ARABIC SUMMARY

دراسات على حفظ وإنتاج الأصول الوراثية لبعض الأشجار والشجيرات البستانية باستخدام تقنيات زراعة الأنسجة

أجريت هذه الدراسة بالتعاون بين وحدة بحوث زراعة الأنسجة قسم البساتين بكلية زراعة مشتهر- جامعة الزقازيق - فرع بنها ومعمل بحوث زراعة الأنسجة - معهد بحوث البساتين- مركز البحوث الزراعية في خلال الفترة ١٩٩٨- ٢٠٠٢ وذلك بهدف استخدام بعض الطرق الحديثة في حفظ بعض الأجزاء النباتية لبعض الأنواع المختلفة وذلك باستخدام تقنيات زراعة الأنسجة. حيث استخدمت بعض المعاملات المختلفة في عملية الحفظ ودراسة التغيرات المورفولوجية والكيماوية و الفسيولوجية ومدى قدرة هذه الأجزاء النباتية على استعادة نموها مرة أخرى وقدرتها على الإكثار.

اختير لهذه الدراسة ثلاثة نباتات اقتصادية هامة وخاصة في بعض النواحي الطبية مثل الخروب *Ceratonia siliqua* والأكاسيا *Acacia salicina* والورد *Rosa polyantha*. وأخذت أجزاء مختلفة منها وتم تعقيمها وزراعتها على بيئة موراشيج وسكوج كاملة التركيز ومضاف إليها بعض المواد الحافظة مثل الكيومارين والسوربيتول والبولي إثيلين جلايكول بتركيزات مختلفة. ثم حفظت الأجزاء النامية في ظروف حفظ مختلفة مثل الحرارة المنخفضة والتغطية بشمع البرافين وفي النيتروجين السائل بالإضافة إلى التخزين في الجو العادي. كما استخدامت طريقة الكبسولات في تغليف النسيج النباتي باستخدام ألجينات الصوديوم ٢% ثم وضع هذه الكبسولة على بيئة زراعة الأنسجة. كذلك تم الزراعة على بيئة خالية من الإضافات وحفظت تحت الظروف العادية (للمقارنة). وأخيراً أجريت تحاليل كيماوية وفسيولوجية للوقوف على أفضل الوسائل المستخدمة في حفظ الأصول الوراثية لبعض النبات عن طريق زراعة الأنسجة.

الملخص العربي

دراسات على حفظ وإنتاج الأصول الوراثية لبعض الأشجار والشجيرات البستانية باستخدام تقنيات زراعة الأنسجة

أجريت هذه الدراسة بالتعاون بين وحدة بحوث زراعة الأنسجة قسم البساتين بكلية زراعة مشتهر- جامعة الزقازيق - فرع بنها ومعمل بحوث زراعة الأنسجة - معهد بحوث البساتين- مركز البحوث الزراعية فى خلال الفترة ١٩٩٨- ٢٠٠٢ وذلك بهدف استخدام بعض الطرق الحديثة فى حفظ بعض الأجزاء النباتية لبعض الأنواع النباتية المختلفة وذلك باستخدام تقنيات زراعة الأنسجة . استخدمت بعض المعاملات المختلفة فى عملية الحفظ ودراسة التغيرات المورفولوجية والكيماوية و الفسيولوجية ومدى قدرة هذة الأجزاء النباتية إستعادة نموها مرة أخرى وقدرتها على الأكثار .

تم أخذ الأجزاء النباتية من الأنواع النباتية الأتية:

الخروب *Ceratonia siliqua* ، الأكاسيا *Acacia salicina* ، الورد *Rosa polyantha*

تم أخذ أجزاء نباتية مختلفة وإجراء عملية التعقيم فى وسط خالي من التلوثات، ثم زراعة هذة الأجزاء المفصولة على بيئة مكونة من أملاح (موراشيج و سكوج)كاملة التركيز مضاف إليها تركيزات مختلفة من BAP وميوأينوسيتول(١٠٠ ملجم/لتر) وذلك حسب النوع النباتى وتم إضافة البولى إثيلين جليكول بتركيزات(١٠ ، ١٥ ،٢٠جم / لتر) وسكر السوربيتول بتركيزات (٥ ، ١٠، ١٥ جم / لتر)ومثبط النمو الكيومارين (٠,٥، ١,٠ ، ١,٥ مجم/ لتر) إلى جانب معاملات الحفظ باستخدام درجة الحرارة المنخفضة (٤°م)فى الظلام ، بالإضافة إلى استخدام شمع البرافين السائل فى درجة حرارة الغرفة وذلك بالغمس لمدة دقيقة ثم الزراعة على بيئة الإكثار أو

بعمل طبقة من الشمع تغطى الجزء النباتى بسمك ٢سم علاوة على استخدم معاملة التجفيف وذلك بالزراعة فى جو جاف عن طريق استخدام مادة (كلوريد الكالسيوم ٢٠ جم/جار٤٠٠ مل) بالأضافة إلى استخدام طريقة الكبسولات في تغليف النسيج النباتى باستخدام أملاح حمض الألجينيك (ألجينات الصوديوم ٢%) فى عمل الكبسولة ثم وضع هذة الكبسولة على بيئة. كذلك تم الزراعة على بيئة خالية من الإضافات وحفظت تحت الظروف العادية (للمقارنة).

وأخيراً تم استخدام عملية الحفظ بالنيتروجين السائل كالآتى : -

استخدمت معاملات تمهيدية قبل الغمس فى النيتروجين حيث تم استخدام كبسولات (كما سبق تحضيرها) وتجفيفها لمدة ٤ ساعات بالسليكاجيل .وأجريت أيضاً عملية التجفيف للفصلة النباتية بدون كبسولة فى السليكاجيل وكلوريد الكالسيوم بمقدار ٥ جم / جار٢٠٠مل. كما استخدمت محاليل الحفظ (PEG ٥ ،١٠ ٪)+ (٥ ،١٠ ٪ DMSO) لمدة (٥ ، ١٠) دقائق ثم النقع فى الأثيلين جليكول (٢٠ - ١٠٪) لمدة (٥ ، ١٠ دقائق)على الترتيب كما أستخدمت الزراعة على مثبط النمو كيومارين بتركيز ١,٥مجم /لتر لمدة اسبوع ثم النقع فى النيتروجين السائل- أيضاً تم أستخدام DMSO ١٠٪ فى بيئة MS حيث تم الزراعة عليها لمدة يومين ثم النقل على بيئة بها جليسرول ٢,٥ % لمدة يومين ثم الغمس فى النيتروجين السائل . تم نقع الجزء النباتى بدون اى معاملة(للمقارنة). وفى نهاية كل معاملة تمت عملية إذابة للثلج المتكون حيث تم النقع فى حمام مائى على درجة ٤٠ مباشرة بعد لمدة ٥ دقائق ثم الزراعة على بيئة الأكثار MS .

حفظت الأجزاء النباتية تحت معاملات الحفظ المختلفة لمدة ٦ ، ١٢ ،١٨ شهر ماعدا معاملات النيتروجين السائل تم الغمس لمدة ٢٤ ساعة. وفى عقب كل فترة حفظ تم دراسة نسبة البقاء وبعض الصفات المورفولوجية

والكيماوية . ثم زراعة الأجزاء النباتية من كل معاملة حفظ لكل فترة مختلفة على بيئة MS وذلك بدون مواد الحفظ ولمدة ٨ أسابيع وذلك بهدف دراسة قدرتها على البقاء والمعيشة بعد الحفظ وبعض الصفات الخاصة بالنمو فى هذة الفترة.

١ - الخروب ***Ceratonia saliqua***

- سجلت أعلى نسبة للبقاء فى نهاية فترات الحفظ (١٨،١٢،٦ شهر) الأجزاء النباتية المزروعة على بيئة MS مضاف إليها مثبط النمو كيومارين بتركيز ١،٥ مجم /لتر (مع الحفظ فى الظروف الطبيعية من درجة حرارة الغرفة والإضاءة الطبيعية) وكان لإضافة البولى إيثيلين جليكول بتركيز ١٥ جم /لترتأثير ايجابى حيث أعطت أعلى نسبة من بقاء الأجزاء النباتية حية .
- يعتبر إضافة الكيومارين إلى بيئة الحفظ بتركيزات ١,٥-١,٠-٠,٥مجم /لتر و أيضا الغمس فى الشمع السائل أو إضافة PEG إلى البيئة بتركيز ١٥ جم /لتر كذلك الحفظ تحت الظروف الطبيعية من المؤثرات التى أعطت تأثير إيجابى فى زيادة قدرة البراعم على التفتح .
- أما عن تأثير المعاملات المختلفة على صفات النمو الخاصة بالمنفصلات النباتية التى تشمل (عدد وطول الأفرع وكذلك الأوراق المتكونة على كل فرع كذلك والمحتوى المائى لكل من الأفرع والكالس) فقد وجد أن كل هذه الصفات تأثرت بالمعاملات المختلفة حيث ادى كلا من التجفيف والكيومارين بتركيز ١،٥ مجم /لتر والغمس فى الشمع السائل تأثير إيجابى فى تحسين وزيادة معدلات هذه الصفات بينما كانت لكل من درجة الحرارة المنخفضة (٤ ° م) والإظلام أو الكبسلة لها تأثيرا سلبيا على هذه المتغيرات .

- تأثرت كل الصفات المورفولوجية بفترات الحفظ حيث كان أعلى نسب تم تسجيلها والحصول عليها بعد ١٢ شهر من الحفظ لكل الصفات ماعدا نسبة البقاء والمحتوى المائى للأفرع كانت أكثر المعاملات وأوضحها تأثرا بعد ٦ شهور حيث سجلت أعلى قيمة .
- من ناحية أخرى فقد تأثر المحتوى الكيماوى من الصبغات (كلوروفيل أ ،ب ، والكاروتين) وكانت أفضل النتائج نتيجة المعاملة لكلا من السوربيتول بتركيز ١٥ جم /لتر والكيومارين بتركيز ١،٥ مجم /لتر، بينما كان للمعاملةبالشمع سواء بالتغطية أو الغمس والحفظ بالكبسولات تأثيرا سلبيا على مستوى المستخلص النباتى من الصبغات .
- أما عن نواتج عملية التمثيل الحيوى من حيث المحتوى من الكربوهيدرات الكلية والفينولات الكلية وكذلك الإندولات فكان للحفظ تحت الظروف الطبيعية على بيئة MS وتحت تركيز ٢٠ جم /لتر لـ PEG وتركيز٠,٥ مجم /لتر للكيومارين تأثير إيجابى لزيادة هذه العملية .، أما عن المواد الصلبة الذائبة الكلية والضغط الإسموزى فقد زادت نتيجة لتعريض النباتات لعملية التجفيف و PEG بتركيز ١٥ جم /لتر .
- وكان لفترات الحفظ تأثير واضحا على المحتوى الكيماوى والفسيولوجى للنباتات التى تم حفظها فقد أعطت فترة ٦ شهور أفضل النتائج وأعلى محتوى كيماوى وفسيولوجى ماعدا المواد الصلبة الذائبة والإندولات حيث سجلت فترة ١٢ شهر أفضل النتائج وأعلى القيم .
- كان لمعاملة التجفيف أعلى تأثير فى زيادة نشاط إنزيمات الأكسدة البولى فينول أوكسيديز وإنزيم البيروكسيديز حيث وصلت إلى أقصى نشاط لها فى نهاية فترات الحفظ الثلاثة (٦، ١٢، ١٨ شهر) حيث وصل النشاط الإنزيمى لإنزيم البيروكسيديز أقصاه بعد ١٢ شهر ثم

إنخفض بعد ذلك إنخفاضا بسيطا ، وكان هذا التأثير مشابه لتأثير إنزيم البولى فينول أوكسيديز .

- الأجزاء النباتية المفصولة أظهرت أعلى قدرة على المعيشة عند إعادة زراعتها على بيئة MS (وذلك فى مرحلة الإكثار الدقيق) خلال فترات الحفظ ٦، ١٢، ١٨ شهر وذلك بعد زراعتها على بيئة MS مضاف إليها الكيومارين بتركيز ١ مجم /لتر بينما تقل هذه القدرة بإستخدام الكبسولات بزيادة فترات الحفظ
- كان للغمس فى الشمع ثم الزراعة على بيئة الإكثار القدرة على تكوين أكبر عدد من الأفرع والأوراق وأيضا طول هذه الأفرع بينما إنخفضت قيم هذه الصفات تحت تأثير كلا من السوربيتول والكبسولات .

يعتبر تأثير الفترات (٦، ١٢، ١٨) على الإكثار الدقيق للنباتات التى تم تعريضها للمعاملات المختلفة أفضل بعد ٦ شهور من الحفظ وذلك لمختلف صفات النمو ماعدا عدد الأوراق وطول الأفرع فكان لفترة ١٢ شهر التفوق فى إعطاء أعلى قيمة لهذين المتغيرين

٢ -الأ كاسيا ***Acasia salicina***

- سجلت نسبة البقاء للأجزاء النباتية المفصولة من نبات الأكاسيا والمنزرعة على بيئة MSأعلى نسبة بقاء تحت الظروف الطبيعية وكان لإضافة منبط النمو (الكيومارين بتركيزات ٠,٥ ، ١,٠ مجم/ لتر) دوراً هاماً فى زيادة هذة النسبة فى جميع مراحل الحفظ ، بينما قلت هذة النسبة فى معظم المعاملات بدرجة قليلة نسبياً.
- أدى استخدام شمع البرافين بالغمس أ والتغطية ،أيضاً عملية التجفيف، والتركيزات المختلفة من الكيومارين وإضافة السوربيتول بتركيزات ٥ ، ١٠ جم / لترإلى زيادة قدرة النباتات على تكوين الكالس حيث أعطت

أعلى معدلات فى حين اعطى كلا من التبريد العادى على درجة 4°C والكبسولات أفضل نتيجة من حيث تقليل كمية الكالس المتكونة .

- تحسنت الصفات الخاصة بالأفرع النباتية الناتجة من حيث (عدد الأفرع – طول كل فرع – عدد الأوراق، والمحتوى المائى لكل من الأفرع والكالس المتكون) وانحصرت أفضل النتائج بين الكيومارين والسوربيتول حيث أعطى أعلى عدد أفرع، وطول للنباتات ، وعدد أوراق لكل من الأفرع والكالس ، فى حين أنة زادت تغطية النباتات بشمع البرافين من نسبة المحتوى المائى لكل من الأفرع والكالس المتكون .
- أثرت فترات الحفظ على قدرة النباتات على المعيشة وتكوين كالس حيث أعطت فترة ٦ شهور أعلى قيمة لكل منهما فى حين كانت فترة ١٢ شهراً أفضل وأعطت أعلى قيمة من حيث قدرة البراعم على التفتح وعدد الأفرع ، وطولها أما باقى الصفات الأخرى الخاصة بالنمو(عدد الأوراق –المحتوى المائى للأفرع والكالس) فكانت أفضل نتائج لكل منهما بعد ٦ شهور من الحفظ .
- تأثر المحتوى الكيماوى للأجزاء النباتية المفصولة من حيث كميات الصبغات والفينولات و الأندولات والكربوهيدرات بالمعاملات المختبرة حيث أدت التغطية بشمع البرافين المحتوى من كلوروفيل ا ، ب بينما رفع(PEG ١٥جم/لتر) كمية الكاروتينات الكلية والفينولات الكلية إلى أعلى قيمة . وأثر كل من التجفيف و الكيومارين على محتوى الأجزاء النباتية من الأندولات الكلية والكربوهيدرات.
- أثرت معاملات السوربيتول على العمليات الفسيولوجية داخل الأجزاء النباتية المحفوظة حيث زاد كل من المواد الصلبة الذائبة الكلية

والضغط الأسموزى إلى أعلى قيمة وذلك عند إضافة السوربيتول بتركيزات ٥ ، ١٠ جم / لتر.

- تأثرت عملية الأكسدة الداخلية بأنزيمات الأكسدة البولى فينول أوكسيديز و البيروكسيديز من حيث النشاط الأنزيمى لهماحيث ادى إضافة كلاً من PEG ١٠جم/لترو التجفيف من زيادة النشاط الأنزيمى
- كانت فترة ٦ شهور أكثر الفترات تأثيراً على المحتوى الكيماوى (الصبغات والكربوهيدرات) والنشاط الفسيولوجى(المواد الصلبة الذائبة – الضغط الأسموزى) – والنشاط الأنزيمى (البيروكسيديز) بينما فترة ١٨ شهراً كانت أكثر تأثيراً على كلاً من الفينولات والأندولات الكلية والنشاط الأنزيمى لأنزيم البولى فينول أوكسيديز .
- فى عملية أعادة النمو مرة أخرى للأجزاء النباتية المحفوظة سجلت تركيزات الكيومارين المختلفة أعلى نسبة بقاء وقدرة على المعيشة ، أما بالنسبة لباقى صفات النمو، فإن اكبر عدد للأفرع والأوراق فكان نتيجة للمعاملة بالكيومارين بتركيزات ١٠مجم / لتر وأطول النباتات فكانت نتيجة للمعاملة بـPEG بتركيزات١٥ جم / لتر
- تعتبر أفضل الفترات هى فترة ٦ شهور وذلك للنباتات الناتجة بعد الحفظ من حيث صفات النمو كلها بعد الحفظ

٣ – الورد ***Rosa polyantha***

- أدى اضافة الكيومارين بتركيز٠,٥ جم /لتر إلى بيئة MS الى تسجيل أعلى نسبة لقدرة الأجزاء النباتية المفصولة على المعيشة لنبات الورد وكان أيضا تركيز ١ جم /لتر من نفس المادة والحفظ تحت درجة الحرارة المنخفضة (٤ْ م) دورا هاما فى رفع هذه النسبة .
- زادت صفات النمو والتى تشمل (عدد وطول الأفرع وعدد الأوراق وكذلك والمحتوى المائى للأفرع والكالس) حيث أعطى الكيومارين

بتركيز ١ جم / لتر أعلى نسبة من عدد الأوراق والمحتوى المائى بالإضافة إلى زيادة عدد وطول الأفرع نتيجة للتعرض للحرارة المنخفضة (٤ْ م) والإظلام .

- زاد المحتوى الكيماوى للصبغلت النباتية داخل الأجزاء النباتية المحفوظة بإستخدام الكيومارين (٠,٥ مجم /لتر ١,٠ مجم /لتر) ووصلت الكاروتينات الكلية تحت تأثير السوربيتول ١٠ جم /لتر زادت إلى أعلى قيمة .بينما لباقى نواتج عملية التمثيل الغذائى من (الكربوهيدرات الكلية والفينولات الكلية وكذلك الإندولات والضغط الإسموزى والمواد الصلبة الذائبة الكلية فقد اعطت معاملة الكيومارين بتركيز ١جم /لتر أعلى قيمة من هذا المحتوى الكيماوى والفسيولوجى .
- أما عن نشاط إنزيمات الأكسدة فكانت نفس المعاملة (الكيومارين ١ جم /لتر) لها أعلى قيمة فى النشاط الإنزيمى (إنزيم البيروكسيديز والبولى فينول أوكسيديز على الترتيب).
- تأثرالمحتوى الكيماوي للنبات المأخوذة بعد الحفظ بفترة الحفظ حيث كانت فترة شهور اكثر الفترات تأثيرا في زيادة محتواها من التركيب الكيماوي من كلا من الصبغات والكربوايدرات الكلية و الفينولات والاندولات وكذلك الضغط الإسموزى والمواد الصلبة الذائبة الكلية والنشاط الإنزيمى لانزيم البيروكسيديز والبولى فينول أوكسيديز .
- فى مرحلة الإكثار الدقيق إمتد تأثير الحرارة المنخفضة (٤ْم) والإظلام أو الكيومارين بتركيز (٠,٥، ١جم /لتر المضاف إلى بيئة الحفظ ليؤدى إلى زيادة نسبة بقاء النباتات فى مرحلة الإكثار وخصوصا خلال فترات الحفظ الثلاثة (١٨،١٢،٦) شهرا وكان لنفس المعاملات فى إعطاء أعلى نتيجة من قدرة البراعم على التفتح

وطول وعدد الأفرع بينما تفوقت معاملة الحرارة المنخفضة فى قدرة الأجزاء النباتية على تكوين كالس .

- أما عن تأثير الفترات على مرحلة الإكثار الدقيق فكانت فترة ٦ شهور أكثر الفترات تأثيرا فى الصفات المورفولوجية للنباتات التى تم عمل إكثار دقيق لها .

- **الحفظ بالنيتروجين السائل : Cryopreservation**

الخروب *Ceratonia siliqua*

- فأعطت المعاملة بالكيومارين ١،٥ مجم / لتر والكبسولات المجففة بكلوريد الكالسيوم أعلى نتيجة فى قدرة الأجزاء النباتية فى البقاء على المعيشة فى نبات الخروب.

الأكاسيا *Acacia salicina*

- اعطىكل من التجفيف بـ $CacL_2$ والنقع فى محلول الحفظ PV ومعاملة Encapsulation /Dehydration بكلوريد الكالسيوم أعلى نتيجة فى نسبة بقاء الأجزاء النباتية حية فى نبات الأكاسيا.

الورد *Rosa polyantha*

- لم تؤثر المعاملات التمهيدية التى تسبق الغمس فى النيتروجين السائل فى نسبة البقاء لنبات الورد حيث فشلت كل النباتات المعاملة بهذه المعاملات فى البقاء حية .

- أما عن المحتوى الكيماوى من الفينولات والإندولات والكربوهيدرات فى نبات الورد فكان للتجفيف بإستخدام $CaCL_2$ أعلى مستوى من هذه المكونات الكيماوية كذلك كان لنفس المعاملة نفس التأثير على نبات الخروب بينما فى نبات الأكاسيا فكان التأثير النقع فى محاليل الحفظ PV_1 و pregroth 2 وكذلك معاملة الكنترول على المحتوى الكيماوى كان إيجابى حيث أدى إلى رفع محتواها من هذه المكونات .

- كذلك فىنبات الورد و الخروب زاد محتوى النبات مـن الصـبغات (الكلورفيل ا ، ب ، والكاروتينات الكلية)تحت تأثير التجفيف بكلوريـد الكالسيوم بينما فى نبات الأكاسيا فقد زاد محتوى النبـات مـن هـذة المكونات تحت تأثير النقع فى محلول الحفظ (PVS 3)

اما النشاط الأنزيمى فقد وصل النشاط الأنزيمى لإنزيم البيروكسيديز (POD) لأقصاة فى نبات الورد تحت تأثير النقع فى محلـول الحفـظ (PVS4) و نفس النتيجة فى الخروب عند النمو على بيئة بها مثبط نمو كيومارين ١,٥مجم/لتركذلك فى الأكاسيا وجد نفس النتيجة عند الكبسلة ثم التجفيف بكلوريد الكالسيوم.كما زاد النشاط الأنزيمى لإنزيم البـولى فينول أوكسييز بالنقع فى محلول الحفظ (PVS4)فى كلاً من الخـروب والأكاسيا ، فى حين زادالنشاط الأنزيمى فى نبات الورد وذلـك بعـد غمسها مباشرة بدون معاملة.