مجلة جامعة كركوك للعلوم الزراعية ... المجلد (9) العدد (4) 2018
Journal of kirkuk University for Agricultural Sciences ...Vol (9) No. (4) 2018

أكثار وحفظ الأصل الوراثي لنبات اللوز *Prunus amygdalus* صنف Carmel خارج الجسم الحي

وسام خزعل خالد[1] عمار زكي قصاب باشي[1]

- [1] جامعة الموصل – كلية الزراعة والغابات
- تاريخ تسلم البحث 2014/11/26 وقبوله 2017/10/3

الخلاصة

أجريت الدراسة في مختبر بحوث النبات (Plant Research Center / School of Agriculture Food & Wine - جامعة أديليد Adelaide - أستراليا، للمدة من 2012/3/20 الى 2012/10/10 بهدف أكثار نبات اللوز *Prunus amygdalus* L. صنف Carmel خارج الجسم الحي ودراسة إمكانية حفظ أصوله الوراثية. درس فيه تأثير أوساط غذائية مختلفة (MS ، QL و WPM) مجهزة بمنظمات نمو مختلفة (BA لوحده أو متداخلاً مع أحد الأوكسينات IAA ، IBA و NAA) في أكثار نبات اللوز، ثم حفظ الأجزاء النباتية بالتجميد (Cryopreservation) باستخدام طريقة التزجيج (Vitrification). زرعت في مرحلة النشوء العقد المفردة في أوساط (MS ، QL و WPM) مجهزة بمستويات مختلفة من BA (0 ،1، 2، 3 و 4 ملغم /لتر)، وبعد مرور 6 أسابيع أوضحت النتائج بأن العقد المزروعة في وسط MS المدعم بـ 1 ملغم / لتر BA أعطت أحسن النتائج من حيث ارتفاع النبيتة (1،05 سم)، عدد الأفرع الأطول من 0،5 سم (1،0)، بالإضافة الى أعلى معدل للكلورفيل الكلي في الأوراق (SPAD 34،62) وتفوقت معنوياً على معظم المعاملات الأخرى. درس في مرحلة التضاعف تأثير إضافة تراكيز مختلفة (0 ، 0،01 ، 0،05 ، 0،1 ، 0،3 ، 0،5 ملغم/لتر) من الأوكسينات (IAA ، IBA و NAA) كل على انفراد الى الوسط المنتخب من مرحلة النشوء (MS مجهز بـ 1 ملغم / لتر BA)، وبعد مرور 8 أسابيع من الزراعة تبين بأن تداخل 1 ملغم / لتر BA مع 0،01 ملغم / لتر IAA تسبب في الحصول على أعلى عدد من البراعم المتفتحة / نبيتة (7،20)، أعلى عدد من الأفرع الأطول من 0،5 سم (3،20)، وأعلى عدد من الأوراق المتفتحة (36،70) وبتفوق معنوي على معظم المعاملات المدروسة. أما فيما يخص تجارب الحفظ بالتجميد Cryopreservation فدرس خلالها تأثير مدة تعريض أطراف الأفرع (بطول 2-3 ملم تحوي 3-4 من مبادئ الأوراق) ناتجة من مرحلة التضاعف الى (10 ، 20 ، 30 ، 40 ، 50 و 60 دقيقة) لسائل تزجيج النبات Plant Vitrification Solution (PVS) من أجل تهيئتها للخزن في النتروجين السائل لمدة أسبوع، وبينت النتائج بعد مرور أربعة أسابيع من زراعة أطراف الأفرع المخزونة في النتروجين السائل على وسط MS خالٍ من منظمات النمو، بأنّ (60) دقيقة هي أفضل مدة تعريض لسائل تزجيج النبات، إذ ساعدت في احتفاظ أكبر عدد من أطراف الأفرع بقدرتها على أستعادة النمو، وبلغت نسبة النجاة عندها (70٪) وتفوقت معنوياً على مدد التعريض 10 و 20 دقيقة.

الكلمات المفتاحية : الأصل الوراثي، نبات اللوز، الجسم الحي.

Propagation and Germplasm preservation of almond *Prunus amygdalus* in Vitro

Wisam Khazaal Khalid[1] Ammar Zeki Ameen Kassab Bashi[1]

- **[1] University of Mosul - College of Agriculture**
- Date of research received 26/11/2014 and accepted 3/10/2017

Abstract

The present investigation was conducted in plant research laboratory (Plant Research Center - School of Agriculture Food & Wine - University of Adelaide -Australia and plant tissue and cell culture laboratory - Department of Horticulture and landscape design - College of Agriculture and Forestry - University of Mosul, from February / 2010 to December /2013. Aiming *in Vitro* Micropropagation of almond *Prunus Amygdalus* L. and germplasm preservation possibility. The effect of different media (MS، QL and WPM) enhanced with PGR BA alone or interacted with one of the following plant Auxin (IAA, IBA or NAA) to propagate Almond cv. (Carmel) and preserving the explant by freezing (Cryopreservation) using Vitrification protocol. At the stage of initiation single node cultured in MS، QL and WPM media fortified with different levels of BA (0, 1, 2,3 and 4 mg/L). After 6 weeks, the obtained results showed that single node cultured in MS medium enhanced with 1 mg/L BA were found to give the best significant increasing for explant height (1.05 cm), number of shoots longer than 0.5 cm (1.0) and maximum total chlorophyll rate in leaves (34,62 SPAD), comparing with other treatments. At the stage of Multiplication effect of enhancing MS medium (MS supplemented with 1 mg/L BA) with different Auxin (IAA, IBA and NAA) concentrations (0 , 0.01 , 0.05 , 0.1 , 0.3 , 0.5 mg/L) were studied independently .After 8 weeks، the obtained results showed that enhancing MS medium with 0.01 mg L^{-1} IAA treatment produced the best results in number of shoots / explant (7.20), number of shoots longer than 0.5 cm (3.20), as well as the highest number of leaves (36.70) with significant different from the other treatments. Regarding cryopreservation experiments, the effect of exposure shoot tips (2-3 mm containing 3-4 leaf primordia) from multiplication stage duration to Plant vitrification Solution (PVS) for (10, 20, 30, 40.,50 and 60 minutes), in order to prepare it for storage in liquid nitrogen for one week, After four weeks from shoot tips cultured in MS free growth regulators medium, The obtained results showed that 60 minutes was the best exposure duration, which gave largest shoots tips restore growth ability number with highest survival percentage (70%) which differed significantly comparing with 10 and 20 minutes .

Key words: almond, Germplasm preservation, In Vitro.

المقدمة

يعد نبات اللوز *Prunus amygdalus* Batsch أحد نباتات العائلة الوردية Rosaceae ضمن الجنس *Prunus* ، وأحد أهم فواكه النُقل التجارية في العالم (Ladizinsky ، 1999). أن وجود حالة العقم الذاتي لأشجار اللوز وحصول التلقيح الخلطي بين الأصناف يعمل على ظهور نباتات غير مشابهة للأمهات (Isikalan وآخرون ، 2008) من جهة أخرى تعد طرائق الأكثار الخضري التقليدية كالأكثار بالترقيد، العقل، التركيب أو التطعيم غير مجدية بسبب صعوبة تجذيره (Rugini و Verma ، 1983 ; Caboni و Damiano ، 1994 ; Miguel ، 1998 و Ainsley وآخرون ، 2001) لذا برزت الحاجة الى استخدام تقانة زراعة الأنسجة كونها واحدة من طرائق الأكثار الخضري وتخدم في الأكثار السلالي السريع لهذا النبات (Henry وآخرون ، 1992 ; Gjuleva و Atanassov ، 1994). كما برزت الحاجة في السنوات الأخيرة الى ضرورة إيجاد طرائق للمحافظة على الأصول الوراثية من الانقراض، وذلك للمحافظة على الأنواع النباتية المهمة، التي قد تكون عرضة للأصابة بالعديد من الأمراض الحشرية والفطرية وغيرها مما ينذر بأختفاء هذه المحاصيل (صبوح ولاوند ، 2012) كونها مصادر وراثية هامة من حيث مقاومتها للظروف البيئية المختلفة والآفات الحشرية والمرضية .

تهدف الدراسة الى أكثار صنف اللوز Carmel خضرياً للعمل على أنتشار زراعته بالأضافة الى الحفاظ عليه من الأندثار وذلك من خلال دراسة تأثير أوساط غذائية مختلفة في تضاعفه بالأضافة الى استخدام تقنية الحفظ بالتجميد للحفاظ على أصوله الوراثية .

المواد وطرائق البحث

أجريت هذه الدراسة في مختبر بحوث النبات (Plant Research Center / School of Agriculture Food & Wine) / جامعة أديليد Adelaide / أستراليا للمدة من 2012/3/20 الى 2012/10/10.

تهيئة نباتات الأمهات :

استخدم في تجارب المحور الأول شتلات لوز صنف Carmel بعمر سنتين نامية في البيت الزجاجي التابع لجامعة أديليد/أستراليا (Waite Campus / Adelaide University) ، وهو من الأصناف الشائعة والمنتشر زراعتها في أستراليا ، ويحتل المرتبة الثانية بعد الصنف Nonpariel في نسبة الإنتاج (32٪) لمحصول اللوز في أستراليا (Anonymous ، 2008). تمت تهيئة الشتلات لتنفيذ تجارب الزراعة النسيجية عن طريق إزالة القمم النامية للشتلات، ثم إجراء عمليات التسميد والمكافحة الدورية لضمان الحصول على شتلات قوية خالية من الأصابات والأمراض.

تحضير الوسط الغذائي :

استخدم في تجارب المحور الأول ثلاثة أوساط غذائية جاهزة هي موراشيج وسكوج MS (Murashige و Skoog، 1962)، وسط النباتات الخشبية WPM (Lloyd وMcCown ، 1980) و وسط QL (Quoirin و Lepoivre ، 1977). لتحضير لتر واحد من الأوساط المدروسة تمت أذابة 6 غم آكار (Agar-agar) في 500 مل ماء مقطر عند درجة الغليان باستعمال جهاز الدوار المغناطيسي ذي الصفيحة الساخنة Hot plat magnetic stirrer، ثم أضيفت العناصر الغذائية الكبرى والصغرى والفيتامينات الخاصة بكل وسط (عبوات مجهزة من شركة Sigma-Aldrich) ثم أضيفت مساحيق السكروز والمايواينوسيتول (Myo-inosetol) الى المحلول وحسب الأوزان المطلوبة لكل منها، بعدها أكمل حجم محلول الوسط الغذائي إلى واحد لتر بإضافة ماء مقطر إلى خليط مكونات كل وسط. وتم ضبط رقم الدالة الهيدروجينية (pH) للوسط بين 5،7 – 5،8 بواسطة محلول 1 عياري من هيدروكسيد الصوديوم NaOH أو حامض الهيدروكلوريك المخفف HCl. بعد الانتهاء من تحضير الوسط الغذائي وتم توزيعه على عبوات بولي بروبلين حجم 250 مل وبواقع 50 مل لكل عبوة ، ثم عقمت العبوات بما تحتويه من وسط غذائي في جهاز المعقام (المؤصدة) Autoclave على درجة حرارة 121°م وضغط 1،04 كغم/سم^3 لمدة 20 دقيقة. تم إجراء تحويرات على مكونات الأوساط الغذائية المستخدمة في الدراسة عن طريق تغيير تراكيز أملاحها أو بإضافة تراكيز مختلفة من منظمات النمو بشكل منفرد أو متداخل وذلك حسب الهدف المنشود من الدراسة .

أخذت فروع غضة حديثة النمو بطول 4-5 سم من شتلات لوز صنف Carmel بعمر سنتين نامية في البيت الزجاجي التابع لمختبر بحوث النبات /جامعة اديليد، جيدة النمو خالية من الأصابات المرضية والحشرية، نقلت الى المختبر، ثم أزيلت منها جميع الأوراق المتفتحة، وتركت تحت الماء الجاري لمدة 15 دقيقة للتخلص من الأتربة والمواد العالقة بها، بعدها نقلت الى منضدة انسياب الهواء الطبقي لأجراء عملية التعقيم السطحي وذلك بغمرها في محلول كلوريد الزئبق $HgCl_2$ بنسبة 0،35٪ لمدة 2،5 دقيقة مع التحريك المستمر بعد الانتهاء من عملية التعقيم . غسلت الأجزاء النباتية بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات ولمدة 5 دقائق لكل مرة، لإزالة التأثير الضار للمادة المعقمة (العنزي ، 2005)، بعدها نقلت الى أطباق بتري معقمة، وأزيلت نهاياتها المجروحة التي كانت ملامسة لمادة التعقيم، ثم قطعَ الجزء الباقي من الفروع الى عقل عقدة مفردة Single node cutting بطول (1-1،2) سم بحيث احتوى كل منها في نهايته العليا على برعم جانبي. بعد الانتهاء من تجهيز الأجزاء النباتية زرعت مباشرة في عبوات البولي بروبلين حاوية على أحد الأوساط الغذائية المدروسة اثناء مرحلة النشوء وبمعدل 3 أجزاء لكل عبوة .

خلال مرحلة النشوء زرعت العقد المفردة (Single node cutting) على 3 أنواع من الأوساط الغذائية الصلبة هي MS و WPM و QL مجهزة بتراكيز مختلفة (صفر ، 1 ، 2 ، 3 و4) ملغم / لتر من BA كل على انفراد. حُضِّنَتْ الزروعات في غرفة النمو عند درجة حرارة 25 ± 1° م وشدة إضاءة 2000 لوكس لمدة 16 ساعة ضوء ، و 8 ساعات ظلام/يوم ، سجلت البيانات بعد مرور 6 أسابيع من الزراعة.

مرحلة التضاعف الخضري:

بناءً على نتائج مرحلة النشوء أعيدت زراعة النبيتات الناتجة من مرحلة النشوء على الوسط الأفضل المنتخب (وسط MS مجهز بـ 1 ملغم / لتر BA) لمدة أربعة أسابيع أضافية من أجل توحيد المزارع، ومن بعدها أخذت الفروع بطول 1 سم لتنفيذ تجارب التضاعف اللاحقة التي تضمنت دراسة تأثير إضافة أحد الأوكسينات IAA ، IBA وNAA وبتراكيز مختلفة (صفر ، 0،01 ، 0،05 ، 0،1 ، 0،3 و 0،5) ملغم / لتر كلٍ على انفراد الى الوسط الغذائي الأفضل المنتخب من مرحلة النشوء (وسط MS مجهز بـ 1 ملغم / لتر BA) في تضاعف الأفرع. حضنت الزروعات في غرفة النمو عند نفس الظروف المستخدمة لمرحلة النشوء، نفذت التجارب باستخدام فرع نباتي واحد لكل مكرر بطول 1 سم، سجلت البيانات بعد مرور 8 أسابيع عن معدل عدد الأفرع الكلي، معدل عدد الأفرع الأطول من 0،5 سم، معدل ارتفاع النبيتة (سم) و معدل عدد الأوراق/ نبيتة، علماً بأنه أجريت إعادة زراعة للأجزاء النباتية دون تقطيع على نفس الأوساط بعد مرور 4 أسابيع من بدء تجارب التضاعف.

أما فيما يخص تجارب الحفظ بالتجميد فقد تم تحضير سائل التحميل Loading solution وسائل تزجج النبات PVS2 وسائل الغسل Unloading solution قبل البدء بخطوات الحفظ، أذ حُضر محلول Loading solution بإضافة الكليسرول Glycerol بتركيز 2 مولاري (14،73 مل / 100 مل) الى محلول وسط MS مجهز بـ 0،4 مولاري سكروز (13،68 غم / 100 مل) أما سائل تزجج النبات (PVS2) حُضر عن طريق إضافة 30٪ كليسرول Glycerol (24 مل/100 مل) ، 15٪ أثيلين كلايكول Ethylene glycol (13،5 مل / 100 مل) و15٪ Dimethyl sulfoxide (DMSO) (13،5 مل / 100 مل) الى إسطوانة حجمية مدرجة سعة 100 مل ، ثم أكمال الحجم النهائي للأسطوانة بوسط MS سائل حاوي على السكروز بتركيز 0،4 مولاري (13،68 غم / 100 مل) في حين حُضر سائل الغسل Unloading solution من محلول وسط (MS) مجهز بـ 1،2 مولاري (41،04 غم / 100مل) سكروز . تم ضبط رقم الدالة الهيدروجينية (PH) للسوائل أعلاه عند 5،7 – 5،8 ، ثم عقمت باستخدام مرشحات دقيقة (Millipore) ذات حجم 0،2 مايكرون بعد ذلك حفظت المحاليل في الثلاجة لحين الاستعمال (Panis ، 2008).

أجريت تجارب الحفظ بالتجميد طبقاً للخطوات الآتية :

أ. الأقلمة (Hardening) :

عرضت النبيتات الناتجة من الزراعة النسيجية الى 4 مº لمدة 3 أسابيع في حاضنات نوع (Panasonic MLR352) بشدة أضاءة 2000 لوكس، وبتعاقب ضوئي 16 ساعة ضوء و 8 ساعات ظلام/ يوم. (Reed ، 1993 ; Chang و Reed ، 1999 ; Vysotskaya وآخرون 1999).

بعد انتهاء مدة الأقلمة، استؤصلت أطراف الأفرع بطول (2-3) ملم تحوي 3-4 من مبادئ الأوراق بواسطة المجهر الضوئي (Binocular Microscope، Olympus cx21) وزرعت في أطباق بتري حاوية على وسط (MS) صلب مجهز بـ 0،3 مولاري سكروز وخالي من منظمات النمو (الشكل 1) ثم غلقت الأطباق بواسطة شريط البارافيلم ، وحضنت في الظلام لمدة 24 ساعة (Niino واخرون ، a1992) .

ب. التزجج Vitrification :

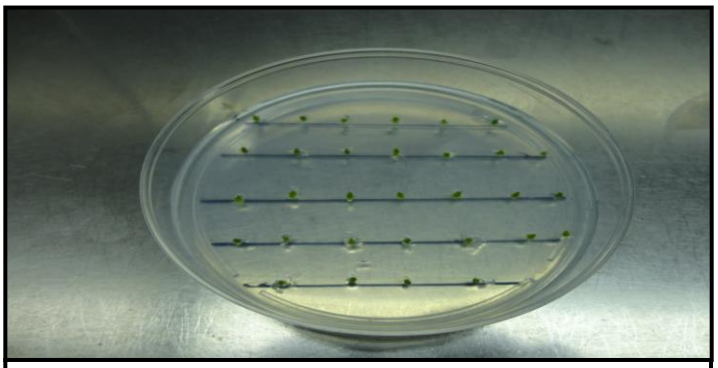
بعد انتهاء مدة التحضين في الظلام نقلت الأفرع الى أنابيب خاصة للحفظ بالتجميد (Cryotube Nalgene 2 ML) حاوية على 1 مل من سائل التحميل Loading solution، ثم عرضت الى صفر مئوي لمدة 20 دقيقة ، تم أزالة سائل التحميل بعد انتهاء المدة المحددة بواسطة Micropipette سعة 1 مل، ثم أضيف سائل التزجيج (PVS2) بمقدار 1 مل ولمدد مختلفة (10 ، 20 ،30 ،40 ، 50 و 60) دقيقة، بعد انتهاء مدد التعريض اللازمة لكل معاملة استبدل سائل التزجيج (PVS2) بـ 0،5 مل جديد من السائل نفسه على درجة حرارة صفر مئوي، ثم أغلقت فوهات الأنابيب بالأغطية الخاصة بها ووضعت داخل قصبات (straw) لخزنها مباشرة في وعاء النتروجين السائل Liquid Nitrogen Dewar لمدة أسبوع. أجريت نفس المعاملات أعلاه لأجزاء نباتية أخرى مماثلة، ولكن من دون التخزين في النتروجين السائل لاستخدامها كمعاملة مقارنة (Reed ، 2008) .

ج . إعادة التجديد Regeneration:

بعد انتهاء مدة التخزين في النتروجين السائل لمدة أسبوع نقلت الأنابيب من أوعية التخزين الى حمام مائي بدرجة 40° لمدة دقيقتين لغرض الأذابة (Thawing)، بعدها غسلت الأجزاء النباتية بمحلول (Unloading solution) لمدة 20 دقيقة مع الرج الخفيف، وذلك لإزالة أثار سائل التزجج PVS2 (Niino وآخرون ،a1992) . بعد ذلك نقلت أطراف الأفرع المخزنة وغير المخزنة في النتروجين السائل الى أطباق بتري حاوية على ورق ترشيح معقم، ثم زرعت على وسط (MS) الصلب بكامل تركيز أملاحه باستثناء خلوه من مادة نترات الأمونيوم (NH4NO3)، وحضنت في الظلام لمدة أسبوع عند درجة حرارة الغرفة (Kuriyama وآخرون ، 1990)، بعدها نقلت الأطباق الى ظروف غرفة النمو الأعتيادية 16 ساعة ضوء و 8 ساعات ظلام. حسبت نسب النجاة للأفرع بعد 4 أسابيع على أساس رجوع اللون الأخضر للأفرع (أي تحول لونها من البني الى الأخضر وبدء نشاط البرعم عن طريق تفتح الأوراق) .

التحليل الأحصائي:

صممت الدراسات بأستخدام التصميم العشوائي الكامل (C.R.D.) كتجارب بسيطة لكل من مرحلة النشوء والحفظ بالتجميد وتجارب عاملية لمرحلة التضاعف بأستخدام 10 مكررات لكل معاملة وجزء نباتي واحد لكل مكرر. وحللت النتائج إحصائيا حسب التصميم المستخدم باستخدام الحاسوب على وفق برنامج SAS ، (Anonymous ، 1996) واختبرت المتوسطات باستخدام إختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى إحتمال 5 % .



الشكل (1) تجهيز أطراف الأفرع (2-3) ملم للحفظ بالتجميد .

النتائج والمناقشة

عدد البراعم المتفتحة :

تشير النتائج في الجدول (1) الى عدم وجود اختلافات معنوية بين الأوساط الغذائية في معدل عدد البراعم المتفتحة / جزء نباتي أذ سجل الوسط الغذائي WPM أعلى عدد من البراعم المتفتحة بلغت 1،62 برعم / جزء نباتي مقارنة بالأوساط MS و QL، كذلك تشير النتائج الى تفوق جميع تراكيز BA معنوياً على معاملة المقارنة في تأثيرها على عدد البراعم المتفتحة / جزء نباتي، إذ سجل التركيز 1 ملغم / لتر BA أعلى عدد للبراعم المتفتحة وبلغت 1،84 برعم مقارنة مع باقي تراكيز BA .

أما فيما يخص معاملات التداخل بين نوع الوسط الغذائي وتراكيز BA المدروسة فيلاحظ وجود اختلافات معنوية بين التداخلات تمثلت بتسجيل معاملة 1 ملغم/لتر BA في الوسط الغذائي WPM أعلى عدد من البراعم المتفتحة / جزء نباتي بلغت 37،2 برعم، ولم تختلف معنوياً عن معاملة 3 ملغم/لتر BA في الوسط الغذائي نفسه، التي كانت عدد البراعم المتفتحة فيها 2،0 برعم كما أنها لم تختلف معنوياً عن المعاملات التي جهز فيها الوسط الغذائي MS بـ 1، 2 أو4 ملغم/لتر BA التي سببت تفتح البراعم بمعدلات (1،90 ، 1،90 ، 62،1) برعم /جزء نباتي على التوالي، وكذلك معاملتا 2 أو 4 ملغم/لتر BA في الوسط الغذائي QL وبنسب بلغت (2،12 و 1،71) برعم/جزء نباتي، في حين سجلت معاملات المقارنة أدنى معدل لتفتح البراعم بلغ 1،0 برعم / جزء نباتي .

الجدول (1) تأثير الأوساط الغذائية MS ، QL و WPM وتراكيز BA والتداخل بينهما في عدد البراعم المتفتحة / لعقد نبات اللوز *Prunus amygdalus* صنف Carmel بعد مرور 6 أسابيع من الزراعة

تركيز BA(ملغم/لتر)		عدد البراعم المتفتحة / جزء نباتي			تأثير تراكيز BA
		MS	QL	WPM	
صفر		1،0 د	1،0 د	1،0 د	1،0 ب
BA	1	1،90 أ- ج	1،25 ج د	2،37 أ	1،84 أ
	2	1،90 أ- ج	2،12 أ ب	1،25 ج د	1،76 أ
	3	1،37 ب- د	1،37 ب- د	2،0 أ- ج	1،57 أ
	4	1،62 أ- د	1،71 أ- د	1،50 ب- د	1،60 أ
تأثير الأوساط		1،56 أ	1،48 أ	1،62 أ	

*** الأرقام ذوات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لاتختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 % .**

ارتفاع النبيتة (سم) :

تشير نتائج الجدول (2) الى وجود تأثير معنوي واضح لنوع الوسط الغذائي في معدل ارتفاع النبيتات النامية من العقد (سم)، إذ تفوقت النبيتات النامية في وسط MS في ارتفاعها معنوياً على النبيتات النامية في وسطي WPM و QL ، في حين لم تختلف النبيتات النامية في وسطي WPM و QL عن بعضها معنوياً، أذ أعطت نبيتات بلغت معدلات أطوالها (0،63 ، 0،40 و 49،0) سم على التوالي. من جهة أخرى تفوقت النبيتات النامية في الأوساط المجهزة بـ 1 و2 ملغم / لتر BA معنوياً في ارتفاعها على النبيتات النامية في الأوساط المجهزة بباقي التراكيز المدروسة، وأعطت نبيتات بلغت ارتفاعها (0،68 و 63،0) سم على التوالي. في حين سجل أقل ارتفاع للنبيتات في أوساط المقارنة (خالية من BA) .

أما فيما يخص التداخل بين الوسط الغذائي وتراكيز BA فيلاحظ من نفس الجدول بأنّ معاملة الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 1 ملغم/لتر BA أعطت أعلى معدل لارتفاع النبيتات وبلغ 05،1 سم، ولم تختلف معنوياً عن معاملة الوسط الغذائي QL المجهز بتركيز 2 ملغم/لتر (91،0) سم، في حين سجلت معاملات المقارنة لجميع الأوساط الغذائية أدنى نسب في معدلات ارتفاع النبيتة مقارنة مع باقي المعاملات، ولم تختلف معنوياً عن جميع معاملات الوسط الغذائي WPM و ولجميع تراكيز BA .

الجدول (2) تأثير الأوساط الغذائية MS ، QL و WPM وتراكيز BA والتداخل بينهما في ارتفاع النبيتة (سم) لعقد نبات اللوز *Prunus amygdalus* صنف Carmel بعد مرور 6 أسابيع من الزراعة

تركيز BA (ملغم/لتر)		معدل ارتفاع النبيتة (سم)			تأثير تراكيز BA
		MS	QL	WPM	
صفر		0،41 ب- د	0،23 د	0،31 ج د	0،30 ج
BA	1	1،05 أ	0،50 ب- د	0،46 ب- د	0،68 أ
	2	0،62 ب	0،91 أ	0،36 ب- د	0،63 أ
	3	0،58 ب ج	0،45 ب- د	0،41 ب- د	0،49 ب
	4	0،48 ب- د	0،45 ب- د	0،45 ب- د	0،46 ب
تأثير الأوساط		0،63 أ	0،49 ب	0،40 ب	

* الأرقام ذوات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لاتختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 % .

عدد الأفرع الأطول من (0،5) سم :

يلاحظ من نتائج الجدول (3) أن أعلى معدل لعدد الأفرع الأطول من 0،5 سم (0،83) فرع / نبيتة أمكن الحصول عليه من زراعة العقد في الوسط الغذائي MS، وتفوق معنوياً على الأفرع الأطول من 0،5 سم التي تم الحصول عليها من زراعة العقد على الأوساط QL و MS (0،39 و 0،24) فرع / نبيتة، واللذان لم يختلفا معنوياً عن بعضهما. من جهة أخرى يلاحظ من نفس الجدول تفوق جميع الأوساط المجهزة بـ BA معنوياً على معاملة المقارنة في عدد الأفرع الأطول من 0،5 سم ، إذ تم الحصول على أعلى عدد من الأفرع / نبيتة (0،71) من زراعة العقد على الأوساط المجهزة بـ 2 ملغم / لتر BA ، وأقلها من العقد المزروعة على وسط المقارنة (0،04) فرع / نبيتة.

أما فيما يخص تأثير التداخل فتظهر النتائج بأن معاملات التداخل بين الوسط الغذائي MS مع جميع تراكيز BA باستثناء معاملة المقارنة أدت الى زيادة معنوية في عدد الأفرع الأطول من 0،5 سم بلغت 0،1 فرع / نبيتة، ولم تختلف معنوياً عن معاملة تداخل 2 ملغم / لتر مع الوسط الغذائي QL ، في حين سجلت معاملات المقارنة ولجميع الأوساط انخفاض معنوي واضح في هذه النسب بلغت أدناها (صفر) فرع / نبيتة في الأوساط QL و WPM على التوالي.

الجدول (3) تأثير الأوساط الغذائية MS ، QL و WPM وتراكيز BA والتداخل بينهما في عدد الأفرع الأطول من (0،5) سم /نبيتة لعقد نبات اللوز *Prunus amygdalus* صنف Carmel بعد مرور 6 أسابيع من الزراعة

تركيز BA (ملغم/لتر)		معدل عدد الأفرع الأطول من 0،5 سم			تأثير تراكيز BA
		MS	QL	WPM	
صفر		0،14 ب ج	0،0 ج	0،0 ج	0،04 ب
BA	1	1،0 أ	0،50 ب	0،25 ب ج	0،59 أ
	2	1،0 أ	1،0 أ	0،12 ب ج	0،71 أ
	3	1،0 أ	0،37 ب ج	0،50 ب	0،63 أ
	4	1،0 أ	0،14 ب ج	0،37 ب ج	0،51 أ
تأثير الأوساط		0،83 أ	0،39 ب	0،24 ب	

* الأرقام ذوات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لاتختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 % .

عدد الأوراق المتفتحة :

يلاحظ من النتائج في الجدول (4) أن للأوساط الغذائية تأثيراً واضحاً في استجابة العقد المفردة لصفة معدل عدد الأوراق المتفتحة، إذ أمكن الحصول على عدد أوراق (73،12 ورقة/ جزء نباتي) من زراعة العقد على الوسط الغذائي WPM ، ولم تختلف معنوياً عن تلك التي تم الحصول عليها من زراعة العقد على الوسط الغذائي MS (20،11 ورقة /جزء نباتي)، لكنها تفوقت معنوياً على عدد الأوراق التي تم الحصول عليها من الزراعة على وسط QL ومن جهة أخرى يلاحظ أيضاً وجود فروقات معنوية في قيم الصفة المدروسة باختلاف تراكيز BA المضافة الى الوسط الغذائي، إذ تفوق التركيز 1 و 2 ملغم/لتر BA معنوياً في تسجيل أعلى عدد من الأوراق المتفتحة (16،0 ، 14،26 ورقة / جزء نباتي) على التوالي مقارنة مع باقي تراكيز BA المستخدمة، في حين حدث أقل تفتح للأوراق في معاملة المقارنة (12،6 ورقة / جزء نباتي) .

الجدول (4) تأثير الأوساط الغذائية MS ، QL و WPM وتراكيز BA والتداخل بينهما في عدد الأوراق المتفتحة لعقد نبات اللوز *Prunus amygdalus* صنف Carmel بعد مرور 6 أسابيع من الزراعة

تركيز BA (ملغم/لتر)		معدل عدد الأوراق المتفتحة حديثاً			تأثير تراكيز BA
		MS	QL	WPM	
صفر		7،0 د- و	6،30 ه و	5،0 و	6،12 ج
BA	1	16،40 ب- ج	8،12 د- و	23،37 أ	16،0 أ
	2	12،70 ج- ه	20،0 أ ب	10،12 ج- و	14،26 أ
	3	8،62 د- و	9،25 د- و	12،0 ج- ه	9،96 ب
	4	11،25 ج- و	7،14 د- و	13،12 ج- د	10،51 ب
تأثير الأوساط		11،20 أ ب	10،15 ب	12،73 أ	

* الأرقام ذوات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لاتختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 % .

كذلك تأثرت هذه الصفة بمعاملات التداخل بين الأوساط الغذائية وتراكيز BA، إذ سجلت معاملة التداخل بين الوسط الغذائي WPM مع التركيز 1 ملغم/لتر BA أعلى القيم لمعاملات التداخل وبمعدل عدد أوراق 23،37 ورقة / جزء نباتي، لم تختلف معنوياً عن معاملة تداخل 2 ملغم/لتر BA مع الوسط الغذائي QL وبمعدل عدد أوراق 0،20 ورقة / جزء نباتي، في حين سجلت معاملات المقارنة للأوساط الغذائية الثلاثة (MS ، QL و WPM) أدنى القيم لعدد الأوراق المتفتحة وبلغت (0،7 ، 6،30 ، 0،5 ورقة / جزء نباتي) على التوالي.

مرحلة التضاعف :

تأثير نوع الأوكسين وتركيزه في تضاعف الأفرع على وسط MS مجهز بـ 1 ملغم / لتر BA :

عدد الأفرع / نبيتة :

أشارت النتائج بعد مرور 8 أسابيع من زراعة الأفرع الجدول (5) إلى عدم وجود اختلاف معنوي بين الأوكسينات المستخدمة في تأثيرها على تضاعف الأفرع المزروعة على وسط MS المجهز بـ 1 ملغم / لتر BA ، إذ سجل IAA أعلى عدد فروع بلغت معدلاتها 3،58 فرع /جزء نباتي مقارنة مع IBA وNAA. من جهة اخرى سجلت تراكيز الأوكسينات (0،01 ، 0،05 و 0،1) ملغم / لتر زيادة معنوية في معدل تضاعف الأفرع، إذ أعطت فروع بلغت معدلاتها (5،41 ، 4،65 و5،40) فرع / جزء نباتي على التوالي مقارنة بالتراكيز صفر، 0،3 و0،5 ملغم / لتر التي أعطت فروع بلغت معدلاتها (1،57، 1،66 و1،67) فرع / جزء نباتي على التوالي. أما فيما يخص معاملات التداخل بين الأوكسينات والتراكيز المستخدمة فيلاحظ وجود اختلاف معنوي واضح في معدل تضاعف الأفرع بأختلاف معاملات التداخل، إذ سجلت معاملة التداخل 0،01 ملغم / لتر IAA أعلى معدل لعدد الأفرع وبلغ 7،20 فرع / جزء نباتي واختلفت معنوياً عن باقي معاملات التداخل باستثناء تداخلات 0،1 ملغم / لتر IAA ، 0،05 و 0،1 ملغم / لتر IBA و 0،01 ملغم / لتر NAA التي أعطت عدد فروع بلغت معدلاتها 5،60 ، 5،20 ، 6،60 و 5،22 فرع /جزء نباتي على التوالي (الأشكال 2 ، 3 و4) .

الجدول (5) تأثير نوع الأوكسين وتركيزه والتداخل بينهما في عدد الأفرع / نبيتة بعد مرور 8 أسابيع من زراعة أفرع اللوز *Prunus amygdalus* صنف Carmel على وسط MS مجهز بـ (1) ملغم / لتر BA

المعاملات	نوع الأوكسين			
تركيز الاوكسين (ملغم/لتر)	IAA	IBA	NAA	تأثير تركيز الأوكسين
0،0	1،57 هـ و	1،57 هـ و	1،57 هـ و	1،57 ب
0،01	7،20 أ	3،80 ج- و	5،22 أ- ج	5،41 أ
0،05	4،50 ب ج	5،20 أ- ج	4،22 ب- د	4،65 أ
0،1	5،60 أ- ج	6،60 أ ب	4،0 ج- هـ	5،40 أ
0،3	1،25 و	1،75 د- و	2،0 د- و	1،66 ب
0،5	1،37 و	1،75 د- و	1،88 د- و	1،67 ب
تأثير نوع الأوكسين	3،58 أ	3،44 أ	3،15 أ	

* الأرقام ذوات الأحرف المتشابهة لتأثير كل عامل أو لتأثير التداخل لاتختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 % .

عدد الأفرع الأطول من (0،5) سم / نبيتة :

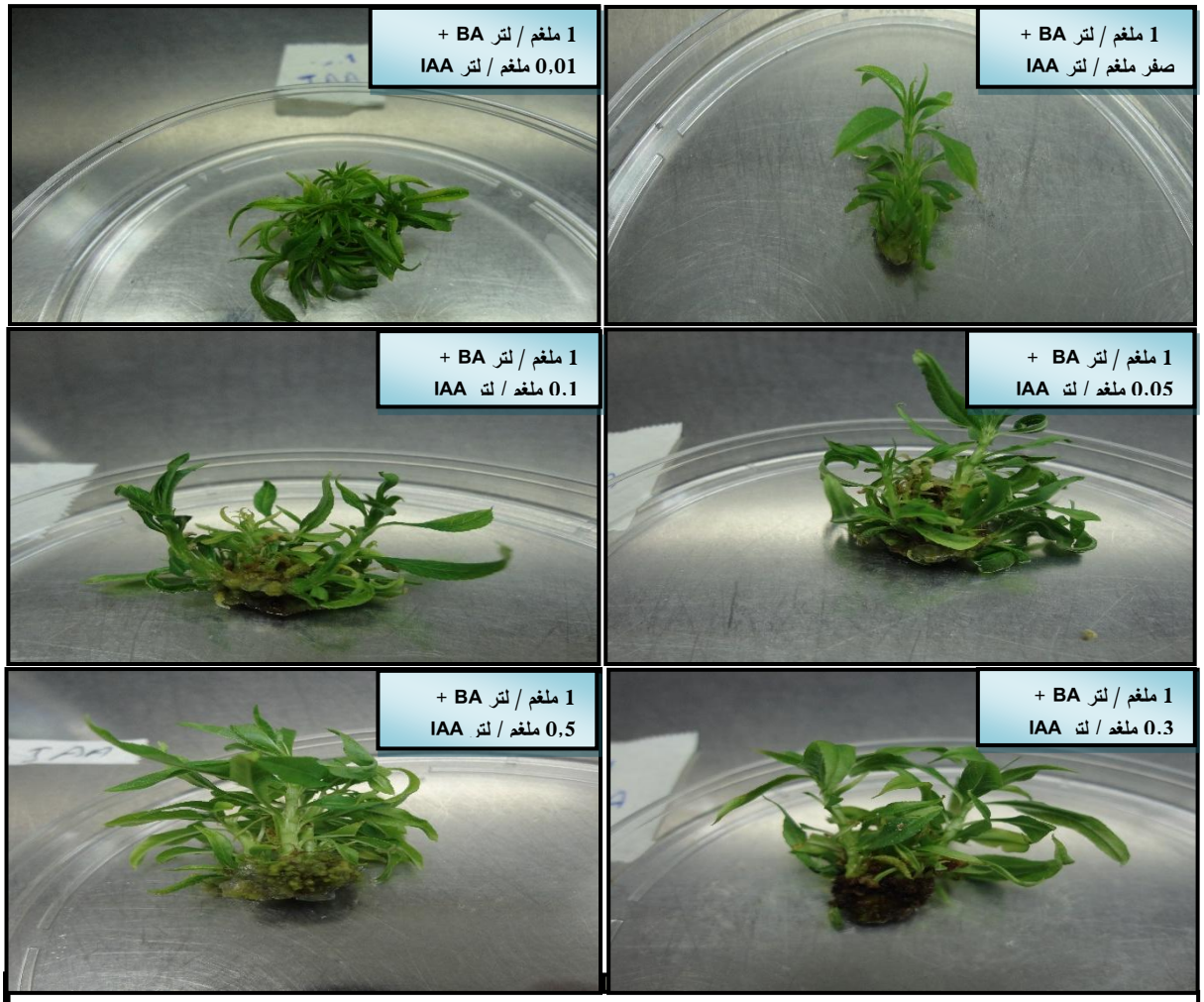
من بيانات الجدول (6) الخاصة بمعدل عدد الأفرع الأطول من 0،5 سم يلاحظ عدم وجود فروقات معنوية بين الأوكسينات المستخدمة في عدد الأفرع على الرغم من تفوق تأثير IBA على كل من IAA وNAA، إذ أعطى أعلى عدد فروع (1،84 فرع / جزء نباتي). أما فيما يخص تأثير التراكيز فيلاحظ من نفس الجدول تفوق معاملات التركيز 0،01 ملغم / لتر معنوياً على باقي تراكيز الأوكسينات، إذ أعطت عدد فروع بلغت معدلاتها 2،37 فرع / جزء نباتي ، ولم تختلف معنوياً عن معاملات التركيزين 0،05 و 0،1 ملغم / لتر، والتي أعطت عدد فروع بلغت معدلاتها (1،85 و2،21) فرع / جزء نباتي على التوالي ، في حين سجلت معاملة المقارنة أدنى معدل لعدد الأفرع (1،0 فرع / جزء نباتي) ، ولم تختلف معنوياً عن المعاملات التي جهزت فيها الأوساط بالتراكيز 0،3 و 0،5 ملغم / لتر .

من جهة أخرى يتضح من معاملات التداخل بين أنواع الأوكسينات وتراكيزها تفوق معاملة التداخل 0،01 ملغم/لتر IAA في إعطاء أعلى معدل لعدد الأفرع الأطول من 0،5 سم (3،20 فرع / جزء نباتي)، والتي لم تختلف معنوياً عن معاملات التداخل بين نفس التركيز وكل من IBA و NAA وكذلك معاملات التداخل بين التركيز 0،1 ملغم/ لتر وكل من IAA ، IBA وNAA ومعاملة 0،05 ملغم / لتر IB ، في حين سجلت معاملة التداخل بين التركيز 0،5 ملغم /لتر IAA أدنى عدد أفرع (0،62 فرع/ جزء نباتي) مقارنة مع باقي معاملات التداخل، والتي لم تختلف معنوياً عن معاملة المقارنة.

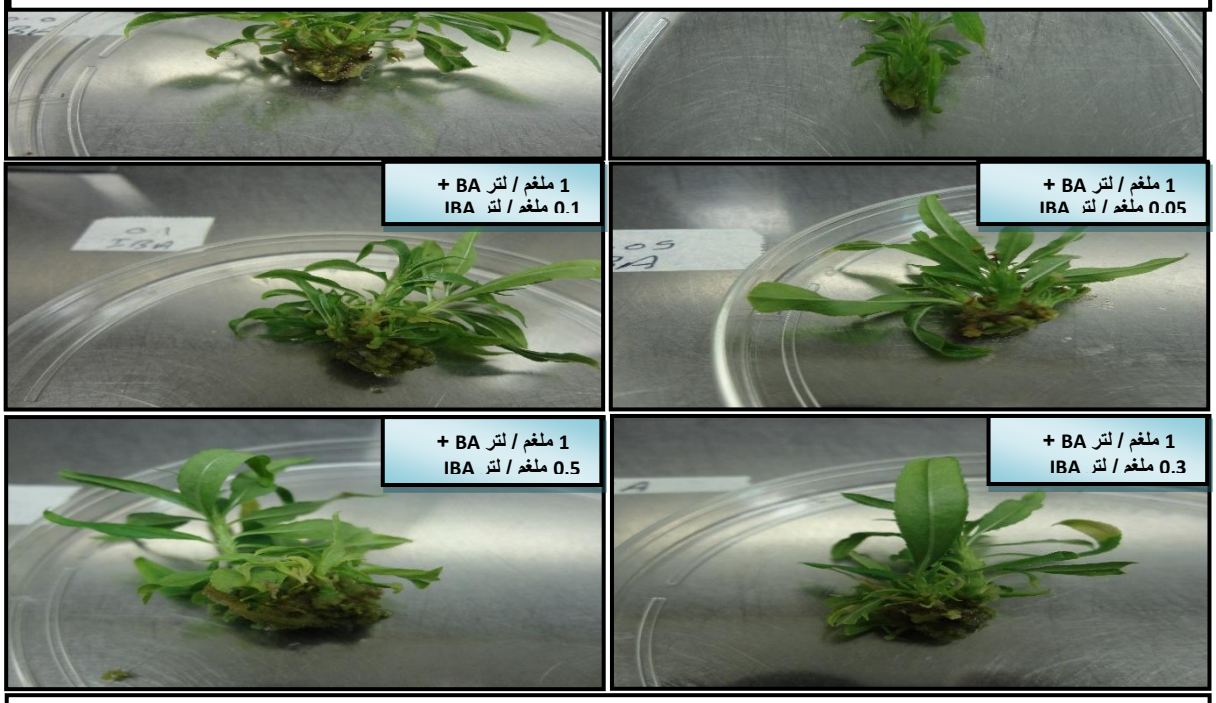
الجدول (6) تأثير نوع الأوكسين وتركيزه والتداخل بينهما في عدد الأفرع الأطول من 0،5 سم / نبيتة بعد مرور 8 أسابيع من زراعة أفرع اللوز *Prunus amygdalus* صنف Carmel على وسط MS مجهز بـ (1) ملغم / لتر BA

المعاملات	نوع الأوكسين			
تركيز الاوكسين (ملغم/لتر)	IAA	IBA	NAA	تأثير تركيز الأوكسين
0،0	1،0 ج د	1،0 ج د	1،0 ج د	1،0 ج
0،01	3،20 أ	1،90 أ- د	2،0 أ- د	2،37 أ
0،05	1،60 ب- د	2،50 أ ب	1،44 ب- د	1،85 أ ب
0،1	2،50 أ ب	2،30 أ- ج	1،85 أ- د	2،21 أ
0،3	1،12 ب- د	1،75 ب- د	1،50 ب- د	1،45 ب ج
0،5	0،62 د	1،62 ب- د	1،44 ب- د	1،23 ب ج
تأثير نوع الأوكسين	1،67 أ	1،84 أ	1،54 أ	

* الأرقام ذوات الأحرف المتشابهة لتأثير كل عامل أو لتأثير التداخل لاتختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 %



الشكل (2) تأثير تراكيز مختلفة من IAA في تضاعف أفرع اللوز *Prunus amygdalus* صنف Carmel بعد مرور 8 أسابيع من الزراعة على وسط MS مجهز بـ 1ملغم / لتر BA



الشكل (3) تأثير تراكيز مختلفة من IBA في تضاعف أفرع اللوز *Prunus amygdalus* صنف Carmel بعد مرور 8 أسابيع من الزراعة على وسط MS مجهز بـ 1 ملغم / لتر BA .

ارتفاع النبيتة (سم) :

يلاحظ من نتائج الجدول (7) التفوق المعنوي لتأثير IBA في ارتفاع النبيتات على IAA وNAA، واللذان لم يختلفا عن بعضهما معنوياً، إذ تم الحصول على أكبر ارتفاع للنبيتات (1،71 سم) من زراعة الأفرع على الوسط الغذائي المجهز بـ IBA تلاه الوسط المجهز بـ IAA (1،39 سم)، ثم الوسط المجهز بـ NAA (1،25 سم). أما فيما يخص تأثير التراكيز فيتضح من نفس الجدول تفوق ارتفاع النبيتات النامية في الوسط المجهز بـ 0،01 ملغم / لتر (1،83 سم) معنوياً على ارتفاع النبيتات النامية في وسط معاملة المقارنة (0،91 سم) والوسط المجهز بـ 0،5 ملغم / لتر (1،29 سم)، لكنها لم تختلف معنوياً عن ارتفاع النبيتات النامية في الأوساط المجهزة بباقي تراكيز الأوكسينات المدروسة .

من جهة أخرى توضح معاملات التداخل بين نوع الأوكسين وتركيزه في الجدول ذاته بأنّ 0،05 ملغم / لتر IBA أعطت أعلى معدل لارتفاع النبيتات (2،05) سم، وتفوقت معنوياً على كل من معاملات المقارنة و معاملات تداخل 0،5 ملغم / لتر IAA و 0،1 ، 0،3 و0،5 ملغم / لتر NAA، لكنها لم تختلف معنوياً عن باقي التداخلات المدروسة.

الجدول (7) تأثير نوع الأوكسين وتركيزه والتداخل بينهما في ارتفاع النبيتة (سم) بعد مرور 8 أسابيع من زراعة أفرع اللوز *Prunus amygdalus* صنف Carmel على وسط MS مجهز بـ (1) ملغم / لتر BA

المعاملات	نوع الأوكسين			
تركيز الاوكسين (ملغم/لتر)	IAA	IBA	NAA	تأثير تركيز الأوكسين
0،0	0،91 د	0،91 د	0،91 د	0،91 ج
0،01	1،58 أ- د	1،95 أ ب	1،97 أ ب	1،83 أ
0،05	1،47 أ- د	2،05 أ	1،25 أ- د	1،60 أ ب
0،1	1،81 أ- ج	1،59 أ- د	1،20 ب- د	1،54 أ ب
0،3	1،53 أ- د	1،81 أ- ج	1،18 ب- د	1،51 أ ب
0،5	1،06 ج د	1،90 أ- ج	0،94 د	1،29 ب ج
تأثير نوع الأوكسين	1،39 ب	1،71 أ	1،25 ب	

*** الأرقام ذوات الأحرف المتشابهة لتأثير كل عامل أو لتأثير التداخل لاتختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 ٪ .**

عدد الأوراق المتفتحة / نبيتة :

تبين نتائج الجدول (8) عدم وجود أي تأثير معنوي لنوع الأوكسين في عدد الأوراق المتفتحة لكل نبيتة، إذ تم الحصول على أعلى عدد للأوراق المتفتحة من الفروع المزروعة على الوسط المجهز بـ IBA (76،21 ورقة / نبيتة)، في حين كان أقلها من الفروع المزروعة على الوسط المجهز بـ NAA وبلغت 20،37 ورقة/ نبيتة .

أما فيما يخص تأثير تراكيز الأوكسينات فيوضح الجدول نفسه بأنّ التراكيز 0،01 ، 0،05 و 0،1 ملغم / لتر تفوقت معنوياً على باقي التراكيز المدروسة إذ تم الحصول على أعلى معدل لعدد الأوراق المتفتحة من الفروع المزروعة على الوسط المجهز بـ 0،01 ملغم / لتر وبلغت 32،44 في حين حدث أقل تفتح للأوراق في الفروع المزروعة على أوساط المقارنة (10،57 ورقة / نبيتة) .

من جهة أخرى توضح بيانات التداخل بين نوع الأوكسين وتركيزه تفوق معاملة 0،01 ملغم / لتر IAA معنوياً على عدد غير قليل من معاملات التداخل، إذ أعطت أعلى عدد من الأوراق المتفتحة (70،36 ورقة / نبيتة)، لكنها لم تختلف معنوياً عن معاملات التداخل 0،01 ملغم / لتر IBA و NAA ، 0،05 ملغم /لتر IAA و IBA و 0،1 ملغم / لتر (IAA ، IBA وNAA) .

الجدول (8) تأثير نوع الأوكسين وتركيزه والتداخل بينهما في عدد الأوراق المتفتحة بعد مرور 8 أسابيع من زراعة أفرع اللوز *Prunus amygdalus* صنف Carmel على وسط MS مجهز بـ (1) ملغم / لتر BA

المعاملات	نوع الأوكسين			
تركيز الاوكسين (ملغم/لتر)	IAA	IBA	NAA	تأثير تركيز الأوكسين
0،0	10،57 و	10،57 و	10،57 و	10،57 ب
0،01	36،70 أ	27،90 أ- د	32،77 أ ب	32،44 أ
0،05	26،30 أ- ه	35،0 أ ب	21،33 ب- و	27،55 أ
0،1	31،80 أ- ج	27،80 أ- د	23،0 أ- و	27،52 أ
0،3	12،0 و	15،50 د- و	15،62 د- و	14،37 ب
0،5	11،25 و	13،75 ه و	18،88 ج- و	14،62 ب
تأثير نوع الأوكسين	21،44 أ	21،76 أ	20،37 أ	

*** الأرقام ذوات الأحرف المتشابهة لتأثير كل عامل أو لتأثير التداخل لاتختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 %**

الحفظ بالتجميد :

يتضح من الجدول (9) الخاص بمعدل بقاء أطراف الأفرع على قيد الحياة Survival بعد انتهاء عملية الحفظ بالتجميد ومرور أربعة أسابيع من زراعة أطراف الأفرع المخزنة في النتروجين السائل على وسط MS الخالي من نترات الأمونيوم بأنّ أعلى معدل لبقاء الأفرع على قيد الحياة 70٪ كان عند مدة التعريض (60) دقيقة لسائل تزجيج النبات PVS2 ، التي بدورها لم

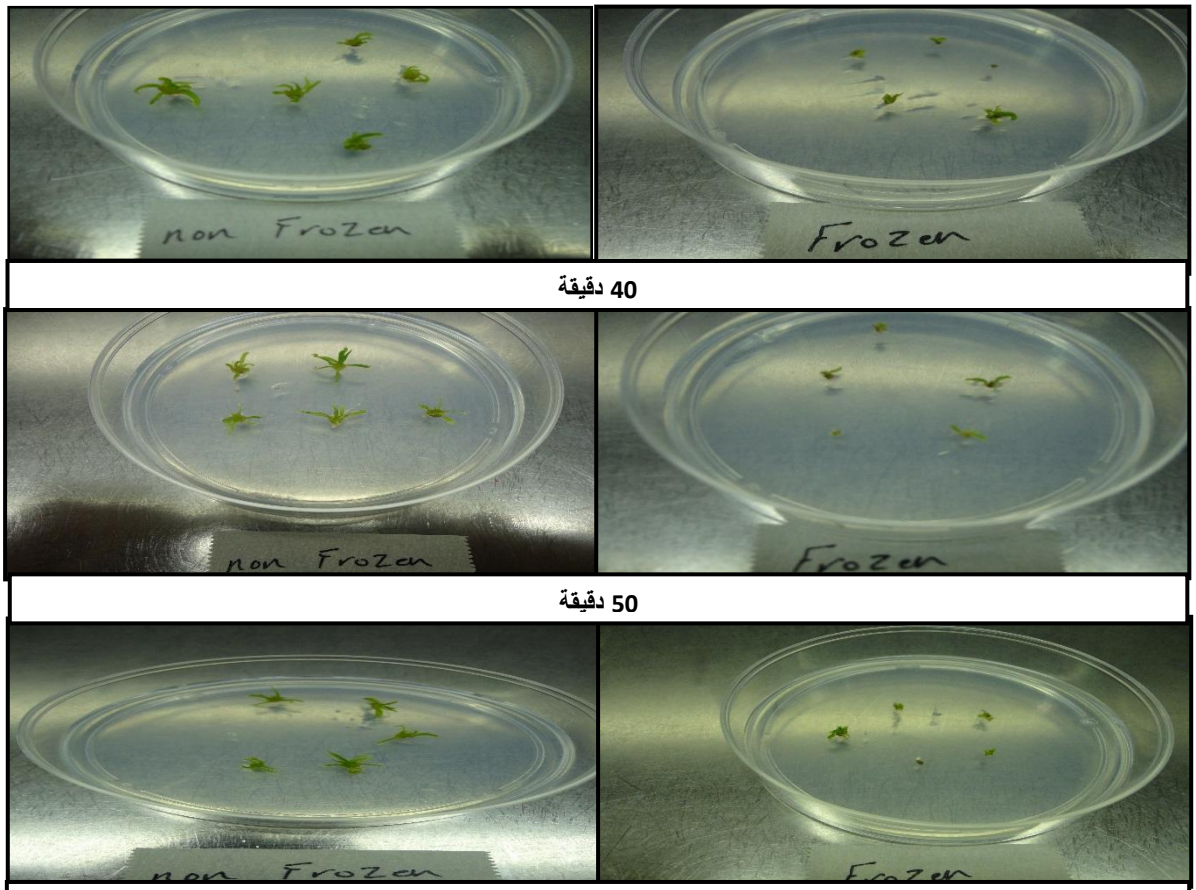
تختلف معنوياً عن معاملات مدد التعريض (30 ، 40 و 50) دقيقة، في حين سجلت مدة التعريض 10 دقائق أدنى النسب لمعدل عدد الأفرع الباقية على قيد الحياة وبلغت 20٪ .

الجدول (9) تأثير مدة تعريض أطراف أفرع نبات اللوز *P. amygdalus* صنف Carmel لسائل تزجج النبات PVS2 (دقيقة) في النسبة المئوية لبقاء الأجزاء النباتية على قيد الحياة بعد 4 أسابيع من الزراعة على وسط التجديد (MS الخالي من نترات الأمونيوم)

تأثير مدة التعريض لسائل PVS2 (دقيقة)	٪ للأجزاء النباتية الباقية على قيد الحياة	
	تخزين في النتروجين السائل	بدون تخزين في النتروجين السائل
10	20 ب	100 أ
20	20 ب	90 أ
30	40 أ ب	90 أ
40	50 أ ب	80 أ
50	40 أ ب	90 أ
60	70 أ	80 أ

*** الأرقام ذوات الأحرف المتشابهة لتأثير كل عامل أو لتأثير التداخل لاتختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 % .**

من جهة أخرى يلاحظ عدم وجود اختلافات معنوية بين معدلات عدد الأفرع الباقية على قيد الحياة ، الخاصة بالأفرع التي لم تخزن في النتروجين السائل ، إذ سجلت معاملة التعريض 10 دقائق أعلى نسبة 100٪ ، في حين سجلت مدد التعريض 40 و60 دقيقة أدنى النسب لمعدلات عدد الأفرع الباقية على قيد الحياة وبلغت 80 ٪ (شكل 5). كمية الاملاح الغذائية الكلية، واختلاف صيغها التركيبية ونسبها ومايتبعه من اختلاف في الشد الأزموزي الحاصل في الوسط الغذائي ، وتأثيره على جاهزية العناصر الغذائية للأجزاء النباتية المزروعة على هذه الأوساط ، إذ أن أكبر كمية من أملاح العناصر الغذائية احتواها وسط MS (4633،28) ملغم / لتر ، تلاه وسط QL (4111،23) ملغم/ لتر فوسط WPM (2684،42) ملغم/ لتر



الشكل (5) تأثير مدد تعريض أطراف أفرع نبات اللوز *P. amygdalus* صنف Carmel لسائل تزجج النبات PVS2 في النسبة المئوية لبقاء الأجزاء النباتية على قيد الحياة بعد 4 أسابيع من الزراعة على وسط التجديد (MS الخالى من نترات الأمونيوم) .

هذا بالإضافة الى ارتفاع تركيز النتروجين في وسط MS (1650 NH4NO3 + 1900 KNO3) ملغم/ لتر عنه في وسط QL (400 NH4NO3 + 1800 KNO3 + 1200 Ca(NO3)2.4H2O) ملغم/ لتر، تلاهم وسط WPM (400 NH4NO3 + 556 Ca(NO3)2.4H2O) ملغم/ لتر، وتتماشى هذه النتائج مع Kassim وآخرين ، (2010) و Channuntapipat وآخرين، (2003)، من حيث تفوق وسط MS على وسط WPM خلال مرحلة نشوء الزروعات لنبات اللوز، وتختلف مع Lamrioui وآخرون (2009) الذي أشار الى تفوق وسط QL معنوياً على وسط MS خلال مرحلة النشوء عند أكثاره لنبات الكرز الحلو ربما يعود ذلك الى اختلاف نوع النبات، فقد أشار Channuntapipat (2003) إلى اختلاف أصناف اللوز في استجابتها للنشوء على أوساط غذائية مختلفة، إذ حصل النشوء الأفضل للصنف Nonpariel على وسط AP، في حين كان النشوء الأفضل للصنف Ne Plus Ultra على الوسط MS.

إن تفوق صفات النمو (عدد البراعم المتفتحة وطول النبيتة وعدد الأفرع الأطول من 0،5 سم وعدد الأوراق المتفتحة) معنوياً في المعاملات المجهزة بـ BA مقارنة مع معاملة المقارنة (الخالية من BA)، قد يرجع سببه الى دور السايتوكاينينات في تنظيم نشاط المرستيمات القمية والتكوين الشكلي وتطور الكلوروبلاست ونمو الأوراق (فهمي ، 2003). إن تأثير السايتوكاينينات المختلفة في أحداث التضاعف الخضري يأتي من خلال دورها في انقسام الخلايا والقضاء على ظاهرة السيادة القمية، بالإضافة الى دورها في منع تحلل البروتينات والكلوروفيل في الخلايا، وخفض نشاط أنزيم الرايبونيوكليز (RNAse) مما يساعد في منع تحلل RNA، بل زيادته وبالتالي زيادة إنتاج الأحماض الأمينية كون السايتوكاينينات تنظم العمل الوظيفي بين RNA الناقل (t-RNA) وRNA الرسول (m-RNA) (جندية ، 2003). إذ يعتقد أنّ وجود السايتوكاينين في جزء من الحامض النووي الناقل t-RNA وبالقرب من الشفرة المضادة Anti-codon له دور مهم في ربط t-RNA مع m-RNA أثناء تكوين البروتينات، إذ أن t-RNA الخالي من سلسلة Isopentenyl الجانبية التابعة لـ Adenine يكون غير فعال. وهذا ماأكدته الأدلة الجديدة عن دور السايتوكاينينات في تنظيم بناء البروتين، إذ وجد بأن معاملة الأجزاء النباتية بالسايتوكاينينات سبب زيادة في محتوى البولي رايبوسومات Polyribosomes (ياسين ، 2000) .

إن زيادة استجابة بعض الصفات المدروسة عند رفع مستويات تراكيز BA في الوسط الغذائي يمكن أعزاؤه الى أن هذه الزيادات حققت حالة التوازن الهورموني المثالية في الجزء النباتي لإعطاء الاستجابة المثلى أما عن أسباب انخفاض قيم الصفات المدروسة اثناء مرحلة النشوء مع استمرار زيادة تراكيز BA فربما يعود الى أن التراكيز المرتفعة من BA أدت الى أحداث خلل في التوازن الهرموني لخلايا الجزء النباتي، مما انعكس سلباً على سير العمليات الحيوية فيه وبالذات استطالة وانقسام الخلايا وبالتالي انخفاض قيم الصفات المدروسة (Skoog وMiller ، 1957). إن التأثير المعنوي الأضافي المتحقق من أضافة بعض تراكيز الأوكسينات الى الأوساط الغذائية المجهزة بالتركيز الأفضل من BA اثناء مرحلة التضاعف مقارنة مع الأوساط المجهزة بالتركيز الأفضل من BA لوحده ، يمكن أعزاؤه الى ضرورة وجود كل من الأوكسين والسايتوكاينين في الخلايا لزيادة فعالية الانقسام الخلوي (وصفي ، 1995). إذ أشار وصفي (1998) الى ضرورة وجود كل من الأوكسينات والسايتوكاينينات لأحداث الانقسام الخلوي كون الأولى تعمل على مضاعفة تخليق الأحماض النووية ، في حين تعمل الثانية على مضاعفة تخليق البروتين داخل الخلية . إذ يعتقد بأنّ السايتوكاينيات تزيد من تكوين DNA و(m-RNA)، في حين إن الأوكسين يزيد من الحامض النووي الناقل (t-RNA) داخل الخلية قبل انقسامها (جندية ، 2003 ; أبو زيد ، 2000). وهذا يتماشى مع ماأشار اليه (عبيد ، 2009) عند دراسته لإكثار الخوخ خارج الجسم الحي من حيث التأثير الإيجابي لإضافة الأوكسينات الى أوساط مجهزة بـ BA اثناء مرحلة التضاعف، والذي فسره على أساس أن السايتوكاينين يحفز الانقسام الخلوي وزيادة عدد الخلايا وحجمها قطريا بالاتجاه العرضي وليس الطولي، في حين أن الأوكسين ينشط عملية الانقسام الخلوي واستطالة الخلايا عن طريق دوره في زيادة ليونة الجدران الخلوية وزيادة نفاذيتها مما يزيد توسيع الخلايا وكبر حجمها، هذا بالإضافة للدور غير المباشر للأوكسين في تخليق البروتين إذ يعد عاملاً فعالاً في تكوين mRNA الذي يشترك مع الأحماض النووية الأخرى في تكوين البروتينات التي تكون المادة الأساسية لبناء الخلايا وتطور نموها (وصفي ، 1998).

أوضحت النتائج بأن لمدد تعريض الأجزاء النباتية لسائل تزجج النبات PVS2 دوراً معنوياً في إزالة الكمية المناسبة من الماء الخلوي (dehydration) لهذه الأجزاء إذ أسهمت هذه المعاملة بشكل فعال في تجنب الأضرار الناتجة عن تكوين البلورات الثلجية بالإضافة الى تجنب الأضرار الناتجة عن الشد الأزموزي للخلايا الناتج عن عملية إزالة الماء وسمية بعض المواد الكيماوية المستخدمة اثناء عملية الحفظ (Niino وآخرون ، 1992b) وتتماشى هذه النتائج مع ماذكره Halmagyi وآخرون (2010) في دراستهم التي اجريت لحفظ أفرع التفاح بالتجميد ، التي أظهرت انخفاض نسب النجاة للأفرع عند تقليل مدة التعريض عن 10 دقائق، في حين أدت زيادة مدة التعريض 40 دقيقة الى زيادة نسبة النجاة كذلك تتماشى هذه النتائج مع ماذكره padro وآخرون، (2012) من حيث أن زيادة مدة التعريض لسائل PVS2 الى 60 دقيقة أدت الى زيادة نسب النجاة لأفرع نبات التوت (Morus alba L.) . إن آلية عمل سائل تزجج النبات PVS2 فسرها Buitink و Leprince (2004) على أساس تأثيره في استبدال الماء الخلوي بسوائل ذات لزوجة عالية أو الى تأثيره في تغيير سلوك الماء المتبقي في الخلايا، في حين فسره Volk و Walters (2006) الى دور بعض مكونات سائل تزجيج النبات في تقييد حركة جزيئات الماء، وبالتالي منعها من تكوين نويات الثلج، وهذا ماأكده Shatnawi وآخرون، (2011) إذ فسر التأثير الإيجابي لزيادة مدة تعريض الأجزاء النباتية لسائل PVS2 في نسبة النجاة الى أنها فسحت المجال لزيادة الذائبات داخل خلايا وأنسجة الأجزاء النباتية المهيئة للحفظ بالتجميد مما أسهم في استبعاد تأثير البلورات الثلجية وتقليل الأضرار الناتجة عن التجميد داخل الخلايا وخارجها.

المصادر

1. أبو زيد، الشحات نصر (2000). الهرمونات النباتية والتطبيقات الزراعية . الدار العربية للنشر والتوزيع ، القاهرة ، مصر.
2. جندية، حسن (2003). فسيولوجيا أشجار الفاكهة (أحدث الطرائق في علاج مشاكل الزراعة والتربية والإنتاج لأشجار الفاكهة في الأراضي المختلفة). الدار العربية للنشر والتوزيع، القاهرة، مصر.
3. صبوح، محمود وسلام لاوند (2012) . الأصول الوراثية والتنوع الحيوي (الجزء النظري). مطبعة جامعة دمشق، دمشق .
4. عبيد، أياد عاصي (2009). تأثيرات الوسط الغذائي والمجال المغناطيسي في الإكثار والصفات التشريحية لأصل الخوخ *Prunus persica* L. Batschصنف محلي بيضاوي بالزراعة النسيجية. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل. العراق .
5. العنزي، أمجد عبد الهادي محمد (2005). دور بعض منظمات النمو القياسية مع مركب السلفانيل أمايد في أستحداث كالس سيقان نبات اللوز *Prunus amygdalus* Batsch. رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، العراق.
6. فهمي، فكري جلال محمد (2003). كتاب زراعة الانسجة ، دار الكتب العلمية للنشر والتوزيع . مصر.
7. وصفي، عماد الدين حسين (1995). فسيولوجيا النبات. المكتبة الأكاديمية، القاهرة، جمهورية مصر العربية.
8. وصفي، عماد الدين حسين (1998). فسيولوجيا النبات. المكتبة الأكاديمية، القاهرة، جمهورية مصر العربية.
9. ياسين، بسام طه (2000) . أساسيات فسيولوجيا النبات ، مطابع دار الشرق ، قطر.
10. Ainsley، P. J. ; G. G. Collins and M. Sedgley (2001) *In Vitro* rooting of almond (*Prunus dulcis* Mill.) *In Vitro* Cellular and Developmental Biology Plant. 37: 778–785.
11. Anonymous (1996).Statistical Analysis System.SAS Institute Inc.Cary N.C.27511.USA.
12. Anonymous، (2008). ABA Australian Almond Statistics Report. In: Australia ، A.B.O. (ed.). Berri.
13. Buitink، J. and O. Leprince (2004). Glass formation in plant anhydrobiotes: Survival in the dry state. Cryobiology. 48:215–228.
14. Caboni، E. and C. Damiano (1994). Rooting in two almond genotypes. Plant *Science*، 96: 163-165.
15. Chang، Y. and B. M. Reed (1999). Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of *Rubus* shoot tips following cryopreservation. Cryoletters 20:371–376 .
16. Channuntapipat، C. ; M. Sedgley and G. Collins (2003). Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the hybrid rootstock Titan X Nemaguard، Scientia Horticulturae. 98: 473- 484.
17. Gjuleva، V. and A . Atanassov (1994). Micropropagation of *platanus acerifolia In Vitro*. Silvae Genetica،43 (4): 215-218.
18. Halmagyi، A. ; C. Deliu ; and V. Isac (2010). Cryopreservation of *Malus* cultivars: Comparison of two droplet protocols.Scientia Horticulturae، 124(3): 387-392.
19. Henry، P. H. ; F. A. Blazich and L. E. Hinesley (1992).Vegetative Propagation of eastern red cedar by stem cuttings. HortScience، 27(12): 1272-1274.
20. Isikalan، C. ; F. A. Akbas ; S. Namli ; E. Tikat and D. Basaran (2008) *In Vitro* micropropagation of almond (*Amygdalus communis* L. cv. Nonpareil). African Journal of Biotechnology، 7(12):1875-1880.
21. Kassim، N.E. ; S.M. Abou Rayya and E.A.M. Ali (2010). Effect of explant types and different basal nutrient media on *In Vitro* growth of bitter almond cuttings during establishment and proliferation stages. Journal of American Science، 6: 408-411.
22. Kuriyama، A. ; K. Watanabe ; S. Ueno and M. Mitsuda (1990). Inhibitory effect of ammonium ion on recovery of cryopreserved rice cells. Plant Science، 64: 231-235.
23. Ladizinsky، G . (1999). On the origin of almond. Genetic Resources and Crop Evolution، 46(2) : 143-147.
24. Lamrioui، A. M. ; A. Louerguioui and A. H. Abousalim (2009). Effect of the medium culture on the micro cutting of material resulting from adult cuttings of wild cherry trees (*Prunus avium* L.) and of *In Vitro* germination. European Journal of Scientific Research.، 25(2): 345-352.
25. Lloyd، G. and B. McCown (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain Laurel، *Kalmia latifolia*، by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings*،30:421-427.

26. Miguel، C. M. (1998). Adventitious regeneration and genetic transformation of almond (*Prunus dulcis* Mill.). – PhD Thesis، Faculdade de Ciências، Univ. Lisboa،
27. Murashige، T. and F. Skoog (1962) . A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant، 15: 473–497.
28. Niino، T. ; A. Sakai ; H. Yakuwa and K. Nojiri (1992b). Cryopreservation of *In Vitro* Grown Shoot Tips of Apple and Pear by Vitrification. Plant Cell Tissue and Organ Culture، 28 : 261-266.
29. Niino، T. ; A. Sakai ; S. Enomoto ; J. Magosi، and S. Kato (1992a). Cryopreservation of *In Vitro* Grown Shoot Tips of Mulberry by Vitrification. CryoLetters، 13: 303-312.
30. Padro، M. D. A. ; A. Frattarelli ; A. Sgueglia ; E. Condello ; C. Damiano and E. Caboni (2012). Cryopreservation of white mulberry (*Morus alba* L.) by encapsulation-dehydration and vitrification. Plant Cell Tissue and Organ Culture، 108:167–172 .
31. Panis، B. (2008). Cryopreservation of Monocots . Chapter 11. In: B. M. Reed، editor. Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer Science+Business Media، LLC. pp. 241-280.
32. Quoirin، M. and Ph. Lepoivre (1977). Etude de milieu adaptes aux cultures *In Vitro* de *prunus*. Acta Horticulureae، 78: 437-442.
33. Reed، B. M. (1993). Responses to ABA and cold acclimation are geno- type dependent for cryopreserved blackberry and raspberry meristems. Cryobiology، 30:179–184 .
34. Reed، B.M. (2008). Plant Cryopreservation: A Practical Guide ، Springer، New York.
35. Rugini، E. and D. C. Verma (1983) . Micropropagation of difficult-to- propagate almond (*P. amygdalus* Batsch) cultivar. Plant Science Letters، 28: 273-281.
36. Shatnawi، M. ; G. Anfoka ; R. Shibli ; M. Al-Mazra'awi ; W. Shahrour and A. Arebia (2011). Clonal propagation and cryogenic storage of virus free grapevine (*Vitis vinifera* L.) via meristem culture. Turkish Journal Of Agriculture and Forestry، 35: 173-184.
37. Skoog، F. and C. O. Miller (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *In Vitro* Symposia of the Society for Experimental Biology ، 9:118-131.
38. Volk، G. M. and C. Walters (2006). Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behaviour in shoot tips during cryoprotection. Cryobiology، 52:48–61.
39. Vysotskaya، O. N. ; A. L. Mochammed and R. G. Butenko (1999). Cryopreservation of red raspberry meristems (*Rubus idaeus* L.) isolated from *In Vitro* plantlets. Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences، 26(1): 19-22 .