

جامعة بنها
كلية الزراعة
قسم البساتين

مادة
الاكثار الدقيق فى محاصيل الخضر

أ.د / مهران النجار

تعريف بالتكنولوجيا الحيوية وأهميتها لمربي النبات

تعريف التكنولوجيا الحيوية:

يختلف تعريف مصطلح التقنية الحيوية (أو التكنولوجيا الحيوية) biotechnology باختلاف المشتغلين بها . وقد أطلق مصطلح التقنية الحيوية الجديدة ليعنى به - عادة - إستعمال تقنيات الدنا (ال دي إن أي DNA) ، إلا أن التقنية الحيوية ذاتها لها أبعاد أكبر ، فهي تتضمن أى تقنية تستعمل فيها الأنواع البيولوجية والكتل الخلوية الحية biomass ، أو مشتقاتها بهدف التوصل إلى منتجات مفيدة. ومن هذا المنطق فإن التربية الكلاسيكية للنباتات يمكن إعتبارها تقنية حيوية قديمة old biotechnology.

ويجمع تعريف الكونجرس الأمريكي للتكنولوجيا الحيوية - الذى وضع في عام 1984 بين كل من التكنولوجيا القديمة والحديثة على حد سواء ، فهو يحددها بأى تقنية تستعمل فيها الكائنات الحية أو أجزاء منها لعمل منتجات جديدة أو محورة ، بهدف تحسين النباتات أو الحيوانات أو تطوير كائنات دقيقة لاستعمالات خاصة .

تاريخ التقدم البحثى فى مجالات زراعة الأنسجة:

Robert Huk أول من إكتشف الخلية النباتية وهى الوحدة الأساسية لإنتاج النبات.

Matthias Schleiden (181-1881) ذكر أن الخلية النباتية هي أساس النبات ولكنه لم يطبق ذلك.

Theodor Schwann (1810-1882) إشتغل على الحيوان وذكر أن الحيوان به خلية حيوانية.

Rudolf Virchow (1821-1902) إهتم بالجزء السيتوبلازمى داخل الخلية.

Gottlieb Haberland (1854-1945) أول من إستخدم زراعة الأنسجة.

أهمية زراعة الأنسجة وتقنيات الدنا والهندسة الوراثية للمربي:

1- **الإكثار الدقيق:**- يحتل الإكثار الدقيق أهمية خاصة في كافة تقنيات مزارع الأنسجة وعمليات التحول الوراثي ، كما لا تخفى أهميته بالنسبة للمربي، الذي يستفيد من الإكثار الدقيق في جوانب عديدة من برامج التربية.

وتقسم طرق التكاثر الدقيق التى يتم بها مضاعفة النمو النباتى فى مزارع الأنسجة كما يلي:

أ- مزارع القمة المريستيمية .

ب- التطعيم الدقيق.

ت- مزارع القمة الخضرية.

ث- مزارع النموات الخضرية العرضية .

ج- مزارع الأنسجة والخلايا وهى التى تقسم بدورها إلى الفئات التالية:

✓ مزارع الكالوس.

✓ مزارع معلقات الخلايا.

✓ مزارع البروتوبلاست.

2- **دفع الأنواع التى يصعب إزهارها إلى الإزهار فى مزارع الأنسجة:**

تفيد عملية دفع النباتات للإزهار فى مزارع الأنسجة فى تربية الأنواع النباتية التى يصعب إزهارها ، وتلك التى لا تزهر سوى مرة واحدة كل عدة سنوات. ومن الأمثلة الهامة على الحالة الأخيرة نبات الغاب البامبو الذى يزهر مرة واحدة خلال فترة حياته ، ثم يموت فى نهاية موسم النمو الذى حدث فيه الإزهار ، الأمر الذى يحدث بعد من 12-24 سنة من النمو فجأة ، وفى كل العشيرة النامية ، دونما سابق دليل على احتمالات الإزهار، الأمر الذى

يجعل تربية الغاب صعباً للغاية. ولكن مع التوصل إلى طريقة سهلة وسريعة لإزهار عدة أجناس وأنواع من الغاب في البيئات الصناعية أصبح من الممكن تربية ذلك النبات.

3- التحسين الوراثي للجيرمبلازم:

أن من أهم تطبيقات تقنيات مزارع الأنسجة والدنا في مجال تربية النبات والتحسين الوراثي للجيرمبلازم المتوفر ما يلي:

التقنية	التطبيقات
الإكثار الدقيق	إدامة السلالات الخضرية – الإكثار على نطاق واسع- إنتاج بذور الهجن
مزارع الأجنة	إجراء التهجينات البعيدة – توسيع القاعدة الوراثية – نقل صفات جديدة
تكوين الأجنة الجسمية	استحداث الطفرات – الحصول على تباينات المزارع- الإنتخاب
الإخصاب في بيئة الزراعة	استخدام عدم التوافق الذاتي في إنتاج الأصناف الهجين
مزارع المتوك والمبايض	الحصول على نباتات أحادية مضاعفة – الحصول على سلالات أصيلة هجين
دمج البروتوبلاست	توسيع القاعدة الوراثية
التحكم في بيئة الزراعة	مقاومة مبيدات الحشائش
تعرض المزارع ونباتات المزارع للإشعاع	التخلص من الارتباطات الغير مرغوب فيها في ال cybrids والهجن والتهجينات البعيدة

4- الهندسة الوراثية للنباتات: ان الأهمية الكبرى للهندسة الوراثية تكمن في أنه أصبح في الإمكان فصل جينات مرغوب فيها بصورة نقية ، وإدخالها في نباتات من نفس النوع ، أو من أنواع أخرى.

5- منتجات صيدلانية خاصة يحصل عليها من مزارع الأنسجة:

تتنوع كثيراً المنتجات الصيدلانية التي يحصل عليها من مزارع الأنسجة ، والتي منها:

- Shikonin مضاد للبكتريا
- Berberine دواء
- Sanguinarine مضاد حيوي
- Paclitaxel مضاد سرطاني

أساسيات مزارع الأنسجة

مختبر زراعة الأنسجة:

تجرى زراعة الأنسجة تحت ظروف معقمة في مختبرات خاصة ، ويجب أن تتوفر فيها شروط معينة، وأن تجهز تجهيزاً خاصاً، فيجب أن يحتوي المختبر على غرفة خاصة لتحضير البيئات ، وأخرى لزراعة الأنسجة وثالثة لحضانة المزارع وحفظها.

وفيما يلي قائمة بأهم المعدات التي يجب أن تتوفر في مختبر زراعة الأنسجة:

- 1- دوارق مخروطية بأحجام مختلفة.
- 2- دوارق معيارية بأحجام مختلفة.
- 3- مخابير مدرجة بأحجام مختلفة.
- 4- ماصات مدرجة بأحجام مختلفة.
- 5- ماصات باستير.

- 6- أوعية مزارع (أنابيب المزارع ، زجاجات بأحجام مختلفة لها أغطية بقلووظ ، وأطباق بتري).
- 7- حجرة أو حيز خاص صغير مزود بالهواء الساخن لتجفيف الأوعية والزجاجات بعد غسلها.
- 8- فرن لتجفيف الأوعية والزجاجات وتعقيم الزجاجات.
- 9- جهاز لتقطير الماء.
- 10- أوعية بلاستيكية (بحجمى 10،20 لترأ) لتخزين الماء المقطر.
- 11- قرص ساخن مع قلاب مغناطيسي إذابة المركبات الكيميائية.
- 12- مضخة تفريغ لتسهيل عملية التعقيم بالترشيح.
- 13- جهاز توليد بخار لإذابة الأجار والبيئات.
- 14- جهاز قياس ال pH لضبط pH البيئات والمحاليل.
- 15- أوتوكليف (جهاز تعقيم البخار تحت ضغط).

مكونات بيئات الزراعة:

يجب أن تتوفر في بيئات الزراعة Culture Media كافة الإحتياجات الغذائية والهرمونية التى تلزم الأنسجة وتميزها. وتختلف هذه الإحتياجات كثيراً ليس فقط من نوع نباتى إلى آخر ، وإنما أيضاً من جزء إلى آخر في النبات الواحد.

ونقدم فيما يلى عرضاً لأهم المكونات التى تدخل في تحضير بيئات الزراعة:

❖ الأملاح غير العضوية:-

يجب أن تتوفر في بيئات مزارع الأنسجة جميع العناصر الضرورية للنمو النباتى سواء أكانت عناصر كبرى (وهى تلك التى تحتاجها النباتات بتركيزات تزيد عن 0.5 مللى مولار وتتضمن النيتروجين والفوسفور والبوتاسيوم والكالسيوم والماغنيسيوم والكبريت) ، والعناصر الصغرى (وهى تلك التى تحتاجها النباتات بتركيزات لا تزيد عن 0.5 مللى مولار وتتضمن الحديد والمنجنيز والبورون والنحاس والزنك واليود والمولبيدوم والكوبالت).

❖ الكربون ومصادر الطاقة:

بعد السكر والجلوكوز هما مصدرا الطاقة الرئيسيين المستعملين في مزارع الأنسجة . ويمكن إستعمال الفركتوز إلا أنه أقل كفاءة . يتحلل السكر في البيئة سريعاً إلى جلوكوز وفركتوز حيث يستهلك الجلوكوز في البداية ويلية الفركتوز. يستعمل السكر عادة بتركيز 2-5%.

ومن بين المواد الكربوهيدراتية الأخرى التى أختبر تأثيرها : اللاكتوز والمالتوز والجالاكتوز والنشا ولكنها كانت جميعاً أقل كفاءة عن السكر والجلوكوز . هذا وتحتوى معظم البيئات على ال myo-inositol بتركيزات حوالى 100 مجم/لتر لأجل تحسين نمو الخلايا.

❖ الفيتامينات:

تقوم النباتات بتمثيل الفيتامينات التى تلزم لنموها وتطورها إلا أن الخلايا النباتية في المزارع تكون في حاجة إلى مصدر للفيتامينات . يعد فيتامين B (الثيامين) من الفيتامينات التى تتحتم إضافتها. ويتحسن النمو بإضافة كل من حامض النيكوتينك وفيتامين B6 (البيرودوكسين). وتحتوي بعض البيئات على الفيتامينات : حامض الفوليك والبيوتين وبارا أمينو حامض البنزويك وحامض الأسكوربيك.

❖ منظمات النمو :

تعد الاكسينات والسيتوكينينات اهم فئات منظمات النمو المستعمله فى بيئات مزارع الأنسجه بينما الفئات الأخرى مثل الجبريلينات وحامض الابسيسك والإثيلين اقل اهميه ومن بين منظمات النمو فان اندول حامض الخليك والزياتين هما الهرمونان الطبيعيان الوحيدان .

❖ الأوكسينات:

إن من أهم تأثيرات الأكسينات تحفيزها على الإنقسام الخولى وتكوين الكالوس فهو يسبب انقسام الخلايا واستطالتها وفتح الأنسجه وتكوين الجذور العرضيه كما انه غالباً ما يثبط النمو الجانبى والنمو الخضرى العرضى . وفى التركيزات المنخفضه من الأكسينات يسود تكوين الجذور العرضيه بينما يتوقف تكوين الجذور العرضيه ويتكون الكالوس فى التركيزات العاليه .

واكثر الأكسينات إستخداماً فى مزارع الأنسجه أكثرها كفاءه ال 2,4-D ' كما يستخدم كذلك كلا من ال NAA و IAA و IBA .

❖ السيتوكينينات:

تشتق السيتوكينينات من الادنين ولها دور هام فى حث النمو الخضرى واكثرها استخداما الكينيتين والبنزىل أدنين وبنزىل أمينو بيورين وجميعها تحفز الإنقسام الخولى اذا ما اضيفت مع احد الاكسينات . وفى التركيزات العاليه (10-1 مجم /لتر) فأنها تحفز النمو الخضرى العرضى وتثبط النمو الجذرى كما انها تحفز النمو الجانبى لتقليلها للسياده القميه.

❖ الجبريلينات:

تستخدم الجبريلينات عادة فى تجديد النمو النباتى كما يعد ال GA3 ضرورياً لمزارع القمم الميرستيمية لبعض الأنواع. وعموماً فإن الجبريلينات تحث على إستطالة السيقان والنمو الميرستيمى وكذلك نمو البراعم فى البيئات إلا أنها تثبط النمو العرضى لكل من الجذور والسيقان .

❖ حامض الأبسيسك :

يعد حامض الأبسيسك ضرورياً لحث تكوين الأجنه فى بيئات الزراعه .

الإضافات العضوية:

1. النيتروجين العضوي:

تكون الخلايا المزروعة قادرة عادة على تمثيل كل الأحماض الأمينية الضرورية لها ، إلا أنه غالباً ما تفيد إضافة مصدرراً للنيتروجين العضوى في صورة أحماض أمينية ، مثل الجلوتامين والأسبارجين وبعض النيوكليوتيدات مثل الأدينين . وفي حالة مزارع الخلايا تفيد كثيراً تزويد البيئة بنحو 0.2-1.0 جم/لتر من ال Casin hydrolysate ، وفي بعض الحالات قد يحل ال L-glutamine بتركيز يصل إلى 8 مللى مولار (150مجم/لتر) محل ال casein hydrolysate .

عند إضافة الأحماض الأمينية إلى بيئة الزراعه فإنه يجب إستعمالها بحرص إذ أنها قد تصبح مثبطة للنمو .

2. الأحماض العضوية:

لا يمكن للخلايا النباتية الإعتماد على الأحماض العضوية كمصدر وحيد للكربون ، إلا أن إضافة أحماض دورة ال TCA مثل الستريك والماليك والفيوماريك تسمح بنمو الخلايا النباتية على الأمونيوم كمصدر وحيد للنيتروجين. ويمكن للخلايا تحمل تركيزات تصل إلى 10 مللى مولار من الحامض. كذلك فإن إضافة حامض البيروفيك تحفز نمو الخلايا المزروعة بكثافة منخفضة.

3. مركبات معقدة:

اختبرت إضافة عديد من المستخلصات مثل الـ protein hydrolysate، ومستخلص الخميرة ومستخلص المولت (مستخلص الشعير المستنبت) ولبن (إندوسبرم) جوز الهند وعصير البرتقال وعصير الطماطم وقد كانت أكثرها فائدة الـ protein hydrolysate ولبن جوز الهند. ويتعين تجنب استخدام التركيزات العالية من تلك الإضافات حتى لا تضر بالنمو، ويتراوح التركيز المناسب عادة بين 0.1-1.0 جم/لتر، بينما يستخدم لبن جوز الهند عادة بتركيز 2%-5% (حجم إلى حجم).

○ أنواع مزارع الأنسجة:

تقسم مزارع الأنسجة tissue culture إلى الأنواع التالية:

1- مزارع البذور seed culture:

ترجع أهمية مزارع البذور إلى ضرورة استعمالها عندما تؤخذ الأجزاء النباتية المستعملة في مزارع الأنسجة (ال explants) من نباتات تنتج في البيئات، وكذلك عند إكثار الأوركيد.

2- مزارع الأجنة embryo culture.

3- مزارع الكالس callus culture.

4- مزارع الأعضاء organ culture وهي قد تكنى بإسم العضو المزروع مثل:

أ- مزارع الميرستيم . ب - مزارع القمة الخضرية.

ت - مزارع الجذور. ث - مزارع النيوسيلة.

ج - مزارع الإندوسبرم. ح - مزارع البويضات.

خ - مزارع المبايض. د - مزارع حبوب اللقاح.

ذ - مزارع المتوك. ر - مزارع البروتوبلاست.

الجزء النباتي المزروع والزراعة:

الجزء النباتي المزروع (ال explants)

يطلق إسم explants على أى قطعة من النسيج النباتي يتم فصلها من النبات الأصلي لأجل زراعتها في بيئة الزراعة في مزارع الأنسجة.

يتأثر إختيار الجزء النباتي اللازم للزراعة في البيئات بعدد من العوامل كما يلي:

1- عمر النسيج النباتي:

من المعروف أن الأنسجة الأصغر عمراً فسيولوجياً تكون بصفة عامة أكثر إستجابة للزراعة في البيئات الصناعية . وفي كثير من الأحيان لا تكون الأنسجة المسنة خلايا كالس قادرة على إعادة التجديد. كذلك فإن الأنسجة الأحدث تكون أسهل في تطهيرها سطحياً وأسرع في نموها وإستنباتها بعد زراعتها.

2- فصل النمو:

نجد أن البراعم أو النموات التي تؤخذ في فصل الربيع عندما تكون في مرحلة النمو القوي تكون أكثر إستجابة للزراعة في البيئات عن البراعم الساكنة، فالأنسجة الساكنة لا تستجيب للزراعة إلا بعد إنتهاء حالة السكون فيها . كذلك فإن معدلات التلوث تزداد مع تقدم فصل الصيف ، وقد تصل إلى 100% في فصلي الخريف والشتاء.

3- حجم الجزء النباتي:

القاعدة هي أنه كلما كان الجزء النباتي المزروع ال (explants) أصغر حجماً كلما إزدادت صعوبة زراعته حيث يكون من الضروري تزويد ببيئات الزراعة بمزيد من المكونات لنجاح الزراعة ، بينما نجد أن الأجزاء النباتية الكبيرة غالباً ما تحتوى على كميات أكبر من الغذاء المخزن بها وهرمونات تساعد في نموها في البيئات الصناعية.

4- حالة النباتات التي تؤخذ منها الأجزاء التي تستعمل في الزراعة:

يوصى دائماً بأخذ الأجزاء النباتية التي تستعمل في الزراعة من نباتات خالية تماماً من جميع الإصابات المرضية والحشرية ولم يسبق تعرضها لأي شد بيئي.

5- الهدف من إنتاج مزرعة الأنسجة:

نجد على سبيل المثال أنه عندما يكون الهدف هو الإكثار الدقيق فإن ال explants المفضل يكون هو البرعم القمي أو الجانبي أو القمة الخضرية. ولأجل إنتاج الكالس يفضل إستعمال أجزاء من الفلقات أو السويقة الجنينية السفلى أو الساق أو الأوراق أو الجنين وتعد أنسجة البادرات الناتجة من البذور المزروعة في ظروف معقمة مثالية لأجل إنتاج الكالس هذا بينما تعد الأنسجة الورقية التي تؤخذ من تلك البادرات النامية في ظروف معقمة هي الأفضل لأجل عزل البروتوبلاست. ولإنتاج نباتات أحادية أو كالس تفضل مزارع المتوك أو حبوب اللقاح.

التطهير السطحي للأجزاء النباتية المستخدمة في الزراعة

يمكن تلخيص طريقة التطهير السطحي لل explants المطلوب زراعته فيما يلي:

- 1- يغسل ال explants في ماء دافئ بالصابون ثم يشطف بماء الصنبور عدة مرات.
- 2- يفيد أحياناً شطف سريع بالكحول أو مسح النسيج بقطعة من الشاش المبلل بالكحول وخاصة عندما تكثر الشعيرات بالنسيج أو يكون مغطى بغطاء شمعي سميك.
- 3- يشطف ال explants في محلول من الكلورين القاصر للألوان الذي يستعمل في تبييض الملابس على أن يحضر المحلول للإستعمال أولاً بأول.
- 4- يصفى محلول التطهير وتشطف ال explants بالماء المعقم 3-5 مرات مع إجراء تلك الخطوة في غرفة عزل hood.

ومن أهم المواد التي تستخدم في التطهير السطحي في مجال زراعة الأنسجة ما يلي:

- 1- هيبوكلوريت الصوديوم:- يتوفر هيبو كلوريت الصوديوم في محلول تبييض الملابس التجاري بنسبة حوالي 5.25% حجماً بحجم وعموماً يخف محلول تبييض الملابس بالماء إلى 5-25% حجماً بحجم مع إضافة نقطتان من توين 20 لكل 100 مل من المحلول المخفف.
- 2- هيبوكلوريت الكالسيوم:- يحضر هيبوكلوريت الكالسيوم بتركيز 0.8% (وزناً بحجم) للتطهير وذلك بإذابة 8 جم من المركب في لتر من الماء مع التقليب لمدة 5-10 دقائق ثم يترك ليرسب منه ما لم يذوب ثم يؤخذ الرائق ويضاف له حجم مماثل من الماء ويضاف إلى المحلول الناتج نقطتان من توين 20 وتعامل به الأنسجة النباتية المطلوب تطهيرها لمدة 5-30 دقيقة.
- 3- كحول الإيثيل أو كحول الأيزوبروبيل:- يستعمل أي من الكحولين بتركيز 70% حجماً بحجم حيث يمسح بأى منهما السطح النباتي كما قد يغمس فيهما الجزء النباتي لمدة دقيقة واحدة إلى خمس دقائق قبل أو بعد تطهيره بهيبوكلوريت الصوديوم.
- 4- غاز الكلورين:- يعد غاز الكلورين فعالاً في تطهير البذور الجافة.

مزارع الخلايا

عزل الخلايا المفردة وزراعتها

يعد عزل خلايا مفردة أولى الخطوات في عمل مزارع الخلايا . وتجري هذه الخطوة إما بالوسائل الميكانيكية ، وإما إنزيمياً من الأعضاء النباتية الكاملة ، وإما تؤخذ الخلايا من نسيج كالس callus tissue نامٍ من أسطح معمة لأجزاء نباتية مزروعة .

وتعد طريقة برجمان Bergmann أكثر الطرق شيوعاً لزراعة الخلايا المفردة ، ويراعى فيها أن يكون تركيز الخلايا المفردة في البيئة السائلة ضعف التركيز النهائي المطلوب عند الزراعة.

بيئات مزارع الخلايا

تتوقف طبيعة النمو في مزارع الخلايا على تركيز الهرمونات في بيئة النمو حيث قد يكون النمو متميزاً Differentiated ، أو غير متميز Undifferentiated. ويعني بالنمو المتميز تكوينه لنموات خضرية أو جذور أو كليهما بينما يعنى بالنمو غير المتميز تكوينه لكتلة من الخلايا تسمى كالس Callus.

ينتج الكالس عادةً من أي نسيج نباتي متميز (مثل الأوراق ، السيقان ، الجذور) بوضع الجزء النباتي الذي تؤخذ منه الخلايا (explant) في بيئة تحتوي على تركيز مرتفع نسبياً من الأوكسين وتركيز منخفض نسبياً من السيبتوكينين حيث يتكون الكالس حينئذ ويمكن أن يستمر في النمو بعد ذلك إما على صورة كتل متعددة الخلايا في البيئات الصلبة وإما على شكل تجمعات صغيرة من الخلايا في البيئات السائلة الدوارة (أي التي توضع على أجهزة تتحرك بأوعية المزارع حركة دورانية). ومع استعمال تركيزات مرتفعة من السيبتوكينينات وتركيزات منخفضة من الأوكسينات في بيئة النمو فإنه يمكن أحياناً تحفيز تكوين نموات متميزة إلى سيقان وأوراق وجذور ، أو تكوين أجنة عرضية تنمو بدورها إلى نباتات كاملة بعد ذلك.

مزارع البروتوبلاست

مقدمة

تُعد مزارع البروتوبلاست protoplast culture (وهي مزارع للخلايا بدون جدرانها السيلولوزية) – وما يترتب عليها من تكوين لهجن جسمية من أكثر التقنيات الحيوية حاجة لظروف وإحتياجات خاصة لنجاحها. وقد أثارت تلك التقنيات إهتمام الكثيرين خلال السبعينيات والثمانينات القرن الماضي ، ولكنها أقلت بعد تطور تقنيات التحول الوراثي.

لقد عرفت مزارع البروتوبلاست كوسيلة لإنتاج نباتات كاملة منها بفضل دراسات Takebe وآخرون 1971 . ومنذ ذلك الحين حدث تقدم هائل في هذا المجال وأمكن تجديد نمو عديد من المحاصيل الزراعية الهامة مثل الموالح ، والكمثرى، والبطاطس ، والطماطم، والأرز ، والبرسيم الحجازي، والذرة ، والخيار، والباذنجان ، والخس ، والكرنبات. - يمكن تجديد نموها بصورة روتينية من مزارع البروتوبلاست ، الأمر الذي مهد الطريق لدراسات دمج البروتوبلاست.

يمكن عن طريق تلك التقنية الحصول على ملايين البروتوبلاست في طبق بتري واحد بتحضير الأنسجة النباتية مع الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية . وتفصل البروتوبلاست من مختلف الأجزاء النباتية كالجذور ، والسويقة الجنينية السفلى ، والفلقات ، وعقد الرايزوبيم الجذرية ، والأوراق ، والثمار ، وبتلات الأزهار ، والإنديسبرم ، والخلايا الأمية لحبوب اللقاح ، والكالس ، ومزارع معلقة الخلايا . ومن بين تلك الأجزاء النباتية تُمثل الأوراق ومزارع معلقة الخلايا أهم المصادر للحصول على محصول عالٍ من البروتوبلاست في أنواع عديدة من النباتات. ولعزل البروتوبلاست يحضن النسيج مع مخلوط من إنزيمات تقوم بتحليل الجدر الخلوية ويتكون من السيلوليز (بتركيز 2-5%) ، وبكتينيز (بتركيز 0.5-1%) لمدة 5-10 ساعات على 25° م. يمرر ناتج عملية التحلل الإنزيمي خلال مناخل تتراوح سعة تقوئها بي 30 ، 40 ميكروميتر للتخلص من الأنسجة غير المهضومة ، ثم تجمع البروتوبلاست في محلول ملحي ذات ضغط أسموزي مناسب.

يتوقف نجاح زراعة البروتوبلاست وتجديد نمو نباتات كاملة منه على العديد من العوامل من أهمها ما يلي:

- ❖ التركيب الوراثي للنبات المستعمل.
- ❖ النسيج المعزول منه البروتوبلاست.
- ❖ الظروف الفسيولوجية التي تتعرض لها مزارع البروتوبلاست.
- ❖ مدى نقاوة الإنزيمات المستخدمة.
- ❖ الضغط الأسموزي للبيئة.
- ❖ فترة الحضانة.
- ❖ بيئة الزراعة ومحتواها من منظمات النمو.
- ❖ كثافة الزراعة.
- ❖ نوع البيئة (صلبة أم سائلة).

بيئات مزارع البروتوبلاست:

تتشابه بيئات مزارع البروتوبلاست مع بيئات مزارع الخلايا إلى حد كبير ، وتفضل البيئات السائلة مع مراعاة الدقة في ضبط الضغط الأسموزي للبيئة.

هذا ويستخدم في مزارع البروتوبلاست الأجاروز بدلاً من الأجار الذي يستخدم في النوعيات الأخرى من مزارع الأنسجة . ويعتبر الأجاروز بمثابة آجار منقى أزيلت منه إسترات الكبريتات ومن ثم تقل فيه الشحنات السالبة كثيراً عما في الأجار.

ومن أهم مميزات الأجاروز – مقارنة بالأجار – ما يلي:

1. تنخفض درجة ذوبان الأجاروز مقارنة بالأجار ، وبالتالي تقل فرصة الإضرار بالبروتوبلاست.
2. تكون كفاءة عملية الزراعة أعلى.
3. يبقى البروتوبلاست في وضع ثابت ، وبالتالي يكون من الأسهل ملاحظته.
4. لا يحدث تجمع وتكتلات للبروتوبلاست بدرجة حدوث ذلك على الأجار ، وبالتالي يكون من الأسهل إجراء عملية إنتخاب وإكثار البروتوبلاستات المفردة.

أهمية مزارع البروتوبلاست:

يستفاد من مزارع البروتوبلاست في النواحي التالية:

- ✓ تُعد مزارع البروتوبلاست أفضل من مزارع الخلايا الكاملة ، ويجب إستعمالها كبداية في عمليات الإكثار وعزل السلالات الطفرية.
- ✓ دمج بروتوبلاست الأنواع النباتية البعيدة عن بعضها معاً ، وهو ما يعد وسيلة فعالة لإجراء التهجينات البعيدة.
- ✓ إدخال تراكيب مجهرية حية أو غير حية في الخلايا النباتية ، ويستفاد من ذلك في دراسات الهندسة الوراثية.
- ✓ إجراء الدراسات الفسيولوجية الخاصة بتمثيل الجدار الخلوى وخصائص الغشاء البلازمى.
- ✓ إحداث الإصابة بالفيروسات بإدخالها في البروتوبلاست مباشرةً.

✓ زراعة كلوروبلاستيدات نباتات عالية الكفاءة في عملية البناء الضوئي في بروتوبلاست نباتات منخفضة الكفاءة ، ونقل الصفات المرتبطة بالكلوروبلاستيدات (مثل المقاومة لمبيد الحشائش إترازين في اللفت) من نوع إلى آخر.

✓ إدخال صفة العقم الذكري السيتوبلازمي في النباتات (Vasil1976).

✓ الحصول على تباينات وراثية يمكن الإستفادة منها في تحسين النباتات ، وخاصة الأنواع العقيمة منها التي لا تنتج بذوراً.

إستخدامات تقنية دمج البروتوبلاست في مجال تربية النبات .. إنجازات ومحددات

مجالات إستخدام التقنية:

أستخدمت تقنية دمج البروتوبلاست في خدمة أهداف تربية النبات في كل من المجالات التالية:

أولاً: التغلب على حالات عدم التوافق الجنسي

أثبتت تقنية دمج البروتوبلاستات أنها أداة فعالة في التغلب على مشاكل عدم التوافق الخلطي في برامج التربية ، وقد أمكن الإستفادة من تلك التقنية في حالات كثيرة نذكر منها ما يلي:

Daucus carota + Petroselinum hortense

Petunia parodii + p. Parviflora

S. melongena + S. nigrum

Lycopersicon + Petunia

Brassica napus + B.nigra

ثانياً: إنتاج ال cybrids (الهجن غير المتساوية asymmetric)

من بين الأنواع النباتية التي أمكن إنتاج cybrids منها تحتوي على هيئتها الكروموسومية الكاملة بالإضافة إلى سيتوبلازمها وسيتوبلازم نوع آخر (بهدف نقل صفات سيتوبلازمية هامة) كالأ من البطاطس ، والصلبيات ، والطماطم ، والجزر.

ثالثاً: المقاومة للأمراض والآفات ومبيدات الحشائش:

ترتب على التباين الوراثي الذي تحدثه عملية دمج البروتوبلاست ظهور حالات من المقاومة أو التحمل لعدد من مسببات الأمراض ، والآفات ، وظروف الجفاف والبرودة ، ومبيدات الحشائش إلخ.

رابعاً: زيادة المحتوى النباتي من الألكالويدات ومنتجات الأيض الثانوية

إن من أهم التطورات التي حدثت مؤخراً في الصناعات الدوائية الزيادة في محتوى النباتات الطبية من الألكالويدات ومنتجات الأيض الثانوية من خلال عملية دمج البروتوبلاست ، والتي كان من أهمها ما يلي:

Atropa + Datura

Atropa + Scopolia

Hyoscyamus + Nicotiana

Rauwolfia + Vinca

ولقد أظهرت هجن الداتورة النوعية الجسمية زيادة قدرت بنحو 20-25% في محتواها من الألكالويدات الكلية مقارنة بالأباء.

خامساً: التهجين الجسمي وتحسين الأشجار

إن تربية الأشجار بطرق التربية التقليدية تتطلب سنوات عديدة ، وهي مشكلة تزداد تعقيداً بحالات عدم التوافق . وقد حدث تقدم كبير في تربية الأشجار مع التقدم في التقنيات الحيوية ، حيث أمكن إجراء الإكثار الدقيق لها بأعداد هائلة في زمن قياسي ، وإنتاج نباتات أحادية ، وحفظ الجيرمبلازم في الحرارة الشديدة الإنخفاض ، وتجديد نمو النباتات من البروتوبلاست ، والتحول الوراثي إلخ.

سادساً: التهجين الجنسي بين البروتوبلاستات الأحادية والثنائية

يمكن أن يؤدي الإندماج بين البروتوبلاستات الأحادية والثنائية العدد الكروموسومي إلى إنتاج هجن ثلاثية تكون عقيمة ، وقد تكون قادرة على إنتاج ثمار بكرية العقد.

سابعاً: التهجينات الجسمية في النباتات الدنيئة

لايختلف نظام دمج البروتوبلاست في النباتات الدنيئة (الطحالب، والسراخس) عما في مغطاة البذور.

أهم المحددات والتحديات التي تواجه إنتاج الهجن الجسمية والإستفادة منها :

- 1) تتطلب الإستفادة من عملية دمج البروتوبلاست توفر نظام كفاء لتجديد النمو من البروتوبلاستات. وعلى الرغم من أن دمج بروتوبلاستات أي نوعين أمر ممكن فإن إنتاج نباتات هجين لم يكن ممكناً إلا في حالات خاصة.
- 2) إن عدم توفر وسيلة فعالة للإنتخاب بين البروتوبلاستات المندمجة يعد أحياناً مشكلة كبيرة.
- 3) غالباً ما تكون نواتج دمج البروتوبلاستات غير متوازنة (عقيمة ، أو مشوهة ، أو غير ثابتة) ، ومن ثم تكون غير خصبة ولا يمكن إكثارها جنسياً.
- 4) كثيراً ما يتكون نمو كالوسي كيمييري في مكان الهجن ، ويرجع ذلك عادة إلى عدم إندماج الأنوية بعد إندماج الخلايا وإنقسامها كل على أفراد.
- 5) يؤدي دمج نوعين ثنائيين إلى الحصول على تراكيب متضاعفة هجينياً وهو أمر لا يكون عادة مرغوباً فيه ، ولذا يفضل في كثير من الأحيان دمج بروتوبلاستات النباتات الأحادية.
- 6) كثيراً ما تكون النباتات الناتجة من عملية التهجين الجسمي شديدة التباين.
- 7) لا يمكن أبداً الجزم بأن صفة معينة مطلوبة سوف يتم التعبير عنها بعد التهجين الجسمي.
- 8) يكون الثابت الوراثي أثناء زراعة البروتوبلاست ضعيفاً.

الإكثار الدقيق

تمهيد

يتم إكثار السلالات الجديدة من المحاصيل التي لا تتكاثر جنسياً، إما خضرياً vegetatively وإما إخصابياً Apomictically، وتفيد كلتا الطريقتين في إنتاج سلالات متجانسة تماماً ومتشابهة للأصل الذي توصل إليه المرابي، والذي استخدم في الإكثار ويعطي الإكثار الخضري سلالات خضرية Clones، بينما يعطي الإكثار اللاإخصابي سلالات لا إخصابية Apomictic Lines .

ويعاب علي التكاثر الخضري أن إنتاج أعداد كبيرة من نباتات الصنف الجديد تصلح للزراعة التجارية علي نطاق واسع يستغرق عدة سنوات، لا يستفاد خلالها من الصنف الجديد. كما قد تصاب النباتات خلال عملية الإكثار بالفيروسات؛ مما يترتب عليه انتشار الإصابة الفيرسية بين نباتات الصنف الجديد.

أما التكاثر اللا إخصابي .. فيعيبه قلة الأنواع النباتية التي تتكون بها الأجنة اللاإخصابية، فضلاً علي صعوبة التمييز بين البادرات التي تنمو من أجنة جنسية، وتلك التي تنمو من أجنة لا إخصابية في حالة التكاثر اللا إخصابي الاختياري. و من العيوب الأخرى للتكاثر اللاإخصابي -مقارنا بالتكاثر الخضري - طول فترة سكون البذور في بعض الأنواع، ووجود مرحلة حدائة Juvenile Phase طويلة في أنواع كثيرة عند إكثارها بالبذور.

أما الإكثار الجنسي.. فلا يصلح لهذه الأنواع التي تكثر تجارياً بوسائل غير جنسية لأنه يؤدي إلي إنتاج نباتات مخالفة للصنف الأصلي، فضلاً علي أن كثيراً من الأنواع النباتية لا تنتج بذوراً بالمرّة؛ مثل الموز، والعنب البناتي، والتين.

تتضح من المناقشة السابقة أهمية الإكثار الدقيق في إكثار الأصناف الجديدة وإنتاج آلاف أو ملايين النباتات الصالحة للزراعة من قطعة مجهرية الحجم من النسيج النباتي في وقت قصير للغاية.

مراحل الإكثار الدقيق

يمر الإكثار الدقيق في مزارع الأنسجة والأعضاء النباتية بخمس مراحل متداخلة فيما بينها، كما يلي:

أولاً: مرحلة التأسيس Establishment Stage

إن وظيفة هذه المرحلة هي ثبات واستطرداد نمو (تأسيس وترسيخ) جزء نباتي مزروع ومعمق (explants) في بيئة للزراعة؛ حيث ينمو طولياً ويظهر واضحاً للعين.

ثانياً: مرحلة التضاعف Multiplication

إن وظيفة مرحلة التضاعف هي زيادة أعداد النموات النباتية تمهيداً لتجديرها في مرحلة لاحقة يقسم الـ explant - الذي نما طولياً في المرحلة الأولى-إلي عدة أجزاء تزرع مستقلة في بيئة جديدة. ويتوقف تضاعف النموات الخضرية المتكونة إما علي الإنتاج المستمر للنموات الإبطية، وإما علي تكوين نموات عرضية من الكتل الكالوسية التي تتكون عند قواعد الأجزاء النباتية المزروعة. ومن الأهمية بمكان تجديد الزراعة علي فترات متقاربة حتي لا ينخفض معدل التضاعف، ويكون من الصعب استمرار النباتات في النمو عندما تنقل إلي بيئة جديدة. قد يجري هذا التجديد كل 2-4 أسابيع، وأفضل وقت لذلك هو عندما تبدأ النموات في الزيادة في الطول.

ثالثاً: المرحلة السابقة للشتل Pretransplanting Stage

إن الهدف من هذه المرحلة هو تهيئة النموات المتضاعفة للصلاحيّة للشتل بتوفير الظروف التي تسمح بتجديرها في البيئات؛ الأمر الذي يتحقق بخفض تركيز السيتوكينين أو حذفه من إضافات البيئة، مع زيادة تركيز الأوكسين؛ فتلك ظروف تسمح بتكوين جذور جديدة مع استطالة النموات بعد أن كانت الظروف السابقة (التركيز العالي للسيتوكينين) تسمح بتضاعف النموات فقط، تستغرق هذه المرحلة نحو 2-4 أسابيع.

رابعاً: مرحلة الشتلة Transplant Stage

تتضمن هذه المرحلة نقل النبات الصغير من ظروف البيئات المعقمة إلي البيئة العادية في الصوبات أولاً ثم في مكانه النهائي بعد ذلك. تمر النباتات خلال تلك المرحلة بفترة أقلمة acclimation تجعلها قادرة علي البقاء عند

نقلها إلى الظروف الطبيعية الخارجية. وفي بداية هذه المرحلة يحافظ علي نسبة عالية من الرطوبة النسبية حول النباتات تدريجيا-إلى ظروف أقرب إلى الظروف الطبيعية (عن Hartmann & Kester).

طرق التكاثر و تجديد النمو في مزارع الاكثار الدقيق

مزارع الأنسجة والأعضاء النباتية

يحدث التكاثر وتجديد النمو regeneration في مزارع الأنسجة والأعضاء النباتية بأحد خمس طرق:

أولاً: من خلال النمو المباشر (من خلال تكاثر البراعم الخضرية وتحفيز النمو الجانبي):

يحدث النمو المباشر بتكاثر الميرستيم المتواجد أصلا في الجزء النباتي المزروع، كما في مزارع القمة الميرستيمية، ومزارع القمة النامية الخضرية، ومزارع البراعم الإبطية، ومزارع العقدة المفردة.

يمكن الحصول علي الأجزاء النباتية التي تستعمل في التكاثر إما من النباتات النشطة في النمو، وإما من النباتات الساكنة.

ولبدء زراعة البراعم .تزال الأوراق المحيطة بالبرعم بعناية، وبعد غسلها بماء الصنبور، فإن البراعم تغسل بمحلول منظف مخفف جدا، ثم تعقم في محلول مخفف من كلوريد الزئبقيك أو هيبوكلوريت الصوديوم يحتوي علي نقطة من مادة مبللة، مثل توين 20، ثم تغسل عدة مرات بماء معقم قبل نقلها ببيئة الزراعة.

ويلي ذلك نقل القمم البرعمية المطهرة سطحيا إلى بيئة الاكثار، حيث تتكون فيها نموات جديدة عديدة، ويلي ذلك نقلها منفردة إلى بيئة التجذير، وتنقل بعد ذلك النباتات التي تتكون بها مجموعا جذريا قويا الي حيث تجري أقلمتها، وبتلك الطريقة يمكن زيادة معدل التكاثر من النبات الواحد بنحو 10000 مرة في المتوسط.

يتحقق الاكثار السريع-من خلال النمو المباشر – بإحدى طريقتين: تحفز في اولهما البراعم الإبطية التي توجد بالجزء النباتي المزروع، وفي اباط النموات الجديدة المتكونة .. تحفز للنمو إلى فروع جديدة وذلك بتوفير تركيز عال نسبيا من سيتوكينين في بيئة الزراعة. وبعد فترة مناسبة يتم فصل كل نمو جانبي جديد إلى بيئة طازجة جديدة لتكوين مزيد من النموات الجديدة. أما الطريقة الاخرى فإنها تناسب الانواع التي لا يمكن ان يتحقق فيها التفرع الايطي السريع، حيث ينمو فيها كل برعم إيطي إلى نمو خضري واحد، حيث يتم في هذه الحالة عمل عقل من تلك النموات تحتوي كل منها علي عقدة واحدة (nodal segments)، وتزرع في بيئة جديدة لمزيد من الاكثار.

وتجدر الإشارة الي أن تحفيز النمو الجانبي في المزارع يتم بتوفير السيتوكينين فيها بتركيز معين، إما مع الأوكسين، وإما بدونه. ويؤدي استمرار توفر السيتوكينين في المزرعة إلى نمو البراعم الجانبية التي تتكون في القمة الميرستيمية التي تنمو من البراعم المزروعة (أي من ال nodal segments)، ثم تنمو البراعم الجانبية التي تتكون في القمم الميرستيمية الجديدة.. وهكذا يؤدي استمرار هذه العملية – لعدة مرات – إلى تكون كتلة من النموات الجديدة.

ثانياً: من خلال تكوين البراعم العرضية:

بينما تنشأ النموات العادية من الميرستيم القمي أو من البراعم التي توجد في اباط الأوراق، فإن النمو العرضي ينشأ من براعم عرضية تتكون إما مباشرة علي الجزء النباتي المزروع، وإما بطريقة غير مباشرة من الكالوس الذي يتكون علي الأجزاء المقطوعة لتلك الأجزاء المزروعة.

ومن بين أنواع الأجزاء النباتية المزروعة التي يتكون منها نموات عرضية، ما يلي:

1- أجزاء الأوراق.

2- الفلقات، والسويقة الجينية السفلي، وغيرهما من أجزاء البادرة.

3- أجزاء من نورات غير مكتملة التكوين وحواملها.

4- الترايب الورقية الإبرية كما في المخروطيات.

5- أوراق الأبال، وهي التي تحتوي علي حلقات من النسيج الميرستيمي في قواعدها.

6-أقراص من النسيج النباتي ،مثل تلك التي تؤخذ من درنات البطاطس من نسيج القشرة – حول الأسطوانة الوعائية- وليس من النخاع.

ثالثاً: من خلال نشأة أعضاء جديدة:

يعرف تجديد النمو الذي يعتمد علي ظاهرة نشأة الأعضاء باسم organogenesis ؛حيث تتكون أعضاء جديدة مفردة – مثل الجذور والنباتات الخضرية – إما مباشرة من الأنسجة النباتية غير الميرستيمية المنتظمة التكوين (مثل مزارع أنصال الأوراق ومزارع الفلقات ... إلخ)، وإما بصورة غير مباشرة، تكون –بدورها – إما من الكالس أو الخلايا المفردة التي قد تنتج عن زراعة تلك الأجزاء غير الميرستيمية المنتظمة التكوين ، وإما من مزارع الكالس ومزارع الخلايا ذاتها . وتعرف الطريقة غير المباشرة لنشأة الأعضاء باسم de novo origin .

رابعاً: من خلال تكوين الأجنة الجسمية:

يعرف تجديد النمو الذي يعتمد علي ظاهرة نشأة الأجنة الجسمية باسم somatic embryogenesis ، بتكوين تراكيب ثنائية القطب الميرستيمي (bipolar) تعطي نمواً جذرياً وخضرياً معاً، وتعرف هذه الطريقة لنشأة الأجنة الجسمية باسم de novo origin .

مزارع الكالس والخلايا والبروتوبلاست

إن زراعة الخلايا النباتية – إما علي صورة نسيج كالس، وإما علي صورة معلقات من الخلايا أو البروتوبلاستات – يوفر وسيلة هامة- قد تكون أساسية – لتجديد نمو نباتات كاملة ، ولكن بسبب كثرة التباينات الوراثية التي تصاحب تلك النوعية من المزارع فإنها لا تستخدم كثيراً في إكثار الأصناف ، وإن كانت تستعمل في الدراسات الوراثية ، والتربوية ،والهندسة الوراثية . وعلي الرغم من ذلك فهي تقدم وسيلة فعالة لتكوين الأجنة الجسمية بأعداد هائلة ؛وهي التي يمكن زراعتها حقلياً وهي محمولة في السوائل (fluid drilling) .

يبدأحت تكوين الجذور والسيقان ومباييء الأجنة proembryoids بإعادة تميز مجموعات من الخلايا البرانشيمية مكونة مراكز للنشاط الميرستيمي ، وقد أطلق عليها اسم meristemoids في حالة ال organogenesis ، و preembryonic masses في حالة ال embryogenesis علي الجزء النباتي المزروع، ولكن الاتجاه قد يمكن التحكم فيه بالتحكم في مكونات بيئة الزراعة .

مزارع الكالس

ينتج الكالس علي الأجزاء النباتية المزروعة في البيئات الصناعية نتيجة للجروح التي تحدث فيها، وذلك استجابة للهرمونات التي قد تتواجد طبيعياً في تلك الأجزاء المزروعة أو تزود بها بيئة الزراعة . هذا ويمكن فصل أي جزء نباتي (بنور أو سيقان أو جذور أو أوراق أو أعضاء تخزين أو ثمار) وتطهيره ، وزراعته علي سطح بيئة زراعة لإنتاج الكالس . ويمكن استمرار إعادة زراعة أنسجة الكالس عدة مرات ولفترات طويلة بعيداً عن الجزء النباتي الأصلي المزروع.

وأفضل البيئات وأكثرها استعمالاً في إنتاج الكالس هي بيئة موراشيخ وسكوج.

وعلي الرغم من أن نسيج الكالس المتكون في البيئات يبدو لأول وهلة كأنه نسيج متجانس من الخلايا ، إلا أنه في حقيقة الأمر نسيج معقد يحتوي علي تباينات كثيرة مورفولوجية،وفسيولوجية،وراثية.

يكون نمو الكالس لوغاريتيمياً،حيث يمر بالمراحل التالية:

1- فترة أولية من الانقسام الخلوي البطيء.. وهي فترة الحث induction period، وهي تتطلب تواجد الأوكسين.

2- فترة من الانقسام الخلوي السريع ،مع التمثيل النشط لكل من الدنا والرنا والبروتين.

3- فترة يتوقف فيها انقسام الخلايا ، وتتميز فيها خلايا الكالس المتكونة إلي خلايا برانشيمية أكبر حجماً و خلايا أخرى من طراز الخلايا الوعائية.

هذا. ولا يحدث الانقسام الخلوي في كل الكتلة الكالوسية ، ولكنه يقع أساسا في طبقة ميرستيمية عند الحافة الخارجية لكتلة الخلايا. أما الأجزاء الداخلية للكالس فإنها تبقى ككتلة غير منقسمة من النسيج ، وبمرور الوقت .. فإنها قد تتميز فسيولوجيا ووراثيا عن خلايا الطبقة الخارجية. يقل الانقسام في خلايا الطبقة الخارجية للكالس بعد فترة، وتظهر فيه عقد knobs (ويصبح knobby) بعدما يصبح الانقسام محصورا في أماكن منفصلة منه ، هي التي تظهر فيها تلك العقد ويعني ذلك أن خلايا الكالس تتباين في أعمارها ، حيث تكون الخلايا الوسطية أكبر عمرا ، بينما تكون خلايا الحافة ميرستيمية وأصغر عمرا.

مزارع معلقات الخلايا

تعد مزارع معلقات الخلايا cell suspension culture امتدادا لمزارع الأنسجة أو مزارع الكالس ؛ حيث إنها تتكون من خلايا أو مجموعات منها منتشرة ونامية في بيئة مغذية سائلة.

تتميز مزارع الخلايا عن مزارع الكالس في أن الخلايا تكون –غالبا- مفردة ، وتكون كل منها علي اتصال مباشر بالبيئة ، وتقل فيها كثيرا ظهور التباينات الوراثية، مقارنة بمزارع الكالس.

تبدأ مزرعة معلقات الخلايا بوضع قطعة من الكالس المفككة أو نسيج مجنس homogenized في بيئة سائلة، بحيث تنفصل فيها الخلايا عن بعضها البعض. وقد توضع المزرعة في دوارق علي جهاز هزاز دوار للسماح باختلاط الهواء مع البيئة السائلة، أو فيما يعرف باسم turbidostat الذي يحافظ علي دوران البيئة داخل الدورق المخروطي بصورة دائمة. وفي طريقة ثالثة توضع الخلايا علي ورقة ترشيح توضع بدورها علي سطح بيئة سائلة توجد في طبق بتري دونما حاجة إلي إحداث أي اهتزازات.

يمر انقسام الخلايا بالمراحل التالية:

- 1- فترة من الانقسام البطيء lag phase.
 - 2- فترة من الانقسام السريع اللوغاريتمي exponential growth.
 - 3- فترة من الانقسام الثابت linear growth.
 - 4- فترة من التدهور في الانقسام وفي أعداد الخلايا الحية deceleration phase.
 - 5- فترة نهائية من الثبات في أعداد الخلايا stationary state.
- ويعرف منحنى النمو هذا بالمنحنى اللوغاريتمي، وهو يتكرر إذا ما جددت زراعة نفس الخلايا في بيئة جديدة ، ويمكن أن يستمر ذلك إلي مالا نهاية باستمرار إعادة الزراعة (عن Hartmann & Kester 1983).

مزارع القمة الخضرية

الجزء النباتي المستخدم في الزراعة

يكون الجزء النباتي المستخدم في الاكثار الدقيق في مزارع القمة الخضرية: إما كل النمو القمي أو بعضه ، وإما النمو الجانبي علي ساق ، وإما قطعة من ساق النبات تحتوي علي عدة عقد ؛ أي إن حجم الجزء النباتي المزروع يتباين كثيرا.

وأكثر الأجزاء النباتية استعمالا هي القمة الخضرية المندمجة التي يتراوح طولها بين 0.5 إلي 2.0 سم. ومن الطبيعي أن هذا الحجم أسهل في تداوله ، ولكنه قد لا يكون خاليا من الإصابات الفيروسية.

وفي نظام آخر للاكثار الدقيق تستعمل أجزاء بطول 1-2 سم. أو أطول من ذلك-من قمة خضرية نامية وغير مكتملة التكوين، وتحتوي علي أوراق غير مكتملة التكوين. وتلك الأجزاء تكون أسهل في تداولها، ولكنها غالبا ما تكون ملوثة بمسببات الأمراض أو مصابة بالفيروسات.

وقد تؤخذ كذلك أجزاء نباتية مماثلة لزراعتها من نموات البراعم الجانبية تكون بمثابة عقلا وحيدة العقدة.

تتوطد زراعة القمة الخضرية من خلال استطالة الميرستيم القمي وما يصاحب ذلك من نمو محدود للميرستيمات الإبطية. أما مرحلة التضاعف فإنها تحدث عند توقف الميرستيم القمي وتحفيز نمو البراعم الإبطية واستطالتها

ويؤدي التجديد المستمر للمزارع وفصل النموات الجديدة وزراعتها في بيئات جديدة إلى إحداث تضاعف كبير في النمو، ولكن يبقى مدي ذلك التضاعف رهنا علي عدد البراعم الإبطية في الجزء النباتي المزروع.

الإكثار الدقيق للأنواع الخشبية

يراعي في عملية الإكثار الدقيق للأنواع الخشبية ما يلي:

1_ الجزء النباتي المزروع :

ما لم يكن الهدف من الإكثار الدقيق هو التخلص من الفيرس، فإنه يكون من المفضل بدء المزارع من عقد ساقية؛ ذلك لأن البراعم أو القمم الميرستيمية المفصولة من النباتات البالغة قد تموت، وقد لا تعطي نتائج جيدة. أما عند استعمال العقد الساقية فإن النسيج الأمي للعقل الصغيرة المزروعة يلعب دورا هاما في بقاء ونمو البراعم.

2_ التلون البني للبيئة :

يعتبر تأكسد المواد الفينولية التي تتسرب من السطح المقطوع للأجزاء النباتية المزروعة التي تؤخذ من الأنسجة المكتملة النمو للأنواع الخشبية وبعض الأنواع الأخرى كذلك يعتبر أحيانا مشكلة خطيرة، حيث تغير أكسدة الفينولات لون البيئة إلى البني القاتم نسبيا، كما تصبح سامة للأنسجة. وتؤدي سرعة نقل الأجزاء النباتية المزروعة إلى بيئة جديدة مرتين أو ثلاث مرات علي فترات قصيرة (أيام قليلة) إلى الحد من تلك المشكلة أحيانا، حيث يلتئم خلال تلك الفترة السطح المقطوع للجزء النباتي المزروع، ويتوقف التسرب منه.

وإذا ما استمرت مشكلة التلون البني في كل مرة تعاد فيها الزراعة فإنه يوصي بإضافة أحد مضادات الأكسدة إلى بيئة الزراعة، مثل ال cysteine-HCl (بتركيز 100 مجم/لتر)، وحامض الأسكوربيك (بتركيز 50-100مجم/لتر)، وحامض الستريك (بتركيز 150مجم/لتر). وكذلك وجد أنه بإضافة البولي فينيل بيروليديون - pyrrolide polyvinyl- الذي يقوم بامتصاص المركبات الفينولية فإنه يمكن إنقاذ النسيج النباتي المزروع من التأثير السام للفينولات المؤكسدة. هذا مع العلم بأن إبقاء المزارع في الظلام في بداية الزراعة يحد من مشكلة التلون البني لأن الضوء يساعد في تحفيز أكسدة الفينولات.

3_ دور الفلوروجلوكونول :

يلعب الفلوروجلوكونول phloroglucinol وهو مركب فينولي يوجد في عصارة الخشب بالتفاح- يلعب دورا في تضاعف السيقان وتجذير عدد من الأنواع النباتية بالعائلة الوردية (Bhojwani & Razdan, 1983).

التطعيم الدقيق للقمة الخضرية

يعرف التطعيم الدقيق micrografting بأنه تطعيم قمة نامية من النبات الأم علي نبات صغير نام في صوبة أو مشتل، أو علي بادرة نباتية أنتجت في ظروف معقمة -و ذلك بعد إزالة قمته- أو علي عقلة دقيقة حصل عليها من التكاثر الدقيق في مزارع الأنسجة.

ومن أهم مزايا التطعيم الدقيق للمربي، ما يلي:

1- التخلص من الفيروسات، عندما يكون من الصعب تجديد نمو سيقان وجذور من القمة الخضرية للنباتات الخشبية في مزارع الأنسجة.

2- تخطي مرحلة الحداثة التي ترتبط بالاكثار البذري في النباتات الخشبية (عن Taji وآخرين 2002).

ولقد نجحت طريقة التطعيم الدقيق في كل من الموالح، والتفاح والفاكهة ذات النواة الحجرية.

وفي الموالح.. نجحت هذه الطريقة في إنتاج نباتات في مرحلة النمو البالغ adult stage مباشرة دون المرور بمرحلة الحداثة القوية التي تمر بها البادرات التي تنتج من الأجنة النيوسيلية، وهي الطريقة التي تستعمل كذلك- في إنتاج نباتات خالية من الإصابات الفيروسية (Hartmann & Kestrer, 1983).

مزارع القمة الخضرية الميرستيمية

يستفاد من مزارع القمة الخضرية الميرستيمية Meristem shoot Tip Culture في إنتاج نباتات خالية من الاصابات الفيروسية وبعد ذلك امرا بالغ الاهمية في المحاصيل التي تتكاثر خضريا ، والتي تنتقل فيها الفيروسات تلقائيا مع الاجزاء الخضرية المستخدمة في التكاثر.

وبرغم أن النباتات قد تكون مصابة بجهازيا بالفيروسات.. الا ان القمة الميرستيمية النامية تكون غالبا خالية تماما من الفيروسات، أو لا تحتوي الا علي قليل جدا منها، ويرجع ذلك إلي الأسباب التالية:

- 1- خلو القمة الميرستيمية من الأنسجة الوعائية التي يكون انتقال الفيروسات فيها سريعا ، بينما يكون انتقالها خلال الروابط البروتوبلازمية أبطأ من سرعة نمو القمة النامية.
- 2- يكون النشاط الأيضي في الخلايا الميرستيمية عالياً بدرجة يقل معها تكاثر الفيروس فيها.
- 3- تكون نظم المقاومة لتكاثر الفيروسات أعلى من الأنسجة الميرستيمية مما في أي نسيج آخر.
- 4- قد يثبط التركيز العالي للأوكسين الطبيعي في القمة النامية نشاط الفيروسات فيها.

ويقسم الميرستيم القمي عادة إلى منطقتين هما :

- 1- الميرستيم الأولي promeristem.. وهو الذى يتكون من الخلايا الميرستيمية القمية والخلايا المجاورة لها.
 - 2- الميرستيم المحيطي peripheral meristem.. وهو الميرستيم الذى يوجد أسفل الميرستيم الأولي ويحيط به جانبياً ومن أسفله ، ويمكن أن يميز به كلاً من مبادئ الأوراق ، والكامبيوم الأولي ، والميرستيم الأساسي.
- وعند زراعة القمة النامية الميرستيمية فإن الجزء المستخدم في الزراع يكون هو القبة القمية apical dome ، وهى المنطقة التى تكون محصورة داخل مبادئ الأوراق ، والتي يتراوح قطرها بين 0.075 ، 0.12 مم ، وطولها بين 0.2 ، 0.025 مم . ولا تتصل تلك القبة القمية بجهاز وعائى مع أي من الأنسجة المكونة للميرستيم المحيطي ، والأمر الذى يفيد كثيراً في منع وصول المسببات المرضية وخاصة الفيروسات إلى القبة القمية.

هذا.. ويستفاد من مزارع القمة الميرستيمية في ثلاثة جوانب تتعلق بإكثار النباتات الإقتصادية هي كما يلي:

- 1- الإستفادة من ظاهرة خلو القمم الميرستيمية من الإصابات الفيروسية في عملية الإكثار الدقيق ذاتها ، لضمان خلو آلاف النباتات المنتجة بهذه الطريقة من أية إصابة فيروسية أو ميكروبلازمية.
- 2- عمل إكثار أولى للنباتات الخضرية التكاثر التى تصاب بشدة بالأمراض الفيروسية، لإنتاج تقاوى من الفئات الممتازة التى تكثر بعد ذلك خضرياً، لإنتاج التقاوى التى يستخدمها المزارعون ، وتلك هى الطريقة التى تتبع في إكثار تقاوى البطاطس والفراولة التى تصاب بنحو 62 مرضاً تسببها فيروسات وميكروبلازمات.
- 3- إعادة إنتاج نباتات خالية من الفيروس من الأصناف القديمة للمحاصيل الخضرية التكاثر التى لم يعد فيها نبات واحد خال من الإصابات الفيروسية ، كما حدث بالنسبة لبعض أصناف البطاطس.

العوامل المؤثرة في عملية الإكثار الدقيق:

تتأثر عملية الإكثار الدقيق بالعوامل التالية:

أولاً: بيئة الزراعة

تؤثر بيئة الزراعة في عملية الإكثار خلال مختلف المراحل كما يلي:

1- بداية الزراعة وتضاعف النموات:

أثبت مخلوط أملاح بيئة موارشيج وسكوج صلاحية للإكثار الدقيق في عديد من الأنواع المحصولية. وغالباً ما يمكن إستعمال البيئة ذاتها لكل من بدء الزراعة، وتضاعف النموات الخضرية .

2- التجذير:

وجد أن البيئات ذات المحتوى المنخفض من الأملاح أكثر مناسبة لتجذير عدد كبير من الأنواع النباتية عن تلك التي تحتوي على تركيز مرتفع من الأملاح ،حيث تستعمل عادة بيئة موارشيج وسكوج بنصف قوتها ، أو حتى بربع قوتها.

ثانياً: الضوء

يؤثر الضوء في عملية الإكثار الدقيق خلال مختلف مراحلها ،كما يلي:

1- بدء الزراعة وتضاعف النموات:

على الرغم من أن نموات المزارع تكون خضراء اللون ، فإنها لا تعتمد على البناء الضوئي لتصنيع إحتياجاتها من الغذاء ، فهي تنمو ك heterotrophs معتمدة في كل غذائها العضوى وغير العضوى على بيئة الزراعة ، وتقتصر الإحتياجات الضوئية لتلك المزارع فقط على عمليات التميز المورفولوجي، وتكفى لذلك إضاءة قوتها 1000-3000 لكس ، علماً بأن 1000 لكس هي القوة الأنسب لعدد كبير من الأنواع النباتية ، وأن قوة تزيد عن 3000 لكس تعد مثبطة للنمو.

2- التجذير:

يعد التجذير في المزارع ضرورياً للقيام بعملية الشتل وللتخفيف من صدمة الشتل. ويعمل خفض مستوى السكرز إلى حوالى 1% مع زيادة شدة الإضاءة إلى 3000-10000 لكس خلال مرحلة التجذير على تحويل النبات من الإعتماد على البيئة في غذائه (heterotrophic) إلى الإعتماد على نفسه (autotrophic) ، كما تحفز الإضاءة العالية التجذير الجيد ، وتزيد من تقسية النباتات. وقد تبدو النباتات في ظروف الإضاءة العالية أقل إخضراراً وقوة في النمو، إلا أنها تكون أقدر على تحمل عملية الشتل عن النباتات الطويلة الخضراء التي تبقى معرضة لإضاءة منخفضة عن (Bhojwani & Razdan 1983).

ثالثاً: درجة الحرارة

تتباين درجة الحرارة المثلى المناسبة لمزارع الإكثار الدقيق باختلاف النوع النباتي المزروع ، وهي لا تختلف كثيراً عن الإحتياجات الحرارية العادية تحت ظروف الزراعة الطبيعية ، وغالباً ما تتراوح حرارة تحضين المزارع بين 20، 28م ، وتكون أكثرية الأنواع النباتية فى منتصف ذلك المدى. وفي أغلب الحالات تبقى الحرارة ثابتة على مدى اليوم ، ولكن بعض الأنواع يناسبها تباين قدره 5م في درجة الحرارة. ويؤدى إرتفاع الحرارة عن 28م إلى تكثف الماء على النباتات وجدران الأوعية مما قد يحد من النمو.

وعادة .. لا يتم التحكم في الرطوبة النسبية أثناء تحضين المزارع ، وإذا تم التحكم فيها .. فإنها تكون غالباً بين 60% ، 80% والأفضل ضبطها عند 70% (Wang & Charles 1991).

التحديات التي تواجه عمليات الإكثار الدقيق:

إن من أهم المشاكل التي قد تواجه عملية الإكثار الدقيق ما يلي:

1- التلوث الميكروبي:

يعد التلوث الفطري والبكتيري من أكبر المشاكل التي لا تسمح بنمو المزارع وتؤدي إلى حتمية التخلص منها. ويمكن التغلب على تلك المشكلة بتنمية النباتات التي تؤخذ منها الأجزاء التي تستعمل في زراعة الأنسجة في غرف نمو ، مع التعقيم الجيد لتلك الأجزاء ، وإجراء كل عمليات الزراعة في البيئات في Laminar Air Flow Cabinets مزودة بمرشحات HEPA (0.2 ميكرومتر) ، وإستعمال أدوات تشريح معقمة. ويفيد تبخير حبرات الزراعة بإستعمال محلول فورمالين مخفف في تقليل حالات التلوث الميكروبي.

2- تلون بينات الزراعة باللون البنّي:

تفرز الأجزاء النباتية المزروعة من بعض النباتات مثل الفلفل – مركبات فينولية في بيئة الزراعة تؤدي إلى إكتسابها لوناً بنياً ، وتقليل نمو الأجزاء النباتية المزروعة فيها. ويرجع هذا التلون إلى تأكسد المركبات الفينولية العديدة اللون وتحولها إلى مركبات أخرى بنية اللون. ويمكن الحد من ظاهرة التلون البنّي بتزويد بيئة الزراعة بالفحم النباتي النشط بنسبة 0.1-0.2% ، أو بحامض الستريك أو حامض الأسكوربيك بتركيز 500-1000 مجم/لتر.

3- تكوين الكالس:

على الرغم من أن تكوين الكالس callusing قد يكون مرغوباً فيه أحياناً ، إلا أنه غالباً ما يكون أمراً غير مرغوب فيه ، ونظراً لأن كتلة خلايا الكالس غير المتميزة تؤثر في التطور الطبيعي لكل من النمو الخضري والجذري ، وقد يؤدي إلى ظهور تباينات وراثية في النباتات التي يتجدد نموها . ومن بين الوسائل التي تحد من ظاهرة تكوين الكالس تزويد البيئة بال triiodobenzoic ، وال phloroglucinol ، وال phloridzin ، أو خفض تركيز الأملاح غير العضوية في بيئة الزراعة.

4- التزجج:

التزجج هو ظهور نباتات غير طبيعية المظهر (زجاجية المظهر ونصف شفافة) في بيئة الزراعة ، وخاصة عند إستعمال بيئات سائلة. تبدو هذه النباتات غير طبيعية المظهر بسبب النمو غير الطبيعي لأوراق نباتات المزارع ، وقلة محتواها من الشمع الأديمي، وضعف كفاءتها في البناء الضوئي ، وعدم قيام الثغور بوظائفها. ويمكن الحد من تلك الظاهرة بجعل ظروف الزراعة تسمح بحركة الماء والغذاء والعناصر في النبات من خلال خفض الرطوبة النسبية في أوعية الزراعة عن (Chahal & Gosal 2002).

5- حساسية النباتات الصغيرة الناتجة من الإكثار الدقيق لصدمة الشتل:

إن أكبر مشكلة في عملية الإكثار الدقيق هي موت نسبة كبيرة من النبات في مرحلة الأقامة ، أي بعد نقلها من مزرعة الإكثار إلى بيئات النمو العادية .

6- التباينات الوراثية التي تظهر في مزارع الإكثار الدقيق:

بينما قد تكون تباينات مزارع الأنسجة أمراً مرغوباً فيه بالنسبة لمربي النبات الذي يسعى دائماً إلى الحصول على تلك التباينات التي قد تفيد في برامج التربية ، إلا أنها لا تفيد أبداً في عملية الإكثار الدقيق التي يجب أن تعطي نباتات متجانسة وصادقة للصنف المكثّر عن (Chahal & Gosal 2002).

تطبيقات الإكثار الدقيق في مجال تربية النباتات وإكثارها

إستعراض التطبيقات

إن من أهم تطبيقات مزارع الإكثار الدقيق التي تخدم تربية النبات ما يلي:

1- التخلص من الفيروسات: ويتبع في التخلص من الفيروسات الطرق التالية:

• المعاملة الحرارية:

تعرف تلك المعاملة بإسم *thermotherapy*، وبمقتضاها تعرض النباتات لحرارة عالية نسبياً ، وهي تستخدم في التخلص من الفيروسات والميكوبلازما ، وقد تستعمل منفردة أو مع المعاملة الكيميائية، أو مع مزارع القمة المريستيمية، أو مزارع القمم النامية المجزأة.

• إستعمال مضادات الفيروسات:

تعرف تلك المعاملة بإسم *chemotherapy*، وبمقتضاها تعامل الأجزاء النباتية التي تؤخذ منها الأجزاء (*explants*) التي تستعمل في الزراعة ، وذلك قبل فصلها. هذا .. وقد تضاف تلك المركبات الكيميائية إلى بيئة الزراعة كذلك وذلك لأجل دعم عملية التخلص من الفيروسات.

• مزارع القمة المريستيمية:

يتضمن الجزء النباتي *explants* الذى يستخدم في مزارع القمة المريستيمية القبة المريستيمية ، بالإضافة عادة إلى زوج من مبادئ الأوراق.

• مزارع القمم النامية المجزأة:

تستعمل مزارع القمم النامية المجزأة على نطاق واسع في إكثار الفلفل والخرشوف.

• التطعيم الدقيق في البيئات الصناعية:

2- الإكثار التجارى للنباتات الخضرية التكاثر:

يمكن إكثار نبات واحد إلى عدة ملايين من النباتات في خلال عام واحد ، الأمر الذى يستحيل تحقيقه بطرق التكاثر العادية ، وكذلك يفيد الإكثار الدقيق في الإكثار التجارى للنباتات الخضرية التكاثر مع المحافظة على صفة التجانس ، كما حدث بالنسبة لمحاصيل الخرشوف (إيطاليا) ، والثوم (التشيك وسلوفاكيا) ، والبطيخ الثلاثي (رومانيا).

3- تسهيل إكثار الأجزاء النباتية المسنة التى يصعب غالباً إكثارها خضرياً :

وذلك بإعادة الحدائة إليها في مزرعة أنسجة ثم إكثارها بعد ذلك.

4- غالباً ما تكون النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة أقوى نمواً عن مثيلاتها الناتجة من الإكثار العادى بسبب إستعادتها لحدائتها ، أو لخلوها من الإصابات الفيروسية.

5- يعد الإكثار الدقيق وسيلة سهلة وإقتصادية كذلك في الأنواع التى يعد إكثارها معقداً وبطيئاً

6- تسهيل مهمة إنتقال الجيرمبلازم عبر الحدود بين الدول على صورة مزارع أنسجة خالية من الإصابات المرضية دونما حاجة إلى إجراءات الحجر الزراعي.

7- الإكثار التجارى السريع للنباتات البذرية التكاثر

8- يفيد الإكثار الدقيق في المحافظة على التركيب الوراثي للنباتات المكثرة دونما تغيير .

9- الحد من الحاجة إلى الصوبات الزراعية في عمليات الإكثار مما يقلل من تكلفتها.

مزارع النباتات الأحادية المجموعة الكروموسومية

تمهيد:

إن الهدف الرئيسي من إنتاج مزارع النباتات الأحادية المجموعة الكروموسومية haploids هو الإستفادة من تلك النباتات في برامج التربية ، وذلك بعد مضاعفتها والحصول منها على نباتات أحادية مضاعفة double haploids .

هذا وتعد زراعة المتوك وحبوب اللقاح هي أكثر التقنيات إستعمالاً في إنتاج النباتات الأحادية المضاعفة في معظم الأنواع النباتية ، حيث تشكل أكثر من 50% من الحالات التي درست.

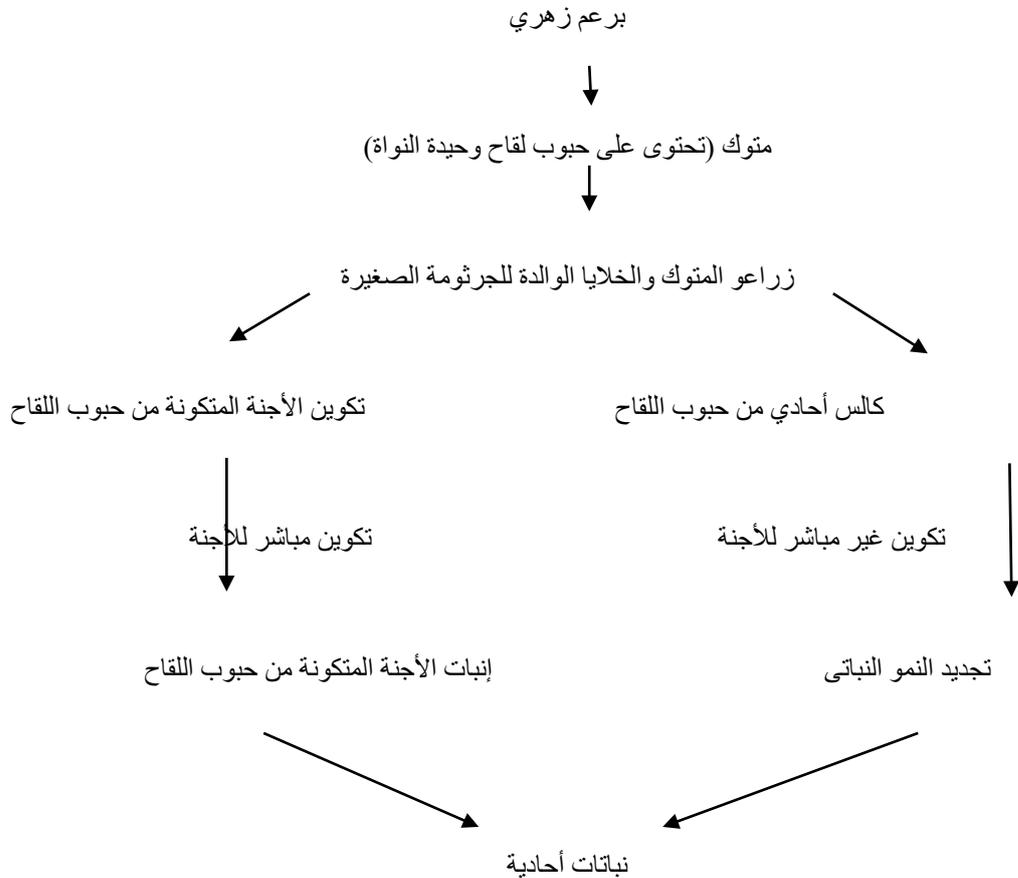
وللتدليل على مدى إنتشار مزارع المتوك وحبوب اللقاح التي تستخدم في الحصول على نباتات أحادية قدر أنه حتى عام 2002 كان قد نشر أكثر من 2000 بحث في الموضوع تناولت بالدراسة أكثر من 250 نوعاً نباتياً ، كانت الباذنجانيات والأسبرجس من أهمها عن (McCown2003).

مزارع المتوك وحبوب اللقاح والخلايا الوالدة للجراثيم الصغيرة

خطوات تكوين النباتات الأحادية

أولاً: مزارع المتوك وحبوب اللقاح

تعد مزارع المتوك من أكثر الطرق شيوعاً لإنتاج النباتات الأحادية. ولقد تم تطوير هذه التقنية لأول مرة على نبات الداتورة بواسطة كل من Guha & Maheshwari 1964. وفي هذه الطريقة .. يتم أولاً جمع البراعم الزهرية وهي في مرحلة مناسبة من التكوين من نباتات جيدة النمو. توضع البراعم في أكياس بلاستيكية على 4م لمدة 7-10 أيام فيما يعرف بمعاملة البرودة. يلي ذلك تعقيم البراعم الزهرية سطحياً بإستعمال 0.1% كلوريد زئبق HgCl₂ لمدة 9-10 دقائق ، ثم تفصل المتوك تشريحياً بعناية من البراعم وتنقل إلى بيئة الزراعة ، وتحضن على 25 ± °C م تحت إضاءة غير مباشرة. نجد غالباً أن المتوك المزروعة تنتج كاس بعد 2-6 أسابيع ، وبعد نحو شهر من تكوين الكاس فإنه يحفز إلى تجديد النمو.



ويوضح الشكل عملية إنتاج النباتات الأحادية من خلال المتوك وما تحتوية من حبوب اللقاح وخلايا والدة للجراثيم الصغيرة.

ثانياً: مزارع الخلايا الجرثومية لحبوب اللقاح

تعتبر زراعة الخلايا الجرثومية المفصولة لحبوب اللقاح (isolated microspores) (الخلايا الجرثومية الصغيرة) أفضل من زراعة المتوك الكاملة ، لأنها لا تعطي أي فرصة لظهور نباتات ثنائية العدد الكروموسومي ، وهي التي قد تنشأ من خلايا جدر المتوك والأنسجة الرابطة بها. وتتفصل الخلايا الجرثومية إما بصورة طبيعية بعد زراعة المتوك ، وإما ميكانيكياً بالضغط على المتوك حتى تبرز منها الخلايا الجرثومية.

تمر الخلايا الجرثومية بعد زراعتها بأشكال مختلفة من تجديد النمو ذكرياً androgenesis تقود إلى تكوين الأفراد الأحادية إما بصورة مباشرة ، وإما بصورة غير مباشرة من خلال تكوين الكالس ، علماً بأن الطريق الأول يعد أفضل من الثاني بالنسبة للمربي.

وعلى الرغم من أن تجديد النمو ذكرياً يمكن أن يحدث في المزارع في مرحلة الخلايا الأحادية الرابع ، أو في مرحلة حبة اللقاح ذات النواتين (الذكورية والخضرية) فإن الخلايا الجرثومية الصغيرة في مرحلة ما قبل الإنقسام الميوزي الأول مباشرة أو عنده هي الأفضل لتجديد النمو.

في حالة تجديد النمو ذكرياً بصورة مباشرة تتطور الخلايا الجرثومية الصغيرة كما لو كانت زيجوتاً ، حيث تمر بشتى مراحل تكوين الجنين كتلك التي تحدث بعد التلقيح والإخصاب. وبعد وصول الأجنة إلى المرحلة الكروية فإنها تنطلق غالباً من الجدار الخارجى لحبة اللقاح لتكتمل نموها خارجياً. يلي ذلك إمتداد الفلقتين وبروز النبات الصغير من المتوك في خلال 4-8 أسابيع.

أما في حالة تجديد النمو غير المباشر فإن الخلايا الجرثومية الصغيرة تنقسم عدة مرات لتكون كالس يندفع خارجاً من جدار المتوك. ويعقب ذلك إما تميز الكالس لتكوين أجنة أو جذور ونموات خضرية في البيئة ذاتها ، وإما أن ينقل إلى بيئة أخرى ليحدث التميز . وغالباً ما تحتوى النباتات المتحصل عليها من الكالس على تباينات وراثية ، وخاصة تلك التي يكون مردها إلى التعدد الكروموسومي ، ولذا فإنها لا يكون مرغوباً فيها (Bajaj 1990).

العوامل المؤثرة في عملية التوالد الذكري:

تتأثر عملية التوالد الذكري بالعوامل التالية:

1- التركيب الوراثي للنبات الذى تؤخذ منه المتوك المستعملة في الزراعة:

تظهر تباينات وراثية كبيرة بين الأجناس والأنواع ، وحتى بين أصناف النوع الواحد في إستجابتها لزراعة المتوك ، ولقد اقترح أن تلك الصفة يتحكم فيها جينات يمكن نقلها إلى التراكيب الوراثية التي تستجيب لزراعة المتوك. فلقد وجد عند إستعمال 43 صنفاً من الطماطم ، و18 سلالة من *Arabidopsis thaliana* أنه لم تنتج نباتات أحادية سوى من ثلاثة تراكيب وراثية من كل نوع. وقد حصل على نتائج متقاربة لتلك النتائج مع كل من أجناس محاصيل التبغ ، والبطاطس. وفي القمح لم يتم الحصول على أنسجة أحادية إلا من 10 أصناف من بين 21 صنفاً استعملت في الدراسة ، ولم تختلف النتائج كثيراً عما تقدم بيانه في جنس محصول الأرز.

2- الحالة الفسيولوجية للنبات الذى تؤخذ منه المتوك المستعملة في الزراعة :

تكون الأزهار الأولى في التكوين أكثر نجاحاً في مزارع المتوك فضلاً عن تأثير نجاح الزراعة بعدد من العوامل التي تؤثر فسيولوجياً على النبات الذى تؤخذ منه المتوك المستعملة في الزراعة مثل عمره ، والفترة الضوئية ، وشدة الإضاءة ، ودرجة الحرارة ، والفترة من السنة ، وحالة التغذية إلخ.

3- مرحلة تكوين الخلايا الأمية لحبوب اللقاح:

تعتبر المرحلة التي تتكون فيها الخلايا الأمية لحبوب اللقاح عند زراعة المتوك – من أهم العوامل التي تتحكم في نجاح زراعة المتوك ، وهي مرحلة تختلف باختلاف الأنواع النباتية ، لكن تعتبر المرحلة المناسبة في عديد من الأنواع هي عندما تحتوى المتوك على حبوب لقاح في وقت مبكر إلى متوسط من مرحلة النواة المفردة عن (Chahal & Gosal 2002).

4- معاملات المتوك السابقة لزراعتها (الصددمات الحرارية والمعاملات الكيميائية):

تجرى معاملات للمتوك بهدف وقف التطور الطبيعي لحبوب اللقاح إلى جاميطة مذكرة ، مثل:

أ- المعاملة بالحرارة المنخفضة ، والتي تتراوح عادة بين 3 ، 6م لمدة 3-15 يوماً.

ب- المعاملة بالحرارة العالية ، مثل 30م لمدة 24 ساعة ، أو 40م لمدة ساعة واحدة.

ت- المعاملة ببعض المركبات الكيميائية ، مثل الإيثريل بتركيز 4000 جزء في المليون.

تعرف معاملات الحرارة المنخفضة والمرتفعة بإسم الصددمات الحرارية.

ومن أمثلة الصددمات الحرارية المعاملة بالبرودة (4-10 لمدة أسبوع) أو الحرارة (5-15 دقيقة) حيث تؤدي تلك المعاملات إلى وقف عمل الجينات المسؤولة عن التكوين الطبيعي للطور الجاميطي.

5- تركيب بيئة الزراعة:

قد يؤثر تركيب بيئة الزراعة على إستجابة المتوك للزراعة ، ومن أهم البيئات الأساسية المستعملة لهذا الغرض: Nitsch & Nitsch , B₅ , Ms , N₆.

تعد بيئة موراشيخ وسكوج مناسبة لزراعة حبوب اللقاح . وعلى الرغم من عدم أهمية العناصر والفيتامينات في حث عملية التوالد الذكري ، فإن لها أهمية كبيرة في تطور تكوين الجنين بعد ذلك ، وللحديد المخليبي خاصة أهمية كبيرة في تميز الأجنة في مرحلة النمو الكروي وحتى طور النمو القلبي. أما منظمات النمو فيتعين تجنب تواجدها في مزارع المتوك وحبوب اللقاح.

6- الضوء:

بينما يحفز الظلام والضوء الأزرق عملية التوالد الذكري ، فإن الضوء الأبيض يعد مثبطاً لها.

7- مستوى التضاعف في النباتات الناتجة من مزارع المتوك:

قد يحدث تضاعف ذاتي للكروموسومات أثناء النمو الكالوسي للخلايا الأمية لحبوب اللقاح مما يؤدي إلى إنتاج نباتات أحادية متضاعفة بصورة مباشرة ، وهو أمر يتفاوت معدل حدوثه بين الأنواع النباتية ، وحسب ظروف الزراعة.

إنتاج النباتات الأحادية المتضاعفة

نجد عند المستوى الأحادي (1ن) أن كل جين يكون ممثلاً مرة واحدة . وبعد مضاعفة الكروموسومات يصبح نظرياً كل جين ممثلاً مرتين ، أي يصبح كل جين homozygous. وبذا يكون النبات الأحادي المتضاعف أصيلاً تماماً.

هذا. ويشار أحياناً إلى النباتات الأحادية المضاعفة بأنها أحادية ثنائية *dihaploids* ، إلا أن التعريف الكلاسيكي للنباتات الأحادية الثنائية أنها النباتات الأحادية ($2n=4s$) للنباتات الرباعية التضاعف ($2n=4s$).

وتتم مضاعفة النباتات الأحادية لإعادتها إلى الحالة الثنائية العدد الكروموسومي إما بمعاملتها بالكوليشيسين ، وإما عن طريق مزارع الكالس للنباتات الأحادية.

وتجرى المعاملة بالكوليشيسين بأي من الطرق التالية

1- بمعاملة النباتات الصغيرة الناتجة من مزارع المتوك وهي ما زالت متصلة بالمتوك بالكوليشيسين بتركيز 0.5% لمدة 24-48 ساعة ، ثم غسلها جيداً وإعادة زراعتها.

2- زراعة المتوك مباشرة على بيئة تحتوى على كوليشيسين لمدة أسبوع أى لحين بدء الإنقسام الخلوى الأول ثم نقلها إلى بيئة لا تحتوى على أى كوليشيسين .

3- معاملة البراعم الإبطية (محاور الأوراق) في النباتات الأحادية بعجينة من اللانولين المحتوى على الكوليشيسين بتركيز 0.4%.

4- تكرار معاملة البراعم الإبطية للنباتات الأحادية بالقطن المبلل بالكوليشيسين لمدة 10-14 يوماً (Chawla 2000).

مزارع النباتات الأحادية كمصدر للتباينات الوراثية

الأساس الوراثي للتباينات

تظهر في مزارع النباتات الأحادية العدد الكروموسومي تباينات وراثية لا حصر لها ، ويكون مرد بعضها إلى حالات التضاعف الكروموسومي غير التام ، وبعضها الآخر إلى حالات من التضاعف الكروموسومي التام ، والنوع الأخير هو الأكثر شيوعاً.

مصادر التباينات الوراثية

إن من أهم مصادر التباينات الوراثية التي تظهر في مزارع النباتات الأحادية ما يلي:

1- التباينات الموجودة أصلاً:

تتواجد العديد من الخلايا المتضاعفة كروموسومياً في الجزء النباتى المزروع منذ البداية ، ولعمر النسيج النباتى المستخدم ونوعه أهمية كبيرة فى هذا الشأن حيث تزداد حالات التباينات تلك بزيادة عمر النسيج ، وفى نسيج النخاع عما فى الأنسجة الميرستيمية بالقمة النامية.

2- التباينات التي تستحث للظهور فى أنسجة الكالس:

يعد ظهور الكالس بمثابة عكس لعملية التميز ، وفيها تستحث عملية التضاعف الكروموسومي دون إنقسام للخلايا وتنتشر ذم الكروموسومات فى الخلايا المنقسمة مما يؤدي إلى حالات التضاعف الكروموسومي غير التام.

3- طول مدة البقاء في المزارع:

تؤدى كثرة دورات مزارع الأنسجة أو طول فترة بقاء المزارع إلى زيادة معدل ظهور التباينات الوراثية.

وسائل التحكم في ظهور التباينات الوراثية

يمكن التحكم في ظهور التباينات الوراثية في مزارع النباتات الأحادية بمراعاة ما يلي:

- 1- إختيار الجزء النباتي المستعمل في الزراعة (ال explants) من نسيج ميرستيمي.
- 2- إختيار بيئة مناسبة للزراعة.
- 3- إختيار الوقت المناسب لإعادة الزراعة:

من المعروف أن مزارع البينات السائلة تعاد كل 7 أيام ، بينما تعاد زراعة مزارع البينات الصلبة كل أربع أسابيع.

4- المحافظة على المزارع في ظروف مناسبة: مثل خفض درجة الحرارة إلى ما بين 4،12°م، زيادة الضغط الأسموزي لبيئة الزراعة، إضافة بعض مثبطات النمو مثل حامض الأبسيسك والسيكوسيل، التخزين في ظروف الحرارة شديدة الإنخفاض في النيتروجين السائل على 196°م.

إستخدامات النباتات الأحادية في مجال التربية

- 1- تحقيق الأصالة الوراثية للجينات التي يصعب الوصول إليها بحالة أصيلة ، كما في آليات عدم التوافق في الراى.
- 2- التخلص من ظاهرة عدم التوافق الذاتي في عديد من محاصيل الفاكهة.
- 3- إستخدام النباتات الأحادية كوسيلة لإنتخاب الجاميطات ، وللحصول على نباتات ثنائية أصيلة في جيل واحد بدلاً من التربية الداخلية لسته أو ثمانية أجيال.
- 4- التأكد من سلامة الإنتخاب لأى صفة تم الإنتخاب لها إذ أن جميع الجينات تكون في حالة أصيلة ولا يمكن أن تحدث فيها أى إنعزالات وراثية في الأجيال التالية للجيل الإنتخابى الأول.
- 5- نقل السيتوبلازم من سلالة لأخرى فى خطوة واحدة ولذلك أهميته الكبيرة عند الرغبة في نقل صفة العقم الذكري السيتوبلازمى إلى إحدى السلالات لإستخدامها كأباء للهجن.
- 6- إجراء الدراسات الوراثية في البطاطس على مستوى النباتات الثنائية العدد الكروموسومى.
- 7- إنتاج أصناف الأسبرجس المذكرة.
- 8- الإنتاج المبكر للأصناف التجارية.
- 9- تشكل النباتات الأحادية مصدراً مثالياً للجيرمبلازم في عمليات دمج البروتوبلاست.
- 10- الإستفادة منها في الدراسات السيتولوجية.