مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 39- عدد 4 (2023): 87-101

Damascus University Journal for the Basic Sciences
Vol 39 No.4 (2023): 87 -101

تأثير الأوساط المغذية المعززة بمنظمات النمو النباتية في تباين محتوى السلالات الخلوية المكررة لكالوس الديجتالس الأرجواني Digitalis purpurea. L من العناصر المعدنية

محمد أحمد العقاب[1] سليم زيد[2] يوسف العموري[3]

[1] طالب دكتوراة – قسم علم الحياة النباتية - كلية العلوم - جامعة دمشق

[2] أستاذ دكتور – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة دمشق

[3] دكتور – باحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية – دمشق – سورية

الملخص

هدف هذا البحث إلى دراسة تأثير الأوسط المغذية المعززة بمنظمات النمو النباتية في تباين محتوى العناصر المعدنية في المزارع الخلوية المكررة للسلالات الخلوية المنتخبة من كالوس الديجتالس الأرجواني.

زرعت السلالات الخلوية DPM1,DPM2,DPM3,DPM4 المنتخبة من كالوس الديجتالس الأرجواني Digitalis purpurea في الأوساط المغذية MS , B5,LS, 5C01، وتم إعادة زراعتها على الأوساط والتراكيز نفسها حتى المزرعة الخلوية المكررة Sub-Culture80، تم اختيار المزارع الخلوية sub-culture10 ، sub-culture20، sub-culture40، sub-culture80 من كل سلالة خلوية مدروسة كمؤشر لدراسة محتويات العناصر وبوجود عينات البذور والنبات النامي في الزجاج كشاهد، أظهرت السلالات الخلوية المدروسة تبايناً في تراكم العناصر المعدنية المدروسة في مستوى الأوساط المختلفة، وفي مستوى المزارع الخلوية المكررة ، تراجع محتوى الحديد في المزارع الخلوية المكررة في كافة الأوساط المغذية بالمقارنة مع الشاهد، وتباينت محتويات الزنك مع تفوق للمزارع المكررة Sub-Culture80 من السلالات الخلوية DPM1, DPM3 في الأوساط MS,LS

حيث تجاوزت 54ppm، وتباين محتوى النحاس والمغنيزيوم ضمن الأوساط والسلالات والمزارع الخلوية، وتفوقت السلالةDPM1 معنوياً في الوسط MS بكافة مزارعها المكررة في تراكم محتويات الصوديوم والبوتاسيوم، وتفوقت السلالة الخلوية DPM4 معنوياً في الوسط 5C01 في تراكم محتوى الكالسيوم، وتراجع محتوى الرصاص في المزارع الخلوية وكان ضمن الحدود المسموحة في كافة المزارع الخلوية المكررة للسلالات الخلوية المدروسة والشاهدين.

تاريخ الإيداع: 2022/07/04
تاريخ الموافقة: 2022/09/12

حقوق النشر: جامعة دمشق –سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

الكلمات المفتاحية : الديجتالس الأرجواني، الكالوس، السلالات الخلوية، المزارع الخلوية المكررة، العناصر المعدنية، طيف الامتصاص الذري، منظمات النمو النباتية.

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

Effect of nutrient media enhanced with plant growth regulators on the variation in the mineral elements content of Digitalis purpurea L callus cell lines subcultures

M. A.Al−oqab[1] Dr.Salim Zaid[2] Dr.Youssef Al-Ammouri[3]

[1] PhD student at the Department of Plant Biology - Faculty of Science - Damascus University.
[2] Professor at the Department of Plant Biology - Faculty of Science - Damascus University.
[3] Researcher at the National Commission for Biotechnology – Damascus.

Abstract

This research aimed to study the effect of the nutrient media enhanced with plant growth regulators on the variation of the mineral content in the subcultures of the selected cell lines of Digitalis purpurea callus.

Selected DPM1, DPM2, DPM3 and DPM4 cell lines from Digitalis purpurea callus were cultured in MS, B5, LS and 5C01 media, and re-cultured on the same media and concentrations until the subculture 80. Cell cultures (subculture10, subculture20, subculture40 and sub-culture80) were selected from each studied cell line as an indicator to study the elements contents, and with the presence of seed and in vitro plant samples as two controls.

The studied cell lines showed a variation in the accumulation of the studied mineral elements at the level of different media, and at the level of subcultures. The iron content decreased in the cell subcultures in all nutrient media compared to the control, and the zinc contents varied with the superiority of the subculture80 of the DPM1 and DPM3 cell lines in the media MS and LS, where it exceeded 54 ppm. Moreover, copper and magnesium contents varied within the media, cell line and cell subcultures, and the DPM1 cell line grown in MS medium excelled in all its subcultures in the accumulation of sodium and potassium contents, while the DPM4 cell line grown in 5C01 medium was superior in the accumulation of calcium content. On the other hand, the lead content decreased in the cell cultures and was within the permissible limits in all the cell subcultures of the studied cell
lines and the two controls.

Received :2022/07/ 04

Accepted:2022/09/12

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a

CC BY- NC-SA

Keywords: Digitalis purpurea, Callus, cell lines, Cell sub-cultures, Mineral elements, Atomic absorption spectrum, Plant growth regulators.

1- المقدمة والدراسة المرجعية Introduction and Literature Review

يعد الديجتالس الأرجواني واحد من أهم النباتات الطبية في العالم (Evans and Evans,2009)، ينتمي الديجتالس الأرجواني Digitalis purpurea إلى الفصيلة الحملية Plantaginaceae (Richard,2002)، وهو نبات عشبي ذو حولين، تعد البلقان وشرق القوقاز وأوربا الغربية وتركيا واليابان والهند موطناً أصلياً له (Verma et al.,2016)، ويزرع للأغراض التجارية في عدد من دول العالم (Willis et al.,2000).

أُدخلت ورقة الديجتالس الأرجواني في دستور الأدوية بلندن عام 1650م (Serrano et al.,2014)، وتعود أولى التجارب العلمية الطبية كعلاج لمرضى القلب إلى عام 1785م من قبل الطبيب وليم ويذرينغ (Goldthorp,2009; Withering,2014) ، تتركز الأهمية الطبية للديجتالس الأرجواني باحتوائه على الغلوكوزيدات القلبية كالديجوكسين حيث وافقت ادارة الغذاء والدواء الأمريكية FDA على استخدامه كعلاج لفشل القلب Heart Failure وفي علاج الرجفان الاذيني Atrial fibrillation (Chen et al.,2015) ويصنف دستور الأدوية السورية الديجوكسين كدواء لمرضى القلب، ونُشرت مؤخراً العديد من الدراسات حول فعالية الديجوكسين في طب الأورام وفعاليته في علاج عدد من الأمراض السرطانية (Stenkvist et al.,1982 ; Platz et al.,2011; Lindholm et al.,2002; Durlacher et al.,2015; Wang et al.,2017) وأوردت عدد من التقارير العلمية التأثير الفعال للديجوكسين كمضاد للفيروسات، حيث يعمل الديجوكسين وبعض الغلوكوزيدات القلبية الأخرى كالـ Ouabain على منع نسخ أو تكرار Cov-2 مما يؤدي إلى تثبيط الفيروس في مرحلة ما بعد دخول دورة الحياة الفيروسية وتشير نتائج الأبحاث الحديثة إلى أن الديجوكسين والـ Ouabain قد يكونا علاجاً بديلاً وفعالاً كمضاد لفيروس كوفيد-19 مع تأثيرات علاجية إضافية محتملة للمرضى الذين يعانون من أمراض القلب والأوعية الدموية (Cho et al.,2020).

لا تهدف الدراسات المتعلقة بالنباتات الطبية فقط إلى توصيف المكونات النشطة الموجودة في النبات ولكن أيضاً للدعم العلمي لخصائصها العلاجية (Lapa et al.,2003) حيث يتزايد الاهتمام بتحليل التركيب الكيميائي وتحليل المعادن لمنتجات الأعشاب الطبية بسبب أهميتها في التغذية العلاجية والغذائية (Niamat et al.,2012; Rodushkin et al.,1999)، تعود أهمية دراسة المحتويات المعدنية في النبات المزروعة تقليدياً بتحديد مستوى النطاقات المسموح بها للاستخدامات الطبية وتختلف كميات وخصائص المكونات النشطة وفقاً للموسم ونوعية التربة (Reddy,2010)، و تعود أهمية دراسة المحتويات المعدنية في الكالوس إلى تحديد الأوساط المثلى لإنتاج المركبات الثانوية ومن أجل تخليق الجسيمات النانوية (NPs) nanoparticles حيث يتم تفضيل المزيد من الأساليب البشرية والصديقة للبيئة ويعتبر التوليف الأخضر الذي يتضمن المستخلصات النباتية والكائنات الحية الدقيقة والإنزيمات بديلاً واعداً جداً للطرق الكيميائية والفيزيائية لتخليق الجسيمات النانوية (Anjum and abbasi,2016) ، ففي دراسة Zaka وآخرون (2021) على Cannabis sativa تم تجميع Ag-NPs و ZnO-NPs من مستخلص الكالوس والذي يحتوي على كمية عالية من المركبات الثانوية لذلك فهو مصدر مفيد لتثبيت NPs حيث يعمل الكالوس على إنتاج NPs أكثر اتساقاً من خلال تقليل مواصفات حجم الجزيئات وزيادة جودة المنتج وتبرز تقنيات النانو النباتية باعتبارها بسيطة وأقل كلفة وصديقة للبيئة وللوقت وتنتج نواتج نانوية مستقرة (Singh et al.,2017)، لذلك أصبح الكالوس المزروع في المخابر نقطة مرجعية هامة للدراسات حول إنتاج الجسيمات النانوية وتأثير تراكم المعادن في النبات، وأثر هذه التراكمات في إنتاج المركبات الثانوية Secondary Metabolism من الكالوس ودورها في النمو وفي الامتصاص للوسط المغذي وأثر بعض المعادن المترافق بتغيرات نخريه وجفاف سريع للخلايا مع عدم تحفيز للأجنة الجسمية (Nawrot-Chorabik,2017; Singh et al.,2017) ، وعلى الرغم من كون بعض المعادن الثقيلة الموجودة في النبات ضرورية لمسار التشغيل السليم للخلايا كالنحاس والحديد والزنك والمنغنيز والكوبالت والنيكل فإن بعض المعادن الثقيلة كالرصاص والزئبق والكادميوم والألمنيوم

تعد سامة في الميزان الخلوي حتى بالحدود الدنيا (Page et al.,2006) فالتأثيرات السامة لأيونات المعادن ليس فقط في البنية الدقيقة للخلايا ولكن أيضاً على المستويات الجزيئية أي في التعبير عن مورثات معينة أو تعطيلها وهي تغيرات مرتبطة بالحمض النووي وتأثر على مسارات النسخ والتخليق الحيوي لبعض البروتينات وتسبب خلل في استقلاب الأوكسجين النشط والأنزيمات المضادة للأكسدة (Nawrot-Chorabik,2017; Schroder et al.,2004)

درس Negi وآخرون (2012) المحتويات المعدنية لنبات الديجتالس الأرجواني المزروع في الوسط الحي In vivo باستخدام مطياف الكتلة ICP-MS، ووجد أن المحتويات المعدنية (البورون B، الكروم Cr ، المنغنيز Mn، الكوبالت Co، النيكل Ni، النحاس Cu، الزرنيخ As، الرصاص Pb) كانت ضمن النطاق المسموح به للاستخدامات الطبية.

تعد هذه الدراسة الأولى من نوعها على الديجتالس الأرجواني وتهدف إلى دراسة تأثير الأوساط المغذية المعززة بمنظمات النمو النباتية في تباين محتوى المكونات المعدنية في المزارع الخلوية المكررة المنتخبة من كالوس الديجتالس الأرجواني.

2-مواد البحث وطرائقه Materials and Methods

2-1-مكان تنفيذ البحث Site of research

نُفذ هذا البحث في مخبر تقانات النباتات الطبية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، ومخابر قسم علم الحياة النباتية بكلية العلوم بجامعة دمشق في الفترة الممتدة 2017-2021

2-2-المادة النباتية Plant Material

تم الحصول على كالوس السلالات الخلوية (DPM1, DPM2, DPM3, DPM4) المعزولة من الزراعة النسيجية للديجتالس الأرجواني D. purpurea من مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق ومخابر قسم علم الحياة النباتية بكلية العلوم – جامعة دمشق، نميت هذه السلالات حتى المزارع الثانوية sub-culture80 على نفس الأوساط ووفق التراكيز المدروسة في الجدول (1)، تم اختيار المزرعة الخلوية المكررة sub-culture10 ، sub-culture20، sub-culture40، sub-culture80 وتم اعتبار النبات النامي في الزجاج in vitro و بذور النبات كشاهد، جففت العينات في الفرن على درجة حرارة 45 درجة مئوية لمدة 10 أيام وتم معالجة العينات وفقاً لطريقة العمل الموصوفة من Karpiuk واخرون (2016) مع إجراء بعض التعديلات، حيث طحنت العينات بجهاز الطحن الألي من النوع Yellow line حتى أصبحت بودرة ناعمة ومتجانسة وحفظت في أنابيب خاصة، تم وزن 2.1 غرام من كل عينة في بوتقة وتم حرقها في فرن عند درجة 550 درجة مئوية لمدة 3 ساعات، تُركت العينات حتى تبرد وتم وزن الرماد الناتج عن حرق العينات، حُل رماد العينات باستخدام 1 مل من حمض كلور الماءHCL 25% المضاف اليه 30 مل من الماء المقطر المنزوع الشوارد، ثم وضع محلول العينات على سخان خفيف مع التحريك لمدة 15 دقيقة وكمل الحجم إلى 50 مل بإضافة 20 مل من الماء المقطر منزوع الشوارد، بردت العينات وجرى الترشيح للمحلول على ورق Whatman في دوارق حجمية، حفظت العينات في أنابيب زجاجيه لإجراء دراسة قياس محتويات العناصر بجهاز طيف الامتصاص الذري Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) من النوع Unicam

969

الجدول (1) السلالات الخلوية المنتخبة من كالوس الديجتالس الأرجواني المدروس.

سلالات الكالوس	الوسط المغذي	تراكيز منظمات النمو النباتية
DPM1	MS	$(2mg2.4\text{-}D+1mgBA)L^{-1}$
DPM2	B5	$(2mg2.4\text{-}D+1mgBA)L^{-1}$
DPM3	LS	$(2mgNAA+2mgBA)L^{-1}$
DPM4	5C01	$(2mgNAA+1mgKin)L^{-1}$

أُجري التحليل وفقاً لتوصيات الشركة المصنعة وبوجود سلسلة عيارية(جدول رقم :2) للمعادن المدروسة (Fe, Zn, Cu, Pb, Mg, Na, K, Ca) من إنتاج شركة Chem- Lab NV-Belgium " بهدف تحديد تراكيز العينات المدروسة بوجود 3 مكررات من كل عينة مدروسة.

العنصر المعدني	السلسلة العيارية
الرصاص	0.2-0.5-1
المغنيزيوم	0.1-0.2-0.3-0.4-0.5
الكالسيوم	1-2-3-4-5
البوتاسيوم	1-2-3-4-5
الصوديوم	1-2-3-4-5
النحاس	0.3-0.5-1-2
الزنك	0.2-0.5-0.7-0.9-1-1.5
الحديد	0.5-1-2-3-4

3-2- تصميم التجارب والتحليل الإحصائي Experiment Design and Statistical Analysis

نفذت جميع تجارب التحليل الإحصائي باستعمال التصميم العشوائي البسيط (CRD) وحللت النتائج ببرنامج IBM SPSS Statistics 24 وقورنت المتوسطات حسبOne Way ANOVA واختبار Tukey عند مستوى L.S.D اختبار اقل فرق معنوي عند 0.01 معنوية.

2- النتائج والمناقشة Results and Discussion

تلعب العناصر الكبرى والصغرى دوراً حيوياً في الوظائف الحيوية في النباتات وفي تفاعلات التمثيل الغذائي وتؤثر تأثيراً مهماً وحاسماً في تكوين المركبات الفعالة حيوياً في النباتات الطبية وبالتالي فهي مسؤولة عن خصائصها الطبية والسامة (Rajurkar and Damame,1998; Zhang et al.,2015; Karpiuk et al.,2016)، وتجرى التعديلات على الأوساط لتحسين ظروف الاستزراع ، وتؤثر المعادن في نفاذية الغشاء وتحفيز امتصاص المغذيات ونمو الخلايا في مزارع الكالوس (Shelat et al.,2013)، وتتجلى خصوصية أصناف التغذية المعدنية من خلال الاختلافات في امتصاص الأيونات ونقلها وتوزيعها وتراكمها وكذلك في إعادة استخدامها وتدفقها وأثرها في إنتاج الكتلة الحيوية، وتم العثور على هذه الفروقات في النباتات المزروعة في الوسط الحي أو في الأوساط الصنعية (Epstein,1972; Saric 1981,1983; Clark,1983).

تظهر نتائج الدراسة في الجدول (3) تبايناً في تركيز العناصر المعدنية المدروسة وفي ثبات التركيز واستقراره في المزارع الخلوية المكررة باختلاف الوسط المغذي ونوعية الشوارد المعدنية المغذية ومنظمات النمو المعززة لنمو كل سلالة خلوية في الديجتالس الأرجواني وتتفق هذه النتائج إجمالاً مع دراسات Sovetkina وآخرون (2001) على نبات الجنسنغ المزروع خلوياً، فقد راكمت المزارع المتشابهة نسبياً كميات مماثلة من المعادن وكانت هناك أيضاً ارتباطات جيدة بين محتويات العناصر الدقيقة والعناصر الكبرى ما يؤكد التراكم الانتقائي للعناصر بواسطة خلايا الجنسنغ المزروع ، ولاحظ Mezei وآخرون (1995) اختلافاً في تركيز العناصر المعدنية بين أصناف بنجر السكر المختلفة.

كما تظهر النتائج وجود تباينات إجمالية في محتويات العناصر المعدنية بين الشاهدين (البذور والنبات النامي في الزجاج) وبين السلالات الخلوية من الكالوس المحفز والنامي في الأوساط المغذية، إذ تظهر النتائج أن لكل عنصر من العناصر حالته الخاصة

المرتبطة فيه وفقاً لطبيعة الوسط المغذي ونوعية الشوارد فيه التي تؤثر على حالة الامتصاص والتي تنعكس على واقع النمو وتراكم الكتلة الحيوية للخلايا والانقسامات المتعددة على المستوى الخلوي.

تتأثر حالات العناصر المعدنية في الأوساط المغذية وفقاً لإمكانيات الوسط في ديمومة خلايا الكالوس المكررة واستدامتها وطبيعة التباينات الجسمية التي تحدث في مستوى الانقسامات، إذ تملك بعض الأوساط المغذية المقدرة بالمحافظة على ديمومة الكالوس بخواصه الكاملة في المزارع المكررة في حين أن بعض الأوساط تحتاج إلى تعديلات في الإضافات العضوية أو تراكيز منظمات النمو لتجنب حالات التدهور لخلايا الكالوس عند مستويات محددة من المزارع الخلوية المكررة.

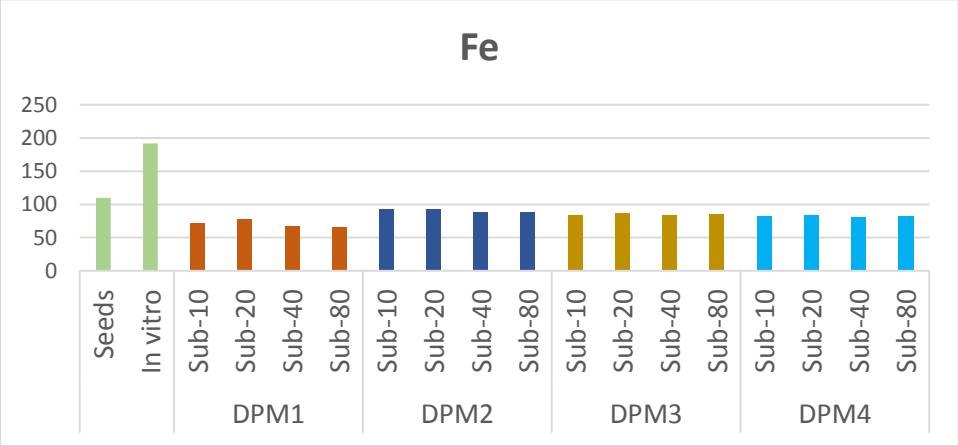
ويرى Sovetkina وآخرون (2001) في دراسات حول تراكم المعادن في مزارع الكالوس لنبات الجنسنغ أن تراكم المحتوى المعدني يعتمد أيضاً على أصل المنفصل النباتي وتحتفظ خلايا الجنسنغ بخصائصها المحددة وراثياً لتراكم المعادن على الرغم من الزراعة في الزجاج على المدى الطويل، تتوافق نتائج دراستنا مع Sovetkina وآخرون (2001) حيث تراوحت المحتويات في كالوس الجنسنغ وفقاً للخطوط وتباينات التراكيب المعدنية وفقاً لذلك بين الخطوط وبين النبات في عناصر الحديد والنحاس والمغنيزيوم، بينما في دراسات Saric وآخرون (1991,1995) كان متوسط تركيز العناصر المعدنية في الكالوس أقل منه في النباتات الأم المزروع في الوسط الحي على الرغم من نموها على أوساط غنية بالمغذيات، لذلك لا تعد الحالة الإجمالية لتوصيف العناصر المعدنية دقيقة ويستحسن أن يتم عرض كل عنصر ومناقشة نتيجته كحالة مفردة وتقييمها وفقاً لتغيرات التركيز في الأوساط المغذية ولتغيرات التركيز ضمن الوسط وبالمقارنة مع البذور والنبات النامي في الزجاج

الجدول رقم (3): تراكيز العناصر المعدنية المدروسة في السلالات الخلوية للديجتالس الأرجواني ppm

الـ عاملة		الـ صاص	الـ غـ م	الـ الـ م	الـ تاسـ م	الـ ديـ م	الـ اس	الـ نـ	الـ يـ
الـ ور		3.31	779.62	2095.23	11809.76	1847.67	3.63	33.48	109.66
الـ ات الـ امي في الـ جاج		2.67	860.34	3714.28	15619.81	2576.19	3.56	40.69	191.95
DPM1	**Sub-10**	1.67	998.59	3047.62	24333.32	5285.71	1.14	48.03	70.90
	Sub-20	1.24	838.21	3380.95	25952.57	5381.02	6.47	49.70	77.91
	Sub-40	1.57	875.31	3347.62	25761.89	5490.48	1.98	51.58	66.50
	Sub-80	1.30	1119.8	3847.62	26857.15	5809.51	2.30	54.18	66.10
DPM2	**Sub-10**	1.17	914.32	2714.29	19571.41	2761.90	4.14	43.68	92.01
	Sub-20	3.16	989.73	3380.95	19809.76	3000.06	5.79	44.04	92.24
	Sub-40	1.65	871.92	2514.28	20380.94	3094.76	2.61	43.86	88.58
	Sub-80	1.91	807.32	2284.95	21333.59	3238.14	2.54	47.43	87.75
DPM3	**Sub-10**	2.89	805.92	3380.95	20924.01	2904.80	2.76	44.01	83.76
	Sub-20	2.55	928.69	2714.28	21523.81	3200.00	3.65	44.69	87.05
	Sub-40	1.45	857.73	2714.28	21623.79	3247.62	3.66	49.24	83.55
	Sub-80	3 .10	951.82	2380.95	22885.98	3247.67	10.54	56.50	85.20
DPM4	**Sub-10**	1.71	837.12	5380.95	21857.13	2638.10	1.84	43.42	81.80
	Sub-20	1.48	767.40	5952.38	22619.34	2790.00	1.84	45.04	83.00
	Sub-40	1.91	784.40	7047.62	23904.75	2947.62	1.82	47.12	81.04
	Sub-80	1.12	660.21	7842.86	23823.79	2928.57	1.80	47.27	81.85
Statistica analysis	**df**	5	5	5	5	5	5	5	5
	F	3.180	8.829	83.956	192.182	532.577	2.907	15.353	320.253
	sig	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000

3-1-الحديد: يعد الحديد واحداً من أهم العناصر الصغرى التي تساعد في نمو النبات والخلايا وله أثر مهم وأساسي في الكلوروفيل وله دوراً أساسياً في تكوين الأنزيمات اللازمة للتمثيل الضوئي ويساعد في الأكسدة والاختزال والتبادل الغازي في النبات ، وتسبب الزيادة الفائضة في تركيزه الإجهاد التأكسدي (Sovetkina et al.,2001) .

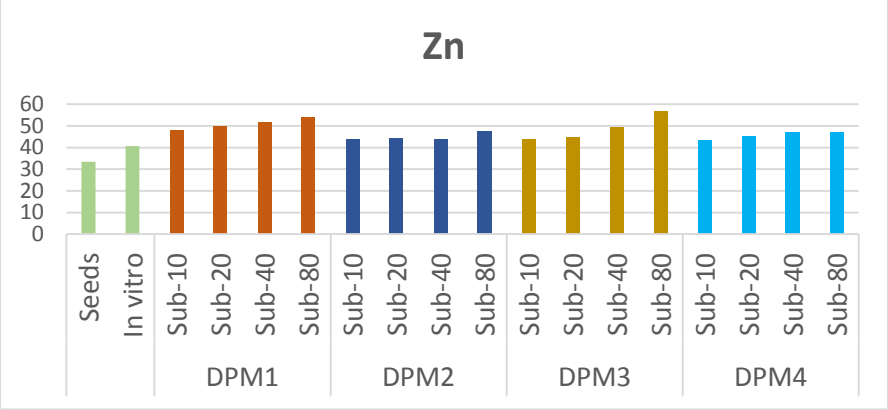
تبين نتائج الجدول (3) والشكل (1) أنه لا توجد فروقات معنوية في تركيز الحديد في السلالات الخلوية المكررة المدروسة ضمن السلالة الخلوية الواحدة في الوسط الواحد مع وجود فروق معنوية بين السلالة DPM1 وبقية السلالات الخلوية ضمن الأوساط المختلفة، ولوحظ وجود فروقات معنوية بين عينات الشاهد (البذور والنبات النامي في الزجاج) والسلالات الخلوية المكررة وقد يعود ذلك إلى أن الحديد قد يكون غير نشط في المزارع الخلوية لقلة حاجة الكالوس لذلك في التمثيل الضوئي، لا تتفق نتائج هذه الدراسة مع دراسات Bolda وآخرون (2011) على كالوس النوع Vaccinium myrtillus فقد أشارت نتائج الدراسة إلى محتوى أعلى من الحديد في الكالوس بالمقارنة مع محتوى أوراق النباتات المزروعة في الوسط In vivo .



الشكل رقم (1): محتوى الحديد (ppm) في السلالات الخلوية المدروسة للديجتالس الأرجواني.

3-2-الزنك: يصنف من العناصر الصغرى ويعد من أهم العناصر، إذ يعد مكوناً رئيسياً لأكثر من 200 أنزيم وله دور تحفيزي وتركيبي على حد سواء، ويجرى حالياً الاعتماد على مزارع الكالوس في إنتاج جسيمات الزنك النانوية، وقد حفز Zaka وآخرون(2021) مزارع الكالوس من منفصلات أوراق نبات القنب Cannabis sativa وحصل على أفضل نتائج لتحفيز الكالوس بوجود تراكيز مختلفة من السيتوكينين TDZ والأوكسين NAA وتم تجميع ZnO-NPs من مستخلص الكالوس الذي أحتوى على كمية متزايدة من المركبات الثانوية لذلك فهو مصدر مفيد وثابت ويعمل الكالوس على إنتاج NPs أكثر اتساقاً، ويتم تمييز الجسيمات النانوية لأكسيد الزنك باستخدام تقنيات قياسية كتحليل طيف الأشعة والـFTiR.

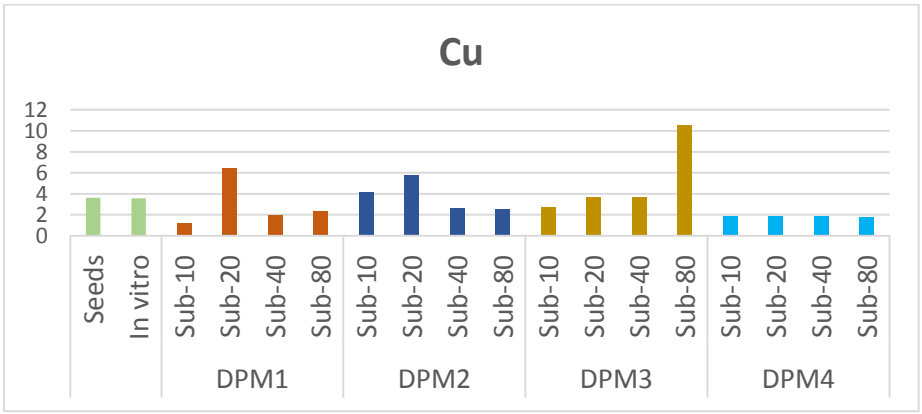
تظهر نتائج الجدول(3) والشكل(2) استقرار إنتاج الزنك ضمن الوسط المغذي الواحد على الرغم من اختلاف المزارع الخلوية المكررة، مع تباين محدود لتراكيز الزنك ضمن الأوساط المختلفة، وتفوق معنوي للسلالات الخلوية في متوسط محتوى الزنك بالمقارنة مع عينة البذور وعينة النبات النامي في الزجاج وتتفق هذه النتائج مع نتائج Zaka وآخرون(2021) على نبات القنب ونتائج أبحاث Bolda وآخرون(2011) على النوع Vaccinium myrtillus فكان محتوى الزنك في مزارع الكالوس أعلى من محتوى أوراق النباتات المزروعة في الوسط الحي.



الشكل (2): محتويات الزنك (ppm) في السلالات الخلوية المدروسة للديجتالس الأرجواني

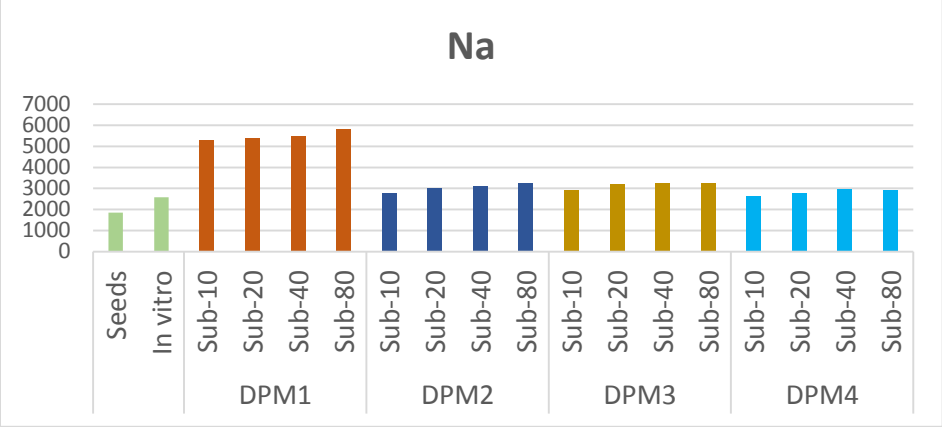
3-3-النحاس : يدخل النحاس في تكوين بعض الإنزيمات التي تأثر تأثيراً مهماً في تفاعلات الأكسدة والاختزال في النبات ويعد عنصراً ضرورياً لتكوين الكلوروفيل، وتعد الكميات الزائدة منه سامة، في كل النباتات الصالحة للأكل كان الحد المسموح به الذي حددته WHO هو 3ppm .

تبين نتائج الجدول (3) والشكل(3) تباين محتويات النحاس ضمن السلالات الخلوية المكررة في الوسط الواحد وفي مستوى الأوساط المختلفة مع عدم وجود فروق معنوية ضمن السلالات الخلوية المكررة، وأظهرت السلالة الخلوية Sub-culture20 للسلالة الخلوية DPM1 النامية في الوسط(MS) والسلالة الخلوية Sub-culture20 للسلالة الخلوية DPM2 النامية في الوسط(B5) والسلالة الخلوية Sub-culture80 للسلالة الخلوية DPM3 النامية في الوسط(LS) أظهرت أفضلية في محتوى النحاس بالمقارنة مع السلالات الأخرى وهو ما قد يشير إلى حصول تباينات جسمية في مستوى السلالات المتفوقة أو حدوث تفاعلات فسيولوجية أو تركيبية معقدة أو حدوث طفرة عززت محتوى النحاس ضمن هذه السلالات.



الشكل رقم (3): محتوى النحاس (ppm) في السلالات الخلوية المدروسة للديجتالس الأرجواني

تتفق هذه النتائج مع نتائج أبحاث Sovetkina وآخرون(2001) فقد أظهرت بعض خطوط الكالوس للجنسنغ قدرات عالية لتراكم النحاس Cu، وكانت الفروق في محتوى النحاس طفيفة في عباد الشمس(Sarica et al.,1997) وفي جذور Bryonia alba L وجد أن النحاس يبلغ 0.13mg/100g من الوزن الجاف للعينة (Karpiuk et al.,2016).



الشكل رقم(4): محتوى الصوديوم (ppm) في السلالات الخلوية المدروسة للديجتالس الأرجواني

4-3-الصوديوم: له دور حيوي للغاية في عديد من العمليات الفسيولوجية ويوجد في السوائل خارج الخلية وهو مسؤول عن إزالة الاستقطاب للأغشية الحيوية وتوزان الماء في وسط داخل الخلية وخارجها(Nisa et al.,2019)، غالباً ما تحتوي الأوراق تراكيز أقل من الصوديوم مقارنة مع الجذور كما أشار (Besford and Maw,1974)، وتتباين محتويات الصوديوم في مزارع الكالوس باختلاف نوعية الشوارد ومكونات الوسط المغذي.

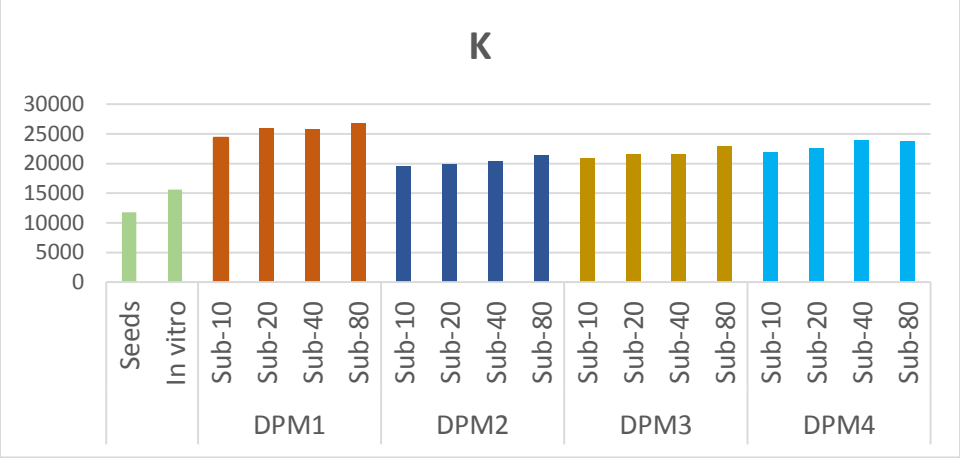
تبين نتائج الجدول (3) والشكل (4) أن تراكم محتوى الصوديوم في السلالات الخلوية للكالوس في الأوساط المغذية المدروسة كانت أعلى من محتويات الصوديوم في البذور والنبات النامي في الزجاج، لم يلحظ فروقات معنوية بين السلالات الخلوية المكررة المدروسة ضمن الوسط المغذي، لوحظ تباين وفروقات معنوية في السلالات الخلوية المدروسة على مستوى الأوساط المغذية المختلفة وحققت السلالة الخلوية DPM1 بجميع سلالتها المكررة النامية في الوسط المغذي (MS) أعلى تراكم في محتوى الصوديوم بالمقارنة مع السلالات الأخرى.

يعود التباين في مستوى الأوساط إلى أن مكونات الأوساط المعدنية ودرجة حموضة الوسط المغذي تؤثر في امتصاص الصوديوم من الوسط وتراكمه أو تمثيله في الوسط المغذي ، تتفق هذه النتائج مع نتائج دراسة Nisa وآخرون(2019) حول كالوس النوع Brassica napus وتشير البيانات إلى أن محتوى الصوديوم في الكالوس المحفز على وسط(MS) كان أعلى بالمقارنة مع بقية العينات المدروسة.

5-3-البوتاسيوم: يعد البوتاسيوم عنصراً مهماً للتمثيل الغذائي للدهون وتخليق البروتين والتوازن الكهربائي والحفاظ على السوائل في الجسم وهو المسؤول عن إرسال النبضات العصبية(Nisa et al.,2019)، وتحافظ النباتات عامة على نسبة عالية من K^+/Na^+ في العصارة الخلوية، ودرس Dafalla و Abdalla(2014) أربعة أنواع من النباتات الطبية وتراوحت كمية البوتاسيوم بين 400-842ppm .

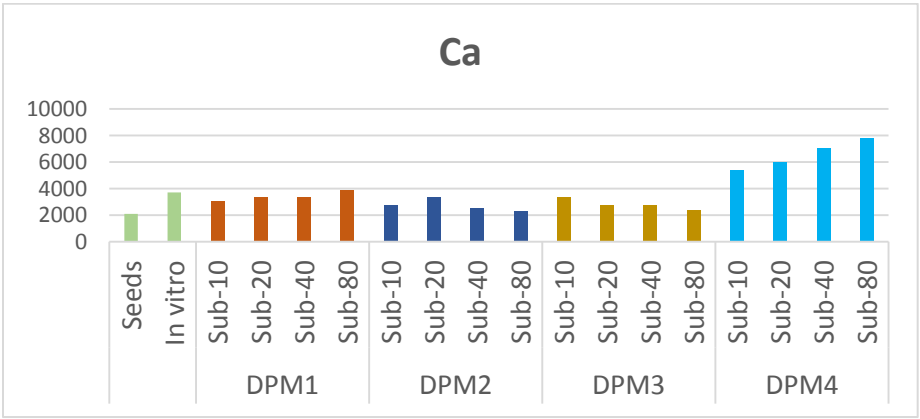
تظهر نتائج الجدول(2) والشكل(5) تضاعف تركيز البوتاسيوم في السلالات الخلوية المكررة في الأوساط المغذية بالمقارنة مع تركيز البوتاسيوم في الوسط الحي وفي البذور، ولوحظ وجود فروقات معنوية بين الأوساط المغذية في مستوى السلالات الخلوية حيث تفوقت السلالة الخلوية DPM1 النامية في الوسط(MS) معنوياً بالمقارنة مع السلالات المدروسة، وتبين النتائج وجود تباين محدود في مستوى السلالات الخلوية المكررة المدروسة ضمن الوسط المغذي نفسه مع أفضلية للسلالات المكررة Sub-Culture 80 في جميع الأوساط ، تتفق هذه الدراسة مع دراسات Sovetkina وآخرون(2001) على نبات الجنسنغ ومع دراسات Bolda وآخرون(2011) على النوع Vaccinium myrtillus بتفوق مزارع الكالوس في محتوى البوتاسيوم.

وتختلف مع دراسات Nisa وآخرون(2019) حيث أظهر الكالوس تركيزاً في البوتاسيوم أقل من محتوى السويقة والأوراق، ولم يبلغ Lopez-lefebre و زملاؤه (2001) عن أي تغيير في تركيز البوتاسيوم في نبات التبغ بالمقارنة مع الكالوس.



الشكل رقم(5): محتوي البوتاسيوم (ppm) في السلالات الخلوية المدروسة للديجتالس الأرجواني

6-3-الكالسيوم: يؤدي الكالسيوم دوراً مهماً في مسارات الإشارات الخلوية (Reddy,2001)، ويعمل كمرسلاً ثانياً جنباً لجنب مع بروتينات نقل الإشارة المعتمدة على Ca^{2+} ويحافظ الكالسيوم على سلامة البلازما ويعمل على استقرار الأغشية عن طريق توصيل البروتينات والدهون المختلفة إلى أسطح الأغشية (Hirschi,2004) ، يؤثر تركيز الكالسيوم مباشرة على محتوى العناصر الغذائية التي تعمل رسولاً ثانوياً (Schroeder et al.,2001). ويشارك الكالسيوم في استطالة الخلايا وانقسام الخلايا ويؤثر على الأس الهيدروجيني الخلوي ويعمل أيضاً كأيون تنظيمي في انتقال الكربوهيدرات من خلال تأثيره في الخلية وجدرانها(Hirschi,2004) وعلاوة على ذلك تحتاج النباتات Ca^{2+} لتقوية جدران الخلايا وتوفير الحماية من الإجهاد الإحيائي واللاإحيائي على الرغم من التأثيرات المحدودة للإجهاد في الزجاج ولكن ربما يكون قد فضل انتشار النباتات في وسط M4 في أثناء التأقلم والمزيد من النمو في الحي (Aranda-peres et al.,2009).

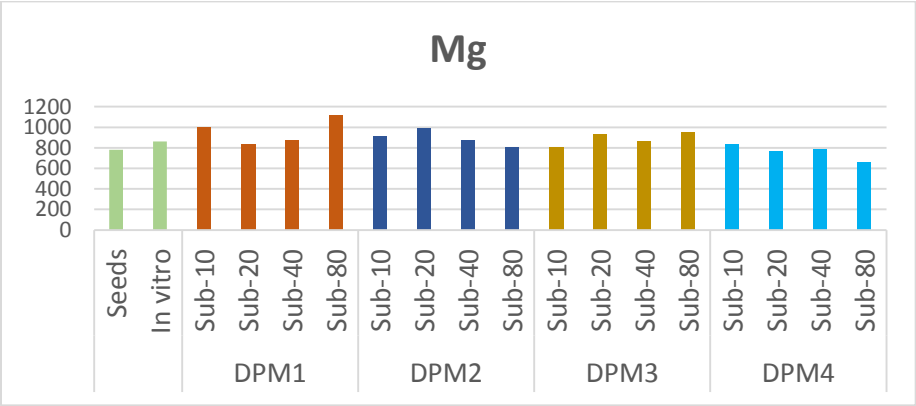


الشكل(6): محتوى الكالسيوم (ppm) في السلالات الخلوية المدروسة للديجتالس الأرجواني

تظهر نتائج الجدول(3) والشكل(6) وجود فروقات معنوية بين السلالات الخلوية المدروسة وبين البذور وسجلت أقل تركيز لمحتوى الكالسيوم 2095.234ppm، وسجل الضرب الخلوي DPM4 النامي في الوسط (5C01) أفضل نتيجة وتراوح محتوى الكالسيوم بين (5380.951ppm-7842.855ppm) للسلالات الخلوية المكررة ، ولوحظ وجود تباينات ضمن السلالات الخلوية المكررة في الضرب الخلوي DPM2 النامي في الوسط المغذي(B5) وسجلت السلالة الخلوية المكررة Sub-Culture- 20 أعلى تراكم في محتوى الكالسيوم 3380.949ppm ضمن هذا الوسط ، وسجلت السلالة الخلوية المكررة Sub-Culture-10 من الضرب الخلوي DPM3 النامي في

الوسط المغذي(LS) أعلى تركيز في تراكم محتوى الكالسيوم مع تراجع للسلالات الخلوية اللاحقة، يعود الاختلاف في تراكيز بعض العناصر المعدنية ضمن الوسط الواحد إلى التباينات الجسمية والتغيرات التي قد تحدث في الصبغيات أثناء النقل المتكرر للخلايا على الأوساط نفسها أو لطفرات مؤقتة قد تحدث نتيجة الحذف أو الإضافة في مستوى المورثات وتفعيل بعضها في السلالات الخلوية أو وقف تفعيلها، أو إلى تباين القدرة في امتصاص الشوارد المعدنية أو التغيرات التي قد تطرأ على الوسط نتيجة التعقيم والزراعة فيه وما يرافق ذلك من تباين في درجات الحموضة ضمن الأوساط المغذية تتفق هذه الدراسة مع أبحاث Sovetkina وآخرون (2001) حول مزارع كالوس الجنسنغ فكان محتوى الكالوس في الخط الخلوي 8 و12 أعلى بخمس مرات في محتوى الكالسيوم في جذور الجنسنغ النامي في الوسط الحي ومع دراسات Aranda-peres وآخرون(2009) على نبات الفريز Vrisea spp.

7-3-المغنيزيوم: عنصر مهم جداً في عديد من الأنزيمات المشاركة في استقلاب الكربوهيدرات والدهون والبروتينات وهو أحد العناصر المهمة في الكلوروفيل (Nisa et al.,2019)



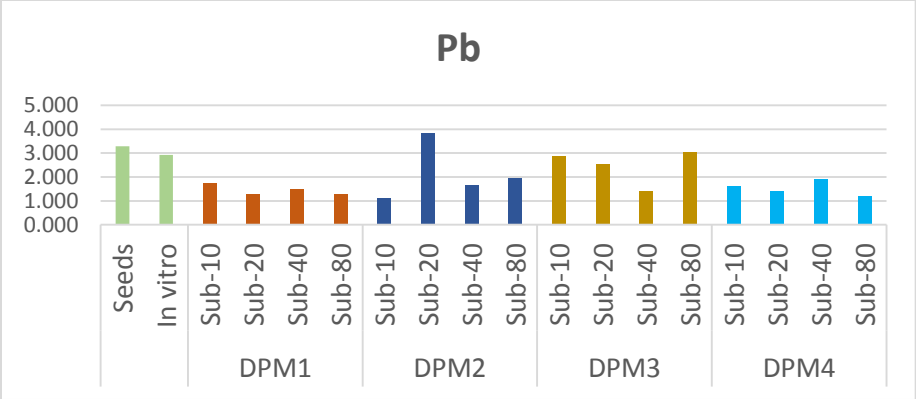
الشكل (7): محتوى المغنيزيوم (ppm) في السلالات الخلوية المدروسة للديجتالس الأرجواني

تظهر نتائج الجدول(3) والشكل(7) تباين محتوى المغنيزيوم في السلالات الخلوية المكررة المدروسة وبين الأوساط المغذية وعينات البذور والنبات النامي في الزجاج، وتفوقت السلالة الخلوية المكررة Sub-culture80 من السلالة الخلوية DPM2 النامية في الوسط(MS) معنوياً من حيث تراكمها لأعلى محتوى من المغنيزيوم 1119.8 ppm، في حين راكمت السلالة الخلوية المكررة Sub-culture80 من السلالة الخلوية DPM4 النامية في الوسط المغذي(5C01) أقل مستوى تراكمي بمحتوى يقدر 660.21ppm، وتظهر النتائج تراكم محتوى المغنيزيوم في بعض السلالات الخلوية المكررة الأخرى تراكماً يفوق عينة النبات النامي في الزجاج والبذور.

تتفق هذه النتائج مع نتائج أبحاث Sovetkina وآخرون(2001) حول إظهار بعض خطوط كالوس الجنسنغ قدرات عالية لتراكم المغنيزيوم، وتتقارب هذه النتائج مع دراسات Adeyeye(2005) حيث أظهر المغنيزيوم Mg نتائج تركيز أعلى في الكالوس من الجذر وقد تعود الاختلافات وفقاً لمتطلبات النبات والجزء المدروس منه، وفي عباد الشمس كان المغنيزيوم أقل بخمس مرات في الكالوس عنه في النبات الأساسي وكان في الوسط الحي بين 563-822 مغ/ 100 غرام من المادة الجافة (Sarica et al.,1997).

8-3-الرصاص: أحد المعادن الثقيلة، لا يستخدم الرصاص والزئبق والكادميوم والالمنيوم في التوازن الخلوي لأنها عناصر سامة للنباتات حتى بكميات صغيرة (Page et al., 2006) فالتأثيرات السامة لأيونات هذه المعادن ليس فقط في البنية الدقيقة للخلايا ولكن أيضاً على المستوى الجزيئي أي في التعبير عن مورثات معينة أو تعطيلها والتغيرات في الحمض النووي وما يترتب عليها في النسخ والتخليق الحيوي لبعض البروتينات والمركبات الثانوية (Nawrot-Chorabik,2017).ويكون معدل التثبيط في التكوين للعناصر الكبرى وفق الترتيب التالي Cd>Pb>Cu>Zn (Agrawal and Sharma,2006).

أظهرت نتائج الجدول(3) والشكل(8) وجود تباين في محتوى الرصاص في السلالات الخلوية المكررة وفي النبات المزروع والبذور ولكنها كانت ضئيلة جداً ولا تتجاوز الحد الأقصى المسموح به، تتفق هذه النتائج مع نتائج أبحاث Sovetkina وآخرون(2001) حول محتويات الرصاص في مزارع الكالوس والجذور لنبات الجنسنغ، وتظهر نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروقات معنوية ذات دلالة إحصائية في مستوى الأوساط المغذية المدروسة.



الشكل رقم(8): محتوى الرصاص (ppm) في السلالات الخلوية المدروسة للديجتالس الأرجواني

3- الإستنتاجات Conclusions

1- تتباين محتويات السلالات الخلوية لكالوس الديجتالس الأرجواني من العناصر المعدنية بسبب إختلاف نوعية الشوارد المعدنية المكونة للأوساط المغذية وبإختلاف نوع منظمات النمو النباتية وتركيزها.

2- تتباين محتويات السلالات الخلوية المكررة على مستوى الوسط المغذي وهذا التباين عائد الى التباينات الجسمية التي قد ترافق إعادة الزرع للسلالات الخلوية للكالوس.

3- يعد الكالوس مصدراً مهماً في تحفيز وتراكم العناصر المعدنية ما يجعل من الزراعة الخلوية مصدر مستقبلي هام للتوليف الأخضر للمعادن.

4-التوصيات والمقترحات Recommendations and Suggestions

- نوصي باستخدام الكالوس في إنتاج العناصر المعدنية الهامة واختيار الأوساط المناسبة التي تعمل على انتاج مستقر ومتسق منها.
- نوصي بضرورة استخدام جهاز طيف الإمتصاص الذري في مخابر الرقابة الدوائية والمقاييس وضبط الجودة وذلك لتحليل الأثر المتبقي من المعادن في الأدوية والمتممات الغذائية العشبية وكذلك المنتجات الغذائية.
- نقترح إلزام المصانع الدوائية والغذائية بإرفاق شهادة خلو للأثر المبتقي للمعادن في المنتجات ذات الطابع العشبي او التي تحتوي نباتات في احدى مكوناتها.

معلومات التمويل :
هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

References :

1. Abbasi, B., & Anjum, S. (2016). Thidiazuron-enhanced biosynthesis and antimicrobial efficacy of silver nanoparticles via improving phytochemical reducing potential in callus culture of Linum usitatissimum L. International Journal of Nanomedicine,715. doi:10.2147/ijn.s102359
2. Adeyeye, E. (2005). Distribution of major elements (Na, K, Ca, Mg) in the various anatomical parts of fadama crops in ekiti state, Nigeria. Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia,19(2). doi:10.4314/bcse.v19i2.21123
3. Agrawal, V., & Sharma, K. (2006). Phytotoxic effects of Cu, zn, Cd and PB on in vitro regeneration and concomitant protein changes in Holarrhena Antidysenterica. Biologia Plantarum,50(2), 307-310. doi:10.1007/s10535-006-0027-z
4. Aranda-Peres, A. N., Pereira Peres, L. E., Higashi, E. N., & Martinelli, A. P. (2009). Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three Vriesea bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest: The importance of calcium. HortScience,44(1), 106-112. doi:10.21273/hortsci.44.1.106
5. Besford, R. T., & Maw, G. A. (1974). Uptake and distribution of potassium in tomato plants. Plant and Soil,41(3), 601-618. doi:10.1007/bf02185819
6. Bolda, V. V., Botau, D., Szôllôsi, R., Petô ,A., Gallé, Á., Tari,I.(2011) .Studies on elemental composition and antioxidant capacity in callus cultures and native plants of Vaccinium myrtillus L. local populations , Volume 55(2):255-259
7. Chen, S., Troy, K., Dipen, P. P., Satinder, Y., & Amy, W. (2015). Digoxin Use in Modern Medicine US Pharmacist. 40(2), 44-48.
8. Cho, J., Lee, Y. J., Kim, J., Kim, S. I., Kim, S. S., Choi, B., & Choi, J. (2020). Antiviral activity of digoxin and Ouabain against SARS-COV-2 infection and its implication for covid-19. https://doi:10.21203/rs.3.rs-34731/v1
9. Clark, R. B. (1983). Plant genotype differences in the uptake, translocation, accumulation, and use of mineral elements required for plant growth. Genetic Aspects of Plant Nutrition,49-70. doi:10.1007/978-94-009-6836-3_5
10. Dafalla, A., Abdalla, H.(2014). Determination the minerals contents of the roots of four medicinal plants as Asaudian indigenous plants using flame atomic absorption spectroscopy (FAAS) .J Chem Pharm Res .4-101:(11)6.
11. Durlacher, C. T., Chow, K., Chen, X., He, Z., Zhang, X., Yang, T., & Zhou, S. (2015). Targeting na+/k+-translocating adenosine triphosphatase in cancer treatment. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology,42(5), 427-443. https://doi:10.1111/1440-1681.12385
12. Epstein, E.(1972) . Physiological genetics of plant nutrition. In: Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. John Wiley and Sons, New York: 325-344.
13. Evans, W. C., & Evans, D. (2009). The scope and practice of Pharmacognosy. Trease and Evans' Pharmacognosy, 5-7. doi:10.1016/b978-0-7020-2933-2.00002-2
14. Goldthorp, W. O. (2009). An account of the foxglove. BMJ, 338(1393). doi:10.1136/bmj.b2189
15. Hirschi, K. D. (2004). The calcium conundrum. both versatile nutrient and specific signal. Plant Physiology,136(1), 2438-2442. doi:10.1104/pp.104.046490
16. Karpiuk, U. V., Al Azzam, K. M., Abudayeh, Z. H., Kislichenko, V., Naddaf, A., Cholak, I., & Yemelianova, O. (2016). Qualitative and quantitative content determination of macro-minor elements in Bryonia Alba L. roots using flame atomic absorption spectroscopy technique. Advanced Pharmaceutical Bulletin,6(2), 285-291. doi:10.15171/apb.2016.040
17. Lapa, A.J., Souccar, C., Lima-Landman, M., Castro, M., Lima ,T.(2003) Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Brazil: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais
18. Lindholm, P., Gullbo, J., Claeson, P., Göransson, U., Johansson, S., Backlund, A., . . . Bohlin, L. (2002). Selective cytotoxicity evaluation in anticancer drug screening of fractionated plant extracts. SLAS Discovery, 7(4), 333-340. doi:10.1177/108705710200700405

19. López-Lefebre, L. R., Rivero, R. M., García, P. C., Sánchez, E., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2001). Effect of calcium on mineral nutrient uptake and growth of tobacco. Journal of the Science of Food and Agriculture,81(14), 1334-1338. doi:10.1002/jsfa.948
20. Mezei, S., Saric, M., Pajevic, S., Kovacev, L. (1995). Concentration of mineral elements in callus tissue cultures of two sugarbeet (Beta vulgaris L.) cultivars. Arch.Biol.Sci., Belgrade, 47 (1-2): 29-32
21. Monica, R. C., & Cremonini, R. (2009). Nanoparticles and higher plants. Caryologia,62(2), 161-165. https://doi:10.1080/00087114.2004.10589681
22. Nawrot-Chorabik, K. (2017). Response of the callus cells of fir (abies nordmanniana) to in vitro heavy metal stress. Folia Forestalia Polonica, 59(1), 25-33. doi:10.1515/ffp-2017-0003
23. Negi, J., Bisht, V., Bhandari, A., & Sundriyal, R. (2012). Determination of mineral contents of Digitalis purpurea L. and Digitalis Lanata Ehrh. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 12(3), 463-470. doi:10.4067/s0718-95162012005000008
24. Niamat, R., Khan, M.A., Khan, KY., Ahmad, M., Ali, B., Mazari, P.(2012). Element Content of Some Ethnomedicinal Ziziphus Linn. Species Using Atomic Absorption Spectroscopy Technique .J Appl Pharm Sci.100-2:96
25. Nisa, Z., Shah, S. H., Farooq, G., Sajad, M. A., & Khan, M. S. (2019). Distribution and comparison of major selected elements in root of wild plant, root derived calli and various anatomical parts of cultivated Saussurea Lappa: An endangered medicinal plant. Pure and Applied Biology,8(2). doi:10.19045/bspab.2019.80087
26. Page, V., Weisskopf, L., & Feller, U. (2006). Heavy metals in White Lupin: Uptake, root- to- shoot transfer and redistribution within the plant. New Phytologist,171(2), 329-341. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01756.x
27. Platz, E. A., Yegnasubramanian, S., Liu, J. O., Chong, C. R., Shim, J. S., Kenfield, S. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., Giovannucci, E., & Nelson, W. G. (2011). A Novel Two-Stage, Transdisciplinary Study Identifies Digoxin as a Possible Drug for Prostate Cancer Treatment. Cancer Discovery, 1(1), 68–77. https://doi.org/10.1158/2159-8274.cd-10-0020
28. Rajurkar, N., & Damame, M. (1998). Mineral content of medicinal plants used in the treatment of diseases resulting from urinary tract disorders. Applied Radiation and Isotopes,49(7), 773-776. doi:10.1016/s0969-8043(97)00296-0
29. Reddy, A. (2001). Calcium: Silver bullet in signaling. Plant Science,160(3), 381-404. doi:10.1016/s0168-9452(00)00386-1
30. Reddy, M. P ., Kumar, N., Vijay Anand, K. G. (2010). In vitro plant regeneration of non-toxic Jatropha curcas L.: Direct shoot organogenesis from cotyledonary petiole explants. Journal of Crop Science and Biotechnology, 13(3), 189–194. https://doi.org/10.1007/s12892-010-0039-2
31. Richard ,G .O. (2002).Whatever Happened To The Scrophulariaceae. .Volume 30:2
32. Rodushkin, I., Ruth, T., & Huhtasaari, Å. (1999). Comparison of two digestion methods for elemental determinations in plant material by ICP Techniques. Analytica Chimica Acta,378(1-3), 191-200. doi:10.1016/s0003-2670(98)00635-7
33. Sarić, M. R. (1981). Genetic specificity in relation to plant mineral nutrition. Journal of Plant Nutrition,3(5), 743-766. doi:10.1080/01904168109362877
34. Saric, M., (1983). Genetic improvement of crops yields as related to plant nutrient requirements. 9th CIEC World Fertilizer Congress. Budapest, Hungary: 115-128.
35. Saric, M., Dragana,V., Lj, V., Skoric D., Snezana, M.,Slobodanka P.(1997).Concentation of Mineral Elements in Callus Tissue Culture of Some Sunflower Inbred Lines. Romanian Agricultural Research, 7-8
36. Saric, M., Krstic, B., Skoric, D .(1991). Element diversity in sun- flower inbred lines. Helia 14 (15): 41-48.
37. Saric, M., Mezei, S., Ruzic, D. (1995). Genetic aspects of mineral nutrition of plants grown in vitro. Arch.Biol.Sci., Bel- grade 47(1-2): 1-12.
38. Schröder, P., Fischer, C., Debus, R., & Wenzel, A. (2004). Reaction of detoxification mechanisms in suspension cultured spruce cells (picea abies l. karst.) to heavy metals in pure mixture and in soil eluates. Environmental Science and Pollution Research,11(6), 393-393. doi:10.1007/bf02979658

39. Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., & Waner, D. (2001). Guard cell signal transduction. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,52(1), 627-658. doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.627.
40. Serrano R.,Frazao,S. Silva,J.Gomas,E.T and Silva O.,2014. Application of microscopy to Digitalis thapsi × Digitalis purpurea natural hybrid identification. FORMATEX 377-384
41. Shelat, P. B., Plant, L. D., Wang, J. C., Lee, E., & Marks, J. D. (2013). The membrane-active tri-block copolymer pluronic F-68 profoundly rescues rat hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-induced death through early inhibition of apoptosis. Journal of Neuroscience,33(30), 12287-12299. doi:10.1523/jneurosci.5731-12.2013
42. Singh, J., Singh, T., & Rawat, M. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles via various plant extracts for anti-cancer applications. Global Journal of Nanomedicine, 2(3). doi:10.19080/gjn.2017.02.555590
43. Sovetkina, T.M., Kalenik, T.K., Bulgakov, V.P. et al. Mineral Composition of Cultured Ginseng Cells. Applied Biochemistry and Microbiology 37, 297–300 (2001). https://doi.org/10.1023/A:1010241520688
44. Stenkvist, B., Bengtsson, E., Dahlqvist, B., Eriksson, O., Jarkrans, T., & Nordin, B. (1982). Cardiac Glycosides and Breast Cancer, Revisited. New England Journal of Medicine, 306(8), 484–484. https://doi.org/10.1056/nejm198202253060813
45. Verma, S. K., Das, A. K., Cingoz, G. S., & Gurel, E. (2016a). In vitro culture of Digitalis L. (Foxglove) and the production of cardenolides: An up-to-date review. Industrial Crops and Products, 94, 20–51. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.031
46. Wang, T., Xu, P., Wang, F., Zhou, D., Wang, R., Meng, L., . . . Ouyang, J. (2017). Effects of digoxin on cell cycle, apoptosis and NF-KB pathway in Burkitt's lymphoma cells and animal model. Leukemia & Lymphoma,58(7), 1673-1685. https://doi:10.1080/10428194.2016.1256480
47. Willis, A., Memmott, J., & Forrester, R. (2000). Is there evidence for the post-invasion evolution of increased size among invasive plant species? Ecology Letters,3(4), 275-283. doi:10.1046/j.1461-0248.2000.00149.x
48. Withering, W.(2014). An Account of the Foxglove and Some of Its Medical Uses. University Press, Cambridge.
49. Zaka, M., Hashmi, S. S., Siddiqui, M. A., Rahman, L., Mushtaq, S., Ali, H., Abbasi, B. H. (2021). Callus-mediated biosynthesis of Ag and ZnO nanoparticles using aqueous callus extract of Cannabis sativa: Their cytotoxic potential and clinical potential against human pathogenic bacteria and fungi,. Green Processing and Synthesis,10(1), 569-584. doi:10.1515/gps-2021-0057
50. Zhang, X., Ding, W., Li, J., Liu, F., Zhou, X., & Tian, S. (2015). Multi-elemental analysis of Ziziphora clinoptilolites from different regions, periods and parts using atomic absorption spectrometry and chemometric approaches. Revista Brasileira De Farmacognosia, 25 (5), 465 -472. doi:10.1016/j.bjp.2015.07.021