إنتاج الأجنة الخضرية في أصلي العنب (B41& R110) باستخدام تقنية زراعة المآبر مخبرياً

نجوى أحمد[1] حسين الزعبي[2]
خليل المعري[3]

الملخص

أُنْتِجَتْ وجُدِّدَتْ نباتات كاملة مخبرياً لأصلي العنب B41 و110 اِسْتُخْدِمَتْ المآبر الزهرية كمادة أولية للزراعة. وجُدِّدَتِ النباتات بتحريض التشكل غير المباشر للأجنة الجسمية (Embryogenesis)، وذلك في مخابر قسم التقانات الحيوية في مركز البحوث العلمية الزراعية بدوما 2008– 2009. أبدت مآبر B41 استجابة جيدة في الوسط المغذي لموراشيج وسكوغ والمضاف إليه5µM 2,4 D + 1.1µM BA، والوسط المضاف إليه 5µM 2,4 D +0.5µM 2iP (5%)، أمَّا مآبر الأصل R110 فأظهرت استجابتها بنسبة جيدة (47%) عند استخدام 5µM 2,4 D +1.1µM BA. تمثلت الاستجابة بإنتاج الكالوس الجنيني الذي تطور بدوره إلى أجنة خضرية في كلا الأصلين عند نقله إلى وسط حاوٍ على نصف كمية الأملاح الأساسية لوسط موراشيج وسكوغ. تابعت الأجنة نموها عند نقلها إلى أوساط تعتمد في تكوينها على أملاح وفيتامينات إما وسط موراشيج وسكوج أو وسط WPM للأصلين حيث تمت نسبة كبيرة منها بصورة طبيعية (73% وسطياً)على نقيض ما حصل عند إضافة 4.44 µM من BA إلى كلٍّ من الوسطين إذْ أدى ذلك إلى رفع نسبة النباتات غير الطبيعية وغير القادرة على الاستمرار بالنمو بشكل كبير(100%). يمكن استخدام وسط MS المضاف إليه 2,4D و BA لتحريض تشكل الكالس الجنيني، ونقل الأجنة الناتجة إلى وسط MS ½، أو WPM لضمان نموها طبيعياً والحصول على نباتات كاملة بظروف مخبرية.

الكلمات المفتاحية: زراعة المآبر–العنب (الأصلB41–الأصلR110)– تكوين الأجنة الخضرية.

(1) ماجستير تقانات حيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية
(2) باحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية
(3) أستاذ في قسم علوم البستنة، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية
عنوان المراسلة عبر الايميل smasoria@yahoo.com

Embryogenesis in Grape (R110 and B41) by Using Anther Culture Technique

Najwa Ahmed(1) **Hussain Alzobi**(2)
Khalil Alma'ari(3)

Abstract

The regeneration of two grape rootstocks (B41 and R110), were successfully achieved. Anthers were used as starting plant material to obtain a complete plant via embryogenesis. This research was conducted in Biotechnology Department-General Commission of Scientific Agriculture Researches- Duoma 2008-2009. B41 anthers showed a good response to the use of Murashige and Skoog medium after supplemented with 5µM 2.4 D + 1.1µM BA (60%) and 5µM 2.4 D + 0.5µM 2iP (5%). Whereas, R110 anthers did not register any response, but in the presence of 5µM 2.4 D and 1.1µM BAP, they gave a good rate callus initiation (47%). The first reaction appeared was the embryogenic callus formation, developed normally to complete plants after subculture on growth-regulators free media containing ½ MS salts or WPM salts, compared with that supplemented with 4.44 µM BA which induced a high abnormality and death. MS medium + BA +2,4 D can be used as initiation medium to get high rate of embryogenic callus, whereas, ½ MS salts or WPM salts can be used to get whole normal plants *in vitro* when embryos culture on them.

Key wards: Anthers culture, B41 rootstock, R110 rootstock, somatic embryogenesis.

(1) Biotechnology master, Agriculture faculty, Damascus, Syria
(2) Researcher in general commission for scientific agriculture researches, Damascus, Syria
(3) Professor in Horticulture department, Damascus university, Syria
Correspondent author Email: sma.soria@yahoo.com

المقدمة:

يعدُّ العنب من أهم المحاصيل الثمرية في العالم، إذْ يحتل مساحة كبيرة نسبة إلى محاصيل الفاكهة الأخرى، وينتشر بين خطي عرض 20 و51 شمالاً وبين 25 و 40 جنوباً بالنسبة إلى خط الاستواء، وبصورة كبيرة في المناطق تحت الاستوائية الحارة (Wang وزملاؤه، 2000) وتتحدد زراعته في مناطق المناخ المتوسطي (Edwin، 1996).

تحتل سورية المرتبة الثالثة عربياً بإنتاج العنب بعد مصر والمغرب، وبيّنت إحصائيات وزارة الزراعة السورية لعام 2014 أن إجمالي المساحة المزروعة بالعنب بلغت نحو 46726 هكتاراً منها 8110 هكتاراً سقياً و 38616 هكتاراً بعلاً، فيما يبلغ إجمالي عدد الأشجار 29719.8 ألف شجرة المثمر منها 26388.2 ألف شجرة أنتجت 195930طناً.

العنب شجيرة معمرة، تتبع عائلة *Vitaceae*، جنس *Vitis* الذي يضم 65 نوعاً بشكل شجيرات خشبية متساقطة الأوراق أو متسلقات، ينمو عدد منها كنباتات زينة حدائقية في حين تنتج الأصناف التابعة للنوع *V. vinifera* الثمار (Charbaji و Nabulsi، 1999).

تتكاثر أصناف العنب خضرياً أو تقليدياً باستخدام العقل الساقية الخشبية والترقيد، وغالباً ما تطعم الأصناف المرغوب فيها على أصول متأقلمة لتحسين مقاومتها للإجهادات الأحيائية واللاأحيائية، ولا سيَّما الأنواع الأمريكية المقاومة لحشرة الفيلوكسرا (Nonnecke، 2002)، أو باستخدام تقنيات زراعة الأنسجة النباتية التي تحتل أهمية كبيرة في مجالات الحفظ والإكثار أو التحسين الوراثي لعدد كبير من الأنواع النباتية المهمة، فهي تسمح بتخطي عدد من المعوقات التي تعاني منها طرائق الإكثار التقليدية بما فيها المتعلقة بالنبات نفسه، أو تلك المتعلقة بالبيئة المحيطة، وغدت من مستلزمات برامج الانتخاب (Margara ,1982)، إذْ تسمح برفع الكفاءة الإنتاجية خلال مدة زمنية محددة مما حدا بالباحث Sasson (1986) بتسميتها بالثورة الخضراء الثانية، وتُساعد زراعة الأنسجة على إنتاج شتلات من العنب خالية من الأمراض ولاسيَّما البكتيرية والفيروسية (Jiang *et al.*, 2000)، وتكون هذه النموات– في أغلب الأحيان– متماثلة وراثياً ومشابهة للنبات الأم (Torres, 1989; Debrgh,1992).

يمكن استخدام أجزاء مختلفة من النبات في مجال إنتاج الأجنة الجسمية (المبايض، والبويضات، والأجنة الجنسية، والأوراق، السوق والمحاليق)، إلا أن المآبر هي الأكثر استخداماً في هذا المجال (Martinelli و Gribaudo، 2001) ويضاف إلى ذلك أن زراعة المآبر جعلت من الممكن دراسة كامل العمليات وفهمها التي تتحكم وتنظم آلية نمو الخلية وانقسامها وتمايزها، ويمكن باستخدام زراعة المآبر الحصول على نباتات أحادية الصيغة الصبغية مخبرياً (*in vitro*) الذي يعدُّ مهماً جداً في دراسة مبادئ ميزات علم الوراثة وتطبيقها في النباتات الراقية (Kumar،1997). ومعلوم أن الإكثار المخبري الدقيق مطبق تطبيقاً واسعاً في إكثار أصناف العنب *Vitis* sp. والهجن (*V. labrusa* ,*V.viniferar*) (Chee و Pool، 1983؛ Heloir وزملاؤه، 1997؛ Mhatre وزملاؤه، 2000؛ Qui وزملاؤه، 2004؛ Zhang وزملاؤه، 2009).

في حين أنه تندر التقارير عن إكثار أصول العنب، وتقتصر فقط على بعض الأصول (Shim وزملاؤه، 2003) التي أغلبها يجري إكثاره بالبراعم القمية بوجود منظمات النمو الخارجية، كذلك الأمر في سورية.

هدف البحث: دراسة إمكانية تجديد بعض أصول العنب المزروعة وإثارها في سورية عن طريق زراعة المآبر الزهرية، وذلك لأهمية هذه الأصول، ومن ثَمَّ الحصول على أعداد كبيرة منها شرط أن تكون سليمة خالية من الأمراض.

المواد والطرائق Material and Methods:

مكان تنفيذ البحث:

نُفِّذَ هذا البحث في كلية الزراعة بجامعة دمشق وفي مخابر زراعة الأنسجة النباتية في قسم التقانات الحيوية التابعة للهيئة العامة للبحوث الزراعية بدوما خلال عام 2008–2009.

المادة النباتية Plant material:

أجريت الدراسة على أصلين من أصول العنب:

Vitis. Vinifera) B41 والأصل (*Vitis. Berlandirei X Vitis. Rupestris*) 110 Richter (*X Vitis. Berlandieri*)، تم الحصول عليها من محطتي البحوث الزراعية المركزية في درعا وسرغايا.

الأصل R110: يعرف بأنّه ذو دورة تكاثرية خضرية طويلة ،ويتصف بتأخر نضج القصبات في نهاية موسم النمو. المجموعة الجذرية له غير متعمقة ، يناسب أنواع الترب كلّها. وهو أصل ممتاز في المناطق الدافئة ذات المناخ الجاف. مقاومته عالية للجفاف وينمو جيداً في الأراضي الطينية السطحية الجافة والسيئة. يتحمل الكلس الفعال في التربة حتى 17%. مقاوم لحشرة الفيلوكسرا ومتوسط المقاومة للنيماتودا. أمَّا الأصل B41 فمتوسط إلى قوي النمو، وحساس للجفاف، يتحمل حتى 60 إلى 70% من الكلس الفعال في التربة ،وهو من أكثر الأصول حساسية لنقص البوتاسيوم، وأكثرها مقاومة لنقص المغنزيوم؛ والجدير بالذكر مقاومته لحشرة الفيلوكسرا (Delas، 1992).

تحضير المادة النباتية Plant material preparation:

جمعت العناقيد الزهرية من كلا الأصلين خلال بداية مرحلة الإزهار بين نيسان وأيار لعام 2008، وبأعمار تراوحت بين 2-4 أسابيع وراوح لون البراعم ما بين الأخضر القاتم إلى الأخضر المصفر وبأحجام مختلفة(شكل،1–أ)، إذْ استخدمت جميعها بشكل مختلط دون فرز. نُقِلَتِ العناقيد الزهرية إلى جو معقم تحت جهاز العزل Laminar air flow. عُقّمت العناقيد الزهرية سطحياً بغمرها في محلول كحولي (Ethanol) بتركيز 70% مدة 30 ثانية تبعها نقع مدة عشر دقائق في محلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيزه 20% مضافاً إليه 2–3 نقاط من مادة ناشرة (Tween 20) إلى كلّ 20 مل من المحلول لتقليل التوتر السطحي، غُسلت البراعم الزهرية بعدها 3 مرات بالماء المقطر المعقم ،وحفظت في الماء إلى حين زراعتها وضعت بعدها على ورق ترشيح معقم بغية استخلاص المآبر.

أُخْرِجَتِ المآبر من الأزهار (شكل،1–ب) حيث تحتوي كل زهرة على 5 مآبر، بعمل شق طولي جانبي للغلاف الخارجي، باستخدام إبر حادة معقمة زرعت بعدها مآبر كل زهرة مجتمعةً مباشرة على وسط الزراعة الأولية مع توخي الحذر عند فصل المآبر لتلافي

إلحاق الضرر بها، إذْ أنّ المآبر المتضررة تميل إلى تشكيل كالوس كنب (ثفنات) من أماكن الضرر بدلاً من تشكله من الخلايا الجنسية ذاتها.

أ–أحجام البراعم والمآبر المستخدمة ب –المآبر في زهرة العنب

شكل (1) براعم زهرة العنب و مآبرها

أوساط الزراعة وظروف التحضين Media and Culture conditions:

استُخدِمَ وسط Murashige و Skoog (1962) وتعديلاته والوسط WPM (Llyod و McCown، 1981)؛ وذلك حسب مراحل الزراعة والإكثار الموضّحة في الجدول(1).

– وسط تشكل الكالوس الكنب Initiation Media:

اِسْتُخْدِمَتْ أملاح وفيتامينات وسط Murashige و Skoog (1962) مضافاً إليه 3% من السكروز كوسط أساسي لتشكل الكالوس (جدول،1)، واختيرت 4 توافقات من منظمات النمو النباتية كما يأتي:

A- Control: hormone free.
B- 5µM 2,4 D + 0.5µM Kin.
C- 5µM 2,4 D + 0.5µM 2iP.
D- 5µM 2,4 D + 1.1µM BA

(D: dichlorophenoxy acetic acid - Kin: kinetine - iP: isopentyl adenine - BA: benzyl adenine)

– وسط التمايز Differentiation Media:

تكون وسط التمايز من أملاح وفيتامينات الوسط MS ولكن بنصف تركيزها العادي (جدول،1) مضافاً إليه السكروز بنسبة 1% .

– وسط التجديد Regeneration Media:

استخدم كل من الوسط 1/2MS والوسط WPM (Lloyd و McCown،1981) كوسط لتجديد ونمو الأجنة التي تشكلت من كتل الكالوس حسب التوافقات الهرمونية الآتية:

1- 1/2 MS-hormone free.

2- 1/2 MS supplemented with 4.44µM BA.
3- WPM –hormone free.
4- WPM supplemented with 4.44µM BA.

جدول (1) تركيب الأوساط المغذية الأساسية المستخدمة في زراعة المآبر (بالميكرومول/اللتر)

الوسط المغذي	وسط تكوين ونمو الكالوس	وسط التمايز	وسط التجديد
المحلول المعدني	MS	1/2MS	WPM
Myo-Inositol	555	555	555
Thiamine- HCl	1.19	0.59	2.96
Pyridoxine- HCl	2.96	1.48	2.96
Nicotinic acid	4.06	2.03	4.06

أضيف 1% سكروز إلى الأوساط الحاوية على أملاح 1/2MS، في حين أضيف 1.5% من السكروز إلى الأوساط الحاوية على أملاح وسط WPM. عدلت الحموضة للأوساط جميعها إلى 5.8 قبل إضافة الآغار بنسبة 0.7%، وبعد ذلك عُقِّمَتِ الأوساط بالاوتوكلاف في حرارة 121 مْ مدة 20 دقيقة.

وُزِّعَتِ الأوساط بعد انخفاض درجة حرارتها في أطباق بتري معقمة، وتركت تتصلب ضمن ظروف معقمة. ولتجنب جفاف أوساط الزراعة أو تعرضها للتلوث أُغْلِقَتِ الأطباق بشريط معقم يضمن الإحكام في الإغلاق، وحفظت في ظروف باردة (+16 مْ) إلى حين الاستخدام، فيما يخص ظروف الزراعة فقد حُضِّنَتْ زراعات المرحلتين الأولى والثانية في درجة حرارة 28 ± 2مْ، في ظروف من الظلام أمَّا في مرحلة التجديد والنمو فَحُضِّنَتْ في درجة حرارة 25 ± 2مْ مدة ضوئية 16 ساعة نهارا، في شدة إضاءة على مستوى النبات تقدر بنحو (60 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$)؛ وذلك في غرف نمو يجري فيها التحكم بالإضاءة ودرجات الحرارة.

دراسة الاستجابة للمعاملات المختلفة:

لتقييم نتائج البحث دُوِّنَتِ المؤشرات الآتية:

– النسبة المئوية للتلوث والاسمرار الحاصلة؛ وذلك بحساب نسبة المآبر الملوثة إلى المجموع الكلي للمآبر؛ وذلك خلال مرحلة الزراعة التأسيسية التي تسبق تشكل الكالوس(شهرين).

- تسجيل الأوساط التي حرضت على تشكل الكالوس والنسبة المئوية للمآبر التي تشكل منها الكالوس عن طريق عد كتل الكالوس في الطبق الواحد، حيث تنسب كتلة الكالوس إلى المجموعة الواحدة (5 مآبر)، وليس إلى مئبر واحد؛ وذلك بعد شهرين من زراعة المآبر.
- متوسط عدد الأجنة المتشكلة من كل معاملة بعد 3 أشهر من بدء مرحلة التمايز.
- النسبة المئوية للمتبقي من الأجنة في مرحلة التجديد.
- النسبة المئوية للنباتات الطبيعية الناتجة مقارنة مع تلك غير الطبيعية.

التصميم والتحليل الإحصائي المستخدم:

تم اِسْتُخْدِمَ تصميم القطاعات العشوائية الكاملة لتحليل البيانات لكل أصل على حدة، واختبار T في التحليل الإحصائي لمقارنة البيانات الناتجة عن مراحل إنتاج الأجنة الخضرية المشتركة بين الأصلين وحساب أقل فرق معنوي على مستوى معنوية 5%، إذْ اِسْتُخْدِمَتْ 4 أوساط مختلفة لاستحداث الكالوس من مآبر أصلي العنب (الأصل B41 – الأصل R 110) وكُرِّرَ كل وسط 3 مرات لكل أصل، وفي كل مكرر زُرِعَ 50 مئبراً. الكالوس المستحصل من هذه المرحلة زُرِعَ على وسط التمايز بمعدل 3 مكررات لكل أصل. الأجنة الناتجة عن مرحلة التمايز زُرِعَتْ على 4 أوساط تجديد مختلفة، وكُرِّرَ كل وسط 3 مرات لكلا الأصلين.

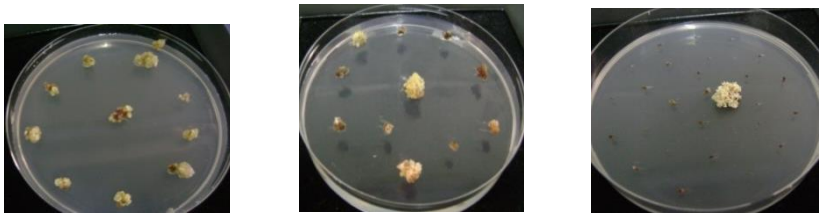
النتائج والمناقشة Results and Discussion:

مرحلة الزراعة التأسيسية Initiation Stage: تهدف هذه المرحلة إلى الحصول على عينات خالية من التلوث، ولها قدرة على النمو وتكوين الكالوس.

تبيّن في هذه الدراسة أنّ نسبة التلوث الحاصلة عند استخدام الأوساط المدروسة ضعيفة جداً، إذْ لم يسجل أي تلوث بالنسبة إلى الأصل R110 في الأوساط جميعها، فيما سجلت نسبة 3.3% عند زراعة مآبر الأصل B41 في الوسط C فقط مما لم يستدع تحليلا" إحصائيا". وتعود هذه النسبة المنخفضة إلى كون المآبر الزهرية موجودة داخل أزهار معقمة سطحياً، وأُخْرِجَتْ ووُزِعَتْ في ظروف معقمة باستخدام جهاز عزل جرثومي أمَّا

سبب التلوث فقد يعود إلى النسيج النباتي نفسه إذْ أنَّ ظروف الزراعة والتعقيم واحدة. ومن الجدير بالذكر أنه لم يلاحظ حدوث اسمرار في أيٍ من الأوساط المستخدمة.

أظهرت مآبر الأصل B41 المزروعة على كل من الوسط C الحاوي على 2iP، والوسط D الحاوي على BA مقدرة على إنتاج الكالوس الكنب، في حين لم تبدِ المآبر المزروعة على الوسط الخالي من الهرمونات والوسط الحاوي على Kin أي استجابة ملحوظة بعد زراعتها. كما أظهرت مآبر الأصل R110 استجابة عند زراعتها على الوسط D فقط أي الحاوي على BA (شكل، 2).



آ–الأصل B41 على الوسط D ب–الأصل B41 على الوسط C حـ–الأصل R110 على الوسط D

شكل (2): كتل الكالوس الناتجة بعد شهرين من زراعة مآبر الأصلين R110وB41

تبيّن النتائج في الجدول (2) نسبة المآبر التي استجابت لمعاملات الأوساط المستخدمة للأصلين R110 وB41. مآبر الأصل B41 كانت الفُضْلَى عند استخدام الوسط D الحاوي على BA، إذْ أبدت نسبة استجابة أعلى (60%) وبفارق كبير منه عند استخدام الوسط C الحاوي على 2iP (5%)، وتفوقت عليها معنوياً وعلى باقي الأوساط التي لم تبدِ أي استجابة. مآبر الأصل R110 استجابت فقط للوسط D (47%) الذي تفوق معنوياً على باقي الأوساط التي لم يظهر عليها أي استجابة. ويلاحظ عدم وجود فرق معنوية في نسبة استجابة المآبر المزروعة من كلا الأصلينR110 وB41 على الوسط D. أتت هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكره Thorpe (1995)، حيث تمّ الحصول على كالوس من زراعة المآبر لـ *Vitis longii* باستخدام الوسط MS مضافاً إليه 5 µM من 2،4– D و 1 µM من BA. اعتمد Popescu عام 2004 الوسط المذكور نفسه باستخدام تراكيز مختلفة من 2،4– D و BA (4.9، 4.4 µM). وقد توصل Novák وزملاؤه (2005) إلى نتيجة

مشابهة، إذْ استخدموا وسط MS مع 4.2 D− بتركيز 5 µM و BA بتركيز 1.1µM. يؤكد Ol'ah وزملاؤه (2009)هذه النتيجة إذْ نجح استخدام هذين الهرمونين معاً في تشكيل كالوس جنيني في 20 طرازاً وراثياً للعنب من أصل 59 طرازاً اختبروا؛ أي ما نسبته 35%.

الجدول(2) نسبة المآبر التي استجابت لمعاملات الأوساط المستخدمة للأصلين[1]

استجابة المآبر %		التوافقات الهرمونية المستخدمة
R110	B41	
0b	0c	A-وسط بدون هرمونات
0b	0c	B-5µM 2,4 D + 0.5µM Kin
0b	5b	C-5µM 2,4 D + 0.5µM 2iP
47a	60a	D-5µM 2,4 D + 1.1µM BA
15.23	11.14	LSD 5% (التوافقات الهرمونية)

[1]:الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تعني عدم وجود فرق معنوي أمّا المختلفة فتعني وجود فرق معنوي بين التوافقات الهرمونية المستخدمة

أشار Nakano وزملاؤه (1997) إلى كون الصنف 'Delaware' من أصل 11 صنفاً تم اختيروا حقق استجابة بتشكيل أجنة جسمية بعد شهرين من زراعة المآبر على وسط 1/2MS مع 4،2− D (10 µM) و4 -CPPU (10 µM) وبعد 6 أشهر من زراعتها على وسط 1/2MS بإضافة 4،2− D (10 µM) فقط. حصل Martinelli وزملاؤه (2001) على أعلى قدرة للمآبر على تخليق الأجنة الجسمية للأصناف 'chardonnay' *V. vinifera* and 'Brachetto a Grappolo Lungo'، عن طريق زراعة المآبر على وسط Nitsch and Nitsch (Robacker، 1993) أضيف إليه 4،2− D (9 µM) و BA (4.4 µM).

استخدم Gambino وزملاؤه (2006) وسطاً لاستحداث الكالس الكنب مؤلفاً من الأملاح الأساسية للوسط Nitsch and Nitsch، فيتامينات الوسط MS، سكروز 6%، وجيلرايت 0.3%، 4،2− D (4.5 µM) و BA (8.9 µM). يضاف إلى أنه في هذه التجربة سُجّلَت استجابة مآبر الأصل B41 للوسط MS مضافاً إليه 4.2− D بتركيز 5 µM

و2iP بتركيز 0.5 µM إذْ تم الحصول على كالس جنيني، إلَّا أنّ نسبة الاستجابة كانت قليلة.

جمع Xu وزملاؤه (2014) المآبر من الأزهار غير الناضجة لنبات .*Vitis vinifera* L" "cv. Manicure Finger" و وزُرِعَتْ على وسط موراشيج وسكوج المضاف إليه 2،4– D (4.5 µM) و 6BA (8.9 µM) التي أعطت أفضل معدل للكالوس الجنيني المتشكل (3.7% ±1.3 %).

تعود النتائج التي تمّ الحصول عليها في هذا البحث إلى كون الأوكسين ضرورياً لنمو الخلية، ويؤثر في كل من انقسامها وتمددها. الأوكسين يحفز بشكل مباشر الطور المبكر من استطالة الخلية، إذْ يسبب استجابة الخلايا لخروج أيونات الهيدروجين منها، ممَّا يسبّب انخفاض ال pH حول الخلايا ومن ثَمَّ ينشط بروتينات لها صلة بجعل جدار الخلية أقل قساوة (Wall Loosening proteins)، ممَّا يؤدي إلى تمدده بفعل ضغط الانتباج الذي يضغط بعكس جدار الخلية (http://en.wikipedia.org/wiki/Auxin). إنّ نسبة الأوكسين إلى السيتوكينين تؤدي دوراً مهماً في تاثير السيتوكينين في نمو الخلية إذْ إنَّ خلايا الأنسجة البرانشيمية الموجودة على وسط حاوٍ على السيتوكينين فقط لا تتأثر ولا تعطي استجابة. أما إذا أُضِيف كل من السيتوكينين والأوكسين وبالمستوى نفسه فإن الخلايا البرانشيمية تعطي كالساً أو خلايا غير متمايزة (Campbell وزملاؤه ,2008)

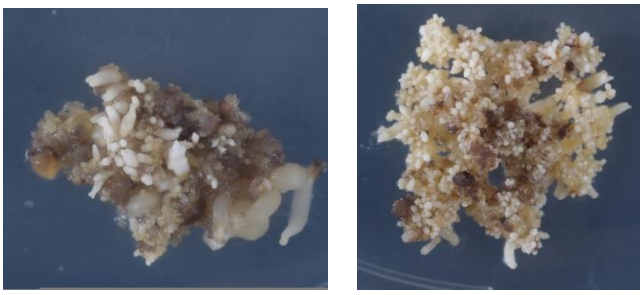
مرحلة التمايز Differentiation Stage:

وُضِعَ الكالوس الناتج لكل من الأصلين B41 و R110 والمتشكل على الأوساط التي حرضت استجابة المآبر، على وسط MS 1/2 وقد أظهر الكالوس المزروع نوعين من الاستجابة إذْ أعطت بعض الخزعات المأخوذة من الكالوس تشكلات جنينية، في حين لم يظهر بعضها الآخر أي استجابة بهذا الاتجاه لكلا الأصلين B41 و R110.

تباينت نسبة تشكل الكالوس الجنيني من الكالوس العام، كما اختلف متوسط عدد الأجنة المتشكلة تبعاً للأصل ولوسط الزراعة (شكل،3) .

دلّت النتائج على عدم وجود فرق معنوي بين الوسط C والوسط D في عدد الأجنة (33.33 و23.16 على التوالي) ونسبة الكالس الجنيني المتشكل (33.33% و32%

على التوالي) من المآبر المزروعة من الأصل B41 ، وعدم وجود فرق معنوي في نسبة الكالس الجنيني المتشكل من مآبر الأصل R110 (31%) ومآبر الأصل B41 (32%) المزروعة على الوسط D؛ إلّا أنَّ متوسط عدد الأجنة المتشكلة على الكالس الناتج عن مآبر الأصل B41 المزروعة على الوسط D (23.16) كان أفضل معنوياً من عدد الأجنة المتشكلة على الكالس الناتج من براعم الأصل R110 (12.83) المزروعة على الوسط نفسه، وقد يعزى ذلك إلى الأصل نفسه وقدرته على الاستجابة أمّا الوسط A والوسط B فلم تحسب نتائجهما لأنه لم يكن هناك أي تشكل للكالس عليهما. إلَّا أنَّ Popescu (2004) أضاف كلاً من BA و IAA إلى الوسط MS واستخدمه لتمايز الأجنة . ويذكر أنَّ Franks وزملاءه (1998) استخدموا وسطاً مؤلفاً من: الأملاح الأساسية للوسط Nitsch and Nitsch، فيتامينات الوسط MS، آغار 1%، فحم نشط 25% ، NOA (10 µM)، BA (1 µM) وIAA (20 µM) كوسط لتمايز الأجنة. أمّا Xu وزملاؤه (2014) فقد نجحوا بالحصول على الأجنة الجسمية من الكالوس الجنيني المتحصل عليه من مآبر النبات "*Vitis vinifera* L. cv. Manicure Finger" بعد أشهر من زراعته على وسط موراشيج وسكوج(MS)الخالي من منظمات النمو.



شكل (3): تشكل الأجنة على كتل الكالوس الجنيني

مرحلة التجديد Regeneration Stage:

في هذه المرحلة كُرِّرَتْ كل معاملة 3 مرات، وفي كل مرة زُرِعَتْ أجنة ومن ثَمَّ زُرِعَ 15 جنيناً للوسط الواحد. فيما يخص الأصل B41، يتبيّن من الجدول(3) عدم وجود فرق معنوي في نسبة المتبقي بين معاملات التجديد بالنسبة إلى الأجنة الناتجة عن استخدام

الوسط C، أمّا الناتجة عن استخدام الوسط D فقد أظهرت فروق معنوية بين معاملات التجديد كلّها في نسبة المتبقي، ولكن استخدام المعاملة WPM أعطى أعلى نسبة متبقٍ(100%)، بينما لوحظ بالنسبة إلى الأصل R110 أن أعلى نسبة متبقي (100%) سجلت عند استخدام الوسط MS 1/2، وأدت إلى زيادة المعنوية مقارنة مع بكلٍّ المعاملتين 1/2 MS+ 4.44 µM BA و WPM+ 4.44 µM BA في حين لم يوجد فرق معنوي بين المعاملة 1/2 MS والمعاملة WPM التي أعطت نسبة متبقٍ عالية (92%) وأدت إلى زيادة المعنوية على المعاملة WPM+ 4.44 µM BA والمعاملة 1/2 MS+ 4.44 µM BA.

جدول (3): نسبة المتبقي من الأجنة في مرحلة التجديد

R110 %	B41 %		أوساط التجديد
D	D	C	
100a	88c	64	1/2 MS
72c	80d	64	1/2 MS+ 4.44 µM BA
92b	100a	72	WPM
64c	92b	52	WPM+ 4.44 µM BA
20.3	1.76	-	LSD 5% (للأوساط)

تدل الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد على عدم وجود فرق معنوي بين أوساط التجديد المستخدمة

لوحظ أن كلاً من الوسطين 1/2 MS و WPM الخاليين من منظمات النمو النباتية، أظهر نتائج جيدة عند استخدامهما كوسط تجديد إذْ ساعدا على تحويل الأجنة المنقولة إليه إلى نبيتات كاملة (الشكل، 4).

بيّنت النتائج الواردة في الجدول (4) أنّ أعلى نسبة نبيتات طبيعية تحققت عند استخدام الوسط 1/2 MS، وذلك بالنسبة إلى الأجنة جميعها التابعة للأصلين، وتلاه الوسط WPM واللذان حققا زيادة معنوية عن باقي المعاملات. وأيضاً وجد أن الأجنة النامية على الأوساط WPM و1/2MS المضاف إلى كلٍّ منهما 4.44 µM من BA كانت جميعها غير طبيعية، إذْ كانت بشكل انتفاخات لم تعطِ قمماً خضريةً وجذوراً واضحةً (الشكل، 5).

جدول (4) تأثير أوساط التجديد على النسبة المئوية للنبيتات الطبيعية

أوساط التجديد	نسبة النبيتات الطبيعية %		
	B41		R110
	C	D	D
1/2 MS	60a	100a	92a
1/2 MS+4.44 µMBA	0c	0c	0c
WP	44b	80b	64b
WP +4.44 µMBA	0c	0c	0c
LSD 5% (للأوساط)	11.22	9.48	13.4

تدلُّ الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد على عدم وجود فرق معنوي بين أوساط التجديد المستخدمة

يمكن تفسير هذه النتائج بكون السيتوكينين يدخل في عدد من العمليات الحيوية النباتية، ومنها انقسام الخلايا والقمم وتشكل الجذور. إنّ السيتوكينينات تنظم نمو البراعم الفرعية وتؤثر سلباً في السيادة القمية، وإن تأثير السيتوكينينات يأتي نتيجة لنسبتها إلى الأوكسينات التي تؤدي إلى نظرية التثبيط المباشر، هذه النظرية توضّح أن الأوكسين يُصْنَعُ في البرعم القمي، ويتحرك باتجاه الفروع، وفي النهاية يعطي الإشارة لنمو الأفرع الجانبية ومن ثُمَّ فإن غياب الأوكسين وحضور السيتوكينين في الوسط يؤدي إلى عدم انتظام نمو البنات (Campbell وزملاؤه ,2008).

إلا أنّه في أغلب الدراسات السابقة لم يتم الوصول إلى هذه المرحلة في مجال زراعة المآبر في العنب، إذْ كانت التجارب تتوقف عند مرحلة تشكل الأجنة، أو استحداث الكالوس فقط لاستخدامها في أغراض التحوير الوراثي . ولكن ذكر Emershad وRamming (1994)أنه تمَّ الحصول على نباتات كاملة مثالية عند نقل الأجنة إلى وسط WPM ،بعد إضافة BA (µM1) و فحم نشط 0.3%. أمّا Salunkhe وزملاؤه (1999) فاستخدموا وسط Nitsch and Nitsch دون إضافة أي من منظمات النمو النباتية لهذا الغرض.

R110 B41

شكل (4): نبات طبيعي ناتج عن زراعة المآبر لكلا الأصلين

–ب– –أ–

شكل (5): أشكال النبيتات غير طبيعية النمو من الأصلين B41 و R110
أ– ساق حلزونية وغياب القمة الخضرية والأوراق
ب – تشكل انتفاخ مع غياب كامل للجذور

الاستنتاجات والتوصيات:

- يمكن استخدام المآبر الزهرية في إنتاج نباتات عنب بأعداد كبيرة.
- أعطى الأصلانB41 و R110 عند الزراعة على الوسط المكون من MS والمضاف إليه 5µM 2,4 D و1.1µM BA أكبر نسبة استجابة للمآبر في استحداث كالس، وأكبر نسبة كالس جنيني وعدد أجنة.
- كان أفضل وسط تجديد هو 1/2MS الذي أدى إلى نمو 95 جنيناً (من أصل 135 جنيناً) وأعطى نباتات طبيعية كاملة 100% بالنسبة إلى الأصل B41 ،لذا يوصى باستخدام هذه الأوساط عند استخدام تقنية زراعة المآبر الزهرية لإكثار العنب.

المراجع

- المجموعة الإحصائية الزراعية لعام 2014 الصادرة عن وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي السورية.

References

-Campbell, N. A.; Reece, J. B.; Urry, L. A.; Cain, M. L.; Wasserman, S. A.; Minorsky, P. V. and Jackson, R. B., 2008. Biology (8th ed.). San Francisco: Pearson, Benjamin Cummings. pp. 827-30.

-Charbaji, T. and Nabulsi, I., 1999. Effect of low doses of gamma irradiation on *in vitro* growth of grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57, 129-132.

-Chee, R. and Pool, R.M.، 1983. *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: Application of previously defined culture conditions to a selection of genotypes. *Vitis*، 22,363-74.

-Delas, J.J., 1992. "Criteria Used for Rootstock Selection in France" in Rootstock Seminar: A World wide Perspective,.

- Debrgh, P. (1992). Reconsideration of the term Verification as used in micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 30:135-166.

-Edwin, F.G., 1996- Plant propagation by tissue culture. Exgenetic Limited, Pp:1055-1086.

-Emershad, R.L. and Ramming, D.W., 1994. Somatic embryogenesis and plant development from immature zygotic embryos of seedles grape (*vitis vinfera* L.). *Spriger – Verlag, Plant Cell Reports*, 14, 6-12.

-Franks, T.; HE, D.G. and Thomas, M., 1998. Regeneration of transgenic shape *vitis vinifera* L. sultana plants genotypic and phenotypic analysis. Molecular Breeding. *Springer Netherlands*, 4, 321-333.

-Gambino, G.; Bondaz, J. and Gribaudo, I., 2006. Detection of elimination of viruses in callus, somatic embryos and plantlets of grape. European Journal of Plant Pathonology, 114، 397-404.

-Heloir, M.C.; Fournioux J.C.; Oziol L. and Bessis, R., 1997. An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary bud microcuttings. *Plant Cell Tiss Org. Cult*., 49, 223-225.

- Jiang , L.E.I Zhong, Li. YuQiao, Wu. Gang, Ni, Jing. De, ZP. Jiang, L. Zhong, (2000). Regulations of multiplication and high growth of Calmeria grape shoot

by, BA and IAA. Journal of Jiangsu Forestry Scienceand- Technology. 27(2):27-29, 333.

-Kumar, DC.K., 1997. An International to Plant Tissue Culture. New Publisher Book agency (p) LTD, 187P.

-Lloyd, G. and Mccown, B., 1981. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Lamia Latifolia, by use of shoot-tip culture. *Proceeding of International Plant Propagation Society*, 30,421-427.

- Margara, J., 1982. Bases de la multiplication vegetative. INRA, Versailles, France, 262P.

-Martinelli, L. and Gribaudo, I., 2001. Somatic embryogenesis in grapevine (*Vitis* spp.). In: Roublekais-Angelakis, K., ed. Molecular biology and biotechnology of grapevine. Dordrecht: Kluwer, pp 327–352.

-Mhatre, M.; Salunkhe, C.K. and Rao, P.S., 2000. Micropropagation of *Vitis vinifera* L.: towards an improved protocol. *Sci. Hort*, 84, 357-363.

-Murashige, T. and Skooge, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15, 473-97.

-Nakano, M.; Sakakibara, T.; Watanabe, Y. and Mii, M., 1997. Establishment of embryogenic cultures in several cultivars of *Vitis vinifera* and *V. labruscana*. *Vitis*, 36,141–145.

- Nonnecke, G. 2002. Grape Cultivars for Iowa December 27, 2007.

-Novák, E.; Zok, A.; Pedryc, A. and Oláh, R., 2005. Development And Optimization Of Genetic Transformation System For Grape. Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Horticultural Science, Corvinus University of Budapest, H- 1118, Budapest, Villányi 29-43, Hungary.

- Ol′ah, R.; Zok, A.; Pedryc, A.; Howard, S. and Kova´cs, L.G., 2009. Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes. *Scientia Horticulturae*, 120, 134-137.

-Popescu, C.F., 2004. Somatic embryogenesis and plant development from anther culture of *Vitis vinifera* (L.). Plant Growth Regulator , *Springer Netherland*, 20,75-78.

-Qui, W.; FeketE, S.; Todd, T. and Kovács, L., 2004. Facilitation of Microshoot Tip Propagation of *Vitis aestivalis* var. Norton by Combined Application of an Antioxidant and Cytokinins. *Am. J. Enol. Vitic*., 55, 112-114.

-Robacker, C., 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from muscadine grape leaf explants. *Hortsci*, 28, 53-55.

-Salunkhe, C.K.; Rao, P.S. and Mhatre, M., 1999. Plantlets regeneration via somatic embryogenesis in anther callus of *vitis latifolia* L. Plant Cell Reports. *Spring Berlin/ Heidlberg*, 18, 670-673.

- Sasson, A., 1986- Quelles biotechnologies pour les pays en développement Unesco, 7 place de Fontenoy, F-75700 Paris, France, 200 P.
- Shim, CS.; Lee, SH.; Park. CW.; Choi, WC.; Choi. G.; Choi, WG.; Lim, SR. and Lee, HY., 2003. Partial disc replacement with the PDN prosthetic disc nucleus device: early clinical results. *J Spinal Disord Tech*., (4) 16,324-30
- Thorpe, T.A. 1995a,b. *In vitro* embryogenesis in plants.
Kluwer Academic Publishers.
- Torres, K. C. (1989). Stages of Micropropagation In: Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. ACI Book, Van Nostrand Reinhald, New York. N8. 52- 65.
- Wang, Q.; Tanne, E.; Arav, A. and Gafn, R. 2000. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of grapevine by encapsulation – dehydration. Plant Cell and Organ Culture, 63،41-46.
-Zhang, J.; MA, H.; Chen, S.; JI, M.; Perl, A .; Kovacs, L. and Chen, Sh., 2009. Stress response proteins' differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon A proteomic approach. *Plant Science*, 177,103–113.
-Xu, Z. S., Yu; Z. Y.; Zhang, M.; Zhang, Z. and Toa, J.M., 2014. Plant regeneration *via* somatic embryogenesis from solid and suspension cultures of "*Vitis vinifera* L. cv. Manicure Finger". *In vitro* cellular and Developmental Biology-Plant, 50, 249-256.
Web sites:
-http://www.syrian-agriculture.org
-http://www.fao.org/corp
-http://en.wikipedia.org/wiki/Auxin

Received	**2016/3/23**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2016/7/24**	**قبول البحث للنشر**