دراسة تأثير بعض منظمات النمو في مرحلتي الإكثار والتجذير لنبات الخرنوب *Ceratonia siliqua L.* في الزجاج

لينا السيد[1] و سليم زيد[2] و منى الصباغ[3]

تاريخ الإيداع 2012/10/25

قبل للنشر في 2013/03/04

الملخص

أجري هذا البحث على نبات الخرنوب *Ceratonia siliquaL.* المكاثر مخبرياً بهدف دراسة تأثير بعض منظمات النمو في مرحلتي الإكثار والتجذير، ومن ثم تحديد التراكيز الفُضلى منها التي تؤدي إلى أعلى معدل إكثار (من حيث عدد النموات المتشكلة وطولها)، وأفضل تجذير (من حيث نسبة التجذير وعدد الجذور وطولها). سجلت النتائج مخبرياً على وسط الإكثار (بفاصل زمني 15 يوماً بين كل نقلة وأخرى) وقد أوضحت النتائج تشكل أكبر عدد للنموات 3.3 عند إضافة 3.11µm من السيتوكينين BAP و1µm من الأكسين IBA، في حين لوحظ أكبر طول للنموات 3.4 سم في المعاملة MS1 عند إضافة 2.2µm BAP +1µm IBA.

أمّا في مرحلة التجذير فقط لوحظ أفضل تجذير (من حيث عدد الجذور 3 جذور، وطول الجذور 2.7 سم، ونسبة تجذير 90%) في المعاملة R1 التي تحتوي MS + 4.9µm IBA، إذْ بلغت الأقلمة نسبة مرتفعة وصلت إلى 95%.

الكلمات المفتاحية: في الزجاج، الإكثار الخضري الدقيق، منظمات النمو، الخرنوب، الأوكسينات، السيتوكينينات.

[1] طالبة ماجستير، [2] أستاذ مشرف، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

[3] أستاذ مشرف مشارك، قسم التقانات الحيوية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دوما، ص.ب.113، دمشق،سورية.

Study the effects of some plant growth regulators on multiplication and rooting in vitro of (*Ceartonia siliqua* L.)

L. Alsaid[(1)], S. Zaid[(2)] and M. Alsabagh[(3)]

Received 25/10/2012
Accepted 04/03/2013

ABSTRACT

This research was conducated on *Ceratonia siliqua* L. *in vitro* to study the effect of some growth regulators in both multiplication and rooting stage. And determine the best concentrations wich lead the highest rate of multiplication (interms of number of shoots and length), and the best rooting (interms of percentage of rooting, number of roots and length). Results were calculated *in vitro* on multiplication media (interval 15 days between each shift and others). Results showed that the highest number of growth was 3.4 when (3.11µM BAP + 1µM IBA) are added, while the highest of the growth was 3.3cm in treatment MS1 after adding (2.2µM BAP + 1µM IBA).

The rooting observed was (3 roots, 2.7cm length and 90% in percentage of rooting) in R1(MS+ 4.9µM IBA), and acclimatization was 95%.

Key word: *In vitro,* Micropropagation, Growth regulators, *Ceratonia siliqua* L.

[(1)]MSC., Student,[(2)] Superviser, Department of Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.
[(3)]Associated Superviser, Department of Biotechnology GCSAR, Douma. P.O.Box 113, Damascus, Syria.

مقدمة

ينتمي الخرنوب إلى الفصيلة السيزالبينية *Cesalpinaceae*، جنس *Ceratonia*، نوع *Ceratonia siliqua*. L.

الخرنوب نبات شجري يصل ارتفاعه إلى 10-20م، أشجار الخرنوب دائمة الخضرة وحيدة الجنس ثنائية المسكن أزهارها عنقودية ذات لون أرجواني. أوراقها مركبة جلدية ريشية متبادلة (الأسو، 2008).

تنتشر أشجار الخرنوب في سورية بدءاً من مستوى سطح البحر وحتى ارتفاع 300م في المنطقة الساحلية على السفح الغربي لسلسلة الجبال الساحلية، وتوجد في الطابق البيومناخي شبه الرطب الحار نظراً إلى حساسيته العالية للبرودة (نحال، رحمة، شلبي، 1989).

يوجد بشكل أفراد قليلة على السفوح الشرقية لسلسة الجبال الساحلية المتاخمة لسهل الغاب، وكذلك على الطريق الواصلة بين مصياف ووادي العيون والدريكيش.

يؤدي الخرنوب دوراً مهماً في عمليات التحريج الاصطناعي، ولا سيما الغابات الجفافية الصنوبرية، كما أنه متحمل جيد للحرائق لذا ينصح باستعماله داخل الغابات الصنوبرية (Rhizopoulou and Davies, 1991;Izhaki *et al*.,1995).

يتمتع الخرنوب بقيمة غذائية وطبية عالية إذْ تحوي الثمار على 0.91% من وزنه الجاف بروتينات وألياف و0.88% كربوهيدرات و0.91% فركتوزاً وسكروزاً، كما يحوي القلف على زيوت دهنية وتانينين، أمَّا القرون الجافة فتحتوي على 50% سكراً، وتملك البذور المطحونة قيمة غذائية كبيرة لاحتوائها على 40% سكر قصب، 7% دهناً و10% بروتيناً.

يحوي غرام واحد من الخرنوب ثلاثة أضعاف الكالسيوم الموجود في اللبن، كما أنه يحتوي فيتامين B1 بنسبة أعلى من الفريز وفيتامين A بكمية تعادل ما في الباذنجان.

تستخدم الثمار كنوع من الحلوى وكغذاء للماشية، يمكن الحصول على الكحول من تخمير لب الثمار لاحتوائها نسبة عالية من السكر، تستخدم الثمار والبذور لعلاج الإمساك عند الأطفال وفي صناعة بعض الأدوية كشراب مانع للسعال، كما أن صمغ الخرنوب يعدل الحموضة في الأمعاء ويمتص بعض السموم والإفرازات الضارة ويعالج الإسهال.

يصنع من الخرنوب عسل الخرنوب، ويستعمل بدلاً من الكاكاو، إلا أنّ هذا المنتج يختلف قليلاً عن الشوكولا في المذاق ويحوي ثلث كمية الطاقة الموجودة فيها.

يمكن أن تحمص بذوره مثل القهوة. وكانت البذور تستخدم أيضاً في الكيمياء، وكذلك كان يستعملها المغنون لتحسين الصوت. ويمكن القول: إنَّ المحتويات الأساسية في الخرنوب هي التانينات (مادة قابضة) والكربوهيدرات والتي يمكن أن ترتبط مع التوكسينات وتثبط نمو البكتريا.

البذور فقيرة بالنشاء والسكر، غنية بالبروتين وتتمتع بفوائد طبية عديدة إذْ تستخدم بوصفها مادة مهمة في الصناعات الطبية الدوائية، كما تستعمل الثمار مادة مهمة في صناعة بعض الأدوية، وتستعمل بشكل كبير في الكيمياء (Morton,1987; Catarino,1993; Kaitho *et al.*,1996; Batlle,1998).

تعاني بذور الخرنوب من تأخر ملحوظ في الإنبات مما يتسبب بمشكلة اقتصادية للمشاتل تتعلق بتنفيذ خطة الإنتاج، ويسبب عدم اطمئنان للنتائج، وإن مشكلة التأخر في الإنبات تتعلق بصلابة الأغلفة البذرية غير النفوذة (Allen and Allen, 1981).

كما أن التكاثر البذري يعطي أشجاراً تتباين في صفاتها نظراً إلى الانعزال الوراثي، ونحصل على أشجار مؤنثة أو مذكرة؛ ولذلك ينصح بزراعة الأشجار المؤنثة.

فضلاً عن أن انتشاره في المناطق التي سبق ذكرها يكون بشكل إفرادي ومشتتاً مما يوحي بأنه مهدد بالانقراض. ونتيجة هذه الأسباب سيجري العمل على إكثاره مخبرياً بطرائق زراعة الأنسجة النباتية.

يجري إكثار نبات الخرنوب بزراعة الأنسجة، إذْ شغل إكثار هذا النبات العديد من الباحثين، ووضعت عدة تقانات لإكثاره بالأنسجة، وقد قام (El-shafey *et al*., 1998) بإنتاج أشجار مؤنثة من الخرنوب باستخدام تقانة زراعة الأنسجة، وعالج مشكلة ظهور الفينولات في الوسط بعدة طرائق منها استعمال حمض الإسكوربيك 150 mg/l مع حمض السيتريك 100 mg/l. وكانت أفضل الزراعات على وسط MS مضافاً إليه توافقات هرمونية من إندول حمض الزبدة IBA بتركيز (0.5mg/l) وبنزيل أمينو بيورين BAP (0.5mg/l) متفقاً في ذلك مع كل من(Williamson, 1950) و(Belkengren and Miller, 1962) و(Vonarnold and Erikson, 1988) و(Bosila *et al*., 1994).

كما درس (Dragan and Branka 1999) تأثير منظمات النمو والسكروز في نمو النباتات المكاثرة مخبرياً وقد استعملا الوسط MS مع كل من التوافقات الآتية: (2.22µM BA+0.49µM IBA) و(5.37 µM NAA+ 0.44 µM BA).

كما درس (B.Vinterhalter *et al*., 1999) تأثير كل من التشعيع والسكر والنتروجين في حجم أوراق الخرنوب المكاثر مخبرياً، وقد استعملت ثلاثة أنواع من السكر (السكروز - الفريكتوز - الغلوكوز).

قام الباحث (S.Goncalves *et al*., 2005) باستخدام أوساط جديدة لإكثار الخرنوب وتجذيره في الزجاج باستخدام تراكيز مختلفة من العناصر الكبرى (N, P, K, Ca, Mg).

كما قام (Branka *et al*., 2007) بدراسة تأثير أملاح النتروجين في نمو الخرنوب المكاثر مخبرياً.

فضلاً عن قيام الباحث (Souheila *et al*., 2008) بدراسة تأثير منظمات النمو في الأجزاء النباتية المكاثرة خضرياً لنبات الخرنوب، وقد استعمل الوسط MS بشكل أساسي وكانت أفضل معاملات الإكثار باستعمال (BAP 2mg/l) وفي التجذير (Carcoal 2mg/l + IBA 2mg/l).

قام الباحث (A.Panteleitchouk 2009) بدراسة تأثير ملح كلوريد الصوديوم NaCl في نمو ومحتوى البرولين في نباتات الخرنوب المكاثرة خضرياً.

الهدف من البحث

1- دراسة تأثير منظمات النمو النباتية في إكثار وتجذير الخرنوب.*Ceratonia siliqua* L وتحديد التراكيز المناسبة لكل مرحلة.

2- دراسة إمكانية تطبيق تقنية الإكثار الخضري الدقيق لنبات الخرنوب بوصفها تقنية بديلة عن التقليدية وإنشاء بنك وراثي لنشر زراعته والحفاظ عليه من الانقراض.

مواد البحث وطرائقه

مكان تنفيذ البحث:

نفذ البحث في جامعة دمشق، كلية العلوم، قسم علم الحياة النباتية، مختبر زراعة النسج النباتية خلال الأعوام 2011 – 2012.

المادة النباتية:

أخذت الخزعات النباتية (explants) من نبات الخرنوب النامي في طرطوس بشكل طبيعي، وقد أخذت عقل مفردة تحوي برعماً جانبياً واحداً بطول 0.5-1سم من النبات الأم لمعاملات التطهير والإدخال، ونقلت مباشرة إلى المختبر.

مراحل تنفيذ البحث:

1- مرحلة الإدخال (الزراعة التأسيسية):

جمعت الأجزاء النباتية ووضعت في أوعية زجاجية ثم غسلت تحت الماء الجاري مدة ساعة، ثم عُقمّت بالمبيد الفطري أكوبسين بتركيز 0.5% مدة 15 دقيقة، وغسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات وذلك قبل إخضاعها للتطهير السطحي ضمن جهاز العزل الجرثومي حيث عقمت بالكحول الإيتيلي 70% مدة دقيقة واحدة، تلا ذلك التطهير بحسب المعاملات الواردة في الجدول (3)، وقد أضيف محلول Tween 20 بمعدل قطرة واحدة لكل 100 مل من محلول التطهير من أجل خفض التوتر السطحي وزيادة تماس الأجزاء النباتية مع مادة التطهير، وجرت عمليات التطهير ضمن جهاز العزل، وبعد التطهيرغسلت ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم، زرعت الأجزاء النباتية المطهرة بطول 0.5 - 1 سم في أنابيب الاختبار على وسط الزراعة التأسيسية MS (Murashige and Skoog 1962) الخالي من منظمات النمو المضاف إليه 30غ/ل سكروز + 8 غ/ل أغار عند درجة PH=5.7 مستخدمين لذلك أوعية زجاجية (11.5× 4.5)سم، وذلك مدة أربعة أسابيع وقد استبعدت خلالها العينات الملوثة، وعُدَّت الأجزاء النباتية الحية والسليمة الأساس للتجارب اللاحقة. واستعملت في مرحلة الزراعات التأسيسية كل من الأوساط MS, MS+1g/lcarcoal، وحضنت الزراعات في غرفة النمو Growth Room في الشروط الآتية:

- درجة الحرارة 23 ± 1 ْم نهاراً و 16 ± 1 ْم ليلاً.
- مدة الإضاءة: 16 ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام في أثناء النمو.
- شدة الإضاءة: 2000 – 3000 لوكس عند مستوى الزراعات.

2- الإكثار:

بعد 4 أسابيع من الزراعة الأولية التأسيسية أخذت النموات الخضرية المتشكلة والخالية من الملوثات من وسط الإدخال إلى وسط الإكثار وزرعت على عدة معاملات (أوساط غذائية) موضحة بالجدول (1). أُجريت الزراعة بأوعية زجاجية (11.5× 4.5) سم وبمعدل 30 مكرراً/معاملة إذْ أضيف إلَى الوعاء 30 مل من الوسط. حضنت الزراعات في غرفة نمو growth room بدرجة حرارة 23 ± 1°م ومدة إضاءة 16 ساعة و8 ساعات ظلام في أثناء النمو وكانت شدة الإضاءة نحو 2000- 3000 لوكس.

الجدول (1) المعاملات الهرمونية المستخدمة في مرحلة الإكثار .

الهرمون / رمز المعاملة	بنزيل أمينو بيورين BAP (mM)	اندول حمض الزبدة IBA(mM)	الجبريلين GA3 GA3 (µM)
MS1	2.2	1	0.8
MS2	3.11	1	0.8
MS3	4	1	0.8
MS0	0	0	0

3- التجذير:

زرعت النموات الخضرية المتشكلة في مرحلة الإكثار السابقة وبطول 1-3 سم إلى وسط التجذير وبعدة معاملات (أوساط غذائية) موضحة بالجدول (2). أُجريت عملية الزراعة بأوعية زجاجية (11.5× 4.5) سم وبمعدل 20 مكرراً/معاملة إذْ أضيف إلى الوعاء 30 مل من الوسط المغذي/ وبعد 7 أيام نقلت إلى وسط MS خالٍ من الهرمونات وحضنت الزراعات مع وجود الإضاءة بمعدل 16 ساعة والظلام 8 ساعات في درجة الحرارة 23 ± 1 ْم نهاراً و16 ± 1 ْم ليلاً، وقد بلغت شدة الإضاءة: 2000 – 3000 لوكس عند مستوى الزراعات، وكان معدل الرطوبة نحو 70%. وأخذت النتائج بعد أربعة أسابيع من الزراعة بالنسبة إلى عدد الجذور وطولها.

الجدول (2) المعاملات الهرمونية المستخدمة في مرحلة التجذير

الهرمون / رمز المعاملة	اندول حمض الزبدة IBA (mM)
R1	4.9
R2	7.3
R3	9.8
R0	0.0

4- مرحلة الأقلمة:

أُجريت عملية التقسية بنقل النبيتات تدريجياً التي اجتازت مرحلة التجذير بنجاح إلى الشروط الطبيعية إلى أصص بلاستيكية بقطر 25سم، تحتوي خليطاً مؤلفاً من 1/2

حجم/حجم تورب/ برليت من أجل عملية الأقلمة حيث حضنت في ظروف غرف النمو، في درجة حرارة 23 ± 1 م نهاراً و16 ± 1 م ليلاً، وشدة إضاءة 2000 – 3000 لوكس، ورطوبة 70%. وذلك مدة أربعة أسابيع مع تثقيب تدريجي للأكياس حتى إزالتها تماماً بهدف تقليل الرطوبة تدريجياً، وحسبت في نهاية عملية الأقلمة نسبة النباتات المتبقية بحالة جيدة، ثم نقلت هذه النباتات لمتابعة النمو في ظروف البيت الزجاجي، وحُسبت نسبة نجاح عملية التقسية وفق ما يأتي:

$$\text{نجاح عملية التقسية\%} = \frac{\text{عدد النباتات الناجحة بعملية التقسية}}{\text{عدد النباتات المنقولة لمرحلة التقسية}} \times 100$$

5- التحليل الإحصائي:

حُلّلت النتائج باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS. إذ قورنت متوسطات 30 عينة نباتية لكل معاملة إكثار وبثلاثة مكررات، و20 عينة نباتية لكل معاملة تجذير. عند مستوى المعنوية % 0.05.

النتائج والمناقشة

الإدخال وتأسيس الزراعات الأولية:

الجدول (3) تأثير معاملات التعقيم في نسبة النموات المتبقية% بعد 10 أيام من زراعة النموات (80 جزءاً نباتياً لكل معاملة) على وسط الإدخال.

رقم المعاملة	معاملات التعقيم	عدد النموات (البراعم) المزروعة	عدد النموات (البراعم) الملوثة	عدد النموات (البراعم) الميتة	عدد النموات (البراعم) الحية	نسبة النموات (البراعم) الحية%	متوسط النتائج بحسب نوع مادة التعقيم%
1	هيبوكلوريت الصوديوم 0.8% مدة 10دقائق	80	55	6	19	23.75	26.875
2	هيبوكلوريت الصوديوم 0.8% مدة 15دقيقة	80	50	6	24	30	
3	هيبوكلوريت الصوديوم0.8% مدة 5 دقيقة+ كلوريد الزئبق 0.1% مدة 1دقيقة	80	40	51	25	31.25	35.625
4	هيبوكلوريت الصوديوم 0.8% مدة 15 دقائق+كلوريد الزئبق0.1% مدة 1دقيقة	80	30	18	32	40	
5	كلوريد الزئبق 0.1% مدة 1 دقيقة	80	20	29	31	38.75	46.25
6	كلوريد الزئبق 0.1% مدة1.5 دقيقة	80	10	5	65	**81.25**	
7	كلوريد الزئبق 0.1% مدة دقيقتين	80	5	60	15	18.75	

توضح النتائج الواردة في الجدول (3) تأثير معاملات التعقيم المختلفة في نسبة النباتات السليمة بعد 10 أيام من الزراعة على وسط الإدخال، وقد بيّنت النتائج أن أفضل معدل بقاء تم الحصول عليه عند استخدام المعاملة رقم 6 إذ وصلت النسبة المئوية للبراعم الحية 81.25 %، وتظهر النتائج أن كلوريد الزئبق أظهر فعالية تعقيم أفضل من هيبوكلوريت الصوديوم بفروق معنوية واضحة، إذ كان متوسط النسبة المئوية للعينات

الحية وغير الملوثة 46.25% عند استعمالنا كلوريد الزئبق، في حين كان المتوسط 31.25% عند استعمال هيبوكلوريت الصوديوم، وكانت أفضل معاملة تعقيم باستعمال هيبوكلوريت الصوديوم وكلوريد الزئبق معاً هي المعاملة رقم 4 إذْ وصلت نسبة النموات (البراعم) الحية وغير الملوثة إلى40%. أمَّا أفضل معاملة تعقيم باستعمال كلوريد الزئبق فكانت 0.1 % مدة دقيقة ونصف، إذْ وصلت إلى 81.25% وانخفضت هذه النسبة إلى 18.75% عند زيادة الزمن إلى دقيقتين، بسبب ازدياد عدد النموات (البراعم) الميتة، أمَّا البراعم الحية وغير الملوثة فبدأت بالنمو بعد 10 أيام من زراعتها.

مناقشة نتائج الإدخال والزراعات التأسيسية الأولية:

إن الحصول على زراعات معقمة من أهم مراحل الإكثار بالأنسجة وأكثرها صعوبة؛ وذلك بسبب مشكلتي التلوث وتماوت البراعم. ولذلك فإنه من الضروري البحث لإيجاد أفضل وسيلة تعقيم آمنة نستطيع من خلالها التخلص من الجراثيم والفطريات من النسيج النباتي (Fiorino and Loreti, 1987). هناك العديد من المواد التي تستعمل في عملية التطهير السطحي، ولعل أكثرها استعمالاً هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl وكلوريد الزئبق HgCl2، عموماً تشير العديد من البحوث إلى أهمية استعمال هيبو كلوريت الصوديوم في فعاليتها العالية في عمليات التطهير السطحي للعينات النباتية (Jones and Hoopgood, 1979) إذ يتميّز بفعالية عالية في تطهير الأجزاء النباتية قليلة التلوث خاصة إذا استخدمت بتراكيز مناسبة، في حين ينصح بعضهم بعدم استعمال كلوريد الزئبق بسبب سميته للنبات وتهتك الأنسجة (Lizarraga *et al*., 1991)، إن استعمال هيبوكلوريت الصوديوم وحده لم يعط نتائج جيدة حيث زاد عدد البراعم الملوثة على الحية النظيفة في حين أعطى هيبوكلوريت الصوديوم مع كلوريد الزئبق 0.1% نتيجة أفضل إذْ استعمل في التجارب هذه (هيبوكلوريت الصوديوم 0.8% مدة 15 دقيقة+ كلوريد الزئبق 0.1% مدة 1 دقيقة)، وكان كل من (Naghmouchi *et al*., 2008) و(Elshafey *et al*., 1998) قد استعملوا هذه التوافقات ولكن مع مدة زمنية وصلت في الكلوريد الى 20 دقيقة وربما يعود هذا إلى المكان الذي جمعت منه العينات ونوعها وعمر الأشجار التي أخذت منها.

ولكن استعمال كلوريد الزئبق 0.1 % مدة دقيقة ونصف في التجارب أثبت فعالية أكبر من هيبوكلوريت الصوديوم بالحصول على نباتات حية وخالية من الملوثات، وبدأت بالنمو بعد 10 أيام من زراعتها، مع أن (Brugaletta *et al*.,2007) استعمل كلوريد الزئبق (0.1 و0.2)% مدة 5 دقائق، ويعود هذا الاختلاف بزمن معاملة التعقيم إلى كمية الملوثات الموجودة في العينة النباتية التي جُمعت من الأشجار في الحقل ضمن الشروط الطبيعية، مع العلم أنه في التجارب وعند استعمال كلوريد الزئبق 0.1 % مدة دقيقتين قُلّل من التلوث ولكن زادت نسبة تماوت البراعم، ويعود السبب في ذلك إلى أن البراعم النباتية التي استعملت في الزراعات الأولية كانت متفتحة قبل التعقيم والزراعة لذلك تأثرت

البراعم بزمن معاملة التعقيم إذْ ازدادت نسبة التماوت بزيادة زمن التعقيم عند استعمال كلوريد الزئبق (الأشكال 1 و2).

الشكل (1) مرحلة الزراعة التأسيسية على الوسط MS في الأسبوع الأول لنبات الخرنوب

الشكل (2) مرحلة الزراعة التأسيسية على الوسط MS في الأسبوع الثاني

الإكثـــــــار

عدد النموات (البراعم) وطولها:

دُرس تأثير توافقات هرمونية مختلفة من البنزيل أمينو بيورين BAP، مع إندول حمض الزبدة IBA في متوسط عدد النموات الجديدة المتشكلة وطولها. ويوضح الجدول (4) هذه النتائج.

الجدول (4) تأثير المعاملات الهرمونية المختلفة في متوسط عدد النموات الجديدة وطولها لنبات الخرنوب على وسط الإكثار.

رمز الوسط	تركيب الوسط	متوسط طول النموات (سم)	متوسط عدد النموات/ الجزء النباتي المزروع
MS1	MS + 2.2 BAP + 1IBA	**3.41 ±0.07**	1.78± 0.08
MS2	MS + 3.11 BAP + 1IBA	2.33± 0.05	**3.3 ± 0.1**
MS3	MS +4 BAP + 1IBA	2.04± 0.04	2.27± 0.07
MS0	0	0.5±0.01	0.9± 0.02

تختلف المتوسطات بعضها عن بعض عند مستوى المعنوية % 0.05.

بيّنت هذه النتائج استجابات متباينة من حيث متوسط عدد البراعم المتشكلة تبعاً لتراكيز منظمات النمو المستخدمة ومستوى تفاعلها ودورها في العمليات الاستقلابية، كما تبيّن أن وجود BAP كان إيجابياً في تطور نمو البراعم وعددها إذْ إنَّ المعاملة MS2

(3.11µM BAP + 1µM IBA) أعطت أفضل النتائج من حيث تأثيرها في متوسط عدد النموات الجديدة المتشكلة/الجزء النباتي المزروع، وقد بلغ متوسط عدد النموات 3.3 كل أربعة أسابيع بدءاً من نمو واحد. وكانت الفروق معنوية مع المعاملة MS1 والمعاملة MS3.

كانت المعاملة MS1 (2.2 µM BAp + 1 µM IBA) الفُضلى من حيث تأثيرها في متوسط طول النموات المتشكلة إذْ بلغ متوسط طول النموات على هذا الوسط 3.4 سم بعد أربعة أسابيع .كانت الفروق معنوية مع المعاملة MS3 والمعاملة MS2 وأظهرت النتائج تفوق المعاملات جميعها المضاف إليها هرمونات وبفروق معنوية واضحة على معاملة الشاهد MS0 الخالي من الهرمونات.

أمَّا عند إضافة الجبريلين إلى أوساط الإكثار المستخدمة فلم تبدِ النباتات أي استجابة ولم تلاحظ أي زيادة في طول النموات المزروعة أو عددها.

مناقشة نتائج الإكثار

يعتمد تشكل النموات الخضرية الجديدة اعتماداً كبيراً على وجود السيتوكينينات في الوسط الغذائي (Nordstorm and Eliasson, 1986)، إذْ تؤدي السيتوكينينات دوراً مهماً ورئيسياً في زيادة تشكل النموات الخضرية الجديدة، كما تؤدي دوراً في التثبيط الكلي أو الجزئي لتشكل الجذور.

استُعمل البنزيل أمينو بيورين BAP في أوساط الإكثار، إذْ يحرض هذا الهرمون وهرمون البنزَيل أدنين BA عند وجودهما بتراكيز محددة في أوساط الإكثار على تشكيل عدد أكبر من النموات الخضرية (البراعم) مقارنة باستخدام Kin (Hutchinson, 1984).

إن وجود الأوكسينات في أوساط الإكثار ضرورية لتعزيز دور السيتوكينينات في زيادة عدد النموات الخضرية الجديدة، لأن وجود الأوكسينات والسيتوكينينات مع بعضهما يعدُّ مهماً جداً من أجل تنظيم النمو والتشكل المورفولوجي في زراعة الأنسجة النباتية. وقد بيّنت تجاربنا أن التشكل المثالي لها يتم باستخدام تراكيز محددة من الأوكسين والسيتوكينين، وقد أوضح (Christison and Warnick, 1988) أن التشكل يتم تحت سيطرة العلاقة بين الأوكسين والسيتوكينين.

أدى استعمال البنزيل أمينو بيورينBAP بتركيز 3.11 ميكرومول مع إندول حمض الزبدة (IBA) بتركيز1 ميكرومول إلى الحصول على أفضل معدل نمو، وقد وصل متوسط عدد النموات الجديدة المتشكلة بدءاً من برعم واحد إلى 3.3 نمواً خلال 4 أسابيع، ولوحظ وجود فروق معنوية بالنسبة إلى عدد النموات عند استعمال (BAP) بتركيز 2.2 ميكرومول مع (IBA) بتركيز 1 ميكرومول، وقد وصل متوسط عدد النموات إلى 1.7 نمواً. كما أنَّ متوسط طول النموات الجديدة المتشكلة وصل إلى 3.4 سم عند استعمال (BAP) بتركيز 2.2 ميكرومول مع (IBA) بتركيز 1ميكرومول.

إن إضافة الجبريلين (GA_3) إلى أوساط الإكثار قد يسبب في بعض الأنــواع النباتيــة زيادة في الطول، وتختلف استجابة الأنواع النباتية لتأثير هذا الهرمون الذي لم تبدِ النموات في التجارب هذه أي استجابة لتأثير الجبريلين، وربما يعود ذلك إلى نوع النبات ومكــان الحصول عليه وعوامل فزيولوجية خاصة به. (الأشكال 3، 4، 5).

الشكل (3) مرحلة التكاثر وتشكل النموات وتأثير منظمات النمو (3.11µM BAP + 1µM IBA) في عدد النموات الخضرية وطولها على الوسط MS.

الشكل (4) يبيّن طول النموات الخضرية على الوسط MS1

الشكل (5) مرحلة التكاثر وتشكل النموات وتأثير منظمات النمو (2.2µM BAP + 1µM IBA) في عدد النموات الخضرية وطولها على الوسط MS1 .

التجـــذيـــــر

جرت دراسة تأثير تراكيز مختلفة من إندول حمض الزبدة IBA في عـــدد الجـــذور المتشكلة وطولها (جدول 5). إذْ وضعت البراعم مدة 7 أيام فـــي الوســـط MS الحـــاوي تراكيز مختلفة من IBA. ثم نقلت بعد انتهاء هذه المدة إلى وسط MS خالٍ من الهرمونات مع الإشارة إلى أن تشكل الجذور بدأ بعد 10 أيام من زراعتها على الوسطً MS الخـــالي من الهرمونات.

الجدول (5) تأثير المعاملات الهرمونية المختلفة في عدد الجذور وطولها لنبات الخرنوب علـــى وسط التجذير.

رمز الوسط	تركيب الوسط	النسبة المئوية للتجذير	متوسط طول الجذور (سم)	متوسط عدد الجذور
R1	MS + 4.9 IBA	%90	**2.71 ±0.07**	**3± 0.09**
R2	MS + 7.3 IBA	%25	0.5±0.04	0.4 ±0.06
R3	MS + 9.8 IBA	%0	0	0
R0	MS 0	%0	0	0

تختلف المتوسطات عن بعضها عند مستوى المعنوية % 0.05. متوسط 20 جذراً نباتياً ± الخطأ المعياري

عدد الجذور وطولها

يتبيّن من خلال النتائج المتحصل عليها أن نسبة التجذير 90% قد تم الحصول عليها علـــى وسط يحوي IBA، في حين كانت نسبة التجذير 0% في الوسط الشاهد الخالي مـــن IBA، إذْ كان لإضافة IBA بتركيز 4.9 µM دور في زيادة نسبة التجذير من جهـــة وعـــدد الجـــذور وطولها من جهة أخرى، وقد بلغت نسبة التجذير 90% وبلغ متوسط عدد الجذور 3، ومتوسط طول الجذور2.7سم، وقد أظهرت المعاملة R1 فروقاً معنوية مقارنة بباقي المعاملات.

أدّى عدم إضافة هرمون IBA إلى وسط الزراعة إلى عدم حدوث تجذير في النموات المزروعة نهائياً وهذا يعني ضرورة إضافة هرمون IBA إلى وسط التجذير. إلا أنَّ زيادة التركيز من هذا الهرمون سببت تشكل ثفنات (كالوس) منعت تشكل الجذور.

مناقشة نتائج التجذير:

يتبيّن من خلال النتائج أن وجود إندول حمض الزبدة ضروري لتشكل الجـــذور وأن التجذير لم يحدث بغياب IBA. فالأوكسينات أدَّت الدور الأساسي فـــي الـــتحكم بتـــشكيل الجذور (Hu and Wang, 1983). وقد تبين في تجاربنا أن استعمال IBA بتركيـــز 4.9 ميكرومول أعطى أفضل نسبة تجذير وصلت حتى 90 %، وإن زيادة تركيز IBA علـــى 4.9 ميكرومول أدى إلى تشكيل الكالوس (الثفنات)؛ مما ســـبب عـــدم تـــشكل الجـــذور، ويختلف تأثير الأكسين في عملية التجذير بحسب تركيز الأكسين المستخدم ونوعه، كمـــا يؤدي وجود عدة أوكسينات في الوسط، أحياناً، إلى تجذير أفضل في العديد من النباتـــات

(Nabors *et al*.,1983)، لما له دور مباشر في زيادة معدل التبادل الأيوني وزيادة الهيدروجين والهيدروكسيل نتيجة دوره في تحريض وزيادة نشاط أنزيمات ATPase في الجدر الخلوية (Rossignol *et al*.,1990) (الأشكال 6، 7).

الشكل (6) مرحلة التجذير وتأثير أوساط الزراعة في متوسط عدد الجذور وطولها لنبات الخرنوب.

الشكل (7) مرحلة التجذير وتأثير وسط الزراعةR1 والمعاملة الهرمونية في عدد الجذور وطولها.

أقلمة النباتات الناتجة عن عملية التجذير

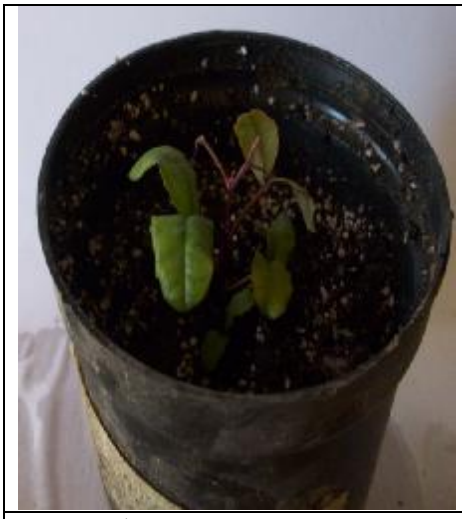
تعدُّ عملية الأقلمة من أكثر مراحل زراعة الأنسجة أهمية؛ وذلك بسبب حساسية النباتات الموجودة في الزجاج، ومن ثمَّ يجب الاهتمام بالنباتات وتوفير الشروط اللازمة لإنجاح هذه العملية من ضوء وحرارة ورطوبة. إذْ غسلت الجذور بالماء بشكل جيد بعد نزعها من وسط الزراعة الحاوي على الآغار؛ وذلك لتجنب نمو الفطريات والبكتريا التي تؤثر في نمو الجذور، ومِن ثمَّ في نمو النبات، زرعت النباتات في أصص بلاستيكية نظيفة تحوي خليطاً معقماً من التورب والبرليت بنسبة 1/2 (حجم/حجم)، وحضنت بغرف النمو وغطيت بأكياس بلاستيكية شفافة للمحافظة على الرطوبة العالية، وأجريت عملية الأقلمة بالفتح التدريجي للأكياس حتى إزالتها تماماً خلال 4 أسابيع. نقلت بعدها النباتات إلى البيت الزجاجي حيث أمضت نحو شهر قبل نقلها إلى الأرض بشكل دائم، وسمدت أسبوعياً بمحلول $MS^{1/10}$. وكانت نسبة الأقلمة مرتفعة وصلت إلى 95%.

مناقشة نتائج الأقلمة:

تأثرت تقسية النباتات تأثراً كبيراً بعدد الجذور، فكان واضحاً سرعة نمو النباتات ذات عدد الجذور الأكبر، في حين لم تتأثر عملية التقسية بطول الجذور. ويعدُّ النمو القوي

للنباتات في الأصص مؤشراً جيداً على إمكانية تأقلمها مع شروط البيت الزجاجي. وقد كان متوسط طول النباتات 15 سم داخل غرف النمو. أمَّا في البيت الزجاجي فقد ازداد نمو النباتات ليصل متوسط الطول إلى 27 سم قبل زراعتها في الحقل وكانت نسبة الأقلمة مرتفعة وصلت حتى 95 %، وهذا يعطي إمكانية وضع بروتوكول متكامل للحصول على الخرنوب باستعمال طرائق زراعة الأنسجة النباتية، ويبدأ من الزراعة التأسيسية وحتى الأقلمة والزراعة بالحقل، ويبيّن الشكل (8 و9) مراحل عملية التقسية. (الشكل 10).

الشكل (8) يبيّن عملية التقسية ضمن شروط غرفة النمو



الشكل (9) يبيّن النبات بعد إزالة الكيس البلاستيكي عنه قبل نقله إلى الحقل

الشكل (10) يبيّن نبات الخرنوب بعد الأقلمة مزروعاً في الحقل بعمر (9 أشهر)

الاستنتاجات والتوصيات

1- استخدام كلوريد الزئبق بتركيز0.1% مدة 1.5دقيقة كان مناسباً في الحصول على أعلى معدل بقاء بنسبة 81%، كما لوحظ أن استخدام تركيز 0.1% مدة دقيقتين أدى إلى انخفاض ملحوظ في معدل البقاء إلى 18%.

2- أدَّت الزراعة على وسط MS2 (3.11µM BAP + 1µM IBA) إلى أفضل وسط للإكثار الخضري من حيث عدد النموات وطولها.

3- أدَّت الزراعة على وسط R1 (4.9µM IBA) إلى أفضل وسط للتجذير من حيث عدد الجذور وطولها.

4- تطبيق تقانة إكثار نبات الخرنوب بزراعة الأنسجة بهدف زراعته في المناطق الملائمة لنموه بهدف الحصول على أعداد كبيرة وبكلفة اقتصادية منخفضة وفي مدة زمنية قصيرة جداً.

REFERANCES المراجع

الأسو، اسعاف. (2007-2008). كسر طور السكون عند بذور 3 أنواع من الفصيلة الفولية وتأثير بعــض أوساط الزراعة في إنباتها. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية – العدد2- المجلد 31.

نحال، شلبي، رحمة. (1989). علم الحراج والمشاكل الحراجية. مطبوعات جامعة حلب.

Allen, O. N. and Allen, E. K. (1981). The leguminoceae. The university of Wisconsin press Madison, W1.812 pages.

Battle, I and Tous, J. (1998). Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) promoting the conservation and use of under-utilised and neglected crops. Roma: Institute of plant genetics and crop plant research; Gatersleben: International plant genetic resource institute(IPGRI).

Brugaletta, M.; Lamalfa, S.; Gentile, A.; Almeida, R. and Romano, A. (2007). *In vitro* culture establishment of ceratonia siliqua(L) mature trees from cultivars of different Mediterranean countries. ISHS Actahorticulturae 812:lll international symposium on a cclimatization and establishment of micropropagated plants.

Chapill, J. A. and Maslin, B. R. (1995). A phylogenetic assessment of tribe Acacieae, (eds), Advances in legume systematic 7: phylogeny. Royal Botanic Gardens,Kew.

Christison, M. L. and Warnick, D. A. (1988). Organogenesis in vitro as a developmental process Hort.Science vol 23 (3): 115-119.

El-shafey, Y.; Elshihy, O.; Youssef, E. and Gad, M. 1998. Production of *ceratonia siliqua* female plantlets through tissue culture technique. Arab journal of biotechnology, vol 1. No(1) Dec.(1998), 77-85.

Fiorino, P. and Loreti, F. (1987). Propagation of fruit tree by tissue culture in Italy. HortScience, 22:353-358.

Goncalves, S., Correia, P. J., Loucao martins, M. A and Romano, A. (2005). Anew medium formulation for *invitro* rooting of carob tree based on leaf macronutrients concentrations. Biologia plantarum 49(2):277-280, 2005.

Hu, Y. C. and Wang, J. P. (1983). Meristem, shoot tip and bud cultures. In: Hand book of plant cell culture, (Eds): D. A. Evans, W. R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamado, vol. I.Macmillan Publishing company, NY. PP. 177-227.

Hutchinson, J. F. (1984). Factors affecting shoot in organ culture of the apple. northen spy.Sci.hort.22:347-358.

Izhaki, I., Korine, G. and Arad, Z. (1995). The effect of bat (Rousettus are Gyptiacus) dispersal on seed germination in eastern Mediterranean, Oecologia 101:335-342.

Jones, O. P. and Hoopgood, M. E. (1979). The successful propagation *in vitro* of two rootstocks of prunus. J.Hort Sci 54(1) : 63-66.

Kaitho, R. J., Umunna, N. N., Nsahlai, I. V., Tamminga, S., Bruchem, J.van., Hanson, J. and Wouw, M.van de (1996). Palatability of multipurpose tree species. Effect of species and length of study on intake and relative palatability by sheep. Agroforestry systems, vol. 33, pp.249-265.

Lizarraga, R., Pant, X. A., Jyasinghe, U., and Dodds, J. H. (1991). Tissue culture elimination of pathogens. International Potato Center (CIP). Research Guide 3:21p.

Morton, J. F. (1987). Carobin: Fruits of warm climates, CF Dowling, Jr. (ed). Miami, FL. PP.121-124.

Murashage, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium forpid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant.15, 473-497.

Naghmouchi, S.; Khouja, L, M.; Rejeb, N, M. and Boussaid, M. (2008). Effect of growth regulators and explants origin on *in vitro* propagation of *ceratonia* siliquaL. Via cuttings. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 12(3), 251-258.

Nabors, M. W., Heyser, J. W., Dykes, T. A and Demott, K. J. 1983. Long duration high frequency plant regeneration from cereal tissue culture. Planta, 157: 385-391.

Nordstrom, A. C. and Eliasson, L. (1986). Uptake and translocation of C14-labeleb benzylamino purine inapple shoots grown *in vitro* in relation to shoot development. Physiolplantarium 68(3): 431-435.

Panteleitchouk, A., Cruz, L.; Lopes, M., Rocha-Santos, T. P. A.; a Duarte, C. A. and Canhoto, M. J. (2009). Effect of NaCl on the growth and proline content of micropropagated *ceratonia siliqua*L. Plantlets. New biotechnology. Vol 225. Sep 2009

Pierik, R. L. M. (1988). In Vitro culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural cops. Propagation of Ornamental 226: 25-40

Rhizopoulou, S. and Davies, WJ. (1991). In fluence of soil drying on root development, water relations and leaf growth of *Ceratonia siliqua* L. Oecologia. 88(1):41B47.

Rossignal, M., Santoni, V., Szponaki, W. and Vansuyt, G. (1990). Differential sensitivity to auxin at the plasma membrane level. pp4983 in Nij Kamp *et al*., (eds) 1990(g.v).

Vinterhalter, B.; Vinterhalter, D. and Neskovic, M. (1999). Effect of irradiance, sugars and niyrogen of leaf size of *in vitro* grown *ceratonia siliqua* L. Biomedical and life sciences. Biologia plantarum. Vol 44. Number2,185-188.

Williamson, C. E. (1950). Phytophath., 40:205-208. (C. F. George, E. F. and Sherringtin, P. D. (1984). Plant propagation by tissue culture,p 343.