الأكثار الدقيق وأنتاج الكريمات من نبات الكلاديولس صنف Oscar خارج الجسم الحي

Micropropagation and Cormels Production in *Gladiolus spp*. Var. Oscar

كاظم محمد ابراهيم ، طارق علي العاني* ، مائدة حسين محمد

قسم التقانة الإحيائية/ كلية العلوم/ جامعة النهرين
*قسم علوم الحياة/ كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
** المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية

Kadhim M. Ibrahim , Tarik A. AL- Ani* , Maeda H. Mohammad**

Dept. of Biotechnology/ College of Science/ AL-Nahrain University
*Dept. of Biology/ College of Science for Women/ Baghdad University
**Iraqi Center of Cancer and Medical Genetic Researches \ AL- Mustansyria University

المستخلص :

استخدمت تقنية زراعة الأنسجة في الأكثار الدقيق لنبات الكلاديولس *Gladiolus spp* صنف Oscar للأجزاء النباتية (البراعم الإبطية للحوامل الزهرية ، البراعم الإبطية للكورمات والكريمات) . بهدف وضع برنامج متكامل لإكثار النبات نسيجياً وأنتاج الكريمات على مدار السنة . تضمن البحث عدة تجارب شملت تأثير تراكيز مختلفة من السايتوكاينين البنزل ادنين Benzyl adenine (BA) والكاينتين Kinetin (Kin) والتداخل بين الـ BA والنفثالين حامض الخليك Naphthalene acetic acid (NAA) في نشوء الأفرع ، دراسة تأثير الـ BA في تضاعف الأفرع ، دراسة تأثير الـ NAA في تجذير الأفرع وللمدد الزمنية 30، 40 و50 يوماً باستخدام الوسط الغذائي MS (Murashige وSkoog, 1962) . كما درس دور الوسط الزراعي (بتموس فقط، بتموس: رمل ورمل فقط) في نجاح النبيتات أثناء عملية الأقلمة . اظهرت النتائج ان اضافة الـ BA الى الوسط الغذائي ماراشيج و سكوج , 1962 (MS) بتركيز 2.0 ملغم/ لتر قد اعطى افضل استجابة لنشوء الزروعات من البراعم الإبطية للحوامل الزهرية بلغ معدل اطوال الافرع فيها 2.5 سم ، بينما اعطى التركيز 0.05 ملغم NAA /لتر و0.4 ملغم BA/لتر افضل استجابة لنشوء البراعم الابطية للكورمات بلغ معدل اطوالها 7.4 سم . واعطى التركيز 1.0 ملغم Kin/لتر افضل استجابة مع اعلى معدل لاطوال الأفرع (6.5 سم) للكريمات. حصل اعلى معدل لعدد الأفرع واطوالها في مرحلة التضاعف عند التركيز 0.75 ملغم BA /لتر لكل من البراعم الابطية للحوامل الزهرية والبراعم الابطية للكورمات عند التركيز 0.5 ملغم/لتر للكريمات . واعطى التركيز 1.0 ملغم NAA /لتر أعلى استجابة في عدد الجذور واطوالها لكافة الاجزاء المدروسة. كما لوحظ زيادة النسبة المئوية للتجذير ، عدد واطوال الجذور بزيادة المدة الزمنية كما اظهرت النتائج تكوين الكريمات بعد 50 يوماً من مرحلة التجذير وبنسبة 100% ولجميع الأجزاء

المدروسة . بعدها نقلت النبيتات المكثرة الى وسط البتموس والذي ساهم في نجاح النبيتات مقارنة بالاوساط المدروسة الاخرى .

Abstract:

Plant tissue culture techniques are used for the micropropagation of *Gladiolus*, Oscar variety, using axillary buds of the flower stalks, axillary buds of corms and cormels. It was aimed to design production program for micropropagation and cormels production all year round. This work included many experiments. The effect of Benzyl adenine (BA) and Kinetin (Kin) and the interaction between BA and Naphthalene acetic acid (NAA) on shoot proliferation, the effect of BA on shoot multiplication, the effect of NAA on rooting after 30, 40 and 50 days, were studied. The role of the composed (Peatmoss only, Peatmoss: sand, sand only) in plantlet survival during acclimatization was also studied. Results showed that BA supplemented to the medium at 2.0 mg\l induced shoot proliferation from axillary buds of flower stalks, giving an average shoot height of 2.5 cm. while reached 7.4 cm. in shoots induced from axillary buds of corms on a combination of 0.05 mg\l NAA and 0.4 mg\l BA. In cormels, the best response occurred at concentration of 1.0 mg\l Kin giving average shoot length of (6.5 cm.). Maximum average of shoot number and length at the multiplication stage occurred at 0.75 mg\l BA in axillary buds taken from both flower stalks and corms, while at 0.5 mg\l in cormels. NAA at 1.0 mg\l achieved the highest response in root number and length for all studied explants. Rooting percent, number and root length increased over time. Cormels formed 50 days after rooting reaching 100% cormels formation on all plantlets regenerated from the different explants under investigation. Peatmoss was found the best among the three tested media in sustaining plantlets survival.

المقدمة :

يعد نبات الكلاديولس *Gladiolus spp* أحد أزهار القطف المهمة في العالم. ينتمي إلى العائلة السوسنية (Iridaceae) والتي تعود إلى ذوات الفلقة الواحدة . يمتاز النبات بجمال أزهاره الصالحة للقطف ولانتظامها على محور الشمراخ الزهري، لذلك أعتبر نبات الكلاديولس في مقدمة النباتات التي تزرع لانتاج أزهار القطف التجارية [1] . ويعد الإكثار الدقيق (Micropropagation) من أهم تطبيقات زراعة الأنسجة النباتية لغرض الإنتاج الواسع Mass (production) من النباتات إذ يوفر إمكانية إنتاج أعداد كبيرة من النباتات المتجانسة وخلال وقت قصير بدءاً بجزء صغير جداً من النبات الام . وظفت هذه التقنية لإكثار العديد من نباتات الزينة ومنها الكلاديولس [2] ، اذ لاقت النباتات المكثرة نسيجيا طلباً متزايداً في الأسواق العالمية ومنها الكلاديولس لما تمتاز به من التجانس (Uniformity). ان أول من كثر نبات الكلاديولس خارج الجسم الحي [3] باستعمالهم سيقان النورة الفتية. وفي دراسة اخرى [4] استعملت فيها القمة النامية بطول 0.5-0.7 ملم والبراعم الابطية في أكثار 22 صنفا من نبات الكلاديولس *Gladiolus hortulans* L. . كما بين [5] امكانية الحصول على أفرع نامية من البراعم الابطية لنبات الكلاديولس على وسط MS المجهز بـ 0.5 ملغم Kin /لتر . وأكد [6] اهمية السايتوكاينينات في نشوء الافرع عندما أضاف السايتوكاينين BA بتركيز 3 ملغم/لتر الى وسط MS بهدف زراعة البراعم الابطية للكورمات .

واشارت دراسات عديدة الى أهمية السايتوكاينين في نشوء الافرع وتضاعفها ، اذ لاحظ [7] ان وجود الـBA بتركيز 1 ملغم/لتر في الوسط الغذائي MS بنصف القوة لبراعم كورمات صنفي الكلاديولس Forest Fire و Elvira ادى الى زيادة في عدد الأفرع . وبين [8] بان زراعة سيقان صنفي الكلاديولس Priscilla و Summer Rose ادى الى

حصول تضاعف عالي في عدد الأفرع عند اضافة BA بتراكيز 0.1-0.5 ملغم/لتر الى الوسط الغذائي MS . كما تمكن [9] من مضاعفة أفرع نبات الكلاديولس للصنفين Malang Stripe و White Friendship على وسط MS مضافا اليه الـ BA بالتراكيز 0.05، 0.10، 0.20 أو 1.00 ملغم/لتر .

واشار [10] الى ان انتاج الكورمات والكريمات لنبات الكلاديولس قد تم عند اضافة تراكيز مختلفة من الـNAA ، حيث أعطت النبيتات معدل 10 كريمات بوزن 13.2 غم بدون NAA و19.8 كريمات بوزن 22 غم عند أضافة الـ NAA بتركيز 0.5 ملغم/لتر . وذكر [8] ان أفرع صنفي الكلاديولس Priscilla وSummer Rose جذرت على وسط MS المجهز بـ 0.1-0.5 ملغم NAA /لتر التي تكونت بعد 2-4 أسابيع وكريمات حيث كون الصنف Priscilla 5.6 كريمات/نبات، بينما أعطى صنف Summer Rose 10 كريمات/نبات . واشار [3] الى أمكانية نقل النبيتات المجذرة لنبات الكلاديولس صنف Eurovision الى أصص تحوي 2 حجم رمل و1 حجم بتموس والتي غطيت في الأسبوع الأول باكياس بلاستيكية . وفي دراسة لنفس الصنف قام بها [11] نقلت فيها النبيتات المجذرة الى أصص تحوي 1 حجم بتموس و1 حجم رمل داخل البيت الزجاجي على درجة حرارة 25± 1م .

وفي هذا البحث تم التوجه إلى الإكثار الدقيق لإحد أصناف الكلاديولس هو Oscar كونه من ازهار القطف المهمة تجارياً، ثم عمل برنامج متكامل لإكثار النبات نسيجياً ابتداءاً من اختيار الجزء النباتي مروراً بإنتاج الكريمات وانتهاءاً بأقلمة الشتلات آملين أن تدخل نتائج هذا المشروع الحيز التجاري في إنتاج الكورمات وبيعها بدل استيرادها سنوياً .

المواد وطرائق العمل :

اختيرت حوامل زهرية في مرحلة تفتح الزهيرة الأولى القريبه من قاعدة الشمراخ الزهري بعد نقلها إلى المختبر . اسؤصلت البراعم الإبطية بطول 1سم . أما الكورمات المستوردة فقد غسلت بالماء الجاري لمدة 15-20 دقيقة للتخلص من الأتربة والمواد العالقة بها ، ثم أزيلت الأوراق الحرشفية التي تغلف الكورمة وفصلت البراعم ألابطية منها . وكذلك تم فصل الكريمات والتي كانت موجودة أصلاً في قاعدة الكورمات بوزن 0.2غم تقريبا ً.

غمرت الأجزاء النباتية بالكحول الاثيلي (C2H5OH) تركيز 70% لمدة دقيقة واحدة ، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ، بعدها عقمت بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (NaOCl) بتركيز 2% لمدة 10 دقائق ، ثم غسلت الأجزاء النباتية بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات .

درس تأثير (BA) في مرحلة نشوء الزروعات للبراعم الابطية للحوامل الزهرية ، البراعم الإبطية للكورمات والكريمات وبتراكيز 0.0، 0.5، 1.0، 1.5، 2.0، 2.5 أو 3.0 ملغم/لتر وبواقع 5 مكررات . كما درس تأثير التداخل بين BA و NAA في مرحلة نشوء الزروعات للبراعم الابطية للحوامل الزهرية ، البراعم الإبطية للكورمات والكريمات ، اذ كانت تراكيز BA 0.0، 0.2، 0.4 أو 0.6 ملغم/لتر، أما تراكيز NAA فكانت 0.0، 0.05، 0.1 أو 0.2 ملغم/لتر وبواقع 5 مكررات. كما درس تأثير Kin في مرحلة نشوء الزروعات للكريمات وبتراكيز 0.0، 0.5، 1.0، 2.0 أو5.0 ملغم/لتر وبواقع 5 مكررات وباستخدام الوسط الغذائي MS [12] .

حضنت الزروعات في الحاضنة (Incubator) على درجة حرارة 25م وشدة إضاءة 1000 لوكس ولمدة 16 ساعة/يوم . أخذت القياسات المتعلقة بالاجزاء الخضرية بعد 30 يوم من الزراعة. استخدمت النموات الناتجة من مرحلة نشوء الزروعات في تجارب التضاعف الخضري وبطول 3.0 سم حيث زرعت على نفس مكونات وسط نشوء الزروعات مع اختلاف تراكيز منظمات النمو . اذ درس تأثير الـ BA في التضاعف الخضري للزروعات وبالتراكيز 0، 0.25، 0.5، 0.75 أو1.0 ملغم/لتر ولجميع الأجزاء النباتية ، وبمعدل 5 مكررات . حضنت الزروعات تحت نفس الظروف المشار اليها سابقا وأخذت القياسات بعد 30 يوماً من الزراعة والتي تضمنت النسبة المئوية للتضاعف وعدد الفروع وأطوالها . نقلت النموات الناتجة من مرحلة التضاعف الخضري بطول 4-8 سم إلى أوساط التجذير لدراسة تأثير NAA بتراكيز 0.0، 0.1، 0.3، 0.5، 1.0، 1.5 أو 2.0 ملغم/لتر في تجذير الافرع . حضنت الزروعات تحت نفس الظروف السابقة وأخذت القياسات بعد 30، 40 و50 يوماً من الزراعة . تم حساب النسبة المئوية للتجذير وعدد الجذور وأطوالها . أستعمل البتموس (Peat moss) وتربة ضفاف الأنهر (تربة مزيجية) في أصص بلاستيكية وبمعدل 10 مكررات ولكل من الأجزاء المدروسة حيث أحتوى الوسط الأول على تربه مزيجية فقط والثاني على بتموس فقط، أما الوسط الثالث فقد أحتوى على خليط من تربة مزيجية وبتموس بنسبة 1:1 (حجم/حجم) . مع مراعاة سقي النبيتات بالماء الحاوي على المبيد الفطري Benomyl بتركيز 0.6 غم/لتر . سجلت النسبة المئوية للنجاة (Survival) أسبوعيا.

النتائج والمناقشة :

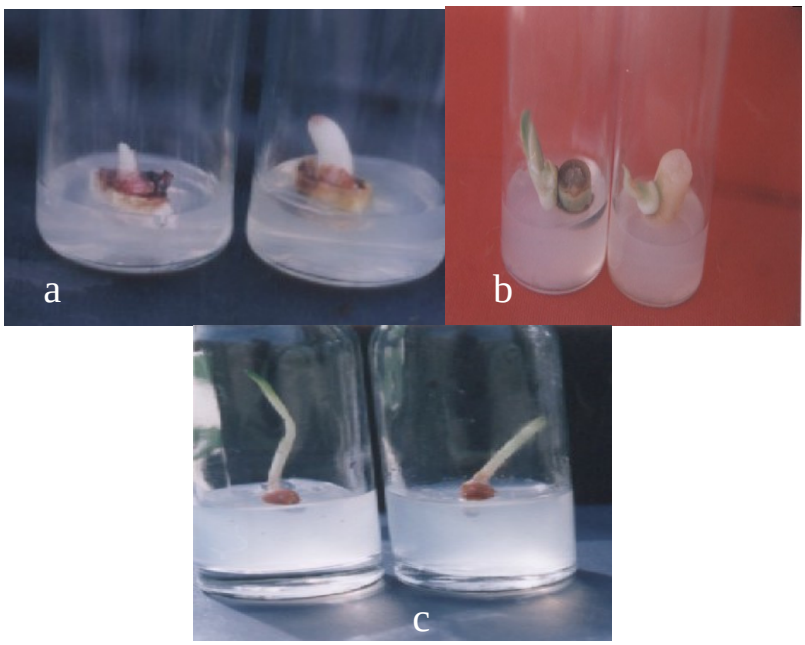
البراعم الأبطية للحوامل الزهرية Axillary buds of flower stalks

يبين الجدول (1) ان الوسط المجهز بـ 2.0 ملغم BA /لتر اعطى أعلى معدل للإستجابة لتكوين الزروعات (30.0%) مع أعلى اطوال للأفرع بلغ 2.5 سم و(صورة 1-a) بالمقارنة مع معاملة السيطرة التي لم تستجب .

من خلال نتائج هذهِ الدراسة يتضح إن وجود الـ BA في الوسط الغذائي لهُ تأثير في تحفيز البراعم الإبطية لأفرع الكلاديولس المزروعة والذي قد يرجع إلى دور السايتوكاينتين في تشجيع نمو وتكوين البراعم والأفرع وذلك لدورهُ المعروف في تحفيز أنقسام وتمايز الخلايا عن طريق تنشيط بناء الحامض النووي DNA ومن ثم تكوين RNA فالبروتينات والانزيمات وبالتالي أنقسام النواة والخلايا [13] .

جدول (1): تأثير تراكيز مختلفة من السايتوكاينين BA في النسبة المئوية لنشوء الزروعات أطوال الأفرع عند نشوء الزروعات من البراعم الإبطية للحوامل الزهرية لنبات الكلاديولس صنف Oscar .

BA (ملغم/لتر)	النسبة المئوية لنشوء الزروعات	معدل اطوال الافرع (سم)
0.0	0.0	0.0
0.5	10	0.4
1.0	20	1.6
1.5	20	2.1
2.0	30	2.5
2.5	20	1.2
3.0	10	0.2
المعدل	*15.7*	*1.15*



صورة (1):

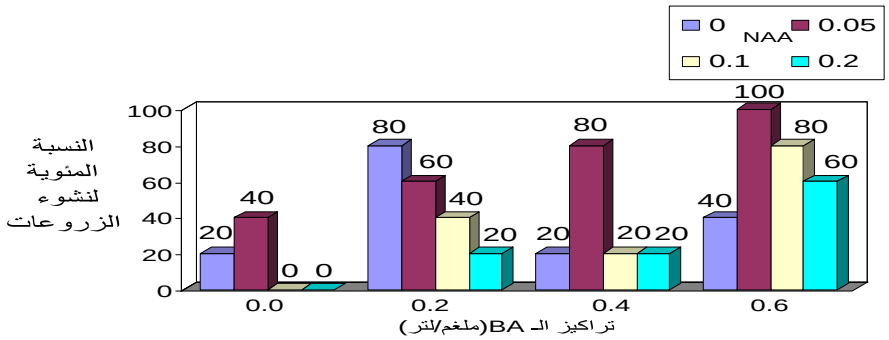
a. نمو البراعم الإبطية للحوامل الزهرية بعد مرور 10 أيام من الزراعة على الوسط الغذائيMS والمجهز بـ 2.0 ملغم/لترBA

b. نمو البراعم الإبطية للكورمات بعد مرور 10 أيام من الزراعة على الوسط الغذائي MS والمجهز بـ 0.6 BA و0.05 NAA.

c. نمو الكريمات بعد مرور 25 يوماً من الزراعة على الوسط الغذائي MS والمجهز بـ 1.0 ملغم/لتر من الـ Kin

البراعم الإبطية للكورمات Axillary buds of corms

تفوقت المعاملات 0.2، 0.4 و0.6 ملغم BA /لتر على معاملة المقارنة في زيادة النسبة المئوية لنشوء الزروعات للإستجابة بلغت (50، 35 ،70)% شكل (1) . وظهرت فروقات أيضا من تأثير مستويات الـNAA ، إذ تفوق التركيزين 0.05 و0.2 والتي تساوت معدلاتهما (40%) . تفوقت المعاملة 0.05 (70%) على معاملة المقارنة (40%) . وظهر من تداخل الـ BA والـNAA تفوق التداخلات (0.6، 0.05) ، (0.4، 0.05) ، (0.6، 0.05) ملغم/لتر على غيرها بلغت (100، 80 ، 80)% على التوالي ، بينما لم تعطِ التداخلات (0.0، 0.1) و(0.0، 0.2) ملغم/لتر اي استجابة صورة(1-b).



شكل (1): تأثير تراكيز مختلفة من الـ BA والـ NAA في النسبة المئوية لنشوء الزروعات للبراعم الإبطية للكورمات لنبات الكلاديولس صنف Oscar

ويوضح الجدول (2) تأثير الـ BA والـ NAA في أطوال الأفرع ، فقد أثر الـ BA بالتراكيز 0.2، 0.4 و0.6 في زيادة أطوال الأفرع مقارنة بالسيطرة ، ولم تظهر فروقات بين التركيزين 0.2 و0.4 ملغم/لتر وتفوقت المعاملة 0.6 ملغم/لتر في تأثيرها الايجابي على هذهِ الصفة.اما بالنسبة للـ NAA فقد اعطى التركيز 0.05 ملغم/لتر أعلى معدل لأطوال الأفرع بلغ 4.9 سم ، وأدت زيادة التركيز الى 0.1 و0.2 ملغم/لتر الى تثبيط النمو الطولي مقارنة بالسيطرة .

جدول (2): تأثير تراكيز مختلفة من الـ BA والـ NAA في أطوال الأفرع لنشوء الزروعات من البراعم الإبطية للكورمات لنبات الكلاديولس صنف Oscar

BA (ملغم/لتر)	تراكيز الـ NAA (ملغم/لتر)				المعدل
	0.0	0.05	0.1	0.2	
0.0	0.4	1.6	0.0	0.0	0.50
0.2	5.8	2.2	2.2	1.6	2.95
0.4	2.0	8.4	1.2	0.6	3.05
0.6	2.8	7.4	3.4	1.8	3.85
المعدل	2.75	4.90	1.70	1.00	

أعطى التداخل بين BA وNAA (0.4، 0.05) أعلى معدل لأطوال الأفرع بلغ 8.4 سم (صورة 1-b) ، ولم تعطِ التداخلات (0.0، 0.1) و(0.0، 0.2) ملغم/لتر أية استجابة. ويظهر من بيانات الجدول الى أن التراكيز العالية نسبياً من الـNAA بمفرده (0.1 و0.2 ملغم/لتر) أدت الى تثبيط نمو الأفرع وهذا مايؤكد أهمية وجود السايتوكاينين مع الاوكسين في الوسط الغذائي لزيادة التأثير . أن هذهِ النتائج تتفق مع [8] اللذان أشارا إلى ضرورة أضافة تراكيز مختلفة من الـ NAA والـ BA للبراعم الإبطية للكورمات عند إكثارهم أربعة أصناف من الكلاديولس .

الكريمات Cormels

أعطت الاجزاء النباتية المزروعة في الوسط المجهز بـ 1.0 ملغم/لتر أعلى معدل للإستجابة بلغ 50% والتي تفوقت على جميع التراكيز الاخرى ، بينما أعطى التركيز 5.0 ملغم/لتر من الـ Kin أقل معدل للإستجابة بلغ 20% ، أي إن زيادة تركيز الـ KIN الى 2.0 و5.0 ملغم/لتر أدت الى تقليل نشوء الفروع ولم يكن لهما تأثير في هذهِ الصفة مقارنة بالسيطرة جدول(3).

كما أظهرت النتائج ان أضافة الـ Kin بتركيز 1.0 ملغم/لتر اعطى اعلى معدل لاطوال الافرع مقارنة بالتراكيز الاخرى ، إذ أعطت الفروع النامية في الوسط المجهز بهذا التركيز أعلى معدل لأطوال الأفرع بلغ 6.5 سم (صورة - c-1) ، وأقل معدل لأطوال الأفرع ظهر في التركيز 5.0 ملغم/لتر حيث بلغ 0.3 سم . وبذلك فان زيادة تركيز السايتوكاينين الى أكثر من 1.0 ملغم/لتر أدت الى تقليل أطوال الأفرع الناتجة. ادت هذهِ الزيادة الى تقليل دور الاوكسين المتواجد داخل الأجزاء المزروعة والمسؤول عن استطالة الخلايا باتجاه المحور الطولي وبالتالي تقليص طول الأفرع الناتجة [14] .

جدول (3): تأثير تراكيز مختلفة من السايتوكاينين Kin في النسبة المئوية لنشوء الكريمات وأطوال الأفرع الناتجة من الكريمات لنبات الكلاديولس صنف Oscar

Kin (ملغم/لتر)	النسبة المئوية لنشوء الكريمات	معدل اطوال الافرع (سم)
0.0	30	1.1
0.5	40	3.1
1.0	50	6.5
2.0	30	2.3
5.0	20	0.3
المعدل	34	2.67

مرحلة التضاعف Multiplication Stage

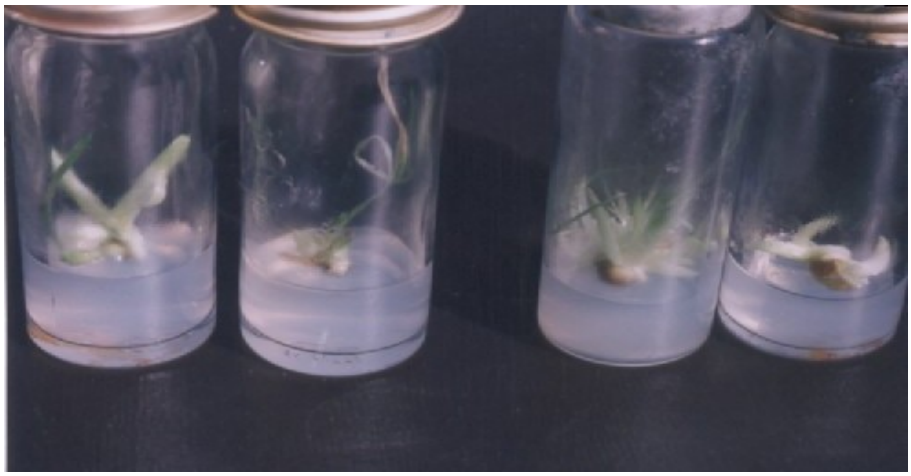
تأثير السايتوكاينينات في تضاعف الأفرع للبراعم الإبطية للحوامل الزهرية

أعطت الافرع المزروعة في الوسط المجهز بـ0.75 ملغم BA /لتر أعلى معدل لتضاعف الأفرع بلغ 60% مقارنة مع معاملة السيطرة التي لم تظهر اية استجابة جدول(4) وصورة (2) .

وبينت النتائج وجود فروقات بين مستويات BA حيث اعطى الوسط المجهز بـ 0.75 ملغم/لتر أعلى معدل لعدد الأفرع بلغ 2.4 فرعاً مقارنة مع معاملة السيطرة التي لم تظهر استجابة.

جدول (4): تأثير تراكيز مختلفة من الـ BA في النسبة المئوية لتضاعف الافرع وعدد وأطوال الأفرع بعد 30 يوماً من نقلها الى وسط التضاعف لنبات الكلاديولس صنف Oscar

BA (ملغم/لتر)	النسبة المئوية لتضاعف الأفرع	عدد الأفرع	أطوال الأفرع (سم)
0.0	0.0	0.0	0.0
0.25	20	0.8	0.4
0.5	40	1.8	2.0
0.75	60	2.4	1.8
1.0	20	1.0	0.4
المعدل	28	1.20	0.94



صورة (2): تضاعف الأفرع بعد 30 يوماً من النقل الى وسط MS والمجهز بـ 0.5 ملغم/لترBA

واظهرت مستويات الـ BA فروقات في معدل أطوال الأفرع ، حيث أعطت الأفرع النامية في الوسط المجهز بـ0.5 ملغم/لتر أعلى معدل لأطوال الأفرع بلغ 2.0 سم تلتها المعاملة بتركيز 0.75 ملغم/لتر (1.8 سم) مقارنة مع معاملة السيطرة التي لم تظهر استجابة. إن زيادة تركيز الـ BA في الوسط الغذائي أدت إلى توقف النمو الطولي للافرع ، وربما أدت هذه الزيادة إلى تقليل دور الاوكسين داخل الأفرع والمسؤول عن استطالة خلايا الساق بإتجاه المحور الطولي ، وعليه ينصح بإضافة الـ BA إلى الأوساط الغذائية في الإكثار الدقيق بتراكيز مناسبة ، وهذا يتفق مع ماأكده [15] الذي أشار إلى أن الـ BA من أكثر السايتوكاينينات تأثيراً وأرخصها ثمناً ، مما يقلل كلف الإكثار خارج الجسم الحي .

البراعم الإبطية للكورمات Axillary buds of corms

يوضح الجدول (5) وجود فروقات في النسبة المئوية للاستجابة عند إضافة تراكيز مختلفة من الـ BA (0.25، 0.5 و0.75) ملغم/لتر مقارنة بالسيطرة ، اذ أعطت الأجزاء النباتية المزروعة في الوسط المجهز بـ 0.75 ملغم/لتر أعلى معدل للتضاعف بلغ 80% ، مقارنة بمعاملة السيطرة التي اظهرت أقل المعدلات (20%) . وبينت النتائج وجود فروقات لمستويات الـ BA في عدد الأفرع وأطوالها. إذ تفوق التركيز 0.75 ملغم/لتر على بقية التراكيز في معدل عدد الأفرع وأطوالها بلغ 4.2 و8 .7 على التوالي مقارنة بالسيطرة والتي سجلت أقل معدل بلغ 0.8 و0.3 سم على التوالي . من خلال نتائج هذه الدراسة تبين ان لوجود الـ BA تأثيراً في تشجيع نمو وتضاعف البراعم الإبطية بتحررها من تأثير السيادة القمية التي تصنع الاوكسين والذي ينتقل نحو الاسفل ويثبط نمو البراعم [14] .

جدول (5): تأثير تراكيز مختلفة من الـ BA في النسبة المئوية لتضاعف للبراعم الابطية للكورمات وعدد وأطوال الأفرع بعد 30 يوماً من نقلها الى وسط التضاعف لنبات الكلاديولس صنف Oscar

BA(ملغم/لتر)	النسبة المئوية لتضاعف للبراعم الابطية للكورمات	عدد الأفرع	أطوال الأفرع (سم)
0.0	20	0.8	0.3
0.25	40	1.4	2.0
0.5	60	1.8	2.4
0.75	80	4.2	7.8
1.0	60	2.8	3.2
المعدل	52	2.20	3.148

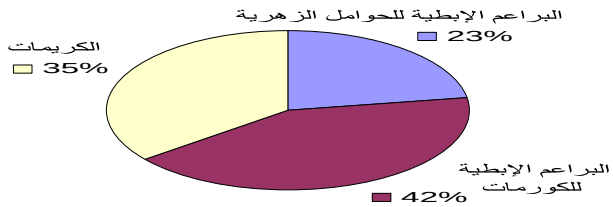
الكريمات Cormels

أعطت الأفرع المزروعة في الوسط المجهز بـ 0.5 ملغم/لتر أعلى معدل للتضاعف بلغ 80% مقارنة بمعاملة السيطرة والتي لم تظهر اي استجابة جدول(6). وبينت النتائج وجود فروقات لمستويات الـ BA في عدد الأفرع وأطوالها. إذ تفوق التركيز 0.5 ملغم/لتر على بقية التراكيز في معدل عدد الأفرع وأطوالها بلغ 2.8 و 3.2 سم على التوالي مقارنة بالسيطرة والتي لم تظهر اية استجابة. إن إرتفاع تراكيز الـ BA في الوسط الغذائي يؤدي إلى إنخفاض في معدل أطوال التفرعات ، لإن إمتصاصه من قبل الأفرع أدى إلى تقليل دور الأوكسين في داخل التفرعات والأخير مسؤول عن إستطالة الخلايا ومن ثم تقليل أطولها [16] .

جدول (6): تأثير تراكيز مختلفة من الـ BA في النسبة المئوية لتضاعف الكريمات وعدد وأطوال الأفرع الناتجة من الكريمات بعد 30 يوماً من نقلها الى وسط التضاعف لنبات الكلاديولس صنف Oscar

BA (ملغم/لتر)	النسبة المئوية لتضاعف الكريمات	عدد الأفرع	أطوال الأفرع (سم)
0.0	0.0	0.0	0.0
0.25	40	1.8	1.5
0.5	80	2.8	3.2
0.75	60	2.0	2.2
1.0	40	0.8	0.8
المعدل	44	1.25	1.55

أما بالنسبة الى تأثير الأجزاء النباتية المدروسة (البراعم الإبطية للحوامل الزهرية ، البراعم الإبطية للكورمات والكريمات) فقد أشارت النتائج في الشكل (2) الى زيادة نسبة الاستجابة في مرحلة التضاعف للبراعم الإبطية للكورمات التي وصلت الى 42% عن باقي الأجزاء التي بلغت 35% للكريمات و23% للبراعم الإبطية للحوامل الزهرية.

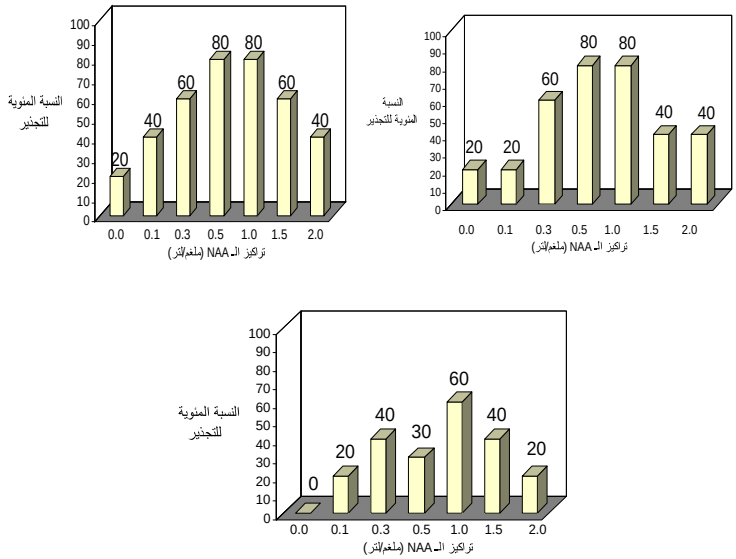


شكل (2): تأثير نوع الجزء النباتي المدروس في النسبة المئوية لاستجابتها على التضاعف لنبات الكلاديولس صنف Oscar

مرحلة التجذير Rooting Stage

تأثير الأوكسينات في تجذير الأفرع للبراعم الإبطية للحوامل الزهرية

يوضح الشكل(3)(a، b وc) وجود فروقات بين مستويات الـ NAA في التأثير على التجذير، فقد أظهر التركيز 1.0 ملغم/لتر أعلى أستجابة (80%) مقارنة بمعاملة السيطرة (20%)صورة(3) وللمدد الثلاث .



شكل(3): (a، b وc): تأثير الأوكسين NAA في النسبة المئوية لتجذير الأفرع الناتجة من البراعم الإبطية للحوامل الزهرية بعد(30، 40 ،50) يوماً (من اليمين الى اليسار) من زراعتها على وسط MS لنبات الكلاديولس صنف Oscar

صورة (3): تكوين الجذور بعد 40 يوماً من النقل الى وسط MS والمجهز بـ 1.0 ملغم/لترNAA

جدول (7): تأثير الأوكسين NAA في معدل عدد الجذور الناشئة على الأفرع الناتجة من زراعة البراعم الإبطية للحوامل الزهرية بعد نقلها الى وسط التجذير بعد ثلاث مدد زمنية لنبات الكلاديولس صنف Oscar

المدة الزمنية (يوم)	NAA (ملغم/لتر)							المعدل
	0.0	0.1	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0	
30	0.0	0.16	0.14	0.2	0.27	0.42	0.08	0.18
40	0.26	0.5	0.7	0.9	0.68	0.4	0.26	0.53
50	0.5	0.86	0.9	1.5	1.8	1.24	0.6	1.06
المعدل	0.25	0.51	0.58	0.86	0.92	0.68	0.31	

أما بالنسبة الى تأثير المدد الزمنية فقد تفوقت المدة 50 يوماً على المدتين 30 و40 يوماً . وقد يعود السبب الى كون فرصة بادئات الجذور المتكونة في المراحل الأولى أكبر للتطور الى جذور، وبزيادة المدة الزمنية تزداد أعداد الجذور وتقوم بأمتصاص كميات أكبر من العناصر الغذائية الموجودة في الوسط . وبذلك فأن وجود الاوكسينات في الوسط الغذائي له دور مهم في تحفيز تكوين مبادئ الجذور من الأفرع ، إذ ان أنقسام خلايا مناشيء الجذور Root Primordia يعتمد على الاوكسين طبيعياً كان أو مضافاً ، أي ان التأثيرات الفسيولوجية لوجود الاوكسينات تكمن في زيادة أنقسام الخلايا وأنها تحول الخلايا البالغة المتمايزة الى خلايا مرستيمية وبذلك يتكون مرستيم الجذر العرضي الذي تنقسم خلاياه لتكون الجذور [17] .

كما تبين نتائج الجدول (7) وجود فروقات بين مستويات NAA في معدل عدد الجذور، إذ أعطى التركيز 1.0 ملغم/لتر أعلى معدل بلغ 7.53 جذر مقارنة بمعاملة السيطرة (0.46 جذر). وتفوقت المدة 50 يوماً على المدتين 30 و40 يوماً، وبذلك يلاحظ ان زيادة مدة التجذير أدت الى زيادة في معدل عدد الجذور . إن هذه النتائج تتفق ، مع ماأشار اليه [8] على إن أفضل أستجابة للتجذير كانت باضافة 1.0 ملغم/لتر NAA . بينما أشار آخرون الى أمكانية تجذير أفرع نبات الكلاديولس بإضافة تراكيز منخفضة من الـ NAA] .[3;8،9]

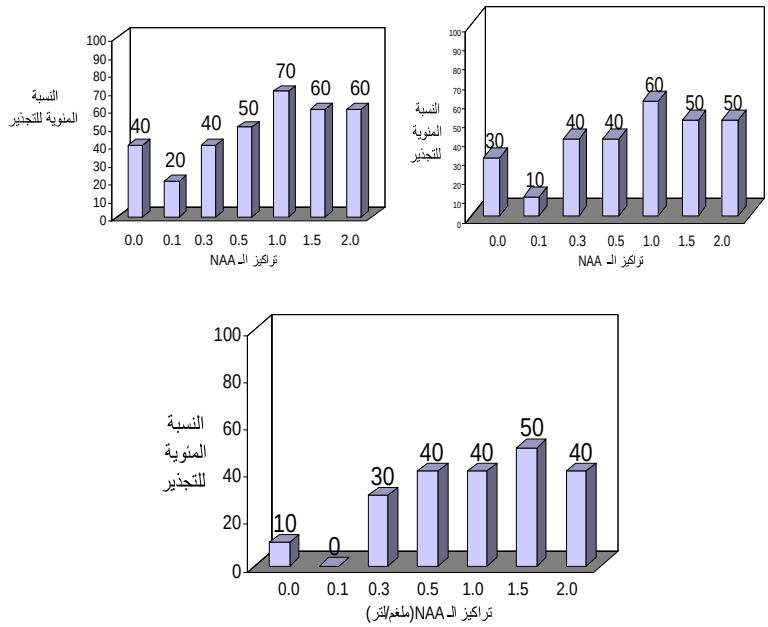
وفيما يخص معدل أطوال الجذور فقد أظهرت نتائج الجدول (8) وجود فروقات في مستويات الـ NAA اذ أعطى التركيز 1.0 ملغم/لتر أعلى معدل لأطوال الأفرع بلغ 0.92 سم مقارنة بمعاملة السيطرة التي أعطت أقل معدل بلغ 0.25 سم . وتفوقت المدة 50 يوماً على المدتين 30 و40 يوماً. لقد أظهرت النتائج ان هناك أختلافاً في عدد الجذور، أطوالها ونسبة التجذير فيها وقد يرجع السبب الى ان عملية نشوء الجذور تتأثر بتركيز ومستوى الاوكسين والسايتوكاينين الداخلي [13] .

جدول (8): تأثير الأوكسين NAA في معدل أطوال الجذور (سم) المتكونة على الأفرع الناتجة من زراعة البراعم الإبطية للحوامل الزهرية بعد نقلها الى وسط التجذير بعد ثلاث مدد زمنية لنبات الكلاديولس صنف Oscar

المدة الزمنية (يوم)	NAA (ملغم/لتر)							المعدل
	0.0	0.1	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0	
30	0.0	1.0	3.0	2.0	5.6	3.8	1.4	2.40
40	0.6	1.4	3.8	3.6	8.0	4.4	2.8	3.51
50	0.8	2.0	4.6	5.2	9.0	6.4	3.4	4.48
المعدل	0.46	1.46	3.80	3.60	7.53	4.86	2.53	

تأثير الأوكسينات في تجذير الأفرع للبراعم الإبطية للكورمات

يوضح الشكل(4)(a، b وc) وجود فروقات بين مستويات الـ NAA إذ أعطى التركيز 1.0 ملغم/لتر أعلى معدل للتجذير بلغ 56.6% مقارنة بالتركيز 0.1 ملغم/لتر التي أظهر أقل معدل بلغ 10%. وتفوقت المدة 50 يوماً على المدتين 30 و40 يوماً.



شكل (4): (a، b وc): تأثير الأوكسين NAA في النسبة المئوية لتجذير الأفرع الناتجة من البراعم الإبطية للكورمات بعد 30، 40 و50 يوماً (من اليمين الى اليسار) من نقلها الى وسط التجذير لنبات الكلاديولس صنف Oscar

جدول (9): تأثير الأوكسين NAA في عدد الجذور الناتجة من زراعة البراعم الإبطية للكورمات على وسط التجذير لنبات الكلاديولس صنف Oscar

المدة الزمنية	NAA (ملغم/لتر)							المعدل
(يوم)	0.0	0.1	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0	
30	0.04	0.00	0.16	0.18	0.38	0.30	0.28	0.19
40	0.22	0.12	0.36	0.28	0.72	0.62	0.60	0.42
50	0.40	0.30	0.70	0.78	1.40	1.00	0.84	0.77
المعدل	0.22	0.14	0.41	0.41	0.83	0.64	0.57	

وتبين نتائج الجدول (9) وجود فروقات بين مستويات الـ NAA في عدد الجذور، إذ تفوق التركيز 1.5ملغم/لتر (3.46 جذر) مقارنة بالتركيز 0.1 ملغم/لتر الذي أعطى أقل معدل لعدد الجذور بلغ 0.26. أما بالنسبة الى تأثير المدد الزمنية ، فقد تفوقت المدة 50 يوم على المدتين 30 و40 يوماً في معدل اعداد الجذور المتكونة.

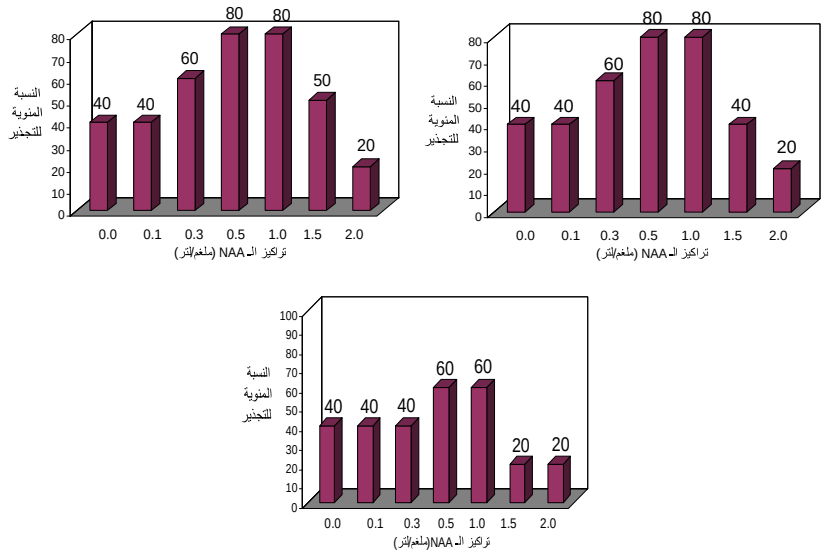
وأظهرت نتائج الجدول (10) وجود فروقات بين مستويات الـ NAA في معدل أطوال الجذور، إذ تفوق التركيز 1.0 ملغم/لتر (0.83 سم) مقارنة بالتركيز 0.1 ملغم/ لتر الذي أعطى أقل معدل بلغ 0.14 سم . وبذلك فأن تركيز الـ NAA قد أثر على عدد الجذور، اذ أزدادت مع زيادته الى مدى معين مع توقف أطوالها [8] .

جدول (10): تأثير الأوكسين NAA في أطوال الجذور (سم) الناتجة من زراعة البراعم الإبطية للكورمات على وسط التجذير لنبات الكلاديولس صنف Oscar

المدة الزمنية (يوم)	NAA (ملغم/لتر)							المعدل
	0.0	0.1	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0	
30	0.4	0.0	1.2	1.0	2.0	3.0	0.8	1.20
40	0.8	0.2	1.4	1.2	2.8	3.2	1.2	1.54
50	1.8	0.6	2.4	3.0	4.4	4.2	1.6	2.57
المعدل	1.00	0.26	1.66	1.73	3.06	3.46	1.20	

تأثيرالأوكسينات في تجذير الأفرع للكريمات

يوضح الشكل(5) (a، b وc) وجود فروقات جراء اضافة NAA حيث أعطى التركيزان 0.5 و1.0 ملغم/لتر أعلى معدل للتجذير بلغ 80%. بينما أعطى التركيز 2.0 ملغم/لتر أقل معدل بلغ 20%. وبذلك يلاحظ بأن التراكيز العالية من الاوكسين كانت ذات تأثير تثبيطي لعملية التجذير والذي قد يرجع الى الزيادة التي تحدث في بناء الأثلين في أنسجة الجذور وبالتالي حدوث تثبيط في نموها وتطورها [18] .



شكل (5): (a، b وc): تأثير الأوكسين NAA في النسبة المئوية لتجذير الأفرع للكريمات بعد 30، 40 و50 يوماً(من اليمين الى اليسار) لنبات الكلاديولس صنف Oscar

وتبين نتائج الجدول (11) وجود فروقات بين مستويات الـ NAA في عدد الجذور الناتجة من زراعة الكريمات فقد أعطى التركيز 0.3 ملغم/لتر أعلى معدل بلغ 5.46 جذراً والذي لم يختلف عن التركيز 1.0 ملغم/لتر (4.26 جذر) ، بينما أعطى التركيز 2.0 ملغم/لتر أقل معدل بلغ 0.40 جذراً.

جدول (11): تأثير الأوكسين NAA في عدد الجذور الناتجة من زراعة الكريمات على وسط التجذير لنبات الكلاديولس صنف Oscar

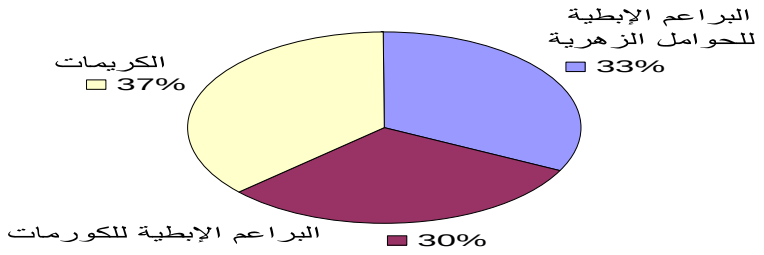
المدة الزمنية (يوم)	NAA (ملغم/لتر)							المعدل
	0.0	0.1	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0	
30	2.6	2.0	4.8	1.4	3.6	0.2	0.2	2.11
40	3.0	2.2	5.6	2.2	4.4	0.6	0.4	2.63
50	3.2	2.2	6.0	2.6	4.8	1.0	0.6	2.91
المعدل	2.93	2.13	5.46	2.06	4.26	0.60	0.40	

وبينت نتائج الجدول (12) تفوق التركيز 1.0 ملغم NAA /لتر في معدل اطوال الجذور بلغ 2.11 سم ، بينما أعطى التركيز 2.0 ملغم/لتر أقل معدل بلغ 2 .0 سم . وتفوقت المدة 50 يوم على المدتين 30 و40 يوم في معدل اطوال الجذور.

جدول (12): تأثير الأوكسين NAA في أطوال الجذور (سم) للكريمات على وسط التجذير خلال ثلاث مدد زمنية لنبات الكلاديولس صنف Oscar

المدة الزمنية (يوم)	NAA (ملغم/لتر)							المعدل
	0.0	0.1	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0	
30	0.7	1.2	1.3	0.4	1.6	0.2	0.1	0.78
40	0.9	1.7	2.1	0.8	2.2	0.3	0.2	1.16
50	1.1	1.8	2.2	1.1	2.5	0.7	0.3	1.38
المعدل	0.90	1.56	1.86	0.76	2.11	0.40	0.20	

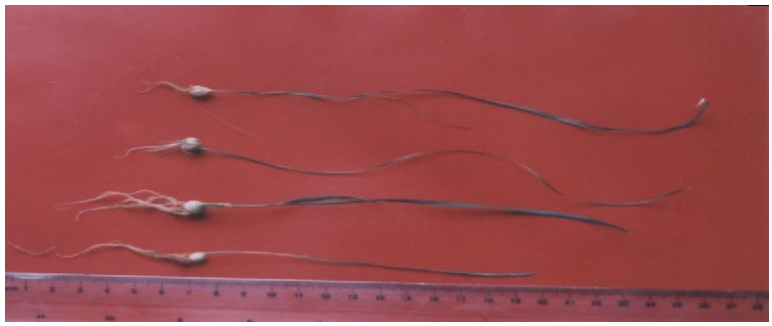
أما عن تأثير الأجزاء النباتية المدروسة (البراعم الإبطية للحوامل الزهرية ، البراعم الإبطية للكورمات والكريمات) فقد أشارت النتائج في الشكل (6) الى زيادة نسبة الاستجابة في مرحلة التجذير للكريمات والتي بلغت معدلها 37% عن باقي الأجزاء والتي بلغت 33% للبراعم الإبطية للحوامل الزهرية و30% للبراعم الإبطية للكورمات .



شكل (6): تأثير نوع الجزء النباتي المزروع في النسبة المئوية لتجذير الأفرع لنبات الكلاديولس صنف Oscar

تكوين الكريمات خارج الجسم الحي

أظهرت النتائج تكوين الكريمات بعد 50 يوماً من نقل النباتات المكثرة الى وسط التجذير وبنسبة 100% والتي تراوحت أوزانها بين 0.05-0.1 غم ولجميع الأجزاء المدروسة صورة (4) . إن وجود السايتوكاينين المصنع من قبل بادئات الجذور يساهم في تراكم النواتج



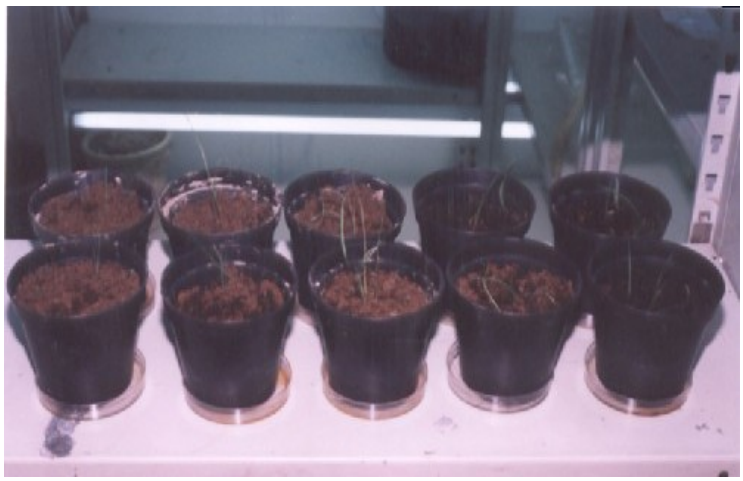
صورة (4): نباتات كلاديولس جاهزة للنقل الى التربة ويظهر عليها الكريمات المتكونة حديثاً

الكاربوهيدراتية القادمة من المجموع الخضري مما يؤدي الى إنتاج كريمات صغيرة الحجم والتي تصبح أكبر مصب للخزن (Sink) بعدها تقوم الكريمات بتقليل نشاطها الحيوي العام وتبقى كونها موقع خزن [18] . وهذا يتفق مع كل من [9،8] . بينما تختلف مع [11، 19] الذين أضافوا السايتوكاينينات بدل الاوكسينات في هذه العملية.

مرحلة الأقلمة Acclimatization Stage

أظهرت نتائج الجدول (13) نسب نجاح نباتات الكلاديولس المنقولة الى أوساط الأكثار بتموس فقط، بتموس: تربة مزيجية (1:1) حجم/حجم وتربة مزيجية (نهرية) فقط للأجزاء النباتية (البراعم الإبطية للحوامل الزهرية ، البراعم الإبطية للكورمات ، للكريمات وللمدد (1، 2، 3، 4) أسابيع من نقلها وأن أفضل وسط زراعي كان وسط البتموس لوحده ولجميع الأجزاء المدروسة ، وقد تفوقت النبيتات الناتجة من زراعة البراعم الإبطية للحوامل الزهرية على الأجزاء الأخرى صورة(5). ويلاحظ أنخفاض في النسب المئوية للنبيتات المؤقلمة خلال الأسبوع الثاني ، الثالث والرابع ولجميع الأجزاء المدروسة.

كما يلاحظ بأن نسبة النجاح قد أنخفضت في النبيتات المزروعة في التربة المزيجية. إن هذه الأختلافات قد تعود الى أن وسط البتموس يحتفظ بالرطوبة وذات محتوى جيد من العناصر الغذائية ، وهش يسهل على الجذور الجديدة أختراقه ، وقد يرجع سبب أنخفاض نسب النجاح في وسط التربة المزيجية الى قلة أحتفاظ هذا الوسط بالماء إضافة الى افتقاره للمواد الغذائية. إن هذه النتائج تتفق مع [19] اللذان استخدما تربة نهرية ، بينما استخدم [3] 2 حجم تربة نهرية: 1 حجم بتموس و [11] الذي استخدم 1 حجم تربة نهرية: 1 حجم بتموس.



صورة (5): نباتات كلاديولس مؤقلمة وجاهزة للنقل الى الزراعة المكشوفة

جدول (13): تأثير نوع الوسط الزراعي المستخدم في الأقلمة ولفترات زمنية مختلفة في النسبة المئوية لنجاة النبيتات الناتجة من زراعة الأجزاء النباتية المختلفة لنبات الكلاديولس صنف Oscar

وسط الأكثار	الفترة الزمنية	النسبة المئوية لنجاح الأقلمة (%)		
		البراعم الإبطية للحوامل الزهرية	البراعم الإبطية للكورمات	الكريمات
بتموس	الأسبوع الأول	100	90	90
	الأسبوع الثاني	90	80	80
	الأسبوع الثالث	80	80	70
	الأسبوع الرابع	70	80	70
بتموس: تربة مزيجية (1:1)	الأسبوع الأول	90	80	50
	الأسبوع الثاني	80	60	40
	الأسبوع الثالث	70	50	20
	الأسبوع الرابع	50	40	20
تربة مزيجية	الأسبوع الأول	80	60	40
	الأسبوع الثاني	70	60	20
	الأسبوع الثالث	50	50	10
	الأسبوع الرابع	30	40	10

المصادر :

1. Shatha, I.I. (1979). Effects of two flower preservatives on some physico-chemical changes in unstored and stored *Gladiolus* spikes (cv. friendship). MSc. Thesis. Univ. Phillipp. Les. Bafios.
2. Wilfret, G.J. (1971). Shoot tip culture of *Gladiolus*: evaluation of nutrient media for callus tissue development. Proc. Flo. State Hortic. Soc. 84: 389-393.
3. Ziv, M.; A.H. Halevy and R. Shilo. (1970). Organs and plantlets regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. Ann. Bot. 34: 671-676.
4. Logan, A.E. and F.W. Zettler (1985). Rapid *in vitro* propagation of virus indexed Gladioli. Acta. Hort. 164: 169-180.
5. Boonvanno, K. (2000). *In vitro* propagation of *Gladiolus*. Suranaree. J. Sci.Tech. 7: 25-29.
6. Jaine, A. (2003). Thin cell layer technology in ornamental plant Micropropagation and Biotechnology. African J. Biotech., 2: 683-691.
7. Hussey, G. (1977). *In vitro* propagation of *Gladiolus* by precocious axillary shoots formation. Sci. Hortic., 6: 287-296.
8. Karintanyakit, P.; H. Ong-Art and B. Chalong Chai (1997). *In vitro* production of *Gladiolus* cormel. Kasetsart University. Bangkok. Thailand. (Email: Libarn @ Ku. Ac. Th.). (http: \\ www. Kasetsart. Univ. of Bankok,. Thiland).
9. Badriah, D.S.; T. Sutater and N.T. Mathius (1998). Response of two *Gladiolus* cultivars to growth substances on *in vitro* culture. J.Hort. (Indonesia), 8: 1048-1059.
10. Lilien-Kipnis, H. and M. Kochba (1987). Mass propagation of new *Gladiolus* hybrids. Acta. Hort. 212: 631-638.
11. Ziv, M. (1990). The effect of growth retardants on shoot proliferation and morphogenesis in liquid cultured *Gladiolus* plants. Acta Horti. 280: 207-214.

12. Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

13. George, E.F; Hall, M.A. and De Klerk, G. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture (3rd ed.). vol. . Springer Publishers.

14. Taiz, L. and Zeiger, E. (2002). Plant Physiology (3rd.ed.). Sinauer Associates, Inc., Publishers.

15. Hussey, G. (1980). Propagation of some members of Liliaceae, Iridacea and Amaryllidaceae by tissue culture. In: Petaloid Monocotyledons. Linn. Soc. Symp. Ser. 8: 33-42.

16. Hartmman, H.T.; D.E. Kester; F.T. Davies and R.L. Geneve (1997). Plant Propagation: Principles and Practices. Sixth Edition. Prentice-Hall International Editions.

17. Ibrahim, K.M. and S. Abdul-Hameed (2001). The Narseries. The University of Musil. Univ. Mosul, Iraq. Press. Ministry of Higher Education, Iraq.