الفصل السادس

التطعيم الدقيق المخبري *In Vitro* Micrografting

6-1- مقدمة Introduction:

إن من أهم أهداف تقنيات زرع الأنسجة النباتية هو الحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية. تعد تقنية زرع الأنسجة المرستيمية مع المعاملة الحرارية من الطرق الرئيسة في الحصول على نباتات خالية من الفيروسات، إلا أن نجاح هذه التقنية لا يزال مقتصراً على النباتات العشبية والخضار وبعض نباتات الفاكهة مثل الموز والفريز. ولم تنجح هذه التقنية إلا في عدد قليل من أشجار الفاكهة (Martinez *et al* ., 1979; Jonard *et al*., 1983).

لذلك فكر الباحثون بتقنية التطعيم الدقيق المخبري للحصول على غراس خالية من الأمراض الفيروسية في الأشجار المثمرة.

يعد الباحث موراشيج وفريقه (1972) في الولايات المتحدة الأمريكية، وفريق نافارو (1975) أول من عملوا على وضع تقنية التطعيم الدقيق المخبري في الحمضيات وتمكنوا من الحصول على أمهات من أصناف الحمضيات الخالية من الفيروسات. وقد تمكن فريق فرنسي فيما بعد من تطبيق التقنية وتحسينها في العديد من أشجار الفاكهة في التفاح (ALSkief and Villemur, 1978)، في الدراق (ALSkief, 1977; Mosella et al., 1980) ، وفي المشمش (Martinez *et al* ., 1979).

وتتالت الأبحاث فيما بعد في العديد من الأشجار الخشبية وأشجار الفاكهة ، نذكر على سبيل الذكر لا الحصر أعمال فريق تركي في الفستق الحلبي (Onay *et al*., 2004; Can *et al*., 2006)، وفي شجرة الصمغ (Khalfallah and Dafallaha, 2008)، وفي أشجار الحمضيات (ALSkief and AL Maarri, 1991; Abbas *et al*., 2008) .

ولابد من الذكر أخيراً بأن تقنية التطعيم الدقيق المخبري قد دخلت النطاق التجاري في كثير من أشجار الفاكهة وذلك في برامج إنتاج الغراس الموثوقة.

6-2- تعريف التطعيم الدقيق: عملية تركيب قمة مرستيمية على بادرات بذرية نامية في وسط مغذٍ، على أن تتم كافة مراحل التطعيم في شروط معقمة (أجزاء نباتية، أوساط مغذية، ظروف العمل، واستخدام أدوات معقمة)، تزرع المطاعيم في أوساط مغذية تحوي كافة العناصر المغذية اللازمة للالتحام والنمو.

6-3- أهداف التطعيم الدقيق:

يهدف التطعيم الدقيق إلى:

أ-الحصول على مطاعيم خالية من الأمراض الفيروسية: لأن الأصول البذرية التي تمثل هنا بادرات بذرية تكون خالية في أغلب الأحيان من الفيروسات. كما يتم استخدام قمم مرستيمية بأحجام صغيرة جداً بين 0.1-1مم كمطاعيم وهي عادة لا تصاب بالفيروسات وبالتالي بعد ألتحام الطعم ونموه، يتم اختبار المطاعيم بعدة طرق للتأكد من خلوها من الفيروسات.

يعد حجم القمم النامية المستخدمة في التطعيم الدقيق العامل المحدد في تحدي خلو المطاعيم من الفيروسات. كلما كان حجم القمم النامية صغيراً، كلما كانت نسبة المطاعيم الخالية من الفيروسات كبيرة، بينما تنعكس سلباً في نسبة نجاح التطعيم.

ب-الكشف المبكر عن حالات عدم التوافق بين الأصل والطعم: تظهر في التطعيم العادي في أشجار الفاكهة بعض حالات عدم التوافق المتأخر وذلك بعد فترة زمنية قد تصل إلى عدة سنوات من زراعة بعض الأنواع في الحقل، مما يسبب خسارة كبيرة للمزارعين. عند تطبيق التطعيم الدقيق المخبري يمكن الكشف عن مثل هذه الحالات من عدم التوافق بشكل مبكر خلال عدة أسابيع.

كما يفيد التطعيم الدقيق في تحديد ودراسة أسباب عدم التوافق بين الطعم والأصل.

ج-تجديد فتوة الأشجار المعمرة Rejuvenation: تعد تقنية التطعيم الدقيق المخبري على بادرات فتية طريقة هامة من طرائق تجديد فتوة الأشجار الهرمة وبالتالي تستعيد هذه الأشجار بعد عملية التطعيم الدقيق قدرتها في الإكثار والتجذير داخل الأنابيب.

6-4- مراحل التطعيم الدقيق المخبري:

تقسم مراحل تطبيق تقنية التطعيم الدقيق إلى ثلاث مراحل أساسية:

6-4-1--المرحلة الأولى: تشمل كافة الخطوات التحضيرية الأساسية التي تسبق تنفيذ التطعيم الدقيق وهي:

1-زرع البذور للحصول على البادرات البذرية التي ستستخدم كأصول في عملية التطعيم الدقيق. يتوجب اختيار الأنواع المناسبة وإجراء كافة المعاملات الخاصة لكسر طور سكونها، وزراعتها بشكل معقم في أوساط مغذية معقمة، وتوضع في ظروف جوية مناسبة حتى تنبت وتصل إلى مرحلة مناسبة للتطعيم الدقيق ويوضح الشكل (6-1) زرع بذور الأصل والانبات في النارنج.

2-**تحضير الأوساط المغذية الخاصة بالتطعيم الدقيق**: تختلف مكونات الأوساط المغذية الخاصة بالتطعيم الدقيق باختلاف الأنواع النباتية. كما تختلف طبيعتها أيضاً فيما إذا كانت سائلة أو صلبة وحسب طبيعة المادة المستخدمة في حمل المطاعيم حيث يمكن استخدام عدة أنواع مثل الورق المقوى والبرلايت والفيرميكولايت مع الوسط المغذي السائل.

3-**تحضير المطاعيم وتعقيمها**: تستخدم في هذه الحالة نموات غضة من الأصناف المراد تطبيق تقنية التطعيم الدقيق عليها. تجمع العينات النباتية وتغسل بشكل جيد وتعقم باستخدام الطرق المناسبة للنوع والصنف المختار حتى تصبح جاهزة للتطعيم الدقيق. وفي نفس الوقت يتوجب تحضير وتعقيم كافة الأدوات اللازمة لتنفيذ التطعيم الدقيق.

6-4-2-المرحلة الثانية: تنفيذ التطعيم الدقيق المخبري سيتم شرح كافة الخطوات بالتفصيل لاحقاً بالتطبيقات العملية.

تشمل تنفيذ عملية التطعيم الدقيق الخطوات التالية:

1-**تحضير الأصل**: ويتم فيه قص البادرة البذرية بالطريقة المناسبة ليتم استخدامها فيما بعد لعملية التطعيم الدقيق. والشكل (6-2) يوضح عملية تحضير الأصل.

2-تحضير الطعم: حيث يتم عزل القمم المرستيمية تحت جهاز العزل الجرثومي والمحافظة عليها من الجفاف ليصار إلى استخدامها في عملية التطعيم الدقيق.

3-تركيب القمم المرستيمية على البادرات البذرية المحضرة سابقاً: يجب أن تتم عملية التركيب بالشكل الصحيح مع أخذ جميع الاحتياطات اللازمة لمنع سقوط المطاعيم وتأمين كافة الظروف المناسبة للالتحام والنمو (الشكل 6-3).

4-وضع المطاعيم المنفذة في غرف النمو: يتم التحكم بالإضاءة والحرارة والرطوبة وتراقب بشكل دائم حتى يتم الالتحام ونمو المطاعيم حتى تصل إلى حجم مناسب لعملية نقلها إلى البيوت المحمية للتقسية ومتابعة نموها.

6-4-3- المرحلة الثالثة مراقبة نمو المطاعيم في البيوت الزجاجية الشبكية واختبارها:

للتأكد من خلوها من الأمراض الفيروسية.

تعد هذه المرحلة من المراحل الهامة وهي التي تظهر نتيجة العمل المخبري ومدى نجاح عملية التطعيم الدقيق. يتم عادة استخدام عدة تقنيات للكشف عن تواجد الفيروسات في الغراس المطعمة، منها النباتات الدالة، الـ ELISA وتقنيات البيولوجيا الجزيئية بالـ RT-PCR، وبالمجهر الالكتروني. وهنا لابد من التعاون مع مختص بالأمراض الفيروسية وأهل الخبرة للتأكد من خلو الغراس من الأمراض الفيروسية.

6-5- العوامل المؤثرة في نجاح التطعيم الدقيق:

تؤثر جملة عوامل كثيرة في نجاح التطعيم الدقيق المخبري في نباتات الفاكهة. تقسم هذه العوامل إلى عدة مجموعات:

- عوامل متعلقة بالأصل المستخدم:

2-عوامل متعلقة بالطعم.

3-عوامل مرتبطة بالأوساط المغذية المستعملة.

4-عوامل مرتبطة بتقنية التطعيم ذاتها.

6-5-1--عوامل مرتبطة بالأصل المستخدم:

تؤثر بعض العوامل في نسبة الإنبات ونوعية البادرات الممكن الحصول عليها والتي تنعكس بدورها في نسبة نجاح التطعيم فيما بعد. ومن هذه العوامل:

-**نوع الأصل المستخدم**: فقد دلت التجارب المنفذة في التطعيم الدقيق لعدة أنواع نباتية بأن نوع الأصل يؤثر بشكل واضح في نسبة نجاح التطعيم. ففي تجربة في الحمضيات حيث استخدم نوعين من البادرات الليمون المخرفش *Citrus jambhiri* والبرتقال الحامض *Citrus aurantium* وقد نفذ التطعيم الدقيق باستخدام مطاعيم من المندرين وقد بلغت نسبة نجاح التطعيم 60% و40% على التوالي (Abbas *et al.*, 2008).

وفي تجربة ثانية في الفستق الحلبي أظهرت بأن نوع الأصل يؤثر في نسبة الإنبات وفي نسبة التلوث وفي نسبة نجاح التطعيم الدقيق. فقد تبين أنه يوجد حالات من عدم التوافق بين أنواع الفستق الحلبي البري مثل *Pistacia terbenthus* و *P. mutica* حيث لوحظ فشل التطعيم بعد عدة أيام بينما كانت نسبة النجاح جيدة عند استخدام بذور نفس النوع *P. vera* (Can *et al*., 2006; Onay *et al*., 2004).

-**عمر الأصل المستخدم**: يؤثر عمر الأصل المستخدم في نسبة نجاح التطعيم الدقيق. فقد لوحظ اختلاف واضح في نسبة نجاح المطاعيم باختلاف الأنواع النباتية.

ففي الدراق عند استخدام بادرات بعمر 5-7أيام كانت نسبة نجاح التطعيم الدقيق 41% بينما عند استخدام بادرات بعمر 12 يوماً لم تتجاوز نسبة نجاح التطعيم 12% (Martinez *et al*., 1981). وقد لوحظ

نتائج مغايرة في التطعيم الدقيق في شجرة الصمغ العربي *Acacia senegal*عند استخدام بادرات بعمر 7 أيام وصلت نسبة نجاح التطعيم الدقيق إلى 86% بينما بلغت 100% عند استخدام بادرات بعمر 14 يوماً (Khalafalla and Daffallah, 2008).

-تأثير شروط إنبات الأصل: تلعب شروط الإضاءة الخاصة بإنبات البذور المستخدمة كأصل بذري دوراً في نسبة نجاح التطعيم الدقيق في بعض الأنواع النباتية فقد دلت تجارب في الحمضيات بأن نسبة نجاح التطعيم الدقيق في بادرات نامية بالظلام كانت أعلى من مثيلاتها النامية بالإضاءة (Navarro *et al*., 1975; Abbas *et al*., 2008).

6-5-2- عوامل متعلقة بالمطاعيم المستخدمة:

تؤثر العديد من العوامل المرتبطة بالأصناف والأنواع المراد استخدامها في التطعيم الدقيق. وأهم هذه العوامل:

-النوع النباتي والأصناف المستخدمة كمطاعيم: تختلف نسبة نجاح التطعيم الدقيق بين الأنواع النباتية لا بل بين الأصناف ضمن النوع الواحد. ويوضح الجدول (6-1) نسبة نجاح التطعيم الدقيق في بعض الأنواع والأصناف النباتية:

جدول (6-1): نسبة نجاح التطعيم الدقيق في بعض أشجار الفاكهة والخشبية

النوع النباتي	% نجاح التطعيم الدقيق	المرجع
الدراق	%70	Martinez *et al*., 1979
المشمش	%45	Martinez *et al*., 1979
الحمضيات	%21	ALSkief and ALMaarri, 1991
الحمضيات المندرين	%60	Abbas *et al*., 2008
البرتقال	%63	

الفستق الحلبي	%70	Onay *et al*., 2004
الصمغ العربي	%86	Khalafalla and Dafallah, 2008

-عمر النبات الأم للأصناف: يؤثر عمر النبات الأم للمطاعيم بشكل كبير في نسبة نجاح التطعيم الدقيق المخبري. تزداد نسبة نجاح التطعيم الدقيق عكساً مع عمر الأصناف المستخدمة كمطاعيم. وقد وجد بالتجربة بأن عمر الأشجار لا يؤثر فقط في نسبة نجاح المطاعيم بل يؤثر في نسبة نموها فيما بعد في البيت الزجاجي.

ففي تجربة نفذت على الفستق الحلبي حيث استخدم قمم نامية من أشجار بعمر مختلف (1-5-10-و30سنة) حيث طعمت على بادرات بذرية من *Pistacia vera* ولوحظ بعد شهرين من التطعيم الدقيق بأن عمر الأشجار الأم قد أثر في نسبة نجاح التطعيم الدقيق وفي نسبة نمو الغراس المطعمة في البيت الزجاجي كما هو موضح في الجدول (6-2) (Onay *et al*., 2003).

جدول (6-2): تأثير عمر الأمهات في التطعيم الدقيق في الفستق الحلبي

عمر الأشجار الأم	**نسبة نجاح التطعيم**	**طول النموات الجديدة المتكونة بعد 60 يوماً**
سنة	%70	10.6سم
5 سنوات	%45	10.14سم
10 سنوات	%25	7.2سم
30 سنة	%20	5.4سم

-حجم ومصدر القمم النامية: يلعب مصدر القمم النامية وطبيعتها دوراً هاماً في نجاح التطعيم الدقيق المخبري. ويختلف التأثير باختلاف الأنواع النباتية المستخدمة.

ويؤثر حجم القمم النامية المستخدمة بشكل مباشر في نسبة نجاح التطعيم الدقيق في الأشجار المثمرة.

-تزداد نسبة نجاح التطعيم الدقيق بزيادة حجم القمم النامية المستخدمة، وقد لوحظ هذا التأثير في العديد من الأشجار المثمرة في الحمضيات، والدراق والفستق الحلبي والمشمش والعنب (Navaro, 1991).

وفي تجربة نفذت في الدراق حيث أخذت القمم النامية من مصادر مختلفة كالتالي:

-قمم نامية من نموات في طور السكون.

-قمم نامية من نموات غضة من أشجار بالغة.

- قمم نامية من نموات غضة فتية تكونت داخل الأنابيب.

وقد طعمت النموات المأخوذة على بادرات بذرية من الأصل نيماغارد بعمر 15 يوماً. وقد لوحظ أن أفضل نسبة نجاح للتطعيم الدقيق تم الحصول عليها في القمم المأخوذة من نموات فتية ناتجة بزراعة النسج، حيث بلغت 50% بينما في حال القمم النامية المأخوذة من النموات الغضة والمتخشبة من أشجار بالغة، فقد وصلت نسبة نجاح التطعيم الدقيق إلى 20%و15% على التوالي (Deogratias *et al*., 1986).

-موعد تنفيذ التطعيم الدقيق:

يلعب موعد أخذ العينات النباتية من الأمهات بهدف تنفيذ التطعيم الدقيق المخبري دوراً هاماً في نسبة نجاح التطعيم بالنسج. ويختلف هذا الموعد باختلاف الأنواع وطبيعة نمو الأشجار. ففي الدراق مثلاً تبين بأن أفضل موعد لتطبيق التطعيم الدقيق خلال شهري نيسان وحزيران من موسم النمو وتنخفض نسبة نجاح التطعيم في أيار وتموز وذلك في الظروف البيئية الخاصة بجنوب فرنسا. وقد لوحظ علاقة طردية بين نسبة المركبات الفينولية وخاصة حمض كلوروجينيك الموجود بالأنسجة النباتية مع نشاط أنزيمات الأوكسيديز والبيروكسيديز التي تعمل على أكسدة المركبات الفينولية إلى كينون وتشكيل مواد سامة واسمرار في مستوى منطقة التطعيم مما يؤدي إلى انخفاض في نسبة نجاح التطعيم الدقيق في أيار وتموز كما هو موضح في الجدول (6-3)، وقد لوحظ انخفاض واضح في مستوى المركبات الفينولية وفي نشاط الأنزيمات في نيسان وحزيران مما يزيد في نسبة نجاح التطعيم الدقيق المنفذة في هذه الفترة من موسم النمو ((Martinez *et al*., 1981

جدول (6-3): تأثير موعد أخذ المطاعيم في نسبة نجاح التطعيم الدقيق في الدراق

موعد التطعيم الدقيق	نسبة نجاح التطعيم بعد 60 يوماً	مستوى المركبات الفينولية الكلية مع/غ مادة جافة	نشاط أنزيمي البيروكسيديز والأوكسيديز
نيسان	%45	30	منخفض
أيار	%25	40	مرتفع
حزيران	%66.6	30	منخفض

تموز	%33.3	50	مرتفع

6-5-3-عوامل متعلقة بتركيب الأوساط المغذية:

يلعب تركيب الوسط المغذي المستخدم في التطعيم الدقيق دوراً هاماً في نسبة نجاح التطعيم الدقيق. يتطلب كل نوع نباتي أوساطاً مغذية تختلف من نوع نباتي لآخر، لا بل من صنف لآخر ضمن النوع الواحد. من عوامل الأوساط المغذية التي تؤثر بشكل مباشر في عملية التطعيم الدقيق المخبري، التركيب المعدني، طبيعة الوسط المغذي سائل أو صلب، نسبة السكروز، تركيز ونوع الهرمونات النباتية، إضافة بعض المركبات العضوية للوسط أو غير العضوية التي تعمل على تخفيف ظاهرة الاسمرار مما ينعكس بشكل إيجابي في نسبة نجاح التطعيم الدقيق.

-تأثير تركيز الهرمونات في نسبة نجاح التطعيم الدقيق:

تلعب الهرمونات النباتية دوراً هاماً في عملية التحام الأصل مع الطعم وفي نمو المطاعيم فيما بعد. لذلك فوجودها ضروري في الوسط المغذي وهي تعمل في زيادة نسبة نجاح التطعيم الدقيق المخبري. ففي تجربة نفذت في التطعيم الدقيق في المندرين على بادرات من البرتقال وبعد التطعيم الدقيق زرعت البادرات المطعمة في وسط مغذ يحوي تراكيز مختلفة من الـ BAP (0-1-3-و5مغ/ل) (Abbas *et al.*, 2008).

لوحظ ازدياد نسبة نجاح التطعيم الدقيق بشكل واضح مع ازدياد نسبة السيتوكينين في الوسط المغذي كما هو موضح في الجدول (6-4).

وفي تجربة أخرى في الدراق تم زراعة المطاعيم في وسط مغذ يحوي تراكيز مختلفة من الأوكسين NAA (0-0.1-0.5-1-و5مغ/ل) (Martinez *et al.*, 1979) . وقد لوحظ بأن أفضل تركيز أعطى أعلى نسبة نجاح بالتطعيم الدقيق هو 1مغ/ل من الأوكسين كما هو موضح بالجدول (6-4).

جدول (6-4): تأثير الهرمونات النباتية في نسبة نجاح التطعيم الدقيق

النوع النباتي	تركيز الـ BAPمغ/ل	%نجاح التطعيم	النوع النباتي	تركيز الـ NAA مغ/ل	%نجاح التطعيم
الحمضيات مندرين على برتقال الحامض	0	%20	الدراق على دراق بذري	0	%5
	1	%28		0.1	%25
	3	%45		0.5	%50
	5	%60		1	%75

				5	%20

ففي المشمش درس تأثير تراكيز مختلفة من السيتوكينين BAP والأوكسين IBA في التطعيم القيق للقمم المرستيمية من صنف Nonpareil والتي ركبت على بادرات بذرية من اللوز Amygdalus communis . وقد تم الحصول على أعلى نسبة نجاح للتطعيم الدقيق عند إضافة 1مغ/ل من الBAP مع 0.2 مغ/ل من الIBA والتي أضيفت إلى وسط موراشيج وسكوغ (MS)(Isikalam et al.,2011).

-تأثير إضافة بعض المواد المضادة للفيروس في نسبة نجاح التطعيم الدقيق:

تعد عملية الحصول على غراس خالية من الفيروسات من أهم أهداف التطعيم الدقيق. فقد دلت التجارب بأنه لا يمكن الحصول على غراس خالية من الفيروس بالتطعيم الدقيق لوحده في بعض الأنواع فيضاف إلى الوسط مواد كيميائية مساعدة مضادة للفيروس.

تستخدم عدة مواد مضادة فيروسية تضاف إلى الأوساط المغذية بعد تعقيمها بالفلترة، مثل:

-آسيكلوغوانوزين Acycloguanosine(Acyclovir).

-آزيدوتيميدين Azidothymidine (Zidovudine).

-دي اتش تي (DHT) (الاسم الكيميائي هو 2-4-dioxohexahydro,1,25-triazine).

-الريبافيرين Ribavirin (Virazol).

-تيوراسيل 2-thiouracil.

تساعد هذه المواد مع التطعيم الدقيق من التخلص من بعض الفيروسات التي تصيب الأشجار المثمرة. ليس فقط بالأشجار المثمرة وإنما بعض الخضار والمحاصيل مثل البطاطا والكريزينتيم.

ففي تجربة نفذت بالهند على الحمضيات المصابة بفيروس (ICRSV) الذي يسبب خسائر كبيرة في بعض أنواع الحمضيات المنتشرة في الهند. أخذ عقل صغيرة جانبية من أشجار مصابة وزرعت في أوساط مغذية تحوي 25ملغ/ل من المواد المضادة للفيروسات المذكورة سابقاً وبعد نمو البراعم عزلت القمم النامية بحجم 0.7مم، وطعمت في المخبر على بادرات بذرية من الليمون المخرفش وقد تم حساب نسبة نجاح التطعيم، كما اختبرت المطاعيم الناجحة للتأكد من خلوها من الفيروسات بتقنية الـ ELIZA وبتقنية الـ RT-PCR (Sanjeev *et al*., 2007). وقد لوحظ تفاوت في قدرة هذه المواد المستخدمة في تثبيط نمو الفيروسات كما هو موضح بالجدول (6-5).

جدول (6-5): التأثير المشترك للتطعيم الدقيق مع المعاملة بمواد مثبطة لنمو الفيروسات

نوع المادة	%نجاح التطعيم	%نجاح التطعيم	%لخلو	% للخلو من

المستخدمة	بالشاهد	بالمعامل بـ25 مغ/ل	الفيروسات بالشاهد	الفيروسات بالمعامل بـ 25مغ/ل
Acycloguanosine	%54	%15	%0	%21
Azidothymidine	%55	%17	%0	%11
DHT	%55	%18	%0	%0
Ribavirin	%55	%17	%0	%37
2-thiouracil	%55	%17	%0	%21

لوحظ بأن أفضل مادة كانت الريبافيرين التي أعت أعلى مستوى من الغراس المطعمة والخالية من الفيروسات. تؤثر المواد المضادة للفيروسات في تثبيط الانقسام الخلوي للفيروس وتعمل أيضاً في تثبيط اصطناع الـ RNA وفي تثبيط تكوين الغلاف البروتيني الخاص بالفيروس مما يحد من نمو الفيروسات وانتشارها. وقد لوحظ أهمية هذه التقنية مع التطعيم الدقيق من التخلص من بعض الفيروسات الصعبة التخلص منها في تقنية واحدة (Sanjeev *et al*., 2007).

ـتأثير نسبة السكروز في الوسط المغذي في نسبة نجاح التطعيم الدقيق:

يعمل السكروز المضاف إلى الوسط المغذي الخاص بالتطعيم الدقيق على تأمين مصدر للطاقة اللازم للالتحام ونمو المطاعيم داخل الأنابيب. وقد لوحظ بأن زيادة تركيز السكروز في الوسط المغذي من 30إلى 50غ/ل يزيد في نسبة نجاح المطاعيم في الدراق والحمضيات (Martinez et al., 1981; ALSkief and ALMaarri, 1991)

رابعاًـعوامل متعلقة بطريقة تنفيذ التطعيم الدقيق:

تعد عملية التطعيم الدقيق عملية حساسة وتتطلب دقة عالية وحذر شديد حتى يتم الحصول على نتائج جيدة. ولا بد من تأمين الشروط المثلى وأخذ الاحتياطات الضرورية الفعالة لمنع القمم النامية من السقوط والجفاف وحتى يتم التحام الأصل مع القمم النامية ونموها. ولابد من تحضير البادرة أو الأصل ثم تفصل القمم النامية بالحجم المناسب (0.3 -0.7مم) ويحافظ عليها من الجفاف. يتم تركيب القمم النامية بطريقة سليمة وصحيحة بحيث يحقق التطابق بين كامبيوم الأصل والطعم. لتحقيق ذلك قام الباحثين بدراسة بعض العوامل المتعلقة بتقنية التطعيم الدقيق المخبري بهدف زيادة نسبة نجاحها. ومن هذه العوامل:

ـطريقة تحضير الأصل أو البادرات البذرية: تختلف طريقة تحضير الأصل بحسب حجم القمم النامية المستخدمة وحسب الغرض من تطبيق تقنية التطعيم الدقيق. ففي حال تطبيق التطعيم الدقيق بغرض

الحصول على غراس خالية من الفيروسات يتم استخدام قمم نامية صغيرة جداً وفي هذه الحالة يتم قطع البادرة بشكل أفقي فوق الفلقات بـ1-2سم. أو يتم عمل كرسي صغير للقمة النامية بعد القص الأفقي للبادرة (ALSkief and ALMaarri, 1991).

وعند تطبيق التطعيم الدقيق بهدف دراسة التوافق بين الأصل والطعم ففي هذه الحالة يتم تحضير البادرة على شكل V بعد القص الأفقي لها. تؤخذ في هذه الحالة قمم نامية كبيرة نسبياً وتحضر القمة النامية بنفس الطريقة ويتم تركيبها معاً بهدف الالتحام والنمو (Wu *et a*l., 2007; Sanjeev *et al*., 2007).

ويوجد طرق اخرى في تنفيذ التطعيم الدقيق مثل T مقلوبة حيث حصل فريق باكستاني على نسبة نجاح عالية بلغت 33% عند استخدام هذه الطريق في تركيب قمم النامية في الحمضيات (Naz et .,2007).

-معاملة منطقة التطعيم بطبقة رقيقة من الآغار:

إن عملية فصل القمم النامية عملية صعبة ويتم فصلها عادة تحت المكبرات الضوئية. وهي سريعة الجفاف ولذلك لابد من أخذ الاحتياطات الضرورية للمحافظة عليها من الجفاف وخاصة أثناء عملية التركيب على الأصل. وذلك فإن إضافة طبقة رقيقة من وسط مغذ صلب يحوي هرمونات نباتية يعمل على تحسين نسبة نجاح التطعيم الدقيق بشكل كبير. تعمل طبقة الآغار الرقيقة اللزجة على تثبيت القمم النامية بشكل صحيح وتحميها من السقوط والجفاف، كما يساعد وجود الهرمونات النباتية مع هذه الطبقة إلى تشجيع الانقسام الخلوي وتسرع من تكوين طبقة من الكالوس في منطقة التطعيم مما يزيد من فرص التحام الطعم مع الأصل. ففي تجربة في هذا المجال نفذت في المشمش والدراق أدى إلى زيادة نسبة نجاح التطعيم الدقيق بشكل كبير، وفي أنواع أخرى لم تعطي نتيجة إيجابية مثل عند تطعيم المشمش على الأصل ميروبلان (*Martinez et al.*, 1979))

كما تم تحسين نسبة نجاح التطعيم الدقيق في الأفوكادو باستخدام طبقة من الوسط المغذي في منطقة التطعيم حيث تعمل على حماية القمم النامية من الجفاف (Phiego and Murashige, 1987).

-معاملة منطقة التطعيم بمضاد أكسدة: تفرز بعض النباتات بعض المركبات الفينولية مما يعيق نجاح التطعيم الدقيق. فقد لوحظ أن معاملة منطقة التطعيم والقمم النامية بمضاد أكسدة يمكن أن يزيد من فرص نجاح التطعيم الدقيق في بعض الأنواع فعند تطعيم مشمش على بادرات بذرية من المشمش معاملة منطقة التطعيم بمحلول يحوي 2غ/ل من مركب دي تيل دي ثيوكاربامات الصوديوم (DIECA) أدى إلى تحسين نسبة نجاح التطعيم وقد حافظت المعاملة على القمم النامية حية بدون اسمرار (Martinez *et al*., 1979). وفي بعض الأنواع الأخرى فإن المعاملة بمضادات الأكسدة (مزيج من الستريك أسيد 100 ملغ/ل مع 150مغ/ل من الأسكوربيك أسيد) لم تحسن من نسبة نجاح التطعيم الدقيق، كما هو الحال عند

تطعيم نبات الزينة Protea cyanoroides، من أزهار القطف الهامة في جنوب إفريقيا، على بادرات بذرية من نفس النوع (Wu *et al*., 2007).

-**زرع القمم النامية بشكل أولي**: تكمن صعوبة التطعيم الدقيق المخبري بعملية فصل القمم الميرستيمية واستعمالها وهي صغيرة جداً، فهي تحتاج دقة وخبرة عالية لوضعها بالشكل الصحيح والمكان الصحيح على الأصل. وتكون عادة نسبة النجاح منخفضة نسبياً. فقد أدخل بعض التحسينات بهدف رفع نسبة نجاح التطعيم الدقيق وذلك بعزل القمم الميرستيمية وزرعها في وسط مغذ مناسب حتى تنمو وتكبر ومن ثم تستخدم في عملية التطعيم الدقيق ففي هذه الحالة زادت نسبة نجاح التطعيم الدقيق بشكل ملموس في العديد من الأنواع النباتية في الحمضيات واللوزيات (Jonard, 1986).

أمثلة عن التطعيم الدقيق المخبري:

طبقت تقنية التطعيم الدقيق في كثير من أنواع الفاكهة بنجاح في اللوزيات (دراق-مشمش-خوخ-لوز) في التفاحيات (تفاح وإجاص) في الحمضيات (الليمون-البرتقال-اليوسفي-المندرين-كريفون....) العنب، الآفوكادو، والفستق الحلبي وبعض الأشجار الحراجية مثل العفص والسيكويا وشجرة الصمغ العربي وبعض نباتات وشجيرات الزينة مثل الكاميليا (Jonard, 1986; Navaro, 1991; Can et al., 2006; Sanjeev et al., 2007)

وسنورد عدة أمثلة تمثل الأهداف الأساسية للتطعيم الدقيق.

-الحصول على غراس خالية من الأمراض الفيروسية:

مثال في الحمضيات (Abbas *et al*., 2008)

يعد المرض الفيروسي التريستيزا من الأمراض الخطيرة التي تصيب الحمضيات وتؤدي إلى تدهور الإنتاج ونمو الأشجار. يسبب هذا المرض فيروس يدعى *Citrus Tristeza Closterovirus* (CTV). وقد استطاع فريق باكستاني من الحصول على غراس خالية من فيروس التريستيزا من أشجار المندرين والبرتقال المصابة بالمرض وذلك بالتطعيم الدقيق المخبري.

أخذت نموات غضة من أشجار مندرين *Citrus reticulata* وأشجار برتقال *Citrus sinensis* مصابة بالتريستيزا وعقمت بهيبوكلوريت الصوديوم 0.5% لمدة 10 دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات. فصلت القمم النامية بحجم (0.3-0.7مم) تحت المكبرة، وطعمت بالمختبر على بادرات بذرية من نوعين من الحمضيات وهما بادرات الليمون المخرفش *Citrus jambhiri* وبادرات من البرتقال الحامض *Citrus aurantium*.

عقمت بذور الأصول وزرعت في وسط مغذ يحوي المحلول المعدني لموراشيج وسكوغ (1962)+سكروز 30غ/ل+ 10غ/ل آغار وبدون هرمونات نباتية. وضعت البذور بعد زراعتها بالظلام حتى تنبت لمدة أسبوعين على درجة حرارة 25مْ.

زرعت البادرات المطعمة بعد تنفيذ التطعيم الدقيق المخبري في وسط مغذ سائل يحوي محلول MS+فيتامينات+30غ/ل سكروز+5مغ/ل من السيتوكينين BAP، بلغت نسبة النجاح بعد شهرين من التطعيم الدقيق بين 40-65% وذلك حسب الأصل المستخدم.

نقلت النباتات المطعمة إلى البيت الزجاجي الشبكي وقدمت لها العناية اللازمة من ري وتسميد وشروط جوية مناسبة للنمو. بلغت نسبة نجاح التقسية أكثر من 90% من النباتات المطعمة المنقولة. أخذت عينات من المطاعيم الجديدة بعد أن تابعت نموها في البيت الزجاجي الشبكي وكونت بين 7-9 أوراق جديدة للفحص للتأكد من خلوها من الفيروسات. اختبرت العينات بتقنية الـ ELISA، وقد تبين أن 90-94% من المطاعيم الناجحة خالية من الفيروس التريستيزا في كل من المندرين والبرتقال.

-الكشف عن حالة عدم التوافق المبكر: يفيد التطعيم الدقيق في الكشف المبكر عن حالات عدم التوافق التي تظهر في الطبيعة بشكل متأخر. كما يفيد بدراسة أسباب عدم التوافق وخاصة الفيروسية منها.

مثال عن عدم التوافق بين المشمش والخوخ مايروبلان:

عند تطعيم قمم نامية من المشمش على بادرات من الخوخ مايروبلان لوحظ بأن نسبة نجاح التطعيم بعد 7 أيام كانت مرتفعة إذ وصلت إلى 86% كما هو موضح بالجدول (6-6). وبدأت بعد 14 يوماً مظاهر عدم التوافق تظهر في القمم النامية وبدأت نسبة نجاح التطعيم تنخفض بشكل تدريجي حتى انعدمت بعد 60 يوماً. وقد لوحظ تشكل واسمرار القمم النامية وحتى النامي منها ثم ينتهي الأمر بموت الطعم في حين يبقى الأصل حي وهذه علائم عدم التوافق بين الأصل والطعم (Martinez *et al*., 1981; Jonard *et al*., 1983). يعزى سبب الاسمرار الذي يظهر في الطعم إلى أكسدة المركبات الفينولية المفرزة من الطعم بفعل أنزيمات البيروكسيديز والأوكسيديز مما يؤدي إلى اسمرار وموت الطعم.

جدول (6-6): تطور التطعيم الدقيق بين المشمش مع الميروبلان مع الزمن (عن Martinez *et al*., 1981)

الزمن باليوم	عدد القمم النامية الحية	نسبة نجاح التطعيم
7	138	86
14	101	63
21	93	58
28	84	52
35	32	20
42	12	7.5

60	0	0

وفي حال الفستق الحلبي لوحظ إن التطعيم الدقيق قد كشف حالات عدم التوافق عند تطعيم الفستق الحلبي على بادرات من أنواع برية *Pistacia mutica* و *P. terebinthus* و *P. kinjuk* حيث لوحظ اسمرار المطاعيم بعد 5-6أيام مباشرة بعد عملية التطعيم أما عند تطعيم الفستق الحلبي على بادرات الفستق الحلبي كانت نسبة النجاح والنمو جيدة، وهذا يدل على وجود حالة من عدم التوافق مع الأنواع البرية المستخدمة (Can *et al*., 2006).

-**التطعيم الدقيق وسيلة لتجديد فتوة الأشجار المعمرة:** إن عملية الإكثار الخضري للأشجار المعمرة عملية صعبة وشاقة ودرجة استجابتها متدنية، لذلك لابد من تجديد فتوتها حتى تستعيد قدرتها على الإكثار والتجذير. يعد التطعيم الدقيق إحدى وسائل تجديد فتوة الأشجار. لأن عند تطعيم قمم نامية مأخوذة من أشجار هرمة على بادرات بذرية فتية فتكتسب المطاعيم بعض صفات النباتات الفتية وتستعيد قدرتها على الإكثار بالنسج.

والأمثلة كثيرة في هذا المجال نذكر على سبيل الذكر لا الحصر. فقد تمكن فريق العالم موراشيج من تجديد فتوة أشجار معمرة من الآفوكادو عند تطعيمها على بادرات بذرية فتية على التجذير (Phiego and Murashige, 1987)

كما استطاع الباحثين من تجديد فتوة العديد من الأشجار المعمرة مثل العفص، السيكويا، شجرة الصمغ العربي، نبات الكاميليا (Jonard et al., 1983; Deogratias et al., 1986-1991; Khalafallah and Dafallah, 2008)