الإكثار الخضري الدقيق لنبات الفريز صنف أوزو جراند (*Fragriassp*., c.v., oso grand)

فهد البيسكي[1] و رولا بايرلي[2]

الملخص

أجري هذا البحث على نبات الفريز صنف أوزوجراند Osogrand المكاثر مخبرياً بهدف دراسة تأثير بعض منظمات النمو في مرحلتي الإكثار والتجذير، ومن ثمّ تحديد التركيز الأفضل منها الذي يؤدي إلى أعلى معدل إكثار (من حيث عدد الأوراق وعدد النموات الجديدة المتشكلة وطولها) وأفضل تجذير (من حيث نسبة التجذير وعدد الجذور وطولها). سجلت النتائج مخبرياً بعد 4 نقلات من الزراعة على وسط الإكثار (بفاصل 21 يوم بين كل نقلة وأخرى) وبعد شهر من الزراعة على وسط التجذير. أوضحت النتائج تشكل أكبر عدد للبراعم 17.00 عند إضافة 0.1 ملغ/ل من الأوكسين IAA + 3.5 مغ/ل من السيتوكينين BAP، في حين لوحظ أكبر عدد للأوراق 10.38 وأكبر طول للنموات 1.58 سم في الوسط الشاهد (دون منظمات نمو). أما مرحلة التجذير، وبغض النظر عن المعاملات الهرمونية المختلفة، فقد لوحظ أن الزراعة على وسط MS بنصف تركيز الأملاح الكبرى قد أدت إلى تجذير أفضل (من حيث عدد وطول الجذور) مقارنة بالزراعة على وسط MS بكامل تركيز الأملاح. لوحظ أكبر عدد للأوراق (15.83 عند الزراعة على وسط 1/2MS+1 مغ/ل من IBA، أما أقل عدد 8.67 فقد لوحظ عند الزراعة على وسط MS+2 مغ/ل من IBA. وقد سُجّل أكبر طول للساق 1.95 سم عند الزراعة على وسط MS+1 مغ/ل من IBA، أمّا أقل طول 1.00سم. فقد لوحظ عند الزراعة على وسط MS + 0.1 مغ/ ل من IBA .

الكلمات المفتاحية: الفريز، إكثار خضري دقيق، قمة نامية، أوكسين، سيتوكينين.

(1) الهيئة العامة للتقانات الحيوية النباتية، وزارة التعليم العالي، ص. ب 31902، دمشق ، سورية.

(2) قسم علوم البستنة، كلية الزراعة، جامعة دمشق، ص. ب 9123، سورية.

In vitro Micropropagation of Strawbery (*Fragria* ssp.,. cv. Oso grand)

F. Al-Biski[1] and R. Bayerly[2]

ABSTRACT

The current investigation was conducted on *Strawbery* (*Fragria* spp., c.v. Ozogrand) propagated *in vitro* to study the effects of some plant growth regulators on multiplication and rooting,and concenquently to determine the best concentrations of growth vegulator. That give up the highest multiplication rate (in terms of leaves number, shoots number and length) and best rooting response (in terms of rooting percentage andaverage of roots length , as well as leaves number and stem length). Results were recorded after 4 subcutures on multuplication media (with 21 days intervals) and after one month from culturing on rooting media Results showed that, the highest multiplication rate of 17.00. was obtained when medium used was supplemented with IAA at 0.1 mg/L+BAP at 3.5 mg/L, while, the highest leaves number 10.38 and the highest shoot length(1.58)were observed in the case of control tretment. Concerning rooting, regardles of the different hormone treatments, it was observed that culturing on MS media (at half strength) resulted in best rooting efficiency (in terms of roots number and length, leaves number and stem length) compared to full strength MS media. The highest leaves number 15.83 was observed when plants were cultured on 1/2 MS media supplemented with 1 mg/l IBA. Meanwhile, the lowest leaves number 8.67 was observed when full MS media + 2 mg/l IBA in used. The highest stem length 1.95 cm was recorded when IBA was added at 1 mg/l to a half strength MS media, however, the lowest stem length, was observed when IBAwas added at 0.1mg/l in a full strength MS media.

Key words: *Fragaria*, Micropropagation, Shoot tip, Auxin, Cytokinin.

(1) General Commession of Biotechnology, Ministry Of Higher Education P.O.Box 9123, Damascus, Syria.
(2) Department of Horticulture Science, Faculty of agriculture, University of Damascus, P.O.Box 9123, Syria.

المقدمة

يتبع الفريز المملكة النباتية، العائلة الوردية *Rosacea*، جنس *Fragaria* الذي يشمل أنواعاً عديدة من أهمها *F; chiloensis* و *F; virginiana* وقد نتجت معظم أصناف الفريز من التهجين بين هذين النوعين.

الفريز نبات عشبي معمر يتميز بجذر ليفي سطحي وساق قصيرة وأوراق مركبة متبادلة تخرج البراعم من آباطها، الأزهار خنثى (وأحياناً مؤنثة فقط)، التلقيح خلطي يؤدي إلى تكوين ثمرة الفريز التي تعدُّ من أكثر الثمار الصيفية المحبوبة والمرغوب فيها لارتفاع محتواها بفيتامين C الذي تفوق نسبته في ثمار الفريز مثيله من ثمار الحمضيات والفليفلة (Khafagi, 2000) .

يتم إكثار الفريز بعدة طرائق، إذ يمكن أن يكاثر بذرياً أو خضرياً (الفسائل- العقل الصغيرة – الميرستيم – المدادات) (Alibrahim, 2002) وقد شغل إكثار نبات الفريز اهتمام العديد من الباحثين منذ السبعينيات حيث وُضعت عدة تقانات لإكثاره بالأنسجة، وذلك بدءاً من القمة الميريستيمية Boxus,1974; Drew *et al.*,1986; Yue *et al.*,1993 Borkowska, 2001). وتهدف زراعة الميرستيم إلى الحصول على نباتات فريز خالية من الفيروسات أو الإصابات الفطرية (Molot *et al.*, 1972; Popov,1974; Mullin *et al.*, 1974; Vertesy, 1976; Coman *et al.,* 1977; Jonkers and Pierik,1978) وقد وجد أن الحصول على أفضل نمو للفريز بأفضل نوعية تكون بزراعة شتول خالية من الأمراض الفيروسية (Yoshino and Hashimoto, 1977).

لوحظ أن أفضل معدل إكثار وتجذير يحدث عند استخدام وسط موراشيج وسكوج (MS) (Murashige and Skooge, 1962) مضافاً إليها 1 ملغ/ ل اندول حمض البيوتريك+0.1 ملغ/ ل بنزيل أمينو بيورين+30 غ/ل سكروز. كذلك أكد Jones and Vine عام 1968 أن استخدام بيئة MS مضافاً إليها 1 مغ/ل حمض اندول البيوتريك +0.2 مغ/ل بنزيل أمينو بيورين + 1 مغ/ل الجبرلين + 40 مغ/ل غلوكوز قد أدت إلى أعلى معدل إكثار وتجذير في نبات الفريز. من جهة أخرى يرى فريق آخر من الباحثين أن استخدام وسطين منفصلين لكل مرحلة (وسط خاص لمرحلة الإكثار، ووسط آخر خاص بمرحلة التجذير) يؤدي إلى نتائج أفضل في زيادة كل من معدل الإكثار والتجذير. فقد لوحظ أعلى معدل إكثار عند زراعة القمم النامية على وسط Heller مضافاً إليها 20 ملغ/ل غلوكوز+1 ملغ/لIBA + 0.2 ملغ/لBAP+1 ملغ/لGA_3 وأن أعلى نسبة تجذير تم الحصول عليها عند نقل النباتات إلى بيئة MS مضافاً إليها 20 غ/ل غلوكوز+1 مغ/لIBA+0.02 مغ/لBAP+5 مغ/لadenine+1مغ/ ل(GA3 VanHoof, 1974).

كذلك فقد أشار Mullin *et al.,* وزملاؤه عام 1974 إلى أن استخدام وسط (Berthelot, 1934) مضافاً إليها 30 غ/ل غلوكوز + 1 مغ/ل من اندول حمض الخليك قد أدى إلى أعلى نسبة إكثار، وأدى استخدام الوسط نفسه مضافاً إليها مع 30 غ/ل غلوكوز+2.5 مغ/ل IAA + 0.1 مغ/ل إلى الحصول على أعلى معدل تجذير.

من جهة أخرى، تم الحصول على أعلى معدل إكثار عند استخدام وسط MS مضافاً إليها 40 غ/ل غلوكوز +1 مغ/ل IBA +0.1 مغ/ل BAP+0.1 مغ/ل GA_3. أما أعلى نسبة تجذير، فقد حدثت عند نقل النباتات إلى بيئة MS مضافاً إليها 40 غ/ل سكروز+1 مغ/ل IBA (Boxus,1974). وقد تم تحضين النباتات في التجارب السابقة جميعها في درجة حرارة 25-28 مْ و16 ساعة إضاءة بشدة ضوئية $12.5\text{-}20 \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$.

فضلاً عن ذلك فقد أشار (BRAHM, *et al.*, 2004)، إلى أن استخدام وسط MS مضافاً إليها 30 غ/ل غلوكوز+0.1 مغ/ل من NAA +1مغ/ل BAP+0.1 مغ/ل GA3 هو أفضل وسط لزراعة الميريستيم. وأن استخدام وسط MS مضافاً إليها 30 غ/ل غلوكوز+1مغ/ل BAP هو أفضل وسط للإكثار التجاري للحصول على أعلى نسبة إكثار.

يمكن استخدام القمم النامية وزراعتها على وسط مغذ يتكون من العناصر الكبرى في محلول Knop (1965) دون إضافة أيون الأمونيا NH_4^+ (Boxus,1974). ولكن لوحظ أن هذه البيئة تؤدي إلى تكوين أوراق خضراء مصفرة ذات نمو بطيء. وتم الحصول على نمو أفضل ونوعية أفضل للنباتات عند إضافة NO_3^- mM 4-8 أو عند إضافة 20.6 mM من نترات الأمونيوم إلى البيئة في مرحلة الإكثار أو التجذير (Zimmerman,1981) وقد لوحظ أن استخدام الأمونيا بتركيز 6 mM NH_4 يؤدي إلى حدوث سمية لنبات الفريز عندما تكون الأمونيا هي المصدر الوحيد للنتروجين في البيئة، في حين لا تلاحظ آثار السمية عند وجود النتروجين بصورة أمونيا ونترات معاً (Damiano,1980).

وبشكل عام فإن وسط MS هو الأفضل مقارنة بباقي أوساط الزرع (Nitsch, *et al.,* 1969 ،Gamborg, *et al.,* 1968)، حتى وإن كان تركيز الأمونيا NH_4 فيها منخفضاً (Atkinson *et al.*,1986).

ويمكن كذلك أن يحدث تكاثر للأفرع بغياب الأوكسين والجبرلين وبوجود السيتوكينين (BAP) بمفرده خاصة فيما لو استخدم بتراكيز مرتفعة. إذ لوحظ أن وجود الأكسين والجبرلين لهما دور في الحصول على نباتات ذات نوعية جيدة ولون أخضر غامق (Anderson *et al.,* 1982). وبالنتيجة فإنه تختلف الحاجة إلى وجود أكسين أو جبرلين في وسط الإكثار بحسب الصنف المدروس، إذ لوحظ أن أفضل وسط إكثار للصنف "Cambridge" هو وسط MS مضافاً إليه 1.1 مغ/ل BAP + 1−0.2 مغ/ل IBA +

0.1 مغ/ل GA_3، أمّا أفضل وسط إكثار للصنف "ES208" فهو وسط MS مضافاً إليه 0.2 -2 مغ/ل BAP (Edwin,1996) .

يتم تحضين القمم النامية عادة في درجة حرارة 22-25 مْ وفي شروط إضاءة 16 ساعة وشدة ضوئية 58-65 $\mu m\ m^{-2}\ s^{-1}$. ولكن لوحظ في 16 صنفاً مختلفاً من أصناف الفريز أن أعلى إنتاج في الحقل للنباتات المكاثرة مخبرياً كان ضمن ظروف 12 ساعة إضاءة فقط (Naumann and Seipp,1986).

جُذّر نبات الفريز مخبرياً بالزراعة على وسط تحوي أملاح كنوب (1965) Knop ومدعمة فقط بالأكسين. وإن أفضل نمو للجذور مخبرياً (Damiano,1978) يكون بالزراعة على وسط يحوي على فحم نشط بتركيز 0.5-4 غ/ل. وأن تجذير الكتل المكونة من 3-4 أفرع يكون أسهل وأسرع من تجذير الأفرع المفردة (Boxus, 1989).

حُدّد في البحث الحالي وسط الزرع المناسب لتأسيس الزراعات المخبرية من صنف الفريز أوزوجراند ثم إكثار النموات الخضرية وتجذيرها مخبرياً.

الهدف من البحث

1- دراسة تأثير منظمات النمو النباتية في إكثار وتجذير نبات الفريز صنف "Osogrand"، وتحديد التراكيز المناسبة لكل مرحلة.

2- دراسة إمكانية تطبيق تقنية الإكثار الخضري الدقيق في إكثار صنف الفريز المدروس.

مواد البحث وطرائقه

مكان تنفيذ البحث:

نفذ البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية وزارة التعليم العالي

المادة النباتية:

يتميز الصنف أوزوجراند بأنه صنف ناتج عن تهجين (Fragaria X ananassa)، إذ يُعدُّ هذا الصنف من أهم أصناف الفريز ذات النهار القصير المدخلة إلى سورية حديثاً، نظراً إلى ما يتمتع به من خصائص نوعية وكمية عالية الجودة: (الإنتاجية العالية – حجم الثمار الكبيرة يصل حتى 70%- ثماره مكتنزة وذات نكهة مميزة ومتحملة للتخزين، فضلاً عن أنه متحمل إلى مقاوم للأمراض الفيروسية وخاصة فيروس كاليفورنيا الشائع – حساس للإصابة بمرض تبقع الأوراق Ramularia (BRAHM, *et al*., 2004).

أخذت الخزعات النباتية (explants) من نبات الفريز صنف اوزوجراند Oso "Grand" المزروع داخل بيوت بلاستيكية ضمن ظروف محمية. حيث أخذت القمم

النامية بطول 0.3 – 0.5 مم من النبات الأم بأربع بداءات ورقية حقيقية (بمعدل 120 قمة نامية لكل معاملة من معاملات التعقيم والإدخال) ونقلت مباشرة إلى المخبر.

وسط الزراعة:

استخدم وسط موراشيج وسكوج (1962) في مراحل التجربة جميعها، وعُدّلت الحموضة على درجة 5.7±0.1 في آخر مرحلة من مراحل تحضير وسط الزرع وقبل إضافة الآغار.

وزع الوسط في أنابيب سعة 20 X25 ملم بحيث يحوي كل أنبوب على 7 مل. وغطيت الأنابيب باستخدام القطن ثم عقمت باستخدام جهاز التعقيم الرطب الاتوغلاف (Autoclave) على درجة حرارة 121 مْ وضغط 1 بار مدة عشرين دقيقة.

زراعة الخزع النباتية (القمم النامية)

1- مرحلة الإدخال (الزراعة التأسيسية):

غسلت القمم النامية بالماء والصابون السائل مدة 20 دقيقة ثم عقمت بالايثانول 70%، ثم نقلت إلى جهاز العزل الجرثومي (Laminar air flow) حيث أجريت المعاملات الآتية:

1- المعاملة بهيبوكلوريت الصوديوم تركيز المادة الفعالة 0.5 % و1% مدة 15 دقيقة.

2- المعاملة بهيبو كلوريت الصوديوم تركيز المادة الفعالة 2 % و3% مدة 10دقائق.

ثم غسلت القمم النامية 3 مرات متتالية بالماء المقطر المعقم وذلك بمعدل 5 دقائق في كل مرة بهدف إزالة كل آثار المادة المستخدمة بالتعقيم .

زرعت القمم النامية على وسط MS خالية من منظمات النمو مضافاً إليها 30 غ/ل سكروز +6 غ/ل آغار. تم تحضين العزلات النباتية في درجة حرارة 26 ±1 م° وشدة ضوئية 800 لوكس مزودة بمصابيح (كول وايت) مدة 16 ساعة/يوم. شملت هذه المرحلة على 4 معاملات. كررت كل معاملة 3 مرات بحيث يحوي كل مكرر على 10 قمم نامية، وفي نهاية هذه المرحلة (بعد 4 أسابيع من الزراعة على وسط الإدخال) حُسبتْ نسبة العينات السليمة (%) Survival percentage .

2- الإكثــار:

نقلت الخزعات النباتية من وسط الإدخال إلى وسط الإكثار وهي بيئة MS مضافاً إليه 30غ/ل سكروز + 6غ/ل آغار (شاهد) فضلاً عن معاملات عديدة شملت إضافة منظمات النمو (أوكسين اندول حمض الخليك (IAA)–أوكسين نفتالين حمض الخليك (NAA) وسيتوكينين بنزيل أمينو بيورين (BAP) إلى الوسط الأساسي. ودُرس تأثير الــBAP بتراكيز: 0.1 – 0.25 – 0.5– 1– 1.5– 2– 2.5– 3– 5 مغ/ل بوجود IAA بتركيز

0.1 مـــغ/ل، كمـــا درس تـــأثير التراكيـــز نفـــسه بوجـــود NAA بتركيـــز 0.1 مغ/ ل بهدف تحقيق أفضل توافق من منظمات النمو.

حُضّنت النباتات ضمن غرفة نمو وكانت شروط التحضين: حرارة 26±1، رطوبـة 70% ±10 وشدة ضوئية 6000 لوكس مدة 16 ساعة باستخدام مصابيح كول وايت.

شملت هذه المرحلة على 23 معاملة، كررت كل معاملة 3 مرات واحتوى كل مكرر 4 عينات. وفي نهاية هذه المرحلة (بعد 4 نقلات من الزراعة على وسط الإكثار وبفاصل 21 يوماً بين كل نقلة وأخرى) جرى حساب عدد الأوراق وعدد البراعم وعدد النموات.

3- التجذيــر:

نقلت النباتات بعد مرحلة الإكثار مخبرياً إلى وسط التجذير وهو وسط MS (بكامـل تركيز الأملاح أو بنصف تركيز الأملاح الكبرى فقط) مضافاً إليه 30غ/ل سـكروز + 6 غ/ل آغار وفق المعاملات الهرمونية بكل من الأوكسين اندول حمـض الخليـك (IAA) أوالأكسين اندول حمض البيوتريك (IBA) الموضحة في الجدول (1).

الجدول (1) المعاملات الهرمونية المستخدمة في مرحلة التجذير

MS (شاهد)											
+ IBA (mg/l)						**+ IAA (mg/l)**					
0.1	0.5	1	1.5	2	3	0.1	0.5	1	1.5	2	3
1/2 MS (شاهد)											
+ IBA (mg/l)						**+ IAA (mg/l)**					
0.1	0.5	1	1.5	2	3	0.1	0.5	1	1.5	2	3

جرى تحضين النباتات ضمن شروط محددة (حـرارة 26 ±1 ورطوبـة 70%±10 وشدة ضوئية 5000 لوكس مدة 16 ساعة يومياً).

شملت هذه المرحلة على 26 معاملة، كررت كل معاملة 3 مرات بحيث يحـوي كـل مكرر 4 نباتات.

جرى في نهاية هذه المرحلة (بعد 4 أسابيع من الزراعة على بيئة التجذير) حـساب: متوسط عدد الجذور وطولها ومتوسط عدد الأوراق وطول الساق.

4- التحليل الإحصائي:

استخدم تصميم القطاعات العشوائية الكاملـة Randomized completely block design لتحليل النتائج وسجلت الفروق المعنوية على مـستوى 5% باسـتخدام برنـامج التحليل الإحصائي MSTAT.

النتائج والمناقشة

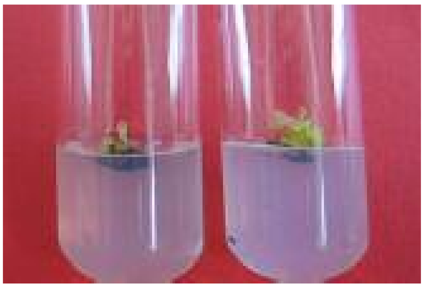
الإدخال وتأسيس الزراعات الأولية

توضح النتائج الواردة في الجدول (2) تأثير معاملات التعقيم المختلفة في نسبة النباتات السليمة بعد أسبوعين من الزراعة على وسط الإدخال.

الجدول (2) تأثير معاملات التعقيم المختلفة في نسبة النباتات المتبقية % بعد أسبوعين من زراعة النموات (120 خزعة نباتية لكل معاملة) على وسط الإدخال.

تركيز هيبوكلوريت الصوديوم %	مدة التعقيم (د.)	عدد النموات المتبقية	نسبة العينات السليمة%	نسبة العينات النامية%	نسبة التلوث في الصنف أوزوغراند%
0.5	15	102	85	85	15.00
1.00	15	111	93	75	7.00
2.00	10	91	76	67	24.00
3.00	10	85	71	63	29.00

أدت معاملات التعقيم جميعها إلى نسبة عينات سليمة يزيد على 70%، وكان أعلى معدل بقاء 92.5% عند المعاملة بـ 1% من هيبوكلوريت الصوديوم مدة 15 دقيقة (شكل1) يتبعها المعاملة بهيبوكلوريت الصوديوم تركيز 0.5% مدة 15دقيقة وبكفاءة 85%.



الشكل (1) نمو القمم النامية وتكشفها بعد الزراعة التأسيسية لصنف الفريز أوزوجراند

من جهة أخرى أدى استخدام التراكيز المرتفعة من هيبوكلوريت الصوديوم (2 و3%) مدة 10 دقائق إلى خفض معدل البقاء إلى 75.80 و70.80% على التوالي (جدول 2).

وعموماً مادة هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl نظراً إلى فعاليتها في عمليات التطهير السطحي في العديد من النباتات المزروعة مخبرياً (Pevalek and Jelaska, 1987) إذ تتميز بفعالية عالية في تطهير الخزعات النباتية قليلة التلوث السطحي خاصة إذا استخدمت بالتراكيز المناسبة مقارنة بمواد أخرى مثل هيبو كلوريت الكالسيوم، والذي يعزى انخفاض تأثيره إلى انخفاض معدل نفاذيته عبر الأغشية الخلوية Jona and (Menini,1987)، ولهذا السبب لم يستخدم هيبو كلوريت الكالسيوم في البحث الحالي، أو

مقارنة بكلوريد الزئبق الذي تؤدي التراكيز المرتفعة منه إلى تهتك الأنسجة وسميتها، وبشكل عام فإنه للحصول على أفضل نمو في نبات الفريز وأعلى نوعية للعينات السليمة يجب البدء أساساً من مادة نباتية (explant) خالية من التلوث (Yashino and Hashimoto, 1977).

الإكثار

1- عدد الأوراق:

تشير النتائج إلى استجابات متباينة من حيث متوسط عدد الأوراق تبعاً لتراكيز منظمات النمو المستخدمة ومستوى تفاعلها ودورها في العمليات الاستقلابية وانعكاسها على الصفات المورفولوجية ولاسيما التغييرات الشكلية فيما يخص المجموع الخضري. فقد أدت الزراعة على وسط MS خالٍ من منظمات النمو النباتية إلى تشكل أكبر عدد من الأوراق 10.38 مقارنة مع المعاملات الأخرى، وبفروق معنوية بين الشاهد والمعاملات الأخرى، في حين كانت الفروق المشاهدة بين المعاملات كلها مع بعضها بعضاً غير معنوية (جدول 3).

الجدول (3) تأثير المعاملات الهرمونية المختلفة في عدد الأوراق بعد 4 نقلات من الزراعة على وسط الإكثار.

IAA (0.1 mg/l) + BAP (mg/l) :										
0.1	0.25	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	5
5.50 bcd	6.50 bc	6.42 bc	5.5 bcd	6.25 bcd	6.17 bcd	5.00 bcd	5.50 bcd	4.92 bcd	5.83 bcd	6.75 b
NAA (0.1 mg/l) + BAP (mg/l) :										
0.1	0.25	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	5
4.75 cd	5.75 bcd	5.92 bcd	4.75 cd	5.42 bcd	5.42 bcd	4.75 cd	5.17 bcd	4.5 d	5.17 bcd	6.25 bcd
NAA (0 mg/l) + BAP (0 mg/l)+ IAA (0 mg/l)										
10.38 a										

ملاحظة: تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية. LSD %5 = 1.04

2- عدد النموات (البراعم):

تشير النتائج إلى استجابات متباينة من حيث متوسط عدد البراعم الجديدة المتشكلة تبعاً لتراكيز منظمات النمو المستخدمة ومستوى تفاعلها ودورها في العمليات الاستقلابية، كما تبيّن أن وجود BAP كان إيجابياً في تطور نمو البراعم وعددها، فقد لوحظ ارتفاع معدل البرعمة وانخفاض معدل النمو الخضري.

وتوضح النتائج في الجدول (4) أن أقل عدد للنموات 1.00 كان في نباتات الشاهد (دون إضافات هرمونية) وبفارق معنوي مقارنة بالمعاملات الهرمونية المدروسة جميعها.

الجدول (4) تأثير المعاملات بمنظمات النمو المختلفة في عـدد النمـوات (البـراعم) الجديـدة المتشكلة بعد 4 نقلات من الزراعة على وسط التضاعف.

IAA (0.1 mg/l) + BAP (mg/l) :										
0.1	**0.25**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**2.5**	**3**	**3.5**	**4**	**5**
10.00 fg	10.08 fg	10.00 fg	12.00 de	12.00 de	13.00 cd	14.00 bc	15.00 b	17.00 a	10.00 fg	8.00 h
NAA (0.1 mg/l) + BAP (mg/l) :										
0.1	**0.25**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**2.5**	**3**	**3.5**	**4**	**5**
9.00 gh	9.00 gh	9.00 gh	11.00 ef	11.00 ef	12.00 de	13.00 cd	14.00 bc	14.75 b	9.00 gh	7.00 I
NAA (0 mg/l) + BAP (0 mg/l)+ IAA (0 mg/l)										
1.00 j										

ملاحظة: تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية. LSD %5 = 0.93

لم يلاحظ أي فرق معنوي في عدد النموات سواء تمت المعاملة بـ 0.1 ملغ/ل من IAA + 3 ملغ/ل من BAP (15.00) أو تمت المعاملة بـ 0.1 ملغ/ل من NAA + 3.5 ملغ/ل من BAP (14.75) وكلاهما أدى إلى عدد نموات أقل معنوياً مقارنة بالمعاملة بـ 0.1 ملغ/ل من IAA + 3.5 ملغ/ل من BAP التي أعطت أكبر عدد ممكن من النموات 17.00 وبفارق معنوي مقارنة بالمعاملات الأخرى المدروسة جميعها.

تشير هذه النتائج إلى مقدرة BAP على حث البراعم الجانبية على النمو والتطور وكذلك الحد من سيطرة السيادة القمية ومن ثم حفزت البراعم العرضية الجانبية على النمو والتطور، والتي شكلت كتلة من النموات الخضرية وهي ظاهرة فيزيولوجية لها أهميتها في التكاثر الخضري الدقيق. ويوضح الشكل (2) و(3) تشكل النموات الجانبية والبراعم العرضية الجانبية المحفزة بوجود السيتوكينين BAP.

الشكل (2) مرحلة تكاثر البراعم العرضية والنموات الجانبية في صنف فريز أوزوجراند

الشكل (3) مرحلة النمو والاستطالة في الأنابيب لصنف الفريز أوزوجراند

3- طول النموات (سم):

أدت المعاملة بـ 0.1 ملغ/ل من NAA + 2.5 ملغ/ل من BAP إلى أقل طول للنموات 0.41 سم بينما أدت معاملة الشاهد إلى أكبر طول للنموات 1.58سم وبفارق معنوي مقارنة بالمعاملات المدروسة جميعها.

لم تلاحظ أي فروق معنوية في طول النموات عندما تمت المعاملة بـ 0.1 مغ/ل منIAA مع التركيز المرتفع 5 مغ/ل من BAP (0.97 سم)، أو مع التركيز المنخفض 0.25 مغ/ل من BAP (0.93 سم) من جهة أخرى، لم تلاحظ فروق معنوية في طول النموات بين باقي المعاملات المدروسة (جدول 5) .

الجدول (5) تأثير المعاملات بمنظمات النمو المختلفة في طول النموات (سم) الجديدة المتشكلة بعد 4 نقلات من الزراعة على وسط التضاعف

IAA (0.1 mg/l) + BAP (mg/l) :										
0.1	**0.25**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**2.5**	**3**	**3.5**	**4**	**5**
0.72 cdefg	0.93 bc	0.92 bc	0.69 cdefg	0.62 efgh	0.63 efgh	0.47 gh	0.52 gh	0.55 gh	0.57 fgh	0.97 b
NAA (0.1 mg/l) + BAP (mg/l) :										
0.1	**0.25**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**2.5**	**3**	**3.5**	**4**	**5**
0.64 defgh	0.84 bcdf	0.82 bcdef	0.62 efgh	0.56 gh	0.55 gh	0.41 h	0.46 gh	0.48 gh`	0.50 gh	0.89 bcd
NAA (0 mg/l) + BAP (0 mg/l)+ IAA (0 mg/l)										
1.58 a										

ملاحظة: تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية.LSD %5 = 0.22

تستخدم طرائق زراعة الأنسجة في إكثار العديد من النباتات ومنها الفريز حيث تمتاز بفعاليتها العالية، ويؤدي استخدامها في إكثار الفريز إلى الحصول على معدل إكثار مرتفع وتوفير الوقت بمعدل 4-5 مرات مقارنة بالإكثار التقليدي بالمدادات، وكذلك الحصول على نباتات قوية النمو وخالية من الإصابات الفيروسية تزهر وتثمر في وقت واحد (Boxus, 1989).

وأشار بعض الباحثين إلى إمكانية إكثار نبات الفريز وتجذيره مخبرياً باستخدام وسط الزرع نفسه بإضافة التراكيز نفسها من منظمات النمو، بينما يرى فريق آخر من الباحثين (Van Hoof, 1974; Mullin *et al.*, 1974) أن استخدام وسط خاص للإكثار ووسط آخر خاص لمرحلة التجذير يؤدي إلى نتائج أفضل في زيادة معدل الإكثار والتجذير.

وبشكل عام، فإنه لإكثار معظم أصناف الفريز بالأنسجة كان وسط MS هو الأفضل مقارنة بباقي الأوساط الزرع الأخرى مثل (Gamborg, *et al.*, 1968; Nitsch, *et al.*, 1969)، حتى و إن كان تركيز الأمونيا NH_4 فيها منخفضاً (Atkinson *et al.*,1986).

يحرض السيتوكينين تحفيز النمو وتشكل النموات الجديدة عندما يستخدم بتراكيز منخفضة (Wozniak *et al.*,1982) حيث يحفز زيادة الانقسام الخلوي والنمو العرضي وخاصة عندما تكون الخزعات النباتية صغيرة (Messeguer and Male,1987; Welsh and Sink,1981; Huang,1984) فيحفز من نمو النبات (Nwankwo and Krikorian,1983) ويزيد معدل الإكثار (Pyott and Coverse, 1981).

للأوكسين دور مهم جداً عندما يضاف بتراكيز منخفضة في مرحلة الإكثار فهو يعدل النظام الأسموزي الخلوي فيزيد الأسموزية والنفاذية الخلوية ويزيد كذلك من معدل نسخ المادة الوراثية وتكوين البروتينات (Rossignol *et al.*,1990). حيث لوحظ أن استخدام تراكيز مرتفعة من السيتوكينين مع تراكيز منخفضة من الأكسين تحفز في تكوين نموات خضرية جديدة، وتزيد معدل الإكثار في العديد من الأنواع النباتية (Pierik,1987). من جهة أخرى أشار بعض الباحثين إلى أنه يمكن الحصول على أعلى معدل إكثار في نبات الفريز عند الزراعة في بيئة خالية من الأوكسين وتحوي على السيتوكينين فقط (BAP) خاصة فيما لو استخدم بتراكيز مرتفعة، ودور الأوكسين في هذه المرحلة هو فقط في الحصول على نباتات ذات نوعية جيدة وذات لون أخضر داكن (Anderson *et al.*, 1982).

وبشكل عام، فإن استجابة النبات لوجود الأوكسين أو السيتوكينين في مرحلة الإكثار تختلف وبشدة حسب الصنف والحالة الفيزيولوجية للنبات الأم، ونوع الخزعة النباتية، ومصدرها، ونوع الهرمون المستخدم، وتركيزه، فقد يؤدي استخدام منظمات النمو إلى زيادة معدل الإكثار في أصناف معينة وخفضه في أصناف أخرى؛ وربما يعزى ذلك إلى اختلاف التركيب الوراثي والتوازنات الداخلية من منظمات النمو ومن ثمّ اختلاف معدل الاستجابة (Conti *et al.*,1991).

التجـذيـر

تم في هذه المرحلة فصل وتجزئة النموات ونقلها إلى أوساط التجذير باستخدام وسط MS بكامل تركيز العناصر الكبرى أو بنصفها مضافاً إليه تراكيز مختلفة من الأوكسينات

اندول حمض الخليك (IAA) واندول حمض الزبدة (IBA) فضلاً عن الشاهد في مرحلة التجذير في نبات الفريز المكاثر مخبرياً، وحُسب متوسط عدد الجذور وطولها (سم)، وعدد الأوراق وطول الساق (سم) في نهاية هذه المرحلة (بعد 4 أسابيع من الزراعة على وسط التجذير).

1- عدد الجذور:

تشكل أكبر عدد للجذور (ولكن دون وجود فرق معنوي) عند الزراعة على وسط MS بنصف تركيز الأملاح مضافاً إليه IBA بتركيز 1 مغ/ل و1.5 مغ/ل (21.8 و21.58 على التوالي) (جدول 6، شكل4)، أمّا أقل عدد للجذور (10.25 و8.92) فقد لوحظ عند الزراعة على وسط MS بكامل تركيز الأملاح مضافاً إليه 1.5 مغ/ل و2 مغ/ل من IAA على التوالي.

الجدول (6) تأثير المعاملات الهرمونية المختلفة في عدد الجذور بعد 4 أسابيع من الزراعة على بيئة التجذير.

MS +												
IAA (mg/l)							**IBA (mg/l)**					
0	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**
12.83 ghi	11.17 ij	17.00 cd	18.33 bc	10.25 jk	8.92 k	14.58 efg	11.42 hij	16.25 de	19.00 bc	11.00 ij	11.50 hij	12.08 hij
1/2 MS +												
IAA (mg/l)							**IBA (mg/l)**					
0	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**
19.33 b	11.42 hij	11.92 hij	13.42 fgh	11.08 ij	15.00 def	17.08 cd	18.58 bc	20.25 ab	21.83 a	21.58 a	15.33 def	14.83 efg

ملاحظة: تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية. LSD%5 = 1.86

الشكل (4) مرحلة التجذير في الأنابيب لصنف الفريز أوزوجراند

وبشكل عام، يتبيّن مما سبق وجود تأثير قوي لتكوين الوسط MS بنصف تركيز الأملاح في تكوين عدد أكبر من الجذور 19.33 وبفارق معنوي مقارنة بالزراعة على بيئة MS بكامل تركيز الأملاح 12.08.

2- طول الجذور:

أدت الزراعة على وسط MS بنصف تركيز الأملاح إلى زيادة طول الجذور 5.54 سم مقارنة بالزراعة على وسط MS بكامل تركيز الأملاح 5.00 سم سواء أضيفت منظمات النمو أم لا وبفروق معنوية (جدول7)، أما أكبر طول للجذور 6.92 سم فقد لوحظ عند الزراعة على وسط MS مضافاً إليه 1 مغ/ل من IBA، يتبعها وبفرق معنوي 6.00 سم الزراعة على وسط MS بنصف تركيز الأملاح مضافاً إليه 1مغ/ل من IAA.

الجدول (7) تأثير المعاملات الهرمونية المختلفة في طول الجذور (سم) بعد 4 أسابيع من الزراعة على وسط التجذير.

MS +												
IAA (mg/l)							IBA (mg/l)					
0	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**
5.00 cdef	5.75 bc	5.75 bc	5.54 bcd	4.50 ef	5.17 bcdef	4.96 cdef	5.46 bcd	5.83 bc	6.92 a	4.42 f	5.04 cdef	4.92 cdef
1/2 MS +												
IAA (mg/l)							IBA (mg/l)					
0	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**
5.54 bcd	4.71 def	5.70 bc	6.00 b	4.46 f	5.79 bc	4.87 cdef	5.37 bcde	5.37 bcde	5.21 bcdef	5.21 bcdef	5.83 bc	5.54 bcd

ملاحظة: تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية. LSD = 0.53

من جهة أخرى، لوحظ أقل عدد للجذور ودون ملاحظة فروق معنوية عند الزراعة على وسط MS +1.5 مغ/ل من IBA أو عند الزراعة على وسط MS بنصف تركيز الأملاح +1.5 مغ/ل من IAA (4.42 سم و4.46 سم على التوالي).

3- عدد الاوراق:

توضح النتائج في الجدول (8) تأثير المعاملات المختلفة في عدد الأوراق في نهاية مرحلة التجذير.

يتبيّن من النتائج أن الزراعة على وسط MS بنصف تركيز الأملاح أعطت عدداً أكبرَ من الأوراق 12.8 مقارنة بالزراعة على وسط MS الشاهد دون منظمات النمو 9.08 وبفارق معنوي بين المعاملتين، في حين كانت أغلب الفروق المشاهدة بين المعاملات غير معنوية عند استخدام منظمات النمو بغض النظر عن التراكيز أو نوع الأوكسين المستخدم.

الجدول (8) تأثير المعاملات بمنظمات النمو المختلفة في عدد الأوراق بعد 4 أسابيع من الزراعة على وسط التجذير.

MS +												
IAA (mg/l)							IBA (mg/l)					
0	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**
9.08 ij	12.17 cdef	13.50 bc	12.83 bcde	11.92 def	11.67 efg	9.67 hij	8.92 ij	8.75 ij	13.63 b	10.25 ghi	8.67 j	11.08 fg
1/2 MS +												
IAA (mg/l)							IBA (mg/l)					
0	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**
12.08 cdef	12.17 cdef	10.83 fgh	11.75 ef	11.58 efg	13.42 bcd	11.75 ef	12.92 bcde	15.42 a	15.83 a	12.08 cdef	13.00 bcde	8.75 j

ملاحظة: تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية. LSD = 1.28

4- طول الساق:

لوحظ أقل طول للساق 1 سم عند الزراعة على وسط MS مضافاً إليه 0.1 مغ/ل من الأوكسين IBA. أما أكبر طول للساق 1.95 سم فقد لوحظ عند الزراعة على وسط MS بنصف تركيز الأملاح مضافاً إليه 1 مغ/ل من IBA (جدول 9).

كذلك يظهر الجدول (9) عدم وجود فرق معنوي في طول الساق سواء تمت الزراعة على وسط MS أو MS بنصف تركيز الأملاح (1.57 سم، 1.54 سم) على التوالي.

الجدول (9) تأثير المعاملات الهرمونية المختلفة في طول الساق بعد 4 أسابيع من الزراعة على وسط التجذير.

MS +												
IAA (mg/l)							IBA (mg/l)					
0	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**
1.57 bcdef	1.33 efgh	1.25 efgh	1.50 defg	1.21 fgh	1.62 abcde	1.42 defg	1.00 h	1.21 fgh	1.92 ab	1.25 efgh	1.17 gh	1.25 efgh
1/2 MS +												
IAA (mg/l)							IBA (mg/l)					
0	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**	**0.1**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**
1.54 cdefg	1.46 defg	1.46 defg	1.72 abcd	1.54 cdefg	1.54 cdefg	1.62 abcde	1.87 abc	1.29 efgh	1.95 a	1.29 efgh	1.50 defg	1.25 efgh

ملاحظة: تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية.0.31 = LSD %5

تحرض الأوكسينات على التجذير فقد أوضح Boxus عام 1974 أن أعلى معدل للتجذير في نبات الفريز يمكن الحصول عليه بإضافة الأوكسين إندول حمض الزبدة بتركيز 1مغ/ل، كما أوضح (Fitsh, 1987 and Vuylsteke, 1989)، أن الأوكسينات تحرض على التجذير إذا استخدمت بالتراكيز المناسبة إذ تؤدي التراكيز المنخفضة إلى

تشجيع التجذير بشكل عام، في حين تعمل التراكيز المرتفعة على إعاقة التجـذير ودفـع النبات نحو تكوين نسيج الكالس.

ويختلف تأثير الأوكسين في عملية التجذير بحسب تركيز الأوكسين المستخدم ونوعه، كما يؤدي وجود عدة أوكسينات في الوسط أحياناً إلى تجذير أفضل في العديد من النباتات (Nabors *et al.*, 1983)، لما له من دور مباشر في زيادة معدل التبادل الأيوني وزيادة معدل النفاذية الخلوية للأيونات لدوره غير المباشر فـي زيـادة معـدل نقـل أيونـات الهيدروجين والهيدروكسيل نتيجة دوره في تحريض وزيادة نشاط أنزيمات الـ ATPase في الجدر الخلوية (Rossignol *et al.*, 1990)، ومن ثم دفع النبات إلى تكوين الجـذور على الأفرع أو القمم النامية المزروعة (Sharma *et al.*, 1981) نتيجة دوره المباشـر في مرحلة مهمة من مراحل التجذير، وهي مرحلة التخلق الجذري (Haissing, 1986).

ويعدُّ وسط MS هو أفضل وسط لتجذير نبات الفريز رغم استخدام عدة أوساط مناسبة لمرحلة الإكثار (Van Hoof, 1974). وللحصول على أفضل تجذير يجب إضافة مصدر آخر إلى النتـروجين مثـل نتـرات الأمونيـوم (Zimmerman, 1981) أو الأمونيـا (Damiano, 1980) عند استخدام أوساط أخرى غير وسط MS في حين تؤدي أمـلاح MS (بكامل أو بنصف التركيز) إلى معدل إكثار وتجذير مرتفع سواء أضيفت إليها أملاح الأمونيا و النترات أم لا (Atkinson *et al.*, 1986).

الإستنتاجات والمقترحات

1. استخدام هيبو كلوريت الصوديوم بتركيز 1 % مدة 15دقيقة كان مناسباً في الحصول على أعلى معدل بقاء بنسبة 92 %، كما لوحظ أن استخدام تركيز 2% و3% مدة 10 دقائق أدى إلى خفض معدل البقاء إلى 75 و70 % على التوالي.
2. تشكل أكبر عدد للبراعم 17.00 عند إضافة 0.1 مغ/ل من الأوكـسين IAA + 3.5 مغ/ل من سيتوكينين BAP في حين لوحظ أكبر عدد للأوراق 10.38 وأكبر طـول للنموات 1.58 في الشاهد.
3. أدت الزراعة على وسط MS بنصف تركيز الأملاح الكبرى إلى تجذير أفضل (مـن حيث عدد الجذور وطولها) مقارنة بالزراعة على وسط MS بكامل تركيز الأملاح.
4. لوحظ أكبر عدد للأوراق 15.83 عند الزراعة على وسط 1/2MS+ 1مـغ/ل مـن IBA، أما أقل عدد 8.67 فقد لوحظ عند الزراعة على وسط MS + 2 مـغ/ل مـن IBA. وتم تسجيل أكبر طول للساق 1.95 سم عند الزراعة علـى وسـط MS + 1 مغ/ل من IBA، أما أقل طول 1.00سم فقد لوحظ عند الزراعة على وسـط MS + 0.1 ملغ/ل من IBA.

REFERENCES

1. Alibrahim, A. (2002). Strawberry. The General Commission for Scientific Agricultural Research. Cited No.(451).
2. Anderson,L. A.; Keene, A. T. and Phill, J. D. (1982). Alkaloid production by leaf organ, root organ and cell suspension culture of *Cinchona Ledgeriana*. Planta Med., 46:25-27.
3. Atkinson, D.; Crip,C. M. and Witltshire, S. E. (1986). The effect of medium composition on the subsequent initial performance of micropropagated strawberry plants. Acta Hort., 179: 877-878.
4. Berthelot, A. (1934). Nouvelles remarques d'ordre chimique sur le choix des milieux de cultures et sur la maniere de formules des milieux syntheitiques. Bull. Sci. Chim.Biol.Paris, 16:1553-1557.
5. Borokwska, B. (2001). Morphological and physiological charactaristics of micropropagated strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro*. Scientia Horticulture., 89:195-206.
6. Boxus, P. H. (1974). The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation. J. Hort. Sci., 49:209-210.
7. Boxus, P. (1989). Review on strawberry mass propagation. Acta Hort., 265: 309-320.
8. BRAHM, Rafael Ucker and OLIVERIA, Roberto pedroso de. *In vitro* multiplication potential of strawberry cultivars. *Rev. Bras. Frutic.* [online]. 2004, vol.26, n.3, pp. 507-510. ISSN 0100-2945
9. Coman, T.; Botez, M.; Ghena, N. and Zambrowicsz, E. (1977). The behaviour of some strawberry cultivars during the process of obtaining planting material free from the main viruses. Pumi culture 5:397-403.
10. Conti, I.; Frangi, P.; Tosca, A. and Verga. (1991). P. Breeding clones of Gerbera hybrids suitable to micropropagation and pot cultivation. Acta Hort., 300: 103-106.
11. Damiano, C. (1978). Active carbon in the *in vitro* culture of strawberry. Fruitculture., 40:49-50.
12. Damiano, C. (1980). Strawberry micropropagation.pp.11-22 in Anon. 1980 (q.v.).
13. Drew, R. A., Herrington, M. E.; Greber, R. S. and Duncalf, F. (1986). Tissue culture and subsequent field evaluation of strawberry. Queen. J. Agric. Anim.Sci. 43:91-96.
14. Edwin, F. G. (1996). Plant propagation by tissue culture. 2nd edition, Exegetics Ltd.,1361pp.
15. Fitsh, M. (1987). Propagation by means of tissue and organ culture technique. Subtropica, 8:10-16.
16. Haissing, B. E. (1986). Metabolic prasses in adventitious rooting of culturings. PP 141-189 in Jackson M.B.(ed) 1986 .(q.v.).
17. Gambrog, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.Exp.Cell Rep.2:209-212.
18. Huang, L. C. (1984). Alternative media and method for Cattleye propagation by tissue culture. Am. Dichid. Soc., Bull.53:167-170.

19. Jona, R, and Menini, V. G. (1987). Tissue culture of selected tropical fruit plants. FAO and Agricultural Organization of the United Nation, 29.124pp.
20. Jones, O. P. and Vine, S. J. (1968). The culture of gooseberry shoot tips for eliminating virus. J.Hort. Sci., 43: 289-292.
21. Jonkers, H. and Pierik, R. I. M. (1978). Plantenteelt in kweekbuizen en toepassingen in de fruiteelt. Fruiteelt, 68:1216- 1220.
22. Khafaji, A. (2000). The strawberry. The red gold in the new centiuary. Etrak publishing. Egept.
23. Knop. W. (1965). Quntitative undersuchugen uber die emahrungsprozesse der pflanzen. Landwirtsch. Vers. Stn.,7:93-107.
24. Messeguer, J. and Male, E. (1987). *In vitro* propagation of *Corylus awallana*. Acta Hort., 212:499-503.
25. Molot, P. M.; Leroux, J. P. and Nourrisseau, J. G. (1972). Regeneration of Fragaria by apix culture. In Actas III: 415-419.
26. Mullin, R. H.; Smith, S. H.; Frazier, N. W.; Schlegel, D. E. and Mcall. S. R. (1974). Meristem culture frees strawberries of mild yellow edge. pollidosis and mottle disease. Phytopath, 64: 1425-1429.
27. Murashige, T. and Skooge, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. Physiol. Plant., 15:273-497.
28. Nabors, M. W.; Heyser, J. W.; Dykes, T. I. AND Demott, K. J. (1983). Long duration high frequency plant regeneration from cereal tissue culture. Planta, 157:385-391.
29. Naumann, W. D. and Seipp, D. (1986). Ertragleistung des Nachbaus Van merist. Erdbeer – Mutterp – flanzen aus Gewebekultur in vergleich zu herkommlic vermerhrtem pflanzgut. Obstau, 11:16-19.
30. Nitsch, J. P. and Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. Sci., 163: 85-87.
31. Nwankwo, B. A. and Krikorian, A. D. (1983). Micropropagation potential of embryo and seedling of derived callus of *Elaeis guineensis*. Jacp. Ann. Bot. 51:65-76.
32. -Pevalek, K. B. and Jelaska, S. (1987). Microclonal propagation of *Prunus avium*. Acta Hort., 212:599-601.
33. Pierik, R. L. M. (1987). *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff publishers, Dordrecht ,The Netherlands, 344pp.
34. Popov, Y. G. (1974). Meristem culture of strawberries affected by virus diseases. Sel Skokoyaistvennaya Biologia, 9:694-697.
35. Pyott, J. I. and Coverse, R. H. (1981). *In vitro* propagation of heat treated red raspberry clones. Hort Science, 16:308-309.
36. Rossignol, M.; Santoni, V.; Szponanski, W. and Vansuty, G. (1990). Differential sensitivity to auxin at the plasma membrane level. PP 498-503. In. Nij Kamp *et al.*, (eds) 1990(q.v.).
37. Sharma, A. K.; Prasad, R. N. and Chaturvedi, H. C. (1981). Clonal propagation of Boungainvillea *Glabra Magnifica* through shoot apex culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1:33-38.
38. Van Hoof, P. (1974). Practical method for meristem culture of *Fragaria.* Bull. Soc. Roy. Bot. Beige., 107:5-8.
39. Vĕrtesy, J. (1976). Virus elimination from certain strawberry cultivars by apical meristem culture. Gyumolecstermesztĕs, 3:153-159.

40. **Vuylsteke, D. R. (1989). Shoot tip culture for propagation, coservation and exchange of *Musa germplasm*.IB. PGR, Rom.**
41. **Welsh, J. and Sink, C. (1981). Mophologenetic responses of Browallia leaf sections and callus. Ann.Bot. 48:583-590.**
42. **Wozniak, J.; Hyndaman, S.E.; Stord, R. and Oglesby, R.(1982). Recent developments in *Gerbera micropropagation*. *In vitro*, 18,293.**
43. **Yoshino, M. and Hashimoto, K. (1977). Occurance of aphid-transmitted strawberry viruses in Saitama prefecture and pruduction of virus free clones by means of meristem culture. Bull.Saitama Hort.Exp.Sta., 5:46-61.**
44. **Yue, D.; Gosslin, A. and Desjardins, Y. (1993). Re-examination of the photosynthetic capacity of *in vitro*-cultured strawberry plantlets. Am. Soc. Hort. Sci., 118:419-424.**
45. **Zimmerman, R. H. (1981). Micropropagation of fruit plants. Acta Hort., 120:217-222.**

Received	2009/07/05	إيداع البحث
Accepted for Publ.	2010/05/24	قبول البحث للنشر