جامعة الدول العربية
المنظمة العربية للتنمية الزراعية
League of Arab States
Arab Organization For Agricultural Development

الدورة التدريبية القومية
حول
إكثار فسائل النخيل باستخدام
تقنية زراعة الانسجة

جمهورية مصر العربية

القاهرة 20-1996/7/25

يوليو (تموز) 1996

الخرطوم

جمهورية السودان - الخرطوم -العمارات شارع Sudan - Khartoum - Al - Amarat St. No. 7 ص.ب: 474 P.O.Box: 474 الرمز البريدي: 11111 Postal Code: 11111
تلكس: AOAD SD Telex: 22554 برقياً: اوادالخرطوم Cable: AOAD Khartoum - فاكس: Fax: (249-11-) 471402 تلفونات: Telephones: (249-11-) 472176 - 472183

تقـــديم

تقديم

تعتبر شجرة النخيل المباركة من اهم الاشجار التي تتلائم مع الظروف البيئية في الوطن العربي . كما يمثل انتاج التمور اهمية اقتصادية وغذائية في العديد من الدول العربية.

وبرغم الامكانات الهائلة للتوسع في زرعة النخيل في الوطن العربي، الا ان اكثار النخيل في معظم الدول العربية ما زال يعتمد بالدرجة الاولى على الطرق التقليدية ، حيث تطول الفترة اللازمة للإكثار وتقل بالتالي امكانية التوسع في زراعة ونشر الاصناف عالية الجودة ، إضافة الى أن الإكثار بالطرق التقليدية ينطوي على مخاطر انتقال الامراض الى الاشجار الناتجة مما يحد من عطائها وإنتاجيتها.

وتشير نتائج التجارب التطبيقية الحديثة الى أهمية إستخدام تقانات زراعة الانسجة في انتاج فسائل النخيل الخالية من الامراض وذات المواصفات العالية من حيث الجودة والانتاج، إضافة الى امكانية إنتاج اعداد كبيرة من هذه الفسائل خلال فترة قصيرة تساعد على التوسع السريع في زراعة هذه الشجرة .

وقد بدأت العديد من الدول العربية في ادخال واستعمال تقنية زراعة الانسجة وإستخدامها في اكثار العديد من المحاصيل ومنها النخيل ، الامر الذي يتطلب تهئية الكادر البشري المؤهل بدرجة كافية للقيام بأعباء عملية الإكثار بإستخدام هذه التقنية.

واستشعاراً من المنظمة العربية للتنمية الزراعية باهمية تأهيل الكادر البشري العامل في مجال اكثار النخيل ، تضمنت خطة عملها في مجال التنمية البشرية لعام 1996 اقامة هذه الدورة التدريبية القومية حول انتاج فسائل النخيل باستخدام تقنيات زراعة الانسجة، بهدف تعريف المتدربين بالمتطلبات المختبرية والاجهزة الخاصة بزراعة الانسجة لاكثار النخيل، وتدريبهم عملياً على التقانات الخاصة باكثار النخيل بالزراعة النسيجية .

وتم عقد الدورة التدريبية بالتعاون مع وزارة الزراعة واستصلاح الاراضي بجمهورية مصر العربية ، في مدينة القاهرة خلال الفترة 20-25/7/1996. وشارك في اعمالها

(20) متدرباً من المهندسين الزراعيين العاملين في مجال زراعة الانسجة واكثار النخيل في وزارات الزراعة بالدول العربية .

وأرجو أن أتوجه هنا بخالص الشكر والتقدير لجمهورية مصر العربية رئيساً وحكومةً وشعباً على إستضافتها لأعمال هذه الدورة التدريبية ، ولمعالي الاستاذ الدكتور يوسف والي نائب رئيس الوزراء ووزير الزراعة واستصلاح الارضي على كريم رعايته لها وللتسهيلات التي تم توفيرها للمتدربين والمشاركين في فعالياتها .

والشكر موصول للسادة الخبراء الذين قاموا باعداد وتقديم محاضرات الدورة التدريبية ، ولجميع المشاركين من الدول العربية الشقيقة ، مع خالص أمنياتي لهم بالاستفادة الكاملة مما تضمنته الدورة من محاضرات نظرية وتطبيقات عملية، وأن تؤدي الى تعزيز مهاراتهم في مجالات عملهم .

والله ولي التوفيق

المدير العام

الدكتور يحيى بكور

المحتويات

المحتويات

رقم الصفحة

* التقديم أ
* المحتويات ج
* المجالات المختلفة لإستخدام التكنولوجيا الحيوية وتقنية زراعة الانسجة – أ.د. مهدية فريد نصر ، 1
* إنجازات وحدة زراعة الأنسجة – أ.د. مهدية فريد نصر 6
* تصميم وإنشاء معمل لزرعة الأنسجة – أ.د. مهدية فريد نصر 12
* مكونات البيئة المغذية اللازمة للزراعة النسيجية – أ.د. ابراهيم عبد المقصود ابراهيم 21
* مراحل الإكثار المعملي لنخيل البلح بإستخدام تقنية زراعة الانسجة – أ.د. مهدية فريد نصر 37
* أقلمة النباتات الناتجة عن زراعة الأنسجة – المرحلة الثانية والاخيرة للأقلمة خارج المعمل – أ.د. مهدية فريد نصر 42
* تنوع وإختلاف النباتات الناتجة من بعض طرق الإكثار بإستخدام تقنية زراعة الأنسجة – أ.د. مهدية فريد نصر 46
* طرق قياس ودراسة الثبات الوراثي للشتلات والنباتات الناتجة عن زراعة الأنسجة – أ.د. سامي عبد العزيز نصر 51
* التجهيزات اللازمة لانشاء معمل لزراعة الانسجة على المستوى البحثي – د. حسن محمد فاضل الوكيل 56
* أهمية إستخدام تقنية زراعة الأنسجة في إكثر النخيل – أ.د. حسين الحناوي – خبير الانتاج النباتي 77
* المشاكل والمعوقات التى تواجه إكثار فسائل النخيل بإستخدام تقنية زرعة الأنسجة – أ.د. حسين الحناوي 90

* كلمات الافتتاح
* كلمة معالي الاستاذ الدكتور يوسف والي نائب رئيس مجلس الوزراء ووزير الزراعة واستصلاح الاراضي بجمهورية مصر العربية 98
* كلمة معالي الاستاذ الدكتور يحيى بكور - المدير العام للمنظمة العربية للتنمية الزراعية . 101
* اسماء المشاركين 103

المجالات المختلفة لإستخدام التكنولوجيا الحيوية وتقنيةزراعة الانسجة.

المجالات المختلفة لاستخدام التكنولوجيا الحيوية وتقنية زراعة الانسجة

Different Fields for the use of Biotechnology and Tissue Culture

أ. د. مهدية فريد نصر
استاذ باحث ورئيس وحدة زراعة الانسجة
مركز بحوث الصحراء

التكنولوجيا الحيوية Biotechnology

عبارة عن نظام علمى يشمل العديد من النظم والتقنيات الحديثة التى تمكننا من القيام بانجازات كبيرة فى مجال البحث العلمى بصفة عامة وفى مجال الزراعة بصفة خاصة بهدف اساسى هو حل غالبية المشاكل التى تعيق الاستفادة بالاراضى الزراعية.

التقنيات المختلفة التى تشملها التكنولوجيا (التقنية) الحيوية :

- زراعة الأنسجة Tissue culture
- حفظ الاصول الوراثية معملياً In Vitro Germplasm Preservation
- الهندسة الوراثية Genetic Engineering or Recombinant DNA Technology
- نقل الصفات الوراثية أو الجينات Gene Transfer

ويتم ذلك بأحد هذه الوسائل :

- الحقن المباشر لمادة ال (Microinjection) DAN
- استخدام سلالات متخصصة من البكتيريا
- استخدام الطرق الكهربائية Electroporation

تقنية زراعة الأنسجة : Tissue Culture Technique

اصطلاح زراعة الانسجة ما هو الا اصطلاحاً عاماً وينطبق على جميع انواع الزراعة المعملية التى تتم تحت ظروف تعقيم كاملة وهى انواع عديدة تختلف باختلاف المنفصل النباتىExplant أى الجزء من النبات المستخدم فى الزراعة المعملية وبالتالى يسمى باسم الجزء المستخدم فى الزراعة كالآتى :

- زراعة الاجنة Embryo Culture
- زراعة القمة المرستيمية Meristem Culture
- زراعة المتك Anther Culture
- زراعة حبوب اللقاح Pollen Culture
- زراعة الاوراق Leaf Culture
- زراعة الخلايا Cell Culture
- زراعة البراعم الجانبية Axillary bud Culture
- زراعة القمة النامية للجذور Root Tip Culture
- زراعة البروتوبلاست Protoplast Culture

ومن هنا يتضح أن التسمية الادق بالنسبة لزراعة الانسجة هو استخدام اصطلاح الزراعة المملية In Vitro او الزراعة تحت ظروف التعقيم Aseptic Culture Technique ويتضح ذلك جلياً فى حالة تجميع المادة العلمية لموضع ما فى هذا المجال حيث كان فى الاعوام السابقة يتم البحث اساساً على موضوع Tissue Cultureحيث استبدل الآن باستخدام In Vitro .

مجالات استخدام تقنية زراعة الانسجة :

أولاً : انتاج الشتلات باعداد كبيرة :

- حيث يمكن انتاج الآف بل ملايين الشتلات من نباتات الزينة وهذا يساعد فى تحقيق عائد اقتصادى كبير فى وقت قصير خاصة بالنسبة لنباتات الزينة مرتفعة الاسعار.
- امكانية ادخال اصناف جديدة من المحاصيل البستانية التى تناسب ظروف منطقة ما او تتميز بصفاتها المحصولية ونشر هذه الاصناف فى وقت قصير وبتكاليف أقل من استيراد جميع الشتلات المطلوب التوسع فى زراعاتها هذا بالاضافة الى التغلب على مشاكل استيراد نباتات كاملة من الخارج وضرورة اجراء اختبارات خلوها من الامراض.
- حل والتغلب على مشاكل اكثار بعض النباتات . كما هو الحال بالنسبة للنخيل لقلة عدد الفسائل المنتجة من النبات الواحد بالطرق المعروفة

حيث يفيد استخدام هذه التقنية فى انتاج العديد من النباتات من مصدر محدود.

ثانياً: إنتاج نباتات خالية من الامراض وخاصة الامراض الفيروسية :

لوحظ أن معظم المحاصيل البستانية التى يتم اكثارها خضرياً وبتكرار زراعتها سنوات عديدة، ان نسبة الاصابة ببعض الامراض الفيروسية تزداد فيها ومن الأمثلة على ذلك نبات الشليك (الفراولة) وكذلك البطاطس والثوم . وحديثاً ظهرت بعض الاصابات الفيروسية على اشجار التين بالساحل الشمالى الغربى بجمهورية مصر العربية.

وحالياً وللتغلب على الاصابة بالامراض الفيروسية هذه نقوم كل عام باستخدام شتلات فراولة ناتج من مزارع الانسجة وكذلك الحال بالنسبة للبطاطس. ونظراً للكميات الكبيرة التى نحتاجها سنوياً للتوسع فى زراعات كل من البطاطس والفراولة فى اراضى الاستصلاح الجديدة، زاد اهتمامنا لانشاء معامل لزراعة الانسجة لانتاج هذا الكم المطلوب وذلك كخطوة للتخلص النهائى من استيراد هذه الشتلات من الخارج.

ثالثاً: إنتاج اشجار الغابات :

من المعروف ان الاكثار الخضرى يحافظ على الصفات الوراثية للاشجار . وفى حالة اشجار الغابات يساعد استخدم زراعة الانسجة فى الاكثار وانتاج الشتلات، فى انتاج كم كبير وبصفة خاصة فى حالة صعوبة اجراء وسائل الاكثار الخضرى المعروفة مثل التطعيم والعقل. وكذلك فى حالة قلة المادة النباتية المتاحة لاحد الهجن المتميزة، حيث يمكن انتاج الآف الشتلات من مصدر محدود عن طريق زراعة الانسجة.

رابعاً: إنتاج العديد من المركبات العضوية الثانوية: Production of Secondary Products

وقد اجريت العديد من الدراسات فى هذا المجال ولكن لازال هناك المزيد لا بد من تحقيقه وهناك العديد من النباتات التى تنتج مواد طبيعية يمكن استخدامها والاستفادة منها فى اغراض علاجية طبية او فى صناعات مثل صناعة العطور.

و في هذا المجال ينقسم دور زراعة الانسجة الى قسمين :

1- (أ) ان تستخدم تقنية زراعة الانسجة فى اجراء الدراسات التى تهدف الى زيادة انتاج وتكوين المادة الفعالة داخل النبات، ثم يتم التوسع فى

زراعة هذه النباتات بالطرق العادية قبل استخرج المادة الفعالة التى زادت فيها بنسبة كبيرة.

(ب) استخدم تقنية الزراعة المعملية فى تغيير صفات المواد الثانوية المنتجة داخل النبات، مثل التخلص من سمية بعض الزيوت، الى ان تصل الى المنتج النهائى بحالة جيدة.

2- فى حالة النباتات الطبية التى تنتج منها مركبات معينة تستخدم فى العلاج وبها نسبة بسيطة جدا من هذه المركبات فمن الافضل التعرف على اماكن تكوين هذه المركبات ثم زراعة هذه الاجزاء معملياً ومحاولة تشجيع تكونها معملياً وبهذا يتم انتاج كم كبير من هذه المركبات فى حيز معملى محدود وتوفير الاراضى الواسعة لاغراض أخرى.

خامساً: التحسين الوراثى للمحاصيل :

ويتم ذلك عن طريق حل المشاكل التى تواجه مربى النباتات عند انتاج صنف جديد او اكساب صنف وصفات معينة مرغوبة وذلك باستخدام تقنية زراعة الانسجة ومثال ذلك :

- التغلب على ظاهرة العقم الاندوسبرمى Somatoplastic sterility والتى تنتج من التهجينات المتباعدة بين الانواع المختلفة او الاجناس المختلفة Different plant genus or species لتكوين منطقة بها خلايا غير جيدة تمنع وصول الغذاء للاندوسبرم حيث يموت نسيج الاندوسبرم والذى يعقبه موت الجنين . فاذا امكن عزل هذه الاجنة الجنسية فى وقت مناسب وتنميتها على بيئة مناسبة ، فانه يمكننا الحصول على هذه الاجنة الهجينة التى تعتبر هدف كبير لمربى النباتات.
- استخدام زراعة المتك او حبوب اللقاح للحصول على نباتات احادية المجموعة الكروموسومية Haploid فى وقت قصير ثم يضاعف النبات بالكولشين فنحصل على نبات ثنائى المجموعة الكروموسومية وفى نفس الوقت احادى فى عوامله الوراثية Homozygous وبالتالى لا نضطر لاجراء التربية الذاتية او التهجين الذاتى والتى تتسبب فى انخفاض خصوبة وضعفها مما يضعف ويوقف برامج التربة.

- التغلب على مشاكل التهجينات النوعية والجنسية باستخدام دمج البروتوبلاست .
- استخدام مزارع الخلية والمعلقات Cell Culture والتى يعقبها الانتخاب Screening لانتاج نباتات تتحمل ظروف بيئية محدودة مثل الملوحة والجفاف أو نباتات تتحمل انواع معينة من المبيدات تقاوم الامراض او النيماتودا . ويمكن اجراء الانتخاب على مستوى الخلايا او على مستوى النبات الكامل .

سادسا: حفظ الأصول الوراثية معمليا: In Vitro Germplasm preservation

ويفيد هذا فى الحفاظ على التنوع البيولوجى وحفظ النباتات البرية ويفيد ايضاً الحفظ المعملى بصفة خاصة بالنسبة للمحاصيل البستانية التى يتم اكثارها بوسائل خضرية مثال ذلك اشجار الفاكهة وكذلك هجن بعض اشجار الغابات، حيث ان حفظ المادة الوراثية على هيئة بذور لن يفيد فى المحافظة على التركيب الوراثى لها واستخدام الطرق المعملية تفيد فى حفظ هذه الاصول لاعوام كثيرة.

ومن طرق الحفظ المعملى :

- استخدام درجات الحرارة المنخفضة أقل من الدرجات المناسبة للنشاط والنمو للنوع النباتى الواحد .
- تخزين المادة النباتية تحت ظروف التعقيم الكامل فى محاليل اسموزية معينة للحفاظ عليها دون اعطائها فرصة للنمو المعملى اثناء التخزين.
- إضافة بعض مثبطات النمو لبيئة حفظ المادة النباتية وذلك لاعاقة النمو.
- تخزين المادة النباتية فى النيتروجين السائل Liquid nitrogen ويطلق على وسيلة الحفظ هذه Cryopreservation ويمكن حفظ المادة النباتية لسنوات عديدة.

وهناك دراسات عديدة فى هذا المجال ولا زالت الدراسات مستمرة خاصة مع الاهتمام العالمى بالمصادر الوراثية النباتية والرغبة الشديدة فى الحفاظ عليها وحفظها وكذلك اهتمامنا على المستوى المحلى مما أدى الى تشكيل اللجنة القومية للمصادر الوراثية النباتية تحت اشراف وزارة الزراعة واستصلاح الاراضى .

إنجازات وحدة زراعة الأنسجة

انجازات وحدة زراعة الانسجة

أ. د. مهدية فريد نصر
استاذ باحث ورئيس وحدة زراعة الانسجة
مركز بحوث الصحراء

تم انشاء وحدة زراعة الأنسجة بمركز بحوث الصحراء وذلك بهدف استخدام تقنية زراعة الانسجة وتقنية فصل وعزل البروتوبلاست وحفظ الأصول الوراثية معملياً باستخدام تقنية زراعة الأنسجة كبعض المجالات التى تتبع التكنولوجيا الحيوية.

وقد امكن انجاز العديد من الأنشطة المتنوعة وتهدف جميعها الى :

* انتاج شتلات العديد من الأنواع النباتية المقاومة للملوحة والجفاف وتناسب الزراعة فى الأراضى الصحراوية وكذلك التى تناسب الزراعة فى اراضى الاستصلاح الجديدة أو تلك التى تثبت تميزها كسلالة فى ملاءمتها للظروف البديلة بكميات تكفى للتوسع الزراعى المطلوب وباسعار مناسبة.
* التوسع فى نشر الأصناف الممتازة والسلالات أو الهجن المتميزة واصول بعض المحاصيل البستانية التى يتم استيرادها من الخارج وتتوفر بكمية محدودة، للحصول على كميات كبيرة فى فترة زمنية قصيرة وبالتالى التوفير فى تكاليف الأنتاج.
* الحفاظ على الأصول الوراثية، بحفظها معملياً وخاصة الانواع النباتية التى لا تتكاثر بالبذور ويلزم وسائل خضرية لاكثارها.
* استخدام تقنية زراعة الانسجة فى انتاج النواتج الثانوية لبعض النبات الطبية والعطرية ونباتات الزيوت خاصة تلك التى يصلح زراعتها فى الأراضى الصحراوية أو تلك التى تنمو بحالة برية.
* التحسين الوراثى للأنواع النباتية باستخدام التقنيات الحيوية الحديثة .

وفيما يلى أهم انجازات الوحدة :

أولاً : استخدام تقنية زراعة الانسجة فى انتاج شتلات بعض اشجار الغابات :

تقوم الوحدة بالاكثار المعملى للأصناف المحلية من اشجار الكافور كى يتثنى لنا ايجاد نظام للاكثار المعملى للهجن المتميزة التى تم استيرادها بواسطة وحدة المراعي بقسم البيئة النباتية والمراعى بالشعبة، لميزة هذه الهجن بقدرتها العالية على امتصاص كمية كبيرة من الماء الارضى وفقده مرة ثانية على هيئة نتح ويساعد هذا فى تقليل ارتفاع مستوى الماء الأرضى الذى يسبب اهم عائق فى واحة سيوه. وما تم فى هذا الصدد هو الزراعة فى توقيتات مختلفة للمرحلة البادئة – استخدام انماط مختلفة من المنفصلات النباتية وذلك بهدف التوصل الى انسبها وأفضلها في انسب وقت من السنة وتقل نسبة الفينولات وتزيد قدرة الانسجة على الاستجابة للنمو المعملى ، جارى ايضاً نقل النموات المتكشفة الى بيئات للتضاعف، فى نفس الوقت يتم العناية بشتلات الهجن وذلك لاستخدامها كمصدر للمادة النباتية للتوصل الى افضل الهجن من حيث قدرتها على الاستجابة للنمو المعملى والتضاعف وبالتالى انتاج الشتلات، حيث ان الكمية المتوفرة من هذه الشتلات محدودة ولاتكفى التوسع المطلوب .

ثانيا : استخدام زراعة الانسجة فى انتاج شتلات بعض هجن الاشجار والشجيرات الرعوية المتميزة :

تقوم الوحدة باستكمال ما بدأناه من دراسات خاصة بدراسة امكانية الاكثار المعملى لشجرة البروسوبس سواء الانواع المحلية أو التى تم احضارها بمعرفة قسم البيئة النباتية والمراعى والتى تتميز بخلوها من الشوك الذى يضايق الحيوانات . ونظراً لتوافر عدد محدود جداً من المادة النباتية لدى القسم يتم أخذ النموات كلما امكن ذلك وتترك فرصة للشجيرات المتكونة من النمو للتكوين بدلاً من الاجزاء التى تم فصلها. ويتم ايضاً دراسة افضل توقيت لأخذ النموات، حيث يتطلب ذلك زراعة معملية دورية على مدار السنة، كذلك يتم استخدام تراكيب مختلفة من البيئة البادئة ومنفصلات نباتية متنوعة، وحالياً يتم نقل النموات المتكشفة الى بيئة تختلف فى تركيبها عن البيئة البادئة وتعتبر تمهيداً للبيئة اللازمة للتضاعف، وهناك بعض المشاكل التى تواجهنا فى المعمل فى هذه الدراسة ونحاول حلها بقدر الامكان والتغلب عليها.

ثالثاً : الحفاظ على الاصوال الوراثية معملياً: In Vitro germplasm preservation

حالياً تقوم الوحدة بدراسات وتجارب متنوعة بهدف الحفظ المعملى لأصول التفاح النامية معملياً حيث يتم تجربة العديد من المنفصلات النباتية والانسجة. كذلك يتم تجربة العديد من البيئات والتراكيب التى تهدف الى اعاقة نمو الانسجة المنزرعة وبالتالى اطالة مدة حفظ هذه الانسجة وتهدف هذه الدراسة الى :

* التعرف على امكانية الحفاظ على ثبات التراكيب الوراثية للخطوات المعملية اثناء الاكثار المعملى دون الحاجة الى تكرار مراحل الزراعة والتفصيص حيث تقل عدد ال Sub-Cultures
* حفظ انسجة الانواع النباتية المختلفة معملياً مما يساعد على الحفاظ على التنوع البيولوجى ونشر الزراعة عند الحاجة الى ذلك .

رابعاً : استخدام تقنية زراعة الانسجة فى دراسة الاستجابة للنمو المعملى :

تجري الابحاث على أصناف عديدة من البرسيم الحجازى والبرسيم المصرى تمهيداً لدراسات خاصة بزيادة القدرة على تحمل ظروف الاجهاد التى ويعانى منها فى الصحراء، خاصة الملوحة والجفاف . تم انجاز جزء كبير من هذه الدراسة. وحالياً يتم التركيز لاتمام عملية التجديد (Regeneration) من الانسجة المتكشفة والمتكونة وذلك لكل من البرسيم الحجازى والمصرى وذلك لتنفيذ هذه المرحلة بكفاءة عالية.

خامساً : الاكثار المعملى الدقيق باستخدام زراعة الانسجة لانتاج شتلات أصول التفاح والكمثرى والخوخ والتى امكن التوسع فى زراعتها فى الأراضى الجديدة :

* فى المرحلة السابقة تم التركيز على اكثار احد اصول الكمثرى وذلك باستخدام انسجة مختلفة في ثمانى اوساط بيئية مختلفة، وقد تم التوصل الى افضلها. وحالياً يتم تكرار استخدام الوسط البيئي المتميز ، بهدف انتاج العديد من النموات التى سوف تستخدم فى التوصل الى انسب محتوى بيئى لمرحلة التضاعف كذلك يتم تكرار هذه الزراعات البادئة وذلك بهدف حل جميع مشاكل الزراعة الأولية والتوصل الى انسب توقيت للتغلب على هذه المشاكل من حيث تركيز الفينولات ونسب التلوث حيث تختلف هذه النسبة باختلاف درجة حرارة

الجو التى تنمو فيها الامهات التى تستخدم فى الحصول على المادة النباتية. وتعتبر النتائج التى تم الحصول عليها الى الآن مباشرة وسوف يتواصل استكمالها .

* يتم استكمال التجارب على اصول التفاح وكذلك الخوخ جنباً الى جنب مع العمل على أصل الكمثرى .

سادساً : انتاج شتلات بعض الانواع النباتية المقاومة للملوحة والجفاف (النخيل – الزيتون) باستخدام الزراعة المعملية (زراعة الانسجة) :

تكمن أهمية هذه الدراسات في اتاحة فرصة التوسع فى زراعة هذا النوع من النباتات فى الاراضى الصحراوية نسبة لأن للنخيل والزيتون قدرة عالية على تحمل الملوحة والجفاف. وتفيد هذه التقنية فى انتاج اعداد كبيرة من فسائل النخيل. وحالياً يتم استكمال العمل فى هذا الاتجاه مع التركيز على استخدام الكشافات الجزئية فى دراسة درجة الثبات الوراثى للنباتات ناتجة من زراعة الانسجة باستخدام طرق الاكثار المعملية المختلفة وكذلك فى مراحل التضاعف المختلفة. وبالنسبة للزيتون تفيد هذه التقنية فى انتاج شتلات من الأصناف المتميزة والتي يصعب اكثارها بالطرق الخضرية المعروفة.

سابعاً : ايجاد نظام معملى متكامل لانتاج الشتلات من السلالات المتميزة من الهوهوبا :

تعتبر هذه الشجيرة من الانواع النباتية المقاومة للجفاف، اذا ما اعتنى بها فى مراحل الزراعة الأولى وهي على قدر معقول من تحمل الملوحة ويمكن أن تزاد هذه القدرة على التحمل باستخدام الوسائل المعملية ومزارع الأنسجة. وقد توصلنا فى العمل الى جميع المراحل المعملية المرحلة البادئة والتضاعف والتجذير وحالياً نقوم بتحسين كفاءة التجذير المعملى واجراء التجارب الخاصة بذلك، حتى نصل الى اعداد كبيرة من النباتات الكاملة لنتمكن من اجراء عمليات الأقلمة داخل وخارج المعمل .

ثامناً : زيادة تحمل بعض الانواع النباتية للملوحة باستخدام زراعة الأنسجة :

حيث يتم الاعداد لهذه الدراسة من حيث تجهيز المادة النباتية وامكانية

الحصول على مراحل الاكثار المعملى المختلفة للانواع النباتية المختارة ومنها الموز – الهوهوبا وسوف يختار احد أصول الفاكهة المتساقطة والعمل المعملى وزيادة التحمل للملوحة، سوف تكون على مستوى معلقات الخلايا والانسجة وعلى مستوى النباتات الكاملة ودراسة النبات الدراسة لجميع الطرق.

تاسعاً : انتاج اشجار النيم باستخدام زراعة الانسجة بحل مشكلة نقص حيوية البذور :

تقوم الوحدة بدراسة امكانية استخدام تقنية زراعة الانسجة فى انتاج شتلات النيم معملياً وذلك للتغلب على مشكلة ضعف حيوية البذور عقب نضجها وتكوينها اذا ما زرعت خلال فترة محدودة ونظراً لاحتياجنا لاستيراد هذه البذور حتى نستطيع ان نلاحق التوسع والاقبال على زراعة هذه الشجرة المتعارف عليها بالصيدلية المتنقلة، فانه من المتوقع ان تحدث مشاكل من عدم امكانية الزراعة فى الوقت المناسب ، هذا بالاضافة الى امكانية الحفاظ على مواصفات سلالة ما من حيث المواصفات الاقتصادية المطلوبة ومحتواها من المركبات الفعالة.

عاشراً : انتاج المركبات الثانوية باستخدام التقنية المعملية (زراعة الأنسجة) :

وقد امكننا انتاج شمع الهوهوبا باستخدام التقنية المعملية وذلك باستخدام انسجة خضرية وكذلك انسجة جنسية وتم تكوين نسيج الكالس من المنفصلات النباتية المختارة من كلا النوعين وتم استخدام العديد من تراكيب الاوساط البيئية التى تعطى افضل واكبر كمية من نسيج الكالس المستخدم فى انتاج شمع الهوهوبا وقمنا بالتحليل الكيميائى للمكونات المعملية ودراسة مدى مطابقتها لشمع الهوهوبا المستخلص من البذور، واجريت العديد من المعاملات للتوصل الى انسبها من حيث كمية الشمع المستخلص من الانسجة. وتفيد هذه الدراسة فى امكانية التحكم فى زيادة المركب الثانوى المستخلص وكذلك تحسين المواصفات.

وحالياً جارى الاعداد للدراسة على الاستخلاص المعملى للمركبات الفعالة التى تحتويها شجرة النيم لما لها من أهمية كبيرة فى مقاومة الحشرات وكذلك نخطط للعمل على العديد من النباتات التى تنمو برياً فى صحراء مصر وذلك بغرض استخلاص المواد الفعالة.

هذا ومن اهداف الوحدة وانجازاتها فى الفترة السابقة تدريب الكوادر واعدادها على استخدام تقنية زراعة الانسجة فى المجالات السابق ذكرها.

اعضاء الفريق البحثي والعاملين بتخصص زراعة الانسجة

العدد	الدرجة الوظيفية	الدرجة العلمية المسجل لها والعمل الوظيفى	التخصص
2	باحث مساعد	اجراء ابحاث الدكتوراه	بساتين وراثة
3	مساعد باحث واخصائى	الانتهاء من رسالة الماجستير	كيمياء حيوى بساتين محاصيل
2	مساعد باحث واخصائى	اجراءات ابحاث الماجستير	بساتين اشجار خشبية
2	مساعد باحث واخصائى	الاعداد لدراسة الماجستير	علوم /نبات وراثة وهندسة وراثية
3	اخصائى	القيام بخطط العمل بالوحدة واعمال الصوب والمشتل.	تخصصات مختلفة

تصميم وإنشاء معمل لزرعة الأنسجة

تصميم وانشاء معمل لزراعة الانسجة

Planning and Building a Tissue Culture lab

أ. د. مهدية فريد نصر
استاذ باحث ورئيس وحدة زراعة الانسجة
مركز بحوث الصحراء

الاعتبار الرئيسي عند تصميم معمل لزراعة لانسجة هو الموقع ويجب ان يحكم التخطيط احكام النظافة داخل وخارج المعمل ، تدفق العمل داخل المعمل وكذلك سهولة الحركة وتوفر الممرات اللازمة لذلك داخل المعمل ومساحة المعمل والابواب والنوافد ويجب ان تعزل حجرة الزراعة Transfer Room جيدا وذلك باحكام غلق النوافذ الخاصة بهذا المعمل. ويفضل ان يكون الباب المؤدي لحجرة الزراعة باب مزودج double door ، ويفضل ان تزود ما بين الاول من معمل تجهيز البيئات والثاني الى خارج المبنى ، ويفضل استعمال الاول، كذلك يجب احكام الغرفة الحاضنة Incubation Room ، وان يراعى استمرار النظافة والتعقيم لهذين المعملين وتراعى حركة الاقدام . ويراعى ايضا بعد المعمل عن اي مصدر للاتربة ويحاط بالنجيل والشجيرات الخالية من الامراض حيث يساهم هذا في جمال المدخل ونظافة الجو ايضا .

وتختلف المساحة اللازمة لانشاء معمل زراعة الانسجة باختلاف الغرض من انشاء المعمل هل هو بحثي او تجاري.

أولاً : تصميم وانشاء معمل لزراعة الانسجة على المستوى البحثي:

Planning and Establishing a Research Tissue Culture lab

ولا بد في هذه الحالة الاخذ في الاعتبار الاهداف المراد تحقيقها وكذلك عدد ونوع النباتات المراد العمل عليها واحتياجاتها البيئية . ففي حالة العمل على اكثر من نبات تختلف في احتياجاتها الحرارية من احتياجات عالية (النخيل – الموز) الى احتياجات منخفضة (اصول بعض انواع الفاكهة المتساقطة مثال ذلك التفاح – الخوخ الكمثرى) حيث الاحتياجات المنخفضة من درجة الحرارة المناسبة لدفع النمو، وفي هذه الحالة فلا

بد من توافر اكثر من معمل للتحضين Incubation Room ويفضل ايضا توفر عدد من الحضانات incubators حيث يتم التحكم في درجة الاضاءة وكذلك درجة الحرارة وقد يتوفر لبعض الاجهزة امكانية الحصول على برنامجين مختلفين لكل من الحرارة والضوء في اليوم الواحد اي خلال اربع وعشرون ساعة.

كذلك بزيادة عدد العاملين بالمعمل البحثي يمكن تحديد عدد الاجهزة المطلوبة للنوع الواحد مثال ذلك زيادة عدد اجهزة ال Lamina Air Flow Hood ويختلف نوع الجهاز المطلوب باختلاف الهدف من الزراعة المعملية او الهدف من العمل ، مثال ذلك توفر انواع مختلفة من جهاز ال Hood باختلاف الهدف من الزراعة.

- جهاز زراعة افقي Horizontal Lamina Air Flow Hood
- جهاز زراعة رأسي Vertical Lamina Air Flow Hood
- جهاز زراعة رأسي (مزود بعدد 2 Hepa Filter)

Vertical Recirculated Lamina Flow Hood (Biological cabinet)

- كما يتأثر حجم الاجزاء المختلفة التابعة لمعمل زراعة الانسجة وبالتالي المساحة الكلية حسب عدد الافراد والانجازات المطلوب تحقيقها. وفيما يلي رسم تخطيط لمعمل زراعة انسجة صغير- شكل(1)، ومعمل زراعة انسجة متوسط شكل(2).

ثانياً: تصميم وانشاء معمل لزراعةالانسجة على مستوى تجاري

Planning and Establishing a Commercial Tissue Culture lab

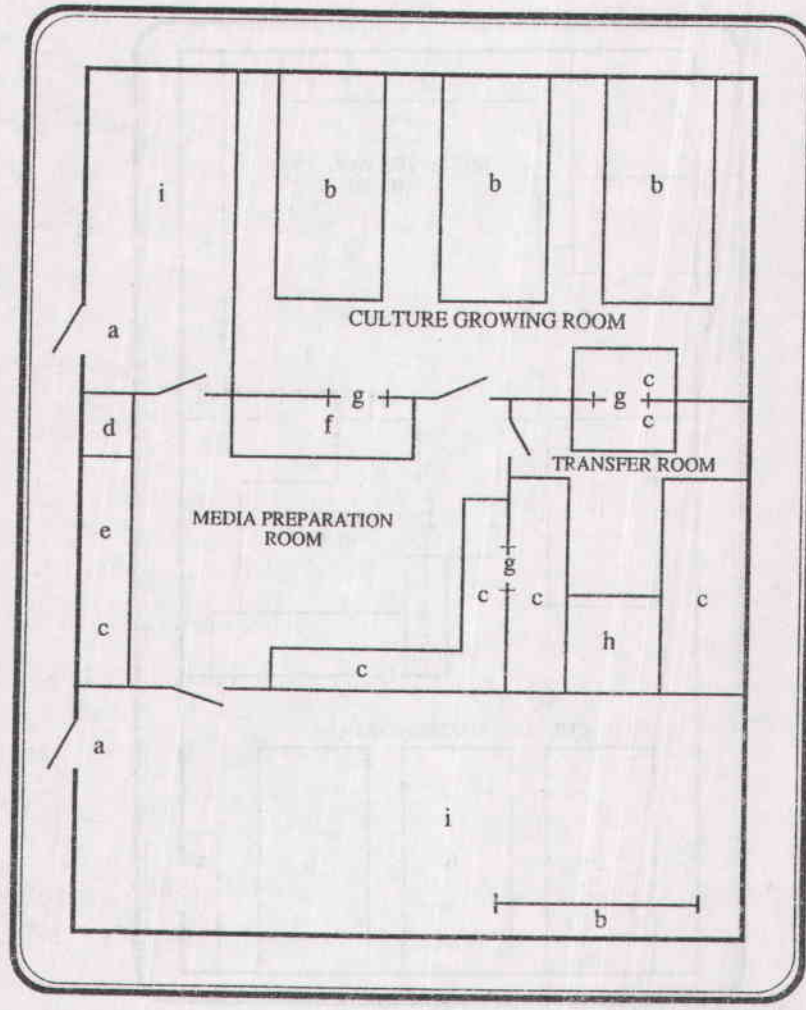
هناك بعض النقاط لا بد من اخذها في الاعتبار عند تخطيط وانشاء معمل لزراعة الانسجة على مستوى تجاري .

- من المعروف ان انشاء وبناء وتجهيز معمل لزراعة الانسجة يتكلف تكاليف كبيرة جداً لا بد من تقديرها مبدئيا والتي من المعروف انها تختلف باختلاف سنة التنفيذ لاختلاف اسعار النقد الاجنبي وكذلك لاختلاف اسعار مستلزمات التشغيل والاجهزة عاماً بعد آخر.

فلا بد من حساب كافة التكاليف اللازمة ثم تحديد الهدف من انشاء المعمل وعدد

شكل رقم (1)

تصميم لمعمل زراعة أنسجة صغير



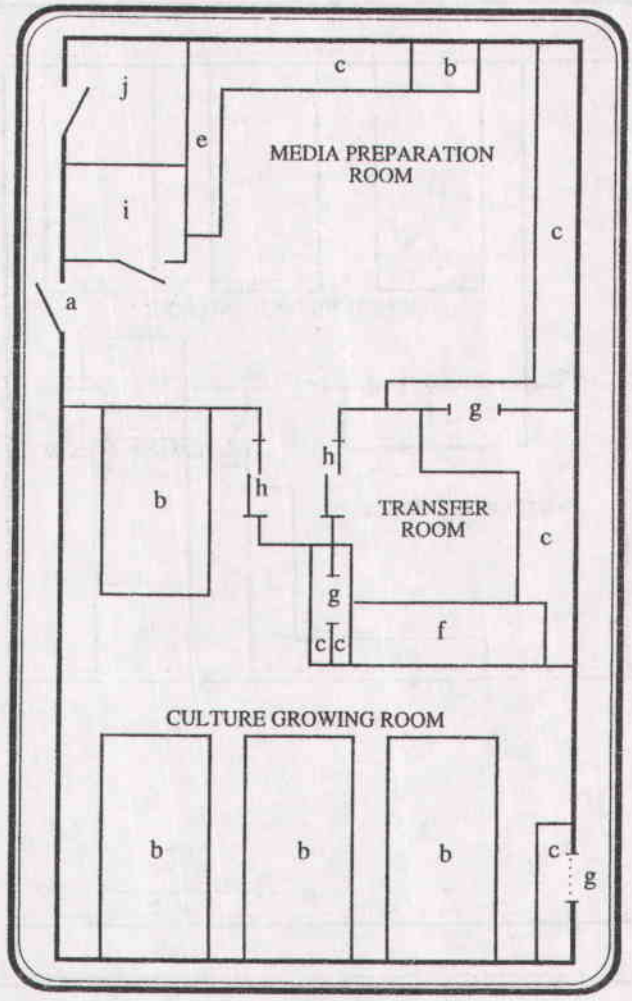
(a) مـــــــدخل (b) أرفـــــــف (c) منضـــــــدة

(d) ثـلاجـــــــة (e) حـوض غـسـيل (f) دفـــــــايه

(g) ممر الى الشـبـاك (h) كـابينه تعـقـيم (i) إتـســـــاع

شكل رقم (2)

تصميم لمعمل زراعة أنسجة متوسط



(a) مـــــــــدخـل (b) ارفـــــــــف (c) منضـــــــدة

(d) ثـلاجـــــــــة (e) حـوض غـسـيل (f) كـابينه تعـقـيم

(g) ممر الى الشـبـاك (h) ابواب زجاجية منزلقة (i) مـــخـــزن

(j) حـجـرة اسـتـراحـة

النباتات المطلوب انتاجها وكيفية تسويقها واسعار ذلك ، ثم دراسة الجدوى الاقتصادية لانشاء المعمل حيث انه في النهاية لا بد ان يكون العائد مجزي حتي يمكن الاستمرارية في العمل ولان الهدف الاساسي من اقامة اي عمل على مستوى تجاري هو الربح والعائد المجزي.

تخطيط لمعمل زراعة الانسجة على مستوى تجاري

Planning a Commercial Tissue Cuture lab

عند التخطيط لانشاء وبناء معمل لزراعة الانسجة يفضل تقسيمه الى مساحات منفصلة وذلك لتسهيل الوصف بالرغم من امكانية اجراء بعض العمليات مجتمعة في نفس المكان ونحن هنا نتحدث عن معمل يقوم بانتاج شتلات على مستوى تجاري لبعض المحاصيل البستانية بشرط ان تكون بحالة صحية جيدة وخالية من الامراض خاصة الامراض الفيروسية .

- مكان اجراء المعاملات الحرارية ومكان اختبار الفيروس:

Heat Treatment Chambers Indexing glass house

ويفضل ان يكون هذا المكان المخصص للمعاملات الحرارية واختبار الفيروس Indexing بالقرب من المعمل ويختلف التصميم هنا باختلاف المادة النباتية المراد التحكم فيها.

- مكان تجميع وتجهيز القمم المرستيمية Collection of Meristem Tips

وهذه الحجرة من المناسب ان يكون مساحتها 10م2 وتكون هذه الحجرة مزودة بمنضدة ومكبر Stereomicroscope. وبضع ازواج من المشارط والملاقط وغيرها من ادوات فصل القمم المرستمية من النباتات ويفضل تزويد هذه الغرفة باضاءة Uv يتم تشغيلها لمدة 12 ساعة قبل بدء العمل وذلك لتقييم المساحة المعملية جميعها والمحافظة على ظروف التقييم طوال هذه الفترة .

- فصل المنفصلات النباتية Transfer of Explants وهذه الغرفة يتم تزويدها وتجهيزها بوضع اجهزة الزراعة تحت ظروف تعقيم كاملLaminar flow Cabinets ويفضل ان تكون مساحة هذه الغرفة كبيرة بدرجة تكفي لوضع 5 اجهزة Laminar Flow Hood بحيث يصل طول مسطح الجهاز الواحد 1.5م

وهذه المساحة وهذا العدد من الاجهزة يكفي لانتاج مليون شتلة في العام مقسمة على موسمين ولا بد ن تزويد كل كابينه زراعة بالادوات اللازمة لفصل وزراعة المنفصل النباتي .

- يد مشرط متغير السلاح
- بضع اسلحة مشارط رقم (11) ، (10) ، (20) ، (21)
- وتعطى زراعة طويلة - موقد كحولي - كمية من الكحول قطن وشاش معقم - ماء مقطر معقم.

معمل التحضين (النمو) Growth Room

ومن المناسب ان يكون بمساحة 60م2 حيث يجب ان تصمم بحيث تستوعب مايوازي 7500 برطمان في نفس الوقت وهذا يستلزم مساحة ارفف تقدر ب 80×90م2.

ومن اهم العوامل البيئية الواجب التحكم فيها الحرارة، فلا بد من الاستعانة باجهزة تكييف محكمة وذلك للتوصل الى درجة الحرارة المطلوبة ويجب مراعاة الآتي حتي لا ترتفع درجة الحرارة داخل الارفف:

- يفضل ان تكون الارفف مثقبة او يسهل مرور الهواء البارد من رف لآخر دون ان يحجز حول لمبات الاضاءة وبالتالي يسبب سخونة الزراعات المتواجدة .
- ان توضع الترنسات وغيرها من مفاتيح الاضاءة خارج غرفة النمو والتحضين حتي لا تسبب ارتفع درجة الحرارة بالقرب من الشغل .
- استخدام منظم يتحكم في اطفاء الاضادة عقب ارتفاع درجة الحرارة مباشرة حتى لا يسبب الاضرار الناجمة عن ارتفاع درجة الحرارة .
- لا بد ان تزود ارفف الزراعة باضاءة تتفاوت في شدتها من 1000-3000 الى 10.000 Lux وذلك لتناسب مراحل النمو العملي جميعها.

معمل تجهيزات البيئات Media Preparation lab

ويجب ان تزود هذه الغرفة بالآتي من الاجهزة :

- موازين
- جهاز قياس درجة ال pH
- سخان مغناطيسي لطهي البيئة

- ثلاجة لحفظ محاليل البيئات ومنظمات النمو ومساحة 30م2 مناسبة لهذ لغرض
- مساحة مكان التعقيم Sterilization Zone

وتشمل هذه الغرفة الاوتوكلاف ويفضل ان يكون أفقي

- **معمل (حجرة نظافة الزجاجيات** Glassware Cleaning Zone

ويمكن ان يتم ذلك بدقة في مكان منفصل عن العمل ويستعمل في آخر مرحلة في الغسيل ماء فقط ويتم ذلك يدوياً او باستخدام ماكينة الغسيل والمساحة المناسبة لذلك 15م2.

- والمساحة المتبقية عبارة عن مكاتب وخلافه ومخزن لخزن مستلزمات العمل .

وفيما يلي رسم يوضح تصميم لمعمل زراعة انسجة على مستوى تجاري .

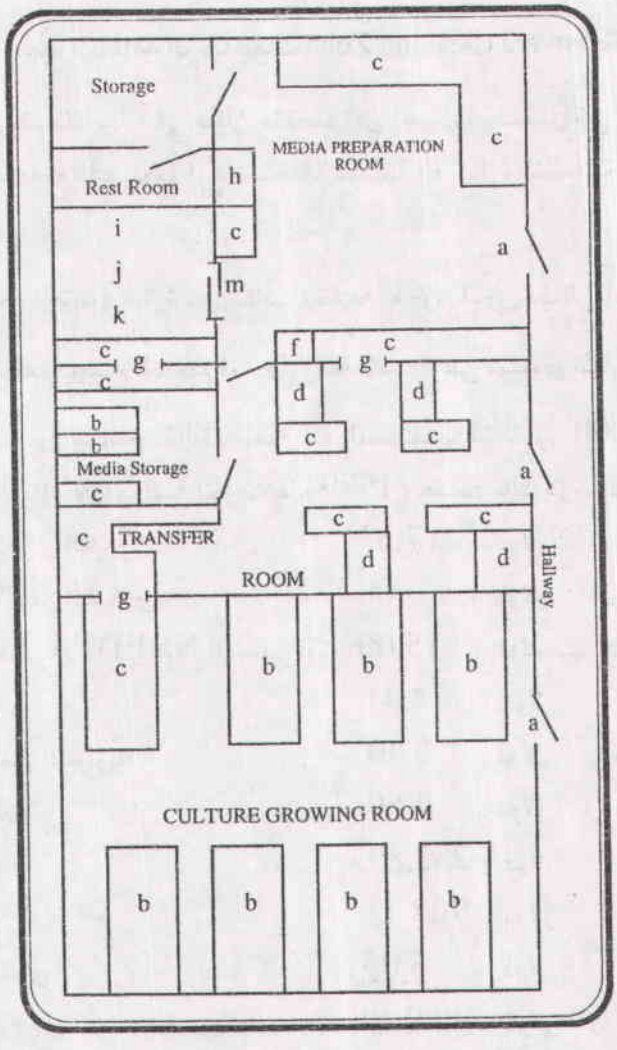
وفيما يلي جدول يوضح تكاليف المكونات المستخدمة لتحضير 1000 لتر من بيئة التضاعف . وذلك بناءً على دراسة اجريت عام 1979 وحسبت بالدولار الامريكي.

املاح العناصر الكبرى	17.53	دولار
املاح العناصر الصغرى	3.00	دولار
املاح الحديد Na EDTA المخلبى	15.00	دولار
فيتامينات	14.41	دولار
اندول حمض البيوتريك	2.40	دولار
بنزيل ادينين	9.60	دولار
سكروز	232.89	دولار
آجار	768.31	دولار
مكونات آخرى	6.00	دولار
اجمالي	1069.14	دولار امريكي
تكلفة 1 لتر من البيئة	= 1.07	دولار امريكي

وبحساب التكلفة الحقيقية باسعار هذا العام (1996) يمكن ان تعتبر ان تكلفة لتر من البيئة يصل الى 4-5 دولار اي يصل الى 14-20 جنيه مصري.

شكل رقم (3)

تصميم لمعمل زراعة أنسجة كبير



(a) مـــــــــدخل (b) ارفـــــــــف (c) منـضـــــــدة

(d) كـــابينه تعـقـيم (e) حـوض غـســيل (f) غـســاله اطبـاق

(g) ممر الى الشـبـاك (h) ثـلاجـــــــة (i) ســـخـــان مـــاء

(j) جـــهـــاز تقطيـــر (k) انـوكـــــــلاف (L) ابواب زجاجية مزلقه

دراسة الجدوى الاقتصادية لانشاء معمل لزراعة الانسجة على مستوى تجاري:

لابد ان نأخذ في الاعتبار عند تجهيز معمل لزراعة الانسجة على مستوى تجاري عدد النباتات المطلوب انتاجها في العام وذلك حتى يتسنى تجهيز المعمل باجهزة ومعدات تتناسب والعدد المطلوب من النباتات، فليس من المعقول ان يكون الهدف النهائي انتاج 150.000 نبات في السنة وتكون امكانيات الاجهزة انتاج مليون شتلة حيث ان هذا يعتبر اهدار للمال وليس اقتصادي بالمرة .

- من النقاط التي لا بد ايضاً اخذها في الاعتبار السوق المحلي واحتياج السوق من الشتلات والكمية المنتجة وكذلك انسب حجم وشكل للمنتج النهائي وكم تبلغ تكلفة الناتج النهائي الى ان تعد بربح لكل وحدة من مراحل النمو وبالتالي اختيارافضلهامن حيث الربحية .
- لا بد ايضا من تحديد الموعد المناسب لبدء الزراعة المعملية للمرحلة الاولى حيث يجب حساب الوقت الذي تستغرقه كل مرحلة والموعد اللازم لانتاج النباتات وتوزيعها ، بعملية حسابية بسيطة يمكن حساب الموعد المناسب لبدء وزراعة المرحلة الاولى (المرحلة البادئة) ويترتب على ذلك مواعيد تسليم الشتلات.

مكونات البيئة المغذية اللازمة للزراعة النسيجية

3- مستخلص المولت

4- كازين هيدروليزيت

و- منظمات النمو النباتية :

1- الاوكسين : اندول اسيتيك ، اندول بيوتريك ، نفتالين اسيتيك

2 ، 4 دايكلوروفينوكسى اسيتيك

2- اليتوكاينين : الكاينتين – بنزايل ادنين – الزياتين – ايزوبنتينايل ادنين

ز- الاجار : وهو عبارة عن سكريات عديدة من اعشاب البحر (طحالب حمراء مثل جلاديوم).

أولاً : المواد المعدنية :

1- العناصر الضرورية الكبرى :

وتشمل النيتروجين والفسفور والبوتاسيوم والكالسيوم والماغنسيوم والكبريت ، ومصادر الاملاح الآتية : حسب بيئة موراشيجى وسكوج عام 1962.

1- نترات الامنيوم $NH_4 No_3$

2- نترات البوتاسيوم KNO_3

3- كلوريد الكالسيوم$Ca\ C1_2\text{-}@H_20$

4- بوتاسيوم داي هيدروجين اورثوفو سفيات $KH_2\ PO_4$

5- كبريتات الماغنسيوم$Mg\ SO_4\ .\ 7H_20$

ويجب الأخذ فى الاعتبار جزئيات الماء الموجودة فى الملح ، وبدراسة مبسطة لهذه الاملاح نجد أنها مصدر للعناصر الضرورية الكبرى حيث انها عناصر تركيبية تدخل فى تركيب مكونات الخلية النباتية فى مزارع الانسجة النباتية ، فنجد أن :

1- النيتروجين : يدخل فى تركيب الاحماض الامينية البروتين والكلورفيل والاحماض النووية (الحامض النووى داى اوكسى رايبونيوكليك) (DNA) والحامض النووى الرايبوزى (RNA) وكذلك يدخل فى تركيب الانزيمات والتى تعتبر عامل مساعد حيوى يسرع من التفاعلات البيولوجية بالخلية النباتية ، ونجد كذلك النيتروجين فى كثير من الهرومونات النباتية مثل الاوكسينات التى تحتوى على حلقة الاندول مثل اندول اسيتيك ، وكذلك فى تركيب مركبات السيتوكينين مثل الكاينتين والبنزايل ادونين وهذه المركبات الهرمونية تساعد على نمو النباتات وتكوين الجذور بالنسبة للاوكسين وتكون الافرع والتضاعف والزيادة العددية بالنسبة للسيتوكاينين.

2- الفوسفور : يدخل فى تكوين الفوسفوليبيد – الاحماض النووية مثل (DNA, RNA)السكريات (جلوكوز – 1 فوسفات) وكذلك مركبات ادينوسين ثلاثى الفوسفات (ATP)ADP ، AMP وذلك لامداد الخلية بالطاقة.

3- الماغنسيوم : يدخل فى تركيب الكلوروفيل وبالتالى يعمل على زيادة اللون الاخضر فى النباتات وعند غيابه تصفر النباتات ولا يستطيع النبات تكملة دورة حياته عند غيابه كلية.

4- الكالسيوم : من العناصر الضرورية للنبات وعند غيابه لا تتكون الصفيحة الوسطية المحتوية على بكتات الكالسيوم وبالتالى يعمل ذلك على اصفرار النبات وخاصة القمة النامية (Shoot Tip Necrosis) وكذلك يؤدى نقص الكالسيوم الى ظهور الظاهرة الزجاجية (Vitrification) وعند غياب العنصر كلية فى البيئة لا يستطيع النبات تكملة دورة حياته .

5- البوتاسيوم : من العناصر الضرورية للنبات حيث يساعد على امتصاص الماء وانتقال السكريات ولكن لم يعرف حتى الآن المركبات التى يدخل فى تركيبها البوتاسيوم وعند غياب البوتاسيوم كلية لا يستطيع النبات تكملة دورة حياته.

6- الكبريت : من العناصر الضرورية للنبات حيث يدخل فى تركيب الاحماض الأمينية سستين ، وسستاين ، وميثونين والبتيدجلوتاثيون - حيث يساعد على اتمام تفاعلات الاكسدة والاختزال ، وبغيابه كلية لا يستطيع النبات تكملة دورة حياته.

2- العناصر الضرورية الصغرى :

وهذه العناصر ضرورية لحياة النبات وغيابها يعوق نمو الانسجة ، ولكن يحتاجها النبات بكميات قليلة ، وتشمل : الحديد ، والبورون ، المنجنيز والزنك والنحاس والكوبالت والكولور والموليبدنيم واليود ومصادرها الاملاح الآتية :

كبريتات الحديدوز	$Fe\ SO_4$
ايثيلين داي امين تيترا اسيتيك لملح الصوديوم	$Na_2\ EDTA$
حامض البوريك	H_3BO_3
يوديد البوتاسيوم	KI
موليبدات الصوديوم	$Na_2MoO_4 . 2H_2O$
كلوريد الكوبالت	$Co\ C1_2 . 6H_2O$
كبريتات المنجنيز	$Mn\ SO_4 . 4H_2O$
كبريتات الزنك	$ZnSO_4 . 7H_2O$
كبريتات النحاس	$Cu\ SO_4 . 5H_2O$

الهرمونات المستخدمة فى مزارع الانسجة النباتية :

اولاً : الاوكسينات :

مركبات كيميائية يحتاجها النبات بكميات بسيطة جداً والغرض منها المساعدة على تكوين الكالوس او تكوين المجموع الجذرى فى المرحلة النهائية وأهمها :

أ- اندول استيك اسيد (IAA) يعمل على تجذير النباتات وهذا المركب يجب اضافته بواسطة المرشحات البكتيرية لأن تعقيمه بواسطة الاوتوكلاف تحت

Murashige and Skoog's Basic Mineral Salts Fornulation*

Chemical Name	Chemical Symbels	Quantity Per Lite
A. Macronutrients		
Ammoniumnitrate	$NH_4\ NO_3$	1.65g
Potassiumnitrate	KNO_3	1.90g
Calcium chloride dihydrate	$CaCl_2\ 2H_2O$	0.44g
Magnesium sulfate 7 hydrate	$MgSO_4\ 7H_2O$	0.37g
Potassium dihydrogenphosphate	$KH_2\ PO_4$	0.17g
B.Iron source* **		
Ferrous sulfate 7 hydrate	$Fe.SO_4\ 7H_2O$	27.8mg
Disocium EDTA**	Na_2 EDTA	37.3mg
C.Micronutrients		
Boric acid	$H_3\ BO_3$	6.2mg
Manganous sulfate 4 hydrate	$MnSO_4\ 4H_2O$	22.3mg
Zinc sulfate 4 hydrate	$ZnSO_4\ 4H_2O$	8.8mg
Potassium iodide	K1	0.83mg
Sodium inolybdate dihydrate	$Na_2\ MoO_4\ 2H_2O$	0.25mg
Cupric sulfate 5 hydrate	$CuSO_4\ 5H_2O$	0.025mg
Cobalt chloride 6 hydrate	$CoCl_2\ 6H_2O$	0.025mg.

* From Physiologia plantarum, Volume 15. page 473, 1962, Reprinted with permission of the publisher.

** EDTA is the abbreviation for ethylenodiaminetotraaceticacid.

*** Usually added from a more concentrated solution, iron stock solutions should be stored in an amber bottle or darkness.

Preparation of Culture Media

مكونات بيئية موراشيجى وسكوج

Stock Solution	Constituents	(g/liter)	To make up 1 liter of MS medium
A	NH_4NO_3	82.5	20
B	KNO_3	95.0	20
C	H_3BO_3	1.24	5
	KH_2PO_4	34.0	
	KI	0.166	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.05	
	$CoCl_2.6H_2O$	0.005	
D	$CaCl_2.2H_2O$	88.00	5
E	$MgSO_4.7H_2O$	74.00	5
	$MnSO_4.4H_2O$	4.46	
	$ZnSO_4.7H_2O$	1.72	
	$CuSO_4.5H_2O$	0.005	
F*	Na2.EDTA	7.45	5
	$FeSO_4.7H_2O$	5.57	
G	Thamine.HCl	0.2**	5
	Nicotinic acid	0.1	
	Pyridoxine.HCl	0.1	
	Glycine	0.4	

* Stock solution F is made differently from the others. To prepare stock solution
F: Dissolve each constituent in 200 ml distilled water; heat Na2. EDTA solution ; with continuous stirring add $FeSO_4.7H_2O$ soultion ; when cool dilute to 1000 ml. Do not refrigerate this solution until it has reached room temperature. An amber coloured or aluminum foil covered bottle should be used for solution F.

** Thiamine, HCL has been increased from 0.02 mg/liter (MS, 1962) as recommended by Linsmaier and Skoog (1965).

ضغط 1.2 كجم/سم2 ودرجة حرارة 121°م يؤدى الى تكسيره وتقليل الاستفادة منه وكذلك يجب حفظه فى زجاجة بنية داكنة اللون لانه يتأثر بالضوء.

ويضاف للبيئة فى حدود من 0.1 - 10 مليجرام/لتر ، ويجب ان تحفظ البيئة المحتوية على هذا الهرمون فى الاظلام التام حتى لا يتكسر وتقل الاستفادة منه . ولقد وجد حديثاً ان الزراعة فى بيئات محتوية على الاوكسين والموضوعة فى الاضاءة قد تكسر الاوكسين بعد 14 يوماً، كذلك يتأثر اندول اسيتيك اسيد بالحموضة والاملاح ، ويلاحظ ان هذا الاوكسين لا يذوب فى الماء ويجب اذابته اولاً فى كحول الايثانول او هيدروكسيد البوتاسيوم.

التحضير :

يوزن 100 ملليجرام من اندول اسيتيك وتذاب فى هيدروكسيد البوتاسيوم 1 ع ثم يكمل الحجم الى 100 سم3 بالماء المقطر.

$$N \quad \frac{CH_2 - CooH}{CH_3 - CH_2 - OH}$$

$$N \quad CH_2 - Coo - CH_2 - CH_3$$

استير ذائب

IAA

اندول غير ذائب

$$CH_2 - CooK$$

$$\frac{CH_2 - CooH}{KOH}$$

اندول غير ذائب

ملح البوتاسيوم للاندول ذائب

ب) نفتالين اسيتيك (NAA)

من المركبات الاوكسينية التى تستخدم بكثرة فى مزارع الانسجة النباتية لتكوين الكالوس او تكوين المجموع الجذرى فى المرحلة النهائية ، ويلاحظ ان الاتزان الداخلى للاوكسين والسايتوكينين هو المحدد فى جميع حالات نمو النبات.

وهذا الهرمون يذوب فى كحول الايثانول وكذلك هيدروكسيد البوتاسيوم ويحضر باذابة 100 مليجرام من الهرمون فى هيدروكسيد البوتاسيوم 1 ع ثم يكمل الحجم الى 100 سم3 وفى هذه الحالة يكون 1 سم3=1 مليجرام.

ج- اندول حامض البيوتريك (IBA) :

من الاوكسينات الهامة التى تستخدم على نطاق واسع فى مزارع الانسجة النباتية بهدف تكوين المجموع الجذرى وهذا الهرمون ثابت نسبياً بالمقارنة باندول اسيتيك أسد حيث أنه يتحمل التعقيم ولا يتكسر بدرجة الحرارة أو الضوء ويذوب ايضاً فى كحول الايثانول وهيدروكسيد البوتاسيوم ويتم تحضيره كما سبق مع اندول اسيتيك.

د- 2 ، 4 داى كلوروفينوكسى اسيتيك :(2, 4-D)

هذا الهرمون يستخدم كمبيد حشائش ويستخدم حالياً للمساعدة فى تكوين الكالوس، بالاتزان مع السايتوكينين ، وهذا الهرمون يذوب ايضاً فى كحول الايثانول وكذلك هيدروكسيد البوتاسيوم.

والجدول المرفق يبين تركيب الاوكسينات المختلفة التى تدخل فى بيئات مزارع الانسجة النباتية.

وكثيراً ما تذكر التركيزات بالملى مول والميكرومول ، وفى هذه الحالة يجب تحويلها الى ملليجرام وميكروجرام طبقاً للقانون الآتى :

التركيز بالميكروجرام = التركيز بالميكرومول × الوزن الجزيئي

التركيز بالمليجرام = التركيز بالمليمول × الوزن الجزيئي

ويجب الاستعانة بالجداول المرفقة لمعرفة الاوزان الجزيئية للمركبات وكذلك الاوزان الذرية للعناصر الداخلة فى بيئات مزارع الانسجة النباتية.

ويجب ملاحظة ان هذه الاوكسينات تتأثر تأثراً كبيراً بتركيز الأس الهيدروجيني (PH) وكمية الاملاح بالبيئة. ولقد استخدمت هذه الاوكسينات بنجاح لتكوين كالوس نخيل البلح ، وكذلك كالوس الفيكاس ، كما استخدمت الاوكسينات لتجذير نباتات الجربيرا والكوردالين ونبات الموز وخلافه.

ثانياً : السيتوكاينين :

من الهرومنات الهامة فى مزارع الانسجة النباتية والتى تساعد على انقسام الخلايا وتكوين النموات الجانبية والمساعدة على الزيادة العددية اثناء اكثار النباتات وتقسم الى:

أ- سيتوكاينين طبيعى : مثل

1- الزياتين
2- زياتين رايبوزايد
3- ايزوبنتنايل ادينين (2ip)

ب - سيتوكاينين صناعى : مثل

1- الكاينتين
2- البنزايل ادينين(BA)

ورموز هذه المركبات واوزانها الجزيئية وتركيبها البنائى مذكور فى الجداول المرفقة. وهذه المركبات عامة تذوب فى حمض الهيدروكلوريك وتحضر باذابة 100 ملليجرام من السيتوكاينين فى 1 ع من حامض الهيدروكلوريك (من 5 - 10 نقط) ثم يكمل الحجم الى 100 سم مكعب.

وعامة تستخدم هذه المركبات بتركيز من 01ر - 10 ملليجرام/لتر وبالنسبة للايزوبنتينايل ادينين يستخدم حتى تركيز 30 ملليجرام/لتر.

وعامة فان هذه المركبات ثابتة وتحفظ فى الثلاجة وتعمل على انقسام الخلايا وزيادة

النموات الجانبية ويستخدم كذلك مع الاوكسين لتكوين الكالوس وذلك عند اتزان بين الاوكسين والسيتوكاينين.

مركبات الفينايل يوريا :

تستخدم هذه المركبات بدلاً من مركبات السيتوكاينين لتكوين النموات الجانبية حيث يثبط مركبات الدايفينايل يوريا انزيمات اكسدة الثايتوكاينينCytokinin oxidase وبالتالى نحافظ على تركيز السايتوكاينين الداخلى بتركيز عالى ولا تهدمه الانزيمات فيقوم بدوره فى عمليات التضاعف .

ويتم تحضير البيئة المغذية كالآتى :

تؤخذ الاحجام الموضحة بالجدول وتوضع فى كأس به حوالى 500 سم3 من الماء المقطر ثم يضاعف اليها من 20 - 30 جرام من السكروز + 100 مليجرام اينوزيتول وتضاعف كذلك الهرمونات المطلوب اضافتها حسب الابحاث التى اجريت من قبل وكذلك على حسب نوع النبات ومرحلته ويضبط ال(PH) عند 5 - 5.2 فى البيئة السائلة ، وعند 5.6 - 5.8 فى البيئة الصلبة التى يضاف اليها الاجار او الجيلرايت ويلاحظ انه احياناً يضاف فحم للبيئة وفى هذه الحالة يجب ضبط عند 6 ثم تطبخ البيئة وتصب فى انابيب 25 × 150 مم او فى ماجينتات (علب بلاستيك مصنوعة من مادة البولى بروبلين) واحياناً من مادة البولى كربونات لتحمل ظروف التعقيم الحرارى واحياناً اخرى تستخدم انواع من البرطمانات المصنوعة من الزجاج ثم تعقم البيئة فى اجهزة الاتوكلاف على ضغط من 1.1 – 1.5 كجم/سم2 ودرجة حرارة 121م لمدة 20 دقيقة ثم تبرد وتحضن لمدة 4 ايام وتكون جاهزة للزراعة ، ويجب تحضين البيئة فى جو مظلم حتى لا تتكسر بعض مركبات البيئة مثل الاندول استيك بالضوء وكذلك تضاف بعض المركبات مثل الجيرليين والاندول اسيتيك والثيامين بواسطة المرشحات البكتيرية نظراً لتكسرها تحت ظروف التعقيم.

« PH» الاس الهيدروجينى :

هو اللوغاريتم السالف لتركيزات ايونات الهيدروجين فى المحلول ويتراوح من 5 - 5.2 فى البيئات السائلة ومن 5.6 - 5.8 في البيئات الصلبة ويضبط الPH بالمحلول المنظم Buffer solution وهو ذلك المحلول الذى يقاوم التغير فى ال (PH) ويلاحظ الآتى :

ال (PH) المنخفض عن 4.5 أو الاعلى من 7 يؤثر تأثيراً سيئاً على نمو النباتات.

فاذا انخفض ال عن 4.5 فيحدث الآتى :

1- يتأثر ثبات الاندول استيك اسيد (IAA) والجبرلين والثيامين والبنتوثنيك.
2- سيولة الآجار.
3- ترسب املاح الفوسفات والحديد.
4- تقل الاستفادة من ايونات الامونيوم نظراً لقلة الامتصاص.

ويختلف الPH قبل وبعد التعقيم حيث تنخفض فيه ال من 3 - 5 وحدة ويلاحظ ان الPH ينخفض اثناء نمو النباتات.

الضغط الاسموزى :

هو مجموع الضغوط الاسموزية للاجار والاملاح والسكريات وجميع مكونات البيئة المغذية وبدون شك فان السكر له تأثير عال نسبياً على الضغط الاسموزى بالمقارنة بالعناصر الضرورية الكبرى ومن الواضح ان السكروز يتحلل الى جلوكوز وفركتوز والذى يغير من الضغط الاسموزى وان الضغط الاسموزى يرجع معظمه الى العناصر الضرورية الكبرى والى سكريات البيئة.

ويقدر الضغط الاسموزى بالبار

1 - بار = 50 بسكال

ولقد قدر الضغط الاسموزى للبيئات ووجد كالآتى :

هوايت (للاملاح) = 0.43

هوايت للسكر = 1.46

هيلدبر انزنت (للاملاح) = 0.67

هيلدبرانزنت للسكر = 1.46

هلير للاملاح = 0.96

هلير للسكر = 4.05

موارشيجى وسكوج للاملاح = 2.27

موارشيجى وسكوج للسكر = 2.20

فاذا كان الضغط الاسموزى اعلى من 3.1 فان النمو يتاثر تأثيراً شديداً. ويزيد الضغط الاسموزى باضافة المانيتول للبيئة.

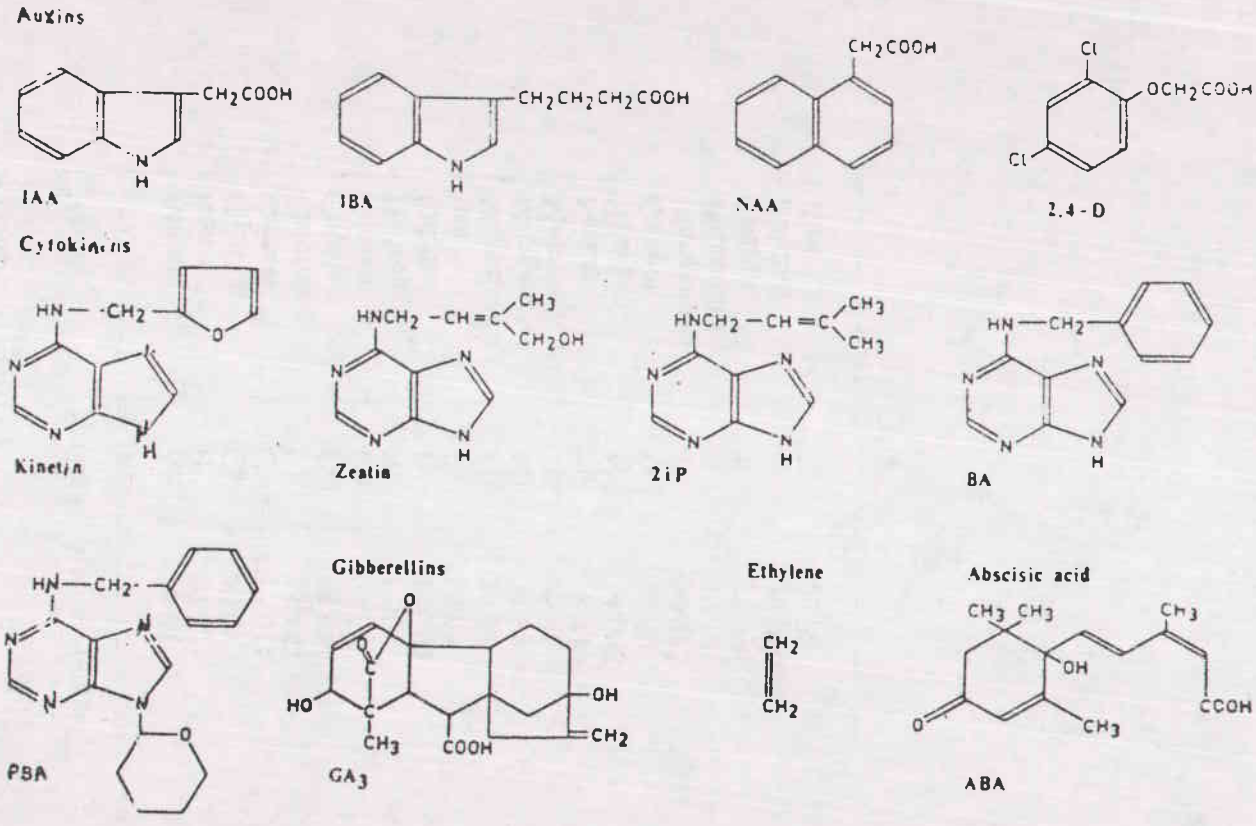


Fig. .. Structural formulae of commonly used regulators: auxins, cytokinins, gibberellins (only GA_3 shown), ethylene and abscisic acid.

الاوزان الذرية للعناصر الداخلة في بيئات مزارع الانسجة

ATOMIC WEIGHTS

Name	Symbol	Atomic weight
Aluminium	Al	26.98
Boron	B	10.82
Calcium	Ca	40.08
Carbon	C	12.011
Chlorine	Cl	35.457
Cobalt	Co	58.94
Copper	Cu	63.54
Hydrogen	H	1.008
Iodine	I	126.91
Iron	Fe	55.85
Magnesium	Mg	24.32
Manganese	Mn	54.94
Molybdenum	Mo	95.95
Nickel	Ni	58.71
Nitrogen	N	14.008
Oxygen	O	16.00
Phosphorus	P	30.975
Potassium	K	39.10
Sodium	Na	22.991
Sulphur	S	32.066
Zinc	Z	65.38

الاوزان الجزئية للمركبات الداخلة في بيئات مزارع الانسجة

Molecular weights of the compounds commonly used in tissue culture media

Compound	Chemical formula	Molecular weight
Macronutrients		
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	80.04
Ammonium sulphate	$(NH_4)_2SO_4$	132.15
Calcium chloride	$CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$	147.02
Calcium nitrate	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$	236.16
Magnesium sulphate	$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	246.47
Potassium chloride	KCl	74.55
Potassium nitrate	KNO_3	101.11
Potassium dihydrogen *ortho*-phosphate	KH_2PO_4	136.09
Sodium dihydrogen *ortho*-phosphate	$NaH_2PO_4 \cdot 2\,H_2O$	156.01
Micronutrients		
Boric acid	H_3BO_3	61.83
Cobalt chloride	$CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$	237.93
Cupric sulphate	$CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$	249.68
Manganous sulphate	$MnSO_4 \cdot 4\,H_2O$	223.01
Potassium iodide	KI	166.01
Sodium molybdate	$Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	241.95
Zinc sulphate	$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	287.54
Sodium EDTA	$Na_2 \cdot EDTA \cdot 2\,H_2O$ $(C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2\,H_2O)$	372.25
Ferrous sulphate	$FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$	278.03
Ferric–sodium EDTA	FeNa - EDTA $(C_{10}H_{12}FeN_2NaO_8)$	367.07
Sugars and sugar alcohols		
Fructose	$C_6H_{12}O_6$	180.15
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.15
Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	182.17
Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	182.17
Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.31
Vitamins and amino acids		
Ascorbic acid (vitamin C)	$C_6H_8O_6$	176.12
Biotin (vitamin H)	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	244.31
Calcium pantothenate (Ca salt of vitamin B_3)	$(C_9H_{16}NO_5)_2Ca$	476.53
Cyanocobalamine (vitamin B_{12})	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	1357.64
L-Cysteine HCl	$C_3H_7NO_2S \cdot HCl$	157.63
Folic acid (vitamin B_c, vitamin M)	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	441.40
Inositol	$C_6H_{12}O_6$	180.16
Nicotinic acid or Niacin (vitamin B_3)	$C_6H_5NO_2$	123.11
Pyridoxine HCl (vitamin B_6)	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	205.64
Thiamine HCl (vitamin B_1)	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	337.29
Glycine	$C_2H_5NO_2$	75.07
L-Glutamine	$C_5H_{10}N_2O_3$	146.15

تابع الاوزان الجزئية للمركبات الداخلة في بيئات مزارع الانسجة

Hormones		
Auxins		
pCAA		
(*p*-chlorophenoxyacetic acid)	$C_8H_7O_3Cl$	186.59
2,4-D		
(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)	$C_8H_6O_3Cl_2$	221.04
IAA		
(indole-3-acetic acid)	$C_{10}H_9NO_2$	175.18
IBA		
(3-indolebutyric acid)	$C_{12}H_{13}NO_2$	203.23
NAA		
(α-naphthaleneacetic acid)	$C_{12}H_{10}O_2$	186.20
NOA		
(β-naphthoxyacetic acid)	$C_{12}H_{10}O_3$	202.20
Cytokinins/purines		
Ad		
(adenine)	$C_5H_5N_5 \cdot 3\,H_2O$	189.13
$AdSO_4$		
(adenine sulphate)	$(C_5H_5N_5)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2\,H_2O$	404.37
BA or BAP		
(6-benzyladenine or 6-benzylamino purine)	$C_{12}H_{11}N_5$	225.20
2-ip		
(6-γ,γ-dimethylallylamino purine or N-isopentenylamino purine)	$C_{10}H_{13}N_5$	203.3
Kinetin		
(6-furfurylamino purine)	$C_{10}H_9N_5O$	215.21
SD8339		
[6-(benzylamino)-9-(2-tetrahydropyranyl)-H-purine]	$C_{17}H_{19}N_5O$	309.40
Zeatin		
[6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)-purine]	$C_{10}H_{13}N_5O$	219.20
Gibberellin		
GA_3		
(gibberellic acid)	$C_{19}H_{22}O_6$	346.37
Other compounds		
Abscissic acid	$C_{15}H_{20}O_4$	264.31
Colchicine	$C_{22}H_{25}NO_6$	399.43
Phloroglucinol	$C_6H_6O_3$	126.11

مراحل الإكثار المعملي لنخيل البلح بإستخدام تقنية زراعة الانسجة

مراحل الاكثار المعملي لنخيل البلح
باستخدام تقنية زراعة الانسجة

أ. د. مهدية فريد نصر
استاذ باحث ورئيس وحدة زراعة الانسجة
مركز بحوث الصحراء

انتاج نباتات كاملة من النخيل باستخدام تقنية زراعة الانسجة والزراعة المعملية يمر باربعة مراحل الى ان نصل الى النبات الكامل. وتختلف كل مرحلة عن غيرها من مراحل النمو المعملى فى احتياجاتها من البيئات المختلفة وكذلك احتياجاتها من الظروف البيئية من حرارة وضوء، وهذه المراحل هى :

- المرحلة البادئة أو الحصول على مزرعة معقمة Establishment of Aseptic Culture
- مرحلة التضاعفMultiplication Stage
- مرحلة التجذيرRooting stage
- مرحلة الأقلمة داخل المعمل In Vitro Accclimatization
- وتشمل الاعداد لنقل الشتلات المتكونة للظروف خارج المعمل بعد الأقلمة داخل المعمل.

ويتم الاكثار بالنسبة لنخيل البلح باستخدام تقنية زراعة الانسجة بطريقتين :

أولاً : تكوين النموات الجانبية مباشرة Organogenesis Via Axillary Growths

ثانياً : تكوين الاجنة الجسمية العرضية Adventitious Sonatic-Embryogenesis

اكثار نخيل البلح باستخدام تكوين الافرع الجانبية :

Organogenesis Via axillary shooting

ويتم فى هذا الاتجاه بزراعة القمة المرستيمية (Shoot tip) للنخيل او البراعم الجانبية Lateral (axillary) buds على البيئة البادئة التي تساعد على اعطاء نمو خضرى محدود. وأهم عامل يجب توفيره هو خلو النمو المتكون من اى تلوث وعلاج مشكلة التلون باللون البنى لانفراد الفينولات . ويعقب هذا تضاعف هذا النمو المتكون

واعطائه بضع نموات (أفرع) جانبية يتم تفصيصها واعادة زراعتها مرة ثانية لتكرار مرحلة التضاعف فتجذير النموات المتكونة، فأقلمة الشتلات الكاملة التكوين .

إكثار النخيل باستخدام تقنية زراعة الانسجة :

تكوين أجنة عرضية جسيمة Adventitious Somatic Embryos

وفى هذا الاتجاه يتم زراعة القمم النامية Shoot tips أو البراعم الجانبية Lateral buds أو اى جزء نباتى آخر مثل جزء من الأوراق او مبادىء الاوراق الصغيرة وفى هذه الحالة تنتج نباتات بها نسبة من التباين.

وينقسم الاكثار عن طريق تكوين النموات العرضية او تكوين البراعم العرضية الجسيمة الى قسمين :

1- تكوين اجنة عرضية جسيمة بطريقة غير مباشرة :

Indirect Somatic Embryogenesis

حيث يتكون نسيج كالس عقب زراعة المنفصل النباتى وينقل هذا النسيج الى البيئة المناسبة لذلك يتكشف الكالس الى أجنة جسمية عرضية . وهذه الطريقة تشجع حدوث كثير من الطفرات وبالتالى هى مناسبة فى برامج التربية (Breeding).

2- تكوين اجنة عرضية جسمية بطريقة مباشرة :

Direct Somatic Embryigenesis

وفى هذه الحالة يتكون الجنين الجسمى من خلية او من نسيج مباشرة بدون تكوين نسيج الكالس ويتم تشجيع تكوين هذه الاجنة بزراعة خلايا النيوسيلة فى الموالح وأوراق واعناق بعض نباتات الزينة بشرط الزراعة فى بيئة تناسب ذلك. وبالنسبة لنخيل البلح فهناك الكثير من الدراسات السابقة فى مجال اكثار النخيل باستخدام تكوين اجنة جسمية عرضية بالطريق الغير مباشر ، اى عن طريق تكوين نسيج الكالس ثم تكشفه الى الاجنة الجسمية ولا زالت الدراسات مستمرة فى هذا الاتجاه ولكن هناك محاولات لتقليل فرصة تكوين نسيج الكالس وتشجيع تكشف الاجزاء المنزرعة الى اجنة جسمية مباشرة وذلك عن طريق احداث تعديلات فى مكونات وتراكيب البيئة خاصة من حيث تركيزات منظمات النمو

المضافة للبيئة. ومع هذا فتكوين نباتات نخيل باستخدام الاتجاه الاول اى عن طريق تكوين النموات الجانبية لا زال هو الاتجاه المفضل نظراً لأن النباتات الناتجة تكون مطابقة تماماً للنبات الام وتقل فرصة حدوث الطفرات او التغيرات فى التركيب الوراثى للشتلات الناتجة ولكن يعاب عليه قلة عدد النباتات الناتجة باستخدام هذا الاتجاه.

ومراحل الاكثار المعملى فى هذا الاتجاه كما سبق كالآتى :

المرحلة الاولى :Establishment stage

والهدف من هذه المرحلة الحصول على نمو أولي للقمة النامية او البراعم الجانبية فى الحصول على مزرعة معقمة خالية من التلوث الفطرى والتلوث البكتيرى ويكون المنفصل النباتى ذو حيوية كبيرة.

ولابد من مراعاة النقاط الآتية لنجاح المرحلة الاولى للنمو المعملى :

- **اختيار المادة النباتية :** لا بد أن تكون الفسائل المختارة بحالة جيدة ويفضل عدم رى المشتل قبل تلقيح الفسائل وحفظها فى مكان نظيف لحين تجهيز الفسائل وزراعتها، حيث ان كل هذه الاحتياطات تقلل فرصة حدوث التلوث .
- **ميعاد تجهيز المادة النباتية :** فيلاحظ ان فصل الصيف ترتفع فيه نسبة التلوث والفنيولات ولكن يصاحبه تشجيع ونشاط نمو الانسجة المنفصلة. وعند تجهيز المادة النباتية فى اشهر الصيف يراعى العناية بوسائل التعقيم، كذلك اضافة المكونات اللازمة لتلاشى تكوين الفنيولات وموسم الربيع افضل وقت لتجهيز المادة النباتية اما الشتاء فأقل استجابة.
- **عمر المفصل النباتى :** يفضل فى حالة النخيل زراعة القمة النامية او البراعم الجانبية لصغر عمر هذه الاجزاء ونشاطها الكبير وقدرتها على النمو والتكشف وكذلك الاوراق ومبادىء الاوراق الصغيرة فى السن .
- **حجم المفصل النباتى :** الحجم الكبير نسبياً يشجع النمو ولكن يزيد فرصة حدوث التلوث وكذلك لابد من العناية بوسائل التعقيم وحجم المنفصل النباتى يؤثر على الوقت اللازم لانهاء واكتمال مرحلة النمو المعملى الأولى، ففى حالة القمة المرستيمية تستكمل المرحلة الاولى فى ثلاثة شهور اما فى حالة استخدام

القمة النامية فتصل هذه المدة الى شهر فقط.

ومشاكل هذه المرحلة :

التلوث : التلون باللون البنى وتكوين الفنيولات :

وهناك احتياطات كبيرة يجب اتباعها لتقليل التلون باللون البنى وتقليل انفراد التانينات او الفنيولات الى البيئة البادئة .

المرحلة الثانية : مرحلة التضاعف : Multiplication Stage

الهدف من هذه المرحلة الزيادة العددية للنموات او الافرع الخضرية المتكونة (الاتجاه للاكثار) او زيادة الاجنة العرضية الجسمية المتكونة سواء بالاتجاه المباشر او غير المباشر . وهنا لابد من تحديد عدد مرات التضاعف والنقل التى لا تسبب حدوث تباين واختلاف فى التركيب الوراثى للنباتات المتكونة ويطلق على هذه الحالة Somaclonal Variation

وقد اجريت بالمعمل دراسات لتحديد عدد مرات النقل فى حالة بعض اصناف الموز وحالياً نقوم بتحديد ذلك بالنسبة للنخيل والهوهوبا من خلال احد الدراسات التى تتم بالوحدة.

وبالرغم من ان مرحلة التضاعف بالنسبة لمعظم النباتات تتم فى حالة رفع تركيز السيتوكينين المضاف للبيئة ، حيث يفيد السيتوكينين فى تشجيع حدوث الانقسامات ولكن فى حالة النخيل فقد لوحظ ان السيتوكينين له نفس التأثير كما هو الحال فى باقى النباتات .

المرحلة الثالثة : مرحلة التجذير Rooting Stage

والهدف من هذه المرحلة تكوين مجموع جذرى قوى مناسب للشتلات المتكونة ومن المعروف ان اضافة الاوكسينات خاصة (اندول حمض البيوتريك (IBA) ونفثالين حمض الخليك (NAA) الى بيئة التجذير تشجع تكوين مبادىء الجذور هذا بالاضافة الى بعض التغيرات فى الضوء ودرجة الحرارة المستخدمة اثناء عملية التجذير ولكن بالنسبة للنخيل فموقف الاوكسينات هذه موقف غير ثابت ومن الملاحظ ان النخيل يختلف فى تأثير منظمات النمو عموماً على استجابته للنمو المعملى وانه فى حالة الاستجابة

للاوكسين للتجذير فيفضل اضافة تركيزات بسيطة جداً من هذه الاوكسينات .

المرحلة الرابعة : مرحلة الأقلمة وتجهيز النباتات المتكونة داخل المعمل قبل نقلها الى المشتل In Vitro Acclimatezation

والهدف من هذه المرحلة بصفة عامة اعداد النباتات المتكونة للاستجابة للأقلمة خارج المعمل وللمكان المستديم لابد من الأخذ فى الاعتبار نوع النبات فمثلاً فى حالة النباتات المتساقطة التى لها فترة سكون فيجب كسره وذلك بتعرض النباتات الكاملة المتكونة داخل المعمل لدرجات حرارة منخفضة فترة معينة تختلف باختلاف المحصول البستانى وباختلاف الصنف اما بالنسبة للنخيل فلا يحتاج هذه المعاملة.

- زيادة الاضاءة لبعض النباتات يساعد على تنشيط انزيمات البناء الضوئى وزيادة كفاءة التمثيل فيسهل اقلمة النباتات ويمكن اتباع هذا بالنسبة للنخيل حيث يتم تعرض النباتات الكاملة المتكونة معملياً لاضاءة اشد من تلك المستعملة فى المرحلة الاولى .
- تقليل كمية السكروز والاملاح فى البيئة قبل النقل للمشتل ، واجراء عملية الاقلمة النهائية.

الاحتياجات البيئية لمراحل النمو المختلفة :

درجة الحرارة :

لا يوجد فرق فى درجة الحرارة المطلوب توفرها من مرحلة الى اخرى بالنسبة للنخيل حيث يفضل توفر درجة حرارة من 27 – 30 درجة مئوية ولو انه يفضل استخدام درجة حرارة اقل نسبياً فى المرحلة الاولى لتثبيط التلوث .

شدة الاضاءة :

يفضل وضع الزراعات الخاصة بالمرحلة الاولى تحت شدة اضاءةLUX1000 بتقليل الفينولات اما بالنسبة لمرحلة التضاعف فتزداد شدة الضوء الى LUX 3000 اما بالنسبة لمرحلة الاقلمة داخل المعمل يفضل رفعها الى LUX 10000.

أقلمة النباتات الناتجة عن زراعة الأنسجة
المرحلة الثانية والاخيرة
للأقلمة خارج المعمل

أقلمة النباتات الناتجة عن زراعة الأنسجة
المرحلة الثانية والأخيرة للأقلمة خارج المعمل

أ. د. مهدية فريد نصر
استاذ باحث ورئيس وحدة زراعة الانسجة
مركز بحوث الصحراء

تختلف النباتات المتكونة معملياً (داخل الانابيب) باستخدام تقنية زراعة الأنسجة عن النباتات النامية خارج المعمل فى نقاط كثيرة.

(De Fossard, 1977 Wardle et al 1983 ; Sutter, 1985 and Fabbri et al., 1986).

ومن نقاط الاختلاف الآتى :

يلاحظ فى النباتات النامية معملياً أن طبقة الكيوتيكل وهى طبقة الشمع المغلفة للأوراق غالباً ما تنمو بضعف وذلك بسبب ارتفاع الرطوبة النسبية (90-100٪) داخل المعمل ويسبب هذا فقد نسبة كبيرة من الماء عن طريق النتح عند تعرض هذه النباتات للحد الخارجى لذلك يلاحظ ان النباتات المتكونة معملياً تكون رفيعة رقيقة وغير نشطة من حيث نشاط التمثيل الضوئى وغير مؤقلمة للظروف الخارجية.

ويختلف التركيب التشريحى لاوراق النباتات النامية معملياً داخل انابيب الاختبار والناتجة من زراعة الانسجة عنه فى أوراق النباتات النامية فى الظروف العادية حيث تصغر وتقل فى العدد الخلايا العمادية فى حين تزداد المسافات الهوائية لطبقة الميزوفيل.

أما بالنسبة للثغور فلا تعمل بكفاءة فى اوراق النباتات النامية داخل الانابيب وتكون مفتوحة مما يسبب عدم تحمل فقد الماء فى الساعات الاولى من عملية الأقلمة هذا بالاضافة الى الطريقة التى تم تنمية النبات عليها اثناء النمو المعملى حيث انه غير ذاتى التغذية وباستمرار تعوده على وجود مصدر كربوهيدرات وبالتالي ليس فى حاجة لعملية التمثيل الضوئى كمصدر للغذاء.

مما سبق يتضح انه لا بد من إتاحة الفرصة والوقت للنباتات الناتجة عن زراعة الانسجة، للتأقلم والتعود على الجو الخارجى . ويعنى هذا تعود النباتات الناتجة على تحمل نقص الرطوبة النسبية فى الجو المحيط بالنباتات .

إن اعادة تشغيل الثغور وانتظامها فى العمل تحت نقص الرطوبة النسبية يعتبر ايضاً من أهداف عملية الأقلمة . وقد اظهرWardle وبعض العلماء عام 1983 ان خفض الرطوبة النسبية للنباتات النامية معملياً ساعد فى تكوين الشمع على سطح طبقة القشرة (Cuticle) وبالتالى خفض معدل البخر والنتح من هذه الطبقة من الخلايا.

كيفية اتمام الاقلمة للنباتات ناتج الانسجة مباشرة خارج المعمل بدون اجراء الاقلمة الاولى داخل المعمل :

- الحفاظ على الرطوبة النسبية حول النباتات النامية خارج المعمل عالية.
- خفض درجة الحرارة المحيطة بالنباتات اثناء الأقلمة.
- خفض الاضاءة او الاشعة التى تتعرض لها نباتات زراعة الانسجة.
- ترك الانابيب او اوعية الزراعة المحتوية على النباتات الكاملة المتكونة معملياً مفتوحة داخل ظروف التعقيم بالمعمل لعدة ايام وذلك تمهيداً للتعرض للظروف خارج المعمل المطلوب تأقلم النباتات عليها.
- من الممكن ايضاً رش النباتات عقب نقلها من الانابيب الى المكان المستديم بمركبات تعيق عملية النتحAntitranspirants وذلك للمساعدة فى خفض البخر والنتح من اوراق هذه النباتات (Sutter and Tazel, 1985) هذا بالرغم من ان استخدام هذه الطريقة قد تكون لها تأثيرات معاكسة.

2- لوحظ ان الجذور المتكونة معملياً تختلف تماماً عن تلك الموجودة على النباتات المؤقلمة، حيث ان الجذور المتكونة على نباتات ناتج عن زراعة الانسجة غير كافية لاداء وظيفتها وذلك بسبب قلة عددها وعدم احتوائها على شعيرات جذرية وسرعان ما تموت ولذلك فتشجيع تكوين الشعيرات الجذرية داخل المعمل يتم بواسطة نقل النباتات المتكونة الى بيئة سائلة.

3- بما أن اعداد النباتات فى الظروف العادية والنامية خارج الظروف المعملية وغير الناتجة من الزراعة النسيجية تنمو بصورة تكافليةSymbiotically مع الفطريات (Mycorrhiza) والبكتريا (Eguminosa , Rhizobiums) هناك تقارير كثيرة فى هذا المجال تفيد بأن حقن تلك النباتات عند نقلها من الأنابيب الى التربة بكائنات مثل الفطر أو البكتريا ينشط نمو وتطور هذه

النباتات. حيث وجد انه باضافة ال Rhizobium اثناء الأقلمة ادى الى تكوين بعض العقد Nodules فى 80٪ من النباتات الحية. هذا وقد وجد أن استخدم حقن النباتات المتكونة معملياً ب ال Mycorhiza Paxillus involuts نتج عنها 75٪ نشاط فى النمو اذا ما قورن بالنباتات التى لم تحقن.

وفيما يلى بعض النقاط التى يجب أن تؤخذ فى الاعتبار فى حالة عدم كفاءة الجذور المتكونة معملياً:

- إتاحة الفرص لتكوين مبادىء الجذور فقط داخل المعمل .
- تشجيع تكوين الجذور داخل المعمل بالطريقة المناسبة وذلك عن طريق نقلها الى بيئة سائلة.
- اجراء مرحلة التجذير كلها خارج المعمل فى التربة أو اى وسط آخر مناسب . وقبل التجذير يفضل غمس الافرع المتكونة معملياً فى محلول اوكسين مباشرة لتشجيع تكوين الجذور . وهذه الطريقة غير مناسبة لجميع الأنواع النباتية.

ملاحظات يجب اتباعها أثناء اجراء عملية الأقلمة :

1- لتفادى حدوث التلوث بالفطريات او البكتريا يجب التخلص نهائياً من الاجار وهو مادة التصلب والمحتوي على السكر المضاف للبيئة وذلك بشطف النباتات جيداً قبل النقل الى بيئات الزراعة المناسبة.

2- استخدام بيئة او وسط زراعة معقم بالبخار او تعقيم باشعة جاما ولو انه فى الواقع لا يتم اتباع هذا التعقيم .

3- التخلص نهائياً من مسببات الامراض مثل الحشرات والبكتريا والفطريات حيث ان النباتات ناتج المعمل دائماً ما تكون ضعيفة رقيقة.

ويمكن التخلص من الفطريات وذلك بمعاملة النباتات ب 0.15-0.25٪ من مركب Previcur-N وذلك عقب نقل هذه النباتات مباشرة الى الخارج ولتحسين نمو النباتات الناتجة من زراعة الانسجة ويجب اجراء عملية التجذير فى بيئة قليلة المحتوى من املاح العناصر الكبرى والصغرى (نصف تركيز املاح العناصر الكبرى والصغرى).

- يمكن كسر سكون النباتات المتكونة وذلك باعطاء النباتات معاملة برودة.

البيئات المستخدمة لأقلمة النباتات :

من أفضل المخاليط والبيئات التى تستخدم فى زراعة النباتات الناتجة من زراعة الانسجة الآتى :

- القرنفل (Pert pellets(Raspbey Jiffyiy's.
- بيت موس – رمل – بيرليت بنسبة 3 : 1 : 4٪ (اصول الفاكهة).
- بيت موس – بيرليت – تراب Pumicel – **غير ميكيوليت** (النباتات الخشبية).
- بيت موس – بيرليت –Sawdust غير ميكيوليت (نباتات خشبية).
- بيت موس وبيرليت بنسبة 1 : 1 (Blachberry , apple).

المواصفات المطلوب توافرها فى البيوت المحمية (صوب الأقلمة):

يجب ان تزود الصوب بالاتي:

- الرى الرزازى (Mist) او الضباب (Fog).
- البنشات الخاصة لوضع اوعية زراعة الشتلات الناتجة .
- نظم اجهزة للتحكم فى نسبة الرطوبة داخل الصوبة.
- نظام لرفع درجة الحرارة (Heating system) .
- نظام للتبريد (Cooling pad system) .
- شبكة محكمة لمنع دخول الحشرات (Insect Proof nets).
- التحكم فى طول الفترة الضوئية (Photopreiod).
- نظام للتظليل للتحكم فى شدة الاضاءة.

تنوع وإختلاف النباتات الناتجة من بعض طرق الإكثار بإستخدام تقنية زراعة الأنسجة

تنوع واختلاف النباتات الناتجة من بعض طرق الاكثار باستخدام تقنية زراعة الانسجة

Somaclonal Variation

أ. د. مهدية فريد نصر
استاذ باحث ورئيس وحدة زراعة الانسجة
مركز بحوث الصحراء

لوحظ أن باستخدام بعض الاكثار بواسطة تقنية زراعة الانسجة مثل :

- تكوين الافرع العريضة Adventitious shoot formation
- زراعة الكالس Callus culture
- زراعة معلق الخلايا Cell suspension culture
- زراعة البروتوبلاست Protoplast culture

تشجع من فرصة حدوث تنوع واختلاف وراثي وتكوين طفرات (Genetic variation and mutations) فى النباتات الناتجة من هذه الطرق السابقة الذكر. ويستخدم هذا الاصطلاح لوصف تنوع وراثى يتم نقله جنسياً للاجيال المتتالية من الخلايا، وهناك فرق هام بين الطفرة (mutant) والتغير فى التركيب (variant) كاصطلاحين يعبران عن حدوث اختلاف فى تركيب النباتات الناتجة معملياً.

فالطفرة mutant تطلق على عملية نقل الصفة التى تسبب فى حدوث التغيير باستخدام قوانين الوراثة المعروفة، أما الاصطلاح variant هو الاختلاف فيطلق على النباتات التى حدث فيها نقل للصفة التى احدثت التغيير الملاحظ وكان انتقال هذه الصفة trait بطريقة غير معروفة ويطلق على هذا النوع من الاختلاف Somaclonal variation

هناك ايضاً نوع آخر من الاختلافات يطلق عليها Epigenetic variation وتتكون هذه الاختلافات نتيجة لحدوث تغيير فى تعبير الجين gene expression وهذا النوع من الاختلافات ينتج عنه تغير فى الشكل الظاهرى للنباتات الناتجة ولا يعتبر متوارث hereditary .

أمثلة على الاختلاف الظاهرى للنباتات Epigenetic variation .

1- النباتات الناتجة معملياً وخالية من الامراض الفيروسية اذا ما قورنت بالنباتات الحاملة لهذه الامراض .

2- تكوين نباتات متزاحمة سميكة الافرع نتيجة لاستخدام مركبات السيتوكينينات او الاكسين واضافتها الى بيئة الزراعة.

3- تكوين نباتات مصابة بمرض فسيولوجى يسمىVitrification .

4- تكوين نباتات مختلفة فى عدد وشكل الثغور وسمك طبقة الكيوتين الشمعية نتيجة لنمو النباتات معملياً داخل انابيب وارتفاع نسبة الرطوبة بدرجة كبيرة.

وقد امكن خلال السنوات الاخيرة تحديد العوامل المؤثرة على امكانية تكوين هذه الطفرات وتتابع تكوين هذه الطفرات اثناء الاكثار المعملى ومن هذه العوامل :

1- الطريقة المستخدمة فى الاكثار الخضرىThe method of vegetative propagation

2- اذا كان النبات المستخدم عبارة عن كيميراIf the plant used is a chimera

3- نوع منظم النمو المضاف للبيئةThe type of regulator in use

4- نوع النسيج المستخدم فى الزراعة The type of tissue used

5- المنفصل النباتى المستخدم فى بدء الزراعة المعملية فى المرحلة الاولى

The starting material

6- عدد مرات النقل المعملى للاجزاء المنزرعة

The number of times subcultured

وتعتبر ظاهرة الSomaclonal variation ظاهرة هامة جداً خاصة فى حالة النباتات التى تظهر اختلافاً بسيطاً فى الظروف العادية او النباتات التى لا تظهر اى اختلاف ومن الصعب حدوث تباين فى النباتات الناتجة منها وفى هذه الحالات فان مربو النباتات يستفيدون من هذه الظاهرة فى تحسين هذه النباتات.

وكان اول من تنبه الى ظاهرة ال Somaclonal variation هو العالمButenko

ومجموعة من العلماء فى عام 1967 حيث لاحظوا هذه الظاهرة على النباتات الناتجة من مزارع كالس نبات الدخان Tobacco .

تلى ذلك العالمان Skocroft, Larkin عام 1981. حيث قاما بتجميع الدراسات الخاصة بشرح وتوضيح هذه الظاهرة وقد تم افراد مساحة لهذه الظاهرة كجزء من الدراسات التى تجرى على زراعة الانسجة ومنذ ذلك الوقت وقد قدمت الكثير من الكتابات التى وضحت ولخصت الاختلافات بين النباتات الناتجة من مزارع الانسجة

(Scow croft et al , 1983, 1985, 1987 , Evans et al 1984 , Hammerschlag, 1984 a, 1990 a and Bajaj, 1991.

ومن اهم النتائج التى اسفرت عنها ظاهرة ال Somaclonal variation تكوين أصناف جديدة لبعض النباتات مثال ذلك :

- اصناف من السلري Celory
- اصناف جديدة من البطاطا Sweet potato

وقد نال كل من العلماء C.E. Flick, P.A. Evan, W.R. Sharsp وكانوا يعملون ب Plant Technology Corp. بنيوجيرسى بالولايات المتحدة جائزة عن دراسة تقدموا بها بعنوان :Generations of Somaclonal Non-Mendelian Variants

وتعريف ظاهرة ال somaclonal variaion من وجهة نظر Scowcroft و Larkin عام 1981 هى الاختلاف الناتج فى النباتات التى تكشفت ونتجت من تعرض جزء من النبات لدورة اكثار معملى تمر بجميع مراحل الاكثار المعملى هذا الجزء المنزرع الى ظروف معينة .

التحورات الوراثية التى تسبب حدوث ال Somaclonal Variation

- تغير عدد الكروموسومات Cromosome number
- تغيير ترتيب الكروموسومات (Orton , 1983)
- تغير عدد الجينات(Brettle, 1986)
- تنشيط العناصر الناقلة(Phillips, 1990)

كيفية تقليل حدوث التباين والحفاظ على الثبات الكروموسومى :

- الانتخاب
- استخدام التركيب المناسب للبيئة الغذائية
- تقليل الوقت بين ال Subcuttures المختلفة.(Evans and Gamborg, 1982)

الانتخاب المعملى In Vitro Section

ومن أهم مزايا الانتخاب المعملى هو امكانية انتخاب بعض النباتات على اساس بعض الصفات المرغوبة حيث يتم الانتخاب لهذه الصفات من اعداد كبيرة من الخلايا المنتظمة.

ويؤخذ على نظام الانتخاب الآتى :

- يحتاج نظام الانتخاب الى وقت كبير لحل كثير من المشاكل فلابد من ايجاد مركب نشط ومؤثر فى حالة الانتخاب للمقاومة للامراض .
- لا بد من توفر نظام لانتاج النباتات باستخدام زراعة الانسجة وذلك باستخدام اى منفصل نباتى سواء كان خلية او نسيج او اى منفصل نباتى آخر.
- لابد من توفر ارتباط وتلازم ما بين التعبير عن الصفة المرغوبة على مستوى الخلية وعلى مستوى النبات الكامل .
- وقد تظهر بعض الصفات الغير مرغوبة عند اعادة عملية الانتخاب مثل صفات ال (Polyploid , Aneuploidy)، وانتخاب الطفرات على مستوى النبات الكامل تعتبر اسهل من الانتخاب على مستوى الخلية.

ويستخدم الانتخاب على مستوى الخلية فى حالة عدم توفر التعبير عن الصفة المرغوبة على مستوى الخلية وعلى مستوى النبات الكامل .

ولا زال استخدام ال Somaclonal variation فى مراحله الاولى من حيث مدى مساهمته فى تحسين انتاجية اشجار الفاكهة المعمرة . فيما عدا بعض الحالات التى ثبت فيها امكانية توارث ظاهرة ال Somaclonal variation اى الصفة الغريبة المرغوبة

مثال ذلك الدراسات التى اجريت على Thornless blackberry Loganberry والفراولة Strawberry .

التطبيقات الممكنة لاستخدام ظاهرة ال Somaclonal variation

لتحسين انتاجية اشجار الفاكهة :

يمكن الاستفادة من هذه الظاهرة فى ادخال بعض الصفات المرغوبة الى محاصيل الفاكهة المعمرة بهدف تحسين انتاجية هذه الاشجار ومن هذه الصفات :

- عدم تكوين اشواك Thornless
- مقاومة الامراض Disease resistance
- تحمل الملوحة Salt tolerantce
- تحمل الجفاف Drought resistance

ويتطلب ادخال هذه الصفات المزيد من الابحاث والدراسات حتى يتسنى تطابق ثبات التغيير فى الشكل الخارجى مع الثبات الوراثى لتواجد هذه الصفات وتكون النباتات الناتجة معملياً وحاملة لهذه الصفات ثابتة وراثياً ويمكن توارثها بين الاجيال المتتابعة.

طرق قياس ودراسة الثبات الوراثي للشتلات والنباتات الناتجة عن زراعة الأنسجة

طرق قياس ودراسة الثبات الوراثي للشتلات والنباتات الناتجة عن زراعة الأنسجة

أ.د. سامى عبد العزيز نصر- رئيس وحدة تربية النباتات
قسم الأصول الوراثية - مركز بحوث الصحراء

فى ظل التقدم الهائل فى تقنيات تحسين النباتات والشتلات سواء فى الحاصلات البستانية أو المحاصيل الحقلية يبرز دور زراعة الأنسجة فى سرعة الحصول على جيرمبلازم مناسب بتراكيب وراثية احادية أو أصيلة أو خليطة مع المحافظة عليها من جيل لآخر. كما تبدى دراسات تحسين التحمل لظروف الاجهاد البيئى والمقاومة لبعض الامراض والحشرات من خلال الدراسات المعملية تناسق يصعب التوصل اليه بالبرامج التقليدية. بالاضافة الى امكان الحصول على بعض النواتج الثانوية من الكالوس مباشرة لبعض التراكيب الوراثية التى يلزم المحافظة عليها وبدون تغير يسىء الى معدل تفاعلها مع الظروف البيئية ويمكن دراسة درجة ثبات ناتجات زراعة الأنسجة بواسطة :

1- الكشافات الجزيئية Molecular Markers

تؤدى معاملة كالوس النباتات المختلفة بالمطفرات الطبيعية والكيميائية او تعريضه لبعض العوامل الانتخابية (مثل التركيزات العالية من الاحماض الأمينية او اشباه الاحماض الأمينية) يؤدى الى قتل جميع خلايا الكالوس ماعدا تلك المقاومة والتى يتم انتخابها مباشرة - وبتكشف مثل هذه الخلايا الى نباتات كاملة يمكن الحصول منها على طفرات مفيدة ويلزم التأكد من ثباتها الوراثى وخاصة المواقع الطافرة من الحامض النووى DNA وتعبيرها الجينى . وتتيح تقنية زراعة الانسجة تكرار الدورات الانتخابية المتتالية تحت بيئات اختبارية متباينة ومحتوية على عوامل اجهاد بيئى مختلفة (مثل تركيزات متدرجة من الملوحة او درجات مختلفة من الحرارة ..... الخ.

كما يستفاد من تقنية زراعة الانسجة فى تنمية نواتج تطبيقات الهندسة الوراثية مثل اكتشاف الجينات والقطع الكروموسومية وعزلها وتداولها بطرق التحول الوراثى Genetic Transformation(بالحقن الدقيق Microinjection او باستخدام بعض انواع بكتيريا

Agrobacterium أو الجراحات الدقيقة للكروموسومات Microdissection) ومن الامثلة لذلك ما ذكره (1989) Hille et al عن نقل احد جينات البكتريا Bacillus thuringiensis الى بعض خلايا الطماطم وبتكشفها من خلال تقنية زراعة الانسجة لتنتج نباتات مقاومة لتغذى يرقات بعض الحشرات عليها حيث ان الجين المنقول مسؤول عن تكوين بروتين سام لمثل هذه الحشرات.

ومما يعاب على مثل هذه الطرق انه يتم تعيين ونقل جين واحد او عدد محدود من المواقع الوراثية فى وقت واحد ولذلك بدأ كل من Tanksley et al (1988) & Young and Tanksley (1989) فى ابتكار تكنيك استخدام الشظايا المحددة متعددة الاطوال (RFLP) فى رسم الخرائط وتحديد التراكيب الوراثية والذى يمكن بواسطته تعيين مئات المواقع المعلمة فى النبات وعند تحليلها يمكن الوصول الى افضل الاحتمالات لترتيب هذه الجينات ومواقعها على الجينوم وبتتابع الاجيال او دورات نمو مثل هذه التراكيب الوراثية يمكن التأكد من ثبات هذه الجينات المعلمة ضمن الهيئة الكروموسومية للنبات . ولتفادى محددات استعمال المواد المشعة بطريقة RFLP يفضل البعض اتباع طريقة تفاعل سلسلة البوليميريز (PCR)Polymerase Chain Reaction أو طريقة تضخيم مناطق عشوائية من ال DNAوالتى تعتمد على استخدام انزيم بلمرة Taq DNA Polymerase تم الحصول عليه من احد انواع البكتريا البحرية المحبة للحرارة حيث يتم رفع وخفض درجة الحرارة وذلك فى دورات متعاقبة وفى وجود عديد من القواعد النتروجينية اللازمة لبناء نسخ عديدة من قطعة الDNAالمرغوبة (Random amplified polymorphic DNA RAPD) والتى تعطى فرصة اكبر فى استخدام اكثر من بادىء بطريقة عشوائية للتعرف على مدى الاختلافات على مستوى قطعة صغيرة من المادة الوراثية بين العينات محل الدراسة والتحليل .

كما يمكن استخدام تقنيات التفريد الكهربىtechniques electrophoresis للبروتينات الكلية الذائبة او الانزيمات لأوراق او بذور النباتات فى عمل بصمة وراثية على اساس الطرز البروتينية وذلك بتقطيع جزيئات البروتين الى سلاسل عديدة الببتيد بعد استخلاصها والتى يمكن استخدامها كعلامات مميزة حيث تعتبر سلاسل الببتيد هى الناتج المباشر لوظيفة المادة الوراثية وكذلك المشابهات الانزيمية isozymes والتى ما هى الا احدى صور البروتين المعقدة حيث يرتبط عدد من تحت الوحدات البروتينية لتنتج

جزئ انزيمى نشط او على مستوى الحامض النووى DNAللشتلات والنباتات ناتج زراعة الانسجة لتكون بمثابة علامات مميزة markers لمثل هذه التراكيب الوراثية كمعاملة مقارنة او معاملات ممثلة للاجهادات البيئية المختلفة حيث يتم التفريد الكهربى لبروتين العينة فى صورة شرائط او حزم bandsحسب الوزن الجزيئي لكل سلسلة Polypeptide chain من المركب البروتينى.

وفى النباتات التى تتكاثر لا جنسيا والتى لا يمكن الاحتفاظ فيها باى تركيب وراثى خليط فى نبات فردى ، لا توجد فرصة لتغيير التراكيب الوراثية الا عن طريق الطفرات الجسمية Somatic mutations (مثل الطفرات البرعمية Bud Sports أو الكيميرا Chimera). وبانتخاب مثل هذه الاجزاء الخضريةClonal selection واكثارها باستخدام تقنية زراعة الانسجة وانتاج افراد عديدة تحمل نفس التركيب الوراثى للطفرات المنتخبة. يلزم التأكد من ثباتها الوراثى تحسباً لحدوث طفرات عكسية Reverse mutations او ان يكون التغير الحادث بيئى وليس وراثى كذلك الحال فى الطفرات الموضعية Point mutations او الطفرات الناتجة عن المعاملة بالاشعاع او المطفرات الكيميائية او الهجن الجسمية الناتجة عن الاندماج الخلوى Protoplast Fusion والتى يمكن من خلال دراسة بصمتها الوراثية تتبع ثباتها عبر دورات الاكثار المتتالية.

2- الطرق الاحصائية المناسبة لقياس ودراسة الثبات الوراثى للشتلات والنباتات ناتجة عن زراعة الانسجة :

يمكن اختبار الثبات الوراثى للصفة تحت الدراسة فى ظروف بيئية متباينة « ثمانية بيئات على الأقل » باحدى الطرق الاحصائية المناسبة ومنها Tai (1971), Freeman and Perkins (1971)) & Eberhart and Russell (1966) والتى تعتمد على ثلاثة مقاييس اساسية هى :

1- المتوسط العام على مستوى جميع البيئات .

2- خط الارتداد.

3- الانحراف عن خط الارتداد

وتتميز السلالة الاكثر ثباتاً بمتوسط اعلى من المتوسط العام وقيم الارتداد تساوى الوحدة او قريباً منها والانحراف عن خط الارتداد يكون اقل ما يمكن .

وفى الظروف المعملية يؤدى استخدام بعض البيئات الخاصة بزراعة الانسجة الى تأثيرات طفرية بدرجات متفاوتة لمعظم السلالات مما يجعل الانحراف عن خط الارتداد كبير نسبياً وفى هذه الحالة يوصى بزراعة السلالة عند توفر الظروف المناسبة (أى باتباع خطوات البيئة المثلى لهذه السلالة من بين البيئات تحت الدراسة) ومثل هذه السلالة بالرغم من تفوقها عن صنف أو اصناف المقارنة تكون أقل ثباتاً من التى تبدى انحرافاً أقل عن خط الارتداد.

References:

* Chrispeels, M. J. and D. E. Sadava (1994). Plant, Genes and Agriculture. Jones and Bartlett publishers, Boston, London.

*Eberhart, S. A. and W.L. Russell (1966). Stability parameters for comparing varieties, Crop Sci., 6: 36 - 40.

* Freeman, G. H. and Perkins, J. M. (1971). Environment and genotype - environmental components of variability Vlll. Relations between genotypes grown in different environments and measures of these environments. Heridity, 27 : 15 - 23.

* Hille, J., M. Koomeef, M. S. Ramanna, and P. Zobel (1989). Tomato : a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. Euphytica, 42 : 1 - 23.

* Tanksley, S.D., J. C. Miller, A. Paterson and R. Bernatzky (1988). Molecular mapping of plant chromosomes. In : Gustafson JP.

* Apples R (eds) Chromosome structure and function. Plenum Press. New York. pp 157 - 173.

* Tai, G. C. C. (1971). Genotype stability analysis and its application to potato regional trias. Crop. Sc. 11 : 184 - 190.

* Young, N.D. and S.D. Tanksley (1989). Restriction fragment length polymorphism maps (RFLP) and the concept of graphical genotypes. Theor. Appl. Genet. 77 : 95 - 101.

التجهيزات اللازمة لانشاء معمل لزراعة الانسجة على المستوى البحثي

التجهيزات اللازمة لانشاء معمل لزراعة الأنسجة على المستوى البحثى

د. حسن محمد فاضل الوكيل – مدرس الفاكهة
كلية الزراعة – جامعة عين شمس

المقدمة :

إن لتقنيات زراعة الأنسجة النباتية تطبيقات كثيرة فى مجال الاكثار الخضرى والحصول على اعداد كبيرة من النباتات الخالية من الامراض بشكل عام ، ومن الامراض الفيروسية بشكل خاص . كما لهذه فوائد كثيرة فى مجال تربية النباتات وتحسينها.

وتتطلب زراعة الأنسجة اماكن خاصة ، نظيفة ومحمية من عوامل الوسط الخارجى ، لأن عمليات الزرع فى سائر مراحلها تتم ضمن جو معقم . ولذلك يجب ان يتوفر معمل خاص مجهز بالاجهزة والأدوات الضرورية لزراعة النسج . كما يتطلب اكثار النباتات بالانسجة توافر شروط مناسبة لعملية التقسية حتى تستطيع النباتات الناتجة عن الانسجة أن تتأقلم مع الظروف الجوية الخارجية.

وتختلف مكونات معمل زراعة الانسجة النباتية بحسب الغرض من انشائه (معمل بحثى او انتاجى) بحسب الانواع النباتية المراد اكثارها ، بحسب الاعداد المراد انتاجها، وبحسب طريقة الاكثار المراد استخدامها (زراعة ميرستيم ، زراعة خلايا نباتية ، زراعة بروتوبلاست ....).

يتطلب انشاء معمل نموذجى لزراعة الانسجة النباتية عزله عن الوسط الخارجى بشكل كامل لتخفيض خطر التلوث الممكن أن يصيب الاجزاء النباتية المزروعة الى الحد الأدنى ، يجب ان يتوفر فى معمل الانسجة النباتية المكان اللازم وسائر الاجهزة والأدوات والمركبات الكيميائية والتى يمكن ايجازها بما يلى :

الاحتياجات المكانية لمعمل زراعة النسيج :

تقسم معامل زراعة الانسجة النباتية الى ثلاث مجموعات من حيث الهدف والمساحة.

- معامل بحثية صغيرة الحجم وتكون مزودة بالاجهزة اللازمة للقيام بالبحث الخاص بالنسج.
- معامل انتاجية مصغرة حيث تحتوى على الاجهزة الضرورية لانتاج عدد محدد من النباتات وتوجد عادة فى المشاتل الصغيرة.
- معامل انتاجية كبيرة : تكون مجهزة باجهزة وأدوات كافية لانتاج ملايين الشتلات.

وتقسم ايضاً المعامل البحثية من حيث توزيع الأماكن الى نموذجين :

1- النموذج الأول : ويضم ثلاثة اماكن :

1- غرفة كبيرة : وتشمل المكان المخصص لتحضير المحاليل ، وتخزين المواد الكيميائية ، وتنظيف الزجاجيات ، وتخزينها بالاضافة الى الأجهزة الضرورية لتعقيم الاوساط المغذية.

2- غرفة العزل وزراعة الاجزاء النباتية : تشمل الاجهزة والادوات الضرورية لفصل وزراعة الاجزاء النباتية ضمن جو معقم ، وتحوى اجهزة العزل الجرثومى مع دواليب نظيفة لتخزين الأدوات والانابيب المحضرة والمعقمة.

3- غرفة النمو : وهى غرفة نظيفة تحتوى على حوامل ورفوف لوضع الانابيب عليها وفى هذه الغرفة يجب التحكم بالظروف المناخية (حرارة ، إضاءة ، ورطوبة ، تهوية) ودراستها حسب النوع النباتى المراد اكثاره.

2- النموذج الثانى : يتم توزيع العمليات التى تجرى فى معمل زراعة الأنسجة كل منها فى غرفة مستقلة وفق ما يلى :

- غرفة (1) لتحضير المحاليل : تزود الغرفة بمصادر للكهرباء ، وماء ، وغاز ، وعدة مغاسل ، ومجموعة كبيرة من رفوف التخزين للزجاجيات ، كما تزود بالأجهزة والأدوات اللازمة لتحضير المحاليل.

- غرفة (2) للمواد الكيميائية : يفضل ان تكون مظلمة قليلاً ، وبعيدة عن الحركة السريعة حيث توضع فيها الموازين الحساسة اللازمة للعمل .

- غرفة (3) للغسيل والتعقيم : تحتوى هذه الغرفة على عدة مغاسل ، واجهزة تعقيم مثل اوتوكلاف وافران تجفيف . وتزود بمصدر كهربائى عالى القدرة لتشغيل

الاجهزة الكهربائية المتوافرة ، ويراعى أن تكون هذه الغرف بعضها بجانب بعض .

- غرفة (4) وتسمى غرفة العزل : توضع فيها دواليب ورفوف لوضع الانابيب والادوات قبل زراعتها . وتوضع فى هذه الغرفة بشكل رئيسى اجهزة العزل الجرثومى . ويجب أن تكون غرفة العزل معزولة بشكل جيد عن الوسط الخارجى، وخالية من النوافذ ، وفى كثير المعامل توضع غرفة العزل الصغيرة بداخل غرفة كبيرة.
- غرفة (5) غرفة النمو يمكن ان تحتوى معامل زراعة الانسجة على عدة غرف للنمو ، وحسب كبر المعمل وحجمه الانتاجى . ويوجد بها عادة رفوف مع إضاءة اصطناعية ، كما تزود باجهزة تحكم للاضاءة والحرارة والرطوبة ، ويجب ان تكون غرف النمو نظيفة ، معزولة عن الوسط الخارجى وخالية من النوافذ.
- غرفة (6) غرفة مبردة : وهى ضرورية لتخزين المحاليل الاساسية ، والاوساط المغذية المحضرة ، والانابيب المزروعة المعدة للتخزين على درجات حرارة منخفضة ، والنباتات النامية المراد الاحتفاظ بها لفترة من الزمن . كما تستعمل الغرفة لتخزين بعض المواد الكيميائية مثل الهرمونات والفيتامينات .

ويجب ان يتوفر فى المعمل ايضاً ، غرفة خاصة بالعمال ، وغرفة خاصة بالادارة ، وتزود المعامل البحثية ايضاً التقنيات الضرورية مثل غرفة خاصة بالتحاليل الكيميائية ، غرفة خاصة بعمل المقاطع التشريحية وفحصها Histology ، وغرفة خاصة بالتصوير (لأخذ الصور وتحميضها وسحبها).

الاجهزة الواجب توافرها فى معمل زراعة الأنسجة Equipments :

يجب ان تتوفر فى معمل زراعة الأنسجة الاجهزة التالية والتى لا يمكن الاستغناء عنها :

- الموازين : ميزان حساس دقيق (حساسية اجزاء من الملغرام).
- ميزان ذو حساسية عادية اجزاء من الغرام .
- اوتوكلاف Autoclave كبير قد يكون أفقياً او عمودياً لتعقيم الانابيب والأوساط المغذية.

- جهاز قياس درجة الحموضة PH meter
- جهاز هزاز Shaker

جهاز تقطير الماء

- جهاز التحريك المغناطيسى
- جهاز توزيع البيئة
- مجاهر ، ومكبرات ذو تكبير عادى (40 مرة).
- حاضنات معملية كبيرة Incubator سعة 200 – 400 لتر مزودة باضاءة واجهزة تحكم للحرارة والرطوبة.
- ثلاجة كبيرة (عدد 2 على الأقل أو غرفة مبردة).
- غسالة ماصات.
- غلاية
- مجفف زجاجى عدد 2 على الأقل.
- موائد متحركة معملية ذات دواليب.
- غرف نمو محكمة (إضاءة ، حرارة ، رطوبة).

هذا وتجدر الاشارة الى وجوب توافر بعض الاجهزة الاخرى ذات الاستعمالات الخاصة ، مثل الاجهزة الخاصة بالتشريح Hisyology(ميكروتون دقيق ، حاضنات ، اجهزة تثبيت المقاطع). وبعض الاجهزة الضرورية للتحاليل الكيميائية الضرورية للتصوير.

الادوات المعملية والزجاجية الواجب توافرها :

Glasswar and Accessories

يجب أن يزود المعمل بعدد كاف من الادوات الزجاجية حتى يتم القيام بالتجارب الخاصة بزراعة النسج ومن الأدوات المعملية والزجاجية اللازم توافرها نذكر :

- انابيب اختبار مقاس 25 × 200 ملم او 25 × 150 ملم عدد/3000/انبوبة قابلة للتعقيم بدرجات الحرارة المرتفعة.
- حوامل معدنية : لوضع الانابيب عليها بعد زراعتها فى غرف النمو ، لا يقل عن 100 حاملاً.

- انابيب اختبار صغيرة لا يقل عن 400 انبوب تستخدم لزراعة المرستيم.
- اطباق بترى ، قطر 60 مم وقطر 85 مم لا يقل عن مائة طبق من كل مقاس.
- زجاجيات للزرع ، دوارق مخروطية ، وزجاجيات باشكال واحجام مختلفة للزرع.
- دوارق معيارية ومخروطية من مختلف الاحجام من 1 - 2 - 4 لترات ، 500م ، 250 مل ، 150 مل ، 100 مل ، 50 مل ، وباعداد مناسبة حسب حجم العمل.
- ماصات باحجام مختلفة 0.1 مل ، 0.2 مل ، 1 مل ، 2، 5، 10 مل بمعدل لا يقل عن 20 ماصة من كل حجم.
- مخبار مدرج زجاجى 10 ، 25 ، 50، 100 ، 250 ، 500 ، 1000 مل بمعدل 10 قطع من كل حجم.
- كاسات زجاجية سعة 500 ، 1000 ، 1500 ، 2000 مل.

المركبات الكيميائية :

1- الاملاح المعدنية الضرورية لتحضير الأوساط الغذائية ونذكر :

نترات الامونيوم	$NH_4\ NO_3$
نترات البوتاسيوم	KNO_3
نترات الكالسيوم المائية	$Ca\ (NO3)4H_2O$
سلفات البوتاسيوم	$K_2\ SO_4$
سلفات الماغنسيوم المائية	$MgSO4\ 7H_2O$
سلفات المنجنيز المائية	$MnSO_4\ H_2O$
سلفات الزنك المائية	$ZnSO_4\ 7H_2\ O$
سلفات النحاس المائية	$CuSO_4\ 5H_2\ O$
سلفات الامونيوم	$(NH_4)_2\ SO_4$
يوديد البوتاسيوم	KI
كلور الكالسيوم المائية	$CaC1_2\ 2\ H_2\ O$
كلور الكوبالت المائية	$CoC1.\ 6H_2\ O$
فوسفات احادية البوتاسيوم	$KH_2\ PO_4$

حمض البوريك $H_3 BO_3$

فوسفات الصوديوم المائية $NaH_2 PO_4 H_2 O$

فوسفات الحديد المائية $FeSO_4 7H_2 O$

شيلات الصوديوم (ايتلين ثنائى الامين ، فرسينات الصوديوم) $Na_2 EDTA$

شيلات الحديد (فرسينات الحديد) FeNaEDTA

2- الفيتامينات VITAMINS

- الثيامين
- ميواينوزيتول
- حمض النيكوتين
- البيريدودكسين
- حمض الاسكوربيك
- البيوتين

3- الاحماض الأمينية مثل :

- الجلوتامين
- ادنين
- جلايسين
- بروالين

4- مركبات الطاقة مثل :

- السكروز Sucrose
- الجلوكوز Glucose
- الفركتوز Fructose
- سوربيتول Sorbitol

5- الهرمونات النباتية :

الاوكسينات:

- اندول اسيتيك اسيد IAA
- اندول بيوتيرك اسيد IBA

- نفثالين استيك اسيد NAA
- دى كلوروفينوكسى استيك اسيد 2,4-D
- السيتوكينينات
- الكينيتين K
- الزياتين Z
- البنزيل امينوبيورين BAP
- ايزوبنتيل ادنين 2ip
- الجبرالينات
- حمض الجبريليك الثالث GA_3
- وفى بعض الاحيان يمكن استخدام انواع اخرى من الجبرالينات مثل GA4+7 وبعض الاحيان مثبطات النمو مثل حمض الابسيسيك (ABA)

6- المركبات العضوية الاخرى : مثل الاحماض العضوية ، كحمض الستريك ، حمض الاسكوربيك ولا بد من توفر بعض المستخلصات النباتية كسائل جوز الهند ، مستخلص الشعير ، عصير الطماطم ، ويجب توافرها عند الحاجة لها.

المواد الكيميائية المستخدمة فى تعقيم الاجزاء النباتية :

1- المعقمات الكيميائة مثل :

- هيبوكلوريت الصوديوم
- هيبوكلوريت الكالسيوم
- برمنجنات البوتاسيوم
- كلوريد الذئبق
- الكحول المطلق

2- المعقمات الجاهزة مثل :

- كلوروكس Chorox

الأدوات اللازمة لعملية الزرع :

- يجب ان يزود المعمل بالادوات الضرورية لعملية زراعة الاجزاء النباتية مثل :

- الملاقط باحجام واطوال واشكال مختلفة.
- المشارط صغيرة وكبيرة.
- ابر للتشريح .
- شفرات .

وتجدر الاشارة اخيراً الى انه يجب أن يتوفر فى المعمل ايضاً سائر الادوات والمواد الكيميائية اللازمة للقيام بالدراسات الجانبية مثل عمل مقاطع تشريحية ، اجراء الدراسات والتحاليل الكيميائية ، والتجارب الفسيولوجية.

كما يجب ان تتوفر الادوات والمواد الكيميائية اللازمة لطبع وتحميض الصور المراد أخذها فى حال احتواء المعمل على غرفة تصوير . وهذا متوفر عادة فى المعامل البحثية الكبيرة.

ولا بد من الاشارة اخيراً الى انه يجب اقامة المعمل فى منطقة محمية ، وبعيدة عن الطرقات العامة ، ونظيفة تحتوى على مصدات رياح ، ويجب ان توجد فى الموقع المختار مصدر للماء بشكل دائم.

ملحقات معمل زراعة الأنسجة :

يتبع معامل زراعة الانسجة النباتية عادة البيوت المحمية المزودة باجهزة تحكم بالاضاءة والحرارة والرطوبة والرى والتهوية، تستخدم هذه البيوت المحمية (بيوت زجاجية ، وبيوت بلاستيكية) فى تقسية النباتات وتربيتها ، كما يتبع المعامل عادة ارض زراعية لتنمية الشتلات حتى الى الحجم المناسب للتسويق.

دراسة جدوى فنية واقتصادية
لتجهيز معمل زراعة الأنسجة لانتاج فسائل النخيل

المقدمة

يمكن عرض الجدوى الفنية والاقتصادية لتجهيز معمل زراعة الأنسجة لانتاج النخيل متضمناً للنواحى الفنية للانتاج من حيث الوقت اللازم للاكثار وكمية الانتاج المتوقع وكذلك يمكن عرض مبسط لانشاء وتشغيل معمل زراعة أنسجة طاقته الانتاجية بسيطة فى حدود حوالى تسعة الى عشرة آلاف فسيلة سنوياً وتكاليف الانتاج وصافى الايراد.

أولاً: الجدوى الفنية :

يجرى فصل المرستيمات الطرفية للفسائل المناسبة من حيث الوزن والعمر للأصناف المتميزة خلال الفترة من اكتوبر الى مارس من العام اى حوالى ستة شهور (24 اسبوع).

ويفترض استخدام 500 فسيلة خلال الفترة المذكورة سابقاً بواقع حوالى 20 عشرون فسيلة اسبوعياً يمكن زراعتها خلال فترة 24 شهراً . وتمر هذه المرستيمات المفصولة والمزروعة على بيئة مناسبة بمرحلة تحضيرية تقدر بحوالى ستة شهور لتكون صالحة للنقل الى بيئة الاكثار السريع التى تستغرق ستة اسابيع عليها لامكانية نقلها على بيئة جديدة للاكثار السريع ويوصى بثلاث نقلات فقط على بيئة الاكثار السريع للحفاظ على التركيب الوراثى للصنف .

وعادة ما يكون معدل التضاعف على بيئة الاكثار السريع للنبيتات خلال النقلة الواحدة حوالى 3 – 5 اضعاف ، اى يصل العشرون مرستيم بعد حوالى عشرة شهور من زراعتها ونقلها ثلاث نقلات على بيئة الاكثار السريع حوالى 540 نبات كامل.

وبذلك خلال الستة شهور التالية للفترة التحضيرية يكون اجمالى النباتات الناتجة حوالى 12000 اثنى عشر الف نبات . ويقدر الفاقد خلال خطوات الاكثار الى نهاية الأقلمة حوالى 25٪ وبذلك يصل الانتاج الى حوالى 9000 تسعة الاف نبات كامل بالصوبة بعد الأقلمة.

ثانيا : الجدوى الاقتصادية :

التكاليف التقريبية لعناصر تكاليف انشاء وتشغيل معمل زراعة أنسجة تجارى :

العناصر الأساسية للمشروع :

1- المبانى
2- الاجهزة
3- تجهيز غرفة التحضين
4- الزجاجيات
5- الكيماويات

أولاً : المبانى :

يلزم مبنى مساحته 120م2 يتكون من دور واحد يشتمل على مكتب ومكان تحضيرى ومكان لتجهيز وتحضير البيئة وغرفة زراعة وغرفة تحضين.

كما هو مبين بالشكل رقم (1).

ويكون ملحق بهذا المبنى صوبة مساحتها 10 × 10م عبارة عن ساران (شبك اسود على حوامل من الحديد) بها جهاز ضباب وأغطية بلاستيكية وحوامل حديدية . وتقدر تكلفة المبنى بحوالى 50000 خمسون الف جنيها ، الصوبة 25000 خمسة وعشرون الف جنيها.

ثانياً : الاجهزة :

	بالجنيه
1- عدد 2 كابينة زراعة	50000 .-
2- جهاز قياس ال PH	5000 .-
3- اوتوكلاف (جهاز تعقيم) سعة 120 لتر	7000 .-
4- ميزان حساس اربعة ارقام عشرية	7000.-
5- ميزان رقمين عشريين	3000.-
6- جهاز نزع الايونات طاقة 60 لتر/ساعة	5000.-
7- مقلِّب مغناطيسى بسطح ساخن عدد 2 جهاز	6000.-

8- لمبة اشعة فوق البنفسجية	2000.-
9- ثلاجة 10 قدم	2000.-
10- ديب فريزر	2000.-
11- 3 جهاز تكييف سبليت	15000.-
12- جهاز تقطير قدره 8 لتر/ساعة	4000.-
اجمالى تكلفة الاجهزة	108000.-

(مائة وثمانية الف جنيه)

ثالثاً : غرفة التحضين :

وتم تصميمها على ان تحتوى على حوامل من الصاج يقدر عددها ب 12 وحدة كل منها يتكون من اربعة ارفف كل رف به 3 لمبات من الفلورسنت غير المبعث للحرارة ويسمى Cool white lamp والرف الواحد ابعاده 60 × 140 سم.

كما هو مبين في الشكل رقم (2)

وتقدر تكاليف التجهيز لغرفة التحضين بحوالى 10000 جنيها عشرة الاف جنيها.

رابعاً : الزجاجيات :

وتقدر بحوالى 15000 جنيه (خمسة عشر الف جنيها).

خامساً : الكيماويات :

وتقدر بحوالى 12000 جنيه (اثنى عشر الف جنيها).

الحساب الاجمالى للتكاليف :

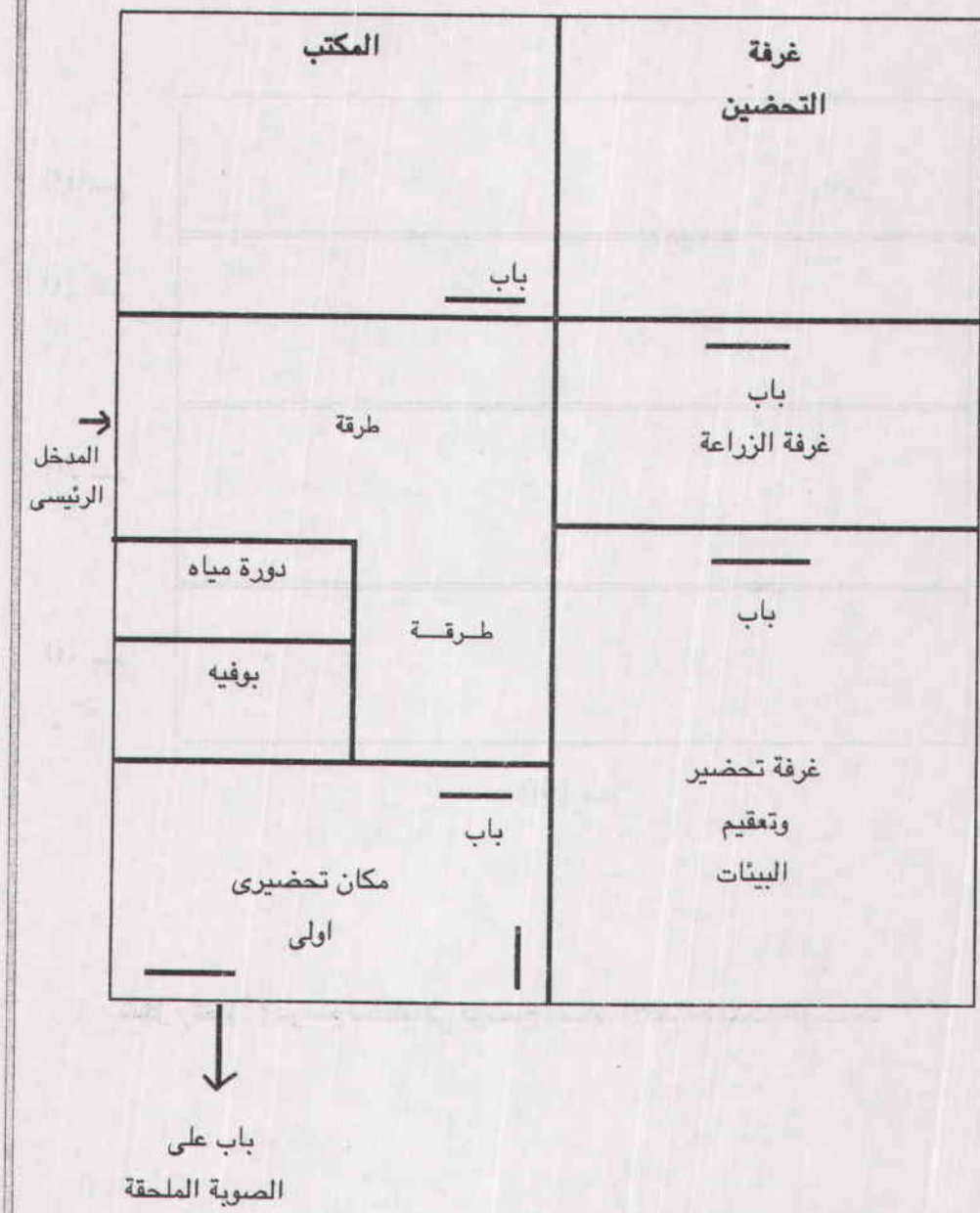
المسلسل	العنصر	التكلفة بالجنيه المصري
اولاً	المباني والمنشآت والصوبة	75000.0
ثانياً	الاجهزة والمعدات	108000.0
ثالثاً	غرفة التحضين وتجهيزاتها	10000.0
رابعاً	الزجاجيات	15000.0
خامساً	الكيماويات	12000.0
	الاجمالي (مائتان وعشرون ألفاً)	220000.0

الطاقة الانتاجية لهذا المعمل بالامكانيات المقترحة تكون :

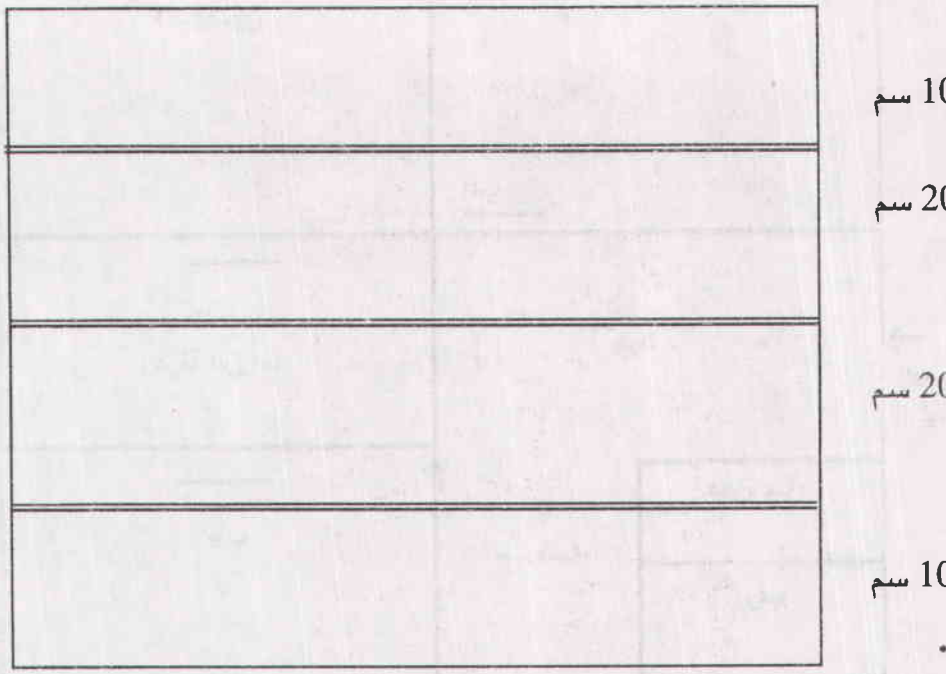
9000 (تسع آلاف) نبات نخيل كامل بعد سنة ونصف من العمل موزعة شهرياً بداية من الشهر السادس من بداية العمل .

وتقدر القيمة التقريبية لهذه النباتات للأصناف المتميزة بحوالى عشرون جنيها للنبات الواحد، باجمالى 180000 (مائة وثمانون الف جنيها مصرياً) خلال ثمانية عشر شهراً.

وتقدر التكاليف الخاصة بالتشغيل بحوالى 80000 (ثمانون الف جنيها) بصافى حوالى 100000 (مائة الف) جنيها ، وتشمل التكاليف الخاصة بالتشغيل : أجور الفنيين والعمال وثمن الفسائل المستخدمة فى الزراعة والكيماويات والزجاجيات المستخدمة وخلافه من مصروفات .

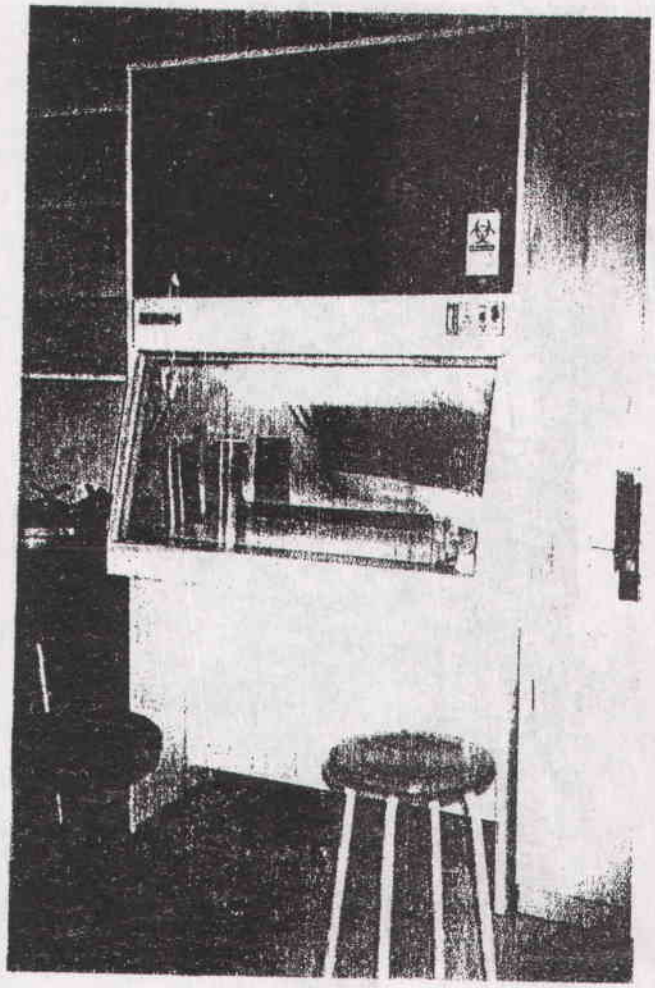


شكل رقم(1): رسم تخطيطى يوضح الاجزاء المختلفة لمعمل زراعة الأنسجة

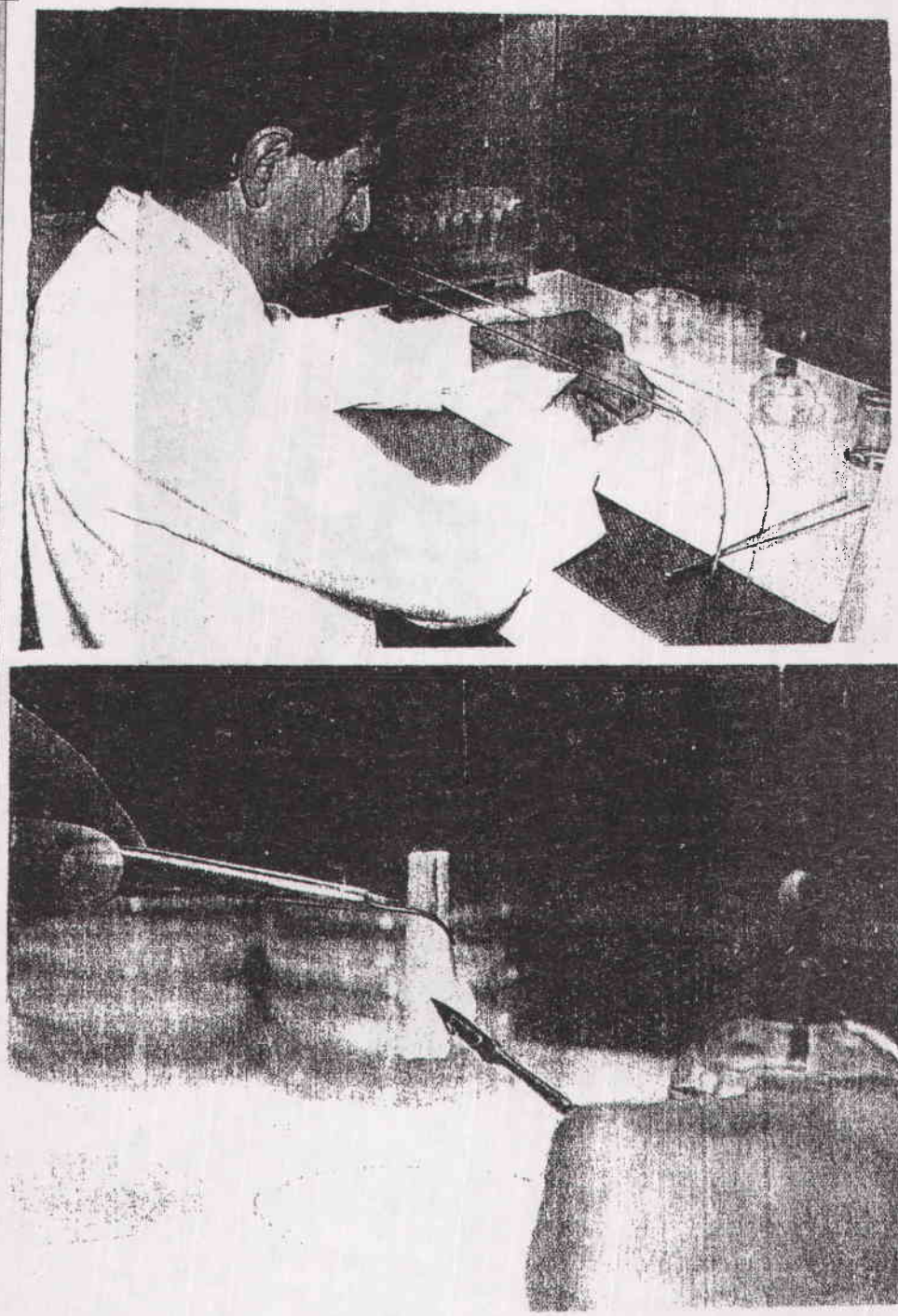


شكل رقم (2) : رسم تخطيطى يوضح لمبات الاضاءة باحد الوحدات

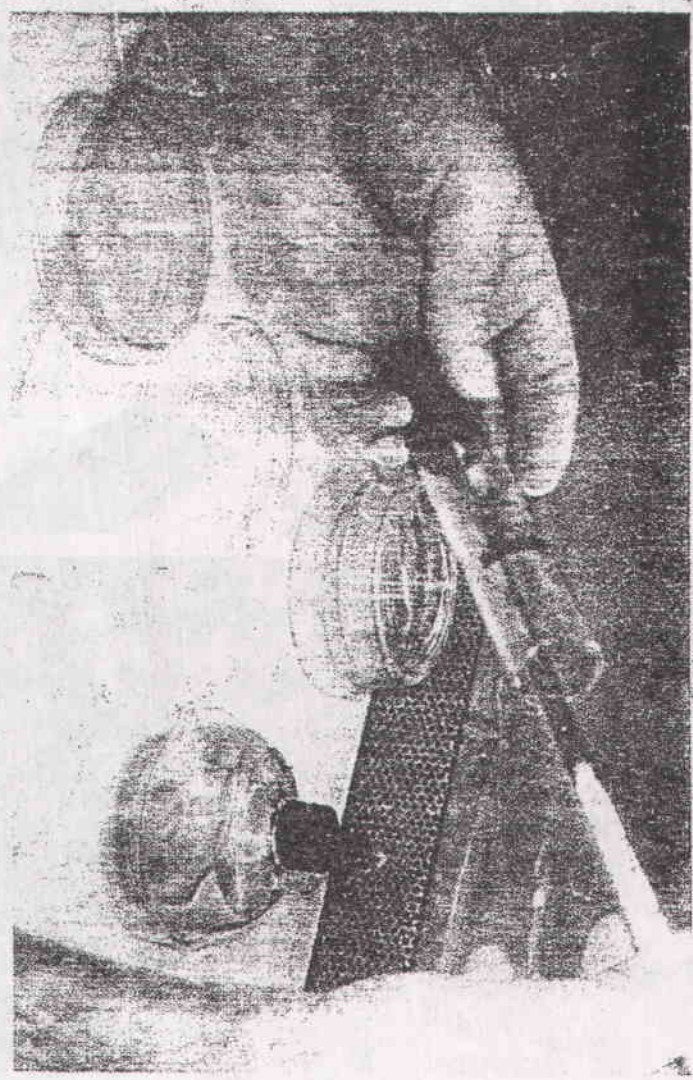
صورة رقم (1) : فسائل النخيل حول الشجرة الأم



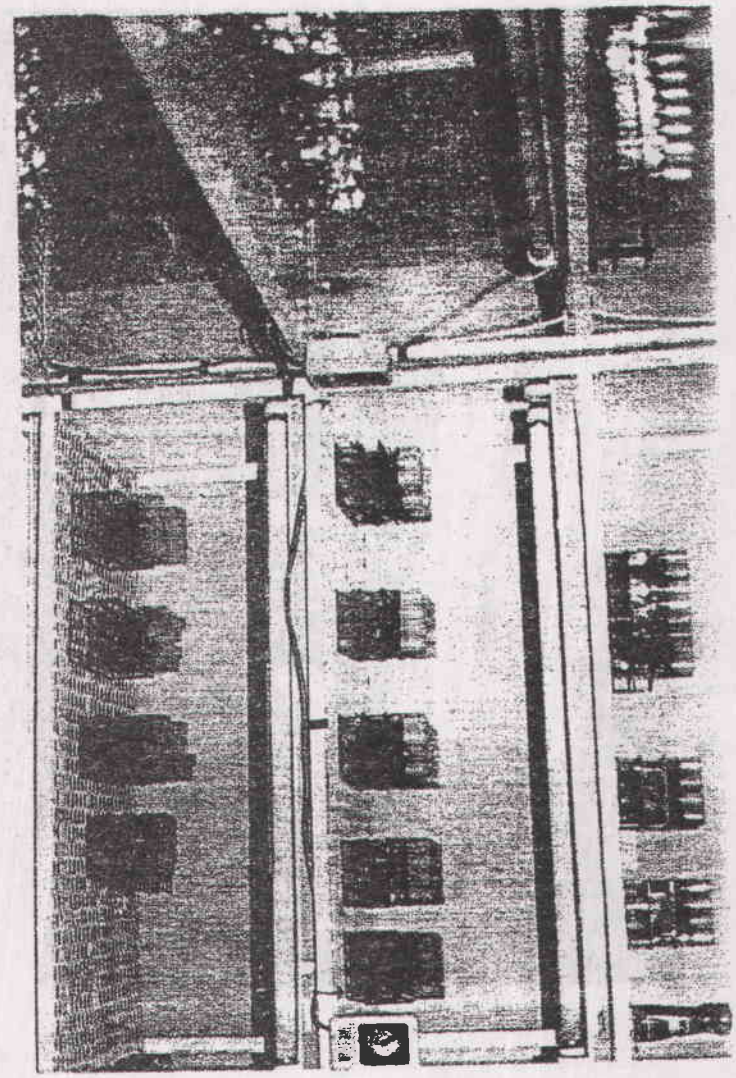
صورة رقم (2) : جهاز العزل الجرثومي



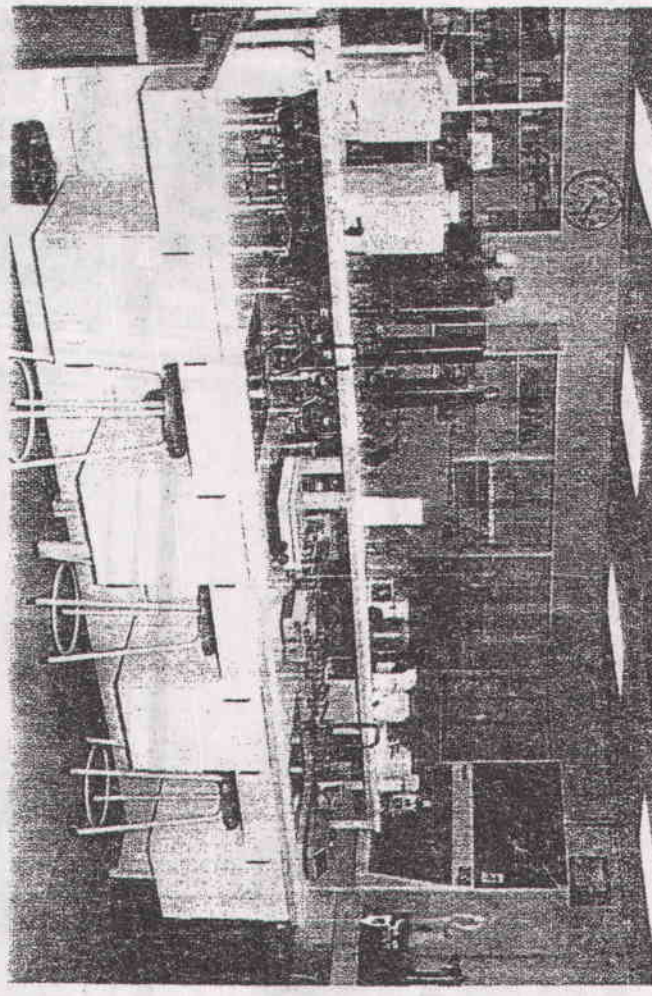
صورة رقم (3-4) : عزل الاجزاء النباتية قبل الزراعة



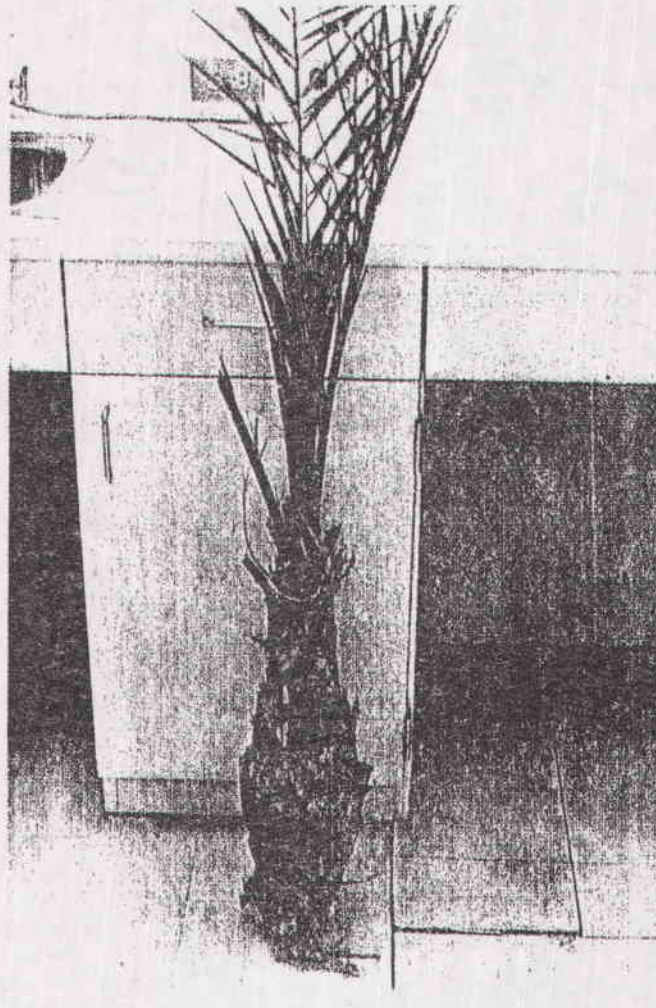
صورة رقم (5) : زراعة الاجزاء النباتية



صورة رقم (6) : غرفة النمو Growth room



صورة رقم (7) : مخبر زراعة الأنسجة النباتية



صورة رقم (8) : فسيلة نخيل جاهزة لعملية الزرع

أهمية إستخدام تقنية زراعة الأنسجة في إكثار النخيل

أهمية استخدام تقنية زراعة الانسجة فى اكثار النخيل

أ.د/ حسين الحناوى - خبير الانتاج النباتى
مدير المكتب الاقليمى للمنظمة بالقاهرة بالتكليف

تمهيد :

تنتشر نخلة التمر فى العديد من بقاع العالم ويعتبر الوطن العربى من اقدم مواطن النخيل فى العالم ولا شك ان لاشجار النخيل أهمية اقتصادية واجتماعية وغذائية للعرب منذ بدء التاريخ ويرجع ذلك الى القيمة الغذائية العالية للتمر (جدول رقم 1) بالاضافة الى المنتجات الثانوية التى تنتج من نخل التمر وهى على سبيل المثال السعف والالياف و الاخشاب التى تستخدم فى بناء المنازل الصحراوية بالاضافة الى استخدام بذور النخيل فى مكونات الاعلاف الحيوانية واستخراج المواد التانينية القابضة والبكتين من ثمار النخيل وغير ذلك من فوائد عديدة ويوضح الجدول المرفق مساحات النخيل فى بعض اقطار الوطن العربى (جدول مرفق رقم 2) ويبين (الجدول رقم 3) الاهمية النسبية للتمور العربية بالنسبة للانتاج العالمى للتمور حيث يوضح هذا الجدول أن التمور العربية تمثل نحو 72٪ من اجمالى التمور المنتجة عالمياً هذا بالاضافة الى جودتها المتميزة وزيادة الطلب العالمى عليها . وجدير بالذكر ان العالم العربى يتميز بتوفر درجات الحرارة ومجموع الوحدات الحرارية والرطوبة النسبية اللازمة لانتاج تمور جيدة (جدول رقم 4) ولنخيل التمر ميزة نسبية بين الاشجار المثمرة المنزرعة فى العالم العربى ويوضح الجدول المرفق (رقم 5) مقارنة بين مدى تحمل بعض اشجار الفاكهة للملوحة فى التربة ومياه الرى مقدرة على اساس درجة التوصيل الكهربائى لمستخلص التربة ويتضح من هذا الجدول ارتفاع درجة تحمل نخيل التمر للملوحة مقارنة بانواع الفاكهة الاخرى مما يؤكد مدى ملاءمتها لظروف الزراعة فى الوطن العربى خاصة فى المناطق الاخرى الحدية وهذا يؤكد اهمية العناية بزيادة انتشار نخلة التمر فى الوطن العربى .

* طبيعة نمو النخيل واكثاره :

- نخلة التمر من النباتات وحيدة الفلقة ثنائية المسكن يمكن ان تتكاثر بواسطة البذرة ويعاب على هذه الطريقة احتمال الحصول على نباتات مذكرة بنسبة 50٪ بالاضافة الى احتمال حدوث انعزالات وراثية تؤدى الى اختلاف النباتات الناتجة من الاكثار البذرى عن الأم وعلى ذلك فانه من المفضل استبعاد هذه الطريقة عند اكثار النخيل.
- يمكن اكثار نخلة التمر عن طريق الرواكيب او الطواعين وهى عبارة عن نموات خضرية تنتج نتيجة لنشاط براعم ابطية ساكنة فى الجزء العلوى من النخلة تنشط فى قواعد اوراق النخيل المركبة تحت منطقة التاج وهى تتكون باعداد قليلة ولا يتكون لها مجموع جذرى الا فى حالة احاطة قاعدتها بصندوق مملوء بتربة مناسبة وريها بصفة منتظمة مع عمل جرح فى قاعدتها لتشجيع انتاج الجذور وعلى ذلك تعتبر هذه الطريقة غير عملية للاكثار لصعوبتها الفنية بالاضافة الى قلة عدد النباتات الناتجة.
- يمكن اكثار النخيل بواسطة الفسائل او الخلفات النامية عند قاعدة الساق نتيجة لنشاط براعم عرضية ساكنة فى المنطقة بين المجموع الجذرى والساق وفى اباط قواعد اوراق النخيل بالقرب من سطح الارض . ويتراوح عدد الفسائل المنتجة من نخلة التمر خلال حياتها من 1 الى 25 فصيلة وهنا يتضح ان هناك تباينا فى عدد فسائل المحتمل انتاجها من نخلة التمر بدرجة كبيرة، وقد ارجع الباحثون هذه الظاهرة الى الاختلافات الوراثية بين الاصناف البستانية للنخيل تؤدى الى الاختلاف فى قدرة تلك الاصناف على اعادة نشاط البراعم العرضية القاعدية الموجدة بها، فعلى سبيل المثال ينتج النخيل البرحى وهو من الاصناف العراقية الجيدة نحو 2 – 3 فسيلة طوال حياته وقد لا ينتج فسائل نهائياً بينما يبلغ عدد الفسائل المنتجة من نخيل الامهات نحو 25 فسيلة طوال فترة حياتها قد تصل الى 40 فسيلة فى حالة استخدام بعض المعاملات الزراعية البسيطة التى تشجع على تنشيط البراعم العرضية القاعدية مثل تكويم التراب حول قاعدة النخلة والرى على فترات منتظمة وازالة الفسائل المتكونة اولا بأول للسماح بتكوين فسائل جديدة.

* استخدام تقنية زراعة الانسجة فى اكثار النخيل :

مما سبق فانه من الواضح أهمية التوجه نحو تقنية جديدة لاكثار النخيل فى اطار المحاور الآتية :

- الحصول على نباتات من الاصناف التى لا تنتج اعداد كافية من الفسائل باعداد كبيرة على ان تكون مشابهة للام.
- الحصول على اعداد كبيرة من فسائل النخيل فى فترة قصيرة لتغطية الحاجة الى اعداد كبيرة من الفسائل لزراعتها ولمواجهة ارتفاع اسعار هذه الفسائل وللمساعدة على نشر زراعة النخيل فى الوطن العربى .
- مواجهة ظاهرة انتشار بعض الامراض الخطيرة فى النخيل مثل مرض البيوض المتسبب عن الفطر Fusarium oxysporum F sp albedenis وهو من اخطر الامراض المنتشرة بالمغرب والجزائر وتونس حيث انه بحلول عام 1958 تسبب هذا المرض فى موت حوالى 10 ملايين نخلة مثمرة لاهم اصناف التمور بالمغرب وهى صنفى المجهول وبوفقوس ويعتقد ان أول ظهور لهذا المرض كان قبل عام 1880 فى المملكة المغربية شمال وادى دوراع ومنذ ذلك الحين استمر انتشار هذا المرض خلال مناطق انتاج نخيل البلح بالمغرب فيما عدا منطقة مراكش وانتشر المرض بسرعة فى اتجاه الشرق ، فلم يأتى عام 1898 الا وكان المرض على حدود الصحراء الجزائرية ولم يمضى وقت طويل حتى ظهر فى مناطق مختلفة من الجمهورية الجزائرية وان خطر المرض اصبح قريباً جداً من المناطق الأساسية للانتاج ، وقد ذكر بعض العلماء ان هذا المرض تسبب فى موت 12 نخلة من صنف دجلة نور بالجزائر وتونس . قتل نحو ثلثى (10 مليون نخلة من اشجار النخيل النامية بالمغرب بل ان هذا المرض قد أتى تماماً على اشجار صنف المجهول الذى كان يعد من أهم واغلى اصناف التمور هناك كما ان عدد اشجار الصنف بوفقوس المنتشر زراعته فى جميع مناطق زراعة النخيل بالمغرب تتناقص عاماً بعد آخر ولم تنجو الا الاشجار التى تنمو فى المناطق التى تعتمد على الامطار (المناطق غير المروية) حيث تقل أهمية المرض فيها واستمر انتشار المرض حتى شمل جميع بساتين النخيل بالمغرب . ولقد اوضح احد

العلماء ان 90 – 100٪ من الاصناف الحساسة لهذا المرض تباد تماماً بعد حوالى 15 – 20 سنة من زراعة الاشجار . هذا ويتوقف تأثير المرض على مدى مقاومة الاشجار له ، حيث لوحظ ان 6٪ من اشجار الاصناف الحساسة لهذا المرض تموت سنوياً مقابل 1.5٪ فقط من اشجار الاصناف ذات المقاومة المعقولة، ويذكر ان متوسط المعدل السنوى لفقد اشجار النخيل فى بساتين المغرب يقدر بحوالى 3 – 4٪ ، من ذلك يتضح ان الهكتار الذى كان يشغل بنحو 300–400 نخلة اصبح يحتوى على 5 – 10 نخلات فقط . ولا يقتصر خطر المرض على موت اشجار النخيل فقط ، حيث انه فى كثير من بساتين النخيل كانت تزرع مع اشجار النخيل بعض المحاصيل الاخرى مثل الخضروات والقمح والشعير وغيرها والتى كانت تستظل بظلال اشجار النخيل ومع موت اشجار النخيل اختفت تلك الحاصلات . وفى بعض مناطق زراعة النخيل بالمغرب وفى الكثير من الاقطار الاخرى يحتل السعف وخشب الجذوع مرتبة تضاهى الثمار من حيث الاهمية حيث يقدر انتاج الهكتار الواحد من هذه المخلفات بحوالى 4 – 5 طن كانت تستخدم كوقود وتدخل فى بعض الصناعات الاخرى مثل صناعة الاسبتة واسقف المنازل كما تستخدم الجذوع فى منع حركة الكثبان الرملية ومع انتشار هذا المرض وموت اشجار النخيل فقد تحول اتجاه السكان لاستخدام الاشجار الاخرى مما ساعد على سرعة تعرية المناطق من الغطاء الشجرى . ولا شك ان هذا التدهور الذى ادى الى موت الكثير من اشجار النخيل دفع السكان الى الهجرة لاماكن مثل المدن بما كان له الأثر الاكبر فى زيادة نسبة البطالة فى هذه المناطق .

- تعتبر وسيلة زراعة الانسجة طريقة مثلى لاختصار برامج التربية فى اشجار الفاكهة وخاصة النخيل بالاضافة الى دور التكنولوجيا الحيوية المقرونة بزراعة الانسجة النباتية فى التحسين الوراثى للمحاصيل التقليدية ذات الصفات الحولية وقد يكون من المفيد استخدام هذه التقنية فى الاشجار المعمرة خاصة النخيل. وقد اشهد عام 1981 نجاح تقنية زراعة الانسجة . فى تخليق ونمو الاعضاء فى نخيل التمر ونجح عمار وبن باديس فى اكثار النخيل بواسطة زراعة الانسجة وقد اشارت الابحاث التى اجراها والى والحناوى عام 1979 على نجاح انتاج فسائل

النخيل داخل الانابيب فى مزارع الانسجة والحناوى وبندق وآخرين عام 1983 فى ندوة النخيل الاولى بالمملكة العربية السعودية ، بالاضافة الى العديد من الباحثين .

ويمثل الشكل المرفق الطرق الرئيسية لاكثار النخيل باستخدام وسيلة زراعة الانسجة.

- حفظ التراكيب الوراثية المتميزة للنخيل باستخدام تقنية زراعة الانسجة من خلال حفظ المزارع تحت نظام التجميد الفائق .
- وجدير بالذكر انه سيتم الاشارة فى المحاضرات التالية الى التقانات المحددة المستخدمة فى اكثار النخيل واستخدام زراعة الانسجة والمشاكل التى تواجه هذه التقانة عند التطبيق بالاضافة الى افضل البيئات المستخدمة ونود أن نشير فى هذا الصدد الى النقاط الآتية:
- ضرورة التوجه نحو استخدام وسيلة زراعة الانسجة فى النخيل من خلال تغذية الاعضاء وليس من خلال انتاج نسيج CALLUS او زراعة الاجنة البذرية.
- ضرورة التوجه نحو التأكد من التطابق الوراثى للنباتات الناتجة كل فترة باستخدام المؤشرات الجزئية واستخدام طريقة الفصل الكهربى للتأكد من مجاميع الصفات الوراثية الموجودة فى الشتلات الناتجة ومقارنتها بالأم.
- مواجهة ظاهرة التلون البنى للمفصلات النباتية للنخيل باستخدام أفضل خليط من المحاليل المؤكسدة.
- مواجهة ظاهرة المظهر الزجاجى لمزارع الانسجة النباتية فى النخيل .
- التوجه نحو توحيد وتبادل المعلومات فى مجال زراعة الانسجة بين الباحثين العرب لما لأهمية هذه التقنية فى اكثار النخيل والحفاظ على الاصناف الجيدة منه التى يتميز بها العالم العربى .

بعض المراجع العربية التى يمكن الاستعانة بها
فى موضوع استخدام تقنية زراعة الانسجة فى اكثار النخيل

* ابو النيل ، مصطفى محمود - 1986 - تحسين طرق التكاثر الدقيق فى نخيل التمر - دليل ندوة النخيل الثانية بالمملكة العربية السعودية ، جامعة الملك فيصل.
* ابو النيل ، مصطفى محمود - 1986 - تنشيط نمو زراعة البراعم الجانبية فى نخيل التمر - دليل ندوة النخيل الثانية بالمملكة العربية السعودية ، جامعة الملك فيصل.
* ابو النيل ، مصطفى محمود - 1986 - تأثير الاوكسنات على تكوين ونمو كالس نخيل التمر - دراسة علاقة التركيب الكيميائى بالوظيفة الحيوية - دليل ندوة النخيل الثانية بالمملكة العربية السعودية بجامعة الملك فيصل .
* أبو النيل ، مصطفى محمود - 1986 - تأثير نيتروجين الاحماض الامينية على نمو نسيج الكالس لنخيل التمر ، دليل ندوة النخيل الثانية بالمملكة العربية السعودية ، جامعة الملك فيصل .
* أبو النيل ، مصطفى محمود وعبد الله صالح الغامدى - 1986 - دور زراعة الانسجة من الخلايا فى اكثار وتحسين اشجار نخيل التمر وراثياً - تقسيم موضوعى لحصر المراجع - دليل ندوة النخيل الثانية بالمملكة العربية السعودية جامعة الملك فيصل .
* اسماعيل محمد مصطفى وفاطمة رمضان العجيلى - 1983 - تأثير منظم النمو حامض اندول بيوتريك على تكوين الجذور فى فسائل النخيل الصغيرة - دليل ندوة النخيل الثالثة - جامعة الملك فيصل - الاحساء - المملكة العربية السعودية.
* البكر ، عبد الجبار - 1972 - (نخلة التمر - ماضيها وحاضرها والجديد فى زراعتها وصناعتها وتجارتها) مطبعة العانى بغداد.
* الغامدى ، عبد الله صالح - 1993 - بنك نخيل التمر الوراثى - النشرة الاعلامية ، (عدد خاص بمناسبة ندوة النخيل الثالثة) - مركز التعليم المستمر - جامعة الملك فيصل - الاحساء ، المملكة العربية السعودية.

* بصرى ، محمد – اهمية مرض البيوض المتسبب عن الفطر فيوراريوم او كسيسبورم على نخيل البلح فى المغرب – ندوة النخيل الاولى – جامعة الملك فيصل – الاحساء – المملكة العربية السعودية ، 424 –431.

* حسين ، فتحى ، محمد سعيد القحطانى ويوسف والى – 1979 – (زراعة النخيل وانتاج التمور فى العالمين العربى والاسلامى) مطبعة جامعة عين شمس – جمعية فلاحة البساتين المصرية – القاهرة.

* خليل ، محمد شكرى ، محمد اسلام خان ومحمد سعيد القحطانى – 1983 – اكثار نخيل البلح بطريقة زراعة الانسجة ، ندوة النخيل الاولى 142 – 150 جامعة الملك فيصل – المملكة العربية السعودية.

* خيرى ، محمد محمد على – 1983 – اكثار النخيل – المشروع الاقليمى لبحوث النخيل والتمور فى الشرق الأدنى وشمال افريقيا – بغداد – العراق.

* عمار ، سيدة وعبد اللطيف بن باديس – 1983 – التكاثر الخضرى لنخيل التمور بواسطة زراعة الانسجة – ندوة النخيل الاولى 158 – 166 – جامعة الملك فيصل – المملكة العربية السعودية.

* عبد اللطيف والهيتى – 1978 – اكثار اشجار النخيل وتحضير ارض البستات – الدورة التدريبية لبستنة ووقاية النخيل – المشروع الاقليمى لبحوث النخيل والتمور فى الشرق الأدنى وشمال افريقيا – بغداد العراق .

القيمة الغذائية لمائة غرام تمر جاف من صنف الخضراوى

المـــــــادة	الكمية (ملغم)
البروتين	2.43
الدهون	0.47
الحموضة	6.7
السكريات الكلية	87.74
الكالسيوم	133.0
الفسفور	15.0
الكبريت	14.0
البوتاسيوم	894.0
الحديد	4.5
المغنيسيوم	60.0
المنغنيز	5.14
النحاس	2.54
الزنك	1.29

المصدر : حميد جاسم محمد الجبورى/نخلة التمر/ جامعة الامارات العربية المتحدة / 1993.

المساحات والانتاج للاقطار العربية المنتجة للتمور

المساحة : الف هكتار
الانتاج : الف طن

القطر	1990		1991		1992		1993	
	المساحة	الانتاج	المساحة	الانتاج	المساحة	الانتاج	المساحة	الانتاج
مصر	51.9	541.9	52.0	603.4	52.8	603.6	53.0	631.2
العراق	125.0	545.0	125.0	566.0	125.0	448.0	125.0	613.0
السعودية	-	499.0	-	540.0	83.4	555.0	-	560.0
الجزائر	78.6	206.0	81.8	209.0	27.9	260.0	84.4	262.0
الامارات	-	96.0	-	173.0	25.0	230.5	28.2	233.3
السودان	23.0	114.0	23.0	140.0	26.4	142.0	26.0	140.0
عمان	26.0	105.0	26.1	117.4	23.5	125.0	27.0	126.9
المغرب	22.0	120.0	23.7	82.0	21.4	82.0	23.4	111.1
تونس	20.5	75.0	20.8	80.2	-	75.0	26.2	86.0
ليبيا	-	90.6	-	75.0	27.0	76.0	27.0	77.0
موريتانيا	5.5	15.4	6.0	16.8	6.5	16.0	5.0	22.4
اليمن	15.3	20.7	15.6	20.9	15.8	21.1	16.2	21.5
البحرين	2.0	16.0	2.0	16.0	2.0	16.0	2.0	16.0
قطر	-	5.2	-	9.0	-	10.0	-	11.0
الصومال	-	9.0	-	10.0	-	8.0	-	9.0
فلسطين	-	3.1	-	3.0	-	3.2	-	3.2
سوريا	0.4	0.5	0.4	0.6	0.4	1.5	0.4	1.4
الكويت	-	1.1	-	1.0	-	1.0	-	1.0
الأردن	0.2	1.0	0.3	0.8	0.3	0.8	0.2	0.9
المجموع	-	2464.5	-	2664.1	-	2675.7	-	2927.9
الانتاج العالمي	-		-	3718.1	-	3709.7	-	4035.9
الانتاج العربي	-	-	-	٪71.6	-	٪72.1	-	٪72.5

المصدر : الكتاب السنوى للاحصاءات الزراعية العربية/ مجلد 14/ المنظمة العربية للتنمية الزراعية - الخرطوم 1994

المصدر * FAO/Yearbook production, Vol. 47, 1993

متوسط درجات الحرارة ومجموع الوحدات الحرارية والرطوبة النسبية لبعض مناطق زراعة النخيل فى الوطن العربى

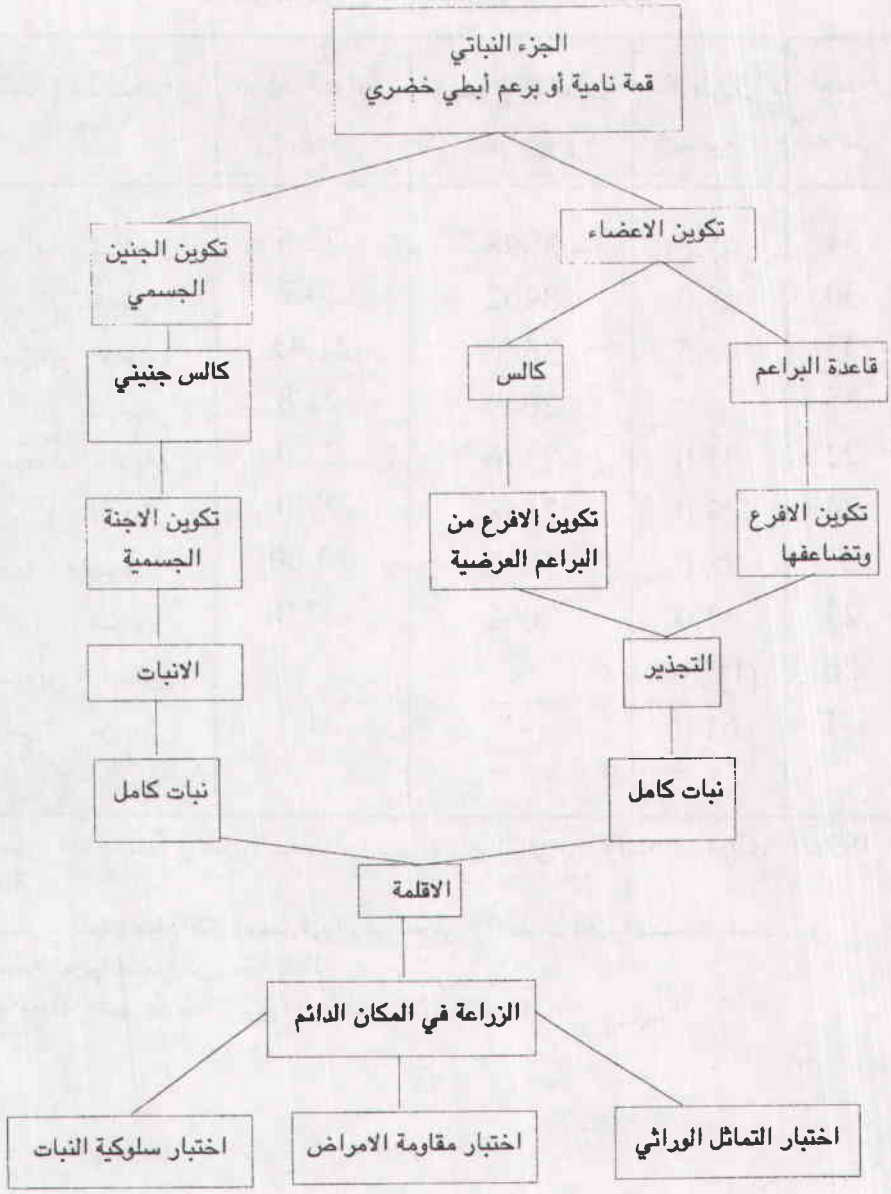
القطر : المدينة	درجة الحرارة م	مجموع الوحدات الحرارية م	الرطوبة النسبية ٪	خط عرض
العراق : بغداد	22.5	3898	45.8	34
البصرة	24.2	3962	63.0	30
الجزائر : توغورت	21.45	3666	43.5	33
بسكره	21.8	3049	-	35
السعودية : الرياض	23.0	2376	31.0	22
المدينة	27.0	2548	27.0	24
مصر : اسيوط	23.00	1832	38.0	27
اسوان	27.0	2668	32.0	23
البحرين : البحرين	-	-	(1)73.3	26
تونس : توزر	21.3	-	61.0	34

المصدر : انتاج التمور ووقايتها/ سلسلة دراسات الانتاج النباتى ووقاية النباتات رقم/FAO/1992 35 .

المصدر : ندوة رعاية واكثار النخيل فى الوطن العربى / الامارات العربية المتحدة/ اصدارات المنظمة العربية للتنمية الزراعية 1989.

(1) معدل الاشهر من تموز (يوليو) الى تشرين الأول (اكتوبر).

الطرق الرئيسية لاكثار النخيل بزراعة الانسجة



مقارنة مدى تحمل اشجار الفاكهة للملوحة فى التربة ومياه الرى

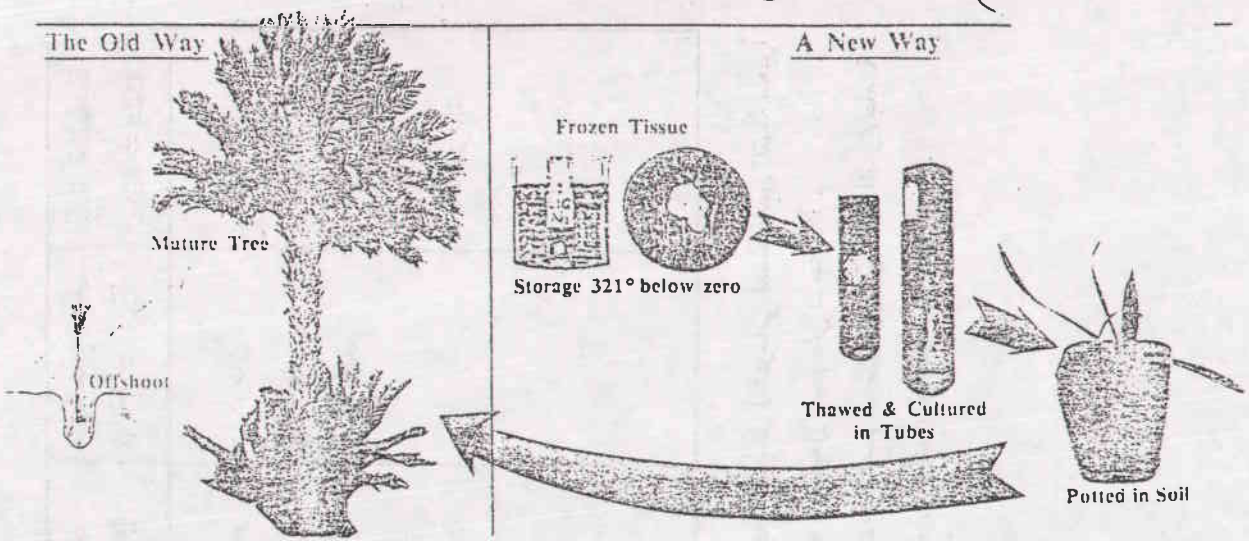
عالية التحمل * Ece=6 - 8	متوسطة التحمل Ece = 3 - 6	حساسة للملوحة Ece =1.5-3
- نخيل التمر	- الرمان - التين - الزيتون	- الكمثرى - التفاح - المشمش - البرتقال - اللوز - الفراولة

*Ece = درجة التوصيل الكهربائى لمستخلص التربة معبراً عنه بالمليموز/سم على درجة 25 م.

المصدر : حميد جاسم محمد الجبورى/نخلة التمر/جامعة الامارات العربية المتحدة/1993.

PRESERVATION AND PROPAGATION OF DATE PALM GERMPLASM

First Practical Method of Coupling Fruit Tree Tissue Culture with Cryogenics



Until Now — The few "offshoot" buds from a mature tree (four to seven years old) are cut off and planted in soil.

Now — Propagation from frozen tree-tissue cultures. Many eighth-inch bits of 60-day cultured tissue can be stored frozen in liquid nitrogen until needed (weeks or decades), then thawed and planted at will to produce an unlimited number of genetically identical new trees.

Result: Many more varieties available using less land and manpower.

المشاكل والمعوقات التى تواجه إكثار فسائل النخيل بإستخدام تقنية زراعة الأنسجة

المشاكل والمعوقات التى تواجه اكثار فسائل النخيل باستخدام تقنية زراعة الانسجة

أ.د/ حسين الحناوى - خبير الانتاج النباتى
مدير المكتب الاقليمى للمنظمة بالقاهرة بالتكليف

تمهيد :

يواجه استخدام تقنية زراعة الانسجة بصفة عامة بعض المشكلات التى يمكن استعراضها فيما يلى :

* اختيار المنفصل النباتى المناسب .
* علاقة العمر الفسيولوجى بالحالة الغذائية للاشجار أو النباتات الأم .
* تحديد البيئة المناسبة لكل منفصل فى المرحلة الأولى للزراعة وتحديد البيئة المناسبة للمراحل التالية وعلاقة ذلك بمدى رد الفعل المورفولوجى للمنفصل النباتى فى المراحل المختلفة حسب المطلوب لكل مرحلة.
* وضع النظام المناسب للتعقيم وعلاقة ذلك بمدى حساسية المنفصل النباتى للمركبات الكيماوية المستخدمة فى التعقيم ويدخل فى ذلك طول فترة التعقيم - وتركيز المركب المستخدم والوسط المناسب للتعقيم باستخدام التعقيم تحت التفريغ .
* افراز المنفصلات النباتية لبعض المركبات المانعة للنمو مثل بعض المركبات الفينولية وغيرها.
* وجود بعض الموانع التشريحية لتكشف الاعضاء داخل المزارع النباتية.
* تحديد الظروف البيئية المناسبة للحصول على افضل نمو وتكشف للاعضاء فى مراحل الزراعة المختلفة.
* تلون المنفصلات النباتية باللون البنى فى مرحلة معينة من الزراعة.
* الظروف المناسبة لأقلمة النباتات الناتجة من الزراعة النسيجية فى غرفة الزراعة وفى الخارج قبل نقلها الى المكان المستديم.

ومما سبق يمكن حصر المشكلات العامة التى تواجه الزراعة النسيجية بصفة عامة فى نحو 10 مشكلات رئيسية يكون بعضها اكثر تأثيراً فى حالة زراعة الانسجة فى النخيل ونستعرضها فى ايجاز فيما يلى :

1- اختيار المنفصل النباتى المناسب :

يشير الرسم المرفق الى الاجزاء المختلفة للفسيلة والتى تستخدم فى زراعة الانسجة ويتضح من هذا الرسم اختلاف القدرة التكوينية للاجزاء المختلفة حيث تكون اعلى ما يمكن فى المنطقة المرستيمية وتقل كلما ابتعدنا عن البرعم الطرفى افقياً او رأسياً ويعزى ذلك الى كون النخيل نبات احادى الفلقة ويصعب تحول الاجزاء المتخصصة التامة التكشف مثل الحزم الوعائية أو انسجة القشرة وغيرها الى الحالة المرستيمية مرة اخرى واعادة تكشفها مرة اخرى وتغيير صفاتها الوظيفية (Redifferntiatian) وهنا تجدر الاشارة الى افضلية استخدام المناطق المرستيمية البراعم الابيطية الموجودة فى اباط بدايات الأوراق فى قمة الفسيلة وذلك لصعوبة تخليق الاعضاء (Denovo) من الانسجة المتخصصة وهنا تجدر الاشارة انه يمكن دفع المنفصلات النباتية الى انتاج نبيتات جديدة عن طريق التعديل فى التوازن الهرمونى للبيئة ممكن دون المرور على مرحلة انتاج الكالس فى حالة استخدام المنفصل النباتى ذو حجم مناسب وطبيعة مريستيمية ويمكن بعد ذلك تفصيص النبيتات المتكونة واستخدامها بتكاثر.

2- تلون المنفصل النباتى باللون البنى :

تشير الدراسات المختلفة الى وجود مركبات تانينية فى العصير الخلوى للقمم النامية ينتشر فى البيئة عند سطح القطع ويكون طبقة عازلة بين البيئة والمنفصل النباتى تمنع استفادة المنفصل النباتى للعناصر الموجودة فى البيئة وهنا تجدر الاشارة الى أهمية استخدام بعض المركبات والمحاليل المضادة للأكسدة التى سبق الاشارة اليها فى المحاضرات السابقة هذا بالاضافة الى تلون القمم النامية للفسائل باللون البنى وذلك يؤدى الى موت الخلايا الخارجية لهذه القمم النامية ويمكن التغلب على هذه الظاهرة بوضع الجزء المطلوب زراعته من الفسيلة تحت ماء جارى لمدة عدة ساعات قبل الزراعة وقد يحدث توقف لنمو الانسجة بعد عدة اسابيع من زراعتها نتيجة لتلونها باللون البنى الا ان هذه الظاهرة لا تحدث فى الاجنة وهذا يؤكد ان السبب فى التلون باللون البنى يعزى اساساً الى القطع فى

المنفصل النباتى وتأكسد المركبات الموجودة بالخلايا عند تعرضها للهواء مباشرة وقد يكون من المفيد اجراء القطع داخل محلول مضاد للأكسدة.

ويوضح الجدول رقم(1) انواع البيئات المختلفة لزراعة الانسجة فى النخيل وعلاقتها بالهدف من الزراعة ويلاحظ فى هذا الجدول ان الاختلاف الاساسى يكون فى التوازن الهرمونى للبيئة ويوضح الجدول المرفق الآخر استجابة الانسجة المختلفة للتوازنات الهرمونية المختلفة ويمكن الاشارة انه قد وجد والى والحناوى عام 1979 انه باضافة المعقد الطبيعى الفرمنتول المستخلص من جنين الذرة الصفراء كمنتج ثانوى فى عملية انتاج النشا والجلوكوز من الذرة الصفراء قد ادى ذلك الى زيادة نمو مزارع انسجة النخيل فى المعمل واشار بعض الباحثين الى ان استخدام بعض المعقدات الطبيعية مثل لبن جوز الهند ومستخلص الشعير الى البيئات فى مزارع الانسجة النباتية قد يؤدى الى تحسين معدل النمو فى هذه المزارع وقد يكون السبب فى ذلك يعزى الى التأثير الثنائى المتضاعف المزدوج لهذه المركبات بصورتها الطبيعية خاصة اذا كانت مأخوذة من نباتات احادية الفلقة ذات طبيعة مماثلة بينما اشار بعض الباحثين الى عدم اهمية اضافة تلك المعقدات الطبيعية وجدير بالذكر ان المحتوى المعدنى لبيئة زراعة الانسجة يختلف باختلاف مرحلة النمو ويعتقد انه من المفضل استخدام مجموعة الاملاح ذات قوة متوسطة فى المرحلة الاولى من النمو وزيادة قوتها تدريجياً.

ويعتقد ايضاً ان مصدر الازوت المستخدم فى بيئة الزراعة النسيجية للنخيل يؤثر بصورة أو باخرى على معدل النمو، وهنا تجدر الاشارة ان الاختلافات المتوقعة فى النتائج المتحصل عليها من زراعة الانسجة فى النخيل قد تعزى الى اختلافات راجعة للنوع والصنف ويمكن وضع نظام ثابت (Protocol) لكل نوع على حدى.

4- النظام المناسب للتعقيم :

أشار كل من تيسيرات وصبور عام 1987 الى فائدة استخدام محلول مخفف من اليود فى تعقيم المنفصلات النباتية للنخيل وذلك بالمقارنة بمحلول كولوربد الزئبق واشار بعض الباحثين الى استخدام محلول هايكولوريد الصوديوم فى التعقيم قد يؤدى الى اصفرار المنفصلات النباتية وموتها وقد لجأ البعض الى وضع القمم النامية للفسائل فى كحول نقى ثم اشعاله بهدف التعقيم السطحى لها وتعزى مشكلة التلوث فى المنفصلات

النباتية للنخيل الى كبر هذه المنفصلات حجماً بالاضافة الى طبيعتها المورفولوجية التى تسمح بوجود الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتريا وجراثيم الفطر فى داخل هذه التراكيب المورفولوجية المتداخلة مما يؤدى الى عدم وصول مواد التعقيم اليها وقد يكون من المناسب الوصول الى مخلوط من المواد المعقمة المختلفة التاثير لكل نوع بستانى من النخيل.

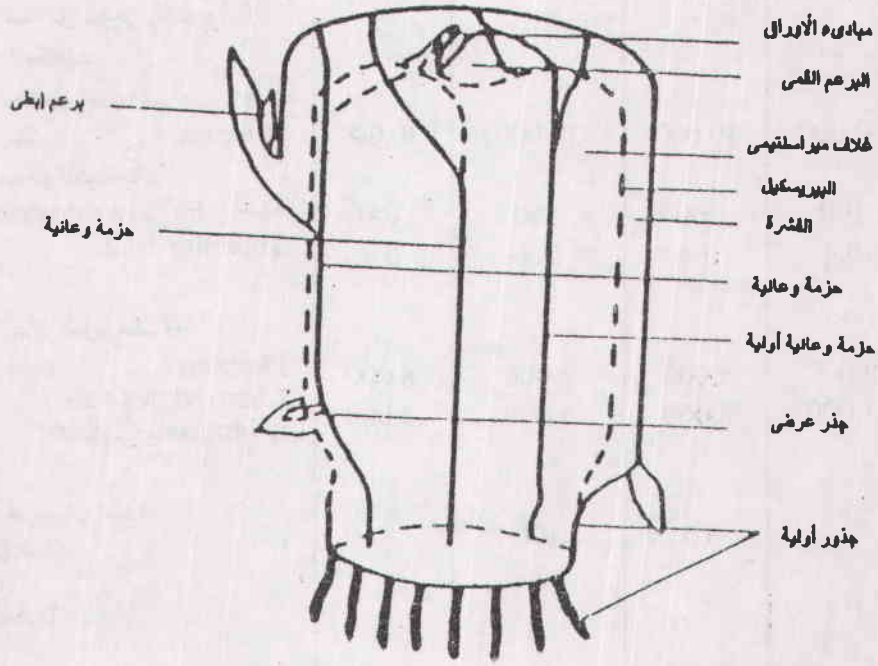
5- الظروف البيئية المناسبة :

أشار الحناوى ووالى 1979 الى انه قد وجد ان لارتفاع درجة الحرارة فى غرفة الزراعة الى نحو 35 درجة مئوية يؤدى الى الاسراع فى النمو فى مزارع الانسجة فى النخيل واتجاهها الى تكوين اللون الاخضر بسرعة بالاضافة الى سرعة تخليق الاعضاء . الا ان بعض الباحثين اشاروا الى ان درجة الحرارة المناسبة لنمو مزارع الانسجة فى النخيل تكون حول 25 درجة مئوية وقد يعزى هذا الاختلاف الى اختلاف الصنف المنزرع ونوع المنفصل النباتى المستخدم ووقت الزراعة الذى يرتبط بدرجة نشاط المنفصل النباتى . وقد وجد ايضاً انه قد يكون من المناسب تعريض المنفصلات النباتية الى فترة اظلام لدفعها الى التجذير. وجدير بالذكر ان لشدة الاضاءة اثر على سرعة تكوين الاعضاء فى مزارع الانسجة النباتية للنخيل الا ان ذلك يختلف باختلاف مرحلة النمو.

6- تحديد الظروف الملائمة للأقلمة :

تختلف الظروف المناسبة للأقلمة باختلاف مرحلة النمو فعند وصول النبتيات الى الحجم المناسب بشرط أن تكون كاملة التكوين فانه يتم رفع شدة الاضاءة تدريجياً وصولاً الى شدة الاضاءة الطبيعية ومن المهم استمرار تعريض النباتات اطول فترة ممكنة لهذه الظروف مع استبعاد النباتات التى لا تستجيب لشدة الاضاءة المرتفعة واعادتها غرفة الزراعة.

ويعتبر ما تم استعراضه من مشاكل هو اهم المشاكل التى تواجه استخدام تقنية زراعة الانسجة فى النخيل وقد تم الاشارة الى لبعضها فى محاضرات سابقة وقد يكون من المناسب وضع منهجية موحدة لمواجهة تلك المشكلات عن طريق تبادل الخبرات العربية فى هذا الشأن نظراً لما للنخيل من أهمية فى الوطن العربى .



رسم تخطيطي يبين الاجزاء المختلفة للفسيلة
والتي تم ذكرها والتي استخدمت في زراعة الانسجة

جدول رقم (1) يبين انواع البيئات المختلفة لزراعة أنسجة نخيل البلح

المكـــون	نـــوع البيئة (ملليجرام/ لتر)			
	إنبات أجنة	إنتاج كالس	قمة فرخ	تكوين جذور عرضية
أملاح غير عضوية : Inorganic salts بيئة مورشيجى وسكوج 1962	+	+	+	+
المكونات :				
مصدر للكربوهيدرات سكروز Sucrose	30.000	30.000	30.000	30.000
مصادر الفيتامينات				
Meso-Inositol dihydate	100	100	100	100
Thiamine HCI.	0.4	0.4	0.4	0.4
مواد اخرى مضافة				
Phytagar	8.000	8.000	8.000	8.000
Charcoal, activate neutralized (Sigma)	3.000	3.000	3.000	3.000
هرمونات نباتية				
2.4.D		100	10	
2ip		3		
NAA				0.1

جدول رقم (2) يبين تاثير الأوكسينات على نمو جنين نخيل البلح

تركيب الوسط الغذائى	نوعية النتائج	النتائج الفردية
(MS)	نمو طبيعى للجنين الى ان يصبح نبتة كاملة.	23/19 نبتة طبيعية كاملة 23/3 نبتة بدون ورق 23/1 لم تظهر الاعضاء
(MS) + (IAA or IBA) + BAP	كالس صغير محبب ثم تظهر النبتة مختلفة النمو حيث يكون لها كثير من الورق وقليل من الجذور.	42/22 نبتة قليلة الجذور 42/8 كالس 42/10 نبتة وكالس 42/2 بدون نمو
(MS) + NAA + BAP	كالس فى البداية ثم يظهر البرعم النباتى ، جذور كثيرة.	24/18 كالس نمو سريع تظهر الاعضاء فيما بعد.
(MS) + (2-4-D) + (BAP)	كالس فقط اعطت مجموعة انسجة	48/40 كالس محبب يظهر اخضراراً جزئياً.

جدول رقم (3) استجابة الأنسجة المختلفة لفسيلة البلح للتشكل عندما زرعت على بيئات تحتوي على خلطات مختلفة من السيتوكينين واندول حامض الخليك ونفثالين حامض الخليك واندول حامض البيوتريك

الهرمون (ملجرام/لتر)	البرعم الطرفى	البرعم الجانبى	مبادىء الورقة	الطبقة الميرستيمية	الجذر
سيتوكينين+ IAA 0.1 + 0.1 1.0 + 0.1 0.5 + 0.1	كالس مبادىء الفرخ كالس باهت كالس اصفر	كالس اصفر كالس ابيض	نمو الورقة نمو الورقة تلون بنى	لا كالس باهت لا	لا لا لا
سيتوكينين + NAA 0.1 + 0.1 1.0 + 0.1 0.5 + 0.1	كالس عدة افرخ + كالس فرخ كالس + عدد بسيط من الافرخ	كالس فرخ + كالس فرخ كالس	نمو الورقة + كالس نمو الورقة	كالس + تلون بنى كالس	تلون بنى + لا كالس اصفر
سيتوكينين +IBA 0.1 + 0.1 1.0 + 0.1 0.5 + 0.1	كالس اخضر تلون بنى كالس باهت	كالس ابيض كالس باهت كالس بنى	لا تلون بنى كالس	لا كالس لا	لا لا لا

كلمات الإفتتاح

كلمة معالي الاستاذ الدكتور يوسف والي
نائب رئيس مجلس الوزراء ووزير الزراعة واستصلاح الاراضي بجمهورية مصر العربية
ألقاها انابة عنه السيد الاستاذ الدكتور عبد العظيم الجزار
وكيل وزارة الزراعة- المشرف على قطاع العلاقات الزراعية الخارجية

السيد الدكتور عبد الرحمن الطيب
نائب مدير عام المنظمة العربية للتنمية الزراعية
السيد الدكتور ابراهيم حميده
رئيس مركز بحوث الصحراء
الاخوة والاخوات الاعزاء

يسعدني ان انقل اليكم تحيات السيد الاستاذ الدكتور يوسف والي نائب رئيس مجلس الوزراء ووزير الزراعة واستصلاح الاراضي الذي كان يود ان يكون مع حضراتكم لولا ظروف عمل طارئة حالت دون حضور سيادته وكلفت ان انقل اليكم تحياته وان انقل للمنظمة العربية للتنمية الزراعية الشكر والتقدير على عقد مثل هذه الدورات المتخصصة كدورتكم هذه « حول انتاج فسائل النخيل باستخدام تكنولوجيا زراعة الانسجة» . كما تعلمون حضراتكم فان انتاج النخيل يمثل اهمية اقتصادية لعالمنا العربي وكما يعتبر النخيل رمزاً لمنطقتناالعربية على امتداد التاريخ لما تمثله النخلة من علو وشموخ ولما تمتاز به من قدرة غير عادية على تحمل الظروف الغير ملائمة من حرارة وملوحة وقلة مياه .

وقد تعرضت اعداد النخيل في منطقتنا لكثير من التقلبات في الاونة الاخير، وكمثال على ذلك ما حدث في صعيد مصر وكنتيجة لغرق مساحات منه في منطقة النوبة بعد بناء السد العالي مما كان له اثر سلبي على اعداد النخيل وكما تعرض النخيل في بعض المناطق في وطننا العربي لبعض الآفات والتي لا مجال للحديث عنها الآن . كل ذلك من

الممكن أن يؤثر سلباً على اعداد النخيل بالمنطقة كما قد يعرض بعض اصنافه المتميزة لخطورة الاندثار .

ومن هنا تأتي الحاجة الملحة الى العمل سوياً للمحافظة على سلالات النخيل بالوطن العربي والتي تعتبر من اجود السلالات بالعالم ولا يكون هذا إلاَّ من خلال تطبيق التكنولوجيا المتقدمة لزراعة الانسجة للمحافظة على السلالات المتميزة وخاصة وان تلك السلالات قد تم اقلمتها واثبتت تميزها عبر سنين طويلة .

وفي هذا المقام فانني اود ان اشير هنا ان اول من ادخل زراعة الانسجة بالنسبة لاشجار الفاكهة في مصر هو استاذنا الجليل الدكتور يوسف والي حيث انشأ اول معمل لزراعة الانسجة بكلية زراعة عين شمس في منتصف السبعينات وتخرج على يديه الجيل الاول من الدارسين لهذه التقنية احدهم الدكتور حسين الحناوى مدير مكتب المنظمة العربية بالقاهرة .

ولادراكنا لاهمية زراعة الانسجة فقد تم انشاء معمل على اعلى مستوى من خلال مشروع مصر كاليفورنيا لتطوير النظم الزراعية في اواخر السبعينات واشرف عليه في ذلك الوقت الاستاذ الدكتور علاء بندق وكيل أول الوزارة الآن وكان ذلك بداية حقيقية للاستفادة من هذه التقنية والعمل على تدريب بعض الكوادر في هذا التخصص ، والآن وبعد ان كانت الجامعات ومعامل الابحاث الحكومية هي المحتكرة لاستخدامات زراعة الانسجة فان القطاع الخاص في مصر ولايمانه باهميتها يقوم الان بانتاج 80٪ من شتلات الفاكهة المنتجة بطريقة زراعة الانسجة.

اما بخصوص موضوع هذه الدورة وهو انتاج فسائل النخيل بطريق زراعة الانسجة فان هناك معمل مركزي متخصص لهذا الغرض تحت الانشاء يتبع وحدة الخدمات البستانية سيتم افتتاحه في غضون شهرين من الآن في محطة الابحاث بسخا وذلك بجانب وحدة انتاج لنفس الغرض في منطقة بهتيم.

كما وان وكالة الوزارة للتشجير وبمساعدة الحكومة الفرنسية تقوم باكثار وتحسين اصناف النخيل المتميزة باستخدام تكنولوجيا زراعة الانسجةحيث يتم اعادة نشرها في بعض مناطق النوبة.

وختاماً احب ان اوجه شكر وتقدير سيادة الاستاذ الدكتور يوسف والي نائب رئيس مجلس الوزراء ووزير الزراعة واستصلاح الاراضي للقائمين على هذه الدورة وفي مقدمتهم المنظمة العربية للتنمية الزراعية ومركز بحوث الصحراء.

كما وارجوا لدورتكم هذه كل النجاح والتوفيق واتمنى للمشاركين تحقيق الاستفادة المثلى التي تحقق النهوض بالنخيل في وطننا العربي وايضا تمنياتنا بطيب الاقامة في مصر.

والسلام عليكم ورحمة الله وبركاته .

اسماء المشاركين

الاســـــــــــم	الدولـــة
1- محمد صبحي علي الفاعوري	الاردن
2- راشد احمد علي سعيد الحنطوبي	الامارات
3- عبد النبي احمد حبيب سلطان	البحرين
4- بلقج مالك	الجزائر
5- سليم شوقي	الجزائر
6- عقيل حمدان ناصر الحميدي	السعودية
7- فهد عبد الرحمن محمد المحيميد	السعودية
8- منى محمد عدنان الصباغ	سوريا
9- سيف بن سعيد بن سليمان السكري	سلطنة عمان
10- نمر محمد نمر عايش	فلسطين
11- محمد عبد الله محمد عبد الرحمن	فلسطين
12- حمد سعد ماجد آل سعد	قطر
13- سلوى سلطان العريفان	الكويت
14- نجلا جرجس خوري	لبنان
15- فتحي العربي الصغير الاحرش	ليبيا
16- طارق عبد المنعم عبد الله	مصر
17- عادل احمد محمود احمد	مصر
18- محمد محمود عبد الستار	مصر
19- أبحمان العربي	المغرب
20- نبيل هزاع علي العبسي	اليمن