زراعة الأنسجة النباتية

Plant Tissue Culture

المحاضرة الحادية عشر

الإكثار الدقيق للنباتات بإستخدام زراعة الأنسجة النباتية

بروتوكول إنتاج الموز من خلال زراعة الأنسجة

Production of Banana (Mousa sp.) through tissue culture

يمثل الموز أهم محصول فاكهة و رابع أهم محصول غذائى فى العالم، و يحتل نسبة كبيرة فى مجال التجارة الدولية، و له أهمية كبيرة كغذاء و دواء للإنسان. و يزرع الموز فى مصر فى غالبية محافظات مصر حيث تتجاوز مساحته 58 ألف فدان، ينتج الفدان قرابة 18 طنا من الثمار، و لوحظ فى الفترة الأخيرة زيادة إقبال المزارعين على زراعة الموز نظراً للعائد المجزى الذى يحققه، و لكن واجه و أعاق هذا الإقبال مجموعة من المشاكل و الصعاب، أخطرها الإصابة بالأمراض و الآفات التى تصيب الموز وعلى رأسها الأمراض الفيروسية (مرض تورد القمة Banana Bunch Top Virus ومرض تبرقش الموز Banana Mosaic) والتى تقضى على مزارع الموز تماما، و هددت بإقلاع المزارعين عن زراعة هذا المحصول الهام. و كان الحل الأمثل هو اللجوء إلى تكنولوجيا إنتاج شتلات خالية من الأمراض و ذات إنتاجية عالية و ذلك باستخدام طرق زراعة الأنسجة النباتية و التى أنقذت هذه الزراعة فى مصر و العالم أجمع، بل أدت إلى توافر شتلات الموز بكميات كبيرة و صفات عالية الجودة، و أصبحت فاكهة الموز أكثر وفرة و بأسعار منخفضة فى متناول الجميع و طول العام. و عملية إكثار الموز من خلال مزارع الأنسجة قد نجحت نجاحا منقطع النظير لدرجة أن معظم مزارع الموز حاليا إن لم يكن كلها تزرع من نباتات موز ناتجة من معامل زراعة الأنسجة.

الهدف من إكثار الموز من خلال زراعة الأنسجة

1 - إنتاج نباتات خالية من الأمراض الفطرية والبكتيرية و النيماتودية وخاصة الأمراض الفيروسية مثل (الفيروس المسبب لمرض التورد والفيروس المسبب لمرض التبرقش).

2 - الزيادة العددية للنباتات السليمة (أي إنتاج أكبر عدد من النباتات القوية النمو والسليمة الخالية من الأمراض).

3- تساعد تلك الطريقة فى سرعة نشر الأصناف الجديدة ذات المواصفات عالية الإنتاج و الجودة.

الأصناف المستخدمة:

أصناف طويلة مثل مغربى – ويليامز – جراندنان وكذلك أصناف قصيرة مثل هندى-بصراي.

<u>بروتوكول إنتاج الموز من خلال زراعة الأنسجة:</u>

يجب إتباع الآتى:-

1 - إختيار الصنف المناسب والملائم والمطلوب للسوق والتأكد من خلوة من الأمراض مورفولوجيا أي من الشكل الظاهرى.

2 - الإختبارات الفيروسية بإستخدام تكنيك الإليزا **(ELISA)** وذلك بأن تؤخذ عينة من كل شجرة موز (قطعة ورقة) وترقم هذه الشجرة في المزرعة ثم تختبر فيرسيا فإذا كانت مصابة تستبعد وإذا كانت سليمة خالية من الإصابة الفيروسية تؤخذ هذه الشجرة لإجراء عملية زراعة الأنسجة منها وتكون كأم.

3 – تقلع الكورمة بحرص شديد حتى لاتتأثر البراعم الطرفية والجانبية.

4 - تنظف الكورمة جيدا بأن تزال الأوراق والأغماد المحيطة بالبرعم الطرفي مع الإحتفاظ بالبراعم الجانبية التي بآباط الأوراق والموجودة على الكورمة وتكون في قطع صغيرة 5 x 5 سم والوزن من10 إلي50 جم.

5 - تغسل جيدا بالماء وتنقع فيه لمدة 6 ساعات.

6 - تنقع في مضادات الأكسدة مثل (حمض الأسكوربيك150 مجم/ لتر + حمض الستريك100 مجم/ لتر) وذلك للتخلص من اللون البنى Browning ويضاف البنليت بمعدل 2جم / لتر لمدة 6 - 12 ساعة.

7 - تغسل بالماء المقطر المعقم للتخلص من آثار الأحماض السابقة.

8 - تعقم أولا بأن توضع في محلول الكلوروكس المادة الفعالة هيبوكلوريت الصوديوم (% 5.25) 20 -30% كلوروكس لمدة نصف ساعة في وجود الماء الجارى ببطئ ليحدث تخلص تدريجى من الأتربة والتلوث.

9 - ينقل الجزء النباتى لغرفة الزراعة ويعقم داخل الهود بإستخدام 30 - 50 % كلوروكس لمدة 20 دقيقة مع الرج والتقليب.

10 - تزال الأوراق التي تأثرت بالكلوروكس ويصغر الجزء النباتى ويغسل بماء مقطر معقم من 4 - 5 مرات للتخلص من آثار الكلوروكس وبهذا تصبح صالحة للزراعة.

ملحوظة: الخطوات 9 و 10 تجرى داخل كابينة زراعة الأنسجة (الهود).

أولا: مرحلة البداية **Starting stage**

وفية يزرع النسيج النباتى الذى تم تعقيمة على البيئة الغذائية الآتية:-

MS + 3 mg /L BAP + 30 gm / L Sucrose + 100 mg /L Inositol + 2 g /L Gelrite .

11 - تنقل الأنابيب التي زرعت بالأنسجة النباتية إلي غرفة التحضين على درجة حرارة 27 ± 2°م وكثافة ضوئية 1500 لوكس وفترة ضوئية 16 ساعة. يلاحظ أن الموز من النباتات التي لاتتأثر بقلة الإضاءة وحاليا تجرى الأبحاث على إجراء التضاعف في الظلام مع إضافة 0.1 مجم/ لتر أنسيميدول. في تلك المرحلة يجب ملاحظة نسبة التلوث دوريا كما يلاحظ تكوين المواد الفينولية حيث أنة يكون عالى في تلك المرحلة.

مدة مرحلة البداية1 إلي2 شهرحسب النسيج والصنف.

ثانيا : مرحلة التضاعف **Multiplication stage**

في هذه المرحلة تختار النموات الخالية من التلوث وتنقل إلي وسط غذائى جديد يحتوى على:

MS salt+5mg/LBAP + 30 g/L Sucrose + 100 mg/L Inositol + 2g/L Gelrite or 8 g/L Agar

ومدة هذه المرحلة حتى الجيل الخامس، بين الجيل والآخر شهر فهذا ينتج كمية كبيرة جدا من النباتات.

أما الجيل السابع ينقل على وسط غذائى جديد يحتوى

MS salt+1mg/LBAP + 30 g/L Sucrose + 100 mg/L Inositol + 2g/L Gelrite or or 8 g/L Agar

ثالثا : مرحلة التجذير **Rooting stage**

تعتبر هذه المرحلة هي آخر مرحلة من مراحل إنتاج الموز من خلال زراعتة بالأنسجة حيث تنقل النباتات من المرحلة السابقة (مرحلة الإكثار) إلي وسط غذائى آخر (مرحلة التجذير) ومدة هذه المرحلة هي شهر لأنة بعد نجاح هذه المرحلة سوف تنقل النباتات إلي (مرحلة الأقلمة). ومرحلة التجذير هذه تحتوى على:

0.5 MS salt + 2mg/L IBA + 20g/L Sucrose + 100 mg/L Inositol + 8g/L Agar.

ظروف التحضين:

يتم التحضين تحت حرارة 27 ±2°م وفترة إضاءة 16 ساعة +8 ساعة أظلام وكثافة ضوئية 3000-4000 لوكس .

عملية الأقلمة

وهذه المرحلة هي الترجمة النهائية لجميع الخطوات السابقة حيث تنقل النباتات الناتجة من مرحلة التجذير أي تستخرج النباتات من الأوعية وتعقم بأن توضع في إناء به ماء وبنليت أو فيتافاكس أو ريزوركس بنسبة 1 % ثم تنقل الى بيئة مكونة من بيت موس + رمل بنسب 2 :1 بالحجم ويتم غسيل الرمل جيدا حتى لاتكون هناك آثار للأملاح تحضر النباتات وتنظف النباتات من الآجار ويزرع كل نبات كامل وبه جذور في أصص صغيرة نمرة 6 ويكيس وتحضن النباتات وذلك بوضعها في:

1- حضانة مزودة بالإضاءة ودرجة حرارة 27 ±2°م وكثافة ضوئية 3000 لوكس لمدة 16 ساعة.

2- غرفة نمو مخصصة لذلك.

3- صوب للأقلمة تحت نفس الظروف السابق ذكرها فى 1.

بعد أسبوع يتم تثقب الأكياس يوميا (في اليوم الأول فتحة واحدة ثم فتحتين في اليوم الثانى ثم ثلاثة في الثالث وهكذا) حتى يتم تثقيب الكيس بأكملة ثم يزال بعد ذلك وتترك النباتات لمدة أسبوعين تكون بعدها صالحة للتدوير لأصص أكبر حجما تمهيدا لزيادة النمو وإمداد المزارعين به أو تتم الأقلمة تحت ظروف الرى الرذاذى وذلك بإستخدام مؤقت Timer حيث يعمل كل 5 دقائق لمدة 5 ثوان وفي الأسبوع الثانى كل 10 دقائق يعمل لمدة 10 ثوان وفي الأسبوع الثالث كل 15 دقيقة يعمل لمدة 15 ثانية وهكذا. ثم بعد ذلك تدور النباتات للأصص الأكبر حجما لزيادة نموها وتسليمها للمزارعين ويلاحظ الآتى على النباتات فى المشتل:

1 - يجب إستبعاد كل النباتات الغير متماثلة مثل المتقزم - المتبرقش - عديم اللون الأحمر أو القرمزى بالورقة وقاعدة النباتات.

2 - يجب إستبعاد النباتات ذات الورقة الشريطية والورقة الغيرمتماثلة علىالنبات والنباتات العملاقة في النمو.

3 - يجب إستبعاد النباتات ذات الأوراق غير المتبادلة على محيط النبات.

ما يلاحظ عند أقلمة نباتات الموز:

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

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

3 - درجة الحرارة لها تأثير فعال حيث أن درجة الحرارة المنخفضة وخاصة أقل من 14°م تؤدى إلي تدهور النباتات وعندما تصل إلي 4°م تموت النباتات كلية وقد يلاحظ هذا جيدا في فصل الشتاء في شهور (نوفمبر -ديسمبر - يناير).

4 - البيئة المغذية ومكوناتها لها أثر شديد الفاعلية في أقلمة النباتات ويجب عدم إضافة أي مغذيات إلا عند ظهور وتكشف ورقة القلب أثناء الأقلمة ثم بعد ذلك يتم التسميد والرى عن طريق النشع (4/1 - 1 /2 - 1 جم / لتر) في الأسبوع الأول حتى الثالث وعلى العاملين في المعمل الأخذ في الإعتبار مدى أهمية زيادة مقاومة النباتات للعطش عن طريق زيادة تركيز الآجار في البيئة وكذلك زيادة الإضاءة قبل نقل النباتات ولو أنة في بعض النباتات قد يكون لمثل هذه المعاملات تأثير سئ على التجذير. كذلك التسميد بالرش (التسميد الورقى بإستخدام الجرانزيت - المبارك - النتروليف) لها أهمية أثناء أقلمة ونمو النباتات.

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

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

وأهم فترة لبيع الموز هي خلال شهر مارس وذلك لأنة عند زراعة النباتات في شهر مارس يمر عليها وقت طويل من درجة الحرارة المناسبة للنمو وتكون النباتات قد زادت في النمو وأصبحت لها القدرة على تحمل البرد خلال أشهر الشتاء وتزهر وتثمر النباتات خلال سنة إلي سنة ونصف على الأكثر وهذه تتوقف على الصنف المستخدم و نظام التغذية الأرضية والتغذية الورقية.