الاكثار الدقيق لنبات Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*)
Micropropagtion of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*)

التفات فاضل شحاذه كاظم محمد ابراهيم* علي هاشم الموسوي
كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
*كلية العلوم/ جامعة النهرين
Eltifat Fadhil Shahatha *Kadhim M. Ibrahim Ali Hashim Al-Musawi
College of Science for Women/ University of Baghdad
*College of Science/ Al-Nahrian University

المستخلص

اشتملت الدراسة الحالية على اجراء عدة تجارب. أختبر في مرحلة نشوء الزروعات وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من الاوكسينين Indole butyric acid (IBA) و Naphthalene acetic acid (NAA) و 0.3 ملغم/لتر من BA في متوسط عدد الافرع واطوالها على الاجزاء النباتية المدروسة (أجزاء الاوراق) لنبات Lisianthus. كما درس تاثير تراكيز مختلفة من قوى وسطي Murashige and Skoog, 1962 (MS) و Gamborg *et al.*, 1967 (B5) في متوسط عدد الافرع خلال مرحلة التضاعف. فيما تضمنت مرحلة التجذير دراسة تأثير تراكيز مختلفة من IBA و NAA بعد تضمينها الى الوسط الغذائي (MS) وتاثير هذا الوسط في تجذير الافرع الناتجة من مرحلة التضاعف كما درس تأثير الوسط الزراعي المكون من التربة المزيجية والبتموس وبنسب مختلفة في نجاح أقلمة النبيتات. اعطى IBA أعلى متوسط لعدد الافرع المتكونة من الاجزاء النباتية الثلاثة بلغ 6.8 فرعاً ومتوسط طول 2.75 سم وبلغ اقصى متوسط عدد أفرع 7.3 جذر عند التركيز 0.1 ملغم/لتر من IBA فيما بلغ اقصاها 6.4 عند التركيز 0.0 من NAA. كما بينت النتائج تفوق الوسط MS على وسط B5 اذ حصل انخفاض معنوي في نشوء عدد الافرع مع تقليل قوة الوسط بلغت اقصاها 8.8 و 6.6 فرعاً في الوسطين على التوالي. أعطت الافرع المنماة على الوسط MS الحاوي على 1.0 ملغم /لتر من IBA اعلى متوسط لعدد الجذور بلغ 5.5 جذراً وبطول 2.5 سم وبنسبة تجذير بلغت 70% في الوقت الذي وصلت فيه اعلى نسبة منوية للتجذير 20% فقط عند تضمين الوسط 1.0 ملغم/لتر من NAA. أقلمت النبيتات وبنسبة نجاح بلغت 90% بعد زراعتها في وسط زراعي مكون من التربة المزيجية والبتموس بنسبة (1:2) حجم/ حجم.

الكلمات المفتاحية: ***Eustoma grandiflorum*** **, الاكثار الدقيق, قوة الوسط , MS , B5**

Abstract

This study was aimed to micropropagate Lisianthus *Eustoma grandiflora* plant which is one of the important cut flowers. The study included many experiments, at the initiation stage, the effect of the two auxins Indole butyric acid (IBA) and Naphthalene acetic acid (NAA) supplemented to Murashige and Skoog medium (MS) containing 0.3 mg/l of Benzyladenine (BA) were investigated for their effect on mean number of initiated shoots and length. type of explant were used namely, leaf discs. The effect of different strengths of MS and B5 media on mean number of multiplied shoots was also studied. During acclimatization, different mixture ratios of peat moss and river sand were examined in their effect on plantlets survival. Results showed that IBA achieved the highest mean shoot number formed on the three explants types under investigation reached 6.8 shoots with a mean length of 2.75 cm. Maximum mean shoot number reached 7.3 at the concentration 0.1 mg/l of IBA while maximum mean shoot number reached 6.4 at the concentration 0.0 mg/l of NAA. Results also revealed that MS medium was better than B5 medium in sustaining shoots yielding 8.8 and 6.6 for both media respectively. A significant reduction in mean number of shoots occurred with reducing the medium salt strength. Shoots transferred to MS medium supplemented with 1.0 mg/l of IBA produced the highest mean root number, length and rooting percentage reached 5.5 roots, 2.5 cm and 70% respectively while rooting percentage did not exceed 20% when the same medium was supplemented with 1.0 mg/l of NAA. Plantlets were successfully acclimatized achiving 90% survival when grown on agricultural medium consisted of river sand : peat moss (2:1)v/v.

Key words: *Eustoma grandiflorum*, Micropropagtion, strengths of media, MS, B5

المقدمة

يعد نبات Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf) Shinn.) احد أزهار القطف المهمة في العالم ينتمي الى عائلة *Gentianaceae* يمتاز بجمال ازهاره وتباين اللوانه المختلفة مثل البنفسجي والارجواني والابيض والازرق والبيجي والوردي وشكلها يشبه ازهار الورد *Rose*. ان اهم ما يميز زهرة Lisianthus قدرتها على البقاء على النبات أو في المزهريات بعد القطف Vase life لفترة تزيد 1-2 اسبوع ولاسيما اذا ما استعملت المحاليل الحافظة مثل كبريتات الالمنيـــــوم [1] لهذا فقد زاد الطلب على هذه

الازهار بشكل ملحوظ في الاسواق الاوربية والامريكية واليابانية، لتنتج حالياً في معظم دول العالم الى الحد الذي اصبحت فيه من ازهار القطف العشر الرئيسية التي تتداول في اسواق الزهور ومزاداتها . حيث ازادت مبيعات هذه الازهار في الولايات المتحده وخاصة في ولاية كاليفورنيا لتصل الى 9.4 مليون دولار في عام 2001 وبنسبة زيادة مقدارها 50% عن مبيعات عام 2000 [2]. مايميز هذا النبات هو امكانية انتاجة في الحقول المكشوفة وداخل البيوت المحمية [3]. وبسبب صغر حجم البذور وصعوبة زراعتها فأن هناك صعوبات في اكثاره جنسياً [4] فضلاً عن ان النباتات الناتجة من البذور غالباً ماتكون غير متجانسة في ارتفاعاتها وموعد ونوعية ازهارها. أستعمل الكثير من الباحثين توليفات مختلفة من منظمات النمو وبتراكيز مختلفة لمراحل الزراعة النسيجية للنبات كمرحلة نشوء الزروعات والتضاعف والتجذير وحصلوا على نباتات لم تلبي الطلب العالمي المتزايد على هذا النبات، لذا وضعت خطة للأكثار الدقيق لهذا النبات تتضمن انتاج اعداد كبيرة من النباتات المتجانسة مظهرياً وخلال مدة قصيرة نسبياً ولذلك وظفت تقانة الزراعة النسيجية في الاكثار الواسع لهذا لنبات. وبناءاً على ماسبق من أهمية كبيرة للنبات وأعتباره نباتاً واعداً كازهار قطف ولقلة الدراسات عليه في العراق ولغرض انتاج النبات بشكل واسع ولكونه ادخل حديثاً الى العراق وملائمته للزراعة في المنطقة الوسطى منه لذا وضع برنامج متكامل لاكثاره من خلال دراسة تأثيرالوسط الغذائي ومكوناتة في انتاج النبات نسيجياً وللحصول على احسن توليفة لتضاعف النموات الخضرية وتجذيرها وأقلمة النبيتات.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

مرحلة نشوء الزروعات Culture initiation stage

أجريت التجارب على نبات *Lisianthus* (Double Eagle Mixed" Hybrid") اذ جلبت شتلات بأرتفاع 20 سم مزروعة في أصص بقطر 12 سم من أحد المشاتل الأهلية في بغداد. وهي مستوردة أصلاً من خارج العراق. جرى تنظيف الأفرع الخضرية بمسحها بالكحول الأثيلي تركيز70% وقطعت اجزاء الاوراق على شكل دوائر باستخدام الثاقب الفليني (Cork borer) وبقطر 0.5 سم وغسلت بتيار ماء جاري لمدة ساعة كاملة ونقلت الى منضدة انسياب الهواء الطبقي Laminar Air Flow Cabinet لضمان عدم التلوث اثناء عملية التعقيم. واتبعت طريقة [5] في التعقيم السطحي للاجزاء النباتية بأستعمال محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 1.5 ولمدة 15 دقيقة.

الوسط الغذائي

أستعمل الوسط الغذائي MS [6] وأضيف السكروز بمقدار 30 غم/لتر والمايوانستول بمقدار 100ملغم /لتر وأضيفت منظمات النمو الى الوسط حسب الهدف من التجربة وبالتراكيز المبينة ازاء كل منها. أضيف 9.0 غم/لتر من مادة الأكار نوع Agar-Agar وسخن الوسط على جهاز الصفيحة الساخنة الممغنط (Hotplate/Magnetic stirrer) لحين الذوبان الكامل. كما حضر وسط MS وبنصف وربع القوة للمغذيات الكبرى. وعدل الـ pH ثم أضيف 0.9 غم من الاكار وأكمل الحجم الى 100 مل، وبعدها مزجت مكونات الوسط بأستعمال جهاز الصفيحة الساخنة الممغنط لأذابة مكونات الوسط الغذائي وعلى درجة حرارة 90-100م، ووزع في دوراق سعة 250 مل بمقدار 50 مل لكل دورق. وغطيت الدوراق بالقطن الطبي ورقائق الالمنيوم بعدها عقمت أوعية الزراعة بجهاز الموصدة Autoclaveعلى ضغط 1.04 كغم/سم^2 ودرجة حرارة 121م لمدة 15 دقيقة وتركت الى حين تصلب الوسط الغذائي في درجة حرارة الغرفة أذ أصبح جاهزاً للزرعة. أما الملاقط والمشارط فعقمت بالكحول الأثيلي تركيز 70% ومررت على اللهب قبل الأستعمال وبعده.

تأثير تراكيز مختلفة من IBA او NAA في نشوء الزروعات

أختبرت التراكيز 0، 0.3، 0.5، 1.0 او 2.0 ملغم /لتر من IBA او NAAعلى وسط النشوء وبواقع سبعة مكررات لكل معاملة وبواقع جزء نباتي واحد لكل مكرر. وحضنت الزروعات في غرفة النمو تحت شدة أضاءه قدرها 1000 لوكس ولفترة أضاءه 8/16 ساعة ضوء/ظلام وعلى درجة حرارة 25م. ولمدة اربع أسابيع. حسب بعدها متوسط عددالافرع وأطوالها.

مرحلة التضاعف Multiplication stage

تأثير تراكيز أملاح MS وB5 في تضاعف الأفرع

أختبرت تراكيز مختلفة من أملاح MS و B5 بقوة كاملة، نصف القوة، او ربع القوة كل على حدة وبوجود 1.0 ملغم /لترمن BA و0.5 ملغم /لتر من IBA. وحضنت تحت نفس الظروف المذكورة في الفقرة السابقة ولمدة اربع أسابيع. حسب بعدها متوسط عدد الافرع فقط.

مرحلة التجذير Rooting stage: تأثير تراكيز مختلفة من IBA أو NAA في تجذير الأفرع

جرى اختبار التراكيز 0، 0.3، 0.5، 1.0 أو2.0 ملغم /لتر من كل من IBA وNAA المضافة الى وسط MS في تجذير الأفرع.

تأثير تراكيز مختلفة من أملاح MS في تجذير الافرع

أختبرت تراكيز مختلفة من املاح MS بقوة كاملة، نصف القوة، او ربع القوة وبوجود 1.0 ملغم / لتر من IBA والذي كان الافضل تأثيراً في التجربة السابقة في تجذير الافرع.

مرحلة الأقلمة Acclimatization stage

استخرجت الأفرع المجذرة من انابيب الاختبار وغسل المجموع الجذري بالماء الجاري لازالة اثار مادة الاكار المتبقية وعوملت بالمبيد الفطري (بلتانول) بتركيز 1.0 مل /لتر لمدة 10 دقائق زرعت بعدها منفردة في سنادين بقطر 7سم حاوية على خلطات مختلفة من المزيج النهري والبيت موس وبنسب مختلفة شملت (0:1، 1:0، 1:1، 2:1 او 1:2) وبواقع ستة مكررات لكل معاملة ووضعت السنادين في بيت زجاجي وغطيت بأغطية بلاستيكية وسقيت بمحلول أملاح MS بنصف قوة ورفع الغطاء البلاستيكي عنها بشكل تدريجي وأخيراً كلياً وحسبت نسبة نجاح النباتات المتأقلمة بعد 4 أسابيع.

التصميم التجريبي والتحليل الاحصائي: صممت تجارب احادية أو ثنائية العوامل مع تداخلاتها وفقاً للتصميم العشوائي الكامل CRD وبعدد مكررات حسب ماورد في المواد وطرائق العمل . حللت البيانات وفق تحليل التباين بأتجاهين وذلك بأستخدام البرنامج الاحصائي الجاهز (SPSS) وقورنت المتوسطات حسب أختبار اقل فرق معنوي بمستوى احتمالية 5% [7].

النتائج والمناقشة

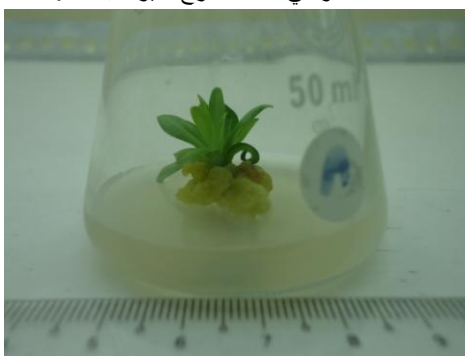
تأثير تراكيز مختلفة من IBA اوNAA في نشوء الزروعات V

يلاحظ من جدول (1) ان أضافة IBA الى الوسط الغذائي MS المجهز بـ 0.3 ملغم /لتر BA لم يكن له تأثيراً معنوياً في متوسط عدد الأفرع المتكونة ماعدا التركيز 0.1 ملغم/لتر حيث ادى الى حصول زيادة معنوية في متوسط عدد الافرع وصلت الى 7.3 فرعاً / جزء نباتي في حين أعطت معاملة المقارنة أقل متوسط عدد أفرع بلغ 6.4 فرعاً / جزء نباتي. اما فيما يخص طول الافرع فيلاحظ من الجدول تفوق جميع التراكيز معنوياً مقارنة مع معاملة المقارنة مع زيادة تراكيز IBA وصولاً الى التركيز 0.5 ملغم /لتر الذي أعطى أعلى متوسط طول بلغ 3.7سم تلاه التركيزان 1.0 ملغم /لتر و 2.0 ملغم /لتر من الـ IBA اذ سجلا متوسط طول بلغا 3.6 و3.5 سم على التوالي. فيما أعطت معاملة المقارنة أقل متوسط طول للفرع بلغ 0.75 سم تلتها المعاملة 0.1 ملغم / لتر IBA التي أعطت 2.2 سم. أشار [5] الى ضرورة تضمين وسط نشوء نبات Lisianthus على IBA أضافة الى BA للحصول على أعلى متوسط لعدد الأفرع المتكونة من الأجزاء النباتية المزروعة. ويلاحظ من النتائج أهمية الأوكسين في نشوء وتطور البراعم العرضية على الأنسجة المزروعة وهذا قد يعود الى دور الأوكسين المعروف التآزري مع السايتوكاينينات في تمايز الأنسجة المزروعة إذ تؤدي نسبة السايتوكاينينات الى الأوكسين العالية الى تحفيز التمايز باتجاه تكوين البراعم والأفرع [8].

جدول (1): تأثير تراكيز مختلفة من IBA أو NAA بوجود 0.3 ملغم /لتر BA في متوسط عدد الأفرع و أطوالها سم المتكونة من أجزاء أوراق نبات Lisianthus بعد أربعة اسابيع من زراعتها على وسط MS.

التركيز	IBA		NAA	
(ملغم/لتر)	متوسط عدد الأفرع	متوسط طول الأفرع سم	متوسط عدد الأفرع	متوسط طول الأفرع سم
0.0	6.40	0.75	6.40	0.75
0.1	7.30	2.20	5.80	1.80
0.5	7.20	3.70	6.00	2.90
1.0	6.60	3.60	2.50	3.30
2.0	6.50	3.50	1.60	1.30
المتوسط	6.80	2.75	4.46	2.01
L.S.D 0.05	0.87	0.73	0.84	0.67

أما NAA فكان تأثيره مشابهاً لتأثير IBA الا انه حقق اقل متوسط في عدد الافرع حيث أن جميع التراكيز لم تفوق معاملة السيطرة والتي أعطت أعلى متوسط عدد أفرع بلغ 6.4 فرع. ويلاحظ ان التركيز 2.0 ملغم / لترمن NAA قد اختلف معنوياً عن بقية التراكيز والذي ادى الى تكوين كالس بلون اصفر فاتح من الجزء النباتي شكل (1) وهذا يتفق مع [9]. كما ان الكالس فشل في التمايز Differentiation وانتاج نباتات كاملة رغم أعادة زراعته، أذ ادت اعادة زرع الكالس Reculture على نفس الوسط أو على وسط حاوي على 0.3 ملغم /لتر من BA و0.5 ملغم /لترمن NAA الى تحول لون الكالس الى اللون البني دون تكوين فروع وهذا يتفق مع [10] عند زراعة اجزاء ورقة نبات الصبار في ان الكالس فقد قدرتة على الاخلاف. ربما يرجع السبب في ذلك وحسب ما أشار [11]، اللذان اقتراحا الى ان سبب تدهور قابلية تكوين الاعضاء أو الاجنة في الكالس، هو تغير التوازن الهرموني داخل الخلايا أو الانسجة ونتيجة ذلك تتوقف تلك الخلايا عن التمايز وتكوين الأجنة والاعضاء. وهذا ما حصل لـ [12] عندما حاول أكثار كالس نبات المكنوليا من الكالس أذ فقد قدرته على التمايز عند اعادة زراعته ولم تنتج أفرعاً. وبهذا فقد أعتمدت التوليفة 0.3 ملغم / لتر BA و 0.5 ملغم / لتر IBA في وسط نشوء زروعات نبات Lisianthus والتي أعطت أفرع تميزت بنشاطها شكل(2).



شكل(1): نشوء زروعات نبات Lisianthus والذي رافقه تكون الكالس بعد أربعة أسابيع من الزراعة حاوي على وسط MS حاوي على2.0 ملغم /لتر

شكل (2): نشوء زروعات نباتLisianthus من اجزاء الاوراق بعد أربعة أسابيع من نقل الأفرع الى وسطMS حاوي على 0.3 ملغم/ لتر و0.5 ملغم/لتر من IBA.

تأثير تراكيزمختلفة من أملاح MS اوB5 في تضاعف الافرع

حصلت أختلافات معنوية في متوسط عدد الافرع بأختلاف قوة وسط MS جدول (2) حيث أعطى الوسط MS بقوة كاملة والحاوي على 0.5 ملغم / لتر IBA و 1.0 ملغم/ لتر BA أعلى متوسط عدد أفرع بلغ 8.8 فرعاً/ جزء نباتي. ويلاحظ من الجدول نفسه أنخفاض متوسط عدد الافرع عند أستعمال وسط MS بنصف القوة وربع القوة والحاويان على 0.5 ملغم/ لتر IBA و 1.0 ملغم/ لتر BA حيث أعطى متوسط عدد افرع بلغ 4.5 و 2.0 على التوالي. ربما يرجع السبب الى الحاجة الماسة الى المغذيات الاساسية الكبرى كالنتروجين والكالسيوم والمغنسيوم وغيرها، التي تعد اساسية في البناء الحيوي للخلية وهذا يتفق مع [10] في دراستها تأثير وسط MS بنصف قوة المغذيات الكبرى في متوسط عدد الافرع خلال مرحلة نشوء زروعات تاج نبات الصبار، وحصل [13] نباتات ناتجة من الزراعة على وسط MS كامل القوة لنبات *Lilium spp* اكبر وقادرة على البقاء مدة أطول من تلك الناتجة من الزراعة على وسط MS بنصف قوة المغذيات الكبرى. يستنتج من النتائج اعلاه بأن الوسط MS بقوة كاملة والحاوي على 0.5 ملغم/ لترIBA و 1.0 ملغم/ لتر BA أفضل لتضاعف أفرع نبات Lisianthus من الوسط MS بنصف القوة والذي أعطى أقل متوسط عدد أفرع شكل(3).

شكل (3): تضاعف زروعات نبات Lisianthus بعد اربعة أسابيع من الزراعة في وسط حاوي على 0.5 ملغم/لترIBA بالتداخل مع 1.0 ملغم/لترBA.

جدول (2): تأثير وسط MS أو B5 بقوى مختلفة من المغذيات الكبرى في متوسط عدد الافرع الناتجة من اجزاء الاوراق خلال مرحلة تضاعف زروعات نبات Lisianthus.

قوة الوسط	نوع الوسط	
	MS متوسط عدد الافرع	B5 متوسط عدد الافرع
قوة كاملة	8.80	6.66
نصف قوة	4.50	3.60
ربع قوة	2.00	1.33
L.S.D 0.05	1.64	1.28

اما بالنسبة للوسط B5 فأن أعلى متوسط عدد افرع وصل 6.66 فرعاً / جزء نباتي وذلك عند أستعمال الوسط B5 بقوة كاملة والحاوي على 0.5 ملغم / لتر IBA و1.0 ملغم / لتر BA. في حين أنخفض متوسط عدد الأفرع الناتجة من الزراعة في الوسط B5 بنصف القوة وربع القوة اذ وصل 3.60 و 1.33 فرعاً / جزء نباتي على التوالي. يتضح من شكل (4) ان لون الافرع الناتجة من الزراعة على وسط B5 تميل للاصفرار (اخضر مصفر) بالأضافة الى كونها ضعيفة وهشة ولم تجذر عند نقلها الى وسط التجذيرمقارنة بالوسط MS. قد يرجع السبب الى الفروقات بالمحتوى النتروجيني والفسفوري لهذين الوسطين [14]. يدخل النتروجين في بناء بروتينات الخلية والاحماض النووية والكلوروفيل والانزيمات الضرورية في تفاعلات الخلية [15]، ويدخل في تركيب المرافقات الانزيمية وأثره الايجابي في نمو النبات. أما عنصر الفسفور فيعد من المركبات الاساسية للخلية النباتية ويدخل في تركيب بروتين نواة الخلية الذي بدونه لايحصل انقسام الخلايا ويعد مهم جدا في عمليات تمثيل الدهون وتحول الكربوهيدرات في النبات، ويعمل الفسفور المكون لجزيئة adenosine triphosphate (ATP) مخزنا وناقلاً للطاقة خلال العمليات الحيوية للنبات [16].

شكل (4): تضاعف زروعات نبات Lisianthus بعد اربعة أسابيع من الزراعة في وسط B5 كامل القوة حاوي على 0.5 ملغم/لترIBA بالتداخل مع 1.0 ملغم/لترBA.

تأثير تراكيز مختلفة من IBA اوNAA في تجذير الأفرع في الوسط MS

تشير النتائج الموضحة في جدول (3) الى ان أضافة أي من الاوكسينين IBA او NAA ادت الى تشجيع تجذير افرع نبات Lisianthus المزروعة خارج الجسم الحي. حيث زادت نسبة التجذير بزيادة تركيز الاوكسين المضاف عدا التركيز 2.0 ملغم / لتر. وتبين ان IBA اكثر تأثيراً من NAA في تجذير الافرع المزروعة فقد زادت النسبة المئوية لتجذير الافرع بزيادة تركيز الاوكسين IBA الى 1.0 ملغم / لتر الذي سجل أعلى نسبة بلغت 70% واعلى متوسط لعدد الجذور المتكونة بلغ 5.5 جذر وبمتوسط طول 2.5 سم (شكل 5) والذي اختلف معنوياً عن معاملة المقارنة (بدون اوكسين) وكذلك التركيز 0.1 ملغم /لتر. أما الاوكسين NAA فقد كان تأثيره اقل في متوسط تجذير الافرع واعطى التركيز 1.0 ملغم /لتر أعلى نسبة مئوية لتجذير الافرع بلغت 20% وبعدد جذور 1.6 وبمتوسط طول 1.5 سم والذي اختلف معنوياً عن معاملة المقارنة وكذلك عن التركيز 0.1 ملغم /لتر. واختلف التركيز 2.0 ملغم /لتر معنوياً عن جميع المعاملات اذ ادى الى تكوين الكالس أضافة للجذور. يلاحظ بأن التراكيز العالية من الاوكسين تكون ذات تأثير تثبيطي لعملية التجذير والذي قد يرجع الى زيادة تخليق الاثلين في انسجة الجذور وبالتالي تثبيط نموها وتطورها [17].

جدول(3): تأثير تراكيز مختلفة من الاوكسينين IBA و NAA (ملغم/لتر) المضافة على انفراد في النسبة المئوية للتجذير ومتوسط عدد الجذور وطولها (سم) لافرع نبات Lisianthus خارج الجسم الحي بعد اربعة اسابيع من زراعتها على وسط MS.

NAA			IBA			
متوسط طول الجذر	متوسط عدد الجذور	التجذير (%)	متوسط طول الجذر	متوسط عدد الجذور	التجذير (%)	تراكيز منظمي النمو
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
1.2	0.6	10	0.8	2.5	30	0.5
1.5	1.6	20	2.5	5.5	70	1.0
1.0	1.3	10	1.3	2.3	20	2.0
0.31	0.34	9.2	0.27	1.4	15.3	L.S.D.0.05

وتتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه [18] في تجذير نبات Lisianthus صنف Griseb وكذلك [5]. يلعب الاوكسين IBA دوراً مهماً في تجذير أفرع نبات Lisianthus والذي أعطى اعلى نسبة تجذير واعلى متوسط جذور. تؤدي الاوكسينات دوراً رئيسياً في تجذير الافرع وتختلف فيما بينها من حيث فعاليتها في احداث التأثير الفسلجي المطلوب ويعتمد التأثير الذي تحدثه على نوع النبات والتركيز المستعمل فضلاً عن مستويات الأوكسين الداخلية في النسيج النباتي[19].

شكل (5): تجذير افرع نبات Lisianthus بعد اربعة أسابيع من الزراعة في وسط حاوي على 1.0 ملغم/لتر IBA.

تأثير تراكيز مختلفة من املاح MS في تجذير الافرع

اتصفت قابلية الافرع لانتاج الجذور في وسط MS بنصف القوة وربع القوة بأنها ضعيفة وقليلة، وقصيرة، وكلاهما يختلفان معنوياً عن وسط MS كامل القوة، حيث أعطى الوسطين الحاويين على املاح MS بنصف و ربع القوة على نسبة تجذير ومتوسط عدد جذور ومتوسط طول جذور اقل من وسط MS كامل القوة. قد يعود السبب في ذلك الى عدم حدوث التوازن الأمثل بين مستوى الكربوهيدرات والنتروجين (C/N ratio) في الانسجة، أذ ذكر [20] أن حدوث هذا التوازن ضروري في تحفيز تجذير الأفرع خارج الجسم الحي.

جدول (4): تأثير تراكيز مختلفة من املاح MS في تجذير الافرع بوجود 1.0 ملغم /لتر من IBA بعد اربعة اسابيع من نقلها الى وسط MS بقوى مختلفة.

قوة أملاح MS	تجذير (%)	متوسط عدد الجذور	متوسط طول الجذر(سم)
قوة كاملة	**70**	**5.5**	**2.5**
نصف القوة	**30**	**1.8**	**1.6**
ربع القوة	**20**	**0.9**	**1.6**
L.S.D 0.05	**9.5**	**0.29**	**0.33**

مرحلة الاقلمة

دلت النتائج الموضحة في جدول (5) ان لوسط الزراعة تأثيراً واضحاً في نسبة نجاح النبيتات المتأقلمة اذ ارتفعت نسبة نجاحها الى 90%عند استعمال الوسط المكون من التربة المزيجية والبتموس بنسبة (1:2) في حين كانت اقل نسبة لنجاح الاقلمة في الوسط المكون من البتموس فقط بلغت 20%. ربما يعود سبب زيادة نجاح الاقلمة في وسط التربة المزيجية والبتموس بنسبة 1:2 كون البتموس يوفر مسامية جيدة مع قابلية احتفاظ بالرطوبة والعناصر الغذائية للوسط مما يسمح بأنتشار ونمو الجذور اضافة الى ما توفره التربة المزيجية من صرف جيد، اما النسبة المئوية الواطئة للبقاء التي تم الحصول عليها من الاقلمة عند الزراعة في البتموس فقط ربما تعود الى رداءة التهوية واحتفاضها بالماء بمقداراكثر بكثير من احتياج النبيته مما ادى الى هلاكها [21].

جدول (5): النسبة المئوية لنجاح النبيتات المؤقلمة Lisianthus الناتجة عن الزراعة النسيجية في وسطي التربة المزيجية والبتموس بنسب مختلفة.

الوسط (تربة مزيجية: بتموس)	نسبة النجاح (%)
(0:1)	**80**
(1:0)	**20**
(1:1)	**70**
(2:1)	**60**
(1:2)	**90**

ومن الجدير بالذكر بأن من احد اسباب نجاح الاقلمة هو غسل جذور النبيتات من بقايا الوسط الغذائي تحت الماء الجاري والذي كان له الاثر في تقليل الاصابة بالمسببات المرضية، فضلا عن ذلك وضعها في الماء لمدة أسبوع مع التبديل المستمر للماء له دوراً كبيراً في نمو الجذور وهذا ما أكده [22]. وان أضافة مبيد فطري الى ماء السقي كان له أثره في تقليل الأصابة بالفطريات بشكل كبير [23].

شكل (6): نباتات Lisianthus مؤقلمة ونامية تحت ظروف البيت الزجاجي

المصادر

1. Liao, L., Lin, Y., Huang, K. and Chen, W. (2001). Vase life of cut *Eustoma* Flowers and aluminum sulfate. Bot. Bull. Acad. Sin. 42: 35-38.
2. Schochw, M., Tjosvold, S.A. and Ploeg, A. T. (2004). Host status of Lisianthus Mariachi lime green for three species of root-knot nematodes. Hort Science. 39(1): 120-123.
3. Harbaugh, B. K. (1995). Flowering of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) shinn. Cultivars Influenced by photoperiod and temperature. Hort. Science. 30 (7): 1375–1377.
4. Farina, E. and Ruffoni, B. (1993). The effect of temperature regimes on micropropagation efficiency and field performance of *Eustoma grandiflorum*. Acta Horticulturae. 337:73-80. (Abst).

5. Paek, K. Y. and Hahn, E. J. (2000). 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. 36:128-132.

6. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Phyiol. Plant. 15:473-497.

7. العقيلي، صالح رشيد، محمد سامر الشايب. (1998). أستخدام البرنامج الاحصائي SPSS، مطبوعات الجامعة، دار الشرق للطباعة، صفحة 358.7

8. Skoog, F. and Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro* Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-131.

9. Gumuscu, A., Cocu, S., Uranby, S., Ipek, A., Caliskan, M. and Arslan, N. (2008). *In vitro* Micro-propagation of endangetred ornamental plant *Neotchihatchewia isatidea* (Boiss.) Rauschert. Afric. J. of Bio. 7(3): 234-238.

10. المؤمن، هديل مكي حبيب (2008). اكثار نبات الصبار *Aloe vera* خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير، كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد، جمهورية العراق.

11. Negrutiu, I. and Jacobs, M. (1978). Restoration of the morphogentic capacity in long term callus cultures of *Arabidopsis thaliana, Z.* Pflanzen Physiol. 90: 431-441.

12. الهاشمي، منارهاشم يوسف. (1998). اكثار نبات المكنوليا *Magnolia grandiflora* L. بطريقة زراعة الأنسجة. رسالة ماجستير، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، جمهورية العراق.

13. Nhut, D. T., Tam N. T. D., Luan, V. Q., Thien, N. Q., Miuh N. T., Xuan Du T. and Bui Van Le (1996). Standerization of *in vitro* Lily (*Lilium spp*.) Plantlets for Propagation and Bulb formation. Dalta Institute of Biology, Hochi. City, Vietnam.

14. الرفاعي، عبد الرحيم توفيق وسمير عبد الرزاق الشوبكي . (2007). زراعة الانسجة والاكثار الدقيق للنبات، المكتبة المصرية للطباعة والنشر، الطبعة الاولى، كلية الزراعة، جامعة المنيا، جمهورية مصر العربية.

15. عبداللطيف، سوسن عبدالله . (2006). دراسة فسلجية في انتاج وخزن ازهار Lisianthus *(Eustoma grandiflorum)*. اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد، جمهورية العراق.

16. ابراهيم، انتصار رزاق . (2006). تأثير سماد ال Agrotonic - والماء الممغنط وموعد الزراعة في النمو الخضري والزهري وانتاج بعض الصبغات الكاروتينويدية لنبات الجعفري *Tagetes erecta* L. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد، جمهورية العراق.

17. عبد القادر، فيصل؛ فهيمة عبد اللطيف؛ أحمد شوقي؛ عباس ابو طبيح وغسان الخطيب . (1982). علم فسيولوجيا النبات. مديرية دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جمهورية العراق.

18. Kunitake, H., Nakashima, T., Mori, K., Tanaka, M. and Mii, M. (1995). 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.

19. Hartmman, H.T., Kester, D. E., Davies., F. T. and R.L. Geneve. (1997). Plant Propagation: Principles and Practice. 6 td ed .Prentice-Hall Internation Editions, USA.

20. George, E. F., Michael, A. H. and G. D. Klerk. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. 3 rd Edition. Springer, Netherlands. P. 182.

21. Ibrahim, K. M., and Majeed, S. H. (2001). The Nurseries. A textbook for technical institutes. Institution of Technical Education. Iraq.

22. Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-166.

23. Tisserat, B. (1981). Date palm tissue culture. U.S. Department of Agriculture, AATT-W. 17: 1-50.