الإكثار الخضري الدقيق (*In Vitro*) لبادرات الخرنوب *Ceratonia siliqua* L. بالعقل الدقيقة

فادي قازنجي[*(1)] وطلال أمين[(1)] وحافظ محفوض[(2)]

(1). قسم الحراج والبيئة، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.
(2). قسم التقانات الحيوية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.
(*للمراسلة: م. فادي قازنجي. البريد الإلكتروني: fadikazngi79@yahoo.com).

تاريخ الاستلام: 2019/07/30 تاريخ القبول: 2019/09/24

الملخص

أجريت الدراسة خلال العامين 2018 و2019 في مشتل البيت الأخضر على الطراز البري S_1 لنوع الخرنوب *Ceratonia Siliqua* L. النامي في موقع صنوبر جبلة التابع لمحافظة اللاذقية، وذلك بهدف تحديد أفضل توازن هرموني لتضاعف النموات الخضرية وتجذير العقل الدقيقة اعتباراً من البادرات، وبالتالي إمكانية إكثار الطرز المرغوبة لنباتات الخرنوب الناضجة لإنتاج سلالات خضرية من أجل إعادة تحريجه في مناطقه المتدهورة. توصلت هذه الدراسة إلى وضع طريقة مفصلة وناجحة للإكثار الخضري الدقيق للخرنوب، إذ أعطى التركيز 10% من هيبوكلوريت الصوديوم لمدة /20/ دقيقة أفضل كفاءة للتعقيم السطحي للنموات الخضرية، وأعطى التركيز 0.5 مغ/ل من الجبرلين (Gibberellic acid) مع BAP (Benzylaminopurine-6) تركيز 0.5 مغ/ل أفضل متوسط لطول النموات (8.47 سم)، بينما تضاعف النموات يصبح أفضل باستخدام هرمون BAP تركيز 0.5 مغ/ل مع 0.1 مغ/ل AIB (Indol-3- butyric acid). حقق تركيز هرمون التجذير AIB 2 ملغ/ل أفضل نسبة تجذير (71.67%) وأعطى أفضل متوسط لعدد الجذور (5.43)، بينما تحقق أفضل متوسط لطول الجذور (4.25 سم) عند تركيز 1 ملغ/ل من AIB.

الكلمات المفتاحية: الخرنوب، الإكثار الخضري الدقيق، البنزيل أمينو بيورين BAP، الأندول بيوتريك أسيد AIB .

المقدمة:

شجرة الخرنوب من الأشجار الحراجية المثمرة الهامة المنتشرة في منطقة حوض البحر المتوسط وتعد موطناً أصلياً له (Talhouk *et al.*, 2005). بالرغم من أن سورية هي من أحد المواطن الأصلية للخرنوب، إلا أن التعديات المتنوعة والمستمرة أدت إلى تراجع مساحاته وأعداد اشجاره وبالتالي طرزه الوراثية وأصبح نوعاً مهدداً بالانقراض (Nahal, 1962).

تدفع هذه الإشكالية إلى البحث في تطوير نبات الخرنوب من خلال إكثار الطرز الوراثية المرغوبة وإعادة تشجيره بصفات خضرية وإنتاجية مرغوبة. يتكاثر الخرنوب جنسياً عن طريق البذور وخضرياً عن طريق الإكثار بالعقل والتطعيم بهدف حفظ صفاته الخضرية والانتاجية (Romano *et al.,* 2002). وقد وصف الخرنوب بأنه من الأنواع صعبة التجذير وبالتالي صعوبة إكثاره بالعقل (Hartmann and Kester, 1983; Gubbuk *et al.,* 2011).

إن صعوبة إكثار نبات الخرنوب بالعقل فتحت الباب لمحاولة إكثاره بالعقل الدقيقة نسيجياً (*in vitro*) وبالتالي قد تساهم هذه التقنية في حل مشاكل إكثار الخرنوب خضرياً بالعقل وتسريع إكثاره وزيادة انتشاره (Gubbuk *et al.,* 2011). وتعد طريقة الإكثار الخضري بالعقل الدقيقة (*in vitro*) من أكثر الطرق استخداماً مقارنةً بطرق الإكثار الأخرى بزراعة الأنسجة (George, 1996; Dopranszki and Silva, 2010).

سابقاً، بذلت جهوداً للإكثار الخضري الدقيق للخرنوب من أجزاء نباتية مختلفة، مثل أجزاء من البذور (Sebastian and McComb, 1986)، وأجزاء من فروع من الأشجار المؤنثة (El-Shafey *et al.,* 1998)، وأخرى من بادرات الخرنوب (Hakim *et al.,* 2010; Radi *et al.,* 2013). وبالنظر إلى صعوبة إكثار نبات الخرنوب بالعقل العادية لإنتاج سلالات خضرية مرغوبة، فإنه من المفيد المساهمة في حل هذه الإشكالية عن طريق الإكثار بالعقل الساقية الدقيقة (*in vitro*).

تهدف الدراسة إلى تحديد أفضل توازن هرموني لتضاعف النموات الخضرية وتجذير العقل الدقيقة اعتباراً من البادرات، وبالتالي إمكانية إكثار الطرز المرغوبة لنباتات الخرنوب الناضجة لإنتاج سلالات خضرية من أجل إعادة تحريجه في مناطقه المتدهورة.

مواد البحث وطرائقه:

1-المادة النباتية المستخدمة:

أ – مصدر البذور:

استخدم في البحث بادرات الخرنوب والتي تعود إلى الطراز البري S_1 لنوع الخرنوب *Ceratonia Siliqua* L. النامي في موقع صنوبر جبلة التابع لمحافظة اللاذقية. والطراز S_1 عبارة عن شجرة أحادية الجنس مؤنثة وناضجة ارتفاعها 8 م، قطرها 47.8 سم، ثمارها طويلة وثقيلة الوزن ومحتواها من الدهون والسكريات والبروتين والألياف مرتفع. أما بذورها فهي طويلة نسبياً وعريضة ومتوسطة السماكة وثقيلة الوزن نسبياً (أمين وآخرون، 2017). تم الحصول على البذور من قرون مكتملة النضج والتي قطفت في شهر أيلول لعام 2017، وجرى حفظها بوعاء مغلق في البراد لحين استخدامها.

ب – تحضير البذور للزراعة:

وضعت البذور في وعاء زجاجي يحوي على ماء الصنبور ومنظف منزلي (سائل جلي الأواني) مع التحريك لعدة دقائق، ثم غسلت البذور بماء الصنبور الجاري. بعد ذلك تم تعقيم البذور بالكحول 70% لمدة ثلاثين ثانية، ثم نقعت لمدة /20/ دقيقة في محلول هيبوكلوريت الصوديوم (كلوروكس تجارياً)، على تراكيز مختلفة هي (10-15-20-25)%. وفي نهاية التعقيم غسلت البذور بالماء المقطر والمعقم (بالأوتوكلاف) ثلاث مرات. تم نقع البذور المعقمة بماء مقطر ومعقم وساخن على درجة 80°م وترك حتى يبرد لمدة /48/ ساعة من أجل كسر السكون الغلافي لبذور الخرنوب.

جـ – الحصول على البادرات:

للحصول على البادرات زرعت البذور في وسط مغذي خالي من العناصر المعدنية الكبرى والصغرى، فقط عبارة عن ماء مقطر وسكروز بتركيز 30 غ/ل وآغار بتركيز 7 غ/ل. وزرع الوسط في أنابيب اختبار قياس 2.5×20 سم بمعدل 10 مل من الوسط المغذي، واغلقت الأنابيب بسدادة قطنية ثم عقمت في المعقم الرطب (الأوتوكلاف)، حتى الحصول على بادرات بذرية بعمر شهر واحد من تاريخ زراعة البذور مكتملة البنى الأساسية من جهاز جذري وهوائي.

2- الأوساط المغذية الأساسية والنوعية:

2-1- الوسط المغذي الأساسي:

يتكون هذا الوسط من عناصر كبرى WPM (Woody Plant Medium) مضافاً إليه العناصر الصغرى لمحلول موراشيج وسكوك MS (Murashige and Skoog, 1962) من أجل عمليات استطالة وإكثار النموات الخضرية (الجدول 1).

الجدول 1. المحلول المعدني لـ WPM وَ MS. (Nas and Read, 2004.)

العناصر المعدنية الكبرى	WPM التركيز مغ/ل	MS التركيز مغ/ل	العناصر المعدنية الصغرى MS	التركيز مغ/ل
NH4NO3	400	1650	H3BO3	6.2
Ca(NO3)2·4H2O	556	-	CuSO4·5H2O	0.025
CaCl2·2H2O	96	440	MnSO4·H2O	16.9
MgSO4·7H2O	370	370	Na2MoO4·2H2O	0.25
KH2PO4	170	170	ZnSO4·7H2O	8.6
K2SO4	990	-	C10H12FeN2NaO8	37
KNO3	-	1900	KI	0.83
			CoCl2·6H2O	0.025

أما الوسط المغذي الأساسي لدفع النموات الخضرية أو العقل الدقيقة على التجذير فقد استخدم نصف تركيز المحلول المغذي لموراشيج وسكوك (Murashige and Skoog). كما أضيف إلى المحلول المغذي الأساسي مهما كان نوعه السكروز بنسبة 30 غ/ل والآجار بنسبة 7 غ/ل وكذلك مجموعة من الفيتامينات حسب موراشيج وسكوك (Murashige and Skoog, 1962) وفق الآتي:

Thiamine (B_1) بتركيز 0.1 مغ/ل.

Pyrodoxine (B_6) بتركيز 0.5 مغ/ل.

Nicotinic acid (B_3) بتركيز 0.5 مغ/ل.

Myo-inositol بتركيز 100 مغ/ل.

في النهاية، ضبطت درجة حموضة المحاليل pH على 5.8 وبدرجة حرارة 22°م. بعد تحضير الوسط المغذي المطلوب، تم توزيعه في الأوعية الزجاجية المناسبة وبكميات محددة، وأغلقت ثم عقمت الأوعية بالمعقم الرطب (الأوتوكلاف) على درجة حرارة 121°م ولمدة 25 دقيقة تحت ضغط جوي واحد.

2-2- الأوساط المغذية النوعية:

أ –الوسط المغذي للنمو والاستطالة:

لدفع الخزعات النباتية على النمو والاستطالة استخدم المحلول المغذي الأساسي مضافاً إليه تراكيز محددة من الجبرلين والسيتوكينين. من أجل معرفة التوازن الهرموني المناسب لنمو واستطالة العقل الدقيقة لنبات الخرنوب أضيفت تراكيز هرمونية متدرجة من حمض الجبريليك GA_3 مع تركيز ثابت من البنزيل أمينو بيورين BAP إلى المحلول الأساسي للاستطالة (الجدول 2).

الجدول 2. المعاملات والتراكيز الهرمونية المستخدمة للنمو والاستطالة.

رمز المعاملة	GA_3 مغ/ل	BAP مغ/ل	BAP + GA_3 مغ/ل
A_0	0	0	0
A_1	0	0.5	0.5
A_2	0.2	0.5	0.7
A_3	0.5	0.5	1
A_4	1	0.5	1.5

لقد أشار Saidi *et al.*, (2007) إلى أهمية التوازن الهرموني المكون من السيتوكينين بنزيل أمينو بيرين (BAP) والجبريلين (GA_3) بتراكيز محددة في نمو واستطالة العقل الدقيقة لدى نبات الخرنوب.

ب – الوسط المغذي للإكثار والتضاعف:

يقصد بالإكثار الحصول على أكبر عدد ممكن من التفرعات للجزء النباتي المراد إكثاره في وحدة الزمن. ومن المعروف أهمية السيتوكينين في عملية التضاعف. لمعرفة تركيز سيتوكينين BAP المناسب أضيفت تراكيز متدرجة منه مع تركيز ثابت من الأندول بيوتريك أسيد AIB إلى المحلول المغذي الأساسي الخاص بعملية التضاعف (الجدول 3).

الجدول 3. المعاملات والتراكيز الهرمونية المستخدمة للإكثار والتضاعف.

رمز المعاملة	AIB مغ/ل	BAP مغ/ل	BAP + AIB مغ/ل
M_0	0	0	0
M_1	0.1	0.5	0.6
M_2	0.1	1	1.1

حيث أشار Radi *et al.*, (2013) إلى دور الستوكينين BAP في عملية تضاعف العقل الدقيقة لنبات الخرنوب بوجود تراكيز محددة من الأوكسين أندول بيوتريك اسيد AIB .

جـ – الوسط المغذي للتجذير:

يلعب الأوكسين دوراً هاماً في تشكل ونمو الجذور، ويعد هرمون AIB من الأوكسينات الهامة حيث يستخدم في العديد من النباتات الخشبية لتشكيل البداءات الجذرية (التجذير) (Onay *et al.*, 2003; Bhatt and Dhar, 2004). لتحديد تركيز الأوكسين AIB المناسب أضيف تراكيز متدرجة منه حسب (الجدول 4).

الجدول 4. المعاملات والتراكيز الهرمونية المستخدمة للتجذير.

رمز المعاملة	AIB مغ/ل
R_0	0
R_1	1
R_2	2

أشار العديد من الباحثين إلى أن الأوكسين مطلوب لتشكل الجذور العرضية على السوق وأن تشكل وتطور الخلايا الجذرية الاولية (البداءات) تعتمد على الأوكسينات المضافة أو الداخلية المنشأ (Pignatti and Crobeddu, 2005; Radi *et al.*, 2013)، وبعد

فترة يصبح مثبط لنمو الجذور حيث أظهر العديد من الباحثين أن الأوكسينات مطلوب فقط خلال مرحلة التشكل، وتصبح لاحقاً مثبطة لاستطالة الجذور (Shwab and Martins-Loução, 1988; El Hamdouni *et al.,* 2000; Chalupa, 2002).

3- شروط الزراعة المخبرية:

وضعت الزراعات حسب هدف التجربة (إنبات، استطالة، إكثار) في غرف نمو على درجة حرارة 25 ± 1 °م مع 16 ساعة إضاءة وَ 8 ساعات ظلام تحت لمبات فلورسنت بيضاء تعطي 4000 Lux/m². أما بالنسبة للتجذير وضعت الزراعات في غرفة النمو على درجة الحرارة السابقة في محلول موراشيج وسكوك MS (Murashige and Skoog, 1962) تم تمديده إلى النصف، مضافاً إليه الأوكسين AIB بعيداً عن الضوء في الظلام لمدة أسبوع، ثم نقله إلى 16 ساعة إضاءة وَ 8 ساعات ظلام تحت لمبات الفلورسنت البيضاء السابقة لمدة شهر في نفس الوسط بدون هرمونات نباتية (Saidi *et al.,* 2007)، استخدمت الزراعات السابقة بطول متوسط 1.5 سم.

4- التقسية:

أخذت النموات المجذرة من الأنابيب وتم غسلها جيداً بالماء، ثم وضعت في وعاء يحوي مطهر فطري (ثيوفانات الميتيل 70%) بتركيز 1 غ/ل ولمدة 10 ثواني، ثم زرعت النموات في صواني بلاستيكية ذات تجاويف للزراعة بأبعاد (3×3×6 سم) تحوي خليط من البيتموس والبيرليت بنسبة 1:4 (حجم/حجم)، وتم سقاية النباتات ولمدة أسبوعين بنفس المحلول الحاوي على المطهر الفطري. نقلت النباتات إلى ظروف البيت الزجاجي (نسبة الرطوبة بين 85 – 90 % ودرجة الحرارة لا تتجاوز 30 درجة مئوية)، وقد وضعت الصواني ضمن أحواض مغطاة بغطاء من نوع أولتراسيل يتميز بالنفوذية للهواء والرطوبة وذو لون أبيض مما يؤدي إلى تخفيف حدة الإضاءة، وبعد أسبوعين تم نقل النباتات إلى بيت بلاستيكي ذو غطاء أبيض ولمدة أسبوع وثم النقل إلى بيت بلاستيكي ذو غطاء شفاف ولمدة أسبوع أيضاً مع متابعة السقاية ضمن فترة الأسبوعين الأخيرين.

5- القياسات والتحليل الاحصائي:

صممت التجارب وفق التصميم التام العشوائية. بالنسبة لتجربتي تعقيم البذور والنمو فقد تم استخدام 50 بذرة لكل مكرر وبواقع 3 مكررات لكل معاملة، أما بالنسبة لأوساط الاستطالة والتضاعف والتجذير فقد تم استخدام 40 نمو لكل مكرر وبواقع 3 مكررات لكل معاملة. القياسات والقراءات التي أجريت خلال تنفيذ التجربة:

- تم قياس بعض معايير الإنبات:
  - النسبة المئوية لإنبات البذور = (عدد البذور النابتة/عدد البذور الكلي)*100
  - اختبار سرعة الإنبات = مجموع (عدد البذور النابتة في كل يوم*رقم اليوم)/عدد البذور النابتة في نهاية فترة الاختبار.
  - تجانس الإنبات = عدد البذور النابتة في نهاية فترة الاختبار(نسبة الإنبات)/عدد أيام الإنبات الفعلي.
- بالنسبة لأوساط الاستطالة والتضاعف والتجذير بدأت النموات المزروعة بالتطور بعد أسبوعين وتم أخذ القراءات بعد ستة أسابيع من الزراعة. تم قياس متوسط طول النبات الكلي ومتوسط عدد الأوراق بالنسبة لوسط الاستطالة. أما بالنسبة لوسط التضاعف تم قياس متوسط عدد النموات الجديدة ومتوسط طول النموات الجديدة. أما بالنسبة لوسط التجذير تم حساب النسبة المئوية للتجذير ومتوسط عدد الجذور وطولها.

- أُخضعت جميع البيانات إلى التحليل الإحصائي باستخدام برنامج Genstat 12، وتم اختبار الفروقات الإحصائية بين المعاملات باستعمال اقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى احتمال 5%.

النتائج والمناقشة:

1 – تأثير تعقيم البذور في مؤشرات الإنبات:

فيما يتعلق بالتعقيم السطحي للبذور، أظهرت النتائج عدم وجود اختلاف في معاملات تعقيم البذور بمادة هيبوكلوريت الصوديوم حسب تركيز المادة وأن نسبة البذور النظيفة وصلت إلى 99% ولذلك تم استخدام أقل تركيز وهو 10% في التجارب اللاحقة. لقد أظهرت العديد من الأبحاث فعالية هيبوكلوريت الصوديوم في التعقيم السطحي للأجزاء النباتية المستخدمة في زراعة الأنسجة (Zaid *et al.*, 2000; Soni *et al.*, 2011). أما فيما يتعلق بنسبة الإنبات وسرعته وتجانسه، فقد بلغ متوسط النسبة المئوية لإنبات البذور 87.33%. ومتوسط سرعة الإنبات 9.47 بذرة/يوم وأخيراً متوسط تجانس الإنبات بلغ 9.38.

3–2– تأثير منظمات النمو في متوسط طول وعدد أوراق النموات المزروعة:

تم دراسة تأثير بعض منظمات النمو في النمو الطولي للنموات المزروعة بهدف الحصول على أكبر نسبة نمو بوحدة الزمن. ويبين الجدول (5) تفوق المعاملة A_3 بالنسبة لمتوسط طول النبات الكلي ولمتوسط عدد الأوراق إذ بلغت (8.47 و6.83 على التوالي) على مستوى كل المعاملات والتي كان أقلها عند المعاملة A_0 والتي بلغت (5.59 و5.37 على التوالي)، ويلاحظ أن زيادة تركيز GA_3 إلى 1 مغ/ل في المعاملة A_4 مع ثبات تركيز السيتوكينين BAP لم تحقق أي زيادة معنوية في متوسط طول وعدد أوراق النموات بل أدى إلى خفض طولها وعدد أوراقها، مما قد يعني أن زيادة تركيز GA_3 إلى 1 مغ/ل ذو أثر سلبي على نمو واستطالة النموات المزروعة وعدد أوراقها (الشكل 1). مع ملاحظة تشكل إشطاءات جديدة (1– 2 إشطاء) في عدد من العقل بطول متوسط 1.5 سم، ولم يلاحظ فرقاً معنوياً بين المعاملات وهذا يعود لوجود هرمون BAP.

وفقاً لنتائج الدراسة السابقة تبين أن إضافة A_3 مع BAP يحسّن الاستطالة، إذ يبقى متوسط طول العقلة بالحد الأدنى عندما يكون تركيز GA_3 ضعيفاً، في حين أن زيادته عن حد معين قد أثر سلبياً وقلل من طول العقلة. وبالتالي فإن إضافة GA_3 بتركيز 0.5 مغ/ل مع BAP بتركيز 0.5 مغ/ل تكون فعالة في استطالة النبات وتشكل الأوراق.

وجد Saidi *et al.*, (2007) في دراستهم على الخرنوب إلى أن إضافة GA_3 بتركيز 0.5 مغ/ل مع BAP بتركيز 0.5 مغ/ل أدى إلى استطالة النموات وزيادة عدد الأوراق، وخفض النسبة المئوية للأجزاء الخضرية غير القادرة على التبرعم، وأكدوا التأثير الايجابي لوجود GA_3 مع BAP على نمو النموات والحصول على أوراق خضراء جيدة بعكس وجود BAP وحده إذ تصبح تلك الأوراق مائلة قليلاً للون البنفسجي مع حدوث بعض الاضطرابات الفيزيولوجية كالتثقب الورقي.

كما وجد Belaizi *et al.*, (1995) بأنه يمكن الحصول على نتائج جيدة عند الجمع بين BAP وَGA_3، ولكن قد يسبب التركيز العالي من BAP بعض الاضطرابات الفيزيولوجية مثل التزجج، تماوت القمم، وظهور العدس وصغر حجم الورقة للخرنوب.

كما وجد El Bouzdoudi *et al.*, (2017) في تجربة إكثار الخرنوب مخبرياً بأن BAP بتركيز 0.3 مغ/ل غالباً ما يشجع على استطالة النموات، ولكن زيادة التركيز لها تأثير سلبي على النمو. وأكدت دراسات أخرى أيضاً أنه يمكن إضافة GA_3 إلى BAP أثناء

إكثار النموات؛ إذ أن إضافة GA_3 بتركيز 0.7 مغ/ل مع BAP بتركيز 0.5 مغ/ل زاد بشكل طفيف عدد النموات والأوراق للخرنوب (El Bouzdoudi *et al.*, 2017).

الجدول 5 . تأثير منظمات النمو في متوسط طول وعدد أوراق النموات المزروعة.

رمز المعاملة	GA_3 مغ/ل	BAP مغ/ل	BAP + GA_3 مغ/ل	متوسط طول النبات الكلي سم	متوسط عدد الأوراق
A_0	0	0	0	5.59[a]	5.37[a]
A_1	0	0.5	0.5	5.98[b]	5.47[a]
A_2	0.2	0.5	0.7	6.07[cb]	5.6[b]
A_3	0.5	0.5	1	8.47[d]	6.83[c]
A_4	1	0.5	1.5	6.33[c]	5.67[b]
L.S.D 5%				0.335	0.106

الشكل 1 . مرحلة نمو الأجزاء الخضرية على الاوساط المختبرة.

3– تأثير منظمات النمو في متوسط عدد وطول النموات الجديدة:

تم دراسة تأثير بعض منظمات النمو للحصول على أكبر عدد ممكن من التفرعات للجزء النباتي المراد إكثاره في وحدة الزمن، ويتبين من الجدول (6) عدم وجود أي نموات جديدة في حال غياب الهرمونات، وبالتالي وجود عقل الخرنوب في الوسط بدون إضافة هرمونات (الشاهد) لم تعطي نموات جديدة. كما تشير النتائج في الجدول (6) إلى تفوق معنوي للمعاملة M_1 بالنسبة لمتوسط عدد النموات الحديثة ولمتوسط طول النموات الحديثة والتي بلغت (4.03 و3.17 على التوالي) على المعاملة M_2 والتي بلغت (3.57 و2.47 على التوالي)، أي أن زيادة تركيز BAP إلى 1 مغ/ل أثر سلباً في معدل الإكثار وأدى إلى انخفاض عدد النموات وطولها، وبالتالي كان التركيز الأفضل من هرمون BAP هو 0.5 مغ/ل (الشكل 2).

توافقت نتائج الدراسة الحالية مع Saidi *et al.*, (2007) الذين وجدوا أن تضاعف نموات الخرنوب يصبح أفضل باستخدام BAP بتركيز 0.5 مغ/ل فقط أو بإضافة 0.09 مغ/ل من ANA أو 0.1 مغ/ل AIB . كما وجد العديد من الباحثين أن BAP بتركيز (0.3 – 0.7) مغ/ل يحسن تضاعف النموات على عكس التراكيز العالية التي تؤدي إلى شفافية النبات، وأيضاً ظهور مسام على العقد السفلية وأوراق حرشفية دقيقة بيضاء اللون (Belaizi *et al.*, 1995; Vinterhalter *et al.*, 1992).

كما أشار Romano *et al.*, (2002) في دراسة على صنف Mulata Carob بأنه يمكن الحصول على أفضل استجابة لتضاعف النموات على وسط MS مضاف له BAP كما أكدوا على أن نوع الخرنوب ونوع السيتوكينين وتركيزه هي العوامل الأكثر أهمية التي تؤثر في إكثار النموات. ولتركيز الأوكسين وللتوازن بينه وبين تركيز السيتوكينين تأثير على الكفاءة وعلى التعضي للخرنوب (Radi *et*

al., 2013). كما وجد Hakim *et al.*, (2010) أن تضاعف نموات الخرنوب قد تم إعادة تجديدها عند زراعة الخزع على وسط MS مع BAP. كما أن الأوكسينات مثل IAA وَ IBA بتراكيز منخفضة 0.1 مغ/ل قد استخدمت جنباً إلى جنب مع العديد من تركيزات BAP وأحياناً GA_3 مع نتائج جيدة للخرنوب عند إكثار النموات الدقيقة من الشجرة (Thomas and Mehta, 1983) واستخدام الإكثار الدقيق للقمم النامية (Saidi *et al.*, 2015).

كذلك وجد Radi *et al.*, (2013) بأن أفضل تأثير تم الحصول عليه من مزج الأوكسينات مع BAP وذلك بجمع BAP بتركيز 0.5 مغ/ل مع IBA بتركيز 0.5 مغ/ل مع GA_3 بتركيز 0.5 مغ/ل يحسن الإكثار للنموات، وأيضاً توفير التجذير لنموات الخرنوب.

الجدول 6 . تأثير منظمات النمو في متوسط عدد وطول النموات الجديدة.

رمز المعاملة	AIB مغ/ل	BAP مغ/ل	BAP + AIB مغ/ل	متوسط عدد النموات الجديدة	متوسط طول النموات الجديدة سم
M_0	0	0	0	0	0
M_1	0.1	0.5	0.6	4.03^a	3.17^a
M_2	0.1	1	1.1	3.57^b	2.47^b
L.S.D 5%				0.131	0.076

الشكل 2 . مرحلة التضاعف على الاوساط الاختبارية.

3-4- تأثير تركيز هرمون AIB في النسبة المئوية للتجذير ومتوسط عدد وطول الجذور.

تم دراسة تأثير تركيزين من هرمون AIB للحصول على أكبر نسبة للتجذير (الجدول 7)، وكانت النتائج على النحو التالي:

الجدول 7 . تأثير تركيز هرمون AIB في النسبة المئوية للتجذير ومتوسط عدد وطول الجذور.

رمز المعاملة	AIB مغ/ل	النسبة المئوية للتجذير %	متوسط عدد الجذور	متوسط طول الجذور سم
R_0	0	25.83^a	2.97^a	1.56^a
R_1	1	59.17^b	4.77^b	4.25^b
R_2	2	71.67^c	5.43^c	3.49^c
L.S.D 5%		6.406	0.200	0.096

- **تأثير تركيز هرمون AIB في النسبة المئوية للتجذير:**

يتبين من الجدول (7) تفوق كل المعاملات على معاملة الشاهد والتي بلغت (25.83%)، وتفوق المعاملة R_2 والتي بلغت (71.67%) على المعاملة R_1 (59.17%) أي أن تركيز 2 ملغ/ل من الهرمون IBA حقق أفضل نسبة تجذير (الشكل 3).

- **تأثير تركيز هرمون AIB في متوسط عدد الجذور:**

يتبين من الجدول (7) تفوق المعاملة R_2 (5.43) على كل المعاملات، أي أن تركيز 2 ملغ/ل هو الأفضل من حيث عدد الجذور المتشكلة (الشكل 3).

- **تأثير تركيز هرمون AIB في متوسط طول الجذور:**

يلاحظ من الجدول (7) تفوق المعاملة R_1 والتي بلغت (4.25 سم) على الشاهد (1.56 سم) وعلى المعاملة R_2 (3.49 سم) أي أن تركيز 1 ملغ/ل أعطى أفضل متوسط لطول الجذور (الشكل 3).

الشكل 3 . مرحلة التجذير على الاوساط الاختبارية.

لكل نوع نباتي تركيز مثالي من AIB تكون عنده النسبة المئوية للتجذير أفضل ما يمكن وتنخفض هذه النسبة بالابتعاد عنه زيادةً أو نقصان وأفضل تركيز في هذه الدراسة هو 2 مغ/ل، وهذا يتوافق مع ما توصل إليه Saidi *et al.*, (2015) إلى أن نسبة التجذير وصلت إلى 82.5% بالنسبة للخرنوب عند التركيز 2 مغ/ل وإلى 65.6% عند تركيز 1 مغ/ل. كما أشار العديد من الباحثين إلى أنه يفضل البدء بتجذير النموات بعد مرحلة الإكثار غالباً بـ AIB 2 مغ/ل في وسط MS ½ وهذا يتفق مع العديد من الدراسات على الخرنوب (Romano *et al.*, 2002; Saidi *et al.*, 2003).

بينما وصلت نسبة النباتات المجذرة للخرنوب إلى (70.37%) عند تركيز 2 مغ/ل من AIB وإلى (56.2%) عند تركيز 1 مغ/ل (El Bouzdoudi *et al.*, 2017). وينطبق ذات الشيء على متوسط عدد الجذور، فقد وصل عند تركيز 2 مغ/ل إلى (5.43 جذر) وهذا اتفق مع دراسة El Bouzdoudi *et al.*, (2017)، على الخرنوب حيث أعطى نفس التركيز أفضل متوسط لعدد الجذور والتي بلغت (4.33) وهي متقاربة مع نتائج الدراسة.

بالنسبة لمتوسط طول الجذور لوحظ أنه انخفض مع زيادة التركيز، وكان أفضل متوسط لطول الجذور عند تركيز 1 مغ/ل فقد وصل الطول حتى (4.25 سم)، ليعود وينخفض مع زيادة التركيز إلى (3.49 سم) عند تركيز 2 مغ/ل، وبالمقارنة مع الدراسات المذكورة على الخرنوب لوحظ أن أفضل متوسط لطول الجذور تم التوصل له هو (4.35 سم) عند تركيز 1 مغ/ل، بينما انخفض إلى (3.58 سم) عند تركيز 2 مغ/ل في دراسة El Bouzdoudi *et al.*, (2017).

5- التقسية:

استغرقت مرحلة التقسية أربعة أسابيع ثم تم نقلها إلى أصص أكبر حجماً ووضعها تحت الشروط الطبيعية، بلغ عدد النباتات في هذه المرحلة (188) نباتاً مجذراً وعدد النباتات في نهاية المرحلة (92) نباتاً مقسى، وبالتالي بلغت نسبة البقاء (48.94%) من النباتات

المقساة (الشكل 4). وتباينت نسبة البقاء من دراسة إلى أخرى إذ لم تتجاوز 40% في دراسة(2017) ,.El Bouzdoudi *et al*، بينما بلغت نسبة النجاح 60% في دراسة (2015) ,.Saidi *et al*.

الشكل 4 . مرحلة التقسية.

الاستنتاجات:

1 – إمكانية إكثار النوع المدروس بالاعتماد على تقنية الإكثار الخضري الدقيق، فقد تم الحصول على أفضل متوسط لطول النموات بوجود 0.5 مغ/ل من الجبرلين مع BAP بتركيز 0.5 مغ/ل، بينما تضاعف النموات أصبح أفضل باستخدام هرمون BAP تركيز 0.5 مغ/ل مع 0.1 مغ/ل AIB.

2 – أفضل تركيز من هرمون التجذير AIB 2 ملغ/ل حقق أفضل نسبة تجذير، وأعطى أفضل متوسط لعدد الجذور، بينما تحقق أفضل متوسط لطول الجذور عند تركيز 1 ملغ/ل من AIB.

3 – الحصول على نسبة بقاء جيدة وفق الطريقة المتبعة في هذا البحث.

التوصيات:

1 – التوسع في الدراسة لتشمل هرمونات جديدة من السيتوكينيات مثل الزياتين والكينيتين بتراكيز مختلفة.

2 – استخدام هرمونات تجذير جديدة مثل IAA بتراكيز مختلفة ومقارنتها مع الهرمون المستخدم في هذه الدراسة AIB.

3 – استخدام تراكيز مختلفة من الهرمون AIB.

المراجع:

أمين، طلال وحافظ محفوض وفادي قازنجي (2017). حصر وتوصيف وتقييم بعض أشجار الخرنوب .*Ceratonia siliqua* L المنتشرة طبيعياً في محافظة اللاذقية. مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية، سلسلة العلوم البيولوجية. 39(4): 2079–3065.

Belaizi, M.; M.R. Bolen; and P. Boxus (1995). Régénération in vitro et Acclimatation du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.). In: Dubois, J., Ed., Quel Avenir pour l 'Amélioration des Plantes ? John Libbey Eurotext, Paris. 227-232.

Bhatt, I.D.; and U. Dhar (2004). Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch. Ham. ex D. Don: a High Value Wild Edible of Kumaun Himalaya. African Journal of Biotechnology. 3: 534-540.

Chalupa, V. (2002). *In vitro* propagation of mature trees of *Sorbus aucuparia* L. and field performance of micropropagated trees. Prague Czech Academy of Agricultural Sciences. 48: 529-535.

Dopranszki, J.; and J.T. Silva (2010). Micropropagation of apple-A review. Biotechnology. Adv., 28: 462-488.

El Bouzdoudi, B.; R. Saidi; N.Z. El Ansari; L.M. El Kbiach; P. Martin; A. Badoc; and A. Lamart (2017). Micropropagation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) through adventitious buds of immature embryonic cotyledons. American Journal of Plant Sciences. 2180-2195.

El Hamdouni, E. M.; A. Lamarti; and A. Badoc (2000). Micropropagation des Cultivars 'Chandler' et 'Tudla' de Fraisier (*Fragaria X ananassa* Duch.). Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux. 139: 91-104.

El-Shafey Y.H.; O.M. Elshihy; E.M. Youssef; and M.G. Mervat (1998). Production of *Ceratonia siliqua* female plantlets through tissue culture technique. Arab J. Biotech., 1(1): 77-85.

George, E.F. (1996). Fruit and nut crops. part 2. Rosaceae, *Malus (apple)* plant propagation by tissue culture in practice. 2nd ed. Edington, Wilts. England: Exegetics Ltd. 1039–1042.

Gubbuk, H.; E. Gunes; T. Ayala-Silva; and S. Ercisli (2011). Rapid vegetative propagation method for Carob. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj., 39(1): 251-254.

Hakim, L.; M.R. Islam; A.N.K. Mamun; G. Ahmed; and R. Khan (2010). Clonal propagation of carob (*Ceratonia siliqua* L., Fabaceae). Bangladesh J. Bot., 39(1): 15-19.

Hartmann, H.T.; and D.E. Kester (1983). Plant propagation, principles and practices. 4th Ed., Prentice Hall, New York, USA. Pp. 265-268.

Murashige, T.; and F.A. Skoog (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. Physiol. Plant. 15: 473–497.

Nahal, I. (1962). Contribution à l'étude de la végétation dans le Baer-Bassit et le Djebel Alaouite de Syrie. Webbia, vol XIV, n° 2, Frienze. pp: 477-641.

Nas, M.N.; and P.E. Read (2004). A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. Scientia Horticulture. 101: 189-200.

Onay, A.; V. Pirinc; F. Adiyaman; Ç. Işikalan; E. Tilkat; and D. Başaran (2003). *In vivo* and *in vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. cv. Turkish Journal of Biology. 27: 95-100.

Pignatti, G.; and S. Crobeddu (2005). Effects of rejuvenation on cuttings propagation of Mediterranean shrub species. Forest@- Rivista di Selvicoltura ed Ecologia Forestale. 2(3):290-295.

Radi, A.; G. Echchgadda; J. Ibijbijen; and M. Rochd (2013). In vitro propagation of Moroccan carob (*Ceratonia siliqua* L.). J. Food Agri. Environ., 11(1): 1103-1107.

Romano, H.; S. Barros; and M. Martins-Loucao (2002). Micropropagation of Mediterranean tree *Ceratonia siliqua* L. Plant Cell Tissue Organ Cult., 68: 35-41.

Saidi, R.; B. El Bouzdoudi; M. B. Kbiach; A. Lamarti; and A. Maouni (2015). Effets des Macroéléments et des Auxines sur la Micropropagation du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.,

Leguminosae) par Culture d'Apex. Journal of Materials and Environmental Sciences. 6: 2330-2337.

Saidi, R.; A. Lamarti; and A. Badoc (2007). Micropropagation du Caroubier (Ceratonia siliqua) par Culture de Bourgeons Axillaires issus de Jeunes Plantules. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 146: 113-129.

Saidi, R.; I. Wahby; and A. Lamarti (2003). Multiplication in vitro du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) par culture des bourgeons. Proceedings of 3ème Congrès National de Génétique et Biologie Moléculaire, Tanger Maroc. 98 p.

Sebastian, K.T.; and J. A. McComb (1986). A micropropagation system of carob (*Ceratonia siliqua* L.) Scienta. Hort., 28(1/2): 127-131.

Shwab, L.; and M.A. Martins-Loução (1988). Shoot formation in *Ceratonia siliqua* hypocotyls callus. Proceedings of the 2nd International Carob Symposium, Valencia. 29 September-1 October 1987, 245-253.

Soni, M.; M. Thakur; and M. Modgil (2011). *In vitro* multiplication of merton I. 793. An apple rootstock suitable for replantation. Indian Journal of Biotechnology. 10: 362-368.

Talhouk, S.N.; P. Breugel; R. Zurayk; A. Al-Khatib; J. Estephan; A. Ghalayini; N. Debian; and D. Lychaa (2005). Status and prospects for the conservation of remnant seminatural carob *Ceratonia siliqua* L. populations in Lebanon. For Ecol Manag., 206: 49–59.

Thomas, V.; and A.R. Mehta (1983). Effect of Phloroglucinol on shoot growth and initiation of roots in carob tree cultures grown *in vitro*. In Sen, S.K. and Giles, K.L., Eds., Plant Cell Culture in Crop Improvement. Plenum Press, New York. 451-457.

Vinterhalter, D.; D. Grubisic; D. Bojovic-Cvetic; and S. Budimir (1992). Lenticel hypertrophy in shoot cultures of *Ceratonia siliqua* L. Plant Cell, Tissue Organ Cult., 31(2): 111-114.

Zaid, S.; M. Soulaiman; and A. Abdul-Kader (2000). The *in vitro* propagation of rootstocks. Damascus University Journal, Biological Sciences Series. 16 (2): 63-78.

In Vitro Micropropagation of Seedlings of *Ceratonia siliqua* L. with Micro-Cuttings

Fadi Kaznigi*(1) Talal Amin(1) and Hafez Mahfoud(2)

(1). Environment and Forestry Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria.
(2). Biotechnology Division, General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Damascus, Syria.
(*Corresponding author: Eng. Fadi Kazngi. E-Mail: fadikazngi79@yahoo.com).

Received: 30/07/2019 Accepted: 24/09/2019

Abstract

This study was carried out during 2018 and 2019 seasons at the Green House Nursery using S_1 genotype of *Ceratonia Siliqua* L. which is grown at the site of Snobar Jablah in Lattakia Governorate to determine the best hormonal balance to multiply the vegetative growth and rooting the micro- cutting of the seedling and thus the possibility of multiplying the desired genotypes of mature carob plants to produce vegetative strains for re-infiltration in its degraded areas. This study found a successful and detailed *In Vitro* propagation system for rapid micropropagation of carob. 10% Sodium Hypochlorite for 20 minutes gave the best efficiency for surface sterilization of vegetative growth. Concentration of 0.5 mg/L of Gibberellin with BAP at a concentration of 0.5 mg/L gave the best average of shoots length (8.47 cm), while the seedling multiplying became better when using the BAP hormone at a concentration of 0.5 mg/L with 0.1 mg/L of AIB. The best concentration of rooting hormone AIB was 2 mg/L which achieved the best percentage of rooting (%71.67), and the best mean number of roots (5.43), while the concentration of 1 mg/L achieved the best mean length of roots (4.25 cm).

Key words: Carob, Micropropagation, Benzyl Amino Purine BAP, Indol Butyric Acid AIB.