مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (30) العدد (3) 2008
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (30) No. (3) 2008

تأثير منظمات النمو في إنتاج فروع خضرية من الزعرور Crataegus Azarolus, L بالزراعة في الزجاج In Vitro

الدكتور مروان حميدان*
الدكتور أحمد عبد القادر**
جهاد ضميرية***

(تاريخ الإيداع 26 / 2 / 2008. قبل للنشر في6/16 /2008)

□ الملخّص □

زرعت عقل صغيرة (تحوي برعماً واحداً) مأخوذة من أشجار الزعرور *Crataegus azarolus L.* النامية بشكل طبيعي في منطقة ريف دمشق ، بعد تعقيمها سطحياً على وسط موراشيج وسكوك المغذي (MS) مضافاً له البنزيل أدنين (BA) أو الكينيتين (Kin) بأربع تراكيز لكل منهما هي : 5، 10، 15، 20 ميكرومول / ل، وأضيف حمض إندول بيوتيريك (IBA) بتركيز 0.5 ميكرومول / ل لجميع المعاملات .

لوحظ أعلى معدل للانبثاق proliferation (بمتوسط حوالي 4 نموات جديدة متشكلة) بعد أربعة أسابيع من الزراعة على الوسط **MS1** الذي يحتوي على : البنزيل أدنين (5 ميكرومول/ ل) + حمض إندول بيوتيريك (0.5 ميكرومول/ ل) متفوقاً بذلك على الوسط **MS5** الذي يحتوي على: الكينيتين (5 ميكرومول/ ل) + حمض إندول بيوتيريك (0.5 ميكرومول/ ل) والذي أعطى عدداً من النموات بمتوسط قدره 1.15 نمواً جديداً. أدت زيادة تركيز البنزيل أدنين في وسط الزراعة إلى انخفاض في متوسط طول النموات، بينما أدت زيادة تركيز الكينيتين إلى تشكل نموات ذات مسطح ورقي كبير نسبياً مع انخفاض في عدد التفرعات وزيادة طولها.

الكلمات المفتاحية: زعرور، إكثار دقيق، زراعة أنسجة، منظمات نمو نباتية ، سيتوكينين ، أوكسين.

* أستاذ – قسم البساتين . كلية الزراعة . جامعة تشرين . اللاذقية . سورية .
** رئيس قسم التقانات الحيوية . الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية . مركز دوما . دمشق . سورية .
*** طالب دراسات عليا (ماجستير) – قسم البساتين . كلية الزراعة . جامعة تشرين . اللاذقية . سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (30) العدد (3) 2008
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (30) No. (3) 2008

Effect of Growth Regulators on *In-Vitro* Proliferation of *Crataegus azarolus*, L. Hawthorn

Dr. Marwan Homedan[*]
Dr. Ahmad Abdul-Kader[**]
Jehad Dumireih[***]

(Received 26 / 2/ 2008. Accepted 16 /6 /2008)

□ ABSTRACT □

Single cuttings with one bud excised from adult of Hawthorn *Crataegus azarolus L.* trees, grown in the field under natural conditions in Damascus countryside are surface-disinfected and cultured on MS basal medium, containing a combination of growth regulators at different concentrations (BA or Kin. at 5, 10, 15 or 20 µM/ l) each with IBA 0.5 µM / l. The highest proliferation rate (4 neoformations) is detected 4 weeks after the culturing on **MS1** medium supplemented with 5 µM/ l BA + 0.5 µM/ l IBA compared to **MS5** medium which contains 5 µM/ l Kin + 0.5 µM/ l IBA (1.15 neoformations). An increase in BA conc. has led to a decrease in neoformations height, while the increase in Kin conc. has increased the foliage surface and the height of neoformations, but with fewer shoots.

Keywords: Hawthorn, *Crataegus azarolus L.***,** Micropropagation, Plant growth, Regulators, Cytokinins, Auxin

[*]**Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
[**]**Head of Biotechnology Department, General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Douma, P. O. Box 113, Damascus, Syria.**
[***]**Postgraduate Student, Horticulture Department , Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

يتبع الزعرور *Crataegus azarolus L.* تحت الفصيلة التفاحية (*Pomoideae*) والفصيلة الوردية *Rosaceae* ، ويعتبر من المصادر الوراثية المهمة فهو يتحمل الجفاف ، وارتفاع نسبة الكلس في التربة بالإضافة إلى تحمله للشتاء البارد والصقيع، ويصلح للزراعة في الأراضي المحجرة، ويتواجد في الارتفاعات العالية حتى 1800 م فوق سطح البحر.

هناك محاولات ناجحة لاستعمال الزعرور من النوع *azarolus* كأصل للكمثرى (الصنف كوشيا)، واستخدام النوع *C. sinaica* كأصل للصنف ويليامز، إضافة لاستخدامه كأصل لتطعيم الأنواع المحسنة من الزعرور (مزهر، 1998). وقد بينت نتائج التجارب في حقول الجامعة في الأردن (Qrunflch, 1994) إمكانية نجاح استخدام نوع الزعرور *C. azarolus* كأصل لكل من : التفاح (الصنف Golden Delicious) والكمثرى (الصنف Williams). من جهة ثانية يكتسب الزعرور أهمية خاصة لما لثماره من قيمة طبية عالية، فهي تستعمل كعلاج لبعض أمراض القلب وكمنشط، إضافة لاستخدام أشجاره كسياج للحدائق والمنتزهات (ضميرية، 2001).

مما تقدم تبرز أهمية إكثار الزعرور بطريقة سريعة وآمنة، وتشير المراجع إلى وجود العديد من الأبحاث والدراسات حول إكثاره بالطرائق التقليدية، ولكن الأبحاث حول إكثاره بزراعة الأنسجة قليلة جداً؛ ففي مجال الإكثار البذري توجد العديد من الدراسات حول تأثير عدد من المعاملات على البذور لتحسين إنباتها، ، وقد بينت النتائج صعوبة إكثار الزعرور بالبذور لدخولها بسكون مضاعف يتعلق بكل من الجنين وغلاف البذرة ما يستدعي تنضيدها لفترات طويلة، وحاجتها إلى معاملات مختلفة لكسر السكون فيها (Dirr and Heuser 1987; Mahlsted and Harbr, 1975; Brinkman,1974; Harthman and Kester 1997; Tipton and Pedroza, 1986; Young and Young, 1992; Morgenson, 2000; Hazin *et al* .2006.)

كما بينت الأبحاث والدراسات صعوبة إكثار الزعرور خضرياً بتجذير العقل والتطعيم، إذ لم تتجاوز نسب نجاح التجذير 36% (Bush, *et al.* 1991; Dirr and Heuser 1987). وبالتالي فإن الإكثار في الزجاج *In Vitro* يمكن أن يكون طريقة فعالة للتغلب على المشاكل التي تعترض الإكثار بالطرائق التقليدية، وعلى الرغم من ذلك فإن الدراسات حول إكثار الزعرور في الزجاج قليلة، ولا توجد أية دراسات حول إكثار نوع الزعرور المنتشر في منطقة ريف دمشق (موضوع هذه الدراسة) بتقانات الزراعة *In Vitro* ، لذلك فإنه يمكن اعتبار هذا البحث مساهمة في الأبحاث الجارية لإكثار الأنواع المختلفة من الزعرور مخبرياً .

تشير المراجع المتوفرة إلى إمكانية إكثار الزعرور *In Vitro* بواسطة زراعة العقل المفردة التي تحوي برعماً واحداً (Rajesh and Bist, 2002; Margaret and Colin, 1986; Picconi and Standardi, 1995; Wawrosch,*et al.* 2007; Marks and Simpson 1999; Hong *et al.* 1987; Shizhou *et al.* 1987; Haapala, 2004.)، فقد جرت دراسة قدرة البراعم الناتجة عن الإكثار نسيجياً لستة أنواع خشبية ومنها نوع الزعرور *C. oxyacantha* على إعادة نموها بعد فترة زمنية من التغليف، وتم التوصل إلى نتائج إيجابية، إذ أظهرت الأنواع المدروسة قدرة كبيرة على إعادة النمو بعد التغليف بمادة Sodium alginate (على شكل كبسولات) ولكن بشرط إعادة الزراعة في بيئة غنية بالمواد المغذية حسب كل نوع نباتي ، وقد أعطى نوع الزعرور المشار إليه معدل تفرع يتراوح مابين 2 – 3 فروع للكبسولة الواحدة وذلك بعد إعادة الزراعة على بيئة MS مضافاً لها الـ : BA بتركيز 0.5 ملغ / ل و سلفات الأدينين Adenine sulfate بتركيز 1 ملغ / ل(Picconi and Standardi, 1995) .

وقد وجد (Hong et al , 1987) عند إكثار نوع الزعرور *C . scabrifolia* بزراعة الأنسجة أن زراعة البراعم الجانبية تعطي تفرعات أفضل من البراعم الطرفية وذلك عند استخدام وسط إكثار MS يحوي BA بتركيز 2 – ملغ/ ل و IAA بتركيز 0.5–1 ملغ/ ل وكانت نسبة تجذير النموات المأخوذة من نباتات بالغة 80%، وبلغت 98% بالنسبة للنباتات الفتية وذلك عند استخدام وسط MS يحتوي على IBA أو IAA بتركيز 0.05–1 ملغ/ل للتجذير .

وقد بينت النتائج التي توصل إليها (Wawrosch et al, 2007) أن تقنية الإكثار الخضري الدقيق لنوع الزعرور *Crataegus monogyna Jacq.* باستخدام البراعم الخضرية الجانبية أسرع وأفضل من طريقة الإكثار التقليدي بالعقل التي بدت بطيئة وصعبة ، وقد جرى الإكثار بزراعة البراعم الخضرية الجانبية التي جمعت من أشجار بالغة في فصل الربيع بعد تعقيمها سطحياً على بيئة MS الحاوية على الزياتين Zeatin بتركيز 10 ميكرومول، ثم زراعة النموات القمية للفروع النامية على بيئة MS الحاوية على BA و IBA ، وبهدف التجذير غمست قواعد النموات الخضرية بمسحوق التجذير Seradix® B3 ثم زرعت في التربة داخل حاضنات رطبة، ثم نقلت بعد ذلك إلى البيت الزجاجي لمتابعة التقسية .

كما جرت دراسة لإكثار الزعرور بجمع الطرود من الأشجار ووضعها في محلول مغذي يحتوي على السكروز بتركيز 58.4 mM و Hydroxyquinoline citrate بتركيز 0.59 mM بهدف تنبيه نمو البراعم الخضرية الجانبية، حيث زرعت البراعم المتفتحة بعد تعقيمها سطحياً بمحلول هيبوكلوريت الكالسيوم المفلتر بتركيز 5% W/V على بيئة LS الحاوية على BA بتركيز 2.5 µM و IBA بتركيز 0.5 µM) .(Marks and Simpson , 1999)

استخدمت تقانات زراعة الأنسجة أيضاً في إكثار الزعرور بزراعة نصل الورقة بهدف إحداث تحوير وراثي باستخدام تقانات الهندسة الوراثية (Dai *et al* 2007) .

كما جرت دراسة تأثير التشعيع في تحسين تفرع النباتات الناتجة عن الإكثار بزراعة الأنسجة ومنها نوع الزعرور *C. oxyacantha* فتبين تحمل هذا النوع لمستويات عالية من التشعيع، مع ملاحظة وجود تأثير مثبط للتشعيع في طول الفروع المتشكلة ، بينما لم يتأثر محتوى الأوراق من الكلوروفيل بالمستويات العالية منه وذلك في مرحلة الإكثار، وجرت عملية الإكثار بعد جمع الطرود ووضعها في محلول مغذي يحتوي على السكر وز بتركيز 58.4 mM و Hydroxyquinoline citrate بتركيز 0.59 mM بعد ذلك أخذت البراعم الخضرية الجانبية المتفتحة وجرى تعقيمها سطحياً بهيبوكلوريت الكالسيوم المفلتر بتركيز 5% W/V وزرعت على بيئة LS (Linsmeir and Skoog) الحاوية على BA بتركيز 2.5 µM و IBA بتركيز 0.5 µM , Marks and Simpson) . 1999)

أما بالنسبة للتعقيم فقد أشار (Dai *et al* . , 2007) عند إكثاره لنوع الزعرور *Crataegus pinnatifida* إلى أن أفضل طريقة لتعقيم العقل المفردة الحاوية على برعم واحد سطحياً هي غسلها بالماء الجاري ثم غمسها بالإيتانول تركيز 70% لمدة 30 ثانية، ثم نقعها بمحلول كلوريد الزئبق تركيز (0.1%,W/V) لمدة 5 دقائق، ثم غسيل بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات تحت جهاز العزل .

أهمية البحث وأهدافه :

تعاني أنواع الزعرور البرية في سورية من خطر الانقراض نتيجة التعرية الوراثية التي تتعرض لها، وفقدان للتنوع الوراثي نتيجة النشاطات البشرية المختلفة مثل : القطع والرعي الجائر للأشجار، والزحف السكاني، واستصلاح الأراضي وهذا ما حصل لأنواع الزعرور المنتشرة في محافظة درعا (مزهر، 1998).

انطلاقا من هذا الواقع ، ونظراً لصعوبة الإكثار الجنسي للزعرور بسبب تدني نسب إنبات بذوره، فإن استخدام الطرائق الحديثة في الإكثار ، ودراسة العوامل المؤثرة في الإكثار الخضري الدقيق Micropropagation يعتبر أمراً هاماً لحفظ الأنواع البرية المختلفة وحمايتها من الانقراض لاستخدامها في برامج التحسين الوراثي، والعمل على نشرها وزراعتها في المناطق الجافة بالإضافة إلى الاستفادة من استخداماتها الزراعية والطبية.

يهدف البحث إلى :

1- تحديد أفضل طريقة للتعقيم السطحي للأجزاء النباتية المستخدمة في الزراعة التأسيسية .

2- تحديد أفضل وسط مغذي، لإنتاج أكبر عدد من النموات الخضرية لنوع الزعرور المدروس.

3- دراسة تأثير نوع وتركيز السيتوكينين المضاف للوسط المغذي في متوسط طول وعدد النموات الجديدة المتشكلة في مرحلة الإكثار المخبري في الأنابيب.

مواد البحث وطرائقه:

-مكان تنفيذ البحث: نفذ البحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- قسم بحوث التقانات الحيوية - دائرة زراعة الأنسجة النباتية- دوما وذلك خلال الأعوام 2006 و2007.

- المادة النباتية:

جرت الدراسة على نوع الزعرور *Crataegus azarolus,* L. وهو عبارة عن شجرة أو شجيرة ارتفاعها (2-10) متر، فروعها قليلة الأشواك نسبياً، بنية وعليها أوبار، الأوراق متساقطة جلدية، بيضية مقلوبة (قمتها المدببة إلى أسفل)، طويلة مستدقة باتجاه عنق الورقة. الورقة مفصصة (3 – 5 فصوص)، خضراء وعلى سطحها العلوي أوبار قليلة، وقد تكون خالية من الأوبار على الوجهين، عنق الورقة طويل، وقد يصل طوله إلى 2 سم أو أكثر. الفصوص كاملة أو مسننة عند القمة، الأوبار ضئيلة. البتلات في الزهرة بيضاء، والثمرة صفراء أو حمراء وردية تصلح للتسويق، وتزرع الأشجار غالباً لثمارها ذات النوى الحجرية وتحتوي الثمرة عادة على بذرتين.

ينمو الزعرور موضوع هذه الدراسة بشكل طبيعي في المناطق نصف الجافة على هيئة غابات موزعة بشكل متفرق أو على شكل أشجار معزولة تنمو على أطراف الحقول، كما يوجد في الجبال وعلى جوانب الهضاب أو التلال، ويزهر في أشهر: آذار ، نيسان وأيار. ويوجد هذا النوع عالمياً في : جنوب أوروبا، تركيا، قبرص، القوقاز، العراق، إيران، ولبنان. أما في سوريا فيوجد هذا النوع في المناطق الساحلية وهضبة حلب وجبل الأكراد وعفرين وجبل الزاوية والغاب وحمص وحماة والمنطقة الجنوبية وغيرها.

جمعت المادة النباتية لإجراء التجارب المختلفة لتنفيذ البحث من شجرة معمرة في منطقة رنكوس بمحافظة ريف دمشق .

مراحل تنفيذ البحث :

1) تجهيز الأجزاء النباتية: جمعت الطرود بعمر سنة قبل بدء سريان العصارة من أشجار نامية في الحقل تحت الشروط الطبيعية، في منطقة رنكوس بمحافظة ريف دمشق، وغمرت قواعدها في الماء عدة أيام بدرجة حرارة الغرفة، بعدها جرى تجهيز عقل مفردة تحوي على برعم إبطي واحد، لاستعمالها كمادة أولية في الزراعة التأسيسية

2) التطهير السطحي للأجزاء النباتية : وضعت الأجزاء النباتية (عقل مفردة يحوي كل منها برعماً إبطياً) في أوعية زجاجية فيها ماء وصابون، وغطيت بقطعة من الشاش، ووضعت تحت الماء الجاري لمدة ساعة، عوملت بعدها بمبيد فطري وأجريت عليها تحت جهاز العزل الجرثومي معاملات التعقيم السطحي بعد نقعها بالكحول الإيثيلي 70 % لمدة دقيقة. بعد ذلك جرت دراسة اختبار كفاءة التعقيم بالمعاملات التالية (50 عقلة / المعاملة):

أ- النقع في محلول ثنائي كلوريد الزئبق $HgCl_2$ بتركيز 0.01 % ولمدة 5 و10 دقائق، ثم غسيل ثلاث مرات بماء مقطر معقم.

ب-النقع في محلول الكلوروكس التجاري الذي يحوي هيبو كلوريت الصوديوم كمادة فعالة بنسبة 5.25% ، وذلك بتراكيز 15- 30 % ولمدة 15 – 30 دقيقة ثم غسلت 3 مرات بماء مقطر معقم.

ج- النقع في محلول هيبو كلوريت الكالسيوم بتركيز 10غ /ل ولمدة 5- 15 دقيقة ثم غسيل 3 مرات بماء مقطر معقم، وأضيفت في جميع الحالات قطرة من محلول توين 20 لكل 100 مل من محلول التعقيم لخفض التوتر السطحي .

3) تأسيس الزراعات المعقمة ودراسة كفاءة التعقيم : بعد إجراء التطهير السطحي للأجزاء النباتية زرعت العقل في أنابيب تحوي وسط موراشيج وسكوك الأساس بنصف التركيز (1/2 MS) الخالي من منظمات النمو وبمعدل 50 عقلة (أنبوب) / المعاملة، وبعد أسبوع من الزراعة استبعدت الأنابيب الملوثة، وقدرت كفاءة معاملات التعقيم بحساب عدد النموات غير الملوثة والنموات الحية (جدول 2) ، وبعد شهر أعطت البراعم الإبطية للعقل المزروعة نموات خضرية ، أعيدت زراعتها على أحد الأوساط المغذية لمدة 3 أشهر و بفاصل 4 أسابيع بين عمليات النقل المختلفة، بهدف الحصول على عدد كاف من النموات الخضرية لإجراء تجارب الزراعة على أوساط النمو الاختبارية .

الشكل رقم (1) : الزراعات التأسيسية للزعرور *Crataegus azarolus* L. المنتشر في منطقة ريف دمشق مخبرياً

زراعة النموات الخضرية على أوساط النمو الاختبارية: جرت تجزئة النموات الخضرية الناتجة عن نمو البراعم الإبطية للعقل بقصها إلى أجزاء بطول 1–2 سم، وزرعت على أوساط النمو الاختبارية والمكونة من وسط الأساس (MS) الحاوي الأوكسين وهو حمض إندول بيوتريك (IBA) وبتركيز ثابت لجميع المعاملات 0,5 ميكرومول / ل (بهدف تحقيق نوع من التوازن : أوكسين . سيتوكينين) ، مضافاً لها السيتوكينين: البنزيل أدنين (BA) أو الكينيتين (Kin) بأربعة تراكيز لكل منهما وهي: 5، 10، 15، 20 ميكرومول / ل ، وبالتالي كان مجموع عدد المعاملات المختبرة 9 معاملات بما فيها معاملة الشاهد الخالية من الإضافات الهرمونية، بحيث يشير رقم الوسط (المعاملة) إلى نوع السيتوكينين وتركيزه (جدول 1). وبعد أربعة أسابيع من الزراعة على الأوساط الاختبارية، أخذت القراءات لتسجيل عدد النموات الخضرية المتشكلة (بدءاً من نمو واحد) وأطوالها.

أوساط الزراعة:

أ- **الوسط الأساس MS:** استخدم محلول Murashige and Skoog (1962) للعناصر المعدنية الكبرى والصغرى مع الإضافات التالية: سكروز 30 غ/ل، آجار 7غ/ل. وضبطت حموضة الأوساط المغذية بحيث كانت درجة الـ pH= 5.7 قبل التعقيم باستخدام جهاز التعقيم الرطب (الأوتوكلاف) على درجة حرارة 121 °م ولمدة 20 دقيقة.

ب- أوساط النمو الاختبارية: تكونت أوساط النمو الاختبارية من وسط الأساس (MS) الحاوي على حمض إندول بيوتريك (IBA) بتركيز ثابت لجميع المعاملات (0,5 ميكرومول / ل)، ولدراسة تأثير نوع وتركيز السيتوكينين أضيف البنزيل أدنين (BA) أو الكينيتين (Kin) بأربع تراكيز لكل منهما وهي: 5، 10، 15، 20 ميكرومول / ل ، وبالتالي كان مجموع عدد المعاملات المختبرة 9 معاملات بما فيها معاملة الشاهد الخالي من الإضافات الهرمونية، بحيث يشير الرقم إلى المعاملة جدول (1) .

الجدول (1): التراكيز الهرمونية (ميكرومول / ل) المستخدمة في إكثار الزعرور *Crataegus azarolus* مخبرياً *In Vitro*

رمز الوسط (المعاملة) / الهرمون	بنزيل أدينين (BA)	حمض إندول البيوتريك (IBA)	كينيتين (Kin)
MS1	5	0.5	-
MS2	10	0.5	-
MS3	15	0.5	-
MS4	20	0.5	-
MS5	-	0.5	5
MS6	-	0.5	10
MS7	-	0.5	15
MS8	-	0.5	20
MS9	0.00	0.00	0.00

شروط الزراعة:

حضنت الزراعات في غرفة النمو Growth Room في الشروط التالية :

- درجة الحرارة 24 ± 1 ْ م نهاراً و16 ± 1 ْم ليلاً .
- فترة الإضاءة : 16 ساعة إضاءة و 8 ساعات ظلام أثناء النمو.
- شدة الإضاءة : 2000 – 3000 لوكس عند مستوى الزراعات (استعملت مصابيح فلورسنت بيضاء).

التحليل الإحصائي:اتبع تصميم التوزيع العشوائي التام ، حيث كان عدد الوحدات التجريبية(عدد الأنابيب) في المعاملة 40 أنبوباً، وعدد المكررات ثلاثة. واستعمل لتحليل التباين برنامج (ANOVA-2) وحللت النتائج باستخدام البرنامج

الإحصائي MSTAT بوساطة الحاسب، وجرت مقارنة المتوسطات بحساب أقل فرق معنوي LSD عند مستوى 0.05 .

النتائـج والمناقشة:

التطهير السطحي للأجزاء النباتية :

بمقارنة نتائج استخدام مركبات التعقيم المختلفة تبين أن كفاءة التعقيم بمحلول هيبوكلوريت الكالسيوم كانت منخفضة جداً، وبلغت نسبة التلوث في الخزعات المزروعة 88 %، أما استعمال محلول كلوريد الزئبق فقد أبدى فعالية أكبر بالتعقيم مقارنة مع هيبوكلوريت الكالسيوم إذ تراوحت نسبة الخزعات غير الملوثة مابين 30 – 40 % ، إلا أن نسبة الموت فيها كانت كبيرة جداً وخاصة عندما كان زمن التعقيم 10 دقائق.

بينما أعطت معاملة التعقيم بمحلول الكلوروكس التجاري الذي يحتوي على هيبوكلوريت الصوديوم بنسبة 5.25 % وبتركيز 30 % ولمدة 15 دقيقة نتائج مقبولة حيث بلغ معدل التلوث 50% جدول (2)، وقد لوحظ بدء نمو البراعم على الخزعات السليمة خلال أسبوعين من الزراعة، وهي التي استعملت في الزراعات التأسيسية(الشكل رقم1).

الجدول (2) : كفاءة معاملات التعقيم المستخدمة في مرحلة الزراعة التأسيسية

معاملات التعقيم	عـــددالعقل المزروعة	عدد العقل الملوثة	النسبة المئوية للتلوث %	عدد العقل غير الملوثة	عدد العقل الحية	النسبة المئوية للعقل الحية من العقل غير الملوثة
كلوريد الزئبق تركيز 0.01% ولمدة 5 دقائق	50	20	%40	30	10	33.3
كلوريد الزئبق تركيز 0.01% لمدة 10 دقائق	50	15	%30	35	5	14.3
هيبوكلوريت الكالسيوم تركيز 5غ/لتر لمدة 5 د	50	48	%96	2	2	100
هيبوكلوريـــت الكالســـيوم تركيـــز 10غ لتـــر لمدة 10 د	50	44	%88	4	4	100
كلوروكس تركيز 15% ولمدة 30 دقيقة	50	38	%76	12	12	100
كلوروكس تركيز 30% ولمدة 15 دقيقة	50	25	%50	25	25	100

تكاثر النموات الخضرية مخبرياً :

جرت دراسة تأثير تراكيز مختلفة من البنزيل أدينين BA والكينيتين Kin في عدد النموات الجديدة المتشكلة وطولها، بوجود حمض الإندول بيوتريك IBA بتركيز 0.5 ميكرومول / ل (جدول رقم 3) مع الإشارة إلى أن تشكل الفروع الحديثة ونموها في الزراعات السليمة بدأ خلال أسبوعين من الزراعة .

الجدول (3) : تأثير أوساط الزراعة المختلفة في متوسط عدد وطول النموات الجديدة للزعرور *Crataegus azarolus*, L. المنتشر في منطقة ريف دمشق(متوسط 40 أنبوباً± الخطأ المعياري SE)

رمز الوسط	تركيب الوسط	متوسط طول النموات /سم	متوسط عدد النموات
MS1	MS + 5 BA + 0.5 IBA	2.690 a ± 0.106	3.900 a ± 0.341
MS2	MS + 10 BA + 0.5 IBA	2.266 b ± 0.131	2.650 b ± 0.228
MS3	MS + 15 BA + 0.5 IBA	1.813 def ± 0.101	2.625 b ± 0.174
MS4	MS + 20 BA + 0.5 IBA	1.612 f ± 0.121	2.725 b ± 0.215
MS5	MS + 5 Kin + 0.5 IBA	1.900 de ± 0.090	1.150 c ± 0.057
MS6	MS + 10 Kin + 0.5 IBA	2.175 bc ± 0.099	1.175 c ± 0.071
MS7	MS + 15 Kin + 0.5 IBA	1.837 def ± 0.075	1.075 c ± 0.047
MS8	MS + 20 Kin + 0.5 IBA	2.000 cd ± 0.098	1.125 c ± 0.053
MS9	MS	1.737 ef ± 0.044	1.050 c ± 0.035
$LSD_{0.05}$		0.252	0.460

تأثير أوساط الزراعة المستخدمة في تشكل النموات الخضرية:

يبدو من الجدول (3)، تفوق الوسط MS1 الحاوي على التراكيز الهرمونية + (5µM BA 0.5µM IBA) على جميع الأوساط الأخرى وبفروق معنوية، فقد بلغ متوسط طول النموات على هذا الوسط 2.69 سم وبلغ متوسط عدد النموات 3.9 نموات جديدة كل أربعة أسابيع بدءاً من نمو واحد ، وبالتالي يمكن القول أن هذا الوسط قد حقق أعلى معدل نمو (طول ، عدد) .

دراسة تأثير منظمات النمو في معدل الإكثار في الأنابيب:

تأثير تركيز البنزيل أدينين BA في طول وعدد النموات الجديدة المتشكلة :

تفوق البنزيل أدنين BA بتركيز 5 ميكرومول على جميع التراكيز الأخرى المستخدمة منه في التأثير على متوسط طول النموات وعددها، كما تفوقت الأوساط الحاوية على BA بجميع التراكيز على الأوساط الحاوية على الكينيتين Kin وبنفس التراكيز وبفروق معنوية وذلك من حيث متوسط عدد النموات، بينما كانت الفروق ظاهرية بين الوسط الذي يحوي BA بتركيز 15 و 20 ميكرومول وبين الوسط الشاهد وذلك من حيث متوسط طول النموات.

ولوحظ تشكل الكالوس عند قواعد النموات في حال إضافة تراكيز مرتفعة من BA إلى الوسط حيث بلغت نسبة تشكل الكالوس (70، 90، 100 %) عند تراكيز BA (10، 15، 20 ميكرومول) على التوالي.

وأدت زيادة تركيز BA في الوسط من 5 إلى 10 ميكرومول إلى تناقص في متوسط عدد النموات بفروق معنوية، بينما كانت الفروق ظاهرية وغير معنوية عند زيادة تركيز BA من 10 إلى 15 أو 20 ميكرومول؛ كما أدت زيادة تركيز BA في الوسط من 5 إلى 10 أو 15 ميكرومول إلى تناقص في متوسط طول النموات وبفروق معنوية بينما كانت الفروق ظاهرية عند زيادة التركيز من 15 إلى 20 ميكرومول، كما أدت زيادة تركيز BA في الوسط إلى زيادة تشكل الكالوس عند قواعد النموات. (جدول 3، والشكل 2-6).

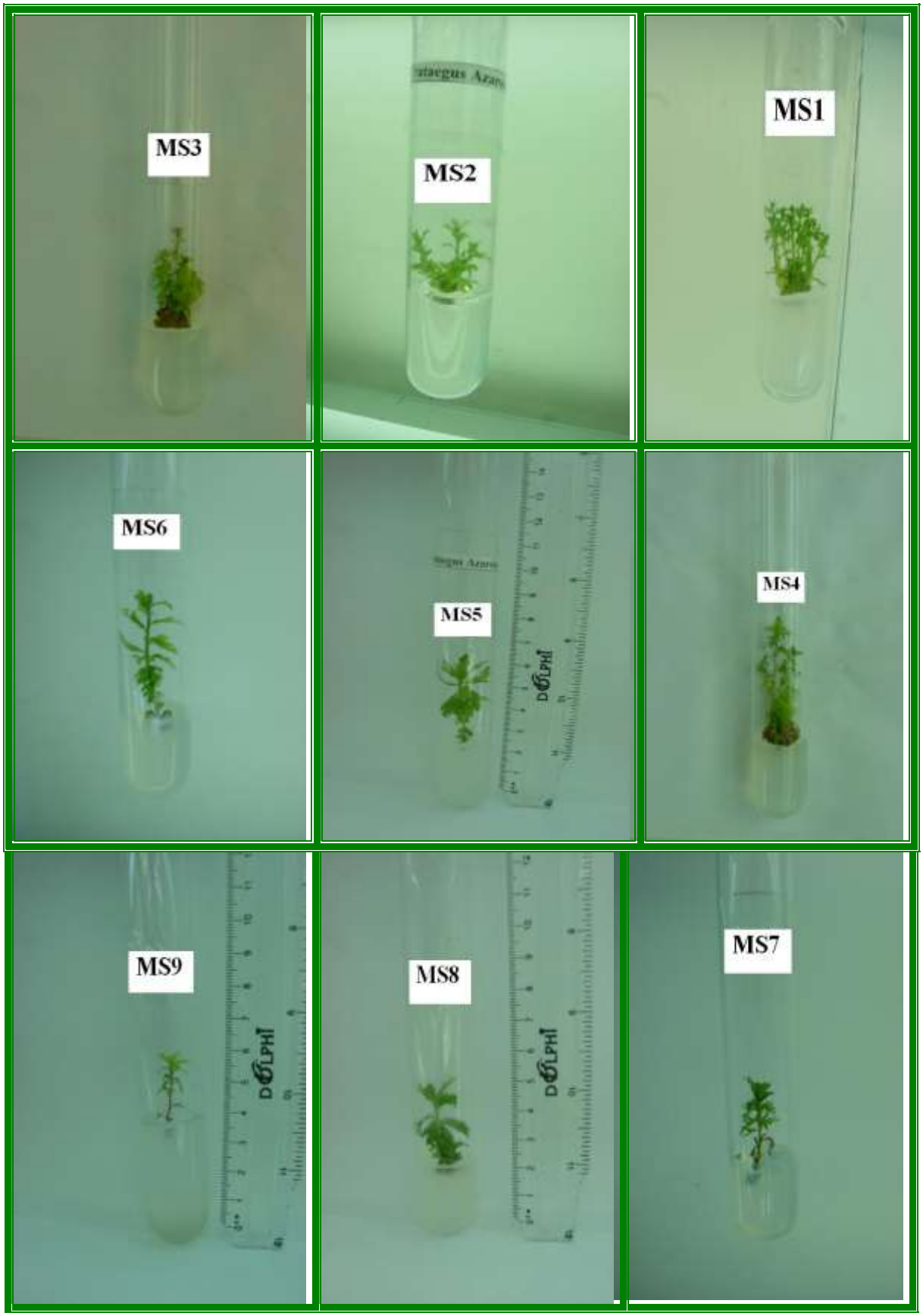
تأثير تركيز الكينيتين في طول وعدد النموات الجديدة المتشكلة :

يبدو من النتائج الواردة في الجدول (3) تفوق الوسط (MS8) الذي يحوي الكينيتين (Kin) بتركيز 20 ميكرومول / ل على الوسط(MS4) الذي يحوي التركيز نفسه من البنزيل أدنين (BA) بفروق معنوية، وذلك من حيث متوسط طول النموات، كما تفوق الوسط (MS6) الذي يحوي الكينيتين Kin بتركيز 10 ميكرومول / ل و الوسط (MS8) الذي يحوي الكينيتين Kin بتركيز 20 ميكرومول / ل على الشاهد (MS9) بفروق معنوية من حيث متوسط طول النموات، بينما كانت الفروق ضئيلة وغير معنوية بين الوسط الذي يحوي الكينيتين Kin بتركيز 5 أو 15 ميكرومول / ل و الشاهد، كما تبين أن الفروق كانت غير معنوية بين الأوساط الحاوية على الكينيتين Kin مع بعضها البعض وذلك من حيث متوسط عدد النموات، وكانت الفروق ضئيلة وغير معنوية أيضاً بين الوسط المضاف له Kin بغض النظر عن التركيز وبين الشاهد. وتميزت النموات المتشكلة في الأوساط المضاف لها الكينيتين Kin بمسطح ورقي كبير نسبياً مقارنة مع الأوساط المضاف لها البنزيل أدنينBA.

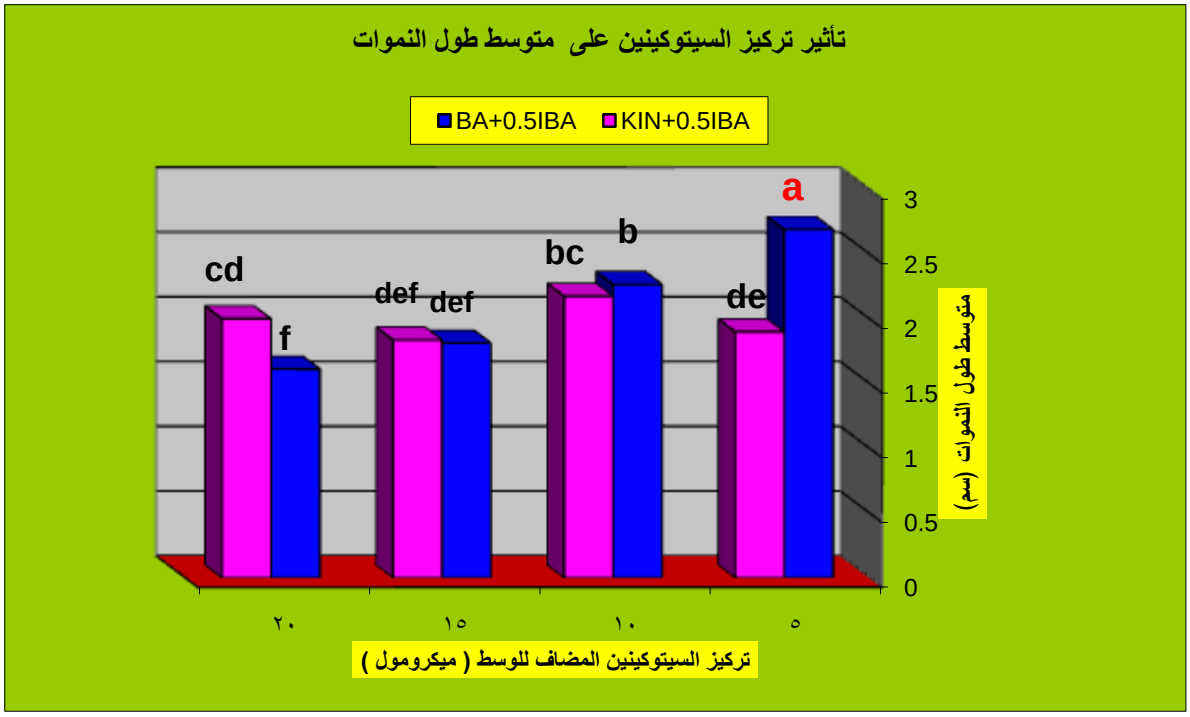
من هذه النتائج يمكن القول : أن إضافة البنزيل أدنين BA إلى الوسط وبغض النظر عن تركيزه كان أفضل من إضافة الكينيتين Kin بأي تركيز كان، وذلك من حيث زيادة عدد النموات ، كما أن إضافة البنزيل أدنين BA إلى الوسط وبأقل تركيز كان أفضل من إضافة الكينيتين Kin بغض النظر عن تركيزه، وذلك من حيث زيادة عدد النموات وزيادة طولها . وبالتالي يمكن الاستنتاج بأن إضافة البنزيل أدنين BA إلى الوسط وبتركيز 5 ميكرومول يعطي أعلى معدل نمو .

أما بالنسبة لاستخدام الـ : الكينيتين Kin ، فقد أدت زيادة تركيزه في الوسط من 5 إلى 10 ومن 15 إلى 20 ميكرومول / ل إلى زيادة في متوسط طول النموات، بينما لم تؤد إلى أي فروق معنوية في متوسط عدد النموات.

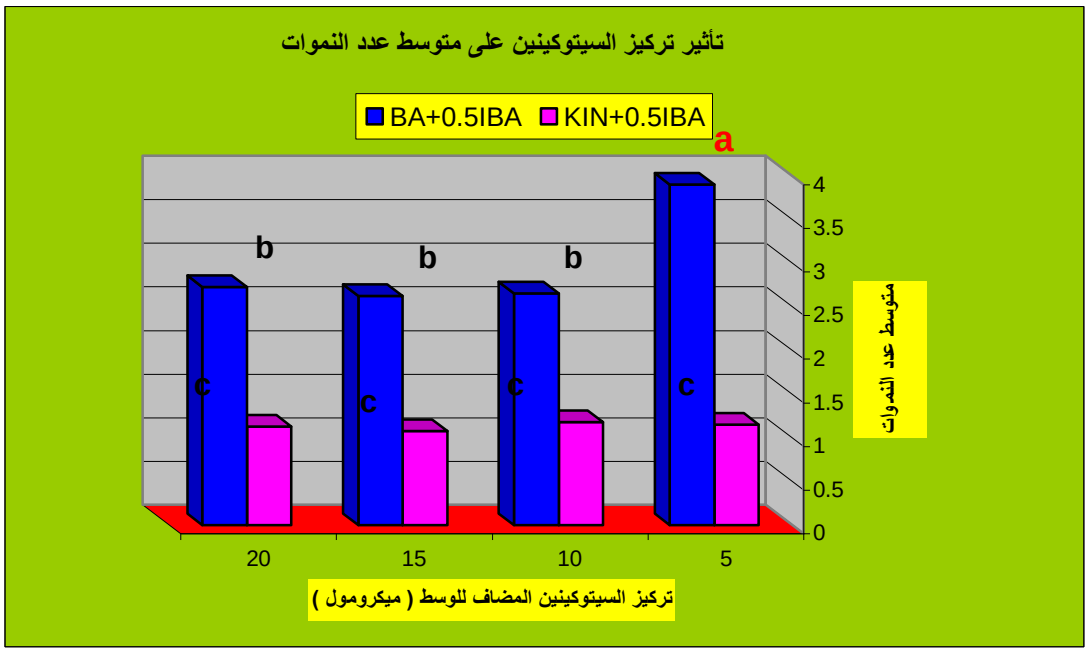
مما سبق يظهر أن زيادة تركيز البنزيل أدنين BA في الوسط تؤدي إلى زيادة تشكل الكالوس عند قواعد النموات، كما تؤدي هذه الزيادة وعند حدود معينة إلى خفض معدل النمو، بينما لم تؤثر زيادة تركيز الـ: الكينيتين Kin بالوسط في متوسط عدد النموات وإنما أدت إلى زيادة في متوسط طول النموات عند حدود معينة من التراكيز (جدول 3، شكل 2-6).



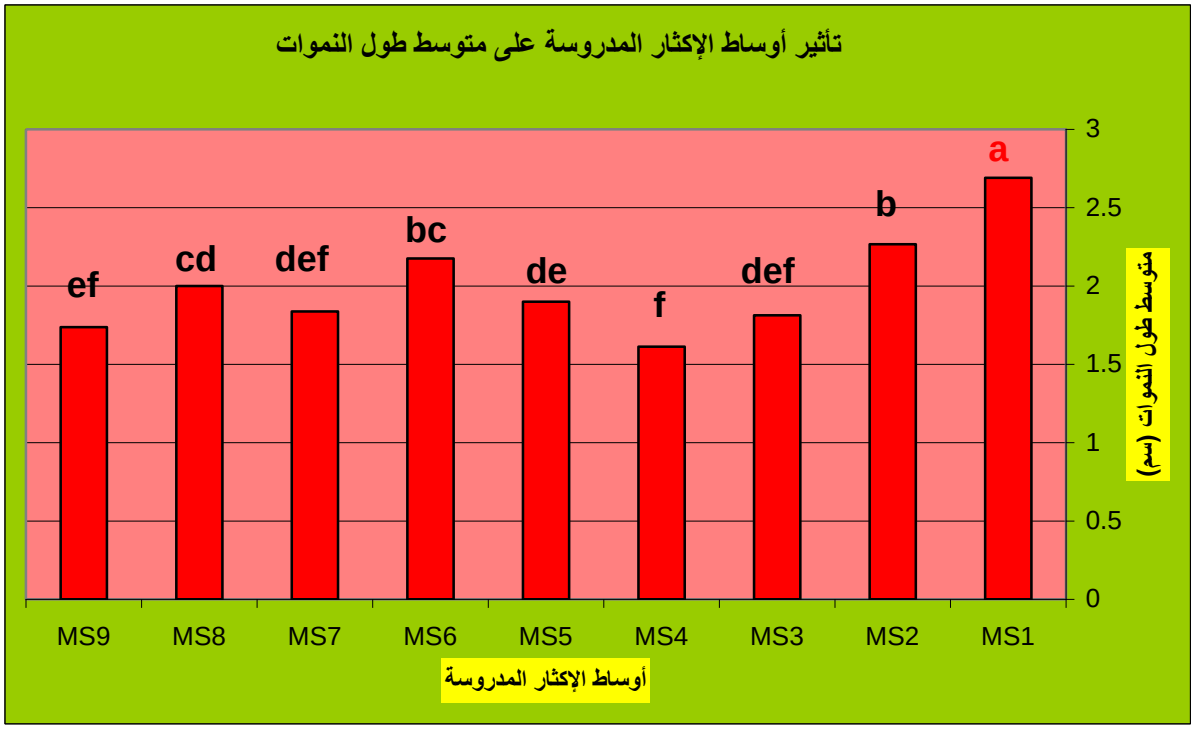
الشكل رقم (2) : تأثير أوساط النمو المختلفة في معدل إكثار الزعرور *Crataegus azarolus*, L. مخبرياً.



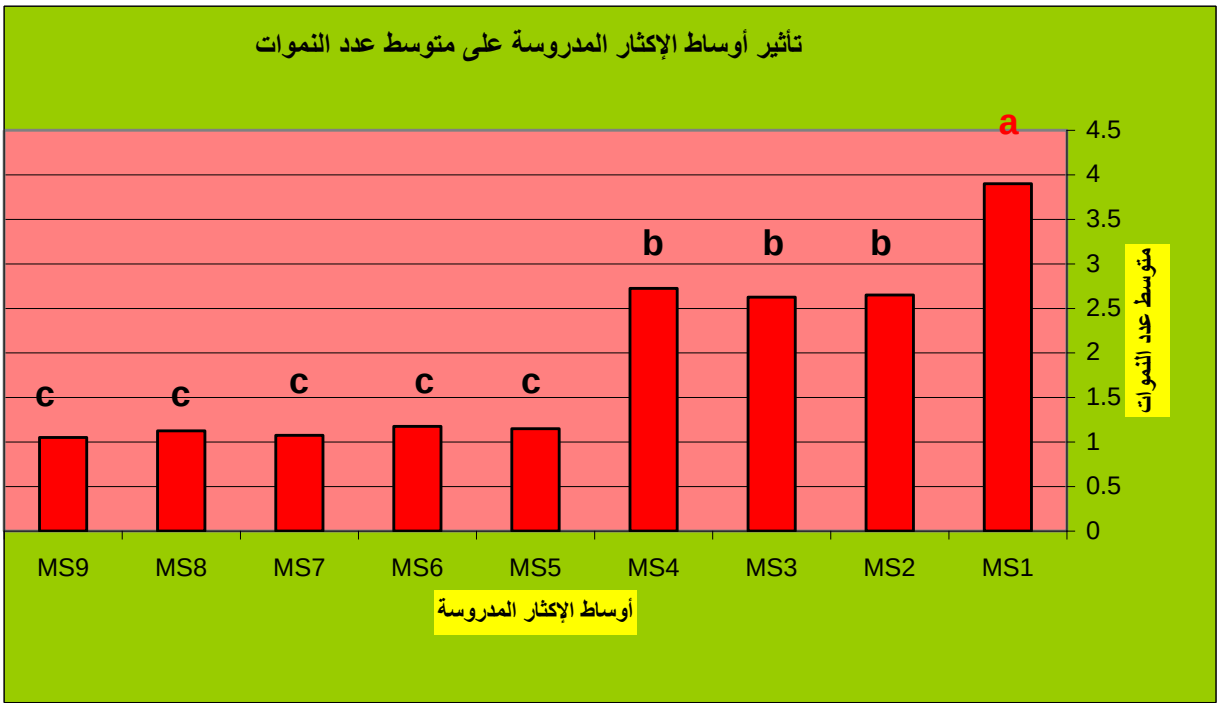
الشكل رقم (3) : تأثير تركيز السيتوكينين في متوسط طول نموات الزعرور *Crataegus azarolus*, L . المتشكلة مخبرياً .



الشكل رقم (4) : تأثير تركيز السيتوكينين في متوسط عدد نموات الزعرور *Crataegus azarolus*, L . المتشكلة مخبرياً .



الشكل رقم (5): تأثير أوساط الزراعة المختلفة في متوسط طول نموات الزعرور *Crataegus azarolus,* L. النامية مخبرياً .



الشكل رقم (6) : تأثير أوساط النمو المختلفة في متوسط عدد نموات الزعرور *Crataegus azarolus,* L. المتشكلة مخبرياً.

المناقشة :

التطهير السطحي للخزعات النباتية :

يعتبر تأسيس الزراعات المعقمة من أهم مراحل الإكثار بزراعة الأنسجة وأكثرها صعوبة، بسبب مشكلتي التلوث والاسمرار في وقت واحد.

يستخدم هيبوكلوريت الصوديوم في تعقيم المواد النباتية لتأسيس زراعات نسيجية سليمة. وفي الدراسة الحالية، أعطى

هيبوكلوريت الصوديوم نتائج مقبولة من حيث الحصول على زراعات أولية خالية من التلوث مقارنة مع معاملات التعقيم الأخرى التي تم تطبيقها، وهذا يتطابق مع النتائج التي توصل إليها Okamura *et al* . (1999) في دراسته حول تحريض تشكل الكالوس في عقل نوع الزعرور *Crataegus cuneata* المكاثر نسيجياً، حيث تبين أن أفضل طريقة للتعقيم السطحي للعقل المستخدمة كان بتعقيمها بالإيثانول تركيز 70% ولمدة 30 ثانية ثم نقعها بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز 5% والحاوي على Tween 80 بتركيز 0.1 مل/ لتر، ومن ثم غسل العقل ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم . وكذلك مع دراسة Rajesh and Bist (2002) باستخدام كلوريد الزئبق بتركيز 0.1% ولمدة 4 دقائق و هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 10% لمدة 4 دقائق. وكذلك تتطابق النتائج مع ما حصل عليه Colin Margaret and (1986) عند تجهيز العقل الحاوية على البراعم في نوع الزعرور *Crataegus brachyantha Sa.* باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم (10% Clorox bleach) بتركيز 0.5% ولمدة 15 دقيقة.

لم يلاحظ وجود إفرازات للمركبات الفينولية (ذات الدور المثبط للنمو) التي تؤدي إلى اسمرار الأنسجة وتحللها وموتها رغم أن الزعرور يتبع الفصيلة الوردية وتحت الفصيلة التفاحية المعروفة بارتفاع مستوى المواد الفينولية فيها، وربما يعزى هذا إلى أن الوقت من السنة الذي تم فيه بدء الزراعات يلعب دوراً مهماً في نسبة الإفرازات الفينولية، حيث تم البدء بالزراعات الأولية قبل سريان العصارة ، وهو الوقت الذي تكون فيه المواد الفينولية بحدودها الدنيا.

تكاثر النموات الخضرية وتأثير كل من الـ : BA والـ : IBA :

تلعب السيتوكينينات دوراً رئيساً في الحد من السيادة القمية وكسر سكون البراعم الجانبية وبالتالي زيادة التفرعات الجانبية. استخدم البنزيل أدنين في الدراسة الحالية عند بدء الزراعة وفي أوساط التكاثر أيضاً بهدف الحصول على عدد أكبر من النموات الخضرية، حيث يعتبر من أكثر السيتوكينينات المستخدمة وأكثرها فعالية حسب ما أكده (Nordstrom and Eliasson, 1986).

أدى استخدام البنزيل أدنين BA بتركيز 5 ميكرومول مع حمض الإندول بيوتريك (IBA) بتركيز 0،5 ميكرومول إلى الحصول عل أفضل معدل نمو، والذي وصل إلى 4 نموات خضرية خلال 4 أسابيع. وهذا يتطابق جزئياً مع نتائج البحث الذي قام به Rajesh and Bist (2002) في إكثار الزعرور من النوع *Crataegus oxyacantha* نسيجياً، حيث تبين أن أفضل وسط إكثار هو وسط MS الحاوي على BA بتركيز 2 ملغ/ل و IBA بتركيز 0.02 ملغ/ل .

ووجد Okamura *et al* . (1999) في دراسته حول تحريض تشكل الكالوس في عقل نوع الزعرور *Crataegus cuneata* أن أعلى نسبة من الكالوس المتشكل كانت عند استخدام وسط MS الحاوي على النفتالين أسيتيك أسيد NAA بتركيز أعلى من 10 µM ، والذي لم يستخدم في هذا البحث نظراً لتحريضه تشكل الكالوس أكثر من الـ IBA وذلك للحفاظ على التركيب الوراثي للنوع موضوع الدراسة .

وهناك أهمية كبيرة للتوافق بين البنزيل أدينين (BA) وحمض الإندول بيوتيريك (IBA) فاستخدام تراكيز عالية من BA مع تراكيز منخفضة من الـ : IBA يؤدي إلى إحداث عدد كبير من التفرعات ولكنها ذات حجم صغير. وعموماً، نقص عدد النموات الجديدة بزيادة تركيز السيتوكينين مع ثبات تركيز الأوكسين مع تشكل الكالوس على سطوح القطع وبغزارة أكثر عند زيادة التركيز، وترافق ذلك مع تقزم تلك النموات ، وتتطابق هذه النتيجة مع ملاحظات الريحاني عام 2006 .

وقد بينت النتائج التي توصل إليها . Wawrosch *et al* عام 2007 أن تقنية الإكثار الخضري الدقيق لنوع الزعرور *Crataegus monogyna Jacq* باستخدام البراعم الخضرية الجانبية هي طريقة أسرع وأفضل من طريقة الإكثار التقليدية بالعقل والتي تتميز بأنها بطيئة وصعبة. وقد تم إكثار النوع المذكور باستخدام البراعم الخضرية الجانبية التي تم جمعها من أشجار بالغة في فصل الربيع ثم تعقيمها سطحياً وزراعتها في بيئة MS الحاوية على Zeatin بتركيز 10 µM، بعد ذلك زراعت النموات القمية للفروع النامية على بيئة MS الحاوية على BA و IBA. ولدى إكثار نوع الزعرور *C.scabrifolia* بزراعة الأنسجة، تبين أن البراعم الجانبية أعطت تفرعات بشكل أفضل من زراعة البراعم الطرفية عند استخدام وسط إكثار MS يحوي BA بتركيز 1–2 ملغ/لتر و IAA بتركيز 0.5–1 ملغ/لتر (Hong *et al*., 1987). وفي الدراسة الحالية ظهرت نتائج مشابهة جزئياً للدراستين السابقتين على الرغم من اختلاف النوع المدروس من الزعرور ؛ ويمكن أن يعزى تفوق البنزيل أدينين (BA) على الكينتين (Kin) عند إضافته إلى الوسط في زيادة عدد النموات، إلى دوره الأكبر في تنشيط نمو البراعم الجانبية الساكنة وتحفيزها على النمو، كما يمكن أن يساهم في تثبيط السيادة القمية للنموات، مما قد يساعد على زيادة التفرع وبالتالي زيادة عدد النموات الجديدة المتشكلة.

الاستنتاجات والتوصيات:

بنهاية هذا البحث يمكن الاستنتاج بإمكانية إكثار الزعرور *Crataegus azarolus,* L. بتقانة زراعة الأنسجة مخبرياً مما يساعد في حفظ هذا النوع وحمايته من التدهور والانقراض والعمل على زراعته في المناطق الملائمة لنموه خاصة أنه من الأنواع المتحملة للجفاف ، والاستفادة من مزايا الثمار الطبية.

كما يكمن التقدم بالتوصيات التالية:

1- جمع الطرود لأخذ الخزعات النباتية وزراعتها في المخبر قبل بدء سريان العصارة في النبات مما يساهم في نجاح الزراعة المخبرية وعدم التعرض لمشكلة الاسمرار الناتج بشكل أساسي عن المركبات الفينولية التي يمكن أن تطرحها الخزعات المزروعة.

2- إضافة BA عند إكثار الزعرور بتركيز 5 ميكرومول إلى وسط موراشيج وسكوغ الحاوي على IBA بتركيز 0.5 ميكرومول حيث أعطى هذا التوافق الهرموني أعلى معدل إكثار مقارنة مع إضافة Kin إلى الوسط المذكور. ولا ينصح بزيادة تركيز BA في الوسط السابق لأن ذلك يؤدي إلى خفض معدل الإكثار وزيادة تشكل الكالوس عند قواعد النموات ما قد يؤدي إلى تغيرات في التركيب الو راثي.

3- إجراء البحوث لتحديد الظروف المناسبة لإكثار الأنواع الأخرى من الزعرور ذات الأهمية مخبرياً .

المراجع :

1. مزهر، بيان. *التنوع الحيوي للمصادر الوراثية لبعض الأشجار المثمرة في جنوب سوريا* /درعا– السويداء/.

كلية الزراعة. جامعة دمشق ، 1998.

2. ضميرية، سمر . *دراسة التنوع الحيوي للأنواع البرية من جنسي اللوز والزعرور في المنطقة الشمالية الغربية من ريف دمشق*. كلية الزراعة. جامعة دمشق ،2001 .

3. BRINKMAN, K. A**.** Seeds of woody plants in United States, Agric. Washington, DC: USDA Forest Service, 1974, 450, 56-60.
4. BUSH EW. JONHSON CE, PAYNE JT**.** *Commercial nursery production of Crataegus opaca in Louisiana*. Proceedings of the Southern Nurserymen´s Association Research Conference, 36 th Annual Report,1991,113B115.
5. DAI, H., ZHANG, Z., AND GUO, X**.** *Adventitious bud regeneration from leaf and cotyledon explants of Chinese hawthorn Crataegus pinnatifida Bge.var.major N.E.Br*, In Vitro Cell. Dev. Biol , 2007, 43,2-8 .
6. DIRR, M. A., AND HEUSER, J**.** The reference manual of woody plant propagation: from seed to tissue culture .Athens, GA: Varsity press, 1987, 239.
7. HAAPLA, T**.** *Establishment and use of juvenility for plant propagation in sterile and non sterile conditions*. Department of Applied Biology, plant Breeding, university of Helsiinki , Finland , 2004**,** 53pp + appendices.
8. HARTMAN , T . H ., KESTER, D . E . , DAVIES, J. R . , AND GENEVE, R . L. *Plant propagation, principles and practices*. 6th ed .Upper Saddle River, NJ, prentice Hall, 1997, 770.
9. HAZIN, C. G., DILEK, Y., AYSE, D., ALIME, D., UMMUHN, G.G., AND MUSA, G**.** *Effect of sowing date on germination rate in some hawthorn*, Suleyman Demirel Universiteesi , Fen Bilimleri Enstitusu Dergisi, 2006, 374-377 .
10. HONG, H., SHIZHOU , H ., AND JINYU, D**.** *Clonal propagation of crataegus scabrifolia shoots Apices in vitro*. Kunming Institute of Botany, chines Acaddemy of Sciences, Kunming , 1987, 65-204 .
11. MAHLSTED, P. J. AND HARBR, E. E**.** *Plant propagation. John Willy and sons*, INC. New York, 1975, 413.
12. MARGARET, E.N., AND COLIN, R.N**.** *Change in shoot proliferation in vitro subculture of shoots of woody species of Rosaceae*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1986, 5,187-197.
13. MARKS, T.R., AND SIMPSON, S.E**.** *Effect of irradiance on shoot development in vitro*, Plant Growth Regulation, 1999, 28, 133-142.
14. MORGENSON, G**.** *Effects of cold stratification, warm-cold stratification, and acid scarification on seed germination of three Crataegus species*, Tree Planter's Notes, 2000 49(3), 72-74.
15. NORDSTROM, A.C. AND ELIASSON, L**.** *Uptake and translocation of C14-labeled benzylaminopurine in apple shoots grown in vitro in relation to shoot development*. Physiol Plantarium., 1986, 68(3): 431-435.
16. OKAMURA, T., AKINO, R., AND OHFUKA, Y. *Induction of callus from Crataegus cuneata stems*, Bull. Mukogawa Women,s Univ. Nat . Sci., 1999, 47, 43-45.
17. PICCIONI, E. AND STANDARDI**. A***Encapsulation of micropropagation buds of six woody species*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 42, 221-226.

18. QRUNFLCH, M. M**.** *Studies on the hawthorn (Crataegus azaralus): III. A potential rootstock for Golden delicious apple and Williams pear*. Horticultural Science, 1994, 69 (1) 1-4.
19. RAJESH, K., AND BIST, L.D**.** *Micropropagation of hawthorn Crataegus oxyacantha Linn through shoot tip culture*, Indian Journal of Horticulture, 2002, 4, 435-439.
20. SHIZHOU, H., AIQIN, L., HONG, H. AND JINYU, D**.** *Ways of enhancing the rooting rate of the in vitro culture shoots from adult Crataegus Scabrifolia trees* .Kunming Institute of Botany, Chines . Academy of Sciences, Kunming, 1987 .
21. TIPTON, J. L., AND PEDROZA, G**.** *Crataegus tracyi Ashe: seed germination response to scarification treatment combinations*, Plant Propagator, 1986, 32(1), 3-5.
22. WAWROSCH,C., PRINZ,S., SOLEIMAN,Y., AND KOPP,B**.** *Clonal propagation of Crataegus monogyna Jacq*. (Lindm.) . Planta Med, 2007, 73.
23. YOUNG, J. A., AND YOUNG, C.G**.** *Seeds of woody plants in North America, revised and enlarged edition*. Portland, OR : Dioscorides press , 1992, 407 .