مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (39) العدد (5) 2017
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (39) No. (5) 2017

Study of the Effect of Plant Hormones in Induce Callus Formation of *Mentha Pulegium*.

Dr. Daniel Al-awad*
Dr. Mayas yazigi**
Reem Ebraheem***

(Received 29 / 8 / 2017. Accepted 2 / 11 /2017)

□ ABSTRACT □

The objective of this research is to induce callus formation of *Mentha pulegium* in vitro. Seedlings have grown in MS medium, then nodal, leaf and stem explant of seedlings were planted with 0.5- 1cm 0n MS medium with various concentrations of auxin (2,4-D - NAA) in combination with various concentrations of cytokinin BAP. The cultures were maintained in plant growth incubator at temperature 25±2 °C with a photoperiod of 16 hours light (2000-2500 lux) and 8 hours dark.

Experiments have proved that the MS medium with 1 mg/l 2,4-D in combination with 0.5 mg/l BAP was the best for forming calluses on 98.33% from nodal explant and97% from stem cutting, whereas using 1 mg/l of 2,4-D with 0.8 mg/l 0f BAP was the best for callus induction from leaf cutting. The MS medium supplemented with 1mg/l of NAA and 0.5 mg/l of BAP was good for callus induction at high percentage 98% for nodal explants.

The results also have proved that the nodal explants were the best plant parts used to form the callus on the MS medium in most hormone concentrations, all BAP concentrations used in combination with 1 mg / l of 2,4-D were suitable for inducted callus formation from nodal explant in percentage ranged between 98 - 98.33%. The calluses can be used to obtain extract crud plant in good amount.

Key words: *Mentha pulegium*, callus, plant hormones, auxin. cytokinin

* **Professor- Department of Plant Biology- Faculty of Sciences- Tishreen university- Lattakia- Syria.**
** **Professor- Department of Plant Biology- Faculty of Sciences- Tishreen university- Lattakia- Syria.**
*** **Postgraduate Student- Department of Plant Biology- Faculty of Sciences- Tishreen university- Lattakia- Syria**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (39) العدد (5) 2017
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (39) No. (5) 2017

دراسة تأثير بعض هرمونات النمو النباتية في تحريض تشكل الكالوس عند نبات النعناع البري *Mentha pulegium*

د. دانيال العوض*

د. ميساء يازجي**

ريم ابراهيم***

(تاريخ الإيداع 29 / 8 / 2017. قبل للنشر في 2 / 11 / 2017)

□ ملخّص □

تم في هذا البحث تنمية بادرات النعناع البري مخبرياً على الوسط المغذي MS ومن ثم زراعة العقد الساقية والقطع الورقية والساقية لتلك البادرات على الوسط MS المضاف إليه تراكيز مختلفة من الأوكسينات(2,4-D -NAA) بالاشتراك مع تراكيز مختلفة من السيتوكينين BAP، حضنت الزراعات جميعها في حاضنة نمو نباتية في الدرجة 25±2م° وبإضاءة 16 ساعة بالتناوب مع 8 ساعات ظلام وبشدة ضوئية تراوحت بين 2500-3000 لوكس.

أثبتت التجارب أن الوسط المغذي MS المضاف إليه 1 مغ/ل من الأوكسين 2,4-D بالاشتراك مع 0.5 مغ/ل منBAP كان الأفضل لتشكل الكالوس حيث بلغت النسبة المئوية على العقد الساقية 98.33 %، وعلى القطع الساقية 97%، وعند استخدام 1 مغ/ل من 2,4-D مع 0.8 مغ/ل من BAP بلغت النسبة 97.66% بالنسبة للقطع الورقية، وكذلك كان الوسط MS المضاف إليه NAA بتركيز 1مغ/ل بالاشتراك مع 0.5 مغ/ل من BAP جيداً لتشكل الكالوس وبنسب مرتفعة وكان أفضلها 98% للعقد الساقية.

تبين النتائج أيضاً أن العقد الساقية أفضل الأجزاء النباتية المستخدمة لتشكل الكالوس على الوسط MS في معظم التراكيز الهرمونية، حيث كانت جميع تراكيز BAP المستخدمة بالاشتراك مع 1مغ/ل من 2,4-D مناسبة لتشكل الكالوس بدءاً من العقد الساقية وبنسبة تراوحت بين 98-98.33%. يمكن استخدام الكالوس المتشكلة من العقد الساقية في الحصول على الخلاصة الخام وبمردود جيد.

الكلمات المفتاحية: نعناع بري- كالوس- هرمونات نباتية – الأوكسينات – السيتوكينينات.

* أستاذ – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

**أستاذ – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم-جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

***طالبة دكتوراه – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم- جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

مقدمة:

ينتمي نبات النعناع البري *Mentha pulegium* إلى الفصيلة الشفوية Lamiaceae وهو نبات عشبي معمر يتراوح ارتفاعه بين 8– 40سم والأوراق بسيطة بيضوية الشكل منشارية الحافة ومعلاقها قصيرُ؛ طولها 0,8– 3 سم تكسوها الأوبار والتي تنتشر كذلك على الساق؛ أزهاره متجمعة على شكل كرة حول العقد الساقية، الزهرة صغيرة طولها 4–6 سم ولونها ليلكي، الثمرة أربع بنيدقات Nutets؛ طول البنيدقة نحو 0,7 مم. ينمو نبات النعناع البري في الأماكن الرطبة قرب المجاري المائية، ويمتلك هذا النبات مجالاً واسعاً من الاستخدامات الطبية والصيدلانية حيث يحضر منه بعض أنواع الغسولات الفموية والصابون المعقم، كما تستخدم مستحضراته كمسكنات في حالات الربو والسعال والتشنجات والالتهابات المعوية والمعدية والتهاب المفاصل، ويستخدم في بعض الصناعات الغذائية لتحسين الطعم (العودات ولحام ، 1994).

قد تعود تلك الفوائد جميعها لاحتوائه على مواد عفصية و فلافونوئيدات وغلكوزيدات، واحتواء أوراقه زيتاً عطرياً يتكون من مركبات ذات استخدامات طبية مثل المنثول 50– 70% ومواد تربينية أخرى كالبوليغون والليمونين والمنتون والفلاندرين (Sen *et al*., 2014; Sunandakumari *et al*., 2005)

تستخدم تقانة زراعة الأنسجة النباتية في الزجاج *In vitro* للتغلب على الكثير من الصعوبات التي تعترض تنمية وإكثار النباتات(Alam *et al*., 2010; Anish *et al*., 2010; Ivanova and Van Staden, 2011; Vasile *et al*., 2011)، وخصوصاً النباتات ذات الأهمية الطبية والاقتصادية، حيث أصبح التنوع الوراثي للعديد منها مهدداً نتيجة لجمعها باستمرار للاستفادة من منتجاتها طبيا وصيدلانيا دون التنبه لخطر اختفائها (Alkowni and Sawalha, 2012; Nalawade and Tsay, 2004).

اهتم العلماء بتقانة زراعة الأنسجة لعدد من الأنواع النباتية الطبية لتأمين مركبات طبية وصيدلانية طبيعية بسرعة وبنوعية وكمية جيدة على مدار العام دون التأثر بفصول السنة (Malabadi *et al*., 2011; Ogita *et al*., 2009).

استخدمت زراعة الأنسجة كطريقة بديلة لإنتاج مركبات الاستقلاب الثانوي حيث احتوت بعض المعلقات الخلوية والكالوس الناتجة من زراعة الخلايا أو بعض أجزاء البادرات نسبة من المادة الفعالة أكثر من تلك الموجودة في النباتات الحقلية (Chakraborty and Chattopadhyay, 2008) يمكن من خلال التحكم بشروط الزراعات النسيجية ضبط كمية المواد في النسج المزروعة والتحكم بخاصية السمية المرافقة لبعض منتجات الاستقلاب الثانوي الناتجة خصوصا من الزيوت العطرية(Bertoli *et al*., 2012).

تحتل الهرمونات النباتية المستخدمة في عمليات تشكل الكالوس الأهمية الأكبر من بين العوامل المؤثرة في نوعية تلك المركبات كونها تحرض على تشكل أنزيمات استقلاب تلعب دوراً رئيساً في تركيب المواد الفعالة في النبات حيث تتكون في هذه الكالوسات كمية جيدة من المركبات التي ينتجها النبات في الطبيعة بكميات قليلة جداُ، ولهذا دور مهم في إمكانية عزل وتحديد المادة الفعالة في مستخلصاتها.(Khafagi, 2007; Kim *et al*., 2016; Shabani *et al*., 2015).

تستخدم الخلاصات الخام للكالوس والنباتات النامية في الزجاج في العديد من تجارب الفعالية الحيوية كمضادات جرثومية أو فطرية كبديل للخلاصات الخام للنباتات النامية حقليا وذلك لسهولة وسرعة الحصول عليها في أي فترة من السنة دون التأثر بفصولها (Khafagi, 2007; Savio *et al*., 2012; Taylor *et al*., 2010).

أهمية البحث وأهدافه:

تأتي أهمية البحث من:

توفير المادة النباتية مخبرياً في أي وقت من العام وذلك بمكاثرة القطع النباتية المختلفة، والحصول على الكالوس كمصدر بديل لإنتاج مركبات الاستقلاب الثانوي الفعالة حيوياً.

أهداف البحث:

1. الحصول على البادرات الفتية مخبرياً.
2. زراعة العقد الساقية والقطع الورقية والساقية للبادرات الفتية للحصول على الكالوس.
3. دراسة تأثير بعض الهرمونات النباتية (BAP, 2,4-D, NAA) في تحريض تشكل الكالوس.
4. استخلاص المادة الخام من الكالوس الناتجة من الزراعة في الزجاج.

طرائق البحث و مواده:

المادة النباتية وزراعتها:

ينمو نبات النعناع البري *Mentha pulegium* قرب المجاري المائية، وهو نبات عشبي معمر يتراوح ارتفاعه بين 8- 40سم وأوراقه بسيطة بيضوية الشكل والأزهار تتجمع في نورات حول العقد الساقية وهي صغيرة الحجم بتلاتها ذات لون ليلكي(الشكل 1). تبدو بذور النبات بيضوية الشكل إلى كروية ذات لون بني وملمس ناعم وتتراوح أبعادها بين 0.7 -0.5مم(الشكل 2)، وقد تم جمع البذور بين شهر حزيران وتموز من صيف عام 2016 من قرب نبع مائي في قرية بطارة التابعة لمنطقة ريف جبلة من محافظة اللاذقية(الشكل3).

الشكل:1 العام للبذور

الشكل2: العام للنبات

الشكل3: نباتات النعناع البري النامية قرب المجرى المائي في موقع بطارة- ريف جبلة

تم تعقيم البذور سطحياً باستخدام الكحول 70% لمدة دقيقتين، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ونقلت إلى محلول هيبوكلوريت الصوديوم 10% لمدة 15 دقيقة، ثم تم غسلها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات متتالية لإزالة آثار الهيبوكلوريت وزرعت البذور في أطباق بتري باستخدام ماء الصنبور فقط.

حُضنت الأطباق في حاضنة نمو نباتية بدرجة حرارة ^{o}C 25±2 بإضاءة 16 ساعة بالتناوب مع 8 ساعات ظلام وبشدة ضوئية 2500- 3000 لوكس.

نُقلت البادرات الناتجة من إنبات البذور إلى الوسط المعدني المغذي MS (Murashige & Skoog, 1962) لتنميتها لمدة شهر بالشروط نفسها، ثم تم تقطيع النباتات التي حصلنا عليها إلى عقد ساقية وقطع ورقية وقطع ساقية بطول 0.5 – 1 سم (الشكل 4) ومن ثم زُرعت في أنابيب زجاجية أو أطباق بتري على الوسط المغذي MS المضاف إليه مزيج من الأوكسينات و السيتوكينينات بتراكيز مختلفة، حيث بلغ متوسط عدد القطع المزروعة 36 قطعة لكل تركيز وذلك بزراعة 4 قطع في كل طبق و3 أطباق لكل تركيز وتم تحضير ثلاث مكررات من كل تجربة، أو قطعتين في كل أنبوب و6 أنابيب لكل تركيز وتم تحضير ثلاث مكررات لكل تجربة. حُضنت الزراعات في حاضنة النمو النباتية وفقا للشروط السابقة.

أُجريت هذه التجارب في مخبر البحث العلمي في قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم –جامعة تشرين في اللاذقية.

البادرات القطع النباتية قبل الزراعة

الشكل 4: البادرات النامية على MS والقطع المستخدمة في الزراعة بعد التقطيع

الأوساط الزرعية والهرمونات النباتية المستخدمة في الحصول على البادرات والكالوس:

تم استخدام ماء الصنبور العادي لإنبات البذور، بينما استخدم الوسط المغذي المعدني MS وذلك لتنمية البادرات ومن ثم زرعت القطع النباتية بهدف الحصول على الكالوس، ويتألف هذا الوسط من العناصر المعدنية الكبرى و الصغرى الأساسية اللازمة لنمو النبات وبعض الفيتامينات والحموض الأمينية و السكاروز بنسبة 3% و أضيفت هرمونات النمو بتراكيز مختلفة وهي : من الاوكسينات :2,4-D (NAA: Naphthalene acetic acid & Dichlorophenoxy acetic aside) ومن السيتوكينينات مركب 6-Benzylamino purine (BAP) ثم تم ضبط درجة PH على القيمة 5.7، وأضيف إليه 8غرام آغار لكل 1 لتر.

تحضير خلاصة الكالوس: حفظت الكالوسات الناتجة من الزراعات السابقة بدرجة حرارة -18م° واستخدمت لاستخلاص المركبات الفعالة الموجودة فيها، حيث تم وزن 1غ من الكالوس المتشكلة من العقد الساقية على الوسط MS المضاف إليه1مغ/ل من 2,4-D بالاشتراك مع 0.5 مغ/ل من BAP و من ثم تم هرسها، وأضيف إليها 20 مل من المحل العضوي (ميتانول أو ايتانول) 100% بهدف استخلاص المواد الفعالة الموجودة فيها ومن ثم وضُعت العينة في الهزاز الأفقي لمدة 48-72 ساعة وبدرجة حرارة 25م° مع التحريك المستمر وبعد ذلك رشحت الخلاصة وتم تبخير المحل العضوي بدرجة حرارة 40م° وبعد ذلك تم حساب مردود الخلاصة من القانون (مردود الخلاصة= $\frac{\text{كتلة الخلاصة}}{\text{كتلةالكالوس}} \times 100$).

النتائج والمناقشة:

تم الحصول على الكالوس من زراعة العقد الساقية على الوسط المغذي MS وذلك في جميع التراكيز الهرمونية المستخدمة (الشكل 5)، وقد تعود النسبة الجيدة للكالوس الناتجة من زراعة العقد الساقية إلى نشاط النسيج الميرستيمي المتوضع في إبط الأوراق المحمولة على هذه العقد مقارنة بالأجزاء الأخرى المستخدمة في الزراعة.

الشكل 5: الكالوس المتشكلة على العقد الساقية

بينت الدراسة الإحصائية (جدول1) عدم وجود فروق معنوية بين نسب تشكل الكالوس للعقد الساقية 98% في الوسط MS1 و98.33% في الوسط MS5، وبين نسبة تشكلها من القطع الساقية 97% والعقد الساقية 98.33% في الوسط MS5 وذلك عند مستوى احتمال 0.05، كما بلغت نسبة تشكل الكالوس من القطع الورقية في الوسط نفسه 86% وهي نسبة جيدة مقارنة ببقية الأوساط، وهذا يدل على أن للتركيز 1مغ/ل من 2,4-D مع التركيز 0.1مغ/ل أو 0.5 مغ/ل من السيتوكينين BAP دور مهم في تحريض تشكل الكالوس عند نبات النعناع لجميع الأجزاء النباتية المستخدمة.

تشابهت هذه النتائج مع دراسة أجراها Johnson *et al.* (2011) والتي بينت أن التركيز 1.5 مغ/ل من 2,4-D كان الأفضل لتحريض تشكل الكالوس عند النوع *Mentha arvensis* حيث بلغت النسبة 84.3% للعقد الساقية و 93.8% للقطع الورقية.

انخفضت نسب تشكل الكالوس لدى زيادة تركيز الأوكسين كما يوضح الجدول 1 وهذا يتوافق مع دراسة أجراها الباحثون XU *et al.* (2009) والتي أثبتوا فيها أن زيادة تركيز الأوكسين لها أثر سلبي في تشكل الكالوس عند النوع *Mentha haplocaix*، ولم تتوافق نتائجنا مع دراسة أخرى أثبتت أنه ليس لتغيير تراكيز الهرمونات أي تأثير في تشكل الكالوس (Aniel Kumar *et al.*, 2010).

قد يعود هذا الأثر السلبي لزيادة تركيز الاوكسينات (جدول 1) إلى احتواء الأجزاء النباتية المختلفة على نسبة جيدة من الأوكسين الداخلي حمض الاندول الخلي IAA (Indol acetic acid) (Liu *et al.*, 1997).

الجدول 1: متوسطات النسب المئوية لتشكل الكالوس على الوسط MS + (تراكيز مختلفة من 2,4-D و BAP مقدرة بالـ مغ/ل)

الوسط المستخدم	تركيز الهرمونات النباتية المضافة لكل وسط مقدرة بـ مغ/ل		النسبة المئوية % لتشكل الكالوس وفقا لنوع القطع النباتية المزروعة		
	2,4-D	BAP	عقدة ساقية	قطع ورقية	قطع ساقية
MS1	1	0.1	98±2.16A	63.66±2.62F	60±4.08F
MS2	3	0.1	50.33±1.24C	40.66±1.69G	23±0.81L
MS3	5	0.1	26.33±1.24D	21±0.81H	16.33±1.24M

MS4	7	0.1	18.66±1.24E	8±1.63I	6.33±1.24N
MS5	1	0.5	98.33±1.96A	86±2.16J	97±2.16A
MS6	3	0.5	94±0.81B	61.66±1.24F	87.33±2.05J
MS7	5	0.5	51.66±1.24C	18.33±1.69H	29±0.81
MS8	7	0.5	19±0.81E	12.33±1.24K	6.66±1.96N

كل نسبة تمثل متوسط ثلاث مكررات.

القيم التي تشترك بحرف أبجدي أو أكثر لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 0.05.

تحرض تشكل الكالوس في مختلف التراكيز المستخدمة من السيتوكينين BAP بالاشتراك مع التركيز 1 مغ/ل من الأوكسين 2,4-D (الجدول 2)، حيث تراوحت نسبة تشكل الكالوس على العقد الساقية مع زيادة تركيز السيتوكينين BAP بين 98 % إلى 98.33 %. قد تعود هذه النسب لدور التراكيز المستخدمة من السيتوكينينات في التحريض على تشكل الكالوس.

توافقت هذه النتيجة مع دراسة أجريت على النوع *Mentha spicata* حيث لوحظ ارتفاع نسبة تشكل الكالوس من 72.2% في التركيز 0.5 مغ/ إلى 84.6% في التركيز 1 مغ/ل من BAP بالاشتراك مع 2 مغ/ ل من 2,4-D (Samantaray *et al.*, 2012).

لوحظ من خلال زيادة تركيز السيتوكينين BAP واستخدام تركيز 1مغ/ل من الأوكسين 2,4-D زيادة قدرة الأوراق على تشكيل الكالوس حتى وصلت إلى 97.66% في التركيز 0.8 مغ/ل و 97% في التركيز 1 مغ/ل (الجدول 2 ، الشكل 6)، وبالتالي قد يكون محتوى الأوراق من السيتوكينينات أقل مما هو موجود في القطع النباتية الأخرى المستخدمة في الزراعة.

لوحظ في دراسة سابقة على النوع نفسه أن القطع الورقية أعطت أفضل نتيجة لتشكل الكالوس عند استخدام 0.5مغ/ل من BAP مع تراكيز مختلفة من 2,4-D (Darvishi *et al.*, 2014)، بينما أثبتت دراسة أخرى أن استخدام التركيز 2 مغ/ل من الأوكسين NAA بالاشتراك مع تراكيز مختلفة من السيتوكينين BAP كان فعالاً في تحريض تشكل الكالوس عند النوع *Ocimum basilicum* L. من الفصيلة Lamiaceae التابع لها النوع المدروس. (Dode and others, 2003)

الجدول 2: متوسطات النسب المئوية لتشكل الكالوس على الوسط MS + 1 مغ/ل من 2,4-D و تراكيز مختلفة من BAP مقدرة بالـ مغ/ل.

الوسط المستخدم	تركيز الهرمونات النباتية المضافة لكل وسط مقدرة بـ مغ/ل		النسبة المئوية % لتشكل الكالوس وفقا لنوع القطع النباتية المزروعة		
	2,4-D	BAP	عقدة ساقية	قطع ورقية	قطع ساقية
MS1	1	0.1	98±2.16A	63.66±2.62B	60±4.08B
MS9	1	0.2	98±0.81A	67±1.24C	66.33±1.24CB
MS5	1	0.5	98.33±1.96A	86±2.16D	97±2.16E
MS10	1	0.8	98.33±1.24A	97.66±2.05E	51.33±1.69F
MS11	1	1	98.33±1.24A	97±2.16E	37.66±1.24G

كل نسبة تمثل متوسط ثلاث مكررات.

القيم التي تشترك بحرف أبجدي أو أكثر لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 0.05.

الشكل 6: الكالوس المتشكلة على القطع الورقية

عندما تم استخدام تراكيز متساوية من الهرمونين NAA و BAP تبين أن لهما دور مهم أيضاً في تحريض تشكل الكالوس وأفضلها العقد الساقية التي سجلت أعلى قيمة 68% على التركيزين (1-1) مغ/ل في الوسط MS14، والقطع الساقية التي سجلت نسبة 60.33% (الجدول 3، الشكل 7) بمقارنتها بنسب تشكلها من القطع الساقية 37.66% في تركيزين متساويين من الهرمونين 2,4-D وBAP على الوسط MS11 (الجدول2). وقد تشابهت هذه النتيجة مع دراسة أجريت لتحريض تشكل الكالوس عند النوع المدروس *M.pulegium*، حيث لوحظ عند وزن الكالوس المتشكلة من زراعة القطع الورقية أو المحور تحت الفلقات لبادرات هذا النوع على الوسط المغذي MS المضاف إليه تراكيز مختلفة منNAA -BA أن وزن الكالوس وصل إلى أعلى قيمة 0.21 – 0.22 غرام لدى استخدام الأوكسين NAA بتركيز 0.5 مغ/ل لوحده أو باستخدام 1مغ/ل من NAA بالاشتراك مع 1 مغ/ل من BA (Jafari *et al.*, 2016). وفي دراسة أخرى أجريت على عدد من النباتات الطبية في فلسطين ومنها النعناع وجد أن استخدام التراكيز المتساوية من الأوكسينات و السيتوكينينات بمختلف أنواعها له دور مهم في تحريض تشكل الكالوس (Alkowni and Sawalha, 2012)

بينما بينت دراسة مختلفة أن استخدام 2 مغ/ل من الأوكسين 2,4-D لوحده كان الأفضل لتشكل الكالوس عند النوع *Mentha piperita* (Chakraborty and Chattopadhyay, 2008).

الجدول 3: متوسطات النسب المئوية لتشكل الكالوس على الوسطMS المضاف إليه تراكيز مختلفة من (NAA+BAP) مقدرة بالـ مغ/ل.

	تركيز الهرمونات النباتية المضافة لكل وسط مقدرة بـ مغ/ل		النسبة المئوية% لتشكل الكالوس وفقا لنوع القطع النباتية المزروعة		
الوسط المستخدم	NAA	BAP	عقدة ساقية	قطع ورقية	قطع ساقية
MS12	0.5	0.5	61.33±1.24A	48.33±1.24D	53±2.16D
MS13	1	0.5	98±0.81B	91,33±1.24B	93.33±1.24B
MS14	1	1	68±1.63C	64.66±1.69A	60.33±1.24A

كل نسبة تمثل متوسط ثلاث مكررات.

القيم التي تشترك بحرف أبجدي أو أكثر لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 0.05.

الشكل 7: الكالوس المتشكلة على القطع الساقية

تبين أن لاستخدام الأوكسين NAA دور مهم أيضاً في تحريض تشكل الكالوس لدى مختلف القطع النباتية المستخدمة في الزراعة (جدول 3)، وبينت الدراسة الإحصائية لنتائج تشكل الكالوس على الوسط MS13 عدم وجود فروق معنوية بين نسب تشكل الكالوس لمختلف القطع النباتية المستخدمة، وسجلت أفضل نتيجة 98% للعقد الساقية. توافقت هذه النتيجة مع عدد من الدراسات التي أثبتت الدور الفعال للأوكسينات 2,4-D و NAA في تحريض تشكل الكالوس لدى أنواع مختلفة من نبات النعناع التابعة للجنس نفسه ومنها النوع المدروس*Mentha pulegium* (Samantaray *et al*., 2012; JAFARI *et al*., 2016; Darvishi *et al*., 2014)

تبين هذه الدراسة أن نسبة تشكل الكالوس عند النوع المدروس توقفت على عاملين وهما نوع الجزء النباتي المستخدم وتركيز الهرمونات وتوافقت هذه النتيجة مع دراسة أجريت على النوع نفسه في إيران (JAFARI *et al*., 2016). تم استخدام العقد الساقية للنوع *M.pulegium* المدوس لتحضير خلاصة الكالوس وكان مردود الخلاصة 2% وحفظت في درجة حرارة -18 م° لاستخدامها في دراسة الفعالية الحيوية للخلاصة الخام للكالوس ضد بعض أنواع الكائنات الدقيقة الممرضة. حيث أثبتت العديد من الدراسات أن خلاصة الكالوس تحتوي على مركبات لا توجد في خلاصات الأجزاء المختلفة للنبات الأصل وهذا ما قد يجعلها تمتلك فعالية حيوية أفضل (Cheong *et al*., 2016; Garapati *et al*., 2016).

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

1-سجلت أفضل قيم لتشكل الكالوس من زراعة العقد الساقية على الوسط المغذي MS المضاف إليه 1مغ/ل من الأوكسين 2,4-D بالاشتراك مع تراكيز مختلفة من السيتوكينين BAP وتراوحت بين 98.33-98 %.

2- بلغت أفضل نسبة لتشكل الكالوس من القطع الورقية المزروعة 97.66%عند استخدام 0.8 مغ/ ل من BAP بالاشتراك مع 1مغ/ل من 2,4-D.

3- كان الهرمون NAA مناسبا لتحريض تشكل الكالوس وسجلت أفضل نتيجة 98% من زراعة العقد الساقية على 1مغ/ل NAA+ 0.5 مغ/ل منBAP .

4- تبين أن أفضل القطع النباتية المستخدمة لتشكيل الكالوس هي العقد الساقية والتي نجحت بنسبة 98% بوجود NAA و98.33 % بوجود 2,4-D بالاشتراك مع BAP.

5- وصل مردود خلاصة الكالوس المتشكلة إلى 2% من أصل 1غ من الكالوس.

التوصيات:

1-دراسة الشروط الملائمة للحصول على كتلة أكبر من الكالوس لاستخدامها في أبحاث الاستخلاص.

2-متابعة مكاثرة الكالوس الناتجة وتحريض تشكل الجذور والبراعم في أبحاث أخرى.

3-تجريب الخلاصة الناتجة من الكالوس في تجارب الفعالية الحيوية.

المراجع:

1- ALAM, I.; SHARMIN, S.A.; NAHER, K.; ALAM, J.; ANISUZZAMAN, M.; ALAM, M.F. *Effect of Growth Regulators on Meristem Culture and Plantlet Establishment in Sweet Potato* ['Ipomoea Batatas'(L.) Lam.]. Plant Omics, 2010, 3- 35.

2- ALKOWNI, R. & SAWALHA, K. *Biotechnology for conservation of palestinian medicinal plants*. Journal of Agricultural Technology ,vol.8, 2012, 1285-1299.

3- .ANISH, N.; RAJESH, M.; ELIAS, J.; JAYAN, N. *In vitro Propagation of Solanum capsicoides All.–An Important Therapeutic Agent'Kantakari'*. Plant Tissue Culture and Biotechnology, vol.20, 2010, 179-184.

4- BERTOLI, A.; LEONARD, M.; KRZYZANWSKA , J.; OLESZEK, W.; PISTELLI, L. *In vitro production of M.× piperita not containing pulegone and menthofuran*. Acta Biochimica Polonica, vol. 59, 2012, 417.

5- CHAKRABORTY, A.; CHATTOPADHYAY, S. *Stimulation of menthol production in Mentha piperita cell culture. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plan.t* 44(6), 2008, 518-524.

6- CHAKRABORTY, A.; CHATTOPADHYAY, S. *Stimulation of menthol production in Mentha piperita cell culture*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, vol. 44, 2008,518-524.

7- CHEONG, B.E.; ZAKARIA, N.A.; CHENG, A.Y.F.; TEOH, P.L. *GC-MS Analysis of Strobilanthes crispus Plants and Callus.* Transactions on Science and Technology, vol.3, 2016, 155-166.

8- DODE, L.B.; BOBROWSKI, V.L.; BRAGA E. J.; BEIXAS, F. K.; SCHUCH, M.W. *In vitro propagation of Ocimum basilicum L.(Lamiaceae). Acta Scientiarum Biological Sciences* 25(2), 2003, 435-437.

9- DARVISHI, E.; KAZEMI, E.; KAHRIZI, D.; Chaghakaboudi, S.R., Khani, Y. Optimization of callus induction in Pennyroyal (*Mentha pulegium*). Journal of Applied Biotechnology Reports, vol.1, 2014, pp. 97-100.

10- GARAPATI, R.; SUSINDRAN, P.; RAMESH, N. *ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CURCULIGO ORCHIOIDES GAERTN. CALLUS EXTRACT AGAINST SELECTED HUMAN PATHOGENS*. Int. J. Modn. Res. Revs., vol. 4, 2016, 1184-1187.

11- IVANOVA, M.; VAN STADENT, J. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in Aloe polyphylla. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), vol. 104, 2011, 13-21.

12- JAFARI, A.; KAHRIZI, D.; MANSOURI, M. *Effects of plant growth regulators and explant on callus induction in pennyroyal (Mentha pulegium L.).* Biharean Biologist, vol.10, 2016, 134-136.

13- JOHNSON, M. ; WESELY, E.; KAVITHA, M.; UMA, V. *Antibacterial activity of leaves and inter-nodal callus extracts of Mentha arvensis L*. Asian Pacific journal of tropical medicine, 4(3), 2011, 196-200.

14- KHAFAGI, I.K. *Variation of callus induction and active metabolite accumulation in callus cultures of two varieties of Ricinus communis L.* Biotechnology, vol.6, 2007,193-201.

15- KIM, H.H.; RHA, E.S.; LEE, S.C.; BAE, C. H. *Plant Regeneration by in vitro Tissue Culture in Korean Soybean (Glycine max L.)*. Korean Journal of Plant Resources Korean Journal of Plant Resources, 29(1), 2016,143-153

16- LIU, Z.-H.; WANG, W.-C.; YAN, S.-Y. *Effect of hormone treatment on callus formation and endogenous indole-acetic acid and polyamine contents of soybean hypocotyl cultivated in vitro*. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 1997, 38.

17- MALABAD, R.B.; VIJAYAKUMAR, S.; TEIXEIRA DA SILVA, J.; MULGUND, G.S.; NATARAJAa, K. *In vitro seed germination of an epiphytic orchid Xenikophyton smeeanum (Reichb. f.) by using smoke-saturated-water as a natural growth promoter*. International Journal of Biological Technology, 2011, 2: 35-41.

18- NALAWADEa, S.M. & TSAY, H S. *In vitro propagation of some important Chinese medicinal plants and their sustainable usage*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, vol.40, 2004,143-154

19- OGITA, S. ; USUI, M.; SHIBUTANI, N.; KATO, Y. *A simple shoot multiplication procedure using internode explants, and its application for particle bombardment and Agrobacterium-mediated transformation in watercress*. Journal of plant research,vol. 122, 2009, 455-463.

20- SAMANTARAY, A.; SIAL, P.; KAR, M. *Micro-propagation and biochemical analysis of Spear Mint (Mentha spicata).* Indian Journal of Innovations and Developments,vol. 1, 2012, 489-493.

21- SEN, M.K.; NASRIN, S.; RAHMAN, S.; JAMAL, A.H.M. *In vitro callus induction and plantlet regeneration of Achyranthes aspera L*., a high value medicinal plant. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, vol.4, 2014, 40-46.

22- SHABANI, Z.; MOGHADAM, E.G.; ABEDI, B.; TEHRANIFAR, A. *The effect of plant growth regulators and their concentration in vitro on mass poropagation of Myrobalan 29C rootstock*. Journal of Horticulture and Forestry, vol.7, 2015,57-64.

23- SAVIO, L.E.B.; ASTARITA, L.V.; SANTAREM, E.R. *Secondary metabolism in micropropagated Hypericum perforatum L. grown in non-aerated liquid medium.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) ,vol. 108, 2012, 465-472.

24- SUNANDAKUMARI, C.; ZHANG, C.L.; MARTIN, K.P.; SLATER, A.; MADHUSOODANAN, P.V. *Effect of Auxins on Indirect In Vitro Morphogenesis and Expression of gusA Transgene in Alectinaceous Medicina Plant, Euphorbia Nivulia Buch.-Ham*. invp In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, vol.41, 2005, 695-699.

25- TAYLOR, D.C.; FALK, K.C.; PALMER, C.D.; HAMMERLINDL, J.; BABIC, V.; MIETKIEWSK JDHAV, A.E.; MARILLIA, E.F. FRANCIS, T.; HOFFMAN, T. *Brassica carinata–a new molecular farming platform for delivering bio-industrial oil feedstocks: case studies of genetic modifications to improve very long-chain fatty acid and oil content in.* seeds. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, vol.4, 2010, 538-561.

26- العودات محمد و لحام جورج. النباتات الطبية واستعمالاتها، الطبعة الرابعة، دمشق، 1994.