مجلة البصرة للعلوم الزراعية 2012، 25(2): 1-16

إخلاف نبات الشليك *Fragaria* x *annanassa* صنف Albion خارج الجسم الحي عن طريق توالد الأعضاء

ماجد عبد الحميد إبراهيم* وهدى عبد الكريم الطه* وزينب عبد الواحد سعيد**

*قسم البستنة وهندسة الحدائق، كلية الزراعة، جامعة البصرة، البصرة، العراق؛ **قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة البصرة، البصرة، العراق

*majidalbassiri@yahoo.com

الخلاصة. أجري البحث الحالي في مختبر زراعة الأنسجة النباتية–كلية الزراعة–جامعة البصرة للفترة من 2010/12/1 ولغاية 2011/10/1 بهدف إكثار نبات الشليك *Fragaria* x *ananassa* صنف Albion خارج الجسم الحي بتقانة توالد الأعضاء المباشر وغير المباشر من زراعة قطع وحوامل الأوراق. بينت نتائج الدراسة تكون كالس محبب من زراعة قطع الأوراق بعد مرور شهرين من الزراعة بالوسط الغذائي MS المزود بالتراكيز 0.5 و 1.0 و 1.5 و 2.0 و 2.5 ملغم/لتر بنزيل أدنين مع تركيز ثابت من نفثالين حامض الخليك (0.2 ملغم/لتر). أدى أضافة البنزيل أدنين بتركيز 1.5 ملغم/لتر في الوسط الغذائي MS إلى تكوين أفرع خضرية. كما أشارت النتائج إلى أن زراعة حوامل الأوراق بنفس مكونات الوسط السابق أدى إلى تكوين كالس متماسك ونشط زادت كميتة بزيادة تركيز البنزيل أدنين في الوسط الغذائي وعند إعادة زراعته أدى إلى توليد أفرع خضرية مختلفة الأطوال مع ظهور جذور بيضاء محمرة قصيرة أسفل الأفرع الخضرية المتوالدة عند تركيز 2.0 ملغم/لتر بنزيل أدنين مع ظهور أفرع عرضية بصورة مباشرة من منطقة القطع للجزء القاعدي من الورقة . كما بينت النتائج أن زراعة قواعد الأوراق وحواملها في وسط MS بنفس مكوناته وتراكيزه مع أستبدال البنزيل أدنين بالكاينتين أدى إلى تكوّن كالس مفصص عند التراكيز 1.5 و 2.0 و2.5 ملغم/لتر كاينتين أعطى أفرعاً خضرية عند أعادة زراعته بينما لم تستمر الحوامل الورقية بالنمو عند تركيزي 0.5 و1.0 ملغم/لتر كاينتين . كما أوضحت النتائج تكوّن كالس مفصص عند زراعة قطع الأوراق في الوسط MS المزود بالبنزيل أدنين بتركيزي 1.0 و 2.0 ملغم/لتر مع 2,4-D بتركيز ثابت 0.1 ملغم/لتر. أدى إلى تكوين أفرع خضرية عند إعادة زراعته بتركيز 2.0 ملغم/لتر بنزيل أدنين.

الكلمات الدالة : الكالس، توالد الأعضاء، بنزيل أدنين، كاينتين، حامل الورقة

المقدمة

يتبع نبات الشليك Strawberry العائلة الوردية Rosaceae والجنس *Fragaria* ويضم هذا الجنس 45 نوعا بريا ومزروعا وهناك اكثر من 200 صنف منتشر في أوروبا وآسيا وأمريكا الشمالية (4) . الشليك نبات عشبي معمر له دورة حياة قصيرة وتنشأ البراعم من اباط الأوراق التي قد تتطور إلى افرع ، أو عنقود زهري ، أو مدادات او تبقى خاملة . تحت ظروف النهار الطويل قد تتطور إلى افرع تاجية وتحت ظروف النهار القصير تتطور إلى مدادات Runners وهي عبارة عن سيقان خيطية ذات عقد وسلاميات وتتكون عند العقد نباتات جديدة التي تخرج من العقد الثانوية (33) . بالرغم من ان الظروف المناخية ملائمة لزراعة الشليك في العراق فأنه لم يشاهد بحالة برية في العراق ، ويعتقد ان زراعته دخلت إلى العراق بصورة عرضية إلى الحدائق المنزلية بين الاعوام (1946–1951)

* مستل من رسالة ماجستير.

ومن المتوقع انتشاره كفاكهة مستقبلية نظراً لملائمة الظروف البيئة لزراعته في بعض محافظات القطر (4) . يتكاثر الشليك بالبذور وهي الطريقة الجنسية التي تستخدم لإنتاج اصناف جديدة من خلال عملية التهجين بين الاصناف والأنواع وهي غير محبذة لأنها تنتج نباتات مختلفة بالتركيب الوراثي عن نبات الام . كما يتكاثر هذا النبات خضريا بواسطة تقسيم التاج والمدادات وتعد الاخيرة من الطرق الاكثر شيوعا في الإكثار على نطاق تجاري (19) ، كما استعملت تقنية زراعة الانسجة النباتية في اكثار نبات الشليك إذ تعد هذه التقنية البديل الامثل لطرق الإكثار الخضري التقليدية والتي يطلق عليها الإكثار الدقيق Micropropagation التي تعد أحدى التقانات الحديثة التي تلعب دورا هاما في خدمة الإنسان خاصة في مجال الإنتاج النباتي إذ يعد الإكثار بالزراعة النسيجية احد الطرق المتبعة حاليا في إكثار أنواع عديدة من النباتات العشبية والخشبية لما تمتاز به هذه الطريقة من مميزات أهمها الحصول على أعداد كبيرة من الشتلات المشابهة لنبات الأم في وقت قصير نسبيا وفي أي وقت من أوقات السنة فضلاً عن إمكانية إنتاج شتلات خالية من الإصابة بالآفات الحشرية والمرضية المختلفة (6 و 16) . استعمل العديد من الباحثين بعض أجزاء هذا النبات في إكثاره نسيجيا فقد لاحظ (27) من خلال دراستهم على الإكثار الدقيق لنبات الشليك ان زراعة إذينات الأوراق في الوسط الغذائي (MS) كامل القوة مضافاً له 2.0 ملغم/لتر من البنزيل ادنين مع 0.2 ملغم لتر من 2,4-D قد أعطى أعلى معدل للنموات الخضرية . وبين (34) ان إضافة BA إلى الوسط الغذائي MS بتراكيز 1.6 و 3.2 و 6.4 ملغم/لتر بمفرده أدى إلى توالد الأفرع العرضية بصورة مباشرة لصنفي (Clone B-302 and Kama) من نبات الشليك (*Fragaria* × *ananassa*) بزراعة سويقة الورقة (petiole) ونصل الورقة (leaf blade) إذ توالدت الأفرع العرضية بتركيزي(3.2 و 6.4 ملغم/لتر)BA فقد تفوق الصنف (Clone B-302) بتوالد الأفرع إذ بلغت النسبة المئوية للإخلاف 17–30% وبمعدل 6–8 سم طول الأفرع عند إضافة BA بتركيز 3.2 ملغم/لتر إلى الوسط الغذائي أما عند إضافة تركيز 6.4 ملغم/لتر بنزيل أدنين (BA) أدى إلى تكوين أفرعاً جديدة للصنف (Kama) . بين (35) ان أفضل وسط غذائي لتكوين الاعضاء بصورة مباشرة عند زراعة أوراق نبات الشليك صنف (Toyonoka) هو MS مضافاً اليه السايتوكاينين Thidiazuron (TDZ) مع الاوكسين 2,4-D بينما سجلت أعلى نسبة للأفرع العرضية المتكونة على الوسط (MS + 0.05 ملغم/لتر BA + 2.0 ملغم/لترTDZ) إذ بلغت 67.3 % وبمعدل 2.34 سم لطول الأفرع .

نظراً لعدم وجود دراسات كثيرة حول زراعة الأنسجة النباتية لنبات الشليك وخصوصاً لصنف Albion الذي يعد أحد أصناف الشليك التجارية والمحايدة الذي لا يتأثر بطول الفترة الضوئية لغرض إكثاره نسيجياً بتقانة توالد الأعضاء وتوسيع زراعته في المنطقة الجنوبية من العراق خالية من الفيروسات والمسببات المرضية .

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لكلية الزراعة – جامعة البصرة وذلك للمدة من 2010/12/1 ولغاية 2011/10/1. استعملت في هذه الدراسة أجزاء نباتية (Explants) مأخوذة من 100 شتلة من نبات الشليك *Fragaria* x *ananassa* صنف Albion التي تم الحصول عليها من أحد مشاتل بغداد . قلعت النباتات من اوعية الزراعة ثم ازيلت الأتربة العالقة بها ، بعدها شرحت بواسطة مشرط حاد عن طريق قطع المجموع الجذري، ثم ازيلت أوراقها الكبيرة وصولا

إلى الأوراق الصغيرة (الفتية)، ثم اخذت الأجزاء النباتية الآتية :-

1- القطع الورقية : قطعت الأوراق الفتية القريبة من البرعم الطرفي إلى اجزاء صغيرة بأبعاد 0.3 – 0.5 سم^2 (لوحة 1) .

2- قطع من سويق الورقة : إذ استأصل سويق الورقة مع جزء من قاعدة الوريقات بطول (0.4 – 0.6) سم وأحتوى هذا السويق على شعيرات ناعمة بيضاء اللون (لوحة 1) .

غسلت الأجزاء النباتية بالماء والصابون عدة مرات للتخلص من الاتربة والمواد العالقة بها ، بعدها غسلت بالماء المقطر عدة مرات ، ثم حفظت جميع الأنسجة النباتية لكل نوع على حده في بيكرات تحتوي على محلول مانع للأكسدة والذي يتكون من 150ملغم/لتر من حامض الستريك و100ملغم/لتر من حامض الاسكوربيك. وحفظت الأجزاء النباتية في الثلاجة على درجة حرارة (4 م$^{\circ}$) لمدة 24 ساعة وذلك لحين الاستعمال . بعدها أجريت عملية التعقيم السطحي لها بعد إخراجها من المحلول المانع للأكسدة ، وضعت مباشرة في محلول التعقيم الحاوي على هايبوكلورات الصوديوم (NaOCl) وبتركيز (1.05%) ومحلول مانع الاكسدة ضمن التركيز المذكور في أعلاه ومبيد البنليت بتركيز 1% وإضافة (2–3) قطرات من مادة ناشرة Tween-20 لكل100 مل من المحلول مع الرج والتحريك بين الحين والأخر ولمدة 15 دقيقة، ثم اخرجت الأجزاء النباتية كلاً على حدة من محلول التعقيم وغسلت بالماء المقطر والمعقم عدة مرات لضمان إزالة التأثير الضار للمادة المعقمة. تمت هذه العملية على منضدة انسياب الهواء الطبقي (Laminar air flow cabinet) .

لوحة(1): الأجزاء النباتية المأخوذة من نبات الشليك : قواعد الوراق (أ) وقطع الأوراق (ب) .

استعمل الوسط الغذائي المكون من املاح (MS) (25) والمواد العضوية وهي السكروز تركيز 3% وكبريتات الأدنين بتركيز 40 ملغم/لتر ومادة PVP بتركيز 0.1% والفيتامينات والكلايسين بتركيز واحد ملغم/لتر بعدها تم إضافة السايتوكاينين والاوكسين بتراكيز مختلفة حسب مرحلة الإكثار النسيجي. ضبط pH الوسط الغذائي ضمن المدى 5.7 – 5.8 ، ثم أضيف الاكار بتركيز 0.6% . سخن الوسط الغذائي حتى وصول درجة حرارته إلى 90 م$^{\circ}$. ثم وزع الوسط الغذائي في أنابيب

الزراعة وبكمية 20 مل لكل انبوبة اختبار ثم سدت الفوهات بالقطن الطبي وغلفت بأوراق الالمنيوم وعقمت أنابيب الزراعة بواسطة جهاز التعقيم البخاري Autoclave تحت ضغط 1.04 كغم/سم^2 ودرجة حرارة 121م° ولمدة 20دقيقة ، حفظت الانابيب في غرفة النمو لحين استعمالها للزراعة .

1. التجربة الأولى : استحثاث الكالس وتوليد الاعضاء من زراعة قطع الأوراق الفتية :

زرعت قطع الأوراق الفتية على الوسط الغذائي MS والمزود بالبنزيل أدنين (BA) بالتراكيز 0.5 و 1.0 و 1.5 و 2.0 و 2.5 ملغم/لتر مع وجود النفثالين حامض الخليك (NAA) بتركيز ثابت 0.2 ملغم/لتر والوسط الاخر مكون من املاح MS مع وجود الكاينتين بالتراكيز 0.5 و 1.0 و 1.5 و 2.0 و 2.5 ملغم/لتر مع وجود NAA بتركيز ثابت 0.2 ملغم/لتر . حضنت الزروعات في غرفة النمو على درجة حرارة 25 ± 2 م ° وتحت شدة اضاءة 1000 شمعة/قدم لمدة شهرين ، بعد ذلك نقل الكالس المتكون في جميع التراكيز المذكورة إلى وسط جديد يتكون من نفس مكونات الوسط السابق ثم استمرت اعادة الزراعة للكالس المستحث Re-culture في التركيزين 2.0 و 2.5 ملغم/لتر BA مع وجود NAA 0.2 ملغم/لتر فقط لغرض توليد الأفرع الخضرية .

2. التجربة الثانية : استحثاث الكالس وتوليد الأعضاء زراعة قواعد الأوراق مع حواملها :-

استعملت قواعد الأوراق مع حواملها لإنتاج الكالس الأولي إذ زرعت تلك الأجزاء بصورة عمودية على أوساط مختلفة متكون من الوسط الغذائي MS مع إضافة منظمات النمو المختلفة ، ففي الوسط الأول اضيف اليه تراكيز مختلفة من BA 0.5 و 1.0 و 1.5 و 2.0 و 2.5 ملغم/لتر اما الوسط الثاني فأضيف اليه الكاينتين بتراكيز 0.5 و 1.0 و 1.5 و 2.0 و 2.5 ملغم/لتر مع وجود الاوكسين NAA بتركيز ثابت 0.2 ملغم/لتر في كلا الوسطين اما الوسط الثالث فمزود بالـ BA بتركيزي 1.0 و 2.0 ملغم/لتر مع وجود الاوكسين 2,4-D بتركيز 0.1 ملغم/لتر ، وحضنت الزروعات في نفس ظروف التحضين من درجة الحرارة وشدة اضاءة لمدة شهرين ، ثم اخذت الملاحظات .

تم نقل الكالس الأولي المتكون في الوسط الغذائي المزود بالـ BA تركيزي 2.0 و 2.5 ملغم/لتر وNAA بتركيز 0.2 ملغم/لتر إلى الوسط الغذائي نفسه وكذلك نقل الكالس المتكون في الوسط الغذائي المزود بالـ BA بتركيز واحد ملغم/لتر و2,4-D بتركيز 0.1 ملغم/لتر إلى الوسط الغذائي نفسه وحضنت الزروعات لمدة شهرين تحت نفس ظروف التحضين السابقة الذكر .

صممت تجارب الدراسة حسب التصميم العشوائي الكامل Randomized (C.R.D.) Complete Design ، وحللت نتائج الدراسة إحصائياً باستعمال تحليل التباين وقورن بين متوسطات المعاملات باختبار اقل فرق معنوي المعدل (R-LSD) عند مستوى إحتمال 0.05 (3) .

النتائج والمناقشة

1. تأثير الـ BA والـ NAA في إستحثاث الكالس وتوالد الأعضاء من زراعة قطع الأوراق الفتية لنبات الشليك صنف Albion:

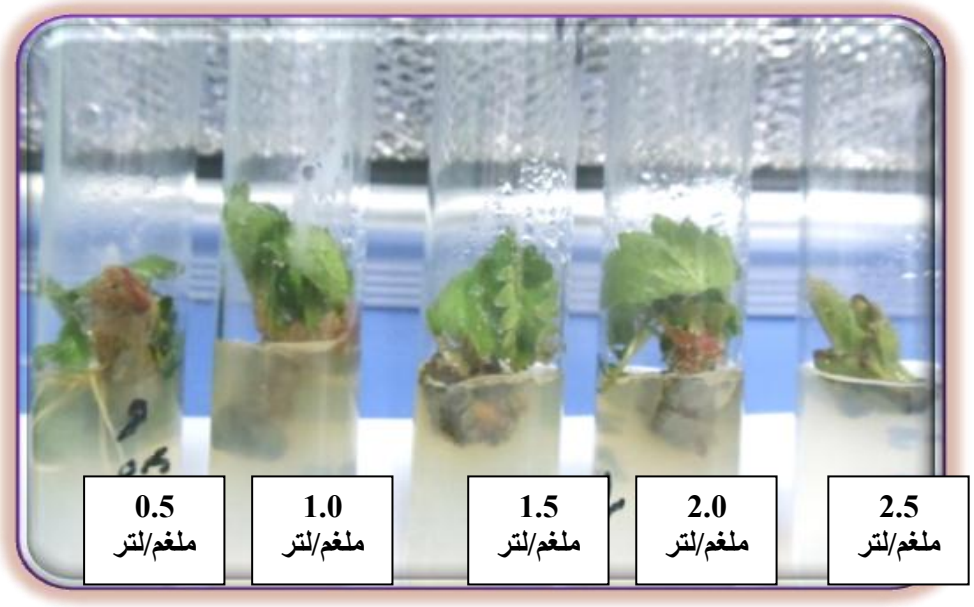
توضح اللوحة (2) تأثير الـ BA بتراكيز 0.5 و 1.0 و 1.5 و 2.0 و 2.5 ملغم/لتر مع وجود الـ NAA بتركيز ثابت 0.2 ملغم/لتر في إستحثاث الكالس الأولي من زراعة قطع الأوراق الفتية لنبات الشليك صنف(Albion) بعد مرور شهرين من زراعتها بالضوء ، إذ يلاحظ تضخم الأوراق

وزيادة حجمها نتيجة لامتصاص المواد الغذائية الموجودة بالوسط الغذائي ، فضلاً عن تكوين الكالس على شكل حبيبات صغيرة متماسكة مع بعضها ذات لون أحمر مسمر عند منطقة القطع في الأوراق الفتية النامية في الوسط الغذائي المزود بالـ BA 0.5 و 1.0 و 1.5 و 2.0 ملغم/لتر في حين تكون كالس مسمر اللون حول حواف قطع الأوراق المزروعة في الوسط الغذائي المزود بالـ BA تركيز 2.5 ملغم/لتر . وقد يعود سبب تكوين الكالس الأولي في الأوساط الغذائية المزودة بالـ BA و NAA إلى أهمية التوازن بين الاوكسينات والسايتوكاينينات في استحثاث الكالس فالسايتوكاينينات تلعب دور مهم في زيادة بناء الـ RNA والبروتينات والإنزيمات داخل الخلية وبالتالي تشجع عملية انقسام الخلايا أو ربما يعود السبب إلى إستجابة الأجزاء النباتية على إستحثاث الكالس إلى وجود الـ NAA بتركيز واطئ 0.2 ملغم/لتر الذي كان اكثر له تأثير على عملية انقسام الخلايا نتيجة لزيادة فعالية السايتوكاينينات ، فالتراكيز الواطئة من الاوكسينات بصورة عامة تؤثر على عمل الإنزيمات المسؤولة عن بناء الجدار الخلوي (31) . تتفق هذه النتائج مع ما اشار اليه العديد من الباحثين حول إستحثاث الكالس من الأوراق او قطع الأوراق لنبات الشليك في الوسط الغذائي MS المزود بالـ BA والـ NAA(22 و 30 و 13 و 18 و 2 و 8) .

كما توضح اللوحة (3) تكون جذوراً بيضاء اللون عددها خمسة يتراوح أطوالها بين 2–5 سم نامية من السطح السفلي للكالس المستحث من زراعة قطع الأوراق الفتية لنبات الشليك المزروعة على وسط غذائي مزود بالـ BA تركيز 0.5 ملغم/لتر مع وجود NAA بتركيز 0.2 ملغم/لتر بعد مرور شهرين من زراعتها في الضوء ، وقد يعود سبب تكوين جذور على قطع الأوراق الفتية لنبات الشليك إلى وجود التراكيز الواطئة من الاوكسين والسايتوكاينين والتوازن بينهما والذي سبب عملية انقسام الخلايا وتكوين مبادئ الجذور ومن ثم كونت جذوراً بيضاء اللون ، هذا ما اكده (32) حول زراعة قطع أوراق الشليك صنف (Hoko-wase) على أوساط غذائية تحتوي على تراكيز متداخلة من الـ BA والـ NAA ولاحظوا ان المستويات المنخفضة من BA 0.5 و 0.7 ملغم/لتر و NAAبتركيزي 0.5 و 0.7 ملغم/لتر كونت كالس غير نشط بني اللون ولكن هناك بعض النمو المتخلخل الذي يولد الجذور العرضية من الكالس خلال 20–30 يوماً من الحضانة ، ولكن لم يوٌلد هذا الكالس الأفرع العرضية بالرغم من اجراء عدة زروعات ثانوية كل أسبوعين ، بينما التركيز العالي من BA 2.0 ملغم/لتر مع وجود NAA بتركيزي 0.5 و 0.7 ملغم/لتر كوّن كالس نشط ولّد أفرعاً عرضية . وهذا ما أكدته الدراستين (17 و 29) إذ بينوا ان التراكيز العالية من السايتوكاينينات هي ضرورية لتوليد الأفرع العرضية .

وتوضح النتائج ايضا في لوحة (4) تلون الكالس الأولي باللون البني الذي لم يستمر بالنمو و لم يعط اي إستجابة بعد اجراء زراعتين ثانويتين للكالس الأولي المستحث من زراعة قطع الأوراق لنبات الشليك على وسط MS المزود بالـBA تركيز 0.5 و 1.0 و 1.5 ملغم/لتر مع وجود 0.2 ملغم/لتر NAA بعد مرور أربعة اشهر في الضوء وقد يعود سبب تلون الكالس بلون البني ثم موته إلى وجود صبغة الانثوسيانين في أنسجة نبات الشليك (الكالس) والتي تعد من المواد الفينولية السامة والتي سببت التلون البني للكالس ومن ثم موته (24) ، هذا ماأكده (26) حول دراستهم تقدير صبغة الانثوسيانين في كالس نبات الشليك ولاحظوا ان هنالك انتاج عالي من صبغة الانثوسيانين في الكالس النامي بالظلام في الوسط غذائي (LS) Linsmaier and Skoog (23) بوجود الـ BA بتركيز 1ملغم/لتر

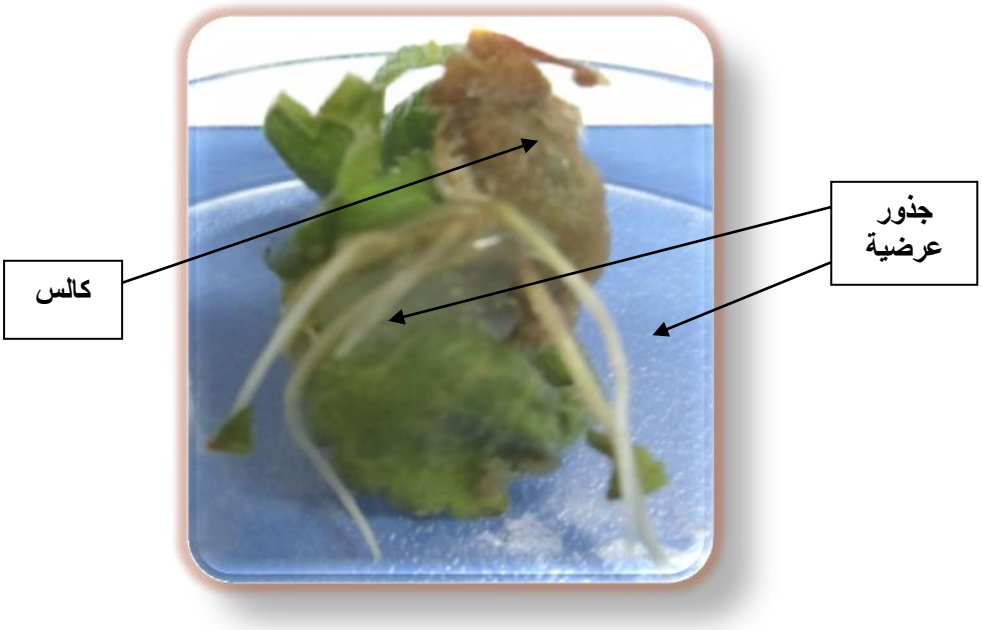
+ الـ 2,4-D بتركيز 1.0 ملغم/لتر ، وان اكسدة المواد الفينولية أدى إلى تكوين الكوينينات (Quinons) التي تعد مواد مثبطة وسامة للأنسجة النباتية نفسها. ويتفق مع ما أكده (28) إذ لاحظوا في دراستهم حول زراعة أطراف الأفرع لنبات الشليك نسيجياً ، ظهور تلون بني للكالس عند مرحلة نشوء المستعمرات وهذه المواد الفينولية هي السبب الرئيسي لموت الأجزاء النباتية. وتتفق هذه النتيجة مع (5) حول اسمرار وتدهور كالس المستحث من زراعة قطع الأوراق الفلقية المأخوذة من بادرات البرتقال المحلي بعد اجراء زروعات ثانوية والذي لم يستمر بالنمو . في حين نمت الأفرع العرضية الصغيرة على أسطح الكالس في الوسط الغذائي المزود بالـ BA بتركيزي 2.0 و2.5 ملغم/لتر وكان أكثر وضوحاً وتمايزاً للأفرع العرضية في الوسط الغذائي المزود بالـBA بتركيز 2.0 ملغم/لتر وقد يعود السبب في ذلك إلى ان هذا التركيز يعتبر التركيز المثالي لعملية نشؤ وتمايز الأفرع العرضية كما ذكر في أعلاه .



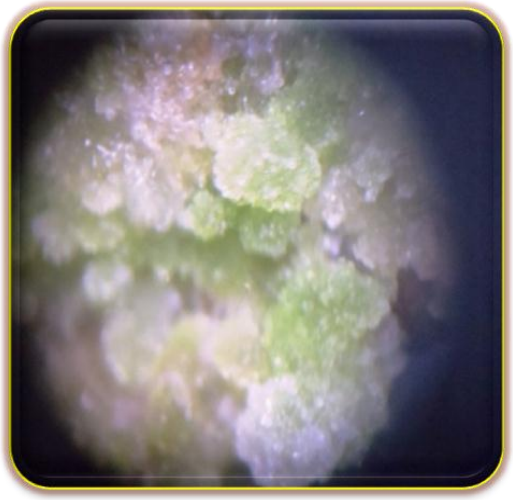
لوحة (2) : تأثير تراكيز مختلفة من BA وNAA بتركيز ثابت0.2 ملغم/لتر في إستحثاث الكالس الأولي من قطع الأوراق الفتية لنبات الشليك بعد شهرين من الزراعة بالضوء .

2 . تأثير الـ BA والـ 2,4-D في إستحثاث الكالس وتوالد الأعضاء من زراعة قطع الأوراق الفتية لنبات الشليك صنف (Albion):

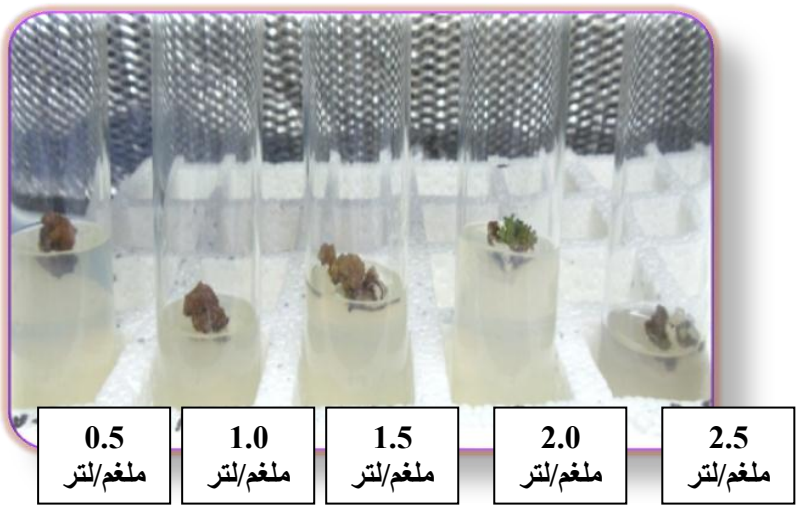
توضح النتائج إستحثاث الكالس الأولي من زراعة قطع الأوراق الفتية في وسط غذائي مزود بالـ BA بتركيزي 1.0 و 2.0 ملغم/لتر مع وجود الاوكسين 2,4-D بتركيز 0.1 ملغم/لتر ، إذ يلاحظ تكوين كالس مفصص مخضر اللون وفي أجزاء أخرى كان أبيض اللون بعد مرور ثمانية أسابيع من الزراعة في الضوء في الوسط BA بتركيز 2.0 ملغم/لتر لوحة (5) . بينما توضح اللوحة (6) تكون كتل من الكالس على سطح قطع الأوراق والتي غطت السطح كلياً مع تكون مبادئ للأفرع العرضية وتلون قسم من هذا الكالس باللون البني في الوسط الغذائي المزود BA بتركيز 1.0 ملغم/لتر بعد مرور شهرين (ثمانية اسابيع) من زراعتها في الضوء .



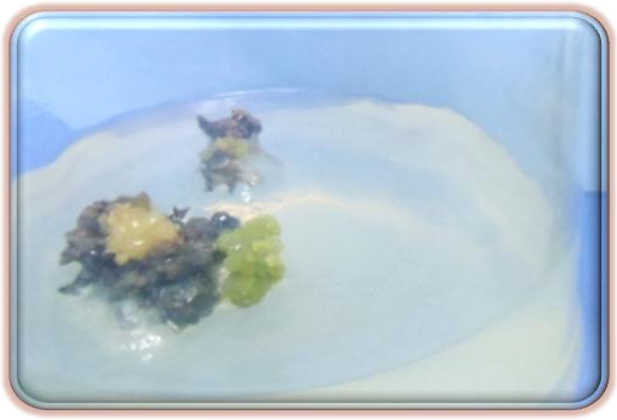
لوحة (3): تكون الجذور من الكالس المستحث من زراعة الأوراق الفتية لنبات الشليك على الوسط الـ MS المزود بالـ BA بتركيز 0.5 ملغم/لتر بعد مرور شهرين من الزراعة بالضوء .



لوحة (4) : توضح تلون الكالس الأولي باللون البني ولم يعط اي استجابة بعد اجراء زراعتين ثانويتين للكالس في وسط MS المجهّز بتراكيز 0.5 و 1.0 و 1.5 ملغم/لتر من BA.



اللوحة (5) : تكون كتل من الكالس على سطح قطع الأوراق في الوسط الغذائي MS المزود بالـ BA بتراكيز مختلفة من البنزيل أدنين مع وجود الاوكسين 2,4-D بتركيز 0.1 ملغم/لتر .

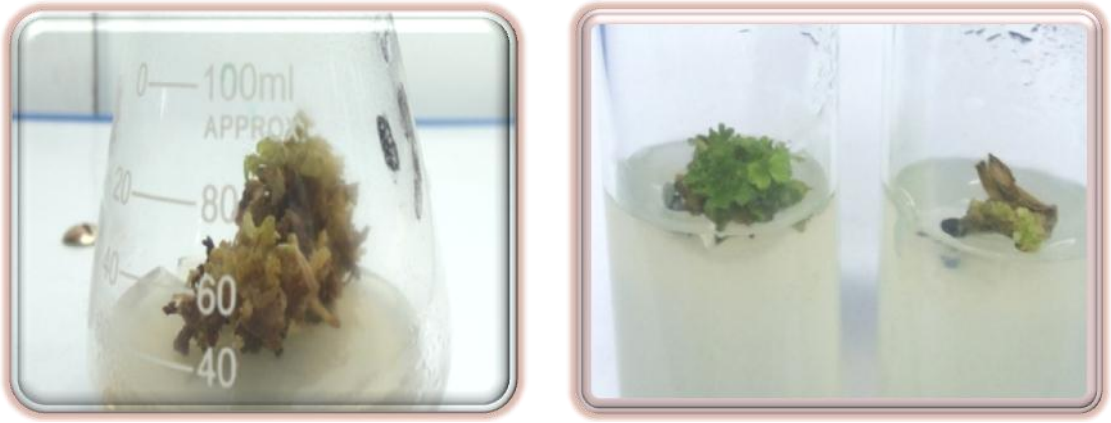


لوحة(6): تكون كالس مع ظهور افرع عرضية في الوسط الغذائي المزود بالـ BA بتركيز 1.0 ملغم/لتر و-2,4 D بتركيز 0.1 ملغم/لتر بعد مرور شهرين من زراعتها بالضوء.

ويلاحظ ايضا ان الأفرع العرضية المتكونة على الكالس المستحث من قطع الأوراق لم تتكون في نفس الوقت وانما تكونت بعد عمل 2–3 زروعات ثانوية شهرياً على وسط غذائي جديد مزود بالـ BA تركيز 1.0 ملغم/لتر و2,4-D بتركيز 0.1ملغم/لتر، إذ تكونت بين 15 – 20 فرعاً عرضياً صغير جداً بطول 0.4 –0.5 سم (لوحة 7).

وقد يعود سبب تكوين الكالس وتوليد الأفرع العرضية منه إلى ان إضافة السايتوكاينينات إلى الوسط الغذائي له اهمية في تحفيز وتكوين الأفرع العرضية من خلال زيادة تضاعف DNA وتباعد الكروموسومات الذي يشجع عملية انقسام الخلية، كذلك فان وجود الاوكسينات يعمل على انقسام الخلايا واستطالتها (15) . تتفق هذه النتيجة مع ما اشار اليها (14 و 21 و 32 و 36) حول تأثير التداخل بين الاوكسين 2,4-D بالتراكيز الواطئة 0.1 ملغم/لتر والسايتوكاينين BA 1.0 و 2.0 ملغم/لتر في تكوين كالس نشط من زراعة قطع أوراق الشليك لأصناف مختلفة . كذلك لاحظوا بأن هذه التوليفة

مفيدة لعملية تمايز الأفرع من هذا الكالس النشط واثبتوا ايضاً ان الكالس الذي يولد الأفرع العرضية يكون مفصصاً ، مفككاً ومخضر اللون.



(أ) (ب)

لوحة(7): تكوين الأفرع العرضية بعد مرور زراعتين ثانويتين (أ) وبعد ثلاثة زروعات ثانوية في (ب) في الوسط الغذائي المزود BA تركيز 1ملغم/لتر و2,4-D تركيز 0.1 ملغم/لتر .

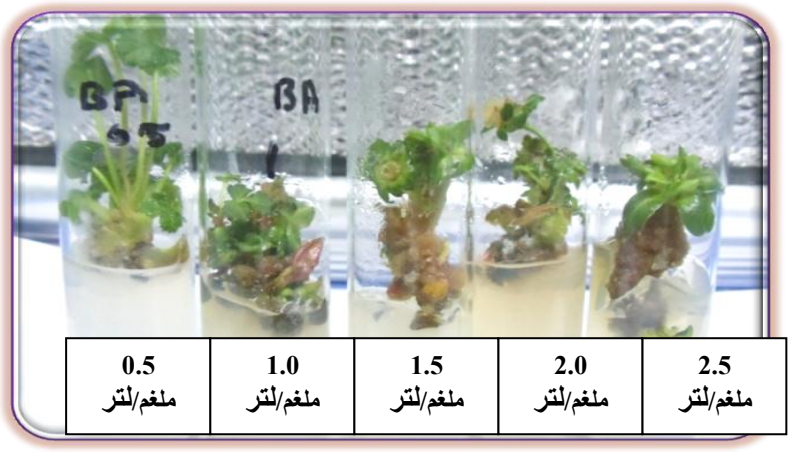
3 . تأثير الـ BA والـ NAA في توالد الاعضاء من زراعة قطع الأوراق وحواملها لنبات الشليك صنف (Albion):

توضح النتائج في لوحة(8) زراعة قاعدة الورقة مع حاملها لنبات الشليك في الوسط الغذائي المزود بتراكيز مختلفة من الـ BA (0.5 و 1.0 و1.5 و 2.0 و 2.5 ملغم/لتر) مع وجود NAA بتركيز ثابت 0.2 ملغم/لتر ، إذ يلاحظ تكوين الكالس الأولي ذو لون اصفر محمر ، مفصص نشط ومتماسك القوام ، غطى جميع اسطح الحامل مع الجزء القاعدي من الورقة وازدادت كمية الكالس المستحث مع زيادة تركيز BA بالوسط الغذائي ، إذ اعطى الوسط الغذائي المزود بالـ BA (2.0 و 2.5 ملغم/لتر) اكبر كمية من الكالس وقد يعود السبب إلى ان هذه الأجزاء النباتية تستجيب إلى عمليات اعادة تمايز الأوراق وتوليد الكالس باعتبارها واقعة قرب المرستيم الابطي (Axillary meristem) الذي يحتوي على مناطق مرستيمية التي تكون خلايا جديدة ومن ثم تكوين الكالس الأولي ، وتوالدت منها أفرعاً عرضية(20). وقد يعود سبب تكوين أفرع طويلة بالتراكيز الواطئة من BA وأفرع قصيرة في التراكيز العالية من BA إلى زيادة تركيز السايتوكاينينات في الوسط الغذائي الذي أدى إلى تقليل دور الاوكسين الداخلي المسؤول عن استطالة الخلايا باتجاه المحور الطولي وبالتالي تقليل طول الأفرع الخضرية (10) وإلى دور السايتوكاينينات في زيادة عدد الأفرع الخضرية والذي أنعكس تأثيرها على أطوالها (9). تتفق هذه النتائج مع ما ذكره (10) من ان BAبالتراكيز العالية (2.0 ملغم/لتر) يثبط نمو الساق والأوراق ومع ما أشار اليه (11) حول ظهور بعض التشوهات على النموات الورقية النامية في التراكيز العالية من BA (2.0 و 2.5 ملغم/لتر) وما أشار اليه (7) حول استعمال التراكيز العالية من BA (2 و 3 و 4 ملغم/لتر) الذي أدى إلى تكوين أفرع قصيرة أحتوت على أوراق ذات نصل ضيق.

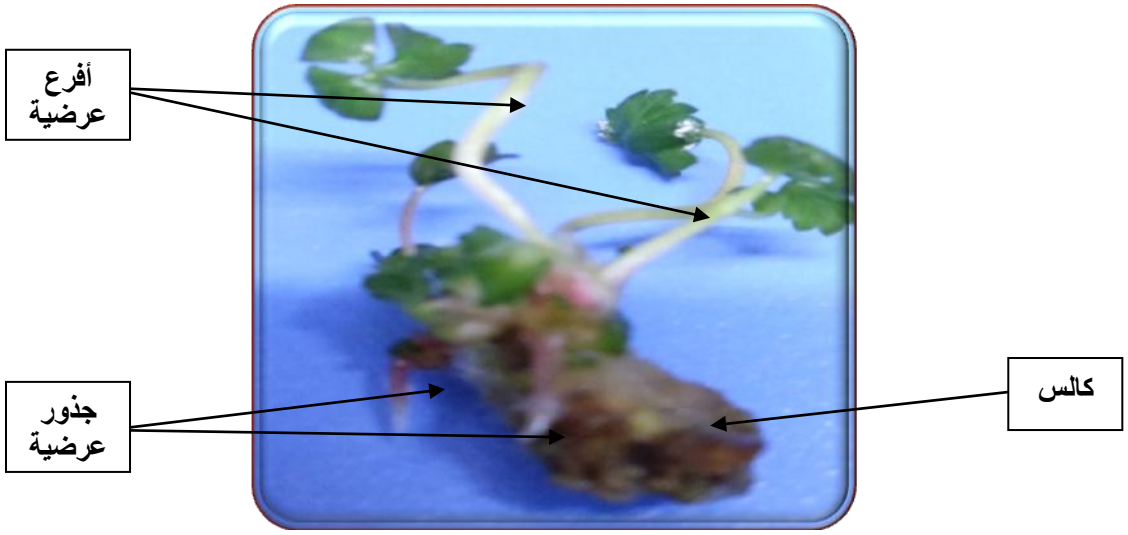
توضح اللوحة (9) توليد افرع عرضية بطول 4 – 5 سم مع تحفيز تكوين جذور بيضاء سميكة محمرة اللون قصيرة بطول 1.0 – 1.5 سم أسفل الأفرع العرضية المتولدة من كالس مستحث من زراعة قواعد الأوراق مع حواملها عند نقل الكالس مع الأفرع الصغيرة إلى الوسط الغذائي المزود بالـ BA تركيز 2.0 ملغم/لتر مع وجود NAA بتركيز 0.2 ملغم/لتر (بعد مرور أربعة أشهر من بداية الزراعة) وقد يعود سبب توليد الأفرع العرضية من الكالس إلى دور السايتوكانيات في نشؤ وتمايز الأفرع كما ذكر سابقاً وإلى دور الـ NAA بتركيز منخفض الذي أدى إلى تحفيز تكوين الجذور.

4. تأثير الكاينتين والـ NAA في إستحثاث الكالس وتوالد الأفرع العرضية من زراعة قطع الأوراق الفتية لنبات الشليك صنف (Albion):

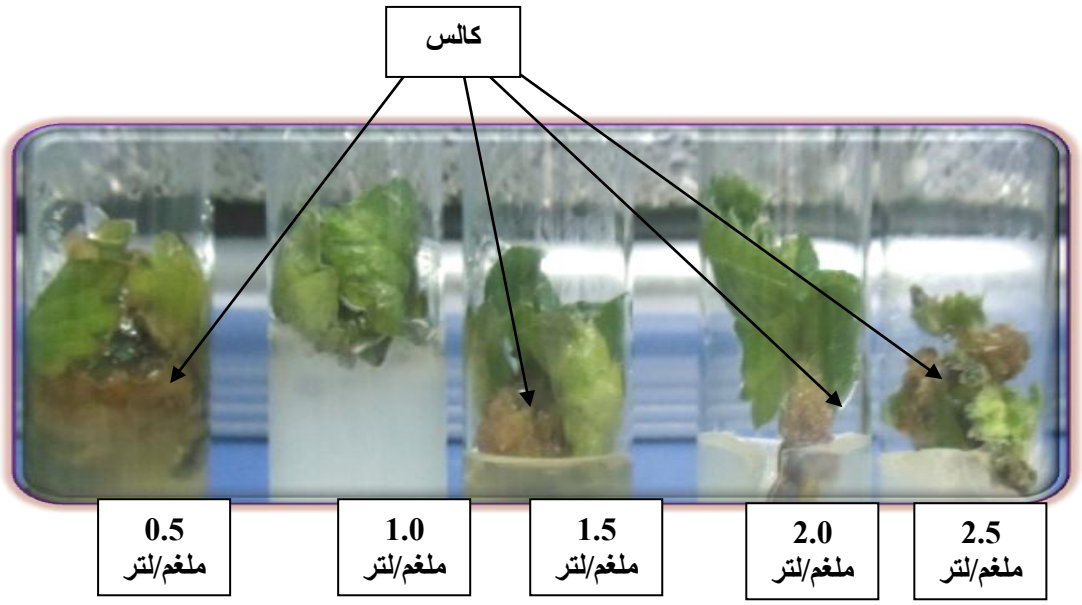
توضح النتائج في لوحة (10) تأثير الكاينتين بتراكيز 0.5 و 1.0 و 1.5 و 2.0 و 2.5 ملغم/لتر مع وجود الـ NAA بتركيز ثابت 0.2 ملغم/لتر في إستحثاث الكالس الأولي من زراعة قطع الأوراق الفتية بعد مرور شهرين من الزراعة بالضوء ، إذ يلاحظ تضخم القطع الورقية وازدياد حجمها والتفافها على بعضها ، إضافة إلى تكوين كالس كريمي مسمر اللون ، متماسك القوام حول منطقة القطع للأوراق الفتية والقسم الاخر من الكالس المتكون محصوراً في وسط الأوراق الملتفة في جميع التراكيز وعند اجراء زروعات ثانوية عددها أثنان للكالس الأولي المستحث من قطع الأوراق الفتية لنبات الشليك بنفس مكونات الوسط السابق وبنفس التراكيز للكاينتين أدى ذلك إلى تلف الكالس وتلونه باللون البني ولم يستمر بالنمو .



لوحة (8): توضح تحفيز الكالس الأولي مع توليد الأفرع الخضرية من زراعة قواعد الأوراق وحواملها لنبات الشليك في وسط غذائي مزود بالـ BA بتراكيز مختلفة مع وجود NAA بتركيز ثابت(0.2 ملغم/لتر) بعد مرور شهرين من الزراعة بالضوء .



لوحة(9): توضح نمو الأفرع العرضية والجذور في وسط مزود BA بتركيز 2.0 ملغم/لتر مع NAA بتركيز 0.2 ملغم/لتر بعد مرور اربعة اشهر من زراعة قواعد الأوراق مع حواملها في الضوء .



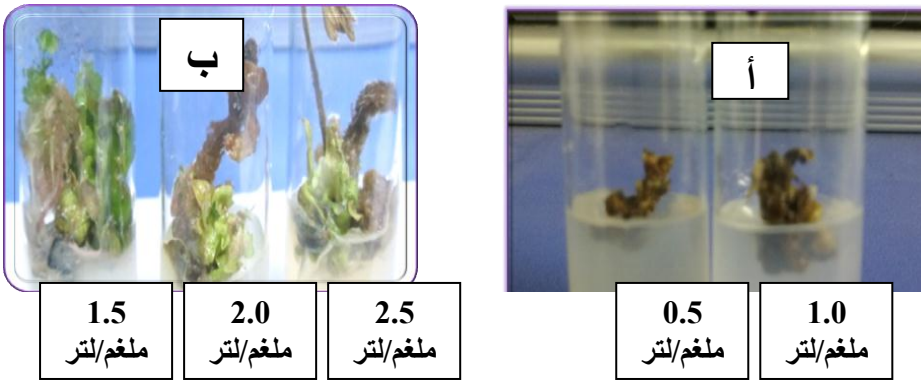
لوحة (10) : توضح تكوين الكالس الأولي من زراعة قطع الأوراق الفتية لنبات الشليك في وسط غذائي مزود بالكاينتين بتراكيز مختلفة مع NAA بتركيز 0.2 ملغم/لتر بعد مرور شهرين من الزراعة في الضوء .

5 . تأثير الكاينتين والـ NAA في إستحثاث الكالس وتوالد الأعضاء من زراعة قواعد الأوراق وحواملها:

توضح النتائج في لوحة (11) زراعة قواعد الأوراق وحواملها لنبات الشليك صنف(Albion) في الوسط الغذائي المزود بالكاينتين بالتراكيز 0.5 و 1.0 و 1.5 و 2.0 و 2.5 ملغم/لتر بعد مرور شهرين من زراعتها بالضوء ، إذ يلاحظ تكوين كالس مفصص مسمر اللون غطى جميع أسطح

قواعد الأوراق وحواملها في التراكيز 1.5 و 2.0 و2.5 ملغم/لتر مع ظهور أفرع صغيرة جداً متداخلة بين أنسجة الكالس الأولي بتركيز 2.0 ملغم/لتر من الكاينتين . أما الوسط الغذائي المزود بالكاينتين تركيزي 0.5 و 1.0 ملغم/لتر فقد تلونت حوامل الأوراق باللون البني ولم تستمر بالنمو وقد يعود سبب ذلك إلى وجود صبغة الانثوسيانين في انسجة نبات الشليك والتي تعد من المواد الفينولية السامة التي سببت التلون البني للأنسجة النباتية (24) . كما توضح اللوحة نفسها تكون أفرعاً خضرية قصيرة ذات اعناق ضيقة وبحدود 7 – 10 أفرع خضرية مع تضخم حامل الورقة ووجود اسمرار بالحوامل والأوراق المتكونة في الوسط الغذائي المزود بالكاينتين 1.5 ملغم/لتر مع وجود NAA بتركيز 0.2 ملغم/لتر . استمرت عملية اعادة الزراعة للكالس والأفرع المتكونة عليه في الوسط الغذائي المزود بالكاينتين تركيز 2ملغم/لتر مع وجود NAA بتركيز 0.2 ملغم/لتر أدى ذلك إلى تكوين افرع خضرية كثيرة وقد يعود السبب إلى استمرار وجود الكاينتين في الوسط الغذائي يؤدي إلى كسر السيادة القمية في الأفرع الجديدة مما يؤدي إلى تضاعف عدد الأفرع الناتجة من مرستيم واحد . تتفق هذه النتيجة مع ماتوصل اليه (1 و 5) حول مضاعفة عدد الأفرع بتكرار الزراعة الثانوية .

نستنتج من الدراسة الحالية أن زراعة قطع الأوراق الفتية في الوسط الغذائي MS المزود 1.0 ملغم/لتر بنزيل أدنين يؤدي الى تكوين الكالس الذي بدوره ينتج أفرعاً عرضية بعد 2–3 من الزروعات الثانوية الشهرية وعند زراعة قطع الأوراق مع حواملها بنفس مكونات الوسط السابق وتراكيز مختلفة من البنزيل أدنين يؤدي الى استحثاث الكالس مع تكون أفرع خضرية متداخله معه ومختلفة الأطوال سلبياً مع زيادة تركيز البنزيل أدنين . بينما يؤدي الوسط الغذائي MS المزود بالكاينتين بتراكيز 1.5 و 2.0 و 2.5 ملغم/لتر الى استحثاث الكالس مع نشوء أفرعاً عرضية قصيرة عند زراعة قطع الاوراق مع حواملها .



لوحة(11): فشل نمو حوامل الأوراق عند زرعتها في الوسط الغذائي المجهز بتركيزي (0.5 و 1.0) ملغم/لتر كاينتين مع وجود NAA بتركيز 0.2ملغم/لتر (أ) وتكوين الكالس والأفرع الخضرية في الوسط الغذائي المجهز بالكاينتين تركيز 1.5 و 2.0 و2.5 ملغم/لتر (ب) لنبات الشليك بعد مرور شهرين من الزراعة في الضوء .

المصادر

1- الحافظ ، عماد أحمد محمد و بدر ، صالح محسن و حسين ، وفاء ابراهيم (1999) . أكثار أصول الحمضيات بزراعة الأنسجة . مجلة الزراعة العراقية ، المجلد الرابع ، العدد الثامن ، العراق .

2- الحجيمي، احسان جالي إذبيب (2010). استعمال تقنية زراعة الانسجة في انتاج الفنكرستين والفنبلاستين في كالس عين البزون المتحمل *Catharantlus roseus* (L.) G.Don للإجهاد الملحي .رسالة ماجستير.كلية الزراعة .جامعة الكوفة .

3-الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الطباعة والنشر. كلية الزراعة والغابات. جامعة الموصل. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق.

4-السعيدي، ابراهيم حسن محمد .(2000) . انتاج الثمار الصغيرة .مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل .

5-الطه، هدى عبد الكريم(2008) .استعمال تقنية الانسجة النباتية في اكثار نباتات مقاومة الملوحة من اشجار البرتقال المحلي *Citrus sinensis* L. Osbeck . cv. Local orange اطروحة دكتوراه /جامعة البصرة – العراق .

6-الكناني ، فيصل رشيد (1987). زراعة الأنسجة والخلايا النباتية. مديرية دار الكتب للطباعة والنشر/جامعة الموصل – العراق .

7- باشي ، عمار زكي قصاب .2006. استجابة أجزاء نباتية مختلفة لنبات اللوز *Amygdalus communis* L. للنمو والتضاعف خارج الجسم الحي .مجلة جامعة كربلاء العلمية المجلد الخامس / العدد الاول .

8-حمد،محمد شهاب وجاسم،نورا جبر (2011). تأثير مكونات الوسط الغذائي والجزء النباتي في استحثاث الكالس لنبات البلادونا خارج الجسم الحي. مجلة العلوم الزراعية العراقية ، 42(3) :59-70.

9-رهيف، عبد الامير هبل ، صالح محسن بدر ، وفاء ابراهيم حسين وميساء عبد الكريم حسين. (2000). الانتاج الواسع لأصل التفاح MM106 بزارعة الانسجة. مجلة الزراعة العراقية. 5 (3) : 200-210 .

10-سلمان، محمد عباس وفرقد محمد الدباغ (2000) .الإكثار الخضري لاشجار البشملة *Riobotrya japonica* Lindle باستخدام تقنية زراعة الانسجة 1-انشاء الزروعات .مجلة الزراعة العراقية .5(3):141-150 .

11- عبدالله ،غسان رشيد،عبداللطيف الخطيب ومحمود سراج علي(2003) تأثير تركيز منظمات النمو (BAP,IAA) على الإكثار الخضري الدقيق للجاردينيا *Cardenia jasminoides* صنف Veitchii بأستخدام تقنيات زراعة الانسجة ، مجلة العلوم الزراعية والبحرية ،8 (1) : 35-40.

12-Al-Khayri, J. M. and A. M. Al-Bhrany, (2001). *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime). Plant Tissue Cult. 12(2): 167-172.

13-Anisuzaman, M.; Jarin, S.; Naher, K.; Akhtar, M.M.; Alam, M.J.; Khalekzzaman, M.; Alam, I. and Alam, M.F. (2008). Callus induced organogenesis in okra (*Abelmoschus esculents* L. Moench.). Asi. J. Plant Sci., 7: 677 – 681.

14-Asahira, T.Y. and Kano, Y. (1977). Shoot information from cultured tissue of strawberry fruits. J. Jap. Soc. Hort. Sci., 46 : 317 .

strawberry plants .J. Food Sci.58: 788-792 .

25-Murashige; T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and Bioassays with Tobacco tissue cultures .Physio. Plant. 15: 235-238.

26-Nakamura M., Takeuchi Y.,Kazuhiko M., Minoru S. and Shintaro F. (1999). High anthocyanin accumulation in the dark by strawberry (*Fragaria ananassa*) callus .Biotechnology Letters 21:695-699 .

27-Passey , A.J.; Barrett , K.J. AND James, D.J.(2003) .Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria ananassa* Duch.) using a range of explants types .Plant Cell Reports .21:397-401.

28-Pirttilla A M; Podolich O; Koskimaki JJ; Hohtola E. and Hohtola A (2008). Role of origin and endophyt infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Plant Cell, Tissue Org. Cult. 95: 47-55.

29-Safdari, Yaghoob.and Seyed Kamal Kazemitabar (2010). Direct shoot regeneration, callus induction and plant regeneration from callus tissue in Mose Rose (*Portulaca grandiflora* L.) PO J 3(2): 47-51.

30-Shirin ,F; Hossain M ;Kabir MF; Roy M. and Sarker, S.R. (2007). Callus Induction and Plant Regeneration from Internodal and Leaf explants of four Potato (*Solanum tuberosum* L.). cultivars. World J. Agric .Sci. 3(1):01-06 .

31-Taiz, L and E , Zeiger. 2006. Plant Physiology. Sinauer Assciates, Inc Publishers. Sunderland . USA. p. 290-300.

32-Toyoda, H.; Horlkoshl, K.; Inaba, K. and Ouchl, S. (1990).Plant regeneration of callus Tissues Induced from Leaf

15-Auge ,R. (1984). Les phenomenes physiologigueslies alarealisation des culture.

16-Azura , H. & T. Motoza (1990). *In vitro* mass propagation of Virus–free plant of Dahlia (Syukuhai). Bulletin of Ibarakiken Horticulture Experiment Station (Japan) 15: 64–69 .

17-Bhuiyan , N.H., Adachi , T. (2002). Efficient regeneration from hypocotyls cultures of betalanin forming plant, *Portulaca* sp. cv. Jawel : stimulatory effect of thidiazuron . Plant Biotech . 19(1) :57-61 .

18-Biswas,M. K.; U. K., Roy,,R. Islam; M. Hossain.(2010). Callus culture from leaf blade, nodal, and runner segments of three strawberry (*Fragaria* sp.) clones. Turk. J. Biol .,34:75-80 .

19-Dickerson, Gerge W.2004. Home Garden Strawberry production in New Mexico.Bringing Science to your Life. Guide H-324.

20-Firoozbady, E. and Moy, Y. (2004). Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis . *In vitro* cell Dev. Biol. Plant, 40:67-74.

21-Jones, O.P.,Waller, BJ. And Beech, M.G. (1988). The production of strawberry plants from callus cultures. Plant Cell Tis Organ Cult.12:235-241.

22-Khan, S.and Spoor, W. (2004). Callus culture and regeneration system from leaf explants in strawberry cv. Tango. International Journal of Biology and Biotechnology. 1(3): 423-428.

23-Linsmaier, EM and Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 18: 100 - 127.

24-Mori T.; M.Sakurai; J. Sheigeta ; K. Youshida and T. Kondo (1993). Formation of anthocyanin from cells cultured from different parts of

Strawberry Cultivar "*Toyonoka*". Journal of Xiaogan University. China. http://en.cnki. com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-GXY200703005.htm

36-ZHU Hai sheng; PAN Dong –ming; LIN Yi-zhang; ZHANG Zhi- zhong and WEN Qing –fang. (2007) *in vitro* Efficient Regeneration system of Strawberry .Acta Boreali–Occidentalia Sinica .Aub.,China. http://en.cnki. com.cn/ Article_en/CJFDTOTAL-DNYX 200705010.htm

explants of Strawberry .Plant Tissue Culture Letters .7(1): 38-41.

33-Zhao,Yanyn .2007.Berry Fruit .print in the United States of America on acide- free paper .

34-Zebrowska, J.I. and J. Hortynski (2005). Plant Regeneration from Leaf explants in Strawberry (*Fragaria* ×*anaassa* Duch.). ISHS Acta Horticulture 567: IV International Strawberry Symposium. 168 (6): 1425-1431.

35-Zhibing, Xie ; Zhong Xiaohong ; Li Jin and Deng Ziniu. (2007). Researh on Inducing of Adventitious Shoots from

Basrah J. Agric. Sci. 2012, 25(2): 1-16

IN VITRO PLANT REGENRATION OF STRAWBERRY (*Fragaria* x *ananassa*) CV. ALBION VIA ORGANOGENESIS

M.A. Ibrahim*; H. A. Al-Taha[*]; Z. A. Saaid**
*Department of horticulture and Lande Scape design, College of Agriculture, University of Basrah; **Department of Biology, College of Science, University of Basrah

[*]majidalbassiri@yahoo.com

Abstract. The present research was conducted at the Plant Tissue Culture Lab. - Agriculture College – Basrah University for the period from 1/12/2010 to 1/10/2011 in order to propagate strawberry plant (*Fragaria ananassa*) cv. Albion using leaf segment and petiole *in vitro* culture by direct and indirect organogenesis. The results of showed that leaf segment produced granular callus after two months of culture on MS medium supplemented with different concentrations (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5) mg.l^{-1} benzyl adenine with a fixed concentration of naphthalene acetic acid (0.2 mg.l^{-1}). The MS medium supplemented with 1.5 mg.l^{-1} benzyl adenine led to the shoot formation. The results also indicated that petioles cultured with the same components of MS medium led to the formation of coherent and active callus increased the quantity of increasing the concentration of benzyl adenine. When it culture led to shoot production with the emergence of the roots of white reddish short down this shoots at a concentration of 2.0 mg.l^{-1} benzyl adenine with the emergence of adventitious shoots directly from cut zone of leaf base of petiole . The results also showed that the cultivation of petiole with leaf base in MS medium with the same components and concentrations with the replacement of the kinetin instead of benzyl adenine led to the formation of lobular callus at concentrations of 1.5, 2.0 and 2.5 mg.l^{-1} Kinetin that gave shoots when re-cultured, while the petioles did not continue to growth at 0.5 and 1.0 mg.l^{-1}. kinetin. The results showed a lobular callus production on leaf segments when growing in the MS medium supplemented with at 1.0 and 2.0 mg.l^{-1} concentrations of benzyl adenine with a fixed concentration at 0.1 mg.l^{-1} of 2,4-D. When the induced callus re-cultured at 2.0 mg.l^{-1} benzyl adenine led to the shoots formation.

Key words: Callus, Organogenesis, Benzyl adenine, Kinetin, Petiole.