الفصل السابع

إكثار بالأجنة الخضرية

يتميز الجنين الخضري عن الجنين الجنسي بأن الأول ينشأ من أجزاء نباتية دون حدوث عملية إلقاح. ومن المفترض إذا لم يحدث طفرات عند تكوين الأجنة الخضرية أن تعطي نباتات مشابهة تماماً للنبات الأم التي أخذت منها الأنسجة التي كونت الأجنة الخضرية. أما عند زراعة الأجنة الجنسية الناتجة بعد عملية الإلقاح، فإننا نحصل على نباتات مغايرة في تركيبها الوراثي للنبات الأم. ومن هذا المنطلق تستبعد عملية الإكثار البذري للنخيل.

يتم تكوين الأجنة الخضرية بزراعة الأنسجة بوساطة عدة طرائق، إما بدءاً من الكالوس كما هو الحال في النخيل أو بدءاً من البروتوبلاست أو الخلايا المفردة أو حبوب اللقاح التي تتطور لتكون أجنة خضرية، قد تكون الأجنة وحيدة أو ثنائية الصيغة الصبغية حسب الخلايا الأم التي كونت منها.

وسيتم شرح مفصل **لإكثار النخيل بالأجنة الخضرية** بعد تكون الكالوس الجنيني، الذي يعطي بدوره مصدراً جيداً وكبيراً للأجنة الخضرية. وأصبحت هذه التقنية إحدى الطرائق الرئيسة في إكثار النخيل بالأنسجة، حيث تعطي أعداداً كبيرة من النباتات خلال فترة زمنية قصيرة نسبياً بالمقارنة مع الطرق الأخرى المتبعة في إكثار النخيل بالأنسجة.

7-1- مقدمة تاريخية Introduction:

يعد العالم Schroder عام 1970 أول من حاول زراعة أجزاء نباتية من قلب النخلة. وقد حصل على الكالوس الذي تطور فيما بعد إلى جذور فقط. كما حصل العالم سميث Smith, 1970 على الكالوس بدءاً من زراعة أجزاء من جذور النخيل التي تطورت وأعطت جذوراً جديدة و كالوساً بسيطاً.

وفي عام Reuveni, 1972، Reuveni et Kipnis, 1974 قاموا بزراعة أجزاء مختلفة من فسائل خضرية من النخيل حيث زرعوا القمم النامية، البراعم الجانبية، الوريقات الأولية، وأجزاء

من الشماريخ الزهرية، أجزاء من الجذور، وأجنة البذور، وحتى البويضات غير الملقحة. جميع محاولاتهم باءت بالفشل، إذ لم يحصلوا إلا على الكالوس.

يعد الباحثان عمار وبن باديس (Ammar et Benbadis, 1977) أول من حصل على أجنة خضرية للنخيل التي تطورت إلى نباتات كاملة فيما بعد، عن طريق زراعة أجنة البذور. كما حصل الباحثان Rynold et Murashige عام 1978 على النتيجة نفسها.

يعد الباحث Tisserat عام 1979 أول من حصل على أجنة خضرية بدءاً من الكالوس المتكون من القمم النامية والبراعم الجانبية. تطورت الأجنة الخضرية وأعطت نباتات كاملة. تتالت الأبحاث في هذا المجال، ويمكن القول أن كثير من الباحثين تمكنوا من الحصول على أجنة خضرية بدءاً من أجزاء نباتية مختلفة.

وتجدر الإشارة إلى أن العمل على النخيل صعب وشاق ويحتاج إلى وقت طويل، لأن استجابة أنسجة النخيل للنمو بطيئة جداً، ويمكن أن تطول الفترة إلى أكثر من 6-8أشهر حتى نحصل على الكالوس الجنيني الذي بدوره يتطور ويعطي أجنة خضرية ونباتات كاملة. وعلينا أن نذكر بأن لإكثار النخيل بالأنسجة أسراراً كثيرة لم تنشر من قبل الباحثين، ويعزى السبب إلى الأهمية الاقتصادية لإكثار النخيل بالأنسجة. ولذلك فالبحث العلمي في هذا المجال يكتنفه الغموض، والدليل على ذلك السعر المرتفع الذي تطلبه بعض الشركات الأجنبية التي تمتلك التقنية ثمناً لها والتي بدأت بشكل فعلي بإنتاج أعداد كبيرة من شتول النخيل بهذه الطريقة.

7-2- كيف تتم زراعة أنسجة النخيل:

7-2-1- **-تحضير الأوساط المغذية:**

تحتوي الأوساط المغذية الخاصة بزراعة أنسجة النخيل للحصول على أجنة خضرية، على العناصر المعدنية بحيث تشمل العناصر الكبرى والعناصر الصغرى وعلى مصدر للطاقة، والفيتامينات والهرمونات النباتية. يحوي الوسط المغذي في المرحلة الأولى على تركيز عالٍ من الأوكسين. إضافة إلى ذلك يحتوي الوسط المغذي على مضاد أكسدة مثل الفحم المنشط أو P.V.P بولي فينيل بيروليدون، وتضاف أيضاً مادة الآجار التي تجعل الوسط المغذي صلباً وشفافاً.

يختلف تركيب الأوساط المغذية حسب طبيعة الأجزاء النباتية المزروعة، حسب الأصناف، ومرحلة الزراعة. بعد تحضير الأوساط المغذية المناسبة، يتم تعبئتها في أنابيب اختبار قياس 25 X150 مم أو 25 X200مم، أو في قوارير سعة 150 مل أو 200مل. ثم تسد الأنابيب

بسدادات بلاستيكية أو معدنية. تعقم الأوساط المغذية داخل أوتوغلاف Autoclave على درجة حرارة 115-121مْ لمدة 15-30دقيقة. تترك الأنابيب لتبرد بعد التعقيم وبهذا الشكل تصبح جاهزة لعملية الزرع.

7-2-2- -تحضير الأدوات والتجهيزات اللازمة للزراعة:

يقصد بأدوات الزرع، الملاقط، المشارط، الإبر والمقصات اللازمة لعملية الزرع، يمكن أن تعقم بالأوتوغلاف أو بالفرن بالهواء الجاف على درجة حرارة 100-150م، ثم تترك لتبرد في غرفة العزل ويجب عدم فتحها قبل إجراء عملية الزرع.

نحتاج لعملية الزرع ورق ترشيح وأطباق بتري. توضع أطباق البتري بعلب معدنية كبيرة وتعقم. ويحافظ عليها من التلوث. كما يتم تحضير الأدوات الزجاجية اللازمة لتعقيم الأجزاء النباتية مثل بياشر ودوارق. بمختلف الأنواع، وتعقم بالأوتوغلاف. يتم تحضير الماء المقطر بحسب حجم الماء المقطر في الدوارق كما هو موضح في الجدول (7-1).

جدول (7-1): تأثير حجم المحلول على الزمن اللازم للتعقيم (عن Thorpe عام 1981)

حجم الوسط أو المحلول (مل)	**الوقت اللازم للتعقيم (121م) (دقيقة)**
20	15
100-75	20
500-250	25
1000	30
1500	35
2000	40 دقيقة

بعد تعقيم الأدوات والمواد الضرورية لعملية الزرع، تترك لتبرد حتى نتمكن من استعمالها أثناء عملية الزرع.

7-2-3- **-تحضير الفسائل للزراعة:**

تؤخذ الفسائل المعدة للزراعة من أمهات سليمة معروفة الأصناف، وخالية من الإصابة بالأمراض والحشرات. ويراعى أن تؤخذ من أمهات جيدة النمو ومعتنى بها بشكل جيد. تؤخذ الفسائل بعمر 2-4سنوات ووزنها لا يقل عن 5-7كغ. يمكن أن تؤخذ الفسائل بحجم أقل من ذلك

ولكن عيبها تكون صعبة التحضير ولا تحوي على براعم جانبية متمايزة. تنظف الفسائل بعد فصلها من الشجرة الأم من التراب ومن الليف والوريقات الخارجية الكبيرة. ثم تنزع الأوراق الخارجية بشكل تدريجي مع أخذ الحذر بعدم إتلاف البراعم الجانبية إن وجدت. تنزع البراعم الجانبية وتوضع في محلول نظيف، حيث يفترض وجود برعم جانبي في إبط كل ورقة. ولكن قسماً فقط من هذه البراعم يكون بحالة جيدة والقسم الأعظم يكون ساكناً أو تالفاً. ويتابع العمل في نزع الأوراق والبراعم الجانبية حتى نصل إلى قلب النخلة. وهذا ما تطلق عليه الجمارة.

نقص بحجم 3-5سم وقطر 1-2سم. وبهذا الشكل تصبح الأجزاء النباتية (الجمارة والبراعم الجانبية) جاهزة لعملية التعقيم.

7-2-4- تعقيم الجمارة والبراعم الجانبية:

يتم استخدام بعض المواد الكيميائية لتعقيم الأجزاء النباتية مثل هيبوكلوريت الصوديوم، هيبوكلوريد الكالسيوم، ماء جافل، برمنغنات البوتاسيوم ، كلور الزئبق، وتستخدم بعض المركبات الجاهزة مثل الدوستوس Domestos (Jones *et al*; 1977)، والكلوروكس Chlorox.

هذا وقد استخدمنا التقنية التالية مع بعض التقنيات الأخرى في مركز أبحاث النخيل والتمور:

-بعد أن تنظف الفسيلة بشكل جيد وتفصل البراعم الجانبية والجمارة بطول 3-5سم، وعرض 1.5-2.5سم. تغسل جيداً بالماء الجاري ثم تنقع في محلول يحوي مزيجاً من حمض الستريك Citric acid 100ملغ/لتر، وحمض الأسكوربيك Ascorbic acid 150ملغ/لتر لفترة 20 دقيقة.

-تنقع الأجزاء النباتية في محلول من الكلوروكس 0.5-1% المضاف له عدة نقاط من التوين Tween80 لمدة 15-20دقيقة يضاف للمحلول معقم مزيج من 150ملغ/لتر من حمض الأسكوربيك و100ملغ/لتر من حمض الستريك. يتم التحريك المستمر أثناء عملية التعقيم.

-تغسل الأجزاء النباتية ثلاث مرات في ماء مقطر ومعقم يحوي 150 ملغ/لتر من حمض الأسكوربيك و100ملغ/لتر من حمض الستريك، ويحافظ على قلب الفسيلة في المحلول نفسه إلى موعد الزراعة.

ولابد من الانتباه إلى أن عملية الغسل، وتغيير المحاليل يجب أن تتم في جو معقم وباستخدام أدوات وزجاجيات معقمة للمحافظة على سلامة الأنسجة من التلوث الخارجي.

وقد أثبتت التجارب المكررة عشرات المرات صلاحية هذه التقنية والتي لا تتجاوز فيها نسبة التلوث عن 10-20% (Al Maarri Al Ghamdi 1995).

7-2-5- -زراعة الأجزاء النباتية:

يتم عزل الأجزاء النباتية وزراعتها في غرفة العزل تحت جهاز العزل الجرثومي Laminar air flux hood حيث يؤمن هذا الجهاز جو معقم كامل في ساحة العمل، خالٍ من التلوث.

يتم فصل الأجزاء النباتية (قمم نامية، بداءات ورقية، أجزاء من الميرستيم، براعم جانبية) بمساعدة أدوات مثل المشارط والملاقط المناسبة، وبمساعدة مجهر. وبعد عملية الفصل تزرع الأجزاء النباتية مباشرة داخل الأنابيب الحاوية على وسط مغذٍ مناسب للزراعة الأولية.

ولابد من الإشارة إلى أنه يمكن تقسيم القمة النامية إلى عدة أقسام، أربعة أقسام أو أكثر وهذا يعود إلى حجم القمة النامية المزروعة وإلى مهارة القائم على العمل.

7-3- -مراحل إكثار النخيل بالأجنة الخضرية:

تشمل زراعة أنسجة النخيل عدة مراحل أساسية، وهي:

-الزراعة الأولية.

-تكوين الكالوس الجنيني وإكثاره.

-تكوين الأجنة الخضرية.

-إنبات الأجنة الخضرية للحصول على نباتات كاملة.

-التقسية أي نقل النباتات من الأنابيب إلى الشروط الطبيعية.

7-3-1- -الزراعة الأولية Initial culture: تهدف الزراعة الأولية الحصول على أنسجة نباتية خالية من التلوث، ولها القدرة على النمو والتطور (Franclet, 1980). إن استجابة أنسجة النخيل للزراعة على أوساط غذائية بطيئة جداً، وتحتاج إلى وقت طويل حتى نحصل على استجابة صحيحة تسمح لنا بمتابعة مراحل الإكثار للحصول على نباتات كاملة. قد تستغرق العملية عدة أشهر وقد تطول حتى سنة.

يتحدد نجاح الزراعة الأولية بعدة عوامل، منها ما هو متعلق بتركيب الأوساط المغذية، ومنها ما هو متعلق بالحالة الفيزيولوجية للنبات الأم، ومنها ما هو متعلق بالعوامل المناخية (حرارة، إضاءة) الواجب توافرها في غرف النمو.

7-3-1-1- -العوامل المتعلقة بالنبات الأم:

يقصد بالحالة الفيزيولوجية للنبات الأم، مدى النشاط الفيزيولوجي للنبات الأم. وهذا النشاط مرتبط بعدة عوامل مثل عمر النبات الأم، طبيعة الأجزاء النباتية المزروعة، وقت زراعة الأجزاء النباتية، طبيعة الصنف، الحالة الصحية للفسائل.

أ-تأثير عمر النبات الأم في استجابة الأجزاء النباتية المزروعة: يعد عمر النبات الأم عاملاً محدداً لإكثار كثير من النباتات بالأنسجة، وبشكل عام تقل قدرة الأجزاء النباتية على الإكثار، كلما زاد عمر النبات الأم (Franclet, 1980 ؛Al Maarri, 1986). ويلاحظ في كثير من الأنواع النباتية المعمرة بأن النباتات الأم تحتاج إلى تجديد حيويتها وفتوتها Rejnvenation حتى تكتسب النباتات قدرة على الإكثار والتجذير من جديد.

وهذه الظاهرة واضحة جداً في إكثار الأشجار الخشبية بالأنسجة، أما في حال النخيل فلا توجد دراسات واضحة تبين أثر عمر النبات الأم في الإكثار بشكل عام. وإن المشكلة بالأساس غير ظاهرة كون الفسائل المستعملة فتية بعمر 2-4 سنوات من جهة، وإن الأشجار الأم في أغلب الأصناف لا تعطي فسائل، إلا في المرحلة الأولى من عمرها قبل أن تدخل الأشجار في طور الإثمار المليء.

ورغم ذلك فإن أثر عمر النبات الأم يظهر بقدرة الأجزاء النباتية على الاستجابة للنمو وتكوين الكالوس، ففي تجربة قام بها العالم Rynold, 1978 على زراعة أجنة البذور حيث أخذ الأجنة من بذور بأعمار مختلفة، بذور ثمار خضراء، أجنة أخذت من بذور بعمر سنتين، وأجنة أخذت من بذور بعمر سنتين ولكن أخضعت لعملية تجميد. بعد زراعة الأجنة من المصادر الثلاثة لاحظ الباحث أن حجم الكالوس المتكون من أجنة حديثة العهد كان ضعفي حجم الكالوس المتكون من أجنة أخذت من بذور بعمر سنتين. وقد أثبتت التجربة أن الأجنة حديثة العهد أعطت كالوساً بنسبة أكبر وحجم أكبر، وكانت مقدرته على تكوين الأجنة مضاعفة عن الكالوس المتكون في الأجنة التي أخذت من ثمار جافة بعمر سنتين (Rynold, 1978).

وتجدر الإشارة أيضاً أن استجابة الأجزاء المأخوذة من فسائل بذرية أسرع وأكثر قدرة على تكوين الأجنة من الأجزاء النباتية المأخوذة من الفسائل الخضرية. وقد أثبت ذلك علمياً من كثير من الباحثين (Benbadis, 1986؛ Tisserat, 1982),

ب-طبيعة الجزء النباتي المزروع: يؤثر الجزء النباتي المزروع تأثيراً مباشراً في نجاح عملية تكوين الكالوس الجنيني، ومن ثم تكون الأجنة الخضرية القادرة على إعطاء نباتات كاملة. وقد تم الحصول على أجنة خضرية بدءاً من أجزاء نباتية مختلفة، من القمم النامية، البراعم الجانبية، الوريقات الأولية، أجنة خضرية بدءاً من أجزاء نباتية مختلفة ،كما هو موضح بالجدول (7-2).

جدول (7-2): تأثير طبيعة الجزء النباتي المزروع على إكثار النخيل بالأجنة

الجزء النباتي المزروع	النتيجة التي توصل لها الباحثون	اسم الباحث
قمم نامية وبراعم جانبية	كالوس/أجنة خضرية ونباتات كاملة	Tisserat, 1979; Tisserat and demason, 1980; Rhiss *et al*, 1979. Sharma et al, 1984; Zaid and Tisserat, 1983; Daguin et letouze, 1988; Abo.elnil, 1989; Al Gnamdi, 1993.
الوريقات الأولية	كالوس/أجنة خضرية ونباتات كاملة	Sharma et al, 1980, Zaid and Tisserat, 1983; Drira, 1981; Poulain et al, 1979. Tisserat, 1981; Al Maarri and Al-Ghamdi, 1995.
الميرستيم	كالوس جنيني/ أجنة خضرية	Tisserat, 1979, Tisserat et al, 1979.
الجذور	كالوس/جذور	Smith, 1975; Euweins, 1978.
براعم زهرية	كالوس/براعم زهرية	Zaid and Tisserat, 1983.
براعم زهرية	كالوس جنيني/ براعم زهرية، أجنة خضرية، نباتات كاملة.	Drira and benbadis, 1985; Drira et al, 1993.

يلاحظ من النتائج التي حصل عليها الباحثون أن القمم النامية، والبراعم الجانبية، والوريقات الأولية الداخلية أكثر الأجزاء النباتية استجابة للحصول على الكالوس.

أما استجابة الأجزاء النباتية الأخرى فأقل من القمم النامية. ومن الملاحظ اتجاه أكثر الباحثين الذين يعملون في زراعة أنسجة النخيل إلى زراعة القمة النامية للفسائل التي تعطي الكالوس بشكل أسرع وأقل عرضة للإصابة بالاسمرار والتلوث في الأجزاء النباتية الأخرى. والكالوس المتكون يمكن أن يتطور ويعطي الأجنة الخضرية التي تنمو إلى نباتات كاملة.

7-3-1-3 - العوامل المتعلقة بالأوساط الغذائية:

لا يوجد إلى الآن وسط مغذٍ وحيد يناسب زراعة أنسجة النخيل، ولكن يلاحظ أن كل باحث درس الأوساط الغذائية من زاوية معينة. وذلك حسب الهدف من الزراعة، حسب الأصناف التي استعملت، وحسب الجزء النباتي المزروع. ولدى دراسة الوسط المغذي، يتوجب دراسة جميع العناصر التي تدخل في تركيبه، مثل تركيب المحلول المعدني، أنواع الهرمونات وتركيزها، نوعية الآجار المستعمل، المواد العضوية المضافة وتراكيزها، السكروز وتركيزه. إن كل عامل من هذه العوامل يلعب دوراً هاماً سلباً أم إيجاباً في تطور الأجزاء النباتية.

أ-تأثير التركيب المعدني للوسط المغذي: يستعمل أغلب الباحثين محلول المعدني لموراشيج وسكوغ (1962) الذي أعطى نتائج جيدة في تطور الكالوس، كما استعمل بعض الباحثين محاليل معدنية أخرى مثل محلول وايت White من قبل Schroeder عام 1970، ومحلول Knop (كنوب) من قبل الباحث عمار وزملائه (1977) في إنبات أجنة بذور النخيل. وقد استخدم تعديل لمحلول موراشيج وسكوغ من قبل العديد من الباحثين (Rynold, 1984 ; Sharma, 1984 ; Zaid M, 1989 ; Tisserat, 1979).

وقد دلت التجارب على أن تمديد المحلول المعدني لموراشيج وسكوغ يقلل من تكون نسبة الكالوس المتكونة على الأنسجة Rynold, 1984. كما أوضحت التجارب عند إضافة كمية زائدة من المركب K2H2PO4.H2O إلى محلول موراشيج وسكوغ، يزيد في تكوين الكالوس ويقلل من ظاهرة الاسمرار (Zaid M, 1989)؛ (Sharma, 1984).

ب-تأثير الهرمونات النباتية ومركبات الوسط الأخرى: تلعب الهرمونات النباتية دوراً فعالاً ومحدداً لنجاح زراعة الأنسجة النباتية بشكل عام والنخيل بشكل خاص، إذ لا يمكن الحصول على الكالوس الجنيني في النخيل إذا لم نضف الهرمونات النباتية إلى الوسط المغذي. ليس كل الهرمونات تؤثر بشكل إيجابي في تكون الكالوس على أنسجة النخيل المزروعة. يضاف عدة مجموعات من الهرمونات النباتية إلى الأوساط المغذية كما يلي:

-الأوكسينات: NOA, TAA, 2.4.D, NAA, IBA...

-السيتوكينينات: 2ip, Z, K, BAP.

-الجبريلينات: GA3.

من الملاحظ أنه لا يمكن تكوين الكالوس الجنيني على أجزاء النخيل المزروعة داخل الأنابيب إلا بوجود الأوكسين 2.4.D، بتراكيز مختلفة. وقد تم الحصول على الكالوس في بعض الأحيان باستخدام NAA أو مزيج من الأوكسينات. وفي المراجع توازنات هرمونية مختلفة، أدت في النهاية إلى الحصول على تطور للكالوس بدءاً من أجزاء نباتية مختلفة. ولكن أكثر هذه المراجع تعمل على استخدام تراكيز عالية من الأوكسين 2.4.D الذي يصل إلى 100ملغ/لتر وبخاصة في المرحلة الأولى للحصول على الكالوس الجنيني (Tisserat, 1979; Tisserat *et al*,1981; Mater *et al*, 1983)

قام الباحث Rynold, 1978 بدراسة تأثير مختلف تراكيز الـ 2.4.D والسيتوكينين 2ip في تكون الكالوس بدءاً من أجنة النخيل المزروعة على وسط مغذٍ MS، المضاف له NaH2PO4.H2O (170ملغ/لتر) مع الفحم المنشط. وقد دلت هذه التجربة على أن أفضل تركيز للهرمونات في تكوين الكالوس هو 100ملغ/لتر من 2.4.D مع 1ملغ/لتر من الـ2ip.

هذا وقد استخدمت هرمونات أخرى لتكوين الكالوس على أنسجة النخيل مثل الـ NAA أو مزيج من الـ NAA مع الـ NOA أو الـ IAA بنسب متفاوتة.

فقد تمكن الباحثان Daiky et Demarly عام 1987 من الحصول على الكالوس الجنيني باستخدام وسط مغذٍ سائل، زرعت فيه أجزاء نباتية من الوريقات الصغيرة المفصولة من نباتات صغيرة من صنف دوغلة نور، يحوي الوسط المغذي العناصر الكبرى لموراشيج وسكوغ مع العناصر الصغرى لـ Ewens عام 1978 (الخالي من يود البوتاسيوم). والذي أضيف له إينوزيتول 100ملغ/لتر، الغلوتامين 100ملغ/لتر، الآرجنين 100ملغ/لتر، الأسباراجين 100ملغ/لتر، والـ FeNa EDTA 20ملغ/لتر، بالإضافة إلى ذلك 50ملغ/لتر من الـ NAA و 50ملغ/لتر من IAA والـ BAP 5ملغ/لتر و10ملغ/لتر من الكينيتين. فقد تمكن الباحثان من الحصول على الكالوس الجنيني على الوسط المذكور الذي تطور فيما بعد إلى أجنة خضرية. واستخدم الوسط السائل فقط لمدة ثلاثة أيام وبعدها نقلت إلى محلول مغذٍ صلب يحوي المكونات السابقة نفسها، ولكن تركيز الهرمونات النباتية خفض 10 مرات من المحلول الأول.

ولابد من القول أيضاً أن بعض الباحثين قد حصلوا على الكالوس الجنيني على أوساط غذائية تحوي على تراكيز مخفضة جداً من الـ 2.4.D لا تتعدى 2ملغ/لتر (Drira *et al*., 1993; Zaid M., 1989). وفي الحالة الأخيرة لم يضف إلى الوسط المغذي الفحم المنشط.

وتجدر الإشارة إلى أن بعض المركبات الكيميائية التي يدخل في تركيبها 2.4.D مثل البيكلورام Picloram، مبيد عشبي المادة الفعالة فيه 2.4.D عند إضافة 1ملغ/لتر من هذا المركب إلى الوسط المغذي، لوحظ في بعض الحالات الحصول على أجزاء نباتية ذات نسبة اسمرار أقل وطبيعة الكالوس المتكون وحجمه كانت أفضل من الكالوس المتكون على أجزاء نباتية مزروعة على وسط مغذٍ نفسه الحاوي على 2.4.D (Zaid M., 1989).

ولابد من الذكر أخيراً أنه يضاف إلى الوسط المغذي الخاص بتكوين الكالوس، بعض الفيتامينات والأحماض الأمينية مثل التيامين كلوريد، ميواينوزيتول، البيرودوكسين، الغلوتامين، حمض النيكوتينيك، بانتوثينات الكالسيوم. ولكن دور الفيتامينات لم يعرف تأثيرها إلى الآن بشكل واضح، حيث أشار بعض الباحثين إلى أهمية كل من التيامين كلوريد، والميواينوزيتول في تنشيط نمو الكالوس المتكون على بعض أنواع النخيل (Reynold and Murashige, 1979)، ولكن يلاحظ أن أغلب الباحثين في مجال إكثار النخيل يضيفون الفيتامينات والأحماض الأمينية المذكورة أعلاه تراكيز محددة. وربما يكون ذلك له أثر إيجابي في نمو الكالوس وتطوره. ولكن لا يوجد دراسات تفصيلية على هذه المركبات الغذائية.

أما فيما يتعلق بالسكروز، يضاف عادة إلى الوسط المغذي بتركيز من 2-5% (Murashige, 1974) يضاف عادة السكروز بتركيز 3% لزراعة النخيل وخاصة لطور تكوين الكالوس. وقد دلت الأبحاث على أن زيادة تركيز السكروز يزيد من تكوين الأجنة الخضرية المتكونة على الكالوس الذي حصل عليه في زراعة أجنة البذور لصنف دوغلة نور (Zaid M., 1989). وفي الوقت نفسه زيادة كمية السكروز في الوسط المغذي وبخاصة بالنسبة للأنسجة النباتية المتمايزة نسبياً مثل الوريقات أو أجزاء من الأوراق الفضة يزيد في مشكلة الاسمرار. ولذلك لا ينصح باستخدامه بتركيز أكثر من 3% في طور الزراعة الأولية.

ج-تأثير نوعية الآجار المستخدم في تكوين الكالوس: تستخدم عادة مادة الآجار آجار، مادة تستخلص من الأشنيات البحرية من الجنس Geliduim، تذوب في الماء على درجة 90م حيث تعطي مادة جيلاتينية شفافة. توجد في الأسواق بعدة أشكال، مثلاً تنتج شركة Merk ثلاث أنواع من الآجار:

-آجار آجار نقي جداً Ultrapur.

-آجار آجار نقي pur

-بودرة الآجار آجار التجارية.

يستعمل الآجار بمعدل 6-8غ/لتر في الوسط المغذي الخاص بزراعة النخيل. وأجريت بعض الأبحاث على زراعة أجزاء من النخيل على أوساط غذائية تحوي أنواعاً غير الآجار مثل الأجاروس Agarose الذي أعطى نتيجة على تكون الكالوس بشكل أفضل من الآجار (Zaid M., 1989). كما تستعمل بعض المخابر الأخرى بعض الأنواع الأخرى التي أثبتت جدوى كبيرة مثل مادة تدعى Auby gel أو الكاراغينان Carraghenanes وهذا النوع من الآجار يستخدم حالياً في فرنسا. ويستخدم أيضاً في المغرب حيث أعطى نتائج جيدة بالمقارنة مع الآجار. مع العلم بأنه رخيص الثمن بالمقارنة مع الآجار آجار (Beauchesne, 1993).

7-3-1-3- تأثير العوامل المناخية في تكوين الكالوس:

تؤثر العوامل الجوية في الوسط المحيط تأثيراً مباشراً في مدى استجابة أجزاء النخيل المزروعة للنمو وتكوين الكالوس. ويقصد بالشروط الجوية، درجة الحرارة، الإضاءة (مدتها، نوعيتها، شدتها)، والرطوبة الجوية.

تدل معظم الأبحاث على أن الإضاءة تعيق أو تقلل من تكون الكالوس في طور الزراعة الأولية، وتسرع في ظهور المركبات الفينولية التي تسبب اسمرار الأجزاء النباتية وتعيق تطورها. كما أن الإضاءة تسرع في تطور وتمايز الأجزاء النباتية، وبالتالي تقلل في فرص تكون الكالوس الجنيني، لذلك يجب أن تتم الزراعة الأولية للنخيل بالظلام أو ضمن شروط إضاءة خفيفة جداً، لأن ذلك يساعد في تكون الكالوس ويؤخر تمايز اسمرار الأجزاء النباتية المزروعة (Drira, 1985; Beauchesne, 1983; Tisserat, 1979).

أما درجة الحرارة تؤثر بشكل مباشر في تكون الكالوس على أنسجة النخيل المزروعة على وسط مغذً يحوي سائر المتطلبات الغذائية اللازمة للنمو. فقد وجد بالتجربة بأن أفضل درجة حرارة لتكوين الكالوس 25-28م°(Tisserat, 1984; Sharma et al, 1984; Mater, 1983).

أما درجات الحرارة المرتفعة غير مناسبة حيث تعمل على زيادة اسمرار الأنسجة النباتية وتمايزها.

-**مشكلة التلوث**: إن الحصول على زراعة سليمة خالية من التلوث، تعد من أول شروط نجاح زراعة الأنسجة النباتية. يجب المحافظة على سلامة الأنسجة النباتية في جميع مراحل الإكثار حيث تؤدي إصابة الأجزاء النباتية في أي مرحلة من مراحل الإكثار إلى فشل الزراعة وموت الأجزاء النباتية. وهذا أمر هام جداً عند إكثار النخيل، لأن استجابة النخيل للنمو بطيئة جداً وهذا يتطلب عدة مرات نقل إلى وسط مغذٍ جديد، قبل أن نحصل على الكالوس الجنيني. لذا يجب أخذ الاحتياطات الكاملة، في مخابر زراعة الأنسجة للوقاية من التلوث.

تعد الأوساط المغذية لزراعة الأنسجة، أوساطاً ممتازة لنمو الأحياء الدقيقة وتكاثرها (بكتريا، فطور...)، وبخاصة لو علمنا بأن الوقت اللازم لانقسام البكتريا 30-60دقيقة. بينما تحتاج الخلية النباتية لانقسامها بين 24-48 ساعة، وهذا يؤدي بعد فترة زمنية قصيرة إلى تشكل مستعمرات بكتيرية أو فطرية تنافس الجزء النباتي المزروع على الغذاء، وتؤدي في النهاية إلى موت الأنسجة النباتية.

استخدم عدة تقنيات لتعقيم أنسجة النخيل قبل الزراعة من قبل الباحثين، ويمكن تلخيصها بما يلي:

-استخدم اللهب مع الكحول للتعقيم الخارجي للجمارة (Reuveni and kipnis, 1974,)؛ (Smith, 1975).

استخدمت طريقة التعقيم بهيبوكلوريت الصوديوم المضاف لها عدة قطرات من Tween80 لمدة 15-20دقيقة بتراكيز مختلفة 1% (Tisserat, 1990)، 2.6% (Tisserat, 1983)، 2% (Al Abo. El. Nil, 1986)، 5% (Al Ghamdi, 1993)، 3% (Maarri et al Skief, 1990).

-كما استخدمت مركبات ومعقمات أخرى مثل كلور الزئبق، برمنغنات البوتاسيوم، هيبوكلوريت الكالسيوم (Sharma, 1980, 1984).

ولا بد من الانتباه إلى أن عملية الغسل وتغيير المحاليل يجب أن تتم في جو معقم وباستخدام أدوات وزجاجيات معقمة للمحافظة على سلامة الأنسجة من التلوث الخارجي.

تتعلق نسبة التلوث في زراعة أنسجة النخيل بمدى التلوث الخارجي للفسائل المزروعة، ومدى دخول الغبار والتراب إلى الأنسجة الداخلية للفسائل. تعد مشكلة التلوث مشكلة كبيرة يجب التغلب عليها بدراسة المعقم المناسب والتركيز والوقت الأمثل لكل نوع من أنواع الأنسجة المستخدمة في الزراعة. حيث لوحظ أن البراعم الجانبية لا تتحمل التراكيز العالية، لذلك يفضل استخدام تراكيز

مخففة من المادة المعقمة. لأن زيادة تركيز المعقم يؤدي إلى زيادة اسمرار البراعم وعدم نموها بعد الزراعة.

لوحظ في النخيل وجود مشكلة التلوث البكتيري الداخلي الذي لا يظهر لدى الزراعة الأولية، وإنما يظهر في وقت لاحق من الإكثار. وقد أشار إلى هذا التلوث العديد من الباحثين (Al Maarri et al Skief, 1990 ؛Beauchesne, 1983 ؛ Tisserat,1984).

يعد التلوث الداخلي من أهم المشكلات التي يعاني منها تطبيق التقنية على النطاق التجاري وهذا ما أشار إليه (Awaawin M, 1993) الذي قام بإكثار أكثر من 150 ألف غرسة نخيل بالأنسجة في المغرب. يمكن التخفيف من التلوث البكتيري الداخلي بإضافة بعض المركبات المشجعة لنمو البكتريا إلى الوسط المغذي مثل مادة البيبتون Peptone بتركيز 2غ/لتر. هذا المركب يشجع نمو البكتريا خلال عدة أيام. ولذلك فالأنابيب المصابة بالبكتريا يظهر عليها التلوث، تستبعد ويحافظ فقط على الأنابيب غير المصابة ويعمل على إكثارها (Beauchesne, 1984).

وفي بعض الأحيان تضاف المضادات الحيوية إلى الوسط المغذي ولكن وجد أن هذه العملية لم تعطِ نتائج مرضية في النخيل (Reuveni and lilien-kipnis, 1974).

يظهر أحياناً التلوث في الأنابيب، ويكون عائداً لأسباب أخرى غير الأجزاء النباتية. ويمكن معرفته بسهولة، فإذا كان انتشار التلوث من المركز بإتجاه المحيط أي من الأجزاء النباتية بإتجاه حواف أواني الزرع، ففي هذه الحالة، فإن سبب التلوث يكون عائداً للأنسجة النباتية المزروعة. أما إذا كان انتشار التلوث من حواف الأواني باتجاه مركز الدورق، فيكون سبب التلوث في هذه الحالة عائداً للأسباب التالية:

-قد يكون التلوث ناتجاً عن عدم التعقيم الكافي للهواء الداخل إلى غرفة العزل (عطل في فلاتر تنقية الهواء).

-قد يكون التلوث ناتجاً عن القائم على العمل نفسه (هواء زفير، أو يداه غير معقمة بشكل جيد، أو الأدوات المستخدمة في عملية الزرع غير معقمة كما يجب).

-قد يكون التلوث ناتجاً عن عدم التعقيم الجيد للأوساط الغذائية، تعقيم غير كامل، أو عطل في جهاز التعقيم.

-ويمكن أن يحدث التلوث داخل غرف النمو مما يؤدي إلى انتشار بعض الأحياء الدقيقة بشكل مفاجئ. وقد تسبب بعض الكوارث حيث يمكن أن تقضي على الآلاف من الأنابيب المزروعة.

كما حدث في أحد المخابر المغربية حيث ظهر التلوث فجأة وقضى على 80% من الأنابيب المزروعة في المختبر. وتم خسارة كثير من نباتات النخيل ذات القيمة الكبيرة.

ويتم استبعاد خطر التلوث باتباع ما يلي:

-تعقيم الأجزاء النباتية بالمواد الكيميائية بشكل جيد.

-أخذ الفسائل من أمهات جيدة النمو، سليمة، ويفضل أن يكون قد طبق عليها مسبقاً برنامج رش وقائي ضد الأحياء الدقيقة. أو يفضل وضع الفسائل لفترة من الزمن قبل استخدامها داخل البيوت المحمية، مع رشها من وقت لآخر بمبيدات فطرية لتخفيف حمولتها من الأحياء الدقيقة.

-عزل جيد لمخبر زراعة الأنسجة، والتأكد من سلامة الهواء الداخل إلى أجهزة العزل من التلوث.

-مراقبة جميع عمليات التعقيم، التي تجري في المختبر بشكل جيد (تعقيم الأدوات، المحاليل....)، مع الكشف الدوري على أجهزة التعقيم للتأكد من صلاحيتها، وعدم وجود أعطال فيها.

-اتباع وسائل توعية للعاملين في المختبر مع المحافظة على النظافة العامة، واتباع الأسلوب الصحيح في الزراعة مع وضع كمامات خاصة أثناء عملية الزراعة، وعدم التكلم أثناء العمل، لأنه عند التكلم يخرج من الفم بعض البكتريا التي قد تحدث التلوث.

- المحافظة على النظافة داخل المختبر لأنها من أهم الاحتياطات الواجب وضعها في الحسبان، لأن ظهور تلوث مفاجئ يمكن أن يسبب كوارث.

7-3-1-4- مظاهر النمو في طور الزراعة الأولية:

-تتميز أنسجة النخيل المزروعة داخل الأنابيب بكونها بطيئة النمو، ولا تبدي أي مظاهر للنمو إلا بعد فترة طويلة، قد تستمر بين 4-8أشهر حتى نحصل على الكالوس الجنيني. فيما لو كانت جميع شروط الزراعة مناسبة للنمو.

تختلف مظاهر النمو الممكن الحصول عليها باختلاف الأجزاء النباتية المستعملة، وباختلاف تركيب الوسط المغذي، والشروط الجوية لغرف النمو. تظهر نتيجة التلوث على الأجزاء النباتية بعد أسبوع من الزراعة على الأوساط المغذية، تستبعد مباشرة الأنابيب الملوثة ويحافظ على الأنابيب السليمة خلال الأسبوع الأول من الزراعة وهذا ما يعرف بالتلوث السطحي للأجزاء المزروعة. أما التلوث الداخلي لا يمكن الكشف عنه إلا بعد عدة أسابيع من الزراعة.

تظهر نتيجة الاسمرار على الأجزاء النباتية بدءاً من الأسبوع الأول، وتزداد بشكل تدريجي حيث يمكن أن تؤدي إلى موت بعض الأجزاء المزروعة خلال فترة زمنية أقل من شهر. ولذلك يضاف إلى الوسط المغذي مركبات مضادة للأكسدة مثل الفحم المنشط، للحد من اسمرار الأجزاء النباتية. ففي هذه الحالة تكون نسبة الاسمرار قليلة. وإن وجدت تكون جزئية على العينات النباتية.

أما عن نمو الأجزاء النباتية المزروعة، يلاحظ تضخم الأجزاء النباتية ويتضاعف حجمها بشكل تدريجي خلال ست أسابيع من الزراعة. ويبدأ ظهور كالوس خفيف يختلف حجمه ونوعه باختلاف الأنسجة المزروعة، وفي بعض الأصناف لا يلاحظ بداية ظهور الكالوس إلا بعد عدة شهور.

-ففي حال القمم النامية على وسط مناسب لتكوين الكالوس، يلاحظ ازدياد حجمها بشكل تدريجي، كما أن الوريقات الأولية الموجودة حول القمة النامية تستطيل. ويلاحظ تكون كالوس خفيف خلال الشهرين الأولين من الزراعة. وهذا الكالوس هش وسمني. ويتكون على قواعد القمة النامية وعلى الوريقات الأولية.

يلاحظ تكون عدة أنواع من الكالوس أثناء نمو القمم النامية المزروعة. ففي بداية الأمر يتكون كالوس هش خفيف، ثم يلاحظ تكون نوع آخر من الكالوس الطري السمني والذي لا يلبث أن يزداد في الحجم. ويتطور إلى كالوس من نوع آخر حبيبي أبيض مصفر الذي يعطي بعد عدة عمليات نقل الكالوس الجنيني المحبحب.

-ولابد من الإشارة إلى أنه يمكن أن يتكون عدة أنواع من الكالوس على الأجزاء النباتية المزروعة، وتم ملاحظة من قبل الكثير من الباحثين نذكر منهم (Quereshi et al, 1982؛ Mater, 1989؛ Zaid, 1989؛ AL Maarri et Al Ghamdi, 1995).

وقد أوضحت الدراسة التشريحية التي قام بها Mater على وجود نوعين من الكالوس النامية في أنسجة النخيل، كالوس رخو هش، يتكون من خلايا مجوفة كبيرة الحجم، يتجاوز قطرها 30 ميكروناً. والنوع الثاني، كالوس متماسك خلاياه متراصة يحوي نوعين من الخلايا، خلايا وسط غير مجوفة قطرها 10-20ميكروناً، ويوجد مع هذه الخلايا المرصوصة خلايا صغيرة الحجم قطرها أقل من 10 ميكرونات، ذات نشاط ميرستيمي واضح داكنة اللون مما يدل على غناها بالأحماض النووية، ولهذه الخلايا قدرة كبيرة على الانقسام.

كما أوضح الفحص الميكروسكوبي المكبر لمقاطع في الكالوس الجنيني وجود مراكز مرستيمية Meristematic centers في المناطق الخارجية وتحت الخارجية للكتل المرصوصة، وهذه

المراكز مكونة من خلايا مرستيمية قطرها 10 ميكرونات تحتوي على نوى بارزة كبيرة الحجم نسبياً. وتحيط بالمراكز المرستيمية حواجز مكونة من جدران خلوية سميكة تفصل المراكز عن بعضها البعض، وعن الخلايا الأخرى شبه المرستيمية الأكبر حجماً التي تحيط بها داخل الكتلة المرصوصة. وبتوسع المراكز المرستيمية نتيجة النمو توالدت كتل منفصلة من العقد الحرة Free nodules أو مبادئ الأجنة الخضرية pro embryiods (Mater, 1986).

-عند زراعة البراعم الجانبية، فإن قسماً منها يتطور مثل القمم النامية ويعطي الكالوس بمراحله المختلفة حتى نحصل على الكالوس الجنيني الذي له القدرة على تكوين الأجنة الخضرية.

-أما فيما يتعلق بزراعة الوريقات الأولية، فتنمو وتستطيل ويمكن أن يصل طولها إلى 5-10سم، وتتمايز أنسجتها، وتصاب بالاسمرار أكثر من البراعم الجانبية والقمم النامية، وتعطي ورقة شبيهة بسعف صغير داخل الأنابيب. ويتكون على أطراف الوريقات الصغيرة المتكونة نموات هشة لا تلبث أن تتمايز إلى ليف صغير سطحي يعطي الوريقة ويأخذ اللون الأسمر البني الواضح. أما على أما على قواعد الأوراق وعلى جزء منها وبخاصة الوريقات الداخلية القريبة من القمم النامية. يتكون الكالوس والذي يتطور فيما بعد إلى الكالوس الجنيني.

كما تظهر في بعض الأحيان بعض الكتل الخلوية بحجم 2-5مم من قلب قواعد الوريقات، قاسية لونها سمني وعند فصلها وزرعها على أوساط مغذية أخرى، يمكن أن يزداد حجمها وعددها، ولكن لا تتطور إلى أجنة خضرية. وفي بعض الأحيان تعطي جذور فقط.

وتجدر الإشارة أخيراً بأنه يمكن في بعض الأحيان الحصول على أجنة خضرية مباشرة على الأنسجة النباتية المزروعة دون المرور في مرحلة الكالوس.

7-3-2--المرحلة الثانية إكثار الكالوس الجنيني:

يتم نقل الكالوس المتكون إلى وسط مغذٍ جديد بهدف إكثار الكالوس الجنيني للحصول على مصدر مستمر للكالوس. تخفض تراكيز الهرمونات النباتية في هذا الطور وبخاصة 2.4.D تجنباً لحدوث طفرات وراثية مما يؤدي إلى ظهور تراكيب وراثية جديدة، وهذا أمر غير مرغوب فيه في الإكثار الخضري.

تستخدم عدة أوساط مغذية لإكثار الكالوس الجنيني، يختلف تركيبها باختلاف الأصناف والقائمين على البحث. تستخدم بشكل عام تراكيز خفيفة من الأوكسينات في إكثار الكالوس (Tisserat, 1984؛ Gabre and Tisserat, 1985).

كما استخدم بعض الباحثين الأوساط السائلة عن إكثار الكالوس الجنيني أو الحبيبي، فقد استطاع الباحثان Dauguin et letouze, 1988 الحصول على إكثار الكالوس على وسط مغذٍ سائل يحوي محلول المعدني لموراشيج وسكوغ الممدد مرتين ويضاف له 3غ/لتر فحماً منشطاً و30غ سكروز وتراكيز خفيفة من الأوكسينات، حيث حصلوا على مصدر مستمر من الكالوس الحبيبي الجنيني.

لم يستطع بعض الباحثين المحافظة على الكالوس الجنيني لفترة طويلة من مرحلة الإكثار ولوحظ أن الكالوس يتدهور بعد فترة من الزمن ويفقد قدرته على تكوين الأجنة الخضرية.

لذلك لابد من تجديد الزراعة بعد فترة زمنية محددة، أو اللجوء إلى بعض الطرائق الأخرى للمحافظة على الكالوس الجنيني مثل التجميد Cryoconservation على درجات حرارة منخفضة -196مْ باستخدام الآزوت السائل.

فقد تمكن Ulrich وزملاؤه عام 1982 من نجاح تجميد الكالوس الجنيني للنخيل صنف مدجول على درجة حرارة -196مْ لفترة تسعة أسابيع، وبعد التجميد أعيد إلى درجات الحرارة العادية وأخذ جزء منه ووضع من جديد على محلول لتكوين الأجنة الخضرية. وفعلاً، تمكن الباحثون من الحصول على أجنة تشابه تماماً الأجنة الخضرية التي حصل عليها من الكالوس نفسه الذي لم تجر عملية تجميد، وتم الحصول عليها من الكالوس نفسه الذي لم تجر له عملية تجميد. وتم الحصول في كلتا الحالتين نباتات كاملة. أخذت عينات نباتية وحللت لمعرفة فيما إذا تعرضت لأي تغير في التركيب الوراثي أثناء عملية التجميد. وقد تم تحليل بعض الأنزيمات باستخدام تقنية Gel electrophoresis وقدرت تراكيز الأنزيمات التالية في الأوراق:

-دي هيدروجينات الكحول Al cohol dehydrogenase

-استيريز Esterase

- بيروكسيداز Peroxidase

- فوسفو غلوكو ايزوميريز Phospho gluco isomerase

-فوسفو غلوكو موتيز Phospho gluco mutase

وحللت تراكيز الأنزيمات السابقة على أوراق أخذت من فسائل النباتات الام وعلى أوراق من نباتات نتجت من الكالوس الجنيني غير المجمد، وأوراق من نباتات نتجت من الكالوس الجنيني الذي أخضع للتجميد.

ودلت النتائج بأنه لا فرق في تركيز الأنزيمات في العينات الثلاث. هذا مما يدل على أن النباتات الناتجة عن طريق الأجنة الخضرية مشابهة للنبات الأم من جهة، ومن جهة أخرى يمكن الاحتفاظ بالكالوس بالتجميد وبالتالي ليكون مصدراً مستمراً للأجنة الخضرية لفترة طويلة. وهذا الأمر في غاية الأهمية بالنسبة لإكثار النخيل لأن استجابة الأجزاء النباتية بطيئة وعملية الحصول على الكالوس الجنيني قد تستغرق نحو 4-8أشهر.

كما تفيد عملية التجميد للكالوس بأنها تؤمن مصدراً مستمراً للكالوس، وتجنب الباحثين إكثار الكالوس لفترة طويلة الذي تزداد معه خطورة حصول على طفرات وراثية في الكالوس وبالتالي الحصول على نباتات مغايرة في تركيبها الوراثي للنبات الأم. كما حصل في مخبر زراعة النسج في مركز أبحاث النخيل والتمور حيث تم إكثار صنف الصفري عن طريق زراعة الأنسجة النباتية، وكانت النباتات الناتجة في البداية مشابهة في تركيبها الوراثي للنبات الأم، وقد استمر إكثار الكالوس الجنيني لأكثر من سنتين، وفي نهاية السنة الثانية ظهر بعض الأجنة التي تطورت وأعطت نباتات ذات أوراق بيضاء اللون خالية من اليخضور (Alpinose)، في حين أوراق الأجنة العادية خضراء واضحة، هذا مما يدل على حدوث تغير في التركيب الوراثي للنباتات الناتجة (AL Maarri et Al Ghamdi, 1997). ولهذا السبب لا ينصح بإكثار الكالوس لفترة زمنية طويلة، ويفضل اللجوء إلى عملية التجميد.

ومن المحاذير التي تؤخذ على الإكثار بوساطة زراعة الأجنة أنه احتمال ظهور طفرات وراثية وهذا غير مرغوب به لأنه يعطي نباتات مغايرة في تركيبها الوراثي للنبات الأم كما حصل في إكثار نخيل الزيت oil Palm، ولتجنب الحصول على مثل هذا النوع من الطفرات، يلجأ الباحثون إلى الحد قدر الإمكان من إكثار الكالوس. والعمل على إكثار الأجنة عن طريق تكوين أجنة خضرية ثانوية وهكذا دون اللجوء إلى عملية إكثار الكالوس. حيث يمكن الحصول على أجنة ثانوية على الأجنة الأولية، وبالتالي تكون مصدراً مستمراً للأجنة، كما هو متبع حالياً في إكثار نخيل الزيت، ونخيل جوز الهند.

كما يلجأ الباحثون أيضاً إلى تخفيض تركيز الأوكسين 2.4.D إلى الحد الأدنى، لتجنب ظهور طفرات من الكالوس، أو استخدامه لفترة قصيرة. حيث يستعمل تركيز عالٍ حسب تقنية (Tisserat, 1979) نحو 100 ملغ/لتر. ولكن جزءاً كبيراً من هذا التركيز يمتص من الفحم المنشط المضاف للوسط المغذي. وقد تمكن بعض الباحثين من الحصول على الكالوس الجنيني باستخدام تراكيز منخفضة من الـ 2.4.D نحو 1-2ملغ/لتر. (Drira *et al*, 1993).

7-3-3- المرحلة الثالثة تكوين الأجنة الخضرية:

تتكون الأجنة الخضرية بدءاً من الكالوس الجنيني على أوساط مغذية، بسيطة تحوي على العناصر المعدنية مع الفيتامينات وقليل من الهرمونات. حتى يمكن الحصول على الأجنة الخضرية على أوساط مغذية خالية من الهرمونات (Tisserat, 1979؛ Mater, 1989؛ Zaid *et al*, 1983).

وقد استخدمت أيضاً تراكيز خفيفة جداً من الهرمونات مثل NAA 0.1ملغ/لتر. وتكونت أجنة خضرية قوية النمو. كما يمكن الحصول على أجنة خضرية على أوساط مغذية سائلة (Aoiuin et letouze, 1987). تنشأ الأجنة الخضرية من خلايا مرستيمية تتواجد في الكالوس الجنيني، وتنشأ عادة من خلية مرستيمية التي تنقسم عدة انقسامات وسرعان ما تتطور إلى تراكيب متعددة الخلايا يكبر حجمها وتأخذ الشكل الدائري وتدعى باعقد الجنينية أو بدايات الأجنة Proembryos

(Tisserat et demason, 1980؛ Mater, 1989؛ Zaid, 1989). تتألف هذه العقد الجنينية من ثلاث طبقات وهي:

-طبقة مركزية: تتألف من خلايا مرستيمية غنية بالسيتوبلاسما والأحماض النووية.

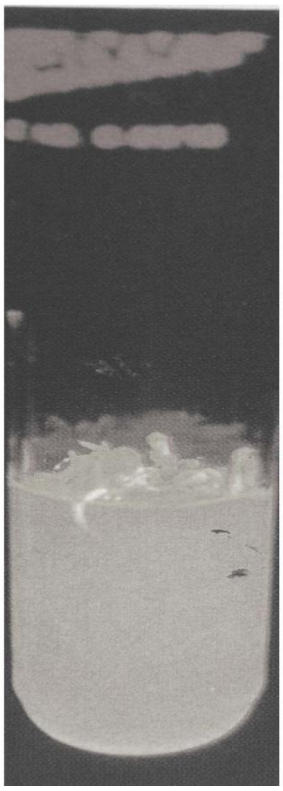
-طبقة محيطية: تتألف من عدة طبقات من الخلايا الخاملة قليلة النشاط والتي تشكل الطبقة المحيطية.

-الطبقة الوسطى: تتألف من خلايا نشيطة تشبه خلايا الكامبيوم في النباتات ثنائية الفلقة وتسمى طبقة الكامبيوم الكاذب، ولها القدرة على الانقسام.

ترتبط العقد الجنينية مع بعضها البعض بوساطة خلايا هلامية من الكالوس سهلة الفصل (Zaid, 1989).

تتطور العقد الجنينية وتشكل الأجنة الخضرية (الشكل 7-1)، حيث تأخذ الشكل البيضوي، وتكبر بالحجم وتتصف بالقطبية المرستيمية وتعرف بثنائية القطب. وتتركب من طرف مرستيمي، يحتوي على خلايا مرستيمية صغيرة داكنة اللون، وطرف غير مرستيمي خامل يحوي على خلايا أكبر حجماً وأكثر تجوف وأفتح لوناً من تلك الموجودة في القطب المرستيمي. والطرف المرستيمي الضيق يمثل نهاية الفلقة التي يتحور وينشأ داخلها كل من السويق والجذير

الأوليين، بينما الطرف الآخر غير العريض غير المرستيمي يمثل نهاية الأخرى من الفلقة والذي يدعى بالممص (Tisserat and demason, 1980؛ Mater, 1989).



الشكل (7-1): تشكل الأجنة الخضرية من الكالوس

وفي مرحلة متقدمة من تكون الأجنة الخضرية، يلاحظ نمو طرفي الساق والجذر، وتظهر حزم الكامبيوم الأولي، وتتوضح الفجوة الداخلية Internal cavity التي تفصل بين مناطق الجنين، وتتوضح بها المدخرات الغذائية. حيث لوحظ أنه تختلف المدخرات الغذائية التي توجد بالأجنة الخضرية بحسب الأنواع النباتية، ففي نخيل الزيت لوحظ توضع حبيبات تحوي الزيوت (Schwindiman *et al*, 1988). أما في نخيل التمر، فلوحظ تواجد مدخرات بروتينية ومدخرات نشوية واضحة في مركز الأجنة المتكونة (Zaid, 1989). وتجدر الإشارة أخيراً إلى أن البنية التشريحية للأجنة الخضرية المتكونة بالأنسجة، تشابه البنية للأجنة الجنسية المتكونة في البذور (Tisserat et demason, 1980؛ Zaid, 1986). ويوضح الشكل (7-2) بعض الجنة الخضرية الطبيعية التي تكونت من الكالوس الجنيني.

لوحظ تكون أجنة خضرية ثانوية على شكل عقد جنينية صغيرة تنشأ من الطبقة المرستيمية النشيطة في العقد الجنينية الأساسية. وتنمو هذه العقد لتشكل أجنة خضرية ثانوية يمكن أن تفصل وتعطي أجنة صالحة للإنبات (Tisserat *et al*, 1983؛ Zaid, 1989).

7-3-4- المرحلة الرابعة:إنبات الأجنة الخضرية:

يتكون عادة في دورق الزرع الواحد عدد كبير من الأجنة الخضرية، يصل في بعض الأحيان إلى أكثر من 50 جنيناً، ولذلك لابد من تفريد الأجنة ونقلها إلى محاليل جديدة حتى تنبت وتعطي نباتات كاملة. وإذا لم يتم تفريد الأجنة، فهذا يؤدي إلى تماوت قسم كبير منها، ونمو جزء بشكل غير طبيعي. والأجنة النامية تبقى ضعيفة.

تفرد عادة الأجنة إلى محاليل بسيطة تحوي على العناصر المعدنية الكاملة مع مصدر للطاقة. وتراكيز خفيفة جداً من الهرمونات حيث ثبت أن تركيز 0.1-1ملغ/لتر من الـ NAA يعطي بادرات جيدة وقوية النمو.

الشكل (7-2) : أجنة نخيل خضرية تكونت من الكالوس الجنيني

تسطيل الفلقة بين 5-10ملم، عند إنبات الأجنة الخضرية، خلال فترة شهر تقريباً. وينمو السويق والجذير في النهاية المرستيمية للفلقة، ويلاحظ استطالة الطرف الغير مرستيمي من الفلقة والذي يلتف حول نفسه، ويبتعد عن سطح الوسط الغذائي. وقد وجد أن ميول الطرف الممص من فلقة الجنين للالتفاف حول نفسه بضع مرات وظهوره بشكل طرف مرئي شائب شائب فوق سطح الوسط الغذائي يشكل علامة جيدة على إنبات الجنين بشكل اعتيادي وطبيعي.

وعاد يكون هذا الانبات الناجح مصاحباً مع خروج الجذر من الفلقة واتجاهه للأسفل داخل الوسط الغذائي.

تبقى البادرات تنمو حتى تصل إلى حجم مناسب للنقل إلى الوسط الطبيعي، ومن المفضل أن تكون مجموعاً جذرياً قوياً وتستطيل حتى طول 7-10سم، وتحوي على الأقل ثلاث أوراق.

7-3-5- نقل النباتات المجذرة إلى الظروف الطبيعية:

وتتصف النباتات الناتجة عن زراعة الأنسجة بكونها حساسة ورهيفة لأنها كانت داخل جو صناعي كامل في غرف النمو، لذلك فهي تتطلب عناية كبيرة أثناء نقلها من الأنابيب إلى شروط الوسط الطبيعي. يتوجب في الأيام الأولى من عملية النقل تأمين درجة حرارة وإضاءة مع نسبة رطوبة عالية تشابه تقريباً شروط غرف النمو. ولذلك فمن الضروري في بادئ الأمر نقل النباتات إلى جو مغلق تماماً داخل البيوت الزجاجية. مع المحافظة على نسبة رطوبة عالية لفترة من الزمن ثم تنخفض الرطوبة والحرارة بشكل تدريجي حتى تتأقلم النباتات تدريجياً مع الأجواء الطبيعية. وقد تشكل عملية النقل مشكلة كبيرة في بعض الأنواع النباتية التي تكون سبباً في الحد من استخدام التكاثر الخضري الدقيق.

تنقل النباتات المجذرة من الأنابيب بوساطة ملاقط خاصة طويلة حيث تغسل الجذور بالماء الفاتر لإزالة بقايا الوسط المغذي الطلب العالق بالجذور حتى لا تنتشر الأمراض على المجموعة الجذرية. لأن بقاء آثار من الوسط المغذي الحاوي على السكريات يساعد على تعفن النبات. وتعامل النباتات قبل زراعتها بمبيد فطري. ثم تزرع داخل مراقد مدفأة خاصة تحوي على وسط زراعي خفيف جيد ومعقم مثل الفيرميكوليت Vermiculite أو البرلايت Perlite أو الدبال Peat Moss وتغطى المراقد بأغطية بلاستيكية أو زجاجية وتوضع المراقد في بيت زجاجي تحت ظروف إضاءة ورطوبة وحرارة مناسبة وقريبة من ظروف غرف النمو. كما يجب تأمين الري ومصدر للتغذية المعدنية حتى تستطيع النباتات الصغيرة تكوين مجموع جذري قوي يساعدها على متابعة نموها.

يتم أقلمة نباتات النخيل الناتجة بالأنسجة عبر ثلاث مراحل:

-المرحلة الأولى: تنقل النباتات الصغيرة وتوضع في مراقد مدفأة تحت الري الضبابي. مغطاة بشكل كامل لفترة زمنية طويلة محددة قد تصل إلى ثلاثة أشهر.

في هذه المرحلة تسمح بتكوين مجموع جذري قوي، ويتم خلال هذه المرحلة الكشف الدوري عن النباتات حتى لا تنتشر التعفنات بها، كون نسبة الرطوبة تكون عالية جداً.

-المرحلة الثانية: تنقل النباتات وتزرع في أصص صغيرة بحجم 2لتراً، وتوضع في البيت الزجاجي مع مراقبة الحرارة والإضاءة والرطوبة. تترك لعدة أشهر حيث تنمو الجذور بشكل جيد وتنتشر في الأصيص بشكل كامل، حتى جزء من الجذور يمكن أن يخرج من قاعدة الأصيص.

-المرحلة الثالثة: تنقل النباتات إلى أوعية كبيرة ويمكن أن تزرع خارج البيت الزجاجي حتى تنمو وتصل إلى حجم مناسب ثم تنقل إلى الأرض الدائمة (Louvet *et al*, 1986).

يتأثر نجاح عملية النقل إلى الوسط الطبيعي بعوامل كثيرة منها ما هو متعلق بالعوامل البيئية مثل الحرارة، الرطوبة، وسط الزراعة، الإضاءة، التغذية المعدنية.... ومنها ما هو متعلق بالنبات نفسه مثل طول النبات، عدد الجذور المتكونة، طبيعة الجذور، عدد الأوراق المتكونة، الحالة الصحية العامة للنباتات.

فقد دلت التجارب بأن أكثر العوامل تأثيراً في نجاح عملية التقسية. هي العوامل المتعلقة بالنبات نفسه. فالنباتات القصيرة الحاوية على عدد قليل من الأوراق أقل من 2 ورقة وطولها أقل من 5سم تقل نسبة نجاح تقسيمها (Tisserat, 1981). وقد حصل الباحث نفسه على نسبة نجاح 100% عندما كانت النباتات المنقولة طولها نحو 10سم. وتحوي ثلاث أوراق. ومجموعاً جذرياً جيداً بطول 5سم وغير ملتف (Tisserat, 1984).

تؤثر طبيعة نمو الجذور والنباتات تأثيراً كبيراً في نسبة نجاح عملية التقسية. يجب أن تحتوي النباتات على جذور أولية وثانوية غير طويلة وغير ملتفة وأن يكون النبات حاوياً على عدة أوراق غير ملتوية حتى نحصل على نسبة نجاح عالية للتقسية (Moustafa *et al*, 1993).

ولابد من الذكر أخيراً أن نسبة نجاح النباتات النامية على وسط مغذ يحوي على فحم منشط أقل من نسبة نجاح النباتات النامية على وسط مغذٍ خالٍ من الفحم، ويعزى ذلك إلى أن الفحم المنشط لا يساعد على تكوين الجذور الثانوية وتتكون عليه جذور رفيعة وطويلة (Beauchesne, 1993).

أما فيما يتعلق بالوسط المستخدم، فقد حصل الباحث Moustafa *et al*, 1993 وزملاؤه على نسبة نجاح عالية لعملية التقسية عندما استخدم مزيجاً من الرمل مع البيت موس 1:1.