تهجين بعض أصول الحمضيات وانتخاب الأفراد المُتحملة لإجهاد البرودة

د.حسان خوجه*
د.علي الخطيب**
فينوس حسن***

(تاريخ الإيداع 7 / 6 / 2020. قبل للنشر في 23 / 11 / 2020)

□ ملخّص □

أجريت هذه الدراسة في مركز البحوث العلمية الزراعية في اللاذقية، خلال أعوام 2018– 2020 حيث تم انتخاب الأبناء الهجينة (الناتجة من بيضة ملقحة Zygote)؛ على أساس المواصفات الشكلية لأصول الحمضيات ضمن ثلاث مجموعات وفق الآتي: المجموعة الأولى هجن نتجت من تلقيح حبوب طلع الأب الزفير(Pollen Parent)، للأم البرتقال ثلاثي الأوراق (seed parent)، ونتجت المجموعة الثانية من تهجين الأب الزفير(Pollen Parent)، مع الأم اليوسفي كليوباترا(Seed parent)، في حين نتجت المجموعة الثالثة من تهجين الأب البرتقال ثلاثي الأوراق(Pollen Parent) مع الأم الزفير (Seed parent).

تم تعريض هذه الهجن المُنتخبة بعمر عام إلى درجتي حرارة (0) مْ، و(-10) مْ، لمدة أربع وعشرين ساعة، وتم تقدير درجة التضرر على الغراس؛ من حيث البقاء على قيد الحياة، ونسبة الضرر على الأوراق؛ إذ استخدم تراكم البرولين كمؤشر كيميائي عن مدى تحمل البادرات لإجهاد البرودة، وقد تم حساب البرولين المتراكم في الأوراق بعد الإجهاد البرودي. بيّنت أهم النتائج أن هجن الحمضيات قد راكمت البرولين في الأوراق عند التعرض للإجهاد، وقد زاد هذا التراكم مع زيادة الإجهاد وانخفاض درجة الحرارة، حيث كان أكبر تراكم عند الإجهاد (–10)مْ، منه في درجة (0)مْ، كما تعرضت أنسجة الأوراق إلى الضرر بعد التعرض للإجهاد البرودي (-10) مْ تلاها يباس كامل للنباتات؛ فلم ينج منها إلا أربعة هجن في الربيع التالي، حيث استعادت نباتاتها نشاطها الفيزيولوجي والحيوي والنمو الخضري، في حين لم تتأثر الهجن بانخفاض الحرارة (0) مْ، ولم يحدث أي ضرر في أنسجة أوراقها.

الكلمات المفتاحية: البرولين – إجهاد البرودة– الهجين– أصول الحمضيات– انتخاب.

* أستاذ مساعد، قسم البساتين، كلية الزراعة، جامعة تشرين ،اللاذقية، سورية.
** باحث حمضيات، دائرة البستنة، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، اللاذقية، سورية.
*** طالبة دراسات عليا (دكتوراه)، قسم البساتين، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

Hybridization Of Some Citrus Rootstock And Selection Of Tolerant Seedlings For Cold Stress

Dr. Hasan Khojah*
Dr. Ali Elkhateeb**
Venus Hasan***

(Received 7 / 6 / 2020. Accepted 23 / 11 /2020)

□ ABSTRACT □

This study was carried out at the Agricultural Scientific Research Center in Lattakia, during the years 2018-2020, where the hybrid sons (resulting from a zygote) were selected on the basis of the morphological specifications of the citrus rootstocks within three groups as follows: The first group resulted from hybridization between (seed parent) *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., (pollen parent) *Citrus aurantium* L., and the second group resulted from hybridization between (seed parent). *Citrus reticulata* Blanco, (pollen parent) *Citrus aurantium* L., and the third group resulted from hybridization between (seed parent) *Citrus aurantium* L., (pollen parent) *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Then these selected seedlings were exposed to one year age to (0)°C and (10-)°C , for a period of twenty-four hours, and the degree of damage to the seedlings was estimated in terms of survival, and the damage rate on the leaves, and the accumulation of proline was used as a chemical indication of the extent of the seedlings tolerance to cold stress. The accumulated proline in the leaves was calculated after the cold stress. The most important results indicated that citrus hybrids accumulated proline in the leaves upon stress, and this increased accumulation with increased stress and low temperature, where it was greater at stress (-10°C) than in (0)°C, and leaf tissues were exposed to damage after exposure to cold stress (-10°C) followed by complete drying of plants that survived only Four hybrids in the following spring, as the plants recovered for their physiological and biological activities and vegetative growth, while the hybrids were not affected to (0) C and there was no damage to leaf tissue .

Key words: proline, cold stress, hybrid, citrus rootstocks, selection

* **Assistant Professor, Department Of Horticulture, Agriculture College, Tishreen University, Lattakia Syria.**
****Reaearcher Citrus, Department Of Horticulture, General Commission For Scientific Agriculture Research(GCSAR), Lattakia, Syria.**
*****Postgraduate Student, Department Of Horticulture, Agriculture College, Tishreen University, Lattakia Syria.**

مقدمة

تحتل شجرة الحمضيات مكانة متقدمة بين الأشجار المثمرة في العالم، نظراً لأهميتها الاقتصادية والغذائية والطبية والجمالية والبيئية. لقد شهد القطر العربي السوري تطوراً ملحوظاً في زراعة الحمضيات؛ إذ تجاوزت المساحة المزروعة 42 ألف هكتار، أعطت إنتاجاً تخطى المليون طن(Ministry Of Agricultur- Citrus Office, 2018). تعد محافظة اللاذقية عماد الوطن في زراعة وإنتاج الحمضيات في سورية، حيث تشكل المساحة المزروعة فيها أكثر من 75% من إجمالي المساحة المزروعة بالحمضيات، وتعطي ما يزيد عن 81% من إجمالي إنتاجها.

نشأت الحمضيات في المنطقة الاستوائية والمدارية، في جنوب شرق آسيا وشرق الهند، وجنوب الصين والفلبين، وتنتشر الآن في المناطق الاستوائية وتحت الاستوائية بين خطي عرض 40 – 45 شمالاً و34– 40 جنوباً حيث درجات الحرارة المعتدلة (Manner *et al*., 2006).

زُرعت شجرة الحمضيات لمئات السنين من مصدر بذري، ومع اتساع الرقعة المزروعة بدأت تعاني الأشجار البذرية من مشاكل عديدة تحد أو تعيق انتشارها، منها ما يخص التربة (كارتفاع نسبة الكلس الفعال في التربة والملوحة)، والمشاكل المناخية (البرودة والجفاف)، والأمراض الفطرية والفيروسية (وخاصة مرض التدهور السريع الفيروسي)، والنيماتودا، عدا عن مشاكل الإنتاج كماً ونوعاً. وكان اعتماد تقنية التطعيم على الأصول المناسبة ذات مقدرة على مقاومة أو تحمل المشاكل التي تعترض كل منطقة، كأحد الحلول الضرورية، وأخذت الأصول الدور الكبير في نجاح زراعة الحمضيات لأن الأصل يلعب دوراً مهماً في نمو وتطور وإنتاج هذه الشجرة(Elkhateeb ,2001,2009) (Elkhateeb *et al*., 2018)، وقد بينت أبحاث Davies *and* Albrigo, (1994) وجود أكثر من عشرين صفة بستانية، كميّة ونوعية مختلفة، يؤثر فيها الأصل على الصنف المطعم.

يعد الزفير (النارنج) Sour Orange من أشهر وأكثر الأصول المستخدمة في الحمضيات، ولكن بدأ الاستغناء عنه عقب ظهور مرض التدهور السريع الفيروسي، الذي فتك حتى عام 1991 بأكثر من 100 مليون شجرة حمضيات مطعمة عليه (Roistacher, 1992). وبدأ استبداله بالأصول المتحملة أو المقاومة لهذا المرض، وخاصة أصل البرتقال ثلاثي الأوراق وهجنه من السيترانج، والسيتروميلو، كبدائل عن الزفير لتطعيم الحمضيات عليها، ولم يعد يستخدم الزفير في كثير من البلدان التي انتشر فيها هذا المرض (Gallasch, 1999). ومع ذلك لايزال الزفير هو الأصل الوحيد المُعتمد في مراكز إنتاج غراس الحمضيات في سورية.

يستخدم مقدار تراكم البرولين كأحد أهم المؤشرات الأولية المهمة في تحديد درجة تحمل النباتات لإجهادات لا إحيائية، وهو من الأحماض الأمينية غير الأساسية التي تدخل في تكوين البروتينات، وهو الحمض الأميني الوحيد الذي يحوي زمرة أمينية NH2 غير حرة، ويسمى بالحمض الإميني Acide imine (wray, 1988). يتراكم البرولين في أنسجة النبات عادة كرد فعل لتأقلمه أو تحسسه مع إجهاد معين كدرجات الحرارية المنخفضة، والملوحة أو نقص الماء، وهذا يمكن معرفته مبكراً خلال دورة حياة النبات. يلعب البرولين دورا مهما على المستوى الخلوي في المحافظة على ارتفاع الضغط الأسموزي الداخلي(Bates *et al*., 1973) . يُعد تحمل البرودة أو الصقيع عاملاً محدداً لنجاح زراعة وانتشار الحمضيات، ويلعب الأصل والصنف ومدة التعرض دوراً في ذلك. لقد وجد أن البرولين يتراكم في أوراق أشجار الحمضيات عند تعرضها لإجهاد برودي؛ ليكسبها تحملاً حتى حرارة −6.7 مْ بدون أي ضرر، لأنه يقي الأغشية الخلوية ويضبط الأنزيمات؛ لذلك يستخدم البرولين كمؤشر قوي عندما تتعرض النباتات لأي إجهادات بيئية مختلفة

ومن ضمنها الإجهاد البرودي (Yelenosky, 1978)، كما أكد Yelenosky, (1979) على أن البرولين يتراكم في أوراق البرتقال والجريب فروت المطعمة على العديد من الأصول عند تعرضها للصقيع، ويلعب البرولين دوراً هاماً في التعديل الأسموزي عند النباتات المعرضة إلى الإجهاد (Delauney *and* Verma, 1993).

يهدف التهجين في الحمضيات الى الحصول على أصناف ذات صفات انتاجية ممتازة وكمية إنتاج عالية، أو الحصول على أصول متحملة أو مقاومة للإجهادات الإحيائية وغير الإحيائية (Akgol *et al.*, 2017)، حيث استخدم سوينغل البرتقال ثلاثي الأوراق كأب في برنامج التهجين الذي قام به للحصول على أصول مقاومه للبرودة وحصل على أهم مجموعتين هما: مجموعة السيترانج الناتجة من التهجين مع البرتقال، ومجموعة السيتروميلو الناتجة من التهجين مع الجريب فروت. لقد بينت نتائج تجربة نفذها Valashkolee وآخرون (2018) على أربعة أنواع من الحمضيات: Kumquat, Fingered citron, Calamondinو Limequat لدرجات حرارة (3، 0، −3، −6) مْ، أن الكمكوات تحمل حتى -3 درجة مئوية، وترافق ذلك مع تراكم كمية كبيرة من البرولين في أنسجة النبات.

أهمية البحث وأهدافه

لقد أدى تعرض سورية لموجات برودة شديدة ومتكررة كان آخرها شتاء 2016− 2017؛ إلى خروج الكثير من أشجار الحمضيات المطعمة على الزفير من الإنتاج نتيجة الصقيع، وبالتالي كان لابد من البحث عن أصول تتحمل هذه الإجهادات، أو السعي لاستنباط أصول جديدة تناسب البيئة المحلية من حيث المناخ، ومن هنا جاءت أهمية هذا البحث في دراسة استخدام أصول جديدة من الحمضيات تتحمل الإجهادات البيئية، ومرغوبة محلياً. ومن هنا كان هدف هذا البحث استنباط أصول جديدة عن طريق التهجين، ثم انتخاب أفراد من الجيل الأول F1 أكثر تحملاً لإجهاد البرد؛ وذلك عن طريق تعريضها لدرجات الحرارة المنخفضة (الصفر المئوي، و−10 تحت الصفر المئوي)، ومعرفة أفضلها في تحمل البرودة باستخدام طريقتين:

- الأولى مباشرة تعتمد على بقاء النباتات المدروسة على قيد الحياة، وتقدير نسب الضرر الناجم عن انخفاض الحرارة؛ باستخدام بعض مؤشرات النمو.
- والثانية غير مباشرة بدراسة المؤشرات الكيميائية، كتراكم البرولين الذي يستخدم كمؤشر لتحمل الاجهادات المختلفة، والعمل على انتخاب هذه الأفراد الهجينة لإعتمادها في تطوير الزراعة المحلية ضمن برامج إكثار الحمضيات، ونشر زراعتها كأصول تطعم عليها الأصناف المختلفة.

طرائق البحث ومواده

مواد البحث

1. المادة النباتية المدروسة:

تم استخدام ثلاث أصول من الحمضيات تنتمي إلى العائلة السذبية *Rutaceae* وإلى تحت عائلة *Aurantioideae* هي:

I. البرتقال ثلاثي الأوراق:.. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

هو الأصل الوحيد متساقط الأوراق من بين الأصول المستخدمة في تطعيم الحمضيات، وأكثرها تحملاً للبرودة، لذلك يستخدم كأصل في المناطق الباردة (Castle,1987)، وهو أصل مقصر، ويدخل في برامج التهجين بكثرة في استنباط أصول متحملة للبرودة. وأشهر برامج الإكثار كانت في فلوريدا قام بها سوينغل للحصول على هجائن مختلفة بغرض تحمل البرودة بعد الصقيع الذي فتك بأشجار الحمضيات المطعمة على الزفير في ولاية فلوريدا عام/1894- 1895/ (Swingle *and* Reece, 1967)، بذوره عديدة الأجنة Polyembryonic، الأشجار المطعمة عليه صغيرة الحجم، وسريعة الإثمار، وذات محصول جيد، كما يعتبر قليل التوافق مع معظم الأصناف التجارية، ويعتبر البرتقال ثلاثي الأوراق مصدر وراثي مهم لبرامج التحسين الوراثي لأصول الحمضيات، وذلك لتحمل الإجهادات ومقاومة الأمراض، (Zhu *et al.*, 2015).

II. الزفير(النارنج) Sour Orange : واسمه العلمي *Citrus aurantium* L.

الأصل الأكثر انتشاراً وشهرة عالمياً ومحلياً، وهو أصل نصف مقصر متوسط النمو والأشجار المطعمة عليه متوسطة الحجم وذو توافق جيد مع الأصناف التجارية (Hutchison,1977)، البذور متعددة الأجنة. توافقه جيد مع معظم أصناف الحمضيات، عدا البرتقال اليافاوي والشاموتي واليوسفي الساتزوما، والحامض الماير، وهو متحمل لمرض التصمغ، وللجفاف، ثمار الأصناف المطعمة عليه جيدة النوعية لكنها أقل نوعية من هجائن البرتقال ثلاثي الأوراق، يُعدّ الزفير الأصل السائد (إن لم يكن الوحيد) في مراكز إنتاج غراس الحمضيات المحلية، وأدى انتشار مرض المالسيكو الفطري إلى موت معظم أشجار الحامض بالقطر، ولكن الأمر الذي يجعل خطورة استخدامه وضرورة البحث عن البدائل هو تسجيل مرض التدهور السريع الفيروسي CTV لأول مرة رسمياً في سوريا عام 2006.

III. اليوسفي كليوباترا Cleopatra mandarin الاسم العلمي *Citrus reticulata* Blanco

استخدم لأول مرة في الولايات المتحدة عام 1917 وتعتبر الهند الموطن الأصلي لليوسفي كليوباترا، والأشجار المطعمة عليه بطيئة النمو، ثماره صغيرة الحجم، وهو يقاوم ال CTV، ويتحمل الترب الكلسية والمالحة (Fadliah, 1977)، كما أكد Nava Ayala و Monter (1994) بأنّه أصل بطيء النمو في المشتل وصعب التطعيم عليه، ويعد هذا الأصل من الأصول الجيدة المتحملة للأمراض الفطرية والفيروسية.

طرائق البحث

تمت زراعة بذور الهجن لكل من الزفير، واليوسفي كليوباترا في نهاية شهر شباط عام 2019، وبذور الهجن للبرتقال ثلاثي الأوراق في نهاية شهر أيلول عام 2018 ضمن مسكبة لكل منها وذات رموز A-B-C حيث توافقت المسكبة ذات الرمز A مع هجن البرتقال ثلاثي الأوراق(Seed parent)، والمسكبة ذات الرمز B مع هجن اليوسفي كليوباترا(Seed parent)، والمسكبة ذات الرمز C مع هجن الزفير(Seed parent)، ثم تم انتخاب الغراس الهجينة في شهر أيار من نفس العام من كل مسكبة على حده بالإعتماد على صفة الورقة كصفة مظهرية سائدة تنتقل إلى أفراد الجيل الأول الهجينة الجنسية دون الخضرية، هذا ماأكده Zhu وآخرون (2013) .

أعطيت هجن البرتقال ثلاثي الأوراق (Seed parent) الأرقام A1-A2- حتى A200 استخدم فيها حبوب طلع الزفير كأب (pollen parent).كما أعطيت هجن الأم اليوسفي كليوباترا (Seed parent) الأرقام B1- B2 حتى B200 وكان الأب هو الزفير أيضاً (pollen parent)، بينما أعطيت هجن الزفير(Seed parent) الأرقام C1-

C2− حتى C200 وكان الأب هو البرتقال ثلاثي الأوراق(pollen parent). يرمز الرقم الثاني إلى رقم النبات في التجربة.

تم نقل الأفراد الهجينة إلى أكواب زراعية سعة 2 كغ وخلطة ترابية مكونة من التورب والرمل والتربة بنسب متساوية وتمت خدمتها والعناية بها حتى موعد بدء التجربة في تشرين الثاني.

تم تعريض غراس الجيل الأول لإجهاد البرد بشكل تدريجي (وضعت ل24 ساعة في جو المخبر 15مْ ثم لمدة 4 ساعات في درجة حرارة 4 مْ يليها درجة الحرارة المُختبرة للمدة المطلوبة) وفقاً لمعاملتين من درجات الحرارة (0)مْ و (-10)مْ حسب (Yelenosky, 1978)، وثم قياس محتوى الأوراق من البرولين قبل التعرض للإجهاد وبعد التعرض للإجهاد ب 24 ساعة حسب (Bates *et al*, 1973)، حيث حسبت قيمة البرولين المُتراكم وفق المعادلة:

$$\text{ملغ برولين\ عينة نباتية غرام} = \frac{\text{التخفيف إن وجد} \times \text{حجم محلول الإستخلاص} \times \text{التركيز جزء بالمليون}}{\text{حجم محلول العينة المقدرة} \times \text{وزن العينة المستخلصة} \times 1000}$$

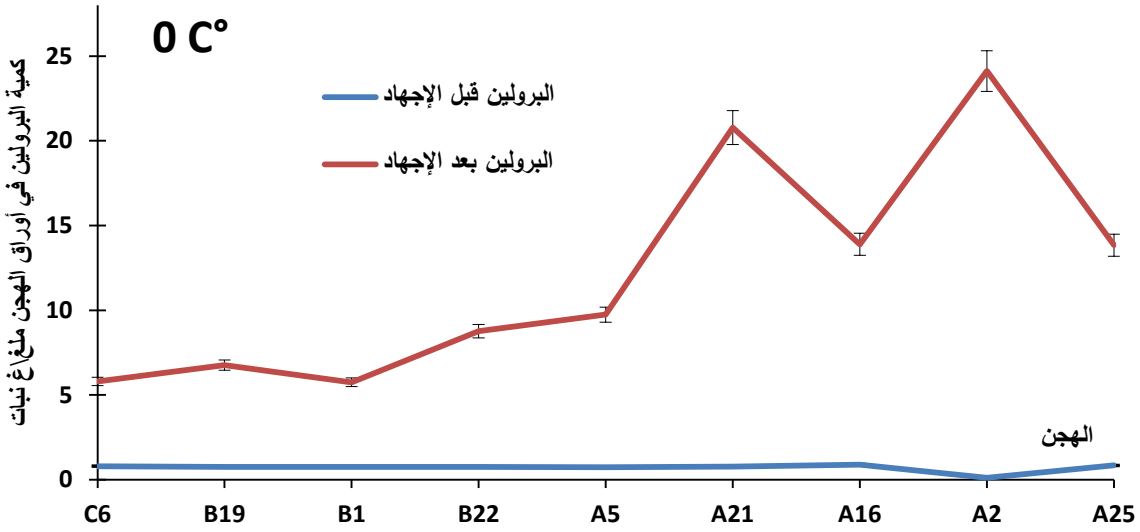
− تم تنفيذ جميع العمليات الزراعية من تسميد وري وتعشيب ...إلخ على الغراس المزروعة في خلطات ترابية ضمن أكواب زراعية، وفق القواعد المتبعة في زراعة الحمضيات.

تم حساب الفروق المعنوية بين قيم البرولين للأبناء المنتخبة من المجتمع النباتي المدروس قبل الإجهاد وبعده باستخدام $T_{student}$

$T_{\text{المحسوبة}} = \frac{\overline{X1}-\overline{X2}}{S\bar{d}}$ حيث أن $S\bar{d}$ الخطأالقياسي للفرق$\overline{X1}-\overline{X2}$. تقارن مع $T_{\text{الجدولية}}$ عند درجات حرية n-1, كما تم استخدام أشرطة الخطأ المُحدد لسلسلة الأبناء الهجن المُنتخبة وتراكم البرولين فيها بعد التعرض لإجهاد البرد وحساب الفروق المعنوية بينها باستخدام الخطأ القياسي SE $SE = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ σ الإنحراف المعياري، ثم حساب الفرق المُحدد CD. $SE \times t_{0.05} = CD$ ($t_{0.05}$ أو $t_{0.01}$ الجدولية عند درجات حرية n-1.)

النتائج والمناقشة

تم اعتماد تراكم البرولين في الأنسجة كمؤشر رئيس في تحديد درجة تحمل الإجهاد البيئي (البرودة)؛ حيث قدرت كمية البرولين في أوراق النباتات قبل وبعد تعرضها للإجهاد. يبين الشكل (1) تراكم كميات كبيرة من البرولين في الأوراق بعد الإجهاد، وأن الهجن التي تحملت درجة الحرارة (0) مْ؛ حيث راكمت البرولين بشكل واضح، واختلف تحمل الأفراد لإجهاد انخفاض الحرارة إلى الصفر وتبعاً للتركيب الوراثي لأبوي كل هجين.



الشكل (1) تراكم البرولين في الأبناء المعرضة لإجهاد البرودة في درجة الحرارة(0)مْ
وضعت أشرطة الخطأ المُحدد لسلسلة المخطط باستخدام الخطأ القياسي

لقد راكمت جميع الهجن المدروسة البرولين بعد تعرضها لإجهاد البرد، حيث تفوقت بدلالة معنوية عالية **على كمية البرولين المتراكم فيها قبل تعرضها للإجهاد حيث $T_{المحسوبة}$ =4.66> $T_{0.01\ الجدولية}$= 2.896، والتي انحصرت بين 0.8 و 0.84 ملغ / غرام نبات، بينما وصلت قيمة البرولين بعد التعرض لإجهاد البرودة إلى 24 ملغ / غرام.نبات، ولكن بنسب متفاوتة حسب الآباء لكل فرد وهذا ما كان له الدور الأساسي في تحمل الإجهاد ونجاح الهجين في معاودة النشاط، وإعطاء فروع جديدة في الربيع التالي. وهذه النتيجة تتوافق مع نتائج أبحاث ودراسات(yelenosky, 1979) حيث وجد أن تراكم البرولين الحر في أوراق الحمضيات سمة مميزة لتحملها الإجهاد البرودي إذ أنها تترافق مع زيادة اللزوجة داخل الخلايا وانخفاض الجفاف الخلوي أثناء عملية التجميد.

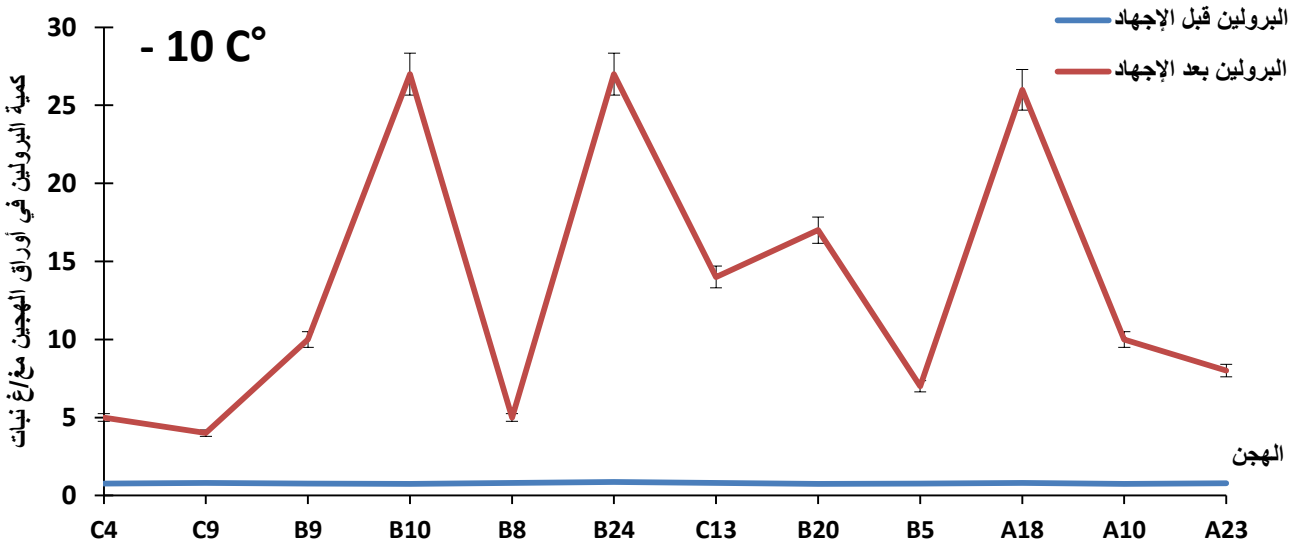
جدول (1) قيم البرولين للهجن المُتحملة لدرجة حرارة 0 مْ و t المحسوبة t الجدولية عند درجة حرية 8.

الهجن	البرولين قبل الإجهاد	البرولين بعد الإجهاد
C6	0.8	5
B19	0.76	6
B1	0.75	5
B22	0.76	8
A5	0.74	9
A21	0.78	20
A16	0.89	13
A2	0.12	24
A25	0.84	13
$T_{المحسوبة}$=4.66	$T_{0.05الجدولية}$=3.355*	$T_{0.01الجدولية}$ =2.896**

وعند حساب قيمة العامل المحدد CD ومقارنته مع متوسط كل قيمتين نلاحظ تراكم أعلى نسبة من البرولين في أوراق الهجينين A2-A21، دون وجود فرق معنوي بينهما، فوصلت إلى (20–24 ملغ/غ نبات) على التوالي، فتفوقت بدلالة معنوية عالية على جميع الهجن، تلاها الهجينين A25-A16 بقيمة قاربت 13مغ/غ نبات، فتفوقا معنوياً على باقي

الهجن دون اختلاف معنوي بينهما، وجاء في المرتبة الثالثة الهجينان A5 وB22 بقيمة تراكم (9–8 مغ /غ نبات) على التوالي وتفوقا معنوياً على الهجن الثلاثة الباقية B1 و B19 وC6 التي جاءت في المرتبة الأخيرة بقيمة تراكم من البرولين بلغت (5 ملغ/ غ نبات)، في الأفراد ذات الرمز C6 (الزفير Seed Parent البرتقال ثلاثي الأوراق Pollen Parent)، وكانت كمية التراكم(5– 6 (ملغ/ غ نبات) في الأبناء B (اليوسفي كليوباترا Seed Parent الزفير Pollen Parent). يتضح أن الهجن الأفضل A الناجمة عن تصالب الأم البرتقال ثلاثي الأوراق مع الأب الزفير، وهي التي تفوقت في تراكم البرولين لذلك نجد أن البرتقال ثلاثي الأوراق هو أكثر الأصول المستخدمة مقاومة لانخفاض درجة الحرارة، وهو الأصل الوحيد متساقط الأوراق عالي التحمل لإنخفاض درجات الحرارة، ويستخدم في العديد من برامج التحسين الوراثي لزيادة مقاومة الحمضيات لإنخفاض درجات الحرارة والصقيع، وهذا يتوافق مع العديد من الأبحاث التي تؤكد ذلك: (Swingle *and* Reece, 1967) (Castle, 1987)، (Yelenosky *et al.*, 1973) (Cevik *and* Moore, 2006) (Zhu *et al.*, 2013)

يوضح الشكل (2) الفرق بين تراكم البرولين في الهجن المنتخبة قبل وبعد تعرضها لإجهاد شديد البرودة بلغ (-10) مْ. لقد تراكم البرولين معنوياً بدلالة إحصائية عالية** (T المحسوبة > T الجدولية 0.01)، بعد التعرض لإجهاد شديد البرودة، في حين لم تتجاوز كمية البرولين في أوراق الهجن 0.9 ملغ/ غ نبات قبل التعرض للإجهاد وسبب ذلك أن الحمضيات تميل إلى مراكمة البرولين عند تعرضها للإجهاد البرودي ويتناسب معدل التراكم مع شدة الإجهاد، لكن ذلك لم يمنع من فقدان بعض الأفراد القدرة على معاودة النشاط في الربيع التالي، فيبست بالكامل، أي أنها ماتت كلياً نتيجة الضرر الذي لحق بها بسبب انخفاض الحرارة الشديد.



الشكل(2) تراكم البرولين في الأبناء المعرضة لإجهاد البرودة في درجة الحرارة (-10)مْ
وضعت أشرطة الخطأ المُحدد لسلسلة المخطط باستخدام الخطأ القياسي

ونلاحظ عند حساب الفرق المُحدد CD ومقارنته مع متوسط كل قيمتين، تفوق الهجن هي A18وB24 وB10 معنوياً بدلالة إحصائية عالية **على باقي الهجن المُنتخبة من حيث تراكم البرولين بعد الإجهاد شديد البرودة بلغ (26، 27 ، 27 ملغ/ غ نبات على التوالي)، دون وجود فروق معنوية بينها. تلاها الهجينان B20 وC13 (17- 14 ملغ/غ نبات)

على التوالي في التفوق المعنوي على باقي الهجن دون وجود فرق معنوي مع الأفراد الهجن A10 و B9، التي بدورها لم تتفوق على باقي الهجن A23 و B5 و B8 و C9 و C4 التي جاءت في المرتبة الأخيرة في تراكم البرولين فيها، مع الإشارة إلى عدم وجود فرق معنوي فيما بينها.

جدول(2) قيم البرولين في الهجن المُعرضة لإجهاد -10 مْ وقيم t المحسوبة وt الجدولية عند درجة حرية 11.

الهجن	البرولين قبل الإجهاد	البرولين بعد الإجهاد
C4	0.76	5
C9	0.8	4
B9	0.76	10
B10	0.75	27
B8	0.8	5
B24	0.87	27
C13	0.8	14
B20	0.75	17
B5	0.77	7
A18	0.8	26
A10	0.75	10
A23	0.79	8
$T_{المحسوبة}=4.908$	$T_{الجدولية\ 0.05}=3.106$ *	$T_{الجدولية\ 0.01}=2.718$ **

يمكن أن يفسر تراكم البرولين في أوراق هجن الحمضيات المنتخبة كرد فعل طبيعي من النبات في مقاومة الإجهاد، إذ أن الزيادة في تراكم البرولين في الهجن قد ترافقت مع زيادة الإجهاد البرودي، وهذا يتفق مع نتائج دراسة (Norris,1970)، ويعزى دور زيادة تراكم البرولين في تحمل البرودة إلى مساهمته في ضبط الضغط الأسموزي توافقاً مع دراسة (Balal *et al*., 2011) الذين ربطوا بين دور البرولين في الضبط الأسموزي مع الإنتاج الأعلى للكتلة الحيوية في الأصول المتحملة للإجهاد، كما يمكن تعليل دور البرولين في تحمل النبات للإجهاد البرودي في مساهمته في حماية الأغشية الخلوية وفي تنظيم الأنزيمات، ينسجم ذلك مع تفسيرات

(Gardner *and* Horanic, 1958) (Yelenosky *and* Hearm, 1967) ، ولا بد من التنويه إلى أن تراكم البرولين الحر هو أحد ميزات التحمل لإجهاد البرد في الحمضيات؛ لأنه يحصل مع تأثيرات مرافقة للتوازن المائي في الأنسجة (Yelenosky, 1979) لقد تبين أن الكثير من الهجن لم تستطع معاودة النشاط في فصل الربيع، بل عجزت عن الاستمرار في الحياة واستئناف النمو وماتت، رغم تراكم البرولين فيها بكميات كبيرة، فالهجين رقم B24 لم يعاود نشاطه في الربيع التالي بل أصيب باليباس الكامل والموت بالرغم أنه قد راكم البرولين بكمية أكبر من الهجن التي استمرت بالحياة في الربيع التالي، ومعنى ذلك أنه ليس بالضرورة أن يكون تراكم البرولين هو المقياس الوحيد لتحمل الإجهاد البرودي. تتوافق هذه النتيجة مع نتائج الباحث (Yelenosky, 1979)، وحيث أن البرولين هو واحد من أكثر الأحماض الأمينية وفرة في أنسجة الحمضيات، ويؤثرفي قابلية ذوبان البروتينات المختلفة في أوراق الحمضيات (Young, 1963) (Abraham *et al* , 2003) وبالنتيجة لم تستطع هذه الهجن مقاومة إجهاد البرودة فيبست.

لقد بينت نتائج هذه الدراسة أن إجهاد البرد بدرجة حرارة صفر مئوية؛ لم يؤد إلى إحداث أية أضرار ظاهرية في أنسجة الأوراق، ولا في النموات الحديثة للغراس الهجينة المُختبرة. بينما أدى إجهاد البرودة الشديدة (-10) مْ على غراس الحمضيات؛ إلى حدوث ضرر في أنسجة النبات سواء في الأوراق أو في النموات الحديثة، وهذا يؤكد أن لزيادة تراكم

البرولين في أنسجة النباتات المتعرضة لإجهاد البرودة دور نسبي في تحمل أو مقاومة البرودة يقف عند عتبة محددة، وأن عوامل أخرى وراثية وغيرها تأخذ دورها في ذلك. تتوافق هذه النتيجة مع معطيات (Dahro *et al*.,2006) الذين درسوا تأثير المورثة PtrA / NINV التي عزلوها من البرتقال ثلاثي الأوراق وتبين أنها تلعب دورًا إيجابيًا في تحمل إجهاد البرودة من خلال تعزيز التعديل الإسموزي عن طريق حماية الهياكل الخلوية المعرضة للإجهاد والحفاظ على إمكانات الماء ضمن الخلية وبالتالي الحفاظ على العضيات الخلوية والبروتينات الأساسية دون التدخل في التمثيل الغذائي للنبات.

والجدول(3) يوضح مقدار الضرر ونسبته في الهجن المدروسة عند تعرضها لإجهاد البرودة الشديدة.

جدول (3) نسبة الأوراق الميتة و البقاء على قيد الحياة في كل هجين تحت درجات الحرارة(-10) مْ

الهجن المدروسة	الآباء	نسبة موت الأوراق%	نسبة البقاء على قيد الحياة %	ملاحظات
B5	(كليوباترا Seed Parent) (زفير Pollen Parent)	18	%0	
B24		58		موت النموات الغضة خلال 48 ساعة
B20		25		
B8		20		موت النموات الغضة خلال 48 ساعة
B9		0		
B10		19		موت النموات الغضة خلال 48 ساعة
C4	(زفير Seed Parent)	8	%0.5	
C13		6		
C9	(البرتقال ثلاثي الأوراق Pollen Parent)	16		
A23	(البرتقال ثلاثي الأوراق Seed Parent) (زفير Pollen Parent)	15	%1.5	موت القمم النامية خلال 48 ساعة
A18		0		
A1		32		موت القمم النامية والفروع الغضة خلال 48 ساعة

يتضح من الجدول (3) اختلاف ردة فعل الهجن لانخفاض درجة الحرارة الشديدة، من حيث نسبة موت الأوراق في الهجن بعد يومين من التعرض لإجهاد البرد على درجة حرارة (-10 مْ) لمدة 24 ساعة؛ فقد تراوحت بين أعلى نسبة موت (58%) في الهجين B24، وأقل نسبة موت (6%) في الهجين C13، بينما لم يحدث أي ضرر في كلا الهجينين A18 أوB9. كما يلاحظ أيضاً أن نسبة الضرر في أوراق هجن البرتقال ثلاثي الأوراق لم تتجاوز 32%،

بينما تراوحت في أوراق هجن اليوسفي كليوباترا بين 0% و 58%، وفي هجن الزفير بين 6% و 16%. مما سبق نجد أن الهجن التي كان البرتقال ثلاثي الأوراق أحد أبويها لم تتجاوز نسبة الأوراق الميتة الثلث في حين زادت عن النصف في الهجن ذات الأبوين الكليوباترا والزفير، يمكن تفسير ذلك بأن مقاومة البرتقال ثلاثي الأوراق العالية للصقيع، وهذا ما أكدته الكثير من الدراسات(Yelenosky *et al.*, 1973) (Zhu *et al.*, 2013)

ويعزى سبب موت الأوراق إلى الضرر الكبير الناجم عن انخفاض درجة الحرارة الشديد، الذي أدى إلى تلف الخلايا مما أدى إلى موتها، وفيما بعد لاحظنا يباس كامل للغراس المعرضة لهذه الدرجة المنخفضة من الحرارة، في حين لم يكن الضرر الناتج عن انخفاض درجة الحرارة إلى درجة الصفر المئوية لمدة 24 ساعة معنوياً؛ إذ توقفت النباتات عن النمو لفترة ستة أشهر ثم تابعت نموها بشكل طبيعي، وذلك في كل الأصول الهجينة.

لقد استأنفت أربعة هجن نموها في فصل الربيع التالي، وبدأت التفرعات الصغيرة والأوراق الغضة بالظهور والنمو وعاود النبات نشاطه الخضري متجاوزاً الإجهاد، وبالتالي فقد تم اعتبارها (بذار مربي) لهجن مستنبطة من الحمضيات عالية التحمل لإجهاد البرد الشديد (-10) مْ، وستدخل في دورة إكثار لإعتبارها أصول لتطعيم الأصناف التجارية عليها ونشرها في المناطق التي تتعرض لصقيع. هذه الهجن هي A23، A18، C9 و A1.

الإستنتاجات والتوصيات

نخلص من هذه الدراسة إلى الاستنتاجات الآتية:

- اعتبار كمية تراكم البرولين في أنسجة النبات أحد مؤشرات تحمل البرودة.
- توجد عوامل وراثية وفيزيولوجية أخرى تساهم في تحمل النباتات للإجهاد البيئي.
- يمكن الحصول على أصول وهجن من الحمضيات من خلال التهجين والانتخاب؛ تتحمل الإجهادات اللاإحيائية.
- يمكن انتخاب هجن تتحمل إجهاد البرد الشديد (-10) مْ بإدخال البرتقال ثلاثي الأوراق في التهجين بغض النظر عن جهة التصالب، أي سواء استخدم كأب أو كأم في التهجين.

ونوصي نتيجة دراستنا بالتالي:

- استكمال التجارب المتعلقة بالهجن المدروسة بما يتلاءم مع ظروف التربة المناسبة لكل هجين.
- إدخالها في دورة إكثار وفق الإجراءات المتبعة في مراكز إنتاج غراس الحمضيات وصولاً إلى مرحلة البذار المعتمدة، ثم توزيعها على المزارعين.
- توسيع هذه الدراسات لمساهمتها الفعالة في توسيع استخدام هذه الهجن.

Reference:

1. ABRAHAM, E; G. RIGO; G. SZEKELY; R. VAGY; C. KONCZ AND L. SZABADOS. *Light dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteriod in Arabidopsis.* Plant Mol. Biol,Vol:51, 2003, P363-372.
2. AKGOL, M; O. SIMSEK; D. DONMEZ AND Y. A. KACAR. *On Overview of In Vitro Haploid Plant Production in Citrus*. American. Journal of Plant Biology,Vol:2(5-1), 2017, P19-23.
3. BALAL, R. M; M. Y. ASHRAF; M. M. KHAN; M. J. JASKANI AND M. Ashfaq*Influence of salt stress on growth and biochemical parameters of citrus rootstocks*. Pak. J. Bot., 2011, 43(4), P2135-2141
4. BATES, L. S. WALDREN, R. P AND TEAR, I. D. *Rapid determination of free proline for water stress studies*. Plant Soil, Vol:39, 1973, P205-207.
5. CASTLE, W.S. *Citrus Rootstocks*. (Eds. Rom. R.C and R.F. Carlson.).John Wiley and Sons, New York. USA,1987.
6. CEVIK, M. S AND G. A MOORE. *Identification and expression analysis of cold-regulated genes from the cold-hardy Citrus relative Poncirus trifoliata (L.) Raf*. Springer Science+Business Media B.V. Plant Mol Biol, Vol:62, 2006, P83–97.
7. DAHRO B., WANG F.; PENG T.; AND HONG LIU J.:*PtrA/NINV, an alkaline/neutral invertase gene of Poncirus trifoliata, confers enhanced tolerance to multiple abiotic stresses by modulating ROS levels and maintaining photosynthetic efficiency*. *BMC Plant Biology,* Vol: 16, 2016, p76.
8. DAVIES, F. S. AND L. G. ALBRIGO. *Citrus Crop Production Science in Horticulture 2. USA,UK,CAB, International*. Printed by Red Wood Books.Wiltshir. UK, 1994, P(73-107).
9. DELAUNEY, A. J; D. P.VERMA. *Proline biosynthesis and osmoregulation in plants*. The plant journal, 4(2), 1993, P215-223
10. ELKHATEEB, A. *Effect of calcium carbonate in the soil on growth and mineral content of some citrus rootstock seedlings.* ph.d thesis, horticulture factuly, tishreen university, 2001, P219.
11. ELKHATEEB, A. *The effect of five citrus rootstocks on the growth productivity and quality of orange fruits Valencia Orange.* Basil Al-Assad Journal for Engineering Sciences, V25, 2009, P 65-85.
12. ELKHATEEB, A; MOHAMAD, M; ALI, Z. *The effect of eight citrus origins on the growth and production characteristics of Clementine 88*. Twelfth Research Conference of General Commission For Scientific Agriculture Research(GCSAR), 2018.
13. FADLIAH, Z.G. *Effect of different Cations in the irrigation water on growth , mineral content, and som organic constituents of Sour orange and Cleopatra mandarin seedlings*. Ph.D. Thesis. Fac. Agric. Alex. Univ. A.R.E. 1977.
14. GALLASCH, P. T. *Chilean Citrus Industry: Rootstocks*. SARDI Citrus Information. SARDI Exporting South Australian Research and Innovation Wordwide, 1999.
15. GARDNER, F. E; AND G. HORANIC. *Influence of various rootstocks on the cold resistance of the scion va riety*. Proc. Fla. State Hort. Soc. Vol: 71, 1958, P81-86.
16. HUTCHISON, D.J. *Influence of rootstock on the performance of Valencia sweet orange*. Proc International of the Society of Citriculture,Vol: 2, 1977, P523-525.

17. MANNER, H. I; R. S. BUKER; V. E. SMITH; D. WARD AND C. R. ELEVITCH. *Citrus (citrus) and Fortunella (kumquat)*. Species Profiles for Pacific Island Agroforestry, 2(1):2006, P2-35.
18. MINISTRY OF AGRICULTURE, Citrus Office, Tartous. Statistics for the season 2018.
19. NAVA AYALA, J AND A. VILLEGAS MONTER. *Nursery performance of rootstocks tolerant to citrus tristeza. Proceedings of the Interamerican Tropical Horticulture*. Vol:38:P86 – 89, Hort. Abs. 66 (11) , 1994, P98-78.
20. NORRIS, J. C. *Young tree decline from a grower viewpoint*. Proc. Fla. State Hort. Vol:83, 1970, P46-48.
21. ROISTACHER, C. N. *Should we introduce protective isolates of citrus Tristeza virus? Citrograph*. 1992, P5 – 9.
22. SWINGLE, W.T AND P. C. REECE. *The botany of citrus and its wild relatives*. In Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD, editors. The Citrus Industry, Berkeley: University of California Press. 1967, P389-390.
23. VALASHKOLEE, S. M. H; Y. TAJVAR; M. AZADBAKHT AND Z. RAFIE-RAD. *Evaluation of physiological and biochemical responses of some ornamental Citrus varieties under low temperature stress*. Crops Improvement (Journal of Agricultural Crops Production), Vol:19, 2018, p 4.
24. WRAY, J. L. *Plant cell fnviron*. Vol:11, 1988, P369-382
25. YELENOSKY, G. AND C. J. HEARN. *Cold damage to young mandarin-hybrid trees on different rootstocks in flatwood soil*. Proc. Fla. State Hort. Soc. Vol:80, 1967, P53-56.
26. YELENOSKY, G; R. T. BROWN AND C. J. HEARN. *Tolerance of Trifoliate Orange selections and hybrids to freezes and flooding*. Florida State Horticultural Society, 1973.
27. YELENOSKY G *Cold hardening 'Valencia' orange trees to tolerate -6.70C without injury*. J Am Soc Hort Sci, Vol:103, 1978, P:449-452.
28. YELENOSKY G. *Accumulation of Free Proline in Citrus Leaves during Cold Hardening of Young Trees in Controlled Temperature Regimes*. Plant Physiol, Vol:64, 1979, , P425-427.
29. YOUNG, R. *Freeze injury to young seedlings of citrus cultivars and related species in the lower Rio Grande Valley*. J. Rio Grande Valley Hort. Soc, Vol: 17, 1963, P:37-42.
30. ZHU, S; B. WU; Y. MA; J. CHEN AND G. ZHONG. *Obtaining citrus hybrids by in vitro culture of embryos from mature seeds and early identification of hybrid seedlings by allele-specific PCR*. Scientia horticulturae,Vol: 161, 2013, P300-305.
31. ZHU, S; F. WANG; W. SHEN; D. JIANG AND Q. HONG. *Genetic diversity of Poncirus and phylogenetic relationships with its relatives revealed by SSR and SNP/InDel markers*. Acta Physiol Plant,Vol:37, 2015, P:141.