تأثير الأوساط المغذية المعززة بمنظمات النمو النباتية في استحداث الكالوس ونموه من أوراق نبات الديجتالس الأرجواني *Digitalis purpurea*

محمد أحمد العقاب*   د. سليم زيد   د. يوسف العموري*****

الملخص

يهدف البحث الى دراسة تأثير أربعة أنواع من الأوساط المغذية الأساسية المدعمة بتراكيز مختلفة من منظمات النمو النباتية في الحصول على أعلى نسبة استحداث، ونمو للكالوس في الديجيتالس الأرجواني *Digitalis purpurea*، وتحديد التوافقات الهرمونية الأفضل. عُقمت بذور الديجيتالس الأرجواني بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم (0.5%)، استُحْدِثَ الكالوس من أوراق وسلاميات وجذور نبات الديجيتالس في أوساط **MS** (Murashige and Skoog, 1962)، **5C01** (Vollosovich et al, 1985)، (Linsmaier and Skoog, 1965) **LS**، **B5** (Gammborg, 1968) المدعم كل منها بتراكيز مختلفة من الأكسينات والسيتوكينينات.

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي تفوق الأوراق كجزء نباتي مستخدم في تحفيز تشكيل الكالوس، كما تفوق الوسط المغذي 5C01 من حيث عدد الأيام اللازمة لبدء التحفيز (5 أيام) بالمقارنة مع (9 أيام) في الوسط MS و (11 يوماً) في الوسط LS و (17 يوماً) في الوسط B5 . أما بالنسبة لمتوسط عدد الأيام اللازمة لتشكل الكالوس، فقد تفوق الوسط

---

* طالب دكتوراه، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم ، جامعة دمشق.

** أستاذ دكتور، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق.

*** دكتور، باحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق.

5C01 معنوياً بالمقارنة مع باقي الأوساط المغذية بمعدل (7، 13، 15، 21) يوماً في الأوساط 5C01، MS، LS، B5 على التولي، وتفوق الوسط المغذي 5C01 في نسبة تشكل الكالوس(95%) بالمقارنة مع 85% في وسط MS 75% في وسط LS 70% في وسط B5، غُرْبِلَتْ الأوساط المغذية المدروسة ، واختير أفضل توليفة من كل وسط من الأوساط الأساسية المدروسة وجُدِّدَت مزارع الكالوس على الأوساط المنتخبة نفسها مدة أربع نقلات متتالية (Sub-culture)، بينت النتائج تفوق الوسط (5C01) بمؤشر قوة النمو بالاعتماد على الوزن الرطب للكتلة الخلوية النامية Biomass مع وجود فروقات معنوية بالمقارنة مع أنواع الأوساط الأخرى، حيث سجل 347 غ بالمقارنة مع 329 غ في الوسط MS و 263 غ في الوسط LS و254غ في الوسط B5، كذلك تفوق الوسط 5C01 في الصفات المورفولوجية للكالوس وامتاز بقوام متماسك ولون كريمي مصفر ومظهر حبيبي.

الكلمات المفتاحية: الجزء النباتي (المنفصل)، الديجتالس الأرجواني، الوزن الجاف، الوزن الرطب، مزارع الكالوس، منظمات النمو النباتية.

The Effect of the Nutrient Medium Enhanced by Plant Growth Regulators on the Inducting and Growing of Callus from *Digitalis Purpurea* Leaves

M. Al−oqab* **Dr. S. Zaid**** **Dr. Y. Al-Ammouri*****

Abstract

This research aims to know the effect of four types of essential nutrient mediums supplemented with various concentrations of plant growth regulators for giving the highest induction rate and growth of callus in *Digitalis Purpurea* , andthe determination of the best combination of plant growth regulators, Seeds have been sterilized with sodium hypo-chloride solution with 5% concentration. Callus have been inducted from the leaves, internode and roots of Digitalis plants in nutrient medium(MS, LS, B5, 5C01),which is enhanced with different concentrations of auxins and cytokinins.

The results of the statistical analysis showed that the superiority of the leaves as an explant in stimulating the formation of callus. Also, the nutrient medium 5C01 has shown better results in terms of the number of days required for the stimulation beginning (5 days) compared with MS (9 days), LS (11 days) and B5 (17 days).

Further, the 5C01 nutrient medium has shown superiority in terms of the average number of required days for producing callus compared with the other nutrient mediums in a daily rate of (7,13,15,21) in the nutrient mediums(5C01, MS, LS, B5) respectively. The nutrient medium (5C01)

* Postgraduate Student (PhD), Dept. of Botany, Faculty of Science, University of Damascus.

** Prof in Dept. of Botany, Faculty of Science, University of Damascus.

*** Dr in National Commission For Biotechnology, Damascus.

also showed superiority in callus formation ratio(95%) compared to MS (85%), LS (75%) and B5(70%).
The studied nutrient mediums were screened and the best combination was selected from each of the essential nutrient mediums that were studied, and the Callus cultures were regenerated on the same selected media for four successive transfers (sub-culture).
The results showed that 5C01 nutreint medium was superior in terms of growth index according to wet weight of biomass with significant differences compared to the other nutrient mediums, where it record 347 g compared to 329 g in MS , 263g in LS, 254g in B5.
The 5C01 nutrient medium also excelled in the morphological characteristics of the callus, it has a coherent texture with creamy yellowish color and a grainy appearance.

Kay Words: Callus cultures , *Digitalis Purpurea* **,** Dry weight , Explant , Plant Growth Regulators, Wet weight.

1. المقدمة

ينتمي نبات الديجتالس الأرجواني *Digitalis Purpurea* إلى الفصيلة الحملية Plantaginaceae (Richard.,2002)، وهو نبات عشبي سنوي (حولي أو ذو حولين)، تعد البلقان وشرق القوقاز وأوروبا الغربية وتركيا واليابان والهند موطناً أصلياً له (Verma *et al.*,2016)، في حين يزرع في عدد من دول حوض المتوسط وكندا.

لنبات الديجتالس الأرجواني عدد من الاستخدامات الطبية ذات القيمة العالية في التصنيع الدوائي، وأُدْخِلَت ورقة الديجتالس الأرجواني في دستور الأدوية بلندن عام 1650م (Serrano *et al.*,2014)، وكانت أولى تجارب الاستخدام الموثوق له في عام 1785م كعلاج لمرضى القلب (Goldthrop,2009; Withering,2014)، إذ يحتوي على غلوكوزيدات قلبية مثل الديجوكسين Digoxine المستخدم في معالجة قصور القلب الاحتقاني Congestive heart failure (CHF)، وقد وافقت عليه إدارة الدواء والغذاء الأمريكية FDA عام 1990 كعلاج لفشل القلب Heart failure وفي علاج الرجفان الأذيني Atrial fibrillation، وفي تنظيم ضربات القلب، وذلك عن طريق تأثيره في مضخة الصوديوم – بوتاسيوم، وتأثيره في العصب الحائر أو المبهم (Chen *et al.*,2015). كما يساعد في التقليل من احتباس السوائل لدى المرضى الذين يعانون من الاستسقاء أو الوذمة (Francis,2008).

وفي مطلع الثمانينات نشر (Stenkvist *et al.*, 1979a,b,1982) دراسات حول الفعالية الإيجابية للديجوكسين في معالجة سرطان الثدي، في حين تحدد الدراسات الحديثة الديجوكسين Digoxine كدواء محتمل في علاج سرطان البروستات (Platz *et al.*,2011). ويحدد المرجع الدوائي السوري الديجوكسين كدواء لمرضى القلب.

يتكاثر الديجتالس الأرجواني بالبذور، لكنها طريقة غير فعالة في إنتاج مخزون كافٍ من المادة النباتية اللازمة لاستخلاص المركبات الفعالة، إضافة الى الأضرار الناتجة عن الجمع العشوائي للنبات، وتعد طرق الإكثار التقليدي للديجتالس بالبذور طرقاً غير مجدية،

إذ تكون محفوفة بالمخاطر وبنسبة إنبات منخفضة (Verma *et al*., 2016)، وقد استعرض (Probert *et al*.,2007) بعض الصعوبات التي تؤثر في جودة البذور والمرتبطة بفترة الجمع وطرق المعالجة وشروط التخزين، وعلى الرغم من تحسن إنبات بذور النبات بوساطة الإماهة (Butler *et al*.,2009) فإن الكثير من البذور تظهر السكون، وقد تفشل بعض البذور في الإنبات حتى في الظروف المثالية، ويمكن أن يعزى ذلك إلى عوامل داخلية تتحكم في السكون، بما في ذلك الهرمونات النباتية التي تحفز السكون مثل حمض الأبسيسيك (ABA)، وعوامل متعلقة بغـلاف البذرة (Holdsworth *et al*. 2008; Linkies and Leubner-Metz., 2012)، وللتغلب على هذه المشكلات استخدمت حديثاً بعض طرائق التقانات الحيوية لتحقيق الإكثار السريع والفعال للكثير من النباتات الطبية كالزراعة النسيجية (Nehra *et al*., 2005; Nikam and Barmukh., 2009). والتي تمتاز بمزايا كثيرة بالمقارنة مع طرق الزراعة التقليدية، والتي من أهمها تجاوز القيود الموسمية والظروف البيئية اللازمة لنمو النبات، والوصول الى معدلات مثلى في إكثار النبات عن طريق التحكم بمكونات الوسط، ومن ثمَّ التحكم بزيادة إنتاج المواد الفعالة بيولوجياً بوساطة الإضافات المغذية والمعززة للنمو.

تأتي أهمية الزراعة النسيجية لنبات الديجتالس الأرجواني نظراً لأهميته الطبية الدستورية، مما يسهل التضاعف السريع للطرز الوراثية المثلى واستخلاص الغلوكوزيدات القلبية منها كمصدر رئيس للديجوكسين Digoxine والديجتوكسين Digitoxine، في ظل تعقيدات البنية الهيكلية للغلوكوزيدات القلبية واستحالة تركيبها كيميائياً رغم التطور الكيميائي والصناعي (Verma *et al*.,2016)، حيث تقدم الزراعة النسيجية أداة قيمة لإنتاج هذه المركبات كبديل عن المصادر النباتية بالطرائق التقليدية لعدد من المركبات الكيميائية المهمة التي يستحيل تركيبها والحصول عليها بطرق التصنيع الكيميائي والتي تمتاز بهياكل ومسارات تركيب أو تخليق معقدة (Siatka.,2019).

تعد الأوكسينات Auxines والسيتوكينات Cytokinines من أهم العوامل المحددة لإنتاج هذه المركبات الكيميائية النباتية المهمة دوائياً في مزارع الأنسجة النباتية ،فنوع منظمات النمو المضافة إلى الوسط المغذي المستخدم و تركيزها تعد عاملاً محدداً في نمو المزرعة النسيجية وتمايزها، وفي تخليق نواتج الاستقلاب الثانوية (Shilpa *et al*.,2010).

ونظراً لأهمية جنس الديجتالس فقد ركزت الأبحاث في العقدين الأخيرين على طرق تجديد الكالوس على أوساط مغذية مختلفة وبتراكيز مختلفة من منظمات النمو بهدف الحصول على الغلوكوزيدات القلبية، حيث تم حث و نمو وتجديد الكالوس للديجتالس الصوفي *Digitalis lanata* على وسط موراشيج وسكوج MS (Bosila *et al.* ,2003 ;Fatima et al.,2009)، وكذلك النوع *Digitalis lamarckii* على وسط LS (Linsmaier and Skoog) (Yucesan *et al*.,2013) وقام كلٌ من Verma وزملائه (2016) بحث (تحفيز) وتجديد الكالوس من مزارع البذور والجذور للديجتالس الأرجواني على الوسط MS وباستخدام تراكيز مختلفة من الأوكسينات كثنائي كلورو فينوكسي حمض الخل 2.4D و نفتالين حمض الخل NAA ، وثنائي بنزوثيازول أوكسي حمض الخل BTOA.

2. أهداف البحث:

يهدف البحث إلى:

- دراسة استجابة الكالوس وسلوكه على عدد من الأوساط المغذية المختلفة بتركيبها من العناصر الغذائية ومنظمات النمو النباتية.
- غربلة الأوساط المغذية المدروسة وانتخاب أفضل التوافقات الهرمونية لاعتمادها في تنفيذ تجارب البحث الكيميائية والجزيئية والخلوية اللاحقة.

3. مواد البحث ، وطرائقه Materials and methods :

3 .1. مكان تنفيذ البحث: نُفذ البحث في مخبر بيوتكنولوجيا النباتات الطبية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية ومخابر قسم علم الحياة النباتية بكلية العلوم/ جامعة دمشق/ في الفترة الممتدة بين 2020-2018م.

3 .2. المادة النباتية:

1.2.3. تطهير البذور وتحضيرها للزرع: حُصِلَ على بذور نبات الديجيتالس من شركة HORTUS، غُمرت كمية كافية من البذور في الكحول الإيتيلي (70%) مدّة دقيقة واحدة، ثمّ عُقمت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) (0.5%) مدّة 5 دقائق ، ثمّ غُسلت بعدها بالماء المقطر المعقّم ثلاث مرّات متتالية بمعدل 5 دقائق في كل مرّة، وتُركت مكشوفةً مدّة 30 دقيقة تحت جهاز العزل الجرثومي حتى جفت هوائياً وأصبحت جاهزة للزرع.

زُرِعَت بعد ذلك البذور بمعدّل بذرة واحدة في كل أنبوب، وذلك باستعمال وسط الزراعة الأساسي (MS) الخالي من منظمات النمو، وحُضنت الأنابيب في الظلام عند درجة حرارة 2± 24 مْ حتى إنبات البذور، بعدها حُضنت النبيتات النامية بظروف 16 ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام بالتناوب مدة 30 يوماً، ثمّ أُعيدت زراعتها عدة مرات على الوسط المغذي نفسه لتأمين المادة النباتية الكافية لتجارب استحداث الكالوس.

3.3. استحداث الكالوس:

3.3.1 تحضير الأوساط المغذية: حُضِّرَتْ الأوساط المغذية (Murashing and skoog,1962) **MS** و**B5** (Gammborg,1968) و**LS** (Linsmaier and Skoog,1965) و**5C01** (Vollosovich *et al.*,1985)، والمضاف إليها منظمات النمو النباتية (الكينتين Kin، 6– بنيزيل أمينو بيورين BAP، بنزيل أدنين BA، 2.4 ثنائي كلوروفينوكسي حمض الخل 2.4D ، نفتالين حمض الخل NAA، أندول حمض الخل IAA) بتراكيز متدرجة (0.25، 0.5، 1، 2) ملغ / ليتر لكل منها، وُزِّعَتْ في أنابيب اختبار زجاجية من نوع بيريكس قياس25×150 مم وبحجم15 مل لكل أنبوب. أُغْلِقَتْ الأنابيب بسدادات قطنية محكمة، وعُقِّمَت بالأوتوكلاف Autoclave عند درجة حرارة 121 درجة مئوية مدة 20 دقيقة ، وتُرِكَت لتبرد حتى تصبح جاهزة للزرع. والجدول (1) يوضح تركيب الأوساط المغذية الأربعة الأساسية المستخدمة في الدراسة.

3.3.2 طريقة الزرع: فُصِلَتْ الأجزاء النباتية Explants (أوراق وسلاميات وجذور النبيتات الناتجة من مرحلة الزراعة النسيجية التأسيسية بعمر ثلاثة أسابيع)، وقُسِّمِتها قطعاً صغيرة، وجُرِّحَتْ باستخدام المشرط. ومن ثم زراعة 80 مكرراً لكل مستأصل نباتي ولكل توليفة هرمونية موزعة على أربعة مكررات وبواقع 20 أنبوباً لكل مكرر، وفي ظروف شديدة التعقيم تحت جهاز العـزل الجرثومي من نوع JSCR-1200 SB.

الجدول (1) تركيب الأوساط المغذية الأساسية المستخدمة في استحداث كالوس نبات الديجيتالس الأرجواني

Composition	MS Medium mg/L	LS Medium mg/L	B5 Medium mg/L	5C01 Medium mg/L
NH4NO3	1650.000	1650.000		500.000
CaCl2	440.000	332.200	113.230	
MgSO4	370.000	180.690	121.560	500.000
KNO3	1900.000	1900.000	2500.000	1100.000
H_3BO_3	6.200	6.200	3.000	6.200
CoCl.6H2O	0.025	0.025	0.025	0.025
CuSO4.5H2O	0.025	0.025	0.025	0.025
Na_2 .EDTA	37.300	37.300	36.700	37.250
MnSO4.H2O	22.300	16.900	10.000	24.100
$Na_2MoO_4.2H_2O$		0.213	0.250	0.250
KI	0.830	0.830	0.750	0.830
ZnSO4.7H2O	8.600	8,600	2.000	10.620
KHPO4	170.000	170.000		
FeSO4.7H2O	27.800	27.800		27.850
NaH2PO4			130.44	
(NH4)2SO4			134.000	300.000
KCl				70.000
$Ca(NO_3)_24H_2O$				900.000
$(NH_4)_2H_2PO_4$				100.000
$NH_4.H_2PO_4$				600.000
myo-Inositol	100.000	100.000		80.000

Vit. B1	0.500	0.400		1.000
Vit. B6	0.500			0.500
P.P	0.500			0.500
Casein				500.000
Glycine	2.000			2.000
Agar	7.000	7.000	7.000	7.000
Sucrose	30,000	30,000	30,000	50,000

حُضنت الأنابيب بعد زراعتها في الظلام في درجة حرارة 25±1 درجة مئوية ومدة 21 يوماً لاستحداث الكالوس، سُجِّلَتْ الملاحظات المتعلقة بالصفات المدروسة في فترة التحضين، وهي عدد الأيام اللازمة لبدء ظهور التحفيز (بدء ظهور الانتفاخات في المنفصل النباتي المزروع)، وعدد الأيام اللازمة للتشكل (تشكل الكتل الخلوية غير المتمايزة)، وشكل الكالوس (حبيبي، غير حبيبي)، وقوامه (متماسك، نصف متماسك، غير متماسك، مائي)، ولونه (أبيض، كريمي، أصفر، بني، أخضر). كما سُجِّلَتْ نسبة الاستجابة (نسبة تشكل الكالوس أو استحداثه) في نهاية فترة التحضين حسب المعادلة الآتية (Namdeo *et al*.,2006):

$$\text{نسبة التشكل} \ (\%) = \frac{\text{عدد المستأصلات النباتية التي كونت كالوس}}{\text{عدد المستأصلات النباتية الكلي المزروعة}} \times 100$$

3.3.3. انتخاب أفضل توافق هرموني من كل وسط مغذٍّ: انتُخِبَت أربعة توافقات هرمونية في نهاية المرحلة السابقة بناء على نسبة استحداث الكالوس وعلى معايير شكلية تتعلق بلون الكالوس وقوامه وقوة نموه بواقع توافق هرموني واحد من كل وسط من الأوساط الأربعة المستخدمة (MS, LS, B5, 5C01)، جُدِّدَتْ مزارع الكالوس المنتخبة (Sub-Culture) على الأوساط نفسها باستخدام دوارق زجاجية من النوع (بيريكس) بسعة 250 مل يحوي كل منها

100 مل وسطاً مغذياً مدة أربع نقلات متتالية، وذلك لضمان تأقلمها وتكيفها مع الأوساط، تم بعدها مقارنة الصفات الشكلية ومعدل نمو الكالوس فيما بينها.

عُبِّرَ عن معدل نمو الكالوس عن طريق حساب الوزن الرطب والجاف للكتلة الخلوية المتشكلة بعمر 21 يوماً لمزرعة الكالوس، حيث سُجِّل الوزن الرطب (غ) للكالوس النامي من كل توافق هرموني بواقع خمسة دوارق، وبمعدل ثلاثة مكررات، ثمّ حُسب الوزن الجاف للكالوس بعد تجفيفه في فرن كهربائي Oven على درجة حرارة 50 م° حتى ثبات الوزن باستعمال الميزان الالكتروني الحسّاس.

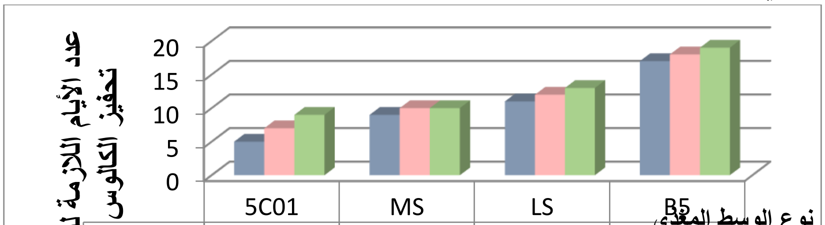
4.3. تصميم التجارب والتحليل الإحصائي Experiments design and statistical analysis:

نُفذت جميع التجارب باستعمال التصميم العشوائي التام Completely Randomized Design (CRD)، بمعدّل 3 مكررات، وحُلِّلَتْ البيانات بعد تبويبها باستعمال برنامج التحليل الإحصائي Mstat-C لحساب قيم أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى المعنوية 0.01%، وقيم معامل التباين (CV%).

4. النتائج والمناقشة:

4.1. بدء تحفيز الكالوس Callus induction: أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية بين أنواع المنفصلات النباتية المستخدمة في تأسيس مزارع الكالوس من جهة، وبين توافقات منظمات النمو المستخدمة في الأوساط المغذية من جهة أخرى بالنسبة لمؤشر بدء تحفيز الكالوس، حيث سجل أقل متوسط لعدد الأيام اللازمة لبدء التحفيز عند استخدام الأوراق كمنفصل نباتي بمقدار (5، 9، 11، 17) يوماً في الأوساط (5C01، MS، LS، B5) على التوالي مع وجود فروقاتٍ معنوية فيما بينها كما يبين الشكل (1)، في حين كان أعلى متوسط لعدد الأيام اللازمة لبدء التحفيز عند استخدام الجذور كمنفصل نباتي بمقدار (9، 10، 13، 19) يوماً في الأوساط (5C01، MS، LS، B5) على التوالي مع وجود فروقاتٍ معنوية فيما بينها، ومع ملاحظة عدم تحفيز الكالوس في بعض

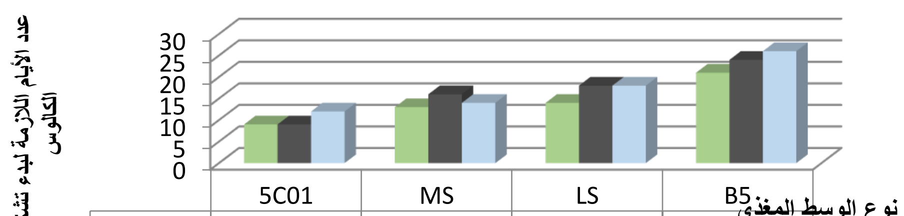
المكررات، تفسر الفروق المعنوية في سرعة بدء تحفيز الكالوس بين المنفصلات النباتية اعتماداً على الطاقة الكامنة ونوع الأنسجة المكونة للمنفصل النباتي وعدد الخلايا القادرة على الانقسام (محمد وعمر، 1990)، فضلاً عن مستويات التركيز الكلي للأوكسينات والسيتوكينينات (الهرمونات النباتية الداخلية ومنظمات النمو المضافة)، إذ يؤثر ذلك بدور حاسم في استجابة الأجزاء النباتية لاستحداث الكالوس (Mastuti *et al.*,2017)



	5C01	MS	LS	B5
الاوراق	5	9	11	17
السلاميات	7	10	12	18
الجذور	9	10	13	19

الشكل (1): عدد الأيام اللازمة لبدء تحفيز الكالوس على الأوساط المغذية المدروسة باستخدام المنفصلات النباتية

2-4- بدء التشكل Callus formation: أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية بين أنواع المنفصلات النباتية المستخدمة في تأسيس مزارع الكالوس من جهة وبين توافقات منظمات النمو في الأوساط المغذية من جهة أخرى بالنسبة لصفة بدء تشكل الكالوس، حيث سجل أقل متوسط لعدد الأيام اللازمة لبدء التشكل عند استخدام الأوراق كمنفصل نباتي بمقدار (9، 13، 14، 21) يوماً في الأوساط (5C01، MS، LS، B5) على التوالي مع وجود فروقاتٍ معنوية فيما بينها كما يبين الشكل (2)، في حين كانت أعلى متوسط لعدد الأيام اللازمة لبدء التشكل عند استخدام الجذور كمنفصل نباتي بمقدار (12، 14، 18، 26) يوماً في الأوساط (5C01، MS، LS،B5) على التوالي مع وجود فروقاتٍ معنوية فيما بينها ومع ملاحظة عدم تشكل الكالوس في بعض المكررات.



	5C01	MS	LS	B5
الاوراق	9	13	14	21
السلاميات	9	16	18	24
الجذور	12	14	18	26

الشكل (2) عدد الأيام اللازمة لبدء تشكل الكالوس على الأوساط المغذية المدروسة باستخدام المنفصلات النباتية

يُلاحظ من النتائج بأنّ الأوراق أظهرت أفضل استجابة من حيث بدء التحفيز والتشكل، كما تختلف سرعة التحفيز والتشكل ضمن الوسط الواحد باختلاف التركيز المستخدم من منظمات النمو. وقد أوضح Davies (2004) أهمية إضافة منظمات النمو في زيادة معدّل انقسام الخلايا النباتية واستطالتها ، وأهمية التوزان الهرموني في تحفيز الكالوس. وقد ذكر Centeno وزملاؤه (1996) أهمية منظمات النمو في نمو أنسجة الكالوس وتمايزها عن طريق الدور المباشر للأوكسينات في توسيع الخلية النباتية و زيادة نفاذيتها ومرونتها، ودور السيتوكينينات في انقسام الخلايا، وفي تصنيع بعض البروتينات المهمة، وتكوين RNA.

4-3- نسبة استحداث الكالوس: من النتائج المبينة أعلاه بالنسبة لمؤشر بدء التحفيز والتشكل فقد اعتُمِدَتْ نتائج الأوراق كمنفصلات نباتية واستبعاد نتائج باقي أنواع المنفصلات النباتية، تشير الدراسات إلى التأثير الكبير للوسط المغذي في نشوء الكالوس وإدامته اعتماداً على مكونات الوسط المغذي من جهة وعلى نوع المنفصل النباتي ومصدره من جهة أخرى (Ajungla *et al.*,2009).

1-3-4- نسبة استحداث الكالوس على الوسط المغذي MS:

تظهر النتائج المبينة في الجدول (2) تميز التوافق الهرموني (2 ملغ/ل من 2.4D +1ملغ/ل من BA) المضاف إلى وسط MS عن التوافقات الأخرى بأعلى نسبة استحداث للكالوس

وصلت حتى 85% وبفروق معنوية بالمقارنة مع باقي التوافقات، في حين أعطت كل من التوافقات الهرمونية (0.25 ملجم من 2.4D +1ملغ من BA) و (0.25 ملغ من 2.4D +2 ملغ من BA) و (0.25 ملغ من IAA+ 2 ملغ من K) و (25.0 ملغ من IAA+ 2 ملغ من BA) و (0.5 ملغ من IAA+ 2 ملغ من BA) أقل نسبة استحداث للكالوس بمقدار 5%، تتطابق هذه النتائج مع نتائج (Abd el-hameid *et al.*,2020) حول استحداث مزارع الكالوس للنوع *Zingiber officinale*، ونتائج (Zang *et al.*,2016) على نبات الخيزران الأسيوي *Dendrocalamus hamiltonii*، ونتائج (Bosila *et al.*,2003) حول تأثير (2.4D+BA) في استحداث الكالوس في النوع *Digitalis lanata*.

تعزى فعالية الـ (2.4D) في تحفيز وتكوين الكالوس في وسط MS إلى خصائصه الرئيسة التي تحفز الانقسام الخلوي للأنسجة النباتية وتثبط تكوين الأعضاء(Nurul *et al.*, 2016)، كما أن 2,4-D شديد المقاومة للهدم الأنزيمي ومقاوم للارتباط بالمواد الأخرى، ومن ثمَّ لا يكون معقدات غير نشطة (صقر، 2019).

كما تظهر النتائج في الجدول (2) أن أقل استجابة لاستحداث الكالوس كانت في التوافقات الهرمونية التي كان فيها تركيز السيتوكينينات أعلى من الأوكسينات ، حيث توجه هذه التوافقات المنفصلات النباتية نحو تشكل الأجنة الجسدية المباشرة Direct Somatic Embryogenesis نتيجة اختلال التوازن بين الأوكسينات والسيتوكينينات في الوسط مما يوجه عملية الانقسام والتمايز نحو تأثير الهرمون الأكثر تركيزاً، فالتراكيز العليا من الأوكسينات تؤدي الدور الأهم في استحداث الكالوس (Basakaran *et al.*,2006) لما لها من تأثير فيزيولوجي مباشر في زيادة الأسموزية ومعدل النفاذية الخلوية، ومن ثمَّ تعديل النظام الأسموزي وزيادة معدل نسخ المادة الوراثية وتكوين بروتينات جديدة (Rossignol *et al.*, 1990).

الجدول (2) نسبة استجابة استحداث الكالوس في وسط MS المعزز بمنظمات النمو النباتية

BAP		BA											
		0.25	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2
NAA	0.25	25	20	15	15	30	25	10	10	20	20	15	15
	0.5	35	30	25	10	40	30	10	10	25	20	20	15
	1	50	60	35	25	45	50	45	30	40	55	30	10
	2	65	65	70	25	35	50	65	40	45	60	70	80
2,4-D	0.25	20	20	10	10	25	20	10	10	20	15	5	5
	0.5	35	30	25	25	30	30	25	20	45	40	30	15
	1	50	65	45	30	45	60	50	35	55	50	50	15
	2	65	65	70	55	70	70	75	50	65	65	85	70
IAA	0.25	15	10	10	5	20	10	10	10	15	10	10	5
	0.5	20	15	15	10	20	25	15	10	20	15	10	5
	1	30	35	20	10	35	45	20	15	30	40	25	15
	2	35	40	40	25	45	45	50	35	30	30	45	30

2-3-4- نسبة استحداث الكالوس على الوسط المغذي LS:

تظهر نتائج الجدول (3) تميز التوافق الهرموني (2 ملغ BA + 2 ملغ من NAA) المضاف إلى الوسط المغذي LS بإعطاء أعلى نسبة استحداث للكالوس 75% يليه التوافق الهرموني (2 ملغ 2.4-D + 1ملغ Kin) وبمعدل 70% بالمقارنة مع أغلب التوافقات الهرمونية الأخرى، في حين أعطت التوافقات الهرمونية (2 ملغ Kin + 0.5 ملغ من NAA) و (2 ملغ BAP + 0.25 ملغ من NAA) و (2 ملغ BA + 0.5 ملغ من IAA) أقل نسبة استحداث للكالوس بمقدار (5%).

يفسر تميز التوافق الهرموني (2 ملغ BA + 2 ملغ من NAA) بوجود علاقة طردية بين تركيز الأوكسينات والسيتوكينينات في الوسط المغذي، حيث تزداد النسبة المئوية لتشكل الكالوس مع زيادة تركيز الأوكسين NAA والسيتوكينين BA إلى حد معين حسب دراسات (Shirin and Rana., 2007.; Tican *et al*., 2008.; Andreea *et al*.,2009).

وتتباين الأوكسينات في تأثيرها الفسيولوجي لأسباب تتعلق بتباين مقدرتها على الحركة في الأنسجة النباتية وارتباطها ببعض الخلايا(Anjana *et al*.,2005; Ajungla *et al*., 2009;).

الجدول (3) نسبة استجابة استحداث الكالوس في وسط LS المعزز بمنظمات النمو النباتية

PGRs		KIN				BAP				BA			
		0.25	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2
NAA	0.25	35	35	25	20	20	10	10	5	40	45	50	60
	0.5	25	20	10	5	25	25	15	10	35	45	55	65
	1	35	40	45	25	40	40	30	25	40	50	65	65
	2	35	60	55	60	35	50	50	35	45	55	55	75
2,4-D	0.25	25	20	30	25	20	20	15	15	25	25	15	10
	0.5	35	30	20	10	25	25	20	15	30	35	25	20
	1	45	50	45	25	35	30	25	25	35	40	40	35
	2	60	65	70	50	50	50	45	40	45	50	60	45
IAA	0.25	15	15	10	10	15	10	15	10	10	15	15	10
	0.5	15	20	10	10	20	15	20	15	20	15	20	5
	1	25	35	30	25	25	35	35	25	25	30	40	25
	2	35	45	55	60	30	40	55	45	35	45	55	45

يفسر تفوق NAA و2,4-D في هذا الوسط إلى القابلية العالية للخلايا على امتصاص بعض الأوكسينات (NAA ، 2,4-D) من قبل الخلية بصورة أفضل في هذا الوسط ، وربما إلى طول مدة الفعالية داخل الخلايا مقارنة مع IAA (Hartmann *et al*., 2002)، حيث أظهر الـ IAA أقل نسب استجابة في هذا الوسط، وذلك عائد إلى مقدرته على الارتباط بمكونات السيتوبلازم أو تحوله إلى مشابهات أخرى غير نشطة هرمونياً (صقر،2019)، بينما يعود تباين عمل السيتوكينينات في هذه التوافقات الى أن بعض السيتوكينينات وبوجود الأوكسينات تزيد على استجابة المنفصل النباتي لبعض منظمات النمو بدرجة أكبر من غيرها، فالتكامل بين الأوكسينات والسيتوكينينات ضروري ليشجع كلاهما عمل الآخر، حيث يكون التركيز المنشط لأحدهما ضعيفاً إذا وجد بمفرده بسبب اختلاف مواقع عمل كل منهما، فالأوكسين يعمل على مستوى التضاعف في DNA في الطور التمهيدي Prophase، بينما يعمل السيتوكينين في مرحلة متأخرة عند انقسام السيتوبلازم وفي الطور النهائي Telophase.

تتقارب هذه النتائج مع نتائج أبحاث (Yücesan *et al*.,2013) حول استحداث المزارع الخلوية ومزارع الكالوس للنوع *Digitalis lamarackii* على الوسط LS، ونتائج دراسات (Michael,2019) حول استحداث مزارع الكالوس لنبات البطاطا الحلوة .

3-4- نسبة استحداث الكالوس على الوسط المغذي B5:

تظهر نتائج الجدول (4) تميز التوافق الهرموني (2 ملغ/ل 2.4D + 1 ملغ/ لBA) المضاف إلى الوسط B5 بإعطاء أعلى نسبة استحداث للكالوس 70% وبفروقات معنوية بالمقارنة مع باقي التوافقات الهرمونية، في حين أعطت كل من التوافقات الهرمونية (0.5 ملغ/ل NAA+ 2 ملغ/ ل BAP) و(0.25 ملغ/ل 2,4-D +2 ملغ/ ل K) أقل نسبة استحداث للكالوس بمقدار (5%). تفسر النتائج السابقة بأن الأوكسين (2,4-D) يمتاز بتأثيره القوي في تشكل الكالوس في الوسط **B5** عن طريق دوره الفعال والمحفز للانقسام الخلوي.

الجدول (4) نسبة استجابة استحداث الكالوس في وسط B5 المعزز بمنظمات النمو النباتية

PGRs		KIN				BAP				BA			
		0.25	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2
NAA	0.25	15	15	10	10	20	20	15	15	25	20	20	15
	0.5	30	30	25	20	20	25	20	5	20	20	25	20
	1	30	40	35	30	30	40	40	30	40	45	30	30
	2	40	55	45	40	40	45	50	50	55	50	40	45
24D	0.25	20	20	15	5	15	15	10	10	30	35	35	40
	0.5	40	40	35	25	25	20	25	25	35	40	45	45
	1	40	55	40	30	45	40	40	30	40	45	55	55
	2	55	55	65	40	45	50	45	40	55	65	70	65
IAA	0.25	30	25	25	15	25	25	20	15	10	10	20	20
	0.5	20	15	10	10	20	25	20	20	15	20	20	25
	1	25	30	30	25	30	35	35	30	25	30	35	20
	2	35	40	45	35	40	40	45	45	35	45	55	40

ويعزى السبب في تفوق الاوساط الغذائية المحتوية 2,4-D معنوياً إلى تأثير السلسلة الجانبية في 2,4-D ، حيث وُجِد أن طبيعة مجموعات الإحلال ومكانها لها تأثير في نشاط المركب، أي أن طول السلسلة الجانبية لمجموعة الخلات المتصلة بذرة الأوكسجين المرتبطة بذرة الكربون الأولى لحلقة الفنيل قد زادت على نشاط الأوكسين، وكذلك وجود ذرتي الكلور المرتبطتين بذرة الكربون الثانية والرابعة لحلقة الفنيل فينوكسي حامض الخل زادت على نشاط هذا الأوكسين وفعاليته، مقارنة بالتركيب الحلقي لمركب NAA الذي يتكون من حلقتي فنيل، وتتصل السلسلة الجانبية لمجموعة الخلات بذرة الكربون الأولى من حلقة الفنيل (دفلن وآخرون، 1998)، وكذلك مقارنة مع IAA الذي يمتاز بسرعة تحلله وهدمه أنزيمياً وبخاصة بوجود بعض الفينولات (التي كانت الأكثر تركيزاً في هذا الوسط) والتي زادت على نشاط أنزيم الهدم IAA Oxidase (صقر، 2019). أما فعالية BA فإنها تدل على الدور التحفيزي للـ BA، لتحفيز الخلايا لامتصاص الأوكسين ، ومن ثمَّ تحفيز نمو الكالوس أكثر من BAP و Kin (Mok and Mok, 1994) في هذا الوسط. تتفق هذه النتائج مع نتائج دراسة (Lin *et al*.,2016) حول التأثير المشترك لتراكيز (2.4D+ BA) في استحداث الكالوس للنوع *Taxus chinensis Rehd*،

وعموماً امتاز الوسط المغذي B5 بأقل نسبة استحداث للكالوس، ويفسر ذلك بشكل رئيس لفقر محتواه من الأملاح بالمقارنة مع الأوساط المغذية الأخرى.

4-4- نسبة استحداث الكالوس على الوسط المغذي 5C01:

تظهر نتائج الجدول (5) تميز التوافق الهرموني (2 ملغ/ل من NAA + 1 ملغ/ل من KIN) المضاف إلى وسط 5C01 بأعلى نسبة استحداث للكالوس 95% وبفروقات معنوية بالمقارنة مع باقي التوافقات الهرمونية، في حين أعطت كل من التوافقات الهرمونية (0.25 ملغ من NAA + 2 ملغ BA) و(0.25 ملغ من IAA + 2 ملغ BA) أقل نسبة استحداث للكالوس بمقدار (5%).

الجدول (5) نسبة استجابة استحداث الكالوس في وسط 5C01 المعزز بمنظمات النمو النباتية

PGRs		KIN				BAP				BA			
		0.25	**0.5**	**1**	**2**	**0.25**	**0.5**	**1**	**2**	**0.25**	**0.5**	**1**	**2**
NAA	**0.25**	30	25	30	20	20	15	15	10	15	15	10	**5**
	0.5	35	40	45	35	20	20	25	15	25	25	20	15
	1	50	55	60	50	35	30	35	40	35	40	30	20
	2	60	70	**95**	70	45	50	40	35	50	50	65	25
2,4-D	**0.25**	25	20	20	10	25	15	10	10	15	15	10	10
	0.5	35	30	30	20	35	30	25	25	30	20	20	15
	1	45	50	45	25	45	60	50	35	35	40	35	20
	2	45	60	65	35	45	60	55	35	30	35	40	35
IAA	**0.25**	20	15	15	10	15	10	10	10	20	15	10	**5**
	0.5	25	20	15	15	25	20	10	10	30	30	25	10
	1	25	20	20	15	30	25	25	15	50	45	35	25
	2	40	40	45	20	45	45	35	25	40	45	45	35

يعزى تفوق الوسط 5C01 في إعطاء أعلى نسبة استحداث للكالوس إلى غناه بالفيتامينات والأحماض الأمينية كميوانسيتول Myo-Inositol، فيتامين ب B6، حمض النيكوتين P.P، الغلايسين Glycine، الكازئين هيدرولست Casein، المستعملة بالمقارنة مع الأوساط الأخرى المختبرة، فقد أشار الكثير من الباحثين إلى أهمية مركبات B6 وP.P و-Myo

Inositol في أوساط الزراعة النسيجية لتحقيق أفضل نمو المنفصلات النباتية المزروعة (George *et al.*,2008)، إضافة إلى غناه بعنصر الآزوت الذي يدخل في بناء الأحماض الأمينية والنووية والبروتينات والأنزيمات المساعدة (Coenzymes). وهذا يتفق مع أبحاث (Hilton and Rhodes,1994) على المزارع الخلوية لأنواع الداتورة *Datura sp*. حيث إنّ محتوى الآزوت في الوسط المغذي يعد أهم العوامل المؤثرة في درجة حموضة الوسط، ومن ثمَّ تحفيز تشكل الكالوس وتطوره في الزراعة النسيجية للكثير من النباتات (Narayan and Venkataraman,2002).

كذلك يحوي الوسط 5C01 تركيزاً مرتفعاً من السكروز Sucrose (50، غ/ليتر) بدلاً من 30 غ / ل في أوساط الزراعة الأخرى المستخدم في معظم مختبرات الزراعة النسيجية، وهذا يتوافق مع نتائج Besher وزملائها (2014) على نبات البنج *H.aureus*، حيث يعد السكروز مصدر الكربوهيدرات الأساسي للخلية النباتية ليزودها بالطاقة اللازمة للنمو والبقاء، عن طريق تحلله إلى مركبات أبسط تترافق مع تحرر (ATP) المستخدم كمصدر طاقة للمنفصل النباتي في عملياته الحيوية.

تتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج أبحاث (بشر، 2020) حول استحداث مزارع الكالوس لنبات البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus L* على الوسط المغذي 5C01 .

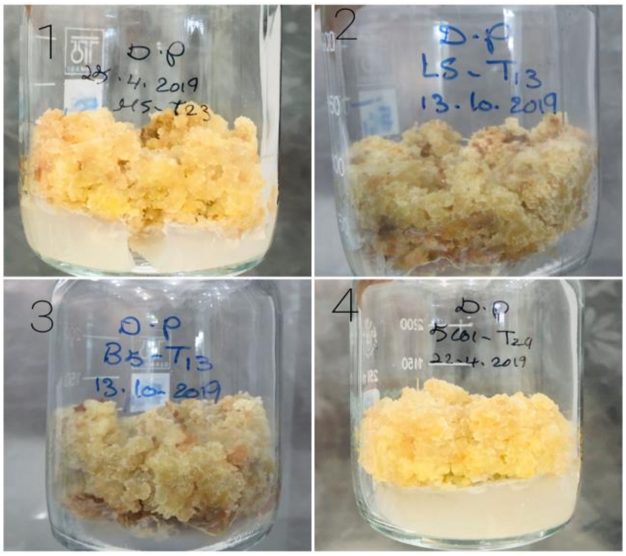
5-4- انتخاب أفضل توافق هرموني من كل وسط مغذي:

تظهر نتائج الجدول (6) أفضل التوافقات الهرمونية التي انتُخِبَتْ بناء على نسبة استحداث واستجابة الكالوس الناتج عن التراكيز المضافة إلى الأوساط المغذية المدرجة في الجداول (2, 3, 4,5) إضافة إلى مجموعة من الصفات الشكلية المتعلقة بالكالوس النامي على هذه الأوساط.

1-5-4- التوصيف الشكلي للكالوس في الأوساط المغذية المدروسة والتوافقات الهرمونية المنتخبة امتاز كالوس نبات الديجتالس *D. purpuria* بإمكانية نموه وإدامته على الأوساط الجديدة المدعمة بأفضل التوافقات الهرمونية المنتخبة، مع وجود تفاوت في صفات الكالوس الناتج لا سيما في صفة اللون والقوام، فقد وُجِد أنّ الوسط 5C01 أعطى

كالوساً بلون كريمي مصفر (وهو اللون المثالي)، في حين كان الكالوس أصفر محمر في الوسط MS مع وجود بعض البقع البنية، وبني مصفر في الوسط LS، وبني مصفر في الوسط B5 كما يوضح الشكل رقم (3).

يفسر اللون البني للكالوس بتشكل مركبات سامة أو معقدات سامة (الفينولات) في الوسط المغذي كنتيجة لعوامل عدة أهمها استخدام منظمات النمو (Ali *et al*.,2003)، نتيجة نشاط بعض الأنزيمات مثل البولي فينول أوكسيداز Poly-phenoloxidae (PPO) والبيروكسيداز Peroxidase (POD) التي تشارك في تحفيز أكسدة المركبات الفينولية واسمرار الأنسجة النباتية، و من ثمَّ فإن معدل النمو العام للخلايا ينخفض بشكل ملحوظ مع زيادة تركيز الفينولات، التي تؤدي في النهاية إلى تماوت الخلايا النباتية.



الشكل (3) كالوس نبات الديجتالس الأرجواني النامي على الأوساط المغذية المدروسة بعمر 21 يوم
1:MS, 2: LS, 3: B5, 4: 5C01

أما بالنسبة لقوام الكالوس فقد كان متماسكاً وذا مظهر حبيبي مرغوب في الوسط 5C01، ورخو ناعم غير حبيبي ونصف متماسك في الوسط MS، و ناعمٍ غير حبيبي وهشٍّ في الوسط

LS، في حين كان طرياً في الوسط B5، تتوافق هذه النتائج مع دراسات كثيرة أكدت أن التغير التدريجي في لون نسيج الكالوس وقوامه يعود لاختلاف نوع منظمات النمو المستخدمة وتركيزها ضمن الأوساط المغذية، حيث يتباين لون الكالوس الناتج مخبرياً بين الأبيض والكريمي والأخضر والأصفر بتدرجاته، وكذلك الأمر بالنسبة لقوام الكالوس، فقد يتدرّج بين الهش والطري والقطني والمتماسك (Turhan, 2004; Badoni and Chauhan, 2009; Al-Sulaiman, 2011;Huda *et al*., 2013)

كما تتفق هذه النتائج مع نتائج أبحاث (Fatima *et al*.,2009) عند استحداث وتنمية مزارع الكالوس لنبات الديجتالس الصوفي *Digitalis lanata*، والتي حُدِّدَ فيها اللون المثالي للكالوس والتباينات اللونية الحاصلة في المزارع الخلوية .

2-5-4- نسبة استحداث الكالوس في التوافقات الهرمونية المنتخبة:

أظهرت النتائج تميز الوسط 5C01 عموماً في إعطاء أعلى نسبة استحداث للكالوس وبخاصة عند استخدام التوافق الهرموني (2 ملغ/ل من NAA + 1 ملغ/ل من KIN) بالمقارنة مع الأوساط المغذية الأخرى المعززة بأفضل التوافقات الهرمونية حسب نتائج الدراسة كما في الجدول (6).

الجدول (6) التوافقات الهرمونية المنتخبة من الأوساط المغذية ونسب استحداث الكالوس فيها والتوصيف الشكلي

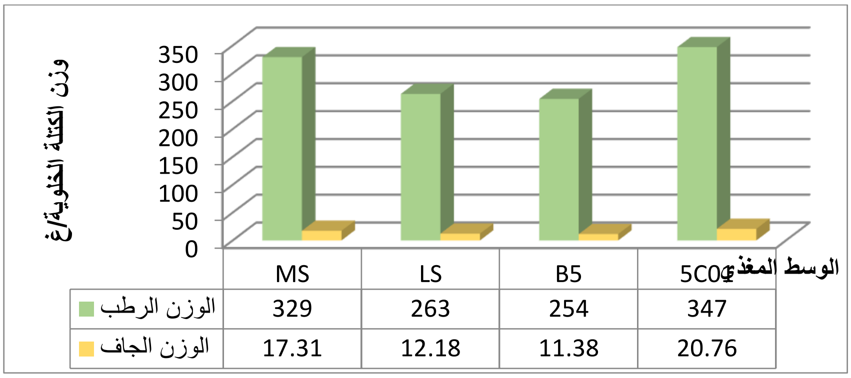
الوسط المغذي	التوليفة الهرمونية المنتخبة من كل وسط	نسبة الاستحداث	توصيف الكالوس
MS	MS+(2mg2.4D+1mgBA)L^{-1}	85%	أصفر محمر، غير حبيبي
LS	LS+(2mgNAA+2mgBA)L^{-1}	75%	بني مصفر، هشّ
B5	B5+(2mg2.4D+1mgBA)L^{-1}	70%	بني مصفر، طري
5C01	5C01+(2mgNAA+1mgKin)L^{-1}	95%	كريمي مصفر، حبيبي

تتفق هذه الدراسة مع نتائج دراسة (بشر وآخرين، 2017) و (بشر، 2020) على نبات البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus* L . كما تتفق مع نتائج أبحاث (Rahman *et al*.,2019) على نبات الفنكا *Catharanthus roseus*_ونتائج دراسة (Lee *et al*.,2011) على نبات التوت الأبيض *Moras alba* .

تعود الاختلافات في نسبة استحداث واستجابة الكالوس على الأوساط المغذية المدروسة إلى حالة التوازن الإجمالي بين الأوكسينات والسيتوكينينات الناتج عن التركيز الكلي لمنظمات النمو المضافة مع هرمونات النمو النباتية الداخلية (Mastuti *et al*.,2017). حيث تعزز الأوكسينات انقسام الخلايا ونموها عن طريق تنشيط مرونة Elasticity ومطاطية plasticity الجدر الخلوية، في حين تعمل السيتوكينينات على انقسام الخلايا، فالانقسام الخلوي عمل مشترك يتطلب علاقة تآزرية بين الأوكسينات والسيتوكينينات (Varsheny.*et al*.,2013)، وكل نوع وتركيز من منظمات النمو النباتية له دور مهم في تحريض الكالوس (Irene *et al*.,2019) فضلا عن التأثيرات الإضافية لمكونات الوسط والعناصر المغذية الموجودة في أوساط الزراعة ، والتي تؤدي دوراً مهماً في تحديد اتجاه الارتباطات المورفولوجية للكالوس(Nurul *et al*.,2016) ويقترح (Jimenez,2001) أن الكفاءة الجنينية وغير الجنينية لتكوين الكالوس في المنفصلات المتشابهة بوساطة أنسجة متطابقة وراثياً تستجيب بشكل مختلف للمنبهات المتغيرة، فضلاً عن الاختلافات في طبيعة الوسط ومكوناته، لأن الوسط المغذي يعد عاملاً مهماً لاستحداث الكالوس في النباتات، حيث تتطلب الأنواع المختلفة أوساطاً مختلفة لتشكيل الكالوس (Jayaraman *et al*.,2014) ، وتؤكد الدراسات أنه لا يمكن إجراء أي تعميم على استجابة النبات لعوامل وسط الاستزراع حيث إنَّ القدرة المورفولوجية للكالوس المستحدث تختلف تباعاً للأنواع (Nurul *et al*.,2016).

3-5-4- متوسط الوزن الرطب للكتلة الخلوية المتشكلة (معدل نمو الكالوس) :

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية في صفة متوسط الوزن الرطب للكالوس بين الأوساط المغذية الأساسية الأربعة المنتخبة، حيث كان متوسط الوزن الرطب للكالوس الأعلى معنوياً في الوسط 5C01 بالمقارنة مع باقي الأوساط المدروسة مسجلاً 347 غ، في حين كان الأدنى معنوياً في الوسط B5 مسجلاً 254 غ كما في الشكل (4) .



الشكل (4) متوسط الوزن الرطب والجاف للكتلة الخلوية النامية في الأوساط المغذية الأساسية

تتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج أبحاث (Nurul *et al.*,2016) على النوع *Barringtonia receonosa*، حيث لوحظ وجود تأثير معنوي في شكل الكالوس والوزن الطري والجاف باختلاف وسط الزراعة الخلوية، وذلك لأن الوزن الرطب للكالوس يتأثر بقدرة امتصاص الخلايا للماء والمكونات الأخرى من الوسط المغذي، مما ينعكس على حجم الخلية ومقدار تضخمها، بينما يؤدي معدل الانقسام الخلوي وتضاعف الخلايا دوراً في زيادة الوزن الجاف للكالوس (Rahman *et al.*,2019) . وبذلك تؤثر مكونات الوسط المغذي في كل وسط استزراع على إمكانية استحداث الكالوس وعلى شكل الكالوس الناتج، ومورفولوجيته، وكتلته (Rahman *et al.*,2019)، وتتفق نتائج هذا البحث مع نتائج أبحاث (Irene *et al.*, 2019) حول تأثير منظمات النمو النباتية في الوزن الطري والجاف وعلى قوام الكالوس في المزارع

الخلوية لنبات القهوة (*Coffea arabica L*) ونتائج (Peraz-Alonso *et al*.,2009) على المزارع الخلوية لنبات الديجتالس الأرجواني *Digitalis Purpurea* ونتائج (Fatima *et al*.,2009) على نبات الديجيتالس الصوفي *Digitalis lanata*.

الاستنتاجات:

- ❒ أهمية اختيار الوسط المغذي ومحتواه من الأملاح والمغذيات ومدى ملاءمته لنوع المزرعة النسيجية المراد تأسيسها.
- ❒ اختيار المنفصل (الجزء) النباتي أمر في غاية الأهمية لتأسيس مزارع الكالوس واستحداثها، لأن تحريض الكالوس يعتمد بشكل كبير على النمط الجيني والطاقة الكامنة للخلايا وقدرتها على الانقسام.
- ❒ أهمية الوسط المغذي المعزز بتراكيز مدروسة من منظمات النمو ، حيث إنَّ تركيز منظمات النمو ونوعيتها ونسبة التوازن بينهما في وسط النمو هي العامل المحدد الرئيس لعملية استحداث أنسجة الكالوس من الأجزاء النباتية وعملية السيطرة على التمايز وتكشف الأعضاء من خلايا الكالوس .

المراجع العربية والأجنبية:

1. بشر شذى، صبوح محمود والعموري يوسف. 2017. ديناميكية النمو والتباينات الجسمية بين مزارع الكالوس لنبات البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus* . مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية.
2. بشر شذى، 2020. تأثير الوسط المغذي وتغير تعبير مورثتي Tropinon ReductaseI و Tropinon Reductase II في ديناميكية النمو وإنتاج الهيوسيامين والسكوبولامين في مزارع الكالوس لنبات البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus* . المجلة السورية للبحوث الزراعية ، المجلد 8
3. دفلن، م، روبرت وفرنسيس، هـ. ويذام. 1998 فسيولوجيا النبات. ترجمة (شراقي ،محمد محمود وخضر ، عبد الهادي وسلامة علي سعد الدين وكامل ،نادية) الدار العربية للنشر والتوزيع، الطبعة الثانية ،671-673 .
4. صقر، محب طه. 2019. منظمات النمو النباتية. فسيولوجيا النبات، كلية الزراعة، جامعة المنصورة. ع.ص 132.
5. محمد، عبد المطلب سيد وعمر، مبشر صالح. (1990). المفاهيم الرئيسة في زراعة الخلايا والأنسجة والأعضاء النباتية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل، مديرية دار الكتب للطباعة والنشر.
6. Abd el-hameid , Asmaa .R. , Abo el-kheir Zakia .A, Abdel-hady, M. S. and Helmy Wafaa A.,2020. Identification of DNA variation in callus derived from Zingiber officinale and anticoagulation acti vities of ginger rhizome and callus. Bulletin of the National Research Centre, 44:28 https://doi.org/10.1186/s42269-020-0281-9
7. Ajungla, L., Patil, P.P., Barmukh, R.B. and Nikam, T.D. 2009. Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of Hyoscyamine and Scopolamine in root culture of *Datura metel* L. .Indian Journal of Bioticnology , 8, 317 -322
8. Ali, N., Mulwa, R. M., Mortan, M. A., Skirvin, R. M. 2003. Micropropagation of guava (Psidium guajava L.). Journal of Horticultural Science and Biotechnology.78:739-741.

9. Al-Sulaiman. A.M. 2011. Variability in response of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars to *in vitro* shoot regeneration, *Journal of King Abdulaziz University: Meteorology, Environment & Arid Land Agriculture.Sciences.*, Vol. 22, No. 2, pp: 3-20.
10. Andreea, N., Câmpeanu, G., Nicoleta Chiru, N. and Karácsonyi, D. 2009. Effect of auxine and cytokinine on callus induction in potato (*Solanum tuberosum* L.) explants. Agricultura – Ştiinţă şi practică, nr. 1-2: 69-70.
11. Anjana, R.S., Trigiano, R.N., Witte, W T. and Schwarz, O J. 2005. *In vitro* adventitious rooting of Cornus Florida microshoots. *Scientia Horticulturae* (103): 381-385.
12. Asemota, O., Eke, CR and Odewale, JO., 2007. Date palm (Phoenix dactylifera L.) in vitro morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. African J Biotechnol, 6: 2353- 2357.
13. Badoni, A. and Chauhan, J.S. 2009. Single node callus culture: improvement for micropropagation of *Solanum tuberosum* (cv. Kufri Himalini). *Nature and Science.*7(3): 99-103.
14. Baskaran, P., Rajeswari, BR. and Jayabalan, N., 2006. Development of an in vitro regeneration system in sorghum [Sorghum bicolor (L). Moench] using root transverse thin cell layers (tTCLs). Turk J Bot, 30:1–9
15. Besher, S., Al-Ammouri, Y., Murshed, R.,2014 . Production of tropane alkaloids from *in vitro* and callus cultures of *Hyoscyamus aureus* and their genetic stability assessment using ISSR markers. Journal of physiology and molecular biology of plants, 20 (3): 343-349. India
16. Bosila, H.A . , Mohamed S. S , Gamal, El ñ . Bekhit, M. ,2003. Factors Affecting Callus Production and Glycosidal Content of Leaf Tissue Culture of Digitalis lanata Ehrh. 289 Acta Hort. 597, ISHS.
17. Butler, L.H., Hay, F.R. Ellis, R.H. and Smith, R.D., 2009. Post-abscission, pre-dispersal seeds of Digitalis purpurea remain in a developmental state that is not terminated by desiccation ex planta. Ann Bot London; 103: 785–794
18. Centeno, M., Rodviquez, L., Feito, A and Fernade, I., 1996. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in Actini deliciosa tissue culture. plant-cell-

Rep, 16:58-62.
19. Chen, Shan., Troy, Khusial. Dipen, Patel. Satinder, Singh.Tatyana, Yakubova. and Amy, Wang., 2015. Digoxin Use in Modern Medicine. US Pharmacist. 40(2):44-48.
20. Davies, P.J. 2004. Plant hormones, biosynthesis, signals transduction and action. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp:1-11.
21. Fatima, Z., Mujib, A., Fatima , S., Arshi, A. and Umar, S.,2009. Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in Digitalis lanata Ehrh.: influence of plant growth regulators and carbohydrates Turk J Bot 33 , 393-405 doi: 10.3906/bot-0805-21
22. Francis, G.S., 2008. The contemporary use of digoxin for the treatment of heart failure. Circ.: Heart Fail. 1, 208–209, http://dx.doi.org/10.1161/ Circulationaha.105.560110.
23. Gamborg, OL., Miller, RA and Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50T151–158
24. George, E. F.; Hall, M. A and De Klerk, G. J. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. The Background, 3rd Ed., Published by Springer, Dordrecht, The Netherlands.
25. Goldthorp,W.O.,2009.Medical classics an account of Foxglove and some of its Medical uses. BMJ 338,1393(CR)-print
26. Hartmann, H. T., Kester, D. E., Devies, F. T and Geneve, R. L., 2002**.** Plant propagation principles and practices, seventh edition, Prentice, Hall, upper saddle river, New gersy.
27. Holdsworth, M.J., Bentsink, L.and Soppe W.J., 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, afterripening, dormancy and germination. New Phytologist, 179, 33-54
28. Huda, M.S.; Hossain, M.M.; Haq, M.Z.; Zamal, S.S. and Karim, M.R. 2013. Effect of explants on callus formation of potato. Eco-Friendly *Agril. J*. 6(08): 146-149
29. Irene, WM., Alumiro, HL. Asava, KK. Agwanda, CO. and Anami, SE., 2019. Effects of Genotype and Plant Growth Regulators on Callus Induction in Leaf Cultures of *Coffea arabica* L. F1 Hybrid. J Plant Biochem Physiol 7:236. doi : 10.35248/2329-9029.19.7.236
30. Jayaraman, S., Daud, NH. Halis, R.and Mohamed, R.,2014. Effects of plant growth regulators, carbon sources and pH values on callus

induction in Aquilaria malaccensis leaf explants and characteristics of the resultant calli. J of Fores Res. 25:535-540.

31. Jiménez, VM.,2001. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. 13:196-223.
32. Lee, Y., Lee, DE. Lee HS. Kim, SK. Lee, WS .and Kim SH.,2011. Influence of auxins, cytokinins, and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious roots of the white mulberry tree (Morus alba L.). Plant Cell, Tissue, and Organ Culture (PCTOC). 105:9-19.
33. Lin, Yan-Li., Huang, San-Wen, Zhang, Jia-Yin. Bu ,Feng-Jiao. Lin, Tao Zhang. Zhong-Hua, and Xiong, Xing-Yao.,2016 A protocol of homozygous haploid callus induction from endosperm of *Taxus chinensis* Rehd. var. *mairei SpringerPlus 5:659,* DOI 10.1186/s40064-016-2320-4
34. Linkies, A.,and Leubner-Metzger, G., 2012. Beyond gibberellins and abscisic acid: How ethylene and jasmonates control seed germination. Plant Cell Reports 31, 253-270
35. Linsmaier E.M and F, Skoog., 1965. Organic Growth factor requirements of Tobacco Tissue cultures. Physiol. Plant., 18, 100-127.
36. Mastuti ,Retno., Aminatun, Munawarti. and Elok, Rifqi Firdiana., 2017.The Combination Effect of Auxin and Cytokinin on In Vitro Callus Formation of *Physalis angulata* L. – A Medicinal Plant AIP Conference Proceedings 1908, 040007. https://doi.org/10.1063/1.5012721
37. Michael, P. S., 2019. Responses of Different Explants of Sweet Potato on Modified MS and LS Based Nutrient Media in vitro ,Asian Journal of Advances in Agricultural Research 11(4): 1-7, Article no.AJAAR.53129 .
38. Mok, D.W.S. and Mok, M.C. 1994. Cytokinins chemistry, activity and function. CRC Press, Inc. Florida.
39. Murashige,T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-479
40. Namdeo A.G.; Mahadik, K.R. and Kadam, S.S. 2006. PHCOG MAG.: Review Article Antimalarial Drug *Artemisia annua*. Pharmacogn. Mag., 2: 6.

41. Narayan, M. S and Venkataraman, L. V. 2002. Effect of Sugar and Nitrogen on the Production of Anthocyanin in Cultured Carrot (Daucus carota) cells. Journal of Food Science 67(1):84 - 86 .
42. Nehra ,N.S., Becewar, M.R. Rottmann, W.H. Pearson, L. Chowdhary, K. Chang, S. Wilde, H.D. Kodrzycki, R.J. Zhang, C. Gause, K.C. Parks, D. W. and Hinchee, MA., 2005. Forest biotechnology: Innovative methods, emerging opportunities. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 41, 701-717
43. Nikam, T. D. and Barmukh, R.B., 2009. GA3 enhances in vitro seed germination in Santalum album. Seed Science and Technology 37, 276-280
44. Nurul, Izzati Osman., Norrizah, Jaafar Sidik. Asmah, Awal.,2016. Effects of variations in culture media and hormonal treatments upon callus induction potential in endosperm explant of Barringtonia racemosa L. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.10.007
45. Peraz-Alonso, N., Wilken, D. Gerth, A. Ja ̈hn, A . Nitzsche, H.M. Kerns, G. Capote-Perez, A and Jime ́nez, E.,2009. Cardiotonic glycosides from biomass of Digitalis purpurea L. cultured in temporary immersion systems. Plant Cell Tiss Organ Cult 99T151–156 DOI 10.1007/s11240-009-9587-x
46. Platz, E.A., Yegnasubramanin, S., Liu ,J.O., Chong,C.R., Shim,J.S., and Kenfield,S.A., 2011.Anovel tow-stage, transdisciplinary study identifies digoxin as a possible drug for prostate cancer treatment. Cancer Discov.1,68-77.
47. Probert, R., Adam, J. Coney,beer J. Crawford, A. and Hay, F., 2007. Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. Aust J Bot; 55: 326–335
48. Rahman, NNA., Rosli, R. Kadzimin, S. and Hakiman, M., 2019. Effects of auxin and cytokinin on callus induction in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Fundamental and Applied Agriculture 4(3): 928–932. doi: 10.5455/faa.54779
49. Richard ,G .O., 2002.Whatever Happened To The Scrophulariaceae. .Volume 30:2
50. Rossignol, M., Santoni, V., Szponarski, W., and Vansuyt,G.1990. Differential Sensitivity to Auxin at the Plasma Membrane Level. Progress in Plant Cellular and Molecular Biology, 498-503

51. Serrano, R.,Frazao,S., Silva,J., Gomas,E.T, and Silva O.,2014. Application of microscopy to Digitalis thapsi × Digitalis purpurea natural hybrid identification. Formatex377-384
52. Shilpa, K., Varun, K and Lakshmi, B. S., 2010. An Alternate Method of Natural Drug Production: Elciting Secondary Metabolite Production Using Plant Cell Culture. Journal of plant sience, 5(3):222-247
53. Shirin, F., & Rana, P. K. 2007. In vitro plantlet regeneration from nodal explants of field-grown culms in Bambusa glaucescens Willd. Plant Biotechnology Reports, 1(3), 141–147. https://doi.org/10.1007/s11816007-0020-9
54. Siatka Tomáš, 2019 Effects of Growth Regulators on Production of Anthocyanins in Callus Cultures of *Angelica archangelica* **.** Natural Product Communications., sagepub.com/journals-permissions DOI:10.1177/1934578X19857344
55. Stenkvist, B., Bengtsson, E. Dahlqvist, B. Eriksson, O. Jarkrans, T.and Nordin, B., 1982. Cardiac glycosides and breast cancer revisited. N. Engl. J. Med. 306, 484.
56. Stenkvist, B., Bengtsson, E. Eklund, G. Eriksson, O. Holmquist, J.and Nordin, B., et al., 1979a. Evidence of a modifying influence of heart glucosides on the development of breast cancer. Anal. Quant. Cytol 2, 49–54.
57. Stenkvist, B., Bengtsson, E. Eriksson, O. Holmquist, J. Nordin, B. and Westman-Naeser, S., et al., 1979b. Cardiac glycosides and breast cancer. Lancet 313, 563.
58. Tican, A.; Campeanu, G.; Chiru, N. and Ivanoici, D. 2008. Using of unconventional methods for obtaining somaclonal variations, having as goal making of new potato varieties with resistance at diseases and pests. *Romanian Biotechnological Letters*. 13(4):3791-3798.
59. Turhan, H. 2004. Callus induction and growth in transgenic potato genotypes. African Journal of Biotechnology,Vol. 3 (8), pp, 375-378.
60. Varsheny, A., Anis, M. and Aref, IM.,2013. Potential role of cytokinin–auxin synergism, antioxidant enzymes activities and appraisal of genetic stability in Dianthus caryophyllus L. An important cut flower crop. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant. 49:166-174.

61. Verma, S.K., Das, A.K. Cingoz ,G S.and Gurel E., 2016.In vitro culture of Digitalis L. (Foxglove) and the production of cardenolides. An up-to-date review. Ind Crops Prod; 94: 20–51
62. Vollosovich, A. G., Martinova, T. U. and Polechk, C., 1985. nutrient medium For Rawollfia serpentia tissue culture. (A.C. CCCP No 1167895).
63. Withering,w.,2014.An Account of the Foxglove and some of its Medical Uses.University press, Cambridge.
64. Yücesan, Buhara. , Müller-Uri, Frieder. Kreis, Wolfgang .and Gürel, Ekrem.,2014. Cardenolide estimation in callus-mediated regenerants of *Digitalis lamarckii* Ivanina (dwarf foxglove) In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant Volume 50, Issue 1, pp 137–142
65. Zang, Qiaolu., Zhou, Ling. Zhuge, Fei. Yang, Haiyun. Wang, Xiaoqin and Lin, Xinchun.,2016. Callus induction and regeneration via shoot tips of *Dendrocalamus hamiltonii* , *SpringerPlus 5:1799* DOI 10.1186/s40064-016-3520-7