مدرسة الإيمان الثانوية المستقلة للبنات
Al Iman Secondary Independent School

وزارة البلدية والتخطيط العمراني
إدارة البحوث الزراعية والمائية
مختبر زراعة الأنسجة النباتية

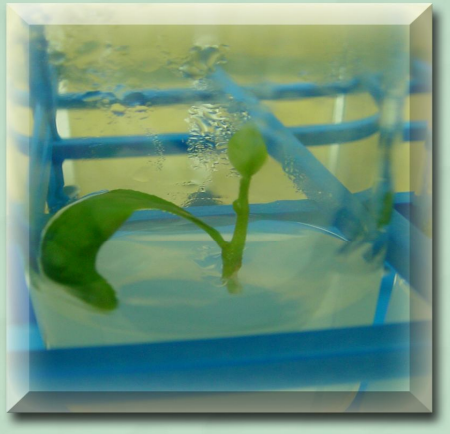
انتاج نباتات مقاومة للملوحة باستخدام تقنية زراعة الأنسجة النباتية

بحث مقدم من الطالبتين:

دانة حمزة امام الخليفة(11) سماح حمزة امام الخليفة(12)

اشراف:

الاخصائية.سلوى الكواري الباحثة.أمينة المالكي د.هالة فتحي



الدوحة-قطر 2008-2009

الملخص

أجرينا هذا البحث في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابعة لوزارة الشؤون البلدية و الزراعة في دولة قطر ، و قمنا بعمل تجربة حول إنتخاب و إكثار النباتات المقاومة للملوحة و تحديداً على نبات الليمون البنزهير (Citrus aurantifolia) حيث زرعت البذور في الوسط الغذائي MS و حضنت لمدة 10 أيام في الظلام ، بعد ذلك نقلت للإضاءة ، و تبين من خلال هذه التجربة سرعة استجابة البذور للوسط الغذائي الملحي و تمكنها من مقاومة الملوحة فقد تفتحت الفلقات منذ أول يوم وضعت فيه في الظلام و بعدها بدأ الجذير بالظهور و الانبات و عند نقلها للإضاءة ظهرت الأوراق وبهذا تبين أن نبات الليمون البنزهير نبات مقاوم للملوحة و سريع الانبات .

و بحصولنا على النباتات المقاومة للملوحة تمكنا من إكثارها باستخدام تقنية زراعة الأنسجة النباتية. حيث تم فصل جزء من الساق يضم البراعم الجانبية . و ذلك للحصول على عدد أكبر من النباتات التي تحمل صفة مقاومة الملوحة عن طريق الإكثار النسيجي .

أسئلة البحث

*هل نستطيع أن نستخدم الأراضي الملحية في الزراعة ؟

* هل تستطيع تقنية زراعة الأنسجة النباتية التغلب على مشكلة الملوحة ؟

فرضية البحث

بما أن العالم يواجه مشكلة تملح التربة مما يجعل هذا عائقاً أمام عملية الزراعة فلابد من وجود نباتات مقاومة للملوحة تواجه هذه الأزمة.

الأهداف

الأهداف الرئيسية للبحث :

1) انتخاب نباتات مقاومة للملوحة من خلال زراعة بذور الليمون على الأوساط الملحية .

2) استخدام أنسجة النباتات المقاومة للملوحة في الإكثار النسيجي للحصول على عدد أكبر عن طريق إنتقال الصفة الوراثية خلال الإكثار النسيجي بشكل طبيعي .

الأهداف الفرعيه.

التدريب على استخدام تقنية زراعة الأنسجة النباتية في حل المشاكل البيئية .

المقدمة و أهمية البحث

Introduction and Rationale

يعد استخدام التكنولوجيا الحيوية و تطبيقاتها المختلفة ثورة علمية و حضارية بداتها الـــدول المتقدمـــة و أحـــرزت انتصارات علمية كبيرة و انجازات مشهودة، مما دعى دول أخرى إلى أن تحذو حذو تلك الدول المتقدمة و تســـتفيد مت تطبيقات التكنولوجيا الحيوية في تنمية المجتمع و النهوض به.

و تعتبر الهندسة الوراثية و تطبيقات التكنولوجيا الحيوية علامة مميزة على مدى تقدم الشعوب نظراً لمـــل تتطلبـــه من إمكانات علمية عالية و أبحاث متطورة و تجارب معملية و حقلية تاخذ سنوات عديدة و تخضع لتقييم دقيق من عدة جهات مختصة، كما تخضع لقواعد و ارشادات و قوانين تهدف إلى سلامة الغنسان و الحيوان و البيئة .

ولتقنية زراعة الأنسجة النباتية تطبيقات عديدة في حل المشاكل البيئية مثل،التلوث البيئي، التصحر، الملوحة. **(1)**

أهمية البحث : مشكلة تملح التربة تقف حاجزاً أمام عملية الزراعة لأن هذه الزيادة في نسبة الأملاح في التربـــة و في مياه الري تؤدي إلى حدوث إجهاد ملحي **salt stress** على النباتات مما يؤدي إلى إنقاص كمية المحاصـــيل الزراعية و تقزم النبات أو بطء نموه .

لكن الحل يكمن في النباتات المقاومة للملوحه , فهناك أصناف عديدة من النباتات المتحملة للأملاح و هذه النباتات أصبحت تشكل أملاً كبيراً في زراعة الصحارى و الأراضي غير القابلة للزراعة:

1. بالاستفادة منها بشكل مباشر و ذلك بزراعتها كمحاصيل قابلة للاستهلاك البشري كما هي الحال في نبات الساليكورنيا أو كأعلاف للماشية.

2. أو الاستفادة منها بشكل غير مباشر: و ذلك بمحاولة نقــل الموروثــات (الجينــات) المقاومــة للأملاح من تلك النباتات إلى المحاصيل الزراعية التقليدية .

ونظراً لأهمية نباتات الموالح مثل البرتقال والليمون والنارنج واليوسفي والبوملي وكونها مصدراً رئيسيا لفيتامين ج البالغ الأهمية تم اختيار نبات الليمون وعلى الأخص الليمون البنزهير المعــروف في دولة قطر باسم الليمون العماني لاستخدامه في هذا البحث. ويزرع اليمون البنزهير بكثرة فــي عمان والبحرين وقطر، ويعتبر أحد العناصر الهامة والأساسية في الموائد الخليجية.

الخلفية العلمية

Literature Review

النباتات المقاومة للملوحة

يمكن للنباتات المقاومة للأملاح أن تحتمل النمو في أوساط يتراوح معدل ملوحتها من درجة مساوية لملوحة مياه البحر إلى درجة ملوحة تزيد عن درجة ملوحة مياه البحر و تذكر المراجع المتخصصة أن هناك ما يزيد عن 2500 نبات من النباتات المقاومة للأملاح تتوزع في معظم أجزاء الكرة الأرضية . **(2)**

يصنف النباتيون النباتات المتحملة للأملاح إلى عدة أقسام فهناك المتحملات الحقيقية للأملاح , و هذه النباتات تنمو في الاوساط الرطبة الغدقة التي يزيد تركيز كلوريد الصوديوم فيها عن 0.5% , و هناك كذلك النباتات الصحراوية المتحملة للملوحة و الجفاف . **(2)**

شكل أ : ((ثمار الليمون-البنزهير))

شكل ب :((شجرة الليمون))

آليات مقاومة الملوحة في النبات

هناك آليتان رئيسيتان لمقاومة الملوحة (أ) التفادي (ب) التحمل . **(6)**

التفادي: -

يمكن للنبات تفادي الإجهاد الملحي باستخدام عدة آليات منها:

آلية عزل الملح سلبياً بأن تكون الجذور غير منفذة للأملاح أو بعزل الأيون الضار من الأعضاء الهامة كالأوراق أو السيقان أو الجذور . **(6)**

الآليه الثانية هي إستبعاد الملح الفائض بالتخلص منه إما بطريقة الإفراز أو الإخراج أو الإستبعاد و جميع تلك الآليات تحتاج لطاقة , مثل نبات الرغل حيث يقوم بعمل غدد محلية كما يقوم بتجميع الأملاح في الأوراق السفلى التي يتم التخلص منها . **(6)**

و الآليه الثالثة هي آلية التخفيف حيث تقوم بعض النباتات بالنمو السريع و المستمر و إمتصاص كميات كبيرة من الماء لمنع زيادة تركيز العنصر .**(6)**

التحمل:-

يتحمل النبات الملوحة بعدة طرق أهمها التنظيم الأزموزي و ذلك بتفادي نزع الماء. كما يمكن للنبات التحمل عن طريق تحمل نقص المغذيات وذلك عن طريق إدامة عملية إمتصاص البوتاسيوم تحت ظروف الملوحة مما يجعلها في وضع تقوم بعملية التحمل و ذلك بتفادي نقص المغذيات. كما يمكن أن تتحمل الضرر الإبتدائي غير المباشر **.(6)**

أسباب تملح التربة

1- تتملح التربة نتيجة لعدم اتباع أساليب مناسبة في الري و الصرف، فالإسراف في ري المزروعات بشكل يزيد عن حاجتها يؤدي بمرور الوقت الى ملوحة التربة او قلويتها بشكل يتطور تدريجيا الى ظاهرة التصحر. **.(5)**

2- تتملح التربة نتيجة لريّها بمياه عالية الملوحة. **.(5)**

3- في المناطق القريبة من البحار يؤدي الإسراف في استخدام المياه الجوفية لإغراض الشرب او الري الى غزو مياه البحر للتعويض عن الماء المستهلك و بذلك يتملح الماء الأرضي تدريجيا ويزداد تملحه بازدياد استهلاك الماء. **.(5)**

4- تتملح التربة نتيجة لاضافة أسمدة كيميائية و عدم مراعات استخدامها و ضررها. **.(5)**

ويتم القضاء على ظاهرة التملح باحدى الطرق التالية :

- استخدام مصدر مياه جيد للري

- عدم المبالغة في إضافة الأسمدة

- محاولة تحسين التربة بإضافة عناصر مغذية.**(5)**

التلوث و التعقيم في زراعة الأنسجة النباتية

من الاسباب الرئيسية لضياع الجهود بفقدان أعداد كبيرة من الزراعات النسيجية هي التلوث بالاحياء الدقيقة مثل الفيروسات ، البكتيريا ، الخميرة ، الفطريات ، الحشرات ، الحلم. **(7)**

كما توجد أنواع من البكتيريا لا تنتج نمواً ظاهراً على النبات أو الوسط الغذائي و تعرف هذه الملوثات بالكامنة أو الداخلية. و يلاحظ تاثير البكتيريا الكامنة في تقليل تضاعف و تجذير النباتات المزروعة خارج الجسم الحي و ربما استحثاث المفت المفاجيء بعد إعادة الزراعة عدة مرات. **(7)**

المصادر المحتملة للعوامل الملوثة

1- الجزء النباتي المنفصل . **(7)**

2- معدات و أدوات التشريح . **(7)**

3- الهواء . **(7)**

4- الإفراط في إعادة استخدام المواد المعقمة و المطهرات . **(7)**

5- الحشرات و الحلم . **(7)**

6- العاملين . **(7)**

تطبيقات زراعة الأنسجة النباتية

تعد تقنية زراعة الأنسجة النباتية من الطرق الحديثة الهامة في إكثار النباتات ، و من الممكن أن تكون البديل عن طرق الإكثار التقليدية.

و لهذه التقنية تطبيقات هامة في مجال الإكثار الخضري حيث تسمح بالحصول علىأعداد كبيرة من النباتات المتشابهة من الناحية الوراثية و ذات النوعية الجيدة و الخالية من الأمراض.

كما تستخدم تقنية زراعة الانسجة النباتية في التربية و التحسين الوراثيللنباتات و المحاصيل الزراعية.

و يقصد بزراعة النسيج ، زراعة أجزاء نباتية صغيرة تتراوح ابعادها بأجزاء من الملميتر و حتى 2- 1 سم (مرستيم ، براعم طرفية ، بروتوبلاست ، حبوب لقاح ، خلية نباتية مفرده .....الخ) على أوساط غذائية محددة التركيب ، بحيث يحوي الوسط المغذي على المتطلبات الغذائية الكافة و اللازمة لنمو الأجزاء المزروعة.

ثم توضع الأنابيب المزروعة في ظروف بيئية و مناخية خاصة لتحريضها على النمو و الإكثار.

و تجدر الإشارة إلى أن عمليات الزراعة كافة يشترط أن تجري في جو معقم و باستخدام أدوات و أجزاء نباتية معقمة .

الحمضيات

الحمضيات أو الموالح عبارة عن مجموعة من أشجار الفاكهة تتميز بوجود غدد زيتية فـــي أوراقهـــا تكســـبها رائحة عطرية مميزة . وثمار الحمضيات ذات قيمة غذائية عالية لما تحتويه من فيتامينات وخاصـــة فيتـــامين C وأملاح معدنية وبعض العناصر مثل الكالسيوم والبوتاسيوم والفوسفور والحديد وغيرها . (4)

التربة المناسبة :

معظم أنواع الحمضيات يمكنها أن تنمو في أنواع مختلفة من التربة ، ولكن تبين أن التربـــة الطينيـــة الرمليـــة الخفيفة والجيدة الصرف والتهوية والحامضية التفاعل أفضل بكثير من بقية الأنواع ، كمـــا أن مســـتوي المـــاء الارضى يجب أن لا يقل عن 120 سم ، وأن تكون حامضية التربة (PH) ما بين 5 – 7 وهنـــاك علاقـــة كبيرة بين نمو الجذور وكمية الأكسجين الذي يتخلل جزيئات التربة ، ولهذا يجب تفكيك التربة وإضـــافة المـــواد العضوية التي تزيد خصوبتها ، وتساعد على سهولة حركة الهواء ، وتحسين خواص التربة .(4)

الليمـــــون Lemon

نبات الليمون نبات شجري معمر يعرف علمياً باسم Citrus limon ويعتبر الليمون من أهم النباتات للاستعمال المنزلي سواء كغذاء أو كدواء ويعتبر الأسبانيون أكثر الأجناس استخداماً لليمون وتشير مؤلفاتهم إلى ذلك حيث لا يوجد مرجع طبي خالياً من الحديث عن الليمون. وموطن الليمون الأصلي كان في الهند وقد عرفت شجرة الليمون أول ما عرفت في أوروبا في القرن الثاني بعد وفاة المسيح، وتزرع الآن في معظم بلاد العالم. الجزء المستعمل من نبات الليمون هي الثمار والتي تجمع في فصل الشتاء وذلك عندما يكون فيتامين ج في قمته. تحتوي ثمار الليمون على زيت طيار بنسبة 2.5% والذي يوجد في الغلاف الثمري للثمرة ويشكل مركب الليمونين 70% من محتوى الزيت الطيار. ومن المركبات الهامة في الزيت الطيار الفاتيربينين والفابابينين وبيتابابينين وسترال. كما تحتوي الثمرة على كومارينان وبايوفلافونيدات وفيتامينات ج وأ ومجموعة فيتامين ب بالإضافة إلى مواد هلامية وسكاكر. (3)

أما استعمالات الليمون فهي مطهر ومضاد للروماتزم ومقشع أي طارد للبلغم ويعتبر فيتامين ج مرققـــاً للمخـــاط ومذيباً له حيث يخرجه من الشعب الهوائية من الرئة ولذلك يعتبر الليمون من أفضل المواد للجهاز التنفسي. كما يعمل الليمون كمضاد للبكتريا وطارد لسموم الجسم ومخفض للحمى. و يفيد الكبد والمعدة والأمعاء، كمـــا أنـــه يقوي جدران الأوعية الدموية وعليه فإنه يمنع نزف اللثة ويفيد في اضطراب الدورة الدموية.(3)

الوسط الغذائي

تقنية زراعة الأنسجة النباتية عبارة عن سلسلة من الخطوات والعمليات المترابطة. ويعتبر الوسط الغذائي أحد أهم حلقات هذه السلسلة. حيث تختلف الأوساط الغذائية المستخدمة في مجال زراعة الأنسجة النباتية باختلاف النبات والنسيج المستخدم، وتتباين احتيجات النباتات والأنسجة المختلفة للعناصر الغذائية الموجودة في الوسط الغذائي.

ومن الأمثلة على الأوساط الغذائية المستخدمه في هذا المجال:

- White (1963)
- Heller (1953)
- Nitsch (1960)
- Murashige and Skoog (1962) (MS)

(8)

مكونات الوسط الغذائي

1) مركبات غير عضوية:

وهي العناصر المعدنية (الأملاح التي يحتاجها النبات للنمو). **(8)**

2) مركبات عضوية: (8)

- مصدر للكربون
- الفايتمينات
- الأحماض الأمينية والأميدات
- المركبات الطبيعية المعقدة
- المواد الدعامية
- الفحم النباتي المنشط
- منظمات النمو

التفاصيل:

المركبات الغير عضوية:

وهي عبارة عن الأملاح المعدنية والتي تنقسم إلى ثلاثة مجموعات:

- **مجموعة العناصر الكبرى:** وهي مجموعة من الأملاح يحتاجها النبات بتركيزات كبيرة في الوسط الغذائي.

مثل : الكربون والهيدروجين والأكسجين والفسفور والنيتروجين والبوتاسيوم و الماغنسيوم والكالسيوم و الكبريت.

(8)

- **مجموعة العناصر الصغرى:** وهي مجموعة من الأملاح يحتاجها النبات بتركيزات ضئيلة في الوسط الغذائي

(ولكن وجودها ضروري). مثل: المنجنيز و الزنك والنحاس و البورون والكوبالت والموليبدنم. **(8)**

- **مجموعة مركبات الحديد:** تعتبر مركبات الحديد من العناصر الصغرى حيث تضاف بتركيزات ضئيلة إلى

الوسط الغذائي. ولكن أهمية وجودها حرة في حالة توازن تركيز الهيدروجين (pH) في الوسط أدى إلى إضافتها

كمجموعة منفصلة. **(8)**

2- **المركبات العضوية**:

مصدر الكربون

يعتبر السكروز من أهم مصادر الطاقة والكربون استخداماً في زراعة الأنسجة النباتية. وهو يتحلل خلال عملية التعقيم بالحرارة إلى جلوكوز وفركتوز وهي الصورة الأكثر استخداماً من قبل الخلايا. **(8)**

الفايتمينات

لقد ثبت أن الفايتمينات تمثل العامل المحدد لنمو الخلايا خارج الجسم الحي. **(8)**

الأحماض الأمينية والأميدات

إضافتها تحفز نمو الخلايا بصورة واضحة وتعتبر المصدر الأساسي للنيتروجين الذي يكون متاحاً للخلايا بمعدل أكبر من نيتروجين الأملاح المعدنية. **(8)**

المركبات الطبيعية المعقدة

استخدم بعض الباحثين مواد طبيعية محفزة للنمو مثل حليب جوز الهند ومستخلص الخميرة. **(8)**

تنقسم المواد الداعمة إلى :

أ- مواد هلامية متصلبة(8)

مثل الآجار(Agar) و جيلرايت (Gelrite) و فايتاجل (Phytagel) و الجلاتين (Gelatin).

ب- مواد دعامية للبيئة السائلة(8)

مثل ورق الترشيح.

ج- الفحم النباتي المنشط(8)

يستخدم لإمتزاز المواد الفينولية التي تتكون عبر مراحل الزراعة المختلفة.

***د - منظمات النمو*(8)**

تنقسم منظمات النمو إلى خمس مجموعات:

1-الأكسينات Auxins

2-السيتوكينينات CytoKinins

3-الجبريلينات

4-الإثيلين

5-مثبطات النمو (حمض الأبسيسك)

ومن المعروف أن الهرمونات النباتية تعمل بعيداً عن أماكن تصنيعها.**(8)**

خطوات تحضير الوسط الغذائي (8)

- تحضير المركزات

تحضير المحاليل الأساسية للعناصر المعدنية والفيتامينات ومنظمات النمو. وتكمن اهمية تحضير مركزات من هذه المواد في عدم تكرار عملية وزن المكونات كل حين وذلك يقلل من احتمالات الأخطاء في وزن أملاح العناصر الصغرى. كما يمكن تخزين المحاليل المركزة لفترة طويلة مقارنة بالمحاليل المخففة.

- إضافة مصدر الكربون وأي مواد عضوية أخرى حسب نوع الوسط والنسيج والهدف من إنشاء الزراعات.
- تثبيت الأس الهيدروجيني.
- تذويب الآجار.
- توزيع الوسط على الأنابيب.
- تعقيم الوسط.
- يترك الوسط ليبرد تدريجياً في حرارة الغرفة.
- يستخدم مباشرة أو يحفظ عند 4مْ.

المواد و طرق العمل

Methodology

نوع البحث : بحث تجريبي باستخدام تقنية زراعة الأنسجة النباتية و تم تجربتها على النباتات المقاومة للملوحة(نبات الليمون "البنزهير").

لقد قمنا بإجراء التجربة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لإدارة البحوث الزراعية و المائية التابعة لوزارة الشؤون البلدية و الزراعة بدولة قطر. و كانت تجربتنا حول النباتات المقاومة للملوحة و اخترنا نبات الليمون ((البنزهير)) لقياس مدى مقاومته للملوحه .

أخلاقيات البحث :

- **الدقة في عمل التجارب.**
- **كتابة مراجع الخلفية العلمية بدقة.**
- **دراسة البحث جيداً.**
- **هدف البحث هو تقديم خدمة للدولة في زراعة نبات و ليس للتجربة فقط.**
- **عرض النتائج بدقة .**

تتلخص الخطوات العملية للتجربة فيما يلي: (8)

1) تحضير المحاليل الأساسية و التي تضم الأملاح و العناصر المعدنية اللازمة لنمو النبات . و تنقسم هذه المحاليل إلى :

- الأملاح المعدنية الكبرى و هي تستخدم بتركيزات كبيرة في الوسط الغذائي نظراً لحاجة النبات لها . و يرمز لها في المختبر اختصاراً بالرمز A .

- الأملاح المعدنية الصغرى و هي تستخدم بتركيزات صغيرة في الوسط الغذائي . و يرمز لها اختصاراً بالرمز B .

- مجموعة الحديد و هي تحتوي على أملاح الحديد الضرورية للنبات و يرمز لها بحرف C

2) تحضير الوسط الغذائي .

3) تجهيز الأدوات اللازمة للزراعة .

4) إنشاء الزراعات النسيجية .

5) تحضين الزراعات .

6) متابعة النتائج .

تحضير المحاليل الأساسية للوسط الغذائي (MS) (9)

مجموعة العناصر الكبرى Macro Elements (STOCK SOLUTION A)

*قمنا بتجهيز بيكر حجم 1 لتر به 500 مل من الماء ثنائي التقطير .

*وضعنا البيكر على جهاز التحريك المغناطيسي .

شكل ت: ((جهاز التحريك المغناطيسي))

*تم رفع درجة حرارة الماء المقطر حتى يكون دافئاً إلى حد ما .

*وزنا المواد الكيميائية الموضحة أدناه **(جدول رقم 1)** و أضفناها إلى بيكر بنفس الترتيب:

جدول (1):تحضير مجموعة العناصر الكبرى

مجموعة العناصر الكبرى **Macro elements**	الوزن المطلوب g/l
NH4NO3	33
KNO3	38
CACL2.2H2O	8.8
MGSO4.7H2O	7.4
KH2PO4	3.4

(9)

*بعد الانتهاء من إذابة جميع المواد الموضحة في الجدول السابق نقلنا المحلول إلى سلندر حجم 1 لتر لإكمال الحجم بالماء ثنائي التقطير (إلى لتر) .

*أعدنا المحلول إلى البيكر على جهاز التحريك المغناطيسي للتحريك لعدة دقائق.

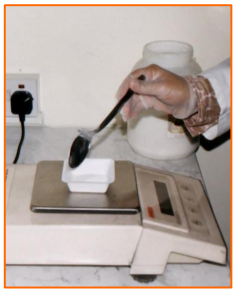
* يتم الاحتفاظ بالمحاليل في دوارق معتمة (ذات لون داكن لتقليل تعرضها للضوء) وتحفظ في الثلاجة عند 4°م إلى حين استخدامها في تحضير الوسط الغذائي. **(9)**

مجموعة العناصر الصغرى (STOCK SOLUTION B)

Micro elements

*قمنا بتجهيز بيكر حجم 1 لتر به 500 مل من الماء ثنائي التقطير .

*وضعنا البيكر على جهاز التحريك المغناطيسي.



شكل ث:((وزن المواد الكيميائية))

*وزنا المواد الكيميائية (شكل د) الموضحة أدناه (بالجدول رقم:2) و أضفناها إلى بيكر بنفس الترتيب:

جدول(2): مكونات مجموعة العناصر الصغرى

مجموعة العناصر الكبرى Macro elements	الوزن المطلوب g/l
KI	0.166
H3BO3	1.240
MNSO4.7H2O	3.38
ZNSO4.7H2O	1.720
NA2MoO4.2H2O	0.050
CUSO4.5H20	0.005
CoCI2.6H2O	0.005

(9)

*بعد الإنتهاء من إذابة جميع المواد الموضحة في الجدول السابق نقلنا المحلول إلى سلندر حجم 1 لتر لإكمال الحجم بالماء ثنائي التقطير (إلى لتر).

*أعدنا المحلول إلى البيكر على جهاز التحريك المغناطيسي للتحريك لعدة دقائق.

يتم الاحتفاظ بالمحاليل في دوارق معتمة (ذات لون داكن لتقليل تعرضها للضوء) وتحفظ في الثلاجة عند 4°م إلى حين استخدامها في تحضير الوسط الغذائي. **(9)**

مركبات الحديد (STOCK SOLUTION C) IRON COMPOUNDS:-

*وزنا المواد الموضحه أدناه **(بالجدول رقم: 3)** و أذبناها كل على حدة في بيكر حجم 1 لتر في كل منهما 400 مل من الماء ثنائي التقطير .

*تمت عملية الإذابة على جهاز التحريك المغناطيسي مع استخدام الحرارة .

جدول (3): مركبات الحديد بالوسط الغذائي

مركبات الحديد IRON COMPOUNDS	الوزن المطلوب g/l
FESO4.7H2O	5.56
NA2EDTA.2H2O	7.46

(9)

*بعد أن تمت عملية الإذابة أضفنا إحدى المادتين للأخرى على جهاز التحريك المغناطيسي .

*نقلنا المحلول إلى سلندر زجاجي مدرج لإكمال الحجم إلى لتر باستخدام الماء ثنائي التقطير .

*أعدنا المحلول إلى بيكر للتحريك لمدة دقائق.

*غطينا المحلول و تركناه إلى أن يفتر قليلاً.

*نقلناه إلى دورق معتم و حفظناه في الظلام بعدما تأكدنا من اكتسابه لدرجة حرارة الغرفة . **(9)**

تحضير الوسط الغذائي الملحي المستخدم في إنبات بذور الليمون

و انتخاب نباتات مقاومة للملوحة (9)

*حضرنا 1 لتر من المعاملات الملحيه . (لكل معاملة 1 لتر على حدة) ونذكر هنا الخطوات لتحضير 1 لتر من الوسط الغذائي.

*جهزنا 300 ml ماء ثنائي التقطير في سلندر مدرج حجم 1 لتر .

*أضفنا 50 ml من المحلول الأساسي للعناصر الكبرى (A) باستخدام سلندر مدرج .

*أضفنا 50 ml من المحلول الأساسي للعناصر الصغرى (B) .

*أضفنا 50 ml من المحلول الأساسي لأملاح الحديد (C) .

*أضفنا 10 ml من المحلول الأساسي لمخلوط الفيتامينات .

* أضفنا ماء ثنائي التقطير إلى نفس السلندر (Cylinder) حتى 800 ml .

شكل ج : ((الأدوات المستخدمة))

شكل ح: ((إضافة المحاليل إلى الوسط))

شكل د: ((نقل المحاليل إلى دورق))

*نقلنا المكونات من السلندر إلى دورق حجم 1 لتر ووضعته على جهاز التحريك المغناطيسي .

*أضفنا0.1 جرام من MYOINOSITOL (باستخدام الميزان الحساس) و هو أحد المواد الكربوهيدراتية .

*أضفنا 20 جرام من السكروز إلى الوسط الغذائي .

*أضفنا NACL كلوريد الصوديوم لكل معاملة على حدة مع تدوين التركيز لكل معاملة. حيث قمنا بتحضير لتر منفصل لكل تركيز ملحي من التراكيز التالية: 0,50,100,150,200 ملليمول من كلوريد الصوديوم .

*أكملنا الحجم بالماء المقطر إلى 1 لتر باستخدام سلندر

*ثبتنا الأس الهيدروجيني عند 5.6±0.01 باستخدام محلول 1 عياري من حمض الهيدروكلوريك و محلول 1 عياري هيدركسيدالصوديوم.

*أضفنا 7 جرام من الآجار .

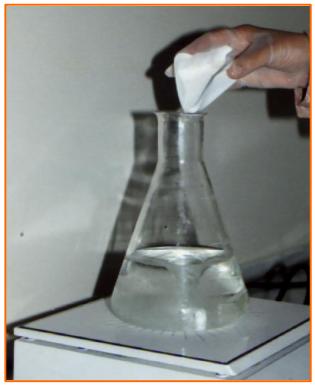
*تم تذويب الآجار في الوسط الغذائي باستخدام الحرارة .

*تم توزيع الوسط الغذائي على الأنابيب و تغطيتها .

*و بذلك أنتهينا من عملية تجهيز الوسط الغذائي و حان وقت تعقيم هذا الوسط حتى يكون بيئة معقمة.

*تم تعقيم الوسط الغذائي في جهاز الأتوكليف الذي يعمل بالحرارة و الضغط عند درجة حرارة 121 م .

* بعد إنتهاء التعقيم تركنا الأنابيب لتبرد في درجة حرارة الغرفة ثم حفظت في الثلاجات عند 4 م إلى حين استخدامها . **(8)**



شكل ذ :**((إضافة السكروز))**

شكل ر: **((تثبيت الأس الهيدروجيني))**

شكل ز: **((أجهزة التعقيم (autoclaves) المستخدمة في التعقيم))**

الأدوات المطلوب تواجدها عند (زراعة بذور الليمون) (8)

- بذور الليمون بعد الغسل و التجفيف لمدة 48 ساعة و من ثم إزالة الأغلفة الخارجية .
- محلول التعقيم هيبوكلوريت الصوديوم .
- عدد 4 قطع شاش معقم (لزراعة 40 بذرة).
- 4 بيكر حجم 100 مل.
- ماء ثنائي التقطير معقم (2 لتر في دوارق حجم 500 مل و 250 مل).
- 3 أطباق بتري معقمة .
- الوسط الغذائي المستخدم لإنبات بذور الليمون .
- ملاقط.
- مشارط.
- محارم ورقية.
- بارافيلم لإحكام إغلاق الأنابيب بعد الزراعة.
- جهاز الترقيم .

- جهاز تعقيم الملاقط .
- بلاط لتبريد الملاقط بعد التعقيم بالحرارة .
- رقائق الألمنيوم .
- وعاء للتفريغ (بيكر كبير) .
- سلندر حجم 100 مل و آخر 1000 مل .

خطوات زراعة بذور الليمون و التي قمنا بعملها(8)

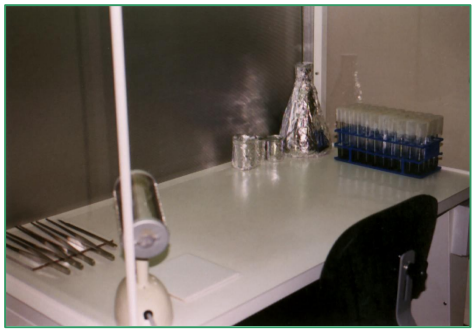
1- استخراج بذور الليمون ثم غسلها تحت الماء الجاري .

2- تجفف البذور باستخدام محارم ورقية ثم تنشر على ورق لمدة 48 ساعة .

3- يتم إزالة الأغلفة الخارجية للبذور .

4- تجهيز غرفة الزراعة(شكل س) ، بعدها نقوم بتشغيل جهاز العزل الجرثومي .Laminar flow hood

ثم نمسحه بالكحول 70% و نتركة يعمل لمدة 30-45 دقيقة قبل بدء العمل .



شكل س : ((غرفة الزراعة))

5- تعقم البذور في مجاميع (10-15) بذرة باستخدام محلول التعقيم هيبوكلوريت الصوديوم(شكل ش)

بتركيز 0.5% داخل بيكر (شكل ص) مع تغطيته برقائق الألمنيوم و التحريك من حين لآخر .

شكل ش: **(محلول التعقيم هيبوكلوريت الصوديوم)**

شكل ص:**(بيكر مغطى برقائق الألمنيوم)**

6- أثناء فترة التعقيم يتم تجهيز ما يلزم لإتمام الخطوات التالية:

- مسح منطقة العمل بالكحول70% و التخلص من جميع الأدوات الغير ضرورية .

- تجهيز وعاء معقم بالكحول للتخلص من مادة التعقيم .

- مسح دوارق الماء المعقم بالكحول 70% و إدخالها إلى منطقة العمل.

- إدخال الأطباق المعقمة مع عدم فتحها إلى حين الحاجة إليها .

-إدخال الشاش المعقم و كذلك الوسط الغذائي .

-التأكد من مسح منطقة العمل و اليد بالكحول 70% بين الحين و الآخر و خاصة في حال إخراج اليد

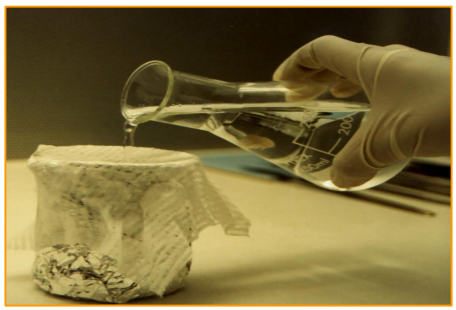
خارج منطقة العمل .

7 -قبل انتهاء مدة 10 دقائق يتم نزع رقاقات الألمنيوم عن الدوارق و فتح الشاش إستعداداً للتخلص من مادة

التعقيم بتفريغها داخل الوعاء المجهز لذلك (شكل ض) .

شكل ض:**((التخلص من مادة التعقيم داخل الوعاء المجهز لذلك))**

8- بعد تكرار الخطوة السابقة لكل الدوارق يتم غسل البذور بالماء المعقم المقطر (شكل ط) بتحريكهـــا فـــي نفس الدوارق , و تتم عملية الغسل هذه ثلاث مرات مع التخلص من الماء كل مره في وعاء التفريغ من خلال الشاش المعقم .



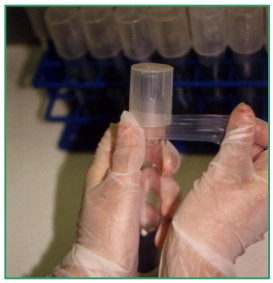
شكل ط: ((غسل البذور بالماء المعقم))

9-في المره الثالثة للغسيل يتم فتح الطبق المعقم و تحريك البذور في الماء ثم صب محتوى الدورق في الطبق المعقم , تترك المجاميع الأخرى في الدوارق بعد الغسيل للمرة الثالثة إلى حين زراعة المجموعة الأولى والاستعداد بفتح طبق جديد و تعقيم الملاقط ..الخ.

10-تزرع البذور على الوسط الغذائي بمعدل بذرة في كل أنبوبه .

11-بعد إغلاق الأنابيب بالبارافيلم(شكل ظ) و تدوين البيانات اللازمة يتم تحضين الزراعات في الظلام لمدة 10 أيام . ثم تحضن لمدة 20 يوم في الإضاءة .

12- يتم تدوين الملاحظات كل يومين لمتابعة الإنبات و مدى تأثير التراكيز الملحية على الإنبات و النمو .



شكل ظ:((إغلاق الأنابيب بالبارافيلم))

الإكثار النسيجي للنباتات المقاومة للملوحة

بعد الحصول على نباتات نامية في الأوساط المحضرة سابقاً قمنا بتجهيز الوسط الغـذائي MS المحتـوي علـى الهرمونات النباتية التي تعمل على تحفير نمو البراعم الجانبية للنبات، واستخدمنا فيها هرمون (أنـدول حمـض الخليك IAA - Indole acetic acid) . و قمنا بالخطوات التالية (8):

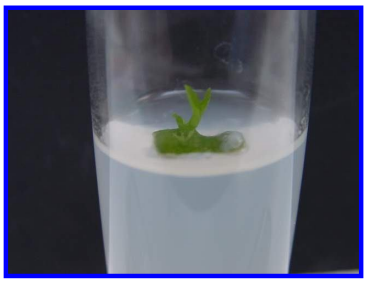
*نقل النبات المقاوم للملوحة من الأنبوبة إلى طبق معقم داخل جهاز العزل الجرثومي .

* قمنا بفصل المجموع الجذري أولاً ثم تخلصت من البرعم القمي و الأوراق جميعها و احتفظنا فقط بجزء مـن الساق يضم البراعم الجانبية .

* قمنا بزراعة هذا النسيج على الوسط المذكور سابقاً بهدف الإكثار .

* تمت المتابعة لرصد النموات الحديثة و البراعم الجانبية للحصول على نباتات جديدة يمكن فصـلها و إكثارهـا في المعمل .

بادرة ليمون بنزهير نامية على الوسط الغذائي MS



شكل ع:((خطوات الإكثار النسيجي))

نتائج البحث و المناقشة

النتائج بعد 4 أيام من الزراعة (24-8-2008م)

قمنا بتدوين ومتابعة نمو بذور الليمون لقياس معدل الإنبات في كل تركيز على حدى .

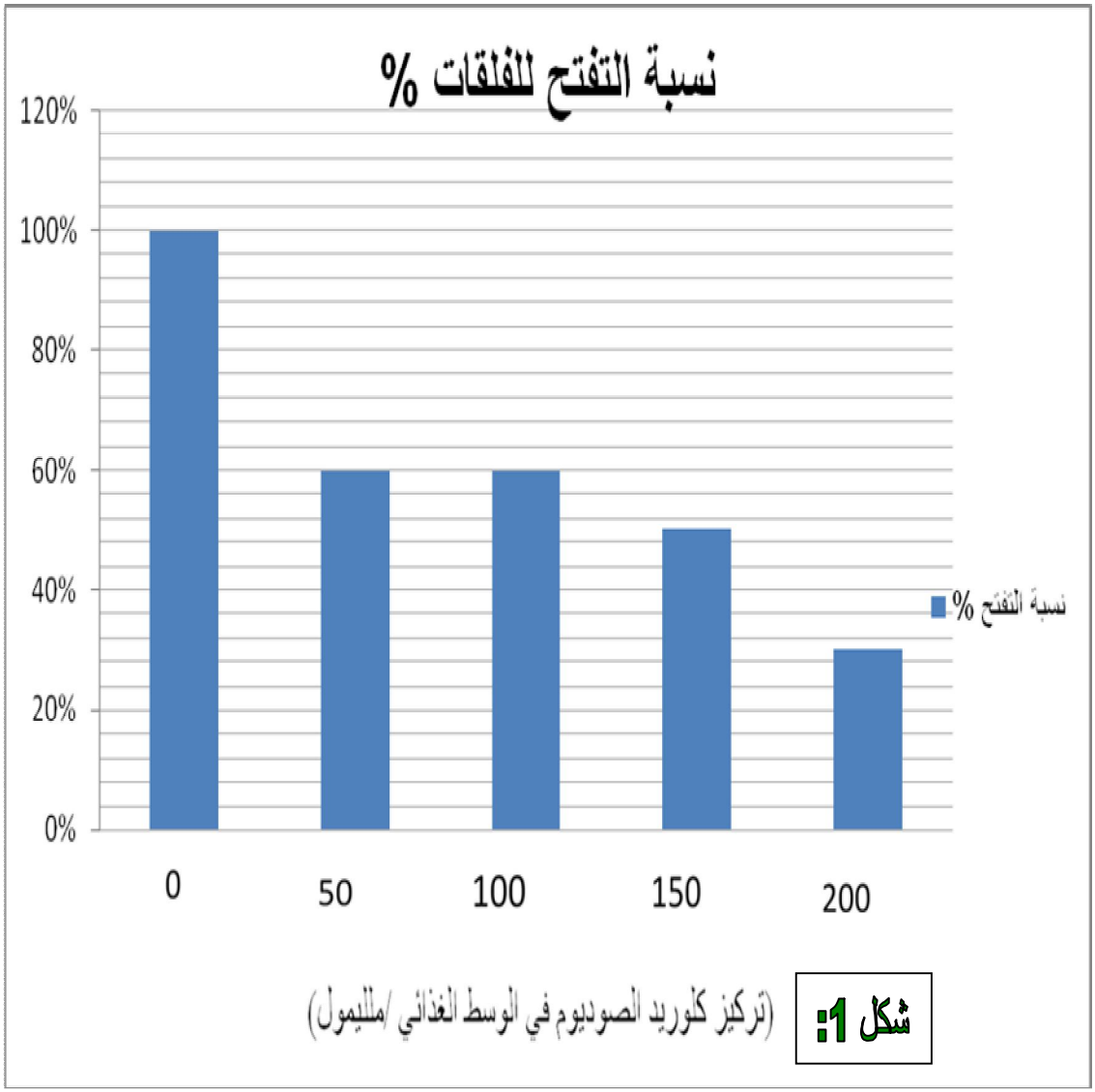
أول متابعة كانت بعد 4 أيام من الزراعة .

جدول (4) : معدل استجابة البذور في الأوساط الملحية .

تركيز NaCl	الملاحظات	نسبة التفتح %
0	تفتحت جميع الفلقات (10 فلقات)	%100
50	تفتحت 6 فلقات	%60
100	تفتحت 6 فلقات	%60
150	تفتحت 5 فلقات	%50
200	تفتحت 3 فلقات	%30

أخذنا هذه النتائج عندما كانت النباتات محضنة (incubated) في الظلام .

*تظهر النتائج المعروضة في الجدول رقم (4) أن زيادة التركيز الملحي في الوسط أدت إلى تأخر تفتح الفلقات،حيث كانت العلاقة عكسية بين معدل التفتح و تركيز الملح في الوسط .



يوضح شكل 1:((تأثير التركيزات الملحية على الإنبات بعد 4 أيام من الزراعة)).

أما المتابعة الثانية كانت بعد 7 أيام من الزراعة (27-8-2008م)

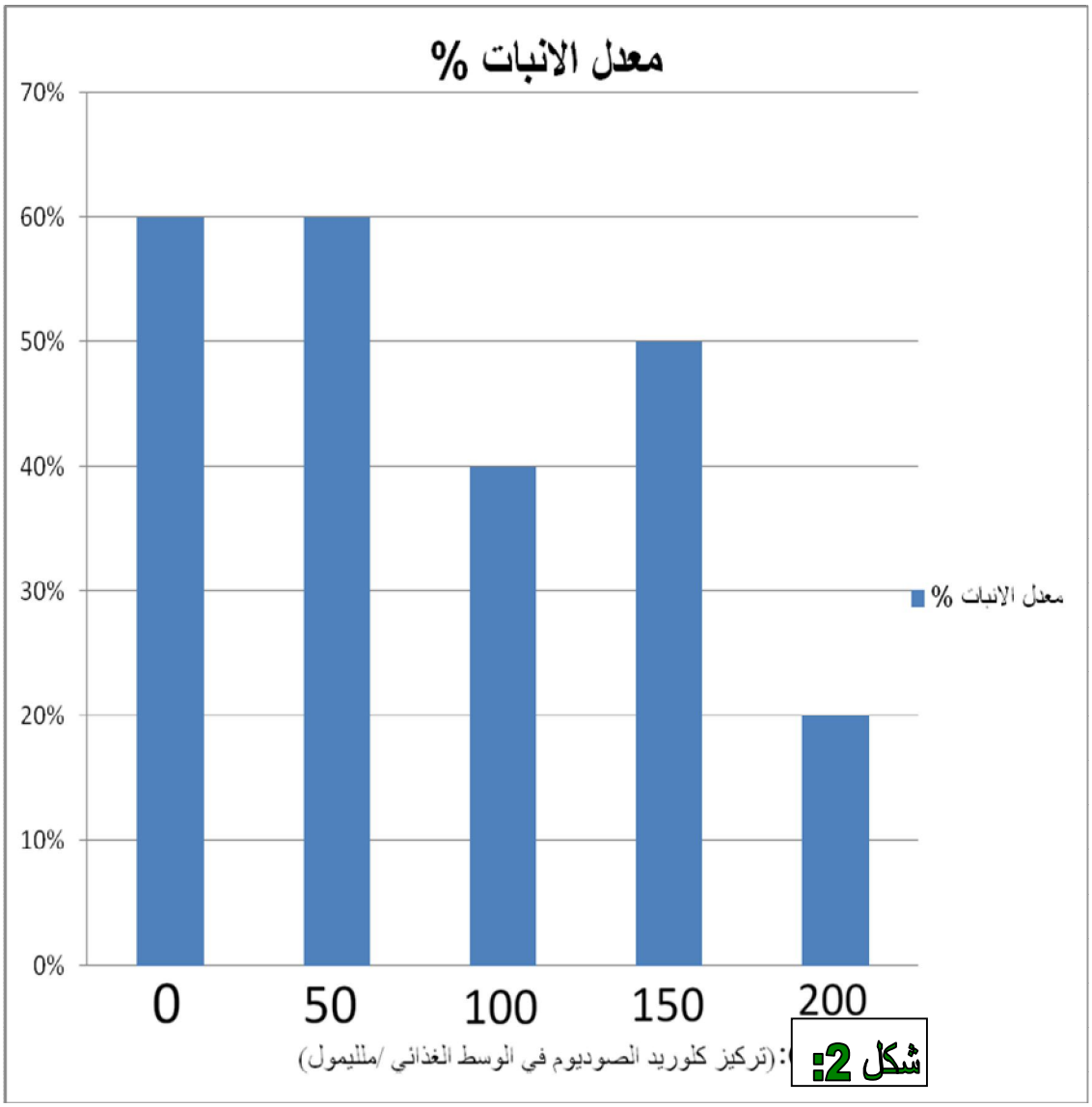
بدأت معظم البذور بالإنبات و ظهر الجذير

جدول (5) : تأثير التركيزات الملحية على الإنبات بعد 7 أيام من الزراعة

تركيز NaCl	الملاحظات	معدل الانبات %
0	ظهور الجذير في 6 بذور	%60
50	ظهور الجذير في 6 بذور	%60
100	ظهور الجذير في 4 بذور	%40
150	ظهور الجذير في 5بذور	%50
200	ظهور الجذير في بذرتان	%20

أخذنا هذه النتائج عندما كانت النباتات موضوعة في الظلام

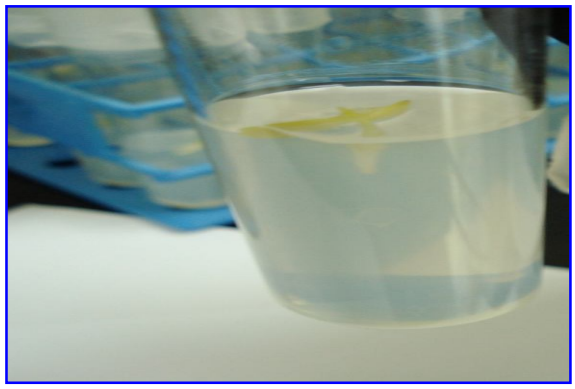
من الواضح أن التركيز الملحي في الوسط الغذائي أدى إلى تثبيط الإنبات في بعض البذور و ذلك مقارنة بالتجربة الضابطه و هي التركيز صفر للملح في الوسط . و لكن نمو بعض البذور هو المطلوب حيث أن الهدف هو الحصول على النباتات المقاومة للملوحة أي أن البذور التي استطاعت الإنبات دليل على نجاحنا في الحصول على نباتات مقاومة للملوحة سوف نستخدمها في الإكثار النسيجي للحصول على عدد أكبر منها .



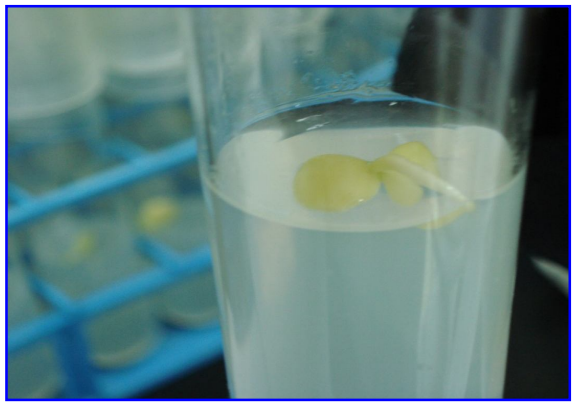
شكل 2:

يوضح شكل 2:((تأثير التركيزات الملحية على الإنبات بعد 7 أيام من الزراعة)).

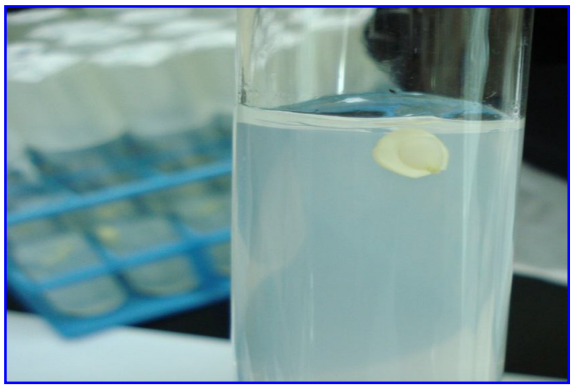
و هنا قمنا بتصوير البذور بعد 7 أيام من الزراعة بمعدل بذرة من كل معاملة من المعاملات الخمسة .



شكل 3: ((بذرة من تركيز (0) و يبدو شكل الجذير واضحاً فيها)).

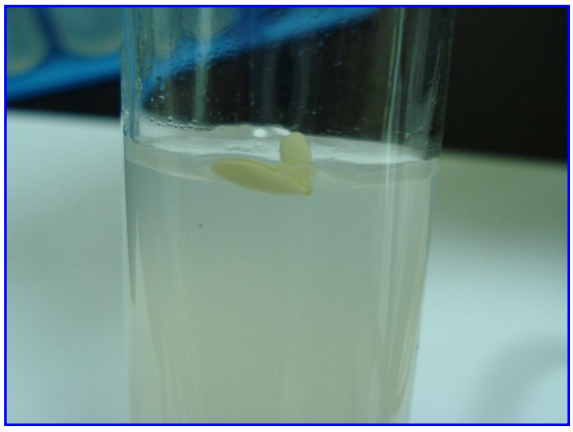


شكل 4: ((بذرة من تركيز (50))).



شكل 5: ((بذرة من تركيز (100))) .

شكل 6: ((بذرة من تركيز (150))).



شكل 7: ((بذرة من تركيز (200) و تبدو في بداية نموها)) .

و المتابعة الثالثة كانت بعد 11 يوم من الزراعة(31-8-2008م)

و في هذا اليوم زاد معدل الانبات لأن معظم البذور ظهر لها جذير.

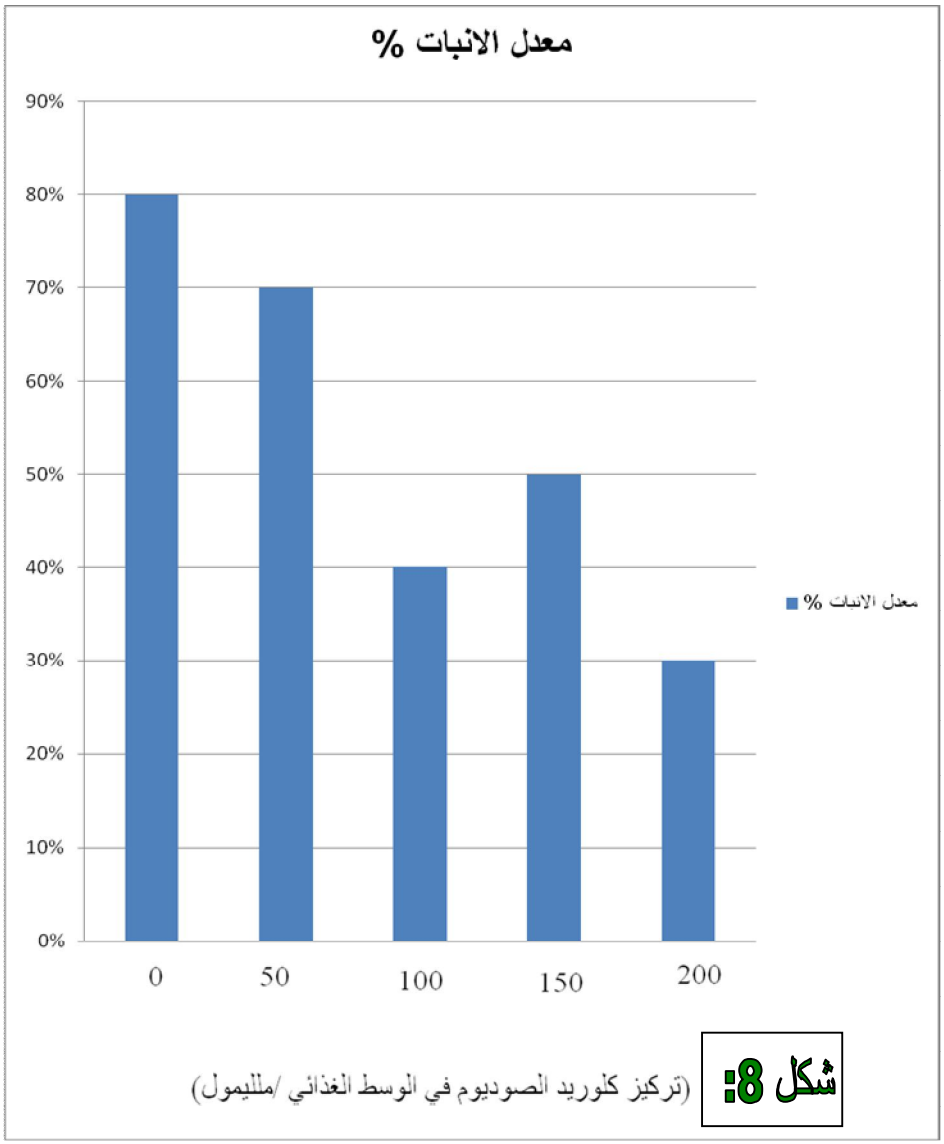
جدول (6) : متابعة الإنبات في بذور الليمون بعد 11 يوم من الزراعة.

تركيز NaCl	الملاحظات	معدل الانبات %
0	ظهور الجذير في 8 بذور	%80
50	ظهور الجذير في 7 بذور	%70
100	ظهور الجذير في 4 بذور	%40
150	ظهور الجذير في 5بذور	%50
200	ظهور الجذير في 3 بذرات	%30

أخذنا هذه النتائج عندما كانت النباتات موضوعة في الظلام

بعد ذلك قمنا بوضعها في الإضاءة لأنها أتمت 10 أيام.

و بذلك زاد معدل الانبات، ففي المعاملة الضابطة (0) أصبح هناك 8 بذور لأن الجذير ظهر في بذرتين أخـــرتيين ، وفي المعاملة (50) ملليمول من كلوريد الصوديوم ظهر الجذير لبذرة واحدة فأصبح العدد 7 ، أما في المعاملـــة (100) لم يظهر الجذير في بذور آخرى و بقي العدد 4 ،كذلك التركيز (150) أيضاً لم يظهر الجذير في بـــذور آخرى و بقي العدد 5 بذور منبته ، و في تركيز (200) تفتحت بذرة إضافية .



شكل 8: (تركيز كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي /ملليمول)

يوضح الشكل **8**:((تأثير التركيزات الملحية على الإنبات بعد 11 يوم من الزراعة)).

و كانت آخر متابعة بعد 12 يوم من الزراعة بتاريخ 1-9-2008

و هذه هي أول نتائج للبذور بعد نقلها من الظلام للإضاءة.

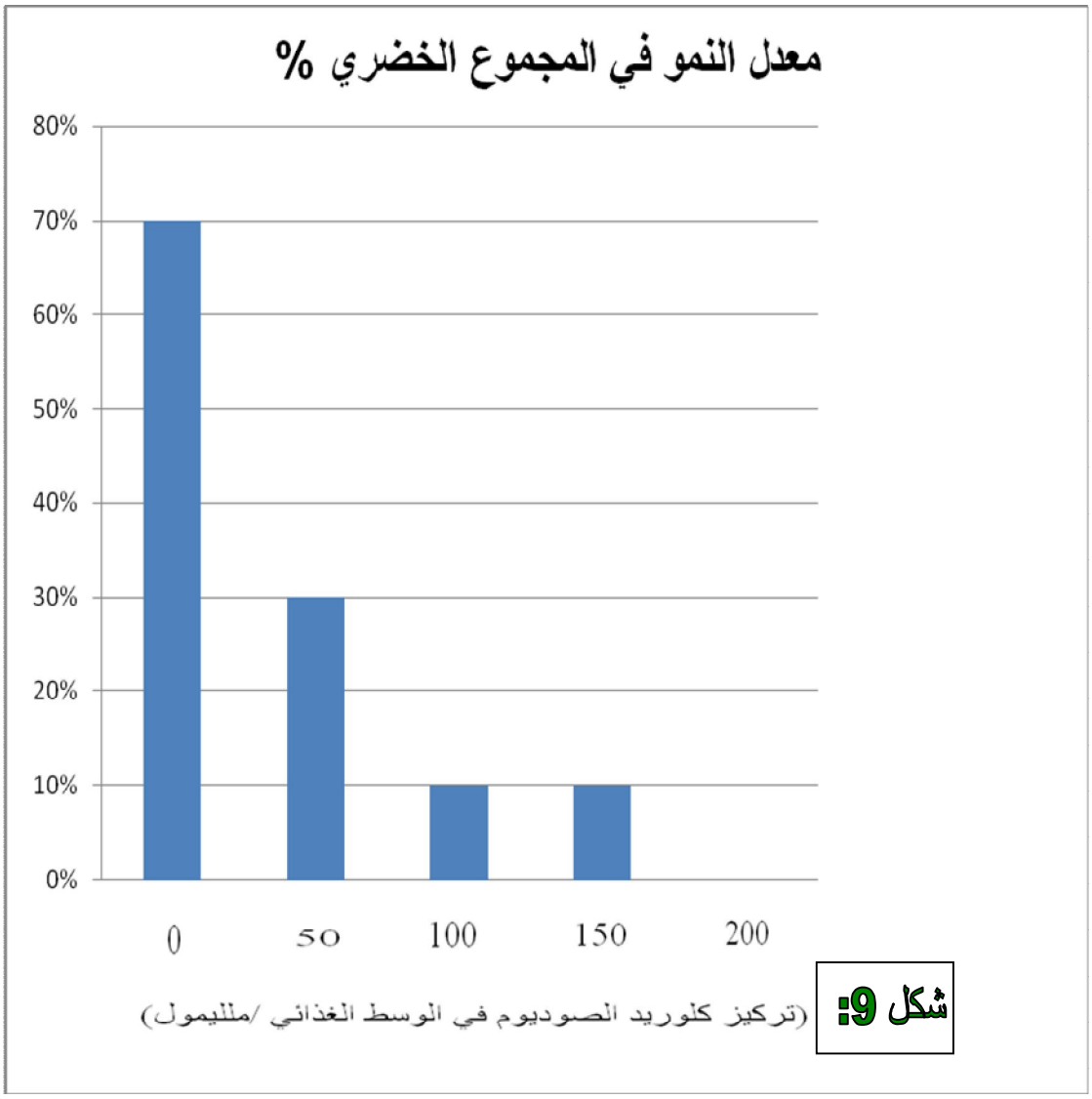
جدول (7): تأثير الملوحة على النمو في المجموع الخضري .

التركيز	الملاحظات	معدل النمو الطبيعي %
0	ظهور الأوراق ل7 بذور	%70
50	ظهور الأوراق ل3 بذور	%30
100	ظهور الأوراق ل بذرة واحدة	%10
150	ظهور الأوراق ل بذرة واحدة	%10
200	لم تظهر الأوراق حتى الآن	%0

و هنا بدأت البذور بالنمو الطبيعي بعد أن ظهرت الأوراق.

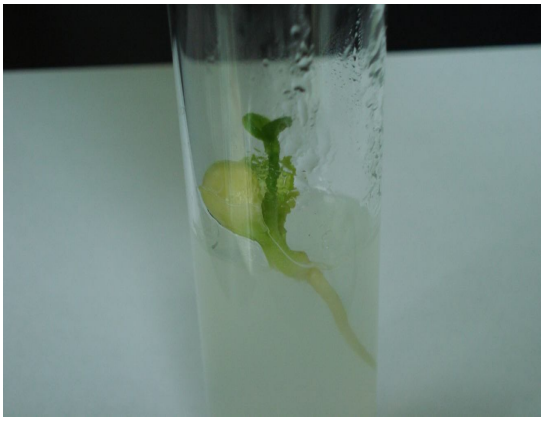
كما هو واضح أن تأثير الملح في الوسط الغذائي ثبط ظهور الأوراق بشكل كبير و لكن باستخدام تقنية زراعة الأنسجة سيتم في الخطوة القادمة استخدام النباتات النامية في الأوساط الملحية في الإكثار النسيجي .

و هذه النتائج توضح لنا أن المجموع الجذري أكثر مقاومة من المجموع الخضري للملوحة .

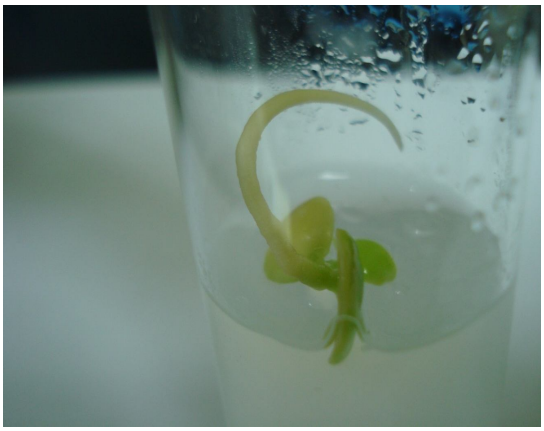


شكل 9: ((تأثير الملوحة على النمو في المجموع الخضري)) .

أما هذه الصور فهي للبذور بعد وضعها في الاضاءة بتاريخ 1-9-2008 (بعد 12 يوم من الزراعة) وهنا قمنا كذلك بتصوير 5 بذرات من كل تركيز .

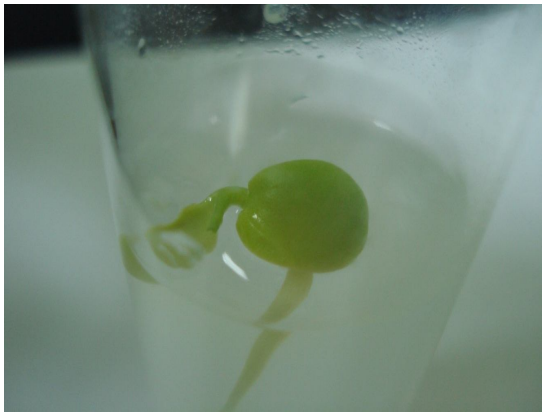


شكل 10 : ((بذرة من تركيز (0) و يبدو شكل الأوراق واضحاً فيها)) .



شكل 11 : ((بذرة من تركيز (50))) .

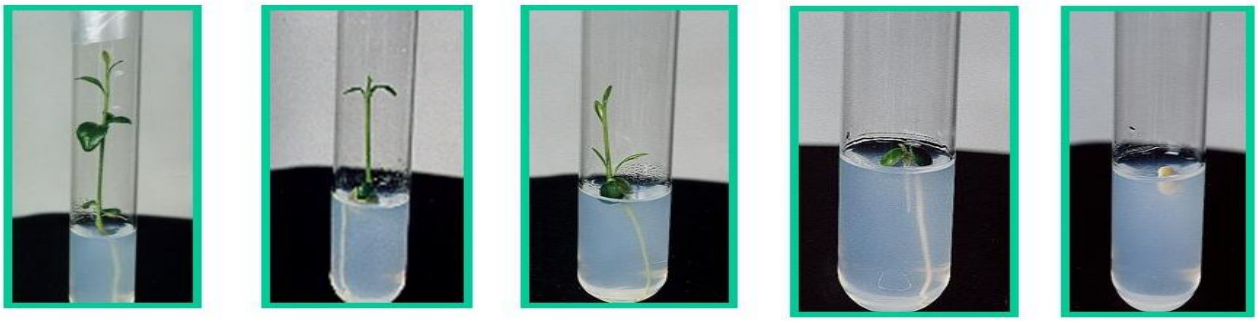
شكل 12: ((بذرة من تركيز(100))).



شكل 13:((بذرة من تركيز (150))).

شكل 14 : ((صورة لبذرة من تركيز (200))).

نتائج الإكثار النسيجي .



صور مراحل الإنبات في الليمون

شكل 15:((مراحل الإنبات في الليمون)).

يتضح من الصورة ظهور النموات الحديثة من البراعم الجانبية و يتم في مختبر الأنسجة فصل هذه النموات و

مواصلة إكثارها للحصول على نباتات كثيرة مقاومة للملوحة يمكن زراعتها في الأراضي الملحية .

Conclusion الخاتمة

في نهاية هذا البحث تمكنا من استخدام تقنية زراعة الأنسجة النباتية كأحد الحلول للمشكلة البيئية المعروفة بملوحة التربة و بالتالي يمكن بواسطتها استخدام الأراضي الملحية في زراعة نباتات مقاومة للملوحة.

Recommendations التوصيات

- نوصي أن يكون هناك بحث آخر في المستقبل القريب لزراعة النباتات المقاومة للملوحة المنتجة بطريقة زراعة الأنسجة في الأراضي الملحية لاختبار قدرتها على مقاومة الملوحة .
- نوصي بإجراء أبحاث في تقنية زراعة الأنسجة النباتية لإنتاج نباتات تقاوم عوامل بيئية أخرى.

التكلفة المالية

لم يكن هناك تكلفة مالية للبحث نظرا للتعاون مع مختبر زراعة الأنسجة النباتية في توفير كل متطلبات البحث العلمي والتدريب على الخطوات العملية والإشراف على البحث مع مركز علي بن سعود آل ثاني للبحث و التطوير العلمي بمدرسة الإيمان الثانوية المستقلة بالإضافة إلى تزويدنا بالمراجع اللازمة من مكتبة مختبر زراعة الأنسجة .

المراجع

1) موقع مركز معلومات التكنولوجيا الحيوية-مصر(مرجع انترنت):أهمية زراعة الأنسجة النباتيه.

.2008-8-25.www.egypt-bic.com/byotec_egy_Arab.htm

2) شرقيه، السيد عمار (من موقع الحديقة)(2008):.مقاومة النباتات للأملاح.

.http://www.alhadeeqa.com/vb/showthread.php?t=3747 25-8-2008.

3) موقع الحواج(مرجع انترنت):الليمون.www.khayma.com/hawaj/limon.htm.2008-8-26.

4) موقع الهيئة العامة لشؤون الزراعة و الثروة السمكية(مرجع انترنت):الحمضيات.

.2008-8-26.http://ias.paaf.gov.kw/paaf/ershad/e69.jsp

5) موقع كيمياء التربة(مرجع انترنت):أسباب تملح التربة.

.2008-8-30. www.bouilloul.com/t1892.html

6) دقش، يس محمد إبراهيم (2002): الإجهاد الملحي في النباتات الاقتصادية. وقائع فعاليات الدورة التدريبية حول تطبيقات زراعة الأنسجة النباتية في تحسين الإنتاج الزراعي. إدارة البحوث الزراعية و المائية بالتعاون مع المنظمة العربية للتنمية الزراعية: 1-15.

7) محمد، ندى (2003):التلوث و التعقيم في زراعة الأنسجة النباتية،المصادر المحتملة للعوامل الملوثة.بحث بعنوان"تقانة زراعة الأنسجة النباتية".وزارة الشؤون البلدية والزراعة، إدارة البحوث الزراعية و المائية،مختبر زراعة الأنسجة النباتية:3-10.

8) الكواري، سلوى دسمال(2008): الوسط الغذائي ،مكونات الوسط الغذائي ،خطوات تحضير الوسط الغذائي ، الخطوات العملية ، تحضير الوسط الغذائي الملحي المستخدم في إنبات بذور الليمون و انتخاب نباتات مقاومة للملوحة ، الأدوات المطلوب تواجدها عند (زراعة بذور الليمون) ، خطوات زراعة بذور الليمون ، الإكثار النسيجي للنباتات المقاومة للملوحة.(الخطوات العملية المستخدمة بمختبر زراعة الأنسجة النباتية).

9) الكواري، سلوى دسمال (2007): تحضير المحاليل الأساسية للوسط الغذائي (MS). الأوساط الغذائية المستخدمة في مختبر زراعة الانسجة النباتية. وزارة الشؤون البلدية و الزراعة،إدارة البحوث الزراعية و المائية،مختبر زراعة الأنسجة النباتية.