استخدام تقانة زراعة الأنسجة النباتية في إكثار صنف العنب الأحمر الدوماني المهدد بالانقراض وحفظه

وسيم محسن[1] و خزامة القنطار[1]

الملخص

جرى في هذا البحث الإكثار بزراعة الأنسجة النباتية لصنف العنب الأحمر الدوماني المهدد بالانقراض حيث زُرعت الأجزاء النباتية وهي عبارة عن عقل طرفية وجانبية بطول 0.5-1 سم تحتوي على برعم واحد على الوسط الأساس المستعمل WPM (Woody Plant Medium)، وتم الحصول على أفضل معدل للإكثار عند استخدام الوسط المغذي المكون من BA بتركيز 4.44 mM وIAA بتركيز 0.58mM، وكان متوسط عدد النموات المتشكلة 2.60 نمواً، ومتوسط عدد الأيام حتى بدء التشكل 9.22 يوماً، أمّا بالنسبة إلى أفضل استطالة للنموات فقد كانت على الوسط المغذي المكون من KIN بتركيز 4.6 mM وIAA بتركيز 0.58mM وكان 10.50 سم. وصل معدل الإكثار في الزرعة الخامسة إلى 5.15 نمواً. ومن أجل التجذير نقلت النموات الخضرية المتشكلة بطول نحو 2-3 سم إلى وسط التجذير حيث تشكلت الجذور خلال 3 أسابيع وبلغت نسبة التجذير 90 %، وأعطى الوسط المضاف إليه IBA بتركيز 4.92 mM والفحم الفعال (AC) بتركيز 1 غ/ل من أفضل النتائج إذْ كان متوسط طول الجذر4.55 ومتوسط عدد الأيام لبدء التكون 10.39 يوماً. كانت عملية الحفظ لهذا الصنف ناجحة حيث بقيت النباتات بقدرة حيوية عالية مدة تزيد على 24 شهراً من خلال زراعتها على الوسط WPM الخالي من الهرمونات الذي حفظت فيه تراكيز العناصر الكبرى والصغرى إلى النصف وزود الوسط بـ 15 غ/ل سكروز، وتبيّن أنه يجب نقل النموات المحفوظة كل 8-10 أسابيع. أُجريت عملية الأقلمة تدريجياً خلال مدة 4 أسابيع وبلغت نسبة النباتات المؤقلمة 85%.

الكلمات المفتاحية: الإكثار الخضري الدقيق، الحفظ بزراعة الأنسجة، صنف العنب الأحمر الدوماني، صنف مهدد بالانقراض، الأقلمة.

[1] الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- قسم التقانات الحيوية- دوما- ص. ب. 113 دمشق – سورية.

Using the plant tissue culture techniques in micropropagation and conservation of the endangered Red Doumani grape cultivar

W. Mohsen[(1)] and Kh. AL-kountar[(1)]

ABSTRACT

In this study, we used plant tissue culture techniques for micropropagation of the endangered Red Doumani cultivar. The explants which were the apex tips and axillary buds (0.5-1 cm) have been cultured on the free of hormones initial medium WPM (Woody plant medium), then moved to the micropropagation media. The results showed that the medium containing 4.44 mM BA + 0.58 mM IAA had the best effect on number of new shoots formed (2.6) and the growth started after 9.22 days, the best elongation was on the medium supplemented with 4.6 mM KIN + 0.58 mM IAA and the rate of multiplication reached 5.15 shoots. For the rooting. The proliferating shoots were transferred into rooting media, the roots had been formed after 3 weeks. The percentage of rooting was 90% and The best results obtained in case of medium with 4.92 mM IBA+ 1 g/l AC after 10.39 days of culture and the length of the main root was 4.55 cm. The *in vitro* conservation was successful for this cultivar and the survived plants maintained their viability until 24 months, after transfer them on a medium with half concentration of the macro and micro elements with 15g/l sucrose. The results showed that the shoots must be transfered every 8-10 weeks. Acclimatization percentage was 85%

Key word: Micropropagati, Conservation by Plant tissue culture, Red Doumani cultivar, Endangered cultivar, Acclimatization.

[(1)] GCSAR, Biotechnology Department, Damascus- Douma, P.O.Box. 113,Syria

1. مقدمة:

تعدُّ الكرمة من الزراعات المهمة من الناحية الغذائية و الاقتصادية لذلك يجب العمل على استخدام التقانات الحديثة التي تكفل الحفاظ على الأصناف عالية الجودة. إن زراعة الكرمة معروفة في سورية منذ 5000 سنة تقريباً. تنتشر زراعة العنب في المحافظات السورية جميعها ويقدر إنتاج محافظات حلب وريف دمشق ودرعا بحدود 53 بالمئة من إجمالي إنتاج العنب، فيما يقدر إنتاج محافظات السويداء وحمص وحماة نحو 33 بالمئة من إجمالي الإنتاج. وبيّنت إحصائيات وزارة الزراعة لعام 2010 أن المساحة المزروعة في عام 2010 نحو 56 ألف هكتار، وبلغ إنتاج سورية من العنب أكثر من 417 ألف طن.

تعدُّ تقنية زراعة الأنسجة النباتية من التقانات الحديثة وذات التطبيقات العديدة، والإكثار الدقيق إحدى الطرائق المهمة في توفير الشتلات المختلفة، إذ إنّه يتفوق على الطرائق التقليدية للإكثار(Swartz *et al*.,1983) وأضاف الباحثون Jiang *et al*. عام (2000) أن استخدام زراعة الأنسجة تساعد على إنتاج شتلات من العنب خالية من الأمراض خاصة البكتيرية والفيروسية، وتكون هذه النموات الخضرية -في أغلب الأحيان- متماثلة وراثياً ومشابهة للنبات الأم (Torres, 1989; Debrgh, 1992). وقد أفاد العديد من الباحثين (Reisch 1986; Singh *et al*., 2000; Mhatre *et al*., 2000; Singh *et al*., 2004) أنّ هذه التقنية مناسبة تماماً لإنتاج عدد كبير نسبياً من نباتات العنب بهذه التقنية في مدة زمنية قصيرة. إن استخدام البراعم الجانبية أو القمية كأجزاء نباتية له أهمية بالغة في إكثار أصناف العنب المختلفة (Gray & Fischer 1985) وإن استخدام تقنية الإكثار بالأنسجة النباتية للأنواع الخشبية تعدُّ من التطبيقات المهمة إذ يتوقف نجاحها على معدل إكثار النموات الخضرية ونسبة التجذير (Hicks & Dorey 1998) وإن استخدام السيتوكينين له أهمية قصوى في إكثار العنب بأعداد كبيرة واقتصادية (Beauchesne 1982; Gray *et al*., 2005). وقد ذكر Lee وWestzstein عام (1990) أن هرمون الـ BA (benzyladenine) بتركيز 10 ميكرومول قد أسهم بشكل فعال في نمو البراعم الجانبية، وقد لاحظ Tapia and Read, 1998 أن استخدام الـ BA بتراكيز مرتفعة كان ضاراً بنوعية النبات. وأظهرت نتائج الباحثين أن نسبة التجذير في العنب كانت مرتفعة (90%) عند استعمال IBA (indole-3-butyric acid) مقارنة بالمعاملات التي استخدمت هرمون NAA (Naphthalene acetic acid) والتي كانت فيها نسبة التجذير منخفضة (Chee & Pool 1992). وبتقدم التقنية الحيوية اتجه كثير من العلماء إلى استخدام تقنية زراعة الأنسجة النباتية في حفظ الأنواع الوراثية وتداولها (Chawla, 2000)، إذ يحافظ الإكثار الدقيق باستخدام البراعم الجانبية على الصفات الوراثية للنبات الأم، ولكن في كثير من الحالات لا تتفق مع مواعيد إنتاج الشتلات مع ميعاد الزراعة في الحقل، لذا كان

التفكير في حفظ الشتلات في المعمل مدداً مؤقتة، وتعرف هذه العملية **بالحفظ مدداً قصيرة** (Kozai *et al*. 1997). وقد حُفظت القمم النامية لنموات العديد من النباتات بخفض درجات الحرارة (Kubota *et al*., 1995)، فعلى سبيل المثال حفظت مزارع العنب مدة 15 سنة في درجة حرارة 9 ْم (Morel, 1975). وأوضح Kartha عام (1985) أن معدل النمو يقل تدريجياً باستهلاك الكربوهيدرات المضافة إلى البيئة، كما أوضح Rout عام (2004) أنه يمكن بحذف بعض منظمات النمو من البيئة خفض معدل النمو وحفظ المزرعة مدداً طويلة. وتشير بعض البحوث إلى دور الحفظ البارد في التخلص من بعض الفيروسات الممرضة في العنب (Wang *et al*., 2003).

أهداف البحث

في هذه الدراسة استخدمت تقانة زراعة الأنسجة النباتية في الإكثار الخضري الدقيق لصنف العنب الأحمر الدوماني، وحفظ هذا الصنف المهم من الاندثار والانقراض، ومن أهداف هذا البحث:

1- إيجاد الطريقة الملائمة لتأسيس المزارع النسيجية.

2- تحديد التوافقات الهرمونية المناسبة لإكثار النموات الخضرية *in vitro*.

3- دراسة بعض العوامل المؤثرة في تجذير النموات الخضرية *in vitro*.

4- أقلمة النباتات المكاثرة نسيجياً خارج الأنابيب من أجل الحصول على غراس تكون معدة للزراعة في مجمعات وراثية خاصة بالوقت المناسب.

5- حفظ هذا الصنف المهم من الانقراض بطريقة الحفظ مدداً قصيرة مخبرياً.

2. مواد البحث وطرائقه

نُفّذ البحث بقسم التقانات الحيوية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في عام 2009-2010.

2.1 المادة النباتية

استخدم في هذا البحث صنف العنب الأحمر الدوماني، وهو نبات طروده محمرة غير مزغبة، السلاميات بطول نحو 10 سم، حجم الورقة متوسطة مفصصة خمسة فصوص والفتحات بين الفصوص كبيرة شكلها أجاصي وعروق السطح السفلي خضراء فاتحة، تزغيبها قليل، حامل الورقة عادي محمر. حجم العنقود متوسط إلى كبير شكله مغزلي متطاول، وحوامل الحبات خضراء فاتحة قصيرة ودرجة تماسكها مع الحبة قوية، إذ يبلغ متوسط وزن العنقود نحو 529 غ، والحبة كروية لونها خمري فاتح مغطاة بالشمع متوسطة الحجم واللب عصيري وردي ومتوسط عددها في العنقود يبلغ 128 حبة. البذور

متوسطة الحجم لونها بني فاتح. يستعمل العنب الأحمر الدوماني لصنع الدبس والزبيب والمشروبات الروحية نظراً إلى ارتفاع نسبة السكر فيه التي تبلغ 14.4(IPGRI. 1997) .

2.2 طرائق البحث:

- **الزراعة الأولية Initial culture:**

جُمعت فروع طرفية بطول 25-30 سم من الصنف الأحمر الدوماني المزروع في محطة جوسية الخراب في حمص في شهر شباط، ووضعت بظروف البيت الزجاجي، وفي شهري نيسان و أيار نمت البراعم الجانبية وأعطت نموات حديثة وصل طولها إلى 10-12 سم، جمعت هذه النموات وقسمت إلى عدة قطع (explant) بطول 0.5-1 سم يحمل كل منها عقدة نباتية تحوي برعماً واحداً (برعماً جانبياً) فضلاً عن العقل الطرفية، وضعت الأجزاء النباتية تحت الماء الجاري مدة 1 ساعة ثم عقمت مدة 15 دقيقة بمبيد فطري (أوكبسين 70%)، وتحت جهاز العزل عقمت سطحياً بالغمر بالكحول 70% مدة دقيقة واحدة، تلى ذلك النقع مع التحريك بمحلول معقم من الكلوركس بتركيز 50% المحتوي على هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز 5.25% بوصفه مادة فعالة، وذلك مدة 10 دقائق مع نقطة توين 20 لكل 100 مل من محلول التعقيم، ثم غسلت ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم.

زُرِعت العقل القمية والجانبية في أنابيب اختبار تحتوي على وسط الأنواع الخشبية WPM(Woody Plant Medium) (Lioyd & McCown 1981) خال من الهرمونات حيث عدلت حموضة الوسط إلى 5.8 قبل التعقيم بالأوتوغلاف. وضعت الزراعات مدة 2-3 أسابيع في غرفة نمو بدرجة حرارة 23± 1 م° ومدة إضاءة 16 ساعة ضوء و8 ساعة ظلام وشدة إضاءة نحو 2000-3000 لوكس على مستوى الزراعات. اِستُبعدتْ في هذه المدة الأنابيب الملوثة، ولم تحسب مع النتائج.

- **طور الإكثار والاستطالة Multiplication and Elongation stage:**

نُقلت النموات الخضرية السليمة الناتجة عن مرحلة الزراعة الأولية بطول 2-3 سم إلى أَنابيب اختبار حاوية 15 مل من أوساط الإكثار وبمعدل 40 مكرراً/ معاملة (عقلة واحدة لكل أنبوب)، حيث درست خمس معاملات من التوافقات الهرمونية (M_5,M_4,M_3,M_2,M_1)، وذلك لتحديد أفضلها، ومن ثمّ زيادة أعدادها تمهيداً للمرحلة التالية. حضنت الزراعات في ظروف غرفة النمو وأخذت النتائج في الأسبوع الرابع من الزراعة، حيث دُرس تأثير الهرمونات النباتية المضافة إلى الوسط المغذي WPM على متوسط عدد النموات المتشكلة، ومتوسط طول النموات المتشكلة، ومتوسط عدد الأيام لبدء النمو.

كما دُرس تأثير عدد مرات النقل على أفضل وسط مغذ في معدل الإكثار، حيث نُقلت الزراعات بمعدل زرعة ثانوية كل 4 أسابيع، وذلك مدة 5 أشهر متواصلة، وزُرعت النموات المكاثرة بطول 2-3 سم على الوسط المغذي للمعاملة M_5، وحُضّنت الزراعات في ظروف غرف النمو نفسها، وأُخذت القراءات من حيث متوسط عدد النموات المتشكلة/النمو في نهاية كل زرعة على حده. ويبين الجدول (1) المعاملات المدروسة والمضافة إلى الوسط المغذي WPM.

الجدول (1) المعاملات المستخدمة في إكثار صنف العنب الأحمر الدوماني *in vitro*

المعاملة	تركيب الوسط الغذائي	
	تركيز السيتوكينين	تركيز الأوكسين
M_1	-	-
M_2	4.4 µM BA	-
M_3	4.4 µM BA	0.58 µM IAA
M_4	4.6µM Kinetin	-
M_5	4.6µM Kinetin	0.58 µM IAA

- **تخليق الجذور في الأنابيب Rooting stage**: نُقلت النموات الخضرية المكاثرة بالمرحلة السابقة وبطول 2-3 سم إلى أنابيب اختبار حاوية 15 مل من أوساط التجذير، إذ درست ثلاث معاملات وهي: R_1 الخالية من هرمونات التجذير وR_2 المزودة بـ 4.92 µM من هرمون IBA (Indol Biotric Acid) والمعاملة R_3 المحتوية على 492 µM. من IBA والمضاف إليه 1g/l من الفحم الفعال (Activated charcoal)؛ وذلك من أجل دراسة تأثيره في تحسين عملية التجذير. حُضّنت الزراعات في ظروف النمو نفسها وحُسبت النتائج في الأسبوع الثالث من الزراعة إذ دُرِست النتائج الآتية: نسبة التجذير، ومتوسط عدد الجذور، ومتوسط طول الجذر الرئيسي، ومتوسط عدد الأيام لبدء التشكل وكما دُرِس تأثير الفحم الفعال في عملية التجذير.

- **أقلمة النباتات الناتجة عن الزراعة المخبرية Acclimatization**:

زُرِعت النباتات التي اجتازت مرحلة التجذير بنجاح وعددها 100 نبات في أصص قطرها 20 سم تحتوي خليطاً مؤلفاً من تورب: برليت بنسبة (1:2 حجم/حجم) وذلك من أجل عملية الأقلمة، وغُطّيت النباتات بأكياس نايلون شفافة مصنوعة من البولي اتيلين وحضنت بدرجة حرارة 23± 1 م° ومدة إضاءة بحدود 16 ساعة تبعها 8 ساعات ظلام حيث كانت شدة الإضاءة نحو 2000-3000 لوكس على مستوى الزراعات، وذلك مدة أربعة أسابيع في غرف نمو، إذ تم خلال هذه المدة فتح تدريجي للأكياس حتى إزالتها تماماً بنهاية الأسبوع الرابع. حسبت بنهاية عملية التقسية نسبة النباتات المتبقية بحالة جيدة، ثم نقلت هذه النباتات لمتابعة النمو في ظروف البيت الزجاجي حيث أمضت نحو 50-60 يوماً قبل نقلها إلى الأرض الدائمة وسمدت أسبوعياً بمحلول MS $^{1/4}$ في أثناء تلك المدة.

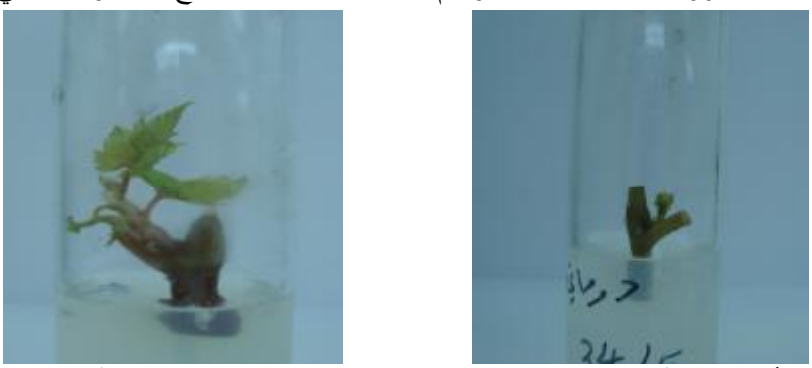
- **حفظ الزراعات النسيجية**: من أجل حفظ النباتات المكاثرة *in vitro* استُخدمتْ طريقة الحفظ مدداً قصيرة، ولهذا نُقلت النموات المكاثرة، وذلك عندما وصل طُولها في الأنابيب إلى 3-5 سم إلى الوسط WPM المعدل حيث خفضت تراكيز الأملاح الكبرى والصغرى ومصدر الكربوهيدرات (السكروز) إلى النصف. قسمت الزراعات النسيجية إلى قسمين الأول حضن في ظروف غرفة النمو في حرارة 23م° مع مدة إضاءة/ظلام، والقسم الآخر حضن في ظروف غرفة التبريد في حرارة 4م° مع القيام بالنقل المتكرر (Subculture) إلى الوسط نفسه (WPM 1/2 + 15غ/ل سكروز) الخالي من الهرمونات وذلك كل 4 أسابيع في حال الحفظ في غرف النمو، وكل 8-10 أسابيع في حال الحفظ في غرف التبريد وذلك لضمان استمرار وجود المادة النباتية في البنك النباتي. حيث تبقى الزراعات محفوظة بهاتين الطريقتين على مدار العام بهدف الحفاظ على هذا الصنف المهم و جعله متاحاً للزراعة في الوقت المناسب.

- **التحليل الإحصائي**: سُجّلت نتائج مرحلة الإكثار والتجذير في جداول وحُلّلت باستخدام البرنامج الإحصائي Genstat. إذ قورنت متوسطات 40 عينة نباتية (مكرر) لكل معاملة إكثار، و20 عينة نباتية (مكرر) لكل معاملة تجذير؛ علماً أن التجارب كررت ثلاث مرات، وقورن بين المتوسطات عند مستوى المعنوية 0.05، وذلك بحسب (Roger *et al.*, 2009).

3. النتائج والمناقشة

- **الزراعة الأولية Initial culture**:

كانت تقنية العمل المستخدمة في تعقيم الأجزاء النباتية كافية جداً للحصول على نسبة مرتفعة من الزراعات السليمة غير الملوثة، إذ تجاوزت نسبة الزراعات الناتجة في نهاية هذه الخطوة 80%، وبلغت نسبة الأجزاء النباتية الملوثة أو الميته نحو 20%. والشكل (1) يبيّن عملية الزراعة الأولية ونمو البراعم الجانبية والقيمة بعد نجاح التطهير السطحي.



أ) الزراعة الأولية للعقل الجانبية ب) نمو في نهاية طور الزراعة الأولية للعقل القمية

الشكل (1) عملية الزراعة الأولية ونمو العقل الجانبية والقمية لصنف العنب الأحمر الدوماني

يتضح من النتائج أنه يجب أن يكون تركيز المادة المعقمة ومدة تعريض الأجزاء النباتية مناسبة، بحيث تعطي أقل نسبة تلوث وأعلى نسبة نمو؛ وذلك لضمان نجاح هذه المرحلة التأسيسية المهمة، وعليه فإن استخدام الكلوركس بتركيز 50% مدة 10 دقائق مناسبة لتعقيم الأجزاء النباتية البادئة للعنب الأحمر الدوماني. استخدمت هذه الأجزاء السليمة والخالية من التلوث بعد 3 أسبوع وعُدَّت الأساس للتجارب اللاحقة.

- طور الإكثار و الاستطالة:

من خلال دراستنا للنتائج الواردة في الجدول (2) يتبين وجود فروق معنوية واضحة بين المعاملات المزودة بالهرمون M_5، M_4، M_3، M_2 وتلك الخالية منه (M_1) وذلك بالنسبة إلى المعايير المدروسة جميعها، وهذا يؤكد أن وجود الهرمونات في الوسط يعدُّ العامل الأساسي في إكثار الدقيق للعنب الأحمر الدوماني، ويبيّن أهمية إضافتها في أوساط الإكثار.

الجدول (2) تأثير المعاملات المختلفة للوسط في إكثار صنف العنب الأحمر الدوماني

المعاملة	متوسط عدد النموات المتشكلة/الجزء النباتي	متوسط طول النموات المتشكلة (سم)	متوسط عدد الأيام حتى بدء التشكل (يوم)
M_1	1.17±0.07 c	2.45±0.12 e	24.73±0.43 d
M_2	2.30±0.08b	4.05±0.09d	10.32±0.13 b
M_3	2.60 ±0.07a	4.73±0.13c	9.22±0.24a
M_4	2.50±0.08a	8.78±0.18b	11.27±0.21c
M_5	2.59±0.10a	10.50± 0.14a	11.05±0.18c
L.S.D 5%	0.19	0.29	0.66
C.V%	19.7	10.9	11.3

ملاحظة: حُلّلت نتائج مرحلة الإكثار باستخدام البرنامج الإحصائي Genstat حيث قورنت متوسطات 40 عينة نباتية (مكرر) لكل معاملة إكثار، علماً أن التجارب كررت ثلاث مرات، وقورن بين المتوسطات عند مستوى المعنوية 0.05.

إنّ أفضل النتائج تم الحصول عليها في المعاملة M_3 من ناحية عدد النموات المتشكلة (2.6) وعدد الأيام (9.22) وكانت المعاملة M_5 الفضلى بالنسبة إلى طول النموات المتشكلة (10.50)، (الشكل 2). تبيّن النتائج أن المعاملة (M_3) التي أضيف إليها هرمون الـ BA أعطت نتائج أفضل من حيث متوسط عدد النموات المتشكلة وعدد الأيام حتى بدء التشكل مقارنة بالمعاملات التي زودت بهرمون الـ KIN (M_5,M_4)، مع ملاحظة أن الفروق لم تكن معنوية بينها بالنسبة إلى عدد النموات، أمّا المعاملات التي أضيف إليها هرمون الـKIN فأعطت أفضل النتائج من حيث طول هذه النموات.

ويتبيّن من النتائج أنه كان لإضافة هرمون الـ IAA إلى المعاملات تأثير إيجابي إذ أسهم في زيادة عدد النموات المتشكلة وطولها/الجزء النباتي مقارنة بالمعاملات التي خلت

منه و بفروق معنوية حيث زاد عدد النموات من 2.30 في المعاملة M_2 إلى 2.60 في المعاملة M_3، وزاد طول النموات من 4.05 سم في المعاملة M_2 إلى 4.73 في المعاملة M_3، ومن 4.05 سم في المعاملة M_2 إلى 4.73 في المعاملة M_3 ومن 8.78 سم في المعاملة M_4 إلى 10.50 في المعاملة M_5، ولكن لم تظهر النتائج فروقاً معنوية بين المعاملتين M_4 وM_5 من حيث عدد النموات المتشكلة. وكذلك ساعدت إضافته إلى الوسط في تقصير المدة الازملة لبدء التشكل من 10.32 يوماً إلى 9.22 يوماً في المعاملة M_2، M_3 على التوالي ومن 11.27 يوماً إلى 11.05 في المعاملة M_4، M_5على التوالي.

الشكل (2) إكثار صنف العنب الأحمر الدوماني مخبريا *in vitro*

وجد أن استخدام BA قد أعطى نتائج أفضل من الكينيتين من حيث متوسط عدد النموات الجديدة المتشكلة/خزعة، وهذا يتطابق مع ما أشار إليه Lee & Wetzatein عام (1990) و Heloir *et al.* عام (1997). ومن ثم فقد أظهرت النتائج أن متوسط عدد النموات الجديدة المتشكلة/خزعة ارتفع عندما أضيف إلى الوسط هرمون IAA (Indolacetic acid) بتركيز 0.58 ميكرومولار، وهذا يبيّن أهمية التوافقات الهرمونية سيتوكينين/أوكسين في تشجيع تشكيل نموات جديدة، وإن وجود الأوكسين ضروري لتعزيز دور السيتوكينين في التشكل العضوي وتحسين نوعية النموات المورقة، فقد أوضح (Skoog & Miller, 1957) أن التشكل يتم تحت سيطرة العلاقة ما بين الأوكسين والسيتوكينين، وهذا ما يبرر إضافة هرمون الـIAA في المعاملات (M_3 وM_5) الذي يتحلل بسهولة في الأوساط المغذية. وتبين في دراسة لـــ Torregrossa and Bouquet

عام (1995) أن الأوكسين يعمل على زيادة تنشيط الأنزيمات وله مقدرة على التحرك النشط في الخلية؛ مما يؤدي إلى زيادة تكشف الأعضاء.

ويمكن تفسير نتائجنا بالاعتماد على حقيقة أن وجود منظمات النمو في وسط الزراعة يعدُّ العامل الأساسي الذي يعزّز التشكل في زراعة الأنسجة ويساعد على النمو ويرفع معدل تكاثر البراعم الإبطية (Hunter,1979) إذ تؤدي السيتوكينينات ومنها الـ BA والكينيتين دوراً مهماً في تكوين الفروع في عمليات الإكثار الدقيق وزيادة عدد التفرعات لأنّها تسهم في تنشيط انقسام الخلايا الميرستيمية النشطة لتكون نموات جديدة على النبات، وهذا ما أشار إليه Gray and Fischer عام (1985). وذكر Perez *et al.* (1985) أنّ دور السيتوكينين في الإكثار الدقيق له أهمية كبيرة في نمو الأفرع، حيث يقود بالتراكيز المرتفعة إلى إنتاج عدد أكبر من الأفرع.

وقد وجد Murashige عام (1974) أنَّ استخدام السيتوكينينات في زراعة الأنسجة النباتية يؤدي إلى زيادة قدرة البراعم الطرفية على امتصاص العناصر الغذائية؛ مما يزيد من تركيزها بالقمم النامية، وأشار إلى أن الكينيتين والـBA يتساويان غالباً في التأثير.

أدّت عملية النقل المتكرر (Subculture) التي أُجريت إلى تأثير إيجابي من ناحية عدد النموات المتشكلة، ونتيجة لذلك زاد معدل الإكثار من 2.10 في الزرعة الأولى إلى 5.15 في الزرعة الخامسة، وهذا موضح في الجدول (3).

الجدول (3) تأثير رقم الزرعة في معدل الإكثار لصنف العنب الأحمر الدوماني:

متوسط عدد النموات المتشكلة/ الزرعة (حيث معدل كل زرعة هو 4 أسابيع)					
رقم الزرعة	1	2	3	4	5
عدد النموات المتشكلة	2.15±0.23c	3.35±0.15b	3.65±0.13b	5.05±0.17a	5.15±0.16a
L.S.D 5%: 0.48 C.V %: 20					

ملاحظة: تمثل المعطيات متوسط 20 مكرراً

من خلال دراستنا للنتائج الواردة في الجدول (3) نلاحظ زيادة عدد النموات المتشكلة كلما زادت عدد مرات النقل حتى الوصول إلى النقلة الخامسة، أي إنّ هناك تناسباً طردياً بين عدد النموات المتشكلة وعدد مرات النقل حتى الوصول إلى الزرعة رقم 5، حيث كان معدل الإكثار (5.15) نمواً، ولاحظنا أن الفروق كانت معنوية بين الزرعات الثانوية الأخيرة وتلك عند بداية الزراعات إذ كانت 5.05 و5.15 في الزرعات الرابعة والخامسة على التوالي، وكانت منخفضة في الزرعات الأولية 3.3 و2.10 في الزرعة الثانية والأولى. كان متوسط الاستطالة للنموات المتشكلة بكل زرعة متقارباً وبلغ نحو 10 سم، وذلك لأنّ النموات زرعت على المعاملة M_5 خلال كامل المدة إذ لم يكن للنقل المتكرر تأثير مباشر في طول النموات.

تضمن تقنية زراعة الأنسجة النباتية إكثاراً سريعاً والحصول على نباتات جيدة النمو وخالية من الأمراض بوقت قصير (Blazina *et al*. 1991)، ويعدُّ تحديد نوع الجزء النباتي المستخدم من الأمور الأساسية التي يجب الاهتمام بها في إكثار العنب، وقد أشارت التقارير أن Morini *et al*., عام (1985) استخدم البراعم القمية في إكثار العنب، أمّا Novak & Juvova عام (1982) فقد استخدموا البراعم الجانبية وكلتا الطريقتين مطبقة في هذا البحث.

حصل Yae *et al*. عام (1990) على نموات جديدة للعنب على الوسط MS المضاف إليه BA مع توافقات هرمونية مختلفة. وعموماً، يعدُّ وجود السيتوكينين في الوسط الغذائي ذا أهمية قصوى من أجل تشكل النموات الخضرية الجديدة والتغلب على السيادة القمية وتحريض نمو النموات الخضرية الجديدة والتثبيط الكلي أو الجزئي لتشكل الجذور (Nordstorm and Eliasson, 1986).

- تجذير صنف العنب الأحمر الدوماني:

نقلت النموات الخضرية المكاثرة بالمرحلة السابقة وبطول 2-3 سم إلى أوساط التجذير وبعد 4 أسابيع من الزراعة أُخذت النتائج، وهي موضحة بالجدول (4).

الجدول (4) تأثير المعاملات المختلفة للوسط في تجذير صنف العنب الأحمر الدوماني

المعاملة	نسبة التجذير (%)	متوسط عدد الجذور (جذر/نبات)	متوسط طول الجذر الرئيسي (سم)	متوسط عدد الأيام حتى بدء التشكل (يوم)
R_1	60	3.00±0.11 c	1.78±0.09 c	21.86±0.25 c
R_2	80	3.39±0.10 b	3.91±0.09b	12.12±0.28b
R_3	90	4.24±0.14a	4.55±0.10a	10.39±0.20a
L.S.D 5%		0.29	0.24	0.68
C.V %		12.9	11.4	7.3

ملاحظة: حُلّلت نتائج التجذير باستخدام البرنامج الإحصائي Genstat حيث قورنت متوسطات 20 عينة نباتية (مكرر) لكل معاملة تجذير علماً أن التجارب كررت ثلاث مرات، وقورن بين المتوسطات عند مستوى المعنوية 0.05 .

من خلال دراستنا للنتائج الواردة في الجدول (4) يتبيّن أن المعاملة (R_3) أعطت أفضل النتائج حيث كانت نسبة التجذير % 90 وبلغ متوسط عدد الجذور 4.24 ومتوسط طول الجذر الرئيسي 4.55 سم، أمَّا عدد الأيام حتى بدء التشكل فكان 10.39 يوماً، وكانت الفروق معنوية بينها وبين باقي المعاملات. ومن خلال دراستنا للنتائج نلاحظ وجود فروق معنوية واضحة بين المعاملات المزودة بهرمون التجذير R_2 وتلك الخالية منه R_1، وذلك بالنسبة إلى المعايير المدروسة جميعها، وهذا يؤكد أن وجود الهرمونات في الوسط من الأمور المهمة لتجذير العنب الأحمر الدوماني.

وتبيّن كذلك أن إضافة الفحم الفعال (AC) إلى معاملة التجذير قد أسهم بشكل واضح في زيادة نسبة التجذير إذ كانت في المعاملة R_2 80% وارتفعت إلى 90% في المعاملة R_3 التي تحوي المكونات نفسها مضافاً إليها 1g/l من الفحم الفعال. وكذلك نلاحظ أن إضافة الفحم الفعال (Ac) قد أسهم بشكل قطعي في زيادة عدد الجذور المتشكلة نظراً إلى أنه يشكل بيئة مظلمة حول قواعد النموات؛ مما يسهم في تحسين الظروف البيئة المناسبة لتشيكل الجذور، إذْ ارتفع عدد الجذور من 3.39 في المعاملة R_2 إلى 4.24 في المعاملة R_3 وزاد طول الجذر الرئيسي من 3.91 في المعاملة R_2 إلى 4.55 في المعاملة R_3. إنّ عدد الجذور له أهمية بالغة إذ هناك علاقة طردية بين عدد الجذور المتشكلة نبات ونسبة نجاح عملية الأقلمة لهذا النبات ومن ثمَّ تضمن لنا المعاملة R_3 إعطاء أكبر عدد من الجذور على النبات، ومن ثمّ تضمن أقلمة ناجحة لهذا النبات.

لوحظ تشكل الجذور بعد انقضاء 10-12 يوماً من الزراعة في المعاملة R_2 وR_3 المزودتين بهرمون التجذير، في حين تأخر ظهور الجذور حتى بداية الأسبوع الثالث من الزراعة في المعاملة (R_1) حيث بدأ التشكل في اليوم 21. ومن ثمَّ فإن المعاملات التي أضيف إليها الهرمون شكلت الجذور بوقت قصير مقارنة بتلك الخالية منه، وكانت الفروق معنوية.

يتضح من خلال النتائج أن أفضل نسبة تجذير قد تم الحصول عليها على وسط يحوي IBA (80-90%)، بينما كانت نسبة التجذير في الوسط الشاهد الخالي من IBA منخفضة إذ بلغت 60%، وكان لإضافة IBA بتركيز 4.92 µM دور في زيادة نسبة التجذير وعدد الجذور، وكان هناك فرق معنوي للمعاملات كلّها التي أضيف إليها IBA مقارنة بالشاهد، وهذا يتطابق مع ما ذكره Helior *et al.*, عام (1997) إذْ بيَّن أنّ وجود هرمون IBA مناسب جداً في وسط تجذير العنب، والشكل 3 يظهر عملية التجذير *in vitro* لصنف العنب الأحمر الدوماني. وهذه النتائج تتوافق مع ما توصل إليه (Gok *et al.*, 1997) إذ وجدوا أن التجذير حدث في الأوساط الحاوية على 0.1- 2 مغ/ل، وكانت نسبة التجذير مرتفعة (90%) في بعض الأصناف. وقد ذكر كل من Roubelakis & Zivanovite عام (1991) و Poudel *et al.*, عام (2005) أن استخدام 1 مغ/ل من IBA هو الأفضل لتجذير العنب.

أ) تجذير بوسط دون فحم　　ب) تجذير بوسط مع فحم　　ج) الجذور المتشكلة

الشكل (3) تجذير صنف العنب الأحمر الدوماني *in vitro*

وقد لاحظنا من خلال نتائج البحث أنّ الفحم الفعال لا يحسن من نسبة التجذير فقط، بل يعمل على زيادة طول الجذور، حيث ظهرت أفضل النتائج في المعاملة R_3 التي أضيف إليها الفحم الفعال (AC). يؤدي وجود الفحم الفعال مع هرمون IBA في الوسط إلى تشكل الجذور بشكل أسرع (Alizadeh *et al.*, 2009)، وهذا يتطابق مع نتائج بحثنا حيث بدء التشكل الجذري في اليوم العاشر. وقد يعود السبب الأساسي في ذلك إلى أن إضافة الفحم الفعال إلى البيئات الغذائية يعمل على امتصاص المواد الفينولية وكذلك يساعد على امتصاص بعض المواد السامة الناتجة من عمليات التعقيم الحراري للأوساط المغذية، وذلك كما ذكر كل من Ebert and Tayor عام (1990) و Nissen and Sutter عام (1990).

- **الأقلمة** Acclimatization:

تعدُّ عملية الأقلمة من أكثر مراحل زراعة الأنسجة أهمية؛ وذلك بسبب حساسية النباتات الموجودة في الزجاج، ونظراً إلى أن عملية الأقلمة هي آخر عملية تتوج نجاح العمل ومن ثمّ يجب الاهتمام بالنباتات وتوفير الشروط اللازمة لإنجاح هذه العملية من ضوء وحرارة ورطوبة، كما يجب مراعاة النبات عند نقله من الزجاج إلى الأصص وذلك لضمان بقائه حياً، حيث تكون أوراق النباتات الموجودة في الزجاج ذات صفات خاصة من حيث تطور القشيرة الضعيف وكمية المواد الشمعية القليلة، ولذلك أجريت عملية التقسية بالفتح التدريجي للأكياس حتى إزالتها تماماً خلال 3 أسابيع حيث كانت نسبة الأقلمة في تجربتنا في نهاية هذه المدة 85%، في حين أخفق نحو 15% منها في الوصول إلى حالة الأقلمة التامة، إذْ تعدُّ هذه النسبة جيدة وتتوافق مع نتائج كثير من

الباحثين (Baydar, 2000; Gok *et al*., 1997) الذين أقروا بصعوبة عملية الأقلمة و حاجتها إلى ظروف خاصة، والشكل (4) يبيّن نجاح عملية الأقلمة.

تشير هذه النتيجة -بشكل واضح- إلى أنه يمكننا تطبيق تقنية زراعة الأنسجة النباتية لإنتاج غراس من هذا الصنف المهم بأعداد كبيرة ومطابقة تماماً للنبات الأم بوقت قصير جداً.

نقلت بعدها النباتات إلى البيت الزجاجي حيث أمضت نحو 50-60 يوماً قبل نقلها إلى الأرض الدائمة وسمدت أسبوعياً بمحلول MS $^{1/4}$ في أثناء تلك المدة. تعتمد معظم تقنيات التقسية على التحكم بالحرارة والرطوبة والتغذية خاصة في المراحل الأولى منها (Bhojwani & Razdan1992).

ومن خلال زراعة هذا الصنف في الأرض الدائمة في المجمعات الوراثية خلال الموسم 2010 و2011 يتبين أن النباتات تنمو بحالة طبيعية جيدة دون حدوث أي تغيّرات مورفولوجية أو تشوهات.

أ) النبات في أثناء الأقلمة ب) النبات المؤقلمة

الشكل (4) عملية الأقلمة لصنف العنب الدوماني

- حفظ الزراعات النسيجية:

من أجل حفظ النباتات المكاثرة *in vitro* استُخدمت طريقة الحفظ مدداً قصيرة، ولهذا نُقلت النموات المكاثرة وذلك عندما وصل طولها في الأنابيب إلى 3-5 سم إلى الوسط (WPM 1/2 + 15غ/ل سكروز) الخالي من الهرمونات؛ وذلك لضمان استمرار وجود المادة النباتية في البنك النباتي على مدار العام. لوحظ في أثناء مدة حفظ صنف العنب

الأحمر الدوماني أن نبيتات العنب المحفوظة بغرف التبريد في حرارة 4 م° قد بدأت بالتماوت في الأسبوع 8-10 حيث كان معدل النمو والاستطالة بهذه النموات لا يتجاوز 0.2-0.5 سم خلال هذه المدة. أمّا النبيتات التي حفظت في غرف النمو فلوحظ كذلك انخفاض في النمو والاستطالة والتفرع مقارنة بتلك المزروعة على أوساط الإكثار المدروسة في البحث وكان لزاماً نقل النموات إلى أوساط جديدة كل 4-5 أسابيع. وهذه النموات النسيجية لم تزل تحتفظ بحيويتها وقدرتها على التجدد؛ وذلك بعد انقضاء أكثر من 24 شهراً من الحفظ بهذه الطرائق.

وبشكل عام يقاس النجاح في استعمال هذه التقنية بطول مدة حفظ الأنواع النباتية بشرط إمكانية استعمالها في الإكثار أو التحسين الوراثي عقب ذلك، وأصبح من البديهي عدُّ التقنية الحيوية وسيلة أساسية في الحفاظ على الأنواع الوراثية، وضرورة حتمية للتطور الزراعي الآمن في المستقبل (Chawla, 2000). و ذكر Morel عام 1975 أن مزارع العنب حفظت بنقلها كل عام إلى بيئة جديدة مدة 15 سنة في درجة حرارة 9 م وربما يرجع ذلك لتأثيرها المباشر في دخول النباتات في دور السكون، وإعاقة الانقسام الخلوي، أو بعض العمليات الاستقلابية، وقد يعود السبب في ذلك إلى أن معدل النمو يقل تدريجياً باستهلاك الكربوهيدرات المضافة إلى البيئة أو بزيادة المواد السامة كناتج من نواتج العمليات الاستقلابية، أو تلك ذات الرقم الهيدرجيني غير المناسب للنمو (Kartha, 1985). ويمكن بحذف بعض منظمات النمو من البيئة خفض معدل النمو وحفظ المزرعة مدداً طويلة، وربما يرجع ذلك إلى تأثيرها المباشر في دخول النباتات في دور السكون، وإعاقة الانقسام الخلوي، أو بعض العمليات الاستقلابية (Roa, 2004).

يمكن إطالة مدة التخزين بدمج أكثر من معاملتين من المعاملات السابقة؛ وذلك كما قمنا بتنفيذه بهذا البحث مثل خفض الحرارة واستعمال بيئة خالية من منظمات النمو، أو ذات تركيز منخفض من الأملاح المعدنية الكبرى والصغرى، أو خفض تركيز السكروز في الوسط لتأخير النمو، والحفظ مدداً طويلة، ومن الواضح أن طرائق تأخير النمو تستخدم غالباً للمحافظة على الأنواع المستخدمة في برامج الإكثار الدقيق. وعلى الرغم من ذلك تستخدم تلك الطرائق في حالة عدم وجود طريقة مثلى لحفظ بعض الأصول الوراثية (Roa , 2004).

الاستنتاجات والمقترحات

من أهم الاستنتاجات التي توصل إليها هذا البحث عن الإكثار الخضري الدقيق لصنف العنب الأحمر الدوماني بطرائق زراعة الأنسجة النباتية *in vitro* ما يأتي:

1- كانت معاملة التعقيم المستخدمة في البحث وهي 50% من الكلوركس مدة 10 دقائق كافية للحصول على نسبة مرتفعة من الأجزاء النباتية السليمة وصلت إلى 80%.

2- إن أفضل النتائج التي تم الحصول عليها بالنسبة إلى إكثار النموات كانت في الوسط المحتوي على (4.4 µM) من البنزيل أدنين BA و(5.4 µM) الإندول استيك أسيد IAA، إذ كان عدد النموات 2.60 نمواً. أمّا أفضل استطالة فتحققت في الوسط المحتوي (4.6 µM) من الكينيتين KIN و(5.4 µM) الإندول استيك أسيد IAA إذ وصل متوسط الاستطالة إلى 10.50سم.

3- إن أفضل النتائج التي تم الحصول عليها بالنسبة إلى تجذير النموات كانت في الوسط المحتوي (4.92µM) من إندول بيوتريك أسيد IBA إذْ كانت نسبة التجذير 90%.

4- ينصح بإضافة الفحم الفعال بمعدل 1 غ/ل إلى أوساط التجذير لما له من تأثير إيجابي في عملية التجذير في المعايير المدروسة كلّها.

5- إن الحفظ البارد مدداً قصيرة كانت من الطرائق الكافية لحفظ هذا الصنف مدداً جيدة تجاوزت 24 شهراً.

6- إن عملية الأقلمة لصنف العنب الأحمر الدوماني كانت بنسبة جيدة تجاوزت 85%.

وفي نهاية هذا البحث نقترح ما يأتي:

1- اعتماد طريقة الإكثار الخضري الدقيق مخبرياً باستخدام طرائق زراعة الأنسجة النباتية من أجل إكثار صنف العنب الأحمر الدوماني وحفظه بأعداد هائلة وعلى مدار العام بهدف الحصول على نباتات متجانسة وثابتة وراثياً تحمل مواصفات اقتصادية مهمة، وهي نباتات سليمة ومطابقة للنبات الأم.

2- إنشاء مجمعات وراثية لهذا الصنف في المحافظات السورية المختلفة التي تنتشر فيها زراعة العنب.

3- حفظ الأصل بالبنك الوراثي، والتوسع بإجراء بحوث عن الحفظ من خلال الطرائق الأخرى (التبريد – الآزوت السائل).

كلمة شك

يتقدم الباحثون بالشكر إلى الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية على الدعم الكبير الذي قدمته لإنجاز هذا البحث المهم ويأملون الإفادة من نتائجه التطبيقية.

REFERENCES المراجع

المجموعة الإحصائية الزراعية (2010)، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، الجمهورية العربية السورية.

ALizadh, M., Singh, S., Patel, V. (2009). Comparative performance of *in vitro* multiplication in four grape rootstock genotypes. International journal of plant production 4(1): 41-50.

Baydar,N.G.(2000). Study of adventitious shoot formation in leaves of grape (*Vitis spp*). Turkish. Journal. of Biology. 24(3):645-656.

Beauchesne, G. (1982). Appearance of plants not true to type during *in vitro* plant propagation,. In: Variability in plants regenerated from tissue culture. (E.D.): Ealre and Y. Demarly. Praeger publication, New York, 268-272

Bhojwani, S.S., Razdan, M. K. (1992). Plant tissue culture: theory and practice. Elsevier science publisher B.V., 502.

Blazina, I., Korosec-kouza,Z., Ravinkar, M., Gogala, N. (1991). Regeneration and micropropagation of grapevine from shoot tip meristem. Acta. Hort., 300: 123-126.

Chawla H.S. (2000) Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers, Inc, USA.

Chee, R., Pool, M. (1992). The effects of growth substance and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro.* Sci. Hort., 16: 17-27.

Debrgh, P. (1992). Reconsideration of the term Verification as used in micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 30:135-166.

Ebert, A. and H. F. Tyor. (1990). Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 20:165-172.

Gok S, F. Ergenoglu, A. B. J Kuden .fg. Jr. Dennis. (1997). Propagation of several grape Varieties and rootstocks by meristem culture. Acta Horticulture. (44) 1: 245-250.

Gray, D. J., Fischer, L. (1985). *In vitro* shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. Proc. Fla. State Hort.Soc., 98: 172-174.

Gray, D. J., Jayasankar, S., Li, Z. (2005). *Vitis* spp. Grape. In: litz RE (ed) Biotechnology of fruit and nut crops, 672-706.

Helior, M., Fournioux, J.C., Oziol, L., Bessis, R. (1997) An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine using axillary bud microcutings plant cell tiss. Org.cult.49: 223-225.

Hicks, G.S; and Dorey. M. (1998). Shoot multiplication growth and adventitious rooting in 3 cultivars of *Vitis, in vitro*. Proc. Nova Section Inst. Sci., 38: 83-89.

Hunter, C.S., (1979). *In vitro* culture of Cinchona ledgeriana L. J. Hort. Sci. 54: 111-114.

IPGRI, UPOV, OIV. (1997). Descriptors for Grapevine (*Vitis* spp.). International Union for the Protection of New Varieties of Plants, Geneva, Switzerland/Office Interantional de la Vigne et du Vin, France/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.3, ISBN 92-9043-352-3.

Jiang , L.E.I Zhong, Li. YuQiao, Wu. Gang, Ni, Jing. De, ZP. Jiang, L. Zhong, .(2000). Regulations of multiplication and high growth of Calmeria grape shoot by, BA and IAA. Journal of Jiangsu Forestry Scienceand- Technology. 27(2):27-29, 333.

Kartha K.K. (1985). Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. 276.

Kozai T., Kubota C. & Jeong B. R (1997) Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 51: 49–56.

Kubota C & Kozai T (1995) Low temperature storage of transplants at the light compensation point: Air temperature and light intensity for growth suppression and quality preservation. *Scientia Hortculturea,* 61: 193-204.

Lee, N., Wetzatein, H.Y. (1990). *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115: 324-329.

Lioyd, G; and McCown, B (1981). Commercially- feasible micropropagation of mountain laurel, *Lamia Latifolia,* by use of shoot tip culture. Proc. Inter plant propagation Soc 30: 421-427.

Mhatre, M., Salunkhe, C.K., Rao, P.S. (2000). Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol. Sci. Hort., 84: 357-363.

Morel G. (1975). Meristem culture technique for the long-term storage of cultivated plants. In: O.H. Frankel and J.G. Hawkes (eds.) Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow, Cambridge Univ. Press, UK. Pp 327-332.

Morini, S., Mazialetti., Barbieri, C., (1985). *In vitro* propagation of Grapevine. Riv. Ortoflorofrutt.ital., 69: 385-396.

Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. of plant physiol. 25:135-166.

Nissen, S. J. and E. G. Sutter. (1990). Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures. Hort Sci. 25(7):800-802.

Nordstorm, A.C and Eliasson, L. (1986). Uptake and translocation of C^{14}-labeled benzylaminopurine in apple shoots grown *in vitro* in relation to shoot development. Physiol Plantarium 68 (3): 431-435.

Novak, F and Juvova, Z. (1982). Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. Sceintia Hort., 18: 231-240.

Perez, C. R. Rodrigues and R.S. Temes. (1985). *In vitro* filbert (Coryllus avellana L.) micropropagation plant cell reports 4 : 137-139.

Poudel, P. R., Kataoka, I., Mochioka, R. (2005). Effect of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Vitis ficifolia* var. *ganebu* and its interspecific hybrid grape. Asian J. Plant Sci., 4: 466-471

Reisch, B.I. (1986). Influence of genotype and cytokinins on *in vitro* shoot proliferation of grapes. J.Amer.Soc. hort.Sci., 111: 138- 141

Rao N.K. (2004) Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology African Journal of Biotechnology. 3:136-145.

Roger, P; Darren M; Simon, H; David, B; Duncan Soutar. GenStat® *for Windows*TM 12th Edition Introduction. (2009). GenStat Release 12 was developed by VSN International Ltd, in collaboration with practising statisticians at Rothamsted and other organisations in Britain, Australia and New Zealand.

Roubelakis-angelakis, K.A., Zivanovite, S. (1991) A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of Grapevine genotypes. Hortscience 26(12): 1551-1553.

Rout G. (2004) Effect of cytokinins and auxins on micropropagation of *Clitoria ternatea* L. *Biolgical Letter*, 41: 21-26.

Singh, S.K., Khawale, R.N., Singh, S.P. (2004). Techniques for rapid *in vitro* multiplication of *vitis vinifera* L. cultivars. J. hort.Sci. biotech., 19: 267-272.

Singh, S.K., Sharam, H.C., Singh, S.P., Sharam, R.R. (2000). Propagation of grape through repetitive micro-cutting technique. Indian Hort., 3: 14-15.

Skoog, F., Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* Symp. Soc. Expt. Biol., II (9): 118-140.

Swartz, H.J. G.J. Galletta, R.H. Zimmerman. (1983) Field performance and phenotypic stability of tissue culture –propagation strawberries. J. Amer Soc Hort Sci, 108: 285-290.

Torregrossa, L., and A. Bouquet, (1995). *In vitro* propagation of *Vitis Muscadinia* hybrids by microcutting Axillary budd. *Vitis* 34, 237-238

Torres, K. C. (1989). Stages of Micropropagation In: Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. ACI Book, Van Nostrand Reinhald, New York. N8. 52- 65.

Wang Q.C., Mawassi M., Li P., Gafny R., Sela I. & Tanne E. (2003) Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Science*, 165: 321-327.

Yae, B., Shin, Y., Kang, D., Lee, D., Choo, K., Monn, Y., Hwang, J. (1990). F actors affecting lateral shoot proliferation in Grapevine cv. Rizamat, *in vitro*. Research reports of the rural development, administration, horticulture, 32: 34-41.

Received	**2012/02/21**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2012/07/18**	**قبول البحث للنشر**