الحفظ في الزجاج للجوافة (*Psidium guajava* L.) صنف البلدي

رحاب نزيه الموسى*[1] ونيفين عبد الفتاح حسن[2] ورمزي جورج استينو[3] وأمينة حامد جمعه[3]

(1). قسم التقانات الحيوية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية. البريد الالكتروني :Email

(2). البنك القومي للجينات، مركز البحوث الزراعية، الجيزة، مصر.

(3). قسم الفاكهة، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، الجيزة، مصر.

(*للمراسلة: د. رحاب الموسى. البريد الإلكتروني: bebo_moussa13@yahoo.com).

تاريخ الاستلام: 2018/01/04 تاريخ القبول: 2018/02/06

الملخص

أُجريت هذه الدراسة في البنك القومي للجينات؛ مصر، خلال الفترة 2012– 2014، بهدف إيجاد طريقة للحفظ في الزجاج للجوافة (*Psidium guajava* L.) صنف البلدي. أُسست دراسة الحفظ المتوسط على درجات حرارة 10 و 15°م تحت ظروف ظلام تام. زُرعت القمم النامية على وسط MS يحوي تراكيز مختلفة (3.0، 4.0، 5.0 و 6.0%) من السكروز أو السوربيتول. بعد 6 أشهر من الحفظ، بقيت83.33% من العينات حية على وسط يحوي 5.0% سوربيتول عند حرارة 15°م، بينما لوحظت نفس نسبة البقاء (66.67%) عندما حُفظت العينات على وسط يحوي 6.0% سوربيتول عند حرارة 15°م وعلى وسط يحوي 5.0 أو 6.0% سوربيتول عند حرارة 10°م. لم تتأثر نسبة التجديد، عدد الأفرع/العينة واستطالة الأفرع بتراكيز العوامل الأسموزية. في حين فقدت كل العينات قدرتها على التجديد بعد الحفظ لمدة 6 أشهر على وسط يحوي 3.0% سكروز (الشاهد) عند حرارة 10 °م. سُجلت بذور الجوافة نسبة إنبات 100% عندما جُففت لمدة 6 ساعات قبل الغمر في النتروجين السائل.

الكلمات المفتاحية : الجوافة، الحفظ المتوسط، السكروز، السوربيتول، الحفظ بالتبريد الشديد، التجفيف.

المقدمة:

تعد المصادر الوراثية ذات أهمية كبيرة لبرامج التربية التقليدية والحديثة، حيث تعتبر مخزن للجينات المقاومة للإجهادات الإحيائية واللاإحيائية (Bekheet and Aly, 2007). بعد التدهور الوراثي الواضح العائد لانتخاب الأصناف الجيدة، أصبح الإنسان أكثر قلقاً على المخزون الوراثي. حيث يقدر أن ما يقارب ثلث نباتات العالم البرية مهددة أو تواجه الانقراض (BGCI, 2005). تم تطوير استراتيجيات التقانات الحيوية، المعتمدة على زراعة الأنسجة والخلايا النباتية، كمقياس بديل ومساعد في إيجاد حلول للمشاكل المتعلقة بحفظ الأصول الوراثية في الحقل (Scherwinski–Pereira and Costa, 2010). تعد تقنيات زراعة الأنسجة ذات أهمية كبيرة في جمع وحفظ وإكثار الأنواع المكاثرة خضرياً وذات البذور العنيدة (Recalcitrant seeds). تم تطوير عدة تقنيات لحفظ هذه الأنواع تندرج في مجموعتين: (1) الحفظ المتوسط عن طريق الحد من النمو، حيث يتم حفظ الأصول الوراثية كعينات نباتية عقيمة أو كنبيتات على وسط مغذي صناعي، (2) الحفظ بالتبريد الشديد للمادة النباتية، عن طريق حفظها في النتروجين السائل (Engelmann and Engels, 2002).

يهدف الحفظ المتوسط في الزجاج إلى زيادة الفاصل الزمني بين النقلات من 2–6 أسابيع، إلى فترة زمنية أطول (مثلاً 3–12 شهر) عن طريق الحد من النمو (Perez–Tornero *et al.*, 1999)، والذي يمكن أن يتم بعدة طرق تتضمن إضافة عوامل أسموزية أو مثبطات نمو أو بإزالة منشطات النمو لتقليل الاستقلاب الخلوي للمادة النباتية، بالإضافة للتحضين على درجات حرارة منخفضة و/أو على شدة ضوئية منخفضة (Engelmann, 2010).

تعمل العوامل الأسموزية كمثبطات نمو عن طريق استحداث إجهاد اسموزي للمادة النباتية المحفوظة. عندما تضاف إلى وسط الزراعة؛ تسبب هذه المواد الكربوهيدراتية إجهاد مائي وتقلل من إتاحة الماء للنبات (Shibli *et al.*, 2006). يعتبر السكروز مكون أساسي في أوساط زراعة الأنسجة النباتية، ويلعب دور ثنائي كمصدر للكربون (طاقة) وكعامل أسموزي. أما السوربيتول فهو سكر كحولي يثبط نمو الأفرع، ولكنه يزيد من محتوى الخلية من الذائبات (Moges *et al.*, 2003).

إضافةً لذلك، يعد الحفظ على درجات حرارة منخفضة من أهم تقنيات زراعة الأنسجة المستخدمة لحفظ الأصول الوراثية. يؤدي تراكم الليبيدات غير المشبعة على جدار الخلية، تحت هذه الظروف، إلى ثخانة الجدار الخلوي مما يؤخر انقسام الخلية واستطالتها (Engelmann, 2010). تعتمد درجة حرارة الحفظ على الموطن الأصلي للنمط الوراثي (Benson, 1994). بشكل عام تعتبر فاكهة المناطق الأستوائية أكثر حساسية لدرجات الحفظ دون 15°م بالمقارنة مع فاكهة المناطق المعتدلة (Scherwinski–Pereira and Costa, 2010). تستخدم الحرارة دون 10°م لحفظ الأصول الوراثية ومجموعات النباتات الخالية من الفيروسات في البنوك الوراثية (Ashmore, 1997).

من جهة أخرى، أصبح الحفظ بالتبريد الشديد للأعضاء والخلايا النباتية وسيلة هامة للحفظ على المدى الطويل. حيث يتم الحفظ على حرارة منخفضة جداً (–196°م) في النتروجين السائل مما يضمن توقف كل العمليات الحيوية وبالتالي يمكن حفظ النباتات لفترة زمنية طويلة (Panis and Lambardi, 2005). وبهذه الطريقة ليس من الضروري أن يتم نقل العينات، كما يقل خطر التلوث وحدوث التباينات المظهرية الجسمية (Somaclonal variation). تتطلب المادة المحفوظة بهذه الطريقة مساحة محدودة ولكن يجب التأكد من التزويد الدائم بالنتروجين السائل (Gonzalez–Benito *et al.*, 2004).

يعتبر حفظ البذور المجففة على حرارة منخفضة من أسهل طرق حفظ الأصول الوراثية (Stanwood, 1985). حيث يتم تجفيف البذور تحت تدفق الهواء العقيم من جهاز العزل الجرثومي، ثم يتم تجميدها سريعاً بغمرها مباشرةً في النتروجين السائل (Panis *et al.*, 2001). تطبق هذه الطريقة مباشرةً على البذور الارثوذكسية، الأجنة الزيغوتية وحبوب الطلع للعديد من الأنواع الزراعية والبستانية المعروفة (Engelmann, 1997). بعض هذه البذور قد تتحمل تجفيف لمحتوى رطوبي أقل من 3% دون أن يحدث ضرر أو انخفاض في الحيوية.

تتبع الجوافة (*Psidium guajava* L.) العائلة (*Myrtaceae*) ويعود موطنها الأصلي لأميركا الجنوبية من المكسيك إلى البيرو. أصبحت الجوافة من أشجار الفاكهة الهامة بسبب قيمتها التجارية والغذائية العالية حيث تحتوي على كميات كبيرة من فيتامين C بالإضافة لكونها مصدر جيد للكالسيوم، والفوسفور، والحديد، والبكتين، مما يجعلها محصول غذائي يشار له كتفاح المناطق الإستوائية (Adsule and Kadam, 1995).

لم يسبق دراسة حفظ الأصول الوراثية للجوافة. لذلك يهدف هذا البحث إلى تطوير تقنية حفظ متوسط للجوافة بهدف زيادة الفترة بين النقلات، وذلك عن طريق تقليل النمو بإضافة عوامل أسموزية (سكروز أو سوربيتول) عند درجات حرارة منخفضة تحت ظروف ظلام تام، وحفظ بذور الجوافة بالتبريد الشديد باستخدام تقنية التجفيف.

مواد البحث وطرائقه:

نُفذت هذه الدراسة خلال الفترة الزمنية 2012–2014 في مخبر زراعة الأنسجة التابع للبنك القومي للجينات والمصادر الوراثية، مركز البحوث الزراعية، الجيزة، مصر.

المادة النباتية:

أُخذت أفرع حديثة النمو بطول 5–10 سم من نباتات الجوافة صنف "البلدي" النامية في الأصص في البيت البلاستيكي، وعُقّمت سطحياً بالغمر لمدة دقيقة واحدة في الكحول الاثيلي بتركيز 70%، ثم لمدة 10 دقائق في محلول الكلوروكس التجاري (الحاوي على هيبوكلوريت الصوديوم كمادة فعالة بنسبة 5.25%) بتركيز 10% مع قطرات من مادة توين 20، ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم 3 مرات بفاصل زمني 5 دقائق. بعد التعقيم، استخدمت العقل العقدية كعينات للزراعة الأولية وزُرعت على وسط مكون من أملاح موراشيج وسكوج MS (Murashige and Skoog, 1962) مع 3.0% سكروز، 0.7% آجار، 100 مغ/ل بولي فينيل بيرليدون (PVP) ومدعم ب 1 مغ/ل بنزيل أمينو بيورين (BAP). قُسّمت الأفرع الناتجة من الزراعة الأولية وزُرعت على وسط الإكثار المكون من أملاح MS مع 4.5% سكروز، 0.7% آجار، 100 مغ/ل PVP ومدعم بـ 0.75 مغ/ل BAP و80 مغ/ل أدنين سلفات (ADS) للحصول على عينات عقيمة من أجل معاملات الحفظ المتوسط في الزجاج. حُضنت العينات خلال مراحل الإكثار في غرفة النمو على حرارة 25 ±2 °م، إضاءة 16 ساعة وشدة ضوئية 3000 لوكس (Al–Mousa, 2014).

الحفظ المتوسط في الزجاج:

استخدمت القمم النامية (بطول 1 سم) غير الملوثة الناتجة من الأفرع المكاثرة في الزجاج لصنف الجوافة البلدي كعينات لتجارب الحفظ المتوسط. زُرعت هذه القمم النامية بشكل إفرادي في أنابيب زجاجية تحوي وسط الحفظ المكون من أملاح MS مع 0.7% آجار بدون منظمات نمو. لاستحداث الإجهاد الاسموزي، أُضيف السكروز والسوربيتول بتراكيز 4.0، 5.0، 6.0% لوسط الحفظ. كما استخدم وسط MS مع 0.7% آجار بدون منظمات نمو مع 3.0% سكروز (التركيز القياسي) كوسط شاهد لتجارب الحفظ. قُسّمت أنابيب الحفظ لكل معاملة إلى مجموعتين؛ حضّنت المجموعة الأولى على حرارة 10°م والمجموعة الثانية على حرارة 15°م تحت ظلام تام لمدة 3 و 6 أشهر. كُررت كل معاملة 3 مرات، واستخدمت 6 عينات لكل مكرر. وقُدّرت نسبة البقاء عند نهاية كل فترة حفظ (3 و 6 أشهر) وفقاً للباحث Reed (1992).

التجديد داخل الزجاج:

نُقلت العينات النباتية من مختلف معاملات الحفظ المتوسط بعد 6 أشهر من الحفظ، وزُرعت في مرطبانات زجاجية تحوي وسط الإكثار المذكور سابقاً. حُضنت الزراعات تحت الظروف الطبيعية المشار لها سابقاً. حُسبت نسبة التجديد، عدد الأفرع/العينة، طول الأفرع (سم) بعد 4 أسابيع من الزراعة على وسط التجديد.

الحفظ الطويل لبذور الجوافة صنف "البلدي" بالتبريد الشديد باستخدام تقنية التجفيف:

عُزلت البذور من ثمار الجوافة الناضجة المجموعة من المجمع الوراثي في منطقة البحيرة، مصر. ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم للتخلص من اللّب العالق بالبذور. عوملت البذور النظيفة بحمض كلور الماء (HCl) بتركيز 10% لمدة 24 ساعة لتحسين عملية الإنبات (Ali *et al.*, 2003). ثم عُقمت سطحياً بالغمر لمدة دقيقة واحدة في الكحول الإيتيلي 70%، 20 دقيقة في محلول الكلوروكس التجاري (الحاوي هيبوكلوريت الصوديوم كمادة فعالة بنسبة 5.25%) بتركيز 10%، ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم 3 مرات بفاصل زمني 5 دقائق.

جُففت البذور المعقمة تحت تدفق الهواء المعقم لجهاز العزل الجرثومي لفترات زمنية تراوحت من 0–6 ساعات. نُقلت البذور المجففة بفاصل زمني 2 ساعة ووضعت في أنابيب 2 مل وغمرت في النتروجين السائل لمدة ساعة واحدة. ثم تمت الإذابة بسرعة في حمام مائي على حرارة 40°م لمدة 3 دقائق. أُخرجت البذور من الأنابيب وزُرعت على وسط الإنبات المكون من أملاح MS ، 3.0% سكروز، 0.7% آجار والمدعم بـ 2 مغ/ل BAP و 3 مغ/ل GA3 (Abdullah *et al.*, 2009). حُسب المحتوى الرطوبي (MC%) للبذور بتجفيفها في الفرن على حرارة 80°م لمدة 48 ساعة (Wang *et al.*, 2000).

كُررت كل معاملة 3 مرات، واستخدمت 10 بذور لكل مكرر. حُسبت نسبة الإنبات بعد 6 أسابيع من الزراعة بالاعتماد على ظهور الأفرع والجذور من جنين البذرة.

التحليل الاحصائي:

صُممت تجارب البحث وفق التصميم العشوائي الكامل (CRD) واختبر تأثير المعاملات باختبار ANOVA لأقل فرق معنوي LSD عند مستوى ثقة 5% بالاعتماد على Waller and Duncan (1969). حُللت البيانات إحصائياً باستخدام برنامج IBM SPSS الإصدار 22.0 (Software Package for Statistics and Simulation, 2013).

النتائج:

الحفظ المتوسط في الزجاج على حرارة 10°م تحت ظلام تام:

بينت النتائج في الجدول (1) والشكل (1A) أن نسبة البقاء للقمم النامية المحفوظة على أوساط تحوي تراكيز مختلفة من السكروز لم تتأثر معنوياً بالتركيز المستخدم، بينما أدت زيادة فترة الحفظ من 3 إلى 6 أشهر إلى انخفاضٍ معنويٍ في نسبة البقاء من 58.33 إلى

35.42%. بعد 6 أشهر من الحفظ، بقيت 50.00% من القمم النامية خضراء وسليمة على وسط يحوي 5.0% سكروز، بينما بلغت نسبة البقاء 25.00% فقط على وسط يحوي 6.0% سكروز بفروق معنوية فيما بينها.

الجدول 1. تأثير كل من المعاملة بتراكيز مختلفة من العوامل الأسموزية (%) وفترات الحفظ (شهر) على نسبة البقاء (%) للقمم النامية للجوافة المحفوظة على حرارة 10°م تحت ظلام تام.

المعاملة	فترة الحفظ (شهر)		متوسط المعاملة
	3	6	
السكروز			
الشاهد (3.0% سكروز)	[a]66.67	[bc]33.33	**[A]50.00**
4.0%	[a]66.67	[bc]33.33	**[A]50.00**
5.0%	[ab]50.00	[ab]50.00	**[A]50.00**
6.0%	[ab]50.00	[c]25.00	**[A]37.50**
متوسط فترة الحفظ	**[A]58.33**	**[B]35.42**	
LSD عند مستوى ثقة 5%		فترة الحفظ	16.36
		المعاملة	23.13
		فترة الحفظX المعاملة	23.13
السوربيتول			
الشاهد (3.0% سكروز)	[ab]66.67	[c]33.33	**[B]50.00**
4.0%	[ab]66.67	[bc]50.00	**[AB]58.33**
5.0%	[a]83.33	[ab]66.67	**[A]75.00**
6.0%	[a]83.33	[ab]66.67	**[A]75.00**
متوسط فترة الحفظ	**[A]75.00**	**[B]54.17**	
LSD عند مستوى ثقة 5%		فترة الحفظ	15.35
		المعاملة	21.71
		فترة الحفظX المعاملة	21.71

تشير الأحرف المتشابهة في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي (P≤0.05) بين المتوسطات.

فيما يختص بتراكيز السوربيتول، أظهرت النتائج في الجدول (1) والشكل (1A) أن إضافة 5.0 أو 6.0% سوربيتول إلى وسط الحفظ أعطت أعلى قيمة للقمم النامية التي بقيت حية (75.00%) بفروقٍ معنويةٍ بالمقارنة مع الوسط الشاهد (3.0% سكروز) والذي سجل أقل قيمة لنسبة البقاء (50.00%). بالإضافة لذلك، انخفضت نسبة البقاء بشكل معنوي من 75.00 إلى 54.17% بزيادة فترة الحفظ من 3 إلى 6 أشهر. بعد 6 أشهر من الحفظ، بلغت نسبة البقاء 66.67% على وسط يحوي 5.0 أو 6.0% سوربيتول، بينما بقيت 33.33% فقط من القمم النامية حية على وسط الشاهد (3.0% سكروز) بفروق معنوية فيما بينها.

الحفظ المتوسط في الزجاج على حرارة 15°م تحت ظلام تام:

أظهرت النتائج في الجدول (2) والشكل (1B) أن نسبة البقاء انخفضت بشكل معنوي من 70.83 إلى 41.67% بزيادة فترة الحفظ من 3 إلى 6 أشهر، بينما لم تؤثر زيادة تركيز السكروز بشكل معنوي في نسبة البقاء للقمم النامية المحفوظة. وسُجلت أعلى نسبة بقاء (50.00%) بعد 6 أشهر من الحفظ على وسط يحوي 4.0 أو 5.0% سكروز بدون فروق معنوية مع الوسط الذي يحوي 3.0 أو 6.0% سكروز (33.33%).

الجدول 2. تأثير كل من المعاملة بتراكيز مختلفة من العوامل الأسموزية (%) وفترات الحفظ (شهر) على نسبة البقاء (%) للقمم النامية للجوافة المحفوظة على حرارة 15°م تحت ظلام تام.

المعاملة	فترة الحفظ (شهر)		متوسط المعاملة
	3	6	
السكروز			
الشاهد (3.0% سكروز)	$^{(ab)}$66.67	$^{(c)}$33.33	$^{(A)}$**50.00**
4.0%	$^{(a)}$83.33	$^{(bc)}$50.00	$^{(A)}$**66.67**
5.0%	$^{(ab)}$66.67	$^{(bc)}$50.00	$^{(A)}$**58.33**
6.0%	$^{(ab)}$66.67	$^{(c)}$33.33	$^{(A)}$**50.00**
متوسط فترة الحفظ	$^{(A)}$**70.83**	$^{(B)}$**41.67**	
LSD عند مستوى ثقة 5%		فترة الحفظ	15.35
		المعاملة	21.71
		فترة الحفظXالمعاملة	21.71
السوربيتول			
الشاهد (3.0% سكروز)	$^{(b)}$66.67	$^{(c)}$33.33	$^{(C)}$**50.00**
4.0%	$^{(b)}$66.67	$^{(b)}$66.67	$^{(BC)}$**66.67**
5.0%	$^{(a)}$100.00	$^{(ab)}$83.33	$^{(A)}$**91.67**
6.0%	$^{(a)}$100.00	$^{(b)}$66.67	$^{(AB)}$**83.33**
متوسط فترة الحفظ	$^{(A)}$**83.33**	$^{(B)}$**62.50**	
LSD عند مستوى ثقة 5%		فترة الحفظ	13.55
		المعاملة	19.17
		فترة الحفظXالمعاملة	19.17

تشير الأحرف المتشابهة في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي (P≤0.05) بين المتوسطات.

بالنسبة لتراكيز السوربيتول، أشارت النتائج في الجدول (2) والشكل (1B) إلى أن أعلى نسب بقاء (91.67 و 83.33%) لوحظت على وسط يحوي 5.0 و 6.0% سوربيتول، على التوالي وبفروق معنوية مع الوسط الشاهد (3.0% سكروز) والذي سجل أقل نسبة بقاء (33.33%). كما انخفضت نسبة البقاء بشكل معنوي من 83.33 إلى 62.50% بزيادة فترة الحفظ من 3 إلى 6 أشهر. أدت إضافة السوربيتول بتركيز 5.0% إلى وسط الحفظ لتحسن معنوي في نسبة البقاء للقمم النامية حيث بلغت نسبة البقاء 83.33% بعد 6 أشهر من الحفظ وبفروق معنوية مع الوسط الشاهد (33.33%).

التجديد في الزجاج لعينات الجوافة المحفوظة لمدة 6 أشهر على حرارة 10°م تحت ظلام تام:

أوضحت النتائج في الجدول (3) والشكل (2A) أن كل العينات المحفوظة لمدة 6 أشهر على الوسط الشاهد (3.0% سكروز) فشلت تماماً في تجديد أفرع جديدة عندما زُرعت على وسط التجديد وحضنت تحت الظروف الطبيعية لمدة 4 أسابيع. بينما سُجلت أعلى نسبة تجديد (25.00%)، أعلى عدد أفرع/عينة (1.33) وأعلى استطالة أفرع (1.67 سم) على وسط يحوي 5.0% سكروز بدون فروقٍ معنويةٍ مع الأوساط التي تحوي 4.0 أو 6.0% سكروز.

من جهة أخرى، أدت إضافة السوربيتول إلى وسط الحفظ لتحسن معنوي في تجديد النباتات بالمقارنة مع الوسط الشاهد (3.0% سكروز). بينما لم يلاحظ وجود فروق معنوية بين تراكيز السوربيتول المختلفة فيما يختص بنسبة التجديد، وعدد الأفرع/العينة، واستطالة الأفرع كما هو موضح في الجدول (3) والشكل (2A).

الجدول 3. تأثير المعاملة بتراكيز مختلفة من العوامل الأسموزية (%) على تجديد القمم النامية المحفوظة لمدة 6 أشهر على حرارة 10°م (بعد 4 أسابيع من الزراعة على وسط التجديد والتحضين تحت الظروف الطبيعية).

المعاملة	نسبة التجديد%	عدد الأفرع/العينة	طول الفرع (سم)
السكروز			
الشاهد (3.0% سكروز)	$^{(B)}$0.00	$^{(a)}$0.00	$^{(B)}$0.00
4.0%	$^{(AB)}$16.67	$^{(a)}$1.33	$^{(A)}$1.63
5.0%	$^{(A)}$25.00	$^{(a)}$1.33	$^{(A)}$1.67
6.0%	$^{(AB)}$16.67	$^{(a)}$1.17	$^{(A)}$1.50
LSD عند مستوى ثقة 5%	29.31	0.33	0.42
السوربيتول			
الشاهد (3.0% سكروز)	$^{(B)}$0.00	$^{(b)}$0.00	$^{(B)}$0.00
4.0%	$^{(A)}$25.00	$^{(a)}$1.50	$^{(A)}$1.69
5.0%	$^{(A)}$41.67	$^{(a)}$1.33	$^{(A)}$1.55
6.0%	$^{(A)}$33.33	$^{(a)}$1.33	$^{(A)}$1.82
LSD عند مستوى ثقة 5%	34.72	0.35	0.42

تشير الأحرف المتشابهة في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي (P≤0.05) بين المتوسطات.

التجديد في الزجاج لعينات الجوافة المحفوظة لمدة 6 أشهر على حرارة 15°م تحت ظلام تام:

أظهرت النتائج في الجدول (4) والشكل (2B) عدم وجود فروقٍ معنويةٍ فيما يتعلق بنسبة التجديد، وعدد الأفرع/العينة، واستطالة الأفرع بالنسبة للعينات المحفوظة على أوساط بتراكيز مختلفة من السكروز بالمقارنة مع الوسط الشاهد (3.0% سكروز).

كما لم تبين النتائج في الجدول (4) والشكل (2B) وجود فروق معنوية فيما يتعلق بعدد الأفرع/العينة واستطالة الأفرع بالنسبة للعينات المحفوظة على أوساط بتراكيز مختلفة من السوربيتول بالمقارنة مع الوسط الشاهد (3.0% سكروز). بينما سُجلت أعلى نسبة تجديد (66.67%) على وسط يحوي 5.0% سوربيتول بفروق معنوية مع الشاهد (25.00%).

الجدول 4. تأثير المعاملة بتراكيز مختلفة من العوامل الأسموزية (%) على تجديد القمم النامية المحفوظة لمدة 6 أشهر على حرارة 15°م (بعد 4 أسابيع من الزراعة على وسط التجديد والتحضين تحت الظروف الطبيعية).

المعاملة	نسبة التجديد%	عدد الأفرع/العينة	طول الفرع (سم)
السكروز			
الشاهد (3.0% سكروز)	$^{(A)}$25.00	$^{(a)}$1.33	$^{(A)}$1.96
4.0%	$^{(A)}$41.67	$^{(a)}$1.42	$^{(A)}$2.13
5.0%	$^{(A)}$41.67	$^{(a)}$1.50	$^{(A)}$2.04
6.0%	$^{(A)}$25.00	$^{(a)}$1.17	$^{(A)}$1.96
LSD عند مستوى ثقة 5%	39.87	0.40	0.35
السوربيتول			
الشاهد (3.0% سكروز)	$^{(B)}$25.00	$^{(a)}$1.33	$^{(A)}$1.96
4.0%	$^{(AB)}$58.33	$^{(a)}$1.50	$^{(A)}$1.88
5.0%	$^{(A)}$66.67	$^{(a)}$1.42	$^{(A)}$1.77
6.0%	$^{(AB)}$33.33	$^{(a)}$1.25	$^{(A)}$1.56
LSD عند مستوى ثقة 5%	40.19	0.41	0.48

تشير الأحرف المتشابهة في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي (P≤0.05) بين المتوسطات.

الحفظ الطويل بالتبريد الشديد لبذور الجوافة صنف "البلدي" على حرارة −196°م في النتروجين السائل باستخدام تقنية التجفيف (Desiccation):

يوضح الشكل (3) مراحل الحفظ الطويل لبذور الجوافة باستخدام تقنية التجفيف. كما يبين الجدول (5) أن نسبة الإنبات لبذور الجوافة صنف البلدي تأثرت معنوياً بكل من المحتوى الرطوبي للبذور والمعاملة بالنتروجين السائل، حيث حسّن التجميد في النتروجين السائل من نسبة الإنبات بشكل معنوي بالمقارنة مع البذور غير المجمدة (74.17 و 53.33% على التوالي). إضافةً لذلك، ازدادت نسبة الانبات معنوياً بزيادة فترة التجفيف. حيث حُققت أعلى نسبة إنبات (90.00%) بعد التجفيف لمدة 6 ساعات، بينما أعطت البذور غير المجففة أقل نسبة إنبات (40.00%) بفروق معنوية مع البذور المجففة.

كما يتضح من النتائج في الجدول (5) أن تجفيف البذور لمستوى رطوبي 4.76% (بعد 6 ساعات من التجفيف) أدى لإنبات كل البذور (100%) بعد تجميدها في النتروجين السائل.

الجدول 5. تأثير فترة التجفيف على المحتوى الرطوبي (%) ونسبة الإنبات (%) لبذور الجوافة الصنف البلدي بعد الغمر في النتروجين السائل.

فترة التجفيف (ساعة)	المحتوى الرطوبي%	نسبة الإنبات (%)		متوسط فترة التجفيف
		شاهد (بدون غمر في LN)	مع غمر في LN	
الشاهد (بدون تجفيف)	33.33	$^{(e)}$33.33	$^{(de)}$46.67	**$^{(C)}$40.00**
2 ساعة	13.04	$^{(d)}$50.00	$^{(c)}$66.67	**$^{(B)}$58.33**
4 ساعة	9.09	$^{(d)}$50.00	$^{(b)}$83.33	**$^{(B)}$66.67**
6 ساعة	4.76	$^{(bc)}$80.00	$^{(a)}$100.00	**$^{(A)}$90.00**
متوسط المعاملة بالنتروجين السائل		**$^{(B)}$53.33**	**$^{(A)}$74.17**	
LSD عند مستوى ثقة 5%		فترة التجفيف	15.97	
		المعاملة بالنتروجين السائل	11.29	
		فترة التجفيفX المعاملة	15.97	

تشير الأحرف المتشابهة في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي (P≤0.05) بين المتوسطات.

المناقشة:

الحفظ المتوسط في الزجاج:

استخدمت عدة تقنيات للحفظ في الزجاج اعتماداً على الفترة الزمنية المطلوبة للحفظ. فالحفظ القصير أو المتوسط يهدف لزيادة الفترة بين النقلات عن طريق تقليل النمو. أشارت النتائج في هذا البحث إلى أن زيادة فترة الحفظ خفضت بوضوح من نسبة البقاء للقمم النامية. قد يكون ذلك عائد لاستنزاف العناصر الغذائية كما ذكر سابقاً من قبل Ahmad and Anjum (2010). هذه النتائج متوافقة مع دراسات سابقة على التمر (El-Dawayati *et al.*, 2013) والعنب (Hassan *et al.*, 2014).

حسنت إضافة السوربيتول إلى وسط الحفظ من نسبة البقاء للقمم النامية وزادت الفاصل الزمني بين النقلات. حيث بلغت أعلى نسبة بقاء (83.33%) للقمم النامية المحفوظة لمدة 6 أشهر على وسط يحوي 5.0 % سوربيتول عند درجة حرارة 15°م. في حين استطاعت 66.67% من العينات البقاء حية بعد 6 أشهر من الحفظ على وسط يحوي 4.0 أو 6.0% سوربيتول عند حرارة 15°م أو على وسط يحوي 5.0 أو 6.0% سوربيتول عند حرارة 10°م. بينما بلغت نسبة البقاء 50.00% بعد 6 أشهر من الحفظ على وسط يحوي 5.0% سكروز عند حرارة 10°م أو على وسط يحوي 4.0 أو 5.0% سكروز عند حرارة 15°م. بشكلٍ مشابهٍ، تم الحصول عل أفرع سليمة من

التمر بعد 6 أشهر من الحفظ على وسط يحوي 40 مغ/ل سوربيتول، ولكن انخفضت نسبة البقاء بشكل حاد وجفت العينات وماتت بعد 12 شهر من الحفظ (Bekheet *et al.*, 2001). في حين وجدت El-Dawayati *et al.* (2013) أن وسط الحفظ الحاوي على سكروز أو سوربيتول هو الأكثر فعالية في إنتاج نسبة بقاء أعلى للقمم النامية من نخيل التمر الصنف زغلول بالمقارنة مع استخدام المانيتول.

أشارت العديد من الدراسات إلى أن السكروز والسوربيتول مواد جيدة لإطالة فترة الحفظ للأنسجة النامية في الزجاج. استناداً إلى نظرية تمدد ونمو الخلية الناتج عن الانتباج، فإن زيادة تركيز المواد الأسموزية في الوسط يلعب دور ضد خلق ضغط انتباج مناسب لحدوث تمدد الخلية. تحت هذه الظروف يُثبط نمو الكالس وتشكل الأفرع (Zimmermann, 1978). زيادة تركيز السكروز فوق 4-5% في وسط عالي الأملاح يؤدي لتأثير مثبط وليس سام على نمو الخلايا النباتية لذلك تستخدم التراكيز العالية من السكروز لحفظ الزراعات في ظروف ساكنة لفترات زمنية طويلة (Schenk and Hilderbandt, 1972). في حين أن السكر الكحولي يقلل من الجهد المائي وإتاحة العناصر الغذائية للخلايا مما يحد من نمو النباتات وبالتالي حفظها على المدى المتوسط (Borges *et al.*, 2004).

أظهرت القمم النامية المحفوظة على حرارة 15°م نسبة بقاء أعلى من تلك المحفوظة على حرارة 10°م. في هذا السياق، بيّن Rodriguez *et al.* (2010) أن الجوافة لم تتحمل درجات حفظ تحت 9-10°م. بينما استطاع Banerjee and De Langhe (1985) حفظ القمم النامية للموز بشكل ناجح على حرارة 15°م بينما على حرارة 10°م تحولت الزراعات للون البني وماتت بعد 3 أشهر.

التجديد في الزجاج:

من النتائج السابقة يمكن استنتاج أن تقدير نسبة البقاء عند نهاية فترة حفظ ليس بالضرورة أن يعكس قدرة النباتات على إعادة النمو بعد الحفظ. وهذا مشابه لما تم التوصل له سابقاً على الإجاص (Ahmad and Anjum, 2010) و نبات القبار *Capparis spinosa* (Al-Mahmood *et al.*, 2012).

كما أن القمم النامية المحفوظة على حرارة 15°م أظهرت معايير نمو أعلى بالمقارنة مع تلك المحفوظة على حرارة 10°م. بشكل مشابه، بلغت نسبة التجديد 100% للقمم النامية لنخيل التمر المحفوظ لمدة 6 أشهر على حرارة 15°م عندما زرعت تحت ظروف نمو طبيعية، بينما بلغت نسبة التجديد 86.66% للقمم النامية المحفوظة لمدة 6 أشهر على حرارة 5°م (El-Dawayati *et al.*, 2013).

حسنت إضافة السوربيتول إلى وسط الحفظ من نسبة التجديد للقمم النامية المحفوظة على حرارة 10 و 15°م، حيث بلغت أعلى نسب تجديد (66.67 و 58.33%) على وسط يحوي 5.0 أو 4.0% سوربيتول على التوالي عند حرارة 15°م. بينما استطاعت 41.67% من العينات المحفوظة أن تستعيد قدرتها على تجديد أفرع جديدة بعد 6 أشهر من الحفظ على وسط يحوي 5.0% سوربيتول عند حرارة 10°م أو على وسط يحوي 4.0 أو 5.0% سكروز عند حرارة 15°م. في حين أن كل العينات المحفوظة على الوسط الشاهد (3.0% سكروز) على حرارة 10°م فشلت بشكل كامل في تجديد أفرع جديدة بعد زراعتها على وسط التجديد وتحضينها تحت ظروف نمو طبيعية. توافقت هذه النتائج مع نتائج سابقة ل Al-Mahmood *et al.* (2012) التي أشارت إلى أن نباتات القبار المحفوظة على وسط يحوي 3.0% سكروز فقدت قدرتها على النمو. بينما استعادت النباتات المحفوظة على وسط يحوي السوربيتول قدرتها على النمو وانتجت أفرع مطورة بشكل جيد.

من جهة أخرى، لم تظهر العينات المحفوظة على أوساط تحوي تراكيز مختلفة من السكروز أو السوربيتول وجود فروق معنوية بالمقارنة مع الوسط الشاهد فيما يختص بعدد الأفرع/العينة واستطالة الأفرع. تتوافق هذه النتائج مع تلك ل El–Homosany (2013) الذي أشار إلى أن حفظ القمم النامية لثلاثة أصناف من العنب على أوساط تحوي تراكيز مختلفة من السكروز أو السوربيتول لم يؤثر على عدد الأفرع الناتجة أو استطالتها بالمقارنة مع القمم النامية المحفوظة على وسط الشاهد (3.0% سكروز). على النقيض من ذلك، وجد Al– Mahmood *et al.,* (2012) أن زيادة تركيز السكروز أو السوربيتول في وسط الحفظ خفض من نمو نبات القبار بعد انتهاء فترة الحفظ.

الحفظ الطويل للبذور بالتبريد الشديد في النتروجين السائل باستخدام تقنية التجفيف (Desiccation):

يعتبر حفظ البذور من أهم طرق الحفظ خارج الموقع. يمكن المحافظة على حيوية البذور بعد الحفظ بتقليل درجة الحرارة وبضبط المحتوى الرطوبي. حيث أن التجفيف غير الكافي ربما يقلل من الحيوية والتجفيف الزائد يقلل من الخواص الفيزيولوجية للبذور (Walters *et al.,* 1998). لذلك من الضرورة أن يتم تحديد المحتوى الرطوبي الأمثل الذي يحافظ على حيوية البذور بعد فترات طويلة من الحفظ (Tarre *et al*., 2007).

أوضحت نتائج هذا البحث أن كل بذور الجوافة كانت قادرة على الإنبات بعد الغمر في النتروجين السائل عند تجفيفها لمدة 6 ساعات (عند مستوى رطوبي 4.76%). بشكل مشابه أشار Stanwood, (1985) إلى أن بذور الجوافة تتحمل تجفيف لمستوى 6% حيث بلغت نسبة الإنبات 98% بعد الغمر في النتروجين السائل. كما بلغت نسبة الإنبات 82% لبذور *Citrus australasica* المجففة لمحتوى رطوبي 5% وتم الحصول على تشكل مورفولوجي طبيعي بعد الحفظ لفترة قصيرة في النتروجين السائل (Hamilton *et al.,* 2005). فُسر التأثير الايجابي للتجفيف الصناعي على الانبات كاستمرار لعملية النضج التي تحصل بشكل طبيعي عندما تصبح البذور أكثر جفافاً (Tompsett and Pritchard, 1998).

بالإضافة لذلك فإن زيادة إنبات البذور بالبرودة تم تسجيله في العديد من الأنواع (Gosling, 1989). في هذا السياق أشار Tarre *et al.,* (2007) إلى أن قابلية الإنبات لبذور *Encholirium magalhaesii* و *E. subsecundum* ازدادت بعد الحفظ في النتروجين السائل.

الاستنتاجات:

إن التقنيات المطورة الموصوفة في هذا البحث يمكن أن تستخدم بشكل فعال في البنوك الوراثية لحماية التنوع الوراثي للجوافة من خطر الفقد المتزايد الناتج عن الأوبئة والمعاملات الزراعية الخاطئة.

المراجع:

Abdullah, T.A.; M.A. Aziz; A.A. Rashid; G. Saleh; S.M.A. Elhory; S.B. Panjaitan; M.S. Hailmi and M. Noor Muzamil (2009). Comparison on the effect of treatment and sub culturing on shoot regeneration from shoot tip seedlings of *Psidium guajava* L. var. Beaumont. Pakistan Journal of Biotechnology. 6(1-2):21-26.

Adsule, R.N.; and S.S. Kadam (1995). Guava. In: Handbook of Fruit Science and Technology: Production, Composition, Storage and Processing (Eds. Salunkhe, D.H. and Kadam, S.S.), New York, Marcel Dekker. Pp. 419-433.

Ahmad, M.; and M.A. Anjum (2010). *In vitro* storage of some pear genotypes with the minimal growth technique. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 34:25-32.

Ali, N.; R.M.S. Mulwa; M.A. Morton; and R.M. Skirvin (2003). Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 78(5):739-741.

Al-Mahmood, H.J.; M.A. Shatnawi; R.A. Shibli; I.M. Makhadmeh; S.M. Abubaker; and A.N. Shadiadeh (2012). Clonal propagation and medium-term conservation of *Capparis spinosa*: A medicinal plant. Journal of Medicinal Plants Research. 6(22):3826-3836.

Al-Mousa, R.N. (2014). Genetic improvement and germplasm conservation of some fruit cultivars. Ph.D. Thesis, Fac. of Agric., Cairo Univ. Cairo. 408p.

Ashmore, S.E. (1997). Status report on the development and application of *In Vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy, 67p.

Banerjee, N.; and E. De Langhe (1985). A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). Plant cell reports, 4:351-354.

Bekheet, S.A.; H.S. Taha; and M.M. Saker (2001). *In vitro* long-term storage of date palm (*Phoenix dactylifera*). Arab Universities Journal of Agricultural Sciences, Egypt. 9(2):793-802.

Bekheet, S.A.; and U.I. Aly (2007). *In vitro* conservation of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) germplasm. International Journal of Agriculture and Biology. 9(3):404-407.

Benson, E.E. (1994). Cryopreservation. In: Plant Cell Culture- A Practical Approach (Eds. Dixon R.A. and Gonzales, R.A.), Oxford University Press, Oxford. Pp.147-167.

BGCI. (2005). In: <http://www.bgci.org/

Borges, M.; W. Ceiro; S. Meneses; N. Aguilera; J. Vazquez; Z. Infante; and M. Fonseca (2004). Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 76(1):87-90.

El-Dawayati, M.M.; E.I. Baker; A.H. Gomaa; and Z.E. Zayed (2013). *In vitro* conservation of date palm shoot tip explants under minimal growth conditions. Egypt Journal of Agricultural Research. 91(3):1043-1062.

El-Homosany, A.A. (2013). Studies on the *In Vitro* conservation of some local grape varieties. Ph.D. Thesis, Fac. of Agric., Cairo Univ. Cairo. 277p.

Engelmann, F. (1997). Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. Plant Genetic Resources Newsletter. 112: 9-18.

Engelmann, F.; and J.M. Engels (2002). Technologies and strategies for *ex situ* conservation. In: Engels, J.M.M.; V. Ramanatha Rao; A.H.D. Brown and M.T. Jackson (Eds.). Managing plant Genetic Diversity, Wallingford and Rome, CAB International and IPGRI. Pp: 89-104.

Engelmann, F. (2010). Use of biotechnologies for conserving plant diversity. Acta Horticulturae. 812:63-82.

Gonzalez-Benito, M.E.; I. Clavero-Ramirez; and J.M. Lopez-Aranda (2004). Review: The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetative propagated crops. Spanish Journal of Agricultural Research. 2(3):341-351.

Gosling, P.G. (1989). The effect of drying *Quercus robur* acorns to different moisture contents, followed by storage, either with or without imbibition. Forestry. 62(1):41-50.

Hamilton, K.N.; S.E. Ashmore; and R.A. Drew (2005). Investigations on desiccation and freezing tolerance of *Citrus australasica* seed for *ex situ* conservation. In: Proceedings of the 5th Australian Workshop on Native Seed Biology. Brisbane, Queensland. 31-23 June 2004. (Eds. Adkins, S.W.; Ainsley, P.J.; Bellairs, S.M.; Coates, D.J. and Bell, L.C.). ACMER: Brisbane. Pp.157-161

Hassan, N.A.; R.G. Stino; A.H. Gomaa; and R.N. Al-Mousa (2014). *In vitro* medium-term germplasm conservation and genetic stability of grape (*Vitis vinifera* L.). Journal of Horticultural Science and Ornamental Plant. 6(1): 9-17.

IBM SPSS Statistics 22.0 (Software Package for Statistics and Simulation), August- 2013.

Moges, A.D.; N.S. Karam; and R.A. Shibli (2003). Slow growth *in vitro* preservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl) shoot tips. Advanced Hort. Science. 17:1-8.

Murashige, T.; and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15(3):473-497.

Panis, B.; R. Swennen; and F. Engelmann (2001). Cryopreservation of plant germplasm. Acta Horticulture. 650:79-86.

Panis, B.; and M. Lambardi (2005). Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). The Role of Biotechnology. 5-7 March, Villa Gualino, Turin, Italy. Pp. 43-54.

Perez-Tornero, O.; F. Ortin-Parraga; J. Egea; and L. Burgos (1999). Medium-term storage of apricot shoot tips *in vitro* by minimal growth methods. Hort. Science. 34(7):1277-1278.

Reed, B.M. (1992). Cold storage of strawberries *in vitro*: A comparison of three storage systems. Fruit Var Journal. 46(2):93-102.

Rodriguez, N.N.; J. Valdes; J.A. Rodriguez; B.J. Velasquez; D. Rivero; F. Martinez; G. Gonzalez; D.G. Sourd; L. Gonzalez; and J. Canizares (2010). Genetic resources and breeding of guava (*Psidium guajava* L.) in Cuba. Biotecnologia Aplicada. 27(3):238-241.

Schenck, R.V.; and A.C. Hildebrandt (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany. (50):199-204.

Scherwinski-Pereira, J.E.; and F.H.S. Costa (2010). *In vitro* conservation of plant genetic resources: Strategies, principles and applications. *In vitro* culture of plants, Brasilia. Embrapa Technological Information. Pp. 177-234.

Shibli, R.; M.A. Shatnawi; W.S. Subaih; and M.M. Ajlouni (2006). *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A review. World Journal of Agricultural Sciences. 2(4):372-382.

Stanwood, P.C. (1985). Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: Cryopreservation of Plant Cell and Organs (Ed. Kartha, K. K), CRC Press Boca Raton, Florida. Pp.199-226.

Tarre, E.; B.B.M. Pires; A.P.M. Guimaraes; and L.A. Carneiro (2007). Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seeds from endemic *Encholirium* Mart. ex Schult. &Schult. f. and *Dyckia* Schult. &Schult. f. species (Bromeliaceae). Acta Botanica Brasilica. 21(4):777-783.

Tompsett, P.B. ; and H.W. Pritchard (1998). The effect of chilling and moisture status on the germination, desiccation tolerance and longevity of *Aesculus hippocastanum* L. seeds. Annals of Botany. 82:249–261.

Waller, R.A.; and D.B. Duncan (1969). A basic rule for thaw symmetric multiple comparison problems. Journal of the American Statistical Association. 64:1484-1499.

Wang, Q.; E. Tanne; A. Arav; and R. Gafny (2000). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 63(1):41-46.

Walters, C.; N.K. Rao; and X. Hu (1998). Optimizing seed water content to improve longevity in *ex situ* gene banks. Seed Science Research. 8:15-22.

Zimmermann, U. (1978). Physics of turgor and osmoregulation. Annual Review of Plant Physiology. 29:121-148.

In vitro Conservation of Guava (*Psidium guajava* L.) var. Al-Baladi

Rehab Al Mousa*(1) Neveen Hassan(2) Ramzy Stino(3) and Amina Gomaa(3)

(1). Department of Biotechnology, General Commission for Scientific Agricultural Research, Damascus, Syria.
(2). National Gene Bank and Genetic Resources, Agricultural Research Center, Giza, Egypt.
(3). Pomology Department, Faculty of agriculture, Cairo University, Giza, Egypt.
(*Corresponding author: Dr. Rehab Al Mousa. E-Mail: bebo_moussa13@yahoo.com).

Received: 04/01/2018 Accepted: 06/02/2018

Abstract

This study was conducted at the National Gene Bank, Egypt, from 2012 to 2014; to find out *in vitro* conservation protocol of guava (*Psidium guajava* L. var. Al-Baladi). The medium-term conservation study was initiated at 10 and 15°C under complete darkness conditions. Shoot tip explants were cultured on MS medium with different concentrations (3.0, 4.0, 5.0 and 6.0%) of sucrose or sorbitol. After 6 months of conservation, up to 83.33% of explants survived on medium with 5.0% sorbitol at 15ºC, while the same survival% (66.67%) was noticed when explants conserved on medium with 6.0% of sorbitol at 15ºC and on medium with 5.0 or 6.0% of sorbitol at 10ºC. Regeneration%, shoot number of explant and shoot length were not affected by osmotic concentrations. Meanwhile, all explants lost their ability to regenerate new shoots when conserved for 6 months on medium with 3.0% sucrose (control) at 10ºC. Guava seeds recorded 100% germination when desiccated for 6 h before cryopreservation in liquid nitrogen.

Keywords: Guava, Medium-term conservation, Sucrose, Sorbitol, Cryopreservation, Desiccation.