AC 194

المملكـــة المغربية

شبكـــة بحـــوث وتطـــوير النخيـــل

الشبكـــة الفرعيـــة لتحسيـــن الاصناف
المركز الجهـوي للبحث الزراعـــي
مـــــــراكش

عروض الدورة التدريبية الأولى حول الزراعة النسيجية لإكثار النخيل

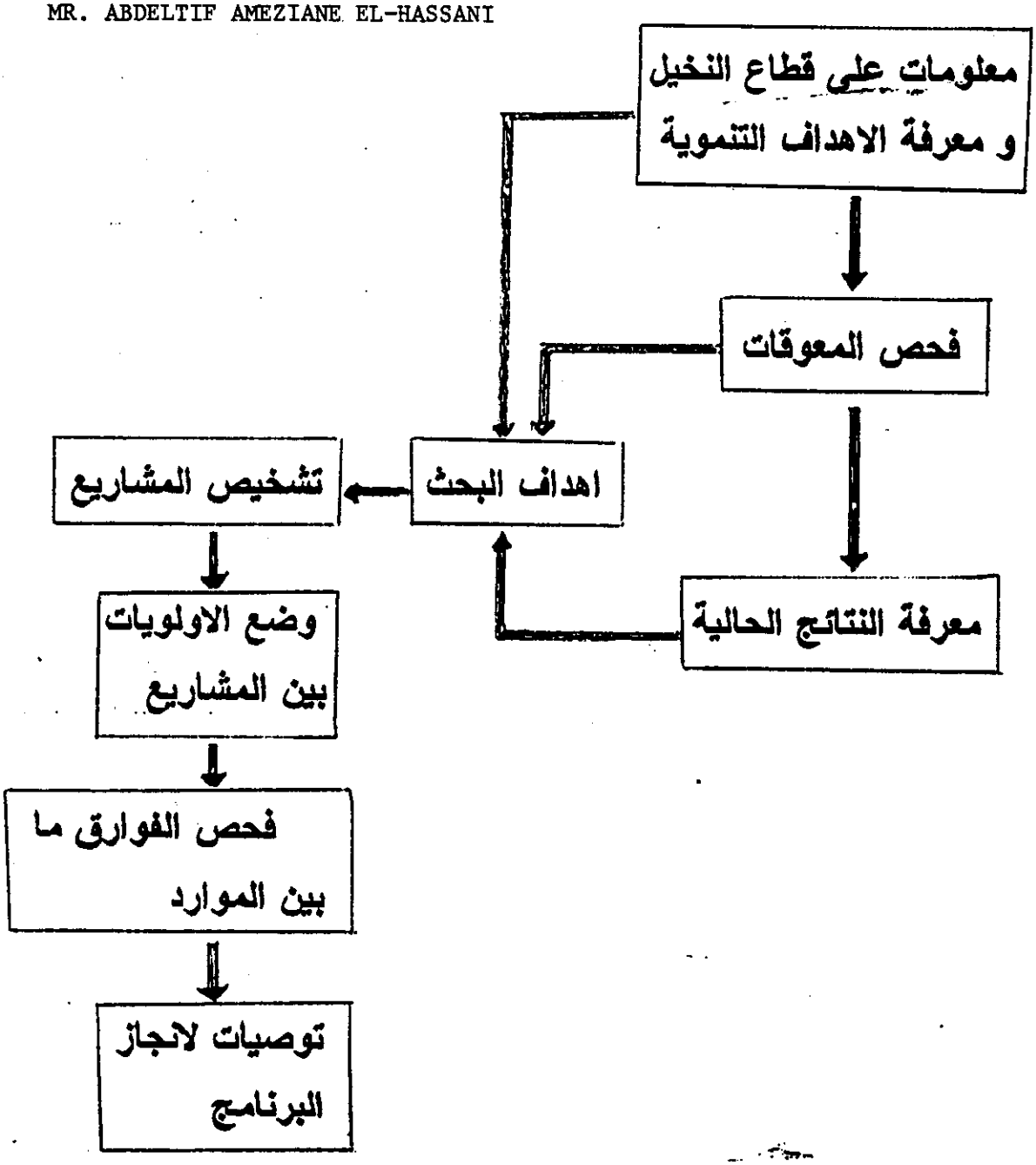
مراكش 9 - 23 أكتوبر 1994

عبد اللطيف أمزيان الحسني
منسق الشبكة الفرعية لتحسين الأصناف

دجنبر 1994

المراحل الثمانية لوضع البرنامج البحثي
(حسب البرمجة بالاهداف)

MR. ABDELTIF AMEZIANE EL-HASSANI



التجربة المغربية في مجال إنتاج فسائل نخيل التمر عن طريق زراعة الأنسجة (محمد البوجرفاوي)

أهداف البرنامج المغربي لإكثار نخيل التمر عن طريق زراعة الأنسجة:

- الإستجابة للأعداد الهائلة من الفسائل المبرمجة في المشروع الوطني لإعادة تعمير الواحات المغربية (3 مليون نخلة إلى غاية 2007).
- إنتاج فسائل مطابقة للأصناف و السلالات المنتخبة من طرف المعهد الوطني للبحث الزراعي في ما يخص المواصفات الوراثية (المقاومة، الجودة،...)

كسب ثقة الفلاحين بإعطائهم فسائل مطابقة للأصناف و السلالات الأم (تحقيق البرنامج الوطني لإعادة غرس الواحات المتضررة من البيوض).

- إنتاج فسائل خالية من الأمراض لتسهيل تبادل النبتات بين الواحات دون انتشار مرض البيوض.
- انتاج فسائل من الأصناف و السلالات لدراسة مدى مقاومتها لمرض البيوض في البيت الزجاجي (resistance confirmation)
- دراسة المواصفات الوراثية للفسائل و مدى مطابقتها للشجرة الأم باستعمال تقنيات RFLP and RAPD (Genetic conformity).

ماهي طريقة الإكثار الناجعة لتحقيق هذا البرنامج ؟

- الطريقة المستعملة بالمغرب :

طريقة الإكثار المباشر باستعمال القاعدة السفلى للأوراق الباطنية للفسيلة

*** مراحل تحسين التقنية :**

1976 : استخدام هذه التقنية لأول مرة من طرف Beauchesne في فرنسا على صنف بوفكوس.

1979 : نشر أول الأبحاث الناتجة عن استعمال هذه الطريقة *Poulain et al* 1979

1984 : استعمال و تطوير هذه الطريقة من طرف الباحثين المغاربة في البرنامج الوطني لإكثار فسائل نخيل التمر.

1985 : انتاج البراعم الأولى (Shoots) لبعض الأصناف و السلالات.

عقد مع المختبر التجاري للضيعة الملكية حول نقل الخبرات في مجال زراعة أنسجة نخيل التمر و الإكثار السريع.

*** مراحل التقنية :**

8 - 12 شهر	1- مرحلة بروز البراعم	Shoot initiation
12 - 24 شهر	2- مرحلة الإكثار السريع	Shoot multiplication
2 - 3 أشهر	3- مرحلة التجدير	Rooting
6 - 8 أشهر	4- مرحلة الأقلمة بالبيت الزجاجي	Acclimatation

الأجزاء التي استعملت لإنتاج فسائل بهذه الطريقة

* القاعدة السفلى للأوراق الباطنية لقلب الفسيلة :

البحوث التي نشرت : – POULAIN et al (1979)

- BEAUCHESNE (1982)

– BEAUCHESNE et al (1986)

* البراعم الجانبية : Auxillary Branching

- DRIRA , 1983
- ABOEL-NIL , 1986
- BOUGUEDOURA , 1990

* البرعم القمي : Apical bud

- ZAID & TISSERAT, 1983
- GABR & TISSERAT, 1985
- TISSERAT , 1984

*البراعم الزهرية : Floral buds

- DRIRA & BENBADIS , 1985
- LOUTFI, 1989

المشاكل التي تعرقل نجاح عملية إكثار الأصناف و السلالات:

1- التلوث البكتيري Endogenous contaminations

2- اسوداد الأنسجة Browning

3- اختلاف كبير في التجارب مع الأوساط المستعملة لدى الأصناف و السلالات (بعض الأصناف لاتتجاوب بتاتا).

4- بروز ظاهرة انتفاخ الأنسجة Vitrification

5-بروز مبكر للجذور بدل البراعم Early Rooting

6- نسبة التكاثر ضئيلة (من 2 إلى 2,5 حسب الأصناف)

7- تذني القدرة على تكوين البراعم لدى الأصناف

8- نسبة نجاح الفسائل في مرحلة الأقلمة متوسطة

الأبحاث الجارية لحل هذه المشاكل :

1- التلوث البكتيري :

* تحديد أصناف البكتيريا التي تلوث أنسجة نخيل التمر
* البحث عن مواد فعالة ضد البكتيريا (Antibiotics,.....)
* البحث عن تقنيات تمكن من الكشف عن الأنسجة الملوثة قبل دخولها إلى المختبر.

2- اسوداد الأنسجة و الأوساط الغذائية:

* دراسة مفعول بعض المواد الكيماوية على ظهور ظاهرة الاسوداد (Cysteine، Charcoal، PVP، Ascorbic acid، Citric acid،...)

3- انتفاخ الأنسجة Vitrification

* دراسة بعض العوامل التي يمكن أن تسبب في ظهور هذه الظاهرة . الامونيوم NH4+

4- التجدير المبكر و تدني القدرة على تكوين البراعم

* البحث عن توازنات هرمونية تحد من هذه الظاهرة

5- دراسة الظروف البيئية التي تسبب في تحسين نسبة نجاح الفسائل في مرحلة الأقلمة.

النتائج التي يوصل إليها مختبر زراعة الأنسجة بمراكش:

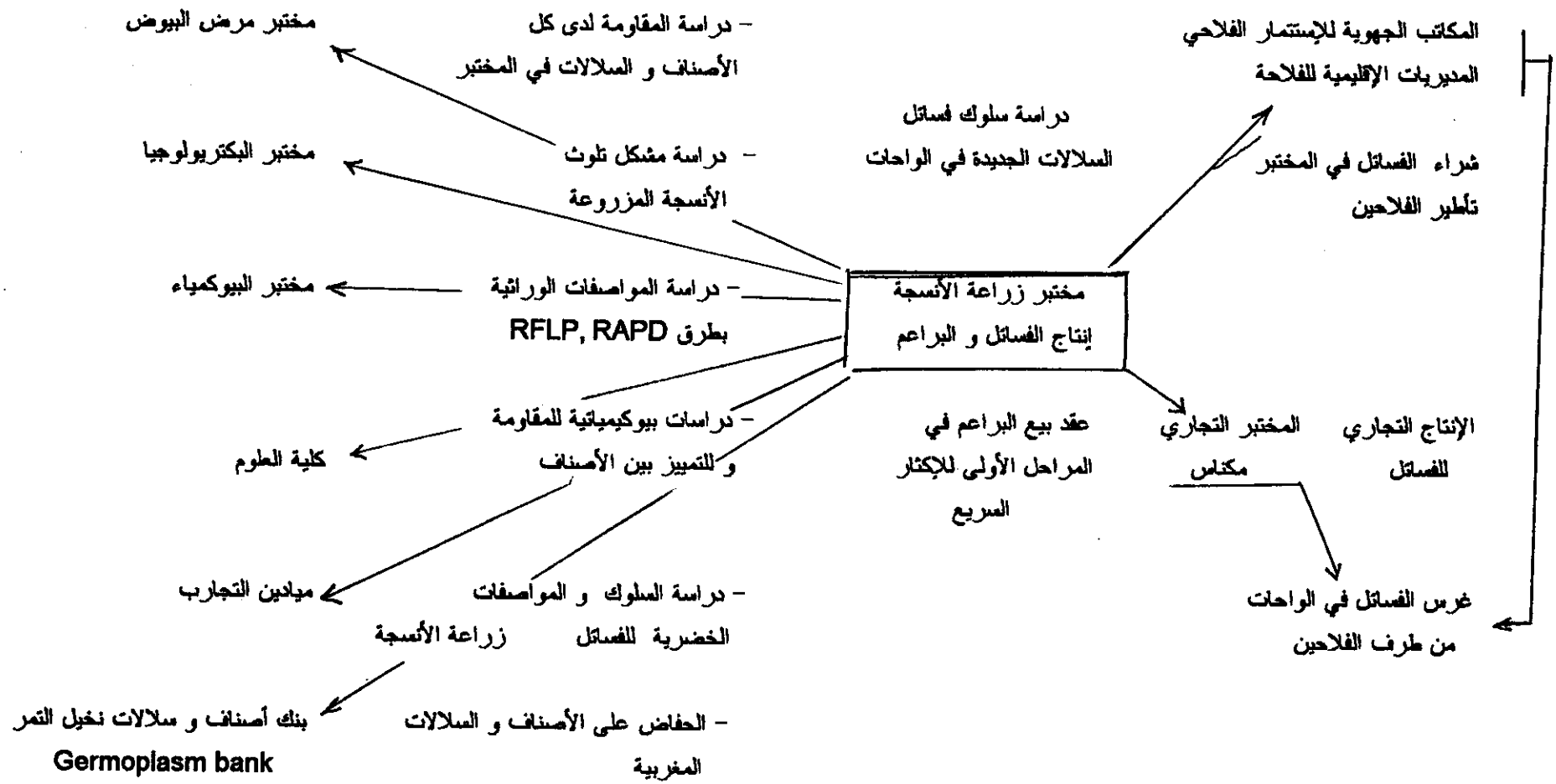
إكثار العديد من الأصناف و السلالات المنتخبة من طرف البحث الزراعي:

* أصناف ذات جودة عالية و حساسة لمرض البيوض : المجهول ، البوفكوس، بوسكري، الجيهل.
* سلالات منتخبة ذات جودة عالية و مقاومة لمرض البيوض : 3017 - 3228b 1394 - 3014
* أصناف و سلالات مبكرة : أحرضان – أكليد – I - EC- J - B - C10 – عزيزة بوزيد.

تقنيات الإكثار المستعملة لدى نخيل التمر

تقنية الإكثار	المزايا	السلبيات
النوى	تستعمل للتحسين الوراثي على المدى البعيد	- تباين كبير في العناصر الوراثية بين النبتات - 50 % من النبتات فحول و 50 % نبتات متمرة
الفسائل التقليدية	المواصفات الوراثية مطابقة لشجرة الأم	- عدد الفسائل المنتجة لدى كل شجرة ضئيل (من 10 إلى 20) خلال حياة النخلة - إكثار السلالات المنتخبة على المدى القريب مستحيل - إمكانية نشر مرض البيوض عن طريق الفسائل
الفسائل الآتية من زراعة الأنسجة • الطريقة المباشرة : تكوين البراعم :Organogenesis	- المواصفات الوراثية مطابقة للنخلة الأم - نسبة الإكثار مرتفعة - إكثار السلالات التي تتوفر على فسائل قليلة - إنتاج فسائل خالية من الأمراض	
• الطريقة الغير المباشرة: بتكوين الكالس Somatic Embryogenesis	- تحسين أصناف و سلالات النخيل عن طريق انتخاب الطفرات الاحتمالية (Somaclonal variation - نسبة الإكثار جد مرتفعة - إكثار السلالات التي تتوفر على عدد قليل من الفسائل - إنتاج فسائل خالية من الأمراض	- إمكانية تباين المواصفات الوراثية للفسائل مقارنة مع النخلة الأم.

دور مختبر زراعة الأنسجة (مراكش) في البرنامج الوطني لأعادة تعمير الواحات و البحوث الجارية حول نخيل التمر بالمملكة المغربية



تقنية فصل الجنين الجسدي كوسيلة للإكثار السريع لنخيل التمر. (رقية الشيخ)

هناك تقنيات الإكثار السريع لنخيل التمر: تقنية التكوين العضوي (Organogenesis) و تقنية فصل الجنين الجسدي (Somatic embryogenesis)

1- التكوين العضوي مستعملة حاليا على الصعيد التجاري لكونها تضمن أكبر نسبة للمطابقة الوراثية للشجرة الأم.

2- فصل الجنين الجسدي تتوفر على عدة مزايا: فهي سريعة جدا و تتوفر على نسبة إكثار أعلى بكثير من تقنية التكوين العضوي إلا أنها تتعرض لبعض الأنتقادات بخصوص إمكانية حدوث بعض التغيرات الوراثية في النبتات المنتوجة.

مبدأ تقنية فصل الجنين الجسدي:

تعتمد هذه التقنية على تطور أجنة جسدية، و هذه الظاهرة تحدث بصفة طبيعية عند بعض الأصناف النباتية كالحوامض. هذه الأجنة تشبه الأجنة التي هي موجودة في البذور.

فصل الجنين الجسدي يمكن أن تكون مباشرة: هناك نمو مباشر للجدور و الأوراق في النسيج المزروع في الأنابيب، أو غير مباشرة أي أن الأعضاء تتطور بعد مرحلة نمو عشوائي (Callus) نتيجة لتأثير بعض الهورمونات في الوسط الغذائي، و المرور بمرحلة الكالس يوفر نسبة إكثار هائلة مما يجعل هذه الطريقة الغير المباشرة مهمة جدا.

مشروع البحوث في تقنية فصل الأجنة الجسدية لنخيل التمر بمراكش:

لتطوير تقنية فصل الجنين الجسدي يقوم المختبر بعدة عمليات بحث ثم انتخابها طبقا لطريقة البرمجة بالأهداف على المدى المتوسط.

هذه العمليات هي:

- تحديد العوامل المسببة لاسوداد الأنسجة المزروعة.
- تحديد الحالة الفيزيولوجية الملائمة للزرع.
- دراسة العوامل التي تتحكم في مرحلة التهيئ للكالس.
- دراسة الإكثار في مرحلة الكالس و الأجنة.

و تهدف هذه العمليات إلى تطوير التقنية وحل بعض المشاكل التي لا تزال تعاني منها. بجانب هذا هناك مشروع آخر يهتم بدراسة التغيرات البيولوجية النووية (RFLP and RAPD)

الحالة الراهنة للأبحاث في تقنية فصل الجنين الجسدي كوسيلة للإكثار السريع

أثبتت الأبحاث أن نجاح تقنية الأجنة الجسدية يعتمد على عدة عوامل أهمها يرتبط بنوعية النسيج المزروع، بتركيبة الوسط الغذائي، و بالحالة البيئية للمزروعات.

نوعية النسيج المزروع (Explant):

تختلف الإجابة حسب المواصفات الوراثية للأم و كذلك حسب فصول السنة، و هذه الأخيرة تلعب دورا هاما عند نخيل التمر، إذ أن وقت استئصال النسيج من الأم له علاقة مباشرة بالحالة الفيزيولوجية للنبات.

هناك عامل آخر هو مصدر النسيج المزروع، استعملت عدة مصادر بعض الأصناف النباتية تستجيب بصفة جيدة لمختلف المصادر كالجزر مثلا. بالنسبة لنخيل التمر، اختبرنا عدة مصادر كالأوراق و الجذور الفتية المأخوذة من نبتات الأنابيب، كما استعملنا البراعم الجانبية و القمية و الأزهار. و أحسن النتائج حصل عليها باستعمال البراعم القمية و الأزهار.

الوسط الغذائي:

استعملت عدة أوساط غذائية في تقنية فصل الجنين الجسدي: وسط وايت (1963)، وسط كامبورغ (1968)، وسط شانك و هيلديربراند (1972) و وسط موراشيك و سكوك (1962).

التركيبة الأساسية للوسط الغذائي:

لها أهمية كبيرة عند بعض الأصناف النباتية خصوصا النتروجين عند الجزر و (Casein Hydrolysat) و النيترات و الكليتامين (Adenin sulfate) ضروري لإنتاج الأجنة عند نخيل التمر، و وجد أن تركيبة (62) MS ملائمة للتقنية.

الفيتامينات :

خصوصا ب (B) و الإنوسيطول تحسن النمو.

كذلك استعمال خليط مركب يتكون من Calcium pantothenate و Nicotin و Pyridoxine Hcl و Biotin و inositol عند نخيل التمر.

الهرمونات:

هذا هو أهم عنصر في تحديد التطور المرفوجينيكي للنسيج، أهم هرمون في إنتاج الكالس هي الأكسين. نوعيتها و تركيزها مهمة لمرحلة الكالس عند نخيل التمر، و بما أن الفحم المنشط ضروري كذلك عند النخيل، فإن الأوكسين تستعمل بكمية هائلة تصل إلى 100 mg/l . الأوكسين الأكثر استعمالا هي 2,4 D 100 mg/l بموازات الفحم المنشط 3 g/l و قد أثبتت الأبحاث التي أنجزناها في المختبر أنه يمكن استعمال حتى 10 mg/l من الأوكسين و استعمال أقل كمية ممكنة من الهرمون مهم جدا لأن 2,4 D (الذي هو مبيد أعشاب قوي) من الأسباب التي تؤدي إلى ظهور التغيرات الوراثية.

المواد المضادة للأكسدة (Adsorbants)

أنسجة نخيل التمر تتأثر كثيرا بمشكل الإسوداد (Browing) الذي ينتج عن المواد الفينولية التي يفرزها النسيج.

استعملت عدة مواد Ascorbac acid , Ammonium citrate , Glutamin , Adenin , PVP إلا أن الفحم المنشط هو الفعال عند نخيل التمر، و كذلك عند الجزر، و نحن نستعمله في المراحلة الأولى (Initiation) بكميات مختلفة تصل إلى 300 mg/l

العوامل البيئية :

تلعب هذه العوامل دورا فعالا في نجاح تقنية فصل الجنين الجسدي. أهم هذه العوامل الحرارة و الضوء..

بالنسبة للضوء : أثبتت أن نمو و تطوير الكالس يتعطل في إشعاع ضوئي كبير ، و لهذا في المختبر ، تمر المرحلة الأولى أي مرحلة نمو الكالس في الظلام ، ثم تخرج المزروعات تدريجيا إلى إشعاع أكبر بمجرد ظهور البويقات الجنينية (Embryogenic nodules) و بنفس المناسبة يغير الوسط الغذائي ليحتوي فقط على تركيبة MS (62) ، و خاليا من الهورمونات.

تقنية فصل الجنين الجسدي كوسيلة
للإكثار السريع لنخيل التمر

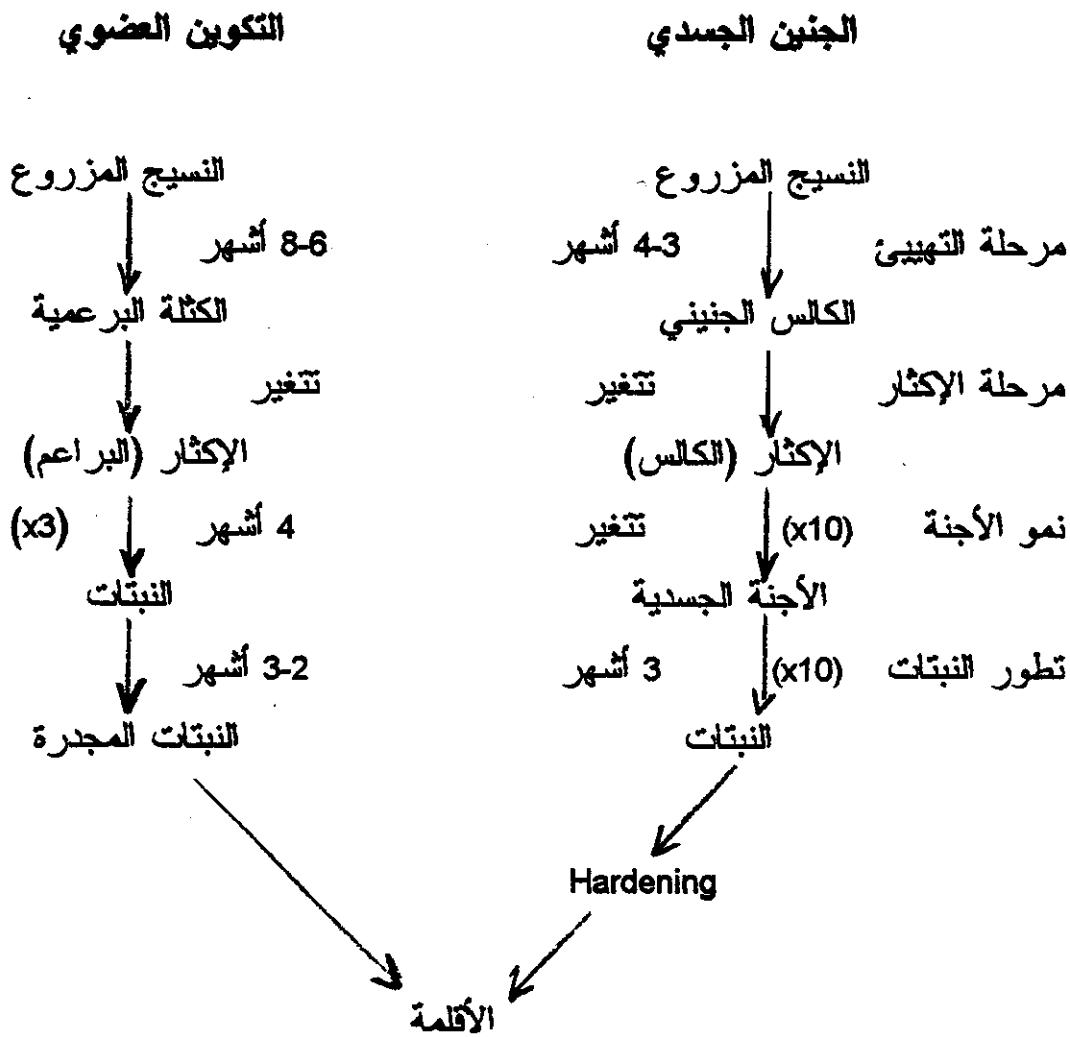
مزايا :

- تقنية سريعة مقارنة بتقنية التكوين العضوي
- تضمن نسبة إكثار أكبر

سلبيات :

- إمكان حدوث تغيرات وراثية

مقارنة بين تقنيتي التكوين العضوي
و فصل الجنين الجسدي



مبدأ التقنية

المرحلة	الأعضاء المنتوجة	الوسط الغذائي
التهييئ	الكالس	MS + 2,4 D + 2IP
الإكثار	الكالس + البويقات الجنينية	MS+ 2,4-D + 2IP
نمو الأجنة	الأجنة الجسدية	MS بدون هرمونات
تطور النيتات	نبتات كاملة	MS/2 + خليط أوكسين و سيطوكينين

مشروع البحوث في تقنية الأجنة الجسدية

- تحديد العوامل المسببة لاسوداد الأنسجة
- تحديد الحالة الفيزيولوجية الملائمة للزرع
- دراسة العوامل المتحكمة في مرحلة الكالس
- دراسة الإكثار في مرحلة الكالس و الأجنة.
- دراسة التغيرات الوراثية

فصل الأجنة الجسدية كوسيلة للإكثار

- نوعية النسيج المزروع
  - حسب المواصفات الوراثية للأم
  - حسب فصول السنة (الحالة الفيزيولوجية)
  - حسب مصدر النسيج

- الوسط الغذائي:
  - التركيبة الأساسية : ((MS (62)
  - الفيتامينات : ب ، و الإنوسيطول و الخليط المركب.
  - الهورمونات : 100 مغ/ليتر
    10 مغ /ليتر

- المواد المضادة للأكسدة (Adsorbants)
  - الفحم المنشط : 3 غ إلى 300 مغ/ليتر
  - PVP

العوامل البيئية :
- الحرارة : 28 درجة نهارا و 21 ليلا
- الضوء : . المرحلة الأولى في الظلام
  . ثم ارتفاع الإشعاع الضوئي تدريجيا

إكثار النخيل بواسطة زراعة الأنسجة:
تجدير و أقلمة النبتات (محمد أنجارن)

مراحل إكثار النخيل:

1- تهيئ البراعم Establissement

2- إكثار البراعم

3- تجدير النبتات

4- الأقلمة

5- غرس في الواحة

A- التجدير:

* تحولات بيوكيماوية و سيطولوجيا
* ظهور انقسام الخلايا ---> تجمعات الخلايا المرستيمية
* تكوين المرستيمات الجدرية
* نمو المرستيم الجدري و بروز الجدر.

عوامل التجدير:

I- نوعية الجزء النباتي المجدر

II- المواد المعدنية، الهرمونية،....

III- الظروف (حرارة T°c، رطوبة، ضوء،...)

I- نوعية الجزء النباتي :

* CORRELATIONS: تأثيرات الأعضاء الأخرى

. وجود أوراق في العقلة

. وجود جذر رئيسي

. المواد المخزونة داخل الأنسجة

* عمر النسيج /عمر النبات الأم

. شجرة الأم كبيرة العمر ---> صعوبة التجدير

. كيف نتفادى هذا المشكل ?

1- اختيار النباتات الصغيرة

2- تشبيب الشجرة Rejeuvenilisation

- تقليم الشجرة

- إكثار Subcultures

- تطعيم Micrografting

- الهرمونات

II- المواد المعدنية ، العضوية، الهرمونية،...

* المواد المعدنية:

. المواد الكبرى

. تأثير النيتروجين

. المواد المعدنية الأخرى

* المواي العضوية:

. الفيتامينات Vitamines

– قليل من الدراسات

– بعض الفيتامينات تعمل على التجدير: Vit D

– بعض الفيتامينات الأخرى مثل Riboflavin تحول دون التجدير.

. الهورمونات Growth regulators

– بعض النباتات

. ظهور الجدور التلقائي بعد المرور إلى وسط غذائي بدون هرمونات

– بعض النباتات الأخرى : ضرورة استعمال الهرمونات:

. الأكسينات Auxins

التراكيز المستعملة :

NAA : 1 - 0,05 mg/l

IAA : 10 - 0,1 mg/l

IBA : 3 - 0,5 mg/l

2,4-D و 2,4,5-T قليلة الاستعمال لأنها تسبب ظهور Callus

. السطوكنين Cytokinins

– تحول دون التجدير

– في بعض الأحيان الكمية المخزونة داخل النسيج تعرقل التجدير

. الجبيرلين GA3

– في أغلبية الحالات GA3 يحول دون التجدير

– Tryptophane + GA3 ---> ⊕ تجدير

. السكر:

- عند بعض النباتات Juglans : غمر العقل في محلول غني بالسكر ---> زيادة تجدير
- السكر يكون أكثر فعالية في الظلام أو إضافة Photosynthesis Inhibitors

. سكر / نتروجين Sucrose/ Azote

- عند الورود (Rose) MS(1962) ---> 70 غرام سكر للحصول على نفس النتيجة ب 30 غرام سكر يجب تخفيض تركيز النتروجين.
- عند Suggar Bet ?

استعمال : N 16 mM - 2% سكر يساوي

N 5 mM - 4% سكر

لهذا فإن تركيز السكر الذي يجب استعماله يختلف حسب :

. البيئة الغذائية المستعملة

. النبتات : الزيتون تركيز عالي، التفاح 2% إلى 5,2 %

* الفحم المنشط : Charcoal

. يساعد على التجدير عند أغلبية النباتات : تفاح، موز، Fucus، Rododendron....

. تأثير الفحم المنشط :

. امتصاص المواد الفينولية ?

. منع تسرب الضوء إلى الجدور ?

. تأثيرات أخرى ?

. التركيزات المرتفعة يمكن أن تحول دون التجدير (أكثر من 3g/l).

(عند Cinchona استعمال 3g/l حال دون التجدير رغم استعمال IBA)

* المواد الفينولية Phénols: Phloroglucinol عند التفاح

III- الظروف أثناء التجدير:

* الضوء :

. شدة الضوء ---> ⊖ التجدير

- استعمال الظلام للتجدير (4 - 15 يوم)

تفاح - Cherry-...

. نوعية الضوء:

الضوء الأحمر ---> ⊕ التجدير

الضوء الأزرق ---> ⊕ نمو الجدور

* Gaz exchange : Aeration:

حسب البيئة التي تنمو فيها الجدور نرى :

. في البيئة الصلبة ------> نمو ضعيف

. في البيئة المائية ------> نمو متوسط

. في البيئة المائية المحركة ------> نمو سريع

. بيئات مختلفة : Rock wool , Virmiculite

* الحرارة :

تباين النتائج حسب النباتات

. تفاح مثلا : 28 °/22°c ----> تجدير جيد

23°c/17°c ----> انخفاض عدد الجدور

. Eucalyptus ----> تجدير أحسن في حرارة منخفضة

التقنيات الحديثة في التجدير

. تجدير خارج الأنبوب Ex vitro Rooting : Asparagus، البطاطيس، Philododendron،....

B- الأقلمة ACCLIMATATION عند النخيل

المراحل:

1- تجدير النباتات

2- تهيئ النباتات للأقلمة

3- الأقلمة في البيت الزجاجي

1- تجدير النبتات :

. داخل الأنبوب الزجاجي

. وسط غذائي خاص

. جدور جيدة (أكثر من 5 جدور)

2- تهييء النباتات للأقلمة:

. الأقلمة تخص نباتات ذات الصفات الآتية :

- 2 - 3 ورقات سالمة
- منطقة التاج عريضة
- جدور متعددة

. التهييء للأقلمة :

- زيادة من شدة الضوء إلى 5000 لكس
- نقص من تركيبة السكر ----> 15 غرام / ليتر

3- الأقلمة داخل البيت الزجاجي :

العوامل التي تأثر على نسبة النجاح في الأقلمة

. نوعية النباتات

. ظروف الحرارة، رطوبة، الضوء أثناء الأقلمة

. الخدمات : ري، تسميد، رش بالمبيدات،

أهم العوائق التي تعرقل إكثار النخيل عن طريق زراعة الأنسجة

1- التلوث الداخلي للأنسجة
2- صعوبة الحصول على البراعم الأولى
3- عدم استجابة بعض الأصناف
4- تباين النتائج حسب الحالة الفزيولوجية للفسيلة
5- تدني نسبة الإكثار عند بعض الأصناف
6- التلوث البني – الإسمرار Browning
7- الحالة الزجاجية للأنسجة Vitrification
8- صعوبة الأقلمة
9- الفسائل غير كافية – أو غير موجودة – عند بعض الأصناف

مشكل التلوث البني – الإسمرار : Browning

1- الأجزاء المزروعة تفرز بعض المواد الفنولية Phenols
2- هذه المواد تتعرض للأكسدة Oxidation إذا توفرت :
- الأنزيمات اللازمة
- الظروف الملائمة للأكسدة

تأثير الإسمرار على الأنسجة:

- اسمرار النسيج النباتي
- انخفاض النمو و نسبة التكاثر
- موت الأجزاء في بعض الحالات

أنواع الأنسجة المتعرضة للإسمرار

- الأجزاء الأولى المزروعة
- البراعم في طور الإكثار
- الكالس Callus
- المحاليل المزروعة Cell suspensions

التقنيات المستعملة لتفادي الإسمرار:

- اختيار الأنسجة المزروعة
- تفادي تراكم المواد الفنولية
- عدم توفير ظروف الأكسدة
- تخفيض نشاط الأنزيمات اللازمة للأكسدة

1- اختيار الأنسجة :

- اختيار الأنسجة الشابة، الحديثة التكوين
- تجنب الأنسجة المخشبة
- العناية بالنبات الأم
- عدم استعمال Oxydants أثناء التعقيم
- غسل الأجزاء من بقايا المحاليل المستعملة للتعقيم

2- تفادي تراكم المواد الفينولية:

- غسل الأجزاء المراد زرعها بالماء عدة مرات
- نقل الأجزاء : تجديد البيئة الغذائية
- امتصاص المواد الفنولية: . الفحم المنشط Charcoal
  . ال PVP

3- عدم توفير ظروف الأكسدة Oxydation:

الظروف الملائمة للأكسدة هي :

- Redox Potential مرتفع
- شدة الضوء
- الحرارة
- الهواء و خصوصا الأ Oxygene

* استعمال بعض المواد التي تعمل على تخفيض Potential redox:

Mercaptoethanol ، Dithiothriol ،Cysteine ،Citric Acid ، Ascorbic Acid، Glutathion،....

* تفادي عرض الأنسجة للضوء الشديد:

الضوء يساعد على : . تكوين المواد الفنولية

. الأكسدة

* تفادي عرض الأنسجة للهواء و الحرارة لمدة طويلة

- السرعة في العمل
- بعض الباحثين: قطع الأجزاء تحت الماء
- تخفيض الحرارة أثناء العمل في Laminar flow

* التخفيض من نشاط الأنزيمات:

- أحسن نشاط للأنزيمات Peroxydases ، phenolosydases يكون في pH=6

------> تخفيض pH يساعد على انخفاض الإسمرار

* بعض مكونات البيئة الغذائية :

- Cytokinins ------> الإسمرار
- Carbohydrates : تعتبر من المواد اللازمة لإنتاج ال Polyphenols

مشكل الإسمرار عند النخيل:

يظهر الإسمرار عند أنسجة النخيل تبعا للعوامل الآتية:

- الأصناف
- نوعية الأنسجة المزروعة
- الحالة الصحية للأنسجة
- تكوين البيئة الغذائية
- عمر أو وزن الفسيلة
- العناية و معاملة الأنسجة

– تأثير الإسمرار على أنسجة النخيل:

- إنخفاض النمو
- عند بعض الأصناف : اسمرار في مرحلة الإكثار ---> تدني نسبة الإكثار
- إنخفاض نمو الجذور

– بعض الدراسات التي أجريت عند النخيل:

- تأثير الفحم المنشط على الإسمرار
- تأثير ال PVP
- تأثير بعض المحاليل Antioxydants
- تأثير تركيز السكر
- تأثير البيئة الغذائية

VITRIFICATION

حالة فزيولوجية Physiological disorder

تؤدي إلى انخفاض النمو، الإكثار و الإسمرار ثم الموت أحيانا

- الأعراض الظاهرة:

* نسيج غني بالماء
* تجمع الماء في Intercellular spaces
* نسيج ضعيف يتكسر بسرعة Low lignification
* غشا الورقة Cuticule رقيق جدا
* عدد Stomates قليل – اختلال وظيفتها.

- الأعراض البوكيماوية:

* Dry weight منخفض
* كمية lignin منخفضة
* كمية Cellulose منخفضة
* قليل من Chlorophyll
* كثرة إنتاج Ethylene
* سرعة نزول pH البيئة الغذائية
* اختلال نشاط عدد من الأنزيمات

- العوامل التي تساعد على ال Vitrification

* استعمال البيئات الغذائية، الغنية بالمواد المعدنية

Gamborg , Knop, white / MS(1962)

* تركيز البيئة من NH_4^+ : عند Salix babylonica ↑ [NH^+] ---> Vitrification
* استعمال بيئات شبه سائلة أو سائلة

* استعمال تراكيز عالية من Cytokinins (عدم توازن البيئة من الناحية الهرمونية)
* رطوبة عالية داخل الأنبوب الزجاجي
* تراكم الغازات داخل الأنبوب خصوصا Ethylene

- لتفادي Vitrification:
* استعمال البيئات الصلبة
* تخفيض من كمية ال Cytokinins
* تخفيض من كمية NH_4^+
* استعمال أغطية تساعد على تسرب الغازات
* الزيادة في تركيز الأ Agar (10 g/ليتر)

في بعض الحالات :
* استعمال $CoCl_2$: 2-3 ايام
* استعمال البرودة 3-4°c (3-4 أسابيع)
* الضوء الشديد أكثر من (15 000 لكس)

- عند النخيل :
* تخفيض من NH4+
* تجنب البيئة المائية و الشبه المائية

PREMIER CYCLE DE FORMATION SUR
LA CULTURE IN VITRO DU PALMIER DATTIER
MARRAKECH 9 - 23 OCTOBRE 1994
****

APPLICATIONS OF TISSUE CULTURE TECHNOLOGY TO WOODY SPECIES

Pr. WALALI LOUDYI D.
Département d'Horticulture
Institut Agronomique et
Vétérinaire Hassan II
- RABAT -

APPLICATIONS OF TISSUE CULTURE TECHNOLOGY TO WOODY SPECIES

1/ METHODS OF PROPAGATION IN VITRO WITH WOODY PLANTS

1.1/ SHOOT CULTURE

1.1.1/ TECHNIQUES

1.1.2/ CULTURE INITIATION

1.1.3/ APPARENT REJUVENATION DURING CULTURE IN VITRO

1.1.4/ CULTURE MEDIA

1.1.5/ ROOTING

1.2/ ADVENTITIOUS REGENERATION

1.3/ PROTOPLAST CULTURE

2/ APPLICATIONS OF PROPAGATION IN VITRO WITH WOODY PLANTS

2.1/ MASS PROPAGATION

2.2/ PERFORMANCE EX-VITRO AND APPARENT REJUVENATION

2.3/ ACCELERATED FLOWERING

2.4/ IMPROVED CONVENTIONAL PROPAGATION

2.5/ SELF-ROOTED FRUIT TREES

3/ CONCLUSIONS AND FUTURE PROSPECTS

APPLICATIONS OF TISSUE CULTURE TECHNOLOGY TO WOODY SPECIES

1/ METHODS OF PROPAGATION IN VITRO WITH WOODY PLANTS

- Shoot culture with the proliferation of lateral shoots is the generally accepted method of propagation in vitro. It maintains the genetic integrity of a clone.

- Other methods for regenerating adventitious shoots or embryos from explants : callus, somatic embryos, protoplasts. More rapid propagation than with shoot culture, but may give rise sometimes to genetic variants or somaclones.

- Undesirable for propagation.

- May be exploited for crop improvement (if they show desirable characters).

- Pre-requisite for application of gene transfer techniques via tissue culture in vitro.

Juvenility and rejuvenation is of fundamental significance to the vegetative propagation of woody plants by both in vivo and in vitro methods.

1.1/ Shoot culture

Has been applied successfully to temperate, subtropical and tropical fruits (scion and rootstock cultivars).

Apple (James and THURBON, 1979)
Avocato (HARTY, 1985)
Citrus (NAVARRO et al., 1975)

Grape (THIES and GRAVES, 1992 ; ROBACKER and CHANG, 1992)
Kiwi (PEDROSO et al., 1992)
Olive (WALALI LOUDYI, 1989)
Peach (HAMMERSCHLAG et al., 1979)

temperate and tropical angiosperm and gymnosperm forest trees and woody ornementals (BAJAJ, 1986 ; 1989).

Many woody plants remain recalcitrant to the shoot culture method. Cultivars and even clones of the same cultivar vary in response to culture in vitro.
(Problems related to juvenility, maturation, growth pattern, insufficiency of research).

- The more juvenile the tissues, the greater is the chance of success with micropropagation.
- Species wich show a continuous growth pattern throughout the season are usualy easier to micropropagate than species characterised by episodic or flushing growth (Mc COWN, 1986).

1.1.1/ Techniques

- Similar to those used with herbaceous plants.
  Some aspects are unique to woody plants - These relate to
- initiation of culture in vitro from donor plants
- apparent rejuvenation during culture
- composition of culture media
- induction of adventitious rooting.

1.1.2/ Culture initiation

- Importance of the physiological status of the shoot explants used to initiate culture in vitro from adult plants.

- Failure of explants to grow when placed on culture media may be due to excessive polyphenol oxidation which often leads to tissue necrosis.

With both angiosperm and gymnosperm forest trees it is advantageous to use explants from portions of adult trees where rejuvenation has occured.

a. naturally, as with the vigorous shoots (suckers) arising from roots.
b. has been indiced, as a result of pruning, grafting onto seedling or growth regulator application (FRANCLET et al. 1980).

Overcoming difficulties in establishing initial explants of various species have been obtained by :

- soaking explants in water (VIEITEZ and VIEITEZ, 1980).
- soaking explants in Diethyldithiocarbamic acid (DIECA) (WALALI LOUDYI, 1989).
- addition of glutathione (RUGINI and FONTANAZZA, 1981) or addition of phloroglucinol (BATERIOLA-LUCA and MULLINS, 1984) to culture media.
- maintaining donor plants in darkness or low light (MARKS and SIMPSON, 1990).

1.1.3/ Apparent rejuvenation during culture in vitro

Succes has been achieved with adult subjects which are difficult or impossible to propagate by conventional methods. Studies with temperate fruit trees (JONES, 1991) and some forest trees (**Sequoi sempervirens** in FOURET et al., 1984) suggest that the basis of this in vitro advantage could be a progressive increase in propagation potential with continued culture in vitro over several months or longer on a culture medium which contains a cytokinin.

This increase in propagation potential could be regarded as a manifestation of a process of rejuvenation in response to culture in vitro.

1.1.4/ Culture media

MURASHIGE and SKOOG (1962), but in many times a modifies MS which contains half or 1/4 concentration of MS macro-elements.

- Woody plant medium of LLOYD and Mc COWN (1980).
- Correlation between growing conditions in vivo and culture medium requirements in vitro (Rhododendron, Kalmia and Magnolia) which grow well on poor and often acid soil require low nutrient concentrations in vitro. Some benefit from a reduction in the pH of culture media (MARKS, 1986).

Substances occuring naturally in some woody species lead to improved responses in vitro when included in culture media. The phenolic compounds phloroglucinol and phloridzin occuring naturally in **Mallus spp** have improved propagation potential of some cultivars of Malus and Prunus (JONES, 1991). With species of Syringa. Alnus and Malus the capacity to metabolise certain carbon sources was reflected by the sugar and sugar alcohols in the sieve-tube exudate of a given genus (WELANDER et al., 1989).

1.1.5/ Rooting

More than 70% of shoots originating from adult woody plants were reported to root in vitro within 4-6 weeks of transfer to a rooting medium. Rooting directly into compost following a dipping treatment with an auxin. Was reported (simplicity and reduced economic cost).

High levels of rooting remains a problem with many adult woody plants, with gymnosperms being particurarly problematic in this respect.

Many factors such as presence of lateral organ (leaf and/or bud) juvenility, auxins, peroxidases, phenols, ethylene interfere at the regulation of adventitious rooting.

1.2/ Adventitious regeneration

Almost all successful adventitious shoot or embryo regeneration with woody plants was with juvenile material. Exceptions to this: - several species of Coffea were multiplied to high frequency through embryos from leaf explants (SONDAHL, 1982).

- shoot or embryo regeneration with about 20 scion and rootstock cultivars of apple. The regeneration was from leaf tissue of shoot cultures with or without the intervention of a callus phase, using culture media based on that of M.S (JONES, 1991).

Similar succes reported with some angiosperm forest trees such as species of Oak (**Quercus ilex**), chestnut (**Aesculus hippocastanum**) and Willow (**Salix viminalis**) (HAMMATT in JONES, 1991).

Considerable variation with genotype in regeneration capacity and the pattern of response appears to be under genetic control (JAMES, 1987).

1.3/ Protoplast culture

Few reports of plant being produced by protoplast culture. Protoplasts-to-tree systems have been developed for genotypes of Citrus and closely related species (VARDI et al., 1990).

Malus, Prunus and Pyrus protoplasts have been successfully regenerated from adult clones (OCHATT, 1990). Ulmus, Populus, Picea and Larix ssp have been regenerated from protoplast cultures (HAMMATT in JONES, 1991).

2/ APPLICATION OF PROPAGATION IN VITRO WITH WOODY PLANTS

Most application with the shoot culture leading in some cases to mass propagation on a commercial scale.

Several examples of the use of shoot culture to produce rejuvenated clones which remain exceptionally easy to propagate in the long-term by conventional methods.

By contrast, almost all investigations with adventitious regeneration remain at the laboratory stage of development and potential applications are only beginning to be explored.

2.1/ Mass propagation

Several commercial laboratories specialised in woody plants, mainly ornemental and to a lesser extend fruit trees.

In Italy peach x almond hybrid rootstocks were multiplied of about 10 million plants annually.

In France, Delbard nurseries propagate millions of apple, pear and rose rootstocks by tissus culture.

- Commercial production of woody ornemental on a smaller scale.

Still remain technical problems and the high economic cost of production.

Need to apply results of recent research to reduce these costs.

The replacement of rooting in vitro by direct methods, possibly in conjunction with fogging systems should give major saving.

Other cost reductions by the use of nutrient replenishment through adding fresh liquid culture medium to 'spent' agar medium and continually harvesting shoots from a culture vessels, thus avoiding the need for constant subculturing. Automation or robotics used in combination with such cost-saving techniques could transform the economics of propagation (LEVIN & VASIL, 1989).

2.2/ Performance ex-vitro and apparent rejuvenation

Few reports of long-term field performance of woody plants from propagation in vitro.

Apple trees have been most studied. Scion and rootstock cultivars produced in vitro were more vigorous, produced more suckers and came into cropping one year later than conventionally propagated counterparts.

The enhanced vigour and tardiness in cropping observed in some cases with apple trees suggest that propagation in vitro may result in tree rejuvenation. The delay in cropping would be disadvantageous for fruit growing but the increased vigour could be of value in the nursery and the increased wood production could be particularly advantageous if applied to forest trees.

Propagation in vitro of elite selections of Eucalyptus was three times faster and more uniform than that of trees from seed of the elite selections. More over, the trees from in vitro propagation flowered two and a half years in contrast to 4-5 years with the seedling trees (GUPTA and MASCARENHAS, 1987).

2.3/ Accelerated flowering

Although propagation in vitro sometimes appears to lead to a delay in flowering, there are important examples of accelerated flowering as a result of such propagation as with loblolly pine (**Pinus taeda**) (Mc KEAND, 1985) and two species of bamboo (**Bambusa**

arundinaceae Willd and Dendrocalanus brandisii Kurts) (NADGAUDA et al., 1990). With bamboo flowers were produced in vitro after only 3 months of culture whereas seedling of this species grow without flowering for about 30 years. This accelerated flowering with bamboo has opened the may to conventional breeding with one of the most important structural raw materials in the word.

2.4/ Improved conventional propagation

The apparent rejuvenation of trees from propagation in vitro appears to lead to the advantage of the production of clones which remain exceptionally easy to propagate by conventional methods. Several examples with temperate fruit trees of such improved propagation. With the apple rootstocks M9 which is normally difficult to propagate there was increased shoot production and improved rooting with both summer and winter shoot cuttings following propagation in vitro (WEBSTER & JONES, 1989). Similar results were obtained with some rootstocks of Pyrus that are normally almost impossible to propagate (JONES and WEBSTER, 1989). Such improved propagation may be sustained for long periods. With the plum rootstocks cv 'Pixy' (**Prunus insititia**) increased rooting from cuttings from stock plants from propagation in vitro was still evident nine years after establishment of the plants in the field (HOWARD et al., 1989).

2.5/ Self-rooted fruit trees

The success of propagation in vitro with fruit tree scion cultivars that are difficult to root by conventional methods make feasible the production on a large scale of self-rooted trees. These could be competitive economically with traditional grafted trees which demand expensive nursery facilities and skills.

Results with self-rooted trees show that the vigour and cropping efficiency are cultivar specific and most are too vigorous for modern high density orchards (ZIMMERMAN, 1986). Nevertheless, some apple cultivars such Gala which is naturally

precocious in flowering appear to be satisfactory when self-rooted at least under certain conditions (WEBSTER et al., 1985).

3/ CONCLUSIONS AND FUTURE PROSPECTS

Thus far the shoot culture method is oustanding in its application to the widest range of woody plants although commercial application has often not been realised for the technical and economic reasons already mentioned. In the near future, the most important application may well come from conventional propagation of apparently rejuvenated material. Improved understanding of the physiological and biochemical basis of juvenility and maturation appears to merit some priority as a research topic. This could lead to further exploitation of rejuvenation with woody plants.

Other priority: early detection of superior trees for cloning by propagation in vitro possibly through use of isoenzyme analysis (MANGANARIS and ALSTON, 1987) or genetic probes (COGHLAN, 1990).

An alternative to shoot culture, embryogenesis from callus or cell suspensions may offer more attractive possibilities in the term, possibly in conjunction with encapsulation of embryos to produce artificial seed (KIM and JANICK, 1990). The appropriate manipulations in vitro would minimise possible problems with embryogenesis from somaclonal variation (KARP, 1989).

The production of new varieties with the applications of in vitro methods. Normal breeding is very time consuming and takes many years.

Manipulation of ploïdy, production of somaclones with callus, cells or protoplasts that are genetically variable or have been subjected to mutagenic agents. The value of haploid plants is well documented and such plants of Malus (WU, 1982) and

Aesculus (RADOJEVIC et al., 1989) have been produced on a limited scale following regeneration from anthers and microspores.

Somaclonal variation has been detected for Populus with respect to tree height and branch pattern (LESTER & BERBEE, 1977) and also resistance to leaf spot fungus (**Septoria musiva**) OSTRY & SKILLING, 1988) and leaf rust (**Melamspora medusae**) (PRAKASK & THIELGES, 1989). Somaclonal variations have been reported also for peach with enhanced resistance to leaf spot disease (**Xanthomonas campestris pu pruni**) (HAMMERSCHLAG, 1988) and also for apple with enhanced resistance to fireblight disease (**Erwinia amylovora**). Long term field trials is now required to test the effictiveness and stability of all these somaclones from trees.

In the longer application of gene transfer techniques should have major impact on the breeding to woody plants.

In relation to protoplast fusion, somatic hybrid plants within the genus Citrus and related wild genus Microcitrus were reported (VARDI et al., 1990).

Somatic hybrids in the Rosaceae involving fusions of protoplats of diploid wild pear (**Pyrus communis**) and triploid cherry rootstock 'Colt' (**Prunus avium x P. pseudocerasus**) (OCHATT, 1990) were reported.

Incorporating foreign DNA into protoplasts of trees have been reported with some gymnosperms (GUPTA et al., 1988) and alder (**Alnus incana**) (SEQUIN & LALONDE, 1988).

With respect to Agrobacterium-mediated gene transfer, transgenic plants of Juglans (Mc GRANAHAN, 1988) and Malus (JAMES et al., 1989) have been recovered which show resistance to the antibiotic kanamycin. Transgenic plants of Populus have also been produced which express a mutant bacterial gene that confers some tolerance to the herbicide glyphosphate (FILLATI et al., 1987).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Aitken-Christie J., Singh A.P., Davies H. (1988).** Genetic manipulation of woody plants. In : Hanover J.W., Keathley D.E., Plenum Press. New York: 413-32.

2. **Aly Mohammed A.M., Fjellstrom R.G., Mc Granahan G.H., and Parfitt D.E., 1992.** Origin of walnut somatic embryos determined by RFLP and Isozyme analysis. HortScience, Vol 27(1) : 61-63.

3. **Ammirato P.V., and Styer D.J., 1985.** Strategies for large scale manipulation of somatic embryos in suspension culture. In: Zaitlin M., Day P. and Hollaender A., (Eds) Biotechnology in Plant Science : Relevance to Agriculture in the Eighties. Academic Press, New York : 161-178.

4. **Arrillaga I., Marzo T., and Segura J., 1992.** Embryo culture of Fraxinus ornus and Sorbus domestica Removes seed dormancy HortScience, Vol 27(4) 371.

5. **Bajaj Y.P.S., 1986.** Biotechnology in Agriculture and Forestry. 1. Trees I - Springer-Verlag - Berlin - Heidelberg.

6. **Bajaj Y.P.S., 1989.** Biotechnology in Agriculture and Forestry. 5. - Trees II - Springer-Verlag - Berlin - Heidelberg.

7. **Ball E.A., 1950.** Differentiation in a callus culture of Sequoia sempervirens. Growth 14 : 295-325.

8. **Beauchesne G., 1983.** Vegetative propagation of date palm (Phoenix dactylifera L.) by in vitro culture. 1 st. Symp. Date Palm 1982. King Faisal Univ., Hofuf Saudi Arabia, pp. 698-699.

9. **Berg L.A., Bustamante M., 1974.** Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas.

Phytopathology 64 : 320-322.

10. **Boxus Ph., Quoirin M., et laine J.M., 1977.** Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture in Plant cell, tissue, and organ culture. Ed. Reinert and Y.P.S. Bajaj - Springer-Verlag - Berlin. 130-143.

11. **Boxus P., and Druart P., 1986.** Virus-free trees through tissue culture. In Biotechnology in Agriculture and Forestry 1 - Trees I - Ed. Bajaj - Springer-Verlag - Berlin - Heidelberg: 24-30.

12. **Carré M., Martin-Tanguy J., Mussillon P., Martin C., 1979.** La culture de méristèmes et la multiplication végétative in vitro, au service de la pépinière. Bull. Petits Fruits. INVUFLEC, 14 : 7-66.

13. **Csinos A. and Hendrix W., 1977.** Toxin produced by Phytophthora cryptogea active on excised tobacco leaves. Can. J. Bot. 55 : 1156-1162.

14. **Daguin F., Guyot E., Cavan A-C., Eschbach L., et Letouzé R., 1992.** Nitric and ammoniacal nutrition in tissue culture = behaviour of three Mahonia clones - Life Adv Sc., in press.

15. **Dameri R.M., Caffaro L., Gastaldo P., Profumo P., 1986.** Histological study of calli and embryoids from leaf explants of Aesculus hippocastanum L. J. Plant Physiol., 126: 93-6.

16. **Dutcher R.D., Powell L.E., 1972.** Culture of apple shoots from buds in vitro. J. Am. Soc. Hort. Sci., 97 : 511-4.

17. **Féraud-Keller C., Espagnac H. 1988.** Conditions d'apparition d'une embryogenèse somatique sur des cals issus de la culture de tissus foliaires du chene vert (Quercus ilex). Can. J. Bot., 67 : 1066-70.

18. **Galzy R., 1972.** La culture in vitro des apex de Vitis rupestris. C.R. Acad. Sci. Ser. D. 274 : 210-213.

19. **Gautheret R., 1954.** Catalogue des cultures de tissus végétaux. Rev. Gén. Bot., 61 : 672-702.

20. **Hammerschlag F.A., Bauchan G.R., Scorza R. 1987.** Factors influencing in vitro multiplication and rooting of peach cultivars. Plant Cell Tiss Org Cult., 8 : 243-8.

21. **Hansen A.J., Lane D., 1983.** Inhibition of apple chlorotic leaf spot virus in apple meristem tissue. Plant Dis Rep. (in press).

22. **Harty P., 1985.** Propagation of avocado by tissue culture: Development of a culture medium for multiplication of shoots South African Avocado Growers Assoc. Yrbk 8 : 70-71.

23. **Huang Sc., Millikan D.F., 1980.** In micrografting of apple shoot tips. HortSci., 15 : 741-743.

24. **Jacoli G.G., 1978.** Sequential degeneration of mycoplasma-like bodies in plant tissue culture infected with aster yellows. Can. J. Bot. 56 : 133-140.

25. **James D.J., Thurbon I.J., 1979.** Rapid in vitro rooting of the apple rootstock M9. J. Hort Sci., 54 : 309-11.

26. **James D.J. et Dandekar A.M., 1991.** Regeneration and transformation of apple (Malus pumila Mill). Plant Tissue Culture Manual B8 - 1 - 18. Kluwer Academic Publishers.

27. **Jones O.P., 1967.** Effect of benzyl adenine on isolated apple shoots. Nature, 215 : 1514.

28. **Jones O.P., 1991.** The role of biotechnology in the multip lication and improvement of woody plants. Acta Horticultura 289 : 35-44.

29. **Lee-Stadelmann O.Y., Lee S.W., Hackett W.P., Read P.E. 1989.** The formation of adventitions buds in vitro on micro cross sections of hybrid populus midveins. Plant Sci., 61 : 263-72.

30. **Ma S.S, Shii C.T., 1974.** Growing banana plantlets fron adventitious buds. Chung-kuo Yuan I Hsueh Hui (China Hortic) 20 : 6-12 (in chinese).

31. **Mc Cown B.H, 1986.** Tissue culture as a plant productior system for horticultural crops. In: Zimmerman et al., eds Dordrecht: Martinus Nijhoff, 33-43.

32. **Mc Cown B.H., Sellmer J.C. (1987).** Cell and tissue culture in Forestry, vol 1. In : Bonga J.M., Durzan D.J. eds. Drodrecht: Martinus Nijhoff, 4-16.

33. **Mc Cown B.H., Zeldin E.L., Pinkalla H.A., Dedolph R.R. (1988).** Genetic manipulation of woody plants. In : Hanover J.W., Heathley D.E., eds New York: Plenum Press, 149-66.

34. **Morel G. et Martin C., 1952.** Guerison de Dahlia atteinte d'une maladie à virus. C.R. Acad. Sci., 235 : 1324-1325.

35. **Morel G. et Martin C., 1955.** Guérison de pomme de terre atteintes de maladies à virus. C.R. Acad. Agr. Fr., 41 : 472 -475.

36. **Mosella Chancel L., Signoret P.A., Jonard R., 1980.** Sur la mise au point de techniques de microgreffage d'apex en vue de l'élimination de deux types de particules virales chez le pecher (Prunus persica, Batsch). C.R. Acad. Sci. Ser. D 290: 287-290.

METHODS OF PRODUCING PLANTS IN VITRO

DR. AAOUINE

1- ADVANTITIOUS SHOOT FORMATION AND ROOTING OF SHOOTS

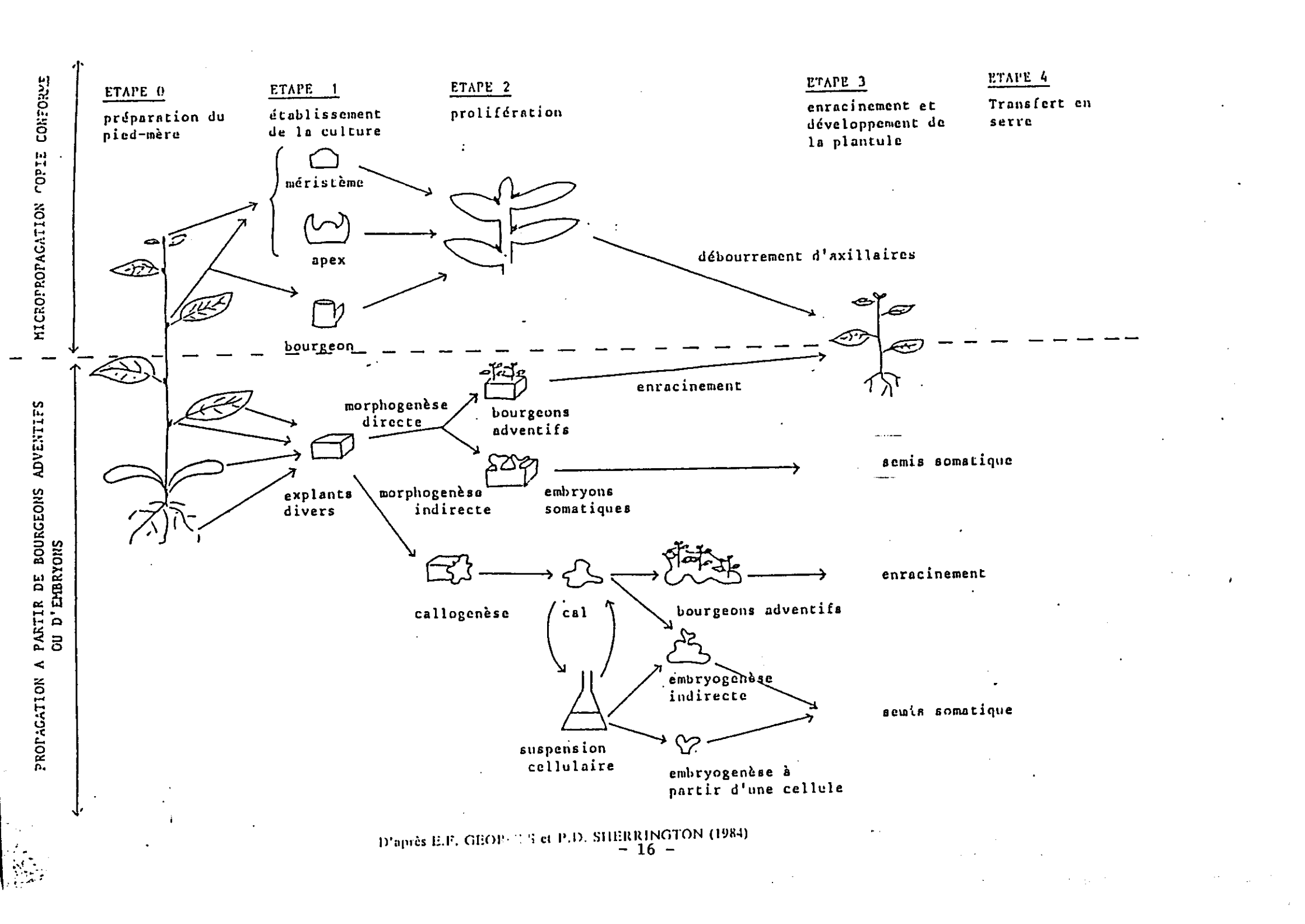
2- ADVENTIVE EMBRYOGENISIS (SOMATIC CELL EMBRYOGENESIS, ANDROGENESIS, PARTHENOGENESIS)

3- ENHANCED AXILLARY BRANCHING OF SHOOTS AND ROOTING OF BRANCHES (FOR CLONAL PROPAGATION ONLY)

4- SHOOT APEX CULTURE (FOR PATHOGEN ELIMINATION ONLY)

5- SHOOT APEX GRAFTING (FOR PATHOGEN ELIMINATION ONLY)

6- DEVELOPMENT FROM ZYGOTE IN EMBRYO, OVULE AND OVULARY CULTURES



D'après E.F. GEORGE et P.D. SHERRINGTON (1984)

1. PROCESSUS D'ELABORATION DE LA PRODUCTION INDUSTRIELLE

PHASE	OBJECTIFS RECHERCHES
I: *ETUDES IN VITRO*	- Détermination de la nature de l'explant à utiliser - Etablissement des cultures propres - Choix de la technique de multiplication à utiliser - Optimisation du taux de multiplication (milieux et environnement de culture) - Préparation des vitroplants pour le transfert in vivo (enracinement, durcissement, dormance...)
II: *ETUDES POST IN VITRO*	- Sevrage - Maitrise de l'acclimatation (composition du substrat, irrigation, fertilisation, ombrage, protéction phytosanitaire,...) - Détermination de l'infrastructure requise - Vérification de la conformité génétique
III: *PRODUCTION INDUSTRIELLE*	- Adaptation, à grande échelle, des résultats de la recherche - Etablissement d'un réseau de commercialisation

PARAMETERS NEEDING EVALUATION: THE EXPLANT

A- ORGAN SOURCE WITHIN PLANT
B- DEVELOPMENTAL PHASE: JUVENILITY VS ADULT
C- AGE OF EXPLANT SOURCE
D- PRECULTURE TREATMENT OF EXPLANT SOURCE

1- ENHANCE DISINFESTATION & PATHOGEN-FREE EXPLANTS
2- SATISFY DORMANCY NEEDS: CHILLING, PHTOPERIOD
3- ADULT-JUVENILE REVERSAL

E- EXPLANT SIZE

1- SURVIVAL FREQUENCY
2- QUICKNESS OF GROWTH INITIATION
3- INFECTION PROBABILITY
4- PROBABILITY OF VARIANTS

F- EXPLANTING SEASON

PARAMETERS NEEDING EVALUATION: NUTRIENT MEDIUM

I- CHEMICAL COMPOSITION

A- INORGANIC SALT MIXTURES

1- EXAMPLES
2- ADVANTAGES AND DRAWBACKS
3- WAYS OF USE

B- ORGANIC CONSTITUENTS

1- CARBOHYDRATS

a- KIND AND QUALITY
b- CONCENTRATION

2- GROWTH REGULATORS

a- AUXINS

* DEFINITION
* EXAMPLES
* EFFECTIVENESS:

IAA< IBA< NAA < NOA< 2,4-D < 2,4,5,T< TORDON

b- CYTOKININS

* DEFINITION
* EXAMPLES
* EFFECTIVENESS: KIN< BA < SD8339 < 2IP < ZEATINE

c- GIBBERELLINS

* DEFINITION
* USES

d- OTHERS

* ABA
* ETHYLENE

3- VITAMINS
4- HEXITOLS
5- AMINO ACIDS AND AMIDES

a- USE L FORM (NATURAL)
b- INTERACTIONS MUST BE CONSIDERED

* L.ISOLEUCINE + L-VALINE ----> STIMULATION OF SHOOT FORMATION, WHILE INDIVIDUALLY THEY ARE NOT EFFECTIVE.
* L-GLUTAMINE + OTHER A.A ----> ANTAGONISTIC EFFECT.
* L-GLUTAMINE ALONE ENHANCES SOMATIC CELL EMBRYOGENESIS
* L-TYROSINE IS BENEFICIAL TO SHOOT FORMATION IN CERTAIN CASES.

6- PHENOLICS

a- ENHANCE ROOTING:

PHLOROGLUCINOL, COFFEIC ACID, CATECHOL (ROOT INITIATION COFACTORS)

b- SHOOT FORMATION

P-HYDROXYPHENYLPYRUVIC ACID CAN REPLACE L-TYROSINE.

7- PURINES AND PYRIMIDINES:

ADENIN STIMULATES ADVENTITIOUS SHOOT FORMATION, SHOOT GROWTH AND CALLUS GROWTH.

8- ORGANIC ACIDS

a- CITRIC AND ASCORBIC ACIDS: USED AS ANTIOXIDANTS.
b- MALIC AND CITRIC ACIDS: USED FOR GRASS EMBRYO CULTURE.

9- NATURAL COMPLEX ADDENDA

ONE SHOULD CONSIDER:

* GENOTYPE EFFECT
* STAGE OF FRUIT MATURITY
* QUANTITY TO BE USED.

C- INERT SURPPORT MATERIALS

1- GELLING AGENTS

a- AGARS: POLYSACCHARIDS FROM MARINE ALGAE.

* AGAR PURITY IS IMPORTANT
* CONCENTRATION : 0,6 - 1%

b- GELRITE :FROM BACTERIAL FERMENTATION

* CLEARER
* 0,2% FOR SAME FIRMNESS
* GEL HARDNESS VARIES WITH SALT CONCENTRATION

c- OTHERS
* STARCH
* GELATIN

2- ADSORBANTS

a- CHARCOAL

* EFFECTS
* QUALITY
* QUANTITY

b- PVP

3- FILTER PAPER SUPPORTS

a- HELLER PLATFORM
b- FILTER PAPER BRIDGES

4- OTHERS

a- SPONGES
b- GLASS-WOOL
c- VERMICULITE
d- ETC.

II- PHYSICAL QUALITIES

A- PH
B- VOLUME OF MEDIUM
C- SHAPE AND SIZE OF CULTURE VESSELS
D- LIQUID VS SOLID MEDIUM.

1- SOLID

a- NATURE AND PURITY OF GELLING AGENT
b- CONCENTRATION

2- LIQUID

a- STATIONARY WITH SUPPORTING MATERIAL

* FILTER PAPER
* GLASS-WOOL
* SPONGE

b- STATIONARY WITHOUT SUPPORTIVES
c- AGITATED

* GENTLE ROTATION: ROTATORS, DRUMS
* VIGOROUS SHAKING

- GIRATORY
- RECIPROCATING

* USE OF MAGNETIC STIRERS
* AIR LIFT AERATED MEDIA
* USE OF PROPELLERS

III- HOW MEDIA CAN BE PREPARED?

A- START FROM SCRATCH
B- USE OF COMMERCIAL FORMULATIONS
C- USE OF PARTIAL FORMULATIONS.

TABLE I

Salt Mixtures for Use in Plant Culture Media (Milligrams per Liter)

Salt	Gamborg, Miller & Ojima, 1968 (22)	Gautheret, 1942 (23)	Heller, 1953 (24)	Hildebrandt, Riker & Duggar, 1946 (25)[b]	Hildebrandt, Riker & Duggar, 1946 (25)[c]	Knudson, 1946 (26)	Margara, Rancillac, & Bouniols, 1966 (27)	Morel & Muller, 1964 (9)	Murashige & Skoog, 1962 (21)	Nitsch & Nitsch, 1969 (28)	Schenk & Hildebrandt, 1972 (29)	Torrey, 1954 (30)	Tripathi, 1968 (31)	Vacin & Went, 1949 (32)	White, 1963 (33)
Aluminum chloride, $AlCl_3$	—	—	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.006	—	—
Ammonium nitrate, NH_4NO_3	—	—	—	—	—	—	—	—	1650	720	—	—	—	—	—
Ammonium phosphate, $NH_4H_2PO_4$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	300	—	—	—	—
Ammonium sulfate, $(NH_4)_2SO_4$	134	—	—	—	—	500	—	1000	—	—	—	—	—	500	—
Beryllium sulfate, $BeSO_4$	—	0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Boric acid, H_3BO_3	3.0	0.05	1.0	0.375	3	—	—	—	6.2	10	5.0	1.5	0.1	—	1.5
Calcium chloride, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150	—	75	—	—	—	—	—	440	166	200	—	300	—	—
Calcium nitrate, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	—	500	—	400	800	1000	472	500	—	—	—	242.0	—	—	300.0
Calcium phosphate, $Ca_3(PO_4)_2$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200	—
Cobaltous chloride, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	0.05	—	—	—	—	—	—	0.025	—	0.1	—	—	—	—
Cupric sulfate, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	0.05	0.03	—	—	—	—	—	0.025	0.025	0.2	0.04	0.002	—	—
Ferric chloride, $FeCl_3$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.5	0.3	—	—
Ferric chloride, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	—	—	1.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ferric citrate, $FeC_6H_5O_7$	—	—	—	—	—	—	10	—	—	—	—	—	—	—	—
Ferric sulfate, $Fe_2(SO_4)_3$	—	50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.5
Ferric tartrate, $Fe_2(C_4H_4O_6)_3$	—	—	—	40	5	—	—	—	—	—	—	—	—	28	—
Ferrous sulfate, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8	—	—	—	—	25	—	—	27.8	27.8	15	—	—	—	—
Magnesium sulfate, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250	125	250	180	720	250	738	125	370	185	400	42.0	250	250	720.0
Manganese sulfate, $MnSO_4 \cdot H_2O$	10	—	—	—	—	—	—	—	16.9	25	10.0	4.5	—	—	—
Manganese sulfate, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	—	3	0.1	4.5	4.5	7.5	—	—	—	—	—	—	0.02	7.5	7.0
Nickel chloride, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$	—	—	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.06	—	—
Nickel sulfate, $NiSO_4$	—	0.05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Potassium chloride, KCl	—	—	750	65	130	—	—	1000	—	—	—	61.0	—	—	65.0
Potassium iodide, KI	0.75	0.5	0.01	3	0.375	—	—	—	0.83	—	1.0	—	0.01	—	0.75
Potassium nitrate, KNO_3	2500	125	—	80	160	—	2020	—	1900	950	2500	85.0		525	80.0
Potassium phosphate, KH_2PO_4	—	125	—	—	—	250	272	125	170	68	—	20.0	—	250	—
Sodium ethylenedinitrilo tetraacetate, $Na_2 \cdot EDTA$	37.3	—	—	—	—	—	—	—	37.3	37.3	20	—	—	—	—
Sodium molybdate, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	—	—	—	—	—	—	—	0.25	0.25	0.1	0.25	—	—	—
Sodium nitrate, $NaNO_3$	—	—	500	—	—	—	2040	—	—	—	—	—	1200	—	—
Sodium phosphate, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150	—	125	33	132	—	—	—	—	—	—	—	250	—	16.5
Sodium sulfate, Na_2SO_4	—	—	—	800	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200
Sulfuric acid, H_2SO_4	—	0.001[a]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Titanium oxide, TiO_2	—	0.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Zinc sulfate, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0	0.18	1.0	6	3	—	—	—	3.6	10	1.0	1.5	0.3	—	3.0

[a] Ml per l.
[b] From tobacco experiments.
[c] From sunflower experiments.

Tableau 2 : Sels minéraux utilisés en culture in vitro (Concentrations en $mg.L^{-1}$

Sels minéraux	Auteurs						
	Knop	Heller (1953)	Murushinge et Skoog (1962)	White (1963)	Monnier (1968)	Gautheret (1977)	Gamborg e (1968) (B5
Macro-éléments							
NH_4NO_3			1 650		825		–
$(NH_4)_2SO_4$			–		–		134
$CaCl_2.2H_2O$		75	440		880		150
$Ca(NO_3).4H_2O$	1 000	–	–	300	–	500	–
$MgSO_4.7H_2O$	250	250	370	720	370	125	250
Kcl	–	750	–	65	350	–	–
KNO_3	250	–	1 900	80	1 900	125	2 500
KH_2PO_4	250	–	170		170	125	–
$NaNO_3$	–	600	–		–	–	–
$NaH_2PO_4.H_2O$	–	125	–	16,5	–	–	150
Na_2SO_4	–	–	–	200	–		
Micro-éléments							
$ALCL_3$		0.03					
$BeSO_4$						0.1	
$COCL_2.6H_2O$			0.025		0.05	0.05	0.0
$CuSO_4.5H_2O$		0.03	0.025		0.05	0.05	0.0
$Fecl_3.6H_2O$		1.0					
$FeSO_4.7H_2O$			27.85		27.85		
Na2-EDTA			37.25		37.85		
EDTA Na sel ferrique							43
$Fe(SO_4)_3$				2.5		5.0	
$MnSO_4.4H_2O$		0.1	22.3	7.0	33.6	3.0	10
$NiCL_2.6H_2O$		0.03					
$NiSO_4$						0.05	
KI		0.01	0.83	0.75	1.66	0.5	0.7
$Na_2MoO_4.2H_2O$			0.25		0.5		0.2
$Ti(SO_4)_3$						0.2	
$ZnSo_4.7H_2O$		1.0	8.6	3.0	21	0.18	2.0
H_3BO_3		1.0	6.2	01.5	12.40	0.05	3.0

Tableau 3 : Caractéristiques physiques et chimiques des régulateurs de croissance utilisés couramment en culture in vitro.

Nom	Abréviation	Nature	Solubilité	Stabilité	Conservation
Auxines					
Acide indola-3acétique	A I A	Naturelle	Peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol ou le méthanol 96°	Peu stable, dégradation par la lumière	Quelques jours, 4-5°C, Obscurité
Acide naphtalène acétique	A N A	Synthèse	Soluble dans le méthanol et l'éthanol 96° Solubilité dans l'eau = 38mg/L à 17°C	Stable à 120°C	4-5°C, Obscurité ou congélateur
Acide 2,4-dichlorophenoxyacétique	2,4-D	Synthèse	Peu soluble dans l'eau, dissoudre dans l'éthanol chauffer légèrement, diluer progressivement avec l'eau	Stable à 120°C	4-5°C, Obscurité, congélateur
Cytokinines					
6-furfurylaminopurine = Kinétine	K I N	Synthèse	Solubles dans NaOH(N), HCL(N), DMSO	Stable à 120°C en solution aqueuse dégradation par la lumière	4-5°C, Obscurité congélateur
6-benzylaminopurine = benzyladénine	B A P B A	Synthèse	"		"
Isopentenyladénine	2 iP	Naturelle	"		"
Zéatine	Z	Naturelle	"	Stable à 120°C	"
Gibbérelline					
Acide gibérellique A3	G A 3	Naturelle	Soluble dans le méthanol et l'éthanol, solution aqueuse de bicarbonate de sodium, modérément soluble dans l'eau	Peu stable, dégradation par la chaleur	dans l'alcool pur et 4-5°C, obscurité

(.) d'après les travaux de H.M. DEKHUIJZEN, 1971

TABLE 2

Auxins and Cytokinins Currently Available for Routine Inclusion in Plant Culture Media

Auxins	Cytokinins
3-Indoleacetic acid (IAA)	N^6-Benzylaminopurine (BA)
3-Indolebutyric acid (IBA)	N^6-γ,γ-Dimethylallylamino purine (2iP)
1-Naphthaleneacetic acid (NAA)	N^6-Furfurylaminopurine (kinetin)
4-Chlorophenoxyacetic acid (ClPA)	
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	

TABLE 3

Some Vitamin Mixtures for Plant Culture Media (Concentrations in Mg per L Medium)

Vitamin	Constabel, 1958 (3)	Gamborg, 1966 (34)	Henderson, Durrell & Donner, 1952 (35)	Morel & Wetmore, 1951 (36)	Nickell & Maretzki, 1969 (37)	Paris & Duhamet, 1953 (38)	Reinert & White, 1956 (39)	White, 1963 (33)
p-Aminobenzoic acid		0.2	0.05					
Ascorbic acid C	10	0.4					0.1	
Biotin	0.1	0.00025	0.005	0.01	0.01	0.002	0.01	
Choline chloride	10.0	0.2	0.1				10.0	
Cyanocobalamin							0.0015	
Folic acid	1.0	0.015	0.1			0.0003		
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5	1.0	2.8	0.06	0.5	0.5
Calcium pantothenate	10.0	0.4	0.8	1.0		5.0	0.1	
Pyridoxine·hydrochloride		0.5	0.1	1.0	0.2	0.001	0.1	0.1
Riboflavin	0.1	0.015	0.05		0.2	0.001	0.1	
Thiamine·hydrochloride B1	0.1	0.5	0.1	1.0	0.03	0.005	0.1	0.1

TABLE 4

Mixtures of Amino Acids and Amides Employed in Plant Culture Media (Concentrations in Mg per L)

Amino Acid or Amide	Constabel, 1958 (3)	Furuhashi & Yatazawa, 1970 (40)	Gamborg, 1966 (34)	Nickell & Maretzki, 1969 (37)	Nitsch, 1974 (10)	Paris & Duhamet, 1953 (38)	Reinert & White, 1956 (39)	Torrey & Reinert, 1961 (41)	Wood & Braun, 1961 (15)
Alanine		115.0				30			
Arginine	7.3	105.0	40	60		72	7.8	7.8	
Asparagi			40				20.0	20.0	200
Aspartic acid		186.0		50		21	6.0	6.0	
Cysteine	1.5	7.9		10		12			
Cystine							1.5	1.5	
Glycine	10.0	150.0	20	25			10.0	10.0	
Glutamic acid	14.0	220.0		65		140	14.0	14.0	
Glutamine			60		800		250.0	50.0	200
Histidine	2.6	46.5		10		12	2.6	2.6	
Isoleucine	10.4	66.0		30			10.4	10.4	
Leucine		145.0				18	15.6	15.6	
Lysine	15.[illegible]	145.0				21	15.6	15.6	
Methionine	13.[illegible]	14.9	30	10			13.0	13.0	
Phenylalanine	15.6	83.0	20	20		8	5.0	2.5	
Proline	5.0	61.0		40			5.0	5.0	
Serine		95.0		50	100	9			
Threonine	13.0	84.0		35			13.0	6.5	
Tryptophan		10.4	40				4.0	4.0	
Tyrosine		54.0		5		18	40.0	40.0	
Valine	13.0	94.0					13.0	13.0	

L-Tyrosine : stimule la formation des pousses
L-arginine : " " l'enracinement
L-serine : " l'androgenese.
L-glutamine : " l'embryogenese somati[illegible]

Substances identified as components of coconut milk.

SUBSTANCE	Ref.No.	SUBSTANCE	Ref.No.
AMINO ACIDS	15	VITAMINS	
Aspartic, Glutamic)		Nicotinic acid)	
Serine, γ-aminobutyric)		Pantothenic acid)	
Asparagine, Glycine)		Biotin, Riboflavin)	
β-alanine, Threonine)		Folic acid)	4
Histidine, Glutamine)	12	Thiamine**)	
Arginine, Lysine)		Pyridoxine**)	
Valine, Methionine***)		Ascorbic acid	22
Tyrosine, Proline)		GROWTH SUBSTANCES	
Homoserine)		Auxin	7,27
Phenylalanine	12,24	Gibberellin	10,27
Hydroxyproline	12,24	1,3,-diphenylurea	6,8,15
OTHER NITROGEN COMPOUNDS		Zeatin	20,24
Ammonium, Ethanolamine	17	Zeatin glucoside	25
Dihydroxyphenylalanine	17	Zeatin riboside	18,23
ORGANIC ACIDS		Growth promoter	26
Shikimic, Quinic*)		Unknown cytokinin/s	16,20
Pyrrolidone carboxylic)	12	OTHERS	
Succinic, Malic)		RNA-Polymerase	21
Citric and unknowns)		DNA-P, RNA-P	12
SUGARS		Uracil, Adenine	19
Sucrose, Glucose	12	Leucoanthocyanins	13,15
Fructose	12,1	Phyllocosine	14
Mannitol	1	Acid phosphatase	9
SUGAR ALCOHOLS		Diastase	2
Sorbitol)		Dehydrogenase)	
m-Inositol)	11,12,15	Peroxidase)	5
Scylloinositol)		Catalase)	

PARAMETERS NEEDING EVALUATION: THE CULTURE ENVIRONMENT

I- LIGHT REQUIREMENTS

A- LAMP QUALITY
B- PHOTOPERIOD
C- INTENSITY

1- STAGES I & II : 1.000 LUX
2- STAGE III : 10,000 LUX
3- STAGE IV : 30,000 LUX

II- TEMPERATURE

A- DIURNAL NEEDS
B- SEASONAL VARIATIONS (PRE-TRANSPLANT)

III- ATMOSPHERIC COMPONENTS

A- AUTO-INTOXICATING GASES
B- POLLUTION (SMOG) CONSTITUENTS
C- DUST & SPORES: SANITATION
D- BENEFICIAL GASES
E- RELATIVE HUMIDITY:

1- EXCESSIVE HUMIDITY
2- ARID CLIMATE

IV- WASTE ACCUMULATION

PARAMETERS NEEDING EVALUATION: THE FINISHED PRODUCT

I- REPRODUCTION OF PHENOTYPE

A- GENETIC VARIANTS
B- EPIGENETIC VARIANTS

II- ESCAPE FROM PATHOGENS

GENETIC IMPROVEMENT OF TREE CROPS

CONSTRAINTS:

* HIGH LEVEL OF GENETIC HETEROGENEITY
* LARGE PHENOTYPIC VARIABILITY
  (DOMINANT GENETIC VARIANCE)
* POLYGENIC HORTICULTURAL TRAITS
* LONG GENERATION INTERVALS
* LARGE AREAS REQUIRED FOR TESTING
* LONG DURATION OF TESTING
* LACK OF BASIC GENETIC (INHERITANCE) KNOWLEDGE.

BIOTECHNOLOGIE ET AMELIORATION GENETIQUE

1- FOURNITURE DU MATERIEL VEGETAL SAIN

2- MULTIPLICATION CLONALE RAPIDE DES SELECTIONS

3- SAUVEGARDE D'HYBRIDES INTERSPECIFIQUES PAR CULTURE D'EMBRYONS

4- CONSERVATION A BASSES TEMPERATURES

5- PRODUCTION D'HAPLOIDES PAR:

a- PARTHENOGENESE
b- ANDROGENESE
c- CERTAINS CROISEMENTS INTERSPECIFIQUES

6- VARIATION SOMACLONALE

7- EMBRYOGENESE SOMATIQUE POUR:

a- REGENERATION DE PLANTS
b- PRODUCTION DE GRAINES ARTIFICIELLES

8- HYBRIDATION PARASEXUEE PAR FUSION DE PROTOPLASTES

9- GENIE GENETIQUE

HYBRIDES "ARTIFICIELS" ISSUS DE FUSION DE PROTOPLASTES

HYBRIDE	REFERENCE
AEGOPODIUM PODAGRARIA + DAUCUS CAROTA	DUDITS ET AL. (1979)
ARABIDOPSIS THALIANA + BRASSICA CAMPESTRIS	GLEBA & HOFFMAN (1978)
ATROPA BELLADONNA + DATURA INNOXIA	KRUMBIEGEL & SCHIEDER (1979)
ATROPA BELLADONNA + NICOTIANA CHINENSIS	GLEBA ET AL. (1982)
BRASSICA CAMPESTRIS + RAPHANUS SATIVUS	PELLETIER ET AL. (1983)
BRASSICA NAPUS + RAPHANUS SATIVUS	PELLETIER ET AL. (1983)
DAUCUS CAROTA + PETROSELINUM HORTENSE	DUDITS ET AL. (1980)
LYCOPERSICON ESCULENTUM + SOLANUM TUBEROSUM	MELCHERS ET AL. (1978)
NICOTIANA TABACUM + SALPIGLOSSIS SINUATA	NAGAO (1982)

TECHNOLOGY TRANSFER CHANNELS

1. PUBLIC TO PUBLIC

2. PRIVATE TO PUBLIC

3. PRIVATE TO PRIVATE

4. INVISIBLE CHANNELS

TECHNOLOGY TRANSFER RELATED PROBLEMS

1. MISHANDLING AND/OR CHOICE OF THE RIGHT TECHNOLOGY

2. TECHNOLOGIES IN HANDS OF PRIVATE SECTOR

3. ABSENCE OF BIOSAFETY AND IPR REGULATIONS

DEVELOPMENT OF DNA MARKERS FOR DATE PALM.

DR. AIT CHITT M.

Approaches in developing DNA markers

Introduction: What DNA markers are?

RFLP (restriction Fragment Length Polymorphism) technology.

- Principles
- Restriction enzymes
- Southern Blotting
- Hybridisation
- Autoradiography

PCR (Polymerase Chaine Reaction) based technologies.

- Principle.
- Use of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique.
- Parametres involved in a RAPD reaction.
  - DNA polymerase.
  - Primers.
  - dNTPs.
  - Reaction buffer.
  - Target DNA.
  - Cycling parametres.

Practical:

Extraction of total DNA from date palm leaves.

- Preparation of stock solutions.
- Extraction.
- Agarose gel electrophoresis of total DNA.
- Digestion with a restriction enzyme.

برنـامج الـدورة التـدريبيـة الاولـى حـول
زراعـة انسجـة النخيـل
مراكش ٩ - ٢٣ اكتوبر ١٩٩٤

الجمعة ٩٤/١٠/٧ : استقبال المشاركين بمطار محمد الخامس و النزول في فندق الكبير

الاثنين ٩٤/١٠/١٠ :

٩ و٣٠ د - ١٠ و ٠٠ د : كلمة الافتتاح

١٠ و ٠٠ د - ١٠ و ٣٠ د : استراحة

١٠ و ٣٠ د - ١٢ و ٠٠ د : اشكالية الواحات المغربية و اهمية زراعة الانسجة في اعادة تشجيرها
امزيان عبد اللطيف

١٥ و ٠٠ د - ١٨ و ٠٠ د : زيارة مختبرات برنامج النخيل

الثلاثاء ٩٤/١٠/١١

٩و ٠٠ د - ١٠ و ٠٠ د : عروض قطرية (الجزائر، العربية السعودية، مصر، عمان، السودان و سوريا)

١٠ و ٠٠ - ١٠ و ١٥ د : استراحة

١٠ و ١٥ د - ١٢ و ١٥ د : العوامل الواجب مراعاتها في زراعة الانسجة
د.محمد اعوين

١٥ و ٠٠ د - ١٦ و ٣٠ د : تقنيات اكثار النخيل عن طريق زراعة الانسجة : الايجابيات والسلبيات
د.محمد اعوين

١٦ و ٣٠ د - ١٦ و ٤٥ د : استراحة

١٦ و ٤٥ د - ١٨ و ٠٠ د : اكثار النخيل عن طريق زراعة الانسجة (organogenesis) : التجربة المغربية
محمد بوجرفاوي

الاربعاء ٩٤/١٠/١٢

٩ و ٠٠ د - ١٠ و ٣٠ د : استعمال البيوتكنولوجيا للتحسين الوراثي عند النخيل
د.محمد اعوين

١٠ و ٣٠ د - ١٠ و ٤٥ د : استراحة

١٠ و ٤٥ د - ١٢ و ٠٠ د : استعمال تقنية زراعة الانسجة لتطهير و انتاج الاغراس الخالية من الفيروسات
د.زوبير

١٥ و ٠٠ د - ١٣ و ٠٠ د : استعمال زراعة الانسجة لاكثار النخيل : الوضع على الصعيد العالمي
د.محمد اعوين

١٦ و ٠٠ د - ١٦ و ١٥ د : استراحة

١٦ و ١٥ د - ١٨ و ٠٠ د : عمل تطبيقي ١ : اعداد المحاليل المركزة (stocks) اللازمة لتحضير الوسط الغذائي
محمد بوجرفاوي

الخميس ٩٤/١٠/١٣

٩ و ٠٠ د - ١٠ و ٣٠ د : استعمال زراعة الانسجة لاكثار الانواع المثمرة
د.ولالي لودي

١٠ و ٣٠ د - ١٠ و ٤٥ د : استراحة

١٠ و ٤٥ د - ١٢ و ١٥ د : تقنية الاكثار بوا سطة الجنين الجسدي عند النباتات .
د.ابو سالم

١٥ و ٠٠ د - ١٨ و ٠٠ د : عمل تطبيقي رقم ٢ : كيفية تحضير الاوساط الغذائية
محمد انجارن

الجمعة ٩٤/١٠/١٤ :

٩ و ٠٠ د – ١٠ و ٣٠ د : اكثار النخيل بواسطة زراعة الانسجة : تجذير واقلمة النباتات
محمد انجارن

١٠ و ٣٠ د – ١٠ و ٤٥ د : استراحة

١٥ و ٠٠ د – ١٦ و ٣٠ د : المشاكل الرئيسية التي تعرقل اكثار النخيل و بعض انواع الاشجار المثمرة عن طريق زراعة الانسجة
محمد انجارن

١٦ و ٣٠ د – ١٨ و ٠٠ د : مناقشة

السبت ٩٤/١٠/١٥ :

٦ و ٠٠ د – ١٦ و ٠٠ د : زيارة مدينة اكادير (اختياري)

الاحد ٩٤/١٠/١٦ : حـــر

الاثنين ٩٤/١٠/١٧ :

٩ و ٠٠ د – ١٠ و ٣٠ د : تقنيات RAPD و RFLP : مبادئها و تطبيقها للتمييز بين اصناف النخيل
مصطفى ايت شيط

١٠ و ٣٠ د – ١٠ و ٤٥ د : استراحة

١٠ و ٤٥ د – ١٢ و ٠٠ د : عمل تطبيقي رقم ٣ : تقنيات تحضير و تطهير انسجة الفسيلة
محمد انجارن و عبد الهادي بن جامع

١٥ و ٠٠ د – ١٧ و ٠٠ د : عمل تطبيقي رقم ٤ : تقنيات تشريح و زراعة انسجة النخيل.
بوجرفاوي محمد

١٧ و ٠٠ د – ١٨ و ٠٠ د : عمل تطبيقي رقم ٥ : تقنية نقل البراعم و اكثارها
محمد انجارن

الثلاثاء ٩٤//١٠/١٨ :

٩ و ٠٠ د – ١٠ و ٠٠ د : عمل تطبيقي رقم ٦ : تقنية تجدير و اقلمة النباتات الاتية من زراعة الانسجة

محمد بوجرفاوي واحمد مزور

١٠ و ٠٠ د – ١٢ و ٠٠ د : عمل تطبيقي رقم ٧ : استخلاص الحامض النووي (ADN) من انسجة النخيل

مصطفى ايت شيط

١٤ و ٠٠ د – ١٨ و ٠٠ د : اتمام العمل التطبيقي رقم ٧

٢٠ و ٠٠ د : حفلـــة عشـــــاء

الاربعاء ٩٤/١٠/١٩ :

٨ و ٣٠ د : الذهاب الى الرباط

١٤ و ٣٠ د : زيارة لوحدة الاكثار التابعة لشركة "سوجيطا" بعين ديك.

الخميس ٩٤/١٠/٢٠ :

٨ و ٣٠ د : زيارة لوحدة الاكثار التابعة لشركة "سوديا" بتمارة

١٥ و ٣٠ د : زيارة لمركز التوثيق للمعهد الوطني للبحث الزراعي

١٨ و ٠٠ د : الرجوع الى الفندق بالرباط

الجمعة ٩٤/١٠/٢١ :

٧ و ٣٠ د : الذهاب الى القنيطرة

٨ و ٣٠ د : زيارة مختبر تطهير الحوامض من الفيروسات

١٠ و ٠٠ د : الذهاب الى مكناس

١٥ و ٣٠ د : زيارة لمختبر اكثار النخيل التابع للضيعات الملكية الفلاحية

١٨ و ٠٠ د : الرجوع الى الرباط

السبت ٩٤/١٠/٢٢ :

حضـــــر

الاحـد ٩٤/١٠/٢٣ :

مغادرة المشاركين .