جامعة طرابلس
كلية العلوم
قسم علم النبات

تأثير إضافة بعض منظمات النمو والفحم النشط والسكروز على اكثار نبات الزنجبيل *Zingiber officinale* Rosc نسيجيا باستخدام البراعم الريزومية

إسراء يونس الصادق إستوكه

مفتاح محمد ضو

أستاذ

قدمت هذه الرسالة استكمالا لمتطلبات الإجازة العالية (الماجستير) في علوم الحياة

بتاريخ .../..../1444هـ الموافق ..../3/2023م

الاهداء

الى معلمي الاول . . . الى من وهبه الله الهيبة والوقار . . . الى من علمني العطاء بدون انتظار . . . الى من احمل اسمه بكل افتخار .

((أبي الغالي _ يونس استوكه _ حفظه الله))

إلى التي أمدتني بالحب والحنان . . . الى من علمتني وعانت الصعاب لأصل الي ما انا فيه . . . إلى من كان دعائها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي إلى أغلى الحبايب .

((أمي الغالية _ حميدة باكير _ رعها الله))

إلى عزي و سندي وقوتي ووسامي . . .الى الايادي السخية . . .الى من شاركوني الطفولة . . . وتقاسمت معهم الافراح والاحزان .

((أشقائي الأعزاء _ أنور وربيع ولطفي _ حفظهم الله))

إلى دعمي وحماسي . . . الى رمز الوفاء والعطاء . . . الى مرسم الامان . . . إلى من تمنى لي النجاح والتوفيق رآجية من الله أن يبارك فيه ويحفظه بعينه التي لا تنام .

((زوجي الموقر _ عبد الحميد المجراب _ حماه الله))

إلى فلذات الكبد فرحة عمري . . . . سر السعادة.

((أطفالي الصغار _ ريان وعبد الرحمن))

الى جميع من تلقَّيتُ منهم النصح والدعم والمساعدة . . .أهدي إليكم بحثي العلمي . . .خلاصة الجهد والتعب .

الشكر والتقدير

قال تعالى: بسم الله الرحمن الرحيم؛ (ومن يشكر فإنما يشكر لنفسه) (لقمان :12)

وقال رسوله الكريم صلى الله علية وسلم : «من لم يشكر الناس، لم يشكر الله عز وجل» .

احمد الله تعالى حمدا كثيرا طيبا مباركا ملئ السموات والارض على ما اكرمني به من اتمام هذه الدراسة والتي ارجو ان تنال رضاه.

❖ ثم اتوجه بجزيل الشكر وعظيم الامتنان الى كل من:

- الدكتور الفاضل / مفتاح محمد ضو ، لتفضله الكريم بالإشراف على هذه الدراسة، لكل ما قدمه من توجيه وارشاد لإتمام هذا العمل على ما هو عليه .
- الاستاذ الفاضل/المهندس المنذر أبوغنية رئيس قسم زراعة الانسجة بمركز بحوث التقنيات الحيوية على مساعدته الفعالة لإتمام البحث واتاحة الفرصة لعمل بحثي بالمركز .
- لكل القائمين بقسم علم النبات من الدكاترة والأساتذة والموظفين اللذين سخروا جهودهم لكي نعلوا ، واخص بالذكر الدكتور الفاضل/ سليمان الصالحين أبوغرارة .
- عظيم الامتنان والشكر لمن كان له فضل علينا وأحسن الظن بنا وشديد الاعتذار لمن قصرنا بحقه أو أخطأنا .

والشكر موصول للجميع

الباحثة : اسراء استوكه

فهرس المحتويات

الموضوع	الصفحة
الإهداء.....	أ
الشكر والتقدير.....	ب
فهرس المحتويات.....	ج
قائمة الجداول	هـ
قائمة الاشكال.....	و
قائمة الاختصارات.....	ح
المستخلص	ط
1. المقدمة	1
2. الدراسات السابقة	3
1.2. نبات الزنجبيل	4
2.2. الزنجبيل في القرأن الكريم والسنة النبوية.....	5
3.2. التصنيف العلمي	5
4.2. القيمة الغذائية والتركيب الكيميائي للزنجبيل	5
5.2. الإكثار التقليدي للزنجبيل.....	6
6.2. الإكثار النسيجي للزنجبيل	7
1.5.2. أهمية زراعة الأنسجة	8
2.5.2. العوامل المحددة لنجاح زراعة الأنسجة.....	8
1. الجزء النباتي المستخدم	8
2. عمر وحجم النسيج المستخدم	9
3. منظمات النمو.....	9
4. الفحم النشط.....	11
5. الكربوهيدرات.....	11
6. عوامل أخرى	12
أولا: العوامل الوراثية.....	13
ثانيا: العوامل المتعلقة بالنبات الأم.....	13
ثالثا: العوامل المتعلقة بالمستأصل النباتي.....	13
رابعا: العوامل المتعلقة بالظروف البيئية للمزرعة النسيجية.....	13
3. المواد وطرائق البحث	14
1.3. المرحلة الاولى:- تأسيس المزرعة المعقمة	14

1.1.3. التعقيم السطحي 14
2.1.3. تحضير وتعقيم الوسط الغذائي 15
2.3. المرحلة الثانية:- استيلاد النباتات او توالد النموات الخضرية 17
1.2.3. تأثير التراكيز المختلفة من السيتوكينين على النمو الخضري 17
2.2.3. تأثير السيتوكينين والفحم النشط على النمو الخضري 17
3.2.3. تجذير النموات الخضرية الناتجة 18
4.2.3. تأثير تراكيز السكروز في وسط النمو على نمو وتجدير المستأصلات 18
3.3. المرحلة الثالثة: الاقلمة..... 19
4. النتائج والمناقشة 21
1.4. تحديد أفضل تركيز لمحلول الكلوركس لإنتاج مزارع نسيجية خالية من التلوث 21
2.4. تحديد أفضل تركيز لبعض منظمات النمو والفحم النشط لتوالد ونمو النموات الخضرية 23
3.4. تحديد أفضل تركيز لبعض منظمات النمو والفحم النشط لتوالد ونمو الجذور 27
4.4. تأثير تركيز السكروز في وسط النمو (MS)على عدد وطول النموات الخضرية..... 30
4.4. تأثير تركيز السكروز في وسط النمو (MS)على عدد وطول الجذور. 32
5.4. أقلمه النبيتات 35
6.4. الاستنتاج 36
5.التوصيات 38
6. المراجع 39
أولاً- المراجع العربية 39
ثانيا- المراجع الانجليزية 40
7. الملاحق 52
Abstract 54

قائمة الجداول

الموضوع	الصفحة
الجدول (1): تراكيز منظم النمو BAP في إكثار نبات *Zingiber officinale* بالتجربة.....	17
الجدول (2): تراكيز منظم النمو BAP والفحم النشط في إكثار نبات *Zingiber officinale* بالتجربة.....	18
الجدول (3): تراكيز منظمات النمو BAP وNAA في إكثار نبات *Zingiber officinale* بالتجربة.....	18
الجدول (4): تراكيز الأملاح المستخدمة لتحضير 1 لتر من وسط النمو MS	53

قائمة الاشكال

الموضوع	الصفحة
شكل (1): الدول الرائدة في انتاج الزنجبيل	3
شكل (2): الشكل الظاهري لنبات الزنجبيل *Zinger officinale*.....	4
شكل (3): مرحلة تشجيع انتاج البراعم لنبات الزنجبيل.....	14
شكل (4): وحدة العزل المعقمة التي تجرى بداخلها عزل وزراعة النباتات وتعتبر أحد أساسيات تجهيز معمل زراعة الانسجة الزراعة.....	16
شكل (5): مستنبتات خالية من التلوث.....	16
شكل (6): غرفة النمو	16
شكل (7): زراعة مستأصل نباتي واحد في كل وعاء منفرد (برطمان).....	19
شكل (8): النبيتات التي أخذت عليها البيانات بعد عملية الأقلمة.....	20
شكل (9): اوعية الزراعة الخالية من التلوث.....	22
شكل (10): نسبة المستأصلات النباتية الخالية من التلوث لنبات *Zingiber officinale* المعامل بمحلول الكلوركس.....	22
شكل (11): تأثير تركيز منظم النمو BAP (5,4,3,2 ملجم/لتر) وNAA (1,0.5 ملجم/لتر) وAC (0.3%) باستخدام الوسط الغذائي (MS) علي عدد النموات الخضرية الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*.....	24
شكل (12): تأثير تركيز منظم النمو BAP (5,4,3,2 ملجم/لتر) و NAA (1,0.5 ملجم/لتر) وAC (0.3%) في الوسط الغذائي (MS) علي متوسط عدد الاوراق الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*.....	26
شكل (13): تأثير تركيز منظم النمو BAP (5,4,3,2 ملجم/لتر) و NAA (1,0.5 ملجم/لتر) وAC (0.3%) في الوسط الغذائي (MS) علي متوسط طول النموات الخضرية الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*.....	26
شكل (14): تأثير تركيز منظم النمو BAP (5,4,3,2 ملجم/لتر) وNAA (1,0.5 ملجم/لتر) وAC (0.3%) في الوسط الغذائي (MS) علي نسبة التجذير الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*.....	29
شكل (15): تأثير تركيز منظم النمو BAP (5,4,3,2 ملجم/لتر) و NAA(1,0.5 ملجم/لتر) وAC (0.3%) في الوسط الغذائي (MS) علي متوسط عدد الجذور الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*.....	30
شكل (16): تأثير تركيز منظم النمو BAP (5,4,3,2 ملجم/لتر) وNAA (1,0.5 ملجم/لتر) وAC	

(0.3%) في الوسط الغذائي (MS) علي متوسط طول الجذور (سم) الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*..... 30
شكل (17): تأثير تركيزات مختلفة من السكروز على عدد النموات الخضرية في الوسط الغذائي (MS) الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale* 31
شكل (18): تأثير تركيزات مختلفة من السكروز علي متوسط طول النموات الخضرية (سم) في الوسط الغذائي (MS) الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale* 31
شكل (19): تأثير تركيز السكروز في الوسط الغذائي (MS) على نسبة التجذير الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*..... 33
شكل (20): تأثير تركيزات مختلفة من السكروز على عدد الجذور في الوسط الغذائي (MS) الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*..... 34
شكل (21): تأثير تركيزات مختلفة من السكروز علي متوسط طول الجذور (سم) في الوسط الغذائي (MS) الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*..... 34
شكل (22): مرحلة نقل النبيتات الي الاصص لإجراء الأقلمة خارج المعمل (*ex-vitro* acclimatization)..... 37
شكل (23): حجم وشكل النباتات بالاصص بعد حوالي اربعة اسابيع من الأقلمه خارج المعمل (*ex-vitro* acclimatization)..... 37
شكل (24): بعض الأجهزة والادوات المستخدمة في التجربة..... 53

قائمة الاختصارات

الاسم	الترجمة	الاختصار
Activated Charcoal	الفحم النشط	AC
6- benzyl-amino-purine	6- بنزايل امينو بيورين	BAP
α-Naphthalene acetic acid	α - نافثالين حمض الخليك	NAA
Murashige & Skoog	بيئة مورشييج وسكوج	MS
Potential of hydrogen	الأس الهيدروجيني	PH
Hydrochloric acid	حمض الهيدروكلوريك	HCl
Statistical Analysis System	نظام التحليل الإحصائي	SAS
Sodium hydroxide	هيدروكسيد الصوديوم	NaOH
Completely Randomized Design	التصميم العشوائي الكامل	CRD
Randomized Completely Block Design	تصميم القطاعات العشوائية الكاملة	RCBD

تأثير إضافة بعض منظمات النمو والفحم النشط والسكروز على إكثار نبات الزنجبيل *Zingiber officinale* Rosc نسيجيا باستخدام البراعم الريزومية

إسراء يونس إستوكه (رسالة ماجستير).

جامعة طرابلس (2023).

الدكتور مفتاح محمد ضو (استاذ).

المستخلص

بالرغم من الأهمية الاقتصادية للزنجبيل إلا أنه لم يسبق زراعته في ليبيا، ولهذا السبب أجريت هذه الدراسة في المركز الوطني لبحوث التقنيات الحيوية، طرابلس، ليبيا في 2019-2020. أنشئت طريقة بسيطة للتكاثر الدقيق لنبات *Zingiber officinale* Rosc وذلك باستخدام البراعم النامية للريزومات الطازجة وزراعتها في وسط شبه صلب. تم التعقيم السطحي لهذه البراعم بواسطة هيبوكلوريت الصوديوم (2، 2.5 و3%) لمدة 30 دقيقة. تركيز 3% قلل التلوث وكان معدل المستأصلات الحية والخالية من التلوث عالي 90%. تم قطع البراعم النامية على الريزوم الي قطع (مستأصلات) وزراعتها على وسط موراشيج وسكوج (MS) المضاف إليه تراكيز (2، 3، 4، 5 ملجم/لتر) (BAP) 6-benzyl-amino-purine مع أو بدون الفحم النشط (AC) 0.3%، وتراكيز (2 و3 ملجم/لتر) BAP مضاف له α-Naphthalene acetic acid (NAA) تراكيز (0.5 و1 ملجم/لتر) لتحفيز النمو الخضري والجذري. أظهرت النتائج أن كل المعاملات المستخدمة سجلت تأثيرًا إيجابيًا على عدد الأفرع باستثناء تلك التي نمت على وسط MS مضاف إليه 5 ملجم/لتر BAP و0.3% AC، والتي سجلت انخفاض غير معنوي في عدد الفروع.

وسط MS الذي يحتوي على 3 ملجم/لتر BAP مع أو بدون AC سجل أعلى عدد أوراق لكل مستأصل حوالي (12.4 و10 ورقة/ مستأصل) على التوالي. جميع معاملات BAP المضاف إليه NAA لم تحسن عدد الأوراق لكل فرع باستثناء المستأصلات المزروعة على وسط MS مضاف إليه 3 ملجم/لتر BAP و0.5 ملجم/لتر NAA، والتي أظهرت زيادة بنحو 26% مقارنة بالشاهد. أدت إضافة AC إلى وسط MS المحتوي على BAP إلى زيادة عدد الأوراق للمستأصل، باستثناء المستأصلات المزروعة على وسط MS المضاف إليه 5 ملجم/لتر من BAP، والتي أظهرت انخفاضًا طفيفًا في عدد الأوراق. لم يتأثر طول الساق بالفحم النشط بينما أظهرت جميع المعاملات الأخرى المستخدمة في هذه التجربة انخفاضًا طفيفًا ولكن غير معنوي في طول الساق باستثناء المستأصلات المزروعة على 4 ملجم/لتر BAP والتي أظهرت انخفاضًا معنويًا مقارنةً بالشاهد. أما بالنسبة لطول الجذر، إما لم يتأثر أو انخفض بشكل طفيف في جميع المعاملات مقارنة بالشاهد؛ من ناحية أخرى، تأثر عدد الجذور بشكل مختلف، حيث سجل أعلى عدد للجذور لكل مستأصل نباتي (17.7) على المستأصلات النباتية المزروعة على وسط MS مضاف اليه 3 ملجم/لتر من BAP، وأظهرت جميع المعاملات الأخرى لـ BAP انخفاضًا طفيفًا مقارنةً بالشاهد. بينت جميع المعاملات المختلفة من BAP وNAA معا زيادة طفيفة في عدد الجذور لكل مستأصل نباتي مقارنة بالشاهد، بينما أظهرت المستأصلات

المزروعة على 3 ملجم/لتر BAP و0.5 ملجم/لتر NAA زيادة عالية في عدد الجذور (13.4 جذر/مستأصل نباتي). أوضحت إضافة AC إلى الوسط الذي يحتوي على تراكيز مختلفة من BAP تأثيرًا إيجابيًا على عدد الجذور باستثناء المستأصلات المزروعة على الوسط المضاف إليه 5 ملجم/لتر والتي بينت انخفاض كبير في عدد الجذور لكل مستأصل مقارنةً بالشاهد. كما تمت دراسة تأثير تركيز السكروز في وسط MS على تطور الأفرع والجذور باستخدام التراكيز 30، 60، 90 و120 جم/لتر. أظهرت النتائج أن تركيز السكروز عند 30 جم/لتر سجل أفضل النتائج فيما يتعلق بطول الأفرع وعددها. علاوة على ذلك، أظهرت النتائج أن عدد الجذور لم يتأثر بمستوى السكروز في الوسط. أوضح تحليل الارتباط للعلاقة بين معايير نمو الفرع وطول الجذور وجود ارتباط عكسي بين هذه المعاملات ومستوى السكروز. نستطيع القول أن أفضل معامله هي تلك التي تحتوي على مستأصلات نباتية مزروعة على وسط MS مضاف إلية 3 ملجم/لتر من BAP، والذي أعطى 5.4 فرع لكل مستأصل، وكل فرع يحتوي بمعدل 10 أوراق و17.7 جذر، تليها مستأصلات نباتية مزروعة على 3 ملجم/لتر BAP مع 0.3% AC، والتي سجلت متوسط 3.9 فرع لكل مستأصل نباتي، وكل فرع يحتوي على متوسط 12.4 ورقة و11 جذرًا. تم أقلمه النبيتات لمدة 4 أسابيع في المعمل (*in-vitro*) وأربعة أسابيع خارج المعمل (*ex-vitro*)، وكان معدل بقاء النباتات الحية والغير ملوثة مرتفع 85%. سيتم نقل هذه النباتات إلى الحقل لإنتاج الريزومات، الجزء المفيد والاقتصادي من الزنجبيل. إن نجاح الزراعة الحقلية سيفتح حقبة جديدة لإنتاج الزنجبيل في ليبيا.

الكلمات المفتاحية: الزنجبيل، التكاثر الدقيق، منظمات النمو النباتية، الفحم النشط، الريزومة، السكروز.

1. المقدمة.

تعتبر الصين الموطن الأصلي لنبات الزنجبيل *Zingiber officinale* ثم أنتشر منها الى الهند وجنوب أسيا وغرب أفريقيا. ومنها الي دول البحر الأبيض المتوسط والعالم العربي عن طريق التجار العرب (Langner وأخرون، 1998؛ Wang وأخرون، 2017؛ Gavande وأخرون، 2018). وهو نبات عشبي معمر ريزومي غني بالمعادن الأساسية والفيتامينات والمركبات الطيارة وغير الطيارة (Syafitri وأخرون، 2018).

يستخدم ريزوم نبات الزنجبيل في الطب لعلاج الروماتيزم (Srinivasan وأخرون، 2017)، وللحماية من مرض السكري (Bhargava وأخرون، 2012؛ Saedisomeolia وأخرون، 2018). وله تأثيرات مفيدة ضد السمنة (Daily وأخرون، 2015) وأمراض القلب والأوعية الدموية والسرطان (Ghasemzadeh وأخرون، 2010؛ Cheng وأخرون، 2011؛ Mughal، 2019) وفي علاج السعال ونزلات البرد والحد من تشنجات الحرارة وللتخلص من الغازات وضد التقيؤ والشقيقة (Grzanna وأخرون، 2005؛ Shawahna وأخرون، 2017؛ Gamal وأخرون، 2018). بالإضافة الي استخداماته العديدة في الطعام حيث يعتبر كأحد أهم التوابل وأكثرها استخداما في جميع أنحاء العالم (Zahara وأخرون، 2018؛ Ali وأخرون، 2018). ويستخدم في صناعة خبز الزنجبيل والبسكويت والكعك والحلويات والحساء والمخللات (Nafi وأخرون، 2014). كما يستخدم أيضًا في صناعة مستحضرات التجميل ومنتجات العناية الشخصية والعطور (Nair، 2019).

تتكاثر النباتات بصفة عامة جنسيا ولا جنسيا، إلا أن العديد من النباتات تواجه مشاكل في الإكثار الجنسي أو اللاجنسي لأسباب عديدة. فالتكاثر الجنسي للزنجبيل لا يمكن حدوثه بسهولة لعدة أسباب أهمها العقم الذاتي وانتشار ظاهرة عدم التوافق (Dhamayanthi وأخرون، 2003). وقد أشار Nair (2019) الى أن هذا النوع *Zingiber officinale* عقيم، ولا يحتوي على بذور. أما بالنسبة للتكاثر اللاجنسي (التكاثر الخضري) يمكن حدوثه بسهولة عن طريق الريزومات ولكن بمعدل انتشار بطيء، حيث ينتج الريزوم حوالي 6-15 برعم في موسم طويل يستغرق حوالي 9-10 أشهر، بالإضافة إلى سهولة نقل الأمراض المختلفة عن طريق الريزومات، والتي تؤثر سلبًا على صفاته الطبية وتقلل الإنتاجية أو تمنعها تماما وهذه تعتبر من أهم معوقات الإنتاج (Mehaboob وأخرون، 2019).

وبذلك يمكن أن يكون استخدام تقنيات زراعة الأنسجة النباتية والتي تتمتع بمزايا معينة مقارنة بالتقنيات التقليدية بديلًا مناسبًا لإنتاج نبات الزنجبيل. حيث تعتبر عملية تكاثر سريعة، وباستخدام الحد الأدنى من المساحة والوقت بغض النظر عن الموسم والطقس على مدار السنة، مع المحافظة على الصفات الوراثية للنبات

الأم (Sidhu، 2010؛ Yildiz، 2012). ولإكثار النباتات التي يصعب إكثارها بالطرق المعتادة، وتعتبر وسيلة مميزة للإكثار الكثيف للنباتات وكذلك لعبت أيضا دور في مجال تحسين الصفات الوراثية لبعض النباتات، وخاصة تلك التي تتكاثر خضريا (Hussain وأخرون، 2012). فالمهتمون بزراعة الزنجبيل وكذلك المهتمون بالبرامج الزراعية وإنتاج أصناف جديدة بدون استثناء يمكنهم الاستفادة من هذه التقنيات وخاصة أن برامج التربية التقليدية لا يمكن تطبيقها لهذا النبات.

تزرع النباتات بالمعمل تحت ظروف معقمة وملائمة من حيث درجة الحرارة والإضاءة وباستخدام بيئة صناعية للنمو تحتوي على جميع العناصر الغذائية والمركبات الضرورية كالسكريات ومنظمات النمو وأخرى مساعدة. السكريات هي المصدر الوحيد للكربون والطاقة وتضاف لوسط النمو عادة نظرًا لقلة كفاءة التمثيل الضوئي للجزء المنزرع والذي ينعكس سلبا على النمو والتطور، والسكروز هو أكثر السكريات استعمالًا ويعتبر الأفضل والأرخص مقارنه بالسكريات الأخرى مثل المالتوز واللاكتوز (George، 2008). حيث يشارك بشكل فعال في التحكم في عمليات النمو والتطور للأجزاء النباتية المختلفة واتمام عملية البناء الضوئي (فهمى، 2003؛ Gibson، 2000).

ومن المركبات المساعدة على النمو الفحم النشط Activated charcoal (AC)، وعادةً يستخدم في الإكثار الدقيق لتحسين نمو الخلايا (Pan وStaden Van، 1998). إضافة الفحم النشط إلي الوسط المغذي من الممارسات الشائعة، وتأثيره الإيجابي على النمو يمكن أن يعزى الى إدمصاص المواد المثبطة للنمو الناتجة من تعقيم وسط النمو عند تعرضه لدرجة حرارة عالية، بالإضافة الي قابليته العالية للإرتباط بالمواد الفينولية التي تنتج من الجزء المنزرع (Teixeria وأخرون، 1994) والتي تعيق نمو وتطور ذلك الجزء المنزرع. كما يعمل الفحم النشط أيضًا على المحافظة على درجة حموضة الوسط عند المستوى المثالي (Owen وأخرون، 1991). ونظرًا للونه الأسود الذي يتميز به الفحم النشط فإنه يعمل على تخليق بيئة مظلمة بوسط النمو وبالتالي فهي تحاكي وتشبه ظروف التربة في الطبيعية مما يساعد على تكوين الجذور (Dumas وMonteuuis، 1995).

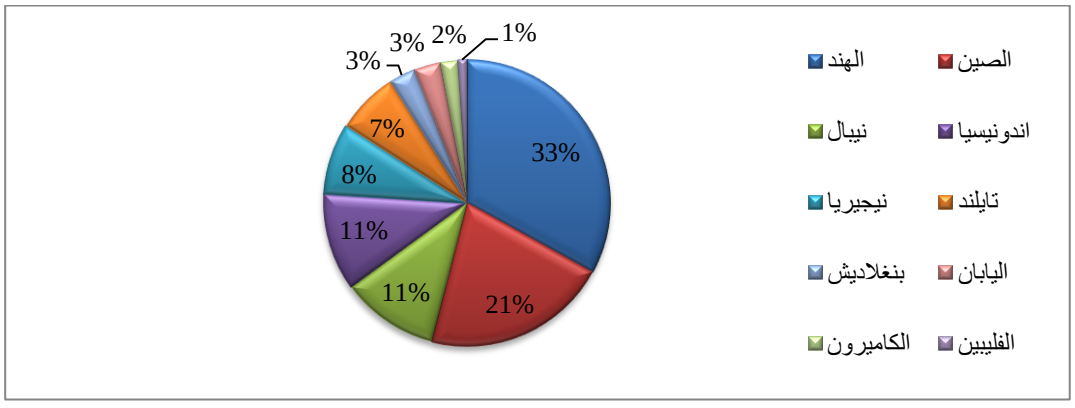
بالنظر الى الصعوبات التي تواجه القائمين على زراعة الأنسجة بصفة عامة فقد وضعت عدة أهداف استراتيجية لهذه الدراسة التي تهدف إلى إمكانية تطوير تقنية تكاثر الزنجبيل نسيجيًا في المعمل بشكل أسرع وخالي من الأمراض وعلى نطاق واسع وكذلك زراعته على مدار السنة بطريقة فعالة واقتصادية، وذلك من خلال دراسة تأثير تراكيز مختلفة لبعض منظمات النمو والفحم النشط والسكروز لتنمية النبات خضريا باستخدام البراعم الريزومية في الوسط الغذائي Murashige & Skoog (MS).

2. الدراسات السابقة.

منذ فجر التاريخ وعلى مر العصور، اعتمد الإنسان كثيرًا على النباتات الطبية لتلبية احتياجاته الصحية والغذائية (Nwachukwu وأخرون، 2010). حيث يمكن إرجاع تطور النظم الطبية التقليدية التي تضم النباتات كوسيلة للعلاج إلى العصر الحجري القديم حتى عصرنا الحاضر الذي تجلت فيه مدى الأهمية الاقتصادية الكبيرة لهذه النباتات الطبية، حيث أصبحت تستخدم بشكل واسع لعلاج الأمراض والوقاية منها، وعلى الرغم من توفر الطب الحديث فقد كان طب الأعشـاب هو الأكثر استخداماً في كثير من دول العالم (Rout وأخرون، 2009؛ Dhanik وأخرون، 2017) .

أظهرت دراسات عديدة أنَّ نسبه كبيرة من سكان الدول النامية تعتمد بشكل كبير على النباتات الطبية لتلبية احتياجاتها من الرعاية الصحية الأساسية. وذلك لسهولة الحصول عليها ورخص ثمنها واستخدامها بشكلها الصحيح أكثر أماناً مقارنه بالأدوية المصنعة (Sharma وأخرون، 2006؛ Yap وأخرون، 2010؛ Akinyemi وأخرون، 2018). تحتوي النباتات الطبية على عدد كبير من المواد الطبية، والتي تعكس القدرة العلاجية لها، ولهذا السبب تمتلك إمكانيات علاجية أفضل من تلك التي تملكها الأدوية المصنعة في معالجة الكثير من الأمراض، فهي تحتوي على مواد فعالة طبيًا بالإضافة الي المواد الغذائية والفيتامينات (Chan، 2003؛ جواد، 2011).

الزنجبيل من النباتات المشهورة منذ القدم، يعرف علميًا بالاسم اللاتيني *Zingiber officinale* ويسمى باللغة الإنجليزية Ginger (فاضل وأخرون، 2017). وقد اشتق الاسم العلمي للزنجبيل من الكلمة اللاتينية Zingiber وتعني شكل الريزوم الذي يشبه القرن (Semwal وأخرون، 2015). ومن أهم الدول المنتجة للزنجبيل هي الهند والصين ونيبال وإندونيسيا (شكل 1).



شكل (1): الدول الرائدة في إنتاج الزنجبيل *Zingiber* Spp (Ravindran وBabu، 2005).

1.2. نبات الزنجبيل.

ينتمي نبات الزنجبيل إلى الفصيلة الزنجبارية Zingiberacea (Mehaboob وأخرون، 2019). تتألف هذه الفصيلة من أكثر من 1200 نوع من النباتات في 53 جنسًا. جنس *Zingiber* يشمل حوالي 85 نوع أهمها النوع *officinale*، وهو نبات عشبي معمر شكل (2)، يتألف من ساق أرضية (ريزوم) تنمو أفقياً تحت سطح التربة يحتوي سطحها على عقد تخرج منها عدة سيقان، ذو رائحة عطرة، له طعم لاذع ولونه أبيض مصفر طول الريزوم 7-15 سم وعرضه 1-1.5 سم (Kor وZadeh، 2014). له أوراق رمحيه مخضره طويلة عرضها 2-3 سم. وأزهار صفراء تتلون نهاية بتلاتها باللون الأرجواني وهي تعتبر صغيرة أو نادرة نوعًا ما (سيد وحسين، 2004؛ Mishra وأخرون، 2012).

شكل (2): الشكل الظاهري لنبات الزنجبيل *Zinger officinale* (Gupta وSharma، 2014).

يعتبر ريزوم الزنجبيل من الأعشاب الأمنة للعلاج مع أضرار طفيفة وليس له تأثيرات سلبية كبيرة. يمكن تطوير هذا النبات من أجل طب الأعشاب في المستقبل، إلا أنه يحتاج إلى المزيد من الدراسات السريرية على البشر من حيث الفعالية والسلامة من المخاطر ومن الأثار الجانبية (Ravindran وBabu، 2005). كما يدخل الزنجبيل في مجموعة واسعة من الاستخدامات الطبية حيث يمكن استخدامه كعقار منفرد أو مركب لعلاج مجموعة من الأمراض المختلفة (Rehman وأخرون، 2011). هناك ثلاثة أنواع أخرى معروفة من الزنجبيل وهي: *Z. zerumbet*، *Z. cassumunnar*، *Z. mioga*، وأيضًا يوجد منه عدة أنواع تعرف باللهجة الدارجة (الشائعة) بين الناس بالزنجبيل البلدي والشـــــامي والعجمي والفارســي والكلاب والهندي

(الكفوف) وهو النوع الأكثر استخدامًا (Ravindran وBabu، 2005)، وقد يكون مستقبلًا بمثابة الذهب الطبيعي للبشرية (Banerjee، 2011).

2.2. الزنجبيل في القرآن الكريم والسنة النبوية.

الزنجبيل خص بالذكر في القرآن الكريم في قوله تعالى: «ويسقون فيها كأسا كان مزاجها زنجبيلا». (الإنسان-17). بالإضافة إلى ذكره في الطب النبوي حيث قال أبو سعيد الخدري- رضي الله عنه:- (أهدى ملك الروم إلى رسول الله، صلى الله عليه وسلم، جرة زنجبيل، فأطعم كل إنسان قطعة، وأطعمني قطعة). وقال ابن القيم- رحمه الله:- (الزنجبيل معين على الهضم، ملين للبطن تليينا معتدلًا، نافع من سدد الكبد العارضة عن البرد، والرطوبة، ومن ظلمة البصر الحادثة عن الرطوبة كحلا واكتحالًا، معين على الجماع، وهو محلل للرياح الغليظة الحادثة في الأمعاء والمعدة، وهو بالجملة صالح للكبد والمعدة) (الجوزية، 751هـ).

2. 3. التصنيف العلمي.

المملكة:	Kingdom : Plantae
القسم:	Division : Tracheophyta
الصنف:	Class : Liliopsida
الرتبة:	Order : Zingiberales
العائلة:	Family : Zingiberaceae
الجنس:	Genus : *Zingiber*
النوع:	Species : *Zingiber officinale* Rosc

(Kumar وأخرون، 2011؛ Marwat وأخرون، 2015 ؛ ربيعة، 2015).

4.2. القيمة الغذائية والتركيب الكيميائي للزنجبيل.

يحتوي الزنجبيل الطازج على 80.9% رطوبة، 12.3% كربوهيدرات، 2.4% ألياف، 2.3% بروتين، 1.2% معادن و0.9% دهون. يعد الزنجبيل غني بالمعادن الأساسية مثل النحاس والزنك والحديد والمغنسيوم والمنغنيز فضلاً عن الكالسيوم والنيكل والصوديوم والبوتاسيوم. كما يحتوي على العديد من الفيتامينات مثل

الرايبوفلافين والثيامين والنياسين وحامض الأسكوربيك كما يحتوي على العديد من الأحماض الأمينية الأساسية والأحماض الأمينية غير الأساسية (López وأخرون، 2017؛ Garace وأخرون، 2017؛ Dhanik وأخرون، 2017).

تم عزل أكثر من 160 مكون، بما في ذلك الزيوت الطيارة ونظائرها من الزنجبيل (Zhang وأخرون، 2020)، حيث وجد أن الزنجبيل غني بالزيوت الطيارة مثل الزنجبرين وفارنسين وكركمين بنسبة 35% و10% و18% على التوالي من مجموع الزيوت الطيارة، وتعتبر من أهم المركبات المسؤولة عن الأنشطة العلاجية للزنجبيل، أما المركبات غير الطيارة والمسؤولة عن الطعم اللاذع والرائحة النفاذة للنبات فتشمل الجنجيرول والشوكول والبارادول فضلاً عن الزنجيرون (Anasori1 وAsghari، 2008؛ Islam وأخرون، 2015؛ Syafitri وأخرون، 2018). بالإضافة إلي احتوائه على ستيرولات وفلافونيدات وكلايكوسيدات وتانينات وتربينينات وصابونينات، وتعتبر ريزومات الزنجبيل مصدر غني بمضادات الأكسدة والطاقة والعناصر المعدنية المهمة، لذا يمكن اعتماده في تعديل مكونات الغذاء (Semwal وأخرون، 2015؛ فاضل وأخرون، 2017).

لاحظ Zadeh وKor (2014) أن نبات الزنجبيل البري أوشك على الانقراض ولم يعد هناك سوى أعداد قليلة منه، وأكد العديد من البحاث أن هذا النبات حتمًا قريب من الانقراض نتيجة لتعرضه للجمع الجائر في مكان تواجده الأصلي والطبيعي. ونظرًا لصعوبة إكثاره خضريا وطول فترة نموه فإن البديل المتاح لإكثار هذا النبات هو استخدام تقنيات زراعة الأنسجة النباتية فهي السبيل الوحيد لإنقاذه (قابيل، 2015).

5.2. الإكثار التقليدي للزنجبيل.

أوضح كل من Dhamayanthi (2003) وAdaniya (2001) أن طرق الإكثار التقليدية (التكاثر الجنسي) للزنجبيل لا يمكن تطبيقها بسهولة لعدة أسباب أهمها نقص خصوبة الإزهار لإنتاج بذور بسبب العقم الذاتي وعدم توافق الجينات بين حبوب اللقاح والبويضات مما تسبب في انتشار ظاهرة تسمى عدم التوافق (incompatability) (Kambaska وSantilata، 2009). كما يتفق مع Nair (2019) الذي أشار إلى عدم احتواء هذا النوع على البذور بسبب المشاكل المذكورة. وكذلك في تقرير لباحثون يابانيون سجلوا فيه أن الإزهار يؤدي إلي نقص الغلة (Adaniya واخرون، 1989). لذلك، فإن تحسين تكاثر البذور وتربيتها أمر مطلوب للغاية (Maiga وأخرون، 2021). ولهذه الأسباب يتم تكاثر الزنجبيل خضريًا بواسطة الساق الأرضية (الريزوم) ولكن أيضًا تكمن الصعوبة في إكثاره بواسطة الريزومة، حيث أن التكاثر الخضري للزنجبيل يحدث بمعدل انتشار منخفض نظرًا لقلة النباتات الناتجة وينطوي على مخاطر عالية من انتشار العدوى أي خطر انتقال المرض عن طريق تقسيم الريزوم.

أن عدم وجود مجموعة البذور الطبيعية ومشكلة التباين الوراثي أعاق تطور الزنجبيل المقاوم للأمراض عن طريق التربية التقليدية (Mehaboob وأخرون، 2019). لذلك، الإكثار بواسطة زراعة الأنسجة النباتية تعتبر أفضل طريقة بديلة لتحقيق إنتاج أعداد كبيره من النباتات المتجانسة والتي لها نفس المحتوى من المركبات الثانوية وأن هذه المواد المنتجة من الخلايا النباتية الناتجة من زراعة الأنسجة لها نتائج إيجابية مقارنة بالمواد المنتجة بأنسجة الخلايا النباتية من نبات الأم (النامي في الحقل) مما يدعم استخدام زراعة الأنسجة النباتية في توفير المركبات الثانوية طوال السنة (Hamirah وأخرون، 2010).

وجد Nair (2019) بأن ظاهرة عدم التوافق تعرقل الجهود للبحث عن تباينات واتحادات وراثية جديدة لتحسين صفات الزنجبيل وأهمها صفة مقاومة الأمراض الفطرية والبكتيرية الرئيسية التي تؤثر على زراعته والتي تنتشر بشكل اساسي من خلال إصابة الريزوم ومنها التعفن الريزومي الناجم عن *Pythium* spp والتعفن الأصفر الناجم عن *Fusarium oxysporum* والذبول البكتيري الناجم عن *Ralstonia solanacearum* والتعفن الجاف الناجم عن *Pratylenchus coffeae*، وكذلك لمقاومة الديدان الخيطية (Nematodes) والتي تؤثر سلبًا على النمو وعلى صفاته الطبية (El-Nabarawy، 2015). وتعتبر الأمراض الفطرية والبكتيرية من أهم معوقات الإنتاج حيث تنتشر في جميع البلدان التي ينمو فيها الزنجبيل في جميع أنحاء العالم. وأكدت العديد من الدراسات أنه يمكن أن يكون الإكثار باستخدام تقنية زراعة الأنسجة بديلاً مناسبًا لإنتاج نبات الزنجبيل الخالي من الأمراض (Naik وNayak، 2006؛ Mengs، 2018).

6.2. الإكثار النسيجي للزنجبيل.

سميت تقنية زراعة الأنسجة بهذا الاسم لأن بدايات هذه التقنية كانت تعتمد كليًا على الأنسجة كجزء نباتي يستزرع في الأنابيب، ويذكر علماء النبات أن التقنية التي بنيت عليها تقنية زراعة الأنسجة أتت بفضل تراكم بعض المعارف من تجارب ودراسات أجريت على النباتات، بدءاً من ملاحظات العالم Schwann سنة 1839 والذي ذكر أن أي خلية يمكن فصلها من النبات وأن هذه الخلية يمكن أن ينشأ عنها نبات كامل. ويعتبر كل من Schleiden وSchwann أول من وضعا الأساس العلمي لزرعة الأنسجة النباتية، وذلك عندما اكتشفا النظرية الخلوية Cell theory والتي تنص على أن الخلية هي الوحدة البنائية والأساسية للنبات الحي وأن نمو النبات يعني الزيادة في عدد الخلايا (زكي والفقي، 1996).

البداية الفعلية لزراعة الأنسجة النباتية كانت عام 1902 عندما نشر العالم الألماني Haberlandt نظرية القدرة الكلية للخلية النباتية *Totipotentiality* وتعني أن الخلية لديها المقدرة الوراثية الكاملة على تكوين جميع أنواع الخلايا النباتية الاخرى أو النبات بالكامل لكن هناك بعض المعوقات تحول دون ذلك والتي اكتشفت لاحقًا وهي ما تعرف بالهرمونات النباتية. ثم بعد ذلك بدأ اهتمام الباحثين المختصين في بقاع العالم بهذا الجانب

من التقنيات الحيوية والذي عرف لاحقا بزراعة الأنسجة النباتية (محمود، 2012). وفي هذه التقنية تجرى عملية عزل وزراعة الخلايا أو الأنسجة أو الأعضاء النباتية المستأصلة من النبات الأم على بيئة غذائية اصطناعية تحت الظروف بيئية خاصة ومعقمة في المعمل (Davey وAnthony، 2010).

1.6.2. أهمية زراعة الأنسجة.

لزراعة الأنسجة النباتية الكثير من الفوائد وخاصة بعد التطور الملحوظ الذي شاهده هذا العلم حيث نخص بالذكر بعض منها: -

1. الحصول على عدد كبير من النباتات في وقت قصير ودون التقيد بوقت محدد للزراعة.
2. انتاج نباتات خالية من مسببات الأمراض خصوصا الفيروسية منها.
3. مصدر بديل للزراعة التقليدية للحصول على المواد العطرية والطبية النادرة بطريقة اقتصادية في المعمل.
4. إكثار النباتات التي يصعب اكثارها بالطرق التقليدية.
5. نقل الأصول الوراثية والنباتات من مكان لأخر بسهولة وتجنب نقل المسببات المرضية المصاحبة لها.
6. دراسة الخلية النباتية وتأثير المواد والعوامل المختلفة على نموها وتكشفها.
7. دراسة العلاقة ما بين المسببات المرضية والنبات على المستوى الخلوي والنسيجي والنبات بالكامل.
8. زراعة الأنسجة هي النواة الأساسية لتجارب الهندسة الوراثية ونقل الجينات.
9. استخدامها في تربية النبات في العديد من المجالات.

2.6.2. العوامل المحددة لنجاح زراعة الأنسجة: -

1. الجزء النباتي المستخدم.

تعتبر القمم النامية أو البراعم المأخوذة من البراعم القميه أو الجانبية للنباتات هي أكثر التقنيات المستخدمة والأكثر نجاحا في زراعة الأنسجة ومطابقة للأصل وذلك لاحتوائها على الخلايا المرستمية القادرة على الانقسام والتكشف (Murashige، 1962). مع امكانية استخدام أجزاء أخرى من النبات مثل زراعة الأعضاء الخضرية وتشمل زراعة الجذور أو الأوراق أو الأعضاء التكاثرية وتشمل زراعة الأجنة، المبايض، البويضات، المتك والأزهار (محمود، 2012).

2. عمر وحجم النسيج المستخدم.

وجد أن النسيج الغض صغير العمر عادةً ما يكون أكثر استجابة في زراعة الأنسجة وله مقدرة عالية على تكوين أجزاء نباتية أخرى جديدة إذا قورنت بالأنسجة الأكبر عمرًا أو الأنسجة الخشبية. حيث أن النسيج الكبير في العمر يكون انقسامه الخلوي وتطوره أبطاء وأقل من النسيج الصغير في العمر. كما ذكر أيضًا أن الأنواع النباتية الخشبية صغيرة العمر نسبيا لها القدرة على تكوين الأعضاء النباتية أسرع مقارنة بالأنواع الخشبية الأكبر عمرًا. أما فيما يتعلق بحجم الجزء المنزرع فإن بعض الدراسات ذكرت أنه كلما زاد حجم المستأصل النباتي زادت فرصة عدم القدرة على التخلص من بعض الأمراض الفيروسية وزادت فرصة الإصابة بالأمراض البكتيرية والفطرية. وفي دراسات أخرى وجد أنه كلما كان حجم المستأصل النباتي أصغر كلما أمكن الحصول على عدد أكبر من النبيتات. وبصفة عامة يفضل استخدام الأجزاء النباتية متوسطة الحجم لضمان الحصول على عدد كافي من النبيتات وتجنب التلوث وهو العامل الأكثر تأثيرًا على نجاح زراعة الأنسجة (محمود، 2012).

3. منظمات النمو.

توجد بالنبات بشكل طبيعي مجموعة من المركبات العضوية بتركيزات منخفضة تتحكم بدرجة كبيرة في النمو والتطور تسمى بالهرمونات النباتية phytohormones أو مواد النمو النباتية (George وأخرون، 2008). أما المواد الكيميائية المصنعة والتي تحاكي التأثيرات الفسيولوجية للهرمونات داخل النباتات فيطلق عليها منظمات النمو النباتية Plant growth regulators. ومن هذه المواد الأكسينات والسيتوكينينات والجبريلينات وغاز الإثيلين. الأكسينات والسيتوكينينات من أكثر منظمات النمو استخدامًا في مزارع الأنسجة. يعتمد نوع وتركيز منظمات النمو المراد استخدامها بشكل أساسي على أنواع الأنسجة أو الأعضاء النباتية المزروعة. بشكل عام يفضل استخدام الأكسينات بتركيزات مرتفعة وذلك لغرض الحصول على مجموع جذري جيد، في المقابل التركيزات العالية من السيتوكينينات يحفز على نمو الفروع الصغيرة. أما التوازن في التركيزات ما بين كل من الأوكسين والسيتوكينين يؤدي الي تطوير كتلة غير متمايزة الخلايا المعروفة باسم الكالس (Kasilingam واخرون، 2018) والكالس عامل مهم في نشوء وتكون نموات جديدة.

الأكسينات Auxin وهي كلمة مشتقة من الكلمة اليونانية Auxien وتعني النمو، ويرجع اكتشاف الأكسينات إلى العالم Went في سنة 1926. تشارك الأكسينات في العديد من عمليات النمو مثل استطالة الساق والسلميات وكسر فترة السكون والتجذير وغيرها، أما فيما يخص زراعة الأنسجة فإن الأكسينات تستخدم للحث على استطالة الخلايا والتمايز الخلوي. تنقسم الأكسينات إلى أكسينات طبيعية مثل Indole-3-acetic acid (IAA) وIndole-3-butyricacid (IBA) وصناعية مثل Naphthalene acetic acid (NAA) و 2,4-Dicholoro phenoxy acetic acid (2,4-D) والأخيرة تعتبر من أكثر الأكسينات

استخداماً في مجال زراعة الأنسجة النباتية. حيث تستخدم على نطاق واسع في عملية التجذير، كما يمكن أن تتفاعل الأكسينات مع السيتوكينينات في تشجيع النموات الخضرية والتمايز في الخلايا (سلمان، 1988).

السيتوكينينات بالرغم من وجودها في أنسجة النبات الكامل إلا أن العديد من الأنسجة المنزرعة والأعضاء الصغيرة ليست لها القدرة على تصنيعها بكميات كافية للنمو خصوصاً في النباتات ذوات الفلقتين، لذا لابد من إضافة السيتوكينينات إلى بيئة النمو. السيتوكينينات لها تأثير مهم في تحفيز انقسام الخلايا وتمايز الجذور والبراعم وعند إضافتها مع الأكسينات فإن ذلك يؤدي إلى انقسام الخلايا بمعدل أسرع وزيادة في حجم الخلايا (Krishnamoorthy، 1981). ومن السيتوكينينات التي تستخدم على نطاق واسع في زراعة الأنسجة النباتية هي kinetin، 6-benzyl amino purine (BAP)، 2-isopentenyl adenine (2ip) وكلها صناعية، والزياتين هو السيتوكاينين الطبيعي الوحيد وعادةً له تأثير على نمو وتطور الجزء المنزرع بالمعمل بمعدل أعلى من الصناعي ولا يستخدم بكثرة لغلاء سعره (زكي والفقي، 1996).

في دراسة قام بها Kambaska وSantilata (2009) من أجل التكاثر الدقيق لنبات الزنجبيل *Zingiber officinale* Rosc، باستخدام مستأصل من البراعم الريزومية الطازجة في وسط MS شبه صلب. مضاف له تركيزات (0.25، 0.5، 1.0، 1.5، 2.0، 2.5، 3.0) ملجم/لتر BAP + (0.25، 0.5، 1.0، 1.5، 2.0، 2.5، 3.0) ملجم/لتر من NAA لنمو النموات الخضرية والجذرية. حيث سجلت المستأصلات المنزرعة على وسط MS المضاف له 2.0 ملجم/لتر BAP + 0.5 ملجم/لتر NAA أعلى معدل لتضاعف الأفرع في المعمل. أما وسط MS المضاف له 2.0 ملجم/لتر من NAA أظهر أفضل نمو لطول وعدد الجذور. كما أوضحت نتائج دراسة أخرى على إكثار نبات الزنجبيل بالمعمل أن الوسط الغذائي MS يعتبر أفضل من الأوساط الأخرى في إنتاج عدد البراعم وجودتها. كما أظهرت الدراسة أن استخدام منظمات النمو مثل BAP مع NAA كانت أكثر فعالية لإنتاج عدد وفير من البراعم وتقليل التكلفة (Pandey وأخرون، 1997).

أوضح David وأخرون (2016) في دراسة على إكثار نبات الزنجبيل أن مستأصلات القمم النامية أعطت أفضل استجابة (زيادة في النمو الخضري) عندما زرعت على وسط غذائي MS يحتوي على تراكيز مختلفة من NAA وBAP تراوحت من 1 إلى 3 ملجم/لتر للحث على تضاعف البراعم الخضرية وتكوين الجذور. وقد لوحظ تشكل البراعم الخضرية لأول مرة عند التركيز 3.0 ملجم/لتر BAP + 1.0 ملجم/لتر NAA بعد 7 أيام من الزراعة. هذه المعاملة كانت الأفضل في عدد من البراعم المنتجة بحوالي 6.14 لكل مستأصل، مع متوسط طول البراعم الخضرية 1.69 سم، كما لوحظ تكون مجموع جذري كثيف بعد 10 أسابيع من الزراعة في الوسط المضاف له 2.0 ملجم/لتر NAA، حيث سجلت 34.40 جذر/مستأصل بمتوسط طول الجذر 4.52 سم.

أظهرت دراسة أخرى أن الوسط MS المضاف له 3.0 ملجم/لتر BAP و 0.4 - l ملجم/لتر NAA كان مثاليا للمجموع الخضري حيث أعطي أكثر عدد من البراعم بمتوسط 36.0 (برعم/ مستأصل)، وأفضل نمو خضري بطول 6.1 سم مع 4.7 ورقة. كما سجل وسط النمو MS المضاف له 0.5 ملجم/لتر NAA أفضل النتائج للمجموع الجذري حيث سجل متوسط عدد الجذور لكل برعم 13.3 ومتوسط طول الجذر 2.0 سم (Jagadev وأخرون، 2008). كما وجد Kasilingam وأخرون (2018) في دراسة لإيجاد طريقة لإكثار الزنجبيل باستخدام وسط MS مضاف له 3.0 ملجم/لتر BAP و 1.0 ملجم/لتر NAA أدت إلى زيادة في عدد البراعم. وقد أوصى الباحثون بهذه الدراسة بأن يحتوي الوسط المستخدم على BAP لتحفيز على تطور نمو الزنجبيل.

4- الفحم النشط.

يستخدم الفحم النشط في زراعة الأنسجة النباتية لتحسين نمو الخلايا وتطويرها. التأثيرات المحفزة للفحم النشط قد يرجع بشكل رئيسي بسبب الادمصاص الذي لا رجعة فيه للعديد من المركبات منها المركبات المثبطة في وسط الزراعة، وإلى حد كبير التقليل من المواد السامة والفينولات والتي تسبب في تغيير وتعتيم وسط الزراعة (Thomas، 2008). وعلى الرغم من هذه الأدوار الداعمة فإن وجود بعض التأثيرات السلبية أيضًا لإضافة الفحم النشط في التكاثر الدقيق مثل ادمصاص بعض الأيونات والفيتامينات ومنظمات النمو. على سبيل المثال في الكاجو *Anacardium occidentale*، إضافة الفحم النشط سبب في قمع انبات البراعم من عقد النموات الخضرية ولكن استطالة النموات الخضرية كانت أكثر وأفضل عند استخدام الفحم النشط (Boggetti وأخرون، 1999).

وقد أظهرت دراسة تبين تأثيرات إضافة الفحم النشط بتركيز 0، 3.0، 4.5 جم/لتر على نمو براعم نبات الكركم *Curcuma longa* نسيجيًا باستخدام الوسط الغذائي MS، حيث أوضحت النتائج أن تركيز 4.5 جم/لتر أدى إلى زيادة في طول الجذور وفي عدد النموات الخضرية والأوراق (Ferrari وأخرون، 2016). هذه النتيجة تتفق مع نتائج Ferrari وأخرون (2019) والتي أظهرت زيادة في الكتلة الجافة للجذر عند استخدام وسط MS المضاف له 4.5 جم/لتر من الفحم النشط لنفس النبات.

5 - الكربوهيدرات.

الكربوهيدرات لا تضاف مطلقا للنباتات النامية بالحقل ولكنها من المركبات الأساسية في وسط النمو للنباتات التي يتم إكثارها نسيجيا بالمعمل. حيث لا تستطيع المستأصلات القيام بعملية البناء الضوئي كالنباتات التي تُزرع في الحقول المفتوحة، لذا فهي تتطلب كربوهيدرات إضافية. فلا يمكن أن تتطور أنسجة النبات بالمعمل في غياب مصدر للكربوهيدرات وذلك لعدم قدرة الأنسجة الصغيرة على إنتاج المواد الكربوهيدراتية

اللازمة للنمو والتطور ويرجع السبب في ذلك لصغر الجزء النباتي وقلة كفاءة التمثيل الضوئي به. أوضح كل من Ramage وWilliams (2001) أن الاختلافات في تركيز منظمات النمو في زراعة الأنسجة لا يمكن أن تتحكم في نمو النباتات بدون الكربوهيدرات. حيث تلعب الكربوهيدرات دورًا أساسيًا في عملية التكاثر وتؤثر على النمو والبقاء، كما يضمن استخدام التركيز الأمثل للسكروز توافر مصدر الكربون اللازم لنمو الخلية، فإذا كان مصدر الكربون كافيًا، فستتشكل الخلايا بسرعة ويكون المستأصل قادرًا على النمو (Sitorus وأخرون، 2011).

ومع ذلك، فإن التركيزات العالية من السكر تمنع نمو النبيتات بسبب الضغط الاسموزي العالي والذي يقلل من قدرة الجزء المنزرع على امتصاص العناصر الغذائية من وسط النمو (Jo وأخرون، 2009). أما Abbas وأخرون (2014) وجدوا أن تشكيل النموات الخضرية للزنجبيل في المعمل تسيطر عليها العديد من العوامل، بما في ذلك تركيز السكروز. استخدمت عدة أنواع من السكريات لهذا الغرض كالفركتوز والجلوكوز والمالتوز والسكروز، ويعتبر الأخير أكثر السكريات استعمالًا وهو سكر ثنائي غير مختزل كيتونى يتكون من (جلوكوز+ فركتوز). وتأثيره فعال جدًا على النمو ومتحمل للحرارة العالية بعكس بعض السكريات الأخرى (George، 2008). وعادةً ما يستخدم بتركيز من 2-5%، حيث يشارك في التحكم في عمليات نمو وتطور الأجزاء النباتية وإتمام عملية البناء الضوئي (فهمى، 2003؛ Gibson، 2000).

لاحظ Marfori وCruz (2018) وFerrari وأخرون (2019) عند زراعة البراعم الريزومية لزنجبيل في وسط MS المضاف له تركيزات 30 و60 و90 و120 جم/لتر من السكروز ازدياد في عدد النموات الخضرية عند تركيزات من 30-90 جم/لتر أما عند تركيز 120 جم/لتر سجل انخفاض معنوي مقارنه بمجموعة الشاهد. وهذه النتيجة اتفقت مع نتائج Archana وأخرون (2013) لإكثار ريزوم الزنجبيل على وسط MS المضاف له تركيزات 30 و80 و90 و100 جم/لتر من السكروز حيث لاحظوا زيادة في عدد وطول النموات الخضرية عند 30 جم/لتر. أما Abbas وأخرون (2014) وجدوا أن التركيز 60-90 جم/لتر من السكروز هو أفضل تركيز لتحسين النموات الخضرية. وأوضحوا أن نمو وتجدير النموات الخضرية لنبات الزنجبيل في المعمل تعتمد على العديد من العوامل، منها تركيز السكروز في الوسط المغذي.

6 - عوامل أخرى.

بالإضافة إلي العوامل المذكورة فقد أوضحت العديد من الدراسات أن نجاح عملية الإكثار عن طريق زراعة الأنسجة النباتية تعتمد بشكل عام على العديد من العوامل الأخرى منها:

أولا: العوامل الوراثية.

تتوقف الاستجابات المختلفة للأنسجة المنزرعة معمليًا على التركيب الوراثي للنبات بصفه أساسية، فتختلف قدرة الأنواع النباتية من نوع لأخر بل ومن صنف لأخر، فللصنف النباتي دور هام في الإكثار الدقيق ومدى الاستجابة لذلك. فالنباتات سهلة الإكثار نسيجيًا عادةً لها القدرة على انقسام الخلايا وتكشفها بمعدل عالي وسريع وهذا نتيجة لنشاط الجينات المسؤولة على الانقسام والتكشف عكس النباتات صعبة الإكثار بالمعمل والتي يكون نشاط تلك الجينات منخفض (محمود، 2012).

ثانيا: العوامل المتعلقة بالنبات الأم.

تتعدد صور تأثير النبات الأم على الأنسجة المنزرعة معمليًا وذلك حسب مرحلة النمو والتطور فالنباتات صغيرة العمر عادةً ما تكون لها استجابة عالية للإكثار معمليًا وكلما زادت بالعمر كلما قلت استجابتها، ولجنس النبات أيضًا تأثير، فالنباتات أحادية الجنس عادةً ما تختلف استجابة النباتات المذكرة عن المؤنثة للإكثار نسيجيًا، كما أن للظروف البيئية التي ينمو فيها النبات الأم تأثير ملحوظ فكلما كانت البيئة مثالية لنمو النبات وخالية من الأمراض والحشرات كلما كانت الاستجابة للنمو بالمعمل أفضل، وأخيرًا فإن المعاملة المثالية وأخذ كل التحوطات الازمة للنبات الأم والأجزاء المفصولة قبل التعقيم يعد أيضًا عامل مهم له تأثير على نمو الأجزاء المنزرعة (محمود، 2012).

ثالثا: العوامل المتعلقة بالمستأصل النباتي.

الكثير من العوامل المتعلقة بالمستأصل النباتي منها: (1) عمر المستأصل النباتي، فالصغيرة بالعمر أفضل استجابة للإكثار بالمعمل وكلما زاد بالعمر قلت الاستجابة. (2) موقع وحجم المستأصل النباتي، فالمستأصل المأخوذ من منطقة قريبة من القمة أفضل استجابة، وحجم المستأصل المتوسط أفضل فهو أقل عرضة للتلوث كما أنه يحمل مواد غذائية كافية للنمو والتكشف. (3) طريقة زراعة المستأصل النباتي، فقد يكون لها تأثير أحيانًا حيث يفضل وضع الجزء المنزرع كوضعه بالطبيعة. (4) تجريح الجزء المنزرع، والذي يشجع في كثير من الأحيان على تكون الكالوس وإنتاج النبيتات (محمود، 2012).

رابعا: العوامل المتعلقة بالظروف البيئية للمزرعة النسيجية.

وهي عبارة عن الظروف التي يتم فيها تحضين المستأصل النباتي والمزرعة النسيجية الناتجة منه والتي تؤثر في زراعة الأنسجة وهي (طبيعة البيئة، نوعية الأوعية، الغازات، الرطوبة النسبية، الحرارة والضوء) وهذه العوامل تساعد على تكشف النموات الخضرية وتوالدها وتكون الجذور عليها، فكلما كانت مثالية للنمو كلما زادت نسبة نجاح المستأصل (محمود، 2012 وMehbub، 2022).

3. المواد وطرائق البحث.

أجريت الدراسة بمعامل قسم زراعة الانسجة النباتية التابع للمركز الوطني لبحوث التقنيات الحيوية بمنطقة تاجوراء وتم استكمال الدراسة بمنطقة الفرناج بعد أن تم النقل، في الفترة الزمنية الممتدة من خريف 2019 الي ربيع 2020. تم أخذ العينات وهي عباره عن ريزومات الزنجبيل الطازجة المستخدمة في الزراعة من الاسواق المحلية بمدينة طرابلس (سوق الجمعة) والتي تم استيرادها من الصين بواسطة شركة مكة للاستيراد والتصدير بجمهورية مصر العربية، القاهرة.

1.3.المرحلة الأولى: تأسيس المزرعة المعقمة.

1.1.3. التعقيم السطحي.

قبل التعقيم أزيلت الأجزاء الجافه وبقايا التربة من على سطح الريزومات السليمة وغسلت بالماء والصابون وجففت على ورق ترشيح في درجة حرارة الغرفة. ووضعت الريزومات في مكان مظلم لمدة 15 يوم لحثها على إنتاج الجزء الخضري (البراعم) وبعد نمو البراعم بأطوال مناسبة فصلت البراعم من على سطح الريزوم (شكل 3).

شكل (3). مرحلة تشجيع إنتاج البراعم لنبات *Zingiber officinale*، (1) الريزومات قبل عملية الإستظلام، (2) وضع الريزومات أثناء عملية الإستظلام، (3) الريزومات بعد عملية الإستظلام وتكون البراعم عليها.

جمعت البراعم النامية والسليمة من الريزومات، ثم وضعت تحت الماء الجاري لمدة 30 دقيقة لغرض إزالة الملوثات السطحية. وبعد ذلك أجريت لها عملية التعقيم السطحي حيث نقلت المستأصلات النباتية إلى وحدة العزل ذات الهواء المعقم (Laminar Air Flow Cabinet) الموجودة بغرفة العزل لتعقيمها حيث قسمت إلى عدة قطع (مستأصل) بواسطة مشرط وملقط معقمان وبطول 1.5- 2.0 سم يحمل كل منها عقدة نباتية مفردة تحوي برعمًا واحدًا والتي استخدمت كمستأصل شكل (4). ثم غمرت في الكحول الايثلي (الايثانول) بتركيز 70% لمدة دقيقتين مع التحريك المستمر لضمان فاعلية المعاملة. بعد ذلك غمرت في المبيضّ التجاري محلول الكلوركس بتراكيز 2، 2.5، 3% (تركيز المادة الفعالة هيبوكلورات الصوديوم (NaOCl)) لمدة 20 دقيقة مع التحريك المستمر للمستأصل وذلك لتعقيمها سطحيًا من البكتريا والفطريات. وأخيرًا غسلت العينات بالماء المقطر والمعقم من 3 إلى 4 مرات لمدة 5 دقائق لكل مرة لإزالة أثار المادة المعقمة قبل الزراعة في الأوعية الزجاجية (البرطمانات).

2.1.3. تحضير وتعقيم الوسط الغذائي.

حُضّر 5 لتر من الوسط الغذائي الأساسي Murashige & Skoog (جدول 4 الملاحق) ووزع 25 مللتر من الوسط الغذائي في البرطمانات المعقمة سعة 250 مللتر وأجري التعقيم في جهاز التعقيم الرطب (Autoclave) على درجة حرارة 121 م° وضغط جوي 1.02 كجم/ سم^3 لمدة 15 دقيقة وذلك بعد ضبط درجة حموضة الوسط الغذائي PH بجهاز قياس الاس الهيدروجيني على درجة 5.7-5.8 باستخدام حمض الهيدروكلوريك HCl وهيدروكسيد الصوديوم NaOH. ثم تركت الأوعية بعد إخراجها من جهاز التعقيم لمدة 3 أيام قبل استخدامها في الزراعة.

زرعت البراعم بإستخدام الملاقط المعقمة على الوسط الغذائي MS بدون منظمات النمو بمعدل 3 قطع في الوعاء الواحد (برطمان) داخل غرفة العزل المعقمة مسبقا. ثم نقلت جميع البرطمانات إلى غرفة النمو (شكل 6) تحت ظروف إضاءة شدتها 24 $\mu M / m^{-2} / sec^{-1}$ على مستوى النبيتات باستخدام مصابيح الفلورسنت البيضاء، وفترة إضاءة 16 ساعة / 8 ساعات ظلام، ودرجة حرارة 25 ±2°م ونسبة الرطوبة 40%، وأثناء فترة النمو تم إزالة وتعقيم العينات الملوثة والضعيفة، وبعد مرور 4 أسابيع من الزراعة استخدمت المستنبتات جيدة النمو الخالية من التلوث (شكل 5) كمصدر للمستأصلات في التجارب.

شكل (4): وحدة العزل المعقمة التي تجرى بداخلها عزل وزراعة النباتات وتعتبر أحد أساسيات تجهيز معمل زراعة الأنسجة الزراعة.

شكل (5): مستنبتات خالية من التلوث.

شكل (6):غرفة النمو.

2.3. المرحلة الثانية: استيلاد النباتات أو توالد النموات الخضرية.

بما أن الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تشجيع النمو الخضري وزيادة معدل التضاعف في المستأصلات النباتية المستهدفة فقد أجريت تجارب لتشجيع النمو الخضري وزيادة معدل التضاعف على النحو التالي:-

1.2.3. تأثير التراكيز المختلفة من السيتوكينين على النمو الخضري.

بعد الحصول على عدد مناسب من المستنبتات والمزارع النسيجية الخالية من التلوث في الفقرة السابقة شكل (5) قسمت المستنبتات بطول 1سم تقريبًا وتحتوي كل عقده على جزء من الساق وورقة وبرعم إبطي، وزرعت العقد المفردة (المستأصل النباتي) بمعدل مستأصل واحد لكل وعاء استزراع (برطمان) على الوسط الغذائي MS شكل (7)، حيث اختبر تأثير منظم النمو بنزيل أدنين 6-benzyl-amino-purine (BAP) بتركيز 0، 2، 3، 4، 5 ملجم/لتر كما موضح بالجدول (1). حيث احتوت كل معاملة على 10 مزارع نسيجية كل مزرعة نسيجية تمثل مكرر. وحضنت المزارع النسيجية تحت ظروف التحضين المذكورة سابقًا وتركت لفترة 4 أسابيع. ثم أخذت القراءات على عدد المستنبتات النامية وطولها وعدد الأوراق لكل نمو خضري.

صممت التجربة حسب تصميم النظام العشوائي الكامل (CRD)، وتم تحليل النتائج باستخدام برنامج التحليل الاحصائي SAS وعزلت المتوسطات بواسطة اختبار دنكن (Duncan)عند مستوى معنوية 5%.

الجدول (1): تراكيز منظم النمو BAP في إكثار نبات *Zingiber officinale* بالتجربة.

مكونات الوسط	الشاهد	معاملة 1	معاملة 2	معاملة 3	معاملة 4
BAP (ملجم/لتر)	0	2	3	4	5

2.2.3. تأثير السيتوكينين والفحم النشط على النمو الخضري.

زرعت مجموعة أخرى من المستأصلات على وسط MS مع وجود تراكيز مختلفة من BAP (0، 2، 3، 4، 5 ملجم/لتر) بإضافة 3 جم/لتر من الفحم النشط Activated Charcoal (AC). حيث زرع مستأصل نباتي واحد في كل برطمان. وتحتوي كل معاملة على 10 مزارع نسيجية كل مزرعة نسيجية تمثل مكرر ونقلت إلى غرفة النمو تحت ظروف التحضين سالفة الذكر لمدة 4 أسابيع أنظر الجدول (2). ثم أخذت القراءات على عدد المستنبتات النامية وطولها وعدد الأوراق لكل نمو خضري.

صممت التجربة حسب تصميم نظام القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD)، وتم تحليل النتائج باستخدام برنامج التحليل الاحصائي SAS وعزلت المتوسطات بواسطة اختبار دنكن عند مستوى معنوية 5%.

الجدول (2): تراكيز منظم النمو BAP والفحم النشط (AC) في إكثار نبات *Zingiber officinale* بالتجربة.

مكونات الوسط	الشاهد	معاملة 5	معاملة 6	معاملة 7	معاملة 8
BAP (ملجم/لتر) + AC (جم/لتر)	0	3 + 2	3 + 3	3 + 4	3 + 5

3.2.3. تجذير النموات الخضرية الناتجة.

النموات الخضرية النامية والمتكونة في مرحلة التضاعف أخذت منها مستأصلات زرعت على بيئات جديدة من الوسط الغذائي MS مضاف إلية تراكيز (0.5 و1 ملجم/لتر) من منظم النمو (NAA) Naphthalene acetic acidمضاف إليه BAP بتراكيز (2 و3 ملجم/لتر) وذلك لغرض تكوين الجذور العرضية. حيث زرعت العقد المفردة ونقلت إلى غرفة النمو تحت ظروف التحضين سالفة الذكر جدول (3). وبعد مرور 6 أسابيع من الاستزراع أخذت القراءات عن خصائص التجذير وهي عدد وطول الجذور.

صممت التجربة حسب نظام القطاعات العشوائية الكاملة، وتم تحليل النتائج باستخدام برنامج التحليل الاحصائي SAS وعزلت المتوسطات بواسطة اختبار دنكن عند مستوى معنوية 5%.

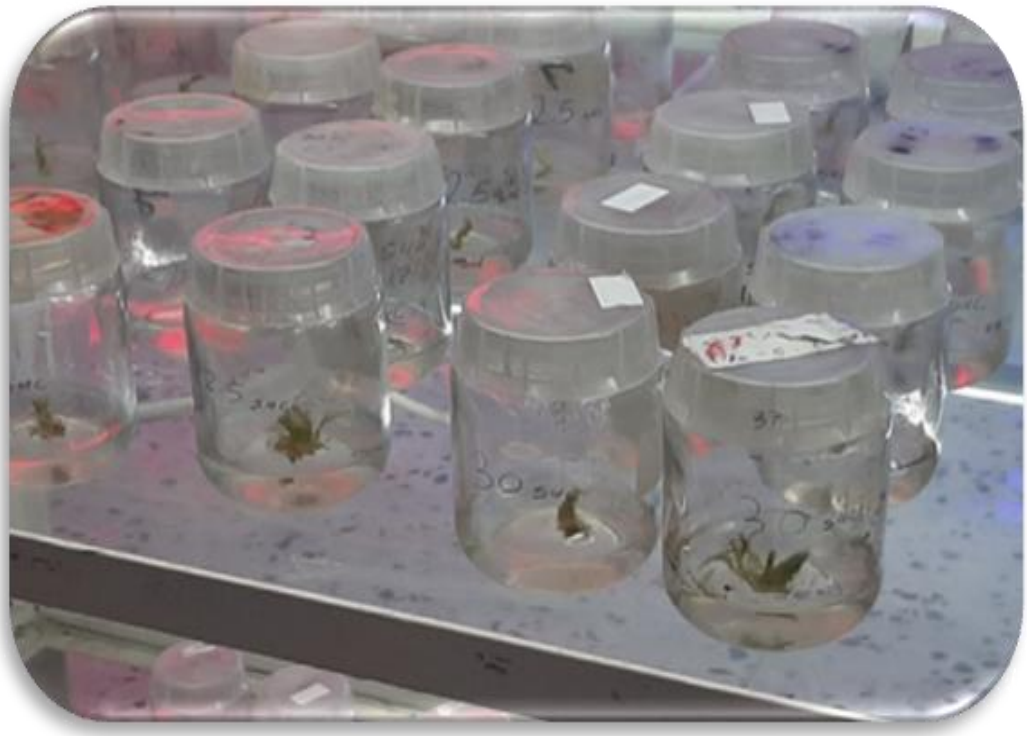
الجدول (3): تراكيز منظمات النمو BAP وNAA في إكثار نبات *Zingiber officinale* بالتجربة.

مكونات الوسط	الشاهد	معاملة 9	معاملة 10	معاملة 11	معاملة 12
NAA + BAP (ملجم/لتر)	0	0.5 + 2	1 + 2	0.5 + 3	1 + 3

4.2.3.تأثير تراكيز السكروز في وسط النمو على نمو وتجدير المستأصلات.

في هذه التجربة تم إعادة زراعة مجموعة أخرى من المستأصلات على وسط MS مضافًا إليه تركيزات 30، 60، 90 و120 جم/لتر من السكروز الملاحق حيث زرع مستأصل نباتي واحد في كل وعاء وتحتوي كل معاملة على 10 مزارع نسيجية كل مزرعة نسيجية تمثل مكرر ثم نقلت إلى غرفة النمو تحت ظروف التحضين المذكورة سابقًا. وبعد مرور4 أسابيع من الاستزراع سجلت القراءات من طول وعدد النموات الخضرية وطول وعدد الجذور.

صممت التجربة حسب النظام العشوائي الكامل، وتم تحليل النتائج باستخدام برنامج التحليل الاحصائي SAS وعزلت المتوسطات بواسطة اختبار دنكن عند مستوى معنوية 5%.



شكل (7): زراعة مستأصل نباتي واحد في كل وعاء منفرد (برطمان).

3.3. المرحلة الثالثة:- الأقلمة.

تمت أقلمة النباتات المتحصل عليها على مرحلتين الأولى بالمعمل (*in-vitro* acclimatization) حيث تم رفع شدة الإضاءة لتشجيع النبيتات على القيام بعملية التمثيل الضوئي وخفض نسبة الرطوبة وزيادة تبادل الغازات وذلك بإزالة الغطاء البلاستيكي تدريجياً لمدة 4 أسابيع لتشجيع النبيتات على استعادة القدرة على فتح وقفل الثغور والتحكم في فقد الماء. ثم أخرجت النموات الخضرية بعناية من البرطمانات وغسل المجموع الجذري بحرص تحت ماء الصنبور الجاري للتخلص من بقايا الوسط الغذائي العالق والذي يحتوي السكروز والذي يعتبر مصدر لنمو الكائنات الحية الدقيقة وتكاثرها بالتربة ومهاجمة الجذور والقضاء على النبات.

أما المرحلة الثانية من الأقلمة (*ex-vitro* acclimatization) أجريت خارج المعمل حيث نقلت النبيتات إلى أواني الزراعة (الأصص) قطر 10 سم التي تحتوي على بيئة معقمة من بيت موس فقط، ورويت بالماء جيدًا قبل تغطيتها بغطاء بلاستيكي منفذ للضوء لتوفير مستوى رطوبة عالي نسبيا حول النبيتات. وحضنت على

درجة حرارة 25 ±2° س م° ومدة إضاءة 16 ساعة 8 ساعات ظلام، مع مراعاة التهوية بشكل دوري. رويت النبيتات بمحلول مغذي معقم مكون من ربع MS خلال الأسبوعين الأولين ثم بالماء المقطر والمعقم حتى انتهاء فترة الاقلمة. ولخفض نسبة الرطوبة وزيادة تبادل الغازات تم عمل فتحات محدودة بالغطاء البلاستيكي مع زيادة هذه الفتحات تدريجيًا قبل نزع الغطاء بالكامل بعد 4 أسابيع.

شكل (8): النبيتات التي أخذت عليها البيانات بعد عملية الأقلمة.

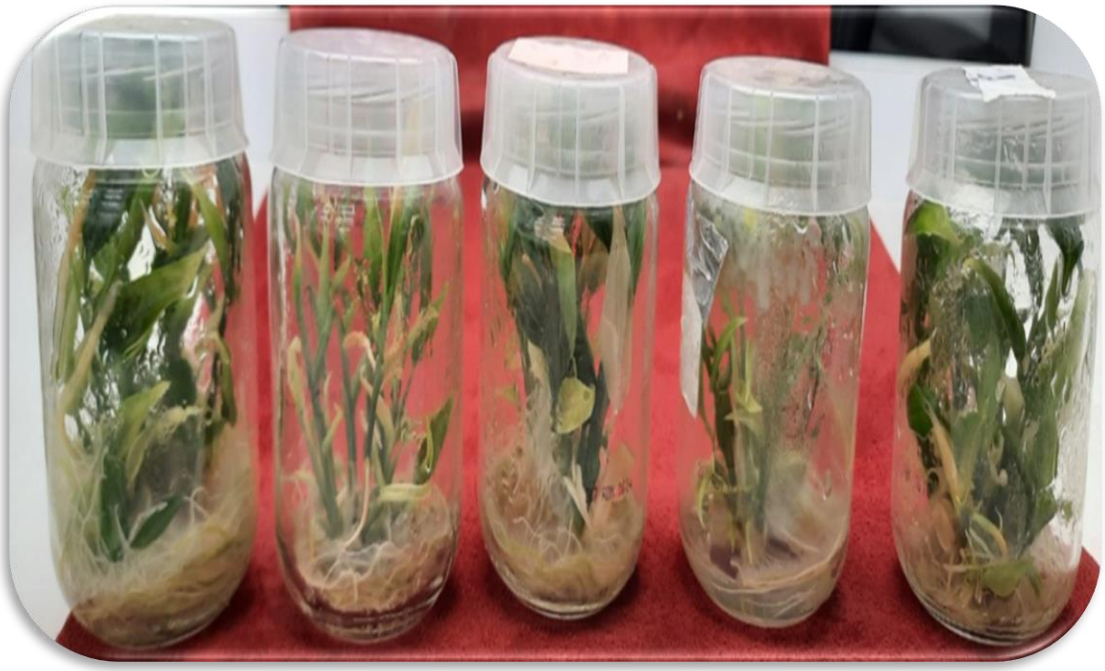
4. النتائج والمناقشة.

1.4. تحديد أفضل تركيز لمحلول الكلوركس لإنتاج مزارع نسيجية خالية من التلوث.

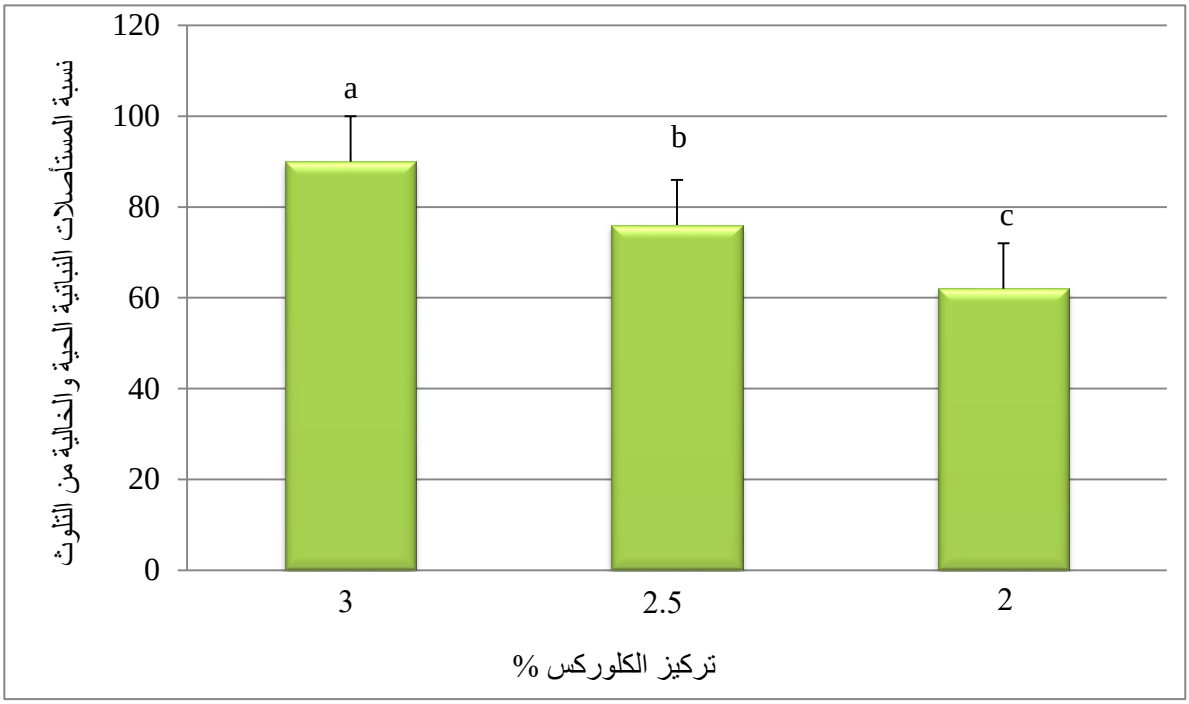
هذه الدراسة استخدمت تراكيز مختلفة من محلول الكلوركس للوصول إلى أقل نسبة من التلوث. أن التراكيز المستخدمة هو المعدل الطبيعي المستخدم في تعقيم أغلب أنواع النباتات في زراعة الأنسجة وخاصة الدرنات والريزومات، والتي تتراوح بين 1.5 إلى 5.5%.حيث لا توجد طريقة مثالية متاحة لإجراءات التعقيم السطحي ينطبق على جميع النباتات وذلك لعدة أسباب أهمها: (1) اختلاف طبيعة النباتات، (2) اختلاف الجزء المستخدم في الزراعة، (3) البيئة التي نمت بها النباتات المستخدمة بالزراعة. ولهذه الأسباب لم تكن أي دراسة قادرة على توحيد بروتوكول التعقيم للإكثار الدقيق بصفة عامة ولا لنبات *Z officinale*. ومن خلال نتائج هذه التجربة (شكل 10) تبين أن أفضل تركيز هو 3% من محلول الكلوركس التجاري لمدة 20 دقيقة، والذي سجل أفضل نسبة للمزارع النسيجة الحية والخالية من التلوث 90%، مع عدم وجود تأثير ضار على المستأصلات.

أدت زيادة تركيز الكلوروكس (المادة الفعالة) من 2% إلى 3% إلى زيادة معنوية في نسبة المزرعة المعقمة. لم تكن التراكيز 2% و2.5% كلوروكس فعالة في القضاء على التلوث بشكل كبير، نتج عنها 62 و76% نبات لكل مستأصل على التوالي، أوضح Zahid (2021) في دراسة على نبات الزنجبيل للتحقيق في آثار الكلوركس (5.25% هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl)) لمدت 30 دقيقة أن زيادة تركيز الكلوروكس إلى 70% أدت الى زيادة معنوية في نسبة المزرعة المعقمة. زيادة تركيز الكلوروكس بنسبة تصل إلى 60-70% قلل من معدل بقاء المستأصلات. لم يكن الكلوروكس بتركيز 30-50% سامًا للأنسجة المزروعة ونجا 100% من المستأصلات. تم تلوث جميع النباتات المستأصلة في معاملة الشاهد (بدون استخدام Clorox). ونظرًا للتلوث بنسبة 100%، لم ينجح أي مستأصل نباتي في معاملة الشاهد.

تعد عملية التعقيم السطحي من أهم العوامل لإنجاح زراعة الأنسجة والحصول على مستأصلات معقمة من أجل تأسيس مزارع نسيجية خالية من التلوث وتضاعف المستأصلات لاحقًا (شكل 9)، ولاختيار أفضل تركيز لمحلول الكلوركس يمكن استخدامه في تعقيم المستأصلات النباتية لنبات الزنجبيل وللحصول نسبة عالية من المزارع النسيجية الحية والخالية من الملوثات. يعد التلوث من أخطر العوامل التي تهدد أي زراعة أنسجة بالمعمل فنجاح هذه المرحلة من نجاح زراعة الأنسجة ككل، حيث يعتمد نجاح تقنية زراعة الأنسجة إلى حد كبير على تأسيس بيئة معقمة في المعمل، حيث أن التلوث في زراعة الأنسجة النباتية يحدث بشكل طبيعي عن طريق الكائنات الحية المختلفة مثل (الفطريات، البكتيريا، الحشرات) التي تقلل الإنتاجية وفي بعض الأحيان يمكن أن تمنعها تمامًا (Mihaljevic وأخرون، 2013).



شكل (9). أوعية الزراعة للنبيتات الحية والخالية من التلوث.



شكل (10). نسبة المستأصلات النباتية الحية والخالية من التلوث لنبات *Zingiber officinale* المعاملة بتراكيز مختلفة من محلول الكلوركس.

توجد أربعة مصادر للتلوث في مزارع الأنسجة وهي المستأصل النباتي سواء كان التلوث فيه داخليًا أو سطحيا والبيئة المستعملة في الزراعة والأدوات المستعملة وأخيرًا الأشخاص القائمين على العمل. يعتبر تلوث الأجزاء التي تنمو تحت سطح التربة مثل الريزومات كما في الزنجبيل مرتفع جدًا وإنشاء مزرعة نسيجية خالية من التلوث في هذه الحالة صعب نسبيًا؛ لذلك، فإن زراعة الأنسجة الناجحة تبدأ مراحلها بالتعقيم الفعال للمستأصل النباتي (Sivanesan وأخرون، 2021).

تتفق هذه النتائج مع ما وجده كل من Azhar وأخرون (2018) في دراسة على نبات *Boesenbergia Rotunda* التابع لنفس الفصيلة بأن محلول الكلوركس (المبيض التجاري) المستخدم بتراكيز منخفضة لا يكون فعال في القضاء على التلوث حيث أن التركيز المنخفض لا يقضي عادةً على كل الملوثات، أما عند استخدام التراكيز العالية منه قلل التلوث بشكل كبير ولكن مع الانخفاض في معدل بقاء المزارع النسيجية على قيد الحياة وذلك بسبب تأثيره الضار فالتركيز العالي يسبب أضرار فسيولوجية وموت المستأصلات وأن أفضل التراكيز من 2.5 إلى 3% من تركيز الكلوركس وذلك لفاعليته في القضاء على التلوث ولا يعتبر سام للأنسجة.

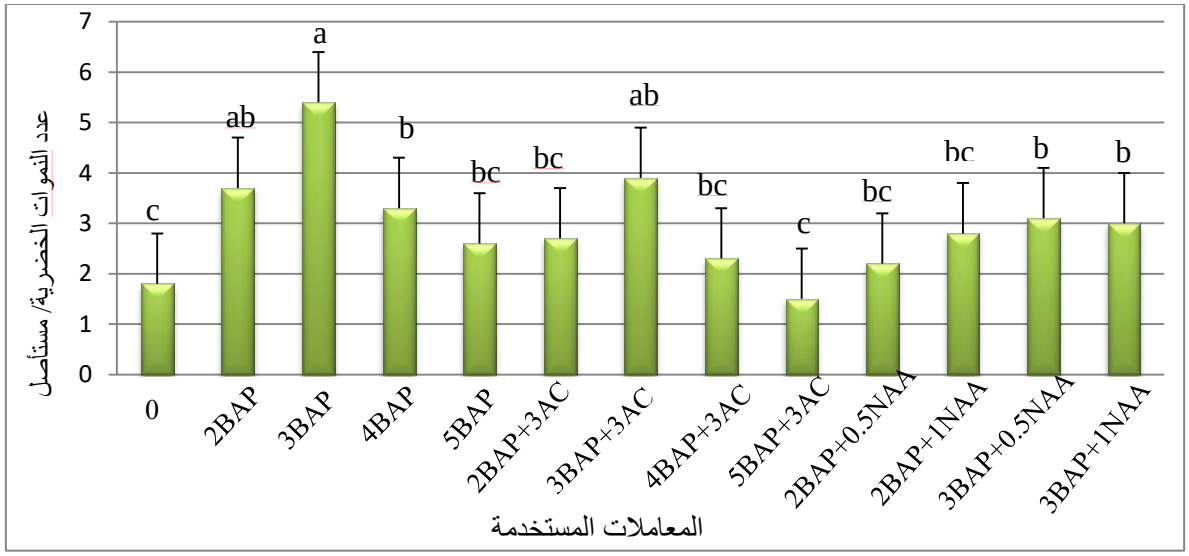
2.4. تحديد أفضل تركيز لبعض منظمات النمو والفحم النشط لتوالد ونمو النموات الخضرية.

تضاف بعض المواد إلى الوسط الغذائي لحث الجزء المنزرع على النمو والتطور فمنها عوامل رئيسية كمنظمات النمو ومنها المساعدة على سبيل المثال الفحم النشط والفيتامينات. فاختيار وسط النمو المناسب يعتبر أحد العوامل المهمة لنجاح زراعة الأنسجة النباتية لأي نبات فقد أوضح Oseni وأخرون (2018) أن وسط زراعة الأنسجة النباتية يجب أن يحتوي على جميع العناصر الغذائية اللازمة للنمو الطبيعي للنباتات وتطورها. في هذه التجربة تم استخدام الوسط الغذائي MS (الجدول 4، الملاحق)، وهو أول وسط تم تحضيره باستخدام المواد الكيميائية من قبل العالمين مورشيج وسكوج (Skoog وMurashige، 1962) وهو أشهر الأوساط وأكثرها استخدامًا في زراعة الأنسجة النباتية إلى الوقت الحاضر حيث يستخدم على نطاق واسع لإكثار العديد من الأنواع النباتية في المعمل بما في ذلك نبات الزنجبيل، وذلك لتوفيره احتياجات النبات اللازمة لنموه الطبيعي وتطوره (Fraternale وأخرون، 2002؛ Karuppusamy وPullaiah، 2007؛ Uei-Chern وأخرون، 2006).

وهناك أوساط أخرى تم إنتاجها لملائمة نمو بعض النباتات وذلك من خلال تحوير مكونات وسط النمو MS ومن أمثلتها وسط كامبروك B5 (Gamborg وأخرون، 1968) وWPM الخاص بالنباتات المتخشبة (Lloyd وMcCown، 1981). لذا يمكن القول بأن نمو وتطور المستأصلات النباتية يتأثر بمكونات البيئة الغذائية من مواد مناسبة لنموها وهذا يتفق مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى أن البيئة الغذائية MS تعد من أهم البيئات في زراعة الأنسجة بما تحتويه من المتطلبات الضرورية لنمو وتطور النسيج

المنزرع (Gamborg وPhillips، 1995). أيضاً أوضحت العديد من الدراسات في مجال إكثار نبات الزنجبيل باستخدام زراعة الأنسجة أن المستأصلات النباتية مثل البراعم الريزومية أعطت أفضل نموات خضرية باستخدام الوسط الغذائي (MS)، بناءً على ذلك فقد استخدم الوسط MS بهذه التجربة.

هذه التجربة تبين بوضوح أن زراعة العقد المفردة على الوسط الغذائي MS المضاف له تراكيز مختلفة من منظم النمو BAP فقط أو مضاف إليه 0.3% من الفحم النشط بالإضافة إلي المعاملات التي استخدمت فيها التراكيز (0.5، 1 ملجم/لتر) من منظم النمو NAA مع 3 ملجم BAP كان لها تأثير إيجابي في عدد النموات الخضرية (شكل 11)، حيث سجلت زيادة في عدد النموات الخضرية في كل المعاملات المستخدمة، باستثناء تلك التي نمت على وسط MS مضاف إليه 5 ملجم/لتر BAP مع 0.3% AC، حيث سجل انخفاض في عدد النموات الخضرية ولكنه غير معنوي. هذا وقد سجل الوسط المضاف له 3 ملجم/لتر BAP أكبر عدد من النموات الخضرية (5.4) (شكل 11)، وهذا يتفق مع Abbas وأخرون (2011) وBalachandran وأخرون (1990) الذين ذكروا أن تركيز 4.5 و3.0 ملجم/لتر من BAP هو الأمثل لتكاثر الزنجبيل في المعمل. بالإضافة الي ما وجدة Jagadev وأخرون (2008) في دراستهم والتي بينت أعلى معدل لإنتاج النموات الخضرية لنبات *Z. officinale* كانت باستخدام الوسط الغذائي MS مضاف له 3.0 ملجم/لترBAP مع 1.0 ملجم/لترNAA. وبالمثل Panda وأخرون (2007) ذكرت أن وسط MS المضاف له 3.0 ملجم/لتر BAP هو التركيز الأفضل لإنتاج الفروع وتضاعفها في *Cucuma longa*.

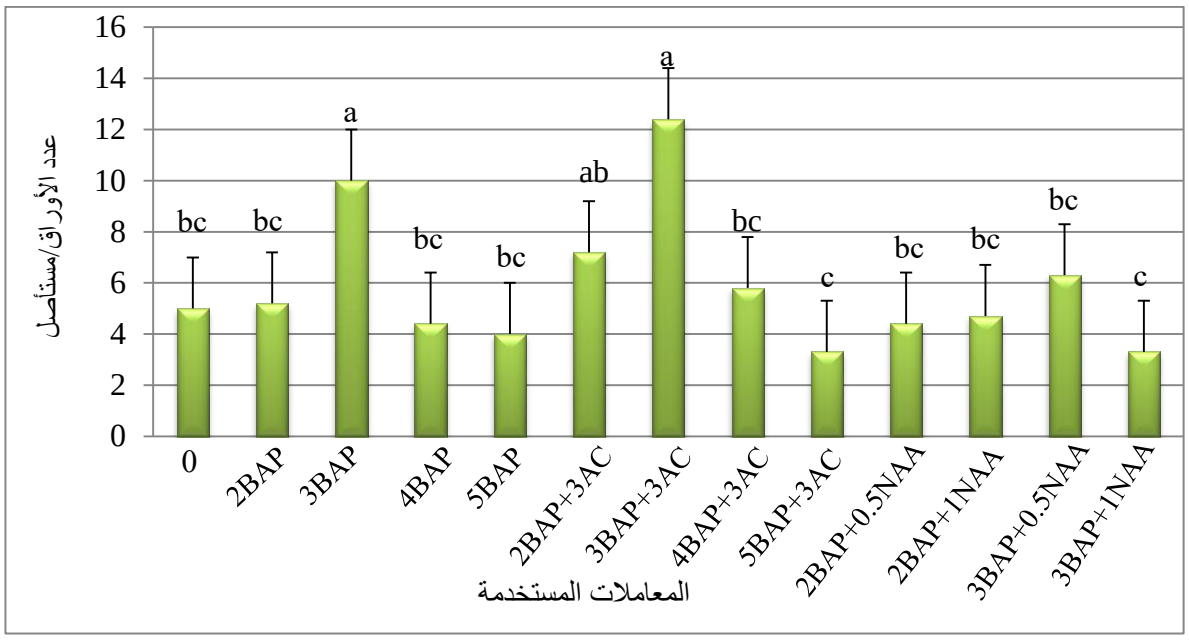


شكل (11): تأثير تركيز منظم النمو BAP (5,4,3,2 ملجم/لتر) وNAA (1,0.5 ملجم/لتر) وAC (0.3%) باستخدام الوسط الغذائي (MS) علي عدد النموات الخضرية الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*. الأعمدة التي تشترك في نفس الحرف لا تختلف معنويا عند مستوى 5% حسب اختبار دنكن.

منظمات النمو النباتية لها تأثير فعال في زراعة الأنسجة بشكل عام، وتؤثر في العمليات الحيوية والفسيولوجية المختلفة للنبات، كما أنها تتحكم بصفات عدة كتكوين النموات الخضرية والجذور وإنتاج الكالوس. السيتوكنينات والأكسينات من أكثر منظمات النمو استخدامًا في زراعة الأنسجة النباتية، ويعتبر منظم BAP ذو كفاءة واضحة على تكوين النموات الخضرية مقارنة مع السيتوكينينات الأخرى ويمكن أن يرجع ذلك إلى ثباته العالي في وسط النمو (Buah واخرون، 2010). وقد أشار Kambaska وSantilata (2009) إلى أن الوسط MS الذي يحتوي على تركيز عالي من BAP مع NAA سجل معدل عالي من النموات الخضرية لنبات *Z. officinale*، وهذا يتفق مع نتائجنا والتي أظهرت بأن الوسط المضاف إليه 3 ملجم/لتر من BAP مع NAA أظهر زيادة في النموات الخضرية مقارنة بالشاهد (شكل 11)، وكذلك يتفق مع نتائج كل من Kasilingam وأخرون (2018) وDavid وأخرون (2016).

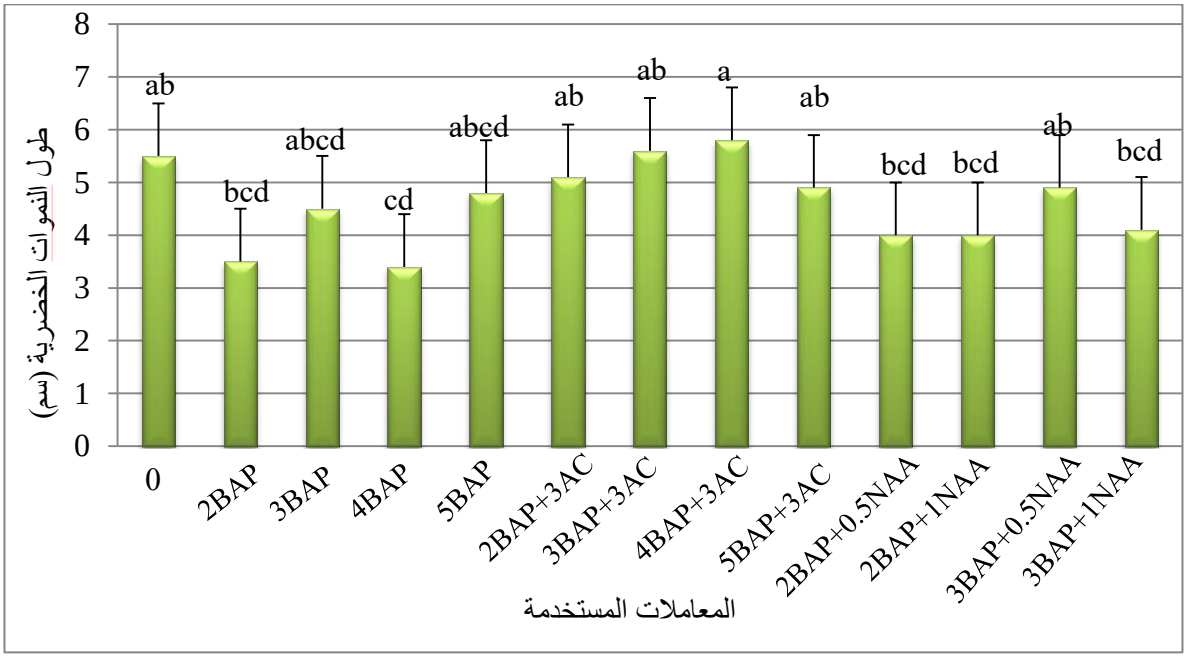
نلاحظ من النتائج بالشكل (12) بأن وسط MS المحتوي على 3 ملجم/لتر BAP والمضاف له أو بدون الفحم النشط سجل أكبر عدد من الأوراق/المستأصل النباتي (12.4 و10 أوراق/مستأصل) على التوالي. كما أن استخدام تراكيز مختلفة من BAP مع NAA في وسط MS لم يحسن عدد الأوراق/فرع باستثناء تلك التي نمت على وسط MS مضاف إليه 3 ملجم/لترBAP و0.5 ملجم/لتر NAA، والتي أظهرت زيادة نسبية مقارنة بالشاهد بحوالي 26% ولكنها ليست معنويه، وهذه النتائج تتفق مع ما وجده Jagadev وأخرون (2008)، الذين ذكروا أن وسط MS المضاف إليه 3 ملجم/لتر BAP و0.4 ملجم/لتر NAA كان الأفضل حيث سجل أكبر عدد من الأوراق لنبيتات *Z. officinale* من بين جميع المعاملات المستخدمة من BAP وNAA. كما أن إضافة 0.3% من الفحم النشط إلى الوسط MS الذي يحتوي على BAP أظهرت تأثير إيجابي على عدد الأوراق/مستأصل باستثناء تلك المضاف إليها 5 ملجم/لتر من BAP، والذي أظهر انخفاضًا طفيفًا غير معنوي مقارنة بالشاهد.

بينت النتائج أن الوسط الغذائي MS المحتوي على 0.3% من الفحم النشط لم يكن له تأثير على طول النموات الخضرية، بينما أظهرت جميع المعاملات الأخرى انخفاضًا طفيفًا غير معنوي في طول النموات الخضرية مقارنة بالشاهد، باستثناء تلك المضاف إليها 4 ملجم/لتر BAP التي بينت انخفاضًا معنويًا (شكل 13). وهذه النتائج أظهرت اختلافًا مع تلك التي حصل عليها Kambaska وSantilata (2009)، في دراستهما على الزنجبيل التي أفادت أن الوسط MS المضاف له 2.0 ملجم/لتر BAP و0.5 ملجم/لتر NAA أظهر استجابة مثالية في طول النموات الخضرية في المزارع النسيجية للنبات، وربما يرجع ذلك إلى اختلاف الصنف النباتي أو للظروف البيئية التي ينمو فيها النبات والتي تختلف من مكان لأخر والتي تؤثر على محتوى الستوكينينات والاكسينات في النبات نفسه أو في العضو النباتي الذي يؤخذ منه المستأصل.



شكل (12): تأثير تركيز منظم النمو BAP (5,4,3,2 ملجم/لتر) وNAA (1,0.5 ملجم/لتر) وAC (0.3%) في الوسط الغذائي (MS) علي متوسط عدد الأوراق الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*.

الأعمدة التي تشترك في نفس الحرف لا تختلف معنويا عند مستوى 5% حسب اختبار دنكن.



شكل (13): تأثير تركيز منظم النمو BAP (5,4,3,2 ملجم/لتر) و NAA (1,0.5 ملجم/لتر) وAC (0.3%) في الوسط الغذائي (MS) علي متوسط طول النموات الخضرية (سم) الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*.

الأعمدة التي تشترك في نفس الحرف لا تختلف معنويا عند مستوى 5% حسب اختبار دنكن.

3.4. تحديد أفضل تركيز لبعض منظمات النمو والفحم النشط لتوالد ونمو الجذور.

تم إجراء هذه التجربة لدراسة استجابة نبات الزنجبيل للتجذير. وذلك لمعرفة أفضل تراكيز للتجذير حيث تم أخذ المستأصلات ومعاملتها بتراكيز مختلفة من BAP (0، 2، 3، 4، 5، 6 ملجم/لتر) بالإضافة الى نفس التراكيز من BAP مضاف اليه AC بتركيز 0.3% بالإضافة الي التركيز (2 و3 ملجم/لتر) من BAP مخلوط مع NAA بتركيز (0.5 و1 ملجم/لتر).تم دراسة تأثير التراكيز سابقة الذكر على نسبة التجذير وعدد الجذور ومتوسط طول الجذر. ومن نتائج هذه الدراسة تبين أن هناك اختلاف واضح بين التراكيز في الاستجابة للتجذير وكان كل من التراكيز 3 ملجم/لتر BAP بدون AC و3 ملجم/لتر BAP مع 0.5 ملجم/لتر NAAهما الأفضل بالإضافة لشاهد حيث كانت نسبة التجذير 100 %. كما تبين أن الاستجابة للتجذير تختلف باختلاف التراكيز المستخدمة من BAP مع أو بدون AC وNAA مع عدم وجود اختلاف كبير بين التراكيز الأخرى شكل (14). وهذا ما يتفق مع دراسة Zahid (2021) حيث تم تحفيز الجذور بسهولة في *Z officinale* وأظهر استجابة 100% من النباتات المستأصلة لتحريض الجذور في وسط MS جميع معاملات الأكسينات المستخدمة بالإضافة الى الشاهد.

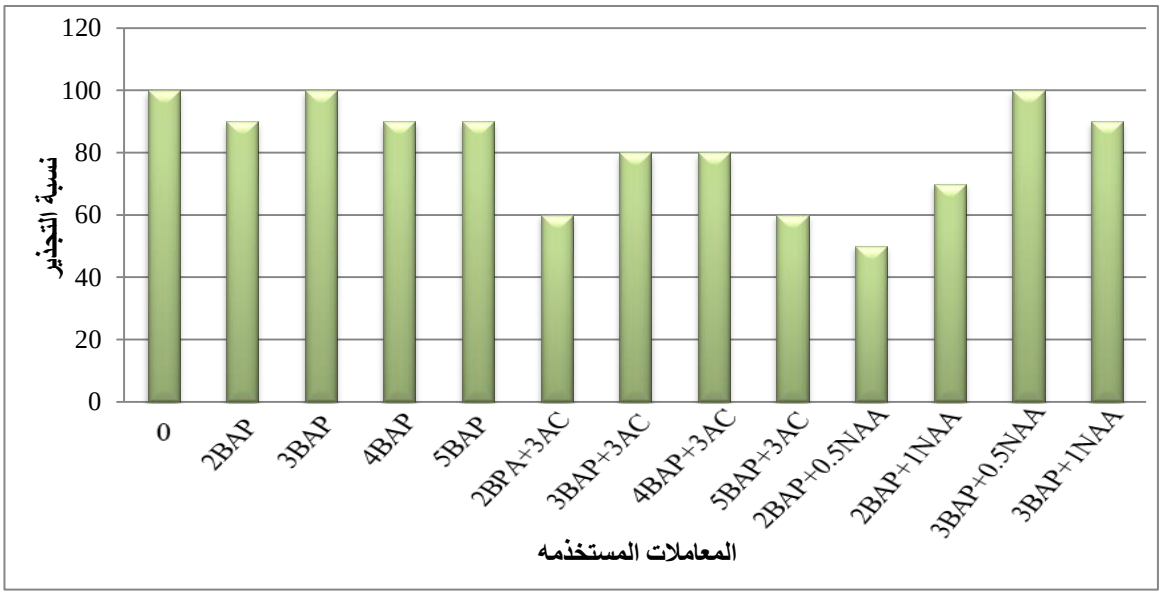
من المعروف أن التجذير الغزير للنبيتات في المعمل من العوامل المهمة لنجاح نمو النباتات في التربة، لذلك، بجانب تضاعف النموات الخضرية، رُكز على عوامل تضاعف الجذور. ففي هذه التجربة، تم تسجيل أكبر عدد للجذور(17.7) في وسط MS المضاف له 3 ملجم/لتر BAP، بينما أظهرت تراكيز BAP الأخرى المستخدمة انخفاض طفيف غير معنوي في عدد الجذور/النموات الخضرية مقارنة بالشاهد (شكل 15). أوضح كل من Buah وأخرون (2010) وCheng وأخرون (2020) أن التأثيرات الإيجابية لمنظم النمو BAP على جذور وبراعم البطاطس المخصبة يرجع إلى مساهمته في التنظيم والتحفيز 22 بروتينًا مهما في النمو بجانب الثبات العالي لمنظم النمو BAP في وسط النمو والتي تنعكس إيجابيًا على نمو المجموع الخضري والجذري للنبيتات. علاوة على ذلك، فإن إضافة السيتوكينين والأوكسينات مجتمعين أثرت بشكل إيجابي في تضاعف وتكاثر الجذور للعديد من نباتات Zingiberaceae (Ayenew وأخرون، 2012). وهذا بدوره يتفق مع Smith (2013) حيث أشار إلي أن أفضل النتائج لتكوين جذور على النموات الخضرية الناتجة كان الوسط الغذائي الذي يحتوي على تراكيز منخفضة من منظم النمو NAA.

أظهرت النتائج كل المعاملات المستخدمة من BAP مع NAA أظهرت زيادة منها معنوية ومنها غير معنوية في عدد الجذور/النموات الخضرية وأهمها تلك التي نمت على وسط MS مضاف له 3 ملجم/لتر BAP و0.5 ملجم/لتر NAA، والتي أظهرت زيادة كبيرة ومعنوية في عدد الجذور بحوالي 13.4 جذر/النمو الخضري (شكل 15). هذه النتائج تتفق مع نتائج كل من Jagadev وأخرون (2008) وAbdelmageed

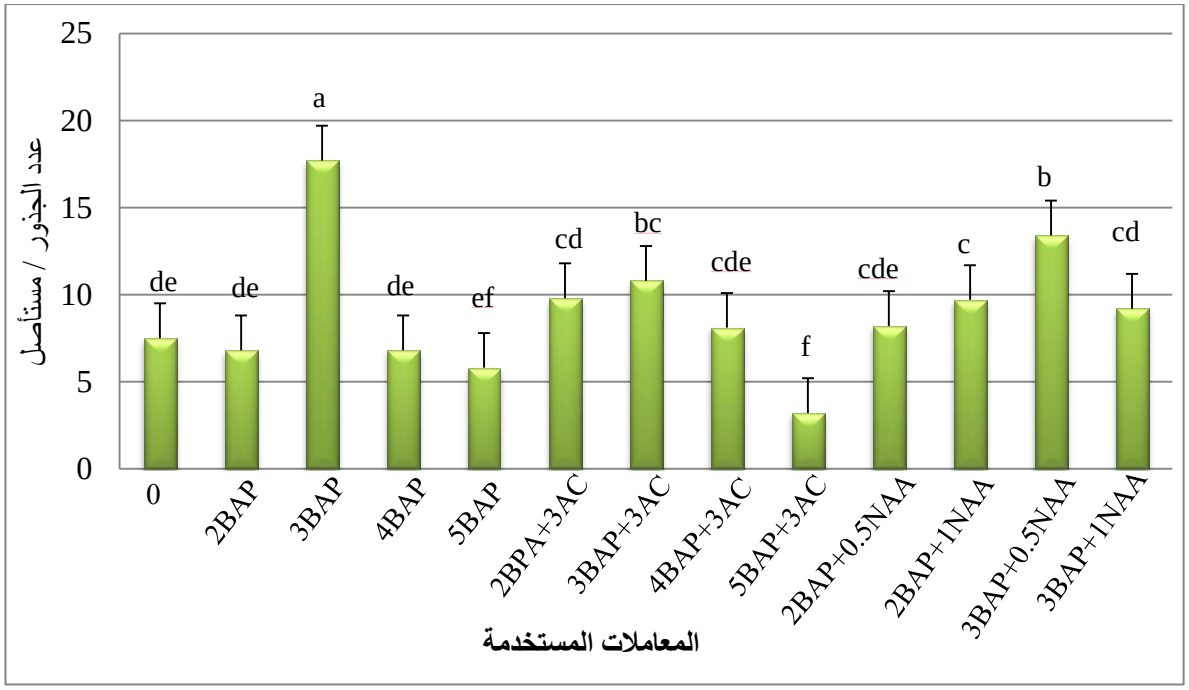
وأخرون، (2011) حيث ذكروا أن التركيز المنخفض من الأكسين NAA يعزز نمو الجذور السليمة وأن زيادة تركيزه في وسط النمو يسبب في تثبيط نمو الجذور.

إضافة الفحم النشط بتركيز 0.3% إلى وسط النمو الذي يحتوي تراكيز مختلفة من BAP أظهر تأثير إيجابي على عدد الجذور/النموات الخضرية باستثناء تلك التي زرعت على وسط النمو المضاف له 5 ملجم/لتر BAP والتي أظهرت انخفاضًا معنويًا في عدد الجذور/النموات الخضرية مقارنة بالشاهد (شكل 15).

وفي الدراسة الحالية على طول الجذور إما أنه لم يتأثر أو انخفض قليلا وذلك في جميع المعاملات المستخدمة مقارنه بالشاهد (شكل 16). وعادة ما يتأثر طول الجذور بمكونات الوسط الغذائي والعدد الكلي للجذور. هذه النتائج تتفق مع نتائج Kambaska وSantilata (2009)، حيث لم يتأثر طول الجذر بشكل كبير بمنظم النمو NAA بالتركيز 0.5 و0.1 ملجم/لتر وأوضحت الدراسة أن استخدام تراكيز منخفضه أقل من 3 ملجم/لتر من NAA كانت مناسبة لتحفيز التجذير في المعمل لنبات *Z officinale*. كما كشفت دراسة Zahid (2021) انخفاضا قليلا لطول الجذور في نبات الزنجبيل عند التركيز 2.5 ملجم/لتر من منظم النمو NAA مقارنة بمجموعة الشاهد وأن زيادة التركيز أكثر من 5 ملجم/لتر لم تسجل زيادة في طول الجذور مقارنه بمجموعة الشاهد. وأوضح David وأخرون (2016) في دراسة على نفس النبات أن استخدام منظم النمو NAA بتركيز 1 ملجم/لتر مع تراكيز 1، 2، 3 ملجم/لتر من BAP قد سجل زيادة قليلة في متوسط طول الجذور ولا يوجد فروق معنويه بينها.

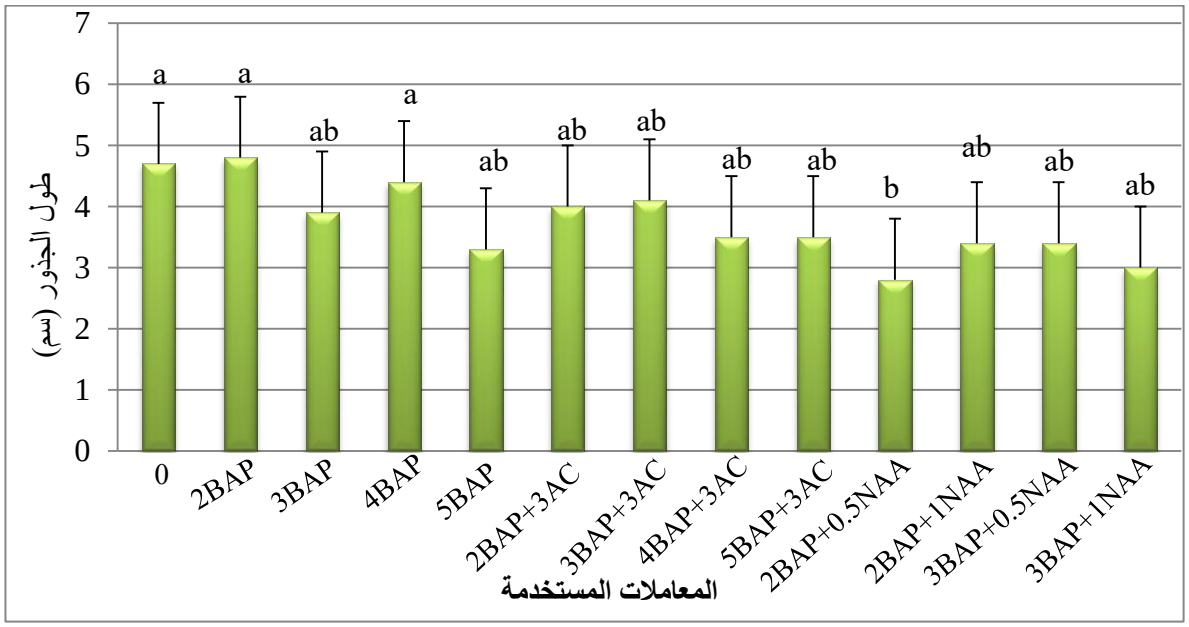


شكل (14): تأثير تركيز منظم النمو BAP (5,4,3,2 ملجم/لتر) وNAA (1,0.5 ملجم/لتر) وAC (0.3%) في الوسط الغذائي (MS) علي نسبة التجذير الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*.



شكل (15): تأثير تركيز منظم النمو BAP (5,4,3,2 ملجم/لتر) وNAA (1,0.5 ملجم/لتر) وAC (0.3%) في الوسط الغذائي (MS) علي متوسط عدد الجذور الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*.

الأعمدة التي تشترك في نفس الحرف لا تختلف معنويا عند مستوى 5% حسب اختبار دنكن.

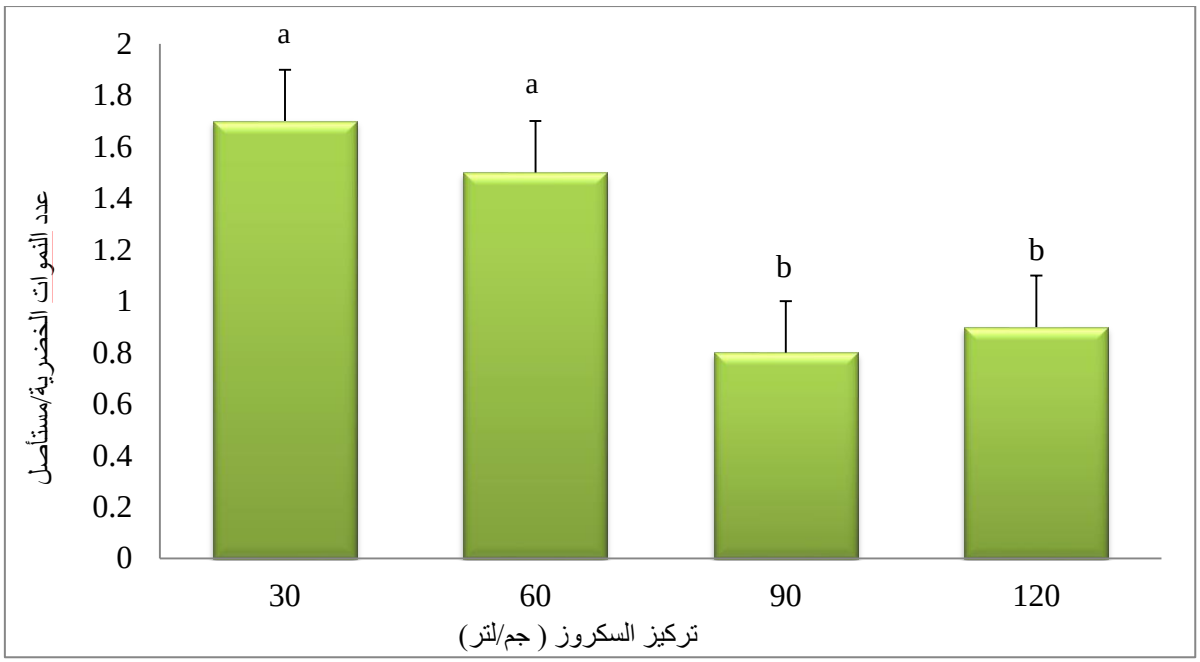


شكل (16): تأثير تركيز منظم النمو BAP (5,4,3,2 ملجم/لتر) وNAA (1,0.5 ملجم/لتر) وAC (0.3%) في الوسط الغذائي (MS) علي متوسط طول الجذور (سم) الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*. الأعمدة التي تشترك في نفس الحرف لا تختلف معنويا عند مستوى 5% حسب اختبار دنكن.

4.4. تأثير تركيز السكروز في وسط النمو (MS) على عدد وطول النموات الخضرية.

أظهرت التجربة أن زيادة مستوى السكروز في الوسط الغذائي أكثر من التركيز المستخدم في وسط MS (30 جم/لتر) يقلل في عدد النموات الخضرية وطولها عند جميع تراكيز السكروز المستخدمة. وهذا الانخفاض كان معنويًا باستثناء عدد النموات الخضرية المزروعة على وسط MS المضاف له سكروز بتركيز 60 جم/لتر، والذي أظهر انخفاض غير معنوي مقارنةً بالشاهد (شكل 17). هذا وكان الانخفاض النسبي لعدد وطول النموات الخضرية على التوالي 12%، 43% عند 60 جم/لتر سكروز و53%، 34% عند 90 جم/لتر سكروز، 48%، 68% عند 120 جم/لتر سكروز. هذه النتائج اتفقت مع نتائج Archana وأخرون (2013) على نبات الزنجبيل، حيث بينوا أن أفضل عدد وطول للنموات الخضرية وطول الجذور كان عند التركيز 30جم/لتر من السكروز في وسط النمو، كما أنها تتفق إلى حد ما مع ما وجده كل من Marfori وCruz (2018) وFerrari وأخرون (2019)، حيث أوضحوا أن زراعة البراعم الريزومية في وسط MS المضاف له تركيزات 30 و60 و90 و120 جم/لتر من السكروز سجل أفضل نمو وتطور للنباتات عند تركيزات من 30-60 جم/لتر.

كما أظهر كل من Abbas وأخرون (2014) أن استخدام تراكيز من 60-90 جم/لتر من السكروز لإكثار نبات الزنجبيل سجل أفضل عدد وطول للنموات الخضرية وهذا لا يتفق مع نتائج هذه الدراسه، بينما التركيز الأعلى من ذلك (120 جم/لتر) كان متوافقًا مع هذه النتائج وبينت تأثير سلبي على عدد وطول النموات الخضرية وعلى النمو بصفة عامة. وربما يرجع هذا التباين في النتائج إلى اختلاف الظروف المعملية في ليبيا التي نمت فيها هذه المستأصلات مع الظروف البيئية الأخرى التي أجريت بها تلك التجارب. أما على المستوى المحلي ومن مراجعة الابحاث السابقة فإنه لم تسجل أي دراسة لإكثار هذا النبات عن طريق زراعة الأنسجة النباتية باستخدام تراكيز السكروز المختلفة.



شكل (17): تأثير تركيز السكروز في الوسط الغذائي (MS) علي عدد النموات الخضرية الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*.

شكل (18): تأثير تركيز السكروز في الوسط الغذائي (MS) علي طول النموات الخضرية (سم) الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*.

5.4. تأثير تركيز السكروز في الوسط الغذائي (MS) على عدد وطول الجذور.

في هذه الدراسة لم يتأثر عدد الجذور بزيادة تركيز السكروز أكثر من 30 جم/لتر في وسط النمو (شكل 20). كما سببت زيادة مستوى السكروز أكثر من 30 جم/لتر في وسط النمو المستخدم (MS) إلى تقليل طول الجذور في جميع مستويات السكروز المستخدمة (شكل 21). وكان هذا الانخفاض معنويًا فقط في النبيتات المنزرعة على وسط MS المضاف له 120 جم/لتر سكروز. وكانت نسبة الانخفاض في طول الجذور 18% و6% و41% عند تركيز 60 و90 و120 جم/لتر سكروز على التوالي. هذه النتيجة تتفق مع Zuraida وأخرون (2016) حيث أوضح أن زيادة تركيز السكروز ما بين التركيز المستخدم من 10-60 لنبات الزنجبيل يزيد من عدد الجذور ولكنه يقلل من متوسط طول الجذور.

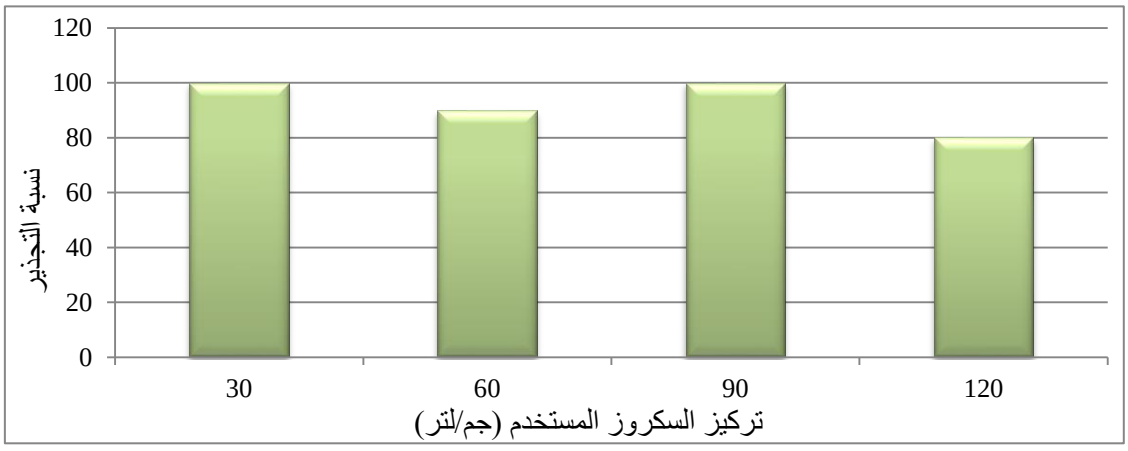
سجلت الدراسة الحالية النسبة القصوى لتجذير من 80 الى 100% وأظهرت أفضل النتائج عند التراكيز 30 و90 جم/لتر من السكروز بنسبة تجذير 100%، يليها كل من التراكيز 60 و120 جم/لتر من السكروز بنسبة تجذير 90 و80% على التوالي شكل (19). حيث أوضح Sha Vaili-Khan وأخرون (1999) تأثير السكروز على النسبة المئوية للتجذير وعدد الجذور وطولها لنبات *Syzygium alternifolium*. وكان أفضل تركيز للسكر هو 3%، حيث زادت النسبة المئوية للتجذير وعدد ومتوسط طول الجذور المتكونة زيادة طردية بزيادة تركيز السكر من 1-3%، أما التراكيز الأعلى (4-5%) فقد سجلت تأثير سلبي على هذه الصفات. كما أوضح George (2008) أن السبب في نقص التجذير في أغلب الأحيان يرجع إلى التغير في الضغط الاسموزي، والذي يزداد بزيادة نسبة السكر بوسط النمو، وأن إضافة مزيد من المادة المذابة ترفع من الضغط الاسموزي للمحلول وفي نفس الوقت تقلل الاسموزيه. كما أن التركيز المرتفع من السكر في أغلب الاحيان غير سام لكنه يسبب انخفاض في معدل النمو لعدد كبير من أنواع الخلايا في بيئة MS إذا زاد تركيز السكر عن 4-5% وكما تسبب في تثبيط لعملية التمثيل الضوئي. (محمود، 2012).

لقد كان متوقعًا بالدراسة الحالية عدم حدوث تحسن في صفات الجذور مع زيادة تركيز السكروز، وذلك لأن الوسط الغذائي MS يعتبر وسط عال في تركيز الأملاح وأن أي زيادة بالأملاح أو السكريات غالبا ما تؤدي إلى تأثيرات سلبية على النمو. كما أظهر تحليل الارتباط لعلاقة معاملات النمو الجذري وجود ارتباط عكسي بين هذه المعاملات ومستوى السكروز بالتجربة. أوضح Wu وأخرون، (2006) أنه يمكن أن يتأخر نمو الخلايا الجديدة التي تنتج عند زراعة الأنسجة في وجود كمية عالية من السكروز وذلك بإنهاء دورة الخلية خاصة عندما تكون العناصر الغذائية محدودة أو تحت الضغط الاسموزي العالي وأن التركيز المنخفض للسكروز يمكن أن يؤثر سلبًا على النمو وتراكم المواد الحيوية. وفي دراسة على أصناف نخيل التمر سجل أعلى عدد للجذور 3.28 و3.09 عند التراكيز 10 و20 جم/لتر سكروز على التوالي وبدون فروق معنوية

بينهما، كما لم تسجل أي فروق في طول الجذر الرئيسي عند مستوى سكروز 0.0، 10، 20 جم/لتر، ولكن سجل تأثير معنوي في متوسط طول الجذور الثانوية حيث أعطى الوسط الخالي من السكروز أعلى طول للجذر الثانوي 1.02 سم مقارنة بالمستأصلات النامية على نسبة سكروز 20 جم/لتر والتي سجلت (0.79 سم) (EL-Kahteeb وأخرون، 2009).

نستنتج مما سبق أن تأثير البيئة على النمو والتكشف يعتمد على تأثيرها الغذائي وضغطها الاسموزي. وقد وجد أن 75% من السكر المضاف للبيئة المستخدمة لمزرعة نبات *Digitalis* ضرورية لنمو الجزء المنزرع، أما النسبة الباقية للسكر فهي مهمة لإحداث الضغط الاسموزي الأمثل لعملية التكشف. كما أن الخلايا الموجودة في ظروف بيئية ذات ضغط اسموزي منخفض تفقد جزء من مائها بالمقارنة مع تلك الموجودة في وسط ذو ضغط اسموزي مرتفع. ولكي تحافظ الخلية على حيويتها لابد أن يقل ضغطها الاسموزي وإلا فإن الماء لن ينتقل إلي الخلايا. وبصفه عامة لو كان الضغط الاسموزي أعلى من 3 بار فإن النمو والتكشف يقف في معظم النباتات. ولذا فإن الضغط الاسموزي يؤثر في معدل نمو وانقسام الخلايا وتكشفها.

كما أن النباتات النامية تحت ظروف المزارع ذاتية التغذية الضوئية بتركيز منخفض من السكر أو بدون إضافة سكر تمتاز بمجموع جذري قوي وقدرة أفضل على امتصاص العناصر والماء من وسط النمو وفي مقاومة الفطريات أثناء عملية الأقلمة. ويمكن للنبيتات أن تنمو في المعمل في وسط نمو خالي من السكر بشرط توفر بيئة ملائمة لعملية التمثيل الضوئي. كما أظهرت نبيتات البطاطس المزروعة على وسط خالي من السكروز مع مستويات عالية من الضوء وثاني أكسيد الكربون مجموع جذري جيد (Kozai وأخرون، 1988). كما أن تخفيض تركيز السكروز أقل من 5 جم/لتر لنبات Rocs *Zingiber officinale* أعطت نموًا ضعيفًا للنبيتات ولم تستطع أي منها أن تبقى حية عند نقلها للصوبة الزجاجية (Hapsari وأخرون، 2011).



شكل (19): تأثير تركيز السكروز في الوسط الغذائي (MS) على نسبة التجذير الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*.

شكل (20): تأثير تركيز السكروز في الوسط الغذائي (MS) على عدد الجذور الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*.

شكل (21): تأثير تركيز السكروز في الوسط الغذائي (MS) على طول الجذور(سم) الناتجة من العقد المفردة لنبات *Zingiber officinale*. الأعمدة التي تشترك في نفس الحرف لا تختلف معنويا عند مستوى 5% حسب اختبار دنكن.

6.4. أقلمه النبيتات.

أجريت عملية الأقلمة بهذه التجربة على مرحلتين; الأولى داخل المعمل (*in-vitro* acclimatization)، ولمدة 4 أسابيع حيث تم فيها: (1) زيادة شدة الإضاءة لتشجيع النبيتات على عملية التمثيل الضوئي لغرض تحويلها الى نبيتات ذاتية التغذية، (2) زيادة عملية تبادل الغازات وتقليل الرطوبة النسبية حول النبيتات وذلك بإزالة الغطاء تدريجيًا مع الزمن والغرض من ذلك تشجيع النبيتات على استرجاع ألية فتح وقفل الثغور والتحكم في النتح وفقد الماء والتي تكون عادةً مفقودة بالنبيتات النامية بالمعمل، وهذا بدوره ينشط تكوين الطبقة الشمعية التي تقلل من معدل فقد الماء من النبيتات عند النقل إلي الحقل. ويمكن أن تجرى هذه المرحلة بطرق أخرى فعلى سبيل المثال بواسطة استخدام بعض المواد التي يمكن أن تمتص الرطوبة (Maene وDebergh،1987 ؛ Wardle وأخرون، 1979). وبعد 4 أسابيع من عملية أقلمة النبيتات بالمعمل نقلت إلى خارج المعمل لإجراء الأقلمة خارج المعمل (*ex-vitro* acclimatization)، حيث تم نقل النبيتات الصغيرة إلى أواني الزراعة تحتوي على بيت موس مع الحرص على عدم إلحاق الضرر بالجذور وغسلت جيدا للتخلص من بقايا وسط النمو الذي يشجع على نمو الكائنات الدقيقة الضارة وأحيانًا مميتة للنبيتات، كما رويت النبيتات على فترات دورية حسب حاجة النبيتات (شكل 22، 23).

سجلت نسبة نجاح عملية الأقلمة حوالي 85% وهي نسبة عالية تدل على نجاح عملية الأقلمة. أما النبيتات المفقودة فقد يكون السبب هو عدم قدرة تلك النبيتات على التكيف مع التغذية الضوئية و/أو انخفاض الرطوبة النسبية أثناء التأقلم في ظروف المعمل، فقد ذكرت ملاحظات مماثلة في كثير من الأبحاث، على سبيل المثال، Preece وSutter (1991) ذكروا أن قدرة النبيتات في عملية التمثيل الضوئي منخفضة بالمعمل، وأثناء عملية الأقلمة هناك حاجة إلى السرعة في الانتقال من التغذية الغير ذاتية إلى حالة التغذية الضوئية من أجل البقاء. وقد يكون السبب لضعف النبيتات أو فقد بعض الجذور عند نزعها من وسط النمو وأثناء غسل الجذور.

أشار Pospisilova وأخرون (1999) أن زيادة كفاءة البناء الضوئي مهم جدًا لنجاح النبيتات وبقائها حية أثناء المرحلة الانتقالية من المعمل إلى الصوبة. ولدى فإن نقل النبيتات من المعمل إلى الصوبة يجب أن يتم بعناية خاصة فيما يتعلق بزيادة كفاءة البناء الضوئي واسترجاع ألية فتح وقفل الثغور والتحكم في النتح. لذلك، فان معظم البحاث ركزوا على تلك العوامل للوصول إلى أعلى نسبة للنباتات التي تبقى على قيد الحياة بالصوبة. فعلى سبيل المثال، وجد Cha-um وأخرون (2005) أن أقلمة نبيتات الزنجبيل في المعمل تحت ظروف رطوبة نسبية عالية مع زيادة نسبة CO_2 حول النبيتات أدى إلى تعزيز التغذية الضوئية، كما أن النباتات الناتجة أظهرت أنظمة خضرية وجذرية قوية مع معدل بقاء للنباتات الحية مرتفع. وهذا ما توصل وأشار إليه كذلك كل من زكي والفقي (1996).

تعتبر مرحلة الأقلمه من الخطوات المهمة في برنامج إكثار أي نبات خضرياً باستخدام زراعة الأنسجة، وذلك نظرًا لأن النباتات النامية في المعمل والناتجة من عملية زراعة الأنسجة تختلف في صفاتها الفسيولوجية والتشريحية عن نظيرتها النامية في الحقل، والتي لا تؤهلها للمعيشة في ظروف الصوبة أو الحقل. فالنبيتات النامية في أوعية الزراعة تعتمد عادةً بشكل أساسي على الوسط الغذائي المتوفر لها في أوعية الزراعة، وعلى الرغم من توفر اللون الأخضر للنبيتات الناشئة من زراعة الأنسجة إلا أنها لا تقوم بعملية البناء الضوئي أو أن كفاءة التمثيل الضوئي بها قليلة، فعدد البلاستيدات الخضراء قليل بالإضافة لعدم احتوائها على الإنزيمات اللازمة لعملية البناء الضوئي أو أن الانزيمات موجودة ولكن لا تقوم بوظائفها الحيوية بنفس الكفاءة كما بنظيراتها النامية بالحقل، لذلك إذا تم نقل النبيتات مباشرة من المعمل إلي الحقل عادةً ما تفقد تلك النبيتات ولا تستطيع التأقلم ولذا من الضروري القيام بمرحلة الأقلمه، وذلك لتقليل ما يعرف بصدمة النقل وتحويل النبيتات الناتجة في المعمل تدريجيًا وبقدر الإمكان إلي نباتات تشبه نظيرتها النامية في الحقل وذلك قبل نقلها إلي الحقل. ويتم ذلك بعدة خطوات مجتمعة أهمها تحفيز النبيتات المستحدثة من زراعة الأنسجة للقيام بالبناء الضوئي وتصنيع غذائها بنفسها وعلى التحكم في النتح باسترجاع ألية فتح وقفل الثغور المفقودة لدى النبيتات بالمعمل. ولنجاح عملية الاقلمه يجب كذلك أن تحتوي النبيتات الناتجة من زراعة الأنسجة على مبادئ جذور (محمود، 2012).

تمر عملية الأقلمه بمرحلتين; الأولى تتم داخل المعمل (*in-vitro* acclimatization)، وتجرى على النبيتات وهي مازالت نامية على البيئة المغذية ويتم فيها تشجيع النبيتات على القيام بعملية البناء الضوئي وتحويلها الى نبيتات ذاتية التغذية، والى زيادة عملية تبادل الغازات وتقليل الرطوبة النسبية حول النبيتات لتشجيعها على استرجاع الية فتح وقفل الثغور والتحكم في النتح وفقد الماء. والمرحلة الثانية تعرف بالأقلمة خارج المعمل (*ex-vitro* acclimatization)، والتي تجرى بالصوبة وهي مرحلة انتقالية بين المعمل والحقل. توجد عدة طرق تستخدم للأقلمة فقد تستخدم طريقة واحدة أو أكثر مجتمعة للوصول الى الهدف المحدد، ويختلف استخدامها من نبات إلي أخر فهناك نباتات حساسة تحتاج إلى عمليه أقلمه معقده ولفترة طويله وأخرى يمكن أقلمتها لفتره بسيطة.

7.4. الاستنتاج.

أظهرت هذه الدراسة طريقة بسيطة واقتصادية في إكثار نبات *Zingiber officinale* Rosc في المعمل. حيث تم تحقيق التعقيم السطحي للبراعم الريزومية بواسطة محلول الكلوركس بتركيز 3% لمدة 20 دقيقة والتي حققت أفضل النتائج بحوالي 90% من المزارع النسيجية كانت حية وخالية من التلوث.

أن زراعة البراعم الريزوميه في وسط MS الشبه صلب المضاف له 3 ملجم/لترBAP أعطى أفضل النتائج لإكثار نبات الزنجبيل باستخدام زراعة الأنسجة النباتية، حيث سجل كل مستأصل نباتي 5.4 نمو خضري ويحمل كل نمو خضري 10 أوراق و17.7 جذر بنسبة تجذير 100%. كما أوضحت النتائج أن استخدام السكروز بالمعدل الطبيعي في وسط MS (30 جم/لتر) أظهر أفضل نمو وتطور لتكاثر نباتات الزنجبيل في المعمل. كما أدت زيادة تركيز السكروز في وسط النمو إلى التقليل في عدد النموات الخضرية معنويًا وطول الجذور بشكل بسيط ولكن غير معنوي.

شكل (22): مرحلة نقل النبيتات إلي الأصص لإجراء الأقلمة خارج المعمل (*ex-vitro* acclimatization).

شكل (23): حجم وشكل النباتات بالأصص بعد حوالي أربعة أسابيع من الأقلمه خارج المعمل (*ex-vitro* acclimatization).

5. التوصيات.

- أجريت هذه الدراسة لإيجاد طريقة دقيقة وسريعة لإكثار *Zingiber officinale* Rosc حيث نوصي بإنشاء بروتوكولات بسيطة واقتصادية أخرى لتكاثر الدقيق لزنجبيل.
- نوصي كذلك بالقيام بهذه الدارسة على أنواع أخرى من السيتوكينين والأوكسين لمعرفة النوع الأمثل ومدى تأثيرها على معدل تكاثر الزنجبيل.
- نوصي بزراعة النباتات الناتجة بعد الأقلمة في الحقل.
- قد تواجه زراعة الزنجبيل في ليبيا مشكلة من المشاكل الزراعية مثل ازدياد الملوحة في مياه الري مما يؤثر على كمية ونوعية الإنتاج لذلك نوصي بإجراء البحوث والدراسات عن أفضل الأنواع التي تتحمل الملوحة الزائدة في مياه الري.
- أخيرًا، نجاح هذه الدراسة بتطبيقها على أرض الواقع سوف يفتح حقبة جديدة للإنتاج التجاري للزنجبيل في ليبيا.

6. المراجع.

أولاً- المراجع العربية:

القران الكريم، مصحف الجماهيرية، رواية قالون، سورة الإنسان، 17.

الجوزية، ابن القيم. 751هـ. الطب النبوي. دار الفكر لطباعة والنشر. بيروت، 334.

جواد، رأفن وعبد الحسن، محمد. 2011. دراسة التأثير التثبيطي للمستخلصات المائية والزيتية والكحولية لبذور نبات الحبة السوداء على أنواع مختارة من البكتيريا المرضية. مجلة أبحاث البصرة. (5)37: 2695-1817.

ربيعة، محمد. 2015. دراسة التأثير الوقائي للمستخلص الإيثانول لريزوم نبات الزنجبيل (*Zingiber officinale*) على الجرذان المعاملة برابع كلوريد الكربون. رسالة ماجستير. قسم علم الحيوان، كلية العلوم، جامعة سبها، ليبيا.

زكي، ماجد والفقي، فوزي. 1996. تقنيات زراعة الانسجة النباتية. المطبعة التجارية الحديثة، غمره، القاهرة.

سلمان، محمد عباس. 1988. أساسيات زراعة الخلايا والأنسجة النباتية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، بغداد. العراق.

سيد، عبد الباسط وحسين، عبد التواب. 2004. الموسوعة الأم للعلاج بالنباتات والأعشاب الطبية. دار ألفا لنشر والتوزيع.

فاضل، مراتب؛ حميد، رفاه وحميش، موسى. 2017. التركيب الكيميائي والتغذوي لريزومات الزنجبيل *Zingiber officinale*. مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 22(3): 89-96.

فهمى، فكرى. 2003. زراعة الأنسجة النباتية. فكرى فهمى، منشورات دار الكتب العلمية للنشر والتوزيع – القاهرة.

قابيل، طارق. 2015. الزراعة النسيجية- تكنولوجيا زراعة الخلايا والأنسجة والأعضاء النباتية. طارق قابيل، منشورات قسم النبات والميكروبيولوجي - كلية العلوم -جامعة القاهرة.

محمود، محمود. 2012. زراعة الانسجة والخلايا النباتية، منشورات الدار العربية لنشر والتوزيع الحديث- مدينة نصر، 520.

ثانيا- المراجع الانجليزية:

Abbas, M. S.; Hussein, S.; Usama, I.; Hattem, M. and El-Sayed, G. 2011. *In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosco). Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 9(2): 165-172.

Abbas, M.; Aly, U.; Taha, H. and Gaber, E. 2014. *In vitro* production of microrhizomes in ginger (*Zingiber officinale* Rosco). Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences, 4(2): 142-148.

Abdelmageed, A.H.; Faridah, Q.Z.; Norhana, F.M.; Julia, A.A. and Midhzar, A.K. 2011. Micropropagation of *Etlingera elatior* (Zingiberaceae) by using axillary bud explants. Journal of Medicinal Plants Research, 5(18): 4465-4469.

Adaniya, S.; Ashoda, M. and Fujieda, K. 1989. Effect of day length on flowering and rhizome swelling in ginger (*Zingiber officinale* Rosc). Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 58(3): 649-656.

Adaniya, S. 2001. Optimal pollination environment of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) evaluated by *in vitro* pollen germination and pollen growth in styles. Scientia Horticulturae, 90(3/4): 219-226.

Akinyemi, O.; Oyewole, S.O. and Jimoh, K.A. 2018. Medicinal plants and sustainable human health: a review. Horticulture International Journal, 2(4): 194-195.

Ali, A.M.; El-Nour, M.E. and Yagi, S.M. 2018. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 16(2): 677-682.

Anasori1, P. and Asghari, G. 2008. Effects of light and differentiation on gingerol and zingiberene production in callus culture of *Zingiber officinale* Rosc. Research in Pharmaceutical Sciences, 3(1): 59-63.

Archana, C.; Geetha, S. and Balachandran, I. 2013. Microrhizome and minirhizome production in three high yielding cultivars of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2(10): 477-484.

Ayenew, B.; Tefera, W. and Kassahun, B. 2012. *In vitro* propagation of Ethiopian ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cultivars: evaluation of explant types and hormone combinations. African Journal of Biotechnology, 11(16): 3911-3918.

Azhar, S.; Ghani, K, and Yusuf, N. 2018. *In vitro* induction of adventitious root from shoot bud of *Boesenbergia rotunda* (Zingiberaceae): Effect of plant growth regulators. Science International (Lahore), 30(1): 147-151.

Banerjee, S.; Mullick, H.I. and Banerjee, J. 2011. *Zingiber officinale*: a natural gold. International Journal of Pharma and bio Sciences, 2(1): 283-294.

Balachandran, M.; Bhat, S. and Chandel, S. 1990. *In vitro* clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp.) and ginger *(Zingiber officinale* Rosc.). Plant Cell Reports, 8(9): 521-524.

Bhargava, S.; Dhabhai, K.; Batra. A.; Sharma, A. and Malhotra, B. 2012. *Zingiber officinale*: chemical and phytochemical screening and evaluation of its antimicrobial activities. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 4(1): 360-364.

Boggetti, B.; Jasik, J. and Mantell, S.H. 1999. *In vitro* multiplication of cashew (*Anacardium occidentale* L.) using shoot node explants of glasshouse-raised plants. Plant Cell Reports, 18(6): 456-61.

Buah, J.; Danso, E.; Taah, K.; Abole, E.; Bediako, E.; Asiedu, J. and Baidoo, R. 2010. The effects of different concentrations cytokines on the *in vitro* multiplication of Plantain (*Musa* sp.). Biotechnology, 9(3): 343-347.

Chan, K. 2003. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. Chemosphere, 52(9): 1361-1371.

Cha-um, S.; Tuan, N.M.; Phimmakong, K. and Kirdmanee, C. 2005. The *ex vitro* survival and growth of Ginger (*Zingiber officinale* Rocs.) influence by *in vitro* acclimatization under high relative humidity and CO_2 enrichment Conditions**.** Asian Journal of Plant Science, 4(2): 109-116.

Cheng, X.; Liu, Q.; Peng, Y.; Qi, L. and Li, P. 2011. Steamed ginger (*Zingiber officinale*): changed chemical profile and increased anticancer potential. Food Chemistry Journal, 129(4): 1785-1792.

Cheng, L.; Wang, D.; Wang, Y.; Xue, H. and Zhang, F. 2020. An integrative overview of physiological and proteomic changes of cytokinin- induced potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber development *in vitro*. Physiology Plant Journal, 168(3): 675-693.

Daily, J.W.; Yang, M.; Kim, D.S. and Park, S. 2015. Efficacy of ginger for treating type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. Journal of Ethnic Foods, 2(1): 36-43.

Davey, M. and Anthony, P. 2010. Plant cell culture: Essential Methods. John Wiley and Sons Ltd.

David, D.; Yan, T. and Gansau, J. A. 2016. *In vitro* propagation of *Zingiber officinale* Rosc. '*Tambunan'*. Transactions on Science and Technology, 3(1-2): 162-167.

Dhamayanthi, K.M.; Sasikumar, B. and Ramashree, A.B. 2003. Reproductive biology and incompatibility studies in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Phytomorphology, 53: 123-131.

Dhanik, J.; Arya, A. and Nand, V. 2017. A review on *Zingiber officinale*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(3): 174-184.

Dumas, E. and Monteuuis, O. 1995. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 40(3): 231-235.

EL-Kahteeb, M.A.; Arafa, A.M.; EL-Banna, A.A. and Zayed, E.M. 2009. Effect of sucrose and ms-salt strength concentrations on the development of date palm plantlets during rooting stage. Journal of Productivity and Development, 14(2): 313-328.

El-Nabarawy, M.A.; El-Kafafi, S.H.; Hamza, M.A. and Omar, M.A. 2015. The effect of some factors on stimulating the growth and production of active substances in *Zingiber officinale* callus cultures. Journal Annals of Agricultural Sciences, 60(1): 1-9.

Ferrari, M.; Antoniazzi, D.; Nascimento, A.; Franz, L.; Bezerra, C. and Magalhães, H. 2016. Evaluation of new protocols to *curcuma longa* micropropagation: a medicinal and ornamental specie. Journal of Medicinal Plants Research, 10(25): 367-376.

Ferrari, M.P.; Queiroz, M.S.; Andrade, M.M.; Trettel, J.R. and Magalhães, H.M. 2019. Growth regulators affect the growth and biochemical activity of *curcuma longa* plants grown *in vitro.* Journal of Agricultural Science, 11(10): 277-291.

Fraternale, D.; Giamperi1, L.; Ricci1, D. and Rocchi, M.L. 2002. Micropropagation of *Bupleurum fruticosum*: the effect of triacontanol. Plant Cell Tissue and Organ Culture 69(2): 135-140.

Gamal, S.; Abd El-Aziz1.; Hesham, N.; Hamid, M.; Saleh, A.; Rasha, A.; Alsaggaf, S.; Magdy, M.O. and El-Fark. 2018. *Zingiber officinale* alleviates maternal and fetal hepatorenal toxicity induced by prenatal cadmium. Biomedical and Pharmacology Journal, 11(3): 1369-1380.

Gamborg, O.L.; Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50, 151-158.

Gamborg, O.L. and Phillips, G.C. 1995. Media preparation and handling. In: Gamborg, O.L. and Phillips, G.C., Eds., Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods, Springer-Verlag, Berlin, 21-34.

Garace, S.; Sankari, M. and Gopi. 2017. Antimicrobial activity of ethanolic extract of *Zingiber officinale* – an *in vitro* study. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 9(9): 1417-1419.

Gavande, S.S.; Shylaja, M.R. and Nazeem, P.A. 2018. Variability analysis in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) somaclones using ISSR marker. Chemical Science Review and Letters, 7(28): 954-958.

George, E. 2008. Plant propagation by tissue culture, Third ed., Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Ghasemzadeh, A.; Jaafar, HZE. and Rahmat, A. 2010. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Molecules, 15(6): 4324-33.

Gibson, S.I. 2000. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. Journal Plant Physiology, 124(4): 1532-1539.

Gupta, S.K. and Sharma. A. 2014. Medicinal properties of *Zingiber officinale* Roscoe. a review. Journal of Pharmacy and Biological Sciences 9(5):124-129.

Grzanna, R.; Lindmark, L. and Frondoza, C. 2005. Ginger--an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. Journal of Medicinal Food, 8(2): 125-132.

Hamirah, M.N.; Sani, H.B.; Boyce, P.C. and Sim, S.L. 2010. Micropropagation of red ginger (*Zingiber montanum* Koenig), a medicinal plant. Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 18(1): 127-130.

Hapsari, B.W.; Ermayanti, T.M.; Rantau, D.E. and Rudiyanto. 2011. Comparison of the reduction effect of sucrose and table sugar concentration on growth characteristics of red ginger (*Zingiber officinale* Rocs.) cultured in liquid medium. Annales Bogorienses, 15(1): 15-20.

Hussain, S.; Fareed, S.; Ansari, S.; Rahman, A.; Zareen, A. and Saeed, M. 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 4(1): 10-20.

Islam, M.S.; Mia, M.; Apu, M.I.; Halder, J.; Rahman, M. F.; Islam, M. and Jahan, N. 2015. A comprehensive review on region based traditional Ayurveda practitioner's plants secondary metabolites and their phytochemical activities in Bangladesh. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 3(6): 202-216.

Jagadev, P.N.; Panda, K.N. and Beura, S. 2008. A fast protocol for *in vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) of a tribal district of India. International Society for Horticultural Science, 765(17):101-108.

Jo, E.; Tewari, R.; Hahn, E. and Peak, K. 2009. *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 96(3): 307-315.

Kambaska, K.B. and Santilata, S. 2009. Effect of plant growth regulator on micropropagtion of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cv- Suprava and Suruchi. Journal of Agricultural Technology, 5(2): 271-280.

Karuppusamy, S. and Pullaiah, T. 2007. *In vitro* shoot multiplication of *Bupleurum disticho-phyllum* wight-a native medicinal plant of southern India. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 17(2): 115-124.

Kasilingam, T.; Raman, G.; Sundramoorthy, N.D.; Supramaniam, G.; Mohtar, S.H. and Avin**,** F.A. 2018. A review on *in vitro* regeneration of ginger: tips and highlights. European Journal of Medicinal Plants, 23(3): 1-8.

Kozai, T. and Iwanami, Y. 1988. Effects of CO_2 enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L) in tissue culture during the preparation stage. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 57(2): 279-288.

Krishnamoorthy, H.N. 1981. Plant growth substances: including applications in agriculture. Tata McGraw-Hill, New Delhi.

Kumar, G.L.; Karthik, K.V. and Rao, B. 2011. A review on pharmacological and phytochemical properties of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). Journal of Pharmacy Research, 4(9): 2963-2969.

Langner, E.; Greifenberg, S. and Gruenwald, J. 1998 Ginger: history and use. Advances in Therapy, 15(1):25-44.

López, E.C.; Balcázar, M.H.; Mendoza, J.R.; Ortiz, A.R.; Melo, M.O.; Parrales, R.S. and Delgado, T.H. 2017. Antimicrobial activity of essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). American Journal of Plant Sciences. 8(7): 1511-1524.

Lloyd, G. and McCown, B. 1981.Commercially-feasible micropropagation of *mountain laurel, kalmia latifolia,* by use of shoot-tip culture. International Plant Propagator's Society, 30: 421-427.

Maene, L. and Debergh, P. 1987. Optimalisation of the transfer of tissue cultured shoots to *in vivo* conditions. International Society for Horticultural Science, 212: 335-348.

Marfori, E.C. and Cruz, M.J. 2018. Influence of sucrose on growth and [6]-gingerol production of *in vitro*-grown ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 10(1) :17-20.

Maiga, A.M.; Diallo, A.G.; Daou, A.; Touré, A.; Danquah, A. and Danquah, E. 2021. Development of female parent sorghum with high lysine and threonine content in Mali. Journal of Genetics Genomics and Plant Breeding, 5(3):63-71.

Marwat, K.S.; Shoaib, M.; Khan, A.E.; Rehman, F. and Ullah, H. 2015. Phytochemistry and bioactivities of quranic plant, zanjabil-ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 15(5): 707-713.

Mehaboob, V.M.; Faizal, K.; Raja, P.; Thiagu, G.; Aslam, A. and Shajahan, A. 2019. Effect of nitrogen sources and 2, 4-D treatment on indirect regeneration of ginger (*Zingiber officinale* rosc.) using leaf base explants. Journal of Plant Biotechnology, 46(1): 17-21.

Mehbub, H.; Akter, A.; Akter, A.; Mandal, M.; Hoque ,A.; Tuleja ,M. and Mehraj, H. 2022. Tissue culture in ornamentals: cultivation factors, propagation techniques, and its application. Plants (Basel), 11(23): 1-33.

Mengs, B. 2018. *In vitro* diseases cleaning, micro-propagation and field establishment of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cultivars. International Journal of Pharmaceutical Science and Research, 3(4): 08-11.

Mihaljevic, I.; Dugalic, K.; Tomas, V.; Viljevac, M.; Pranjic, A.; Cmelik, Z.; Puskar, B. and Jurkovic, Z. 2013. *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of '*oblacinska'* sour cherry. Journal of Agriculture Science, 58(2): 117-126.

Mishra, R. K.; Kumar, A. and Kumar, A. 2012. Pharmacological activity of *Zingiber officinale*. International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences, 1(3): 1073-1078.

Mughal, M.H. 2019. 6-Gingerol and shogaol; a comprehensive strategy against various maladies. Significances of Bioengineering and Biosciences, 3(1): 226-230.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-479.

Nafi, A.; Ling, F.H.; Bakar, J. and Ghazali, H.M. 2014. Partial characterization of an enzymatic extract from bentong ginger (*Zingiber officinale* var. Bentong). Molecules Journal, 19(8): 12336-12348.

Nair, K.P. 2019. Turmeric (*Curcuma longa* L.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) - world's invaluable medicinal spices. Published by the Registered Company Springer Nature Switzerland AG, Gewerbestrasse, Cham, Switzerland.

Nayak, S.; Naik, P.K. 2006. Factors effecting *in vitro* microrhizome formation and growth in *curcuma longa* L. and improved field performance of micropropagated plants, ScienceAsia, 32(1): 31-37.

Nwachukwu, C.U.; Umeh, C.N.; Kalu, I.G.; Okere, S. and Nwoko, M.C. 2010. Identification and traditional uses of some common medicinal plants in ezinihitte mbaise L.G.A. of Imo state, Nigeria. Report and Opinion, 2(6): 1-8.

Oseni, O.M.; Pande, V. and Nailwal, T.K. 2018. A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7(7): 3778-3786.

Owen, H.R.; Wengerd, D. and Miller, A.R. 1991. Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. Plant Cell Reports, 10(11): 583-586.

Pan, M.J. and Van Staden, J. 1998. The use of charcoal *in vitro* culture-a review. An International Journal on Plant Growth and Development, 26: 155-163.

Panda, M.KV.; Mohanty, SV.; Subudhi, EV.; Acharya, A. and Nayak, S. 2007. Assessment of genetic stability of micropropagated *Curcuma longa* L. by cytophotometry and RAPD analyses, International Journal of Integrative Biology. 1(3): 189-195.

Pandey, Y.R.; Sagwansupyakorn, C.; Sahavacharin, O. and Thaveechai, N. 1997. *In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Kasetsart Journal - Natural Science, 31: 81-86.

Pospisilova, J.; Ticha, I.; Kadlecek, P.; Haisel, D. and Plzakova, S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to e*x vitro* conditions. Biologia Plantarum Journal, 42: 481-497.

Preece, J. E. and Sutter, E. G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In. Debergh P.C, Zimmerman R.H (Eds.) Micropropagation. technology and application. Kluwer Academic Pub., Dordrecht, Boston, London, 71-93.

Uei-Chern, C.; Yeh, C.; Agrawal, D. and Tsay, H. 2006. *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of *Bupleurum kaoi*-an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology Plant. 42(2): 128-133.

Ramage, C.M. and Williams, R.R. 2001. Mineral nutrition and plant morphologies. *in vitro* cell dev biol plant. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant. 38(2): 116-124.

Ravindran, P.N. and Babu, K.N. 2005. Ginger: the genus *Zingiber*. Boca Raton London, New York, Washington, D.C.

Rehman, R.; Akram, M.; Akhtar, N.; Jabeen, Q.; saeed, T.S.; Shah, M.A.; Ahmed, K.; Shaheen , G. and Asif, H.M. 2011. *Zingiber officinale* Roscoe (pharmacological activity). Journal of Medicinal Plants Research, 5(3): 344-348.

Rout, S.P.; Choudary, K.A.; Kar, D.M.; Lopamudra, D.L. and Jain, A. 2009. Plants in traditional medicinal system-future source on new drugs. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 1(1):1-23.

Saedisomeolia, A.; Arzati, M.M.; Abdolahi, M.; Sedighiyan, M.; Rangel, A.; Muench, G.; Zarezadeh, M.; Jafarieh, A. and Honarvar, N.M. 2018. Mechanisms of action of ginger in nuclear Factor-kappaB signaling pathways in diabetes. Journal of Herbal Medicine, 16: 1-20.

Semwal, R.B.; Semwal, D.K.; Combrinck, S. and Viljoen, A.M. 2015. Gingerols and shogaols: important nutraceutical principles from ginger. Phytochemistry Journal, 117: 554-568.

Sharma, P.M. and Srivastava, C.N. 2006. Phytoextract-induced developmental deformities in malaria vector. Bioresource Technology Journal, 97(14): 1599-604.

Shawahna, R. and Taha, A. 2017 .Which potential harms and benefits of using ginger in the management of nausea and vomiting of pregnancy should be addressed? a consensual study among pregnant women and gynecologists. BMC Complementary and Alternative Medicine, 17(1): 204.

Sha-valli Khan, P.S.; Hausman, J.F. and Rao, K.R. 1999. Effect of agar, MS medium strength, sucrose and polyamines on *in vitro* rooting of *Syzygium alianifolinm*. Biologia Plantarum, 42: 333-340.

Sidhu, Y. 2010. *In vitro* micropropagation of medicinal plants by tissue culture. The Plymouth Student Scientist, 4(1): 432-449.

Sitorus, E.N.; Hastuti, E.D.; Setiari, N. 2011. Induksi kalus binahong (*Basella rubra* L.) secara *in vitro* pada media Murashige and Skoog dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda. Bioma: Berkala Ilmiah Biologi, 13(1): 1-7.

Sivanesan, I.; Muthu, M.; Gopal, J.; Tasneem, S.; Kim, D and Oh , J. 2021. A fumigation-based surface sterilization approach for plant tissue culture, International Journal of Environmental Research Public Health, 18(5): 1-11.

Smith, R.H. 2013. Plant tissue culture techniques and experiments. Third ed., Elsevier, Amsterdam.

Srinivasan, K. 2017. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. PharmaNutrition Journal, 5(1): 18-28.

Syafitri, D.M.; Levita, J.; Mutakin, M and Diantini, A. 2018. A review: is ginger (*Zingiber officinale* var. Roscoe) potential for future phytomedicine?. Indonesian Journal of Applied Sciences, 8(1): 1-6.

Teixeria, J.B.; Sondahl, M.R. and Kirby, E.G. 1994. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. Plant Cell Reports Journal, 13(5): 247-250.

Thomas, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture, Biotechnology Advances Journal, 26(6): 618-631.

Wang, J.; Weixin, K.; Bao, R.; Xiaosong, H. and Chen, F. 2017. Beneficial effects of ginger *Zingiber officinale* rosc on obesity and metabolic syndrome: a review. Annals of the New York Academy of Sciences Journal, 1398(1):83-98.

Wardle, K.; Quinilan, A. and Simpkins, I. 1979. Absicsic acid and the regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleracea* L. var. botrytis regererated through apical meristem culture. Annals of Botany, 43(6): 745-752.

Wu, C.H.; Dewir, Y.S.; Hahn, E.J. and Paek, K.Y. 2006. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolic from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. Journal of Plant Biology , 49: 193-199.

Yap, C.K.; Mohd-Fitrim, M.R.; Mazyhar, Y. and Tan, S.G. 2010. Effects of metal contaminated soils on the accumulation of heavy metals in different parts of *Centella asiatica*: A laboratory study. Sains Malaysiana Journal, 39(3): 347-352.

Yildiz, M. 2012. The prerequisite of the success in plant tissue culture: high frequency shoot regeneration. In: Leva, A. and Rinaldi, L. Recent advances in plant *in vitro* culture. Janeza Trdine Publishers, Rijeka, Croatia. 64-90.

Zadeh, J.B. and Kor, N.M. 2014. Physiological and pharmaceutical effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) as a valuable medicinal plant. European Journal of Experimental Biology, 4(1): 87-90.

Zahara, M.; Hasanah, M. and Zalianda, R. 2018. Identification of zingiberaceae as medicinal plants in gunung cut village, aceh barat daya, indonesia. Journal of Tropical Horticulture, 1(1): 24-28.

Zahid, N. A.; Jaafar, H. Z. and Hakiman , M. 2021. Micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) 'Bentong' and evaluation of its secondary metabolites and antioxidant activities compared with the conventionally propagated plant, Multidisciplinary Digital Publishing Institute Journal. 10(4): 630.

Zhang, M.; Zhao, R.; Wang, D.; Wang, L.; Zhang, Q.; Wei, S.; Lu, F.; Peng, W. and Wu, C. 2020. Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and its bioactive components are potential resources for health beneficial agents. Phytotherapy Research Journal, 35(2): 711-742.

Zuraida, A.R.; Shukri, M.A.; Sabrina, E.N.; Nazreena, A. O.; Radziah, C. Z.; Pavallekoodi, G. and Sreeramanan, S. 2016. Micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* var. rubrum) using buds from microshoots. Pakistan Journal of Botany, 48(3): 1153-1158.

7.الملاحق.

الجدول (4): تراكيز الأملاح المستخدمة لتحضير 1 لتر من وسط النمو MS.

العناصر الكبرى	ملجم/لتر	العناصر الصغرى	ملجم/لتر
NH4.NO3	1650	H3BO3	6.2
KNO3	1900	MnSO4.4H2O	19.0
MgSO4.7H2O	370	ZnSO4.4H2O	8.6
CaCl2.2H2O	440	KI	0.83
KH2PO4	170	Na2MoO4.2H2O	0.25
المضافات العضوية	**ملجم/لتر**	CuSo4.5H2O	0.025
Nicotinic acid	0.5	CoCl2.6H2O	0.025
Thiamine.HCl	0.5	NaEDTA.2H2O	37.3
Pyridoxine.HCl	0.5	FeSO4.7H2O	27.8
Myo-inositol	100		
Glycine	2.0		
Sucrose	30000		
Phytagel	2000		

المصدر: Skoog وMurashige (1962).

شكل (24). يوضح بعض الأجهزة والادوات المستخدمة في التجربة. (1) جهاز تسخين بمقلب مغناطيس، (2) وحدة العزل ذات الهواء المعقم (الهود)، (3) جهاز التعقيم بالبخار Autoclave، (4) ميزان الكتروني حساس، (5) جهاز قياس الاس الهيدروجيني pH Meters، (6) مخابير زجاجية مدرجة متعددة الأحجام وكؤوس زجاجية مدرجة متعددة الأحجام ودوارق عيارية زجاجية متعددة الأحجام.

The effect of adding some growth regulators, activated charcoal and sucrose on the Micropropagation of ginger plant (*Zingiber officinale* Rosc) using rhizome buds

Isra Younes Estouka (Master).

University of Tripoli (2023).

Moftah Muhammad Dow (professor).

Abstract

Despite its economic importance, ginger has never been cultured in Libya, for this reason, this experiment was carried out at the National Research Center of Biotechnology, Tripoli, Libya in 2019-2020. Simple micropropagation method was established for *Zingiber officinale* Rosc using fresh rhizome sprouting bud in semisolid culture media. Fresh rhizome sprouting buds were surface sterilized by sodium hypochlorite (2, 2.5, or 3%) for 30 minutes. A concentration of 3% significantly reduced contamination of rhizome sprouted bud explants; the aseptic explants' survival rate was high (90%).Rhizome sprouted bud explants were cut in pieces and cultured on Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with different concentrations (2, 3, 4, or 5 mg/l) of BAP (6- benzyl-amino-purine) with or without 3% AC (activated charcoal), and combinations of BAP (2, or 3 mg/l) with NAA (α- Naphthalene acetic acid) (0.5, or 1 mg/l) for shoot and root induction. Our results showed that all treatments used recorded positive effect on shoot number, with the exception of those grown on MS medium accompanied with 5 mg/L BAP and 0.3% AC, which recorded non-significant decline in shoot number. MS medium containing 3 mg/L BAP with or without AC recorded highest leaves number per explant (12.4, 10 leaf/explant) respectively. All treatments of BAP accompanied with NAA did not improved leaves number per shoot except explants grown on MS medium enhanced with 3 mg/L BAP and 0.5 mg/L NAA, which exhibited increase of about 26% compared with control. Adding AC to MS medium encompassing BAP increased leaves number per explant, except explants grown on MS medium supplemented with 5 mg/L BAP, which exhibited slight diminution in leaves number. Shoot length was not effected by AC while all other treatments used in this experiment showed slight but non-significant decrease in shoot length with the exception of explants grown on 4 mg/L BAP which displayed a significant reduction compared to control. In our study on roots, root length either was not affected or slightly decreased in all treatments compared to control; on the other hand, root number was affected differently, the highest root number per explant (17.7) was recorded on explants grown on MS medium supplemented with 3 mg/L BAP, all other treatments of BAP demonstrated slight reduction compared to control. All treatments of different combinations of BAP and NAA showed slight increase in root number per explant compared to control while explants grown on 3 mg/L BAP and 0.5 mg/L NAA revealed

high increase in root number (13.4 root/explant). Adding AC to the medium containing different concentrations of BAP illustrated positive effect on root number except explants grown on medium supplemented with 5 mg/L, which presented high reduction in root number per explants compared to control. The effect of sucrose concentration in MS medium was also studied by using four different concentrations (30, 60, 90, and 120 g/L) for shoot and root induction. Results showed that sucrose concentration at 30 g/L gave the best results regarding shoot length and number and root length. Furthermore, the results demonstrated that root number was not affected by sucrose level in the medium. Correlation analysis for the relationship of shoot growth parameters and root length illustrated that reverse correlation existed between these parameters and sucrose level. I could say that the best treatment was that of explants grown on MS medium containing 3 mg/L BAP, which gave 5.4 shoot per explant, each shoot possesses in mean 10 leaves and 17.7 roots, followed by explants cultured on 3 mg/L BAP with 3% AC, which recorded a mean of 3.9 shoot per explant, each shoot possesses in mean 12.4 leaves and 11 roots. Plantlets were acclimatized four weeks *in-vitro* and four weeks *in-vivo*, and high survival rate (85%) was recorded. Plants would be transferred to the field to produce rhizomes, the useful and economical part of ginger. The success of field culture will open new era of ginger production in Libya.

Key words: Ginger, Micropropagation, Plant growth regulators, Activated Charcoal, Rhizome, Sucrose.