



الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة دمشق _ كلية الهندسة الزراعية
ماجستير التقانة الحيوية

الإكثار الدقيق للزعفران (*Crocus sativus* L.) باستخدام الأجنة الخضرية

In vitro micropropagation of Saffron (*Crocus sativus* L.)

via embryogenesis

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في التقانات الحيوية

إعداد

المهندسة نائلة كنينه

إشراف

المشرف المشارك

د. فهد البيسكي

(باحث - الهيئة العامة للتقانة الحيوية)

المشرف العلمي

أ.د. خليل المعري

(كلية الزراعة - جامعة دمشق)

فهرس المحتويات

المحتويات	رقم الصفحة
الملخص العربي	1
الفصل الأول : المقدمة Introduction	2
مبررات و أهداف البحث	5
الفصل الثاني : الدراسة المرجعية Review Of Literature	6
الفصل الثالث : مواد و طرائق البحث Methods and Materials	17
الفصل الرابع : النتائج والمناقشة Results and Discussion	23
المرحلة التأسيسية (التطهير السطحي) Initial stage (Surface disinfection)	23
تأثير التراكيز المختلفة من هيبوكلوريت الصوديوم (Naocl) و زمن التطهير في نسبة العينات النامية و نسبة العينات السليمة	23
مرحلة استحداث الكالس Callus Induction Stage	25
مرحلة تشكل الكالس الجنيني Callus Embryo Genies Stage	29
مرحلة التجديد و النموات المتجددة Regeneration and Shoot Regeneration Stage	34
الاستنتاجات و المقترحات Conclusions and Suggestions	36
الاستنتاجات Conclusions	36
المقترحات Suggestions	36
المراجع References	37
المراجع العربية Arabic References	37
المراجع الأجنبية English References	37
Abstract	48

فهرس الجداول

رقم الصفحة	العنوان	رقم الجدول
18	التركيب الكيميائي للمحلول المعدني (MS) لموراشيچ وسكوغ (1962) المستخدم في التجارب المنفذة خلال مراحل النمو المختلفة	1
19	الأوساط المغذية والمزائج الهرمونية المستخدمة في تجارب البحث المختلفة المنفذة خلال مراحل النمو المختلفة .	2
23	تأثير التراكيز المختلفة من هيبوكلوريت الصوديوم (Naocl) و زمن التطهير في نسبة العينات النامية و نسبة العينات السليمة	3
24	تأثير نوع الخزعة النباتية و تركيز الأكسين 2,4-D في نسبة استحداث الكالس في الزعفران المدروس <i>Crocus.sativus.L</i>	4
26	تأثير نوع الخزعة النباتية و تركيز السيتوكينين 6-BAP في نسبة استحداث الكالس في الزعفران المدروس <i>Crocus.sativus. L</i>	5
28	تأثير نوع الخزعة النباتية و تركيز المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP في نسبة استحداث الكالس في الزعفران المدروس <i>Crocus.sativus.L</i>	6
30	تأثير نوع الخزعة النباتية و تركيز الأكسين 2,4-D في نسبة استحداث الكالس الجنيني في الزعفران المدروس <i>Crocus.sativus.L</i>	7
31	تأثير نوع الخزعة النباتية و تركيز السيتوكينين 6-BAP في نسبة استحداث الكالس الجنيني في الزعفران المدروس <i>Crocus.sativus. L</i>	8
32	تأثير نوع الخزعة النباتية و تركيز المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP في نسبة استحداث الكالس الجنيني في الزعفران المدروس <i>Crocus.sativus.L</i>	9
34	تأثير تركيز المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP في نسبة التجديد و متوسط عدد النموات في الزعفران المدروس <i>Crocus.sativus.L</i>	10

فهرس الأشكال و المخططات

رقم الصفحة	العنوان	رقم الشكل
3	أزهار و كورمات الزعفران <i>Crocus sativus</i> . L	1
20	المراحل التأسيسية في نبات الزعفران <i>Crocus.sativus</i> .L.var. Mashhadani. ايراني المصدر	2
35	استحداث الكالس و تكون الكالس الجنيني و تجديد النموات في نبات الزعفران <i>Crocus.sativus</i> .L.var. Mashhadani. ايراني المصدر	3

المختصرات العلمية الواردة في الأطروحة

Abbreviations

المختصر العلمي	المصطلح باللغة الانكليزية	المصطلح باللغة العربية
MS	Murashige and Skoog (1962)	المحلول المعدني موراشيج وسكوغ
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	ديكلورو فينوكسي أسيتيك أسيد
TDZ	Thidiazuron N-phenyl-N-1,2,3-thidiazol-5-yl urea	تيديازورون
IAA	Indole-3-acetic acid	إندول أسيتيك أسيد
NAA	α -Naphthallen acetic acid	نفتالين أسيتيك أسيد
6- BAP	6- Benzyl aminopurine	٦- بنزيل أمينو بيورين
BA	Benzyl adenine	بنزيل أدنين
KI or KIN	Kinetin (6- furfuryl aminopurine)	كينيتين
	Ethylene	الإيثيلين
B1	Thiamine	ثيامين
Vit . C	Ascorbic acid	حمض الأسكوربيك
B6	Pyridoxine	بيرودوكسين
B2	Folic acid	حمض الفوليك
B5	Pantothenat calcium	بانثوثينات الكالسيوم
B3	Nicotinic acid	حمض النيكوتين
C V	Coefficient of Variation	معامل تباين التجربة
L S D	Fisher's Least Significant Difference	أقل فرق معنوي

الملخص

نُفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية النباتية التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية - وزارة التعليم العالي ، و في مخابر كلية الزراعة - جامعة دمشق خلال الفترة ما بين 2016 و 2020 ، بهدف استحداث الكالس من البراعم القمية و الجانبية لنبات الزعفران *Crocus Sativus* L.var. Mashhadani و تجديد النباتات من الكالس الجنيني لاستخدامها في برامج الإكثار و التحسين الوراثي.

أظهرت نتائج التطهير السطحي لكورمات الصنف المدروس أنّ أفضل تركيز من محلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) المستخدم للتطهير هو 5 % لمدة 20 دقيقة.

بينت نتائج المعاملة بالأكسين 2,4-D بأن التركيز 0.25 مغ ل⁻¹ أعطى النسبة الأعلى من استحداث الكالس (38.33%) و بفروق معنوية مع بقية المعاملات . و كانت البراعم القمية أكثر استجابة لوسط الاستحداث (27.20%) بالمقارنة مع البراعم الجانبية (9.58%) و بفروق معنوية بين هاتين المعاملتين . أما بالنسبة لتأثير السيتوكينين 6-BAP في استحداث الكالس فقد أعطى التركيز 0.25 مغ ل⁻¹ النسبة الأعلى من استحداث الكالس (12.74%) و بفروقات معنوية مع بقية المعاملات . و لم يلحظ أي فرق معنوي في استجابة كل من البراعم القمية و الجانبية لوسط الاستحداث بقيمة بلغت (5.43 ، 1.52%) على التوالي .

كذلك بينت نتائج تأثير المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP أنّ المزيج الهرموني 1) مغ ل⁻¹ من 6-BAP و 0.25 مغ ل⁻¹ من 2,4-D أعطى أعلى نسبة استحداث للكالس (55.31%) و بفروقات معنوية مع بقية المعاملات . كما كانت البراعم القمية أعلى استجابة لوسط الاستحداث (40.93%) بالمقارنة مع البراعم الجانبية (13.99%) و بفروق معنوية بين هاتين المعاملتين .

بينت نتائج المعاملة بالأكسين 2,4-D تفوق المعاملة بالتركيز 0.25 مغ ل⁻¹ في نسبة تشكل الكالس الجنيني (32.14%) على بقية المعاملات. و كانت البراعم القمية أكثر استجابة لتشكيل الكالس الجنيني (19.76%) بالمقارنة مع البراعم الجانبية (8.09%) و بفروق معنوية بين هاتين المعاملتين . أما بالنسبة لتأثير السيتوكينين 6-BAP فقد أعطى التركيز 0.25 مغ ل⁻¹ النسبة الأعلى لتشكيل الكالس الجنيني (9.29%) مع بقية المعاملات. و لم يلحظ أي فرق معنوي في استجابة كل من البراعم القمية و الجانبية لوسط تشكل الكالس الجنيني بقيمة بلغت (3.86 ، 1.18%) على التوالي .

كذلك أظهرت نتائج تأثير المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP أنّ المعاملة بالمزيج الهرموني 1.0 مغ ل⁻¹ من 6-BAP و 0.25 مغ ل⁻¹ من 2,4-D أعطت أعلى نسبة تشكل للكالس الجنيني (54.76%) و بفروقات معنوية مع بقية المعاملات . كما كانت البراعم القمية أعلى استجابة لتشكيل الكالس الجنيني (34.16%) بالمقارنة مع البراعم الجانبية (11.27%) و بفروق معنوية بين هاتين المعاملتين .

أما بالنسبة لمتوسط نسبة تجديد النموات فقد لوحظ أعلى نسبة تجديد للنموات (51.50%) عند استخدام التركيز 1.5 مغ ل⁻¹ من 6-BAP و بفروقات معنوية مع بقية المعاملات. و كان أعلى متوسط لعدد النموات المتشكلة عند استخدام التركيز (1.5 مغ ل⁻¹ من 6-BAP) ، و التركيز (1 مغ ل⁻¹ من 6-BAP + 0.175 مغ ل⁻¹ من 2,4-D) بقيمة بلغت (9.36 ، 8.33 نمواً) على التوالي و بفروقات معنوية مع بقية المعاملات .

الكلمات المفتاحية: الزعفران ، الكالس الجنيني ، الأجنة الخضرية ، التجديد ، 2,4-D ، 6-BAP.

الفصل الأول: المقدمة

Introduction

1- المقدمة Introduction :

يعد الزعفران *Crocus sativus* L. محصولاً اقتصادياً مهماً عرف كمصدر للتوابل منذ 1500 سنة على الأقل (Grilli Caiola و زملاؤه، 2004). وتعدّ مياسم الأزهار المجفّقة التابل الأعلى في العالم على امتداد العصور وذلك لخواصه العطرية و الصباغية و الطبية (Plessner و Ziv، 1999)، حيث يعد الزعفران لؤلؤة التوابل في العالم ، و يباع على شكل شعيرات (مياسم) أو على شكل مسحوق من مياسم نبتة الزعفران. ونظراً لثمنه المرتفع و استعمالاته المختلفة يلقب في عدد من مناطق إنتاجه بالذهب الأحمر (Poggi و زملاؤه، 2010). إنّ كلمة زعفران عموماً تستعمل للدلالة على كل من التابل و النبات نفسه. الاسم saffron اسم مشتق من الكلمة اللاتينية *Safranun* و التي أتت بدورها من الكلمة العربية الأصفر (Winterhalter و Straubinger، 2000). و يعود موطنه الأصلي إلى إيران وآسيا الصغرى و شرقي دول البحر الأبيض المتوسط (Grilli Caiola و زملاؤه، 2004).

1-1- التصنيف النباتي Plant Taxonomy :

ينتمي الزعفران (*Crocus sativus* L.) إلى المملكة النباتية *Plantae* ، الشعبة *Magnoliophyta* ، الرتبة *sparagales* ، الفصيلة السوسنية *Iridaceae* ، الجنس *Crocus* و النوع *sativus* (Karasawa، 1933). وتضم الفصيلة السوسنية 60 جنساً و 1500 نوعاً نباتياً، والنباتات في هذه الفصيلة معظمها عشبي له ريزومات أو كورمات أو أبصال. ويعد الزعفران من مغلفات البذور Angiosperms. و يعد *C. sativus* L. الزعفران المستزرع أكثر الأنواع أهمية من الناحية الإقتصادية (Fernandez، 2004) ، و هو عبارة عن طفرة نشأت من النوع البري *Crocus cartwrightianus*. و تُعدّ سورية موطناً مهماً للعديد من الأنواع النباتية ذات الأهمية العالمية و منها الزعفران ، إذ ينتشر في معظم بيئاتها المتباينة إما على شكل تجمعات نباتية و إما على شكل مفرد ضمن الغابات أو المراعي. و تتميز سورية بتنوع طبيعي كبير ضمن الفلورا النباتية البرية، و يضم هذا التنوع الطبيعي العديد من الأنواع البرية لجنس الزعفران *Crocus* ، حيث سجّلت الفلورا السورية مايزيد على 14 نوع من أنواع الزعفران البري في سورية (Post، 1932).

2-1- الوصف المورفولوجي Morphological Characteristics:

يعد الزعفران نباتاً عشبياً بصلياً معمرّاً تمتد دورة حياته في الأرض من 4-8 سنوات حيث تكون ذروة الإنتاج في السنة الرابعة والخامسة (Fernandez، 2004)، ذو كورمة أرضية يتراوح قطرها ما بين 1-5سم، و هي متناظرة مسطحة في القاعدة و دائرية في الأعلى، و تعد الكورمة ساق أرضية متضخمة قصيرة مقسمة إلى عقد و سلاميات و داخلها نسيج برانشيمي، لها برعم قمّي رئيسي و براعم عرضية جانبية ، محاطة بأوراق حرشفية لونها أسمر إلى بني مصفر، و تتكون الكورمة بمعظمها من أنسجة الساق على عكس البصلة المتكونه من أنسجة الورقة، و تنقسم جذور الكورمة إلى نوعين جذور ليفية رفيعة ومستقيمة تنمو عند قاعدة الكورمة الأم تمتص الماء و الأملاح المعدنية، و جذور ثخينة تربط الكريّات بالكورمة الأم و تساعد في استقرارها داخل التربة. تعطي الكورمة الواحدة 6-10 أوراق شريطية ضيقة يتراوح طولها ما بين 30-40 سم ذات لون أخضر فاتح إلى غامق. يعد الزعفران نباتاً مزهراً خريفاً أزهاره بوقية منتصبه بنفسجية اللون مؤلفة من ست بتلات يتراوح عدد الأزهار ما بين 1-8 زهرة للكورمة الواحدة، و تعد الأزهار ثنائية الجنس تحتوي مدقة ذات مبيض منخفض يعلوه قلم طويل ذو ثلاثة مياسم حمراء مخملية يتراوح طولها ما بين 2-3 سم و هي ضيقة في أسفلها و أكثر عرضاً في قمّتها ، وعلى ثلاثة أسدية لكل منها مئبرين بلون أصفر تحوي داخلها حبوب لقاح ، الثمرة كبسولة لها العديد من البذور باللون البني أو المحمر (Mathew، 1982) (الشكل 1).



الشكل (1) : أزهار و كورمات الزعفران *Crocus sativus* L (Mathew، 1982)

3-1- الأهمية الاقتصادية و الطبية للزعفران:

يحتل الزعفران مرتبة متقدمة بين المحاصيل الطبية والعطرية إذ يعتبر النبات من التوابل الأعلى في العالم (Plessner و Ziv، 1999). يبلغ الإنتاج العالمي من الزعفران حوالي 270 طن سنوياً وتعد إيران المنتج الأكبر للزعفران في العالم حيث تنتج حوالي 90-93 % من الإنتاج العالمي، كما يزرع أيضاً في إسبانيا ، الهند ، المغرب ، اليونان ، إيطاليا ، تركيا (Tantry و زملاؤه، 2017). و بالرغم من العائد الاقتصادي العالي لزراعة الزعفران و انخفاض متطلباته البيئية و الطلب المتزايد عليه فإن الكميات المنتجة منه لا تزال قليلة و يعود ذلك إلى صعوبة إدخال المكننة الزراعية في إنتاج الزعفران إذ لا تزال تتم بشكل يدوي بدءاً من الزراعة و حتى قطاف الأزهار وفصل المياسم (Schmidt و زملاؤه، 2007).

إن أهم المركبات الكيميائية التي تعطي الزعفران خصائصه المميزة هي غليكوزيدات (الكروسين - البيكروكروسين) و ألدهيد السافرنال، حيث يعد الكروسين المسؤول عن اللون الأصفر البرتقالي (Abdullaev، 2002). أما البيكروكروسين فهو عبارة عن غليكوزيد ينشطر إلى سكر و زيت طيار و هو المسؤول عن طعم و رائحة الزعفران كما يشترك السافرنال مع البيكروكروسين في إعطاء الزعفران رائحته المميزة (Abdullaev، 1993). إن الخواص العلاجية للزعفران معروفة منذ القديم كجزء من الطب العشبي التقليدي كمسكن للألام و المغص عند الرضع و في علاج الإلتهابات الرئوية و أمراض القلب ، كما أنه مقوي للبصر و محسن للذاكرة (Abdullaev، 2003). و تعود الأهمية الطبية الكبرى للزعفران إلى دوره كعامل وقائي و علاجي لعدد كبير من أنواع السرطان (Li و زملاؤه، 2015; Samarghandian و زملاؤه، 2010).

4-1- الإكثار Multiplication :

يعد نبات الزعفران ثلاثي الصيغة الصبغية ($2n=3\times=24$) عقيم غير منتج للبذور (Darvishi و زملاؤه ، 2006) ، وذلك نظراً للانقسام الاختزالي الشاذ الذي ينتج عنه صيغيات شاذة و مجموعة من البويضات غير المتوازنة جينياً بالشكل و الحجم ، حبوب اللقاح عقيمة (عقم سيتوبلاسمي ذكرى) و ليست لها أي فعالية على المبيض (Winterhalter و Straubinger، 2000) ، حيث يمكن أن تنبت على المياسم دون أن يتم إخصاب المبايض إذ لا يمكن لأنبوب اللقاح إيصال حبوب اللقاح و بالتالي لا تتشكل بذور ، و إن تشكلت فإنها تكون غير قادرة على الإنبات ، و هذا ما يعيق تربية الزعفران لذا يتم إكثاره خضرياً عن طريق الكريّمات المتكونة على الكورمة الأم حيث تنتج كل كورمة عدد محدود 3-4 كورمات سنوياً (Rashed- mohasel، 1990). لذا يساهم استخدام تقنيات زراعة الأنسجة في إكثار الزعفران بشكل

فعال و سريع لنشره كنبات مهم اقتصادياً لإنتاج نباتات مطابقة للنبات الأم ، إلى جانب دورها في التحسين الوراثي للنباتات ، و بالتالي زيادة الإنتاج كماً ونوعاً (Mushtaq و زملاؤه، 2014).

2-مبررات البحث Research Justifications:

يُعد الزعفران أحد أهم المحاصيل الاقتصادية و الطبية ، و يعد من المحاصيل الأعلى في العالم حيث يعادل سعره سعر الذهب في الأسواق العالمية . و يعد الزعفران نبات ثلاثي الصيغة الصبغية يتكاثر عن طريق الكورمات الأرضية حيث تنتج كل كورمة عدد محدود من الكورمات سنوياً و هذا يقود إلى معدل إكثار منخفض ، كما أنه عقيم غير منتج للبذور، إذ يحد عقم أزهار الزعفران و الفشل في إنتاج بذور قادرة على الإنبات من نجاحه بطرق التربية الجنسية ، لذلك يعد الزعفران من المصادر الوراثية المهمة للتنوع الحيوي و الضرورية لتحسين القاعدة الوراثية. كما تعد دراسة استحداث الكالس و تكون الأجنة الخضرية ضرورياً لفهم العمليات الفيزيولوجية و البيوكيميائية و الوراثية التي تحدث في النبات. كما يساهم تجديد و تشكيل النموات من الكالس بدور مهم في الإكثار الخضري (الأجنة الخضرية) ، إلى جانب دورها في مجال التحسين الوراثي للزعفران من خلال إيجاد تباينات وراثية جديدة بهدف الحصول على سلالات جديدة متفوقة من حيث عدد الكورمات و نسبة المواد الفعالة و بالتالي زيادة الإنتاج كماً و نوعاً ، ومن هنا أتى هدف البحث في أمثلة تقنية الإكثار الدقيق لنبات الزعفران باستخدام الأجنة الخضرية .

أهداف البحث :

1. تحديد التركيز الأمثل والفترة الزمنية المناسبة من محلول هيبوكلوريت الصوديوم في التطهير السطحي لكورمات نبات الزعفران المستزرع .*Crocus sativus* L.var.Mashhadani.
2. أمثلة الأوساط المغذية المستخدمة و تحديد التراكيز المثلى من المزائج الهرمونية لبعض منظمات النمو النباتية (2.4-D ، 6-BAP) لاستحداث الكالس و الكالس الجنيني من الخزعات النباتية (البراعم القمية ، البراعم الجانبية) .
3. تحديد التراكيز المثلى من المزائج الهرمونية لبعض منظمات النمو النباتية (2.4 D ، 6-BAP) لتجديد النموات من الكالس الجنيني .

الفصل الثاني

الدراسات المرجعية

Literature Review

2 - الدراسة المرجعية Literature Review :

تعد تقنية زراعة الأنسجة النباتية من التقنيات الحيوية الهامة ، فقد فتحت مجالاً غير محدود للتطبيقات الزراعية ، حيث برزت أهميتها كطريقة بديلة عن الطرق التقليدية في الإكثار و خاصة النباتات صعبة الإكثار - حيث يعد نبات الزعفران عقيم غير منتج للبذور و ينتج عدد محدود من الكورمات - إلى جانب دورها في التحسين الوراثي لنبات الزعفران ، كما أنها من الوسائل التطبيقية المهمة في دراسة العمليات الفيزيولوجية . كذلك تُسهم هذه التقنية في حفظ الأصول الوراثية لنبات الزعفران و خاصةً الأنواع المهددة بالإنقراض بالإضافة إلى فائدتها في الحصول كورمات خالية من الأمراض (Fernández، 2004) . غير أن هناك بعض الصعوبات التي ما تزال تواجه تقنية زراعة الأنسجة كتقنية حديثة، و بشكل عام يعد تطبيق هذه التقنية في النباتات أحادييات الفلقة أكثر صعوبة مقارنة بالنباتات ثنائية الفلقة (Kamo و زملاؤه، 1999; wang و Nguyen، 1990) ، و حتى ضمن نباتات أحادييات الفلقة نجدها أكثر صعوبة في الفصيلة السوسنية *Iridaceae* و التي يتبع لها الزعفران مقارنة مع الفصائل الأخرى مثل البصلية و الفلقاسية و الزنبقية (*Amaryllidaceae* , *Araceae* , *Liliaceae*) (Hussy، 1975) ، حيث إن حجم الخزعة النباتية المأخوذة و الأضرار الفيزيائية (الميكانيكية) و دخول النبات بطور السكون (أهمية موعد أخذ العينة) و استمرار بعض الأجزاء النباتية المزروعة نتيجة إفراز بعض المواد الفينولية (Yildirim، 2007) هي مشاكل إضافية - إلى جانب مشكلة التلوث السطحي للأجزاء النباتية تحت أرضية - تجعل دراسة زراعة الأنسجة صعبة في أحادييات الفلقة البصلية و تقف أمام انتشارها و نجاحها (Mushtaq و زملاؤه، 2014) .

إن استجابة الأجزاء النباتية المزروعة للزراعة النسيجية ما هي إلا محصلة لتفاعل هذه الأجزاء النباتية بما تحمله من خصائص وراثية مع المركبات التي تكون الوسط من منظمات النمو و عناصر معدنية و تغذية عضوية و فيتامينات ، و تتطلب الزراعة النسيجية وجود توازن نوعي وكمي لكل هذه المواد حيث يؤدي التوازن الغذائي الجيد إلى استقلال وظيفي جيد ، إلى جانب ظروف النمو من حرارة و رطوبة و ضوء (المعري، 2018). و يعد الوسط الغذائي من أهم العوامل التي تؤثر في طبيعة نمو الجزء النباتي و انقسامه و تمايزه . و توصل الباحثون نتيجة اختبار عدد كبير من الأوساط المغذية التي احتوت على تراكيز

مختلفة من العناصر المعدنية نتيجة لدراسات مُعمَّقة لكثير من الأنواع النباتية (George، 1993). و يعد المحلول المعدني MS موراشيج و سكوغ (Murashige و Skooge، 1962) من أكثر الأوساط استخداماً في زراعة النسيج . و تؤدي المواد الكربوهيدراتية دوراً مهماً بالنسبة للأجزاء النباتية المزروعة في الزجاج حيث تكون الخزع النباتية المزروعة داخل الأنابيب غير قادرة على القيام بعملية التمثيل الضوئي و تصنيع غذائها بصورة ذاتية بسبب صغرها و عدم وجود العناصر الضرورية للاصطناع الضوئي و خاصة اليخضور و غاز CO₂ داخل الأنابيب ، ولذا عادة ماتضاف السكريات إلى الأوساط المغذية المزروعة بالخزعات النباتية لتأمين مصدر للكربون و الطاقة ، كمتحافظ السكريات على مستوى التوازن الحلوي في الوسط. و يعد السكروز أكثر السكريات استعمالاً كمصدر مناسب ، حيث يعد تأثير السكروز فعال جداً على نمو و تطور الأجزاء النباتية في زراعة الأنسجة بعكس بعض السكريات الأخرى كالمالتوز و اللاكتوز، كما لوحظ تأثير السكروز في اصطناع الأكسينات في الأنسجة النباتية ، بينما يعمل الغلاكتوز كمثبط لتكوين الأكسينات مما يؤثر سلباً في قدرة الخزعات النباتية على النمو و تكوين البراعم العرضية بعكس السكروز (المعري، 2018). كما تساهم إضافة الفيتامينات إلى الوسط المغذي في تحفيز النمو و تكشف الأنسجة ، و يعد الميواينوزيتول و الثيامين من أكثر الفيتامينات تأثيراً في تحفيز نمو العينات النباتية (المعري، 2018) . و تختلف الاحتياجات الغذائية باختلاف الجزء المزروع و حالته التطورية ، و مرحلة النمو، كذلك باختلاف النوع النباتي لذلك لا يمكن استعمال وسط غذائي واحد لجميع الأنواع النباتية (الكناني، 1987) .

يمر الإكثار الدقيق بالأجنة الخضرية في الزعفران كأحد طرق الإكثار الدقيق بالمراحل التالية : 1. الزراعة الأولية 2. استحداث الكالس و تشكيل الكالس الجنيني 3. تجديد النموات و نمو النموات المتجددة (yildrim، 2007).

1-2- مرحلة الزراعة الأولية Initial culture Stage :

تعد مرحلة الزراعة الأولية (التأسيسية) أولى مراحل الزراعة النسيجية حيث تهدف إلى أقلمة الأجزاء النباتية المزروعة في ظروف الزراعة المخبرية ، كما تهدف إلى الحصول على عينات خالية من التلوث و قادرة على النمو. و لذا تعد عملية التطهير السطحي surface disinfection للأجزاء النباتية Explant المستخدمة في الزراعة الأولية أول وأهم الخطوات التي يعتمد عليها نجاح أو فشل الزراعة النسيجية (المعري، 1995). و يتوقف نجاح التطهير على عدة عوامل هي الجزء النباتي المراد تطهيره ، فالتلوث مشكلة حقيقية خطيرة تواجه الإكثار الخضري الدقيق لأحاديات الفلقة و خصوصاً في حال استخدمت أجزاء تحت أرضية مثل الكورمات و الأبصال و الريزومات و الدرنات كمصدر للخزعات النباتية المستخدمة في مرحلة الزراعة الأولية (Mushtaq و زملاؤه، 2014; yildrim، 2007) وللحصول على أعلى نسبة للعينات السليمة يجب البدء أساساً بمادة نباتية خالية من التلوث . كما يعتمد نجاح التطهير على نوع و تركيز المادة

المستخدمة في التطهير، و الزمن اللازم للتطهير (المعري، 1995). و غالباً ماتستخدم مادة هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl نظراً لفاعليتها العالية في عمليات التطهير السطحي في العديد من النباتات المزروعة مخبرياً حيث تتميز بفاعلية عالية في تطهير الخزعات النباتية قليلة التلوث السطحي خاصة إذا استخدمت بتركيز مناسبة مقارنة مع مطهرات أخرى (Jelaska و Pevalek، 1987). و يختلف تركيز المادة الفعالة المستخدمة في عملية التطهير السطحي تبعاً لدرجة نظافة الجزء النباتي المراد زراعته و ظروف نموه و طبيعته . و يتوقف الزمن اللازم للتطهير السطحي على تركيز المادة الفعالة ، و بشكل عام يتناسب الزمن اللازم لعملية التطهير السطحي عكسياً مع تركيز المادة الفعالة ، و يفضل عادةً استخدام تركيز قليل من المادة الفعالة لفترة زمنية أطول تجنباً لتلف الجزء المراد زراعته (Almaarri و زملاؤه، 1986).

2-2- مرحلة استحداث الكالس و تشكل الكالس الجنيني Callus Induction And Embryogenic Callus Formation Stage

الكالس callus كتلة من الخلايا البرانشيمية (ذات جدران رقيقة) غير متميزة متوضعة بشكل حر غير منظم تنشأ من مصادر نباتية مختلفة تحت تأثير هرموني و هي تنمو و تنقسم بشكل عشوائي، و لها أشكال و ألوان و قساوة مختلفة. تتمتع بعض أنواع الكالس بالقدرة على تكوين أجنة خضرية و يطلق عليه الكالس الجنيني Embryogenic callus ، و تتمتع أنواع أخرى من الكالس بقدرة على تشكيل براعم و جذور و ذلك حسب تركيب الأوساط المغذية ، و يدعى في هذه الحالة Organogenic callus (المعري، 2018). و للكالس و أنواعه أهمية كبيرة في عمليات التحسين الوراثي للنباتات بهدف الحصول على سلالات أو أصناف جديدة ، كما يمكننا من دراسة بعض الظواهر الفيزيولوجية كالإجهادات الحيوية و اللاحيوية كالجفاف و الملوحة (المعري، 2018).

و يعرف التطور الجنيني الخضري بأنه العملية التي يتم من خلالها تمايز الخلايا الجسدية إلى أجنة خضرية (جسمية) عند الزراعة على الأوساط المغذية و الحاوية على منظمات النمو المناسبة (Feher و زملاؤه، 2003)، و يتم اشتقاق الجنين بدءاً من خلية خضرية واحدة أو من مجموعة من الخلايا الخضرية (Litz و Gray، 1995). تتكون الأجنة الخضرية بطريقة غير جنسية حيث تتشكل من الخلايا النباتية التي عادة لا تدخل في تطور الأجنة الجنسية (الخلايا النباتية عدا البيضة الملقحة) حيث عادة ما تنمو الأجنة الخضرية بشكل مباشر من أنسجة الخزعة النباتية Explant، أو تنمو بشكل غير مباشر بدءاً من النسيج غير المنظم (الكالس). و قد استطاع Steward و زملاؤه (1958) الحصول و لأول مرة على الأجنة الخضرية من خلال زراعة خلايا نبات الجزر *Daucus Carota*.

يتضمن تكون الأجنة الخضرية بشكل غير مباشر فقد التمايز من الأنسجة غير المنظمة في الكالس قبل إنتاج الجنين ، في حين يتم التكون المباشر للأجنة الخضرية من أنسجة منظمة دون أن تمر بمرحلة الكالس (Slater و زملاؤه، 2003). و تنشأ الأجنة الخضرية من خلايا ميرستيمية تتواجد في الكالس الجنيني حيث تنشأ عادة من خلية ميرستيمية تنقسم عدة انقسامات سرعان ما تتطور إلى تراكيب متعددة الخلايا يكبر حجمها و تأخذ الشكل الدائري و تسمى العقد الجنينية أو بداءات الأجنة ، و ترتبط العقد الجنينية مع بعضها البعض بواسطة خلايا هلامية من الكالس سهلة الفصل (Zaid و Tisserat، 1983). كما لوحظ وجود مراحل مختلفة من تطور الأجنة الخضرية في وسط تشكل الأجنة الخضرية حيث أن التطور الجنيني غير متزامن بين الأجنة المتشكلة ، و تم وصف و دراسة مراحل التطور الجنيني في الزعفران أثناء مرورها من الكروي إلى القلبي ثم التوريدي فالفلقة باستخدام المجهر الضوئي (Silvia و زملاؤه، 2009). يتمثل تطور الأجنة بعدد كاف من المؤشرات المورفولوجية و الجزيئية ، و يتأثر تطور الأجنة الخضرية بعوامل فيزيائية و كيميائية مختلفة (Bandyopadhyay و Hamill، 2000) . و يعد تكون الأجنة الخضرية نموذجاً لفهم العمليات الفيزيولوجية و البيوكيميائية التي تحدث في النبات كما يتيح نماذج لإمكانية الدراسة الجزيئية و دراسة تنظيم التعبير الوراثي ، كما تسمح بدراسة أسباب التطور الوراثي أثناء تكون الأجنة الخضرية ، و بالتالي يعتبر من أهم التقنيات الواعدة و المستقبلية في التقانات الحيوية (Loyola – Vargas، 2006).

أكد Elhag و Butler (1992) أن قدرة النبات على تكوين الكالس و الكالس الجنيني تختلف باختلاف النوع النباتي و هذا يعود إلى الاختلاف الوراثي بين الأنواع النباتية و حتى الأصناف ضمن الأنواع ، و كذلك باختلاف عمر و مصدر الخزعة ، كما يتأثر باختلاف تركيب الوسط الغذائي و تركيز منظمات النمو و الظروف البيئية من حرارة و رطوبة و إضاءة ، حيث تعد هذه العوامل من الشروط الأساسية لنجاح تشكل مزارع الكالس (Evan و زملاؤه، 2003).

كما يلعب نوع الجزء أو النسيج النباتي المزروع و الحالة الفسيولوجية دوراً أساسياً و محدداً لمدى الاستجابة للزراعة النسيجية (Mushtaq و زملاؤه، 2014). حيث أن لاختيار نوع النسيج أو الخزعة النباتية دوراً رئيساً في استحداث الكالس و في إمكانية الحصول على الأجنة الخضرية ، حيث تم استحداث الكالس و التكون الجنيني في الزعفران باستخدام خزع متنوعة (Mushtaq و زملاؤه، 2014) مثل أنسجة الكورمة (Ahuja و زملاؤه، 1994)، البراعم القمية و البراعم الجانبية (Karamian، 2014; Ebrahimzadeh و Karamian، 2001)، المبيض و مختلف الأعضاء الزهرية (Evans و زملاؤه، 1983) بالإضافة إلى قواعد الأوراق (Sandeep و زملاؤه، 2016). كما تعود أسباب

الاختلاف في الاستجابة لاستحداث الكالس و النمو باختلاف الخزعات النباتية إلى التغيرات الحاصلة في الحالة الفزيولوجية (Sreelatha و زملاؤه، 1998) ، فعندما درس Aftab و زملاؤه (2008) ثلاث أنواع من الخزعات النباتية من نبات الغلادبول ، تبين أن الكورمات الصغيرة أو الثانوية أعطت أفضل استجابة للنمو (90%) بالمقارنة مع الخزعات الأخرى (القمم النامية و الأوراق). و تعد الكورمات من أكثر الخزعات النباتية استخداماً في زراعة الأنسجة في الفصيلة السوسنية (Ziv و Lilien-kipnis، 2002). كما بين Hiremath (2006) أن البراعم الريزومية القمية في الزنجبيل كانت أسرع استجابة للنمو و أعطت أعلى معدل إكثار و السبب يعود إلى حقيقة احتواء البراعم الريزومية مناطق ميرستيمية كاملة ذات قدرة على الانقسام و النمو. كما تمكن Yang و زملاؤه (1996) تحفيز تشكل الكالس الجنيني بنسبة مرتفعة 80% و بشكل سريع خلال 45 يوم عند استخدام خزع الأوراق الفتية و البراعم في نبات الزعفران . وعلى الرغم من إمكانية استخدام خزع نباتية متنوعة إلا أن عمر و مرحلة تطور الخزع النباتية تؤدي دوراً أساسياً لبدء تشكل الكالس الجنيني ، حيث ثبت أنه عندما تكون مرحلة الخزعة النباتية غير صحيحة ، يتم فقط تكون كالس شفاف و هش و لين مع عدم احتمال تشكل الأجنة الخضرية (Lu و Vasil، 1982) . بالإضافة إلى ذلك فقد بينت الأبحاث بأن الخزع الفتية لها قدرة عالية على الانقسام و تعد الأكثر قدرة على الأرجح لتحفيز اتجاه مسار تكون الأجنة الخضرية و تشكيل الأجنة الخضرية بشكل أعلى مقارنة مع الخلايا المعمرة و المتخشبة (Woodward و Puonti، 2001) ، و بشكل عام إن الأنسجة التي مازالت بمرحلة الفتوة هي الأفضل في الزراعة النسيجية (Panaia و زملاؤه، 2004) .

أيضاً يعود اختلاف الخزعات في استجابتها إلى تباينها الوراثي في كفاءة الاستجابة لاستحداث الكالس و تشكل الكالس الجنيني ، و يؤثر التركيب الوراثي للخزع النباتية المختلفة و الطرز الوراثية المختلفة في كفاءة استحداث الكالس و تكون الكالس الجنيني (الأجنة الخضرية) ، والذي يرجع إلى تفاوت مستوى الهرمونات النباتية الداخلية و خصوصاً السيتوكينينات في طرز وراثية مختلفة يمكن أن يؤثر في مدى استجابتها لاستحداث الكالس و تكون الكالس الجنيني و تكون الأجنة الخضرية (Kim و زملاؤه، 2004; Radhakrishnan و زملاؤه، 2001).

كما أن وجود مستويات متفاوتة من منظمات النمو النباتية الداخلية خصوصاً السيتوكينينات في طرز وراثية مختلفة يمكن أن تؤثر بمدى استجابتها لتكوين الأجنة الخضرية (Kim و زملاؤه، 2004; Radhakrishnan و زملاؤه، 2001) أيضاً يساهم الأكسين الداخلي المنشأ من خلال الانتقال القطبي القمي- القاعدي مبكراً في الأجنة الكروية و الذي يعتبر

حدث بالغ الأهمية في تكون الأجنة الخضرية، و لذا يعتبر الأكسين من العناصر الأساسية الفاعلة و المسؤولة عن تطور الجنين (Shan و زملاؤه، 2000).

تؤدي منظمات النمو دوراً أساسياً في زراعة الأنسجة (Bhaskaran و R.H، 1990) ، فقد بينت العديد من الأبحاث في بعض النباتات أحادية الفلقة أن للأكسين 2,4-D داي كلوروفينوكسي أسيتيك أسيد الدور الأهم في استحداث الكالس ، و تكوين الكالس الجنيني (Jogeswar و زملاؤه، 2007 ; Vikrant و Rashid، 2003) . و لوحظ أنّ وجود تركيز منخفض جداً من 2,4-D يؤثر سلباً في نسبة استحداث الكالس . كما تبين أن زيادة تركيز 2,4-D عزز تشكيل الكالس و لكن ثبط و أعاق تشكيل النموات (Mushtaq و زملاؤه، 2014) ، بينما تؤدي التراكيز العالية جداً من 2,4-D إلى إعطاء كالس غير مرغوب فيه و طري ، و تؤثر سلباً في معدل تجديد النبات (Mendoza و Kaeppler، 2002) . حيث أنه عند إضافة الأكسينات بتركيز عالية يتم تشكل كالس و أجنة خضرية نتيجة تنشيط عملية الانقسام الخلوي بالإضافة إلى أنه يصبح سام و يحفز على إنتاج الإيثيلين الذي قد يتسبب في إعاقة النمو (George، 1993). و تشير هذه النتائج إلى أهمية ضبط تركيز الأكسين في وسط الاستحداث.

درس Ding و زملاؤه (1981) و لأول مرة بنجاح استخدام تقنية زراعة الأنسجة على نبات الزعفران بهدف الحصول على الكالس من زراعة خزع الكورمات على الوسط المغذي MS الحاي على منظمات النمو النباتية IAA (إندول أسيتيك أسيد) و 2,4-D .

كما بينت الأبحاث أن لوجود السيتوكينين وحده تأثير ضعيف على الانقسام الخلوي و يزداد بشكل كبير بوجود العلاقة التآزرية المتوازنة بين الأكسين و السيتوكينين حيث يعدّ التفاعل بينهما الأكثر فعالية في الانقسام الخلوي و استحداث الكالس (المعري، 2018) . كما بينت دراسة أجراها Gupta و زملاؤه (2006) أن وسط استحداث الكالس يجب أن يحتوي على السيتوكينين مثل 6-Benzylaminopurine 6-BAP ، الكينتين Kinetin ، بالإضافة إلى الأكسين 2,4-D . كذلك يؤثر تركيز السيتوكينينات الداخلية الذاتية المنشأ أو المضافة خارجياً في تشكل الكالس الجنيني (المرحلة الكروية) و تكوين الأجنة الخضرية و تحفيز التطور الجنيني و إنضاج الأجنة (Victor و زملاؤه، 1999) . بين Noriega و Són Dahl (1992) أن العلاقة التآزرية المتوازنة بين الأكسين و السيتوكينين تعد ضرورية لتشكيل الكالس الجنيني.

نجح Ahuja و زملاؤه (1994) في الحصول على أجنة كروية متميزة بنتيجة تمايز الكالس الناشيء عن النسج الميريستيمية لبراعم كورمات الزعفران و ذلك عند نقله إلى الوسط MS مضافاً إليه 2 مغ. لتر⁻¹ من IAA و 2 مغ. لتر⁻¹ من الكينتين.

كما درس Ebrahimzadeh و زملاؤه (2000) استحداث الكالس من الخلايا الميرستيمية القمية للزعفران و بين أن الوسط MS مضافاً إليه 2 مغ. لتر⁻¹ من 2,4-D و 0.5 مغ. لتر⁻¹ من الكنيتين أعطى أعلى معدل لنسبة استحداث الكالس بنسبة بلغت 44% ، و تتفق نتائج استحداث الكالس باستخدام مزيج من 2,4-D و الكنيتين مع بعض الأبحاث السابقة (Dalila و زملاؤه، 2013; Karamian و Ranjbar، 2010)، حيث تشكل كالس أبيض إلى مصفر طري في المراحل الأولى و بعد إعادة نقل لعدة مرات تم تمايزه إلى كالس أبيض جنيني قابل للتفتيت و محبب.

و في دراسة أخرى نفذها Karamian و Ebrahimzadeh (2001) للحصول على الكالس الجنيني من الخلايا الميرستيمية القمية في الزعفران ، وجد أن الوسط الأفضل MS مضافاً إليه 4 مغ. لتر⁻¹ من الكنيتين و 1 مغ. لتر⁻¹ من 2,4-D .

كما بين Blazquez و زملاؤه (2004) أن الوسط MS مضافاً إليه 0.1 مغ. لتر⁻¹ من 2,4-D و 0.5 مغ. لتر⁻¹ من 6-BAP كان الأمثل للحث على استحداث الكالس و تشكل الكالس الجنيني. بينما بين Darvishi و زملاؤه (2006) أن الوسط المغذي MS المضاف إليه 1 مغ. لتر⁻¹ من كل من 2,4-D و 6-BAP يملك التأثير الأفضل في تحريض استحداث الكالس و تشكيل الكالس الجنيني و ذلك بدءاً من البراعم القمية للزعفران.

بين Darvish و زملاؤه (2007) أن استعمال التراكيز العالية من الأكسينات و السيتوكينينات كان أكثر ملاءمة لاستحداث الكالس ، حيث تشكل الكالس الجنيني في الوسط MS مضافاً إليه 1 مغ. لتر⁻¹ من 2,4-D و 1 مغ. لتر⁻¹ من BA .

و درس Vahedi و زملاؤه (2014) استجابة الخرز النباتية من الخلايا الميرستيمية القمية و الجانبية لكورمة الزعفران لتحريض استحداث الكالس من النسيج الميرستيمي و تشكيل الأجنة الخضرية ، فوجد أن الوسط MS مضافاً إليه 2 مغ. لتر⁻¹ من 2,4-D و 0.5 مغ. لتر⁻¹ من الكنيتين كان الأمثل لاستحداث الكالس من الخلايا الميرستيمية القمية و الجانبية على التوالي ، حيث أنتجت الخلايا الميرستيمية القمية الكالس الأعلى جودة مقارنةً مع الخلايا الميرستيمية الجانبية، و كانت استجابة خرز الميرستيمات القمية لاستحداث الكالس أسرع مقارنة بخرز الميرستيمات الجانبية.

درس Mirjalili و Poorazizi (2015) استحداث الكالس و تشكل الكالس الجنيني من الأنسجة الميرستيمية للبراعم القمية للزعفران ، و بينت النتائج أن أعلى نسبة لاستحداث الكالس و الكالس الجنيني المتشكل في وسط MS مضافاً إليه 1 مغ. لتر⁻¹ من 2,4-D و 2 مغ. لتر⁻¹ من 6-BAP قد بلغت 44.3 و 36.1% على التوالي، تليه المعاملة ذات التركيز 0.5 مغ. لتر⁻¹ من 2,4-D و 2 مغ. لتر⁻¹ من 6-BAP بنسبة بلغت 40.4 و 34.1% على التوالي.

كما درس Sandeep و زملاؤه (2016) على أحد أنواع الزعفران التركي *C. oliveri* أن الوسط الأفضل لاستحداث

الكالس و تشكل الأجنة هو الوسط MS مضافاً إليه 4 مغ. لتر⁻¹ من تيديزيرون TDZ و 4 مغ. لتر⁻¹ من NAA (نفتالين أسيتيك أسيد) مضافاً إليه 5% من السكروز حيث بلغت نسبة استحداث الكالس 100% و بنسبة 83.3% عند إضافة 2% من السكروز حيث أن تخفيض نسبة السكروز في وسط الاستحداث تُعطي كالس مائي القوام هش طري ، و تقلل من نسبة تشكل الكالس الجنيني (Zhao و زملاؤه، 2010) .

وفي دراسة أجراها Lagram و زملاؤه (2017) لاستحداث الكالس من البراعم القمية للزعفران المغربي تبين أن الوسط المغذي MS مضافاً إليه 1 مغ. لتر⁻¹ من 2,4-D و 1 مغ. لتر⁻¹ من 6-BAP كان الأمثل لاستحداث الكالس 85.42%. درس Lagram و زملاؤه (2017) تأثير التوليفات الهرمونية من السيتوكينين و الأكسين مجتمعين معاً في الخلايا الميرستيمية القمية لكورمة الزعفران ، حيث بينت النتائج أن الوسط الأفضل لاستحداث الكالس هو الوسط MS مضافاً إليه 1 مغ. لتر⁻¹ من كل من 2,4-D و 6-BAP بنسبة بلغت 87.50 % ، و تبين أن استخدام تراكيز متساوية من السيتوكينين و الأكسين مجتمعين معاً كان الأكثر ملائمة لاستحداث الكالس و نموه و سرعة تشكله و هذا ما اتفق مع دراسات Chen و زملاؤه (2003).

يساهم استخدام الأوساط المغذية السائلة في إنتاج كالس عالي الجودة من الزعفران و بكميات مضاعفة ، فقد لوحظ ازدياد إنتاج الكالس الجنيني أربعة أضعاف في الأوساط المغذية السائلة مقارنة مع استخدام الأوساط المغذية الصلبة (Mushtaq و زملاؤه، 2011). كما تمكن Asrar و زملاؤه (2009) من الحصول على كالس جنيني عالي الجودة في الوسط الصلب بالمقارنة مع الأوساط السائلة مستخدماً الوسط المغذي MS مضافاً إليه 1.5 مغ. لتر⁻¹ من 2,4-D و 1.5 مغ. لتر⁻¹ من 6-BAP و 0.5 مغ. لتر⁻¹ من NAA و ذلك خلال 45-60 يوم ، في حين كان الوسط السائل ذو المحتوى الهرموني نفسه قادراً على إعطاء كالس عالي الجودة خلال 14 يوم .

إن منظمات النمو النباتية و الموجودة في الوسط المغذي يمكن التلاعب بها للحث على استحداث الكالس و تغير فيما بعد للحث على تشكيل الأجنة من الكالس ، حيث أكد Sharifi و زملاؤه (2010) أن وجود الأكسين على وجه الخصوص يحفز استحداث و إكثار الكالس و يمنع التمايز في حين أن إزالة أو خفض تركيز الأكسين يسمح بتقدم تطور الأجنة الخضرية و إنضاجها . حيث أن إزالة الأكسين من الوسط يعطي إشارة لخلايا الكالس للشروع في النمو المنظم . إن حقيقة تكون الأجنة الخضرية يمكن أن تحدث عند إزالة الأكسين تشير إلى أن وجود الأكسين يساعد فقط في استكمال الطور الكروي للأجنة الخضرية (العقد الجنينية أو بداءات الأجنة) والتي تحتوي منتجات مثبطة للتقدم في

مراحل تطور الأجنة الخضرية ، و نتيجة لذلك فإن إزالة الأكسين قد يؤدي إلى تعطيل المورثات المسؤولة عن وجود هذه المنتجات المثبطة و بالتالي تمكين تكوين الأجنة الخضرية (Ribnicky و زملاؤه، 1996) ، كما أن هنالك حاجة إلى منتجات المورث الجديد للانتقال إلى مرحلة القلب و هذه المنتجات الجديدة قد تم إنتاجها فقط عندما تم إزالة الأكسين الخارجي من وسط الزراعة (Zimmerman, 1993; Cheng و Raghavan, 1985). مع الإشارة إلى أن العوامل الوراثية المسؤولة عن استحداث الكالس تختلف عن تلك المسؤولة عن تشكل الكالس الجنيني (Haliloglu, 2006). كذلك أكد Devi و زملاؤه (2011) أن انخفاض نسبة الأكسين إلى السيتوكينين تعد ضرورية لتطور مزيد من الأجنة الناضجة وصولاً إلى مرحلة الفلقة .

3-2- مرحلة التجديد Regeneration Stage :

يحدث تجديد الأجنة الخضرية و نموها عندما تتضج بشكل كامل لتكون النموات الخضرية و الجذرية (Warren و Fowler, 1981) ، حيث تميزت مواصلة التطور الجنيني و تجديد الأجنة بظهور النسيج الميرستيمي القمي و فلقة أي مرحلة الفلقة cotyledonary في الأجنة الناضجة (مرحلة البادرة) ، مع تمايز لاحق للكريما في الجزء القاعدي من الجنين الخضري (Silvia و زملاؤه، 2009) . و يساهم استحداث النموات الخضرية و تجديد الأجنة بدءاً من الكالس في الحصول على سلالات جديدة و التي يمكن الاستفادة منها في التحسين الوراثي (Kher و زملاؤه، 2014) . تختلف مقدرة تجديد النباتات من الكالس باختلاف الصنف و الحالة الفزيولوجية و الوسط المغذي (Elhag و Butler, 1992). كما يعود اختلاف نسبة التجديد إلى مصدر الخزعة النباتية التي استحدث منها الكالس فقد تمكن Yang و زملاؤه (1996) الحصول من خزع البراعم على نموات متجددة من الكالس الجنيني بنسبة مرتفعة 94% بالمقارنة مع الخزع الأخرى المدروسة . أيضاً بين Zhao و زملاؤه (2010) أن نسبة تشكل النموات تتعلق بالتركيب الوراثي المدروس والذي يتعلق بتفاوت مستوى المحتوى الهرموني الداخلي من السيتوكينينات في الطرز الوراثية المختلفة . كما تؤدي منظمات النمو دوراً أساسياً في تجديد النباتات ، حيث يساهم الأكسين في تكوين الأجنة الخضرية و نموها بدءاً من الكالس و إنباتها لتكوين نباتات كاملة بدءاً من نسيج غير متميز كالكالس و الحصول على سلالات متباينة وراثياً. و ذلك يعود إلى الدور المباشر للأكسين و المعروف فزيولوجياً في الانقسام الخلوي و الاستطالة الخلوية من خلال تشجيع زيادة معدل تكوين البروتينات و الأحماض النووية مما يؤدي إلى زيادة الضغط الأسموزي الخلوي و بالتالي زيادة تدفق السوائل إلى داخل الخلايا و بالنتيجة تنشيط استطالة الخلايا و انقسامها، لذا فإن إضافة الأكسين في مرحلة الإكثار بتركيز منخفض

له دور مهم و فاعل في النمو الأولي للميرستيمات (Rossignol و زملاؤه، 1990) ، إضافة لدوره في الاستطالة الخلوية و الطولية للنموات الخضرية المكاثرة بزراعة النسج ، كما تحفز الأكسينات تمايز الحزم الوعائية (Aloni، 2004).

إن للسيتوكينينات تأثيرات مهمة في تشجيع تشكل نموات من الأنسجة الغير المتميزة (الكالس) أو أجزاء من ساق أو ورقة ، و يعود ذلك إلى أن السيتوكينين هرمون الانقسام الخلوي إذ لا يمكن للخلايا أن تدخل طور الميتوز مالم يتواجد السيتوكينين حيث ينشط السيتوكينين اصطناع البروتينات و تشكل الأحماض النووية DNA و RNA و يشجع عمل بعض الإنزيمات اللازمة للانقسام الخلوي مما يؤدي لزيادة الضغط الأسموزي الخلوي (المعري، 2018). و تؤدي زيادة تركيز السيتوكينين نتيجة احتوائه على شق الأدنين بدور مهم في تحفيز نمو النبات و زيادة معدل الإكثار بزيادة عدد النموات المتكونة (Nwankwo و Krikorian، 1990). بينما ينفرد السيتوكينين في تثبيط الاستطالة الطولية للخلايا و بالتالي يحد بشكل مباشر أو غير مباشر من استطالة النموات الخضرية المتكونة لذا يلاحظ أنه تقل استطالة النموات المتكونة بزراعة الأنسجة عند زيادة تركيز السيتوكينين (المعري، 1995; Welsh و Sink، 1981). كما تؤثر السيتوكينينات في تمايز و تطور الكلوروبلاست ، و يمنع السيتوكينين اصفرار النموات لتأثيره الإيجابي في تشكيل البروتين و الاحتفاظ بمادة الكلوروفيل ، كما تؤثر السيتوكينينات في تمايز و تطور الكلوروبلاست (Welsh و Sink، 1981) .

بين shan و زملائه (2000) بأن TDZ ، 6-BAP ، كينيتين من السيتوكينينات غير الطبيعية التي تحفز على التجديد و تشكل النموات من الكالس. حيث بين Indra و Krishnaveni (2009) الدور الإيجابي للكينيتين و TDZ في تمايز الكالس الجنيني إلى نموات و زيادة نسبة التجديد . كما وجد أن هرمون BA يستخدم على نطاق واسع لإكثار الأجناس التابعة للفصيلة السوسنية (Koetle، 2009). و يعد 6-BAP واحد من أكثر السيتوكينينات نشاطاً في زراعة الأنسجة النباتية لتشكل النموات من الكالس (Skoog و Miller، 1957) ، لذا يعد تواجد السيتوكينين 6-BAP في وسط التجديد العامل الأهم المحدد في تجديد النبات ، و هذا يؤكد أهمية وجوده في زيادة نسبة تجديد النموات من الكالس ، و لكن تؤدي زيادة تركيزه عن حدٍ معين تأثيراً سلبياً في نسبة تجدد النموات. و رغم أن زيادة الأكسين تعزز تشكل الكالس و الأجنة الخضرية نتيجة تنشيط عملية الانقسام الخلوي لكنها تعيق و تثبط تشكيل النموات الخضرية (Mushtaq و زملاؤه ، 2014) حيث يصبح ساماً و يحفز على إنتاج الإيثيلين الذي قد يتسبب في إعاقة النمو (George، 1993). و قد تؤدي الزيادة الكبيرة للأكسين إلى إعطاء كالس غير مرغوب فيه وطري ، و تؤثر سلباً في معدل تجديد النبات (Mendoza و Kaeppler، 2002).

و قد وجد في بعض التجارب بأنه ليس للسييتوكينين تأثير فعال في الانقسام الخلوي دون وجود الأكسين معه بتوازن هرموني (Morel و زملاؤه، 1968). حيث يعزز الاتحاد بين السييتوكينينات و الأكسينات عند إضافة تراكيز منخفضة من الأكسين بنسبة أقل من السييتوكينين تكون النموات و نموها مقارنة باستخدام السييتوكينين فقط في العديد من الأنواع النباتية (Khaleghi و زملاؤه، 2008) ، مما يشير إلى أهمية المحافظة على التوازن الهرموني بين الأكسين و السييتوكينين و لذا فإنه للتحكم في تجديد النبات من الكالس الجنيني لابد من إضافة كميات متوازنة من الأكسين والسييتوكينين إلى وسط التجديد، و لابد أن تكون نسبة السييتوكينين/الأكسين أكبر من الواحد لزيادة نسبة التجديد و عدد النموات المتشكلة (Srivastava, 2002; Miller و Skoog, 1957).

تمكن George (1993) و Ahuja و زملاؤه (1994) الحصول على نموات متجددة من الأجنة الكروية المستتبطة في الوسط MS مضافاً إليه 2مغ. لتر⁻¹ من IAA و 2 مغ. لتر⁻¹ من Kin .

كما بين hi و زملاؤه (2007) أن الوسط الأمثل للحصول على النموات الخضرية من كالس الزعفران هو الوسط MS ½ مضافاً إليه 1مغ. لتر⁻¹ من NAA و 1مغ. لتر⁻¹ من BA .

و أدى استخدام المزيج المؤلف من كل من الهرموني 2, 4-D و 6-BAP بنسبة 1: 25 (لكلا الهرموني على التوالي) إلى تجديد النموات من الكالس الجنيني في الزعفران (yildirim, 2007).

كما تم الحصول على أعلى عدد من النموات المتشكلة عن الكالس حيث تم تجديد النموات من الأجنة الخضرية الناضجة بنسبة بلغت 70% على الوسط المغذي MS مضافاً إليه 2 مغ. لتر⁻¹ من IAA و 2 مغ. لتر⁻¹ من TDZ و 2 مغ. لتر⁻¹ من 6-BAP (Sandeep و زملاؤه، 2016) .

كما وجد Sandeep و زملاؤه (2016) أن الوسط المغذي MS مضافاً إليه 4 مغ. لتر⁻¹ من NAA و 4 مغ. لتر⁻¹ من TDZ ساهم في إنضاج الأجنة الخضرية و أعطى أعلى نسبة تجديد للنموات من الكالس المستحدث في كورمات الزعفران التركي *C.oliveri* بقيمة بلغت 70% و بلغ عدد النموات المتشكلة 7.2 نمواً .

و بين Lagram و زملاؤه (2017) أن أعلى نسبة تجديد للنموات الناتجة عن الكالس المستحدث من كورمات الزعفران المغربي 64% و بمتوسط طول للنموات المتشكلة 6.65 سم باستخدام المزيج الهرموني ذو التركيز 1مغ. لتر⁻¹ من 6-BAP و 2مغ. لتر⁻¹ من NAA .

الفصل الثالث

مواد البحث و طرائقه

Materials and Methods

3- مواد البحث و طرائقه Materials and Methods:

1- 3- مكان تنفيذ البحث Research site:

نُفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية النباتية التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية - وزارة التعليم العالي، و في مخابر كلية الزراعة بجامعة دمشق خلال الفترة ما بين 2016 و 2020.

2- 3- المادة النباتية Plant material :

استعمل في تنفيذ هذا البحث 700-800 كورمة من نبات الزعفران المسترع *Crocus sativus*.L. ايراني المصدر من الصنف مشهداني Mashhadani تم تأمينها من مصادر موثوقة من قبل هيئة التقانة الحيوية. و يتميز الصنف بكورماته ذات الحراشف البنية و أزهاره ذات البتلات البنفسجية و المياسم القرمزية اللون، و تزرع كورماته بشهر أيلول لتزهر بعد الزراعة ب(30 - 40 يوم) و تقتلع كورماته عند نضجها في شهر أيار .

3- 3- طرائق البحث Research Methods :

1- 3- 3- مرحلة الزراعة الأولية Initial culture Stage :

تُسمى الزراعة التأسيسية، و هي أول مرحلة في زراعة الأنسجة ، و تتم الزراعة وفق الخطوات التالية :

1- 3- 1- تحضير الوسط المغذي (وسط الزراعة الأولية) Media Preparation:

تم استخدام المحلول المعدني الكامل لموراشيج وسكوغ (MS Murashige و Skooge، 1962) في جميع مراحل البحث ، والمكون من العناصر الكبرى و الصغرى حيث يتضح تركيبه في الجدول (1). كما تم إضافة الفيتامينات كالثيامين (1 مغ.ل⁻¹) و الميوإينوزيتول (100مغ.ل⁻¹) التي تنشط نمو الأجزاء النباتية المزروعة و تطورها ، بالإضافة إلى السكروز (30غ.ل⁻¹)، و كان آخرها إضافة الهرمونات، و الماء المقطر ليكون الحجم النهائي لتر واحد مع التحريك في دورق زجاجي وضبطت درجة الحموضة pH الوسط على درجة 5.8 باستخدام جهاز pH meter بإضافة قطرات من محلول ماءات الصوديوم (NaOH) N1 و ذلك قبل إضافة الآغار حيث أضيف 5.5 غ . ل⁻¹ آغار عالي النقاوة

إلى المحلول ، و تم التسخين على جهاز التسخين و التحريك المغناطيسي حتى الذوبان التام للأغار على درجة الغليان بشكل كامل ليكسب الوسط الغذائي الصلابة و يوضح الجدول (2) مكونات الوسط المغذي. و عقم الوسط في جهاز الموصد أو جهاز التعقيم الرطب Autoclave على حرارة 121°م و تحت ضغط 1.04 كغ/سم² لمدة 20 دقيقة (Indra و Krishnaveni، 2009) . وزّع الوسط بعد ذلك عند درجة حرارة أعلى من 70°م في أطباق بتري .

الجدول (1): التركيب الكيميائي للمحلول المعدني لموراشيج و سكوغ (MS) المستخدم في التجارب المنفذة خلال

مراحل النمو المختلفة

المحلول المعدني من العناصر الصغرى والكبرى	التركيب الكيميائي	التركيز (مغ/ل)
نترات الأمونيوم	NH ₄ NO ₃	1650
نترات البوتاسيوم	KNO ₃	1900
كلوريد الكالسيوم المائي	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
سلفات المغنيزيوم المائية	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
فوسفات البوتاسيوم	KH ₂ PO ₄	170
سلفات الحديد المائية	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
شلات الصوديوم	Na ₂ EDTA	37.25
سلفات المنغنيز المائية	MnSO ₄ .7H ₂ O	22.3
سلفات الزنك	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
حمض البوريك	H ₃ BO ₃	6.2
يود البوتاسيوم	KI	6.6
مولبيدات الأمونيوم المائية	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.83
سلفات النحاس المائية	CuSO ₄ .2H ₂ O	0.025
كلور الكوبالت المائي	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025

الجدول (2): الأوساط المغذية والمزائج الهرمونية المستخدمة في تجارب البحث المختلفة المنفذة خلال مراحل النمو المختلفة

مكونات الوسط المغذي	التركيب الكيميائي	مرحلة الزراعة الأولية	مرحلة استحداث الكالس وتشكل الكالس الجنيني	مرحلة التجديد والنمو المتجددة
المحلول المعدني	MS	MS	MS	MS
السكروز		30 غ/ل	30 غ/ل	30 غ/ل
الآغار		7 غ/ل	7 غ/ل	7 غ/ل
ميواينوسيتول	B8	100 مغ/ل	100 مغ/ل	100 مغ/ل
ثيامين	B1	1 مغ/ل	1 مغ/ل	1 مغ/ل
بيروكسين	B6	-	1 مغ/ل	1 مغ/ل
حمض النيكوتين	B3	-	1 مغ/ل	1 مغ/ل
بانثوثينات الكالسيوم	B5	-	1 مغ/ل	1 مغ/ل
حمض الأسكوربيك	Vit .C	100 مغ/ل	100 مغ/ل	100 مغ/ل
حمض الفوليك	B2	-	0.5 مغ/ل	0.5 مغ/ل
غلايسين		-	2 مغ/ل	2 مغ/ل
هيدروليزات الكازئين		-	-	500 مغ/ل
Prolin		-	-	600 مغ/ل
pH		5.8	5.8	5.8
منظمات النمو				
ديكلوروفينوكسي أسيتيك أسيد 2,4-D	-	-	0.25-0.5-1-1.5-2	0.0-0.175
٦- بنزيل أمينو بيورين 6-BAP	-	-	0.25-0.5-1-2	0.0-0.175-0.25-0.5-1-2
مزائج من 2,4-D و 6-BAP	-	-	0.25-0.5-1-1.5-2	0.0-0.175
	-	-	0.25-0.5-1-2	0.0-0.175-0.25-0.5-1-2

2-1-3 تجهيز الكورمات للزراعة:

تم انتقاء الكورمات السليمة غير المتضررة و غير المصابة بالأمراض متجانسة الحجم ، و تم تحضير الكورمات للزراعة بدءاً بغسلها تحت الماء الجاري لمدة 30 دقيقة لإزالة الأتربة العالقة عليها ، ثم أزيلت الأوراق الحرشية عنها.

3-1-3 تطهير الكورمات :

تهدف الزراعة الأولية إلى الحصول على عينات نباتية سليمة خالية من التلوث ، ولها قدرة على النمو. و لتحقيق هذه الأهداف و بما أن مشكلة التلوث تعد الأهم في مرحلة الزراعة الأولية و خاصة عندما تكون الأجزاء المستخدمة في الزراعة تنمو تحت الأرض (كورمات) ، تم دراسة بعض العوامل المؤثرة في النمو من خلال اختبار فعالية تراكيز مادة

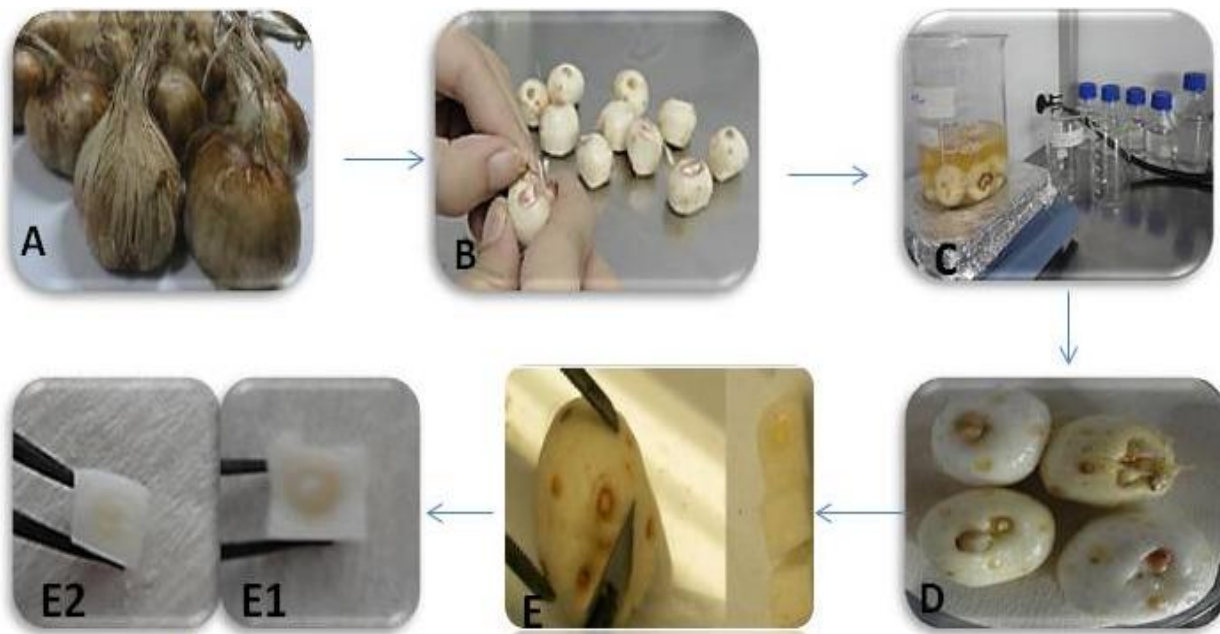
التطهير و زمن التطهير خلال مرحلة الزراعة الأولية لذا تم إجراء عدة تجارب لتحديد الطريقة المثلى لتطهير الكورمات والحصول على أقل نسبة تلوث و دراسة مدى تأثير التطهير على بقاء الخزع النباتية سليمة و قادرة على النمو ليتم اعتماد نتائجها لاحقاً. و بناءً على ماسبق فقد جرى تطهير الكورمات بالكحول الايتيلي تركيز (70%) مدة دقيقة واحدة مع التحريك، و عوملت بعد ذلك بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) بتركيز مختلفة (0-1-2-3-4-5%) لمدة 10 و 20 دقيقة مع إضافة محلول % 20-TWEEN إلى وسط التطهير و هي مادة ناشرة تساعد في نشر مادة التطهير على سطح الجزء النباتي و تغلغلها بين حراشف البراعم من خلال خفض التوتر السطحي للجزء النباتي المراد زراعته، و بالتالي زيادة فعالية المادة المطهرة و كفاءة عملية التطهير. و بانتهاء مدة التطهير تم غسل الكورمات بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات متتالية بمعدل 15، 10، 5 دقائق على التوالي مع التحريك بهدف إزالة آثار المادة الفعالة المستخدمة بالتطهير، و تمت عملية التطهير تحت جهاز العزل الجرثومي Laminar air flow Hood .

4 - 1 - 3 عزل و زراعة الخزعات النباتية :Cultivation of explants

بعد تطهير الكورمات تم عزل البراعم الجانبية والقمية على شكل مكعبات بحجم 1-1.5 سم³ و زراعتها في الوسط المغذي MS (Murashige و Skooge، 1962) خال من منظمات النمو (وسط الزراعة الأولية) - كما استخدم MS أيضاً في جميع مراحل البحث - الجدول (1)، و المضاف له 30 غ.ل⁻¹ سكروز و 7 غ.ل⁻¹ آجار نقي وضبطت درجة الحموضة (pH) 5.8 .

وقد تمت كافة مراحل التطهير السطحي و الزراعة الأولية في ظروف معقمة في غرفة الزراعة ضمن جهاز العزل الجرثومي و باستخدام أدوات معقمة من مشارط و مقصات و أطباق بتري . وتم زراعة البراعم في أطباق بمعدل 3 براعم في كل طبق ، وبمعدل ثمانى أطباق لكل مكرر وكررت كل معاملة لمرتين ، حيث بلغ عدد معاملات التعقيم المدروسة 10 معاملات. و حُضنت الأطباق المزروعة بالخزعات النباتية بغرفة النمو على درجة حرارة 24 ± 1 م° و ظلام و رطوبة نسبية 70%. و تم في نهاية مرحلة التطهير السطحي دراسة:

- تأثير التراكيز المختلفة من هيبوكلوريت الصوديوم و زمن التطهير في نسبة العينات السليمة .
- تأثير التراكيز المختلفة من هيبوكلوريت الصوديوم و زمن التطهير في نسبة العينات النامية .



الشكل (2): المراحل التأسيسية في نبات الزعفران *Crocus sativus*.L.var. Mashhadani ايراني المصدر .
A: كورمات نبات الزعفران المستزرع *Crocus sativus*.L. ايراني المصدر من الصنف مشهداني Mashhadani
B: تجهيز الكورمات للتطهير (إزالة الأوراق الحشوية للكورمات) ، C: التطهير السطحي للكورمات ، D: الكورمات
بعد التطهير ، E: عزل خزع البراعم القمية و الجانبية ، E1 : خزعة البرعم القمي ، E2: خزعة البرعم الجانبي

2-3- مرحلة استحداث الكالس و تشكل الكالس الجنيني Callus Induction And Embryogenic Callus Formation Stage

تم في مرحلة استحداث الكالس و تشكل الكالس الجنيني زراعة البراعم الجانبية و القمية من الكورمات على الوسط المغذي MS المعتمد في مرحلة الزراعة الأولية ، و المضاف إليه 100 مغ/ل ميواينوسيتول + 1 مغ/ل ثيامين + 30 غ/ل سكروز + 7 غ/ل آغار بالإضافة إلى الفيتامينات و الأحماض الأمينية ، و ضبطت درجة الحموضة pH على 5.8 بعد إضافة تراكيز مختلفة من منظمات النمو النباتية الجدول (2). حيث تمت دراسة تأثير استخدام تراكيز مختلفة من الأكسين (2,4-D) (0.25-1-1.5-2 مغ.ل⁻¹)، و السيتوكينين (6-BAP) (0.25-0.5-1-2 مغ.ل⁻¹). كما درست تراكيز مختلفة من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP على شكل مزائج يتضمن كل مزيج أحد تراكيز الأكسين 2,4-D (0.25-0.5-1-1.5-2 غ.ل⁻¹) مع أحد تراكيز السيتوكينين 6-BAP (0.25-0.5-1-2 مغ.ل⁻¹) تبعاً.

و تم زراعة البراعم في أطباق و بمعدل 3 براعم في كل طبق ، و بمعدل ثماني أطباق لكل مكرر و كررت كل معاملة لمرة ، حيث بلغ عدد المعاملات المدروسة 33 معاملة. و حضنت الأطباق المزروعة بالخزعات النباتية في الظلام بشكل كامل على درجة حرارة $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ، و رطوبة نسبية 70%، و نقلت الخزع إلى وسط طازج كل 21 يوم (Nasircilar و زملاؤه، 2006) . و تم في نهاية مرحلة استحداث الكالس (بعد 45-60 يوم) دراسة:

- تأثير التراكيز المختلفة من أكسين 2,4-D و نوع الخزعة النباتية في نسبة استحداث الكالس .
- تأثير التراكيز المختلفة من السيتوكينين 6-BAP و نوع الخزعة النباتية في نسبة استحداث الكالس .
- تأثير التراكيز المختلفة من المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP و نوع الخزعة النباتية في نسبة استحداث الكالس .

كما تم في نهاية مرحلة تشكل الكالس الجنيني (بعد 90-120 يوم) دراسة:

- تأثير التراكيز المختلفة من أكسين 2,4-D و نوع الخزعة النباتية في نسبة تشكل الكالس الجنيني
- تأثير التراكيز المختلفة من السيتوكينين 6-BAP و نوع الخزعة النباتية في نسبة تشكل الكالس الجنيني
- تأثير التراكيز المختلفة من المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP و نوع الخزعة النباتية في نسبة تشكل الكالس الجنيني

3-3- مرحلة التجديد Regeneration Stage :

تهدف هذه المرحلة إلى الحصول على أكبر عدد ممكن من النموات الخضرية جيدة النمو، لذا تم في هذه المرحلة نقل الكالس الجنيني إلى وسط MS المضاف إليه كازئين هيدروكسيلات 500 مغ.ل⁻¹ و البرولين 600 مغ.ل⁻¹ (و هي عبارة عن أحماض أمينية لتزويد الجزء المزروع بمصدر آخر من الآزوت العضوي حيث تحرر هذه المواد الآزوت ببطء و يبقى متوفراً للنبات)، إلى جانب الغلايسين والفيتامينات و مصادر الطاقة و الأغار المستخدمة في المرحلة السابقة ، و ضبطت درجة الحموضة pH على 5.8 بعد إضافة تراكيز مختلفة من منظمات النمو النباتية الجدول (2). و تمت الزراعة في أنابيب و بمعدل 16 أنبوب لكل مكرر و كررت كل معاملة مرتين ، حيث بلغ عدد معاملات التجديد المدروسة 14 معاملة و حضّنت الأنابيب المزروعة بالخزعات النباتية على درجة حرارة 24 ± 1م°، و رطوبة نسبية 70%، و 16 ساعة إضاءة و 8 ساعات ظلام و شدة ضوئية 3000 لوكس (Nasircilar و زملاؤه، 2006) ، و تم نقل الخزع إلى وسط طازج كل 21 يوم، حيث تمّت استخدام منظمات النمو النباتية من السيتوكينين (6-BAP) بتراكيز مختلفة (0-0.25-0.5-1-1.5-2مغ.ل⁻¹) و

الأكسين 2,4-D بتركيز (0-0.175مغ.ل⁻¹)، و في نهاية مرحلة التجديد تم دراسة:

- تأثير التراكيز المختلفة من المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP في نسبة التجديد
- تأثير التراكيز المختلفة من المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP في متوسط عدد النموات.

3-4- التصميم التجريبي و التحليل الإحصائي Statistical Analysis And Experimental Design :

صُممت التجربة وفق التصميم العشوائي التام (RCD) ، و حُللت النتائج باستخدام برنامج XLSTAT. 2014 و أجري تحليل التباين (Two way ANOVA) باستخدام اختبار Fisher ، حيث تم مقارنة المتوسطات و حساب قيمة أقل فرق معنوي LSD عند مستوى ثقة 99% ، و تم تكرار التجارب مرتين.

الفصل الرابع

النتائج و المناقشة

Results and Discussion

4- النتائج و المناقشة Results and Discussion:

4-1- المرحلة التأسيسية Initial stage (التطهير السطحي) (Surface disinfection):

4-1-1- تأثير التراكيز المختلفة من هيبوكلوريت الصوديوم و زمن التطهير في نسبة العينات السليمة (المتبقية) و نسبة العينات النامية:

الجدول (3): تأثير التراكيز المختلفة من هيبوكلوريت الصوديوم و زمن التطهير في نسبة العينات السليمة و نسبة العينات النامية

تركيز هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl	الزمن (الدقيقة)	نسبة العينات السليمة (%)	نسبة العينات النامية (%)
0	10	0.00 ^j	15.87 ^g
0	20	0.00 ^j	12.70 ^g
1	10	14.27 ⁱ	25.39 ^f
1	20	25.71 ^h	27.14 ^f
2	10	38.57 ^g	30.00 ^f
2	20	50.00 ^f	38.57 ^e
3	10	57.14 ^e	40.00 ^e
3	20	64.29 ^d	48.57 ^d
4	10	67.14 ^d	57.14 ^c
4	20	74.28 ^c	61.42 ^{bc}
5	10	88.57 ^b	72.85 ^a
5	20	98.57 ^a	67.14 ^{ab}
زمن التطهير	10	44.29 ^A	40.21 ^A
	20	52.14 ^A	42.59 ^A
	0	0.00 ^F	14.28 ^E
	1%	20.00 ^E	26.27 ^D
	2%	44.29 ^D	34.28 ^C
	3%	60.71 ^C	44.29 ^B
	4%	70.71 ^B	62.14 ^A
	5%	93.57 ^A	67.14 ^A
	المتغير		نسبة العينات السليمة (%)
			نسبة العينات النامية (%)
تركيز هيبوكلوريت الصوديوم		5.42	6.48
زمن التطهير		13.95	9.01
تفاعل زمن التطهير وتركيز هيبوكلوريت الصوديوم		6.19	8.35
C.V		1.99	1.99
		(%1) LSD	(%1) LSD

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

يُلاحظ من الجدول (3) أنَّ المعاملة بهيبوكلوريت الصوديوم عند تركيزي 5 % أدت إلى زيادة معنوية في نسبة العينات السليمة و النامية (93.57 ، 67.14 %) على التوالي و بفروقات معنوية بالمقارنة مع جميع المعاملات المدروسة و بالمقارنة مع معاملة الشاهد (بدون هيبوكلوريت الصوديوم) (0.00%) (جميع العينات مصابة بالمسببات المرضية) . كما أبدت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروقات معنوية بين تأثير زمني التطهير المستعملين (10 ، 20 دقيقة) في نسبة العينات السليمة و النامية ، حيث حقق الزمن 20 دقيقة النسبة الأعلى لكل من العينات السليمة (52.14%) و العينات النامية (42.59%).

أما بالنسبة إلى تفاعل تراكيز هيبوكلوريت الصوديوم و زمني التطهير فقد تفوقت المعاملة بالتركيز 5% من هيبوكلوريت الصوديوم لمدة 20 دقيقة في زيادة نسبة العينات السليمة و النامية معنوياً (98.57 ، 67.14 %) على التوالي بالمقارنة مع جميع المعاملات المدروسة و بالمقارنة مع معاملة الشاهد (بدون هيبوكلوريت الصوديوم) (0.00%) (جميع العينات مصابة بالمسببات المرضية).

إن نجاح التطهير يعتمد على نوع و تركيز المادة المستخدمة في التطهير ، و الزمن اللازم للتطهير (المعري، 1995). حيث تشير النتائج إلى أهمية التطهير السطحي للخرعات النباتية بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم 5% لفترة لا تقل عن 20 دقيقة لزيادة نسبة العينات السليمة و النامية ، من خلال القضاء على جميع المسببات المرضية مع ضمان سلامة أكبر نسبة ممكنة من الخزعات النباتية للنمو ، و خاصةً عند الزراعة في الزجاج *In vitro* ، و يمكن أن يؤدي التطهير السطحي دوراً مهماً في المحافظة على سلامة الخزعات لاحقاً (المعري، 1995). و تتفق نتائجنا مع Jelaska و Pevalek (1987) الذين أكدوا على الفاعلية العالية في استخدام هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl في عمليات التطهير السطحي للخرعات النباتية في العديد من النباتات المزروعة مخبرياً إذا استخدمت بتركيز مناسبة مقارنة مع مطهرات أخرى مثل هيبوكلوريت الكالسيوم $Ca(ClO_2)$ الذي يعزى انخفاض تأثيره إلى انخفاض معدل نفاذيته عبر الأغشية الخلوية ، أو مقارنة مع كلوريد الزئبق Hg_2Cl_2 الذي تؤدي التراكيز المرتفعة منه إلى تهتك الأنسجة و سميته و كثيراً ما يوصى بعدم استخدامه لسميته الشديدة و خطورته على الإنسان (Lizarrag و زملاؤه، 1991 ; Pierik، 1987).

2-4- مرحلة استحداث الكالس Callus Induction Stage :

بدأ الكالس بالظهور بعد 45 إلى 60 يوم من زراعة الخزعات النباتية في وسط الاستحداث . و تشكل الكالس الجنيني بعد 90-120 يوم من الزراعة ، حيث سجلت قراءات نسبة استحداث الكالس و نسبة تشكل الكالس الجنيني .

1-2-4- تأثير التراكيز المختلفة من أكسين 2,4-D و نوع الخزعة النباتية في نسبة استحداث الكالس:

الجدول (4): تأثير نوع الخزعة النباتية و تركيز الأكسين 2,4-D في نسبة استحداث الكالس في الزعفران

المدرّوس *Crocus.sativus.L*

نسبة استحداث الكالس (%)			المعاملات 2,4-D (مغ . ل ⁻¹)
متوسط المعاملات	الخرزة النباتية		
	البرعم الجانبي	البرعم القمي	
0.00 ^C	0.00 ^b	0.00 ^d	0
38.33 ^A	17.14 ^a	59.52 ^a	0.25
22.62 ^B	11.90 ^{ab}	33.33 ^b	0.5
20.59 ^B	11.24 ^{ab}	29.95 ^b	1
17.88 ^B	9.52 ^{ab}	26.24 ^{bc}	1.5
12.38B ^C	7.62 ^{ab}	17.14 ^c	2
-	9.57 ^B	27.70 ^A	المتوسط
نسبة استحداث الكالس % LSD (1%)			المتغير
12.44			المعاملة 2,4-D
7.66			الخرزة
15.13			تفاعل 2,4-D والبرعم الجانبي
11.28			تفاعل 2,4-D و البرعم القمي
2.02			C.V

*تشير اختلاف الأحرف الكبيرة في السطر الواحد بالنسبة لنوعي الخزعة و في العمود الواحد بالنسبة لتراكيز 2,4-D ، و اختلاف الأحرف الصغيرة في الأعمدة و الأسطر بالنسبة للتفاعل بين نوعي الخزعة و التراكيز الهرمونية ل 2,4-D إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ثقة 99 %.

يلاحظ من الجدول (4) أن المعاملة بالتركيز 0.25 مغ.ل⁻¹ من 2,4-D أدت إلى زيادة معنوية في نسبة استحداث الكالس (38.33%) و بفروقات معنوية بالمقارنة مع بقية المعاملات ، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند معاملة الشاهد (بدون 2,4-D).

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي أن المعاملة بالتركيز 0.25 مغ.ل⁻¹ من 2,4-D أدت لزيادة نسبة استحداث الكالس معنوياً من كل من البراعم القمية و الجانبية (59.52 ، 17.14%) على التوالي و بفروقات معنوية بالمقارنة مع بقية المعاملات المدروسة ، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند معاملة الشاهد (بدون 2,4-D). أما بالنسبة لمتوسط نسبة استحداث الكالس من الخزعة النباتية (البرعم القمي ، البرعم الجانبي) ، فقد لوحظ أن البراعم القمية أكثر استجابة لوسط الاستحداث (27.20 %) بالمقارنة مع البراعم الجانبية (9.58 %) و بفرق معنوي بين هاتين المعاملتين .

بيّنت العديد من الأبحاث أنّ للأكسين 2,4-D الدور الأساسي في استحداث و تشكيل الكالس ، و خاصةً الأنواع النباتية أحادية الفلقة Monocotyledons (Jogeswar و زملاؤه، 2007; Vikrant و Rashid، 2003) . حيث أنّ زيادة استحداث الكالس بوجود الأكسين 2,4-D ناجم عن دوره في تشجيع الانقسام الخلوي الميتوزي ، إذ يعمل الأكسين على زيادة معدل اصطناع الأحماض النووية الرنا RNA و الدنا DNA ، و يساهم في تنشيط اصطناع البروتينات ، كما يساهم الأكسين في تنشيط عمل الإنزيمات التي تعمل على تنشيط التفاعلات الكيميائية اللازمة لتأمين المواد الضرورية للانقسام الخلوي Cell division مثل تنشيط عمل أنزيم RNA Polymerase (Morel و زملاؤه، 1968) ، و يساهم الأكسين في زيادة تدفق السوائل إلى داخل الخلية ما يؤدي للاستطالة الخلوية و الانقسام الخلوي و بالتالي فإن الأكسين يسرع الدورة الخلوية و تشكيل بنى الكالس (Stale و Lnze، 2001).

2-2-4- تأثير التراكيز المختلفة من السيتوكينين 6-BAP و نوع الخزعة النباتية في نسبة استحداث الكالس:

الجدول (5): تأثير نوع الخزعة النباتية و تركيز السيتوكينين 6-BAP في نسبة استحداث الكالس في الزعفران المدروس *Crocus sativus*.L

نسبة استحداث الكالس (%)	المعاملات	
	6-BAP (مغ . ل ⁻¹)	
متوسط المعاملات	البرعم القمي	البرعم الجانبي
0.00 ^B	0.00 ^b	0.00 ^b
12.74 ^A	17.86 ^a	7.62 ^a
0.00 ^B	0.00 ^b	0.00 ^b
0.00 ^B	0.00 ^b	0.00 ^b
4.64 ^B	9.29 ^{ab}	0.00 ^b
-	5.43 ^A	1.52 ^A
المتغير		نسبة استحداث الكالس % LSD (1%)
المعاملة 6-BAP		6.97
الخزعة		4.84
تفاعل 6-BAP و البرعم القمي		12.22
تفاعل 6-BAP و البرعم الجانبي		9.63
C.V		2

*تشير اختلاف الأحرف الكبيرة في السطر الواحد بالنسبة لنوعي الخزعة و في العمود الواحد بالنسبة لتراكيز 6-BAP ، و اختلاف الأحرف الصغيرة في الأعمدة و الأسطر بالنسبة للتفاعل بين نوعي الخزعة و التراكيز الهرمونية ل 6-BAP إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ثقة 99 %.

يلاحظ من الجدول (5) أن المعاملة بالتركيز 0.25 مغ.ل⁻¹ من 6-BAP أدت إلى زيادة معنوية في نسبة استحداث الكالس (12.74%) و بفروقات معنوية بالمقارنة مع بقية المعاملات ، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند معاملة الشاهد (بدون 6-BAP). و بيّنت نتائج التحليل الإحصائي أن المعاملة بالتركيز 0.25 مغ.ل⁻¹ من 6-BAP أدى لزيادة نسبة استحداث الكالس معنوياً من كل من البراعم القمية و الجانبية (17.85 ، 7.62 %) على التوالي و بفروقات

معنوية بالمقارنة مع بقية المعاملات المدروسة ، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند معاملة الشاهد (بدون 6-BAP). أما بالنسبة لمتوسط نسبة استحداث الكالس من الخزعة النباتية (البرعم القمي ، البرعم الجانبي) فقد لوحظ عدم وجود أي فرق معنوي في استجابة كل من البراعم القمية و الجانبية لوسط الاستحداث بقيمة بلغت (5.43 ، 1.52%) لكل من البراعم القمية و الجانبية على التوالي . و فسرت النتائج بأن للسيتوكينينات دوراً مهماً 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 و يشجع تكوين الأحماض النووية الدنا DNA و الرنا RNA ، و ينشط عمل بعض الإنزيمات .

3-2-4- تأثير التراكيز المختلفة من المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP و نوع الخزعة النباتية في نسبة استحداث الكالس :

يُلاحظ من الجدول (6) أنّ المعاملة بالمزائج الهرمونية ذات التراكيز (1.0 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 0.25 مغ.ل⁻¹ 2,4-D¹) و (0.5 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 0.25 مغ.ل⁻¹ 2,4-D¹) و (1 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 1 مغ.ل⁻¹ 2,4-D¹) أدت إلى ازدياد متوسط نسبة استحداث الكالس معنوياً بقيمة بلغت (55.31 ، 45.23 ، 41.43%) على التوالي و بفروقات معنوية مع بقية المعاملات المدروسة ، بينما أدت المعاملة بالمزيجين (0.5 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 1 مغ.ل⁻¹ 2,4-D¹) و (0.25 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 0.25 مغ.ل⁻¹ 2,4-D¹) إلى انخفاض متوسط نسبة استحداث الكالس معنوياً بقيمة بلغت (13.57 ، 14.17%) على التوالي ، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند معاملة الشاهد (بدون 2,4-D و 6-BAP). بيّنت نتائج التحليل الإحصائي أن استخدام المزائج الهرمونية ذات التراكيز (1 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 0.25 مغ.ل⁻¹ 2,4-D¹) ، (0.5 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 0.25 مغ.ل⁻¹ 2,4-D¹) أدى إلى ازدياد معنوي في نسبة استحداث الكالس من البراعم القمية بقيمة بلغت (87.50 ، 71.43%) على التوالي و بفروقات معنوية مع بقية المعاملات ، بينما انخفضت نسبة استحداث

الكالس معنوياً عند المعاملة بالمزائج الهرمونية ذات التراكيز (0.5 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 1 مغ.ل⁻¹ 2,4-D¹) و (0.25 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 0.25 مغ.ل⁻¹ 2,4-D¹) ، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند معاملة الشاهد (بدون 2,4-D و 6-BAP). كما بينت النتائج أن المعاملة بالمزائج الهرمونية ذات التراكيز (1 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 0.25 مغ.ل⁻¹ 2,4-D¹) و (2 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 1 مغ.ل⁻¹ 2,4-D¹) و (1 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 1 مغ.ل⁻¹ 2,4-D¹) أدت إلى ازدياد معنوي في نسبة استحداث الكالس من البراعم الجانبية بقيمة بلغت (28.56 ، 27.14 ، 23.81%) على التوالي و بفروقات معنوية مع بقية المعاملات، بينما انخفضت نسبة استحداث الكالس معنوياً عند استخدام المزائج الهرمونية ذات التراكيز (1 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 2 مغ.ل⁻¹ 2,4-D¹) و (2 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ +

2 مغ.ل⁻¹ (2,4-D) ، (0.5 مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 2 مغ.ل⁻¹ (2,4-D) بقيمة بلغت (5.71 ، 4.76 ، 3.57%) على التوالي ، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند معاملة الشاهد (بدون 2,4-D و 6-BAP).

أما بالنسبة لتأثير نوع الخزعة النباتية في متوسط نسبة استحداث الكالس (البرعم القمي ، البرعم الجانبي) ، لوحظ أن البراعم القمية أكثر استجابة لاستحداث الكالس (40.93%) بالمقارنة مع البراعم الجانبية (13.99%) و بفروق معنوية بين هاتين المعاملتين .

الجدول (6): تأثير نوع الخزعة النباتية و تركيز المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP

في نسبة استحداث الكالس في الزعفران المدروس *Crocus sativus*.L

نسبة استحداث الكالس			المعاملات	
الخرزعة النباتية			2,4-D مغ.ل ⁻¹	6-BAP مغ.ل ⁻¹
متوسط المعاملات	البرعم الجانبي	البرعم القمي		
0.00 ^G	0.00 ⁱ	0.00 ⁱ	0	0
14.17 ^{FG}	8.33 ^{cdef}	20.00 ^{gh}	0.25	0.25
29.05 ^{BCDEF}	10.47 ^{bcdef}	47.61 ^{cdef}	0.25	0.5
41.07 ^{ABC}	21.42 ^{abcd}	60.71 ^{bc}	0.25	1
28.56 ^{BCDEF}	15.47 ^{abcdef}	41.64 ^{cdef}	0.25	1.5
23.21 ^{DEF}	10.71 ^{bcdef}	35.71 ^{efgh}	0.25	2
45.23 ^{AB}	19.04 ^{abcde}	71.43 ^{ab}	0.5	0.25
34.52 ^{BCDE}	16.66 ^{abcdef}	52.37 ^{bcde}	0.5	0.5
13.57 ^{FG}	12.86 ^{abcdef}	14.28 ^{hi}	0.5	1
23.81 ^{DEF}	7.14 ^{cedf}	40.47 ^{def}	0.5	1.5
19.05 ^{DEF}	3.57 ^{ef}	34.52 ^{efg}	0.5	2
55.31 ^A	28.56 ^a	87.50 ^a	1	0.25
27.86 ^{CDEF}	17.62 ^{abcdef}	38.09 ^{efg}	1	0.5
41.43 ^{ABC}	23.81 ^{abc}	59.04 ^{bcd}	1	1
28.45 ^{BCDEF}	15.23 ^{abcdef}	41.66 ^{cdef}	1	1.5
17.98 ^{EF}	5.71 ^{def}	30.23 ^{fgh}	1	2
24.64 ^{CDEF}	17.14 ^{abcdef}	32.14 ^{fgh}	2	0.25
30.71 ^{BCDEF}	18.57 ^{abcde}	42.85 ^{cdef}	2	0.5
36.19 ^{BCD}	27.14 ^{ab}	45.24 ^{cdef}	2	1
23.33 ^{DEF}	7.62 ^{cdef}	39.04 ^{efg}	2	1.5
18.09 ^{EF}	4.76 ^{def}	31.42 ^{fgh}	2	2
-	13.99 ^B	40.93 ^A	المتوسط	
نسبة استحداث الكالس (%) LSD (%1)			المتغير	
17.19			المعاملة 6-BAP+ 2,4-D	
4.91			الخرزعة	
19.78			تفاعل 6-BAP+ 2,4-D والبرعم القمي	
17.51			تفاعل 6-BAP+ 2,4-D والبرعم الجانبي	
1.97			C.V	

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

تؤدي السيتوكينينات دوراً مؤزراً لهرمونات أخرى كالأكسينات في بعض مظاهر النمو و تساعد باستحداث و تشكل الكالس و زيادة الكتلة الحية المزروعة بالنسج ، حيث أن وجود السيتوكينين لوحده له تأثيراً ضعيفاً في الانقسام الخلوي بينما يزداد الانقسام الخلوي بشكل كبير بوجود العلاقة التآزرية المتوازنة بين الأكسين و السيتوكينين في الوسط المغذي و يعدّ التفاعل بين السيتوكينين و الأكسين الأكثر فعالية في الانقسام الخلوي و استحداث الكالس (المعري، 2018) .

يعود التباين لاستحداث الكالس في الزعفران لنوع الخزعة النباتية (البرعم القمي ، البرعم الجانبي) ، حيث لا تستجيب جميع الأعضاء أو الخزعات النباتية المزروعة للنمو بنفس الدرجة ضمن النوع النباتي الواحد كما يختلف باختلاف النوع النباتي . تعود أسباب الاختلاف في الاستجابة للنمو باختلاف الخزعات النباتية إلى التغيرات الحاصلة في الحالة الفيزيولوجية و يؤثر التركيب الوراثي للخزعة النباتية في كفاءة استحداث الكالس (Hartmann و زملاؤه، 1997). والذي يعود إلى تفاوت مستوى الهرمونات النباتية الداخلية و خصوصاً السيتوكينينات في الطرز الوراثية المختلفة (Kim و زملاؤه، 2004). كما أكد Evan و زملاؤه (2003) أن قدرة الخزعة النباتية على تكوين الكالس تختلف باختلاف تركيب الوسط الغذائي حيث تختلف الاستجابة لتركيز و نوع الأكسين و السيتوكينين المستخدم . و من حيث نسبة الكالس المتشكل ، أظهرت البراعم القمية أعلى استجابة لوسط الاستحداث بالمقارنة مع البراعم الجانبية ، حيث أن الخلايا الميرستيمية للقمة النامية كانت الأسرع استجابة و أنتجت الكالس الأعلى جودة بالمقارنة مع الخلايا الميرستيمية للبرعم الجانبي (Elhag و Butler، 1992).

3-4- مرحلة تشكل الكالس الجنيني Embryogenic callus Stage:

1-3-4- تأثير التراكيز المختلفة من أكسين 2,4-D و نوع الخزعة النباتية في نسبة تشكل الكالس الجنيني:

يلاحظ من الجدول (7) أن المعاملة بالتركيز 0.25 مغ.ل⁻¹ من 2,4-D أدت إلى زيادة معنوية في متوسط تشكل الكالس الجنيني (32.14 %) و بفروقات معنوية بالمقارنة مع بقية المعاملات، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند معاملة الشاهد (بدون 2,4-D).

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي أن المعاملة بالتركيز 0.25 مغ.ل⁻¹ من 2,4-D أدت إلى زيادة نسبة تشكل الكالس الجنيني معنوياً من كل من البراعم القمية و الجانبية (49.28 ، 15.0 %) على التوالي و بفروقات معنوية بالمقارنة مع بقية المعاملات ، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند معاملة الشاهد (بدون 2,4-D) . أما بالنسبة لمتوسط نسبة

تشكل الكالس الجنيني من الخزعة النباتية (البرعم القمي ، البرعم الجانبي)، فقد لوحظ أن البراعم القمية أكثر استجابة لتشكيل الكالس الجنيني (19.76 %) بالمقارنة مع البراعم الجانبية (8.09 %) و بفرق معنوي بين هاتين المعاملتين .

الجدول (7): تأثير نوع الخزعة النباتية و تركيز الأوكسين 2,4-D في نسبة تشكل الكالس الجنيني في الزعفران

المدرّوس *Crocus.sativus.L*

نسبة تشكل الكالس الجنيني (%)			المعاملات 2,4-D (مغ . ل ⁻¹)
متوسط المعاملات	الخرعة النباتية		
	البرعم الجانبي	البرعم القمي	
0.00 ^C	0.00 ^b	0.00 ^d	0
32.14 ^A	15.00 ^a	49.28 ^a	0.25
17.86 ^B	10.00 ^{ab}	25.71 ^b	0.5
12.85 ^B	9.29 ^{ab}	16.43 ^{bc}	1
12.14 ^B	8.57 ^{ab}	15.71 ^{bc}	1.5
8.57 ^{BC}	5.71 ^{ab}	11.43 ^{cd}	2
-	8.09 ^B	19.76 ^A	المتوسط
نسبة تشكل الكالس الجنيني% LSD (1 %)			المتغير
10.87			المعاملة 2,4-D
6.96			الخرعة
12.09			تفاعل 2,4-D والبرعم الجانبي
13.98			تفاعل 2,4-D والبرعم القمي
2			C.V

*تشير اختلاف الأحرف الكبيرة في السطر الواحد بالنسبة لنوعي الخزعة وفي العمود الواحد بالنسبة لتراكيز 2,4-D، واختلاف الأحرف الصغيرة في الأعمدة والأسطر بالنسبة للتفاعل بين نوعي الخزعة والتراكيز الهرمونية ل 2,4-D إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ثقة 99 %.

2-3-4- تأثير التراكيز المختلفة من السيتوكينين 6-BAP و نوع الخزعة النباتية في نسبة تشكل الكالس الجنيني:

يلاحظ من الجدول (8) أن المعاملة بالتركيز 0.25 مغ.ل⁻¹ من 6-BAP أدت إلى زيادة معنوية في متوسط نسبة تشكل الكالس الجنيني (9.29 %) و بفروقات معنوية بالمقارنة مع بقية المعاملات ، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند معاملة الشاهد (بدون 6-BAP). و بيّنت نتائج التحليل الإحصائي أن المعاملة بالتركيز 0.25 مغ.ل⁻¹ من 6-BAP أدت إلى زيادة نسبة تشكل الكالس الجنيني معنوياً من كل من البراعم القمية و الجانبية (12.86 ، 5.71 %) على التوالي و بفروقات معنوية بالمقارنة مع بقية المعاملات المدروسة ، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند معاملة الشاهد (بدون 6-BAP) . أما بالنسبة لمتوسط نسبة تشكل الكالس الجنيني من الخزعة النباتية (البرعم القمي ، البرعم الجانبي) فقد لوحظ عدم وجود أي فرق معنوي في استجابة كل من البراعم القمية و الجانبية لوسط تشكل الكالس الجنيني بقيمة بلغت (3.86 ، %) 1.18 لكل من البراعم القمية و الجانبية على التوالي .

الجدول (8) : تأثير نوع الخزعة النباتية و تركيز السيتوكينين 6-BAP في نسبة تشكل الكالس الجنيني في الزعفران المدروس *Crocus.sativus.L*

المعاملات 6-BAP (مغ . ل ⁻¹)	نسبة تشكل الكالس الجنيني (%)	
	الخرعة النباتية	
	البرعم القمي	البرعم الجانبي
0	0.00 ^b	0.00 ^b
0.25	12.86 ^a	5.71 ^a
0.5	0.00 ^b	0.00 ^b
1	0.00 ^b	0.00 ^b
2	6.43 ^{ab}	0.00 ^b
المتوسط	3.86 ^A	1.18 ^A
المتغير		
المعاملة 6-BAP		
الخرعة		
تفاعل 6-BAP و البرعم القمي		
تفاعل 6-BAP والبرعم الجانبي		
C.V		
نسبة تشكل الكالس الجنيني % LSD (1 %)		
4.78		
3.38		
8.04		
4.76		
2.04		

*تشير اختلاف الأحرف الكبيرة في السطر الواحد بالنسبة لنوعي الخزعة و في العمود الواحد بالنسبة لتراكيز 6-BAP، و اختلاف الأحرف الصغيرة في الأعمدة و الأسطر بالنسبة للتفاعل بين نوعي الخزعة و التراكيز الهرمونية ل 6-BAP إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ثقة 99 %.

3-3-4- تأثير التراكيز المختلفة من المزائج الهرمونية من الأوكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP و نوع الخزعة النباتية في نسبة تشكل الكالس الجنيني:

يُلاحظ من الجدول (9) تفوق المعاملة بالمزيج الهرموني ذو التركيز (1 مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 0.25 مغ.ل⁻¹ 2,4-D) في متوسط نسبة تشكل الكالس الجنيني (54.76%) على بقية المعاملات المدروسة ، بينما أدى استخدام المزائج الهرمونية ذات التراكيز (0.25 مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 0.25 مغ.ل⁻¹ 2,4-D) و (0.5 مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 1 مغ.ل⁻¹ 2,4-D) و (1 مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 2 مغ.ل⁻¹ 2,4-D) إلى انخفاض معنوي في متوسط نسبة تشكل الكالس الجنيني بقيمة بلغت (13.44 ، 13.13، 11.88%) على التوالي ، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند المعاملة الشاهد (بدون 2,4-D و 6-BAP). بينت نتائج التحليل الإحصائي تفوق المعاملة بالمزيج الهرموني ذو التركيز (1مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 0.25 مغ.ل⁻¹ 2,4-D) في نسبة تشكل الكالس الجنيني من البراعم القمية (80.95%) على بقية المعاملات المدروسة ، بينما انخفضت نسبة تشكل الكالس الجنيني معنوياً عند المعاملة بالمزائج الهرمونية ذات التراكيز نسبة تشكل الكالس الجنيني معنوياً (1 مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 2 مغ.ل⁻¹ 2,4-D) و (0.5 مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 1 مغ.ل⁻¹ 2,4-D) بقيمة بلغت (18.13 ، 12.50%) على التوالي ، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند معاملة الشاهد (بدون 2,4-D و 6-BAP). كما بينت النتائج أن المعاملة بالمزائج الهرمونية ذات التراكيز (1 مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 0.25 مغ.ل⁻¹ 2,4-D) و (1 مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 1 مغ.ل⁻¹ 2,4-D) و (1 مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 2 مغ.ل⁻¹ 2,4-D) أدت إلى ازدياد معنوي في نسبة تشكل الكالس الجنيني من البراعم الجانبية بقيمة بلغت

(23.13 ، 20 ، 18.75%) على التوالي و بفروقات معنوية مع بقية المعاملات ، بينما انخفضت نسبة تشكل الكالس الجيني معنوياً عند استخدام المزائج الهرمونية ذات التراكيز (1مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 2مغ.ل⁻¹ 2,4-D) و (0.5مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 2مغ.ل⁻¹ 2,4-D) و (2مغ.ل⁻¹ 6-BAP + 2مغ.ل⁻¹ 2,4-D) بقيمة بلغت (5.61 ، 5 ، 4.17%) على التوالي ، في حين فشلت تماماً عملية الاستحداث عند معاملة الشاهد (بدون 2,4-D و 6-BAP). أما بالنسبة لتأثير نوع الخزعة النباتية في متوسط تشكل الكالس الجيني (البرعم القمي، البرعم الجانبي) ، لوحظ أن البراعم القمية أكثر استجابة لتشكيل الكالس الجيني (34.16%) بالمقارنة مع البراعم الجانبية(11.27%) و بفروق معنوية بين هاتين المعاملتين.

الجدول (9) : تأثير نوع الخزعة النباتية و تركيز المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيبتوكينين 6-BAP في نسبة تشكل الكالس الجيني في الزعفران المدروس *Crocus.sativus.L*

نسبة تشكل الكالس الجيني %			المعاملات	
الخرزعة النباتية				
متوسط المعاملات	البرعم الجانبي	البرعم القمي	6-BAP مغ. ل ⁻¹	2,4-D مغ. ل ⁻¹
0.00 ^G	0.00 ^e	0.00 ⁱ	0	0
13.44 ^{FG}	7.08 ^{bcde}	19.79 ^{fgh}	0.25	0.25
22.81 ^{BCDEF}	7.50 ^{bcde}	38.13 ^{bcdef}	0.25	0.5
31.25 ^{BCD}	18.75 ^{abc}	43.75 ^{bcd}	0.25	1
21.88 ^{BCDEF}	13.13 ^{abcde}	33.75 ^{defg}	0.25	1.5
18.43 ^{DEF}	7.29 ^{bcde}	28.75 ^{defgh}	0.25	2
35.52 ^B	14.79 ^{abcd}	56.25 ^{bc}	0.5	0.25
24.06 ^{BCDEF}	11.88 ^{abcde}	36.25 ^{defg}	0.5	0.5
13.13 ^{FG}	13.75 ^{abcd}	12.50 ^{hi}	0.5	1
19.69 ^{CDEF}	6.25 ^{cde}	33.13 ^{defg}	0.5	1.5
15.00 ^{EFG}	5.00 ^{de}	25.00 ^{defgh}	0.5	2
54.76 ^A	23.13 ^a	80.95 ^a	1	0.25
26.56 ^{BCDEF}	17.50 ^{abcd}	35.63 ^{defg}	1	0.5
30.00 ^{BCDE}	20.00 ^{ab}	40.00 ^{bcde}	1	1
34.38 ^{BC}	11.25 ^{abcde}	57.50 ^b	1	1.5
11.88 ^{FG}	5.61 ^{cde}	18.13 ^{ghi}	1	2
17.71 ^{DEF}	11.67 ^{abcde}	23.75 ^{efgh}	2	0.25
22.81 ^{BCDEF}	14.38 ^{abcd}	31.25 ^{defgh}	2	0.5
24.69 ^{BCDEF}	16.88 ^{abcd}	32.50 ^{defg}	2	1
22.08 ^{BCDEF}	6.67 ^{bcde}	37.50 ^{cdefg}	2	1.5
15.21 ^{EFG}	4.17 ^{de}	26.25 ^{defgh}	2	2
-	11.27 ^B	34.16 ^A	المتوسط	
نسبة تشكل الكالس الجيني % LSD (1 %)			المتغير	
15.07			المعاملة 6-BAP+ 2,4-D	
4.44			الخرزعة	
19.66			تفاعل 6-BAP+ 2,4-D والبرعم القمي	
13.58			تفاعل 6-BAP+ 2,4-D والبرعم الجانبي	
1.97			C.V	

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

يلعب نوع الجزء أو النسيج النباتي المزروع و الحالة الفسيولوجية و الطراز الوراثي دوراً أساسياً و محدداً لمدى الاستجابة للزراعة النسيجية لاستحداث الكالس و إمكانية الحصول على الأجنة الخضرية (Mushtaq و زملاؤه، 2014)، وهذا يتوافق مع ماتوصلنا إليه فقد لوحظ أن البراعم القمية أكثر استجابة لتشكل الكالس الجنيني بالمقارنة مع البراعم الجانبية ، ويعود اختلاف الخزعات في استجابتها إلى التباين الوراثي في كفاءة تشكيل الكالس الجنيني ، وهذا يتوافق مع (Kim و زملاؤه، 2004) الذين أكدوا على أن التركيب الوراثي للزرع النباتية المختلفة و الطرز الوراثية المختلفة تؤثر في كفاءة استحداث الكالس و تكون الأجنة الخضرية ، و الذي يرجع إلى تفاوت مستوى الهرمونات النباتية الداخلية و خصوصاً السيتوكينينات حيث يمكن أن يؤثر ذلك في استجابتها لاستحداث الكالس و تكوين الأجنة الخضرية .

تشير هذه النتائج إلى أهمية وجود الأكسين 2,4-D في وسط استحداث الكالس لتشجيع تشكل الكالس الجنيني، لكن حتى مستوى معين وهذا يتفق مع ماتوصل إليه (Mushtaq و زملاؤه، 2014). حيث تؤثر زيادة تركيز 2,4-D أكثر من 0.25 مغ.ل⁻¹ سلباً في نسبة تشكل الكالس الجنيني وهذا يتفق مع ماتوصل إليه Mendoza و Kaeppler (2000) و Darvish و زملاؤه (2007) حيث أكدوا أن التراكيز العالية جداً من 2,4-D تؤدي إلى إعطاء كالس غير مرغوب فيه و طري و تؤدي إلى تشكيل الكالس غير الجنيني ، و تؤثر سلباً في معدل تجديد النبات . و يُلاحظ بالمقابل أن وجود تركيز منخفض جداً من 2,4-D يؤثر سلباً في نسبة الكالس الجنيني. و تشير هذه النتائج إلى أهمية ضبط تركيز الأكسين 2,4-D في وسط الاستحداث.

كما لوحظ تأثير الأكسين في العلاقة التآزرية مع السيتوكينينات المستخدمة في الوسط المغذي بشكل كبير على زيادة نسبة تشكل الكالس الجنيني باستخدام المزائج الهرمونية من 2,4-D و 6-BAP وهذا يتوافق مع Mirjalili و Poorazizi (2015) . كما لوحظ أن انخفاض نسبة الأكسين إلى السيتوكينين تعد ضرورية لنضج الأجنة الخضرية و هذا يتوافق مع ماتوصل إليه Devi و زملاؤه (2011).

4-4- مرحلة التجديد و النموات المتجددة Regeneration and Shoot Regeneration Stage :

تأثير التراكيز المختلفة من المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP في نسبة التجديد و متوسط عدد النموات:

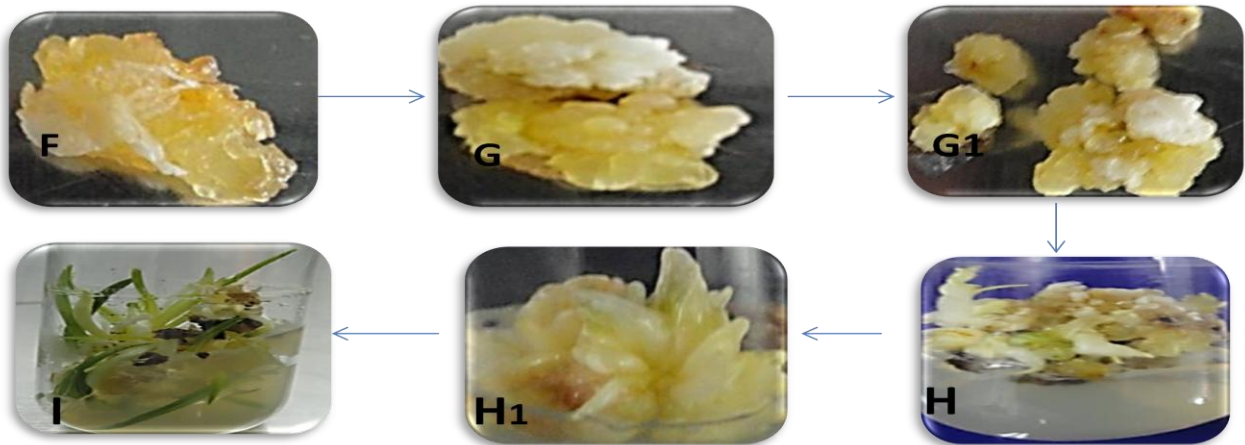
يُلاحظ من الجدول (10) أنَّ المعاملة بالمزيج الهرموني ذو التركيز 1.5 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 0 مغ.ل⁻¹ 2,4-D أدت إلى زيادة معنوية في نسبة التجديد (51.50%) و متوسط عدد النموات (9.36 نمواً) و بفروقات معنوية بالمقارنة مع بقية المعاملات المدروسة ، في حين أدت المعاملة بالمزيج الهرموني ذو التركيز 3 مغ.ل⁻¹ 6-BAP¹ + 0.175 مغ.ل⁻¹ 2,4-D إلى انخفاض معنوي في نسبة التجديد (8.33%) و متوسط عدد النموات (0.59 نمواً) ، في حين فشلت تماماً عملية التجديد عند معاملة الشاهد (بدون 2,4-D و 6-BAP).

جدول (10) : تأثير تركيز المزائج الهرمونية من الأكسين 2,4-D و السيتوكينين 6-BAP في نسبة التجديد و متوسط عدد النموات في الزعفران المدروس *Crocus.sativus.L*

عدد النموات متوسط المعاملات	نسبة التجديد (%) متوسط المعاملات	المعاملات (التراكيز)	
		2,4-D مغ.ل ⁻¹	6-BAP مغ.ل ⁻¹
0.00 ^I	0.00 ^H	0.00	0.00
24.22 ^C	4.33 ^{CD}	0.50	0.00
37.50 ^B	6.00 ^B	1.00	0.00
51.44 ^A	9.36 ^A	1.50	0.00
16.41 ^{CDE}	4.25 ^{CD}	2.00	0.00
11.72 ^{DEFG}	2.50 ^{EF}	2.50	0.00
7.03 ^{FGHI}	1.70 ^{FG}	3.00	0.00
2.34 ^{HI}	0.59 ^{GH}	0.00	0.175
18.75 ^{CD}	4.94 ^C	0.5	0.175
38.28 ^B	8.33 ^A	1.00	0.175
22.65 ^C	4.50 ^C	1.5	0.175
14.06 ^{DEF}	3.22 ^{DE}	2.00	0.175
10.15 ^{EFGH}	2.25 ^F	2.5	0.175
4.68 ^{GHI}	1.40 ^{FG}	3.00	0.175
عدد النموات % (% 1)LSD	نسبة التجديد % (% 1)LSD	المتغير	
1.17	29.8	المعاملة 6-BAP+ 2,4-D	
1.98	1.98	C.V	

*تشير اختلاف الأحرف الكبيرة في العمود الواحد بالنسبة لتراكيز المزائج الهرمونية (2,4-D + 6-BAP) إلى وجود فروق معنوية بين متوسط نسبة التجديد عند مستوى ثقة 99 %.

نلاحظ أنَّ نسبة تشكل النموات تتأثر بالمزائج الهرمونية المختلفة و تركيز منظمات النمو وهذا يتوافق مع Zhao و زملاؤه (2010)، حيث يساهم الأكسين في تكوين الأجنة الخضرية و إنباتها بدءاً من نسيج غير متمايز كالكالس إلى جانب التأثير المهم للسيتوكينينات في تشجيع تشكل النموات من الكالس (المعري، 2018). و يعود ذلك إلى الدور المباشر للأكسين في الانقسام الخلوي إلى جانب السيتوكينين الذي يعدهرمون الانقسام الخلوي إذ لايمكن للخلايا أن تدخل طور الميتوز مالم يتواجد السيتوكينين (Rossignol و زملاؤه، 1990). و يعد تواجد السيتوكينين 6-BAP في وسط التجديد العامل الأهم المحدد في تجديد النبات حيث يعد من أكثر السيتوكينينات نشاطاً في زراعة الأنسجة النباتية في تحفيز تجديد النموات من الكالس (Skoog و Miller، 1957)، و يعود ذلك إلى احتواء السيتوكينين على شق الأدنين و الذي يساهم بدور مهم في تحفيز نموالنبات و زيادة عدد النموات المتكونة وهذا يؤكد أهمية وجوده في تمايز الكالس الجنيني إلى نموات و زيادة نسبة التجديد وهذا يتفق مع ماتوصلنا إليه ومع Indra and Krishnaveni (2009) و shan و زملائه (2000)، بينما لوحظ أن زيادة تركيز السيتوكينين عن حدٍ معين يؤثر سلباً في نسبة تجدد النموات و هذا يتفق مع (Ranjan و زملاؤه، 2003). ليس للسيتوكينين تأثير فعال في الانقسام الخلوي دون وجود الأكسين معه بتوازن هرموني (Morel و زملاؤه، 1968). حيث يعزز الاتحاد بين السيتوكينينات و الأكسينات عند إضافة تراكيز منخفضة من الأكسين مع تراكيز مرتفعة من السيتوكينين تكون النموات و نموها مقارنة باستخدام السيتوكينين فقط (Khaleghi و زملاؤه، 2008)، ولذا فإنه للتحكم في تجديد النبات من الكالس الجنيني لابد من إضافة كميات متوازنة من الأكسين و السيتوكينين إلى وسط التجديد بحيث تكون نسبة السيتوكينين/الأكسين أكبر من الواحد لزيادة نسبة التجديد و عدد النموات المتشكلة (Srivastava، 2002) و هذا يتوافق مع نتائجنا و مع Khaleghi و زملائه (2008) و Lagram و زملائه (2017) .



الشكل (3): استحداث الكالس و تكون الكالس الجنيني و تجديد النموات في نبات الزعفران

Crocus sativus. L. var. Mashhadani إيراني المصدر.

F : الكالس المستحدث ، G1, G : الكالس الجنيني ، H ، H1: مرحلة التجديد ، I: النموات المتشكلة من الكالس.

الفصل الخامس

الاستنتاجات و المقترحات

Concluding And Suggestions

الاستنتاجات Conclusion:

- 1- تُعد عملية تطهير الخزعات النباتية بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) 5% مدّة 20 دقيقة، فعّالة في الحد من نمو المسببات المرضية عند الزراعة في الزجاج ، التي يمكن أن تؤثر سلباً في نمو الخزعات النباتية.
- 2- تباين تركيز الأكسين ونوع الخزعة النباتية (البراعم القمية-البراعم الجانبية) بالنسبة لاستحداث الكالس حيث كانت البراعم القمية أكثر استجابة لوسط الاستحداث بالمقارنة مع البراعم الجانبية ، بالإضافة إلى أهمية وجود الأكسين 2,4-D في وسط استحداث الكالس لتشجيع تشكل الكالس الجيني، لكن حتى مستوى معين، حيث تؤثر زيادة تركيز 2,4-D أكثر من 0.25 مغ.ل⁻¹ سلباً في نسبة تشكل الكالس الجيني، و يُلاحظ بالمقابل أنّ وجود تركيز منخفض جداً من 2,4-D يؤثر سلباً في نسبة تشكل الكالس الجيني .
- 3- تتحدد نسبة استحداث الكالس و تشكل الكالس الجيني بشكل رئيس بوجود المركب 2,4-D و تآزره مع السيتوكينين 6-BAP و تتأثر بنوع الخزعة (البرعم القمي ، البرعم الجانبي). و تؤثر زيادة تركيز 2,4-D عن 0.25 مغ.ل⁻¹ و 1 مغ.ل⁻¹ من 6-BAP سلباً في نسبة استحداث الكالس و تشكل الكالس الجيني . و كانت البراعم القمية أكثر استجابة لاستحداث الكالس و تشكل الكالس الجيني من الجانبية .
- 4- تتحدد نسبة تجديد النباتات و عدد النموات المتشكلة بشكل رئيس بوجود السيتوكينين 6-BAP و تتأثر باختلاف تركيزه ، و تؤثر زيادة السيتوكينين BAP عن 1.5 مغ.ل⁻¹ سلباً في نسبة التجديد و عدد النموات المتشكلة، و يجب ألا يقل تركيزه عن 0.5 مغ.ل⁻¹.
- 5- تم لأول مرة في سورية تطبيق تقنية زراعة الأنسجة على نبات الزعفران، حيث تم من خلالها استحداث الكالس و تشكيل الكالس الجيني من براعم الكورمات و تجديد النموات من الكالس .

المقترحات Suggestions :

- 1- استعمال تقنية زراعة الأنسجة النباتية كطريقة فعّالة لاستحداث الكالس في برامج التحسين الوراثي للزعفران ، من خلال إيجاد تباينات وراثية جديدة (Somaclonal variation) كاستنباط سلالات تتميز بنوعية و جودة عالية بالنسبة للمواد الفعّالة ، و سلالات متفوقة من حيث عدد الكورمات و بالتالي زيادة الإنتاج كماً ونوعاً.
- 2- دراسة التباين الوراثي للنباتات المتجددة عن الكالس الجيني لمقارنتها مع النبات الأم من الناحية الوراثية .

المراجع REFERENCES

المراجع العربية.....Arabic References

- 1-الكناني، فيصل رشيد.1987. زراعة الأنسجة والخلايا النباتية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . العراق .
- 2- المعري،خليل (1995). إكثار النخيل بزراعة الأنسجة النباتية،جامعة الملك فيصل،السعودية ، ص. 256.
- 3-المعري، خليل (2018). زراعة الأنسجة النباتية – الجزء النظري ، جامعة دمشق، سورية ، ص. 339.
- 4-المغازي ،أحمد محمد(2001).حتمية العناية بالنباتات الطبية ،مجلة أسبوط للدراسات البيئية –جامعة أسبوط ،كلية الصيدلة ، العدد العشرون .

المراجع الأجنبية.....International References

5. Abdullaev, F. (1993). Biological effects of Saffron. Biofactors, 4: 83–86.
6. Abdullaev, F. (2002). Cancer chemo preventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). Exp. Biol. Med, 227: 20–25.
7. Abdullaev, F. (2003). *Crocus sativus* against cancer. Archives of Medical Research, 34(4): 354.
8. Aftab, F.; Alam, M.; Afrasiab, H. (2008). *In vitro* shoot multiplication and callus induction in *Gladious*. Hort. Pak.J. Bot, 40(2): 517–522.
9. Ahmad, M.; Razvi, S.; Zaffar, G.; Nengroo, Z.; Mir, S.; Wani, B.; Habibi, M. (2014). Micropropagation of saffron (*Crocus sativus* L.). a review. Journal of Cell and Tissue Research, 14(1): 4073–4076.
10. Ahmad, M.; Zaffar, G.; Habib, M.; Arshid, A.; Dar, NA.; Dar, ZA. (2014). Saffron (*Crocus sativus* L.) in the light of biotechnological approaches. A review. Scientific Research and Essays, 9(2): 13–18.
11. Ahuja, A.; Kouli, S.; Ram, G.; Kaul, B. (1994). Somatic embryogenesis and

regeneration of plantlets in saffron, *Crocus sativus* L. Indian J. Exp. Biol, 32: 135–140.

12. Almaarri, K.; Arnaud, E.; Miginiac, E. (1986). Micropropagation *in vitro* du poirier cv " Williams" par culture des meristemes. 26th – Science week, auditorium. The University of Teshrine, Latakia, Syria.

13. Aloni, R. (2004). The induction of vascular tissues by auxin. Davies p.J.(ed). Plant Hormones, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.471–492

14. Asrar, H.; Wafai, L.; Taseem, A.; Mokhdomi, L.; Asif, Amin.; Amjad, M.; Shoiab, Bukhari.; Zubair, Wani.; Sumira, Tyub.; Raies, A.; Qadri, I. (2009). An efficient method for development of callus and suspension culture in *Crocus Sativus.L* (Saffron) using 6-BAP, 2–4 D and NAA enriched media. International Journal of Current Trends in Science and Technology, 46.

15. Bandyopadhyay, S. and Hamill, J. (2000). Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. Annals of Botany, 86: 237–244.

16. Blazquez, S.; Piqueras, M.; Serna, M.; Casas, J.; Fernandez, J. (2004). Somatic embryogenesis in saffron. Optimization through temporary immersion and polyamine metabolism. Acta Horti, 650: 269–276.

17. Cheng, J. and Raghavan, V. (1985). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Hyoscyamus niger*. American Journal of Botany, 74: 580–587.

18. Chen, S.; Wang, X.; Zhao, B.; Yuan, X.; Wang, Y. (2003). Production of crocin using *Crocus sativus* callus by two-stage culture system. Biotechnol Lett, 25: 1235–1238.

19. Dalila, ZD.; Jaafar, H.; Manaf, AA. (2013). Effects of 2.4-D and kinetin on callus induction of *Barringtonia racemosa* leaf and endosperm explants in different types of

basal media. Asian J Plant Sci, 12(1): 21–27.

20. Darvishi, E.; Zarghami, R.; Mishani, C.; Omid, M.; Sarkhosh, A. (2006). *In vitro* production of Pathogen –free plantlets via meristem culture in saffron (*Crocus sativus L.*). biotechnology, 5(3): 292–295.

21. Darvishi, E.; Zarghami, R.; Mishani, C.; Omid, M. (2007). Effects of different hormone treatments on non-embryogenic and embryogenic callus induction and time-term enzyme treatments on number and viability of isolated protoplasts in *Crocus sativus L.*. Acta Hort, 739: 279–284.

22. Devi, K.; Sharma, M.; Singh, M.; Ahuja, P. (2011). *In vitro* cormlet production and growth evaluation under greenhouse conditions in saffron (*Crocus sativus L.*). A commercially important crop: Engin. Life Sci, 11(1): 1–6 .

23. Ding, B.; Bai, SH.; Wu, Y.; Fang, XP. (1981). Induction of callus and regeneration of plantlets from corms of *Crocus sativus L.* Acta. Bot. Sin, 23: 419–420 .

24. 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, 11(3): 169–173.

25. Elhag, H. and Butler, L. (1992). Effect of genotype, explant age and medium composition on callus production and plant regeneration from immature embryos of sorghum. Arab. Gulf J. Sci. Res., 10: 109–119.

26. Evan, D.E.; coleman, J.O.; Kearns, A. (2003). Role of callus embryogenesis , and cell culture. Oxford Brookes University Oxford ,UK Bios scientific Publishers, PP: 64–65.

27. Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. (1983). Handbook of plant cell culture. Techniques for Propagation and Breeding, 1.

28. Feher, A.; Pasternak, TP.; Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult*, 74(3): 201–228.
29. Fernández, J. (2004). Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Research Developments in Plant Science*, 127–159.
30. George, E. (1993). plant propagation by tissuse culture.part1. the technology, Exegetics Ltd, Edington, Wilts, UK.
31. Gupta, S.; Khanna, V.K.; Rameshwar, S.; Garg, G.K. (2006). Strategies for overcoming genotypic limitations of *in vitro* regeneration and determination of genetic components of variability of plant regeneration traits in Sorghum. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 86: 379–388.
32. Haliloglu,K. (2006). Efficient regeneration system from wheat leaf base segment. *Biologia plantarum*, 50(1): 326–330.
33. Hartmann, H.F.; Kester, D.E.; Dauies, F.D.; Geneve, R.L. (1997). *Plant Propagation –principles and practices*. 6th Ed.Prentice Hall of India private Ltd.,New Delhi, 549–611.
34. hi, B.; Zarghami, R.; Abd–Mishani, C.; Omid, M. (2007). Effects of different hormonal treatments on the callus production and plantlet regeneration in saffron (*Crocus sativus L.*). *Pakistan J Biol Sci*, 10(10): 1625–1631.
35. Hussey,G. (1975).Totipotency in tissue culture and callus of some members of the *Liliaceae , Iridaceae and Amarylludaceae*. *J.Exp.Bot.*, 26: 253–262.
36. Indra, AP.; Krishnaveni, S. (2009). Effect of hormones, explants and genotypes on *in vitro* culturing of Sorghum. *J Bioch*, 1: 96–103.
37. Jogeswar, G.; Ranadheer, D.; Anjaiah, V.; 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*, 43: 159–166.

38. Kamo, k.; Chen, J.; Lawson, R. (1990). The establishment of cell suspension cultures of *Gladiolus* that regenerate plants. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 26: 425–430.

39. Karamian, R. (2014). Plantlet regeneration via somatic emryogenesis in four species of *crocusi* international symposium on saffron biology and biotechnology. ISHS Acta Horticulturae, 650.

40. Karamian, R. and Ebrahimzadeh, H. (2001). Plantlet regeneration from protoplast-derived embryogenic calli of *Crocus Cancellatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult*, 65(2): 115–121.

41. Karamian, R. and Ranjbar, M. (2010). Efficient somatic embryogenesis and plantlet regeneration from protoplast culture of *Crocus sativus* L. *Acta Hortic*, 850: 113–116.

42. Karasawa, K. (1933). The triploidy of *Crocus sativus* L. and its high sterility. *Jpn. J. Genet.* 9: 6–8.

43. Khaleghi, A.; Khalighi, A.; Sahraroo, A.; Karimi, M.; Rasoulnia, A.; Ghafoori, I.N.; Ataei, R. (2008). *In vitro* Propagation of *Alstroemeria* cv. ‘Fuego’. *American–Eurasian J. Agricult. Environ. Sci.*, 3: 492–497.

44. Kher, MM.; Joshi, D.; Nekkala, S.; Nataraj, M.; Raykundaliya, D. (2014). Micropropagation of *Pluchea lanceolata* (Oliver & Hiern) using nodal explant. *Journal of Horticultural Research*, 22(1): 35–39.

45. Kim, Y.J.; Park, T.; Kim, H.S.; Park, H.K.; Chon, S.U.; Yun, S.J. (2004). Factors affecting somatic embryogenesis from immature cotyledon of soybean. *Journal of Plant Biotechnology*, 6: 45–50.

46. Koetle, M.J. (2009). *In vitro* propagation of *Dierama erectum*. Research Centre for plant Growth and Development School of Biological and Conservation Sciences, University of KwaZulu–Natal ,Pietermaritzburg, 86.
47. Lagram, Khalid.; Ben El Caid, Mohamed.; El Aaouam, Souad.; Lachheb, Mohamed.; Mousadik, Abdelhamid.; Amine, Mohammed. (2017). *In vitro* shoots and micro–corms formation through indirect organogenesis of Moroccan saffron (*Crocus sativus* L.). International Society for Horticultural Science, 23.
48. Li, S.; Jiang, S.; Jiang, W.; Zhou, Y.; Shen, X.Y.; Luo, T.; Kong, L.P.; Wang, H.Q.; (2015). Anticancer effects of crocetin in human esophageal squamous cell carcinoma KYSE–150 cells. *Oncology letters*, 9: 1254–1260.
49. Litz, RE. and Gray, DJ. (1995). Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World J Microbiol Biotech*, 11: 416–425.
50. Livre, B. (2007). *Le Safran en Europe* eds. Alexandros– SRL, Athènes, 50.
51. Lizarrage, R.; Panta, A.; Jayasinghe, U.; Dodds, J.H. (1991). Tissue culture for elimination of pathogens. International Potato Center (CIP). Research Guide, 3: 21 P.
52. Loyola– Vargas, V. M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants, 13.
53. Lu, C.Y. and Vasil, I.K. (1982). Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of *Panicum maximum* Jacq. *American Journal of Botany*, 69: 77–81.
54. Mathew, B. (1982). *The Crocuses*. B.T. Batsford, London, 18.
55. 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*, 38: 39–45.

56. Mirjalili, Seyed Abbas. and Poorazizi, Elahe. (2015). Evaluation of callus formation and embryogenesis in saffron (*Crocus sativus L.*) for flower harvesting. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES). Agriculture Jahad Institute of Technical and Vocational Higher Education, Tehran, Iran. Islamic Azad University.
57. Morel, G.; Matin, C.; Muller, C. (1968). La guérison des pommes de terre atteintes de virus. Ann. Physiol., Veg, 10(2): 113–139.
58. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473–495.
59. Mushtaq, Ahmad.; Gul, Zaffar.; Mehfuza, Habib.; Ameerque, Arshid.; Dar, N.; Dar, Z. (2014). Saffron (*Crocus sativus L.*) in the light of biotechnological approaches, 17.
60. Mushtaq, Ahmad.; Gul, Zaffar.; Mir, S.D.; Razvi, S.M.; Rather, M.A.; Mir, M.R.; (2011). Saffron (*Crocus sativus L.*) Strategies for enhancing productivity. Research Journal of Medicinal Plant, 5: 630–649.
- regeneration from A.; Turgut, G.; Fiskin, K. (2006). Callus induction and plant 61. Nasircilar, .mature embryos of different Wheat Genotypes. Pak. J.Bot, 38: 637–645
62. Noriega, C. and Söndahl, MR. (1992). Somatic embryogenesis in hybrid tea roses. Biotechnology, 9: 991–993.
63. Nwankwo, B. A. and Krikorian, A.D. (1983). Micropropagation potential of embryo and seedling of derived callus of *Elaeis guineensis jacp.* Ann. Bot., 51: 65–76.
64. Panaia, M.; Senaratma, T.; Dixon, K.; Sivasithamparam, K. (2004). The role of cytokinins and thidiazuron in the stimulation of somatic embryogenesis in key members of the Restionaceae. Australian Journal of Botany, 52: 257–265.
65. pevalek, k.B. and Jelaska, S. (1987). Microclonal propagation of *prunus avium.* Acta

Hort, 212: 599–601.

66. Pierik, RLM. (1987). *In vitro* culture. Of higher Plants, 344p.

67. Plessner, O. and Ziv, M. (1999). *In vitro* propagation and secondary metabolite production in *Crocus sativus* L. OPA (Overseas Publishers Association) N.V. Published by license under the Harwood Academic Publishers imprint, part of the Gordon and Breach Publishing Group., 44.

68. Poggi, L.; portela, A.; pontin, M.; Molina, RV. (2010). Corm size and incubation effects on time to flowering and threads yield and quality in Saffron Production in Argentina. Acta Hort, 850: 193–198.

69. Post, G. (1932). Flora of Syria, Palestinae and Sinai. American Press, Beirut, Volumes I: 928p.

70. Radhakrishnan, T.; Murthy, T.; Chandran, K.; Bandyopadhyay, A. (2001). Somatic embryogenesis in *Arachis hypogaea*. revisited. Australian Journal of Botany, 49: 753–759.

71. Ranjan, R.; Purohit, S.; Prasad, V. (2003). Plant hormones. action and application , Agrbion (India), 39.

72. Rashed-mohasel, M.H. (1990). Identification of saffron weeds in Southern Kohrasan. I.R.O.S.T. Mashhad Center, Iran, 20.

73. Ribnicky, D.; Ilic, N.; Cohen, J.; Cooke, T. (1996). The effects of exogenous auxins on endogenous indole–3–acetic acid metabolism. Plant Physiology, 112: 549–558.

74. Rossignol, M.; Santoni, V.; Szponrski, W.; Vansuyts, G. (1990). Differential sensitivity to auxin at the plasma membrane level. Nigkamp et al (eds) (q.v.), 498–503.

75. Samarghandian, S.; Boskabady, M.; Davoodi, S. (2010). Use of *in vitro* assays to assess the potential antiproliferative and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.) in

human lung cancer cell line. Pharmacognosy magazine, 6: 309–314.

76. Sandeep, K.; Ashok, K.; Gunce, S.; Emel, U.; Ekrem, G. (2016). Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus specie. Biotechnology Reports, 10: 66–74.
77. Schmidt, M.; Betti, G.; Hensel, A. (2007). Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses. WMW Wiener Medizinische Wochenschrift, 157: 315–319.
78. Shan, X.; li, D.; QU, r. (2000). Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley. In index/D8704G8361LN2105. Pdf of plant, 36: 207–210.
79. Sharifi, G.; Ebrahimzadeh, H.; Ghareyazie, M.; Karimi, H. (2010). Globular embryo-like structures and highly efficient thidiazuron-induced multiple shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 46: 274–280.
80. Silvia, B.; Enrique, O.; José, A.; Nieves, F.; José, A.; Abel, P. (2009). Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 97(1): 49–50.
81. Skoog, F. and Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol*, 11: 118–131.
82. Slater, A.; Scott, N.; Fowler, M. (2003). *Plant Biotechnology*. Oxford University Press, England, 33.
83. Sreelatha, U.; Nair, R.; Rajmohan, k. (1998). Factors affecting somatic organogenesis from leaf explants of *anthurium species*. *Journal of Ornamental Horticulture*, 1: 48–54.
84. Srivastava, I. (2002). *plant growth and development hormones and environment*.

Academic press,London, 28 .

85. Stale, H. and Lnze, D. (2001). When plant cells decide to divide.Trends in Plant Science, 16.

86. Steward, F.; Mapes, M.; Smlth, J. (1958). Growth and organized development of cultured cells. Growth and division of freely uspended cells. Am. J. Bot, 45: 693–703.

87.Tantry, E.; Musroor, S.; Ahmad, V. (2017). An Economic analysis of production and marketing of saffron in Jammu and Kashmir. International Journal of Social Relevance & Concern ISSN, 2347–9698.

88. Vahedi, M.; Kalantari, S.; Salami, S.; Alireza, A. (2014). Factors affecting callus induction and organogenesisin saffron (*Crocus sativus* L.). Plant Tissue Cult.& Biotech, 24(1): 1-9.

89. Victor, J.; Murch, S.; KrishnaRaj, S; Saxena, P. (1999). Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: the role of thidiazuron and N6–benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis, Plant Growth Regul, 28: 9–15.

90. Vikrant, S. and Rashid, A. (2003). Somatic embryogenesis or shoot formation following high 2,4D pulse–treatment of mature embryos of *Paspalum scrobiculatum*. Biol. Plant, 46: 297–300.

91. Wang, W. and Nguyen, H. (1990). A novel approach for efficient plant regeneration from Long –term suspention culture of weat. plant Cell Rep, 8: 639–642.

92. Warren, G. and Fowler, M. (1981). Physiological interactions during the initial stage of embryogenesis in cultures of *Daucus carota* L. New Phytol, 87: 481–486.

93. Welsh, J. and Sink, C. (1981). Morphogenetic responses of Browallia leaf sections and callus. Ann. Bot, 48: 385–390.

94. Winterhalter, P. and Straubinger, M. (2000). Saffron–renewed interest in an ancient spice. *Food Rev. Int.*, 16: 39–59.
95. Woodward, B. and Puonti, K. (2001). Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Manihot esculenta Crantz*). *Euphytica*, 120: 1–6.
96. Yang, Yonghua.; Guo, Zibiao.; Xiao, Fenghui. (1996). Differences on organogenesis of callus types in saffron. *Journal of Plant Resources and Environment*, 5(3): 63–64.
97. Yildirim, E. (2007). Development of *in vitro* micro propagation techniques for saffron (*Crocus Sativus* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 11: 159–166.
98. Zaid, A. and Tisserat, B. (1983). *In vitro* shoot tip differentiation in (*Phoenix dactylifera* L) Date Palm. *Journal*, 2: 163–182.
99. Zhao, L.; Liu, L.; Song, S. (2010). Optimization of callus induction and plant regeneration from germinating seeds of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *African Journal of Biotechnology*, 9(6).
100. Zimmerman, J. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 5: 1411–1423.
101. Ziv, M. and Lilien–Kipnis, H. (2002). Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes *in vitro*. *plant cell Reports*, 19 :845–850.

Abstract:

The research was conducted in the laboratory of plant biotechnology affiliated to the National Commission of Biotechnology (NCBT) , Ministry of Higher Education , and Faculty of Agriculture , University of Damascus , during the period between 2016 –2018 for callus induction from apical and lateral buds in *Crocus.sativus*.L. var. Mashhadani and shoot regeneration from embryogenic callus to be used in propagation and genetic improvement programs.

Results of the surface sterilizing experiment of the studied species of corms revealed that the best concentration of sodium hypochlorite solution (NaOCl) used to sterilizing was 5% for 20 minutes.

Results of the effect of Auxin 2,4-D revealed that the rate of callus induction was highest at 0.25mg.l^{-1} of 2,4-D at (38.33%) with significant differences comparing with other treatments , while the apical buds were more responsive to the callus induction than the lateral buds , that the apical buds had the highest value (27.20%) comparing with lateral buds (9.58%) with significant difference between these treatments.

As for the effect of cytokinin 6-BAP in callus induction, the rate of callus induction was higher at 0.25 mg.l^{-1} 6-BAP at a value of (12.74%) with significant differences comparing with other treatments. the apical buds responsive for callus induction was (5.43%), without significantly differences with the lateral buds responsive that was (1.52%).

Results of the effect of hormonal mixtures of Auxin 2,4-D and cytokinin 6-BAP revealed that the hormonal mixture 1 mg.l^{-1} 6-BAP and 0.25 mg.l^{-1} 2,4-D gave the highest average rate of callus induction (55.31%) with significant differences comparing with other treatments. The apical buds gave the highest value (40.93%) comparsing with lateral buds (13.99%) for the callus induction with significant difference between these treatments .

Also that , Results revealed the highest rate of embryogenic callus formation was (32.14%) in the concentration 0.25 mg.l^{-1} of 2,4-D with significant differences comparing with other

treatments . the apical buds were more responsive to the embryogenic callus formation than the lateral buds, that the apical buds had the highest value (19.76%) comparing with lateral buds (8.09%) with significant difference between these treatments .

As for the effect of cytokinin 6-BAP in the embryogenic callus formation , the highest rate was (9.29%) at 0.25 mg.l^{-1} of 6-BAP. the apical buds responsive for embryogenic callus formation was (3.86%) , without significantly differences with the lateral buds responsive that was (1.18%).

Results of the effect of hormonal mixtures of Auxin 2,4-D and cytokinin 6-BAP that the hormonal mixture 1 mg.l^{-1} 6-BAP and 0.25 mg.l^{-1} 2,4-D of gave the highest average rate of embryogenic callus formation (54.76%) with significant differences comparing with other treatments. The apical buds gave the highest value (34.16%) comparing with lateral buds (11.27%) for the embryogenic callus formation with significant difference between these treatments.

As for the highest average rate of shoot regeneration was at (51.50%) in the concentration 1.5 mg.l^{-1} 6-BAP with significant differences comparing with other treatments. And the highest average rate of number of shoots were in the concentration 0.175 mg.l^{-1} 2,4-D and 1 mg.l^{-1} 6-BAP ,and 1.5 mg.l^{-1} 6-BAP were (9.36 ,8.33) shoots in order with significant differences comparing with other treatments.

Key words:Saffron, Embryogenic callus, Embryogenesis, Regeneration, 2,4-D, 6-BAP.