اسس اكثار النباتات بواسطة زراعة الانسجة النباتية

من اكثر استعمالات زراعة الانسجة النباتية في الوقت الحاضر هو اكثار النباتات خضريا وعلى نطاق تجاري، وهنالك اكثر من 294 نوع من النباتات تكثر بواسطة هذه الطريقة.

ان الفضل الرئيسي في استعمال هذه الطريقة لأكثار النباتات خضريا يعود الى العالم الفرنسي Morel عام 1960 والذي استعملها لأول مرة في اكثار نبات الاوركيد، اذ استطاع الحصول على اعداد كبيرة جدا من نباتات الاوركيد بزراعة جزء من فرع مأخوذ من النبات المذكور ويطلق على استخدام هذه الطريقة في اكثار النباتات بالاكثار الدقيق (Micro Propagation).

بنيت التقنية المتبعة في اكثار النباتات خضريا بواسطة هذه الطريقة على ضوء الاسس التالية التي تم الحصول عليها من نتائج الدراسات المكثفة في هذا المجال:

1- ظاهرة الـ Totipotency في الخلايا النباتية (تعد احد المفاهيم الاساسية في علم زراعة الانسجة النباتية الذي يعني ان كل خلية من خلايا النبات لها القابلية على الانقسام والتضاعف والتطور الى نبات مشابه للنبات الذي اخذت منه اذا ما توفرت لها الظروف الملائمة من حيث الحرارة، الرطوبة، الضوء والوسط الغذائي).

2- امكانية الحصول على نبيتات عديد بزراعة اجزاء نباتية مختلفة.

3- تشجيع التمايز الى اجنة متعددة من انسجة النبيتات او من انسجة الكالس.

اهم مايميز هذه الطريقة عن الطرق التقليدية المتبعة في التكاثر الخضري:

1- امكانية انتاج اعداد كبيرة من النباتات المتجانسة الخالية من الامراض بمساحة محدودة وبوقت قليل بأستعمال جزء صغير جدا من النبات الام.

2- تعد الطريقة الوحيدة الممكن استعمالها لأكثار بعض النباتات خضريا كما هو الحال في نبات الاوركيد Orchid.

مراحل الاكثار بتقنية زراعة الانسجة النباتية

تقسم مراحل الإكثار باستخدام تقنية زراعة الأنسجة الى اربعة مراحل رئيسية هي:

اولاً. مرحلة انشاء الزروعات (Establishment stage)

هي أولى مراحل الإكثار والتي يتم فيها اختيار الجزء النباتي المستخدم بانشاء الزروعات ويتم اختيار الجزء النباتي حسب الهدف المطلوب وحسب نوع النبات وان الهدف من هذه المرحلة هو الحصول على نمو اولي للأجزاء النباتية المزروعة سواءً كانت قمم نامية او مرستيمات قمية او براعم جانبية وان العوامل الأساسية المؤثرة في هذه المرحلة هي:

أ. التخلص من مسببات التلوث
ب. الاختيار المناسب للجزء النباتي (Explant)
ج. مكونات الوسط الغذائي
د. الظروف البيئية

من اهم المعوقات التي تواجه العاملين في هذا المجال في هذه المرحلة هي:

١. التلوّن البني (اسمرار) الوسط الغذائي (Browning)

ان بعض الأنسجة التي تحتوي على نسب عالية من المواد الفينولية تكون صعبة الاكثار، ففي حالة زراعة القمم النامية المأخوذة من الأشجار الخشبية يؤدي الى تلوّن الوسط الغذائي باللون البني وخاصة المنطقة المحيطة بقاعدة بالجزء النباتي المزروع (Explant) ويعتقد ان سبب ذلك يعود الى تحفيز نشاط انزيمات الـ Polyphenolase نتيجة لإحداث جروح في النسيج النباتي اذ تعمل هذه الأنزيمات على اكسدة المركبات الفينولية متسببة في تكوين مواد مثبطة للنمو فضلاً 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، أو ان احداث الجرح يؤدي الى قيام النسيج النباتي بإنتاج هذه المركبات ولضمان نجاح زراعة الأنسجة المزروعة لابد من السيطرة على تأثير هذه المواد في تثبيط النمو ويكون ذلك من خلال:

أ. إضافة مواد مانعة للأكسدة: حيث تضاف مواد تحد من اكسدة المواد الفينولية كاستخدام حامض الأسكوربك (Ascorbic acid) والذي هو فيتامين C وحامض الستريك (Citric acid) او إضافة مادة الـ Polyvinyl poly pyrolidine.
ب. نقع الأجزاء النباتية بمحلول مانع للأكسدة قبل زراعته.
ج. اجراء عملية إعادة الزراعة في أوساط جديدة على فترات متقاربة (3-7) أيام.
د. تقليل شدة الاضائة أو الزراعة في الظلام خلال الفترة الأولى.
هـ. نقع الأجزاء النباتية المفصولة بالماء المقطر المعقّم لبضع ساعات قبل زراعتها.
و. الزراعة في وسط غذائي سائل واجراء عمليات إعادة الزراعة بشكل متكرر لحين التأكد من خلو الوسط من هذه المواد.
ز. إضافة 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.

٢. التلوث البكتيري(bacterial contamination)

من الملاحظ ظهور التلوث بعد فترة من الزراعة على الرغم من اتخاذ كافة التدابير اللازمة لاجراء عملية التعقيم السطحي للأجزاء النباتية فيلاحظ أحيانا 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 أجزاء نباتية من أشجار خشبية معمرة، حيث تعيش البكتريا داخل النسيج النباتية 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 الأجزاء النباتية لغرض تغلغل المادة المعقمة الى داخل الاجزاء النباتية فضلا عن إضافة المضادات الحيوية (Antibiotics) الى الوسط الغذائي ويكون لها دورا في تحديد نمو البكتريا الاّ انها لاتقضي عليها نهائيا في بعض الأحيان.

لذا فان أولى العمليات التي تتم في هذه المرحلة هي تعقيم الأجزاء النباتية بالمعقمات الكيميائية المناسبة لهذا الغرض من اجل التخلص من مسببات التلوث كالفطريات والبكتريا ومن ثم غسلها بالماء المقطر المعقم لإزالة تأثير مواد التعقيم لأن بقائها يعيق نمو الأجزاء المزروعة، ويعتمد نجاح أي برنامج

لزراعة الأنسجة على مرحلة النشوء التي يتم فيها الحصول على زروعات خالية من التلوث لتكون أساس للمراحل اللاحقة.

ثانياً. مرحلة التضاعف الخضري (Vegetative multiplication stage)

هي ثاني مرحلة من مراحل زراعة الأنسجة ويتم فيها زيادة عدد النموات الناتجة من الجزء النباتي المزروع والتي يطلق عليها الـ Propagules والتي منها يتم انتاج العدد المطلوب من النباتات فبعد زيادة نمو الجزء المزروع في المرحلة الأولى يتم نقله الى وسط غذائي جديد بعد مرور 4-6 أسابيع.

ان المكونات الأساسية للوسط الغذائي في كلا المرحلتين لا تختلف كثيراً ولكن هناك اختلاف في نوع وتراكيز منظمات النمو المستخدمة، والتي تعتبر من العوامل المهمة جدا لنجاح هذه المرحلة وعادة ما يكون تركيز السيتوكاينين اعلى من تركيز الأوكسين وقد يضاف الجبريلين بتراكيز واطئة الى الوسط الغذائي في هذه المرحلة لإحداث الاستطالة في النموات التي تتطلب ذلك كما في زراعة القمم النامية للبطاطا والداليا والقرنفل والداوودي وبعد الحصول على التضاعف تفصل النموات عن بعضها البعض 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 الأخذ بنظر الاعتبار توفر الظروف الملائمة للتضاعف.

ثالثاً. مرحلة التجذير (Rooting stage)

ان الهدف من هذه المرحلة هو تكوين مجموع جذري في قاعدة السيقان الناتجة من مرحلة التضاعف حيث تفتقر الأفرع الخضرية الناتجة من طريقتي الاكثار عن طريق البراعم الأبطية والبراعم العرضية الى الجذور مما يتطلب تحفيز نمو الجذور من هذه الأفرع وعادة ما يتطلب اضافة الأوكسينات الى الوسط الغذائي الخاص بالتجذير ويختلف نوع الأوكسين المستخدم وتركيزه تبعا لنوع وصنف النبات.

ان إضافة الاوكسينات الى الوسط الغذائي تعتبر من العوامل المشجعة لتحفيز نشوء الجذور وتختلف مدة التجذير اعتمادا على الأنواع والاصناف النباتية المختلفة، وتستخدم في هذه المرحلة مكونات الوسط الغذائي الأساسية المستخدمة في المرحلتين السابقتين الا انه في بعض الأحيان يتطلب تغيير بعض مكونات الوسط الغذائي كاستخدام نصف تركيز املاح MS عند تجذير النباتات الصعبة التجذير، لقد وجد ان النموات الخضرية لبعض النباتات تفشل في التجذير لدى زراعتها في الأوساط الغذائية ويعود سبب ذلك الى تأثير السايتوكاينينات المستخدمة في مرحلة التضاعف وللتغلب على هذه الحالة يتم زراعتها في وسط غذائي خالي من السايتوكاينين لمدة أربعة أسابيع ثم تنقل بعد ذلك الى وسط التجذير، وتستخدم في هذه المرحلة تركيبات مختلفة من الأوساط 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 شأنه توفير الكثير من الجهد والمال مقارنة في حالة التجذير في اوعية الزراعة النسيجية.

رابعاً. مرحلة الأقلمة (Acclimatization stage)

تعتبر هذه المرحلة من المراحل المهمة والأساسية التي يعتمد عليها نجاح اي برنامج للاكثار باستخدام تقنية زراعة الأنسجة، حيث ان النباتات الناتجة في اوعية الزراعة تكون معتمدة في تغذيتها على الوسط الغذائي الاصطناعي ويتطلب تهيئتها تدريجياً للقيام بتصنيع غذائها بنفسها من خلال عملية التمثيل الضوئي، حيث ان نقل النباتات بشكل مفاجئ من ظروف الزراعة في الأوعية الزجاجية والتي تكون فيها الرطوبة النسبية عالية جدا الى الحقل مباشرةً سوف يعرضها الى الهلاك في اغلب الأحيان 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 جيداً لازالة بقايا الوسط الغذائي العالقة بالجذور ومن ثم نقل النباتات الى السنادين ووضعها في مكان محمي وتوفير رطوبة عالية حول النباتات في الأيام الأولى ومن ثم تقليل الرطوبة تدريجياً حتى تصبح النباتات قادرة على الامتصاص بشكل كفوء لتعويض النقص الذي يحصل في الماء بسبب التبخر وبعد تقسية وأقلمة النباتات بشكل جيد لتكون قادره لتحمل الظروف البيئية تترك لتنمو بصورة طبيعية.