



زراعة الانسجة النباتية وتقاناتها

الجزء النظري





منشورات جامعة دمشق
كلية الزراعة

زراعة الأنسجة النباتية وتقاناتها

- الجزء النظري -

الدكتور
خليل المعري
أستاذ في قسم علوم البستنة

١٤٣٩ - ١٤٤٠ هـ
٢٠١٨ - ٢٠١٩ م

جامعة دمشق



الفهرس

الموضوع	رقم الصفحة
الفهرس.	5
المقدمة.	11
الفصل الأول: بعض المصطلحات الأساسية المهمة في زراعة الأنسجة النباتية	13
-الأنسجة الميرستيمية	13
-التمايز الخلوي	14
-الكالوس	15
-تكوين الأجنة الخضرية	17
-الإكثار الخضري	18
-التعديل الوراثي	19
الفصل الثاني: زراعة الأنسجة النباتية وتقاناتها المختلفة	23
-مفهوم زراعة الأنسجة النباتية	25
-طرائق زراعة الأنسجة النباتية	25
-طرائق التحسين الوراثي	27
-تطبيق تقانات زراعة الأنسجة النباتية	27
-إنشاء مخبر لزراعة الأنسجة النباتية	28
الفصل الثالث: الأوساط المغذية المستخدمة بزراعة النسيج	33
-تركيب الأوساط المغذية	33
-العناصر المعدنية	33
-أهمية ودور العناصر المعدنية الكبرى	34
-العناصر الصغرى	36

38	-المواد الكربوهيدراتية
38	-الفيتامينات
42	-الأحماض الأمينية
43	-درجة الحموضة
44	-تحضير الأوساط المغذية
45	-تخزين الأوساط المغذية
47	الفصل الرابع: الهرمونات النباتية ودورها في زراعة الأنسجة النباتية
48	-الأوكسينات
50	-التأثيرات الفيزيولوجية للأوكسينات
52	-السيتوكينينات
55	- التأثيرات الفيزيولوجية للسيتوكينينات
56	-الجبرلينات
58	- التأثيرات الفيزيولوجية للجبرلينات
60	-الإيثيلين ومركباته
61	-مثبطات النمو
65	الفصل الخامس: التكاثر الخضري الدقيق
65	-تعريف التكاثر الخضري الدقيق
66	-مزايا التكاثر الخضري الدقيق
67	-مراحل التكاثر الخضري الدقيق
69	-العوامل المؤثرة في نمو العينات أثناء طور الزراعة الأولية
77	-طور الإكثار والاستطالة
77	-نماذج إكثار النباتات بزراعة النسيج
80	-العوامل المؤثرة في إكثار الأجزاء النباتية
86	-العوامل المؤثرة في تجذير العينات النباتية داخل الأنابيب

94	-التقسية ونقل النباتات إلى الظروف الطبيعية
101	-المعوقات الفيزيولوجية في التكاثر الدقيق
108	-التدرن الدقيق المخبري
111	-العوامل المؤثرة في تكوين الدرينات داخل الأنابيب
115	-مثال على تأثير الهرمونات النباتية في التدرن الدقيق بالبطاطا
117	-مراحل إنتاج البذار الخالي من الفيروسات
121	الفصل السادس: التطعيم الدقيق المخبري
121	-تعريف التطعيم الدقيق
122	-مراحل التطعيم الدقيق المخبري
124	-العوامل المؤثرة في نجاح التطعيم الدقيق
134	-الحصول على غراس خالية من الأمراض الفيروسية
135	-الكشف عن حالة عدم التوافق المبكر
139	الفصل السابع: الإكثار بالأجنة الخضرية
140	-كيف تتم زراعة الأنسجة بالنخيل
144	-الزراعة الأولية
146	-العوامل المتعلقة بالأوساط الغذائية
150	-تأثير العوامل المناخية في تكوين الكالوس
154	-مظاهر النمو في طور الزراعة الأولية
156	-المرحلة الثانية إكثار الكالوس الجنيني
159	-المرحلة الثالثة تكوين الأجنة الخضرية
161	-المرحلة الرابعة إنبات الأجنة الخضرية
162	-نقل النباتات المجذرة إلى الظروف الطبيعية
165	الفصل الثامن: زراعة البروتوبلاست
166	-مزايا زراعة البروتوبلاست

167	-عزل البروتوبلاست
168	-عزل البروتوبلاست من أوراق التبغ
170	-العوامل المؤثرة في عزل البروتوبلاست
172	-حيوية البروتوبلاست
180	-استخدامات زراعة البروتوبلاست
182	-فعالية التعديل الوراثي في البروتوبلاست
185	-دمج البروتوبلاست
189	-عزل البروتوبلاست في الفطر المحاري
191	الفصل التاسع: زراعة الخلايا النباتية
191	-كيفية الحصول على الخلايا الحرة
192	-مثال على عزل الخلايا النباتية في أوراق التبغ
194	-مراحل تطور الخلايا الحرة في معلق خلوي
195	-العوامل المؤثرة في زرع الخلايا
196	-تطبيقات زراعة الخلايا النباتية
198	-إنتاج المواد الفعالة بوساطة زرع الخلايا النباتية
202	-أمثلة على بعض المواد الفعالة
203	-العوامل المؤثرة في إنتاج المواد الفعالة بزراعة الخلايا النباتية
209	الفصل العاشر: إنتاج سلالات متباينة وراثياً بزراعة الكالوس
209	-الكالوس وأنواعه
211	-زراعة الكالوس
212	-مشاكل زراعة الكالوس
214	-العوامل المؤثرة في زراعة الكالوس
217	-التغيرات الوراثية التي تحدث في النباتات المتجددة من الكالوس
222	-إنتاج مواد فعالة بزراعة الكالوس

227	- الصور الملونة
239	الفصل الحادي عشر: زراعة المياسم وحبوب اللقاح
240	-بعض التعاريف المرتبطة بالتقانة
241	-طرق إنتاج النباتات الأحادية
242	-طريقة زراعة المتك
246	-زراعة حبوب الطلع
247	-العوامل المؤثرة في زراعة المتك وحبوب اللقاح
250	-تقانة مضاعفة النباتات وحيدة الصيغة الصبغية
251	-بروتوكول إنتاج نباتات مضاعفة الهابلويد
255	الفصل الثاني عشر: زراعة الجذور الشعرية
256	-تعاريف خاصة بالجذور الشعرية
257	-تكوين نظام الجذور الشعرية
258	-العوامل المؤثرة في تكوين الجذور الشعرية
268	-انتخاب سلالات الجذور الشعرية
269	-الكشف عن التعديل الوراثي في الجذور الشعرية (الجينات الكاشفة)
270	-تطبيقات زراعة الجذور الشعرية
274	-تجديد نباتات كاملة من الجذور الشعرية
279	الفصل الثالث عشر: التعديل الوراثي في النبات
279	-تعريف التعديل الوراثي
281	-أنواع المحاصيل المعدلة وراثياً
284	-كيف يتم الحصول على نباتات معدلة وراثياً
286	-التعديل الوراثي بواسطة الأغروباكتريوم
291	-طرائق الكشف عن التعديل الوراثي
292	-تجديد الأنسجة النباتية المحورة

293	-تقييم النباتات المعدلة وراثياً
293	-العوامل المؤثرة في التعديل الوراثي
297	-المراجع العلمية
327	-المصطلحات العلمية



مقدمة

يسعى الإنسان دائما إلى اكتشاف أسرار الطبيعة عن طريق البحث العلمي، واكتشاف الطرائق والتقانات الحديثة التي تفيد في مواكبة التطور والتحديث في مختلف مجالات الحياة. تلعب تقانات زرع الأنسجة النباتية دورا مهماً في الثورة الزراعية الحديثة. لما لها من أهمية كبيرة في الإكثار والتحسين الوراثي للنباتات البستانية. وتمثل إحدى الركائز الأساسية للتقانة الحيوية، التي تساهم بشكل كبير في تحقيق الأمن الغذائي وحماية البيئة النباتية وتحسين تحمل النباتات للإجهادات الإحيائية والإحيائية. كما تلعب دورا مهماً في زيادة المساحة الخضراء وفي حماية التنوع الحيوي البري من التدهور والانقراض. كما تساهم في إكثار الأصول الوراثية النباتية وحفظها لفترة زمنية متوسطة الأجل وطويلة الأجل بالكبسلة بالآزوت السائل.

وقد دخلت هذه التقانات مجالات متعددة كثيرة نذكر منها، الحصول على سلالات مقاومة لبعض الأمراض والحشرات، وللظروف البيئية الصعبة، كما تستخدم في إنتاج المواد الفعالة المستخدمة في الصناعات الدوائية والتجميلية والغذائية. وتتميز تقانات زراعة الأنسجة النباتية أيضا بالقدرة على إنتاج نباتات بأعداد كبيرة وخالية من الأمراض ومشابهة للنبات الأم، وخاصة الأمراض الفيروسية، كما تسمح بإنتاج أمهات خالية من الفيروسات ليصار إلى تنميتها لإنتاج غراس ويزار خالي من الفيروسات. تمثل هذه التقانات ركنا أساسيا في نقل الجينات والتعديل الوراثي باستخدام طرائق الهندسة الوراثية.

ونظرا لأهمية تقانات زراعة الأنسجة النباتية في التطوير الزراعي وتحسين الإنتاج النباتي، قمنا بوضع هذا الكتاب ليكون عوناً لكافة المهتمين في هذا المجال. ففي البداية تم إعطاء فكرة شاملة عن المبادئ العامة لزراعة النسيج النباتية، من حيث أهميتها ومزاياها ومتطلباتها وكيفية تطبيقها. وقد تم إعطاء فكرة كاملة عن الأوساط المغذية ومكوناتها الأساسية وطريقة تحضيرها بما يتناسب تقانات زرع النسيج المختلفة. وخصص فصل مستقل لتوضيح دور الهرمونات النباتية ودورها في التقانة الحيوية النباتية و تقاناتها المختلفة.

وقد تم استعراض طرائق الإكثار الخضري الدقيق وزراعة الميرستيم بهدف الحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية. وقد خصص فصل مستقل لكل من التقانات التالية: التطعيم الدقيق، تكوين الدرينات الدقيقة، زراعة الجذور الشعرية، زراعة البروتوبلاست، زراعة حبوب اللقاح، وتكوين سلالات متباينة وراثيا، بالإضافة لإعطاء فكرة عن التعديل الوراثي وفوائده التطبيقية. وفي الختام خصص فصل مستقل على تقانة زراعة الخلايا النباتية لإنتاج المواد الفعالة.

نقدم هذا العمل المتواضع إلى جميع المهتمين من طلاب ومهندسين وباحثين ومنتجين في هذا المجال ونأمل أن نكون وفقنا في نقل بعض المعلومات المتوفرة عن هذا الموضوع من خلال عمل فريد من نوعه، راجيين من الله الخير والتوفيق للجميع.

المؤلف

الفصل الأول

بعض المصطلحات الأساسية والمهمة في زراعة الأنسجة النباتية

1- الأنسجة المرستيمية Meristem tissue:

يشكل الميرستيم الوحدة الأساسية في إكثار النباتات بزراعة النسيج، يتألف من كتلة خلوية متراصة ومتجانسة، ذات بنية أولية غير متميزة، ولها قدرة كبيرة على الانقسام وتشكيل أعضاء جديدة. تتصف الخلايا الميرستيمية بصغر حجمها، كبر النواة كثيفة السيتوبلازم وهي غنية بالريباسات، وتكون العلاقة النووية السيتوبلاسمية كبيرة، وذات جدر رقيقة وتحوي صانعات غير متميزة وتكون شبه خالية من المكتنفات العاطلة والفجوات. تنقسم خلايا الميرستيم انقسامات ميتوزية، وتعطي خلايا جديدة تشابه النبات الأم الذي أخذ منه الميرستيم.

تقسم الأنسجة المرستيمية في النباتات الراقية إلى عدة أنواع:

1-1- الأنسجة المرستيمية الأولية وتشمل:

1-1-1- الأنسجة المرستيمية الجذرية: تعمل على تشكيل المجموعة الجذرية ونموها في جميع الاتجاهات، ويمكن تمييز عدة أنواع منها:

- الأنسجة المرستيمية الجذرية الطرفية: هي أنسجة الميرستيم الموجودة في قمة الجذور، وتعمل على نمو الطولي للجزر وتشكيل الجذور الجانبية.

- الأنسجة المرستيمية الجذرية الجانبية: تعمل على تكوين التفرعات الجانبية للمجموعة الجذرية.

- الأنسجة المرستيمية الجذرية العرضية: تتكون على أجزاء نباتية لا تحوي بالأساس على مجموعة جذرية، مثل الجذور العرضية التي تتشكل في الإكثار الخضري.

1-1-2- الأنسجة المرستيمية الخضرية: تعمل على تكوين المجموعة الخضرية للنباتات ونموها، يوجد عدة أنواع من الأنسجة المرستيمية الخضرية:

- الميرستيم القمي الخضري: ويوجد في البراعم الطرفية من النموات الخضرية.

- الميرستيم الخضري الجانبي: ويوجد في البراعم الجانبية.
- الميرستيم الخضري العرضي: نميز نوعين من الأنسجة الميرستيمية العرضية. النوع الأول ويوجد في البراعم الرائدة والعرضية. وتكون موجودة أصلاً في الأنسجة النباتية. النوع الثاني يتكون على أنسجة لا تحوي بالأصل على براعم (Margara, 1982).
- الميرستيم الورقي: يتكون من الميرستيم القمي ويتطور ويشكل الورقة.
- الميرستيم الزهري: يوجد في البراعم الثمرية والزهرية وعند تطوره يشكل الأزهار والثمار فيما بعد.

1-2- الأنسجة الميرستيمية الثانوية:

توجد في أنسجة نباتات ثنائية الفلقة طبقة كاملة من الخلايا بشكل حلقة تدعى الكامبيوم، وهي طبقة من الخلايا المنتظمة والمتراصة تتوضع بين الخشب واللحاء في نباتات ثنائية الفلقة، تتصف طبقة الكامبيوم بالقدرة على الانقسام، وهي المسؤولة عن النمو العرضي في الساق والجذر. ولهذه الطبقة أهمية كبيرة في الإكثار الخضري، فهي تعمل على تكوين الجذور العرضية في النباتات المكاثرة بالعقل أو بزرعة النسيج. أما في النباتات وحيدة الفلقة تكون خالية من طبقة الكامبيوم، وتتواجد بدلاً عنها نقاط أو مناطق مرستيمية بينية تحت البراعم لها قدرة على الانقسام والتعضي.

1-3- التمايز الخلوي Differentiation:

يقصد به اكتساب الخلايا صفات نسيج معين بشكل تدريجي بحيث تصبح في المستقبل جزءاً من النسيج الذي اكتسبت صفاته، وتفقد الخلايا التمايزة بشكل تدريجي قدرتها على الانقسام الخلوي، ونلاحظ تغييرات سيتولوجية وبيوكيميائية وشكلية على الخلايا التمايزة، ويزداد حجم الفجوات وتكبر الخلايا وتصغر العلاقة النووية السيتوبلاسمية بالتدريج، كما تزداد سماكة الجدر الخلوية وتتكشف الصانعات بشكل واضح مع تقدم درجة تمايز الأنسجة. تختلف الأنسجة النباتية بحسب درجة تمايزها.

1-3- التمايز الرجعي Dedifferentiation:

وهو قدرة بعض خلايا الأنسجة التمايزة على العودة إلى الوراء واكتساب صفات الخلايا المرستيمية من جديد، إذ تستعيد قدرتها على الانقسام، علماً أنه ليست هناك قدرة لساكن

الأنسجة النباتية على التمايز الرجعي، فعندما تصل الأنسجة النباتية إلى مرحلة متقدمة من التمايز تفقد قدرتها على التمايز الرجعي كما هو الحال في الأوعية الخشبية أو الغربالية. تستطيع الأنسجة التي لم تصل إلى مرحلة متقدمة من التمايز أن تستعيد قدرتها على الانقسام واكتساب صفات الأنسجة المرستيمية، كما هو الحال في الأنسجة البارنشيمية. ولهذه الخاصية أهمية كبيرة في مجال زرع الأنسجة النباتية، وخاصة فيما يتعلق باختيار الأجزاء النباتية لزراعة النسيج.

1-4- الطاقة الخلوية الكامنة Totipotency :

يقصد بالطاقة الخلوية الكامنة قدرة التي تتمتع بها الخلايا النباتية على تشكيل نبات كامل، وهذا ما يطلق عليه ظاهرة التشكل أو regeneration. نظريا لكافة الخلايا النباتية التي تتمتع بهذه القدرة على التشكل، وذلك بعكس الخلايا الحيوانية التي لا تتمتع بهذه الظاهرة سوى البيضة الملقحة.

عملية كل خلية نباتية لها قدرة على الانقسام أو لها قدرة على التمايز الرجعي تتمتع بقدرتها على تشكيل نبات كامل. فمن الممكن الحصول على نبات كامل بدءاً من خلية نباتية تنقسم وتتطور في أوساط غذائية محددة التركيب كما هو الحال بزراعة الخلايا ضمن معلق خلوي أو زراعة البروتوبلاست. والأمثلة كثيرة في هذا المجال ضمن المملكة النباتية.

1-5- الكالوس Callus :

وهي كتلة خلوية غير متميزة تنشأ من مصادر نباتية مختلفة تحت تأثير هرموني، وتنمو وتنقسم بشكل عشوائي، ولها أشكال وألوان وقساوة مختلفة. تتمتع بعض أنواع الكالوس بالقدرة على تكوين أجنة خضرية، ويطلق عليه الكالوس الجنيني Embryogenic callus ، وتتمتع أنواع أخرى بتشكيل براعم وجذور، وذلك حسب تركيب الأوساط المغذية، ويدعى في هذه الحالة Organogenic callus، وتوجد أنواع من الكالوس الهشة أو الصلبة أو الرخوة التي ليس لها قدرة على تكوين نباتات كاملة، تتكاثر وتعطي نمو عشوائي للخلايا، وللكالوس وأنواعه أهمية كبيرة في إكثار والتحسين الوراثي للنباتات بهدف الحصول على سلالات أو أصناف جديدة مقاومة للإجهادات الحيوية واللاحيوية.

1-6- السلالة الخضرية Clone:

وهي مجموعة نباتات نتجت من نبات واحد وتكون متشابهة فيما بينها من الناحية الوراثية والمورفولوجية والإنتاجية. وكل نوع نباتي يتم إكثاره بالأنسجة بدءاً من نبات أو عدة أجزاء نباتية مأخوذة من نفس النبات يطلق على عملية الإكثار اسم تشكيل السلالات الخضرية Clonage .

1-7- التجذير Rhizogenesis :

هي قدرة العينات النباتية المختلفة على تكوين الجذور في وسط خاص بالتجذير Rooting medium. وتختلف قدرة النموات الخضرية على التجذير باختلاف الأنواع النباتية كما هو الحال في إكثار بالعقل، وتعد عملية التجذير أحد المراحل الأساسية في التكاثر الخضري الدقيق، وتتكون الجذور عادة من طبقة الكامبيوم بشكل أساسي أو من بعض الأنسجة التي لها قدرة على التمايز الرجعي مثل الأنسجة البارنشيمية وبارنشيم الخشب واللحاء بشكل ثانوي بشرط وجود العناصر الضرورية والمناسبة للتجذير .

1-8- التبرعم Bud proliferation :

لابد من التمييز بين نوعين من تكوين البراعم في الأجزاء النباتية المزروعة: النوع الأول: ويقال له النمو الطبيعي للبراعم Bud Formation. وفي هذه الحالة تتشأ وتتكون براعم جديدة من نمو البراعم الموجودة أصلاً في الأجزاء النباتية المزروعة قد تكون البراعم الموجودة براعم جانبية أو براعم طرفية أو براعم عرضية، ومثالها تكوين النموات الجانبية الجديدة في طور الإكثار نتيجة توفر الشروط المناسبة للنمو والإكثار. النوع الثاني: ويقال له تخليق البراعم Bud Neoformation : وهي قدرة الأجزاء النباتية الخالية من البراعم على تكوين البراعم الخضرية كما هو الحال عند تشكيل براعم بدءاً من الكالوس المزروع في وسط مغذ مناسب، ويطلق على ذلك تكوين البراعم الخضرية غير المباشر Indirect Organogenesis . ويمكن أن تتكون البراعم مباشرة على أجزاء نباتية دون المرور بمرحلة الكالوس على أوراق أو أعناق وتدعى في هذه الحالة التكوين المباشر للبراعم Direct Organogenesis .

1-9- تكوين الأجنة الخضرية Embryogenesis :

وهي المراحل المتعاقبة التي تؤدي لتكوين الأجنة في أجزاء نباتية مختلفة، وتوجد أنواع عدة من الأجنة:

- **الأجنة الجنسية:** التي تنتج من نمو البويضة الملقحة الناتجة من اتحاد العروس المذكرة مع العروس المؤنثة في الأزهار، بفعل عملية التلقيح، وعندما تنمو تكون الأجنة الجنسية. وتوجد فقط في بذور النباتات المختلفة.

- **الأجنة الخضرية:** التي تتكون في بعض أنواع بذور النباتات بشكل طبيعي، يلاحظ في بذور بعض أنواع النباتات كالحمضيات والمانجو وجود عدة أجنة خضرية إلى جانب الجنين الجنسي، وتنشأ بشكل طبيعي بدءاً من أجزاء جسمية مثل خلايا أنسجة النوسيل، ويطلق عليه مصطلح أبوميكسي Apomixy، كما يمكن أن تتطور الأجنة الخضرية من الخلايا المساعدة في الكيس الرشيمي، وقد تعطي أجنة أحادية أو ثنائية الصيغة الصبغية.

- **الأجنة الخضرية المحدثّة بشكل تحريضي:** وتتكون بدءاً من أجزاء نباتية مختلفة (كالوس، خلايا مفردة، حبوب لقاح، وبروتوبلاست) عند زراعتها في أوساط مغذية خاصة. وقد تتكون الأجنة مباشرة دون المرور بمرحلة الكالوس، وتدعى العملية في هذه الحالة Direct Embryogenesis، أو تتكون بعد تكوين الكالوس وتسمى Indirect Embryogenesis، وقد تكون الأجنة الخضرية المتكونة وحيدة أو ثنائية الصيغة الصبغية في حال تكونت من زرع حبوب اللقاح. أما إذا نتجت من زراعة أجزاء نباتية أخرى مثل الكالوس أو البروتوبلاست فتكون في هذه الحالة ثنائية الصيغة الصبغية (Margara, 1982; Zryad, 1990; ALMaarri 1995).

1-10- التشكل النباتي Morphogenesis :

تختلف قدرة الأجزاء النباتية المزروعة على النمو والتشكل باختلاف الأنواع النباتية، وباختلاف الأجزاء النباتية، وطبيعة الجزء النباتي المزروع، ففي بعض الأنواع يلاحظ قدرة الأوراق على تكوين نباتات كاملة أكثر من أنواع أخرى، وقدرة التشكل مرتبطة بعوامل فيزيولوجية ووراثية.

من العوامل الفيزيولوجية المحددة لاختيار الجزء النباتي، والتي لها علاقة مباشرة بزراعة النسيج يظهر لدينا عمر النبات الأم، فكلما كان النبات الأم فتي Juvenile كانت قدرته كبيرة على النمو والإكثار بالنسج، و تتخفف القدرة على التشكل والنمو مع تقدم النبات بالعمر، حتى تصل إلى مرحلة التوقف في النباتات الهرمة، وهذا الأمر يلاحظ بشكل كبير في الأشجار الخشبية والحراجية.

إذا أردنا إكثار شجرة معمرة لتمييزها في بعض الصفات الجيدة، لا بد من إجراء عملية إعادة فتوة أو ما يسمى تجديد فتوة Rejuvenation حتى تستعيد قدرتها على الإكثار والتجديد بالنسج.

تعد تقانات زرع الأنسجة النباتية إحدى الطرائق المهمة في تجديد فتوة الأشجار المعمرة، حيث تكتسب الأجزاء النباتية المزروعة بالأنابيب صفات النباتات الفتية مع زيادة عدد مرات النقل على الوسط المغذي والأمثلة كثيرة على ذلك. في البطاطا العنب، الجريبيرا وفي النخيل (Auge et al., 1984; AlMaarri, 1995).

11-1 - *In vitro* :

مصطلح لاتيني يعبر عن زرع خزعات نباتية معزولة من النبات الكامل في وسط مغذي صناعي في الزجاج داخل المختبر لتحفيزه على النمو والإكثار، وتكون النباتات الناتجة غير ذاتية التغذية.

12-1 - زرع في الشروط الطبيعية *Ex vitro* or *In vivo* :

مصطلح لاتيني يعبر عن نقل النباتات المكاثرة بالزجاج وزرعها في الشروط الطبيعية في التربة أو في أصص في خلطات زراعية، حتى تنمو وتتابع تطورها بشكل طبيعي، وتعتمد النباتات النامية على ذاتها في تأمين غذائها ويطلق عليها نباتات ذاتية التغذية.

13-1 - الإكثار الخضري *Clonal propagation* :

طريقة من الإكثار الخضري الدقيق في النباتات بزراعة النسج، ويتم الحصول فيها على نباتات متشابهة وراثياً مع النبات الأم كما تكون كافة النباتات الناتجة منحدرة من نبات واحد.

14-1 - زرع بشروط معقمة Aseptic technique :

تقانة يتم فيها زرع العينات النباتية ضمن شروط معقمة بحيث نحصل على زراعة خالية من التلوث، ويتم التطهير السطحي للخرعات النباتية قبل زرعها في الأنابيب ضمن شروط معقمة في المختبر لقتل الأحياء الدقيقة (الفطريات ، البكتيريا، الخمائر...) لتجنب تلوث الخلايا والأنسجة النباتية المزروعة .

15-1 - خزعة نباتية Explant :

أي جزء نباتي يؤخذ من مكانه الطبيعي في النبات، ويعقم ويزرع في وسط مغذ ضمن شروط مخبرية معقمة، وقد تكون الخزعة النباتية جزءاً من برعم أو من جذر أو ورقة....الخ توضع في شروط خاصة بعد زرعها لتحفيزها على النمو والإكثار .

16-1 - النقل Subculture :

نقل الأجزاء النباتية المزروعة إلى وسط جديد للمحافظة عليها من التدهور والموت على أن تتم عملية النقل ضمن شروط معقمة وفي وقت محدد، كما تختلف الفترة بين عمليات النقل بحسب النوع النباتي وحسب تقانة الأنسجة المستخدمة.

17-1 - الصدمة الكهربائي Electroporation :

هي عملية إحداث فتحات مسامية في الجدار الخلوي للخلايا والأنسجة المزروعة نتيجة إمرار تيار كهربائي خفيف بشكل يسمح بإدخال جسيمات غريبة إلى داخل الخلايا مثل البلازميد أو قطعة من DNA .

18-1 - التعديل الوراثي Transformation :

عملية نقل وإدخال قطعة من DNA أو بلازميد تحمل مورثات غريبة إلى داخل الخلايا النباتية بإحدى تقانات الهندسة الوراثية، وبالتالي يؤدي لإحداث تغير في التركيب الوراثي والحصول على خلايا ونباتات معدلة وراثياً.

19-1 - تجديد النمو Regeneration system :

هي عملية الحصول على نباتات كاملة بدءاً من أجزاء نباتية مختلفة مثل القمم النامية، الكالوس، الخلايا النباتية، بروتوبلاست، أو حبوب لقاح، وقد تكون النباتات الناتجة مشابهة أو مغايرة في تركيبها الوراثي للنبات الأم.

1-20- الحفظ بالتجميد Cryopreservation :

هي طريقة للحفظ لفترات زمنية طويلة جداً للخزعات النباتية المزروعة بالأنسجة مثل القمم النامية، الكالوس، خلايا نباتية، بذور وذلك على درجات منخفضة جداً أكثر من - 100 م.

1-21- سلالات متباينة وراثيا Somaclonal variation :

سلالات نباتية تنشأ من أجزاء نباتية مختلفة بزراعة النسيج مثل الكالوس أو البروتوبلاست أو الخلايا النباتية وتكون مختلفة وراثيا عن النبات الأم الذي نشأت منه.

1-22- زراعة الميرستيم Meristem culture :

هو زرع القمة المرستيمية للبراعم الطرفية أو الجانبية لوحدها دون أخذ بداءات ورقية معها بطول أقل من 1مم بين 0.1-0.3 مم. كما تؤخذ عادة من القمم النامية، وتزرع للحصول على نباتات خالية من الإصابات الفيروسية.

1-23- زراعة حبوب اللقاح Androgenesis :

زرع حبوب الطلع في أوساط مغذية بهدف الحصول على نباتات وحيدة الصيغة الصبغية التي يتم مضاعفتها بالكولشيسين للحصول على سلالات نقية ثنائية الصيغة الصبغية.

1-24- زراعة البويضات قبل التلقيح Gynogenesis or Parthenogenesis :

زرع الأعراس المؤنثة الموجودة في الكيس الرشيمي قبل الإخصاب بهدف الحصول على نباتات وحيدة الصيغة الصبغية، ويمكن مضاعفتها بالكولشيسين للحصول على سلالات نقية.

1-25- تكوين الكالوس Callogenesis :

عملية تكوين الكالوس من أجزاء نباتية مختلفة براعم، سلاميات، أوراق، قمم جذرية، خلايا نباتية وحبوب لقاح وذلك تحت تأثير محرض هرموني مثل 2,4 D .

1-26- تكوين النموات الخضرية Caullogenesis :

عملية تكوين براعم عرضية بدءاً من أجزاء نباتية غير متميزة كالكالوس العضوي. تتطور البراعم الخضرية وتعطي نموات خضرية Shoots، و يشابه هذا المصطلح مصطلحاً آخر يدعى (تجديد البراعم العرضية) Bud Neoformation .

1-27- القمم النامية Shoot Apex :

تحتوي القمة النامية القمة المرستيمية بالإضافة إلى عدة بداءات ورقية بحجم 1-2 مم تقريباً. كما هو موضح بالشكل (1-2). ويجب التذكير أخيراً بأنه يمكن أخذ القمم النامية من البراعم الطرفية أو من البراعم الخضرية الجانبية.





الفصل الثاني

زراعة الأنسجة النباتية وتقاناتها المختلفة

1-2- مقدمة Introduction:

يسعى الإنسان دائماً إلى اكتشاف أسرار الطبيعة عن طريق البحث العلمي، واكتشاف الطرائق والتقانات الحديثة التي تفيد في مواكبة التطور والتحديث في مختلف مجالات الحياة، تعد تقانات زراعة الأنسجة النباتية مجموعة مهمة من التقانات الحديثة التي لعبت دوراً ولا تزال لها أهمية كبيرة في تطوير الإنتاج الزراعي وتحسينه في مجال العلوم النباتية بشكل عام وعلوم البستنة بشكل خاص.

تعود فكرة زراعة الأنسجة إلى العالم الألماني Hamberland عام (1902) عندما زرع بعض خلايا البشرة في وسط كنبوب وبقيت على قيد الحياة عدة أشهر دون أن تبدي أية استجابة للانقسام والنمو، وفي عام 1922 تمكن العالمان Kott et Roblins من الحصول على استطالة قمم جذرية في البندورة من عدة ميليمترات إلى 4-5 سم وبقيت في الوسط المغذي عدة أشهر ثم ماتت.

يعد العالم الأمريكي White عام (1932) أول من حصل على انقسام خلايا قمم من جذور البندورة بشكل غير محدود، كما تمكن العالم الفرنسي Gautheret عام (1934) من الحصول على نتائج مماثلة بدءاً من زرع خلايا كامبيوم لبعض الأشجار الحراجية.

يعد العالمان White و Gautheret أول من وضع أسس تقانات زراعة الأنسجة النباتية. وتناقلت الأبحاث والاكتشافات مع مرور الزمن. وقد استعملت المستخلصات النباتية والعصائر مثل سائل جوز الهند في زراعة الأنسجة لتنشيط النمو قبل اكتشاف الهرمونات النباتية. وقد استخدمت الهرمونات النباتية لأول مرة من قبل العالمين Skoog and Miller عام 1957، فقد أوضحا الدور الإيجابي لكل من الأوكسين والسيٲوكينين في نمو أجزاء نباتية من التبغ المزروع في وسط مغذ بشكل معقم داخل الأنابيب.

وقد تمكن العالمان Morel and Martin عام 1958 من الحصول لأول مرة على نباتات سليمة من الفيروسات عن طريق زراعة الميرستيم المأخوذ من نبات بطاطا مصاب بالفيروسات. وقد تمكنوا من وضع تقانة زرع الميرستيم لأول مرة.

استطاع الباحث Hildebrand عام 1965 من الحصول على نباتات كاملة بدءاً من زرع خلايا جنينية من التبغ في وسط مغذ سائل، وفي عام 1969 حصل العالمان Nitch and Nitch على نباتات وحيدة الصيغة الصبغية بدءاً من زرع حبوب لقاح لنبات التبغ. وقد قام العالم Garlson وزملاؤه عام 1972 من وضع تقانة لعزل البروتوبلاست وحصلوا على نباتات كاملة بدءاً من دمج نوعين من البروتوبلاست من التبغ.

لقد تطورت تقانات زراعة الأنسجة النباتية خلال العقدين الأخيرين تطوراً كبيراً وشملت عدداً كبيراً من النباتات، وتوسعت فوائدها التطبيقية في الإكثار والتحسين النباتي، واستتباط أصناف جديدة، وإكثارها خضرياً. ففي عام 1990 تم إنتاج أكثر من 60 مليون نبات على مستوى فرنسا فقط باستخدام تقانات زراعة الأنسجة النباتية المختلفة (Coudret, 1991).

وأما حالة اختيار الجزء النباتي، والذي له علاقة مباشرة بزراعة النسيج، وعمر النبات الأم فكلما كان النبات الأم فتي Juvenile كانت قدرته كبيرة على النمو والإكثار بالنسج. و تنخفض القدرة على التشكل والنمو تنخفض مع تقدم النبات بالعمر، حتى تصل إلى مرحلة التوقف في النباتات الهرمة، وهذا الأمر يلاحظ بشكل كبير في الأشجار الخشبية والحرجية.

إذا أردنا إكثار شجرة معمرة لتمييزها في بعض الصفات الجيدة، لا بد من إجراء عملية إعادة فتوة أو ما يسمى تجديد فتوة Rejuvenation حتى تستعيد قدرتها على الإكثار والتجديد بالنسج.

تعد تقانات زرع الأنسجة النباتية إحدى الطرائق المهمة في تجديد فتوة الأشجار المعمرة، حيث تكتسب الأجزاء النباتية المزروعة بالأنابيب صفات النباتات الفتية مع زيادة عدد مرات النقل على الوسط المغذي والأمثلة كثيرة على ذلك. في البطاطا العنب، الجريبيرا وفي النخيل (Auge et al., 1984; AlMaarri, 1995).

2-2- مفهوم زراعة الأنسجة النباتية:

يقصد بزراعة النسيج، زراعة أجزاء نباتية صغيرة تتراوح أبعادها بعدة ميكرونات حتى 1-2 سم (عقل صغيرة ، براعم ، قمم نامية ، قمم مرستيمية، حبوب لقاح ، خلايا مفردة وبروتوبلاست) في أوساط مغذية محددة التركيب بحيث تحوي كافة المتطلبات الغذائية اللازمة لنمو الأجزاء المزروعة، ثم توضع الأنابيب المزروعة في شروط جوية خاصة داخل غرف النمو لتحريضها على النمو والإكثار. يشترط أن تتم كافة عمليات الزرع في جو معقم وباستخدام أدوات ومحاليل وأجزاء نباتية معقمة.

إن المفهوم التقليدي للإكثار الخضري هو استخدام أجزاء نباتية في الإكثار بهدف الحصول على نباتات مشابهة تماماً في الصفات المورفولوجية والوراثية والانتاجية لصفات النبات الأم التي أخذت منه الأجزاء النباتية.

أما المفهوم الحديث للإكثار الخضري عبر استخدام تقانات زراعة النسيج، فليس من الضروري الحصول على نباتات مشابهة في تركيبها الوراثي للنبات الأم، فقد نحصل على نباتات مشابهة أو مغايرة في التركيب الوراثي للنبات الأم، ويعود ذلك حسب الأجزاء النباتية المستخدمة، وحسب الهدف من زراعة النسيج وحسب الأوساط الغذائية المستخدمة. ففي تقانات التكاثر الخضري الدقيق Micropropagation يتم الحصول على نباتات مشابهة تماماً بالتركيب الوراثي للنبات الأم. وفي زرع الكالوس Callus Culture أو حبوب اللقاح يمكن أن نحصل على نباتات مشابهة أو مغايرة في التركيب الوراثي للنبات الأم ولهذا السبب لهذه التقانات أهمية في تربية والتحسين الوراثي للنبات.

2-3- طرائق زراعة الأنسجة النباتية:

تقسم تقانات زراعة الأنسجة النباتية إلى مجموعتين من الطرائق:

2-3-1- طرائق الإكثار: تشمل كافة الطرائق التي يتم فيها استخدام أجزاء نباتية حاوية على أنسجة مرستيمية أو زراعة أنسجة نباتية تعطي أنسجة مرستيمية مباشرة دون المرور بمرحلة الكالوس، وتشمل الطرائق الآتية:

2-1-3-1- التكاثر الخضري الدقيق **Micropropagation** : وتضم التقانات الآتية :

- زراعة العقل الصغيرة **Microcuttings**: بطول 1-2 سم وتحتوي برعماً جانبياً أو طرفياً.

- زراعة براعم وقمم نامية بحجم 1-5مم ولها عدة مسميات مثل: Shoot apex culture أو Apex culture أو Bud culture.

- زراعة الميرستيم **Meristem Culture**. وهو بحجم من 0.1-1 مم.

- زراعة البراعم والأقراص الزهرية **Bud flower culture** ويتم زرع البراعم الزهرية، أو الأقراص الزهرية بأحجام مختلفة تختلف باختلاف الأنواع النباتية.

2-1-3-2- التطعيم المخبري الدقيق **In Vitro Micrografting** : ويتم فيه تطعيم قمم مرستيمية من نباتات موثوقة على بادرات بذرية بهدف الحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية أو لأهداف أخرى مثل دراسة التوافق بين الأصل والطعم.

2-1-3-3- تكوين الدرينات الدقيقة **In vitro Microtuberization**: وهي طريقة مهمة تستخدم في إكثار بذار البطاطا بهدف الحصول على بذار خال من الأمراض الفيروسية، وهذه التقنية تستخدم في النطاق التجاري في كثير من دول العالم، ويتم تكوين الدرينات الصغيرة داخل الأنابيب، ويتم زرع القمم المرستيمية في البداية وبعد التأكد من خلو النموات الناتجة من زراعة الميرستيم من الفيروسات يتم بعدها إنتاج الدرينات لتكون أمهات في إنتاج البذار.

2-1-3-4- تكوين المباشر للبراعم **Direct Organogenesis**: ويتم زراعة أجزاء نباتية خالية من الأنسجة المرستيمية مثل زرع الأوراق أو أعناق أو سلاميات. ويتم تكوين براعم مباشرة وتتطور البراعم وتتكاثر لإعطاء نباتات كاملة.

2-1-3-5- الإكثار بالأجنة الخضرية **Embryogenesis**: ويتم زرع أجزاء نباتية قد تحوي أو خالية من الأنسجة المرستيمية. توجه الأجزاء المزروعة نحو تكوين الكالوس الجنيني أو تكوين الأجنة الخضرية مباشرة.

2-3-2- طرائق التحسين الوراثي:

ويتم فيها زرع أجزاء نباتية خالية من الأنسجة المرستيمية كما تمر بمرحلة الكالوس عند تطورها، ومن هذه الطرائق:

2-3-2-1- زراعة الخلايا النباتية Plant Cell Culture: تزرع الخلايا النباتية ضمن

معلق خلوي في أوساط مغذية سائلة ومتحركة، ولهذه التقنية تطبيقات مهمة في إنتاج المركبات الثانوية، والمواد الفعالة المستخدمة في صناعة الأدوية، والصناعات التجميلية والتحويلية، ولها أيضاً تطبيقات في تربية النبات والتحسين الوراثي.

2-3-2-2- زراعة البروتوبلاست Protoplast Culture: البروتوبلاست هي خلية

نباتية خالية من الغشاء البكتوسلولوزي، ولها تطبيقات مهمة في مجال تربية النبات والحصول على هجن خضرية متجانسة، وتعد إحدى طرائق الهندسة الوراثية.

2-3-2-3- زراعة المآبر وحبوب اللقاح Anther and Grain Pollen Culture:

تزرع حبوب اللقاح بهدف الحصول على نباتات وحيدة الصيغة الصبغية التي لها أهمية كبيرة في تربية النبات للمحاصيل المختلفة.

2-3-2-4- زراعة الكالوس Callus Culture: يتم الحصول على الكالوس من أجزاء

نباتية مختلفة تحت تحريض هرموني وخاصة D₂-4، ويتم إكثار الكالوس والعمل على تطوره للحصول على نباتات كاملة وتسمى عملية تطور الكالوس لتكوين نبات كامل بالـ Regeneration System. تعد عملية إكثار الكالوس بهدف زيادة الخلط الوراثي للحصول على تراكيب وراثية جديدة قد تكون مهمة في برنامج تربية النبات وهذا ما يدعى بالـ Somaclonal Variation.

2-4- تطبيق تقانات زراعة الأنسجة النباتية:

تحتاج تطبيق تقانات زراعة الأنسجة النباتية إلى دقة وخبرة عالية وتوفر المخابر المجهزة والضرورية لتنفيذ العمل بنجاح، ويعزى السبب إلى وجود عوامل كثيرة تؤثر في نجاح تطبيق زراعة الأنسجة مثل عوامل الأوساط المغذية، عوامل البيئة وشروط غرف النمو، عوامل مرتبطة بالأنواع النباتية، عوامل مرتبطة بالقائم على المشروع والخبرة ضرورية لنجاح المشروع، عوامل مرتبطة بالنظافة وعقامة المخبر، إذ يعد التلوث العدو الأول لتقانات زراعة

الأنسجة النباتية لهذا السبب يجب أن تكون عوامل الأمان والنظافة في مخبر زراعة الأنسجة النباتية مثل غرفة العمليات الخاصة بالمشافي.

تعد تقانات زراعة الأنسجة النباتية من الطرق الحديثة في الإكثار الخضري إذ تسمح بإنتاج أعداد كبيرة من النباتات المشابهة للنبات الأم والخالية من الأمراض وذات مواصفات عالية الجودة، كما تستخدم في مجال التحسين الوراثي.

إن الخطوات العريضة لكافة تقانات زراعة الأنسجة النباتية متشابهة. تختلف من حيث الهدف والغرض ونوعية الطريقة المستخدمة، ونوعية الجزء النباتي المستخدم وفي تركيب الأوساط المغذية اللازمة وفي شروط ومراحل الزرع.

وهنا سوف نلقي الضوء على الخطوات الأساسية العامة المشتركة بين جميع تقانات زرع الأنسجة، وسوف تتم معالجة خصوصيات كل طريقة عند دراستها فيما بعد بشكل منفصل.

تشمل الخطوات العريضة لتطبيق تقانات زراعة الأنسجة الخطوات الآتية:

1-تحضير الأوساط المغذية وتعقيمها

2-تحضير الأجزاء النباتية وتعقيمها

3-عزل الأجزاء النباتية وزراعتها

4-وضع العينات المزروعة في غرف النمو لحثها على النمو.

2-4-1-تحضير الأوساط المغذية وتعقيمها: تؤثر الأوساط المغذية بشكل مباشر في نجاح زراعة الأنسجة النباتية، وتحتوي الأوساط المغذية على كافة العناصر الضرورية اللازمة لنمو وتطور العينات المزروعة، يختلف تركيب البيئات الغذائية بحسب النوع النباتي، والجزء المزروع، وحسب الهدف من زرع الأنسجة النباتية وحسب مرحلة الزراعة. يزداد تركيب الوسط المغذي تعقيداً كلما صغر حجم الجزء النبات المزروع، ويتألف الوسط المغذي بشكل عام من العناصر المعدنية الكبرى والصغرى، ومصدر للطاقة، وفيتامينات، وأحماض أمينية، وهرمونات نباتية وبعض المركبات العضوية أو المعدنية الأخرى التي تضاف إلى الوسط المغذي لأغراض محددة.

هذا وسوف تتم دراسة تفصيلية لمكونات الأوساط المغذية والاحتياجات الغذائية لزراعة الأنسجة النباتية في الفصل الثالث من هذا الكتاب.

تعباً الأوساط المغذية بأنابيب اختبار من نوع البيركس القابل للتعقيم وتغلق بسدادات معدنية أو بلاستيكية، وتعقم في الأوتوغلاف تحت ضغط على درجة حرارة 115° م لمدة 30 دقيقة أو على درجة حرارة 121° م لمدة 15-20 دقيقة.

2-4-2 تحضير الأجزاء النباتية وتعقيمها: تختلف طريقة تحضير العينات النباتية لزراعة النسيج بحسب النوع النباتي، وحسب الهدف من زرع الأنسجة النباتية وحسب طبيعة وحجم الجزء النباتي المزروع.

تؤخذ العينات النباتية من أمهات مطابقة للنوع والصنف المراد زراعته، جيدة النمو وخالية من الأمراض، يفضل أن تكون الأمهات نامية في بيت محمي وخاضعة لبرنامج رش وقائي، لأن النباتات النامية بالحقل أو بالطبيعة تحوي ثلوثاً أكبر بكثير من النباتات المرباة بالبيوت المحمية، وتكون حمولة الأجزاء الهوائية من الأحياء الدقيقة أقل بكثير من حمولة الأجزاء النباتية الأرضية، وتعد عملية الحصول على عينات خالية من التلوث شرطاً أساسياً لنجاح زراعة النسيج.

تستخدم المواد الكيميائية والمطهرات في تعقيم العينات النباتية. توجد عدة مواد تستخدم بشكل واسع في التعقيم السطحي للعينات النباتية مثل:

- هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl)، هيبوكلوريت الكالسيوم (Ca (Ocl)₂)، الماء الأوكسجين، كلوريد الزئبق، نترات الفضة، برمنغنات البوتاسيوم، الكحول وبعض المركبات الجاهزة مثل Domestos والكوروكس (Jones et al., 1977; ALMaarri et al., 1986).

تختلف تراكيز المادة الفعالة ونوع المادة الفعالة والفترة الزمنية باختلاف الأنواع النباتية، وطبيعة العينات النباتية المستخدمة.

تقسم الأجزاء النباتية من حيث تحملها للتعقيم إلى:

- عينات قاسية تتحمل تراكيز عالية، لفترة زمنية طويلة مثل الأجزاء المتخشبة والبذور القاسية.

- اجزاء نصف غضة مثل النموات نصف غضة والبراعم الجانبية والنموات الغضة الطرفية والجذور الرفيعة وبعض البذور الغضة.

- أجزاء غضة ورهيفة مثل الأوراق والوريقات المرستيمية وأعناق الأوراق.
وتجدر الإشارة أخيراً يجب وضع تقانة للتطهير السطحي تتناسب كل نوع نباتي يراد زرع
داخل الأنابيب. ويجب أن تتم عملية التعقيم تحت شروط معقمة وباستخدام أدوات معقمة.

2-4-3- زراعة الأجزاء النباتية: تختلف طريقة فصل الأجزاء النباتية وزراعتها في
الأوساط المغذية المحضرة سابقاً، حسب الجزء النباتي المزروع، حسب تقانة الأنسجة
المستخدمة وحسب الهدف من زراعة النسيج.

يتم عزل العينات النباتية وزرعها في غرف خاصة تدعى غرف العزل ويجب أن تكون هذه
الغرف معقمة نظيفة معزولة، وغير معرضة للتيارات الهوائية المباشرة، وخالية من النوافذ
وغير قريبة من الممرات العامة في المخبر، كما توضع في غرف العزل أجهزة خاصة تؤمن
العمل في جو معقم وتسمى أجهزة العزل الجرثومي Laminar air flux hood.

4- وضع الأنابيب المزروعة في غرف النمو: توضع الأنابيب المزروعة في غرف خاصة
تسمى بغرف النمو growth room، إذ يتم التحكم بالحرارة والإضاءة والرطوبة، يجب أن
تكون غرف النمو نظيفة ومعزولة عن الجو الخارجي. وتزود بأجهزة تحكم بالحرارة والإضاءة
والرطوبة بحيث تؤمن الظروف الجوية المناسبة للنمو النباتي.

2-5- إنشاء مخبر لزراعة الأنسجة النباتية:

تتطلب زراعة النسيج أماكن خاصة، نظيفة ومحمية من عوامل الوسط الخارجي، لأن
عمليات الزرع في سائر مراحلها تتم ضمن ظروف معقمة، ويجب أن تتوفر في المخبر
الخاص بزراعة النسيج جميع الأجهزة والمواد والأدوات الضرورية لتطبيق زراعة الأنسجة
النباتية بكافة طرائقها، كما يتطلب إكثار النباتات بالأنسجة توافر شروط مناسبة لعملية
التقسية حتى نستطيع أقلمة النباتات النسيجية مع الظروف الطبيعية وتتابع نموها في شروط
طبيعية بعد نجاح عملية التقسية.

يجب توافر بيت زجاجي مجهز بكافة أجهزة التحكم بالحرارة والتهوية والرطوبة والإضاءة
والتغذية المعدنية، ومعزول بشكل جيد عن الوسط الخارجي لمنع دخول الحشرات إلى داخله.
يفيد البيت الزجاجي في عملية التقسية للنباتات النسيجية Vitoplants ، وفي عملية تربية
الأمهات المراد إكثارها بالنسج.

تختلف مكونات مخبر زراعة الأنسجة النباتية بحسب التقانات المتبعة وحسب الهدف من زراعة النسج وحسب الغرض من إنشاء المخبر هل هو بحثي أو إنتاجي، وحسب الأنواع النباتية والأعداد المراد إنتاجها.





الفصل الثالث

الأوساط المغذية المستخدمة ب زراعة النسيج

3-1- مقدمة:

تعد الخزعات النباتية المزروعة داخل الأنابيب غير ذاتية التغذية، فهي تعتمد على الأوساط المغذية لتأمين احتياجاتها الغذائية. ويحتوي الوسط المغذي على كافة المتطلبات المغذية التي تحتاجها الأجزاء النباتية المزروعة من مغذيات معدنية وعضوية حتى تستطيع النمو والإكثار، ويختلف تركيب الوسط المغذي بحسب النوع النباتي، وحسب طريقة زراعة النسيج، وحسب مرحلة الزرع، والهدف من زرع الخزعات النباتية. يزداد تركيب الأوساط المغذية تعقيداً كلما صغر حجم الجزء النباتي. فعند زرع بذور مثلاً يكون الوسط المغذي بسيط، في حين عند زرع البروتوبلاست تحتاج إلى وسط مغذي معقد حتى تستطيع الخلايا النباتية النمو والانقسام والإكثار.

3-2- تركيب الأوساط المغذية:

يتألف الوسط المغذي من العناصر المعدنية الكبرى والصغرى، وعلى مصدر الطاقة، ومركبات عضوية مثل الفيتامينات والأحماض الأمينية والهرمونات النباتية بكميات متفاوتة وتراكيز مختلفة بحسب النوع النباتي، وحسب طبيعة الجزء المزروع وحجمه، والهدف من زراعة الأجزاء داخل الأنابيب. ويتألف الوسط المغذي من العناصر الآتية:

3-2-1: العناصر المعدنية:

مجموعة من العناصر المعدنية الكبرى والصغرى التي يحتاجها النبات بتراكيز مختلفة للنمو والإكثار. وتنقسم هذه العناصر إلى قسمين:

أولاً: العناصر الكبرى:

وتشمل ستة عناصر رئيسة كبرى يحتاجها النبات وهي: النيتروجين (N) - الفوسفور (P) - البوتاسيوم (K) - الكالسيوم (Ca) - المغنيزيوم (Mg) - الكبريت (S).

يحتاج النبات والخزعات النباتية هذه العناصر بكميات كبيرة، فهي عناصر بنائية تدخل في تركيب الخلايا والأنسجة النباتية، وتضاف العناصر الكبرى إلى الأوساط المغذية على شكل أملاح مثل نترات أو سلفات أو كلوريد، وتعد كافة العناصر الكبرى سريعة الانحلال بالماء.

ويمثل الجدول (1-3) مكونات بعض المحاليل المعدنية من العناصر المعدنية الكبرى المستخدمة بزراعة النسيج.

أهمية العناصر المعدنية الكبرى ودورها:

أ- الآزوت: يدخل النتروجين في تكوين البروتينات، والأحماض النووية، والبروتوبلازم. ويعد عنصر الآزوت من العناصر الضرورية للانقسام الخلوي، وبناء الأنسجة النباتية المختلفة، ويدخل في تركيب المركبات العضوية الأولية والثانوية. وتظهر أعراض نقصه على صورة اصفرار النبات وتقرم النمو. وله دور في التخلص من الجذور الحرة التي تنشأ من عمليات الاستقلاب.

ب- الفوسفور: يزيد تركيزه في القمم الميرستيمية، وينشأ به دوره مع النتروجين من حيث أهميته بالرغم من احتواء الأنسجة على كمية قليلة منه، ويدخل في عمليات البناء الضوئي، وتكوين وانقسام الخلايا، وتطور الجذور. وله دور مهم في تكوين المركبات الناقلة للطاقة، وربما تؤدي زيادة الصورة الميسرة من الفوسفات إلى تثبيط النمو في مزارع الأنسجة نظراً لترسيب الكالسيوم، وبعض العناصر الأخرى.

ج- البوتاسيوم: يعد عنصر البوتاسيوم من العناصر المعدنية التي توجد بالأنسجة النباتية بتركيزات مرتفعة، ويدخل في تركيب البروتينات واليخضور، وبعض الأنزيمات والكربوهيدرات كما يلعب دوراً مهماً في الانقسام الخلوي، وفي تنظيم درجة الحموضة والضغط الخلوي الداخلي.

د- المغنيزيوم: يدخل في تكوين الكلوروفيل وتثبيط العديد من الإنزيمات، خاصة تلك التي تنظم انتقال الفوسفات، وحركة السكريات داخل النبات، وتمثل الأحماض النووية، وله دور مهم في الاتزان الأيوني في النبات.

هـ-الكبريت :الكبريت أحد مكونات بعض الأحماض كالسستين والسستئين التي تدخل في تكوين البروتين وبعض الفيتامينات كالثيامين، ويؤدي نقصه إلى رخاوة الأنسجة، وزيادة هشاشتها، وانخفاض قطر سوق النباتات.

و-الكالسيوم :لا يتم تكوين السيليلوز في خلايا مزارع الأنسجة إلا في وجود الكالسيوم في الوسط، وللكالسيوم دور مهم في تكشف الأعضاء من خلال تأثيره على الفعل الحيوي لمنظمات النمو، كما يدخل الكالسيوم كأحد مكونات جدار الخلية، وبالنسبة للنيتروجين، ترجع أهميته لكونه يدخل في تركيب الأحماض الأمينية والبروتينات وهو أساس بناء الخلية ويدخل أيضاً في تركيب الفيتامينات والأحماض النووية والأنزيمات التي تساعد على إتمام عملية البناء الضوئي.

جدول (3-1): تركيب العناصر المعدنية الكبرى في بعض المحاليل المستخدمة بزراعة النسيج (مليمول mM).

التركيب المعدني	محلول موراشيج وسكوغ	كامبورغ	هيلر	وايت
NH ₄ NO ₃	20.6	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	1	-	-
CaCl ₂ 2H ₂ O	3	1	0.5	-
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	-	-	-	1.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.5	1	1	3
KCl	-	-	10.1	0.09
KNO ₃	18.8	24.7	-	-
KH ₂ PO ₄	1.25	-	-	-
NaNO ₃	-	-	7.1	0.8
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	1.1	0.9	0.14
Na ₂ SO ₄	-	-	-	1.4

ثانياً- العناصر الصغرى:

تشمل مجموعة العناصر الصغرى جميع العناصر المعدنية التي يحتاج إليها النبات في النمو والتمثيل الغذائي لكن بكميات صغيرة جداً، ولكنها ضرورية لحياة النبات، ونموه ، وتشمل هذه المجموعة العناصر التالية: الحديد (Fe)-المنغنيز (Mn)-الزنك (Zn)البورون (B)-النحاس (Cu)-الموليبدينوم (Mo) -الكلور (Cl)-الكوبالت (Co) وقد ثبت أن هذه العناصر تعمل منشطات للأنزيمات.

وقد أظهرت معظم البيئات المستخدمة في مجال زراعة الأنسجة، وخاصة بيئة موراشيغ وسكوج، بأنها أدخلت لتحسين كفاءة نمو النبيتات في زراعة الأنسجة. ويوضح الجدول (3-2) مكونات بعض المحاليل من العناصر الصغرى، والمستخدم في زراعة النسيج.

يجب التساؤل عن كيفية اختيار تلك العناصر في البيئة المغذية سواء أكانت كبرى أم صغرى، وكيفية تحديد النسبة المفترض أن يحتاجها النبات دون حدوث أي ضرر في العمليات الحيوية، فنجد أن كل عنصر له دور معين في مراحل نمو النبات، كما نجد أن عنصر الحديد والزنك والموليبدينوم جزء من تركيب الأنزيمات.

وطبقاً للتوصيات الجمعية الدولية لفيزيولوجيا النبات، فإن العناصر التي يحتاجها النبات بكميات تزيد عن 0.5 مليغرام/لتر تصنف على أنها عناصر كبرى أما الأقل من ذلك فهي عناصر صغرى، أما بالنسبة للعناصر الصغرى، فأنا نجد أن هذه العناصر لا توجد منفردة أبداً في الطبيعة، لذا فهي توجد إما في الصورة المركبة مثل كبريتات النحاس، وكبريتات والزنك، وكبريتات المنغنيز، أو على الصورة المخلبية EDTA حيث يوصي بأن يكون الحديد على الصورة المخلبية مصدراً للحديد في الوسط وذلك لمنع ترسيبه بالوسط، ويتم إذابته في صوديوم أدتا. ($\text{Na}_2 \text{EDTA}$)

الجدول (3-2): تركيب بعض المحاليل المعدنية من العناصر الصغرى (ميكرومول).

التركيب المعدني	موراشيج وسكوغ	كامبورج	هيلر	وايت
ZnSO ₄ .7H ₂ O	30	7	16	10
MnSO ₄ .4H ₂ O	100	59	0.45	22
H ₃ BO ₃	100	49	-	24
KI	5	4.8	0.06	4.5
AlCl ₃	-	-	0.23	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.1	0.1	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1	0.1	0.12	-
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	-	3.7	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	100	100	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	-	6.3
NiCl ₂ .6H ₂ O	-	-	0.13	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1	1	3.5	-

أهمية العناصر الصغرى:

وترجع فاعليتها لقدرتها على تغيير تكافؤها داخل النبات، مما يزيد من نشاط الإنزيمات الضرورية للكثير من العمليات الحيوية، و تزداد حاجة الخلايا لها خلال الكشف فقد يتكون الكالوس دون كشف إلا في حالة وجود تلك العناصر، ويؤدي نقص النحاس من مزارع الأنسجة إلى تقزم وتشوه النمو. و يسبب نقص الموليبدنيوم أعراض التسمم NO₃ لعدم اختزالها لـ NH₄، ويثبط الكوبالت والحديد بعض عمليات الأكسدة، وكذلك إنتاج الإيثيلين. للحديد قدرة عالية على التأكسد والاختزال، وبذلك تكون له تأثيرات فيزيولوجية مهمة في نشاط عدد من الإنزيمات خصوصاً النشطة في عمليات التنفس، كما يتم بوجود الزنك إنتاج هرمون أندول حامض الخلي IAA.

3-2-2- المواد الكربوهيدراتية Carbohydrates :

لا تستطيع الأجزاء النباتية المزروعة بالأنابيب القيام بعملية الاصطناع الضوئي بسبب صغرها وعدم وجود العناصر الضرورية للاصطناع الضوئي، وخاصة اليخضور وغاز CO₂ داخل الأنابيب، لذلك يضاف مصدر للطاقة إلى الوسط المغذي، وتحتاج الخزعات النباتية المزروعة داخل الأنابيب إلى مصدر للطاقة لكي تقوم بعملية النمو والإكثار، ولذلك تضاف عادة السكريات إلى الأوساط المغذية لتأمين مصدر الكربون. يستعمل السكر كـ مصدر مناسب، وهو أكثر السكريات استعمالاً، وهو سكر ثنائي غير مختزل كيتوني يتكون من (جلوكوز + فركتوز). وتأثيره فعال جداً على النمو بعكس بعض السكريات الأخرى مثل المالتوز واللاكتوز. والسكروز يستخدم عادة بتركيز من 2-8% في الوسط الغذائي لكي يساعد على تطور ونمو الأجزاء النباتية في زراعة الأنسجة. تختلف قدرة العينات النباتية على النمو والتطور بحسب نوع الكربوهيدرات المضافة إلى الوسط المغذي. وقد لوحظ بالتجربة بأن السكروز بتركيز 3% يعطي أفضل النتائج في تكوين البراعم ونموها بعكس أنواع أخرى مثل المانيتول الذي لا يعطي نتيجة مشابهة مثل السكروز (Margara, 1982).

كما لوحظ تأثير السكروز في اصطناع الأوكسينات بالأنسجة النباتية، أما الغلاكتوز فيعمل مثبطاً لتكوين الأوكسينات، مما يؤثر سلباً في قدرة الخزعات النباتية على النمو، وتكوين البراعم العرضية بعكس السكروز.

3-2-3- الفيتامينات Vitamins :

تعمل إضافة الفيتامينات إلى الوسط المغذي في تحفيز تعضي الأجزاء النباتية المزروعة ونموها. وهذه الفيتامينات تستخدم كعوامل مساعدة في إتمام العمليات الحيوية بالنبات، ومن هنا ظهر الاحتياج إلى إضافة الفيتامينات الأساسية إلى الوسط الغذائي للحصول على أحسن نمو وأسرع تكشف لتلك الأنسجة والقدرة على إنتاج نباتات.

تعمل الفيتامينات كعامل مساعد في النظم الأنزيمية، وهي مطلوبة بكميات قليلة جداً، ومن أكثرها شيوعاً الثيامين وهو أكثر الفيتامينات استخداماً في مزارع الأنسجة النباتية، ومنها

أيضاً حمض النيكوتين والبيروكسين والكالسيوم بنتوثانين والميواينوزيتول، ويعد الميواينوزيتول والثيامين من أكثر الفيتامينات تأثيراً في تحفيز نمو العينات النباتية وإكثارها.

يضاف أحياناً فيتامين C (أسكوربيك أسيد) مع حمض الستريك إلى الوسط المغذي كعامل مساعد في تخفيف ظاهرة الاسمرار في الأنسجة النباتية إذ يعملان كمادة مضادة للأكسدة، مما يخفف من هذه الظاهرة في بعض الأنواع النباتية، ويوضح الجدول (3-3) مكونات بعض المحاليل المغذية من الفيتامينات والمستخدمة بزراعة النسيج.

الجدول (3-3): تركيب بعض المحاليل المغذية من الفيتامينات (مغ/ل)

الفيتامينات	موراشيج وسكوغ	كامبورج	نيتش	وايت
الثيامين	0.5	10	0.5	0.01
البيروكسين	0.5	1	0.5	0.01
حمض النيكوتين	0.5	1	5	0.05
الميواينوزيتول	100	100	100	-
غلايسين	2	-	2	3
بيوتين	-	-	0.05	-
فوليك أسيد	-	-	0.5	-

3-2-4- الأحماض الأمينية Amino Acid :

تعد الخزعات النباتية المزروعة بالنسج ذاتية التغذية بالنسبة لعنصر الأزوت، وتستطيع القيام باصطناع المواد الأزوتية اللازمة لنموها داخل الأنابيب، تقوم بامتصاص النترات والأمونيوم من الوسط المغذي وتؤمن حاجتها من المركبات العضوية الأزوتية ومنها الأحماض الأمينية. عادة لا تضاف الأحماض الأمينية للوسط الغذائي في مزارع الأنسجة إلا في بعض الحالات الخاصة. وهناك العديد من المصادر التي تحتوي على الأحماض الأمينية التي يمكن إضافتها إلى الوسط الغذائي مثل الكازئين وقد نحتاج أحياناً لإضافة حمض أميني معين لإحداث تأثير فيزيولوجي مطلوب مثل حمض الميثونين والذي له دور

مؤثر في تخليق الإثيلين وله تأثير منه أيضاً، ومن الأحماض الأمينية التي تستخدم في مزارع الأنسجة منها على سبيل المثال الأرجنين والغلوتامين والأسبارجين.

ولابد من التذكير بأنه لا يمكن تكوين قاعدة عامة حول إضافة الأحماض الأمينية ونوعها وبسبب التناقض في النتائج المتحصل عليها، ففي بعض التجارب أعطت نتائج إيجابية، وفي بعض النتائج الأخرى أعطت نتائج سلبية وفي بعضها الآخر لم تبد الخزعات أية استجابة إضافية للنمو عند إضافة الأحماض الأمينية، وذلك حسب النوع النباتي وحسب الهدف من زراعة النسيج.

3-2-5- منظمات النمو النباتية Plant Growth Regulators :

تلعب الهرمونات النباتية دوراً مهماً في توجيه النمو في كافة طرائق زراعة النسيج، وتختلف الهرمونات المستخدمة بحسب الأنواع وحسب الهدف من زراعة النسيج وحسب مرحلة النمو للأجزاء النباتية، ويتوجب الأخذ بثلاثة عوامل وهي نوع الهرمون المستخدم، وتركيزه، والتوازن الهرموني بين الهرمونات المضافة.

يتم إنتاج الهرمونات النباتية في أماكن محددة من النبات، وهذه المواد العضوية تتكون بكميات صغيرة جداً، ثم تنتقل إلى أماكن أخرى لأحداث تأثيرها الفيزيولوجي.

وتوجد خمسة مجاميع رئيسة للهرمونات النباتية وهي: الأوكسينات، والسيبتوكينينات، والجبريلينات، والإيثلين ومركباته ومثبطات النمو مثل حمض الأبسيسيك، ونظراً لأهمية هذه المركبات فقد تم تخصيص فصل كامل لها للتعرف عليها وعلى دورها الفيزيولوجي في زراعة الأنسجة النباتية.

3-2-6- أحماض عضوية:

لا تستخدم الأحماض العضوية بزراعة الأنسجة إلا لأغراض خاصة ومحددة. تضاف عادة كمضادات أكسدة مثل حمض الأسكوربيك مع حمض الستريك، وفي حال وجود مشكلة اسمرار في الخزعات النباتية. كما تضاف أحياناً بعض الأحماض مثل المالات- الفومارات- والسوكسينات التي تعمل على زيادة مصادر النتروجين في الأوساط المغذية الخاصة بزراعة الخلايا النباتية، عند استخدام الأمونيوم كمصدر للأزوت.

3-2-7- مواد عضوية طبيعية:

تضاف إلى الأوساط المغذية أحيانا بعض المصادر العضوية الطبيعية مثل عصير البرتقال، المستخلص من الخميرة، عصير البندورة ، مستتبت الشعير ، وسائل جوز الهند.

فقد لوحظ بالتجربة، بأن إضافة سائل جوز الهند إلى الوسط المغذي زاد بشكل واضح نمو الخلايا النباتية وزيادة انقسامها وزيادة نمو الكالوس في بعض الأنواع النباتية.

ويعود السبب لاحتواء سائل جوز الهند على بعض الفيتامينات، وبعض الأحماض الأمينية، وبعض السكريات، مع هرمونات نباتية، أوكسين وسيتوكينين، بتركيز خفيفة جداً (Margara, 1982). كانت تستخدم قديما قبل اكتشاف الهرمونات الصناعية بمختلف مركباتها بهدف تحفيز النمو والانقسام الخلوي.

3-2-8- الآجار

هناك نوعان مستعملان في الأوساط المغذية في زراعة النسيج، وسط سائل وفي هذه الحالة تضاف كافة مكونات الوسط من دون الآجار، وتضاف عادة مادة الآجار آجار للوسط الصلب ، هي مادة كربوهيدراتية عديدة تضاف للبيئة لإعطائها الصلابة بتركيز 0.6-1% ونحصل عليها من الطحالب البحرية، وهناك سببان أساسيان لاستخدام الآجار في الوسط هما: خموله من الناحية الحيوية، والثانية: سهولة إذابته عند التسخين وتصلبه عند درجة حرارة 45-50 م. والآجار هو سكر عديد غير متجانس يتكون من الأجرور والأجروبيكتين، والأجرور هو المسؤول عن صفة الجيل للآجار. تختلف نوعية الآجار المستخدمة حسب درجة نقاوتها فيوجد الآجار التجاري وتستخدم بتركيز 8-12 غ /ل. أما الآجار النقي يستخدم بالمتوسط 6 غ/ل. يتأثر تصلب الآجار بعاملين:

الأول درجة الحموضة ويفضل أن يكون pH بين 5-6، في حال زيادة الحموضة يقل تصلب الآجار.

الثاني درجة تركيز الآجار في حال التراكيز الخفيفة تحت ال6 غ/ل تقل صلابة الآجار لكن تزيد قابلية امتصاص العناصر المغذية من قبل الأجزاء النباتية. وفي حال التراكيز العالية

10 غ/ل تزداد صلابة الوسط وتقل قابلية امتصاص العناصر المغذية من قبل الخزعات النباتية، وتزيد من صلابة الأنسجة النباتية وتصبح أكثر قدرة لعملية التقسية (Hartmann & Kester, 1986).

ويمكن استعمال مواد أخرى مثل البيوجل Biogel وهو جل بولي أكراميد Poly acramide.

3-2-9- الفحم النشط Activated charchol :

يستخدم الفحم النشط في مزارع الأنسجة النباتية لمعالجة بعض الظواهر أو المعوقات الفيزيولوجية أو لتشجيع النمو في بعض الأنواع النباتية:

- مثل ظاهرة الاسمرار التي تظهر بفعل المركبات الفينولية التي تفرزها الخزعات النباتية. يضاف الفحم النشط الذي يعمل على امتصاص المواد المثبطة للنمو التي تنتج بواسطة النسيج المزروع في البيئة المغذية.

- أو لمعالجة ظاهرة الشفافية التي تصاب بها الخزعات النباتية أثناء طور الإكثار، إذ يعمل الفحم النشط المضاف على امتصاص منظمات النمو، التي لها قابلية عالية في الارتباط بالفحم النشط.

- تحسن نمو الكالوس الجنيني وإكثاره وتجذير داخل الأنابيب في بعض الأنواع النباتية مثل النخيل (المعري، 1995) .

3-2-9- درجة الحموضة pH:

يعرف الـ pH بأنه اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الهيدروجين. وهو الدليل السهل والسريع لمعرفة حموضة أو قلوية المحاليل المستعملة ويتدرج الـ pH من 1 حتى 14 درجة وتكون نقطة التعادل عن $pH = 7$ أما الأقل من ذلك فيدل على أن الوسط حامضي (من 1-7) ، والأعلى من ذلك يكون الوسط قلوي (7-14).

والـ pH ضروري جدا لتسهيل أيونات المعادن في البيئة وجعلها في صورة ميسرة للنباتات النامية عليه وهي غالبا ما تكون حامضية إلى متعادلة حتى يكون جميع العناصر الغذائية في الصورة الميسرة لها تمكن النبات من الاستفادة منه دون حدوث أي ضرر عليه .

وتؤثر درجة الحموضة في درجة ذوبان الأجار وتصلبها وتفضل أن تكون بين 5-6 للحصول على أفضل بيئة مغذية تسمح بنمو الخزعات النباتية المزروعة داخل الأنابيب بشكل جيد.

3-3- تحضير المحاليل الأم:

تحتوي الأوساط المغذية مركبات كثيرة وبتراكيز مختلفة. فالعناصر الكبرى يكون تركيزها كبير نسبياً، أما العناصر الصغرى والهرمونات النباتية والفيتامينات فتضاف بتراكيز صغيرة حتى أجزاء من المليمغرام، ومن الصعب وزنها بدقة لذلك يتم تحضير محاليل أم مركزة، وتتخذ منها مقادير معينة حسب نسبة التركيز. يفضل تحضير المحاليل الأم كل عنصر بشكل مستقل، ويمكن دمج بعض المركبات بعضها مع بعض كما في العناصر الصغرى عدا مركبات الحديد.

تعد عملية تحضير المحاليل الأم بشكل مركز مهمة وأساسية في زراعة النسيج للأسباب الآتية:

- يسهل عمل الوسط المغذي وذلك بأخذ الكميات المطلوبة مباشرة من المحاليل الأم.
- يوفر وقت وجهد في تحضير المحاليل المغذية.
- يؤمن دقة في العمل، لأنه ليس بالأمر السهل أن نزن أجزاء من المليمغرام مهما كان الميزان حساساً.

يتم تحضير المحاليل الأم بتركيزها 10 إلى 100 مرة وذلك حسب درجة الاستهلاك في المخبر، توجد مركبات سهلة الانحلال بالماء مثل العناصر المعدنية الكبرى والصغرى فيتم وزن المقادير المطلوبة وإذابتها بشكل مباشر بالماء المقطر المعقم، وتوجد بعض المركبات التي يصعب انحلالها بالماء فهي تذاب إما بالمذيبات العضوية أو الكحول أو قلويدات الخفيفة أو الحموض الخفيفة كما هو الحال بالهرمونات النباتية.

تحفظ المحاليل الأم بالبراد على درجة حرارة 2 م، وتحفظ محاليل الأم الخاصة بالهرمونات في زجاجات قاتمة اللون للتخفيف من تخریبها بفعل الضوء.

3-4- تحضير الأوساط المغذية:

يتطلب تحضير الأوساط الزراعية دقة وتنظيم العمل بشكل جيد وعناية خاصة، بسبب المكونات الكثيرة التي تدخل في تحضيره. يكفي نسيان إضافة مركب من مكونات الوسط الأساسية مثل عنصر من العناصر الكبرى إلى خلل في نمو الأجزاء النباتية المزروعة، وينتهي بتوقف النمو كلياً، كما يتوجب أخذ الحيطة والحذر أثناء التحضير ولابد من تنظيم العمل بشكل مرتب والقيام بتسجيل كافة الخطوات عند التحضير. يتطلب تحضير الأوساط استخدام ماء مقطر عالي النقاوة ومنزوع الأيونات. ويجب استخدام زجاجيات بأنواعها المختلفة تتحمل درجات الحرارة العالية من نوع البيركس، ويجب استخدام ماصة خاصة لكل مركب وعدم مزج المحاليل الأم الأساسية وخلطها.

4-4-1- شروط تحضير الوسط المغذي:

يتطلب تحضير الأوساط المغذية الشروط الآتية:

- تأمين الأدوات اللازمة للتحضير (ميزان حساس-جهاز تسخين وتحريك مغناطيسي أو ميكروايف-براد-مقياس pH ميتر-أوتوغلاف-موزع بيئة آلي).
- تأمين الزجاجيات اللازمة للتحضير (دوارق-ماصات-مخبر زجاجي-أنابيب زجاجية للزرع-حوامل أنابيب....). ويجب أن تكون كافة الزجاجيات المستخدمة من نوع (البيركس) متحملة للحرارة العالية.
- توفر المحاليل الأم لكافة مكونات الوسط المغذي.
- العمل في مكان نظيف في المخبر مع توفير المساحة الكافية للعمل الخاص بتحضير المحاليل المغذية.
- تتم إضافة كافة مكونات الوسط المغذية بالترتيب مع مراعاة تسجيل كل مركب يضاف إلى ورق تحضير الوسط المغذي، على استمارة تحضير الوسط. على أن يستخدم لكل مكون ماصة خاصة لمرة واحدة فقط.
- يتوجب قياس درجة حموضة الوسط المغذي قبل إذابة الآغار، ويتم ذلك باستخدام حمض أو أساس مخفف (1N) من NaCl أو NaOH لتعديل الحموضة للوسط المغذي.

- يتم تحضير الوسط المغذي على درجات حرارة عالية مع التحريك المستمر للوسط حتى إذابة كاملة للأجار المضاف، وعندما يصبح الوسط شفافاً يكمل حجم المحلول المحضر بالماء المقطر حتى نحصل على الحجم الكلي الواجب تحضيره، ويتوجب إضافة السكروز في نهاية فترة التحضير حتى لا يتكرمل بفعل درجات الحرارة العالية.

- يوزع الوسط على دوارق وأنابيب الزرع بحسب الكمية المطلوبة للعمل (للأنابيب بين 10-25 مل/الأنبوب). وتسد الأنابيب بسدات معدنية أو بلاستيكية أو بالقطن.

3-4-2 تعقيم الوسط المغذي:

نظراً لاحتواء الوسط المغذي على معظم العناصر الغذائية اللازمة لنمو الكائنات الدقيقة كالبكتيريا والفطريات والخمائر وغيرها، فإن عملية التعقيم للوسط المغذي قبل زراعة الجزء النباتي عليه ضرورة جداً للحفاظ عليه من هذه الملوثات التي تنافسه على الغذاء، وتفرز مواد سامة تؤدي إلى موت الخزعات النباتية. يتم تعقيم الأوساط المغذية بالأتوغلاف على درجات حرارة 115 م لمدة 30 دقيقة أو على درجة حرارة 121 م لمدة 20 دقيقة مع ضغط 1 بار. ولابد من التنكير بوجود بعض المواد العضوية والهرمونات التي لا تتحمل التعقيم بدرجات الحرارة العالية، فيتم تعقيمها بالفلتر عن طريق استخدام جهاز الميليورن للتعقيم باستخدام فلتر دقيقة، وتضاف إلى الوسط بعد تعقيمه وقبل تعبئة الدوارق وأنابيب الزرع، وتوزع في هذه الحالة باستخدام أدوات معقمة، وتحت جهاز العزل الجرثومي. مع أخذ جميع الاحتياطات الضرورية لتجنب تلوث الوسط المغذي.

3-5- تخزين الأوساط المغذية:

تخزن الأوساط المغذية لمدة أسبوعين في جو المخبر. وذلك حسب المواد الموجودة في الوسط المغذي، فإذا احتوى الوسط الأوكسين أندول أستيك أسيد فهو سريع التدهور والتخريب، وفي هذه الحالة لا يفضل تخزين الوسط المغذي أكثر من أسبوع في جو المخبر. وإذا أريد تخزينها لفترة أطول يفضل وضعها في البراد إذ يمكن حفظها لمدة 4-6 أسابيع.

يتوجب وضع أو تخزين الوسط المغذي في المخبر في خزن نظيفة، داخل غرف العزل لتجنب التلوث. تخزن الأنابيب أو دوارق الزرع بالظلام للتخفيف من تخريب الهرمونات وخاصة الأوكسينات بفعل الضوء.



الفصل الرابع

الهرمونات النباتية ودورها في زراعة الأنسجة النباتية

4-1- مقدمة:

تلعب الهرمونات النباتية دوراً مهماً في توجيه النمو بتقانات زراعة الأنسجة المختلفة. وتؤثر بشكل مباشر في التشكل النباتي وفي مظاهر النمو المختلفة الممكنة ملاحظتها في الخزعات النباتية المختلفة المزروعة داخل الأنابيب، يختلف تأثير الهرمونات النباتية بحسب الأنواع النباتية وطبيعة الخزعات النباتية المزروعة و نوع الهرمون ومرحلة الزرع.

وتعرف الهرمونات النباتية بكونها مركبات عضوية تنتجها النباتات وتحدث تأثيرات تنظيمية في استقلاب النباتات تتعكس على مظاهر النمو المختلفة، وتعد مركبات غير نوعية حيث يمكن أن تؤثر في أكثر من مظهر من مظاهر النمو المختلفة، وتؤثر الهرمونات النباتية بتركيز خفيفة جداً وفي أماكن بعيدة عن أماكن اصطناعها. وتصبح مواداً مثبطة للنمو إذا استخدمت بتركيز مرتفعة مثل 2-4 D (دي كلورو فينوكسي أسيتيك أسيد) يؤثر بالانقسام الخلوي بتركيز خفيفة ومبيد أعشاب بتركيز مرتفعة.

تؤثر منظمات النمو في عمليات النمو المختلفة كالانقسام الخلوي-الاستطالة - التجذير - نمو البراعم الجانبية-الأزهار وتكوين الثمار.....الخ.

تقسم الهرمونات النباتية إلى خمس مجموعات وهي:

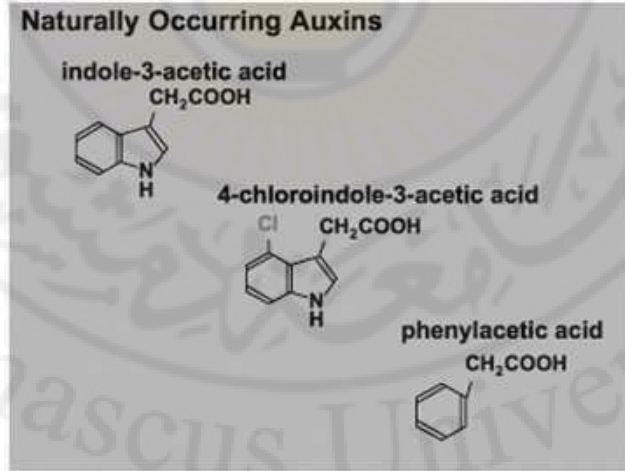
- 1- الأوكسينات.
- 2- السيٲوكينينات
- 3- الجبريلينات
- 4- الايثلين
- 5- مثبطات النمو مثل حمض الابسيسيك أسيد.

4-2- الأوكسينات Auxins :

يعود أصل الكلمة إلى اللغة اللاتينية Auxen وتعني النمو، أي المواد التي تؤثر في النمو. يعد العالم Went (1928) أول من استخدم كلمة أوكسين حيث تمكن بواسطة اختبار الشهير المسمى اختبار الشوفان من كشف ومعايرة الأوكسين، حيث قام بقص وإزاحة قمة بادرة الشوفان من نهايتها العلوية مما أدى إلى توقف نموها واستطالة البادرة، وعندما أعاد قمة البادرة إلى مكانها لاحظ أن البادرات قد استأنفت نموها. فسر Went تجربته بأن هناك مادة محرضة تتكون بالقمم النامية، وتنتقل إلى الساق لتحريضه على الاستطالة وهذه المادة ما أطلق عليها الأوكسين.

اكتشفت الأوكسينات في عدد كبير من الأنواع النباتية، وقد دلت الأبحاث أن الأوكسين الطبيعي أندول أستيك أسيد (Indol acetic acid) يوجد بالنبات في أشكال مختلفة.

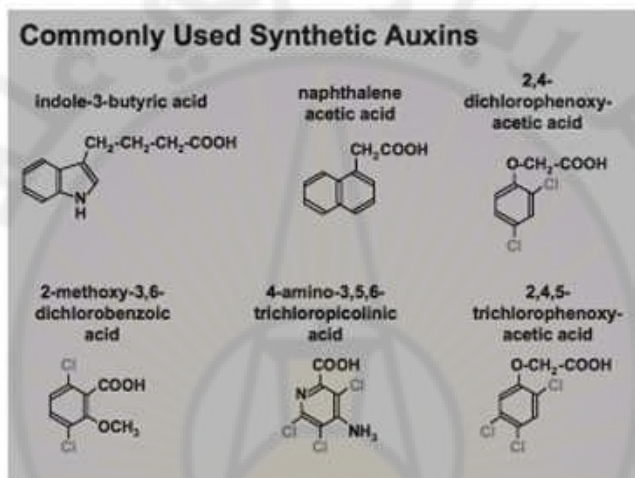
- الشكل الحر غير مرتبط
- طلائع الأوكسين مثل مركب التريبتوفان وهو طليعة IAA .
- الأوكسينات المرتبطة، وهي معقدات الأوكسين مع مركبات أخرى مثل البروتينات أو الفيتامينات مثل IAA إينوزيتول، والIAA أسباراتيك أسيد.



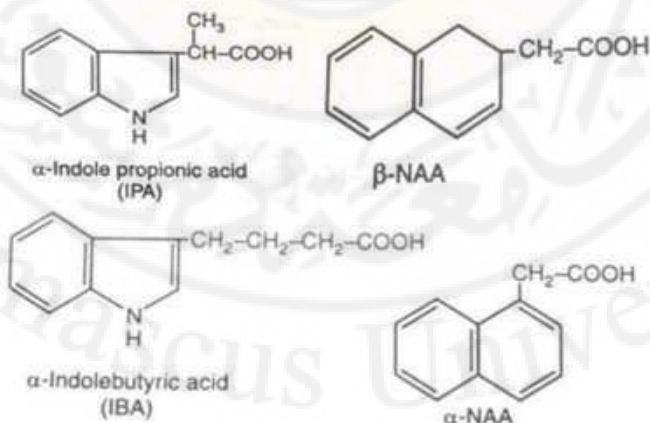
الشكل (4-2): الصيغة الكيميائية لبعض الأوكسينات الطبيعية

يتم اصطناع الأوكسينات بشكل أساسي في القمم النامية الخضرية والأوراق الفتية وفي الثمار الفتية التي لم يكتمل نموها أثناء مرحلة تكوين البذور والأجنة. تتقل الأوكسينات عبر اللحاء من الأعلى إلى الأسفل وإلى المجموعة الجذرية عبر اللحاء.

توجد العديد من الأوكسينات ذات التركيب الكيميائي المختلفة ونذكر فيما يلي التركيب الكيميائي لأهم الأوكسينات المستخدمة بزراعة الأنسجة النباتية (شكل 2-4).



Structure of Auxins



الشكل (2-4): التركيب الكيميائي للأوكسينات الصناعية

ولابد من التذكير بوجود بعض المركبات التي لها نشاط أوكسيني، ولكنها قليلة الاستعمال في زراعة الأنسجة النباتية مثل:

- أندول أسيتونتريل (IAN Indole acitonitril).
- أندول استيك أسيد آلانين (IAA Alanin).
- أندول استيك أسيد أسباراتيك (IAA-Asparatic).
- أندول استيك أسيد غلايسين (IAA-Glycin).
- أندول استيك أسيد فينيل آلانين (IAA-Phenyl alanine).

التأثيرات الفيزيولوجية للأوكسينات:

تلعب الأوكسينات دوراً مهماً في تنظيم النمو في النباتات بشكل عام فهي تؤثر فيزيولوجياً في مظاهر النمو الآتية:

- 1- استطالة خلايا الأوراق والسوق.
- 2- تكشف الخلايا والأعضاء النباتية.
- 3- تكوين ونشأة الأزهار وتطورها وبروز عقدها، وتكوين الثمار، وتكوين الأجنة والبدور.
- 4- تساقط الأوراق والأزهار والثمار بالإضافة لتكوين الثمار البكرية.
- 5- اتجاه النمو الانتحاء الضوئي للأوراق والسوق الهوائية والانتحاء الأرضي للجذور.
- 6- السيادة القمية ونمو البراعم الجانبية.

كما تلعب الأوكسينات دوراً مهماً في تقانات زراعة الأنسجة النباتية وتؤثر في:

- أ- الانقسام الخلوي وتكوين الكالوس.
- ب- الاستطالة الخلوية والطولية للنموات الخضرية المكاثرة بزراعة النسيج.
- ت- تكوين البراعم ونموها بدءاً من الكالوس.
- ث- تجذير العينات النباتية المزروعة بالنسيج. وتكوين الجذور على الخزعات غير المتميزة.

ج- تكوين النباتات الكاملة بدءاً من عينات غير متميزة كالكالوس، وتكوين سلالات متباينة وراثياً.

ح- تساعد في انقسام ونمو المعلقات الخلوية والجذور الشعرية وإنتاجها من المواد الفعالة.

خ- تلعب دوراً في تكوين الأجنة الخضرية وانباتها.

ولا بد من التذكير بأن الأوكسينات قد تؤثر في مظاهر النمو لوحدها أو بالتعاقد مع السيبتوكينينات والجبريلينات، كما سيتم إعطاء بعض الأمثلة في هذا الفصل على دور الأوكسينات في تطور الخزعات النباتية المزروعة داخل الأنابيب.

-تكوين خلايا الكالوس وإكثارها في مزارع الأنسجة النباتية:

تشجع الأوكسينات المضافة إلى الوسط المغذي على الانقسام الخلوي في الخزعات النباتية المزروعة داخل الأنابيب أو الانقسام الخلوي وتكوين الكالوس في مزارع المعلقات الخلوية. ويعمل الأوكسين في زيادة اصطناع الأحماض النووية وتنشيط اصطناع البروتينات، وعمل الأنزيمات، وتنشيط كافة التفاعلات الكيميائية اللازمة لتأمين المواد الضرورية للانقسام الخلوي مثل تنشيط عمل الأنزيم RNA Polymerase الذي يساهم في اصطناع الأحماض النووية، كما لوحظ بأن الأوكسينات تساهم في نسخ الصفات الوراثية الموجودة في ال RNA وال DNA، كما أوضحت التجارب بأن الأوكسين يؤثر أيضاً في استقلال النبات والخلايا والتي تؤدي إلى زيادة الانقسام والاستطالة الخلوية وزيادة النمو النباتي.

إن إضافة الأوكسين إلى الوسط المغذي عامل ضروري لا يمكن الاستغناء عنه لتكوين الكالوس، ويختلف نوع الأوكسين المضاف وتركيزه والنوع النباتي في تكوين الكالوس، ففي النخيل مثلاً تم الحصول على الكالوس عند استخدام أوكسين الـ 2.4.D بتركيز 100 مغ/ل (المعري، 1995)، كما تم الحصول على الكالوس باستخدام تراكيز منخفضة في نباتات أخرى لا تتجاوز أجزاء أو عدة ملغرامات من الأوكسين

كما يمكن الحصول على الكالوس عند استخدام أنواع أخرى من الأوكسين غير الـ 2.4.D

مثل الـ NAA

ولابد من التذكير بأن وجود الأوكسين ضروري لتكوين الكالوس ولإكثاره والمحافظة عليه من التدهور وخاصة في الأنواع النباتية الحساسة حيث يستخدم تراكيز خفيفة من الأوكسين.

- **هدم الأوكسين:** يتم هدم الأوكسينات عندما تزداد نسبتها في النبات عن الحد الطبيعي المسموح به. وتتم عملية الهدم بطريقتين :

1- الأكسدة الضوئية: يتحلل الأوكسين عند تعرضه للضوء، وخاصة الأشعة فوق البنفسجية، ويتفكك ويتحول إلى مركبات غير فعالة، كما يتوجب أخذ الحيلة عند تحضير الهرمون وتخزينه في مخابر زراعة الأنسجة بتخزين المحاليل الهرمونية في البراد وفي أوعية زجاجية داكنة اللون، كما يستدل على تفكك الأوكسين داخل المحلول وتخربه عند تحول لون المحلول الهرموني إلى اللون الأصفر أو الأسمر.

2- الأكسدة الأنزيمية: تساهم بعض الأنزيمات مثل البيروكسيداز وال IAA Oxidase بأكسدة الأوكسين وتحويله إلى مركبات غير فعالة كما هو بالمعادلة الآتية:



كما يمكن أن ينتج أندول ألدهيد من تخريب الأوكسين بالأكسدة الأنزيمية.

4-3- السيتوكينينات Cytokinins :

بدأت محاولات الكشف عن السيتوكينين في وقت متأخر بالمقارنة مع الأوكسينات ففي عام 1941 لاحظ العالمان Van Overbeec and Blakeslee وجود مادة في حليب جوز الهند قادرة على تنشيط الانقسام الخلوي عند إضافتها إلى الوسط المغذي لزراعة النسيج. وفي عام 1952 تمكن الباحث ستيوارد وزملائه من عزل مادة 1,3, diphenyl uree من سائل جوز الهند، وأوضحوا تأثيرها الإيجابي في تنشيط الانقسام الخلوي. وبعدها نتالت الأبحاث وتم اكتشاف العديد من المركبات التي تحفز الانقسام الخلوي. استعملت كلمة سيتوكينين لأول مرة من قبل الباحث Skoog وزملاؤه عام 1965، فقد أطلقوها على مركبات منتجة طبيعياً مثل الكينيتين أو مركبات صناعية ذات تأثير منشط للانقسام الخلوي.

توجد السيٲوكينينات تقريباً في أغلب الأنسجة النباتية، فهي عالية التركيز في الجذور والبذور والثمار الغضة والأجنة. يتم اصطناع القسم الأعظم من السيٲوكينين في الجذور كما كان يقال سابقاً، والقسم الآخر في الثمار غير الناضجة والبذور اثناء تكوين الأجنة ونمو الثمار، وقد دلت الأبحاث الحديثة وخاصة بعد استخدام الوراثة والفيزيولوجيا الجزيئية بأنه يتم اصطناع السيٲوكينين في القمم الجذرية، وفي القمم الخضرية وفي خلايا الكامبيوم، وفي الأعضاء النباتية الغضة غير الناضجة مثل الثمار والبذور (Miyawaki *et al*, 2003; Osugi and Hitoshi, 2015).

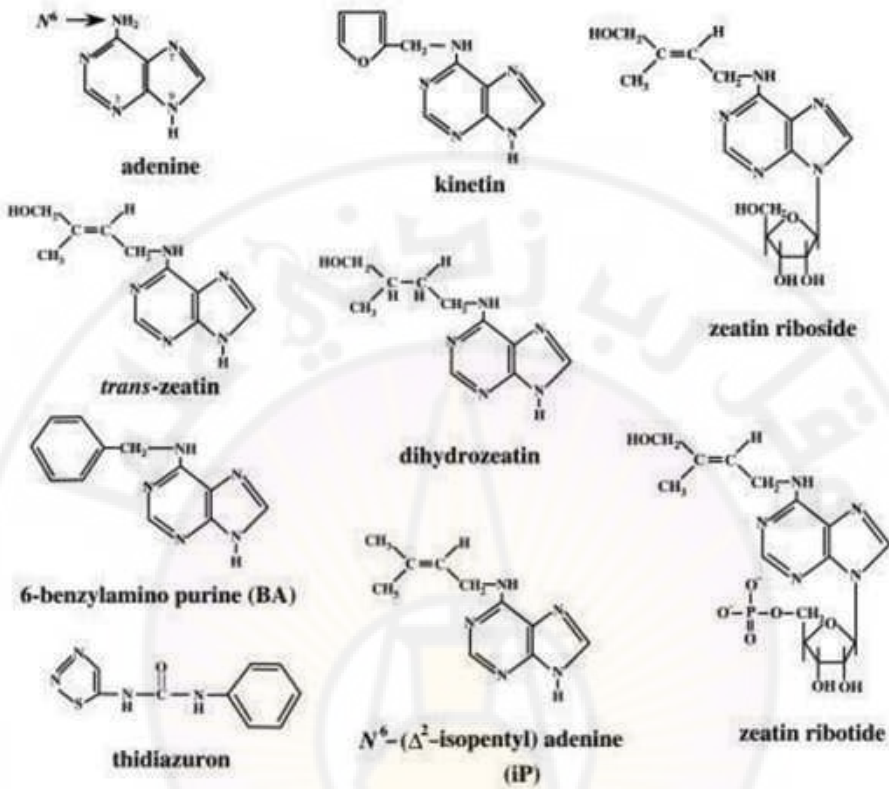
تنتقل السيٲوكينينات إلى الأجزاء العلوية من الشجرة مع النسغ الناقص بواسطة الأوعية الخشبية، كما تنتقل من الأجزاء العلوية إلى الأجزاء السفلية في النبات عبر الأوعية الغربالية، كما يوجد قسم صغير من السيٲوكينين يتم تصنيعه في أماكن تأثيره في البذور والثمار في مرحلة النمو. ويوضح الشكل (3-4) التركيب الكيميائي لبعض السيٲوكينينات الطبيعية والاصطناعية المستخدمة بزراعة النسج.

4-3-1- التركيب الكيميائي للسيٲوكينينات:

تقسم السيٲوكينينات إلى ثلاث مجموعات:

1- السيٲوكينينات الطبيعية التي تم اكتشافها في الأنسجة النباتية، ومنها المركبات التالية :

- سيس زيانتين cis- Zeatin (cZ).
- ترانس- زيانتين trans-Zeatin (tZ).
- ديهيدرو زيانتين Dihydro Zeatin (DZ).
- إيزوبنتيل آدينين iso-PenthyI adenine (iP).
- أورثو توبولين ortho Topolin (oT).



شكل (3-4): التركيب الكيميائي لبعض السيتوكينينات

2- السيتوكينينات الصناعية: تشمل المركبات التي لها نشاط سيتوكيني في تم تصنيعها تجارياً ومنها:

- الكينتين Kinetin (K).
- 6-بنزيل أمينوبورين 6-Benzyl aminopurine (BAP).
- التديازورون Tidiazouron (TDZ).

3- السيتوكينينات المرتبطة: وهي المركبات التي ترتبط مع مركبات عضوية في الأنسجة النباتية والتي لها نشاط سيتوكيني ومنها:

- سيتوكينين + ريبوزيد مثل الزيانتين ريبوزيد Zeatin Riboside (ZR).

- سيتوكينين + ريبوتيد Cytokinin-Ribotide .
- سيتوكينين + أدينوزين مثل isopenthy- adinosine .
- سيتوكينين + غلوكوزيد Cytokinin-glycoside . (Osugi & Hitoshi , Azami Sakakibara, 2015).

4-3-2- التأثيرات الفيزيولوجية للسيتوكينينات:

تلعب السيتوكينينات دوراً مهماً في النمو النباتي فهي تؤثر كعامل محفز في العديد من المظاهر الفيزيولوجية في النبات مثل الانقسام الخلوي، السيادة القمية، تكوين البراعم، نمو البراعم الجانبية وتكوين الثمار البكرية، كما تلعب دوراً مثبطاً في بعض المظاهر النمو الأخرى مثل تكوين الجذور-الاستطالة الخلوية واستطالة النموات الخضرية والجذور، الإزهار...

كما تلعب دوراً مؤازراً لهرمونات أخرى في بعض مظاهر النمو مثل تساعد بتكوين الكالوس مع الأوكسين، وزيادة الكتلة الحية المزروعة بالنسج.

4-3-3- تأثير السيتوكينين في مجال زرع الأنسجة النباتية:

تلعب السيتوكينينات دوراً مهماً في الانقسام الخلوي، فقد دلت الأبحاث على أن السيتوكينين ينشط اصطناع البروتينات اللازمة للانقسام الخلوي، ويشجع تكوين الأحماض النووية DNA & RNA. كما يحفز السيتوكينين التبادل الشاردي عبر الأغشية الخلوية ويؤثر في النفاذية الخلوية، كما تنشط السيتوكينينات عمل بعض الأنزيمات مثل نترات ريدوكتاز، الأميلاز، الكاتالاز والبروتين فوسفوريلاز وأنزيمات أخرى مما يؤدي إلى زيادة الاستقلاب الخلوي.

إن التآزر الواقع بين الأوكسين والسيتوكينين يؤثر في الانقسام الخلوي، لأن وجود السيتوكينين لوحده يكون تأثيره ضعيفاً، ويزداد الانقسام الخلوي بشكل كبير بوجود توازن بين الأوكسين والسيتوكينين في الوسط المغذي. ينفرد الأوكسين في تثبيط استطالة الخلوية الطولية ويشجع النمو الخلوي القطري والشعاعي، وهذه الظاهرة تلاحظ في طور الإكثار

لكثير من الأنواع النباتية مثل الإجاص والمشمش والورد (ALMaarri *et al.*, 1986; 2007)، عند زيادة تركيز السيٲوكينين يزيد معدل الإكثار وينخفض متوسط استطالة النموات الخضرية المتكونة.

تؤثر السيٲوكينينات في تمايز الكلوروبلاست وتطوره ، حيث لوحظ أن كالوس التبغ المزروع في وسط يحوي سيٲوكينين وبوجود الضوء تتحول البروبلاست إلى كلوروبلاست، وتعطي الكالوس اللون الأخضر الفاتح، ومن التأثيرات المهمة للسيٲوكينينات قدرتها على تكوين براعم في أنسجة غير متميزة مثل الكالوس أو أجزاء من ساق أو ورقة، وتؤثر أيضا في نمو البراعم الجانبية وتحد من السيادة القمية، وهذا التأثير الفيزيولوجي في غاية الأهمية حيث قاد إلى تطبيقات مهمة في تقانة التكاثر الخصري الدقيق. يعطي إضافة السيٲوكينين إلى وسط المغذي في طور الإكثار الفرصة لنمو البراعم الجانبية أو تكون براعم عرضية جديدة ونموها مما يؤدي إلى تكوين معدل إكثار عال. والأمثلة كثيرة جداً في هذا المجال، فقد تمكن العالم جونز وزملائه عام 1977 من الحصول على معدل إكثار أكثر من ثلاثة بالشهر في التفاح بوجود 1 مغ/ل من ال-BAP. أما فيما يتعلق بتكوين البراعم العرضية ونموها في النخيل فهذا يتطلب إضافة الأوكسين والسيٲوكينين إلى الوسط المغذي بتوازن لصالح السيٲوكينين (ALMaarri & ALGhamdi, 1997). كما لا بد من الإشارة إلى الدور المثبط للسيٲوكينينات في تكوين الجذور في تقانات زراعة الأنسجة النباتية.

ولابد من التذكير بوجود تأثيرات فيزيولوجية أخرى للسيٲوكينينات في النبات مثل اصطناع البروتينات والاحماض النووية، وفي تنشيط الاستقلاب في النبات، وفي تكوين الدرينات في المحاصيل الدرنية، وفي تكوين الثمار البكرية وفي نمو ثمار أشجار الفاكهة....

4-4- الجبريلينات Gibberellins :

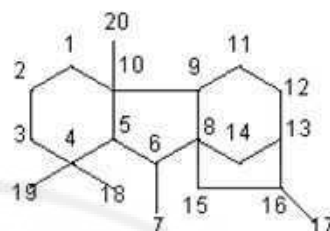
اكتشفت الجبريلينات من قبل العالم الياباني كوروساوا Kurosawa في عام 1926 بطريقة الصدفة، عندما لاحظ أن نبات الرز يصاب بمرض البادرة السخيفة (Bakane) نتيجة العدوى بفطر *Gibberella fujikuroi* الذي يسبب استطالة غير طبيعية في المسافات العقدية للنباتات المصابة مما يسهل رقادها. وقد وجد هذا العالم عند إضافة

مستخلص الفطر إلى نباتات سليمة يؤدي إلى إصابتها بمرض الرقاد. وفي عام 1939 تمكن الباحث Yabuto من عزل هذه المادة على شكل بلوري وسميت بالجبريلين نسبة إلى الفطر جبريلا، ثم تتالت الكشوفات عن مواد لها نشاط مادة الجبريلين في النباتات الراقية وقد تم عزل حتى (1980) 52 جبريلين وسميت من حمض الجبريلين 1 حتى حمض الجبريلين 52 (GA1-GA52) وحدد تراكيبها الكيميائية (Maziliac, 1981). ولحد تاريخه تم اكتشاف أكثر من 120 مركب في النباتات الراقية تتبع عائلة الجبريلين.

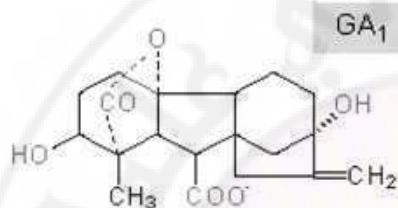
4-4-1- التركيب الكيميائي للجبريلينات:

تقسم الجبريلينات إلى مجموعتين، مجموعة تحوي 20 ذرة كربون ومجموعة ثانية تحوي 19 ذرة كربون فقط. تشترك جميع الجبريلينات في أن ذرة الكربون السابعة تشكل جزءا من مجموعة كربوكسيل (COOH)، وتختلف الجبريلينات بشكل بسيط في تركيبها الكيميائي وتكمن في نقاط ثانوية لجذر الـ OH، وذلك في مواقع ذرات الكربون 2 أو 3 أو 13. ونورد فيما يلي التركيب الكيميائي لبعض الجبريلينات المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتية (الشكل 4-4):

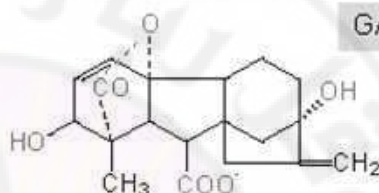
gibberelins



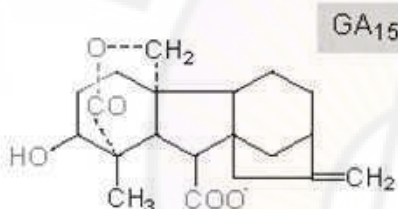
basic structure



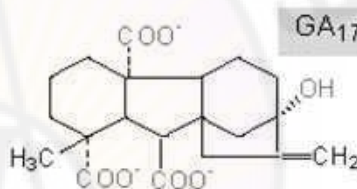
GA₁



GA₃



GA₁₅



GA₁₇

الشكل (4-4): التركيب الكيميائي لبعض الجبريلينات

تصطنع الجبريلينات في النباتات الراقية بدءاً من طليعة الجبريلين، وهو حمض الميفالونيك (Mevalonic acid). تصنع بشكل أساسي في القمم النامية الخضرية والجذرية وفي الأوراق الغضة الفتية، وفي الثمار الغضة والبذور أثناء تشكل الأجنة، ويتم اصطناع الجبريلين في الصانعات الخضراء وفي البروتوبلازم على مستوى الخلايا النباتية. يتم انتقال الجبريلينات في جميع الاتجاهات وذلك عبر اللحاء والخشب، وقد اكتشف العديد من الجبريلينات في النسغ الناقص لعدد كبير من النباتات مثل العنب والتفاح والبندورة.....

4-4-2- التأثيرات الفيزيولوجية للجبريلينات:

يقوم الجبريلين بتأثيرات فيزيولوجية واضحة في النمو النباتي الخضري والثمري بشكل عام ويمكن إيجازها بالآتي:

1- ينشط الجبريلين النمو الطبيعي لبعض النباتات القزمية، ويحد من ظاهرة التقزم الوراثي.

2- يحرض إنبات البذور وكسر طور سكونها وله دور واضح في كسر سكون البراعم في الأشجار الخشبية.

3- يعمل الجبريلين على استطالة السوق الزهرية وتشجيع الإزهار في بعض النباتات ذي الحولين.

4- يحرض الجبريلين على استطالة الأفرع الثمرية وكبر حجم الثمار كما في العنب.

5- يساعد الجبريلين على خف الأزهار والثمار العاقدة في بعض أنواع الأشجار المثمرة.

6- ينشط الجبريلين تكوين الثمار البكرية في بعض أشجار الفاكهة.

7- يلعب دور أساسي في تنشيط بعض الأنزيمات وفي اصطناع البروتينات وفي استقلالها مما يؤدي إلى تنشيط العمليات الحيوية وتنشيط النمو والاستطالة.

4-3-4- التأثيرات الفيزيولوجية بزراعة النسيج:

يمكن تلخيص الدور الفيزيولوجي للجبريلينات في مجال زراعة الأنسجة النباتية بالآتي:

1- تنشط الجبريلينات الاستطالة الخلوية بشكل أساسي. واستطالة النموات الخضرية الطولية.

2- تساهم في تنشيط الانقسام الخلوي.

3- تعمل على تنشيط اصطناع الأوكسينات وتزيد فاعليتها، كما تمنع تدهم الأوكسين مما يؤدي إلى زيادة النمو وتنشيط الانقسام الخلوي

4- تحافظ الجبريلينات على فتوة الأنسجة النباتية، كما تساهم في تجديد فتوة النباتات الهرمة مع السيتوكينين.

5- تساهم في كسر طور سكون الأجنة والدرينات الدقيقة المنمأة بالأنابيب.

6- تساعد في إنتاج بعض المواد الفعالة بزراعة النسيج.

4-5- الإيثيلين ومركباته:

يعد الإيثيلين الهرمون الغازي الوحيد ويسمى أيضا هرمون الإنضاج، لأنه يكثر في الثمار الناضجة، يتم اصطناع الإيثيلين من مركب الميثيونين حيث يتحول بوجود الأوكسجين وبعض الأنزيمات إلى الإيثيلين. ولا يحصل هذا التحول في الثمار الخضراء بل في الثمار التي اكتمل نموها، ويتم تدهم الإيثيلين بشكل سريع في الأنسجة ويتحول إلى مركبات استقلابية أخرى.

4-5-1- التأثيرات الفيزيولوجية للإيثيلين:

- 1- ينشط ويسرع إنضاج بعض ثمار الفاكهة مثل الموز.
- 2- يسرع في انفصال الغلاف الخارجي لبعض ثمار النقل مثل الجوز والبيكان.
- 3- يسرع في تساقط الأوراق عن طريق تكوين طبقة الانفصال بسرعة مما يسهل القطاف الآلي في بعض أشجار الفاكهة كالزيتون والعنب.
- 4- يسرع في هرم الأوراق، وفقد اليخضور منها.
- 5- يساعد في خف الأزهار والثمار في بعض أشجار الفاكهة.
- 6- يثبط نمو البراعم الجانبية في بعض المحاصيل والخضراوات مثل البصل والبطاطا.
- 7- يساهم في تنظيم الإزهار في بعض نباتات الفاكهة مثل الأناناس.

يستخدم الإيثيلين بوزارة النسيج للأغراض الآتية:

- 1- كسر طور سكون بذور بعض النباتات قبل زرعها داخل الأنابيب مثل بذور البطاطا وعباد الشمس.
- 2- يمكن استخدامه في بعض الحالات كمنشط لتجذير الخزعات النباتية أثناء التكاثر الخضري الدقيق.
- 3- يشجع تكوين الأجنة الخضرية في بعض الحالات بالتعاقد مع الأوكسين.

ولابد من التذكير ببعض المركبات التي تنتج الإيثيلين، ومن أهمها الإيثفون Ethephon والإثيرل Ehterel، وهي أسماء تجارية.

4-6- متبّطات النمو:

اكتشف كثير من المركبات الكيميائية التي تعمل على تثبيط نمو الخلايا والأنسجة النباتية، إذا زاد تركيزها داخل النبات عن حد معين، ومن هذه المواد:

حمض السناميك Cinamic acid ،

بعض اللاكتونات مثل حمض الكوماريك Cumaric acid

حمض الأبسيسيك Absissic acid .

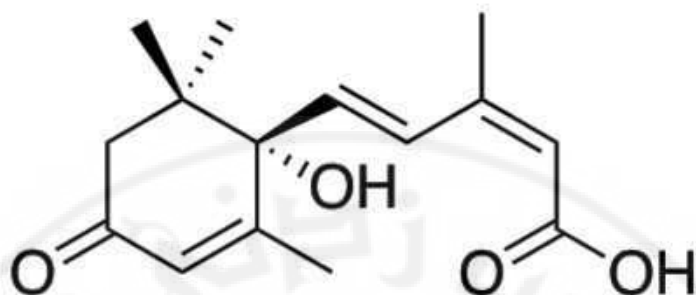
المركبات الفينولية مثل الأورثوفينول.

هذا ويوجد عدد كبير من المركبات العضوية الطبيعية والصناعية التي تثبط النمو النباتي (Macmillan, 1980). سيتم التركيز في هذا المجال على المواد المستخدمة في مجال زراعة الأنسجة النباتية، التي تشمل حمض الأبسيسيك والمركبات الفينولية.

4-6-1- حمض الأبسيسيك :

يصنف الفيزيولوجيون هذا المركب ضمن الهرمونات النباتية، على الرغم من أنه يعمل على تثبيط نمو الأنسجة النباتية، وهذا لا يتوافق مع دوره الفيزيولوجي. يبرر ذلك على أساس أن حمض الأبسيسيك (ABA) يؤثر في النمو بتراكيز خفيفة جداً أقل من 1مغ/ل، حيث يلعب دور رسول كيميائي في تنظيم النمو ، كما يعمل على المحافظة على حياة النبات عند تعرض النبات للإجهادات الحيوية واللاحوية حيث يعد هرمون المحافظة على البقاء أو هرمون العوز، ومن هذا المنطلق يعد هذا المثبط هرموناً نباتياً يتدخل في النمو والتطور.

يوجد ABA بكميات كبيرة في البذور والبراعم الساكنة وفي الأوراق الهرمة وتكون نسبته قليلة جداً في الأنسجة الفتية، يتم اصطناع حمض الأبسيسيك في الأوراق البالغة ومنها ينتقل إلى مختلف الأنسجة عبر الأوعية الغربالية مثل الأوكسين. ويوضح الشكل (4-5) التركيب الكيميائي لحمض الأبسيسيك.



الشكل (4-5): التركيب الكيميائي لحمض الأبسيسيك

4-6-2- التأثيرات الفيزيولوجية لحمض الأبسيسيك:

يلعب حمض الأبسيسيك دوراً مهماً في سكون البراعم والبذور بشكل عام يمنع نمو وإنبات البذور والبراعم، فعند إضافته إلى البذور التي خرجت من طور سكونها يجعلها تدخل في طور سكون ثانوي كما هو الحال في التفاح (Mazliac, 1981). يسرع ABA تساقط الأوراق حيث لوحظ ازدياد تركيزه في الأوراق في مرحلة تساقطها.

يتدخل حمض الأبسيسيك في ردود فعل النبات على الإجهادات الحيوية واللاحيوية مثل الجفاف - الملوحة - الصقيع.....، ففي هذه الحالات يلاحظ ازدياد تركيز الـ ABA في مناطق التماس مع الوسط الخارجي في الأوراق والجذور. يلاحظ ازدياد تركيزه في الأنسجة ومسامات الأوراق عند تعرض النبات للعطش الشديد حيث يعمل على المحافظة على المسامات بشكل مغلق لتجنب البخر والنتح، وبالتالي يتم المحافظة على الماء الداخلي للنبات، كما يساهم في الوقت نفسه بتسريع امتصاص الماء في الخلايا الجذرية وبالتالي يحقق نوعاً من التوازن المائي في الأنسجة مما يجعل النبات يقاوم ظروف الجفاف بشكل كبير.

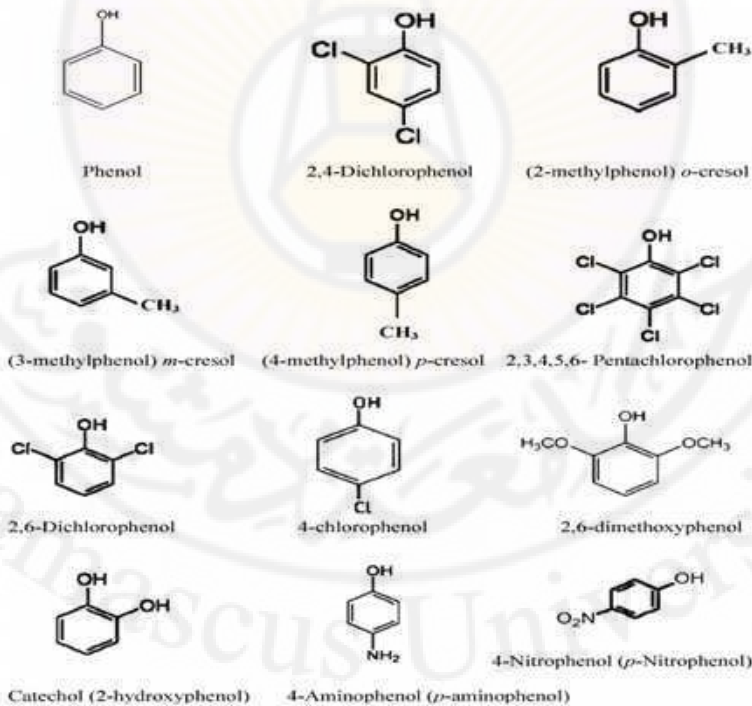
أما فيما يتعلق بزراعة الأنسجة النباتية لا يستخدم حمض الأبسيسيك إلا في حالات خاصة حيث يمكن استعماله كمضاد للجبرلين في تثبيط النمو والاستطالة والسكون والإنبات، كما يستخدم في حفظ المادة النباتية لزراعة الأنسجة عن طريق تخفيف النمو

إطالة الفترة الزمنية بين عمليات النقل ففي السوسن مثلاً تم الحصول على إطالة الفترة الزمنية بين عمليات النقل وصلت إلى ستة أشهر (أبو زيدان ، 2017).

4-6-2- المركبات الفينولية:

توجد المركبات الفينولية بغزارة في مختلف الأنسجة النباتية ويختلف تركيزها باختلاف الأنواع النباتية وفصل النمو وبحسب الأجزاء النباتية.

تتركب المركبات الفينولية من الفينيل آلانين وتضم مجموعة كبيرة من المركبات نذكر على سبيل الذكر لا الحصر، حمض كلوروجينيك Chlorogenic acid ، الفلوروغليسنيول Phloroglucinol ، الأورثوفينول Orthophynol ، الفلورودزين Phlorodzin ، دي كلوروفينول، دي ميتيل فينول، م كيرزول ، 4 كلوروفينول.....الخ. ويوضح الشكل (4-6): بعض الفينولات الموجودة في الخلايا والأنسجة النباتية.



الشكل (4-6): التركيب الكيميائي لبعض الفينولات

تعد المركبات الفينولية من أكبر المنتجات الثانوية ذات الوزن الجزيئي المنخفض التي يتم اصطناعها في النباتات. يوجد أكثر من 8000 مركب يتبع هذه المجموعة (Sedighi *et al.*, 2014).

للمركبات الفينولية تأثيرات كبيرة في حقول كثيرة من الحياة: مثل الغذاء، الكيمياء، الصيدلة والطب، ولها تأثيرات بيولوجية أيضاً، كمضادات أكسدة ومضادة للفطريات والبكتريا والحشرات....، كما لها دوراً مهماً في حفظ الأغذية وإنتاجها والمحافظة على صحة النبات والحيوان والإنسان. حيث يزداد إنتاجها عند تعرض النبات للإجهادات الحيوية واللاحيوية.

تلعب المركبات الفينولية بشكل عام كعامل مثبت للنمو بشكل معاكس ومضاد لعمل الأوكسينات، لكن دلت بعض الأبحاث على وجود بعض المركبات الفينولية التي تعمل على حماية الأوكسين الطبيعي من التدهور وبالتالي فهي تساعد الأوكسين في تأثيره على نمو الخزعات النباتية داخل الأنابيب. مثل الفلوروغلوسينول الذي يزيد من قدرة عينات التفاح المكاثرة بالأنسجة على التجذير عند إضافته إلى الوسط المغذي (James *et al.*, 1981). تعمل المركبات الفينولية بشكل عام على تثبيط النمو، وتسبب استمرار الأجزاء النباتية وتعيق نموها، حيث تتحول هذه المركبات بوجود بعض الأنزيمات مثل بولي فينول أوكسيداز Polyphenol oxidase وأنزيمات البيروكسيداز Pyroxidases التي تعمل على أكسدة المركبات الفينولية إلى مركبات سامة مثل الكينون وتؤدي إلى استمرار الأنسجة وتحللها ثم موتها. وهذه الظاهرة تسبب مشكلة فيزيولوجية كبيرة في مجال زراعة الأنسجة النباتية كما هو الحال في النخيل (المعري ، 1995) .

تلعب المركبات الفينولية دوراً مهماً كمضادات أكسدة، إذ تعمل على حماية الأنسجة النباتية ومنع تطور الخلايا السرطانية في النبات من خلال تنظيم انتقال الأوكسينات والأنزيمات وبالتالي تعيق تكوين الدرينات السرطانية في النبات (Rasouli *et al.*, 2016).

الفصل الخامس

التكاثر الخضري الدقيق

5-1- تعريف التكاثر الخضري الدقيق Micropropagation :

يقصد بالتكاثر الخضري الدقيق زراعة أنسجة نباتية صغيرة حاوية على أنسجة مرستيمية في أوساط مغذية محددة التركيب بحيث تحوي جميع المكونات اللازمة لنمو الأجزاء النباتية على أن تتم كافة مراحل الزرع ضمن شروط معقمة، ثم توضع العينات في شروط خاصة لتحريضها على النمو والإكثار.

يعد التكاثر الخضري الدقيق الطريقة الأساسية في إكثار النباتات بزراعة النسيج، و يتم الحصول على نباتات مشابهة للنبات الأم في الموصفات المورفولوجية والوراثية والإنتاجية، وتكون النباتات الناتجة جيدة الخواص خالية من الأمراض.

يشمل التكاثر الخضري الدقيق حسب الأجزاء المزروعة التقانات التالية:

1- زراعة عقل صغيرة Microcutting Culture: ويتم فيها زرع عقل صغيرة بطول 1-2 سم تحوي برعم طرفي أو برعم جانبي. وهي أسهل أنواع تقانات التكاثر الخضري الدقيق، وتعطي نمو سريع وتكون النباتات الناتجة بهذه التقنية مشابهة للنبات الأم وغير خالية من الفيروسات إلا إذا أخذت العينات النباتية من أمهات خالية من الفيروس. لا ينصح باستخدام هذه الطريقة في العينات المتخشبة لأنه من الصعب الحصول على عقل متخشبة خالية من التلوث.

2- زراعة البراعم والقمم النامية الطرفية Bud or Shoot Apex Culture : ويتم بها زرع براعم جانبية أو طرفية بحجم 1-5 مم. وتكون النباتات الناتجة بهذه التقنية تكون مشابهة للنبات الأم وغير خالية من الفيروسات إلا إذا أخذت العينات النباتية من أمهات خالية من الفيروس. تكون نسبة التلوث أقل من نسبة تلوث العقل الصغيرة.

3- زراعة القمم المرستيمية Meristem Culture: ويتم أخذ القمم المرستيمية بحجم من 0.1-1 مم. وفي هذه الحالة يتم الحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية.

4-زراعة أجزاء زهرية: وتزرع البراعم الزهرية أو الأقراص الزهرية بهدف تحول الأجزاء الزهرية إلى براعم خضرية مباشرة دون المرور بمرحلة الكالوس. ويتم الحصول على نباتات مشابهة في تركيبها الوراثي للنبات الأم كما هو الحال في نبات الجيرييرا. وهنا العامل المحدد لنجاح هذه التقنية هو درجة تمايز البراعم الزهرية، أو المرحلة التي وصل إليها نمو الأعضاء الزهرية.

5-2-مزايا التكاثر الخضري الدقيق:

تعد وسيلة الإكثار بالنسج من الوسائل الحديثة المهمة والتي لها مردود اقتصادي كبير، وتساهم بشكل كبير في تحسين الإنتاج الزراعي كما ونوعا.

وللتكاثر الخضري الدقيق مزايا كثيرة وأهمها:

1 - تسمح بإنتاج أعداد كبيرة من النباتات الخالية من الأمراض، ويعد معدل الإنتاج كبير يضاهي آلاف المرات المعدل الممكن الحصول عليه في طرائق الإكثار التقليدي (Martin *et al.*,1986; ALMaarri *et al.*,1981). ففي الورد يمكن الحصول على أعداد تصل إلى 10000 مرة أكثر من الأعداد التي يمكن الحصول عليها من نبات واحد في السنة (Martin *et al.*,1981). ففي هولندا لوحدها يتم إنتاج أكثر من 100 مليون نبات سنويا بزراعة النسج (Hall,1999).

2-تسمح بالحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية، وذلك عن طريق زراعة الميرستيم الذي لا يصاب بالفيروسات، ولهذه التقنية أهمية كبيرة في إكثار البذار، وبعض الأنواع النباتية كالبطاطا (Morel and Martin,1958;) والموز (Kosky *et al.*,2002) والفريز (Hanineva *et al.*,2005).

3-تضمن تقانات التكاثر الخضري الدقيق الحصول على نباتات مشابهة في تركيبها الوراثي للنبات الأم ، ونسبة الطفرات لا تزيد عن نسبتها في حال الإكثار الخضري التقليدي.

4-تسمح بإكثار الأنواع أو الأصناف التي يصعب إكثارها بالطرائق التقليدية مثل شجرة النخيل حيث تعد طريقة الإكثار بالفسائل هي الطريقة الشائعة في إكثار النخيل ولكن يوجد كثير من أصناف عالية الجودة التي لا تعطي فسائل أو تعطي عدد محدود جدا من الفسائل. ولهذا فتطبيق تقانات التكاثر الخضري الدقيق يقدم كثير من الحلول في إكثار

النخيل وهي ذات عائد اقتصادي كبير وتسمح بتطوير زراعة النخيل وخاصة الأصناف عالية الجودة (ALMaarri, 1995).

5- تسمح بإكثار الأصناف والسلالات الجديدة المعتمدة الناتجة عن عمليات التحسين الوراثي والمقاومة لبعض الإجهادات الحيوية واللاحوية. كما تساهم في سرعة نشر هذه الأصناف تجارياً. كما تسمح بإكثار الأصناف عديمة البذور.

6- تسمح بالعمل على مدار السنة في المختبر. ويمكن الاستغناء عن حقول الأمهات في المسائل للأصول والأصناف إذا اعتمد إكثارها بالنسج كما هو الحال في أصل اللوز GF677 .

7- تسمح تقانات الإكثار بالنسج ونقل المادة النباتية الموثوقة وتداولها من بلد إلى آخر دون نقل الأمراض البكتيرية والفطرية والحشرات معها. دون الحاجة إلى تطبيق قواعد الحجر الزراعي. كما هو الحال في النخيل، وقد أدى انتشار مرض البيوض وحشرة سوسة النخيل الحمراء نتيجة لنقل الفسائل من بلد لآخر. لو كان معتمد نقل الأصناف عن طريق زراعة النسج لما أدى إلى زيادة وانتشار هذه الحشرة في دول الخليج العربي (ALMaarri, 1995).

8- تلعب تقانات زراعة النسج دوراً مهماً في حفظ الأصول الوراثية النباتية وإكثارها. وتعاني كثير من المصادر الوراثية الطبيعية البرية في كثير من بلدان العالم من التدهور والضياع بسبب العوامل البيئية القاسية وبسبب التعديلات عليها من قبل الإنسان. لذلك يمكن حفظ هذه الأصول النباتية البرية بوساطة زراعة النسج (Abouzaidan et al., 2016 ، ALMaarri, 2016).

5-3- مراحل التكاثر الخضري الدقيق:

تشمل عملية الإكثار الدقيق بالنسج المراحل الآتية:

- الزراعة الأولية
- الإكثار والاستطالة
- تجذير العينات
- التقسية أي نقل النباتات المجذرة من الأنابيب إلى الظروف الطبيعية.

5-3-1- الزراعة الأولية: يشمل طور الزراعة الأولية الحصول على عينات نباتية خالية من التلوث ولها قدرة على النمو والإكثار .

تعد من أول شروط نجاح زراعة الأنسجة النباتية الحصول على زراعة عينات سليمة خالية من التلوث، ويجب المحافظة على سلامة الأنسجة النباتية من التلوث في كافة مراحل التكاثر الخضري الدقيق، لأن ظهور التلوث في أية مرحلة يؤدي إلى فشل الزراعة وموت الأجزاء النباتية المزروعة.

يعد التلوث العدو الأول في تقانات زرع الأنسجة النباتية لأنه يسبب فشل الزراعة منذ الأسبوع الأول. لو قارنا الفترة الزمنية اللازمة لانقسام البكتريا (30-60 دقيقة) مع الفترة الزمنية اللازمة لانقسام الخلية النباتية (24-48 ساعة) . فهذا يعني تكون مستعمرة بكتيرية مقابل انقسام الخلايا النباتية مرة أو مرتين، وطبعاً المنافسة على الغذاء في الوسط المغذي تكون لصالح البكتريا، وبالتالي يلاحظ بعد أسبوع موت العينات النباتية.

تعد مشكلة التلوث مشكلة كبيرة في الإكثار الخضري، وهي مرتبطة بعدة عوامل مثل طبيعة الأجزاء النباتية ودرجة تخشبها وحجمها، بالإضافة إلى شروط زراعة النبات الأم، نوع المادة المعقمة ودرجة التركيز والفترة الزمنية المستخدمة، شروط جو التعقيم والأدوات المستخدمة، بالإضافة إلى النظافة العامة في المخبر.

ففي النخيل مثلاً تتعلق نسبة التلوث بزراعة النسيج بمدى تلوث الخارجي للفسائل المستخدمة، ومدى دخول الغبار والتراب إلى داخل قلب الفسيلة. وقد استخدمت مادة هيبوكلوريت الصوديوم المضاف لها عدة قطرات من توين 80 لمدة 15 دقيقة بتركيز مختلفة 1% (Tisserat,1984) ، 5% (AboelNil,1986) ، 3% (ALGamdi,1993) و 2% (ALMaarri and ALGhamdi,1994) .

تعد مشكلة التلوث السطحي مشكلة أساسية يجب تخطيها لنجاح زراعة النسيج وذلك من خلال دراسة المعقم المناسب والتركيز والفترة الزمنية المناسبة للتعقيم لكل نوع نباتي على حدى.

تعد الأوساط المغذية بيئة مناسبة لنمو الأحياء الدقيقة، لذلك يتوجب استمرار مراقبة طريقة التحضير والتعقيم حتى تكون خالية من التلوث، كما يتم التأكد من أجهزة تعقيم البيئات

المغذية، لأن أي عطل مفاجئ في الأوتوغلاف يسبب ظهور نسبة تلوث 100% في العينات في كافة مراحل التكاثر الخضري الدقيق. ويمكن أن يسبب هذا كارثة حقيقية في مخبر إنتاجي، ويقضي على كافة العينات النباتية.

كما يتوجب التأكد من تعقيم أدوات الزرع والأطباق البتري والزجاجيات، ومن كفاية تعقيم الماء المقطر المعقم الذي يستخدم في غسل العينات النباتية بعد تعقيمها بالمواد الكيميائية. كما لابد من مراقبة العاملين والفنيين الذين يقومون بعمليات الزرع والنقل للتأكد من صحة تنفيذ العمليات ومن أخذ الاحتياطات الضرورية أثناء العمل من تعقيم الأيدي وتعقيم أدوات الزرع، والنقل تحت جهاز العزل الجرثومي بالشكل الصحيح.

كما لابد من التأكد أخيرا من أن جو العمل سليم وأنه لا يوجد أعطال في أجهزة العزل الجرثومي.

لوحظ في بعض الأنواع النباتية وجود تلوث داخلي بكتيري لا يظهر في الزراعة الأولية، إنما يظهر في وقت لاحق في طور الإكثار وقد لوحظ في عدة أنواع خشبية مثل النخيل (Tisserat, 1984; Beauchesne, 1983) ، وفي الجوز والدفناباخيا والمشمش.

ويمكن أن يحدث التلوث داخل غرف النمو مما يؤدي إلى انتشار بعض الأحياء الدقيقة بشكل مفاجئ. وقد تسبب بعض الكوارث كما حدث في أحد المخابر المغربية لإنتاج النخيل حيث ظهر تلوث مباشرة وأدى للقضاء على 80% من الأنابيب الموجودة في المخبر (Awaain M., 1993).

تظهر نتيجة التلوث في العينات النباتية المزروعة خلال الأسبوع الأول، وتستبعد كافة العينات الملوثة ويتم المحافظة على العينات السليمة الخالية من التلوث.

5-3-1-1-العوامل المؤثرة في نمو العينات أثناء طور الزراعة الأولية:

تتعلق قدرة العينات النباتية المزروعة في الأنابيب على النمو بمجموعة كبيرة من العوامل يمكن تقسيمها إلى عدة مجموعات كالآتي:

-عوامل متعلقة بالنبات الأم وبالأجزاء النباتية المزروعة: مثل نوع النباتي، نوع الأصناف، عمر النبات الأم، الحالة الصحية للنبات الأم، موعد زرع العينات النباتية، شروط زراعة

الأمهات، طبيعة الأجزاء النباتية المزروعة، حجم الجزء النباتي المزروع، مكان الجزء النباتي على الطرود.

- عوامل مرتبطة بالأوساط المغذية المستخدمة: مثل تركيب المعدني للوسط المغذي، تركيز السكر، والأحماض الأمينية، والفيتامينات، طبيعة الوسط المغذي، نوع الهرمونات المستخدمة وطبيعتها وتركيزها والتوازن الهرموني في الوسط. نسبة الآجار المستخدمة ونوعها.

- عوامل مرتبطة بالشروط الجوية في غرف النمو: مثل الحرارة، الإضاءة، شدتها، فترتها ونوعيتها، والرطوبة أيضاً.

1- تأثير عمر النبات الأم:

يؤثر عمر النبات الأم بشكل مباشر في استجابة العينات المزروعة للنمو. كلما زاد عمر النبات الأم قلت استجابتها للنمو، والإكثار بزرعة النسج. ويلاحظ هذا في النباتات الخشبية بشكل عام وفي الأشجار الحراجية وأشجار الفاكهة بشكل خاص.

فقد دلت التجارب في التفاح بأن القمم النامية المأخوذة من أشجار معمرة تحتاج إلى فترة زمنية حتى تستجيب للنمو بشكل أطول (45-60 يوم) من الفترة الزمنية (30 يوم) التي تحتاجها القمم النامية المأخوذة من غراس فنية بعمر سنة (Jones *et al.*, 1977). ويوضح الجدول (5-1) تأثير عمر النبات الأم في استجابة العينات النباتية المزروعة.

جدول (5-1): تأثير عمر النبات الأم في استجابة العينات للنمو بالنسج

المرجع	استجابة النبات المعمر	استجابة النبات الفتى	الجزء المزروع	النوع النباتي المزروع
Fouret <i>et al.</i> ,1988	0	+++	قمم نامية	شجرة السيكيويا
ALMaarri <i>et al.</i> ,1986	0	++	قمم نامية	الإجاص
	+	+++	قمم نامية	الحمضيات
Kartsona and Papafotiou,2007	+	+++	عقل جانبية	البلوط
Abdulmutalib <i>et al.</i> ,2008	+	+++	عقل جانبية وقمم نامية	المشمش

0 لا يوجد استجابة ، + استجابة ضعيفة، ++ استجابة وسط، +++ استجابة عالية.

يختلف طول طور الفتوة بحسب الأنواع النباتية، ففي بعض الأنواع يستمر عدة سنوات 5-7 سنوات في أشجار الفاكهة، وفي بعض الأنواع الحراجية يستمر 20-40 سنة. والفاصل بين طور الفتوة وطور النضج بدء تكوين الأزهار والثمار على الأشجار. ونظرا لأهمية عمر النبات الأم في التكاثر الخضري الدقيق فسوف يتم التعرف على أنواع العمر النباتي وعلى كيفية تجديد فتوة الأشجار .

يمكن تمييز ثلاثة أنواع من عمر الأشجار الخشبية:

- **العمر الزمني Chronological ageing** : هو العمر الزمني الحقيقي للشجرة الذي يستدل عليه من الإنبات وحتى السنة المراد زرع العينات النباتية. شجرة بعمر 40 سنة أو 200 سنة.

- **العمر التطوري Ontogenetical ageing** : هي المراحل التي تمر بها الأشجار من حيث التطور من الإنبات حتى الشيخوخة، أي طور الفتى طور النمو الخضري، طور النمو والإثمار، طور الإثمار المليء، طور الشيخوخة. تختلف طول الفترة الزمنية لكل مرحلة باختلاف الأنواع النباتية.

- **العمر الفيزيولوجي Physiological ageing** : هي درجة النشاط الفيزيولوجي التي يتمتع بها النبات بحسب العمر التطوري والعمر الزمني، ففي طور الفتى يلاحظ نشاط فيزيولوجي كبير في النبات ومناطق النمو، أما في طور الشيخوخة يلاحظ ضعف فيزيولوجي واضح في الأشجار الهرمة. ولابد من الإشارة بأن العمر الفيزيولوجي للنموات القريبة من الجذور يكون أقل من العمر الفيزيولوجي للبراعم الموجودة في النموات الطرفية من الأشجار. وبالتالي درجة استجابتها عند زراعتها بالنسج تكون أعلى من استجابة العينات المأخوذة من المناطق العلوية من الشجرة (Ballester *et al.*, 1990).

في كثير من الأحيان تحمل الأشجار المعمرة الكبيرة بعض الصفات المهمة والتي يهمنها المحافظة عليها وإكثارها، مثل المقاومة لبعض الأمراض والحشرات أو ذات مواصفات ثمرية جيدة أو متحملة لبعض العوامل البيئية مثل مقاومة درجات الحرارة المنخفضة أو متحملة للجفاف لذلك يتم العمل على إكثارها بالنسج.

يتطلب تجديد فتوة الأشجار المعمرة حتى تستعيد قدرتها في النمو والإكثار بالنسج. توجد عدة طرائق لإعادة فتوة الأشجار الهرمة مثل القطع التجديدي، التطعيم على غراس بذرية فتية، التطعيم المتكرر والتعقيل المتكرر. كما لوحظ عند زرع العينات النباتية بالنسج تكتسب صفات النباتات الفتية، لذلك تعد زراعة الميرستيم أو التطعيم الدقيق أو الإكثار المتكرر من طرائق تجديد فتوة الأشجار الهرمة بزراعة النسج.

2-مؤعد زرع العينات النباتية:

تختلف الفترة الزمنية المناسبة لزرع العينات النباتية باختلاف الأنواع النباتية. فقد لوحظ بالتفاحيات واللوزيات بأنه أفضل مؤعد لزرع القمم النامية في نهاية الشتاء بعد كسر طور السكون وقبل تفتح البراعم أي في بداية آذار وحتى نهايته (ALMaarri *et al.*, 2007). وفي بعض النباتات كالورد لوحظ في بداية الربيع عندما يصل طول النموات على 10-20 سم.

أما في النخيل فقد لوحظ بأن أفضل مؤعد لزرع العينات النباتية المأخوذة من الفسائل وذلك خلال شهر كانون الأول وكانون الثاني حيث تم الحصول على أفضل نسبة من العينات النامية وأقل نسبة اسمرار للأنسجة النباتية بالمقارنة مع أشهر الصيف التي ينعدم فيها النمو (Beauchsene, 1988; ALMaarri and ALGhamdi 1998)، وترتفع نسبة الاسمرار بسبب زيادة إفراز المركبات الفينولية وزيادة نشاط انزيمات البيروكسيداز في الصيف وتقل نسبتها في الشتاء (Bakir *et al.*, 1988)

3-طبيعة الجزء النباتي المزروع :

تختلف استجابة الأجزاء المزروعة بحسب الأنواع النباتية. وهناك أهمية لطبيعة العينات النباتية في درجة استجابتها للنمو، ففي بعض الأنواع النباتية لوحظت استجابة البراعم الطرفية أفضل من البراعم الجانبية. والعقل الغضة أفضل من العقل المتخشبة. وفي بعض الأنواع تلاحظ استجابة البراعم الزهرية أكثر من الأجزاء النباتية الأخرى، كما هو الحال في الجريبيرا.

توجد علاقة مباشرة بقدرة العينات المزروعة للنمو مع قدرتها على التشكل وتكوين نباتات كاملة. فمثلاً في البيجونيا ريكس تبين بأن زرع الأوراق أو أعناق الأوراق أعطت نتيجة إيجابية أكثر من زرع أجزاء نباتية أخرى (ALMaarri *et al.*, 1995). ففي نبات العرق السوس أوضحت التجارب أن زرع العقل الجانبية أعطت معدل إكثار أعلى من العقل الطرفية والقمم النامية (Badekan *et al.*, 2016). وقد لوحظ في بعض النباتات بأن رقم العقلة على الطرود تؤثر في استجابة العينات الجانبية للتكاثر الخضري الدقيق ففي شجرة

الجوافة تم الحصول على أعلى معدل إكثار من العقل الجانبية رقم 2 أكثر من العقل الطرفية والقاعدية من الطرود (Shekafandeh and Khash-Khui, 2008). دلت التجارب في إكثار النخيل بالنسج أنه تم الحصول على استجابة متفاوتة ، وكانت القمم النامية أفضل الأجزاء المزروعة ، ثم البراعم الجانبية، وأخيراً الوريقات الداخلية حول القمة النامية. أما الأجزاء النباتية المتميزة، أو في طريقها إلى التمايز ليس لها القدرة على النمو وتكوين براعم خضرية، بل على العكس تنمو ويزداد قطرها واستطالتها ولا تعطي أية استجابة للنمو بل يظهر عليها علامات الاسمرار وتنتهي بالموت. لذلك لطبيعة الأجزاء المزروعة في النخيل أهمية كبيرة في نجاح إكثار النخيل بالنسج (Beauchesne,1980; ALMaarri,1995).

5-3-1-2- تأثير العوامل المتعلقة بالأوساط المغذية :

1- تأثير التركيب المعدني للوسط المغذي:

يختلف تأثير التركيب المعدني في الوسط المغذي في استجابة العينات المزروعة بالنسج بحسب الأنواع النباتية، فقد دلت التجارب في كثير من النباتات الخشبية ونباتات الزينة بأن أفضل محلول استخدم هو المحلول المعدني لموراشيغ وسكوغ (1962)، حيث يعطي نتائج جيدة في كثير من الأنواع النباتية المكاثرة بالنسج . يمتاز المحلول المعدني MS بكونه غني بالعناصر المعدنية ويحوي كافة العناصر اللازمة لنمو العينات النباتية المزروعة. ولا يحذر استخدام الوسط المعدني MS في بعض الأنواع النباتية لأنه يسبب ظهور مرض الشفافية، بسبب غناه بعنصر الأمونيوم، منذ طور الزراعة الأولية، كما هو الحال في إكثار القرنفل بالقمم المرستيمية. ففي هذه الحالة يتم تخفيف نترات الأمونيوم إلى الربع أو النصف، للحد من ظاهرة الشفافية.

ففي تجربة نفذت على إكثار الفستق الحلبي بزراعة النسج زرعت عقل جانبية صغيرة بطول 1-2 سم غضة في عدة أوساط مغذية تحوي محاليل معدنية مختلفة وهي MS , KNOP, WPM, A Anderson وقد أضيف تركيب الوسط المغذي نفسه وبعد شهر من الزراعة لوحظ أن أفضل محلول معدني هو MS حيث أعطى أعلى نسبة نمو في العينات

المزروعة والتي بلغت 66.6% ، أما نسبة النمو في المحاليل الأخرى كانت بالترتيب 38% لمحلل KNOP ، 11% لمحلل WPM ، و 5.6% في محلل المعدني لـ Anderson (Abousalim,1991).

2- تأثير الهرمونات في الوسط المغذي:

تلعب الهرمونات النباتية دوراً أساسياً في استجابة العينات النباتية للنمو. تختلف أنواع الهرمونات وتركيزها وتوازنها باختلاف الأنواع النباتية ومدى قدرة العينات المزروعة على التشكل والنمو، يضاف عادة ثلاثة أنواع من الهرمونات النباتية في وسط الزراعة الأولية سيتوكينيتين وأوكسين وجبرلين. وعادة تكون نسبة السيتوكينين على الأوكسين أكبر أو تساوي الواحد. بالنسبة للتكاثر الخصري الدقيق لكثير من الأنواع النباتية. تختلف نوعية السيتوكينينات ونوعية الأوكسينات المستخدمة وتراكيزها بحسب الأنواع النباتية. ويوضح الجدول (2-5) تركيز الهرمونات وتوازنها في إكثار بعض الأنواع النباتية.

جدول (2-5) : تركيز الهرمونات المستخدمة في الزراعة الأولية في بعض الأنواع .

النوع النباتي	نوع السيتوكينين وتركيذه مغ/ل	نوع الأوكسين وتركيذه مغ/ل	سيتوكينين /أوكسين	المرجع
التفاح	BAP 1	IBA 1	1	Jones et al.,1977
البنفسج الإفريقي	BAP 0.1	IAA 0.1	1	Auge et al.,1984
السفرجل	BAP 1	IBA 0.2	5	ALMaarri et Dira,1983[al.,1986

Chaussat & Bigo,1980	1	IBA 1	BAP 1	النخيل
ALMaarri & Xie, 2009	20	NAA 0.2	K 2	الكريزنتيم
	2	IBA 0.5	TDZ 1	آرتيميزيا آنا

تتطلب بعض الأنواع النباتية إضافة الهرمونات بشكل خاص، وهي أنواع خاصة من الهرمونات النباتية كما هو الحال في النخيل حيث ثبت بأن إضافة الـ 2iP أعطى نتائج أفضل من استخدام أنواع أخرى من السيتوكينينات (ALMaarri,1995). ولابد من الذكر بأنه في بعض الأنواع النباتية يضاف الجبريلين إلى وسط الزراعة الأولية، وفي بعض الأنواع الأخرى ليس من الضروري إضافة الجبريلين.

5-3-1-3- عوامل متعلقة بشروط غرف النمو:

تؤثر العوامل الجوية في غرف النمو في مخابر زرع الأنسجة النباتية في نمو العينات المزروعة في طور الزراعة الأولية، تختلف الحرارة المناسبة بحسب الأنواع النباتية، يستخدم درجة حرارة 22 إلى $24 \pm 1^\circ\text{C}$ بشكل عام في كثير من الأنواع النباتية. ويوجد بعض الأنواع التي تفضل التناوب الحراري بين الليل والنهار 24°C نهاراً و 12°C ليلاً.

كما تؤثر الإضاءة في نمو العينات المزروعة. يستخدم عادة 16 ساعة إضاءة و 8 ساعات ظلام في غرف النمو وهذا يناسب كثير من النباتات المكاثرة بالنسج. يستعمل في بعض المعاملات شروط إضاءة خاصة كفترة ظلام في بداية زرع العينات النباتية كما هو الحال عندما يراد تكوين براعم مباشرة على أوراق أو أعناق Direct Organogenesis ،

كما هو الحال عند تكوين براعم في أوراق الإجاص السوري البري، يتم وضع العينات المزروعة بالظلام لمدة 30 يوما على درجة حرارة 24°م ثم تنقل على شروط إضاءة 16 ساعة يوميا بشدة 3000 لوكس (ALMaarri & Thouma, 2009).

تؤثر الرطوبة الجوية النسبية في نمو بعض الأنواع النباتية مثل الورد الذي لوحظ بشكل كبير انخفاض معدل إكثاره بالشتاء بسبب تدفئة غرف النمو التي عملت على خفض الرطوبة الجوية. وقد تم السيطرة على مشكلة نمو العينات المزروعة وإكثارها عن طريق زيادة الرطوبة الجوية في غرف النمو على 70% (Coudret, 1991)

5-3-2 طور الإكثار والاستطالة:

تتم الأجزاء النباتية أثناء طور الزراعة الأولية، وتعطي نمو بطول 1-2 سم. تنقل النموات إلى وسط خاص بالإكثار بهدف زيادة عدد النموات الخضرية المتكونة نتيجة نمو البراعم الجانبية، وتكوين براعم عرضية ونموها ونمو البراعم الطرفية. يهدف طور الإكثار إلى الحصول على أكبر معدل من النموات الخضرية ذو النوعية الجيدة. لا يهم فقط تكوين نموات خضرية جديدة بأعداد كبيرة، بل يجب الانتباه إلى جودة النموات المتكونة ونوعيتها.

ترتبط نوعية النموات الجديدة المتكونة بثلاثة عوامل:

- أن تكون خالية من الإصابة بمرض الشفافية.
- أن تكون مستقيمة غير ملتوية وجيدة النمو.
- أن تكون ذات استطالة جيدة، وتحتوي على أوراق جيدة التكوين كما هو موضح بالشكل (1-5).

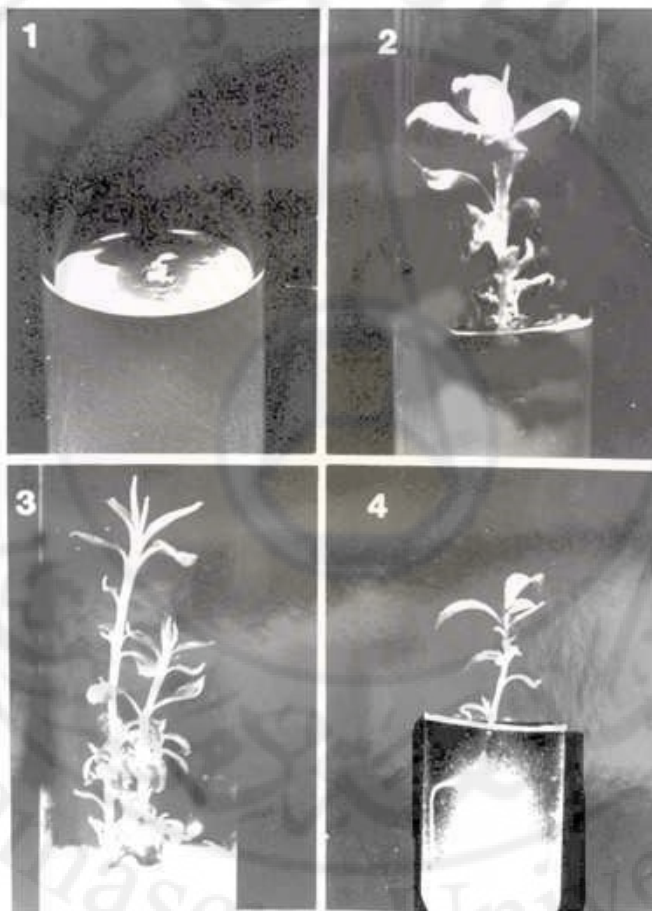
لابد من التذكير بأن النموات المصابة بظاهرة الشفافية تصبح ضعيفة النمو وتفقد بشكل تدريجي قدرتها في النمو والتجذير فيما بعد، وإذا جذرت تموت أثناء عملية التقسية.

5-3-2 نماذج إكثار النباتات بزرعة النسيج:

تختلف طرائق إكثار النباتات بزرعة النسيج بحسب النوع النباتي، وحسب طبيعة وطريقة نموه، وقدرته على التجديد والتشكل. فالنباتات الخشبية تعطي نموات تختلف بشكل جذري عن طريقة إكثار النباتات العشبية أو الریزومية، أو البصلية. كما تختلف طريقة إكثار

نباتات وحيدة الفلقة عن نباتات ثنائية الفلقة. لذلك يمكن ملاحظة الكثير من نماذج الإكثار
بزراعة النسيج ومنها:

1- الإكثار العمودي بساق واحدة، كما هو الحال بالبطاطا، إذ تنمو العينات بشكل عمودي
وتصل إلى طول أكثر من 10-15 سم. وفي هذه الحالة يتم تقسيم النبات إلى عقل صغيرة
جانبيهة بطول 1-1.5 سم بهدف الإكثار حيث تعود وتنمو وتعطي نمو



الشكل (1-5): إكثار الإجاص بزراعة القمة النامية. 1- زراعة قمة نامية، 2- نمو القمة بعد شهرين
من الزراعة، 3- طور الإكثار، 4- طور التجذير.

شاقولي طويل بعد ثلاثة أسابيع. وهذا يعني أنه يمكن الحصول على 7-10 عقل من عقلة واحدة خلال 3-4 أسابيع. بمعدل إكثار عال. ينصح في هذا النموذج استخدام أنابيب طويلة بطول 20 سم.

2- الإكثار بالنموات الجانبية القاعدية: تنشأ النموات الخضرية من البراعم الجانبية والبراعم العرضية التي تتكون في قاعدة الجزء النباتي. يتم في هذه الحالة إزالة البراعم القمية للنموات مع الأوراق القديمة لتشجيع نمو البراعم الجانبية والبراعم العرضية وتكوين نموات جديدة واستطالتها، يلاحظ هذا النموذج في كثير من الأشجار الخشبية مثل التفاحيات واللوزيات الشكل (5-1).

3- الإكثار بالبروتوكروم: يلاحظ هذا النموذج في إكثار نباتات الأوركيد مثل السميديوم *Cymbidium*. ينشأ البروتوكروم من زراعة القمم النامية في الأوركيد وعند تطور القمة تعطي كتلاً كروية الشكل تدعى بالبروتوكروم. والبروتوكروم كتلة كروية خضراء اللون بأحجام مختلفة من 2-5 مم عندما تتطور تنمو وتعطي نمواً خضرياً، وبعد نموها يمكن أن تنقل على محلول تجذير لتجذر وتعطي نباتات كاملة. أثناء الإكثار تتشكل بروتوكرومات ثانوية صغيرة الحجم وتم تتطور لتعطي بروتوكرومات جديدة وهكذا تكون وسيلة الإكثار في الأوركيد (Hartmann & Kester, 1983; Margara, 1982).

4- الإكثار بالبراعم الريزومية: طريقة من طرائق إكثار النباتات الريزومية بالنسج حيث يلاحظ تكون براعم على الريزوم أثناء طور الإكثار كما هو الحال في نبات الأيستروميريا *Estromeria*. يلاحظ في الأجزاء المكاثرة تكون جزء متضخم وعليه تتكون البراعم الريزومية وتنمو لتعطي نموات خضرية جديدة (الشكل 5-2) (ALMoussa et al., 2009).

5- الإكثار بالبصيلات : يلاحظ هذا النموذج في إكثار النباتات البصيلية بالنسج إذ تتكون بصيلات صغيرة في آباط الوريقات أو تتكون بصيلات جديدة ثانوية بجانب البصيلات المتكونة بالنسج يمكن أن تفصل وتنقل من جديد لمحلول إكثار لتكوين بصيلات جديدة . يلاحظ هذا النموذج في نبات الليليوم.

6-الإكثار بالأجنة الخضرية: هي إحدى النماذج الأساسية في إكثار بعض الأنواع النباتية مثل النخيل، وقد تتكون الأجنة الخضرية مباشرة دون تكوين الكالوس الجنيني أو تتكون بعد تكوين الكالوس الجنيني (Tisserat,1983). تشبه الأجنة الخضرية المتكونة الأجنة الجنسية حيث عند تطور وانبات الجنين الخضري يعطي الجذير في بادئ الأمر ثم البراعم ويتطور فيما بعد ليعطي نبات كامل (الشكل 4-5).

7-الإكثار بتشكيل البراعم مباشرة على أجزاء خضرية: يتم في هذه الحالة تشكيل البراعم مباشرة على أجزاء خضرية أو زهرية مثل البيجونيا، الجريبيرا، البنفسج الإفريقي، و الأرتميزيا آنا (ALMaarri and Xie,2009). وثم يتم إكثار هذه البراعم لتشكيل نموات وبراعم جديدة بالتقسيم. ويوضح الشكل (3-5) تكون النموات الجانبية من البراعم العرضية في النخيل.

ومن الجذير بالذكر بأنه يمكن ملاحظة نماذج أخرى في إكثار الأنواع النباتية لم تذكر في هذه العجالة. أو يمكن أن تشبه أحد نماذج الإكثار المذكورة مع وجود بعض الخلافات تتعلق بالنوع المدروس.

5-3-2-3-العوامل المؤثرة في إكثار الأجزاء النباتية:

هناك عوامل كثيرة تؤثر في إكثار النباتات بزراعة النسيج.

- منها ما هو متعلق بالنبات الأم إذ تؤثر كافة العوامل بطور الزراعة الأولية في طور الإكثار مثل عمر النبات الأم، الحالة الفيزيولوجية للنبات الأم، موعد زرع العينات النباتية طبيعة الجزء النباتي المزروع، النوع النباتي والأصناف، كل هذه العوامل يجب أن تدرس بعناية لوضع الشروط المناسبة للحصول على معدل إكثار جيد.

فمثلا على سبيل الذكر، يؤثر عمر النبات الأم في معدل الإكثار بشكل مباشر، فالنباتات المعمرة تتصف بمعدل إكثار منخفض بالمقارنة مع النباتات الفتية وفي كثير من الأحيان لا تبدي استجابة للإكثار والنمو والأمثلة كثيرة على ذلك في مجال الأشجار الخشبية والحراجية (Franklet,1980).

وقد لوحظ أن موعد زرع العينات النباتية يؤثر تأثيراً مباشراً في معدل نموها وإكثارها. فإذا زرعت في الوقت المناسب تنمو وتعطي معدل إكثار جيد، أما إذا زرعت في وقت غير

مناسب فيلاحظ تدني معدل الإكثار بشكل كبير، ويظهر هذا الأثر بشكل واضح بالنباتات المعمرة أكثر من نباتات العشبية.

وقد لوحظ بأن الحالة الصحية للنبات الأم وشروط زراعته تؤثر في معدل الإكثار، فإذا أخذت العينات من نباتات جيدة موضوعة في بيت محمي تعطي معدل إكثار أفضل من المعدل الممكن الحصول عليه من عينات من نفس النوع مأخوذة من نباتات ضعيفة النمو أو مزروعة في ظروف غير مناسبة.

- عوامل مرتبطة بالأوساط المغذية:

تؤثر مجموعة من العوامل المتعلقة بالأوساط المغذية في معدل الإكثار بزراعة النسيج في كثير من الأنواع النباتية، مثل التركيب المعدني، تركيز الهرمونات النباتية ونوعها، تركيز السكر، طبيعة الوسط فيما إذا كان سائلاً أو صلباً... يختلف تركيب الوسط المناسب بحسب الأنواع النباتية، حتى بحسب الأصناف ضمن النوع الواحد.

1- تأثير التركيب المعدني في الإكثار بزراعة النسيج:

يؤثر التركيب المعدني للوسط المغذي في معدل الإكثار، وفي متوسط استطالة النموات وفي نوعية النموات الجديدة المتكونة. فعند إكثار الأشجار المثمرة لوحظ بأن المحلول المعدني لمورايشيج وسكوغ يزيد في نسبة النموات المصابة بمرض الشفافية (Letouze and Dauguin, 1983; Maarri et al., 1987). ويعزى السبب بان المحلول المعدني MS غني بنترات الأمونيوم ولذلك عند تخفيض نترات الأمونيوم في الوسط إلى النصف أو الربع نقل بشكل كبير نسبة العينات المصابة بمرض الشفافية (Quoirin et Lepoivre, 1977).

وقد لوحظ بوضوح تأثير التركيب المعدني في نوعية النموات الخضرية المتكونة. ففي تجربة نفذت لدراسة تأثير المحلول المعدني في إكثار الإجاص والنخيل. وقد توضح تأثير التركيب المعدني في نوعية النموات المتكونة بشكل واضح كما هو موضح بالجدول (3-5).

جدول (5-3): تأثير التركيب المعدني في نوعية النموات المتكونة أثناء طور الإكثار

المحلل المعدني	النبت	معدل الإكثار	% للشفافية
Qouirin & Lepoivre	الإجاص	5	20.8
Murahige and Skoog	الإجاص	5.1	45.8
Murahige and Skoog	النخيل	2.1	25
Beauchesne	النخيل	2.3	8

يختلف التركيب المعدني بين الأوساط المذكورة بمدى غناها ببنترات الأمونيوم حيث MS يحوي 4 مرات زيادة عن المحاليل الأخرى وهذا ما يفسر زيادة نسبة الشفافية عند استخدامه في الوسط المغذي (ALMaarri & ALGhamdi, 1996).

2- تأثير تركيز الهرمونات النباتية المستخدمة في الإكثار بالنسج:

يختلف محتوى وسط الإكثار من الهرمونات النباتية بحسب الأنواع النباتية. يتوجب أن يكون مستوى السيتوكينين على الأوكسين أكبر من الواحد في كثير من الأنواع النباتية كون السيتوكينين يحد من السيادة القمية ويشجع نمو البراعم الجانبية والعرضية وتكوينها، يخالف هذه القاعدة بعض النباتات التي تتمتع بنموذج إكثار عمودي ذات النمو الواحد مثل البطاطا.

يختلف نوع السيتوكينين المستخدم وتركيزه بحسب الأنواع النباتية، وبحسب الأصناف، فبعض الأنواع تفضل الـ BAP مثل التفاحيات واللوزيات، وبعض الأنواع تفضل الكينتين مثل بعض نباتات الزينة وبعض الأنواع تفضل إيزوبنتيل آدينين مثل النخيل.

وقد دلت التجارب بأنه يزداد معدل الإكثار، وتقل نسبة استطالة النموات المتكونة مع ازدياد تركيز السيٲوكينين في الوسط. كما دلت التجارب بزيادة نسبة النموات المصابة بالشفافية مع زيادة نسبة السيٲوكينين في الوسط المغذي كما هو موضح بالجدول (4-5)، عند إكثار الإاجاص والسفرجل (ALMaarri & ALGhamdi,1996).

جدول (4-5): تأثير السيٲوكينين في إكثار السفرجل والإاجاص

تركيز ال BAP مغ/ل	معدل الإكثار بالسفرجل	% للشفافية بالسفرجل	معدل الإكثار بالإاجاص	% للشفافية بالإاجاص
0	1	0	1	0
0.5	3.6	0	4	0
1	4.2	0	4.6	10
2	5.2	10	5.4	25
4	6.1	30	---	---

مما لا شك فيه بأن زيادة تركيز السيٲوكينين في وسط الإكثار يزيد في نسبة النموات الخضرية المتكونة ولكنه يؤثر بشكل سلبي على نوعيتها إذ تقل استطالة النموات وتزيد نسبة العينات المصابة بالشفافية.

وهذا مهم للحكم على التركيز الأنسب أي الذي يعطي أفضل معدل من النموات الخضرية ذو النوعية الجيدة هو 0.5 مغ/ل للإاجاص و 1مغ/ل للسفرجل.

وقد لوحظت ظاهرة الشفافية أيضاً عند إكثار النخيل بالأجنة، وذلك عند استخدام تراكيز عالية من السيٲوكينين (Zaid,1989 ، المعري 1995).

كما لابد من الإشارة إلى وجود تأثير واضح لنسبة السكروز في الوسط المغذي في معدل الإكثار وفي استطالة النموات المتكونة. إذ لوحظ أفضل تركيز يختلف باختلاف الأنواع النباتية بين 20-30 غ/ل. فالتركيز الخفيفة تزيد من احتمال إصابة النموات المتكونة بظاهرة الشفافية كما يكون معدل الإكثار منخفضاً. أما التراكيز العالية 50 غ/ل وما فوق وتعطي نموات خالية من الشفافية، ولكن نسبة استطالتها تكون منخفضة نسبياً. وهذا الأثر غير واضح في بعض الأنواع النباتية، وقد وجد بوضوح في التفاح والأجاص.

تتكون داخل الأنابيب أثناء طور الإكثار أوراق ذات شكل مورفولوجي وفيزيولوجي خاص يختلف عن الأوراق التي تتكون بالطبيعة، فقد تبين بأن أوراق النباتات داخل الأنابيب تحتوي على طبقة شمعية رقيقة، وعلى عدد من المسامات التي تبقى مفتوحة بشكل أقل بكثير من الأوراق التي تنمو طبيعياً، كما لوحظ بأن أوراق النباتات النسيجية ذات محتوى منخفض من الكلوروفيل والنظام الأنزيمي الخاص بالاصطناع الضوئي غير مكتمل مما ينعكس سلباً على عملية الاصطناع الضوئي التي تكون شبه معدومة في الأنابيب كما هو الحال في إكثار الكيوي (Gago et al.,2014).

كما لوحظ أن تركيز السكروز وشدة الإضاءة يؤثران تأثيراً واضحاً في محتوى الأوراق من اليخضور في الكيوي المكاثّر بالنسج، وكان أفضل تركيز من السكروز قد أعطى أعلى نسبة من اليخضور وهي 2.3%. تلعب طبيعة الوسط المغذي دوراً مهماً في إكثار العينات النباتية فقد لوحظت زيادة معدل الإكثار عند استخدام المحاليل السائلة في بعض الأنواع النباتية مثل في الفريز (Hanhineva et al.,2005) ، وكان الأثر سلبياً في أنواع أخرى، إذ أدت إلى زيادة ظاهرة الشفافية كما في العنب.

5-3-2-4- تأثير شروط النمو:

تؤثر الشروط الجوية في غرف النمو في إكثار العينات النباتية بالنسج. فعند انخفاض درجة الحرارة عن درجة الحرارة المثالية وهي بين 22 إلى 24 °م تتعكس بشكل سلبي في معدل إكثار العينات النباتية وفي استطالة النموات الجديدة المتكونة.

تستخدم عادة فترة ضوئية 16 ساعة إضاءة و 8 ساعات ظلام في معظم الأنواع النباتية المكاثرة بالنسج. تستخدم أحيانا نظام إضاءة مغاير في بعض الأنواع النباتية ولأغراض خاصة محددة. كما هو الحال في البطاطا يستخدم شروط نهار قصير (16 ساعة ظلام و 8 ساعات إضاءة) لتحريضها على تكوين درينات داخل الأنابيب.

تؤثر شدة الإضاءة في معدل إكثار العديد من الأنواع النباتية إذ تتطلب إضاءة ذات شدة ضعيفة إلى متوسطة، وزيادة شدة الإضاءة تحد من استطالة النموات المتكونة وتزيد من درجة تخشبها.

تؤثر الفترة الضوئية في نمو الخزعات النباتية المزروعة داخل الأنابيب، ففي ظروف النهار الطويل تكون نسبة النمو، ومحتوى اليخضور وعدد المسامات أعلى من ظروف النهار القصير (Jo et al, 2008). كما تبين أن شدة الإضاءة ونوعية الإضاءة تؤثر في نمو العينات النباتية المزروعة بالزجاج وإكثارها. فقد لوحظ بأن اللبد الأبيض أعطى نتائج إيجابية أفضل من الإضاءة بالفلورسنت الأبيض (Li et al., 2013). كما هو الحال في إكثار نبات الأوركيد *Vanilla planifolia* في المكسيك كان معدل الإكثار عالي، عند استخدام اللبد الأبيض واللبد الحمر مع الأزرق (Bello-Bello et al., 2016).

تؤثر الرطوبة الجوية في معدل إكثار بعض الأنواع النباتية، لأن انخفاض نسبة الرطوبة في غرف النمو تسرع من جفاف الأوساط المغذية والعينات النباتية وتقلل من إكثارها كما هو الحال في الورد.

5-3-3- تجذير العينات داخل الأنابيب:

يهدف طور التجذير إلى تكوين جذور ذات نوعية جيدة في النموات المتكونة أثناء طور الإكثار. تتكون مجموعة من النموات الخضرية التي يختلف عددها بحسب الأنواع النباتية، وليس كل النموات المتكونة صالحة للنقل إلى وسط تجذير.

يجب أن تكون النموات الصالحة للتجذير ذات نمو جيد طويلة ومستقيمة وغير مصابة بظاهرة الشفافية، وتحتوي أوراقاً جيدة التكوين ودرجة تخشب الساق جيدة وغير رفيعة. لهذا

السبب يجب التأكيد على نوعية النموات الجديدة المتكونة أثناء طور الإكثار حيث تشكل العينات الأساسية الصالحة للنقل إلى وسط التجذير بهدف الحصول على نباتات جيدة بعد تجذيرها داخل الأنابيب.

تختلف قدرة العينات النباتية على التجذير بحسب الأنواع النباتية، وحسب الأصناف والسلالات المختلفة، ويجب التركيز في نسبة التجذير الممكن الحصول عليها وفي نوعية الجذور المتكونة كما هو موضح في الشكل (3-5) .

ترتبط نوعية الجذور المتكونة بعدة عوامل :

1- كمية الكالوس المتكونة في قواعد العقل فكلما كانت نسبة الكالوس كبيرة تشكلت جذور ذات نوعية سيئة، لأن وجود الكالوس يؤدي إلى ضعف ارتباط الجذور مع العقلة نفسها، وبالتالي تصبح الجذور سهلة الانفصال عن النبات مما يؤدي إلى انخفاض في نسبة نجاح عملية التقسية، وقد لوحظت هذه المشكلة بشكل واضح في الإجاص (ALMaarri *et al.*, 1994).

2- عدد الجذور المتكونة .

3- سماكة الجذور المتكونة.

4- استطالة الجذور المتكونة.

تتصف الجذور بكونها ذو نوعية جيدة عندما تكون خالية أو تحوي الحد الأدنى من الكالوس وتحوي عدد جيد من الجذور الرفيعة والطويلة.

للحكم على قدرة النباتات على التجذير فلا بد من الحصول على نسبة تجذير عالية نسبيا 70-80% مع تكوين جذور ذي نوعية جيدة. حتى نحصل على نباتات كاملة صالحة للنقل إلى الظروف الطبيعية.

5-3-3-1-العوامل المؤثرة في تجذير العينات النباتية داخل الأنابيب:

ترتبط قدرة العينات النباتية على التجذير داخل الأنابيب بمجموعة كبيرة من العوامل. عوامل متعلقة بالنبات الأم والعينات نفسها، عوامل تتعلق بتركيب الأوساط المغذية، وعوامل متعلقة بشروط غرف النمو .

- العوامل المتعلقة بالنبات الأم:

إن كافة العوامل التي أثرت بطور الزراعة الأولية فهي تؤثر بدورها في قدرة العينات النباتية في التجذير. من هذه العوامل النوع النباتي واختلاف الأصناف، عمر النبات الأم، موعد زرع العينات النباتية، الحالة الصحية للنبات الأم.

1-النوع النباتي: تختلف قدرة الأنواع النباتية في تجذير والإكثار بحسب الأنواع. يوجد أنواع سهلة التجذير مثل البطاطا، التبغ، ونباتات متوسطة إلى صعبة التجذير بالنسج مثل الأشجار الفاكهة والخشبية، ونباتات صعبة جدا وهي تحتاج إلى معاملات كثيرة حتى تنمو وتتكاثر بالنسج مثل بعض الأشجار الحراجية وبعض أصناف النخيل.

يجب القيام بدراسة تفصيلية لكافة العوامل التي تؤثر في الإكثار والتجذير عندما يراد إكثار نوع نباتي بالنسج للتوصل إلى أفضل الشروط التي يمكن أن تعطي نتائج جيدة قابلة للتطبيق.

2-عمر النبات الأم: تتصف العينات المأخوذة من نباتات فتية بقدرة كبيرة على الإكثار والتجذير، أما العينات المأخوذة من أمهات معمرة فتكون قدرتها على الاستجابة للنمو متدنية، ونسبة تجذيرها منخفضة. لذلك يتم عادة تجديد فتوة الأشجار المعمرة وحيويتها لتستعيد قدرتها على النمو والإكثار بالنسج.

يعد معيار تجذير العينات النباتية بالأنابيب أحد المعايير الأساسية في اكتساب العينات النباتية المعمرة بعض صفات النباتات الفتية، وتزداد قدرتها على التجذير *Rejuvenation*. يعد زرع القمم المرستيمية أحد تقانات تجديد فتوة الأشجار المعمرة. ففي تجربة نفذت على أشجار هرمة من السيكويا *Sequoia sempervirens* بعمر 600 سنة . في حال الشاهد الفتية كانت نسبة التجذير عالية جداً ووصلت لأكثر من 90%. في حين كانت نسبة التجذير معدومة في الأشجار المعمرة. نفذت عملية النقل المتكرر للقمم المرستيمية بمعدل مرة كل شهر لمدة 24 شهراً، وقد تم نقل جزء من العينات إلى وسط تجذير. وقد لوحظ أن نسبة تجذير العينات المعمرة كانت معدومة حتى عملية النقل الـ14، بعدها بدأت تزداد نسبة التجذير بشكل تدريجي حتى وصلت إلى 70% في عملية النقل الـ24. وهذا يعني أن عملية الزرع المتكررة للقمم المرستيمية أدت إلى ازدياد تدريجي في نسبة نموها وتجذيرها مع الزمن

مما يدل على اكتسابها لبعض الصفات النباتية الفتية مع الزمن (Fouret *et al.*, 1987).

- تأثير عوامل المتعلقة بتركيب وسط المغذي الخاص بالتجذير:

يلعب تركيب الوسط المغذي دوراً مهماً في تجذير العينات النباتية في الأنابيب. ويختلف تركيب الأوساط المغذية الخاصة بالتجذير بحسب الأنواع النباتية. وهناك عوامل تدخل في تركيب الأوساط المغذية يكون لها أثر إيجابي في بعض الأنواع وقد لا تبدي الأثر نفسه على أنواع أخرى. ومن هذه العوامل: التركيب المعدني، الهرمونات النباتية، السكريز و تركيزه، طبيعة الوسط المغذي، بالإضافة بعض المركبات مثل الفلوروغليسنيول والفحم المنشط.

1-تأثير التركيب المعدني: يلعب التركيب المعدني دوراً مهماً في تجذير العينات النباتية بالنسج. ويختلف نوع المحلول المعدني المستخدم في تجذير الأنواع النباتية.

يستخدم المحلول المعدني لموراشيغ وسكوغ بكثرة في أوساط التجذير، ولكن لوحظ بأن هذا المحلول غني بالعناصر المغذية، لذلك لوحظ أن تخفيف MS إلى النصف أو ثلث مرات يزيد بشكل واضح في تجذير العينات في بعض الأنواع النباتية كالإجاص والتفاح والنخيل والورد. ففي الإجاص كانت نسبة التجذير باستخدام المحلول المعدني MS بشكل كامل لا تزيد عن 50% بينما عند تمديد نفس المحلول المعدني ثلاث مرات ، زادت نسبة التجذير بشكل كبير إلى أكثر من 80%. وهذا يدل أن وسط التجذير يتطلب تخفيف تركيز العناصر المعدنية في الوسط (ALMaarri *et al.*, 1994).

2-تأثير الهرمونات النباتية: تلعب الهرمونات النباتية دوراً مهماً في توجيه نمو العينات النباتية المزروعة بالنسج. يتوجب أن يكون الميزان الهرموني في وسط التجذير لصالح الأوكسين، أي أوكسين /سيتوكينين يجب أن يكون أكبر من واحد. ويفضل عدم إضافة أي سيتوكينين إلى وسط التجذير لان السيتوكينينات تثبط تكوين الجذور.

يختلف نوع الأوكسين المستخدم بحسب الأنواع النباتية. ففي بعض الأنواع NAA يعطي أفضل نتيجة كما هو الحال في الإجاص والسفرجل، وفي بعض الأنواع IBA يعطي أفضل

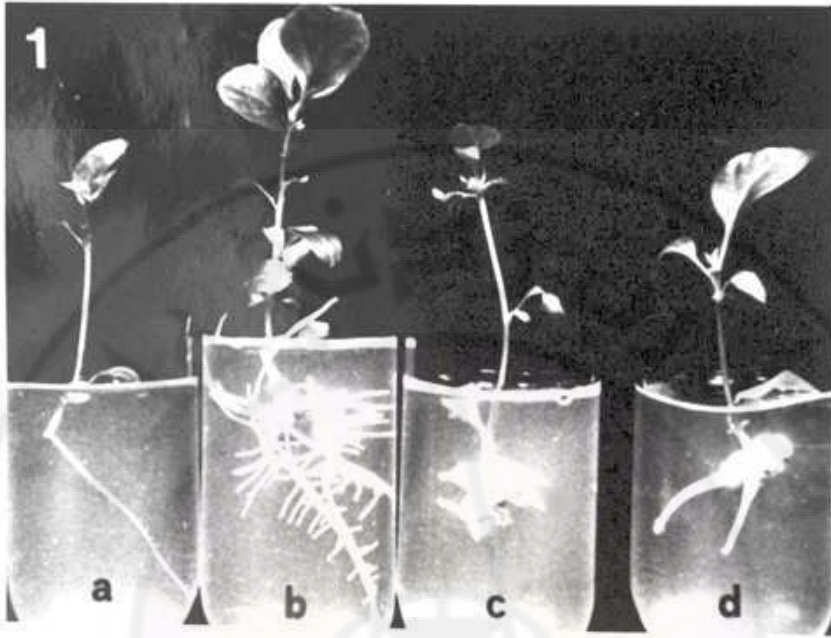
نسبة تجذير كما في التفاح، وفي بعض الأنواع الأوكسين IAA يعطي أفضل نسبة تجذير كما في العنب.

يلعب التركيز المستخدم دوراً مهماً في نسبة التجذير وفي نوعية الجذور المتكونة. ويختلف التركيز الأنسب باختلاف الأنواع النباتية. ففي تجربة على الإجاص فقد تم دراسة تراكيز مختلفة من الأوكسين NAA (0-0.2-0.5 - 1مغ/ل) وقد لوحظ التأثير الإيجابي للأوكسين في تنشيط تكوين الجذور، كلما زاد تركيز الأوكسين في الوسط المغذي زادت نسبة التجذير كما هو موضح بالجدول (5-5).

جدول (5-5): تأثير الأوكسين في تجذير الإجاص وفي نوعية الجذور المتكونة

تركيز NAA مغ/ل	% التجذير	نسبة الكالوس المتكونة	متوسط عدد الجذور المتكونة	استطالة الجذور سم	سماعة الجذور
0	20	0	2	4	رفيعة
0.1	80	+	3.5	2.8	رفيعة
0.5	90	++	5.2	1.5	وسط
1	100	+++	6.8	0.9	سميكة

=+ كالوس خفيف ، =++ كالوس وسط ، =+++ كالوس كبير



الشكل (5-5): تأثير تركيز الأوكسين في تجذير الإصاص

يتبين لنا من الجدول أن زيادة تركيز الأوكسين في الوسط، تزيد في نسبة التجذير وفي نسبة الكالوس المتكونة وفي عدد الجذور المتكونة، كما تعمل على تثبيط استطالة الجذور المتكونة (ALMaarri *et al.*, 1994).

تبين لنا أن نسبة الكالوس المتكونة في قواعد العقل تزداد مع زيادة تركيز الأوكسين في الوسط وهذه النقطة سلبية لأن تواجد الكالوس بكميات كبيرة يؤدي إلى ضعف ارتباط الجذور المتكونة بالعقل نفسها وبالتالي يمكن أن تفقد العقل جزءاً من جذورها أثناء عملية التقسية مما ينعكس سلباً في نسبة نجاح التقسية. وهناك عامل سلبي لسماكة الجذور أيضاً، كونه يحوي في أنسجة الجذر خلايا من الكالوس مع الجذر، فإذا نظرنا للنتائج التي تم الحصول عليها بالجدول (5-5) تبين أن أفضل تركيز هو 0.2 مغ/ل لأنه يعطي نسبة تجذير جيد ونوعية الجذور المتكونة تكون جيدة. كما هو موضح بالشكل (5-5).

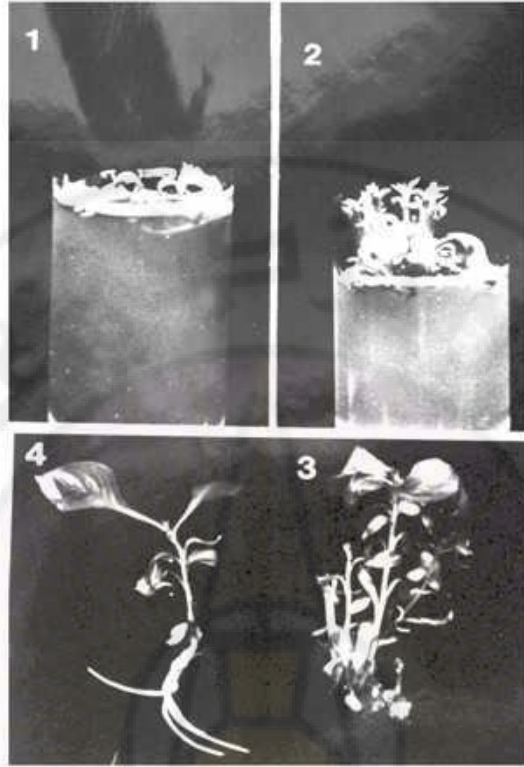
تتمثل هنا نوعية الجذور الجيدة بالعينات التي تحوي الحد الأدنى من الكالوس مع عدد جيد من الجذور الرفيعة جيدة الاستطالة.

3-تأثير تركيز السكر: يختلف تأثير السكر في الوسط في تجذير العينات النباتية بحسب الأنواع. يستخدم عادة 30 غ/ل من السكر في كثير من الأنواع النباتية. وقد دلت بعض التجارب زيادة نسبة تجذير بزيادة تركيز السكر بين 50-70 غ/ل، وخاصة في الأنواع الخشبية مثل الورد (Avramis,1982) ، السيكويا (Boulay,1977)، النخيل (ALMaarri& ALGhamdi,2001).

يمكن تفسير دور الإيجابي للسكر في الوسط المغذي في زيادة نسبة C/N في أنسجة العينات النباتية مما يزيد من فرص تكوين الجذور بالأنابيب.

4-تأثير إضافة الفلوروغليسينول: لوحظ أن إضافة بعض المواد الفينولية مثل الفلوروغليسينول Phloroglucinol أو الفلوروزين Fluoridzin ، تنشيط تكوين الجذور في بعض الأنواع النباتية صعبة التجذير مثل التفاح والخوخ، وقد لوحظ عدم وجود أي تأثير إيجابي في بعض الأنواع الأخرى مثل الإحاص.

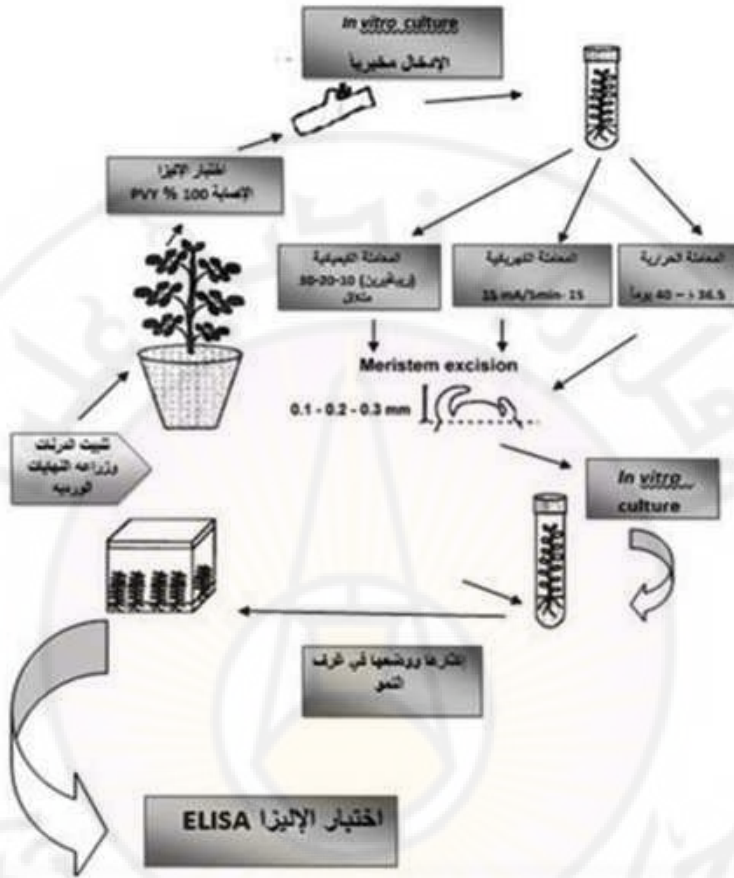
وبعض أصول التفاح (Hartmann & Kester,1983). ويبدو أن هذه المواد الفينولية تساعد عمل الأوكسين في تنشيط تكوين الجذور في بعض الأنواع والأصناف، ولا يظهر هذا الأثر المنشط في أنواع وأصناف أخرى.



الشكل (5-6): طور الإكثار (1-بداية الإكثار، 2 و3 بعد شهر) والتجذير (4) في الإجاص باس كراسان

- تأثير عوامل متعلقة بشروط غرف النمو:

تؤثر العوامل الجوية في غرف النمو في تجذير العينات النباتية، وخاصة عامل الإضاءة ونوعيتها. فقد لوحظ عند تعريض العينات النباتية لفترة ظلام لمدة أسبوع ثم تنقل إلى نظام إضاءة 16 ساعة و 8 ساعات ظلام، تزيد في نسبة تجذير العينات النباتية في بعض الأنواع في التفاح، الإجاص والسفرجل والمشمش (Hartmann& Kester,1983; ALMaarri *et al.*,1994). ويعود السبب بأن تعريض العينات إلى فترة ظلام تحمي من تدهور الأوكسين الداخلي بفعل الضوء مما يزيد في فرص تجذير العينات النباتية. ويوضح الشكل (5-7) إنتاج نباتات خالية من الأمراض الفيروسية بزرعة الميرستيم.



الشكل (5-7) : زراعة الميرستيم للحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية

5-3-3-4-آلية تكوين الجذور بالنسج :

تتكون الجذور بشكل أساسي من طبقة الكامبيوم في قاعدة النموات الخضرية المزروعة في وسط تجذير مناسب، أو من بعض الطبقات التي تحوي خلايا التي لها قدرة على التمايز الرجعي مثل الخلايا البارانشيمية. تختلف الفترة الزمنية اللازمة لتكوين ونمو الجذور باختلاف الأنواع النباتية المزروعة، ففي بعض الأنواع يمكن أن تجذر بـ 10-12 يوماً وفي بعض الأنواع تحتاج أسبوعين أو ثلاثة أسابيع وفي بعض الأنواع شهراً أو أكثر.

تتكون الجذور وفق المراحل الآتية:

1 - يلاحظ في الأيام الثلاثة الأولى من نقل العينات النباتية نشاط حيوي كبير على مستوى طبقة الكامبيوم حيث تعمل خلايا الكامبيوم على اصطناع وتكوين كافة المواد الضرورية اللازمة للانقسام الخلوي.

2- تبدأ بعض خلايا في طبقة الكامبيوم بالانقسام الشديد وتكون نواة قمة مرستيمية تتطور فيما بعد لتكون قمة مرستيمية جذرية.

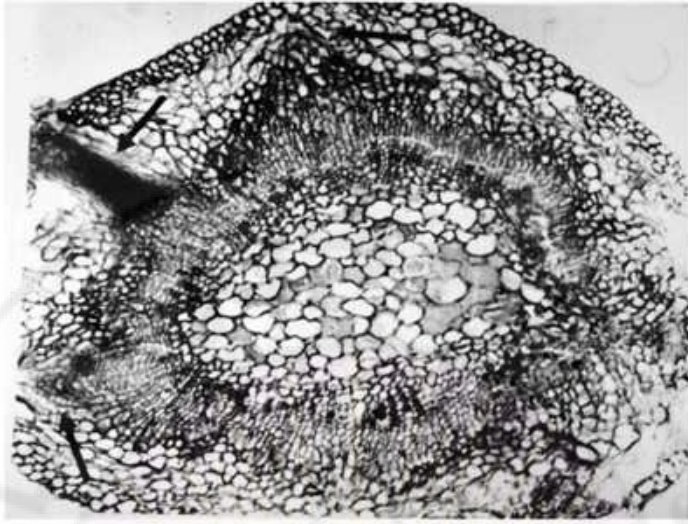
3- تستمر القمة المرستيمية المتكونة بالنمو وتبدأ باختراق الأنسجة الداخلية وتبدأ أيضا الخلايا المنقسمة الداخلية على التمايز وتكوين أنسجة الجذر المختلفة من أوعية ناقلة خشبية وغريالية تتصل بشكل أساسي مع الأوعية الناقلة في الساق كما هو موضح بالشكل (5-8).

4- تتابع القمة الجذرية نموها واختراقها لأنسجة العقلة في قاعدة حتى ترى بالعين المجردة وهنا تتابع القمة المرستيمية انقسامها واستطالتها وتكوين الأنسجة الجذرية الجديدة بشكل كامل.

5-3-4- تقسية النباتات إلى الظروف الطبيعية ونقلها:

تعد عملية التقسية من العمليات المهمة في التكاثر الخضري الدقيق، ولا يمكن أن تنجح عملية الإكثار ما لم يتم نقل النباتات المجذرة بالأنابيب إلى الظروف الطبيعية بنجاح.

تحتاج عملية التقسية توافر بيوت زجاجية وبيوت بلاستيكية مجهزة بأجهزة تحكم بالحرارة والرطوبة والإضاءة والري. كما تحتاج مراقب مدقاة ومظلات لحماية النباتات الصغيرة من أشعة الشمس المحرقة في أيام الصيف.



الشكل (5-8): مقطع تشريحي يوضح تكوين الجذر في نبات مكائر بالنسج

تتطلب عملية نقل النباتات من الأنابيب إلى الظروف الطبيعية، عناية خاصة وكبيرة لكون هذه النباتات رقيقة وحساسة جداً لعوامل الجوية الخارجية، لهذا لا بد من توافر ظروف جوية مقاربة مع ظروف غرف النمو، وبخاصة في المرحلة الأولى من النقل. كما يجب تأمين وسط تربة جيد التهوية، خفيف جيد الاحتفاظ بالماء وجيد الصرف حتى يسمح بنمو الجذور وتكوين جذور جديدة. ولابد أيضاً من حماية النباتات الصغيرة من الأمراض والحشرات عن طريق تعقيم وسط التربة المستعمل، بالإضافة إلى استبعاد أي مصدر لتلوث النباتات وأخذ الاحتياطات الكافية لحمايتها.

تتصف النباتات النسيجية داخل الأنابيب بكونها غير ذاتية التغذية Heterotrophic تعتمد اعتماداً كلياً في تأمين احتياجاتها الغذائية على الوسط المغذي. لذلك تكون لها فيزيولوجية خاصة فالأوراق تحوي على مسامات غير وظيفية، تبقى مفتوحة بشكل دائم. الأوراق التي تتكون داخل الأنابيب ذات محتوى منخفض من الكلوروفيل، ويوجد خلل بالنظام الأنزيمي الخاص بالاصطناع الضوئي مما يؤدي إلى ضعف أو عدم حدوث الاصطناع

الضوئي داخل الأنابيب كما هو ملاحظ في أوراق نبات الكيوي المكاثر بالنسجة (Gago et al., 2014). يختلف الشكل المورفولوجي والفيزيولوجي لأوراق نباتات الأنابيب، عن الأوراق التي تتكون في النباتات الطبيعية. كما يلاحظ وجود طبقة كيتينية أو شمعية قليلة السماكة، لذلك تكون حساسة لأي إجهاد بيئي مثل الجفاف أو حساسة للإصابة بالأمراض الفطرية والحشرية.

كما تكون الجذور المتكونة في الأنابيب غير وظيفية في كثير من الأنواع النباتية، فهي لا تستطيع القيام بعملية امتصاص الماء والأملاح المعدنية من التربة.

يتوجب عند عملية التقسية تقديم كافة الخدمات اللازمة لتغيير فيزيولوجية النباتات من نباتات غير ذاتية التغذية إلى نباتات ذاتية التغذية Autotrophic . هذا يعني يجب العناية بالنباتات حتى تستطيع تكوين أوراق جديدة تحوي طبقة كيتينية أو شمعية، كما تحوي على مسامات طبيعية تفتح وتغلق بعكس المسامات الموجودة في الأوراق النسيجية التي تبقى مفتوحة، وتستطيع القيام بعمليات الفيزيولوجية المختلفة وخاصة الاصطناع الضوئي. كما تعطي فرصة لتكوين جذور جديدة قادرة على القيام بعمليات الامتصاص والنشاط الحيوي.

تتطلب عملية تحويل النباتات من نباتات غير ذاتية التغذية إلى نباتات ذاتية التغذية تعتمد على نفسها في تأمين الغذاء، تأمين جو مشبع بالرطوبة في المرحلة الأولى وخاصة الأسبوع الأول مع تربة خفيفة ومعقمة، ودرجة حرارة تشبه درجة الحرارة الموجودة في غرف النمو. تخفض الحرارة والرطوبة الأرضية والجوية بشكل تدريجي مع الزمن حتى تتأقلم النباتات مع الظروف الجديدة وتصبح قادرة بالاعتماد على نفسها.

يتم إخراج النباتات من الأنابيب بحذر بواسطة ملاقط طويلة، وتغسل بالماء الفاتر الجاري بهدف تخليص النباتات من بقايا الوسط المغذي قبل زرعها بحذر وانتباه في وسط التربة الجديد مثل البرلايت أو الفرميكولايت أو التورب المعقم. إن عملية إزالة بقايا الوسط المغذي عملية مهمة، حتى لا نسمح للأحياء الدقيقة بمهاجمة النباتات المنقولة، وإصابتها بالأمراض والتعفنات.

تختلف نسبة نجاح تقسية النباتات الناتجة بزراعة النسيج بحسب الأنواع النباتية، وحسب توفر الظروف المثالية لتنفيذ هذه العملية، ففي بعض الأنواع تسبب عملية تقسية النباتات

مشكلة في بعض المناطق الجافة والحارة كما هو الحال في النخيل. وفي بعض الأنواع الأخرى تكون نسبة النجاح عالية أكثر من 90% كما هو الحال في الجريبيرا، ويوضح الشكل (5-9) نبات إجااص بعد 3 أشهر من التقسية.



الشكل (5-9): تقسية النباتات النسيجية نبات إجااص بعد 3 أشهر من النمو.

تتأثر نسبة نجاح التقسية بعدة عوامل، منها الشروط الجوية كالحرارة والرطوبة والإضاءة والتهوية، والوسط المستعمل يجب أن يؤمن تهوية جيدة ليسمح بنمو المجموع الجذري بشكل مبكر وبسرعة. كما تؤثر بعض المعاملات أثناء طور التجذير في نسبة نجاح التقسية مثل تركيز الأوكسين المستخدم، وتركيز السكر، وتركيز الآجار. فقد وجد بالتجربة في بعض الأنواع النباتية رفع تركيز الأوكسين يزيد من تكوين الكالوس في قاعدة العقل المجذرة وهذا ينعكس بشكل سلبي في نسبة نجاح التقسية (Martin, 1983). وقد وجد بالتجربة أيضا بأن زيادة السكر والآجار في الوسط المغذي الخاص بالتجذير تحسن من نسبة نجاح تقسية النباتات المعمرة العشبية (Hartmann&Kester, 1983).

تؤثر فترة بقاء العينات في وسط التجذير في نسبة نجاح التقسية، فقد دلت التجارب في بعض الكرز، فقد لوحظ أن نقل النباتات بعد 15 يوماً كانت نسبة نجاح التقسية عالية بينما لم تتجاوز 10% عند نقل النباتات بعد فترة 45 يوماً من الزرع في وسط التجذير (Marin and Gella, 1985).

5-4- تجذير النموات الخضرية في البيت الزجاجي مباشرة:

تعد عملية تجذير النموات الخضرية المتكونة في طور الإكثار مباشرة داخل البيت الزجاجي مهمة في التكاثر الخضري الدقيق، فهي تسمح بتجذير العينات وتنفيذ عملية التقسية في وقت واحد، وهذا أمر مهم بالنسبة للناحية الاقتصادية حيث يتم توفير مرحلة كاملة من مراحل الإكثار. تتطلب هذه العملية توفر مرافق خاصة داخل البيوت المحمية مع حرارة مناسبة ورطوبة عالية.

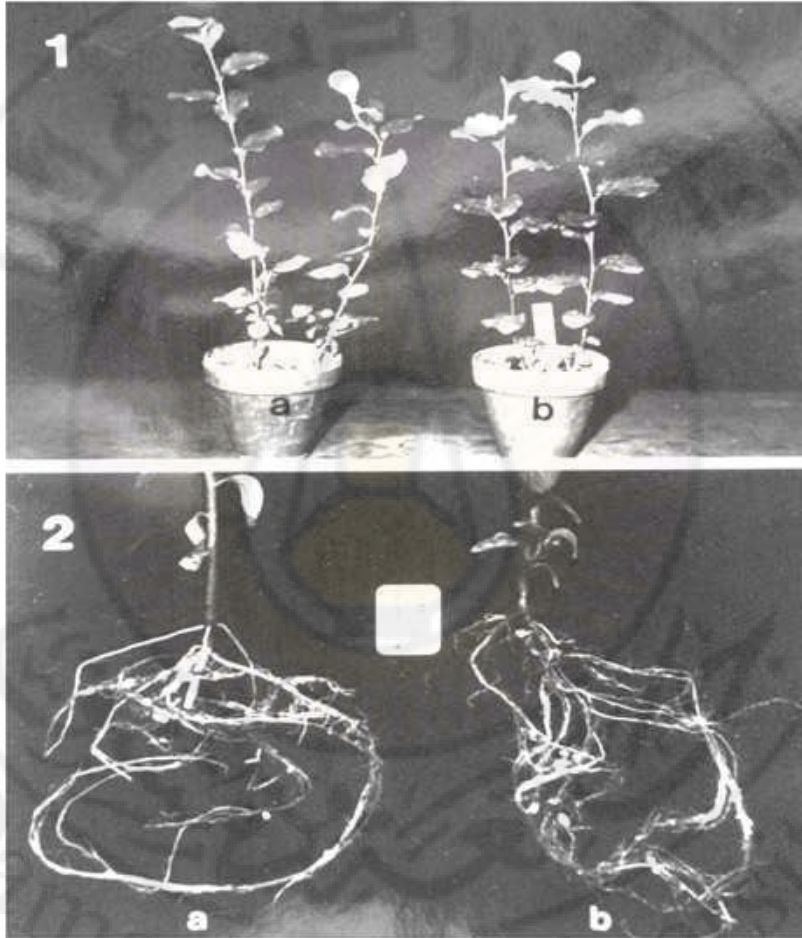
تختلف قدرة النموات الخضرية في التجذير المباشر في البيوت المحمية بحسب الأنواع النباتية، وحسب عمر النبات الأم، وحسب تركيز الأوكسين المستخدم وفترة المعاملة. والوسط المستخدم.

ففي تجربة أجريت في ثلاثة أنواع نباتية إجااص فتي، إجااص معمر والسفرجل باستخدام ثلاث تراكيز من الأوكسين NAA وهي 10-50-100 مغ/ل لمدة ساعة. ثم زرعت العينات في مرقد خاص داخل البيت المحمي في وسط من الفيرميكوليت المعقم، وقد تم المحافظة على درجة حرارة ورطوبة عالية أثناء فترة 30 يوماً وهي فترة تنفيذ التجربة. ويوضح الجدول (5-6) بأن نسبة التجذير كانت في النباتات الفتية عالية في كافة تراكيز الهرمون المستخدمة. واختلفت نسبة التجذير في العينات المأخوذة من نباتات معمرة بحسب تركيز الأوكسين.

جدول (5-6): تجذير النموات الخضرية مباشرة في البيت المحمي.

النوع النباتي	تركيز الأوكسين NAA المستخدم مغ/ل	نسبة المنوية لتجذير العينات في البيت المحمي
إجاص فتي	10	100
	50	100
	100	100
إجاص معمر	10	16
	50	50
	100	75
السفرجل	10	58
	50	86
	100	50

كما لوحظ أن التركيز الأنسب من الأوكسين يختلف باختلاف الأنواع والأصناف النباتية (ALMaarri,1986). ويوضح الشكل (5-10) عملية تجذير النموات مباشرة بالبيت المحمي ومقارنة نمو المجموع الجذري في السفرجل بين عينات نباتية جذرت مباشرة مع عينات جذرت بالأنابيب. وقوة النمو الخضري بعد ثلاثة شهور من عملية التجذير.



الشكل (5-10): مقارنة بين تجذير النباتات في البيت الزجاجي (a2) والتجذير بزراعة النسيج (b2) في السفرجل.

5-5-المعوقات الفيزيولوجية في التكاثر الخضري الدقيق:

5-1-مقدمة:

لوحظ من خلال التجارب والأبحاث، وجود بعض المعوقات الفيزيولوجية التي تظهر أثناء مراحل التكاثر الخضري الدقيق للنباتات. يمكن لهذه المشكلات أن تخفض من الإنتاج، وتحد من نجاح إكثار النخيل بالأنسجة، وتقلل من معدل الإكثار، ومن عدد النباتات الناتجة ذات المواصفات الجيدة. تعزى أسباب هذه المشكلات إلى عدة عوامل، منها ما هو متعلق بالجزء النباتي نفسه، وبالحالة الفيزيولوجية للنبات الأم، ومنها ما هو متعلق بتركيب الأوساط المغذية، ومن هذه المشكلات نذكر:

- أ- إفراز مواد سامة في الوسط المغذي تؤدي إلى ظهور الاسمرار على الأجزاء النباتية المزروعة وتنتهي بتحلل الجزء النباتي المزروع وموته.
- ب- ظهور مرض الشفافية على الأجزاء النباتية المزروعة أثناء مراحل مختلفة من الإكثار.
- ج- تدهور الكالوس الجنيني، وفقدان قدرته على تكوين الأجنة والإكثار.
- د- ظهور الكالوس بكميات كبيرة على قواعد النباتات أثناء طور التجذير، مما يقلل من نجاح عملية التقسية.
- هـ - الثبات الوراثي للنباتات الناتجة بالأنسجة وظهوره في بعض الأحيان، نباتات شاذة أو مغايرة للنبات الأم.

5-5-2-ظاهرة الاسمرار Browning:

تعمل الأجزاء النباتية المزروعة على أوساط مغذية، على إفراز بعض المركبات السامة داخل الوسط مثل المركبات الفينولية التي تؤدي إلى اسمرار المحلول والجزء النباتي المزروع واسوداده. وبعد فترة من الزمن يتحلل الجزء النباتي ويؤدي إلى موته. ويعمل معظم الباحثين سبب الاسمرار الحاصل في الأجزاء النباتية المقطوعة، وبالتالي الوسط الملامس لها إلى أكسدة الفينولات المتعددة التي تصبح نتيجة قطع الأجزاء النباتية بتماس مع أنزيمات الأكسدة، وتتحول هذه المركبات الفينولية إلى كوينونات ذات السمية العالية للنبات. ويلاحظ ظهور الاسمرار في الوسط المغذي، إذ يتدرج اللون من الأصفر إلى

البنّي الغامق والأسود. ويعتقد أن تثبيط حيوية الجزء النباتي ثم موته يعود أيضاً إلى الارتباط الحاصل بين الفينولات والبروتين، مما يؤدي إلى فقدان فعالية العديد من الأنزيمات. أما الأنزيمات المسؤولة عن ظاهرة الاسمرار فهي البولي فينول أوكسيديز Poly phenol oxidase وأنزيم البيروكسيديز Pyroxydase هي الأنزيمات المسؤولة عن ظاهرة الاسمرار.

إن ظاهرة الاسمرار مشكلة كبيرة في النخيل (الشكل 5-11)، وتحد من نجاح عملية الإكثار. وقد واجهت هذه المشكلة تقريباً جميع العاملين في مجال إكثار النخيل بالأنسجة. وتتعلق هذه الظاهرة بكثير من العوامل، يمكن إيجازها بالآتي:

-عوامل متعلقة بالنبات نفسه:

مثل عمر الجزء النباتي المستخدم، درجة تمايز الأنسجة المستخدمة، نوعية الجزء النباتي المزروع، موعد الزراعة. فقد دلت التجارب أن القمة النامية تتعرض للاسمرار بشكل أقل من الورىقات الأولية والتي بدورها تتعرض لظاهرة الاسمرار بشكل أقل من الورىقات الخضراء المتميزة. وقد لوحظ أن المبادئ الزهرية المزروعة أقل تعرضاً للاسمرار من القمم النامية والورىقات الأولية. وتبين أيضاً بأن لموعد الزراعة تأثير على فرز المركبات الفينولية حيث لوحظ أن الأجزاء النباتية المزروعة في تشرين الثاني أقل تعرضاً لظاهرة الاسمرار من الأجزاء المزروعة في الصيف (Al Maarri et Al Ghamdi, 1995).

-عوامل متعلقة بالوسط المغذي:

تركيب الوسط المغذي، تركيز الهرمونات النباتية ونوعيتها، التركيب المعدني للوسط المغذي، نوعية الآجار المستخدم، التوازن الهرموني بين NO_3^- و NH_4^+ واليوتاسيوم. فقد دلت التجارب أن ارتفاع نسبة NH_4^+ في الوسط المغذي يعمل على زيادة حموضة الوسط المغذي والذي يرافقه انخفاض واضح في امتصاص عنصر البوتاسيوم وهذا يؤثر بشكل مباشر في زيادة إفراز المركبات الفينولية في الوسط المغذي، ويقلل من تكوين الكالوس الجنيني.

وتجدر الإشارة إلى أن زيادة تركيز الهرمونات النباتية مثل الأوكسينات والBAP يزيد بشكل واضح من ظهور المركبات الفينولية (المعري، 1995).

-عوامل تتعلق بالظروف الجوية في غرف النمو:

مثل درجة الحرارة، وشدة الإضاءة. فقد دلت التجارب أن ارتفاع درجة الحرارة تزيد في ظاهرة الاسمرار، وظهور المركبات الفينولية السامة في الوسط المغذي. كما أن شدة الإضاءة تزيد من ظاهرة الاسمرار بالمقارنة مع الظلام.

-عوامل تتعلق بالتعقيم وطريقة الزراعة:

تزداد ظاهرة الاسمرار عند استخدام تراكيز عالية من المادة المعقمة، لفترة طويلة أثناء عملية التعقيم، وهذا يؤدي إلى إضعاف الأجزاء النباتية في الوقت نفسه. وتتوجب زراعة الأجزاء النباتية بعد تعقيمها مباشرة، لأن تركها لفترة قبل زراعتها يزيد في ظهور المركبات الفينولية السامة، ويتوجب عدم تجريح الأجزاء النباتية كثيراً. عند عملية النقل إلى وسط جديد أو Subculture لأن القطع والتجريح يزيد من ظاهرة الاسمرار. يتم الحد من ظاهرة الاسمرار بمعاملة الأجزاء النباتية بمواد مضادة للأكسدة التي تحد من ظهور المركبات الفينولية. أو بإضافة هذه المواد إلى الوسط المغذي.

فقد دلت التجارب أن إضافة الفحم المنشط إلى الوسط المغذي يعمل على امتصاص المركبات الفينولية المفزة في الوسط المغذي، وبهذا الشكل يحافظ على الأجزاء النباتية سليمة من الاسمرار، ينصح عند استعمال الفحم المنشط زيادة تركيز الهرمونات النباتية المضافة إلى الوسط لأنه جزءاً كبيراً منها يمتص أيضاً من قبل الفحم المنشط.

وقد تم استخدام مواد أخرى مثل مزيج من حمض الأسكوربيك وحمض الستريك داخل الوسط أعطى نتيجة إيجابية، في حين لم يحد هذا المزيج من ظاهرة الاسمرار عند إضافته إلى الوسط من قبل. ولا ينصح بعض الباحثين باستعمال المزيج المذكور داخل الوسط المغذي لأنه يشجع نمو البكتيريا ويزيد من نسبة التلوث.

كما استخدمت مواد أخرى في الحد من ظاهرة الاسمرار مثل البوليفينيل بيروليديون (PV.P)، والكافيين Caffeine، وكان لها أثر إيجابي في الحد من ظاهرة الاسمرار. كما دلت الأبحاث على أن عملية النقل المتكرر وعلى فترات قصيرة أثبتت فاعلية في الحد من ظاهرة الاسمرار.

5-5-3-مرض الشفافية Vitrification :

تعد ظاهرة الشفافية من أكثر الأمراض الفيزيولوجية خطورة التي تصيب النباتات في مرحلة الإكثار، وتؤدي إلى إضعاف النباتات، وتفقد قدرتها على الإكثار والتجذير، وإذا جذرت يتم الحصول على نباتات رهيقة، ضعيفة تكون نسبة نجاحها عند نقلها إلى الشروط الطبيعية محدود جداً. اكتشف مرض الشفافية في كثير من الأنواع النباتية التي تم إكثارها بالأنسجة مثل التفاح، السفرجل، الكمثرى، الورد، الصفصاف، الكرمة، والنخيل.

تتصف النباتات المصابة بمرض الشفافية بساق رفيع، شاحب اللون، شفاف، المسافة العقدية كبيرة، وتكون الأوراق متطاولة وشفافة وملتفة وقليلة اليخضور وتتصف خلايا الأوراق بقوامها الاسفنجي ذات فجوات كبيرة وتكون المسامات قليلة، وغالباً مغلقة. كما تحوي النباتات المصابة على كمية ضئيلة من الكامبيوم والأوعية الناقلة.

كما تتصف النباتات المصابة بمرض الشفافية بضعف نموها وضعف قدرتها على الإكثار والتجذير، وسريعة التلف. وقد دلت الدراسات التشرحية التي أجريت على الإجاص بأن النباتات المصابة بمرض الشفافية يكون فيها عدد طبقات الخشب أقل بكثير من النباتات السليمة أما في النخيل فقد لوحظ مرض الشفافية في الكالوس بسبب إلى زيادة تركيز الهرمونات في الوسط المغذي. وقد تمت مشاهدة مرض الشفافية في النخيل على الكالوس وعلى الأجنة كما هو موضح بالشكل (5-12)، وبعض الأجزاء النباتية المزروعة إذ تصبح الأجزاء النباتية شفافة ويزيد محتواها المائي وتميل للأسمرار. وتصبح الأجنة الصغيرة المصابة شفافة، وتفقد قدرتها على النمو الطبيعي وتميل للأسمرار. وفي نهاية الأمر يتوقف نموها وتسمر وتموت

(Al-Maarri et Al-Ghamdi, 1995).

تعزى أسباب مرض الشفافية في النخيل إلى عدة عوامل. فقد ظهرت الإصابة بكثرة عند استخدام المحلول السائل (Al-Maarri et Al-Ghamdi, 1995). وأيضاً ظهر مرض الشفافية عند استخدام تراكيز عالية من الهرمونات النباتية، كما لوحظ مرض الشفافية على أجنة النخيل عند استخدام المحلول المعدني لموراشيج وسكوغ دون إضافة الفحم. والسبب أن هذا المحلول يحوي تراكيز عالية من الأمونيوم NH_4^+

(Al-Maarri et Al-Ghamdi, 1995). ويوضح الجدول (5-7) أسباب مرض الشفافية وطرائق الوقاية منها في بعض الأشجار المثمرة.

الجدول (5-7): أسباب مرض الشفافية وكيفية الوقاية منها في بعض الأشجار المثمرة (المعري 1995):

النبات	السبب	العلاج	المرجع
الدراق	زيادة عنصر الكلور في الوسط	إضافة المركبات على شكل كبريت وتخفيض الكلور	Quoirin et Lepoivre, 1977
البرقوق	نقص تركيز الآجار	زيادة تركيز الآجار	Rolland et Corner, 1981
السفرجل	زيادة السيتوكينين	تخفيض تركيز السيتوكينين	Al-Maarri et al, 1987
الصفصاف	زيادة الأوكسين والسيتوكينين	تخفيض تركيز الهرمونات	Beauchesne, 1981
الإجاص	زيادة تركيز عنصر الأمونيوم NH_4 + تركيز السكر قليل	تخفيض نترات الأمونيوم، زيادة السكر في الوسط	Al-Maarri, 1986
العنب	محلول سائل	استخدام محلول صلب	Monette
النخيل	زيادة تركيز الهرمونات	تخفيف الهرمونات	Zaid M. 1989
النخيل	محلول سائل، زيادة السيتوكينين	استخدام محلول صلب ، تخفيض السيتوكينين	Al-Maarri et Al-Ghamdi, 1995

وقد لوحظ أن نباتات النخيل المكاثرة على وسط مغذي يحوي على الفحم المنشط لا تظهر به هذه الظاهرة، مما يدل على أن الفحم المنشط يمكن استخدامه كعلاج في التخلص من ظاهرة الشفافية وبخاصة عند استخدام تقانة الأجنة الخضرية في إكثار نخيل التمر.

وقد دلت الأبحاث الحديثة التي أجريت على النباتات المصابة بمرض الشفافية انخفاض وزنها الجاف بالمقارنة مع النباتات السليمة، كما تزداد كمية الماء بشكل كبير في النباتات المصابة، وفي الوقت نفسه يلاحظ انخفاض مقدار السلولز، وانخفاض نشاط أنزيمات البيروكسيداز، ونقص في اللغنين في النباتات المصابة بالمقارنة مع النباتات السليمة.

5-5-4- تكون الكالوس على قواعد النباتات:

يعد تكون الكالوس على قواعد العقل أثناء طور التجذير والإكثار أمراً غير مرغوب فيه، ففي حال إكثار النخيل بالبراعم، يمكن أن يؤدي ظهور الكالوس على قواعد الأجزاء النباتية إلى تطور بعض البراعم بدءاً من الكالوس، وفي هذه الحالة يمكن أن تظهر بعض النباتات المغايرة في تركيبها الوراثي عن النبات الأم. ولذلك يتوجب استبعاد جميع النباتات المشكوك بها. أما فيما يتعلق بطور التجذير، فإن تكون الكالوس على قواعد النموات أثناء مرحلة التجذير أمر غير مرغوب، لأنه يضعف درجة ارتباط الجذور مع النبات الأصلي، وبالتالي تقل فرصة نجاح عملية التقسية إذ تنفصل في هذه الحالة، ويمكن أن تتكون بعض الجذور من الكالوس ولا تكون مرتبطة بالنبات الأم مما يسهل فصلها عند عملية التقسية.

ولذلك يجب استبعاد النباتات التي تظهر عليها هذه الحالة، كما يتوجب العمل على الحد من تكون كميات كبيرة من الكالوس على قواعد النموات أثناء طور التجذير. ويمكن ذلك عن طريق تخفيف تركيز الأوكسينات المستخدمة في الوسط المغذي الخاص بالتجذير.

5-5-5- تدهور الكالوس الجنيني، وفقدان قدرته على تكوين الأجنة Callus Degradation:

يفقد الكالوس الجنيني قدرته على تكوين الأجنة الخضرية والإكثار عبر الزمن، من خلال عمليات النقل المتكرر على المحلول نفسه لفترة طويلة. وقد لوحظت هذه الظاهرة في عدة أنواع نباتية مثل التبغ، الجذر، الخس... (Margara, 1982).

فقد أوضحت التجارب أن الكالوس يحتفظ بقدرته على الإكثار، وتكوين الأجنة الخضرية لفترة زمنية. ويلاحظ بعد عدة عمليات من النقل المتكرر على وسط مغذٍ محدد أن الكالوس تنخفض قدرته على تكوين الأجنة الخضرية تدريجياً حتى تصل إلى مرحلة تتوقف تماماً ويقال بأن الكالوس أصبح متدهوراً، وبعد فترة من الزمن نتيجة لعمليات النقل المتكرر.

يبدأ ظهور بعض التغيرات على مستوى التركيب التشريحي للكالوس الجنيني إذ يلاحظ تهشم الطبقة الخارجية للكالوس، ويتحول من الشكل الحبيبي إلى الشكل الرخو. وتتراكم في بعض الخلايا المركبات الفينولية، ويأخذ اللون المسمر إلى البني، ويصاب بمرض الشفافية. ويفقد الكالوس قدرته على تكوين الأجنة والانقسام، وينتهي بتدهور الكالوس Callus degradation وعلى مستوى الخلايا يصغر حجم السيتوبلازما، وتزداد نسبة الماء والفجوات في الخلايا، وتصبح الخلايا شفافة وتفقد في النهاية قدرتها على الانقسام.

ولم تعرفا لأسباب الحقيقية للتدهور إلى الآن، ولكن وضعت عدة فرضيات منطقية تفسر التدهور الذي يحصل في الكالوس ومن هذه الفرضيات:

أ- يمكن أن تعزى أسباب التدهور إلى أسباب وراثية، اختلاف في عدد الكروموزومات الموجودة في الخلايا (Aneaploidy, Polyploidy). وقد لوحظت هذه التغيرات في الكروموزومات في الكالوس والتي تؤدي إلى تدهوره.

وقد دلت الأبحاث بوجود علاقة وثيقة بين تغير التركيب الوراثي وقدرة الكالوس على إعطاء نباتات كاملة في التبغ. وإن التغير في عدد الكروموزومات الموجودة في خلايا الكالوس يؤدي إلى توقف قدرة هذا الكالوس على إعطاء نباتات كاملة.

وتجدر الإشارة إلى أنه يمكن أن يحدث توقف في قدرة الكالوس على تكوين الأجنة مع الزمن دون حدوث تغير في التركيب الوراثي.

ب- يمكن أن تعزى أسباب التدهور في الكالوس إلى عوامل فيزيولوجية غذائية أو هرمونية. إذا يلاحظ بأن الكالوس يحتاج إلى بعض المركبات أو الهرمونات حتى يتابع نموه وتكوين الأجنة، وهذه المواد تستهلك مع الزمن وبالتالي يحدث التدهور (Margara, 1982).

وقد لوحظ ظهور التدهور في الكالوس عند استخدام تراكيز هرمونية عالية وخاصة 2.4.D. وذلك مع مرور الزمن، وعلى الرغم من الثبات الوراثي للكالوس.

كما دلت بعض التجارب أن قدرة الكالوس على تكوين الأجنة يمكن أن تتوقف عبر الزمن نتيجة استخدام وسط مغذٍ خالي من 2.4.D. وتُعزى الأسباب إلى استهلاك المحتوى الداخلي من هذا الهرمون الذي يعد عاملاً مهماً لتكوين الأجنة الخضرية. وفي الحقيقة فإن الأمر أعقد من ذلك، وإلى الآن لم تعرف الأسباب الحقيقية لتدهور الكالوس الجنيني. وفقدان قدرته على تكوين الأجنة.

يلجأ العلماء حالياً للحفاظ على أكبر فترة ممكنة من الكالوس الجنيني، وبعيداً عن التدهور، إلى حفظ قسم منه على درجات منخفضة جداً بالتجميد - 196م بالآزوت السائل، ويمكن في هذه الطريقة حفظ الكالوس الجنيني لفترة غير محدودة. وقد أثبتت هذه الطريقة جدواها.

5-6- التدرن الدقيق المخبري *Microtuberisation*:

5-6-1- مقدمة :

تستخدم تقانة التدرن الدقيق بالنسج في إنتاج بذار المحاصيل الدرنية مثل البطاطا العادية والبطاطا الحلوة. تعد البطاطا من أحد أهم المحاصيل الزراعية في العالم وأحد الأغذية الأساسية في البلدان النامية، ويرجع ذلك لوفرة غلتها، وتنوع الظروف البيئية التي تنمو فيها، كما تستخدم علفاً للحيوانات وفي الصناعة إذ يستخرج منها النشاء والكحول وبعض الأحماض العضوية مثل الستريك واللاكتيك. وتستهلك في صناعة الورق والمنسوجات.

يتوقف مردود البطاطا في وحدة المساحة على عوامل كثيرة معروفة، منها العمليات الزراعية المختلفة، والظروف البيئية ومدى ملائمة التربة والصفات الوراثية للصنف المزروع ومن أهم العوامل المؤثرة في الإنتاجية جودة البذار وخلوه من الإصابات المرضية وخاصة البكتيرية والفيروسية.

5-6-2- إنتاج بذار البطاطا بالنسج:

تعد تقانات زراعة الأنسجة النباتية الطريقة المثلى والمتبعة في معظم أنحاء العالم لإكثار بذار أصناف البطاطا الخالية من الأمراض الفيروسية وذلك عن طريق استخدام الزراعة المرستيمية كنقطة انطلاق. (Manthel *et al.*, 1978; Ermishin 1994).

ولما كانت البطاطا تتكاثر خضرًا بالدرنات وهذه الطريقة تتيح الفرصة لانتقال الإصابات المرضية من الآباء إلى الأجيال اللاحقة وخاصة تلك التي لا يمكن مقاومتها مثل الأمراض الفيروسية عبر الأجيال وتؤدي إلى نقص حاد بالمحصول الدرني ، والتدهور الفيزيولوجي لبذار البطاطا نتيجة زراعته عدة مواسم متتالية.

لذلك لابد من وضع برنامج لإكثار بذار البطاطا يبدأ من الزراعة المخبرية، ويمر بالزراعة في البيوت الزجاجية والبلاستيكية حتى الزراعة الحقلية المكشوفة بهدف إنتاج البذار الخالي من الأمراض وخاصة الفيروسية.

يتم إكثار البطاطا بالنسج بطريقتين:

- 1- إنتاج شتول بأعداد كبيرة بالنسج بعد تقسيئها في البيوت الزجاجية.
- 2- إنتاج درينات دقيقة Microtubers بالمختبر باستخدام اوسط مغذية

5-6-3- مزايا إكثار البطاطا بزراعة الأنسجة:

يتم الحصول على كميات كبيرة من الشتول أو الدرينات الدقيقة الخالية من الأمراض الفيروسية خلال فترة زمنية محدودة. تمثل هذه المادة النباتية الناتجة نواة لإنتاج بذار على النطاق التجاري (Bajaj,1987).

تتصف النباتات المكاثرة بالنسج بإنتاجية عالية بالمقارنة مع انتاجية النباتات المكاثرة بالدرنات ((Donnelly et al., 2003).

يسهل تبادل الأصناف بين الدول دون نقل الأمراض، كون العينات النباتية مزروعة في وسط معقم خال من التلوث. إمكانية حفظ الأصناف والمصادر الوراثية من التدهور لفترات زمنية متوسطة وطويلة الأمد على درجات حرارة منخفضة جدا بالآزوت السائل (Altoveros et al.,1995).

5-6-4- مزايا إكثار البطاطا بالدرينات الدقيقة:

- لا يحتاج إكثار البطاطا بالدرينات لعملية تقسية مثل إكثار الشتول داخل الأنابيب ، وبالتالي تكون تكلفة الإنتاج أقل (Rolot,2005).

- يمكن تطبيق هذه التقنية في إكثار عدد كبير من أصناف البطاطا، والحصول على درينات دقيقة في فترة زمنية قصيرة، بهدف تشكيل بنك وراثي لحفظها كون الدرينات الدقيقة سهلة التخزين.

- تعد الدرنات الناتجة من زراعة الدرينات الدقيقة في الحقل أكبر حجماً من الدرنات الناتجة من زراعة النباتات النسيجية (Wiersema *et al.*, 1987).

- يتم اختصار الفترة الزمنية في برنامج إنتاج البذار عند استخدام الدرينات الدقيقة، حيث يعد إنتاج الدرينات الدقيقة في الأنابيب مؤشر على قدرة تدرن أصناف البطاطا في الحقل.

-يسهل تخزين الدرينات الدقيقة للأصناف المختلفة في حيز ضيق من المساحة، كما يسهل نقل المصادر النباتية بين الدول.

5-6-5- طريقة الإكثار بالتدرن الدقيق المخبري:

تشمل عملية إكثار البطاطا عن طريق تكوين الدرينات الدقيقة بالنسج المراحل الآتية:

1-مرحلة الزراعة الأولية: يتم بها عزل قمم مرستيمية وزرعها في أوساط مغذية سائلة أو صلبة بهدف الحصول على عينات نباتية خالية من التلوث، ولها قدرة على النمو والاستطالة. يتم عادة زرع قمم مرستيمية صغيرة جدا بين 0.1-0.3 مم بهدف الحصول على نموات خالية من الأمراض الفيروسية.

2-مرحلة الإكثار والاستطالة: في نهاية طور الزراعة الأولية للقمم المرستيمية يتم الحصول على نموات صغيرة بطول 1-2 سم، ويتم نقلها إلى طور الإكثار والنمو بهدف زيادة عدد النموات الخضرية الممكن الحصول عليها. يتصف نموذج الإكثار بالبطاطا بالنمو العمودي، أي يتم السعي في هذا الطور نحو توجيه العينات النباتية إلى إعطاء نموات طويلة، جيدة التكوين وغير رفيعة. يصل طول النموات في نهاية دورة الإكثار التي تستمر بين 3-4 أسابيع، بين 12-15 سم وتحتوي 6-10 عقل جانبية جيدة التكوين.

وتكرر عملية الإكثار بتقسيم النبات إلى عقل صغيرة بطول 1-2 سم وتحتوي برعم جانبي مع ورقة. وهذه العقل تعطي بدورها في نهاية دورة الإكثار نموات طويلة جديدة وهكذا حتى يتكون لدينا كم من النموات كافية للبدء بالنقل إلى وسط تكوين الدرينات الدقيقة. يجب التأكد

قبل الإكثار التجاري للعينات الناتجة من خلوها من الأمراض الفيروسية بواسطة عدة اختبارات مثل النباتات الدالة، الطريقة المناعية الـ ELISA، و الـ RT-PCR.

3-مرحلة تكوين الدرنات الدقيقة بالنسج: يتم نقل النموات والعقل المتكونة إلى وسط خاص بحيث تتوفر به كافة الشروط المناسبة لتكوين الدرنات، إذ يضاف عادة السكروز بتركيز مرتفع مع السيتوكينين وبعض مثبطات النمو مثل الـ CCC او الباكلوبوترازول. وتوضع العينات النباتية بفترة بالظلام لتحريض تكوين الدرنات. ولابد من دراسة تفصيلية لبعض العوامل المؤثرة بالتدرن الدقيق المخبري.

4-مرحلة حصاد الدرنات الدقيقة: تجمع الدرنات الدقيقة المتكونة داخل الأنابيب، وتغسل بالماء الجاري لإزالة بقايا الوسط المغذي، ويفضل معاملتها بمبيد فطري قبل تخزينها في البراد على درجة حرارة 2-3°م لمدة 3-4 أشهر لكسر طور سكونها وتصبح لها المقدرة على الإنبات، ليتم متابعة برنامج انتاج البذار الخالي من الفيروسات حيث يتم الحصول بزراعة النسج على درنات أو نباتات تمثل F0 ويمكن إكثارها بالبيت الزجاجي للحصول على درنات صغيرة Minitubers التي تمثل F1. وبعدها يتم متابعة إكثار النباتات أو الدرنات بالحقل ضمن برنامج لإنتاج البذار بمراحله المختلفة، حتى الوصول إلى مرحلة تسويق البذار.

5-6-6-العوامل المؤثرة في تكوين الدرنات داخل الأنابيب:

تعد عملية تكون الدرنات عملية فيزيولوجية معقدة، إذ تتأثر بجملة عوامل:

- 1-عوامل غذائية: نسبة السكروز بالوسط، تركيب المحلول المعدني- نسبة C/N .
- 2-عوامل هرمونية: بعض الهرمونات المحرصة للتدرن مثل السيتوكينين وحمض الأبسيسيك والبعض الآخر مثبط للتدرن مثل الأوكسين والجبرلين.
- 3-عوامل مناخية: درجة الحرارة المثلى بين 16-19 م ودرجة الحرارة العالية مثبطة. الإضاءة ظروف النهار القصير والظلام محرصة للتدرن
- 4-عوامل وراثية: تختلف استجابة الأصناف للتدرن وذلك باختلاف تركيبها الوراثي.

1- تأثير السكر في تكوين الدرينات الدقيقة:

تؤثر نسبة السكر في الوسط المغذي في تكوين الدرينات الدقيقة داخل الأنابيب، ويتطلب تكوين الدرينات نسبة عالية من السكر في الوسط حيث تؤثر بشكل مباشر في رفع نسبة C/N مما يحفز في تكوين الدرينات الصغيرة.

ففي تجربة نفذت على تكوين الدرينات الدقيقة في صنفين من البطاطا الدراجا والبيرو. أخذت نتائج التدرن بعد 60 يوما من زراعة العقل المفردة على وسط التدرن المضاف له تراكيز مختلفة من السكر (0-20-40-60-80 و 100 غ/ل) ، تحت ظروف النهار القصير. جمعت العينات وحسبت النسبة المئوية للتدرن ومتوسط وزن الدرينات المتكونة، كما هو موضح بالجدول (5-8).

جدول (5-8): تأثير السكر في التدرن الدقيق المخبري في البطاطا

تركيز السكر غ/ل	% للتدرن صنف دراجا	% للتدرن صنف بيرو	متوسط وزن الدرينات مغ صنف دراجا	متوسط وزن الدرينات مغ صنف بيرو
0	0	0	0	0
20	0	0	0	0
40	47	53	46	50
60	60	67	57	62
80	80	93	76	81
100	70	53	62	75

بلغت أعلى نسبة تدرن للأصناف المذكورة عند التركيز 80 غ/ل، كما لوحظ أعلى متوسط وزن للدريئات المتكونة (ALMaarri *et al.*, 2008). وقد لوحظ فرق واضح بقدرة الأصناف في تكوين الدريئات بالأنسجة ويعزى ذلك للاختلاف في التركيب الوراثي لهذه الأصناف.

وقد دلت بعض التجارب المنفذة في الصين أن العامل الأساسي في تكوين الدريئات الدقيقة داخل الأنابيب هو محتوى الوسط المغذي من السكر، وقد تم الحصول على شكل الدريئات في عدة أصناف من البطاطا مثل صنف ديزيرييه Desiree عند إضافة 80 غ/ل من السكر، تحت ظروف إضاءة مختلفة (نهار طويل - نهار قصير - إضاءة كاملة). ولم يلاحظ أي فروق معنوية في نسبة التدرن وفي متوسط وزن الدريئات المتكونة (He and Meng, 2016).

وقد لوحظ ارتفاع نسبة السكر في الدريئات وانخفاض نسبة النشاء داخل الأنسجة، كما لوحظ زيادة نسبة نشاط الأنزيم سكروز سينثيتاز Sucrose synthetase وانزيم سكروز-فوسفات- سينثيتاز Sucrose- Phosphate- Synthetase في الأنسجة النباتية في ظروف التجربة (He and Meng, 2016).

2- تأثير الهرمونات النباتية في التدرن الدقيق:

تلعب الهرمونات النباتية دوراً مهماً في التدرن الدقيق المخبري. يختلف التأثير الهرموني بحسب الأصناف وحسب نوع الهرمون المستخدم وحسب التوازن بين الهرمونات المستخدمة في الأوساط المغذية. تعمل بعض الهرمونات في تحفيز تكوين الدريئات بالنسج مثل السييتوكينين (ALTaweel *et al.*, 2001 ; Wang & Hu, 1982)، كما هو موضح بالجدول (5-9).

جدول (5-9): تأثير الهرمونات النباتية في تكوين الدرينات الدقيقة.

تركيز الـ CCC مغ/ل	تركيز الـ BAP مغ/ل	عدد الدرينات في 10 نباتات	متوسط وزن الدرينة مغ
0	0	5.7	7
200	5	7	72
500	5	11.7	83
500	0	11.0	58
0	5	16.2	133

أما بعض الهرمونات مثل الجبريلين تعمل على تثبيط تكوين الدرينات بالنسج. وقد دلت التجارب على أهمية استعمال بعض مثبطات النمو في تشجيع التدرن الدقيق مثل حمض الأبسيسيك والكومارين (Dodds *et al.*, 1988)، وحمض الجاسمينويدس Jasminoids Acid (Pelacho *et al.*, 1993).

وقد وجد بالتجربة أن نسبة حمض الأبسيسيك /حمض الجبريليك تؤثر بشكل واضح في تكوين وتنظيم نمو وكسر طور سكون الدرينات الدقيقة وقد وجد بالتجربة بأن إضافة الـ ABA إلى وسط التدرن شجع التدرن بعكس إضافة الجبريلين.

ولابد من الذكر أنه في بعض التجارب لم يعط إضافة الأيسيسيك أسيد أي نتيجة إيجابية لا بل على العكس أدى إلى تخفيض تكوين الدرينات بالنسج (gopthal *et al.*,2004). ولكن لوحظ بان إضافة بعض المركبات مثل باكلوبوترازول Paclobutrazol ، والـ(CCC) Chlorocholine Chloride مع السيتوكينين (الكينتين أو البنزيل أمينو بيورين) زاد بشكل كبير من تكوين الدرينات الدقيقة ومن وزنها (Yamamoto and Nakata,1997; Zang *et al.*,2004; Sakha *et al.*, 2004).

مثال على تأثير الهرمونات النباتية في التدرن الدقيق بالبطاطا:

تمت دراسة تأثير كل من السيتوكينين BAP لوحده، والـCCC لوحده بتركيز 200 و 500 مغ/ل. وتم إضافة الـBAP مع الـ CCC معا وقد استخدمت في هذه التجربة نموات من البطاطا من صنف بينيمارو Benimarو، بطول 5-6سم تحوي 3-4 عقل وقد زرعت بشكل أفقي في وسط التدرن الذي أضيف له الهرمونات النباتية آنفة الذكر. وقد سجلت بعد شهر من الزراعة عدد الدرنات المتكونة في كل معاملة ومتوسط وزن الدرينات كما هو موضح بالجدول (5-9).

من الجدول يتبين لنا بأن إضافة السيتوكينين لوحده يحسن تكوين الدرينات كما إضافة الـCCC لوحده زاد في نسبة الدرينات الدقيقة المتكونة بالنسج كما زاد في وزن الدرينات المتكونة، اما إضافة السيتوكينين مع الـCCC قد زاد بشكل كبير نسبة الدرينات المتكونة وفي متوسط وزنها.

يعزى هذا الأثر الإيجابي للـCCC مع السيتوكينين بكون هذا المركب يثبط تكوين الجبريلين في أنسجة العينات النباتية وينشط بنفس الوقت اصطناع حمض الجاسميك الذي يدعى هرمون التدرن مما يحفز تشكل الدرينات الدقيقة وزيادة وزنها في الأنابيب (Husain *et al.*,2006, Yamamoto and Nakata,1997).

وفي تجربة أخرى تم استبدال الـCCC بمركب الباكلوبوترازول 1مغ/ل وقد أدى على نتائج مماثلة في تنشيط التدرن الدقيق وفي زيادة وزن الدرينات المتكونة وانخفضت نسبة الدرينات المشوهة (Zang *et al.*,2004). هذا يعني يمكن الاستعاضة بهذا المركب بدل الـCCC .

2-تأثير الإضاءة في التدرن الدقيق المخبري:

تلعب الإضاءة وخاصة الفترة الضوئية دوراً مهماً في التدرن الدقيق المخبري. تختلف استجابة أصناف البطاطا المختلفة للضوء. بشكل عام فقد وجد إن تعريض العينات النباتية أثناء طور التدرن لفترة ظلام تزيد بشكل كبير من نسبة التدرن ومتوسط وزن الدرينات المتكونة. يمكن تفسير دور الظلام بكونه ينشط اصطناع الجبرلين الذي يتكون بشروط الإضاءة الطويلة (16 ساعة إضاءة و 8 ساعات ظلام)، كما ينشط تكوين حمض الجاسمينويك Jasminoic Acid هرمون التدرن بفعل الظلام.

كما تؤثر شروط النهار القصير في تنشيط تكوين الدرينات بالنسج ويكون تأثيره قريب من تأثير الظلام. أما في حال النهار الطويل فتكون نسبة التدرن منخفضة، حجم ووزن الدرينات المتكونة صغير (Jackson, 1999; ALMaarri *et al.*, 2008).

ولابد من القول أخيراً بأن يوجد في برنامج إنتاج بذار البطاطا قسمان: قسم مهم جداً للحصول على نباتات ودرينات الدقيقة للجيل صفر F0، وهذا يتم بواسطة تقانات زراعة الأنسجة النباتية ضمن مخابر متخصصة ومجهزة لهذا الغرض. والقسم الثاني يتم به إكثار النباتات للحصول على درنات الأجيال اللاحقة حتى الوصول إلى جيل الأليت. و يتم العمل في البيوت الزجاجية والبيوت البلاستيكية الشبكية وفي الحقل للوصول إلى البذار المناسب الذي يباع للمزارعين على انه بذار موثوق خالي من الفيروسات.

5-6-7-برنامج إنتاج بذار البطاطا بزراعة النسج :

5-6-7-1-مقدمة: تؤثر الإصابة بالأمراض الفيروسية بشكل مباشر على إنتاجية ونوعية البطاطا المنتجة في الحقول. تعمل الفيروسات في بذار البطاطا إلى خفض إنتاجية المحصول من الناحية الكمية، وإلى إنتاج محصول ذو نوعية سيئة. تختلف نسبة الخسارة في المحصول حسب نوع الفيروس وحسب الأصناف. ولذلك يوجد قوانين صارمة في كثير من الدول التي لا تسمح باستعمال بذار إلا بعد التأكد من خلوه من الأمراض الفيروسية الخطيرة مثل X and Y . يتم إنتاج البذار باستخدام زراعة الميرستيم لإنتاج نباتات مخبرية أو لإنتاج درينات دقيقة خالية من الإصابات الفيروسية.

5-6-7-2-مراحل إنتاج البذار الخالي من الفيروسات:

يشمل إنتاج بذار خالي من الأمراض الفيروسية المراحل التالية:

1-المرحلة المخبرية: ويتم بها إنتاج نباتات مخبرية بزراعة الميرستيم داخل مخبر زراعة النسيج ويجب أن تكون الشتول المخبرية خالية 100% من الأمراض الفيروسية بأنواعها المختلفة. كما يتم إنتاج درينات الدقيقة من عينات ناتجة عن زراعة الميرستيم، ويجب أن أيضا تكون الدرينات خالية من الفيروسات بال100%.

ويتم المحافظة على العينات بطرائق الحفظ بزراعة النسيج أو يمكن حفظها بالكبسلة لفترات زمنية طويلة بالآزوت السائل. ويطلق على النباتات الناتجة بـ F0. يتوجب في هذه المرحلة فحص كافة السلالات الخضرية المكاثرة بزراعة النسيج باستخدام إحدى تقانات الفحص الفيروسي مثل النباتات الدالة أو الـ ELIZA أو باستخدام طرائق البيولوجيا الجزيئية مثل الـ RT-PCR. ويجب استبعاد كافة السلالات المشتبه بإصابتها بالأمراض الفيروسية. ويتم المحافظة على السلالات الخالية من الفيروسات ليصار إلى إكثارها واستخدامها في إنتاج البذار في المراحل التالية. كما يتوجب في هذه المرحلة تعليم الجيد للسلالات والأصناف حتى لا يتم خلط بين الأصناف، ويمكن ذلك بتخصيص كل رف أو مجموعة رفوف لصنف محدد. ويفضل عمل مخطط لأماكن تواجد الأصناف في غرف النمو وفي أماكن تخزين السلالات والأصناف المختلفة.

2-مرحلة البيوت الزجاجية:

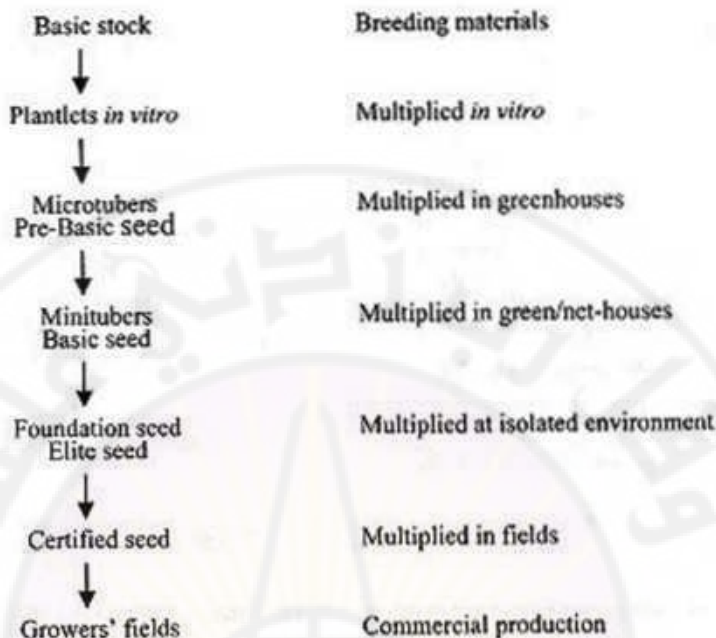
تهدف هذه المرحلة إنتاج الأمهات أو النويات داخل بيوت زجاجية جيدة العزل. يفضل في هذه المرحلة أيضا إمكانية فصل السلالات الخضرية الناتجة من المرحلة الأولى. يتوجب أخذ عينات من كافة السلالات للتأكد من خلوها من الأمراض الفيروسية. تستبعد أية سلالة مصابة أو مشتبه بإصابتها بأحد الفيروسات. في جيل الأمهات يجب أيضا تكون نسبة الإصابة بالفيروسات 0%.

تزرع درينات الدقيقة الناتجة من المرحلة الأولى في المخبر، بعد حصاها وكسر طور سكونها بهدف تكوين درينات أكبر حجما وزيادة عددها. يتوجب زرع كل صنف على حدى

أو في طاولة مستقلة. كما تخضع للاختبارات الفيروسية بحيث يتم استبعاد كل السلالات المصابة من برنامج الإنتاج. يتوجب أن تكون الدرينات الأمهات الناتجة سليمة بالـ100%.

3-مرحلة البيوت المحمية الشبكية: يقصد بها إنتاج السوبر إيليت. يتم زرع الدرينات والدرنات الناتجة من البيوت الزجاجية بهدف إكثارها وزيادة عددها، يتم زرعها في بيوت محمية وشبكية بحيث لا تدخل الحشرات إليها مثل المن والنطاطات التي تنقل الفيروسات. يجب أن تكون البيوت الشبكية في أماكن معزولة، بعيدة عن أماكن زراعة البطاطا ونباتات العائلة الباذنجانية. يجب اختبار النباتات للتأكد من خلوها من الأمراض الفيروسية مرة كل 15 يوم. لا يسمح أن تكون الإصابة بالفيروسات في السوبر إيليت بين 0.5-1%. يمكن تكرار إكثار السوبر إيليت عدة مرات بشرط أن لا تزيد نسبة الإصابة بالأمراض الفيروسية أكثر من 1% (SE1-SE2-SE3 ...).

4-مرحلة الحقول المكشوفة لإنتاج الإيليت: يتم زرع السوبر إيليت في حقول مفتوحة ومعزولة بهدف الإكثار وزيادة كمية البذار الناتجة. يجب أن تكون الحقول المختارة بعيدة عن أماكن زرع البطاطا ونباتات العائلة الباذنجانية لأنها تمثل نفس عوائل الفيروسات التي تصيب بذار البطاطا. يجب القيام بالكشف الدوري عن الأمراض الفيروسية مرة كل 15 يوم، ويجب ألا تزيد نسبة الإصابة في مرحلة الإيليت عن 1-2%. ويمكن إكثار هذه المرحلة عدة مرات على شرط ألا تزيد نسبة الإصابة عن 2% (E1-E2-E3). يتوقف سلسلة إكثار الإيليت عندما تصل نسبة الإصابة الفيروسية إلى 5%، ففي هذه الحالة توزع كبذار على المزارعين لإنتاج بطاطا الطعام. ويوضح الشكل (5-11) مراحل إنتاج بذار البطاطا بزراعة النسيج.



الشكل (5-11): مراحل إنتاج البذار في البطاطا

ولابد من التذكير أخيراً بأن هذا البرنامج لإنتاج بذار البطاطا معتمد بشكل كبير في كثير من الدول المشهورة بزراعة البطاطا، وتوجد شركات كثيرة في العالم التي تعمل في إنتاج بذار البطاطا. ويتم إنتاج مئات الآلاف من الأطنان من بذار البطاطا سنوياً باستخدام تقانة زراعة النسيج للميرستيم وإنتاج ميكروتيوبير بزراعة النسيج خالية من الأمراض الفيروسية. ويعد مشروع إنتاج بذار البطاطا من المشاريع الواعدة والرابحة والقابلة للاستثمار. ويوجد في القطر الخبراء والفنيين الذين يستطيعون وضع هذه التقانة لإنتاج البذار الخالي من الأمراض الفيروسية قيد التنفيذ والإنتاج بخبرات وطنية لسد حاجة القطر من البذار والاستغناء عن الاستيراد بالعملة الصعبة.



الفصل السادس

التطعيم الدقيق المخبري *In Vitro* Micrografting

6-1- مقدمة Introduction:

إن أهم أهداف تقانات زرع الأنسجة النباتية هو الحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية. تعد تقانة زرع الأنسجة المرستيمية مع المعاملة الحرارية من الطرق الرئيسية في الحصول على نباتات خالية من الفيروسات، إلا أن نجاح هذه التقانة لا يزال مقتصرًا على النباتات العشبية والخضار وبعض نباتات الفاكهة مثل الموز والفريز. ولم تنجح هذه التقانة إلا في عدد قليل من أشجار الفاكهة (Martinez *et al.*, 1979; Jonard *et al.*, 1983) لذلك فكر الباحثون بتقانة التطعيم الدقيق المخبري للحصول على غراس خالية من الأمراض الفيروسية في الأشجار المثمرة.

يعد الباحث موراشيخ وفريقه (1972) في الولايات المتحدة الأمريكية، وفريق نافارو (1975) أول من عملوا على وضع تقانة التطعيم الدقيق المخبري في الحمضيات وتمكنوا من الحصول على أمهات من أصناف الحمضيات الخالية من الفيروسات. وقد تمكن فريق فرنسي فيما بعد من تطبيق التقانة وتحسينها في العديد من أشجار الفاكهة في التفاح (ALSkief and Villemur, 1978)، في الدراق (Mosella *et al.*, 1977; ALSkief, 1980)، وفي المشمش (Martinez *et al.*, 1979).

وتتالت الأبحاث فيما بعد في العديد من الأشجار الخشبية وأشجار الفاكهة، نذكر على سبيل الذكر لا الحصر أعمال فريق تركي في الفستق الحلبي (Onay *et al.*, 2004; Can *et al.*, 2006)، وفي شجرة الصمغ (Khalfallah and Dafallaha, 2008)، وفي أشجار الحمضيات (ALSkief and AL Maarri, 1991; Abbas *et al.*, 2008).

وتجدر الإشارة إلى أن تقانة التطعيم الدقيق المخبري قد دخلت النطاق التجاري في كثير من أشجار الفاكهة وذلك في برامج إنتاج الغراس الموثوقة.

6-2- تعريف التطعيم الدقيق:

عملية تركيب قمة مرستيمية على بادرات بذرية نامية في وسط مغذٍ، على أن تتم كافة مراحل التطعيم في شروط معقمة (أجزاء نباتية، أوساط مغذية،

ظروف العمل، واستخدام أدوات معقمة)، تزرع المطاعيم في أوساط مغذية تحوي كافة العناصر المغذية اللازمة للالتحام والنمو.

6-3- أهداف التطعيم الدقيق:

يهدف التطعيم الدقيق إلى:

أ- الحصول على مطاعيم خالية من الأمراض الفيروسية: لأن الأصول البذرية التي تمثل هنا بادرات بذرية تكون خالية في أغلب الأحيان من الفيروسات، كما يتم استخدام قمم مرستيمية بأحجام صغيرة جداً بين 0.1-1م كمطاعيم، وهي عادة لا تصاب بالفيروسات، وبالتالي بعد التحام الطعم ونموه، يتم اختبار المطاعيم بعدة طرق للتأكد من خلوها من الفيروسات.

يعد حجم القمم النامية المستخدمة في التطعيم الدقيق العامل المحدد في تحدي خلو المطاعيم من الفيروسات. كلما كان حجم القمم النامية صغيراً، كلما كانت نسبة المطاعيم الخالية من الفيروسات كبيرة، بينما تنعكس سلباً في نسبة نجاح التطعيم.

ب- الكشف المبكر عن حالات عدم التوافق بين الأصل والطعم: تظهر في التطعيم العادي في أشجار الفاكهة بعض حالات عدم التوافق المتأخر وذلك بعد فترة زمنية قد تصل إلى عدة سنوات من زراعة بعض الأنواع في الحقل، مما يسبب خسارة كبيرة للمزارعين. عند تطبيق التطعيم الدقيق المخبري يمكن الكشف عن مثل هذه الحالات من عدم التوافق بشكل مبكر خلال عدة أسابيع. كما يفيد التطعيم الدقيق في تحديد ودراسة أسباب عدم التوافق بين الطعم والأصل.

ج- تجديد فتوة الأشجار المعمرة **Rejuvenation**: تعد تقانة التطعيم الدقيق المخبري على بادرات فتية طريقة مهمة من طرائق تجديد فتوة الأشجار الهرمة، وبالتالي تستعيد هذه الأشجار بعد عملية التطعيم الدقيق قدرتها في الإكثار والتجديد داخل الأنابيب.

6-4- مراحل التطعيم الدقيق المخبري:

تقسم مراحل تطبيق تقانة التطعيم الدقيق إلى ثلاث مراحل أساسية:

6-4-1- المرحلة الأولى: تشمل كافة الخطوات التحضيرية الأساسية التي تسبق تنفيذ

التطعيم الدقيق وهي:

1- زرع البذور للحصول على البادرات البذرية التي ستستخدم أصولاً في عملية التطعيم الدقيق، ويتوجب اختيار الأنواع المناسبة، وإجراء كافة المعاملات الخاصة لكسر طور سكونها، وزراعتها بشكل معقم في أوساط مغذية معقمة، وتوضع في ظروف جوية مناسبة حتى تنبت وتصل إلى مرحلة مناسبة للتطعيم الدقيق ويوضح الشكل (6-1) زرع بذور الأصل والانبات في النارج.

2- تحضير الأوساط المغذية الخاصة بالتطعيم الدقيق: تختلف مكونات الأوساط المغذية الخاصة بالتطعيم الدقيق باختلاف الأنواع النباتية. كما تختلف طبيعتها أيضاً فيما إذا كانت سائلة أو صلبة وحسب طبيعة المادة المستخدمة في حمل المطاعيم حيث يمكن استخدام عدة أنواع مثل الورق المقوى والبرلايت والفيرميكولايت مع الوسط المغذي السائل.

3- تحضير المطاعيم وتعقيمها: تستخدم في هذه الحالة نموات غضة من الأصناف المراد تطبيق تقانة التطعيم الدقيق عليها. تجمع العينات النباتية وتغسل بشكل جيد وتعقم باستخدام الطرق المناسبة للنوع والصنف المختار حتى تصبح جاهزة للتطعيم الدقيق. وفي نفس الوقت يتوجب تحضير وتعقيم كافة الأدوات اللازمة لتنفيذ التطعيم الدقيق.

6-4-2- المرحلة الثانية: تنفيذ التطعيم الدقيق المخبري سيتم شرح كافة الخطوات بالتفصيل لاحقاً بالتطبيقات العملية.

تشمل تنفيذ عملية التطعيم الدقيق الخطوات الآتية:

1- تحضير الأصل: يتم فيه قص البادرة البذرية بالطريقة المناسبة كي يتم استخدامها فيما بعد لعملية التطعيم الدقيق. والشكل (6-2) يوضح عملية تحضير الأصل.

2- تحضير الطعم: يتم عزل القمم المرستيمية تحت جهاز العزل الجرثومي والمحافظة عليها من الجفاف ليصار إلى استخدامها في عملية التطعيم الدقيق.

3- تركيب القمم المرستيمية على البادرات البذرية المحضرة سابقاً: يجب أن تتم عملية التركيب بالشكل الصحيح مع أخذ جميع الاحتياطات اللازمة لمنع سقوط المطاعيم وتأمين كافة الظروف المناسبة للالتحام والنمو (الشكل 6-3).

4-وضع المطاعيم المنفذة في غرف النمو: يتم التحكم بالإضاءة، والحرارة، والرطوبة، كما ترأقب بشكل دائم حتى يتم الالتحام، ونمو المطاعيم إلى أن تصل إلى حجم مناسب لعملية نقلها إلى البيوت المحمية للتقسية ومتابعة نموها.

6-4-3-المرحلة الثالثة مراقبة نمو المطاعيم في البيوت الزجاجية الشبكية واختبارها: للتأكد من خلوها من الأمراض الفيروسية.

تعد هذه المرحلة من المراحل المهمة وهي التي تظهر نتيجة العمل المخبري ومدى نجاح عملية التطعيم الدقيق. يتم عادة استخدام عدة تقانات للكشف عن تواجد الفيروسات في الغراس المطعمة، منها النباتات الدالة، الـ ELISA وتقانات البيولوجيا الجزيئية بالـ RT-PCR، وبالمجهر الإلكتروني. وهنا لابد من التعاون مع مختص بالأمراض الفيروسية وأهل الخبرة للتأكد من خلو الغراس من الأمراض الفيروسية.

6-5-العوامل المؤثرة في نجاح التطعيم الدقيق:

تؤثر جملة عوامل كثيرة في نجاح التطعيم الدقيق المخبري في نباتات الفاكهة. تقسم هذه العوامل إلى عدة مجموعات:

1-عوامل متعلقة بالأصل المستخدم.

2-عوامل متعلقة بالطعم.

3-عوامل مرتبطة بالأوساط المغذية المستعملة.

4-عوامل مرتبطة بتقانة التطعيم ذاتها.

6-5-1-عوامل مرتبطة بالأصل المستخدم:

تؤثر بعض العوامل في نسبة الإنبات ونوعية البادرات الممكن الحصول عليها، والتي

تتبعكس بدورها في نسبة نجاح التطعيم فيما بعد. ومن هذه العوامل:

-نوع الأصل المستخدم: فقد دلت التجارب المنفذة في التطعيم الدقيق لعدة أنواع نباتية بأن

نوع الأصل يؤثر بشكل واضح في نسبة نجاح التطعيم، ففي تجربة في الحمضيات تم

استخدام نوعين من البادرات وهما: الليمون المخرفش *Citrus jambhiri* والبرتقال الحامض

Citrus aurantium ، وقد نفذ التطعيم الدقيق باستخدام مطاعيم من المندرين، و بلغت

نسبة نجاح التطعيم 60% و 40% على التوالي (Abbas et al., 2008).

وفي تجربة ثانية في الفستق الحلبي أظهرت أن نوع الأصل يؤثر في نسبة الإنبات، وفي نسبة التلوث، وفي نسبة نجاح التطعيم الدقيق. فقد تبين وجود حالات من عدم التوافق بين أنواع الفستق الحلبي البري مثل *Pistacia terbenthus* و *P. mutica* حيث لوحظ فشل التطعيم بعد عدة أيام في حين كانت نسبة النجاح جيدة عند استخدام بذور نفس النوع *P. vera* (Can et al., 2006; Onay et al., 2004).

- عمر الأصل المستخدم: يؤثر عمر الأصل المستخدم في نسبة نجاح التطعيم الدقيق، وقد لوحظ اختلاف واضح في نسبة نجاح المطاعيم باختلاف الأنواع النباتية.

ففي الدراق عند استخدام بادرات بعمر 5-7 أيام كانت نسبة نجاح التطعيم الدقيق 41% بينما عند استخدام بادرات بعمر 12 يوماً لم تتجاوز نسبة نجاح التطعيم 12% (Martinez et al., 1981). وقد لوحظ نتائج مغايرة في التطعيم الدقيق في شجرة الصمغ العربي *Acacia senegal* عند استخدام بادرات بعمر 7 أيام وصلت نسبة نجاح التطعيم الدقيق إلى 86% بينما بلغت 100% عند استخدام بادرات بعمر 14 يوماً (Khalafalla and Daffallah, 2008).

- تأثير شروط إنبات الأصل: تلعب شروط الإضاءة الخاصة بإنبات البذور المستخدمة كأصل بذري دوراً في نسبة نجاح التطعيم الدقيق في بعض الأنواع النباتية فقد دلت تجارب في الحمضيات بأن نسبة نجاح التطعيم الدقيق في بادرات نامية بالظلام كانت أعلى من مثيلاتها النامية بالإضاءة (Navarro et al., 1975; Abbas et al., 2008).

6-5-2- عوامل متعلقة بالمطاعيم المستخدمة:

تؤثر العديد من العوامل المرتبطة بالأصناف والأنواع المراد استخدامها في التطعيم الدقيق. وأهم هذه العوامل:

- النوع النباتي والأصناف المستخدمة كمطاعيم: تختلف نسبة نجاح التطعيم الدقيق بين الأنواع النباتية لا بل بين الأصناف ضمن النوع الواحد. ويوضح الجدول (6-1) نسبة نجاح التطعيم الدقيق في بعض الأنواع والأصناف النباتية:

جدول (6-1): نسبة نجاح التطعيم الدقيق في بعض أشجار الفاكهة والخشبية

النوع النباتي	% نجاح التطعيم الدقيق	المرجع
الدراق	%70	Martinez <i>et al.</i> , 1979
المشمش	%45	Martinez <i>et al.</i> , 1979
الحمضيات	%21	ALSkief and ALMaarri, 1991
الحمضيات المندرين	%60	Abbas <i>et al.</i> , 2008
البرتقال	%63	
الفسق الحلبي	%70	Onay <i>et al.</i> , 2004
الصمغ العربي	%86	Khalafalla and Dafallah, 2008

-عمر النبات الأم للأصناف: يؤثر عمر النبات الأم للمطاعم بشكل كبير في نسبة نجاح التطعيم الدقيق المخبري. تزداد نسبة نجاح التطعيم الدقيق عكساً مع عمر الأصناف المستخدمة كمطاعم. وقد وجد بالتجربة بأن عمر الأشجار لا يؤثر فقط في نسبة نجاح المطاعم بل يؤثر في نسبة نموها فيما بعد في البيت الزجاجي. ففي تجربة نفذت على الفستق الحلبي، استخدم قمم نامية من أشجار بعمر مختلف (1-5-10-30 سنة) و طعمت على بادرات بذرية من *Pistacia vera* وقد لوحظ بعد شهرين من التطعيم الدقيق أن عمر الأشجار الأم قد أثر في نسبة نجاح التطعيم الدقيق، وفي نسبة نمو الغراس المطعمة في البيت الزجاجي كما هو موضح في الجدول (6-2) (Onay *et al.*, 2003).

جدول (6-2): تأثير عمر الأمهات في التطعيم الدقيق في الفستق الحلبي

عمر الأشجار الأم	نسبة نجاح التطعيم	طول النموات الجديدة المتكونة بعد 60 يوماً
سنة	70%	10.6سم
5 سنوات	45%	10.14سم
10 سنوات	25%	7.2سم
30 سنة	20%	5.4سم

-حجم ومصدر القمم النامية: يلعب مصدر القمم النامية وطبيعتها دوراً مهماً في نجاح التطعيم الدقيق المخبري. ويختلف التأثير باختلاف الأنواع النباتية المستخدمة. ويؤثر حجم القمم النامية المستخدمة بشكل مباشر في نسبة نجاح التطعيم الدقيق في الأشجار المثمرة.

-تزداد نسبة نجاح التطعيم الدقيق بزيادة حجم القمم النامية المستخدمة، وقد لوحظ هذا التأثير في العديد من الأشجار المثمرة في الحمضيات، والدراق والفستق الحلبي والمشمش والعنب (Navaro, 1991).

وفي تجربة نفذت في الدراق تم أخذ القمم النامية من مصادر مختلفة وفق الآتي:

-قمم نامية من نموات في طور السكون.

-قمم نامية من نموات غضة من أشجار بالغة.

- قمم نامية من نموات غضة فتية تكونت داخل الأنابيب.

وقد طعمت النموات المأخوذة على بادرات بذرية من الأصل نيماتاغارد بعمر 15 يوماً. وقد لوحظ أن أفضل نسبة نجاح للتطعيم الدقيق تم الحصول عليها في القمم المأخوذة من نموات فتية ناتجة بزراعة النسج، حيث بلغت 50% بينما في حال القمم النامية المأخوذة من النموات الغضة والمتخشب من أشجار بالغة، فقد وصلت نسبة نجاح التطعيم الدقيق إلى 20% و15% على التوالي (Deogratias et al., 1986).

-موعد تنفيذ التطعيم الدقيق:

يلعب موعد أخذ العينات النباتية من الأمهات بهدف تنفيذ التطعيم الدقيق المخبري دوراً مهماً في نسبة نجاح التطعيم بالنسج، ويختلف هذا الموعد باختلاف الأنواع وطبيعة نمو الأشجار، ففي الدراق مثلاً تبين أن أفضل موعد لتطبيق التطعيم الدقيق خلال شهري نيسان وحزيران من موسم النمو، وتتخفض نسبة نجاح التطعيم في أيار وتموز، وذلك في الظروف البيئية الخاصة بجنوب فرنسا. وقد لوحظت علاقة طردية بين نسبة المركبات الفينولية وخاصة حمض كلوروجينيك الموجود بالأنسجة النباتية مع نشاط أنزيمات الأوكسيداز والبيروكسيداز التي تعمل على أكسدة المركبات الفينولية إلى كينون وتشكيل مواد سامة واسمرار في مستوى منطقة التطعيم مما يؤدي إلى انخفاض في نسبة نجاح التطعيم الدقيق في أيار وتموز كما هو موضح في الجدول (3-6)، وقد لوحظ انخفاض واضح في مستوى المركبات الفينولية وفي نشاط الأنزيمات في نيسان وحزيران مما يزيد في نسبة نجاح التطعيم الدقيق المنفذة في هذه الفترة من موسم النمو ((Martinez *et al.*, 1981

جدول (3-6): تأثير موعد أخذ المطاعيم في نسبة نجاح التطعيم الدقيق في الدراق

نشاط أنزيمي البيروكسيداز والأوكسيداز	مستوى المركبات الفينولية الكلية مع/غ مادة جافة	نسبة نجاح التطعيم بعد 60 يوماً	موعد التطعيم الدقيق
منخفض	30	45%	نيسان
مرتفع	40	25%	أيار
منخفض	30	66.6%	حزيران
مرتفع	50	33.3%	تموز

6-5-3-عوامل متعلقة بتركيب الأوساط المغذية:

يلعب تركيب الوسط المغذي المستخدم في التطعيم الدقيق دوراً مهماً في نسبة نجاح التطعيم الدقيق، ويتطلب كل نوع نباتي أوساطاً مغذية تختلف من نوع نباتي لآخر، لا بل من صنف لآخر ضمن النوع الواحد. من عوامل الأوساط المغذية التي تؤثر بشكل مباشر

في عملية التطعيم الدقيق المخبري، التركيب المعدني، طبيعة الوسط المغذي سائل أو صلب، نسبة السكر، تركيز ونوع الهرمونات النباتية، إضافة بعض المركبات العضوية للوسط أو غير العضوية التي تعمل على تخفيف ظاهرة الاسمرار مما ينعكس بشكل إيجابي في نسبة نجاح التطعيم الدقيق.

-تأثير تركيز الهرمونات في نسبة نجاح التطعيم الدقيق:

تلعب الهرمونات النباتية دوراً مهماً في عملية التحام الأصل مع الطعم وفي نمو المطاعيم فيما بعد. لذلك فوجودها ضروري في الوسط المغذي وهي تعمل في زيادة نسبة نجاح التطعيم الدقيق المخبري. ففي تجربة نفذت في التطعيم الدقيق في المندرين على بادرات من البرتقال وبعد التطعيم الدقيق زرعت البادرات المطعمة في وسط مغذ يحوي تراكيز مختلفة من الـ BAP (0-1-3-5 و5مغ/ل) (Abbas *et al.*, 2008).

لوحظ ازدياد نسبة نجاح التطعيم الدقيق بشكل واضح مع ازدياد نسبة السيتوكينين في الوسط المغذي كما هو موضح في الجدول (4-6).

وفي تجربة أخرى في الدراق تم زراعة المطاعيم في وسط مغذ يحوي تراكيز مختلفة من الأوكسين NAA (0-0.1-0.5-1 و5مغ/ل) (Martinez *et al.*, 1979). وقد لوحظ بأن أفضل تركيز أعطى أعلى نسبة نجاح بالتطعيم الدقيق هو 1مغ/ل من الأوكسين كما هو موضح بالجدول (4-6).

جدول (4-6): تأثير الهرمونات النباتية في نسبة نجاح التطعيم الدقيق

النوع النباتي	تركيز الـ BAP مغ/ل	% نجاح التطعيم	النوع النباتي	تركيز الـ NAA مغ/ل	% نجاح التطعيم
الحمضيات مندرين على برتقال الحامض	0	20%	الدراق على دراق بذري	0	5%
	1	28%		0.1	25%
	3	45%		0.5	50%
	5	60%		1	75%
				5	20%

ففي المشمش درس تأثير تراكيز مختلفة من السيتوكينين BAP والأوكسين IBA في التطعيم الدقيق للقمم المرستيمية من صنف Nonpareil التي ركبت على بادرات بذرية من اللوز *Amygdalus communis*. وقد تم الحصول على أعلى نسبة نجاح للتطعيم الدقيق عند إضافة 1مغ/ل من الـBAP مع 0.2 مغ/ل من الـIBA والتي أضيفت إلى وسط موراشيغ وسكوغ (MS) (Isikalam *et al.*, 2011).

- تأثير إضافة بعض المواد المضادة للفيروس في نسبة نجاح التطعيم الدقيق:
تعد عملية الحصول على غراس خالية من الفيروسات أهم أهداف التطعيم الدقيق، فقد دلت التجارب بأنه لا يمكن الحصول على غراس خالية من الفيروس بالتطعيم الدقيق لوحده في بعض الأنواع فيضاف إلى الوسط مواد كيميائية مساعدة مضادة للفيروس.
تستخدم عدة مواد مضادة فيروسية تضاف إلى الأوساط المغذية بعد تعقيمها بالفلتر، مثل:
-آسيكلوغوانوزين (Acyclovir) Acycloguanosine.
-آزيدوتيميدين (Zidovudine) Azidothymidine.
-دي انتش تي (DHT) (الاسم الكيميائي هو 2,4-dioxohexahydro-1,2,5-triazine).
-الريبافيرين (Ribavirin) (Virazol).
-تيوراسيل 2-thiouracil.

تساعد هذه المواد مع التطعيم الدقيق من التخلص من بعض الفيروسات التي تصيب الأشجار المثمرة. ليس فقط بالأشجار المثمرة وإنما بعض الخضار والمحاصيل مثل البطاطا والكرزيتيم.

ففي تجربة نفذت بالهند على الحمضيات المصابة بفيروس (ICRSV) الذي يسبب خسائر كبيرة في بعض أنواع الحمضيات المنتشرة في الهند. أخذ عقل صغيرة جانبية من أشجار مصابة وزرعت في أوساط مغذية تحوي 25مغ/ل من المواد المضادة للفيروسات المذكورة سابقاً وبعد نمو البراعم عزلت القمم النامية بحجم 0.7م، وطعمت في المختبر على بادرات بذرية من الليمون المخرفش وقد تم حساب نسبة نجاح التطعيم، كما اختبرت المطاعيم الناجحة للتأكد من خلوها من الفيروسات بتقانة الـELIZA وتقانة الـRT-PCR

(Sanjeev *et al.*, 2007). وقد لوحظ تفاوت في قدرة هذه المواد المستخدمة في تثبيط نمو الفيروسات كما هو موضح بالجدول (5-6).

جدول (5-6): التأثير المشترك للتطعيم الدقيق مع المعاملة بمواد مثبطة لنمو الفيروسات

نوع المادة المستخدمة	% نجاح التطعيم بالشاهد	% نجاح التطعيم بالمعامل بـ 25 مغ/ل	% لخلو الفيروسات بالشاهد	% لخلو الفيروسات بالمعامل بـ 25 مغ/ل
Acycloguanosine	54%	15%	0%	21%
Azidothymidine	55%	17%	0%	11%
DHT	55%	18%	0%	0%
Ribavirin	55%	17%	0%	37%
2-thiouracil	55%	17%	0%	21%

لوحظ بأن أفضل مادة كانت الريبافيرين التي أعطت أعلى مستوى من الغراس المطعمة الخالية من الفيروسات. إذ تؤثر المواد المضادة للفيروسات في تثبيط الانقسام الخلوي للفيروس، وتعمل أيضاً في تثبيط اصطناع الـ RNA ، وفي تثبيط تكوين الغلاف البروتيني الخاص بالفيروس، مما يحد من نمو الفيروسات وانتشارها. وقد لوحظت أهمية هذه التقنية مع التطعيم الدقيق من التخلص من بعض الفيروسات الصعبة التخلص منها في تقانة واحدة (Sanjeev *et al.*, 2007).

-تأثير نسبة السكر في الوسط المغذي في نسبة نجاح التطعيم الدقيق:

يعمل السكر المضاف إلى الوسط المغذي الخاص بالتطعيم الدقيق على تأمين مصدر للطاقة اللازم للالتحام ونمو المطاعيم داخل الأنبوب. وقد لوحظ أن زيادة تركيز السكر في الوسط المغذي من 30 إلى 50 غ/ل يزيد في نسبة نجاح المطاعيم في الدراق والحمضيات (Martinez *et al.*, 1981; ALSkief and ALMaarri, 1991))

رابعاً-عوامل متعلقة بطريقة تنفيذ التطعيم الدقيق:

تعد عملية التطعيم الدقيق عملية حساسة، وتتطلب دقة عالية وحذراً شديداً حتى يتم الحصول على نتائج جيدة. ولا بد من تأمين الشروط المثلى، وأخذ الاحتياطات الضرورية الفعالة لمنع القمم النامية من السقوط والجفاف وحتى يتم التحام الأصل مع القمم النامية ونموها، ولابد من تحضير البادرة أو الأصل ثم تفصل القمم النامية بالحجم المناسب (0.3-0.7 مم) ويحافظ عليها من الجفاف، ويتم تركيب القمم النامية بطريقة سليمة وصحيحة بحيث يحقق التوافق بين كامبيوم الأصل والطعم. لتحقيق ذلك قام الباحثين بدراسة بعض العوامل المتعلقة بتقانة التطعيم الدقيق المخبري بهدف زيادة نسبة نجاحها. ومن هذه العوامل:

-طريقة تحضير الأصل أو البادرات البذرية: تختلف طريقة تحضير الأصل بحسب حجم القمم النامية المستخدمة، وحسب الغرض من تطبيق تقانة التطعيم الدقيق، ففي حال تطبيق التطعيم الدقيق بغرض الحصول على غراس خالية من الفيروسات، يتم استخدام قمم نامية صغيرة جداً وفي هذه الحالة يتم قطع البادرة بشكل أفقي فوق الفلقات بـ 1-2 سم. أو يتم عمل كرسي صغير للقمم النامية بعد القص الأفقي للبادرة (ALSkief and ALMaarri, 1991).

وعند تطبيق التطعيم الدقيق بهدف دراسة التوافق بين الأصل والطعم ففي هذه الحالة يتم تحضير البادرة على شكل V بعد القص الأفقي لها، وتؤخذ في هذه الحالة قمم نامية كبيرة نسبياً، وتحضر القمم النامية بالطريقة نفسها ويتم تركيبها معاً بهدف الالتحام والنمو (Wu et al., 2007; Sanjeev et al., 2007). وتوجد طرق أخرى في تنفيذ التطعيم الدقيق مثل T مقلوبة فقد حصل فريق باكستاني على نسبة نجاح عالية بلغت 33% عند استخدام هذه الطريق في تركيب قمم النامية في الحمضيات (Naz et al., 2007).

-معاملة منطقة التطعيم بطبقة رقيقة من الآجار:

إن عملية فصل القمم النامية عملية صعبة، ويتم فصلها عادة تحت المكبرات الضوئية، وهي سريعة الجفاف ولذلك لابد من أخذ الاحتياطات الضرورية للمحافظة عليها من الجفاف، وخاصة أثناء عملية التركيب على الأصل، ولذلك فإن إضافة طبقة رقيقة من وسط

مغذ صلب يحوي هرمونات نباتية يعمل على تحسين نسبة نجاح التطعيم الدقيق بشكل كبير.، تعمل طبقة الآجار الرقيقة اللزجة على تثبيت القمم النامية بشكل صحيح وتحميها من السقوط والجفاف، كما يساعد وجود الهرمونات النباتية مع هذه الطبقة إلى تشجيع الانقسام الخلوي وتسرع من تكوين طبقة من الكالوس في منطقة التطعيم مما يزيد من فرص التحام الطعم مع الأصل. ففي تجربة في هذا المجال نفذت في المشمش والدراق أدت إلى زيادة نسبة نجاح التطعيم الدقيق بشكل كبير، وفي أنواع أخرى لم تعط نتيجة إيجابية مثل عند تطعيم المشمش على الأصل موروبلان ((Martinez et al., 1979

كما تم تحسين نسبة نجاح التطعيم الدقيق في الأفوكادو باستخدام طبقة من الوسط المغذي في منطقة التطعيم حيث تعمل على حماية القمم النامية من الجفاف (Phiego and Murashige, 1987).

-معاملة منطقة التطعيم بمضاد أكسدة: تفرز بعض النباتات بعض المركبات الفينولية مما يعيق نجاح التطعيم الدقيق، فقد لوحظ أن معاملة منطقة التطعيم والقمم النامية بمضاد أكسدة يمكن أن يزيد من فرص نجاح التطعيم الدقيق في بعض الأنواع فعند تطعيم مشمش على بادرات بذرية من المشمش معاملة منطقة التطعيم بمحلول يحوي 2 غ/ل من مركب دي ثيل دي ثيوكاربامات الصوديوم (DIECA) أدى إلى تحسين نسبة نجاح التطعيم وقد حافظت المعاملة على القمم النامية حية بدون اسمرار (Martinez et al., 1979). وفي بعض الأنواع الأخرى فإن المعاملة بمضادات الأكسدة (مزيج من الستريك أسيد 100 ملغ/ل مع 150 ملغ/ل من الأسكوربيك أسيد) لم تحسن من نسبة نجاح التطعيم الدقيق، كما هو الحال عند تطعيم نبات الزينة Protea cyanoroides، من أزهار القطف المهمة في جنوب إفريقيا، على بادرات بذرية من نفس النوع (Wu et al., 2007).

-زراعة القمم النامية بشكل أولي: تكمن صعوبة التطعيم الدقيق المخبري بعملية فصل القمم الميرستيمية واستعمالها وهي صغيرة جداً، فهي تحتاج دقة وخبرة عالية لوضعها بالشكل الصحيح والمكان الصحيح على الأصل. وتكون عادة نسبة النجاح منخفضة نسبياً. فقد أدخلت بعض التحسينات بهدف رفع نسبة نجاح التطعيم الدقيق وذلك بعزل القمم الميرستيمية وزرعها في وسط مغذ مناسب حتى تنمو وتكبر، ومن ثم تستخدم في عملية التطعيم الدقيق

ففي هذه الحالة زادت نسبة نجاح التطعيم الدقيق بشكل ملموس في العديد من الأنواع النباتية في الحمضيات واللوزيات (Jonard, 1986).

أمثلة عن التطعيم الدقيق المخبري:

طبقت تقانة التطعيم الدقيق في كثير من أنواع الفاكهة بنجاح في اللوزيات (دراق-شمش-خوخ-لوز) في التفاحيات (نفاح وإجاص) في الحمضيات (الليمون-البرتقال-اليوسفي-المندرين-كريفون....) العنب، الأفوكادو، والفستق الحلبي وبعض الأشجار الحراجية مثل العفص والسيكويا وشجرة الصمغ العربي وبعض نباتات وشجيرات الزينة مثل الكاميليا (Jonard, 1986; Navaro, 1991; Can et al., 2006; Sanjeev et al., 2007) وسنورد عدة أمثلة تمثل الأهداف الأساسية للتطعيم الدقيق.

-الحصول على غراس خالية من الأمراض الفيروسية:

مثال في الحمضيات (Abbas et al., 2008)

يعد المرض الفيروسي التريستيزا من الأمراض الخطيرة التي تصيب الحمضيات وتؤدي إلى تدهور الإنتاج ونمو الأشجار. يسبب هذا المرض فيروس يدعى *Citrus Tristeza* *Closterovirus* (CTV). وقد استطاع فريق باكستاني من الحصول على غراس خالية من فيروس التريستيزا من أشجار المندرين والبرتقال المصابة بالمرض وذلك بالتطعيم الدقيق المخبري.

أخذت نموات غضة من أشجار مندرين *Citrus reticulata* وأشجار برتقال *Citrus sinensis* مصابة بالتريستيزا وعقمت بهيبوكلوريت الصوديوم 0.5% لمدة 10 دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات. فصلت القمم النامية بحجم (0.3-0.7 مم) تحت المكبرة، وطعمت بالمختبر على بادرات بذرية من نوعين من الحمضيات وهما بادرات الليمون المخرفش *Citrus jambhiri* وبادرات من البرتقال الحامض *Citrus aurantium*. عقت بذور الأصول، وزرعت في وسط مغذ يحوي المحلول المعدني لموراشيغ وسكوغ (1962) + سكرز 30 غ/ل + 10 غ/ل آجار وبدون هرمونات نباتية، وضعت البذور بعد زراعتها بالظلام حتى تثبت لمدة أسبوعين على درجة حرارة 25م.

زرعت البادرات المطعمة بعد تنفيذ التطعيم الدقيق المخبري في وسط مغذ سائل يحوي محلول MS+فيتامينات+30غ/ل سكروز+5مغ/ل من السيبتوكينين BAP، بلغت نسبة النجاح بعد شهرين من التطعيم الدقيق بين 40-65% وذلك حسب الأصل المستخدم.

نقلت النباتات المطعمة إلى البيت الزجاجي الشبكي، وقدمت لها العناية اللازمة من ري وتسميد وشروط جوية مناسبة للنمو.

بلغت نسبة نجاح التغطية أكثر من 90% من النباتات المطعمة المنقولة. أخذت عينات من المطاعيم الجديدة بعد أن تابعت نموها في البيت الزجاجي الشبكي وكونت بين 7-9 أوراق جديدة للفحص للتأكد من خلوها من الفيروسات. اختبرت العينات بتقانة الـ ELISA، وقد تبين أن 90-94% من المطاعيم الناجحة خالية من الفيروس التريستيزا في كل من المندرين والبرتقال.

-الكشف عن حالة عدم التوافق المبكر: يفيد التطعيم الدقيق في الكشف المبكر عن حالات عدم التوافق التي تظهر في الطبيعة بشكل متأخر. كما يفيد بدراسة أسباب عدم التوافق وخاصة الفيروسية منها.

مثال عن عدم التوافق بين المشمش والخوخ مايروبلان:

عند تطعيم قلم نامية من المشمش على بادرات من الخوخ مايروبلان لوحظ بأن نسبة نجاح التطعيم بعد 7 أيام كانت مرتفعة إذ وصلت إلى 86% كما هو موضح بالجدول (6-6). وبدأت بعد 14 يوماً مظاهر عدم التوافق تظهر في القلم النامية وبدأت نسبة نجاح التطعيم تتخفض بشكل تدريجي حتى انعدمت بعد 60 يوماً.

وقد لوحظ تشكل واسمرار القلم النامية وحتى النامي منها ثم ينتهي الأمر بموت الطعم في حين يبقى الأصل حي وهذه علائم عدم التوافق بين الأصل والطعم (Martinez et al., 1983; Jonard et al., 1981). يعزى سبب الاسمرار الذي يظهر في الطعم إلى أكسدة المركبات الفينولية المفردة من الطعم بفعل أنزيمات البيروكسيدز والأوكسيديز مما يؤدي إلى اسمرار وموت الطعم.

جدول (6-6): تطور التطعيم الدقيق بين المشمش مع الميروبلان مع الزمن (عن Martinez et al., 1981)

الزمن باليوم	عدد القمم النامية الحية	نسبة نجاح التطعيم
7	138	86
14	101	63
21	93	58
28	84	52
35	32	20
42	12	7.5
60	0	0

وفي حالة الفستق الحلبي كشف التطعيم الدقيق حالات عدم التوافق عند تطعيمه على بادرات من أنواع برية *Pistacia mutica* و *P. terebinthus* و *P. kinjuk* حيث لوحظ استمرار المطاعيم بعد 5-6 أيام مباشرة بعد عملية التطعيم، أما عند تطعيم الفستق الحلبي على بادرات الفستق الحلبي كانت نسبة النجاح والنمو جيدة، وهذا يدل على وجود حالة من عدم التوافق مع الأنواع البرية المستخدمة (Can et al., 2006).

-التطعيم الدقيق وسيلة لتجديد فتوة الأشجار المعمرة:

إن عملية الإكثار الخضري للأشجار المعمرة عملية صعبة وشاقة ودرجة استجابتها متدنية، لذلك لابد من تجديد فتوتها حتى تستعيد قدرتها على الإكثار والتجدير. يعد التطعيم الدقيق إحدى وسائل تجديد فتوة الأشجار. لأن عند تطعيم قمم نامية مأخوذة من أشجار هرمة على بادرات بذرية فتية فنكتسب المطاعيم بعض صفات النباتات الفتية وتستعيد قدرتها على الإكثار بالنسج.

والأمثلة كثيرة في هذا المجال نذكر على سبيل الذكر لا الحصر. فقد تمكن فريق العالم موراشيج من تجديد فتوة أشجار معمرة من الأفوكادو عند تطعيمها على بادرات بذرية فتية على التجدير (Phiego and Murashige, 1987).

كما استطاع الباحثين من تجديد فتوة العديد من الأشجار المعمرة مثل العفص، السيكيويا، شجرة الصمغ العربي، نبات الكاميليا (Jonard *et al.*, 1983; Deogratias *et al.*, 1986-1991; Khalafallah and Dafallah, 2008)





الفصل السابع

الإكثار بالأجنة الخضرية

يتميز الجنين الخضري عن الجنين الجنسي بأن الأول ينشأ من أجزاء نباتية دون حدوث عملية إلقاح. ومن المفترض إذا لم تحدث طفرات عند تكوين الأجنة الخضرية أن تعطي نباتات مشابهة تماماً للنبات الأم التي أخذت منها الأنسجة التي كونت الأجنة الخضرية. أما عند زراعة الأجنة الجنسية الناتجة بعد عملية الإلقاح، فإننا نحصل على نباتات مغايرة في تركيبها الوراثي للنبات الأم. ومن هذا المنطلق تستبعد عملية الإكثار البذري للنخيل.

يتم تكوين الأجنة الخضرية بزراعة الأنسجة بوساطة عدة طرائق، إما بدءاً من الكالوس كما هو الحال في النخيل أو بدءاً من البروتوبلاست أو الخلايا المفردة أو حبوب اللقاح التي تتطور لتكون أجنة خضرية، قد تكون الأجنة وحيدة أو ثنائية الصيغة الصبغية حسب الخلايا الأم التي كونت منها.

وسيتّم الشرح المفصل لآلية إكثار النخيل بالأجنة الخضرية بعد تكون الكالوس الجنيني، الذي يعطي بدوره مصدراً جيداً وكبيراً للأجنة الخضرية. وأصبحت هذه التقنية إحدى الطرائق الرئيسية في إكثار النخيل بالأنسجة، حيث تعطي أعداداً كبيرة من النباتات خلال فترة زمنية قصيرة نسبياً بالمقارنة مع الطرق الأخرى المتبعة في إكثار النخيل بالأنسجة.

7-1- مقدمة تاريخية Introduction:

يعد العالم Schroder عام 1970 أول من حاول زراعة أجزاء نباتية من قلب النخلة. وقد حصل على الكالوس الذي تطور فيما بعد إلى جذور فقط. كما حصل العالم سميث Smith, 1970 على الكالوس بدءاً من زراعة أجزاء من جذور النخيل التي تطورت وأعطت جذوراً جديدة وكالوساً بسيطاً.

وفي عام 1972، Reuveni et Kipnis, 1974 قاموا بزراعة أجزاء مختلفة من فسائل خضرية من النخيل حيث زرعوا القمم النامية، البراعم الجانبية، الوريقات الأولية،

وأجزاء من الشماريخ الزهرية، أجزاء من الجذور، وأجنة البذور، وحتى البويضات غير الملقحة. جميع محاولاتهم باءت بالفشل، إذ لم يحصلوا إلا على الكالوس.

يعد الباحثان عمار و ابن باديس (Ammar et Benbadis, 1977) أول من حصل على أجنة خضرية للنخيل التي تطورت إلى نباتات كاملة فيما بعد، عن طريق زراعة أجنة البذور. كما حصل الباحثان Rynold et Murashige عام 1978 على النتيجة نفسها.

يعد الباحث Tisserat عام 1979 أول من حصل على أجنة خضرية بدءاً من الكالوس المتكون من القمم النامية والبراعم الجانبية. تطورت الأجنة الخضرية وأعطت نباتات كاملة. تتالت الأبحاث في هذا المجال، ويمكن القول إن كثير من الباحثين تمكنوا من الحصول على أجنة خضرية بدءاً من أجزاء نباتية مختلفة.

وتجدر الإشارة إلى أن العمل على النخيل صعب وشاق، ويحتاج إلى وقت طويل، لأن استجابة أنسجة النخيل للنمو بطيئة جداً، ويمكن أن تطول الفترة إلى أكثر من 6-8 أشهر حتى نحصل على الكالوس الجنيني الذي بدوره يتطور، ويعطي أجنة خضرية ونباتات كاملة، وعلينا أن نذكر أن لإكثار النخيل بالأنسجة أسراراً كثيرة لم تنتشر من قبل الباحثين، ويعزى السبب إلى الأهمية الاقتصادية لإكثار النخيل بالأنسجة. ولذلك فالباحث العلمي في هذا المجال يكتنفه الغموض، والدليل على ذلك السعر المرتفع الذي تطلبه بعض الشركات الأجنبية التي تمتلك التقنية ثمناً لها والتي بدأت بشكل فعلي بإنتاج أعداد كبيرة من شتول النخيل بهذه الطريقة.

7-2- كيف تتم زراعة أنسجة النخيل:

7-2-1- تحضير الأوساط المغذية:

تحتوي الأوساط المغذية الخاصة بزراعة أنسجة النخيل للحصول على أجنة خضرية، على العناصر المعدنية بحيث تشمل العناصر الكبرى والعناصر الصغرى وعلى مصدر للطاقة، والفيتامينات والهرمونات النباتية. يحوي الوسط المغذي في المرحلة الأولى على تركيز عالٍ من الأوكسين. إضافة إلى ذلك يحتوي الوسط المغذي على مضاد أكسدة مثل الفحم المنشط أو P.V.P بولي فينيل بيروليديون، وتضاف أيضاً مادة الآجار التي تجعل الوسط المغذي صلباً وشفافاً.

يختلف تركيب الأوساط المغذية حسب طبيعة الأجزاء النباتية المزروعة، حسب الأصناف، ومرحلة الزراعة. بعد تحضير الأوساط المغذية المناسبة، يتم تعبئتها في أنابيب اختبار قياس 25 X 150 مم أو 25 X 200 مم، أو في قوارير سعة 150 مل أو 200 مل. ثم تسد الأنابيب بسدادات بلاستيكية أو معدنية. تعقم الأوساط المغذية داخل أوتوغلاف Autoclave على درجة حرارة 115-121 م° لمدة 15-30 دقيقة. تترك الأنابيب لتبرد بعد التعقيم وبهذا الشكل تصبح جاهزة لعملية الزرع.

7-2-2- تحضير الأدوات والتجهيزات اللازمة للزراعة:

يقصد بأدوات الزرع، الملاقط، المشارط، الإبر والمقصات اللازمة لعملية الزرع، يمكن أن تعقم بالأوتوغلاف أو بالفرن بالهواء الجاف على درجة حرارة 100-150 م°، ثم تترك لتبرد في غرفة العزل ويجب عدم فتحها قبل إجراء عملية الزرع. نحتاج لعملية الزرع ورق ترشيح وأطباق بتري، وتوضع أطباق البتري بعلب معدنية كبيرة وتعقم. ويحافظ عليها من التلوث. كما يتم تحضير الأدوات الزجاجية اللازمة لتعقيم الأجزاء النباتية مثل بياشر ودوارق. بمختلف الأنواع، وتعقم بالأوتوغلاف. يتم تحضير الماء المقطر بحسب حجم الماء المقطر في الدوارق كما هو موضح في الجدول (7-1).

جدول (7-1): تأثير حجم المحلول على الزمن اللازم للتعقيم (عن Thorpe عام 1981)

حجم الوسط أو المحلول (مل)	الوقت اللازم للتعقيم (121 م°) (دقيقة)
20	15
100-75	20
500-250	25
1000	30
1500	35
2000	40 دقيقة

بعد تعقيم الأدوات والمواد الضرورية لعملية الزرع، تترك لتبرد حتى نتمكن من استعمالها أثناء عملية الزرع.

7-2-3- تحضير الفسائل للزراعة:

تؤخذ الفسائل المعدة للزراعة من أمهات سليمة معروفة الأصناف، وخالية من الإصابة بالأمراض والحشرات. ويراعى أن تؤخذ من أمهات جيدة النمو ومعتنى بها بشكل جيد. تؤخذ الفسائل بعمر 2-4 سنوات ووزنها لا يقل عن 5-7 كغ. يمكن أن تؤخذ الفسائل بحجم أقل من ذلك ولكن عيبها تكون صعوبة التحضير ولا تحوي براعم جانبية متميزة، تنظف الفسائل بعد فصلها من الشجرة الأم من التراب، ومن الليف والوريقات الخارجية الكبيرة. ثم تنزع الأوراق الخارجية بشكل تدريجي مع أخذ الحذر بعدم إتلاف البراعم الجانبية إن وجدت، وتنزع البراعم الجانبية وتوضع في محلول نظيف، حيث يفترض وجود برعم جانبي في إبط كل ورقة. ولكن قسماً فقط من هذه البراعم يكون بحالة جيدة والقسم الأعظم يكون ساكناً أو تالفاً. ويتابع العمل في نزع الأوراق والبراعم الجانبية حتى نصل إلى قلب النخلة. وهذا ما تطلق عليه الجمارة.

نقص بحجم 3-5 سم وقطر 1-2 سم. وبهذا الشكل تصبح الأجزاء النباتية (الجمارة والبراعم الجانبية) جاهزة لعملية التعقيم.

7-2-4- تعقيم الجمارة والبراعم الجانبية:

يتم استخدام بعض المواد الكيميائية لتعقيم الأجزاء النباتية مثل هيبوكلوريت الصوديوم، هيبوكلوريد الكالسيوم، ماء جافل، برمنغنات البوتاسيوم، كلور الزئبق، وتستخدم بعض المركبات الجاهزة مثل الدوستوس Domestos (Jones et al, 1977)، والكلوروكس Chlorox.

هذا وقد استخدمنا التقانة الآتية مع بعض التقانات الأخرى في مركز أبحاث النخيل والتمور:

- بعد أن تنظف الفسيلة بشكل جيد وتفصل البراعم الجانبية والجمارة بطول 3-5 سم، وعرض 1.5-2.5 سم. تغسل جيداً بالماء الجاري ثم تنقع في محلول يحوي مزيجاً من حمض الستريك Citric acid 100 ملغ/لتر، وحمض الأسكوربيك Ascorbic acid 150 ملغ/لتر لفترة 20 دقيقة.

- تنقع الأجزاء النباتية في محلول من الكلوروكس 0.5-1% المضاف له عدة نقاط من التوين Tween80 لمدة 15-20 دقيقة يضاف للمحلول معقم مزيج من 150 ملغ/لتر من

حمض الأسكوربيك و100ملغ/لتر من حمض الستريك. يتم التحريك المستمر أثناء عملية التعقيم.

-تغسل الأجزاء النباتية ثلاث مرات في ماء مقطر، ومعقم، يحوي 150 ملغ/لتر من حمض الأسكوربيك و100ملغ/لتر من حمض الستريك، ويحافظ على قلب الفسيلة في المحلول نفسه إلى موعد الزراعة.

ولابد من الانتباه إلى أن عملية الغسل، وتغيير المحاليل يجب أن تتم في جو معقم وباستخدام أدوات وزجاجيات معقمة للمحافظة على سلامة الأنسجة من التلوث الخارجي. وقد أثبتت التجارب المكررة عشرات المرات صلاحية هذه التقنية التي لا تتجاوز فيها نسبة التلوث عن 10-20% (Al Maarri Al Ghamdi 1995).

7-2-5- زراعة الأجزاء النباتية:

يتم عزل الأجزاء النباتية وزراعتها في غرفة العزل تحت جهاز العزل الجرثومي Laminar air flux hood حيث يؤمن هذا الجهاز جواً معقماً كاملاً في ساحة العمل، خالياً من التلوث.

يتم فصل الأجزاء النباتية (قمم نامية، بداءات ورقية، أجزاء من الميرستيم، براعم جانبية) بمساعدة أدوات مثل المشارط والملاقط المناسبة، وبمساعدة مجهر. وبعد عملية الفصل تزرع الأجزاء النباتية مباشرة داخل الأنابيب الحاوية على وسط مغذٍ مناسب للزراعة الأولية. ولابد من الإشارة إلى أنه يمكن تقسيم القمة النامية إلى عدة أقسام، أربعة أقسام أو أكثر، وهذا يعود إلى حجم القمة النامية المزروعة وإلى مهارة القائم على العمل.

7-3- مراحل إكثار النخيل بالأجنة الخضرية:

تشمل زراعة أنسجة النخيل عدة مراحل أساسية، وهي:

-الزراعة الأولية.

-تكوين الكالوس الجنيني وإكثاره.

-تكوين الأجنة الخضرية.

-إنبات الأجنة الخضرية للحصول على نباتات كاملة.

-التقسية أي نقل النباتات من الأنابيب إلى الشروط الطبيعية.

7-3-1- الزراعة الأولية Initial culture: تهدف الزراعة الأولية الحصول على أنسجة نباتية خالية من التلوث، ولها القدرة على النمو والتطور (Franclet, 1980). إن استجابة أنسجة النخيل للزراعة على أوساط غذائية بطيئة جداً، وتحتاج إلى وقت طويل حتى نحصل على استجابة صحيحة تسمح لنا بمتابعة مراحل الإكثار للحصول على نباتات كاملة. قد تستغرق العملية عدة أشهر وقد تطول حتى سنة.

يتحدد نجاح الزراعة الأولية بعدة عوامل، منها ما هو متعلق بتركيب الأوساط المغذية، ومنها ما هو متعلق بالحالة الفيزيولوجية للنبات الأم، ومنها ما هو متعلق بالعوامل المناخية (حرارة، إضاءة) الواجب توافرها في غرف النمو.

7-3-1- العوامل المتعلقة بالنبات الأم:

يقصد بالحالة الفيزيولوجية للنبات الأم، مدى النشاط الفيزيولوجي للنبات الأم. وهذا النشاط مرتبط بعدة عوامل مثل عمر النبات الأم، طبيعة الأجزاء النباتية المزروعة، وقت زراعة الأجزاء النباتية، طبيعة الصنف، الحالة الصحية للفسائل.

أ- تأثير عمر النبات الأم في استجابة الأجزاء النباتية المزروعة: يعد عمر النبات الأم عاملاً محدداً لإكثار كثير من النباتات بالأنسجة، وبشكل عام تقل قدرة الأجزاء النباتية على الإكثار، كلما زاد عمر النبات الأم (Al Maarri, 1986؛ Franclet, 1980). ويلاحظ في كثير من الأنواع النباتية المعمرة بأن النباتات الأم تحتاج إلى تجديد حيويته وفوتوتها Rejnvenation حتى تكتسب النباتات قدرة على الإكثار والتجديد من جديد.

وهذه الظاهرة واضحة جداً في إكثار الأشجار الخشبية بالأنسجة، أما في حال النخيل فلا توجد دراسات واضحة تبين أثر عمر النبات الأم في الإكثار بشكل عام. وإن المشكلة بالأساس غير ظاهرة كون الفسائل المستعملة فتية بعمر 2-4 سنوات من جهة، وإن الأشجار الأم في أغلب الأصناف لا تعطي فسائل، إلا في المرحلة الأولى من عمرها قبل أن تدخل الأشجار في طور الإثمار المليء.

وعلى الرغم من ذلك فإن أثر عمر النبات الأم يظهر بقدرة الأجزاء النباتية على الاستجابة للنمو وتكوين الكالوس، ففي تجربة قام بها العالم Rynold, 1978 على زراعة أجنة البذور حيث أخذ الأجنة من بذور بأعمار مختلفة، بذور ثمار خضراء، أجنة أخذت من

بذور بعمر سنتين، وأجنة أخذت من بذور بعمر سنتين ولكن أخضعت لعملية تجميد. بعد زراعة الأجنة من المصادر الثلاثة لاحظ الباحث أن حجم الكالوس المتكون من أجنة حديثة العهد كان ضعفي حجم الكالوس المتكون من أجنة أخذت من بذور بعمر سنتين. وقد أثبتت التجربة أن الأجنة حديثة العهد أعطت كالوساً بنسبة أكبر وحجم أكبر، وكانت مقدرة على تكوين الأجنة مضاعفة عن الكالوس المتكون في الأجنة التي أخذت من ثمار جافة بعمر سنتين (Rynold, 1978).

وتجدر الإشارة أيضاً إلى أن استجابة الأجزاء المأخوذة من فسائل بذرية أسرع وأكثر قدرة على تكوين الأجنة من الأجزاء النباتية المأخوذة من الفسائل الخضرية. وقد أثبت ذلك علمياً من كثير من الباحثين (Benbadis, 1986؛ Tisserat, 1982)،

ب- **طبيعة الجزء النباتي المزروع:** يؤثر الجزء النباتي المزروع تأثيراً مباشراً في نجاح عملية تكوين الكالوس الجنيني، ومن ثم تكون الأجنة الخضرية القادرة على إعطاء نباتات كاملة. وقد تم الحصول على أجنة خضرية بدءاً من أجزاء نباتية مختلفة، من القمم النامية، البراعم الجانبية، الوريقات الأولية، أجنة خضرية بدءاً من أجزاء نباتية مختلفة، كما هو موضح بالجدول (2-7).

جدول (2-7): تأثير طبيعة الجزء النباتي المزروع على إكثار النخيل بالأجنة

الجزء النباتي المزروع	النتيجة التي توصل لها الباحثون	اسم الباحث
قمم نامية وبراعم جانبية	كالوس/أجنة خضرية ونباتات كاملة	Tisserat, 1979; Tisserat and demason, 1980; Rhiss <i>et al</i> , 1979. Sharma <i>et al</i> , 1984; Zaid and Tisserat, 1983; Daguin <i>et letouze</i> , 1988; Abo.elnil, 1989; Al Gnamdi, 1993.

Sharma et al, 1980, Zaid and Tisserat, 1983; Drira, 1981; Poulain et al, 1979. Tisserat, 1981; Al Maarri and Al-Ghamdi, 1995.	كالوس/أجنة خضرية ونباتات كاملة	الوريقات الأولية
Tisserat, 1979, Tisserat et al, 1979.	كالوس جنيني/ أجنة خضرية	الميرستيم
Smith, 1975; Euweins, 1978.	كالوس/جنور	الجنور
Zaid and Tisserat, 1983.	كالوس/براعم زهرية	براعم زهرية
Drira and benbadis, 1985; Drira et al, 1993.	كالوس جنيني/ براعم زهرية، أجنة خضرية، نباتات كاملة.	براعم زهرية

يلاحظ من النتائج التي حصل عليها الباحثون أن القمم النامية، والبراعم الجانبية، والوريقات الأولية الداخلية أكثر الأجزاء النباتية استجابة للحصول على الكالوس. أما استجابة الأجزاء النباتية الأخرى فأقل من القمم النامية. ومن الملاحظ اتجاه أكثر الباحثين الذين يعملون في زراعة أنسجة النخيل إلى زراعة القمة النامية للفسائل التي تعطي الكالوس بشكل أسرع وأقل عرضة للإصابة بالاسمرار والتلوث في الأجزاء النباتية الأخرى. والكالوس المتكون يمكن أن يتطور ويعطي الأجنة الخضرية التي تنمو إلى نباتات كاملة.

7-3-1 العوامل المتعلقة بالأوساط الغذائية:

لا يوجد إلى الآن وسط مغذٍ وحيد يناسب زراعة أنسجة النخيل، ولكننا نجد أن كل باحث درس الأوساط الغذائية من زاوية معينة. وذلك حسب الهدف من الزراعة، حسب الأصناف التي استعملت، وحسب الجزء النباتي المزروع. ولدى دراسة الوسط المغذي، يتوجب دراسة جميع العناصر التي تدخل في تركيبه، مثل تركيب المحلول المعدني، أنواع الهرمونات وتركيزها، نوعية الأجار المستعمل، المواد العضوية المضافة وتراكيزها، السكروز وتركيزه. إن كل عامل من هذه العوامل يلعب دوراً مهماً سلباً أم إيجاباً في تطور الأجزاء النباتية.

أ-تأثير التركيب المعدني للوسط المغذي: يستعمل أغلب الباحثين محلول المعدني لموراشيخ وسكوغ (1962) الذي أعطى نتائج جيدة في تطور الكالوس، كما استعمل بعض الباحثين محاليل معدنية أخرى مثل محلول وايت White من قبل Schroeder عام 1970، ومحلول Knop (كنوب) من قبل الباحث عمار وزملائه (1977) في إنبات أجنة بذور النخيل. وقد استخدم تعديل لمحلول موراشيخ وسكوغ من قبل العديد من الباحثين (Zaid M, 1989 ; Tisserat, 1979 ; Rynold, 1984 ; Sharma, 1984).

وقد دلت التجارب أن تمديد المحلول المعدني لموراشيخ وسكوغ يقلل من تكون نسبة الكالوس المتكونة على الأنسجة Rynold, 1984. كما أوضحت التجارب عند إضافة كمية زائدة من المركب $K_2H_2PO_4.H_2O$ إلى محلول موراشيخ وسكوغ، أنه يزيد في تكوين الكالوس ويقلل من ظاهرة الاسمرار (Zaid M, 1989)؛ (Sharma, 1984).

ب-تأثير الهرمونات النباتية ومركبات الوسط الأخرى: تلعب الهرمونات النباتية دوراً فعالاً ومحدداً لنجاح زراعة الأنسجة النباتية بشكل عام والنخيل بشكل خاص، إذ لا يمكن الحصول على الكالوس الجنيني في النخيل إذا لم نضيف الهرمونات النباتية إلى الوسط المغذي. ليس كل الهرمونات تؤثر بشكل إيجابي في تكون الكالوس على أنسجة النخيل المزروعة. يضاف عدة مجموعات من الهرمونات النباتية إلى الأوساط المغذية كما يلي:

-الأوكسينات: NOA, TAA, 2.4.D, NAA, IBA, ...

-السيٲوكينينات: 2ip, Z, K, BAP

-الجبريلينات: GA3

من الملاحظ أنه لا يمكن تكوين الكالوس الجنيني على أجزاء النخيل المزروعة داخل الأنابيب إلا بوجود الأوكسين 2.4.D، بتركيز مختلفة. وقد تم الحصول على الكالوس في بعض الأحيان باستخدام NAA أو مزيج من الأوكسينات. وفي المراجع توازنات هرمونية مختلفة، أدت في النهاية إلى الحصول على تطور للكالوس بدءاً من أجزاء نباتية مختلفة. ولكن أكثر هذه المراجع تعمل على استخدام تراكيز عالية من الأوكسين 2.4.D الذي يصل إلى 100ملغ/لتر وبخاصة في المرحلة الأولى للحصول على الكالوس الجنيني (Tisserat, 1979; Tisserat et al, 1981; Mater et al, 1983)

قام الباحث Rynold, 1978 بدراسة تأثير مختلف تراكيز الـ 2.4.D والسيتوكينين 2ip في تكون الكالوس بدءاً من أجنة النخيل المزروعة على وسط مغذٍ MS، المضاف له $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (170 ملغ/لتر) مع الفحم المنشط. وقد دلت هذه التجربة على أن أفضل تركيز للهرمونات في تكوين الكالوس هو 100 ملغ/لتر من 2.4.D مع 1 ملغ/لتر من 2ip.

هذا وقد استخدمت هرمونات أخرى لتكوين الكالوس على أنسجة النخيل مثل الـ NAA أو مزيج من الـ NAA مع الـ NOA أو الـ IAA بنسب متفاوتة.

فقد تمكن الباحثان Daiky et Demarly عام 1987 من الحصول على الكالوس الجنيني باستخدام وسط مغذٍ سائل، زرعت فيه أجزاء نباتية من الوريقات الصغيرة المفصولة من نباتات صغيرة من صنف دوغلة نور، يحوي الوسط المغذي العناصر الكبرى لموراشيغ وسكوغ مع العناصر الصغرى لـ Ewens عام 1978 (الخالي من يود البوتاسيوم). الذي أضيف له إينوزيتول 100 ملغ/لتر، الغلوتامين 100 ملغ/لتر، الأرجنين 100 ملغ/لتر، الأسباراجين 100 ملغ/لتر، والـ FeNa EDTA 20 ملغ/لتر، بالإضافة إلى ذلك 50 ملغ/لتر من الـ NAA و 50 ملغ/لتر من الـ IAA والـ BAP 5 ملغ/لتر و 10 ملغ/لتر من الكينيتين. فقد تمكن الباحثان من الحصول على الكالوس الجنيني على الوسط المذكور الذي تطور فيما بعد إلى أجنة خضرية. واستخدم الوسط السائل فقط لمدة ثلاثة أيام وبعدها نقلت إلى محلول مغذٍ صلب يحوي المكونات السابقة نفسها، ولكن تركيز الهرمونات النباتية خفض 10 مرات من المحلول الأول.

ولابد من القول أيضاً أن بعض الباحثين قد حصلوا على الكالوس الجنيني على أوساط غذائية تحوي على تراكيز مخفضة جداً من الـ 2.4.D لا تتعدى 2 ملغ/لتر (Drira et al., 1989; Zaid M., 1993). وفي الحالة الأخيرة لم يضاف إلى الوسط المغذي الفحم المنشط.

وتجدر الإشارة إلى أن بعض المركبات الكيميائية التي يدخل في تركيبها 2.4.D مثل البيكلورام Picloram، مبيد عشبي المادة الفعالة فيه 2.4.D عند إضافة 1 ملغ/لتر من هذا المركب إلى الوسط المغذي، لوحظ في بعض الحالات الحصول على أجزاء نباتية ذات نسبة

اسمرار أقل وطبيعة الكالوس المتكون وحجمه كانت أفضل من الكالوس المتكون على أجزاء نباتية مزروعة على وسط مغذٍ نفسه الحاوي على 2.4.D (Zaid M., 1989).

ولابد من التذكير أنه يضاف إلى الوسط المغذي الخاص بتكوين الكالوس، بعض الفيتامينات والأحماض الأمينية مثل التيامين كلوريد، ميوينوزيتول، البيرودوكسين، الغلوتامين، حمض النيكوتينيك، بانتوثينات الكالسيوم. ولكن دور الفيتامينات لم يعرف تأثيرها إلى الآن بشكل واضح، حيث أشار بعض الباحثين إلى أهمية كل من التيامين كلوريد، والميوينوزيتول في تنشيط نمو الكالوس المتكون على بعض أنواع النخيل (Reynold and Murashige, 1979)، ولكن يلاحظ أن أغلب الباحثين في مجال إكثار النخيل يضيفون الفيتامينات والأحماض الأمينية المذكورة أعلاه تراكيز محددة. وربما يكون ذلك له أثر إيجابي في نمو الكالوس وتطوره. ولكن لا يوجد دراسات تفصيلية على هذه المركبات الغذائية.

أما فيما يتعلق بالسكروز، يضاف عادة إلى الوسط المغذي بتركيز من 2-5% (Murashige, 1974) يضاف عادة السكروز بتركيز 3% لزراعة النخيل وخاصة لطور تكوين الكالوس. وقد دلت الأبحاث على أن زيادة تركيز السكروز يزيد من تكوين الأجنة الخضرية المتكونة على الكالوس الذي حصل عليه في زراعة أجنة البذور لصنف دوغلة نور (Zaid M., 1989). وفي الوقت نفسه زيادة كمية السكروز في الوسط المغذي وبخاصة بالنسبة للأنسجة النباتية المتميزة نسبياً مثل الوريقات أو أجزاء من الأوراق الفضة يزيد في مشكلة الاسمرار. ولذلك لا ينصح باستخدامه بتركيز أكثر من 3% في طور الزراعة الأولية.

ج-تأثير نوعية الآجار المستخدم في تكوين الكالوس: تستخدم عادة مادة الآجار آجار، مادة تستخلص من الأشنيات البحرية من الجنس Gelidium، تذوب في الماء على درجة 90م حيث تعطي مادة جيلاتينية شفافة. توجد في الأسواق بعدة أشكال، مثلاً تنتج شركة Merk ثلاثة أنواع من الآجار:

-آجار آجار نقي جداً Ultrapur.

-آجار آجار نقي pur

-بودرة الآجار آجار التجارية.

يستعمل الآجار بمعدل 6-8 غ/لتر في الوسط المغذي الخاص بزراعة النخيل. وأجريت بعض الأبحاث على زراعة أجزاء من النخيل على أوساط غذائية تحوي أنواعاً غير الآجار مثل الأجاروس Agarose الذي أعطى نتيجة على تكون الكالوس بشكل أفضل من الآجار (Zaid M., 1989). كما تستعمل بعض المخابر الأخرى بعض الأنواع الأخرى التي أثبتت جدوى كبيرة مثل مادة تدعى Auby gel أو الكاراغينان Carraghenanes وهذا النوع من الآجار يستخدم حالياً في فرنسا. ويستخدم أيضاً في المغرب فقد أعطى نتائج جيدة بالمقارنة مع الآجار. مع العلم بأنه رخيص الثمن بالمقارنة مع الآجار آجار (Beauchesne, 1993).

7-3-1-3- تأثير العوامل المناخية في تكوين الكالوس:

تؤثر العوامل الجوية في الوسط المحيط تأثيراً مباشراً في مدى استجابة أجزاء النخيل المزروعة للنمو وتكوين الكالوس، ويقصد بالشروط الجوية، درجة الحرارة، الإضاءة (مدتها، نوعيتها، شدتها)، والرطوبة الجوية.

تدل معظم الأبحاث على أن الإضاءة تعيق أو تقلل من تكون الكالوس في طور الزراعة الأولية، وتسرع في ظهور المركبات الفينولية التي تسبب اسمرار الأجزاء النباتية وتعيق تطورها. كما أن الإضاءة تسرع في تطور وتمايز الأجزاء النباتية، وبالتالي تقلل في فرص تكون الكالوس الجنيني، لذلك يجب أن تتم الزراعة الأولية للنخيل بالظلام أو ضمن شروط إضاءة خفيفة جداً، لأن ذلك يساعد في تكون الكالوس ويؤخر تمايز اسمرار الأجزاء النباتية المزروعة (Drira, 1985; Beauchesne, 1983; Tisserat, 1979).

أما درجة الحرارة تؤثر بشكل مباشر في تكون الكالوس على أنسجة النخيل المزروعة على وسط مغذٍ يحوي سائر المتطلبات الغذائية اللازمة للنمو. فقد وجد بالتجربة بأن أفضل درجة حرارة لتكوين الكالوس 25-28م (Tisserat, 1984; Sharma et al, 1984; Mater, 1983).

أما درجات الحرارة المرتفعة فغير مناسبة، إذ تعمل على زيادة اسمرار الأنسجة النباتية وتمايزها.

-مشكلة التلوث: إن الحصول على زراعة سليمة خالية من التلوث، تعد من أول شروط نجاح زراعة الأنسجة النباتية. إذ يجب المحافظة على سلامة الأنسجة النباتية في جميع مراحل الإكثار حيث تؤدي إصابة الأجزاء النباتية في أي مرحلة من مراحل الإكثار إلى فشل الزراعة وموت الأجزاء النباتية. وهذا أمر هام جداً عند إكثار النخيل، لأن استجابة النخيل للنمو بطيئة جداً وهذا يتطلب عدة مرات نقل إلى وسط مغذ جديد، قبل أن نحصل على الكالوس الجنيني. لذا يجب أخذ الاحتياطات الكاملة، في مخابر زراعة الأنسجة للوقاية من التلوث.

تعد الأوساط المغذية لزراعة الأنسجة، أوساطاً ممتازة لنمو الأحياء الدقيقة وتكاثرها (بكتريا، فطور...)، وبخاصة لو علمنا بأن الوقت اللازم لانقسام البكتريا 30-60 دقيقة. في حين تحتاج الخلية النباتية لانقسامها بين 24-48 ساعة، وهذا يؤدي بعد فترة زمنية قصيرة إلى تشكل مستعمرات بكتيرية أو فطرية تنافس الجزء النباتي المزروع على الغذاء، وتؤدي في النهاية إلى موت الأنسجة النباتية.

استخدم عدة تقانات لتعقيم أنسجة النخيل قبل الزراعة من قبل الباحثين، ويمكن تلخيصها بالآتي:

-استخدم اللهب مع الكحول للتعقيم الخارجي للجذارة (Reuveni and kipnis, 1974)؛ (Smith, 1975).

استخدمت طريقة التعقيم بهيبوكلوريت الصوديوم المضاف لها عدة قطرات من Tween80 لمدة 15-20 دقيقة بتركيز مختلفة 1% (Tisserat, 1990)، 2.6% (Tisserat, 1983)، 2% (Al Maarri et al Skief, 1990)، 3% (Al Ghamdi, 1993)، 5% (Abo. El. Nil, 1986).

-كما استخدمت مركبات ومعقمات أخرى مثل كلور الزئبق، برمنغنات البوتاسيوم، هيبوكلوريت الكالسيوم (Sharma, 1980, 1984).

ولا بد من الانتباه إلى أن عملية الغسل وتغيير المحاليل يجب أن تتم في جو معقم وباستخدام أدوات وزجاجيات معقمة للمحافظة على سلامة الأنسجة من التلوث الخارجي.

تتعلق نسبة التلوث في زراعة أنسجة النخيل بمدى التلوث الخارجي للفسائل المزروعة، ومدى دخول الغبار والتراب إلى الأنسجة الداخلية للفسائل. تعد مشكلة التلوث مشكلة كبيرة يجب التغلب عليها بدراسة المعقم المناسب والتركيز والوقت الأمثل لكل نوع من أنواع الأنسجة المستخدمة في الزراعة. حيث لوحظ أن البراعم الجانبية لا تتحمل التراكيز العالية، لذلك يفضل استخدام تراكيز مخففة من المادة المعقمة. لأن زيادة تركيز المعقم يؤدي إلى زيادة اسمرار البراعم وعدم نموها بعد الزراعة.

لوحظ في النخيل وجود مشكلة التلوث البكتيري الداخلي الذي لا يظهر لدى الزراعة الأولية، وإنما يظهر في وقت لاحق من الإكثار. وقد أشار إلى هذا التلوث العديد من الباحثين (Al Maarri et al Skief, 1990؛ Beauchesne, 1983؛ Tisserat, 1984).

يعد التلوث الداخلي من أهم المشكلات التي يعاني منها تطبيق التقانة على النطاق التجاري وهذا ما أشار إليه (Awaawin M, 1993) الذي قام بإكثار أكثر من 150 ألف غرسة نخيل بالأنسجة في المغرب. يمكن التخفيف من التلوث البكتيري الداخلي بإضافة بعض المركبات المشجعة لنمو البكتريا إلى الوسط المغذي مثل مادة البيبتون Peptone بتركيز 2 غ/لتر. هذا المركب يشجع نمو البكتريا خلال عدة أيام. ولذلك فالأنابيب المصابة بالبكتريا يظهر عليها التلوث، تستبعد ويحافظ فقط على الأنابيب غير المصابة ويعمل على إكثارها (Beauchesne, 1984).

وفي بعض الأحيان تضاف المضادات الحيوية إلى الوسط المغذي ولكن وجد أن هذه العملية لم تعط نتائج مرضية في النخيل (Reuveni and lilien-kipnis, 1974).

يظهر أحياناً التلوث في الأنابيب، ويكون عائداً لأسباب أخرى غير الأجزاء النباتية. ويمكن معرفته بسهولة، فإذا كان انتشار التلوث من المركز باتجاه المحيط أي من الأجزاء النباتية باتجاه حواف أواني الزرع، ففي هذه الحالة، فإن سبب التلوث يكون عائداً للأنسجة النباتية المزروعة. أما إذا كان انتشار التلوث من حواف الأواني باتجاه مركز الدورق، فيكون سبب التلوث في هذه الحالة عائداً للأسباب التالية:

- قد يكون التلوث ناتجاً عن عدم التعقيم الكافي للهواء الداخل إلى غرفة العزل (عطل في فلاتر تنقية الهواء).

- قد يكون التلوث ناتجاً عن القائم على العمل نفسه (هواء زفير، أو يداه غير معقمة بشكل جيد، أو الأدوات المستخدمة في عملية الزرع غير معقمة كما يجب).

- قد يكون التلوث ناتجاً عن عدم التعقيم الجيد للأوساط الغذائية، تعقيم غير كامل، أو عطل في جهاز التعقيم.

- ويمكن أن يحدث التلوث داخل غرف النمو مما يؤدي إلى انتشار بعض الأحياء الدقيقة بشكل مفاجئ. وقد تسبب بعض الكوارث حيث يمكن أن تقضي على الآلاف من الأنابيب المزروعة. كما حدث في أحد المخابر المغربية حيث ظهر التلوث فجأة وقضى على 80% من الأنابيب المزروعة في المختبر. وتم خسارة كثير من نباتات النخيل ذات القيمة الكبيرة. ويتم استبعاد خطر التلوث باتباع ما يلي:

- تعقيم الأجزاء النباتية بالمواد الكيميائية بشكل جيد.

- أخذ الفسائل من أمهات جيدة النمو، سليمة، ويفضل أن يكون قد طبق عليها مسبقاً برنامج رش وقائي ضد الأحياء الدقيقة. أو يفضل وضع الفسائل لفترة من الزمن قبل استخدامها داخل البيوت المحمية، مع رشها من وقت لآخر بمبيدات فطرية لتخفيف حمولتها من الأحياء الدقيقة.

- عزل جيد لمخبر زراعة الأنسجة، والتأكد من سلامة الهواء الداخل إلى أجهزة العزل من التلوث.

- مراقبة جميع عمليات التعقيم، التي تجري في المختبر بشكل جيد (تعقيم الأدوات، المحاليل....)، مع الكشف الدوري على أجهزة التعقيم للتأكد من صلاحيتها، وعدم وجود أعطال فيها.

- اتباع وسائل توعية للعاملين في المختبر مع المحافظة على النظافة العامة، واتباع الأسلوب الصحيح في الزراعة مع وضع كمادات خاصة أثناء عملية الزراعة، وعدم التكلم أثناء العمل، لأنه عند التكلم يخرج من الفم بعض البكتيريا التي قد تحدث التلوث.

- المحافظة على النظافة داخل المختبر لأنها من أهم الاحتياطات الواجب وضعها في الحسبان، لأن ظهور تلوث مفاجئ يمكن أن يسبب كوارث.

7-3-1-4-مظاهر النمو في طور الزراعة الأولية:

- تتميز أنسجة النخيل المزروعة داخل الأنابيب بكونها بطيئة النمو، ولا تبدي أي مظاهر للنمو إلا بعد فترة طويلة، وقد تستمر بين 4-8 أشهر حتى نحصل على الكالوس الجنيني. فيما لو كانت جميع شروط الزراعة مناسبة للنمو.

تختلف مظاهر النمو الممكن الحصول عليها باختلاف الأجزاء النباتية المستعملة، وباختلاف تركيب الوسط المغذي، والشروط الجوية لغرف النمو. تظهر نتيجة التلوث على الأجزاء النباتية بعد أسبوع من الزراعة على الأوساط المغذية، تستبعد مباشرة الأنابيب الملوثة ويحافظ على الأنابيب السليمة خلال الأسبوع الأول من الزراعة وهذا ما يعرف بالتلوث السطحي للأجزاء المزروعة. أما التلوث الداخلي لا يمكن الكشف عنه إلا بعد عدة أسابيع من الزراعة.

تظهر نتيجة الاسمرار على الأجزاء النباتية بدءاً من الأسبوع الأول، وتزداد بشكل تدريجي حيث يمكن أن تؤدي إلى موت بعض الأجزاء المزروعة خلال فترة زمنية أقل من شهر. ولذلك يضاف إلى الوسط المغذي مركبات مضادة للأكسدة مثل الفحم المنشط، للحد من اسمرار الأجزاء النباتية. ففي هذه الحالة تكون نسبة الاسمرار قليلة. وإن وجدت تكون جزئية على العينات النباتية.

أما عن نمو الأجزاء النباتية المزروعة، يلاحظ تضخم الأجزاء النباتية ويتضاعف حجمها بشكل تدريجي خلال ست أسابيع من الزراعة. ويبدأ ظهور كالوس خفيف يختلف حجمه ونوعه باختلاف الأنسجة المزروعة، وفي بعض الأصناف لا يلاحظ بداية ظهور الكالوس إلا بعد عدة شهور.

- ففي حال القمم النامية على وسط مناسب لتكوين الكالوس، يلاحظ ازدياد حجمها بشكل تدريجي، كما أن الوريقات الأولية الموجودة حول القمة النامية تستطيل. ويلاحظ تكون كالوس خفيف خلال الشهرين الأولين من الزراعة. وهذا الكالوس هش وسمني. ويتكون على قواعد القمة النامية وعلى الوريقات الأولية.

يلاحظ تكون عدة أنواع من الكالوس أثناء نمو القمم النامية المزروعة. ففي بداية الأمر يتكون كالوس هش خفيف، ثم يلاحظ تكون نوع آخر من الكالوس الطري السمني والذي لا

يلبث أن يزداد في الحجم. ويتطور إلى كالوس من نوع آخر حبيبي أبيض مصفر الذي يعطي بعد عدة عمليات نقل الكالوس الجنيني المحبب.

- ولابد من الإشارة إلى أنه يمكن أن يتكون عدة أنواع من الكالوس على الأجزاء النباتية المزروعة، وتم ملاحظة من قبل الكثير من الباحثين نذكر منهم (Quereshi *et al*, 1982؛ Mater, 1989؛ Zaid, 1989؛ AL Maarri et Al Ghamdi, 1995).

وقد أوضحت الدراسة التشريحية التي قام بها Mater على وجود نوعين من الكالوس النامية في أنسجة النخيل، كالوس رخو هش، يتكون من خلايا مجوفة كبيرة الحجم، يتجاوز قطرها 30 ميكروناً. والنوع الثاني، كالوس متماسك خلاياه متراسة يحوي نوعين من الخلايا، خلايا وسط غير مجوفة قطرها 10-20 ميكروناً، ويوجد مع هذه الخلايا المرصوصة خلايا صغيرة الحجم قطرها أقل من 10 ميكرونات، ذات نشاط ميرستيمي واضح داكنة اللون مما يدل على غناها بالأحماض النووية، ولهذه الخلايا قدرة كبيرة على الانقسام.

كما أوضح الفحص الميكروسكوبي المكبر لمقاطع في الكالوس الجنيني وجود مراكز مرستيمية Meristematic centers في المناطق الخارجية وتحت الخارجية للكتل المرصوصة، وهذه المراكز مكونة من خلايا مرستيمية قطرها 10 ميكرونات تحتوي على نوى بارزة كبيرة الحجم نسبياً. وتحيط بالمراكز المرستيمية حواجز مكونة من جدران خلوية سميكة تفصل المراكز بعضها عن بعض، وعن الخلايا الأخرى شبه المرستيمية الأكبر حجماً التي تحيط بها داخل الكتلة المرصوصة. ويتوسع المراكز المرستيمية نتيجة النمو توالدت كتل منفصلة من العقد الحرة Free nodules أو مبادئ الأجنة الخضرية pro embryoids (Mater, 1986).

- عند زراعة البراعم الجانبية، فإن قسماً منها يتطور مثل القمم النامية ويعطي الكالوس بمراحله المختلفة حتى نحصل على الكالوس الجنيني الذي له القدرة على تكوين الأجنة الخضرية.

- أما فيما يتعلق بزراعة الوريقات الأولية، فتتمو وتستطيل ويمكن أن يصل طولها إلى 5-10 سم، وتتمايز أنسجتها، وتصاب بالاسمرار أكثر من البراعم الجانبية والقمم النامية، وتعطي ورقة شبيهة بسعف صغير داخل الأنابيب. ويتكون على أطراف الوريقات الصغيرة

المتكونة نموات هشة لا تلبث أن تتمايز إلى ليف صغير سطحي يعطي الوريقة ويأخذ اللون الأسمر البني الواضح. أما على قواعد الأوراق وعلى جزء منها وبخاصة الوريقات الداخلية القريبة من القمم النامية. يتكون الكالوس والذي يتطور فيما بعد إلى الكالوس الجنيني.

كما تظهر في بعض الأحيان بعض الكتل الخلوية بحجم 2-5مم من قلب قواعد الوريقات، قاسية لونها سملي وعند فصلها وزرعها على أوساط مغذية أخرى، يمكن أن يزداد حجمها وعددها، ولكن لا تتطور إلى أجنة خضرية. وفي بعض الأحيان تعطي جنور فقط. وتجدر الإشارة أخيراً بأنه يمكن في بعض الأحيان الحصول على أجنة خضرية مباشرة على الأنسجة النباتية المزروعة دون المرور في مرحلة الكالوس.

7-3-2- المرحلة الثانية إكثار الكالوس الجنيني:

يتم نقل الكالوس المتكون إلى وسط مغذ جديد بهدف إكثار الكالوس الجنيني للحصول على مصدر مستمر للكالوس. تخفض تراكيز الهرمونات النباتية في هذا الطور وبخاصة 2.4.D تجنباً لحدوث طفرات وراثية مما يؤدي إلى ظهور تراكيب وراثية جديدة، وهذا أمر غير مرغوب فيه في الإكثار الخضري.

تستخدم عدة أوساط مغذية لإكثار الكالوس الجنيني، يختلف تركيبها باختلاف الأصناف والقائمين على البحث. تستخدم بشكل عام تراكيز خفيفة من الأوكسينات في إكثار الكالوس (Tisserat, 1984؛ Gabre and Tisserat, 1985).

كما استخدم بعض الباحثين الأوساط السائلة عن إكثار الكالوس الجنيني أو الحبيبي، فقد استطاع الباحثان Dauguin et letouze, 1988 الحصول على إكثار الكالوس على وسط مغذ سائل يحوي محلول المعدني لمورايشيغ وسكوغ الممدد مرتين ويضاف له 3غ/لتر فحماً منشطاً و30غ سكرورز وتراكيز خفيفة من الأوكسينات، حيث حصلوا على مصدر مستمر من الكالوس الحبيبي الجنيني.

لم يستطع بعض الباحثين المحافظة على الكالوس الجنيني لفترة طويلة من مرحلة الإكثار ولوحظ أن الكالوس يتدهور بعد فترة من الزمن ويفقد قدرته على تكوين الأجنة الخضرية.

لذلك لابد من تجديد الزراعة بعد فترة زمنية محددة، أو اللجوء إلى بعض الطرائق الأخرى للمحافظة على الكالوس الجنيني مثل التجميد Cryoconservation على درجات حرارة منخفضة -196م باستخدام الآزوت السائل.

فقد تمكن Ulrich وزملاؤه عام 1982 من نجاح تجميد الكالوس الجنيني للنخيل صنف مدجول على درجة حرارة -196م لفترة تسعة أسابيع، وبعد التجميد أعيد إلى درجات الحرارة العادية وأخذ جزء منه ووضع من جديد على محلول لتكوين الأجنة الخضرية. وفعلاً، تمكن الباحثون من الحصول على أجنة تشابه تماماً الأجنة الخضرية التي حصل عليها من الكالوس نفسه الذي لم تجر عملية تجميد، وتم الحصول عليها من الكالوس نفسه الذي لم تجر له عملية تجميد. وتم الحصول في كلتا الحالتين نباتات كاملة. أخذت عينات نباتية وحللت لمعرفة فيما إذا تعرضت لأي تغير في التركيب الوراثي أثناء عملية التجميد. وقد تم تحليل بعض الأنزيمات باستخدام تقانة Gel electrophoresis وقدرة تراكيز الأنزيمات التالية في الأوراق:

Alcohol dehydrogenase	-دي هيدروجينات الكحول
Esterase	-استيريز
Peroxidase	-بيروكسيداز
Phospho gluco isomerase	-فوسفو غلوكو ايزوميريز
Phospho gluco mutase	-فوسفو غلوكو موتيز

وحللت تراكيز الأنزيمات السابقة على أوراق أخذت من فسائل النباتات الأم وعلى أوراق من نباتات نتجت من الكالوس الجنيني غير المجمد، وأوراق من نباتات نتجت من الكالوس الجنيني الذي أخضع للتجميد.

ودلت النتائج بأنه لا فرق في تركيز الأنزيمات في العينات الثلاث، وهذا مما يدل على أن النباتات الناتجة عن طريق الأجنة الخضرية مشابهة للنبات الأم من جهة، ومن جهة أخرى يمكن الاحتفاظ بالكالوس بالتجميد وبالتالي ليكون مصدراً مستمراً للأجنة الخضرية لفترة طويلة. وهذا الأمر في غاية الأهمية بالنسبة لإكثار النخيل لأن استجابة الأجزاء النباتية بطيئة وعملية الحصول على الكالوس الجنيني قد تستغرق نحو 4-8 أشهر.

كما تفيد عملية التجميد للكالوس بأنها تؤمن مصدراً مستمراً للكالوس، وتجنب الباحثين إكثار الكالوس لفترة طويلة الذي تزداد معه خطورة حصول على طفرات وراثية في الكالوس وبالتالي الحصول على نباتات مغايرة في تركيبها الوراثي للنبات الأم.

كما حصل في مخبر زراعة النسيج في مركز أبحاث النخيل والتمور حيث تم إكثار صنف الصفري عن طريق زراعة الأنسجة النباتية، وكانت النباتات الناتجة في البداية مشابهة في تركيبها الوراثي للنبات الأم، وقد استمر إكثار الكالوس الجنيني لأكثر من سنتين، وفي نهاية السنة الثانية ظهر بعض الأجنة التي تطورت وأعطت نباتات ذات أوراق بيضاء اللون خالية من اليخضور (Alpinose)، في حين أوراق الأجنة العادية خضراء واضحة، هذا مما يدل على حدوث تغير في التركيب الوراثي للنباتات الناتجة (AL Maarri et Al, 1997). ولهذا السبب لا ينصح بإكثار الكالوس لفترة زمنية طويلة، ويفضل اللجوء إلى عملية التجميد.

ومن المحاذير التي تؤخذ على الإكثار بوساطة زراعة الأجنة أنه احتمال ظهور طفرات وراثية وهذا غير مرغوب به لأنه يعطي نباتات مغايرة في تركيبها الوراثي للنبات الأم كما حصل في إكثار نخيل الزيت oil Palm، ولتجنب الحصول على مثل هذا النوع من الطفرات، كما يلجأ الباحثون إلى الحد قدر الإمكان من إكثار الكالوس.

والعمل على إكثار الأجنة عن طريق تكوين أجنة خضرية ثانوية وهكذا دون اللجوء إلى عملية إكثار الكالوس. حيث يمكن الحصول على أجنة ثانوية على الأجنة الأولية، وبالتالي تكون مصدراً مستمراً للأجنة، كما هو متبع حالياً في إكثار نخيل الزيت، ونخيل جوز الهند.

كما يلجأ الباحثون أيضاً إلى تخفيض تركيز الأوكسين 2.4.D إلى الحد الأدنى، لتجنب ظهور طفرات من الكالوس، أو استخدامه لفترة قصيرة. حيث يستعمل تركيز عالٍ حسب تقانة (Tisserat, 1979) نحو 100 ملغ/لتر.

ولكن جزءاً كبيراً من هذا التركيز يتمص من الفحم المنشط المضاف للوسط المغذي. وقد تمكن بعض الباحثين من الحصول على الكالوس الجنيني باستخدام تراكيز منخفضة من الـ 2.4.D نحو 1-2 ملغ/لتر. (Drira et al, 1993).

7-3-3- المرحلة الثالثة: تكوين الأجنة الخضرية

تتكون الأجنة الخضرية بدءاً من الكالوس الجنيني على أوساط مغذية، بسيطة تحوي على العناصر المعدنية مع الفيتامينات وقليل من الهرمونات. حتى يمكن الحصول على الأجنة الخضرية على أوساط مغذية خالية من الهرمونات (Mater, Tisserat, 1979؛ Zaid et al, 1983؛ 1989).

وقد استخدمت أيضاً تراكيز خفيفة جداً من الهرمونات مثل NAA 0.1 ملغ/لتر. وتكونت أجنة خضرية قوية النمو. كما يمكن الحصول على أجنة خضرية على أوساط مغذية سائلة (Aoiuin et letouze, 1987). تنشأ الأجنة الخضرية من خلايا مرستيمية تتواجد في الكالوس الجنيني، وتنشأ عادة من خلية مرستيمية التي تنقسم عدة انقسامات وسرعان ما تتطور إلى تراكيب متعددة الخلايا يكبر حجمها وتأخذ الشكل الدائري وتدعى باعقد الجنينية أو بدايات الأجنة Proembryos

(Zaid, 1989؛ Mater, 1989؛ Tisserat et demason, 1980). تتألف هذه العقد الجنينية من ثلاث طبقات وهي:

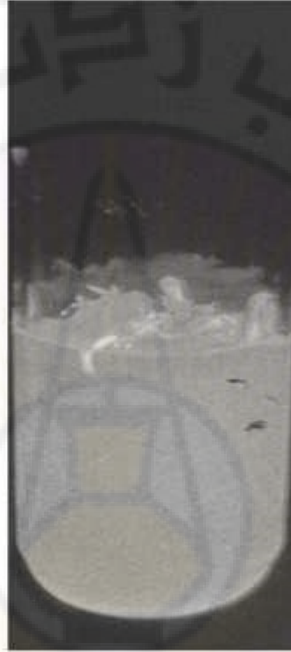
-طبقة مركزية: تتألف من خلايا مرستيمية غنية بالسيترولاسما والأحماض النووية.
-طبقة محيطية: تتألف من عدة طبقات من الخلايا الخاملة قليلة النشاط والتي تشكل الطبقة المحيطية.

-الطبقة الوسطى: تتألف من خلايا نشيطة تشبه خلايا الكامبيوم في النباتات ثنائية الفلقة وتسمى طبقة الكامبيوم الكاذب، ولها القدرة على الانقسام.

ترتبط العقد الجنينية مع بعضها البعض بواسطة خلايا هلامية من الكالوس سهلة الفصل (Zaid, 1989).

تتطور العقد الجنينية وتشكل الأجنة الخضرية (الشكل 7-1)، إذ تأخذ الشكل البيضوي، وتكبر بالحجم وتتصف بالطبقة المرستيمية وتعرف بثنائية القطب. وتتربك من طرف مرستيمي، يحتوي على خلايا مرستيمية صغيرة داكنة اللون، وطرف غير مرستيمي حامل يحوي على خلايا أكبر حجماً وأكثر تجوف وأفتح لوناً من تلك الموجودة في القطب

الميرستيمي. والطرف الميرستيمي الضيق يمثل نهاية الفلقة التي يتحور وينشأ داخلها كل من السويق والجذير الأوليين، في حين الطرف الآخر غير العريض غير الميرستيمي، يمثل نهاية الأخرى من الفلقة الذي يدعى بالممص (Mater, Tisserat and demason, 1980)؛ (1989).



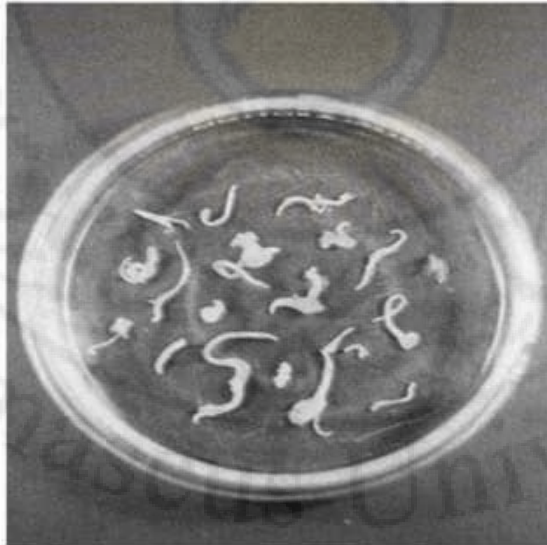
الشكل (7-1): تشكل الأجنة الخضرية من الكالوس

وفي مرحلة متقدمة من تكون الأجنة الخضرية، يلاحظ نمو طرفي الساق والجذر، وتظهر حزم الكامبيوم الأولى، وتتوضح الفجوة الداخلية Internal cavity التي تفصل بين مناطق الجنين، وتتوضح بها المدخرات الغذائية. حيث لوحظ أنه تختلف المدخرات الغذائية التي توجد بالأجنة الخضرية بحسب الأنواع النباتية، ففي نخيل الزيت لوحظ توزيع حبيبات تحوي الزيوت (Schwindiman *et al*, 1988). أما في نخيل التمر، فلوحظ وجود مدخرات بروتينية ومدخرات نشوية واضحة في مركز الأجنة المتكونة (Zaid, 1989). وتجدر الإشارة أخيراً إلى أن البنية التشريحية للأجنة الخضرية المتكونة بالأنسجة، تشابه البنية

للأجنة الجنسية المتكونة في البذور (Zaid, 1986؛ Tisserat et demason, 1980). ويوضح الشكل (2-7) بعض الجئة الخضرية الطبيعية التي تكونت من الكالوس الجنيني. لوحظ تكون أجنة خضرية ثانوية على شكل عقد جنينية صغيرة تنشأ من الطبقة المرستيمية النشيطة في العقد الجنينية الأساسية. وتتمو هذه العقد لتشكل أجنة خضرية ثانوية يمكن أن تفصل وتعطي أجنة صالحة للإنبات (Zaid, 1989؛ Tisserat et al, 1983).

7-3-4- المرحلة الرابعة: إنبات الأجنة الخضرية:

يتكون عادة في ورق الزرع الواحد عدد كبير من الأجنة الخضرية، وقد يصل في بعض الأحيان إلى أكثر من 50 جنيناً، ولذلك لابد من تفريد الأجنة ونقلها إلى محاليل جديدة حتى تثبت وتعطي نباتات كاملة. وإذا لم يتم تفريد الأجنة، فهذا يؤدي إلى تماوت قسم كبير منها، ونمو جزء بشكل غير طبيعي. والأجنة النامية تبقى ضعيفة. تفرد عادة الأجنة إلى محاليل بسيطة تحوي على العناصر المعدنية الكاملة مع مصدر للطاقة. وتراكيز خفيفة جداً من الهرمونات حيث ثبت أن تركيز 0.1-1 ملغ/لتر من الـ NAA يعطي بادرآت جيدة وقوية النمو.



الشكل (2-7): أجنة نخيل خضرية تكونت من الكالوس الجنيني

تستطيل الفلقة بين 5-10 ملم، عند إنبات الأجنة الخضرية، خلال فترة شهر تقريباً. وينمو السويق والجذير في النهاية المرستيمية للفلقة، ويلاحظ استطالة الطرف غير المرستيمي من الفلقة والذي يلتف حول نفسه، ويبتعد عن سطح الوسط الغذائي. وقد وجد أن ميل الطرف الممص من فلقة الجنين للالتفاف حول نفسه بضع مرات وظهوره بشكل طرف مرئي شائب فوق سطح الوسط الغذائي يشكل علامة جيدة على إنبات الجنين بشكل اعتيادي وطبيعي. وعاد يكون هذا الإنبات الناجح مصاحباً مع خروج الجذر من الفلقة واتجاهه للأسفل داخل الوسط الغذائي.

تبقى البادرات تنمو حتى تصل إلى حجم مناسب للنقل إلى الوسط الطبيعي، ومن المفضل أن تكون مجموعاً جذرياً قوياً وتستطيل حتى طول 7-10 سم، وتحوي على الأقل ثلاث أوراق.

7-3-5- نقل النباتات المجذرة إلى الظروف الطبيعية:

وتتصف النباتات الناتجة عن زراعة الأنسجة بكونها حساسة ورهيفة لأنها كانت داخل جو صناعي كامل في غرف النمو، لذلك فهي تتطلب عناية كبيرة أثناء نقلها من الأنابيب إلى شروط الوسط الطبيعي. يتوجب في الأيام الأولى من عملية النقل تأمين درجة حرارة وإضاءة مع نسبة رطوبة عالية تشابه تقريباً شروط غرف النمو. ولذلك فمن الضروري في بادئ الأمر نقل النباتات إلى جو مغلق تماماً داخل البيوت الزجاجية. مع المحافظة على نسبة رطوبة عالية لفترة من الزمن ثم تتخفّض الرطوبة والحرارة بشكل تدريجي حتى تتأقلم النباتات تدريجياً مع الأجواء الطبيعية. وقد تشكل عملية النقل مشكلة كبيرة في بعض الأنواع النباتية التي تكون سبباً في الحد من استخدام التكاثر الخضري الدقيق.

تتقل النباتات المجذرة من الأنابيب بوساطة ملاقط خاصة طويلة حيث تغسل الجذور بالماء الفاتر لإزالة بقايا الوسط المغذي الطلب العالق بالجذور حتى لا تنتشر الأمراض على المجموعة الجذرية. لأن بقاء آثار من الوسط المغذي الحاوي على السكريات يساعد على تعفن النبات. وتعامل النباتات قبل زراعتها بمبيد فطري. ثم تزرع داخل مراقد مدفأة خاصة تحوي على وسط زراعي خفيف جيد ومعقم مثل الفيرميكوليت Vermiculite أو البرلايت Perlite أو الدبال Peat Moss وتغطي المراقد بأغطية بلاستيكية أو زجاجية وتوضع

المراقد في بيت زجاجي تحت ظروف إضاءة ورطوبة وحرارة مناسبة وقريبة من ظروف غرف النمو. كما يجب تأمين الري ومصدر للتغذية المعدنية حتى تستطيع النباتات الصغيرة تكوين مجموع جذري قوي يساعدها على متابعة نموها.

يتم أقلمة نباتات النخيل الناتجة بالأنسجة عبر ثلاث مراحل:

-**المرحلة الأولى:** تنقل النباتات الصغيرة وتوضع في مراقد مدفأة تحت الري الضبابي. مغطاة بشكل كامل لفترة زمنية طويلة محددة قد تصل إلى ثلاثة أشهر.

في هذه المرحلة تسمح بتكوين مجموع جذري قوي، ويتم خلال هذه المرحلة الكشف الدوري عن النباتات حتى لا تنتشر التعفنات بها، كون نسبة الرطوبة تكون عالية جداً.

-**المرحلة الثانية:** تنقل النباتات وتزرع في أصص صغيرة بحجم 2 لتر، وتوضع في البيت الزجاجي مع مراقبة الحرارة والإضاءة والرطوبة. تترك لعدة أشهر حيث تنمو الجذور بشكل جيد وتنتشر في الأصوص بشكل كامل، حتى جزء من الجذور يمكن أن يخرج من قاعدة الأصوص.

-**المرحلة الثالثة:** تنقل النباتات إلى أوعية كبيرة ويمكن أن تزرع خارج البيت الزجاجي حتى تنمو وتصل إلى حجم مناسب ثم تنقل إلى الأرض الدائمة (Louvet *et al*, 1986).

يتأثر نجاح عملية النقل إلى الوسط الطبيعي بعوامل كثيرة منها ما هو متعلق بالعوامل البيئية مثل الحرارة، الرطوبة، وسط الزراعة، الإضاءة، التغذية المعدنية.... ومنها ما هو متعلق بالنبات نفسه مثل طول النبات، عدد الجذور المتكونة، طبيعة الجذور، عدد الأوراق المتكونة، الحالة الصحية العامة للنباتات.

فقد دلت التجارب أن أكثر العوامل تأثيراً في نجاح عملية النقسية. هي العوامل المتعلقة بالنبات نفسه. فالنباتات القصيرة الحاوية على عدد قليل من الأوراق أقل من 2 ورقة وطولها أقل من 5 سم نقل نسبة نجاح تقسيمها (Tisserat, 1981). وقد حصل الباحث نفسه على نسبة نجاح 100% عندما كانت النباتات المنقولة طولها نحو 10 سم. وتحتوي ثلاث أوراق. ومجموعاً جذرياً جيداً بطول 5 سم وغير ملفت (Tisserat, 1984).

تؤثر طبيعة نمو الجذور والنباتات تأثيراً كبيراً في نسبة نجاح عملية النقسية. يجب أن تحتوي النباتات على جذور أولية وثانوية غير طويلة وغير ملفقة وأن يكون النبات حاوياً

على عدة أوراق غير ملتوية حتى نحصل على نسبة نجاح عالية للتقسية (Moustafa *et al*, 1993).

ولابد من التذكير أخيراً أن نسبة نجاح النباتات النامية على وسط مغذ يحوي على فحم منشط أقل من نسبة نجاح النباتات النامية على وسط مغذ خالٍ من الفحم، ويعزى ذلك إلى أن الفحم المنشط لا يساعد على تكوين الجذور الثانوية وتتكون عليه جذور رفيعة وطويلة (Beauchesne, 1993).

أما فيما يتعلق بالوسط المستخدم، فقد حصل الباحث Moustafa *et al*, 1993 وزملاؤه على نسبة نجاح عالية لعملية التقسية عندما استخدم مزيجاً من الرمل مع البيت موس 1:1.

الفصل الثامن

زراعة البروتوبلاست Protoplast Culture

8-1- مقدمة:

تعد زراعة البروتوبلاست إحدى الطرائق الأساسية من تقانات زراعة الأنسجة النباتية. والبروتوبلاست بالتعريف هي خلية نباتية خالية من الغشاء البكتوسلوزي، وتحتوي كافة مكونات الخلية النباتية من السيتوبلازم والنواة والصانعات والميتوكوندري والفجوة وتكون محاطة بالغشاء السيتوبلازمي كما هو موضح بالشكل (8-1). تعد البروتوبلاست أصغر جزء نباتي ويتم زرعها في أوساط مغذية صلبة أو سائلة، وتحتفظ البروتوبلاست بقدرتها في تكوين نباتات كاملة مثل الخلايا النباتية، ويمكن القيام بتطبيق بعض التقانات التي لا يمكن تطبيقها في الخلايا النباتية بسبب وجود الجدار الخلوي. لذلك لها أهمية علمية وتطبيقية في مجال تربية النبات والتحسين الوراثي وفي مجالات الهندسة الوراثية.

قبل البدء بدراسة البروتوبلاست وكيفية الحصول عليها وزرعها، لابد لنا من تذكر الخلية النباتية ومكوناتها المختلفة، إذ يوضح الشكل (8-1) المرفق بنية الخلية النباتية بمكوناتها المختلفة الأساسية.

يتألف الجدار الخلوي من طبقتين:

- طبقة بكتينية تعمل على ربط الخلايا النباتية مع بعضها في النسيج البارانشيمي، وعند تفكيك هذه الطبقة يتم تحرير الخلايا النباتية عن بعضها بعضاً.
- طبقة من السللوز والهيميسللوز تحيط بالخلايا النباتية، وعند هضم هذه الطبقة يتم تحرير البروتوبلاست.

يلعب الجدار البكتوسلوزي دوراً مهماً في حياة الخلية النباتية، فهو يقوم بالوظائف الآتية:

- 1- حماية الخلية من المؤثرات الخارجية.
- 2- المحافظة على شكل الخلية النباتية، نتيجة اختلاف في الضغط بين داخل الخلايا وخارجها.

3-تحتوي على انزيمات ضرورية لاستقلاب الخلوي ومهمة للنمو والانقسام الخلوي.
4-يحتوي الجدار على فتحات دقيقة تسمح بنقل ومبادلة المواد الغذائية والمركبات الأساسية بين الخلايا.

لذلك من الضروري عند نزع الجدار الخلوي لتحرير البروتوبلاست إضافة بعض المواد الحافظة لوسط الاستخلاص للمحافظة على حياة البروتوبلاست حتى لا تتعرض للتخريب بفعل اختلاف الضغط الحلوي بين وسط الاستخلاص وداخل البروتوبلاست. يضاف عادة بعض المواد الحافظة للضغط الحلوي مثل المانيتول والسوربيتول والغلوكوز.

8-2-مزايا زراعة البروتوبلاست:

تعد تقانة زرع البروتوبلاست من التقانات المهمة التي لها تطبيقات كثيرة في مجال تربية النبات والهندسة الوراثية وبحوث الإجهادات الحيوية واللاحيوية في النبات، ولهذه التقانة مزايا وفوائد كثيرة منها:

1-تعد تقانة البروتوبلاست إحدى تقانات الإكثار الخضري عندما تتطور وتعطي أجنة خضرية مباشرة أو تعضي مباشر دون المرور بمرحلة الكالوس.

2-يمكن الحصول على زيادة في الخلط الوراثي عند تطور البروتوبلاست وتكوين كالوس ومن ثم نباتات كاملة، كما يمكن الحصول على سلالات أو أصناف جديدة أو طفرات لها أهمية تطبيقية في مجال التحسين الوراثي للنباتات الاقتصادية.

3-يتم الحصول على أنواع نباتية جديدة عن طريق دمج البروتوبلاست.

4-يمكن الحصول على هجن خضرية متجانسة Somatic Hybrid أو غير متجانسة أو هجن خضرية غير متكاملة مثل السيبريد Cybrid، عن طريق دمج البروتوبلاست.

5-تعد طريقة زرع البروتوبلاست إحدى طرائق الهندسة الوراثية إذ يمكن إدخال أجزاء من الـ DNA أو بلازميد، أو بكتريا، أو فيروسات أو كلوروبلاست، وتعد تقانة زرع البروتوبلاست مهمة في عملية النقل المورثي والتعديل الوراثي.

6-يمكن نقل صفة العقم السيتوبلاسمي عن طريق دمج البروتوبلاست.

8-3- عزل البروتوبلاست:

يتم عزل البروتوبلاست من مصادر نباتية مختلفة، من القمم النامية الخضرية والجذرية، ومن الأوراق النباتية، من حبوب اللقاح والخلايا النباتية، كما يمكن عزل البروتوبلاست من الكالوس.

يتوجب إضافة مواد حافظة للضغط الحلولي إلى وسط الاستخلاص مثل السكروز أو الجلوكوز، أو المانيتول والسوربيتول، للمحافظة على حياة البروتوبلاست وحيويتها من التأثير بتركيز الوسط المغذي.

يتألف الوسط المغذي الخاص بالاستخلاص من العناصر المعدنية الكبرى والصغرى، فيتامينات، أحماض أمينية، الهرمونات النباتية، مصدر للطاقة بالإضافة إلى مواد حافظة للضغط الكحولي، ويضاف أيضا المزيغ الأنزيمي.

يتم عزل البروتوبلاست إما :

1-بطريقة ميكانيكية حيث يتم تجزئة الأوراق ثم تطحن للحصول على مزيغ من البروتوبلاست والشوائب التي تنتج من تهشيم الأنسجة النباتية. يتم الحصول على نسبة قليلة من البروتوبلاست التي تتصف بضعف حيويتها، كما يلاحظ وجود نسبة من البروتوبلاست المجرحة والمهشمة بفعل الهرس.

2-بطريقة أنزيمية حيث يضاف إلى وسط الاستخلاص مزيغ أنزيمي من البكتيناز Pectinase، الذي يعمل على هضم الروابط البكتينية في الجدار البكتوسلولي، والسيلوليز Cellulase والهيمي سلوليز hemicellulase الذين يعملون على هضم الروابط السيلولية وتحرير البروتوبلاست.

والأنزيمات المستخدمة هي مركبات بروتينية بسيطة، تعزل من الفطور مثل فطر Trichoderma أو فطر Aspergillus . ولابد من تحديد المزيغ المناسب الذي يختلف باختلاف نوع النبات ونوع الأنسجة المستخدمة في عزل البروتوبلاست. توجد في الأسواق خلطات جاهزة يمكن استخدامها مباشرة، ويتم الحصول بهذه الطريقة على بروتوبلاست بكمية كبيرة وذات حيوية عالية وغير مهشمة.

عزل البروتوبلاست من أوراق التبغ:

يؤثر مكان وعمر النبات في نسبة البروتوبلاست التي يمكن الحصول عليها من بارانشيم أوراق التبغ. يفضل استخدام نباتات نامية في بيت زجاجي، ويفضل أخذ أوراق من الثلث العلوي للنبات بين 15 ورقة (الأفضل بين 4-6 أوراق من القمة).

تعقم الأوراق بالكحول 70% لمدة نصف دقيقة، ثم تعقم بمحلول من هيبوكلوريت الكالسيوم 5% لمدة 5 دقائق ثم تغسل ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم.

تجفف الأوراق بورق فيلتر معقم، ثم تقسم إلى قطع صغيرة حوالي 0.5-1 سم، ثم تنزع البشرة السفلية، ويضاف وسط الاستخلاص الحاوي على المحلول الأنزيمي، كما هو موضح بالجدول (1-8)، والمعقم بالفلتر إلى الأوراق لعزل البروتوبلاست.

ويمكن الحصول على عدة ملايين من البروتوبلاست، ذات الحيوية العالية، من غرام واحد من أوراق التبغ (Chaussat et Bigot, 1982).

يهدف عزل البروتوبلاست الحصول على أعلى نسبة من البروتوبلاست ذات الحيوية العالية. لا يضاف عادة إلى وسط الاستخلاص في التبغ السكر حتى لا تبدأ البروتوبلاست بتكوين الجدر الخلوية بمرحلة مبكرة. وإنما يضاف إلى وسط زرع البروتوبلاست كما هو موضح بالجدول (1-8).

جدول (1-8): وسط عزل وزراعة بروتوبلاست التبغ

عناصر الوسط	وسط الاستخلاص مغ/ل	وسط الزرع
البكتينيز (ماسيروزييم)	200	0
السلوليز	1500	0
NH ₄ NO ₃	825	825
KNO ₃	950	950
CaCL ₂ .2H ₂ O	220	220
MgSO ₄ .7H ₂ O	185	185
KH ₂ PO ₄	85	85

27.85	27.85	FeSO ₄ .7H ₂ O
25.37	37.25	Na ₂ EDTA
1	1	ZnSO ₄
1	1	H ₃ BO ₃
0.1	0.1	MnSO ₄ .4H ₂ O
0.03	0.03	CuSO ₄ .5H ₂ O
0.03	0.03	ALCL ₃
0.03	0.03	NICL ₂ .6H ₂ O
0.01	0.01	KI
100	100	اينوزيتول
1	1	بانتوتينات الكالسيوم
0.01	0.01	بيوتين
1	1	نياسين
1	1	بيريدوكسين
1	1	تيامين
3	3	NAA
1	1	BAP
20000	0	سكروز
80000	80000	مانيتول
6000	0	بكتوآغار
		5.5=pH

8-4-العوامل المؤثرة في عزل البروتويلاست:

تؤثر بعض العوامل الأساسية في عزل البروتويلاست في الأنواع النباتية، وتختلف شروط العزل ونسبة البروتويلاست الممكن الحصول عليها بحسب الأنواع النباتية.

8-4-1-تأثير عمر النبات الأم:

لوحظ تأثير واضح لعمر النبات الأم في نسبة البروتويلاست الممكن الحصول عليها، وفي نسبة حيويتها، ففي التبغ فقد أوضحت التجارب بأن أفضل عمر لنباتات التبغ هو بين 40 - 60 يوما تعطي أفضل النتائج (Watt et al., 1974).

8-4-2-تأثير حجم الأوراق المستخدمة:

يؤثر حجم الأوراق المستخدمة أيضا في نسبة البروتويلاست الممكن الحصول عليها وفي نسبة حيويتها. ففي العنب تبين بأن استخدام الأوراق ذات الحجم الوسط أفضل من الصغيرة والكبيرة (Wright, 1985) كما هو موضح بالجدول (8-2). وقد تم الحصول على نتائج مماثلة في التبغ.

جدول (8-2): تأثير حجم أوراق العنب في عزل البروتويلاست

حجم الأوراق	عدد البروتويلاست في سم ² من أوراق العنب
صغيرة	0.1±0.6 مليون
وسط	0.5 ± 5.3 مليون
كبيرة	0.5 ± 2.7 مليون

8-4-3- تأثير تركيب الوسط المغذي ونسبة الهرمونات النباتية:

يلعب التركيب المعدني، ونسبة الهرمونات النباتية المستخدمة ونوعها في وسط الاستخلاص دوراً مهماً في عزل البروتوبلاست، ففي العنب لوحظ تمديد المحلول المعدني لموراشيغ وسكوغ عشر مرات زاد بشكل كبير في نسبة البروتوبلاست حوالي أربعة أضعاف (Wright, 1985).

كما يمكن الحصول على البروتوبلاست من خلايا الكالوس. فقد تم الحصول على أعلى نسبة من البروتوبلاست الحية من كالوس نبات *Fritillaria imperialis* وذلك باستخدام وسط استخلاص يحوي 9% مانيتول + 2% سيلولاز + 10% بكتيناز، وقد تم معاملة الكالوس بهذا المزيج لمدة 8 ساعات (Chamani and Tahami, 2016).

تلعب الهرمونات دوراً مهماً في وسط الاستخلاص، وقد دلت التجارب بأن للأوكسينات دوراً مهماً في زيادة نسبة البروتوبلاست المعزولة، وتختلف نوع الأوكسينات المستخدمة ونسبتها بحسب الأنواع النباتية ففي التبغ يتم استخدام الأوكسين NAA بتركيز 3 مغ/ل والـ BAP بتركيز 1 مغ/ل (Chaussat and Bigot, 1982)، أما في حالة أوراق العنب يتم استخدام D, 4-2 بتركيز 5 مغ/ل والـ BAP بتركيز 0.1 مغ/ل حيث تم الحصول على أفضل نسبة من البروتوبلاست الحية (Wright, 1985)، ويلعب الأوكسين دوراً مهماً في زيادة مطاطية الجدر الخلوية مما يزيد من فاعلية الأنزيمات في هضم الجدر بين الخلايا وتحرير البروتوبلاست. كما تلعب الهرمونات النباتية دوراً مهماً فيما بعد في تكوين الجدر الخلوية الجديدة عند زرع البروتوبلاست.

8-4-4- تأثير الإضاءة والحرارة:

تؤثر الإضاءة في عزل البروتوبلاست، فقد لوحظ أن تعريض الأوراق لفترة ظلام أو تنفيذ عملية الاستخلاص بالظلام أو بشروط النهار القصير تزيد في نسبة البروتوبلاست الممكن الحصول عليها من الأوراق في التبغ وفي العنب وفي البطاطا والباذنجان (Bhatt & Fassuliotis, 1981; Wright, 1985).

تؤثر الحرارة أيضا في عزل البروتوبلاست وفي نسبة حيويتها، وقد وجد بالتجربة في حال العنب بأن أفضل درجة حرارة كانت 22°م حيث أعطت أفضل عدد من البروتوبلاست بالمقارنة مع درجات الحرارة العالية والمنخفضة كما هو موضح بالجدول (3-8) (Wright,1985).

جدول (3-8) : تأثير درجة الحرارة في عزل البروتوبلاست بالعنب

درجة الحرارة المستعملة درجة مئوية	عدد البروتوبلاست بالسهم المربع في الأوراق
15	1.0±11.0 مليون
22	2.3±24.8 مليون
26	0.8± 12.8 مليون
30	1.2 ± 7.6 مليون

من الملاحظ بشكل واضح أن درجة الحرارة تؤثر بشكل كبير في نشاط أنزيمات الاستخلاص الذي ينعكس في عدد البروتوبلاست المحررة من نسيج الأوراق. ولابد من الإشارة أخيراً بأن نوع الأنزيمات وتركيزها، ونوع المواد الحافظة المستخدمة وتركيزها يؤثران بشكل كبير في عزل البروتوبلاست، ويختلف هذا التأثير بحسب الأنواع النباتية.

8-5-حيوية البروتوبلاست:

تنشط الأنزيمات في عملية هضم الجدر البكتوسلولوزية ضمن شروط خاصة إذ تؤثر بعض العوامل مثل درجة الحموضة، نسبة الأملاح، درجة الحرارة والإضاءة في نشاط

الأنزيمات. كما تلعب مدة الهضم وتركيز الأنزيمات، تركيز المواد الحافظة للثبات الضغط الحلوي للخلايا، الحالة الفيزيولوجية للأجزاء المستخدمة ومكونات الوسط المغذي، دوراً في المحافظة على حيوية البروتوبلاست وفي نسبة البروتوبلاست المحررة، ويتوجب المحافظة على سلامة الغشاء السيتوبلازمي، وذلك عن طريق اختيار الأمثل للأنزيمات الهاضمة وتحديد بدقة الفترة المناسبة للهضم (حوالي ساعة إلى ساعتين بالنسبة للأنزيمات المعاملة بالحرارة) كما يجب اختيار المواد الحافظة التي تعمل على تثبيت الضغط الحلوي لمنع انفجار أو انكماش بشكل قوي للبروتوبلاست. إن ارتفاع الشد أو الانخفاض الشديد لمثبت الضغط ربما ينتج عنه ضرر غير عكسي، قد يؤثر على حيوية البروتوبلاست.

يمكن التحقق من حيوية البروتوبلاست بعد العزل مباشرة بالطرق الآتية:

- بوساطة كاشف إيفان (Evan's Blue)، ويتم ذلك بوضع 100 ميكروليتر من معلق البروتوبلاست في طبق بتري ويضاف له 10 ميكروليتر من صبغة إيفان بتركيز 0.4 مول يحضن المزيج لمدة 5 دقائق. يتم حساب النسبة المئوية للبروتوبلاست الغير مصبغة بأزرق إيفان وهي تعبر عن نسبة البروتوبلاست الحية (Bohmer & Meyer, 1996).

- بوساطة فينول سفرانين Phenol Safranin، وتعمل هذه الصبغة على تلوين البروتوبلاست الميتة باللون الأحمر ، بينما الخلايا الحية تبقى بدون تلوين. ويتم حساب نسبة البروتوبلاست الحية بعد نقع المعلق البروتوبلاست في محلول 0.1 % من فينول سفرانين لمدة ساعتين.

- بوساطة فلورسين دي آسيتات Fluorescein diacetate (FAD)، ويعمل على تشجيع الغشاء السيتوبلازمي الذي يصبح لونه أخضر وأبيض بينما لا يطرا أي تلوين على الخلايا الميتة. يتم حساب نسبة حيوية البروتوبلاست بعد 5-15 دقيقة من المعاملة بالـ FAD (Sankararao & Prakash, 1995).

8-6-تنقية البروتوبلاست:

يتم غسل معلق البروتوبلاست في نهاية التحضين بالمحلول الأنزيمي بوسط الاستخلاص الخالي من الأنزيمات. يحوي المعلق الخاص بالبروتوبلاست على البروتوبلاست مع بقايا الأنسجة النباتية والخلايا المهشمة، لذلك يتم تنقية البروتوبلاست من

الشوائب بوساطة فلتره المعلق بفلتر دقيقة ميكرونية (منخل بـ 50-60 ميكرون) تسمح بمرور الخلايا عبرها مع وسط مغذي السائل دون الشوائب الكبيرة. بعد الفلتره يتم غسل المعلق بإضافة وسط مغذي خاص بالغسل، ثم تنقل المعلق البروتوبلاست بسرعة 600 دورة بالدقيقة لمدة 5 دقائق ويتم إزالة المادة الطافية مع الشوائب وبعدها نأخذ الراسب الحاوي على البروتوبلاست، ثم تكرر العملية مرتين إلى ثلاث مرات بهدف تنقية البروتوبلاست. يؤخذ راسب البروتوبلاست ويضاف له وسط مغذي حاوي على جميع العناصر المغذية اللازمة لزراعة البروتوبلاست.

تعد عدد خلايا البروتوبلاست الموجودة في المعلق باستخدام جهاز الهيماسيتوميتر Hemacytometer (Bohmer & Meyer, 1996).

8-7- زرع البروتوبلاست :

يشبه الوسط المغذي الخاص بزرع البروتوبلاست الأوساط المغذية الخاصة بزرع الخلايا النباتية، يضاف إلى وسط زرع البروتوبلاست بعض المواد الحافظة للضغط الحلوي مثل المانيتول، كما تضاف تراكيز عالية من الهرمونات النباتية من الأوكسين والسيتوكينين. لتسمح بتكوين الجذر الخلوية بأقرب فرصة ممكنة. يختلف تركيب الوسط المغذي الخاص بزرع البروتوبلاست وتركيز ونوع الهرمونات المستخدمة بحسب الأنواع النباتية، وتزرع البروتوبلاست في بيئة مغذية سائلة أو نصف صلبة أو صلبة، بحسب الأنواع النباتية. يحدث في بادئ الأمر إعادة تكوين الجذر الخلوية خلال عدة أيام بعد زرع البروتوبلاست في الظروف المناسبة. يمكن التحقق من إعادة تجديد الجذر الخلوية باستخدام اختبار صبغة أبيض فلور الكالسيوم حيث يصبغ السيللوز المصنع الجديد وتضيء عندما تشع بالأشعة فوق البنفسجية بطول موجة 366 نانوميتر.

يبدأ أول انقسام خلوي للبروتوبلاست بعد تجديد الجذر الخلوية، ويحدث عادة بعد 2-7 أيام بحسب الأنواع النباتية كما هو موضح بالشكل (8-2).

فقد دلت التجارب بأن الوسط السائل يتم تبديل الوسط المغذي في هذه الفترة ويستخدم وسط مغذي بدون مواد حافظة. يتم متابعة تطور الخلايا بشكل معلق خلوي الذي يمكن أن تتطور الخلايا لتعطي كتلة خلوية صغيرة كما هو موضح بالشكل (8-3). التي تتطور

لتشكل أجنة خضرية وتتابع نموها لتشكيل نبات كامل، وفي هذه الحالة تعطي نباتات أكثر ثباتاً من الناحية الوراثية، أو تتابع الخلايا انقسامها وتشكل كتلة صغيرة من الخلايا ميكروكالوس الذي يمكن أن يتطور ويكون كالوس جنيني أو كالوس تكويني ويعطي نباتات كاملة وفي هذه الحالة يتم الحصول على نباتات قد تكون مشابهة للنبات الأم وقد تكون مغايرة للنبات الأم ويوضح الشكل (2-8) عزل البروتوبلاست في النبات وزرعها وتطورها.

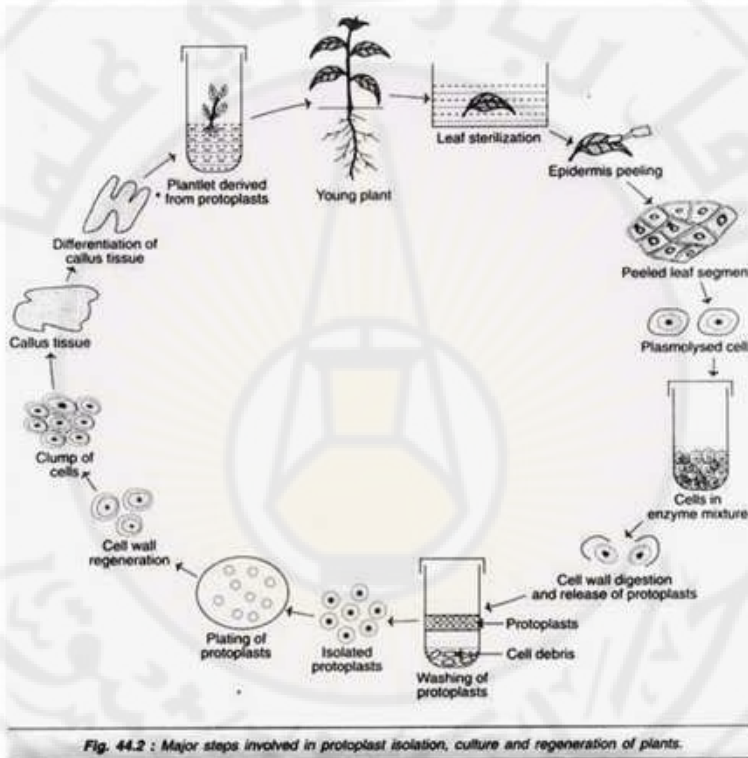
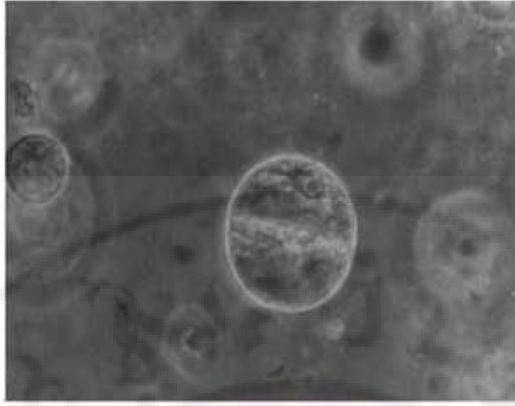


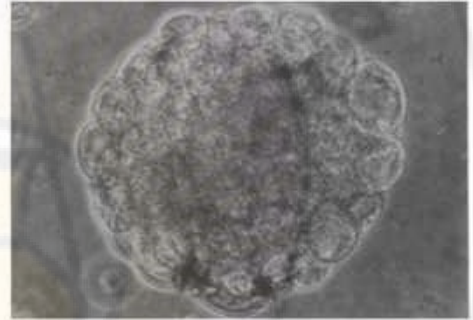
Fig. 44.2 : Major steps involved in protoplast isolation, culture and regeneration of plants.

الشكل (2-8): عزل وزرع وتطور البروتوبلاست

يمكننا الحصول من الميكروكالوس على تكوين الأجنة التي تنمو وتثبت وتعطي نبات كامل. أو الميكروكالوس يمكن أن يتطور ويتكون براعم ويجذر ويعطي نباتات كاملة كما هو موضح بالأشكال (3-8، 4-8، 5-8). وعندما تصبح النباتات كاملة يتم تقسيئها ونقلها إلى البيت الزجاجي كما هو موضح بالشكل (6-8).



الشكل (3-8) : تشكيل الجدار الخلوي في البروتويلاست



الشكل (4-8): تشكيل الكتلة الخلوية صغيرة الشكل (5-8) تشكيل البراعم في البنفسج الإفريقي



الشكل (6-8): نباتات ناتجة من زرع البروتويلاست في البنفسج الأفريقي.

تؤثر عوامل كثيرة في زرع البروتوبلاست، ومدى استجابتها للتطور والنمو، فقد لوحظ تأثير واضح للنوع النباتي في نسبة البروتوبلاست الممكن الحصول عليها، وفي قدرتها على النمو وتكوين نباتات كاملة، فقد دلت التجارب بالحصول على نباتات كاملة في العديد من النباتات العشبية محاصيل وخضار ونباتات زينة مثل التبغ، الداتورا، الجزر، الفاصولياء، النجيليات والبنفسج، (Chaussat & Bigot, 1982; Winkelmann and Grunewaldt, 1992).

وقد استخدم عزل البروتوبلاست وزرعه في تحسين الوراثي للعديد من الأشجار الخشبية أشجار الفاكهة كالتفاحيات والحمضيات والكيوي والموز والأشجار الحراجية مثل الحور والصفصاف والأوكالبتوس والصنوبريات (Deng, 2003).

لمصدر البروتوبلاست دور مهم في قدرتها على النمو والتجديد، فقد دلت التجارب أن البروتوبلاست المأخوذة من الأوراق أكثر استجابة للنمو من البروتوبلاست المأخوذة من أجزاء نباتية أخرى في التبغ والنجيليات، كما أن البروتوبلاست الناتجة من أوراق تكونت داخل الأنابيب تعطي استجابة للنمو بشكل أكبر من المأخوذة من أوراق جمعت من الطبيعة أو من البيوت المحمية.

لوحظ أيضاً أن لشروط زراعة الأمهات دوراً كبيراً في قدرة البروتوبلاست في النمو والتجديد، وتبين أن النباتات الموجودة في الطبيعة تعطي بروتوبلاست بكميات أقل، وتكون قدرتها في النمو والتطور أقل بكثير من البروتوبلاست المأخوذة من أمهات مربية داخل بيوت محمية.

يلعب تركيب الوسط المغذي دوراً مهماً في توجيه النمو والحصول على نباتات كاملة، وتختلف تركيب الأوساط المغذية باختلاف الأنواع النباتية. فإن إعادة تجديد الجذر الخلوية والانقسام الخلوي وتشكيل الكالوس، وتكوين الأعضاء النباتية براعم وجذور أو تكوين الأجنة كل هذه المراحل تحتاج إلى تركيب خاص للوسط المغذي يختلف باختلاف مرحلة الزرع وحسب النوع النباتي وحسب طبيعة النمو المراد الحصول عليه ويوضح الجدول (8-1) تركيب الوسط المغذي اللازم لزرع البروتوبلاست في خلايا التبغ.

يلعب تركيز البروتوبلاست في الوسط المغذي له دوراً مهماً في قدرة البروتوبلاست في النمو وتكوين الميكروكالوس، ففي حال التبغ توضح بأن أفضل كثافة حوالي 50000 بروتوبلاست بالمم² أعطت أفضل نتيجة من البروتوبلاست النامية حيث لوحظ أكثر من 50% من البروتوبلاست بدأت بالانقسام والنمو أما الكثافة الأعلى والتراكيز الأقل من البروتوبلاست تؤثر في مقدرة البروتوبلاست في التجديد والنمو (Chaussat & Bigot, 1982).

تختلف الفترة الزمنية اللازمة لتجديد الجذر الخلوية وبداية الانقسام الخلوي، ومن ثم تطور الميكروكالوس، والحصول على أجنة أو أعضاء نباتية براعم وبالتالي تكوين نباتات كاملة بحسب الأنواع النباتية، ويوضح الجدول (4-8) كافة المراحل المتعاقبة مع الفترة الزمنية اللازمة منذ استخلاص البروتوبلاست حتى الحصول على نباتات كاملة في نبات البنفسج، كما يعطي فكرة عن طبيعة النمو ومراحله المختلفة بالإضافة إلى متطلبات الوسط المغذي في كل مرحلة (Winkelmann and Grunewaldt (1992).

في هذا المثال تم الحصول على 2000 نبات خلال فترة حوالي 28 أسبوع وقد فحصت النباتات الناتجة فبلغت نسبة التشابه الوراثي مع النبات الأم حوالي 95%.

جدول (4-8): زرع البروتوبلاست في البنفسج وتطوره

مراحل الزرع	طبيعة النمو	متطلبات الوسط المغذي	الفترة الزمنية بالأسبوع
أوراق متكونة بالنسج بروتوبلاست	عزل البروتوبلاست بالأنزيمات استبعاد المحلول الأنزيمي + تنقية	وسط مغذي + مواد حافزة + محلول أنزيمي نفس الوسط السابق بدون أنزيمات	0 0

2	وسط مغذي + مواد حافطة + تراكيز الهرمونات تخفيض المواد الحافطة + تخفيض الهرمونات نفس الوسط صلب	تجديد الجذر الخلوية + بداية الانقسام انقسام خلوي لتكوين كتل خلوية صغيرة	زرع البروتوبلاست تبدل وسط الزرع
4	زيادة تركيز السيٲوكينين تخفيض السيٲوكينين	تكوين ميكروكالوس 3- 4مم تكوين براعم خضرية	زرع على وسط صلب زرع الميكروكالوس إكثار واستطالة النموات
12	إضافة الأوكسين تحتاج ظروف خاصة	زيادة عدد النموات واستطالتها تكوين الجذور تقسية النباتات	تجذير النموات نقل النباتات إلى البيت المحمي
20			
24			
28			

8-8- استخدامات زراعة البروتوبلاست:

تستخدم زراعة البروتوبلاست لأغراض متعددة، كما لاحظنا من تعرفنا على مزايا زرع البروتوبلاست، ويمكن إيجاز هذه الاستخدامات بالآتي:

1- تعد طريقة زرع البروتوبلاست طريقة من طرائق التكاثر الخضري الدقيق إذا تطورت مباشرة، وأعطت نباتات كاملة دون المرور بمرحلة الكالوس عن طريق تكوين المباشر للأجنة أو البراعم، ويتم الحصول على نباتات مشابهة في تركيبها الوراثي للنبات الأم. لاستخدم في الإكثار الخضري لاته من الصعب التأكد أي من النباتات تكونت بشكل مباشر وأي نباتات تكونت بعد المرور بمرحلة الكالوس في مرحلة مبكرة. وهذا يعطي شك بمدى الثبات الوراثي للنباتات الناتجة ولو بنسبة قليلة، كما لاحظنا في مثال البنفسج الأفريقي بالفقرة السابقة حيث كانت نسبة التغير قليلة لم تتجاوز 5%. لذلك لا تستخدم هذه التقنية في التكاثر الخضري الدقيق في أنواع النباتات ذات الأهمية الاقتصادية. يمكن أن تتطور البروتوبلاست بشكل مباشر لتكوين الأجنة الخضرية. ففي الموز تم الحصول على أجنة خضرية بعد ثلاثة أسابيع من زراعة البروتوبلاست، كما تم تطور الأجنة وأعطت نباتات كاملة بعد 12 أسبوع (Haicour et al., 2009).

2- تكوين طفرات جديدة لها أهمية في تربية النبات: تعد طريقة زرع البروتوبلاست مصدراً لزيادة الخلط الوراثي عند تكوين الميكروكالوس وإكثاره للحصول على كالوس، وثم تكوين نباتات كاملة بالتكوين غير المباشر للأجنة، أو البراعم هنا يلاحظ الحصول على نباتات قد تشابه أو تغاير في تركيبها الوراثي للنبات الأم، وقد تم تكوين عدة طفرات مهمة في بعض الأنواع النباتية. نذكر منها طفرة قديمة تم الحصول عليها من قبل فريق أمريكي عام 1973 بدءاً من زرع بروتوبلاست حيث حصلوا على طفرة في التبغ مقاومة لمادة سامة وهي الميثونين سلفوكسيمين مادة سامة للخلايا النباتية. وهذه المادة تشبه مادة سامة تفرز من بكتريا *Pseudomonas tabaci* التي تسبب اللفحة البكتيرية للتبغ، ونتيجة الانتخاب عن طريق زرع البروتوبلاست تم الحصول على طفرة مقاومة لهذا المرض.

وتختلف نسبة الخلط الوراثي في النباتات الناتجة عن زرع البروتوبلاست بحسب الأنواع النباتية. ويمكن أن يعزى سبب الخلط الوراثي إلى اختلاف في بنية الكروزمات أو في

عددها (Fiuk and Rybczynski, 2007; Tomiczak *et al.*,2016). ففي دراسة نفذت على زراعة البروتوبلاست لخمس أنواع من النباتات الطبية التي تتبع جنس *Gentiana* . لوحظ تفاوت في نسبة الخلط الوراثي للأنواع المدروسة. ويوجد اختلاف واضح في عدد الكروموزومات في النباتات المتجددة كما هو موضح بالجدول (5-8).

جدول (5-8): نسبة عدد الصبغيات في النباتات المتجددة من البروتوبلاست

النوع النباتي	النباتات المتجددة	عدد النباتات	عدد الكروموزومات
Gentiana kurroo	نباتات الشاهد	$24 = 100\%$	$2n=26$
	نباتات متجددة 1	$2 = 10\%$	$2n=26$
	نباتات متجددة 2	$17 = 85\%$	$4n=52$
	نباتات متجددة 3	$1 = 5\%$	غير محدد العدد
Gentiana tibetica	نبات الشاهد	$35 = 100\%$	$4n=52$
	نباتات متجددة 1	$60 = 85\%$	$4n=52$
	نباتات متجددة 2	$10 = 14.3\%$	تقريباً 100 كروموزوم

يلاحظ اختلاف في نسبة عدد الكروموزومات بين النوعين وفي نسبة النباتات غير المحددة عدد الصبغيات (Tomiczak *et al.*,2016).

3-إدخال الـ **DNA** والأحياء الدقيقة، وجسيمات غريبة إلى البروتوبلاست، وتعد تقانة زرع البروتوبلاست إحدى تقانات الهندسة الوراثية بحيث تسمح،كونها خالية من الجدار الخلوي بإدخال المورثات أو البلاسميدات أو أجزاء من الـ **DNA** أو الـ **RNA** أو بعض الأحياء الدقيقة والفيروسات، ويمكن الحصول على بروتوبلاست معدلة وراثياً وبالتالي نباتات كاملة بعد نمو البروتوبلاست وتطورها.

يتم التعديل الوراثي بشكل غير مباشر (عن طريق البكتريا الأكرىوبكتريوم) أو مباشر حيث يتم بإحدى التقانات التالية (Darbany *et al.*,2008) :

- 1-القذف المورثات المباشر داخل الخلايا النباتية بالمدفع الجيني Biolistic Gun .
 - 2-الحقن الدقيق ويتم حقن المورثات داخل الخلايا بوساطة أبر دقيقة جدا ميكروماسة بحجم 0.1-0.5 ميكرون .
 - 3- الصدمة الكهربائية Electroporation ، ويتم عمل صدمة كهربائية تسمح بعمل مسامات مؤقتة بالغشاء السيتوبلازمي مما يسهل دخول المورثات أو الـ DNA إلى داخل الخلايا أو البروتوبلاست .
 - 4- التعديل الكيميائي بوساطة البولي إيثيلين غليكول PEG الذي يعمل على دخول الـ DNA إلى داخل الخلايا أو البروتوبلاست . كما يمكن استخدام مواد كيميائية أخرى مثل ديكستران سلفات أو كالسيوم سلفات .
 - 5-التعديل باستخدام جسيمات ليبيدية الحاملة للبلازميد Lipofection: يتم دمج جسيمات الليبوزوم الحاملة للبلازميد مع الخلايا النباتية أو البروتوبلاست مما تسمح بدخول هذه الجسيمات إلى داخل الخلية .
 - 6-التعديل باستخدام الأمواج فوق الصوتية Ultrasound Treatment التي تعمل على زيادة مطاطية الجدر الخلوية مما تزيد من فرص دخول البلازميدات إلى داخل الخلايا .
 - 7-التعديل بوجود وسيط فيبر كربيد السيليكون Silicon carbide fibers
- يمكن استخدام كافة الطرق المباشرة في التعديل الوراثي في البروتوبلاست ولكنها لا تزال أقل فاعلية بشكل عام من التعديل بوساطة الأكرابكتريوم . ولكنها مفيدة في بعض الأنواع النباتية على سبيل المثال في المحاصيل النجيلية تعطي نتائج إيجابية كون التعديل بفعل البكتريا يكون قليل الفعالية .

8-9-فعالية التعديل الوراثي في البروتوبلاست:

- تتوقف فعالية التعديل الوراثي في البروتوبلاست على مجموعة من العوامل الأساسية وهي:
- 1-تقانة التعديل الوراثي المستخدمة: لتقانة التعديل المستخدمة وتركيز البروتوبلاست وتركيز البلازميدات أو الـ DNA الحاملة للمورثات المراد إدخالها، مصدر البروتوبلاست، المعاملات الأولية المختلفة، الوزن الجزيئي لـ PEG والتركيز و pH. كل هذه العوامل تؤثر

في فعالية طريقة التعديل الوراثي المستخدمة وتؤثر في نسبة البروتوبلاست المعدلة وراثياً، ويؤثر النوع النباتي بشكل مباشر في نجاح التعديل الوراثي في البروتوبلاست.

2-تقانة الكشف عن البروتوبلاست المعدلة وراثياً:

يتوجب الكشف عن الخلايا المعدلة وراثياً بعد حوالي 14 يوماً من التعديل الوراثي، ويتم ذلك عادة من خلال إضافة للبلازميد المدخل إلى البروتوبلاست بعض الجينات مثل جين مقاومة لبعض المضادات الحيوية أو مضاد لمبيد عشبي أو مولدة للإشعاع وبعض الجينات التي لا تكون في المجموعة الوراثية الأساسية للنبات مثل جين Gus الذي يعمل على تشفير أنزيم β -glucuronidase وهذا الأنزيم يسمح بكشفه بواسطة اختبار Gus-assay أو بواسطة طرائق البيولوجيا الجزيئية، وتوجد بعض الطرائق الإشعاعية مثل مركب EGFP مركب يدمج مع البلازميد وبعد نقل البلازميد إلى الخلايا يكشف عنه حيث بواسطة جهاز fluorescence spectrofluorimetry يعطي أخضر اللون ويتم الكشف على مستوى الخلايا أو الكالوس. ويمكن عزل ظاهرياً الميكروكالوس المعدل عن الميكروكالوس غير محور، ويسمى اختبار البروتين الأخضر المشع (Neidz *et al.*, 2001).

ولابد من حساب نسبة البروتوبلاست المحورة، وتحسب بالمقارنة بين الكتل الخلوية التي بقيت على قيد الحياة بعد اختبار الجين المضاد الحيوي ففي هذه الحالة العينات المحورة تبقى على قيد الحياة عند زرعها على وسط يحوي المضاد الحيوي كونها تحمل الجين المقاوم بينما العينات غير المحورة تموت تحت تأثير المضاد الحيوي.

3-قدرة الخلايا المحورة على التجديد وتكوين نباتات كاملة:

ليست كافة النباتات المحورة وراثية بواسطة البروتوبلاست لها قدرة على التجديد وتكوين نباتات محورة كاملة، ولذلك لا بد من دراسة كثير من العوامل التي تؤثر في تجديد وتعضي المباشر وغير المباشر للأنواع المراد تحويلها وهذا مهم جداً لنجاح التحويل الوراثي بواسطة البروتوبلاست، وتختلف قدرة التعضي بحسب الأنواع النباتية وكل نوع يحتاج إلى شروط خاصة تختلف بين الأنواع لا بل بين الأصناف ضمن النوع الواحد.

4-التحقق من الثبات الوراثي في النباتات الناتجة من زرع البروتوبلاست المحورة:

يختلف مدى الثبات الوراثي في النباتات الناتجة عن البروتوبلاست بحسب طريقة التجديد المتبعة.

في حال التجديد والتعضي المباشر دون المرور بمرحلة الكالوس تكون النباتات الناتجة مشابهة تماما للنبات الأم أما إذا كان التجديد أو التعضي غير مباشر ينتج نباتات قد تكون مشابهة أو مغايرة في تركيبها الوراثي للنبات الأم الذي أخذ من البروتوبلاست، وهو أمر في غاية الأهمية بالنسبة للتحوير الوراثي باستخدام البروتوبلاست.

السؤال الذي يطرح نفسه ما الفائدة من التحوير الوراثي إذا لم أحافظ على الثبات الوراثي للنبات الأم. لذلك يجب دراسة، وإيجاد الإجابة على هذا السؤال حتى تكون تقانة التحوير بواسطة البروتوبلاست ناجحة. يجب الحصول على بروتوبلاست محورة ولها المقدرة على التجديد أو التعضي المباشر وتحافظ على صفات النبات الأم.

يرتبط موضوع الثبات الوراثي بعوامل كثيرة مثل النوع النباتي، طريقة التجديد أو التعضي، فترة إكثار الكالوس، نوع ونسبة الهرمونات النباتية المستخدمة في الوسط المغذي الخاص بالتجديد. ويتم الكشف عن الثبات الوراثي للنباتات الناتجة عن البروتوبلاست بواسطة تقانات البيولوجيا الجزيئية.

مثال على التحوير الوراثي بواسطة البروتوبلاست: تم الحصول على نباتات من البرتقال الحلو المحورة بواسطة البروتوبلاست التي تحمل بلاسميد يحوي EGFP Neidz *et al.*, 2001).

الذي يميز البروتوبلاست المحورة ويعطيها اللون الأخضر، عزلت البروتوبلاست من كالوس جنيني من البرتقال الذي يعطي أجنة خضرية بسهولة كما هو موضح بالشكل (8-7)، وعزلت البروتوبلاست ومزجت مع بلازميد يحوي الـ EGFP .

وتم التحوير بتقانة الصدمة الكهربائية Electroporation وتم الكشف عن البروتوبلاست والميكروكالوس والكالوس الجنيني المحور بواسطة جهاز fluorescence spectrofluorimetry الذي يعطي اخضر اللون.

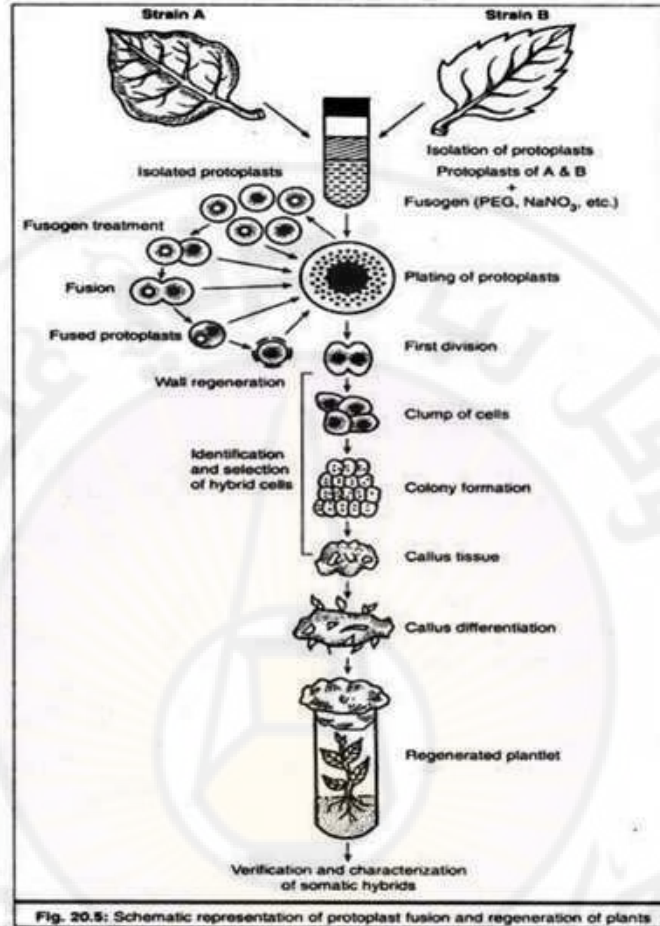
ويمكن عزل ظاهريا العينات غير المحورة التي يبقى لونها أبيض عن المحورة التي تتلون باللون الأخضر الشكل (8-7). وقد تم الحصول على ميكروكالوس وكالوس جنيني الذي تطور فيما بعد وأعطى نباتات كاملة كما هو موضح بالشكل (8-7).

8-10-دمج البروتوبلاست:

تعد تقانة دمج البروتوبلاست إحدى التطبيقات الأساسية لزراعة البروتوبلاست، وتسمح هذه التقانة بدمج نوعين من البروتوبلاست من أنواع نباتية متباعدة والحصول على هجن لا يمكن الحصول عليها بالتهجين الجنسي لعدم وجود توافق بالتلقيح فيما بينها.

تسمح أيضاً بدمج نوعين، والحصول على هجن خضرية متجانسة يمكن عند نموها أن تعطي نباتات جديدة، كما حصل عند دمج بروتوبلاست من البطاطا مع بروتوبلاست من البندورة تم الحصول على هجين خضري متجانس عند نموه أعطى نبات وسط بين البندورة والبطاطا سمي بالبومات (Chaussat & Bigot, 1982)، ولكن مع الأسف كان نباتاً عقيماً.

كما تفيد عملية دمج البروتوبلاست الحصول على هجن متجانس H₀ غير متجانسة تسمح بنقل الصفات الوراثية من نبات لآخر، وبالتالي الحصول على هجن ذات أهمية اقتصادية أو تحمل بعض الصفات الجديدة المهمة في برنامج التحسين الوراثي للنبات المستخدم، ويوضح الشكل (8-8) عملية دمج هجن البروتوبلاست وتطورها وتكوين نبات كامل.



الشكل (8-8): دمج البروتوبلاست وتجديدها لتكوين نبات كامل

تفيد عملية دمج البروتوبلاست في نقل صفة العقم السيتوبلازمي في بعض الأنواع النباتية عن طريق تشكيل السيبريد Cybrid، ولهذه الخاصية تطبيقات مهمة في برامج إنتاج البذار لبعض الأنواع النباتية.

8-10-1 طرائق دمج البروتوبلاست:

يستخدم نوعين من طرائق الدمج:

1-**بالطريقة الكهربائية:** ويتم تعريض البروتوبلاست النوعين المراد دمجهم لحقل كهربائي يعمل على تقريب البروتوبلاست من بعضها مع بعض واندماجهم.

2-**بالطريقة الكيميائية:** ويتم ذلك عن طريق وضع نوعين من البروتوبلاست مع بعضها بتركيز متساوية تقريباً، مليون بروتوبلاست بالميليلتر، من كل نوع ، ثم يضاف لهم محلول PEG البولي إيثيلين غليكول بتركيز معين، وتترك لفترة من الزمن 10-30 دقيقة، ثم يغسل محلول PEG ثلاث مرات، وتزرع الخلايا المندمجة في وسط مغذ سائل يحوي كافة المتطلبات اللازمة للانقسام والتطور، ويعمل البولي إيثيلين غليكول على تقريب بين خلايا البروتوبلاست، ويساعد في عملية الدمج (Zhang and Huajun,2004) . .

8-10-2- نتائج دمج البروتوبلاست:

لا يمكن الحكم على نتائج دمج البروتوبلاست مباشرة بعد عملية الاندماج، قد يكون اندماجاً حقيقياً كاملاً أو منقوصاً، أو اندماجاً سيتوبلاسمياً فقط. ويتم الحكم على نتائج الدمج بعد بدء انقسام البروتوبلاست المندمجة إذ تظهر الحالات الآتية:

1-**هجين خضري متجانس ومتكامل Somatic Hybrid:** في هذه الحالة يتم اندماج كلي بين نواة و سيتوبلاسم الأب الأول ،مع نواة و سيتوبلاسم الأب الثاني ويتم المحافظة على الاندماج الكامل حتى بعد انقسام الخلايا وتكوين الميكروكالكوس الذي عند تطوره يعطي نبات هجين وسط بين النوعين (Chaussat and Bigot,1982).

2-**هجين غير كامل وغير متجانس:** في هذه الحالة يتم اندماج كلي بين نواة و سيتوبلاسم الأب الأول مع نواة و سيتوبلاسم الأب الثاني، ولكن تفقد بعض المخزون النووي لأحد الأبوين ويتشكل بعد الانقسام هجين غير محدد عدد الكروموزومات Anaploid. وهذا النوع من الهجن لا يتطور في أغلب الأحيان.

3-**هجين غير مستقر:** أي يحدث اندماج سيتوبلاسمي ونووي بين الأبوين، ولكن لا تثبت النواتج أن تعوداً للانفصال من جديد عند أول انقسام وبالتالي يلاحظ تشكل كتلة من الخلايا تشبه الأب الأول وكتلة من الخلايا تشبه الأب الثاني، وهذا ما يسمى بالكميريا Chimera.

4-**هجين سيتوبلاسمي، الـ Cybrid :** أي يحدث اندماج كامل بين سيتوبلاسم الأب الأول مع سيتوبلاسم الأب الثاني دون حدوث اندماج نووي، وعند الانقسام تكون كتلة خلوية

تحتوي سيتوبلازما الأبوين مع نواة أحد الأبوين ويمكن أن تتطور وتعطي نباتات كاملة. ولهذا النوع له فوائد تطبيقية مهمة في بعض الأنواع النباتية التي تتصف بصفة العقم الذكري السيتوبلازمي.

لا توجد اختبارات نستطيع بها التمييز بين أنواع الهجن المتكونة في مرحلة مبكرة. ولابد من القيام بعملية التجديد والتعويض للحكم على الهجن الناتجة. وخاصة الهجن الخضرية المتجانسة التي تهم ونسعى دائما لتكوينها.

8-10-3- تقييم الهجن الخضرية الناتجة من دمج البروتوبلاست:

تقيم الهجن الخضرية المتجانسة وذلك من خلال مقارنة هذه الهجن مع هجن جنسية ناتجة عن عملية التهجين الجنسي بين الأنواع في حال وجود توافق بالتلقيح فيما بينها. كما يتم مقارنة الهجن الخضرية مع الآباء. ويتم مقارنة الصفات الخضرية والزهرية والشرية والصفات الانتاجية والزراعية ومدى قدرتها على التلقيح (Si et al., 1998 ; 2000 and (2001) ، كما يمكن مقارنة الهجن مع الآباء باستخدام بعض المعايير السيتولوجية (عدد الكروموزومات) والأنزيمية والجزيئية (Matthews et al., 1999; Trabelsi et al., 2007; Guo et al., 2005). كما يمكن مقارنة درجة الخصوبة وحيوية حبوب اللقاح الناتجة للهجن الناتجة ومقارنتها مع الآباء.

8-10-4- مثال على دمج البروتوبلاست في البطاطا:

عزلت بروتوبلاست من صنف بطاطا *Solanum tuberosum* رباعي الصيغة الصبغية صنف Dezire من أوراق بعمر 4-6 أسابيع. كما عزلت بروتوبلاست من نوع بطاطا برية *Solanum circaeifolium* تحمل صفة المقاومة لمرض الفيتوفتورا *Phytophthora infestans* . أخذت بروتوبلاست بحجم 1:1 من النوعين وأخذ منها 100 ميكروليتر وأضيفت لها عدة قطرات من محلول PEG 25% وضع المزيج لمدة 20-30 دقيقة مع التحريك الخفيف. ثم تم استبعاد محلول الـ PEG ووضع المزيج في وسط للزراعة ولابد من الإشارة بأنه لا يمكن تمييز بين البروتوبلاست المندمجة مع البروتوبلاست غير المندمجة في مرحلة مبكرة لذلك زرعت كافة البروتوبلاست مع بعض ، وبدأت بالانقسام بعد 4-5 أيام حيث شكلت بعد فترة ميكروكالوس التي أعطت بدورها نباتات كاملة . فقد كانت

نسبة العينات التي تطورت إلى نباتات كاملة حوالي 26% (Espejo *et al.*, 2008).
وقد تم الحصول على 19 هجين خضري متجانس وقد تم تقييمها ولوحظ بأنها تحمل صفات
وسط بين الأبوين.

8-11- عزل البروتوبلاست في الفطر المحاري:

تم عزل البروتوبلاست أيضاً من بعض أنواع الفطر الزراعي مثل النوع المحاري
Pleurotus pulmonarius; *Pleurotus florid*. تم الحصول على البروتوبلاست من
هيفات الفطر الزراعي بعمر 3 أيام، وقد استخدم 3 أنواع من الأنزيمات، وهي بكتيناز
1مل+ 1مل سيلولاز + 1مل شيتيناز وأضيفت إلى وسط الاستخلاص السوربيتول كمادة
حافطة للضغط الحلوي (Eyini *et al.*, 2006).

8-11-1- العوامل المؤثرة في عزل بروتوبلاست الفطر المحاري:

-نوع المزيج الأنزيمي وتركيزه: استخدم ثلاثة أنواع من الأنزيمات كل واحد بشكل مستقل أو
مزيج فيما بينها، وقد تم الحصول على أعلى نسبة من البروتوبلاست الحية باستخدام مزيج
من الأنزيمات الثلاثة وهي بكتيناز (Pectinase) 1مل+ 1مل سيلولاز (Cellulase)
+ 1مل شيتيناز (Chitinase).

-عمر الهيفات: جريت هيفات من الفطر المحاري بأعمار مختلفة وهي : 3-5-7-9 أيام
وقد تم الحصول على أعلى نسبة من البروتوبلاست الحي من هيفات بعمر 3 أيام.

-تأثير فترة التحضين: أخضعت الهيفات بعمر 3 ايام للتحضين مع المزيج النومي لفترات
مختلفة وهي : 0.5- 1- 2- 2.5- 3 و 4 ساعات. وقد تبين بان أفضل فترة تحضين
هي ثلاث ساعات أعطت أفضل نسبة من البروتوبلاست.

-تأثير درجة الحموضة: استخدم وسط استخلاص بدرجات من pH 4-6-8 وكان الوسط
الحاوي على درجة حموضة 6 أفضل ما يمكن.

-تأثير نوع المادة الحافطة: استخدم ثلاثة أنواع من المواد الحافطة بمعدل 0.6 مول، وهي
السوربيتول وسلفات المغنيزيوم وكلوريد البوتاسيوم. وقد كانت أفضل النتائج في السوربيتول.

8-11-2- زرع بروتوبلاست الفطر المحاري:

زرعت البروتوبلاست مباشرة بعد عزلها في وسط مغذ في غرف النمو على درجة حرارة 30 م ولوحظ تطور سريع للبروتوبلاست إذ تطورت وأعطت هيفات جديدة بعد أربعة أيام فقط من زراعتها ونسبة التجديد كانت منخفضة بحدود 3-4 % . كما قسم من البروتوبلاست كون ميكروكالموس (Eyini *et al.*, 2006).

8-11-3- دمج بروتوبلاست في الفطور الزراعية:

تمكن فريق ياباني من دمج نوعين من البروتوبلاست التي تم عزلها من نوعين من الفطور. النوع الأول وهو *Laetiporus sulphureus* ، هذا الفطر ينتج مواد مضادة وممانعة للجلطات القلبية التي تعد أول سبب رئيس للموت في اليابان. هذا الفطر يصعب إكثاره وإنتاجه وشكله غير مرغوب للاستهلاك. فقد تم دمج البروتوبلاست مع بروتوبلاست تم الحصول عليها من فطر مرغوب ومواصفاته الإنتاجية جيدة وهو *Hypsizygus marmoreus*. وتمت عملية الدمج بين النوعين بواسطة الPEG . وبعد الدمج تم الحصول على هجن متجانسة بين النوعين، واستطاعت الهجن إنتاج المادة الفعالة وهي مرغوبة من الناحية التسويقية والإنتاجية (Okamura *et al.*, 2000).

الفصل التاسع

زراعة الخلايا النباتية

9-1- مقدمة:

تعد تقانة زرع الخلايا النباتية إحدى تقانات زراعة الأنسجة النباتية المهمة لما لها من أهمية تطبيقية في العلوم الزراعية والصيدلانية، وتتصف الخلايا النباتية بخاصية الطاقة الخلوية الكامنة Totipotency وهي قدرة الخلايا على التجدد وتكوين نباتات كاملة. وهذا يزيد من أهمية زرع الخلايا النباتية حيث يمكن الحصول على نباتات وطفلات وسلالات جديدة لها أهمية تطبيقية في برامج التحسين الوراثي للنباتات ذات الأهمية الاقتصادية. كما يمكن استخدام الخلايا النباتية انتاج المواد الفعالة ذات الأهمية التطبيقية في الصناعات التجميلية والصيدلانية.

يتضمن تطبيق زرع الخلايا النباتية مرحلتين:

المرحلة الأولى: كيفية الحصول على معلق خلوي يحوي خلايا مستقلة بعضها عن بعض.
المرحلة الثانية: تتضمن زرع الخلايا ونموها للاستفادة من تطبيقاتها المختلفة.

9-2- كيفية الحصول على الخلايا الحرة:

يتطلب تحرير الخلايا النباتية فك الجدار البكتيني الذي يربط بين الخلايا مع المحافظة على الجدار الخلوي السيلوزي. يتم الحصول على المعلق الخلوي من الأنسجة النباتية المختلفة مثل الأوراق، القمم النامية الجذرية والخضرية، الأنسجة البارنشيمية، ومن خلايا الجنينية في البذرة. يتم الحصول على المعلق الخلوي بطريقتين:

9-2-1- الطريقة الميكانيكية: تتطلب هذه الطريقة تجزئة الأنسجة إلى قطع صغيرة في بادئ الأمر، بعد تعقيمها. ثم توضع في وسط مغذي يحوي تركيز عال من السكر 40 غ/ل، ثم تطحن بشكل يدوي ضمن الوسط السائل. يتم الحصول على مزيج من الخلايا الحرة وخلايا مجزأة بأبعاد مختلفة بالإضافة إلى بقايا الأنسجة النباتية.

يفلتر المعلق الخلوي عبر فلتر دقيقة (40-60 ميكرون) معقمة تحت جهاز العزل الجرثومي للتخلص من الأجزاء كبيرة الحجم من الأنسجة وتبقى الخلايا الحرة وبقايا الأنسجة

صغيرة الحجم. يتم غسل المعلق الخلوي بوسط مغذي جديد ويثقل بهدف تنقية المعلق الخلوي.

طبقت هذه التقنية على حوالي 200 نوع نباتي أعطت نتائج إيجابية فقط على 27 نوع نباتي. وكانت نسبة الخلايا الحرة الناتجة متفاوتة بين الأنواع (Chaussat et al., 1982).

يتم الحصول بهذه الطريقة على نسبة ضئيلة من الخلايا الحية التي لها قدرة على النمو والتطور، كما يتم الحصول على نسبة عالية من الخلايا المشوهة والمضروبة.

9-2-2- الطريقة الأنزيمية:

تستخدم في هذه الطريقة أنزيمات خاصة لفك الروابط البكتينية التي تربط بين الخلايا النباتية بهدف تحرير الخلايا الحرة ضمن المعلق الخلوي. يستخدم عادة أنزيم البكتيناز يضاف مع الوسط المغذي الخاص بالاستخلاص.

مثال على عزل الخلايا النباتية في أوراق التبغ:

تؤخذ أوراق تبغ من نباتات نامية في البيت الزجاجي، ثم تعقم الأوراق تحت جهاز العزل الجرثومي، وتقسّم إلى أجزاء صغيرة، وتترزع البشرة السفلية لتسهيل هضم الأنسجة بالمحلول الأنزيمي، ويضاف للأجزاء النباتية وسط مغذي يحوي أنزيم البكتيناز بالإضافة إلى السكر بنسبة 40 غ/ل والمحلول المعدني المغذي. وتترك لفترة من الزمن تختلف بحسب الأنواع النباتية.

بعد هدم الجدر البكتينية يتم غسل المعلق الخلوي بوسط جديد مغذي وخالي من المحلول الأنزيمي مرتين ويفلتر المعلق لتنقية الخلايا الحرة. التي تصبح جاهزة لعملية الزرع. تتصف هذه التقنية بكونها تعطي نسبة عالية من الخلايا الحرة، ذات الحيوية العالية والغير مهشمة. كما يمكن الحصول على الخلايا الحرة مباشرة من الكالوس القابل للفرط friable callus.

وذلك عن طريق وضع جزء من الكالوس في وسط مغذي سائل مع التحريك المستمر، يتفكك الكالوس ويتم تحرير الخلايا الحرة. ويتم فصل الخلايا ضمن المعلق الخلوي بالفلتر لفصل الكالوس عن الخلايا الحرة (Gurel et al., 2002; Ngara et al., 2008).

9-3- زراعة الخلايا النباتية:

يختلف تركيب الأوساط المغذية الخاصة بزرع الخلايا النباتية بحسب الأنواع النباتية وحسب الهدف من زرع الخلايا النباتية.

يتألف الوسط المغذي بشكل عام من:

- المحلول المعدني الحاوي العناصر الكبرى والصغرى مثل المحلول المعدني لموراشيغ وسكوغ (MS).

- الفيتامينات مثل التيامين والميوينوزيتول والبيوتين ...

- أحماض أمينية الغلوتامين والترينوفان....

- مصدر للطاقة مثل السكروز أو الغلوكوز..

- الهرمونات النباتية وخاصة السيتوكينين والأوكسين.

وهو يشابه تركيب الوسط المغذي الخاص بزرع البروتوبلاست ولكن الاختلاف بأن الوسط الخاص بزرع الخلايا لا يحوي على مواد حافظة للضغط الخلوي بسبب احتواء الخلايا على الجدار السيلولوزي. يتم زرع الخلايا النباتية في وسط سائل ضمن معلق خلوي، أو في وسط صلب في أطباق بتري. تتوجب معرفة نسبة حيوية الخلايا يمكن التحقق من حيويتها بعد العزل مباشرة بواسطة كاشف إيفان (Evan's Blue)، ويتم ذلك بوضع 100 ميكروليتر من المعلق الخلوي في طبق بتري ويضاف له 10 ميكروليتر من صبغة إيفان بتركيز 0.4 مول يحضن المزيج لمدة 5 دقائق، يتم حساب النسبة المئوية للخلايا غير المصبوغة بأزرق إيفان وهي تعبر عن نسبة الخلايا الحية (Bohmer & Meyer, 1996). كما يتم التحقق من درجة تركيز الخلايا بنفس الطرق المستخدمة في البروتوبلاست. يعد عدد خلايا الحرة الموجودة في المعلق باستخدام جهاز الهيماسيتوميتر Hemacytometer (Bohmer & Meyer, 1996).

لا بد من الإشارة بأن خلايا المعلق الخلوي ليست ذات قدرة كافية على الانقسام والتطور وإعطاء نباتات كاملة، وتختلف النسبة بحسب الأنواع النباتية وحسب مصدر الخلايا الحرة،

ففي تجربة نفذت على زراعة خلايا نبات الأسبرج، فقد لوحظ وجود ثلاث مجموعات من الخلايا الحرة:

- خلايا ميتة وتصل نسبتها بين 36-40%.

- خلايا حية ليس لها قدرة على الانقسام تبقى ساكنة في المعلق الخلوي.

- خلايا لها قدرة على الانقسام وتتطور وتشكل ميكروكالموس. تزداد نسبتها مع الزمن حتى تصل إلى 50% من خلايا المعلق الخلوي (Jullien et Guern, 1979).

9-4-مراحل تطور الخلايا الحرة في معلق خلوي:

يختلف منحني النمو الخاص بالخلايا النباتية بحسب كثافة الخلايا بالمعلق الخلوي وبحسب النوع النباتي المستخدم، يقسم منحني النمو إلى ثلاث أقسام:

- **الطور التمهيدي:** في هذا الطور الذي يستمر بالمتوسط 24 ساعة لا تدخل به الخلايا بمرحلة الانقسام. تعمل الخلايا على القيام بعملية اصطناع المواد الضرورية للانقسام الخلوي، في هذه المرحلة يلاحظ نشاط استقلابي كبير على مستوى الخلايا.

- **الطور الانقسام الخلوي:** و يلاحظ بدء نشاط كبير للخلايا بزيادة عددها بشكل ملحوظ، ويستدل على ذلك بزيادة دليل الانقسام الخلوي بشكل كبير Mitotic Index ويستمر طور الانقسام الخلوي عدة ايام حوالي 5 ايام تقريبا حيث يلاحظ في نهاية هذا الطور وصول عدد الخلايا في المعلق الخلوي إلى أقصى عدد ممكن. وغذا أردنا المحافظة على معدل إكثار خلوي مرتفع يتوجب تغيير الوسط المغذي بعد اسبوع على 10 ايام لتأمين حاجة الخلايا من العناصر المغذية.

- **الطور التوقف عن الانقسام الخلوي:** يلاحظ في هذا الطور توقف الخلايا النباتية عن الانقسام من خلال ثبات دليل الانقسام الخلوي. وتبدأ الخلايا في اصطناع بعض المركبات الثانوية التي تفيد في المحافظة على حياتها لفترة زمنية أطول، وتجعلها تقاوم عوامل الإجهادات اللاحيوية التي تتعرض لها في المعلق الخلوي. وخلال هذه المرحلة إذ لم يتم نقل الخلايا إلى وسط خلوي جديد، ويزداد إفراز بعض المركبات في المعلق الخلوي التي تعمل

على اسمرار الوسط وبدء موت الخلايا بشكل تدريجي. يستمر هذا الطور حوالي أسبوع تقريباً، لذلك يتوجب نقل الخلايا النباتية بمعدل مرة كل 15-20 يوم، للمحافظة على حيوية المعلق الخلوي.

تتطور الخلايا في معلق خلوي، ويمكن أن تعطي أجنة خضرية مباشرة دون المرور بمرحلة الكالوس، وفي هذه الحالة تعد طريقة من طرائق التكاثر الخضري الدقيق حيث تكون النباتات الناتجة مشابهة في أغلب الأحيان للنبات الأم.

كما يمكن أن تتطور الخلايا النباتية وتكون ميكروكالوس وهذا الميكروكالوس يتكاثر و يعطي إما كالوس جنيني أو كالوس عضوي وفي مرحلة لاحقة يتطور ويشكل نباتات وذلك حسب تقانة تكوين الأجنة غير المباشر أو تكوين نباتات كاملة بشكل غير مباشر (Indirect Organogenesis). وفي هذه الحالة تكون النباتات الناتجة مشابهة أو مغايرة في تركيبها الوراثي للنبات الأم. ويتم الحصول على مصدر للخلط الوراثي أو سلالات أو أصناف جديدة، لذلك تعد في هذه الحالة تقانة زرع الخلايا النباتية طريقة من طرائق التحسين الوراثي.

9-5-العوامل المؤثرة في زرع الخلايا النباتية:

تؤثر عوامل عديدة في قدرة الخلايا النباتية في التطور وتكوين نباتات كاملة. تقسم العوامل إلى عدة أقسام:

- عوامل متعلقة بتركيب الأوساط الغذائية: مثل المحلول المعدني، تركيز الهرمونات النباتية ونوعها، طبيعة الوسط المغذي سائل أو صلب....

فقد لوحظ في حال نمو الخلوي في وسط سائل، أعطى كتلة حيوية بشكل أكبر من الوسط الصلب (Ngara et al., 2008). كما لوحظ لنوع الهرمونات النباتية وتركيزها تأثير واضح في نمو الخلايا النباتية. ففي تجربة على الشوندر السكري فقد تم الحصول على أكبر كتلة حيوية وقدرة على انقسام الخلايا في وسط سائل يحوي 0.25 مع/ل من الBAP و 0.25 مع/ل من الD 2,4 (Gurel et al.,2002).

- عوامل متعلقة بالنوع النباتي وبمصدر الخلايا النباتية: تختلف قدرة الخلايا النباتية على النمو والتطور باختلاف الأنواع النباتية في بعض الأنواع يلاحظ نمو سريع للخلايا النباتية

مثل التبغ، وفي بعض الأنواع يلاحظ نمو بطيء للخلايا في المعلق الخلوي. كما لمصدر الخلايا النباتية تأثير واضح في قدرتها على النمو وتكوين نباتات كاملة، فقد لوحظ في نبات الجبريرا بأن الخلايا المعزولة من كالوس لها قدرة على النمو بشكل أكبر من خلايا معزولة من الأوراق (Ngara *et al.*, 2008).

- عوامل تتعلق بشروط زرع الخلايا الحرة: مثل عدد الخلايا الحرة في 1مل من المعلق الخلوي ففي حال خلايا التبغ فقد لوحظ بأن أفضل كثافة للخلايا حوالي 200000 خلية بالمل، في حين بالجبريرا 30000 خلية بمل (Chaussat and Bigot, 1982; Ngara *et al.*, 2008).

9-6- تطبيقات زراعة الخلايا النباتية:

تستخدم تقانة زراعة الخلايا النباتية في المجالات التالية:

9-6-1- في مجال الإكثار الخضري: عند تطور الخلايا النباتية بشكل مباشر من دون المرور بمرحلة الكالوس فيمكن الحصول على تطور مباشر للأجنة الخضرية أو تطور مباشر للبراعم وبالتالي الحصول على نباتات كاملة. ففي هذه الحالة تكون النباتات الناتجة مشابهة للنبات الأم. لا تستخدم تقانة زرع الخلايا النباتية للإكثار الخضري، لأنه من الصعب التمييز في مرحلة مبكرة بين الخلايا التي تطورت مباشرة من الخلايا التي تطورت بشكل غير مباشر، وهذا يعني بوجود شك من ناحية التشابه الوراثي مع النبات الأم.

9-6-2- في مجال التحسين الوراثي: تعد طريقة زراعة الخلايا النباتية من طرائق الحصول على سلالات متباينة وراثيا. عند تكون نباتات كاملة بعد تكوين الكالوس من الخلايا الحرة. أي تكوين أجنة خضرية أو براعم بشكل غير مباشر. وقد تحمل السلالات الجديدة صفة جديدة مثل المقاومة لبعض الأمراض أو صفة مميزة مهمة في برنامج التحسين الوراثي للنبات المدروس.

تجديد النباتات بدءاً من زراعة الخلايا النباتية: تختلف الشروط المثلى لتجديد النباتات من نوع نباتي إلى نوع نباتي آخر، لذلك ليتم الحصول على التجديد لنبات ما لابد من وضع شروط الوسط المناسب والشروط الفيزيولوجية والبيئية المناسبة.

مثال: فقد تم الحصول على نباتات كاملة في الشوندر السكري بدءاً من زرع الخلايا النباتية وفق الآتي (Gurel *et al.*, 2002): تم الحصول على معلق خلوي بدءاً من الكالوس.

زرعت الخلايا الحرة في وسط يحوي 2.4.D $+0.25\text{mg/l}$ BAP $+0.25\text{mg/l}$ MS لمدة 15 يوماً بالظلام لتكوين الكالوس. نقل الكالوس إلى وسط مغذ صلب يحوي $MS + 0.3$ mg/l IAA $+0.1$ mg/l BAP بهدف إكثار الكالوس، وكررت عملية النقل إلى الوسط نفسه عدة مرات بهدف الحصول على كميات كافية من الكالوس تكفي لتجارب التجديد فيما بعد.

نقل الكالوس إلى وسط تجديد يحوي IAA $+0.3\text{mg/l}$ BAP $+1\text{mg/l}$ MS. عرض الكالوس إلى درجة حرارة منخفضة 4 م لمدة 15 يوماً بالظلام قبل النقل إلى وسط التجديد، وأعطى الكالوس بعد شهر من الزراعة بالإضاءة على براعم. نقلت البراعم إلى وسط تجدير وأعطت جذوراً، وتم الحصول على نباتات كاملة.

ففي قصب السكر تم الحصول على طفرات متحملة لبعض الأمراض بوساطة زراعة الخلايا النباتية.

9-6-3- الحصول على طفرات عالية الإنتاج من الأحماض الأمينية:

تسمح تقانة زرع الخلايا النباتية في بعض النباتات مثل الحبوب بإنتاج بعض الطفرات أو السلالات عالية الإنتاج من بعض الأحماض الأمينية مثل التريبتوفان اللايسين، والميثيونين.

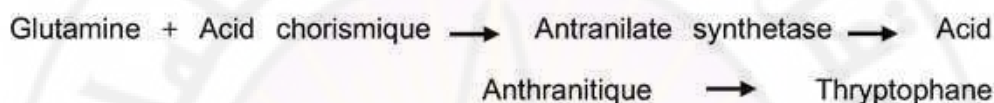
عند إضافة بعض مشابهات الأحماض الأمينية إلى وسط المغذي الخاص بالمعلق الخلوي. تمتص خلايا المعلق المشابهات المضافة مما يؤدي إلى تثبيط تكوين الحمض الأميني المذكور، مما يعمل على إحداث خلل كبير في نمو الخلايا. لا بل توقف كامل لنموها بسبب نقص في الحمض الاميني. وتبدأ الخلايا بالتماوت.

تعمل بعض خلايا في المعلق الخلوي على تطوير أسلوب للتأقلم مع الوسط الجديد، بحيث تستطيع بشكل خفيف على اصطناع الحمض الاميني على الرغم من وجود المشابه في الوسط عن طريق تطوير نظام أنزيمي الخاص بإنتاج الحمض الأميني المدروس. وتستطيع ان تبقى على قيد الحياة. عند نقل الخلايا إلى وسط جديد بدون إضافة المشابه

تستطيع إنتاج كمية أعلى من الحمض الأميني المذكور وتسمى في هذه الحالة خلايا عالية الإنتاج من الحمض الأميني المدروس (Superproductrices).

مثال: إنتاج التريبتوفان في معلق خلايا التبغ:

أضيف مركب 5-D.L.Methyltryptophane إلى معلق خلوي لنبات التبغ، هذا المركب مشابه للتريبتوفان. أدى إلى توقف وتثبيط تكون التريبتوفان في المعلق الخلوي وذلك عن طريق تثبيط النظام الأنزيمي الخاص بإنتاج التريبتوفان Antranilate synthetase كما هو موضح بالشكل (1-9):



الشكل (1-9): إنتاج التريبتوفان في المعلق الخلوي

عند زرع الخلايا مع المشابه لم يلاحظ أي مظهر لنمو الخلايا وانقسامها وقسم كبير من الخلايا تماوت بسبب عدم تمكنها من إنتاج التريبتوفان.

استطاعت بعض خلايا من النمو الخفيف بعد 30-60 يوما من بداية التجربة. حيث طورت نفسها واستطاعت من تطوير النظام الأنزيمي وإنتاج التريبتوفان بكمية خفيفة على الرغم من وجود المشابه في الوسط.

نقلت هذه الخلايا إلى وسط جديد خالي من المشابه. استطاعت إنتاج تركيز عال من التريبتوفان بالمقارنة مع الخلايا العادية واستطاعت إنتاج أضعاف النسبة المنتجة في الخلايا العادية.

9-6-4- إنتاج المواد الفعالة بوساطة زرع الخلايا النباتية:

تستطيع الخلايا النباتية من إنتاج مجموعة كبيرة من المركبات الثانوية الفعالة التي لها أهمية كبيرة في الصناعات الدوائية والعطرية والتجميلية. مثل القلويدات والستروئيدات والصبغات والمضادات الحيوية. قبل التكلم عن كيفية إنتاجها بالخلايا النباتية لا بد من التعرف على هذه المركبات الفعالة بشيء من التفصيل.

9-7-المنتجات الاستقلابية في النبات وفي الخلايا النباتية:

يُنتج النبات أثناء حياته مجموعة كبيرة من المركبات الكيميائية والتي يحتاجها لنموه وحمايته من المؤثرات الخارجية. تقسم هذه المركبات إلى قسمين:

المنتجات الأولية مثل الكربوهيدرات-البروتينات-الدهن -الأحماض النووية والهرمونات النباتية. ويتم إنتاجها من قبل النبات بتركيز مختلفة وهي ضرورية لنمو النبات وتطوره وإكمال حياته.

المنتجات الثانوية: مركبات ثانوية ينتجها النبات لتأمين احتياجاته الضرورية لمقاومة الإجهادات الحيوية واللاحوية. وتنتج هذه المركبات من استقلاب المركبات الأولية. تقسم **المنتجات الثانوية إلى:**

-منتجات ثانوية تستخدم لحماية النباتات من الأحياء الممرضة مثل البكتيريا والحشرات والفيروسات والنباتات والفطور.

-منتجات جاذبة للحشرات لإتمام عملية التلقيح وإنتاج البذور.

-منتجات مهمة لزيادة تحمل النبات للإجهادات اللاحوية.

-منتجات ثانوية لأغراض إنتاج الأدوية والمستخدمة في معالجة أمراض الإنسان والحيوان.

-منتجات ثانوية تستخدم في الصناعات الغذائية والتحويلية.

يوجد أكثر من 250000 مركب ثانوي يتم اصطناعها في الخلايا والأنسجة النباتية وتقسّم إلى أربع مجموعات مهمة وهي:

القلويدات ALKaloids .

الجليكوسيدات Glycosides .

الفينولات Phenolic compounds .

الترپينويدات Terpenoids .

9-7-1 القلويدات ALKaloids :

تتكون مركبات هذه العائلة من الأحماض الأمينية مثل التيروزين - التريبتوفان - الأرجينين - الأورثينين - واللايسين . تحتوي أغلب مركبات هذه العائلة على قلويدات اندولية حلقية تتحدّر من التريبتوفان.

تستخدم المنتجات الثانوية لهذه المجموعة بشكل رئيس في صناعة الأدوية. وأمثلة على هذه المجموعة نذكر على سبيل الذكر لا الحصر:

التروبان Tropane ، الأتروبين Atropine ، المورفين Morphine ، الكودئين Codaine ، الكوكائين Cocaine ، الهيوسيامين Hyoscymine ، السكوبولامين Scopolamine ، البربرين Berberine .

9-7-2-الترينويدات Terpenoides : تتألف مركبات هذه العائلة من 5 ذرات كربون ومضاعفاتها تدعى الوحدة الخماسية بالأيزوبرين Isoprene . ويمثل الجدول (9-1) تصنيف التربينويدات مع عدد ذرات الكربون.

جدول (9-1): تصنيف التربينويدات

نموذج	عدد ذرات الكربون	وحدات الإيزوبرين	مثال
هيميتربين	C5	1	Prenol
Monoterpene	C10	2	Menthol
Sesquiterpene	C15	3	Farnesol
Diterpene	C20	4	Cafestol
Triterpene	C30	6	Farnesol pyrophosphate

Lycopene, Carothene	8	C40	Tetraterpene
------------------------	---	-----	--------------

مثال: الـ **Farnesol**: يستخدم مادة عطرية، ومبيد حشرياً، ومضاداً سرطانياً ومضاداً بكترياً.

مثال 2 **Taxol** : يستخدم كمضاد سرطان وخاصة لسرطان الثدي.

9-7-3- المجموعة الثالثة المركبات الفينولية: تتحدر من مركب الفينول، وتتكون من الأحماض الأمينية العطرية مثل التيروزين والفينيل آلانين.

تلعب المركبات الفينولية دوراً مهماً في حماية الخلايا كمضادات أكسدة ومنع تكوين وتطور الخلايا السرطانية من خلال تنظيم انتقال الأوكسينات والأنزيمات التي تعيق من تطور وتكوين الدرنات السرطانية في النبات (Rasouli *et al.*,2016).

تعد المركبات الفينولية من أوسع المركبات الثانوية التي ينتجها النبات ذات الوزن الجزيئي المنخفض. ويوجد أكثر من 8000 مركب يتبع هذه المجموعة (Sedighi *et al.*,2014). تؤثر هذه المركبات في كثير من الحقول في الغذاء والكيمياء والطب والصيدلة. ولها تأثيرات بيولوجية مختلفة كمضادات أكسدة، ومضادة للبكتيريا وللطور، وتلعب دوراً في حفظ الأغذية والمحافظة على صحة الإنسان كمركبات وقائية تجنب الإنسان الكثير من الأمراض وتزيد من مناعة الجسم.

يزداد إنتاج المركبات الفينولية عند تعرض الخلايا والأنسجة النباتية إلى عوامل الإجهاد المختلفة مثل الحرارة والضوء وعوامل الوسط المغذي والجفاف والملوحة....الخ.

تضم المركبات الفينولية الكثير من المركبات مثل المركبات الأنثوسيانية والمركبات الفلافونية **Flavonoids** (Flavones , Flavonols).

الكومارين واللغنين.....

9-7-4- المجموعة الرابعة الغليكوزيدات Glycosides: تحوي هذه المجموعة على الكربوهيدرات المرتبطة مع مركبات غير كربونية. ويوجد في النبات مجموعة كبيرة من الغليكوزيدات وذات الفائدة الطبية والصناعية.

مثل بعض المواد السامة التي توجد في الأنسجة النباتية المختلفة كالأميغدالين Amygdalin التي توجد في بذور اللوز المر وهي غليكوسيد مرتبط مع المركبات السيانية (Cyanogenic glycosides).

الريزين Resine مادة سامة تحوي زيوت طيارة. اللاتكس Latex السائل الحليبي يتكون من بروتينات وقلويدات وسكريات ونشا ودهون وتانينات... المطاط الطبيعي

الفيتوستيرول **Phytosteroles** : مركبات تحوي زيوت نباتية توجد بشكل حر في الخلايا أو على شكل غليكوزيدات مع الدهون.

9-7-5- أمثلة على بعض المواد الفعالة:

-المركبات الثانوية المستخدمة لعلاج القلب مثل الديجوكسين Digoxin ، اللانوكسين Lanoxin.

-المركبات الثانوية المستخدمة في علاج السرطان، ويتم إنتاجها من النباتات مثل: Viniblastine , Vinicristine, Ellipticine, Taxol, Quercetine, baccharin , Podophyllotoxin, Brucentine,

-المركبات المستخدمة كمضاد حشرات مثل: Rotenoids, Pyrethrins, neem, Nicotine .

-المركبات المستخدمة في الطعم مثل: الفانيليا ، الفلفل ، الكوكا ، الكمون، Cardamon .

-المركبات المستخدمة كملونات طبيعية: مثل الزعفران Saffron، Anthocynins ، الكاروتينات، الكلوروفيل، الريبوفلافين، الكوركومين Curcumine .

-إنتاج المواد الفعالة بزرع الخلايا النباتية:

يعد إنتاج المواد الفعالة الطبيعية بواسطة زرع الخلايا النباتية من أهم تطبيقات زراعة الخلايا النباتية، توجد أبحاث كثيرة في هذا المجال ولكن الأعمال التي وصلت إلى الإنتاج التجاري قليلة جداً، ويعزى ذلك للأسباب الآتية:

- يوجد فروقات كبيرة في إنتاج المواد الفعالة بحسب التركيب الوراثي للنباتات الطبية واختلاف في قدرة الخلايا في إنتاج المواد الفعالة وذلك حسب السلالات الخلوية.

- عدم وجود استمرارية لفترة زمنية طويلة في قدرة الخلايا على إنتاج المواد الفعالة ويعزى ذلك لتغير في التركيب الوراثي للسلاسل المنتخبة والذي ينعكس سلباً بتغير في النظام الأنزيمي في الخلايا الذي يمكن ان ينعكس سلباً في كمية المادة الفعالة المنتجة.

- إن نقل نتائج الأبحاث من المختبر إلى المصانع ليس بالأمر السهل يمكن أن يؤثر بشكل كبير في تعرض الخلايا النباتية إلى بعض التغيرات في الوسط أو في شروط الإنتاج والتي تسبب في تغير في مستوى الإنتاج وفي استمراريته.

9-8-العوامل المؤثرة في إنتاج المواد الفعالة بزراعة الخلايا النباتية:

9-8-1-انتخاب سلاسل من الخلايا ذات إنتاجية عالية من المادة الفعالة:

في بداية الأمر يتوجب تحديد النباتات البرية ذات الإنتاجية العالية ليصار إلى استخدامها في برنامج الانتخاب الخلوي.

انتخاب أي الأجزاء النباتية من هذه النباتات تعطي سلاسل خلوية مميزة الإنتاج هل الأوراق أو البراعم أم الجذور.... ليكون مصدر جيد للكالوس حتى يتم الحصول على معلق خلوي مناسب.

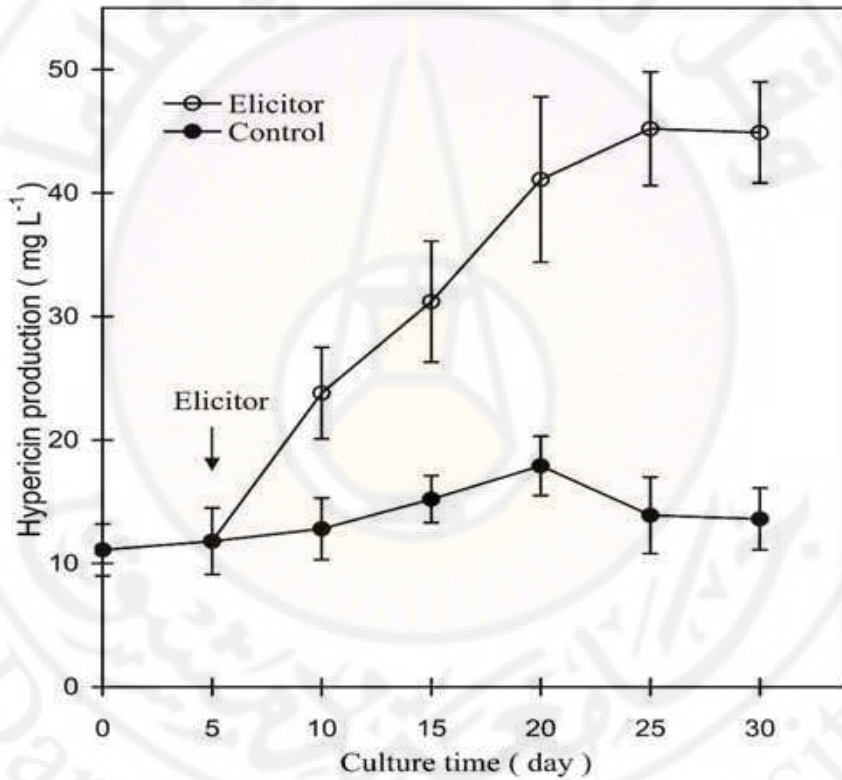
انتخاب السلاسل الخلوية ذات الإنتاجية العالية من المواد الفعالة. وهنا لابد من الذكر بأنه يمكن انتخاب سلاسل خلوية عالية الإنتاج من المواد الفعالة Superproductrices عن طريق إضافة المشابهات Analogues إلى الوسط المغذي وانتخاب السلاسل التي تبدي مقاومة للمشابه.

9-8-2-دراسة تركيب البيئة المناسبة والظروف البيئية بهدف الحصول على أكبر كمية

من المادة الفعالة وهذا يتطلب دراسة تأثير تركيب الأوساط المغذية من المواد المعدنية والسكريات والمواد الأزوتية والـ pH والهormونات النباتية. كما يتطلب دراسة شروط غرف النمو الحرارة والإضاءة ونسبة الرطوبة. ويختلف تركيب الأوساط المغذية وشروط غرف النمو من نوع نباتي إلى نوع نباتي آخر. ولذلك لابد من دراسة كافة العوامل حتى يتم الحصول على أعلى كمية ممكنة من المواد الفعالة.

مثال إنتاج مادة الهيبرسين:

تعد مادة الهيبرسين Hypericin مادة فعالة تدخل في صناعة الأدوية النفسية والعصبية. أنتجت هذه المادة بواسطة زراعة خلايا من نبات *Hypericum perforatum*. أخذت أوراق النبات المذكور وزرعت في وسط يحوي MS+K +24D لتكوين الكالوس بهدف الحصول فيما بعد على معلق خلوي. زرعت الخلايا في وسط مناسب لإنتاج مادة الهيبرسين كما هو موضح بالشكل (2-9):



الشكل (2-9): إنتاج الهيبرسين Hypericin في معلق خلوي لنبات *Hypericum* بوجود محرض

لوحظ إنتاج أكبر كمية من المادة الفعالة في الظلام بدءاً من خلايا أخذت من الكالوس المتكون من الأوراق بالمقارنة مع نسبة المادة الفعالة المنتجة من خلايا كالوس متكون من الجذور والقمم النامية (Bais et al.,2002).

ويوضح الشكل (9-3) إنتاج مادة الديجوكسين من زرع خلايا نبات الديجيتاليس في المخبر، إذ يتم استخلاص المادة الفعالة من الوسط المغذي أو من الخلايا نفسها أو من الاثنين معاً.

9-8-3-إضافة مواد محرضة Elicitors لإنتاج المواد الفعالة:

عند تعرض النبات للإجهادات الحيوية واللاحيوية ينتج النبات بعض المواد للدفاع عن نفسه مثل حمض الساليسليك وميتيل جاسمونات، وقد لوحظ عند إضافة هذه المواد المحرضة إلى وسط المعلق الخلوي أدى إلى زيادة إنتاج المواد الفعالة. يجب أمثلة التركيز الأنسب ونوع المادة المحرضة وعمر الخلايا النباتية وموعد إضافة المادة المحرضة كل هذه العوامل تؤثر في زيادة إنتاج المادة الفعالة. فقد تم الحصول على زيادة واضحة في نسبة المادة الفعالة باكليتاكسل Paclitaxel مضادة سرطان عند إضافة المحرض ميتيل جاسمونات إلى معلق خلوي من نبات *Taxus medica* وذلك بعد 8 أيام من عمر المعلق الخلوي بالمقارنة مع إضافة المادة المحرضة بعد 14 يوماً (Ketchum et al.,1999).

كما يمكن إضافة أكثر من محرض لزيادة إنتاج المادة الفعالة، فقد تم الحصول على زيادة واضحة في إنتاج مادة التاكسان Taxane (Paclitaxel) عند إضافة ميتيل جاسمونات مع مادة محرضة ثانية وهي سيكلوديكترين Cyclodextrine إلى معلق خلوي من نبات *Taxus medica* (Sabater-Jara et al.,2014).

مثال على تأثير المادة المحرضة في إنتاج المواد الفعالة:

يتم إنتاج مادة الويذافيرين Withaferin A من معلق خلوي من نبات *Withania somnifera* ، وهو نبات طبي شجيري مستقيم الخضرة يعيش بشكل أساسي في الهند والباكستان، لوحظ عند إضافة مادة محرضة إلى المعلق الخلوي مثل السالاسين Salacin أنه أدى إلى زيادة واضحة في نسبة المادة الفعالة المنتجة بلغ معدل الزيادة 50 ضعف بعد 15 يوماً من إضافة المادة المحرضة. وكان أفضل تركيز من السالاسين 750مليمول حيث

بلغ إنتاج Withaferin A 25 مغ/ل بينما في حال الشاهد كان معدل الإنتاج 0.47 مغ/ل (Ciddi,2006).

9-8-4-التحول الحيوي Biotransformation : وتتم إضافة طليعة المادة الفعالة إلى الوسط المغذي، وتعمل الخلايا النباتية بتحويلها إلى المادة الفعالة بوساطة النظام الأنزيمي المتوفر داخل خلايا المعلق الخلوي. تشكل مادة الأرتيميزين Artemisinin طليعة المادة الفعالة لمركب دي أوكسي أرتيميزين Deoxyartemisinin . فعند إضافة الأرتيميزين إلى معلق خلوي لنبات الـ *Catharantus roseus* يتم التحول بنسبة 78% (Patel et al., 2010).

تؤثر بعض العوامل بالاصطناع الحيوي مثل النوع النباتي ، نوعية المادة المضافة وكميتها ، الوسط المغذي وطبيعته ونسبة الهرمونات النباتية المضافة، الفترة الزمنية التي تضاف فيها طليعة المادة الفعالة. ففي حال المعلق الخلوي *Catharantus roseus* عند إضافة الأرتيميزين مباشرة منذ بداية الزرع فلا يلاحظ أي تحول حيوي، بينما عند إضافة طليعة المادة الفعالة بعد 20 يوم من الزرع فيلاحظ نسبة عالية من التحول الحيوي تصل إلى 78%.

9-8-5-إضافة بعض المواد لزيادة النفاذية الخلوية:

تعمل إضافة بعض المواد إلى المعلق الخلوي إلى زيادة نفاذية المواد الفعالة من الفجوات الخلوية وعبر الأغشية الخلوية إلى الوسط المغذي. لا تؤثر المواد المضافة على حيوية الخلايا كما لا تؤثر في نسبة اصطناع المواد الفعالة في المعلق الخلوي.

تستخدم عدة مواد عضوية مثل الإيزوبروبانول Isopropanol دي ميتيل سلفوكسيد DMSO والشيتوزان Chitosan. يلعب موعد إضافتها وتركيزها دوراً مهماً في زيادة النفاذية الخلوية وفي قدرة الخلايا على إنتاج المادة الفعالة.

مثال أضيف مادة الديكانول Decanol إلى معلق خلوي من نبات الـ *Taxux chinensis* ، أدى إلى زيادة إنتاج مادة Paclitaxel عن طريق زيادة نفاذية الأغشية الخلوية مما يؤدي إلى زيادة تركيز المادة الفعالة في الوسط المغذي مما يسهل من استخلاصها من الوسط (Wang et al.,2001).

9-8-6- استخدام خلايا الكامبيوم في إنتاج المواد الفعالة:

تمتاز خلايا الكامبيوم بمزايا متعددة تجعل لها أهمية خاصة في إنتاج المواد الفعالة ومن هذه المزايا:

- 1- تتصف بقدرتها على الانقسام اللامتناهي مما يؤدي إلى تكوين كتلة كبيرة من المادة الحية.
 - 2- تعمل على إنتاج المواد الفعالة بتركيز عالية.
 - 3- تنتج المواد الفعالة لفترة طويلة نسبياً مما يعطي استمرارية في إنتاج المواد الفعالة لفترة أطول.
 - 4- تتصف أغشيتها الخلوية برقتها مما يزيد في نفاذيتها الخلوية، وهذا يسهل من انتقال المواد الفعالة من الفجوات إلى الوسط بشكل أسهل وأسرع.
 - 5- تستجيب لإضافة المواد المحرصة بشكل كبير مما يزيد من إنتاج المواد الفعالة.
- لذلك لوحظ استخدام هذا المصدر من الخلايا النباتية لإنتاج بعض المواد الفعالة التي يمكن أن تؤدي إلى استخدامها فيما بعد على النطاق التجاري (Lee et al.,2010).
- وتجدر الإشارة بأن يمكن إنتاج بعض المواد بوساطة زراعة الخلايا النباتية، وهي غير موجودة أصلاً في النبات الأم، فقد تمكن فريق ياباني من إنتاج خمس مواد فعالة مضادة للبكتيريا في معلق خلوي من نبات *Tectonia grandis*، مع العلم بأن هذه المواد المنتجة غير موجودة في النبات الكامل بالطبيعة (Kawazzu et al.,1998). زرعت أوراق النبات المذكور بعد تعقيمها في وسط مغذ لتكوين الكالوس ثم اخذت الخلايا من الكالوس بهدف إنتاج المواد الفعالة.

وبالختام لابد من القول بأن هذه التقنية لها أهمية كبيرة في إنتاج المواد الفعالة ذات المصدر الطبيعي، وهي تقنية واعدة وخاصة بأنه على المستوى المخبري توجد أبحاث بالآلاف التي تمكن فيها العلماء بإنتاج أعداد كبيرة من المواد الفعالة، التي لها أهمية كبيرة في مجال الطب والصيدلة والصناعات الغذائية والتجميلية والدوائية، ولكن لا يزال عدد محدود من الأبحاث التي طبقت في الإنتاج التجاري بشكل كامل وهنا تكمن المشكلة وهي بنقل النتائج المخبرية من المستوى الصغير إلى المستوى الصناعي فهذا يحتاج إلى أمثلة

تقانة الإنتاج ودراسة بالتفصيل العوامل المؤثرة في الإنتاج على المستوى الصناعي. والمشكلة الثانية عدم استمرارية إنتاج المواد الفعالة لفترة زمنية طويلة بسبب عوامل فيزيولوجية ووراثية تؤثر في إنتاج المواد الفعالة في الخلايا النباتية. كما لابد من تطوير مفاعلات حيوية كبيرة يتم السيطرة فيها على عوامل الوسط وشروط الإنتاج بدقة حتى يتم تأمين استمرارية الإنتاج لفترة زمنية طويلة.



الفصل العاشر

إنتاج سلالات متباينة وراثيا بزراعة الكالوس

Somaclonal variation by callus culture

10-1-مقدمة:

يتم الحصول على الكالوس من أجزاء نباتية مختلفة، خلايا، فلقات، أوراق، جذور، قمم نامية وبراعم جانبية، حبوب لقاح، أجزاء زهرية، بروتوبلاست، وأجنة خضرية، ويتم تجديد الكالوس بهدف تكوين نباتات كاملة بشكل مباشر أو غير مباشر، وقد تكون النباتات الناتجة عن تجديد الكالوس مشابهة للنبات الأم أو غير مشابهة للنبات الأم، وتعد تقانة زراعة الكالوس إحدى التقانات المستخدمة في تربية النبات والتحسين الوراثي، والتي يمكن الحصول بواسطتها على سلالات متباينة وراثيا عن النبات الأم. وقد تحمل السلالات الجديدة بعض الصفات المهمة في برنامج التربية للنبات المدروس، وهذا يؤدي إلى تحسين صفاته الكمية والنوعية. كما يمكن الحصول على سلالات مقاومة لبعض الأمراض والحشرات أو متحملة لبعض الإجهادات البيئية مثل تحمل الجفاف مثلاً.

- **سلالات Somaclones** وهي عبارة عن سلالات تنشأ بزراعة النسيج وقد تكون مشابهة للنبات الأم أو متباينة وراثيا عن النبات الأم.

- **Somacolnal variation**: يقصد بها الحصول على سلالات متباينة وراثيا بدءاً من أجزاء نباتية مختلفة مثل الكالوس - خلايا - بروتوبلاست - حبوب لقاح - وجذور شعرية. ولا يمكن التحكم في هذه الحالة في التباينات الوراثية للسلالات المحدثة. يمكن أن تكون الاختلافات وراثية مؤقتة لا تلبث أن تزول بعد فترة من الزمن، وهي في هذه الحالة غير قابلة للتوريث. ويمكن أن تكون الاختلافات ثابتة وهي قابلة للتوريث للأجيال اللاحقة من النباتات.

10-2-الكالوس وأنواعه:

يظهر الكالوس عند تعرض الأنسجة النباتية للجروح والتقسيم، وينشأ من الأنسجة الميرستيمية أو الأنسجة النباتية التي لها قدرة على التمايز الرجعي مثل الأنسجة البارثيمية.

والكالوس بالتعريف عبارة عن كتلة خلوية غير متميزة لها القدرة على الانقسام وتتمو بشكل عشوائي. تختلف سرعة انقسام الكالوس ونموه بحسب النوع النباتي، وحسب مصدر الكالوس، ونوعه وحسب الوسط المغذي ومكوناته، ويقسم الكالوس إلى عدة أنواع:

10-2-1- الكالوس الجنيني:

نوع من الكالوس يتميز بقدرته على تكوين الأجنة الخضرية، ويتصف بكونه سملي حبيبي وجلدي الملمس، ويعد أكثر أنواع الكالوس ثباتاً من الناحية الوراثية، أي نسبة التغيرات الوراثية في النباتات الناتجة عن الكالوس الجنيني منخفضة. ولهذا السبب يعد إكثار بالأجنة الخضرية إحدى طرائق الإكثار الخضري في العديد من الأنواع النباتية مثل النخيل.

10-2-2- الكالوس العضوي:

نوع من الكالوس الذي يتميز بقدرته على تكوين البراعم والجذور، وبالتالي إعطاء نباتات كاملة، ويتصف هذا الكالوس بتعدد ألوانه سملي مصفر، أو أخضر مصفر، وحبيباته أصغر حجماً من الكالوس الجنيني، وتكون سرعة نموه وتكاثره أكبر من الكالوس الجنيني، كما تكون نسبة التغيرات الوراثية في النباتات المتجددة منه كبيرة، لهذا السبب يستخدم هذا النوع من الكالوس لتكوين السلالات المتباينة وراثياً، ليصار إلى استخدامها في التحسين الوراثي للنباتات المدروسة.

10-2-3- الكالوس الهش:

وهو كالوس خفيف هش لونه سملي مسمر وفي أغلب الأحيان يصاب بظاهرة الشفافية والاسمرار، ويتحول إلى كالوس أسمر داكن اللون مائي الشكل، وليست له القدرة على التطور والتجديد. يمكن أن تتطور بعض خلاياه في بعض الأحيان لتكوين نوع آخر من الكالوس (عضوي أو جنيني). يهمل هذا النوع من الكالوس ولا يتابع نموه وإكثاره.

10-2-4- كالوس رخو مائي طري:

قد يكون أبيضاً أو سملياً مسمراً. وهذا أيضاً لا يستطيع أن يتطور، وفي أغلب الأحيان يهمل.

ونشير إلى وجود عدة ألوان من الكالوس حسب النوع النباتي، وحسب الصبغات التي تتراكم فيها، نذكر منها على سبيل المثال الأخضر المصفر، الكالوس الأصفر المبيض، الكالوس الأحمر اللون أو السمني المحمر....

10-3-زراعة الكالوس:

10-3-1-مزايا زراعة الكالوس:

1- تستخدم زراعة الكالوس بشكل أساسي في التحسين الوراثي للنباتات البستانية والحقلية. يتم الحصول على سلالات متباينة وراثيا والتي لها تطبيقات متعددة في تربية النبات نذكر منها على سبيل المثال لا الحصر:

- الحصول على سلالات متحملة للأمراض (الفطرية والبكتيرية والفيروسية)
- الحصول على سلالات متحملة أو مقاومة للنيماطودا.
- الحصول على سلالات متحملة للحشرات الضارة.
- الحصول على سلالات متحملة للإجهادات اللاحيوية مثل الجفاف والملوحة.....
- الحصول على سلالات متحملة لنوعية التربة مثل تحمل نسبة عالية من الكلس، أو نوع التربة طينية أو خفيفة....
- الحصول على سلالات تحمل بعض الصفات الوراثية التي تؤدي إلى زيادة الإنتاجية من الناحية الكمية والنوعية، مثل في النباتات الطبية زيادة المادة الفعالة وتحسين نوعيتها

2-تستخدم في الإكثار الخضري في بعض الأنواع عن طريق تكوين الأجنة الخضرية.

3-تستخدم زراعة الكالوس كمصدر هام للخلايا النباتية والبروتوبلاست.

4-تستخدم في إنتاج المواد الفعالة في بعض الأنواع النباتية الطبية.

تختلف أهداف زراعة الكالوس بحسب الأنواع النباتية، ففي النباتات الطبية والعطرية تهدف إلى إنتاج سلالات متباينة وذات نسبة عالية من المواد الفعالة، أو يمكن أن تحوي السلالات الجديدة مواد فعالة غير موجودة في النبات الأم.

ففي الزيتون مثلاً، تهدف زراعة الكالوس إلى إنتاج سلالات متباينة وراثياً لتحسين الإنتاجية ونوعية الزيت وكميته، وتحسين الأصناف وزيادة مقاومة أشجار الزيتون للأمراض والحشرات.

مثال: مرض التدهور البكتيري السريع في الزيتون Quick decline ، يسببه نوع من البكتريا *Xylella fastidiosa* . وهو مرض خطير يؤدي إلى جفاف الأشجار وموتها بدءاً من النموات الغضة والأوراق الطرفية باتجاه الأفرع الهيكلية، والجذع، وفي النهاية تموت الأشجار، وينتقل هذا المرض بواسطة أدوات التطعيم والحشرات والنطاطات. ينتشر هذا المرض حالياً بجنوب أوروبا وفي إيطاليا بالتحديد إذ قضى على عشرات الآلاف من أشجار الزيتون في جنوب إيطاليا عام 2013، وقد وصل هذا المرض إلى إيطاليا من أمريكا الجنوبية عن طريق شتلة بن مصابة بالبكتريا الممرضة. لا يوجد هذا المرض في القطر لحد الآن ولكن يتوجب أخذ الحيطة والحذر عن طريق فرض شروط صارمة لدخول غراس الزيتون والحمضيات إلى القطر مع التشديد في تطبيق قواعد الحجر الزراعي. تلعب تقانات زراعة الأنسجة النباتية دوراً مهماً في مكافحة هذا المرض ومنع دخوله إلى القطر. ويمكن تحديد دور زراعة النسيج بما يلي:

- عمل برنامج استنباط سلالات متباينة وراثياً متحملة لهذا المرض، عن طريق زراعة الكالوس.
- اعتماد تقانة زراعة النسيج في نقل وتبادل المادة النباتية بين الدول.
- إكثار الأصناف المتحملة لهذا المرض بزراعة النسيج، الناتجة عن برامج التحسين الوراثي.

10-3-2- مشاكل زراعة الكالوس:

- لا تخلو زراعة الكالوس من بعض المشاكل والصعوبات، وتوجد بعض النباتات التي ليس لها القدرة على تكوين نباتات كاملة من الكالوس.
- يتم الحصول على سلالات متباينة غير معروفة الصفات، وفي بعض الأحيان تحمل السلالات المتجددة صفات غير مرغوبة.
 - يتم الحصول على طفرات غير مستقرة وغير ثابتة.

- يتوجب إخضاع السلالات المتباينة إلى عدة تجارب تقييم حقلي للتأكد من ثبات الصفات المنتخبة ولعدة سنوات.

- يمكن الحصول على تغييرات وراثية أثناء الإكثار أو تقييم السلالات.

10-4-4- كيف يتم الحصول على سلالات متباينة وراثيا بزراعة الكالوس:

يتم الحصول على سلالات متباينة وراثيا بواسطة زراعة الكالوس وفق الخطوات الآتية:

10-4-1- تكوين الكالوس العضوي:

يتم تعقيم أجزاء نباتية مختلفة وزراعتها بهدف الحصول على الكالوس العضوي (Organogenic callus)، ويمكن الحصول على الكالوس العضوي من أجزاء نباتية مختلفة من الأوراق-الجذور -القلم النامية -الكامبيوم -الأجزاء الزهرية والأجنة، كما يتم الحصول على الكالوس من زرع البروتوبلاست، والخلايا النباتية ضمن معلق خلوي، ومن زرع حبوب اللقاح والجذور الشعرية.

يجب دراسة تركيب الوسط المغذي المناسب والشروط المناسبة لتكوين الكالوس العضوي الذي له قدرة على التجديد وتكوين نباتات كاملة.

10-4-2- إكثار الكالوس العضوي:

يهدف إكثار الكالوس إلى زيادة كميته، وزيادة الخلط الوراثي لخلاياه، ويتوجب دراسة الوسط المغذي وشروط الإكثار التي تؤمن الحصول على أكبر كمية ممكنة من الكتلة الحية، وأعلى معدل لنمو وإكثار الكالوس، على هذا المستوى يمكن عمل اختبارات لمدى تحمل الكالوس لبعض الإجهادات، مثل الجفاف والملوحة عن طريق إضافة عامل الإجهاد إلى الوسط المغذي.

10-4-3- تجديد الكالوس:

يتم نقل الكالوس العضوي إلى أوساط جديدة مناسبة لعملية التجديد أي تشكيل براعم وجذور وبالتالي الحصول على نباتات كاملة. يتم إكثار السلالات الجديدة المتشكلة حتى يتم الحصول على أعداد كافية من النباتات للتقييم واختيار المناسب منها، تعد هذه المرحلة أساسية في تكوين السلالات المتباينة وراثياً، تشكل عملية التجديد في بعض الأنواع النباتية معضلة كبيرة، فهي تحتاج كثير من العمل والجهد للحصول على نتيجة إيجابية. ففي كالوس

البطاطا المجهد ملحيا تم تجريب أكثر من 40 وسط مغذي حتى تمكنا من الحصول على تشكيل نباتات كاملة من الكالوس (مصا وزملانها، 2018).

10-4-4-اختبار السلالات الجديدة:

يتم إكثار السلالات الجديدة الناتجة عن طريق التجديد، بهدف الحصول على أعداد كافية من كل سلالة للتقييم ومقارنتها، من الناحية المورفولوجية والفيزيولوجية والوراثية مع النبات الأم الذي أخذت منه الأجزاء النباتية. يتم تحديد الصفات الجديدة التي تحملها السلالات الجديدة، واختيار السلالات التي تحمل بعض الصفات المهمة في برنامج التحسين الوراثي للنبات المدروس.

10-4-5-إكثار السلالات المنتخبة:

يتم إكثار السلالات التي تحمل صفات جديدة مهمة في برنامج التحسين الوراثي ليصار فيما بعد إلى تجربتها للتأكد من الثبات الوراثي للصفات الجديدة، ويتم اعتماد السلالات الجديدة وإكثارها، للحصول على أعداد كافية من النباتات للتجريب الحقلي قبل تحويلها إلى أصناف جديدة، يمكن استثمارها تجارياً.

10-5-العوامل المؤثرة في زراعة الكالوس:

توجد عوامل كثيرة تؤثر في زرع الكالوس، وإنتاج سلالات متباينة وراثياً، وتقسم هذه العوامل إلى ثلاث مجموعات:

- عوامل فيزيولوجية: مثل طبيعة الأجزاء النباتية ومصدرها، عمر النبات الأم، النوع النباتي.
- الفترة الزمنية المطبقة في إكثار الكالوس.
- عوامل تتعلق بالأوساط المغذية: التركيب المعدني، نوع الهرمونات النباتية المستخدمة وتراكيزها لكل مرحلة من مراحل زراعة الكالوس. طبيعة الوسط المغذي...
- عوامل تتعلق بالشروط الجوية المطبقة في غرف النمو مثل الحرارة الإضاءة والرطوبة.

يختلف تأثير العوامل باختلاف النوع النباتي، وباختلاف مرحلة الزرع. فنفس العامل قد يكون له أثر إيجابي في مرحلة ويعطي أثر سلبي في مرحلة أخرى من زراعة الكالوس.

10-5-1- تأثير طبيعة الخزعات النباتية ومصدرها:

تختلف استجابة الخزعات النباتية لتكوين الكالوس بحسب النوع النباتي وحسب مصدرها. لوحظ من خلال التجارب بأن الأجزاء النباتية الخالية من الأنسجة الميرستيمية، مثل الأوراق والسلاميات، لها القدرة على تكوين الكالوس وسلالات متباينة ومصدر للخلط الوراثي أكثر من الأجزاء النباتية الحاوية على أنسجة جنينية مثل البراعم والقمم النامية. ويوضح الجدول (10-1) اختلاف تأثير الخزعات النباتية ومصدرها في مقدرة بعض الأنواع النباتية على تكوين سلالات متباينة.

ويوضح الشكل (10-1) تطور الميرستيم المزروع بالأنسجة في البطاطا للحصول على خزعات في طور الإكثار التي تم إكثارها لأخذ عينات ورقية منها لتكوين الكالوس كما هو موضح بالشكل (10-2).

جدول (10-1): تأثير الخزعات النباتية في تكوين سلالات متباينة

المرجع	وجود سلالات متباينة	طبيعة الخزعة النباتية	النبات
Matsuda <i>et al.</i> , 2014	+	جزء من ورقة	البنفسج الإفريقي
Martin <i>et al.</i> , 2004	-	نمو خضري	اللوز
Bhatia <i>et al.</i> , 2009	-	جزء من القرص الزهري عنق من ورقة	الجيريبرا
Parado <i>et al.</i> , 2017	+		كيوي

الكرز الحلو	قمة نامية	+	Piagnani & Chiozotto, 2010
البطاطا	جزء من ورقة	+	مصا وزملاتها، 2017

10-5-2- تأثير الهرمونات النباتية في الوسط:

تلعب الهرمونات النباتية دوراً مهماً في تكوين وتجديد الكالوس، وفي زيادة الخلط الوراثي للسلاسل الناتجة. فقد لوحظ بأن الأوكسينات تؤثر بشكل مباشر في تكوين الكالوس وفي إكثاره. ويختلف التأثير بحسب نوع الأوكسين وتركيزه.

لقد دلت التجارب بأن أفضل أوكسين لتكوين الكالوس، وفي زيادة الخلط الوراثي هو 2,4,D. يختلف التركيز الأنسب بحسب الأنواع النباتية. يعمل هذا الأوكسين على زيادة إنتاج ال DNA في خلايا الكالوس، كما يزيد في عدد الكروموزومات في الخلايا، أي يسبب ظاهرة ال Polyploidy. لوحظ في نبات الفريز مثلاً زيادة إنتاج الدنا وتضاعف عدد الصبغيات بسبب زيادة تركيز ال 2,4,D في الوسط المغذي الخاص بتكوين الكالوس.

تلعب الهرمونات النباتية دوراً مهماً في تجديد الكالوس العضوي، على أن يكون التوازن الهرموني بين الأوكسينات والسيبتوكينينات لصالح السيبتوكينين، ويشجع السيبتوكينين تكوين البراعم في الكالوس في مرحلة التجديد وإكثار العينات المتجددة. في حين الأوكسين يشجع تكوين الجذور. وتختلف نسب الهرمونات وتركيزها وتوازنها بحسب النوع النباتي ومصدر الكالوس في مرحلة التجديد.

10-5-3- تأثير الصنف:

يؤثر النوع النباتي والأصناف التابعة لنفس النوع بقدرتها على تكوين الكالوس وعلى تجديده. كما يؤثر عامل الصنف على زيادة الخلط الوراثي في الكالوس. دلت التجارب في الموز مثلاً، بأن زيادة السيبتوكينين في الوسط المغذي لم يؤثر في نسبة الخلط الوراثي لصنف كرافنديش Gravendish، بينما زادت نسبة الخلط الوراثي في الصنف الموز وليامس باستخدام نفس التركيز من السيبتوكينين.

10-5-4- تأثير فترة الزراعة وعدد مرات النقل:

تلعب فترة زراعة الكالوس دوراً مهماً في زيادة الكتلة الحية، وفي زيادة الخلط الوراثي في خلاياه. كما يؤثر عدد مرات النقل في الثبات الوراثي للكالوس وفي مقدرة على التجديد. وكلما زادت الفترة الزمنية أو عدد مرات النقل كلما زادت نسبة التغير الوراثي، كما نقل قدرته على التجديد وتكوين نباتات كاملة. فقد لوحظ في حال الكالوس الجنيني عند نقله لفترة زمنية طويلة يفقد قدرته على التجديد وعلى تكوين أجنة خضرية. وقد لوحظت هذه الظاهرة في عدة أنواع نباتية مثل التبغ والجذر والخس.... (Margara, 1982).

وقد لوحظت نفس الظاهرة في النخيل، وقد قامت الباحثة Zaid عام 1989 بعمل دراسة تفصيلية حول تدهور كالوس النخيل، حيث لاحظت في بداية الأمر البنية الحبيبية للكالوس وقدرته الكبيرة على تكوين الأجنة الخضرية. يبدأ بعد فترة من الزمن بسبب النقل المتكرر لفترة طويلة نسيباً بفقدان قدرته على تكوين الأجنة الخضرية بشكل تدريجي. ويلاحظ تغيرات على المستوى التشريحي للكالوس الجنيني. يظهر تهشم الطبقة الخارجية للكالوس ويتحول من الشكل الحبيبي إلى الشكل الرخو، وتتراكم في أنسجة الخلايا بعض المركبات الفينولية، ويأخذ اللون الأسمر ويفقد قدرته على الانقسام وينتهي الأمر بتدهور الكالوس (المعري، 1995).

10-6- التغيرات الوراثية التي تحدث في النباتات المتجددة من الكالوس:

تحدث تغيرات وراثية كمية ونوعية على مستوى جينوم خلايا الكالوس، أثناء مرحلة إكثارها وتجديدها لتعطي سلالات متباينة وراثياً.

10-6-1- وقد يحدث التغيرات التالية والتي يمكن إيجازها بالآتي:

- تغير في عدد الصبغيات بسبب زيادة اصطناع ال DNA .
- تغير في بنية الصبغيات.
- اختلاف في ترتيب أو تسلسل المورثات على مستوى الصبغيات.
- نقص جزء من الكروموزوم، أو تنشيط بعض المورثات الصامتة مما يؤدي إلى تغيير في وظيفة الجينات المتنحية عندما تكون الخلايا في مرحلة وحيدة الصيغة الصبغية. أي يلاحظ عدم انتظام في وظيفة الصبغيات.

- تغييرات في إنتاج الدنا في النواة مما يؤدي إلى زيادة عدد الصبغيات أو تضاعفها.
- حدوث طفرات أو اختلافات وراثية على مستوى جينوم الكلوروبلاست أو الميتوكوندري، وذلك عن طريق تنشيط بعض المورثات أو تثبيط عمل مورثات أخرى، بالإضافة إلى تنشيط تكوين الـ DNA.
- تغير في التعبير الجيني في السلالات المتباينة وراثيا، بسبب التغير في بنية الدنا من خلال عملية الـ DNA Methylation أي إضافة جذر الميثيل إلى السيتوزين أو الأدنين في النيكلوتيدات التي تشكل بنية الدنا. وقد لوحظت هذه الظاهرة أي إضافة جذر الميثيل في العديد من الطفرات المحدثة في بعض الأنواع النباتية مثل العنب - التفاح-نخيل الزيت.

10-6-2-أسباب حدوث التغييرات الوراثية بزراعة الأنسجة النباتية:

توجد مسببات كثيرة تسبب حدوث الطفرات الوراثية على مستوى الكالوس. ويمكن إيجازها بالآتي:

- أ- الخزعات النباتية المستخدمة، نوعها وطريقة تحضيرها، طريقة التعقيم، الجروح الزائدة تساعد في حدوث تغييرات وراثية.
- ب- الأوساط المغذية وتركيبها من المحلول المعدني والهرمونات النباتية. تحدث تغيرات وراثية عند تعريض الخزعات النباتية والكالوس للإجهادات مثل تراكيز عالية من الهرمونات، تراكيز ملحية عالية، ومعاملات جفاف.
- ت- تعريض الخزعات نباتية إلى شروط إجهاد مناخية مثل درجات حرارة عالية، إضاءة شديدة، نقص أوكسجين كل هذه العوامل يمكن أن تحدث تغييرات وراثية على مستوى الخزعات أو على مستوى الكالوس.

10-6-3-آلية تشكل السلالات المتباينة وراثيا والمحدثة من الكالوس:

عند تعرض الخزعات النباتية أو الكالوس إلى إحدى مسببات السابقة التي تحدث تغييراً في التركيب الوراثي في النباتات المتجددة من الكالوس. تسبب حدوث إجهاد أكسدة على مستوى الخلايا، وهذا بدوره يسبب تكون جذور حرة في الخلايا التي تحدث تغييرات وراثية.

تظهر عدة أشكال من الجذور الحرة مثل:

- سوبر أوكسيد Superoxide وهذا يحدث تغيير عن طريق إحداث DNA Methylation.
- بيروكسيد الهيدروجين Hydrogene peroxide، الذي يسبب تغيير في عدد الكروموزومات.
- الهيدروكسيل Hydroxyl تحدث تبدلات في موضع الجينات وترتيبها على الصبغيات.
- ألكوكسيل ALKOXIL والبيروكسيل Peroxyl وهذين المركبين يحدثوا تغيير في بنية الدنا زيادة او نقصان.

تحدث الجذور الحرة تغييرات وراثية مما يؤدي إلى ظهور طفرات في العينات النباتية المزروعة وخاصة الكالوس مما يتسبب بتكوين سلالات متباينة وراثياً بعد التجديد.

10-7-تقييم السلالات المتباينة وراثياً:

يتم تقييم السلالات المحدثة من الكالوس والمتباينة بهدف انتخاب السلالات التي تحمل صفات مهمة جديدة لاعتمادها واستثمارها في المجال الإنتاجي. يعتمد في التقييم المخبري والحقلي المعايير التالية:

10-7-1-المعايير المورفولوجية:

مثل الشكل -اللون-طبيعة النمو-ارتفاع النبات-شكل الأوراق-سماكة الأوراق شكل الثمار وحجمها.....

10-7-2-المعايير الفيزيولوجية:

قوة نمو النبات-الاصطناع الضوئي وشدته-مدى تحمل السلالات المدروسة للإجهادات الحيوية واللاحوية-كثافة المسامات - حجم المسطح الورقي.....

10-7-3-المعايير الزراعية والإنتاجية:

الإزهار-القدرة على التلقيح-إنتاجية النبات من الثمار-تنوع الثمار المنتجة.....

10-7-4-المعايير السيتولوجية:

عدد الكروموزومات في السلالات-الصيغة الصبغية ثنائية أو ثلاثية أو رباعية-كثافة

السيتوبلازم في الخلايا-حجم الخلايا.....

10-7-5-المعايير البيوكيميائية:

محتوى الثمار من المركبات العضوية مثل البروتينات-الكربوهيدرات-الدهون-نسبة

الحموضة - النشاط الأنزيمي-محتوى الثمار من الفيتامينات او المواد الطبية الفعالة.....

10-7-6-المعايير الجزيئية:

ويقصد بها دراسة الاختلافات الوراثية بين السلالات على مستوى الدنا، باستخدام تقانات

المؤشرات الجزيئية مثل RAPD- AFLP-SSR-ISSR ...

RAPD : Randomly amplified polymorphic DNA : استخدمت هذه التقنية في

الكشف عن السلالات المتباينة وراثيا في الدراق والبرتقال والزيتون.

AFLP : Amplified fragment length polymorphism : استخدمت في الكشف

عن السلالات المتباينة في الكيوي وفي العنب.

SSR : Simple sequence repeat : استخدمت في الآكيدنيا.

ISSR : Inter simple sequence repeat : استخدمت أيضا في دراسة التباينات

الوراثية في السلالات المحدثة في الآكيدنيا.

يلجأ بعض الباحثين لاستخدام أكثر من طريقة للتأكد من الاختلافات الوراثية في السلالات

المدرسة. وقد استعملت تقنية الـ RAPD مع تقنية الـ ISSR في دراسة التباينات الوراثية

في (الآكي دنيا).

10-8-إنتاج بعض السلالات ذات الأهمية الاقتصادية:

تم إنتاج العديد من السلالات ذات الأهمية الزراعية، باستخدام تقنية زراعة الكالوس،

في بعض الأنواع البستانية. قسم من هذه السلالات أثبت مقاومة لبعض الأمراض

والنيماتودا. كما تم الحصول على بعض السلالات المتحملة للملوحة ودرجات الحرارة

المرتفعة. وقسم من السلالات أعطى زيادة في الإنتاجية كما زاد من نوعية الثمار المنتجة. ويوضح الجدول (2-10) بعض السلالات المنتخبة ذات الأهمية الاقتصادية في بعض المحاصيل البستانية (Krishna *et al.*, 2016).

جدول (2-10): انتخاب سلالات ذات أهمية زراعية بوساطة زراعة الكالوس

المرجع	صفة السلالة المنتخبة	النوع النباتي
Chevreau <i>et al.</i> , 1998	مقاوم للفحة البكتيرية	التفاح
Modjil <i>et al.</i> , 2012	مقاوم للنيماتودا	تفاح أصل MM106
Hwang, 2002	مقاوم للفيوزاريوم + زيادة حجم المخروط الثمري	موز
Esmail <i>et al.</i> , 2012	مقاوم للفيوزاريوم	القرنفل
	متحملة للملوحة	الحمضيات
	أصناف جديدة	الجريبيرا
Kuksava <i>et al.</i> , 1997	مقاوم للبيوترتيس	العنب
Lewa <i>et al.</i> , 2012	أصول مقصرة	الزيتون
Das <i>et al.</i> , 2000	متحملة للحرارة المرتفعة، وتحسين الإنتاجية	البطاطا

10-9- إنتاج مواد فعالة بزراعة الكالوس:

تمثل النباتات الطبية مصادر مهمة للمواد الفعالة التي تدخل بصناعة الأدوية. تستخدم تقانة زراعة الكالوس في التحسين الوراثي للنباتات الطبية، كما تستخدم لإنتاج المواد الفعالة بدءاً من الكالوس. وقد استخدمت في إنتاج العديد من المواد الفعالة. ففي نبات *Ocimum granisimum* قد تم زراعة عقل صغير في وسط مغذي لتكوين وإكثار الكالوس. وقد تم الحصول على الكالوس من الأوراق، نقل الكالوس لوسط جديد لإنتاج روزمارينيك أسيد *Rosmarinic acid* ، وهو مضاد أكسدة ويستخدم طبياً كمضاد للالتهابات البكتيرية والفيروسية، وقد تم استخلاص هذا المركب من الوسط المزروع به الكالوس (Sravanthi *et al.*, 2016).

10-10- مثال على زراعة الكالوس:

في الليمون المخرفش *Citrus jambhiri*: يستخدم هذا النوع من الحمضيات كأصل جيد للليمون والبرتقال في الهند، وقد تم الحصول على سلالات بنسبة عالية، من الكالوس في هذا النوع وفق الخطوات الآتية:

- أخذت بذور من الليمون المخرفش وزرعت في وسط مغذي بعد تعقيمها. وضعت في الظلام حتى الإنبات والحصول على بادرات صغيرة.
- أخذت الفلقات وزرعت في وسط يحوي محلول مورايشيغ وسكوغ مضاف له 2 مغ/ل من الـ 2,4,D + 0.75 مغ/ل من السيٲوكينين بنزيل أمينو بيورين. بلغت نسبة العينات التي كونت الكالوس 83%. وكان الكالوس سمّي مخضر وقسم منه أخضر واضح.
- تم إكثار الكالوس لعدة مرات ثم نقل إلى وسط تجديد يحوي MS أضيف له 3مغ/ل من الـ BAP وبلغت نسبة التجديد 87.5%.
- نقلت النموات المتجددة إلى وسط تجذير يحوي أوكسين بمعدل 0.5 مغ/ل من الـ IBA . بلغت نسبة التجذير 91%.
- تم تقسية النباتات المتجددة ووصلت نسبة نجاح التقسية أكثر من 67% (Singh *et al.*, 2011).

ولابد من الذكر أخيراً بأن الكالوس في الليمون المخرفش، احتفظ بقدرته على التجديد لأكثر من 420 يوماً، ولكن نسبة التجديد انخفضت نسبياً إلى 58%. في هذا المثال، تم وضع بروتوكول جيد مع نسبة نجاح عالية على تجديد نباتات كاملة من الكالوس. وهذا البروتوكول يمكن استخدامه في الكالوس المعدل وراثياً للحصول على نباتات معدلة وراثياً.

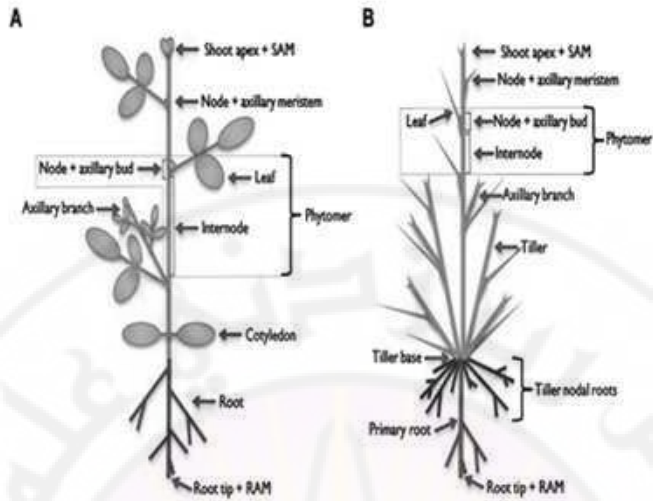




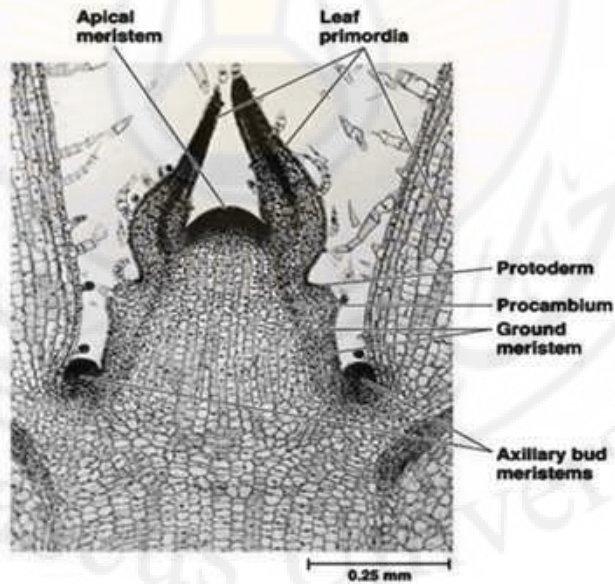


الصور الملونة





شكل (1-1): القمم المرستيمية في نباتات: A نبات ثنائي الفلقة، B نبات أحادي الفلقة.



الشكل (2-1): بنية القمة النامية (القمة المرستيمية + البدايات الورقية).



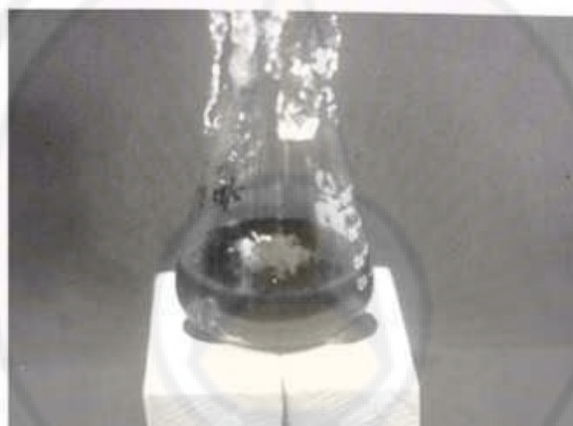
الشكل (2-5): التكاثر الخضري الدقيق للسوسن (زراعة اولية- طور الإكثار- طور التجذير- طور النقسية).



الشكل (3-5): التكاثر الخضري الدقيق للنخيل بالتبرعم (طور الإكثار، و طور التجذير).



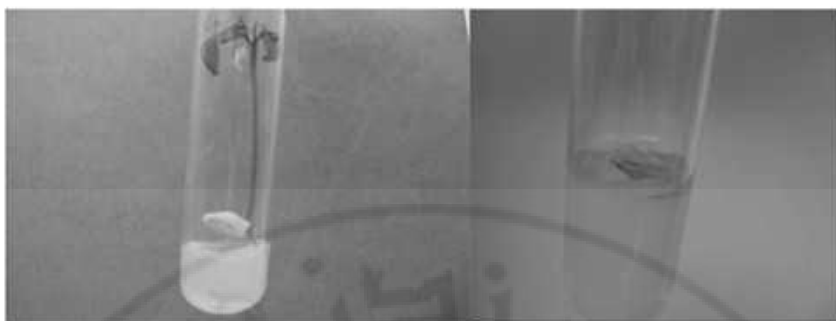
الشكل (4-5): انتشار بتكوين الاجنة الخضرية (اجنة خضرية ، انبات الاجنة).



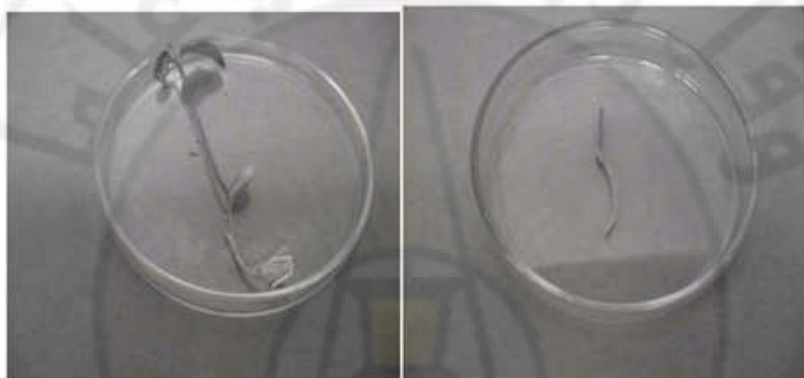
الشكل (5-11): ظاهرة الاسمرار في النخيل



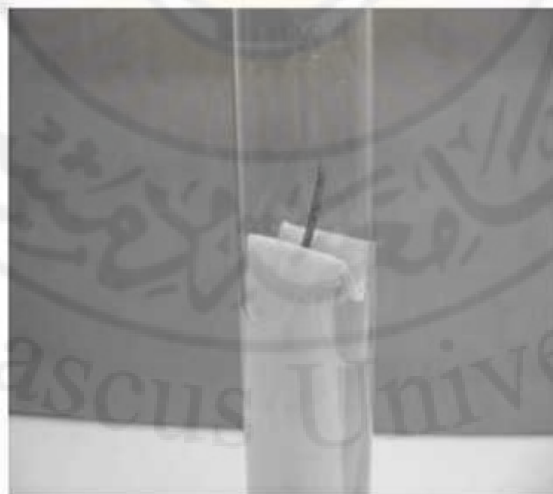
الشكل (5-12): ظاهرة الشفافية في الكالوس وفي اجنة النخيل



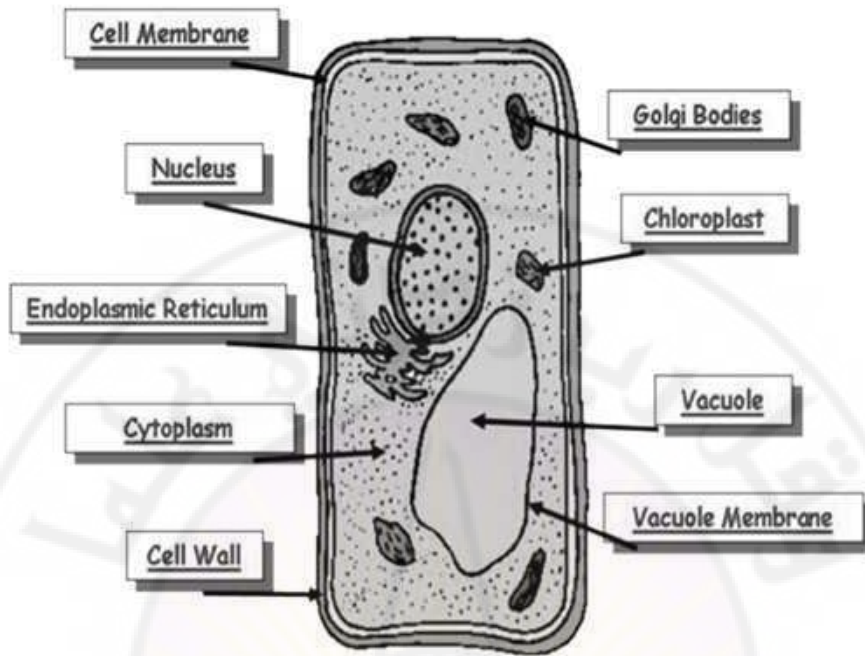
الشكل (1-6): زرع بذور الأصل ونباتها



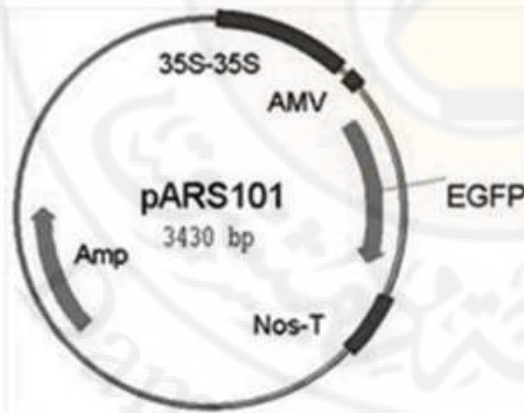
الشكل (2-6): تحضير الأصل للتطعيم الدقيق (بادرة قبل وبعد التحضير).



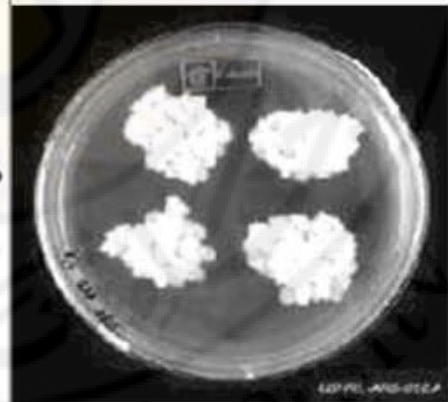
الشكل (3-6): تركيب القمة النامية الميرستيمية على الأصل



الشكل (1-8): بنية الخلية النباتية



B- بلازميد يحمل ال EGFP



الشكل (7-8) : A- كالوس جنيني



D- ميكروكالوس محور



C - بروتوبلاست محورة



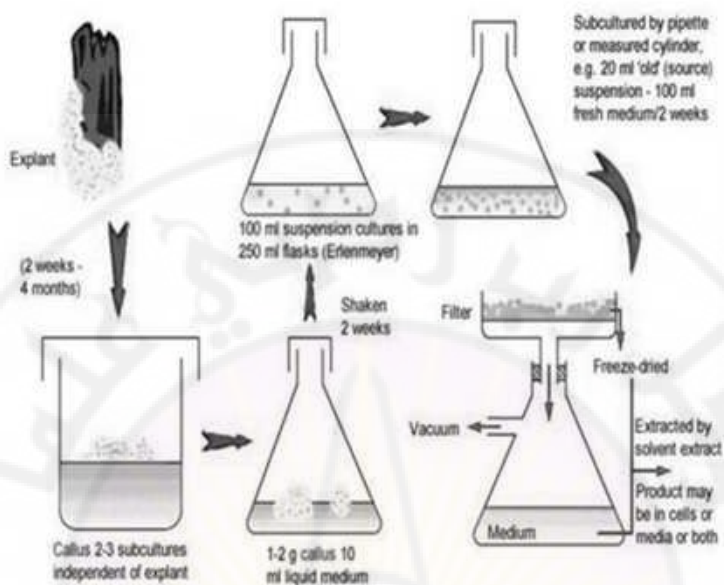
F- نبات كامل محور



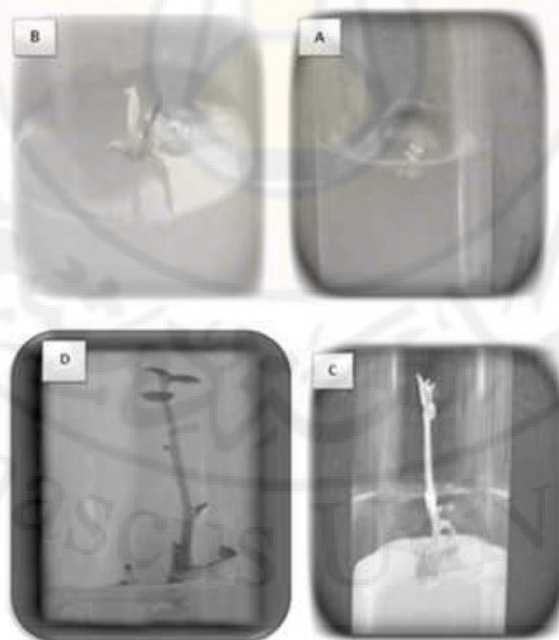
E - كالوس جنيني محور

الشكل (7-8): التعديل الوراثي في البروتوبلاست بالحمضيات

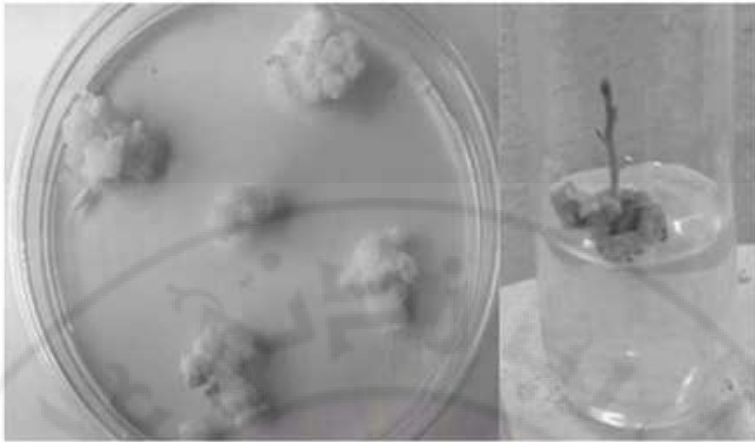
Plant Cell Culture



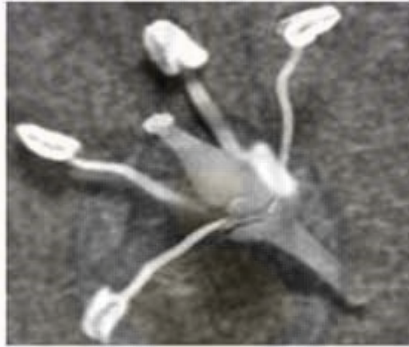
الشكل (9-3): إنتاج مادة الديجوكسين بزراعة الخلايا لنبات الديجيتاليس



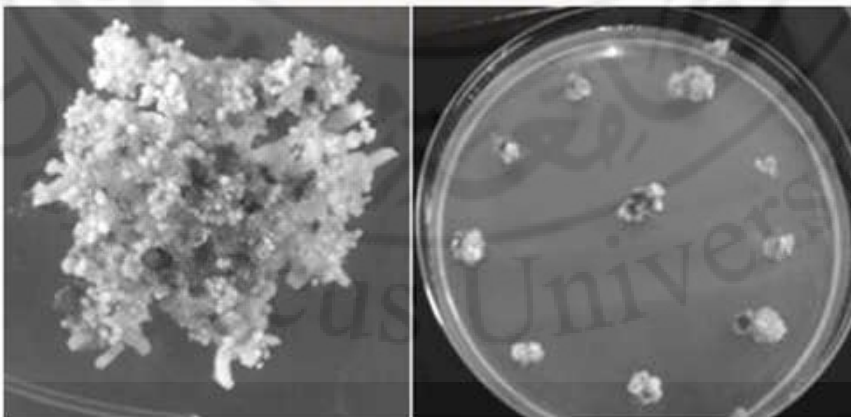
الشكل (10-1): مراحل نمو القمم الميرستيمية لعينات البطاطا المزروعة بطول 300 ميكرون.



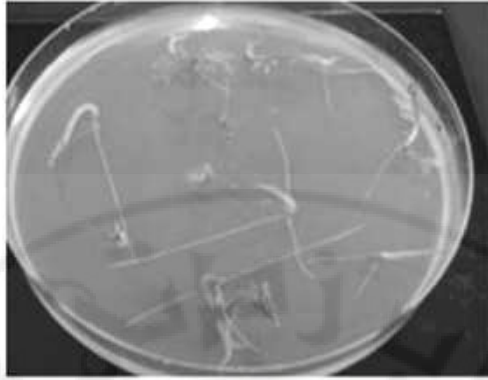
الشكل (2-10): زراعة الكالوس (الكالوس العضوي ونبات متجدد في البطاطا).



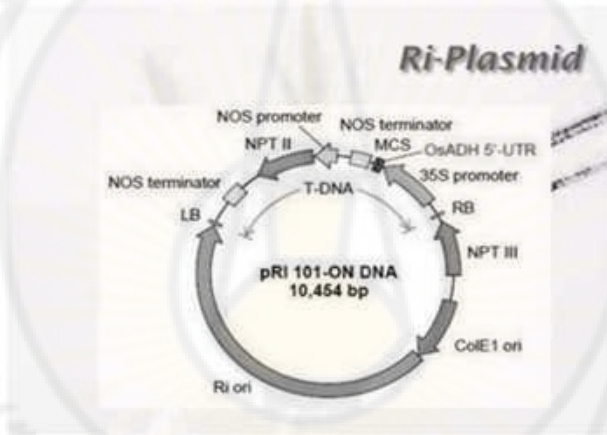
الشكل (2-11): البرعم الزهري مع المأبر في العنب



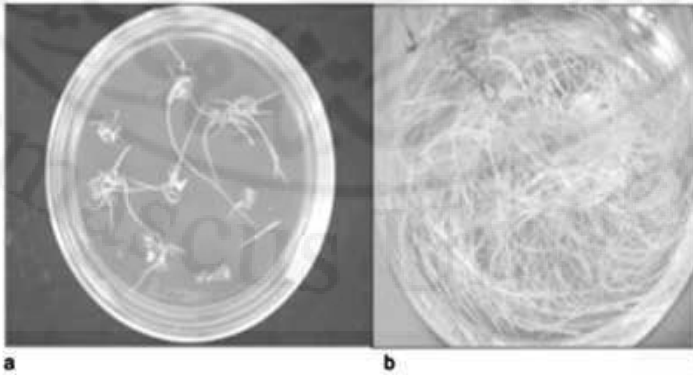
الشكل (4-11): تكون الاجنة الخضرية الشكل (3-11): تكون الكالوس الجنيني من المأبر



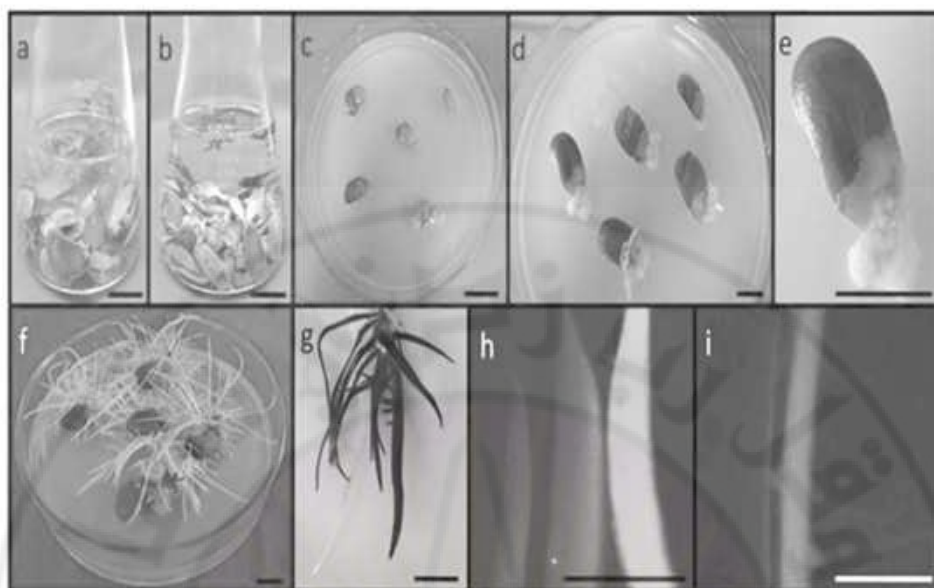
الشكل (11-5): أنبات الأجنة في العنب



الشكل (12-2): البلاسميد Ri Plasmid



الشكل (12-3): تكوين الجذور الشعرية في أجزاء من الورقة (A)، وإكثارها (B).

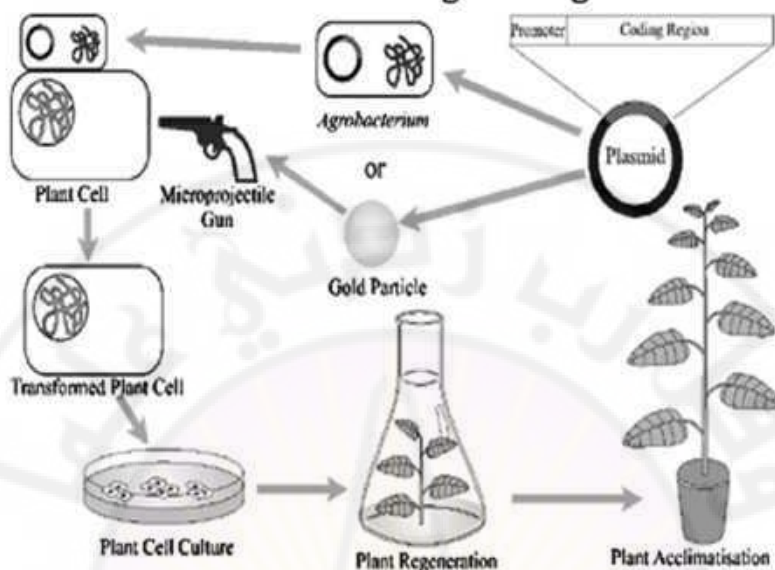


الشكل (8-12): تكوين الجذور الشعرية في فول الصويا (Chen et al., 2017).

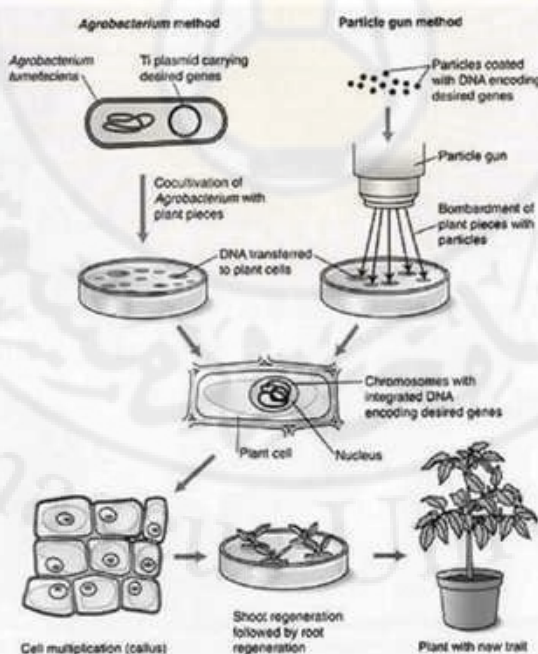


(12- 9): تطبيقات زراعة الجذور الشعرية المختلفة (عن Mehrotra et al., 2015).

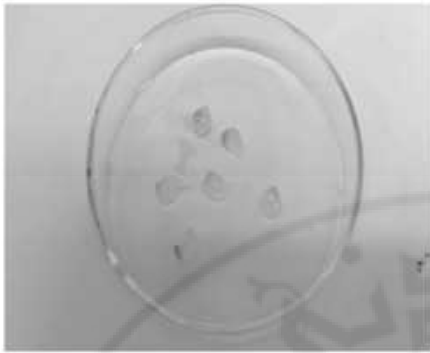
Plant Genetic Engineering



شكل (1-13): التعديل الوراثي بالبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* وبالفرد الحيوي



الشكل (5-13): التعديل الوراثي بشكل مباشر أو غير مباشر في النبات



حفظ القمم النامية بالازوت السائل بعد الكبسلة

الفصل الحادي عشر

زراعة المياسم وحبوب اللقاح

11-1-مقدمة:

تعد تقانة زرع حبوب اللقاح من تقانات زراعة الأنسجة النباتية المهمة المستخدمة في تربية النبات. تهدف عملية زرع حبوب اللقاح الحصول على نباتات وحيدة الصيغة الصبغية وعند تضاعفها بالكولشيسين تعطي نباتات ثنائية الصيغة الصبغية، والتي تمثل سلالات نقية تدخل بشكل مباشر في برامج تربية النباتات الاقتصادية. من أهم الأساسيات الضرورية في مجال تربية النبات هو الحصول على أكبر قدر من التباينات الوراثية من المصادر النباتية حتى يكون هناك مجال لإجراء عملية الانتخاب.

وقد وضع أول تقرير علمي عن إمكانية الحصول على نباتات أحادية من نبات الداتورة من قبل العالمين (Guha and Maheshwari 1964) وذلك عن طريق تكوين أجنة من حبوب اللقاح، وقد تمكن العالمان (Bourgin and Nitsch, 1967) من الحصول على نباتات أحادية من الدخان، وخلال الأعوام الأخيرة من الثمانينات أمكن الحصول على نباتات أحادية من الأرز، القمح، الذرة والكرنب والعديد من المحاصيل الأخرى. ولقد شجع هذا النجاح علماء التربية أن يعملوا جاهدين للحصول على نباتات متباينة من تلك النباتات الأحادية.

إن عملية الحصول على السلالات النقية بالطرائق التقليدية تحتاج عدة سنوات من العمل، في حين يمكن الحصول عليها بزراعة النسج بفترة زمنية قصيرة. يتم توفير الوقت والجهد عند استخدام الطرائق الحديثة. يتم زراعة حبوب اللقاح أو المياسم في مرحلة محددة بعد الانقسام الميوزي في الأسدية عند تشكل الأعراس الذكرية، وحيدة الصيغة الصبغية وقبل عملية التلقيح. تم الحصول على نباتات أحادية الصيغة الصبغية بتطبيق هذه التقانة في أكثر من 250 نبات من الفصائل التالية: الباذنجانية - الوردية - الصليبية-والنجيلية وغيرها.

11-2- بعض التعاريف المرتبطة بالتقانة:

- الأندروجينيزيس **Androgenesis**: ويقصد بها زرع الأجزاء الزهرية المذكرة من الزهرة المياسم أو حبوب الطلع لتكوين سلالات وحيدة الصيغة الصبغية.
- الجينوجينيزيس **Gynogenesis**: ويقصد بها زراعة الأعضاء المؤنثة من الزهرة البويضات قبل الإخصاب، بعد الانقسام الاختزالي وقبل التلقيح بهدف الحصول على سلالات وحيدة الصيغة الصبغية.
- السلالة النقية **Clone pure**: وهي سلالات ثنائية الصيغة الصبغية وتكون الكروموزومات نقية ومتشابهة ومتطابقة بدون وجود أي اختلاف في توزيع الجينات بين الصبغيات الثنائية. وهذا ينطبق على كافة الصبغيات الثنائية.
- سلالة وحيدة الصيغة الصبغية **Haploid**: سلالة وحيدة الصيغة الصبغية تنشأ من خلايا حبوب اللقاح أو من البويضة المؤنثة قبل التلقيح. ويوجد سلالات $n1$ محدثة بزراعة النسج، كما يوجد سلالات وحيدة الصيغة الصبغية طبيعية تتواجد في بعض النباتات.
- السلالات وحيدة الصيغة الصبغية الطبيعية **Spontaneous haploids**: تميل بعض الأنواع النباتية لتشكل بشكل طبيعي سلالات وحيدة الصيغة الصبغية، بنسبة قليلة جداً لا تتعدى واحد بالألف. كما هو الحال في نبات الأسبرج والقطن والفليفلة. ونميز الأنواع الآتية من السلالات الطبيعية:
 - 1- النباتات متعددة الأجنة **Polyembryonies** مثل في الأسبرج بحيث يوجد جنينين في البذرة واحد طبيعي ثنائي الصيغة الصبغية ويكون نموه جيد و جنين نموه ضعيف يكون وحيد الصيغة الصبغية وينشأ عادة من أنسجة البويضة الأم من خلية مساعدة بعد الانقسام الاختزالي وقبل التلقيح تتطور هذه الخلية وتشكل جنين $N 1$.
 - 2- أجنة **semigamy**: وهي أجنة طبيعية تتكون بشكل مختلط من الأعراس المذكرة والأعراس المؤنثة بعد نمو الأنبوبة الطلعية وقبل حدوث الإخصاب

ويكون الجنين في هذه الحالة وحيد الصيغة الصبغية. كما هو الحال في بذور القطن وتكون نسبتها ضعيفة لا تتجاوز 1 بالألف.

3- أجنة طبيعية تتشأ بشكل طبيعي من حبوب اللقاح أو البويضة قبل التلقيح تتطور وتشكل نباتات وحيدة الصيغة الصبغية، ونسبتها قليلة جداً.

11-3- طرق إنتاج النباتات الأحادية :

11-3-1- إنتاج نباتات أحادية من البويضات غير المخصبة: Gynogenesis

تنتج النباتات الأحادية عن طريق تنمية بويضة غير مخصبة بسبب تأخير عملية التلقيح، طريقة بديلة مناسبة للنباتات ذات العقم الذكري، ونجحت في الشعير ودوار الشمس وغيرها، وتستعمل خلايا غير مخصبة بالكيس الجنيني أو المبيض أو البويضات نفسها .

أشهر هذه الطرق **Parthenogenesis** إذ تتطور خلية البويضة غير المخصبة، نتيجة تأخير التلقيح، أو بالتلقيح الكاذب بحبة لقاح بها خلل كنتيجة للمعاملة بالأشعة المؤينة أو بحبة لقاح غريبة قد تكون من النوع نفسه لكنها لا تحدث الإخصاب .

تعد الأبحاث المتاحة عن طريقة Gynogenesis قليلة نسبياً، وذلك لصعوبة تطبيقها في الكثير من النباتات بالمقارنة مع زراعة المتك. تمتاز النباتات الأحادية بالقصر وصغر حجم الأوراق خاصة النصل، وزيادة الثمار الصغيرة بسبب عدم تكوين البذور، وربما يشاهد عدد من الأوراق والأزهار الغير كاملة التكوين، أو اندماج أكثر من ورقة أو زهرة.

11-3-2- إنتاج النباتات الأحادية من حبوب اللقاح: Androgenesis

تفيد زراعة المتوك Anther Culture في إنتاج نباتات أحادية من حبوب اللقاح من خلال تكوين الأجنة Pollen Embryogenesis ، أو من خلال تكوين الكالوس Pollen Callusing. ويجب أن تؤخذ المتوك من نباتات حديثة الإزهار ويكون ذلك في مرحلة معينة من تكوين حبوب اللقاح قبل تفتح الزهرة. ويعود السبب في أخذ البرعم الزهري صغير وغير متفتح تحت ظروف إضاءة جيدة حتى تكون حبوب اللقاح غير ناضجة وفي مرحلة مناسبة للزرع .

11-4- أهمية مزارع المتوك وحبوب اللقاح:

ترجع أهمية هذه المزارع إلى الحصول على نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية إما من خلال تكوين الأجنة أو تكوين الكالوس ويفيد هذا الآتي:

- تستخدم النباتات الأحادية في الحصول على سلالات ثنائية نقية من المحاصيل الخلطية التلقيح وذلك بمعاملتها بالكولشيسين. ويمكن استخدامها مباشرة في برنامج تربية النبات.
- تفيد مزارع المتوك في التعرف على الطفرات المنتخبة بسهولة.
- تستخدم زراعة المتك وحبوب اللقاح في الدراسات السيتولوجية المتعمقة
- تفيد في دراسة آلية تكون نباتات كاملة من خلية أو حبة طلع والعوامل التي تؤثر في تكوين الأجنة الخضرية من حبوب الطلع.
- يمكن الحصول على سلالات متباينة وراثياً عن طريق زراعة المتك وحبوب اللقاح من خلال تكوين الكالوس وتجديده، ويتم الحصول على سلالات مهمة يمكن الاستفادة منها في برنامج التحسين الوراثي. فقد تم إنتاج سلالات من حبوب الطلع ذات إنتاجية عالية من المواد الفعالة.
- تفيد النباتات الأحادية في الحصول على مختلف حالات التعدد الكروموسومي الغير تام.

11-5- طريقة زراعة المتك:

- تنزع المتوك المغلقة التي تحتوي على حبوب اللقاح غير الناضجة وهي ما تزال في حالة انقسام (بعد الانقسام المنصف وقبل أول انقسام خيطي).
- تؤخذ البراعم الزهرية من نباتات مزروعة في بيت زجاجي، تعقم البراعم الزهرية، وتفصل المتك بعناية من البراعم الزهرية.
- توضع المتوك المعقمة في بيئة مغذية معقمة ويشق المتك من الجانب باستخدام مشروط حاد ومعقم وتؤخذ الأسدية وتوضع في طبق بتري معقم، ويزال الخيط بعناية لتبقى المتوك فقط، ويجب أن تكون عملية شق المتوك بعناية حتى لا يحدث ضرر، لأن تجريحها يحفز غالباً تكوين كالوس من خلايا جدر المتوك وهي خلايا ثنائية.

وبعد شق المتوك بعناية تنتشر حبوب اللقاح على سطح البيئة الصلبة، كما يمكن زراعتها في بيئة سائلة وتحفظ على هزاز بطيء.

11-5-1- شروط تحضين مزارع المتوك:

تحضن مزارع المتوك أو حبوب اللقاح في حاضنات ذات كثافة ضوئية (5000-10000 لوكس) والفترة الضوئية 16 ساعة ودرجة حرارة من 22-28م. تتحول جدر المتوك تدريجياً للون البني ثم تنفتح خلال 3-8 أسابيع على حسب النوع النباتي وذلك بسبب الضغط الداخلي للكالوس المتكون من حبوب اللقاح أو بسبب النبيتات التي تنمو منها، ثم تفصل هذه النبيتات أو النموات الخضرية المتكونة عن الكالوس بعد أن يصل طولها إلى 3-5مم، وتنقل إلى وسط مناسب للنمو الجذري.

تنقل النباتات المجذرة إلى أصص صغيرة تحتوي على خليط من التربة والبيتموس، وتغطي هذه الأصص بأكياس بلاستيك وتوضع في صوبة رطبة، وبعد أسبوع ترفع الأكياس البلاستيكية وبعد أسبوعين من ذلك تنقل النباتات إلى أصص أكبر حتى تصل إلى مرحلة الإزهار والنضج وهذه النباتات تكون أحادية، ويمكن تحويلها إلى نباتات ثنائية باستخدام الكولشيسين.

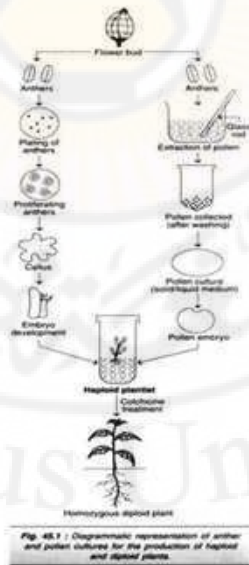


Fig. 48.1 : Diagrammatic representation of anther and pollen cultures for the production of haploid and diploid plants.

الشكل (11-1): زراعة المتك وحبوب اللقاح لإنتاج نباتات هابلويد

11-5-2- مثال تطبيقي:

زراعة المآبر:

يعتبر نبات التبغ النبات النموذجي لزراعة المآبر وحبوب اللقاح وبالتالي يعتبر البروتوكول التالي هو البروتوكول الأساسي لزراعة المآبر في نبات التبغ:

- يتم أخذ المآبر غير الناضجة التي تحوي على حبوب اللقاح بعد الانقسام المنصف، وقبل أول انقسام خيطي إذ تعتبر هذه المادة المثالية لاستحداث الكالوس.
- تنقل البراعم الزهرية غير المفتحة إلى جهاز العزل الجرثومي (دون القيام بغسلها بالماء والصابون لأنها أجزاء دقيقة جداً) ، كل برعم زهري يحتوي على 5 سبلات - 5 بتلات - 5 أسدية.
- يتم إجراء تطهير سطحي للبراعم غير المفتحة بغمرها بالكحول الإيثيلي 70% لمدة 10 ثواني ثم تنقل إلى محلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 2% ، ثم تغسل بالماء المقطر المعقم 3 مرات لإزالة آثار المواد المستخدمة في التعقيم.
- البراعم الزهرية في نبات التبغ يتم جمعها، وهي غير متفتحة بعد 3-4 أشهر من الزراعة، ويتم قياس طول المآبر، وكذلك طول البراعم، إذ يتم انتقاء براعم بطول 17-25 ملم (1-2.5 سم) وتستبعد البراعم التي بدأت بالتفتح.
- لاستخلاص المآبر تؤخذ البراعم، ويجرى قطع طولي باستخدام المشروط، ثم يتم استخراج المآبر ويتم فصل الخيط السدوي عن السداة (ثم نعمل شق في السداة لإخراج حبوب الطلع).
- يجب لفت النظر إلى ضرورة عدم حدوث أي ضرر على مستوى المثبر، وذلك حتى لا يتكون الكالوس، لأنه قد لا يكون مطلوباً لذلك يجب استبعاد الأجزاء المتضررة أثناء الزراعة.

تؤخذ المآبر وتوضع في ظروف ظلامية بزراعتها على بيئة مناسبة (MS) الصلبة أو بيئة White أو (Nitsch and Nitsch).

- تنقل الخرزات المزروعة إلى الحاضنة وبعد 4 أسابيع تتطور المآبر وتعطي أجنة وبعدها تتطور الأجنة وتعطي نباتات كاملة قد تكون أحادية الصيغة الصبغية أو ثنائية الصيغة الصبغية.

- في بعض الحالات قد تتطور المآبر وتعطي نسيج كالوس، حتى مراحل متقدمة من التكشف. يتم فحص الكالوس فقد تحوي على خلايا 1 N و 2 N وخلايا ثلاثية الصيغة الصبغية.

شروط التحضين :

- ظلام، حرارة 24-28م، فترة ضوئية 14 ساعة/ يوم ، شدة ضوئية 2000 لوكس.
- بعدها تؤخذ النباتات بطول 5سم وتنقل إلى بيئة آجار مغذية جديدة بعد غسل قواعد الجذور بالماء الجاري ونضعه في ظروف حرارة 27 م وفترة ضوئية 16 ساعة /يوم، شدة ضوئية 1600 لوكس ورطوبة 75%.
- ثم تتم عملية تقسية هذه النباتات بفتح أنابيب الاختبار، وسحب هذه النباتات من البيئة فريداً، وتغسل قواعد الجذور بالماء المقطر المعقم (3 مرات)، وتوضع في أصص صغيرة تحوي بيتموس معقم، ويتم تغطية النباتات بمادة بلاستيكية شفافة ويثقب الكيس (2-3 ثقب) للتهوية، ثم نزيد عدد الثقوب إلى (4-5 ثقب) بعد أسبوع ثم بعد أسبوع آخر ننزع الكيس، وبعد 4 أسابيع تنقل النباتات لأصص أكبر حجماً وتنزع الأكياس نهائياً، ويجب إجراء العد الكروموزومي لمعرفة فيما لو كان النبات أحادياً أو ثنائياً الصيغة الصبغية.
- وقد تم زراعة المآبر في بعض أصول العنب وخاصة ب41 بدءاً من البراعم وتوضح الأشكال (11-2) شكل البرعم الزهري في العنب. تم أخذ المآبر وزراعتها. بعد فترة من الزمن كونت كالوس جنيني كما هو موضح بالشكل (11-3).
- نقل الكالوس الجنيني إلى وسط جديد لتشكيل الأجنة الخضرية كما هو موضح بالشكل (11-4). وقد تم الحصول على أجنة خضرية من زراعة المآبر التي نقلت إلى وسط إنبات حيث نمت الأجنة وكونت نباتات كاملة كما هو موضح بالشكل (11-5).

11-6 زراعة حبوب الطلع

يمكن زراعة حبوب اللقاح بطريقتين:

11-6-1- الطريقة الأولى:

الطريقة المتبعة هنا تصف زراعة حبوب اللقاح المعزولة من التبع، هذه التقنية تعد البروتوكول الرئيسي لزراعة حبوب اللقاح وتتضمن المراحل الآتية:

- اختيار براعم الأزهار المناسبة غير المتفتحة، وتعقيم حبوب اللقاح المعزولة بدون الخيط السدوي.
- يوضع حبوب اللقاح في وعاء معقم صغير يحوي 20 مل من البيئة السائلة الأساسية (MS أو White أو Nitsch and Nitsch).
- ثم تجمع حبوب اللقاح على جانب الكأس المعقم بواسطة مكبس زجاجي (حقنة) لسحبها واستخراجها.
- بعد ذلك تتم فلتر حبوب اللقاح المتجانسة عبر منخل نايلون (قطر فتحاته 40-60 µ) لإزالة حبوب اللقاح المحطمة.
- حبوب اللقاح التي تم ترشيحها يتم تثقيفها باستخدام قوة الطرد المركزي بسرعة منخفضة (500-800 دورة في الدقيقة) لمدة 5 دقائق.
- تستبعد المواد الطافية (حطام حبوب اللقاح)، وتنقل حبوب الطلع السليمة لوسط سائل جديد، وتغسل مرتين بإعادة التثقيف، وتنقل إلى بيئة سائلة جديدة.
- أخيرا تخلط حبوب اللقاح في الحجم المقاس من الوسط السائل الأساسي لتكون الكثافة بحدود 40000 حبة بالمل. يؤخذ 2.5 مل من معلق حبوب اللقاح وتنتشر في طبق بتري، تنمو حبوب اللقاح بشكل أفضل في الوسط السائل لكن إن كان من الضروري يمكن أن تنمو بزراعتها في وسط صلب يحوي كمية قليلة من الآجار. كل طبق من أطباق البتري يغلق بواسطة شرائط Cello لتجنب الجفاف.
- تحضن أطباق البتري على درجة حرارة 27-30 م تحت كثافة ضوئية منخفضة من الضوء الأبيض (LUX,500, 16 hr.)

- يمكن أن يلاحظ تشكل الأجنة الفتية بعد 30 يوماً وهذه الأجنة ستعطي عندما تنمو نباتات أحادية الصيغة الصبغية.
- النباتات أحادية الصيغة الصبغية تحضن على درجة حرارة 27-50 م° (LUX22000، 16 hr) ثم تنقل هذه النباتات إلى التربة كنباتات أحادية الصيغة الصبغية.

11-7- مقارنة بين زرع المتك وزرع حبوب اللقاح:

تعد طريقة زراعة المأبر طريقة سهلة، سريعة، عملية، وجود جدار المأبر يعطي فرصة لنمو حبوب اللقاح بشكل جيد. من مشاكلها نسبة النباتات وحيدة الصيغة الصبغية تكون قليلة لأنه يوجد خلط بين النباتات المتكونة من حبوب الطلع مع النباتات المتكونة من جدار المأبر، وهي إما تكون ثنائية أو مختلفة الصيغة الصبغية. تعطي زراعة حبوب اللقاح نباتات وحيدة الصيغة الصبغية بشكل أعلى من زراعة المتك، لا توجد مشكلة وجود الجدار في المتك، وتكون نسبة النباتات الثنائية الصيغة الصبغية أو المختلفة أقل من زراعة المتك. كما تكون نسبة تطور الخلايا إلى أجنة عالية. وأخير نسبة الكالوس المتكونة في زراعة حبوب اللقاح قليلة.

11-8- العوامل المؤثرة في زراعة المتك وحبوب اللقاح:

توجد العديد من العوامل التي تؤثر في زراعة المتك وحبوب اللقاح، وتختلف استجابة المتك بحسب الأنواع النباتية، ومن أهم العوامل المدروسة نذكر:

11-8-1- درجة تطور حبوب اللقاح في المتك عند الزراعة: يعد عامل تطور حبوب

اللقاح من أهم العوامل التي تعطي نتائج إيجابية في زراعة المتك وحبوب اللقاح.

في البداية لابد من إعطاء فكرة على كيفية تطور حبوب اللقاح في المتك. تشمل مرحلتين:

- المرحلة الأولى: تشكل الخلايا وحيدة الصيغة الصبغية Microsporogenesis ، وتتم من الخلايا الأم لحبوب اللقاح، ثنائية الصيغة الصبغية تقوم بالانقسام الاختزالي، وتشكل في نهاية المطاف أربع خلايا وحيدة الصيغة الصبغية.
- المرحلة الثانية: تطور الخلايا وحيدة الصيغة الصبغية، وتشكيل حبوب الطلع الناضجة Microgametogenesis. تخضع للانقسام الميوزي 1 و 2 لتشكيل

حبوب اللقاح الناضجة والتي لها قدرة على التلقيح والإخصاب. تحوي حبوب الطلع على نواتين وحيدة الصيغة الصبغية.

يختلف الموعد المناسب لزرع حبوب اللقاح، وهي بشكل عام بعد الانقسام الميوزي، وقبل نضج حبوب اللقاح، كما هو موضح بالشكل (11-6). ففي الفصيلة النجيلية من المفضل زراعة المتك وحبوب اللقاح بعد تكوين الأعراس في المرحلة الأولى وقبل الانقسام الميوزي الأول، وفي التبغ في مرحلة الانقسام الميوزي الأول والثاني، وفي البيتونيا عند نضج 90% من حبوب اللقاح في المتك (Margara, 1980).

وقد أوضحت التجارب بأن عامل درجة تطور المتك من أهم العوامل التي تؤثر في استجابة المتك لتكوين الأجنة وإعطاء نباتات أحادية الصيغة الصبغية في العديد من الأنواع النباتية مثل القرنفل الصيني *Dianthus chinensis* (Fu et al., 2008).

11-8-2- تعريض المتك للصدمات قبل زرعها:

يتم تعريض المتك قبل زرعها داخل الأنابيب إلى بعض الصدمات مثل درجة حرارة منخفضة كما هو الحال في القمح والتبغ. كما يمكن تعريض المتك إلى درجات حرارة مرتفعة فترة من الزمن تزيد من استجابة بعض الأنواع وتزيد في نسبة النباتات وحيدة الصيغة الصبغية الناتجة كما في نبات الكولزا *Colza*.

تعمل الصدمة الحرارية المنخفضة أو المرتفعة إلى خلل في الانقسام الميوزي في حبوب الطلع قبل نضجها مما يزيد من استجابتها بعد الزرع، وتزيد في نسب نباتات N 1.

في نبات التبغ، لوحظ عند تعريض المتك لدرجات حرارة منخفضة 5 م لمدة 72 ساعة أدى إلى تكون أجنة بنسبة 58% في المتك المزروعة، وقد تم الحصول على نتائج مماثلة في نبات فول الصويا (Rodriguez et al., 2004).

وفي نبات اللفت عند تعريض المتك لدرجات حرارة مرتفعة حوالي 35 م لمدة 24 ساعة زاد في نسبة تكون الأجنة من زراعة المتك.

11-8-3- تأثير الإضاءة: تلعب الفترة الضوئية والشدة الضوئية دوراً في نسبة استجابة المتك للنمو وتكوين الأجنة. فقد أوضحت بعض التجارب التأثير الإيجابي لطول النهار القصير، والشدة الضوئية الكثيفة في تكوين الأجنة في زراعة المتك وحبوب اللقاح.

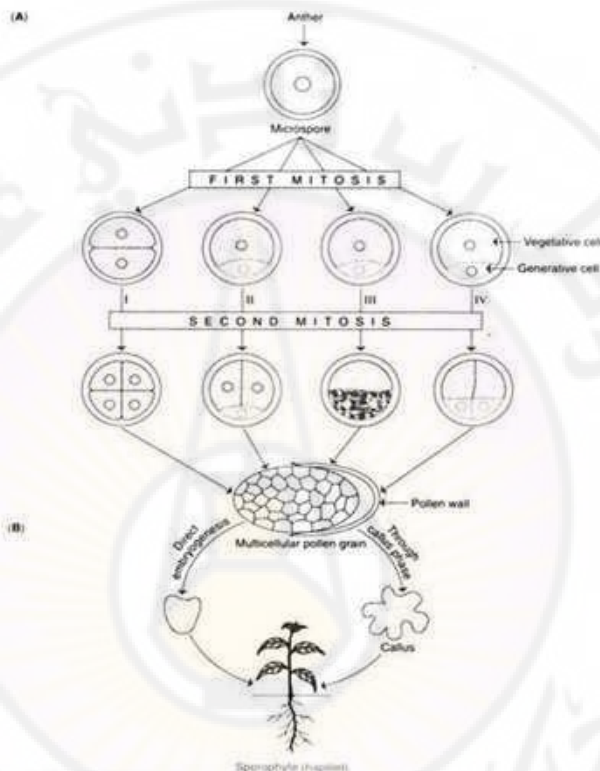


Fig. 45.2 : Diagrammatic representation of microspore divisions leading to the formation of a multicellular pollen grain (A), followed by the formation of haploid sporophyte (B) (Note : I, II, III and IV indicate respective pathways).

الشكل 11-6 : مراحل تطور حبوب اللقاح وانقسامها لتحديد الموعد المناسب لزراعتها

11-8-4- تأثير عمر النبات الأم وفترة الإزهار: كلما زاد عمر النبات الأم قلت استجابة المتك للنمو وتكوين الأجنة، كما لوحظ أخذ المتك من نباتات في بداية الإزهار تكون استجابتها عالية للنمو، وتقل عند أخذ المتك من أزهار في نهاية فترة الإزهار.

11-8-5- تأثير عوامل الوسط المغذي: يلعب تركيب الوسط المغذي دوراً مهماً في استجابة المتك وحبوب اللقاح.

- تركيز السكروز في الوسط: تحتاج بعض الأنواع النباتية إلى إضافة تراكيز عالية من السكروز أعلى من 80 غ/ل في الوسط المغذي مثل بعض أنواع الفصيلة النجيلية، وبعض الأنواع تحتاج إلى تراكيز خفيفة جداً 20 غ/ل مثل بعض أنواع الفصيلة الباذنجانية والفصيلة الزنبقية.
- تركيز الهرمونات النباتية في الوسط: لوحظ إضافة الأوكسين 2,4D. إلى الوسط المغذي بتراكيز 1 مغ/ل يزيد من استجابة المتك وحبوب اللقاح، للانقسام الخلوي ويزيد من تطورها. كما هو الحال في الفصيلة الصليبية والنجيلية. بينما لوحظ استجابة جيدة في بعض الأنواع النباتية عند استخدام تراكيز خفيفة من الأوكسين كما هو الحال في بعض أنواع الفصيلة الباذنجانية.
- إضافة الفحم المنشط: لوحظ عند إضافة الفحم المنشط إلى الوسط المغذي يزيد في نسبة تكون الأجنة الخضرية في زراعة حبوب اللقاح لبعض الأنواع النباتية مثل البطاطا والرز والتبغ. يعمل الفحم المنشط على امتصاص مثبطات النمو المفردة في الوسط مما يؤدي إلى زيادة استجابة المتك وحبوب اللقاح المزروعة للنمو والتطور.

11-9- تقانة مضاعفة النباتات وحيدة الصيغة الصبغية Doubled Haploids :

تعد تقانة مضاعفة النباتات وحيدة الصيغة الصبغية إحدى التقانات الحديثة والتي يتم بواسطتها الحصول على سلالات نقية. والتي استخدمت في برامج تربية النبات في العديد من المحاصيل والنباتات البستانية. يتم الحصول على سلالات نقية بهذه الطريقة خلال سنة تقريباً، بينما في البرامج التقليدية عن طريق التلقيح الذاتي، تحتاج عدة سنوات إلى عشرات السنين في الأشجار المثمرة. ولابد من التمييز بين النباتات ثنائية الصيغة الصبغية والنباتات مضاعفة الهابلويد، في كلا الحالتين النباتات ثنائية الصيغة الصبغية، لكن في الحالة الأولى تحمل الصبغيات مورثات متشابهة أو مختلفة في كل زوج من الصبغيات، أما في النباتات مضاعفة الهابلويد تكون الصبغيات وترتيب المورثات متشابهة تماماً Homogenous genome . تعد السلالات مضاعفة الهابلويد أكثر فاعلية في برنامج التهجين بغرض الحصول على أصناف جديدة (Rahman and Michalak de Jimenez, 2016)،

وتستخدم هذه التقنية في برنامج تربية النباتات بشكل روتيني مثل برنامج تحسين نبات الكانيولا (Xu et al.,2007)، ولابد من الإشارة أن استخدام هذه التقنية تعطي هجن نقية 100%، كما تقصر البرنامج الزمني لبرنامج التربية، وتستخدم النباتات مضاعفة الهابلويد في الدراسات الوراثية وفي تطوير المعلمات الجزيئية.

تسمح تقنية زراعة حبوب اللقاح بإدخال الجينات بإحدى طرائق الهندسة الوراثية. وتسمح تقنية مضاعفة الهابلويد في تثبيت الجين المدخل في الصبغيات وتصبح النباتات المعدلة وراثيا أكثر ثبات وهذا تكون نتائج التعديل الوراثي أكثر فاعلية. ففي القمح تم إدخال مورثة زيادة التحمل للملوحة (*HVI1*) عن طريق حبوب اللقاح وتم تثبيت هذه الصفة بتقانة مضاعفة الهابلويد في الصبغيات المتشابهة (Chauchan and Kurana,2011).

11-9-2-بروتوكول إنتاج نباتات مضاعفة الهابلويد:

سيتم وصف التقنية من خلال مثال على نبات اللفت *Brassica napus* وفق الخطوات الآتية:

1- تؤخذ البراعم الزهرية من نباتات جيدة النمو ومرباة داخل بيت زجاجي، وتنقل النباتات إلى غرفة نمو عند بدء الإزهار على درجة حرارة 15م نهارا/10 م ليلاً و16 ساعة إضاءة، وتترك لمدة أسبوع حتى موعد أخذ البراعم الزهرية في مرحلة بعد الانقسام الاختزالي وقبل الانقسام الميوزيك (الشكل 11-6). ويمكن التعرف وتحديد فترة أخذ البراعم من خلال تحديد حجم البراعم.

2- تعقم البراعم الزهرية ثم تستخلص حبوب اللقاح في وسط سائل، ويراعى عند التعقيم واستخلاص حبوب اللقاح أن تكون درجة حرارة المحاليل منخفضة حوالي 4م.

3- تزرع حبوب اللقاح بتركيز 40000 خلية بالمل، في وسط مغذي سائل مع إضافة الكولشيسين بمعدل 200 ميكرومول لكل 10مل من الوسط الحاوي على الميكروسبور.

4- توضع خلايا الطلع المزروعة لمدة 48 ساعة بالظلام في حاضنة على درجة حرارة مرتفعة 32 م.

5- يغسل مستخلص حبوب اللقاح بإضافة نفس الوسط المغذي لاستبعاد الكولشيسين وينقل، ويؤخذ الراسب الحاوي على حبوب اللقاح ويوضع في الظلام لمدة 12 يوماً على درجة حرارة 22 م وذلك بعد إضافة وسط مغذي سائل جديد. يجب في كافة المراحل المحافظة على عقامة ونظافة العمل. وبعدها تنتقل إلى وسط جديد مع لمدة 12-20 يوماً على أن يتم تبديل الوسط المغذي السائل مرة كل أسبوعين وفي نهاية هذه المرحلة تكون الأجنة قد تكونت.

6- تنتقل الأجنة إلى وسط صلب لتنمو وتشكل نباتات كاملة، وهذه الفترة تحتاج من شهر حتى ثلاثة أشهر، يتم تعريض الأجنة لدرجات حرارة منخفضة 4 م لمدة 10 أيام، ثم تنتقل إلى غرفة النمو على درجة 27 م لمتابعة تطورها حتى تصبح جاهزة للنقل إلى الظروف الطبيعية.

7- بعد ثلاثة أشهر من النقل النباتات مضاعفة الهابلويد تنمو بشكل طبيعي وتزهو وتكون بذور، أما النباتات الهابلويد يكون نموها ضعيفاً وتنمو بشكل غير طبيعي ولا تزهو وإذا ازهرت لا تكون بذوراً. وهنا تتوجب دراسة حالة تقييم للسلاسل الناتجة للتمييز بين النباتات الهابلويد من النباتات مضاعفة الهابلويد.

8- كما يمكن التعرف على محتوى النباتات بشكل مبكر فيما إذا كانت هابلويد أو مضاعفة الهابلويد أو متعددة العدد الكروموزومي من خلال الدراسات السيتولوجية والتي عن طريقها يمكن معرفة عدد الكروموزومات في النباتات الناتجة (Rahman and Michalak de Jimenez, 2016).

ولابد من الذكر أخيراً بأن كافة العوامل التي تؤثر في زراعة المتك وحبوب اللقاح تؤثر في إنتاج النباتات مضاعفة الهابلويد. كما يمكن استخدام مواد أخرى غير الكولشيسين في مضاعفة الصبغيات مثل (trifluralin, oryzalin, and amiprophosmethyl (APM)، وهي مبيدات عشبية.

وقد تمكن فريق فرنسي من الحصول على نباتات مضاعفة الهابلويد في الإجازص وبمعاملة النموات الغضة بوسط مغذي سائل والمضاف له الأوريزالين بتركيز 300

ميكرومول لمدة 48 ساعة قبل نقلها إلى نفس الوسط الخالي من مادة الأوريزالين (Bouvier et al.,2002).

ولابد من الإشارة بأن هذه التقنية مستخدمة بشكل تجاري في إنتاج السلالات النقية في العديد من برامج تربية النبات، وإنتاج الأصناف التجارية، وفي برامج إنتاج بذار النباتات البستانية وإنتاج الهجن.





الفصل الثاني عشر

زراعة الجذور الشعرية

Hairy root culture

1-12- مقدمة Introduction :

تعد الطبيعة مصدر إلهام للإنسان، ومنها يكتشف الكثير من المعلومات المهمة التي لها آثار تطبيقية في المجالات المختلفة.

لاحظ العلماء إصابة بعض جذور النباتات البرية بمرض بكتيري يدعى مرض الجذور الشعرية (الشكل 1-12)، وهو مرض يصيب الجذور وتتكون في منطقة الإصابة جذور ليفية رفيعة وكثيفة. قام علماء أمراض النبات بدراسة هذا المرض في الطبيعة، واستطاعوا تحديد المسبب وهو نوع من البكتيريا السالبة التي تعيش في التربة وتدعى الأغروباكتريوم ريزوجين *Agrobacterium rhizogene*، تحوي البكتيريا على بلاسميد يحمل مورثات تعمل على تحفيز تكوين الهرمونات النباتية بتركيز عالية (الأوكسينات والسيتوكينينات)



الشكل (1-12): مرض الجذور الشعرية في الطبيعة

عند تعرض جذور النباتات في الطبيعة إلى جروح، تهاجم بكتيريا الأنسجة الجذرية وتدخل إلى داخل الخلايا النباتية، فينتقل البلاسميد إلى داخل الخلايا ويندمج مع جينوم الخلايا النباتية. تنتقل المورثات البكتيرية وتندمج مع جينوم الأنسجة النباتية الجذرية ويحفزها لإنتاج

الهرمونات النباتية التي تحفز تكوين ونمو الجذور اللبفية مسببة ظهور المرض في جذور النباتات المصابة.

أدت هذه الاكتشافات إلى تطوير تقنية مهمة في مجال التقنية الحيوية النباتية وهي تقنية زراعة الجذور الشعرية Hairy root culture التي تعد إحدى تقنيات التعديل الوراثي التي يمكن استخدامها في نقل بعض المورثات المهمة من نبات إلى نبات آخر .

12-2-2- تعاريف خاصة بالجذور الشعرية Terminology :

12-2-2-1- زراعة الجذور الشعرية: عبارة عن زراعة أجزاء نباتية مختلفة مع الأغروباكتريوم ريزوجين Agrobacterium rhizogene ضمن شروط معقمة بهدف نقل البلاسميد Ri plasmid من البكتريا إلى داخل الخلايا النباتية واندماجها مع جينوم الخلايا مما يحفز على اصطناع الهرمونات النباتية وتحريضها في تكوين الجذور الشعرية ونموها وإكثارها.

12-2-2-2- الأغروباكتريوم: بكتريا سالبة من بكتريا التربة ويوجد منها نوعين، تستخدم في التقنية الحيوية النباتية:

-النوع الأول: أغروباكتريوم ريزوجين: يستخدم في تقنية الجذور الشعرية.

-النوع الثاني: أغروباكتريوم تومافيسينس Agrobacterium tumefaciens ويستخدم في النقل المورثي والحصول على نباتات معدلة وراثياً.

12-2-3- البلاسميد Plasmid : هو جزء من البلاسميد البكتيري، يوجد في الأغروباكتريوم وهو قطعة من الـ DNA ، ri DNA أو T-DNA تحوي حوالي 20000 جزء من الـ DNA. ويحوي مجموعة من الجينات التي تعمل على تكوين الأنزيمات المحفزة لاصطناع الأوكسينات والسيتوكينينات، كما تحوي الأنزيمات الخاصة باصطناع الأوبيينات Opines التي تعد مصدر غذاء للبكتريا (أزوتي، والطاقة).

كما هو موضح بالشكل (12-2).

12-2-4- الأوبين Opines: مركبات عضوية توجد في الجذور الشعرية أو في التدرن السرطاني البكتيري، يتم اصطناعها من قبل المتطفل Agrobacterium rhizogene حيث توجد الأنزيمات المسؤولة عن اصطناع الـ Opines في البلاسميد البكتيري الذي يتم نقله

إلى الخلايا النباتية ويسخرها لاصطناع الـ Opines. تستخدم البكتريا المتطفلة هذه المركبات كمصدر للأزوت والطاقة.

يوجد حوالي 30 مركب مختلف من الـ Opines تم اكتشافها لحد الآن، وصنفت ضمن عدة عائلات مثل Manopines، Agrocinosins، Octopines، Agropines.

12-3- تكوين نظام الجذور الشعرية Establishment of a hairy root culture system:

يتم زرع وإنشاء نظام زراعة الجذور الشعرية وفق الآتي:

- يتم عزل الأجزاء النباتية المراد استخدامها، ثم تعقم وتزرع بنفس الطرائق التي استخدمت في التكاثر الخضري الدقيق.

- تزرع العينات النباتية زراعة أولية في وسط مغذ لمدة قصيرة 2-3 أيام.

- تنقل الخزعات النباتية وتجرح بمشرط صغير وتزرع مع البكتريا أغروباكتريوم ريزوجين لمدة 2-3 أيام وذلك حسب الأنواع النباتية لإعطاء فرصة للبكتريا بمهاجمة الخلايا النباتية واختراقها.

- تنقل العينات فيما بعد إلى وسط جديد على أن يضاف له مضاد حيوي، أو مزيج من المضادات الحيوية للتخلص من البكتريا والقضاء عليها بشكل كامل.

- تنقل العينات النباتية بعد فترة أسبوع إلى أسبوعين إلى وسط جديد خالٍ من المضادات الحيوية للسماح بتشكيل الجذور الشعرية. كما هو موضح بالشكل (12-3).

- تختلف الفترة الزمنية اللازمة لتكوين الجذور الشعرية بحسب الأنواع النباتية، ففي بعض الأنواع تظهر بعد أسبوع من الزرع، وفي بعض الأنواع الأخرى تحتاج إلى فترة شهر حتى تظهر بشكل واضح الجذور الشعرية.

- يتم نقل الجذور الشعرية مرة بالشهر إلى وسط جديد حتى تسمح بنمو وإكثار الجذور الشعرية، ولا يحتاج الوسط إلى إضافة هرمونات نباتية، لأن الجذور الشعرية تكون هرمونات داخلية بشكل مستمر بفعل المورثات التي نقلت من بلاسميد الأغروباكتريوم.

تتصف الجذور الشعرية بنموها السريع والعشوائي والمستمر والمستقر في أوساط مغذية خالية من الهرمونات النباتية، وتعمل على إنتاج مواد فعالة التي تستخدم في الصناعات الدوائية والتجميلية والغذائية.

تتصف الجذور العادية الغير محورة وراثياً بالنمو البطيء، وعدم تشكيل جذور ليفية وتحتاج إلى إضافة هرمونات نباتية إلى الوسط المغذي حتى تنمو.

12-4- العوامل المؤثرة في تكوين الجذور الشعرية Factors affecting hairy root

:culture

تؤثر عوامل عديدة في نجاح تكوين الجذور الشعرية داخل الأنابيب، تختلف العوامل المؤثرة باختلاف الأنواع النباتية، ولا بد من الإشارة بأن العوامل التي تؤثر في نمو الجذور الشعرية وإكثارها، ليس لها التأثير نفسه فيما يتعلق بإنتاج المواد الفعالة.

12-4-1- تأثير سلالة البكتريا المستخدمة:

تختلف قدرة التعديل الوراثي للأغروباكتريوم ريزوجين، وذلك حسب السلالة المستخدمة. وقد لوحظ اختلافات كبيرة بين سلالات البكتريا المستخدمة في قدرتها في تكوين الجذور الشعرية، وفي قدرتها في نمو الجذور الشعرية وإكثارها، وفي تكوين المواد الفعالة . قسمت سلالات الأغروباكتريوم ريزوجين إلى خمس مجموعات أو عائلات وذلك حسب مركبات الـ Opines التي تنتجها لتغذية البكتريا وهي:

-مجموعة Octopines.

-سلالات الـ Agropines.

-سلالات الـ Nopalines.

-سلالات الـ Manopines.

-سلالات Cucumopines (Zhou *et al.*, 1998).

تختلف السلالات وقدرتها لتكوين الجذور الشعرية وإنتاج المواد الفعالة، فقد لوحظ أن سلالات الـ Agropines أعطت أكبر قدرة في تكوين الجذور الشعرية في نبات الفول السوداني Peanut، وخاصة السلالة R1601 (Kim *et al.*, 2008).

ولوحظ انتخاب تحت سلالات أو سلالات من السلالة نفسها، وأبدت هذه تحت سلالات اختلافات واضحة بقدرتها في تكوين الجذور الشعرية وفي إنتاج المادة الفعالة. ففي تجربة أجريت في نبات الأرتيميزيا أنا *Artemisia anna* حيث استخدمت عدة تحت سلالات من السلالة R1601 في تكوين الجذور الشعرية وفي قدرة الجذور الشعرية المتكونة لتكوين مادة الأرتيميزينين. (Deyu *et al.*, 2001) Artemisinin

ويوضح الجدول (1-12) قدرة تحت السلالات المتكونة في تكوين الجذور الشعرية وفي قدرتها في تكوين المادة الفعالة، حيث استخدم 0.2 غ/بالدورق (مادة جافة) يحوي 100 مل من الوسط المغذي السائل يحوي المحلول المعدني MS مع 250 مغ/ كنامايسين.

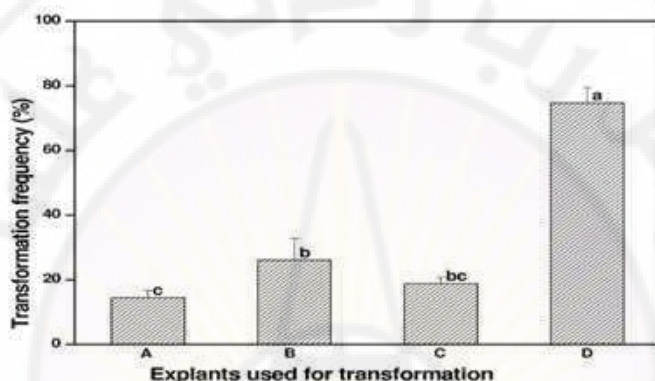
جدول (1-12): تأثير تحت السلالات في نمو وإكثار الجذور الشعرية بنبات الأرتيميزيا أنا، وإنتاج مادة الأرتيميزينين. (Deym *et al.*, 2001)

تحت السلالة المستخدمة	كتلة المادة الحية المتكونة غ/بالدورق	متوسط إنتاج الأرتيميزينين مغ/ل.
R1601-L-1	0.76	9.08
L-2-1601	0.89	1.83
L-3-1601	1.45	7.93
L-4-1601	1.10	3.49
P-1-1601	0.98	0.61
P-2-1601	0.96	1.60

12-4-2- تأثير طبيعة الخزعة النباتية المستخدمة:

يتم الحصول على الجذور الشعرية في العديد من الأنواع النباتية من أجزاء نباتية مختلفة مثل: السويقة الجنينية، الفلقات، الأوراق، القمم النامية، أعناق الأوراق، الجذور، السلايمات، والدرنات والبروتوبلاست (Mugnier, 1988; Jian *et al.*, 2009). تختلف أفضل الأجزاء النباتية من نبات إلى آخر، ففي نبات السالفيا *Salvia miltiorrhiza* أعطت الأوراق أكبر ما يمكن من الجذور الشعرية عند تلقيحها بالأغروباكتريوم ريزوجين، (Hsia *et al.*, 2007) كما هو موضح بالشكل (3-11).

ففي تجربة نفذت في نبات اللوتس *Lotus coniculatus* إذ استخدمت أربعة أنواع من الأجزاء النباتية وهي: الجذور-السلاميات-الأوراق والعقل الطرفية أو الجانبية. حيث لقحت العينات المذكورة بالبكتريا A.R ، وحسبت نسبة العينات المعدلة وراثياً والتي كونت جذور شعرية كما هو موضح بالشكل (4-12) وقد أظهرت النتائج أن العقل الصغيرة أعطت أفضل النتائج. (Jian et al., 2009)



الشكل (4-12): تأثير طبيعة العينات النباتية في تكوين الجذور الشعرية في نبات اللوتس.
A جذر - B سلاميات - C أوراق - D عقل صغيرة.

12-4-3- تأثير عمر الأجزاء النباتية المستخدمة:

يلعب عمر الأجزاء النباتية دوراً مهماً في قدرتها على تكوين الجذور الشعرية، وبشكل عام كلما زاد عمر العينات النباتية كلما قلت قدرتها بالاستجابة للتعديل الوراثي بالبكتريا، وانخفضت نسبة الجذور الشعرية المتكونة.

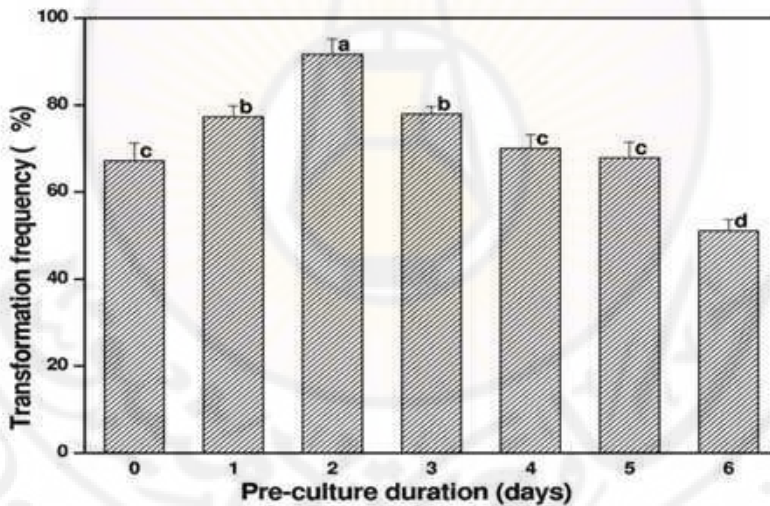
ففي تجربة على نبات السوس *Glycyrrhiza glabra* ، استخدمت أجزاء نباتية ورقية متكونة داخل الأنابيب بأعمار مختلفة من 2-3-4-5 أسابيع وقد استخدمت سلالة A.R. KS99 في عملية التلقيح لتكوين الجذور الشعرية. وقد لوحظ بأن أفضل عمر للأوراق كان بين 3-4 أسابيع فقد أدت إلى تكوين أكبر كمية من الجذور الشعرية بعد 85 يوماً من الزراعة. في

حين الأوراق أكثر عمراً كونت جذور شعرية بكمية أقل، كما هو الحال في الأوراق الفتية جداً (Mehrotra *et al.*, 2008).

12-4-4- تأثير الزراعة التمهيدية:

تؤثر الزراعة التمهيدية لفترة من الزمن في وسط مغذٍ في قدرة العينات النباتية في تكوين الجذور الشعرية والمعاملة بالبكتريا أغروباكتريوم ريزوجين.

ففي تجربة أجريت في نبات اللوتس *Lotus corniculata*، حيث زرعت العينات النباتية في وسط مغذٍ لفترة زمنية بين 0-6 أيام، ثم نقلت وزرعت بشكل مشترك مع البكتريا لمدة يومين. بعد فترة زمنية 4-5 أسابيع حسبت العينات النباتية المعدلة وراثياً التي كونت جذوراً شعرية. دلت النتائج أن الزراعة التمهيدية لمدة يومين أعطت أفضل نسبة للتعديل الوراثي كما هو موضح بالشكل (12-5).



الشكل (12-5): تأثير فترة الزراعة التمهيدية في تكوين الجذور الشعرية. (Jian *et al.*, 2009)

12-4-5- تأثير التركيب المعدني:

يؤثر التركيب المعدني للوسط المغذي في قدرة العينات النباتية في تكوين الجذور الشعرية وفي قوة نموها ومدى قدرتها في تكوين المواد الفعالة.

يختلف تركيب الوسط المغذي بحسب الأنواع النباتية، ففي نبات السالفيا *Salvia miltiorrhiza* أعطى الوسط الخاص بالأشجار الخشبية (WPM) نتائج أفضل من الوسط المعدني لموراشيج وسكوغ في تكوين الجذور الشعرية (Hsia *et al.*, 2007) وفي قدرتها على النمو.

وتجدر الإشارة أنه ليس من الضروري أن يكون الوسط المعدني الذي يعطي أفضل نمو للجذور الشعرية، أن يكون هو الأنسب في إنتاج المواد الفعالة. وبالعودة للمثال السابق فقد تم الحصول على أعلى نسبة من المواد الفعالة من الجذور الشعرية النامية في الوسط المعدني B5.

وجد في بعض الأحيان أنه يتم الحصول على أعلى معدل لنمو الجذور الشعرية، وأعلى نسبة من المادة الفعالة على نفس الوسط المعدني، كما هو الحال في نبات الروبيا *Rubia ackane*، تم الحصول على أعلى معدل من نمو الجذور الشعرية في وسط (SH)، كما تم الحصول على أعلى كمية من مادة *Alizarin* والـ *Purpurin* في نفس الوسط، بالمقارنة مع MS والـ B5 (Park and Lee, 2009).

12-4-6- تأثير طبيعة الوسط:

تؤثر طبيعة الوسط المغذي في نمو الجذور الشعرية وفي إنتاج المواد الفعالة، ويختلف التأثير باختلاف الأنواع النباتية. ففي نبات السالفيا، كان معدل نمو الجذور الشعرية في الوسط السائل لثلاثة أصناف أكثر من معدل نمو الجذور الشعرية في الوسط الصلب، أما إنتاج المادة الفعالة التانشينون *Tanshinone* في الوسط الصلب كان أعلى بثلاث مرات من إنتاج هذه المادة من الجذور الشعرية النامية في الوسط السائل.

12-4-7- تأثير تركيز السكر:

يختلف تأثير تركيز السكر المضاف إلى الوسط المغذي بحسب الأنواع النباتية. فقد لوحظ بأن أعلى معدل لنمو الجذور الشعرية تم الحصول عليه في وسط مغذٍ يحوي 60 غ/ل سكروز، وذلك بعد 6 أسابيع من زراعة الجذور الشعرية. بينما في القطن نوع *Gossypium barbadense*، فقد كان أفضل تركيز هو السكر 30 غ/ل بدون هرمونات حيث كان معدل نمو الجذور الشعرية أعلى ما يمكن. (Triplett *et al.*, 2008)

12-4-8- تأثير إضافة الهرمونات النباتية:

يعمل التعديل الوراثي بالأغروباكتريوم ريزوجين إلى نقل المورثات المحفزة لتكوين الهرمونات إلى الخلايا النباتية مما يؤدي إلى اصطناع تراكيز عالية من الهرمونات التي تحفز تكوين الجذور الشعرية ونموها. لذلك لا تحتاج الجذور الشعرية إلى إضافة الأوكسينات إلى الوسط المغذي لنموها وإكثارها. في حين تفيد إضافة الهرمونات وتزيد في إنتاج المواد الفعالة. تختلف الحاجة إلى إضافة الهرمونات النباتية بحسب الأنواع النباتية، ففي تجربة نبات القطن من النوع *Gossypium barbadense* أوضحت النتائج بأن إضافة الأوكسين إلى وسط نمو الجذور الشعرية يعمل كعامل سلبي في نمو الجذور الشعرية (Triplett *et al.*, 2008).

وقد لوحظ زيادة واضحة في نمو الجذور الشعرية، وفي إنتاج المادة الفعالة في بعض الأنواع النباتية مثل الأرتيميزيا آنا. *Artemisia annua*. زاد نمو الجذور الشعرية عند إضافة الجبرلين GA بتركيز خفيفة 0.01-0.02 مغ/ل. وقد أثبتت الدراسات إلى أن الأوكسينات وخاصة NAA بتركيز مختلفة تعمل على زيادة إنتاج المادة الفعالة (الأرتيميزينين *Artemisinin*) وكان تأثير الـ IAA أقل فعالية في إنتاج المادة الفعالة من الـ NAA. أما الجذور الشعرية النامية في وسط بدون هرمونات ينخفض بشكل واضح إنتاجها من المادة الفعالة.

تلعب بعض المركبات الكيميائية التي تضاف إلى الأوساط المغذية كطلائع لتكوين المواد الفعالة، ففي القطن تبين إضافة حمض الساليسيليك *Salicylic acid* وميثيل جاسمونات *Methyl jasmonate* إلى زيادة واضحة في إنتاج مادة الجوسيبول *Gossipol* في الجذور الشعرية وقد يبلغ معدل الزيادة ضعف إلى ثلاثة أضعاف الشاهد (Triplett *et al.*, 2008) ونشير بأن مادة الجوسيبول المنتجة في الجذور الشعرية للقطن تساوي للكمية الموجودة في جذور النباتات النامية في الحقل.

يختلف التركيز الأنسب من الهرمونات النباتية ونوعها بحسب الأنواع النباتية، ففي نبات الروبيا *Rubia* أعطى الأوكسين NAA بتركيز 0.5 مغ/ل أفضل معدل لنمو الجذور الشعرية وأفضل نسبة للمادة الفعالة المنتجة بالجذور الشعرية (الأنتراكينون *Park*)

(Antraquinon) (Lee, 2009)، في حين كان التركيز الأنسب في حال الأرتيميزيا بين 1-5مغ/ل من NAA .

12-4-9- تأثير الإضاءة:

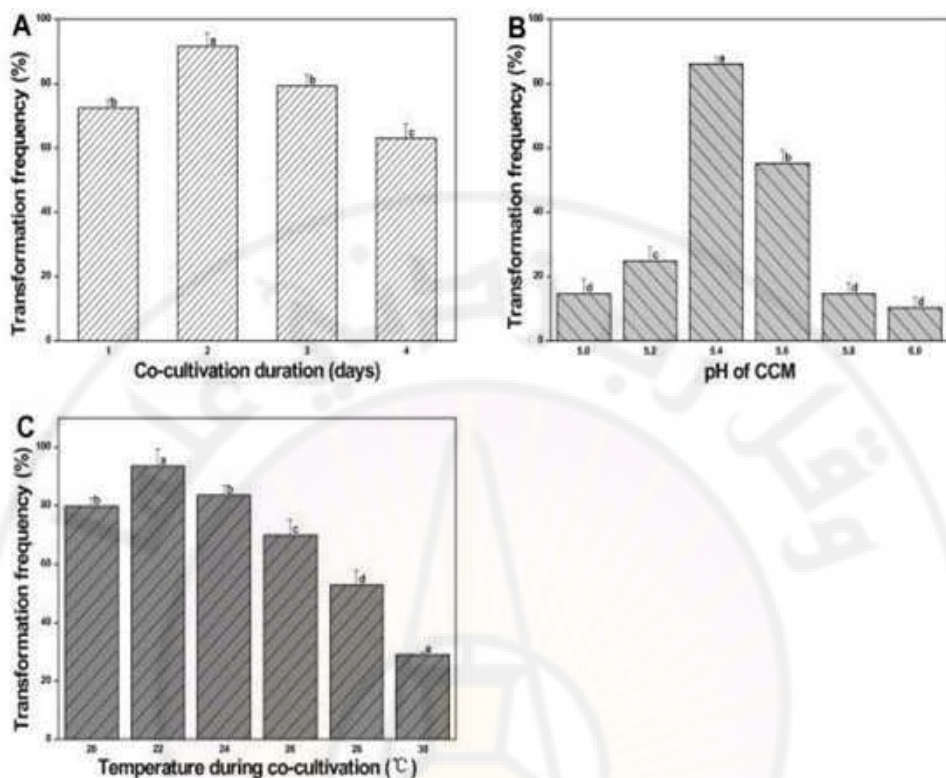
تؤثر الإضاءة في نمو وإكثار الجذور الشعرية، وفي تكوين المواد الفعالة وقد يكون التأثير إيجابياً أو سلبياً وذلك حسب الأنواع النباتية.

ففي نبات السالفيا *Salvia miltiorrhiza* تنمو الجذور الشعرية، وتزداد الكتلة الحية بشكل كبير بمعدل مرة ونصف في الضوء بالمقارنة مع نموها بالظلام. ولكن يزداد تكوين المادة الفعالة (التانشيونين Tanshinone) بالظلام بالمقارنة مع نسبتها عند تعريض الجذور الشعرية للظلام. (Hsia et al., 2007)

12-4-10- العوامل المرتبطة بالزراعة المشتركة مع البكتريا:

آ- تأثير فترة الزراعة المشتركة مع البكتريا: تؤثر فترة زراعة البكتريا *Agrobacterium rhizogene* في نسبة التعديل الوراثي. وتختلف الفترة المناسبة بحسب الأنواع النباتية وحسب السلالة البكتيرية ومدى شراستها.

ففي تجربة نفذت على اللوتس *Lotus coniculatus*. فقد زرعت عينات ورقية مع البكتريا لفترة زمنية من 1-6 أيام في وسط مغذٍ للتعديل الوراثي وقد لوحظ بأنه أفضل فترة للزراعة المشتركة هي ليومين حيث بلغت نسبة التعديل أعلى ما يمكن كما هو موضح بالشكل (12-6).



الشكل (12-6): تأثير بعض العوامل مثل فترة الزراعة المشتركة مع البكتريا، الحرارة، وال pH في التعديل الوراثي وتكوين الجذور الشعرية في نبات اللوتس.

ب-تأثير PH الوسط المغذي في الزراعة المشتركة:

يؤثر PH الوسط المغذي بشكل كبير في التعديل الوراثي وتكوين الجذور الشعرية، وذلك أثناء الزراعة المشتركة للعينات النباتية مع البكتريا. ففي تجربة أجريت مع نبات اللوتس حيث زرعت العينات النباتية مع البكتريا لمدة يومين في أوساط مغذية مختلفة ال PH كالتالي: 5-5.2-5.4-5.6-5.8-6.

وحسبت نسبة التعديل الوراثي وقد لوحظ فروقات كبيرة في نسبة التعديل وذلك حسب درجة ال PH. وكان أفضل نسبة تعديل في ال PH 5.4 ، كما هو موضح في الشكل (12-6).

ج-تأثير درجة حرارة غرف النمو أثناء الزراعة المشتركة:

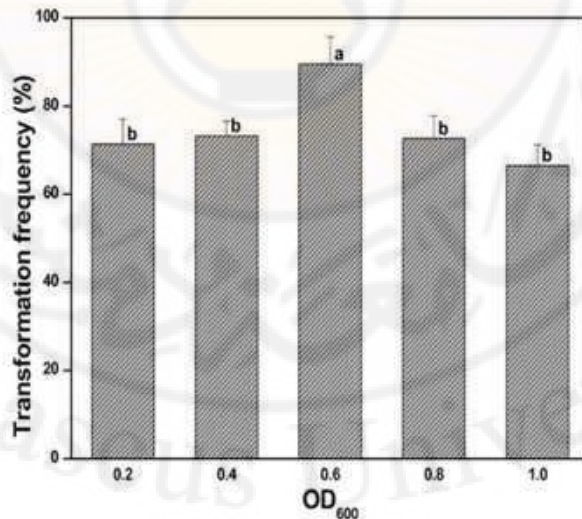
تؤثر درجة حرارة غرف النمو أثناء الزراعة المشتركة بين العينات النباتية مع البكتريا *Agrobacterium rhizogene* في نسبة التعديل.

تتخفض نسبة التعديل في درجات الحرارة المنخفضة تحت العشرين درجة مئوية كما تقل في درجات الحرارة العالية 28-30م، وأفضل درجة هي 22م، كما هو الحال في التعديل الوراثي لنبات اللوتس. الشكل (12-6).

د-تأثير كثافة البكتريا في التعديل الوراثي:

تلعب كثافة البكتريا المضافة إلى وسط الزراعة المشتركة دوراً مهماً في نسبة التعديل الوراثي في نسبة تكوين الجذور الشعرية، ولابد أن تكون الكثافة البكتيرية مناسبة للحصول على نسبة جيدة من الجذور الشعرية.

الكثافة العالية والكثافة القليلة تنعكس سلباً في نسبة التعديل وتكوين الجذور الشعرية، تختلف الكثافة الأنسب بحسب النوع النباتي، مثلاً في نبات اللوتس تبين بأن الكثافة OD=600 أي بمعدل 600 ألف خلية بكتيرية في 1مل كما هو موضح بالشكل (12-7).



الشكل (12-7): تأثير كثافة البكتريا في التعديل الوراثي في اللوتس

ونقاس الكثافة Optical density على أساس OD= عدد البكتيريا في 1مل من المحلول البكتيري. ونقاس بواسطة جهاز السبيكتروفوتوميتر Spectrophotometer. ونشير إلى أن السلالة البكتيرية المستعملة تؤثر بشكل كبير في نسبة التعديل، ونسبة تكوين الجذور الشعرية، وفي نسبة اصطناع المواد الفعالة.

هـ- تأثير المضاد الحيوي المضاف إلى الزراعة المشتركة:

يتوجب بعد إتمام عملية التعديل الوراثي، التخلص من البكتيريا، والحد من نموها للسماح للعينات النباتية بالنمو وتكوين الجذور الشعرية، يجب إضافة مضاد حيوي مناسب وفعال ضد السلالات البكتيرية المستخدمة، كما توجد عدة أنواع من المضادات الحيوية التي تستخدم إما على شكل منفرد، أو مزيج من أكثر من مضاد حيوي، وتستخدم المضادات الحيوية الآتية:

-السيفاتكسيم Cefataxime sodium .

-الكارينسللين Carbencillin .

-الفانكوميسين Vancomycin .

-الأمبيسيلين Ampicillin .

-الكلافورام Claforam .

-الستربتومييسين Streptomycin .

-التتراسكلين Tetracyclin .

تستخدم بتركيز من 100-500 ميكروغرام/مل، وتستخدم مزيجاً في بعض الأحيان لقتل البكتيريا الأغروباكتريوم ريزوجين واستبعاده للسماح بنمو العينات النباتية وإكثارها (Hu & Du, 2006).

12-4-11- تأثير فترة نمو الجذور الشعرية:

تختلف الفترة الزمنية الخاصة بنمو وإكثار الجذور الشعرية بحسب الأنواع النباتية بين 4-12 أسبوع. (Hsia et al., 2007)

يمر منحني النمو للجذور الشعرية بمرحلتين:

1-المرحلة الأولى: ويتم خلالها نمو الجذور الشعرية وإكثارها وفي هذه المرحلة التي تستمر عدة أسابيع 4-12 أسبوع، يتم زرع العينات النباتية في وسط مغذٍ مناسب وفي أغلب الأحيان لا تتم إضافة الهرمونات النباتية، ويفضل تنمية الجذور الشعرية بالإضاءة وعلى درجة حرارة $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ليتم الحصول على أكبر كمية ممكنة من الكتلة الحية الرطبة أو الجافة.

2-المرحلة الثانية: ويتم خلالها إنتاج المواد الفعالة من قبل الجذور الشعرية، وفي هذه المرحلة يفضل إضافة بعض الهرمونات النباتية وخاصة الأوكسينات، كما يفضل وضع العينات المزروعة في الظلام لإنتاج أكبر كمية ممكنة من المادة الفعالة.

لوحظ بأن إنتاج أغلب المركبات الثانوية يحدث بعد توقف منظم النمو أو على الأقل ليس خلال مرحلة نمو وإكثار الجذور الشعرية (Bourgaud et al., 2001)، ففي نبات الأرتيميزيا أنا تم إنتاج مادة الأرتيميزين بالزراعة على مرحلتين، المرحلة الأولى لزيادة الكتلة الحية للجذور الشعرية، والمرحلة الثانية لإنتاج المركبات الثانوية، وزادت كمية المادة المنتجة في هذا النظام بشكل كبير بالمقارنة مع الزراعة بالنظام الواحد.

وفي نبات السالفيا استمر نمو الجذور الشعرية في بعض الحالات إلى 12 أسبوعاً، وفي بعض الأحيان أو السلالات يتوقف النمو عند الأسبوع العاشر، ولكن يستمر إنتاج المواد الفعالة حتى 12 أسبوعاً. (Hsia et al., 2007)

12-5- انتخاب سلالات الجذور الشعرية Selection of hairy root line :

يوجد اختلافات وراثية واسعة في سلالات الجذور الشعرية، ويعود السبب إلى التعديل الوراثي الحاصل بسبب الأغروباكتريوم ريزوجين مما يعطي سلالات الجذور الشعرية التي تختلف في قدرتها على النمو والإكثار وفي قدرتها في تكوين المواد الفعالة، وفي قدرتها في تكوين نباتات كاملة.

كما لوحظ بأن اختلاف في التركيب الوراثي لسلالات البكتريا المختلفة تسبب أيضاً اختلافات واضحة في قوة نمو الجذور الشعرية وإكثارها وقدرتها في تكوين المواد الفعالة. كذلك لوحظ اختلافات بين سلالات الجذور المتكونة حسب مصدر وطبيعة العينات النباتية المستخدمة.

لذلك لابد من وضع برنامج لانتخاب سلالات الجذور الأكثر فائدة التي تتمتع بالصفات الآتية:

- سريعة النمو والإكثار .
 - مستقرة وتعطي كمية كبيرة من الكتلة الحية.
 - تنتج مواد فعالة بكمية جيدة ليصار إلى استثمارها من الناحية التجارية.
 - استمرارية إنتاج المادة الفعالة لفترة زمنية طويلة، الثبات في الإنتاج.
- ولابد أخيراً من الاحتفاظ بسلالات الجذور الشعرية جيدة الصفات وحفظها بزراعة النسج أو باستخدام تقانات الحفظ بالتجميد.
- ويوضح الشكل (8-12) مثلاً آخر عن تكوين الجذور الشعرية في نبات فول الصويا بدءاً من الفلقات التي اخذت وعُملت وزرعت مع البكتريا ثم زرعت في وسط لتكوين الجذور الشعرية. كما يوضح الشكل نفسه طريقة الكشف عن التعديل الوراثي (Chen *et al.*, 2017).

12-6- الكشف عن التعديل الوراثي في الجذور الشعرية (الجينات الكاشفة):

يتم نقل بعض المورثات بفعل البكتريا إلى العينات النباتية التي ستشكل الجذور الشعرية. يحمل البلاسميد بعض الجينات الكاشفة، سهلة الكشف والقياس، وعند الكشف عنها تعطي دليلاً على التعديل الوراثي، وتسمى هذه المورثات بالجينات الكاشفة. ويمكن أن تنتقل إلى الجذور الشعرية. ومن هذه المورثات:

- مورثة B- glucoronidase (Gus) الذي يمكن الكشف عنها بسهولة في الجذور الشعرية باستخدام تقانة الدراسة التشريحية.

- مورثة II Gene Neomycin Phosphor Transferase (NPT-II) ويرتبط معه أنزيم Kanamycin resistant.

- مورثة. Gene Green Fluorescent protein (GFP)

- المورثة التي تعطي المقاومة للمضاد الحيوي الهيجرومايسين Hygromycin. ففي هذه الحالة يتم الكشف عن التعديل الوراثي في الجذور الشعرية.

12-7-7- تطبيقات زراعة الجذور الشعرية Hairy Root Culture Applications :

توجد تطبيقات متعددة لزراعة الجذور الشعرية، إذ تعد طريقة من طرائق التعديل الوراثي والنقل المورثي، كما يمكن بوساطة هذه التقنية دراسة آلية عمل المورثات وآلية اصطناع بعض المركبات الفعالة. ويعد إنتاج المواد الفعالة من أهم تطبيقات زراعة الجذور الشعرية. ويوضح الشكل (12 - 9) أهم تطبيقات تقنية زراعة الجذور المختلفة.

12-7-1- إنتاج مركبات ثانوية: Secondary Metabolites Production

ينتج النبات نوعين من المركبات:

-المركبات الأساسية: مثل الكربوهيدرات، الدهون، البروتينات. وهي مركبات يعمل النبات على إنتاجها لتأمين العناصر الأساسية اللازمة للانقسام الخلوي والنمو والتطور النباتي. وأي نقص في أي مركب يعمل على توقف النمو النباتي.

-المركبات الثانوية: وهي مركبات مهمة ينتجها النبات لأغراض محددة مثل:

-بعض المركبات التي تعمل على جذب الحشرات لإتمام عملية الإلقاح.

-بعض المركبات التي تعمل على المحافظة على حياة النباتات من الإجهادات الحيوية واللاحيوية مثل الفيتامينات، الفلافونيدات، الأصبغة.

-بعض المركبات الفعالة مثل المضادات الحيوية وبعض المركبات الفعالة التي تدخل في صناعة الأدوية مثل القلويدات، الزيوت العطرية، الأصبغة، النيكوتين، الهبوسيامين، التربينات، الأتروبين...إلخ.

12-7-1-3- مزايا زراعة الجذور الشعرية لإنتاج المركبات الثانوية:

تنتج العديد من النباتات الطبية والعطرية كثير من المواد الفعالة التي تراكمتها في المجموع الجذري في الطبيعة. يتم الحصول على هذه المواد من خلال جمع النباتات من الطبيعة واستخلاص المواد من الجذور، وهذا يتطلب القضاء على النباتات التي تعيش في الطبيعة. إذا كان الطلب كبيراً على المواد الفعالة الموجودة في هذه النباتات البرية، ولا يوجد سياسة آمنة لحفظ قسم من النباتات البرية فهذا يؤدي إلى تدهور الكثير من النباتات البرية وانقراضها، مما يحدث خللاً في التنوع الحيوي البري لهذه النباتات. ولذلك يجب وضع خطة

بترك جزء من النباتات البرية ولو 10-20% من مجموع انتشارها في الطبيعة حتى تستمر في تكوين البذور والإكثار للمحافظة على التوازن الحيوي الطبيعي وتجنباً لانقراضها.

-يعد إنتاج المواد الفعالة من الجذور الشعرية في المختبر وسيلة فعالة في المحافظة على التنوع الحيوي الطبيعي وتجنب تدهور الأنواع البرية المهمة.

-يتم إنتاج المواد الفعالة من الجذور الشعرية بطريقة سريعة، سهلة، بفترة زمنية قصيرة، وبشكل مستقر ومستمر، وباستخدام أوساط مغذية خالية من الهرمونات النباتية.

-يمكن أن تعطي الجذور الشعرية نسبة أعلى من المادة الفعالة بالمقارنة مع نسبتها في الجذور الطبيعية لبعض الأنواع النباتية.

-تعطي نقانة الجذور الشعرية آفاقاً لتحسين وزيادة إنتاج المادة الفعالة، وذلك من خلال انتخاب سلالات عالية الإنتاج، ومن خلال إدخال بعض الجينات التي تؤثر في اصطناع بعض الأنزيمات التي تؤثر في اصطناع بعض المركبات الثانوية وزيادة إنتاجيتها.

12-7-1-3 -آلية تأثير الجينات المدخلة في تكوين المركبات الثانوية:

تؤثر المورثات المدخلة بفعل البكتريا *Agrobacterium rhizogene* إلى تعديل وراثي في آلية الاصطناع الحيوي للمواد الفعالة. *Methabolic Engineering*.

يوجد هناك آليتان تفسران تأثير المورثات المدخلة في الاصطناع الحيوي للمواد الفعالة في الجذور الشعرية:

أ- تعمل الجينات المدخلة في النبات إلى تنشيط تكوين بعض الأنزيمات غير الموجودة أصلاً في النبات. تعمل الأنزيمات الجديدة إلى إحداث تغييرات في إنتاج المواد الفعالة في الجذور الشعرية مما يؤدي إلى زيادة في إنتاجها.

مثال: في الجذور الشعرية لنبات الروبيا *Rubia peregrine* تم إدخال جين محفز لإنتاج أنزيم جديد غير موجود وهو *Isochorismate synthase* الذي أدى إلى إحداث تغييرات في آلية إنتاج مادة الأنتراكينون *Anthraquinone* مما زاد في معدل تراكمها في الجذور الشعرية. (Lodhi et al., 1996)

ب- تعمل الجينات المدخلة في النبات إلى تنشيط تكوين بعض الأنزيمات الموجودة مسبقاً في الجذور الشعرية إلى زيادة فاعلية إنتاج المواد الفعالة.

مثال: إدخال جين في الجذور الشعرية لنبات الداتورة *Datura metel* هذا الجين يعمل في اصطناع أنزيم في الجذور الشعرية وهو Putrescine N-methyl transferase (PMT) وهو بالأصل موجود في نبات الداتورة. يعمل هذا الأنزيم في تنشيط إنتاج مادة التروبان Tropan alkaloid ويزيد من تراكمها في الجذور الشعرية في الداتورة (Moyano et al., 2003).

12-7-1-4- العوامل المؤثرة في إنتاج المواد الفعالة:

تؤثر مجموعة كبيرة من العوامل في إنتاج المواد الفعالة في الجذور الشعرية، وقد تم التعرض إلى العديد من العوامل من خلال دراستنا للعوامل المؤثرة في نمو الجذور الشعرية وإكثارها، مثل الحرارة، الإضاءة، تركيب الأوساط المغذية، السلالة البكتيرية، طبيعة الأجزاء النباتية المستخدمة، طبيعة الوسط المغذي، الهرمونات النباتية، عمر النبات الأم... إلخ. كل هذه العوامل تؤثر في إنتاج المواد الفعالة ومدى تراكمها في الجذور الشعرية. يختلف تأثير العوامل المذكورة من نبات إلى نبات آخر. ولا يمكن التعميم في التأثير، لأنه أحياناً في نبات يكون أحد العوامل إيجابياً، ويكون تأثير نفس العامل سلبياً في نبات آخر.

فقد تمت دراسة إنتاج بعض المركبات الفعالة من خلال التحكم بالشروط الجوية وتركيب الأوساط المغذية. فقد أمكن الحصول على أعلى معدل من إنتاج مادة السولاسودين Solasodine بالجذور الشعرية لنبات نوع البنجورة *Solanum khasianum* بزراعة الجذور الشعرية في وسط مغذٍ يحوي 3% سكروز، 21% CO₂، وبالإضاءة بشدة 2000 lux بفترة ضوئية 14 h إضاءة + 10 h ظلام، وبدرجة حرارة 25°م (Jacob and Malpathak, 2004).

12-7-1-5- الإنتاج التجاري لبعض المواد الفعالة:

في السنوات الأخيرة، تم الانتقال من مستوى إنتاج بعض المركبات الثانوية الصيدلانية من المخبر إلى شركات تجارية كبيرة، تعمل على الإنتاج التجاري في المفاعلات الحيوية كبيرة الحجم.

يوجد العديد من الشركات التجارية التي تعمل في إنتاج بعض المواد الفعالة بوساطة تقانة الجذور الشعرية ومن هذه الشركات:

-شركة **Rhizoprot** : شركة فرنسية تعمل في إنتاج بعض المواد الفعالة ذات القيمة الاقتصادية مثل بعض أنواع البروتينات (GFP) ، الأنزيمات، الأمصال.

-شركة **Rootec** : شركة سويسرية يتم إنتاج العديد من المركبات الفعالة من أكثر من 20 نبات طبي، حيث تنتج بعض مضادات الأكسدة، الفلافونيدات، قلويدات، فيتامينات، ومضادات حيوية....إلخ.

12-7-2- إنتاج مواد فعالة جديدة:

تستطيع الجذور الشعرية بسبب التعديل الوراثي أن تنتج مواد فعالة جديدة، لا يمكن أن ينتجها النبات الأم الغير معدل وراثياً. يعزى السبب في اكتساب صفات جديدة بسبب المورثات الجديدة التي تم نقلها إلى النبات بفعل البكتريا *Agrobacterium rhizogene*. تتمكن الجذور الشعرية بفضل تغيرات تحدث على مستوى آليات إنتاج المواد الفعالة إلى التوصل إلى إنتاج مواد جديدة غير موجودة في النبات الطبي المزروع في الطبيعة. مثال: في نبات السكونولاريا *Scutellaria baicalensis* ، تم إنتاج نوع الغليكوزيدات المرتبطة مع الفلافونات، وهي مركبات جديدة غير موجودة في النبات الأم (Nishikawa & Ishimaru, 1997).

12-7-3- تغيير في الطبيعة الكيميائية للمركبات الثانوية:

تستطيع الجذور الشعرية بحكم التعديل الوراثي تغيير في آلية إنتاج المادة الفعالة وتؤدي إلى تغيير في تركيبها الكيميائي وكميتها في الجذور الشعرية، ففي نبات اللوتس يسبب التعديل الوراثي تغييراً في تكثيف التانينات وطبيعتها الكيميائية ونسبة تراكمها في الجذور الشعرية بالمقارنة مع النبات اللوتس الأم.

12-7-4- دراسة آلية عمل الجينات:

تسمح تقانة الجذور الشعرية بدراسة وظيفة الجينات، وكيفية التحليل الجزيئي للمورثات، كما تسمح بفهم عمل الجينات بعد التعديل الوراثي، كما تسمح بفهم دقيق لعمل المورثات أثناء التعديل الوراثي وكيف يعبر عن نفسه، مع إمكانية دراسة آليات الإنتاج البيوكيميائي للمواد الفعالة.

12-7-5- إنتاج بروتينات جديدة:

يعد إنتاج البروتينات العلاجية بواسطة الجذور الشعرية، على نطاق تجاري له أهمية اقتصادية كبيرة. حيث تم الحصول على عدة بروتينات جديدة لها أهمية في مجال استثمار النقاات الحيوية النباتية في علاج الأمراض أو في زيادة مقاومة النباتات لبعض الأمراض أو الفيروسات.

فقد تمكن العلماء من إنتاج بعض البروتينات مثل مولدات الضد Antibodies في الجذور الشعرية لنبات التبغ المعدل وراثياً. وقد تم الحصول على IgG monoclonal antibodis بشكل مستمر وقد تم دراسة عدة عوامل أدت إلى زيادة تراكم البروتين المذكور في الجذور الشعرية لنبات التبغ. (Wongsamuth and Doran, 1997) كما تم إنتاج بروتينات تعطي مقاومة لبعض الإصابات الفيروسية في الجذور الشعرية لنبات العنب. يعد نقل مورثة أو أكثر مسؤولة عن إنتاج بروتين فيروسي إلى نبات العنب يؤدي إلى تكوين جذور شعرية تعمل على تكوين بروتين خاص يعطي صفة المقاومة ضد فيروس معين، هذا يؤدي إلى الحصول على جذور شعرية تحمل صفة المقاومة للفيروس. ويمكن نقل صفة المقاومة إلى النبات الكامل في حال تمكنا من تجديد الجذور الشعرية والحصول منها على نباتات كاملة.

12-7-6- تجديد نباتات كاملة من الجذور الشعرية:

سجل تجديد نباتات كاملة بدءاً من الجذور الشعرية في العديد من النباتات مثل الـ *Catharanthus roseus*. يتم الحصول على نباتات كاملة بعدة طرائق للتجديد:

-تكوين البراعم مباشرة دون المرور بمرحلة الكالوس. Direct Organogenesis.

-تكوين البراعم بشكل غير مباشر، بعد تكوين الكالوس. Indirect Organogenesis.

-تكوين مباشر للأجنة الخضرية من الجذور الشعرية. Direct Embryogenesis.

-تكوين غير مباشر للأجنة الخضرية من الجذور الشعرية، بعد المرور بمرحلة الكالوس

Indirect Embryogenesis.

بشكل عام يتم الحصول على نباتات كاملة مستقلة وراثياً بدءاً من الجذور الشعرية. ولابد من توفير الشروط والأوساط المناسبة للحصول على عملية التجديد.

فقد تم الحصول على براعم جانبية ونباتات كاملة من نبات الكاترانثوس *Catharanthus roseus* من الجذور الشعرية عند زراعتها في وسط مغذٍ من الـ MS والمضاف له 31.1 ميكرومول من الـ BAP و 5.4 ميكرومول من الـ NAA ووصل معدل التجديد إلى أكثر من 80% (Choi *et al.*, 2004).

12-7-7- تعد طريقة من طرائق الإكثار الخصري الدقيق:

تعد تقانة زراعة الجذور الشعرية طريقة من طرائق الإكثار الخصري الدقيق في حال تم التجديد مباشرة دون المرور بمرحلة الكالوس، ففي هذه الحالة نحصل على نباتات مشابهة في تركيبها الوراثي للنبات الأم. ويمكن استثمارها في التكاثر الخصري بزراعة الأنسجة. كما يمكن تكوين الأجنة مباشرة من الجذور الشعرية والتي يمكن تطويرها فيما بعد لتكوين البذار الصناعي الذي يمكن استثماره في التكاثر الخصري الدقيق.

12-7-8- استخدام في مجال التحسين الوراثي:

تعد تقانة زراعة الجذور الشعرية طريقة فعالة في الحصول على نباتات معدلة وراثية وتحمل جينات جديدة، تجعل منها وسيلة فعالة في الحصول على نباتات تحمل صفات جديدة كمقاومة الأمراض والالتهابات البيئية. هذا ما يعطي لهذه التقانة لاستثمارها في مجال التحسين الوراثي للنباتات.

ونشير إلى أنه في الإكثار الخصري الدقيق لبعض الأشجار الخشبية، من الصعب الحصول على تجذير النباتات المزروعة داخل الأنابيب أو تكون نسبة تجذيرها منخفضة مما يحد من استعمال تقانة الإكثار بالنسج لبعض الأنواع. ففي هذه الحالة يمكن أن تلعب تقانة الجذور الشعرية دوراً مهماً في تحسين إكثار هذه الأنواع، لأنه لا يوجد بعض التجارب التي أدت تقانة الجذور الشعرية إلى تحسين تجذير العينات داخل الأنابيب مما أدى إلى تحسين تقانة الإكثار وأعطى فرصة لإمكانية استخدام الإكثار الدقيق في الإنتاج لهذه الأنواع صعبة

التجذير. وهذا تم الحصول عليه في إكثار بعض أشجار الفاكهة مثل الزيتون، الدراق، التفاح (McAfee *et al.*, 1993).

12-7-9- وسيلة لمكافحة التلوث Tool for phytoremediation :

تعد تقانة زراعة الجذور الشعرية وسيلة من وسائل مكافحة التلوث بالطبيعة. وهذا ما نطلق عليه استخدام النباتات في مكافحة التلوث. phytoremediation. ويتم في هذه الحالة استخدام الجذور الشعرية في تخليص الأوساط من المعادن الثقيلة عن طريق امتصاصها وتثبيتها داخل الجذور وتخليص الماء أو التربة من المعادن الثقيلة مثل الرصاص، الكاديوم.

كما يمكن التخلص من الملوثات عن طريق تحليل الملوثات في الطبيعة، وتحويلها بفعل النظام الأنزيمي الموجود بالنبات أو بالجذور الشعرية من الشكل السام وتحويلها إلى مركبات غير سامة، وقد استطاع بعض الباحثين من التخلص من بعض الملوثات الموجودة في البيئة مثل الـ DDT ، وبعض المضادات الحيوية، أو المبيدات العشبية عن طريق معاملتها مع الجذور الشعرية لبعض النباتات مثل نبات الشيكوري و Helianthus annuus والـ Brassica napus (Guillon *et al.*, 2006).

فقد تم التخلص من بعض المركبات الفينولية، والمركبات العضوية السامة والعطرية عن طريق زراعة الجذور الشعرية لهذا النبات Armoracia lapathifolia حيث تملك الجذور الشعرية لهذا النبات تراكيز عالية من بعض الأنزيمات مثل البيروكسيداز Peroxidases التي تعمل على تفكيك الفينولات والمواد العضوية العطرية إلى مواد غير سامة في فترة زمنية قصيرة، ولهذا يمكن القول أن زراعة الجذور الشعرية وسيلة فعالة في التخلص من الملوثات في الماء والبيئة والتربة.

12-7-10- إنتاج المواد الفعالة في المفاعلات الحيوية Bioreactor technology :

تعد النباتات بشكل عام مصدراً مهماً جداً للكثير من المواد الفعالة المستخدمة في الصناعة الدوائية والتجميلية، تمثل المواد الفعالة المنتجة من النبات مصدراً هاماً آخر وليس

لها أية آثار جانبية كونها طبيعية، بعكس المواد الفعالة المصنعة بالمصانع قد يكون لها آثار جانبية ضارة. لهذا يتجه العالم اليوم نحو استثمار النباتات بطرائق تقانات الحيوية المختلفة للحصول على المواد الفعالة من النباتات باستخدام المفاعلات الحيوية.

إن عملية نقل الأبحاث المثبتة من المخابر الصغيرة إلى المصانع الكبيرة تتطلب تطوير تقانات أخرى غير التقانات التي يتم الحصول منها على المواد الفعالة مثل تقانات المفاعلات الحيوية، وهي عبارة عن أجهزة بأبعاد مختلفة من لتر إلى أكثر من 1000 لتر. يتم بواسطتها التحكم بالأوساط المغذية ومكوناتها والشروط الضرورية المناسبة لنمو العينات النباتية (خلايا نباتية، كالوس، نموات خضرية، جذور شعرية) ليصار إلى اصطناع المواد الفعالة ونمو وإكثار العينات النباتية لفترة زمنية طويلة نسبياً.

ويعد تطوير المفاعلات الحيوية المناسبة والملائمة لكل تقانة من تقانات إنتاج المواد الفعالة وتأمين الشروط المناسبة عامل هام وأساسي في نجاح استثمار التقانات على النطاق التجاري، مثل إنتاج المواد الفعالة على نطاق كبير بدءاً من زراعة الجذور الشعرية

يهدف المفاعل الحيوي الخاص بالجذور الشعرية إلى تأمين الشروط المناسبة (حرارة، إضاءة، أوساط مغذية... إلخ) لفترة زمنية طويلة بحيث يسمح الحصول على أكبر كمية ممكنة من نمو الجذور الشعرية وإكثارها، مع المحافظة على حيويتها. وفي الوقت نفسه من أجل الحصول على أكبر كمية ممكنة من إنتاج المواد الفعالة ولفترة زمنية طويلة نسبياً.

ففي تجربة أجريت على نبات السالفيا *Salvia officinalis*، تمت زراعة الجذور الشعرية في مفاعل حيوي مناسب وتم مقارنة إنتاج المادة الفعالة *rosmarinic acid* مع نموات مكاثرة خضرياً ومزروعة أيضاً في مفاعل حيوي. تبين أن الجذور الشعرية بعد حوالي 40 يوماً أنتجت المادة الفعالة روزمارينيك أسيد بنسبة عالية بلغت 18 ضعف النسبة التي تم إنتاجها بفعل النموات الخضرية خلال نفس الفترة. (Grezegorczyk et al., 2010)



الفصل الثالث عشر

التعديل الوراثي في النبات

1-13- مقدمة Introduction:

يستفيد الإنسان ويتعلم من الطبيعة تطوير آليات محددة في كافة مجالات علوم الحياة، وقد لاحظ العلماء إصابة النباتات بالطبيعة بمرض التدرن السرطاني الذي يصيب الشتول أيضاً في المشتل، استطاع الباحثون تحديد المسبب وأعراض المرض وآلية انتقال الإصابة، يعد مرض التدرن التاجي أحد الأمراض البكتيرية التي تسبب ظهور تدرنات سرطانية في ساق ومنطقة تاج الغراس، وتمت دراسة البكتريا المسببة للمرض وهي نوع من بكتريا التربة السالبة وتدعى الأغروباكتريوم تومافيسينس *Agrobacterium tumefaciens*. تحوي هذه البكتريا بلاسميد يحمل مورثات اصطناع الهرمونات النباتية. تهاجم البكتريا الخلايا والأنسجة النباتية المعرضة للجروح ويدخل إلى داخل الأنسجة وينقل البلاسميد من البكتريا ويتحد مع جينوم الخلايا النباتية ويسخرها لإنتاج الهرمونات النباتية بشكل زائد مما يؤدي إلى تسريع الانقسام الخلوي وتنشيطه مما يشكل تدرنات أو أورام سرطانية في النبات بفعل الإصابة. وهذا نوع من التعديل الوراثي الطبيعي.

أخذ العلماء بهذه الأفكار من الطبيعة ثم قاموا بتطويرها لنقل مورثات أخرى يمكن إضافتها إلى بلاسميد الأغروباكتريوم وأصبحت هذه التقنية إحدى الطرائق الأساسية في التحوير الوراثي ونقل المورثات والحصول على نباتات معدلة وراثياً.

13-2- تعريف التعديل الوراثي:

وهو عبارة عن نقل مورثة أو أكثر من نبات أو كائن حي إلى نبات أو كائن حي آخر بإحدى طرائق الهندسة الوراثية حتى يتم الحصول على نباتات محورة وراثياً، تحمل صفات جديدة ناتجة عن التعبير الجيني للمورثات الجديدة التي نقلت إلى النبات.

13-3- أهداف التعديل الوراثي:

يهدف التعديل الوراثي في النبات بشكل عام إلى تحسين النبات، وزيادة مقاومته للأمراض والحشرات والإجهادات اللاحيوية وتحسين نوعية المنتج.

ويمكن إيجاد الأهداف بما يلي:

- أ- الحصول على نباتات معدلة وراثياً تحمل صفة المقاومة للأمراض والحشرات.
- ب- الحصول على نباتات تحمل صفات جديدة تعطي النبات صفات تحمل للإجهادات اللاحيوية مثل الجفاف، الصقيع، درجات الحرارة العالية، الملوحة... إلخ.
- ج- الحصول على نباتات معدلة وراثياً تحمل صفات مقاومة الأمراض الفيروسية.
- د- يفيد التعديل الوراثي في التحسين الوراثي للنباتات من الناحية الكمية والنوعية مثل زيادة صفة الإنتاجية، تحسين نوعية المنتج مثل زيادة القدرة التخزينية، تحسين طعم الثمار، زيادة محتواها من العناصر المغذية والفيتامينات... إلخ.
- هـ- زيادة إنتاجية المواد الفعالة في النباتات الطبية والعطرية.
- و- تحسين نوعية الزيت وكميته في النباتات الزيتية مثل الزيتون يمكن أن يكون أحد أهداف التعديل الوراثي زيادة نسبة الزيت في الثمار، وزيادة نوعية الزيت المنتج. كما يمكن أن يكون الهدف الحصول على نباتات مقاومة لبعض الأمراض مثل مرض التدهور السريع البكتيري في الزيتون Quick decline الذي تسببه بكتريا *Xyllela fastidiosa* (لايوجد دراسات لحد الآن في هذا المجال).
- ز- الحصول على نباتات متحملة لنقص العناصر المعدنية مثل نقص الحديد أو الزنك.
- ل- الحصول على نباتات معدلة وراثياً تحمل صفة الإلقاح الذاتي (الخصوبة الذاتية).
- ح- الحصول على نباتات معدلة وراثياً تحمل صفة إنتاج الأصبغة الأنثوسيانية، أو إنتاج بعض البروتينات النوعية الخاصة.
- ط- الحصول على نباتات معدلة وراثياً تحمل صفة إنتاج الكاروتينات، مثال على ذلك الرز الذهبي.
- وفي الختام لا بد من القول بأن أهداف التعديل الوراثي كثيرة ومتشعبة جداً، وتختلف بشكل كبير من نوع نباتي إلى نوع نباتي آخر، حسب الهدف من زراعة النبات، مثال في نباتات الزينة، يتم الاهتمام بزيادة المحصول الزهري، وكبر حجم الأزهار، وتحسين نوعية الأزهار من حيث اللون والشكل والرائحة، وفترة الإزهار وعدد مرات الإزهار في السنة، وفترة بقاء الزهرة وزيادة قدرتها التخزينية..... إلخ.

13-4-أنواع المحاصيل المعدلة وراثياً:

تقسم المحاصيل المعدلة وراثياً إلى ثلاثة أقسام:

أ-المحاصيل التي يتم إدخال صفات جديدة عليها، مثل المقاومة للمبيدات العشبية، ومقاومة أفضل للحشرات والأمراض بأنواعها المختلفة (الفطرية، البكتيرية والفيروسية)، وتحمل صفات المقاومة للإجهادات اللاحيوية (جفاف، ملوحة، صقيع...إلخ).

ب-المحاصيل التي تتم إضافة قيمة غذائية إضافية عليها مثل زيادة القيمة الغذائية للمحاصيل المستخدمة في تغذية الحيوان مثل زيادة نسبة البروتين، نسبة الفيتامينات....إلخ.

ج-المحاصيل المستخدمة في الناحية الطبية والدوائية، مثل زيادة نسبة المادة الفعالة أو إنتاج محاصيل تحوي فائدة دوائية (Fernandez and Caswell, 2006).

ومن أهم الأمثلة للمنتجات الزراعية المعدلة وراثياً:

- إنتاج صنف من البطاطا ذو نسبة عالية من النشاء.
- إنتاج أصناف من القطن مقاومة للحشرات ومبيدات الأعشاب.
- إنتاج أصناف من الذرة لها القدرة على مقاومة الحشرات، ومنها القادر على النمو في بيئات فقيرة وجافة.
- إنتاج زيوت آمنة على الصحة مستخلصة من فول الصويا والكانبولا.
- إنتاج صنف من الأرز الغني بالحديد وفيتامين A.
- إنتاج صنف من الذرة يحتوي على نسبة عالية من حمض الأوليك وهو من الأحماض الدهنية المفيدة الأحادية غير المشبعة.

13-5-مزايا النباتات المعدلة وراثياً:

تعد تقانات التعديل الوراثي من التقانات المهمة التي تؤثر في تحسين إنتاجية المحاصيل الزراعية، والطبية، والغذائية من الناحية الكمية والنوعية.

ويمكن إيجاز مزايا النباتات المعدلة وراثياً بالآتي:

- 1- زيادة مردود المحاصيل الزراعية.

2- خفض التكاليف الزراعية، عن طريق التخفيف من استعمال المبيدات الحشرية والفطرية ومبيدات الأعشاب، مع المحافظة بشكل أفضل على البيئة.

3- زيادة أرباح المزارعين.

4- الحصول على محاصيل أكثر تحملاً للظروف البيئية، وبالتالي تسمح بزراعة هذه المحاصيل المعدلة في مناطق جديدة، مما يزيد من المساحة القابلة للزراعة وزيادة العائد الاقتصادي.

5- تحسين الظروف الصحية والبيئية والقدرة على التحكم في ظروف الإنتاج.

6- إطالة فترة حفظ المنتج الزراعي وحفظ الأغذية بحالة جيدة.

7- رفع القيمة الغذائية للطعام.

8- الحصول على منتجات ذات نوعية جديدة، بسبب التحوير الوراثي.

9- إمكانية استخدام بعض المحاصيل المعدلة وراثياً كدواء لعلاج بعض الأمراض التي تصيب الإنسان.

10- زيادة إمكانية شحن المحاصيل الزراعية إلى أماكن بعيدة مع تخفيض نسبة التلف منها، بسبب تحسين نوعيتها وزيادة قدرتها على التخزين.

13-6- سلبيات النباتات المعدلة وراثياً ومخاطرها:

لاحظنا وجود فوائد كثيرة للتعديل الوراثي في زيادة الإنتاجية، وتحسين نوعية الأغذية والمحاصيل بالمقارنة مع هذه الفوائد الكثيرة التي ذكرت سابقاً لاحظ العديد من الباحثين تأثر صحة الإنسان والبيئة والتنوع الحيوي النباتي بخلل ومخاوف من النباتات المعدلة وراثياً التي يمكن إيجازها بالآتي:

1- من الممكن أن تسبب بعض النباتات المعدلة وراثياً بعض المشاكل الصحية للإنسان مثل التحسس أو بعض الاضطرابات العصبية لدى بعض الأشخاص.

2- من الممكن للنباتات المعدلة وراثياً أن تحدث خللاً في البيئة نتيجة انتقال المورثات الجديدة إلى الكائنات الحية الموجودة في الطبيعة، مثل:

آ- نقل مورثة مقاومة الأعشاب إلى المحاصيل تزيد في مقاومتها للأعشاب، ولا تحتاج إلى استخدام مبيدات الأعشاب، لكن انتقال المناعة إلى الأعشاب نفسها يجعل من الصعب مكافحتها وتصبح لا تتأثر بالمبيدات العشبية.

ب- نقل مورثات مقاومة الأمراض والحشرات إلى النباتات مثل الذرة والبطاطا والقطن أتاح للنباتات المعدلة وراثياً من إنتاج مادة سامة تقاوم الحشرات الضارة، وبالتالي تكتسب مناعة ضد الحشرات، ويمكن أن تنتقل المناعة إلى الحشرات نفسها.

ج- إمكانية حدوث تلقيح بين النباتات المعدلة وراثياً مع النباتات البرية، مما يؤدي إلى انتقال المورثات الجديدة إلى الحياة البرية، وقد يحدث خللاً في التنوع الحيوي النباتي ويحدث تلوثاً وراثياً.

د- تحدث خللاً في التوازن البيئي بسبب التهجين مع النباتات البرية، مما يؤدي إلى نشوء أنواع جديدة من النباتات مما يحدث خلل في التوازن الطبيعي وتلوث الطبيعة البرية.

3- من مخاطر النباتات المعدلة وراثياً أنها يمكن أن تستخدم كسلاح اقتصادي ضد شعوب العالم الثالث عن طريق احتكارها من الشركات العالمية للبلدان المتطورة، مثل شركات إنتاج البذار أو شركات التقنية الحيوية التي تنتج المواد الضرورية اللازمة للتعديل الوراثي، أو الشركات التي تهتم بالبنوك الوراثية للجينات، أو الشركات المنتجة للمواد الفعالة والبروتينات والأنزيمات، هذه الشركات يمكن أن تقوم باستخدام التقنية كسلاح ضد الدول تباع لبعض الدول، وتحرم دول أخرى وذلك حسب مصالحها الاستراتيجية.

4- يمكن أن يحدث خلل في النباتات المعدلة وراثياً من حيث نموها وتطورها أو خلل في إنتاج البروتينات النباتية المتعددة، مما يؤدي إلى حدوث اضطرابات فزيولوجية في النباتات المعدلة وراثياً.

5- من الممكن أن تظهر أمراض جديدة، وحشرات جديدة، وأعشاب جديدة بسبب تلوث البيئة بمورثات جديدة لم تكن قبل موجودة.

6- لابد من أخذ الحيطة والحذر وخاصة بالنسبة للأغذية المعدلة وراثياً، لأنه لا يعرف مدى تأثيرها التراكمي على صحة الإنسان والحيوان، ولهذا لابد من دراسة آثارها الجانبية لفترة زمنية طويلة قبل السماح بإنتاجها تجارياً على المدى الواسع. وهنا لابد أن نتكلم قليلاً عن الأمان الحيوي للنباتات المعدلة وراثياً بعد أن تعرفنا على منافعها و مضارها:

تعريف الأمان الحيوي:

مصطلح يستخدم للإشارة إلى السياسات والإجراءات المعتمدة لضمان الاستخدام الآمن لتطبيقات التقنية الحيوية المعاصرة، ومنع أو الإقلال من المخاطر المحتملة والمرتبة عن التقانات الحيوية ومنتجاتها وذلك عن طريق المراقبة المخبرية الجيدة، واتباع القواعد السليمة في إنتاج النباتات المعدلة وراثياً، والتحقق من عدم وجود آثار جانبية لها على سلامة الإنسان والبيئة مع التطبيق الصارم لقوانين السلامة الأحيائية.

بروتوكول قرطاجنة: (حول السلامة الأحيائية التابع للاتفاقية الدولية المتعلقة بالتنوع البيولوجي): وهذا البروتوكول هو اتفاقية بيئية دولية تهدف إلى حماية التنوع الحيوي، من الأخطار المحتملة من الكائنات الحية المحورة وراثياً والناجمة عن التقانات الحيوية المختلفة، يركز البروتوكول على وضع القواعد والشروط والقوانين والوسائل الإعلامية المتقدمة والتي تسمح بنقل الكائنات المحورة وراثياً بين الدول مع المحافظة على استدامة التنوع الحيوي وحفظه، كما يؤسس البروتوكول غرفة لتبادل معلومات السلامة الحيوية من أجل تسهيل تبادل المعلومات والخبرات حول الكائنات الحية المحورة ولمساعدة الدول في تنفيذ البروتوكول (برنامج الأمم المتحدة للبيئة، 2006).

13-7- كيف يتم الحصول على نباتات معدلة وراثياً:

يتم الحصول على نباتات معدلة وراثياً وفق الخطوات الآتية:

21-7-1- دراسة المصادر الوراثية وتحديد المورثات المهمة: تعد الدراسات الوراثية من أهم النقاط الأساسية في برنامج التعديل الوراثي. لا يمكن العمل في مجال التحويل الوراثي

بدون معرفة مسبقاً بالمورثات التي سيتم نقلها من كائن حي إلى النبات أو من نبات إلى نبات، لذلك يتم أولاً:

- تحديد المورثات المهمة في برنامج التحسين الوراثي للنوع المدروس.
 - تحديد مورثات المقاومة مثل مورثة Vf المقاومة لجرب التفاح.
 - رسم خرائط وراثية، وتحليل الموقع الوراثي للجينات.
 - تحديد تركيب المورثة وتحديد التسلسل النيكليوتيدي للمورثات.
 - تحديد الواسمات الجزيئية للمورثات المهمة.
 - عمل قواعد وبيانات وراثية.
 - عمل بنك وراثي للجينات، ويمكن الاستفادة مباشرة من مورثات محددة موجودة في البنك الوراثي يمكن طلبها واستخدامها مباشرة في التعديل الوراثي.
- حالياً في أغلب بلدان العالم يتم الحصول على المورثات المطلوبة مباشرة من البنوك الوراثية العالمية المنتشرة في الدول المتقدمة، حيث يتم شراءها وجهازها للتطبيق المباشر دون الحاجة إلى البحث وتنفيذ الدراسات التي ذكرت في الأعلى.

12-7-2-نقل المورثة أو المورثات إلى النباتات المراد تحويله:

يتم نقل المورثات المرغوبة إلى الأجزاء النباتية لغرض التعديل الوراثي بواسطة عدة تقانات من الهندسة الوراثية وهي:

12-7-2-1-زراعة البروتوبلاست:

تعد تقانة عزل البروتوبلاست وزرعها إحدى تقانات الهندسة الوراثية بحيث تسمح كونها خالية من الجدار البكتوسلوزي الخلوي من إدخال المورثات، والبلاسميدات، أو أجزاء من الـ DNA أو الـ RNA أو الفيروسات التي تحمل المورثات المطلوبة، إذ يتم انتقالها إلى داخل البروتوبلاست وتندمج مع جينوم الخلايا النباتية ويتم الحصول على بروتوبلاست معدلة وراثياً. ولابد من تطويرها وتجديدها للحصول على نباتات كاملة معدلة وراثياً كما هو موضح بالشكل (1-13).

تتوقف فعالية التعديل الوراثي في البروتوبلاست على مجموعة من العوامل الأساسية وهي:

أ- تقانة التعديل الوراثي المتبعة، تركيز البروتوبلاست، وتركيز البلاسميدات، أو الـ DNA الحاملة للمورثة المراد إدخالها، مصدر البروتوبلاست، المعاملات الأولية المختلفة، النوع النباتي، مكونات الوسط المغذي....إلخ.

ب- تقانة الكشف عن البروتوبلاست المعدلة وراثياً بإحدى تقانات الكشف التي سيتم تفصيلها لاحقاً.

ت- قدرة الخلايا البروتوبلاست المحورة على التجديد وتكوين نباتات كاملة وهنا لابد من دراسة كثير من العوامل التي تؤثر في التجديد والتكوين المباشر للنباتات أو غير المباشر، وهذه العوامل سبق وأن تم التطرق إليها في الفصول السابقة، كزراعة البروتوبلاست أو إنتاج نباتات متباينة وراثياً.

13-7-2-2- التعديل الوراثي بواسطة الأغروباكتريوم:

تعد تقانة التعديل الوراثي بالبكتريا طريقة غير مباشرة من تقانات الهندسة الوراثية المطبقة في الحصول على نباتات محورة وراثياً. يتم تحميل المورثات المراد نقلها على البلاسميد الذي يحمل بدوره على بلاسميد البكتريا A.t، عند دمج الأغروباكتريوم *Agrobacterium tumefaciens* مع الأجزاء النباتية تهاجم البكتريا الخلايا النباتية وينتقل البلاسميد T. DNA الحامل للمورثة الجديدة وتندمج مع جينوم الخلايا النباتية ويتم الحصول على خلايا معدلة وراثياً والتي تتطور وتعطينا نباتات معدلة وراثياً كما هو موضح في الشكل (1-13).

-مثال عن التعديل الوراثي بالأغروباكتريوم في التفاح:

تم استخدام أجزاء ورقية لنموات خضرية مكاثرة بالأنسجة، استعملت سلالة EHA1015 من البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* التي تحمل مورثة g2PS1 التي تعطي صفة المقاومة للأمراض الفطرية، حملت المورثة على بلاسميد (PGreen II 355-g2ps1) الذي أدخل إلى سلالة البكتريا المستعملة (EHA1015) وزرعت البكتريا بشكل مشترك مع الأوراق النباتية مما أدى إلى انتقال المورثة إلى الخلايا النباتية وتم الحصول على أجزاء ورقية معدلة وراثياً. وقد تم الكشف عن الأجزاء النباتية المعدلة وراثياً باستخدام مورثة bar المحملة على البلاسميد، تعطي هذه المورثة أنزيم فوسفوتيريسين PPT الذي يبطل مفعول

المبيد العشبي Basta. مما يبطل التأثير السام للمبيد العشبي على الأجزاء المعدلة وراثياً وتبقى على قيد الحياة. بينما الأنسجة غير المعدلة تموت بسبب التأثير السام للمبيد العشبي.

وتم التعديل الوراثي باتباع الخطوات الآتية:

1- تم إكثار التفاح بزرعة النسج في وسط مغذٍ MS والمضاف له BAP 1مغ/ل، و أعيدت عملية الإكثار مرة كل 4 أسابيع ضمن شروط معقمة.

2- أخذت الأوراق المتكونة على النموات الخضرية للتفاح صنف كولدن، من طور الإكثار، وقطعت إلى قطع صغيرة وجرحت بالشفرة.

3- لقحت مع البكتريا Agr. T الذي يحمل البلاسميد لمدة 1/2 ساعة.

4- نقلت وزرعت الأوراق بشكل مشترك مع المعلق البكتيري الذي يحمل المورثة g2ps1 التي تعطي صفة المقاومة للأمراض الفطرية لمدة يومين أو ثلاثة.

5- نقلت الأجزاء الورقية إلى وسط يحوي مضاد حيوي للتخلص من البكتريا. هنا أضيف مزيج من المضادات الحيوية 150مغ من الـ Tecarcillin + 250مغ/ل من الـ Cefotaxime للتخلص من البكتريا.

6- تنقل الأجزاء الورقية إلى أوساط تجديد وانتخاب تحوي MS+TDD+PPT 3مغ/ل (كعامل انتخاب).

ووضعت العينات بالظلام لمدة ثلاثة أسابيع بدرجة 25م. ثم بعدها تنقل إلى الإضاءة لتكوين نموات خضرية، وهنا لابد من الإشارة إلى أن العينات النباتية المحورة تبقى على قيد الحياة، في حين تموت العينات غير المحورة بفعل التأثير السام للمبيد العشبي بسبب عدم احتوائها على PPT. كما يتم التأكد من العينات الحية المحورة وراثياً بالكشف الجزيئي بالـ PCR.

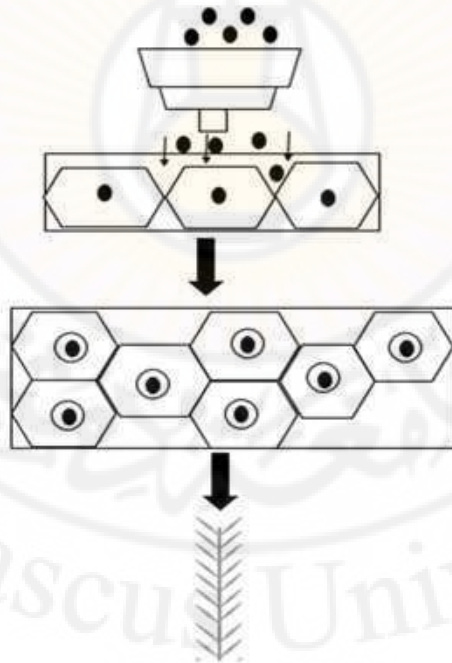
7- يتم إكثار النموات الخضرية المعدلة وراثياً كمرحلة أولى، ثم تنقل إلى وسط مغذٍ مناسب للتجذير للحصول على نباتات كاملة معدلة وراثياً.

8- يتم التحقق من الثبات الوراثي للنباتات ومدى مقاومتها لجرب التفاح.

13-7-2-3- قذف المورثات المباشر بالمدفع الجيني Biolistic Gun Method:

يتم إدخال المورثات إلى الخلايا النباتية مباشرة. ففي هذه الطريقة يتم ربط المورثات أو الـ DNA إلى جسيمات صغيرة جداً من الذهب أو جزيئات التنجستين والتي يتم إطلاقها أو قذفها تحت الضغط العالي إلى داخل خلايا الأنسجة النباتية. تخترق الجسيمات الحاملة للمورثات جدار والغشاء الخلوي، ثم تتفصل المورثات عن جسيمات الذهب وتندمج مع جينوم الخلايا داخل النواة (الشكل 13-2).

تم تطبيق هذه التقنية في العديد من المحاصيل الزراعية وخاصة نباتات وحيدة الفلقة كالقمح والذرة. تستخدم تقنية المدفع الجيني في نباتات وحيدة الفلقة لأن استخدام البكتيريا في التعديل الوراثي ينجح بشكل كبير في نباتات ثنائية الفلقة، ونسبة نجاحه في النباتات وحيدة الفلقة قليلة، لهذا يتم التركيز على استخدام المدفع الجيني.



شكل (13-2): التعديل الوراثي باستخدام المدفع الجيني

13-7-2-4-الحقن الدقيق المباشر بواسطة إبر دقيقة جداً:

يتم إدخال المورثات مباشرة إلى داخل الخلايا النباتية بواسطة إبر دقيقة جداً 0.1-0.5 ميكرون. ويتم الحصول على النباتات المعدلة وراثياً بعد اندماج المورثات المحقونة مع جينوم الخلايا وبدء انقسامها.

يتم التحقق من الخلايا المعدلة وراثياً بإحدى اختبارات الجينات الكاشفة، ويتم تجديد الأنسجة المعدلة وراثياً للحصول على نباتات محورة كاملة.

13-7-2-5-إدخال المورثات بالصدمة الكهربائية Electroporation Method:

يتم عمل صدمة كهربائية للخلايا النباتية أو البروتوبلاست، مما يؤدي إلى فتح ثغرات مؤقتة في الغشاء السيتوبلازمي مما يسهل دخول المورثات أو الـ DNA أو البلاسميد إلى داخل الخلايا أو البروتوبلاست واندماجها مع جينوم الخلايا ويحصل التعديل أو التحوير الوراثي.

13-7-2-6-الطريقة الكيميائية بالبولي إيثيلين غليكول PEG Method:

يعمل مركب البولي إيثيلين غليكول على تجميع المورثات أو الـ DNA أو البلاسميدات الحاملة للمورثات على سطح الخلايا النباتية أو أسطح خلايا البروتوبلاست مما يساعد في اندماجها مع بعضها البعض مما يؤدي إلى دخول المورثات أو البلاسميد إلى داخل الخلايا النباتية، ويحدث الاندماج ويتم الحصول على خلايا معدلة وراثياً وعند تجديدها يتم الحصول على نباتات محورة وراثياً. ولابد من التذكير بأن هذا المركب PEG تم استخدامه مسبقاً في دمج البروتوبلاست.

13-7-2-7-تطبيق الطريقة الكيميائية مع الصدمة الكهربائية بشكل مشترك:

استخدمت هذه الطريقة بنجاح في عدة محاصيل زراعية فقد أضيف مركب الـ PEG مع إحداث صدمة كهربائية. حيث يعمل الـ PEG على تجميع المورثات على أسطح البروتوبلاست، والصدمة الكهربائية تحدث فتحات في الغشاء السيتوبلازمي مما أدى إلى زيادة مسامية الأغشية الخلوية في البروتوبلاست مما سهل دخول المورثات أو البلاسميد إلى داخل الخلايا النباتية واندماجها مع جينوم الخلية والحصول على خلايا أو بروتوبلاست معدلة وراثياً. وإذا تطورت وتجددت وأعطت نباتات كاملة تكون محورة وراثياً، يمكن الكشف

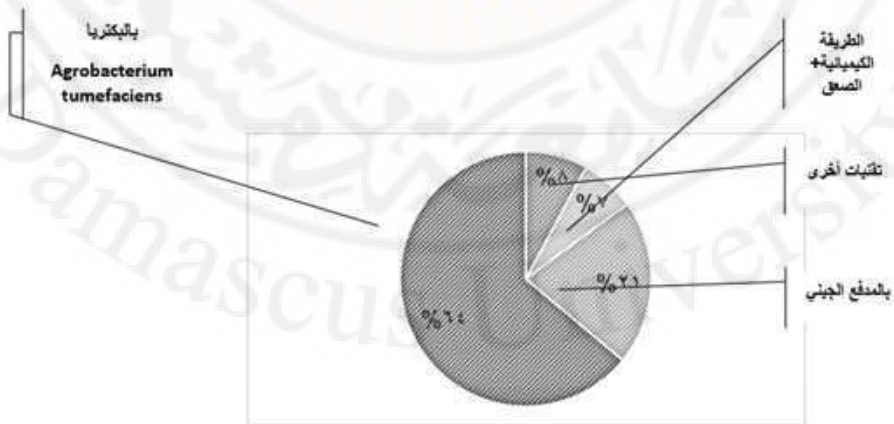
عنها وتقييمها بالبيوت الزجاجية. وقد تم استخدام هذه التقنية في بروتوبلاست نبات الرز، وقد تم الحصول على نباتات كاملة محورة وراثياً.

13-7-2-8-التعديل باستخدام جسيمات ليبيدية حاملة للبلاسميد Lipofection :Method

يتم تحميل البلاسميدات على جسيمات الليزوزوم، وهي جسيمات ليبيدية، يتم دمج الجسيمات الليبيدية الحاملة للبلاسميد مع الخلايا النباتية أو البروتوبلاست، وتخترق الجسيمات الغشاء الخلوي عن طريق اندماجها مع الغشاء الخلوي ويتم تحرير البلاسميدات داخل الخلية وتندمج مع جينوم الخلايا ويحدث التعديل الوراثي.

13-7-9-التعديل الوراثي باستخدام الأمواج فوق الصوتية Ultrasound Method

تعمل الأمواج فوق الصوتية عند معالجة الخلايا النباتية على زيادة مطاطية الجدر الخلوية مما يزيد من فرص دخول البلاسميدات إلى داخل الخلايا. ولابد من الذكر أخيراً حول نسبة استخدام تقانات التعديل الوراثي عالمياً. تعد تقنية البكتريا غير المباشرة أكثر التقانات استخداماً إذ تصل نسبتها إلى 64% من نسب التعديل الوراثي المنفذة عالمياً، تليها تقنية المدفع الجيني بنسبة 21%. ويوضح الشكل (13-3) نسب استخدام التقانات المختلفة في التعديل الوراثي المطبقة على مستوى العالم.



شكل (13-3): نسب الأعمال الخاصة بالتعديل الوراثي

12-7-3-طرائق الكشف عن التعديل الوراثي:

بعد نقل المورثات إلى النبات بإحدى طرائق الهندسة الوراثية، لابد من التمييز بين الأنسجة النباتية المحورة وراثياً من الأنسجة والخلايا غير المحورة. ويتم ذلك على مستوى الخلايا النباتية أو البروتوبلاست أو الكالوس أو الأنسجة الورقية. يتم الكشف بعد أسبوعين من التعديل الوراثي بإحدى التقانات الآتية:

- 1- تزويد البلاسميد المدخل إلى الخلايا النباتية بمورثة مقاومة لبعض المضادات الحيوية مثل الكنامايسين والهيجرومايسين كمورثات انتخاب، ففي هذه الحالة تنقل الخلايا أو الأنسجة النباتية إلى وسط يحوي الكنامايسين مثلاً، 25-100مغ/ل لفترة من الزمن فالخلايا المحورة تحمل صفة المقاومة تبقى على قيد الحياة بينما الخلايا غير المحورة تموت لأنها لا تحمل الجين المقاوم للمضاد الحيوي.
- 2- تزويد البلاسميد المدخل بمورثة مقاومة لمبيد عشبي الـPPT، وقد تم شرح آلية عملها في الانتخاب في مثال التحويل الوراثي بالأغروباكتريوم في التفاح مسبقاً.
- 3- تزويد البلاسميد المدخل إلى الخلايا بمورثة مولدة للبروتين (GFP) Green Fluorescent Protein. ويتم الكشف عن مدى وجود البروتين عن طريق تعريض الخلايا أو الأنسجة المحورة إلى الأشعة، وتتلون الخلايا النباتية المحورة باللون الأخضر في حين تبقى الأنسجة غير المحورة بيضاء اللون كما هو موضح بالشكل (7-8).
- 4- تزويد البلاسميد المدخل بمورثة Gus التي تعمل على تنشيط أنزيم - β glucuronidase. وهذا الأنزيم يمكن الكشف عنه باختبار Gus-assay أو تشريحاً أو بطرائق البيولوجيا الجزيئية.
- 5- تزويد البلاسميد المدخل ببعض المورثات الأخرى المستخدمة في الكشف الإيجابي عن الخلايا المحورة وراثياً مثل مورثة (Pmi) فوسفومانوز إيزوميراز Phosphomannase Isomerase. أو مورثات أخرى تستطيع بطرائق مختلفة التمييز بين الخلايا المحورة وراثياً عن الخلايا غير المعدلة.

يطلق على الطرائق التي تقضي بموت الخلايا غير المحورة بالطرائق السلبية، كما يطلق على الطرائق التي تحافظ على حياة الخلايا بالطرائق الإيجابية.

12-7-4- تجديد الأنسجة النباتية المحورة Regeneration system:

لا يمكن القول بأنه تم الحصول على نجاح كامل في التعديل الوراثي دون وضع ثقافة تجديد بهدف الحصول على نباتات كاملة معدلة وراثياً بدءاً من الخلايا النباتية المعدلة، وهذا ما نطلق عليه نظام التجديد Regeneration system.

توجد أربع طرق لتطوير التجديد كما هو موضح بالشكل (4-13):



شكل (4-13): أشكال التجديد

وقد تمت دراسة هذه التقانات ومزاياها، والعوامل المؤثرة في التجديد بشكل مفصل في فصل سابق.

12-7-5-تقييم النباتات المعدلة وراثياً:

تتقل النباتات المعدلة وراثياً بعد تجديدها داخل الأنابيب إلى بيت زجاجي محكم العزل بهدف تقييمها ومعرفة مدى تحملها للصفة المرغوبة وماهي درجة التحمل؟ هل توجد تباينات وراثية مع النبات الأم؟ وهل حافظت النباتات المعدلة وراثياً على صفات النبات الأم+ الصفة الجديدة الناتجة عن نقل المورثة؟ هل أدت عملية النقل المورثي إلى ظهور صفات غير مرغوبة؟ هل تشبه الثمار الناتجة عن النبات المعدل وراثياً في صفاتها ونوعيتها صفات ثمار النبات الأم غير المعدل وراثياً.

كما لابد من أخذ كافة الاحتياطات حتى لا تتطلق حبوب الطلع من النباتات المعدلة وراثياً إلى خارج البيت الزجاجي حتى لا يتم تلوث البيئة وراثياً، هنا تجدر الإشارة بتطبيق قواعد الأمان الحيوي بشكل صارم.

12-8-العوامل المؤثرة في التعديل الوراثي Factors affecting plant Transformation :

يجب تحقيق هدفين أساسيين لنجاح التعديل الوراثي في النبات:

أولاً- نقل المورثات من نبات إلى آخر، أي تطبيق تقانة المناسبة لنقل المورثة أو المورثات من كائن حي إلى النبات. وهذا الأمر بغاية الأهمية للحصول على خلايا أو أنسجة معدلة وراثياً. تؤثر مجموعة كبيرة من العوامل لتحقيق هذا الهدف وأهمها:

1- استخدام تقانة النقل المناسبة من تقانات الهندسة الوراثية، مثلاً بالنسبة للنباتات وحيدة الفلقة، يفضل استخدام تقانة المدفع الجيني Bioleptic Method كما هو الحال في القمح والذرة. أما بالنسبة للنباتات ثنائية الفلقة يفضل استخدام تقانة النقل المورثي بالأغروباكتريوم *Agrobacterium tumefaciens*.

2- استخدام الأجزاء النباتية المناسبة: خلايا، بروتوبلاست، كالوس، أوراق، فلفات، قمم نامية... إلخ. يختلف الجزء النباتي المناسب بحسب الأنواع النباتية. كما يؤثر عمر النبات الأم وموعد زراعة الأجزاء النباتية... إلخ.

3- استخدام سلالة الأغروباكتريوم المناسبة: لابد من اختيار السلالة المناسبة من البكتريا التي تحقق أعلى نسبة من التعديل الوراثي، كما لابد من تحديد التركيز الأنسب من البكتريا (حسب الكثافة البكتيرية OD) والفترة الزمنية للزراعة المشتركة بين الأجزاء النباتية والبكتريا.

4- الوسط المغذي ومكوناته: تلعب دوراً في نسبة التعديل الوراثي، مثل تركيب الوسط المغذي من الأملاح المعدنية، تركيز السكر، طبيعة الوسط المغذي، محتوى الوسط المغذي من الهرمونات النباتية وتوازنها ونوعيتها، PH الوسط، نوع المضادات الحيوية المضافة إلى الوسط المغذي لقتل خلايا البكتريا المستخدمة في التعديل الوراثي.

5- الشروط الجوية المستخدمة في تحقيق التعديل الوراثي مثل الحرارة، الإضاءة (شدتها ونوعيتها)... إلخ كلها تؤثر في نسبة التعديل الوراثي.

ونشير إلى عدم وجود عوامل ثابتة للأنواع النباتية المختلفة، فهناك لكل نوع نباتي عوامل محددة تؤثر في نسبة التعديل الوراثي وتختلف من نوع نباتي إلى نوع نباتي آخر.

ثانياً: وضع تقانة لتجديد النبات Regeneration System:

بعد الحصول على خلايا أو أنسجة نباتية معدلة وراثياً، والتحقق من التعديل الوراثي بإحدى تقانات الكشف التي سبق شرحها.

فلا بد من وضع تقانة مناسبة للتجديد أي الحصول على نباتات كاملة بدءاً من الخلايا النباتية أو الكالوس أو الأوراق.

تختلف العوامل المؤثرة بتجديد النباتات وذلك حسب طريقة التجديد مباشرة أو غير مباشرة للأجزاء النباتية المختلفة وذلك حسب ما هو موضح بالشكل (13-4).

تختلف العوامل المؤثرة في تجديد الخزعات النباتية بحسب طريقة التجديد، مثلاً تكوين البراعم غير المباشر لابد في المرحلة الأولى من تكوين الكالوس وإكثاره، كمرحلة أولى وهذا يتطلب إضافة الأوكسين 2.4.D بتركيز تختلف من نوع نباتي إلى نوع نباتي آخر، وبعد الحصول على الكالوس العضوي ينقل إلى وسط جديد يحوي ميزان هرموني جديد بهدف تكوين براعم بدءاً من الكالوس المعدل وراثياً. ويتوجب هنا في هذه المرحلة إضافة السيٲوكينين بتركيز محدد، والتوازن الهرموني بين الأوكسين والسيٲوكينين في هذه المرحلة يكون لصالح السيٲوكينين. ويتوجب في مرحلة لاحقة إكثار البراعم المتكونة من الكالوس بهدف الحصول على مصدر مستمر من النموات الخضرية، وبعد مرحلة إكثار النموات الخضرية التي تتطلب أيضاً شروط وعوامل محددة مثل التوازن بين $Cyt/Aux > I$. كما يفضل ألا يحتوي التركيب المعدني للوسط المغذي على تراكيز عالية من نترات الأمونيوم حتى لا تصاب النموات الخضرية المتكونة بظاهرة الشفافية.

ويجب تجنب كافة العوامل التي تشجع على تكوين نموات شفافة حتى يتم الحصول على نموات جيدة النمو صالحة للنقل إلى وسط تجذير خالٍ من السيٲوكينين مع إضافة الأوكسين، وعندها يتم الحصول على نباتات كاملة معدلة وراثياً جاهزة للنقل إلى البيت الزجاجي.

تختلف العوامل المؤثرة في تجديد الأنسجة النباتية المعدلة وراثياً بحسب النوع النباتي، حسب طريقة التجديد، وحسب نوعية الأجزاء النباتية المزروعة.

يتم تقييم النباتات المعدلة وراثياً في البيت الزجاجي، ومتابعة التعبير المورثي للمورثات الجديد بهدف تثبيت الصفات الجديدة التي تحملها النباتات المعدلة وراثياً.



المراجع العربية

- القباني نور (2012): عزل وزرع البروتوبلاست في بعض أصناف البطاطا. رسالة ماجستير -جامعة دمشق.
- الكناني فيصل رشيد (1987): زراعة الأنسجة والخلايا النباتية ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل ، ص 480 .
- المعري خليل (1995). إكثار النخيل بوساطة زراعة الأنسجة النباتية، جامعة الملك فيصل ، السعودية ، 265 صفحة.
- أبو زيدان ثريا (2011). الإكثار الخضري الدقيق والتحليل الكيميائي لبعض أنواع السوسن البري في سورية. رسالة ماجستير -جامعة دمشق.
- طوشان حياة فرج الله (1988): التشكل النباتي، منشورات جامعة حلب، كلية الزراعة سوريا، ص 573.
- عبو فؤاد، المعري خليل (1988): أساسيات الفيزيولوجيا النباتية منشورات جامعة دمشق.
- قطنا هشام ، القطب عدنان ، المعري خليل (1989): فيزيولوجيا الفاكهة ، منشورات جامعة دمشق، 399 صفحة.
- مصا ريم (2011): دراسة مقارنة بين الطرائق المختلفة لإنتاج بذار البطاطا الخالي من الفيروس PVY مخبرياً. رسالة ماجستير -جامعة دمشق.
- مصا ريم؛ المعري خليل؛ البيسكي فهد (2017): استحداث الكالوس ودراسة مدى تحمل ثلاثة أصناف من البطاطا للإجهاد الملحي مخبرياً، منشورات مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. قيد النشر.
- مصا ريم؛ المعري خليل؛ البيسكي فهد (2018): تأثير الأوساط المغذية في تكشف الكالس النامي تحت ظروف الملوحة لصنفين من البطاطا (*Solanum tuberosum* L.)، مجلة إكساد. قيد النشر.

المراجع الأجنبية

- Abbas M., Khan MM., Fatima B., and H. Abbas. 2008. Elimination of *Citrus Tristeza Closterovirus* (CTV) and production of Certified *Citrus* Plant through Shoot Tip Micrografting, Pak. J. Bot., 40(3):1301-1312.
- AboElnil.1989. Refining methods for date Palm propagation, Secon sympo.on Date palm, K.F.U.,AlHassa,S A: 29-43.
- ABousalim, A. 1991. *In vitro* propagation of *Pistacia vera*, Effect of Culture media, Actes Inst. Agron. Vet.,Vol:11 (3):23-26
- Abyari M.,Nasr N, Soorni J and D.Sadhur, 2016. Enhanced Accumulation of Scopoletin in Cell Suspension Culture of *Spilanthes acmella* Using Precursor Feeding, Braz. Arch. Biol. Technpl.,v 59: e16150533, 2016.
- ALGhamdi, A.S.1993. True to Type date palm produced through tissue culture techniques,Abs. on the third Symp. On Date Palm in K.F.U. ,S.A.
- AlMaarri, K; Arnaud, E.T.E and Miginiac, E. 1986. Micropropagation *in vitro* du poirier cv " Williams" par culture des meristemes. 26th – Science week, auditorium. The University of Teshrine, latakia, Syria. 1 – 7 November.
- AlMaarri, K. 1986. Micropropagation *in vitro* du Pommier et du Poirier, et du Cognassier de provence: problemes poses

par l'état physiologique du matériel. These doctorat, Univ, Paris 6, France, pp 165.

- ALMaarri, K., Arnaud Y, and E. Miginiac.1986(a). *In vitro* micropropagation of Provence Quince, Scientia Horticulturae, 28:315-321.
- ALMaarri K., Arnaud Y., E. Miginiac,1986 (b). Etude comparatives de l'aptitude a la micropropagation par la culture des meristemes, du poirier" Passe Crassane " adulte et juveniles, C R Acad. Agric. fr.,72(5): 413-421.
- ALMaarri K.,ArnaudY.,E. Miginiac,1986 (c). Micropropagation *in vitro* du Poirier" Williams " par la culture des meristemes, 26th Science Week, Auditorium of the Teshrine, Latakia, 1-7 Novembre, 1986.
- ALMaarri K., Arnaud Y, and E. Miginiac,1987 (a). Microbouturage *in vitro* du Poirie de jeune poirier issus de pepins de Passe Crassane, Can. J. Of Botany,65:803-806.
- ALMaari K., Arnaud Y., er E. Miginiac. 1987 (b). Micropropagation *in vitro* du Cognassier Etude sur le passage des vitroplants en conditions naturelles., R. J. of Aleppo University, N.9:81-95.
- ALMaarri K. and N. ALBatal. 1993. Vegetative propagation of 12 Roses Cultivators by *in vitro* culture. R. J. of Latakia University, Syria.
- ALMaarri K. , Arnaud Y., et E. Miginiac.1994. Micropropagation of *Pyrus communis* Passe crassane and "

Williams": Factors affecting root formation *in vitro*. *Sciencia Horticulturae* ,58:207–214.

- ALMaarri K., and A.S. ALGamdi. 1995. Effect of prelevement date on *in vitro* Date Palm propagation cv "Hillaly ", Arab. Univ. J. Agric.Sci., 3(1):151–167.
- ALMaarri K., N. ALBatal and A.S.ALGamdi. 1995. *in vitro* propagation of *Gardenia jasmenoides* Ellis, *Croton* and *Begonia rex*, J. Agric. Sci. ,Mansoura University, Egypt, 20 (10): 4431–4438.
- ALMaarri K.1995. Date Palm propagation through tissue culture techniques ,256p, Kinf faisal University.
- ALMaarri K .,and A.S.ALGamdi. 1996. Factors affecting the incidence of vitrification of some *in vitro* propagated fruit trees, J. of King Saudi University, Saudia Arabia.
- ALMaarri,K. and A.S.ALGamdi,1997– Micropropagation of five date palm Cultivars through *in vitro* auxiliary bud proliferation. R.J. of Damascus University.
- ALMaarri K. and A.S.ALGamdi. 1998. Effect of seasonal variation on the multiplication of date palm through tissue culture techniques, Symp. On date palm, Marakesh, Morocco, 244–248.
- ALMaarri K.,and A.S.ALGamdi. 2002. Micropropagation of Date Palm cultivar Hillaly: Factors affecting Root formation *in vitro*, 41St. Week, Conference of Biotechnology, Damascus University ,Syria, Under publication.

- ALMaarri K.,Kheeti Mandy K.AL Taweel. 2003. Effect of some factors influencing on *in vitro* tuberisation of Potatos cv" Draga ",R.J.of Damascus University.
- ALMaarri, K.,and Thouma R. 2009. *In Vito* Regeneration of Old Wild Syrian Pear (*Pyrus syriaca* from Leaf . ,Under Publication.
- ALMaarri, K; Mania Youness and Issam Fallouh.2007. *In vitro* Conservation of some clones of *Pyrus syriaca* Tolerant to lime soil. The 46th Annual Science Week. Conference on Sustainable Agricultural Development and food Secutity., Abst.
- Al Maarri, K; Qudah A, and R. Shibli. 2007. *In vitro* Propagation of Rootstock Reine Claude P3116(Torinel)., Conference on Agriculture Research ,in Jordan ,Amman, under publication.
- ALMaarri K., Kabani N. and F. ALBiski. 2012. Protoplast Isolation and culture in some potato cultivars, Jordan Journal of Agricultural Science, Under Publication.
- ALMaarri K., Massa R. and ALBiski F. 2013. Evaluation of some therapies and meristem culture to eliminate Potato Y potyvirus from infected potato plants, Plant Biotechnology, Under Publication.
- AL-Qudaht, A; Al Maarri, K. and R. Shibli. 2007. Multiplication of Apricot *Prunus armeniaca* L cvs " Ajamy and Balady"by Tissue Culture Techniques .Jordan Journal of Agricultural Science, Under Publication.

- ALSkief J., 1977–Sur le greffage *in vitro* d'apex sur des plantules decapitees de Pecher (*Prunus persica*) C.R.A and Sc., paris, 284 (D): 2499–2502.
- ALSkief J. and Villemur P. 1978. Greffage *in vitro* des plantules decapitees du Pommier (*Malus pumila*), C. R. Acad. Sc., paris, 287 serie D: 1115–1118.
- ALSkief J., et ALMaarri K. 1991. Microgreffage *in vitro* des agrumes sur de plantules decapites, R. J. of Aleppo University, No., 15:46–60.
- Auge R.1984. La culture *in vitro* et ces applications horticoles, ED., Lavoisier.Paris, france,152P.
- Badkane Y.,Yadav A.S.,and A. Bajaj. 2016. Effect of explant sources and different concentration of plant growth regulators on *in vitro* micropropagation of Glycyrriza glabra, Indo American Pharmaceutical and Research Science, 6(6): 5830–5840.
- Bairu MW, Aremu AO, Staden JV. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regul, 63:147–173
- Bajaj, Y. P. S. 1987. Biotechnology in agriculture and forestry. Vol.3 potato. 500P.
- Bajaj, Y. P. S. 1990. Biotechnology in agriculture and Forestry, Vol. 11: Somaclonal Variation in crop improvement I. Springer–Verlag, Berlin, pp. 1–685.

- Baker, R. 1962. Thermotherapy of planting material. *Phytopathology*, 52:1244–1255.
- Balester A., Sanchez M.C., San-Jose M.C., and Vieitez A.M. 1990. Development of rejuvenation methods for *in vitro* establishment, multiplication and Rooting of Mature trees., In Rodriguez, R *et al.*, (eds), *Plant Aging: Basic and Applied Approaches*, Plenum Press, new York.
- Beauchesne, G. 1980. Interet de la culture *in vitro* pour la multiplication vegetative. *C.R.Acad Sc.Fr.*, 66 (8):638–649.
- Beauchesne, G. 1981. Lea milieux minéraux utilises en culture *in vitro* et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspet pathologique. *C R Acad . Sc.Fr.*, 67:1389–1397.
- Beauchesne G. 1982. Vegetative propagation of Date Palm by *in vitro* culture, First Symp. On Date Palm, K.F.U., ALHassa, S.A., 698–704.
- Bello-Bello J., Martinez-Estrada E., and Morales- Ramos. 2016. Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla, *African Journal of Biotechnology*, vol. 15: 272–277.
- Bhatia R, Singh KP, Sharma TR, Jhang T. 2011. Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro*-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 104(1):131–135

- Bhatt, D. P and Fassuliotis. 1981. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of eggplant. *Z.Pflanzenphysiol*,104:81–89.
- Bhojwani, S.S and Razdan, M.K. 1983. Plant tissue culture: Theory and Practice. Elsevier science publishers, Amsterdam, pp. 1–502.
- Bisaria, V and Panda, A. 1991. Large–scale plant cell culture: methods, applications and products. *Current opinion in Biotech.*2:370–374.
- Biswas, M.K., Dutt M., Roy U.K., Islam R. and Hossain M. 2009. Development and evaluation of in vitro somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. *Scientia Horticulturae*. 122: 409–416.
- Bohmer, P and Meyer, D.1996. Plant Protoplast Culture, Hannover University, depart. of Molecular biology, course.
- Boulay, M .1977. Multiplication rapide du sequoia sempervirens par la culture *in vitro*, *Annales AFOCEL*: 37–65.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci*. 161: 839–851
- Bourgin, J. P and Nitsch, J. P. 1967. Obtention de Nicotiana Haploides a partir d'etamines cultivees *in vitro*. *Ann. Physiol . veg.* 9:377–382.

- Can C., Ozaslan M., Tor, em H., Sarpkaya K., and I. Elman. 2006. *In vitro* Micrografting of pistachio *Pistacia vera* cv 'Siirt', on wild pistachio rootstocks, J. Of Cell and Molecular Biology, 5:25–31.
- Chamani E. and S. Talami. 2016. Efficient protocol for protoplast isolation and plant regeneration of *Fritillaria imperialis*, Journal and Technology, vol.,18 (2): 467–482.
- Chaussat R., Bigo C.,1980. La multiplication vegetative de Plantes superieures, Ed., Gauthier–Villars, Pris , France, 277 P.
- Chaussat, R, a et Bigot C.1982. La multiplication vegetative des plantes superieures, Gauthier–villars, paris ,france, 277P.
- Chen W, Viljoen AM. Geraniol . 2010. A review of a commercially important fragrance material. South African J Bot, 76:643–651.
- Chevreau E, Brisset MN, Paulin JP, James DJ. 1998. Fire blight resistance and genetic trueness–to–type of four somaclonal variants from the apple cultivar Greensleeves. Euphytica, 104:199–205.
- Choi PS, Kim YD, Choi KM, Chung HJ, Choi DW, Liu JR. 2004. Plant regeneration from hairy–root culture transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. Plant Cell Rep. 22(11): 828–31.
- Collin, H. A and Watts, M. 1983. Flavor production in culture. In: D. A. Evans *et al* .(eds). Hand–book of plant Cell culture,

vol.1: Techniques for propagation and breeding. Macmillan publishing Co. N. Y., pp. 729–747.

- Daniel Lineberger, R. 1983. Tissue culture of woody plants. The buckeye nurseryman. Columbus, OH.
- Darbani b, Farjani S, Turchi M and Steward Jr. 2008. DNA-Delivery methods to produce transgenic plants, Biotechnology, 7 (3): 385–402.
- Das A, Gosal SS, Sidhu JS, Dhaliwal HS. 2000 Induction of mutations for heat tolerance in potato by using *in vitro* culture and radiation. Euphytica, 114:205–209.
- Daugiun F. et Letouze R. 1985. Relation entre Hypolignification l'état vitreux chez *salix babylonica* en culture *in vitro*, rôle de la nutrition ammoniacal, Can J. of Bot., 63:324–326.
- Debergh. P. C and Maene, L. J. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Sci. Hortic. 14: 335–345.
- Deng L. Xu, 2003. protoplast isolation, culture and application to genetic improvement of woody plant, J. Food, Agric. And Environment, vol. 1 (3 and 4).
- Deogratias J. M., Lutz A., and Dosba F. 1986. *In vitro* Micrografting of shoot-tips from juvenile and adult (*Prunus avium* and *Prunus persica*), Acta Hort., 193: 139–145.

- Deogratias J. M., Castelloni V., Ortega V., and L. Navarro. 1991. Study of growth parameters on Apricot shoot tip grafting *in vitro*, Acta Horticulturae, 293:363–371.
- Divakran M., Pillai G., Babu K .and K.V.Peter. 2008. Isolation and fusion of protoplasts in Vanilla species, Current Science vol.,94 (1):115–119.
- Dodds, J.H and Roberts, L. W. 2008. Experiments in plant tissue culture. 3rd edition. Michigan state University–university of Idaho. 272pp.
- Drira N. 1983. multiplication vegetative du palmier dattier par la culture de fragments de folioles de plantes adultes ,3eme Cong. Arab d'horticulture, le caire,7P.
- Esmail NM, Al-Doss AA, Barakat MN. 2012. *In vitro* selection for resistance to Fusarium oxysporum f. sp. dianthi and detection of genetic polymorphism via RAPD analysis in carnation. J Med Plants Res, 6(23):3997–4004
- Espejo, Giselle Cipriani, Genoveva Rose, Alí Golmirzaie and William Roca . 2008. Somatic hybrids obtained by protoplast fusion between *Solanum tuberosum* L. subsp. tuberosum and the wild species *Solanum circaefolium* Bitter, rev. Peru. Biol., vol.15 (2).
- Evans, D.E., Coleman, J.O.D. and Kearns, A. 2003. Role of callus in embryogenesis, organogenesis, and cell culture. In: Plant Cell Culture. Oxford Brookes University, Oxford, UK Bios Scientific Publishers, pp. 64–65.

- Eyini M., Rajkumar and P Bajaji. 2006. Isolation, Regeneration and PEG-Induced fusion of protoplasts of *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus florida*, *Microbiology*, 34(2): 73-78.
- Faccioli , G. 2001. Control of Potato Viruses using Meristem and Stem-cutting Cultures, *Thermotherapy and Chemotherapy Scientific Information*, 2(3): 191-197.
- Fiuk A., Rybczynski J. 2007. The effect of several factors on somatic embryogenesis and plant regeneration in protoplast culture of *Gentiana kurroo.*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91: 263-271.
- Franklet A. 1980. Rajeunissement et propagation des ligneux, *Annual , AFOCEL*, :11- 40.
- Gago J., Martinez-Nunez L., Landin M., Flexas J., and P. Gallego. 2014. Modeling the effect of light and sucrose on *in vitro* propagated plants: A multiscale system analysis using artificial intelligence technology., <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone0086989>.
- Gambrog, O. L., Miller, R. A and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Gautheret F. 1959. *La culture des tissus vegetaux*, Ed., Masson , paris, France, 760 P.

- Garcia, R. G; Lozoya–Saldana, H and Abello, J. F. 1996. Electrotherapy and shoot tip culture eliminate potato virus X in potatoes. Vol. 73.
- Gautheret. 1959. La culture des tissus vegetaux, Ed., Masson, Paris ,France, 760P.
- Gautheret, R. J. 1985. History of plant tissue and cell culture : A personal account. In: I. K, Vasil (*Ed.*), cell culture and somatic cell genetics of plants, vol. 2: cell growth, nutrition, cytodifferentiation, and cryopreservation. Academic press, Inc., Orlando, pp. 1–59.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture, 2nd Ed. Exegetics Ltd. Hardcover. Part 1. The technology. 574 pp.
- George, E. F. 1996. Plant propagation by tissue culture, 2nd Ed. Exegetics Ltd. Hardcover. Part 2. In practice. 799 pp.
- George, E. F., Hall, M.A and Klerk Geert–Jan. 2008. PPlant propagation by tissue culture. 3rd Edition, volume 1. Springer. 508 pp.
- Gianni, F. 2002. Eradication of Potato virus Y and Potato leaf roll virus by chemotherapy of infected potato stem cuttings. vol.41: 76–78 .
- Grzegorzcyk I and Wysokinska H. 2010. Antioxidant compounds in *Salvia officinalis* L. Shoot and hairy root culture in the nutrient sprinkle bioreactor. ACTA SOCIETATIS BOTANICORUM POLONIAE. Vol.79, No. 1:7–10.

- Guha, S and Maheshwari, S. C. 1964. *In vitro* production of embryos from anther of Datura. Nature (London). 204:497.
- Guha, S and Maheshwari, S. C. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of Datura *in vitro*. Nature 212:97-98.
- Guillon S, Tremouillaux-Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P. 2006. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. Trends Biotechnol. 24: 403-409.
- Guo W. W., R. C. Wu, Y. J. Cheng & X. X. Deng. 2007. Production and molecular characterization of Citrus intergeneric somatic hybrids between red tangerine and citrange. Plant Breed. 126: 72-76.
- Gurel S, Gurel E and Kaya Z. 2002. Protoplast Fusion in Sugar beet Beta vulgaris, Turk J.Biol.,26: 163-170.
- Haicour R., Assani A., Buitrang V., and A. Guedira. 2009. Protoplast isolation and culture for banana regeneration via somatic embryogenesis, Fruits, vol.,64:261-269.
- Hartman H. and D.Kester, 1983. Plant Propagation , Prinsipal and Practice, Ed.,Englewood Cliffs, New Jersey 07632, 727 P.
- He, X., and Meng, M. 2016. Physiological responses to exogenous sucrose in tuber induction of potato *in vitro*, Turk. J. Field and Crops, 21(2): 254-260.
- Heberle-Bors, E. 1985. *In vitro* haploid formation from pollen: A critical review. Theor. Appl. Genet 71:361-374.

- Heller R., 1981. Physiology Vegetale, Tom 2 ., Development., Ed, Masson ,Paris, France, 215P.
- Helliot, B; Panis, B; Hernandez, R; Swennen. R; Lepoivre, P and Frison, E. 2007. Development of *in vitro* techniques for the elimination of cucumber mosaic virus from banana (*Musa* spp.).European Journal of Histochemistry. 51: 153–158.
- Herman, Edwin, B. 1995. Regeneration and Micropropagation: techniques, systems and media. Volume 3 of recent advances in plant tissue culture. 183pp.
- Holland .1996. Potato Diseases, pest and defects .Casparie, Den Haag.2ed.180pp.
- Hsia C–N, Lin J–F, Chen U–C, Tsao C–Y, Chan H S. 2007. Establishment hairy root culture system of *Salvia miltiorrhiza*. Agriculture Research Institute.
- Hu Z–B and Du M. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. Journal of Integrative Plant Biology. 48(2): 121–127
- Hwang, S .2002. Somaclonal variational approach to breeding Cavendish banana for resistance to *Fusarium* wilt race 4. In: Global conference on banana and plantain, Bangalore, India, Abstract 57, October 28–31
- Isikalan C., Namli S., Abbas F. and D. Erolak. 2011. Micrografting of Almond cultivar non pareil, Ausryalian Journal.
- Jacob A and Malpathak N. 2004. Green hairy root culture of *Solanum khasianum* Clarke– a new route to *in vitro*

solasodine production. URRUNT SCIENCE, Vol. 87, No. 10, 25.

- Jian B, Hou w, Wu C, Liu B, Liu W, Song S, Bi Y, Han T. 2009. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of Superroot-derived Lotus corniculatus plants: a valuable tool for functional genomics. BMC Plant Biology 2009, 9:78.
- Jo.E.A.,Twari R.K.,and K.Y. Paek. 2008. Effect of photoperiod and light intensity on *in vitro* propagation of Alocasia amazonica, Plant Biotechnology Report, 2: 207.
- Jonard R., Hugard J., and Macheix J.J. 1983. *In vitro* Micrografting and its application to fruit science, Sci. Hort., 20: 147-159.
- Jonard R. 1986. Micrografting and its application to tree improvement, In Bajaj, Y P S (ed) Biotechnology in Agriculture and forestry trees, Springer-Verlag, New York.
- Jones O.P.,Hopgood M E., and O'Farrell D.1977. Propagation *in vitro* of M26 Apple rootstock, J.of Hort. Sci.,59:235-238.
- Kartsomas E, and Papafotiou M. 2007. Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of Quercus enboica, an endemic rare and endangered oak in Greece. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 90 (1):111-116.
- Khalafalla M M., and Daffalla H. M. 2008. *In vitro* micropropagation and Micrografting of Gum Arabic Tree (*Acacia Senegal*), Int. J. Sustain. Crop. Prod., 3(1):19-27.

- Kartha, K. K. 1984. Elimination of viruses, In: I. K. Vasil (Ed.) Cell culture and somatic cell genetics of plants, vol 1: Laboratory procedures and their applications. Academic press, Inc., Orlando., pp 577–585.
- Ketchum RE, Gibson DM, Croteau RB, Shuler ML. 1999. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnol Bioeng*, 62:97–105.
- Kim JS, Lee SY, Park SU. 2008. Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (20), pp. 3788–3790.
- Kleinhempel, D; Schenk, G; Bittner, H; Gase, G and Kurzinger, B. 1990. Determination of virus resistance under *in vitro* conditions. *Eur. Assoc. Potato Res.* 5: 341– 342.
- Knobloch, K. H. Bentnagel, G and Berlin, J. 1981. Medium Induced formation of indole alkaloids and concomitant changes of interrelated enzyme activities in cell suspension culture of *Catharanthus roseus* cell cultures. *Z. Naturforsch* 36a: 40–43.
- Krishna H., Alizadeh M., Singh D. and R. Sadh. 2016. Somaclonal variation and their applications in horticultural crops improvement, *Biotech*, 6(1): 54–62.
- Kuksova VB, Piven NM, Gleba YY. 1997. Plant cell variation and *in vitro* induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 49:17–27.

- Larkin, P. J and Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation– a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197–214.
- Lee EK, Jin YW, Park JH. 2010. Cultured cambial meristematic cells as a source of plant natural products. Nat Biotechnol, 28:1213–1217.
- Leva AR, Petruccelli R, Rinaldi LMR. 2012. Somaclonal variation in tissue culture: a case study with olive. In: Leva AR, Rinaldi LMR, editors. Recent advances in plant *in vitro* culture. Croatia: INTECH Open Access Publisher; pp. 123–150.
- Li HM, Tang C., Xu Z. 2013. The effect of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis *in vitro*, Sci. Hortic., 150: 117–124.
- Li T, Dai C X. 2000. Studies on improving the cell division frequency of potato protoplasts. Acta Agronomica Sinica, 26(6): 953–958.
- Lizarrage, R; Panta, A; Jayasinghe, U and Dodds, J.H. 1991. Tissue culture for elimination of pathogens. International Potato Center (CIP). Research Guide 3:21 P.
- Lodhi AH, Bongaerts RJM, Verpoorte R, Coomber SA, Charlwood BV. 1996. Expression of bacterial isochorismate synthase in transgenic root culture of *Rubia perigrina*. Plant Cell Rep 15, 54–57.

- Luciana,N. 1993. Stock indexing and Potato virus Y elimination from potato plants cultivated in vitro .vol. 60:525–530.
- Mahmoud, S.Y. M; Hosseney, M. H and Abdel–Ghaffar, M. H. 2009. Evaluation of some therapies to eliminate potato Y potyvirus from potato plants. Int. J. Virol., 5: 64–76.
- Mantel, S. H; Matthews, J. A and Mckee, R. A. 1985. Principles of Biotechnology. Blackwell Scientific Publication, Oxford, U. K., pp 1–269.
- Margara J.,1982. Base de la multiplication vegetative, INRA, 149,rue de Grenelle, Paris, France,261.
- Marisol Ochoa–Villarreal, Susan Howat, SunMi Hong, Mi Ok Jang, Young–Woo Jin, Eun–Kyong Lee, and Gary J. Loake. 2016. Plant cell culture strategies for natural products production BMB Rep. 31; 49(3): 149–158.
- Martin C.,Carre M. and Vernoy. 1981. La multiplication vegetative *in vitro* des vegetaux ligneux: cas du Rosiers, C R, Acad Sci, 293: 175–177.
- Martin C., Carre M. and Vernoy. 1983. La multiplication vegetative *in vitro* des vegetaux ligneux cultives : cas des arbres fruitiers, Agronomie,3 (4):303–306.
- Martinez J., Hugard J and Jonard R. 1979. Sur differentes combinaisons de greffage des apex realises *in vitro* entre pecher, Abricoteir et Myroblan, C. R. Acad. Sc., paris, 288 serie D: 757–762.

- Martinez J., Poessel L. L., Hugard J and Jonard R. 1981. L' utilization du microgreffage *in vitro* pour l'etude des greffes incompatibles, C. R. Acad. Sc., paris, 292 serie D: 961964.
- Matthews D., J. Mc Nicoll, K. Harding & S. Millam. 1999. 5'- Anchored simple sequence repeat primers are useful for analyzing potato somatic hybrids. Plant Cell Rep 19: 210-212.
- Maziliac P, 1961. Physiologie Vegetale, Tom 2, Croissance et Developpement, Ed, Herman ,Paris, 465P.
- McAfee BJ, White EE, Pelcher LE, Lapp MS. Root induction in pine (Pinus) and larch (Larix) Spp. Using Agrobacterium rhizogenes. Plant Cell Tiss Organ Cult. 34: 53-62.
- Mehrotra S, Kukreja AK, Khanuja SPS, Mishra BN. 2008. Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of Glycerrhiza glabra in bioreactor. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458; Vol, 11No. Issue of April 15, 2008.
- Mink, G. I; Wample, R and Howell, W. E. 1998. Heat treatment of perennial plants to eliminate phytoplasmas, viruses and viroids while maintaining plant survival. Plant Virus Disease Control. p. 332-345
- Modgil M, Guleria N, Ghani M, Sharma JN. 2012. Identifying somaclonal variants of the apple rootstock Malling 7 resistant to white root rot. Sci Hortic, 137:148-155.

- Morel, G and Martin, C.1955. Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus .C.R. Séance Acad. Agric. Fr.41:472–475.
- Mosella Ch. L., Signoret P. A and Jonard R. 1980. Sur la mise au point de techniques de microgreffage d'apex en vue de l' élimination de deux types de particules virales chez le Pêcher C. R. Acad. Sc., paris, 290 serie D, 287–290.
- Moyano E, Jouhikainen K, Tammela P. 2003. Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root culture of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. J Exp Bot 54, 203–211.
- Mugnier J. 1988. Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep 7, 9–12.
- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised Medium for Rapid Growth and Bioassays Tobacco Tissue Culture. Physiol. Plant. V. 15: 473–479.
- Murashige T., W. P. Bitters, Roistacher C N and P. B Holiday. 1972. A technique of shoot grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. Hort. Sci., 7: 118–119.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol 25: 135–166.
- Murashige, T. 1978. Principles of rapid propagation. In: K.W. Hughes *et al.* (Eds.), propagation of higher plants through

tissue culture. U. S. Dept. of Energy. Washington, D. C., pp. 14-24.

- Murashige, T and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Navarro L., Roistacher C. N, and Murashige T. 1975. Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus free Citrus., *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 100: 471-479.
- Navarro L. 1988. Application of shoot-tips grafting *in vitro* to woody species, *Acta Horticulturae*, 227:43-55.
- Naz A., Jaskani M., Abbas H and M. Kasim. 2007. *In vitro* studies on micrografting technique in two cultivars of citrus to produce virus free plants, *Pak. J.Bot.*,39(5): 1773-1778.
- Neidz R.,Mckendree W and Shatters R. 2001. Using GFP to select for transgenic sweet orange derived from electroporation protoplasts, Depart. Of Horticulture research Lab., USDA-ARS.
- Newman DJ, Cragg GM. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, 75:311-335.
- Nicholas Trigiano, R and Gray, D.J. 2000. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press. 454PP.
- Nishikawa K and Ishimaru K. 1997. Flavonoids in root culture of *Scutellaria baicalensis*. *J Plant Physiol* 151, 633-636.

- Nitsch, J. P and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Sci.* 163: 85–87.
- Okamura T., Takeno T., Dohi M., Yasumura I., and M. Ohsugi. 2000. Development of mushrooms for thrombosis prevention by protoplast fusion, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol., 89, 5: 474–478.
- Onay A., Pirinc V., Yildirim H, Adryaman F and D. Basaran. 2003. *In vivo* and *in vitro* Micrografting of Pistachio *Pistacia vera* cv 'Siirt', *Turk J. Boil.*, 27: 95–100.
- Onay A., Pirinc V., Yildirim H, Adryaman F and D. Basaran. 2004. *In vitro* Micrografting of Mature pistachio *Pistacia vera* cv 'Siirt', *Plant Cell, Tissue and organ culture*, 77: 215–219.
- Park, S. U and Lee, S.Y. 2009. Anthraquinone production by hairy root culture of *Rubia akane* Nakai: Influence of media and auxin treatment. *Scientific Research and Essay* Vol. 4 (7) pp. 690–693.
- Pazhouhandeh, M. 2001. Establishment of *in vitro* Gene-bank for Virus-free Potato Germplasm. MSc Thesis, Tarbiat Modarres University. Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
- Pliego F and Murashige T. 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*, *Hortscience*, 22: 1321–1324.

- Purohit, S. S and Mathur, S. K. 1990. Fundamentals of Biotechnology. Agro-Botanical Publishers (India), Bikaner, India, pp. 1-164.
- Quoirin M et Lepoivre Ph. 1977. Etude de milieux adaptes au culture *in vitro* de Prunus, Acta horticulturae,78: 437-442.
- Rasouli H.,Farzaei M. 2016. Plant cell cancer : may natural phenolic compounds prevent onest and development of plant cell malignancy? A literature review, Molecules, 21: 1104
- Razdan, M.K. 2003. Introduction to plant tissue culture. 2nd edition. 330pp.
- Rolando, A.K; Tovar,P and Dodds,J.H.1985. Induction of *In vitro* tubers in abroad range of potato genotype .Plant Cell.Tissue and organ culture 7:3-10.
- Sabater-Jara AB, Onrubia M, Moyano E. 2014. Synergistic effect of cyclodextrins and methyl jasmonate on taxane production in Taxus media cell cultures. Plant Biotechnol J,12:1075-1084.
- Sagawa, Y and Kunisaki, J. T. 1990. Micropropagation of floriculturel crops. In : P. A. Ammirato *et al.* (Eds.), Handbook of plant cell culture, vol 5: ornamental specis. McGraw-Hill publishing Company, N. Y., pp 25-56.
- Sakai A. and Engelmann F.,2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet- vitrification: a review., Cryo. Letters, 28 (3):151-172.

- Sakha B.M., Bhatia D.S., Batra V.K., Chaudary V.K., and S.C. Khurana, 2004. *In vitro* microtuberization in Potato (*Solanum tuberosum*) cultivars , Indian Journal of Experimental Biology, 42: 1245–1247.
- Sankararao K. and Parkash A S. 1995. A simple method for the isolation of Plant protoplasts, J Biosci.,20: 645–655.
- Savita, Balwinder Singh, Gurdeep Singh Virk, and Avinash Kaur. 2011. An efficient plant regeneration protocol from callus cultures of Citrus jambhiri Lush, Physiol Mol Biol Plants, 17(2): 161–169.
- Sedighi A., Ghalam M. and Roficion K. 2014. Study of the effect of plant growth regulators, size and cultivated of the grape inflorescence explant on production in vitro conditions, J.HerbMed.Pharmacol, 3 (1):35–40
- Sharp, W. R; Raskin, R. S; Sommer, H. E. 1972. The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato. In Planta 104(4): 375–361.
- Shekafandeh A., and M. Khosh-Khui. 2008. Effect of bud position and culture Medium on shoot proliferation from nodal culture of two mature Guava cultivars., Asian Journal of Plant Science, 7: 177–182.
- Shepard, J. F., Bidney, D and Shahin, E. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. Sci. (N. Y) 208: 17–24.

- Si H J, Dai C X. 1998. Cytological observation and peroxidase isoenzyme analysis of interspecific somatic hybrid plants in potato. *Chinese Potato Journal*, 12(4): 195–199.
- Si H J, Wang D, Liu J, Xie C H. 2001. Identification and application of agronomic characters of somatic hybrids in potato. In: Chen Y L (ed.) *Potato Industry and West Development*. Harbin: Harbin University of Engineering Press, 106–110.
- Si H J, Wang D. 2003. Fertility and genetic improvement of interspecific somatic hybrids of potato. *Acta Agronomica Sinica*, 29(1)(in press).
- Skirvin, R. M. 1987. Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica* 27:241–266.
- Smith, R.H. 2000. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. 2nd edition. Academic Pr. 231pp.
- Sravanthi M and Nohan G., 2016. Plant tissue culture: an alternative for production of useful secondary metabolites. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4 (4): 269–272.
- Steward F C., 1983. *Plant Physiology Vol.6– Energy and Carbone methabilism*, Ed., Accad, Press, Newyork, 553P.
- Sunderland, N. 1982. Induction of growth in culture of pollen. In: M. M. Yeoman and D. E. S. Truman (*Eds.*), *Differentiation in vitro*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 1–24.

- Sunjeev Sh., Balwinder S., Gita R., Vipin H and Gurdeep S N. 2007. Production of Indian citrus ringspot virus free plant of Kinnow employing Chemotherapy coupled with shoot tip grafting, Journal central European Agriculture, 8(1):1-8.
- Tisserat, B.1983. Factors involved in the production of Plantlet from date palm callus culture, Euphytica,31:201-214.
- Tisserat, B.1984. Propagation of date palm by shoot tip cultures ,Hort.Science,19:230-231.
- Toapala, T.2004. Establishment and use of Juvenility for plant propagation in sterile and non sterile conditions, deJt of Applied Biology , Helsinki University, Publ. N21.
- Tomiczak K., Sliwinska E., and J Rybczynski. 2016. Comparision of the morphogenesis potential of five Gentiana species in leaf mesophyll protoplast culture culture and ploidy stability of regenerated calli and plants, Plant Cell Tissue Organ culture, 126: 319-331.
- Trabelsi S., R. Gargouri-Bouزيد, F. Vedel, A. Nato, L. Lakhoua & N. Drira. 2005. Somatic hybrids between potato *Solanum tuberosum* and wild species *Solanum vernei* exhibit a recombination in the plastome. Plant Cell Tissue Organ Cult. 83: 1-11.
- Triplett, B. A, Moss, S. C, Bland, J. M, Dowd, M. K. 2008. Induction of hairy root culture from Gossypium hirsutum and

Gossypium barbadense to produce gossypol and related compounds. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.44:508–517.

- Walkey, D. G .A .1985. Applied plant virology.329P.
- Wang, P. J and Hu, N. Y.1980. Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture. In: A. Fiechter (Editor), Advances in Biochemical Engineering : plant cell culture, II. springer-verlag, Berlin,pp.61–99.
- Wang C, Wu J, Mei X. 2001. Enhanced Taxol Production and Release in Taxus chinensis Cell Suspension Cultures with Selected Organic Solvents and Sucrose Feeding. Biotechnol Prog; 17:89–94.
- Wareh,H; Trolinder,N.L; Goodin,J.R.1989. *In vitro* flowering of potato . Hortscience 24 (4):680–682.
- Watts JM; MotoyoshiF and King JM.1974. problems associated with the production of stable protoplasts of Tobacco mesophyll. Ann bot.,38:667–671.
- White, P. R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant physiol. 9: 585–600.
- Wright, D. C.1985. Factors affecting isolation of protoplast from leaves of grape (Vitis vinifera), Plant Cell tissue organ Culture,4: 95–100.
- Wongsamuth, R and Doran, P. M. 1997. Hairy roots as an expression system for production of antibodies. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. Pp. 89–97.

- Wu H C, E S du Toit and C. F. Reinhardt. 2007. Micrografting of *Protea cynaroides*
- Zaid, A. 1989. Review of Date palm tissue culture, second symp. on date palm, ALHassa, S A.,67–75.
- Zang w. Di and Huaiju N Sl. 2004. Study on Protoplast Culture and Somatic Hybridization of Potato,5th World Potato Congress.
- Zhou L, Wang J, Yang C. 1998. Progress on plant hairy root culture and its chemistry. 1. Induction and culture of plant hairy roots. *Nat Product Res Dev* 10, 87–95.
- Zhou P, Yang J, Zhu J. 2015. Effects of β -cyclodextrin and methyl jasmonate on the production of vindoline, catharanthine, and ajmalicine in *Catharanthus roseus* cambial meristematic cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015:7035–7045
- Zhu, Z. C and Wu, H. S. 1979. *In vitro* induction of haploid plantlets form unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum*. *Acta. Genet. Sin.* 6:181–183.
- Zimmerman, R. H. 1986. Propagation of fruit, root and vegetable crops–Overview. In : R. H. Zimmerman *et al.* (Eds.). *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops* Martinus Nijhoff, Dordrecht. The Netherlands, pp. 183–200.
- Zyrd I P., 1988. *Culture de cellules, tissues et organs vegetaux*, Lavoisier, Paris, 260 P.



المصطلحات العلمية

A

Absissic Acid	- حمض الأبسيسيك
Acclimatization	- التقسية
Agar	- الآجار
Agrobacterium	- الأكروباكتريوم
Agrobacterium rhizogene	- الأكروباكتريوم ريزوجين
Agrobacterium tumafescence	- الأكروباكتريوم تومافسينس
Alkaloides	- القلويدات
Amino Acid	- الأحماض الأمينية
Anaploidy	- غير محدد عدد الصبغيات
Antioxidant	- مضاد أكسدة
Antibodies	- زراعة حبوب اللقاح
Androgenesis	- مولدات الضد
Antivirus	- مضاد فيروس
Anti Gibberrellins	- مضاد جبريلين
Anther Culture	- زراعة المتك
Apex	- القمة النامية
Apex culture	- زراعة القمم النامية
Apomixy	- أجنة نوسيلية
Artemisia	- الزراعة المعقمة
Artemisinin	- نبات الشيح

Aseptic culture	- الأرتيمزينين
Ash	- الرماد
Autoclave	- الأوتوغلاف
Autotrophic	- ذاتية التغذية

Auxin	- الأوكسين
Axillary bud	- براعم جانبية
Axillary branch	- تفرعات او نموات جانبية
	- جذور جانبية
Axillary roots	

B

Bacteria	- البكتريا
Bayoud	- مرض البيوض
Biolistic gun	- المدفع الجيني
Bioreactor	- المفاعل الحيوي
Bioreactor technology	- تقانة المفاعل الحيوي
Biosafety	- الأمان الحيوي
Biotransformation	- الاصطناع الحيوي
Plant Breeding	- تربية النبات
Browning	- الاسمرار
Bud formation	- تشكيل البراعم
Bud proliferation	- إكثار البراعم

Bud neoformation	- تجديد البراعم
Bud culture	- زراعة البراعم

C

Callus	- الكالوس
Callogenesis	- تكوين الكالوس
Callus degradation	- تدهور الكالوس
Callus Culture	- زراعة الكالوس
Cambium	- الكامبيوم
Cambium stem cells	- خلايا الكامبيوم الجنينية
Carbohydrates	- السكريات
Caullogenesis	- تكوين النموات الخضرية
Cefotaxime	- سيفوناكسيم
Cell	- الخلايا
Cell Culture	- زراعة الخلايا
Cellulase	- السيللولاز
Charcoal	- الفحم
Chimeria	- الشيمير
Climatic Factors	- العوامل الجوية
Clone	- السلالة أو الكلون
Clone pure	- السلالة النقية
Clonage	- تكوين السلالات
Chronological ageing	- العمر الزمني

Cotyledon	- الفلقات
Cryoconservation	- الحفظ بالتجميد
Crypreservation	- الحفظ بالآزوت السائل
Cultivar	- صنف
Cybrid	- السيبريد
Cymbidium	- السيمبيديوم
Cytogenetic	- الوراثة الخلوية
Cytology	- علم الخلية
Cytokinin	- السيتوكينين
Cytoplasm	- السيتوبلازم

D

Data Palm	- النخيل
Dedifferenciation	- التمايز الرجعي
Degeneration	- التدهور
Dicotyledones	- نباتات ثنائية الفلقة
Differenciation	- التمايز الخلوي
Dimetly Sulfoxide	- داي ميتيل سلفوكسيد
Direct organogenesis	- التبرعم المباشر
Direct embryogenesis	- تكوين المباشر للأجنة
DNA methylation	- إضافة جذر الميتيل للدنا
Domestos	- دومستوس
Doubled haploid	- تقانة مضاعفة النباتات N 1

E

Electrophoresis	- تقانة الهجرة الكهربائية
Electroporation	- الصق الكهربائي
Elicitor	- محرض
Embryos	- الأجنة
Embryo Culture	- زراعة الأجنة
Embryoids	- العقد الجنينية
Embryogenic callus	- الكالوس الجنيني
Embryogenesis	- تكوين الأجنة (الإكثار بالأجنة)
Enzyme	- الأنزيم
Evan blue	- كاشف إيفان
Explant	- خزعة نباتية
F	
Fag-Mist	- الري الضبابي
Fertilization	- التسميد
Fibers	- الألياف
Flavonoides	- الفلافونيدات
Flavonols	- الفلافونول
Flowers	- الأزهار
Fluorescein diacetate (FAD)	- فلورسين دي آسيتات
Friable callus	- كالوس سهل الانفراط
Fruit	- الثمار
Fruit Set	- عقد الثمار
Fungy Infection	- التلوث الفطري

G

Gel	- الهلام
Genetic Factors	- العوامل الوراثية
Genetic Stability	- الثبات الوراثي
Genetic Engineering	- الهندسة الوراثية
Genetic Improvement	- التحسين الوراثي
Germination	- الإنبات
Gibbrellin	- الجبريلين
Glycerol	- الغليسروول
Glutamin	- الغلوتامين
Grain Pollen	- حبوب اللقاح
Green house	- بيت زجاجي
Growth	- النمو
Growth room	- غرفة النمو
Growth Regulators	- منظمات النمو

H

Haploid	- نباتات وحيدة الصيغة الصبغية
Hardining	- التقسية
Heterotrophic	- غير ذاتي التغذية
Histology	- علم التشريح
Hibridization	- التهجين

Hormons - الهرمونات

I

Incompatibility - عدم التوافق

Inflorescence - النورة الزهرية أو الطلع

Inositol - اينوزيتول

Irrigation - الري

Isozyme Polymorphism - التحليل الأنزيمي

Isoperin - وحدة كربونية خماسية

K

Kimri Stage - طور الكمري

L

Lateral Bud - البراعم الجانبية

Leaf - ورقة

Leaflet - الوريقات

Leaf Primordia - البداءات الورقية

Lipides - دسم

Liquid Nitrogene - الآزوت السائل

M

Male Trees - الأشجار المذكرة

Macroelements - العناصر الكبرى

Manitol - المانيتول

Medium - وسط مغذٍ

Meristem	- الميرستيم
Meristem Culture	- زراعة الميرستيم
Metazinia	- الميتازينيا
Micrografting	- التطعيم
Microcuttings	- عقل صغيرة
Micropropagation	- التكاثر الخضري الدقيق
Microtuberisation	- تكوين الدريئات الدقيقة
Microelements	- العناصر الصغرى
Microne	- ميكرون
Micromole	- ميكرومول
Microsporogenesis	- تشكل خلايا N1
Microgametogenesis	- تشكل حبوب الطلع
Microtubers	- دريئات دقيقة
Minituber	- دريئات صغيرة
Mitotic index	- دليل الانقسام الخلوي
Mother plants	- نباتات الأمهات
Multiplication stage	- طور الاستطالة
	-
Monocotyledons	- نباتات وحيدة الفلقة
	N
Neoformation	- تكوين البراعم
Nursery	- المستل

Nutritional Requirements

- المتطلبات الغذائية

O

Off-Shoot

- فسيلة

Oil-Palm

- نخيل الزيت

Ontogenical ageing

- العمر التطوري

Organogenesis

- تكوين الأعضاء النباتية
(التبرعم)

Organ Culture

- زراعة الأعضاء

Opines

- أوبين

Oxidase

- الأوكسيداز

P

Palmae

- العائلة النخيلية

Parenchime

- البارانشيم

Peat Moss

- الدبال

Pectinase

- بكتيناز

Perlite

- البرلايت

Phloem

- الأوعية الغربالية

Phenol safranin

- فينول سافرانين

Physiological Disorders

- معوقات فیزیولوجية

Phytoremediation

- مكافحة التلوث بالنباتات

Photosynthesis

- الاصطناع الضوئي

Pinnate leaf

- الورقة البالغة

Plant cell culture

- زراعة الخلايا النباتية

Plant virus free	- نبات خالي من الفيروسات
Plasmid	- بلاسميد
Pleuroteus	- الفطر المحاري
Pollen callusing	- كالوس حبوب اللقاح
	- أجنة حبوب اللقاح
Pollen embryogenesis	
Pollination	- التلقيح أو التأبير
Poly ethylene Glycol	- البولي إيثيلين غليكول
Polyembryon	- متعدد الأجنة
Polyploidy	- متعدد الكروموزومات
Poly vinyl Pyrolidone	- بولي فينيل بيروليدون
Primary Culture	- الزراعة الأولية
Protoplast	- البروتوبلاست
Protoplast Culture	- زراعة البروتوبلاست
Protoplast fusion	- دمج البروتوبلاست
Protiens	- البروتين
Phynol compounds	- المركبات الفينولية
Pyridoxin	- البيريدوكسين
Physiological ageing	- العمر الفيزيولوجي
Pyroxidase	- البيروكسيداز
R	
Regeneration	- التشكل
Rejuvenation	- العودة إلى طور الفتوة

Root	- جذر
Rooting	- تجذير
Root–Stock	- الأصل
Rose	- الورد
Rooting medium	- محلول تجذير
Rooting stage	- طور التجذير
Ryboflavin	- الريبوفلافين
S	
Secondary Products	- منتجات كيميائية ثانوية
Seeds	- بذور
Seed Germination	- إنبات البذور
Seedlings	- بادرات بذرية
Selection	- انتخاب
Salt minerals	- الأملاح المعدنية
Shoots	- نموات خضرية
Shoot–Tip	- قمة نامية
Soil	- التربة
Somatic Embryos	- أجنة خضرية متشابهة
Somaclonal variation	- سلالات متباينة
Spine	- الكربة (قاعدة الورقة)
Spathe	- الطلع
Subculture	- إعادة الزرع على نفس الوسط
Suspension Culture	- معلق خلوي

T

Tamar Stage	- طور التمر
Thermotherapy	- المعاملة بالحرارة
Terpenoids	- التربينويدات
Thiamin	- الثيامين
Tidiazouron	- التديازورون
Tissue Culture	- زراعة الأنسجة
Totipotency	- الطاقة الخلوية الكامنة
Transformation	- التعديل الوراثي
Tree	- الشجرة
Trunk	- الجذع

V

Vegetative Propagation	- الإكثار الخضري
Verbam	- الفريام
Vigor	- قوة النمو
Virus	- الفيروس
Vitamins	- الفيتامينات
Vitrification	- الشفافية

X

Xylem	- الخشب
-------	---------

اللجنة العلمية :

د. أسعد العيسى

د. محمد بطحة

د. حسان عبيد

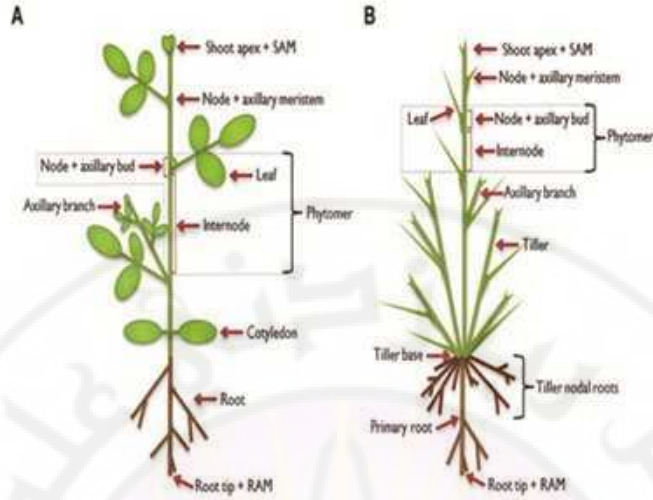
المدقق اللغوي :

د. محمد تمام الأيوبي

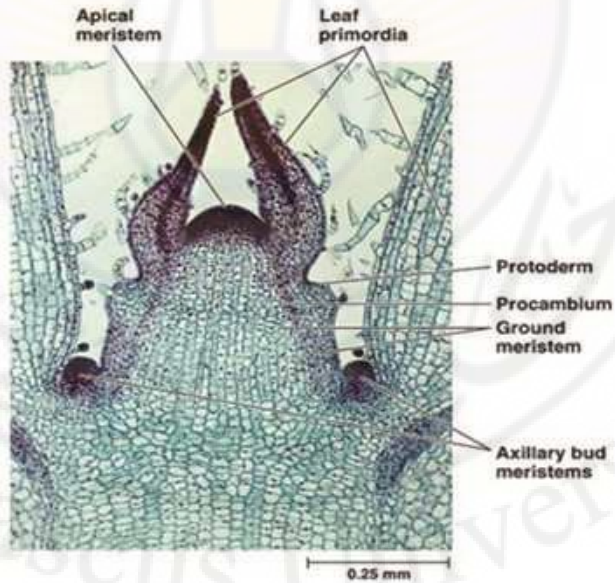
حقوق الطبع والترجمة والنشر محفوظة لمديرية الكتب والمطبوعات الجامعية

الصور الملونة





شكل (1-1): القمم المرستيمية في نباتات: A نبات ثنائي الفلقة، B نبات أحادي الفلقة.



الشكل (2-1): بنية القمة النامية (القمة المرستيمية + البدايات الورقية).



الشكل (2-5): التكاثر الخضري الدقيق للسوسن (زراعة اولية- طور الإكثار - طور التجذير - طور التقسية).



الشكل (3-5): التكاثر الخضري الدقيق للنخيل بالتبرعم (طور الإكثار، و طور التجذير).



الشكل (4-5): إكثار بتكوين الأجنة الخضرية (أجنة خضرية ، نباتات الأجنة).



الشكل (5-11): ظاهرة الاسمرار في النخيل



الشكل (5-12): ظاهرة الشفافية في الكالوس وفي أجنة النخيل



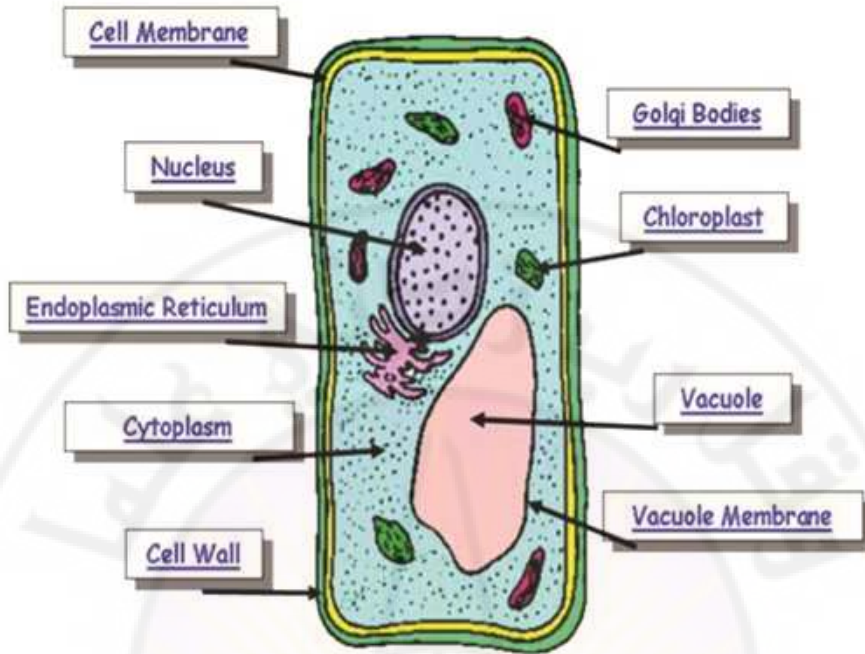
الشكل (1-6): زرع بذور الأصل وانباتها



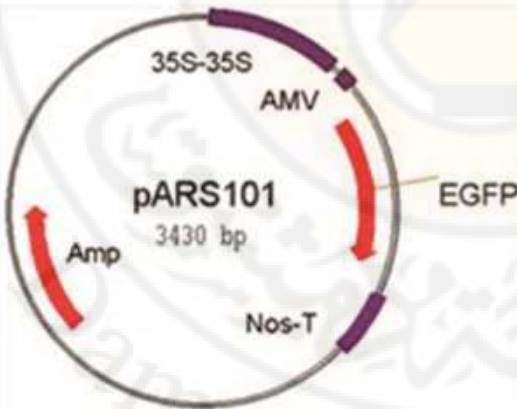
الشكل (2-6): تحضير الأصل للتطعيم الدقيق (بادرة قبل وبعد التحضير).



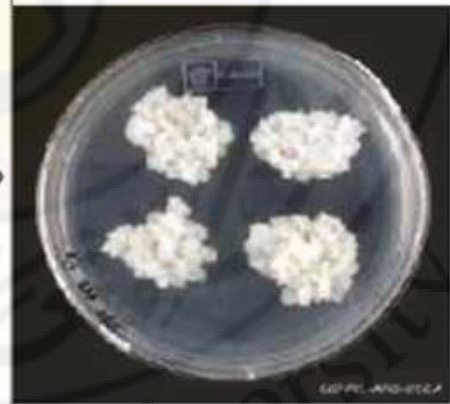
الشكل (3-6): تركيب القمة النامية الميرستيمية على الأصل



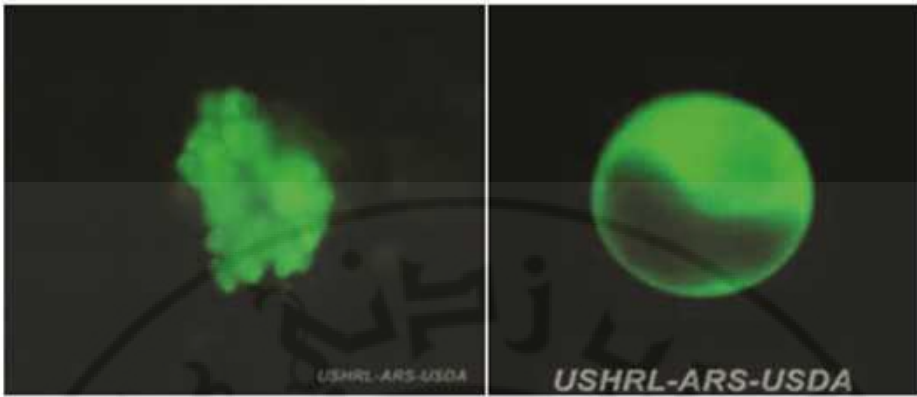
الشكل (8-1): بنية الخلية النباتية



B- بلازميد يحمل ال EGFP

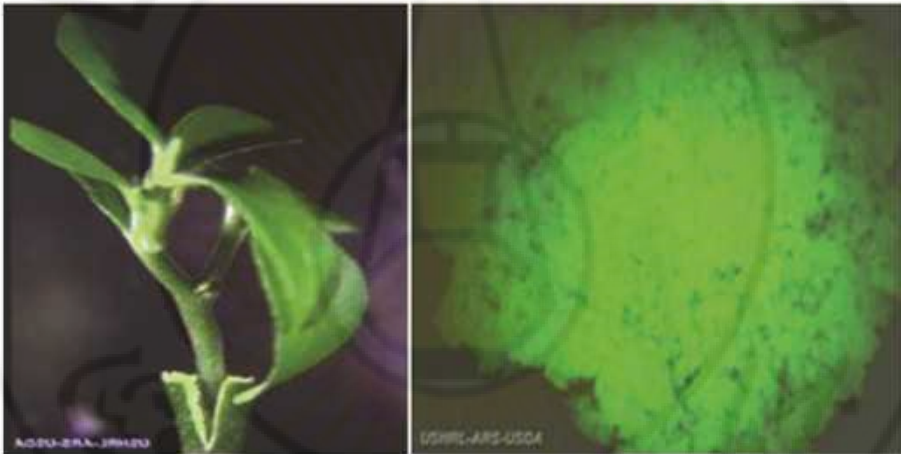


الشكل (7-8) : A- كالوس جنيني



D - ميكروكالوس محور

C - بروتوبلاست محورة

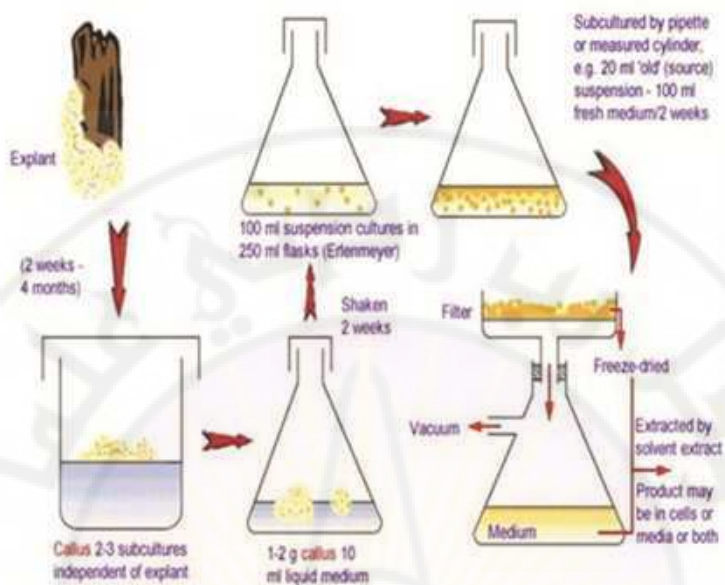


F - نبات كامل محور

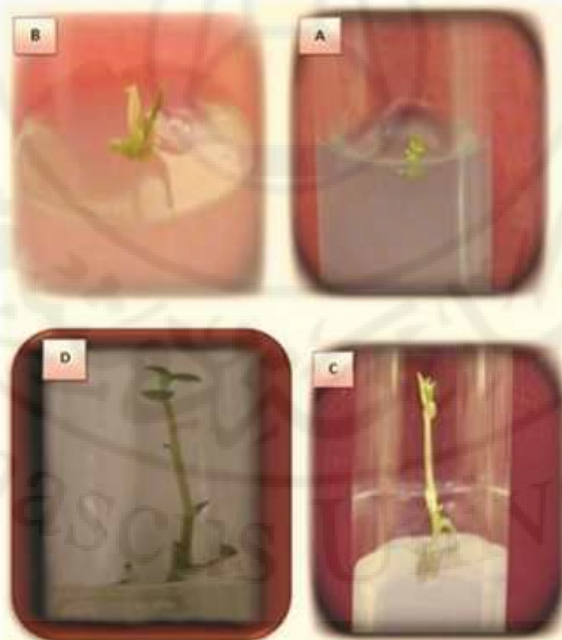
E - كالوس جنيني محور

الشكل (7-8): التعديل الوراثي في البروتوبلاست بالحمضيات

Plant Cell Culture



الشكل (3-9): إنتاج مادة الديجوكسين بزراعة الخلايا لنبات الديجيتاليس



الشكل (1-10): مراحل نمو القمم الميرستيمية لعينات البطاطا المزروعة بطول 300 ميكرون.



الشكل (2-10): زراعة الكالوس (الكالوس العضوي ونبات متجدد في البطاطا).



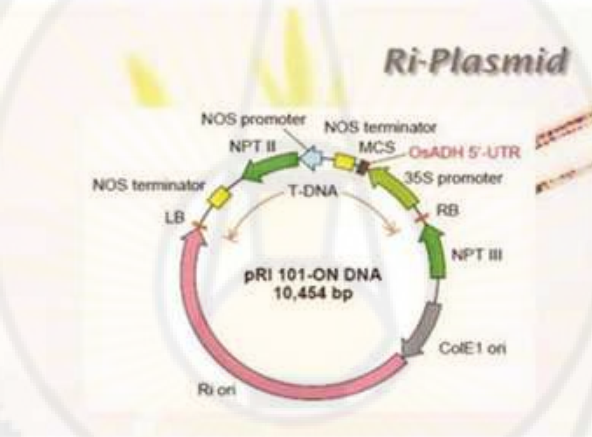
الشكل (2-11): البرعم الزهري مع المأبر في العنب



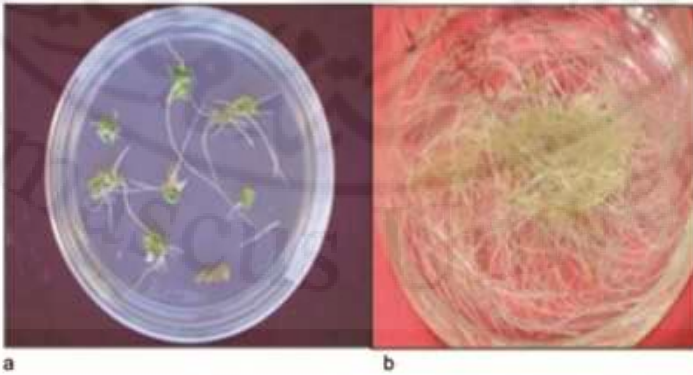
الشكل (4-11): تكون الأجنة الخضرية الشكل (3-11): تكون الكالوس الجنيني من المأبر



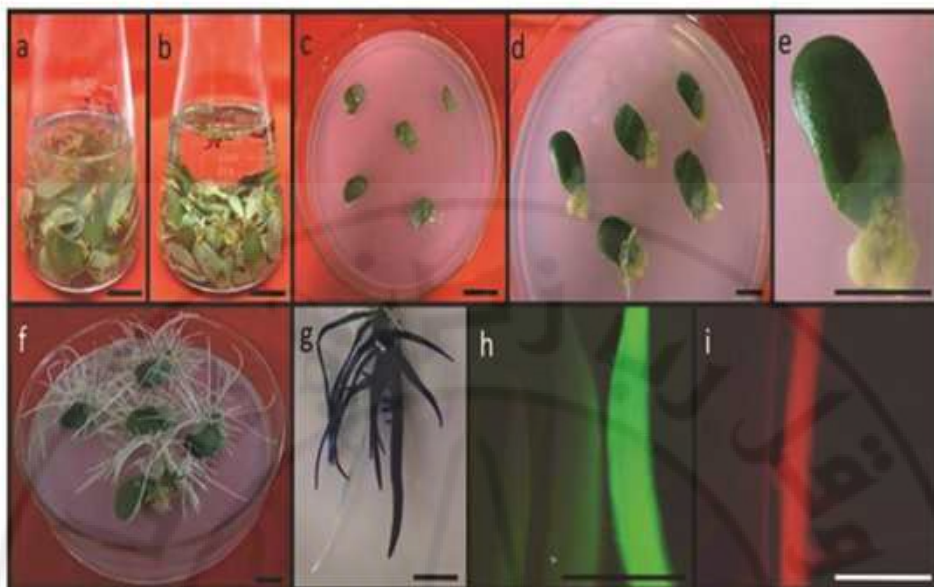
الشكل (11-5): إنبات الأجنة في العنب



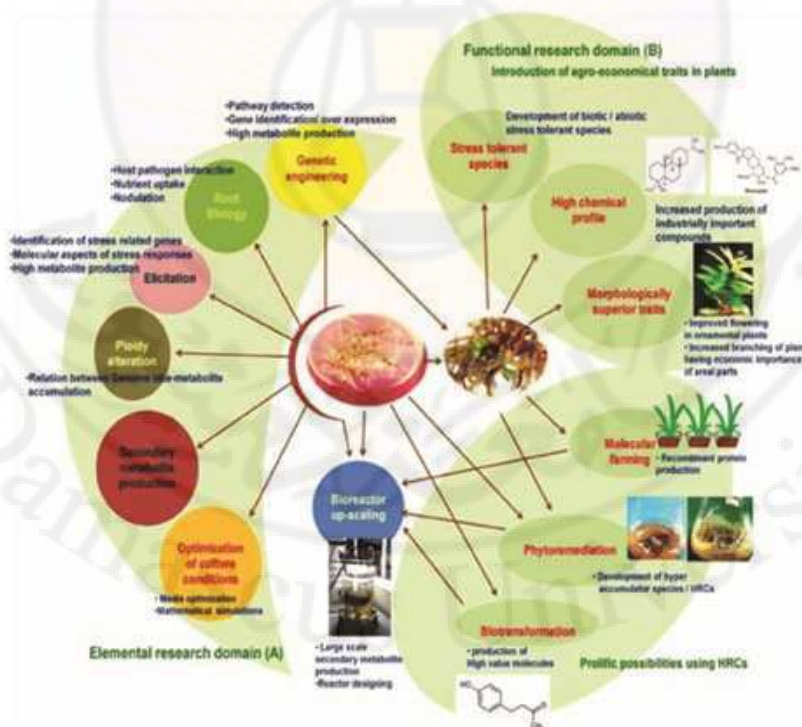
الشكل (12-2): البلاسميد Ri



الشكل (12-3): تكوين الجذور الشعرية في أجزاء من الورقة (A)، وإكثارها (B).

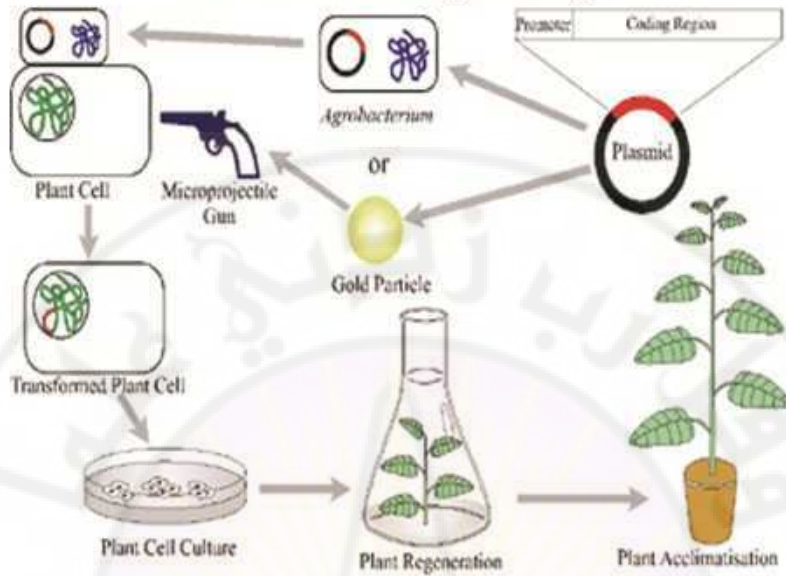


الشكل (8-12): تكوين الجذور الشعرية في فول الصويا (Chen et al., 2017).

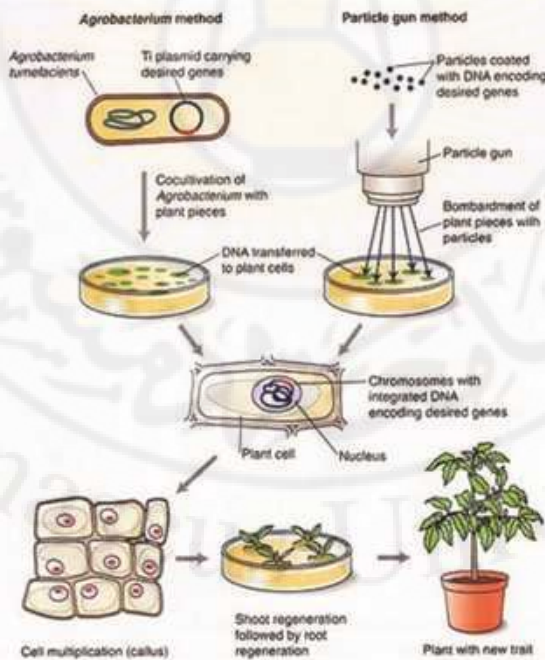


(9 - 12): تطبيقات زراعة الجذور الشعرية المختلفة (عن Mehrotra et al., 2015).

Plant Genetic Engineering



شكل (1-13): التعديل الوراثي بالبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* وبالفرد الحيوي



الشكل (5-13): التعديل الوراثي بشكل مباشر أو غير مباشر في النبات



حفظ القمم النامية بالأزوت السائل بعد الكبسلة

الفصل الحادي عشر

زراعة المياسم وحبوب اللقاح

11-1-مقدمة:

تعد تقانة زرع حبوب اللقاح من تقانات زراعة الأنسجة النباتية المهمة المستخدمة في تربية النبات. تهدف عملية زرع حبوب اللقاح الحصول على نباتات وحيدة الصيغة الصبغية وعند تضاعفها بالكولشيسين تعطي نباتات ثنائية الصيغة الصبغية، والتي تمثل سلالات نقية تدخل بشكل مباشر في برامج تربية النباتات الاقتصادية. من أهم الأساسيات الضرورية في مجال تربية النبات هو الحصول على أكبر قدر من التباينات الوراثية من المصادر النباتية حتى يكون هناك مجال لإجراء عملية الانتخاب.

وقد وضع أول تقرير علمي عن إمكانية الحصول على نباتات أحادية من نبات الداتورة من قبل العالمين (Guha and Maheshwari 1964) وذلك عن طريق تكوين أجنة من حبوب اللقاح، وقد تمكن العالمان (Bourgin and Nitsch, 1967) من الحصول على نباتات أحادية من الدخان، وخلال الأعوام الأخيرة من الثمانينات أمكن الحصول على نباتات أحادية من الأرز، القمح، الذرة والكرنب والعديد من المحاصيل الأخرى. ولقد شجع هذا النجاح علماء التربية أن يعملوا جاهدين للحصول على نباتات متباينة من تلك النباتات الأحادية.

إن عملية الحصول على السلالات النقية بالطرائق التقليدية تحتاج عدة سنوات من العمل، في حين يمكن الحصول عليها بزراعة النسج بفترة زمنية قصيرة. يتم توفير الوقت والجهد عند استخدام الطرائق الحديثة. يتم زراعة حبوب اللقاح أو المياسم في مرحلة محددة بعد الانقسام الميوزي في الأسدية عند تشكل الأعراس الذكرية، وحيدة الصيغة الصبغية وقبل عملية التلقيح. تم الحصول على نباتات أحادية الصيغة الصبغية بتطبيق هذه التقانة في أكثر من 250 نبات من الفصائل التالية: الباذنجانية - الوردية - الصليبية-والنجيلية وغيرها.

11-2- بعض التعاريف المرتبطة بالتقانة:

- الأندروجينيزيس **Androgenesis**: ويقصد بها زرع الأجزاء الزهرية المذكرة من الزهرة المياسم أو حبوب الطلع لتكوين سلالات وحيدة الصيغة الصبغية.
- الجينوجينيزيس **Gynogenesis**: ويقصد بها زراعة الأعضاء المؤنثة من الزهرة البويضات قبل الإخصاب، بعد الانقسام الاختزالي وقبل التلقيح بهدف الحصول على سلالات وحيدة الصيغة الصبغية.
- السلالة النقية **Clone pure**: وهي سلالات ثنائية الصيغة الصبغية وتكون الكروموزومات نقية ومتشابهة ومتطابقة بدون وجود أي اختلاف في توزيع الجينات بين الصبغيات الثنائية. وهذا ينطبق على كافة الصبغيات الثنائية.
- سلالة وحيدة الصيغة الصبغية **Haploid**: سلالة وحيدة الصيغة الصبغية تنشأ من خلايا حبوب اللقاح أو من البويضة المؤنثة قبل التلقيح. ويوجد سلالات $n1$ محدثة بزراعة النسج، كما يوجد سلالات وحيدة الصيغة الصبغية طبيعية تتواجد في بعض النباتات.
- السلالات وحيدة الصيغة الصبغية الطبيعية **Spontaneous haploids**: تميل بعض الأنواع النباتية لتشكل بشكل طبيعي سلالات وحيدة الصيغة الصبغية، بنسبة قليلة جداً لا تتعدى واحد بالألف. كما هو الحال في نبات الأسبرج والقطن والفليفلة. ونميز الأنواع الآتية من السلالات الطبيعية:
 - 1- النباتات متعددة الأجنة **Polyembryonies** مثل في الأسبرج بحيث يوجد جنينين في البذرة واحد طبيعي ثنائي الصيغة الصبغية ويكون نموه جيد وجنين نموه ضعيف يكون وحيد الصيغة الصبغية وينشأ عادة من أنسجة البويضة الأم من خلية مساعدة بعد الانقسام الاختزالي وقبل التلقيح تتطور هذه الخلية وتشكل جنين $N1$.
 - 2- أجنة **semigamy**: وهي أجنة طبيعية تتكون بشكل مختلط من الأعراس المذكرة والأعراس المؤنثة بعد نمو الأنبوبة الطلعية وقبل حدوث الإخصاب

ويكون الجنين في هذه الحالة وحيد الصيغة الصبغية. كما هو الحال في بذور القطن وتكون نسبتها ضعيفة لا تتجاوز 1 بالألف.

3- أجنة طبيعية تتشأ بشكل طبيعي من حبوب اللقاح أو البويضة قبل التلقيح تتطور وتشكل نباتات وحيدة الصيغة الصبغية، ونسبتها قليلة جداً.

11-3- طرق إنتاج النباتات الأحادية :

11-3-1- إنتاج نباتات أحادية من البويضات غير المخصبة: Gynogenesis

تنتج النباتات الأحادية عن طريق تنمية بويضة غير مخصبة بسبب تأخير عملية التلقيح، طريقة بديلة مناسبة للنباتات ذات العقم الذكري، ونجحت في الشعير ودوار الشمس وغيرها، وتستعمل خلايا غير مخصبة بالكيس الجنيني أو المبيض أو البويضات نفسها .

أشهر هذه الطرق **Parthenogenesis** إذ تتطور خلية البويضة غير المخصبة، نتيجة تأخير التلقيح، أو بالتلقيح الكاذب بحبة لقاح بها خلل كنتيجة للمعاملة بالأشعة المؤينة أو بحبة لقاح غريبة قد تكون من النوع نفسه لكنها لا تحدث الإخصاب .

تعد الأبحاث المتاحة عن طريقة Gynogenesis قليلة نسبياً، وذلك لصعوبة تطبيقها في الكثير من النباتات بالمقارنة مع زراعة المتك. تمتاز النباتات الأحادية بالقصر وصغر حجم الأوراق خاصة النصل، وزيادة الثمار الصغيرة بسبب عدم تكوين البذور، وربما يشاهد عدد من الأوراق والأزهار الغير كاملة التكوين، أو اندماج أكثر من ورقة أو زهرة.

11-3-2- إنتاج النباتات الأحادية من حبوب اللقاح: Androgenesis

تفيد زراعة المتوك Anther Culture في إنتاج نباتات أحادية من حبوب اللقاح من خلال تكوين الأجنة Pollen Embryogenesis ، أو من خلال تكوين الكالوس Pollen Callusing. ويجب أن تؤخذ المتوك من نباتات حديثة الإزهار ويكون ذلك في مرحلة معينة من تكوين حبوب اللقاح قبل تفتح الزهرة. ويعود السبب في أخذ البرعم الزهري صغير وغير متفتح تحت ظروف إضاءة جيدة حتى تكون حبوب اللقاح غير ناضجة وفي مرحلة مناسبة للزرع .

11-4- أهمية مزارع المتوك وحبوب اللقاح:

ترجع أهمية هذه المزارع إلى الحصول على نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية إما من خلال تكوين الأجنة أو تكوين الكالوس ويفيد هذا الآتي:

- تستخدم النباتات الأحادية في الحصول على سلالات ثنائية نقية من المحاصيل الخلطية التلقيح وذلك بمعاملتها بالكولشيسين. ويمكن استخدامها مباشرة في برنامج تربية النبات.
- تفيد مزارع المتوك في التعرف على الطفرات المنتخبة بسهولة.
- تستخدم زراعة المتك وحبوب اللقاح في الدراسات السيتولوجية المتعمقة
- تفيد في دراسة آلية تكون نباتات كاملة من خلية أو حبة طلع والعوامل التي تؤثر في تكوين الأجنة الخضرية من حبوب الطلع.
- يمكن الحصول على سلالات متباينة وراثياً عن طريق زراعة المتك وحبوب اللقاح من خلال تكوين الكالوس وتجديده، ويتم الحصول على سلالات مهمة يمكن الاستفادة منها في برنامج التحسين الوراثي. فقد تم إنتاج سلالات من حبوب الطلع ذات إنتاجية عالية من المواد الفعالة.
- تفيد النباتات الأحادية في الحصول على مختلف حالات التعدد الكروموسومي الغير تام.

11-5- طريقة زراعة المتك:

- تنزع المتوك المغلقة التي تحتوي على حبوب اللقاح غير الناضجة وهي ما تزال في حالة انقسام (بعد الانقسام المنصف وقبل أول انقسام خيطي).
- تؤخذ البراعم الزهرية من نباتات مزروعة في بيت زجاجي، تعقم البراعم الزهرية، وتفصل المتك بعناية من البراعم الزهرية.
- توضع المتوك المعقمة في بيئة مغذية معقمة ويشق المتك من الجانب باستخدام مشروط حاد ومعقم وتؤخذ الأسدية وتوضع في طبق بتري معقم، ويزال الخيط بعناية لتبقى المتوك فقط، ويجب أن تكون عملية شق المتوك بعناية حتى لا يحدث ضرر، لأن تجريحها يحفز غالباً تكوين كالوس من خلايا جدر المتوك وهي خلايا ثنائية.

وبعد شق المتوك بعناية تنتشر حبوب اللقاح على سطح البيئة الصلبة، كما يمكن زراعتها في بيئة سائلة وتحفظ على هزاز بطيء.

11-5-1- شروط تحضين مزارع المتوك:

تحضن مزارع المتوك أو حبوب اللقاح في حاضنات ذات كثافة ضوئية (5000-10000 لوكس) والفترة الضوئية 16 ساعة ودرجة حرارة من 22-28م. تتحول جدر المتوك تدريجياً للون البني ثم تنفتح خلال 3-8 أسابيع على حسب النوع النباتي وذلك بسبب الضغط الداخلي للكالوس المتكون من حبوب اللقاح أو بسبب النبيتات التي تنمو منها، ثم تفصل هذه النبيتات أو النموات الخضرية المتكونة عن الكالوس بعد أن يصل طولها إلى 3-5مم، وتنقل إلى وسط مناسب للنمو الجذري.

تنقل النباتات المجذرة إلى أصص صغيرة تحتوي على خليط من التربة والبيتموس، وتغطي هذه الأصص بأكياس بلاستيك وتوضع في صوبة رطبة، وبعد أسبوع ترفع الأكياس البلاستيكية وبعد أسبوعين من ذلك تنقل النباتات إلى أصص أكبر حتى تصل إلى مرحلة الإزهار والنضج وهذه النباتات تكون أحادية، ويمكن تحويلها إلى نباتات ثنائية باستخدام الكولشيسين.

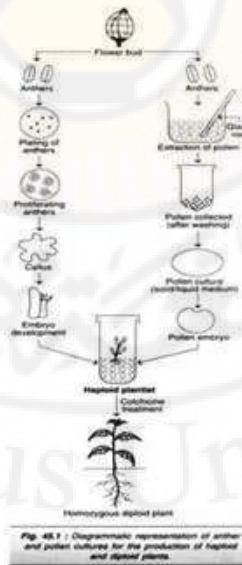


Fig. 48.1 : Diagrammatic representation of anther and pollen cultures for the production of haploid and diploid plants.

الشكل (11-1): زراعة المتك وحبوب اللقاح لإنتاج نباتات هابلويد

11-5-2- مثال تطبيقي:

زراعة المآبر:

يعتبر نبات التبغ النبات النموذجي لزراعة المآبر وحبوب اللقاح وبالتالي يعتبر البروتوكول التالي هو البروتوكول الأساسي لزراعة المآبر في نبات التبغ:

- يتم أخذ المآبر غير الناضجة التي تحوي على حبوب اللقاح بعد الانقسام المنصف، وقبل أول انقسام خيطي إذ تعتبر هذه المادة المثالية لاستحداث الكالوس.
- تنقل البراعم الزهرية غير المفتحة إلى جهاز العزل الجرثومي (دون القيام بغسلها بالماء والصابون لأنها أجزاء دقيقة جداً) ، كل برعم زهري يحتوي على 5 سبلات - 5 بتلات - 5 أسدية.
- يتم إجراء تطهير سطحي للبراعم غير المفتحة بغمرها بالكحول الإيثيلي 70% لمدة 10 ثواني ثم تنقل إلى محلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 2% ، ثم تغسل بالماء المقطر المعقم 3 مرات لإزالة آثار المواد المستخدمة في التعقيم.
- البراعم الزهرية في نبات التبغ يتم جمعها، وهي غير متفتحة بعد 3-4 أشهر من الزراعة، ويتم قياس طول المآبر، وكذلك طول البراعم، إذ يتم انتقاء براعم بطول 17-25 ملم (1-2.5 سم) وتستبعد البراعم التي بدأت بالتفتح.
- لاستخلاص المآبر تؤخذ البراعم، ويجرى قطع طولي باستخدام المشروط، ثم يتم استخراج المآبر ويتم فصل الخيط السدوي عن السداة (ثم نعمل شق في السداة لإخراج حبوب الطلع).
- يجب لفت النظر إلى ضرورة عدم حدوث أي ضرر على مستوى المثبر، وذلك حتى لا يتكون الكالوس، لأنه قد لا يكون مطلوباً لذلك يجب استبعاد الأجزاء المتضررة أثناء الزراعة.

تؤخذ المآبر وتوضع في ظروف ظلامية بزراعتها على بيئة مناسبة (MS) الصلبة أو بيئة White أو (Nitsch and Nitsch).

- تنقل الخرزات المزروعة إلى الحاضنة وبعد 4 أسابيع تتطور المآبر وتعطي أجنة وبعدها تتطور الأجنة وتعطي نباتات كاملة قد تكون أحادية الصيغة الصبغية أو ثنائية الصيغة الصبغية.

- في بعض الحالات قد تتطور المآبر وتعطي نسيج كالوس، حتى مراحل متقدمة من التكشف. يتم فحص الكالوس فقد تحوي على خلايا 1 N و 2 N وخلايا ثلاثية الصيغة الصبغية.

شروط التحضين :

- ظلام، حرارة 24-28م، فترة ضوئية 14 ساعة/ يوم ، شدة ضوئية 2000 لوكس.
- بعدها تؤخذ النباتات بطول 5سم وتنقل إلى بيئة آجار مغذية جديدة بعد غسل قواعد الجذور بالماء الجاري ونضعه في ظروف حرارة 27 م وفترة ضوئية 16 ساعة /يوم، شدة ضوئية 1600 لوكس ورطوبة 75%.
- ثم تتم عملية تقسية هذه النباتات بفتح أنابيب الاختبار، وسحب هذه النباتات من البيئة فريداً، وتغسل قواعد الجذور بالماء المقطر المعقم (3 مرات)، وتوضع في أصص صغيرة تحوي بيتموس معقم، ويتم تغطية النباتات بمادة بلاستيكية شفافة ويثقب الكيس (2-3 ثقب) للتهوية، ثم نزيد عدد الثقوب إلى (4-5 ثقب) بعد أسبوع ثم بعد أسبوع آخر ننزع الكيس، وبعد 4 أسابيع تنقل النباتات لأصص أكبر حجماً وتنزع الأكياس نهائياً، ويجب إجراء العد الكروموزومي لمعرفة فيما لو كان النبات أحادياً أو ثنائياً الصيغة الصبغية.
- وقد تم زراعة المآبر في بعض أصول العنب وخاصة ب41 بدءاً من البراعم وتوضح الأشكال (11-2) شكل البرعم الزهري في العنب. تم أخذ المآبر وزراعتها. بعد فترة من الزمن كونت كالوس جنيني كما هو موضح بالشكل (11-3).
- نقل الكالوس الجنيني إلى وسط جديد لتشكيل الأجنة الخضرية كما هو موضح بالشكل (11-4). وقد تم الحصول على أجنة خضرية من زراعة المآبر التي نقلت إلى وسط إنبات حيث نمت الأجنة وكونت نباتات كاملة كما هو موضح بالشكل (11-5).

11-6 زراعة حبوب الطلع

يمكن زراعة حبوب اللقاح بطريقتين:

11-6-1- الطريقة الأولى:

الطريقة المتبعة هنا تصف زراعة حبوب اللقاح المعزولة من التبع، هذه التقنية تعد البروتوكول الرئيسي لزراعة حبوب اللقاح وتتضمن المراحل الآتية:

- اختيار براعم الأزهار المناسبة غير المتفتحة، وتعقيم حبوب اللقاح المعزولة بدون الخيط السدوي.
- يوضع حبوب اللقاح في وعاء معقم صغير يحوي 20 مل من البيئة السائلة الأساسية (MS أو White أو Nitsch and Nitsch).
- ثم تجمع حبوب اللقاح على جانب الكأس المعقم بواسطة مكبس زجاجي (حقنة) لسحبها واستخراجها.
- بعد ذلك تتم فلتر حبوب اللقاح المتجانسة عبر منخل نايلون (قطر فتحاته 40-60 µ) لإزالة حبوب اللقاح المحطمة.
- حبوب اللقاح التي تم ترشيحها يتم تثقيفها باستخدام قوة الطرد المركزي بسرعة منخفضة (500-800 دورة في الدقيقة) لمدة 5 دقائق.
- تستبعد المواد الطافية (حطام حبوب اللقاح)، وتنقل حبوب الطلع السليمة لوسط سائل جديد، وتغسل مرتين بإعادة التثقيف، وتنقل إلى بيئة سائلة جديدة.
- أخيراً تخلط حبوب اللقاح في الحجم المقاس من الوسط السائل الأساسي لتكون الكثافة بحدود 40000 حبة بالمل. يؤخذ 2.5 مل من معلق حبوب اللقاح وتنتشر في طبق بتري، تنمو حبوب اللقاح بشكل أفضل في الوسط السائل لكن إن كان من الضروري يمكن أن تنمو بزراعتها في وسط صلب يحوي كمية قليلة من الآجار. كل طبق من أطباق البتري يغلق بواسطة شرائط Cello لتجنب الجفاف.
- تحضن أطباق البتري على درجة حرارة 27-30 م° تحت كثافة ضوئية منخفضة من الضوء الأبيض (LUX,500, 16 hr.)

- يمكن أن يلاحظ تشكل الأجنة الفتية بعد 30 يوماً وهذه الأجنة ستعطي عندما تنمو نباتات أحادية الصيغة الصبغية.
- النباتات أحادية الصيغة الصبغية تحضن على درجة حرارة 27-50 م° (LUX22000، 16 hr) ثم تنقل هذه النباتات إلى التربة كنباتات أحادية الصيغة الصبغية.

11-7- مقارنة بين زرع المتك وزرع حبوب اللقاح:

تعد طريقة زراعة المأبر طريقة سهلة، سريعة، عملية، وجود جدار المأبر يعطي فرصة لنمو حبوب اللقاح بشكل جيد. من مشاكلها نسبة النباتات وحيدة الصيغة الصبغية تكون قليلة لأنه يوجد خلط بين النباتات المتكونة من حبوب الطلع مع النباتات المتكونة من جدار المأبر، وهي إما تكون ثنائية أو مختلفة الصيغة الصبغية. تعطي زراعة حبوب اللقاح نباتات وحيدة الصيغة الصبغية بشكل أعلى من زراعة المتك، لا توجد مشكلة وجود الجدار في المتك، وتكون نسبة النباتات الثنائية الصيغة الصبغية أو المختلفة أقل من زراعة المتك. كما تكون نسبة تطور الخلايا إلى أجنة عالية. وأخير نسبة الكالوس المتكونة في زراعة حبوب اللقاح قليلة.

11-8- العوامل المؤثرة في زراعة المتك وحبوب اللقاح:

توجد العديد من العوامل التي تؤثر في زراعة المتك وحبوب اللقاح، وتختلف استجابة المتك بحسب الأنواع النباتية، ومن أهم العوامل المدروسة نذكر:

11-8-1- درجة تطور حبوب اللقاح في المتك عند الزراعة: يعد عامل تطور حبوب

اللقاح من أهم العوامل التي تعطي نتائج إيجابية في زراعة المتك وحبوب اللقاح.

في البداية لابد من إعطاء فكرة على كيفية تطور حبوب اللقاح في المتك. تشمل مرحلتين:

- المرحلة الأولى: تشكل الخلايا وحيدة الصيغة الصبغية Microsporogenesis ، وتتم من الخلايا الأم لحبوب اللقاح، ثنائية الصيغة الصبغية تقوم بالانقسام الاختزالي، وتشكل في نهاية المطاف أربع خلايا وحيدة الصيغة الصبغية.
- المرحلة الثانية: تطور الخلايا وحيدة الصيغة الصبغية، وتشكيل حبوب الطلع الناضجة Microgametogenesis. تخضع للانقسام الميوزي 1 و 2 لتشكيل

حبوب اللقاح الناضجة والتي لها قدرة على التلقيح والإخصاب. تحوي حبوب الطلع على نواتين وحيدة الصيغة الصبغية.

يختلف الموعد المناسب لزرع حبوب اللقاح، وهي بشكل عام بعد الانقسام الميوزي، وقبل نضج حبوب اللقاح، كما هو موضح بالشكل (11-6). ففي الفصيلة النجيلية من المفضل زراعة المتك وحبوب اللقاح بعد تكوين الأعراس في المرحلة الأولى وقبل الانقسام الميوزي الأول، وفي التبغ في مرحلة الانقسام الميوزي الأول والثاني، وفي البيتونيا عند نضج 90% من حبوب اللقاح في المتك (Margara, 1980).

وقد أوضحت التجارب بأن عامل درجة تطور المتك من أهم العوامل التي تؤثر في استجابة المتك لتكوين الأجنة وإعطاء نباتات أحادية الصيغة الصبغية في العديد من الأنواع النباتية مثل القرنفل الصيني *Dianthus chinensis* (Fu et al., 2008).

11-8-2- تعريض المتك للصدمات قبل زرعها:

يتم تعريض المتك قبل زرعها داخل الأنابيب إلى بعض الصدمات مثل درجة حرارة منخفضة كما هو الحال في القمح والتبغ. كما يمكن تعريض المتك إلى درجات حرارة مرتفعة فترة من الزمن تزيد من استجابة بعض الأنواع وتزيد في نسبة النباتات وحيدة الصيغة الصبغية الناتجة كما في نبات الكولزا *Colza*.

تعمل الصدمة الحرارية المنخفضة أو المرتفعة إلى خلل في الانقسام الميوزي في حبوب الطلع قبل نضجها مما يزيد من استجابتها بعد الزرع، وتزيد في نسب نباتات N 1.

في نبات التبغ، لوحظ عند تعريض المتك لدرجات حرارة منخفضة 5 م لمدة 72 ساعة أدى إلى تكون أجنة بنسبة 58% في المتك المزروعة، وقد تم الحصول على نتائج مماثلة في نبات فول الصويا (Rodriguez et al., 2004).

وفي نبات اللفت عند تعريض المتك لدرجات حرارة مرتفعة حوالي 35 م لمدة 24 ساعة زاد في نسبة تكون الأجنة من زراعة المتك.

11-8-3- تأثير الإضاءة: تلعب الفترة الضوئية والشدة الضوئية دوراً في نسبة استجابة المتك للنمو وتكوين الأجنة. فقد أوضحت بعض التجارب التأثير الإيجابي لطول النهار القصير، والشدة الضوئية الكثيفة في تكوين الأجنة في زراعة المتك وحبوب اللقاح.

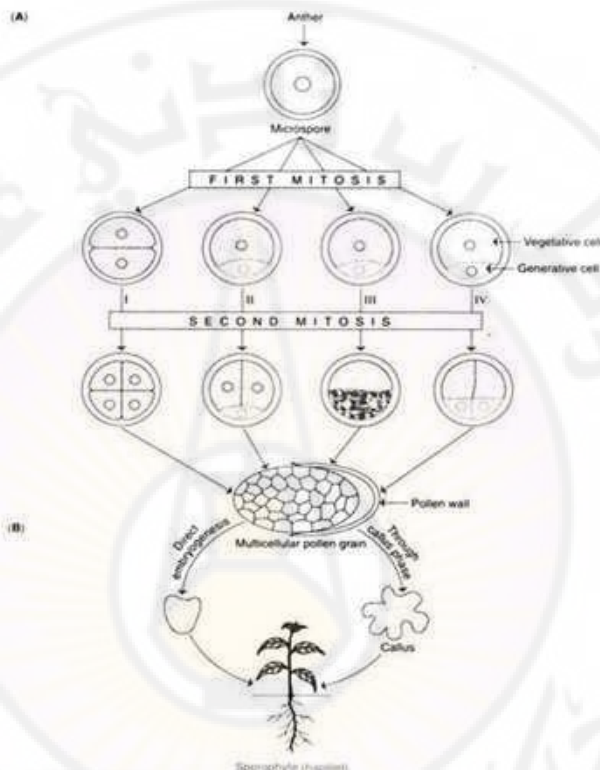


Fig. 45.2 : Diagrammatic representation of microspore divisions leading to the formation of a multicellular pollen grain (A), followed by the formation of haploid sporophyte (B) (Note : I, II, III and IV indicate respective pathways).

الشكل 11-6 : مراحل تطور حبوب اللقاح وانقسامها لتحديد الموعد المناسب لزراعتها

11-8-4- تأثير عمر النبات الأم وفترة الإزهار: كلما زاد عمر النبات الأم قلت استجابة المتك للنمو وتكوين الأجنة، كما لوحظ أخذ المتك من نباتات في بداية الإزهار تكون استجابتها عالية للنمو، وتقل عند أخذ المتك من أزهار في نهاية فترة الإزهار.

11-8-5- تأثير عوامل الوسط المغذي: يلعب تركيب الوسط المغذي دوراً مهماً في استجابة المتك وحبوب اللقاح.

- تركيز السكروز في الوسط: تحتاج بعض الأنواع النباتية إلى إضافة تراكيز عالية من السكروز أعلى من 80 غ/ل في الوسط المغذي مثل بعض أنواع الفصيلة النجيلية، وبعض الأنواع تحتاج إلى تراكيز خفيفة جداً 20 غ/ل مثل بعض أنواع الفصيلة الباذنجانية والفصيلة الزنبقية.
- تركيز الهرمونات النباتية في الوسط: لوحظ إضافة الأوكسين 2,4D. إلى الوسط المغذي بتراكيز 1 مغ/ل يزيد من استجابة المتك وحبوب اللقاح، للانقسام الخلوي ويزيد من تطورها. كما هو الحال في الفصيلة الصليبية والنجيلية. بينما لوحظ استجابة جيدة في بعض الأنواع النباتية عند استخدام تراكيز خفيفة من الأوكسين كما هو الحال في بعض أنواع الفصيلة الباذنجانية.
- إضافة الفحم المنشط: لوحظ عند إضافة الفحم المنشط إلى الوسط المغذي يزيد في نسبة تكون الأجنة الخضرية في زراعة حبوب اللقاح لبعض الأنواع النباتية مثل البطاطا والرز والتبغ. يعمل الفحم المنشط على امتصاص مثبطات النمو المفرزة في الوسط مما يؤدي إلى زيادة استجابة المتك وحبوب اللقاح المزروعة للنمو والتطور.

11-9- تقانة مضاعفة النباتات وحيدة الصيغة الصبغية Doubled Haploids :

تعد تقانة مضاعفة النباتات وحيدة الصيغة الصبغية إحدى التقانات الحديثة والتي يتم بواسطتها الحصول على سلالات نقية. والتي استخدمت في برامج تربية النبات في العديد من المحاصيل والنباتات البستانية. يتم الحصول على سلالات نقية بهذه الطريقة خلال سنة تقريباً، بينما في البرامج التقليدية عن طريق التلقيح الذاتي، تحتاج عدة سنوات إلى عشرات السنين في الأشجار المثمرة. ولابد من التمييز بين النباتات ثنائية الصيغة الصبغية والنباتات مضاعفة الهابلويد، في كلا الحالتين النباتات ثنائية الصيغة الصبغية، لكن في الحالة الأولى تحمل الصبغيات مورثات متشابهة أو مختلفة في كل زوج من الصبغيات، أما في النباتات مضاعفة الهابلويد تكون الصبغيات وترتيب المورثات متشابهة تماماً Homogenous genome . تعد السلالات مضاعفة الهابلويد أكثر فاعلية في برنامج التهجين بغرض الحصول على أصناف جديدة (Rahman and Michalak de Jimenez, 2016)،

وتستخدم هذه التقنية في برنامج تربية النباتات بشكل روتيني مثل برنامج تحسين نبات الكانيولا (Xu et al.,2007)، ولابد من الإشارة أن استخدام هذه التقنية تعطي هجن نقية 100%، كما تقصر البرنامج الزمني لبرنامج التربية، وتستخدم النباتات مضاعفة الهابلويد في الدراسات الوراثية وفي تطوير المعلمات الجزيئية.

تسمح تقنية زراعة حبوب اللقاح بإدخال الجينات بإحدى طرائق الهندسة الوراثية. وتسمح تقنية مضاعفة الهابلويد في تثبيت الجين المدخل في الصبغيات وتصبح النباتات المعدلة وراثيا أكثر ثبات وهذا تكون نتائج التعديل الوراثي أكثر فاعلية. ففي القمح تم إدخال مورثة زيادة التحمل للملوحة (*HVI1*) عن طريق حبوب اللقاح وتم تثبيت هذه الصفة بتقانة مضاعفة الهابلويد في الصبغيات المتشابهة (Chauchan and Kurana,2011).

11-9-2-بروتوكول إنتاج نباتات مضاعفة الهابلويد:

سيتم وصف التقنية من خلال مثال على نبات اللفت *Brassica napus* وفق الخطوات الآتية:

- 1- تؤخذ البراعم الزهرية من نباتات جيدة النمو ومرباة داخل بيت زجاجي، وتنقل النباتات إلى غرفة نمو عند بدء الإزهار على درجة حرارة 15م نهارا/10 م ليلاً و16 ساعة إضاءة، وتترك لمدة أسبوع حتى موعد أخذ البراعم الزهرية في مرحلة بعد الانقسام الاختزالي وقبل الانقسام الميوزيك (الشكل 11-6). ويمكن التعرف وتحديد فترة أخذ البراعم من خلال تحديد حجم البراعم.
- 2- تعقم البراعم الزهرية ثم تستخلص حبوب اللقاح في وسط سائل، ويراعى عند التعقيم واستخلاص حبوب اللقاح أن تكون درجة حرارة المحاليل منخفضة حوالي 4م.
- 3- تزرع حبوب اللقاح بتركيز 40000 خلية بالمل، في وسط مغذي سائل مع إضافة الكولشيسين بمعدل 200 ميكرومول لكل 10مل من الوسط الحاوي على الميكروسبور.
- 4- توضع خلايا الطلع المزروعة لمدة 48 ساعة بالظلام في حاضنة على درجة حرارة مرتفعة 32 م.

5- يغسل مستخلص حبوب اللقاح بإضافة نفس الوسط المغذي لاستبعاد الكولشيسين وينقل، ويؤخذ الراسب الحاوي على حبوب اللقاح ويوضع في الظلام لمدة 12 يوماً على درجة حرارة 22 م وذلك بعد إضافة وسط مغذي سائل جديد. يجب في كافة المراحل المحافظة على عقامة ونظافة العمل. وبعدها تنتقل إلى وسط جديد مع لمدة 12-20 يوماً على أن يتم تبديل الوسط المغذي السائل مرة كل أسبوعين وفي نهاية هذه المرحلة تكون الأجنة قد تكونت.

6- تنتقل الأجنة إلى وسط صلب لتنمو وتشكل نباتات كاملة، وهذه الفترة تحتاج من شهر حتى ثلاثة أشهر، يتم تعريض الأجنة لدرجات حرارة منخفضة 4 م لمدة 10 أيام، ثم تنتقل إلى غرفة النمو على درجة 27 م لمتابعة تطورها حتى تصبح جاهزة للنقل إلى الظروف الطبيعية.

7- بعد ثلاثة أشهر من النقل النباتات مضاعفة الهابلويد تنمو بشكل طبيعي وتزهر وتكون بذور، أما النباتات الهابلويد يكون نموها ضعيفاً وتنمو بشكل غير طبيعي ولا تزهر وإذا ازهرت لا تكون بذوراً. وهنا تتوجب دراسة حالة تقييم للسلاسل الناتجة للتمييز بين النباتات الهابلويد من النباتات مضاعفة الهابلويد.

8- كما يمكن التعرف على محتوى النباتات بشكل مبكر فيما إذا كانت هابلويد أو مضاعفة الهابلويد أو متعددة العدد الكروموزومي من خلال الدراسات السيتولوجية والتي عن طريقها يمكن معرفة عدد الكروموزومات في النباتات الناتجة (Rahman and Michalak de Jimenez, 2016).

ولابد من الذكر أخيراً بأن كافة العوامل التي تؤثر في زراعة المتك وحبوب اللقاح تؤثر في إنتاج النباتات مضاعفة الهابلويد. كما يمكن استخدام مواد أخرى غير الكولشيسين في مضاعفة الصبغيات مثل (trifluralin, oryzalin, and amiprophosmethyl (APM)، وهي مبيدات عشبية.

وقد تمكن فريق فرنسي من الحصول على نباتات مضاعفة الهابلويد في الإجاص وبمعاملة النموات الغضة بوسط مغذي سائل والمضاف له الأوريزالين بتركيز 300

ميكرومول لمدة 48 ساعة قبل نقلها إلى نفس الوسط الخالي من مادة الأوريزالين (Bouvier et al.,2002).

ولابد من الإشارة بأن هذه التقنية مستخدمة بشكل تجاري في إنتاج السلالات النقية في العديد من برامج تربية النبات، وإنتاج الأصناف التجارية، وفي برامج إنتاج بذار النباتات البستانية وإنتاج الهجن.





الفصل الثاني عشر

زراعة الجذور الشعرية

Hairy root culture

1-12- مقدمة Introduction :

تعد الطبيعة مصدر إلهام للإنسان، ومنها يكتشف الكثير من المعلومات المهمة التي لها آثار تطبيقية في المجالات المختلفة.

لاحظ العلماء إصابة بعض جذور النباتات البرية بمرض بكتيري يدعى مرض الجذور الشعرية (الشكل 1-12)، وهو مرض يصيب الجذور وتتكون في منطقة الإصابة جذور ليفية رفيعة وكثيفة. قام علماء أمراض النبات بدراسة هذا المرض في الطبيعة، واستطاعوا تحديد المسبب وهو نوع من البكتيريا السالبة التي تعيش في التربة وتدعى الأغروباكتريوم ريزوجين *Agrobacterium rhizogene*، تحوي البكتيريا على بلاسميد يحمل مورثات تعمل على تحفيز تكوين الهرمونات النباتية بتركيز عالية (الأوكسينات والسيتوكينينات)



الشكل (1-12): مرض الجذور الشعرية في الطبيعة

عند تعرض جذور النباتات في الطبيعة إلى جروح، تهاجم بكتيريا الأنسجة الجذرية وتدخل إلى داخل الخلايا النباتية، فينتقل البلاسميد إلى داخل الخلايا ويندمج مع جينوم الخلايا النباتية. تنتقل المورثات البكتيرية وتندمج مع جينوم الأنسجة النباتية الجذرية ويحفزها لإنتاج

الهرمونات النباتية التي تحفز تكوين ونمو الجذور اللبفية مسببة ظهور المرض في جذور النباتات المصابة.

أدت هذه الاكتشافات إلى تطوير تقنية مهمة في مجال التقنية الحيوية النباتية وهي تقنية زراعة الجذور الشعرية Hairy root culture التي تعد إحدى تقنيات التعديل الوراثي التي يمكن استخدامها في نقل بعض المورثات المهمة من نبات إلى نبات آخر .

12-2-2- تعاريف خاصة بالجذور الشعرية Terminology :

12-2-1- زراعة الجذور الشعرية: عبارة عن زراعة أجزاء نباتية مختلفة مع الأغروباكتريوم ريزوجين Agrobacterium rhizogene ضمن شروط معقمة بهدف نقل البلاسميد Ri plasmid من البكتريا إلى داخل الخلايا النباتية واندماجها مع جينوم الخلايا مما يحفز على اصطناع الهرمونات النباتية وتحريضها في تكوين الجذور الشعرية ونموها وإكثارها.

12-2-2- الأغروباكتريوم: بكتريا سالبة من بكتريا التربة ويوجد منها نوعين، تستخدم في التقنية الحيوية النباتية:

-النوع الأول: أغروباكتريوم ريزوجين: يستخدم في تقنية الجذور الشعرية.

-النوع الثاني: أغروباكتريوم تومافيسينس Agrobacterium tumefaciens ويستخدم في النقل المورثي والحصول على نباتات معدلة وراثياً.

12-2-3- البلاسميد Plasmid : هو جزء من البلاسميد البكتيري، يوجد في الأغروباكتريوم وهو قطعة من الـ DNA ، ri DNA أو T-DNA تحوي حوالي 20000 جزء من الـ DNA. ويحوي مجموعة من الجينات التي تعمل على تكوين الأنزيمات المحفزة لاصطناع الأوكسينات والسيتوكينينات، كما تحوي الأنزيمات الخاصة باصطناع الأوبيينات Opines التي تعد مصدر غذاء للبكتريا (أزوتي، والطاقة).

كما هو موضح بالشكل (12-2).

12-2-4- الأوبين Opines: مركبات عضوية توجد في الجذور الشعرية أو في التدرن السرطاني البكتيري، يتم اصطناعها من قبل المتطفل Agrobacterium rhizogene حيث توجد الأنزيمات المسؤولة عن اصطناع الـ Opines في البلاسميد البكتيري الذي يتم نقله