مجلة جامعة النهرين المجلد ١٤ العدد(3) أيلول، ٢٠١١ ص ٢٨-٣٩
العلوم

الإكثار الدقيق لنبات Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf). Shinn.) خارج الجسم الحي

حسام سعد الدين محمد
قسم البستنة ، كلية الزراعة ، جامعة بغداد.

الخلاصة

هدفت الدراسة الى وضع برنامج متكامل للإكثار الدقيق لنبات Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf). Shinn.). اشتملت الدراسة على اجراء عدة تجارب لمراحل الأكثارالمتلاحقة. فقد أختبرت فعالية هايبوكلورات الصوديوم NaOCl في التعقيم السطحي للأجراء النباتية وكذلك اختبار تاثير تراكيز مختلفة من السايتوكاينينين Benzyl adenine (BA) أو6-Furfural amino purine (Kinetin) (KIN) أوالأوكسينين Indol butyric acid (IBA) أو Indol-3-acetic acid (IAA) منفردة أو بالتداخل مع بعضها في نشوء وتضاعف وتجذير الأفرع. دلت النتائج على أن التركيز 1.5% من هايبوكلورات الصوديوم ولمدة ١٥ دقيقة كان فعالاً في الحد من تلوث الأجزاء النباتية وكانت العقد هي الأفضل في أستجابتها إذ أعطى التركيز 0.3 ملغم/لتر من BA أعلى معدل لعدد الأفرع المتكونة من العقد بلغ 6.2 فرعاً، كما أمكن زيادة عدد الأفرع المتكونة من العقد معنوياً الى 7.2 فرع وبطول 2.03سم بعد إضافة 0.1 ملغم/لتر IBA الى وسط النشوء. أعطت المعاملة 1.0 ملغم/لتر BA بالتداخل مع 0.5 ملغم/لتر IBA أعلى معدل لعدد الأفرع المتضاعفة بلغ 8.4 فرع وبطول 3.41سم. أعطى الوسط MS الحاوي على 1.0 ملغم/لتر من IBA أعلى معدل لعدد الجذور بلغ 4.6 جذراً وبطول 1.4 سم وبنسبة تجذير بلغت ٦٠%، وقد أمكن تحسين التجذيرمعنوياً بزيادة تركيز السكروز في الوسط الغذائي الى ٤٥ غم/لتر الذي أعطى أعلى معدل لعدد الجذور بلغ 9.7 جذراً وبطول 4.8 سم وبنسبة تجذير بلغت 90%. أقلمت النبيتات وبنسبة نجاح بلغت ٩٠% عند أستعمال وسط زراعة مكون من الزميج والبتموس بنسبة (1:٢). يستنتج من هذه النتائج أستجابة نبات Lisianthus للإكثار الدقيق بإتباع البرنامج الموصوف اعلاه.

الكلمات المفتاحية: الإكثار الدقيق، *Eustoma grandiflorum*، الأوكسينات، السايتوكاينينات.
Keywords: *Eustoma grandiflorum, Auxins, Cytokinins.*

المقدمة

يعد نبات (*Eustoma* Lisianthus *grandiflorum* (Raf.) Shinn.) أحد أزهار القطف المهمة في العالم [1] ينتمي إلى عائلة Gentinaceae، ونظراً لما تمتاز به أزهاره من جمالية وتعدد ألوان وشكل شبيه بأزهار الورد Rose وقدرتها على البقاء على النبات أو في المزهريات بعد القطف (Vas life) لمدة تزيد عن أسبوعين [2] فقد زاد الطلب على هذه الازهار بشكل ملحوظ خلال السنوات الاخيرة الى الحد الذي اصبحت فيه من ازهار القطف العشرة الرئيسة التي تتداول في اسواق الزهور ومزاداتها [3]. يكثر نبات Lisianthus بالبذور والعقل الطرفية. وبسبب صغر حجم البذور وصعوبة التعامل معها فأن هناك صعوبات في أكثاره جنسياً [4] فضلاً عن أن النباتات الناتجة من البذور غالباً ما تكون غير متجانسة في ارتفاعها وموعد ونوعية أزهارها. أما الأكثار الخضري بالعقل الطرفية فأن عدد العقل التي يمكن الحصول عليها من النبات الواحد محدوداً [5]. تعد تقانة الأكثار الدقيق للنبات فعالة في الأكثارالواسع إذ تتضمن انتاج أعداد كبيرة من النباتات المتجانسة مظهرياً وخلال مدة قصيرة نسبياً، ولذلك وظفت هذه التقانة في الإكثار الواسع لنبات Lisianthus. إذ استطاع [6] اكثار مجموعة أصناف Echo في وسط MS مضافاً اليه ٠.١ ملغم/لتر من BA في مرحلة النشوء، فيما تمكنا [5] من أكثار بادرات منتخبة لنبات Lisianthus خارج الجسم الحي في وسط MS مضافاً اليه التوليفة ٠.١ ملغم/ لتر من BA مع ٠.٢ من IBA أو ١.٠ ملغم/لتر من IAA. بناءً على ما تقدم ولكون نبات Lisianthus ادخل حديثاً إلى العراق وملائمته للزراعة في المنطقة الوسطى [7] وبهدف أكثاره نسيجياً فأن هذه الدراسة تهدف الى وضع برنامج متكامل لإكثار نبات Lisianthus.

المواد وطرائق العمل

اجريت الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لقسم البستنة/ كلية الزراعة–جامعة بغداد للفترة من تشرين أول ٢٠٠٨ ولغاية نهاية أيلول ٢٠٠٩ وذلك وفقاً للمراحل التالية:

أولاً :– مرحلة أنشاء الزروعات : والتي إشملت على:

١– مصدر الأجزاء النباتية: أجريت التجارب على نبات Lisianthus صنف Double Eagle "F1 Hybrid "Mixed إذ جلبت شتلات بطول ٢٥ سم مزروعة في أصص بقطر ١٥ سم من أحد المشاتل الأهلية في بغداد. وخلال الأسبوع الأول من شهر تشرين الأول أخذت أفرع خضرية بطول ٢٠ سم ونقلت الى المختبر.

٢– تحضيرالأجزاء النباتية: جرى تنظيف الأفرع الخضرية بمسحها بالكحول الأثيلي بتركيز ٧٠% وقطعت الى عقل بطول ٥ سم وغسلت بتيارماء جاري لمدة ساعة كاملة بعدها أزيلت الأوراق تدريجياً وغسلت العقل بعدها بالصابون السائل ونقلت الى منضدة انسياب الهواء الطبقي Laminar Air Flow Cabinet لتعقيمها سطحياً.

٣– تعقيم وتهيئة الأجزاء النباتية: اختبرت فعالية هايبوكلورات الصوديوم في تعقيم القمم النامية استعملت فيها تراكيز مختلفة من القاصر التجاري علامة FAS وبتركيز مادة فعالة ٦% (وزن/ حجم) لهذا الغرض حيث جرى تخفيفه في محاليل تعقيم للحصول على التراكيز ١.٥، ٣.٠، 4.5 أو٦.٠% من هايبوكلورات الصوديوم وأعتمدت المدة ١٥ دقيقة لكل تركيز مستعمل بالأعتماد على تجارب سابقة، مع مراعاة استعمال بضعة قطرات من المادة الناشرة Tween 20 مع محاليل التعقيم لتقليل الشد السطحي لمحاليل التعقيم، جرى بعدها غسل الأجزاء النباتية بالماء المعقم المقطر ثلاث مرات ونقلت العقل الى أطباق بتري معقمة وقطعت القمم النامية (Shoot tips) بطول ١ سم والعقد الحاوية على البراعم الجانبية وبطول 1.5 سم، زرعت في أنابيب أختبار بطول ١٢٥ ملم وقطر٢٥ ملم حاوية على ٢٠ مل من الوسط الغذائي المذكوره مكوناته لاحقاً وأخذت البيانات بعد ١٠ أيام من تاريخ الزراعة إذ حسبت النسبة المئوية للزروعات الملوثة ونسبة بقائها حية.

٤– الوسط الغذائي: حضر وسط نشوء الزروعات من مجموعة الأملاح اللاعضوية الكبرى والصغرى والحديد لوسط MS [8] مضافاً إليه (ملغم/ لتر) ٠.١ Thiamin و0.5 Nicotinic acid و0.5 Pyridoxine و2.0 Glycine و ١٠٠ Myo–Inositol مع ٣٠٠٠٠ سكروز وجرى تضمين الوسط بمنظمات النمو حسب الهدف من التجربة والتراكيز المبينة ازاء كل منها. خلطت المواد سالفة الذكر جيداً بالخلاط المغناطيسي وعدل الرقم الهيدروجيني pH إلى ٥.٧ بأضافة محلول ٠.٥ عياري من هيدروكسيد الصوديوم NaOH بعدها أضيف ٧.٠ غم/ لتر من مادة الـ Agar وسخن الوسط لحين ذوبان الأكار ووزع في أوعية الزراعة وهي أنابيب أختبار بطول ٢٢ سم وبقطر ٢.٥ سم وبواقع ٢٠ مل للأنبوبة وغطيت بسدادة من ألـ Polypropylene لمرحلتي النشوء والتجذير أو دوارق مخروطية سعة ٣٠٠ مل احتوت على ٥٠ مل للدورق واستعملت أغطية قطنية مغطاة برقائق الألمنيوم. عقمت أوعية الزراعة بجهار الموصدة على ضغط ١.٠٤ كغم/سم^{٢} ودرجة حرارة ١٢١ مْ لمدة ٢٠ دقيقة بردت بعدها الى درجة حرارة الغرفة.

٥– تأثير تراكيز مختلفة من كل من BA وKIN في نشوء الزروعات: زرعت الأجزاء النباتية المحضرة في الفقرة السابقة (القمم النامية والعقد) في وسط MS المجهز بالتراكيز (٠،0.1، 0.3، 0.5، 0.7 أو 1.0ملغم/لتر) من كل من BA وKIN على انفراد وبعشرة مكررات لكل معاملة وبواقع جزء نباتي واحد لكل مكرر وجرى تحضينها في غرفة النمو تحت شدة ضوئية قدرها ١٠٠٠ لوكس ولفترة إضاءة ٨/١٦ ضوء/ظلام وعلى درجة حرارة ٢٤ مْ ± ١ ولمدة أربعة أسابيع. بعدها حسب معدل عدد الأفرع الناتجة ومعدل طولها.

٦– تأثير تراكيز مختلفة من IBA وIAA في نشوء الأفرع: لوحظ من نتائج التجربة السابقة انخفاض في أطوال الأفرع المتكونة وعدم تمايز قواعدها بشكل واضح وأنتج أفرع مكتظة يصعب التعامل معها في المراحل اللاحقة وعليه اختبرت التراكيز (٠، 0.05، 0.1، 0.5 أو1.0ملغم/ لتر) من IBA أو IAA لوسط النشوء وبوجود ١ ملغم/ لتر BA الذي كان التركيز الأفضل من التجربة السابقة. زرعت الأجزاء النباتية بعشرة مكررات لكل معاملة وبواقع أنبوب أختبار لكل

جزء نباتي واحد لكل مكرر وحضنت تحت نفس الظروف المذكور في الفقرة السابقة ولمدة أربعة أسابيع بعدها حسب معدل عدد الأفرع الناتجة ومعدل طولها.

ثانياً: مرحلة التضاعف

تأثير التداخل بينِ BA وIBA في تضاعف الأفرع: أخرجت الأجزاء النباتية التي حققت أفضل أستجابة لتكوين الأفرع من المرحلة السابقة وجرى فصل الأفرع في أطباق بتري وبأستعمال ملاقط ومشارط معقمة الى أفرع منفردة ونقلت إلى دوارق حاوية على أوساط جديدة لغرض مضاعفتها خضرياً، وقد استعمل نفس الوسط السابق لتحقيق هذا الغرض مع أختبار ٢٠ توليفة لمنظمات النمو النباتية تداخلت فيها تراكيزمختلفة من BA (٠، ٠.٥، ١.٠، 2.0 أو4.0 ملغم/ لتر) مع التراكيز (٠، ٠.١، 0.5 أو 1.0 ملغم/ لتر) من IBA بتجربة عاملية وبواقع عشرة مكررات لدراسة تأثيرها في تضاعف الزروعات من خلال حساب معدل عدد الأفرع المتضاعفة لكل معاملة ومعدل طولها بعد أربعة أسابيع من التحضين تحت نفس الظروف الخاصة بنشوء الزروعات.

ثالثاً: مرحلة التجذير: نقلت الأفرع الى أنابيب اختبار حاوية على ٢٠ مل من وسط التجذير وجرى اختبار:

١- تأثير تراكيز مختلفة من IBA أو IAA في تجذير الأفرع: جرى اختبار التراكيز (٠، ٠.١، ٠.٣، ٠.٥ أو١.٠ ملغم/ لتر) كلاً على حدة من كل من IBA وIAA المضافة الى وسط MS في تجذير الأفرع.

٢- تأثير تراكيز مختلفة من أملاح MS في تجذير الافرع: تم اختبار تأثير تراكيز مختلفة من أملاح MS (X٠.٥، X١.٠ أوX١.٥) وبوجود 1.0 ملغم/لترمن IBA والذي كان الأفضل تأثيراً في التجربة السابقة في تجذير الأفرع.

٣-تاثير تراكيز مختلفة من السكروز في تجذير الافرع: تم اختبار تأثير اضافة تراكيز مختلفة من السكروز (٣٠، ٤٥، ٦٠، ٧٥ أو٩٠ غم/لتر) الى وسط MS وبوجود 1.0ملغم/ لترمن IBA ولجميع تجارب التجذير وبواقع عشرة مكررات لكل معاملة وحضنت الزروعات في شدة إضاءة ١٠٠٠ لوكس ولمدة ١٦ ساعة يومياً ودرجة حرارة ٢٤ ْم سجلت النتائج وهي النسبة المئوية للتجذير ومعدل عدد الجذور ومعدل طول الجذر (سم) بعد ٤ أسابيع من النقل الى وسط التجذير.

رابعاً: مرحلة الأقلمة

استخرجت الأفرع المجذرة من أنابيب الاختبار وغسل المجموع الجذري بالماء الجاري لإزالة آثار الاكار المتبقي وعوملت بالمبيد الفطري (بلتانول) بتركيز 1.0مل/لتر لمدة ١٠ دقائق زرعت بعدها منفردة في اصص بقطر ٧سم حاوية على خلطات مختلفة من الزميج النهري والبيت موس من انتاج شركة وبنسب مختلفة شملت زميج: بتموس (١:٠، ١:٠، ١:١، ٢:١ أو١:٢) وبواقع عشرة مكررات لكل معاملة ووضعت الأصص في البيت الزجاجي وغطيت بنفق بلاستيكي وسقيت الاصص بمحلول أملاح MS بنصف قوة وثم رفع الغطاء البلاستيكي عنها بشكل تدريجي حتى تم رفعه كلياً بعد ٤ أسابيع إذ تم حساب نسبة نجاح النباتات المتأقلمة.

خامساً: التحليل الأحصائي

اتبع التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (CRD) وبعدد المكررات المبين أزاء كل تجربة، وجرى أختبار مقارنة المتوسطات حسب أختبار أقل فرق معنويLeast Significant Difference (LSD) وبمستوى أحتمال ٥%. استعمل البرنامج Genestat Discovery الإصدار (3.0) لعام ٢٠٠٨ لهذا الغرض.

النتائج والمناقشة

١-نشوء الزروعات

أ- تعقيم الأجزاء النباتية: تشير النتائج الموضحة في الجدول (١) إلى فعالية هايبوكلورات الصوديوم في الحد من تلوث الأجزاء النباتية وبلغت أعلى نسبة مئوية للبقاء ١٠٠% عند التركيز ١.٥% لمدة ١٥ دقيقة في حين قلت نسبة البقاء مع زيادة تركيز المحلول المعقم ومدة التعقيم وقد أدى التركيز العالي (٦%) إلى الأضرار بالأنسجة المزروعة وموتها. يتضح من خلال النتائج أعلاه كفاءة التعقيم السطحي بمحلول القاصر التجاري FAS الحاوي على تركيز ١.٥% هايبوكلورات الصوديوم مع بضع قطرات من المادة الناشرة

Tween–20 ولمدة ١٥ دقيقة في التخلص من الملوثات السطحية للقمم النامية. ولقد أكد الباحثون على كفاءة التعقيم بمحلول هايبوكلورات الصوديوم للأجزاء النباتية لنبات Lisianthus في القضاء على الملوثات السطحية من جهة وعدم الأضرار بأنسجة النبات من جهة أخرى عند التراكيز المناسبة[4 و٥].

ب–تأثير تراكيز مختلفة من BA أو KIN في نشوء الزروعات

أشارت النتائج إلى إن إضافة BA للوسط الغذائي قد شجع على تكوين الأفرع على الأجزاء النباتية (جدول٢)، وتفوقت العقد على القمم النامية بغض النظرعن التركيز المستعمل. وقد زاد عدد الأفرع المتكونة معنوياً بزيادة تراكيز BA المضافة وصولاً إلى التركيزين ٠.3 و٠.٥ ملغم/ لتر اذ بلغ ٦.٢ و5.1 فرع للعقد والقمم النامية على التوالي بعدها انخفض عدد الأفرع المتكونة بزيادة تراكيز BA المضافة.

جدول (١)

تأثير تركيز هايبوكلورات الصوديوم في النسبة المئوية للتلوث ونسبة البقاء للقمم النامية لنبات Lisianthus.

NaOCl%	البقاء (%)	الملاحظات
١.٥	100	حصل ضرر للأجزاء النباتية والاستجابة بعد ثلاثة أيام.
٣.٠	٨٠	تضررالأجزاء النباتية بنسب متباينة والاستجابة بعد أسبوع.
4.5	٧٠	تضررالأجزاء النباتية بنسب أكبر والاستجابة قليلة.
6.0	0	تضرر الأجزاء النباتية وموتها.

أما بالنسبة لتأثير تراكيز BA في طول الأفرع المتكونة فيلاحظ انه بالرغم من حدوث زيادة طفيفة في طول الأفرع عند التركيز ٠.١ ملغم/لتر إلا إن التأثير الواضح كان انخفاض طول الأفرع معنوياً بزيادة تراكيز BA المضافة خاصةً عند التركيز ٠.٧ ملغم/لتر وأدى التركيز ١.٠ ملغم/ لتر إلى نشوء أفرع قصيرة ومتضخمة ومتحدة القواعد.

يوضح الجدول (٣) تأثير تراكيز مختلفة منKIN في معدل عدد الأفرع المتكونة ومعدل طول الأفرع. اذ حصلت زيادة معنوية في عدد الأفرع المتكونة بزيادة تراكيز KIN المضافة وصولاً إلى التركيز ٠.٥ ملغم/ لتر للقمم النامية وبلغ ٣.٣ فرع و ٠.٧ ملغم/ لتر للعقد وأعطى ٣.٧ فرع ثم انخفض عدد الأفرع بعد ذلك معنوياً في القمم النامية في حين لم يكن الانخفاض في عدد الأفرع المتكونة معنوياً في حالة العقد وتفوقت القمم النامية على العقد وبغض النظرعن التركيز المستعمل. ويلاحظ ايضاً زيادة في معدل طول الأفرع عند التركيز ٠.١ ملغم/ لتر بعدها انخفض معدل طول الأفرع إلى ٠.٦٨ سم و ١.٠٢ سم للقمم النامية والعقد على التوالي وذلك بزيادة تركيز KIN إلى ٠.٧ ملغم/ لتر. لقد دلت نتائج التجارب الحالية على اهمية السايتوكاينينات في تحفيز استجابة الأجزاء النباتية لنبات Lisianthus للزراعة خارج الجسم الحي وهذا يعود إلى الدور الذي تؤديه هذه المركبات في تحفيز انقسام الخلايا ونموها [9]، وتشير الدراسات الى ان هذا النوع من الهرمونات النباتية يعتبر متطلب أساسي لتنظيم نشاط المرستيمات القمية والتكوين الشكلي Morphogenesis وتطور الكلوروبلاست ونمو الاوراق [10]. كما دلت النتائج كذلك على أفضلية BA على KIN. ومن المعروف ان فعالية السايتوكاينينات تزداد اذا ما احتوت السلسلة الجانبية على ثلاث أواصر مزدوجة بعكس KIN و 2ip اللذين يحتويان على آصرتين وآصرة مزدوجة واحدة على التوالي، وكذلك احتواؤه على حلقة Benzyl [11]، ولذلك يعد BA من أكثر السايتوكاينينات فعالية. كما تبين من نتائج الدراسة اختلاف الاستجابة بين القمم النامية والعقد، الذي قد يعزى إلى عوامل فسلجية تتعلق بمحتوى النسيجين الغذائي والهورموني [12و13] او إلى درجة نضج وتمايز الخلايا المكونة للحزم الوعائية والتي تعتمد عليها عملية نقل الغذاء الممتص من الوسط الغذائي إذ أشار [14] إلى ان الأجزاء النباتية الكبيرة الحاوية على نسيج البرنكيما والأوعية الناقلة والكامبيوم، تظهر استجابة افضل بغض النظر عن تراكيز كل من الاوكسين والسايتوكاينين في الوسط الغذائي او الى كلا السببين اعلاه.

ج–تأثير تراكيز مختلفة من IBA و IAA في نشوء الزروعات

لم يكن لإضافة IBA إلى الوسط الغذائي لم يكن له تأثيراً معنوياً في عدد الأفرع المتكونة إلا إن تأثيره كان معنوياً

في معدل طول الأفرع (جدول ٤) اذ ازداد معدل طول الأفرع.

جدول (٢)

تاثير تراكيز مختلفة من BA في معدل عدد الأفرع ومعدل طول الأفرع الناتجة من زراعة القمم النامية والعقد لنبات Lisianthus.

BA (ملغم/لتر)	عدد الأفرع		طول الفرع(سم)	
	القمم النامية	العقد	القمم النامية	العقد
0.0	1.0٠	1.٧٠	1.0٣	1.03
0.1	2.1٠	3.7٠	1.٠٦	1.15
0.3	3.3٠	6.2٠	1.0٣	0.78
0.5	5.1٠	6.1٠	0.9١	0.64
0.7	3.7٠	3.7٠	0.٦٨	0.47
1.0	2.1٠	3.2٠	0.7٤	0.54
$L.S.D_{0.05}$	0.5٣	0.٧8	0.17	0.16

مع زيادة تركيز IBA وصولاً إلى التركيز ٠.٥ ملغم/ لتر الذي أعطى أعلى معدل طول بلغ ٣.٥٥ سم وتم الحصول على أفرع قوية. أما IAA فكان تأثيره مشابهاً لـ IBA إلا إنه حقق اقل من حيث عدد الأفرع ومعدل أطوالها (جدول ٤). وعليه فقد اعتمدت التوليفة 0.3 ملغم/ لتر BA و٠.٥ ملغم/ لتر IBA في وسط نشوء زروعات نبات Lisianthus (شكل ١). أشار [5] الى ضرورة تضمين وسط نشوء نبات Lisianthus على IBA أو IAA إضافة الى BA للحصول على أعلى معدل لعدد الأفرع المتكونه من الأجزاء النباتية المزروع. ويلاحظ من النتائج أهمية الأوكسين

في نشوء وتطور البراعم العرضية على الأنسجة المزروعة وهذا قد يعود إلى دور الأوكسين التآزري مع السايتوكاينينات تمايزالأنسجة المزروعة إذ تؤدي نسبة السايتوكاينينات إلى الأوكسين العالية الى تحفيز التمايز باتجاه تكوين البراعم والأفرع [15].

٢. تضاعف الزروعات

تشير النتائج في جدول ٥ إلى تأثير تراكيز مختلفة من BA وIBA والتداخل بينهما في معدل عدد الأفرع الناتجة بعد أربعة أسابيع من الزراعة على أوساط التضاعف اذ أثر BA معنوياً في تضاعف الأفرع إذ زاد معدل عدد الأفرع المتكونة معنوياً بزيادة تراكيز BA.

جدول (3)

تاثير تراكيز مختلفة من KIN في عدد الأفرع ومعدل طول الفرع من القمم النامية والعقد لنبات Lisianthus خارج الجسم الحي.

KIN (ملغم/لتر)	عدد الأفرع		طول الفرع(سم)	
	القمم النامية	العقد	القمم النامية	العقد
0.0	1.0٠	1.4٠	1.03	1.03
0.1	1.7٠	2.1٠	1.07	1.58
0.3	1.8٠	2.6٠	1.03	1.16
0.5	3.3٠	3.3٠	0.88	1.03
0.7	2.3٠	3.7٠	0.68	1.02
1.0	1.8٠	3.6٠	0.74	0.77
$L.S.D_{0.05}$	0.5٠	0.78	0.17	0.22

شكل (١) نشوء زروعات نبات Lisianthus من العقد بعد (من اليسار ١ ، ٢، ٣ و ٤) اسابيع من الزراعة في وسط النشوء.

المضافة وصولاً إلى التركيز ١.٠ ملغم/لتر والذي أعطى ٦.٦٥ فرع واختلف معنوياً عن باقي التراكيز. وحصل انخفاض معنوي في معدل عدد الأفرع بزيادة التركيز. أما بالنسبة لتأثير تراكيز IBA في تضاعف الأفرع فكان معنوياً في تحفيزه للتضاعف الخضري إذ أعطى التركيز ٠.١ ملغم/ لتر أعلى معدل للتضاعف بلغ ٤.٩٢ فرع في حين انخفضت أعدادها مع زيادة تراكيزه إلى ٠.٥ ملغم/ لتر ولكنه تفوق على معاملة المقارنة (بدون اوكسين). أما بالنسبة للتداخل فقد كان معنوياً في تحفيز التضاعف الخضري اذ أعطت المعاملة ١.٠ ملغم/ لتر BA مع ٠.٥ ملغم IBA أعلى معدل لعدد الأفرع المتكونة بلغ ٨.٤٠ فرعاً والتي اختلفت معنوياً عند جميع تداخلات التجربة فيما أعطت المعاملة ١.٠ ملغم/ لتر من IBA اقل معدل للتضاعف وكان ١.٠ فرع.

جدول (4)

تاثير تراكيز مختلفة من IBA وIAA (بوجود 0.3 ملغم/ لتر BA) في معدل عدد الأفرع ومعدل أطوالها (سم) المتكونة من القمم النامية والعقد لنبات Lisianthus.

التركيز (ملغم/لتر)	IBA		IAA	
	عدد الأفرع	طول الفرع	عدد الأفرع	طول الفرع
0	6.2٠	0.77	6.20	0.77
0.٠٥	6.7٠	1.15	٠5.7	0.82
0.١	7.2٠	2.03	5.80	1.26
0.5	7.1٠	3.55	6.30	2.56
1.0	6.4٠	3.51	5.70	3.01
$L.S.D_{0.05}$	1.10	0.20	0.82	0.19

جدول (٥)

تأثير تراكيز مختلفة من BA وIBA والتداخل بينهما في عدد الأفرع المتضاعفة لنبات Lisianthus خارج الجسم الحي.

BA / IBA	0.0	0.5	١.٠	٢.٠	٤.٠	معدلات IBA
0	1.50	3.60	6.٤0	0٤.٧	٣.٣٠	3.90
0.١	1.80	4.30	70٧.	٥.60	5.٢٠	4.92
0.5	1.20	4.60	٨.٤0	٤.٩٠	٤.٧٠	4.76
1.0	1.00	3.70	4.١٠	5.20	4.٥٠	3.70
معدلات BA	1.38	4.05	6.65	5.10	4.43	

$L.S.D_{0.05}$	BA= 0.23 IBA = 0.21 للتداخل= 0.46

أما بالنسبة للتأثيرفي معدل طول الأفرع المتكونة في مرحلة التضاعف فتشير النتائج المعروضة في جدول (٦) إلى إن إضافة BA أدت إلى انخفاض معنوي في طول الأفرع المتكونة حيث أعطت معاملة المقارنة (بدون سايتوكاينين) أعلى معدل لطول الأفرع بلغ 3.75 سم، أما اقل معدل لطول الأفرع فكان ٠.٨٨ سم عند التركيز ٤.٠ ملغم/ لتر BA. دلت النتائج إن إضافة IBA إلى الوسط الغذائي الخاص بالتضاعف أدى إلى زيادة معنوية في طول الأفرع وأعطى التركيز 1.0 ملغم/ لتر أعلى معدل لطول الأفرع بلغ ٢.٧٧ سم في حين أعطت معاملة المقارنة (بدون اوكسين) اقل معدل للطول وكان ٢.١٣ سم. أما بالنسبة لتأثير التداخل فقد أوضحت النتائج إن التأثير كان معنوياً في صفة طول الأفرع إذ أعطت المعاملة ٠.٥ ملغم/ لتر من IBA وبدون سايتوكاينين أعلى معدل لطول الأفرع بلغ ٤.١٨ سم في حين أعطت المعاملة ٤.٠ ملغم/ لتر من BA وبدون اوكسين اقل معدل لعدد الأفرع وكان ٠.٥٤ سم.

يتضح من النتائج أعلاه إن أفضل وسط لتضاعف الأفرع هو الحاوي على ١.٠ ملغم/ لتر BA مضافاً إليه ٠.٥ ملغم/ لتر من IBA حيث أعطى معدل عدد أفرع بلغ ٨.٤ فرع وبطول ٣.٤١ سم. وتتفق النتائج أعلاه مع ما وجده [5] في أهمية التداخل بين السايتوكاينين BA والأوكسينIBA أو IAA في تحفيز التضاعف لزروعات نبات Lisianthus خارج الجسم الحي وهذا يعزى إلى الدور الذي يؤديه التوازن بين تراكيز هذين النوعين من منظمات النمو في تحديد نمط التمايز الخلوي وتكوين الأعضاء خارج الجسم الحي، إذ يؤدي وجود تراكيز عالية من السايتوكاينينات وواطئة من الأوكسينات في الوسط الغذائي إلى تكوين براعم خضرية تنمو إلى افرع [15]. وتشير الدراسات الى ان الأوكسين يعمل على تحفيز الجينات التي يقوم السايتوكاينين بالسيطرة على تعبيرها الجيني، وان نواتج التعبير الجيني تؤدي دوراً أساسياً في العمليات البيولوجية مثل انقسام الخلايا وتطور الكلوروبلاست وأيض العناصر المغذية [16].

جدول (٦)

تأثير تراكيز مختلفة من BA وIBA والتداخل بينهما في معدل طول الأفرع المتضاعفة لنبات Lisianthus خارج الجسم الحي.

BA / IBA	0.0	0.5	١.٠	٢.٠	٤.٠	معدلات IBA
0	3.65	3.17	2.34	1.07	0.54	2.13
0.١	3.76	3.30	٢.٥٠	1.25	0.77	2.32
0.5	4.18	3.66	٣.٤١	1.36	1.03	2.73
1.0	3.51	٠4.1	٣.٥٥	1.52	1.19	2.77
معدلات BA	3.75	3.56	2.95	1.30	0.88	
$L.S.D_{0.05}$	BA= 0.13 IBA = 0.12 للتداخل= 0.27					

شكل (٢) تضاعف زروعات نبات Lisianthus بعد ٤ اسابيع من نقل الأفرع الى وسط حاوي على 0.1 ملغم/لتر IBA بالتداخل مع تراكيز BA من اليسار (٠، 0.5، و 1.0 ملغم/لتر).

3- تجذير الأفرع

أ- تأثير تراكيز مختلفة من الاوكسينين IBA و IAA في تجذير الافرع

أدت إضافة IBA أوIAA الى تشجيع تجذير افرع نبات Lisianthus المزروعة خارج الجسم الحي (جدول ٧). زادت نسب التجذير بزيادة تركيز الاوكسين المضاف وتبين ان IBA اكثر تأثيراً من IAA في تجذير الافرع المزروعة. فقد ازدادت النسبة المئوية لتجذير الافرع بزيادة تركيز الاوكسين IBA الى ١.٠ ملغم/ لتر الذي سجل أعلى معدل لعدد الجذور المتكونة بلغ 4.6 فرع وبطول 1.4 سم والذي اختلف معنوياً عن معاملة المقارنة (بدون اوكسين) وكذلك التركيز 0.1 ملغم/لتر ولم يختلف عن التركيزين 0.3 و0.5 ملغم/لتر. أما الاوكسين IAA فقد كان تأثيره اقل في تجذير الافرع واعطى التركيز 1.0 ملغم/لتر اعلى نسبة مئوية لتجذير الافرع بلغت 30% وبعدد جذور 1.7 وبطول 1.8 سم والذي اختلف معنوياً عن معاملة المقارنة وكذلك عن التركيزين 0.1 و0.3 ملغم/لتر بالنسبة لعدد الجذور وعن التركيز 0.1 فقط بالنسبة لطول الجذور، (شكل ٣). تتفق النتائج مع ما توصل اليه [17] في تجذير نبات Lisianthus صنف Griseb وكذلك [5].

جدول (٧)

تأثير تراكيز مختلفة من الاوكسينين IBA و IAA في معدلات النسبة المئوية للتجذير وعدد الجذور وطول الجذر (سم) لافرع نبات Lisianthus خارج الجسم الحي .

التركيز	IBA			IAA		
(ملغم/لتر)	% تجذير	معدل عدد الجذور	معدل طول الجذور	% تجذير	معدل عدد الجذور	معدل طول الجذور
0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
١0.	10	0.30	0.20	10	0.10	0.40
0.3	40	2.90	0.30	10	0.30	1.50
0.5	50	3.70	0.70	20	0.80	1.30
1.0	60	4.60	1.40	30	1.70	1.٨0
$L.S.D_{0.05}$		2.78	1.19		1.39	1.22

شكل (٣) تجذير أفرع نبات Lisianthus بعد ٤ أسابيع من الزراعة في وسط حاوي على IBA بالتراكيز(من اليمين ٠، 0.5 و 1.0 ملغم/لتر).

يتضح أن للأوكسين IBA دوراً مهماً في تجذير أفرع نبات Lisianthus والذي اعطى اعلى نسبة تجذير واعلى معدل لعدد الجذور المتكونة مقارنة مع IAA. وبصورعامة تؤدي الأوكسينات دوراً رئيسياً في تجذيرالأفرع وتختلف فيما بينها من حيث فعاليتها في احداث التاثير الفسلجي المطلوب ويعتمد التأثير الذي تحدثه على نوع النبات والتركيز المستعمل فضلاً عن مستويات الأوكسين الداخلية في النسيج النباتي [18]. ولربما يعود تفوق الأوكسين IBA على IAA في تجذير الأفرع الى ثباتية الأوكسين IBA مقارنة بـ IAA الذي يعاني أكسدة ضوئية في الوسط الغذائي أذ وجد أن الأكسدة الضوئية لـ IAA تزداد بوجود أملاح MS [19].

ب- تأثير تراكيز مختلفة من املاح MS في تجذير الافرع

لم يكن لتراكيز املاح MS تأثير معنوي في تجذير الافرع المزروعة (جدول ٨) واعطى الوسطين الحاويين على املاح MS بنصف القوة وكذلك على قوة ونصف على نسبة تجذير وعدد جذور ومعدل طول جذور اقل من وسط MS بالقوة الكاملة. قد يعود السبب في ذلك الى عدم حدوث التوازن الأمثل بين مستوى الكاربوهيدرات والنتروجين C/N ratio في الأنسجة، إذ ذكر [19] أن حدوث هذا التوازن يؤدي دوراً رئيسياً في تحفيز تجذير الأفرع خارج الجسم الحي.

جدول (8)

تأثير تراكيز مختلفة من املاح MS في النسبة المئوية للتجذير وعدد الجذور وأطوالها (سم) لافرع نبات Lisianthus خارج الجسم الحي.

قوة أملاح MS	% تجذير	معدل عدد الجذور	معدل طول الجذر
0.5X	50	1.8	2.1
1.0X	60	4.6	1.4
1.5X	30	2.2	0.9
$L.S.D_{0.05}$		2.81	1.82

جـ- تأثير تراكيز مختلفة من السكروز في تجذير الافرع

ان اضافة تراكيز اضافية من السكروز الى وسط التجذير وبوجود 1.0ملغم/ لترمن IBA قد حسن من تجذير الافرع، يلاحظ من الجدول (٩) ان رفع تركيز السكروز في وسط MS الى ٤٥ غم/ لتر قد اعطى اعلى نسبة تجذير بلغت 90% وبعدد جذور بلغ ٩.٧ جذر والذي اختلف معنوياً عن باقي تراكيز السكروز ويلاحظ انخفاض النسبة المئوية.

شكل (٤) تجذير أفرع نبات Lisianthus في وسط حاوي على السكروز بالتراكيز (من اليمين ٣٠، ٤٥، ٦٠، ٧٥ و٩٠ غم/لتر).

للتجذير وعدد الجذور المتكونة بزيادة تراكيز السكروز المضافة وصولاً الى التركيز ٩٠ غم/ لتر الذي اعطى اقل نسبة تجذير وصلت 50% واقل معدل لعدد الجذور بلغ ١.٩ جذر.

اما بالنسبة لطول الجذور فيلاحظ ايضاً ان التركيز ٤٥ غم/ لتر قد اعطى اعلى معدل لطول الجذر بلغ ٤.٨ سم والذي اختلف معنوياً عن التركيز ٣٠ غم/ لتر الذي سجل ١.٤ سم ولم يختلف معنوياً عن باقي تراكيز السكروز التي ادت زيادتها الى انخفاض في معدل طول الجذور المتكونة، (شكل ٤). لقد أشار بعض الباحثين مثل [20] الى أن السكروز يعتبر عامل مهم في تحسين تجذير نبات Lisianthus صنف Echo. إذ وجد ان السكروز عامل مهم في تكوين الجذور واشار [19] الى انه بوجود التركيز المناسب من الاوكسين في الوسط الغذائي فأن تجذير النموات المزروعة فيه يعتمد على التوازن بين تركيز السكروز وتركيز النتروجين الكلي وان رفع تركيز السكروز الى ٤-٧% له تاثير كبير في زيادة التجذير، وهذا ربما يفسر كذلك انخفاض التجذير بزيادة تراكيز املاح MS اي زيادة تراكيز النتروجين في الوسط، وبالتالي تقليل نسبة الكاربوهيدرات الى النتروجين.

جدول (٩) تأثير تراكيز مختلفة من السكروز المضاف الى وسط MS الحاوي على 1.0 ملغم/ لتر من IBA في النسبة المئوية للتجذير ومعدل عدد الجذور ومعدل أطوالها (سم) لافرع نبات Lisianthus خارج الجسم الحي.

جدول (٩)

تأثير تراكيز مختلفة من السكروز في النسبة المئوية للتجذير ومعدلات عدد الجذور وأطوالها (سم) لافرع نبات Lisianthus خارج الجسم الحي.

السكروز (غم/لتر)	% تجذير	معدل عدد الجذور	معدل طول الجذور
٣٠	60	4.6	1.4
٤٥	90	9.7	4.8
٦٠	70	4.3	3.6
٧٥	60	3.3	3.4
٩٠	50	1.9	2.6
$L.S.D_{0.05}$		2.87	2.28

٤- مرحلة الاقلمة

يلاحظ من الشكل (٥) نباتات Lisianthus بعد مرور شهرين من نقلها الى التربة ودلت النتائج الموضحة في الجدول (١٠) ان لوسط الزراعة تأثير واضح في نسبة نجاح النبيتات المتأقلمة اذ ارتفعت نسبة نجاح النباتات الى ٩٠% عند استعمال الوسط المكون من الزميج والبيتموس بنسبة

(١:٢) في حين كانت اقل نسبة لنجاح الاقلمة في الوسط المكون من البتموس فقط وبلغت ٦٠%. ويعود سبب زيادة نجاح الاقلمة في وسط الزميج والبيتموس بنسبة (١:٢) كون البيتموس يوفر مسامية جيدة للوسط مما يسمح بأنتشار ونمو الجذور اضافة الى ما يوفره الزميج من صرف جيد. يستنتج من نتائج الدراسة الحالية أستجابة نبات Lisianthus للزراعة خارج الجسم الحي وإمكانية الإكثار الدقيق له بإتباع البرنامج الموصوف أعلاه.

جدول (١٠)

تأثير نسب البتموس والزميج في الوسط الزراعي في النسبة المئوية لنجاح أقلمة نبيتات Lisianthus الناتجة من زراعة الأنسجة النباتية.

الوسط (زميج : بتموس)	% النباتات المتأقلمة
(٠:١)	70
(١:٠)	60
(١:١)	80
(٢:١)	80
(١:٢)	90

شكل (٥) نباتات Lisianthus بعد مرور شهرين من نقلها الى التربة.

المصادر

[1] A. H. Halevy and A. M. Kofranek. Evaluation of Lisianthus as a new flower crop. Hort Science, 19(6): 845-847. 1984.

[2]L. Liao; Y. Lin; K. Huang and W. Chen. Vase life of cut Eustoma flowers and aluminum sulfate. Bot. Bull. Acad. Sin., 42: 35-38. 2001.

[3] The rise of Lisianthus. 2004. http://arabflower.net

[4] E. Farina and S. Ruffoni. The effect of temperature regimes on micropropagation efficiency and field performance of *Eustoma grandiflorum.* Acta Hort., 337: 73-80. 1993.

[5] K. Y. Paek and E. J. Hahn. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant., 36:128–132. 2000.

[6] M. Ordogh; E. Jambor-benczur and A. Tilly-Mandy. Micropropagation of 'Echo' cultivars of *Eustoma grandiflorum*. Acta Horticulturae,, 725: 457-460. 2006.

[٧] عبد اللطيف، سوسن عبد الله، دراسة فسلجية في انتاج وخزن ازهار Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*)، اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد، جمهورية العراق، ٢٠٠٦.

[8] T. Murashige, and F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15:473-497. 1962.

[٩] محمد، عبد العظيم كاظم واليونس، مؤيد احمد، اساسيات فسيولوجيا النبات، جامعة بغداد، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جمهورية العراق، ١٩٩١.

[10] T. Werner; V. Motyka; M. Strnad and T. Schmülling. Regulation of plant growth by cytokinin. Proc.Natl. Acad. Sci., 98:10487-10492. 2001.

[11] H. N. Krishnamoorthy. Plant Growth Substances Including Application in Agriculture. Tata McGraw Hill New Delhi, p. 214. 1991.

[12] B. G. A. Bowes. Color Atlas of Plant Propagation and Conser-vation, Manson Publishing Ltd, London U. K.1999.

[13] R. N. Trigiano, and D. J. Gray. Plant Tissue Culture: Concepts and Laboratory Exercises. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, pp:11-17. (٢٠٠٠).

[14] M. Omura and T. Hidaka. Shoot tip culture of citrus. Longevity of culture shoots. Bull. Fruit Tree Research Station, Japan, 22:37-48.1992.

[15] F. Skoog, and C.O. Miller. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro.* Symp. Soc. Exp. Biol. 9:118-131. 1957.

[16] T. Schmülling; S. Schäfer, and G. Romanov. Cytokinins as regulators of gene expression. Physiol. Plant., 100(3):505-512.1997.

[17] H. Kunitake; T. Nakashima; K. Mori; M. Tanaka and M. Mii. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of Lisianthus *(Eustoma grandiflorum)* by adding activated charcoal into protoplast culture medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43: 59-65. 1995.

[18] H.T. Hartmann; D. E. Kester, F.T. Davies, and R.L. Genever. Plant Propagation: Principles and Practices. Hall Inc., New jersey, USA. 1996.

[19] George, E. F.; Michael, A. H. and G.D. Klerk. Plant Propagation by Tissue Culture. Third Edition. Springer, Netherlands. p. 182. ٢٠٠٨.

[20] F. Chen; S.C. Hsu; L.H. Ke and M.C. Wu. Micropropagation of *Eustoma grandiflorum* by axillary bud culture. Acta Hort., 725: 323-345. 2006.

Abstract

A complete protocol for Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) micropropagation was designed. Several experiments were conducted. Sodium hypochlorite NaOCl was tested for explants surface sterilization, the effect of cytokinins, Benzyl adenine (BA) or 6-Furfural amino purine (KIN) and the auxins, Indol butyric acid (IBA) or Indol-3-acetic acid (IAA) on shoots initiation, Multiplication, rooting and acclimatization stages. Results indicated that 1.5% of sodium hypochlorite was effective in disinfecting explants. Nodal segments were better than shoot tips in their response to *in vitro* culture. BA at 0.3 mg/l gave the highest average of shoots number (6.2) from nodal segments. Shoots number and length increased to 7.2 and 2.03 cm respectively when 0.1 mg/l was added to the initiation medium. The height multiplication rate (8.4 shoots with 3.41cm in length) was achieved when shoots were transferred to a medium supplemented with 1.0 mg/l BA and 0.5 mg/l IBA. In rooting stage 60% of shoots were rooted in a medium supplemented with 1.0 mg/l IBA with 4.6 roots and 1.4 cm in length. Rooting was improved up to 90% by increasing sucrose concentration up to 45 g/l. Roots number and length increased to 9.7 and 4.8 cm respectively. Acclimatization of plantlets was achieved using a mixture of river sand and peat moss (2:1) (v:v) with 90% plantlet survival. According to these results, Lisianthus micropropagation can be carried out using the protocol described above.