أنتاج كورمات الكلاديولس *Gladiolus grandiflorus* بتقانة الزراعة النسيجية

خزعل علي امين
قسم علوم الحياة / كلية التربية
جامعة الموصل

الاستلام	القبول
2008 / 11 / 06	2009 / 04 / 06

Abstract

We achieved an economical conclusion for Laboratory propagation of gladiolus bulbs *Gladiolus grandiflorus* using tissue culture techniques. This method include the use of corm slices with 8-10 millimeters thickness which were lied in contact with Murashige and Skoog solid medium supported with 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/L of NAA or 2,4-D interaction with different concentrations (0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg/L) of BA and Kinetin. The number of shoots obtained at the level of 4.0 mg/L BA combined with 1.0 mg/L of NAA was 5.1 folds while the largest number of shoots 4.9 folds were found with the kin at 4.0 mg/L with 1.0 mg/L of NAA. The later has more impact on vegetative growth and the number of shoots formed than 2,4-D.

The sucrose and NAA had a great effect on the rooting of shoots and formation of corms, through the best periods of time for each of them. Rooting were 100% when used 60 g/L sucrose within 14 days, and took 56 days to produce corms.

When 90 g/L of sucrose were used with 10 mg/L NAA for rooting, shoots were rooted within 11 days and corm formation 7.0 corm/shoot were accomplished after 42 days. The corms were ready for planting in the filed.

الخلاصة

توصلت الدراسة إلى طريقة اقتصادية للإكثار المختبري لأبصال نبات الكلاديولس *Gladiolus Grandiflorus* بتقانة الزراعة النسيجية، إذ قطعت الكورمات بسمك 8-10/ملم ووضعت في وسط MS الصلب المدعم بـ 0.25 ، 0.5 ، 1.0 ، 2.0 ملغم/لتر من

NAA أو 2,4-D متداخلة مع تراكيز (0.5 ، 1.0 ، 2.0 ، 4.0 ملغم/ لتر) من BA أو Kin. تم الحصول على عدد كبير من الأفرع الخضرية عند استخدام تركيز 4.0 ملغم /لتر من BA مع 1.0 ملغم / لتر من NAA والبالغ 5.1 فرع خضري/شريحة بينما كان العدد 4.9 عند نفس التركيز من Kin ، NAA وكان دور NAA اكبر من 2,4-D من حيث تكوين الأفرع الخضرية، أما بالنسبة للتجذير وتكوين الكورمات من الأفرع الخضرية المتكونة فكان للسكروز و NAA تأثير واضح على التجذير وتكوين الكورمات وتقصير المدة الزمنية اللازمة لتكوينهما إذ بلغت نسبة التجذير 100% خلال 14 يوماً من تاريخ الزراعة عند التركيز 60 غم/لتر من السكروز مع 10 ملغم / لتر NAA و56 يوماً كانت المدة الزمنية اللازمة لتكوين الكورمات في حين أختصرت الفترة الزمنية اللازمة للتجذير إلى 11 يوم وتكوين الكورمات إلى 42 عند التركيز 90 غم / لتر سكروز و 10 ملغم / لتر NAA وأمكن الحصول على أعداد جيدة من الكورمات بلغت 8.7 كورمة / فرع خضري عند المعاملة 90 غم / لتر سكروز و 0.5 ملغم / لتر NAA بعد مدة 46 يوماً. وكانت الكورمات المكثرة بهذه الطريقة ذات حجم صالح للزراعة.

المقدمة

يعّد الكلاديولس *Gladiolus* من أهم أبصال الزينة على المستوى العالمي إذ تسمى ملكة الأبصال المزهرة وذلك لجمال أزهارها وتنوع ألوانها وطول مدة بقائها نظرة في المزهريات بعد القطف، ينتمي جنس الكلاديولس إلى العائلة السوسنية Iridaceae والذي يضم أكثر من 180 نوعاً، موطنه الأصلي حوض البحر الأبيض المتوسط (1). النبات عبارة عن كورمة قرصية الشكل تغلفها أوراق حرشفية، تتكون الكورمات سنوياً من المناطق القاعدية للشمراخ الزهري قبل وخلال مدة التزهير، يبدأ تكوين الشمراخ الزهري بعد اكتمال نمو الورقة الرابعة من النبات، الزهرة قمعية الشكل وتنتظم حوالي (30) زهرة على الشمراغ الواحد، يتكاثر الكلاديولس جنسياً بوساطة البذور أما خضرياً فتستخدم الكورمات والكريمات (1،2) تصاب الكورمات بالعديد من الأمراض الفطرية والفايروسية بسبب بقائها مدة طويلة في التربة لذا لجأ العاملون في مجال الإكثار إلى استخدام تقانة الزراعة النسيجية في إكثاره فضلاً عن الحصول على أصناف هجينة عبر التضريب بين الأصناف المختلفة (3) .

أشارت العديد من الدراسات إلى إمكانية استحداث وتمايز الكالس من الأجزاء المختلفة للنبات كالشمراغ الزهري (4) والمرستيم القمي (5) والبراعم الجانبية للكورمة (5) وشرائح الكورمات (7) . أظهرت إحدى الدراسات ان إضافة 1.5 ملغم /لتر NAA و 0.5 ملغم /لتر Kinetin إلى وسط MS الصلب حفز استحداث ونمو الكالس من البراعم القمية والجانبية وأجزاء من الكورمة واسنحث الكالس على التمايز وتكوين الأفرع الخضرية عند إضافة 0.5، 1.0 ملغم / لتر من BAP إلى الوسط (8).

كذلك وجد ان الوسط الحاوي على 0.5 ملغم لتر BA مع 0.01 ملغم / لتر NAA هو الأمثل في تمايز كالس شرائح الكلاديولس صنف Ice gold (9)، في حين أشارت دراسات أخرى إلى أفضلية إكثار هذا النبات عن طريق حث البراعم الجانبية على تكوين الأفرع الخضرية من دون تكوين الكالس (5)، (10) وأوضحت دراسة أخرى ان إضافة (7–10) ملغم / لتر BA كان مناسباً في تكوين الأفرع الخضرية من البراعم الجانبية للكورمات (11)، وأمكن الحصول على 15–20 فرعاً خضرياً فرعاً خضرياً من أجزاء قاعدة الورقة لنبات الكلاديولس عند وضعه على وسط MS الصلب المدعم بـ 0.2 ملغم / لتر من NAA و 0.9 ملغم /لتر من BA (12) . وتوصلت دراسة أخرى إلى ان تعقيم شرائح الكورمات بكلوريد الزئبق 0.1 % لمدة 8–10 دقائق ومن ثم وضعها على وسط MS الصلب المضاف إليه 2 ملغم / لتر NAA مع 2 ملغم /لتر GA3 كان الوسط الأمثل لتكوين النموات الخضرية من حيث العدد والطول (13).

أما بشأن تجذير الأفرع الخضرية وتكوين الكريمات والكورمات خارج الجسم الحي فقد لوحظ أشارت أن إضافة تراكيز عالية من السكروز وصلت إلى 120 غم/لتر أدت إلى تجذير وتكوين الكورمات (8) و (9).

تهدف الدراسة الحالية إلى توظيف تقانة الزراعة النسيجية في الإكثار التجاري للكلاديولس.

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على كورمات الكلاديولس صنف *Gladiolus grandiflorus* من جامعة الإسكندرية جمهورية مصر العربية، وضعت الكورمات في الثلاجة عند درجة 5^{o}م لمدة 60 يوماً لكسر طور السكون بعدها أزيلت الأوراق الحرشفية المحيطة بالكورمة، غلفت الكورمات بالشاش بعد ترطيبها بالماء المعقم في إناء زجاجي واستمر الترطيب لحين انتفاخ البراعم وتحفزها على النمو والبالغة 15 يوماً، بعدها غسلت الكورمات والبراعم الجانبية النامية بالماء الجاري لمدة 45 دقيقة ووضعت على أوراق الترشيح المعقمة لغرض التخلص من الماء العالق بها، قطعت الكورمات بشكل شرائح من الخارج إلى الداخل وبسمك 8–10 ملم بوساطة مشرط حاد معقم بحيث احتوت كل شريحة على 1– 2 برعم جانبي، عقمت الشرائح بمحلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl تركيز 3% (القاصر التجاري 6%) لمدة 5 دقائق تبعها غمر الشرائح بمحلول كلوريد الزئبق $HgCl_2$ تركيز 0.2% لمدة 5 دقائق ثم غسلت عدة مرات بالماء المقطر المعقم لإزالة أثار المادة السامة جففت الشرائح بأوراق الترشيح المعقمة لإزالة بقايا الماء العالقة بها وهيأت الأجزاء النباتية للزراعة (8).

تكوين النموات الخضرية من الشرائح المعقمة

اختبر وسط MS (16) المدعم بـ 0.0 ، 0.1 ، 0.5 ، 1.0 ، 2.0 ملغم/ لتر من NAA (Naphthalene acetic acid) او 2,4-D (2.4 Dichloro phenoxy Acetic Acid) والمتداخلة مع 0.0 ، 0.5 ، 1.0 ، 2.0 ، 4.0 ملغم/لتر من (Benzyl Adenine) BA و الـ Kin (Kiniten) لغرض تشجيع تكوين النموات الخضرية من الشرائح وكان عدد الشرائح المستخدمة او المزروعة 5/معاملة ، نقلت الشرائح المعقمة إلى دوارق زجاجية سعة 100 مللتر احتوت على 25 مللتر من إحدى تداخلات الوسط الغذائي المختبرة وبمعدل (5) شرائح /دورق حضنت العينات في غرفة النمو عند درجة حرارة 25 ± 2^{o} م وشدة إضاءة 1500 لوكس ونظام تعاقبي 16 ساعة ضوء /8 ساعة ظلام.

تجذير الأفرع الخضرية وتكوين الكريمات

استخدم وسط MS الصلب الحاوي على تراكيز 30 ، 60 ، 90 غم /لتر سكروز ومتداخل مع التراكيز 0.25 ، 0.5، 1.0 ، 10 ملغم / لتر NAA لغرض حث الأفرع الخضرية على التجذير وتكوين الكريمات، نقلت الأفرع الخضرية المتكونة إلى دوارق زجاجية سعة 100 مللتر والحاوية على 25 مللتر من إحدى الأوساط الغذائية المختبرة وبمعدل 5 أفرع / دورق حضنت العينات في ظروف التحضير الواردة أعلاه.

النتائج والمناقشة

كفاءة التعقيم السطحي لشرائح الكورمات

أظهرت نتائج العملية المتبعة في التعقيم السطحي لشرائح الكورمات كفاءة عالية في الحصول على شرائح معقمة بنسبة 90%.

تكوين الأفرع الخضرية من الشرائح المعقمة

أظهرت نتائج الجدول (1) كفاءة شرائح الكورمات الحاوية على البراعم الجانبية في تكوين الأفرع الخضرية عند زراعتها في الوسط MS المضاف إليه تراكيز BA و NAA او 2,4-D ويبين الجدول ان تأثير مجمل تداخلات الوسط الغذائي الحاوية على NAA و BA كانت ملائمة في حثها على نشوء الأفرع الخضرية من تلك الأوساط المدعمة بـ 2,4-D وBA ، ويلاحظ ان أفضل وسط بدلالة إعطائه اكبر عدد من الأفرع الخضرية والبالغة 5.1 فرع خضري / شريحة (شكل B و C) (MS + 4.0 ملغم / لتر BA + 1.0 ملغم / لتر NAA) شكل (1) وهذه النتيجة تتفق مع دراسة كل من (8)، (9)، (15)، (16)، (17)، (18) من حيث التأثير الايجابي لكل من NAA و BA في تشجيع حث الأجزاء النباتية في تكوين الأفرع الخضرية مباشرة دون المرور في مرحلة الكالس، في حين كانت أفضل نتيجة من حيث عدد الأفرع الخضرية 3.3 (فرع خضري / شريحة) عند الوسط (MS + 4.0 ملغم / لتر BA + 0.1 ملغم / لتر 2,4-D)، وقد يعزى انخفاض أعداد الأفرع الخضرية عند إضافة الـ 2,4-D إلى الوسط MS إلى التأثير التثبيطي له في منع تكوين الصفيحة الوسطى وعرقلة الانقسام

الخلوي عند استخدامها بتراكيز عالية مما يعيق انقسام الأنسجة المرستمية القمية في عملية نشوء الأفرع الخضرية وهذا ما أشارت إليه الدراستان(19) و(20).

جدول (1): تكوين الأفرع الخضرية من شرائح كورمات الكلاديولس في وسط MS الصلب الحاوي على تراكيز من BA والمتداخلة مع تراكيز من NAA أو 2,4-D

BA ملغم/لتر	NAA ملغم / لتر					2,4-D ملغم / لتر				
	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0
0.0	1.2*	2.1	3.2	3.8	2.6	1.0	1.2	1.7	1.0	1.0
0.5	1.7	3.2	3.8	4.1	4.0	1.5	2.1	1.8	2.2	2.3
1.0	2.5	4.2	3.6	4.4	4.0	1.8	3.1	3.0	2.8	2.2
2.0	2.6	4.0	3.8	4.8	3.6	2.2	2.8	2.6	2.2	2.1
4.0	2.4	4.4	4.0	5.1	3.9	2.5	3.3	2.4	2.0	1.1

* معدل الأفرع الخضرية المتكونة من شريحة

أما الجدول رقم (2) والذي يوضح تأثير الكاينتين وكل من NAA أو2,4-D في تكوين الأفرع الخضرية من شرائح كورمات الكلاديولس المعقمة، اذ بين زيادة واضحة في عدد الأفرع الخضرية المتكونة والمتناسبة مع زيادة تركيز الكاينتين لوحده إلى حد ما في الوسط الغذائي، ويلاحظ من الجدول ان التداخلات الحاوية على الكاينتين وNAA كانت أفضل بشكل عام من الأوساط الحاوية على الكاينتين و2,4-D وكانت أفضل نتيجة هي 5 فرع خضرية / شريحة في الوسط المدعم بـ 4.0 ملغم / لتر كاينتين مع 0.5 ملغم / لتر NAA كما أمكن الحصول على نفس العدد من النموات الخضرية عند استخدام 4 ملغم /لتر Kin مع 2 ملغم / لتر NAA لذا نستطيع ان نقول بان الكاينتين له الدور الأكبر في تكوين النموات الخضرية لوحدها.

وبصورة عامة فإن تكوين الأفرع الخضرية مباشر ة من شرائح الكورمات المعقمة دون مرورها بمرحلة الكالس قد يعود إلى كفاية منظمات النمو من الأوكسينات والسايتوكاينيات الداخلية (Endogenous) لهذه القطع النباتية أو إلى كفاءتها عند الإضافة إلى الوسط الغذائي وهذا يتفق مع أوضحه (21).

جدول (2): تكوين الأفرع الخضرية من شرائح كورمات الكلاديولس في وسط MS الصلب الحاوي على تراكيز من ال Kin والمتداخلة مع تراكيز من NAA أو 2,4-D

BA ملغم/لتر	NAA ملغم / لتر					2,4-D ملغم / لتر				
	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0
0.0	- *	2.1	2.8	3.1	2.3	-	2.0	2.0	2.8	1.0
0.5	3.2	3.8	3.2	3.6	3.6	2.1	2.0	2.1	2.8	1.2
1.0	3.6	3.4	4.1	3.7	3.8	2.2	3.1	2.4	2.1	1.4
2.0	4.1	4.2	4.4	4.5	5.0	3.0	3.0	2.7	2.4	2.0
4.0	4.0	4.8	5.0	4.9	5.0	3.4	3.4	3.0	2.6	2.6

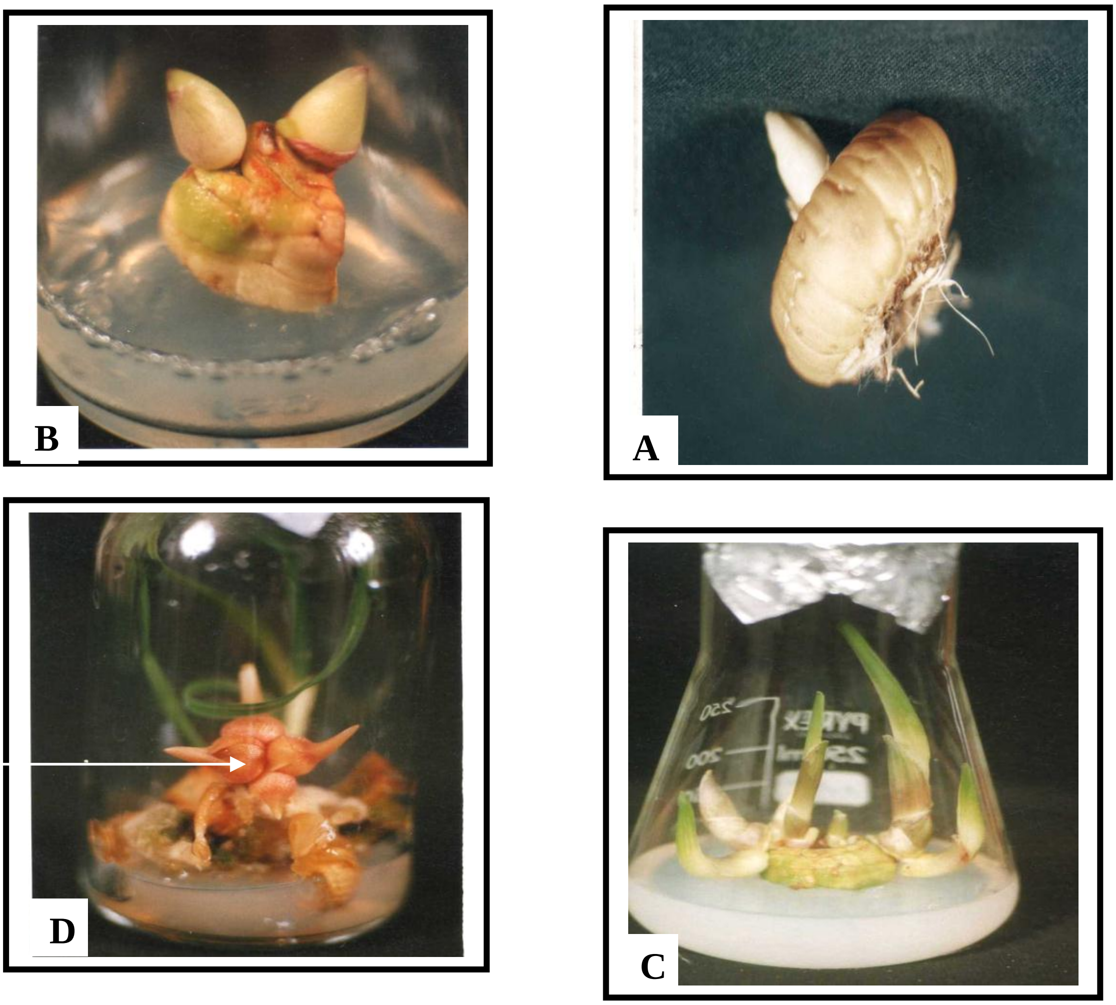
* معدل الأفرع الخضرية المتكونة من كل شريحة / كورمة

تجذير الأفرع الخضرية وتكوين الكورمات :

يبين الجدول (3) ان لزيادة تركيز السكروز في الوسط الغذائي وتداخله مع تراكيز NAA تأثير واضح في اختزال المدة الزمنية اللازمة للتجذير إذ كانت أقصر مدة زمنية 11 يوم عند إضافة 90 غم/لتر من السكروز إلى الوسط MS المزود بـ 10 ملغم/لتر NAA، كما يشير الجدول إلى ان تركيز 60 غم/لتر سكروز وتداخله مع 10 ملغم/لتر NAA أدى إلى زيادة نسبة التجذير وتكوين الكورمات إذ بلغت 100% بعد 14 يوماً من المعاملة (شكل D)، ويظهر الجدول أيضاً اختزال في المدة الزمنية اللازمة لتكوين الكورمات والمتناسبة مع زيادة تركيز السكروز في الوسط الحاوي على 90 غم/ لتر من السكروز وهذا ما أشار إليه ElGendy وآخرون (8) و Nagaraju وآخرون (9). أما فيما يتعلق بصفة تكوين الكورمات يلاحظ من الجدول ان لتراكيز السكروز المستخدمة وتداخلاتها مع NAA تأثير واضح في عدد الكورمات المتكونة وكان التركيز 60 غم / لتر سكروز أكثر ملائمة من باقي التراكيز وامتاز الوسط الحاوي على 60 غم /لتر سكروز و 0.5 ملغم / لتر NAA بكفاءته إذ أعطى أفضل عدد من الكورمات والبالغ 9.6 كورمة / فرع خضري (شكل D) نفسه وهذا أيدته العديد من الدراسات منها الحياوي وآخرون (22) و Priyakumari (23) ويمكننا أن نوصي بأنه يمكن الحصول على أعداد كبيرة من الكورمات باستخدام تقانة الزراعة النسيجية وهذا يعد من الإنجازات المهمة في مجال إكثار أبصال الزينة.

جدول (3): تأثير السكروز و NAA في تجذير الأفرع الخضرية وتكوين الكورمات لنبات الكلاديولس

تراكيز السكروز غم/لتر	NAA ملغم/لتر	الزمن اللازم للتجذير(يوم)	نسبة التجذير %	الزمن اللازم لتكوين الكورمات (يوم)	عدد الكورمات
30	0.0	25	30	–	–
	0.25	18	70	75	5.8
	0.5	16	71.4	74	5.3
	1.0	15	70.5	72	5.4
	10	16	75.2	70	4.4
60	0.25	17	92.6	65	9.2
	0.5	17	92.8	62	9.6
	1.0	15	94.2	57	8.5
	10	14	100	56	8.4
90	0.25	13	80.3	50	8.2
	0.5	12	81.6	46	8.7
	1.0	11	78.3	45	7.8
	10.0	11	79.3	42	7.0



شكل (1): يوضح مراحل نشوء الأفرع الخضرية وتكوين الكورمات من شرائح كورمة الكلاديولس

A) الكورمة الكاملة التي اعتمدت كمصدر للشرائح.

B) بداية تكوين البراعم الخضرية من شرائح الكورمة على الوسط MS المجهز بـ 2 ملغم/لتر NAA مع 4.0 ملغم / لتر BA وبعمر 15 يوماً.

C) تطوير البراعم الخضرية إلى نمو1ت خضرية من الشكل – 2 – وعلى ذات الوسط وبعمر 30 يوماً.

D) نشوء الكورمة او الكريمات (التأشير) من النموات الخضرية للشكل (3) وعلى وسط MS المجهز بـ 60 غم / سكروز بعد 56 يوماً للزراعة.

المصادر

1) السلطان، سالم محمد، وطلال محمود الجلبي، محمد داؤد الصواف / نباتات الزينة. دار الكتب للطباعة والنشر / جامعة الموصل.

2) Steinitz B & Lilien– kipnis H. Plant Physiol. 135: 495-500 (1989).

3) Ziv M. Plant Cell, Tiss, Org, Cult. 17:101-110 (1989).

4) Ziv M. Scienta Hortic. 11: 257-260 (1979).

5) Duony Tan Nhut; Jaime, A. Planzuan Huyen; K. Y. Scientia Hortic 102: 407-414 (2004) .

6) Ziv M. Lilient, Kipnis, H. Pv; Evans, D. A; Sharp, W. R. and Bajaj Y. P. S. Hand book of Plant Cell Culture Vol: 5 (1990). New York.

7) Pinaki Sinha, and Shamal, K. Rg. Plant Tiss Cult. 12:139-195. (2002).

8) ElGenfy, S. A; Hashi, M. E. Hosni, A. M. Agriculture Sci. 9:869-887. (2001).

9) Nagaraju, V; Bhwink, G; Parthasarathy, V. A. Acta. Bota. Croatica 61:27-33. (2002).

10) Hussain C. T. S; Geetha, P. K. Applied Horti 3:50-55. (1997).

11) Steiniz t, B. A litlient; H. Plant Physiol. 135:495-500 (1992) .

12) Subhash, K. Ro. Y, Faurab vCangoped hyay. Afri. J. Biotech 5:1204-1209. (2006) .

13) Pathania, N. S.; Misra, R. L; Reghava–S.P.S. Ornamental, Hort. 4:69-73 (2001).

14) Anandhi, S; Sekar, friend ship. Indian. J. Hortic; 57:360-363. (2002).

15) Hosni, A. M. Agriculture Sci 9:853–865. (2001).

16) Murashige, T.; Skoog, F. Physiol, Plant. 15:473– 479 (1962).

17) اللبو، رشا إسماعيل خليل. تمايز مزارع كالس الأجزاء المختلفة من البيتونيا *Petunia hybrida* واستخلاص بعض المركبات الفلافونويدية، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل. (2007).

18) العقـراوي، هــاوزين صــلاح خليـل. تعـريض بـذور وأعضــاء وكــالس نبــات اليانســون *Pimpinella anisum* للأشـعة فـوق البنفسـجية وتقـدير محتـوى انيشـول بوسـاطة كروماتوغرافيـا السـائل عـالي الأداء، رسـالة ماجسـتير، كليـة التربيـة، جامعـة الموصـل (2006).

19) البياتي، يحيى علي تقي. تكثير نبات الجيربرا *Gerbera jamesonii* بطريقة زراعة الأنسجة، رسالة ماجستير، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل (1988).

20) سلمان، محمد عباس. أساسيات زراعة الخلايا والأنسجة النباتية. دار الكتب للطباعة والنشر / جامعة الموصل (1988).

21) الكناني، فيصل رشيد ناصر. زراعة الأنسجة والخلايا النباتية. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل. (1987).

22) حياوي، سهام أحمد محمود. الفعالية المضادة للجراثيم في النيكوتين المستخلص من نباتات التبغ *Nicotiana tabacum* L البذرية والكالس والنباتات المتكونة منه والكشف عن الروتين في الكالس. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل. (2001).

23) Priyakumari, and Sheela, V. L. Tropical Agri 43:47-50. (2005).