تأثير بعض السكريات في تجديد نبات *Albizzia julibrissin* (Durazz.) مخبرياً في أوساط خالية من منظمات النمو النباتية

حسين الزعبي*

ملخـص

تمت دراسة تأثير ثلاثة أنواع من السكريات هي السكروز و الفركتوز والكزايلوز أو خليط من الفركتوز و الكزايلوز في إمكانية تجديد نبات *Albizzia julibrissin* مخبرياً. ودرس بشكل خاص تأثير هذه السكريات في استجابة المستزرعات لإنتاج كالوس أو نموات خضرية أو تخليق جذور. أمكن إعادة تجديد نبات كامل باستخدام هذه السكريات من دون إضافات هرمونية. وأظهرت الدراسة إمكانية استخدام سكريات غير شائعة في مجال زراعة الأنسجة مثل الكزايلوز الذي أعطى تطوراً أفضل، كما يشجع كذلك عملية التجذير بشكل خاص مقارنةً بالسكروز شائع الاستخدام في أوساط زراعة الأنسجة النباتية. يمكن أن تتيح هذه النتائج فرصة لدراسات متقدمة في مجال العلوم الأساسية والتطبيقية لفهم ماهية التعضي النباتي وعلاقته بطبيعة التغذية الكربونية للجزء النباتي المدروس، إضافة إلى إمكانية الإفادة منها في المجال التطبيقي؛ إذ تلعب طبيعة السكر المستخدم دوراً هاماً في توجيه استجابة النبات المدروس حسب الهدف المطلوب من الزراعة. علاوة على ذلك، تضمن الطريقة المستخدمة في التجديد في أوساط خالية من منظمات النمو الحصول على نموات مطابقة للنوع وتتجنب ظهور الشواذ المورفولوجية الناتجة عن استخدام منظمات النمو في أوساط الزراعة.

الكلمـات الدالـة: شجرة الحرير، إعادة التجديد، اوكسين، كربوهيدرات، التشكل الظاهري الزراعة المخبرية.

المقدمـة

أخذت تقنيات الزراعات الدقيقة للخلايا والأنسجة أو لأعضاء نباتية أهمية كبيرة خلال العقود الماضية في مجالات حفظ أو إكثار أو تحسين عدد كبير من الأنواع النباتية المهمة. فهي تسمح بتخطي العديد من المعوقات بما فيها المتعلقة بالنبات نفسه أو تلك المتعلقة بالبيئة المحيطة. وغدت من مستلزمات برامج الانتخاب Margara (1989). كما سمحت بالاستثمار الأقصى أو حتى زيادة التنوع الوراثي للأصناف و في الوقت نفسه رفع الكفاءة الإنتاجية خلال فترة زمنية محددة مما حدا بـ Sasson (1986) لتسميتها الثورة الخضراء الثانية. كما تعتبر طريقة ممتازة لفهم الآليات التي تحكم سلوك النبات وبشكل خاص إعادة تجديده. فهي توفر إمكانية متابعة تطور جزء نباتي معزول في ظروف معروفة ومدروسة بعيدا عن أي معوقات يفرضها وجود هذا الجزء في النبات الكامل. كما تسمح بالتعرف بشكل أوضح على الظواهر المشاركة في تطوره.

منذ الأعمال الكلاسيكية لـ Skoog and Miller (1957) حول التعضي بدءا من أجزاء من الكالوس *Nicotiana tabacum*، وانطلاقا من الفكرة المرجحة لفرضية سيطرة التوازن الهرموني على نوع استجابة النبات اتجهت جميع الأبحاث نحو الدراسات الكمية و الكيفية للتوازنات الهرمونية في أوساط الزراعة المستخدمة. غير أن هذه الفكرة لم تكن عامة؛ إذ إن عددا كبيرا من الأنواع النباتية يبدي ردود أفعال تشذ عن هذه القاعدة .Bertrand-Garcia et al (1992). وتندر الدراسات والأبحاث التي تهتم بالعناصر الأخرى المكونة لأوساط الزراعة.

* قسم التقانات الحيوية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دوما، ص.ب. 113، دمشق، سورية، هاتف: 86263 573 11 963 +، فاكس: 92 79 575 11 963 +.
البريد الإلكتروني: gcsarpbio@mail.sy

تاريخ استلام البحث 2007/9/26 وتاريخ قبوله 2009/4/29.

وحديثا بدأ بعض الأبحاث بالاهتمام بدراسة تأثير بعض المصادر الكربونية وخاصة السكروز والغلوكوز إضافة لعناصر أخرى في نوع استجابة النبات. حاولت هذه الأبحاث إظهار أن الطبيعة الكيميائية للسكر تلعب دورا أساسيا وهاما في رد فعل العينات المزروعة مخبريا لا يقل أهمية عن ذلك الذي تلعبه منظمات النمو. ومن هذه الأبحاث Faria et al. ؛ (2001) Mandal and Gupta (2004)، (2005) Eke et al.، (2004) Samir and Debnath. غير أن غالبية الأبحاث حول تأثير السكريات كانت تتم بوجود إضافات هرمونية، مما يجـعل أي نتيجة نهائية حول الدور الذي يلعبه السكر صعبة التأكيد. إن فهماً أفضل لدور السكريات في التشكل النباتي مخبرياً يمكن أن يفتح بابا واسعا أمام تطبيقات هامة في الإكثار المخبري للنباتات و خاصة عندما تكون النتائج غير واضحة بسبب وجود الهرمونات في الوسط الزراعي كتلك الاختلافات غير المرغوبة و المسجلة خاصة في برامج الإكثار المتماثل مثلا. لذا يهدف هذا البحث لدراسة تأثير بعض السكريات في استجابة العينات المزروعة مخبرياً، وبالتالي إمكانية التجديد من دون إضافات هرمونية. ويتطلب إجراء مثل هذه الأبحاث طرازاً نباتيا سهل الإكثار و وسطاً زراعياً بسيطاً خالياً من الإضافات الهرمونية التي يمكن أن تخل بالتوازن الداخلي للعينة المزروعة.

المواد و الطرائق

الوصف النباتي للمادة المستخدمة

شجرة الحرير *Albizzia julibrissin* Durazz. ذات منشأ إيراني و (*julibrissin* هو اسمها الفارسي) وهي شجرة واسعة التأقلم و الانتشار يمكن زراعتها على شواطئ المتوسط. تنتسب إلى الجنس *Albizzia* الذي يضم 25 نوعاً تنتشر في المناطق المدارية و تحت المدارية لكل من اسيا و افريقيا و استراليا. وتنتمي إلى العائلة البقولية *Leguminous* وتحت العائلة الميموزية *Memosoidee*. فهي شجرة تزيينية ذات مظهر جميل يصل ارتفاعها إلى 12 م تستطيل أفرعها مع التقدم بالعمر مما يعطيها تاجا كثيفا مستوياً بشكل المظلة. الشجرة ذات أوراق مركبة مكونة من عدد كبير من الوريقات. وتمتاز بإزهارها الذي يدوم فترة طويلة (من حزيران و حتى أيلول)، وتظهر الأزهار الريشية على نهاية الأفرع و تغطي أحيانا كامل الشجرة بلون زهري لماع. أما الثمار فتنضج بين أيلول و كانون الأول و هي عبارة عن قرون بطول 15 سم. وتمتاز هذه الشجرة بأهمية بيولوجية و بيئية. فهي من النوع المثبت للأزوت الجوي بفضل البكتيريا التعايشية الموجودة على جذورها. كما تمتاز بسرعة نمو كبيرة واحتواء بذورها على نسبة عالية من البروتين مما يعطي النبات أهمية رعوية بالغة حسب Rao and Deepesh (1997). كما يمكن لهذه الشجرة النمو في الأراضي الفقيرة أو المتدهورة كالأراضي الكلسية عالية الـ pH > 8.0 مما يؤدي لتحسين خواص التربة. و يستخدم خشب الشجرة لأشغال قيمة مثل الموبيليات الفاخرة وإطارات الصور .Pomier et al (1986).

المواد و طرائق البحث

تحضير المادة النباتية: بسبب صلابة قشرة البذور تم غمسها في حمض الكبريت المركز لمدة 35 دقيقة ثم غسلها تحت الماء الجاري مدة عشر دقائق و غسلها 3 مرات بالماء المقطر و المعقم. و من ثم غمرت في محلول من هيبوكلوريت الكالسيوم بنسبة 8% أضيفت له نقطتان من Tween 20 لمدة 20 دقيقة. غسلت البذور بعدها 3 مرات بالماء المقطر المعقم و حفظت في الماء لحين زراعتها.

أوساط الزراعة وظروفها: تم استخدام وسط Murashige and Skoog(1962) و تعديلاته في جميع مراحل التجديد، الجدول(1).

الجدول 1. المحتوى المعدني و العضوي (بالملغرام/ لتر) للأوساط المستخدمة في الزراعة.

		اعادة تشكل		تجذير
	انتاش ½ MS	دون إضافة هرمونية MS	وجود منظمات نمو MS	النموات الخضرية MSd
NH_4NO_3	825	1 650	1 650	550
KNO_3	950	1 900	1 900	633.3
$CaCl_2.2H_2O$	220	440	440	146.6
$MgSO_4.7H_2O$	185	370	370	123.3
KH_2PO_4	85	170	170	56.6
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	-	-
KI	0.42	0.83	0.83	0.42
H_3BO_3	3.10	6.20	6.20	3.10
$MnSO_4.7H_2O$	11.15	22.30	22.30	11.15
$ZnSO_4.7H_2O$	8.30	8.60	8.60	8.30
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.13	0.25	0.25	0.13
$CuSO_4.5H_2O$	0.01	0.03	0.03	0.01
$CoCl_2.6H_2O$	0.01	0.03	0.03	0.01
$FeSO_4.7H_2O$	13.90	27.80	27.80	13.90
Na_2-EDTA. $2H_2O$	18.65	37.30	37.30	18.65
IBA	-	-	1	-
BAP	-	-	1	0.2
(IAA+BAP)	-	-	(1+1)	-
Sucrose	-	30000		5000
Fructose	-	30000	30000	-
Xylose	-	30000	-	10000
(fructose + xylose)	-	10000 +20000		2500 + 5000
Agar	8000	8000	8000	8000
Activated charcoal	-	-	-	2000

تم وضع الزرعات في غرف نمو في درجة حرارة 25 ± 2°م، إما في الظلام أو تحت فترة ضوئية بلغت 16 ساعة في اليوم بشدة إضاءة على مستوى النبات تقدر بـ (60 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$). و لدراسة تأثير السكريات المختلفة في سلوك السويقات المزروعة من دون إضافات هرمونية تمت إضافة ثلاثة أنواع من السكريات وهي السكروز (Sucrose) والفركتوز (Fructose) والكزايلوز(Xylose) بتركيز 30 غ/ ل و خليط من سكري الفركتوز بتركيز10

غ/ل و الكزايلوز بتركيز 20 غ/ل إلى أوساط الزراعة. وتمت زراعة جزء من سويقات نباتات تحت فلقية بعمر أسبوع ناتجة إما في ظروف الإضاءة أو في ظروف الظلام. و زرعت في وسط زراعي سائل أو صلب، بوجود أو غياب 3-(3.4 Dichlorophényl)-1.1-(D.C.M.U.) Diméthylurée.، وهو مثبط لعملية التركيب الضوئي، بتركيز 23 غ/ل حسب Gudin (1984). يبين الجدول(1) الأوساط المختلفة المستخدمة و ظروف الزراعة.

بغية دراسة الأثر المحتمل لخلايا الكالوس في عودة السويقات المزروعة و المنحنية الناتجة عن الزراعة في الوسط MS بوجود مختلف السكريات إلى وضعها الأصلي، تمت مقارنة سلوك جزء من السويقات المزروعة و المنحنية بعد ظهور الكالوس مع جزء آخر من السويقات المنحنية التي أجريت لها عملية إزالة يومية لكل تكاثر خلوي حاصل في شروط معقمة. أما الجزء الثالث من السويقات فقد تم تطعيمه في فترة الانحناء الأعظمي من أحد الطرفين أو كليهما بمكعبات مصلبة بالأغار من دون IAA أو محتوية على 1 ملغ/ ل من IAA المضاف بعد التعقيم بالفلترة. وتمت زراعتها جميعاً فوق وسط MS المحتوي على السكروز.

تجذير النموات الخضرية الناتجة

لاختبار المقدرة التجذيرية للسكر الموجود في أوساط الزراعة، تم أيضا استخدام أوساط زراعة خالية من هرمونات النمو. زرعت نموات ورقية ناتجة عن الزراعة في وسط MS أضيف له أحد السكريات بشكل منفرد في أنابيب زجاجية بحجم 200 X 28 مم في وسط صلب أضيف له 2غ / ل من الفحم المنشط وهي الكمية الموصى بها حسب Margara (1989) . تمت زراعة النموات الخضرية في بداية الأمر في أوساط تجذير مماثلة في محتواها لتلك الأوساط التي حرضت على إنتاجها. وتم بعدها استخدام أوساط ممددة لـ MS وسمي الوسط الأساس فيها MSd. وتمت إضافة تراكيز مخففة من السكريات، الجـدول (1). وتم استخدام شاهدين لهذه الغاية أحدهما MSd فقط والثاني MSd أضيف له 0.2 ملغ/ل IBA. ويوصى باستخدام الأوكسينات لتحريض التجذير (1998) Kumar et al. ؛ Rout et al. (1999).

نقل النباتات المجذرة إلى التربة و أقلمتها

تم غسل النموات الخضرية جيدة التجذير بعد إخراجها من أنابيب الزراعة لإزالة آثار وسط الزراعة و زرعت في أصص بلاستيكية فوق خليط معقم من التورب و التيرو المشبع بمحلول أملاح MS 1/2، ثم وضعت ضمن أنفاق بلاستيكية مدة ثلاثة أسابيع مع السقاية مرتين في الأسبوع.

دراسة استجابة العينات المدروسة للمعاملات المختلفة

تم تقدير انحناء السويقات المزروعة بقياس المسافة بين نهايتي السويقات المزروعة. أما أهمية تشكل الكالوس فقد تم تقديرها خلال الـ 15 يوماً الأولى نظريا حسب التالي:

- كالوس غزير يغطي كامل سطح السويقات (رخو شفاف)++++
- كالوس هام يغطي نهايتي السويقات (رخو شفاف)+++
- كالوس مرئي (أبيض مخضر متماسك) يغطي فقط إحدى النهايتين++
- كالوس قليل (اخضر متماسك) يغطي فقط إحدى النهايتين +
- كالوس غائب غير ملاحظ بالعين المجردة 0.

وتم تقدير أهمية إعادة التشكل أو التجدد بعد البراعم و/ أو النموات الخضرية النامية على السويقات بشكل مباشر أو غير مباشر و أخذ المتوسطات لكل سويقة من ناحية، وعد الجذور المتشكلة على السويقات أو في قاعدة النموات الخضرية المزروعة وحساب أطوالها بعد 45 يوماً من الزراعة و أخذ المتوسطات لكل سويقة أو نمو خضري. و بغية دراسة تطور الجزأين الخضري و الجذري للنموات الخضرية، تم أخذ أوزانها الرطبة و الجافة منفصلة بعد 45 يوماً من عملية التجذير.

حللت المعطيات والقراءات لكل من عدد البراعم و الجذور المتشكلة على السويقة و عدد الجذور على النموات الخضرية و طول الجذور و تطور الجزأين الخضري و الجذري للنموات الخضرية و تطور الكتلة الحيوية للسويقات المزروعة أو للنسب المئوية للنموات الخضرية المجذرة الناتجة عن التجارب بواسطة الحاسوب باستخدام البرنامج الإحصائي Stat box و بتطبيق تحليل التباين ANOVA وباستخدام التصميم العاملي. وقد تم تفسير وتحليل النتائج بناء على ذلك، حيث أُخذ 30 مكرراً لكل معاملة وكررت

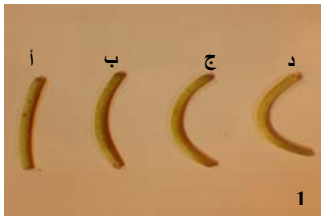
التجربة ثلاث مرات وبالشروط نفسها.

النتائج

كان لطبيعة السكر الموجود في وسط الزراعة أثر كبير في مختلف أشكال استجابات السويقات مثل انحنائها ثم عودتها لشكلها الأصلي، وظهور الكالوس والتعضي (سواء تشكل البراعم أو ظهور الجذور العرضية) ثم المقدرة على تجذير النموات الخضرية الناتجة. بدأت السويقات المزروعة فوق وسط صاب بالانحناء باتجاه الأعلى بدءا من اليوم الثاني من الزراعة و وصل الانحناء حده الأقصى في أوقات مختلفة حسب السكر الموجود في وسط الزراعة. أما العودة إلى الشكل الطبيعي(الاستقامة) فبدأت مع بدء ظهور الكالوس أو تشكل البراعم العرضية.

غابت ظاهرة الانحناء في وسط الزراعة MS، و بدت أقل أو أكثر أهمية بدءا من اليوم الأول على العينات المزروعة في باقي الأوساط، فكانت قصوى عند السويقات المزروعة فوق وسط محتوٍ على MS أضيف له السكروز+ IAA، الشكل(1). وبلغت حدها الأقصى خلال الأسبوع الأول فوق الوسط المحتوي على MS الذي أضيف له الفركتوز، أو على MS الذي أضيف له السكروز مع أو من دون IAA، وخلال الأسبوع الثاني فوق الوسط المحتوي على MS الذي أضيف له الخليط السكري الفركتوز والكزايلوز، وخلال الأسبوع الثالث فوق الوسط المحتوي على أملاح MS مع إضافة الكزايلوز وحده. ثم ما لبثت السويقات المزروعة أن عادت للاستقامة مع بدء تشكل الكالوس أو تشكل البراعم العرضية.

لم تؤد الزراعة في الأوساط نفسها و لكن في ظروف من الظلام إلى ظاهرة الانحناء بشكل ملحوظ. بالمقابل لوحظت فقط استطالة السويقات المزروعة في وسط سائل. فكان ذلك أكثر أهمية بوجود IAA في أقصى حدوده فوق الوسط المحتوي على MS +IAA + الخليط (فركتوز مع الكزايلوز). أما في الأوساط المحتوية فقط على السكريات فالاستطالة كانت أكثر أهمية في حال وجود خليط الفركتوز مع الكزايلوز منها في حال وجود السكروز وحده في وسط الزراعة، الشكل(1). وأدى تعليق مكعب يحتوي على IAA على الطرف القمي للسويقات المنحنية أو مكعبين على طرفيها في آن واحد إلى استقامتها خلال يومين. وأدى تعليقه على الطرف الجذري إلى النتيجة نفسها و لكن بعد 3 أيام، الشكل(1). و أدت إزالة كل تشكل للكالوس بعد الانحناء الأعظمي للسويقات بشكل يومي خلال الأيام الأربعة التالية، و هي الفترة الطبيعية لعودة استقامة السويقات المنحنية المزروعة فوق الوسط نفسه لاستمرارية انحنائها.



1: سويقات مزروعة في أوساط مختلفة (أ): شاهد MS. (ب): MS + سكروز.(ج): MS + كزايلوز.(د): MS + خليط فركتوز + كزايلوز.

2:عودة السويقات إلى الاستقامة بوجود مكعبات تحوي IAA.

3: سويقات مزروعة في وسط MS سائل:(أ) بوجود كزايلوز+ فركتوز. (ب) بوجود كزايلوز+ فركتوز+ IAA.

4: سويقات مزروعة في وسط MS سائل:(أ) بوجود السكروز. (ب) بوجود السكروز+ IAA.

الشكل 1. سلوك السويقات تحت الفلقية خلال الأيام الأولى من الزراعة.

القدرة على إنتاج الكالوس

لم تبد السويقات المأخوذة من نباتات فتية نمت في ظروف ضوئية والمزروعة في وسط MS الخالي من أي سكر أي نشاط خلال مدة 45 يوماً من الزراعة، من دون أن تظهر أي بوادر موت. أما السويقات المأخوذة من نباتات فتية نامية في الظلام فاخضر لونها قليلاً من دون أن تبدي أي نشاط آخر، الجدول(2).

ولم تبد السويقات المزروعة هي الأخرى بوجود D.C.M.U. أي رد فعل فيما يخص إنتاج الكالوس، إضافة لذلك تحول لون طرفي السويقات المزروعة بوجود الكزايلوز سواء استخدم وحده أو بخلطه مع الفركتوز إلى لون بني ثم ما لبثت السويقات أن ماتت. وبدت هذه الظاهرة أكثر وضوحاً وأسرع في السويقات الناتجة عن النباتات المنتشة في الظلام.

أبدت السويقات المزروعة في وسط سائل في بداية الزراعة بوجود السكروز، وفي وقت متأخر بوجود الكزايلوز، تضخما في حجم الطرفين مع ظهور تشققات على مستوى الأنسجة السطحية من دون ظهور أي استجابة أخرى.

واختلف سلوك السويقات المزروعة في أوساط صلبة بوجود السكريات فقط حسب نوعية السكر، وظروف الزراعة من إضاءة أو ظلام، وحسب أصل السويقات (ناتجة عن نباتات منتشة في ظروف الإضاءة أو في ظروف الظلام). فقد أنتجت السويقات المزروعة في ظروف الإضاءة لمدة 16 ساعة في وسط يحوي السكروز منذ الأسبوع الأول كالوساً بكميات كبيرة بدءاً من طرفي السويقة ثم ما لبث أن غطى السويقة كاملة بعد 20 يوماً من الزراعة، في حين أنتجت السويقات المزروعة فوق وسط يحوي الفركتوز كالوساً أقل كثافة وسرعة تطور منه في حالة وجود السكروز، الشكل(2).

الجدول 2. تأثير كل من طبيعة السكر الموجود في وسط الزراعة و ظروف الزراعة (إضاءة/ ظلام) في سلوك السويقات تحت الفلقية المزروعة.

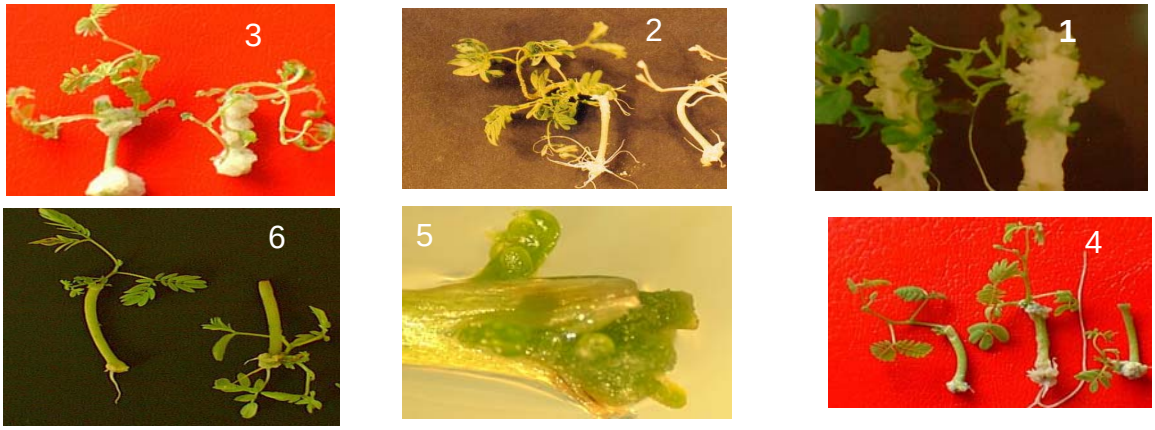
وسط الزراعة ظروف إنتاج السويقات ظروف زراعة السويقات	حجم الكالوس المتشكل	إعادة التجديد		استجابة التجذير	
		متوسط عدد البراعم/ سويقة± SE	متوسط عدد النموات الخضرية/ سويقة ± SE	متوسط عدد الجذور/ سويقة± SE	متوسط طول الجذور مم / سويقة± SE
وسط MS	0	0	0	0.2±0.02	2
MS + سكروز	++++	d 1.9±5.8	d 0.4±2.6	ab 0.3±0.8	b 0.6±23
MS + سكروز (زراعة في الظلام)	++	b 0.9±2.2	b 0.2±1.3	c 0.7±1.8	a 0.8±25
MS + سكروز (انتاش في الظلام)	++++	c 1.5±3.7	c 0.6±1.9	a 0.1±0.3	d 1.0±15
MS+ فركتوز	+++	d 1.5±5.1	cd 0.3±2.4	a 0.2±0.4	d 0.8±15
MS+ كزايلوز	+	c 1.6±3.6	c 0.8±2.1	c 0.3±1.7	d 1.2±15

وسط الزراعة ظروف إنتاج السويقات ظروف زراعة السويقات	حجم الكالوس المتشكل	إعادة التجديد		استجابة التجذير	
		متوسط عدد البراعم/ سويقة± SE	متوسط عدد النموات الخضرية/ سويقة ± SE	متوسط عدد الجذور/ سويقة± SE	متوسط طول الجذور مم / سويقة± SE
MS + كزايلاوز (زراعة في الظلام)	+	a 0.1±0.4	a 0.1±0.4	b 0.2±1.2	f 0.0±2
MS + كزايلاوز انتاش في الظلام	+	bc 1.5±3.4	c 0.5±1.7	c 0.9±2.2	e 0.8±7
MS+ كزايلاوز+ فركتوز	++	b 0.9±2.9	d 0.5±2.8	bc 1.2±1.1	c 0.5±20
MS + كزايلاوز+ فركتوز (زراعة في الظلام)	+	a 0.1±0.8	a 0.1±0.4	a 0.1±0.4	d 0.9±15
MS + كزايلاوز+ فركتوز (انتاش في الظلام)	++	c 1.4±3.8	bc 0.4±1.4	bc 0.6±1.2	c 1.1±20

تم أخذ 30 نباتا لكل حالة وكررت التجربة ثلاث مرات وأخذت القراءات بعد 30 يوماً من بدء الزراعة.

++++: تشكل كمية كبيرة جدا من الكالوس. +++: تشكل كمية كبيرة من الكالوس. ++: تشكل كمية متوسطة من الكالوس.

+: تشكل كمية قليلة جدا من الكالوس. 0 :غياب كامل للكالوس. اختلاف الأحرف في العمود الواحد يعني فرقاً معنويا بين المعاملات للعامل المدروس عند p = 0.05.



الشكل 2. استجابة أجزاء من السويقات تحت الفلقية بـ (تجديد مباشر أو غير مباشر) مزروعة في وسط MS أضيف له:

1 – 30 غ / ل سكروز في ظروف 16 ساعة إضاءة. 2 - 30 غ / ل سكروز في ظروف ظلام.

3 - 30 غ / ل فركتوز في ظروف 16 ساعة إضاءة. 4 -10 غ / ل فركتوز+ 20 غ /ل كزايلاوز في ظروف 16 ساعة إضاءة.

5 - 6 -30 غ / ل كزايلاوز في ظروف 16 ساعة إضاءة.

أنتجت السويقات المزروعة فوق وسط يحتوي على الكزليلوز آثاراً من الكالوس المتماسك بلونٍ أخضر فوق الطرف الجذري فقط، في حين أنتجت السويقات المزروعة بوجود خليط الفركتوز مع الكزليلوز كالوساً وسطاً بين ما أنتجته السويقات المزروعة بوجود الكزليلوز و تلك المزروعة بوجود السكروز. فهو إما متماسك أو قطني وتطور بشكل بطيء جداً. أما السويقات المزروعة في ظروف من الظلام فقد أنتجت كالوساً قليلاً على طرفيها فقط، الشكل(2).

القدرة على إنتاج البراعم العرضية

أظهرت السويقات الناتجة عن النباتات المنتشة في ظروف الإضاءة و المزروعة بوجود السكروز مقدرة عالية على التجدد تمثلت بإنتاج براعم عرضية بشكل غير مباشر بمتوسط 5.8 برعم/ سويقة فوق كالوس غزير، في حين أنتجت السويقات الناتجة عن نباتات منتشة في ظروف الظلام ومزروعة في الشروط السابقة نفسها 3.7 برعم/ سويقة، وأنتجت السويقات الناتجة عن النباتات المنتشة في ظروف الإضاءة والمزروعة في ظروف الظلام 2.2 برعم / سويقة بالمتوسط بعد 45 يوماً من الزراعة. و إذا أخذ بالحسبان عدد البراعم التي تطورت إلى نموات خضرية فإننا نلاحظ انخفاض العدد ليبلغ 2.6 بالنسبة للسويقات الناتجة في ظروف الإضاءة والمزروعة في ظروف إضاءة أيضاً، و 1.3 للسويقات الناتجة عن نباتات منتشة في ظروف الإضاءة ومزروعة في ظروف الظلام، و 1.9 للسويقات الناتجة عن نباتات منتشة في ظروف الظلام ومزروعة في ظروف الإضاءة. كما أبدت السويقات المزروعة فوق وسط يحتوي على الفركتوز مقدرة عالية على التجدد؛ إذ تشكلت البراعم بشكل غير مباشر على آثار من الكالوس، في حين أنتجت السويقات المزروعة بوجود الكزليلوز عدداً أقل من البراعم المتشكلة من الحالتين السابقتين كلتيهما. فبعد 20 يوماً من الزراعة كان متوسط عدد البراعم المتشكلة 3.6 برعم / سويقة مزروعة في ظروف الإضاءة وناتجة عن نباتات نامية في ظروف الإضاءة و 3.4 برعم/ سويقة ناتجة في ظروف الظلام ومزروعة في ظروف الإضاءة و 0.4 برعم / سويقة ناتجة عن نباتات نامية في ظروف الإضاءة ولكن مزروعة في ظروف الظلام، (الجدول2)، ليصبح عدد النموات الخضرية الناتجة القابلة للتجذير بعد 45 يوماً 2.1 و 1.7 و 0.4 برعم / سويقة على التوالي.

بلغ متوسط البراعم المتكونة على السويقات بوجود خليط من الفركتوز و الكزليلوز بعد 20 يوماً من الزراعة 2.9 برعم/ سويقة ناتجة عن نباتات نامية في الضوء ومزروعة في ظروف الإضاءة (الجدول2)، و 3.8 برعم / سويقة ناتجة عن نباتات نامية في الظلام ومزروعة في ظروف الإضاءة، و 0.8 برعم/ سويقة ناتجة عن نباتات نامية في الضوء ومزروعة في ظروف الظلام. أما عدد النموات الخضرية القابلة للتجذير بعد 45 يوماً من الزراعة فبلغ 2.8 و 1.4 و 0.4، على التوالي وللترتيب السابق نفسه. وتجدر الإشارة إلى أن تشكل البراعم بوجود خليط من الفركتوز و الكزليلوز تم بشكل غير مباشر بدءاً من كالوس متوسط الكثافة؛ إذ ظهرت على طرفي السويقة مترافقة مع الجذور العرضية أو من دون الجذور العرضية (الشكل 2).

القدرة على إنتاج الجذور

تباينت مقدرة السويقات المزروعة فوق وسط صلب بوجود السكريات في إنتاج الجذور العرضية بشكل عام من الكزليلوز إلى السكروز أو الخليط (فركتوز و كزليلوز).

فبوجود السكروز، لعب لاختلاف ظروف الزراعة دوراً متبايناً في القدرة على إنتاج الجذور العرضية؛ فكانت عالية عند السويقات الناتجة من نباتات نامية في ظروف الإضاءة ولكن مزروعة في الظلام بمتوسط قدره 1.8 جذر / سويقة ثم تلك المزروعة في ظروف الإضاءة وناتجة من نباتات نامية في ظروف الإضاءة بمتوسط 0.8 جذر/ سويقة وأخيراً تلك الناتجة من نباتات نامية في ظروف الظلام ومزروعة في ظروف الإضاءة بمتوسط 0.3 جذر/ سويقة. وكانت متدنية بوجود الفركتوز بمتوسط 0.4 جذر/ سويقة .

ولم يلحظ بوجود الكزليلوز أي فرق معنوي يتعلق بالقدرة على إنتاج الجذور بين السويقات الناتجة من نباتات نامية في ظروف الإضاءة بمتوسط 1.7 جذر/ سويقة وتلك الناتجة من نباتات نامية في الظلام بمتوسط 2.2 جذر/ سويقة. وقد لوحظ وجود فرق معنوي في المقدرة على إنتاج الجذور بين الزراعة في ظروف الظلام بمتوسط 0.4 جذر/ سويقة وتلك الناتجة في ظروف الإضاءة حيث لوحظ ارتفاعها في الحالة الأخيرة (الجدول 2) عند إضافة السكر منفردا إلى وسط الزراعة. ولم تتأثر المقدرة على إنتاج الجذور بوجود خليط (الفركتوز والكزليلوز) وذلك باختلاف أصل السويقات في حين تنخفض بالنسبة للسويقات المزروعة في

ظروف الظلام (الجدول2). أما فيما يتعلق بطول الجذور العرضية المتشكلة فقد تناقصت اعتبارا من تلك الناتجة بوجود السكروز (15 – 25) مم إلى تلك الناتجة بوجود الكزايلوز (2 – 20 مم) مروراً بتلك الناتجة عن وجود خليط (الفركتوز و الكزايلوز) (15– 20 مم).

تطور الكتلة الحيوية للسويقات المزروعة تحت تأثير مختلف السكريات المنتجة لها

أظهرت السويقات المزروعة فوق وسط MS الصلب وحده أو الذي أضيفت له السكريات ولكن بوجود D.C.M.U. أو في وسط MS السائل الذي أضيفت له السكريات المختلفة، ثباتية في الوزن خلال 30 يوماً من الزراعة.

أدى وجود السكروز في وسط الزراعة- وبشكل أقل الفركتوز- إلى زيادة كبيرة في وزن السويقات. فبوجود السكروز وبعد 30 يوماً تغير متوسط كتلة المادة الجافة للسويقات المزروعة في ظروف الإضاءة من 3.3 إلى 51.5 ملغ للسويقات الناتجة في ظروف الإضاءة ومن 2.4 الى 35.7 ملغ للسويقات الناتجة في ظروف الظلام، وانخفضت هذه الزيادة إلى 16.8 ملغ في ظروف الزراعة في الظلام. كما لوحظ تزايد سريع في كتلة المادة الجافة للسويقات أيا كان أصلها عند زراعتها في ظروف الإضاءة اعتباراً من الأسبوع الثاني من الزراعة وبشكل منتظم بالنسبة للسويقات الناتجة في ظروف الإضاءة والمزروعة في ظروف الظلام نتيجة الانقسامات الخلوية السريعة وتشكل البراعم العرضية.

ازداد متوسط كتلة المادة الجافة للسويقات الناتجة في ظروف الظلام و المزروعة بوجود الفركتوز حتى بلغ 32.6 ملغ خلال 30 يوماً من الزراعة. ازدادت كتلة المادة الجافة بوجود الكزايلوز بنحو ثلاثة أضعاف خلال 30 يوماً مهما كان أصل السويقات أو ظروف الإضاءة ولكن كانت الزيادة الأكثر خلال الأيام العشرة الأخيرة للزراعة في ظروف الإضاءة مما يمكن ربطه مع انخفاض النشاط الميتوزي خلال الأيام العشرين الأولى وزيادة نشاط التعضي فيما بعد(نتائج غير مبينة).

أبدت السويقات بوجود الخليط (فركتوز مع كزايلوز) زيادة في متوسط كتلة المادة الجافة وسطاً بين الحالتين السابقتين، وفي هذه الحالة فإن الزيادة الوزنية تظهر منتظمة خلال الـ 20 يوماً الأولى ثم ما تلبث أن تزداد في ظروف الإضاءة وتنخفض في ظروف الظلام.

تأثير التغذية الكربونية في قدرة تجذير النموات الخضرية الناتجة عن إعادة التجديد وتطورها

سمحت النتائج الأولية بتبني الوسط MS أضيف له إما 5 غ / ل سكروز أو 10غ / ل كزايلوز أو7.5غ / ل من الخليط (فركتوز و كزايلوز)، الجدول(1). وقد تمت دراسة تأثير طبيعة السكر(يات) الموجود(ة) في الوقت نفسه في الوسط المنتج للنموات الخضرية و وسط تجذيرها. وتمت مقارنة نتائج التجذير مع تلك الناتجة بوجود اوكسين IBA بتركيز 0.2 ملغ / ل حسب Alonzo-Lopez (1996).

تشابهت نسبة تجذير النموات الخضرية المزروعة في وسط تجذير يحتوي الكزايلوز وحده أو مخلوطاً مع الفركتوز عندما نتجت النموات الخضرية بوجود السكروز، في حين ان كمية الكالوس (من النوع المتماسك) كانت أكبر في الحالة الثانية، وكانت الجذور المتشكلة جيدة التطور بطول 1.3 سم. أما وجود 5غ / ل من السكروز في وسط التجذير فيؤدي لتشكل كالوس بكميات كبيرة تغطي الجذور المتشكلة وتعيق نموها، الشكل (3).

الشكل 3. استجابة النموات الخضرية الناتجة في وسط MS بوجود 30 غ/ ل من السكروز و المزروعة للتجذير في وسط MSd أضيف له:

1 - 10 غ / ل كزايلوز 2 - 5 غ / ل سكروز 3 - 2.5غ / ل فركتوز + 5 غ /ل كزايلوز

وقد تناقص متوسط عدد الجذور المتشكلة على النموات الخضرية الناتجة بوجود السكروز من 9.4 جذر بوجود السكروز في وسط التجذير إلى 5.2 جذر بوجود الخليط (فركتوز و كزايلوز) و إلى 2.7 جذر بوجود الكزايلوز وحده في وسط التجذير، الجدول(3).

الجدول 3. التأثير المتبادل بين كل من وسط إنتاج النموات الخضرية و وسط تجذيرها في مقدرتها التجذيرية بعد 45 يوماً من الزراعة.

وسط إنتاج النموات الخضرية	وسط التجذير								
	MSd			MSd+ 5 غ /ل سكروز			MSd+ 0.2 ملغ / ل IBA		
	% للنموات الخضرية المجذرة	متوسط عدد الجذور /نبات	متوسط طول الجذور (سم)	% للنموات الخضرية المجذرة	متوسط عدد الجذور /نبات	متوسط طول الجذور (سم)	% للنموات الخضرية المجذرة	متوسط عدد الجذور /نبات	متوسط طول الجذور (سم)
MS + سكروز	NT	NT	NT	(b) 63.3	(d) 2.1±9.4	0.2±0.6	NT	NT	NT
MS+ كزايلوز+ فركتوز	(a) 16.7	(a) 0.5±1.4	0.3±1	(d) 83.3	(c) 1.7±7.7	0.6±3.5	(b) 70	(ab) 1.8±4.1	1.3±1.5
MS+ كزايلوز	(a) 10	(a) 0.4±1.3	0.3±0.7	(b) 66.7	(b) 2.3±4.8	0.3±0.8	(c) 86.7	(ab) 1.6±4.4	1.3±2.1

وسط إنتاج النموات الخضرية	وسط التجذير					
	MSd+ 7.5 غ /ل كزايلوز+ فركتوز			MSd+ 5 غ /ل كزايلوز		
	% للنموات الخضرية المجذرة	متوسط عدد الجذور / نبات	متوسط طول الجذور (سم)	% للنموات الخضرية المجذرة	متوسط عدد الجذور / نبات	متوسط طول الجذور (سم)
MS + سكروز	(b) 70	(b) 2.7±5	0.6±1.3	(b) 70	(a) 1.7±2.7	0.9±3.4
MS+ كزايلوز+ فركتوز	(c) 90	(b) 1.3±5.5	0.5±2.2	(c) 93.3	(b) 0.6±6.3	0.6±3.6
MS+ كزايلوز	(bc) 76.7	(cd) 2.2±8	0.6±1.5	(c) 93.3	(ab) 0.7±4.2	0.7±4.3

تمت الدراسة على 30 نمواً ورقياً لكل وسط مختبر وكررت التجربة ثلاث مرات.

لختلاف الأحرف في العمود الواحد يعني فرقاً معنوياً بين المعاملات للعامل المدروس عند $p = 0.05$.

NT : ليست مختبرة.

أما الجذور الأكثر طولاً فهي تلك الناتجة عن الوسط الأخير، الشكل (3)، في حين تحسنت مقدرة النموات الخضرية على التجذير عندما كان السكر المضاف لوسط إنتاجها هو الكزايلوز، الجدول(3)؛ إذ ينعدم تقريباً تشكل الكالوس في قاعدتها وبالتالي فإن عدد الجذور العرضية المتشكلة يزداد عموماً مهما كان السكر الموجود في وسط التجذير، الشكل (4).

الشكل 4. استجابة النموات الخضرية الناتجة في وسط MS بوجود 30 غ / ل كزايلوز و المزروعة للتجذير في وسط MSd أضيف له:

1- 5 غ / ل سكروز
2- 10 غ / ل كزايلوز
3- 2.5 غ / ل فركتوز+ 5 غ /ل كزايلوز
4- 0.2 ملغ / ل IBA

كونت النموات الخضرية الناتجة في وسط يحتوي على الخليط (فركتوز و كزايلوز) على قاعدتها بعد زراعتها في وسط التجذير كالوساً أقل أهمية منه في حالة كون السكروز السكر المنتج لها. وتجذير هذه النموات الخضرية محدود في حال وجود السكروز في وسط التجذير ويزداد في حال وجود الكزايلوز وحده أو مع الفركتوز في وسط التجذير، الشكل(5).

كان وسط التجذير المحتوي على الكزايلوز كمصدر كربوني الأفضل؛ إذ بلغت نسبة تجذير النموات الخضرية الناتجة بوجود السكروز 70% و 93.3 % بالنسبة لتلك الناتجة بوجود الكزايلوز وحده أو مخلوطاً مع الفركتوز. أما العدد المتوسط للجذور المتشكلة فهو يتراوح بين 2.7 و 8 بطول يتراوح بين 3.4 و 4.3 سم، الجدول(3).

بوجود السكروز في وسط التجذير، فإن عدد الجذور المتشكلة على قاعدة النموات الخضرية يمكن أن يكون أكبر أو

معادلاً أو أقل منه في الحالات السابقة للسكر المنتج لهذه النموات الخضرية، ولكن في جميع الحالات فإن طولها يكون أقل منه في الحالات السابقة. وتسلك النموات الخضرية المزروعة فوق وسط تجذير يحتوي على الخليط (فركتوز + كزايلوز) سلوكاً وسطاً مقارنة بالحالتين السابقتين، الجدول(3).

بوجود IBA في وسط التجذير، فإن نسبة التجذير تزداد إذا كانت النموات الخضرية الناتجة بوجود خليط الفركتوز والكزايلوز مقارنة بتلك الناتجة بوجود الكزايلوز. بالمقابل لم يظهر أي اختلاف معنوي فيما يخص العدد المتوسط للجذور الناتجة في حين ان طول الجذور الناتجة اختلف بشكل معنوي؛ فكان أعلى في حال الخليط السكري (فركتوز و كزايلوز)، الجدول(3).

الشكل 5. استجابة النموات الخضرية الناتجة في وسط MS بوجود 10 غ / ل فركتوز+ 20 غ / ل كزايلوز و المزروعة للتجذير في وسط MSd أضيف له:

1- 5غ / ل سكروز
2- 2.5غ / ل فركتوز+ 5 غ /ل كزايلوز
3- 10 غ / ل كزايلوز
4- 0.2 ملغ / ل IB

تأثير وجود السكريات المدروسة في تطور الجزأين الخضري والجذري للنموات الخضرية

كان متوسط الوزن الجاف للنموات الخضرية قبل التجذير الناتجة بوجود خليط (الفركتوز و الكزايلوز) 10.2 ملغ، وهو أكبر معنوياً من ذاك الخاص بالنموات الخضرية الناتجة بوجود الكزايلوز والبالغ 9.2 ملغ، وجاء في المركز

الأخير الوزن الجاف للنموات الخضرية الناتجة بوجود السكروز الذي بلغ 7.9 ملغ.

وبدا تطور الجزء الأخضر للنموات الخضرية المجذرة في وسط MSd الذي أضيف له السكروز متماثلاً مهما كان الوسط المنتج لها، الجدول(4) ، والشيء نفسه انطبق بالنسبة للنموات الخضرية المزروعة فوق MSd الذي أضيف له خليط الفركتوز و الكزايلوز ولكن بشكل أفضل. بالمقابل أعطت النموات الخضرية الناتجة بوجود الكزايلوز والمزروعة فوق وسط MSd والكزايلوز وحده أو مشتركاً مع الفركتوز أفضل نمو للجزء الخضري.

أما بالنسبة للجذور المتشكلة فلم يلاحظ أي اختلاف في الوزن الجاف إذا كانت ناتجة في الوسط MSd الذي أضيف له الخليط (فركتوز و كزايلوز) مهما كان الوسط المنتج للنموات الخضرية، بينما لم يلاحظ بوجود السكرين الآخرين أي اختلاف أيضاً في حال كون الخليط (فركتوز و كزايلوز) أو الكزايلوز وحده هي السكريات المنتجة للنموات الخضرية، الجدول(4).

وبشكل عام يمكن اعتبار أن الخليط السكري (فركتوز وكزايلوز) هو الإضافة السكرية الأكثر ملاءمة لتطور النموات الخضرية، ولكن هذه العلاقة مع تطور الجزء الجذري لم تكن بهذا الوضوح، وذلك لوجود الكالوس الذي لا يمكن فصله عن الجذور المتشكلة في حال السكروز أو الخليط (فركتوز مع كزايلوز).

الجدول 4. التأثير المتبادل بين كل من وسط إنتاج النموات الخضرية و وسط تجذيرها في تطور الجزأين:

(1): الخضري

وسط إنتاج النموات الخضرية	متوسط الزيادة في المادة الجافة للجزء الأخضر من النموات الخضرية المجذرة (ملغ) ± SE			
	MSd	MSd+ 5 غ /ل سكروز	MSd+ 5 غ/ل كزايلوز	MSd+ 7.5غ/ل كزايلوز وفركتوز
MS + سكروز	NT	(b) 3.7± 27.4	(a) 3.6± 22.2	(c) 4.9±39.9
MS+ كزايلوز+ فركتوز	(a) 1.21±10.6	(b) 3.2 ± 29.4	(ab) 2.1±26.6	(c) 3.2±43.8
MS+ كزايلوز	(a) 1.29±10	(b) 3.4±30.8	(b) 2.6± 27	(c) 4.2±43.5

(2): الجذري مع الكالوس المرافق

وسط إنتاج النموات الخضرية	متوسط الزيادة في المادة الجافة للجزء الجذري من النموات الخضرية المجذرة (ملغ) ± SE			
	MSd	MSd+ 5 غ /ل سكروز	MSd+ 5 غ/ل كزايلوز	MSd+ 7.5 غ /ل كزايلوز وفركتوز
MS + سكروز	NT	(c) 0.6±6.8	(a) 0.3±3.1	(c) 0.8±5.6

وسط إنتاج النموات الخضرية	متوسط الزيادة في المادة الجافة للجزء الجذري من النموات الخضرية المجذرة (ملغ) ± SE		
	MSd	MSd+ 5 غ /ل سكروز	MSd+ 5 غ/ل كزايلوز	MSd+ 7.5 غ /ل كزايلوز وفركتوز
MS+ كزايلوز+ فركتوز	NT	(bc) 0.5±5.9	(b) 0.6±4.1	(bc) 0.1±5.2
MS+ كزايلوز	NT	(bc) 0.6±5.1	(b) 0.4±4.5	(c) 0.8±6.4

الأقلمة والزراعة في الأصص

أبدت النموات الخضرية المجذرة والمزروعة في الأصص حيوية مرتفعة؛ إذ تجاوزت نسبة النباتات الحية 92% بعد أسبوع من النقل إلى التربة، الشكل (6).

الشكل 6. نباتات فتية بعد نقلها إلى التربة و أقلمتها.

1: بعد أسبوع من النقل.

2: بعد 45 يوماً من النقل.

المناقشة

أظهرت أوساط الزراعة المحتوية على الفركتوز مصدراً للطاقة تغيراً في اللون إلى السمرة بعد عملية التعقيم، وهذا قد يكون نتيجة تفكك مركبات الفركتوز، مثل 5-(hydroxymethyl) - 2 - furaldehyde حسب Kent et al. (1990)، أو إنتاج مركبات فينولية حسب Suortti (1983)، وهذا قد يفسر ظهور الاسمرار على طرفي السويقات المزروعة في أوساط زراعية محتوية على الفركتوز.

ظاهرة الانحناء والعودة للاستقامة للسويقات المزروعة

يعود سبب ظاهرة انحناء السويقات المزروعة في وسط صلب إلى إعادة توزيع الأوكسين المحتوى في جزء معين من العضو النباتي تحت تأثير الإضاءة المطبقة على هذا العضو، بحيث تتجمع منه كمية أكبر في الجزء الواقع في الظلام (هروباً من الضوء، وبفعل التخريب الضوئي في الجهة المعرضة للضوء) حسب Pilet (1961)، مما يؤدي بالنتيجة إلى ضعف النمو في تلك المنطقة وارتفاع تركيزها في الجهة الواقعة في الظلام . ويقود ذلك بالتالي إلى تسريع نمو هذه

المنطقة الذي يترجم بانحناء العضو النباتي نحو الأعلى؛ إذ يكون بطن الانحناء موافقاً لأبعد نقطة عن المصدر الضوئي. أما على الوسط السائل فإن جميع جوانب النبات تلامس الوسط بشكل متساوٍ، و تكون السويقات في حالة دوران والجوانب كلها معرضة للضوء بشكل متناوب في الوقت والمكان، مما يفسر استطالة السويقات من دون أن تنحني.

أما عودة السويقات المنحنية إلى شكلها الطبيعي متزامنةً إما مع ظهور الكالوس أو مع ظهور براعم عرضية أو نتيجة وضع مكعب جيلوزي يحتوي على 1AA على طرفي السويقة المنحنية، و غياب هذه الظاهرة عند إزالة خلايا الكالوس عن طرفي السويقة خلال الأيام الأولى لظهور الكالوس، فذلك يمكن تفسيره بقدرة خلايا الكالوس المنقسمة لسويقات *A. julibrissin* على تركيب هرموناتها الداخلية الخاصة. وهذه الظاهرة لا تبدو واضحة في حالة إضافة الهرمونات للوسط ولكن يمكن أن تظهر جلياً عند الزراعة في وسط يخلو من أي إضافة هرمونية خارجية .

إنتاج الكالوس

تؤكد نتائجنا تلك الأبحاث المنشورة من قبل Alonzo-Lopez (1996) عن مقدرة السكروز على إنتاج الكالوس بدءاً من أجزاء جذرية من *Albizzia julibrissin* مزروعة مخبرياً حتى بغياب هرمونات النمو من وسط الزراعة، كما تؤكد مقدرة أقل للفركتوز ثم لخليط الفركتوز مع الكزايلوز ثم للكزايلوز وحده. أما الكالوس فيظهر بأشكال مختلفة حسب نوع السكر المختبر؛ فهو إما شفاف غير متماسك كالموصوف من قبل Wright and Northcote (1973) و El-Maataoui et al. (1998) أو كالوس من النوع المتماسك في وسط يحتوي على الكزايلوز فقط أو على الخليط (فركتوز مع كزايلوز). كما تشير ملاحظاتنا في حال الزراعة في الظلام إلى أن الضوء غير ضروري لتشكل الكالوس، وهذا يتطابق مع دراسات Chlyah (1975) و Margara (1998)، ولكن بالمقابل يزداد نموه بوجود الضوء؛ إذ إن الكالوس الناتج في ظروف الإضاءة أكبر حجماً منه في ظروف الظلام، وهذا ناتج بالتأكيد عن الفعل التآزري لعملية التركيب الضوئي مع محتوى الوسط السكري الذي يزيد في كمية النشا في العينات المدروسة (دراسة تشريحية غير منشورة).

كما لم يقتصر تأثير وجود D.C.M.U. في وسط الزراعة على تثبيط عملية التمثيل الضوئي فحسب كما هو معروف؛ فوجود هذه المادة مثبط لجميع العمليات المورفولوجية (كالوس- تعض) مقارنة مع ما يلاحظ في حال الزراعة في ظروف الظلام.

إنتاج البراعم

تؤكد نتائجنا الدور الايجابي للسكروز في تشكل البراعم، ويتطابق ذلك مع نتائج دراسة Takayama and Mhsawa (1980) ونتائج دراسة Romano et al. (1997) ونتائج دراسة Doung Tan Nhut et al. (2001)، حتى لو استخدم هذا السكر من دون إضافات هرمونية. كما أظهرت مقدرة السكرين الآخرين (الكزايلوز وحده أو مختلطاً مع الفركتوز) على إنتاج براعم ولكن بمعدل متوسط أقل من السابق. وهذا يتطابق مع نتائج دراسة Alonzo-Lopez (1996) وهو على حسب معرفتنا صاحب الدراسة الوحيدة التي أظهرت ذلك. إن السكروز الذي تبين في تجاربنا أنه سكر يشجع بشكل كبير إنتاج البراعم لم يكن مناسباً لنمو هذه البراعم وتطورها إلى نموات ورقية على النحو الذي سجله كل من Christianson and Warniek (1984) و Ezura et al. (2000). ويبدو أن هناك فعلاً تضادياً بين كثافة تشكل كل من الكالوس والبراعم؛ إذ إن نمو الكالوس بشكل سريع وكبير يمنع في بعض الأحيان تشكل البراعم أو يعيق التطور اللاحق للبراعم المشكلة إلى نموات ورقية. وهذه الظاهرة تمت ملاحظتها عند زراعة عقل من البلوط الأخضر؛ فقد بدت هذه الظاهرة واضحة بين تشكل الكالوس وتطور الجذور(نتائج غير منشورة). ومما يدعم هذه الفكرة استخدام الكزايلوز وحده أو مع الفركتوز؛ فقد أتاح تشكل الكالوس الضعيف الفرصة لتطور جميع البراعم المتشكلة إلى نموات خضرية.

إذاً يلعب السكر الموجود في وسط الزراعة دوراً محدداً للتطور اللاحق؛ إذ يمكن أن يوجهه باتجاه معين. وهذا يؤكد اختلاف نتائج استخدام السكروز والغلوكوز و الفركتوز والغالاكتوز والمانوز والمالتوز والرافانوز والستاشيوز مرافقة لإضافات هرمونية Devi et al. (1977) أو

باستخدام السكروز والمالتوز (1990) Yue Hua et al. أو باستخدام السكروز والمالتوز والسلبيوز Millam et al. (1992) ومع السكريات نفسها المستخدمة من قبل Alonso-Lopez (1996)، ولهذا الفعل الموجه للسكريات أهمية عملية كبيرة. فحسب الأهداف من البرنامج يمكن مثلاً استخدام السكروز في برنامج لاستغلال الاختلافات الوراثية؛ إذ يعتبر الكالوس مكاناً مناسباً للتغيرات الوراثية Arene et al. (1993) ، أو استخدام الكزايلوز في مجال الإكثار الخضري.

لقد أظهرت الدراسة في ظروف الظلام أن الإضاءة تلعب دوراً منشطاً لظهور البراعم عندما يكون السكر المستخدم هو الكزايلوز وحده أو مع الفركتوز من دون إضافة هرمونية. وهذا ينطبق أيضاً في حال وجود السكروز وحده في ظروف الظلام؛ إذ إن البراعم المتشكلة تمكنت من التطور إلى نموات ورقية، وكان إنتاج الكالوس ضعيفاً مقارنة مع النباتات المزروعة في ظروف الإضاءة.

المقدرة على إنتاج الجذور

أظهرت الدراسات أن السكروز والفركتوز يعتبران ضعيفي التأثير على التجذير، ويفسر ذلك كما ذكر سابقاً بالتضاد بين تشكل الكالوس و التعضي. كما أظهرت تجاربنا ولأول مرة حسب معرفتنا الأثر الايجابي للكزايلوز في تحفيز نمو الجذور من دون استخدام أي منظمات نمو حال استخدامه وحده أو كموجه في حال استخدامه مع الفركتوز، مما شجع على استخدامه في تجارب تجذير النموات الخضرية. من ناحية ثانية، شجعت الإضاءة أيضاً تشكل الجذور بوجود الكزايلوز وحده أو مع الفركتوز. وبالمقابل فإن ظروف الظلام شجعت تشكل الجذور بوجود السكروز في وسط الزراعة.

تجذير النموات الخضرية

تؤكد دراستنا فكرة أن التجذير المخبري لا يحتاج تركيزاً عالياً من الأملاح المعدنية Bon et al. (1998) و Kromer and Gamian (2000) و Doung Tan Nhut et al. (2001). كما تشير إلى أن منظمات النمو لم تكن ضرورية أيضاً للتجذير. والتراكيز السكرية التي أعطت أفضل النتائج للتجذير كانت منخفضة نسبياً فكانت 5غ/ ل للسكروز و 10غ/ ل للكزايلوز و5غ/ل + 2.5غ/ ل للخليط (فركتوز مع كزايلوز)، وهذا يتوافق مع الدور التنظيمي للسكريات على فعل الأوكسينات المقترح من قبل Ryan and Farmer (1991) و Darvill et al. (1992). أما إضافة السكريات بكمية 30 غ/ ل إلى وسط الزراعة فلم تسمح بعملية تجذير ناجحة. و هذا أظهرته نتائج دراسة Chan Lai Keng et al. (1999) ؛ إذ إن ارتفاع تركيز السكروز في وسط التجذير من 15غ/ ل إلى 30غ/ ل يؤخر تشكل الجذور المتشكلة على النموات الخضرية لـ *Azdirachat excelsa* L. ، وهذا يمكن تفسيره- ولو جزئيا- بالفعل المثبط للاوكسين عند التركيز العالي للسكريات المقترح من قبل Aldington and Fry (1993) . لقد أظهرت الدراسة مقدرة عالية للكزايلوز غير المستخدم في مجال زراعة الأنسجة على تحريض التجذير، وكان من السكريات التي أعطت أفضل النتائج في هذا المجال. فكان ترتيب السكريات حسب تأثيرها في التجذير مماثلاً للترتيب الخاص بالسكريات المستخدمة في أوساط إنتاج النموات الخضرية المنقولة لاحقاً. وإن القدرة المنظمة للسكريات على تشكيل الجذور لاحقاً يمكن أن تحدد من مرحلة التشكل الميرستيمي وتطورها إلى نموات ورقية، وهذا يفسره اتجاه الخلايا القاعدية للنموات الخضرية الناتجة بوجود السكروز نحو الانقسام اللامتمايز وتشكيل الكالوس، وبالمقابل هناك الاتجاه نحو التعضي وتشكيل الجذور إذا كانت النموات الخضرية ناتجة بوجود الكزايلوز، أما تلك الناتجة بوجود الخليط (فركتوز مع كزايلوز) فاستجابتها وسط بين الاثنين؛ فهي تعطي كالوساً وجذوراً في الوقت نفسه.

الاستنتاجات

أظهرت هذه الدراسة من ناحية مقدرة السكروز و الفركتوز و الكزايلوز وحده أو مخلوطاً مع الفركتوز على إعادة تجديد النبات حتى بغياب أي إضافة هرمونية خارجية إلى وسط الزراعة. ومن ناحية ثانية، فاختلاف الاستجابة بغياب الإضافة الهرمونية يقودنا لافتراض أن السكريات الموجودة في وسط الزراعة تلعب دوراً منظماً في اصطناع الأوكسينات الداخلية حسب طاقة رد الفعل الناتج. فمن المهم

في المستقبل دراسة تطور الأوكسين الداخلي بوجود مختلف السكريات (المصادر الكربونية). كما تم وضع علاقة بين العودة للشكل الطبيعي للسويقات المنحنية والبدء بتشكل الكالوس أو ظهور البراعم على السويقات المدروسة. وهذا يمكن تفسيره باصطناع اوكسينات داخلية محكومة بدورها بطبيعة السكر الموجود في وسط الزراعة. وعلى مستوى تجذير النموات الخضرية الناتجة فإن أثر السكريات في التجذير لا يتعلق فقط بطبيعة السكريات الموجودة في وسط التجذير ولكن أيضاً بطبيعة السكر الموجود في وسط إنتاج هذه النموات الخضرية. إذاً فهناك تأثير تراكمي للسكر الموجود في وسط الإنتاج وذاك الموجود في وسط التجذير؛ فمن الواضح أن هذه السكريات لها شأن بقدرة التطور عن طريق تنظيم فعل بعض المورثات. كما أظهرت التجارب السكروز والفركتوز كسكرين يشجعان أساساً نمو الكالوس.

أما الكزايلوز فهو سكر يشجع عملية التجذير بشكل خاص. و الكزايلوز سواء استخدم وحيداً أو مختلطاً مع الفركتوز، فهو يعطي تطوراً أفضل للجزء الأخضر للنموات الخضرية المجذرة منه في حال وجود السكروز المستخدم بشكل واسع في زراعة الأنسجة النباتية. وتكتسب نتائجنا من ناحية أخرى أصالة عملية؛ فحسب معرفتنا تعتبر دراستنا الوحيدة التي تم من خلالها الحصول ولأول مرة على نباتات كاملة ابتداء من أعضاء نباتية خالية من الميرستيم في أوساط زراعية لا تحوي إلا الأملاح المعدنية ومصادر كربونية (السكريات) فقط من دون إضافات هرمونية في أي مرحلة من مراحل الزراعة. ومن ناحية أخرى فإن دراستنا تفتح الباب واسعاً للبحث؛ إذ سيكون مهماً معرفة مصير السكريات داخل الخلية ومعرفة أفضلية استخدامها بالأخص عند استخدام أكثر من سكر في وسط الزراعة.

المراجـع

Aldington, S. and Fry, S. 1993. Oligosaccharins. ***Adv. Bot. Res.,*** 19: 1 – 1.

Alonso-Lopez, A. 1996. Les capacité de régénération par voie végétative de *l'A. julibrissin.* Influence de la nutrition carbonée sur les phénomènes de callogenèse et d'organogenèse. *Thèse. Univ. d'Avignon et des pays de Vaucluse* .

Arene, L., Pellegrino, C. and Gudin, S. 1993. A comparison of the somaclonal variation level of *Rosa hybrida* L. meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissues. ***Eurphytica***, 71:83–90.

Bertrand-Garcia, R., Waling, L.L. and Murashige, T. 1992. Analysis of polypeptides associated with shoot formation in tobacco callus cultures. ***Amer. J. Bot.,*** 79 (5) : 481 –487.

Bon, M.C., Bonal, D., Doreen, K. Goh and Monteuuis, O. 1998. Influence of different macronutrient solutions and growth regulators on micropropagation of juvenile *Acacia mangium* and *paraserianthes falcataria* explants. ***Plant-Cell-Tissue-and-Organ-Culture***, 53:171 – 177.

Chlyah, A. 1975. Différenciation cellulaire et organogénétique en relation avec des corrélation inter tissulaires. étude Eco physiologique et cytologique. *thèse de Doctorat d'état* Paris 11. Orcy.

Christianson, M. L. and Warnick, D.A. 1984. Phenocritical times in the process of *in vitro* shoot organgenesis. ***Developmental Biology,*** 101:382 – 390.

Darvill, A., Augur, C., Bergmann, C., Russell, W., Carlson and Jong-joo Cheong, S. 1992. Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth. development and defence responses in plants. ***Glycobiology***, 2(3): 181 – 189 .

Duong Tan Nhut, Bui Van Le, Tanaka, M. and Tran Thanh, Van K. 2001. Shoot induction and plant regeneration from receptacle tissues of *Lilium longiflorum.* ***Scientia Horticulturae***, 87:131 – 138.

Eke, C.R., Akomeah, P. and Asemota, O. 2005. Somatic embryogenesis in date palm *(Phoenix dactylifera* L.)

from apical meristem tissues from "zebia" and "loko" landraces. ***Af. J. Biotechnol***., 4:244-246.

El-Maataoui, M., Espagnac, H., Jaber, B. and Alonso-Lopez, A. 1998. Regulation of *in vitro* callogenesis and organgenesis from *Albizzia* root explants by carbohydrate source modifications. ***Plant Physiology***, 152:494 – 501.

Ezura, H., Nukui, N., Yuhashi, K.-I. and Minamisawa, K. 2000. *In vitro* plant regeneration in *Macroptilium atropurpureum*. A legume with a broad symbiont range for nodulation. ***Plant Science*** ,159:21–27.

Faria, R.T., Rodrigues, F.N., Oliveira, L.V.R.and Müller, C. 2004. *In vitro dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. ***Hortic. Bras***., 22:780-783.

Gudin, S. 1984. Contribution à l'étude du passage de la mixotrophie à la photo autotrophie dans des suspensions cellulaires de *Myrtillocactus geometrizans* et d'*Euphorbia Characias*. Mémoire de *D.E.A. "développement et amélioration des végétaux.* Univ. D'Aix – Marseille III.

Kromer, K. and Gamian, A. 2000. Analysis of soluble carbohydrates. proteins and lipids in shoots of M7 apple rootstock cultured *in vitro* during regeneration of adventitious roots. ***J. Plant Physiol.***, 156:775 – 782.

Kumar, S., Sarkar, A. K. and Kunhikannan, C. 1998. Regeneration of plant from leaflet explants of tissue culture raised safed siris (*Albizia procera*), ***Plant-Cell - Tissue- and -Organ – Culture***, 54(3):137 – 143.

Lai King, Chan, Liew Teik Kool and Chris Teo Kheng Hoe. 1999. *In vitro* rooting of sentang shoots (*Azadirachta excelsa* L.) and acclimatization of the plantlets. ***In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant,*** 35:396- 400.

Mandal, A. K. A. and S. Dutta Gupta. 2001. Direct shoot organogenesis and plant regeneration in Safflower. ***In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant***, 37:50 – 54.

Margara, J. 1989. Bases de la multiplication végétative, 258 P.

Millam, S., Davidson, D. and Wayne, P. 1992. The use of flax (*Linum usitatissimum*) as a model system for studies on organogenesis *in vitro*: the effect of different carbohydrates. ***Plant-Cell-Tissue-and-Organ-Culture,*** 28:163 – 166.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. ***Physiologia Plantarum***, 15:473 – 497.

Pilet, P. Emile. 1961. Les phytohormones de croissance. méthodes chimie. biochimie. physiologie. applications pratiques, 774 P.

Pomier, M., Beligne, V., Bonneau, X. and Taffin, (de) G. 1986. Restauration de la fertilité des sols lors de la replantation d'une cocoteraie. ***Oléagineux***, 41 (5): 223-228.

Rao, L. P. V. and Deepesh, De N. 1987. Tissue culture propagation of tree legume *Albizia Lebbek* L. *Benth.* ***Plant Science,*** 51:263 – 267.

Romano, A., Noaonha, C. and Matins – Loução, M.A. 1997. Role of carbohydrates in micro propagation of *cork oak*. ***Plant-Cell-Tissue-and-Organ-Culture***, 40:159 – 167.

Rout, G. R., Samantaray, S. and Das, P. 1999. Root induction in microshoots of *Simarouba glauca* L. *in vitro*: peroxidase as a marker for rooting. ***Silvae Genetica***, 48:14-17.

Ryan, Clarence A. and Edward E. Farmer. 1991. Oligosaccharides signals in plants: a current assessment. ***Annu. Rev. Plant Physiol. Bio.,*** 42:651 – 674.

Samir, C. and Debnath. 2004. Effect of carbon source and concentration on development of Linggonberry *(Vaccinum vitis-idaea* L.) shoot cultivated *in vitro* from nodal explants. ***In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant***, 41: 145-150.

Sasson, A. 1986. Quelle biotechnologie pour les pays en développement livre en Français- 200p. Biofuture - Paris ;U.N.E.S.C.O.

Skoog, F. and Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of

growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. ***Symp. Soc. Exper. Biol.,*** 11:118 – 131.

Suortti, T. 1983. Identification of antimicrobial compounds in heated neutral glucose and fructose solution. ***Z.Lebnsm. Unters. Forsch.,*** 177:94 –96.

Wright, K. and Northcote, D. H. 1973. Differences in ploidy and degree of intercellular contact in differentiating and non-differentiating sycamore calluses. ***Cell Sci.,***12:37–53.

Yue Hua Cao, Phelep, M. and Duhoux, E. 1990. Effects of some organic compounds (maltose-sucrose-vitamins) on the shoot biomass of *Allocasuarina verticillata* (Lam.) L. Johnson (*Casuarinaceae*) grown *in vitro*. ***Bull. Soc. Bot. Fr.,*** 137. Actual Bot., 7-13.

Influence of Some Carbohydrates on *in vitro* Regeneration of Albizzia (*Albizzia julibrissin* Durazz.) on Growth Regulator-Free Media

Hussein Al-Zu'bi*

ABSTRACT

The effect of three carbohydrates; i.e. sucrose, fructose, xylose or a mixture of fructose and xylose on *in vitro* regeneration of *Albizzia julibrissin* using hypocotyl explants was investigated. Carbon source had considerable effect on the different morphogenic responses, mainly on callus, shoot and root induction. It was shown that the regeneration of whole rooted plants on growth regulator-free media using xylose as a sole carbon source could be achieved. Xylose gave better results in the induction of shoots and also roots, in comparison with sucrose which is commonly used in tissue culture media. The results of the present work open numerous perspectives concerning both fundamental and applied approaches for better understanding of morphogenesis in relation with tissue nutrition through manipulation of the carbon source used. Furthermore, the method used in the regeneration on growth regulator-free media may ensure true-to-type multiplication and avoid abnormalities which might be caused by growth regulators added to culture media.

KEYWORDS: *Albizzia julibrissin*, Regeneration ,Auxin, Morphogenesis, Carbohydrates, *In vitro*.

*Department of Biotechniques, General Commission of Agricultural Scientific Research, Damascus, Syria.
Received on 26/9/2007 and Accepted for Publication on 29/4/2009.