروع في الوسط الغذائي (شكل 1/ج).

عدد ايام اللازمة لاكتمال تكوين الكالس: تم تسجيل البيانات ولكل تركيز من تراكيز منظمات النمو المُستخدمة بعد اكتمال تكوين الكالس بصورة نهائية (شكل 1/د).

حساب الوزن الطري والجاف لنسيج الكالس (ملغم): تم حساب الوزن الطري بواسطة ميزان حساس بعد التخلص من بقايا الوسط الغذائي الملتصقه به، ثم جفف الكالس في الفرن الكهربائي (Oven) على درجة حرارة 60°م حتى ثبات الوزن ليتم تسجيل الوزن الجاف للكالس في ذات الميزان الحساس.

التصميم التجريبي والتحليل الاحصائي: صممت التجارب وفق التصميم العشوائي الكامل Complete (Randomized Design) كتجارب عاملية وبواقع 10 مكررات لكل معاملة وحللت البيانات المستحصل عليها وبحسب اعداد المكررات المشار اليها في كل تجربة باستعمال التحليل الاحصائي Genestat الأصدار 12 والموضوع بالحاسبة الالكترونية.

شكل 1 مراحل الانبات وتكوين الكالس (أ) أنبات البذور المُعقمة لمحصول *H. annuus* L. بعد 10 أيام من الزراعة على وسط MS النسبة المئوية للحصول على بادرات مُعقمة (ب) البادرات المُعقمة لمحصول *H. annuus* L. بعد 6 أيام من الزراعة على وسط MS (ج) بدء إستحثاث الورقة الفلقية لتكوين نسيج الكالس (د) إكتمال تكوين الكالس المُستحث من الورقة الفلقية.

النتائج والمناقشة

تأثير تركيز NaOCl ومدة المُعاملة في النسبة المئوية للقضاء على تلوث البذور: تشير النتائج في الجدول 1 الى وجود تأثير معنوي لكل من تركيز المعاملة بمحلول NaOCl والتداخل بين تركيز مُعاملة NaOCl والمدة الزمنية للتعقيم في القضاء على تلوث بذور محصول زهرة الشمس، إذ اظهرت النتائج تفوق التركيز 6.0% من محلول NaOCl بإعطائه أعلى نسبة مئوية للقضاء على تلوث البذور بلغت كل منهما 70.0% وبالرغم من عدم اختلافهُ معنويا عن التركيز 2.0 و4.0% إلا ان جميعهم قد اختلفوا معنوياً عن المعاملة المقارنة الذي سجل أقل معدل للصفة بلغت 3.3%.

كما يشير الجدول ايضا الى عدم وجود فرقاً معنوي في تأثير مُدة المعاملة بمحلول NaOCl للقضاء على تلوث البذور (جدول 1).

أما التداخل الثنائي بين معاملتي الدراسة، فقد حققت التوليفة بين المُعاملة بالتركيز 6.0% لمدة 10 دقائق أعلى معدل معنوي للصفة بلغت 100%، في حين ظهر التلوث بجميع العينات عند عدم المُعاملة بمحلول NaOCl لمدة 10 او 15 دقيقة (جدول 1).

يعود التأثير المُعقم لِـ NaOCl الى Hypochlorin acid والذي يعد مادة مؤكسدة قوية، إذ يتكون هذا الحامض نتيجة ذوبان الكلور بالماء، وتؤكد هذه النتيجة مدى فعالية محلول NaOCl في القضاء على مُسببات التلوث والتي من شأنها ان تؤثر على الجزء النباتي وتسبب فشل الزراعة في المختبر (1). تتفق هذه النتائج مع توصل اليهِ (14) للتعقيم السطحي لبذور نبات *Fagopyrum esculentum* M. و(12) للتعقيم السطحي لبذور محصول *H. annuus* L. و(4) للتعقيم السطحي لبذور *Physalis peruviana*.

جدول 1 تأثير تركيز NaOCl (%) ومدة التعقيم (دقيقة) والتداخل بينهما في النسبة المئوية للقضاء على تلوث بذور محصول *H. annuus* L. بعد 10 أيام من الزراعة في وسط MS.

مدة التعقيم (دقيقة)	تركيز NaOCl (%)				المتوسط
	0	2.0	4.0	6.0	
5.00	10	80	50	70	52.5
10.00	0	50	60	100	52.5
15.00	0	50	80	40	42.5
المتوسط	3.3	60.0	63.3	70.0	
LSD p≤ 0.05	15.67= NaOCl	NS=min.		27.14= min.× NaOCl	

*Table 1 shows that sunflower seeds were significantly affected by treatment with different concentrations of NaOCl and their interaction with the duration of sterilization in eliminating seed contamination. The treatment with 6.0% NaOCl was superior in eliminating seed contamination by 70.0%. In contrast, the control treatment recorded the lowest mean value of 3.3%. As for the interference, the combination of 6.0% × 10 minutes achieved the highest mean value of 100%, while contamination appeared in all samples not treated with NaOCl for 10 or 15 min.

تأثير تركيز NaOCl ومدة المُعاملة في النسبة المئوية للحصول على بادرات مُعقمة: تشير النتائج في الجدول 2 الى وجود تأثير معنوي لكل من تركيز المُعاملة بِـ NaOCl وتداخلها مع المدة الزمنية في النسبة المئوية للحصول على بادرات مُعقمة من محصول زهرة الشمس، إذ أظهرت النتائج تفوق التركيزين 4.0 و6.0% من

محلول NaOCl بأعطاء كل منهما اعلى نسبة مئوية للحصول على بادرات مُعقمة بلغت 63.3% ولم يختلفا معنويا مع التركيز 2.0%، إلا ان جميع التراكيز آنفة الذكر قد تفوقت معنوياً قياساً بما انتجتهُ معاملة المقارنة التي اعطت أقل معدل للصفة بلغت 3.33% (جدول 2).

ويشير الجدول ايضا الى عدم وجود اختلافاً معنوياً في تأثير مدة المُعاملة بمحلول NaOCl في نسبة انبات البذور (جدول 2).

إما التداخل بين تركيز ومدة المُعاملة بمحلول NaOCl فقد سجلت تأثيراً معنوياً في نسبة الحصول على البادرات المُعقمة، إذ سجل التركيز 6.0% مع المدة 10 دقائق أعلى نسبة للحصول على البادرات المُعقمة بلغ 90.0%، في حين أعطت مُعاملة المُقارنة عند المُعاملة بالماء المقطر لمدة 10 أو 15 دقيقة أدنى نسبة مئوية للحصول على البادرات المُعقمة بلغ 0% (جدول 2).

ان سبب زيادة نسبة أنبات البذور في التركيز 6.0% من NaOCl مقارنة ببقية المعاملات قد يعود الى حدوث عملية امتصاص عالي للماء بعملية التشرب Imbibition اذ يُعد الماء عاملاً هاماً في إنبات البذور لترطيب أغلفة البذرة مما يزيد من عملية دخول الأوكسجين، إضافه الى كونه عامل مساعد في العمليات الفسيولوجية في انسجة البذرة و تنشيط فعالية بعض الأنزيمات مثل a – amylase.

جدول 2 تأثير تركيز NaOCl (%) ومدة التعقيم (دقيقة) والتداخل بينهما في النسبة المئوية لأنبات البذور بعد 10 أيام من الزراعة في وسط MS.

مدة التعقيم (دقيقة)	تركيز NaOCl (%)				المتوسط
	0	2.0	4.0	6.0	
5.00	10	80	50	60	62.5
10.00	0	40	60	90	52.5
15.00	0	40	80	40	42.5
المتوسط	3.3	53.3	63.3	63.7	
LSD p≤ 0.05	15.84= NaOCl	NS=min.		27.43= min.× NaOCl	

*Table 2 shows a significant effect of the concentration of NaOCl treatment and its interaction with the treatment duration in obtaining sterile sunflower seedlings. The 4.0 and 6.0% concentrations of the NaOCl showed the highest mean value of 63.3%. As for the interference, the concentration was recorded at 6.0% for 10 min. The highest mean value of the trait was 90.0%, while the control treatment with a period of 10 or 15 min provided the lowest mean value of 0%.

تأثير 2,4-D و Kintein والتداخل بينهما في النسبة المئوية لاستجابة تكوين الكالس: تشير النتائج في الجدول 3 إلى وجود تأثير معنوي للمُعاملة بالتراكيز المُختلفة من منظم النمو Kintein والتداخل الثنائي مع 2,4-D في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس، إذ بينت النتائج عدم وجود تأثير معنوي لمنظم النمو 2,4-D في التأثير على النسبة المئوية لاستجابة تكوين الكالس.

كما بينت ذات النتائج تفوق التركيزين 0 و0.25 ملغم لتر$^{-1}$ من منظم النمو Kintein بتحقيقهما أعلى نسبة استجابة بلغت 100% لكل منهما، فبالرغم من عدم وصول ذلك التفوق حدود المعنوية قياساً بما حققتهُ المعاملتين 0.50 و0.75 ملغم لتر$^{-1}$، إلا أن جميع التراكيز الواردة في اعلاه قد اختلفت معنوياً مع التركيز العالي (1.0 ملغم لتر$^{-1}$) والذي أعطى أدنى معدل للاستجابة بلغ 80%.

أما التداخل بين عاملي الدراسة فقد كان لهُ تأثيراً معنوياً، إذ يوضح الجدول 3 بأن بعض التوليفات بين منظمي النمو قد استحثت نسبة استجابة بلغت 100%، منها تراكيز منظم النمو 2,4-D مع كل من معاملتي 0 أو 0.25 ملغم لتر$^{-1}$ من Kintein، بينما أدنى نسبة مئوية لاستحثاث الكالس من الورقة الفلقية بلغ 70% عند المُعاملة بالتركيز العالي لكل من منظمي النمو أو المُعاملة بالتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ لكل من 2,4-D وKintein.

إن مدى استجابة الجزء النباتي لإضافة منظمات النمو يعتمد بصورة أساسية على نوع المُنظم المُضاف وتركيزهِ والمستوى الهرموني الداخلي للجزء النباتي وصولاً لإعلى استجابة لتكوين نسيج الكالس واستمرار نموهِ، وتُعد الأوراق باعتبارها الجزء النباتي المُستحث منهُ الكالس في دراستنا، ذات قدرةً عاليةً لتكوين الكالس ومصدراً مهماً في تقانة زراعة الانسجة النباتية، إذ ينشأ الكالس عادةً بسبب الانقسامات المُتعددة للخلية النباتية، التي تنقسم بدورها محورياً ومحيطياً لتغير من قطبية الخلايا (فقدان التمايز) لقسم منها ويمكن ان تستمر بالانقسام والتوسع مكونةً نسيج الكالس. أما الانخفاض في مستوى الاستجابة لتكوين الكالس تحت التراكيز العالية لمنظمات النمو النباتية، يُعد مؤشراً للسمية التي عانى منها الجزء النباتي بسبب التركيز العالي لكلا منظمي النمو، إذ أن التركيز العالي للمُعاملة يمكن ان يؤدي إلى حالة عكسية مما يثبط المسارات الحيوية المسؤولة عن استحثاث الكالس من الجزء النباتي. وأشارت الكثير من الدراسات الى اهمية التوازن بين الأوكسينات والسايتوكينات للحفاظ على نمو وتطور الجزء النباتي، إذ تُعتبر السايتوكينيات اساس بدء عملية الانقسام الخلوي وذلك لأحتواها على الأدنين، كما ان لمنظم النمو 2,4-D دورا مهما في عملية الانقسام الخلوي عن طريق تصنيع البروتينات وبذلك يؤثر على فعالية الأنزيمات والتنفس والانقسام الخلوي (7 و8).

جدول 3 تأثير التراكيز المختلفة لمنظمي النمو 2,4-D وKintein والتداخل بينهما في النسبة المئوية لاستجابة تكوين الكالس بعد 5 أسابيع من النمو في وسط MS.

2,4-D ملغم لتر$^{-1}$	Kin. ملغم لتر$^{-1}$					المتوسط
	0	0.25	0.50	0.75	1.0	
1.0	100	100	100	100	70	94.0
2.0	100	100	90	80	100	94.0
3.0	100	100	90	100	70	92.0
المتوسط	100	100	93.3	93.3	80.0	
LSD p≤ 0.05	NS=2,4-D		10.90=Kin.		18.88=Kin.×2,4-D	

*Table 3 shows a significant difference between the treatment with Kintein and the interaction with 2,4-D in the induction of callus formation. Concentrations of 0 and 0.25 mg L-1 of Kintein provided the highest response rate 100. As for the overlap, some combinations recorded a response rate of 100%, including concentrations of 2,4-D with both treatments of 0 or 0.25 mg L-1 of Kintein. In contrast, the lowest callus induction reached 70% for the treatment with the high concentration of each growth regulator or the treatment with the concentration of 1.0 mg L-1 for 2,4-D and Kintein.

تأثير 2,4-D وKintein والتداخل بينهما في عدد الأيام اللازمة لبدء تكوين الكالس: تشير النتائج في الجدول 4 الى وجود تأثير معنوي لكل من تركيز المُعاملة بمنظم النمو 2,4-D وتداخلها مع Kintein في المدة اللازمة لبدء استحثاث الكالس، إذ بينت النتائج وجود اختلاف معنوي بين التراكيز المختلفة من 2,4-D، إذ سجل التركيز 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ أدنى مُدة لازمة لبدء استحثاث تكوين الكالس بلغت 7.31 يوماً وبالرغم من عدم اختلافها معنوياً عن

المدة التي استغرقتها المُعاملة 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ والتي كانت 7.91 يوماً، إلا ان كلاهما قد اختلف معنويا مع ما استغرقهُ التركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ والذي بلغ 9.63 يوماً.

كما تبين النتائج في الجدول 4 عدم وجود تأثير معنوي للمُعاملة بمنظم النمو Kintein في التأثير على مدة استحثاث الكالس من الورقة الفلقية لمحصول زهرة الشمس.

أما التداخل بين عاملي استحثاث نسيج الكالس، فتشير النتائج الى وجود تأثير معنوي عند التداخل الثنائي بين Kintein ×2,4-D في تقليص عدد الأيام اللازمة لبدء تكوين الكالس، اذ اظهرت النتائج تفوق التركيز 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ من منظم النمو 2,4-D مع 0.25 ملغم لتر$^{-1}$ من Kintein بإعطائهما أدنى مدة لبدء استحثاث نسيج الكالس من الورقة الفلقية لمحصول زهرة الشمس بلغ 5.29 يوماً، في حين بلغ اطول مدة 12.71 يوماً عند التوليفة Kintein×2,4-D بالتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ لكل منهما (جدول 4).

تشير الدراسات الى ضرورة وجود حالة من التوازن بين فعالية كل من الأوكسينات والسايتوكينات في الوسط الغذائي لتحفيز الجزء النباتي على تكوين الكالس، اذ تُعد السايتوكينيات ومن خلال احتوائها على الأدنين اساس للبدء بالانقسام الخلوي (8)، اضافة الى تأثير الأوكسينات والمتمثلة بمنظم النمو 2,4-D على الأتساع الخلوي من خلال دورهُ في ازاحة أيون الكالسيوم المُرتبط بالجدار الخلوي من خلال مجموعة كاربوكسيل والذي يعطي الجدار دعامة وقوة تحميهِ، هذهِ الإزالة تمنح الجدار الخلوي المرونة اللازمة للاتساع دون الرجوع لوضعهِ السابق ومع تراكم نواتج العمليات الأيضية تحدث الاستطالة للخلية النباتية، فضلاً عن دور الاوكسينات في عملية تصنيع البروتينات وتأثيرها ايضا على فعالية الأنزيمات والتنفس (2).

جدول 4 تأثير التراكيز المختلفة لمنظمي النمو 2,4-D و Kintein والتداخل بينهما في عدد الأيام اللازمة لبدء تكوين الكالس بعد 5 أسابيع من النمو في وسط MS.

2,4-D ملغم لتر$^{-1}$	Kin. ملغم لتر$^{-1}$					المتوسط
	0	0.25	0.50	0.75	1.0	
1.0	8.00	7.71	11.57	8.14	12.71	9.63
2.0	8.57	5.29	8.29	7.29	7.14	7.31
3.0	7.29	7.43	6.71	11.43	6.71	7.91
المتوسط	7.95	6.81	8.86	8.95	8.86	
LSD p≤ 0.05	1.433=2,4-D		NS=Kin.		3.204=Kin.×2,4-D	

*Table 4 indicates a significant effect of the concentration of treatment with 2,4-D and its interaction with Kintein on time required to initiate callus induction. As the concentration recorded 2.0 mg L-1 of 2,4-D, the minimum time required to start callus formation reached 7.31 days, while the concentration of 1.0 mg L-1 took 9.63 days. As for the combination 2,4-D and Kintein, the concentration of 2.0 mg L-1 of 2,4-D with 0.25 mg L-1 of Kintein showed superiority by providing the lowest duration for the onset of callus tissue induction of 5.29 days, while the most extended period was 12.71 days when using the Kintein combination 2,4-D, at a concentration of 1.0 mg L-1.

تأثير 2,4-D و Kintein والتداخل بينهما في عدد الأيام اللازمة لإكتمال تكوين الكالس: تشير النتائج في الجدول 5 الى وجود تأثير معنوي للتراكيز المختلفة من منظمي النمو 2,4-D و Kintein والتداخل بينهما في عدد الأيام اللازمة لأكتمال تكوين الكالس، إذ اظهرت النتائج تفوق التركيز 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D في تقليص المدة

اللازمة لإكتمال تكوين الكالس وحقق أدنى معدل للصفة بلغت 29.06 يوماً متفوقاً بذلك معنوياً عن التركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ والتي كانت بحاجة لمدة اطول لإكتمال تكوين الكالس بلغ 31.23 يوماً.

تشير نتائج الجدول 5 إلى وجود تأثير معنوي لمُعاملة الورقة الفلقية بمنظم النمو Kintein بهدف تكوين نسيج الكالس، إذ حقق التركيز 0.75 ملغم لتر$^{-1}$ أدنى مدة لإكتمال تكوين الكالس بواقع 28.90 يوماً وبالرغم من عدم اختلافهِ معنوياً بما أستغرقتهُ التراكيز 0 و0.25 و1.0 ملغم لتر$^{-1}$، إلا ان مستوى المعنوية كان واضحة مع المدة التي استغرقتها المُعاملة بالتركيز 0.50 ملغم لتر$^{-1}$ والتي احتاجت الى اطول مدة لإكتمال تكوين الكالس بلغ 32.10 يوماً.

أما التداخل الثنائي بين عاملي الدراسة فقد كان لهُ تأثيراً معنوياً في تقليص المدة اللازمة لإكتمال تكوين الكالس، فقد أنتجت التوليفة 3.0×0 ملغم لتر$^{-1}$ من منظمي النمو 2,4-D وKintein بالتتابع، أقل مدة لإكتمال تكوين الكالس بلغ 24.43 يوماً بينما كانت أطول مدة لإكتمال تكوين الكالس قد بلغت 33.00 يوماً قد انتجتها التوليفتين 2.0×0 و1.0×0.50 ملغم لتر$^{-1}$ لمنظمي النمو 2,4-D وKintein بالتتابع (جدول 5).

تعود اهمية منظم النمو 2,4-D الى طول السلسلة الجانبية وطبيعة مجموعة الأنحلال والتي زادت من نشاطه، وتأثيره في اتساع الخلايا، فضلاً عن دورهِ في بناء الأنزيمات وزيادة نشاطها ويُعد الإنسجام بين الأوكسين والسايتوكينين اساس استجابة الجزء النباتي لعملية الأستحثاث وتكوين الكالس.

تتفق هذه النتائج مع نتائج التي توصل اليها كل من (3) لإستحثاث نسيج الكالس من نبات *Nigella sativa* L. و(14) لإنتاج الكالس المُستحث من الورقة الفلقية لنبات *Fagopyrum esculentum* M..

جدول 5 تأثير التراكيز المختلفة لمنظمي النمو 2,4-D وKintein والتداخل بينهما في عدد الأيام اللازمة لإكتمال تكوين الكالس بعد 5 أسابيع من النمو في وسط MS.

2,4-D ملغم لتر-1	Kin. ملغم لتر-1					المتوسط
	0	0.25	0.50	0.75	1.0	
1.0	31.57	31.29	33.00	30.57	29.71	31.23
2.0	33.00	26.14	32.00	25.14	29.00	29.06
3.0	24.43	31.14	31.29	31.00	29.71	29.51
المتوسط	29.67	29.52	32.10	28.90	29.48	
LSD p≤ 0.05	1.713=2,4-D		2.211=Kin.		3.830=Kin.×2,4-D	

*Table 5 indicates a significant effect of different concentrations of growth regulators 2,4-D and Kintein and their interaction on the days required to complete callus formation. The 2.0 mg L-1 of 2,4-D concentration was superior in reducing the time needed to complete callus formation and achieved the lowest average of 29.06 days for the trait. While the concentration of 0.75 mg L-1 for the treatment with Kintein provided the most down period for completion of callus formation, which amounted to 28.90 days, the treatment with 0.50 mg L-1 took the most extended period of 32.10 days. While the combination produced 0.0×03 mg L-1 of 2,4-D and Kintein respectively, the shortest period was 24.43 days, while the most extended period was 33.00 days produced by the two combinations of 0×2.0 or 0.0×.01 500 mg L-1 of 2, 4-D and Kintein, respectively.

تأثير 2,4-D وKintein والتداخل بينهما في الوزن الطري: تشير النتائج في الجدول 6 الى وجود تأثير معنوي للتراكيز المختلفة من منظمي النمو 2,4-D وKintein والتداخل بينهما في الوزن الطري للكالس المُستحث من

الورقة الفلقية لمحصول زهرة الشمس، إذ اظهرت النتائج تفوق التركيز 1.0ملغم لتر$^{-1}$ من منظم النمو 2,4-D في اعطاء اعلى معدل للصفة بلغ 544 ملغم مُتفوقا بذلك معنوياً على التركيز 2.0 الذي حقق متوسطاً للصفة بلغت 473 ملغم الذي تفوق بدورهِ معنوياً قياساً بالتركيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ الذي سجل أدنى متوسط للوزن الطري بلغ 387 ملغم. هذا يفسر اهمية الأوكسينات ومنها 2,4-D في تحفيز استطالة الخلايا النباتية, وزيادة الكتلة الحيوية من خلال دورهِ الفعال في زيادة ليونة الجدار الخلوي، إذ يعمل على كسر روابط الجدار الخلوي واعادتها الى مواقع جديدة مما يساهم في زيادة حجم الخلية النباتية، فضلا عن دور الأوكسينات في فك ارتباط ايون الكالسيوم بمجموعة الكاربوكسيل للمواد البكتينية المكونة للجدار الخلوي مما يسهل أتساع الخلايا، اضافة الى دور الأوكسينات في تحفيز بناء m-RNA الذي له دور مهم في تنشيط بناء الأنزيمات والبروتينات وبالتالي يساهم في زيادة الكتلة الحيوية للخلايا النباتية (19).

كما اظهرت النتائج في ذات الجدول تفوق التركيز 0.75 ملغم لتر$^{-1}$ من منظم النمو Kintein في اعطاء اعلى متوسط للصفة بلغ 540 ملغم، ففي الوقت الذي لم يصل مستوى هذا التفوق حدود المعنوية قياساً بما انتجتهُ التراكيز 0.25 و0.50 و1.0 ملغم لتر$^{-1}$، إلا ان مستوى التفوق قد تجاوز حدود المعنوية قياساً بمعاملة المقارنة والتي انتجت أدنى قيمة متوسطة للصفة بلغت 365 ملغم (جدول 6). يُعد هذا دليل على اهمية منظم النمو Kinetin في تحسين نمو الخلية النباتية من خلال دورهِ في تحفيز عملية انقسام الخلايا البرنكيمية وزيادة حجم الأنسجة بعد ايام من زراعتها (5 و7).

كما تشير النتائج الى وجود تأثير معنوي عند تداخل عاملي الدراسة في زيادة معدل الوزن الطري للكالس المُستحث من الورقة الفلقية لمحصول زهرة الشمس، اذ حققت التوليفة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ من منظم النمو 2,4-D والتركيز 0.75 ملغم لتر$^{-1}$ من Kintein اعلى معدل للصفة بلغ 767 ملغم، فيما انتجت التراكيز العالية لكلا المنظمين ادنى معدل للصفة بلغ 280 ملغم (جدول 6). أن تكامل التأثير بين الأوكسينات والسايتوكاينينات هو ألأساس الذي تستند عليه عملية زراعة الكالس، إذ أن توازن الفعالية بينهما يصب في إنجاح عملية إستحثاث الكالس من الأجزاء النباتية.

جدول 6 تأثير التراكيز المختلفة لمنظمي النمو 2,4-D وKintein والتداخل بينهما في الوزن الطري لمزارع الكالس (ملغم) بعد 5 أسابيع من النمو في وسط MS.

2,4-D ملغم لتر$^{-1}$	Kin. ملغم لتر$^{-1}$					المتوسط
	0	0.25	0.50	0.75	1.0	
1.0	327	510	656	767	459	544
2.0	392	534	400	532	506	473
3.0	376	522	436	322	280	387
المتوسط	365	522	497	540	415	
LSD p≤ 0.05	70.1 =2,4-D		90.5=Kin.		156.8=Kin.×2,4-D	

*Table 6 indicates a significant effect of different concentrations of growth regulators 2,4-D and Kintein and their interaction on the fresh weight of the callus. The concentration of 1.0 mg L-1 of 2,4-D in Benofir exceeded the highest mean value of 544 mg. While the concentration recorded 3.0 mg L-1 the lowest average value was 387 mg. As for Kintein treatments, the concentration recorded 0.75 mg L-1 the highest average value was 540 mg. The control treatment produced the lowest mean value of 365 mg at the time. As for the interference, the combination of 1.0 x 75.0 mg L-1 of 2,4-D and Kintein

achieved the highest mean value of 767 mg, while the high concentrations produced the lowest mean of 280 mg.

تأثير 2,4-D وKintein والتداخل بينهما في الوزن الجاف: تشير النتائج في الملحق 3 والجدول 8 الى وجود تأثير معنوي للتراكيز المُختلفة من منظمات النمو قيد الدراسة والتداخل بينهما في الوزن الجاف لمزارع الكالس المُستحثة من الورقة الفلقية لمحصول زهرة الشمس، إذ اظهرت النتائج تحقيق منظم النمو 2,4-D بالتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ اعلى معدل معنوي للصفة بلغ 41.6 ملغم، متفوقا بذلك على التركيز 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ بمتوسط بلغ 32.3 ملغم والذي لم يختلف بدورهِ معنوياً عن التركيز الأعلى (3.0 ملغم لتر$^{-1}$) والذي سجل أدنى قيمة متوسطة للوزن الجاف بلغ 28.8 ملغم.

تشير ذات النتائج الى تفوق منظم النمو Kintein بالتركيز 0.75 ملغم لتر$^{-1}$ بأعلى متوسط للصفة بلغت 38.3 ملغم، في الوقت الذي لم يصل مستوى ذلك التفوق حدود المعنوية قياساً بالتراكيز الآخرى من منظم النمو (0.25 و0.50 ملغم لتر$^{-1}$)، إلا أن ذلك التفوق قد تجاوز حدود المعنوية قياساً بما حققهُ التركيزين 0 و1.0 ملغم لتر$^{-1}$ وبنسبة زيادة عنهما بلغت 46.7 و21.6% بالتتابع (جدول 7).

كما تشير النتائج الى وجود اختلاف معنوي للتداخل بين كلا العاملين في الوزن الجاف لنسيج الكالس المُستحث من الورقة الفلقية لمحصول زهرة الشمس، إذ حققت التوليفة بين منظمي النمو 2,4-D × Kintein بالتركيزين 1.0 × 0.75 بالتتابع أعلى قيمة متوسطة للصفة بلغ 53.0 ملغم، فيما اعطت المُعاملة بالتركيزين العاليين لكلا المنظمين أدنى قيمة متوسطة للصفة بلغ 16.6 ملغم (جدول 7).

أن الزيادة في الوزن الطري والجاف للكالس هي انعكاس للتغيرات في المحتويات المُختلفة لخلاياه معتمده على نموه في الوسط الغذائي المُستعمل، والذي يعتمد بالأساس على منظمات النمو المضافة. بشكل عام يرافق عملية انقسام خلايا الكالس زيادة بالمحتويات المهمة لأدامة الانقسام والنمو مثل الكاربوهيدرات والبروتينات والاحماض الأمينية مع تغيرات داخلية تؤدي الى انقسام الخلايا وزيادة حجمها. هذا ما تم ملاحظتهِ في المُعاملة بتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D مع 0.75 ملغم لتر$^{-1}$.Kin في الحصول على اعلى متوسط للوزن الطري والجاف للكالس المُستحث (الجدولين 6 و7) (10 و17). وتعطي ظاهرة تكوين الكالس المحفزة بواسطة منظمات النمو دليلاً قوياً على عملية تخصص الخلايا النباتية وعدم فقدان طاقتها الكامنة (16). اما المستويات المرتفعة من الاوكسينات في المعاملة بتركيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D والسايتوكاينينات بتركيز 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ .Kin فانها تسبب تناقصا في معدلات النمو والانقسام للخلايا بسبب اضطراب العمليات الحيوية داخل الانسجة، نتيجة لاختلال التوازن الهرموني مما يؤدي الى تكوين الاثلين والذي يقوم بدوره الى تثبيط الفعاليات الايضية وانخفاض معدلات الانقسام والنمو (5 و15).

جدول 7 تأثير التراكيز المُختلفة لمنظمي النمو 2,4-D وKintein والتداخل بينهما في الوزن الجاف لمزارع الكالس (ملغم) بعد 5 أسابيع من النمو في وسط MS.

2,4-D ملغم لتر$^{-1}$	Kin. ملغم لتر$^{-1}$					المتوسط
	0	0.25	0.50	0.75	1.0	
1.0	21.7	43.1	49.5	53.0	40.5	41.6

32.3	37.6	36.9	27.4	35.0	24.5	**2.0**
28.8	16.6	25.0	34.0	36.2	32.1	**3.0**
	31.5	38.3	37.0	38.1	26.1	**المتوسط**
11.73=Kin.×2,4-D			6.77=Kin.	5.25=2,4-D		**LSD p≤ 0.05**

*Table 7 shows a significant difference between the study factors and their interaction in the dry weight of callus cultures. The treatment with a concentration of 1.0 mg L-1 of 2,4-D provided the highest mean value of 41.6 mg. In contrast, the concentration of 3.0 mg L-1 showed the lowest mean value of 28.8 mg. The results also indicate that Kintein was superior at a concentration of 0.75 mg L-1, with the highest mean value of 38.3 mg, as for the effect of overlapping on the dry weight of callus cultures. The combination 2,4-D and Kintein at concentrations of 0.75×1.0 mg L-1, respectively, achieved the highest mean value for the trait, which amounted to 53.0 mg. In comparison, the treatment with the two high concentrations recorded the lowest average value for the trait amounted to 16.6 mg.

المصادر

1. Abdala, B. A. (2013). In vitro and in vivo production of thymol and its derivatives in black seed *Nigella sativa* L. Ph.D Dissertation. Department of Field Crops College of Agriculture, University of Baghdad, pp:135
2. Abu Zaid, A. N. (2003). Plant Hormones and Agricultural Applications. Third Edition. Arab House of Publishing and Distribution. Arab Republic of Egypt, pp: 351.
3. Al-Ani, N. K. (2008). Thymol production from callus culture of Nigella sativa L. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 18(2): 181-185.
4. Al-Oubaidi, M. H. A. (2021). In vitro *Physalis peruviana* response to nanoparticles and their effects on secondary metabolite and genetic variation. A Dissertation, Departmemt of Horticulture, College of Agricultural engineering sciences, University of Baghdad.
5. Bhatla, S. C., and Lal, M. A. (2018). Plant physiology, development and metabolism. Springer.
6. FAO. (2020). Crop Prospects and Food Situation—Quarterly Global Report No. 1.
7. Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., and Ahmad, A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. Environmental and experimental botany, 68(1): 14-25.
8. Heldt, H. W., and Piechulla, B. (2021). Plant biochemistry. Academic Press.
9. Ibrahim, K. M. (2017). Applications in Plant Biotechnology, College of Biotechnology, Al-Nahrain university, 680.
10. Kasprzyk-Pawelec, A., Pietrusiewicz, J., and Szczuka, E. (2015). In vitro regeneration induced in leaf explants of Citrus limon L. Burm cv.'Primofiore'. Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus, 14(4): 143-153.
11. Liu, X., Li, X., Qiao, Z., Li, W., Gao, B., and Han, L. (2020). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from the receptacle of sunflower (Helianthus annuus L.). bioRxiv.
12. Mahmood, Z. F., and Ibrahim, K. M. (2017). Increase Helianthus annuus L. Tolerance and Accumulation of Cadmium in Vitro and it's Expression in Intact Plants. Al-Nahrain Journal of Science, 20(2): 96-102.
13. Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3): 473-497.

14. Nasralla, A. Y., Khierallah, H. S. M., and Neamah, S. I. (2015). The effect of plant growth regulators on plant anti-oxidant production from callus of buckwheat, Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 46(6): 922-933.
15. Saini, H. K., Gill, M. S., and Gill, M. S. I. (2010). Direct shoot organogenesis and plant regeneration in rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.). Indian Journal of Biotechnology, 9: 419:423.
16. Sarma, C., Borthakur, A., Singh, S., Modi, M. K., and Sen, P. (2011). Efficient in vitro plant regeneration from cotyledonary explants of Citrus reticulata L. Blanco. Annals of Biological Research, 2(6): 341-348.
17. Taiz, L., and Zeiger, E. (2010). Plant Physiology, 5rd Edition. Sinauer Associates, Inc, 782.
18. Vinay, S., and Afroz, A. (2015). Plant Tissue Culture. Springer, 529.
19. Pidlisnyuk, V., Stefanovska, T., Zhukov, O., Medkow, A., Shapoval, P., Stadnik, V., and Sozanskyi, M. (2022). Impact of plant growth regulators to development of the second generation energy crop Miscanthus× giganteus produced two years in marginal post-military soil. Applied Sciences, 12(2): 881.