الإكثار الدقيق نباتات نخيل التمر باستخدام زراعة الأنسجة النباتية

تكاثر النخيل تقليدياً عن طريق الفسائل للحصول على نفس الصنف وهناك أصناف ممتازة يندر إنتاجها من الفسائل وذلك يؤدى إلى ارتفاع ثمن فسائلها وصعوبة التوسع فى زراعتها لذلك بدأ الاتجاه إلى الإكثار بزراعة الأنسجة للأصناف المنتخبة والممتازة من نخيل البلح حيث يمكن أن يتم فى وقت قياسى إنتاج عدد كبير من النباتات مقارنة بطرق التكاثر التقليدية بواسطة الفسائل .

مزايا استخدام تقنية زراعة الأنسجة فى إكثار نخيل التمر

1. الحصول على أعداد كبيرة جداً من الفسائل باستخدام عدد قليل من الأمهات، **وبذلك تسهم هذه الطريقة فى إكثار أصناف النخيل النادرة والأصناف التي تنتج عدد قليل من الفسائل كصنف البرحي**
2. الحصول على فسائل خالية من الأمراض الفطرية المنتشرة حالياً فى كثير من البلدان والتي يخشى استيراد فسائل منها مثل مرض البيوض .
3. من أهم مميزات هذه الطريقة هو تجانس الفسائل الناتجة مما يضمن تجانس النمو وسرعة النمو حيث يمكن الحصول على المحصول بعد 4 سنوات فقط من الزراعة .
4. زراعة الفسائل بالأرض المستديمة مباشرة بدون عمل مشتل والانتظار لمدة 3 - 2 سنوات حيث أن الفسيلة التى تزرع تكون ذات مجموع جذرى كامل وتزرع فى نفس المواعيد العادية للزراعة فى أب وايلول أو اذار ونيسان.
5. سهولة تداول الفسائل ونقلها مع ضمان خلوها من الإصابات الحشرية أو المرضية .
6. الحصول على فسائل من النخيل الذي فقد قدرته على إنتاج الفسائل .

من المعوقات والمشاكل التي تواجهه زراعة الأنسجة

1 - التلوث : تعتبر مشكلات التلوث الفطري والبكتيري من أهم المشاكل التى تقابل مزارع الأنسجة النباتية

2- ظاهرة التلون البنى Browning:

والسبب فى هذه الظاهرة أن الجزء النباتي المنزرع على البيئة المغذية يفرز أو ينتج مواد سامة داخل وسط الزراعة(مواد فينولية).وتؤدى هذة المواد بدورها الى اسمرار الجزء النباتي وبعد فترة يتحلل الجزء النباتى ويموت وترتبط هذه الظاهرة بالعديد من العوامل أهمها:

1- عمر الجزء النباتي المستخدم:

كلما كان عمر الفسيلة أقل كلما كان أفضل.

2- نوع الجزء النباتي: وجد أن القمة النامية أقل تعرض للاسمرار من الأوراق الآولية.

3-شدة الآضاءة : تعرض النباتات خاصة فى المراحل الآولى من النمو للضوء يزيد من هذة الظاهرة.

4-مدة التعقيم : كلما زاد ت فترة التعقيم كلما ساعد هذه الظاهرة على الظهور.

الطرق المتبعة لتقليل ظاهرة التلون البنى (الآسمرار):

1-النقل المتكرر على فترات متقاربة.

2- صغر حجم الجزء النباتى، يجب أن يكون الجزء المجروح صغير بقدر الآمكان .

3- استخدام مضادات الأكسدة أما بنقع الأجزاء النباتية فيها أو أضافتها للبيئة مثل حمض الآسكوربيك أو حمض ألستريك.

4- يجب عدم تعرض الجزء النباتي فى المراحل الآولى للضوء الشديد.

5- أضافه الفحم النشط لأنه يقوم بأدمصاص المواد الفينولية على سطحه.

6- التوازن الهرموني فى الوسط المغذي' يقلل من هذه الظاهرة.

3- مرض الشفافية (الظاهرة الزجاجية) Vitrification: وهو من أكثر الأمراض خطورة الذي يصيب النباتات فى مرحلة الآكثار ويؤدى الى أضعاف النباتات أو فقد قدرتها على الآكثار والتجذير وتتصف النباتات المصابة بمرض الشفافية بساق رفيع شاحب اللون شفاف والأوراق متطاولة وشفافة وملتفة وقليلة الكلوروفيل، وممكن يحدث أيضا فى مرحلة الكالس وتصبح الأجنة شفافة لامعة وتضعف قدرتها على الآكثار و التجذير وترتبط حدوث هذه الظاهرة باستخدام تركيزات عالية من الهرمونات فى البيئة المغذية " الاوكسينات" وعدم استخدام الفحم النباتي فضلا عن زيادة تركيز الامونيوم. كيفية التغلب على ظاهرة التزجج

1 -زيادة تركيز كل من الفحم و الأكر و السكر في البيئة ، وخفض تركيز ايون الامونيوم .
2- تحسين عملية التبادل الغازي داخل مزارع الأنسجة من خلال حجم الأواني الزجاجية و نوع الأغطية .
3- تظهر هذه الظاهرة بوضوح بانخفاض شدة الإضاءة و ارتفاع درجات الحرارة.
- 4 - تظهر هذه الظاهرة بوضوح مع زيادة في التعقيم للأجزاء النباتية المستخدمة.
5- تقليل تركيز الآوكسينات المستخدمة فى الوسط المغذى الخاص بالتجذير. 6
- ارتفاع مستويات السيتوكينين في مزارع الأنسجة .

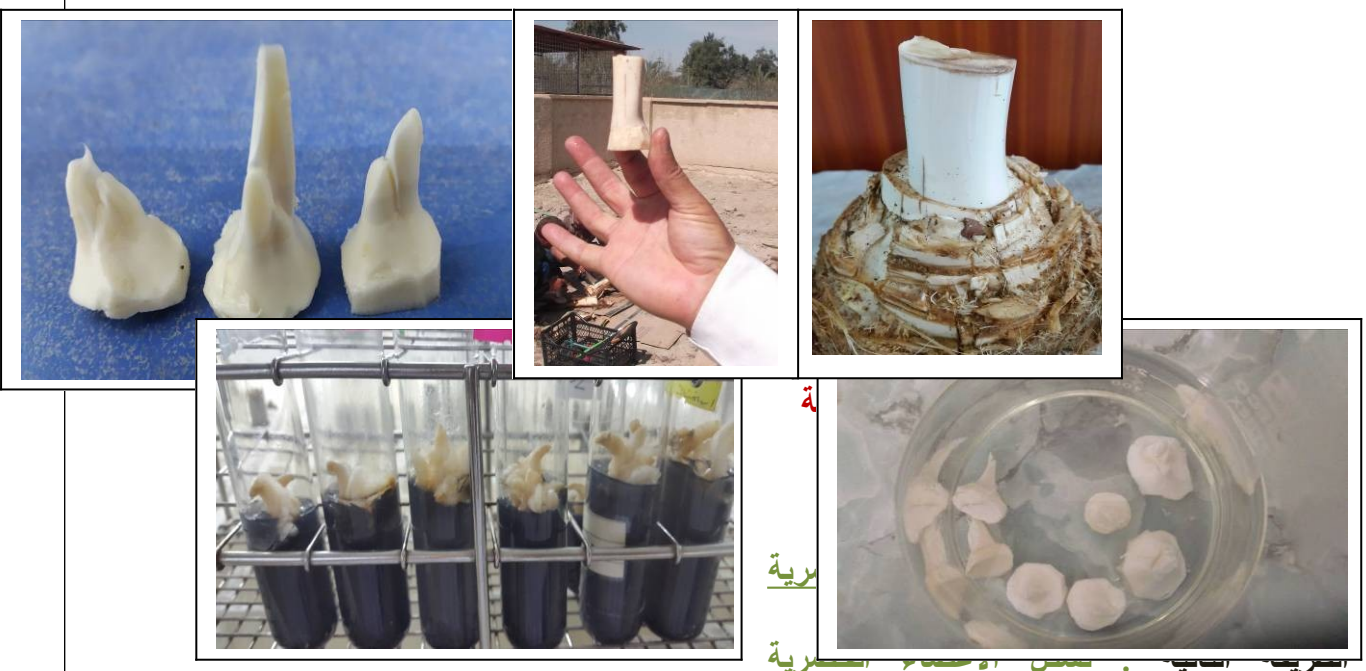
خطوات الإكثار

مرحلة التأسيس للزراعة النسيجية Cultures Establishment

استصال البراعم الطرفية (Shoot tip) من فسائل نخيل التمر التي تتراوح اعمارها بين (3-4) سنوات. وضع الأجزاء المستأصلة في محلول مضاد للأكسدة "Antioxidant Solution" والذي يتكون من 150 مغ. لتر$^{-1}$ حامض الستريك و100 مغ. لتر$^{-1}$ حامض الأسكوربك لإيقاف عملية الأكسدة ومنع اسمرار الأنسجة المراد زرعتها وتراكم المواد الفينولية على التطهير السطحي للأجزاء النباتية بوضعها في محلول هيبوكلوريت الصوديوم التجاري

حجم:حجم مع إضافة قطرة واحدة من المادة الناشرة "Tween-20" خلال 20 دقيقة الى كل 100 مل، بعدها تستخرج الأجزاء النباتية من محلول التعقيم وتغُسل بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات وتتم هذه العملية داخل حجرة انسياب الهواء الطبقي Laminar Air Flow Cabinet المعقمة مسبقا بكحول الإيثانول بتركيز % 70، يوزع الوسط الغذائي (MS) والموصوفة من (Murashige and Skoog,1962) . بواقع 25 سم^{3}لكل أنبوبة اختبار وتغُطى الأنابيب بالقطن ومن ثم بورق الألمنيوم Aluminum foil الطبي ومن ثم تعقم تعقيماً بخارياً في جهاز المعقم Autoclave على درجة حرارة 121° م وتحت ضغط 1.05 كغم/سم 2 لمدة 15 دقيقة. تقسم البراعم الطرفية طوليا الى اربعة اجزاء وزراعة كل ربع برعم طرفي في داخل أنبوبة زجاجية مزودة بالمواد المبينة سابقا وتزود بمنظمات النمو النباتية وحسب الغرض من الزراعة (كالس او تكوين الاعضاء المباشر Direct Organogenesis، والتي سيأتي شرحهما بالتفصيل لاحقا). ففي حالة كون الغرض هو انتاج الكالس يزود الوسط الغذائي بمنظمات النمو التالية (**نفثالين حامض الخليك " NAA "بتركيز ٣٠ ملغم.لتر$^{-1}$والسايتوكانين ايزوبنتايل ادينين 2iP بتركيز ٣ ملغم.لتر$^{-1}$ مع٣ غم.لتر$^{-1}$من مسحوق الفحم**، وتحضن الزروعات في الظلام المستمر في المراحل الأولية من الزراعة، وعملية إعادة الزراعة تجرى كل5- 6 أسابيع الى وسط جديد.

ملاحظة **(مالفرق بين اعادة الزراعةReculture والزراعة الثانوية Subculture)**



Organogenesis Technique

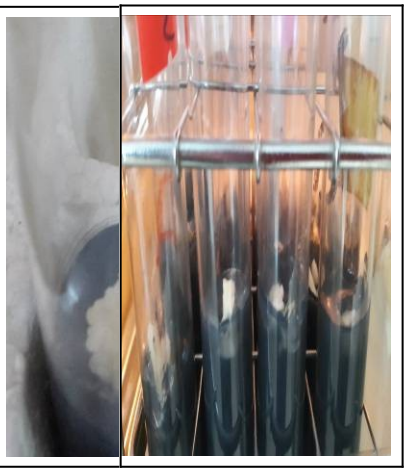
: عملية زراعة أشجار نخيل التمر عن طريق زراعة الأنسجة تمر بعدد من المراحل هي

تقنية تشكل الأجنة الخضرية Embryogenesis Technique بعد تحضين الزروعات في الظلام المستمر على وسط استحثاث الكالس، والتي تختلف مدتها حسب الصنف المزروع ، وتعرف هذه المرحلة بمرحلة نشوء الكالس Callus Formation Stage، ويتم في هذه المرحلة عزل اللب أو الكالس من القمة النامية، ويقطع إلى أجزاء صغيرة، ويوضع كل منها في أنبوب اختبار يحتوي على

وسط غذائي خاص يحتوي على توليفة دقيقة من الأملاح والفيتامينات ومنظمات النمو [**0.1 mg.l^{-1} 6-benzyl adenine (BA), 0.01 mg.l^{-1} naphthalene acetic acid (NAA)**]. والفحم المنشط بتركيز 250 **mg.l^{-1}**، حيث يتم تشجيع تكون الأجنة الجسمية لتبدأ الخلايا بالتخصص والتمايز. بعد تكون الأجنة الخضرية او اللاجنسية او الجسدية تفصل عن بعضها وتنقل الى وسط الانبات والذي يكون عادة خالي من المنظمات النمو Free hormone ، حيث يبدأ تكون الجذير والرويشة وتكون النبيت الكامل داخل الأنابيب .

الأجنة الخضرية المتكونة

الكالس



تشكل الأعضاء الخضرية Organogenesis Technique

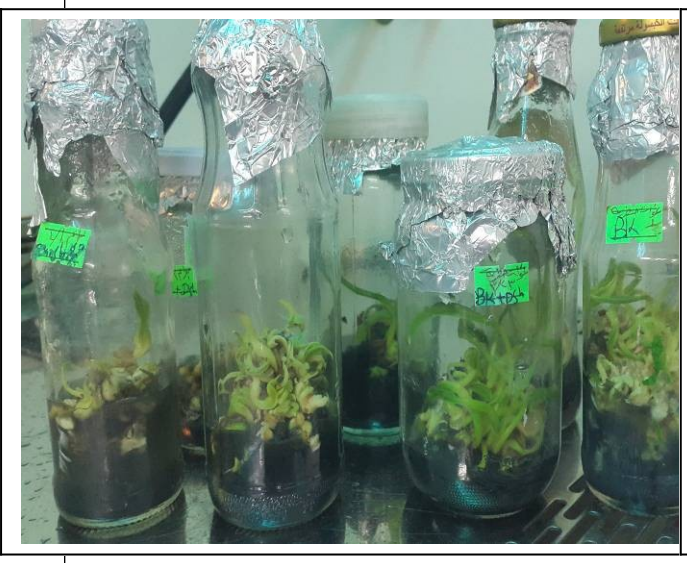
التوالد المباشر Direct organogenesis
التبرعم غير المباشر In direct organogenesis

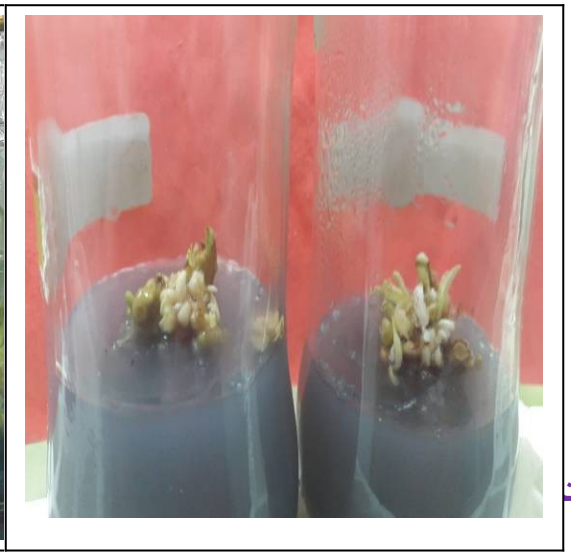
ففي التوالد المباشر تتوالد البراعم مباشرة من النسيج النباتي "Explant " المزروع على وسط توالد البراعم المزود بمنظمات النمو التالية :
1 mg.l^{-1} naphthalene acetic acid (NAA), 3 mg.l^{-1} 2-isopentenyladenin (2iP), 3 mg.l^{-1} 6-benzyl amino purine (BAP).

أما التبرعم غير المباشر تتوالد البراعم بصورة غير مباشرة من أنسجة الكالس المزروعة على وسط التبرعم المكون من بالتركيزين (1 mg.l^{-1}NAA With 1 mg.l^{-1} 2iP OR 3) ومسحوق الفحم 250 ملغم. لتر$^{-1}$.

مرحلة التضاعف والاستطالة: Multiplication Stage

تنقل الأنسجة بعد ظهور البراعم إلى وسط غذائي خاص تحت ظروف الإضاءة الى وسط التضاعف المزود بمنظمات النمو 0.5 mg.l^{-1} Kinetin and 1.0 mg. l^{-1} BAP, 0.5 mg. l^{-1} NAA ، حيث يعمل على تضاعف البراعم والأفرع المتمايزة، وفي هذه المرحلة يتم إنتاج أعداد كثيرة من الأفرع الخضرية واستطالتها .





مرحلة الت

يتم نقل الأفرع السابقة إلى وسط غذائي خاص يحتوي على محفزات التجذير NAA (1^{-1}) mg.l ، حيث تبقى في هذا الوسط لمدة شهر- شهر ونصف ، تنشأ خلالها الجذور والتي سوف تعمل على تزويد النبيتة بحاجتها من المواد الغذائية، وهنا تنتقل النبتة من مرحلة التغذية الرمية إلى مرحلة التغذية الذاتية .

مرحلتي الاستطالة والتجذير

مرحلة الأقلمة:"" Acclimatization Stage""

وهذه المرحلة هي الترجمة النهائية لجميع الخطوات السابقة، حيث تنقل نبيتات نخيل التمر المكثرة بزراعة الأنسجة والمحتوية على ورقتين على الأقل ومجموع جذري جيد من انابيب الزراعة حيث يغسل المجموع الجذري بالماء الجاري للتخلص من بقايا الوسط الغذائي وبعدها بالماء المقطر، ومتابعة لاستكمال الأقلمة والنقل الى تربة الأصص يجري تعقيم النبيتات من خلال وضعها في محلول يحتوي على المبيد الفطري (Benlate) بتركيز 500 مغ/ لتر لمدة (15) دقيقة، ثم تجري زُراعة النبيتات في أصص تحوي على خليط التربة المكونة من البيرلايت والبيتموس (الدبال المتحلل) بنسبة2:1 حجماً:حجم تعُقم خلطات التربة داخل جهاز المعقام وبطريقة تعقيم الأوساط الغذائية نفسها ، وبعد زراعة النباتات في الأصص تتمم متابعة سقيها بالماء المقطر ورشها "بربع التركيز من املاح"MS" حسب ألحاجة واعتمادا على مستوى رطوبة التربة ، مع رش النباتات بالمبيد الفطري Benlate مرة واحدة أسبوعياً بتركيز 500 (مغ/لتر. مع ضرورة تغطية النباتات المزروعة لمدة شهر- شهر ونصف مع ضرورة رفعها بين فترة وأخرى والتي تزداد بمرور الوقت. ثم يزال بعد ذلك وتترك النباتات بدون تغطية، تكون بعدها صالحة للتدوير لأصص أكبر حجما تمهيدا لزيادة النمو ، أو تتم الأقلمة تحت ظروف الرى الرذاذى وذلك بإستخدام مؤقت Timer. وتبقى في البيت الزجاجي لمدة سنة ونصف تقريبا قبل أن يتم نقلها إلى الحقل.

ما يلاحظ عند أقلمة نباتات النخيل :

1 - النباتات المنقولة ذات الأحجام الكبيرة تتميز بمجموع جذرى قوى يكون نسبة نجاحها أفضل في الأقلمة.

2 - يلعب الضوء وشدتة دورا هاما في عملية الأقلمة حيث أن شدة الضوء العالية جدا مع درجة الحرارة العالية تؤثر تأثير سلبى على أقلمة النباتات.

3 - في بعض الأحيان يجب تقليل كمية السكر وزيادة شدة الإضاءة (الكثافة الضوئية) في مرحلة التجذير حتى تنشط إنزيمات البناء الضوئى ويسهل أقلمة النباتات.

4 - كذلك يجب المحافظة على النباتات أثناء نقلها من التعرض لضوء الشمس المباشر حتى لايتأثر نموها.

نبات نخيل منتج بالزراعة خارج الجسم الحي *In vitro*