الفصل الخامس

التكاثر الخضري الدقيق

5-1- تعريف التكاثر الخضري الدقيق Micropropagation :

يقصد بالتكاثر الخضري الدقيق زراعة أنسجة نباتية صغيرة حاوية على أنسجة مرستيمية في أوساط مغذية محددة التركيب بحيث تحوي جميع المكونات اللازمة لنمو الأجزاء النباتية على أن تتم كافة مراحل الزرع ضمن شروط معقمة ثم توضع العينات في شروط خاصة لتحريضها على النمو والإكثار.
يعد التكاثر الخضري الدقيق الطريقة الأساسية في إكثار النباتات بزراعة النسج. يتم الحصول على نباتات مشابهة للنبات الأم في المواصفات المورفولوجية والوراثية والانتاجية. وتكون النباتات الناتجة جيدة الخواص خالية من الأمراض.

يشمل التكاثر الخضري الدقيق حسب الأجزاء المزروعة التقنيات التالية:
1- زراعة عقل صغيرة Microcutting Culture: ويتم فيها زرع عقل صغيرة بطول 1-2 سم تحوي برعم طرفي أو برعم جانبي. وهي أسهل أنواع تقنيات التكاثر الخضري الدقيق، وتعطي نمو سريع وتكون النباتات الناتجة بهذه التقنية مشابهة للنبات الأم وغير خالية من الفيروسات إلا إذا أخذت العينات النباتية من أمهات خالية من الفيروس. لاينصح باستخدام هذه الطريقة في العينات المتخشبة لانه من الصعب الحصول على عقل متخشبة خالية من التلوث.

2- زراعة البراعم والقمم النامية الطرفية Bud or Shoot Apex Culture : ويتم بها زرع براعم جانبية أو طرفية بحجم 1-5 مم. وتكون النباتات الناتجة بهذه التقنية تكون مشابهة للنبات الأم وغير خالية من الفيروسات إلا إذا أخذت العينات النباتية من أمهات خالية من الفيروس. تكون نسبة التلوث أقل من نسبة تلوت العقل الصغيرة.

3- زراعة القمم المرستيمية Meristem Culture : ويتم أخذ القمم المرستيمية بحجم من 0.1-1مم. وفي هذه الحالة يتم الحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية.
4- زراعة أجزاء زهرية : ويتم زراعة البراعم الزهرية أو الأقراص الزهرية بهدف تحول الأجزاء الزهرية إلى براعم خضرية مباشرة دون المرور بمرحلة الكالوس. ويتم الحصول على نباتات مشابهة في تركيبها الوراثي للنبات الأم كما هو الحال في نبات الجيربيرا. وهنا العامل المحدد لنجاح هذه التقنية هو درجة تمايز البراعم الزهرية آو المرحلة التي وصل إليها نمو الأعضاء الزهرية.

2-5- مزايا التكاثر الخضري الدقيق:

تعد وسيلة الإكثار بالنسج من الوسائل الحديثة الهامة والتي لها مردود اقتصادي كبير، وتساهم بشكل كبير في تحسين الإنتاج الزراعي كما ونوعا.
وللتكاثر الخضري الدقيق مزايا كثيرة وأهمها:
1 – تسمح بإنتاج أعداد كبيرة من النباتات الخالية من الأمراض. يعد معدل الإنتاج كبير يضاهي آلاف المرات المعدل الممكن الحصول عليه في طرائق الإكثار التقليدي (Martin et al.,1981; ALMaarri et al.,1986). ففي الورد يمكن الحصول على أعداد تصل إلى 10000 مرة أكثر من الأعداد التي يمكن الحصول عليها من نبات واحد في السنة (Martin et al.,1981). ففي هولندا لوحدها يتم إنتاج أكثر من 100مليون نبات سنويا بزراعة النسج (Hall,1999).

2- تسمح بالحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية وذلك عن طريق زراعة المرستيم الذي لايصاب بالفيروسات. ولهذه التقنية أهمية كبيرة في إكثار البذار وبعض الأنواع النباتية مثل والبطاطا (Morel and Martin,1958;) والموز (Kosky et al.,2002) والفريز (Hanineva et al.,2005).

3- تضمن تقنيات التكاثر الخضري الدقيق الحصول على نباتات مشابهة في تركيبها الوراثي للنبات الأم ، ونسبة الطفرات لاتزيد عن نسبتها في حال الإكثار الخضري التقليدي.

4- تسمح بإكثار الأنواع أوالأصناف التي يصعب إكثارها بالطرائق التقليدية مثل شجرة النخيل حيث تعد طريقة الإكثار بالفسائل هي الطريقة الشائعة في إكثار النخيل ولكن يوجد كثير من أصناف عالية الجودة التي لا تعطي فسائل أو تعطي عدد محدود جدا من الفسائل. ولهذا فتطبيق تقنيات التكاثر الخضري الدقيق يقدم كثير من الحلول في إكثار النخيل وهي ذات عائد اقتصادي كبير وتسمح بتطويرزراعة النخيل وخاصة الأصناف عالية الجودة (ALMaarri,1995).

5- تسمح بإكثار الأصناف والسلالات الجديدة المعتمدة الناتجة عن عمليات التحسين الوراثي والمقاومة لبعض الإجهادات الحيوية واللاحيوية. كما تساهم في سرعة نشر هذه الأصناف تجاريا. كما تسمح بإكثار الأصناف عديمة البذور.

6- تسمح بالعمل على مدار السنة في المختبر . كمايمكن الاستغناء عن حقول الأمهات في المشاتل للأصول والأصناف إذا اعتمد إكثارها بالنسج كما هو الحال في أصل اللوز GF677 .

7- تسمح تقنيات الإكثار بالنسج بتداول ونقل المادة النباتية الموثوقة من بلد إلى آخر دون نقل الأمراض البكتيرية والفطرية والحشرات معها. دون الحاجة إلى تطبيق قواعد الحجر الزراعي. كما هو الحال في النخيل أدى انتشار مرض البيوض وحشرة سوسة النخيل الحمراء نتيجة لنقل الفسائل من بلد لآخر. لو كان معتمد نقل الأصناف عن طريق زراعة النسج لما أدى إلى زيادة وانتشار هذه الحشرة في دول الخليج العربي (ALMaarri,1995).

8- تلعب تقنيات زراعة النسج دورا هاما في حفظ وإكثار الأصول الوراثية النباتية . تعاني كثير من المصادر الوراثية الطبيعية البرية في كثير من بلدان العالم من التدهور والضياع بسبب العوامل البيئية القاسية وبسبب التعديات عليها من قبل الإنسان . لذلك يمكن حفظ هذه الأصول النباتية البرية بوساطة زراعة النسج (، ALMaarri, 2016 ، Abouzaidan et al., 2016) .

5-3- مراحل التكاثر الخضري الدقيق :

تشمل عملية الإكثار الدقيق بالنسج المراحل التالية:

- الزراعة الأولية
- الإكثار والاستطالة
- تجذير العينات
- التقسية أي نقل النباتات المجذرة من الأنابيب إلى الظروف الطبيعية.

5-3-1- الزراعة الأولية : يشمل طور الزراعة الأولية الحصول على عينات نباتية خالية من التلوث ولها قدرة على النمو والإكثار.

تعد من أول شروط نجاح زراعة الأنسجة النباتية هو الحصول على زراعة عينات سليمة خالية من التلوث. يجب المحافظة على سلامة الأنسجة النباتية من التلوث في كافة مراحل التكاثر الخضري الدقيق، لان ظهور التلوث في أي مرحلة يؤدي إلى فشل الزراعة وموت الأجزاء النباتية المزروعة.

يعد التلوث العدو الأول في تقنيات زرع الأنسجة النباتية لانه يسبب فشل الزراعة منذ الأسبوع الأول . لو قارنا الفترة الزمنية اللازمة لانقسام البكتريا (30-60 دقيقة) مع الفترة الزمنية اللازمة لانقسام الخلية النباتية (24-48 ساعة) . فهذا يعني تتكون مستعمرة بكتيرية مقابل انقسام الخلايا النباتية مرة أو مرتين، وطبعا المنافسة على الغذاء في الوسط المغذي تكون لصالح البكتريا، وبالتالي يلاحظ بعد أسبوع موت العينات النباتية.

تعد مشكلة التلوث مشكلة كبيرة في الإكثار الخضري وهي مرتبطة بعدة عوامل مثل طبيعة الأجزاء النباتية ودرجة تخشبها وحجمها، بالإضافة إلى شروط زراعة النبات الأم. نوع المادة المعقمة ودرجة التركيز والفترة الزمنية المستخدمة . شروط جو التعقيم والأدوات المستخدمة ، بالإضافة إلى النظافة العامة في المخبر.
ففي النخيل مثلا تتعلق نسبة التلوث بزراعة النسج بمدى تلوث الخارجي للفسائل المستخدمة ومدى دخول الغبار والتراب إلى داخل قلب الفسيلة. وقد استخدمت مادة هيبوكلوريت الصوديوم المضاف لها عدة قطرات من توين80 لمدة 15 دقيقة بتراكيز مختلفة 1% (Tisserat,1984) ، 5% (AboelNil,1986)، 3% (ALGamdi,1993) و 2% (ALMaarri and ALGhamdi,1994) .
تعد مشكلة التلوث السطحي مشكلة اساسية يجب تخطيها لنجاح زراعة النسج وذلك من خلال دراسة المعقم المناسب والتركيز والفترة الزمنية المناسبة للتعقيم لكل نوع نباتي على حدى.
تعد الأوساط المغذية بيئة مناسبة لنمو الأحياء الدقيقة لذلك يتوجب باستمرار مراقبة طريقة التحضير والتعقيم حتى تكون خالية من التلوث، كما يتم التاكد من أجهزة تعقيم البيئات المغذية، لأن أي عطل مفاجئ في الأوتوغلاف يسبب ظهور نسبة تلوث 100% في العينات في كافة مراحل التكاثر الخضري الدقيق. وهذا يمكن أن يسبب كارثة حقيقية في مخبر إنتاجي، ويقضي على كافة العينات النباتية.
كما يتوجب التأكد من تعقيم أدوات الزرع و الاطباق البتري والزجاجيات، ومن كفاية تعقيم الماء المقطر المعقم الذي يستخدم في غسل العينات النباتية بعد تعقيمها بالمواد الكيميائية. كما لابد من مراقبة العاملين والفنيين الذين يقومون بعمليات الزرع والنقل للتاكد من صحة تنفيذ العمليات ومن أخذ الأحتياطات الضرورية أثناء العمل من تعقيم الأيدي وتعقيم أدوات الزرع ، والنقل تحت جهاز العزل الجرثومي بالشكل الصحيح.
كما لابد من التأكد أخيرا من أن جو العمل سليم وانه لا يوجد أعطال في أجهزة العزل الجرثومي.
لوحظ في بعض الأنواع النباتية وجود تلوث داخلي بكتيري لايظهر في الزراعة الأولية ، إنما يظهر في وقت لاحق في طور الإكثار وقد لوحظ في عدة أنواع خشبية مثل النخيل (Tisserat,1984; Beauchesne,1983) ، وفي الجوز والدفنباخيا والمشمش.
ويمكن أن يحدث التلوث داخل غرف النمو مما يؤدي إلى انتشار بعض الأحياء الدقيقة بشكل مفاجئ. وقد تسبب بعض الكوارث كما حدث في أحد المخابر المغربية لإنتاج النخيل حيث ظهر تلوث مباشرة وأدى للقضاء على 80% من الأنابيب الموجودة في المخبر(Awaain M.,1993).
تظهر نتيجة التلوث في العينات النباتية المزروعة خلال الأسبوع الأول ، وتستبعد كافة العينات الملوثة ويتم المحافظة على العينات السليمة الخالية من التلوث.

5-3-1-1- العوامل المؤثرة في نمو العينات أثناء طور الزراعة الأولية:

تتعلق قدرة العينات النباتية المزروعة في الأنابيب على النمو بمجموعة كبيرة من العوامل يمكن تقسيمها إلى عدة مجموعات كما يلي :
-عوامل متعلقة بالنبات الأم وبالأجزاء النباتية المزروعة: مثل نوع النباتي ، نوع الأصناف ، عمر النبات الأم ، الحالة الصحية للنبات الأم ، موعد زرع العينات النباتية ، شروط زراعة الأمهات ، طبيعة الأجزاء النباتية المزروعة ، حجم الجزء النباتي المزروع، مكان الجزء النباتي على الطرود.

- عوامل مرتبطة بالأوساط المغذية المستخدمة: مثل تركيب المعدني للوسط المغذي ، تركيز السكروز والأحماض الآمينية والفيتامينات، طبيعة الوسط المغذي ، نوع الهرمونات المستخدمة وطبيعتها وتركيزها والتوازن الهرموني في الوسط. نسبة الآجار المستخدمة ونوعها.
- عوامل مرتبطة بالشروط الجوية في غرف النمو: مثل الحرارة ، الأضاءة شدتها ، فترتها ونوعيتها، الرطوبة .

1- تأثير عمر النبات الأم :

يؤثر عمر النبات الأم بشكل مباشر في استجابة العينات المزروعة للنمو. كلما زاد عمر النبات الأم كلما قلت استجابتها للنمو والإكثار بزراعة النسج. ويلاحظ هذا في النباتات الخشبية بشكل عام وفي الأشجار الحراجية وأشجار الفاكهة بشكل خاص. فقد دلت التجارب في التفاح بان القمم النامية المأخوذة من أشجار معمرة تحتاج إلى فترة زمنية حتى تستجيب للنمو بشكل أطول (45-60 يوم) من الفترة الزمنية (30 يوم) التي تحتاجها القمم النامية المأخوذة من غراس فتية بعمر سنة (Jones et al.,1977). ويوضح الجدول (5-1) تأثير عمر النبات الأ م في استجابة العينات النباتية المزروعة.

جدول (5-1): تأثير عمر النبات الأم في استجابة العينات للنمو بالنسج

النوع النباتي المزروع	الجزء المزروع	استجابة النبات الفتي	استجابة النبات المعمر	المرجع
شجرة السيكويا	قمم نامية	+++	0	Fouret et al.,1988
الإجاص	قمم نامية	++	0	ALMaarri et al.,1986
الحمضيات	قمم نامية	+++	+	

البلوط	عقل جانبية	+++	+	Kartsona and Papafotiou,2007
المشمش	عقل جانبية وقمم نامية	+++	+	Abdulmutalib et al.,2008

0 لايوجد استجابة ، + استجابة ضعيفة، ++ استجابة وسط، +++ استجابة عالية.

يختلف طول طور الفتوة بحسب الأنواع النباتية ففي بعض الأنواع يستمر عدة سنوات 5-7 سنوات في أشجار الفاكهة وفي بعض الأنواع الحراجية يستمر 20-40 سنة. والفاصل بين طور الفتوة وطور النضج هو بدء تكوين الأزهار والثمار على الأشجار. ونظرا لأهمية عمر النبات الأم في التكاثر الخضري الدقيق سوف يتم التعرف على أنواع العمر النباتي وعلى كيفية تجديد فتوة الأشجار.
يمكن تمييز ثلاث أنواع من عمر الأشجار الخشبية :

- العمر الزمني Chronological ageing : وهو العمر الزمني الحقيقي للشجرة والذي يستدل عليه من الإنبات وحتى السنة المراد زرع العينات النباتية. شجرة بعمر 40سنة أو 200 سنة.

- العمر التطوري Ontogenetical ageing : وهو المراحل التي تمر بها الأشجار من حيث التطور من الإنبات وحتى الشيخوخة أي طور الفتي طور النمو الخضري، طور النمو والإثمار ، طور الإثمار المليء ، طور الشيخوخة. تختلف طول الفترة الزمنية لكل مرحلة باختلاف الأنواع النباتية.

- العمر الفيزيولوجي Physiological ageing : وهي درجة النشاط الفيزيولوجي التي يتمتع بها النبات بحسب العمر التطوري والعمرالزمني. ففي طور الفتي يلاحظ نشاط فيزيولوجي كبير في النبات ومناطق النمو ،أما في طور الشيخوخة يلاحظ ضعف فيزيولوجي واضح في الأشجار الهرمة. ولابد من الإشارة بأن العمر الفيزيولوجي للنموات القريبة من الجذور يكون أقل من العمر الفيزيولوجي للبراعم الموجودة في النموات الطرفية من الأشجار. وبالتالي درجة استجابتها عند زراعتها بالنسج تكون أعلى من استجابة العينات الماخوذة من المناطق العلوية من الشجرة (Ballester et al. 1990).
في كثير من الأحيان تحمل الأشجار المعمرة الكبيرة بعض الصفات الهامة والتي يهمنا المحافظة عليها وإكثارها، مثل المقاومة لبعض الأمراض والحشرات أو ذات مواصفات ثمرية جيدة او متحملة لبعض العوامل البيئية مثل مقاومة درجات الحرارة المنخفضة أو متحملة للكلس والجفاف لذلك يتم العمل على إكثارها بالنسج .

يتطلب تجديد فتوة الأشجار المعمرة حتى تستعيد قدرتها في النمو والإكثار بالنسج . يوجد عدة طرائق لإعادة فتوة الأشجار الهرمة مثل القطع التجديدي، التطعيم على غراس بذرية فتية ، التطعيم المتكرر والتعقيل المتكرر. كما لوحظ عند زرع العينات النباتية بالنسج تكتسب صفات النباتات الفتية، لذلك تعد زراعة المرستيم أو التطعيم الدقيق أو الإكثار المتكرر من طرائق تجديد فتوة الأشجار الهرمة بزراعة النسج.

2- موعد زرع العينات النباتية :

تختلف الفترة الزمنية المناسبة لزرع العينات النباتية باختلاف الأنواع النباتية. فقد لوحظ بالتفاحيات واللوزيات بأنه أفضل موعد لزرع القمم النامية في نهاية الشتاء بعد كسر طور السكون وقبل تفتح البراعم أي في بداية آذار وحتى نهايته (ALMaarri et al., 2007 ; Druard et al.,). وفي بعض النباتات كالورد لوحظ في بداية الربيع عندما يصل طول النموات على 10-20 سم.

اما في النخيل فقد لوحظ بان أفضل موعد لزرع العينات النباتية الماخوذة من الفسائل وذلك خلال شهر كانون الأول وكانون الثاني حيث تم الحصول على أفضل نسبة من العينات النامية وأقل نسبة اسمرار للأنسجة النباتية بالمقارنة مع أشهر الصيف التي ينعدم فيها النمو(Beauchsene,1988; ALMaarri and ALGhamdi 1998)، وترتفع نسبة الأسمرار بسبب زيادة إفراز المركبات الفينولية وزيادة نشاط انزيمات البيروكسيديز في الصيف وتقل نسبتها في الشتاء (Bakir et al.,1988)

3- طبيعة الجزء النباتي المزروع :

تختلف استجابة الأجزاء المزروعة بحسب الأنواع النباتية. كما لطبيعة العينات النباتية أهمية في درجة استجابتها للنمو. ففي بعض الأنواع النباتية لوحظ استجابة البراعم الطرفية أفضل من البراعم الجانبية. والعقل الغضة أفضل من العقل المتخشبة . وفي بعض الأنواع يلاحظ استجابة البراعم الزهرية أكثر من الأجزاء النباتية الأخرى ، كما هو الحال في الجربيرا. يوجد علاقة مباشرة بقدرة العينات المزروعة للنمو مع قدرتها على التشكل وتكوين نباتات كاملة . فمثلا في البيجونيا ريكس تبين بان زرع الأوراق أو أعناق الأوراق أعطى نتيجة إيجابية أكثر من زرع أجزاء نباتية أخرى (ALMaarri et al.,1995). ففي نبات العرق السوس أوضحت التجارب بان زرع العقل الجانبية أعطت معدل إكثار أعلى من العقل الطرفية والقمم النامية (Badekan et al., 2016). وقد لوحظ في بعض النباتات بأن رقم العقلة على الطرود تؤثر في استجابة العينات الجانبية للتكاثر الخضري الدقيق ففي شجرة الجوافة تم الحصول على أعلى معدل إكثار من العقل الجانبية رقم 2 أكثر من العقل الطرفية والقاعدية من الطرود (Shekafandeh and Khash-Khui, 2008).

ففي إكثار النخيل بالنسج فقد دلت التجارب بأن تم الحصول على استجابة متفاوتة ، وكانت القمم النامية أفضل الأجزاء المزروعة ، ثم البراعم الجانبية وأخيرا الوريقات الداخلية حول القمة النامية. أما الأجزاء النباتية المتمايزة أو في طريقها إلى التمايز

ليس لها القدرة على النمو وتكوين براعم خضرية ، بل على العكس تنمو ويزداد قطرها واستطالتها ولا تعطي أي استجابة للنمو بل يظهر عليها علامات الأسمرار وتنتهي بالموت. لذلك لطبيعة الأجزاء المزروعة في النخيل أهمية كبيرة في نجاح إكثار النخيل بالنسج (Beauchesne,1980; ALMaarri,1995).

5-3-1-2- تأثير العوامل المتعلقة بالأوساط المغذية :

1-تأثير التركيب المعدني للوسط المغذي:

يختلف تاثير التركيب المعدني في الوسط المغذي في استجابة العينات المزروعة بالنسج بحسب الأنواع النباتية. فقد دلت التجارب في كثير من النباتات الخشبية ونباتات الزينة بان أفضل محلول استخدم هو المحلول المعدني لموراشيج وسكوغ (1962) ،حيث يعطي نتائج جيدة في كثير من الأنواع النباتية المكاثرة بالنسج . يمتاز المحلول المعدني MS بكونه غني بالعناصر المعدنية ويحوي كافة العناصر اللازمة لنمو العينات النباتية المزروعة . ولا يحبذ استخدام الوسط المعدني MS في بعض الأنواع النباتية لانه يسبب ظهور مرض الشفافية، بسبب غناه بعنصر الآمونيوم، منذ طور الزراعة الأولية ، كما هو الحال في إكثار القرنفل بالقمم المرستيمية. ففي هذه الحالة يتم تخفيف نترات الآمونيوم إلى الربع أو النصف، للحد من ظاهرة الشفافية.

ففي تجربة نفذت على إكثار الفستق الحلبي بزراعة النسج حيث زرعت عقل جانبية صغيرة بطول 1-2سم غضة في عدة أوساط مغذية تحوي محاليل معدنية مختلفة وهي MS , KNOP, WPM, A Anderson وقد اضيف نفس تركيب الوسط المغذي وبعد شهر من الزراعة لوحظ بأن أفضل محلول معدني هو MS حيث أعطى أعلى نسبة نمو في العينات المزروعة والتي بلغت 66.6% ، أما نسبة النمو في المحاليل الأخرى كانت بالترتيب 38% لمحلول KNOP ، 11% لمحلول WPM ، و5.6% في محلول المعدني ل Anderson (Abousalim,1991).

2-تأثير الهرمونات في الوسط المغذي:

تلعب الهرمونات النباتية دورا أساسيا في استجابة العينات النباتية للنمو. تختلف أنواع الهرمونات وتركيزها وتوازن فيما بينها باختلاف الأنواع النباتية ومدى قدرة العينات المزروعة على التشكل والنمو. يضاف عادة ثلاث أنواع من الهرمونات النباتية في وسط الزراعة الأولية سيتوكينيتن وأوكسين وجبرلين. وعادة تكون نسبة السيتوكينين على الأوكسين أكبر أو تساوي الواحد. بالنسبة للتكاثر الخضري الدقيق لكثير من الأنواع النباتية. تختلف نوعية السيتوكينيات ونوعية الأوكسينات المستخدمة وتراكيزها بحسب الأنواع النباتية . ويوضح الجدول (5-2) تركيز الهرمونات وتوازنها في إكثار بعض الأنواع النباتية.

جدول (5-2) : تركيز الهرمونات المستخدمة في الزراعة الأولية في بعض الأنواع .

النوع النباتي	نوع السيتوكينين وتركيزه مغ/ل	نوع الأوكسين وتركيزه مغ/ل	سيتوكينين/ أوكسين	المرجع
التفاح	BAP 1	IBA 1	1	Jones et al.,1977
البنفسج الإفريقي	BAP 0.1	IAA 0.1	1	Auge et al.,1984
السفرجل	BAP 1	IBA 0.2	5	ALMaarri et [al.,1986
النخيل	BAP 1	IBA 1	1	Drira,1983
الكريزنتيم	K 2	NAA 0.2	20	Chaussat & Bigo,1980
آرتيميزيا آنا	TDZ 1	IBA 0.5	2	ALMaarri & Xie, 2009

تتطلب بعض الأنواع النباتية إضافة الهرمونات بشكل خاص ، أنواع خاصة من الهرمونات النباتية كما هو الحال في النخيل حيث ثبت بأن إضافة ال2iP أعطى نتائج أفضل من استخدام أنواع أخرى من السيتوكينينات(ALMaarri,1995).
ولابد من الذكر بأنه في بعض الأ نواع النباتية يضاف الجبريلين إلى وسط الزراعة الأولية ، وفي بعض الأنواع الأخرى ليس من الضروري إضافة الجبريلين.

5-3-1-3- عوامل متعلقة بشروط غرف النمو:

تؤثر العوامل الجوية في غرف النمو في مخابر زرع الأنسجة النباتية في نمو العينات المزروعة في طور الزراعة الأولية. تختلف الحرارة المناسبة بحسب الأنواع النباتية ، يستخدم درجة حرارة 22 إلى 24± 1°م بشكل عام في كثير من الأنواع النباتية.ويوجد بعض الأنواع التي تفضل التناوب الحراري بين الليل والنهار 24 ° نهارا و12 ° ليلا.
كما تؤثر الإضاءة في نمو العينات المزروعة. يستخدم عادة 16 ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام في غرف النمو وهذا يناسب كثير من النباتات المكاثرة بالنسج.
يستعمل في بعض المعاملات شروط إضاءة خاصة كفترة ظلام في بداية زرع العينات النباتية كما هو الحال عندما يراد تكوين براعم مباشرة على أوراق او أعناق

Direct Organogenesis ، كما هو الحال عند تكوين براعم في أوراق الإجاص السوري البري ، يتم وضع العينات المزروعة بالظلام لمدة 30 يوما على درجة حرارة 24°م ثم تنقل على شروط إضاءة 16 ساعة يوميا بشدة 3000 لوكس (ALMaarri & Thouma,2009).

تؤثر الرطوبة الجوية النسبية في نمو بعض الأنواع النباتية مثل الورد الذي لوحظ بشكل كبير انخفاض معدل إكثاره بالشتاء بسبب تدفئة غرف النمو التي عملت على خفض الرطوبة الجوية. وقد تم السيطرة على مشكلة نمو العينات المزروعة وإكثارها عن طريق زيادة الرطوبة الجوية في غرف النمو على 70% (Coudret, 1991)

5-3-2- طور الإكثار والاستطالة :

تنمو الأجزاء النباتية أثناء طور الزراعة الأولية وتعطي نمو بطول 1-2 سم. تنقل النموات إلى وسط خاص بالإكثاربهدف زيادة عدد النموات الخضرية المتكونة نتيجة نمو البراعم الجانبية وتكوين براعم عرضية ونموها ونمو البراعم الطرفية. يهدف طور الإكثار إلى الحصول على أكبر معدل من النموات الخضرية ذو النوعية الجيدة. لا يهم فقط تكوين نموات خضرية جديدة بأعداد كبيرة ، بل يجب الانتباه إلى جودة ونوعية النموات المتكونة.

ترتبط نوعية النموات الجديدة المتكونة بثلاث عوامل :

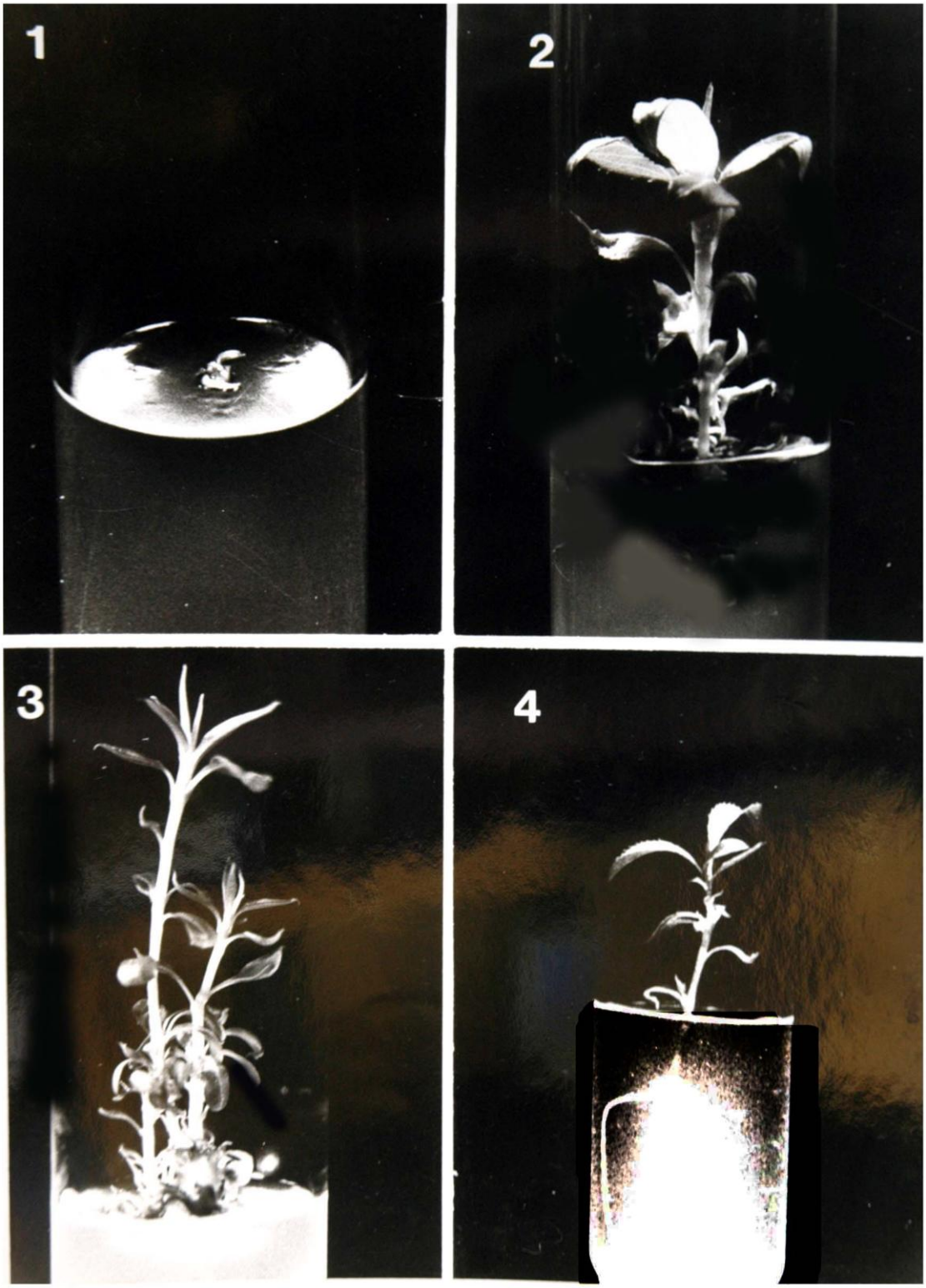
- ان تكون خالية من الإصابة بمرض الشفافية.
- أن تكون مستقيمة غير ملتوية وجيدة النمو.
- ان تكون ذات استطالة جيدة، وتحتوي على أوراق جيدة التكوين كما هو موضح بالشكل (5-1).

لابد من الذكر بان النموات المصابة بظاهرة الشفافية تصبح ضعيفة النمو وتفقد بشكل تدريجي قدرتها في النمو والتجذير فيما بعد ، وإذا جذرت تموت أثناء عملية التقسية.

5-3-2-1- نماذج إكثار النباتات بزراعة النسج:

تختلف طرائق إكثار النباتات بزراعة النسج بحسب النوع النباتي وحسب طبيعة وطريقة نموه ، وقدرته على التجديد والتشكل. فالنباتات الخشبية تعطي نموات تختلف بشكل جذري عن طريقة إكثار النباتات العشبية أو الريزومية، أو البصلية. كما تختلف طريقة إكثار نباتات وحيدة الفلقة عن نباتات ثنائية الفلقة. لذلك يمكن ملاحظة كثير من نماذج الإكثار بزراعة النسج ومنها :

1-الإكثار العمودي بساق واحدة ، كما هو الحال بالبطاطا حيث تنمو العينات بشكل عمودي وتصل إلى طول أكثر من 10-15 سم . وفي هذه الحالة يتم تقسيم النبات إلى عقل صغيرة جانبية بطول 1-1.5 سم بهدف الإكثارحيث تعود وتنمو وتعطي نمو



الشكل (5-1): إكثار الإجاص بزراعة القمة النامية. 1- زراعة قمة نامية، 2- نمو القمة بعد شهرين من الزراعة، 3- طور الإكثار، 4- طور التجذير.

شاقولي طويل بعد ثلاث اسابيع . وهذا يعني بأنه يمكن الحصول على 7-10 عقل من عقلة واحدة خلال 3-4 أسابيع . بمعدل إكثار عال.
ينصح في هذا النموذج استخدام أنابيب طويلة بطول 20 سم.

2- الإكثار بالنموات الجانبية القاعدية: تنشأ النموات الخضرية من البراعم الجانبية والبراعم العرضية التي تتكون في قاعدة الجزء النباتي. يتم في هذه الحالة إزالة البراعم القمية للنموات مع الأوراق القديمة لتشجيع نمو البراعم الجانبية والبراعم العرضية وتكوين نموات جديدة واستطالتها. يلاحظ هذا النموذج في كثير من الأشجار الخشبية مثل التفاحيات واللوزيات الشكل (5-1).

3- الإكثار بالبروتوكروم: يلاحظ هذا النموذج في إكثار نباتات الأوركيد مثل السمبيديوم Cymbidium . ينشأ البروتوكروم من زراعة القمم النامية في الأوركيد وعند تطور القمة تعطي كتل كروية الشكل تدعى بالبروتوكروم .
والبروتوكروم هو كتلة كروية خضراء اللون بأحجام مختلفة من2-5مم عندما تتطور تنمو وتعطي نمو خضري وبعد نموها يمكن أن تنقل على محلول تجذير لتجذر وتعطي نباتات كاملة. أثناء الإكثار تتشكل بروتوكرومات ثانوية صغيرة الحجم وثم تتطور لتعطي بروتوكرومات جديدة وهكذا تكون وسيلة الإكثار في الأوركيد (Hartmann & Kester,1983; Margara,1982).

4- الإكثار بالبراعم الريزومية: وطريقة من طرائق إكثار النباتات الريزومية بالنسج حيث يلاحظ تكون براعم على الريزوم أثناء طور الإكثار كما هو الحال في نبات الايستروميريا Estromeria . يلاحظ في الأجزاء المكاثرة تكون جزء متضخم وعليه تتكون البراعم الريزومية وتنمو لتعطي نموات خضرية جديدة (الشكل 5-2) (ALMoussa et al.,2009).

5- الإكثار بالبصيلات : يلاحظ هذا النموذج في إكثار النباتات البصيلية بالنسج حيث تتكون بصيلات صغيرة في آباط الوريقات أو تتكون بصيلات جديدة ثانوية بجانب البصيلات المتكونة بالنسج يمكن أن تفصل وتنقل من جديد لمحلول إكثار لتكوين بصيلات جديدة . يلاحظ هذا النموذج في نبات الليليوم.

6- الإكثار بالأجنة الخضرية: وهو أحد النماذج الأساسية في إكثار بعض الأنواع النباتية مثل النخيل وقد تتكون الأجنة الخضرية مباشرة دون تكوين الكالوس الجنيني أو تتكون بعد تكوين الكالوس الجنيني (Tisserat,1983). تشبه الأجنة الخضرية المتكونة الأجنة الجنسية حيث عند تطور وانبات الجنين الخضري يعطي الجذيرفي بادئ الأمر ثم البريعم ويتطور فيما بعد ليعطي نبات كامل (الشكل 5-4).

7- الإكثار بتشكيل البراعم مباشرة على أجزاء خضرية: يتم في هذه الحالة تشكيل البراعم مباشرة على أجزاء خضرية أو زهرية مثل البيجونيا، الجربيرا، البنفسج الإفريقي، و الآرتيميزيا آنا (ALMaarri and Xie,2009). وثم يتم إكثار هذة البراعم لتشكيل نموات وبراعم جديدة بالتقسيم. ويوضح الشكل (5-3) تكون النموات الجانبية من البراعم العرضية في النخيل.

ومن الجذير بالذكر بأنه يمكن ملاحظة نماذج أخرى في إكثار الأنواع النباتية لم تذكر في هذه العجالة. أو يمكن أن تشبه أحد نماذج الإكثار المذكورة مع وجود بعض الخلافات تتعلق بالنوع المدروس.

5-3-2-3- العوامل المؤثرة في إكثار الأجزاء النباتية:

يوجد عوامل كثيرة تؤثر في إكثار النباتات بزراعة النسج .

- منها ماهو متعلق بالنبات الأم حيث كافة العوامل التي أثرت بطور الزراعة الأولية تؤثر في طور الإكثار مثل عمر النبات الأم ، الحالة الفيزيولوجية للنبات الأم ، موعد زرع العينات النباتية طبيعة الجزء النباتي المزروع ، النوع النباتي والأصناف، كل هذه العوامل يجب أن تدرس بعناية لوضع الشروط المناسبة للحصول على معدل إكثار جيد .

فمثلا على سبيل الذكر ، يؤثر عمر النبات الأم في معدل الإكثار بشكل مباشر فالنباتات المعمرة تتصف بمعدل إكثار منخفض بالمقارنة مع النباتات الفتية وفي كثير من الأحيان لاتبدي استجابة للإكثار والنمو والأمثلة كثيرة على ذلك في مجال الأشجار الخشبية والحراجية (Franklet,1980).

وقد لوحظ بان لموعد زرع العينات النباتية تاثير مباشر في معدل نموها وإكثارها . فإذا زرعت في الوقت المناسب تنمو وتعطي معدل إكثار جيد أما إذا زرعت في وقت غير مناسب فيلاحظ تدني معدل الإكثار بشكل كبير. يظهر هذا الأثر بشكل واضح بالنباتات المعمرة أكثر من نباتات العشبية.

وقد لوحظ بان الحالة الصحية للنبات الأم وشروط زراعته تؤثر في معدل الإكثار ، فإذا اخذت العينات من نباتات جيدة موضوعة في بيت محمي تعطي معدل إكثار أفضل من المعدل الممكن الحصول عليه من عينات من نفس النوع مأخوذة من نباتات ضعيفة النمو أو مزروعة في ظروف غير مناسبة.

- عوامل مرتبطة بالأوساط المغذية :

تؤثر مجموعة من العوامل المتعلقة بالأوساط المغذية في معدل الإكثاربزراعة النسج لكثير من الأنواع النباتية، مثل التركيب المعدني ، تركيز الهرنونات النباتية ونوعها، تركيز السكروز ، طبيعة الوسط فيما إذا كان سائل أو صلب...
يختلف تركيب الوسط المناسب بحسب الأنواع النباتية ، حتى بحسب الأصناف ضمن النوع الواحد.

1- تأثير التركيب المعدني في الإكثار بزراعة النسج:

يؤثر التركيب المعدني للوسط المغذي في معدل الإكثار وفي متوسط استطالة النموات وفي نوعية النموات الجديدة المتكونة. فعند إكثار الأشجار المثمرة لوحظ بأن المحلول المعدني لموراشيج وسكوغ يزيد في نسبة النموات المصابة بمرض الشفافية (ALMaarri et al.,1987; Letouze and Dauguin,1983). ويعزى السبب بان المحلول المعدني MS غني بنترات الآمونيوم ولذلك عند تخفيض نترات الآمونيوم في الوسط إلى النصف أو الربع تقل بشكل كبير نسبة العينات المصابة بمرض الشفافية (Quoirin et Lepoivre,1977).
وقد لوحظ بوضوح تاثير التركيب المعدني في نوعية النموات الخضرية المتكونة . ففي تجربة نفذت لدراسة تاثير المحلول المعدني في إكثار الإجاص والنخيل. وقد توضح تاثير التركيب المعدني في نوعية النموات المتكونة بشكل واضح كما هو موضح بالجدول (5-3).

جدول (5-3): تأثير التركيب المعدني في نوعية النموات المتكونة أثناء طور الإكثار

المحلول المعدني	النبات	معدل الإكثار	% للشفافية
Qouirin & Lepoivre	الإجاص	5	20.8
Murahige and Skoog	الإجاص	5.1	45.8
Murahige and Skoog	النخيل	2.1	25
Beauchesne	النخيل	2.3	8

يختلف التركيب المعدني بين الأوساط المذكورة بمدى غناها بنترات الآمونيوم حيث MS يحوي 4 مرات زيادة عن المحاليل الأخرى وهذا مايفسر زيادة نسبة الشفافية عند استخدامه في الوسط المغذي (ALMaarri & ALGhamdi,1996).

2-تأثير تركيز الهرمونات النباتية المستخدمة في الإكثاربالنسج:

يختلف محتوى وسط الإكثار من الهرمونات النباتية بحسب الأنواع النباتية . يتوجب أن يكون مستوى السيتوكينين على الأوكسين أكبر من الواحد في كثير من الأنواع النباتية كون السيتوكينبن يحد من السيادة القمية ويشجع نمو وتكوين البراعم الجانبية والعرضية. يخالف هذه القاعدة بعض النباتات التي تتمتع بنموذج إكثار عمودي ذات النمو الواحد مثل البطاطا.

يختلف نوع السيتوكينين المستخدم وتركيزه بحسب الأنواع النباتية وبحسب الأصناف ، فبعض الأنواع تفضل ال BAP مثل التفاحيات واللوزيات، وبعض الأنواع تفضل الكينتين مثل بعض نباتات الزينة وبعض الأنواع تفضل ايزوبتنيل آدنين مثل النخيل. وقد دلت التجارب بانه يزداد معدل الإكثار وتقل نسبة استطالة النموات المتكونة مع ازدياد تركيز السيتوكينين في الوسط . كما دلت التجارب بزيادة نسبة النموات المصابة بالشفافية مع زيادة نسبة السيتوكينين في الوسط المغذي كما هو موضح بالجدول (5-4) ،عند إكثار الإجاص والسفرجل (ALMaarri & ALGhamdi,1996).

جدول (5-4): تأثير السيتوكينين في إكثار السفرجل والإجاص

تركيز ال BAP مغ/ل	معدل الإكثار بالسفرجل	% للشفافية بالسفرجل	معدل الإكثار بالإجاص	% للشفافية بالإجاص
0	1	0	1	0
0.5	3.6	0	4	0
1	4.2	0	4.6	10
2	5.2	10	5.4	25
4	6.1	30	---	---

مما لا شك فيه بأن زيادة تركيز السيتوكينين في وسط الإكثار يزيد في نسبة النموات الخضرية المتكونة ولكن يؤثر بشكل سلبي على نوعيتها حيث تقل استطالة النموات وتزيد نسبة العينات المصابة بالشفافية.
لذلك للحكم على التركيز الأنسب أي الذي يعطي أفضل معدل من النموات الخضرية ذو النوعية الجيدة هو 0.5 مغ/ل للإجاص و1مغ/ل للسفرجل.
وقد لوحظ ظهور ظاهرة الشفافية أيضا عند إكثار النخيل بالأجنة وذلك عند استخدام تراكيز عالية من السيتوكينين (Zaid,1989 ، المعري 1995).
كما لابد من الإشارة إلى وجود تاثير واضح لنسبة السكروز في الوسط المغذي في معدل الإكثار وفي استطالة النموات المتكونة. حيث لوحظ أفضل تركيز يختلف باختلاف الأنواع النباتية بين 20-30غ/ل. فالتراكيز الخفيفة تزيد من احتمال إصابة النموات المتكونة بظاهرة الشفافية كما يكون معدل الإكثار منخفض. أما التراكيز العالية 50غ/ل ومافوق تعطي نموات خالية من الشفافية ولكن نسبة استطالتها تكون منخفضة نسبيا . وهذا الأثر غير واضح في بعض الأنواع النباتية وقد وجد بوضوح في التفاح والإجاص.
تتكون داخل الأنابيب أثناء طور الإكثار أوراق ذات شكل مورفولوجي وفيزيولوجي خاص يختلف عن الأوراق التي تتكون بالطبيعة. فقد تبين بان الأوراق النباتات داخل الأنابيب تحتوي على طبقة شمعية رقيقة، وعلى عدد من المسامات التي تبقى مفتوحة بشكل اقل بكثير من الأوراق التي تنمو طبيعيا، كما لوحظ بأن أوراق النباتات النسيجية ذات محتوى منخفض من الكلوروفيل والنظام الأنزيمي الخاص بالاصطناع الضوئي غير مكتمل مما ينعكس سلبا على عملية الاصطناع الضوئي التي تكون شبه معدومة في الأنابيب كما هو الحال في إكثار الكيوي (Gago et al.,2014). كما لوحظ بان لتركيز السكروز وشدة الإضاءة تأثير واضح في محتوى الأوراق من اليخضور في الكيوي المكاثر بالنسج وكان أفضل تركيز من السكروز أعطى اعلى نسبة من اليخضور هو 2.3% .
تلعب طبيعة الوسط المغذي دورا مهما في إكثار العينات النباتية فقد لوحظ زيادة معدل الإكثار عند استخدام المحاليل السائلة في بعض الأنواع النباتية مثل في الفريز (Hanhineva et al.,2005) ، وكان الأثر سلبي في أنواع أخرى إذ أدى إلى زيادة ظاهرة الشفافية كما في العنب.

5-3-2-4-تأثير شروط غرف النمو :

تؤثر الشروط الجوية في غرف النمو في إكثار العينات النباتية بالنسج. فعند انخفاض درجة الحرارة عن درجة الحرارة المثالية وهي بين 22 إلى 24° م تنعكس بشكل سلبي في معدل إكثار العينات النباتية وفي استطالة النموات الجديدة المتكونة.
تستخدم عادة فترة ضوئية 16 ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام في معظم الأنواع النباتية المكاثرة بالنسج . تستخدم أحيانا نظام إضاءة مغاير في بعض الأنواع النباتية ولأغراض خاصة محددة. كما هو الحال في البطاطا يستخدم شروط نهار قصير(16 ساعة ظلام و8 ساعات إضاءة) لتحريضها على تكوين درينات داخل الأنابيب.

تؤثر شدة الإضاءة في معدل إكثار العديد من الأنواع النباتية حيث تتطلب إضاءة ذات شدة ضعيفة إلى متوسطة، وزيادة شدة الإضاءة تحد من استطالة النموات المتكونة وتزيد من درجة تخشبها .
تؤثر الفترة الضوئية في نمو الخزعات النباتية المزروعة داخل الأنابيب، ففي ظروف النهار الطويل تكون نسبة النمو ومحتوى اليخضور وعدد المسامات أعلى من ظروف النهار القصير(Jo et al,2008). كما تبين أن شدة الإضاءة ونوعية الإضاءة توثر في نمو وإكثار العينات النباتية المزروعة بالزجاج. فقد لوحظ بأن الليد الأبيض أعطى نتائج إيجابية أفضل من الإضاءة بالفلورسنت الأبيض (Li et al.,2013). كما هو الحال في إكثار نبات الأوركيد *Vanilla planifolia* في المكسيك كان معدل الإكثارعالي، عند استخدام الليد الأبيض والليد الحمر مع الأزرق (Bello-Bello et al.,2016).
تؤثر الرطوبة الجوية في معدل إكثار بعض الأنواع النباتية لان انخفاض نسبة الرطوبة في غرف النمو تسرع من جفاف الأوساط المغذية والعينات النباتية وتقلل من إكثارها كما هو الحال في الورد.

5-3-3-تجذير العينات داخل الأنابيب :

يهدف طور التجذير إلى تكوين جذور ذو نوعية جيدة في النموات المتكونة أثناء طور الإكثار. تتكون مجموعة من النموات الخضرية التي يختلف عددها بحسب الأنواع النباتية، وليس كل النموات المتكونة صالحة للنقل إلى وسط تجذير.
يجب أن تكون النموات الصالحة للتجذير ذات نمو جيد طويلة ومستقيمة وغير مصابة بظاهرة الشفافية، وتحوي أوراق جيدة التكوين ودرجة تخشب الساق جيدة وغير رفيعة. لهذا السبب يجب التأكيد على نوعية النموات الجديدة المتكونة أثناء طور الإكثار حيث تشكل العينات الأساسية الصالحة للنقل إلى وسط التجذير بهدف الحصول على نباتات جيدة بعد تجذيرها داخل الأنابيب.
تختلف قدرة العينات النباتية على التجذير بحسب الأنواع النباتية وحسب الأصناف والسلالات المختلفة. ويجب التركيز في نسبة التجذير الممكن الحصول عليها وفي نوعية الجذور المتكونة كما هو موضح في الشكل (5-3) .
ترتبط نوعية الجذور المتكونة بعدة عوامل :
1- كمية الكالوس المتكونة في قواعد العقل كلما كانت نسبة الكالوس كبيرة كلما أدى إلى تشكيل جذور ذو نوعية سيئة ، لان وجود الكالوس يؤدي إلى ضعف ارتباط الجذور مع العقلة نفسها وبالتالي تصبح الجذور سهلة الإنفصال عن النبات مما يؤدي إلى انخفاض في نسبة نجاح عملية التقسية، وقد لوحظت هذه المشكلة بشكل واضح في الإجاص(ALMaarri et al.,1994).
2- عدد الجذور المتكونة .
3- سماكة الجذور المتكونة.
4- استطالة الجذور المتكونة.

تتصف الجذور بكونها ذو نوعية جيدة عندما تكون خالية أو تحوي الحد الأدنى من الكالوس وتحوي عدد جيد من الجذور الرفيعة والطويلة.
للحكم على قدرة النباتات على التجذير فلابد من الحصول على نسبة تجذير عالية نسبيا 70-80% مع تكوين جذور ذي نوعية جيدة. حتى نحصل على نباتات كاملة صالحة للنقل إلى الظروف الطبيعية.

5-3-3-1-العوامل المؤثرة في تجذير العينات النباتية داخل الجذور:

ترتبط قدرة العينات النباتية على التجذير داخل الأنابيب بمجموعة كبيرة من العوامل . عوامل متعلقة بالنبات الأم والعينات نفسها، عوامل تتعلق بتركيب الأوساط المغذية ، وعوامل متعلقة بشروط غرف النمو.

- العوامل المتعلقة بالنبات الأم:

إن كافة العوامل التي أثرت بطور الزراعة الأولية فهي تؤثر بدورها في قدرة العينات النباتية في التجذير. من هذه العوامل النوع النباتي واختلاف الأصناف، عمر النبات الأم ، موعد زرع العينات النباتية ، الحالة الصحية للنبات الأم.

1- النوع النباتي : تختلف قدرة الأنواع النباتية في تجذير والإكثار بحسب الأنواع. يوجد أنواع سهلة التجذير مثل البطاطا التبغ ، ونباتات متوسطة إلى صعبة التجذير بالنسج مثل الأشجار الفاكهة والخشبية ، ونباتات صعبة جدا وهي تحتاج إلى معاملات كثيرة حتى تنمو وتتكاثر بالنسج مثل بعض الأشجار الحراجية وبعض أصناف النخيل.
يجب القيام بدراسة تفصيلية لكافة العوامل التي تؤثر في الإكثار والتجذير عند ما يراد إكثار نوع نباتي بالنسج للتوصل إلى أفضل الشروط التي يمكن أن تعطي نتائج جيدة قابلة للتطبيق.

2- عمر النبات الأم : تتصف العينات المأخوذة من نباتات فتية بقدرة كبيرة على الإكثار والتجذير. أما العينات المأخوذة من أمهات معمرة تكون قدرتها على الاستجابة للنمو متدنية ونسبة تجذيرها منخفضة. لذلك يتم عادة تجديد فتوة وحيوية الأشجار المعمرة لتستعيد قدرتها على النمو والإكثار بالنسج.
يعد معيار تجذير العينات النباتية بالأنابيب أحد المعايير الأساسية في اكتساب العينات النباتية المعمرة بعض صفات النباتات الفتية وتزداد قدرتها على التجذير Rejuvenation.
تعد زرع القمم المرستيمية أحد تقنيات تجديد فتوة الأشجار المعمرة. ففي تجربة نفذت على أشجار هرمة من السيكويا *Sequoia sempervirence* بعمر 600 سنة . ففي حال الشاهد الفتي كانت نسبة التجذير عالية جدا اكثر من 90%. بينما كانت نسبة

التجذير معدومة في الأشجار المعمرة. نفذت عملية النقل المتكرر للقمم المرستيمية بمعدل مرة كل شهر لمدة 24 شهرا، وقد تم نقل جزء من العينات إلى وسط تجذير. وقد لوحظ أن نسبة تجذير العينات المعمرة كانت معدومة حتى عملية النقل ال14 ، بعدها بدأت تزداد نسبة التجذير بشكل تدريجي حتى وصلت إلى 70% في عملية النقل 24 . وهذا يعني بأن عملية الزرع المتكرر للقمم المرستيمية أدى إلى ازدياد تدريجي في نسبة نموها وتجذيرها مع الزمن مما يدل على اكتسابها لبعض الصفات النباتات الفتية مع الزمن (Fouret et al.,1987) .

- تأثير عوامل المتعلقة بتركيب وسط المغذي الخاص بالتجذير:

يلعب تركيب الوسط المغذي دورا هاما في تجذير العينات النباتية في الأنابيب. يختلف تركيب الأوساط المغذية الخاصة بالتجذير بحسب الأنواع النباتية. يوجد عوامل تدخل في تركيب الأوساط المغذية قد يكون لها أثر إيجابي في بعض الأنواع وقد لاتبدي نفس الأثر على أنواع أخرى. ومن هذه العوامل : التركيب المعدني ، الهرمونات النباتية ، السكروز وتركيزه، طبيعة الوسط المغذي، إضافة بعض المركبات مثل الفلوروغليسينول والفحم المنشط .

1- تأثير التركيب المعدني: يلعب التركيب المعدني دورا مهما في تجذير العينات النباتية بالنسج. ويختلف نوع المحلول المعدني المستخدم في تجذير الأنواع النباتية. يستخدم المحلول المعدني لموراشيج وسكوغ بكثرة في أوساط التجذير، ولكن لوحظ بأن هذا المحلول غني بالعناصر المغذية، لذلك لوحظ بأن تخفيف MS إلى النصف أو ثلاث مرات يزيد بشكل واضح في تجذير العينات في بعض الأنواع النباتية كالإجاص والتفاح والنخيل والورد. ففي الإجاص كانت نسبة التجذير باستخدام المحلول المعدني MS بشكل كامل لا تزيد عن 50% بينما عند تمديد نفس المحلول المعدني ثلاث مرات ، زادت نسبة التجذير بشكل كبير إلى أكثر من 80%. وهذا يدل بأن وسط التجذير يتطلب تخفيف تركيز العناصر المعدنية في الوسط (ALMaarri et al.,1994).

2-تأثير الهرمونات النباتية: تلعب الهرمونات النباتية دورا مهما في توجيه نمو العينات النباتية المزروعة بالنسج. يتوجب أن يكون الميزان الهرموني في وسط التجذير لصالح الأوكسين، أي أوكسين /سيتوكينين يجب أن يكون أكبر من واحد. ويفضل عدم إضافة أي سيتوكينين إلى وسط التجذير لان السيتوكينينات تثبط تكوين الجذور.

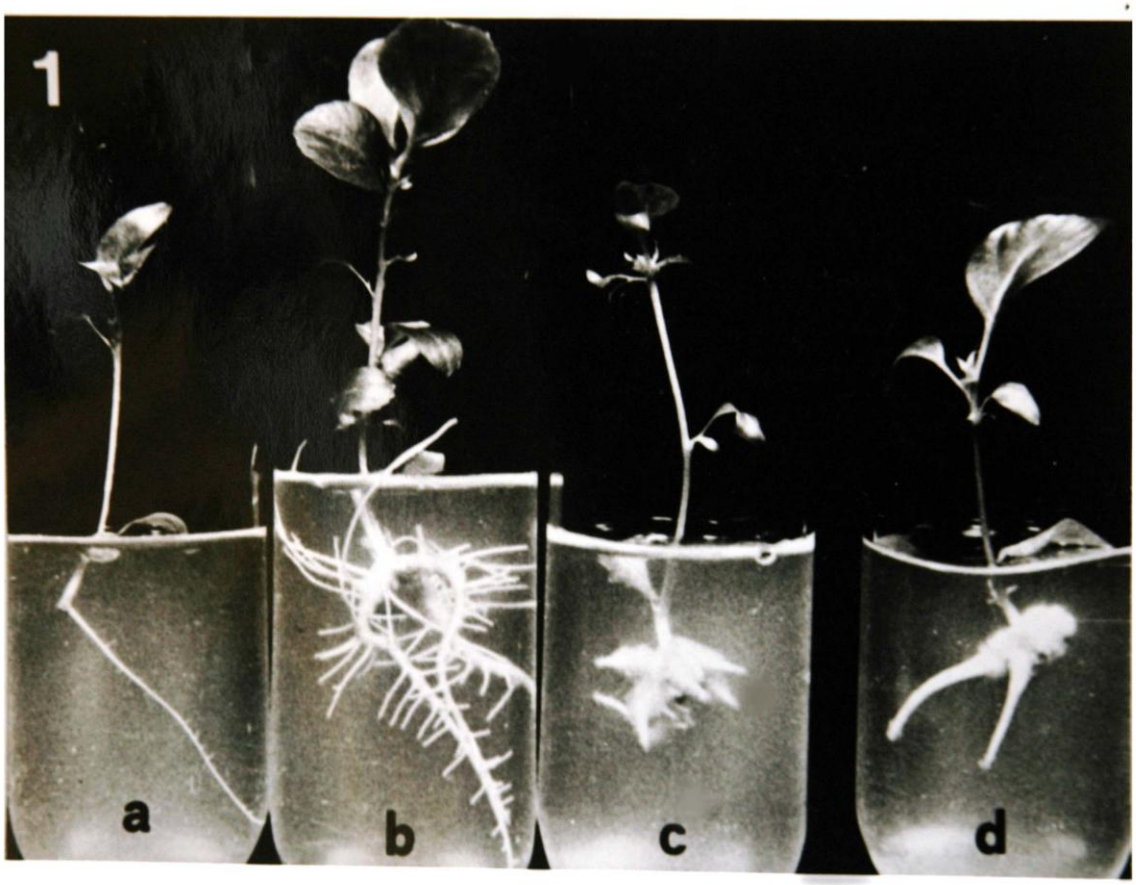
يختلف نوع الأوكسين المستخدم بحسب الأنواع النباتية . ففي بعض الأنواع الNAA يعطي أفضل نتيجية كما هو الحال في الإجاص والسفرجل، وفي بعض الأنواع IBA يعطي أفضل نسبة تجذير كما في التفاح ، وفي بعض الأنواع الأوكسين IAA يعطي أفضل نسبة تجذير كما في العنب.

يلعب التركيز المستخدم دورا مهما في نسبة التجذير وفي نوعية الجذور المتكونة. ويختلف التركيز الأنسب باختلاف الأنواع النباتية. ففي تجربة على الإجاص فقد تم دراسة تراكيز مختلفة من الأوكسين NAA (0- 0.2- 0.5 – و1مغ/ل) وقد لوحظ التاثير الإيجابي للأوكسين في تنشيط تكوين الجذور ، كلما زاد تركيز الأوكسين في الوسط المغذي زادت نسبة التجذير كما هو موضح بالجدول (5-5).

جدول (5-5): تأثير الأوكسين في تجذير الإجاص وفي نوعية الجذور المتكونة

تركيز الNAA مغ/ل	% التجذير	نسبة الكالوس المتكونة	متوسط عدد الجذور المتكونة	استطالة الجذور سم	سماكة الجذور
0	20	0	2	4	رفيعة
0.1	80	+	3.5	2.8	رفيعة
0.5	90	++	5.2	1.5	وسط
1	100	+++	6.8	0.9	سميكة

+= كالوس خفيف ، ++= كالوس وسط ، +++= كالوس كبير



الشكل (5-5): تأثير تركيز الأوكسين في تجذير الإجاص

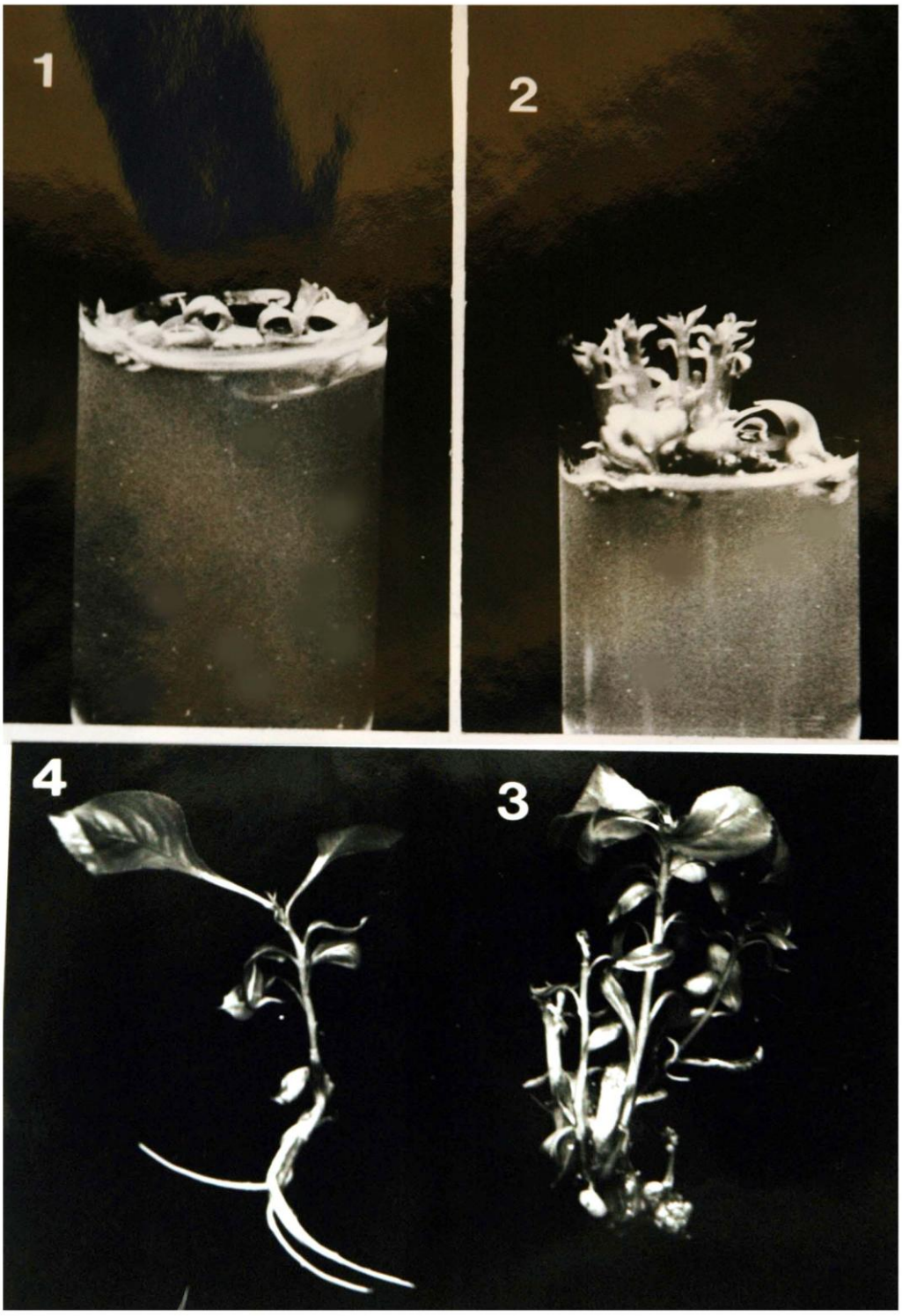
يتبين لنا من الجدول بأن زيادة تركيز الأوكسين في الوسط تزيد في نسبة التجذير وفي نسبة الكالوس المتكونة وفي عدد الجذور المتكونة، كما تعمل على تثبيط استطالة الجذور المتكونة (ALMaarri et al.,1994).

تبين لنا بأن نسبة الكالوس المتكونة في قواعد العقل تزداد مع زيادة تركيز الأوكسين في الوسط وهذه النقطة سلبية لان تواجد الكالوس بكميات كبيرة يؤدي إلى ضعف ارتباط الجذور المتكونة بالعقل نفسها وبالتالي يمكن أن تفقد العقل جزء من جذورها أثناء عملية التقسية مما ينعكس سلبا في نسبة نجاح التقسية. كما لسماكة الجذور عامل سلبي، كونه يحوي في أنسجة الجذر خلايا من الكالوس مع الجذر. لذلك فإذا نظرنا للنتائج التي تم الحصول عليها بالجدول (5-5) تبين بأن أفضل تركيز هو 0.2 مغ/ل لأنه يعطي نسبة تجذير جيد ونوعية الجذور المتكونة تكون جيدة.كما هو موضح بالشكل (5-5).

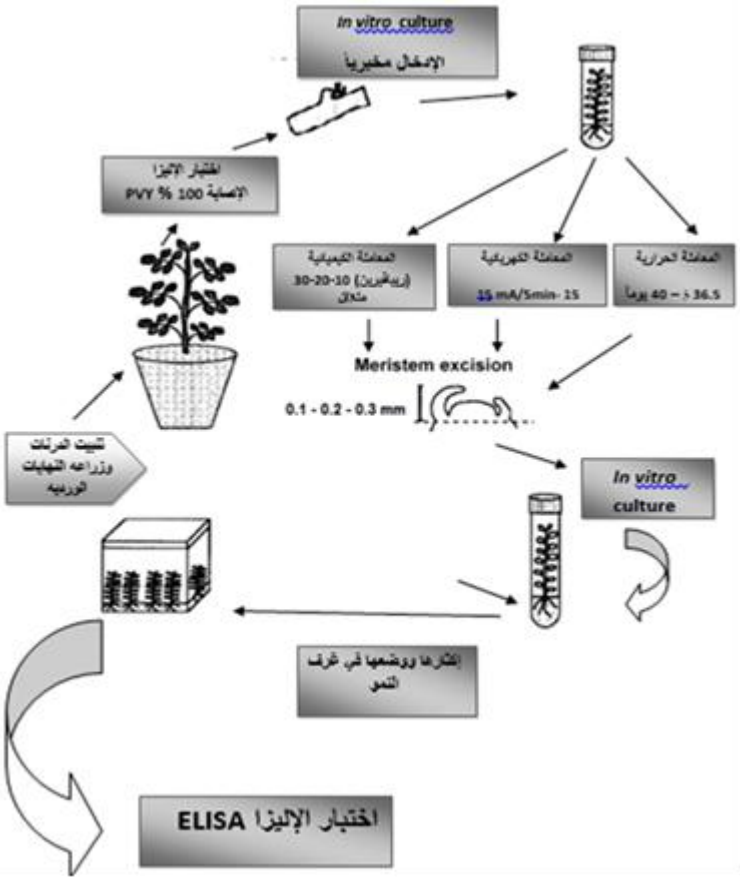
تتمثل هنا نوعية الجذورالجيدة بالعينات التي تحوي الحد الأدنى من الكالوس مع عدد جيد من الجذور الرفيعة جيدة الاستطالة.

3-تأثير تركيز السكروز: يختلف تاثير السكروز الأنسب في الوسط في تجذير العينات النباتية بحسب الأنواع. يستخدم عادة 30غ/ل من السكروز في كثير من الأنواع النباتية. وقد دلت بعض التجارب زيادة نسبة تجذير بزيادة تركيز السكروز بين 50-70غ/ل ، وخاصة في الأنواع الخشبية مثل الورد (Avramis,1982) ، السيكويا (Boulay,1977)، النخيل (ALMaarri& ALGhamdi,2001).
يمكن تفسير دور الإيجابي للسكروز في الوسط المغذي في زيادة نسبة C/N في أنسجة العينات النباتية مما يزيد من فرص تكوين الجذور بالأنابيب.

4-تأثير إضافة الفلوروغليسينول : لوحظ إن إضافة بعض المواد الفينولية مثل الفلوروغليسينول Phloroglucinol أو الفلوردزين Fluoridzin تنشط تكوين الجذور في بعض الأنواع النباتية صعبة التجذير مثل التفاح والخوخ. وقد لوحظ بعدم وجود أي تأثير إيجابي في بعض الأنواع الأخرى مثل الإجاص
وبعض أصول التفاح (Hartmann & Kester,1983). ويبدو أن هذه المواد الفينولية تساند عمل الأوكسين في تنشيط تكوين الجذورفي بعض الأنواع والأصناف، ولا يظهر هذا الأثر المنشط في أنواع وأصناف أخرى.



الشكل (5-6): طور الإكثار(1- بداية الإكثار، 2 و3 بعد شهر) والتجذير(4) في الإجاص باس كراسان



الشكل (5-7): زراعة المرستيم للحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية

- تأثير عوامل متعلقة بشروط غرف النمو:

تؤثر العوامل الجوية في غرف النمو في تجذير العينات النباتية وخاصة عامل الإضاءة ونوعيتها . فقد لوحظ عند تعريض العينات النباتية لفترة ظلام لمدة أسبوع ثم تنقل إلى نظام إضاءة 16 ساعة و8 ساعات ظلام ، تزيد في نسبة تجذير العينات النباتية في بعض الأنواع في التفاح، الإجاص والسفرجل والمشمش (Hartmann& Kester,1983; ALMaarri et al.,1994). ويعود السبب بان تعريض العينات إلى فترة ظلام تحمي من تدهور الأوكسين الداخلي بفعل الضوء مما يزيد في فرص تجذير العينات النباتية.

ويوضح الشكل (5-7) إنتاج نباتات خالية من الأمراض الفيروسية بزراعة المرستيم

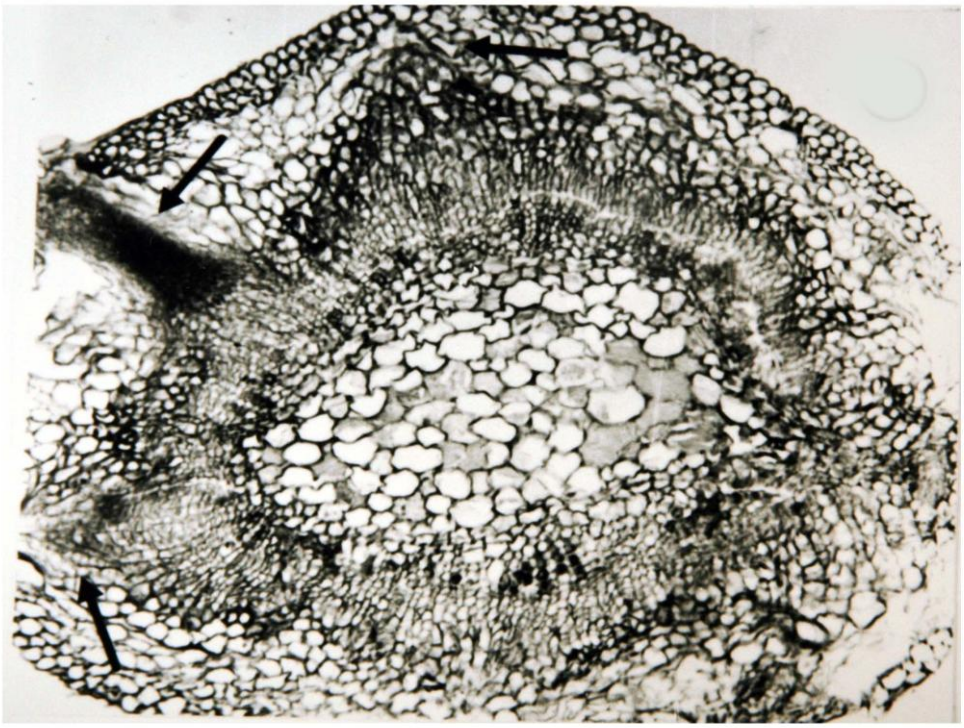
5-3-3-4- آلية تكوين الجذور بالنسج :

تتكون الجذور بشكل أساسي من طبقة الكامبيوم في قاعدة النموات الخضرية المزروعة في وسط تجذير مناسب ، أو من بعض الطبقات التي تحوي خلايا التي لها قدرة على التمايز الرجعي مثل الخلايا البارانشيمية. تختلف الفترة الزمنية اللازمة لتكوين ونمو الجذور باختلاف الأنواع النباتية المزروعة، ففي بعض الأنواع يمكن

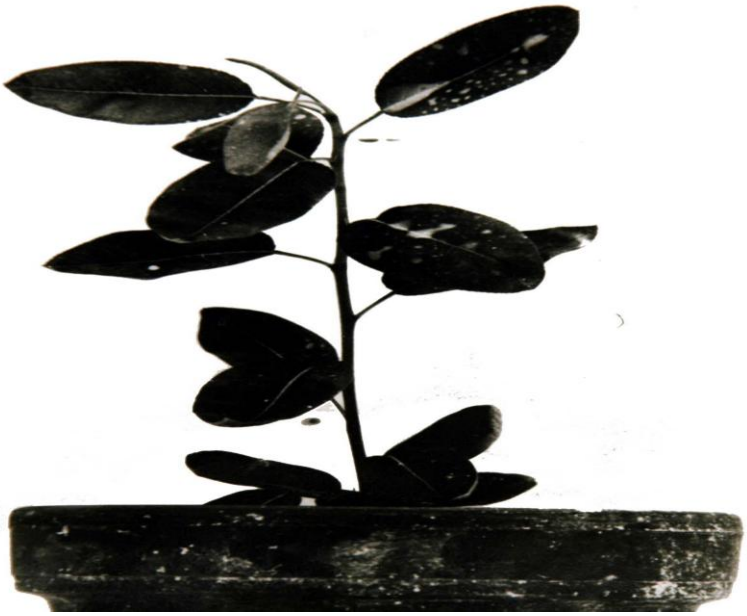
أن تجذر ب10-12 يوما وفي بعض الأنواع تحتاج أسبوعين أو ثلاث أسابيع وفي بعض الأنواع شهر أو أكثر.
تتكون الجذور وفق المراحل التالية:
1 - يلاحظ في الأيام الثلاث الأولى من نقل العينات النباتية نشاط حيوي كبير على مستوى طبقة الكامبيوم حيث تعمل خلايا الكامبيوم على اصطناع وتكوين كافة المواد الضرورية اللازمة للانقسام الخلوي.
2- تبدأ بعض خلايا في طبقة الكامبيوم بالإنقسام الشديد وتكون نواة قمة مرستيمية تتطور فيما بعد لتكون قمة مرستيمية جذرية..
3- تستمر القمة المرستيمية المتكونة بالنمو وتبدأ باختراق الأنسجة الداخلية وتبدأ أيضا الخلايا المنقسمة الداخلية على التمايز وتكوين أنسجة الجذر المختلفة من أوعية ناقلة خشبية وغربالية تتصل بشكل أساسي مع الأوعية الناقلة في الساق كما هو موضح بالشكل (5-8).
4- تتابع القمة الجذرية نموها واختراقها لأنسجة العقلة في قاعدة حتى ترى بالعين المجردة وهنا تتابع القمة المرستيمية انقسامها واستطالتها وتكوين الأنسجة الجذرية الجديدة بشكل كامل .

5-3-4-التقسية ونقل النباتات إلى الظروف الطبيعية:

تعد عملية التقسية من العمليات الهامة في التكاثر الخضري الدقيق ، ولايمكن أن تنجح عملية الإكثار ما لم يتم نقل النباتات المجذرة بالأنابيب إلى الظروف الطبيعية بنجاح.
تحتاج عملية التقسية توافر بيوت زجاجية وبيوت بلاستيكية مجهزة بأجهزة تحكم بالحرارة والرطوبة والإضاءة والري. كما تحتاج مراقد مدفأة ومظلات لحماية النباتات الصغيرة من أشعة الشمس المحرقة في أيام الصيف.



الشكل (5-8): مقطع تشريحي يوضح تكوين الجذر في نبات مكاثر بالنسج



الشكل (5-9): تقسية النباتات النسيجية نبات إجاص بعد 3 اشهر من النمو.

تتطلب عملية نقل النباتات من الأنابيب إلى الظروف الطبيعية ، عناية خاصة وكبيرة لكون هذه النباتات رهيفة وحساسة جدا لعوامل الجوية الخارجية، لهذا لا بد من توافر ظروف جوية متقاربة مع ظروف غرف النمو ، وبخاصة في المرحلة الأولى من النقل. كما يجب تأمين وسط تربة جيد التهوية ،خفيف جيد الاحتفاظ بالماء وجيد الصرف حتى يسمح بنمو الجذور وتكوين جذور جديدة. ولابد أيضا من حماية النباتات الصغيرة من الأمراض والحشرات عن طريق تعقيم وسط التربة المستعمل ، بالإضافة إلى استبعاد أي مصدر لتلوث النباتات وأخذ الأحتياطات الكافية لحمايتها.

تتصف النباتات النسيجية داخل الأنابيب بكونها غير ذاتية التغذية Heterotrophic تعتمد اعتماد كلي في تأمين احتياجاتها الغذائية على الوسط المغذي . لذلك تكون لها فيزيولوجية خاصة فالأوراق تحوي على مسامات غير وظيفية ، تبقى مفتوحة بشكل دائم. الأوراق التي تتكون داخل الأنابيب ذات محتوى منخفض من الكلوروفيل، ويوجد خلل بالنظام الأنزيمي الخاص بالأصطناع الضوئي مما يؤدي إلى ضعف أو عدم حدوث الآصطناع الضوئي داخل الأنابيب كما هو ملاحظ في أوراق نبات الكيوي المكاثر بالأنسجة (Gago et al.,2014). يختلف الشكل المورفولوجي والفيزيولوجي لأوراق نباتات الأنابيب، عن الأوراق التي تتكون في النباتات الطبيعية. كما يلاحظ وجود طبقة كيتينية أو شمعية قليلة السماكة ، لذلك تكون حساسة لأي إجهاد بيئي مثل الجفاف أو حساسة للإصابة بالأمراض الفطرية والحشرية.
كما تكون الجذور المتكونة في الأنابيب غير وظيفية في كثير من الأنواع النباتية، فهي لاتستطيع القيام بعملية امتصاص الماء والأملاح المعدنية من التربة.
يتوجب عند عملية التقسية تقديم كافة الخدمات اللازمة لتغير فيزيولوجية النباتات من نباتات غير ذاتية التغذية إلى نباتات ذاتية التغذية Autotrophic . هذا يعني يجب العناية بالنباتات حتى تستطيع تكوين أوراق جديدة تحوي طبقة كيتينية او شمعية ، كما تحوي على مسامات طبيعية تفتح وتغلق بعكس المسامات الموجودة في الأوراق النسيجية التي تبقى مفتوحة، وتستطيع القيام بعمليات الفيزيولوجية المختلفة وخاصة الأصطناع الضوئي. كما تعطي فرصة لتكوين جذور جديدة قادرة على القيام بعمليات الإمتصاص والنشاط الحيوي.

تتطلب عملية تحويل النباتات من نباتات غير ذاتية التغذية إلى نباتات ذاتية التغذية تعتمد على نفسها في تامين الغذاء، تامين جو مشبع بالرطوبة في المرحلة الأولى وخاصة الأسبوع الأول مع تربة خفيفة ومعقمة، ودرجة حرارة تشبه درجة الحرارة الموجودة في غرف النمو. تخفض الحرارة والرطوبة الأرضية والجوية بشكل تدريجي مع الزمن حتى تتأقلم النباتات مع الظروف الجديدة وتصبح قادرة بالاعتماد على نفسها.
يتم إخراج النباتات من الأنابيب بحذر بوساطة ملاقط طويلة ، وتغسل بالماء الفاتر الجاري بهدف تخليص النباتات من بقايا الوسط المغذي قبل زرعها بحذر وانتباه في

وسط التربة الجديد مثل البرلايت أو الفرميكولايت أو التورب المعقم. إن عملية إزالة بقايا الوسط المغذي عملية مهمة ، حتى لا نسمح للأحياء الدقيقة بمهاجمة النباتات المنقولة وإصابتها بالأمراض والتعفنات.
تختلف نسبة نجاح تقسية النباتات الناتجة بزراعة النسج بحسب الأنواع النباتية وحسب توفر الظروف المثالية لتنفيذ هذه العملية. ففي بعض الأنواع تسبب عملية تقسية النباتات مشكلة في بعض المناطق الجافة والحارة كما هو الحال في النخيل. وفي بعض الأنواع الأخرى تكون نسبة نجاح عالية أكثر من 90% كما هو الحال في الجربيرا. ويوضح الشكل (5-9) نبات إجاص بعد 3 اشهر من التقسية.
تتأثر نسبة نجاح التقسية بعدة عوامل ، منها الشروط الجوية مثل حرارة ورطوبة وإضاءة وتهوية.، وسط المستعمل يجب ان يؤمن تهوية جيدة ليسمح بنمو المجموع الجذري بشكل مبكر وبسرعة. كما تؤثربعض المعاملات اثناء طور التجذير في نسبة نجاح التقسية مثل تركيز الأوكسين المستخدم ، تركيز السكروز، وتركيز الآغار. فقد وجد بالتجربة في بعض الأنواع النباتية رفع تركيز الأوكسين يزيد من تكوين الكالوس في قاعدة العقل المجذرة وهذا ينعكس بشكل سلبي في نسبة نجاح التقسية (Martin,1983). وقد وجد بالتجربة أيضا بأن زيادة السكروز والآغار في الوسط المغذي الخاص بالتجذير تحسن من نسبة نجاح تقسية النباتات المعمرة العشبية (Hartmann&Kester,1983).
تؤثر فترة بقاء العينات في وسط التجذير في نسبة نجاح التقسية فقد دلت التجارب في بعض الكرز حيث لوحظ أن نقل النباتات بعد 15يوم كانت نسبة نجاح التقسية عالية بينما لم تتجاوز 10% عند نقل النباتات بعد فترة 45 يوم من الزرع في وسط التجذير (Marin and Gella,1985).

5-4- تجذير النموات الخضرية في البيت الزجاجي مباشرة:

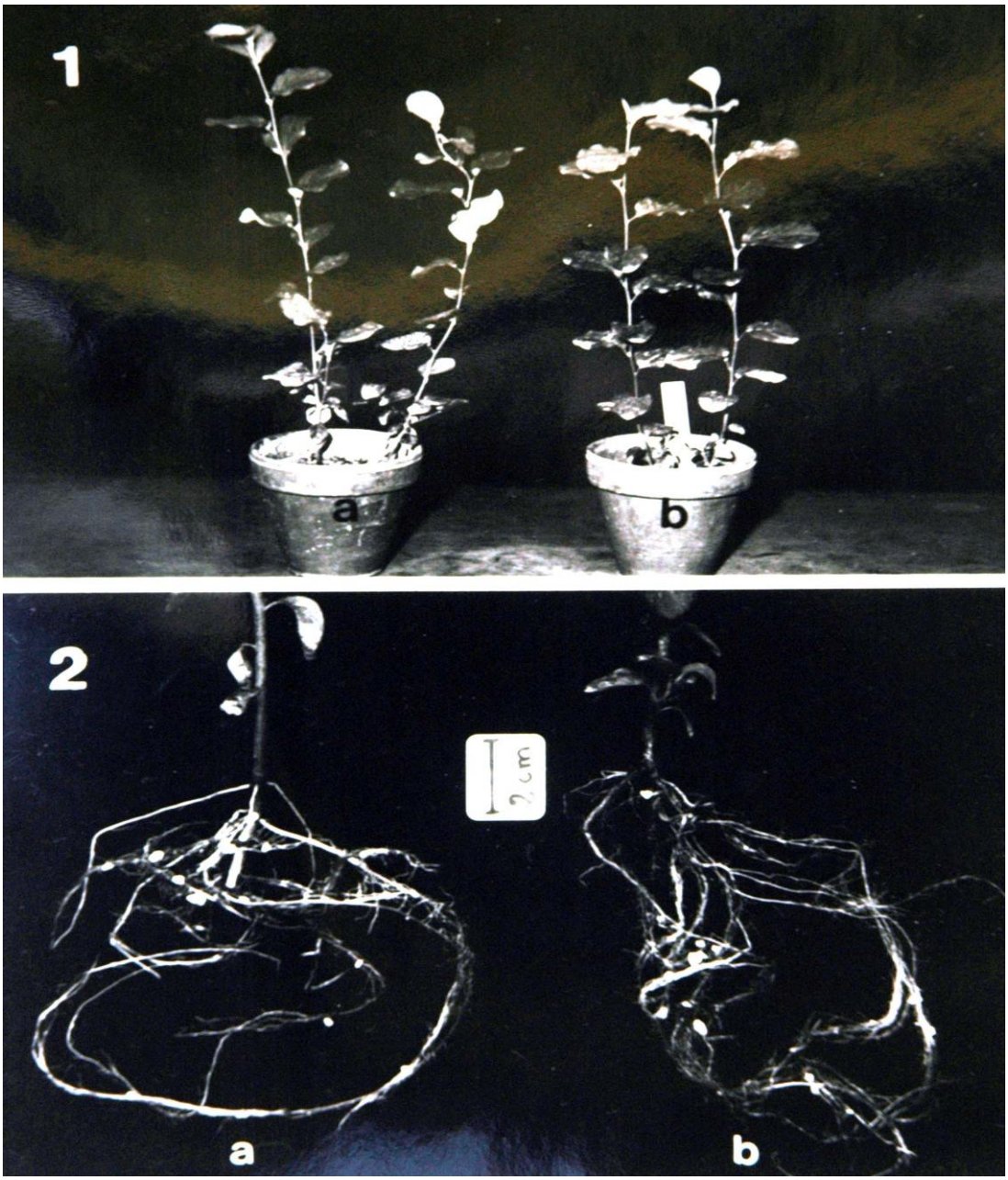
تعد عملية تجذير النموات الخضرية المتكونة في طور الإكثار مباشرة داخل البيت الزجاجي هامة في التكاثر الخضري الدقيق فهي تسمح بتجذير العينات وتنفيذ عملية التقسية في وقت واحد وهذا أمر مهم بالنسبة للناحية الأقتصادية حيث يتم توفيرمرحلة كاملة من مراحل الإكثار. تتطلب هذه العملية توفر مراقد خاصة داخل البيوت المحمية مع حرارة مناسبة ورطوبة عالية.
تختلف قدرة النموات الخضرية في التجذير المباشر في البيوت المحمية بحسب الأنواع النباتية ، وحسب عمر النبات الأم وحسب تركيز الأوكسين المستخدم وفترة المعاملة . والوسط المستخدم.
ففي تجربة أجريت في ثلاث أنواع نباتية إجاص فتي ، إجاص معمر والسفرجل باستخدام ثلاث تراكيز من الأوكسين NAA وهي 10- 50- و 100 مغ/ل لمدة ساعة . ثم زرعت العينات في مرقد خاص داخل البيت المحمي في وسط من الفيرميكوليت المعقم، وقد تم المحافظة على درجة حرارة ورطوبة عالية أثناء فترة 30 يوما وهي فترة تنفيذ التجربة. ويوضح الجدول (5-6) بأن نسبة التجذير كانت

في النباتات الفتية عالية في كافة تراكيز الهرمون المستخدمة . واختلفت نسبة التجذير في العينات الماخوذة من نباتات معمرة بحسب تركيز الأوكسين .

جدول (5-6): تجذير النموات الخضرية مباشرة في البيت المحمي.

النوع النباتي	تركيز الأوكسينNAA المستخدم مغ/ل	نسبة المئوية لتجذير العينات في البيت المحمي
إجاص فتي	10	100
	50	100
	100	100
إجاص معمر	10	16
	50	50
	100	75
السفرجل	10	58
	50	86
	100	50

كما لوحظ بان التركيز الأنسب من الأوكسين يختلف باختلاف الأنواع والأصناف النباتية (ALMaarri,1986). ويوضح الشكل (5-10) عملية تجذير النموات مباشرة بالبيت المحمي ومقارنة نمو المجموع الجذري في السفرجل بين عينات نباتية جذرت مباشرة مع عينات جذرت بالأنابيب. وقوة النمو الخضري بعد ثلاث أشهر من عملية التجذير.



الشكل (5-10): مقارنة بين تجذير النباتات في البيت الزجاجي (a2) والتجذير بزراعة النسج (b 2) في السفرجل.

5-5- المعوقات الفيزيولوجية في التكاثر الخضري الدقيق:

5-1-مقدمة:

لوحظ من خلال التجارب والأبحاث،وجود بعض المعوقات الفيزيولوجية التي تظهرأثناء مراحل التكاثرالخضري الدقيق للنباتات . يمكن لهذه المشكلات أن تخفض من الإنتاج وتحد من نجاح إكثارالنخيل بالأنسجة، وتقلل من معدل الإكثار ومن عدد النباتات الناتجة ذات المواصفات الجيدة. تعزى أسباب هذه المشكلات إلى عدةعوامل، منها ماهومتعلق بالجزءالنباتي نفسه،وبالحالة الفيزيولوجية للنبات الأم، ومنها ماهو متعلق بتركيب الأوساط ا لمغذية، ومن هذه المشكلات نذكر:

آ-إفرازمواد سامة في الوسط المغذي تؤدي إلى ظهورالاسمرارعلى الأجزاءالنباتية المزروعة وتنتهي بتحلل الجزءالنباتي المزروع وموته.

ب-ظهورمرض الشفافية على الأجزاءالنباتية المزروعة أثناء مراحل مختلفة من الإكثار.
ج-تدهورالكالوس الجنيني، وفقدان قدرته على تكوين الأجنة والإكثار.
د-ظهورالكالوس بكميات كبيرة على قواعد النباتات أثناء طورالتجذير، مما يقلل من نجاح عملية التقسية.
هـ -الثبات الوراثي للنباتات الناتجة بالأنسجة وظهوره في بعض الأحيان، نباتات شاذة أومغايرة للنبات الأم.

2-5-5-ظاهرة الاسمرار Browning:

تعمل الأجزاءالنباتية المزروعة على أوساط مغذية، على إفرازبعض المركبات السامة داخل الوسط مثل المركبات الفينولية التي تؤدي إلى اسمرارالمحلول والجزءالنباتي المزروع واسوداده. وبعدفترة من الزمن يتحلل الجزء النباتي ويؤدي إلى موته.
ويعزي معظم الباحثين سبب الاسمرارالحاصل في الأجزاءالنباتية المقطوعة وبالتالي الوسط الملامس لها إلى أكسدة الفينولات المتعددة التي تصبح نتيجة قطع الأجزاء النباتية بتماس مع أنزيمات الأكسدة وتتحول هذه المركبات الفينولية إلى كوينونات ذات السمية العالية للنبات.
ويلاحظ ظهورالاسمرارفي الوسط المغذي. حيث يتدرج اللون من الأصفرإلى البني الغامق والأسود. ويعتقد أن تثبيط حيوية الجزء النباتي ثم موته يعود أيضاً إلى الارتباط الحاصل بين الفينولات والبروتين،مما يؤدي إلى فقدان فعالية العديد من الأنزيمات.
أما الأنزيمات المسؤولة عن ظاهرة الاسمرارفهي البولي فينول أوكسيديز Poly phynol oxidase وأنزيم البيروكسيديز Pyroxydase هي الأنزيمات المسؤولة عن ظاهرة الاسمرار.
إن ظاهرةالاسمرارمشكلة كبيرة في النخيل (الشكل 5-11)، وتحد من نجاح عملية الإكثار. وقد واجهت هذه المشكلة تقريباً جميع العاملين في مجال إكثارالنخيل بالأنسجة. وتتعلق هذه الظاهرة بكثيرمن العوامل، يمكن إيجازها بمايلي:

-عوامل متعلقة بالنبات نفسه:
مثل عمرالجزءالنباتي المستخدم، درجة تمايزالأنسجة المستخدمة، نوعية الجزءالنباتي المزروع، موعدالزراعة. فقد دلت التجارب أن القمة النامية تتعرض للاسمراربشكل أقل من الوريقات الأولية والتي بدورها تتعرض لظاهرة الاسمراربشكل أقل من الوريقات الخضراء المتمايزة. وقد لوحظ أن المبادئ الزهرية المزروعة أقل تعرضاً للاسمرارمن القمم النامية والوريقات الأولية. وتبين أيضاً بأن لموعد الزراعة تأثيرعلى فرزالمركبات الفينولية حيث لوحظ أن الأجزاءالنباتية المزروعة في تشرين الثاني أقل تعرضاً لظاهرةالاسمرارمن الأجزاءالمزروعة في الصيف Al ((Maarri et Al Ghamdi, 1995.

-عوامل متعلقة بالوسط المغذي:
تركيب الوسط المغذي، تركيزالهرمونات النباتية ونوعيتها، التركيب المعدني للوسط المغذي، نوعية الآجارالمستخدم، التوازن الهرموني بينNO3- وNH4+ والبوتاسيوم.

فقد دلت التجارب أن ارتفاع نسبةNH4 + في الوسط المغذي يعمل على زيادة حموضة الوسط المغذي والذي يرافقه انخفاض واضح فيامتصاص عنصرالبوتاسيوم وهذا يؤثر بشكل مباشرفي زيادة إفرازالمركبات الفينولية في الوسط المغذي، ويقلل من تكوين الكالوس الجنيني.

وتجدرالإشارة إلى أن زيادة تركيزالهرمونات النباتية مثل الأوكسينات والـBAP يزيد بشكل واضح ظهورالمركبات الفينولية (المعري، 1995).

-عوامل تتعلق بالظروف الجوية في غرف النمو:
مثل درجة الحرارة، وشدة الإضاءة. فقد دلت التجارب أن ارتفاع درجة الحرارة تزيد في ظاهرة الاسمرار، وظهورالمركبات الفينولية السامة في الوسط المغذي. كما أن شدةالإضاءة تزيد من ظاهرة الاسمراربالمقارنة مع الظلام.

-عوامل تتعلق بالتعقيم وطريقة الزراعة:
تزداد ظاهرة الاسمرارعند استخدام تراكيزعالية من المادة المعقمة،ولفترة طويلة أثناءعمليةا لتعقيم وهذا يؤدي إلى إضعاف الأجزاءالنباتية في الوقت نفسه. ويتوجب زراعة الأجزاءالنباتية بعد تعقيمها مباشرة لأن تركها لفترة قبل زراعتها يزيد في ظهورالمركبات الفينولية السامة،ويتوجب عدم تجريح الأجزاء النباتية كثيراً. عندعملية النقل إلى وسط جديد Subculture لأن القطع والتجريح يزيد من ظاهرة الاسمرار. يتم الحد من ظاهرة الاسمرار بمعاملة الأجزاء النباتية بمواد مضادة للأكسدة التي تحد من ظهورالمركبات الفينولية. أوبإضافة هذه المواد إلى الوسط المغذي.
فقد دلت التجارب بأن إضافة الفحم المنشط إلى الوسط المغذي يعمل على امتصاص المركبات الفينولية المفرزة في الوسط المغذي وبهذا الشكل يحافظ على الأجزاءالنباتية سليمة من الاسمرار، ينصح عند استعمال الفحم المنشط زيادة تركيزالهرمونات النباتية المضافة إلى الوسط لأنه جزءاً كبيراً منها يمتص أيضاً من قبل الفحم المنشط.
وقد تم استخدام مواد أخرى مثل مزيج من حمض الأسكوربيك وحمض الستريك داخل الوسط أعطى نتيجة إيجابية، في حين لم يحد هذا المزيج من ظاهرة الاسمرارعند إضافته إلى الوسط من قبل. ولاينصح بعض الباحثين باستعمال المزيج المذكورداخل الوسط المغذي لأنه يشجع نموالبكتريا ويزيد من نسبة التلوث.
كما استخدمت مواد أخرى في الحد من ظاهرة الاسمرارمثل البوليفينيلبيروليدون(PV.P) Polyvinyl. Pyrrolidone، والكافيئينCaffeine وكان لها أثرإيجابي في الحد من ظاهرة الاسمرار. كما دلت الأبحاث على أن عملية النقل المتكرروعلى فترات قصيرة أثبت فاعلية في الحد من ظاهرة الاسمرار.

3-5-5-مرض الشفافيةVitrification :

تعد ظاهرة الشفافية من أكثرالأمراض الفزيولوجية خطورة التي تصيب النباتات في مرحلة الإكثار وتؤدي إلى إضعاف النباتات وتفقد قدرتها على الإكثار والتجذير. وإذاجذرت يتم الحصول على نباتات رهيفة، ضعيفة تكون نسبة نجاحها عند نقلها إلى الشروط الطبيعية محدود جداً.
اكتشف مرض الشفافية في كثيرمن الأنواع النباتية التي تم إكثارها بالأنسجة مثل التفاح، السفرجل،الكمثرى،الورد، الصفصاف،الكرمة، والنخيل.
تتصف النباتات المصابةبمرض الشفافية بساق رفيع، شاحب اللون، شفاف،المسافة العقدية كبيرة، وتكون الأوراق متطاولة وشفافة وملتفة وقليلة اليخضور وتتصف خلايا الأوراق بقوامها الاسفنجي ذات فجوات كبيرة وتكون المسامات قليلة، وغالباً مغلقة. كماتحوي النباتات المصابةعلى كمية ضئيلة من الكامبيوم والأوعية الناقلة.
كما تتصف النباتات المصابة بمرض الشفافية بضعف نموها وضعف قدرتهاعلى الإكثاروالتجذير، وسريعة التلف. وقد دلت الدراساتا لتشريحية التي أجريت على الإجاص بأن النباتات المصابة بمرض الشفافية يكون فيهاعدد طبقات الخشب أقل بكثيرمن النباتات السليمة أما في النخيل فقد لوحظ مرض الشفافية في الكالوس بسبب إلى زيادة تركيزالهرمونات في الوسط

المغذي. وقد تمت مشاهدة مرض الشفافية في النخيل على الكالوس وعلى الأجنة كما هو موضح بالشكل (5-12)، وبعض الأجزاءالنباتية المزروعة حيث تصبح الأجزاء النباتية شفافة ويزيد محتواها المائي وتميل للاسمرار. وتصبح الأجنة الصغيرة المصابة شفافة، وتفقد قدرتها على النموالطبيعي وتميل للاسمرار. وفي نهاية الأمريتوقف نموها وتسمر وتموت Al-Maarri et Al-Ghamdi, 1995)).

تعزى أسباب مرض الشفافية في النخيل إلى عدةعوامل. حيث ظهرت الإصابة بكثرة عند استخدام المحلول السائل (Al-Maarri et Al-Ghamdi, 1995). وأيضاً ظهرمرض الشفافية عند استخدام تراكيزعالية من الهرمونات النباتية. كما لوحظ مرض الشفافية على أجنة النخيل عند استخدام المحلول المعدني لموراشيج وسكوغ دون إضافةالفحم. والسبب أن هذا المحلول يحوي تراكيزعالية من الأمونيومNH4+
(Al-Maarri et Al-Ghamdi, 1995). ويوضح الجدول (5-7) أسباب مرض الشفافية وطرائق الوقاية منها في بعض الأشجارالمثمرة.

الجدول(5-7):أسباب مرض الشفافية وكيفية الوقاية منها في بعض الأشجارالمثمرة (المعري 1995):

النبات	السبب	العلاج	المرجع
الدراق	زيادة عنصر الكلور في الوسط	إضافة المركبات على شكل كبريت وتخفيض الكلور	Quoirin et Lepoivre, 1977 Rolland et Corner, 1981
البرقوق	نقص تركيز الآجار	زيادة تركيز الآجار	
السفرجل	زيادة السيتوكينين	تخفيض تركيز السيتوكينين	Al-Maarri et al, 1987
الصفصاف	زيادة الأوكسين والسيتوكينين	تخفيض تركيز الهرمونات	Beauchesne, 1981
الإجاص	زيادة تركيز عنصر الأمونيوم NH4+ تركيز السكر قليل	تخفيض نترات الأمونيوم، زيادة السكر في الوسط	Al-Maarri, 1986
العنب	محلول سائل	استخدام محلول صلب	Monette
النخيل	زيادة تركيز الهرمونات	تخفيف الهرمونات	Zaid M. 1989
النخيل	محلول سائل، زيادة السيتوكينين	استخدام محلول صلب ، تخفيض السيتوكينين	Al-Maarri et Al-Ghamdi, 1995

وقد لوحظ إن نباتات النخيل المكاثرة على وسط مغذٍي يحوي على الفحم المنشط لاتظهر به هذه الظاهرة، مما يدل على أن الفحم المنشط يمكن استخدامه كعلاج في التخلص من ظاهرة الشفافية وبخاصة عنداستخدام تقنية الأجنة الخضرية في إكثارنخيل التمر.

وقد دلت الأبحاث الحديثة التي أجريت على النباتات المصابة بمرض الشفافية بأنه ينخفض وزنها الجاف بالمقارنة مع النباتات السليمة، كما تزداد كمية الماء بشكل كبيرفي النباتات المصابة، وفي الوقت نفسه يلاحظ انخفاض مقدارالسللوز، وانخفاض نشاط أنزيمات البيروكسيديز،ونقص في اللغنين في النباتات المصابة بالمقارنة مع النباتات السليمة.

5-5-4-تكون الكالوس على قواعد النباتات:

يعد تكون الكالوس على قواعد العقل أثناء طورالتجذيروالإكثارأمراًغيرمرغوب فيه،ففي حال إكثارالنخيل بالبراعم، يمكن أن يؤدي ظهور الكالوس على قواعد الأجزاءالنباتية إلى تطوربعض البراعم بدءاً من الكالوس وفي هذه الحالة يمكن أن تظهربعض النباتات المغايرة في تركيبها الوراثي عن النبات الأم. ولذلك يتوجب استبعاد جميع النباتاتا لمشكوك بها. أما فيما يتعلق بطورالتجذير، فإن تكون الكالوس على قواعد النموات أثناء مرحلة التجذيرأمرغيرمرغوب،لأنه يضعف درجة ارتباط الجذورمع النبات الأصلي، وبالتالي تقل فرصة نجاح عملية التقسية حيث تنفصل في هذه الحالة ،ويمكن أن تتكون بعض الجذورمن الكالوس ولاتكون مرتبطة بالنبات الأم مما يسهل فصلهاعندعملية التقسية.
ولذلك يجب استبعادالنباتات التي تظهرعليهاهذه الحالة،كما يتوجب العمل على الحد من تكون كميات كبيرة منا لكالوس على قواعد النموات أثناء طورالتجذير. ويمكن ذلك عن طريق تخفيف تركيزالأوكسينات المستخدمة فيالوسط المغذي الخاص بالتجذير.

5-5-5-تدهورالكالوس الجنيني وفقدان قدرته على تكوين الأجنةCallus Degradation:

يفقد الكالوس الجنيني قدرته على تكوين الأجنة الخضرية والإكثارعبرالزمن، من خلال عمليات النقل المتكررعلى المحلول نفسه لفترة طويلة. وقد لوحظت هذه الظاهرة في عدة أنواع نباتية مثل التبغ، الجذر،الخس... (Margara, 1982).
حيث أوضحت التجارب بأن الكالوس يحتفظ بقدرته على الإكثاروتكوين الأجنة الخضرية لفترة زمنية. ويلاحظ بعد عدة عمليات من النقل المتكررعلى وسط مغذٍ محدد بأن الكالوس تنخفض قدرته على تكوين الأجنة الخضرية تدريجياً حتى تصل إلى مرحلة تتوقف تماماً ويقال بأنا لكالوس أصبح متدهوراً، وبعد فترة من الزم ننتيجة لعمليات النقل المتكرر.
يبدأ ظهوربعض التغيرات على مستوى التركيب التشريحي للكالوس الجنيني حيث يلاحظ تهشم الطبقة الخارجية للكالوس، ويتحول من الشكل الحبيبي إلى الشكلا لرخو. وتتراكم في بعض الخلايا المركبات الفينولية، ويأخذ اللون المسمرإلى البني،ويصاب بمرض الشفافية. ويفقد الكالوس قدرته على تكوين الأجنة والانقسام، وينتهي بتدهورالكالوسCallus degradation وعلى مستوى الخلايا يصغرحجم السيتوبلاسما، وتزداد نسبة الماء والفجوات في الخلايا، وتصبح الخلايا شفافة وتفقد في النهاية قدرتهاعلى الانقسام.
ولم تعرفا لأسباب الحقيقية للتدهور إلى الآن، ولكن وضعت عدة فرضيات منطقية تفسرالتدهورالذي يحصل في الكالوس ومن هذه الفرضيات:
أ-يمكن أن تعزى أسباب التدهورإلى أسباب وراثية،اختلاف في عدد الكروموزومات الموجودة في الخلايا (Aneaploidy, Polyploidy). وقد لوحظت هذه التغيرات في الكروموزومات في الكالوس والتي تؤدي إلى تدهوره.
وقد دلت الأبحاث بوجودعلاقة وثيقة بين تغيرالتركيب الوراثي وقدرةالكالوس على إعطاء نباتات كاملة في التبغ. وإن التغيرفي عددالكروموزومات الموجودة في خلايا الكالوس يؤدي إلى توقف قدرة هذاالكالوس على إعطاء نباتات كاملة.
وتجدر الإشارة إلى أنه يمكن أن يحدث توقف في قدرة الكالوس على تكوين الأجنة مع الزمن دون حدوث تغيرفي التركيب الوراثي.
ب-يمكن أن تعزى أسبابا لتدهورفي الكالوس إلى عوامل فيزيولوجية غذائية أوهرمونية. إذا يلاحظ بأن الكالوس يحتاج إلى بعض المركبات أوالهرمونات حتى يتابع نموه وتكوين الأجنة،وهذه المواد تستهلك مع الزمن وبالتالي يحدث التدهور (Margara, 1982).

وقد لوحظ ظهور التدهور في الكالوس عند استخدام تراكيز هرمونية عالية وخاصة 2.4.D وذلك مع مرور الزمن، وعلى الرغم من الثبات الوراثي للكالوس.
كما دلت بعض التجارب أن قدرة الكالوس على تكوين الأجنة يمكن أن تتوقف عبر الزمن نتيجة استخدام وسط مغذٍ خالي من 2.4 .D. وتعزى الأسباب إلى استهلاك المحتوى الداخلي من هذا الهرمون الذي يعد عاملاً هاماً لتكوين الأجنة الخضرية.
وفي الحقيقة فإن الأمر أعقد من ذلك، وإلى الآن لم تعرف الأسباب الحقيقية لتدهور الكالوس الجنيني. وفقدان قدرته على تكوين الأجنة.
يلجأ العلماء حالياً للحفاظ على أكبر فترة ممكنة من الكالوس الجنيني، وبعيداً عن التدهور، إلى حفظ قسم منه على درجات منخفضة جداً بالتجميد - 196م بالآزوت السائل، ويمكن في هذه الطريقة حفظ الكالوس الجنيني لفترة غير محدودة. وقد أثبتت هذه الطريقة جدواها.

5-6- التدرن الدقيق المخبري Microtuberisation:

5-6-1- مقدمة :

تستخدم تقنية التدرن الدقيق بالنسج في انتاج بذار المحاصيل الدرنية مثل البطاطا العادية والبطاطا الحلوة. تعد البطاطا من أحد أهم المحاصيل الزراعية في العالم وغذاء أساسي في البلدان النامية، ويرجع ذلك لوفرة غلتها وتنوع الظروف البيئية التي تنمو فيها. كما تستخدم كعلف للحيوانات وفي الصناعة حيث يستخرج منها النشاء والكحول وبعض الأحماض العضوية مثل الستريك واللاكتيك.
وتستعمل في صناعة الورق والمنسوجات.
يتوقف مردود البطاطا في وحدة المساحة على عوامل كثيرة معروفة ، منها العمليات الزراعية المختلفة والظروف البيئية ومدى ملاءمة التربة والصفات الوراثية للصنف المزروع ومن أهم العوامل المؤثرة في الإنتاجية جودة البذار وخلوه من الإصابات المرضية وخاصة البكتيرية والفيروسية.

5-6-2- إنتاج بذار البطاطا بالنسج:

تعد تقانات زراعة الأنسجة النباتية الطريقة المثلى والمتبعة في معظم أنحاء العالم لإكثار بذار أصناف البطاطا الخالية من الأمراض الفيروسية وذلك عن طريق استخدام الزراعة المرستيمية كنقطة انطلاق. (Manthel et al.,1978; Ermishin 1994).
ولما كانت البطاطا تتكاثر خضريا بالدرنات وهذه الطريقة تتيح الفرصة لانتقال الإصابات المرضية من الآباء إلى الأجيال اللاحقة وخاصة تلك التي لا يمكن مقاومتها مثل الأمراض الفيروسية عبر الأجيال وتؤدي إلى نقص حاد بالمحصول الدرني ، والتدهور الفيزيولوجي لبذار البطاطا نتيجة زراعته عدة مواسم متتالية.
لذلك لابد من وضع برنامج لإكثار بذار البطاطا يبدأ من الزراعة المخبرية ويمر بالزراعة في البيوت الزجاجية والبلاسيكية وحتى الزراعة الحقلية المكشوفة بهدف إنتاج البذار الخالي من الامراض وخاصة الفيروسية.

يتم إكثار البطاطا بالنسج بطريقتين :
1- إنتاج شتول بأعداد كبيرة بالنسج بعد تقسيتها في البيوت الزجاجية.
2- إنتاج درينات دقيقة Microtubers بالمختبر باستخدام اوسط مغذية

5-6-3- مزايا إكثار البطاطا بزراعة الأنسجة:

يتم الحصول على كميات كبيرة من الشتول أو الدرينات الدقيقة الخالية من الأمراض الفيروسية خلال فترة زمنية محدودة. تمثل هذه المادة النباتية الناتجة نواة لإنتاج بذار على النطاق التجاري (Bajaj,1987) .
تتصف النباتات المكاثرة بالنسج بانتاجية عالية بالمقارنة مع انتاجية النباتات المكاثرة بالدرنات (Donnelly et al., 2003).
يسهل تبادل الأصناف بين الدول دون نقل الأمراض ، كون العينات النباتية مزروعة في وسط معقم خال من التلوث.
إمكانية حفظ الأصناف والمصادر الوراثية من التدهور لفترات زمنية متوسط وطويلة الأمد على درجات حرارة منخفضة جدا بالآزوت السائل (Altoveros et al.,1995).

5-6-4- مزايا إكثار البطاطا بالدرينات الدقيقة:

- لا يحتاج إكثار البطاطا بالدرينات لعملية تقسية مثل إكثار الشتول داخل الأنابيب ، وبالتالي تكلفة الإنتاج تكون أقل (Rolot,2005).
- يمكن تطبيق هذه التقنية في إكثار عدد كبير من أصناف البطاطا والحصول على درينات دقيقة في فترة زمنية قصيرة، بهدف تشكيل بنك وراثي لحفظها كون الدرينات الدقيقة سهلة التخزين .
- تعد الدرنات الناتجة من زراعة الدرينات الدقيقة في الحقل أكبر حجما من الدرنات الناتجة من زراعة النباتات النسيجية (Wiersema et al.,1987).
- يتم اختصار الفترة الزمنية في برنامج انتاج البذار عند استخدام الدرينات الدقيقة ، حيث يعد انتاج الدرينات الدقيقة في الأنابيب مؤشر على قدرة تدرن أصناف البطاطا في الحقل.
-يسهل تخزين الدرينات الدقيقة للأصناف المختلفة في حيز ضيق من المساحة ، كما يسهل نقل المصادر النباتية بين الدول.

5-6-5- طريقة الإكثار بالتدرن الدقيق المخبري:

تشمل عملية إكثار البطاطا عن طريق تكوين الدرينات الدقيقة بالنسج المراحل التالية:

1- مرحلة الزراعة الأولية: يتم بها عزل قمم مرستيمية وزرعها في أوساط مغذية سائلة او صلبة بهدف الحصول على عينات نباتية خالية من التلوث،ولها قدرة على النمو والاستطالة. يتم عادة زرع قمم مرستيمية صغيرة جدا بين 0.1-0.3 مم بهدف الحصول على نموات خالية من الأمراض الفيروسية.
2- مرحلة الإكثار والاستطالة: في نهاية طور الزراعة الأولية للقمم المرستيمية يتم الحصول على نموات صغيرة بطول 1-2 سم . يتم نقلها إلى طور الإكثار والنمو بهدف زيادة عدد النموات الخضرية الممكن الحصول عليها . يتصف نموذج الإكثار بالبطاطا بالنمو العمودي أي يتم السعي في هذا الطور نحو توجيه العينات النباتية إلى إعطاء نموات طويلة ،جيدة التكوين وغير رفيعة . يصل طول النموات في نهاية دورة الإكثار التي تستمر بين 3-4 أسابيع، بين 12-15 سم وتحوي 6-10 عقل جانبية جيدة التكوين.
ويتم تكرار عملية الإكثار بتقسيم النبات إلى عقل صغيرة بطول 1-2 سم وتحوي برعم جانبي مع ورقة. وهذه العقل تعطي بدورها في نهاية دورة الإكثار نموات طولية جديدة وهكذا حتى يتكون لدينا كم من النموات كافية للبدء بالنقل إلى وسط تكوين الدرينات الدقيقة. يجب التأكد قبل الإكثار التجاري للعينات الناتجة من خلوها من الأمراض الفيروسية بوساطة عدة اختبارات مثل النباتات الدالة ، الطريقة المناعية ال ELIZA، و ال RT-PCR .

3- مرحلة تكوين الدرينات الدقيقة بالنسج: يتم نقل النموات والعقل المتكونة إلى وسط خاص بحيث تتوافر به كافة الشروط المناسبة لتكوين الدرينات . حيث يضاف عادة السكروز بتركيز مرتفع مع السيتوكينين وبعض مثبطات النمو مثل الCCC او الباكلوبوترازول. وتوضع العينات النباتية بفترة بالظلام لتحريض تكوين الدرينات . ولابد من دراسة تفصيلية لبعض العوامل المؤثرة بالتدرن الدقيق المخبري.

4- مرحلة حصاد الدرينات الدقيقة :

تجمع الدرينات الدقيقة المتكونة داخل الأنابيب ، وتغسل بالماء الجاري لإزالة بقايا الوسط المغذي ويفضل معاملتها بمبيد فطري قبل تخزينها في البراد على درجة حرارة 2-3°م لمدة 3-4 أشهر لكسر طور سكونها وتصبح لها المقدرة على الإنبات ، ليتم متابعة برنامج انتاج البذار الخالي من الفيروسات حيث يتم الحصول بزراعة النسج على درينات أو نباتات تمثل F0 ويمكن إكثارها بالبيت الزجاجي للحصول على درينات صغيرة Minitubers التي تمثل F1 . وبعدها يتم متابعة إكثار النباتات أو الدرنات بالحقل ضمن برنامج لإنتاج البذار بمراحله المختلفة، حتى الوصول إلى مرحلة تسويق البذار.

5-6-6- العوامل المؤثرة في تكوين الدرينات داخل الأنابيب:

تعد عملية تكون الدرينات عملية فيزيولوجية معقدة ، حيث تتأثر بجملة عوامل :

1- عوامل غذائية : نسبة السكروز بالوسط ، تركيب المحلول المعدني- نسبة C/N .

2- عوامل هرمونية : بعض الهرمونات المحرضة للتدرن مثل السيتوكينين وحمض الأبسيسيك والبعض الآخر مثبط للتدرن مثل الأوكسين والجبريلين.

3- عوامل مناخية : درجة الحرارة المثلى بين 16-19 م ودرجة الحرارة العالية مثبطة . الإضاءة ظروف النهار القصير والظلام محرضة للتدرن

4- عوامل وراثية : تختلف استجابة الأصناف للتدرن وذلك باختلاف تركيبها الوراثي.

1- تأثير السكروز في تكوين الدرينات الدقيقة:

تؤثر نسبة السكر في الوسط المغذي في تكوين الدرينات الدقيقة داخل الأنابيب . يتطلب تكوين الدرينات نسبة عالية من السكروز في الوسط حيث تؤثر بشكل مباشر في رفع نسبة C/N مما يحفز في تكوين الدرينات الصغيرة.

ففي تجربة نفذت على تكوين الدرينات الدقيقة في صنفين من البطاطا الدراجا والبورو. أخذت نتائج التدرن بعد 60 يوما من زراعة العقل المفردة على وسط التدرن المضاف له تراكيز مختلفة من السكروز (0-20-40-60-80 و100 غ/ل) ، تحت ظروف النهار القصير. جمعت العينات وحسبت النسبة المئوية للتدرن ومتوسط وزن الدرينات المتكونة، كما هو موضح بالجدول (5-8).

جدول (5-8): تأثير السكروز في التدرن الدقيق المخبري في البطاطا

تركيز السكروز غ/ل	%للتدرن صنف دراجا	%للتدرن صنف بورو	متوسط وزن الدرينات مغ صنف دراجا	متوسط وزن الدرينات مغ صنف بورو
0	0	0	0	0
20	0	0	0	0
40	47	53	46	50

60	60	67	57	62
80	80	93	76	81
100	70	53	62	75

جدول (5-9): تاثير الهرمونات النباتية في تكوين الدرينات الدقيقة.

تركيز ال CCC مغ/ل	تركيز ال BAP مغ/ل	عدد الدرينات في 10 نباتات	متوسط وزن الدرينة مغ
0	0	5.7	7
200	5	7	72
500	5	11.7	83
500	0	11.0	58
0	5	16.2	133

بلغت أعلى نسبة تدرن للأصناف المذكورة عند التركيز 80غ/ل، كما لوحظ أعلى متوسط وزن للدرينات المتكونة (ALMaarri et al.,2008). وقد لوحظ فرق واضح بقدرة الأصناف في تكوين الدرينات بالأنسجة ويعزى ذلك للاختلاف في التركيب الوراثي لهذه الأصناف.
وقد دلت بعض التجارب المنفذة في الصين بأن العامل الأساسي في تكوين الدرينات الدقيقة داخل الأنابيب هو محتوى الوسط المغذي من السكروز، وقد تم الحصول على تشكل الدرينات في عدة أصناف من البطاطا مثل صنف ديزيريه Desiree عند إضافة 80 غ/ ل من السكروز، تحت ظروف إضاءة مختلفة (نهار طويل – نهار قصير- وإضاءة كاملة). ولم يلاحظ أي فروق معنوية في نسبة التدرن وفي متوسط وزن الدرينات المتكونة (He and Meng, 2016). وقد لوحظ ارتفاع نسبة السكروز في الدرينات وانخفاض نسبة النشاء داخل الأنسجة، كما لوحظ زيادة نسبة نشاط الأنزيم سكروز سينيتاز Sucrose synthetase وانزيم سكروز-فوسفات- سينتيتاز Sucrose- Phosphate- Synthetase في الأنسجة النباتية في ظروف التجربة(He and Meng, 2016) .

2- تأثير الهرمونات النباتية في التدرن الدقيق:

تلعب الهرمونات النباتية دورا مهما في التدرن الدقيق المخبري . يختلف التأثير الهرموني بحسب الأصناف وحسب نوع الهرمون المستخدم وحسب التوازن بين الهرمونات المستخدمة في الأوساط المغذية. تعمل بعض الهرمونات في تحفيز تكوين الدرينات بالنسج مثل السيتوكينين(Wang %Hu,1982 ; ALTaweel et al.,2001)، كما هو موضح بالجدول (5-9) .

أما بعض الهرمونات مثل الجبريلين تعمل على تثبيط تكوين الدرينات بالنسج. وقد دلت التجارب على أهمية استعمال بعض مثبطات النمو في تشجيع التدرن الدقيق مثل حمض الأبسيسيك والكومارين (Dodds et al.,1988) ، وحمض الجاسمينويدس (Jasminoids Acid Pelacho et al.,1993).
وقد وجد بالتجربة بأن نسبة حمض الأبسيسيك /حمض الجبريليك تؤثر بشكل واضح في تكوين وتنظيم نمو وكسر طور سكون الدرينات الدقيقة وقد وجد بالتجربة بان إضافة ال ABA إلى وسط التدرن شجع التدرن بعكس إضافة الجبريلين .
ولابد من الذكر بانه في بعض التجارب لم يعط إضافة الأبسيسيك أسيد أي نتيجة إيجابية لا بل على العكس ادى ألى تخفيض تكوين الدرينات بالنسج (gophal et al.,2004).
ولكن لوحظ بان إضافة بعض المركبات مثل باكلوبوترازول Paclobutrazol ، والCCC (Chlorocholine Chloride) مع السيتوكينين (الكينتين أو البنزيل أمينو بيورين) زاد بشكل كبير من تكوين الدرينات الدقيقة ومن وزنها(Yamamoto and Nakata,1997; Zang et al.,2004; Sakha et al., 2004) .

مثال على تاثير الهرمونات النباتية في التدرن الدقيق بالبطاطا:
تم دراسة تاثير كل من السيتوكينين BAP لوحده، والCCC لوحده بتركيز 200 و500 مع/ل. وتم إضافة الBAP مع ال CCC معا وقد استخدمت في هذه التجربة نموات من البطاطا من صنف بينيمارو Benimaru ، بطول 5-6سم تحوي 3-4 عقل وقد زرعت بشكل أفقي في وسط التدرن الذي أضيف له الهرمونات النباتية آنفة الذكر. وقد سجلت بعد شهر من الزراعة عدد الدرنات المتكونة في كل معاملة ومتوسط وزن الدرينات كما هو موضح بالجدول (5-9).

من الجدول يتبين لنا بأن إضافة السيتوكينين لوحده يحسن تكوين الدرينات كما إضافة الCCC لوحده زاد في نسبة الدرينات الدقيقة المتكونة بالنسج كما زاد في وزن الدرينات المتكونة ، اما إضافة السيتوكينين مع الCCC قد زاد بشكل كبير نسبة الدرينات المتكونة وفي متوسط وزنها.
يعزى هذا الأثر الإيجابي للCCC مع السيتوكينين بكون هذا المركب يثبط تكوين الجبريلين في أنسجة العينات النباتية وينشط بنفس الوقت أصطناع حمض الجاسمينوسك الذي يدعى هرمون التدرن مما يحفز تشكل الدرينات الدقيقة وزيادة وزنها في الأنابيب (Husain et al.,2006
(Yamamoto and Nakata,1997).
وفي تجربة اخرى تم استبدال الCCC بمركب الباكلوبوترازول 1مغ/ل وقد ادى على نتائج مماثلة في تنشيط التدرن الدقيق وفي زيادة وزن الدرينات المتكونة وانخفضت نسبة الدرينات المشوهة(Zang et al.,2004) . هذا يعني يمكن الاستعاضة بهذا المركب بدل الCCC .

3- تأثير الإضاءة في التدرن الدقيق المخبري:
تلعب الإضاءة وخاصة الفترة الضوئية دورا هاما في التدرن الدقيق المخبري.
تختلف استجابة أصناف البطاطا المختلفة للضوء . بشكل عام فقد وجد إن تعريض العينات النباتية أثناء طور التدرن لفترة ظلام تزيد بشكل كبيرمن نسبة التدرن ومتوسط وزن الدرينات المتكونة.
يمكن تفسير دور الظلام بكونه يثبط اصطناع الجبريلين الذي يتكون بشروط الإضاءة الطويلة (16 ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام) ، كما ينشط تكوين حمض الجاسمينوئيك Jasminoic Acid هرمون التدرن بفعل الظلام.

كما تؤثر شروط النهار القصير في تنشيط تكوين الدرينات بالنسج ويكون تاثيره قريب من تاثير الظلام. أما في حال النهار الطويل فتكون نسبة التدرن منخفضة، حجم ووزن الدرينات المتكونة صغير (Jackson ,1999; ALMaarri et al.,2008).

ولابد من القول أخيرا بأن يوجد في برنامج انتاج بذار البطاطا قسمان قسم هام جدا للحصول على نباتات ودرينات الدقيقة للجيل صفر F0 . وهذا يتم بوساطة تقنيات زراعة الأنسجة النباتية ضمن مخابر متخصصة ومجهزة لهذا الغرض . والقسم الثاني يتم به إكثار النباتات للحصول على درنات الأجيال اللاحقة حتى الوصول إلى جيل الأليت . وهذا العمل يتم في البيوت الزجاجية والبيوت البلاستيكية الشبكية وفي الحقل للوصول إلى البذار المناسب الذي يباع للمزارعين على انه بذار موثوق خالي من الفيروسات.

5-6-7- برنامج إنتاج بذار البطاطا بزراعة النسج :

5-6-7-1- مقدمة: تؤثر الإصابة بالأمراض الفيروسية بشكل مباشر على إنتاجية ونوعية البطاطا المنتجة في الحقول. تعمل الفيروسات في بذار البطاطا إلى خفض إنتاجية المحصول من الناحية الكمية، وإلى إنتاج محصول ذو نوعية سيئة. تختلف نسبة الخسارة في المحصول حسب نوع الفيروس وحسب الأصناف. ولذلك يوجد قوانين صارمة في كثير من الدول التي لاتسمح باستعمال بذار إلا بعد التأكد من خلوه من الأمراض الفيروسية الخطيرة مثل Y and X .
يتم إنتاج البذار باستخدام زراعة المريستسم لإنتاج نباتات مخبرية أو لإنتاج درينات دقيقة خالية من الإصابات الفيروسية.

5-6-7-2- مراحل إنتاج البذار الخالي من الفيروسات:

يشمل إنتاج بذار خالي من الأمراض الفيروسية المراحل التالية:

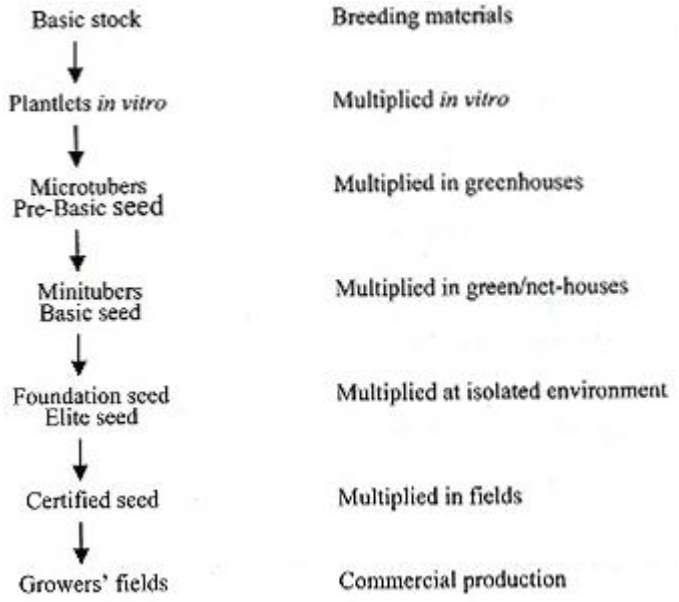
1- المرحلة المخبرية : ويتم بها إنتاج نباتات مخبرية بزراعة المرستيم داخل مخبر زراعة النسج ويجب أن تكون الشتول المخبرية خالية 100% من الأمراض الفيروسية بأنواعها المختلفة. كما يتم إنتاج درينات الدقيقة من عينات ناتجة عن زراعة المرستيم ، ويجب أن أيضا تكون الدرينات خالية من الفيروسات بال100%.
ويتم المحافظة على العينات بطرائق الحفظ بزراعة النسج أو يمكن حفظها بالكبسلة لفترات زمنية طويلة بالآزوت السائل. ويطلق على النباتات الناتجة ب F0 . يتوجب في هذه المرحلة فحص كافة السلالات الخضرية المكاثرة بزراعة النسج باستخدام إحدى تقنيات الفحص الفيروسي مثل النباتات الدالة أو الELIZA أو باستخدام طرائق البيولوجيا الجزيئية مثل ال RT-PCR .ويجب استبعاد كافة السلالات المشتبه بإصابتها بالأمراض الفيروسية. ويتم المحافظة على السلالات الخالية من الفيروسات ليصار إلى إكثارها واستخدامها في إنتاج البذار في المراحل التالية. كما يتوجب في هذه المرحلة تعليم الجيد للسلالات والأصناف حتى لا يتم خلط بين الأصناف ، ويمكن ذلك بتخصيص كل رف أو مجموعة رفوف لصنف محدد. ويفضل عمل مخطط لأماكن تواجد الأصناف في غرف النمو وفي أماكن تخزين السلالات والأصناف المختلفة.

2- مرحلة البيوت الزجاجية:
تهدف هذه المرحلة إنتاج الأمهات أو النويات داخل بيوت زجاجية جيدة العزل. يفضل في هذه المرحلة أيضا إمكانية فصل السلالات الخضرية الناتجة من المرحلة الأولى . يتوجب أخذ عينات

من كافة السلالات للتأكد من خلوها من الأمراض الفيروسية. تستبعد أي سلالة مصابة او مشتبه بإصابتها باحد الفيروسات. في جيل الأمهات يجب أيضا تكون نسبة الإصابة بالفيروسات 0%. تزرع درينات الدقيقة الناتجة من المرحلة الأولى في المخبر، بعد حصادها وكسر طور سكونها بهدف تكوين درينات أكبر حجما وزيادة عددها. يتوجب زرع كل صنف على حدى او في طاولة مستقلة. كما تخضع للاختبارات الفيروسية بحيث يتم استبعاد كل السلالات المصابة من برنامج الإنتاج. يتوجب ان تكون الدرينات الأمهات الناجة سليمة بال100%.

3- مرحلة البيوت المحمية الشبكية: يقصد بها إنتاج السوبر أيليت. يتم زرع الدرينات والدرنات الناتجة من البيوت الزجاجية بهدف إكثارها وزيادة عددها ، يتم زرعها في بييوت محمية وشبكية بحيث لا تدخل الحشرات إليها مثل المن والنطاطات التي تنقل الفيروسات. يجب أن تكون البيوت الشبكية في اماكن معزولة ، بعيدة عن أماكن زراعة البطاطا ونباتات العائلة الباذنجانية . يجب اختبار النباتات للتاكد من خلوها من الأمراض الفيروسية مرة كل 15 يوم. لايسمح أن تكون الأصابة بالفيروسات في السوبر إيليت بين 0.5-1%. يمكن تكرار إكثار السوبر إيليت عدة مرات بشرط أن لاتزيد نسبة الإصابة بالأمراض الفيروسية أكثر من 1% (SE1-SE2-SE3…).

4- مرحلة الحقول المكشوفة لإنتاج الإليت . يتم زرع السوبر إيليت في حقول مفتوحة ومعزولة بهدف الإكثار وزيادة كمية البذار الناتجة. يجب أن تكون الحقول المختارة بعيدة عن اماكن زرع البطاطا وانباتات العائلة الباذنجانية لانها تمثل نفس عوائل الفيروسات التي تصيب بذار البطاطا. يجب القيام بالكشف الدوري عن الأمراض الفيروسية مرة كل 15 يوم، ويجب ان لاتزيد نسبة الإصابة في مرحلة الإليت عن 1-2%. ويمكن إكثار هذه المرحلة عدة مرات على شرط أن لاتزيد نسبة الإصابة عن 2% (E1-E2-E3….). يتوقف سلسلة إكثار الإليت عندما تصل نسبة الإصابة الفيروسية إلى 5%، ففي هذه الحالة توزع كبذار على المزارعين لإنتاج بطاطا الطعام. ويوضح الشكل (5-11) مراحل إنتاج بذار البطاطا بزراعة النسج.



الشكل (5-11): مراحل إنتاج البذارفي البطاطا

ولابد من الذكر اخيرا بان هذا البرنامج لإنتاج بذار البطاطا معتمد بشكل كبير في كثير من الدول المشهورة بزراعة البطاطا. ويوجد شركات كثيرة في العالم التي تعمل في إنتاج بذار البطاطا. ويتم إنتاج مئات الآلاف من الأطنان من بذار البطاطا سنويا باستخدام تقنية زراعة النسج للمرستيم وإنتاج ميكروتيوبر بزراعة النسج خالية من الأمراض الفيروسية. ويعد مشروع إنتاج بذار البطاطا من المشاريع الواعدة والرابحة والقابلة للاستثمار. ويوجد في القطر الخبراء والفنيين الذين يستطيعون وضع هذه التقنية لإنتاج البذار الخالي من الأمراض الفيروسية قيد التنفيذ والإنتاج بخبرات وطنية لسد حاجة القطر من البذار والاستغناء عن الاستيراد بالعملة الصعبة.