استحداث الكالس وتكوين الأجنة الجسمية من زراعة أجزاء الورقة لنبات الكلاديولس *Gladiolus hybrida*

علاء هاشم يونس الطائي بشار زكي قصاب باشي
قسم البستنة / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل / العراق

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في مختبر زراعة الخلايا والأنسجة النباتية خلال المدة من أب ٢٠٠٨ لغاية شباط ٢٠٠٩ على نبات الكلاديولس صنف "White prosperity" ، إذ زرعت أجزاء وسطية أو قاعدية من أوراق ناتجة من الزراعة النسيجية على وسط MS المجهز بمنظمات النمو التالية : NAA بالتراكيز صفر و١.٠ و٢.٠ و٤.٠ و٦.٠ ملغم / لتر و 2,4-D بالتراكيز صفر و ٠.٠١ و ٠.٠٢ و ٠.١ و٠.٢ ملغم / لتر وTDZ بالتراكيز صفر و ٠.١ و٢.٠ و٣.٠ و٤.٠ ملغم / لتر كل على انفراد بهدف استحداث الكالس وتمايزه . تشير النتائج إلى الحصول على أعلى نسبة لتكوين الكالس٩٠ % من زراعة أجزاء الأوراق على وسط MS المزود بـ ٠.٢ملغم/ لترD-2,4 وهذه المعاملة أعطت أعلى كمية من الكالس واحتاجت إلى أقل عدد أيام لبدء تكوين الكالس ٣٠ يوم ، زرع الكالس المتكون على وسط MS المزود بـ صفر و ٠.١ و ٠.٢ ملغم / لتر BA لغرض تمايزه وأعطى أفضل نسبة تمايز للأفرع من الزراعة على الوسط المزود بـ ٠.١ ملغم / لتر BA بنسبة٨٠ % وبعدد أفرع ١٠ فرع / جزء نباتي وهذا بدوره أعطى أعلى معدل لطول أطول فرع ٦.٥ سم وأعلى معدل لعدد الجذور ١٧ جذر / جزء نباتي وبمعدل طول لأطول جذر ٤.٣ سم بعد ٨ أسابيع من الزراعة . كما تم الحصول على الأجنة الجسمية (Somatic embryogenesis) من خلال زراعة الكالس الناتج من زراعة قواعد الأوراق على وسط MS المزود بـ ٠.٢ملغم / لتر 2,4-D بعد ٨ أسابيع من الزراعة ثم الزراعة على وسط MS خالي من منظمات النمو إذ تم تشخيص المراحل الثلاثة لتكوين الأجنة الجسمية (الطور الكروي والقلبي والطوربيدي) ، الأجنة الناتجة تطورت إلى نبيتات من خلال زراعتها على وسط MS المزود بـ ٠.٢ ملغم / لتر IAA بعدها تم أقلمتها في المختبر وبنسبة بقاء ١٠٠ % . ومن حساب عدد الكروموسومات للنباتات الناتجة من زراعة الكالس والنباتات الناتجة من الحقل تبين أنها متشابهة في عدد الكروموسومات (٦٠ كروموسوم) مما يدل على عدم حدوث تغايرات وراثية فيما بينها .

المقدمة

يعود جنس الكلاديولس إلى العائلة السوسنية (Iridaceae) ، تعتبر جنوب إفريقيا الموطن الأصلي له (رسول ، ١٩٨٨ و Goldblatt و Manning ، ١٩٩٨) ، ويعد من أجود أزهار القطف التي تزرع تجاريا حيث يمكن زراعته في أي وقت من السنة وإنتاج أزهاره على مدار العام ، وهو نبات عشبي مزهر حولي من ذوات الفلقة الواحدة ذات أوراق سيفية ، يتكاثر الكلاديولس جنسيا بالبذور وخضريا بزراعة الكورمات أو الكريمات (لارسون ، ١٩٨٥ وطواجن ، ١٩٨٧ و خطاب و وصفي ، ١٩٨٨) . وترجع أهمية الكلاديولس إلى قصرمدة النمو التي تبلغ في المتوسط ثلاثة أشهر من بداية زراعة الكورمات و حتى الحصول على الأزهار فضلا عن تعدد أشكاله وألوان أزهاره وطول حياة الأزهار المقطوفة في المزهرية وكذلك وجود بعض الأنواع التي تكون أزهارهاعطرية (خطاب ووصفي ، ١٩٨٨) . يعد إكثار النبات خضريا من أهم التطبيقات العملية لزراعة الأنسجة في الوقت الحاضر ، إذ أمكن وباستخدام التقنيات المختلفة للزراعة النسيجية الحصول على أعداد كبيرة تصل إلى الملايين من النباتات المتجانسة وذلك من تضاعف الأفرع أو استحداث الكالس وتمايزه أو من خلال تكوين الأجنة الجسمية وفي فترة قصيرة مقارنة بالطرق التقليدية (محمد وعمر ، ١٩٩٠) . إذ تمكن Bajaj وآخرون (١٩٨٣) من استحداث الكالس من زراعة أجزاء من أوراق نبات الكلاديولس من الزراعة على وسط MS المجهز بـ NAA و Kin . وحصل Emek وErdage (٢٠٠٧) على الكالس من زراعة أجزاء من ورقة نبات الكلاديولس ناتجة من الزراعة النسيجية على وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من NAA و BA فوجدا أن أفضل وسط لتكوين الكالس هو الوسط المجهز بـ ٥ ملغم / لتر NAA + ١ ملغم / لتر BA للأجزاء التي أخذت من

• البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول .

تاريخ تسلم البحث ٢٠١٠/٦/٣٠ تم قبوله في ٢٠١٠/١٠/٤

قاعدة الورقة ، وعند زراعة هذا الكالس على وسط MS المجهز بـ ٠.١ ملغم / لتر BA مع خفض نسبة السكر إلى ٢٠ % تم الحصول على الأفرع التي كونت نباتات كاملة فيما بعد . أما فيما يتعلق بتكون الأجنة اللاجنسية (الجسمية) فقد أشار Kim و Han (١٩٩٢) إلى أن الأجنة الجسمية حفزت إما بشكل مباشر على الأجزاء النباتية المأخوذة من أنسجة الكورمات أو بشكل غير مباشر عن طريق تكوين الكالس ومن ثم تكوين نبيتات من هذه الأجنة ، و ذكر الباحثان أن قابلية تكوين الأجنة الجسمية تختلف بين الأصناف في حين لم يكن لعمر الكالس تأثير على تحفيز تكوين الأجنة الجسمية من خلاياه حيث أمكن حفظ قابلية تكون الأجنة الجسمية لمدة أكثر من ٢٨ شهرا عن طريق الاستمرار بالزراعة الثانوية بمدد شهرية ، وأشار الباحثان إلى أن كفاءة تكوين الأجنة الجسمية كانت أفضل على وسط MS المحتوي على 2,4-D بتركيز ٠.٠٧٥ – ١ ملغم / لتر و NAA بتركيز ٠.١– ١ ملغم / لتر ولاحظا أن تطور الأجنة الجسمية كان ضعيفا بوجود 2, 4-D مقارنة بوجود NAA. وحصل Kasumi وآخرون (١٩٩٩) على الأجنة الجسمية من خلال زراعة قطع من السيقان النورية لثلاثة أصناف من الكلاديولس هي " Topaz"، " Traveler " و " Hector " على وسط MS المجهز بـ ٥ ملغم / لتر NAA وكانت نسبة تكوين الأجنة الجسمية٥١ % مع ملاحظة أن الأجنة الجسمية تكونت أكثر في الصنفين"Topaz " و"Traveler". وتمكن Kasumi وآخرون (٢٠٠٤) من الحصول على الأجنة الجسمية من خلال زراعة قطع من جذور نبات الكلاديولس الناتجة من الزراعة النسيجية صنف " Grandiflora " على وسط MS المجهز بـ ٥ ملغم / لتر NAA + ٥ ملغم / لتر BA . وقام كل من Emek و Erdage (٢٠٠٧) بزراعة قطع من أوراق نبات الكلاديولس صنف " Anatolicus " ناتجة من الزراعة النسيجية على وسط MS مجهز بتراكيز مختلفة من NAA فوجدوا أن أفضل كمية كالس تكون على وسط MS المجهز بـ ٥ ملغم / لتر NAA وتم الحصول على الأجنة الجسمية من هذا الكالس بعد ٨ أسابيع من الزراعة على وسط MS المجهز بـ ٠.١ ملغم / لتر BA .

تهدف هذه الدراسة إلى استحداث الكالس من زراعة أجزاء وسطية أو قاعدية من ورقة نبات الكلاديولس الناتجة من الزراعة النسيجية وتمايزه من خلال زراعتها على وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من منظمات النمو بالإضافة إلى تكوين الأجنة الجسمية وتحديد مراحلها المختلفة وتطورها إلى نبيتات ثم اقلمتها في المختبر ومعرفة مدى الثبات الوراثي للنباتات الناتجة من الكالس .

مواد البحث وطرائقه

أجريت هذه الدراسة في مختبر زراعة الخلايا والأنسجة النباتية التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق/كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل خلال المدة من أب ٢٠٠٨ لغاية شباط ٢٠٠٩ على نبات الكلاديولس صنف " White prosperity " وهو احد الأصناف الأوربية التجارية . إذ أخذت أجزاء وسطية من أوراق ناتجة من زراعة نسيجية بطول ٠.٥ سم لأفرع نامية على وسط MS المزود بـ ٠.٥ ملغم / لتر BA وزرعت على وسط MS الصلب المستخدم من قبل Murasshige و Skoog ، ١٩٦٢ المدعم بالاكار (٦ غم / لتر) (الجدول ١) والمجهز بمنظمات النمو التالية : NAA بالتراكيز صفر و ١.٠ و ٢.٠ و٤.٠ و٦.٠ ملغم / لتر ، 2,4-D بالتراكيز صفر و ٠.٠١ و ٠.٠٢ و ٠.١ و ٠.٢ ملغم / لتر ، TDZ بالتراكيز صفر و ١.٠ ، و ٢.٠ و ٣.٠ و٤.٠ ملغم / لتر كل على انفراد بهدف الحصول على الكالس . الكالس الناتج من أفضل معاملة أعيدت زراعته على وسط MS المزود بـ صفر و ٠.١ و ٠.٢ ملغم / لتر BA بعد تجزئته إلى أجزاء بحجم ٥ ملم^3 بهدف التمايز وأخذت بياناتها بعد ثمانية أسابيع من الزراعة . زرعت الأفرع الناتجة بعد فصلها على وسط MS المجهز بـ ١ ملغم / لتر IBA بهدف تجذيرها . كما تم زراعة الأجزاء القاعدية من الورقة الناتجة من الزراعة النسيجية بطول ٠.٥ سم على وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من 2,4-D صفر و ٠.٠١ و ٠.٠٢ و ٠.١٠ و ٠.٥٠ ملغم / لتر لتكوين الكالس ، الكالس المتكون نقل إلى وسط MS خالي من منظمات النمو بهدف الحصول على الأجنة الجسمية وبعد ظهور الأجنة الجسمية أعيدت زراعتها على وسط MS المزود بـ ٠.٢ ملغم / لتر IAA ٠ استعملت لزراعة الأجزاء النباتية قناني زجاجية حجم ٢٠٠ سم^3 وضع بها ٢٠ سم^3 من الوسط الغذائي ، وغُطّيت فوهة القنينة بورق الألمنيوم ، بعدها تم تعقيم الوسط الغذائي بجهاز المؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة ١٢١مْ وتحت ضغط ١.٠٤ كغم / سم^2 لمدة ٢٠ دقيقة وأجريت عملية الزراعة في منضدة انسياب الهواء الطبقي (Laminar – air – Flow cabinet) ، بعد زراعة جميع الأجزاء النباتية وللتجارب المختلفة نقلت الزروعات إلى غرفة النمو تحت شدة إضاءة ٣٠٠٠ لوكس بتعاقب ضوئي ١٦ ساعة ضوء و٨ ساعات ظلام مجهزة من

أنابيب الفلورسنت البيضاء وبدرجة حرارة٢٥ ± ٢مْ . تم تحليل البيانات باستخدام التصميم العشوائي الكامل CRD وكل معاملة تكونت من عشرة مكررات كل مكرر احتوى على جزء نباتي واحد واستعمل البرنامج الجاهز Anonymous (١٩٩٦) لتحليل البيانات وتم مقارنة المتوسطات حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى احتمال ٥ % (داؤود وعبد الياس ، ١٩٩٠) .

الدراسة الخلوية : تم عمل مقاطع خلوية لحساب عدد الكروموسومات للنباتات الناتجة من الكالس ومقارنته مع عدد الكروموسومات للنبات الناتج من الحقل :

١ – **التثبيت (Fixation) :** ثبتت نهايات الجذور بعد استئصالها من النباتات بطول ١٠ ملم باستخدام محلول كارنوي أول (١) (Carnoys flouid) والمتكون من ثلاثة حجوم من الكحول الاثيلي المطلق (Absolute Alcohole) وحجم واحد من حامض الخليك الثلجي (Glacial acetic acid) و المحضر أنيا لتجنب تكون خلات الاثيل التي تزيد من درجة اصطباغ السايتوبلازم (Sharma وSharma ، ١٩٨٠) وتركت لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة الغرفة وبعد ذلك غسلت بالكحول الاثيلي بتركيز ٧٠ % مع الرج بين فترة وأخرى لمدة ثلاث ساعات مع تبديل الكحول كل ساعة بعدها حفظت في التركيز الكحولي نفسه داخل الثلاجة لحين الاستعمال .

٢ – **التصبيغ وتحضير الشرائح :** استخدمت صبغة الكارمين (Carmen) الحامضية بتركيز ٢ % في تصبيغ نهايات الجذور لمدة ٢٤ ساعة وبعدها أزيل الماء بعملية سحب الماء (Dehydration) وذلك بإمرار الجذور في سلسلة متدرجة تصاعدي من الكحول الاثيلي (٣٠ و ٥٠ و ٧٠ %) على التوالي واستخدمت طريقة الهرس (Squash method) في تحضير الشرائح حيث وضع طرف الجذر المصبوغ على الشريحة الزجاجية وبوساطة إبرتي التشريح الدقيقتين أزيلت القلنسوة Root (cap) وأخذ١-٢ ملم من طرف الجذر وهرس على شريحة زجاجية هرسا جيدا باستخدام بعض القطرات من حامض الخليك الثلجي بتركيز ٤٥ % ثم وضع غطاء الشريحة بدقة لمنع تكون الفقاعات الهوائية و بوساطة النهاية العريضة لإبرة التشريح يضرب باعتناء عدة ضربات سريعة ومستمرة على غطاء الشريحة لتوزيع الخلايا بشكل متساوي ولطرد الفقاعات الهوائية المتكونة ثم مررت الشريحة على لهب مصباح كحولي (٤- ٥) مرات متتالية وبعد ذلك وضعت الشريحة بين طيات ورقتي الترشيح وضغط عليها بقوة بواسطة الإبهام ، ثم فحصت تحت المجهر واختيرت الخلايا التي تحتوي على أطوارانقسام واضحة والتي يسهل عد الكروموسومات فيها ، ثم صورت بوساطة الكاميرا الرقمية (Digital) نوع (Sony) من خلال المجهر الضوئي Olympic (عمر ، ٢٠٠٨) .

الجدول (١) : مكونات الوسط الغذائي MS الصلب بكامل قوته .

المركب	التركيز (ملغم / لتر)	المركب	التركيز (ملغم / لتر)
MS salts	قوة كاملة	Pyridoxine-HCl	٠.٥
Inositol	١٠٠	Nicotinic acid	٠.٥
Sucrose	٣٠٠٠٠	Glycine	٢.٠
Thiamine-HCl	٠.١	Agar-Agar	٦٠٠٠

النتائج والمناقشة

يبين الجدول (٢) أن أعلى نسبة لتكوين الكالس٩٠ % حصلت من الزراعة على الوسط المزود بـ ٠.٢ ملغم / لتر 2,4-D وهذه المعاملة بدورها أعطت أعلى كمية من الكالس واحتاجت إلى أقل عدد أيام لبدء تكوين الكالس ، زرع الكالس المتكون على وسط MS المزود بـ صفر و ٠.١ و ٠.٢ ملغم / لتر BA كما في الجدول (٣) \الذي يبين أن أفضل نسبة تمايز تم الحصول عليها من الزراعة على الوسط المزود بـ ٠.١ ملغم / لتر BA والذي تفوق معنويا على معاملة ٠.٢ ملغم / لتر BAولأغلب الصفات المدروسة وكانت بنسبة ٨٠ % مقارنة مع ٢٠ % من الزراعة على الوسط المزود بـ ٠.٢ ملغم / لتر BA وبعدد أفرع ١٠ فرع / جزء نباتي مقارنة مع ٦ فرع / جزء نباتي من المعاملة ٠.٢ ملغم / لتر BA وهذا التركيز بدوره أعطى أعلى معدل لطول أطول فرع ٦.٥ سم وأعلى معدل لعدد الجذور ١٧ جذر / جزء نباتي وبمعدل طول ٤.٣ سم في حين كانت هذه المعدلات ٤.٥ سم و١٢جذر / جزء نباتي و ٤ سم من الزراعة على الوسط المزود بـ ٠.٢ ملغم / لتر BA على التوالي ، ويبين الجدول أن الكالس المزروع عند معاملة المقارنة لم يتمايز إلى أفرع أو

جذور . والشكل (١) يبين الكالس المتكون وتمايزه إلى أفرع ، قد يكون سبب نجاح أجزاء الأوراق في استحداث الكالس لا سيما في الأوساط المحتوية على NAA أو 2,4-D أو TDZ إلى قدرة الخلايا على إعادة التكوين (Totipotency) للخلايا مقترنة بوجود العوامل الداخلية المتعلقة بالتركيب الوراثي للخلايا النباتية ومستوى الهرمونات و الفيتامينات فضلا عن توافق الوسط الغذائي والإضافة الخارجية لمنظمات النمو بالتراكيز الملائمة التي قد تعزز انقسام خلايا الأجزاء النباتية المختلفة التي قد تتباين قابليتها اعتمادا على مصدرها فالأوراق أعطت الكالس ربما لكونها مواقع رئيسة في بناء العديد من المركبات الضرورية كالهرمونات النباتية والتي تعتبر مراكز تجهيز النبات بالغذاء المصنع و تمتاز مثل هذه الخلايا الموجودة في هذه الأجزاء النباتية فقدان التمايز (Dedifferentiation) فتتحول إلى خلايا مرستيمية مرة أخرى كما يحدث في التئام الجروح (Margl وآخرون ، ٢٠٠٢) .

الجدول (٢) : تأثير إضافة NAA أو 2,4-D أو TDZ في وسط MS الصلب في استحداث الكالس من زراعة الأجزاء الوسطية من ورقة نبات الكلاديولس *Gladiolus hybrida* للصنف " prosperity White" بعد ٨ أسابيع من الزراعة .

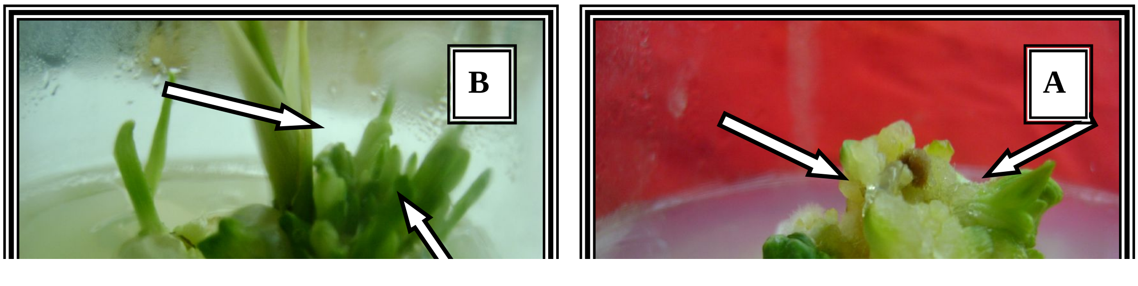
منظمات النمو	التراكيز (ملغم / لتر)	بدء استحداث الكالس (يوم)	الأجزاء التي كونت كالس (%)	كمية الكالس المتكون
NAA	٠.٠٠	صفر	صفر	صفر
	١.٠٠	٤٥	٢٠	+
	٢.٠٠	٣٩	٣٠	+
	٤.٠٠	٤٠	٣٠	+
	٦.٠٠	٣٢	٨٠	++
2,4-D	٠.٠٠	صفر	صفر	صفر
	٠.٠١	صفر	صفر	صفر
	٠.٠٢	٤٢	٢٠	+
	٠.١	٣٨	٥٠	+
	٠.٢	٣٠	٩٠	+++
TDZ	٠.٠٠	صفر	صفر	صفر
	١.٠٠	٤٨	١٠	+
	٢.٠٠	٤٠	٢٠	+
	٣.٠٠	٣٢	٦٠	+
	٤.٠٠	٣٧	٤٠	++

صفر لم يتكون كالس + كالس قليل بقطر ٠.٥سم ++ متوسط بقطر ١سم +++ كالس بقطر ١.٥- ٢ سم
عدد القطع المزروعة ١٠ قطع

الجدول (٣) : تمايز كالس أوراق الكلاديولس *Gladiolus hybrida* صنف " prosperity White " في وسط MS المزود بتراكيز من BA بعد ٨ أسابيع من الزراعة .

BA (ملغم / لتر)	تمايز الكالس (%)	عدد الأفرع / جزء نباتي	طول أطول فرع (سم)	عدد الجذور	طول أطول جذر (سم)
صفر	صفر ج	صفر ج	صفر ج	صفر ج	صفر ج
٠.١	٨٠ أ	١٠ أ	٦.٥ أ	١٧ أ	٤.٣ أ
٠.٢	٢٠ ب	٦ ب	٤.٥ ب	١٢ ب	٤.٠ أ

الأرقام ذات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنويا فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى
احتمال ٥ % .



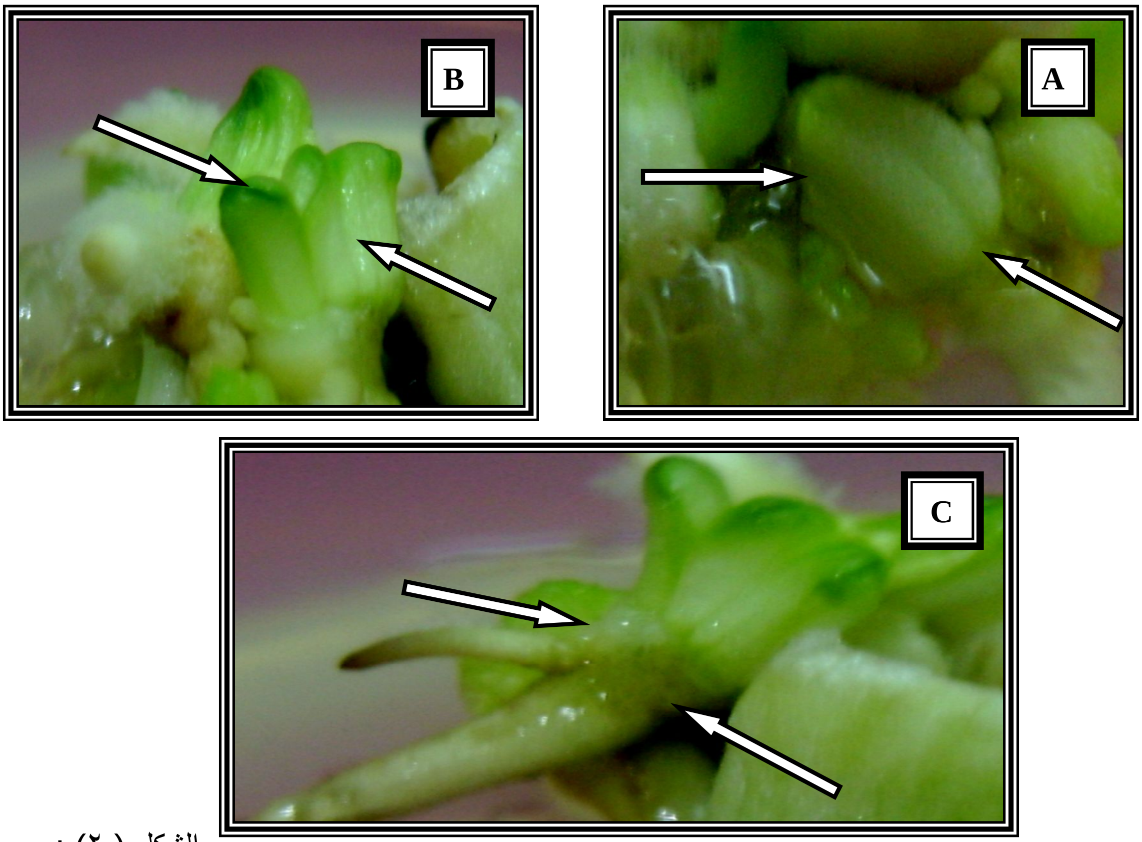
الشكل (١) : A = الكالس الناتج من زراعة الأجزاء الوسطية لورقة نبات الكلاديولس *Gladiolus hybrida*
صنف " White prosperity " على وسط MS المزود بـ ٠.٢ ملغم / لتر 2,4-D . B = تمايزه إلى أفرع من زراعته على وسط MS مجهز بـ (٠.١) ملغم / لتر BA .

يبين الجدول (٤) تأثير إضافة 2,4-D في تكوين الكالس من زراعة أجزاء قواعد الأوراق إذ أن معاملة ٠.٢ ملغم / لتر أعطت أفضل كمية كالس مقارنة مع باقي المعاملات الأخرى واحتاجت إلى اقل عدد من الأيام (٣٢) يوما لاستحداث الكالس وبنسبة استجابة٩٠ % ، تميز الكالس بكونه هش كريمي اللون ، وعند زراعة الكالس الناتج من المرحلة السابقة في وسط MS خالي من منظمات النمو تطور إلى أجنة جسمية في مرحلة الطور الكروي بعد ٣٠ - ٣٥ يوم من الزراعة والتي تطورت إلى الطور القلبي بعد ١٠- ١٥ يوم تقريبا ثم إلى الطور الطوربيدي بعد ١٠ - ١٥ يوم تقريبا الشكل (٢) . قد يكون سبب تكوين الكالس هو بدء الانقسام في الطبقات المحيطية (الخارجية) للأنسجة أو الأجزاء المزروعة والذي يعود إلى عدة عوامل متداخلة منها تأثير المواد المتحررة من الأنسجة المجروحة إلى مناطق القطع وتوفر الأوكسجين بكميات كبيرة وسرعة تحرر ثاني اوكسيد الكاربون إلى المحيط الخارجي ووفرة العناصر الغذائية بسبب التماس المباشر مع الوسط وتحرر المواد المثبطة المتطايرة بسرعة اكبر (سلمان ، ١٩٨٨) ، هذا يتماشى مع Emekو Erdage ، (٢٠٠٧) في دراستهما لتكوين الكالس من زراعة أجزاء من ورقة نبات الكلاديولس على الوسط المجهز بـ ٥ ملغم / لتر NAA + ١ ملغم / لتر BA ومن ثم تمايز الكالس الناتج إلى أفرع من خلال الزراعة على الوسط MS المجهز بـ ٠.١ ملغم / لتر BA .

الجدول (٤) : تأثير إضافة 2,4-D إلى وسط MS في استحداث الكالس من قواعد أوراق نبات الكلاديولس *Gladiolus hybrida* صنف " White prosperity " بعد مرور ٨ أسابيع من الزراعة .

2,4-D (ملغم / لتر)	استحداث الكالس (يوم)	استجابة الأجزاء (%)	كمية الكالس المتكون	قوام ولون الكالس
صفر	صفر	صفر	صفر	صفر
٠.٠٢	٤٤	٣٠	+	صلب ابيض
٠.١	٤٢	٤٠	+	أبيض متوسط الصلابة
٠.٢	٣٢	٩٠	+++	هش كريمي اللون
٠.٥	٤٢	٢٠	+	صلب ابيض

صفر لم يتكون كالس + كالس قليل بقطر ٠.٥سم ++ متوسط بقطر ١سم +++ جيد بقطر ١.٥- ٢ سم



الشكل (٢) :
المراحل المختلفة لنشوء الأجنة الجسمية (Somatic embryogenesis) لنبات الكلاديولس *Gladiolus hybrida* صنف " White prosperity "
A – الطور الكروي B – الطور القلبي C – الطور الطوربيدي .

و يبين الجدول (٥) تكوين وتطور الأجنة عند زراعتها على وسط MS الحاوي على ٠.٢ ملغم / لتر IAA بعد ثمانية أسابيع من الزراعة إذ تكونت بمدة تراوحت بين ٣٠-٣٥ يوم وبعدد أجنة ٥- ٧ جنين / جزء نباتي (قطعة كالس) وتطورت وأصبحت بأطوال تراوحت بين ٨ - ١١سم بعد ٨ أسابيع من الزراعة كما موضح في الشكل (٣) . قد يفسر سبب استجابة قواعد الأوراق لتكوين الكالس والأجنة إلى أن نباتات الفلقة الواحدة ومن ضمنها نبات الكلاديولس ، تكون الأجزاء المرستيمية في الورقة أو الحرشفة عند القاعدة حيث ترتبط الصفيحة القاعدية (لذا يجب أن تحتوي قواعد الأوراق أو قواعد الحراشف على جزء من انسجه الصفيحة القاعدية) أو قد تحوي مرستيمات بينية عند قواعد العقد التي تحمل الأوراق والتي تواجدت مع أجزاء قواعد الأوراق التي استخدمت للزراعة مما أعطى فرصة اكبر لتكوين الكالس وتمايزه (Hussey ، ١٩٨٠) .

الجدول (٥) : تكوين وتطور الأجنة الجسمية من زراعة الكالس على وسط MS خالي من منظمات النمو و من ثم تنميته على وسط MS المدعم بـ ٠.٢ ملغم / لتر IAA بعد ثمانية أسابيع من الزراعة .

عينات الكالس المزروعة	استحداث الأجنة (يوم)	عدد الأجنة/ عينة	طول الجنين (سم) بعد ٨ أسابيع من الزراعة
العينة (١)	٣٠	٦	١٠
العينة (٢)	٣٥	٧	٩
العينة (٣)	٣٢	٥	٨
العينة (٤)	٣١	٦	١٠
العينة (٥)	٣٢	٥	١١

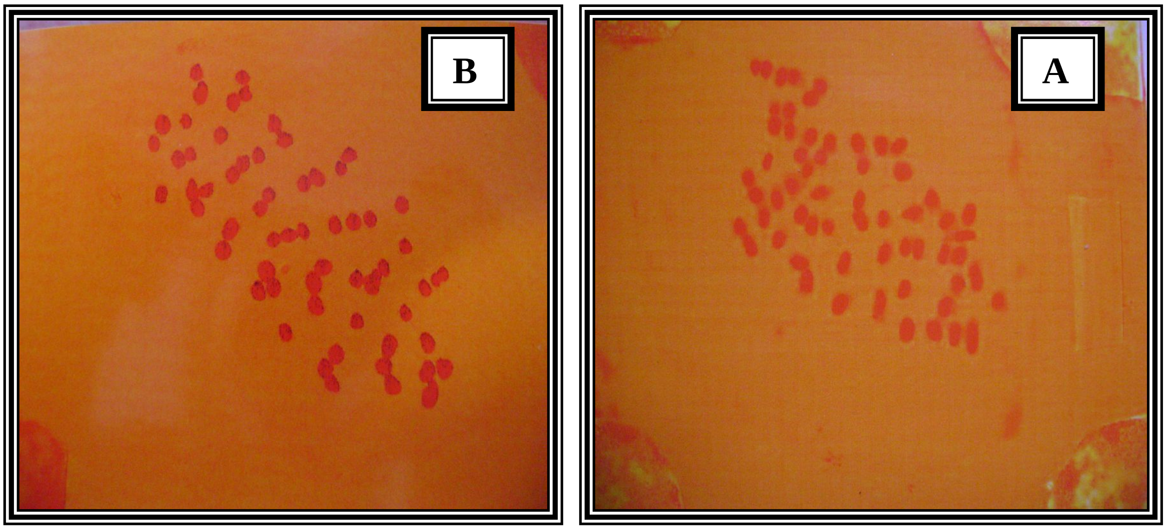
الشكل (٣) : A = الأجنة الجسمية قبل فصلها .
B = الأجنة الجسمية بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على وسط MS المدعم بـ ٠.٢ ملغم / لتر IAA

يبين الجدول (٦) الحصول على عدد كروموسومات ٦٠ كروموسوم (2N = 60) في أغلب العينات المختبرة وفي عينات قليلة ٦١ كروموسوما من فحص خلايا قمم جذور نبات الكلاديولس صنف " White prosperity " وللعينات المأخوذة من نباتات ناتجة من زراعة الكالس أو من عينات نباتات مأخوذة من الحقل كما في الشكل (٤) ، وهذا يدل على عدم وجود تغايرات وراثية بين النباتات الناتجة من الكالس والنباتات الأم (النباتات النامية في الحقل) ربما يعود السبب إلى حصول اختلاف بسيط في عدد الكروموسومات (٦٠ – ٦١) كروموسوما إلى عدم الدقة في حساب عدد الكروموسومات لصغر حجمها وعدم وضوح الصورة لأمور تتعلق بقوة تكبير العدسات . هذه النتيجة تتفق مع لارسون (١٩٨٥) الذي بين أن الأصناف الأوربية عديدة التضاعف (2N = 60 – 120) ، وكذلك تتفق مع Ozhatoy (٢٠٠٢) الذي بين أن الكلاديولس من النباتات عديدة التضاعف التي تحتوي على (2N = 60 – 120) وخاصة الأصناف الأوربية .

الجدول (٦) :عدد الكروموسومات في خلايا قمم جذور نباتات الكلاديولس للصنف White prosperity للنباتات الناتجة من الكالس والحقل .

النباتات المختبرة	عدد الكر وموسومات / خلية					المعدل ±SD
النباتات الناتجة من الكالس						
	النبات الأول	النبات الثاني	النبات الثالث	النبات الرابع	النبات الخامس	
العينة الأولى	٦٠	٦١	٦٠	٦٠	٦٠	٦٠ ± ١
العينة الثانية	٦٠	٦٠	٦٠	٦١	٦٠	٦٠ ± ١
العينة الثالثة	٦٠	٦٠	٦١	٦٠	٦٠	٦٠ ± ١
العينة الرابعة	٦٠	٦٠	٦٠	٦١	٦٠	٦٠ ± ١
العينةالخامسة	٦١	٦٠	٦٠	٦٠	٦٠	٦٠ ± ١
النباتات الناتجة من الحقل						

النباتات المختبرة	عدد الكر وموسومات / خلية					المعدل ± SD
	النبات الأول	النبات الثاني	النبات الثالث	النبات الرابع	النبات الخامس	
العينة الأولى	٦٠	٦١	٦٠	٦٠	٦١	٦٠ ± ١
العينة الثانية	٦١	٦٠	٦٠	٦٠	٦٠	٦٠ ± ١
العينة الثالثة	٦٠	٦٠	٦٠	٦٠	٦١	٦٠ ± ١
العينة الرابعة	٦٠	٦٠	٦١	٦٠	٦٠	٦٠ ± ١
العينةالخامسة	٦٠	٦٠	٦١	٦٠	٦١	٦٠ ± ١



الشكل (٤) : يبين عدد الكروموسومات لنباتات الكلاديولس *Gladiolus hybrida* الصنف " White prosperity " A = الناتجة من الزراعة النسيجية ، B = النامية في الحقل . (قوة التكبير ٢٨٠ X) .

CALLUS INITIATION AND SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM CULTURED LEAF EXPLANTS OF *Gladiolus hybrida*

Alaa Hashem. Y. Altaee Bashar. Z. Kassab bashi
College of Agriculture and Forestry – Mosul. Univ. Iraq.

ABSTRACT

The present study was carried out in Plant Tissue Culture laboratory, from August . (2008) to February (2009), of Gladiolus plants " White prosperity " cv. Medium and base parts of leaves produced in vitro cultured on MS medium supplemented with NAA at (0.0 , 1.0 , 2.0 , 4.0 , 6.0) mg/l , 2,4-D at (0.0 , 0.01 , 0.02 , 0.1 , 0.2) mg/l , TDZ at (0.0 , 1.0 , 2.0 , 3.0 , 4.0) mg/l for callus initiation and differentiation , The Results indicated that highest percentage 90 % for callus formation were obtained from culture parts of leaf on MS medium supplemented with 0.2 mg/l 2,4-D . and this treatment gave highest amount of callus and needed only (30) days to callus formation , callus culture on MS medium supplemented with BA at (0.0 , 0.1 , 0.2) mg/l for differentiation , gave 80 % of callus differentiation to shoots and gave 10 shoot / explant with longest shoot 6.5 cm and highest root number 17 root / explant with longest root 4.3 cm after 8 weeks . Somatic embryogenesis obtained from

culture callus produced from culture base of leaf on MS medium supplemented with 0.2 mg/l 2,4-D for 8 weeks and then culture on MS medium free from hormones , three stage of Somatic embryogenesis observed (globular, heart , terbenoid) embryos were development from culture on MS medium supplemented with 0.2 mg/l IAA and acclimated in laboratory with survival 100 % , plants produced from tissue culture or from feiled had the same number of chromosome (60) and this indicate that there are no somaclonal variations between them .

المصادر

خطاب ، محمود وعماد الدين وصفي (١٩٨٨) . أبصال الزينة . دار فجر الإسلام للطباعة والنشر/الإسكندرية .

داؤود ، خالد محمد و زكي عبدالياس (١٩٩٠) ، الطرق الإحصائية للأبحاث الزراعية . مطابع التعليم العالي / جامعة الموصل

رسول ، طاهر نجم (١٩٨٨) . هندسة الحدائق . مطبعة جامعة الموصل ، ٢٢١ صفحة .

الرفاعي ، عبد الرحيم توفيق و سمير عبد الرزاق الشوبكي (٢٠٠٢) . تقنيات القرن ٢١ لتحسين النبات باستخدام زراعة الأنسجة . دار الفكر العربي للطباعة والنشر . الطبعة الأولى . القاهرة – مصر .

سلمان ، محمد عباس (١٩٨٨) . أساسيات زراعة الخلايا والأنسجة النباتية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة بغداد – العراق

طواجن ، أحمد محمد موسى (١٩٨٧) . نباتات الزينة. مطبعة جامعة البصرة ، ٥٠٢ صفحة .

عمر ، عمر مظفر (٢٠٠٨) . استحداث التضاعف الكروموسومي والتقييم المبكر لشتلات الخروب *Ceratonia silique* والروبينيا *Robinia pseodocacea* . رسالة ماجستير . كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل – العراق

لارسون ، روي ا (١٩٨٥) . مقدمة في نباتات الزينة . ترجمة . عبد الرحمن العريان و عبد العزيز كامل .الدار العربية للتوزيع والنشر .

محمد ، عبد المطلب سيد و مبشر صالح عمر (١٩٩٠) . المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والأعضاء للنبات مديرية دار الكتب للطباعة والنشر / جامعة الموصل – العراق .

Anonymous (1996) . Statistical Analysis System user's Guide , Release7 , SAS . Institute . Inc . Cary. USA.

Bajaj ,Y. P. ; M.M . Sidhu and A. P.Gill (1983).Some factors affecting the *In vitro* propagation of *Gladiolus* . Scientia Horticulture . 8 : 269 - 275 .

Emek , y . and B . Erdage .(2007) . Somatic embryogenesis from leaf explants of *Gladiolus anatilicus*. Pak . J . Boil . Sci .10(8). 1190 - 1194 .

Goldblatt P, J . C . Manning (1998) . *Gladiolus* in Southern Africa Systematics, Biology, and Evolution , Fernwood Press, Cape Town .

Hussey . G. (1980). Totipotancy in tissue explants of some members of the liliaceae, iridaceae and amaryllidaceae . J .Exp . Bot . 26 : 7- 9

Kasumi, M.; Y. Takatsu; H. Tomotsune and F. Sakuma (1999). Somatic embryogenesis from cultured cormel stem tips and flower color variations among regenerated plants of *Gladiolus* .J . Jap . Soc. . Sci . 68 (1) : 168 –175.

Kasumi ' M ; Y. Takatsu ; K . Suzuki ; T. Gonai ; M . Nogi ; T . Yamada and T. Manabe (2004). Callus formation and plant regeneration from root explant of *Gladiolus* (*Gladiolus grandiflora* Hort .) . J .JPN . Soc. 4(1) : 7 .

Kim, K .W.and S.Y Han (1992) . Somatic embryogenesis and plant regenera from *Gladiolus* callus *In Vitro* . J . Kor . Soci . Hort . Sci . 34 (2) : 136 - 144.

Margl , L ; A , Tei ; I , Gyurjan and M , Wink . (2002) . GLC – MS analysis of thiophene derivatives in plant and in *In Vitro* culture of *Tagetes patul* a (Asteraceae) Z . Naturforsch . (57) : 63 – 71 .

Murashige , T. and F. A . Skoog (1962) . A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture . Physiol . Plant . 15 : 473 - 492.

Ozhatoy , N . (2002) . Diversity of bulbous monocots in Turkey with special reference. Chromosome numbers . University of Istanbul . Pure Appl .

Sharma ,A.K .and J. Sharma . (1980).Chromosome Techniques Theory and practice 2nd Ed . Butlerwoths . London . P.575 .Chem . 74 , (4) . 547 - 555 .