Effect of Amino Acids Type and Concentration on Callus Induction from Mature Bean *Phaseolus vulgaris* L. Embryos

تأثير نوع وتركيز الاحماض الامينية على استحثاث الكالس من اجنة الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* الناضجة

ستار عبد الله شلاهي* و زهرة نوري الحطاب**
* مركز بحوث التقنيات الاحيائية، جامعة النهرين، بغداد، العراق.
Sattarbio@yahoo.com
** وزارة العلوم و التكنولوجيا، قسم الهندسة الوراثية، بغداد، العراق.

المستخلص

تم تنفيذ البحث بهدف دراسة تأثير تراكيز بعض الاحماض الامينية على استحثاث الكالس من اجزاء الجنين الناضج للفاصوليا صنف (Harvester). استحث الكالس على الوسط الغذائي MS بوجود 0.5 ملغم.لتر-1 من البنزيل ادينين (BA) ، و 1 ملغم . لتر-1 من الاندول حمض الخليك (IAA) و توليفات وتراكيز مختلفة من الكلايسين، الاسبراجين، التايروسين، متحلل الكيزين والمايو اينوسيتول كما مبين في المتن. أظهرت النتائج استجابة جميع الأجزاء الجنينية لنبات الفاصوليا المزروعة على وسط السيطرة الحاوي على (100 ملغم . لتر-1 من كل من متحلل الكيزين، الكلايسين، الاسبراجين، التايروسين والاينوسيتول) و بنسب مختلفة. فقد تفوقت السويقة الجنينية على كلٍ من الجذير والرويشة معنويا ، وبنسبة استحثاث بلغت 95.6 % مقارنة ب 76.7 % ، و 36.6 % لكل من الجذير والرويشة على التوالي.

كما أظهرت النتائج ان اعلى معدل وزن طري كان للكالس المستحث على الوسط الغذائي 4X (الحاوي على 400 ملغم . لتر-1 من كل من متحلل الكيزين، الكلايسين، الاسبراجين، التايروسين والاينوسيتول). اما الوسط الغذائي المزود ب 400 ملغم . لتر-1 متحلل الكيزين و 100 ملغم . لتر-1 الاينوسيتول فقد اعطى اقل معدل الوزن الطري مقارنة بالاوساط الاخرى و اختلف بذلك معنويا حتى عن وسط السيطرة. اما اقل معدل وزن جاف فقد كان للكالس المستحث على الوسط الغذائي الحاوي على 400 ملغم . لتر-1 من الاينوسيتول مع ثبات جميع مكونات وسط السيطرة الأخرى.

يستنتج من البحث ان افضل جزء نباتي لاستحثاث الكالس من بذور الفاصوليا تحت ظروف التجربة الحالية هو السويقة الجنينية. كما بينت الدراسة اهمية اضافة الكلايسين، الاسبراجين، التيروسين، الاينوسيتول و متحلل الكيزين بتركيز 400 ملغم . لتر-1 الى وسط استحثاث الكالس لزيادة كمية الكالس المنتج في وحدة الزمن.

الكلمات الدالة: **متحلل الكيزين، الكلايسين، الاسبراجين، التايروسين ،الاينوسيتول**

Abstract

This research was conducted to study the effect of some amino acids and their concentrations on callus induction from mature bean CV. Harvester embryos. Calli were induced on MS media supplemented with 0.5 mg /L BA, 1 mg/L IAA and different combination and concentrations of casein hydrolysate, glycine, asparagine, tyrosine and myo inositol as described in the text. All the embryo parts induced calli on the control medium which contained 100 mg/l of each of casein hydrolysate, glycine, asparagine, tyrosine, and myo- inositol, with different percentage. The hypocotyl apex gave significantly high percentage (95.6%) of callus induction compared with the radicle (76.7%) and the shoot apex (36.6%).

The results showed that the highest average fresh weight of callus was obtained when 400 mg of each of casein hydrolysate, glycine, asparagine, tyrosine, and myo-inositol have been added to the callus induction medium. Medium supplemented with 400 mg/L casein hydrolysate, and 100 mg/L myo- inositol only gave the lowest average fresh weight of callus, which was significantly less than that of the control. The lowest average callus dry weight was obtained in the presence of 400 mg/L of myo- inositol and 100 mg/L of the others.

In conclusion the hypocotyl apex is the recommended explant for callus induction from bean. Moreover, the addition of 400 mg/L of casein hydrolysate glycine, asparagine, tyrosine, and myo- inositol was important to increase callus induction per time unit.

Index: hypocotyl apex, casein hydrolysate, glycine, asparagine, tyrosine, myo inositol, radicle**,** shoot apex**.**

المقدمة

تمكن الباحثون من النجاح في استحثاث الكالس من اغلب الأجزاء لنبات الفاصوليا باستخدام اوساط غذائية مزودة بهرمونات مختلفة [1، 2، 3]. و قد تباين الكالس المستحث من تلك الاوساط من حيث النوعية و الكمية. و قد وجد ان اضافة الاحماض الامينية الى الاوساط الغذائية المستخدمة لاستحثاث الكالس دور في نمو الانسجة من خلال تأثيرها على عمليات البناء و الفعاليات الانزيمية المختلفة التي تحدث داخل الخلايا [4]. فهي تستخدم لاستحداث استجابات فسيولوجية معينة كاضافة التيروسين الذي يساعد في انشاء البراعم الخضرية [5] و الارجنين الذي يحفز التجذير و السيرين الذي يستخدم في مزارع المايكروسبور للحصول على اجنة احادية. كما ان الاميدات – الكلوتامين و الاسباراجين- تزيد معنويا من تكون الاجنة الجسمية [6]. كما استخدمت طه[3] متحلل الكيزين مع بعض الاحماض الامينية لتحسين نوع الكالس المستحث من الفاصوليا و اطالت مدة ادامته على الوسط الغذائي.

لذا يهدف البحث الحالي الى دراسة تأثير تركيز بعض الاحماض الامينية و متحلل الكيزين على استحثاث الكالس من اجزاء الجنين المختلفة من نبات الفاصوليا باستخدام افضل وسط غذائي و توليفة هرمونات من الادبيات العلمية لتحسين الكالس نوعاً و كماً.

المواد و طرائق العمل

استخدم نبات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* صنف (Harvester) احد الاصناف المعتمد زراعته في العراق والمنتج من قبل شركة Pop Dvrien Seeds الهولندية والمستورد من قبل القطاع الخاص، حسب الخطوات الاتية :

1- طريقة التعقيم

عقمت البذور الناضجة الجافة بغسلها اولا بمسحوق الغسيل المحلي والماء و بعد ذلك غمرت بالكحول الاثيلي (70 % حجم . حجم - 1) لمدة دقيقة واحدة تحت ظروف غرفة العزل مع التحريك المستمر، ثم استُبدل الكحول بمحلول القاصر المحلي الحاوي(5-6%) هايبوكلورات الصوديوم وبنسبة 30%(حجم . حجم - 1) ، و المضاف اليه2 -3 قطرات من المادة الناشرة Tween 20 لمدة نصف ساعة مع مراعاة التحريك بين حينٍ وآخر . بعدها تم غسل البذور بماءٍ مقطر معقم ثلاث مرات باستبدال الماء المقطر كل 5 دقائق واخيراً تركت البذور في الماء المقطر لمدة 24 ساعة. تم اعادة عملية التعقيم السالفة الذكر في اليوم التالي بجميع خطواتها بأستثناء عملية استخدام محلول القاصر ـ حيث تكون فترة التعقيم به 20 دقيقة بدل من نصف ساعة [3].

2- الوسط الغذائي المستخدم

تم استخدام الوسط الغذائي المقترح من قبل[3] والذي اطلق عليه اسم السيطرة x والذي يتكون من وسط MS [7] المحورعن [8] المضاف اليه (30) غرام.لتر-^{1}سكروز، 100ملغم من كل من مايوانيوسيتول والكلايسين والتايروسين و الاسبرجين ومتحلل الكيزين (Casien Hydrolysate)، و0.5 ملغم.لتر- ^{1} من البنزيل ادينين (BA) ، و 1 ملغم . لتر- ^{1} من الاندول حمض الخليك (IAA) ، 0.6 % آجار . كما استخدمت مع المكونات الرئيسية لوسط السيطرة توليفات مختلفة من بعض الاحماض الامينية و متحلل الكيزين وفيتامين مايو اينوسيتول كما مبين في الجدول(1). تم تعديل الرقم الهيدروجيني الى 5.8 باستخدام (1N HClاو 1N NaOH) وعقم الوسط بجهاز المؤصدة، ثم قسم في اطباق بلاستيكية تحت ظروف معقمة و بواقع 25 مللتر لكل طبق.

3- طريقة الزراعة

تم ازالة غلاف البذور المعقمة واستئصال الجنين وتقسيمه الى ثلاثة اجزاء لغرض زراعتها على الوسط الغذائي المعد في اطباق بتري حسب المعاملة ثم حضنت الاطباق المزروعة في الظلام لحين استحثاث الكالس وبدرجة حرارة (23±2 مْ) .لقد تم نقل الكالس المستحث الى اوساط غذائية جديدة لها نفس محتوى الوسط الغذائي الاول المستخدم لاستحثاث الكالس. وكررت هذه العملية فيما بعد كل 3 – 4 اسابيع في غرفة العزل. وضعت الزروعات المعاد زراعتها في غرفة الحضن وبدرجة حرارة (23±2 مْ) وبتعاقب ضوئي 16 ساعة يومياً و شدة اضاءة 1000 لوكس.

4- طريقة الوزن و التجفيف

وزنت الاطباق بعد الزراعة مباشرة ومن ثم بعد شهر من الزراعة وسجل الفرق بين الوزنين ليتعين الوزن الطري ، اما بالنسبة للوزن الجاف فوضعت قطع الكالس على ورق الترشيح في الفرن للتخلص من الماء تحت درجة حرارة (70-75 مْ) ولمدة 48 ساعة [9] ثم تركت النماذج لتصل الى درجة حرارة الغرفة واخذت اوزانها.

حللت بيانات التجربة باستخدام تصميم تام التعشية (CRD (Completely Randomized Design وقورنت المتوسطات حسب اختبار L.S.D وعلى مستوى احتمال 5 % [10]

النتائج و المناقشة

استجابة الاجزاء الجنينية لمكونات الوسط الغذائي و استحثاث الكالس

أظهرت النتائج استجابة جميع الأجزاء الجنينية لنبات الفاصوليا المزروعة على وسط السيطرة (Control) المقترح من قبل [3]، وذلك بزيادة حجمها بعد فترة مراقبة استغرقت 3 - 5ايام. ثم ازداد نشاط خلايا هذه الاجزاء الجنينية فيما بعد بزيادة انقساماتها المتكررة مستحثاً بذلك الكالس وكما هو مبين في الشكلين (1) و (2). الا ان معدلات النسب المئوية للاستحثاث من تلك الاجزاء اختلفت ، فقد تفوقت السويقة الجنينية على كل من الجذير و الرويشة و بشكل معنوي ، و بنسبة استجابة بلغت 95.6 % في حين كانت نسب استجابة كلٌ من الجذير والرويشة هي 76.7 % ، و 36.6 % على التوالي. وبهذا تتفق هذه النتائج مع ما حصل عليه [3,11] . كما يبين الشكل (2) اختلاف الوان الكالس الحبيبي النسجة، فقد تميز الكالس المستحث من السويقة الجنينية باللون الكريمي الشاحب في حين كان لون الكالس المستحث من الجذير بني ومن الرويشة مائل للخُضرة. ان هذا الاختلاف يرجع الى احتواء خلايا الكالس على البلاستيدات الخضراء في الحالة الاخيرة في حين تمتلك خلايا الحالتين الأوليين على بلاستيدات عديمة اللون ، وعليه تتفق هذه النتائج مع ما حصلت عليه [3].

ان سلوك الاجزاء الجنينية المزروعة خارج الجسم الحي (*In vitro*) يختلف عما هو عليه وهي متصلة بالبذرة الام (*In vivo*) ، حيث تعمل بعد فصلها عن بعضها بشكلٍ مستقل وعليه يكون التأثير في استجابة هذه الأجزاء ابتداءاً هو لتركيز منظمات النمو والتراكيز العالية من الاحماض الامينية و متحلل الكيزين (Casein Hydrolysate) [12]. كما ان اجزاء جنين الفاصوليا تكون غنية بعناصر النمو الكبرى كالـ Ca ،NH_4 ، K ، P ، Mg [13] و المتحصلة من امتصاص السويداء السائلة جزئياً خلال أطوار التشكل (Development Phase) [14] وبهذا سوف تعمل التراكيز المثلى من الـ IAA و BA على أطلاق خلايا الاجزاء الجنينية المحتجزة في طور الـ G_1 phase من دورة حياة الخلية (Cell Cycl) بواسطة (ABA) Abscic acid [15] و تحفيز الانقسام الميتوزي في الأجزاء الجنينية [16] من خلال توجيه التعبير الجيني [17] لانتاج الأنزيمات المحللة للبروتين وتنشيطها وذلك لتكسير ببتيدات متحلل الكيزين الى ببتيدات اصغر واستغلالها في بناء بروتينات أخرى ضرورية لعملية الانقسام [18]. اما بالنسبة إلى تفوق السويقة الجنينية فان ذلك يعود إلى إمكانية خلاياها على الانقسام السريع وآلية امتصاص العناصر الغذائية عن طريق الحزم الوعائية التي كانت مصدراً لاتصاله بالفلق بالإضافة الى جفاف الأجزاء الأخرى عند اجراء عملية الاستئصال وخصوصاً الرويشة فإنها حساسة للجفاف جداً [19].

تاثير التراكيز المختلفة من بعض الاحماض الامينية ومتحلل الكيزين و الاينوسيتول في الوزن الطري والجاف للكالس المستحث

أظهرت النتائج تفوق معدل الوزن الطري للكالس المستحث في الوسط تحوير 2 (4x) معنوياً على جميع معدلات الوزن الطري للكالس المستحث في الأوساط الأخرى. و كان اقل معدل للوزن الطري هو للكالس المستحث في وسط التحوير 4 الذي بلغ 75 ملغرام و كان بدوره اقل من معدل الوزن الطري للكالس المستحث على وسط السيطرة (x) البالغ 117 ملغرام. اما الوزن الجاف، فقد تفوق معدله في وسط التحوير 6 معنوياً على جميع المعدلات لبقية الأوزان الجافة للكالس المستحث على الأوساط الأخرى حيث بلغ 25.4 ملغرام. في حين كان اقل معدل وزن جاف هو للكالس المستحث على وسط التحوير 3 الحاوي أربعة أضعاف تركيز فيتامين الميو اينوسيتول فقط مع ثبات جميع مكونات وسط السيطرة الأخرى الذي بلغ 9.2 ملغرام، و كان اقل حتى من معدل الوزن الجاف للكالس المستحث على وسط السيطرة البالغ 14 ملغرام كما هو مبين في الجدول (2)، و قد تحفز لاعطاء جذوراً عرضية (Adventitious roots) كما هو مبين في الشكل (2) .

من هذه النتائج يتبين ان لمضاعفة تركيز الأحماض الأمينية ومتحلل الكيزين (Casein Hydrolysate) دور في زيادة الوزن الطري والجاف وخصوصاً عندما يضاعف تركيز الاينوسيتول معها حيث يعتبر الأخير محفز جيد لكلٍ من النمو من ناحية [7 ، 6]، و أيض الكربوهيدرات وبناء الأغشية ، وتكوين جدار الخلية (Cell Wall) من ناحيةٍ أخرى [20 ، 21 ، 6].

أما بخصوص اختلاف معدلات الوزن الطري و الجاف للكالس وخصوصاً عن معدل وزن الكالس المستحث على وسط السيطرة قد تعود للأسباب الاتية :

الأول : هو العجز في محتوى الاوساط الغذائية من تركيز بعض الأحماض الأمينية على سبيل المثال الحمض الاميني الكلايسين الذي تكون نسبته قليلة في متحلل الكيزين [22] بالكمية المضافة إلى الأوساط التي اعطت كالس بمعدل وزن طري أو جاف منخفض.

الثاني : اختلاف نسبة الكاربون إلى النتروجين (C:N ratio) في الأوساط الغذائية أدى إلى اختلاف النتائج حيث كلما كانت النسبة متوازنة كلما انعكس ذلك ايجابياً على الوزن الطري او الجاف على حدٍ سواء .

الثالث : ارتفاع الضغط الازموزي لبعض الأوساط ذات التركيز المرتفع من السكروز و متحلل الكيزين مما يؤدي إلى انخفاض الوزن الطري للكالس [19،23].

الرابع : يعمل السكروز و متحلل الكيزين كبديل عن فيتامين الاينوسيتول حيث يمكن تعويض انخفاض تركيز الاينوسيتول عند توفر تركيز مرتفع من السكروز و متحلل الكيزين [20، 21،24].

مقارنة استجابة الأجزاء الجنينية إلى مكونات وسطي [السيطرة x و الـ تحوير 2 (4x)

لقد تم اختيار مكونات وسط التحوير 2 (4x) من بين الأوساط المختلفة المذكورة في الجدول (1) لتكون معاملة مفردة ومستقلة لمقارنتها مع مكونات وسط السيطرة من حيث استجابة الأجزاء الجنينية لاستحثاث الكالس.

لقد أظهرت المقارنة ان سلوك الأجزاء الجنينية المختلفة المزروعة على الوسط 4x لم يختلف عن تلك المزروعة في وسط السيطرة في بادئ الأمر إلا إنها اتجهت فيما بعد إلى الازدياد بالطول ولجميع الأجزاء الجنينية المختلفة وحتى طولٍ بلغ 2 ملم في السيطرة و 4 ملم في تحوير 2 ثم شرعت بعد ذلك باستحثاث نسيج الكالس. وقد تفوق الوسط 4x على وسط السيطرة (x) معنوياً في إعطاء نسبة استحثاث اكبر لنسيج الكالس من الأجزاء الجنينية المختلفة.

أما على مستوى الجزء الجنيني فقد تفوقت السويقة الجنينية معنوياً في إعطاء معدل استحثاث للكالس على الاجزاء الأخرى (الجذير والرويشة). كذلك تفوق كل من الجذير والرويشة معنوياً في استحثاث الكالس عند زراعتهما على الوسط 4x مقارنة مع استحثاث الكالس من نفس الجزئين عند زراعتهما على وسط السيطرة (x) اذ بلغت نسبة الاستحثاث من الجذير 99 % بعد ان كانت 76.7 % ، في حين أصبحت 62.5 % في الكالس المستحث من الرويشة بعد إن كانت 36.6 % وكما هو مبين في الشكل (3). أما من ناحية حجم ولون الكالس فقد تميز الكالس المستحث من السويقة الجنينية بكبر حجمه مقارنة بالجزأين الآخرين ، كذلك يوجد اختلاف في الألوان وحسب الجزء الجنيني المستخدم وكما هو ظاهر في الشكل (4).

يتبين من النتائج أعلاه الفرق الشاسع بين استجابة الأجزاء لمكونات الوسطين ، وهذا قد يعود إلى الضغط الازموزي المرتفع للوسط 4x عن الضغط الازموزي لوسط السيطرة بسبب احتواء الأول على تركيز عالي من متحلل الكيزين والأحماض الأمينية الأخرى [19 ، 23، 25].

أما بشأن التفاوت بين الأجزاء الجنينية في استحثاث الكالس على نفس الوسط ـ 4x ـ وخصوصاً الرويشة فأنها تكون حساسة للجفاف عند إجراء عملية الاستئصال نظراً لرقتها وصغر حجمها. كذلك حجم القطعة المستخدمة والظروف المتبعة في الزراعة جميعها تؤثر في استحثاث الكالس (callus) المتكون [19، 26 ، 27].

يستنتج من الدراسة الحالية اهمية اضافة الاحماض الامينية (الكلايسين، الاسبراجين، التيروسين، الاينوسيتول) و متحلل الكيزين بتركيز 400 ملغم . لتر- 1 الى وسط استحثاث الكالس من الاجزاء المختلفة للاجنة الناضجة لنبات الفاصوليا فقد ادت تلك الاضافة الى زيادة كمية الكالس المنتج من تلك الاجزاء في وحدة الزمن مقارنة بمعاملة السيطرة وبينت الدراسة ان افضل جزء نباتي لاستحثاث الكالس تحت ظروف التجربة هو السويقة الجنينية الوسطى.

المصادر :

1. Mohamed, F.M.;Dermot ,P.; Coyne ,Pand Read ,E.(1993). Shoot organogesis in callus induced from pedicel explant of common bean (*Phaseolus vulgaris*).J. Ameri.Soc. Hort. Sci.118 (1):158-162.
2. Zambre,M.A.; Declercq, J.; Vranov, E. and dillen, W.(1998). Plant cell Report.17:626-630.
3. طه ، آلاء جبار.(2002). استخدام اشعة كاما (كوبالت 60) وزراعة الانسجة في استحداث تغايرات وراثية في نبات وانسجة كالس الفاصوليا ***Phaseolus vulgaris* L.** . اطروحة دكتوراه .كلية العلوم - الجامعة المستنصرية - العراق.ع ص:223.
4. محمد، عبد العظيم كاظم ويونس، مؤيد أحمد. 1991. اساسيات فسيولوجيا النبات، الجزء الثالث، كلية الزراعة، جامعة بغداد- العراق.ع ص:
5. Skoog, F. and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-130.
6. Smith, R. H. (2000). Plant tissue culture techniques and experiments, 2d Ed.
7. Murashige, T.and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue-Physiol. Plant.15: 473-497.
8. Green C. E. and Philips, R. S. (1975). Plant regeneration from tissue culture of miaze. Crop. Sci., 15: 417 – 421.
9. الصحاف، فاضل حسين.(1989).تغذية النبات التطبيقي، وزارة التعليم العالي و البحث العلمي. كلية الزراعة-جامعة بغداد- العراق.ع ص:260.
10. الساهوكي، مدحت و وهيب، كريمة احمد. (1990) تطبيقات في تصميم و تحليل التجارب، وزارة التعليم العالي و البحث العلمي – العراق.ع ص:488
11. Mohamed, F.M.;Paul ,D.;Reod ,E.and Coyne ,P.(1992). Plant regeneration from in vitroculture of embryonic axis explant in common and tepary bean. J.Amer. Soc. Hort. Sci.117 (2):331-336
12. Yamaguchi, T .; Wakizuka, T .; Okui .K and Ohata, E . (1982). Promotion of germination in agedriee and bean seeds *in vitro*. In plant tissue and cell culture, pp. 785- 786.
13. Smith, J. G. (1973). Embryo development in *Phaseolus vulgaris*, Plant Physiol., 51 : 454 -458.
14. Lepold ,A. C. and Kriedemann M. J.(1975).Plant growth and development.2d ed New York: McGraw-Hill.
15. Yeung, E. C. (1982). Abscises and precious germination of bean embryonic auxis. Plant Tissue and Cell Culture, 209 – 210.
16. Jeffs, R.A. and Northcote, D.H. (1967). The influence of indd. 3yt acetic acid and sugar on the pattern of induced differentiation in plant tissue culture, J. cell. Sci., 2: 77-88.
17. Galston, A. W and Davies, P. J. (1969). Hormonal regulation in higher Plants. Science, Vol, 163:1288-1297.
18. Yomo, H. and Taylor, M. P. (1973). Histochemical studies on protease formation in the cotyledons of germinating bean seeds. Planta., 112:35-43.
19. Carman,J.G.(1994).Nutrient absorption and the development and genetic stability of cultured meristems. In VII International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Florence, Italy.
20. Tanner, W. (1969). Function of myoinesitol glycosides in yeasts and higher plants. Ann N. Y. Acad. Aci, 165: 726 – 742.
21. Arora, S.K. (1983). Chemistry and Biochemistry of Legumes first published in the United Kingdom. by Edward Arnold (publisher) limited.pp:358.
22. الشبيبي، محسن وعلي،عامر محمد وطعمة، صادق جواد والعمر، محمود العيد.(1986). كيمياء الالبان. وزارة التعليم العالي و البحث العلمي . كلية الزراعة- جامعة بغداد - العراق.ع ص:606.

23. Raghavan, V. (1966). Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. Biol. Rev; 41:1 – 58.
24. Bolwell, G. P. and Northcote, D. H. (1981). Control of hemicelluose and pectin synthesis during differentation of vascular tissue in bean (*Phaseolus vulgaris*) callus and in hypocoty, Planta., 152: 225 – 233.
25. Ziebur, N. K.; Brink.;G .R.A.;Lloyd,H.and Stahman, M. A. (1950).The effect of casein hydrolysate on the growth *in vitro* of immature hordeum embryos.Amer. J. Bot., 144-148.
26. Street, H.E. (1978). Plant Tissue and Cell culture. Black well scientific publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne.
27. Staba, E.J. (1982).Plant tissue culture as a source of biochemical CRC-press. Inc, Florida.

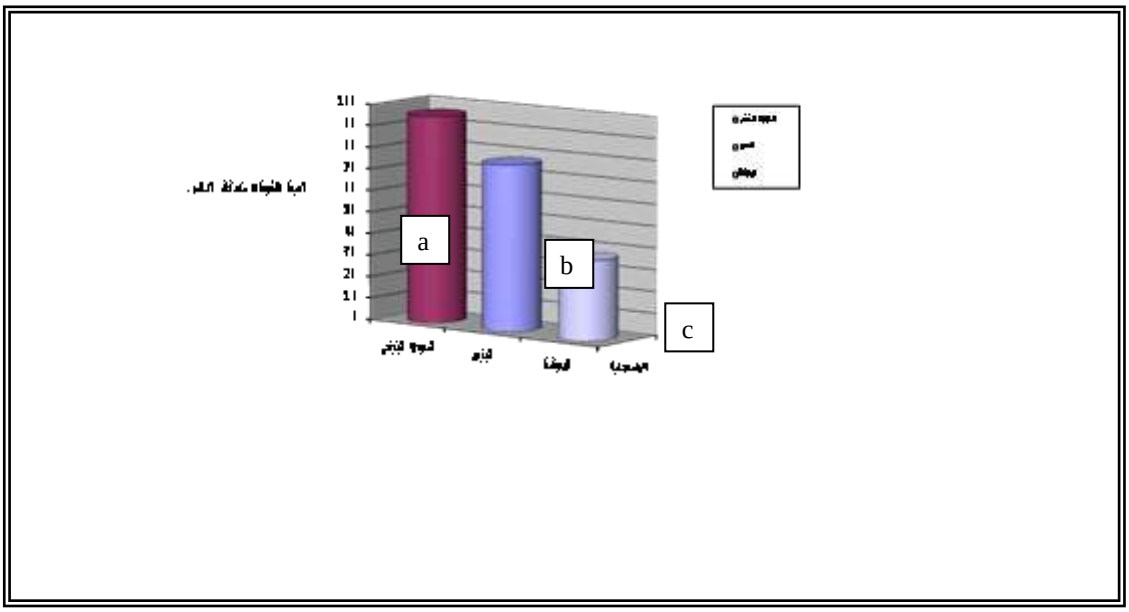
الجدول(1) التحويرات المجرات على محتوى وسط السيطرة (x) بـ [ملغم . لتر- ^{1}]

المواد المضافة / اسم الوسط	متحلل الكيزين	حمض الكلايسين	حمض الاسبراجين	حمض التايروسين	فيتامين الاينوسيتول	السكروز غرام . لتر- ^{1}
وسط السيطرة (x)	100	100	100	100	100	30
تحوير 1 (2x)	200	200	200	200	200	30
تحوير 2 (4x)	400	400	400	400	400	30
تحوير 3	100	100	100	100	400	30
تحوير 4	400	0.0	0.0	0.0	100	60
تحوير 5	800	0.0	0.0	0.0	200	60
تحوير 6	1600	0.0	0.0	0.0	400	60

الجدول (2) معدل الوزن الطري و الجاف للكالس حسب نوع الوسط المستخدم بالـ [ملغرام]

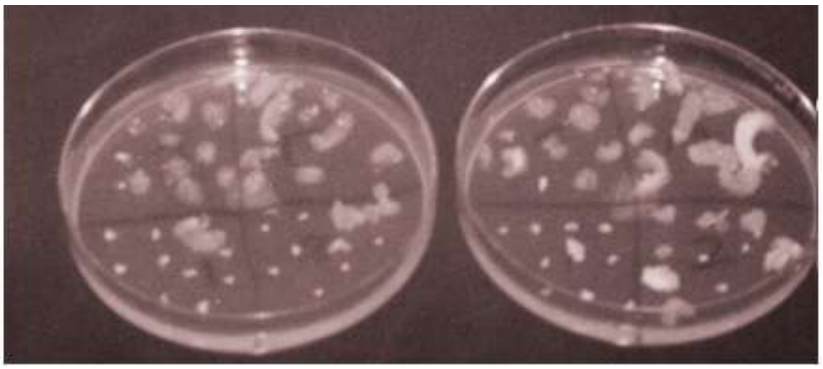
الوسط	الوزن (ملغم)	
	الوزن الطري	الوزن الجاف
السيطرة	117e*	14 e
تحوير 1	172.3 c	19 c
تحوير 2	226.5 a	22 b
تحوير 3	79 f	9.2 g
تحوير 4	75 f	11 f
تحوير 5	136.5 d	18.1 d
تحوير 6	184.5 b	25.4 a
LSD	5.83	0.85

* المعدلات التي تحمل احرف متشابهة لاتختلف عن بعضها معنوياً و حسب اختبار LSD وعلى مستوى احتمال 0.05.

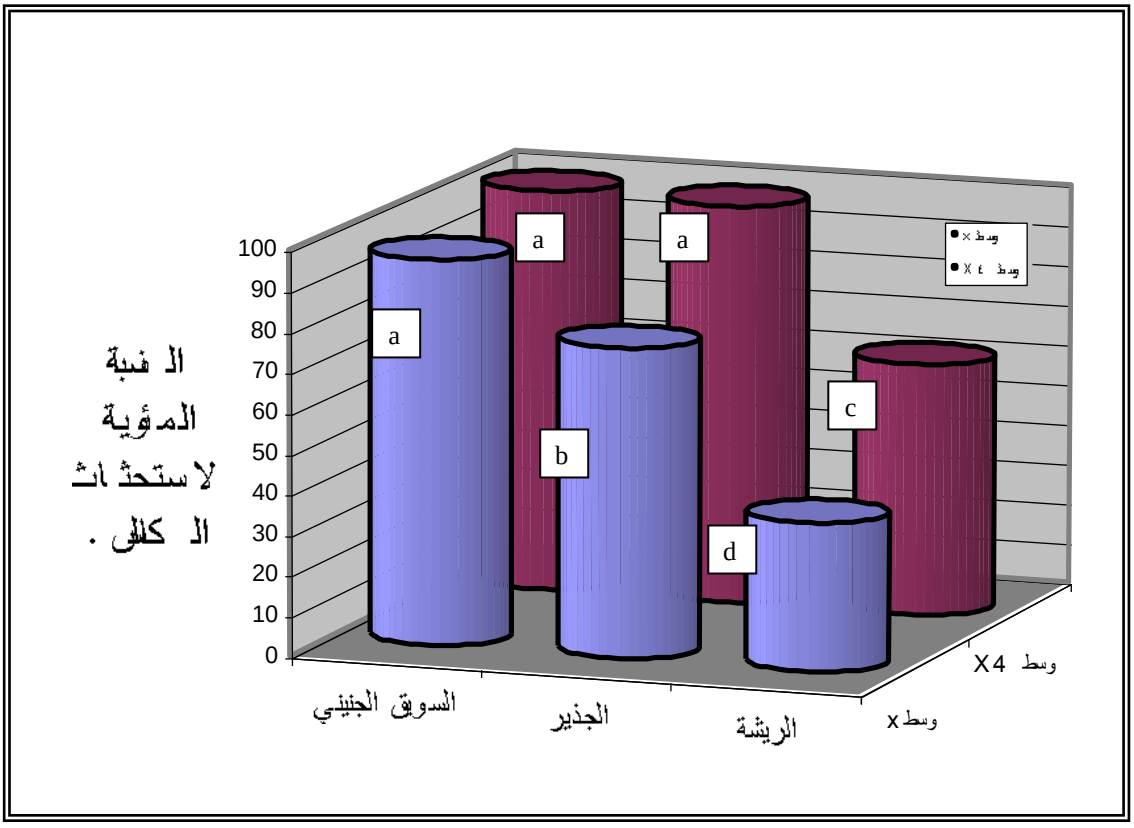


*المعدلات التي تحمل أحرف متشابهة لا تختلف معنوياً عن بعضها حسب اختبار **LSD** وعلى مستوى احتمال 0.05 %.

الشكل (1)النسبة المئوية لاستحثاث الكالس من الأجزاء الجنينية للفاصوليا على وسط السيطرة

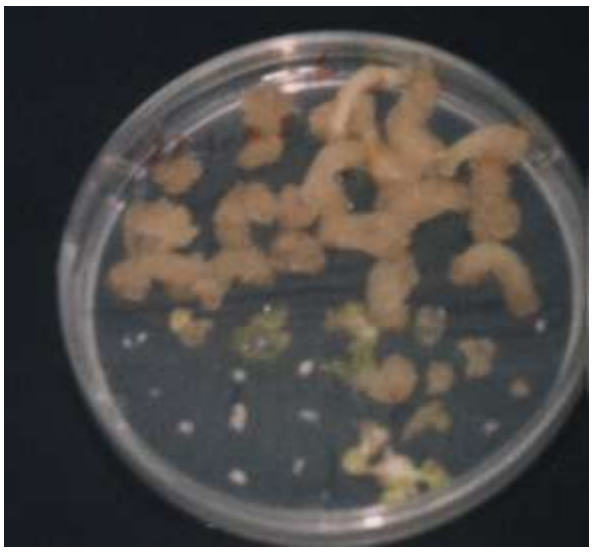


الشكل(2) استجابة الأجزاء الجنينية لاستحثاث الكالس على وسط السيطرة (Control) .



*الاحرف التي تحمل احرف متشابهة لاتختلف معنوياً حسب اختبار LSD وعلى مستوى احتمال 0.05 %.

الشكل (3) النسب المئوية لاستحثاث الكالس من الاجزاء الجنينية على وسطي السيطرة و الوسط 4x



الشكل (4) تأثير مكونات الوسط 4x في استجابة الاجزاء الجنينية المختلفة.