تأثير كثافات زراعة المعلقات الخلوية لنبات *Withania somnifera* L. بطريقة النشر والطمر في تكوين بادئات الكالس

مثنى محمد ابراهيم[1] بتول محمد علوان

كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة ديالى، العراق.

[1] المسؤول عن النشر: sadeh1970@gmail.com

المستخلص

نجحت الدراسة من إنشاء مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات الوذانيا *Withania somnifera* L. المستحث في وسط MS الصلب المضاف اليه 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D متداخلا مع 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin. وأظهرت زراعة كثافات مختلفة (1.0, 1.52, 1.79, 2.03) × 10 ^{4} خلية سم$^{-3}$ من هذه المعلقات بطريقة النشر وطريقة الطمر بطبقة الاكار بوجود وسط MS الصلب المدعم بتراكيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin تفوقت طريقة الزراعة بالنشر على طريقة الطمر في اعداد المستعمرات الخلوية وأعداد منشآت الكالس المتكون منها، فقد بلغت اعداد المستعمرات الخلوية 27.600 مستعمرة طبق$^{-1}$ عند زراعة الكثافة 2.03 × 10 ^{4} خلية سم$^{-3}$ بالمقارنة مع كثافة الأنشاء التي بلغت 8.125 مستعمرة طبق$^{-1}$ في طريقة النشر، في حين بلغت اعداد هذه المستعمرات بطريقة الطمر 21.400 مستعمرة طبق$^{-1}$ عند زراعة الكثافة ذاتها وبالمقارنة مع كثافة الإنشاء التي بلغت 10.400 مستعمرة طبق$^{-1}$، وتفوقت الكثافة العالية معنويا على باقي الكثافات وقد أعطت منشآت كالس بلغ عددها 58 منشآ بعد 20 يوما من زراعة الخلايا المعلقة بطريقة النشر، وبلغ عددها 6 منشآ بعد 25 يوما من زراعة الخلايا المعلقة بطريقة الطمر.

الكلمات المفتاحية: Callus, Cell suspension, *Withania somnifera*.

المقدمة

تتألف العائلة الباذنجانية Solanoaceae من 84 جنسا والتي تشمل حوالي 3000 نوعا، منتشرة في جميع أنحاء العالم وعادة ما تكون شجيرات سنوية (Hunziker, 2001) ومنها نبات الوذانيا *Withania somnifera* والذي يعرف بإسم اشواجندا (Adhikari وPant، 2013)، الذي يعد من النباتات الطبية المهمة التي استخدمت في الطب الهندي القديم من قبل السكان الاصليين لأكثر من 3000 سنة، وللنبات عدة تسميات منها Winter chirry وأطلق عليها أسم الجينسنغ الهندي، نتيجة تشابه الخصائص العلاجية ما بين جذور الجينسنغ وجذور الاشواجندا (Mirjalili وآخرون، 2009)، واستخدم مستخلص الأوراق في الطب الأيورفيدي في الهند (Kanungo وآخرون، 2015)، كمضاد للأكسدة ومعزز للجهاز المناعي الى جنب تعزيزه استقرار نسبة السكر في الدم وخفض مستويات الكولسترول. وأشارت الأبحاث الى أن هذه العشبة فعالة في زيادة الذاكرة وزيادة القدرة على الاستيعاب وتحسين ردود الأفعال اللاإرادية، وتحد من تدهور خلايا المخ، لذا فهي فعالة في المساعدة في علاج بعض الحالات المرضية، كأمراض الزهايمر والشلل والرعاش والتدهور العقلي المرتبط بالسن، ووجد أن لها أثاراً جانبية بالنسبة للأفراد الذين يعانون من التعب والإجهاد أو الأفكار السلبية المستمرة (Siddique وآخرون، 2004; Chimire وآخرون، 2010; Mir وآخرون، 2014)، ويعزى الطعم المر والرائحة المميزة لنبات الأشواجندا والتأثير الفسلجي الى وجود بعض الأكتونات الستيرويدية Steroidal lactone (Mohanty وآخرون، 2004). وتتواجد ايضا في أوراق وجذور النبات العديد من القلويدات أهمها Withanine وSomniferine والتي تعالج أمراض والم الأورام والقرحة وغيرها (Shukla وShukla، 2012).

استلام البحث: 2016/10/9
قبول النشر: 2016/2/27

تمثل المعلقات الخلوية نظاماً للمزارع الخلوية التي توجد في حالة عشوائية تماما عند زراعتها في الوسط الغذائي السائل المتحرك، تتكون من مجموعة خلايا تشتق من الكالس الهش او من النسيج المتوسط للأوراق، وتمتلك هذه الخلايا القدرة على النمو والقيام بالفعاليات الايضية المختلفة، ويفضل الكالس الهش غير المتماسك والسريع النمو في انشاء مزارع المعلقات الخلوية لان خلاياه يسهل تفككها الى خلايا احادية بواسطة التحريك في الوسط الغذائي السائل (الجواري، 2004)، ويعتمد نجاح هذه التقانة على كثافة الخلايا المزروعة ونوع الوسط الزراعي المستخدم (رشيد وقاسم، 2006).

تهدف الدراسة الحالية الى أنشاء مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من الكالس وزراعتها بطريقتي النشر والطمر والحصول على الكالس المشتق من المعلقات الخلوية.

المواد وطرائق البحث

المادة النباتية

نقعت بذورنبات الوذانيا *Withania somnifera* لمدة 24 ساعة في حامض الجبرلين GA_3 بتركيز 500 ملغم لتر$^{-1}$ لزيادة نسبة انباتها (Niyaz وSiddiqui، 2014)، وعقمت سطحياً بغمر البذور في محلول هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl (القاصر في الاسواق المحلية) بتركيز 6% بنسبة 1 حجم مادة معقمة: 1 حجم ماء معقم لمدة 15 دقيقة مع الرج، ومن ثم غسلت البذور بالماء المعقم ثلاث مرات بمعدل 5 دقائق مرة$^{-1}$ لإزالة اثار المادة المعقمة (Udayakumar وآخرون، 2013) وجففت البذور المعقمة من الماء العالق بها بوضعها على ورق ترشيح معقم، وزرعت البذور على سطح 20 مل من وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو في قناني زجاجية حجم 250 مل وبمعدل خمس بذور قنينة$^{-1}$، وحفظت العينات في الظلام لمدة 4 أيام، وعند بدأ الإنبات نقلت الى نظام الضوء والظلام المتعاقب 16 ساعة ضوء 8 ساعة$^{-1}$ ظلام وشدة إضاءة 2000 لوكس. فصلت السيقان تحت الفلقية Hypocotyl من البادرات المعقمة بعمر 3 أسابيع وبطول 1.0 سم قطعة، ثم نقلت الى قنان زجاجية حجم 100 مل تحوي 20 مل من وسط الاستحثاث MS المدعم بأفضل تركيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin اعتماداً على تجارب أولية (نتائج غير منشورة).

مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية

استخدم الكالس الهش المشتق من السيقان تحت الفلقية (على وسط MS المدعم بتراكيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin) لإنشاء المعلقات الخلوية بنقل قطع الكالس بوزن 1 غم تقريبا الى دوارق زجاجية سعة 250 مل تحوي 50 مل من الوسط السائل MS المدعم بأفضل تداخل من منظمات النمو لأستحثاث الكالس (3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin)، وحضنت العينات في الحاضنة الهزازة Shaking incubator بسرعة 150 دورة دقيقة$^{-1}$ وبدرجة حرارة 28 ْم في ظروف ظلام تام لمدة 24 ساعة، يعقبها امرار المزرعة المتكونة من منخل دقيق معقم حجم فتحاته 46 مايكرومترا (plan Genet. Manipulation on Lab. Nott .U.K) لعزل الخلايا المفردة والتخلص من الكتل الخلوية المتجمعة، واعيد تعليق هذه الخلايا في وسط غذائي جديد مدعم بنفس تراكيز منظمات النمو السابقة بعد السماح بركود واستقرار خلايا المعلق الخلوي داخل كابينة الزرع لمدة ساعة والتخلص من الوسط السائل بسكبه بعناية دون فقد للخلايا الراكدة (Dixon, 1985) وأعيدت المزرعة الى الحاضنة لغرض نمو المزرعة بالظروف السابقة نفسها.

تقدير كثافات مزارع المعلقات الخلوية

أخذت عينة بحجم 1.0 مل من مزرعة المعلقات الخلوية بعد مضي 24 و 48 و72 ساعة من التحضين فضلا عن كثافة الانشاء (المرحلة الصفرية) ووضعت على شريحة الهيموسايتوميتر (Lab. W. Germany) للتعرف على نمو الخلايا وزيادة أعدادها مع عمر المزرعة ونشاط انقسامها وتحديد كثافة مزرعة المعلق الخلوي عند كل مرحلة عمرية وذلك من خلال حساب عدد الخلايا في 1 مل وتقدير العدد الكلي للخلايا في المزرعة بكاملها وتمت متابعة هذه المزارع للتعرف على مسار نموها.

زراعة المعلقات الخلوية

لزراعة المعلقات الخلوية بكثافات مختلفة نفذت تجربة بسيطة بالتصميم العشوائي الكامل وبعشرة مكررات لكل كثافة خلوية من الخلايا المعلقة وتم إجراء مقارنة الفروق بين المعاملات وفقا لاختبار دنكن المتعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05 (Victor وFelipe، 2006)، واستخدمت طريقتان للزراعة كل على حدة هما:

طريقة النشر Cell plating method

استعملت طريقة النشر الموصوفة من قبل Bedrgmann (1960) مع بعض التحوير على أطباق بتري حاوية على وسط MS الصلب المدعم بتركيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin، إذ أخذ 10 مل من مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية بكثافات 1.0 × 10^4 و1.52 × 10^4 و 1.79 × 10^4 و 2.03 × 10^4 خلية سم$^{-3}$، وسحب منها بواسطة ماصة معقمة حجم 1.0 مل وزرع بنشره على وسط MS المدعم بالتراكيز اعلاه والموزع بشكل طبقة رقيقة في اطباق بتري بلاستيكية حجم 9 سم. غطيت الاطباق بأغطيتها وحركت بشكل دائري على سطح المنضدة لضمان توزيع المعلق بشكل متساوي على سطح الوسط ثم سدت بالبارافيلم وحفظت في غرفة النمو بدرجة حرارة 25 مْ وغطيت بورق أبيض لغرض تقليل شدة الاضاءة.

طريقة الطمر Array method

استعملت طريقة الطمر الموصوفة من قبل (Dixon، 1985) إذ أخذ 10 مل من مزرعة المعلق الخلوي للسيقان تحت الفلقية بكثافة 1.0 × 10^4 و 1.52 × 10^4 و 1.79 × 10^4 و 2.03 × 10^4 خلية سم$^{-3}$. رسبت الخلايا بطردها مركزيا عند سرعة 1000 دورة دقيقة$^{-1}$ وأخذ الراسب من الخلايا ومزج بعناية مع 10 مل من وسط MS المدعم بتركيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin والمصلب بالآكار بتركيز 3% والمعقم مسبقا والمحافظ عليه بحالته السائلة بوضعه في حمام مائي بدرجة حرارة 45 ْم، مزج المعلق الخلوي والوسط مزجاً جيدا ثم صب الوسط بعناية في اطباق بتري بلاستيكية قطر9 سم بشكل طبقة رقيقة وتركت الاطباق في كابينة الزراعة لحين تصلب الوسط ثم غطيت الاطباق بأغطيتها وسدت بالبارافيلم وغطيت بورق أبيض لغرض تقليل شدة الاضاءة وحفظت في غرفة النمو بدرجة حرارة 25 ْم وبتعاقب ضوئي 16 ساعة ضوء 8 ساعة$^{-1}$ ظلام.

فحصت خلايا المعلقات الخلوية المزروعة في الأطباق لكل من طريقة النشر وطريقة الطمر بعد 24 ساعة من زراعتها باستخدام المجهر الضوئي الاعتيادي لتحديد بداية دخول الخلايا في انقسامها الأول ومتابعة مواصلتها للإنقسام حتى تكوين المستعمرات البنوية التي تعطي لاحقا منشآت الكالس، سجيل البيانات لعدد المستعمرات الخلوية وعدد منشآت الكالس ومتابعتها حتى تطورها الى قطع صغيرة من الكالس يمكن مشاهدتها بالعين المجردة.

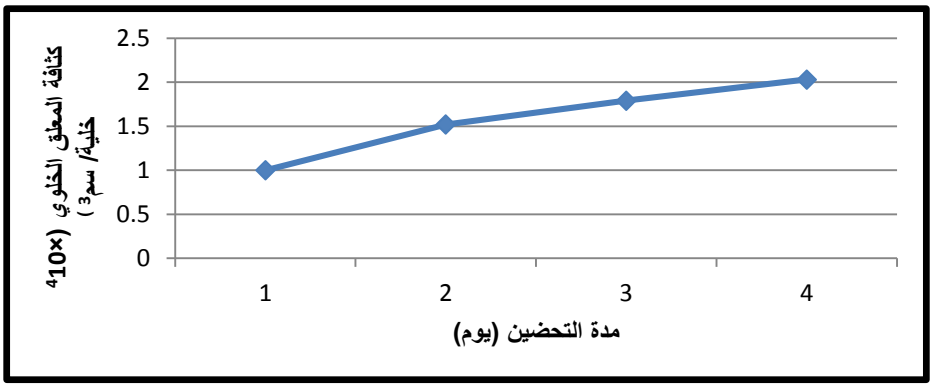
نقل منشآت الكالس وادامتها

نقلت قطع الكالس المتكونة من زراعة المعلقات الخلوية بالطريقتين (النشر والطمر) عند بلوغها حجما مناسبا (بقدر حجم حبة العدس) بواسطة ملقط معقم الى سطح 25 مل من الوسط الغذائي الصلب MS المدعم بتركيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin في قناني زجاجية بحجم 500 مل لغرض نموه واكثاره، تم تسجيل اعداد القطع التي تم نقلها ومعدلات نمو الكالس وعدد العينات الميته والصفات الوصفية المشتملة على اللون والقوامية بعد شهر من الزراعة.

النتائج والمناقشة

المعلقات الخلوية النموذجية المستحثة من كالس السيقان تحت الفلقية

أكدت النتائج أن وسط الأستحثاث MS السائل + 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin أظهر ملائمته لإنشاء مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية إذ أحتوت مزارع المعلقات الخلوية على أعداد كبيرة من الخلايا المفردة وغياب الكتل الخلوي، فقد شجع هذا الوسط على نحو واضح نمو خلاياها ومباشرتها الإنقسام الأول بعد 24 ساعة من التعليق وزيادة كثافة مزرعة المعلق الخلوي قياسا الى كثافة إنشائها (1.0 × 10 ^{4} خلية سم$^{-3}$)، لتواصل إنقساماتها متخذة نمطا تدريجيا في نموها (شكل1) إذ بلغت كثافتها (2.03 × 10 ^{4}) خلية سم$^{-3}$ في اليوم الرابع من إنشائها.



الشكل 1. منحنى نمو خلايا المعلقات الخلوية المشتقة من الكالس الهش للسيقان تحت الفلقية لنبات *Withania somnifera*

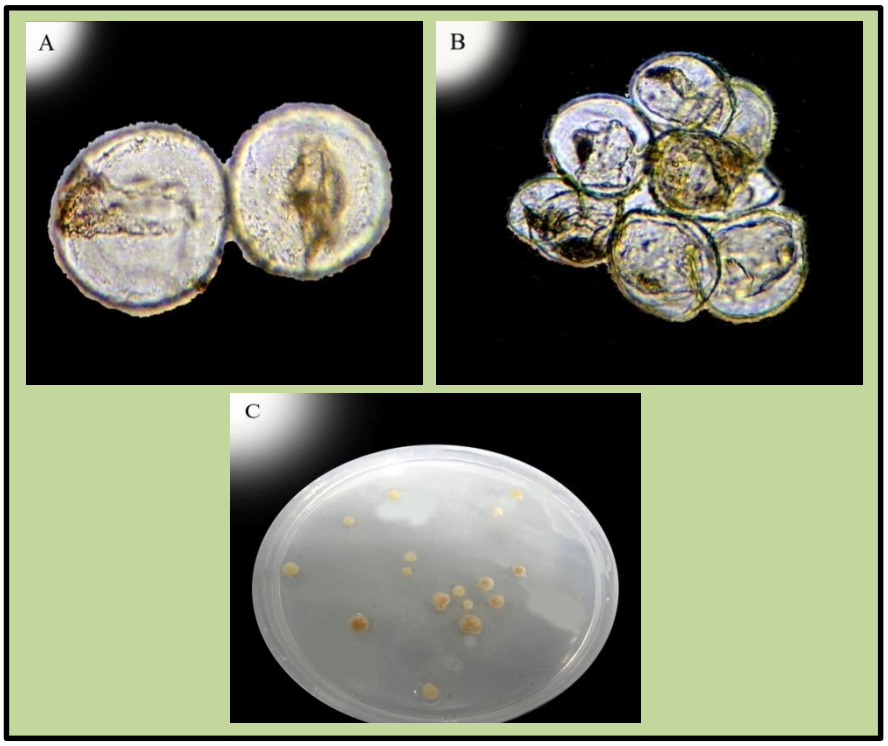
سلوك المعلقات الخلوية ونواتجها عند زراعتها بطريقة النشر

أظهرت نتائج زراعة كثافات متباينة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية بطريقة النشر بوجود وسط MS المدعم بإضافة 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin، تباينا في أعداد المستعمرات الخلوية المتكونة ونواتجها من منشآت الكالس (الجدول 1) إذ سجلت زراعة الكثافة 2.03 × 10 ^{4} خلية سم$^{-3}$ أعلى معدل لعدد المستعمرات والبالغ 27.600 مستعمرة طبق$^{-1}$ ممثلة أعلى المعدلات المعنوية لأعداد المستعمرات الخلوية طبق$^{-1}$ بالمقارنة مع أعدادها الناتجة من زراعة كثافة الإنشاء 1.0 × 10^4 التي بلغت 8.125 مستعمرة طبق$^{-1}$، وتفوقت الكثافة العالية 2.03 × 10^4 معنويا على باقي الكثافات وقد أعطت منشآت كالس بلغ عددها 58 بعد 15 يوما من زراعة الخلايا المعلقة، في حين بلغ أعداد منشآت الكالس 26 بعد 15 يوما من زراعة الخلايا المعلقة عند كثافة 1.79 × 10 ^{4} خلية سم$^{-3}$، بينما فشلت باقي المستعمرات الخلوية في كثافة الانشاء 1.0 × 10^4 وكثافة 1.52 × 10 ^{4} خلية سم$^{-3}$ في التطور الى منشآت الكالس. وتشير فحوصات المجهر الضوئي أن خلايا المعلقات المزروعة باشرت بانقسامها الأول بعد 48 ساعة مكونة الخلية البنوية (شكل:2 A) واستمرت بمواصلة أنقساماتها المتعاقبة بصورة نمطية منتجة

المستعمرات الخلوية المؤلفة من أعداد كبيرة من الخلايا (شكل:2 B) بعد 10 يوما، وتطورها لاحقا الى منشآت الكالس التي ظهرت بهيئة قطع نسيجية دقيقة بيضاء اللون صغيرة الحجم ترى بالعين المجردة على سطح الوسط (شكل:2 C) بعد 20 يوما.

الجدول 1. تكوين منشآت الكالس من زراعة كثافات متباينة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس قطع السيقان تحت الفلقية لنبات الوذانيا *W. somnifera* في وسط MS الصلب المدعم بأضافة 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin بطريقة النشر

الكثافة المزروعة (×10^4 خلية سم$^{-3}$)	معدلات أعداد المستعمرات الخلوية طبق$^{-1}$	أعداد منشآت الكالس بعد 20 يوماً
1.0(كثافة الأنشاء)	C 8.125	0
1.52	CB 12.900	0
1.79	B 16.500	26
2.03	A 27.600	58



الشكل 2. زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنبات *Withania somnifera* بطريقة النشر (A): الخلايا البنوية الناتجة من الانقسام الأول بعد 48 ساعة للخلايا المعلقة المزروعة في وسط (MS+ 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D +0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin) بطريقة النشر (قوة تكبير 40x) (B): المستعمرة الخلوية الناتجة من الانقسامات المتعاقبة للخلايا البنوية (في A) بطريقة النشر بعد 10 أيام (قوة تكبير 40x) (C): منشآت الكالس بعد 20 يوما

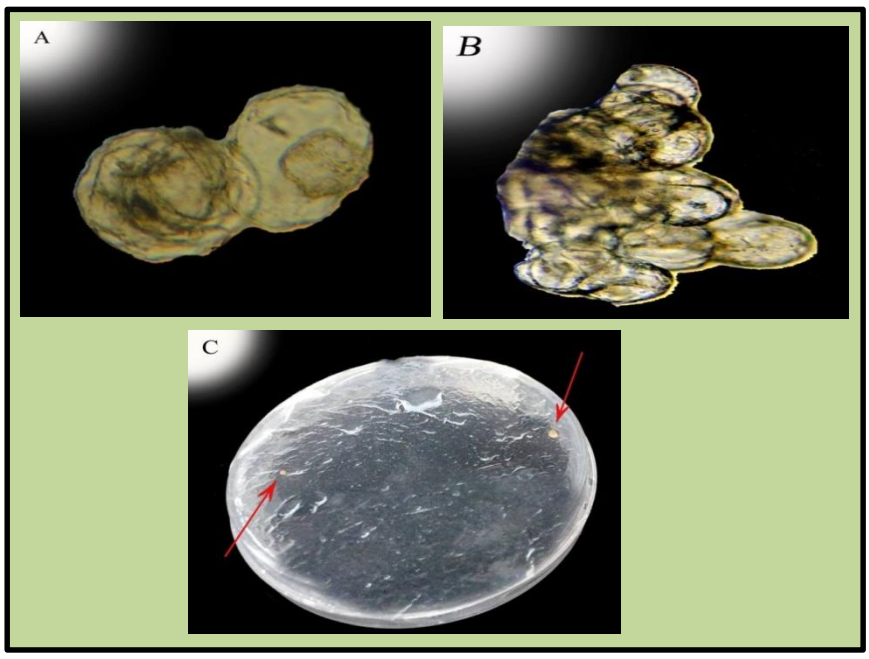
سلوك المعلقات الخلوية ونواتجها عند زراعتها بطريقة الطمر

أظهرت نتائج زراعة كثافات متباينة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية بطريقة الطمر بوجود وسط MS المدعم بإضافة 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin، تباينا في أعداد المستعمرات الخلوية المتكونة ونواتجها من منشآت الكالس (الجدول 2)، واظهرت نشوء المستعمرات

الخلوية علاقة طردية مع كثافة الزراعة، إذ سجلت زراعة الكثافة 2.03 × 10 ^{4} خلية سم$^{-3}$ أعلى المعدلات لأعداد المستعمرات الخلوية بلغت 21.400 مستعمرة طبق$^{-1}$ بالمقارنة مع أعدادها الناتجة من زراعة كثافة الإنشاء التي بلغت 10.400 مستعمرة طبق$^{-1}$. وتفوقت معنويا على باقي الكثافات وقد أعطت منشآت كالس بلغ عددها 6 بعد 25 يوما من زراعة الخلايا المعلقة في حين لم تتطور المستعمرات الخلوية في باقي الكثافات الى منشآت الكالس. وتشير فحوصات المجهر الضوئي أن خلايا المعلقات المزروعة باشرت بأنقسامها الأول بعد 72 ساعة مكونة الخلية البنوية (شكل 3A) وأستمرت بمواصلة أنقساماتها المتعاقبة بصورة نمطية منتجة المستعمرات الخلوية المؤلفة من أعداد كبيرة من الخلايا (شكل 3B) بعد 15 يوما، وتطور بعضها لاحقا الى منشآت الكالس التي ظهرت بهيئة قطع نسيجية دقيقة صفراء اللون صغيرة الحجم على سطح الوسط (شكل 3C) بعد 25 يوما.

الجدول 2. تكوين منشآت الكالس من زراعة كثافات متباينة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس قطع السيقان تحت الفلقية لنبات الوذانيا *W. somnifera* في وسط MS الصلب المدعم بإضافة 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin بطريقة الطمر

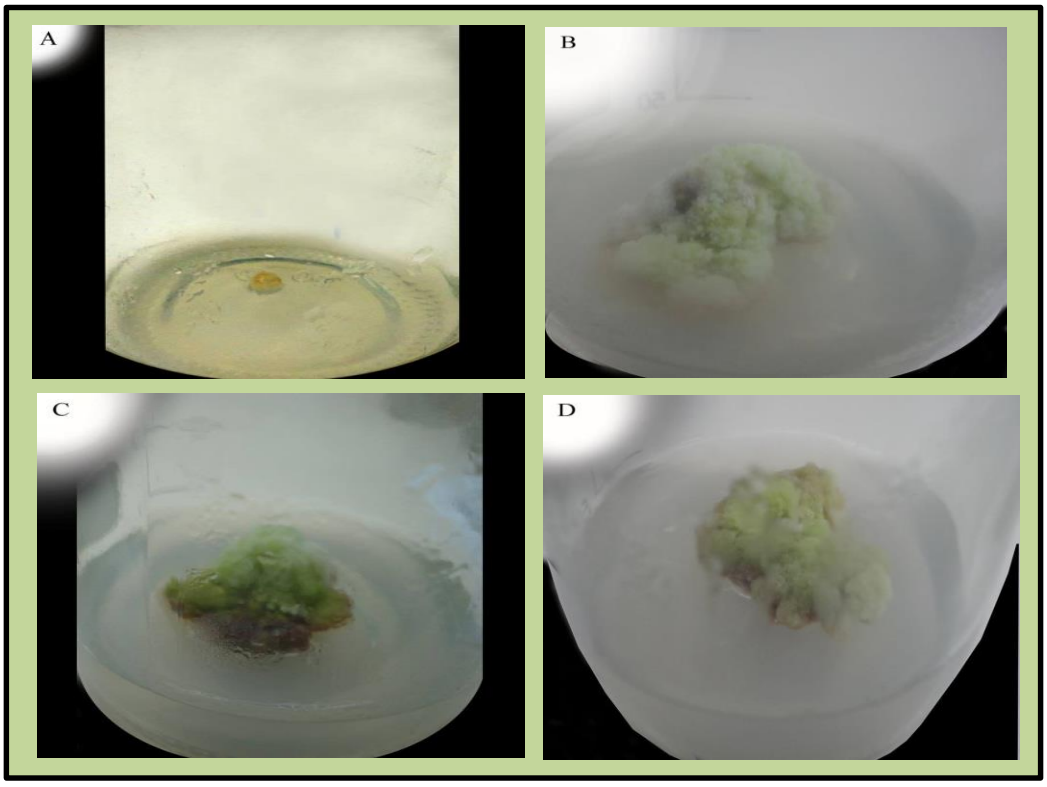
الكثافةالمزروعة (×10 ^{4} خلية سم$^{-3}$)	معدلات أعداد المستعمرات الخلوية طبق$^{-1}$	أعداد منشآت الكالس بعد 25 يوماً
1.0 (كثافة الإنشاء)	C 10.400	0
1.52	C 12.000	0
1.79	B 16.111	0
2.03	A 21.400	6



الشكل 3. زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنبات *Withania somnifera* بطريقة الطمر (A): الخلايا البنوية الناتجة من الأنقسام الأول بعد 72 ساعة للخلايا المعلقة المزروعة في وسط (MS+ 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D +0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin) بطريقة الطمر (قوة تكبير 40x) (B): المستعمرة الخلوية الناتجة من الانقسامات المتعاقبة للخلايا البنوية (في A) بطريقة الطمر بعد 15 يوما (قوة تكبير 40x).(C): منشآت الكالس بعد 25 يوما

الإدامة الدورية لمنشآت الكالس

امتاز الكالس الناتج من زراعة المعلقات الخلوية بكل من طريقة النشر والطمر بقوامه الهش ولونه الاصفر المائل الى البني الفاتح، وأدى استمرار الإدامة الدورية لمنشآت الكالس المتكونة من زراعة المعلقات الخلوية للسيقان تحت الفلقية بكلا الطريقتين الى زيادة أحجامها إذ بلغ معدل وزنه 5.592 غم بعد شهر من الزراعة إذ التقطت هذه القطع الصغيرة عند بلوغها حجم حبة العدس ونقلت الى 20 مل من نفس الوسط في وعاء زجاجي لتستمر في نموها مكونة مزارع الكالس، واتصف الكالس المشتق من زراعة منشآت الكالس المتكونة بتباين الوانه فمنه ما كان ذا لون ابيض حبيبي القوام ومنه ما كان لونه أخضر غامق حبيبي القوام صلب ولبعضه لون اخضر فاتح صلب القوام، شكل 4.



الشكل 4. الكالس المشتق من زراعة منشآت الكالس لنبات *Withania somnifera* على وسط MS الصلب المدعم بتركيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin (A): منشأ كالس بعد اعادة زراعتها (B): كالس ذو لون ابيض حبيبي القوام (C): كالس ذو لون أخضر غامق صلب القوام (D): كالس ذو لون أخضر فاتح حبيبي القوام بعد ثلاثين يوما من إعادة الزراعة

ان استخدام مزارع المعلقات الخلوية تمثل اتجاها حديثا في مجال التقانات الحيوية في النبات بوصفها انظمة انموذجية ليس من اجل الحصول على الكالس فحسب بل في توفيرها مجالا كبيرا لمتابعة انقسام الخلايا المفردة وتوسعها وتخصصها (رشيد وقاسم، 2006). إن الدافع في اعتماد تقانة انشاء المعلقات الخلوية المشتقة من الكالس تكمن في تحديد الكثافة الحرجة اللازمة لانقسام الخلايا ونموها، فقد اشارت هذه الدراسة الى نجاح استخدام وسط MS السائل المدعم بتركيز 3.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin في إنشاء المعلقات الخلوية واحتفاظ الخلايا بحيويتها، ومن المؤكد ان قوام الكالس الهش وكميتة كانت احد عوامل نجاح إنشاء هذه المزارع واحتوائها على اعداد كبيرة من الخلايا المفردة، وهذا يفسر نشاط الانقسامات الخلوية وتواصلها حتى تكوينها قطع صغيرة من الكالس ويحتمل ان يعزى هذا الى الفعل النشط

الحاصل بين المجاميع الكبيرة من الخلايا المفردة (Cuddihy وBottino, 1982) وعلى تركيب الوسط مع الحركة المستمرة لضمان توزيع الخلايا وعدم تكتلها في مكان واحد حيث تنفصل خلايا الكالس المنقول عن بعضها خلال الحركة المستمرة لينتج عنها معلقا خلويا، ويكون معدل انقسام الخلايا في مزارع الخلية المعلقة خلال الطور الأسي من النمو اعلى من معدل انقسام خلايا الكالس (Ramawat, 2008)، فالكالس الذي تم الحصول عليه في هذه الدراسة بواسطة زراعة المعلقات الخلوية بطريقة النشر والطمر (Bedrgmann, 1960; Dixon, 1985) ابدى مسارا اعتياديا في نموه وتمكن من الزيادة في الحجم من دون ان يعاني من ظاهرة الإسوداد التي ترافق الكالس المشتق من الجزء النباتي، وان التغلب على الصعوبات التي صاحبت استحثاث الكالس قد تفسر بأن هذا الكالس المشتق من المعلقات الخلوية يختلف في سلوكه عن سلوك الكالس المتكون من الأجزاء النباتية بسبب نشأته المتوقعة من خلايا مفردة او من كتلة من هذه الخلايا غير المتخصصة التي قد تختلف عن الخلايا المتخصصة الموجودة في الجزء النباتي المستخدم لاستحثاث الكالس منه (Morris وآخرون، 1999) بدلالة اختلاف الوان الكالس واشكاله وقوامه الناتجة من اعادة زراعة منشآت الكالس الناتجة من زراعة المعلقات الخلوية. وهناك دراسات عديدة اشارت الى نجاح زراعة المعلقات الخلوية المستحثة من الكالس بطريقة الطمر في الاكار فقد تمكنت المعلقات الخلوية المستحثة من كالس أوراق الجت *Medicago sativa* النامية على وسط UM المدعم بأضافة 2,4-D من أستحثاث الكالس الذي أمتاز بلونه الأصفر وقوامه الهش وقدرته على التمايز خلال 5 أسابيع من نقله الى أوساط خاصة للتمايز مثل وسط HFMS (Cocking وDavey, 1980). وتمكنت خلايا المعلقات الخلوية المشتقة من نبات *Cyamopsis tetragonoloba* والمزروعة في وسط MS المدعم بإضافات NAA و2,4-D بطريقة الطمر في الاكار من الإنقسام بعد يومين من زراعتها. وأتصف الوسط المستخدم بجهد تناضحي واطئ شجع تكوين المستعمرات الخلوية التي تطورت الى كالس تمكن من التمايز وتكوين الافرع الخضرية (Saxena وآخرون, 1982). وقد يفسر صعوبة تمايز الكالس الناتج من زراعة الخلايا المعلقة المشتق من كالس السيقان تحت الفلقية الى وجود تأثيرات سايتوبلازمية وأخرى نووية في النبات (She – Gong و Fuxiong, 2000).

المصادر

الجواري، سهلة محمد زيدان شعيب. 2004. الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان مع بلازميدات Ri في الحصول على نباتات الباقلاء *Vicia faba* L. المحولة وراثيا. اطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة الموصل.

رشيد، جميلة هزاع ووجدان سالم قاسم. 2006. دور المعاملة الحرارية في تحضير الانقسام الخلوي وتكوين الكالس من زراعة المعلقات الخلوية لنباتات زهرة الشمس *Helianthus annuus* في قطرات الاكار المتعددة. *مجلة زراعة الرافدين*. 34(2): 22-29.

Adhikari, S. R. and B. Pant. 2013. Induction and proliferation of *in vitro* mass of callus of *Withania somnifera* L. Dunal. *Res. in plant Sci.*, 1(3): 58-61.

Bedrgmann, L. 1960. Growth and division of single cells of higher plants in vitro. *J. Gen. physiol.*, 43: 841-851.

Chimire, K., E. S. Seong, E. H. Kim, K. Lamsal, C. Y. Yu, and I. M. Chung. 2010. Direct shoot organogenesis from petiole and leaf discs of *Withania somnifera* L. Dunal. *Afr. J. of Biotech.*, 9(44): 7453-7461.

Cocking, E. C. and M. R. Davey. 1980. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissues derived from leaf protoplasts and leaf explants of *Medicago sativa. Z. Pflanzenphysiol. Bd*., 99: 261-270.

Cuddihy, A. E. and P. J. Bottino. 1982. Winged-bean protoplasts: Isolation and culture to callus. *Plant cell tiss. & Org.Cult.*, 1: 201-209.

Dixon, R. A.1985. Plant Cell Cultures. A Practical Approach. IRL Press, Oxford, U.K.

Gong-She, L. and W. Fuxiong. 2000. Bud regeneration by suspension culture of sunflower. *J. Plant. Bio.*, 49: 212-216.

Hunziker, A. T. 2001. Genera *Solanacearum:* the genera of the *Solanaceae illustrated*, argraned according to a new system; Gantner Verlag: Ruggell, Liechtenstein.

Kanungo, S., M. Kumari and S. L. Sahoo. 2015. Application of Antioxidant Enzyme Activity and Biochemical Characterization in Static and Suspension Cultures of *Withania somnifera* L. *Applied food Technology*, 2(2): 15-22.

Mir, B. A., J. Khazir, K. R. Hakeem, S. Koul and D. A. Cowan. 2014. Enhanced production of Withaferin-A in shoot cultures of *Withania somnifera* L. Dunal. Department of Genetics, University of Pretoria, 1-9.

Mirjalili, M. H., E. Moyano, M. Bonfill, R. M. C. Cusido and J. Palazon. 2009. Steroidal Lactones from *Withania somnifera*, an Ancient Plant for Novel Medicine. www.mdpi. *Com/journal/molecules*, 14: 2373-2393.

Mohanty, I., S. K. Gupta, K. K. Talwar, A. Dinda, S. Joshi, P. Bansal, A. Saxena and D. S. Arya. 2004. Cardioprotection from ischemia and reperfusion injury by *Withania somnifera*: a hemodynamic, biochemical and histopathological assessment. *Mol. Cell Biochem*., 260: 39-47.

Morris, P., K. J. Webb, M. P. Robbins and B. Jorgensen. 1999. Application of biotechnology to *lotus* breeding. *News Lett. Sci. and Techn.*, 28: 199-228.

Niyaz, A. and E. N. Siddiqui. 2014. Seed germination of *Withania somnifera* L. Dunal. European. *J. of Med. plants*, 4(8): 920-926.

Ramawat, K. G. 2008. Plant Biotechnology. Printed in India. PP: 1-265.

Saxena, K. P., R. Gill, A. Rashid and S. C. Maheshwari. 1982. Colony formation by Cotyledonary protoplast of *Cyamopsis tetragonoloba* L. *Plants physiol.*, 106: 277-280.

Shukla, H. Y. and P. K. Shukla. 2012. Effect of stand geometry and plant growth regulators on root yield and alkaliod content of Ashwagandha (*Withania somnifera* Dunal). *Int. J. Med. Arom. plants*, 2(3): 390-395.

Siddique, N. A., M. A. Bari, S. Shahnewaz, M. H. Rahman, M. R. Hasan, M. S. I. Khan and M. S. Islam. 2004. Plant regeneration of *Withania somnifera* (L.) Dunal (Ashwagandha) from nodal segments derived callus an endangered medicinal plant in Bangladesh. *J. of Biolog. Sci.*, 4(2): 219-223.

Victor, M. L. and V. Felipe. 2006. Plant Cell Culture Protocols. 2$^{Ed.}$, Humana Press Int., Totowa, N. J.

Udayakumar, R., C. W. Choi, K. T. Kim, S. Kasthurirengan, T. S. Mariashibu, J. J. S. Rayan and A. Ganapathi. 2013. In vitro plant regeneration from epicotyl explant of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *J. M. P. R.*, 7(1): 43-52.

THE EFFECT OF DENSITIES CULTURE OF CELL SUSPENSION PLANT *Withania somnifera* L. IN CELL PLATING AND ARRAY METHOD IN THE FORMATION OF CALLUS PRIMORDIAS

Muthana M. Al-Mahdawe[1] **Batoul. M. Alwan**

Dept. of Biology-College of Education pure sciences-University of Diyala, Iraq.

[1] Corresponding author: sadeh1970@gmail.com

ABSTRACT

This study succeeded in establish cell suspension derived from callus hypocotyle *Withania somnifera* L. seedlings, induced in MS solid medium supplemented with 3.0 mg l^{-1} 2,4-D Intertwined with 0.5 mg.L^{-1} Kin. Detection culture different densities (1.0, 1.52, 1.79, 2.03) $\times 10^4$ cell cm^{-3} of these suspensions of plating and array method of agar-solidified MS medium in the presence of concentrations 3.0 mg l^{-1} 2,4-D + 0.5 mg l^{-1} Kin. Culture method by plating was exceeding the array method in the number of cellular colonies. It has reached the 27.600 colony $dish^{-1}$ at the culture density 2.03 $\times 10^4$ cell cm^{-3} compared with the initiation density which amounted to 8.125 colony $dish^{-1}$ in plating method, while the number of these colonies by array method was 21.400 colony $dish^{-1}$ using the same culture density compared with the initiation density which amounted to 10.400 colony $dish^{-1}$. Moral high density excelled significantelly on the rest of the densities opals giving 58 callus primordial after 20 days of culture of cells suspension using plating method, and giving 6 callus primordial after 25 days of culturing on cell suspension when array method was used.

Key words: Callus, Suspension cell, *Withania somnifera.*