جامعــة بنهـا
كليـــة الزراعـــة
قســـم البسـاتيـن

محـاضرات فـي

زراعة الانسجة والاجنة واستخدامها فى مجال الفاكهة

إعداد
الأستاذ الدكتور/ خالد بكرى
أستاذ الفاكهة وزراعة الأنسجة

المحتوى العلمي لمقرر زراعة الانسجة والاجنة واستخدامها فى مجال الفاكهة

١-مقدمة تاريخية عن زراعة الأنسجة.
٢-تعريف زراعة الأنسجة وأهميتها.
٣-بعض المصطلحات الخاصة بزراعة الأنسجة والخلايا.
٤-مجالات زراعة الأنسجة.
٥-مراحل زراعة الأنسجة.
٦-معمل زراعة الأنسجة وتجهيزه وأدواته.
٧-بيئات زراعة الأنسجة وتجهيزها.
٨-إجراءات زراعة الأنسجة.
٩-استخدام زراعة الأنسجة كوسيلة سريعة للإكثار.
١٠-استخدام زراعة الأنسجة لإنتاج النباتات الخالية من الفيروس.
١١-استخدام زراعة الأنسجة فى إنتاج المواد العلاجية والطبيعية.
١٢-العوامل المؤثرة على إنتاج النواتج الثانوية لعملية التمثيل الغذائى.
١٣-استخدام زراعة الأنسجة فى خدمة مربى النبات.
١٤-زراعة معلقات الخلايا.
١٥-زراعة البروتوبلاست.
١٦-زراعة الأنسجة فى نخيل البلح- الموز- العنب.
١٧-المشاكل الناجمة عن استخدام زراعة الأنسجة فى الإكثار الخضرى.

والله ولى التوفيق

مقدمة:

- أول من تنبه إلى قدرة الخالق سبحانه وتعالى فى أن كل خلية نباتية منفردة لها القدرة على التكاثر وتكوين نبات كامل هو العالم هابرلاند Haberlandt وكانت أول محاولة له عام ١٩٠٢ .
- وقد عرفت هذه النظرية باسم القدرة الذاتية أو نظرية تعدد الجهود Totipotency وهذه النظرية اعتمد عليها علم زراعة الأنسجة النباتية.
- وقد بدأت الدراسة الجادة على زراعة الأنسجة والخلايا والأعضاء عام ١٩٣٤ عندما تمكن العالم White من تركيب بيئة غذائية وتمكن من إنماء جذور الطماطم عليها.
- ثم اكتشف نفس العالم White أول الهرمونات النباتية عام ١٩٣٤ وهو أندول حمض الخليك Indol acetic acid (IAA) .
- وقد قام Gualthert عام ١٩٣٩ باستخدام الاكسين لأول مرة فى بيئات زراعة الأنسجة وتمكن من إنتاج نسيج كلس Callus من زراعة أنسجة نخاع الجزر وفى نفس العام تمكن White من إنتاج الكالس من نبات الدخان.
- وفى عام ١٩٤١ اكتشف Van overbeek and Blackslee أهمية لبن جوز الهند Coconutmilk (الاندوسبرم السائل لثمار جوز الهند الغير ناضجة) فى تشجيع الزراعات على إنتاج الكالس وخاصة عند زراعة أجنة نبات الداتورة. وعندئذ تمكن من الجمع بين الأكسين ولبن جوز الهند فى بيئة واحدة لإنتاج الكالس فى عديد من النباتات.
- وفى عام ١٩٨٤ تم اكتشاف الكينتين بفضل الله ثم مجهودات معمل Skoog وقد تم استخدام الاكسين مع الكينتين لتكوين الأعضاء المختلفة وهو ما يسمى بالتكشف المورفولوجى.

- وفى عام ١٩٤٩تمكن Nitsch من زراعة مبيض الطماطم لإنتاج نبات كامل.
- وفى عام ١٩٥٢ تمكن Morel and Morting من الحصول على أول نبات خالى من الفيروس من الداليا باستخدام تقنية زراعة الأنسجة.
- وفى عام ١٩٥٦ تمكن Nickell لأول مرة من زراعة معلقات الخلايا لنبات الفول.
- وفى عام ١٩٥٧ اكتشف Skoog and Miller أن التوازن الهرمونى بين الاكسين والسيتوكينين هو المسبب لاختلاف التخليق المورفولوجى لأنسجة الدخان والتى ينتج عنها الكالس أو النموات الخضرية أو الجذور العرضية.
- وفى عام ١٩٥٨ تمكن Reinert and Steward من تخليق الأجنة العرضية من زراعة خلايا الجزر.
- وفى عام ١٩٦٠ تمكن Murashige and Skoog من تطوير البيئة الغذائية اللازمة لتنمية كالس الدخان وثبت فيما بعد صلاحيتها للعديد من النباتات وهى البيئة الشهيرة المسماء بـ MS .
- وفى عام ١٩٦٧ تمكن Buargin and Nitsch من الحصول على أول نبات أحادى المجموعة الكروموسومية من زراعة متوك نبات الدخان.
- وفى عام ١٩٧٢ قام Murashige ومساعدوه من تطوير تقنية التطعيم الدقيق للقمم النامية Shoat apex micrografting للحصول على نباتات خالية من الفيروس فى الموالح (الحمضيات).
- وفى عام ١٩٧٧ تمكن Chilton ومساعدوه من عزل البلازميد من البكتريا لاستخدامها فى إدخال مادة الجين إلى نبات آخر وكان ذلك مدخلاً للهندسة الوراثية.
- وفى عام ١٩٧٨ تم عزل البروتوبلاست من البطاطس والطماطم وأحداث التهجين الخلوى بينهما عن طريق دمج البروتوبلاست.
- وفى عام ١٩٧٨ تم اكتشاف وعزل وتوصيف الإنزيمات الاندونيوكليز المقيدة Restriction enzymes وأطلق عليها هذا لأنها لا تقطع DNA عشوائياً ولكنها تقطعه فى أماكن محددة. وهذا الاكتشاف هو أهم كشف لإمكان عزل الجينات ونقلها وتحقيق أهداف الهندسة الوراثية وقد نال كل من Nathans and Smith عن هذا العمل جائزة نوبل فى العلوم. ثم توالت الدراسات واستمرت إلى يومنا هذا.

ما هى زراعة الأنسجة؟

زراعة الأنسجة Tissue culture هو العلم الذى يهتم بزراعة الأنسجة والخلايا والأعضاء على بيئة غذائية صناعية معقمة وتحضين هذه الزراعات فى ظروف بيئية مناسبة من الحرارة والإضاءة لتكوين نبات كامل جديد أو تحقيق الهدف الذى من أجله تمت الزراعة.

أهمية زراعة الأنسجة:

١- إنتاج أعداد كبيرة من النباتات فى فترة زمنية قصيرة Mass production .
٢- إنتاج نباتات خالية من الأمراض الفيروسية Free of virus .
٣- إنتاج بعض المواد الطبية والعطرية فى فترة قصيرة.
٤- تستخدم فى حل بعض المشاكل عند إجراء برامج التربية مثل زراعة الأجنة للهجن المتباعدة.
٥- إجراء التطعيم الدقيق لإنتاج نباتات ذات صفات معينة.

٦- توفير الوقت والمجهود لأن مساحة العمل محدودة.

٧- صغر حجم الجزء المستعمل فى الزراعة.

٨- سهولة الاحتفاظ بتلك النباتات ونقلها وتخزينها لحين الحاجة إليها.

بعض المصطلحات الخاصة بزراعة الأنسجة
Plant tissue culture terminology

In vitro : هى كلمة لاتينية تعنى In glass وتعنى التجارب العلمية التى تجرى على الأعضاء النباتية فى الأوعية الزجاجية والتى تنمو تحت ظروف صناعية.

In vivo : هى كلمة لاتينية تعنى In life وهى التجارب العلمية التى تجرى على الأعضاء النباتية فى الظروف الطبيعية (فى الحقل) وهى مرتبطة بأجزاء النبات الأخرى.

Excise : هو عزل أو فصل أنسجة أو أعضاء أو قطاعات الأنسجة من النباتات كأجزاء نباتية للزراعة مثل عزل القمة النامية تحت الميكروسكوب وزراعتها فى المعمل.

Explant : هو لفظ يطلق على أى جزء نباتى يتم فصله من النبات ثم تعقيمه وزراعته على بيئة صناعية معقمة فقد يكون الـ Explant قمة نامية أو برعم ابطى أو جنين أو جزء من الجذر أو جزء من الورقة.

Aseptic : هو الخلو من الكائنات الممرضة والتلوث بالفطريات والبكتريا والفيروس. أى خلو البيئة الغذائية من الكائنات الدقيقة وهو متطلب هام لمزارع الأنسجة النباتية.

Callus : هى أنسجة الجروح التى تتكون عند الأسطح المجروحة فى النبات وهى أنسجة غير متميزة. وهى أنسجة برانشيمية تختلف فى درجة تلجننها وعادة لا يوجد بينها مادة لاحمة .

Bud : هو البرعم الخضرى أو الزهرى وهو ما زال فى حالة نشأة ولم ينمو بعد وعادة ما يكون مغلف بأوراق حرشفية تسمى Bud scale .

Axillary bud : هو برعم أو فرع خضرى ابطى يخرج من أباط الأوراق وهو عادة يتكون من الخلايا المريستمية الإبطية للقمم النامية وعادة تدفع لإنتاج أعداد كبيرة من النباتات Mass production ويتم ذلك خلال استخدام الهرمونات التى تعمل على تثبيط السيادة القمية للقمة النامية وتشجيع إنتاج نموات جانبية Lateral shoot .

Adventitious : هى أعضاء نباتية (براعم – نموات خضرية– جذور.....) نتجت بطريقة عرضية فى موضع غير تقليدى مثل تكون النموات أو الأجنة على نسيج الكالس.

Disease- free, pathogen- free, pathogen tested
هى النباتات الصحيحة الخالية من أى أعراض مرضية والتى تستخدم كمصدر للحصول على نباتات كثيرة ذات مواصفات مثالية.

Somatic embryo or Embryoid : هى الأجنة العرضية الناشئة من أنسجة خضرية فى المعمل In vitro وهى تشبه الأجنة الزيجوتية مورفولوجيا.

Embryogenesis : هى عملية تكوين الأجنة بطريقة غير جنسية وعادة تنمو الأجنة اللاجنسية مباشرة من زراعة الأجزاء النباتية أو بطريقة غير مباشرة من الكالس وفى بعض الحالات تنمو الأجنة العرضية من الخلايا المنفردة.
Differentiation : هو التميز أو التخلق أوالتغيرات الفسيولوجية التى تحدث فى خلايا الأنسجة أو الأعضاء أثناء التطور والنمو لتصبح الخلايا أو الإنسجة متخصصة لها دور فسيولوجى أو عمل معين.

Organogenenesis : هى نشأة الأعضاء على سطح المنفصل النباتى أو من الكالس الناتج من زراعته وهى عادة تكون نموات خضرية أو جذور.

Induction : هو الحث أو التغيرات الفسيولوجية التى تعمل على حدوث ظاهرة فسيولوجية أثناء عملية التطور والتى ينتج عنه عملية Initiation .

Initiation : هو أول تغير ميكروسكوبى مرئى لتمييز الخلايا وتخليقها عند تطورها إلى أعضاء.

Cybrid : هى الخلية أو النبات الناتج من التهجين السيتولابلازمى مع نواة من إحدى الخلايا وعضوات الخلية السيتوبلازمية من أخرى.

Meristem : هى مناطق النمو والانقسام وتكوين وبناء البوتوبلاست ومنشأ الأنسجة الجديدة فى النباتات وعادة تكون الخلايا المريستمية خلايا غير متميزة Undifferentiated ومنها تتكون الأنسجة المتخصصة وظيفياً أو فسيولوجياً ويوجد المرستيم فى القمم النامية وقمم الجذور وفى أباط الأوراق وخلايا الكامبيوم الحزمى والأوراق الحديثة.

Meristemaid : كتلة من خلايا مريستمية لها القدرة على النمو والتطور وتحتوى على سيتوبلازم كثيف مع عديد من الفجوات العصارية.

Shoot apex or shoot tip : هى القمة المريستمية الهرمية الشكل Meristimatic dome بالإضافة إلى مبادئ الأوراق Leaf premordia والأوراق المنبثقة وبعض خلايا الاستطالة الساقية.

ويجب عدم الخلط بين Shoot tip ، Meristem tip لأن الأول أكبر حجماً والثانى أصغر حجماً ويحتوى على القبة المريستمية فقط مع زوج واحد من مبادئ خروج الأوراق.

Somatic hybrid : هى الهجن الجسمية الناتجة من دمج الخلايا أو البروتوبلاست لتكوين نبات جديد (Genom جديد) .

Subculture : هى إعادة زراعة الخلايا أو الأنسجة أو الأعضاء المتكونة على بيئة جيدة لها تركيب مختلف فى واحد أو أثنين من مكوناتها للحصول على شكل مورفولوجى جديد أو تطور للأعضاء بعد مرور زمن فاصل يسمى Passage time .

Reculture : هى إعادة الزراعة على بيئة لها نفس مكونات البيئة السابقة ويكون الغرض هنا المحافظة على النسيج من التدهور نظرا لجفاف البيئة أو نفاذ محتوياتها أو تغير درجة حموضتها.

مجالات زراعة الأنسجة والخلايا

توجد أربعة مجالات رئيسية لزراعة الأنسجة والخلايا وهى:
١- إنتاج بعض المواد الكيماوية العلاجية والمواد الطبيعية والعطرية.
٢- التحسين الوراثى للمحاصيل الحقلية والبستانية.
٣- الحصول على سلالات خالية من الأمراض.
٤- الإكثار السريع وإنتاج عدد غزير من النباتات.

أولاً: إنتاج المواد الكيماوية الطبية والمواد الطبيعية:
هناك العديد من النباتات تنتج مواد طبيعية تعتبر إحدى نواتج عمليات التمثيل الغذائى يقوم الإنسان باستخراجها واستعمالها فى صناعات عديدة أهمها صناعة الدواء والزيوت العطرية ومكسبات الطعم مثل:

- الاتروبين من نبات الأتروبا.
- الكافيين من نبات البن.
- كوكايين من نبات الكوكا.
- الهيوسيامين من نبات السكران.
- الاميجدالين من نبات الخوخ- المشمش- البرقوق.
- السالسين من نبات الصفصاف.
- الزيوت العطرية من عدة نباتات (ريحان- نعناع – عطر).
- الفيتامينات من عدة نباتات (الحمضيات – الجوافة).

حيث تتم زراعة أنسجة أو أعضاء مختلفة من تلك النباتات للحصول على نسيج الكالوس ثم نستخلص المادة الفعالة منه دون الحاجة إلى زراعة النبات بالكامل وبذلك يمكن توفير مساحات من الأراضى وكذلك توفير المجهود اللازم للاستخراج هذه المواد من النبات الكامل.

ثانياً: التحسين الوراثى للمحاصيل:

تستخدم تقنية زراعة الأنسجة والأعضاء والخلايا فى برامج التحسين الوراثى للمحاصيل وذلك فى مجالات مختلفة مثل:

- **Embryo and Ovaryculture** → Embryo development
- **Cell and tissue culture** → Induction and isolation of maturation
- **Anther and microspore**:

- Source of variation
- Haploid plant development.

- **Protoplasts**: – Mutation. – Hybridization. – Gene transfer.

كما لوحظ أن تقنية زراعة الأنسجة والأعضاء يمكن أن تذلل كثير من العقبات أمام مربى النبات حيث:

١- ثبت أن الأجنة الناتجة من الهجن المتباعدة الإباء لا يتم تكوينها ونضجها مثل الأجنة الناتجة عن الهجن الجنسية أو النوعية وتلك الأجنة تعانى من ظاهرة العقم الاندوسبرمى وينتج من عدم التوازن الكروموسومى لأنسجة الاندوسبرم والجنين فكما هو معروف أن الأجنة لا تتصل مباشرة بالأنسجة الوعائية لنبات الأم ولكن يتم الاتصال عن طريق الاندوسبرم والذى يستقبل المواد الغذائية ويوصلها للجنين عن طريق الحبل السرى وبالفحص السيتولوجى لهذه الأجنة ثبت أن هناك منطقة غير حية تمنع وصول الغذاء للاندوسبرم وعندئذ يموت الجنين. فإذا أمكن فصل هذه الأجنة فى وقت مناسب وتنميتها على بيئة مناسبة فإنه يمكن الحصول على نبات كامل هجين وهو هدف عظيم لمربى النبات.

٢- إذا أراد المربى الحصول على قوة الهجين فإنه يواجه عدة صعوبات أهمها طول المدة وكذلك صعوبة الحصول على نباتات متماثلة فى صفاتها الوراثية Homozygous لذلك يتطلب تأصيل العوامل الوراثية بالتهجين الذاتى لعدة أجيال فيواجه بأن نباتات الجيل الثالث أو الرابع تكون عديمة الخصوبة مما يوقف برامجه. ولذلك فإن حصوله على نبات أحادى المجموعة الكروموسومية Haploid يعتبر من الآمال العظيمة لمربى النبات حيث يمكن مضاعفته بالكولشيسين فيحصل على نبات ثنائى المجموعة الكروموسومية وفى نفس الوقت أصيل فى صفاته الوراثية Homozygous وذلك بزراعة المتك أو حبة اللقاح.

٣- يبحث مربى النبات كثيراً عن مصادر للاختلافات الوراثية واستخدام زراعة الأنسجة يمكن للمربى أن يتعامل مع عدد كبير من النباتات فى حيز محدود فيسهل عليه الانتخاب لصفات عديدة مثل المقاومة للإمراض– الجفاف– الملوحة– الحشرات. حيث نحصل على مزارع الخلايا ثم تعامل الخلايا بسموم الفطر المسبب للمرض أو بتركيزات عالية من الملوحة ثم يتم الانتخاب كما يمكن بنفس الطريقة السابقة إحداث الطفرات وعزلها.

٤- قد يصعب على مربى النباتات إجراء التهجينات الجنسية أو النوعية عند الرغبة فى نقل صفة ما من نبات إلى نبات آخر ولكن عن طريق الهندسة الوراثية وزراعة البروتوبلاست يمكن إجراء تلك التهجينات. كما يمكن عزل جين بمفرده ونقله ليدمج مع المادة الوراثية لنبات يراد إدخال صفة ما فيه بالإضافة إلى إمكانية نقل أى مادة وراثية معزولة من أى كائن حى إلى النبات.

ثالثاً: الحصول على سلالات خالية من الأمراض:

تصاب كثير من النباتات بالإمراض الفيروسية ويبذل الدراسون جهداً كبيراً للحصول على نباتات خالية من الإصابة وتستخدم تقنية زراعة الإنسجة فى الحصول على هذه النباتات بعدة طرق منها:

١- زراعة القمم النامية حيث وجد أن الفيروس ينتقل ببطء إلى القمم النامية وبالتالى فهى غالباً ما تكون خالية من الفيروس خاصة إذا عزلت بأحجام ميكروسكوبية تصل إلى ٠.٢ – ٠.٥ سم وزراعتها.

٢- زراعة نسيج النيوسيلة فى بعض النباتات وحيدة الجنين مثل الشادوك فى الحمضيات وبعض أصناف المانجو.

٣- إجراء عملية التطعيم الدقيق Shoot tip micrografting حيث يتم زراعة بذور الأصل على بيئة صناعية ثم عزل القمة النامية بطول ٠.١٤–٠.١٨ سم وتطعيمها على بادرة الأصل وبذلك نحصل على بادرة مكونة من أصل وطعم خالية من الفيروس بعد عدة أسابيع.

رابعاً: استخدام زراعة الأنسجة كوسيلة سريعة للتكاثر:

نظراً لأن طرق التكاثر الخضرى بالوسائل التقليدية ليست سريعة بالدرجة الكافية فإن الإكثار بزراعة الأنسجة يلبى الطلب المتزايد على الشتلات خاصة نباتات الفاكهة والزينة وبسعر مناسب فى حيز محدود. حيث نجح الباحثون فى إكثار بعض النباتات الصعبة الإكثار والغالية مثل الأوركيد. كما نجح بكرى عام ١٩٩٤ فى إكثار نخيل البلح بزراعة الأنسجة وفى عام ١٩٩٨ نجح بكرى فى إكثار المانجو البيكان بزراعة الأنسجة. كما نجحت كثير من المعامل فى إكثار العديد من النباتات الغالية الثمن وإنتاج عدد كبير منها.

مراحل زراعة الأنسجة

أولاً: مرحلة التأسيس (الحصول على مزرعة معقمة): Establishment of aseptic culture stage

وهذه المرحلة هامة جداً والغرض منها الحصول على مزرعة معقمة خالية من التلوث بأى كائن دقيق سواء للبيئة أو الجزء النباتى لأن التلوث بأى كائنات دقيقة سواء للبيئة أو الجزء النباتى لأن التلوث معناه تعفن الجزء النباتى وموته ويأتى ذلك بتعقيم الأدوات المستعملة– تعقيم البيئة الغذائية– تعقيم الأنسجة المستعملة ثم الزراعة فى جو وحيز معقمين.

ثانياً: مرحلة التضاعف (زيادة الأعضاء المتكاثرة): Multiplication of propagula stage

والهدف من هذه المرحلة هو زيادة الأعضاء والتراكيب الناتجة من المرحلة الأولى مثل زيادة حجم نسيج الكالس أو خروج النموات العرضية أو زيادة تكوين الأجنة الجسمية.

ثالثاً: مرحلة التجذير Rooting stage :

والهدف منها زراعة النموات الخضرية الناتجة من المرحلة الثانية على بيئة غذائية تحفزها على خروج الجذور.

رابعاً: مرحلة الأقلمة (الإعداد لنقل النبات للتربة): **Hardening stage (Adaptation)**

وهذه المرحلة تعتبر من أهم المراحل لأن التكاثر باستخدام زراعة الأنسجة لا يعتبر ناجحاً إلا إذا تم نقل النبات الناتج فى الأنبوبة المعقمة إلى التربة واستمراره فى النمو. وللوصول إلى هذه الغاية يجب العمل على تهيئة النبات للظروف الصعبة المحتمل أن يواجهها فى التربة وهذه التهيئة لابد أن تكون تدريجية حتى لا تحدث صدمة للنبات.

معمل زراعة الأنسجة

يحتوى معمل زراعة الأنسجة على الأدوات والأجهزة الآتية :

الأدوات:

١- الأنابيب Culture tubes :

وهذه تستخدم فى الزراعة وتصنع من زجاج البيركس لكى يتحمل حرارة التعقيم والتى تصل إلى ١٢١^{o} م وهذه الأنابيب أحجامها مختلفة مثل:

الحجم ١٦ × ١٠٠ وهذه سعتها ١٥ سم. ١٦ × ١٢٥مم وهذه سعتها ١٩ سم. ١٦ × ١٥٠مم وهذه سعتها ٢٣ سم. ٢٠ × ١٥٠ مم وهذه سعتها ٣٠ سم ٢٥ × ١٥٠مم وهذه سعتها ٦٠ سم.

٢- **أغطية الأنابيب Caps** : وهذه تصنع من مادة البولى بروبلين Polypropylene لتحمل الحرارة العالية وهى ذات أحجام مختلفة.

٣- **حوامل الأنابيب Raks** : وتصنع من الخشب أو الألومونيوم أو البلاستيك أو مادة البولى بروبلين المتحملة للحرارة وهذه ذات ثقوب مختلفة تبعاً لسمك الأنابيب وهذه تحمل من ١٢ إلى ٥٠ أنبوبة.

٤- **الدوارق المخروطية:** وهذه تصنع من زجاج البيركس وذات سعات مختلفة ١٠٠، ١٢٥، ٢٥٠، ٥٠٠ ملل.

٥- **أطباق بترى Petridishes** : وهى تصنع من الزجاج البيركس أو البلاستيك وتباع معقمة ولا تستعمل إلا مرة واحدة أما الزجاج فتستعمل أكثر من مرة وسعة الطبق ١٠٠ × ١٥ أو ٦٠ × ١٠ ملل.

٦- **القفازات Gloves** : وهذه تستخدم لمنع التلوث عن طريق اليدين أو لحماية بشرة اليدين من الكيماويات وتصنع من البلاستيك المقاوم للكيماويات.

٧- **أدوات تشريح:** مثل الملاقط والمشارط والأمواس.

٨- **زجاجيات لحفظ البيئة والكيماويات:** وهذه تكون ذات أحجام مختلفة ولونها غامق حتى لا تتأثر الكيماويات بالضوء.

الأجهزة:

١- **الأفران Ovens** : وتستخدم لتعقيم الأدوات والأطباق وعادة يتم التعقيم على درجة ١٨٠°م لمدة ٣ ساعات.

٢- **جهاز قياس الرقم الهيدروجينى PH meter** :

لقياس وضبط حموضة البيئة وهو يقرأ اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الهيدروجين. ويقرأ فى مدى ١٤-٠ وذو حساسية PH 0.1± .

٣- **أوتوكلاف Autoclave** : لتعقيم البيئة الغذائية والزجاجيات على درجة حرارة ١٢١°م وضغط ١.٥.

٤- **جهاز طرد مركزى:** وهذا الجهاز يعمل حتى ٧٠٠ لفة/ دقيقة.

٥- **هزاز Shaker** : ويوجد منه نوعان: أفقى ودائرى والأفقى هو الأكثر استخداماً ومزود بضابط لسرعة الهز ويعمل فى مدى ٠-٢٠٠ لفة/ دقيقة.

٦- **ترمومترات لقياس درجة الحرارة داخل الحضانات.**

٧- **كابينة تعقيم (هود) (Hood) Laminer Flow** وهى تعمل على تخليص الهواء الداخل إلى حيز الكابينة من الكائنات الدقيقة عن طريق امراره على فلاتر ميكروبية وقد يزود بأشعة فوق بنفسجية Ultera vilot lamp ومصدر للإضاءة وأبعاده H29 X D17X W50 ومنه فردى وزوجى.

٨- **حضانة Incubator** : وتكون مزودة بضابط للحرارة وتعمل من ٤-٤٠°م ومزودة بإضاءة مع ميقاتى لضبط فترات الإضاءة والإظلام وتتراوح شدة الإضاءة بها من 1000 إلى 10000 LUX .

٩- موازين حساسة: لوزن الكيماويات وتزن حتى أربع أرقام عشرية.
١٠ - جهاز تقطير مياه : ويفضل أن يكون من الأجهزة التى تقوم بتقطير الماء مرتين.
١١- حمام مائى Water bath . ١٢- مقلب مغناطيسى Magnetic steirrer .
١٣- مقياس لشدة الإضاءة LUX Meter . ١٤- ميكروسكوب ضوئى: لفحص الزراعات.
١٥- ثلاجة: لحفظ المحاليل والكيماويات.

الكيماويات: ولابد أن تكون نقية Pure ومصدر صناعتها معلوم ومنها الأملاح المعدنية والفيتامينات ومنظمات النمو والأجار والسكر والفحم النشط والمواد الطبيعية .... الخ.

بيئة زراعة الأنسجة
Tissue culture media

تختلف البيئة المناسبة لزراعة الأنسجة تبعاً لإختلاف النسيج المستعمل وطوره أو مرحلة النمو. ويوجد العديد من البيئات الغذائية التى تعطى للباحث فرصة الاختيار من بينها. وبصفة عامة تتركب البيئة الغذائية من:

١- الأملاح الغير عضوية: Inorganic salts

وتشمل العناصر الكبرى مثل النيتروجين، البوتاسيوم، الفسفور، الماغنسيوم، الكبريت، والعناصر الصغرى مثل الحديد، المنجنيز، النيكل، الكوبالت، الزنك، النحاس، البورون، المولبيدنم.

وهناك العديد من مخاليط الأملاح المعروفة مثل:

Murashing and skoog (MS), White, Nitseh and Nitsch وهذه المخاليط الثلاثة السابقة تناسب معظم النباتات وخاصة M.S ويمكن للباحث إضافة أى عناصر أخرى يراها ضرورية لنجاح الزراعات مثل زيادة تركيز الفوسفور بإضافة فوسفات الصوديوم الإحادية بتركيز 170 ملليجرام/ لتر.

٢- السكريات: Sugars : حيث يستخدم السكروز أو الجلوكوز والفركتوز والمانوز والمالتوز وهذه تستخدم بتركيزات تختلف باختلاف الجزء النباتى ومرحلة النمو فمثلا تركيز 2-4 % ملائمة لزراعة الأجنة، ٥% مناسبة لزراعة القمم النامية، ٧.٥% مناسبة لبيئة التطعيم الدقيق.

٣- الفيتامينات Vitamins :

وهى إحدى المكونات الهامة فى البيئة وعادة يستخدم فيتامين B1 (الثيامين) والبيروركسين وحمض النيكوتين والريبوفلافين، والبيوتين. كما يستعمل الاينوسيتول بتركيز ١٠٠ جزء فى المليون سواء كان فى صورة Myo أو Meso .

٤- الأحماض الأمينية Amino acid :

ومنها الارجنين وحمض الاسبارتيك وحمض الجلوتاميك والتبروزين وترجع أهميتها إلى زيادة نمو الكالس.

٥- المواد الطبيعية : Nutural compounds

وهذه المواد لا تستعمل إلا إذا فشلت البيئات فى إنماء النسيج أو عند الرغبة فى زيادة النمو لأن هذه المواد تحتوى على العديد من الفيتامينات والأحماض الأمينية ومن أهمها :

الكازين– صويا ببتون– مستخلص الخميرة والشعير– لبن جوز الهند– اندوسبرم الذرة– لب الموز– عصير البرتقال– عصير الطماطم..... الخ.

٦– منظمات النمو: Growth regulators :

تعتبر منظمات النمو من أهم مكونات البيئة وبدونها قد لا نحصل على أى نجاح من زراعة الأنسجة والأعضاء والخلايا وتشمل منظمات النمو المستخدمة كل من :

- الاكسينات Auxins مثل 2,4–D, NAA, IAA .
- السيتوكينينات Cytokinins مثل الكينتين، الزيتين، BA .
- الجبريللينات Gibrellins مثل GA3 .

وترجع أهمية هذه المنظمات إلى دورها فى انقسام واستطالة الخلايا وكذلك قدرتها على تكشف الأعضاء المختلفة والتوازن بينها له دور هام جداً فى نوع النمو الناتج هل هو نمو Shoot أم جذر Root أم كالوس أم أجنة جسمية Samatic embryos .

إجراءات زراعة الأنسجة

١– تحضير البيئة وتعقيمها Stocks and media prepration .
٢– اختيار نبات الأم Selective of mother plants .
٣– اختيار الجزء النباتى Selective of explant .
٤– تعقيم المنفصل النباتى Sterelization and washing of explant .
٥– نقل الجزء النباتى لسطح البيئة Transfer of the explant to suitable the media .
٦– التحضين فى ظروف مناسبة In cubation of the environment .
٧– تكوين النموات الخضرية Proliferationof shoots .
٨– تكوين الجذور على النموات Transfer of shoots to rooting medium .
٩– تقسية النباتات قبل نقلها للتربة Hardening of plants .

وفيما يلى نبذة عن كل إجراء من هذه الإجراءات:

١– تحضير البيئة:

- تشمل تلك الخطوة إعداد Stocks من مكونات البيئة المختلفة وتخزينها على درجة ٤–٥°م لحين استعمالها وذلك لتوفير الجهد اللازم لوزن هذه المكونات كل مرة بحيث تجدد هذه الـ stocks كل شهر. ويجب أن نأخذ فى الاعتبار أن بعض مكونات البيئة تذوب فى الماء وبعضها لا يذوب فى الماء مثل الكينتين يذوب فى محلول قلوى، BA يذوب فى Hcl والاكسين يذوب فى الكحول أو KOH .
- تخلط مكونات البيئة معاً وتكمل إلى لتر أو إثنين حسب المطلوب بالماء المقطر ثم توضع على المقلب المغناطيسى.
- يضبط الـ PH بإضافة نقط من NaoH 0.1 عيارى أو Hcl ٠.١ عيارى حتى تصبح البيئة ذو PH 5.7± 0.1 وقد تصل إلى PH 6 عند زراعة الجذور.

- يضاف الأجار بتركيز 0.6 إلى ١% ويذاب على حمام مائى درجة حرارته ١٠٠ °م لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة ثم يضاف الفحم حسب الحاجة ثم توزع البيئة على الأنابيب أو الدوارق المعقمة مسبقاً ثم تغطى وتوضع فى الاتوكلاف للتعقيم.
- تعقم البيئة فى الأوتوكلاف على درجة حرارة ١٢١° م وضغط ١كجم/سم٢ لمدة ١/٤ ، ١/٣ ساعة على حسب حجم البيئة فى الدوارق مع ملاحظة عدم فتح الجهاز إلا بعد نزول الضغط تدريجياً إلى الصفر لأن ذلك قد يسبب غليان البيئة وتطايرها وتطاير الأغطية وكسر الأنابيب والدوارق.
- ويجب مراعاة أن GA_3 يعقم بالترشيح (الفلتر) لأنه يهدم بالحرارة ولذلك يضاف بعد خروج الأنابيب من الأوتوكلاف وبعد أن تصل درجة حرارتها إلى ٥٠°م .
- كما يجب ألا يزيد حجم البيئة داخل الأنبوبة أو الدورق عن الثلث حتى يسمح بالتهوية الجيدة.

٢- **اختيار النبات الأم:** يجب أن يكون النبات الأم فى حالة صحية جيدة وفى بداية نشاطه وذو صفات جيدة وخالى من الأمراض خاصة الفيروسية ويجب أن يكون خرج من طور السكون وخاصة الفواكه المتساقطة- الأبصال- الكورمات- الدرنات.

٣- **اختيار الجزء الذى يستخدم فى الزراعة:** الأجزاء التى تستخدم فى الزراعة هى القمم النامية- الجذور - السيقان - أجزاء الأزهار- أجزاء الثمار- البراعم الأبطية- الأجنة- السويقة الجنينية- نسيج النيوسيلة- الاندوسبرم- الفلقات- النخاع- أجزاء من الأوراق. وكل نبات يؤخذ منه Explant مناسب لزراعة الأنسجة.

- وهناك عدة اعتبارات من الواجب النظر إليها قبل اختيار الجزء المزروع وهى: نوع العضو الذى سيؤخذ منه النسيج- الحالة الفسيولوجية للعضو المأخوذ منه الجزء المزروع- موسم أخذ الجزء النباتى - حجم الجزء المستعمل- العمر الفسيولوجى للمنفصل النباتى وأخيراً الحالة العامة للنبات.

٤- **تعقيم الجزء النباتى:** يغسل الجزء النباتى المستعمل تحت تيار من ماء الصنبور لمدة ساعة للتقليل من التلوث إلى درجة كبيرة ثم تنقع الأنسجة فى كحول إيثايل ٧٠% لمدة ٥ دقائق ويجب ألا تزيد عن ذلك حتى لا يحدث جفاف للجزء النباتى Dehydration . ثم تغمس الأنسجة فى محلول هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز ١% لمدة ٥-٣٠ دقيقة حسب نوع النسيج مع إضافة نقطتين من مادة Tween 20 لزيادة فعل مادة التعقيم. ثم تغسل الأنسجة بماء مقطر معقم ثلاث مرات حتى يتم التخلص من كل آثار محلول التعقيم.

- **تعقيم البذور:** تعقم البذور فى محلول برومين بتركيز ١% لمدة ٥ دقائق ثم تغمس فى محلول الصوديوم هيبوكلوريت ١% لمدة ١٥-٣٠ دقيقة مع استخدام مادة ناشرة ويمكن تعقيم البذور فى محلول كلوريد الزئبق بتركيز 0.1% لمدة ٣٠ دقيقة. وقد تغمس البذور فى كحول ٩٥% ثم تحرق سريعاً على لهب فيتم التعقيم السطحى للبذور.

٥- **نقل الجزء النباتى المعقم إلى سطح البيئة:**

- يتم نقل الجزء النباتى المعقم على سطح البيئة المعقمة مسبقاً فى الأوتوكلاف باستخدام أدوات معقمة وفى حيز معقم وهو جو كابينة التعقيم (الهود) Laminer air flow .
- وعادة يكون الوسط الغذائى (البيئة) فى ثلاث صور هى الصورة الصلبة أو شبه الصلبة والسائلة ويختلف ذلك باختلاف نوع الجزء النباتى المستخدم والغرض من الزراعة فمثلاً نبات الأسبرجس، الجربيرا تنجح زراعتها على البيئة الصلبة. كما وجد أن كالسى الدخان يتخلق عند نقله من على بيئة صلبة إلى بيئة سائلة.
- ويجب أن تزود كابينة الزراعة بمصدر للهب لتعقيم الأدوات المستخدمة فى الزراعة حتى تقلل أو نمنع التلوث تماماً.

٦- **التحضين فى ظروف بيئية مناسبة للمزرعة:** العوامل أو الظروف البيئية اللازم توافرها عند زراعة الأنسجة النباتية هى الإضاءة المناسبة والحرارة المناسبة والرطوبة المناسبة للحفاظ على الأنسجة من الجفاف والموت.

- **الاحتياجات الضوئية:** يجب النظر للاحتياجات الضوئية لمزرعة الأنسجة من حيث طول الفترة الضوئية Day lenth وشدة الإضاءة Light intensity باهتمام كبير لأن ذلك يساعد على نشأة وتخليق الأعضاء Intiation .

- ويرجع صعوبة تكشف الأعضاء فى بعض الزراعات الغير ناجحة إلى عدم تعرضها لشدة الإضاءة المناسبة. ولقد لوحظ أن زراعة الأنسجة يلزمها التدرج فى شدة الإضاءة من ٣٠٠-٣٠٠٠ Lux وفى مرحلة بدايات الجذور يلزم التدرج من ١٠٠٠-٣٠٠٠ Lux .
- أما بالنسبة لفترات الإضاءة والإظلام فإنها تختلف أيضاً باختلاف النباتات ومرحلة الزراعة وقد وجد أن معظم الزراعات يناسبها ٦ ساعات إضاءة، ٨ ساعات إظلام وهناك بعض الزراعات تحتاج لظروف خاصة مثل نبات الجزر فإنه يحتاج إلى ١٢ ساعة إضاءة/ يومياً والقنبيط يحتاج إلى ٩ ساعات.
- كما يراعى أن تكون الإضاءة فى غرفة النمو Growth chamber أو غرفة التحضين مصدرها لمبات الفلوروسنت البيضاء إلا إذا احتاجت بعض النباتات غير ذلك.
- **الاحتياجات الحرارية:** فى معظم الأحيان تكون درجة حرارة ٢٧ °م هل أنسب درجة لنمو الأنسجة فى النباتات الاستوائية. وتكشف الأعضاء يكون بصورة أفضل فى درجات حرارة تتراوح بين ٢٧-٣٥ °م.
- وفى نبات الدخان وجد أن الدرجة المناسبة هى من ١٨-٣٣ °م.

٧- تكوين النموات الخضرية:

- اكتشف Skoog & Miller 1969 أن التوازن الهرمونى بين الاكسين والسيتوكينين هو الذى يتحكم فى تكوين النموات الخضرية أو الجذور من كالوس نبات الدخان. ولذلك فإن تكون النموات الخضرية shoots يلزمه وجود مستوى عالى من السيتوكينين فى البيئة مع مراعاة ظروف التحضين فى غرفة النمو كما سبق ذكره.
- كما ذكر أن نمو الكالوس يحتاج إلى محتوى متوازن من الأكسين والسيتوكينين فى البيئة.

٨- **تكوين الجذور:** بعد تكوين النموات الخضرية يتم نقلها على بيئة ذات مستوى مرتفع من الأكسين لتشجيع تكوين الجذور ويختلف بتركيز الاكسين إلى السيتوكينين فى بيئة الزراعة باختلاف نوع النبات.

- وذكر بعض الباحثين أن وجود الجبريللين فى بيئة الزراعة يثبط تكوين الجذور مع ملاحظة ظروف التحضين حيث لوحظ أن الإظلام يشجع تكوين الجذور أو وضع الفحم النباتى النشط فى البيئة والتى تزرع فيها النموات ويعطيها المظهر الغامق يشجع من نمو الجذور.

٩- **تقسية (أقلمة) النباتات قبل نقلها للتربة:** وتعتبر هذه الخطوة من أهم مراحل زراعة الأنسجة لأنها تحدد نجاح هذه التقنية من عدمه. وعادة تنقل النباتات الناتجة من بيئة التجذير إلى بيئة سائلة تتكون من الأملاح والسكر وبعض الفيتامينات والفحم النشط.

- كما يتم تعريض النباتات لشدة إضاءة عالية فترفع إلى 10000 Lux .
- ثم تنقل النباتات إلى أصص أو أكواب بلاستيك بها بيئة مكونة من بيت موس وفيرموكلايت وتوضع تحت وحدة الرى الرزازى Under mist مع تدفئة قواعد الأصص وتغطية النباتات بالبلاستيك الشفاف وأحداث ثقوب تدريجية فى هذا الغطاء ثم تتم إزالته تماماً.

- تروى النباتات بمحلول هوجلاند مرة فى الأسبوع وذلك لمدة ٣-٤ أسابيع ثم تنقل النباتات إلى الظل ثم إلى الجو الخارجى فى المشتل.

استخدام زراعة الأنسجة كوسيلة سريعة للتكاثر

الإكثار الخضرى من أهم طرق الإكثار بالنسبة للكثير من النباتات وخاصة أشجار الفاكهة والنباتات التى لا تكون بذور. ويستخدم فيها الأبصال والدرنات والكورمات والتطعيم وتكوين الجذور على العقل بالإضافة إلى زراعة الأنسجة والخلايا.

وتختلف زراعة الأنسجة عن طرق الإكثار التقليدية فيما يلى:

١- صغر حجم الجزء النباتى المستخدم فى الإكثار.
٢- تتم الزراعة على وسط غذائى صناعى (بيئة صلبة- شبه صلبة- بيئة سائلة).
٣- تتم الزراعة تحت ظروف معقمة وتحت ظروف بيئية مناسبة.
٤- يمكن إنتاج إعداد كبيرة من النباتات فى فترة قصيرة.
٥- خلو النباتات الناتجة من الأمراض وخاصة الفيروسية.
٦- سهولة الاحتفاظ بتلك النباتات وتخزينها لحين الحاجة إليها.
٧- انخفاض تكلفة الإنتاج على المدى البعيد وخاصة عند إنتاج نباتات الزينة والفاكهة غالية الثمن.
٨- يمكن إنتاج النباتات فى أى وقت دون الارتباط بموسم زراعى معين.

- **وتتبع الطرق (الأساليب) التالية لإكثار النباتات باستخدام زراعة الإنسجة:**

١- إنتاج الكالوس: Callus Production
٢- تكوين الأفرع (النموات) الخضرية الجانبية: Axillary branching .
٣- تكوين الأجنة الجسمية: Somatic embryogenesis .

وفيما يلى شرح لكل طريقة من هذه الطرق بالتفصيل:

١- إنتاج الكالوس: وفى هذه الطريقة يزرع الجزء النباتى Explant للحصول على نسيج الكالوس خلال المرحلة الأولى ثم تنقل على بيئة جديدة تركيبها مختلف من حيث المستوى الهرمونى والفيتامينات لتكوين النموات الخضرية العرضية على الكالوس خلال المرحلة الثانية ثم ينقل كل نمو منفرداً على بيئة جديدة تركيبها مختلف لتكوين الجذور خلال المرحلة الثالثة ثم تتم تقسية النباتات تمهيداً لنقلها للتربة خارج المعمل.

- **البيئة المستخدمة Media** : يفضل أن تكون البيئة غنية بالأكسين ١-١٠ مليجرام/ لتر وخاصة 2-4-D لدوره الواضح فى إنتاج الكالوس مع مستوى منخفض من السيتوكينين صفر- ٠.١ مليجرام/ لتر ويفضل استخدام Benzyle adenine (BA) وذلك لتكوين الكالوس.
- ولتكوين النموات الخضرية ينقل الكالوس على بيئة تحتوى على مستويات متكافئة من الاكسين والسيتوكينين ٣-٢ مليجرام لتر أو على بيئة محتواها مرتفع من السيتوكينين ومنخفض من الاكسين حسب نوع النبات.
- كما يفضل خلال هذه المرحلة إضافة سلفات الأدينين [١٥٠ مليجرام/ لتر] وإضافة الكازين [٥٠٠-١٠٠٠مليجرام/لتر] لأنها تساعد على تكوين النموات الخضرية.

- ولتكوين الجذور على النموات يجب أن تحتوى البيئة على مستوى مرتفع من الأكسين ويستعمل IAA بتركيز ١٠ مليجرام/ لتر أو IBA بتركيز 0.1-3.0 مليجرام / لتر .
- وفى بعض الأحيان تحتوى البيئة على نصف أو ربع أو ثلث تركيز الأملاح وإضافة الفحم النشط.
- **وفى هذه الطريقة يتم إنتاج عدد كبير من النباتات ولكن لها بعض العيوب مثل:**

١- تغير فى صفات النباتات الناتجة لحدوث تضاعف فى خلايا الكالوس.

٢- استخدام 2,4-D يسبب حدوث طفرات قد تكون غير مرغوبة كما فى نخيل البلح.

٢- **تكوين النموات الخضرية الجانبية:** وفى هذه الطريقة تزرع القمم النامية بطول 1-5 مم أو أجزاء من الساق أو الجذر أو الورقة وتزرع على بيئة ذات مستوى منخفض من الاكسين والسيتوكينين (٠.٠١ – ٠.١ مليجرام/ لتر IBA) و (٠.٠٥ – ٠.٥ مليجرام/ لتر BA) أو على بيئة محتواها متوسط من الاكسين والسيتوكينين (٢ ملجيرام/ لتر NAA) و (٢ ملليجرام/ لتر kinetin) . حيث تنمو الأجزاء النباتية إلى أفرخ shoots ثم تنقل النموات على بيئة جديدة لإحداث التضاعف أى زيادة عدد النموات الجانبية.

- ثم ينقل كل نمو منفرداً على بيئة التجذير ثم إحداث الأقلمة كما سبق ذكره فى الطريقة الأولى.

٣- **تكوين الأجنة الجسمية:** ويتم تكوين الأجنة الجسمية على خلايا الكالوس أو على الجزء النباتى مباشرة حيث يمكن إنتاج ما يقرب من ١٠٠٠ جنين لكل جرام من الخلايا المزروعة.

- وفى هذه الطريقة تزرع الأجزاء النباتية على بيئة ذات مستوى منخفض من منظمات النمو (١-١٠ مليجرام من 2,4-D + 0-0.1 مليجرام/ لتر من BA) فتتكون مبادئ خروج الأجنة الجسمية (العرضية).
- فى المرحلة الثانية تنقل الأجنة العرضية المتكونة على بيئة تساعد فى زيادة عدد الأجنة وهذه يزداد فيها تركيز السيتوكينين عن الاكسين زيادة كبيرة (1.0:100). كما يفضل خلال هذه المرحلة إضافة مستخلص الشعير بتركيز 500-1000 مليجرام/ لتر وكذلك إضافة سلفات الأدينين بتركيز ١٠ مليجرام/ لتر وزيادة تركيز النيتروجين والبوتاسيوم.
- ثم بعد ذلك تنقل الأجنة المتكونة على بيئة بسيطة متكونة من الأملاح والسكر والفيتامينات ولا يضاف منظمات نمو وفى بعض الأحيان يضاف الجير يللين لزيادة نمو الأجنة.
- وبعد ذلك تتبع نفس الخطوات السابق ذكرها فى الطريقة الأولى وقد تغلف الأجنحة وتخزن أو تنقل لمكان آخر.

استخدام زراعة الأنسجة لإنتاج النباتات الخالية من الفيروس

يتم الحصول على نباتات خالية من الفيروس باستخدام تقنية زراعة الأنسجة بالأساليب الآتية:

١- زراعة القمة النامية Shoot tip culture .

٢- التطعيم الدقيق Shoot tip micrografting

٣- نشأة الأجنة النيوسيلية Initiation of nucilear embryos

وفيما يلى شرح لكل أسلوب من هذه الأساليب:

١- زراعة القمة النامية: القمم النامية عادة ما تكون خالية من الفيروس لأن معدل نموها يكون أسرع من معدل تكاثر الفيروس كما أن الفيروس ينتقل ببطء خلال القمة النامية لخلوها من أنسجة الخشب ولذلك تؤخذ القمم النامية بأطوال 0.2-0.5 مم مع ١-٣ من مبادئ الأوراق Leaf primordial. ويمكن أن تعامل القمم بالجيريللين قبل أخذها حتى تستطيل ثم تقطع ويمكن قتل الفيروس بوضع القمم النامية فى ماء درجة حرارته من 30-40° م . ثم يتبع معها نفس التقنية السابق ذكرها فى استخدام زراعة الأنسجة كوسيلة للإكثار.

٢- التطعيم الدقيق بالقمة النامية: وفى هذه الطريقة تتم زراعة بذور الأصل المراد التطعيم عليه بعد تعقيمها وغسلها بالماء المقطر على بيئة مكونة من أملاح M.S دون إضافة أى منظمات نمو.

- ويمكن الحصول على القمم النامية اللازمة للتطعيم من النموات الحديثة بالأشجار المنزرعة فى البستان أو الصوب ثم تعقم وتغسل بالماء المقطر وذلك داخل كابينة الزراعة.
- تنقل البادرات الناتجة من زراعة البذور داخل كابينة الزراعة ثم نقوم بعمل قطع على شكل حرف T مقلوبة ثم توضع القمة النامية داخلها وذلك باستخدام أدوات معقمة ثم تغلق الأنابيب وتحضن داخل غرفة النمو تحت ظروف بيئية مناسبة حتى تمام الالتحام بين الأصل والطعم ونمو الطعم إلى Shoot ثم يجرى لها عملية الأقلمة ونقلها إلى الصوبة ثم إلى المشتل ثم إلى الأرض المستديمة بعد وصولها إلى الحجم المناسب.
- وقد نجحت هذه التقنية فى إكثار العديد من أشجار الفاكهة مثل الموالح (الحمضيات).

٣- نشأة وإنتاج الأجنة النيوسيلية: تنتج الأجنة الخضرية النيوسيلية طبيعياً فى العديد من النباتات مثل بعض أنواع الموالح وبعض أصناف المانجو ولكن يصعب تكوينها فى النباتات وحيدة الجنين. ولإنتاج مثل هذه الأجنة من نسيج النيوسيلة هدف هام حيث أن هذه الأجنة تكون خالية من الفيروس.

- ويتم ذلك بالحصول على ثمار غير ناضجة (بعد حوالى ١٠٠- ١٢٠ يوم من التلقيح والإخصاب) ثم تعقم سطحياً وتستخرج منها البذور ثم ينزع منها الجنين الجنسى ثم يزال النسيج النيوسيلى ويزرع على بيئة غذائية معقمة سبق إعدادها حيث تتكون الأجنة مباشرة على نسيج النوسيلة أو يتكون الكالوس أولاً ثم تتكون عليه الأجنة النيوسيلية بعد ذلك.
- وقد وجد أن الاكسين (NAA) بتركيز ٠.١ مليجرام/ لتر يشجع تكوين الأجنة. كما وجد أن التركيز المنخفض من السيتوكينين (٠.٠١ مليجرام/ لتر) يشجع تكوين الأجنة والتركيز العالى يثبط إنتاجها.
- كما وجد أن مستخلص الشعير بتركيز 500-1000 جزء فى المليون والأدينين سلفات بتركيز ٢٥-١٠٠ جزء فى المليون يشجع على تخليق الأجنة العرضية على نسيج النيوسيلة.
- كما لوحظ أن تعريض الزراعات لدرجة حرارة ثابتة ٢٧ °م وإضاءة خافتة ١٠٠ قدم/ شمعة يشجع تكوين الأجنة من الينوسيلة.

إستخدام زراعة الأنسجة فى إنتاج المواد العلاجية والطبيعية

تستخدم الكثير من النباتات كمصدر للحصول على كثير من الفيتوكيماويات مثل القلويدات، الجلوكسيدات، الكحولات والفينولات وهى جميعها مركبات ثانوية لعمليات الأيض الغذائى داخل النبات وهذه النباتات تعرف بالنباتات الطبية والعطرية. وهذه المواد الطبيعية تستخدم فى العديد من الصناعات الدوائية ومستحضرات التجميل ومكسبات الطعم والرائحة للصناعات الغذائية.

وعلى سبيل المثال فإن المواد العطرية التى تستخرج من النباتات فى العالم تعادل ما قيمته أكبر من ١.٥ مليون دولار سنوياً مما يظهر أهميتها الكبيرة.

- **ويعترض استخلاص تلك المركبات كثير من المشاكل أهمها:**

١- النباتات الطبية العطرية تنتج فى مواسم محددة وليس طول العام فهى غالباً نباتات عشبية غير معمرة.
٢- اختلاف نسب تلك المواد الثانوية تبعاً لتغير الظروف البيئية المؤثرة فى إنتاجها.
٣- تعرض النباتات للأمراض والآفات فى المزرعة.
٤- الحاجة إلى مساحات كبيرة من الأرض لزراعة تلك النبات.
٥- تحتاج إلى جهد كبير لإنتاجها وجمعها ونقلها إلى مصانع الاستخدام.

- ولذلك تم التفكير فى استخدام تقنية زراعة الأنسجة للحصول على هذه المركبات دون التعرض للمشاكل السابق ذكرها. حيث أشار بعض الباحثين إلى إمكانية استخدام زراعة الأنسجة للحصول على الفيتوكيماويات وذلك بزراعة أجزاء تختلف باختلاف النبات مثل المريستيمات، الجذور، الأوراق وأنسجة الثمار الغير ناضجة لأن النبات الطبى والعطرى لا يقوم بإنتاج المادة الفعالة من كل الأجزاء بل من جزء معين مثل إنتاج المانيتول من أوراق النعناع ومادة الأتروبين من جذور نبات الأتروبا وزيت الياسمين من أزهار الياسمين.
- ولذلك تزرع الأجزاء النباتية Explants لإنتاج كتل من الخلايا المعروفة باسم الكالس Callus . وكذلك بزراعة معلقات الخلايا من تلك النباتات.
- وكانت أول الدراسات التى تناولت إمكانية الحصول على الفيتوكيماويات مثل الزيوت العطرية ما قام بها بعض الباحثين عام ١٩٧٦ من زراعة الأنسجة الغير متميزة لنبات البابونج.
- كما قام بعض الباحثين عام ١٩٧٨ من إنتاج الزيت العطرى من زراعة شرائح من أوراق وسيقان نبات الكافور.
- كما تمكنت إحدى الشركات اليابانية عام ١٩٨٣ من استخدام تقنية زراعة الأنسجة تجارياً لإنتاج صبغة الشيكانين الحمراء.

إنتاج مكسبات الطعم باستخدام زراعة الأنسجة

- مكسبات الطعم فى الفواكه عبارة عن مركبات تتكون أثناء نضج الثمار عندما يتحول التمثيل الغذائى فى الثمرة ناحية الهدم Catabolism حيث توجد كميات قليلة من الدهون والكربوهيدرات والبروتينات حيث تحول تدريجياً إلى رائحة الثمار وطعمها المميزان لها. ولذلك فى معظم الحالات نجد أن هذه المواد لا تتكون فى الخلايا الغير مخلقة.

- وقد اقترح بعض الباحثين عام ١٩٨٣ أنه لم يكن فى الإمكان تكوين الزيوت العطرية من زراعة أنسجة الليمون، الخوخ، الزبدية، التفاح لغياب الغدد الزيتية الضرورية لبناء وتراكم الزيوت العطرية.

- كما أكد بيكر Becker عام ١٩٨٤ هذه النتيجة وقال أنه لم يتمكن من الحصول على الزيوت العطرية بكلس نبات الينسون والنعناع الفلفلى إلا عند تخليق النباتات على الكالوس وإنتاج الزيوت العطرية من هذه النباتات.

- ولكن تمكن بعض الباحثين من استخلاص بعض المواد من كالوس الكاكاو وكالوس النعناع والفلفل. وبصفة عامة فإن النواتج الثانوية لعملية التمثيل تتأثر ببعض العوامل.

العوامل المؤثرة على إنتاج النواتج الثانوية لعملية التمثيل الغذائى

١- مكونات البيئة (الوسط الغذائى).

٢- الظروف البيئية:

أ- الضغط الاسموزى. ب- الضوء. جـ- المحتوى الغازى. د- درجة أيون الهيدروجين PH . هـ- المظهرات Elicitors .

٣- نوع الجزء النباتى ومرحلة نموه.

١- مكونات البيئة:

- تختلف الاحتياجات الغذائية المشجعة على تخليق الفيتوكيماويات تبعا لنوع النبات ففى كثير من النباتات يدفع المستوى العالى من الأملاح على تكون تلك المركبات. فى حين وجد أن زيادة النيتروجين فى البيئة الغذائية يؤدى إلى نقص النواتج الثانوية حيث أدى زيادة النيتروجين إلى ٣% فى البيئة إلى تثبيط إنتاج مادة الشيكونين Shikonin .
- كما لوحظ أن زيادة الفوسفور مفيد فى إنتاج الفتيوكيماويات.
- ووجد أن زيادة نسبة السكر عن ٥% يسبب رفع الضغط الإسموزى فى الوسط الغذائى مما يسبب زيادة إنتاج المركبات الثانوية.
- كما أوضحت الدراسات إن إضافة منظمات النمو وخاصة الاكسينات تؤثر فى إنتاج الفيتوكيماويات وتشجعها.
- كما لوحظ أن إضافة المواد الطبيعية مثل مستخلص الخميرة ولبن جوز الهند والكازين يؤدى إلى زيادة الفيتوكيماويات الناتجة من الكرفس.

٢- الظروف البيئية:

أ- الضغط الاسموزى: أشار الباحث رومانى Romani ومساعدوه عام ١٩٧٩ عند زراعة معلقات خلايا الكمثرى يزداد إنتاج الإيثلين عند رفع الضغط الأسموزى للبيئة. كما لوحظ أن إضافة المانيتول وحمص الاسكوربيك بتركيزات عالية يؤدى إلى رفع الضغط الاسموزى للبيئة مما يسبب زيادة إنتاج القلويدات الناتجة من زراعة خلايا وأنسجة الفلفل.

ب- الضوء: وجد أن للضوء تأثير هام على إنتاج كثير من الإنزيمات المسئولة عن إنتاج الفيتوكيماويات الهامة فى النبات. وتؤثر كل من شدة الإضاءة ومدة الإضاءة فى إنتاج الصبغات عند زراعة خلايا الجذر. كما لوحظ أن صبغة الأنثوسيانين لا تتكون عند غياب الضوء.

جـ- المحتوى الغازى: وجد أن غازات وسط الزراعة لها تأثير هام على إنتاج المواد المكسبة للطعم فى التفاح والعنب ففى دراسة قام بها بعض الباحثين عام ١٩٨١ وجدوا أن زيادة تركيز ثانى أكسيد الكربون فى وسط الزراعة أدى إلى زيادة إنتاج بعض المواد مثل الايثيل أسيتات إيثانول.

د- درجة أيون الهيدروجين (PH) : فى دراسة على معلقات نبات الفلفل الحار وجد أن درجة أيون الهيدروجين (PH) فى الوسط الغذائى لها تأثير هام على إنتاج القلويدات من خلايا النبات. كما وجد أن رفع الـ PH من ٤.٥ إلى ٥.٥ يزيد من إنتاج صبغة الانثوسيانين عند زراعة خلايا الجزر.

هـ- المظهرات: Elicitors ويقصد بها مظهرات النواتج الثانوية مثل خلايا البكتريا والفطر الضعيفة. حيث أن مهاجمة الكائنات الميكروبية للخلايا النباتية تؤدى إلى زيادة تكوين النواتج الثانوية للتمثيل الغذائى مثل الزيوت العطرية والفينولات والقلويدات والتى تعتبر فى حقيقتها ذات نشاط مضاد للكائنات المرضية. ولكن هذا يحتاج إلى مزيد من الدراسة لتوضيح هذا الدور.

٣- نوع الجزء النباتى ومرحلة نموه:

- حيث تختلف المركبات الثانوية الناتجة باختلاف نوع الجزء النباتى ومرحلة نموه فمثلاً زراعة أجزاء نباتية معينة مثل الأوراق أو الجذور لا تنتج مواد ثانوية إلا إذا أعطت نسيج كالسى ثم تخلقت نباتات على الكالس مثل الينسون، الشمر والنعناع.
- كما لوحظ أن كمية النواتج الثانوية تختلف باختلاف مرحلة نمو الجزء النباتى حيث أن نسيج الكالس أو معلقات الخلايا تعطى كمية كبيرة من النواتج الثانوية عن الكمية الناتجة من زراعة الأعضاء الكاملة مثل البراعم أو القمم النامية حيث أن هذه الأعضاء تتجه إلى الزيادة العددية أو التضاعف على حساب إنتاج الفيتوكيماويات.
- كما وجد أن كثير من الخلايا الغير متميزة لا تستطيع تخليق الفيتوكيماويات ولذلك كان حث الخلايا على التميز وتكوين الأعضاء من الأشياء الدافعة لتكوين تلك النواتج حيث وجد بعض الباحثين أن الكالس الغير متميز لنبات الاثروبا لا يكون قلويد الاتروبين والهيوسامين بينما أمكن تكوين تلك القلويدات عند تميز الكالس إلى جذور.
- كما وجد بعض الباحثين أن نسبة الزيت المأخوذة من الكالس نبات الكافور كانت أعلى عند أخذ الجزء النباتى من نبات فى مرحلة الطفولة.

استخدام زراعة الأنسجة فى خدمة مربى النبات

تخدم تقنية زراعة الأنسجة مربى النبات فى مجالات عديدة من أهمها ما يلى:

١- زراعة المتك أو حبوب اللقاح للحصول على نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية.

٢- زراعة الأجنة الناتجة من الهجن الجنسية البعيدة.

٣- إحداث التضاعف Polypoildy والحصول على الطفرات.

١- زراعة المتك وحبوب اللقاح Anther and pollengrains culture

قدم بعض الباحثين عام ١٩٧٤ أول تقرير عن زراعة المتوك وحبوب اللقاح ومن بعدهم استخدم العديد من الباحثين هذه التقنية فى إنتاج النباتات الأحادية فى العديد من النباتات مثل الداتورة والأرز والقمح والذرة والدخان والبطاطا والقطن وفول الصويا والفلفل وذلك بغرض التحسين الوراثى وإنتاج نباتات متماثلة Homozygous والتى تدخل فى برامج التهجين للحصول على قوة الهجين.

- **تقنية (تكنيك) الزراعة:** تعقم البراعم الزهرية قبل تفتحها ثم تفصل المتوك وتزرع على بيئة الأجار المناسبة السابق إعدادها. ويشترط أن تكون حبوب اللقاح داخل المتوك ناضجة حتى تنمو إلى أجنة دون أن تمر بمرحلة الكالس لأن الأجنة الناتجة من الكالس يمكن أن يكون بها تغيرات نتيجة لحدوث طفرات.
- أما عن زراعة حبوب اللقاح فبعد تعقيم البراعم الزهرية وقبل انتشار حبوب اللقاح مباشرة تنقل حبوب اللقاح بفرشاة معقمة من المتوك إلى محلول مغذى بحيث تكون كثافة حبوب اللقاح فى معلق البيئة ٤-٥×١٠^{٤} حبة لقاح لكل / ملل محلول.
- ثم يمرر هذا المحلول على فلتر ذو ثقوب دقيقة ثم يستقبل الراشح فى أنبوبة جهاز الطرد المركزى المعقمة وتطرد مركزيا بمعدل ١٠٠ لفة / دقيقة لمدة ٥ دقائق ثم يخلط معلق حبوب اللقاح مع كمية مساوية من البيئة الصلبة وتصب فى أطباق

بترى وتحضن على درجة حرارة ٢٥°م فتنمو حبوب اللقاح إلى أجنة خضرية مباشرة أو يتكون الكالس أولاً ثم ينقل على بيئة مناسبة لتخليق الأعضاء.

- وقد وجد أن جدار المتك يلعب دوراً هاماً فى تخليق الأجنة فقد أمكن بعد الباحثين من إنتاج نباتات أحادية المتك فى عملية تخليق الأجنة الخضرية من حبوب اللقاح وفيه يتم عمل شرائح من متوك الأزهار وتوضع على سطح البيئة الغذائية المناسبة وتوضـــع على سطح البيئة الغذائية المناسبة ويوضع فوقها شرائح من ورق الترشيح ثم يتم إسقاط نقطة من معلق حبوب اللقاح بالماصة فتتلامس مع جدار المتك بشكل غير مباشر مما يشجع تكوين الأجنة العرضية من حبوب اللقاح.

البيئة المناسبة: Media

- تختلف الاحتياجات الغذائية لزراعة حبوب اللقاح والمتوك بإختلاف الأنواع والأصناف فالبعض يحتاج إلى بيئة بسيطة مثل متوك الدخان والتى تنمو على بيئة مكونة من سكر وحديد مخلبى فقط بينما البعض الآخر يحتاج إلى بيئة معقدة للغاية وعادة تستعمل بيئة White 1963, Nitsh 1969, M.S, 1962 وفيها يستخدم السكروز بنسبة تتراوح بين 2-3 % وقد يزيد إلى ٦% فى بعض النباتات.
- والسكر فى بيئة الزراعة يمد حبوب اللقاح بالكربوهيدرات ويقوم بدور منظم للضغط الأسموزى اللازم للحفاظ على حبة اللقاح دون انفجار. وقد وجد أن بعض النباتات تحتاج للسكروز بنسبة عالية للمحافظة على الضغط الأسموزى المناسب كما فى القمح يحتاج إلى سكروز بنسبة ٩%، الذرة ١٢% .
- وقد أشار الباحث Chaphan 1973 إلى أن التركيز العالى من أيون الأمونيوم يثبط من تكوين الأجنة عند زراعة حبوب اللقاح فى نبات الأرز. كما أشار نفس الباحث أن إضافة لبن جوز الهند إلى البيئة بنسبة ١٠-١٥% يفيد فى إنتاج الأجنة الخضرية من المتك.
- أما عن الأحماض الأمينية والفيتامينات والهرمونات (منظمات النمو): فقد أشار بعض الباحثين أن إضافة الإحماض الأمينية مثل الجلوتامين، السيرين، الاسبراجين، التيروسين بتركيزات ١-٣ × ١٠^٣ يفيد فى تكوين الأجنة من المتك. كما أن إضافة الفتيامنيات مثل حمض الفوليك، الريبوفلافين٠.٥ جزء فى المليون والجليسين 0.2 ppm والبيوتين 0.5 ppm ضرورى لتكوين الأجنة من المتك. كما وجد أن إضافة الكينتين يقلل أو يثبط من تكشف الأجنة الخضرية ولذلك يضاف الأكسين منفرداً مثل IAA بتركيز (0.1-0.5ppm) ، NAA بتركيز (0.1-0.2ppm) . كما يمكن إضافة حمض الجيريلليك GA بتركيز (1.0ppm) للأسرع من تكوين ونمو الأجنة.

تحديد طور المتك: Anther stage

يمكن تحديد مراحل تكوين الجاميطات المذكرة باستعمال طريقة الاسيتوكارمن لمعرفة أنسب مرحلة يمكن أن تعطى الأجنة. وقد وجد أن تلك المرحلة تختلف باختلاف النبات فمثلاً فى القمح ثم إنتاج النباتات الأحادية من جميع مراحل تكوين حبوب اللقاح وهى:

PMC: Pollen mother cell. EUS: Early uninuclate stage.

IUS: Intermediate uninuclate stage. LUS: Late uninuclate stage.

أما عن الكالس فيتكون من جميع مراحل تكوين حبوب اللقاح ماعدا مرحلة Pollen mother cell (PMC).

- **بعض المعاملات التى تجرى على المتك قبل الزراعة لتشجيع تكوين الأجنة:**

١- أشار عدد من الباحثين على أن المعاملة بالحرارة الباردة للمتوك قبل الزراعة يشجع من تكوين الأجنة ويزيد من عدد حبوب اللقاح النامية لإنتاج الأجنة العرضية وذلك بتعريض البراعم الزهرية لدرجات حرارة 5° م لمدة ٧٢ ساعة أو 3°م لمدة ٤٨ ساعة.
٢- كما يمكن إعطاء صدمة للبراعم الزهرية بقطع أطراف النورات الزهرية قبل استعمال البراعم فى الزراعة.
٣- كما وجد بعض الباحثين عام ١٩٧١ أن تعريض البراعم الزهرية لأشعة جاما يشجع تكوين الأجنة من المتوك.
٤- كما أمكن تشجيع الأجنة من متك الطماطم عن طريق نقع البراعم الزهرية فى محلول 2,4-D بتركيز ١٠مجم/ لتر لمدة ٦ ساعات على درجة 4° م فى الظلام. ومما سبق نجد أن معاملات ما قبل الزراعة تشجع تكوين الأجنة.

- **الظروف البيئية المناسبة لتحضين الزراعات:** وجد أن تحضين الزراعات فى الظلام يشجع من تكوين الأجنة العرضية من المتك. وفى الطماطم تم تعريض الزراعات للإظلام لمدة ٧ أيام ثم نقلت إلى إضاءة قدرها 6000lux لمدة ١٦ ساعة يومياً لمدة ١٥ أسبوع تتكون بعدها الأجنة.
- وفى الموالح وجد أن تعريض الزراعات للإظلام لمدة ٧ أيام ثم إضاءة LUX 500 لمدة ١٦ ساعة يومياً يشجع تكوين الأجنة.
- وفى العنب وجد أن تعريض الزراعات للإظلام لمدة ٣٠ يوم ثم للإضاءة الطبيعية يشجع من تكوين الأجنة.

٢-زراعة الأجنة Embryo Culture

يعود تاريخ زراعة الأجنة إلى بداية القرن العشرين عندما أشار الباحث Honning عام ١٩٠٤ إلى إمكانية نمو الأجنة غير الناضجة والمستأصلة من البذرة إلى باردة كاملة. وبعد ذلك قام بعض الباحثين من زراعة أجنة الداتورة الهجين وبالتالى التغلب على صعوبة نمو إنبات البذور الناتجة من الهجين الجنسية.

- ومما هو معروف أنه كلما تباعدت درجة القرابة بين الآباء فإن فرصة نمو الأجنة تكون ضعيفة وبالتالى تموت أثناء تكوينها ولذلك تعزل هذه الأجنة فى مرحلة مبكرة بعد التلقيح
- وقد أمكن عزل الجنين الجنسى الهجين فى الموالح وزراعته على بيئة غذائية بسيطة تتكون من الأملاح والأجار فى حالة إذا كان الجنين كبير ومكتمل النمو. أما إذا كان الجنين صغير وغير مكتمل النمو فيتم استعمال بيئة أكثر تعقيداً.
- **وقد وجد من المفيد إضافة المواد الآتية لبيئة زراعة الأجنة:**
  ١- إضافة لبن جوز الهند بتركيز من ١٠-٢٥% .
  ٢- نسبة عالية من السكر للحفاظ على ضغط اسموزى مناسب.
  ٣- مادة منظمة للضغط الأسموزى للخلايا مثل سكر المانيتول والسربيتول.
  ٤- مستوى هرمونى ملائم مثل الجبريللين بتركيز ١- ١٠ ملجرام/ لتر.
- مع ملاحظة أن تعرض الأجنة لدرجة حرارة قدرها 26°م وإضاءة شدتها LUX 1000 لمدة ١٦ ساعة يومياً.

٣- إنتاج النباتات المتضاعفة باستخدام تقنية زراعة الأنسجة

إن زراعة الأنسجة لإنتاج النباتات المتضاعفة كروموسومياً هدف هام لمربى النبات لأن إنتاجها فى الطبيعة يكون بنسبة ضئيلة مما يجعل إنتاجها صناعياً ضرورة وذلك باستعمال مادة الكولشيسين ولكن هذه الطريقة تؤدى لإنتاج نباتات متضاعفة فى أجزاء من النبات وليس فى كل أجزاء النبات.

- ولذلك فإن استخدام زراعة الأنسجة والخلايا لإنتاج النباتات المتضاعفة كروموسومياً قد تغلب على بعض المشاكل السابق ذكرها فى بعض النباتات مثل الجزر، الدخان- البطاطا.
- وتتلخص هذه التقنية فى الحصول على الكالوس النامى على بيئة غذائية بتركيز عالى من الأملاح والذى عادة ما يحدث التضاعف ثم تعزل الخلايا منفردة وتنمى على حدة لتكون سلالة خضرية Clone والتى ينتج عند نقلها على بيئة مناسبة نبات كامل متضاعف.
- وتتكون البيئة المناسبة من أملاح MS مضافاً إليها IAA والكينيتن بتركيز ٢ملجم/ لتر + الأينوسيتول بتركيز 300 ملجرام/ لتر.
- وفى بعض الأحيان يضاف الكولشيسين للبيئة لإحداث التضاعف فى خلايا الكالس ثم بعد ذلك يتكون الأفرخ (Shoots) من الكالس.
- ثم تنقل الأفرخ إلى محلول هو جلاند + ٣% سكروز فتتكون عليها الجذور ثم تنقل بعد ذلك إلى التربة بعد إجراء الأقلمة.
- وبعد ذلك يمكن اختبار هذه النباتات عن طريق عد الكروموسومات باستخدام طريقة الاسيتوكارمن.

زراعة معلقات الخلايا Cell suspension culture

تعتمد هذه التقنية على عزل الخلايا الغير متطورة أو الغير متميزة والتى يمكن أن تنقسم عند زراعتها على بيئة مناسبة ثم تتكشف إلى كالسى Callus أو تجمعات من الخلايا Agregates أو إلى أجنة كروية الشكل وذلك على حسب نوع الوسط الغذائى ثم ينتقل الكالس أو الخلايا المتجمعة أو الأجنة إلى الوسط المناسب للحصول على النبات الكامل.

- وباستخدام هذه التقنية تم انتخاب نباتات مقاومة للملوحة على مستوى الخلية بزراعة معلقات الخلايا ثم نقلها على بيئات (أوساط) تحتوى على ١% كلوريد صوديوم فيؤدى ذلك إلى موت بعض الخلايا وتبقى الخلايا التى تحمل تراكيب وراثية تقاوم الملوحة فيتم نقلها على بيئة جديدة لتكوين الأعضاء (أوراق وسيقان وجذور).

- كما تم انتخاب بعض النباتات المقاومة للأمراض حيث تم معاملة كالس الخس بحمض الأكساليك وهو السم الذى تنتجه الكائنات الدقيقة المسببة للمرض الذى يسبب تعفن وموت الخس، وبعد هذه المعاملة تموت بعض خلايا الكالس وتبقى خلايا أخرى مقاومة فيتم عزلها وأكثارها ونقلها إلى بيئة جديدة لتكوين نبات كامل مقاوم للأمراض.

- كما يتم مضاعفة العدد الكروموسومى عند معاملة معلقات الخلايا بالكولشيسين فحدث لها تضاعف وتكونت نباتات. ومما سبق ذكره يمكن عن طريق تقنية زراعة الخلايا تحقيق التالى:
  ١- الإنتخاب على مستوى الخلية حيث يمكن الحصول على ملايين السلالات الخضرية.
  ٢- استحداث الطفرات وعزلها. ٣-إحداث التضاعف.

خطوات زراعة الخلايا:

١- يتم الحصول على الكالس عن طريق زراعة الأجزاء النباتية على بيئة مناسبة لذلك.

٢- ينقل الكالس إلى قمع مغطى بقماش نايلون ثقوبه (٣٥٠-٤٠٠ ميكرون) ويتم الضغط على الكالس حتى يتم الحصول على راشح محتوى على الخلايا.
- ويمكن إحداث زيادة فى تفكك الخلايا عن طريق المعاملة بإنزيم البكتينز بمعدل ٠.١ - ٠.٤ مليجرام/ لتر لمدة ساعة مع وضعها على جهاز هزاز بمعدل ١٢٥ لفة / دقيقة فى الظلام.
٣- بعد الحصول على الخلايا الفردية توضع فى بيئة سائلة تحتوى على محلول منظم يحافظ على الضغط الأسموزى وعادة يضاف المانيتول أو السربيتول بمعدل ٣٠جرام/ لتر أو يستخدم الانزيتول بتركيز ٠.٢ جرام/ لتر.
٤- تزرع بعد ذلك الخلايا على بيئة .M.S ويلاحظ أن زيادة الأمونيا هام فى تخليق الأجنة. ووجد أن النيكل والكبريت والزنك هام لتكاثر وانقسام الخلايا.أما عن تركيز منظمات النمو فقد وجد أن إضافة IAA مع 2,4-D بتركيز ٢.٠ ملجرام/ لتر ومستوى منخفض من السيتوكيتين مناسب لنمو الخلايا.
٥- تتم إعادة الزراعة على بيئة جديدة بشرط ألا يقل عدد الخلايا عن ١٠^{٦}/ ملل (٦٠ ألف خلية/ ملليتر) حتى لا تفقد الخلايا قدرتها على الانقسام.
مع ملاحظة أن عملية إعادة الزراعة تتم كل ثلاثة أسابيع.

- **التحضين:** تحضن الدوارق المحتوية على معلقات الخلايا على درجة حرارة 25-28^{o} م وفى الظلام أو الضوء الخافت على حسب نوع النبات. ففى خلايا البطاطا وجد أن معدل النمو يزداد إذا عرضت معلقات الخلايا إلى إضاءة شدتها ١٠٠٠- ٢٠٠٠ LUX . وفى البازنجان وجد أن أفضل معاملة عند تعريض الخلايا إلى 1100 LUX لمدة ٢٢ ساعة يومياً.

زراعة البروتوبلاست

عن طريق زراعة البروتوبلاست يمكن إحداث التهجينات الجسمية على مستوى الخلية وذلك عن طريق إندماج البروتوبلاست المتحصل عليه من نباتين مختلفين.
- ويتم ذلك بزراعة أجزاء نباتية مناسبة Explants للحصول على نسيج الكالس Callus .
- يعامل نسيج الكالس بالإنزيم للتخلص من الجدار الخلوى ومن أكثر الانزيمات استخداماً هو إنزيم السيليوليز بتركيز يتراوح بين ٢-٤% فى وجود محلول المانيتول ٠.٦ مول لمدة ٤- ٦ ساعات ودرجة حرارة 30-33^{o} م وعلى جهاز الهزاز Shaker .
- كما يمكن عزل البروتوبلاست من الأوراق دون الحصول على الكالس وذلك كما يلى:

عزل البروتوبلاست من الأوراق:

ويتم ذلك بإسلوبين: الأول يعرف باسم العزل فى خطوة واحدة وفيه تؤخذ أجزاء من بشرة الأوراق بعد تعقيمها وتقطع إلى شرائح رقيقة للغاية وتوضع فى طبق بترى وتعامل أنزيمياً وتوضع فى الظلام لمدة ثلاثة أيام مع ملاحظة أن المخلوط الانزيمى يختلف باختلاف نوع النبات. أما الأسلوب الثانى فيعرف باسم العزل فى خطوتين:

١- **الخطوة الأولى:** تؤخذ شرائح الورق ويوضع عليها المخلوط الإنزيمى ويضبط الـ PH على ٥.٨ ثم يرشح تحت تفريغ لمدة ٥ دقائق ثم ينقل الراشح على هزاز ذو حمام مائى درجة حرارته 25^{o}م لمدة ١٥ دقيقة ثم يغير المحلول الانزيمى ويحضن لمدة ساعة.

٢- **الخطوة الثانية:** تؤخذ الخلايا المنفصلة من الخطوة الأولى وتحضن لمدة ٩٠ دقيقة على درجة 30°م مع مخلوط أنزيمى ثم يطرد مركزياً بمعدل ١٠٠ لفة / دقيقة.

إنـدماج البروتوبلاسـت: بعـد عـزل البروتوبلاسـت يـتم عمـل دمـج البروتوبلاسـت للحصـول علـى النبـات الهجـين: ويـتم دمـج البروتوبلاست باستخدام عدة طرق هى:

١- الطريقة الميكانيكية. ٢-الطريقة الكيماوية. ٣-الطريقة الكهربية.

١- **الطريقة الميكانيكية:** وفيها يتم دمج البروتوبلاست تحت ميكروسكوب خاص وباستخدام ماصة خاصة تسمى Micropipette ثم ينقل على بيئة خاصة مناسبة لتكوين الجدار والأنسجة وتخليق النباتات الهجينة منها.

٢- **الطريقـة الكيماويـة:** وفيها تستخدم بعض المواد الكيماوية التى تساعد فى عملية الدمج مثل نترات الصوديوم أو نترات البوتاسيوم أو أيون الكالسيوم أو مادة البولى إيثلين جليكول (PEG) أو مادة الدكستران Dextran .

٣- **الطريقة الكهربية :** وهى من الطرق الحديثة يستخدم التيار الكهربى المنبعث من جهاز خاص وبطول موجى ٥١٤ نانوميتر وإشعاع ضوئى متطور مقداره mw400 حيث تساعد الشحنات المنبعثة من الجهاز فى دمج البروتوبلاست.

الزراعـة والتحضـين: بعد عزل البروتوبلاست ودمجه يزرع على بيئات مناسبة سائلة أو صلبة حيث يؤخذ ٢ ملل من معلق البروتوبلاست ويوضع فى طبق بترى معقم ويضاف عليه كمية مساوية من البيئة الغذائية المحتوية على ١.٢% آجار مع مستوى منخفض من الأملاح فى وجود المانيتول ونسبة عالية من أيون الأمونيوم، ٣% سكروز.

- يتم التحضين على درجة حرارة من 25-28°م وإضاءة شدتها 300 LUX لمدة يومين ثم ينقل إلى إضاءة شدتها LUX 3000 .
- وبعد ثلاثة أسابيع من الزراعة يبدأ ظهور مستعمرات خضراء وفى نهاية الأسبوع السادس تتكون مجموعات من الخلايا ثم تبدأ فى النمو ثم تعطى الكالس الذى يعطى نبات كامل بعد ذلك.

أقلمة النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة

تعتبر زراعة الأنسجة من تقنيات الزراعة الحديثة المتطورة ولها أهمية كبيرة حيث تلعب دوراً هاماً فى الآتى:

١- إكثار بعض الأصناف عالية الجودة التى تتصف بندرة وغلاء شتلاتها أو فسائلها.
٢- الحصول على معدل عال من الإكثار يصل إلى بضعة آلاف من النباتات فى فترة زمنية قصيرة بدءاً من نبات واحد.
٣- النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة مشابهة للنبات الأم.
٤- الحصول على نباتات خالية من الأمراض وخاصة الأمراض الفيروسية بزراعة المرستيم القمى.
٥- سرعة إكثار ونشر الأصناف المقاومة لبعض الأمراض والحشرات.
٦- استخدام تقنيات زراعة الأنسجة فى التحسين الوراثى حيث أمكن الحصول على بعض أصناف مقاومة للجفاف والظروف البيئية الصعبة كما فى العنب.

ويدور موضوعنا فى هذا البحث حول الحصول على نباتات كاملة من زراعة الأنسجة لها القدرة على النمو فى الحقل تحت الظروف البيئية الطبيعية. وهذا ما يعرف بعملية الأقلمة.

أى تهيئة النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة لتتواءم مع الظروف الطبيعية المحيطة سواء فى الصوبة أو الحقل وهذه تعتبر المرحلة الأخيرة من المراحل التطورية التى تميز التكاثر بواسطة زراعة الأنسجة النباتية وهذه المراحل هى :

- مرحلة إعداد النباتات الأم. – مرحلة إنشاء المزارع النسيجية (بداية الزراعة)
- مرحلة التضاعف على البيئة المغذية (الزيادة العددية) – مرحلة تكوين الجذور
- **مرحلة الأقلمة:** ومرحلة الأقلمة تعتبر مرحلة هامة وحاسمة للحصول على نباتات كاملة مناسبة للنمو فى الصوبة أو الحقل حتى يمكننا الاستفادة من النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة.

ويجب على القائم بإجراء هذه المرحلة الإلمام بجميع التغيرات فى العمليات الفسيولوجية فى النباتات كذلك احتياجات النباتات النامية من زراعة الأنسجة حتى تتواءم مع الظروف الخارجية. كذلك يجب معرفة أن نباتات زراعة الأنسجة تتميز ببعض المواصفات الخاصة كمثال لهذه طبقة الكيوتيكل التى تغطى الورقة وتحد من فقد المياه من النبات تعتبر غير موجودة فى النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة لأن مثل هذه النباتات لا تحتاج إليها حيث أنه ليست هناك مخاوف من فقد المياه أثناء نموها فى جو ذو رطوبة مرتفعة بجانب أن ثغور النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة النباتية لا تعمل بكفاءة عالية وكذلك نجد أن معدل التمثيل الضوئى للنباتات النامية فى بيئات صناعية يعتبر ضئيلاً مقارنة بالنباتات النامية فى الصوب أو الحقول وبذلك يكون هناك مخاطر موت للنباتات عند نقلها إلى تربة صناعية فى الصوب أو الحقل حيث تنقل النباتات من البيئة المغذية ذات الظروف المتحكم فيها إلى تربة صناعية فى الصوب أو الحقل فى بيئة غير متحكم فيها لهذا تجرى عملية الأقلمة وذلك لتهيئة النباتات على النمو فى الظروف الطبيعية.

الأقلمة Acclimatization (Adaptation)

المقصود بها : هى عملية تجهيز النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة قبل نقلها إلى الصوبة أو الحقل لزيادة قدرتها على المعيشة فى الظروف الجديدة ولتقليل الفاقد من النباتات فى هذه المرحلة.

أى هى تلك العمليات التى تجرى على النباتات خلال المرحلة الانتقالية والتى تتعلق بإعداد النباتات للنقل لظروف الحقل.

وهذه المرحلة تتم بعد الحصول على نباتات كاملة وبعد مرحلة التجذير Rooting فى زراعة الأنسجة حيث يجب أن تنقل هذه النباتات إلى الصوب أو الحقل بهدف استكمال دورة حياتها وتحقيق الهدف المنشود من زراعة الأنسجة.

ويجب معرفة أن عدد كبير من النباتات يفقد نتيجة للتغير فى ظروف النمو حيث أن النبات الناتج من زراعة الأنسجة نبات مرهف حيث تتوفر له جميع العوامل المساعدة على النمو وظروف بيئية متحكم فيها وبالتالى فإنه عند انتقاله إلى ظروف بيئية خارجية غير متحكم فيها وجو غير معقم فإن عدد كبير من النباتات يفقد لعدم قدرته على ملائمة البيئة الجديدة .

*** الصفات المورفولوجية والتشريحية والفسيولوجية لنباتات زراعة الأنسجة:**

هناك بعض الصفات المورفولوجية والتشريحية والفسيولوجية التى تميز النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة مما يصعب عليها مواجهة الظروف الخاصة.

ومن أهم هذه المميزات ما يلى:

١- قلة كفاءة التمثيل الضوئى فى النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة حيث يتوافر لها مصدر هرمون فى البيئة المغذية.

٢- قلة تطور الطبقة الشمعية على سطح الأوراق بسبب نموها فى جو مشبع بالرطوبة.

٣- عدم وجود ميكانيكية فتح وغلق الثغور.

وفيما يلى استعراض بعض هذه النقاط بالتفصيل:-

التركيب التشريحى للورقة Leaf anatomy

تتميز النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة بأنها تحتوى على أوراق غير سميكة مقارنة بتلك النباتات الناتجة من الزراعة التقليدية. ويرجع ذلك إلى اختزال عدد طبقات نسيج الميزوفيل الذى يحتوى على الفراغات الهوائية بين خلاياه كذلك نجد عدم تطور الكلوربلاست ويجرع ذلك إلى عدم القيام بعملية التمثيل الضوئى يسبب توافر مصدر الكربون فى البيئة المغذية.

وتعتبر طبقة الكيوتين التى تتكون من مزيج من الكيوتين والشمع والتى تعمل على منع فقدان النبات للماء نجدها فى النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة تقل حيث أن هذه النباتات نامية فى جو مشبع بالرطوبة ومحكم فنجد أنها تحتوى فقط على طبقة رقيقة من هذه الطبقة الشمعية.

كذلك عدم وجود ميكانيكية فتح وغلق الثغور حيث أن ثغور النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة تكون مفتوحة طوال الوقت حيث يرجع ذلك إلى عدم وجود مخاطر لفقدان الماء من النبات نتيجة لنموها فى جو مشبع بالرطوبة.

البناء الضوئى Photosynthesis

فالمقصود بالبناء الضوئى هى تلك العملية التى يقوم فيها النبات باستخدام الكربون والماء فى وجود الضوء لتوفير ما يلزم من غذاء.

فنجد فى النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة تقل أو تنعدم كفاءة النباتات فى القيام بهذه العملية وذلك بسبب توفر الكربوهيدرات فى صورة سكروز وكذلك عدم حدوث التبادل الغازى اللازم للقيام بعملية التمثيل الضوئى.

بعض النقاط التى يجب وضعها فى الاعتبار عند إجراء عملية الأقلمة:-

- إن الأوراق الجديدة المتكونة على النبات بعد نقله إلى الصوبة أو الحقل تتشابه تشريحيا مع أوراق النباتات النامية بالحقل وبهذا فإن الأقلمة لا تعمل على تعديل التركيب التشريحى للورقة بل تعمل على تهيئة الخلايا الموجودة أصلاً بالورقة لتساعدها فى مواجهة الظروف لجديدة.
- وجد Satler & Langhans سنة ١٩٨٢ : أنه أثناء الأقلمة يزداد سمك الطبقة الشمعية على النمو الخضرى للنبات وبذلك يقل معدل فقدان الماء من النبات وتزداد نسبة نجاح نمو النباتات بالصوب أو الحقل.
- وجد Domoryetal سنة ١٩٨٥ & Fabbri et al سنة ١٩٨٦ : أنه لا يحدث تغيير فى عدد طبقات الخلايا المكونة لنسيج الميزرفيل بالورقة ولكن يزداد فى الحجم بدون أن يحدث تغيير فى حجم الفراغات البينية بينها.
- لذلك يجب معرفة انه عندما تنقل هذه النباتات إلى الصوبة أو الحقل فإنها تفقد كميات كبيرة من الماء لعدم وجود الطبقة الشمعية وبالتالى نفقد النباتات بإعداد كبيرة.
- ونجد أنه عندما تنقل هذه النباتات إلى ظروف الحقل مباشرة وبدون إجراء الأقلمة فإن ثغورها تستمر فى وضع الانفتاح وبذلك نفقد كمية كبيرة من الماء الذى تهلك معه النباتات. وأثناء عملية الأقلمة تستعيد نسبة كبيرة من الثغور مقدرتها الميكانيكية على الانغلاق والانفتاح لمواجهة الظروف المحيطة.
- كفاءة الأقلمة أى كفاءة النباتات على المعيشة فى ظروف الصوبة أو الحقل تعتمد على مقدرتها على التحول من الاعتماد الكلى على البيئة المغذية إلى الاعتماد على التمثيل الضوئى وتوفير الغذاء اللازم لاستمرار نموها.

- **طرق الأقلمة Methods for acclimatization**

يجب معرفة أن طرق الأقلمة وكيفية إجرائها للنباتات تختلف تبعاً للنوع النباتى المستخدم.

وتتركز عملية الأقلمة أساساً على:-

١- الخفض التدريجى لنسبة الرطوبة.

٢- زيادة معدلات الضوء.
٣- تشجيع النباتات على القيام بالتمثيل الضوئى.

وإجراء عملية الأقلمة للنباتات وهى مازالت نامية على بيئة مغذية ضرورى جداً وذلك بواسطة تقليل نسبة الرطوبة فى الجو المحيط مما يعمل على تكوين الطبقة الشمعية وزيادة سمكها وبالتالى يقلل من معدل فقد النبات للماء عند النقل إلى الصوبة أو الحقل.

ومن الطرق المنشرة استخدامها فى أقلمة النباتات هى إزالة غطاء إناء الزراعة لعدة ساعات يوميا وهذه الفترة تزداد تدريجيا حتى يمكن إزالة الغطاء تماماً لعدة أيام قبل نقل النباتات إلى الصوبة ولوحظ أن هذه العملية تعمل على زيادة الطبقة الشمعية.

- **القواعد العامة الواجب اتباعها عند نقل النباتات :-**

١- غسل النباتات الناتجة وخاصة الجذور جيداً بالماء المقطر وذلك بهدف التخلص من بقايا البيئة التى تحتوى على سكروز حتى لا تعطى فرصة لنمو الكائنات الدقيقة بالتربة.
٢- غسل النباتات بمحلول يحتوى على مطهر فطرى لتلاقى أى مخاطرة من مهاجمة الفطريات للنباتات المنقولة إلى تربة الزراعة.
٣- يتم نقل النباتات إلى التربة الصناعية وتوضع فى صوبة بلاستيكية يحافظ فيها على توفير نسبة رطوبة مرتفعة بواسطة استخدام أجهزة الرش الرزازى ولكنها يعمل على زيادة الرطوبة بالتربة وبالتالى توفر الظروف الملائمة لنمو الفطريات والبكتريا والطحالب لذا يفضل استعمال أجهزة الرش الرزازى بأجهزة الرش الضبابى ويجرى تشغيل هذه الأجهزة على فترات زمنية تتباعد تدريجيا حتى تتم عملية الأقلمة وعندها تنقل النباتات إلى الحقل.
٤- يلجأ البعض إلى تعديل معدل النتح فى النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة بالرش بمحلول جليسرين أو اندول بيوتريك اسيد IBA.
٥- كذلك يجب تعريض النباتات تدريجيا إلى كثافة ضوئية مرتفعة حتى تصل فى النهاية إلى الكثافة الضوئية التى تعادل مثيلتها بالحقل الذى تنقل إليه النباتات.

وهناك العديد من الأنواع المختلفة من التربة الصناعية التى تستخدم عند نقل النباتات من البيئات المغذية المعقمة إلى تربة صناعية مثل:

فرموكلايت varmiculite ، بيرليت Perlite ، بيت peat ، Sand قد تستخدم هذه الأنواع من التربة الصناعية سواء منفردة أو تخلط ببعضها أو تخلط مع بعض الأسمدة.

ويلاحظ أن تربة البيت Peat ذات درجة حموضة مرتفعة ولهذا فإنها تثبط نمو الجذور وأن تربة فرموكلايت veronucate قلوية إلى حد ما ومن المعروف أن افضل تربة صناعية لتشجيع نمو الجذور يجب أن تكون بها مواصفات خاصة منها ما يلى:-

١- أن تكون متعادلة أو حامضية قليلاً PH ٥,٥-٧
٢- أن تكون بها صفات المقدرة العالية على الاحتفاظ بالرطوبة.
٣- أن تكون بها صفات التهوية الجيدة.

الأبحاث التى أجريت فى مجال عملية الأقلمة:

- Phillips (1988) and Eerle and Langhams (1978): أشاروا إلى أن الرطوبة النسبية قد تكون مفيدة فى بداية حياة النباتات الصغيرة.

- Popov and Trushechkin (1972): لا حظوا أن أفضل تجذير ونمو لنباتات الفراولة كانت على تربة شبيهة بالفلين Turf soil + بيت موسى أو على التربة المعقمة.
- Molt et al (1973) : كتبوا بأن خسارة النباتات الصغيرة أى موتها كبير جداً عند نقل النباتات إلى التربة مباشرةً.
- Mullin et al (1974) : قد استنتج أن النباتات الصغيرة تكون ضعيفة هذا عندما تؤخذ لأول مرة من الأنبوبة ولابد أن تعامل ببراعة باليد.
- Murashige (1974): وجد أن مخاليط التجذير عموماً تحتوى على مواد مثل البيت peat والبارك berk وبيرلايت perlite وفر ميكولايت vermeulite و pumiei ورمل Sand وطمى soil وممكن إمداده أو خلطه بواسطة كمية قليلة من الأسمنت.
- Alconero et al (1975): وجد فى دراسة على زراعة الأنسجة فى البطاطا أنه عند استخدام مخاليط تربة بها كمية كبيرة من البيت يؤدى إلى تقدم بطئ فى النمو وفيه اعلى فى معدلات الموت لأن البيت حامضى.
- Daniana (1977) : وجد أن الأصناف أفضل بيئة هى رمل وبيت موس عندما كانت طول الجذر ١سم وان ذلك أدى إلى الحصول على شتلات جيدة وكذلك أدى ذلك إلى أقل خسارة فى التكلفة وأيضاً أدى إلى التبكير فى النمو فى معظم الأنواع والأصناف.
- Davis et al (1979): أشاروا إلى أن أفضل نتائج الأقلمة يحصل عليها من نباتات البطاطس كانت عندما توضع أولاً تحت الرش الرزازى المتقطع لأيام معدودة وبعد ذلك تنقل إلى مكان مظلل لمدة أسبوع واحد.
- Damiano: (1980) كتب أن أفضل أقلمة عند زراعة النباتات فى بيئة نقيه أو خليط ١:١ من الرمل والبيت موس وأن الـ PH هام وأن أحسن النتائج التى أخذت كانت عند (PH 7 –5.5)
- Mcgrew(1980) : استنتج أن نقل النباتات إلى التربة فى البيوت الزجاجية وإجراء اختبار الفيروس يحتاج على الأقل إلى ٤ أشهر.
- Brainerd and fuchigami (1981) : قالوا أن الأقلمة هى العملية التى بواسطتها يتلاءم نظام أو تركيب النباتات مع تغير البيئة .
- Hwang et al (1983) : أشاروا إلى أن نباتات البطاطا تحسن نموها وأعطت براعم جانبية عندما نقلت إلى أوعيه بلاستيكية مليئة برمال كوارتزيه quarts sand نظيفة.
- Temmpleton – Somers and callins (1686) أشاروا إلي أن نمو نباتات البطاطا المزروعة فى الأنابيب كانت عند نقلها للتربة الممزوجة بنسبه (١طمى : ١ بيت : ١رمل) بالنسبة للحجم.
- Love et al (1987) يقترح أن استخدام أحواض أو صناديق لزراعة النباتات يعطى نمو جيد للنباتات وذلك عند استخدام غطاء بلاستيك شفاف حيث يعمل على حفظ الرطوبة.
- Torres (1989) : يقول أن النباتات التى كونت جذور فى أنابيب الزراعة عموما لابد أن تنقل هذه الشتلات على بيئة ذات تهوية جيدة ورطوبة نسبية عالية لعدة أيام.
- وجد حسنى عام ١٩٨٩م من تجربة الأقلمة لنباتات الفراولة الناتجة من مزارع الأنسجة أن الصنفين تيوجا وتفتس يناسبها البيئة المكونة من (١ بيت موس : ١رمل) بينما كان الوسط الزراعى المكون من (٢ بيت موس: ١ رمل) كان الأفضل بالنسبة إلى الصنف باجرو.
- Satangelo and Sannino(1991) : اشتغلوا على خمسة أصناف من البطاطا وذكروا أنه من جهة انتشار أو تفريع النباتات أن أحسن النتائج كان بواسطة البيت موس وبواسطة الرمل ,agriperlite الأجروبرليت.

- Badawi et al (1990) ذكروا أن نباتات الفراولة المزروعة فى أنابيب الزراعة قد فشلت تماما فى استمرار النمو عند زراعة النباتات فى ١٠٠% رمل كما أن نسبة بقائها على قيد الحياة تساوى صفر فى المائة بعد مرور ٣ أسابيع.
- El-Gizawy et al. (1991) : وجد أن وسط النمو الذى يحتوى فقط على بيت موس أو رمل يعطى أقل نسبة بقاء على قيد الحياة لنباتات الخرشوف .
- وجد المعرى والغامدى عام ١٩٩٤م : أن نقل نباتات العنب المجذرة إلى الظروف الطبيعية من الأنابيب إلى أصص صغيرة تحتوى على وسط خفيف من الدبال المتحلل وغطيت الأصص فى المرحلة الأولى بأكياس بلاستيكية لحفظ الرطوبة ووضعت داخل صوبه زجاجية على درجة ٢٢°م وبعد عشره أيام من عملية النقل ثم رفع الغطاء البلاستيكى تدريجيا لكى تتأقلم النباتات على الظروف الجوية مع ريها باليد بواسطة وعاء له رأس لتخفيف ضغط الماء على النباتات الصغيرة. وبلغت نسبة النجاح ٩٠% وبدأت النباتات المنقولة فى النمو الطبيعى حيث وصل ارتفاع النبات بعد ثلاث أشهر إلى اكثر من ١٥سم.
- وجد المعرى والغامدى عام ١٩٩٤م : أن عند نقل نباتات النخيل المجدرة إلى الظروف الجوية الطبيعية عندما نقلت النباتات المجدرة النامية من الأجنة من الأنابيب إلى أصص تحتوى على الدبال المتحلل Peat moss به بعض العناصر المعدنية وغطت الأصص فى الشهر الأول بأكياس بلاستيك لحفظ الرطوبة حول النباتات ووضعت داخل صوبه زجاجية على درجة ٢٢م وإضاءة ١٦ ساعة يوميا وبعد شهر تقريبا رفع الغطاء البلاستيكى بشكل تدريجى حتى تتأقلم النباتات مع ظروف الوسط الخارجى وتنقل لكى تنمو داخل الصوبة الزجاجية تحت ظروف الإضاءة الطبيعية.
- وجد الشباسى عام ١٩٩٤م : فى تجربة الأقلمة أن أنسب مخلوط من بيئات الزراعة التى استخدمت لنقل وأقلمه النباتات الصغيرة الناتجة من زراعة الأنسجة فى الصنفين أبيس ومبروكة للبطاطا هو المخلوط المكون من البيت موس Peat moss والرملSend بنسبة ١:١ (حجم:حجم) حيث أن هذه البيئة أعطت أعلى نسبة نجاح للنباتات المنقولة إلى الخارج.
- وجد حفنى عام ١٩٩٥م فى تجربة الأقلمة لنباتات التوت الناتجة من زراعة الأنسجة أن أعلى نسبة بقاء للنباتات حية مع أفضل نمو كان عند الزراعة على مخلوط تربه محتوي على بيئة بيت موس + رمل بنسبة ١:١ حجم.
- وجد سعيد عام ١٩٩٦م : من تجربة الأقلمة لنباتات الكوسة أن الزراعة على تربة مكونه من بيت موس + طمى بنسبة (١:٢) وتكييس النباتات أدى إلى إنتاج نباتات قوية تتحمل الظروف البيئية الخارجية .

زراعة الأنسجة فى بعض النباتات الاقتصادية

تستخدم تقنية زراعة الأنسجة فى العديد من النباتات الاقتصادية الهامة للتغلب على بعض مشاكل الإكثار التقليدى ولإنتاج إعداد كبيرة من النباتات فى فترة قصيرة للتوسع فى زراعة هذه النباتات ومن أهم هذه النباتات تخيل البلح– الموز– – العنب – البطاطس– الفراولة– نباتات الزينة والنباتات الطبية والعطرية مثل الورد– الأرولا– الياسمين– الفل ..... الخ.

١– زراعة الأنسجة فى نخيل البلح

- **أسباب استخدام زراعة الأنسجة فى إكثار النخيل:**

١. عند زراعة البذرة ينتج عنها ٥٠% ذكور، ٥٠% إناث.
٢. النباتات الناتجة من البذرة غير مطابقة للصنف الأصلى.
٣. بعض الأصناف تنتج عدد قليل من الفسائل الخضرية.

٤. انخفاض نسبة نجاح الفسائل المزروعة بالطرق التقليدية.

- **أهداف استخدام زراعة الأنسجة فى نخيل البلح:**

١- الحصول على عدد كبير من الشتلات المطابقة للأم فى وقت قصير.
٢- الحصول على شتلات من الأصناف التى تنتج عدد قليل من الفسائل.
٣- تقليل الأسعار الخاصة بالشتلات.
٤- تقصير برامج التربية والتحسين الوراثى.
٥- حفظ التراكب الوراثية الممتازة.
٦- التغلب على الأمراض الفطرية والحشرية.
٧- التغلب على عيوب الإكثار الجنسى.

- وقد قام العديد من الباحثين فى مصر والسعودية والمغرب والإمارات بإجراء تجارب عديدة على إكثار نخيل البلح باستخدام طرق زراعة الأنسجة مثل القحطانى ومطر والحناوى وبكرى.
- **طرق زراعة أنسجة النخيل:**

هناك طريقتان رئيسيتان لزراعة أنسجة نخيل البلح:
أولاً: الطريقة المباشرة (تكوين النموات أو البراعم الجانبية).
ثانياً: الطريقة الغير مباشرة (تكوين الأجنة العرضية الجسمية).

أولاً: الطريقة المباشرة

وتعتمد هذه الطريقة على نمو البراعم الطرفى وأيضاً البراعم الجانبية وتضاعف هذه النموات عدة مرات حتى الوصول بها إلى مرحلة التجذير ثم الأقلمة.

- **مرحلة الزراعة والنمو:**

١- مرحلة البداية Starting stage .
٢- مرحلة التضاعف Multiplication stage .
٣- مرحلة التجذير Rooting stage .
٤- مرحلة الأقلمة Acclimatization stage .

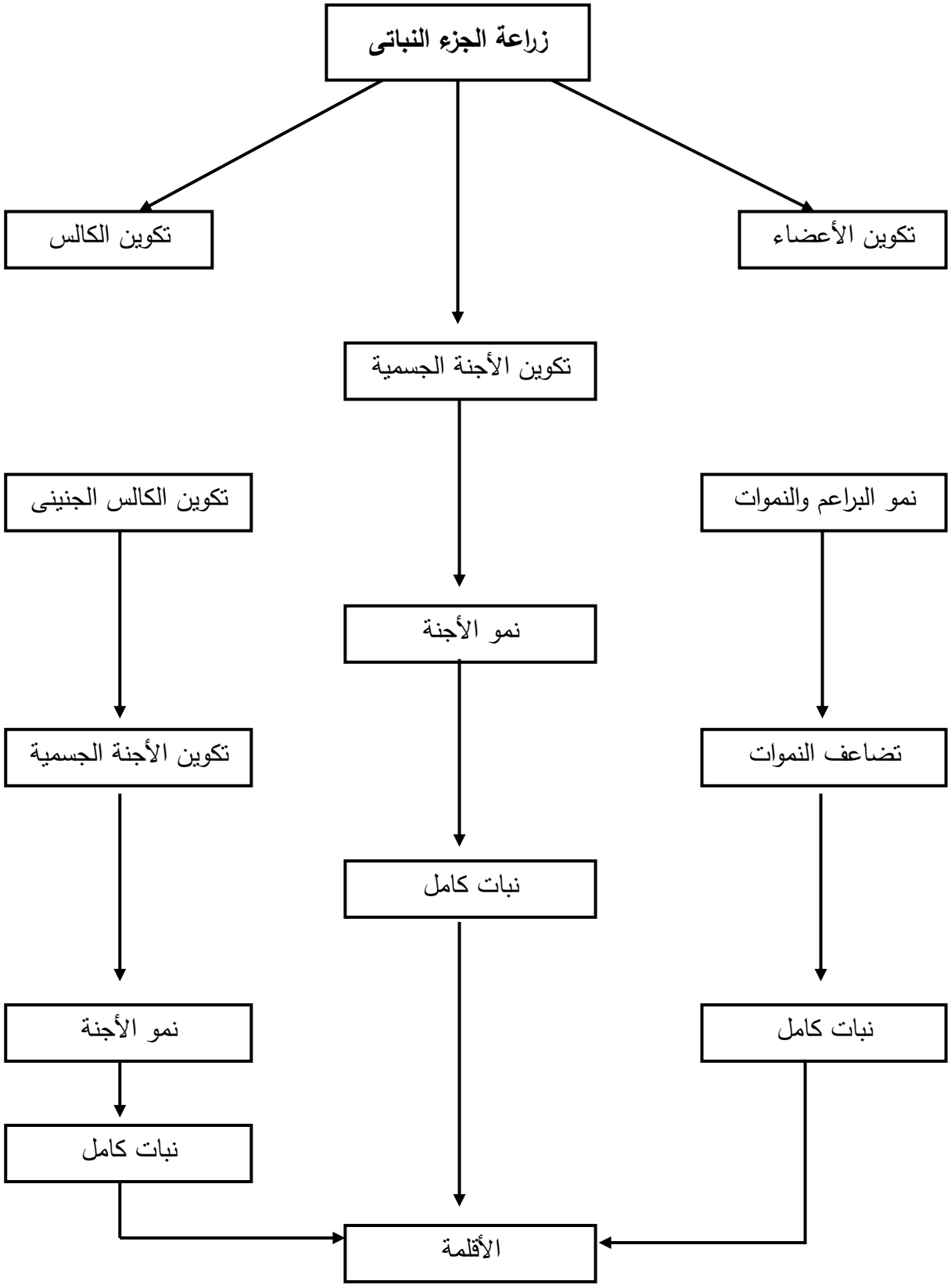
ثانياً: الطريقة الغير مباشرة:

وتعتمد هذه الطريقة على تكوين أجنة جسمية .Somatic Emb من الأجزاء النباتية أو من نسيج الكالس.

- **مراحل الزراعة والنمو:**

١- مرحلة البداية (التأسيس).
٢-مرحلة تكوين الكالس وتضاعفه.
٣-مرحلة تكوين الكالس الجنينى.
٤ - مرحلة تكوين الأجنة الجسمية.
٥-مرحلة نمو الأجنة.
٦- مرحلة النمو الخضرى.
٧-مرحلة الاستطالة.
٨- مرحلة التجذير (تكوين الجذور).
٩-مرحلة الأقلمة أو التقسية.
١٠- الزراعة فى الأرض المستديمة.

الطرق المستخدمة فى إكثار نخيل البلح بزراعة الأنسجة



٢-زراعة الانسجة فى الموز:

يعتبر الموز من أهم نباتات الفاكهة التي طبق في إكثارها خضريا على نطاق تجاري طريقة زراعة الأنسجة (التكاثر الدقيق) . وقد سبق وتناولت مزايا الإكثار الخضري بزراعة الأنسجة كطريقة حديثة وفعالة يمكن بواسطتها إنتاج أعداد هائلة من النباتات في حيز محدود مع المحافظة على مطابقة النباتات الناتجة في صفاتها وخصائصها وسلوكها لنبات الأم المرغوب إكثاره ، ويوفر الإكثار الخضري للموز بزراعة الأنسجة ضمان خلو النباتات الناتجة من الفيروسات المسببة لأمراض تورد القمة والتبرقش.

وتتلخص الخطوات الأساسية لإكثار الموز بزراعة الأنسجة فى :

١- توفير مصدر للنسيج النباتي المستخدم فى الإكثار (نبات الأم) ويراعي فيها لصفات المرغوبة والخلو من مسببات الأمراض.

٢- تفصل القمة الطرفية لنبات الأم ويتم إعدادها وتطهيرها ثم يجهز ويفصل النسيج النشط الميرستيمي ويتم ذلك داخل المعمل.

٣- تجري زراعة النسيج النشط) الميرستيمي (بعد تجهيزه في أواني خاصة على بيئة معقمة تتوفر بها مستلزمات النمو من مغذيات ومواد منشطة ويجري تعديل تركيب البيئة على فترات.

٤- توضع الأوعية المزروع بها النسيج داخل الحضانات الخاصة التي توفر ظروف بيئة معدلة من الحرارة والإضاءة والرطوبة ويجري تعديل ظروف البيئة على مراحل

٥- تتكون في النهاية داخل الأوعية أفراد جديدة جنينية كاملة التكوين فيتم فصل ونقل هذه الأفراد إلى أوعية مناسبة تصلح لنقلها خارج المعمل إلى صوبة الحضانة حيث تبقي لمدة شهرين ثم إلى صوبة الأقلمة لمدة شهرين آخرين.

٦- تعامل النباتات داخل صوبة الأقلمة في خطوات ومراحل متتالية تصل في نهايتها إلى طول ٣٠ – ٥٠ سم وتصبح صالحة للنقل إلى أرض المشتل أو المكان المستديم وتوجه النباتات داخل صوبة الأقلمة والعناية بالتسميد والري ومكافحة الآفات مع تخفيض الإضاءة ورفع رطوبة الصوبة واستخدام الري الرذاذي ، وتكون النباتات الجاهزة للنقل مزروعة داخل أكياس بلاستيك سعة ٥ كجم فى المشتل.

ويتم تقسية النباتات الناتجة باستخدام زراعة الأنسجة في مراحل كما يلى:

المرحلة الأولى:

بعد خروج النباتات من المعمل وهى غالباً ماتكون فى برطمانات زجاجية أو ماجنتا بلاستيك ونامية فى بيئة غذائية على آجار والنباتات النامية فى هذه البرطمانات أو الماجنتا تكون بطول ٥ – ٣ سم وبها عدد من ٥ – ٣ ورقات صغيرة ولها جذور شعرية ويتبع الآتى

أ/ النباتات توضع فى حوض به ماء دافئ درجة حرارته لاتزيد عن وبه مطهر فطرى مثل البنليت ١ جم لكل لتر ماء ويتم فصل النباتات عن بعضها

ب/ تنقل النباتات بعد ذلك فى حوض به ماء ليتم غسيل النباتات من بقايا البيئة الغذائية العالقة بها كما يتم إزالة بعض بقايا الأوراق السفلية ذات اللون الأسود

المرحلة الثانية: بعد تجهيز النباتات فى المرحلة الأولى يتم زراعتها مباشرة حتى لاتفقد رطوبتها وتذبل ويتبع الآتى:

- تزرع في خليط من الرمل (١:٢) والقريرة بعد خلطها جيداً أو البيت موس بنسبة ١ : ١

يزرع كل نبات فى اصيص وتوضع النباتات المنزرعة فى صوبة خاصة وهى عبارة عن صوبة من السيران الشبكى مغطاة بالبلاستيك بطول ١٢ متر وعرض ٨.٥ متر وبها مناضد مركب عليها أقواس مغطاة بالبلاستيك الشفاف وتوجد رشاشات داخل وخارج هذه الأقواس للرى ولرفع نسبة الرطوبة حتى تصل إلى حوالى ١٠٠٪ كما توجد بالصوبة ترمومترات لقياس درجات النهايات الصغرى والعظمى لدرجات

الحرارة ويجب ألا تزيد درجة الحرارة خلال فصل الصيف عن ٣٠° م داخل الصوبة ، كما توجد أسلاك تدفئة كهربائية على سطح المناضد أسفل النباتات لرفع درجة الحرارة خلال أشهر الشتاء بحيث لاتقل عن ٢٠° م وتتسع هذه الصوبة لعدد عشرة آلاف نبات فى الدفعة الواحدة .

-تترك هذه النباتات تحت الغطاء البلاستيك بالصوبة مع استخدام الرى لمدة نصف دقيقة كل ساعة وذلك للمحافظة على الرطوبة العالية ودرجة الحرارة المناسبة على ألا يفتح الغطاء البلاستيك لفترة ٢٥ - ٢٠ يوم .

-يبدأ تكوين الجذور الجديدة بعد مدة أسبوع ويصبح هناك مجموع جذرى جيد بعد شهر .

بعد مدة ٢٥ يوم تبدأ عملية التقسية وفيها يفتح الغطاء تدريجياً حيث يبدأ من نصف ساعة يومياً إلى أن يتم إزالة الغطاء تماماً مع زيادة فترات الرى الرزازى .

-بعد التأكد من تكوين المجموع الجذرى تسمد النباتات عن طريق الرش الورقى باستخدام الأسمدة المركبة نتروچين وبوتاسيوم وفوسفور .

-بعد فترة تتراوح مابين ٦٠ - ٤٥ يوماً يصبح طول النباتات حوالى ١٠ سم وبه حوالى ٥ أوراق جديدة وفى هذه الحالة يكون جاهز للنقل إلى الصوبة الكبيرة .

المرحلة الثالثة:

-تجهز صوبة مغطاة بشبك سيران أسود نسبة تظليله ٦٣٪ وتروى بالرى الرزازى لنقل النباتات إليها ويتم فيها الآتى :

-تجهيز أكياس بلاستيك سعة ٥ كجم بمخلوط البيت موس والرمل بنسبة ١٢ : ١ .

-تنقل النباتات الصغيرة المنزرعة فى القصارى الصغيرة إلى أكياس بعد ملئها باحتراس لمنع تمزق المجموع الجذرى .

-تسمد هذه النباتات بعد النقل بحوالى أسبوع بسماد مركب مرة واحدة كل أسبوع بمعدل ٤ جم للنبات لمدة شهر ثم تصبح مرتين فى الأسبوع لمدة شهر آخر رشاً على الأوراق .

-تمكث هذه النباتات بالصوبة مدة تتراوح بين ٧٥ - ٦٠ يوم وتكون النباتات قد وصلت إلى طول حوالى ٥٠ - ٤٠ سم وفى هذه المرحلة تكون النباتات جاهزة للنقل إلى المزرعة المستديمة .

-يجب رش النباتات بالصوبة مرة كل أسبوعين بأحد المبيدات الحشرية مثل الملاثيون بتركيز ١.٥ فى الألف لمقاومة حشرة المن .

-يجب الملاحظة المستمرة للنباتات الموجودة بالصوبة واستبعاد أى نباتات تظهر عليها اختلافات فى شكل ولون الأوراق وطول النباتات حيث أن هذه النباتات تعطى نباتات غير مطابقة للصنف الطفرات.

ميزات نباتات الموز الناتجة بزراعة الأنسجة:

١-التجانس في النمو مما يضمن توحيد مواعيد التزهير وجمع المحصول. ٢- سرعة النمو فيمكن للنبات المغروس في فبراير (بطول ٥٠ سم) أن يثمر خلال ديسمبر من نفس العام في حالة استخدام نظام الري بالتنقيط وهو المفضل. ٣- يمكن زراعة النباتات بالعدد النهائي المطلوب للفدان (٨٠٠ - ١٠٠٠ نبات بالفدان) ولذلك يتحقق الإثمار الكامل للمزرعة في العام الأول أما في الزراعة التقليدية فيتحقق ذلك بعد ثلاث سنوات ٤- يتم الاستغناء عن المشتل وتخطط الأرض المستديمة للغرس على أبعاد ٤ × ٢,٥ متر وزراعة نباتين بالجورة الواحدة يبعد الأول عن الآخر ٣٠ سم ويحتاج الفدان إلى ٨٤٠ نبات في السنة الأولى على أن يربي نبات واحد بجوار كل أم. ٥-تغرس النباتات في جوز تجهز بحجم يساوي حجم الكيس من المنقول به ويراعي الحرص في الغرس بإزالة قاعدة الكيس ووضعه بالنبات في الجورة وبعد الترديم يسحب الكيس إلى أعلى بدون التأثير على المجموع الجذري . ٦- تغرس شتلات الموز من الزراعات النسيجية إما في فبراير وتزهر وتثمر في نهاية ديسمبر من نفس العام . أو تغرس في يوليو وأغسطس لتزهر وتثمر في يوليو وأغسطس من العام التالي وفى جميع الحالات يفضل استخدام نظام الري بالتنقيط.

٣- اكثار العنب بزراعة الانسجة:

المنفصل النباتي: الثلاث عقل من قمة الفرع حديث النمو.

الطريقة: تقطع ٣ سنتيمترات من قمة الفرع ويتم التخلص من الأوراق المتفتحة. تقلب هذه الاطراف في الكحول ٧٠٪ لمدة دقيقة واحدة آو ٧٪ كلوركس و ٠,١ مل ٢٠ Tween لمدة ٢٠ دقيقة مع التقليب المستمر ثم تغسل ٤ مرات في ماء مقطر معقم ويتم فصل البراعم تحت شروط التعقيم وفي حالة النباتات المصابة بالفيروس يجب أن يكون الفصل تحت الميكروسكوب الضوئي.

البيئة المستخدمة: موراشيج وسكوج

ظروف التحضين: يحتاج النمو إلى إضاءة بقوة ٣٠٠٠ لوكس (Lux) لمدة ١٦ ساعة و٨ ساعات إظلام في درجة حرارة ٢٣ م الا آن بعض المراجع تفضل استخدام ٣٠ م خلال النمو ماعدا أثناء فترة تكوين الجذور.

ملاحظات: هناك احتياج أساسي للحصول على شتلات عنب خالية من الأمراض الفيروسية حيث تعتبر هذه الشتلات أمهات لإنشاء مزارع خالية يتم أخذ العقل منها للإكثار التقليدي بالعقل أو عن طريق التطعيم على أصول أخرى وأيضا في حالة الإكثار المعملي يتم الحصول أيضا بالتبعية على نباتات عنب خالية من النيماتودا والتي تصيب الجذور. كما أنه يمكن أخذ منفصلات نباتية ذات حجم كبير نسبياً وإعادة زراعتها بالمعمل من الأمهات المختبرة والخالية من الفيروس وهذا ما يسهل ويسرع من الإكثار المعملي لأصناف العنب. وبالنظر إلى الطرق التقليدية للإكثار فإنها تحتاج إلى وقت طويل وتكون مكلفة للحصول على نباتات خالية من الأمراض ثم إكثارها بالطرق التقليدية مقارنة بطرق زراعة الأنسجة الحالية. فبرنامج الإكثار التقليدي قد يحتاج إلى عدة سنوات للحصول على عدة مئات من النباتات الخالية من الأمراض وعلى الأقل سنتين عند استخدام التطعيم للحصول على حقل خال من الأمراض. وعلى العكس من ذلك فإنه يمكن إنتاج عدد من النباتات كافية للزراعة في الحقل من نباتات منتجة معملياً في خلال عام فقط. ومن ناحية أخرى فإنه يجب الأخذ في الاعتبار الأصناف المختلفة من العنب التي قد يكون من الصعب اكثارها معملياً.

المصادر:

١-أ.د تيمور نصر الدين، أ.د. ابراهيم عبد المقصود، د. محمد احمد محمد نجاتي. تقنيات وتطبيقات زراعة الانسجة النباتية. القاهرة. ٢٠١٤.

Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K. (1996) Plant tissue culture: theory and practice. Elsevier.

Matthews, R. E. (1991). Plant Virology. Third edition. Academic Press New York and London.