استحداث الكالس وتجديد النباتات من الأجنة الناضجة لثمان طرز وراثية من القمح القاسي

م. محمد الحمود[1] أ. د. أيمن الشحاذه العوده[2] د. فهد البيسكي[3]

الملخص

نُفذتْ الدراسة في مخبر زراعة الأنسجة، التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية، بهدف صياغة بروتوكول خاص من خلال تحديد الوسط الأمثل لاستحداث الكالس، وتجديد النباتات منه ابتداءً من الأجنة الناضجة لدى ثمان طرز وراثية من القمح القاسي ($Doma_1$، $Bouhoth_{11}$، $Cham_3$، Bezater، $Cham_5$، Aghamatales، Icaverve، Icambel) المزروعة في الزجاج. وضعت التجربة وفق التصميم العشوائي البسيط، بواقع 32 مكرراً. أظهرت النتائج أهمية التعقيم السطحي للبذور قبل زراعتها بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم (4%)، مدّة 20 دقيقة في تحسين نسبة الإنبات من خلال القضاء على جميع المسببات المرضية، كما أظهرت أنّ نسبة استحداث الكالس كانت الأعلى معنوياً عند التراكيز 2 ،3 مغ. ل$^{-1}$2,4-D (89.58 ،83.13 %على التوالي). وكانت نسبة استحداث الكالس الجنيني الأعلى معنوياً عند تركيز 2 مغ . ل$^{-1}$ 2,4-D (61.04%). وكان متوسط نسبة تجديد النبات وعدد النموات المتشكلة الأعلى معنوياً عند استعمال الوسط المحتوي على1 مغ . ل$^{-1}$BAP و0.5 مغ.ل$^{-1}$IAA (33.75%، 12.88% على التوالي). تُشير النتائج إلى أهمية منظمات النمو في استحداث الكالس وتشكله، وبخاصة لدى الأنواع النباتية أحادية الفلقة، مثل القمح. ويعتمد نظام التجديد الفعّال في القمح ، بشكلٍ رئيس على التوازن الهرموني بين نسبة الأوكسين (IAA) والسيتوكينين (BAP) للحصول على أعلى نسبة تجديد.

الكلمات المفتاحية: الأجنة الناضجة، منظمات النمو، الكالس، القمح القاسي، التعقيم السطحي.

1 طالب دكتوراه، قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

2 أستاذ بيئة وفيزيولوجيا المحاصيل الحقلية، قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

3 باحث في الهيئة العامة للتقانات الحيوية، دمشق.

Initiation of Callus and Plant Regeneration from Mature Embryos of Eight Durum Wheat Genotypes

Mohammad AL-Hamood(1) Prof. Dr. Ayman Shehada AL-Ouda(2)

Dr. Fahed AL-Beesky(3)

Abstract

The study was carried out in the Tissue Culture Laboratory of the General Commission for Biotechnology, with the aim of formulating a special protocol by determining the optimal medium for callus development and plant regeneration starting from the mature embryos of eight durum wheat genotypes (Doma1, Bouhoth11, Cham3, Bezater, Cham5, Aghamatales, Icaverve, Icamber), which were cultured *in vitro*. The experiment was laid according to a simple random design (CRD), with 32 replications. The results showed the importance of superficial sterilization of the seeds before planting them with sodium hypochlorite solution (4%), for a period of 20 minutes, in improving the germination rate by eliminating all pathogens. They also showed that the rate of callus development was significantly higher at concentrations of 2,3 mg. L^{-1} of 2,4-D (89.58 and 83.13%, respectively). The percentage of embryonic callus development was significantly higher at the concentration of 2 mg. L^{-1} of 2.4-D (61.04%). The average rate of plant renewal and the number of formed growths were significantly higher when using the medium containing 1 mg. L^{-1} of BAP and 0.5 mg L^{-1} of IAA (33.75%, 12.88%, respectively).

The results indicate the importance of growth regulators in callus development and formation, especially in monocotyledonous plant species, such as wheat. The effective regeneration system in wheat depends mainly on the hormonal balance between the ratio of auxin (IAA) and cytokinin (BAP) to obtain the highest regeneration rate.

Key words: Mature embryos, Growth regulators, Callus, Durum wheat, Surface sterilization.

(1)PhD Student, Dept. of Field Crops, Faculty of Agriculture. Damascus University.
(2)Prof. Dr., Dept. of Field Crops, Faculty of Agriculture. Damascus University.
(3) Researcher, CNBT, Damascus, Syria.

المقدمة

يتبع القمح بنوعيه الطري (*Triticum aestivum* L.) والقاسي (*Triticum durum* L.) للعائلة النجيلية *Poaceae*، والجنس *Triticum*، وهو من أوّل الأنواع النباتية المحصولية التي تمّ استئناسها على وجه البسيطة، ويتميز هذا الجنس باحتوائه على عددٍ كبير من الأنواع [29]. وتُعد محاصيل الحبوب عامةً، والقمح خاصةً العنصر الأهم في النظام الغذائي البشري، إذْ تُسهم الحبوب بنحو 42.5% من إمدادات السعرات الحرارية الغذائية في العالم، وتأتي مساهمتها من خلال التزويد بالبروتينات (37%) [9]. ويحتل محصول القمح من حيث الإنتاج العالمي، المرتبة الثانية في قائمة محاصيل الحبوب بعد محصول الذرة الصفراء (*Zea mays* L.)، حيث تمّ إنتاج قرابة 771.7 مليون طناً من القمح، منها 36.4 مليون طناً من القمح القاسي خلال عام 2018، [10].

قد تفشل بعض طرائق التربية التقليدية بسبب النقص في التباين الوراثي في الأنواع المحصولية المزروعة أو البرية، وعدم امتلاك مربي النبات الوسائل الدقيقة للانتخاب، لذلك تُعد طرائق الانتخاب المخبرية باستخدام تقانة زراعة الأنسجة النباتية من التقانات الملائمة والفعّالة [4] ، حيث تسمح هذه الطريقة بتقييم الطرز الوراثية استناداً إلى مقدرتها على البقاء تحت ظروف الإجهاد اللاأحيائي المستهدف، كما يمكن إنجاز الانتخاب المخبري بوقت قصير نسبياً، وفي ظروف متحكم بها من خلال التحكم ببيئة الزراعة والوسط المغذي، ومعاملات الإجهاد اللاأحيائي المطبقة [27].

تستعمل تقانات الزراعة الخلوية ومزارع الكالس بكفاءةٍ عالية في برامج التربية والتحسين الوراثي للنباتات جنباً إلى جنب مع طرائق الانتخاب التقليدية، بهدف الحصول على طرزٍ وراثية جديدة للأنواع النباتية ذات الخصائص الجيدة، معتمدةً في ذلك على التباينات الجسمية Soma clonal variations ،(التي تعرف بأنّها التغيرات الوراثية التي تحدث على الخلايا النباتية للكالس نتيجة عمليات الحذف أو الإضافة أو التكرار أو الانقلاب في النيوكلوتيدات المكونة للمورثة)، وقد تشاهد أحياناً هذه التباينات على هيئة

تغير في الشكل الظاهري للنباتات المتجددة من زراعة الكالس [18] ، أو تباين في الصفات الفيزيولوجية (الوظيفية) والكيميا حيوية Biochemical للخلايا النباتية المزروعة في الزجاج *In Vitro* [5]. ويُعرف الكالس Callus بأنّه عبارة عن كتلة خلوية غير متمايزة تنتج عن الانقسامات المتكررة للخلايا النباتية، ليس لها شكل وظيفي معين، مختلفة القوام، يتدرج لونها من الأصفر الباهت إلى البني الداكن، وتتمايز هذه الخلايا فيما بعد لتشكل جذراً أو ساقاً أو نباتاً كاملاً تبعاً لحالة التوازن الهرموني الموجود في الخلية [8] ، وقد تؤدي التغيرات الفيزيولوجية للكالس إلى تغير في مظهر النموات الناتجة [30]. و تؤدي منظمات النمو، وبخاصةٍ الأوكسينات والسيتوكينينات دوراً مهماً في زراعة الأنسجة [12]، وتعتمد زراعة الكالس على عدّة عوامل، أهمها مكونات الأوساط المغذية المستعملة، وتركيز منظمات النمو المستعملة ونوعيتها، وظروف التحضين (طول الفترة الضوئية، والحرارة، والرطوبة)، وأوعية الزراعة [17].

وعلى الرغم من أنّ النباتات أحادية الفلقة، وبخاصةٍ القمح تُعد من النباتات الصعبة الإكثار والتجديد في زراعة الأنسجة، فمن الممكن الحصول على الكالس من العديد من الخزعات النباتية، مثل الأجنة الناضجة، والأجنة غير الناضجة والغلاف الزهري [31]، ويحدد نوع الجزء النباتي نسبة التجديد وعدد النموات المتجددة [33]. وأظهرت معظم الدراسات أنّ الأجنة غير الناضجة هي أفضل مصدر لزراعة أنسجة القمح [34].إلا أنّ التوافر المحدود لهذه الأجنة على مدار العام يجعل الحصول عليها بشكلٍ مستمر شاقًا ويستغرق وقتاً طويلاً، ما يحد من استخدامها ويجعلها غير ملائمة للزراعة في المختبر [7]، لذلك تمّ استعمال الأجنة الناضجة كبديلٍ فعّال للأجنة غير الناضجة بسبب توافرها على مدار العام ، وسهولة عزلها، والاستقرار الجيني لها [18]، علماً أنّ معدّل تشكل الكالس الجنيني أقل بنحو 10% عند استعمال الأجنة الناضجة بالمقارنة مع الأجنة غير الناضجة، وتدخل في طور النمو العشوائي غير المتمايز بشكلٍ أسرع من الأجنة غير

الناضجة، وبالتالي تعطي نسبةٍ مرتفعة من استحداث الكالس [11]. ويعتمد النجاح في زراعة الأنسجة النباتية للقمح إلى حدٍ كبير على تأثير العديد من العوامل أهمها، الطراز الوراثي، والجزء المستخدم [15]، ومنظمات النمو الداخلة في تركيب الوسط المغذي [25].تؤدي الأوكسينات دوراً حيوياً في تعزيز انقسام الخلايا ونموها، في حين تُسهم للسيتوكينينات في تشكيل البراعم من الأنسجة غير المتمايزة (الكالس). ويُعد الأوكسين (2،4–D)، والسيتوكينين البنزيل أمينو بورين (BAP) الأكثر استعمالاً في نبات القمح [6]، ولابدّ أن تكون نسبة السيتوكينين/الأوكسين أكبر من الواحد، حيث أنّ النسبة المرتفعة من الأوكسين إلى السيتوكينينات تُعزز تكوين الكالس، بينما يتم تشجيع نمو الجذر عندما تكون نسبة السيتوكينينات إلى الأوكسين أكبر من الواحد [22].

هدف البحث

يهدف البحث إلى صياغة بروتوكول خاص بزراعة الأنسجة لنبات القمح من خلال تحديد الوسط الأمثل لاستحداث الكالس من الأجنة الناضجة لدى بعض الطرز الوراثية من القمح القاسي، بالإضافة إلى تحديد الوسط الأمثل لتجديد النباتات من الكالس للحصول على نباتات متباينة وراثياً بهدف استعمالها في عمليات التحسين الوراثي لاحقاً.

مواد البحث وطرائقه

مكان وزمان تنفيذ البحث: نُفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية النباتية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق، خلال عامي 2019– 2020.

المادة النباتية: نُفذ البحث على ثمانية طرز وراثية من القمح القاسي، أربعة منها أصناف معتمدة محلياً ($Doma_1$، $Bouhoth_{11}$، $Cham_3$، $Cham_5$)، وأربعة سلالات مبشرة (Aghamatlas، Bezater، Icaverve، Icambel). تمّ الحصول على البذار من إدارة بحوث المحاصيل في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية.

مرحلة التطهير السطحي: تمّ غسل البذور أولاً بالماء الجاري، ثمّ غمرت بالكحول الايتيلي (تركيز 70%) مدّة دقيقة واحدة مع التحريك، ثمٌّ عُوملت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم

(NaOCl) (تركيز 4%) مدّة 20 دقيقة مع إضافة محلول TWEEN 20 لزيادة فعّالية عملية التعقيم وتخفيف التوتر السطحي، ثمّ غُسلت البذور بالماء المقطر المُعقّم ثلاث مرات متتالية، وذلك بمعدّل 5 دقائق لكل مرة. زُرعت حبوب القمح في وسط MS [21]، المضاف له 30 غ.ل$^{-1}$ سكروز و7 غ.ل$^{-1}$ آجار بدرجة حموضة (pH = 5.8)، وذلك ضمن أنابيب اختبار بحجم 2.5× 20 سم، تحوي 12.5 مل من الوسط المغذي، ثم تمّ تعقيم الأنابيب في جهاز التعقيم الرطب Autoclave على درجة حرارة 121 م° وضغط 1.04 كغ.سم^{2} مدّة 20 دقيقة. حُضنت الأنابيب المزروعة بغرفة النمو على درجة حرارة 22±2 م° وإضاءة 16 ساعة/8 ظلام وشدّة ضوئية 3000 لوكس [2]. بلغ عدد الأنابيب المزروعة 32 أنبوباً من كل معاملة ولكل طراز وراثي. تمّ في هذه المرحلة تسجيل النسبة المئوية للإنبات وللعينات السليمة.

مرحلة استحداث الكالس Callus induction: تمّ في هذه المرحلة استئصال الأجنة الناضجة من البذور وزراعتها على الوسط المغذي MS المضاف له تراكيز مختلفة من الأوكسين (2,4-D) (0، 1، 2، 3، 4 مغ. ل$^{-1}$)، ضمن أطباق بتري بقطر 9 سم وارتفاع 1.5 سم، وتمّت زراعةخمسة أجنة في كل طبق، بمعدّل ثلاثة أطباق لكل معاملة. وحُضنت الأطباق في الظلام عند درجة حرارة 25 م°، ورطوبة نسبية 70%، ونُقلت كل أسبوعين إلى وسط جديد، وأخذت القراءات بعد 6 أسابيع، حيث تمّ تحديد التركيز الأمثل من المزيج الهرموني (2,4-D وKinetin) من خلال دراسة نسبة استحداث الكالس.

مرحلة تجديد الكالس Callus regeneration Stage: تمّ نقل الكالس إلى وسط MS المعدّل، المضاف له كازئين هيدروليسات 500 مغ.ل$^{-1}$ والبرولين 600 مغ. ل$^{-1}$، حيث تمّت دراسة تأثير منظم النمو السيتوكينين بنزيل أمينو بيورين (6-BAP) (0، 1،2، 3، 4 مغ . ل$^{-1}$) والأوكسين IAA بتركيز (0.5 مغ. ل$^{-1}$)، لتحديد المزيج الهرموني الأفضل مع الخزعة الأفضل من خلال دراسة نسبة تشكل الكالس التكويني المتجدد، وعدد النموات المتشكلة، وكانت الزراعة في أطباق بتري بقطر 9 سم وارتفاع 1.5 سم، حيث زرعت 3 خزعات في الطبق، وحُضّنت على درجة حرارة حرارة 24 م°، ورطوبة نسبية 70%، و16

ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام وشدة ضوئية 3000 لوكس، وأخذت قراءات نسبة التجديد وعدد النموات المتشكلة.

التصميم التجريبي والتحليل الإحصائي: وضعت التجربة وفق التصميم العشوائي البسيط، بواقع 32 مكرراً (أنبوباً). وحُللت النتائج باستعمال برنامج MSTAT-C، وأُجري تحليل التباين، حيث تمّت مقارنة المتوسطات وحساب قيمة أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى معنوية 1%.

النتائج والمناقشة

المرحلة التأسيسية (التطهير السطحي):

تأثير التراكيز المختلفة من محلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl)، وفترات التعقيم في نسبة الإنبات:

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاتٍ معنوية ($P\leq0.01$) في صفة متوسط نسبة الإنبات بين تراكيز محلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl)، وفترات التعقيم، والطرز الوراثية المدروسة، والتفاعلات المتبادلة بينها. يُلاحظ أن متوسط نسبة الإنبات كان الأعلى معنوياً عند تركيز محلول هيبوكلوريت الصوديوم (4%) (87.42%)، وتراجعت نسبة الإنبات مع انخفاض تركيز المحلول، حيث كانت نسبة الإنبات الأدنى معنوياً عند معاملة الشاهد (بدون هيبوكلوريت الصوديوم) (17.28%)، ما يُشير إلى أهمية تعقيم البذور قبل الزراعة باستعمال التركيز الأنسب من محلول (NaOCl) (4%) للحصول على أعلى نسبة إنبات(الجدول، 1). ويُلاحظ أنّ متوسط نسبة الإنبات كان الأعلى معنوياً عندما عُقمت البذور بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم مدّة 20 دقيقة (55.00%) بالمقارنة مع الفترة الزمنية الثانية 15 دقيقة (47.24%) (الجدول، 1). وكان متوسط نسبة الإنبات الأعلى معنوياً لدى صنف القمح القاسي $Doma_1$ (92.66%)، في حين كان الأدنى معنوياً لدى الطرازين Icaverve و Aghamatlas وبدون فروقاتٍ معنوية بينهما (17.20، 17.36% على التوالي) (الجدول، 1). ويُلاحظ بالنسبة للتفاعل ما بين تراكيز محلول هيبوكلوريت الصوديوم وفترات المعاملة والطرز الوراثية المدروسة، فقد كان متوسط نسبة الإنبات الأعلى معنوياً في التركيز 4% من محلول هيبوكلوريت الصوديوم، عند المدّة الزمنية 20 دقيقة في الطرز الوراثية Bezater، Icambel، $Doma_1$، $Bouhoth_{11}$، Aghamatales، وبدون فروقاتٍ معنوية بينها (100.00، 98.75، 97.50، 96.25، 96.25% على التوالي)، في

حين كان متوسط نسبة الإنبات الأدنى معنوياً في المعاملة الشاهد عند المدّة الزمنية 15 دقيقة لدى السلالة Aghamatales (6.250%) (الجدول، 1). تُشير النتائج إلى أهمية التعقيم السطحي للبذور قبل زراعتها بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز (4%) ولفترةٍ لا تقل عن 20 دقيقة لتحسين نسبة الإنبات من خلال القضاء على جميع المسببات المرضية، وبخاصةٍ عند الزراعة ضمن الظروف المخبرية (الأوساط المغذية). ويُعزى التباين في نسبة الإنبات بين الطرز المدروسة بشكلٍ رئيس إلى التباين في حيوية البذور Seed viability، ويمكن أن يؤدي التعقيم السطحي دوراً مهماً في المحافظة على سلامة البادرات لاحقاً. وأشارت النتائج إلى زيادة نسبة الإنبات مع زيادة تركيز هيبوكلوريت الصوديوم وزمن التعقيم لدى جميع الطرز الوراثية المدروسة، ويُعزى ذلك إلى دور هذه المادة في وقاية البذور من المسببات المرضية، علماً أن زيادة تركيز هيبوكلوريت الصوديوم لا تؤثر سلباً في حيوية الحبوب، ويعود ذلك إلى وجود الغلاف الداخلي Pericarp الذي يحمي جنين البذرة من الضرر الذي يمكن أن ينجم عن تلك المادة [16].

الجدول رقم (1): تأثير التراكيز المختلفة من محلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl)، وفترات التعقيم في نسبة الإنبات.

نسبة الإنبات (%)								
Doma$_1$	Bezater	Icambel	Cham$_5$	Bouhoth$_{11}$	Cham$_3$	Icaverve	Aghamatales	من (د)
16.25^{STU}	8.75^{UVW}	17.50^{RST}	25.05^{NOPQ}	18.75^{QRS}	21.25^{PQRS}	23.80^{OPQR}	6.25^{W}	15
16.25^{STU}	8.75^{UVW}	17.50^{RST}	25.05^{NOPQ}	18.75^{QRS}	21.25^{PQRS}	23.80^{OPQR}	7.500^{VW}	20
22.50^{OPQRS}	15.00^{STUV}	18.70^{QRS}	27.60^{NOP}	21.25^{PQRS}	31.35^{KLMN}	27.60^{NOP}	10.00^{TUVW}	15
36.25^{JKLM}	36.25^{JKLM}	29.95^{LMNO}	37.50^{JK}	27.50^{NOP}	37.35^{JKL}	28.75^{MNOP}	27.50^{NOP}	20
76.25^{DEF}	92.50^{AB}	43.75^{J}	81.25^{CDE}	42.50^{J}	80.00^{CDE}	43.75^{J}	82.50^{CD}	15
78.75^{CDE}	92.50^{AB}	67.50^{GHI}	86.25^{BC}	61.25^{I}	85.00^{BC}	65.00^{HI}	82.50^{CD}	20
86.25^{BC}	97.50^{A}	73.75^{EFG}	86.25^{BC}	70.00^{FGH}	81.25^{CDE}	66.25^{GHI}	96.25^{A}	15
96.25^{A}	100.00^{A}	98.75^{A}	85.00^{BC}	96.25^{A}	83.75^{CD}	83.75^{CD}	97.50^{A}	20
53.59^{AB}	**56.41^{A}**	**45.92^{D}**	**56.74^{A}**	**44.53^{D}**	**55.15^{AB}**	**45.34^{D}**	**51.25^{C}**	ف
50.31^{DE}	53.43^{CD}	38.42^{F}	55.03^{BC}	38.12^{F}	53.46^{CD}	40.35^{F}	48.75^{E}	15
56.87^{ABC}	59.37^{A}	53.42^{CD}	58.45^{AB}	50.93^{DE}	56.83^{ABC}	50.32^{DE}	53.75^{CD}	20
16.25^{O}	8.75^{P}	17.50^{O}	25.05^{KLM}	18.75^{NO}	21.25^{MNO}	23.80^{LMN}	6.87^{P}	0
29.37^{IJK}	25.62^{KLM}	24.32^{KLM}	32.55^{IJ}	24.37^{KLM}	34.35I	28.17^{JKL}	18.75^{NO}	2
77.50^{FG}	92.50^{BC}	55.62^{H}	83.75^{E}	51.87^{H}	82.50^{EF}	54.37^{H}	82.50^{EF}	3
91.25^{CD}	98.75^{A}	86.25^{AD}	85.62^{E}	83.12^{E}	82.50^{EF}	75.00^{G}	96.87^{AB}	4

المتغير	LSD (%1)
تركيز هيبوكلوريت الصوديوم	5.06
زمن التطهير	1.680
الأصناف	3.360
تفاعل زمن التطهير و تركيز هيبوكلوريت الصوديوم	2.663
تفاعل تركيز هيبوكلوريت الصوديوم والأصناف	5.327
تفاعل زمن التطهير والأصناف	3.766
تفاعل زمن التطهير والأصناف وتركيز هيبوكلوريت الصوديوم	7.533
C.V (%)	8.97

تُشير الأحرف المتماثلة على مستوى الأعمدة والسطور إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية عند مستوى معنوية 0.01.

مرحلة استحداث الكالس:

بدأ الكالس بالظهور بعد 6 إلى 8 أيام من زراعة الأجنة على وسط الاستحداث وكان الكالس في البداية ذو قوام طري وكميته قليلة، ولكن تحسّنت خواص الكالس بعد النقل وأصبح أكثر تماسكاً. وتكوّن بعد 45 يوماً من الزراعة الكالس الجنيني، حيث سجلت قراءات نسبة تشكّل الكالس، ونسبة تشكّل الكالس التكويني.

تأثير التراكيز المختلفة من أكسين 2,4-D في استحداث الكالس:

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية ($P\leq0.01$) في نسبة استحداث الكالس بين مستويات منظم النمو 2,4-D المختلفة وبين الطرز الوراثية، والتفاعل المتبادل بينهما. ويُلاحظ أنّ متوسط نسبة استحداث الكالس كان الأعلى معنوياً عند التراكيز (2 ،3 مغ. ل$^{-1}$ 2,4-D) (89.58،83.13 %على التوالي) وبدون فروقات معنوية بينها، في حين كانت نسبة استحداث الكالس الأدنى معنوياً (فشل عملية الاستحداث) لدى المعاملة الشاهد (بدون 2,4-D) (0.00%). تؤكد هذه النتائج أنّ نسبة استحداث الكالس تتحدد بشكلٍ رئيس بوجود الأوكسين 2,4-D في وسط الاستحداث (الجدول،2). وكانت نسبة استحداث الكالس الأعلى معنوياً لدى الصنفين $Bouhoth_{11}$، $Cham_5$ (72.67، 69.67% على التوالي) وبدون فروقاتٍ معنوية بينهما، في حين كانت نسبة استحداث الكالس الأدنى معنوياً لدى الصنف Icaverve (44.00%)، ما يُشير إلى وجود تباين وراثي في كفاءة استحداث الكالس (الجدول، 2). أمّا بالنسبة للتفاعل بين الطرز الوراثية ومستويات منظم النمو 2,4-D المختلفة، فقد كان متوسط نسبة استحداث الكالس الأعلى معنوياً عند التراكيز (1، 2، 3،مغ . ل$^{-1}$ 2,4-D) في الصنفين $Bouhoh_{.11}$ (93.33، 100.00، 93.33% على التوالي)، و$Cham_5$ (90.00،

96.66، 93.33% على التوالي)، وفي التركيز (2 مع.ل$^{-1}$2,4-D) لدى الأصناف Bezater، $Doma_1$، Agmatales، $Cham_3$ (93.33، 93.33، 90.00، 90.00% على التوالي)، في حين كانت الأدنى معنوياً عند المعاملة الشاهد وفي جميع الأصناف (0.00%) (الجدول، 2). بيّنت العديد من الأبحاث أنّ للأوكسين2,4-D الدور الأساسي في استحداث وتشكيل الكالس، وبخاصةٍ في الأنواع النباتية أحادية الفلقة Monocotyledons [13]، ويعود ذلك إلى أنّ هرمون 2,4-D هو الأوكسين الأكثر ثباتاً وفعّالية خلال الزراعة بالإضافة لدوره في تشجّيع الانقسام الخلوي الميتوزي، حيث يعمل الأوكسين على زيادة معدّل اصطناع الأحماض النووية RNA، كما ينشط عمل الأنزيمات التي تعمل على تنشيط التفاعلات الكيميائية اللازمة لتأمين المواد الضرورية للانقسام الخلوي Cell division، مثل تنشيط عمل أنزيم RNA Polymerase [17]. تتوافق هذه النتائج مع ما حصل عليه [28] في نبات القمح. اللذين بينوا أنّ استخدام هرمون2,4-D لوحده هو الأفضل لاستحداث الكالس. أما بالنسبة لتباين استجابة الأصناف لاستحداث الكالس، فقد بيّنت العديد من الدراسات تباين نسبة استحداث الكالس باختلاف الأنواع، وحتى الأصناف المدروسة التابعة للنوع نفسه [24].

الجدول (2): تأثير تراكيز مختلفة من أوكسين 2,4-D في نسبة استحداث الكالس في أصناف القمح المدروسة.

الطرز	المعاملات 2,4-D (مغ . ل$^{-1}$)					متوسط الطرز
	0	1	2	3	4	
Cham.3	0.00_{M}	56.67_{IJK}	90.00_{ABCD}	80.00_{DEF}	50.00_{KL}	55.33_{C}
Doma.1	0.00_{M}	66.67_{GHI}	93.33_{ABC}	83.33_{CDEF}	56.67_{IJK}	60.00_{C}
Bouhoth.11	0.00_{M}	93.33_{AB}	100.0_{A}	93.33_{ABC}	76.67_{EFG}	72.67_{A}
Icaverve	0.00_{M}	53.33_{JKL}	66.67_{GHI}	56.67_{IJK}	43.33_{L}	44.00_{D}
Bezater	0.00_{M}	86.67_{BCDE}	93.33_{ABC}	88.33_{BCD}	66.67_{GHI}	67.00_{B}
Aghamatales	0.00_{M}	83.33_{CDEF}	90.00_{ABCD}	88.33_{BCD}	63.33_{HIJ}	65.00_{B}
$Cham_5$	0.00_{M}	90.00_{ABCD}	96.67_{AB}	93.33_{ABC}	68.33_{GH}	69.67_{AB}
Icambel	0.00_{M}	73.33_{FGH}	86.67_{BCDE}	81.67_{DEF}	56.67_{IJK}	59.67_{C}
متوسط التراكيز	0.00_{D}	75.42_{B}	89.58_{A}	83.13_{AB}	60.21_{C}	

المتغير	نسبة استحداث الكالس(%) LSD (1%)
تركيز 2,4-D	12.65
الصنف	4.86
تفاعل2,4-D والأصناف	10.88
C.V	7.82

تُشير الأحرف المتماثلة على مستوى الأعمدة والسطور إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية عند مستوى معنوية 0.01.

تأثير التراكيز المختلفة من أكسين 2,4-D في نسبة تشكل الكالس الجنيني: بيّنت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية ($P\leq0.01$) في صفة نسبة تشكل الكالس الجنيني بين مستويات منظم النمو 2,4-D المختلفة، والطرز المدروسة والتفاعلات المتبادلة بينها. يُلاحظ أنّ متوسط نسبة تشكل الكالس الجنيني كان الأعلى معنوياً عند تركيز2 مغ . ل$^{-1}$ 2,4-D (61.04%)، في حين فشلت تماماً عملية تشكل الكالس

الجنيني عند المعاملة الشاهد (بدون 2,4-D) (0.00%)(الجدول، 3). وكانت نسبة استحداث الكالس الأعلى معنوياً لدى الصنفين $Doma_1$، $Bouhoth_{11}$ (38.67، 34.00% على التوالي) وبدون فروقات معنوية بينهما، في حين كانت نسبة استحداث الكالس الأدنى معنوياً لدى الطرازين Icaverve، Bezater (21.00، 22.67% على التوالي) وبدون فروقات معنوية بينهما (الجدول،3). أمّا بالنسبة للتفاعل بين الطرز الوراثية ومستويات منظم النمو2,4-D المختلفة، فقد كانت نسبة تشكل الكالوس الجنيني الأعلى معنوياً عند التركيز 2مع.ل$^{-1}$ 2,4-D لدى الأصناف$Doma_1$ ، $Cham_5$، $Bouhoth_{11}$ (76.66، 70.00، 66.66% على التوالي) وبدون فروقاتٍ معنوية بينها، في حين فشلت عملية تشكل الكالس الجنيني في المعاملة الشاهد (بدون2,4-D) ولدى جميع الأصناف المدروسة (0.00%) (الجدول، 3). تُشير النتائج إلى أهمية وجود الأوكسين 2,4-D في وسط استحداث الكالس لتشجيع تشكل الكالس الجنيني، لكن حتى مستوىً معين، حيث سبب ارتفاع تركيز الأوكسينات في الوسط استجابة ضعيفة لتشكل الكالس كذلك فإن التركيز المنخفض من الأوكسين لا يعطي نتائج جيدة، حيث تؤثر زيادة تركيز 2,4-D أكثر من 2مغ . ل$^{-1}$ سلباً في نسبة تشكل الكالس الجنيني، ويُلاحظ بالمقابل أنّ وجود تركيز منخفض جداً من2,4-D يؤثر سلباً في نسبة الكالس الجنيني [3] . وتُشير هذه النتائج إلى أهمية ضبط تركيز الأوكسين 2,4-D في وسط الاستحداث. يُلاحظ مما تقدم، أنّ العوامل الوراثية المسؤولة عن تشكل الكالس الجنيني تختلف عن تلك المسؤولة عن استحداث الكالس. تتوافق هذه النتائج مع ما توصّل إليه [6] بأنّ التراكيز المرتفعة من الأوكسينات في وسط استحداث الكالس في القمح يؤدي إلى ضعف في تشكل الكالس وتحوله بشكلٍ سريع إلى اللون البني أو الأسود، أما التراكيز المنخفضة فتفشل في الحصول على تشكل للكالس بنسبة جيدة وهذا يعود إلى أنّ استعمال الأوكسين بالتراكيز المرتفعة يؤدي إلى انقسام خلوي سريع في مراحل مبكرة من الاستحداث يعقبها

اضطراباً في استقرار تشكل الكالس ثمّ انخفاضاً في معدّل انقسام الخلايا ويليها تماوت نسيج الكالس بسبب إنتاج الخلايا للإيثلين بكمياتٍ كبيرة [23].

الجدول (3): تأثير تراكيز مختلفة من 2,4-D في نسبة تشكل الكالس الجنيني في طرز القمح المدروسة.

الطرز	المعاملات 2,4-D (مغ . ل$^{-1}$)					متوسط الطرز
	0	1	2	3	4	
Cham.3	0.00_{P}	21.67_{LMN}	63.33_{BC}	46.67_{DEFG}	18.33_{MNO}	30.00_{BC}
Doma.1	0.00_{P}	38.33_{GHIJ}	76.67_{A}	50.00_{DEF}	28.33_{JKLM}	38.67_{A}
Bouhoth.11	0.00_{P}	35.00_{HIJK}	66.67_{AB}	45.00_{DEFG}	23.33_{LMNO}	34.00_{AB}
Icaverve	0.00_{P}	16.67_{NO}	48.33_{DEFG}	26.67_{KLMN}	13.33_{O}	21.00_{E}
Bezater	0.00_{P}	18.33_{MNO}	53.33_{CDE}	25.00_{KLMN}	16.67_{NO}	22.67_{DE}
Aghamatales	0.00_{P}	28.33_{JKLM}	55.00_{CD}	$40.00_{FGH}I$	13.33_{O}	27.33_{CD}
Cham$_5$	0.00_{P}	26.67_{KLMN}	70.00_{AB}	38.33_{GHIJ}	25.00_{KLMN}	32.00_{BC}
Icambel	0.00_{P}	30.00_{IJKL}	55.00_{CD}	43.33_{EFGH}	26.67_{KLMN}	31.00_{BC}
متوسط التراكيز	0.00_{D}	26.88_{C}	61.04_{A}	39.38_{B}	20.63_{C}	
المتغير				**نسبة استحداث الكالس(%) LSD (1%)**		
تركيز 2,4-D				**7.74**		
الصنف				**4.78**		
تفاعل2,4-D والأصناف				**10.71**		
C.V				**1.46**		

تُشير الأحرف المتماثلة على مستوى الأعمدة والسطور إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية عند مستوى معنوية 0.01.

مرحلة التجديد Regrneration Stage:

تأثير تركيز السيتوكينينBAP والأوكسين IAA في نسبة تجديد النبات (%) من الكالس: بيّنت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاتٍ معنوية ($P\leq0.01$) في صفة نسبة تجديد النباتات في التراكيز المختلفة من منظم النمو BAP والطرز المدروسة والتفاعلات المتبادلة بينها. يُلاحظ أنّ متوسط نسبة تجديد النباتات كان الأعلى معنوياً عند استعمال 1 مغ . ل$^{-1}$BAP و0.5 مغ.ل$^{-1}$IAA (33.75%)، في حين كان الأدنى معنوياً في المعاملة الشاهد(بدون منظمات النمو)، والمعاملة 0 مغ . ل$^{-1}$ BAP و 0.5 مغ . ل$^{-1}$IAA(0.00%). ما يؤكّد أهمية وجودBAP في تجديد النباتات من الكالس، ولكن تؤثر زيادة تركيزه عن حدٍ معين سلباً في نسبة تجديد النباتات (الجدول، 4). وبالنسبة الطرز المدروسة فقد كان متوسط نسبة تجديد النبات الأعلى معنوياً لدى الصنف$Doma_1$ (23.00%)، تلاه وبفروقات معنوية الأصناف $Bouhoth_{11}$، $Cham_3$، $Cham_5$ (18.00، 16.73، 16.67% على التوالي) وبدون فروقات معنوية بينها، في حين كانت نسبة تجديد النبات الأدنى معنوياً لدى الصنفين Icaverve، Bezater (9.00، 10.20% على التوالي) وبدون فروقات معنوية بينهما (الجدول،4). أما بالنسبة للتفاعل المتبادل بين الطرز المدروسة والتراكيز المختلفة من منظم النموBAP، فكانت نسبة التجديد الأعلى معنوياً في الصنف $Doma_1$ عند المعاملة 1 مغ . ل$^{-1}$ BAP و0.5 مغ . ل$^{-1}$IAA (48.33%)، في حين كانت الأدنى معنوياً في المعاملة الشاهد (بدون منظمات النمو)، والمعاملة 0 مع.ل$^{-1}$ BAP ولدى جميع الطرز المدروسة (0.00%) (الجدول، 4). يُلاحظ أنّ العامل الأهم المحدد في تجديد النباتات هو وجود السيتوكينين في وسط التجديد (BAP)، لما لها من دورٍ مباشر في تشكيل البراعم من الأنسجة غير المتمايزة (الكالس)، ويعود ذلك إلى دورها في الانقسام الخلوي Cell division، فقد دلّت البحوث على أنّ السيتوكينينات تُنشط اصطناع البروتينات اللازمة للانقسام الخلوي، كما

تُشجع تشكل الـRNA [1]. وقد كان أفضل وسط لتجديد النبات 1 مغ . ل$^{-1}$BAP و0.5 مغ.ل$^{-1}$IAA وهذا يتوافق مع ما حصل عليه [26]، كما يتوافق مع ما حصل عليه [19]، حيث أعطى حمض الإندول الخلي عند دمجه مع Benzyl Amino Purine استجابة للتجديد في نبات القمح بنسبة تزيد عن40 ٪ تقريباً. عموماً، تُسهم السيتوكينينات في تحسين دور الأوكسينات في تشكيل الكالس [32].

الجدول (4): تأثير تركيز السيتوكينينBAP والأوكسين IAA في نسبة تجديد النبات في طرز القمح المدروسة.

الأصناف	نسبة تجديد النبات (%)						متوسط الطرز
	المعاملات مغ . ل-1						
	6-BAP	0	1	2	3	4	
	IAA	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
Bouhoth.11	-	0.00_{P}	35.00_{CD}	28.33_{EF}	18.33_{HIJ}	8.33_{LM}	18.00_{B}
Doma.1	-	0.00_{P}	48.33_{A}	31.67_{DE}	21.67_{GH}	13.33_{JK}	23.00_{A}
Bezater	-	0.00_{P}	26.67_{EFG}	15.00_{IJK}	6.00_{NO}	3.33_{NOP}	10.20_{DE}
Cham$_5$	-	0.00_{P}	41.67_{B}	23.33_{FGH}	13.33_{JK}	5.00_{NOP}	16.67_{BC}
Aghamatales	-	0.00_{P}	31.67_{DE}	21.67_{GH}	15.00_{IJK}	6.00_{NO}	14.87_{C}
Icaverve	-	0.00_{P}	20.00_{HI}	13.33_{JKL}	8.33_{LMN}	3.33_{NOP}	9.00_{E}
Cham.3	-	0.00_{P}	38.33_{BC}	28.33_{EF}	11.67_{KL}	5.33_{NO}	16.73_{BC}
Icambel	-	0.00_{P}	28.33_{EF}	20.00_{HI}	6.66_{MNO}	3.00_{OP}	11.60_{D}
متوسط التراكيز	-	0.00_{E}	33.75_{A}	22.71_{B}	12.63_{C}	5.95_{D}	-
المتغير	**LSD (%1) نسبة تجديد النبات من الكالس(%)**						
تركيز BAP	**2.10**						
الصنف	**2.35**						
تفاعل BAP، والأصناف	**5.26**						
C.V	**6.21**						

تُشير الأحرف المتماثلة على مستوى الأعمدة والسطور إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية عند مستوى معنوية .0.01

مرحلة النموات المتجددة Shoot Regeneration:

تأثير تركيز السيتوكينينBAP والأوكسين IAA في عدد النموات المتشكلة من الكالس:

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية ($P\leq0.01$) في عدد النموات المتشكلة من الكالس في التراكيز المختلفة من منظم النمو BAP والطرز المدروسة والتفاعلات المتبادلة بينها. يُلاحظ أنّ متوسط عدد النموات المتشكلة كان الأعلى معنوياً عند استعمال 1 مغ . ل$^{-1}$BAP و0.5 مغ . ل$^{-1}$IAA (12.88%)، في حين كانت عدد النموات المتشكلة الأدنى معنوياً في المعاملة الشاهد (بدون منظمات النمو)، والمعاملة 0 مغ . ل$^{-1}$ BAP و 0.1 مغ . ل$^{-1}$IAA (0.00%). ما يؤكّد أهمية وجود BAP في عدد النموات المتشكلة، ولكن تؤثر زيادة تركيزه عن حدٍ معين سلباً في عدد النموات (الجدول، 5). وكان متوسط عدد النموات المتشكلة من الكالس الأعلى معنوياً لدى الصنفين $Bouhoth_{11}$، $Doma_1$ (7.733، 7.733% على التوالي) وبدون فروقاتٍ معنوية بينهما، في حين كان الأدنى معنوياً لدى الصنف Icaverve (3.00%) (الجدول، 5). أما بالنسبة للتفاعل المتبادل بين الطرز المدروسة والتراكيز المختلفة من منظم النموBAP، فكانت عدد النموات المتشكلة من الكالس الأعلى معنوياً في الأصناف$Doma_1$،$Cham_5$ ، $Bouhoth_{11}$، عند المعاملة 1 مغ.ل$^{-1}$ BAP و0.5 مغ.ل$^{-1}$IAA (16.33، 15.33، 15 %على التوالي) وبدون فروقات معنوية بينها، تلاها وبفروقات معنوية الصنف$Doma_1$ عند المعاملة 2 مغ.ل$^{-1}$ BAP و0.5 مغ.ل$^{-1}$IAA (13.33%)، في حين كان عدد النموات المتشكلة الأدنى معنوياً في المعاملة الشاهد (بدون منظمات النمو) عند جميع الطرز المدروسة (0.00 %) (الجدول، 5). يُلاحظمما سبق، أنّ أفضل وسط لتجديد النبات من حيث نسبة التجديد وعدد النموات المتشكلة من الكالس، كان الوسط المغذي المضاف إليه 1 مغ . ل$^{-1}$ BAPو0.5 مغ . ل$^{-1}$IAA، وهذا يتوافق مع ما حصل عليه [20] . كما أن التفاعل بين BAP و IAA بتركيز منخفض له تأثير فعّال في تكوين النموات، حيث أنّ وجود اثنين من

منظمات النمو المختلفة ضرورياً لنجاح تكوين نموات النبات في زراعة الأنسجة، و يُعد التفاعل بين السيتوكينين والأوكسين مهم جداً في تنظيم نمو النبات. يؤدي الأوكسين عند إضافته بتركيز منخفض في مرحلة تشكل النموات دوراً مهماً يتمثل في زيادة نفاذية الخلية والضغط الحلولي، وتشجيع تكوين البروتينات، كما يُحفز وجود تركيز مرتفع من السيتوكينين مع تركيز منخفض من الأوكسين نمو النبات وتكوين النموات في العديد من الأنواع [14].

الجدول (5): تأثير تركيز السيتوكينينBAP والأوكسين IAA في عدد النموات المتشكلة في طرز القمح المدروسة

الأصناف	عدد النموات المتشكلة						متوسط الطرز
	المعاملات مغ . ل-1						
	6-BAP	0	1	2	3	4	
	IAA	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
Bouhoth.11	-	0.00_{S}	15.00_{AB}	12.33_{CD}	6.66_{HI}	4.66_{JKL}	7.73_{A}
Doma.1	-	0.00_{S}	16.33_{A}	13.33_{BC}	5.66_{IJ}	3.33_{KLMNO}	7.73_{A}
Bezater	-	0.00_{S}	12.67_{CD}	9.33_{FG}	4.00_{JKLMN}	1.33_{PQRS}	5.46_{C}
Cham5	-	0.00_{S}	15.33_{A}	11.33_{DE}	4.66_{JKL}	2.00_{OPQR}	6.66_{B}
Aghamatales	-	0.00_{S}	12.00_{CDE}	8.00_{GH}	3.00_{LMNO}	2.33_{NOPQ}	5.06_{CD}
Icaverve	-	0.00_{S}	8.66_{FG}	4.33_{JKLM}	1.33_{PQRS}	0.66_{QRS}	3.00_{F}
Cham.3	-	0.00_{S}	12.67_{CD}	6.66_{HI}	1.66_{OPQR}	0.33_{RS}	4.26_{DE}
Icambel	-	0.00_{S}	10.33_{EF}	5.00_{IJK}	2.66_{MNOP}	1.66_{OPQRS}	3.93_{E}
متوسط التراكيز	-	0.00_{E}	12.88_{A}	8.79_{B}	3.70_{C}	2.04_{D}	-
المتغير	**LSD (%1) عدد النموات المتشكلة (%)**						
تركيز BAP	**0.99**						
الصنف	**0.80**						
تفاعل BAP، والأصناف	**1.80**						
C.V	**5.25**						

تُشير الأحرف المتماثلة على مستوى الأعمدة والسطور إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية عند مستوى معنوية .0.01

الاستنتاجات

1- تُعد عملية تعقيم البذور بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز (4%) مدّة لا تقل عن 20 دقيقة فعّالة في الحد من نمو المسببات المرضية، التي يمكن أن تؤثر سلباً في إنبات البذور واسترساء البادرات.

2- تتحدد نسبة استحداث الكالس بشكلٍ رئيس بوجود المركب 2,4-D، وتؤثر زيادة 2,4-D عن 3 مغ.ل$^{-1}$ سلباً في تشكّل الكالس، ويجب ألاّ يقل تركيزه عن 1 مغ.ل$^{-1}$.

3- يُعد وجود السيتوكينين في وسط التجديد (BAP) العامل الأهم المحدد لتجديد النبات، وقد كان أفضل وسط لتجديد النبات (1 مغ . ل$^{-1}$BAP و0.5 مغ.ل$^{-1}$IAA)، ولكن تُؤثر زيادة تركيز BAP في الوسط عن 2 مغ . ل$^{-1}$BAP سلباً في نسبة التجديد.

4- يتحدد عدد النموات المتشكلة من الكالس بوجود السيتوكينين في وسط التجديد (BAP)، وقد أعطى التركيز (1 مغ . ل$^{-1}$BAP و0.5 مغ.ل$^{-1}$IAA) أفضل عدد من النموات المتشكلة.

التوصيات

1- استخدام تقانة زراعة الأنسجة النباتية في غربلة وتقييم استجابة الأنواع النباتية المختلفة للعديد من الإجهادات البيئية نظراً لسهولتها وتوفيرها للوقت والجهد، إضافةً إلى إمكانية غربلة أعداد كبيرة من النباتات في وقتٍ قصير.

2- استخدام تقانة التغيرات الوراثية الجسمية في برامج التحسين الوراثي للقمح القاسي لإنتاج أصناف متحملة للإجهاد الملحي.

3- متابعة الدراسة والانتخاب الحقلي للسلالات المتجددة عن الكالس.

References:

1- Abdullah HA, Said AGE, Khalafalla MM. Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in some wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars grown in Sudan. **African Journal of Biotechnology**. 2012; 11(16):3793-3799.

2- Albiski, F.; S. Najla, R. Sanoubar, N. Alkabani and R. Murshed. 2012. *In vitro* screening of potato lines for drought tolerance. **Physiol. Mol. Biol. Plants**,18(4);315-321.

3- Al-Khayri J.M., Naik P.M., and Alwael H.A. (2017): *In vitro* plant regeneration of 'Ramsi' tomato landrace (*Solanum lycopersicum* L.) from cotyledonary explants. **Acta Horticulture**. 1187: 43-50.

4- Anil V.S., Bennur S. and Lobo S. (2018): Soma clonal variations for crop improvement: Selection for disease resistant variants *in vitro*. **Plant Science Today**, 5(2): 44-54.

5- Bouiamrine. EL- H, M. Diouri and R. EL Halimi. 2012. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity from mature and immature durum wheat embryos. **International Journal of Biosciences (IJB)**, Vol. 2, No. 9, p. 29-39.

6- Dargahlou .A. S , E. D. Uliaie, and A. Bandehagh. 2017. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of some Iranian wheat (Triticum aestivum L.) genotypes. **J. Bio. & Env. Sci.** Vol. 10, No. 5, p. 275-283.

7- Ding L, Li S, Gao J, Wang Y, Yang G, He G. 2009. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. **Molecular Biology Reports** 36, 29-36.

8- Efferth .T.(2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. **Journal Engineering**. Vol.5, p. 50-59.

9- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016. FAO fertilizer and plant nutrition bulletin: Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis. **FAO, Rome, Italy**. 203p

10- FAOSTAT dat (2018). h**ttp://apps.fao.org/faostat/deful.jsp**, accessed 2018.

11- Fazeli-nasab, B.; O. Mansour and A. Mehdi. 2012. Estimate of callus induction and volume immature and mature embryo culture and response to in-vitro salt resistance in presence of NaCL and ABA in salt tolerant wheat cultivars. **Intl Agri Crop Sci**., 4(1):8-16.

12- Fehér A. (2019): Callus, dedifferentiation, tot potency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? **Frontiers in Plant Science**. 10:536.

13- Habiba RMM, El-Maksoud MMA. Gomaa KAA. 2012, Effect Of Genotypes And Their Interaction With 2, 4 Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) Levels On Wheat's Immature Embryo Culture Response. **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**. v: 42(1):37-52.

14- Hafeez I, Sadie B, Sadaqat HA, Kainth RA, Iqbal MZ, Khan IA. 2012. Establishment of efficient *in vitro* culture protocol for wheat land races of Pakistan. **African Journal of Biotechnology** v(11), 2782-2790.

15- Ikeuchi M., Sugimoto K. and Iwase A. (2013): Plant callus: mechanisms of induction and repression. **Plant Cell**. 25, 3159–3173.

16- Indra AP, Krishnaveni S (2009). Effect of hormones, explants and genotypes in in-vitro culturing of Sorghum. **J Biochem Tech** 1:96-103

17- Kareem T.K. and Karrar A.T. (2018): Biochemical and physiological changes of callus growth and lycopene pigment production from tomato (*Lycopersicon esculentum*

Mill.) under drought stress. **International Journal of Innovative Science and Technology**. 3(2), 7-21

18- Khan UW, Ahmed R, Shahzadi I, Maroof Shah M. 2015. Some important factors influencing tissue culture response in wheat. **Sarhad Journal of Agriculture** 31, 199-209.

19- Mehmood K, Arshad M, Ali Gm, Razzaq A. 2013, Tissue Culture Responses Of Some Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Cultivars Grown In Pakistan. **Pak. J. Bot**. V 45(SI):545-549.

20-Mohammed. A. M, A. O. Alfalahi, A. S. Abed and Z. N. Hashem. 2019. Callus Induction and Plant Regeneration from Immature Embryos of Two Wheat Cultivars (*Triticum aestivum* L.). **Iraqi Journal of Biotechnology**, Vol. 18, No. 2, 57-63.

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

22- Nasution N.H. and Nasution I.W. (2019): The Effect of plant growth regulators on callus induction of Mangos teen (*Garcinia mangostana* L.). IOP Conf. Ser.: **Earth Environment and Science**. 305 012049.

23- Neiverth, A., Silva, J.B.D., Schuster, I., Santos, M.F.D., Vendruscolo, E.C.G. 2010. Regeneration of wheat plants

from wheat (*Triticum aestivum* L. cv. CD104) mature embryos. **Scientia Agraria** **11**:101-108.

24-Pal S.P., Alam I., Anisuzzaman M., Sarker K.K., Sharmin S.A. and Alm M.F. (2007): Indirect organogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* l.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. 31: 63-70.

25- Papry M., Ahsan S.M., Shahriyar S., Sathi M.A., Howlader P., Robbani M., Akram S. and Biswas M.J.H. (2016): *In vitro* regeneration protocol development via callus formation from leaf explants of tomato (*Solanum Lycopersicon* Mill.). **Tropical Plant Research** V 3(1): 162-171.

26-Pola, S., Mani, N.S. and Ramana, T. 2009. Mature embryo as a source material for efficient regeneration response in Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench.). **Seed Sci J** 26:93-104

27- Rao S. and Jabeen F.T.Z. (2013) *In vitro* selection and characterization of polyethylene glycol (PEG) tolerant callus lines and regeneration of plantlets from the selected callus lines in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)". **Physiology and Molecular Biology of Plants** V19(2). 261-268.

28-Rashid, U., S. Ali.,G. M. Ali, N. Ayub and M. S. Masood. 2009. Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistan bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Electronic Journal of Biotechnology ISSN**, vol.12. no.3, p.1-12.

29- Raza, A., A. Razzaq, S. S. Mehmood, X. Zou, X. Zhang, Y. Lv, and J. Xu. 2019b. Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: **A review. Plants** 8 (2):34.

30- Sahara A., Reflini, Utomo C. and Liwang T (2019): Early detection of soma clonal variation in oil palm callus culture through cytological and SDS-PAGE protein analysis. The 2nd International Conference on Natural Resources and Life Sciences (NRLS) **IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci**. 293 012005..

31- Sherkar H.D. and Chavan A.M. (2014): Studies on callus induction and shoot regeneration in tomato. **Science Research Reporter**. 4(1): 89-93.

32- Soheilikhah Z., Karimi N., Ghasmpour H.R. and Zebarjadi A.R. (2013): Effects of saline and mannitol induced stress on some biochemical and physiological parameters of

Carthamus tinctorius L. varieties callus cultures. **Australian Journal of Crop Science**. 7(12): 1866-1874.

33- Wayase U.R. and Shitole M.G. (2014): Effect of plant growth regulators on organogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Dhanashri. **International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology**. 2: 65-71

34- Yang S, Xu K, Wang Y, Bu B, Huang W, Sun F, Liu S, Xi Y (2015) Analysis of biochemical and physiological changes in wheat tissue culture using different germplasms and explant types. **Acta Physiol Plant** 37:1-10. https:// doi. org/ 10. 1007/ s11738- 015- 1861-4.