تأثير بعض منظمات النمو في أثناء التكاثر الخضري الدقيق مخبرياً لأصل العنب *Ru140*

علي جرار[1] و حسان عبيد[2] و حسين الزعبي[3]

الملخّص

أجري البحث على أصل العنب Ru140، في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بدمشق بهدف الإكثار الخضري الدقيق (*in vitro*)، باستعمال بعض منظمات النمو في مرحلة الإكثار والتجذير وتحديد تركيزها الأنسب في أفضل معدل إكثار وأفضل تجذير (معدل التجذير، عدد الجذور وطولها). أوضحت النتائج أن أفضل وسط للإكثار المخبري الدقيق لأصل العنب المدروس هو وسط MS المعدل المحتوي على: 4.44 µM BA + 0.49 µM IBA وبمعدل إكثار بلغ 7.72 نمواً خضرياً جديداً كل أربعة أسابيع مع متوسط طول بلغ 5.54 سم، نقلت النموات بعمر أربعة أسابيع إلى أوساط استطالة تحتوي مكونات وسط الإكثار ذاتها لكن مع إضافة الكينيتين بتركيز 2.22 µM بدلاً من البنزيل أدنين، ممَّا أدى إلى متوسط طول للنموات الخضرية بلغ 7.87 سم، ثم نقلت هذه النموات إلى أوساط التجذير وتم الحصول على أعلى معدل تجذير (87%) مع أكبر عدد للجذور (7.56) عند استخدام الأوكسين IBA بتركيز 4.44 µM مقارنة بباقي المعاملات الأخرى ومع الشاهد أيضاً، في حين تم الحصول على أكبر طول للجذور (6.29 سم) عند المعاملة بالتركيز المنخفض من الأوكسين IBA (2.22 µM). قُسّيت النموات المجذرة تدريجياً لشروط الوسط الخارجي وبنسبة نجاح بلغت 70%.

الكلمات المفتاحية: العنب، الأصل روجري Ru140، زراعة الأنسجة، منظمات لنمو نباتية NAA, IBA, Kin, BA.

[1] طالب ماجستير، [2] أستاذ، قسم علوم البستنة، كلية الزراعة، جامعة دمشق، ص. ب 30621، سورية.
[3] ادكتور باحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، قسم التقانات الحيوية، دوما، ص.ب. 113، دمشق، سورية.

Effect of some growth regulators on *in vitro* micropropagation of Ru140 grape rootstock

Jarrar, A.[(1)], H. Obaid [(2)] and H. Alzubi[(3)]

Abstract

This investigation was conducted on Ru140 grape rootstock at the General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Damascus with the aim of *in vitro* vegetatively micropropagation using some plant growth regulators on multiplication and rooting to determine the best combinations and concentrations of plant growth regulators that result in the best multiplication rate, and best rooting crekeria (rate and roots number and length). Results demonstrated that, the best medium for *in vitro* micropropagation of the studied rootstock was the modified MS medium supplemented with 4.44 µM BA + 0.49 µM IBA with multiplication rate of 7.72 new shoots every 4 weeks, and shoots lengt of 5.54 cm. These shoots were transferred for 4 weeks to among elongation medium containing the same medium with the addition of Kinetine at a concentration of 2.22 µM instead of BA which led to a shoot elongation rate of 7.87 cm, then these shoots were transferred to rooting medium for rooting, It was shown that using auxin IBA at a concentration of 4.44 µM resulted at the highest rate of rooting (87%) with the largest number of roots (7.56) when using the auxin IBA concentration µM 4.44 compared with the rest of other transactions and with the control as well. However, The highest length of roots (6.29 cm) was observed on medim contained lower IBA concentration (2.22 µM). Rooted Plants were acclimatized gradually to *ex vitro* conditions with 70 % efficiency.

Keywords: Grape, Ru140 Rootstock, Plant tissue culture, Plant growth regulators, BA, Kin, IBA, NAA.

[(1)]MSc. Student, [(2)] Prof. Dr. Dep. Hort. Sci., Fac. Agric., Univ. Damascus, P.O.Box 30621, Syria.
[(3)]General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Douma, P. O. Box 113, Damascus, Syria.

المقدمة

ينتمي العنب إلى العائلة Vitaceae (Ampelideae)، والجنس *Vitis* (Walker، 2002) الذي يحوي على 60 نوعاً، بعضها ذات ثمار صالحة للأكل، وبعضها الآخر تستخدم كأصول، والقسم الثالث نباتات زينة، وتعد الأنواع التي تنتشر منها في أمريكا وآسية أصولاً مقاومة للأمراض (Dalbo وزملاؤه، 2000). يعدُّ الأصل Ruggery 140 (Ru140) ناتجاً عن التهجين بين *V.rupestris* du lot مع *V.berlandieri* ويتميز بقوة نموه، وتحمله الفلوكسيرا، والجفاف، والكلس الفعال حتى 20%، ويعطي توافقاً جيداً مع الأصناف التي تطعم عليه خاصة الحلواني والبلدي (البيتموني) والزيني.

تعود أهمية شجرة العنب لما تنتجه من ثمار ذات قيمة غذائية وعلاجية عالية، تستعمل على شكل أعناب مائدة للتناول الطازج، أو أعناباً مجففةً كالزبيب، أو لصنع الدبس والخل والنبيذ، أو استخراج الدهون من بذورها لاستعمالها في تحضير الصابون والأصباغ، كما تستخدم أوراقها كغذاء للإنسان أو كعلف للحيوان بعد تجفيفها، ويستعمل التفل في تحضير علف لتغذية الحيوانات أو في تحضير أسمدة عضوية بعد تجريده من البذور، فضلاً عن استخدامها شجرة تزيينية (حامد وزملاؤه، 2006).

تفيد طريقة الزراعة المخبرية في الحصول على النتائج بسرعة أكبر نسبياً، فضلاً عن إمكانية التحكم الكامل ببيئة نمو النبات، وقد أكد العديد من الباحثين توافقاً جيداً بين النتائج الحقلية والمخبرية في أثناء دراسة الإجهادات المختلفة على أشجار العنب (Barlass وSkene، 1981؛ Bavaresco وزملاؤه، 1993؛ Singh وزملاؤه، 2000؛ Sivritepe وEris، 1997، 1999؛ Troncoso وزملاؤه، 1999).

لتقنيات زراعة الخلايا والأنسجة النباتية أهمية كبيرة في مجالات حفظ عدد كبير من الأنواع النباتية المهمة وحفظها أو إكثارها، فهي تسمح بتخطي العديد من المعوقات بما فيها المتعلقة بالنبات نفسه أو تلك المتعلقة بالبيئة المحيطة، وغدت من مستلزمات برامج الانتخاب، كما تعدُّ طريقة موثوقاً بها لاختبار تحمل النباتات للملوحة بنتائج موافقة لنتائج الدراسة في ظروف البيت الزجاجي أو الحقل (Mercado وزملاؤه، 2000؛ Naik وWidholm، 1993؛ Watanabe وزملاؤه، 2000). أجريت دراسة مخبرية على الإكثار الخضري الدقيق لأربعة أصول عنب باستخدام أجزاء عقدية مع إضافة منظمات نمو مختلفة، ولوحظ نجاح تأسيس الزراعات عند استخدام إما BA أو Kin، ولكن المعاملة بـ 2.0 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA كانت الأكثر فاعلية في زيادة معدل الإكثار، وقد أعطى الأصل H-144 أعلى معدل تضاعف (12 عزلة من كل زراعة) وأعلى معدل تجذير (87.7%) (Alizadeh وزملاؤه، 2010).

وثقت دراسات عدة استعمال تقنية الإكثار المخبري الدقيق لأصناف عديدة من العنب *Vitis vinifera* ونجاحها بشكل جيد (Reisch، 1986؛ Singh وزملاؤه، 2004). وقد وضعت بروتوكولات عدة لإكثار العنب الموسكادي مخبرياً (Lee وWetzstein، 1990؛ Torregrosa وBouquet، 1995؛ Roubelakis-Angelakis، 2001) وكذلك لإكثار بعض سلالات العنب البري (Poudel وزملاؤه، 2005؛ Zhang وزملاؤه، 2006).

تحتاج النباتات عند نقلها إلى الوسط الخارجي إلى عدة أسابيع من أجل أقلمتها بشكل تدريجي مع الرطوبة الجوية المنخفضة نسبياً (Bolar وزملاؤه، 1998)، لذلك يمكن للنباتات أن تذبل بسرعة بسبب فقدان الماء من أوراقها بشكل كبير، كما أن الاستفادة من ماء الري تكون محدودة بسبب قلة فعالية الامتصاص الجذري وكذلك نظام التوصيل بين الجذر والساق (Fila وزملاؤه، 1998)، وقد بيَّن Ruzic وزملاؤه (1991) وكذلك Blenda (1995) أن دراسة عوامل التقسية تساعد على تحسين كفاءة هذه العملية بشكل كبير بحيث يمكن تقسية النباتات المجذرة بنجاح ونقلها إلى ظروف البيت الزجاجي ومنه إلى المشتل.

هدفت الدراسة إلى وضع تقنية للتكاثر الخضري الدقيق لأصل العنب Ru140 واختبار مدى استجابته ضمن أوساط غذائية مختلفة وتحديد الوسط الأفضل لإنتاج أكبر عدد ممكن من النموات الخضرية مع أفضل استطالة لها وتجذيرها ليصار إلى تقسيتها وتطعيمها وإنتاج غراس مطعمة ذات توافق جيد مع الأصناف التي تطعم عليه مثل الحلواني والبلدي والزيني.

مواد البحث وطرائقه

أجري البحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، قسم التقانات الحيوية، مخبر زراعة الأنسجة النباتية، دمشق، دوما، خلال المدة بين 2011-2012. أخذت طرود من أصل العنب Ruggery140 (Ru140) من حقول الأمهات التابعة لوزارة الزراعة والإصلاح الزراعي في مركز تل شهاب الزراعي بدرعا، وقد استُخدمت العيون المأخوذة من الأشجار الفتية للأصل المذكور كخزعات أولية في الزراعة المخبرية في الخريف.

الزراعات التأسيسية (التطهير السطحي للمادة النباتية والزراعة الأولية): أخذت العقل النباتية بطول 0.5 – 1 سم حيث تحتوي كل منها على عين واحدة، ثم وضعت تحت الماء الجاري مدة ساعة لتقليل التلوث البكتيري والفطري، ومن ثم في محلول مبيد فطري إيكوبسين (3%) مع الصابون السائل مدة نصف ساعة على جهاز التحريك المغناطيسي، ومن ثم غمرت العينات النباتية في الكحول 70% مدة 1 دقيقة، ثم نقعت في 0.525% من هيبوكلوريت الصوديوم (10% من محلول كلوراكس التجاري الذي يحتوي 5.25% هيبوكلوريت الصوديوم كمادة فعالة) مدة 10 دقائق مع إضافة نقطة توين 20 لكل 100 مل من المحلول، تلا ذلك النقع في محلول ثنائي كلوريد الزئبق $HgCl_2$ بتركيز

0.1% مع نقطة من محلول توين 20 مدة 30 ثانية، ثم غسلت هذه العينات ثلاث مرات بماء مقطر معقم، وتركت في آخر غسلة في الماء المقطر إلى حين موعد زراعتها في الأنابيب خلال ساعتين.

زرعت الخزعات النباتية (100خزعة نباتية) بعد تطهيرها في أنابيب اختبار تحوي 20 مل من وسط الزراعة الأساس ومن دون منظمات نمو، ثم حضنت مدة 4 أسابيع في غرفة نمو بدرجة حرارة 23±1 مْ ومدة ضوئية 16 ساعة ضوء و8 ساعات ظلام وشدة ضوئية نحو 55 µmol m-2 s-1 photon flux على مستوى الزراعات، وذلك لتحديد نسبة التلوث واستبعاد الخزعات الملوثة، نقلت الزراعات بعدها إلى أوساط مختلفة تحوي منظمات نمو بتراكيز مختلفة (جدول 1)، وذلك لاختبار استجابة النبات المدروس لتراكيز مختلفة من منظمات النمو التي شملت BA, Kin, IBA, NAA, في سبعة تراكيب مختلفة من ضمنها تركيب الوسط الشاهد.

استخدم وسط موراشيج وسكوج (Murashige وSkoog، 1962) مع إضافة الجلايسين 2.00 مغ/ل، وبيرودوكسين 1.00مغ/ل، وثيامين هيدروكلوريد 1.00مغ/ل، وميواينوزيتول 500.00 مغ/ل، وحمض النيكوتين 1.00 مغ/ل، وبانثونات الكالسيوم 0.50 مغ/ل، بيوتين 0.10 مغ/ل، حمض الفوليك 0.01 مغ/ل، و30غ/ل سكروز و6 غ/ل آجار آجار، وعدلت حموضة الأوساط إلى pH= 5.3-5.4 قبل التعقيم بالأتوغلاف على درجة حرارة 121 مْ، وضغط 1.1 كغ/سم2 مدة 20 دقيقة.

الإكثار والاستطالة: نقلت الخزعات النباتية النامية إلى أوساط الإكثار المختبرة المؤلفة من الوسط الأساسي MS مع تراكيز مختلفة لمنظمات النمو: BA، Kin، IBA، NAA وقد تضمنت هذه المرحلة ست معاملات (منظمات نمو) فضلاً عن الشاهد كما يأتي:

- 2.22 µM BA + 0.49 µM IBA
- 4.44 µM BA + 0.49 µM IBA
- 2.22 µM BA + 0.49 µM NAA
- 4.44 µM BA + 0.49 µM NAA
- 2.22 µM Kin + 0.49 µM IBA
- 4.44 µM Kin + 0.49 µM IBA
- الشاهد (دون منظمات نمو)

نُقلت الخزعات النباتية أولاً إلى وسط الإكثار المخبري المعتمد كل أربعة أسابيع مدة أربعة أشهر مع تفريد النموات الخضرية المتشكلة وفصلها للحصول على كمية كافية من المادة النباتية، كما أُخذت القراءات بعد أربعة أسابيع من إعادة الزراعة الأخيرة لتحديد

أفضل وسط للإكثار. كررت التجارب 3 مرات حيث حُسب متوسط عدد وطول النمـوات الجديدة المتشكلة في أوساط الإكثار المختبرة؛ وذلك بغية تحديد أفضل معدل تكاثر وأفضل متوسط استطالة للنموات الخضرية الجديدة، ومن ثم تحديد أفضل التراكيز من منظمـات النمو المستخدمة التي تعطي أفضل معدل إكثار للنموات الجديدة المتـشكلة مخبريـاً مـع استطالة جيدة.

التجذير داخل الأنابيب: أُجري التجذير على أوساط تحتوي التركيب الأساسي للوسـط MS ½ مع إضافة الأوكسين IBA إلى الوسط وبتراكيز مختلفة (2.22 – 4.44 – 8.88 µM) فضلاً عن الشاهد (دون منظمات نمو) وقد اختيرت التراكيـز بحـسب الدراسـات المرجعية حول التجذير المخبري لنباتات العنب المكاثرة مخبريـاً (Mhatre وزمـلاؤه، 2000؛ Gray وBenton، 1991؛ Thies وGraves، 1992؛ Cavagnaro وزمـــلاؤه، 2006)، ودُرسَ تأثير تركيز منظمات النمو في مؤشرات التجذير، وشملت مرحلة التجذير أربع معاملات في كل معاملة عشرون مكرراً، وأخذت قراءات التجذير الآتيـة بعـد 30 يوماً من الزراعة على أوساط التجذير: معدل التجذير (%)، ومتوسـط عـدد الجـذور الجانبية المتشكلة، ومتوسط أطوال الجذور الجانبية المتشكلة.

الأقلمة: نُقلت النبيتات المجذرة بعد غسل الجذور جيداً إلى أصص تحتوي على خلطة من البرليت والبيتموس بنسبة 1:1 (حجم:حجم) التي عُقّمت مسبقاً، وغُطّيت بأكياس شفافة من البولي إيتلين لحفظ الرطوبة مع متابعتها بالري من خلال ثقب فـي الغطـاء. وفُـتح الغطاء تدريجياً بعد شهر واحد من زراعة النبيتات في هذه الأصص، ثم نقلت إلى البيـت الزجاجي وتُوبعت بالري.

استُخدم في هذه التجربة تصميم القطاعات العشوائية الكاملة، إذْ اشتملت مرحلة التكاثر سبع معاملات في كل معاملة أربعون مكرراً، وأُخذت القراءات بعد أربعة أسـابيع مـن الزراعات في مرحلة التكاثر، وشملت مرحلة التجذير أربع معاملات فـي كـل معاملـة عشرون مكرراً، وأخذت قراءات التجذير بعد 30 يوماً من الزراعة على أوساط التجذير.

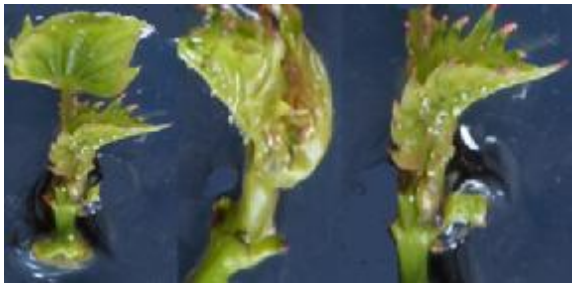
حُلّلت البيانات إحصائياً باستخدام الحاسب، حيث أخضعت المعطيات في التجارب كلّها لتحليل التباين باستخدام البرنامج الإحصائي MSTAT ومن خلال حساب المتوسط، وقيمة أقل فرق معنوي على مستوى 1% .

النتائج والمناقشة

الزراعات التأسيسية:

التعقيم السطحي للمادة النباتية: تشير النتائج (الشكل1) إلى أن طريقة التعقيم المتبعة كانت فاعلة، إذْ بلغت نسبة النباتات السليمة وغير الملوثة 95%، ونسبة النباتات الناميـة

90%، مع متوسط طول نموات بلغ 2.45 سم. ومع الرغم من فعالية كلوريد الزئبق في عمليات التطهير السطحي للمستزرعات النباتية إلا أنه لم ينصح باستخدامه بسبب سميته وقد أشار Pevalek-Kozlina و Jelaska (1987) إلى أهمية استخدام هيبو كلوريد الصوديوم في التطهير السطحي، إذ يتميّز بفعالية كبيرة في تطهير المستزرعات النباتية (Shaltout، 1993).



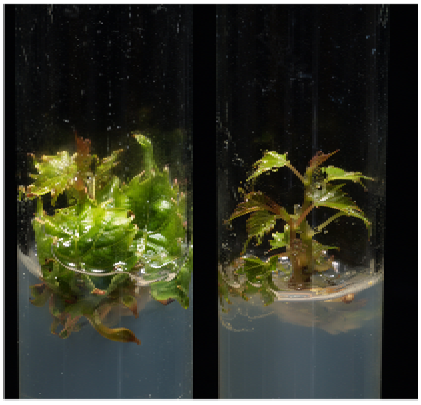
الشكل (1) نمو الزراعات الأولية لأصل العنب المدروس خلال 4 سابيع

الإكثار والاستطالة: تشير النتائج الموضحة في الجدول (1) إلى تأثير المعاملات المختلفة في مرحلة التكاثر من حيث عدد النموات وطولها، إذ أعطت المعاملة الثانية أعلى معدل تكاثر (7.72 نمواً خضرياً كل أربعة أسابيع) (الشكل 2) وكانت الفروق الملاحظة معنوية مقارنة بالشاهد وبباقي المعاملات المدروسة، كما لوحظت نسبة تكاثر عالية أيضاً في المعاملتين الأولى والرابعة ومن دون فروق معنوية بينهما (6.49، 6.56 للمعاملتين الأولى والرابعة على التوالي)، إذْ أدّت هاتان المعاملتان إلى زيادة معنوية في نسبة التكاثر مقارنة مع باقي المعاملات وبالشاهد أيضاً. وسُجّلت أقل معدلات التكاثر في المعاملات الخامسة والسادسة ثم الثالثة على الترتيب. كما تبين أن تركيز 4.44 من BA + 0.49 من IBA كان الأفضل من حيث عدد النموات الجديدة المتشكلة، تلاه التركيز 2.22 من BA + 0.49 من IBA، بتفوق معنوي على المعاملات المحتوية على الكينيتين، إذ أبدى الـ Kin فعالية ضعيفة بوجود الأكسين IBA من حيث تشكل النموات الجديدة مقارنة بالسيتوكينين BA، كما كانت استجابة الخزعات النباتية لإضافة Kin متماثلة في التركيزين المستخدمين، ولم تلاحظ أي فروق معنوية عند زيادة التركيز من 2.22 µM إلى 4.44 µM (5.75 و5.64 على التوالي) وكانت الفروق غير معنوية وليست ذات دلالة إحصائية. وكذلك فقد اختلفت معدلات التكاثر تبعاً لتركيز السيتوكينين في الأوساط التي تحوي BA، وقد يعزى انخفاض نسبة التكاثر إلى انخفاض تركيز السيتوكينين في الوسط، إذ يُركّبُ طبيعياً في القمة النامية للجذر، ويكون بكمية قليلة في قمة الساق (Gaspar، 1988).

وقد جاءت النتائج موافقة مع لما توصل إليه Alizadeh وزملاؤه (2010)؛ وذلك من حيث زيادة فاعلية BA في التأثير في معدل التضاعف من Kin، في حين تتعارض النتائج في هذه الدراسة مع ما توصل إليه Poudel وزملاؤه (2005) من أن الكينيتين كان أكثر فاعلية في إكثار سلالتين من العنب البري، وقد يعود ذلك إلى الاختلاف في النمط الوراثي للنبات، إذْ إنَّ نوع منظمات النمو المناسبة لإكثار صنف معين مخبرياً وتركيزها ربما تكون غير مناسبة لإكثار صنف آخر (Poudel وزملاؤه، 2005؛ Singh وزملاؤه، 2004).

وبشكل عام، فإن المعدلات المرتفعة نسبياً من السيتوكينين مع التراكيز المنخفضة من الأوكسين تحفز تشكل النموات الخضرية في كثير من الأنواع النباتية (Pierik، 1988)، وهذا يتطابق مع نتائج هذه الدراسة، ويمكن أن يعزى ذلك بشكل أساسي إلى دور السيتوكينين BA في الانقسام الخلوي وتحريض تشكل النموات العرضية، ومن ثمَّ فإنَّ معدل التضاعف العالي يعود إلى وجود التركيز المناسب من السيتوكينين.

إنَّ لترافق الأوكسين مع السيتوكينين دوراً في تحريض تخليق جديد للحمض الريبي النووي منقوص الأكسجين (DNA)، وكلاهما ضروري لحدوث الانقسام الخيطي (الميتوز)، ولهما دور تآزري، فتوافر أحدهما يشجع عمل الآخر، إذْ يعدُّ BA من أهم السيتوكينينات المستخدمة في أوساط الزراعة المخبرية للعنب (Chee وPool، 1982؛ Harris وStevenson، 1982؛ Reisch، 1986؛ Martinez وTizio، 1989؛ Thies وGraves، 1992؛ Mhatre وزملاؤه، 2000؛ Singh وزملاؤه، 2004). فضلاً عن تأثير الأوكسين في تعزيز دور السيتوكينين في التشكل العضوي وتحسين نوعية النموات المورقة، وهذا التشكل العضوي يجري تحت سيطرة العلاقة ما بين الأوكسين والسيتوكينين (Christison وWarnick، 1988).



الشكل (2) تأثير المعاملة 2 (4.44 µM BA + 0.49 µM IBA) في معدل التكاثر المخبري لأصل العنب المدروس.

ومن حيث تأثير نوع الأوكسين في عملية التضاعف، فقد لوحظ في مجموعة الأوساط التي احتوت BA وجود فروق معنوية بين IBA وNAA من حيث عدد النموات الجديدة، وذلك بتركيز 4.44 µM لـــ BA مع ثبات تركيز الأوكـــسين (0.49 µM) وكـــان IBA متفوقاً معنوياً على NAA إذْ بلغ عدد النموات 7.72 عنـــد اســـتخدام IBA و6.56 عنـــد استخدام NAA مع ثبات تركيز السيتوكينين، ولُحظ الأمر نفسه في المعـــاملتين الأولـــى والثالثة فقد تفوق IBA على NAA من حيث عدد النموات (6.49 و5.49 للأوكـــسينات المذكورة على التوالي) عند التركيز نفسه من BA (2.22 µM) مع ثبات تركيز الأوكسين (0.49 µM).

أما من جيث استطالة النموات فقد لوحظ أعلى طول للنموات الناتجة (7.87 سم) فـــي المعاملة الخامسة، إذْ أدّت هذه المعاملة إلى زيادة معنوية في الطول مقارنة بالشاهد وبباقي المعاملات المدروسة. (الجدول 4 والشكل 3). كما لوحظت نسبة اســـتطالة عاليـــة فـــي المعاملات الأولى والسادسة والثالثة (6.92 و6.89 و6.68 سم لكل منها علـــى التـــوالي) وبفروق معنوية مقارنة بالشاهد وبباقي المعاملات، في حين كانت أخفض نسبة اســـتطالة في المعاملة الرابعة (5.35 سم) من دون فروق معنوية بينها وبين الشاهد (5.23)، ومـــن ثم في المعاملة الثانية (5.54 سم) وبفروق معنوية فيما بينها من جهـــة، وبينهـــا وبـــين الشاهد من جهة أخرى.

الشكل (3) تأثير المعاملة 5 (2.22 µM Kin + 0.49 µM IBA) في استطالة نموات أصل العنب المدروس مخبرياً.

تعمل التراكيز المرتفعة من السيتوكينين على تثبيط الاستطالة، وهذا ما يفسر تفـــوق المعاملة الخامسة على المعاملة السادسة باستخدام التركيز ذاته من IBA (0.49 µM) مع اختلاف تركيز الـــ Kin (2.22 و4.44 µM في المعاملتين الخامـــسة والـــسادسة علـــى التوالي). وحين دراسة تأثير نوع السيتوكينين في استطالة النموات الخضرية، أوضـــحت النتائج أن الـــ Kin قد تميّز بفعالية أكبر في زيادة طول النموات الخضرية من الـــــ BA

حين استخدام التركيز ذاته (المعاملة الخامسة والأولى) إذْ أدّت إضافة الــ Kin إلى معدل استطالة 7.87 سم في المعاملة الخامسة، متفوقة بذلك على المعاملة الأولى التي استخدم فيها الــ BA بالتركيز نفسه (2.22 µM) إذْ أعطت استطالة 6.92 سم فقط كذلك فقد تباين تأثير نوع الأوكسينات المختبرة في طول النموات الخضرية بالعلاقة مع نوع السيتوكينين المرافق، ففي مجموعة الأوساط التي احتوت على الــ BA كان متوسط طول النموات أعلى بتوافر IBA عن الأوساط المحتوية على التركيز ذاته من NAA باستخدام التركيز ذاته من الــ BA، بين المعاملات الأولى والثالثة وبين الثانية والرابعة.

الجدول (1) تأثير المعاملات المختلفة في إكثار عينات أصل العنب المدروس واستطالتها

رقم المعاملة	تراكيز منظمات النمو المستخدمة	النباتات المصابة بالشفافية%	النباتات النامية%	متوسط عدد النموات الخضرية الجديدة المتشكلة	متوسط طول النموات الخضرية الجديدة المتشكلة (سم)
1	2.22 µM BA+0.49 µM IBA	2.45^{b}	94.32^{b}	6.49^{b}	6.92^{b}
2	4.44 µM BA+0.49 µM IBA	3.61^{a}	97.86^{a}	7.72^{a}	5.54^{d}
3	2.22µM BA+0.49µM NAA	1.64c	93.67^{b}	5.49^{d}	6.68^{c}
4	4.44µM BA+0.49µM NAA	3.56^{a}	97.22^{a}	6.56^{b}	5.35^{e}
5	2.22 µM Kin+0.49µM IBA	1.53^{c}	90.30^{c}	5.75^{c}	7.87^{a}
6	4.44µM Kin+0.49µM IBA	2.38^{b}	89.37^{c}	5.64^{cd}	6.89^{b}
7	بدون هرمونات	0.00^{d}	99.13^{a}	5.22^{e}	5.23^{e}
L.S.D (1%)		**0.203**	**2.750**	**0.214**	**0.178**

المعاملات التي تحمل الأحرف ذاتها ليس بينها فروقات معنوية.

التجذير: توضح النتائج في الجدول (2) أن التراكيز العالية من IBA (8.88 µM) أدّت إلى تشكيل نموات كثيفة من الكالس ولم تعط جذوراً نهائياً، حيث كان معدل التجذير في هذه المعاملة مساوياً للصفر، في حين تم الحصول على أعلى معدلات التجذير في المعاملة الثانية حين استخدام التركيز 4.44 µM من IBA (87%)، كما تم الحصول على معدل تجذير جيد وصل إلى 60% حين المعاملة بتركيز 2.22 µM من IBA، وتم الحصول على أكبر عدد من الجذور (7.56) في المعاملة الثانية حين استخدام 4.44 µM من IBA، متفوقة على المعاملة الأولى حين استخدام التركيز المنخفض من IBA (2.22 µM) وبفروق معنوية إذْ كان متوسط عدد الجذور في المعاملة الأولى 5.52، هذا وقد تفوقت المعاملتان الأولى والثانية على المعاملة الثالثة وبفروق معنوية إذْ كان متوسط عدد الجذور في المعاملة الثالثة مساوياً للصفر، في حين أعطت التراكيز المنخفضة من الـــ IBA (2.22 µM) أفضل متوسط طول للجذور (6.29 سم) متفوقة على بقية المعاملات بفروق معنوية، تلتها المعاملة التي احتوت 4.44 µM من IBA حيث بلغ متوسط طول الجذور 5.34 سم (شكل 4).

الشكل (4) تأثير أفضل المعاملات في تجذير نموات أصل العنب المدروس مخبرياً.

جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما أشار إليه Chvojka وزمـــلاؤه (1986) إذ تـــرتبط قدرة الأصول على التجذير ارتباطاً كبيراً بمعدل الأوكسينات الخارجية المضافة إلى وسط التجذير، كما تختلف عملية تخليق الجذور العرضية بتأثير الأوكسينات من نوع نباتي إلى آخر من الناحية الوراثية مع كون الأنواع الخشبية عموماً أكثر صـــعوبة بالتجـــذير مـــن الأنواع العشبية (Harbage وزملاؤه، 1993)، لذا يعدُّ الاختيار الصحيح لنوع الأوكـــسين وتركيزه مهماً جداً في التأثير في قدرة النموات على التجذير في الأنابيب الدقيقة. تـــؤدي الأوكسينات دوراً مهماً في النمو السريع للنبات، كما تشجع نشوء الجذور وتؤدي التراكيز المنخفضة من الأوكسين دوراً مهماً في استطالة الجذور، في حين تتسبب التراكيز العالية من الأوكسين تشكل الكالس على الخزعات النباتيـــة Edwin وGeorge (1996)، وهـــذا يتطابق مع نتائج الدراسة الحالية، حيث لوحظ تشكل نموات كثيفـــة مـــن الكـــالس عنـــد المعاملة بالتراكيز العالية من IBA، في حين أعطت التراكيز المنخفضة أفضل متوســـط طول للجذور.

الجدول (2) تأثير تركيز IBA على نسبة التجذير ومتوسط عدد وطول الجذور المتشكلة.

تركيز IBA (µM)	معدل التجذير (%)	متوسط عدد الجذور	متوسط طول الجذور (سم)
2.22	60.32 [b]	5.52 [b]	6.29 [a]
4.44	87.40 [a]	7.56 [a]	5.34 [b]
8.88	0.00 [c]	0.00 [d]	0.00 [d]
0	59.38 [b]	3.12 [c]	3.66 [c]
LSD 0.05	**3.75**	**0.47**	**0.23**

ملاحظة: المعاملات التي تحمل الأحرف ذاتها ليس بينها فروق معنوية.

إن فعل الأكسين على مستوى الجذر مشابه لما هو عليه على مستوى الساق، ولكن الجذر أكثر حساسية للأكسين إذ تؤدي التراكيز المنخفضة إلى زيادة معدل التجذير في حين تعيق التراكيز المرتفعة التجذير أو تعيق استطالة خلايا الجذر، فمن المعروف فيزيولوجياً أن التركيز المنشط لنمو خلايا الساق واستطالتها هو تركيز مثبط لنمو خلايا الجذر واستطالتها، كما أن تأثير الأكسين في عملية التجذير يختلف بحسب تركيزه ونوعه ووجود أكسين واحد أو عدة أكسينات في الوسط، ولكن بشكل عام يعمل الأكسين على زيادة معدل التباين الأيوني والنفاذية الخلوية والنشاط الأنزيمي ومعدل نقل الشوارد مما يزيد من معدل تكوين الجذور على الأفرع المزروعة نتيجة دوره المهم والمباشر في أهم مرحلة من مراحل التجذير وهي مرحلة الدفع الجذري، ويتطابق هذا التفسير مع ما توصل إليه Haissing (1986).

الأقلمة: إن المرحلة الحرجة جداً والتي صودفت في أثناء تنفيذ التجارب كانت تقسية وأقلمة النباتات المجذرة ونقلها لشروط الوسط الخارجي حيث تم نقسية النباتات المجذرة تدريجياً وبنسبة نجاح بلغت 70% مع ملاحظة حساسية النبات العالية لانخفاض الرطوبة وخاصة في مراحله الأولى بعد الإخراج من الأنابيب، كما أن الظروف المخبرية المعقمة تزيد من صعوبة تأقلم النباتات المكاثرة مخبرياً مع الظروف الخارجية (Pierik، 1988). إن نقل النباتات المجذرة إلى أصص تحوي خلطة من البرليت والبيتموس يعمل على تحسين عملية الأقلمة إذْ أشار Dills and Braham عام 1988 إلى أن استخدام مزيجاً من أحجام متساوية من البيتموس والبرليت من الممكن أن ينتج عدداً أكبر من النباتات التي يتم نقلها إلى الحقل.

واستُنتج أنَّ الطريقة الموصوفة في هذا البحث تتيح إمكانية إنتاج الآلاف من الغراس السليمة والمطابقة وراثياً للنباتات الأم من الأصل المدروس، وخلال مدة زمنية قصيرة، بحيث يمكن تجاوز المشاكل الناجمة عن طرائق الإكثار البذري، ومن ثمَّ يمكن تطبيق الطريقة الموصوفة في هذا البحث على نطاق تجاري لتوفير هذه الأصل المهم لمزارعي العنب للإفادة من ميزاته في التطعيم عليه لتحسين إنتاج العنب في سورية.

References المراجع

حامد، فيصل، وعماد العيسى، ومحمد بطحة. 2006. إنتاج الفاكهة، جامعة دمشق، 177 – 222.

Alizadeh, M., S. K. Singh and V. B. Patel. 2010. Comparative performance of *in vitro* multiplication in fourgrape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes, International Journal of Plant Production. 4 (1): 41-50.

Barlass, M. and K. G. M. Skene. 1981. Relative NaCl tolerances of grapevine cultivars and hybrids *in vitro*, Z Pflanzenphysiol. 102: 147-161.

Bavaresco, L., M. Fregoni and E. Gambi. 1993. *In vitro* method to screen grapevine genotypes for tolerance to lime-induced chlorosis, Vitis. 32: 145-148.

Blenda, V. 1995. Adaptability of rootstocks of stone fruit crops obtained from isolated meristems, Sadovodstvo I Vinogradarstvo. 3: 18-19.

Bolar, J. P., J. L. Norelli. H. S. Aldwinckle and V. Hankc. 1988. An efficient method for rooting and acclimatization of micropropagated apple cultivares, Hort Science. 37: 1251 – 1252.

Cavagnaro, J. B., M. T. Ponce. J. Guzman and M. A. Cirrincione. 2006. Argentinean cultivars of Vitis vinifera grow better than European ones when cultured *in vitro* under salinity, Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad Ciencias Agrarias. Univ. Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina. ISSN 0327 - 9545 Bio Cell. 30(1): 1-7.

Chee, R and R. M. Pool. 1982. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured in vitro, Sci. Hort. 16: 17-27.

Christison, M. L and D. A. Warnick. 1988. Organogenesis *in vitro* as a developmental process, Hort. Science, 123 (3): 115-119.

Chvojka, I., A. Volfora. B. Rovenska. J. Reslova and M. Vavrova. 1986. Effect of phenyl acetic acid on root initiation in Cherry *Prunus avium* cultivar Colt explant. Sbornik UVTIZ, Zahradinictvi. 13(4): 252-260.

Dalbo, M. A., G. N. Ye. N. F. Weeden. H. Steinkellner. K.M. Sfc and B.I. Reisch. 2000. Gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker- based genetic map, Genome. 43(2): 333-340.

Dills, K.L and R.R. Braham. 1988. Effect of soil media on the growth and survival of micropropagated black cherry, Tree planters Notes. 39(3): 31-34.

Edwin, F and Ph.D. George. 1996. Plant propagation by tissue culture, Kluwer Academic Publishers. Part 2:1043-1048.

Fila, G., J. Ghoshghaie. J. Hoarau and G. Cornic. 1998. Photosynthesis, Leaf conductance and Water relation of in vitro cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization, Physiol Plant. 102: 411 – 418.

Gaspar, T. 1988. Aspect physiologique de l'organogneses *in vitro*, In: Culture de Cellules, Tissus et Organes Vegetaux", J. P. Zryd (Ed). Presses Polytechniques Romandes. 69-87.

Gray, D. G and C. M. Benton. 1991. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). Plant Cell Tiss. Org. Cul.. 27: 7-14.

Haissing, B. E. 1986. Metabolic prasses in adventitious rooting of culturings. PP 141-189 in Jackson M.B.(ed) 1986(q.v.).

Harbage, J. F., D.P. Stimart and R. F. Evert 1993. Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh. "Gala", J. Amer Soc. Hort. Sci. 118(5): 680-688.

Harris, R.E and J. H. Stevenson. 1982. *In vitro* propagation of *Vitis*, Vitis. 21: 22-32.

Lee, N and H.Y. Wetzstein. 1990. *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation, J. Amer. Soc. Hort. Sci.. 115: 324-9.

Martinez, E. A and R. Tizio. 1989. Grapevine micropropagation through shoot tips and minicuttings from *in vitro* cultured one-node cuttings, Hort. Sci. 24: 3- 513.

Mercado, J. A., M. A. Sancho-carrascosa. S. Jimenez-bermiudez. R. Peran-quesada. F. Pliego-alfaro and M. Quesada. 2000. Assessment of *in vitro* growth of apical stem sections and adventitious organogenesis to evaluate salinity tolerance in cultivated tomato, Plant Cell Tiss Org Cult. 62: 101-106.

Mhatre, M., C. K. Salunkhe and P. S. Rao. 2000. Micropropagation of *Vitis vinifera* L.: Towards an improved protocol, Sci. Hort.. 84: 63-357.

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

Naik, P. S and J. M. Widholm. 1993. Comparison of tissue culture and whole plant responses to salinity in potato, Plant Cell Tiss Org Cult. 33: 273-280.

Pevalek-kozlina, B and S. Jelaska. 1987. Microclonal Propagation of *Prunus avium* L, Acta Hort. 212: 599-601.

Pierik, R. I. M. 1988. *In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops, propagation of ornamental. 226: 25-40.

Poudel, P. R., I. Kataoka and R. Mmochioka. 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: 71-466.

Reisch, B. I. 1986. Influence of genotype and cytokinins on *in vitro* shoot proliferation of grapes, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111: 41-138.

Roubelakis-angelakis, K. A. 2001. Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine, Kluwer Academic Publishers, London. 474p.

Ruzic, D., R. Cerovic and M. Nikolic. 1991. Filed performance of the micropropagated Sour cherry cultivar sumadinka, Jugosovensko-vocarstvo. 25: 1-2,19-26.

Shaltout, AD. 1993. Factor influencing rooting of Peach shoots cultured *in vitro*, Acta . Hort. 409: 197-202.

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

Singh, S. K., R. N. Khawale and S. P. Singh. 2004. Techniques for rapid *in vitro* multiplication of *Vitis vinifera* L. cultivars, J. Hort. Sci. Biotech. 19: 267-72.

Sivritepe, M and A. Eris. 1999. Determination of salt tolerance in some grapevine cultivars (*Vitis vinifera*) under *in vitro* conditions, Turkish J Biol. 23: 473-485.

Sivritepe, M. and A. Eris. 1997. Determining salt tolerance of some grapevine rootstocks under *in vitro* conditions, Bahce. 26 (1- 2): 49-65.

Thies, K. L and C. H. Graves. 1992. Meristem micropropagation protocols for *Vitis rotundifolia* Michx, Hort Sci. 27: 3- 447.

Torregrosa, L and A. Bouquet. 1995. *In vitro* propagation of *Vitis* × *Muscadinia* hybrids by microcuttings or axillary budding, Vitis. 34: 8-237.

Troncoso, A., C. Matte. M. Cantos and S. Lavee. 1999. Evaluation of salt tolerance of *in vitro*-grown grapevine rootstock varieties, Vitis. 38(2): 55-60.

Walker, R. 2002. "The effects of salinity on vines and wines.", Australian Viticulture. 6 (4): 11-21.

Watanabe, S., K. Kojima and S. Sasaki. 2000. Effect of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in Populus euphratica in vitro, Plant Cell Tiss Org Cult. 63: 199-206.

Zhang, J.L., R. Xu. Z.Y. Cao. S.M. Wang and J.Z. Ren. 2006. Factors affecting *in vitro* propagation of a Chinese wild grape (Vitis piasezkii var. pagnucii): shoot production and rhizogenesis, New Zealand J. Crop Hort. Sci. 343: 217-223.

Received	**2013/03/14**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2013/07/30**	**قبول البحث للنشر**