

اسس اكتار النباتات بواسطة زراعة الانسجة النباتية

من اكثر استعمالات زراعة الانسجة النباتية في الوقت الحاضر هو اكتار النباتات خضراء وعلى نطاق تجاري، وهناك اكثر من 294 نوع من النباتات تكثر بواسطة هذه الطريقة.

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

بنيت التقنية المتبعة في اكتار النباتات خضراء 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 نبيبات عديدة بزراعة اجزاء نباتية مختلفة.

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

اهم ما يميز هذه الطريقة عن الطرق التقليدية المتبعة في التكاثر الخضري:

1- امكانية انتاج اعداد كبيرة من النباتات المتGANسة الخالية من الامراض بمساحة محدودة وبوقت قليل باستعمال جزء صغير جداً من النبات الام.

2- تعد الطريقة الوحيدة الممكن استعمالها لأكتار بعض النباتات خضراء كما هو الحال في نبات الاوركيد Orchid

مراحل الاكتار بتقنية زراعة الانسجة النباتية

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

اولاً. مرحلة انشاء الزروعات (Establishment stage)

هي أولى مراحل الإكتار 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 مرسنات 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 أهم 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 الاكتثار، ففي حالة زراعة القمم النامية المأخوذة من الأشجار الخشبية يؤدي إلى 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 لاحادث جروح في النسيج النباتي اذ تعمل هذه الانزيمات على اكسدة المركبات الفينولية متباعدة في تكوين مواد متبطة 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، او 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 الأسكوربيك (Ascorbic acid) والذي هو فيتامين C وحامض الستريك (Citric acid) او إضافة مادة الـ Polyvinyl poly pyrrolidine.
- ب. نقع الأجزاء النباتية بمحلول مانع للأكسدة قبل زراعتها.
- ج. اجراء عملية إعادة الزراعة في أواسط جديدة على فترات متقاربة (3-7) أيام.
- د. تقليل شدة الإصابة أو الزراعة في الظلام خلال الفترة الأولى.
- هـ. نقع الأجزاء النباتية المفصولة بالماء المقطر المعقم لبعض 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 لداقفه مما يعمل على ادماصاص (Absorption) المواد الفينولية لغرض التخلص من تأثيرها الضار.

٢. التلوّن البكتيري (bacterial contamination)

من الملاحظ ظهور التلوّن بعد فترة من الزراعة على الرغم من اتخاذ كافة التدابير الازمة لإجراء عملية التعقيم السطحي للأجزاء النباتية فيلاحظ أحياناً ظهور التلوّن البكتيري بعد مدة قد تصل الى عدة أشهر من الزراعة ويكون ذلك ناتج من نمو البكتيريا في الوسط الغذائي خاصة في حالة استئصال أجزاء نباتية من أشجار خشبية معمرة، حيث تعيش البكتيريا داخل النسيج النباتي ثم تنمو بطيئاً ثم يزداد عددها وتظهر الى الوسط الغذائي مما تؤثر سلباً على نمو الجزء المزروع ، ومن امثلة هذه البكتيريا هي *Bacillus sp.* و *Eriwina sp.* و تعالج هذه الحالة من خلال اجراء عملية التفریغ الهوائي اثناء عملية تعقيم الأجزاء النباتية لغرض تغلف المادة المعقمة الى داخل الاجزاء النباتية فضلاً عن إضافة المضادات الحيوية (Antibiotics) الى الوسط الغذائي ويكون لها دوراً في تحديد نمو البكتيريا الا انها لا تقتضي عليها نهائياً في بعض الأحيان.

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

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

ثانياً. مرحلة التضاعف الخضري (Vegetative multiplication stage)

هي ثالثي 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 بعد زيادة نمو الجزء المزروع في المرحلة الأولى يتم نقله إلى وسط غذائي جديد بعد مرور 4-6 أسابيع. ان المكونات الأساسية للوسط الغذائي في كلا المرحلتين لا تختلف كثيراً ولكن هناك اختلاف في نوع وترانكيرز منظمات النمو المستخدمة، والتي تعتبر من العوامل المهمة جداً لنجاح هذه المرحلة وعادة ما يكون تركيز السايتوکاينين أعلى من تركيز الأوكسجين وقد يضاف الجبريلين بتركيز واطئة إلى الوسط الغذائي في هذه المرحلة لإحداث الاستطالة في النموات التي تتطلب ذلك كما في زراعة القمم النامية للبطاطا والداليا والقرنفل والداودي وبعد الحصول على التضاعف تفصل النموات عن بعضها البعض وتزرع منفصلة في وسط غذائي جديد يحتوي على نفس المكونات لغرض إحداث تضاعف متوازي 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)

إن الهدف من هذه المرحلة هو تكوين مجموع جزري في قاعدة الساقان الناتجة من مرحلة التضاعف حيث تفتقر الأفرع الخضرية الناتجة من طريق الاقثار عن طريق البراعم الأبطنية والبراعم العرضية إلى الجذور مما يتطلب تحفيز نمو الجذور من هذه الأفرع وعادة ما يتطلب إضافة الأوكسجينات إلى الوسط الغذائي الخاص بالتجذير ويختلف نوع الأوكسجين المستخدم وتركيزه تبعاً لنوع وصنف النبات.

إن إضافة الأوكسجينات إلى الوسط الغذائي تعتبر من العوامل المشجعة لتحفيز نشوء الجذور وتختلف مدة التجذير اعتماداً على الأنواع والاصناف النباتية المختلفة ، وستستخدم في هذه المرحلة مكونات الوسط الغذائي الأساسية المستخدمة في المرحلتين السابقتين إلا أنه في بعض الأحيان يتطلب تغيير بعض مكونات الوسط الغذائي كاستخدام نصف تركيز أملاح MS عند تجذير النباتات الصعبة التجذير ، لقد وجد أن النموات الخضرية لبعض النباتات تقشل في التجذير لدى زراعتها في الأوساط الغذائية ويعود سبب ذلك إلى تأثير السايتوکاينينات المستخدمة في مرحلة التضاعف وللتغلب على هذه الحالة يتم زراعتها في وسط غذائي خالي من السايتوکاينين لمدة أربعة أسابيع ثم تنقل بعد ذلك إلى وسط التجذير ، وستستخدم في هذه المرحلة تركيبات مختلفة من الأوساط الغذائية مثل وسط White حيث وجد أن هناك بعض النباتات تكون استجابتها جيدة للتجذير في هذا الوسط وقد يضاف الفحم المنشط (activated charcoal) إلى الوسط الغذائي حيث لوحظ أنه يؤدي إلى تحسين التجذير ، ويتم العمل في الوقت الحاضر باتجاه تجذير الساقان القوية النمو والنشطة الناتجة من مرحلة التضاعف في التربة مباشرة سواء بمعاملتها أو عدم معاملتها بالأوكسجينات وهذا من شأنه توفير الكثير من الجهد والمال مقارنة في حالة التجذير في أوعية الزراعة النسيجية.

رابعاً. مرحلة الأقلمة (Acclimatization stage)

تعتبر هذه المرحلة من المراحل المهمة والأساسية التي يعتمد عليها نجاح أي برنامج للاكتار باستخدام تقنية زراعة الأنسجة، حيث أن النباتات الناتجة في أو عية الزراعة تكون معتمدة في تغذيتها على الوسط الغذائي الاصطناعي ويطلب تهيئتها تدريجياً للقيام بتصنيع غذائها بنفسها من خلال عملية التمثيل الضوئي، حيث أن نقل النباتات بشكل مفاجئ من ظروف الزراعة في الأو عية الزجاجية والتي تكون فيها الرطوبة النسبية عالية جدا إلى الحقل مباشرةً سوف يعرضها إلى الهلاك في اغلب الأحيان وهذا يتطلب زراعتها تحت ظروف رطوبة عالية يتم تقليلها تدريجياً إلى أن تصبح قادرة على تحمل الظروف البيئية المباشرة لتصبح قادرة على الاعتماد على نفسها في تصنيع غذائها.

ان النباتات الناتجة عادة ما تكون خالية من طبقة الكيوتكل في اوراقها او ان تكون رقيقة جدا حيث ان ظروف الرطوبة العالية المتوفرة في او عية الزراعة تجعلها في غنى عن الحد من كمية الماء المفقودة عن طريق النتح فضلاً عن ان الاو عية الناقلة في النباتات تكون غير متطرفة إلى الحد الذي يجعلها كفؤة في الامتصاص، ويستخدم بعض الباحثين مواد مانعة لتبخر الماء ترش على المجموع الخضري للتعويض عن طبقة الكيوتكل لكنها غالباً ما تكون غير فعالة مما يتطلب اجراء عملية التقسيمة والأقلمة لمدة مناسبة قبل زراعة النباتات في المكان المستديم وتنطلب هذه العملية عنابة فائقة حيث يتم غسل النباتات جيداً لازالة بقايا الوسط الغذائي العالقة بالجذور ومن ثم نقل النباتات إلى 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 كفؤ لتعويض النقص الذي يحصل في الماء بسبب التبخر وبعد تقسيمة وأقلمة النباتات بشكل جيد لتكون قادره لتحمل الظروف البيئية تترك لتنمو بصورة طبيعية.