وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الانبار- كلية الزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق
المرحلة الرابعة

المادة: زراعة انسجة نبات
مدرس المادة: أ.م. د. محمد عبد الغفور محمد
العام الدراسي 2020 - 2021

بنية المقرر

الأسبوع	الساعات	مخرجات التعلم المطلوبة	اسم الوحدة / المساق أو الموضوع	طريقة التعليم	طريقة التقييم
الأول	5	1 الإلمام بتاريخ وتطور الزراعة النسيجية	مقدمة ونبذة تاريخية عن تطور زراعة النسيجة والخلايا النباتية.	المحاضرة، المناقشة ،تقارير، مختبرات افلام علمية	الأسئلة امتحانات سريعة وشهرية ونشاط صفي وتقارير
الثاني	5	التعرف على العوامل المؤثرة في نجاح زراعة الخلايا والانسجة النباتية	العوامل المؤثرة في نجاح زراعة الخلايا والانسجة النباتية	المحاضرة، المناقشة ،تقارير، مختبرات افلام علمية	الأسئلة امتحانات سريعة وشهرية ونشاط صفي وتقارير
الثالث	5	التعرف على المراحل المتبعة في الاكثار الدقيق.	المراحل المتبعة في الاكثار الدقيق. العوامل المؤثرة في كل مرحلة من هذه المراحل ومعالجة المركبات الفينولية	المحاضرة، المناقشة ،تقارير، مختبرات افلام علمية	الأسئلة امتحانات سريعة وشهرية ونشاط صفي وتقارير
الرابع	5	التعرف على التطبيقات العملية لزراعة الخلايا والانسجة النباتية	التطبيقات العملية لزراعة الخلايا الانسجة النباتية في مجال تربية وتحسين النباتات إنتاج نباتات سليمة من الاصابات بمسببات مرضية محددة.	المحاضرة، المناقشة ،تقارير، مختبرات افلام علمية	الم الأسئلة امتحانات سريعة وشهرية ونشاط صفي وتقارير
الخامس		امتحان الشهر الأول			
السادس	5	ان يتعلم الطالب طرق أنتاج بعض المركبات الصيدلانية	أنتاج بعض المركبات الصيدلانية	المحاضرة، المناقشة ،تقارير، مختبرات افلام علمية	الأسئلة امتحانات سريعة وشهرية ونشاط صفي وتقارير
السابع	5	ان يتعلم الطالب الاكثار السلالي السريع	الإكثار السلالي السريع	المحاضرة، المناقشة ،تقارير، مختبرات افلام علمية	الأسئلة امتحانات سريعة وشهرية ونشاط صفي وتقارير
الثامن	5	ان يتعلم الطالب أستحثاث ونمو الكالس	استحثاث ونمو الكالس	المحاضرة، المناقشة ،تقارير، مختبرات افلام علمية	الأسئلة امتحانات سريعة وشهرية ونشاط صفي وتقارير
التاسع	5	ان يتعلم الطالب ماهية الآليات المتعددة في دمج وزراعة البروتوبلاست	دمج وزراعة البروتوبلاست	المحاضرة، المناقشة ،تقارير، مختبرات افلام علمية	الأسئلة امتحانات سريعة وشهرية ونشاط صفي وتقارير
العاشر		امتحان الشهر الثاني			
الحادي عشر	5	ان يتعرف على زراعة الاعضاء النباتية	زراعة الاعضاء النباتية	المحاضرة، المناقشة ،تقارير، مختبرات افلام علمية	الأسئلة امتحانات سريعة وشهرية ونشاط صفي وتقارير
الثاني عشر	5	ان يتعلم الطالب زراعة الاجنة	زراعة الاجنة	المحاضرة، المناقشة ،تقارير، مختبرات افلام علمية	الأسئلة امتحانات سريعة وشهرية ونشاط صفي وتقارير
الثالث عشر	5	ان يتعرف الطالب على كيفية تكوين الاجنة الجسمية	تكوين الاجنة الجسمية	المحاضرة، المناقشة ،تقارير، مختبرات افلام علمية	الأسئلة امتحانات سريعة وشهرية ونشاط صفي وتقارير
الرابع عشر	5	تعليم الطالب زراعة حبوب اللقاح والمتوك وإنتاج نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية	زراعة حبوب اللقاح والمتوك وإنتاج نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية	المحاضرة، المناقشة ،تقارير، مختبرات افلام علمية	الأسئلة امتحانات سريعة وشهرية ونشاط صفي وتقارير
الخامس عشر		امتحان الشهر الثالث			

المراجع

1- اساسيات زراعة الانسجة النباتية. د. محمد عباس سلمان

2- المفاهيم الرئيسية لزراعة الخلايا والانسجة النباتية. د. مبشر صالح عمر ود. عبد المطلب سيد محمد

3- تقانات احيائية. د. كاظم ابراهيم الصميدعي

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الانبار- كلية الزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق
المرحلة الرابعة

المادة: زراعة انسجة نبات
مدرس المادة: أ.م. د. محمد عبد الغفور محمد
العام الدراسي 2020 - 2021

نبذة تاريخية عن تطور زراعة الانسجة والخلايا النباتية

المقدمة

تحتل تقنية زراعة الانسجة النباتية اهمية كبيرة من بين التقانات الاحيائية الاخرى، وهي تعني عزل خلية او نسيج او عضو نباتي وتعقيمه وزراعته على او ساط غذائية اصطناعية معقمة وتحت ظروف خالية تماما من المسببات المرضية ومن ثم تطور الجزء المزروع الى نبات كامل مشابه للأصل الذي اخذ منه ويتم ذلك تحت ظروف بيئية مسيطر عليها من الحرارة والرطوبة والإضاءة.

لقد اصبح استعمال هذه التقنية شائعا في معظم انحاء العالم وتدرسها اغلب الجامعات العالمية والمراكز البحثية والتي لديها فرق متخصصة للعمل في هذا الميدان سواء من الناحية الوراثية او تربية وتحسين النبات او من الناحية الفسيولوجية والكيمياء الحياتية او غيرها وتمتلك مختبرات متطورة للقيام بمثل هذه الاعمال. ولم يعد استعمال هذه التقنية مقتصرا على العاملين في مجال الاحياء المجهرية، حيث ان هناك مؤسسات متكاملة تقوم بإكثار النباتات خضريا واخرى متخصصة لإنتاج العقاقير الطبية والمواد الصيدلانية والبعض الاخر يقوم بإنتاج نباتات خالية من المسببات المرضية.

نبذة تاريخية

تعود المحاولات الاولى لزراعة الخلايا والانسجة والاعضاء النباتية الى العام **1903** عندما نشر الباحث الالماني **Habertandt** نتائج ابحاثه التي استمرت خمس سنوات حيث تمكن من زراعة خلايا بعض النباتات على وسط غذائي اصطناعي في محاولة منه تدفع هذه الخلايا للنمو والتطور الى نباتات كاملة. وبالرغم من النتائج التي الا انه خرج بمفهوم الطاقة الكامنة للخلايا (**Totipotantiality**) والذي اصبح فيما بعد حجر الزاوية تقنية زراعة انسجة النبات. ان مفهوم الطاقة الكامنة للخلايا يعني ان كل خلية من خلايا النبات لها القدرة على النمو والتطور الى نبات كامل مشابه للنبات الام اذا ما توفرت لها الظروف الملائمة من حيث الغذاء والحرارة والضوء. وبعد ذلك تمكن العالم **Hanning (1904)** من الحصول على انسجة الكالس من قمم الجذور المزروعة على اوساط غذائية محضرة مختبريا. وقد تطورت تقنية زراعة الانسجة تطورا بطيئا، ففي العام **1934** تمكن العالم **White** من استعمال قمم جذور نبات الطماطم وزراعتها في وسط غذائي سائل وتمكن من اكثار هذه الجذور بشكل مستمر. وتعد محاولة الباحث **Ball (1946)** اولى المحاولات لزراعة القمم النامية للأفرع الخضرية (**Shoot tips**) حيث تم تطورها الى نباتات كاملة مشابهة للنبات الام. ويأتي اكتشاف السايتوكاينينات من قبل **Miller** واخرون (**1955**) ليحقق طفرة نوعية في تقدم زراعة الانسجة النباتية. وبعد ذلك توصل الباحثان **Skoog** و **Miller (1957)** الى حقيقة مهمة في مجال زراعة الانسجة الا وهي ان نسبة الاوكسينات الى السايتوكاينينات في الوسط الغذائي تلعب دورا اساسيا في تحديد طبيعة نمو وتخصص الجزء المزروع.

وقد حقق العالمان **Murashige** و **Skoog (1962)** طفرة علمية نوعية في مجال زراعة الانسجة عندما تمكنا من تحضير تركيبة لوسط غذائي اصطناعي لزراعة انسجة نبات التبغ مكونة من العناصر المعدنية الاساسية الكبرى والصغرى والفيتامينات ومصدر الطاقة (**السكر**) وقد اصبح هذا الوسط فيما بعد من اشهر الاوساط الغذائية الاساسية المستخدمة في زراعة انسجة النبات ولازال يستخدم الى يومنا هذا.

لقد توالت الانجازات العلمية لاستخدامات زراعة الانسجة في مختلف المجالات حتى اصبحت في الوقت الحاضر من الهم التقانات التي تخدم مختلف العلوم وانه نادرا ما يخلو مركز للبحوث العلمية في العالم من المختصين في هذا المجال ومن المختبرات العلمية المتخصصة في مجالات علمية مختلفة. واستنادا الى هذه المعطيات فقد اتجه الباحثون الى تسخير هذه التقنية واستخدامها لحل العديد من المشاكل البحثية والعلمية وقد اخذت طريقها الى حيز التنفيذ والتطبيق في العديد من المحاصيل المهمة واثبتت جدواها.

❖ *بعض المصطلحات المستخدمة في زراعة الانسجة*

Totipotantiality (الطاقة الكامنة):- وتعني ان كل خلية من خلايا النبات لها القدرة على النمو والتطور الى نبات كامل مشابه للنبات الام اذا توفرت لها الظروف الملائمة من حيث الغذاء والضوء والحرارة.

***In Vitro* :-** وهي كلمة لاتينية تعني في زجاجة (**In glass**) ويقصد بها اجراء التجارب العلمية على الاعضاء النباتية في الاوعية الزجاجية بعد فصلها من النبات الام والتي تنمو تحت ظروف مسيطر عليها، وهي الاسم الرديف لزراعة الانسجة.

***In Vivo* :-** وهي كلمة لاتينية تعني في الطبيعة (**In life**) حيث يتم اجراء التجارب العلمية على الاعضاء النباتية تحت الظروف الطبيعية وهي مرتبطة بأجزاء النبات الحية الاخرى.

Explant :- وهي الجزء النباتي المستأصل من النبات الام والذي تم تهيئته للزراعة النسيجية ويكون اما خلية مفردة او نسيج او عضو نباتي.

Excise :- وهي استئصال او عزل انسجة او اعضاء نباتية وزراعتها على اوساط غذائية اصطناعية، مثل عزل القمة النامية تحت المجهر.

Adventitious :- وتعني عرضي وتطلق على الاعضاء النباتية **(براعم**، نموات خضرية، **جذور** وغيرها**)** نتجت بطريقة عرضية في غير الموضع الطبيعي لنشوئها او في وقت غير المعتاد لتكونها مثل تكون النموات الخضرية في نسيج الكالس او تكون الاجنة العرضية من الكالس بدون مبيض او عمليات تزاوج واخصاب وغيرها.

Mass production (الانتاج الكمي):- وهي عملية اكثار النباتات خضريا بأعداد كبيرة وعلى مستوى تجاري وهذه احدى استخدامات تقنية زراعة الانسجة.

Aseptic :- ويعني خالي من المسببات المرضية وهو الخلو من الملوثات كالفطريات والبكتريا والفيروسات وغيرها من الكائنات المرضية. وان خلو الوسط الغذائي من الكائنات الدقيقة هو متطلب هام واساسي لمزارع الانسجة النباتية.

Bud :- ويعني البرعم سواء كان خضريا (**Vegetative bud**) او زهريا (**Flowering bud**) وهو مازال في حالة سكون ولم ينمو بعد وعادة ما يكون محاطة بعدة اوراق حرشفية تسمى **Bud scale .**

Axillary bud :- وهو برعم ابطي يتواجد في اباط الاوراق وينشأ من الخلايا المرستيمية الابطية لبادئات الاوراق. وتكون البراعم الابطية مصدرا لإنتاج اعداد كبيرة من الافرع ويتم ذلك خلال استخدام منظمات النمو التي تعمل على تثبيط السيادة القمية للقمم النامية وتشجيع انتاج النموات الجانبية.

Induction :- وهو الحث او العوامل التي تؤدي الى التغيرات الفسيولوجية التي تعمل على حدوث ظاهرة بيولوجية اثناء عمليات التطور والتي ينشأ عنه عملية النشوء (**Initiation**).

Initiation:- هو اول تغير يمكن مشاهدته تحت المجهر لتكوين الخلايا وتمايزها عند تطورها الى اعضاء.

Meristem :- هي مناطق النمو والانقسام وتكوين وبناء البروتوبلاست ومنشأ الانسجة الجديدة في النباتات. وعادة ما تكون الخلايا المرستيمية خلايا غير متمايزة (**Undifferentiated**) ومنه تتكون الانسجة المتخصصة وظيفيا او فسيولوجية وتوجد في القمم النامية للأفرع الخضرية او قمم الجذور وفي اباط الاوراق وخلايا الكمبيوم الحزمي واماكن النمو الاخرى مثل الاوراق الحديثة وغيرها.

Meristemoid :- كتلة من الخلايا المرستيمية العنقودية لها القدرة على النمو والتطور وتحتوي على سيتوبلازم كثيف مع عدد من الفجوات العصارية.

Callus :- هي انسجة الجروح التي تتكون عند الأسطح المجروحة في النبات وهي انسجة برنكيمية غير متمايزة وتطلق بشكل واسع على الخلايا المفككة الناتجة من زراعة الاجزاء النباتية المختلفة على اوساط غذائية محضرة مختبريا.

Cybrid (الهجين السايتوبلازمي):- وهو الهجين الناتج من دمج سيتوبلازم الخلية مع نواة وعضيات خلية اخرى وتستخدم تقنية زراعة الانسجة لتشجيع نمو وانقسام الخلية الهجينية لغرض الإكثار.

Differentiation (التمايز):- وهي التغيرات الفسيولوجية والمورفولوجية التي تحدث في الخلايا والانسجة والاعضاء النباتية اثناء النمو والتطور لتصبح متخصصة لأداء دور فسيولوجي وحيوي معين.

Organogenenesis (تكوين الاعضاء):- هي عملية نشوء الاعضاء النباتية كالنموات الخضرية او الجذور من الاجزاء النباتية المزروعة او من انسجة الكالس الناتجة منها.

Diseasse – free plants :- هي النباتات الخالية من اي من المسببات المرضية كالبكتريا والفطريات والفيروسات وغيرها وتستخدم مثل تلك النباتات كمصدر للحصول على نباتات ذات مواصفات مثالية.

Somatic embryos (الاجنة الجسمية او الخضرية):- وهي الاجنة العرضية الناتجة من زراعة الاجزاء النباتية او من انسجة الكالس الناتجة منها في خارج الجسم الحي (**In Vitro**) وهي تشبه مورفولوجيا الاجنة الجنسية.

Embryogenesis (تكوين الاجنة):- وهي عملية تكوين الاجنة بطريقة غير جنسية وعادة تنشأ الاجنة اللاجنسية اما مباشرة من زراعة الجزء النباتي او بطريقة غير مباشرة من الكالس.

Shoot apex :- هي القمة المرستيمية الهرمية وتكون على شكل قمة (**dome**) وتتكون من خلايا نشطة سريعة الانقسامات فضلا عن خلايا استطالة الساق وتكون محاطة بزوج واحد من بادئات الاوراق.

Shoot tip :- وهو قمة الفرع الخضري ويتكون من القمة المرستيمية وعدة ازواج من بادئات الاوراق والاوراق الحرشفية المحيطة بها.

❖ *متطلبات انشاء مختبرات زراعة الانسجة*

لغرض انشاء اي مشروع لزراعة الانسجة فان ذلك يتطلب مجموعة من المستلزمات الاساسية لتنفيذ ونجاح العمل ويعتمد ذلك على حجم المشروع والهدف المطلوب تنفيذه وفيما يلي المتطلبات الاساسية لأنشاء مركز متخصص لزراعة الانسجة:-

اولا- البنايات

تعتمد مساحة البنايات والمرفقات الملحقة بها على حجم المشروع والهدف منه وعلى العموم تكون موزعة كما يلي:-

1-.الادارة

وتشمل غرف المكتب الخاصة بإدارة المشروع والمنتسبين والعاملين فيه ويفضل ان تكون هذه البناية منفصلة عن بناية العمل الفني بحيث تكون المراجعات والزيارات لبناية الادارة فقط وعدم الدخول الى بناية العمل الفني لغرض المحافظة على النظافة والتعقيم وسرية العمل.

2- بناية العمل الفني وتشمل:-

أ-.مختبر اعداد الاوساط الغذائية وتوزيعها في اوعية الزراعة وتعقيمها وتكون مجهزة لهذا الغرض ويتوفر فيها العديد من الاجهزة مثل:-

-.الثلاجة **Refrigerator** - حمام مائي **Bath water.**

- الخلاط المغناطيسي **Megnetic sterrer** - المعقام **Autociave**

- الميزان الحساس **Digital balance** - الفرن الكهربائي **Oven.**

- الملاقط **forceps** الكبيرة والصغيرة - الابر **Needles** الدقيقة للتشريح.

- انابيب او زجاجيات للزراعة. - جهاز ال **Ph meter.**

- مصدر للماء والغاز والكهرباء. - المنظفات والمطهرات.

- جهاز التقطير **Distilling apparatus of water.**

- غسالة اطباق اوتوماتيكية **Washing machine.**

- المجهر الالكتروني **Electronic microscope.**

- دولاب لحفظ الكيمياويات او الزجاجيات **Cupboard.**

- مشارط **Scalpels** حادة لتقطيع الانسجة النباتية.

- القفازات **Gloves** تستعمل لمنع التلوث عن طريق اليدين او حماية البشرة من الكيمياويات والمواد الضارة الاخرى.

ب- غرفة اجراء الزراعة النسيجية ويوجد فيها اجهزة تعقيم الهواء، الهودات (**Laminar air flow hoods**) والتي يتم فيها استئصال وزراعة الاجزاء النباتية في الاوساط الغذائية ويجب ان تتوفر فيها شروط النظافة والتعقيم التام ولا يسمح بدخول غير العاملين اليها.

ج- الحاضنات وهي غرف خاصة بتحضين الزروعات وتحتوي على رفوف مزودة بإنارة خاصة وتكون الحرارة فيها مسيطر عليها.

3- البيت الزجاجي والظلل الخاصة بعملية الاقلمة.

4- غرف الصيانة والمخازن والمولدات الكهربائية وغيرها.

ثانيا- الكادر

يتطلب اي مشروع لزراعة الانسجة كادر اداري وفني متخصص يعتمد على حجم المشروع ومتطلباته.

ثالثا- الاجهزة والمعدات

وتشمل مجموعة متنوعة من الاجهزة الخاصة بزراعة الانسجة ومعدات الزراعة فضلا عن زجاجيات مختلفة لتحضير الاوساط الغذائية وتوزيعها وقناني خاصة لتوزيع الاوساط الغذائية فيها وغيرها من المواد.

رابعا- المواد الكيمياوية

وتشمل مجموعة متنوعة من الكيمياويات الخاصة بتحضير الاوساط الغذائية والفحوصات السيرولوجية ومواد التعقيم والمبيدات وغيرها من المواد.

ومن الجدير بالذكر انه يمكن انشاء مختبر صغير لزراعة الانسجة من غرفتين، **الاولى** تكون عامة لتحضير الاوساط الغذائية وتوزيعها وتعقيمها ويمكن عزل جزء منها لغرض وضع جهاز اجراء عملية الزراعة النسيجية (**الهود**). اما الغرفة **الثانية** فتكون خاصة لتحضين الزروعات فيها.

العوامل المؤثرة في زراعة الانسجة النباتية

يعتمد نجاح الجزء النباتي المزروع في الوسط الغذائي وتطوره اللاحق على العديد من العوامل المختلفة فمنها ما يتعلق بالوسط الغذائي ومنها ما يتعلق بالجزء المزروع او الظروف البيئية التي يتم حفظ المزروعات فيها **وكما يلي:-**

1- الوسط الغذائي

تستعمل زراعة الانسجة اوساط غذائية مختلفة حسب الانواع النباتية وحسب الصنف ضمن النوع الواحد ونوع الجزء المزروع والهدف من الزراعة. وتشترك جميع الاوساط الغذائية بالمتطلبات الاساسية من حيث الاملاح المعدنية ومصدر الطاقة ولكنها تختلف بتراكيز هذه المكونات ونوع منظمات النمو والفيتامينات والاحماض الامينية المضافة الى الوسط الغذائي. وقد توصل الباحثون في هذا المجال الى خلطات مختلفة من المكونات العضوية واللاعضوية والفيتامينات وغيرها من الاضافات لتكون الاساس في تحضير الوسط الغذائي.

ومن اشهر الاوساط الغذائية المستخدمة على نطاق واسع في زراعة الانسجة هي:-

وسط Murashige و Skoog (1962).

وسط White (1963).

وسط Gamborg واخرون (1968) ويعرف هذا الوسط باسم B5.

بالإضافة الى العديد من الاوساط الغذائية الاخرى. وتختلف هذه الاوساط في تراكيز الاملاح الرئيسية والثانوية المحضرة منها وكذلك في تركيز بعض المركبات العضوية ومنظمات النمو ونوع تركيز مصدر الطاقة (**السكر**) واستعمال مادة الاكار (**Agar**) بشكل واسع لتصليب الوسط

الغذائي واكسابه القوام الهلامي ويستخدم البعض مادة النشأ لهذا الغرض في حين تستخدم الاوساط السائلة في زراعة الخلايا المعلقة (**Suspension culture**).

كما ان لنوع السكريات وتراكيزها في الوسط الغذائية تأثير كبير على الانواع النباتية المزروعة فيه الكالس وفيما يخص منظمات النمو فأنها تعتبر من العوامل المحددة لتكوين الاعضاء النباتية من انسجة الكالس فمن الملاحظ ان زيادة تركيز السايتوكاينين عن الاوكسين تؤدي الى تكوين النموات الخضرية بينما في العكس من ذلك يؤدي الى تكوين الجذور وعند التوازن بينهما سوف يستمر نمو الكالس وتضاعفه دون حدوث تمايز فيه الى اعضاء. وفي بعض الحالات لوحظ ان وجود الجبرلين يؤدي الى تثبيط تكوين الاعضاء النباتية. اما وجود الاحماض الامينية في الوسط الغذائي فانه يؤدي الى زيادة تكوين الاعضاء النباتية في الانسجة المزروعة. ومن الجدير بالذكر ان اضافة خليط من الاحماض الامينية قد يؤدي الى تثبيط نمو الانسجة المزروعة وربما يكون ذلك بسبب التداخل والتضاد الذي يحصل بين الاحماض المستخدمة.

وتؤثر في الوسط الغذائي عدة عوامل نذكر منها:-

أ-.تركيز ايون الهيدروجين (PH) في الوسط الغذائي

يؤثر تركيز ايون الهيدروجين في امتصاص العناصر الغذائية من قبل الجزء المزروع في الوسط الغذائي وان افضل **PH** لنمو الانسجة والاجزاء النباتية المزروعة يقع بين **5 – 6** ويتم تعديل ال **PH** للأوساط الغذائية الى الحد المطلوب قبل تعقيمها. ومن الجدير بالذكر ان الاكار يتأثر بال **PH** فعندما يكون اقل من **5** يصبح الوسط الغذائي رجراجا ولا يتم تثبيت الجزء النباتي فيه بصورة صحيحة وعندما يكون اعلى من **6** يكون الوسط صلب جدا مما يعيق انتشار العناصر الغذائية الى الجزء النباتي بسهولة.

ب- الحالة الغازية

تعتبر تهوية الوسط الغذائي من الامور الاساسية والمهمة في نجاح زراعة الانسجة خاصة عند الزراعة في اوساط سائلة وفي هذه الحالة يتم تزويد المزارع في الاوساط السائلة بالهواء من خلال الرج او استخدام مضخات خاصة لهذا الغرض مع مراعاة ظروف التعقيم التام. وقد يؤدي تراكم الغازات في اوعية الزراعة الى التأثير السلبي على نجاح الزراعة النسيجية. قد يتراكم الاثيلين في اوعية الزراعة مما يتطلب التخلص منه وهذا يتطلب ان تكون اوعية الزراعة بمواصفات تسمح بالتنافذ دون ان تسمح بدخول الملوثات الى داخل الاوعية.

2- درجة الحرارة

تؤثر درجة الحرارة على العمليات الفسيولوجية في النبات تأثير كبيرا، حيث انها تتحكم بالعمليات الحيوية والكيميائية كما انها تؤثر في عمليات امتصاص الماء والاملاح وعملية فقدان الماء عن طريق النتح، حيث تؤدي درجات الحرارة العالية الى زيادة معدل فقد الماء. لذا تعتبر درجة الحرارة عاملا رئيسيا من العوامل المحددة لتطور الجزء النباتي المزروع والتكوين الظاهري له. وبصورة عامة فان تنمية الاجزاء النباتية على درجة حرارة **25م** يعتبر مناسبا

لمعظم النباتات مع وجود بعض الاستثناءات التي يتطلب تنميتها في درجات حرارة اعلى او اقل من ذلك. ومن الملاحظ ان الاجزاء النباتية المفصولة في مرحلة السكون لا تظهر استجابة جيدة للزراعة النسيجية ما لم تستوفي احتياجاتها الحرارية اللازمة لأنهاء السكون من خلال تعريضها الى درجات حرارية منخفضة كافية لهذا الغرض.

3- الضوء

لا تحتاج الانسجة المزروعة في المراحل الاولى للضوء بكميات كبيرة لكونها لا تقوم بعمليات التمثيل الضوئي بل تعتمد على ما يوفره الوسط الغذائي المزروعة فيه من مصدر الطاقة (**السكريات**) وفي المراحل الاخرى يعتبر الضوء عاملا مهما للسيطرة على عملية التكوين الظاهري للأنسجة وتكوين الاجنة الجسمية (**الخضرية**) وكذلك تكوين المجموع الخضري. كما انه من الضروري تعريض النباتات للإضاءة في مرحلة تهيئة النباتات لعملية الاقلمة قبل نقلها في اوعية الزراعة النسيجية الى البيت الزجاجي ويختلف تأثير الضوء على نمو وتطور الانسجة المزروعة تبعا **لاختلاف ما يلي:-**

أ-. طول الفترة الضوئية

يختلف تأثير الفترة الضوئية على تكوين الاعضاء النباتية حسب اختلاف النباتات وان تعريض الاجزاء النباتية المزروعة الى **16** ساعة اضاءة في اليوم يعتبر مناسبا لمعظم النباتات الا ان هناك حالات تنمو فيها الزروعات بشكل افضل في الظلام كما في حالة مزارع الكالس. وان استجابة الاجزاء النباتية المزروعة لطول الفترة الضوئية يعتمد على التغير الحاصل في مستويات الاوكسينات والسايتوكاينينات الداخلية.

ب- طول الموجة الضوئية

من خلال البحوث والدراسات وجد بأن **الضوء الابيض** يؤدي الى تحفيز تكوين البراعم، في حين ان **الضوء الاحمر** يحفز تكوين الازهار بينما وجد ان الظلام والاشعة **الحمراء البعيدة (Infra – red)** تحفز تكوين الجذور. بينما لوحظ ان **الضوء الازرق** يحفز نشوء النموات الخضرية في لب نبات التبغ.

ج- شدة الاضاءة

من الشائع استخدام الاضاءة في المرحلتين الاولى والثانية (**النشوء والتضاعف**)من مراحل الاكثار باستخدام تقنية زراعة الانسجة وعادة ما تستخدم شدة اضاءة **1000** لوكس خلالهما، في حين انه قد يتطلب زيادة شدة الاضاءة في المرحلة الثالثة (**مرحلة التجذير**) وربما تصل شدة الاضاءة فيها الى **10000** لوكس.

4- الجزء النباتي

يعتبر الجزء النباتي من العوامل الاساسية والمهمة في نجاح زراعة الانسجة ويتأثر نجاح الجزء المزروع على عدة عوامل منها:-

أ-.حجم الجزء النباتي Explant size

تزداد فرصة نجاح الجزء النباتي المزروع في الوسط الغذائي كلما ازداد حجمه سواء كان قمة نامية او كالس او غير ذلك. وقد اكدت العديد من الدراسات زيادة فرصة نجاح القمة النامية المزروعة كلما احتوت على عدد اكبر من بادئات الاوراق. ويكون حجم الجزء النباتي عاملا محددا في حالة انتاج نباتات خالية من المسببات المرضية وخاصة الفايروسية حيث انه من المعروف ان الفيروسات تزداد بزيادة حجم الجزء النباتي من ناحية اخرى فان عدد الافرع الناتجة من زراعة القمة النامية يتأثر بحجم الجزء المزروع فمثلا وجد ان زراعة القمة النامية لنبات الداوودي بطول **0.1 – 0.2** ملم قد اعطت فرعا واحدا في حين ان القمة النامية المزروعة بحجم **0.5 – 1.2** ملم قد اعطت افرعا عديدة.

ب- مصدر الجزء النباتي Source of the explant

تمتاز الخلايا النباتية بالقدرة والكفاءة على التكوين الجنيني ومن الملاحظ ان هذه القدرة تختلف باختلاف النسيج النباتي ضمن النبات الواحد وباختلاف الانواع النباتية. حيث ان الخلايا قد تفقد قابليتها على التكوين الجنيني الا اته بالإمكان حثها على استعادة القدرة على تكوين الاعضاء النباتية وتختلف هذه القدرة باختلاف الاعضاء النباتية. لقد لوحظ ان خلايا انسجة الكالس الناتجة من الجذور في بعض كونت جذورا فقط في حين ان خلايا الكالس الناتجة من انسجة خضرية كالأفرع او الاوراق لنفس النبات كونت افرع فقط.

ج- العمر الفسيولوجي The physiological Age

للأنسجة الفتية قابلية لاستعادة التكوين الظاهري مقارنة بالأنسجة الاكبر عمرا سواء كانت هذه الانسجة مستأصلة من نباتات عشبية او خشبية.

د- موعد اخذ الجزء النباتي The date of excising the Explant

يؤثر موسم اخذ الجزء النباتي ومرحلة نمو النبات الام في نجاح نمو وتطور الجزء المزروع، حيث ان استئصال الاجزاء النباتية في موسم النمو والنشاط يمنحها فرصة اكبر للنمو والتطور مقارنة بتلك المستأصلة في فترة السكون.

5- التركيب الوراثي Genotype

يلعب التركيب الوراثي للأنواع النباتية والاصناف ضمن النوع الواحد دورا كبيرا في مدى استجابة الاجزاء النباتية للزراعة النسيجية حيث ان هناك اصناف سهلة الاكثار خضريا في حين ان هناك اصناف اخرى ضمن نفس النوع صعبة الاكثار. **وقد يعزى سبب ذلك الى اختلاف المحتوى الهرموني في ما بينها** والذي ينعكس بدوره على احتياجاتها لمنظمات النمو المضافة الوسط الغذائي لأحداث نمو معين.

6- التعقيم Sterilization

ان الوسط الغذائي المستخدم في زراعة الانسجة يعتبر ملائما جدا لنمو المسببات المرضية. وعليه فان عملية تعقيم الاجزاء النباتية تعتبر ضرورية جدا لمنع نمو وتكاثر هذه المسببات واتي فيما لو تواجدت فأنها سوف تنافسه على الغذاء وتقوم بهاجمته مما يتسبب في موته. وقد تكون عملية التعقيم السطحي غير فعالة للتخلص من الكائنات الحية المتواجدة داخل النسيج المزروع.

7- الحالة الفسيولوجية للنبات الام Physiological state of the mother plant

تلعب الحالة الفسيولوجية للنبات الام دورا كبيرا في سلوك الجزء المزروع، فمثلا ان الجزء النباتي المأخوذ من اشجار بالغة غالبا ما يتطلب وسطا غذائيا يختلف في مكوناته عن الوسط المستخدم لزراعة الاجزاء المأخوذة من الاشجار في طور الحداثة.

مراحل الاكثار بزراعة الانسجة

تقسم مراحل الاكثار باستخدام تقنية زراعة الانسجة الى **اربعة مراحل رئيسية هي:-**

اولا- مرحلة انشاء الزروعات Establishment stage

وهي اولى مراحل الاكثار والتي يتم فيها اختيار الجزء النباتي المستخدم بأنشاء الزروعات ويتم اختيار الجزء النباتي حسب الهدف المطلوب وحسب نوع النبات. وان الهدف من هذه المرحلة هو الحصول على نمو اولي للأجزاء النباتية المزروعة سواء كانت قمم نامية او مرستيمات قمية او براعم جانبية .

وان العوامل الاساسية المؤثرة على هذه المرحلة هي:-

أ-.التخلص من مسببات التلوث.

ب- الاختيار المناسب للجزء النباتي **(Explant)**.

ج- مكونات الوسط الغذائي.

د- الظروف البيئية.

اهم المعوقات التي تواجه العاملين في هذا المجال في هذه المرحلة

1-.التلون البيئي (اسمرار) الوسط الغذائي Browning

ان بعض الانسجة التي تحتوي على نسب عالية من المواد الفينولية تكون صعبة الاكثار، ففي حالة زراعة القمم النامية المأخوذة من الاشجار الخشبية يؤدي الى تلون الوسط الغذائي باللون البني وخاصة المنطقة المحيطة بقاعدة الجزء النباتي المزروع **(Explant)** ويعتقد **ان سبب ذلك** يعود الى تحفيز نشاط انزيمات **Polyphenolase** نتيجة لأحداث الجروح في النسيج النباتي وتعمل هذه الانزيمات على اكسدة المركبات الفينولية متسببة في تكوين مواد مثبطة للنمو فضلا

عن تحول لون الوسط الغذائي الى اللون البني. ويعتقد البعض بأن مصدر المركبات الفينولية ناتجا اما من زيادة المحتوى الداخلي للجزء المزروع من هذه المواد وعند زراعته سوف تخرج من منطقة الجرح وتنتقل الى الوسط الغذائي، لو ان احداث الجروح يؤدي الى قيام النسيج النباتي بإنتاج هذه المركبات. ولضمان نجاح زراعة الانسجة المزروعة لابد من السيطرة على تأثير هذه المواد في تثبيط **النمو ويكون ذلك من خلال:-**

أ-.اضافة مواد مانعة للأكسدة:- حيث تضاف مواد تحد من اكسدة المواد الفينولية كاستخدام حامض الاسكوربك (**Ascorbic acid**) **والذي** هو فيتامين **C** وحامض الستريك (**Citric acid**) او اضافة مادة ال **Polyvinyl poly pyrolidine.**

ب- نقع الاجزاء النباتية بمحلول منع للأكسدة قبل زراعتـــــــــــــــــــــــــــه.

ج- اجراء عملية اعادة الزراعة في اوساط جديدة على فترات متقاربة (**3 – 7**) ايام.

د- تقليل شدة الاضاءة او الزراعة في الظلام خلال الفترة الاولـــــــــــــــــــى.

هـ- تقع الاجزاء النباتية المفصولة بالماء المقطر المعقم لبضع ساعات قبل زراعتها.

و- الزراعة في وسط غذائي سائل واجراء عمليات اعادة الزراعة بشكل متكرر لحين التأكد من خلو الوسط من هذه المواد.

ز- اضافة الفحم المنشط (**Activated charcoal**) الى الوسط الغذائي والذي يمتاز بزيادة المساحة السطحية لدقائقه مما يعمل على ادمصاص (**Absorption**) المواد الفينولية لغرض التخلص من تأثيرها الضار.

2- التلوث البكتيري Bacterial contamination

من الملاحظ ظهور التلوث بعد فترة من الزراعة على الرغم من اتخاذ كافة التدابير اللازمة لأجراء عملية التعقيم السطحي للأجزاء النباتية. فيلاحظ احيانا ظهور التلوث البكتيري بعد مدة قد تصل الى عدة اشهر من الزراعة. ويكون ذلك ناتج من نمو البكتريا في الوسط الغذائي خاصة في حالة استئصال اجزاء نباتية من اشجار خشبية حيث تعيش البكتريا داخل النباتي ثم تنمو نموا بطيئا ثم يزداد عددها وتظهر الى الوسط الغذائي مما تؤثر سلبا على نمو الجزء المزروع. ومن امثلة هذه البكتريا هي .**Eriwina sp** و **Bacillus sp.** وتعالج هذه الحالة من خلال اجراء عملية التفريغ الهوائي اثناء عملية تعقيم الاجزاء النباتية لغرض تغلغل المادة المعقمة الى داخل الاجزاء النباتية فضلا عن اضافة المضادات الحيوية (**Antibiotics**) الى الوسط الغذائي ويكون لها دورا في تحديد نمو البكتريا الا انها لا تقضي عليها نهائيا في بعض الاحيان.

لذا فان اولى العملية التي تتم في هذه المرحلة هي تعقيم الاجزاء النباتية بالمعقمات الكيميائية المناسبة لهذا الغرض من الجل التخلص من مسببات التلوث كالفطريات والبكتريا ومن ثم غسلها بالماء المقطر المعقم لإزالة تأثير مواد التعقيم لأن بقاءها يعيق نمو الاجزاء المزروعة. ويعتمد

نجاح اي برنامج لزراعة الانسجة على مرحلة النشوء التي يتم فيها الحصول على زروعات خالية من التلوث لتكون اساس للمراحل اللاحقة.

ثانيا- مرحلة التضاعف الخضري Vegetative multiplication stage

وهي ثاني مرحلة من مراحل زراعة الانسجة ويتم فيها زيادة عدد النموات الناتجة من الجزء النباتي المزروع والتي يطلق عليها **Propagules** والتي منها يتم انتاج العدد المطلوب من النباتات. فبعد زيادة نمو الجزء المزروع في المرحلة الاولى يتم نقله الى وسط غذائي جديد بعد مرور **4 – 6 اسابيع**. ان المكونات الاساسية للوسط الغذائي في كلا المرحلتين لا تختلف كثيرا ولكن هناك اختلاف في نوع وتراكيز منظمات النمو المستخدمة والتي تعتبر من العوامل المهمة جدا لنجاح هذه المرحلة. وعادة ما يكون تركيز السايتوكاينين اعلى من تركيز الاوكسين وقد يضاف الجبرلين بتراكيز واطئة الى الوسط الغذائي في هذه المرحلة لأحداث الاستطالة في النموات التي تتطلب ذلك كما في زراعة القمم النامية للبطاطا والداليا والقرنفل والداوودي وبعد الحصول على التضاعف تنفصل النموات عن بعضها العض وتزرع منفصلة في وسط غذائي جديد يحتوي على نفس المكونات لغرض احداث تضاعف متوالي للحصول على اعداد كبيرة من النموات الخضرية. وتختلف سرعة ومعدل التضاعف باختلاف النباتات ويتراوح بين **5 – 60** في فترة زمنية محددة مع الاخذ بنظر الاعتبار توفر الظروف الملائمة للتضاعف.

ثالثا- مرحلة التجذير Rooting stage

ان الهدف من هذه المرحلة هو تكوين مجموع جذري في قاعدة السيقان الناتجة من مرحلة التضاعف. حيث تفتقر الافرع الخضرية الناتجة من طريقتي الاكثار عن طريق البراعم الابطية والبراعم العرضية الى الجذور مما يتطلب تحفيز نمو الجذور من هذه الافرع. وعادة ما يتطلب اضافة الاوكسينات الى الوسط الغذائي الخاص بالتجذير ويختلف نوع الاوكسين المستخدم وتركيزه تبعا لنوع وصنف النبات. وان اضافة الاوكسينات الى الوسط الغذائي يعتبر من العوامل المشجعة لتحفيز نشوء الجذور وتختلف مدة التجذير اعتمادا على الانواع والاصناف النباتية المختلفة.وتستخدم في هذه المرحلة مكونات الوسط الغذائي الاساسية المستخدمة في المرحلتين السابقتين الا انه في بعض الاحيان يتطلب تغيير بعض مكونات الوسط الغذائي كاستخدام نصف تركيز املاح MS عند تجذير نباتات صعبة التجذير. لقد وجد ان النموات الخضرية لبعض النباتات تفشل في التجذير لدى زراعتها في الاوساط الغذائية **ويعود سبب ذلك الى تأثير السايتوكاينينات المستخدمة في مرحلة التضاعف.** وللتغلب على هذه الحالة يتم زراعتها في وسط غذائي خالي من السايتوكاينين لمدة اربع اسابيع ثم تنقل بعد ذلك الى وسط التجذير. وتستخدم في هذه المرحلة تركيبات مختلفة من الاوساط الغذائية مثل وسط **White** حيث وجد ان هناك بعض النباتات تكون استجابتها جيدة للتجذير في هذا الوسط. وقد يضاف الفحم المنشط (**activated charcoal**) الى الوسط الغذائي حيث لوحظ انه يؤدي الى تحسين التجذير ويتم العمل في الوقت الحاضر باتجاه تجذير السيقان القوية النمو والنشطة الناتجة من مرحلة التضاعف في التربة مباشرة سواء بمعاملتها او عدم معاملتها بالاوكسينات وهذا من شانه توفير الكثير من الجهد والمال مقارنة في حالة التجذير في اوعية الزراعة النسيجية.

رابعا- مرحلة الاقلمة Acclimatization stage

تعتبر هذه المرحلة من المراحل المهمة والاساسية التي يعتمد عليها نجاح اي برنامج للإكثار باستخدام تقنية زراعة الانسجة، حيث ان النباتات الناتجة في اوعية الزراعة تكون معتمدة في تغذيتها على الوسط الغذائي الاصطناعي ويتطلب تهيئتها تدريجيا للقيام بتصنيع غذائها بنفسها من خلال عملية التركيب الضوئي. حيث ان نقل النباتات بشكل مفاجئ من ظروف الزراعة في الاوعية الزجاجية والتي تكون فيها الرطوبة النسبية عالية جدا الى الحقل مباشرة سوف يعرضها الى الهلاك في اغلب الاحيان. وهذا يتطلب زراعتها تحت ظروف رطوبة عالية يتم تقليلها تدريجيا الى ان تصبح قادرة على تحمل الظروف البيئية المباشرة لتصبح قادرة على الاعتماد على نفسها في تصنيع غذائها. ان النبيتات الناتجة عادة ما تكون خالية من طبقة الكيوتكل في اوراقها او ان تكون رقيقة جدا حيث ان ظروف الرطوبة العالية المتوفرة في اوعية الزراعة تجعلها في غنى عن الحد من كمية الماء المفقودة عن طريق النتح فضلا عن ان الاوعية الناقلة في النبيتات تكون غير متطورة الى الحد الذي يجعلها كفوءة في الامتصاص. ويستخدم بعض الباحثين مواد مانعة لتبخر الماء ترش على المجموع الخضري للتعويض عن طبقة الكيوتكل لكنها غالبا ما تكون غير فعالة مما يتطلب اجراء عملية التقسية والاقلمة لمدة مناسبة قبل زراعة النباتات في المكان المستديم.

وتتطلب هذه العملية عناية فائقة حيث يتم غسل النباتات جيدا لإزالة بقايا الوسط الغذائي العالقة في الجذور ومن ثم نقل النباتات الى السنادين ووضعها في مكان محمي وتوفير رطوبة عالية حول النباتات في الايام الاولى ومن ثم تقليل الرطوبة تدريجيا حتى تصبح النباتات قادرة على الامتصاص بشكل كفوء لتعويض النقص الذي يحصل في الماء بسبب التبخر. وبعد تقسية واقلمة النباتات بشكل جيد لتكون قادرة لتحمل الظروف البيئية تترك لتنمو بصورة طبيعية.

❖ استخدامات تقنية زراعة الانسجة النباتية

اولا- الاكثار السلالي السريع Rapid clonal propagation

يعتبر الاكثار الخضري بزراعة الانسجة من اكثر المجالات نجاحا ويسمى الاكثار الدقيق وقد تحقق اكثار ما يزيد عن **600 نوع** نباتي تشمل انواع عشبية وشجيرية وشجرية سواء محاصيل او خضر او فواكه او اشجار غابات. وبالنسبة للمجالات الاخرى فقد استخدمت هذه التقنية في مجال تربية وتحسين النباتات من خلال الحصول على نباتات احادية العدد الكروموسومي وتوظيف ذلك في مجال التربية والتحسين. اما في مجال استخدام المطفرات المختلفة للحصول على اصناف جديدة فقد نجحت الى حد كبير في انتاج اصناف جديدة تتحمل الظروف البيئية او تتحمل الاصابة ببعض الامراض واصبحت زراعة الانسجة تقنية مهمة جدا في مجال امراض النبات.

اما بالنسبة للهندسة الوراثية فهي تعتبر مجالا واسع يمكن بواسطته تحقيق الكثير في تحسين القدرات الانتاجية لكثير من المحاصيل الزراعية ويعتمد ذلك على ادخال مادة وراثية جديدة الى البروتوبلاست او الخلية وكان ذلك يصاحبه الكثير من المشكلات اهمها عدم مقدرة المادة

الوراثية الجديدة على الاندماج في الهيئة الوراثية للنوع الاصلي ثم قدرتها على ترجمة معلوماتها الوراثية في السيتوبلازم ثم مستوى النبات الكامل ومع ذلك فقد استمرت المحاولات وامكن فعلا انتاج بعض الاصناف الجديدة من كثير من المحاصيل الاقتصادية باستعمال الهندسة الوراثية.

تعد طريقة اكثار النباتات باستخدام تقانة زراعة الانسجة واحدة من اهم التطبيقات العملية لهذه التقانة حيث امكن اكثار العديد من النباتات بهذه الطريقة والتي اثبتت جدواها الاقتصادية. تبدأ عملية الاكثار باستئصال الاجزاء النباتية المطلوبة ثم تعقيمها لغرض ازالة المسببات المرضية العالقة بها ومن ثم زراعتها بوسط غذائي معقم يحتوي على المتطلبات الاساسية للنمو والتكاثر. وقد اصبح بالإمكان انتاج توائم كثيرة جدا ومتماثلة من النباتات تصل الى اكثر من مليون نبات من اصل واحد مقارنة بالطرق التقليدية للإكثار التي يكون عدد النباتات الناتجة محدودا، ومن الجدير بالذكر ان الثبات الوراثي للنباتات الناتجة يعتمد على طريقة الاكثار المستخدمة. لقد امكن استخدام هذه التقانة في اكثار العديد من الاجناس النباتية التابعة لعوائل نباتية مختلفة ويضم كل جنس الكثير من الاصناف.

مميزات الاكثار باستخدام تقانة زراعة الانسجة

اصبحت تقنية زراعة الانسجة من اهم التقانات الأحيائية الحديثة التي انتشرت انتشارا واسعا واستخدمت في العديد من المجالات لما تمتاز به من مواصفات على درجة عالية من الاهمية، **ومن مميزات هذه التقنية ما يلي:-**

1-.نظرا لكون عملية زراعة الانسجة تجري في ظروف خالية من المسببات المرضية وتتم جميع مراحلها تحت التعقيم التام فأن الشتلات الناتجة منها تمتاز بكونها خالية من الامراض والاصابات الحشرية المختلفة.

2- طبقا لما ورد اعلاه فأن الشتلات الناتجة تكون صحية وقوية النمو وتكون اسرع في نموها من الشتلات المكثرة بالطرق التقليدية.

3- بسبب قوة نمو النباتات الناتجة وخلوها من الامراض فأنها تكون ذات انتاجية عالية مقارنة بتلك الناتجة من الاكثار بالطرق التقليدية.

4- التماثل الوراثي للنباتات المكثرة خضريا بهذه التقنية، حيث تكون مشابهة للأصل الذي اخذت من الاجزاء النباتية المزروعة واعتمادا على طريقة الاكثار المتبعة وتكون الشتلات الناتجة ذات حجم متشابه تقريبا.

5- يمكن استخدام هذه التقنية للإكثار في اي وقت من السنة لأنها تتم تحت ظروف مسيطر عليها ولا حاجة للتقيد بموسم الاكثار.

6- لا تتطلب عملية الاكثار مساحات واسعة، حيث يتم الاكثار في المختبرات وتوضع الاوعية الزجاجية الخاصة بالإكثار في غرف خاصة مجهزة بطوابق من الرفوف.

7- تساهم هذه التقنية في سهولة تداول النباتات بين المراكز العالمية والدول، وحفظ الاصول الوراثية والاستغناء عن حقول الامهات الكبيرة قدر الامكان.

8- ان هذه التقنية صديقة للبيئة حيث لا ينتج عنها ملوثات ضارة للبيئة، فضلا عن مميزات اخر لعملية الاكثار بهذه الطريقة.

طرق الاكثار بزراعة الانسجة

1-.تحفيز نمو البراعم الابطية Axillary branching

البرعم الابطي (Axillary bud):- هو برعم يوجد في ابط الورقة ويؤدي نشاطه الى تكوين فروع جانبية. قد تكون فروع خضرية او ازهارا او نورات، واذا اتلف البرعم الطرفي او ازيل صناعيا فان البراعم الابطية تنمو مباشرة لتعطي فروعا جانبية وتعرف هذه الظاهرة **بالسيادة القمية**.

تعتمد طريقة تحفيز البراعم الابطية اساسا على القضاء على ظاهرة السيادة القمية لغرض تحفيز نمو هذه البراعم الساكنة ويتم ذلك من خلال اضافة السايتوكاينينات الى الوسط الغذائي، حيث ان السيادة القمية تكون ناتجة من تأثير الاوكسينات التي يتركز انتاجها في القمم النامية وان السايتوكاينينات تعمل على تقليل او الحد من تأثير الاوكسينات. ان النباتات الناتجة من الاكثار بهذه الطريقة تكون متماثلة وراثيا مع امهاتها وتكون ذات ثبات وراثي عالي، حيث ان نسبة الاختلافات الحاصلة في النباتات المكثرة بهذه الطريقة لا تزيد عن تلك الحاصلة في النباتات المكثرة بالطرق التقليدية للإكثار الخضري ويمكن ادخالها في دورات متعاقبة من خلال اعادة الزراعة على الاوساط الغذائية الخاصة لهذا الغرض وبذلك يمكن انتاج عدد كبير من الشتلات التي يتم تجذيرها ونقلها الى التربة. وتعتبر هذه الطريقة من اكثر الطرق المستخدمة في الاكثار الخضري وتستخدم ايضا في اكثار النباتات التي تمتاز بطول دورة حياتها مثل اشجار الغابات والفاكهة وكذلك اكثار النباتات التي يتطلب انتاجها درجة عالية من التجانس كنباتات الشليك والروز والبطاطا والاناناس والموز وغيرها من النباتات.

2- تشجيع تكوين البراعم العرضية Adventitious bud formation

البراعم العرضية هي تلك البراعم التي تنشأ في غير المكان الطبيعي لتكونها ويمكن تشجيع تكوين هذه البراعم على الانسجة والاعضاء المزروعة في خارج الجسم الحي من خلال التحكم بمكونات الوسط الغذائي المستخدم لهذا الغرض وتلعب منظمات النمو دورا اساسيا في هذا المجال فمن خلال التوليفة الملائمة من الاوكسينات والسايتوكاينينات يمكن تشجيع تكون البراعم العرضية على الاجزاء النباتية المزروعة في خارج الجسم الحي واكثارها بشكل حيث تتكون من هذه البراعم يجري تقسيمها واعادة زراعتها في اوساط غذائية جديدة بنفس مكونات الوسط الاصلي لغرض انتاج اعداد كبيرة منها وبعد ذلك تنقل البراعم المتكونة الى اوساط غذائية خاصة لتشجيع نموها وتطورها الى افرع خضرية يجري تجذيرها لاحقا لتكوين شتلات كاملة منها يتم اقلمتها ونقلها الى البيت الزجاجي لتنمو تحت الظروف الطبيعية. وتختلف الانواع النباتية والاصناف فيما بينها في قابليتها على تكوين مثل هذه البراعم سواء في الطبيعة او في

حالة الاكثار باستخدام تقانة زراعة الانسجة. ومن خلال هذه الطريقة يمكن انتاج اعداد كبيرة من النباتات المشابهة للأصل الذي اخذت منه الانسجة المزروعة. ومن الجدير بالذكر انه يمكن ضمان الثبات الوراثي للنباتات الناتجة الى حد كبير باستثناء حالات الكايميرا والتي تسمى النباتات في هذه الحالة بالنباتات الكاميرية (**Chimeral plants**) .

3- استحثاث نشوء الكالس وتكوين الاجنة اللاجنسية Somatic embryogenesis

الكالس هو عبارة عن مجموعة من الخلايا البرنكيمية المفككة ذات جدران رقيقة، وتنشأ هذه الخلايا من انقسام خلايا الجزء المزروع نتيجة احداث الجروح فيه لذلك يطلق عليها انسجة الجروح. وعند استخدام تقنية زراعة الانسجة امكن تحفيز الاجزاء النباتية المأخوذة من انواع مختلفة وزراعتها في الوسط الغذائي. وتلعب منظمات النمو دورا اساسيا في تحقيق ذلك وتختلف النباتات في متطلباتها من الاوساط الغذائية وتراكيز المكونات الداخلة في تحضير هذه الاوساط تبعا للانواع النباتية المختلفة وكذلك الاصناف ضمن النوع الواحد. وبعد نشوء الكالس يتم اكثاره لعدة مرات لحين الحصول على الكمية المطلوبة مع مراعات تجديد الزروعات بين الحين والاخر وذلك من خلال انشاء زروعات جديدة بزراعة اجزاء نباتية في وسط النشوء وذلك لان الأستمرار باكثار الكالس لفترة طويلة قد يتسبب بحدوث تغايرات وراثية فضلا عن ان بعض انسجة الكالس هذه قد تفقد قابلية التكوين المظهري (**Morphogenesis**) وبالتالي تفشل في تكوين النموات الخضرية. وبعد تكون الكالس ينقل الى اوساط غذائية خاصة بتشجيع نشوء الاجنة اللاجنسية (**الخضرية**) منه التي يتم انباتها لاحقا الى بادرات كاملة ذات مجموع خضري وجذري تتم اقلمتها ونقلها الى البيت الزجاجي. وباستخدام هذه الطريقة يمكن انتاج اعداد كبيرة جدا من اصل جزء نباتي واحد في فترة زمنية محددة حيث تستخدم هذه الطريقة في حالة عدم الحاجة الى مستوى عالي من الثبات الوراثي. ان تكون الاجنة الخضرية من خلايا الكالس تسمى بالطريقة غير المباشرة لتكون الاجنة الجسمية (**Indirect embryogenesis**) اما اذا تكونت الاجنة من الخلايا المباشرة دون المرور بمرحلة الكالس فتسمى بالطريقة المباشرة لتكوين الاجنة الجسمية (**Direct embryogenesis**) .

لقد لاحظ الباحثون ان مراحل تطور الجنين الجسمي (**الخضري**) لا تختلف عن مراحل تطور الجنين الجنسي. وتتمثل هذه المراحل بنمو الجنين الى الطور الكروي ثم القلبي ثم الطوربيدي واخيرا الطور الفلقي (**بزوغ الفلق**).

مراحل تطور الجنين في النبات

الطور الفلقي ← الطور الطوربيدي ← الطور القلبي ← الطور الكروي ← مجموعة خلايا ← خلية مفردة.

انتاج نباتات خالية من الفايروسات *Virus _ free plant production*

الفايروسات عبارة عن طفيليات اجبارية التغذية (**Obligate parasite**) تعيش داخل الخلية ويرتبط تكاثرها ارتباطا وثيقا مع عمليات الايض الطبيعية في النبات وان هذا الارتباط ليس انتقائيا ولا توجد طريقة فعالة للقضاء على الفيروسات سوى انتاج نباتات مقاومة للإصابة بالفيروسات. على الرغم من ان غالبية الفيروسات لا تنتقل عن طريق البذور وان بذور النباتات المصابة تعطي نباتات خالية من الفايروسات، الا ان البادرات الناتجة من زراعة البذور تكون عديمة الفائدة عند الرغبة في المحافظة على السلالات الخضرية والهجن والاصناف لكونها لا تنتج نباتات مطابقة تماما للآباء. عند اصابة الاجزاء الخضرية جهازيا ينتقل المرض من الجيل الخضري الى الاجيال اللاحقة في المحاصيل المكثرة خضريا، وتكون النباتات كافة مصابة وهذا يؤثر كثيرا على كمية الحاصل، فمثلا وجد ان حاصل البطاطا ينخفض بمقدار **95%** نتيجة الاصابة بالفيروسات المختلفة **PLRV (Potato leave Roll Virus)** و **PVX (Potato Virus X)** و **PVY (Potato Virus Y)** .

كيفية حدوث الاصابة بالفيروسات

لا تحدث اصابة النبات بالفيروسات الا عند حدوث الجروح في النبات. يمكن للفيروس ان يصل الى المادة الحية للخلية ثم يبدأ نشاطه بالتضاعف، لا تمتلك الفيروسات القدرة على اختراق الجدر السيليلوزية للخلايا. تحدث الجروح نتيجة لأضرار ميكانيكية متعددة او نتيجة لتغذية الحشرات او الاصابة بالنباتات المتطفلة. باستثناء انتقال الفيروسات النباتية عن طريق البذور لبعض المحاصيل او عن طريق حبوب اللقاح فان الجروح تعتبر بالضرورة اساسا لحدوث اصابة النبات بالفيروسات. وعند دخول الفيروس الى خلايا العائل واستقراره داخلها. تنشأ الاعراض الفيروسية نتيجة لتفاعل الفيروس مع خلايا العائل.

طرق انتقال الفيروسات النباتية

تختلف الطرق التي تنتقل بها الفيروسات النباتية وكما سبق الذكر لابد من حدوث جروح في خلايا النبات يصل عن طريقها الفيروس الى سيتوبلازم الخلايا حتى يمكنه من احداث العدوى حيث لا تمتلك الفيروسات القدرة على اختراق الجدر السيليلوزية للخلايا وقد يلزم ايضا ان يصل الفيروس الى خلايا خاصة كنسيج اللحاء مثلا حيث يمكنه ان يتكاثر بداخلها. **ويمكن تلخيص الطرق اتي تنتقل بها الفيروسات النباتية الى ما يلي:-**

1-.الانتقال الميكانيكي

يتم التنقل بهذه الطريقة عن طريق العصير للنبات المصاب والمحتوي على الفيروس وتنتقل الفيروسات ميكانيكيا بواسطة الوسائل الطبيعية (**النقل الميكانيكي بالوسائل الطبيعية**) من النباتات المصابة الى النباتات السليمة نتيجة الجروح التي تحدث في النبات من جراء العمليات الزراعية او الاحتكاك بين النباتات نتيجة التيارات الهوائية او مرور عمال الزراعة ... الخ حيث يقع العصير من النباتات المصابة ويلامس الجروح في النباتات السليمة فينتقل اليها الفيروس. والكثير من الفيروسات النباتية تنتقل بهذه الطريقة.

2- الانتقال بالتكاثر الخضري

تعمل اعضاء التكاثر الخضرية مثل الشتلات والبراعم والصلات والدرنات والكورمات على نقل الفيروسات النباتية فهذه الاعضاء الخضرية اذا كانت مأخوذة من نباتات مصابة بالفيروسات ادت الى نقله الى النباتات السليمة الجديدة.

وتنتقل بعض الفيروسات النباتية عن طريق التطعيم **Grafting** في النباتات التي يمكن اجراء عملية التطعيم بها. ومن ناحية اخرى فان جميع الفيروسات النباتية يمكن ان تنتقل عن طريق التطعيم وذلك نتيجة الجروح التي تحدث اثناء التطعيم وتلامس الخلايا المجروحة الا ان هذه العملية قد لا تنجح في بعض الاحوال لعدم توافق الاصل مع الطعم كما انها لا تنجح في نباتات الفلقة الواحدة.

3- الانتقال عن طريق الحامول

الحامول (.Cascuta spp) من النباتات البذرية المتطفلة على النباتات فعند تغذية الحامول على النباتات المصابة بالفيروس ثم امتداد افرع الحامول للاتصال والتطفل على النبات السليم نجد ان الفيروس ينتقل من النبات المصاب الى السليم عن طريق هذه الافرع التي تصل بين النباتين كما قد تصاب النباتات بالفيروسات التي تصيب الحامول نفسه.

4- الانتقال عن طريق البذور

تختلف الفيروسات النباتية عن بعضها في امكانية انتقالها عن طريق البذور ومعظم الفيروسات النباتية لا تنتقل عن طريق البذور ولكن يحدث النقل بنسب مختلفة في بعض النباتات القولية والقرعية لفيروسات معينة وتعرف هذه الفيروسات باسم الفيروسات المنقولة عن طريق البذور **(Seed borne viruses)** ويفسر عدم انتقال الكثير من الفيروسات النباتية عن طريق البذور **بتفسيرات عديدة منها:-**

أ-.حالة تأثير التضاد

تحدث هذه الحالة للبذور الكاملة النضج لضعف العمليات الحيوية كما تتجمع في البذور الناضجة بعض المواد التي تؤثر على بعض الفيروسات.

ب- عدم وجود نقر **(pits)** في جدران الخلايا المرستيمية في جنين البذرة وبالتالي عدم وجود خيوط بلازمية **(Plasmodesmata)** التي تصل بين الخلايا ببعضها والذي يجعل الفيروس غير قادر على الانتقال اليها.

ج- عدم تمكن الفيروس من الادمصاص ببروتين البذور بسبب عدم قدرة الفيروس على التكاثر.

5- الانتقال عن طريق التربة

تنتشر بعض الفيروسات عن طريق التربة اي ان الاصابة تحدث في الاجزاء النباتية التي تحت سطح التربة اي في منطقة الجذور ويرجع انتقال وانتشار الفيروسات النباتية عن طريق التربة الى :-

أ-.توج الفيروسات محمولة على حبيبات التربة وتدخل الى الجذور عن طريق الجروح التي تحدث للجذور اثناء نموها او اثناء عمليات الري.

ب- يحمل الفيروس الى انسجة النبات عن طريق بعض انواع الكائنات الدقيقة مثل البكتريا والفطريات.

ج- يحمل الفيروس عن طريق بعض الكائنات الحية مثل ديدان النيماتودا (**الديدان الثعبانية**) او بعض الحشرات التي تصيب الجذور.

6- الانتقال عن طريق الديدان الاسطوانية (النيماتودا)

تعمل بعض انواع الديدان الاسطوانية مثل الديدان الاسطوانية الخنجرية على نقل بعض الفيروسات. وتتميز الديدان الاسطوانية الناقلة بانها ذات رمح طويل كما تفتح الغدد اللعابية بالقرب من اتصال البلعوم والامعاء وليس من المعروف مدة بقاء الفيروس في اجسام الديدان الاسطوانية او بقاءه بعد الانسلاخ او الانتقال عن طريق البيض.

7- الانتقال عن طريق الفطريات

وجد ان فطر (**Chytridiales olpidium**) يساعد في نقل فيروسان هما فيروس العرق المتضخم في الخس (**Big vein of lettuce**) وفيروس التقرح في نبات التبغ (**Tobacco necrosis**) ويعتبر الفطر **Otpidium** من الفطريات الاولية التي تكون داخل خلايا الجذور لنبات العائل القريبة من منطقة القشرة اكياسا جرثومية **Zoosporangia** يخرج منها جراثيم هدبية متحركة عن طريق قنوات وانابيب تصل الى خارج انسجة العائل وتسبح جراثيم هذا النوع ذات الهدب الواحد وتصيب خلية جذرية ثم تكون كيس جرثومي داخل الخلية وهكذا تستمر دورة الاصابة بالفطر.

8- الانتقال عن طريق الحشرات

تعتمد معظم الفيروسات النباتية على الحشرات في انتقالها ويرجع ظهور الاوبئة بالأمراض الفيروسية الى نشاط الحشرات في نقل الفيروسات، والحشرات ذات الكفاءة العالية في نقل الفيروسات النباتية تكون في الغالب من الحشرات ذات الفم الثاقب الماص كما ان هناك القليل من الفيروسات التي تنتقل بواسطة الحشرات ذات اجزاء فم قارض.

علاقة الفيروسات بالحشرات الناقلة *Relationship between viruses and insect vectors*

هناك نوعان من العلاقات بين الفيروس والحشرة الناقلة :-

1-.الانتقال بالطريقة الميكانيكية

تتغذى الحشرة على النبات المصاب ثم عند تغذيتها على نبات سليم تنقله الى النبات السليم وتحدث له العدوى مباشرة نتيجة لتلوث اجزاء الفم الخارجية بالفيروس وتفقد الحشرة القدرة على النقل والعدوى خلال ساعات او دقائق من تركها للنبات المصاب، وبعد التغذية على نبات واحد او عدة نباتات سليمة. وتعرف هذه المجموعة من الفيروسات والتي سرعان ما تفقد الحشرة القدرة على نقلها باسم الفيروسات غير الباقية **Non persistent viruses** او الفيروسات الخارجية **External** وهي التي تنقل اطراف اجزاء الفم. وقد عرفت منذ عام **1972** والى وقتنا الحاضر باسم الفيروسات المحمول **بأجزاء الفم.** وتقوم الحشرات ذات اجزاء الفم القارض او الثاقب الماص بنقل الفيروسات التابعة لهذه المجموعة.

2- علاقة بيولوجية

توجد علاقة بيولوجية بين الفيروس والحشرة الناقلة فعندما تكتسب الحشرة الفيروس بعد ان تتغذى الحشرة على النبات المصاب فأنها لا تنقله مباشرة ولكنها تظل محتفظة به لفترة قد تصل الى طول حياتها وتعرف هذه الفيروسات بالفيروسات الداخلية **Internal viruses** حيث تدخل جسم الحشرة وتضم **المجموعتين الاتيتين:-**

أ-.الفيروسات العابرة Circulative viruses

يطلق عليها احيانا بالفيروسات الباقية **Persistent viruses** او الداخلية **Internal viruses** ولا تتمكن الحشرة من نقل الفيروس مباشرة بعد تغذيتها على نبات مصاب ولكن يجب ان تمر فترة من الزمن بعد التغذية على النبات المصاب حيث تبقى الحشرة محتفظة بالفيروس من عدة ساعات الى عدة ايام تسمى **بفترة الحضانة** تكتسب فيها الحشرة القدرة على نقل الفيروس الى نبات سليم. وحينما تصبح الحشرة قادرة على النقل فأنها تحتفظ بقدرتها على النقل لفترة طويلة ولا تتضاعف هذه الفيروسات داخل جسم الحشرة حيث وجد ان تركيز الفيروس في جسم الحشرة يقل تدريجيا بتكرار تغذيتها على نباتات سليمة وبعد ان تفقد الحشرة القدرة على احداث الاصابة وذلك لفقدان الحشرة الفيروس من جسمها فأنها لا تستعيد القدرة على النقل حتى تتغذى على نبات مصاب مرة اخرى.

ب- الفيروسات المتكاثرة Propagative viruses

هي من الفيروسات الداخلية واتي تبقى داخل جسم الحشرة لفترات طويلة (**Persistent**) قد تصل الى طول عمر الحشرة كما يمكن ان تنتقل عن طريق الاجيال بالإضافة الى عن طريق بيض الحشرة الناقلة.

ويوجد الكثير من الادلة التي تثبت ان الفيروسات التابعة لهذه المجموعة تتضاعف داخل جسم الحشرة الناقلة حيث لا تفقد الحشرة القدرة على نقل الفيروس طول حياتها وبتكرار تغذيتها على النباتات السليمة كما تمر الفيروسات المتكاثرة بفترة حضانة داخل جسم الحشرة قبل ان تصبح الحشرة قادرة على نقل الفيروس. ومن المعروف ان معظم الفيروسات العابرة او المتكاثرة لا تنتقل نقلا ميكانيكا صناعيا (**الحقن الميكانيكي**) كذلك فأنه من المعروف ان العلاقات البيولوجية بين الفيروسات والحشرة الناقلة لها تتعرض الى درجة عالية من التخصص فهناك الفيروسات او السلالات من الفيروسات لا تنتقل الا عن طريق حشرات خاصة او سلالات هذه الحشرة. وتلعب فترات التغذية للحشرات لاكتساب الفيروس من النباتات المصابة وحقنه في النباتات السليمة دورا هاما في كفاءة النقل.

الفايروسات وعلاقتها بالمرستيم القمي

لاحظ بعض الباحثين انخفاض اعداد الفيروسات كلما اقتربنا من المرستيم القمي للنباتات المصابة ولم يعثر على الفايروسات في المرستيم القمي ل **50%** من النباتات المدروسة. وبناءا على هذه الملاحظة اقترح **Morel** و **Martin** سنة **1952** امكانية عزل المرستيم القمي من النباتات المصابة جهازيا بالفيروسات خارج الجسم الحي بهدف الحصول على نباتات خالية منها. ونجحوا في تأكيد هذه الفرضية وحصلوا على نباتات داليا خالية من الفايروسات عند زراعة مرستيم النباتات المصابة. ومنذ ذلك الحين اتبعت هذه التقانة للحصول على نباتات خالية من الفايروسات في العديد من الانواع النباتية.

الطرق المتبعة للحصول على نباتات خالية من المسببات المرضية وخاصة الفايروسية

1-.زراعة القمة النامية او المرستيم القمي

تنمو كافة النباتات نتيجة لنشاط مرستيماتها القمية. وكما سبق ذكره فان المرستيم القمي يتمثل في قبة (**Dome**) من الانسجة الواقعة في نهاية الفرع وتكون بقطر حوالي **0.1** ملم وطول **0.2 – 0.3** ملم، اما القمة النامية فانها عبارة عن المرستيم القمي مضافا اليه بضع ملمترات اخرى من الانسجة الواقعة اسفل المرستيم القمي ويتمثل عادة ب **2 – 4** ازواج من مبادئ الاوراق. ولوحظ ان احتمالية تواجد الفايروس او كثافته تزداد كلما تركنا المرستيم القمي باتجاه الانسجة الواقعة تحته، وهذا يعني ان احتمالية خلو المرستيم القمي من الفايروسات تكون اعلى مقارنة بالقمة النامية، حيث انه كلما كبر حجم الجزء النباتي (**explant**) كلما كانت نسبة نجاح نموه اعلى. **ان اسباب كون المرستيم القمي هو الجزء النباتي الامثل لإنتاج نباتات خالية من الاصابات الفايروسية يعود الى ما يلي:-**

أ-.ان زراعة المرستيم القمي على وسط غذائي ملائم يمكن ان يؤدي الى التضاعف وتوالد نباتات اسرع من بقية الانسجة.

ب- النباتات الناتجة تمتلك نفس الصفات الوراثية للنبات الام وذلك لأن الخلايا المرستيمية هي خلايا جسمية متشابهة التركيب الوراثي.

ج- ان المرستيمات القمية للنباتات المصابة بالفايروسات اما ان تكون خالية من الفايروسات او حاوية على تراكيز منخفضة جدا منها.

ويعتقد بان الاسباب التي تجعل المرستيمات القمية خالية او قليلة الفايروسات مقارنة بالأجزاء النباتية الاخرى هي:-

ا-.ان المستويات العالية من الاوكسين في القمة النامية قد تثبط تضاعف الفايروس. حيث خلال عقد الخمسينات من القرن الماضي افترض ان تثبيط الفايروس ناتج عن تأثير الهرمونات المتراكمة في القمة النامية والمرستيم القمي التي تعتبر مراكز انتاج هذه المركبات.

ب- ان الانقسام الخلوي السريع في المرستيم القمي يجعله خاليا من الفايروسات من خلال الفعاليات البنائية العالية في الخلايا المرستيمية ، الامر الذي يخلق حالة منافسة بين انقسام الخلايا وتضاعف الفايروسات مما يحد من نموه وانتشاره.

ج- لوحظ خلال التجارب على نبات القرنفل ان المرستيمات الحاوية على فايروس التبرقش **(Mottle virus)** تصبح خالية من الفايروسات بعد **(30 – 40)** ساعة من نقلها الى الوسط الغذائي. وقد يكون ذلك ناتجا من تماس المادة النباتية مع الوسط الغذائي كان السبب قد ادى الى التخلص من الفايروسات في المرستيمات النامية خارج الجسم الحي.

د- يعتقد ان خلو المرستيمات القمية من الانسجة الوعائية يمنع من تواجد الفايروسات فـــيـــها.

هـ- ان حركة الفايروسات من خلال الروابط البروتوبلازمية **Plasmodesmata** بطيئة جدا ولا تجعله يتماشى مع نمو القمة النامية النشط.

و- ان المجموعة المبطلة لفعالية الفايروس في جسم النبات، ان وجدت فأنها تكون بأعلى فعاليتها في المرستيم القمي مقارنة باي منطقة اخرى.

ان الاسباب الوارد ذكرها اعلاه والتي تفسر غياب جزيئات الفايروس قد لا تنطبق على كافة انواع الفايروسات فقد ثبت وجود الفايروس **(TMV)** وهو فايروس موزائيك التبغ وكذلك الفايروس **PVX** و **CMV** والذي يسبب موزائيك الخيار في الخلايا المرستيمية. وعلى الرغم من ذلك امكن انتاج نباتات جديدة خالية من الفايروسات عند زراعتها في الوسط الغذائي، وقد يعود سبب ذلك الى تأثير مجموعة عوامل متداخلة مع بعضها تتعلق بالوسط الغذائي، منظمات النمو، جرح الخلايا لدى فصل القمة النامية او المرستيم القمي.

2- معاملة المرستيم القمي بالحرارة قبل او بعد فصله

تحققت نجاحات عديدة في انتاج نباتات خالية من الفايروسات عند معاملة المرستيم القمي او القمة النامية بدرجات حرارية مرتفعة نسبيا سواء قبل او بعد فصلها عن النبات الام. الا انه من الضروري تحديد درجة الحرارة والمدة اللازمة لتعريض هذه الاجزاء النباتية للحرارة لكي لا يؤدي ذلك الى قتل المادة النباتية. ويعتمد مقدار درجة الحرارة ومدة التعريض على نوع الفايروس ومدى انتشاره. فقد امكن الحصول على نموات خالية من الفايروس عند تعريض القمة

النامية الى الهواء الحار درجة حرارته **30 – 37م** او تغطيسها بالماء الحار لمدة **5 – 10** دقائق.

وتفيد المعاملة الحرارية كذلك في القضاء على انواع الفايروسات التي لا يمكن التخلص منها عن طريق زراعة المرستيم غير المعامل بالحرارة. فقد امكن التخلص من الفايروس **PVX** و **PVS** من نباتات البطاطا المصابة عند تعريض النباتات للحرارة وقبل فصل المرستيم. الا انه في حالة نبات التبغ وجد ان تعريض المرستيمات المفصولة النامية على وسط صلب او سائل الى درجة حرارة **32م** وكان فعالا في التخلص من الفايروسات. وامكن زيادة نسبة نباتات القرنفل الخالية من الفايروسات بنسبة **90%** بعد معاملة المرستيم القمي.

3- المعاملة بالمواد الكيميائية Chemotherapy

لاحظ بعض الباحثين ان اضافة الاوكسينات والسايتوكاينينات الى الوسط الغذائي تؤدي في بعض الاحيان الى تقليل تركيز الفايروسات ولكنها لم تحد منها نهائيا. لقد امكن زيادة نسبة النباتات السليمة الناتجة عن زراعة المرستيم القمي او القمة النامية عند اضافة بعض مضادات الفايروسات الى الوسط الغذائي. ويستخدم لهذا الغرض مركبات مثل **Thiouracil** و **Malachite** و **Virazole** .

4- التطعيم الدقيق خارج الجسم الحي In Vitro Micrografting

يتم اتباع هذه التقانة في الحالات التي يصعب فيها تجذير القمم المرستيمية المزروعة بالطريقة الاعتيادية وخصوصا في الاشجار، تم استخدام هذه التقانة للحصول على حمضيات خالية من العديد من الفايروسات، وتتلخص هذه الطريقة باستئصال المرستيم القمي مع **1 – 2** زوج من بادئات الاوراق وتركيبها على بادرات صغيرة الحجم قد تكون ناتجة من البذور ونامية في الوسط الغذائي المعقم ومن ثم تطور الطعم الى نبات كامل يتم نقله فيما بعد الى التربة. يتطلب اجراء هذه العملية دقة فائقة ومهارة خاصة.

اختبار الاصابة بالفايروسات

بعد التأكد من نجاح عملية زراعة المرستيم القمي والحصول على نبيتات نسيجية منه يصبح من الضروري التأكد من خلوها من الفايروسات. ولأن للفايروسات القدرة على الاختفاء والظهور بين فترة واخرى لذلك يجب فحص النباتات خلالا السنة الاولى بشكل مستمر كما يجب اجراء الفحوصات الدورية على المزارع للتأكد من سلامتها. **وهناك عدة طرق للفحص واجراء الاختبارات منها:-**

1-.فحص عصير الاوراق بالمجهر الالكتروني **Serum-specific electron microscopy test** .

2- طريقة النباتات الكاشفة **Indicator plants method**.

3- الاختبارات السيرولوجية.

واهم هذه الطرق ما يلي:-

أ-.اختبار التجمـــــــع Agglutination test

ب- اختبار الترسيـــــب Precipitation test

 # الترسيب في الانابيب Tube precipitation

 # الترسيب الدقيـــــق Micro precipitation

ج- الانتشار المزدوج في الاكار Agar double diffusion

د- طريقة الانزيم المرتبط ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

وهي الطريقة الاحدث والافضل وتمتاز بما يلي:-

1-.اكثر حساسية من كل الطرق السيرولوجية السابقة حيث يتم باستخدامها الكشف عن الفايروسات الموجودة بتركيز صغير او منخفض في النبات المصاب.

2- تتم العملية باستخدام كمية صغيرة جدا من **Anti-body .**

3- سهل الاجراء رغم خطواته العديـــــــــــــــــدة.

4- يمكن ان يتم الفحص على عدد كبير من العينـــــــات.

استخدامات تقانة زراعة الانسجة / انتاج بعض المركبات الصيدلانية

كما هو معروف فان هناك العديد من النباتات التي تنتج مواد طبيعية تعتبر احدى نواتج عمليات التمثيل الغذائي يقوم الانسان باستخراجها واستعمالها في صناعات عديدة اهمها صناعة الدواء وانتاج الزيوت العطرية ومكسبات الطعم والنكهة.

اهمية النباتات الطبية

تحتل النباتات الطبية اهمية كبيرة في حياة الانسان، فمنذ القدم عرف الانسان النباتات الطبية واستخدامها لغرض علاج بعض الامراض والجروح التي تصيبه. وفي الوقت الحاضر تستخدم النباتات الطبية لغرض استخلاص العقاقير الصيدلانية منها.

المواد الفعالة واماكن تواجدها

تتواجد المواد الفعالة في النباتات بتركيز تختلف تبعا لنوع النبات ونوع المادة ومكان النمو والظروف البيئية التي ينمو فيها النبات. ان تواجد المواد الفعالة يختلف هو الاخر حسب الجزء او العضو النباتي فبعضها يتواجد في السيقان والبعض الاخر يتواجد في الجذور او الازهار او الثمار او البذور.

كيفية الحصول على النباتات الطبية

معظم النباتات الطبية تنمو بصورة برية تحت الظروف الطبيعية مما يجعل من عملية الحصول عليها عملية صعبة وشاقة. لقد اهتم الانسان في هذا الموضوع وقام بزراعة بعض هذه النباتات تحت ظروف مسيطر عليها. وتم انشاء مراكز علمية وبحثية متخصصة لهذا الغرض حيث يتم تحديد متطلبات نموها وزيادة تركيز المادة الفعالة فيها.

الظروف البيئية المناسبة لنمو النباتات الطبية

تختلف الظروف البيئية المناسبة للنمو باختلاف النباتات فمنها ما ينمو في المناطق الصحراوية ومنها ما ينمو في المناطق الجبلية او في الغابات وغيرها من الاماكن. ان هذا يتطلب توفر ظروف مشابهة لظروف نموها الطبيعية في حالة الرغبة في زراعتها من قبل الانسان.

المساحة اللازمة لإنتاج النباتات الطبية

تتطلب عملية زراعة النباتات الطبية مساحة واسعة وهذا يتطلب رعاية النباتات وخدمتها لحين وصولها الى المرحلة التي يتم فيها استئصال الاجزاء المطلوبة لأجراء عملية الاستخلاص. وفي حالة كون المواد الفعالة تتركز في الجذور فانه يتطلب اتلاف النباتات كاملة لغرض اخذ الجذور واستخلاص المواد منها، حيث يتطلب انتاج اعداد كبيرة من النباتات.

استخلاص المواد الفعالة

يتم استخلاص المواد الفعالة بطرق ووسائل مختلفة حسب الاجزاء المستخدمة وحسب المواد المراد استخلاصها. قد يتطلب في بعض الاحيان اتلاف النباتات كاملة كي يتم استخلاص المواد المطلوبة.

كيفية التعامل مع النباتات لغرض تهيئتها لعملية الاستخلاص

لغرض استخلاص المواد الفعالة فانه يتطلب قطع الاجزاء المطلوبة او ربما قلع النباتات بشكل كامل كما في حالة تواجد المادة الفعالة في الجذور. ان هذا يتطلب تنظيف النباتات وغسلها وربما معاملتها ببعض مواد التعقيم قبل ادخالها في مراحل الاستخلاص الاساسية.

التلوث الحاصل اثناء الاستخلاص

نتيجة نمو النباتات تحت الظروف البرية او الظروف الحقلية الطبيعية فأنها تكون عرضة للإصابة بمختلف الملوثات الكيمياوية والاحياء الملوثة. لذلك يتطلب اجراء بعض العمليات الخاصة بإزالة التلوث والتي قد تكون غير فعالة تماما بإزالة التلوث او ربما تؤثر سلبا على المادة الفعالة فيها.

وظيفة المواد الثانوية للنبات والمنتجة عرضيا

وظيفة المواد الثانوية المنتجة في النبات غير معروفة بدقة، ولكن هنالك بعض المقترحات التي تفسر انتاجها وتواجدها في جسم النبات ومن هذه **المقترحات هي:-**

1-.لبعض هذه المواد اهداف تنظيمية للنمو والتطور في النبا_____ت.

2- تزويد النبات بالحماية من مهاجمة البكتريا والفطريا_____ت.

3- تجعل النباتات غير مستساغة الطعم من قبل الحيوانات مما يبعدها عنها اثناء عملية الرعي.

4- تكون لهذه المواد فائدة بحيث تعمل كطارد للحشرات او كمبيد حش_____ري.

5- بعض المواد يكون لها فائدة للنبات بالانتخابية حيث يتغير تركيزها من مرحلة نمو الى اخرى وتوفر لها الحماية وتحمل الظروف البيئية غير الملائمة.

استخدام المواد الثانوية المستخلصة من النبات

تستخدم المواد الكيمياوية المنتجة ثانويا من عمليات الايض في النبات في عدة **مجالات منها:-**

1-.مضافات او مكملات غذائي_____ة.

2- نكهات او توابـ_____ل.

3- فيتامينا_____ت.

4- مواد عطور او تجمـ_____يل.

5- مراهم للجروح والحـ_____روق.

6- مصدر لأكثر من نصف العقاقير المستخدمة عالمـ_____يا.

7- مبيدات حشري_____ة.

8- مضادات حيوية لحماية النبات بالإضافة الى استخدامات اخرى.

زراعة الانسجة النباتية وانتاج المواد الطبية

تستخدم تقانة زراعة الانسجة لإنتاج بعض المركبات المهمة والتي تدخل في صناعة العقاقير الصيدلانية لما لهذه التقانة من اهمية في هذا الجانب. ولقد امكن استخدام زراعة الانسجة لبعض النباتات الطبية مثل الداتورة والسكران والديجتالس وغيرها لإنتاج المواد الطبية وكذلك بعض النباتات العطرية مثل الريحان والنعناع والعتر لإنتاج الزيوت العطرية وذلك بزراعة انسجة او اعضاء مختلفة من تلك النباتات للحصول على انسجة الكالس ثم يستخلص المادة الفعالة منه دون الحاجة لزراعة النبات بأكمله وبذلك يمكن توفير مساحات الاراضي اللازمة لزراعة هذه النباتات وكذلك توفير المجهود الزراعي وكذلك المجهود اللازم لاستخراج هذه المواد من النبات الكامل وبذلك يكون اكثر فائدة من الناحية العلمية والاقتصادية. ويعتبر هذا المجال من مجالات

أ.م. محمد عبد الغفور محمد

زراعة الانسجة الحديثة التي لم تحظى بعد بالقدر الكافي لأنه من المتوقع ان يكون من اهم المجالات لاستخدام زراعة الانسجة في المستقبل القريب.

ان استخدام تقانة زراعة الانسجة النباتية لإنتاج المواد المهمة طبيا له فوائد عديدة منها:-

1-.عدم التقيد بموسم الزراعة وبالإمكان الانتاج على مدار العـــــــــــــــــــــــام.

2- عدم التقيد بالظروف البيئية حيث يمكن توفير الظروف الملائمة لذلك مختبريـــــــــــــا.

3- عدم استخدام مساحات شاسعة لزراعة النباتـــــــــــــــــــــــــــــــــات.

4- بالإمكان زراعة الجزء النباتي المحدد والذي تتواجد فيه المادة الفعالـــــــــــــــــــة.

5- السيطرة على ظروف النظافة والتعقيـــم.

6- امكانية زيادة تركيز المادة الفعالة من خلال استخدام الاوساط الغذائية الملائمة لذلـــــــــك.

7- سهولة استخلاص المواد الفعالة من خلال التعامل مع كميات محددة من الزروعات دون التعامل مع نبات كامل.

8- الاقتصاد بالنفقات والايدي العاملـــة.

المعوقات التي تواجهها عملية انتاج المواد الطبية عن طريق زراعة الانسجة

1-.ان العديد من المواد الثانوية تنتج في الانسجة المتخصصة ولا تنتج من انسجة الكالس او الخلايا المعلقة (**Suspension culture**).

2- ان بعض عمليات الانتاج تكون في فترات محددة وليست دائميه حتى في الانسجة المتخصصة.

3- يكون الانتاج بكميات ضئيلـــة.

4- الكثير من المواد المنتجة تبقى مرتبطة بالأنسجة المنتجة لها ولا يستخلص منها الا القليل.

5- بسبب الاختلافات الوراثية التي قد تحدث في الخلايا والانسجة المزروعة، فان المواد يتغير مستوى انتاجها.

6- تواجه عملية الانتاج الكمي من مزارع الخلايا المعلقة بعض المعوقات بسبب محدودية هذه المزارع.

طرق زيادة تركيز المواد الثانوية المنتجة

اتبعت عدة وسائل لغرض زيادة حاصل المواد الكيميائية المنتجة عرضيا باستخدام تقنية زراعة الانسجة ومن **هذه الوسائل:-**

1-.استخدام تقنية الخلايا الحاضنة Immoblized or Nurse cells

بدلا من زراعة الخلايا المجهزة للمواد الثانوية في مزارع معلقة يمكن زراعتها مع بعض الخلايا الاخرى التي تعتبر بمثابة الحاضنة لها وامكانية انقسام وتكاثر هذه الخلايا وانتاج المواد الثانوية منها لفترة طويلة في المفاعلات الحيوية.

2- تقنية تحفيز انتاج المواد الثانوية

نظرا لقلة ناتج الخلايا غير المتمايزة من المواد الثانوية، فبالإمكان زيادة الانتاج عن طريق تغذية هذه الخلايا والانسجة بسلسلة من محفزات تفاعلات البناء الحيوي لغرض زيادة انتاج مثل هكذا مواد من الخلايا والانسجة غير المتمايزة.

3- تقنية التحويل الحيوي

هناك مدى واسع من الانزيمات المنتجة في مملكة النبات والتي تمكن حدوث التفاعلات الصعبة او مستحيلة الحدوث. ان تزويد الزروعات بهكذا مواد تؤدي الى احداث تحويل حيوي لغرض انتاج المركبات الثانوية.

4- الانتاج شبه المصنع

بالإمكان انتاج بعض اساسيات المواد الكيمياوية والتي تكون غير مكتملة التصنيع، عن طريق تقنية زراعة الانسجة والتي يتم استكمال انتاجها عن طريق التفاعلات الكيميائية الاخرى خارج نطاق زراعة الانسجة.

5- زراعة الاعضاء المتمايزة

بالإمكان زراعة الجذور او الاوراق او النموات الخضرية القادرة على انتاج المركبات غير الممكن انتاجها من الخلايا والانسجة غير المتمايزة او المتخصصة.

عزل وزراعة ودمج البروتوبلاست *Isolation, Culture & Fusion of protoplast*

البروتوبلاست:- عبارة عن خلية ازيل جدارها الخارجي بالوسائل الميكانيكية او الكيميائية باستخدام الانزيمات. ان ازالة الجدار الخلوي يجعل الغشاء البلازمي معرضا وبشكل مباشر الى المؤثرات الخارجية وان الخلية بدون الجدار الخلوي بعد ازالته تسمى البروتوبلاست المعزول **(Isolated protoplast)**.

ان البداية الحقيقية للدراسات المتعلقة بالبروتوبلاست اجريت من قبل **Cocking** في ستينيات القرن الماضي حيث تمكن من ازالة الجدار الخلوي انزيميا والحصول على البروتوبلاست المعزول. وبعد ذلك تمكن **Takable** واخرون **(1971)** من الحصول على نبيتات جديدة من البروتوبلاست المعزول من خلايا النسيج المتوسط لأوراق نبات التبغ باستخدام الانزيمات اللازمة لذلك. لقد تمكن **Carison** واخرون من الحصول على هجين جسمي نتيجة دمج نوعين من التبغ، حيث استخدموا مادة البولي اثيلين كلايكول **(Polyethelen glycol , PEG)** لاتمام عملية الدمج. ثم تمكن العالم **Milchers** واخرون **(1978)** من انتاج هجين جسمي من دمج البروتوبلاست لنباتي البطاطا والطماطم واطلق على هذا الهجين اسم **(Pomato)**. وفي العام التالي تمكن الباحثون من استخدام التيار الكهربائي للمساعدة في دمج البروتوبلاست واعقب ذلك نجاحات في مجال اجراء تغييرات في المحتوى الجيني للخلايا من خلال ادخال جينات مأخوذة من بعض انواع البكتريا الى الخلايا النباتية لأحداث تغايرات وراثية مفيدة.

الاستخدامات التطبيقية لزراعة البروتوبلاست

ان الخلايا النباتية تكون مرتبطة مع بعضها بواسطة الروابط البلازمية والتي تسمى **Plasmodesmata**. وان عزل البرتوبلاست وزراعته مفيد جدا في دراسة المكونات الخلوية تحت ظروف بيئية مسيطر عليها. **وفيما يلي اهم الاستخدامات التطبيقية لعزل وزراعة البروتوبلاست:-**

1-.انتاج الهجن الجسمية

ويحصل ذلك عند دمج البروتوبلاست لنوعين او جنسين نباتيين مختلفين لينتج عن ذلك نباتا جديدا يحمل صفات وراثية مختلفة عن صفات اي من النباتين اللذين تم دمج البروتوبلاست الخاص بهما. وتستخدم هذه الطريقة لإنتاج الهجن في الحالات التي لا يمكن انتاجها بالطرق التقليدية **بسبب عدم التوافق الجنسي او الفيزياوي**.

2- يمكن ادخال مكونات خلوية الى البروتوبلاست المعزول مثل ادخال النواة او المايتوكوندريا او الكلوروبلاست لغرض اجراء دراسات خلوية معينة.

3- ان البروتوبلاست المزروع يكون قادرا على بناء جدار خلوي جديد خلال **2 – 10** ايام من الزراعة وان ذلك من شأنه ان يسهل كيفية تكون الجدار الخلوي ومعرفة مكوناته.

4- يمكن استخدام البروتوبلاست في اكثار النباتات في خارج الجسم الحي، حيث ان الخلية النباتية قادرة على تكوين نبات كامل مشابه للنبات الام وهذه ما يطلق عليه (**Totipotency**).

5- يمكن دراسة عمل بعض المكونات الخلوية من خلال انقسام البروتوبلاست مثل معرفة دور الانابيب الدقيقة (**Microtubules**) في هذا المجال.

6- ان سهولة عزل اي من المكونات الخلوية من البروتوبلاست المفصول بعد ازالة جدار الخلية يفيد في دراسة هذه المكونات بشكل جيد.

عزل البروتوبلاست Protoplast isolation

يتم عزل البروتوبلاست بطريقتين هما:-

1-.الطريقة الميكانيكية

وهي طريقة قديمة وقليلة الاستخدام في الوقت الحاضر. وتتمثل هذه الطريقة بوضع النسيج المراد عزل البروتوبلاست منه في محلول عالي الازموزية (**Hypertonic solution**) وهذا يؤدي الى انكماش البروتوبلاست وابتعاده عن الجدار الخلوي وسوف يساعد ذلك على تقليل الضرر الذي قد يصيب البروتوبلاست عند عزله ميكانيكيا. وبعد ذلك يتم تقطيع النسيج باله حادة وبذلك يمكن تمزيق الجدار الخلوي لخروج الروتوبلاست. ولهذه الطريقة محاسنها وعيوبها **فمن محاسنها** انه لا يتم فيها استخدام المواد الكيمياوية (**الانزيمات**) التي قد تعرض البروتوبلاست الى اضرار. اما من مساوئها ان كمية البروتوبلاست الحي المستحصل عليه تكون قليلة، وان سلوك البروتوبلاست الحي سوف يتأثر بمكونات البروتوبلاست المهشم نتيجة الفصل.

2- الطريقة الانزيمية

وهذه الطريقة مفضلة عن الطريقة الاولى، حيث يتم فيها اذابة الجدار الخلوي باستخدام **الانزيمات مثل:-**

a-.Cellulase.

b- Hemicellulase.

c- Pectinase.

d- Macerozymes.

e- Drieseiase.

يقوم انزيم البكتينيز بفصل الخلايا عن بعضها البعض فيما يعمل انزيم السيلوليز على اذابة الجدار الخلوي.

الاجزاء النباتية التي تستخدم كمصدر للبروتوبلاست

ان معظم الدراسات السابقة الخاصة بعزل وزراعة البروتوبلاست كانت تقتصر على استخدام النسيج المتوسط للورقة. ثم تطورت زراعة البروتوبلاست لتشمل السويقة الجنينية السفلى، الاوراق الفلقية التي يتم الحصول عليها من البادرات، خلايا الكالس خاصة خلايا الكالس الجنينية، حامل الورقة، الساق، الاوراق التويجية، حبوب اللقاح او جذور البادرات.

كيفية انتاج نباتات جديدة من زراعة البروتوبلاست

ان الميزة التي تتمتع بها الخلية النباتية وهي قدرتها على انتاج نبات كامل يحمل صفات نبات الام دفع الباحثين الى اكثار النباتات باستخدام تقنية زراعة البروتوبلاست في خارج الجسم الحي. **ويمكن تلخيص خطوات اكثار النباتات باستخدام تقنية البروتوبلاست بما يلي:-**

1-.تعقيم الاوراق المراد عزل البروتوبلاست منها بأحد مواد التعقيم ثم غسلها جيدا بالماء المقطر المعقم.

2- نزع نسيج البشرة السفلي وتقطيع الورقة الى اجزاء صغيرة لكي يسهل نفوذ الانزيمات.

3- توضع الاجزاء في محلول عالي الازموزية يحتوي على المانيتول (**Mannitol**) لضمان حصول الانكماش البروتوبلازمي.

4- اضافة الانزيمات التي تحلل الجدار الخلوي بعد تعقيمها باستخدام الفلترة (**Filtration**).

5- تنقية البروتوبلاست وذلك بإزالة بقايا الانزيمات المستخدمة وكذلك مخلفات الجدار الخلوي، ويتم ذلك باستخدام جهاز الطرد المركزي حيث يتجمع البروتوبلاست في القعر.

6- يتم فحص البروتوبلاست الحي وذلك باضافة صبغة (**Fluorecein diacetate, FDA**) فان البروتوبلاست الحي يمتص هذه الصبغة عكس البروتوبلاست غير الحي.

7- يزرع البروتوبلاست في الوسط الغذائي المناسب، حيث يمكن تنمية البروتوبلاست وتحفيزه على الانقسام في الاوساط الغذائية السائلة والاوساط شبه الصلبة.

يكون البروتوبلاست المعزول جدارا خلويا جديدا بعد **2 – 10** ايام من الزراعة ويختلف ذلك حسب الانواع النباتية. وحال تكون الجدار الخلوي تبدأ الخلايا بالانقسام مكونة كتل صغير من الكالس ويمكن ان تتكون الاعضاء والاجنة مباشرة من الكالس. وفي بعض الحالات يمكن ان تتكون الاجنة الجسمية مباشرة من البروتوبلاست كما في الحمضيات وامكن نجاح الاخلاف من بروتوبلاست العديد من الانواع النباتية.

اندماج البروتوبلاست Protoplast fusion

يمكن تحقيق اندماج البروتوبلاست باستخدام احد **التقنيتين التاليتين:-**

1-.الطريقة الكيميائية Chemical technique

تتضمن اضافة بعض المركبات الكيمياوية مثل البولي اثيلين كلايكول (**Polyethylene glycol, PEG**) والديكسترات (**Dextran**) وال (**Polyvinyl alcohol, PVA**) ونترات الصوديوم وغيرها، حيث يحتوي البروتوبلاست على اغشية تحمل شحنات سالبة وتعمل هذه المركبات على معادلة الشحنة مما يتيح اقتراب البروتوبلاست بعضها مع البعض الاخر ومن ثم اندماجها.

2- الطريقة الكهربائية Electrical technique

استخدمت هذه الطريقة من قبل **Zimmerman (1982)** ويتم ذلك بإمرار تيار كهربائي ضعيف من جهاز صغير يولد هذا التيار والذي يؤدي بدوره الى اقتراب البروتوبلاست ثم اندماجها. وقد تستخدم كلا الطريقتين معا لغرض دمج البروتوبلاست في بعض النباتات، حيث تستخدم الطريقة الكيمياوية اولا ثم الكهربائية.

العوامل التي تؤثر في نجاح عزل وزراعة البروتوبلاست

يمكن الحصول على بروتوبلاست من كافة الانسجة الحية والفتية. وتتضمن هذه العملية فصل البروتوبلاست بإزالة جدار الخلية ويقوم بعدها البروتوبلاست ببناء جدار خلوي جديد ومن ثم يحدث انقسام الخلايا. ان العوامل التي تؤثر في اعادة تكون الجدار الخلوي والانقسام تتمثل في التركيب الوراثي حيث تختلف الانواع النباتية فيما بينها، وكذلك الحالة الفسيولوجية للنبات الام وطبيعة الظروف التي يتعرض اليها.

العوامل التي تؤثر على نجاح عزل زراعة البروتوبلاست

1-.الضغط الاوزموزي

ان ازالة الجدار الخارجي واحتفاظ الخلية بالغشاء الخلوي فقط يتطلب ان يكون الضغط الاوزموزي في الوسط الغذائي مساويا او قريب من الضغط الاوزموزي للبروتوبلاست، حيث ان ارتفاعه كثيرا يؤدي الى انكماش البروتوبلاست كما ان انخفاضه يؤدي الى انتفاخ البروتوبلاست وربما انفجاره.

2- الوسط الغذائي

يعتبر وسط **MS** او **B5** **(مع اجراء بعض التحويرات فيهما)** مناسبين لزراعة البروتوبلاست وان زيادة تركيز الفيتامينات والمواد العضوية المعقدة يعتبر ضروريا لنموه عندما تكون كثافته قليلة. ويمكن ان يكون الوسط الغذائي المناسب لنمو نسيج الكالس لنوع نباتي معين ملائما لنمو البروتوبلاست لنفس النوع.

3- منظمات النمو

ان اضافة توليفة من الاوكسينات والسايتوكاينينات يعتبر ضروريا لنجاح زراعة البروتوبلاست، الا ان هناك انواع قليلة من النباتات التي لا يتطلب اضافة منظمات النمو الى الوسط الغذائي في حالة زراعة البروتوبلاست فيه.

4- الظروف البيئية

لوحظ ان شدة الاضاءة العالية تؤدي الى تثبيط انقسام البروتوبلاست لذلك يفضل زراعته تحت اضاءة قليلة او في الظلام كما ان درجة الحرارة ما بين **24 – 26 م** تعتبر ملائمة لنموه.

5- الكثافة

ان كثافة البروتوبلاست تعتبر عاملا محددا لنجاح زراعته وتتراوح الكثافة المناسبة **0.5 – 2 × 10** بروتوبلاست لكل **سم3** من وسط الزراعة، ويختلف هذا العدد باختلاف الانواع النباتية ويمكن قياس الكثافة باستعمال جهاز ال **Haemocyto meter**.

- ***دمج البروتوبلاست والتهجين الجسمي Protoplast fusion & somatic hybridization***

لغرض دمج البروتوبلاست واجراء التهجين الجسمي يتم خلط احجام متساوية من بروتوبلاست النوعين المراد دمج بروتوبلاستيهما للحصول على الكثافة المطلوبة ثم يضاف لهما اي من مركبات الدمج (**Fusion agents**) المذكورة سابقا. ويحفظ الخليط على درجة حرارة **35م** لمدة خمس دقائق وبعدها تجرى عملية الطرد المركزي لمدة خمس دقائق لغرض ترسيب البروتوبلاست. توضع الانابيب في حمام مائي بدرجة حرارة بدرجة حرارة **30م** ويتم خلالها دمج معظم البروتوبلاست مع بعضه البعض وبعد ذلك يتم غسل البروتوبلاست جيدا وينقل الى وسط غذائي سائل ويتم فحصه تحت المجهر لمشاهدة حدوث الاندماج. واثناء عملية الاندماج قد يحدث اندماج النواتين او تبقى منفصلتين، ففي حالة اندماجهما ينتج عن ذلك هجين حقيقي يسمى **Synkaryocytes** اما في حالة اختفاء احد النواتين واندماج السايتوبلازم فيسمى في هذه الحالة بالهجين السايتوبلازمي (**Cybrid**) في حين عند دمج السايتوبلازم وبقاء النواتين منفصلتين فيسمى **Heterokaryon**.

تكوين وزراعة الاعضاء النباتية

تكوين الاعضاء Organogenesis

هي عملية نشوء الاعضاء النباتية كالنموات الخضرية او الجذور من الاجزاء النباتية المزروعة او من انسجة الكالس الناتجة منها. ان نشوء الاعضاء من الجزء النباتي مباشرة يسمى (**Direct Organogenesis**) اما نشوئها من انسجة الكالس فيسمى (**Indirect Organogenesis**) وتلعب الاوكسنات والسايتوكاينينات دورا مهما واساسيا في ذلك. ان زيادة نسبة السايتوكاينين الى الاوكسين تؤدي الى تشجيع تكوين السيقان، اما في حالة زيادة نسبة الاوكسين الى السايتوكاينين فان ذلك يساعد على تكوين الجذور.

زراعة الاعضاء النباتية Plant organs culture

لكل عضو من الاعضاء المفصولة من النبات القدرة على التخصص وتكوين نبات مشابه للنبات الام عند زراعته على اوساط غذائية ملائمة لهذا الغرض وتحت الظروف البيئية المناسبة.
وتقسم الاعضاء النباتية الى:-

1-.الاعضاء الخضرية Vegetative organs وتشمل:-

أ-.القمم النامية والمرستيمات القمية Shoot tips and meristem tips.

ب- الجذور Root.

ج- الاوراق Leafs.

2- الاعضاء التكاثرية Reproductive organs وتشمل:-

أ-.زراعة الاجنة Embryoes culture.

ب- زراعة البويضات Ovules culture.

ج- زراعة المبايض Ovaries culture.

د- زراعة المتك وحبوب اللقاح Anther and pollen grains culture.

الاعضاء الخضرية

أ-.زراعة القمم النامية والمرستيمات القمية

تنمو قمة الساق مكونة نباتا كاملا اذا احتوت على عدد من بادئات الاوراق وجزء من الساق، وتعود اولى النجاحات في مجال زراعة المرستيم القمي الحقيقي الى عام **1970** حيث تم عزل المرستيم القمي فقط دون اي بادئات للأوراق (**Leaf primordia**) لنبات التبغ حيث تم

زراعتها على اوساط غذائية محددة من اجل نموها وتطورها الى نموات خضرية تم تجذيرها فيما بعد.

وتعتبر هذه التقانة من التقانات الصعبة جدا التي يتطلب اجراءها دقة ومهارة فائقتين حيث يجب عزل المرستيم القمي بالحجم المطلوب وبسرعة خوفا من جفافه اثناء اجراء العملية والنقل الى الوسط الغذائي. ومن الجدير بالذكر ان نسبة النجاح في هذه العملية تكون منخفضة نسبيا فضلا عن ضرورة توفير مواد معينة في الوسط الغذائي مثل الاحماض الامينية وغيرها بتشجيع نمو المرستيمات وتطورها. وتختلف احتياجات القمم النامية بالمواد الغذائية المكونة للوسط الغذائي باختلاف الانواع النباتية ونوع الجزء المستخدم وحجم الجزء النباتي المزروع، حيث ان زراعة المرستيم القمي بدون بادئات الاوراق يحتاج لأضافه منظمات النمو النباتية في حين ان الجزء الحاوي على بادئات الاوراق لا يحتاج الى ذلك **لأن** الاوراق تعد مصدرا لبناء الهرمونات النباتية.

ب- زراعة الجذور

تعد الجذور من المصادر المهمة لعدد من المركبات النباتية وقد ساهمت هذه التقنية في دراسة بناء العديد من المركبات المهمة مثل المواد الفينولية والقلويدات والفيتامينات والاحماض الامينية.

وتظهر الجذور المفصولة والمزروعة على اوساط غذائية خاصة صفات مظهرية مشابهة لصفات الجذور المتصلة بالنبات الام، حيث يمكن تتبع مركز نشاط الجذور في قممها (**Root apex**) بالإضافة الى انماط الانسجة الوعائية للأنواع النباتية ونوعية التفرعات الجانبية لها. كما ان بعض الصفات الفسيولوجية المهمة للجذور المتصلة بالنبات يمكن تتبعها في الجذور المستأصلة من نباتات مختلفة عند زراعتها على الاوساط الغذائية **ويمكن تقسيمها الى ثلاثة انواع هي:-**

1-.جذور ذات معدلات عالية من النمو مع تكوين العديد من الجذور الفرعية مثل جذور الطماطم.

2- جذور ذات معدلات متوازنة من النمو بحيث تنمو لمدة معينة، حيث تنخفض بعدها سرعة نموها او عدم تكوين جذور فرعية كما في الكتان.

3- جذور لا تنمو في الاوساط الغذائية القياسية المعدة لنمو الجذور وربما تحتاج لوجود عوامل نمو محددة مثل جذور النباتات الخشبية.

ويتأثر تكوين الجذور بعدة عوامل مثل التعقيم وظروف التحضين ومكونات الوسط الغذائي، وعادة ما يستخدم وسط **White** لغرض زراعتها.

ج- زراعة الاوراق

لا يوجد وسط محدد لزراعة اوراق معظم النباتات وانما يتم استخدام اوساط غذائية مختلفة حسب نوع النبات، ويعد وجود السكروز مهما جدا في الوسط الغذائي ويعتمد تركيزه على حجم الورقة المستخدمة.

الاعضاء التكاثرية Reproductive organs

تستخدم الاعضاء التكاثرية اساسا لإنتاج نباتات نقية وراثيا او لغرض انتاج نباتات احادية العدد الكروموسومي او الحصول على سلالات متجانسة (**Homozygous lines**) وذلك لأهميتها في اعمال التربية والتحسين.

أ-.زراعة الاجنة Embryos culture

يعتبر اجهاض الاجنة من المشاكل التي تواجه مربي النبات ويحصل الاجهاض اثناء عملية التهجين سواء بين الاجناس (**Intergeneric crosses**) او في حالة التهجين بين اصناف الجنس الواحد (**Interspecific crosses**) حيث على الرغم من حصول عملية الاخصاب الا ان الجنين يجهض في مراحل معينة من مراحل تطور البذرة والذي ربما يسبب اضمحلال السويداء (**Endosperm**) وحرمان الجنين من الغذاء اللازم لتطوره. ولغرض انقاذ الجنين وعدم فقدانه يتم عزله في مراحل مبكرة وزراعته على وسط غذائي محدد لغرض تطوره الى بادرة ثم الى نبات كامل.

ب- زراعة البويضات Ovules culture

تستخدم هذه التقنية في الحالات التي يحصل فيها الاجهاض في مراحل مبكرة جدا اي بعد الأخصاب مباشرة، حيث لا يمكن عزل الجنين وذلك لصغر حجمه فيلجأ الباحثون الى عزل البيضة بأكملها وزراعتها على اوساط غذائية ملائمة لحين تطور الجنين. كما يتم ايضا استخدام تقنية زراعة البويضات للقضاء على حالات عدم التوافق (**Incompatibility**) وخصوصا في الاجناس المتباعدة وراثيا، فقد تنضح حبوب اللقاح في اوقات مبكرة قبل ان تكون المياسم مستعدة للتلقيح او قد لا ينمو انبوب اللقاح على ميسم الزهرة بسبب وجود بعض المثبطات في مياسم الزهرة او غيرها من العوامل فباستخدام تقنية التلقيح والاخصاب خارج الجسم الحي يمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق عزل البويضات وزراعتها ومن ثم تلقيحها بحبوب اللقاح من النبات المرغوب من اجل الحصول على اجنة حية تنمو فيما بعد الى بادرات.

ج- زراعة المبيض Ovary culture

تستخدم زراعة المبايض في الدراسات التي تتعلق بمظهر الثمار وفسلجتها ومراحل تطورها واحتياجاتها الغذائية واول من قام بزراعة المبايض هو الباحث **Larue** عام **1942** حيث استخدم مبايض من نباتات مختلفة تعود لأجناس متعددة كونت قسم منها نباتات كاملة في حين ان الاخرى اظهرت انتفاخات بالمبيض فقط.

تحتاج زراعة المبايض المفصولة اوساطا غذائية خاصة حاوية على المواد الغذائية بتراكيز معينة مع وجود الاحماض الامينية. ومن المفضل عند زراعتها **ابقاء قسم من الاوراق التويجية متصلة مع المبيض** وذلك لان وجودها يشجع الى حد ما نمو المبيض الى خارج الجسم مقارنة بتلك المزروعة بدون الاوراق التويجية وان اضافة الهرمونات النباتية الى الاوساط الغذائية يتحدد بعملية التلقيح، حيث تحتاج المبايض غير الملقحة لإضافة الاوكسينات في حين ان المبايض الملقحة لا تحتاج الى هذه الاضافات وربما يعود السبب الى ان المبايض بعد التلقيح لها القابلية على بناء الاوكسينات داخليا.

د- زراعة المتك وحبوب اللقاح Anther and pollen grain culture

باستخدام تقانة زراعة الانسجة، امكن الحصول على نباتات تحتوي على نصف العدد الكروموسومي (**Haploid plants**) بمدة قصيرة مقارنة بالطرق التقليدية المتبعة في هذا المضمار وتكون النباتات الناتجة عقيمة يمكن تحويلها الى نباتات خصبة بمضاعفة العدد الكروموسومي وذلك باستخدام مادة الكولجسين (**Colciecine**) حيث امكن ذلك من زراعة المتوك او حبوب اللقاح وذلك عن طريق تحوير نمو حبة اللقاح من تكوين انبوب اللقاح الى انقسام خلوي ومن ثم اعادة تمايز الخلايا الى اجنة تنمو فيما بعد الى نباتات كاملة.

العوامل المؤثرة في تكوين الاعضاء النباتية

1-.العوامل الكيميائية

اكد الباحثون بان وجود الاوكسين بتراكيز مناسبة يؤدي الى تحفيز نشوء مبادئ الجذور واشارت الدراسات التي اجريت في هذا المجال ان العامل الذي يحفز نشوء عضو معين من نسيج مزروع قد لا يظهر نفس التأثير على نسيج اخر. ومن المؤكد ان تكوين الاعضاء في خارج الجسم الحي يعتمد على مجموعة معقدة من العوامل المحددة المتداخلة مع بعضها وقد ادى ذلك الى ظهور عدة فرضيات عن كيفية تكوين الاعضاء في خارج الجسم الحي، وان احداها تفترض ان التغيير في نسبة مكونات الوسط الغذائي يعتبر عاملا حاسما ومحددا لتكوين او عدم تكوين الاعضاء النباتية. ومن الجدير بالذكر ان لنسبة تركيز الاوكسين الى السايتوكاينين في الوسط الغذائي يؤدي الى تكوين الجذور وفي حالة العكس يؤدي الى تكوين الافرع الخضرية اما في حالة التوازن فسوف يستمر نمو الكالس.

2- العوامل الفيزيائية

تؤثر العوامل الفيزياوية على تكوين الاعضاء النباتية، حيث وجد ان الضوء يعتبر عاملا محددا لتكوين الازهار في الانسجة المأخوذة من نباتات تتأثر بطول الفترة الضوئية. كما وجد ان تعريض الزروعات الى درجات حرارة منخفضة يعتبر اساسيا لتحفيز نشوء الازهار في النباتات التي يتطلب ازهارها فترة برودة مناسبة لذلك. من ناحية اخرى تؤدي شدة اضاءة قليلة ودرجات حرارة اقل من **25م** الى زيادة تكوين البراعم في انسجة التبغ المزروعة، اما شدة الاضاءة العالية ودرجات الحرارة المرتفعة فأنها تثبط تكوين البراعم. اما الحالة الفيزياوية للوسط الغذائي فقد عرف تأثيرها على تمايز الانسجة المزروعة منذ فترة طويلة، حيث لوحظ

ان الاورام النباتية لهجن نباتي التبغ المزروعة على وسط غذائي شبه صلب تنمو بهيئة كالس غير متمايز بينما يؤدي زراعتها في وسط سائل بنفس المكونات الى تكوين افرع عليها.

فقدان قابلية التكوين المظهري في المزارع طويلة الامد

لوحظ ان بعض مزارع الكالس او الخلايا المعلقة والتي كانت ذات قابلية على تكوين الاعضاء او تكوين الاجنة يحدث لها تدهور مستمر وفي بعض الاحيان فقدان تام لقابليتها على التكوين المظهري في حالة استمرار بقاءها في الاوساط الغذائية من خلال اعادة زراعتها بشكل متتالي ولفترة طويلة. **ولتفسير هذه الظاهرة وضعت ثلاث فرضيات لذلك هي:-**

1-.الفرضية الوراثية Genetic hypothesis

وتقترح هذه الفرضية ان التغيرات النووية (**بما فيها التعدد الكروموسومي والطفرات الكروموسومية**) التي تحصل عادة في الخلايا المزروعة هي المسؤولة عن فقدان تكوين الاجنة او تكوين الاعضاء في المزارع طويلة الامد، وعادة لا يمكن عكس الفقدان الوراثي لهذه لقابلية تكوين الاجنة والاعضاء في هذه المزارع.

2- الفرضية الفسيولوجية Physiological hypothesis

قد يعزى تدهور قابلية تكوين الاعضاء او الاجنة الى التغير الحاصل في التوازن الهرموني داخل الخلايا او الانسجة او الى حساسية الخلايا الى مواد النمو المضافة الى الوسط الغذائي. وفي مثل هذه الحالات يتوقف تمايز الخلايا الى اعضاء او اجنة دون ان تفقد قابليتها بشكل تام لأحداث ذلك مرة اخرى، حيث يفترض ان الخلايا قادرة على استعادة قابليتها على تكوين الاعضاء او الاجنة عن طريق تحوير المعاملات الخارجية.

3- فرضية التنافس Competitive hypothesis

وهذه الفرضية هي جمع للفرضيتين السابقتين، حيث يعتقد بعض الباحثين ان هناك عمليتين ربما تشتركان في احداث التدهور والفقدان النهائي قابلية تكوين الاجنة والاعضاء خلال عمليات اعادة الزراعة المستمرة وعلى فترات طويلة. لقد لوحظ حدوث هذه الحالة في خلايا الجزر حيث اصبحت هذه الخلايا في بداية الامر اكثر حساسية لتثبيط قابلية التعبير عن ال **Totipotency** الخاص بها نتيجة تأثير الاوكسين **2,4-D** ومن ثم تظهر لاحقا وبمرور الزمن خطوط جديدة من الخلايا تفتقر الى قابلية تكوين الاجنة والاعضاء بسبب عدم الثبات الخلوي في الخلايا المزروعة. ان هذا ليس بالضرورة ان يحدث فيه تغير اعداد الكروموسومات وانما قد تحدث طفرات وراثية محدودة او فقدان وانتقال المعلومات الوراثية.

زراعة الكالس Callus culture

الكالس:- عبارة عن مجموعة من الخلايا البرنكيمية المفككة ذات الجدران الرقيقة، وتتكون هذه الخلايا من انقسام خلايا الام نتيجة لأحداث جروح فيه. حيث يتكون الكالس في مناطق الجرح في السيقان او الجذور وغيرها. وقد يتكون الكالس ايضا نتيجة لمهاجمة المسببات المرضية او الحشرية للنباتات واحداث جروح فيها.

وباستخدام تقانة زراعة الانسجة امكن تحفيز تكوين الكالس من اجزاء مختلفة من النبات ولأنواع نباتية متعددة على الرغم من ان هذه النباتات لا تكون كالس عند احداث جروح فيها في الطبيعة. وبشكل عام يمكن القول ان النباتات المتعددة الخلايا لها القدرة على انتاج الكالس عند زراعة اجزاء منها في اوساط غذائية مناسبة لهذا الغرض، الا ان نباتات ذوات الفلقتين هي المفضلة واستخدمت بشكل واسع في مجال البحوث العلمية والتطبيقية لزراعة الخلايا والانسجة النباتية. ويمكن تحفيز تكوين الكالس عند فصل اي جزء من النبات سواء كان **جذر، ساق، ورقة وغيرها**، الا ان الانسجة الفتية هي الاكثر احتمالا لإنتاج الكالس.

يمكن تحفيز خلايا الجزء النباتي المفصول والمزروع في الوسط الغذائي لانتاج الكالس تحت تأثير منظمات النمو التي تساعد على انقسام الخلايا. ومن جهة اخرى امكن الحصول على الكالس من اجزاء نباتية ذات خلايا عالية التخصص **(متمايزة)** ليس لها نشاط مرستيمي وذلك من خلال حثها على فقد التمايز والدخول في دورة انقسامات متكررة لانتاج خلايا الكالس. يزداد الكالس في الحجم نتيجة لانقسام خلاياه الواقعة في الطبقات الخارجية على الاغلب، اما الخلايا الكائنة في الداخل عادة ما يكون انقسامها قليل وربما معدوم، **وقد يعود السبب في ذلك** الى ان خلايا الطبقة الخارجية تكون في تماس مع الوسط الغذائي وبالتالي تتحفز للانقسام ويكون نشاطها في الانقسام معتمدا على مكونات الوسط الغذائي وخاصة منظمات النمو فضلا عن نوع الجزء النباتي المستخدم والظروف البيئية خلال فترة التحضين. ان خلايا الكالس الواقعة في مركز الكتلة والتي تكون غير قادرة على الانقسام وتكبر في العمر فتحصل لها تغيرات فسيولوجية وربما وراثية فتختلف عن الخلايا المرستيمية ولذلك ربما تحدث اختلافات وراثية لبعض الخلايا لا تشابه خلايا النبات الام من ما قد ينتج عنها نباتات تختلف في صفاتها عن النبات الام.

الاوساط الغذائية المستخدمة في نشوء وتنمية الكالس

ان لمكونات الوسط الغذائي اثر كبير في نشوء الكالس من الاجزاء النباتية المفصولة والمزروعة فيه وقد تختلف الاجزاء النباتية المزروعة في احتياجاتها لمكونات الوسط الغذائي، وبناء على ذلك فقد تم تحوير عدة اوساط غذائية لتصبح ملائمة لنمو نسيج او عضو نباتي معين. فبالإضافة الى المكونات الاساسية من العناصر المعدنية الرئيسية والثانوية والفيتامينات والسكروز فقد ثبت ضرورة اضافة بعض المركبات الاخرى مثل عصير الليمون، حيث وجد ان اضافته الى الوسط الغذائي المزروع فيه الجزء النباتي الحاوي على خلايا الكامبيوم قد ادى الى نشوء الكالس دون الحاجة الى اضافة اي نوع من منظمات النمو النباتية.

كما يضاف احيانا حليب جوز الهند الى وسط زراعة الكالس فضلا عن اضافة بعض الحوامض الامينية مثل الكلايسين وال **Aspartic acid** و ال **Glutamic acid** كمصدر للنيتروجين المختزل. ان اهم الاوساط الغذائية التي تستخدم لغرض نشوء وتنمية الكالس هي **White, B5, MS** . ولغرض تصليب الوسط الغذائي يضاف اليه الاكار او يستخدم الوسط السائل في زراعة الكالس.

اما اضافة منظمات النمو فذلك يختلف باختلاف الجزء النباتي المزروع ومدى احتياجه الى نوع وتركيز معين من منظم النمو لتحفيز انقسام الخلايا وتكوين الكالس، حيث ان بعض الاجزاء النباتية تتطلب اضافة الاوكسينات الى الوسط الغذائي لتحفيز نشوء الكالس، والبعض الاخر يتطلب اضافة السايتوكاينين معا وبعضها الاخر لا تحتاج الى وجود اي من منظمات النمو في الوسط الغذائي لغرض نشوء الكالس.

مراحل تطور الكالس Callus development stage

1-.مرحلة التحفيز Induction stage

يتم خلال هذه المرحلة تحفيز وتنشيط العمليات الايضية لخلايا الجزء النباتي وذلك لغرض تهيئتها للانقسام. ويتوقف طول الفترة اللازمة لتهيئة الخلايا للانقسام على عدة عوامل اهمها الحالة الفسيولوجية للجزء النباتي المستأصل وظروف تحضين الزروعات. وعادة ما تستجيب الخلايا الواقعة في الطبقات السطحية من قطعة النسيج الى التحفيز اكثر من الخلايا الواقعة في العمق.

2- مرحلة انقسام الخلايا Cell division stage

يزداد نشاط الخلايا في هذه المرحلة بعد ان تتحول الخلايا المتخصصة للجزء النباتي المزروع الى خلايا مرستيمية، اي حدوث عملية فقدان التمايز (**Dedifferentiation**) ومن ثم اعادة تخصصها من جديد (**Redifferentiation**). ومن الجدير بالذكر ان الخلايا في الطبقة السطحية والملامسة للوسط الغذائي تكون اكثر قدرة على الانقسام نتيجة عدة عوامل متداخلة مع بعضها **ومن هذه العوامل:-**

أ-.تأثير المواد المتحررة من الانسجة نتيجة الجروح والتي يعتقد بان لها دور مهم في تحفيز الانقسام.

ب- وفرة الاوكسجين حول الخلايا مما يعزز قابليتها على الانقسام السريع.

ج- سرعة تحرر غاز ثاني اوكسيد الكاربون بعيدا عن الانسجة المزروعة.

د- وفرة المواد الغذائية وسرعة استفادة الخلايا منها نتيجة لتماس خلايا الطبقة السطحية مع الوسط الغذائي.

3- مرحلة التمايز والتخصص Differentiation & Specialization stage

وتتمثل هذه المرحلة في تخصص خلايا الكالس الناتجة من انقسام الخلايا وقيامها ببعض العمليات الايضية مثل انتاج المركبات الثانوية (**Secondary substances**).

ومن الجدير بالذكر ان هذه المراحل متداخلة مع بعضها بمعنى اخر ان خلايا الجزء النباتي المزروع لا تتحفز كلها في وقت واحد وتدخل في المرحلة اللاحقة بل ان بعض الخلايا تتحفز وتمر بانقسامات متكررة ولا زالت خلايا اخرى قد جرى لها التحفيز وهكذا الحال لبقية المراحل.

اعادة زراعة الكالس Sub culturing of callus

وهي عملية نقل الكالس المتكون الى اوساط غذائية جديدة على فترات محددة، وتعد هذه العملية من المتطلبات الاساسية لنجاح زراعة الكالس. ان استمرار زراعة الكالس في نفس الوسط الغذائي لمدة طويلة يؤدي الى تدهور النمو ويعود ذلك الى **عدة اسباب منها:-**

1-.استنزاف المكونات الغذائية للوسط الغذائي وجفاف الوسط شبه الصلـــــــــــــــــــب.

2- زيادة تركيز المكونات الغذائية في حالة الزراعة بالأوساط السائلة نتيجة تبخر المـــــــــاء.

3- تجمع وتراكم المخلفات الايضية للأجزاء النباتية في الوسط الغذائي مما تؤثر سلبا على نمو الاجزاء المزروعة.

عادة ما يتم نقل الكالس الناتج الى وسط غذائي جديد بنفس المكونات كل 4 اسابيع تقريبا وهذا يعتمد على نوع النبات ومعدل انقسام خلايا الجزء المزروع. فعندما يصل الكالس الى الحجم المناسب يقسم الى قطع يتراوح وزنها من **20 – 100** ملغم ويزرع في اوساط محضرة حديثا. ولابد من التقيد بالحجم المناسب للكالس عند اجراء عملية اعادة الزراعة، حيث عند نقل الكالس وهو لايزال بكمية قليلة جدا يؤثر سلبا على نموه بحيث يكون بطيئا او قد يتوقف النمو. اما اذا ترك لفترة طويلة وازداد حجمه كثيرا فان ذلك قد يؤدي الى توقف الخلايا المتواجدة في المركز عن النمو وقد تفرز مواد ضارة تؤثر على بقية الخلايا.

ان الكالس المتكون تكون بعض خلاياه ملكننة (**Lignified**) والبعض الاخر تكون خلاياه هشة سهلة التمزق. كما تختلف خلايا الكالس في الوانها فمنها ماهي مصفرة ومنها البيضاء او الخضراء فضلا عن ان بعض الخلايا تحتوي على صبغة الانثوسيانين وهناك من الخلايا التي تتلون باللون البني والتي تستبعد عند اعادة الزراعة في وسط جديد.

يمكن تمييز عدة مجاميع من خلايا الكالس نتيجة حدوث بعض التغيرات التي تحصل له كما ان اعادة زراعة الكالس لفترات طويلة قد يتسبب في احداث بعض التغيرات الوراثية والتي تكون **على نوعين:-**

1- تغيرات في التركيب الوراثي Genetic Variation

وتحدث هذه التغيرات نتيجة لفقدان جزء من الكروموسوم او الجينات وبذلك فان هذه التغيرات تكون ثابتة وتتوارث بين الاجيال.

2- تغيرات ابيجينية Epigenetic Variation

وتكون هذه التغيرات في التعبير الجيني وهي تتوارث ايضا، الا انه من الممكن ان تختفي هذه الاختلافات عند الجيل الثالث او الرابع.

ظاهرة التكيف في الانسجة النباتية Habituation

يقصد بالتكيف هي جميع التغيرات الحاصلة في الانسجة النباتية المزروعة وامكانية نمو هذه الانسجة عند الغاء بعض مكونات الوسط الغذائي وخاصة منظمات النمو، حيث ينمو النسيج النباتي دون الحاجة الى اضافة الاوكسينات او السايتوكاينينات والتي كانت مضافة الى الوسط الغذائي في الاساس عند زراعة الاجزاء النباتية. فقد وجد ان الكالس المتكون على اجزاء بعض النباتات والذي يحتاج الى الاوكسينات في بداية نشوئه وتكونه يمكنه ان ينمو دون الحاجة الى اضافة هذه الاوكسينات الى الوسط الغذائي وتسمى انسجة الكالس هذه بالأنسجة المتكيفة للاوكسين (**Auxin Aabituated**)، كما ان انسجة الكالس التي يمكن ان تنمو على اوساط خالية من السايتوكاينين تسمى انسجة متكيفة للسايتوكاينين (**Cytokinin Habituated**)، وفي بعض الاحيان تتكون انسجة كالس متكيفة لأكثر من مركب.

ان الميكانيكية التي يحدث فيها التكيف للأنسجة غير مفهومة تماما، الا انه يعتقد ان الانسجة المتكيفة تصنع كميات كافية من عوامل النمو التي تتكيف لها نتيجة لحدوث تغيرات في مجموعة من الجينات المرتبطة والمسيطرة على مجموعة تنظيم بناء الهرمونات. ويعتقد بعض الباحثين ان التكيف يحدث نتيجة حصول تغيرات على مستوى التعبير الجيني (**Epigenetic**) حيث بينوا ان حالة التكيف هذه من الممكن ان تزول. وذكر باحثون اخرون ان هناك علاقة بين العوامل البيئية الخاصة بتحضين الزروعات وحالة التكيف لأنسجة الكالس، حيث لوحظ ان انسجة كالس التبغ المتكيفة للسايتوكاينين تفقد هذه الخاصية عند زراعتها على درجة حرارة 16م بدلا من **26م**، كما اضافوا ان تركيز الاملاح المعدنية في الوسط الغذائي قد تفقد نسيج الكالس المتكيف للاوكسين هذه الخاصية عند نقله الى وسط غذائي اخر مجهز بكميات اضافية من بعض الاملاح اللاعضوية.

ظاهرة التزجج Vetrification

ويقصد بها تكون نبيتات من انسجة الكالس ذات نمو غير طبيعي، حيث تكون النبيتات الناتجة منه مشوهة وتكون اوراقها سميكة وشفافة وتنكسر بسهولة وقد لوحظ هذه الظاهرة في بعض الانواع النباتية. وربما يعود سبب حصولها الى تأثير بعض مكونات الوسط الغذائي وخاصة منظمات النمو، حيث وجد ان النبيتات الناتجة من الكالس المتكون من زراعة القمم النامية في

وسط علي التركيز من ال **NAA** تحصل لها هذه الظاهرة كما وقد حصلت نفس هذه الصفات لنبيتات التفاح الناتجة من زراعة الكالس في وسط غذائي حاوي على السايتوكاينين **BA**.

تكوين وزراعة الاجنة

لا تنحصر قابلية النباتات المزهرة في تكوين الاجنة على تطور البيضة المخصبة فقط، حيث ثبت امكانية تكونها من الخلايا الجسمية المأخوذة من اجزاء نباتية مختلفة بعد زراعتها على اوساط غذائية محددة تحتوي على المتطلبات اللازمة لنشؤها وتطورها. ان هذه الامكانية على تكوين الاجنة مبنية على مفهوم الطاقة الكامنة للخلايا (**Totipotentiality**) والتي مفادها بان كل خلية من خلايا النبات تمتلك قابلية وراثية كامنة لتكوين نبات كامل يحمل كافة الصفات الوراثية للنبات الام عند توفر الظروف البيئية والغذائية المناسبة.

ويعتبر الباحث **Steward** واخرون (**1958**) اول من تمكنوا من الحصول على جنين خضري من انسجة الكالس لنبات الجزر، وبعد فترة وجيزة اعلن **Recent** (**1959**) تكون الاجنة الجسمية من مزارع الخلايا المعلقة لنبات الجزر، حيث كانت هذه الاجنة مشابهة للأجنة الجنسية في تركيبها ومراحل تطورها. ومن ذلك الوقت اصبحت عملية الحصول على الاجنة الخضرية حالة ممكنة في النباتات الراقية. ويمكن الحصول على الاجنة الخضرية من ثلاثة مصادر من الخلايا التي تحتوي على **2n** من الكروموسومات (**Diploid cells**) **وهي:-**

1-.الخلايا الخضرية للنباتات الناضجة **Vegetative cells of mature plants.**

2- السويقة الجنينة السفلى والاوراق الفلقية **Hypocotyls and cotyledons.**

3- الانسجة المأخوذة من الاعضاء التكاثرية عدا البيضة المخصبة **Reproductive tissues.**

ويتمثل الجزء النباتي المفصول (Explant) من الانسجة التكاثرية بالاتي:-

أ-.الاجزاء الزهرية **Floral parts** مثل الاوراق التويجية، الاوراق الكأسية، البراعم الزهرية والمبيض قبل حصول عملية التلقيح.

ب- البويضة والانسجة الملحقة بها.

ج- الاجنة الجنسية، حيث امكن انتاج اجنة خضرية عند زراعة البيضة المخصبة وغالبا ما يتكون الكالس اولا ثم يعقبه تكون الاجنة الخضرية.

د- السويداء Endosperm، حيث امكن الحصول على اجنة خضرية عند زراعة السويداء لعدد من النباتات، الا ان الاجنة تتوقف عند الطور الكروي **Globular stage.**

هـ- المتك والمايكروسبورات Anther and microspores، حيث امكن الحصول على نباتات بشكل مباشر او غير مباشر (**اي بعد تكون الكالس**) من زراعة المايكروسبورات او المتوك، الا ان النباتات الناتجة تكون احادية المجموعة الكروموسومية (**Haploid**) كما امكن

الحصول على اجنة خضرية عند زراعة الخويط (**Filament**) وتكون النباتات الناتجة في هذه الحالة ثنائية المجموعة الكروموسومية (**Diploid**).

كيفية تكوين الاجنة الخضرية

عادة ما تتكون الاجنة الخضرية من الاجزاء النباتية المذكورة اعلاه بطريقتين هما:-

1-.التكون المباشر للأجنة الخضرية Direct embryogenesis

تتكون الاجنة الخضرية في هذه الطريقة مباشرة من الجزء النباتي المزروع دون المرور بمرحلة الكالس، حيث ان خلايا النسيج المزروع تطرأ عليها منذ البداية تغييرات واضحة لتصبح جاهزة للتحول الى اجنة خضرية وتسمى مثل هذه الخلايا بالخلايا المهيأة مسبقا للتحول الى اجنة خضرية (**Pre Embryo genic Determined Cells**) (**PEDC**) وان الخلايا التي ستتحول الى اجنة لابد وان يحصل لها في بداية الامر القابلية على اعادة الانقسام (**Redifferentiation**) او (**Dedifferentiation**) وعند انقسامها تكون الخلايا الجنينية الام (**Embryo genic Mother Cells**) (**EMC**).

2- التكون غير المباشر للأجنة الخضرية Indirect Embryogenesis

وفي هذه الحالة لا تتكون الاجنة الخضرية من خلايا النسيج المزروع مباشرة وانما يتكون الكالس اولا الذي تتحول بعض خلاياه الى اجنة خضرية. اي ان الاجنة الخضرية لا تتكون الا بعد تحفيز خلايا الكالس لتتحول الى اجنة خضرية وتسمى الخلايا التي تتحفز لتكوين الاجنة بالخلايا المحفزة لتكوين الاجنة (**Induced Embryo genic Determined Cells**) (**IEDC**) وتلعب مكونات الوسط الغذائي دورا مهما في هذا الجانب. كما تعتبر منظمات النمو المضافة الى وسط الزراعة ذات تأثير كبير في هذا المجال.

وفي كلتا الطريقتين فان عملية تكون الاجنة الخضرية تمر بأطوار تطورية مشابهة لتلك التي تحصل للأجنة الجنسية **وهذه المراحل هي:-**

1-.الطور الكروي Globular stage.

2- الطور القلبي Heart-shaped stage.

3- الطور الطوربيدي Torpedo stage.

4- الطور الفلقي Cotyledonary stage.

مراحل تكون الاجنة الجسمية

تمر عملية تكون الاجنة الجسمية بمرحلتين هما:-

1-.مرحلة التحفيز Induction stage

2- مرحلة التطور Development stage والتي تؤدي في النهاية الى الانبات.

لابد من الاشارة هنا الى ان متطلبات هاتين المرحلتين مختلفة تماما، لذلك تستخدم اوساط غذائية مختلفة لكل مرحلة. ففي مرحلة التحفيز يكفي اضافة النترات لوحدها بكميات كبيرة، في حين انه في مرحلة تطور الجنين يتطلب اضافة مستويات عالية من السكروز والنتروجين وخصوصا النتروجين المختزل (**الامونيوم او الاحماض الامينية**).

متطلبات زراعة الاجنة

من اهم العوامل التي تحدد نجاح زراعة الاجنة هو اختيار الوسط الملائم الذي يوفر الاحتياجات المختلفة للجنين في مراحل تطوره المختلفة. الدراسات المبكرة التي اجريت في هذا المجال تركزت على تطور النباتات من اجنة بالغة على وسط بسيط. وان الاهتمام المستمر من الباحثين لحل المشاكل المختلفة مثل السيطرة على التكوين الجنيني والرغبة في الحصول على هجن من تهجينات غير خصبة ادى الى اجراء بحوث مكلفة حول الاحتياجات الغذائية والبيئية للأجنة غير البالغة. وكانت هناك جهود مستمرة من قبل العديد من الباحثين لتحسين وسط الزراعة من اجل تنمية الاجنة الفتية المفصولة واستنساخ نمط التكوين الجنيني الجاري داخل البويضة.

من اهم العوامل المؤثرة في تكوين وتطور الاجنة ما يلي:-

1-.املاح العناصر المعدنية

استعملت خلطات مختلفة من املاح العناصر المعدنية في الاوساط المستعملة لزراعة الاجنة، دون التحديد الدقيق لدور كل عنصر منها، وفي الدراسات التي اجريت على تأثير استعمال محاليل قياسية مختلفة من العناصر المعدنية اشار بعض الباحثين الى عدم وجود علاقة بين النمو وبقاء الاجنة غير البالغة في وسط معين ففي وسط **MS** الذي يشجع اقصى نمو للأجنة كان معدل بقاء الاجنة واطئ جدا بينما كان نمو الاجنة في وسط **Knop** الاقل سمية رديء جدا. وقد حفز ذلك **Monnier** لتركيب محلول من املاح العناصر المعدنية لتشجيع النمو الجيد والبقاء بنسبة عالية للأجنة، حيث غير تركيز كل ملح في وسط **MS** لدراسة تأثير تلك التغيرات وعلى اساس التجارب التي اجراها طور وسط يكون نمو الاجنة فيه جيدا كما هو الحال في وسط **MS** ومعدل بقاءها اعلى.

2- الكربوهيدرات والضغط الازموزي في وسط الزراعة

تحتاج الاجنة المفصولة والمزروعة في الوسط الغذائي الى توفير مصدر للطاقة سواء كانت بالغة او غير بالغة، ويعتبر السكروز من افضل اشكال الكربوهيدرات ويستعمل عادة في اوساط زراعة الاجنة. واضافة السكروز الى الوسط كمصدر للطاقة ولإبقاء ضغط ازموزي مناسب في الوسط والذي يعتبر من العوامل المهمة جدا في حالة زراعة الاجنة غير البالغة، وللغرض

الاخير يختلف التركيز الملائم من السكروز باختلاف مرحلة تطور الجنين. تنمو الاجنة البالغة بصورة جيدة في اوساط تركيز السكروز فيها **2%** اما الاجنة الفتية فأنها تحتاج الى تراكيز عالية من الكربوهيدرات. وهذا يتوافق مع الملاحظات التي تشير الى الاجنة في المراحل الاولى من تطورها في مناشئها داخل الجسم الحي تكون محاطة بسائل ذات ضغط ازموزي عالي.

3- الحوامض الامينية والفيتامينات

قد تحفز اضافة الحوامض الامينية الى وسط الزراعة بشكل مفرد او جماعي نمو الاجنة، حيث ذكر **Hnnig (1904)** الى ان الاسبارجين **asparagin** كان فعالا جدا في تحفيز نمو الاجنة ويعتبر ال **glutamine** من اكثر الحوامض الامينية تأثير على نمو الاجنة المفصولة وذكر **Rijevn (1955)** ان ال **glutamine** حفز نمو الاجنة المفصولة من بذور نباتات مزهرة تعود لتسعة عوائل نباتية مختلفة وكان التحفيز بفعل استعمال ال **glutamine** اكثر من التحفيز الحاصل بفعل ال **aspasigine**. واستعملت الفيتامينات في اوساط زراعة الاجنة الا ان وجودها لا يعتبر ضروري دائما وقد تسبب الفيتامينات تثبيط التكوين الظاهري الاعتيادي في بعض الحالات. لذلك فان من المناسب ان لا تضاف الفيتامينات الى الوسط الا بعد ان يتم التأكد من تأثيراتها الجيدة من خلال اختبارات تجريبية على الموضوع قيد الدراسة.

4- المستخلصات الطبيعية للنباتات

لاحظ بعض الباحثين ان الاجنة لنبات الداتورا في مرحلة ما بعد الطوربيدي كونت بادرات طبيعية في وسط مكون من **1% dextrose** و **1%** اكار، املاح معدنية، **glycine**، **thiamine**، **ascorbic acid**، **nicotinic acid**، **Vitamin**، **succinic acid**، وال **Pantothenic acid** في حين فشلت الاجنة التي في مرحلة الطور القلبي والاجنة الاصغر في التطور على هذا الوسط. وبما ان الاجنة غير البالغة الموجودة في البويضة تكون محاطة بالسويداء، فقد قام **Van Overbeck** واخرون **(1942)** بإضافة حليب جوز الهند الى الوسط المذكور في محاولة لزراعة الاجنة الفتية.

5- منظمات النمو

يجب اضافة الاوكسين او السايتوكاينين او كليهما الى الاوساط المستعملة لزراعة الانسجة النباتية وذلك لتحفيز نشوء الكالس على الاجنة او اجزائها المزروعة. ولحد الان لا يوجد دليل مقنع يشير الى ضرورة اضافة منظمات النمو الى الوسط للحصول على تطور اعتيادي للأجنة المفصولة سواء كانت بالغة او غير بالغة ما عدا الحالات التي تتعلق بأنهاء طور السكون. وقد وجد انه من الضروري تجهيز وسط زراعة الاجنة التي في مرحلة الطور الكروي لل **Capsella** والمتكون من الاملاح المعدنية، الفيتامينات و **2%** سكروز بال **IAA**، الكاينتين، وسلفات الادنين. ان الانبات المبكر لأجنة الشعير **(التي بطول 500 مايكرون)** والذي يتحفز بالجبرلين **GA3** والكاينتين يمكن منعه، وتحفيز التطور الاعتيادي للأجنة بإضافة ال **ABA** وايونات **NH4** الى الوسط الغذائي.

6- تركيز ايون الهيدروجين في الوسط الغذائي

لقد وجد ان تركيز الهيدروجين ال **PH** في عصير بويضة ال **Capsella** هو **6** ولوحظ ان نمو الاجنة المفصولة لنفس النوع تنمو بصورة جيدة في وسط تركيز الهيدروجين فيه بين **5.4 – 7.5** . ويقع تركيز ايون الهيدروجين المثالي لنمو اجنة نبات الداتورا في المراحل المبكرة بين **5 – 7.5** .

7- ظروف زراعة الاجنة

تنمو الاجنة المزروعة لمعظم النباتات في درجة حرارة تتراوح بين **25م** الى **30م** ، وقد وجد ان درجة الحرارة المثالية لنمو اجنة ال **Datura tatula** كانت **35م.** ولا يعتبر الضوء من العوامل المحددة لنمو الاجنة، حيث لوحظ ان نمو الاجنة الفتية لل **Datura** لم يتأثر بالضوء. اما في الشعير فقد وجد ان الضوء يمنع او يثبط الانبات المبكر للأجنة غير البالغة.

طريقة فصل الاجنة وزراعتها

هناك خطوتين مهمة في مجال زراعة الاجنة هي:-

1-.تركيب وسط الزراعة.

2- فصل الجنين.

يكون نوع النباتات مهما عندما يكون الهدف هو تدريب المبتدئين على طريقة العمل، ويختلف تركيب الوسط وتهيئة النبتة باختلاف نوع النبات وعمر الجنين. ان اختيار نوع النبات لزراعة.

د. محمد عبد الغفور محمد

زراعة الانسجة النباتية