تأثير الموسم ومصدر الجزء النباتي وطريقة التعقيم واستخدام مضادات أكسدة في اكثار الزيتون صنف صوراني بزراعة الأنسجة

م. رشا أحمدبك الأحمدبك – طالبة دكتوراه في قسم البساتين – كلية الزراعة – جامعة الفرات

إشراف:

أ. د. زياد الحسين – عضو هيئة تدريسية في قسم البساتين – كلية الزراعة – جامعة الفرات

أ. د. أسعد العيسى – عضو هيئة تدريسية في قسم المحاصيل – كلية الزراعة – جامعة الفرات

أ. د. علاء الدين جراد – عضو هيئة تدريسية في قسم البساتين – كلية الزراعة – جامعة الفرات

الملخص

هدفت هذه الدراسة إلى معرفة تأثير مواد تعقيم سطحية مختلفة، موضع البراعم، وقت جمع البراعم وإضافة مضادات أكسدة إلى وسط الزراعة، على الأجزاء النامية (البراعم) في المرحلة التأسيسية في عملية إكثار الزيتون بزراعة الأنسجة. تم اختبار ثلاث مواد تعقيم: هيبوكلوريد الصوديوم، كلوريد الزئبق والكلوراكس (التجاري) لتعقيم الأجزاء النباتية وذلك بتراكيز ومدد معاملة مختلفة. كما تم اختبار فعالية أربعة مضادات أكسدة مختلفة: فحم نشط، PVP، حمض الستريك وحمض الأسكوربيك في التخفيف من مشكلة اسمرار البيئة (وسط الزراعة). اختبر تأثير جمع الأجزاء النباتية (البراعم) في خمسة أوقات مختلفة خلال السنة ومن مواقع مختلفة من الفروع والسرطانات على النبات الأم.

أظهرت النتائج أن استخدام كلوريد الزئبق بتركيز (0.1%) لمدة (2 دقيقة) في تعقيم الأجزاء النباتية (البراعم) كان الأفضل وأعطى (30.30%) أجزاء نباتية سليمة

و(40.40%) أجزاء ملوثة، وقد كان واضحاً بشكل عام أن النسبة المئوية للتلوث انخفضت بزيادة تركيز أو زمن المعاملة بالمادة المعقمة. كما أظهرت نتائج الدراسة أنه يمكن التحكم بإنتاج الأجزاء النباتية (البراعم) للمركبات الفينولية بشكل كبير باستخدام مضادات الأكسدة وتحققت أفضل النتائج بإضافة مزيج من حمضي الستريك والأسكوربيك إلى وسط الزراعة. أظهرت دراسة تأثير موقع الجزء النباتي في النبات الأم بأن أعلى نسبة مئوية للعينات السليمة وأقل نسبة مئوية للعينات الملوثة تحققت في الأجزاء (البراعم) المأخوذة من المنطقة القاعدية للفروع وقمم السرطانات مقارنة بتلك المأخوذة من وسط أو أعلى الفروع، كما تحققت أفضل النتائج عند جمع الأجزاء النباتية (البراعم) في (15) شباط.

الكلمات المفتاحية: زيتون، مضادات أكسدة، زراعة الأنسجة، تعقيم.

Effect of Season, Explant Source, Sterilization Method and Antioxidants on In Vitro Culture of Olive (Olea europeae L.) c.v Sorane

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of different surface sterilization agents, bud position, time of bud's collection and addition of antioxidants to culture media on the growing explants in the initiation stage for in vitro propagation of olive. Three sterilizing agents: Sodium hypochlorite (NaOCl), Calcium hypochlorite (Ca(OCl)2), mercuric chloride (HgCl2) and Clorox (commercial) were tasted to sterilize the explants by different concentrations and time of treatment. The effectiveness of four different antioxidants: activated charcoal (AC), PVP, Ascorbic acid (AA) and Citric acid (CA) was also tested to eliminate the medium browning problem. The effect of collecting explants at five different dates during the year, and from different positions of branches and suckers on the mother plant.

The results showed that using HgCl2 at concentration of (0.1%) for (2) minutes in disinfecting treatments of explants was the best treatment and gave the (30.30%) survived explants and (40.4%) contaminated explants. Generally, it was revealed that the percentage of contamination decreased with an increasing the concentration or time of treatment with the sterilization agents. The results revealed that explant's production of phenolic compounds was significant controlled by antioxidants, and the best control was achieved by adding a combination of Ascorbic and Citric acid to the medium. The study of the effect of the location of the explant on the mother plant showed that the highest percentage of healthy samples and the lowest percentage of contaminated samples were achieved in explants taken from the basal parts of branches and suckers compared to those taken from the middle or top of branches. The best results were achieved when explants were collected in the 15^{th} of February.

Key words: Olive, antioxidants, in vitro, sterilization.

المقدمة:

يعد الزيتون من أقدم أشجار الفاكهة دائمة الخضرة في العالم تقريباً والتي عرفها الانسان واستفاد منها جل الاستفادة، حيث أكل ثمرها، واستخدم زيتها، واستفاد من خشبها، بل وحتى الأوراق ونواتج عصر الثمار حولهما الى ألواح خشبية لإشعالها والاستفادة من مردودها الحراري المرتفع.

ينتمي الزيتون الى العائلة الزيتونية *Oleaceae* والجنس *Olea* الذي يضم أكثر من ثمانين نوعاً وأهم هذه الأنواع *O. europeae* ونميز له نوعين: البري *O. e. sylvestis* والمزروع *O. e. sativa* . وينمو الزيتون الأوربي في حوض البحر الأبيض المتوسط ويصل ارتفاع أشجاره بالعموم حتى (12-15م)، وبشكل عام فإن أشجار هذا النوع ذات نمو بطيء ولكنها مقاومة للجفاف وتعيش طويلاً، وهي ذات متطلبات بيئية منخفضة وهذا ماساعد ويساعد على زراعتها في المناطق الفقيرة بالمتطلبات الغذائية والوعرة وشبه الصحراوية بنجاح والتي يصعب زراعة أي أنواع نباتية أخرى فيها مما يساهم في إعادة تأهيل هذه المناطق ويخفف انجراف التربة ويحسن المناخ المحلي [1].

يتم اكثار الزيتون بالطرق الجنسية والخضرية المختلفة، يتم الاكثار الجنسي عادة باستخدام البذور المتوفرة لإنتاج أصول لتطعم لاحقاً بأصناف من الصعب إكثارها بالطرق التقليدية، كما تستخدم هذه الطريقة في برامج التربية وحفظ الأصول الوراثية والتشجير [2]، أما في المشاتل فإن إكثار الأصناف المرغوبة بالطرق الخضرية التقليدية هو الأكثر شيوعاً كاستخدام السرطانات والقرم والعقل الساقية بأنواعها المختلفة والتطعيم، وتتميز هذه الطرق جميعاً بالبساطة وسهولة التنفيذ ولكنها غير مرغوبة في إنتاج الغراس بسبب التباينات الوراثية ما بين الأم والأفراد الناتجة (في الإكثار الجنسي) بالإضافة لبطء نمو الغراس والتأخر بعملية الاثمار [3]، وفي العقود الأخيرة استخدمت تقنية زراعة الانسجة كأحد الطرائق الخضرية لإكثار أصناف من الزيتون وقد انتشرت بسرعة وذلك لميزاتها

العديدة وخاصة الحصول على غراس خالية من الأمراض والآفات [4]، وهي طريقة سريعة ولا تحتاج لمساحات كبيرة للإنتاج بالإضافة للعديد من المميزات الأخرى [5].

هدف البحث:

نجاح زراعة الأنسجة يعتمد على تأمين عينات نامية وسليمة في المرحلة التأسيسية، وهنالك أبحاث عدة تستخدم مواد كيميائية مختلفة لتعقيم الأجزاء النباتية (البراعم) عند الزراعة، بالإضافة إلى استخدام مضادات الأكسدة لتقليل أكسدة الفينولات في البيئة الغذائية. ولذلك هدف هذا العمل إلى دراسة تأثير ما يلي:

1- تراكيز ومدد معاملة مختلفة من (هيبوكلوريد الصوديوم، كلوريد الزئبق، كلوراكس تجاري).
2- إضافة مضادات أكسدة الفينولات (بولي فينيل بيروليدون، فحم نشط، حمض الستريك، حمض الأسكوربيك)
3- مواعيد أخذ الجزء النباتي (البراعم) خلال السنة.
4- موقع الجزء النباتي (البراعم) على النبات الأم.

الدراسات السابقة:

إن أول الدراسات لإكثار الزيتون ترجع إلى Ruggini الذي طور بيئة خاصة لإكثار الزيتون هي (OM) Olive Medium وذلك في عام 1984، وفيما بعد أمكن تطوير هذه التقنية لتصبح من الطرق الناجحة لإكثار أصناف مختلفة من الزيتون، ولإكثار الزيتون استخدمت أجزاء نباتية مختلفة مثل العقل الساقية الصغيرة والخلفات والأوراق الفلقية والسويقات والجذور والأجنة والقمم النامية الفرعية والميرستيمية [6]. وبشكل عام وبغض النظر عن النبات أو الجزء المستخدم فإن تقنية زراعة الانسجة تمر بأربع مراحل متتالية وهي: المرحلة التأسيسية، مرحلة الإكثار، مرحلة التجذير ومرحلة التقسية [7]. وتعرف المرحلة التأسيسية بأنها مرحلة بدء الزراعة المخبرية تحت ظروف تعقيم مثالية

وتتم وفق عدة خطوات متتالية تبدأ بالحصول على الجزء النباتي من النبات الأم ثم تعقيمه ثم زراعته للحصول على عينات سليمة وقوية النمو [8]، وإن نجاح المرحلة التأسيسية هو الأساس لإتمام الاكثار المخبري فقد تحدث في هذه المرحلة خسارة للعينات المزروعة ويكون ذلك بسبب التلوث (فطريات، بكتريا) أو ضعف الحيوية أو الاسمرار [9].

إن التعقيم هو شرط مطلق لنجاح زراعة الأنسجة ويشمل سلامة العينات وخلوها من الكائنات الدقيقة وعدم تعرضها لمفرزاتها السامة كالفطريات والبكتريا وحتى الغبار وكل ما ينتشر في الهواء وعلى سطح النبات ويسبب تلوث العينات السطحي، ولذلك فإن الهدف من هذه المرحلة هو التخلص من كل هذه الملوثات والقضاء عليها لأن خطرها لا يقتصر على العينات الملوثة فقط وإنما يشتمل على انتقال التلوث إلى عينات سليمة خلال الزراعة [10]. إن عملية التعقيم السطحي للعينات النباتية (Explants) تعتبر أهم خطوة قبل المرحلة التأسيسية لإكثار النباتات بزراعة الأنسجة وذلك لأن الكائنات الدقيقة تنمو أسرع من النباتات في ظروف الزراعة المخبرية وبالتالي يمكن أن تقود إلى خسارة المرحلة التأسيسية، إن هذه العملية ليست عملية سهلة وإنما تحتاج لمجموعة إجراءات متتالية تبدأ من رعاية الشجرة الأم ثم اختيار الجزء النباتي وأخيراً إجراءات تعقيمه قبل زراعته [11]. إن المحاليل المستخدمة في تعقيم الأجزاء النباتية عديدة ولكن الأكثر شيوعاً هو البرومين، هيبوكلوريد الكالسيوم، هيبوكلوريد الصوديوم، كلوريد الزئبق، نترات الفضة بالإضافة للمضادات الحيوية والمبيدات الفطرية [12]، وإن اختيار المحلول المناسب وطريقة المعاملة المثلى به (التركيز والزمن المناسبين) بحيث يتم القضاء على الكائنات الحية الدقيقة الملوثة مع ضمان الحد الأدنى من تضرر الانسجة النباتية يتوقف على مجموعة نقاط أهمها: حساسية الجزء النباتي وصفاته المورفولوجية والتشريحية بالإضافة إلى درجة تلوثه، مع الإشارة الى أن بعض المواد يمكن أن تفشل في تعقيم الجزء النباتي أو تعمل على عرقلة نموه نتيجة سميتها [13]، مع الأخذ بعين الاعتبار أن أغلب الدراسات تؤكد على أهمية معاملة الجزء النباتي بالكحول الإيتيلي قبل المعاملة بالمواد المعقمة الأساسية لزيادة كفاءة عمل المواد المعقمة في تعقيم هذه الأجزاء [3]. ولتعقيم أجزاء من الزيتون

نصح [14] باستخدام كلوريد الزئبق أو هيبوكلوريد الصوديوم أو الكالسيوم، كما أكد [15] في دراسة لتعقيم أجزاء نباتية من نباتات كبيرة بالعمر باستخدام كلوريد الزئبق (1-0.5%) أو هيبوكلوريد الصوديوم (15%) أن أفضل نسبة أجزاء حية وسليمة كانت عند التعقيم بكلوريد الزئبق، ولضمان نجاح تعقيم البراعم القمية من التفاح اختبر [16] استخدام هيبوكلوريد الصوديوم والكالسيوم وكلوريد الزئبق بتراكيز مختلفة ومدد معاملة مختلفة وتوصل الباحثان إلى أن أفضل نسبة للعينات السليمة والنامية كانت عند المعاملة بكلوريد الزئبق (0.1%) وذلك لأربع دقائق، وكذلك الأمر عند [17] الذي عمل على تعقيم أجزاء من الأناناس باستخدام هيبوكلوريد الصوديوم بتراكيز ومدد معاملة مختلفة وتوصل إلى أفضل النتائج عند تركيز (20%) لمدة (20 دقيقة)، وهذا ما وجده [18] الذي استخدم هيبوكلوريد الصوديوم على أحد أنواع الأوركيد فحصل على أفضل النتائج، وكذلك الأمر بالنسبة لـ [19] الذي استخدم هيبوكلوريد الصوديوم بتراكيز (20-25%) ولمدة (10-15 دقيقة) لتعقيم عينات نباتية من التفاح وتوصل إلى أن أفضل تركيز ومدة معاملة بهيبوكلوريد الصوديوم للحصول على أفضل النتائج يتعلق بموعد أخذ العينة من الحقل. ولاختيار المادة والطريقة المناسبتين توصل [20] إلى أن تحديد وتوصيف طريقة التعقيم السطحي للجزء النباتي تعتمد على النوع النباتي ومستوى التلوث السطحي والظروف البيئية المحيطة وعمر ونوع الجزء النباتي المستخدم. وفي هذا الخصوص اختبر [21] ستة مواد معقمة لتعقيم عينات من الكرز الحلو وهي: هيبوكلوريد الكالسيوم، هيبوكلوريد الصوديوم، كلوريد الزئبق، دي كلوروسينورات الصوديوم، بيروكسيد الهيدروجن، ونترات الفضة وذلك بتراكيز ومدد معاملة مختلفة. وفي إكثار نبات الخرنوب استخدم [22] مواد معقمة مختلفة (هيبوكلوريد الصوديوم وكلوريد الزئبق) بتراكيز ومدد معاملة مختلفة، وكذلك الأمر عند [23] الذي استخدم هيبوكلوريد الزئبق بتراكيز ومدد مختلفة للحصول على عينات نامية وسليمة من الإجاص. وفي تجارب على الزيتون صنف Frontio اختبر [24] لتعقيم العينات النباتية (براعم قمية وجانبية) عدة محاليل معقمة (HGCL2 – NAHPO4) بتراكيز ومدد معاملة مختلفة وتوصلوا إلى أن أفضل

النتائج (75%) من العينات النامية كانت هي المعاملة بـ(HGCL2) بتركيز (0.1%) ولمدة دقيقتين، وأكد كذلك [25] في تعقيم أجزاء من الزيتون صنف Picholine أن أفضل نسبة عينات حية وأقل نسبة تلوث كانت عند استخدام كلوريد الزئبق بتركيز (0.05%) ولمدة ثلاث دقائق.

تعتبر ظاهرة الاسمرار في المرحلة التأسيسية إحدى المشاكل الفيزيولوجية الرئيسة لإكثار العديد من النباتات الخشبية وخاصة أشجار الفاكهة حيث تقوم أنسجة هذه الأشجار بعد قصها وزراعتها بإفراز بعض المواد الفينولية إلى الوسط الغذائي فتتأكسد وتتحول إلى مواد سامة تؤثر في الأنسجة نفسها فتثبط نموها وقد تؤدي إلى موتها [26]، وتتأثر هذه الظاهرة بالظروف البيئية للنبات الأم ونوع النبات وصنفه والحالة الفيزيولوجية للجزء النباتي بالإضافة إلى محتوى البيئة الغذائية [27]. وتحدث ظاهرة الاسمرار (الفينول) عند زراعة أنواع نباتية عديدة وخاصة الأنواع الخشبية وينتج اللون البني المرافق لها من أكسدة المركبات الفينولية عند تفاعلها مع مكونات البيئة، فهنالك الكثير من المركبات الفينولية في النسيج النباتي والتي تتجمع في الخلايا خاصة (Tannin Idioblastes) أو في الفجوات الخلوية، وفي بيئات الزراعة وبعد إفراز الفينولات من الجزء النباتي تتأكسد هذه الفينولات بواسطة أنزيم البيروكسيداز أو أنزيم البولي فينول أكسيداز وهذه المركبات المتأكسدة تثبط النشاط الأنزيمي في العينة النباتية مما يؤدي إلى موتها. ووفقاً لنتائج الكثير من الدراسات ولتجنب الاسمرار أو للتخفيف منه تستخدم مجموعة من المواد المضادة للأكسدة منها حمض الأسكوربيك وحمض الستريك (حمض الليمون) وبولي فينيل بيروليدون (PVP) والفحم النشط (AC) [28] و [29] و [30]، وهنا نجد أن [31] قد استخدم بنجاح حمضي الستريك والأسكوربيك معاً بتركيز بلغ على الترتيب (150 مغ/ل) و (100 مغ/ل) للتخفيف من حدة هذه الظاهرة، بينما حصل [27] على أفضل النتائج باستخدام حمض الستريك فقط بتركيز (100 مغ/ل)، وللتخلص من الفينول عند زراعة براعم الزيتون استخدم [24] عدة مضادات أكسدة وتوصل لأفضل النتائج باستخدام حمض الاسكوربيك (100مغ/ل)، ولتخفيف الفينول عند زراعة الورد

اختبر [32] الفحم النشط (3 غ/ل) وحمض الأسكوربيك (100 مغ/ل) وحمض الستريك (100 مغ/ل) وتوصل إلى أقل نسبة فينول (20%) عند استخدام الفحم النشط، ويمكن أن يرجع ذلك التأثير الإيجابي للفحم النشط لكون حبيباته ناعمة جداً وبالتالي مساحة السطح الخارجي لها كبيرة مما يساعد في امتصاص مركبات الفينول [33]، كما يبين [34] أن حبيبات الفحم النشط ذات سطح خارجي كبير ولها قدرة على امتصاص عدد أكبر من المركبات السامة خلال زراعة الأنسجة مثل الفينولات المؤكسدة ومركبات إنتاج الايثيلين.

مواد البحث وطرائقه:

1-المادة النباتية: أخذت العينات النباتية (براعم) من أشجار الزيتون (*Olea europeae L.*) صنف صوراني بعمر (15سنة) نامية تحت ظروف مدينة دير الزور.

2-مكان إجراء البحث وتاريخه: نفذ البحث في مخابر كلية الزراعة بجامعة الفرات خلال الأعوام (2019-2024)

3-طريقة العمل:

3-1-التعقيم (Surface Steralization): أخذت من الأشجار الأم عقل بطول (10-20 سم) وفي المخبر غسلت بالماء الجاري للتخلص من الغبار والملوثات الخارجية، ثم قسمت العقل إلى أجزاء صغيرة بحدود (5 سم) وتركت في المبيد الفطري (سولفين إنتاج أغري بيس) بتركيز (5 غ/ل) لمدة نصف ساعة، ثم رفعت العقل، وضمن طاولة العزل (Laminar Box) في المخبر قسمت العقل إلى قطع صغيرة بحدود (0.5-1 سم) بحيث يحتوي كل جزء على زوج من البراعم فقط، غمرت بالكحول الإيتيلي (70%) لمدة دقيقة تلاها التعقيم النهائي باستخدام مواد التعقيم الأساسية (حسب الاختبار) وبتراكيز ومدد معاملة (حسب الاختبار) وأضيف لكل محلول عدة نقاط من مادة Tween20 وذلك لخفض التوتر السطحي للمادة المعقمة وتحسين تماسها مع العينة. وبعد التعقيم غسلت

العينات ثلاث مرات بالماء المقطر والمعقم لمدة (15 دقيقة) تقريباً. وبعد تجفيف العينات على ورق ترشيح معقم أصبحت جاهزة للزراعة.

3-2-التخلص من الفينول (Removal of Phenolics): للتخفيف أو للتخلص من ظاهرة الاسمرار تم زراعة العينات النباتية المعقمة (باستخدام 0.1% HGCL2 لمدة 2 دقيقة) في المرحلة التأسيسية على بيئة غذائية MS صلبة وتحتوي مضادات أكسدة (عوامل الدراسة) بالإضافة للشاهد الذي ترك بدون إضافات.

3-3-البيئة الغذائية والزراعة وطروف النمو: زرعت الأجزاء النباتية الجاهزة (البراعم بدون الأوراق الخارجية) في أنابيب اختبار (1.5 × 15 سم) تحتوي على (10 مل) من البيئة الغذائية الصلبة ½ MS (Murashige and Skoog 1962) حيث خفضت الأملاح الكبرى لنصف التركيز الأصلي وتركت العناصر الصغرى والحديد على حالها، وأضيف لها: (1 مغ/ل) إندول حمض الزبدة IBA (Indol biotric acid) إنتاج MERCK. (2 مغ/ل) بنزيل أمينو بيورين BAP (6-Benzyladenine) إنتاج MERCK. (1 مغ/ل) حمض الجبرلين3 GA (Gibberellic acid C19H22O6) إنتاج AVONCHEM. فيتامينات (ميواينوزيتول 100مغ/ل، حمض النيكوتين 0.5 مغ/ل، بيرودكسين 0.2 مغ/ل، ثيامين 2.5 مغ/ل) وهي من إنتاج MERCK، MERCK،HIMEDIA ، MERCK على الترتيب. جلايسين (0.2 مغ/ل) (H2NCH2COOH) إنتاج MERCK. (30 غ) سكروز (C12H22O11) إنتاج MERCK. (7 غ) آغار . آغار (Agar-Agar) إنتاج MERCK. ضبط الـ PH على (5.6). ثم أغلقت الأنابيب بقطع من ورق الألمنيوم المعقم، وأخيراً تركت في ظروف الحاضنة (غرفة النمو) لمدة أربعة أسابيع تحت الشروط التالية: *الإضاءة: (16 ساعة) ضوء و (8 ساعات) ظلام بشدة (3000 لوكس). *درجة الحرارة: ضبطت الحرارة على (25±2°م) نهاراً و(20±2°م) ليلاً. *الرطوبة: نسبة الرطوبة في الحاضنة بحدود (50-70%).

4-عوامل الدراسة: تضمنت المرحلة التأسيسية اختبار العوامل التالية:

مواد التعقيم: شملت الدراسة مواد التعقيم التالية:

1-كلوراكس Clorox (Commercial bleach) (20%) لمدة (10-20 دقيقة)، وهو إنتاج محلي (شركة مدار) يحتوي هيبوكلوريد الصوديوم فعال 4-5%.

2-هيبوكلوريد الصوديوم (NAOCL2) بتراكيز (10-20%) لمدة (10-20 دقيقة) إنتاج MERCK.

3-كلوريد الزئبق (HGCL2) بتركيز (0.1-0.2%) لمدة (1-2-4 دقيقة) إنتاج MERCK.

مضادات الأكسدة: شملت المواد التالية:

1-بولي فينيل بيروليدون (polyvinylpyrrolidone) (PVP) بتركيز (200 مغ/ل) إنتاج MERCK.

2-فحم نشط (Carbone attivo puro) (AC) بتركيز (500 مغ/ل) إنتاج MERCK.

3-حمض الأسكوربيك (Ascorbic acid) C6H8O6 بتركيز (100 مغ/ل) إنتاج MERCK.

4-حمض الستريك (Citric acid) C6H8O7.H2O بتركيز (100 مغ/ل) إنتاج MERCK.

5-مزيج من حمضي الستريك والأسكوربيك بتركيز (100 مغ/ل) لكل منهما.

موقع الجزء النباتي: أخذت العينات (البراعم) في منتصف شباط كالتالي:

– من الفرع: بعد إزالة قمة الفرع تم الترقيم التسلسلي للبراعم (من القمة للقاعدة) بحيث أخذ البرعم الأول بعد قمة الفرع المزالة الرقم 1 وهكذا حتى الرقم 7 أي (البرعم 7).

– من السرطان: أزيلت قمة السرطان ثم أخذ البرعم الأول بعدها.

مواعيد أخذ الجزء النباتي: أخذت العينات النباتية (البراعم) من نموات العام الحالي بمواعيد مختلفة من السنة كالتالي: 15 شباط، 15 أذار، 15حزيران، 15 أيلول، 15 تشرين الثاني.

5–القراءات والقياسات: سجلت القراءات بعد شهر من الزراعة كالتالي:

1–العينات الملوثة: العينات الملوثة بالميكروبات (فطريات وبكتريا)

2–اللون البني: البيئات الملونة باللون المسود (افرازات فينولية)

3–العينات النامية والسليمة: العينات النامية والسليمة من أي تلوث أو اسوداد

4–العينات الميتة: العينات الميتة

6–التحليل الاحصائي: صممت تجارب العمل حسب التصميم العشوائي الكامل (C.R.D) واستخدمت (45عينة) لكل عامل من عوامل الدراسة موزعة في ثلاثة مكررات، وحللت النتائج باستعمال تحليل التباين وقورن بين متوسطات المعاملات باستخدام اختبار أقل فرق معنوي عند مستوى (5%).

النتائج والمناقشة:

1- طرق التعقيم

الجدول (1): تأثير استخدام مواد تعقيم بتراكيز ومدد زمنية مختلفة في تعقيم عينات الزيتون

طرق التعقيم		عينات ملوثة %	عينات ميتة %	عينات نامية %
مادة التعقيم وتركيزها	مدة المعاملة (دقيقة)			
كلوريد الزئبق 0.1%	1	75.33	5.21	19.46
كلوريد الزئبق 0.1%	2	40.40	29.30	30.30
كلوريد الزئبق 0.1%	4	16.70	70.00	13.30
كلوريد الزئبق 0.2%	1	38.33	32.70	28.60
كلوريد الزئبق 0.2%	2	26.66	60.00	13.34
كلوريد الزئبق 0.2%	4	8.80	84.6	6.60
هيبوكلوريد الصوديوم 10%	10	100.00	0.00	0.00
هيبوكلوريد الصوديوم 10%	20	83.30	5.53	10.70
هيبوكلوريد الصوديوم 20%	10	64.67	9.43	25.90
هيبوكلوريد الصوديوم 20%	20	51.11	39.33	9.50
كلوراكس	10	100.00	0.00	0.00
كلوراكس	20	81.11	7.50	11.39
$LSD_{0.05}$		1.0877	1.1915	1.5382

** جمعت الأجزاء النباتية (البراعم) في منتصف شهر شباط (حسب ما ورد في فقرة مواد البحث وطرائقه).

من خلال نتائج الجدول (1) يتبين أن عملية تعقيم الجزء النباتي تأثرت بنوع مادة التعقيم وتركيزها ومدة المعاملة، فتشير نتائج العينات الملوثة إلى أن أعلى نسبة تلوث (100%) كانت عند المعاملة بهيبوكلوريد الصوديوم (10%) لمدة (10 دقائق)،

والكلوراكس التجاري لمدة (10 دقائق)، وأن أقل نسبة تلوث كانت (8.8%) عند المعاملة بكلوريد الزئبق (0.2%) لمدة (4 دقائق)، تلاها بالنتيجة المعاملة بكلوريد الزئبق (0.1%) لمدة (4 دقيقة) إذ بلغت النسبة (16.70%). كما تظهر النتائج أن زيادة تركيز كلوريد الزئبق خفض من نسبة التلوث عند نفس مدة المعاملة وبفروق معنوية، وكذلك الأمر عند زيادة مدة المعاملة عند نفس التركيز. كذلك تبين النتائج أن زيادة تركيز هيبوكلوريد الصوديوم خلال نفس مدة المعاملة أو زيادة مدة المعاملة عند نفس التركيز أدت إلى انخفاض معنوي في نسبة العينات الملوثة وأن أقل نسبة (51.11%) كانت عند المعاملة بهيبوكلوريد الصوديوم (20%) لمدة (20 دقيقة). كما أن زيادة مدة المعاملة بالكلوراكس التجاري أدت إلى خفض نسبة التلوث وبشكل معنوي.

مقارنة نتائج العينات الميتة تؤكد أن أعلى نسبة (84.60%) كانت عند التعقيم بكلوريد الزئبق (0.2%) لمدة (4 دقائق) وأقل نسبة للعينات الميتة (0%) عند المعاملة بهيبوكلوريد الصوديوم (10%) مدة (10 دقائق) وكلوراكس مدة (10 دقائق). وعند مقارنة تأثير زيادة التركيز لكل المواد المعقمة المستخدمة نجد أنها جميعاً أدت إلى زيادة نسبة العينات الميتة بنفس الفترة الزمنية، كذلك أدت إطالة مدة المعاملة بنفس التركيز من كلوريد الزئبق وهيبوكلوريد الصوديوم والكلوراكس إلى ارتفاع معنوي في نسبة العينات الميتة.

يتبين من نتائج الجدول (1) أن أعلى نسبة للعينات النامية (30.30%) كانت عند المعاملة بكلوريد الزئبق (0.1%) لمدة (2 دقيقة) تلاها المعاملة بنفس المادة عند التركيز (0.2%) لمدة (1 دقيقة) وبلغت (28.60%)، كما أعطت المعاملة بهيبوكلوريد الصوديوم (20%) لمدة (10 دقائق) نسبة عينات نامية مرتفعة (25.90%) مقارنة ببقية المعاملات، وكانت أقل نسبة للعينات النامية (6.60%) عند المعاملة بكلوريد الزئبق (0.2%) مدة (4 دقائق) ثم المعاملة بهيبوكلوريد الصوديوم (20%) لمدة (20 دقيقة) حيث بلغت (9.50%). وفيما يخص زيادة التركيز أكدت نتائج المعاملة بكلوريد الزئبق

أن رفع تركيزه إلى (0.2%) حسن من نسبة العينات النامية عند المعاملة لمدة (1 دقيقة)، بينما أدت نفس الزيادة إلى تناقص نسبة العينات عند المعاملة لـ (2 دقيقة). كما أن زيادة تركيز هيبوكلوريد الصوديوم أدت إلى زيادة في نسبة العينات النامية عند المعاملة لمدة (10 دقائق) بينما لم تختلف النتائج معنوياً عند المعاملة لمدة (20 دقيقة). والجدير بالذكر عدم نمو أي عينة (0%) في المعاملتين هيبوكلوريد الصوديوم (10%) لمدة (10 دقيقة) والكلوراكس (10%) مدة (10 دقيقة) أيضاً.

مما سبق يمكن القول إنه من أكبر صعوبات المرحلتين التأسيسية والإكثار هو التلوث الميكروبي، حيث تسبب الميكروبات العديد من التأثيرات السلبية وذلك لأنها تشارك الجزء النباتي بالمواد الغذائية الموجودة في البيئة الغذائية، وتخفض من صحة وسلامة الجزء النباتي، وتقلل من حيويته مما يؤدي إلى اصفرار الجزء النباتي المزروع وتشوهه وتضرره، وهذا يقود في النهاية الى خسارة اقتصادية وهدر للوقت وبشكل خاص في النباتات الخشبية [35]. والنتائج السابقة تؤكد أن المعاملة بهيبوكلوريد الصوديوم وكلوريد الزئبق كانت فعالة في خفض نسبة التلوث وهذا يتفق مع ما أشار إليه [21] في تعقيم عينات من الكرز، كما أن نتيجة العمل بأن الكلوراكس التجاري لم يكن له تأثير معنوي في خفض نسبة التلوث تتفق مع ما أكده [19] فقد كان تأثير الكلوراكس ضعيف في تعقيم أجزاء من التفاح مقارنة ببقية مواد التعقيم الأخرى. وتدل كذلك مقارنة نتائج البحث على أن زيادة تركيز المادة في نفس مدة المعاملة سبب انخفاضاً في نسبة تلوث عينات الزيتون بينما زاد من نسبة العينات الميتة وهذا ينسجم مع نتائج [23] الذي استخدم تراكيزاً منخفضة من هيبوكلوريد الصوديوم أو كلوريد الزئبق فلم تؤثر معنوياً في نسبة التلوث ومع زيادة تركيز المادتين السابقتين انخفضت نسبة التلوث بشكل معنوي في عينات من الإجاص ولكن زادت نسبة العينات المتضررة أو الميتة. كما يؤكد [18] أن زيادة تركيز هيبوكلوريد الصوديوم ساعد في تخفيض نسبة التلوث ولكنه زاد من نسبة العينات الميتة. وزيادة نسبة العينات الميتة مع زيادة تركيز المادة المعقمة أو زيادة مدة المعاملة ربما يرجع لزيادة تأثير سمية هذه المواد في أنسجة الجزء النباتي، وقد أشار لنفس الملاحظة

[20] بأن زيادة موت الأجزاء النباتية مع زيادة تركيز المادة أو مدة المعاملة قد تعود لزيادة نشاط السمية للمواد المطهرة المستخدمة. ويبين [18] أن زيادة موت الأجزاء النباتية مع زيادة التركيز أو مدة المعاملة يرتبط بزيادة دور القواعد النشطة في المواد المعقمة في قتل الأنسجة الجنينية في الجزء النباتي. وبشكل عام تؤكد نتائج العمل على أفضلية كلوريد الزئبق في خفض نسبة التلوث ورفع نسبة العينات النامية مقارنة بهيبوكلوريد الصوديوم والكلوراكس وهذا ينسجم مع نتائج [36] و [23] عند زراعة الإجاص.

2- الموعد

الجدول (2): تأثير موعد فصل الجزء النباتي عن النبات الأم في تلوث عينات الزيتون

موعد فصل الجزء النباتي	عينات ملوثة(%)	عينات ميتة(%)	عينات نامية(%)
2/15	30.10	31.10	38.80
3/15	44.10	38.83	17.60
6/15	78.23	11.11	10.33
9/15	58.5	20.00	21.50
11/15	18.88	60.56	20.60
$LSD_{0.05}$	2.2523	0.8216	0.1623

** جمعت الأجزاء النباتية (البراعم) من قواعد الفروع وقمم السرطانات (حسب ما ورد في فقرة مواد البحث وطرائقه).

من نتائج الجدول (2) يتبين أن موعد أخذ الجزء النباتي خلال السنة كان له تأثيراً واضحاً في نسبة التلوث، إذ يلاحظ أن أعلى نسبة تلوث (78.56%) كانت عند أخذ الجزء خلال شهر حزيران، بينما أقل نسبة كانت عند أخذ الجزء في تشرين الثاني (18.88%)، ولتوضيح نسبة التلوث خلال السنة تشير معطيات الجدول إلى أن نسبة التلوث في شباط كانت (30.1%) ثم ترتفع في آذار وتبلغ النسبة الأكبر في حزيران ثم تنخفض بعدها في أيلول وتستمر في الانخفاض لتصل إلى أقل نسبة في تشرين الثاني.

أما مقارنة نسبة العينات الميتة فأظهرت أنها بلغت (31.10%) عند أخذ العينات في منتصف شباط، ثم ارتفعت إلى (38%) في منتصف آذار، ولكنها انخفضت انخفاضاً واضحاً في العينات المأخوذة في منتصف حزيران فبلغت (11.11%)، ولكنها عادت فارتفعت في العينات المأخوذة في منتصف أيلول تشرين الثاني وبلغت على الترتيب (20.00%) و (60.56%).

نتائج نسبة العينات النامية تشير إلى تحقق أعلى نسبة للنمو وبفروق معنوية عند أخذ العينات خلال شباط حيث كانت النسبة (38.8%) ثم انخفضت في آذار واستمرت في الانخفاض حتى حزيران الذي وصلت فيه نسبة العينات النامية إلى أدنى مستوى (10.33%) وبفروق معنوية عن جميع المواعيد الأخرى، ثم ارتفعت من جديد خلال أيلول وتشرين الثاني وبلغت على الترتيب (21.50%) و (20.60%).

مما سبق يلاحظ أن أفضل نسبة نمو وأقل نسبة تلوث يمكن أن تتحقق عند أخذ الأجزاء النباتية في شباط وقد يعود ذلك إلى أن نشاط الكائنات الدقيقة الملوثة يكون في أدنى مستوياته في هذه الفترة من السنة، وهذا يتفق مع ما توصل إليه [19] في التفاح، و [3] و [21] في الزيتون.

3- موقع الجزء النباتي

الجدول (3): تأثير موقع الجزء النباتي في النبات الأم في تلوث عينات الزيتون

موقع الجزء النباتي		عينات ملوثة(%)	عينات ميتة(%)	عينات نامية(%)
الفرع	برعم 1	48.88	45.10	6.02
	برعم 3	50.22	43.80	6.00
	برعم 5	42.33	43.50	13.17
	برعم 7	37.11	34.11	28.49
السرطان	-	31.11	37.11	31.88
$LSD_{0.05}$		1.8189	1.6511	1.6269

** جمعت العينات (البراعم) في منتصف شهر شباط (حسب ما ورد في فقرة مواد البحث وطرائقه).

من خلال الجدول (3) يتبين أن موقع الجزء النباتي على النبات الأم لعب دوراً مهماً في نسبة التلوث، حيث يلاحظ أن البراعم المأخوذة من قمة الفرع (البرعم 1و3) أظهرت أعلى نسبة تلوث وبفروق معنوية مقارنة بالباقي وكانت النسب على التوالي (48.88–50.22%) وبدون فروق معنوية بين الموقعين، أما أقل نسبة تلوث فكانت في البراعم المأخوذة من قاعدة الفرع (برعم 7) حيث بلغت نسبة التلوث (37.11%)، وعند المقارنة مع براعم مأخوذة من سرطانات النبات يلاحظ أنها أعطت أقل نسبة تلوث (31.11%) وبفروق معنوية مع جميع براعم الفرع.

مقارنة نتائج العينات الميتة تبين كذلك أن أعلى نسبة كانت في البراعم (1–3–5) فقد بلغت النسب على الترتيب (45.1–43.8–43.5%) وبدون فرق معنوي فيما بينها، أما أقل نسبة عينات ميتة كانت في براعم قاعدة الفرع (البرعم 7) التي أعطت النسبة (34.11%) وهي أقل أيضاً وبفروق معنوية من النسبة التي أعطتها براعم السرطانات.

أما بالنسبة للعينات النامية فقد حققت براعم السرطان أعلى نسبة (31.88%) وتفوقت معنوياً على جميع براعم الفرع، يليها البرعم (7) بنسبة (28.49%) والتي تفوقت على جميع نتائج براعم الفرع الأخرى وبفروق معنوية. أما أقل نسبة عينات نامية فكانت في البراعم (1–3) من قمة الفرع.

من النتائج السابقة يمكن الاستنتاج بأن موقع الجزء النباتي لعب دوراً مهماً في نسبة التلوث ونسبة العينات النامية وأفضل النتائج كانت في براعم قاعدة الفرع أو من السرطانات، وأهمية موقع الجزء النباتي أكده [37] في الجوافة و [16] في التفاح، و [38] في زراعة التفاح أيضاً. ويعتقد [21] أن مستوى التلوث السطحي للجزء النباتي يتوقف إلى حد ما على الحالة البيئية وعلى عمر ونوع الجزء النباتي المستخدم.

4- مضادات الاكسدة

الجدول (4): تأثير إضافة مضادات الأكسدة في نسبة الاسمرار في البيئة الغذائية المزروعة ببراعم الزيتون

مضادات الاكسدة	عينات مع الفينول المؤكسد(%)	عينات ملوثة وبدون فينول(%)	عينات نامية(%)
الشاهد	84.00	13.22	2.33
فحم نشط 500 مغ/ل	45.74	41.50	13.10
بولي فينيل بيروليدون 200 مغ/ل	44.86	38.54	16.6
حمض الأسكوربيك 100 مغ/ل	36.86	25.26	31.97
حمض الستريك 100 مغ/ل	44.41	36.40	27.10
حمض الستريك + الأسكوربيك 100 مغ/ل لكل منهما	33.86	32.71	33.97
$LSD_{0.05}$	1.4525	1.6207	1.7908

** جمعت الأجزاء النباتية (البراعم) من قواعد الفروع وقمم السرطانات (حسب ما ورد في فقرة مواد البحث وطرائقه) في منتصف شهر شباط وعقمت بكلوريد الزئبق 0.1% لدقيقتين.

من خلال معطيات الجدول (4) يتبين أن مضادات الأكسدة أثرت بشكل معنوي في خفض نسبة الفينول، حيث يلاحظ أن الفحم النشط خفض نسبة العينات مع فينول بشكل كبير ومعنوي (45.74%) مقارنة بالشاهد (84%)، كذلك إضافة PVP إلى البيئة ساعد في خفض نسبة العينات مع الفينول إلى (44.86%) ولكن بدون فرق معنوي عن الفحم النشط. كما أن إضافة حمض الأسكوربيك خفضت النسبة الى (36.86%) وبشكل أقل من حمض الستريك (44.41%)، وتحققت أقل نسبة للعينات مع الفينول في بيئة أضيف لها حمض الستريك وحمض الأسكوربيك معاً حيث بلغت النسبة (33.86%) وبفروق معنوية عن جميع المعاملات الأخرى.

تبين مقارنة نتائج العينات النامية والسليمة (بدون فينول + تلوث) أن أعلى نسبة للعينات النامية والسليمة كانت في بيئة أضيف إليها حمض الستريك وحمض الأسكوربيك حيث بلغت النسبة (33.97%) وتفوقت معنوياً على جميع النتائج الأخرى بما فيها الشاهد. أما أقل نسبة للعينات النامية والسليمة كانت عند المعاملة بالفحم النشط (13.1%) تلتها معاملة PVP (16.6%).

تبين مقارنة نتائج العينات الملوثة وبدون فينول أن أعلى نسبة للعينات الملوثة وبدون فينول كانت عند استخدام الفحم النشط وبلغت (41.50%) متفوقة معنوياً على كل المعاملات بما فيها الشاهد الذي حقق أقل نسبة عينات ملوثة وبدون فينول وبلغت (13.22%).

نتائج العمل تؤكد على أهمية مضادات الأكسدة المختلفة في تقليل نسبة أكسدة الفينول والحد من مشكلة الاسمرار في البيئة مقارنة بالشاهد وهذا ما أكده [24]، و [39]، و [29] في الدراق، وكانت أفضل النتائج عند استخدام حمض الأسكوربيك وحمض الستريك معاً وهذه النتائج تتفق مع ما أكده [32] و [40] و [38]. بينت النتائج كذلك أن الفحم النشط خفض من حالة الاسمرار في البيئة مقارنة بالشاهد وهذا ينسجم مع ما أشار إليه [32] الذي أرجع تأثير الفحم لكون حبيباته ناعمة جداً وبالتالي السطح الخارجي لها كبير وهذا ما يساعد على امتصاص كمية كبيرة من مركبات الفينول، وقد أكد نفس الملاحظة [41]، كما أن التأثير المعنوي لحمض الأسكوربيك في خفض أكسدة الفينولات في البيئة تتفق مع ما أشار إليه [24] الذي أكد تفوق حمض الأسكوربيك على PVP والفحم النشط وحمض الستريك، وهذا يتوافق مع نتائج كلاً من [40] و [42]. ويعتقد [43] أن تفوق حمض الأسكوربيك يعود لدوره في تنظيم عمليات أكسدة الفينول في البيئة أكثر من بقية مضادات الأكسدة الأخرى.

الاستنتاجات:

من نتائج دراسة استخدام مواد كيميائية مختلفة لتعقيم أجزاء (براعم) من الزيتون وإضافة مواد مضادة لأكسدة الفينول واستخدام أجزاء نباتية من مواقع مختلفة وبأوقات مختلفة خلال السنة يمكن استخلاص النتائج التالية:

1- استخدام كلوريد الزئبق (0.1%) لمدة (2 دقيقة) و(0.2%) لمدة (1 دقيقة) أعطت أفضل النتائج بالنسبة للعينات الملوثة ونسبة العينات النامية والسليمة مقارنة ببقية المعاملات (هيبوكلوريد الصوديوم، كلوراكس تجاري) بتراكيز ومدة معاملة مختلفة.

2- أخذ الأجزاء النباتية (البراعم) من قاعدة الفرع (البرعم 7) أو من السرطانات (البرعم الأول بعد القمة) أعطت أفضل النتائج بالنسبة للعينات الملوثة والعينات النامية والسليمة.

3- فصل الجزء النباتي (البراعم القاعدية للفروع وقمم السرطانات) في شباط أعطى أفضل النتائج من حيث نسبة التلوث، ونسبة النمو مقارنة ببقية المواعيد.

4- إضافة حمض الأسكوربيك بتركيز (100 مغ/ل) مع حمض الستريك (100 مغ/ل) أظهرت أقل نسبة لأكسدة الفينولات في البيئة الغذائية وتفوقت على الفحم النشط، وPVP ، وكلاً من الحمضين على حدة.

التوصيات:

مما سبق ينصح عند إكثار صنف الزيتون صوراني بزراعة الأنسجة أخذ الأجزاء النباتية (البراعم) من قمم السرطانات أو من قواعد الأفرع الحديثة خلال شهر شباط وتعقيمها بكلوريد الزئبق (0.1%) لمدة (2 دقيقة) مع إضافة حمض الأسكوربيك لوحده أو مع حمض الستريك لتقليل أكسدة الفينولات في البيئة الغذائية.

المراجع:

1. Boustany, N., R. E. Khoury, G. Hassoun, N. Sakrand G.M. Scarpa. 2019 - Micro Propagation of the Millennium Olive Trees (Olea europeae L.) in Bashaaleh Lebanon. **Int. Curr. Res.**, 11(04): 2751-2759.
2. Idowu, A. P. E., D. O. Ibitoye and O. T. Ademayegun. 2009 - Tissue Culture as Plant Production Technique for Plant Horticultural Crop. **Afr. J. Biotech.**, 8(16): 3782-3788.
3. Lambardi, M. and E. Ruggini. 2003 - Micro Propagation of Olive (Olea europeae L.). In: Micro Propagation of Woody Trees and Fruits. **Kluwer Academic Publisher Netherland**, Editor: Daniel Mohan Bienstock, Katsuaki Ishii (Editor), ISBN-13:9781402011351, pp. 621-646.
4. Sharma.D.R, and Modgil. M. 2003 – Micro Propagation of Temperate Fruit Crops. In: Micro Propagation of Horticultural Crops. (Eds): R. Chandra and M. Mishra 1 st edition, **Int. Book Distributer Co., India**: p.164-165.
5. Chaari, A., A.C. Chaabouni, M. Maalej, N. Drira. 2002 - Meski Olive Variety Propagation by Tissue Culture. **Acta Hort.**, 585, 871-874.
6. Bayraktar, M., S.H. Smedley, S. Unal, N. Varol and A. Curel. 2020 - Micro Propagation and Prevention of

Hyperhydriaty in Olive (Olea europeae L.) Cultivar Gemlik. **South Afr. J. Bot.**, 128:264-273.

7. Loyola. Vargas, V.M., Ochoa. Alejo, N. 2018 - An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. **Plant Cell Cult. Protoc.** 2018, 1815, 3-13.
8. Michelia, M. and D.F. Da Silva. 2020 - Biotech Nological Tools for Quality Olive Growing. **JOJ Wild Biodivers**, 2(1): 555-583.
9. Oseni, O.M., V. Pande and T.K.Nailwal. 2018 - A review on Plant Tissue Culture, A technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. **Int. J. Curr. Microbiol. APP. Sci.**, 7(07): 3778-3786.
10. Toppo, R., Beura, S. 2018 - Effect of Surface Sterilization Time on Leaf Explants for Aseptic Culture in Anthurium adreanum (Hort) CV. Fire. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.** 2018, 7, 2509-2515.
11. Inam UL Haq, Humara Umar, Naeem Akhtar, Muhammed Azhar Iqbal and Muhammad Ijaz. 2021 - Techniques for Micro Propagation of Olive (Olea europeae L.): **Asystematie Review**. March 2021. Volume 34. Issue I. page 184.
12. Kim, D.H., J.Gopal and I.Sivanesan. 2017 - Nanomaterials in Plant Tissue Culture; The Disclosed and Undisclosed. **RSC Advances**. 2017, 7, 36492-36505.

13. Soni, M., Thanker, M. and M, Modgil. 2011 – In Vitro Multiplication of MORTON 1-713- An Apple Rootstock Surtable for Replantation. **Indian. J. Biotech**. 10: 362-368.

14. Ruggini E. 1991 – Stato dell` Arte Della Coltura In Vitro dell` Olivo Prospettive per il Miglioramento Genetico. In: S. Sansavini (ed) Biotecnologie Resistenze Genetiche nelle Piante da frutto. **AGROBIOFRUT, Cesena**, pp. 132-147.

15. Martinez D., Arroyo-Garcia R., Revilla A. M. 1999 – Cryconservation of In Vitro Grown Shoot-tips of Olea europaea L. var. Arbequina. **CryoLetters** 20: 29-36.

16. Al Hussain Zeiad and Badrran Raddah. 2017. The Effect of Plant Regulators on In Vitro Culture of Apple Ecotype Deire. **THE ARABIC JOURNAL OF ARID ENVIRONMENTS ACSAD**.

17. Nelson, Buah John., Paul Agu Asare and Ransford Arthur Junior. 2015 – In Vitro Growth and Multiplication of Pineapple under Different Duration of Sterilization and Different Concentrations of Benzylaminopurine and Sucrose. **Biotechnology**, 14: 35-40.

18. Rodrigues, D.T., R.F. Novais, V.H.A. Venegas, J.M.M. Dias, W.C. Otoni and E.M. de Albuquerque Villani. 2013 – Chemical sterilization in In Vitro Propagation of Arundina

bambusifolia Lindl. and Epidendrum ibaguense Kunth. **Rev. Ceres**, 60: 447-451.

19. Papafotiou, M., and A.N. Martini. 2009 - Effect of Season and Sterilization Method on Response of Malosorbus florentina (Zucc.) Browicz (Rosaceae) Buds to In Vitro Culture. Proc. VIth IS on New Floricultural Crops Ed(s).: M. Johnston (et al.) **Acta Hort**. 813, ISHS 2009.
20. Sathyanarayana BN, and Varghese DB. 2007 - Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols. **I. K. International**. pp. 106.
21. Mihaljevic, I.,, Krunoslav Dugalic, Vesna Tomas , Marija Viljevac , Ankica Pranjic , Zlatko cmelik , Boris Puskar and Zorica Jurkovic. 2013 - In Vitro Sterelization Procedures for Micro Propagation of 'OBLAČINSKA' Sour Cherry. **Journal of Agricultural Sciences** Vol. 58, No. 2, 2013 Pages 117-126.
22. Lena Alsaid, Salem Zead, and Muna Sappagh. 2014. Studing The Effect of Some Plant Regulators on Multiplication and Rooting Stages of In Vitro Culture of Carob Tree (Ceratonia siliqua L.). **Damascus University Journal for The Basic Sciences**. 38(1) 389-406.
23. Wolella, E. 2017 - Surface Sterilization and In Vitro Propagation of Prunus domestica L. cv. Stanley Using

Axillary Buds as Explants. **Journal of Biotech Research** [ISSN: 1944-3285] 2017; 8:18-26.

24. Mangal, M., D. Sharma, M. Sharma and S. Kumar. 2014 - In Vitro Regeneration in Olive (Olea europeae L.) cv Frantoio from Nodal Segments. **Indian J. Exp. Biol.**, 52: 912-916.

25. Brhadda N. ;Abousalim A. ;Walali Loudiyi D. E. ; Benali D. 2003 - Effect Dumilieu de Culture sur le Microbouturage de l Olivier (Olea europeae L.) cv. Picholine Marocaine Biotechnol. **Agron. Soc. Environ.** 2003 :7 (3-4), 177-182.

26. Bridg, H. 1993 - Alternatives para la Propagacion de chir imoya Annona cherimola Mill. **Agricultura Tropical** 30: 45-57

27. Rostami, A.A. and Shahsavar. 2012 - In Vitro Micro Propagation of Olive (Olea europeae L.) Mission by Nodal Segments. **J. Biol. Environ. Sci.**, 6(17): 155-159.

28. Roussou, P.A. and C.A. Pontikis. 2001 - Phenolic Compounds in Olive Explants and their Contribution to Browning during Establishment Stage In Vitro. **Gartenbanwissenschaft**, 66(6): 298-303.

29. Jain, N. and Babbar, S.B. 2003 - Regeneration of `juvenile` Plants of Black Plum Syzygium cuminiiSkeels from Nodal

explants of Mature Trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 73(3): 257-263.

30. Komalavalli, N. and Roa, M.V. 2000 - In Vitro Micro Propagation of Gymnema Sylvestre A Multipurpose Medical Plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 61(2): 97-105.

31. Hassan, S.A.M. and N.S. Zayed. 2018 - Factor Controlling Micro Propagation of Fruit Trees: **A Review. Sci. Int.**, 6: 1-10.

32. Akhtar, G., M. Jaskani, Y. Sajjad, and A.Akram. 2016 - Effect of Antioxidants, Amino Acids and Plant Growth Regulators on In Vitro Propagation of Rosa centifolia . **Iran J Biotechnol**. 2016 Mar; 14(1): 51–55.

33. Sharada M, Ahuja A, Kaul MK. 2003 - Regeneration of Plantlets via cultures in Celasttrus paniculatus Wild–A rare endangered, medicinal plant. **J Plant Biochem Biotechnol**. 2003; 12: 65-69.

34. Thomas TD. 2008 - The Role of Activated Charcoal in Plant Tissue Culture. **Biotechnology Advances**, 26:618-631.

35. Niedz RP, Bausher MG. 2002 - Control of In Vitro Contamination of Explants from Greenhouse and Field-grown Trees. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** 38:468-471.

36. Tiefeng, X., Zhang, L., Sun, X., Tang, K. 2005 - Efficient In Vitro Plant Regeneration of Pinellia ternata (Thunb.) Breit. **Acta. Biol. Cracov. Ser. Bot.** 47(2):27-32.

37. Zamir,S, Syed Tariq Shah, Nawab Ali, G.S.S. Khattak. and T. Muhammad . 2004 - Studies on In Vitro Surface Sterilization and Antioxidants on GUAVA Shoot Tips and Nodal Explants. **Pak. J. Biotechnol. Vol.** 1 (2) 12-16 (2004).

38. Kianamiri, S., . and M. Hassani . 2010 - The Effect of Benzyl Adenine (BA) Hormone and Explants Type on Establishment and Roliferation of Iranian Dwarfing Apple Rootstock Azayesh' under In Vitro, 'Condition . **Acta Hort.** 865, ISHS 2010: 135-140.

39. Abdelwahd, R.N., Hakam, M., Labhilili, S.M., and Udupa. 2008 - Use of an Absorbent and Antioxidant to Reduce the Effects of Leached Phenolic in In Vitro Plantlet Regeneration of Faba Bean. **African Journal of Biotechnology**, 7(8), 997-1002.

40. Wu HC, du Toit ES. 2004 - Reducing Oxidative Browning during In Vitro Establishment of Proteacynaroides. **Sci Hortic.** 2004;100:355–358.

41. North, J. J., Ndakidemi, P. A., and Laubscher, C. P. 2012 - Effects of Antioxidants, Plant Growth Regulators and Wounding on Phenolic Compound Excretion during Micro

Propagation of Strelitziareginae. **Inter. J. of Physical Sci.** 7 (4), 638-646.

42. Jakhar, J. A., R. Tiwari, and L. Bhatt. 2017. Effect of Antioxidants in Controlling Phenolic Exudates in invitro Culture of Gliicidia (Gliricidia sepium Jacq.) **Steud. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci** (2017) 6(12): 4291-4296.

43. Ndakidemi1, C.F., Mneney, E. and Ndakidemi1, P.A. 2014 - Effects of Ascorbic Acid in Controlling Lethal Browning in In Vitro Culture of Brahylaena huillensis Using Nodal Segments. **American Journal of Plant Sciences**.5:187-191.