ISSN: 1608-9391

e-ISSN: 2664-2786

Received: 11/8/2020

Accepted: 4/10/2020

استحداث مزارع الكالس من القطع النباتية لبادرات نبات شوك الجمل *Silybum marianum* وتقدير محتواها من البروتين

**رحاب عبد الجبار حامد البكر

*صباح عبد الله صالح البدراني

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل

*E-mail: sabahasm1975@gmail.com

**E-mail: Rehsbio39@uomosul.edu.iq

الملخص

تضمن البحث التحري عن افضل طريقة لتعقيم بذور نبات شوك الجمل *Silybum marianum* والحصول على بادرات سليمة، وبيان دور منظّمات النمو النباتية Benzyl adenine (BA) و 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ونوع القطعة النباتية لبادرات النبات في استحداث ونمو الكالس، بالإضافة الى قياس حيوية الكالس ومستوى البروتين. اظهرت النتائج ان أفضل معاملة لتعقيم البذور هي نقعها بالماء المقطر المعقم لمدة (24) ساعة، ثم بالكحول الايثيلي 70% لمدة (3) دقائق، بعدها بمحلول القاصر التجاري (هايبوكلورات الصوديوم NaOCl) 2.5% لمدة (10) دقائق، ثم بـ Tween 20 بتركيز 0.1% لمدة (10) دقائق، زرعت قطع البادرات (جذور، اوراق، سيقان، عقد) على أوساط (MS) الصلبة والحاوية على تراكيز مختلفة (0.1، 0.5، 1.0، 1.0) ملغم/لتر (BA)، و (0.25، 0.5، 0.5، 1.0) ملغم/لتر (2,4-D). نجحت الاوساط المدعمة بـ 1.0 ملغم/لتر من (BA) و (2,4-D) في تحفيز الكالس حيث بلغ الوزن الرطب لكالس الجذور (2.4، 3.1، 4.1) غم خلال (40، 80، 120) يوم، اكدت النتائج ان قطع الجذور والعقد كانت الاكثر استجابة لاستحداث الكالس. شهدت حيوية الكالس زيادة واضحة في عمر (80) يوم لتبلغ 87% لكالس كل من الجذور والاوراق والعقد ومع بلوغ الكالس عمر (120) يوم اظهرت الجذور تفوق من حيث حيوية الكالس اذ بلغت 95%. بينت النتائج تباين مستوى البروتين في مزارع الكالس باختلاف مصدر الكالس وعمره، إذ بلغ اعلى مستوياته لكالس العقد، وفي عمر (80 و 120) يوم كان اعلى مستوى للبروتين لكالس الجذور.

الكلمات الدالة: نبات شوك الجمل، استحداث الكالس، منظّمات النمو النباتية، تعقيم البذور، البروتين.

المقدمة

نبات شوك الجمل *Silybum marianum* يعرف عادة بشوك الحليب (Milk Thistle) (Zahoor, 2014) ومحليا الخرشوب البري (Bijak, 2017)، ينمو في مناطق البحر المتوسط والهند والصين وشمال امريكا وافريقيا واستراليا (Nemati et al., 2017). وهو نبات حولي او شبه حولي يعود الى عائلة النجميات (Asteraceae) (Ekmekci and Karaman, 2012). يصل طول النبات الى 2 متر مع اوراق خضراء غامقة ذات حافات ابرية وعروق بيضاء واشواك على السيقان وازهار بنفسجية (Zahra, 2017). وطبياً يعود تاريخه العلاجي الى 2000 سنة ومضادات الاكسدة الخاصة به تعتبر عامل حماية غير عادي للكبد وقد اثبت ذلك من خلال العديد من التجارب والدراسات السريرية (Bahmani et al., 2015). ويعد السيلمارين Silymarin المركب الفعال لهذا النبات نظراً لتأثيراته البايولوجية الفعالة لما يحتويه من مضادات اكسدة (Anti-Oxidant) ومضادات الالتهابات (Anti-Inflammatory) وقوته المضادة للتليف (Antifibrotic) وتعديل نظام المناعة (Federico et al., 2017). بالإضافة الى تأثيراته المضادة للسرطان Anti-Cancer (Ozturk et al., 2015) وحماية الكلى (Soto et al., 2010). ودوره في زيادة تكوين البروتين وتجديد الخلايا (Santosh, 2004; Kropacopa et al., 1998) ويقلل من فعالية مسببات الاورام ويبطئ ايض الكالسيوم كما يشارك في استقرار معظم الخلايا واستقلاب الحديد (Rodriguez et al., 2018). كما صنف عام 2014 سادسا من بين المكملات الغذائية العشبية العشرين الاكثر مبيعا في سوق الاغذية الطبيعية والعشبية (Smith et al., 2014).

ان لتقنية زراعة الانسجة النباتية (Plant Tissue Culture) دور مهم في تسهيل معظم البحوث الخاصة بتربية النباتات والتغلب على العديد من المشاكل المرتبطة بتقلبات الطقس وكذلك الامراض ومشاكل التربة كما تعد مصدر مهم للعديد من النواتج الطبيعية ذات القيمة الدوائية والتي يمكن الحصول عليها من مزارع الكالس والمعلقات الخلوية (John and Koperuncholan, 2012). ويعتمد نمو الكالس بدرجة كبيرة على مكونات الوسط الغذائي ونسبها، وان لنوعية منظمات النمو وتركيزها دور مهم في عملية استحداث الكالس ونموه (Sania and Iram Liaqat, 2017). كما يعد البروتين من المكونات الخلوية الاساسية وان قياس كميته يعتمد عليها في تحديد نمو الكالس (Elhaak et al., 2016).

المواد وطرائق العمل

مصدر البذور المستخدمة في البحث

زودت بذور نبات شوك الجمل *Silybum marianum* المستخدمة في البحث من مصدرين: المجموعة الاولى تم الحصول عليها من مركز البحوث الزراعية في جمهورية مصر العربية، والمجموعة الثانية أُخذت من الاسواق المحلية لمدينة الموصل.

اختبار حيوية البذور

اختبرت حيوية البذور بوضعها في أطباق بتري (Petir dishes) حاوية على أوراق ترشيح وذلك بوضع (10) بذور من كل مجموعة على حدى وحفظت بدرجة حرارة 25 °م لحين حصول الأنبات فيها مع مراعاة ترطيبها بصورة دورية لمدة اربعة ايام. وبعدها تم حساب النسبة المئوية للأنبات باستخدام القانون التالي:

$$\text{النسبة المئوية للأنبات} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{عدد البذور المزروعة}} \times 100$$

التعقيم السطحي للبذور وزراعتها

بعد التأكد من حيوية البذور تم استخدام طرق مختلفة في تعقيم البذور وكانت:

طريقة التعقيم الاولى:

عقمت البذور بغمرها في محلول الايثانول بتركيز 99% مدة ثلاثة دقائق مع التحريك المستمر، ثم نقلت الى محلول القاصر (هايبوكلورات الصوديوم NaOCl) المخفف مع الماء المقطر من المحلول الرئيسي المركز وبنسبة (2:1) (قاصر: ماء مقطر معقم) (حجم: حجم) لفترات زمنية (5، 10، 15) دقيقة مع التحريك لبيان أفضل وقت لمعاملة البذور بمحلول القاصر (البكر، 2002). بعد انتهاء التعقيم غسلت البذور بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لإزالة آثار مواد التعقيم المستخدمة، ثم جففت على أوراق ترشيع معقمة لإزالة الماء العالق بها، وزرعت في قناني زجاجية حاوية على أوساط غذائية معقمة خاصة لإنبات البذور وتنمية البادرات.

طريقة التعقيم الثانية:

نقعت البذور بالماء المقطر المعقم مدة (24) ساعة، وعقمت بالايثانول 70% لمدة (3) دقائق مع التحريك المستمر، بعدها نقلت الى دورق حاوي على محلول القاصر (هايبوكلورات الصوديوم NaOCl) بتركيز 2.5% لمدة (20) دقيقة مع التحريك المستمر (Pourjabar et al., 2012)، واخيرا غسلت البذور ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم لإزالة اثار المواد المعقمة. جففت البذور على أوراق ترشيع معقمة وزرعت في قناني زجاجية حاوية على أوساط غذائية معقمة خاصة لإنبات البذور وتنمية البادرات.

طريقة التعقيم الثالثة:

نقعت البذور لمدة (24) ساعة في الماء المقطر المعقم، ووضعت في دورق زجاجي معقم حاوي على الايثانول بتركيز (70%) ولمدة (3) دقائق مع التحريك المستمر، بعدها عقمت باستخدام محلول القاصر (هايبوكلورات الصوديوم NaOCl) بتركيز 2.5% لمدة (10) دقائق مع التحريك المستمر. أكمل التعقيم باستخدام Tween 20 بتركيز 0.1% مدة (10) دقائق مع التحريك المستمر (Pourjabar et al., 2018). غسلت البذور جيدا باستخدام الماء المقطر المعقم من (3-5) مرات، وجففت على أوراق ترشيع معقمة، وزرعت في قناني زجاجية حاوية على اوساط غذائية معقمة خاصة لإنبات البذور وتنمية البادرات.

الايوساط الغذائية المستخدمة لإنبات البذور

لغرض زراعة البذور وتنمية البادرات استخدمت ثلاث أنواع من الاوساط الخاصة وهي:

○ وسط MS بكامل قوته التركيبية (Murashige and Skoog, 1962)

○ وسط MS بنصف قوته التركيبية

○ وسط Arnon و Hogland (Arnon and Hogland, 1940, 1944)

حفظت القناني الزجاجية الحاوية على الاوساط الغذائية والبذور المزروعة فيها في حاضنة النمو Growth Chamber

بظروف الظلام ودرجة حرارة (24±1)°م، وبعد أنبات البذور نقلت الى الضوء وتعاقب يومي (16) ساعة ضوء و (8) ساعات ظلام، وحددت افضل طريقة للتعقيم عن طريق حساب النسبة المئوية والفترة الزمنية لإنبات البذور.

زراعة القطع النباتية واستحداث الكالس

أخذت البادرات بعمر (20) يوم، وقطعت باستعمال مشرط معقم حيث أستخدم في هذه الدراسة أجزاء مختلفة من البادرة (جذور، أوراق، سيقان، عقد) بلغ طول القطعة (1-1.5) سم تقريباً وزرعت بعد ذلك على وسط MS المجهز بمستويات مختلفة من منظمات النمو المستخدمة في الدراسة. بعدها نقلت القناني الزجاجية الحاوية على القطع النباتية (Explants) المزروعة الى الحاضنة، وحفظت بدرجة حرارة (24±1) °م، والمجهزة بفترة ضوئية وتعاقب يومي (16) ساعة ضوء و (8) ساعات ظلام.

منظمات النمو المستخدمة في الدراسة

تم اختبار تأثير مستويات منتخبة من منظمات النمو في استحداث ونمو مزارع الكالس من قطع البادرات المختلفة لنبات شوك الجمل *Silybum marianum*. أستخدم منظم النمو Benzyl Adenine (BA) بالتراكيز (0.1، 0.5، 1.0، 1.0) ملغم/

لتر وتداخله مع منظم النمو 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) بالتراكيز (0.25، 0.5، 0.5، 1.0) ملغم/لتر على التوالي.

تقدير الوزن الرطب للكالس (الادامة الدورية لمزارع الكالس)

تم حساب الوزن الرطب للكالس من خلال الاعتماد على تحديد الفرق في وزن القناني الزجاجية الحاوية على الوسط الغذائي MS الصلب قبل وبعد اعادة زراعة الكالس وخلال فترة نمو (40، 80، 120) يوم من الزراعة.

حيوية الكالس

تم قياس حيوية الكالس للقطع النباتية المختلفة من نبات شوك الجمل وبثلاثة اعمار (40، 80، 120) يوم ولجميع المعاملات بالاعتماد على مدى قدرة خلايا الكالس الحية على اختزال مادة Triphenyltetrazolium Chloroide الى Formazan الحمراء، وحسب طريقة (Towill and Mazur, 1975)، إذ تم إضافة 3سم³ من محلول كاشف 2,3,5 Triphenyltetrazolium Chloroide الى 0.5 غم من كالس الأجزاء النباتية المختلفة بعمر (40، 80، 120 يوم)، وحفظت العينات بدرجة 22°م لمدة 18 ساعة، واكمل بعزل الراسب وغسله بالماء المصفى ثم إضافة 3سم³ من الايثانول 95% وترك لمدة 30 دقيقة، بعدها تم قياس الامتصاصية عند طول موجي 482 نانوميتر.

تقدير كمية البروتين الكلية لمزارع الكالس

قدرت كمية البروتين الكلي لعينات الكالس المستحدث من القطع النباتية المختلفة لنبات شوك الجمل والنامي على أوساط MS الحاوية على (1.0) ملغم/لتر من BA و2,4-D وبثلاثة اعمار (40، 80، 120) يوم حسب طريقة Lowry (Lowry et al., 1951)، وبالاعتماد على المنحني القياسي المحضر من مصل البقر BSA.

النتائج والمناقشة

اختبار حيوية البذور

تميزت البذور التي تم الحصول عليها من مركز البحوث الزراعية في جمهورية مصر العربية بحيوية أعلى من خلال نسبة الانبات والتي كانت (80%)، بفترة انبات 4 ايام بالمقارنة مع البذور المحلية، حيث كانت نسبة أنباتها (70%) واستغرقت 7 ايام للإنبات، لذلك استخدمت البذور من المصدر الاول في جميع التجارب المختبرية. الشكل (1).
قد يعود التباين في حيوية البذور من المصدرين الى البيئة المحيطة لنمو النبات، وظروف الحصاد والتجفيف والنقل والخزن والتي تؤثر وبشكل كبير على جودة البذور وانباتها مستقبلا (Hamza, 2008).

الشكل 1: إنبات بذور نبات شوك الجمل *Silybum marianum* بعد مرور (4) ايام من وضعها على اوراق الترشيح

تعقيم البذور وانتبات البادرات

أشارت النتائج المستحصل عليها من تعقيم بذور نبات شوك الجمل *Silybum marianum* بالمعاملات الثلاث المختلفة ان أفضل معاملة للحصول على بادرات سليمة ونامية بشكل جيد كانت الطريقة الثالثة، إذ بلغت نسبة الأنبات 88 % خلال 5 ايام وكفاءة النمو 94 % ، تراوح طول البادرات (6.0 - 7.5) سم، وطول المجموع الجذري (7 - 10) سم بعد مرور اسبوعان الشكل (A,B - 2). اما طريقة التعقيم الاولى والثانية فكانت نسبة أنبات البذور ضعيفة جداً (26، 14) % على التوالي مقارنة مع نتائج الطريقة الثالثة، كما بلغت كفاءة النمو (44، 40) % على التوالي، إذ أن أغلب البادرات لم تستكمل النمو بشكل جيد (الجدول 1). أكدت النتائج على الدور الكبير الذي تلعبه أنواع المحاليل المعقمة وتركيزها والمدة الزمنية للتعقيم والتوازن بينها للحفاظ على حيوية الجزء النباتي والتخلص من الملوثات بنفس الوقت (Street,1977 ; Neumann, 2009). كما أثبتت النتائج أن نقع البذور بالماء المقطر لمدة (24) ساعة ساهم في زيادة نسبة الإنبات وتقليل الفترة الزمنية للإنبات. فالبذور الجافة تقوم بامتصاص الماء بسرعة إلى حد التشبع والانتفاخ مما يؤدي الى زيادة النشاط الانزيمي وعمليات الهدم والبناء للمواد الغذائية والتي تتطلب لإتمامها وسطاً مائياً وبالتالي تمزق غذاء البذرة وظهور الجذير (Hartmann, et al., 2002)، إذ يعتبر النقع من التقنيات المستعملة في تحفيز نمو البذور (Qaoud and Alkoni,1995).

وبينت النتائج ايضاً أن الاوساط الغذائية المختلفة المستخدمة في زراعة البذور لم يكن لها اي تأثير على نسبة أنبات البذور، حيث كانت بنفس الكفاءة. وقد يعود ذلك الى قدرة بذور نبات شوك الجمل على النمو في ظروف تغذية متفاوتة وبيئات مختلفة كونه شديد التحمل وقابل للتكيف (Cwalina-Ambroziak et al., 2012; Qavami et al., 2013).

الجدول 1: النسبة المئوية للأنبات وكفاءة النمو في طرق تعقيم بذور نبات شوك الجمل *Silybum marianum* والمزروعة على أوساط MS الخالية من منظمات النمو

طريقة التعقيم المستخدمة	نسبة الانبات %	فترة الانبات (يوم)	كفاءة النمو %
الاولى	26	17	44
الثانية	14	10	40
الثالثة	88	5	94

B

A

الشكل 2: بادرات نبات شوك الجمل *Silybum marianum* بعمر 14 يوم

استحداث الكالس من القطع النباتية المختلفة لنبات شوك الجمل *Silybum marianum* المزروعة على اوساط MS المجهزة بتركيز مختلفة من (BA) و(2,4-D) بعد مرور 40 يوم:

تباينت الفترة الزمنية لاستحداث الكالس من القطع النباتية لنبات شوك الجمل حسب تراكيز منظمات النمو المضافة الى الوسط وكذلك نوع القطعة النباتية (الجدول 2)، اذ استغرقت القطع النباتية المزروعة على اوساط MS مضافا اليها 1.0 ملغم/لتر من BA و 2,4-D أقل فترة زمنية للاستحداث وكانت 10 أيام للكالس المستحدث من الجذور والعقد و 12 يوم للكالس المستحدث من الساق و 20 يوما للكالس الاوراق. أما بالنسبة لبقية الاوساط فقد تباينت الفترة الزمنية لاستحداث الكالس حسب نوع القطع النباتية المزروعة عليها وتركيز منظمات النمو المضافة للوسط، حيث تراوحت بين (10-15) يوم للعقد و(10-17) يوم للجذور و(12-20) للسيقان و(18-25) للأوراق وباختلاف منظمات النمو المضافة للوسط (الجدول 2).

يلاحظ من هذه النتائج ان قطع العقد كانت الاسرع في الاستجابة (12-15) يوم، الا ان قطع الاوراق استغرقت فترة زمنية اطول لاستحداث الكالس في جميع الاوساط المستخدمة مقارنة مع باقي القطع النباتية، حيث تراوحت بين (18-25) يوم، اذ كانت الفترة الزمنية الأقل وهي (18) يوم في الأوساط المجهزة بتركيز (0.1، 0.25) ملغم/ لتر لكل من BA و 2,4-D على التوالي، في حين كانت أطول فترة للاستحداث في الأوساط الحاوية على BA و 2,4-D بتركيز (1.0، 0.5) ملغم / لتر على التوالي وهي 25 يوم.

الجدول 2: الفترة الزمنية لاستحداث الكالس من الاجزاء النباتية لنبات شوك الجمل *Silybum marianum* بعد 40 يوم من الزراعة

BA / 2,4-D				الفترة الزمنية اللازمة لاستحداث الكالس من أجزاء نبات شوك الجمل / يوم	
ملغم / لتر				سيقان	عقد
		أوراق	جذور		
0.1/0.25		18	17	20	10
0.5 /0.5		20	13	15	12
1.0/0.5		25	12	12	15
1.0 /1.0		20	10	12	10

بينت النتائج المستحصل عليها ان قطع نبات شوك الجمل *Silybum marianum* (الجذور، الاوراق، السيقان، العقد) المزروعة على اوساط MS المجهزة بتركيز مختلفة من BA و 2,4-D استجابت وبشكل متفاوت لاستحداث الكالس، اذ كانت جميع الاوساط محفزة لاستحداث الكالس ولكن بدرجات مختلفة حسب التراكيز المضافة الى الوسط.

برهنت النتائج في (الجدول 3) ان أفضل استجابة في الاوساط الحاوية على (1.0) ملغم/لتر من BA و 2,4-D حيث بلغت النسبة المئوية لاستحداث الكالس من القطع النباتية المزروعة على هذه الاوساط 90% في حالة الجذور والعقد، أما بقيت التراكيز من منظمات النمو المضافة الى الوسط الغذائي فكانت نسبة الاستجابة لاستحداث الكالس عليها متباينة بحسب نوع القطعة النباتية المزروعة، اذ لوحظ ان الاوساط المدعمة ب (1.0، 0.5) ملغم/ لتر من BA و 2,4-D على التوالي حفزت استحداث الكالس من الجذور والعقد بنسبة (80-90) % على التوالي، بينما كانت استجابة قطع الاوراق والسيقان المزروعة على نفس الاوساط ضعيفة حيث بلغت 40% لكل منها، تليها الاوساط المدعمة ب (0.5) ملغم/لتر من BA و 2,4-D، فقد كانت النسبة المئوية لاستحداث الكالس في حالة الجذور والاوراق والعقد جيدة نسبيا وهي 80% للجذور و 70% لكل من الاوراق والعقد في حين تراجعت هذه النسبة لتكون الأضعف في الكالس المستحدث من قطع السيقان وكانت 40%.

كما أشارت النتائج أيضا الى أن الاستجابة المنخفضة حصلت في الاوساط المجهزة بتركيز (0.1، 0.25) ملغم/لتر من BA و 2,4-D على التوالي اذ كانت 40% لكل من قطع الجذور والاوراق والسيقان، أما بالنسبة للعقد فقد كانت النسبة المئوية لاستحداث الكالس 60% (الجدول 3).

الجدول 3: النسبة المئوية لاستحداث الكالس من الاجزاء المختلفة لبادرات شوك الجمل *Silybum marianum* بعد مرور 40 يوما من الزراعة

عقد (%)	سيقان (%)	اوراق (%)	جذور (%)	2,4-D/ BA ملغم / لتر
60	40	40	40	0.25/ 0.1
70	40	70	80	0.5 /0.5
80	40	40	90	0.5/ 1.0
90	60	80	90	1.0 / 1.0

وبشكل عام يمكن القول إن استحداث الكالس ونموه يعتمد بصورة خاصة على نوع الجزء النباتي المزروع ومكونات الوسط الغذائي وخاصة منظمات النمو النباتية المضافة اليه (Pourjabar *et al.*, 2012; Rapbie *et al.*, 2010). اذ ان استجابة القطع النباتية لاستحداث الكالس يعود الى فعالية الاوكسينات والساييتوكاينينات، حيث ان اضافة كل من BA و 2,4-D الى الوسط الغذائي معا أو بشكل منفرد أثبتت فعالية في استحداث الكالس من القطع النباتية (Sania and Iram Liaqat, 2017).

كما بينت النتائج المستحصل عليها أيضا ان التراكيز العالية من BA و 2,4-D حفزت استحداث الكالس بنسب جيدة وهذا ما اشار اليه كل من (Elhaak *et al.*, 2016). ومن جهة أخرى فإن استجابة القطع النباتية لاستحداث الكالس في الاوساط الحاوية على تراكيز متساوية من BA و 2,4-D كانت الأفضل، قد يعود ذلك الى أن فعالية الأوكسينات في تحفيز الانقسام الخلوي ونشوء الكالس يظهر بوضوح عندما تصل الى مستوى من التوازن في عملها مع الساييتوكاينينات (Hartman *et al.*, 2002).

برهنت النتائج على ان قطع الجذور والعقد كانت الافضل في الاستجابة لاستحداث الكالس على التراكيز المختلفة من منظمات النمو المضافة الى الوسط اذا ما قورنت مع قطع الاوراق والساق المزروعة على نفس الاوساط وهذا ما اكدته دراسة كل من (Cimino *et al.*, 2006; Hasanloo *et al.*, 2008; Jabeen *et al.*, 2019).

الوزن الرطب للكالس المستحدث من قطع بادرات نبات شوك الجمل *Silybum marianum* المزروعة على اوساط MS المدعمة بتركيز مختلفة من BA و 2,4-D بعد مرور 40 يوم

اظهرت النتائج المثبتة في (الجدول 4) تباين الوزن الرطب للكالس بحسب نوع القطع النباتية المزروعة وتركيز منظمات النمو المضافة الى الوسط، وكانت أفضل الوزن الرطب للكالس النامي على أوساط MS المجهزة بـ 0.5 ملغم/ لتر من BA و 2,4-D بالنسبة لقطع العقد حيث بلغ الوزن الرطب 2.5 غم، تليها الاوساط المجهزة بـ 1 ملغم/لتر من BA و 2,4-D بالنسبة لقطع الجذور والاوراق والعقد اذ بلغ الوزن الرطب (2.4، 2.2، 2.2) غم لكل منها على التوالي، كذلك بلغ الوزن الرطب (2.1) غم لكالس الجذور النامي على اوساط مجهزة بـ (0.1، 0.25) ملغم/ لتر مع (0.5، 0.5) ملغم/لتر BA و 2,4-D، من جهة أخرى بلغ الوزن الرطب لكالس الجذور والاوراق (1.8) غم على الاوساط المجهزة بـ (1.0، 0.5) من BA و 2,4-D على التوالي، في حين كان أعلى وزن لكالس السيقان 0.9 غم في الاوساط الحاوية على 0.5 ملغم/لتر من BA و 2,4-D (الجدول 4).

الجدول 4: الوزن الرطب لكالس القطع النباتية لنبات شوك الجمل *Silybum marianum* النامي على اوساط MS الصلبة المجهزة بتركيز مختلفة من منظمات النمو BA و 2,4-D بعد مرور 40 يوما من بدء الزراعة

الوزن الرطب للكالس /غم				2,4-D/BA
عقد	سيقان	أوراق	جذور	ملغم / لتر
1.4	0.4	0.8	2.1	0.25/0.1
2.5	0.9	1.8	2.1	0.5/0.5
1.5	0.7	0.3	1.8	0.5/1.0
2.2	0.3	2.2	2.4	1.0/1.0

عدد المكررات خمسة لكل معاملة

امتاز الكالس المستحدث من قطع الجذور في الاوساط الحاوية على تركيز مختلفة من منظمات النمو بقوام هش ولون أبيض حليبي مائل للاصفرار الشكل (A-3)، أما كالس العقد فكان بلون بني شاحب وقوام هش الشكل (D-3)، وقد اتفقت مع نتائج كل من (John and Koperuncholan, 2012) والتي حصلا عليها من زراعة قطع بادرات شوك الجمل على اوساط MS مع تركيز مختلفة من 2,4-D، وبالنسبة لكالس الساق فقد كان بلون بني وقوام متراس الشكل (C-3)، وأظهر كالس الاوراق تباين باللون والقوام مع تباين تركيز منظمات النمو في الاوساط المزروعة عليها، اذ تميز بلون أخضر فاتح مائل الى الاصفرار في الاوساط الحاوية على تركيز 1 ملغم/ لتر من BA و 2,4-D و 0.5 ملغم/ لتر من BA و 2,4-D، بينما كان بلون أخضر مائل الى البني الفاتح في الاوساط الاخرى مع قوام متراس الشكل (B-3) وهي نفس النتيجة التي حصل عليها (Jabeen et al., 2019) عند زراعته للقطع النباتية نفسها من بادرات شوك الجمل على اوساط حاوية على تركيز مختلفة من BA و 2,4-D. اذ تشير العديد من الدراسات ان الوان الكالس وقوامه له علاقة وثيقة بنسبة الاوكسينات والساييتوكاينينات المضافة للوسط (Danya et al., 2012).

الشكل 3: قطع نبات شوك الجمل *Silybum marianum* المزروعة على وسط MS الصلب المدعم بتركيز مختلفة من BA وال 2,4-D بعد مرور 40 يوما

- A كالس الجذور على وسط MS + 1.0 ملغم/لتر من BA و 2,4-D
- B كالس الاوراق على وسط MS + 1.0 ملغم/لتر من BA و 2,4-D
- C كالس السيقان على وسط MS + 0.5 ملغم/لتر من BA و 2,4-D
- D كالس العقد على وسط MS + 0.5 ملغم/لتر من BA و 2,4-D

الوزن الرطب لكالس القطع النباتية لنبات شوك الجمل بعد 80 يوم من الزراعة:

تبين بعد مرور 80 يوما من بدء الزراعة أن الاوساط التي حفزت نمو الكالس منذ الايام الاولى من الزراعة قد تحولت القطع المزروعة عليها وبشكل كامل الى كالس، كما بينت النتائج المثبتة في (الجدول 5) أن أفضل الاوساط المشجعة لاستحداث ونمو الكالس من قطع الجذور والعقد لبادرات نبات شوك الجمل هي الاوساط الحاوية على 1 ملغم/ لتر من BA و 2,4-D حيث بلغ الوزن الرطب للكالس (3.1، 3.0) غم على التوالي، وكذلك الاوساط الحاوية على (1.0، 0.5) ملغم/ لتر من BA و 2,4-D حيث بلغ الوزن الرطب (2.9) غم لكالس الجذور. تليها الاوساط المجهزة بـ 1.0 ملغم/ لتر من BA و 2,4-D بالنسبة لكالس الاوراق إذ بلغ 2.7 غم، وكذلك الاوساط المجهزة بـ (0.1، 0.25) ملغم/ لتر مع (0.5، 0.5) ملغم/ لتر BA و 2,4-D إذ بلغ الوزن الرطب لكالس الجذور عندها (2.5، 2.6) غم على التوالي. أما بالنسبة لبقية التراكيز المضافة الى الاوساط الغذائية فقد حفزت نمو الكالس لكن بأوزان أقل لمعظم القطع النباتية قياسا بالتراكيز المذكورة أعلاه.

أما من ناحية الشكل والقوام فقد احتفظ كالس الجذور والساق بالقوام الهش مع تغير في اللون الى البني خاصة عند الاطراف، أما كالس العقد فكان بلون بني فاتح وقوام هش، بينما تميز كالس الاوراق بقوام متراس ولون اخضر غامق الى بني الشكل (4).

ويمكن القول وبشكل عام ان قطع الجذور والعقد للبادرات كانت الافضل في استحداث ونمو مزارع الكالس لمختلف التراكيز المستخدمة بالاعتماد على الوزن الرطب الناتج، كما عدت قطع السيقان الاقل في الاستجابة لنمو الكالس بالاعتماد على الوزن الرطب الناتج، وهذا ما اكدت عليه دراسة (Eari et al., 2017).

الجدول 5: الوزن الرطب لكالس القطع النباتية لنبات شوك الجمل *Silybum marianum* النامي على اوساط MS الصلبة المجهزة بتراكيز مختلفة من منظمات النمو BA و 2,4-D بعد مرور 80 يوم

الوزن الرطب لكالس / غم				2,4-D/ BA
عقد	سيقان	أوراق	جذور	ملغم / لتر
1.8	0.8	1.2	2.5	0.25/0.1
2.3	1.3	1.3	2.6	0.5/0.5
1.8	1.0	2.3	2.9	0.5/1.0
3.0	0.6	2.7	3.1	1.0/1.0

عدد المكررات خمسة لكل معاملة

الشكل 4: قطع نبات شوك الجمل *Silybum marianum* المزروعة على وسط MS الصلب المدعم بتركيزات مختلفة من BA وال 2,4-D بعد مرور 80 يوما

- A كالس الجذور على وسط MS + 1.0 ملغم/لتر من BA و 2,4-D
- B كالس الاوراق على وسط MS + 1.0 ملغم/لتر من BA و 2,4-D
- C كالس السيقان على وسط MS + 0.5 ملغم/لتر من BA و 2,4-D
- D كالس العقد على وسط MS + 1.0 ملغم/لتر من BA و 2,4-D

الوزن الرطب لكالس القطع النباتية لنبات شوك الجمل بعد 120 يوم من بدء الزراعة

عند حساب الوزن الرطب لكالس القطع النباتية بعد مرور 120 يوما، والمثبتة في (الجدول 6)، لوحظ زيادة في الوزن الرطب للكالس النامي على الاوساط التي شجعت استحداثه ونموه في المراحل الاولى للزراعة وكانت أفضلها اوساط MS المجهزة بـ 1.0 ملغم/لتر من BA و 2,4-D حيث بلغت الوزن الرطب لكالس الجذور، الاوراق، السيقان والعقد (4.1، 3.0، 1.8، 3.7) غم على التوالي. تليها الاوساط الحاوية على (1.0، 0.5) ملغم/لتر من BA و 2,4-D على التوالي حيث بلغت الوزن الرطب لقطع الجذور، والاوراق، والسيقان، والعقد (3.7، 2.9، 1.2، 3.4) غم على التوالي. بينما كان أقل وزن طري للكالس في القطع النامية على اوساط MS المجهزة بـ (0.25 و 0.1) ملغم/لتر من BA و 2,4-D على التوالي حيث كان (2.9، 2.0، 1.3، 2.1) غم لكل من الجذور، الاوراق، السيقان، والعقد على التوالي.

ومن النتائج المستحصل عليها في (الجدول 6) يمكن القول ان الجذور قد تفوقت على باقي قطع البادرات المستخدمة في انتاج مزارع الكالس وعلى الاوساط المدعمة بـ 1.0 ملغم/لتر من BA و 2,4-D اذ بلغ الوزن الرطب للكالس النامي عليها (4.1) غم تليها قطع العقد والاوراق، الا ان قطع السيقان كانت اقل استجابة لتكوين الكالس مقارنة بباقي القطع، الاستجابة لاستحداث الكالس تتأثر بدرجة كبيرة بوسط النمو وتركيز منظمات النمو المضافة للوسط، كذلك فإن استجابة القطع النباتية على وسط الزراعة يعتمد على المحتوى الداخلي للهرمونات النباتية الموجودة في القطعة النباتية، لذا فإن الاستجابة لاستحداث الكالس تتغير بالاعتماد على نوع القطعة النباتية المستخدمة (Bekheet, 2015; Neumann et al., 2009).

يعد قياس الوزن الرطب في الكالس مؤشرا واضحا وسريعا لمعدل نمو الكالس بعد ملاحظة زيادة كتلة الكالس على الوسط الغذائي (Hartmann et al., 2002). اذ ان الزيادة في الوزن الرطب للكالس تتناسب وبشكل طردي مع تقدمه بالعمر (Rabia et al., 2015). كما ان لنوع القطع النباتية وتركيز منظمات النمو المضافة للوسط الغذائي دور كبير في استحداث ونمو

كالس نبات شوك الجمل (Lv et al., 2017). وان التغيرات في الوزن الرطب في الكالس يعود اختلاف تراكيز منظمات النمو المضافة الى الوسط، فالأوكسينات والساييتوكاينينات لهم دوراً أساسياً في تحفيز استحداث ونمو الكالس، ويبدو دورها جلياً عندما يحقق توازن بينهما وبما يتفق مع نوع النبات المستخدم (Razdan, 2003; Jain and Häggman, 2007).

كما لوحظ تغير في بعض الصفات الشكلية لكالس القطع النباتية من حيث اللون والقوام مع زيادة عمر الكالس أذ أصبح كالس الجذور بلون بني الى بني غامق مع قوام أقل هشاشة، أما بالنسبة لكالس الاوراق فقد أصبح بلون أخضر غامق مع الحفاظ على قوامه المترص، وتميز كالس الساق بقوام هش مع لون بني غامق الشكل (5) وهي تطابق النتيجة التي حصل عليها (Khan et al., 2014) عند استخدام قطع بادرات شوك الجمل على اوساط MS مضاف لها TDZ بتراكيز مختلفة.

الجدول 6: الوزن الرطب لكالس القطع النباتية لنبات شوك الجمل *Silybum marianum* النامي على اوساط MS الصلبة المجهزة بتراكيز مختلفة من منظمات النمو BA و 2,4-D بعد مرور 120 يوماً من بدء الزراعة

الوزن الرطب للكالس/ غم				2,4-D /BA
عقد	سيقان	أوراق	جذور	ملغم / لتر
2.1	1.3	2.0	2.9	0.25/0.1
2.6	1.6	1.8	3.1	0.5/0.5
3.4	1.2	2.9	3.7	0.5/1.0
3.7	1.8	3.0	4.1	1.0/1.0

عدد المكررات خمسة لكل معاملة

الشكل 5: الكالس المتكون من قطع نبات شوك الجمل *Silybum marianum* على وسط MS

مضافاً له 1.0 ملغم/لتر لكل من BA و 2,4-D بعد مرور 120 يوماً من بدء الزراعة

A- كالس الجذور B- كالس الاوراق

C- كالس السيقان D- كالس العقد

وبعد متابعة الوزن الرطب للكالس خلال الاعمار (40، 80، 120) يوم يمكن القول ان اوساط MS المدعمة بـ 1.0 ملغم/ لتر لكل من BA و 2,4-D قد تفوقت على بقية الاوساط في تحفيزها لنمو الكالس وبشكل تدريجي وزيادة مستمرة للوزن الطري خلال هذه الاعمار، وهذا واضح في الشكل (6)، لذا عدت هذه الأوساط المثلى لتحفيز استحداث ونمو الكالس من القطع النباتية المختلفة لبادرات نبات شوك الجمل اعتمادا على نتائج البحث الحالي.

الشكل 6: الزيادة في الوزن الرطب للكالس القطع النباتية لنبات شوك الجمل *Silybum marianum* النامي على اوساط MS الصلبة المجهزة بـ 1.0 ملغم/لتر من BA و 2,4D بعد (40، 80، 120) يوم

قياس حيوية الكالس المستحدث من القطع النباتية لنبات شوك الجمل في الاعمار المختلفة (40، 80، 120) يوم

أظهرت نتائج قياس حيوية كالس القطع النباتية المختلفة وبثلاثة اعمار والمثبتة (بالجدول 7)، ان حيوية الكالس تراوحت بين (50-75)% في عمر (40) يوم، وقد زادت بشكل ملحوظ حتى وصلت الى نسب متساوية تقريبا (87)% مع بلوغ الكالس عمر (80) يوما بالنسبة للأوراق والعقد والجذور، الا انه مع تقدم عمر الكالس الى (120) يوم لوحظ تفوق كالس الجذور على باقي المزارع من حيث الحيوية، حيث بلغت (95)% يليه كالس العقد والاوراق حيث بلغت عندها (90-89)% على التوالي، بالمقابل كانت حيوية كالس السيقان هي الاقل من بين المزارع (80) في عمر (120) يوم، وقد اتفقت هذه النتائج مع نتائج الدراسة التي قام بها (Chiavegatto et al., 2015).

وبشكل عام تؤكد النتائج المستحصل عليها في (الجدول 7) أن حيوية الكالس زادت بشكل واضح في العمر 80 يوما لكافة انواع المزارع النباتية، كما اكدت النتائج تفوق كالس الجذور عن باقي مزارع الكالس بزيادة الحيوية الى العمر (120) يوم.

الجدول 7: حيوية كالس القطع النباتية المختلفة من نبات شوك الجمل بأعمار مختلفة النامي على اوساط MS المدعمة 1.0 ملغم/ لتر من BA و 2,4-D

نوع الجزء النباتي Explants	الحيوية (%)		
	بعد 40 يوم	بعد 80 يوم	بعد 120 يوم
جذور	69	87	95
اوراق	75	87	89
سيقان	50	77	80
عقد	74	87	90

قياس كمية البروتين في الكالس المستحدث من القطع النباتية لنبات شوك الجمل في الاعمار المختلفة (40، 80، 120) يوم بحسب النتائج المستحصل عليها (الجدول 8) تبين ان تركيز البروتين في الكالس المستحدث من القطع النباتية المختلفة بعمر (40) يوم كان بأعلى قيمة في كالس العقد مقارنة بتركيز البروتين في كالس القطع الاخرى حيث بلغ 0.90 ملغم/غم، كما ان تركيز البروتين في كالس كل من الجذور والاوراق كان متقاربا جدا حيث بلغ (0.86، 0.84) ملغم/غم على التوالي، اما الكالس المستحدث من السيقان فقد كان تركيز البروتين فيه هو الاقل (0.56) ملغم/غرام. بعد مرور 80 يوما لوحظ ارتفاع كبير في مستوى البروتين لكالس القطع النباتية بشكل عام وخاصة في كالس الجذور حيث بلغ اعلى قيمة (1.26) ملغم/ غم، وفي عمر (120) يوم لوحظ تفوق مستوى البروتين في كالس الجذور عن باقي المزارع، حيث بلغ (1.64) ملغم/ غم، يليه كالس العقد والاوراق حيث بلغ (1.42- 1.35) ملغم/ غم، وسجلت اقل قيمة (1.26) ملغم/ غم في مزارع السيقان (الجدول 8) والشكل (7)، وقد تطابقت هذه النتائج مع ما حصل عليه كل من (Abbasi *et al.*, 2016). يعد البروتين من المؤشرات الحيوية المهمة التي تعبر عن نمو الكالس في العديد من النباتات فالزيادة في الوزن الرطب او الجاف لاي خلية من نسيج نباتي حي يجب ان يرافقه زيادة في المكونات الأساسية الخلوية ومن أهمها المركبات البروتينية، وتبعاً لذلك يمكن تحديد الزيادة في نمو الكالس بتحديد مقدار الزيادة في كمية البروتينات (Neumann *et al.*, 2009).

ان الزيادة والانخفاض في تركيز البروتين يعتمد على نوع القطعة النباتية المزروعة وما تحتويه من انزيمات وهرمونات نباتية والتي تختلف من جزء نباتي الى اخر، ولمنظمات النمو النباتية المضافة الى الوسط الغذائي تأثير على المحتوى البروتيني لمزارع الكالس (Elhaak *et al.*, 2016).

الجدول 8: تركيز البروتين في كالس القطع النباتية المختلفة لنبات شوك الجمل *Silybum marianum* النامي على اوساط MS المدعمة بـ 1.0 ملغم/لتر من BA و 2,4-D بأعمار مختلفة

نوع الجزء النباتي Explant	تركيز البروتين (ملغم/غم) وزن طري		
	40/يوم	80/يوم	120/يوم
جذور	0.86	1.26	1.64
اوراق	0.84	1.20	1.35
سيقان	0.56	1.18	1.26
عقد	0.90	1.24	1.42

الشكل 7: المحتوى البروتيني لكالس القطع النباتية المختلفة لنبات شوك الجمل *Silybum marianum* النامي على اوساط MS المجهزة بـ 1.0 ملغم/لتر من BA و 2,4-D

شكر وتقدير

يتقدم الباحثان بالشكر والتقدير إلى قسم علوم الحياة وعمادة كلية العلوم، في جامعة الموصل، وإلى كل من ساهم في اتمام هذا البحث.

المصادر العربية

البكر، رحاب عبد الجبار حامد عبدالله (2011). تنمية واستحداث مزارع الكالس من البراعم لنبات البندق *Corylus avellana* L مع عزل مركب التاكسون. اطروحة دكتوراه، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

المصادر الاجنبية

- Abbasi, B.H.; Yucesan, B.; Saeed, S.; Rehman, K.; Khan, M.A. (2016). Evaluation of biochemical markers during somatic embryogenesis in *Silybum marianum* L. *SpringerLink.*, **6**(71),1-8.
- Arnon, D.I.; Hogland, D.R. (1944). The investigation of plant nutrition by artificial culture method. *Biol. Rev.* **19**, 55-67.
- Bahmani, M.; Shirzad, H.; Rafieian, S.; Rafieian-Kopaei, M. (2015). *Silybum marianum*: Beyond Hepatoprotection. *J. Evid. Complement. Alter. Med.*, **20**(4), 292-301.
- Bakheet, S.A. (2015). Effect of drought stress induced by mannitol and polyethylene glycol on growth and silymarin content of milk thistle callus cultures. *Plan Bioltech. Nat. Res. Giza, Egypt.*, **33**,12622.
- Bijak, M. (2017). Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.). Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules.*, **10**;22(11), 1-11.
- Chiavegatto, R.B.; Castro, A.H.F.; Pádua, M.S.; Aldes, E.; Techio, V.H. (2015). Cell viability, mitotic index and callus morphology of byrsonima verbascifolia (Malpighiaceae). *Tropical Plant Biol.*, **8**(1-2),1-50.
- Cimino, C.; Vairo, C.S.; Spina, F.; Natalucci, C.; Priolo, N. (2006). Callus culture for biomass production of milk thistle as a potential source of milk clotting peptidases. *Elec. J. Biotech.*, **9**(3), Special Issue, 2006.

- Cwalina-Ambroziak, B.; Wierzbowska, J.; Damszel, M.; Eresa Bowszys, T. (2012). The effect of mineral fertilization on achenes yield and fungal communities isolated from the stems of milk thistle *Silybum marianum* (L.) Gaertner. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*. **11**(4), 157 - 68.
- Danya, U.; Udhayasankar, M.R.; Arumugasmy, K.; Punitha, D. (2012). An efficient protocol devised for rapid callus induction from leaf explant of *Stephania wightii* (Arn) Dunn-an endemic medicinal plant. *Res. Plant Bio.*, **2**(5), 18-22.
- Eari, S.; Aghdasi, M.; Ahmadzadeh, E.; Mianabadi, M. (2017). Influence of Plant Growth Regulators on Callus Induction, Silymarin Production and Antioxidant Activity in Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) under Tissue Culture Medium. *J. Med. Plants By-Products.*, **1**, 59-69.
- Ekmekçi, B.A.; Karaman, M. (2012). Exogenous ascorbic acid increases resistance to salt of *Silybum marianum* (L.). *African J. Biotech.*, **11**(42), 9932-9940.
- Elhaak, M.; Zayed, M.; Mattar, M.; Gad, D.; Dietz, K. (2016). Optimization of *Silybum marianum* L. Callus production and magnifying callus silymarin accumulation. *IJAPBC.*, **5**(2), 2277 – 4688.
- Federico, A.; Dallio, M.; Loguercio, C. (2017). Silymarin/Silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. *Molecules*, **22**, 191; doi:10.3390. 1-16.
- Hamza, J.H. (2008). Quality of agriculture seed. Department of field crop sciences, Ph.D. thesis, College of Agriculture, University of Baghdad.
- Hartmann, H.T.; Kester, D.E.; Davies, F.T.; Geneve, R.L. (2002). "Plant Propagation Principles and Practices". Pearson Education, Upper Saddle River, New Jersey.
- Hasanloo, T.; Khavari-Nejad, R.A.; Majidi, E.; Shams Ardakani, M.R. (2008). Flavonolignan production in cell suspension culture of *Silybum marianum*. *Pharma. Biol.*, **46**(12), 876 – 82.
- Jabeen¹, Z.; Rahman¹, K.U.; Zia¹, M.A.; Jhan, N. (2019). Establishment of an efficient and reproducible in vitro protocol for callogenesis of *Silybum marianum*. *Int. J. Biosci.* **14**(1), 402-410.
- Jain, S.M.; Häggman, H. (2007). "Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits". Springer, USA, 559 p.
- John, A.S.; Koperuncholan, M. (2012). Direct root regeneration and indirect organogenesis in *Silybum marianum* and preliminary phytochemical, antibacterial studies of its callus. *Int. J. Pharma.*, **2**(2), 392-400.
- Khan, F.A.; Zahoor, M.; Ullah, N.4 Khan, S.; Khurram, M.; Khan, S.; Ali, J. (2014). A general introduction to medicinal plants and silybum marianam. *Life Sci. J.*, **11**(9), 471-481.
- Kropacopa, K.; Misuropa, E.; Hakoba, H. (1998). Protective and therapeutic effect of silymarin on the development of latent liver damage". *Radiats Piol. Radioecol.*, 411-415.
- Lowery, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- LV, Y.; Wang, R.; Lv, Y.; Yang, Z.; Wang, Y. (2017). In vitro propagation of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. and genetic fidelity assessment of micro propagated plants. *Pak. J. Bot.*, **49**(2), 673-680.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues culture. *Physiol. Plant*, **15**, 473-497.
- Nemati, Z.; Talebi, E.; Nasrollahi, N. I.; Khosravinezhad, M. (2017). Physicochemical properties of *Silybum marianum* seed oil in two different regions of Iran. *Int. J. New Technol. Research (IJNTR)*, **3**(2), 37-40.
- Neumann, K.H.; Kumar, A.; Imani, J. (2009). "Plant Cell and Tissue Culture-A Tool in Biotechnology. Basic and Application". Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Ozturk, B.; Kocaoglu, E.H.; Durak, Z.E. (2015). Effects of aqueous extract from *Silybum marianum* on adenosine deaminase activity in cancerous and noncancerous human gastric and colon tissues. *Pharma. Magazine.*, **11**, 143-146.
- Pourjabar, A.; Azim, M.R.; Mostafaie, A.; Kahrizi, D.; Cheghamirza, K. (2018). Proteome analysis of milk thistle (*Silybum marianum* L.) cell suspension cultures in response to methyl jasmonate and yeast extract electors. Budapest, Hungary, *Applied. Ecology. Environ. Res.* **17**(1), 547-560.
- Pourjabar, A.; Mohammadi, S.A.; Ghahramanzadeh, R.; Salimi, G. (2012). Effect of genotype, explant type and growth regulators on the accumulation of Flavonoides of *Silybum marianum* L. in In vitro Culture. World Academy of Science, Engineering and Technology, *Int. J. Biologic., Biomolec. Agric. Food Biotechnol. Eng.*, **6**(7), 514-516.
- Qaoud, H.; Alkoni, R. (1995). The effect of different seed treatments on seed germination of *Gundelia tournefortii* seeds. *An-Najah J. Res.*, **3**(9), 58-72.
- Qavami, N.; Naghdi Badi, H.; Labbafi, M.R.; Mehrafarin, A. (2013). A Review on pharmacological, cultivation and biotechnology aspects of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). *J. Med. Plants*, **12**(47), 19-36.
- Rabia, R.; Zertashia, R.; Bilal, H.A.; Chunzhao, L.; Mir-Ajab, K. (2015). *Silybum marianum*: adventitious roots induction along with free radical scavenging activity. *J. Plant Biol. Res.*, **4**(1), 12-21.
- Rabie, K.A.E.; Abed El-Aal, M.S.; Manaf, H.H., (2010). Enhanced silymarin accumulation as influence of medium composition in cell suspension cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *J. Plant Production, Cairo, Egypt.*, **1**(2), 319-332.
- Razdan, M.K. (2003). "Introduction to Plant Tissue Culture Second Edition, Science Publishers". Inc. Enfield (NH), USA., ISBN: US. p.330
- Rodriguez, J.P.; Norman, G.Q.; Ju, S.L.; Jeong, M.L.; Hyun, Y.K. (2018). Determination of silybin B in the of *Silybum marianum* using HPLC-UV. *Nat. Prod. Sci.*, **24**(2), 82.
- Sania, S. A. M.; Iram Liaqat, N. M. (2017). Evaluation of an important flavonoid silymarin in callus cultures of *Silybum marianum*. *Int. J. Biosci., (IJB)* **10**(6), 20-28.
- Santosh, K. (2004). Silymarin and skin cancer prevention: Anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects. *Int. J. Encol.*, **18**, 101-112.
- Smith, T.; Lynch, M.E.; Johnson, J.; Kawa, K.; Bauman, H.; Blumenthal, M. (2015). Herbal dietary supplement sales in US increase 6.8% in 2014. *Herbal Gram. American Biotechnol., Council.*, **107**, 52-59.
- Soto, C.; Perez, J.; Garcia, V.; Uría, E.; Vadiello, M.; Raya, L. (2010). Effect of silymarin on kidneys of rats suffering from alloxan-induced diabetes mellitus. *Phytomedic.*, **17**, 1090-1094.
- Street, H.E. (1977). "Plant Tissue and Cell Culture". University of California Press, Berkley, CA, USA.
- Towill, L. E.; Mazur, P. (1975). Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue culture. *Can. J. Bot.*, **35**, 1097-1102.
- Zahoor, M. (2014). A general introduction to medicinal plants and *Silybum marianum*. *Life Sci. J.*, **11**(9), 471-481.
- Zahra, N. (2017). A short review on ethnomedicinal uses and phytochemistry of *Silybum marianum*. *Nat. Product. Chem. Res. J.*, **5**(7), 1-3.
-

Initiation Callus Cultures from the Seedlings of *Silybum Marianum* and Estimate their Protein Content

Sabah A. Al-Badrani

Rehab A.H. Al-Bakr

Department of Biology/ College of Sciences / University of Mosul

ABSTRACT

The present research investigates the best Method for sterilization the *Silybum marianum* Plant seeds for getting best seedlings and the roles of plant growth regulators the (BA) Benzyl adenine and (2,4-D) 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid, as well the type of the explants of the seedlings to induce and grow callus. In addition, determined the callus viability and its protein content. The results showed the best treatment seeds is to soak them with water for (24) hours and then with Ethanol 70% for (3) minutes, immerse them with Sodium hypochlorite) NaOCl) 2.5% for (10) minutes, and with 0.1% Tween 20 for (10) minutes. The explants of seedlings (roots, leaves, shoots, nodes) have been cultured on solid MS medium contain different concentrations (0.1,0.5,1.0,1.0) mg/L of BA and (0.25,0.5,0.5,1.0) mg/ L of 2,4-D. The medium which supplemented with (1) mg/l of (BA) and (2,4-D) had succeeded to induction of calls growth, which produce (2.4,3.1,4.1) gm. fresh weight respectively. The results showed that roots and nodes have more response than others to initiate and induce callus. The viability of callus showed a noticeable increase in age (80) day to reach (87%) for roots, leaves, and nodes callus. The callus of roots showed best increase in viability which reaches (95%) in (120) day. The results explained variation in protein level in callus culture with different in callus source and age, it reaches the highest level in nodes callus, and in (80, 120) days was the highest level of protein where in roots callus.

Keywords: *Silybum marianum*, Callus induction, Plant growth regulators, Seeds sterilization, Protein.