التقرير النهائي للبحث رقم ٢٣٨/٢٠٠١

بعنوان : إحداث تضاعف كروموزومي لنبات الجاردينيا و الانتخاب المبكر للنباتات المضاعفة.

Polyploidisation and early screening of Gardenia

إعداد

الأستاذ الدكتور/عبد الله بن صالح الغامدي و الدكتور/ غسان بن رشيد عبد الله

قسم البساتين

كلية العلوم الزراعية والأغذية

جامعة الملك فيصل

التقرير النهائي للبحث رقم ٢٣٨/٢٠٠١

إحداث تضاعف كروموزومي لنبات الجاردينيا و الانتخاب المبكر للنباتات المضاعفة.

Polyploidisation and early screening of Gardenia

الأستاذ الدكتور عبد الله بن صالح الغامدي و الدكتور غسان بن رشيد عبد الله

قسم البساتين – كلية العلوم الزراعية والأغذية – جامعة الملك فيصل

ملخص البحث: تهدف هذه المحاولة لتطوير طريقة التضاعف الكروموسومي للحصول على رباعيات الصيغة الصبغية وتحسين الصفات الزهرية والخضرية لنوعين من الجاردينيا(*G.jasminoides* , *G.thunbergia*) المستخدمين في التنسيق الداخلي . كانت المعالجة بالكولشيسين أو الأوريزالين كمعيقات للانقسام الخلوي على عقل ساقية، عقل جذرية، عقل ورقية وسلاميات قبل زراعتها على الوسط المغذي، وكذلك ضمن الوسط المغذي خلال المرحلة الأخيرة لإعادة النمو من الكدب. زراعة العقل الساقية على MS مضافا له 1 ملجرام/لتر BAP و0.5 ملجرام/لتر IAA وكذلك الزراعات الثانوية التي أعطت مردود مرتفع من النموات التي تم تجذيرها على MS مضافا له 1 ملجرام /لتر IAA . الكدب تم الحصول عليها على MS مضافا له 2 و 0.25 ملجرام/لترمن NAA وBAP على التوالي، وهذه الكدب أعطت بدورها نموات جديدة على الظلام في وسط MS مع 2 و 0.5 ملجرام/لترمن الزياتين وNAA على التوالي بعد الزراعة الثانوية الرابعة للكدب.إن المعالجة بمعيقات الانقسام للعقل الساقية وكذلك إضافتها للوسط في المرحلة الأخيرة لإعادة النمو من الكدب أعطى نموات رباعية الصيغة الصبغية وكذلك نموات شيميرية، بالمقابل لم تؤد المعالجات في مرحلة ما قبل إنتاج الكدب إلى إعطاء أي نوع من تلك النموات.أعلى نسبة للنموات الرباعية تم الحصول عليها بعد المعالجة بمعيقات الانقسام في المرحلة الأخيرة لإعادة النمو من الكدب مقارنة بتلك الناتجة من العقل الساقية المعالجة . وبشكل عام فإن الأوريزالين كان أكثر سمية للعينات النباتية من الكولشيسين وأكثر قدرة على إحداث الشيميرا، كما إن إمكانية الحصول على النموات المضاعفة كان أقل والتي لعب الكولشيسين الدور الأكبر في إحداثها.

الكلمات المفتاحيه: الجاردينيا، ألإكثار المخبري، إنتاج الكدب، التعضي، الكروموسـوم، التـضاعف، الشيميرا ، الكولشيسين، الأوريزالين، قياس التدفق الخلوي (FCM).

المقدمة

تعتبر الجاردينيا من النباتات الهامة في التنسيق الداخلي للمنازل حيث تزرع في الداخل وعلى الشرفات وفي الحدائق المنزلية المظللة لأن القليل من الأصناف قادر على العيش خارجيا بسبب حساسيتها لحرارة الصيف العالية وأشعة الشمس المباشرة. وهي ذات أهمية اقتصادية أيضاً نظرا لاستخدامها في صناعة العطور و الأصبغة لوجود مادة ألفا كروسيتين (γ-Crocetin) المستخدمة كصباغ أصفر للحرير. وتعتبر مادة الكروسين (crocin) المستخلصة من ثمار الجاردينيا من مضادات الأكسدة (Thanh وآخرون 2000)، إضافة لذلك فقد تمكن Paik وفريقه (2001) من الحصول على أصبغه زرقاء من ثمار الجاردينيا باستعمال بعض المعالجات الكيميائية البسيطة وكان لذلك أهمية كبيرة في مجالات صناعة الأصبغة الطبيعية المنشأ.

تنتمي أشجار وشجيرات الجاردينيا للعائلة الروبية *Rubiaceae* و الجنس *Gardenia* الذي يضم العديد من الأنواع ، ومن أهمها *G. jasminoides*، *G. thunbergia* ، *G. rothmannia* و *G.augusta* ويعتبر النوع . *G. jasminoides* واحد من أكثر الأنواع شعبية في الولايات المتحدة والصين حيث يصل ارتفاع الشجيرة إلى 1.5 م وهي دائمة الخضرة وبرائحة شمعية، و تزهر من منتصف مايو وحتى يونيو ويمكن أن يستمر حتى سبتمبر، معطية أزهار مضاعفة بلون أبيض ورائحة عطرية قوية. تحتاج شجيرات الجاردينيا إلى إضاءة قوية غير مباشرة للإزهار.

أما النوع *G.thunbergia* فاسمه العام شجرة الجاردينيا حيث يصل ارتفاعها حتى 3 م والعرض إلى 1.2 م في المناطق الملائمة (الاستوائية). يلائمها التربة الرملية المتوسطة الخصوبة والطينية الخصبة ، كما تحب الأراضي الحمضية والإضاءة العالية. هذه الأشجار نصف ظليلة تزهر في الخريف معطية أزهار بيضاء اللون بشكل أقحواني ذات أنبوب طويل. خشبها القاسي يستخدم لصنع بعض الأدوات الزراعية في جنوب أمريكا كما تستخدم كأصل لتطعيم شجيرات الجاردينيا عليه مثل الصنف Veitchii، فهي مقاومة للنيماتودا (Dumanois وآخرون 1984).

وتلعب تقنيات زراعة الأنسجة دورا كبيرا وهاما في إكثار العديد من النباتات الاقتصادية الهامة وكذلك الأشجار والشجيرات الصعبة الإكثار بالطرق الخضرية التقليدية ومن بينها الجاردينيا. ولقد كان Dumanois وزملائه (1984) أول من استخدم تقنيات زراعة الأنسجة لإكثار الجاردينيا حيث نجح في تجذير النموات الحديثة الناتجة في الأنابيب وبنسبة 75% متخلصاً من تأثير وقت التجذير على نجاح الإكثار وأيضا من المردودية المنخفضة لطرق الإكثار التقليدية.

لم يقتصر استخدام تقنية زراعة الأنسجة على إكثار هذا النبات فقط بل اتجهت الأبحاث نحو دراسة تغير أنزيم البيروكسيدز أثناء مراحل التشكل النباتي(Shen 1990) والحصول على المادة النباتية اللازمة لإنتاج الكروسين من الجاردينيا والمستخدمة في الأصبغة (George وآخرون 1993) ، ودراسة تأثير مكونات الوسط الغذائي على إنتاج الكروسين من الكدب (callus) (Lai وyang 1999). هذا وقد استخدمت ثمار الجاردينيا سابقا من قبل طبيب صيني كمضاد حيوي و مهديء عصبي و مدر للبول ومسكن للحمى (Hayashi وآخرون 1992) .

ومن أجل تحسين كفاءة الإكثار ، فقد بين Serret وآخرون (1997,1996) بأن النبيتات الناتجة من أنابيب غير محكمة الإغلاق كانت أنجح بالتقسية من تلك المأخوذة من أنابيب محكمة الإغلاق مع اختلاف الاستجابة الضوئية لهذه النبيتات حسب تركيز السكروز المستخدم. كما أدى تناوب استخدام مصادر نتروجينية مختلفة في الوسط المغذي إلى زيادة إنتاجية العقلة المخبرية من النموات المورقة في كل من الجاردينيا والموز(George و Ravishankar 1996) .

لقد أصبح التضاعف الكروموزومي من اهتمامات مربي النبات لما له من أهمية في تحسين الصفات البستانية لبعض النباتات كالأزهار الكبيرة والأوراق السميكة ذات الخضرة الداكنة وزيادة نسبة العرض للطول في المسطح الورقي أو إطالة فترة الإزهار أو تأخيره (Kehr 1996) و (Gao وآخرون 1996). إضافة لذلك يستخدم التضاعف الكروموزومي في النباتات البستانية من أجل إعادة الخصوبة للهجن العقيمة الناتجة عن التهجين بين الأجناس، وكذلك الهجن ثلاثية الصيغة الصبغية (Pryot وFrzier 1968) و(Goldy وآخرون 1996) ومضاعفة النباتات أحادية الصيغة الصبغية للحصول على سلالات

نقية جديدة وخصبة(Yetisir و Sari 2003) و(Zamani وآخرون 2000).كما يستفاد أيضا من التضاعف الصبغي في إنتاج نباتات ثلاثية العدد الكروموزومي عقيمة، وذلك بتهجين ثنائي الصيغة الصبغية مع رباعي الصيغة الصبغية، وهذا مفيد في النباتات المزروعة في الحدائق حيث من غير المرغوب إنتاج الثمار عليها (Hancock 1997).

يمكن للتضاعف الكروموزومي أن يحدث بشكل طبيعي وخاصة في النباتات أحادية الصيغة الصبغية حيث تعتبر هذه الأخيرة حالة غير طبيعية، أو بشكل اصطناعي باستخدام العديد من المواد الكيميائية مثل الكولشيسين (Colchicine) والأوريزالين (Oryzaline) وغيرها من المواد التي تلعب دورا هاماً في حدوث الاندوميتوز (Endomitos) أثناء الانقسام الخلوي بحيث تعيق الطور الانفصالي بالرغم من حدوث تتضاعف للكروموزومات التي تبقى ضمن نفس الخلية، وبذلك يتضاعف العدد الكروموزومي لهذه الخلية. تستخدم هذه المواد بتراكيز مختلفة (Redha وآخرون 1998) وأزمنة مختلفة (Anderson وآخرون 1991) وطرق مختلفة حسب الجزء النباتي المراد مضاعفته (Petersen وآخرون 2002).

تحتاج برامج التحسين النباتي دائما وبشكل متزايد إلى أدوات أكثر فعالية في عمليات التربية، وهذا ذو أهمية بقدر أهمية إنتاج الأحاديات المضاعفة لتسريع إنتاج السلالات النقية وبأقل وقت ممكن (Dickson وWallace 1986) وزيادة فعاليتها في تحسين الأصناف (Demarly وSibi 1989). وقد بين Delaat وآخرون (1987) بأن الطرق التقليدية المستخدمة مباشرة في تقدير العدد الكروموزومي وتحديد مستوى التضاعف في النباتات طويلة ومعقدة جدا و تحتاج إلى مخابر جيدة التجهيز وكادر مدرب وذو خبرة.و تعتمد الطريقة التقليدية على إحصاء العدد الكروموزومي مباشرة في النواة أثناء الانقسام الخلوي في وقت معين من النهار وتحت المجهر بعد القيام بالعديد من المراحل التحضيرية الطويلة، لذلك فالحاجة ماسة لإيجاد طرق غير مباشرة وفعالة في تحديد مستوى التضاعف مثل تحديد حجم الثغور التنفسية وعدد الكلوروبلاست في الخلايا الحارسة (Sari وآخرون 1999)، وبالرغم من فعالية هذه الطريقة، فإنها غير قابلة للتطبيق في بعض الحالات عندما يكون مستوى

التضاعف منخفضاً Delaat وآخرون (1987) لهذا يتوجب استخدام تقنية أخرى مثل (Flow Cytometry). لقد أستخدم Brown وآخرون (1991) طرق مختلفة لتحديد عدد الكروموزومات وتحديد مستوى التضاعف في العديد من الأنواع النباتية واقترحوا استخدام الـ Flow Cytometry كطريقة ناجحة وفعالة لذلك، وبعدهم Sari وآخرون (1999) قاموا بمقارنة الطريقة المباشرة (إحصاء العدد الكروموزومي) بالطرق غير المباشرة بتقدير: حجم الثغور التنفسية،عدد الكلوروبلاست في الخلايا الحارسة، الاختلافات الشكلية واستخدام جهازالـ Flow Cytometry لتحديد درجة التضاعف في البطيخ الأحمر، حيث بينوا إمكانية استخدام كافة الطرق السابقة الذكر في حين كان استخدام جهاز الـ Flow Cytometry أكثر قابلية للتطبيق بشكل عملي ومكثف.

إن استخدام جهاز الـ Flow Cytometry هي طريقة متكاملة لتقدير الـ DNA النووي للنباتات لأنها تسمح بتقديرات حساسة ودقيقة لكثافة الحزم الضوئية لأعداد كبيرة من النوى الملونة خلال ثواني (Arumuganat و Earle 1991) هذه الطريقة استخدمت بنجاح على البطيخ الأصفر(Cuny وآخرون 1992، Abak وآخرون 1996، Yetisir وSari 2003) وعلى البطيخ الأحمر (Sari وآخرون 1999) وعلى النوع *Hemerocallis* (Saito وآخرون 2003) ،كما أستخدم أيضاً في كشف الشيميرا (Chimiras) في النباتات الناتجة من تربية الموز داخل الأنابيب (Roux وآخرون 2001).

يهدف هذا البحث إلى تطوير وتحسين كفاءة الإكثار النسيجي للجاردينيا، وإيجاد طريقة مناسبة وفعالة لإحداث تضاعف كروموزومي في النبات الناتجة والتي تساعد في الحصول على بعض الصفات الزهرية و الخضرية الجديدة التي لم تكن موجودة سابقا في النباتات الأم حيث أن الصيغة الصبغية (Ploidy) للجاردينيا هي ثنائية وفيها ٢٢ كروموزوم (2n=22) (Ma وآخرون 1984)، بالإضافة إلى استخدام طرق حديثة في الكشف المبكر عن التغير في العدد الكروموزومي للنباتات الناتجة عن استخدام المواد المعيقة للانقسام الخلوي وتحديد درجة هذا التغير.

مواد وطرق البحث

نفذ هذا البحث بقسم البساتين في كلية العلوم الزراعية والأغذية بجامعة الملك فيصل في الفترة ما بين 2001 و 2003 م وذلك على نوعين من الجاردينيا: *G.jasminoides* و*G.thunbergia* ، حيث استخدم لهذه الغاية عشر نباتات من كل نوع مزروعة في البيت الزجاجي كأمهات في أصص تحتوي على خلطة زراعية مؤلفة من رمل و بتموس وتربة زراعية بنسبة 1:1:1 وتم ريها بمحلول غذائي مخفف من الأملاح المعدنية(Murashige وSkoog 1962) بين فترة وأخرى ، بهدف الحصول على نموات حديثة بشكل مستمر لإمداد الزراعة النسيجية بالأجزاء النباتية اللازمة.

إنتاج النبيتات مخبريا:

فصلت النموات الحديثة من النباتات الأم وتم غسلها بالماء العادي ثم مسحها بالكحول الإيثيلي تركيز 70 % وتقطيعها إلى أجزاء بطول 2-3 سم ويحتوي كل منها على عقدة ساقية واحدة فقط لتكون الجزء المستخدم في الزراعة الأولية. طهرت هذه الأجزاء بغمرها في محلول من الكلوروكس التجاري بتركيز 30% والمضاف له عدة نقاط من التوين (Tween –20) كمادة ناشرة لمدة 35 دقيقة ثم غسلت الأجزاء النباتية ثلاث مرات بالماء المقطر والمعقم لمدة ثلاث دقائق في كل مرة.

زرعت الأجزاء النباتية المختارة بعد تعقيمها في أنابيب اختبار بشكل رأسي بمعدل عقلة ساقية واحدة في كل أنبوب تحت جهاز العزل الجرثومي (Hood) كزراعة أولية، ثم وضعت في غرفة حضانة مكيفة وتحت شدة ضوئية مقدارها 5000 لوكس لمدة 16 ساعة يوميا وعلى درجة حرارة 24 ± 2 درجة مئوية نهاراً و 22 ± 2 درجة مئوية ليلاً.

أما في مرحلة الزراعة الثانوية، فقد تم أخذ النموات المخبرية الناتجة عن الزراعة الأولية وتجزئتها إلى عقل ساقية مخبرية دقيقة وزراعتها ضمن أوساط جديدة من المحاليل الغذائية التي نجحت عليها الزراعة الأولية، في حين تمت إعادة زراعة العقل الساقية الأولية بعد أخذ النموات الحديثة منها

للتجذير أو إكثارها من جديد بعد ترك قواعد هذه النموات عليها وذلك لعدة زراعات بمعدل مرة واحدة كل 6 أسابيع بهدف الحصول على جزء استزراع للإكثار (أمهات إكثار مخبرية) في الأنابيب للتخلص من مشكلة التعقيم في كل مرة ولتساعد في توفير أكبر كمية من النموات الحديثة المورقة بهدف الوصول إلى الإنتاج التجاري ذو الجدوى الاقتصادية العالية.أما في مرحلة التجذير، فقد استخدمت النموات الحديثة الناتجة عن الزراعات الأولية أو الثانوية أو عن أمهات الإكثار النسيجية بطول حوالي 3 سم، لأن النموات الأصغر من ذلك ضعيفة التجذير و تقسيتها أصعب وأقل نجاحا .

ولقد تم تنفيذ الزراعات الأولية والثانوية في وسط مغذي يحتوي على الأملاح المعدنية لموراشج وسكوج (Murashige وSkoog 1962) بالإضافة إلى المحلول الفيتاميني (Navarro وآخرون 1975) و تراكيز مختلفة من بنزيل امينو بورين(BAP) (0.0 و 0.25 و 0.5 و 1.0 و 1.5 و 2 ملجرام/ليتر) أو أندول حمض الخليك(IAA) (0.0 و 0.25 و 0.5 و 0.75 و 1.0 ملجرام/ليتر) بالمشاركة مع أفضل تركيز من BAP و 30 جرام/لتر سكروز و 7.5 جرام /لتر آجار-أجار و ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط على 5.5 قبل إضافة الآجار- آجار . وبعد إذابة الآجار- آجار حراريا وزع الوسط المغذي في أنابيب اختبار قياس 150 x 25 مم بمعدل 15 مل / أنبوب و أغلقت الأنابيب بواسطة سدادات بلاستيكية شفافة وعقمت بواسطة معقم رطب (Autoclave) على درجة حرارة 121 درجة مئوية ولمدة 15 دقيقة.

أما مرحلة التجذير فقد نفذت مخبريا في أنابيب تحتوي على بيئة مغذية مؤلفة من العناصر المعدنية الكبرى المخففة إلى النصف والعناصر الصغرى لـ (MS) و تراكيز مختلفة من الأوكسين IAA (0.0 و 0.25 و 0.5 و 0.75 و 1.0 و 1.5 ملجرام/ليتر) مضافا له المحلول الفيتاميني المستخدم من قبل Navarro وآخرون (1975) و20 جرام/لتر سكروز و 7.5 جرام/لتر آجار-أجار وضبط الرقم الهيدروجيني للوسط على 5.5 قبل إضافة الآجار- آجار و الفحم المنشط والذي أضيف بتركيز 2 جرام/لتر للحد من ظاهرة تضخم الجذور التي تظهر أحيانا.

تشكل عملية الأقلمة للنباتات الناتجة مخبريا في معظم الأحيان المرحلة الأكثر حرجاً للإكثار الدقيق باستخدام تقنيات زراعة الأنسجة. فقد تم في هذه المرحلة نقل النبيتات المجذرة مخبرياً إلى أصص

صغيرة من البيتموس المضغوط القابل للتحلل والحاوية على خلطة زراعية معقمة حرارياً ومؤلفة من بتموس و فيرميكولايت بنسبة ١:٣. رويت النبيتات بمحلول مغذي مخفف من الأملاح المعدنية (Murashige and Skoog 1962) يحتوي على مضاد فطري (بنلايت بنسبة ١%)، وتمت تغطيتها بطبقة رقيقة من البولي إثيلين الأبيض الشفاف وذلك بشكل ناقوس لتأمين قدر عال من الرطوبة الجوية وهي في البيت الزجاجي. تم فتح الغطاء بعد شهر من الزراعة ومتابعة العناية بالنباتات الجديدة من ري وتسميد ومكافحة ثم نقلت إلى أصص بلاستيكية أكبر حجماً.

أستخدم في هذه التجارب التصميم الكامل العشوائية بأربع مكررات يضم كل منها 20أنبوب اختبار، ثم أخذت القراءات حول تأثير المعاملات على النسبة المئوية لتفتح البراعم الجانبية، و عدد النموات المورقة /العقلة العقدية، ومتوسط طول النموات بعد 6 أسابيع من الزراعة الأولية أو الثانوية ماعدا مرحلة التجذير فقد أخذت القراءات بعد أربعة أسابيع. ثم حللت البيانات إحصائيا على الحاسوب باستخدام البرنامج Costat و تحليل التباين ANOVA لحساب أقل فرق معنوي (L.S.D.) بين متوسطات تأثير المعاملات على الصفات المدروسة على المستوى (5 %) (Gomez و Gomez 1984).

إنتاج الكدب (Callus) وإعادة النمو(Regeneration)

تم في هذه المرحلة استخدام العديد من الأجزاء النباتية الناتجة مخبريا(سلاميات، أوراق وجذور). حيث زرعت المادة النباتية على بيئة زراعية تحتوي على المحلول المعدني (MS) مضافا له المحلول الفيتاميني (Navarro وآخرون 1975)، 30 جرام/لتر سكاروز و 8 جرام /لتر آجار- آجار بالإضافة إلى تراكيز مختلفة من NAA (0 ، 0.25 ، 0.5 ، 1 ، 2 ملجرام/لتر) و BAP (0.25 ملجرام/لتر) ووضعت الزراعات في الظلام وبعد ستة أسابيع تم أخذ القراءات لتحديد النسبة المئوية لتشكل الكدب.

ومن أجل إعادة النمو (Regeneration) فقد تم زراعة الكدب (Callus) الناتجة سابقا بمختلف أنواعها على وسط مغذي يختلف عن الذي نتجت فيه، برفع نسبة السكر إلى 4% واستخدام الزياتين

(Zeatine) بتراكيز مختلفة (0.5 ، 1 ، 2 ملجرام/لتر) و NAA (0.5 ملجرام/لتر) على الظلام أو بوجود 16 ساعة ضوء يوميا وبعد شهر من الزراعة يتم فحص العينات بمساعدة مكبرة ضوئية مزدوجة (Stereomicroscope) لتحديد عدد العينات التي أعطت براعم عرضية وعدد البراعم العرضية المتشكلة في كل عينة. وقد استمرت هذه المرحلة أربعة أشهر حيث أجريت عدة زراعات ثانوية للكدب بمعدل واحدة كل شهر حيث استطاع الكدب الجنيني إعطاء براعم عرضية و نموات ساقية متطورة.

أستخدم في هذه التجارب التصميم العاملي كامل العشوائية (Completely Randomized Factorial) بخمسة مكررات كل منها طبق بتري (15 x 100مم) يحتوي على سبع عينات نباتية لكل معاملة ويتم مقارنة المتوسطات باستخدام تحليل التباين ANOVA لحساب أقل فرق معنوي (L.S.D.) بين متوسطات المعاملات على المستوى (5 %).

معاملات وقف الانقسام الخلوي Antimitotics

تم في هذه المرحلة استخدام أجزاء نباتية مختلفة ناتجة ضمن الأنابيب (*In vitro*) من نوعين من الجارديني (*G.jasminoides*, *G. thunbergia*): عقل ساقية فيها اثنين من البراعم الجانبية، عقل ورقية، عقل جذرية وسلاميات ساقية، حيث تم معاملة هذه الأجزاء النباتية بتراكيز مختلفة لمواد معيقة للانقسام الخلوي: الكولشيسين (Colchicine) (125 ، 250، 500 و 1000 ملجرام/لتر) أو اوريزالين (Oryzalin) (5 ، 10، 20 و 40 ملجرام/لتر) ولمدة زمنية مختلفة (2، 4، 8 يوم) .

ومن أجل ذلك وضعت العقل الساقية في وسط سائل يحتوي على الوسط MS مضافا له كولشيسين (Colchicine) أو اوريزالين (Orizaline) بوجود 1.5% من Dimethylsulfoxide (DMSO) الذي يساعد على دخول مادة التضاعف إلى داخل الأنسجة النباتية، أما شاهد التجربة فيحتوى على الوسط الغذائي و1.5% DMSO فقط، وذلك في دورق(Erlenmeyer) على جهاز هزاز بسرعة(60 rpm) في غرفة حضانة مكيفة بعيدا عن الضوء وعلى درجة حرارة 24 ± 2 درجة مئوية نهارا و 22 ± 2 درجة مئوية ليلا .

وبعد انتهاء زمن المعالجة يتم غسل الأجزاء النباتية ثلاث مرات بماء مقطر ومعقم ثم تعاد زراعتها في أطباق بتري تحتوي على بيئة صلبه مؤلفة من MS مضافا له 0.5 و1 ملجرام /لتر من IAA و BAP على التوالي لتشجيع نمو وتطور البراعم الجانبية إلى نموات جديدة، وذلك بمعدل 6 أطباق بتري لكل معاملة ويحتوي كل منها على 5 عقل ساقية. كما يتم فصل بعض البراعم الجانبية(adjacent buds) من الأنسجة وفحصها تحت المكبرة لتحديد النسبة المئوية لموت البراعم تحت تأثير تركيز المواد المستخدمة لوقف الانقسام الخلوي. وبعد 8 أسابيع من الزراعة تخضع النموات الناتجة إلى اختبار التضاعف.

إضافة لذلك وفي المرحلة الأولية لإنتاج الكدب فقد تم معالجة بعض الأجزاء النباتية (أوراق، سلاميات ساقية وعقل جذرية) بالكولشيسين (250، 500 ملجرام/لتر) والأوريزالين (10، 20 ملجرام/لتر) ولمدة 2 ، 4 و 8 يوم قبل زراعتها على وسط MS مضافا له 2 و 0.25 ملجرام/لتر لكل من NAA و BAP على التوالي لتحريض تشكل الكدب حيث أستخدم لكل معاملة 6 مكررات ممثلة بأطباق بتري يحتوي كل منها على سبع عينات نباتية، وبعد 6 أسابيع من الزراعة يتم فحص العينات وتحديد النسبة المئوية لتشكل الكدب .

ومن أجل إعادة النمو فقد تم زراعة الكدب الناتجة عن السلاميات الساقية ولعدة زراعات ثانوية على وسط MS مضافا له 2 و 0.5 ملجرام /لتر لكل من Zeatine و NAA على التوالي وذلك بمعدل زراعة كل شهر، وبعد ذلك نقلت الكدب الجنينية بعمر ثلاثة أشهر على نفس الوسط مضافا له الكولشيسين (250 ، 500 ملجرام/لتر) أو الأوريزالين (10 ، 20 ملجرام/لتر) ولمدة (2 ،4 ، 8 يوم) وذلك في المرة الأخيرة للزراعة الثانوية قبل إعادة النمو و بمعدل 5 أطباق بتري يحتوي كل منها 7 كدب لكل معاملة.

ضبطت كل الأوساط المستخدمة على رقم هيدروجيني (pH= 5.5) قبل إضافة 2 جرام /لتر فيتاجيل (Phytagel) ماركة (Sigma) وعقمت لمدة 20 دقيقة على الدرجة121 مئوية بواسطة المعقم

الرطب (Autoclave) ، أما الكولشيسين فقد ذوب في ماء مقطر والأوريزالين في كحول تركيز ٧٠%، وكلا المحلولين تم تعقيمهما بالفلتره وإضافتهما للوسط بعد تعقيمه.

لقد تم تحديد مستوى الصيغة الصبغية (Ploidy level) أو التغيرات الناتجة في النموات المخبرية عن استخدام معيقات الانقسام الخلوي (الكولشيسين والأوريزالين) بواسطة جهاز Flow Cytometry (PA) من شركة Partec وباستخدام محاليل عالية التوضيح للـ DNA في نواة الخلية (High Resolution DNA Kit Type P) إنتاج شركة بارتك أيضا (Partec 05-5002) ،حيث يؤخذ جزء من ورقة بمساحة 0.5 – 1سم٢ وتقطع بواسطة شفرة حلاقة ضمن 0.4 مل من محلول لعزل الأنوية (Nucleic extraction buffer) وتترك لمدة 5 دقائق ثم تلون الأنوية بإضافة 1.6 مل من محلول ملون (Staining buffer) الذي يوضح بشكل عالي لمجموع الـ DNA داخل النواة، ثم يمرر المحلول عبر فلتر من خيوط النايلون بقطر 50 ميكرومول. أما الإشعاع الضوئي النسبي لمجموع DNA النواة فيتم تحليله بواسطة جهاز قياس التدفق الضوئي الخلوي عبر فلتر ضوئي متوافق مع الملون المستخدم (Partec 05-5002)، وفي كل مرة يتم فحص الـ DNA لحوالي 5000 نوية.

تظهر النتائج على شكل خطوط بيانية موضحة بقمة (Peak) واحدة أو قمتين أو أكثر حسب حالة الانقسام الخلوي من جهة ودرجة التغير أو التضاعف من جهة ثانية بالإضافة إلى عدد الخلايا المختبرة (Total Count) والمتوسط (Mean) ومعامل التباين (CV%).

عندما يكون عدد النموات المختبرة والناتجة عن البراعم الجانبية أو الناتجة من الكدب (Callus) كافية يتم استخدام SAS/STAT (SAS 1989) لتحديد التباين بحساب أقل فرق معنوي على المستوى (5%).

النتائج والمناقشة

أولاً- الإكثار المخبري

لدى دراسة الشروط المخبرية والبيئات اللازمة لإكثار الجارديني تبين بأن النسبة المئوية المثلى لتفتح البراعم الجانبية في الزراعة الأولية كانت بوجود التراكيز العالية من BAP (1، 1.5 و2 ملجرام/لتر) حيث لا يوجد فرق معنوي بين تأثير التركيز ين 1 و 1.5 ملجرام/لتر في حين يتفوق عليهما التركيز 2 ملجرام/لتر في كلا النوعين المدروسين. في حين أن التركيز 2 ملجرام/لتر متفوق على كافة التراكيز عدا التركيز 1.5 ملجرام /لتر من حيث تأثيره على متوسط عدد النموات الناتجة بالعقلة. أما بالنسبة إلى طول النموات فقد تفوق كل من الشاهد و التراكيز المنخفضة على التراكيز العالية 1.5 و2 ملجرام/لتركما هو موضح في الجدول رقم(1).

جدول رقم (١): تأثير تركيز السيتوكينين (BAP) في الوسط المغذي على نجاح الزراعة الأولية.

تركيز BAP (mg/l)	% لتفتح البراعم		متوسط عدد النموات /العقلة		متوسط طول النمو /سم	
	Gardenia jasminoides	Gardenia thunbergia	Gardenia jasminoides	Gardenia thunbergia	Gardenia jasminoides	Gardenia thunbergia
0.00	25.3 d	19.1 d	1.2 e	1.1 d	2.4 a	1.9 a
0.25	33.8 d	22.5 d	1.7 d	1.6 c	2.1 ba	1.7 a
0.50	60.4 c	58.4 c	2.1 c	2.3 b	2.0 ba	1.7 a
1.00	86.7 b	80.1 b	2.3 cb	2.6 ba	1.7 bc	1.3 ba
1.50	93.3 ba	86.2 ba	2.4 b	2.9 a	1.5 c	1.1 bc
2.00	100.0 a	89.9 a	2.7 a	3.1 a	0.8 d	0.5 c

المعاملات التي تحمل أحرف متشابهة في العمود الواحد ليس بينها أي فرق معنوي على اختبار L.S.D على المستوى 5 %.

تعطي العقدة الساقية عادة العديد من النموات المورقة ،نتيجة تفتح البراعم الجانبية الثانوية حسب ما ذكره Altman و Goren (1978) أو نتيجة التفرع الثانوي حسب مشاهدة Nozeran وآخرون(1983) . وحسب Gaspar (1988) فإن تأثير تركيز السيتوكينين قليل جدا على مستوى القمة النامية الساقية من أجل الإكثار ضمن الأنابيب، وقبله أوضح Koda وOkazawa (1978) بأن تكون السيتوكينين يتم في مستوى القمة النامية الجذرية، لذلك فإن العقلة الساقية تتطلب تركيز معين من السيتوكينين المضاف إلى الوسط المغذي لتطورها. وهكذا يمكن إكثار الجارديني بمعزل عن استخدام الأوكسين ولكن بنسبة نجاح

منخفضة حيث أن استخدام بنزيل آمينو بورين (BAP) بمفرده يؤمن نسبة تفتح عالية للبراعم الجانبية ولكن مع وجود بعض التدني في نوعية النموات الناتجة وطولها لذلك كان لابد من استخدام الأوكسين بالمشاركة لمؤازرة دور السيتوكينين في الإكثار وكذلك تحسين نوعية النموات الناتجة. وتوضح القيم المدونة في الجدول (2) عدم وجود فروق معنوية بين تأثير عدم وجود الأوكسين أ و وجوده بتراكيز منخفضة من أندول أسيد أسيتيك (IAA) (0.25 و 0.5 ملجرام/لتر) في حين لعبت التراكيز العالية (0.75 و 1 ملجرام /لتر) دوراً سلبياً على تفتح البراعم مع تشكل الكدب على قواعد العقل. أما متوسط عدد النموات فقد تناقص مع وجود الأوكسين حيث تفوق الشاهد على كافة التراكيز، لكن متوسط طول النموات قد ازداد بوجود الأوكسين في الوسط المغذي وكان أفضلها على 0.5 و 0.75 ملجرام /لتر حيث لا يوجد فرق معنوي بينهما في حين تفوقا معنويا على كل من الشاهد و 0.25 ملجرام/لتر . ومن هنا نستنتج ضرورة وجود السيتوكينين و الأوكسين معا في الوسط المغذي، حيث كان أفضلها عند مشاركة (BAP و IAA) على التراكيز 1 و 0.5 ملجرام/لتر على التوالي، للحصول على أفضل النتائج في مرحلة الإكثار وعلى الأخص نوعية النموات الناتجة والصالحة للتجذير.

جدول رقم (٢): تأثير تركيز الأوكسين (IAA) في الوسط المغذي على نجاح الزراعة الأولية بوجود ١ملغ/لتر من BAP .

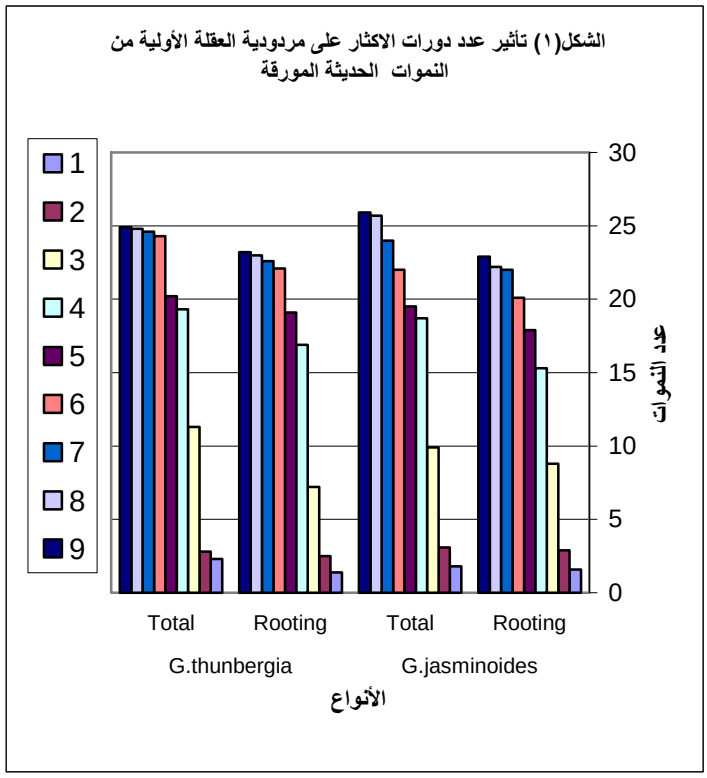
تركيز IAA (mg/l)	% لتفتح البراعم		متوسط عدد النموات /العقلة		متوسط طول النمو /سم	
	Gardenia jasminoides	Gardenia thunbergia	Gardenia jasminoides	Gardenia thunbergia	Gardenia jasminoides	Gardenia thunbergia
0.00	86.7 a	73.3 b	2.3 a	2.6 a	1.7 d	1.3 c
0.25	88.3 a	80.1 a	1.8 b	2.5 ab	3.0 c	1.8 c
0.50	93.3 a	86.3 a	1.8 b	2.3 b	4.1 a	3.5 a
0.75	75.0 b	84.3 a	1.7 cb	1.6 c	3.8 ab	3.1 ab
1.00	63.3 c	77.2 ab	1.6 c	1.5 c	3.4 bc	2.6 b

المعاملات التي تحمل أحرف متشابهة في العمود الواحد ليس بينها أي فرق معنوي على اختبار L.S.D على المستوى 5 %.

ونذكر هنا بأن قاعدة النموات المورقة الناتجة هي أكثر حيوية من المناطق الوسطى والعليا، لذلك استخدمت التقنية بقص هذه النموات بعد ترك قواعدها على العقلة الأولية (العقلة الأم) والتي أعيدت زراعتها على وسط جديد يحتوي على 1 ملجرام/لتر (BAP) و 0.5 ملجرام/لتر(IAA)، والذي سمح

بتطور جيل جديد من البراعم الجانبية إلى نموات مورقة على هذه القواعد، والتي قادت إلى تحقيق زراعة متكررة للعقلة الأم على وسط جديد كل 6 أسابيع (دورة زراعية) واستمرت حتى 9 دورات. وهذه سمحت بالحصول على ما يسمى أرومة إكثار حقيقية من الدورة الثالثة بالإضافة إلى رفع مردود العقلة من النموات المورقة، حيث تقطع النموات الصالحة للتجذير وتترك قواعدها على العقلة التي يعاد زراعتها كل 6 أسابيع.

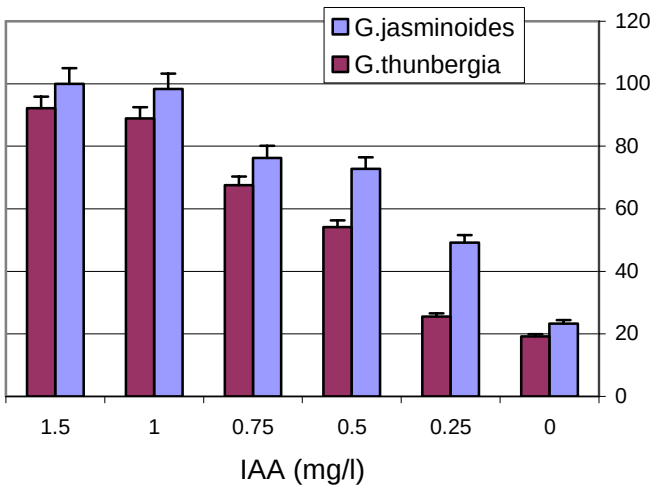
وهكذا فإن متوسط ما تنتجة العقلة الواحدة من النموات المورقة الصالحة للتجذير حوالي 22 نمو بالنسبة للنوع *G. jasminoides* و 22.6 للنوع *G.thunbergia* في الدورة السابعة حيث لا يوجد فروقات معنوية بين الدورات الثلاثة الأخيرة (7 و8 و9). في حين توجد فروقات معنوية واضحة بين الدورات من الأولى وحتى السابعة، لذلك ينصح بتجديد الزراعة المخبرية بعد الدورة السابعة أي بعد حوالي 10 أشهر من الزراعة الأولية الشكل رقم (1).



ومن اجل الحصول على نباتات قادرة على الحياة خارج الأنابيب من جهة والحصول على الجذور المخبرية التي ستستخدم في الحصول على الكدب اللازمة لإجراء التضاعف لاحقاً من جهة ثانية، فقد زرعت النموات (بطول 3سم) الناتجة عن مرحلة الإكثار بعد إزالة الأوراق السفلية عن قاعدتها على وسط للتجذير يختلف عن الوسط السابق الذي نتجت عليه بتخفيض تركيز العناصر الكبرى إلى النصف وكذلك السكاروز إلى 20 جرام/لتر ووجود الأوكسين (IAA) على تراكيز مختلفة.

يوضح لنا الشكل (2) تأثير تراكيز الأوكسين IAA على النسبة المئوية للتجذير. لقد تفوق الأوكسين بكافة تراكيزه على الشاهد كما لم يكن هناك فرق معنوي بين التركيزين 0.5 و 0.75 ملجرام/لتر. و لكنهما تفوقا على التركيز 0.25 ملجرام/لتر، في حين التراكيز العالية (1 و 1.5 ملجرام /لتر) متفوقة على التراكيز الأخرى دون وجود فرق معنوي بينهما، وبذلك يكون التركيز 1 ملجرام /لتر من الأوكسين هو الأفضل حيث نسبة التجذير 98.3 %. للنوع *G.jasminoides* و88.9 % للنوع *G.thunbergia* . وقد لوحظ تضخم الجذور على التراكيز العالية (1 و 1.5 ملغ/لتر)، لذلك استخدام الفحم النشط بتركيز 2 ملجرام /لتر، والذي قلل من عدد الجذور ومن تضخمها مع تطور الجذور الثانوية.

الشكل (٢) تأثير تركيز الأوكسين IAA على النسبة المئوية للتجذير



ثانيا- إنتاج الكدب(Callus)

تم في هذا المرحلة دراسة الشروط اللازمة للحصول على الكدب من أجزاء نباتية مختلفة و الناتجة ضمن الأنابيب، حيث زرعت المادة النباتية في أطباق بتري تحتوي على المحلول المعدني (MS) مضافا له تراكيز مختلفة من نفتالين حمض الخليك(NAA) و 0.25 ملجرام/لتر من بنزيل آمينو بورين (BAP). وتشير النتائج المدونة في الجدول (3) إلى أن الأجزاء النباتية المستخدمة متفاوتة في استجابتها لتشكيل الكدب فقد تفوقت كل من الأوراق والجذور على السلاميات في كلا النوعين، كما إن تأثير منظمات النمو تناسب طرديا مع زيادة التركيز، فالتراكيز العالية للأوكسين (1 و 2 ملجرام /لتر) هي من أعطى أفضل النتائج بوجود 0.25 ملجرام /لتر من (BAP). وقد كانت كدب الأوراق أكثر قدرة على التكاثر والتطور من كدب الجذور والسلاميات. و إن مشاركة منظمات النمو (BAP, NAA) بتركيز(2 و 0.25 ملجرام/لتر) على التوالي قد أعطى أعلى نسبة لتشكل الكدب. وستشكل هذه الكدب الناتجة المادة النباتية اللازمة لاحقا لإحداث التضاعف والحصول على نباتات مضاعفة العدد الكروموزومي في نوعين من الجاردينيا. وبذلك فإن مشاركة الأوكسين بتراكيز أعلى بكثير من السيتوكينين في الوسط كان له الدور الكبير في تشكل الكدب، وهذا متفق مع كل من Nawa و Ohtani (1992) على الجاردينيا .

جدول رقم(٣): تأثير تركيز (NAA) على تشكل الكدب (Callus) بوجود ٠,٢٥ ملجرام/لترمن (BAP).

تركيز (NAA) mg/L	النسبة المئوية لتشكل الكدب (%)						المتوسط
	Gardenia jasminoides			Gardenia thunbergia			
	سلاميات	أوراق	جذور	سلاميات	أوراق	جذور	
0.00	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	**00.0**
0.25	18.2	21.5	20.5	19.5	25.6	30.2	**22.6**
0.50	38.9	52.5	50.1	42.5	57.3	55.6	**49.5**
1.00	60.2	78.9	88.5	79.6	84.2	86.3	**79.6**
2.00	97.6	100.0	100.0	89.1	98.4	96.7	**97.0**
المتوسط	**45.8**	**58.7**	**59.9**	**57.7**	**66.4**	**67.2**	
L.S.D.5%	03.2	04.5	03.4	05.6	06.6	04.5	

ثالثا- إعادة النمو من الكدب (Regeneration)

تم في هذه المرحلة زراعة الكدب الناتجة سابقا من أجزاء نباتية مختلفة على وسط مغذي مختلف عن الوسط السابق الناتجة عنه بنسبة السكروز(4%) ووجود كل من الزياتين و NAA. وبعد أربعة زراعات ثانوية بمعدل واحدة كل شهر على الظلام أو بوجود 16 ساعة ضوء يوميا، أمكن الحصول على براعم و نموات جديدة من الكدب وبنسبة نجاح مختلفة حسب نوع الكدب المستخدمة وتركيز منظمات النمو وطريقة الزراعة.

وتبين النتائج في الجدول (4) بأن إعادة النمو من الكدب الناتج عن السلاميات يتأثر بوجود منظمات النمو في الوسط الزراعي، حيث من الضروري وجود السيتوكينين فقد أمكن الحصول على نسبة مئوية مرتفعة من الكدب القادرة على إعطاء براعم (54%) بوجود 2 ملجرام /لتر زياتين فقط بالمقارنة مع الشاهد، ولكن عند مشاركة الأوكسين (NAA) بتركيز 0.5 ملجرام/لتر مع الزياتين (2 ملجرام/لتر) وصلت النسبة إلى 67.7 % في النوع *G.jasminoides* مقابل 55.8 % في النوع *G.thunbergia* على الظلام وكذلك زادت من متوسط عدد البراعم في الكدب (4 براعم/كدب)، كما إن لمشاركة NAA والزياتين في الوسط دور فعال في زيادة النسبة المئوية لإعادة النمو وعدد البراعم المتشكلة على الضوء أيضا وفي كلا النوعين، ولكن بشكل أقل مما هو علية على الظلام . إذا هناك تأثير لمنظمات النمو على تشكل الكدب بوجود الضوء ولكن بشكل محدود جدا.

كما وجدنا أيضا بأن استجابة الكدب لإعطاء البراعم تحت تأثير الضوء كان أقل بكثير من استجابتها على الظلام حيث أن أعلى نسبة للكدب المشكلة للبراعم على الضوء لم يتجاوز 9 % ومتوسط عدد البراعم في الكدب لم يتجاوز (2 برعم) هذا بالنسبة للنوع *G.jasminoides*. وأقل من ذلك بالنسبة للنوع *G.thunbergia* .

جدول (٤): تأثير تركيز (Zeatine , NAA) على إعادة النمو(Regeneration) من كدب السلاميات .

Zeat+ NAA	ظلام		ضوء (١٦ساعة)	
mg/l	% لتشكل البراعم	عدد البراعم/ الكدب	% لتشكل البراعم	عدد البراعم/ الكدب
G.jasminoides				
0.0 + 0.0	00.0	0.0	0.0	0.0
0.5 + 0.0	03.6	1.1	0.0	0.0
1.0 + 0.0	32.6	1.6	6.2	1.2
2 .0+ 0.0	54.5	2.4	8.5	2.0
0.5 + 0.5	23.8	2.0	0.0	0.0
1.0 + 0.5	59.8	3.1	0.0	0.0
2 .0+ 0.5	67.7	4.0	6.6	1.8
L.S.D. 0.05	**9.23**	**2.1**	**5.1**	**1.6**
G.thunbergia				
0.0 + 0.0	00.0	0.0	0.0	0.0
0.5 + 0.0	01.9	1.8	0.0	0.0
1.0 + 0.0	21.3	1.9	2.6	1.6
2 .0+ 0.0	25.1	2.6	7.9	1.9
0.5 + 0.5	20.1	2.8	0.0	0.0
1.0 + 0.5	22.5	3.7	1.2	2.0
2 .0+ 0.5	55.8	4.2	1.6	2.1
L.S.D. 0.05	**08.3**	**1.9**	**4.2**	**1.4**

أما عن استجابة الكدب الناتجة عن كل من الأوراق والجذور لتشكل البراعم على الظلام فقد كانت ضعيفة جدا مقارنة باستجابة كدب السلاميات حيث تشير النتائج في الجدول رقم (5) بأن النسبة المئوية لتشكل البراعم على الكدب الورقي كان أفضلها بوجود 2 و 0.5 ملجرام/لتر لكل من الزياتين و (NAA) على التوالي، حيث وصلت إلى 27.7 % ومتوسط عدد البراعم (2.9 برعم) مقابل 7.6 % من الكدب الجذرية القادرة على إعطاء البراعم بمعدل 1.6 برعم /كدب في النوع *G.jasminoides*، هذه الفروق مابين أصل الكدب لوحظ أيضا في النوع *G.thunbergia* حيث كانت استجابة الكدب الجذرية لإعادة النمو أقل بكثير من استجابة الكدب الورقية لذلك. وقد نقلت الكدب التي أعطت البراعم إلى إضاءة لمدة ١٦ ساعة يوميا من أجل تطور هذه البراعم إلى نموات مورقة ضمن الأنابيب.

جدول (٥): تأثير تركيز (Zeatine) و (NAA) على إعادة النمو من كدب الأوراق والجذور على الظلام.

Zeat+ NAA mg/l	كدب ورقية		كدب جذرية	
	% لتشكل البراعم	عدد البراعم/ الكدب	% لتشكل البراعم	عدد البراعم/ الكدب
G.jasminoides				
0.0 + 0.0	0.00	0.00	0.0	0.00
0.5 + 0.0	0.00	0.00	0.0	0.00
1.0 + 0.0	12.60	1.10	3.2	1.10
2.0 + 0.0	14.50	1.40	2..5	1.30
0.5 + 0.5	11.60	1.20	0.0	0.00
1.0 + 0.5	13.80	2.10	3.1	1.00
2.0 + 0.5	27.70	2.90	8.6	1.60
L.S.D. 0.05	**03.23**	**0.96**	**1.2**	**0.48**
G.thunbergia				
0.0 + 0.0	0.0	0.00	0.0	0.00
0.5 + 0.0	0.0	0.00	0.0	0.00
1.0 + 0.0	10.3	1.20	3.6	1.00
2.0 + 0.0	14.1	1.60	4.9	1.20
0.5 + 0.5	10.1	1.90	0.0	0.00
1.0 + 0.5	12.5	1.70	2.1	1.00
2.0+ 0.5	25.8	2.20	6.4	2.20
L.S.D. 0.05	**0.43**	**0.68**	**2.1**	**0.26**

رابعا- معاملات وقف الانقسام

١- في البراعم الجانبية للعقل الساقية

عقل ساقية مخبرية كانت قد عوملت بالكولشيسين والأوريزالين بتراكيز مختلفة فترات زمنية مختلفة ثم زرعت ضمن أطباق بتري تحتوي على أوساط غذائية صلبة ملائمة لتطور البراعم الجانبية إلى نموات مورقة، وقد وجد بأن التراكيز العالية من الكولشيسين(1000 ملجرام /لتر) و الأوريزالين (40 ملجرام /لتر) والزمن الطويل للمعالجة (8 يوم) تؤدي إلى موت نسبة عالية من الأنسجة النباتية وعلى الأخص البراعم الجانبية (53% و 46.7 %) لكل من *G.jasminoides* و *G.thunbergia* على التوالي بوجود الكولشيسين في حين كان التأثير أكثر بوجود الأوريزالين (63.3 % و56.7 %) لكل من *G.jasminoides* و *G.thunbergia* على التوالي وهذا ما يوضحه الجدولين 6 و 7.

جدول (٦): تأثير تركيز الكولشيسين (Colchicine) وزمن المعالجة على النسبة المئوية لموت العقل الساقية المخبرية للجاردينيا.

زمن المعالجة	تركيز الكولشيسين (mg/l)					المتوسط
(يوم)	0.0	125	250	500	1000	
G.jasmioides						**15.6a**
2	0.0	0.0	03.3	06.7	40.0	10.0
4	0.0	0.0	10.1	16.7	46.7	14.7
8	0.0	6.7	20.0	30.0	53.3	22.0
G.thunbergia						**12.2a**
2	0.0	0.0	00.0	03.3	36.7	08.0
4	0.0	0.0	03.3	13.3	40.0	11.3
8	0.0	3.3	13.3	23.3	46.7	17.3
المتوسط	**0.0a**	**1.7a**	**08.3b**	**15.6c**	**43.9d**	
أقل فرق معنوي (L.S.D)	P= 0.05					
بين التراكيز	5.49					
بين الأزمنة	4.25					
بين الأنواع	3.47					

المعاملات التي تحمل أحرف متشابهة في العمود الواحد أو الصف الواحد ليس بينها أي فرق معنوي على اختبار L.S.D على المستوى 5 %.

إن التركيز السمي لمعيقات الانقسام تجلى بوضوح مع زيادة التركيز وزيادة زمن المعالجة، كما إن التراكيز المنخفضة للكولشيسين (125 ملجرام/لتر) والأوريزالين (5 ملجرام/لتر) لم يختلف تأثيرها عن الشاهد. أما بالنسبة لزمن المعالجة فقد تفوقت المعالجة لمدة 8 أيام على كل من 2 و 4 أيام حيث أن هذه

الأخيرة لا يوجد فروق معنوية بينها في حالة الكولشيسين في حين كان هناك فروق معنوية بين الأزمنة الثلاثة عند استخدام الأوريزالين (جدول 7). ولم توجد أي فروق معنوية بين النوعين المدروسين في مدى التحمل لهذه المواد المستخدمة كل على حده.

جدول (٧): تأثير تركيز الأوريزالين (Orizaline) وزمن المعالجة على النسبة المئوية لموت العقل الساقية المخبرية للجاردينيا.

زمن المعالجة	تركيز الأوريزالين (mg/l)					المتوسط
(يوم)	0.0	5	10	20	40	
G.jasmioides						**17.33a**
2	0.0	00.0	06.7	13.3	23.3	08.67
4	0.0	03.3	16.6	20.0	50.0	18.00
8	0.0	16.6	20.0	26.7	63.3	25.33
G.thunbergia						**15.33a**
2	0.0	00.0	3.3	13.3	20.0	07.33
4	0.0	03.3	13.3	16.7	46.7	16.00
8	0.0	13.3	16.7	26.7	56.7	22.67
المتوسط	**0.0a**	**6.11ab**	**12.77bc**	**19.44c**	**43.33d**	
أقل فرق معنوي (L.S.D)	P= 0.05					
بين التراكيز	7.62					
بين الأزمنة	5.9					
بين الأنواع	4.82					

المعاملات التي تحمل أحرف متشابهة في العمود الواحد أو الصف الواحد ليس بينها أي فرق معنوي على اختبار L.S.D على المستوى 5 %.

بالإضافة لذلك فقد كان لهذه المواد تأثير على مردود هذه العقل من النموات المورقة القابلة للحياة كما هو موضح في الجدولين 8 و 9 واللذين بينا أن مرود العقلة من النموات قد أنخفض مع زيادة تركيز المواد المستخدمة، فقد تفوق الشاهد معنويا على كافة التراكيز عند استخدام أي من المواد المعيقة للانقسام، كما تفوقت التراكيز المنخفضة على التراكيز المرتفعة. أما بالنسبة لزمن المعالجة فقد كان للزمن 8 أيام تأثير سلبي على المردود مقارنة بالأزمنة 2 و 4 أيام حيث تفوقا عليه، في حين لا توجد فروق معنوية على المستوى 5 % بين الأزمنة2 و 4 أيام. كما توجد فروقات معنوية بين مردود الأنواع المستخدمة بغض النظر عن المادة المستخدمة وتركيزها حيث تفوق النوع *G.thunbergia* (4.21 و 3.94 نمو/عقلة) على النوع *G.jasminoides* (3.25 و 3.1 نمو/عقلة) بوجود الكولشيسين أو الأوريزالين على التوالي.

جدول (٨): تأثير تركيز الكولشيسين (Colchicine) وزمن المعالجة على متوسط مردود العقل الساقية المخبرية للجاردينيا من النموات المورقة (نمو /العقلة).

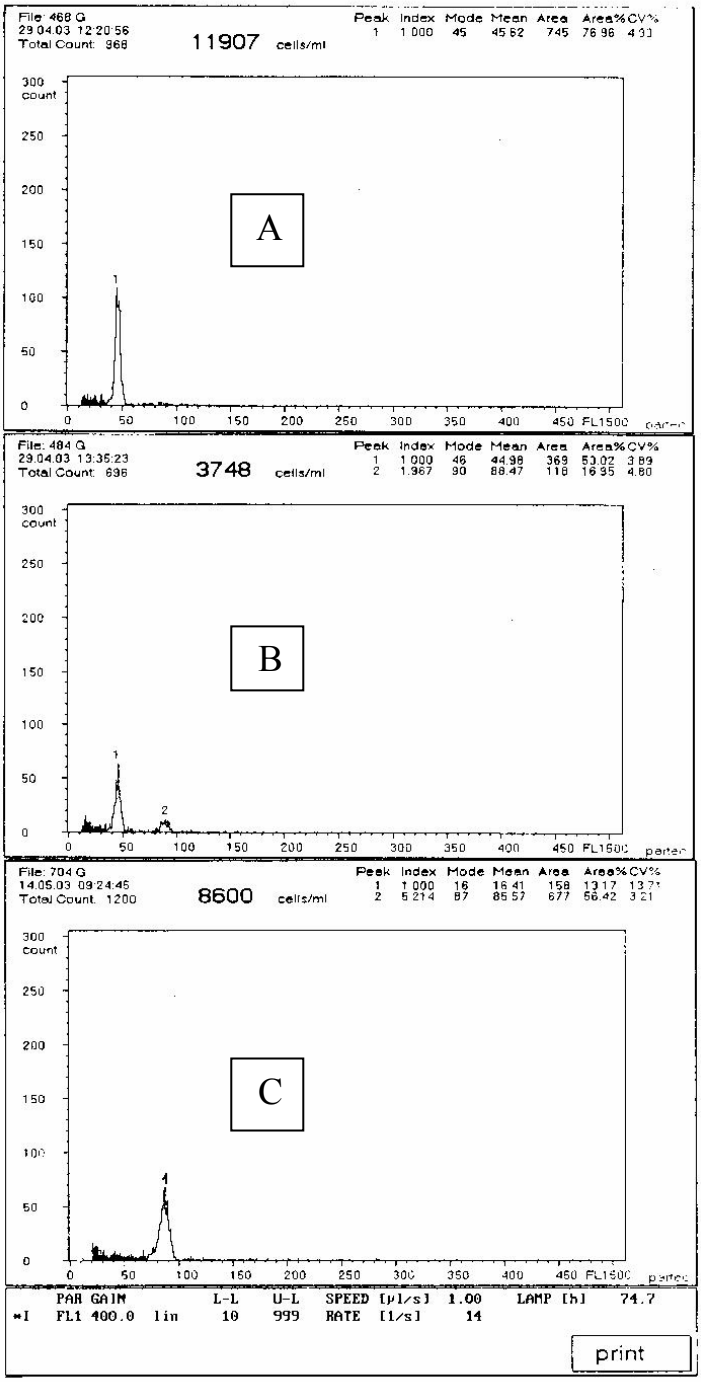
زمن المعالجة (يوم)	تركيز الكولشيسين (mg/l)					المتوسط
	0.0	125	250	500	1000	
G.jasmioides						**3.25a**
2	4.28	4.22	3.58	2.62	2.55	3.45
4	4.98	4.10	2.92	2.42	2.15	3.32
8	4.23	3.57	2.75	2.28	2.03	2.97
G.thunbergia						**4.21b**
2	5.43	4.93	4.30	4.22	3.57	4.49
4	5.20	4.80	4.10	4.12	3.42	4.33
8	4.63	4.37	4.07	3.33	2.67	3.81
المتوسط	**4.79e**	**4.33d**	**3.62c**	**3.16b**	**2.73a**	
أقل فرق معنوي L.S.D				P= 0.05		
بين التراكيز				0.41		
بين الأزمنة				0.32		
بين الأنواع				0.26		

المعاملات التي تحمل أحرف متشابهة في العمود الواحد أو الصف الواحد ليس بينها أي فرق معنوي على اختبار L.S.D على المستوى 5 %.

جدول (٩): تأثير تركيز الأوريزالين (Oryzalin) وزمن المعالجة على متوسط مردود العقل الساقية المخبرية للجاردينيا من النموات المورقة (نمو/العقلة).

زمن المعالجة (يوم)	تركيز الأوريزالين (mg/l)					المتوسط
	0.0	5	10	20	40	
G.jasmioides						**3.10a**
2	4.28	3.85	3.17	2.55	2.35	3.24
4	4.98	3.70	2.80	2.47	2.07	3.20
8	4.23	3.57	2.55	2.12	1.88	2.87
G.thunbergia						**3.94b**
2	5.43	4.83	4.23	3.65	3.22	4.27
4	5.20	4.70	4.13	3.48	3.05	4.11
8	4.63	3.90	3.37	2.88	2.33	3.42
المتوسط	**4.79d**	**4.09c**	**3.38b**	**2.86a**	**2.48a**	
أقل فرق معنوي L.S.D				P= 0.05		
بين التراكيز				0.45		
بين الأزمنة				0.35		
بين الأنواع				0.28		

المعاملات التي تحمل أحرف متشابهة في العمود الواحد أو الصف الواحد ليس بينها أي فرق معنوي على اختبار L.S.D على المستوى 5 %.



الشكل(٣) خطوط بيانيه لتحليل DNA النواة في الجاردينيا، المحور الأفقي يمثل كمية الـ DNA النووي (RFI) والمحور العمودي يوضح عدد الأنويه: (A) النبات الأم 2n (B) الشيمير Chimer، (C) مضاعف العدد الصبغي(Tetraploid).

بعد 8 أسابيع من زراعة العقل المعالجة بمعيقات الانقسام تم فحص النموات الناتجة بواسطة جهاز (Flow Cytometry) لتحديد مستوى الصيغة الصبغية لهذه النموات وقد تبين بأن هناك ثلاث أنواع من النموات كما هو موضح في الشكل (3): الأولى (A) تمثلت بظهور قمة واحدة في الخط البياني موقعها مماثل لموقع قمة النبات الأم على المحور الأفقي الممثل لكمية الـ DNA النووي (RFI)، وهذه لم يحدث بها أي تغير على مستوى التضاعف ، الثانية (B) تمثلت بوجود قمتين الأولى موقعها مطابق لموقع قمة النبات الأم والثانية في موقع على مسافة مضاعفة على المحور RFI وهذه عبارة عن نموات شيميريه (Chimers) أي حدث تغير أو تضاعف العدد الكروموزومي في عدد محدد من الخلايا، والفئة الثالثة (C) تمثلت بظهور قمة واحدة في الخط البياني لكن موقعها على مسافة مضاعفة من موقع قمة النبات الأم على المحور الأفقي الممثل لكمية الـ DNA النووي (RFI) وهذه عبارة عن نموات مضاعفة الصيغة الصبغية (Tetraploid).

لقد لعب الكولشيسين دورا فعالاً في إحداث تضاعف في العدد الكروموزومي إذا ما قارنا ذلك مع الشاهد حيث تفوقت كافة التراكيز على الشاهد في عدد النموات المضاعفة غير أن هذه التراكيز يقل تأثيرها على التراكيز العالية (1000 , 500 ملجرام/لتر) في حين تفوق التركيز 250 ملجرام/لتر معنويا على كافة التراكيز الأخرى (125 ، 500 ، 1000 ملجرام/لتر) والتي لم تلاحظ أي فروق معنوية بينها وهذا ما يوضحه الجدول رقم(10).

كذلك لعب الأوريزالين دوراً واضحا في إحداث التضاعف في النموات الناتجة عن العقل الساقية المعالجة، وقد وضح الجدول رقم (11) وجود فروق معنوية بين التراكيز المستخدمة والشاهد وكذلك تفوق التراكيز المنخفضة (5 و 10 ملجرام/لتر) على التراكيز المرتفعة (40 ملجرام/لتر) في حين تفوق التركيز(10 ملجرام/لتر) معنويا على كافة التراكيز الأخرى وأعطى أعلى نسبة للتضاعف (% 7.86) على مستوى النوعين وكافة الأزمنة المستخدمة معاً.

إن استخدام معيقات الانقسام كان له الدور الواضح في إحداث نسب من النموات المضاعفة تتفاوت فيما بينها حسب التراكيز في كلا النوعين المستخدمين، في حين بين التحليل الإحصائي عدم وجود

أي فروق معنوية بين أزمنة المعالجة في تأثيرها على النسبة المئوية للتضاعف في كلا النوعين النباتيين معاً وكذلك عدم وجود فرق معنوي بين الأنواع المستخدمة في استجابتها للتضاعف تحت تأثير كل من الكولشيسين أو الأوريزالين.

جدول (١٠): تأثير تركيز الكولشيسين (Colchicine) وزمن المعالجة على النسبة المئوية للنموات الرباعية الصيغة الصبغية (Tetraploids).

زمن المعالجة	تركيز الكولشيسين (mg/l)					المتوسط
(يوم)	0.0	125	250	500	1000	
G.jasmioides						**5.10a**
2	0.0	3.96	7.76	6.75	4.34	4.56
4	0.0	8.13	7.59	4.91	5.71	5.27
8	0.0	6.00	13.63	4.16	3.57	5.47
G.thunbergia						**3.50a**
2	0.0	3.37	6.20	4.09	2.94	3.32
4	0.0	6.94	5.04	2.80	3.22	3.60
8	0.0	4.76	8.49	2.59	2.12	3.59
المتوسط	**0.0 a**	**5.53 b**	**8.12 c**	**4.22 b**	**3.65 b**	
أقل فرق معنوي L.S.D	P= 0.05					
بين التراكيز	2.36					
بين الأزمنة	1.83					
بين الأنواع	1.61					

المعاملات التي تحمل أحرف متشابهة في العمود الواحد أو الصف الواحد ليس بينها أي فرق معنوي على اختبار L.S.D على المستوى 5 %.

جدول (١١): تأثير تركيز الأوريزالين (Orizaline) وزمن المعالجة على النسبة المئوية للنموات الرباعية الصيغة الصبغية (Tetraploids).

زمن المعالجة	تركيز الأوريزالين (mg/l)					المتوسط
(يوم)	0.0	5	10	20	40	
G.jasmioides						**4.04 a**
2	0.0	3.45	06.59	7.58	3.70	4.26
4	0.0	8.26	06.58	3.39	0.00	3.64
8	0.0	5.61	11.29	4.26	0.00	4.23
G.thunbergia						**3.56 a**
2	0.0	3.45	06.56	5.21	2.27	3.50
4	0.0	7.35	05.56	3.41	0.00	3.26
8	0.0	5.94	10.59	3.13	0.00	3.93
المتوسط	**0.0 a**	**5.68 b**	**7.86 c**	**4.49 b**	**1.00 a**	
أقل فرق معنوي L.S.D	P= 0.05					
بين التراكيز	1.99					
بين الأزمنة	1.54					
بين الأنواع	1.26					

المعاملات التي تحمل أحرف متشابهة في العمود الواحد أو الصف الواحد ليس بينها أي فرق معنوي على اختبار L.S.D على المستوى 5 %.

لم يقتصر تأثير تركيز معيقات الانقسام على إعطاء نموات مضاعفة الصيغة الصبغية بل كان لها دور أخر تجلى بإعطاء نموات شيميرية اختلفت نسبتها حسب المادة المستخدمة وتركيزها، والتي ظهرت بشكل قمتين على محور حساب العدد الكروموزومي في الشكل (3). ويوضح لنا الجدول رقم (12) بان للكولشيسين تأثير مختلف على النسبة المئوية للنموات الشيميرية حسب التركيز المستخدم، فعند أخذ كافة المعاملات معا بعين الاعتبار نحد بأن التركيز(1000 ملجرام/لتر) قد تفوق على كل من الشاهد والتركيز(125 ملجرام/لتر) في حين لا توجد أية فروقا معنوية بين التراكيز العالية بتأثيرها على إنتاج النموات الشيميرية، أما عن الفرق بين الأنواع في استجابتها لمعيقات الانقسام فقد تفوق النوع *G.thunbergia* على النوع *G.jasminoides* حيث وصل متوسط النموات الشيميرية للنوع الأول (9.54 %) مقابل (6.43 %) للنوع الثاني ، في حين لا توجد أي فروق معنوية بين أزمنة المعالجة الثلاثة المستخدمة. هذه النتائج كانت مشابهة جدا لتأثير الأوريزالين على إنتاج النموات الشيميرية، فقد تفوق التركيز العالي (40 ملجرام/لتر) معنويا على كافة التراكيز الأخرى حيث وصلت النسبة إلى (15.79 %) مقابل (8.23 %) عند التركيز (5 %)، وكذلك تفوق النوع *G.thunbergia* معنويا على النوع *G.jasminoides* في إنتاج النموات الشيميرية، في حين لم يتفوق أي من أزمنة المعالجة الثلاثة (2 ، 4 ، 8 يوم) في تأثيرها على إنتاج هذا النوع من النموات كما هو موضح في الجدول رقم (13).

وبشكل عام نجد بأن معيقات الانقسام كان لها دور واضح بتأثيرها على نسبة النموات الرباعية الصيغة الصبغية وكذلك نسبة النموات الشيميرية، كما إن التركيز العالية كان لها الدور الأكثر تفوقا في إنتاج النموات الشيميرية وعلى العكس من ذلك في إنتاج النموات الرباعية حيث تفوقت التراكيز الدنيا، كما لم نلحظ أي دور للنوع النباتي في استجابته للتضاعف في حين تجلى هذا الدور في إنتاج النموات الشيميرية، أما عن أزمنة المعالجة فلم نلحظ أي تأثير لها على إنتاج النموات الشيميرية أو المضاعفة.

جدول (١٢): تأثير تركيز الكولشيسين (Colchicine) وزمن المعالجة على النسبة المئوية للنموات الشيميرية (Chimeric).

زمن المعالجة	تركيز الكولشيسين (mg/l)					المتوسط
(يوم)	0.0	125	250	500	1000	
G.jasmioides						**0 9.45b**
2	0.0	08.70	12.16	13.59	10.32	08.95
4	0.0	11.43	13.11	12.66	14.63	10.37
8	0.0	07.14	10.42	10.61	17.00	09.03
G.thunbergia						**06.43a**
2	0.0	05.88	07.38	10.85	08.11	06.44
4	0.0	06.54	07.48	08.40	11.81	06.83
8	0.0	04.26	06.49	06.60	12.70	06.01
المتوسط	**0.0a**	**7.31b**	**9.51bc**	**10.45bc**	**12.43c**	
أقل فرق معنوي L.S.D	P= 0.05					
بين التراكيز	3.41					
بين الأزمنة	2.62					
بين الأنواع	2.16					

المعاملات التي تحمل أحرف متشابهة في العمود الواحد أو الصف الواحد ليس بينها أي فرق معنوي على اختبار L.S.D على المستوى 5 %.

جدول (١٣): تأثير تركيز الأوريزالين (Oryzalin) وزمن المعالجة على النسبة المئوية للنموات الشيميرية (Chimeric).

زمن المعالجة	تركيز الأوريزالين (mg/l)					المتوسط
(يوم)	0.0	5	10	20	40	
G.jasmioides						**10.58b**
2	0.0	09.41	13.64	15.38	16.21	10.93
4	0.0	12.12	13.56	13.16	16.51	11.07
8	0.0	7.69	10.64	11.29	19.1	09.74
G.thunbergia						**07.89a**
2	0.0	06.55	09.38	11.48	12.97	08.04
4	0.0	07.14	09.09	09.26	13.24	07.75
8	0.0	06.45	07.81	08.24	16.83	07.87
المتوسط	**0.0a**	**8.23b**	**10.7b**	**11.47b**	**15.79c**	
أقل فرق معنوي L.S.D	P= 0.05					
بين التراكيز	3.65					
بين الأزمنة	2.83					
بين الأنواع	2.31					

المعاملات التي تحمل أحرف متشابهة في العمود الواحد أو الصف الواحد ليس بينها أي فرق معنوي على اختبار L.S.D على المستوى 5 %.

٢ـ في الكدب و النموات الناتجة عنها:

لقد استخدمت معيقات الانقسام في هذا الجزء من البحث بشكلين : الشكل الأول بمعالجة العينات النباتية بمعيقات الانقسام قبل زراعتها على الوسط المشجع لتشكل الكدب، والشكل الثاني بإضافة معيقات الانقسام لوسط الزراعة في المرحلة ما قبل النهائية من إعادة النمو. هذا وقد لعبت معيقات الانقسام المستخدمة قبل الزراعة دوراً سلبياً في تشكل الكدب حيث كانت نسبة السلاميات المعالجة بها و التي أعطت الكدب بعد الزراعة على MS أقل من تلك السلاميات التي أقتصر محلول المعالجة فيها على الماء المقطر و DMSO بنسبة 1.5. ويبين لنا الجدول (14) بأن المعالجة بالكولشسين مهما كان التركيز قد أدت إلى انخفاض نسبة الكدب المتشكلة مقارنة بالشاهد حيث تفوق التركيز 0 ملجرام/لتر على كل من التركيزين 250 و 500 ملجرام/لتر والتي لا توجد أي فروق معنوية بينها، هذا التفوق انطبق أيضا على النسبة المئوية للكدب التي أعطت نموات جديدة وكذلك متوسط عدد النموات في الكدب الواحد في كلا النوعين المدروسين ما عدا متوسط عدد النموات في كدب النوع *G.thunbergia* حيث يقل المتوسط مع زيادة التركيز فقد تفوق كل من الشاهد و250 ملجرام/لتر على التركيز500 ملجرام/لتر. أما بالنسبة لأزمنة المعالجة فلم نجد أي فروق معنوية بينها من حيث تأثيرها على النسبة المئوية لتشكل الكدب والنسبة المئوية للكدب المعطية للنموات ولا متوسط عدد النموات، وكذلك لا توجد فروق معنوية بين الأنواع المدروسة في استجابتها لتشكل الكدب وكذلك متوسط عدد النموات في حين تفوق معنويا النوع *G.jasminoides* على النوع *G.thunbergia* بالنسبة المئوية للكدب القادرة على إعطاء نموات فقط.

أما الأوريزالين فقد ازداد تأثيره بازدياد التركيز والذي تجلى بتناقص النسبة المئوية لتشكل الكدب وكذلك نسبة الكدب المنتجة للنموات ومتوسط عدد النموات في الكدب، حيث تفوق معنويا التركيز20 ملجرام/لتر على الشاهد وكذلك على التركيز10 ملجرام/لتر الذي تفوق بدوره على الشاهد أيضا بالنسبة لكافة الدراسات وعلى مستوى النوعين المدروسين، هذا بالنسبة لتأثير تركيز الأوريزالين، أما عن تأثير زمن المعالجة فلا توجد أي فروق معنوية بين الأزمنة الثلاثة المستخدمة في تأثيرها على كافة الدراسات، وكذلك لا توجد فروق أيضا بين الأنواع النباتية المستخدمة في استجابتها للأوريزالين إلا فقط على مستوى

النسبة المئوية لتشكل الكدب حيث تفوق النوع *G.jasminoides* على النوع *G.thunbergia* ، وهذا ما يوضحه الجدول رقم (14) والذي يبن لنا أيضا بأن سمية الأوريزالين على الأنسجة النباتية المستخدمة كانت عالية وخاصة على التراكيز العالية حيث انخفضت النتائج إلى أكثر من النصف عند التركيز20 ملجرام/لتر مقارنة بالتركيز10 ملجرام/لتر وأكثر من ذلك بكثير إذا ما قورنت بالشاهد (0 ملجرام /لتر). ولكن نتيجة فحص النموات الناتجة باستخدام جهاز الـ Flow Cytometry لم تبين وجود أي تغير في هذه النموات فقد ظهرت كلها بقمة واحدة على محور كمية الـ DNA في موقع مماثل لموقع النبات الأم، و يعزى ذلك إلى أن هذه النموات ناتجة عن مجموعة من الخلايا التي لم يحدث فيها تغير وخاصة وإن هذه النموات نتجت بعد عدة زراعات ثانوية للكدب وصلت إلى أربعة بمعدل واحدة كل شهر.

جدول رقم (١٤): تأثير معيقات الانقسام على تشكل كدب (Callus)السلاميات وإعادة النمو(Regeneration) عند إضافة معيقات الانقسام في المراحل الأولى لتشكل الكدب

G.thunbergia			G.jasminoides					
متوسط عدد النموات	نسبة الكدب مع نموات	نسبة تشكل الكدب	متوسط عدد النموات	نسبة الكدب مع نموات	نسبة تشكل الكدب	الزمن يوم	التركيز mg/l	المادة
4.1b	**55.2b**	**89.1b**	**4b**	**62.2b**	**92.4b**	-	-	بدون
4.2	51.2	81.3	3.9	60.6	87.3	2	250	colchicine
4.0	49.9	78.6	3.6	56.3	80.5	4		
3.8	46.3	69.9	3.5	53.8	74.9	8		
4b	**49.1a**	**76.6a**	**3.7a**	**56.9a**	**80.9a**			متوسط
3.6	55.3	82.2	3.9	60.3	88.2	2	500	
3.4	50.1	78.2	3.7	59.1	82.2	4		
3.8	41.3	65.8	3.7	48.3	67.8	8		
3.6a	**48.9a**	**75.4a**	**3.8a**	**55.9a**	**79.4a**			متوسط
			0.2	3.83	1.96	بين التراكيز		L.S.D. 5%
			0.37	6.22	10.6	بين أزمنة المعالجة		
			0.08	6.66	13.9	بين الأنواع		
4.1c	**55.2c**	**89.1c**	**4c**	**62.2c**	**92.4c**			بدون
3.5	50.0	51.2	3.2	53.9	76.9	2	10	Oryzalin
3.2	49.5	66.8	3.1	53.8	79.6	4		
2.8	44.2	70.1	3.4	50.2	76.5	8		
3.2b	**47.9b**	**62.7b**	**3.2b**	**52.6b**	**77.7b**			متوسط
2.3	25.4	32.6	2.5	29.5	34.5	2	20	
0.0	0.0	29.5	1.2	18.5	32.5	4		
0.0	0.0	30.1	0.0	0.0	32.8	8		
0.8a	**8.5a**	**30.7a**	**1.2a**	**16a**	**33.3a**			متوسط
			0.195	2.9	2.21	بين التراكيز		L.S.D. 5%
			2.09	35.86	38.25	بين أزمنة المعالجة		
			1.149	12.63	3.8	بين الأنواع		

* المعاملات التي تحمل أحرف متشابهة في نفس العمود ليس بينها أي فرق معنوي على اختبار L.S.D على المستوى 5 %.

إن إضافة معيقات الانقسام للوسط الزراعي (MS) في المرحلة الأخيرة لإعادة النمو، كان له تأثير على النسبة المئوية للكدب المعطية للنموات من جهة وكذلك على النسبة المئوية للنموات المضاعفة و الشيميرية من جهة ثانية. لقد وضحت النتائج في الجدول رقم (15) تفوق الشاهد معنويا على المعاملات التي تحتوي على الكولشيسين في إنتاج الكدب المعطي للنموات، ولكن لا توجد فروقا معنوية بين تركيزي الكولشيسين (250 و 500 ملجرام /لتر) المستخدمين بتأثيرهما على النسبة المئوية للكدب المنتجة للنموات، في حين تفوق التركيز 500 ملجرام/لتر على التركيز250 ملجرام/لتر وعلى الشاهد بإنتاج النموات المضاعفة الصيغة و النموات الشيميرية، في حين لم تلحظ أي فروق معنوية بين أزمنة المعالجة بتأثيرها على كافة المعايير المدروسة.

لقد أبدى الأوريزالين فاعلية أقوى من الكولشيسين حيث أن النسبة المئوية للكدب المنتجة تناقصت كثيرا عند التركيز20 ملجرام /لتر والتي وصلت إلى 16% مقابل 63 و 67.7 % عند التركيز 10 و 0 ملجرام/لتر على التوالي، وبذلك فقد تفوق الشاهد(0 ملجرام/لتر) معنويا على كل من التركيزين 10 و 20 ملجرام/لتر وكذلك تفوق التركيز 10 ملجرام/لتر معنويا على التركيز20 ملجرام/لتر بالنسبة للكدب المنتجة للنموات. أما بالنسبة لإنتاج النموات المضاعفة فقد تفوق التركيز 10 ملجرام/لتر معنويا على كل من الشاهد والتركيز 20 ملجرام /لتر الذي تفوق بدوره على الشاهد، في حين لا توجد فروق معنوية بين تركيزي الأوريزالين المستخدمين واللذين تفوقا معنويا على الشاهد بإنتاج النموات الشيميرية، كذلك لا توجد أي فروق بين أزمنة المعالجة بتأثيرها على كل من النسبة المئوية للكدب المنتجة للنموات والنسبة المئوية للنموات الشيميرية وكذلك المضاعفة.

جدول رقم (١٥): تأثير معيقات الانقسام على إعادة النمو(Regeneration) من كدب سلاميات G.jasminoides ونسبة النموات المضاعفة الصيغة والشيميرية عند إضافة معيقات الانقسام في المراحل الأخيرة لإعادة النمو

المادة	التركيز mg/l	الزمن يوم	نسبة الكدب مع نموات	عدد النموات المختبرة	عدد النموات الرباعية	%	عدد النموات الشيميرية	%
بدون	-	-	**67.7b**	**100**	**0**	**0a**	**0**	**0a**
colchicine	250	2	60.6	92	16		20	
		4	55.2	88	20		19	
		8	50.1	72	15		18	
			55.6a	**252**	**51**	**20.2b**	**57**	**22.6b**
	500	2	61.2	77	11		14	
		4	55.6	65	29		22	
		8	49.8	59	25		16	
			55.5a	**201**	**65**	**32.3c**	**52**	**25.9c**
L.S.D. 5%								
بين التراكيز			2.39			1.05		1.16
بين الأزمنة			13.46			36.7		29.38
بدون	**-**	**-**	**67.7c**	**100**	**0**	**0a**	**0**	**0a**
Oryzalin	10	2	50.1	61	06		09	
		4	72.3	45	18		22	
		8	68.7	38	12		14	
			63.7b	**144**	**36**	**25c**	**45**	**31.3b**
	20	2	29.5	22	03		06	
		4	18.5	25	04		09	
		8	00.0	00	00		00	
متوسط			**16a**	**47**	**7**	**14.9b**	**15**	**31.9b**
L.S.D. 5%								
بين التراكيز			1.55			1.44		1.35
بين الأزمنة			42.46			32.11		40.62

** المعاملات التي تحمل أحرف متشابهة في نفس العمود ليس بينها أي فرق معنوي على اختبار L.S.D على المستوى 5 %.

الاستنتاج والخلاصة

لقد لعب الإكثار الخضري للجاردينيا باستخدام تقنيات زراعة الأنسجة دورا فعالا في زيادة إنتاج العقلة الساقية من النموات الخضرية المورقة و القابلة للتجذير، وذلك بوجود 1 و 0.5 ملجرام/لتر من BAP و IAA على التوالي في وسط الإكثار MS . وكان هناك دور واضح للزراعات الثانوية والتي وصل عددها إلى 9 في زيادة مردود هذه العقل من النموات المورقة التي تم تجذيرها مخبريا في وسط MS مضافا له 1 ملجرام/لتر من IAA ، حيث وصلت نسبة التجذير إلى 98.3 % و 88 % لكل من النوعين *G.jasminoides* و *G.thunbergia* على التوالي.

لقد استخدمت أجزاء نباتية مختلفة للحصول على الكدب، غير أن هذه الأجزاء اختلفت في استجابتها لتشكيل الكدب حتى ضمن النوع الواحد، حيث أن نسبة النجاح كانت مختلفة، وقد تفوقت الأوراق على كل من السلاميات والجذور في قدرتها على تشكيل الكدب. كما اختلفت تراكيز الأوكسين المستخدمة ضمن الوسط الزراعي في تأثيرها على تشكل الكدب حيث كان للتراكيز العالية الدور الأكبر في زيادة نسبة النجاح، وقد كان للمشاركة ما بين NAA و BAP في وسط إنتاج الكدب بالتركيز 2 و 0.25 ملجرام/لتر لكل منها على التوالي الدور الأكبر في نجاح الحصول على الكدب والتي وصلت إلى أعلاها (100%) في جذور وأوراق النوع *G.jasminoides*.

إن زراعة الكدب الناتجة سابقا ولعدة زراعات ثانوية في وسط ملائم لإعادة النمو (Regeneration) ساعد في الحصول على نموات جديدة بعد الزراعة الرابعة، وقد بينت النتائج بأن كدب السلاميات كانت أكثر قدرة من كدب الأوراق والجذور على إعادة النمو من جديد، كما إن الوسط الزراعي MS المضاف له الزياتين وNAA بتركيز2 و0.5 ملجرام/لتر على التوالي قد أعطى أفضل نسبة من الكدب القادرة على إعادة النمو، والتي وصلت إلى 55.8 % و 67.5 % في النوعين *G.thunbergia* و *G.jasminoides* على التوالي. وقد أظهر النوع النباتي دورا في ذلك فقد كانت استجابة النوع *G.jasminoides* لإعادة النمو من الكدب أعلى من النوع *G.thunbergia*، كذلك الشروط الفيزيائية كان

لها دور في ذلك، فقد كان للزراعة على الظلام فعالية أفضل من الزراعة تحت تناوب ضوئي بمعدل 16 ساعة يوميا، وذلك على مستوى النسبة المئوية للكدب المعطية للنموات ومتوسط عدد البراعم فيها.

لقد كانت هذه النتائج متفقة مع ما توصل إلية Almeida وآخرون عام 2003 م في أبحاثهم على الحمضيات حيث بينوا بنتائجهم الدور البارز لزيادة نسبة السيتوكينين على الأوكسين في الوسط المستخدم لإعادة النمو من الكدب وكذلك الدور الأكثر فعالية للزراعة على الظلام من الزراعة تحت التناوب الضوئي بمعدل 16 ساعة يوميا.

إن لمعيقات الانقسام تأثير واضح على الانقسام الخلوي والذي يمنع تشكل الجدار الخلوي في الطور الانفصالي وهذا ما يؤثر بدوره على العدد الكروموسومي في نواة الخلية الجديدة، وقد تنوع دور هذه المواد في هذا البحث حسب المادة المستخدمة وتركيزها وزمن المعالجة بها. وقد تجلى ذلك بزيادة موت البراعم الجانبية للعقل الساقية المعالجة مع زيادة تركيز المادة المستخدمة من جهة وزيادة زمن المعالجة من جهة ثانية. كذلك كان لنوع المادة المستخدمة دور في ذلك فقد تفوق الأوريزالين على الكولشيسين بتأثيره على نسبة موت الأنسجة المعالجة والتي وصلت إلى 53 % و 46.7 % لكل من *G.jasminoides* و *G.thunbergia* على التوالي عند المعالجة بالكولشيسين وإلى 63.3 % و 56.7 % لكل من *G.jasminoides* و *G.thunbergia* على التوالي عند المعالجة بالأوريزالين وذلك عند استخدام الزمن الأطول من المعالجة (8 أيام) ، في حين لم تظهر الأنواع النباتية فرقا في تأثرها بسمية هذه الموات والتي تجلت بموت البراعم الجانبية في العقل الساقية. كما لعبت المعالجة بالتراكيز العالية لمعيقات الانقسام دورا سلبيا على مردود العقل الساقية من النموات حيث انخفض هذا المردود كثيرا بالمقارنة مع العقل المعالجة بالتراكيز المنخفضة ومع الشاهد(بدون معالجة).

إن معالجة العقل الساقية المخبرية بمعيقات الانقسام إضافة لما سبق فقد ساعد في الحصول على نموات ذات تغير في العدد الكروموسومي الخلوي فمنها الرباعية الصيغة الصبغية ومنا الشيميرية وبنسب مختلفة حسب المادة المستخدمة وتركيزها، فقد أعطت المعالجة بالكولشيسين بتركيز منخفض (250 ملجرام/لتر) أعلى نسبة من النموات الرباعية الصيغة الصبغية في حين أعطت المعالجة بالتركيز العالي

(1000 ملجرام/لتر) أعلى نسبة من النموات الشيميرية، كذلك الأوريزالين فقد كانت النسبة المرتفعة للنموات المضاعفة عند المعالجة بالتركيز المنخفض (10 ملجرام/لتر) والنسبة العالية للنموات الشيميرية عند المعالجة بالتركيز المرتفع (40 ملجرام/لتر). وبشكل عام لعب الأوريزالين دور أكثر فاعلية بإعطاء النموات الشيميرية مقارنة بالنموات المضاعفة الذي لعب الكولشيسين دورا أكبر بإعطائها في العقل الساقية، كذلك فإن النسبة العامة للنموات المضاعفة كانت أقل من نسبة النموات الشيميرية بين النموات الكلية الناتجة. هذه النتائج متقاربة مع النتائج التي حصل كل من Petersen وآخرون عام 2002 على النوع *Miscanthus sinensis* واللذين نصحوا باستخدام معيقات الانقسام مع زراعة الأنسجة للحصول على تضاعف كروموسومي.

لم يقتصر استخدام معيقات الانقسام على معالجة العقل الساقية قبل زراعتها في الوسط المغذي بلى تعدى ذلك إلى معالجة الأجزاء النباتية المعدة لإنتاج الكدب (Callus) وإعادة النمو منها قبل الزراعة أو في الوسط الزراعي المستخدم لإعادة النمو من الكدب. إن استخدام هذه المواد لمعالجة الأجزاء النباتية خارج الوسط الزراعي وقبل الزراعة لم يكن له أي دور في إنتاج النموات المضاعفة أو النموات الشيميرية حيث لم نحصل على أي منها، في حين كان له تأثير سلبي واضح على النسبة المئوية لتشكل الكدب تجلى بانخفاض كبير عند الأجزاء النباتية المعالجة مقارنة بالأجزاء غير المعالجة، وقد طال هذا التأثير السلبي أيضا كل من النسبة المئوية للكدب القادرة على إعطاء النموات ومتوسط عدد النموات في الكدب.

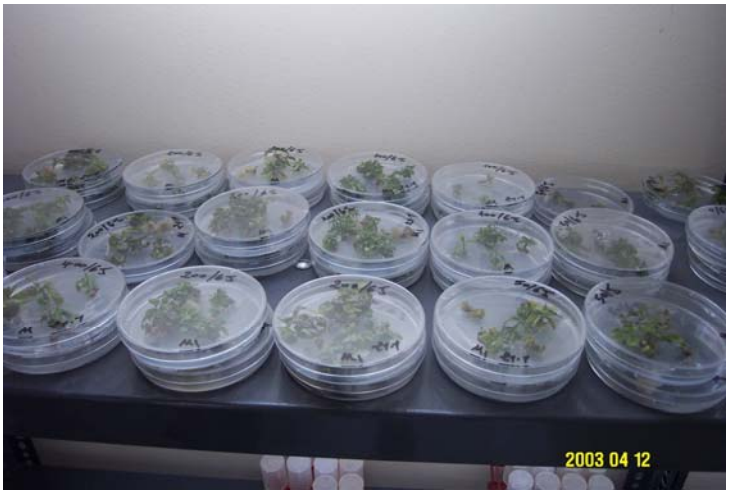
إن استخدام معيقات الانقسام في الوسط المغذي المستخدم لإعادة النمو من الكدب في المرحلة الأخيرة كان له الدور الواضح والإيجابي في الحصول على النموات المضاعفة (الرباعية) وكذلك الشيميرية، فقد وصلت نسبة النموات الرباعية إلى 32 % بوجود 500 ملجرام من الكولشيسين في الوسط المغذي مقابل 25.9% من النموات الشيميرية على نفس التركيز، في حين وصلت نسبة النموات الرباعية إلى 25 % مقابل 31.3 % من النموات الشيميرية بوجود 10 ملجرام/لتر من الأوريزالين في الوسط المغذي وهذا يوضح الدور الأقوى للأوريزالين في إحداث الشيميرا (Chimeras) عنه في إحداث

التضاعف. كما كان لمعيقات الانقسام في الوسط المغذي تأثير سلبي على النسبة المئوية للكدب القادرة على إعادة النمو وإعطاء النموات، حيث انخفضت نسبتها مع زيادة تركيز المادة المستخدمة.

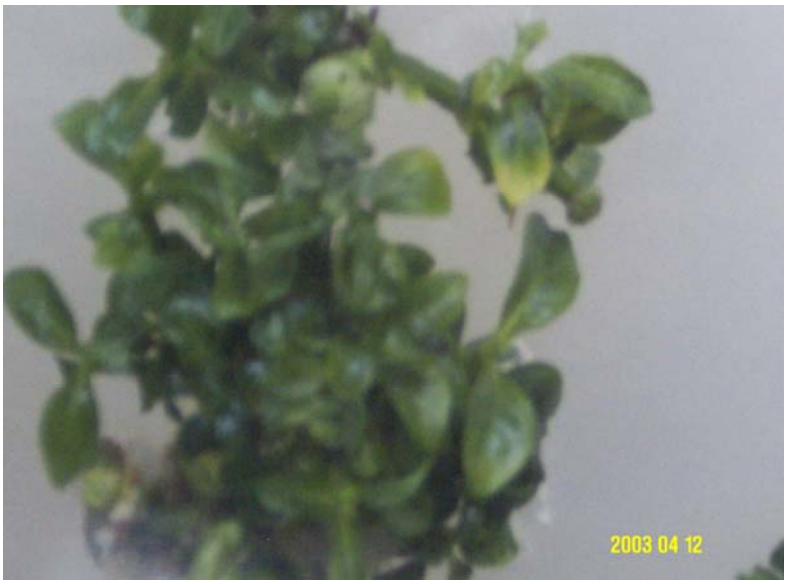
وبشكل عام فإن استخدام معيقات الانقسام من كولشيسين و أوريزالين كان له الدور السلبي على حياة الأجزاء النباتية وكذلك على مردود العقل الساقية من النموات وعلى النسبة المئوية لتشكل الكدب وقدرتها على إعادة النمو خاصة على التراكيز العالية، وإن الأوريزالين كانت له درجة سمية أعلى من الكولشيسين، وبشكل مخالف فإن تركيز الكولشيسين بين 25 و1250 µM كانت سامة على العينات الورقية في الكيوي بدرجة أكبر من الأوريزالين بين 5 و 30 µM (Legave و Chalak ,1996)، في حين أن نتائجنا تتفق مع Wan وآخرون (1991) اللذين وضحوا بأن الأوريزالين يقلل من نسبة نمو الكالس وتلك القادرة على إعطاء النموات في الذرة، وكذلك في هجن الجنس Allium فقد كان لإستخدام الكولشيسين التأثير السلبي على حياة الكدب وقدرتها على إعادة النمو (Song وآخرون ، 1997).

أما فيما يخص مدة المعالجة بمعيقات الانقسام على مختلف أنواعها ومختلف الطرق المستخدمة فلم يكن لها أي تأثير على النسبة المئوية للنموات الشيميرية أو الرباعية الناتجة حيث لم تسجل أي فروقا معنوية بينها، كذلك لم تكن هناك أي تأثير معنوي للأنواع النباتية المستخدمة في إنتاج النموات الشيميرية أو المضاعفة من الكدب حيث لم تسجل أي فروق معنوية بينها في استجابتها للتضاعف أو الشيميرا.

الشكل رقم(٤): نبات الجاردينيا مزهر



الشكل رقم (٥): طرق الزراعة النسيجية ضمن الأنابيب (فوق) و أطباق بتري (تحت)



الشكل رقم (٦): الإكثار بالعقلة الساقية المخبرية ضمن أطباق بتري

الشكل رقم (٧): الحصول على الكدب (callus) من السلاميات وإعادة النمو (Regeneration)

المراجع

Abak, K.; Sari, N.; Paksoy, M.; Yilmaz, H.; Aktas, H.; and Tunali, C. 1996. Genotype response to haploid embryo induction with pollination by irradiated pollens in melon, obtaining of dihaploid lines determination of haploid and diploid plants by different techniques. Tr. J. Agric. Forestry, 20(5): 425 – 430.

Almeida, W.A.B.; Mour, F.A.A.; Filho, O.; Pino, L. E.; Boscariol, R.L.; Rodriguez, A.P.M. and Mendes, B.M.G. 2003. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. Plant Science 164 (2): 203-211.

Anderson J.A.; Mousset D.C.; Williams, E.G. and Taylor, N.L. 1991. An *in vitro* chromosome doubling method for clovers (*Trifolium* spp.). *Genome* 34 (1), 1-5.

Arumuganthan, K. and Earle, E.; 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Plant Mol. Biol. Reporter, 9: 221 – 231.

Brown, S.C.; Devaux, P.; Marie, D.; Bergounioux, C.; and Petit, P.X. 1991. Cytometrié en flux: Application à l'analyse de la ploidie chez les végétaux. Biofuture 105: 2 – 16.

Chalak, L. and Legav, J.M. 1996. Oryzalin combined with adventitious regeneration for an efficient chromosome doubling of trihaploid Kiwifruit. Plant Cell Report 16: 97-100.

Craven LA; Rouse JL 1989. Rhododendron leucogigas 'Hunstein's Secret'. American-Rhododendron Society Journal, 43: 4, 186-189.

Cuy, F.; Dumas de Vaulx, R.; Longhi, B. and Siadous, R. 1992. Analyse des plantes de melon (Cucumis melo L.) issues de croisements avec du pollen irradié à différenttes doses. Agronomie, 12: 623 – 630.

De Laat, A.M.M.; Gohde, W.; and Vogelzang, M.J.D.C. 1987. Determination of ploidy of single plants and plants population by flow cytometry. Plant Breeding 99: 303 – 307.

Demarly, Y. and Sibi, M. 1989. Amélioration des plantes et Biotéchnologies. John Libbey, Paris.

Dickson, M.H. and Wallace, D.H. 1986. Cabbage breeding. In Bassatt, M.J.(Ed). Breeding Vegetable Crops. Avi. Publ. Comp., Westpart, CT,:395 – 432.

Dumanois, CH.; Godin, B.; Lebofuf, J. and Bigo, C. 1984 Multiplication vegetative *in vitro* de *Gardenia jasminoides* Ellis. P.H.M.Revue Horticole n 249, 19- 30

Gao, S.L., D.N. Zhu., Z.H. Coi and D.R. Xu. 1996. Autotetraploid plant from colchicine-treted bud culture of *Saluia miltiorrhiza*. Plant cell Tissue culture, 47: 37 – 77.

George J; Ravishankar GA. 1996 Development of modified plant tissueculture media using alternate sources of nitrogen and vitamins for micropropagation. Indian-Journal-of-Experimental-Biology., 34: 2, 163-170

George PS; Ravishankar, GA. 1995 Induction of crocin and crocetins in callus cultures of *Gardenia jasminoides* Ellis. Food Biotechnology, 9: 1-2: 29-38.

Goldy, R.G. and P.M. Lyrene. 1984. *In vitro* colchicine tretment of 4X bluebessie, *Vaccinium* SP.J.Amer. Soc. Hort. Sci. 109:336 – 338.

Hancock, J.F., 1997. The Colchicine Story. HortScience. 32: 1011-1012.

Kehr, A.E. 1998. Woody plant polyploidy . Am. Nurseryman. 183 (3): 38-47.

Kehr, A.E. 1976. Breeding for purpose. Quart Bull . Am. Rhodod Sec. 20: 130 – 141

Ma, X.H., Qin, R.L., and Xing, W.B. 1984. Chromosome observations of some medical plants in Xinjiang. Acta Phytotax. Sin. 22: 243-249.

Murashige, T. and Skooge, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacoo tissue culture. Physiol. Plant.,15: 473-497.

Nawa, Y.; and Ohtani, T. 1992. Induction of caluus from flesh of gardenia jasminoides Ellis fruit and formation of yllow pigment in the callus. Bioscience, biotechnology and biochemistry. 56 (11): 1732 – 1736.

Petersen, K.K.; Hagberg, P. and Kristiansen, K. 2002. *In vitro* chromosome doubling of Misconthus sinensis. Plant Breeding 121, 445-450.

Pryor, R.C. and L.C. Frazier. 1968. Colchicine induced tetraploid azaleas. HortScience, 3: 283 – 286.

Redha, A.; Attia, T.; Buter, B.; Saisingtong, S.; Stamp, P. and Schmid J.E. 1998. Improved Production of doubled haploid by colchicine application to wheat (Triticum aestivum L.).Plant cell reports 17 (12), 974-979.

Roux, N.; Dolezel, J.; Swennen, R. and Zapata-Arias, F.J. 2001. Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimeras in *Musa* spp. Plant cell, tissue and organ culture, 66 (3): 187 – 197.

Saito, H.; Mizunashi, K.; Tanaka, S.; Adachi, Y. and Nakano, M. 2003. Ploidy estimation in Hemerocallis species and cultivars by flow cytometry. Scientia Horticulturae, 97: 185 – 192.

Sari, N.; Abak, K. and Pitrat, M. 1999. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon (Citrullus lanatus Thunb) Matsum and Nakai. Scientia Horticulturae, 82: 265 – 277.

Serret, MD; Trillas, MI; Matas, J; Araus, JL. 1997. The effect of different closure types, light, and sucrose concentrations on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 47, (3): 217-230

Serret, MD; Trillas, MI; Matas, J; Araus, JL. 1996 Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. Plant-Cell,-Tissue-and-Organ-Culture, 45: (1): 1-16.

Sas Institute Inc, 1989. SAS/STAT User's Guide, Version 6, 4th edn, Vol. 2 SAS Institue, Inc., Cary.

Song, P., Kang, W. and Peffey, E.B. 1997. Chromosome doubling of Allium fistulosum x A.cepa interspecific F_1 hybrids through colchicine treatment of regeneration callus. Euphytica 93: 256-262.

Wan, Y.; Duncan, D.R.; Rayburn, A.L.; Petolino, J.F. and Widholm, J.M. 1991. The use of antimicrotubule herbircides of the production of doubled haploid plants from anther-derived maizecallus. Theor.Appl.Genet. 81:205-211.

Yetisir, H. and Sari, N.2003. Anew method for haploid muskmelon (*Cucumis melo* L.) dihaploidization. *Scientia Horticulturae* 98: 277 – 283.

Zamani, G.; Kovacs, E.; Gouli-Vavdinoudi, D.; Roupakias, G. and Barnabas, B. 2000. Regeneration of fertile doubled haploid plants from colchicine-supplemented media in weat anther culture. Plant Breeding, 119: 461-465.