تأثير استخدام تراكيز مختلفة من الأوكسين والسيتوكينين في استحداث الكالوس والكالوس الجنيني في الزعفران الحلبي (*Crocus aleppicus* B.)

سلاف بريدي[1]، خليل المعري[1]، فهد البيسكي[2]

(1) قسم علوم البستنة_ كلية الزراعة_ جامعة دمشق.

(2) الهيئة العامة للتقانة الحيوية_ وزارة التعليم العالي.

الملخص:

قمنا في هذا البحث ولأول مرة في سوريا بتطبيق تقانة زراعة الأنسجة على النوع البري للزعفران الحلبي (*Crocus aleppicus* B.) بهدف استحداث الكالوس والكالوس الجنيني بدءاً من البراعم القمية والجانبية.

أظهرت نتائج التطهير السطحي لكورمات النوع المدروس أن أفضل تركيز مستخدم من محلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) هو 5% لمدة 30 دقيقة.

كما تبيّن أن زراعة البراعم القمية أعطت أعلى نسبة لاستحداث الكالوس (54.40%)، وكذلك لتشكل الكالوس الجنيني (40.06%)، على عكس البراعم الجانبية التي أعطت نسباً منخفضة (18.91 و13.97%) على التوالي.

لم تعطِ العينات النباتية المزروعة (البراعم القمية والبراعم الجانبية) كالوساً أوكالوساً جنينياً عند الزراعة في وسط الشاهد (وسط خالٍ من الأوكسين 2,4-D والسيتوكينين 6-BAP)، في حين أعطت عند استخدام مزائج هرمونية مختلفة من هذين الهرمونين كالوساً وكالوساً جنينياً بنسب اختلفت باختلاف التراكيز المستخدمة من كل منهما وبحيث أعطى المزيج الهرموني 0.25 مغ.ل$^{-1}$ 2,4-D + 1 مغ.ل$^{-1}$ 6-BAP أعلى نسبة لاستحداث الكالوس (95.00 و37.5%)، وكذلك أعلى نسبة لتشكل الكالوس الجنيني (90.00 و29.17%) على التوالي، وذلك بالمقارنة مع الشاهد.

الكلمات المفتاحية: الزعفران الحلبي، الكالوس، الكالوس الجنيني، منظمات النمو، التطهير السطحي.

Effect of different concentrations of auxin and cytokinin on callus Induction and embryogenic callus formation in (*Crocus aleppicus* B.)

Solaf Bredy[(1)], Khalil Almaarri [(1)], Fahed Albiski[(2)]

[(1)] Department of Horticulture Science,Faculty of Agriculture,University of Damascus

[(2)] National Commission for Biotechnology, Ministry of Higher Education.

Abstract:

For the first time in Syria, we have studied the effect of different concentration of auxin and cytokinin on callus induction and embryogenic callus formation in *Crocus aleppicus* B. from apical and lateral buds.

The results of the surface sterilizing experiment revealed that the best used concentration of sodium hypochlorite solution (NaOCl) was 5% for 30 minutes.

The results revealed that the apical buds were better in callus induction (54.40%) and embryogenic callus formation (40.06%) than lateral buds with (18.91 and 13.97%) respectively.

The explants (apical and lateral buds) failed to form callus and embryogenic callus in the control experiment (0.00 2,4-D+0.00 6-BAP), but these explants produced different percentages of callus and embryogenic callus when we used a combination of 2,4-D and 6-BAP, whereas the mixture (0.25 $mg.l^{-1}$ 2,4-D + 1 $mg.l^{-1}$ 6-BAP) achieved the highest percentage for callus (95.00 and 37.5%) and embryogenic callus (90.00 and 29.17%) respectively.

Key words: *Crocus aleppicus*, Callus, Embryogenic callus, Growth regulators, surface sterilizing.

المقدمة Introduction:

تعتبر الفصيلة السوسنية Iridaceae واحدة من أغنى الفصائل النباتية بالأنواع والأكثر انتشاراً في العالم، ويتمثل ذلك بـ 65– 76 جنساً وأكثر من 2030 نوعاً يتبع لها [10]، وينتشر الجنس Crocus الذي ينتمي لهذه الفصيلة في كل من آسيا، أوروبا وشمال افريقيا [10]، ويضم نحو 80 نوعاً برياً [33]، ومنها الزعفران المزروع *Crocus sativus* L.، كما تزرع العديد من أنواعه كنباتات زينة، ولبعضها الآخر استخدامات وفوائد طبية [14]، وقد سَجَّلَت الفلورا السورية 14 نوعاً من الزعفران [22].

إنّ الزعفران الحلبي *Crocus aleppicus* B. أحد الأنواع البرية التي تنتمي لهذا الجنس، وينتشر برياً في بلاد الشام، ويتميز بكورمة بيضاوية قطرها 1.5 سم، ذات أغلفة بنية مخططة بعروق متوازية، الخارجية منها شريطية نوعاً ما، ويتأرجح عدد أوراقه بين 4–7 أوراق، عرضها 1–1.5 مم، أما الأغمدة فعددها 2–3، مبيضّة أو مشوبة بالبني قليلاً. كما يتميز بأنبوبة زهرية بأطوال مختلفة وبتلات ذات قمة متضيقة، وعرضها 5–7مم، بيضاء معرقة كثيراً أو قليلاً بأزرق قاتم أحياناً برتقالية قليلاً عند قاعدة البتلة، أمّا الأسدية فهي عبارة عن خيوط طويلة نوعاً ما، تحمل مآبر مصفرة، المياسم برتقالية متفرعة في شرائط خيطية أقصر من المآبر والثمرة كبسولة بيضوية الشكل (1).

يزهر الزعفران الحلبي أواخر شهر تشرين الأول وحتى شهر كانون الثاني، وينتشر في سورية (السلسلة الجبلية الشرقية، وادي القرن، جبل معلولا، قارة، سهل الديماس، قطنا، حوران، السويداء، حلب)، بالإضافة لانتشاره في كل من لبنان وفلسطين [22].

الشكل (1): نبات الزعفران الحلبي .B *Crocus aleppicus*

يعود استخدام الزعفران إلى العصور القديمة، حيث يستخدم غالبا في الطب الشعبي، وفي الصبغات الطبيعية، وكتابل في الصناعات الغذائية [25].

كما يستخدم على شكل مشروب لمعالجة العديد من الأمراض كالسعال، واضطرابات المعدة، الجدري، الزكام، الربو واضطرابات الجهاز الدوراني [2].

كما ذكر سابقا، فإن هذا النوع ينتمي للجنس Crocus، وتشير الدراسات إلى كون مياسم أزهار هذا الجنس تحتوي بشكل رئيسي على ثلاث مركبات فعالة هي الكروسين Crocin، البيكروكروسين Picrocrocin، والسافرنال Safranal، المسؤولة عن اللون والطعم والرائحة بالترتيب [34].

للبيكروكروسين تأثير مهدئ ضد التشنجات [9]، ومستخلصات الكروسين لها استخدامات في معالجة أمراض الجهاز الدوراني وجهاز التنفس [3]. ويعتبر الكروسين أيضاً مضاد أكسدة يعمل ضد إجهادات الأكسدة في الخلايا العصبية [16].

بالإضافة للتأثير الإيجابي للمستخلص المائي للزعفران عند المرضى الذين يعانون من الربو التحسسي [11]، كما نشر [12] أن مستخلصات الزعفران استخدمت ضد أنواع مختلفة من الأورام والسرطانات منذ العصور القديمة، وأظهرت بعض الابحاث أن الزعفران يمكن أن يكون ذو تأثير ايجابي محتمل ضد السرطان [2].

كما أن لمستخلص الزعفران أو مركباته الفعالة (الكروسين، البيكروكروسين) تأثيراً إيجابياً في علاج اضطرابات الجهاز العصبي المصاحبة لتلف الذاكرة [35].

تستخدم تقانة زراعة الأنسجة النباتية كطريقة بديلة عن الطرائق التقليدية في إكثار النباتات صعبة الاكثار، إلى جانب دورها في التحسين الوراثي للنباتات، وبالتالي زيادة الإنتاج كماً ونوعاً.

ويعد تطبيق هذه التقانة في النباتات أحاديات الفلقة أكثر صعوبة مقارنة بالنباتات ثنائيات الفلقة، كما أنها أكثر صعوبة في الفصيلة السوسنية والتي يتبع لها الزعفران [24].

تعد مرحلة الزراعة الأولية (التأسيسية) أولى مراحل الزراعة النسيجية وتهدف إلى الحصول على عينات خالية من التلوث وقادرة على النمو، وفي هذه المرحلة تحديداً فإن عملية التطهير السطحي للأجزاء النباتية المستخدمة في الزراعة الأولية هي أولى وأهم الخطوات التي يتوقف عليها نجاح أو فشل الزراعة النسيجية [1]. يتوقف نجاح التطهير السطحي على عدة عوامل منها الجزء النباتي المراد تطهيره، فالتلوث مشكلة حقيقية خطيرة تواجه الإكثار الخضري الدقيق لأحاديات الفلقة وخصوصاً في حال استخدمت أجزاء أرضية كالأبصال مصدراً للخزعات النباتية المستخدمة في مرحلة الزراعة الأولية [24]. كما يعتمد نجاح التطهير على نوع وتركيز المادة المستخدمة في التطهير، والزمن اللازم للتطهير [1]، وتستخدم عادة مادة هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl نظراً لفاعليتها في عمليات التطهير السطحي في العديد من النباتات المزروعة مخبرياً [28].

تختلف قدرة النباتات على تكوين الكالوس والكالوس الجنيني باختلاف النوع النباتي والطراز والتركيب الوراثي واختلاف عمر ومصدر الخزعة النباتية [6]، وتتأثر هذه العملية باختلاف تركيب الوسط الغذائي ودرجة الحرارة والإضاءة، إذ تعتبر هذه العوامل من الشروط الأساسية لنجاح تشكل مزارع الكالوس [7].

لقد تم استحداث الكالوس والكالوس الجنيني عند الزعفران باستخدام خزع نباتية متنوعة مثل أنسجة الكورمة على وسط LS المضاف له 2×10^{-5} من البننزيل أدنين BA و2×10^{-5} من نفتالين أسيتك أسيد NAA [4]، البراعم القمية والبراعم الجانبية على وسط LS المضاف له 4 مغ. ل$^{-1}$ NAA و4 مغ. ل$^{-1}$ BA [15]، المبيض ومختلف

الأعضاء الزهرية على وسط MS المضاف له (0.5–5.4 µM نفتالين أستيك أسيد NAA+ 8.9– 22.2 µM BAP+ 9.3– 23.2 µM كينيتين KN) [27]، بالإضافة إلى قواعد الأوراق على وسط MS (سكروز 5%) المضاف له 4 مغ. ل $^{-1}$ NAA + 4 مغ. ل$^{-1}$ TDZ [29].

بينت الأبحاث التي تمت على بعض النباتات أحادية الفلقة (الذرة البيضاء *Sorghum bicolor* L.) أن للأوكسين داي كلوروفينوكسي حمض الخل 2,4–D الدور الأهم في استحداث الكالوس، وتكوين الكالوس الجنيني [13]، وتبين أن زيادة تركيز 2,4–D يعزز تشكيل الكالوس ولكنه يثبّط ويعيق تشكيل النموات عند الزعفران *Crocus sativus* L. [24]. في حين تؤدي التراكيز العالية جداً من2,4–D عند زراعة جنين القمح إلى إعطاء كالوس غير مرغوب فيه وطري، وتؤثر سلباً في معدل تجديد النبات [20].

يؤثر الأوكسين وبالمشاركة مع السيتوكينينات المستخدمة في الوسط المغذي بشكل كبير في استحداث الكالوس وأيضاً في نضج الأجنة الجسمية [5]، وقد بيّن بعض الباحثين [26] أن انخفاض نسبة الأوكسين إلى السيتوكينين تعتبر ضرورية لاستحداث الكالوس الجنيني في ورد الشاي الهجين.

بيّنت دراسة أجريت لاستحداث الكالوس من البراعم القمية لنبات الزعفران المغربي أن الوسط المغذي MS المضاف إليه1مغ. ل$^{-1}$ من 2,4–D و 1مغ. ل$^{-1}$ من6–BAP كان الأمثل لاستحداث الكالوس بقيمة بلغت85.42%، متفوقاً على باقي المعاملات الهرمونية (معاملة الشاهد بدون هرمونات نباتية، 0.25 مغ. ل$^{-1}$ 2,4–D + 1 مغ. ل$^{-1}$ 6–BAP، 0.1 مغ. ل$^{-1}$ 2,4–D + 1 مغ. ل$^{-1}$ 6–BAP، 0.25 مغ. ل$^{-1}$ 2,4–D + 0 مغ. ل$^{-1}$ 6–BAP) [18].

تطرقت بعض الدراسات إلى استجابة الخزع النباتية من الخلايا الميرستيمية القمية والجانبية لكورمة الزعفران لتحريض استحداث الكالوس من النسيج الميرستيمي وتشكيل الأجنة الجسمية، ووجدت أن الخلايا الميرستيمية القمية أنتجت الكالوس الأعلى جودة مقارنةً مع الخلايا الميرستيمية الجانبية [32].

يؤثر التركيب الوراثي للخزع النباتية المختلفة والطراز الوراثي في كفاءة تكون الكالوس الجنيني من الكالوس، الأمر الذي يعزى الى تفاوت مستوى الهرمونات النباتية الداخلية وخصوصاً السيتوكينينات حيث يمكن أن يؤثر ذلك في استجابتها لاستحداث الكالوس وتكوين الأجنة الخضرية [17].

مبررات البحث:Research Justifications

يُعد الزعفران الحلبي *C. aleppicus* أحد أهم الأنواع البرية والطبية المنتشرة في سوريا ونظراً لقلّة الأبحاث حول هذا النوع، إضافة إلى النقص الحاد في كورمات هذا النوع البري وتدهوره مما يجعله من الأنواع المهددة بالانقراض إضافة إلى معدلات الإكثار المنخفضة جداً، كما أن استحداث الكالوس والكالوس الجنيني ضروري لفهم العمليات الفيزيولوجية والبيوكيميائية والوراثية التي تحدث في النبات.

لــذا هــدف البحث إلى:

1. تحديد التركيز الأمثل والفترة الزمنية المناسبة من محلول هيبوكلوريت الصوديوم في التطهير السطحي للخزعات النباتية لنبات الزعفران الحلبي *C. aleppicus*.
2. تحديد التراكيز المثلى من المزيج الهرموني لبعض منظمات النمو النباتية (2.4- D+ 6-BAP) لاستحداث الكالوس والكالوس الجنيني عند النوع *C. aleppicus*.

مواد البحث وطرائقهِ Materials and Methods:

نُفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية النباتية التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق وفي مخابر كلية الزراعة بجامعة دمشق خلال الأعوام 2018 – 2019، حيث استعمل في تنفيذ هذا البحث النوع البري للزعفران الحلبي*C. aleppicus* .

تم تطهير الكورمات بالكحول الإيتيلي (70%) مدة دقيقة واحدة مع التحريك، ثم عوملت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) بتراكيز مختلفة (0، 1، 2، 3، 4، 5%) لمدّة 15 أو30 دقيقة، ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات متتالية بمعدل 5، 10، 15 دقائق.

زُرعت العينات النباتية في وسط MS [23] المضاف له 30 غ.ل$^{-1}$ سكروز و7 غ.ل$^{-1}$ آجار وضبطت درجة الحموضة (pH) 5.8.

تمّ في مرحلة استحداث الكالوس وتشكل الكالوس الجنيني زراعة البراعم الجانبية والقمية من الكورمات على الوسط المغذي MS المضاف إليه تراكيز مختلفة من منظمي النمو الأوكسين 4،2 دي كلوروفينوكسي أستيك أسيد (2,4-D) (0، 0.25، 0.5، 1، 1.5، 2 مغ. ل$^{-1}$)، والسيتوكينين Benzyl amino purine (6 –BAP) (0، 0.25، 0.5، 1، 1.5، 2 مغ.ل$^{-1}$). وحضّنت في الظلام بشكل كامل على درجة حرارة 24±1م°، ورطوبة نسبية 70%، وتم نقل الكالوس إلى أنابيب أخرى تحوي نفس الوسط السابق بمعدل مرة كل ثلاثة أسابيع، و بعد 50- 60 يوم تمّ تحديد التركيز الأمثل من المزيج الهرموني 2,4-D و6-BAP مع الخزعة الأفضل من خلال دراسة نسبة استحداث الكالوس وبعد 90- 120 يوم للكالوس الجنيني.

التصميم التجريبي والتحليل الإحصائي:

صُممت التجربة وفق التصميم العشوائي التام (CRD)، وحُللت النتائج باستخدام برنامج XLSTAT. 2018 وأجري تحليل التباين (Two way ANOVA) باستخدام اختبار Fisher، حيث تم مقارنة المتوسطات وحساب قيمة أقل فرق معنوي LSD عند مستوى ثقة 99%.

النتائج والمناقشة Results and Discussion:

1. المرحلة التأسيسية (التطهير السطحي) (Surface disinfection):

يلاحظ من الجدول (1) أن تركيز 5% من هيبوكلوريت الصوديوم لمدة 30 دقيقة هو الأفضل معنوياً (96.19%) مقارنة مع التراكيز الأخرى المستخدمة، في حين لوحظ إصابة جميع العينات المزروعة بالمسببات المرضية عند غياب هيبوكلوريت الصوديوم نهائياً. وفيما يخص التفاعل بين تركيز هيبوكلوريت الصوديوم المستخدم وزمن التطهير، فقد تفوّق التركيز (5%) لمدة 30 دقيقة معنوياً على باقي المعاملات.

الجدول (1): تأثير التراكيز المختلفة من هيبوكلوريت الصوديوم وزمن التطهير في نسبة العينات السليمة

تركيز NaOCl	الزمن (دقيقة)	نسبة العينات السليمة (%) *Crocus aleppicus*
0	15	0.00^{h}
0	30	0.00^{h}
1	15	5.39^{g}
1	30	26.06^{f}
2	15	24.92^{f}
2	30	48.25^{e}
3	15	56.59^{d}
3	30	71.29c
4	15	67.26c
4	30	83.33b
5	15	84.96^{b}
5	30	96.19^{a}
فترة التطهير	15	39.54^{B}
	30	54.16^{A}
التركيز	0	0.00^{F}
	%1	15.73^{E}
	%2	36.58^{D}
	%3	62.89^{C}
	%4	75.30^{B}
	%5	90.58^{A}
المتغير		$LSD_{(0.01)}$ نسبة العينات السليمة (%)
تركيز هيبوكلوريت الصوديوم		**7.24**
زمن التطهير		**14.40**
تفاعل زمن التطهير وتركيز هيبوكلوريت الصوديوم		**5.23**

*** يشير اختلاف الأحرف الصغيرة إلى وجود فروق معنوية بين معاملات التفاعل، واختلاف الأحرف الكبيرة إلى وجود فروق معنوية بين المتوسطات عند مستوى ثقة 99%.**

2. مرحلة استحداث الكالوس:

بدأ الكالوس بالظهور بعد 50 إلى 65 يوم من زراعة الخزعات النباتية على وسط الاستحداث، وتكون الكالوس الجنيني بعد 90–120 يوم من الزراعة، حيث سجلت كل من قراءات نسبة تشكل الكالوس والكالوس الجنيني.

2.1. تأثير التراكيز المختلفة من المزائج الهرمونية من الأوكسين 2,4-D والسيتوكنين 6-BAP النباتية في نسبة استحداث الكالوس في الزعفران الحلبي *Crocus aleppicus* B.:

يلاحظ من الجدول (2) وجود فروق معنوية في نسبة استحداث الكالوس بين نوعي الخزعة النباتية (البرعم القمي والبرعم الجانبي) وكذلك وجود فروق معنوية بين المعاملات (المزائج الهرمونية).

فبالنسبة لاستحداث الكالوس من البراعم القمية في حالة الشاهد (عدم استخدام أي مزيج هرموني) لم ينتج كالوس (0.00%)، أمّا في حالة المزائج الهرمونية المختلفة فقد نتج الكالوس بنسبٍ اختلفت باختلاف المزيج الهرموني وبفروقٍ معنوية مع الشاهد كان أعلاها في المعاملة (11) (95.00%)، في حين كان أقلها في المعاملة (8) (21.67%).

أما بالنسبة لاستحداث الكالوس من البراعم الجانبية، فقد فشلت البراعم الجانبية في إعطاء كالوس عندما لم يحتوِ وسط الزراعة على أي هرمون (الشاهد) (0.00%).

أما في حالة استخدام المزائج الهرمونية، فلوحظ إعطاء كالوس بنسب اختلفت باختلاف المزيج الهرموني وبفروق لم تكن معنوية في بعضها (1، 5، 8، 9، 10، 16، 19، 20) بالمقارنة مع الشاهد، في حين كانت الفروق معنوية مع بقية المعاملات وبحيث كان أعلاها في المعاملة (11) (37.50%).

الجدول (2) تأثير نوع الخزعة النباتية وتركيز المزائج الهرمونية من الأوكسين 2,4-D والسيتوكينين 6-BAP في نسبة استحداث الكالوس في نبات الزعفران الحلبي (*Crocus aleppicus* B.)

رقم المعاملة	المعاملات		نسبة استحداث الكالوس %		
			الخزعة النباتية		
	2,4-D مغ. ل$^{-1}$	6-BAP مغ. ل$^{-1}$	البرعم القمي	البرعم الجانبي	متوسط المعاملات
0	0	0	0.00^{j}	0.00^{h}	0.00^{F}
1	0.25	0.25	26.67^{hi}	13.33^{cdefgh}	20.00^{EF}
2	0.5	0.25	60.41^{def}	17.50^{cdefg}	38.96^{BCDE}
3	1	0.25	68.75^{de}	21.2^{abcdefg}	45.00^{ABCD}
4	1.5	0.25	44.99^{efg}	20.83^{bcdefg}	35.42^{CDE}
5	2	0.25	41.66^{fghi}	12.50^{defgh}	27.08^{CDE}
6	0.25	0.5	90.00^{abc}	29.17^{abc}	59.58^{AB}
7	0.5	0.5	72.92^{bcd}	23.75^{abcdef}	48.33^{ABC}
8	1	0.5	21.67^{i}	14.58^{cdefgh}	18.12^{EF}
9	1.5	0.5	56.25^{defg}	11.25^{efgh}	33.75^{CDE}
10	2	0.5	42.50^{fghi}	8.33^{fgh}	25.41^{CDE}
11	0.25	1	95.00^{a}	37.50^{a}	66.25^{A}
12	0.5	1	54.16^{defg}	25.83^{abcde}	40.00^{BCDE}
13	1	1	93.75^{ab}	34.17^{ab}	63.96^{A}
14	1.5	1	66.67^{de}	24.58^{abcdef}	45.62^{ABCD}
15	2	1	43.75^{fgh}	19.58^{bcdefg}	31.67^{CDE}
16	0.25	2	37.50^{ghi}	10.00^{efgh}	23.75^{DEF}
17	0.5	2	50.00^{efg}	22.50^{abcdefg}	36.24^{BCDE}
18	1	2	69.17^{cde}	27.92^{abcd}	48.54^{ABC}
19	1.5	2	58.33^{defg}	16.25^{cdefgh}	37.29^{BCDE}
20	2	2	43.33^{fgh}	6.25^{gh}	24.79^{CDE}
المتوسط			54.40^{A}	18.91^{B}	-

المتغير	نسبة استحداث الكالوس(%) LSD 0.01
المعاملة 6-BAP+ 2,4-D	23.86
الخزعة	6.42
تفاعل2,4-D +6-BAP البرعم القمي	20.91
تفاعل2,4-BAP-6+ D البرعم الجانبي	16.40

*يشير اختلاف الأحرف الكبيرة في السطر الواحد بالنسبة لنوعي الخزعة وفي العمود الواحد بالنسبة لتراكيز المزائج الهرمونية (6-BAP+2,4-D) واختلاف الأحرف الصغيرة في الأعمدة بالنسبة للتفاعل بين نوعي الخزعة وتركيز المزائج الهرمونية (6-BAP+2,4-D) إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ثقة 99%.

بينت العديد من الأبحاث أن للأوكسين 2,4–D دوراً أساسياً في استحداث وتطور الكالوس، وخاصة عند الأنواع النباتية أحادية الفلقة [13] حيث أن زيادة استحداث الكالوس بوجود الأوكسين 2,4–D ناجم عن دوره في تشجيع الانقسام الخلوي الميتوزي، إذ يعمل الأوكسين على زيادة معدل اصطناع الأحماض النووية، ويساهم في تنشيط اصطناع البروتينات، كما يساهم الأوكسين في تنشيط عمل الأنزيمات التي تعمل على تنشيط التفاعلات الكيميائية اللازمة لتأمين المواد الضرورية للانقسام الخلوي مثل تنشيط عمل أنزيم RNA polymerase [21] والاستطالة الخلوية وزيادة النمو، فالأوكسين يسرع الدورة الخلوية وتشكيل بنى الكالوس [31].

كما تلعب السيتوكينينات دوراً هاماً في النمو النباتي فهي تؤثر كعامل محفز في العديد من المظاهر الفيزيولوجية في النبات مثل الانقسام الخلوي حيث ينشط السيتوكينين اصطناع البروتينات اللازمة للانقسام الخلوي ويشجع تكوين الأحماض النووية الدنا DNA والرنا RNA، وينشط عمل بعض الأنزيمات، كما تحفز السيتوكينينات التبادل الشاردي عبر الأغشية الخلوية، وتؤثر في النفاذية الخلوية [1].

بينت الأبحاث وجود علاقة تآزرية بين الأوكسين 2,4–D والسيتوكينين 6–BAP بتأثيرهما في الانقسام الخلوي واستحداث الكالوس حيث أن لوجود السيتوكينين لوحده تأثير ضعيف في الانقسام الخلوي بينما يزداد الانقسام الخلوي بشكل كبير بوجود العلاقة التآزرية المتوازنة بين الأوكسين والسيتوكينين في الوسط المغذي ويعدُ التفاعل بين السيتوكينين والأوكسين الأكثر فعالية لاستحداث الكالوس [19].

يعود التباين في استحداث الكالوس عند النوع *C. aleppicus* لنوع الخزعة النباتية (البرعم القمي، البرعم الجانبي) حيث لا تستجيب جميع الأعضاء أو الخزعات النباتية المزروعة للنمو بنفس الدرجة ضمن النوع النباتي الواحد كذلك ضمن الأنواع النباتية المختلفة.

تعود أسباب اختلاف الاستجابة للنمو باختلاف الخزعات النباتية للتغيرات الحاصلة في الحالة الفزيولوجية [30] ويؤثر التركيب الوراثي للخزعة النباتية في كفاءة استحداث

الكالوس والذي يعود إلى تفاوت مستوى الهرمونات النباتية الداخلية خصوصاً السيتوكينينات في الطرز الوراثية المختلفة [17].

ومن حيث صفة درجة الكالوس المتشكل (المظهر، والحجم، واللون، والقوام)، أظهرت البراعم القمية أعلى استجابة لوسط الاستحداث بالمقارنة مع البراعم الجانبية، حيث أن الخلايا الميرستيمية للقمة النامية كانت الأسرع استجابة وأنتجت الكالوس الأعلى جودة بالمقارنة مع الخلايا الميرستيمية للبرعم الجانبي.

2.2. تأثير التراكيز المختلفة من المزائج الهرمونية من الأوكسين 2,4-D والسيتوكنين 6-BAP في نسبة تشكل الكالوس الجنيني في نبات الزعفران الحلبي (*Crocus aleppicus* B.):

يلاحظ من الجدول (3) وجود فروق معنوية بين نوعي الخزعة النباتية (برعم قمي، برعم جانبي)، وكذلك بين المعاملات في نسبة تشكل الكالوس الجنيني.

فعند نقل زراعة البرعم القمي في وسط الشاهد الذي لا يحوي أي مزيج هرموني لم يتشكل الكالوس الجنيني إلا أن استخدام المزائج الهرمونية أدّى لتشكل الكالوس الجنيني بنسب تختلف باختلاف التراكيز المستخدمة من 2,4-D و6-BAP، وبفروق معنوية في جميع المزائج الهرمونية بالمقارنة مع الشاهد باستثناء المزيج (8) الذي بلغت نسبة تشكل الكالوس الجنيني عنده 14.58% فقط، وبفروق غير معنوية بالمقارنة مع الشاهد (0.000%)، في حين أعطى المزيج الهرموني (11) أعلى نسبة لتشكل الكالوس الجنيني من البرعم القمي (90.00%).

أما بالنسبة لتشكل الكالوس الجنيني من البرعم الجانبي فقد فشل البرعم الجانبي في إعطاء كالوس جنيني في وسط الشاهد (عند غياب المزائج الهرمونية)، وكذلك لم يتمكن المزيج الهرموني (20) من دفع البرعم الجانبي لتشكيل كالوس جنيني، في حين أدّت بقية المزائج الهرمونية لتشكل كالوس جنيني ولكن بنسب اختلفت باختلاف المزيج الهرموني المستخدم في وسط الزراعة، وقد كانت الفروق معنوية فقط في المعاملات (6، 11، 12، 13، 18) حيث بلغت أعلى نسبة 29.17% في المعاملة (11)، ولم تكن معنوية في بقية المعاملات مقارنةً مع الشاهد.

الجدول (3) تأثير نوع الخزعة النباتية وتركيز المزائج الهرمونية من الأوكسين 2,4-D والسيتوكينين 6-BAP في نسبة تشكل الكالوس الجنيني في الزعفران الحلبي (*Crocus aleppicus* B.)

رقم المعاملة	المعاملات		نسبة استحداث الكالوس الجنيني		
			الخزعة النباتية		
	2,4-D مغ. ل$^{-1}$	6-BAP مغ .ل$^{-1}$	البرعم القمي	البرعم الجانبي	متوسط المعاملات
0	0	0	0.00^{h}	0.00^{d}	0.00^{F}
1	0.25	0.25	22.92^{fg}	10.00^{bcd}	16.46^{DEF}
2	0.5	0.25	43.33^{cdef}	11.25^{abcd}	27.29^{CDE}
3	1	0.25	41.66^{cdef}	18.33^{abcd}	30.00^{CDE}
4	1.5	0.25	37.50^{def}	14.58^{abcd}	26.04^{CDE}
5	2	0.25	31.25^{efg}	8.33^{bcd}	19.79^{DEF}
6	0.25	0.5	63.33^{bc}	22.92^{abc}	43.12^{ABC}
7	0.5	0.5	45.83^{cde}	17.50^{abcd}	31.67^{BCDE}
8	1	0.5	14.58^{gh}	13.33^{abcd}	13.95^{EF}
9	1.5	0.5	38.32^{def}	12.50^{abcd}	25.40^{CDE}
10	2	0.5	34.17^{defg}	6.25^{bcd}	20.20^{DEF}
11	0.25	1	90.00^{a}	29.17^{a}	59.58^{A}
12	0.5	1	39.58^{def}	20.83^{abc}	30.21^{CDE}
13	1	1	79.16^{ab}	24.58^{ab}	51.87^{AB}
14	1.5	1	47.92^{cde}	16.25^{abcd}	32.08^{BCDE}
15	2	1	29.16^{efg}	15.00^{abcd}	22.08^{DE}
16	0.25	2	26.67^{efg}	9.17^{bcd}	17.92^{DEF}
17	0.5	2	35.42^{defg}	18.75^{abcd}	27.08^{CDE}
18	1	2	53.75^{cd}	19.58^{abc}	36.67^{BCD}
19	1.5	2	36.66^{defg}	5.00^{cd}	20.83^{DE}
20	2	2	30.00^{efg}	0.00^{d}	15.00^{EF}
المتوسط			40.06^{A}	13.97^{B}	–

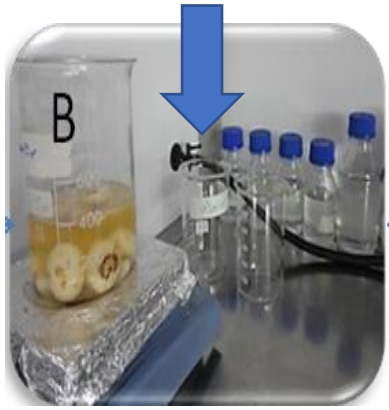
المتغير	$LSD_{0.01}$ نسبة استحداث الكالوس الجنيني (%)
المعاملة 6-BAP+ 2,4-D	20.63
الخزعة	5.96
تفاعل2,4-D+6-BAP والبرعم القمي	22.11
تفاعل2,4-D+6-BAP والبرعم الجانبي	19.10

*يشير اختلاف الأحرف الكبيرة في السطر الواحد بالنسبة لنوعي الخزعة وفي العمود الواحد بالنسبة لتراكيز المزائج الهرمونية (2,4-D+6-BAP) واختلاف الأحرف الصغيرة في الأعمدة والأسطر بالنسبة للتفاعل بين نوعي الخزعة وتركيز المزائج الهرمونية (2,4-D+6-BAP) إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ثقة 99%.

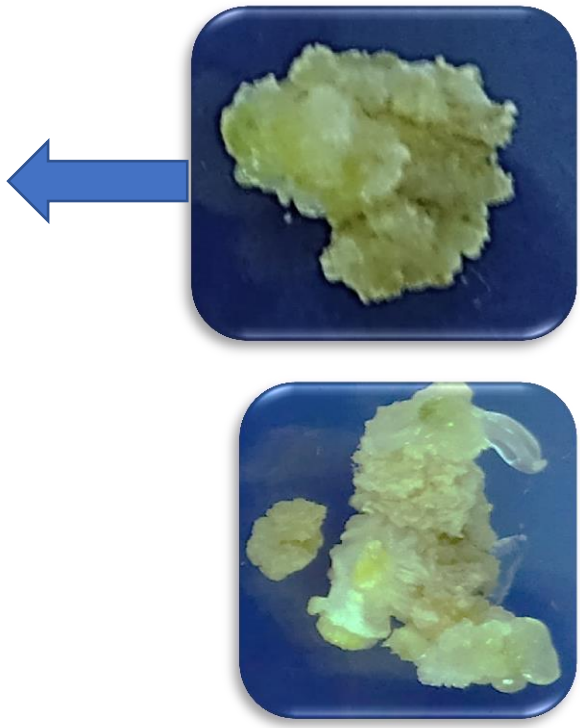
يلعب نوع الجزء أو النسيج النباتي المزروع والحالة الفسيولوجية والطراز الوراثي دوراً أساسياً ومحدداً لمدى الاستجابة للزراعة النسيجية لاستحداث الكالوس و إمكانية الحصول على الأجنة الخضرية [24]، وهذا يتوافق مع ما توصلنا إليه فقد لوحظ أن البراعم القمية أكثر استجابة لاستحداث الكالوس الجنيني بالمقارنة مع البراعم الجانبية، ويعود اختلاف الخزعات في استجابتها في كفاءة استحداث الكالوس الجنيني إلى التباين الوراثي فيما بينها، وهذا يتوافق مع [17] الذي أكد على أن التركيب الوراثي للخزع النباتية المختلفة والطرز الوراثية المختلفة تؤثر في كفاءة استحداث الكالوس وتكون الأجنة الخضرية، والذي يرجع الى تفاوت مستوى الهرمونات النباتية الداخلية و خصوصاً السيتوكينينات.

تشير نتائجنا إلى أهمية وجود الأوكسين 2,4–D في وسط استحداث الكالوس لتشجيع تشكل الكالوس الجنيني، لكن حتى مستوىً معين، وهذا يتفق مع ما توصلت إليه بعض الأبحاث مثل [20] حيث أكد أن زيادة تركيز 2,4–D عن 0.25 مغ. ل$^{-1}$ تؤثر سلباً في نسبة تشكل الكالوس الجنيني وتعطي كالوس غير مرغوب فيه وطري وتؤدي إلى تشكل الكالوس غير الجنيني، كما تؤثر سلباً في معدل تجديد النبات. وكذلك أكّد بالمقابل أنّ وجود تركيز منخفض جداً من 2,4–D يؤثر سلباً في نسبة الكالوس الجنيني. يدل ذلك على أهمية ضبط تركيز الأوكسين 2,4–D في وسط الاستحداث.

كما تشير نتائجنا إلى ضرورة استخدام المزيج الهرموني 2,4–D+ 6–BAP ولكن ضمن تراكيز محددة لكل منهما لتشجيع تشكل الكالوس الجنيني، وهذا يتوافق مع [5]، ويظهر الشكل (2) تشكل الكالوس والكالوس الجنيني مخبرياً عند الزعفران الحلبي:



1 **2**



4 3

1: مرحلة تعقيم الكورمات، 2: الكورمات بعد التعقيم، 3: الكالوس، 4: الكالوس الجنيني

الشكل (2): تطهير الكورمات وتكوين الكالوس والكالوس الجنيني عند الزعفران الحلبي

الاستنتاجات:

خلص البحث إلى النتائج التالية:

1- تُعد عملية تطهير الخزعات النباتية بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) 5% مدّة 30 دقيقة فعّالة في الحد من نمو المسببات المرضية التي يمكن أن تؤثر سلباً في نمو الخزعات النباتية عند الزراعة في الزجاج.

2- تتحدد نسبة استحداث الكالوس والكالوس الجنيني بشكلٍ رئيس بوجود المركب 2,4-D وتآزره مع السيتوكينين 6-BAP وتتأثر بنوع الخزعة (البرعم القمي،

البرعم الجانبي)، حيث كانت البراعم القمية أكثر استجابة لاستحداث الكالوس والكالوس الجنيني من الطرفية.

المقترحات:

للحصول على أعلى نسبة لاستحداث الكالوس والكالوس الجنيني عند زراعة الزعفران الحلبي *Crocus aleppicus* B. باستخدام تقانة زراعة الأنسجة النباتية، تزرع البراعم القمية في وسط يحوي الزيج الهرموني 0.25 مغ.ل$^{-1}$ + 1 مغ.ل$^{-1}$ 6- BAP.

المراجع:

1. AL-MAARI, K. 1995.Palm propagation by plant tissue culture. King Faisal University, Saudi Arabia, pages 77-96 (In Arabic).
2. ABDULLAEV, F.I. and ESPINOSA-AGUIRRE, J.J. 2003. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials, Cancer detect pre. v. 28:246-432.
3. ABE, K. and SAITO, H. 2000. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. Phytother Res., v. 14 (3):49-52.
4. AHUJA, A., KOUI, S., RAM, G., and KaUL, B.L. 1994. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in saffron, *Crocus sativus* L., Indian J. Exp. Biol, Vol. 32. 135–140.
5. DEVI, K., SHARMA, M., SINGH, M. and AHUJA, P.S. 2011. *In vitro* cormlet production and growth evaluation under greenhouse conditions in saffron (*Crocus sativus* L.) – A commercially important crop: Engin. Life Sci., Vol. 11(1).1-6.
6. EBRAHIMZADEH, H., KARAMIAN, R., NOORI-DALOII, MR. 2000. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlet in saffron, *Crocus sativus* L. Journal of Science Islamic Republic of Iran, Vol.11(3), 169-173.
7. EVAN, D.E., COLEMAN, J.O.D and KEARNS, A. 2003. Role of callus embryogenesis, and cell culture. Oxford Brookes University Oxford, UK Bios scientific Publishers, PP. 64-65.
8. EVANS, D.A., SHARP, W.R., AMMIRATO, P.V. and YAMADA, Y. 1983- Handbook of Plant Cell Culture: Techniques for Propagation and Breeding, Vol.1. New York: MacMillan Publishing Company.
9. GIACCIO, M., 1990. Components and features of saffron. Proceedings of the International Conference on Saffron, L'Aquila, 135-148.

10. GOLDBLATT, P., RODRIGUEZ, A., POWELL, MP., DAVIES, TJ., MANNING, JC., VAN DER BANK, M. and SAVOLAINEN, V. 2008. '*Iridaceae* out of Australasia'? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. Systematic Botany, Vol. 33. 495-508.
11. HAGGAG, E.G., ABOU-MOUSTAFA, M.A., Boucher, W. and Theoharides, T.C., 2003. The effect of a herbal water extract on histamine release from mast cells and on allergic asthma. J. Herb. Pharmcother. 3, 41-54.
12. HARTWELL, J.L., 1982. Plants used against cancer. A survey, Quaterman Publications, Lawrence, 284 p.
13. JOGESWAR, G., RANADHEER, D., ANJAIAH, V. and KISHOR, P.B.K. 2007. High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench from immature inflorescence explants. *In vitro* Cell Dev. Biol. Plant, Vol.43. 159-166.
14. Kandemir, N., Celik, A. and Yayla, F. 2012. Comparative anatomic and ecologic investigation on some endemic Crocus Taxa (*Iridaceae*) in Turkey. Pak. J. Bot., Vol.44(3). 1065-1074.
15. KARAMIAN, R., 2014. Plantlet Regeneration Via Somatic Emryogenesis In Four Species of *Crocus* International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology. ISHS Acta Horticulturae 650.
16. KARIMI, G., HOSSEINZADEH, H. and KHALEGHPANAH, P. 2001. Study of antidepressant effect of aqueous and ethanolic of Crocus sativus in mice. Iranian J. Basic. Med. Sci., v. 4: 11–15.
17. KIM, Y.J., PARK, T., KIM, H.S., PARK, H.K., CHON, S.U. and YUN, S.J. 2004. Factors affecting somatic embryogenesis from immature cotyledon of soybean. Journal of Plant Biotechnology, Vol. 6. 45-50.
18. LAGRAM, Kh., BEN El CAID, M., El AAOUAM, S., LACHHEB, M., El MOUSADIK, A. and SERGHINI, M.A. 2016. *In vitro* shoot regeneration and Development of

Microcorms of Moroccan Saffron (*Crocus sativus* L.). Atlas journal of plant Biology. ISSN 1949-1379.

19. MASTUTI, R. MUNAWARTI, A. and FIRDIANA, E.R. 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 (2017); https:// doi.org/10.1063/1.5012721.
20. MENDOZA, M. G. and KAEPPLER, H. F. 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant, Vol. 38. 39-45.
21. MOREL, G., MATIN, C. and MULLER, C. 1968. Laguuerison des pommes De terre atteintes irus. de a virus. Ann. Physiol., Veg., Vol.10(2). 113-139.
22. MOUTERDE, P. 1966- Nouvelle flore du Liban et de la Syrie. 3 Tome + Atlas: DAR El Mashreq, Beyrouth, Liban. 563 p. (in French).
23. MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, Vol.15. 473-495.
24. MUSHTAQ, A., Gul, Z., MEHFUZA, H., AMEEQUE, A., DAR, N. A. and DAR, Z. A. 2014. Saffron (*Crocus sativus* L.) in the light of biotechnological approaches. Academic journals. Vol.9(2): 2348-2353.
25. NEGBI, M., DAGAN, B., DROR, A. and BASKER, D. 1989. Growth, flowering, vegetative reproduction and dormancy in the saffron crocus (*Crocus sativus* L.), Israel J. Bot., 38: 95-113.
26. NORIEGA, C. and SÖNDAHL, MR .1992. Somatic embryogenesis in hybrid tea roses. Biotechnology, Vol.9: 991–993.
27. OTSUKA, M., SAIMOTO, H.S., MURATA, Y. and KAWASHIMA, M. 1992. Method for producing saffron stigma-like tissue. United States Patent.
28. PEVALEK, k.B. and JELASKA, S. 1987.Microclonal propagation of *prunus avium.* Acta Hort., Vol 212. 599-601.

29. SANDEEP, K. V., ASHOK, K. D., GUNCE, S. C., EMEL, U. and EkREM, G. 2016. Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus specie. Biotechnology Reports, Vol. 10. 66–74.
30. SHARAFZADEH, Sh. 2012. *In vitro* callus induction in saffron leaves. International Journal of Pharma and Bio Sciences. Vol 3/Issue 1.
31. STALE, H. and LNZE, D. 2001. When plant cells decide to divide. Trends in Plant Science. Vole16.
32. VAHEDI, M., KALANTARI, S. and SALAMI, S. A. 2014. Factors Affecting Callus Induction and Organogenesis in Saffron (*Crocus sativus* L.). Plant Tissue Cult. & Biotech. Vol. 24(1). 1-9.
33. VURDU, H. and GÜNEY, K. 2004. Safran Kırmızı Altın. Gazi Üniversitesi Kastamonu Orman Fakültesi Yayınları, 36 p (in Turkish).
34. YILDIRIM, E. 2007. Development of *in vitro* micro propagation techniques for saffron (*Crocus Sativus* L.). Plant Cell Tiss. Org. Cult., v. 11: 159-166.
35. ZHANG, Y., SHOYAMA, Y., SUGIURA, M. and SAITO, H., 1994. Effects of *Crocus sativus* L. on the ethanol-induced impairment of passive avoidance performances in mice. Biol. Pharm. Bull.17: 217-221.