

زراعة الانسجة النباتية

Plant Tissue Culture

المحاضرة الاولى

Plant tissue culture: Over view نظرة عامة

الزراعة النسيجية Plant tissue culture هي عبارة عن حقل من العلوم له عدة وجوه وتطبيقات مختلفة فبالامكان عن طريق هذه التقنية اجراء عمليات تتعلق بالاكثار بسهولة من قبل عامل بسيط داخل مطبخ البيت الى عالم مشهور يعمل داخل مختبر محكم متقن .

حديثا استخدم مصطلح التقانات الحيوية النباتية او Plant Biotechnology وهذا المصطلح يكون اعم واشمل من المصطلح من المصطلح الاول وذلك لتقدم العلوم وظهور التقنيات الحيوية المختلفة التي تدخل في التطبيقات النباتية المختلفة . وعلى العموم يمكن تقسيم تطبيقات التقانات الحيوية النباتية الى مجموعتين :

المجموعة الاولى والتي يطلق عليها الزراعة النسيجية والتي تتعلق بزراعة الخلايا والانسجة النباتية والتي تؤدي الى تكوين النباتات الكامله من هذه الاجزاء المزروعه. وهذه التقنية نشئت بالاعتماد على مفهوم قديم وهي القدرة الكامنه في الخلايا للتحويل الى انواع مختلفة من الخلايا (Totipotency) والتي اشار اليها او ذكرها العالم هايبرلنت Haberlandt سنة 1902 واطرها العالم ستورت Steward في عام 1958 اذ استطاع فريقه العلمي وللأول مره من تحويل الخط الخلوي (Cell Line) في نبات الجزر الى الاجنة الصناعيه Artificial embryos () والتي عرفت فيما بعد بالاجنة الجسميه somatic embryo

بينما المجموعة الثانية هي اكثر حداثة وهي مستمدة من المعرفة المتوفرة من شريط الDNA الحلزوني والتي اكتشفت من قبل العالمين واتسن وكريك سنة 1953. وهما اي الباحثين اساسا هذه القاعة الاستراتيجية للبايلوجي الجزيئي.

ان مصطلح الزراعة النسيجية Plant tissue culture هو في الواقع اسم مغلوظ Misnomer قد تم استعارته من حقل الزراعة النسيجة الحيوانية Animal Cell Culture وذلك لأن اكثار النباتات يتعلق بالنبات بصورة كاملة وليس بجزء منها او بالانسجة المعزولة منها فقط لذا فمن الافضل استخدام مصطلح زراعة النبيتات Plantlet culture أو الأكتار الدقيق Micropropagation أو الأستنساخ بالزراعة النسيجية Cloning Tissue Culture او من الممكن أن نسيمه بالنشوء خارج الجسم الحي Growing In vitro وعلى العموم اي من المسميات المذكوره أنفا كلها تعني العملية نفسها وهي الأكتار الخضري للنباتات. وعلى اي حال ان هذه الطريقة من الأكتار أصالية أصبحت

مقبولة من قبل حرفيو صناعة المشاتل في العالم كما ان لها تأثير كبير في التجارة البستنية بصورة عامه سنأتي على ذكرها فيما بعد.

لقد كان اول استخدام للزراعة النسيجية لإنتاج النباتات على النطاق التجاري الواسع من قبل معمل انتاج الأوركيد في عام 1950 وهذه المصادفة فتحت الباب لزراعة الأنسجة ذات المواصفات العالية للأوركيد بينما كانت فيما كانت الطرق التقليدية صعبة جدا خصوصا عن طريق استخدام البذور . او من الصعب جدا اجراء عملية اكثار النباتات المصابه بالفيروسات بالطرق التقليدية . لذا كانت الزراعة النسيجية الحل الأمثل لزراعة هذا النبات كما واستطاع العاملون في هذ الحقل من الزراعة النسيجية ايجاد التركيبة المناسبة لنموه في المزرعة النسيجية.

بالرغم من انتشار هذا التكنيك بين اوساط الاعمال التجارية في المشاتل لكن نرى الكثير من الناس لايعرف الكثير بل ولايكثرث لهذا التكنيك ويسئل الكثير عن هذه التقنية وكيف يتم استخدامها ومالفائدة منها ويسئل عن التكاليف الخاصه بالبنياية والمواد وماهو المردود الأقتصادي لهذا التكنيك ،.....الخ.

يمكن ان نعرف الزراعة النسيجية على انها زراعة اي قطعة نباتية سواء اكانت من جذر او ساق او برعم او ورقة او نسيج او خلية في انبوبة او وعاء زرعي حيث تتوفر لها سيطرة مناسبة من الغذاء والبيئة خارج الجسم الحي كما ويجب ان تكون عملية الزراعة خالية من الملوثات (الكائنات الدقيقة كالبكتريا والفطريات).

وتقسم عملية الاكثار بالزراعة الى اربعة مراحل مهمة:

1- المرحلة الاولى: مرحلة التأسيس Stage1: Establishment

2- المرحلة الثانية: مرحلة التضاعف Stage2: Multiplication

3- المرحلة الثالثة: مرحلة التجذير Satage3: Rooting

4- المرحلة الرابعة: مرحلة الأقلمة Stage4: Acclimatization or Hardening

ولكن قد تتداخل هذه المراحل مع بعضها البعض في بعض الحالات كما وقد تختلف احتياجات هذه المراحل من مرحلة الى أخرى او من نبات الى اخر كما وقد تضاف مرحله او اثنين وحسب النبات المكثر او حسب اسلوب او طريقة الاخلاف المتبعه.

يطلق على القطعة الصغيرة الماخوذه من اي جزء من النبات بال-Explant وتستطيع هذه القطعة الصغيرة أن تتكاثر وتنتج نباتات كامله فقط اذا توفرت لها ظروف ملائمة .

الوسط الغذائي Medium والجمع Media وهي عبارة عن القاعدة الاساسية Substrate لنمو النباتات وهي من المصطلحات الخاصة بالزراعة النسيجية وتعني خليط من مواد كيميائية محددة لتكون وسط غني بالمواد الغذائية والوسط الغذائي اما يكون سائلا Liquid او صلبة Solid ملائمة لنمو الاعضاء Organs او النبيتات Plantlets او الخلايا Cells .

تبدأ السيقان الفتية بالتطور في المزارع النسيجية عندما يزرع الـ Explant في الوسط الغذائي وهي تذكر بالنمو والتطور الأولي للبادرات عند زراعة البذور. وتستمد السيقان الصغيرة بالتضاعف منتجة اوراق خلال الدورة الزراعية خارج الجسم الحي وقد يكون هذا من حسن الحظ لأن اكثار النباتات المزروعة خارج الجسم الحي قد لا تنتج بالأكثر بصورة واسعة داخل الانابيب. تنقل النباتات الناتجة من عملية الأكتار الدقيق بعد عملية التضاعف الى خارج المختبر حيث يبدأ النبات بتكوين اوراق طبيعية في الحجم ومن المؤمل ان يكون لهذا النبات نفس خصائص النضوج للنباتات التي نشأ منها. تسمى النباتات الناتجة من الزراعة النسيجية بالـ (Clone) اي النسخة المطابقة للنبات الام تميزا لها عن النباتات المكثرة خضريا بأستخدام العقل او النباتات الناتجة من البذور وتتميز النباتات من الزراعة النسيجية بان التركيب الوراثي Genetic make-up لكل خلفه (Clone) مطابقة لجميع النسخ الناتجة من الزراعة النسيجية وكذلك للنبات الأم. في المقابل النباتات المكثرة بواسطة البذور فهي تكون ناتجة من البذور والتي تكوزن ناتجة من عملية التكاثر الجنسي وهي لا تشابه النبات الام ولا يطلق عليها بالـ Clone وذلك لأن كل نبات له تركيبه الوراثي الخاص به والفريد من نوعه وذلك لأن كل نبات له تركيبه الوراثي الخاص به والفريد من نوعه وذلك لكون البذور هي خليط ناتج من من جينات الأب والام فلذلك هي تختلف عن جينات الأبوين كما وتختلف جينات بعضها البعض لأذا فأن مصطلح الأستنساخ Cloning المستخدم في الزراعة النسيجية يعني أكثر النباتات المنتخبة بأعداد كبيرة والتي لها نفس الطراز الوراثي أو تحمل نفس الصفات الوراثية للنبات الأم. من المشاكل التي من الممكن أن تنشأ من عملية الأكتار التقليدية بواسطة البذور او العقل هي انتقال الأمراض او الممرضات وخصوصا الفايروسات ولا يمكن تلافي هذه الحالات (أي لا يمكن ازالة الممرضات بالطرق التقليدية) لذا كانت الزراعة النسيجية الحل الأنجع للتخلص من هذه الممرضات وذلك عن طريق زراعة المرستيم الطرفي > Apical meristem

أهداف الزراعة النسيجية :

يمكن اجمال هذه الأهداف بمايلي:

- 1- الأكتار الغزير للنباتات الصعبة الاكثار Recalcitrant plant او النادره >
- 2- انتاج النباتات الخالية من الفايروسات
- 3- أكتار النباتا المعدلة وراثيا.
- 4- حفظ الجيرم بلازم للنباتات
- 5- شحن النباتات لمسافات بعيدة
- 6- انتاج سلالات نباتية جديدة.
- 7- انتاج المركبات الصيدلانية.
- 8- انتاج النباتات احادية الكروموسومات haploid plants

ان تنمية النباتات بالطرق التقليدية الاعتيادية بأستخدام البذور او العقل غير عملية وذلك لعدة اسباب يمكن اجمالها بمايلي:

- 1- تفقر النباتات الناتجة من البذور الى التماثل.
- 2- عدم مطابقة النباتات الناتجة من البذور للصفة الوراثي الاصيلي الذي تولدت منه البذور
- 3- تاخذ البذور وقتا طويلا لتصل الى مرحلة النضج او النباتات الكاملة.
- 4- يصعب حمل البذور
- 5- عدم توفر البذور بصورة دورية
- 6- العقل تنمو بصورة بطيئة
- 7- معدل بقاءها قليل
- 8- تحتاج الى الكثير من الرعاية
- 9- تكون معرضة لاصابة بالامراض
- 10- هناك قصور في الحصول على اصول النباتات او الاصول النباتية والتي تؤخذ منها العقل وذلك بسبب:

أ- هناك هجين واحد فقط

ب- هناك نبات واحد خالي من الفايروسات

ت- هناك طفرة وراثية واحد فقط

- 11- ان عملية زراعة البذور او العقل الساقية في المشاتل يجب ان تكون في فصل محدد من السنة

أذن الزراعة النسيجية هي الطريقة العملية الوحيدة لنتاج الاعداد المطلوبة من النباتات ، لكن اذا توفر التجهيز المناسب للنباتات عن طريق البذور او العقل في هذه الحالة ستكون الزراعة النسيجية غير عملية لانها ستكون مكلفة خصوصا اذا كانت اعداد النباتات المطلوبه اقل من 1000 نبتة. أما اذا كانت النباتات الناتجة من البذور مقبولة ولكن لاتوجد كميته كافية منها اذن يمكن استخدام البذور او الاجنة المستاصلة من البذور كمادة او نسيج او عضو ملائم للبدء بالزراعة النسيجية. في الطرق التقليدية بأكثر النباتات باستخدام العقل او البذور فان كل عقلة او كل بذرة تكون نبات واحد بينما بالمقابل فان القطعة النسيجية الواحده Explant يمكنها من الناحية النظرية ان تنتج اعداد لامتناهية من النباتات وبوقت قياسي . فعملية التضاعف في الزراعة النسيجية تكون بشكل لو غارتمي . من الامور المهمة في الزراعة النسيجية ان النباتات المزروعة داخل الانابيب لاتحتاج الى الرعاية اليومية التي تحتاجها النباتات في البيئة الحية كما هو الحال عند زراعة البذور او العقل الساقية . فالنباتات المزروعة داخل الانابيب تحتاج الى ان تنقل الى بيئات جديده(تجديد الوسط الغذائي) كل 2-6 اسابيع وهي لاتحتاج عند نقلها الى عمليات ري او تعشيب كما هو الحال في البيئة الحية. من الامور الواجب مراعاتها في مختبرات الانتاج التجاري الكبير للنباتات انه يجب ان يلحق بها مختبر بحثي صغير وذلك لغرض تنقية البروتوكولات الخاصه باكثر النباتات بالاضافة الى اجراء فحوصات السلامة الوراثية للنباتات . كما ويتم في هذا المختبر اصدار القرار بخصوص اكثر او عدم اكثر

النباتات تجاريا . بالاضافة الى ان في هذا المختبر يتم التحري او تشخيص الملوثات البكتيرية او الفطرية التي تسبب فساد المزارع النسيجية.
وعلى العموم فقبل البدء بانشاء مختبرات الاكثار يجب التأكد من وجود سوق لهذه النباتات والا سيكون انشاء هذه المختبرات غير ذي جدوى اقتصادية.

Disadvantage of plant tissue culture مساوىء الزراعة النسيجية

- 1- حدوث طفرات وراثية Mutation
- 2- يتطلب مختبرات خاصه او متطلبات خاصه
- 3- يتطلب مهارات خاصه
- 4- حدوث اخطاء يصعب تمييزها خلال عملية الأكتار

المحاضرة الثانية

The botanical Basis for the tissue culture النسيجية للزراعة النباتية

أن التنوع الملحوظ للتكاثر الخضري في النبات يعكس أمكنية او قدرة النبات العجيبة على التضاعف. أن العوامل المستخدمة للتضاعف او نشوء النبات في الطبيعة هي نفسها المستخدمة في الزراعة النسيجية او في البيوت البلاستيكية. أن هذه القدرة او الامكانية للنبات على التضاعف باستخدام الطرق الخضرية هي القواعد الأساسية للتضاعف خارج الجسم الحي ولا توجد اي تلاعب في الجينات ولا يوجد اي خلط في الصفات الوراثية كما يحدث او يقع في التكاثر الجنسي.

لقد اظهرت الدراسات التشريحية والفسولوجية لسلوك النبات ان الظواهر الطبيعية التي تتحكم في الاكثار الخضري هي غير محدودة وقد علمتنا هذه الدراسات كيفية التلاعب بهذه الظواهر لخدمة الأغراض الخاصة بنا. فنحن نأخذ العقل الساقية عن طريق تقسيم السيقان كما نقوم بعمليات الترقيد وعمليات التطعيم . وبأختصار نحن نستطيع ان نحفز عملية التكاثر لخضري بطرق مختلفة.

الساق هذا العضو المهم في النبات له القدرة على التجديد (تجديد الجسم او العضو) وهي تنمو باشكل مختلفة ولها سلوكيات مختلفة فقسم منها قصيرة واخرى طويلة نحيلة او بدينة مستديرة او منبسطة او مربعة او فوق التربة او تحتها متناثر هاو منتصبه (مستقيمه). أن احد اهم الطرق المستخدمة في عملية الاكثار الخضري بصورة واسعة من قبل مربي النبات هو استخدام العقل الساقية Stem Cutting وهي عبارة عن ساق أو جزء من من ساق تستطيع ان تجذر بعد غرسها في وسط زرعى والذي هو خليط من البيتموس وقلف النباتات مع الرمل والبرلايت او قد يكون بسيطا هو عبارة عن الرمل والبرلايت. وتنمو الجذور عادة من العقد وهي الجزء الذي يخرج منه البراعم والأوراق عندما يوضع تحت سطح الوسط الزرعى . ولزيادة تعجيل تكوين الجذور يتم احداث جروح في المنطقة السفلى للعقلة وكثيرا ما يستخدم الاوكسين عند قاعدة العقل وذلك لزيادة عملية او نسبة تجذير العقل.

هناك نوعين من الجذور العرضية التي تنشأ من العقل الساقية:

أ- الجذور المسبقة التكوين Performed Root وهي عبارة عن جذور متكونة اصلا على العقلة وهي لازالت ملتصقة على النبات الام ولكنها لاتبرز حتى يفصل الساق من النبات الأم (شكل-1).

ب- الجذور الناتجة من الجروح Wound- induced roots وهذا النوع من الجذور ينتج فقط عندما تفصل العقلة من الساق ويتم عند ذلك تحفيز نشوء الجذور شكل-2.

ويمكن اجمال مراحل أو التغيرات التي تحدث في العقلة الساقية خلال تكوين الجذور الى اربعة مراحل.

1- المرحلة الأولى: عملية فقدان التمايز Dedifferentiation لبعض الخلايا الناضجة.

2- المرحلة الثانية : نشوء بادئات الجذور Formation of root initials وتنشأ هذه البادئات من مناطق خاصة قرب الحزم الوعائية او النسيج الوعائي والتي تصبح خلايا مرستيمية بعملية فقدان التمايز (المرحلة الأولى).

3- المرحلة الثالثة : التطور اللاحق لهذه البادئات الى جذور اولية منتظمة

4- المرحلة الرابعة : ظهور او بروز هذه الجذور الاولية من انسجة الساق الأخيرة ومن ثم تكون الروابط الوعائية بين الجذور الحديثة المتكونة والأوعية الناقلة الموجوده في العقلة نفسها.

نشوء الجذور من الكالس

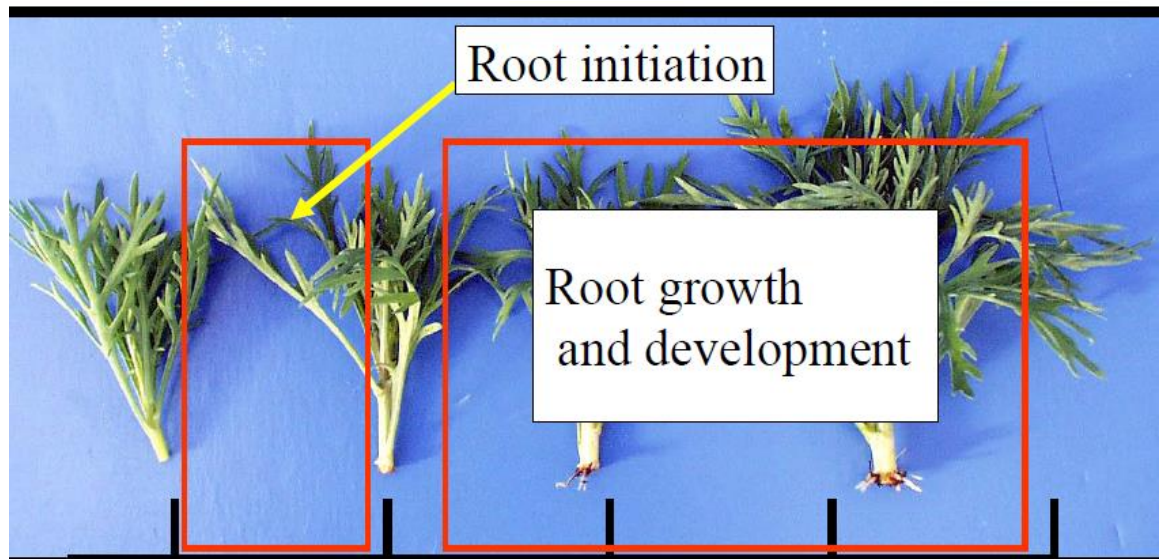
قد يتكون الكالس وهو عبارة عن نسيج غير منتظم من الخلايا البارنكيمية في المراحل المختلفة لعملية اللكنة او تكوين الخشب عند قاعدة العقلة عندما توضع في ظروف ملائمة لغرض تحفيز نمو الجذور. يتكون الكالس من الخلايا الفتية الموجودة في قاعدة العقلة في منطقة الكامبيوم الوعائي او ربما في منطقة القشرة او اللب. ويعتقد ان عملية تكوين الكالس ضرورية او اساسية لتكوين الجذور العرضية ولكن في معظم النباتات ان عملية تكوين الكالس وتكوين الجذور عمليتان منفصلتان ولكنهما تحدثان في الوقت نفسه وقد تعتمد على الظروف الداخلية الملائمة.

في بعض الانواع النباتية يظهر ان عملية تكوين الكالس هي الباديء المهم لتكوين الجذور العرضية في نبات الصنوبر *Pinus radiate* اذ تتكون الجذور العرضية من الكالس الناشيء عند قاعدة الورقة .

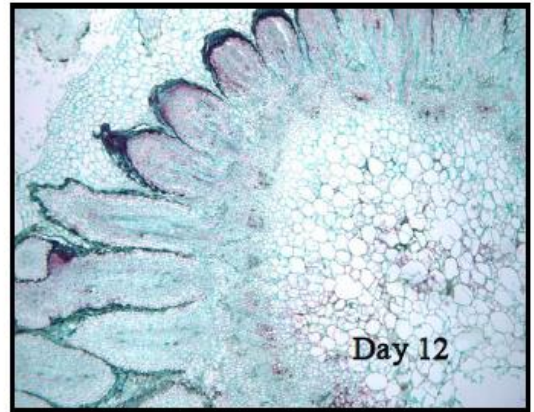
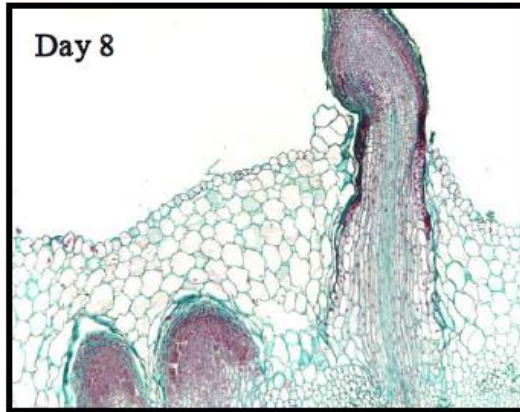
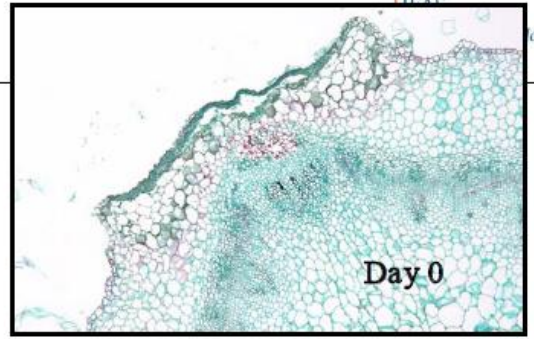
وعلى العموم السيقان الصغيرة كثيرا ما تستخدم كباديء للزراعة النسيجية اما العقل الدقيقى Microcuttings او Tiny cuttings الناتجة من الزراعة النسيجية والتي يمكن زراعتها لتنمو وتصبح نباتا كاملا. ويلعب حجم العقلة او الساق دورا مهما في نجاح تكوين النبات الكامل وعادة مايكون حجمها 2,5-5 سم او ربما اكثر وهذا يعتمد على نوع النبات.



شكل-1- الجذور المسبقة التكوين Performed roots



Wound induced root formation



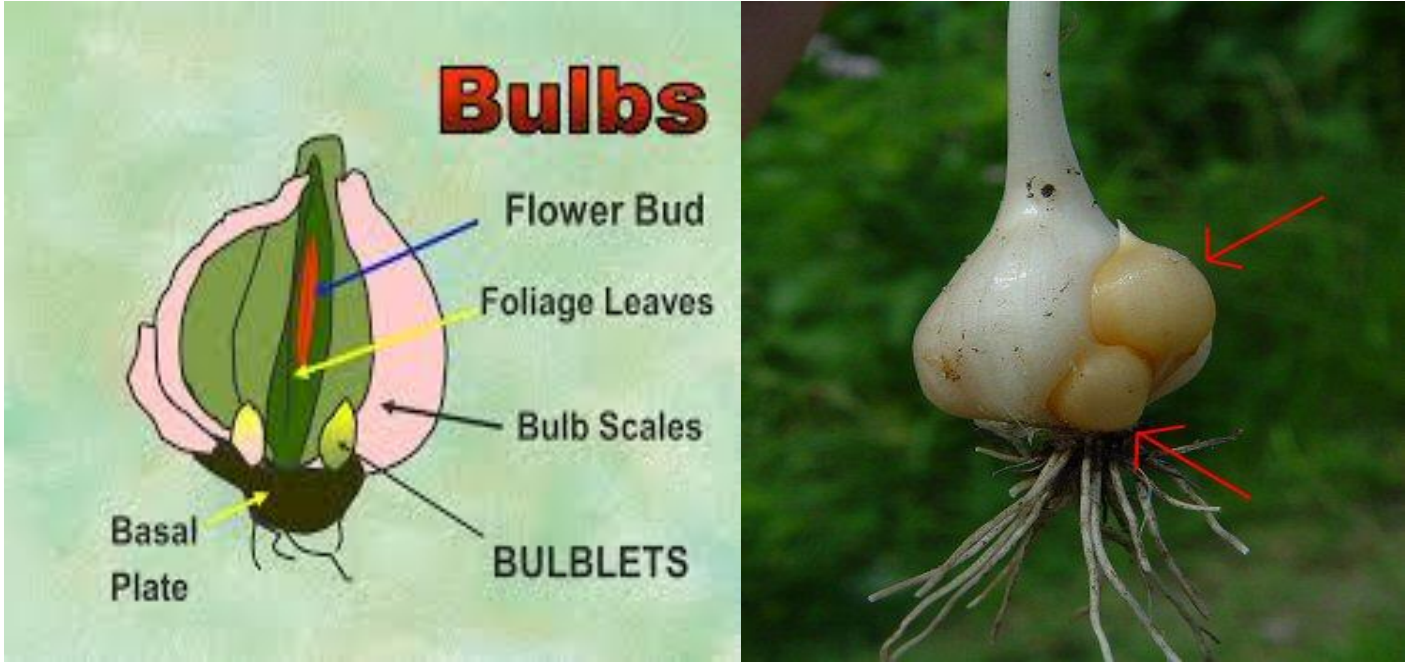
شكل-2- الجذور الناشئة من الجروح Wound induced root



شكل-3- الجذور الناشئة من الكالس Root initiation from callus

Bulbs الأنبصال

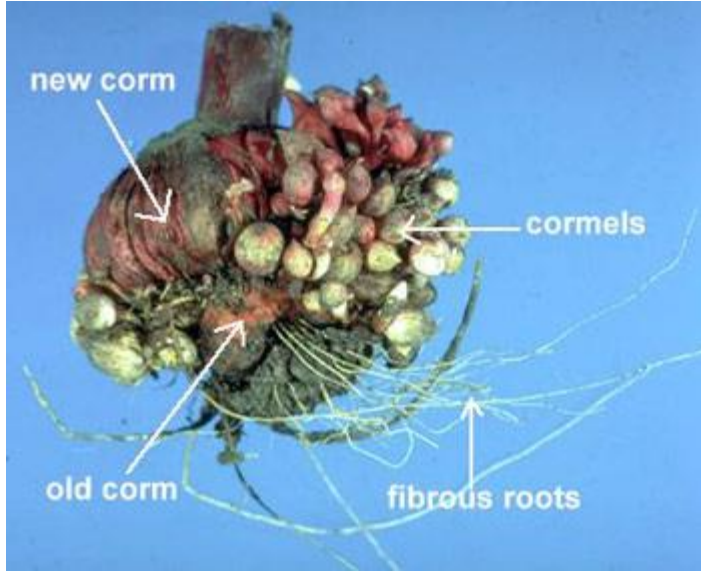
وهي اعضاء تنمو تحت سطح التربة وهي عبارة عن ساق قصيرة مستقيمة يطلق عليها الصفيحة القاعدية Basal plate تحمل في قمته نقطة النمو او بادئات الازهار ومحاطة بواسطة حراشف سميكة لحمية. تنتج الأنبصال في نباتات ذوات الفلقة الواحدة وهي سيقان محورة لغرض الخزن والتكاثر. من الناحية التشريحية تحتوي الأنبصال على ساق زهرية في مركز البصلة تغلفها قواعد الاوراق وهي عبارة عن اوراق لحمية خازنة للمواد الغذائية ويطلق عليها بالاوراق الحرفشية. ان المرستيمات الابضية الموجوده في هذه الاوراق تنمو لتنتج مايعرف ب البصيلات الصغيرة Bulblets وعندما تنمو الى الحجم المطلوب يطلق عليها بالخلافات offsets. شكل-4



شكل-4. الانبصال Bulbs

Corms الكورمات

هي عبارة عن ساق منتفخة صلبة محمورة تحت الأرض ذات عقد متكاملة ومابين العقد وبراعم جانبية ولكنها لاتحتوي على الحراشف كما هو الحال في الابصال. في الكورمة الناضجة يكون هناك بقايا الاوراق التي تحيط بكل عقدة ويطلق عليها بالغلاف Tunica بينما عند قمة الكورمة هناك ساق طرفية والتي تنمو الى اوراق وساق مزهرة . في بعض الكورمات الكبيرة قد تنمو بعض البراعم الجانبية العليا قد تنمو الى براعم او سيقان زهرية بينما تكون البراعم القاعدية مثبتة النمو ، شكل-5

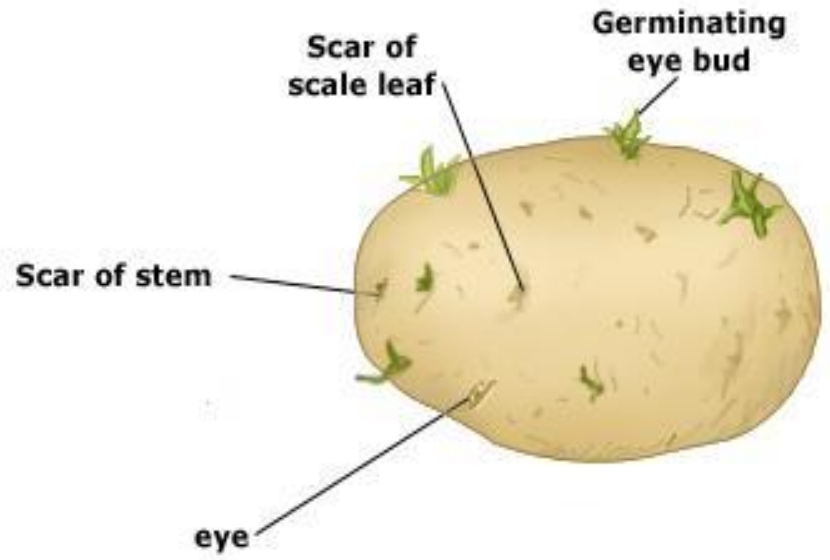
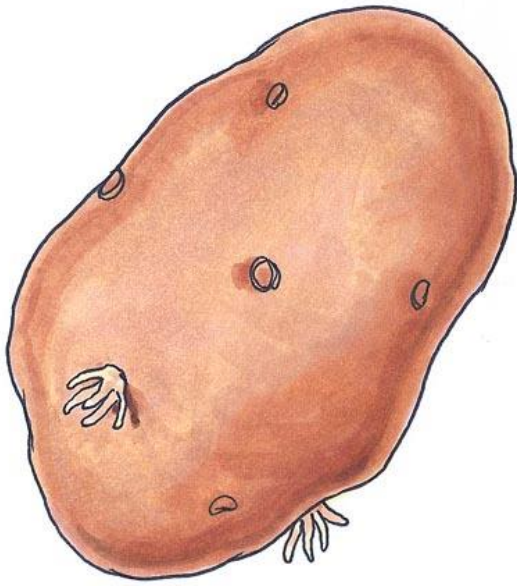


شكل-5- الكورمات

Tubers الدرناات

وهي عبارة عن ساق خاصة محورة للخرن تكون منتفخة، وتعد البطاط من افضل مثال على هذه الدرناات . والدرناات عبارة عن ساق لها كل اجزاء السيقان القياسية ولكنها منتفخة فقط. خارجيا توجد مناطق على الدرنة تشبه العيون وتسمى ايضا بالعيون Eyes موجوده على سطح الدرنة تشمل هذه المناطق العقد Nodes وتحتوي على برعم واحد او اكثر ويقع تحت ندبة الورقة. ترتتب البراعم على شكل حلزوني تبدأ من البرعم القمي وتنتهي بالمددات وهو الجزء الذي تتصل به الدرنة. اما البرعم الطرفي فيكون نهايته عند نهاية الورقه بعيدا باتجاه تاج النبات وايضا يظهر هذا الساق مثل سابقته من السوق يظهر السيادة القمية كأى نظام ساقى.

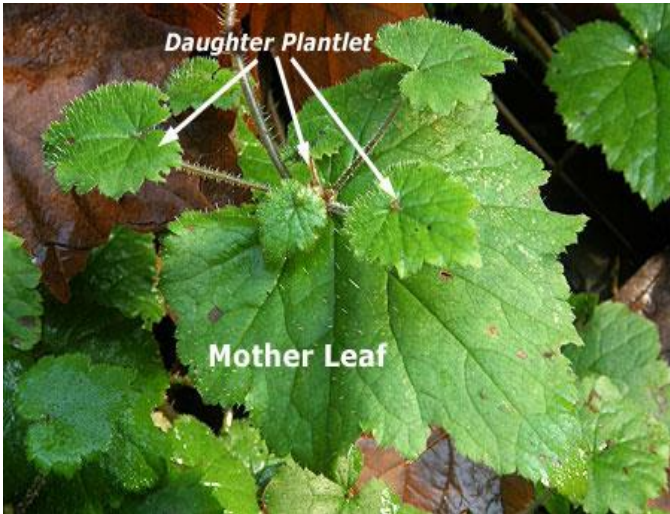
شكل-6



شكل-6- الدرناات Tubers

الاوراق Leaves

قد تنتج الاوراق في بعض النباتات نباتات جديدة وبذا يطلق عليها بالعقل الورقية Leaf cuttings ومثال عليها نبات الـ Bryophyllum و الـ African Violets وفي بعض النباتات قد تكون العقل الورقية نباتات جديدة وهي لازالت متصله بالام ويطلق على هذا النبات ب النبات او النبتة التي تحمل اطفالها Piggyback plant هذا وتعتبر الورقه من احد اهم انواع القطع المهمه المستخدمه في الزراعة النسيجية. شكل-7



شكل -7- Piggyback plant

Leaf Cuttings – Wound-induced, secondary meristems

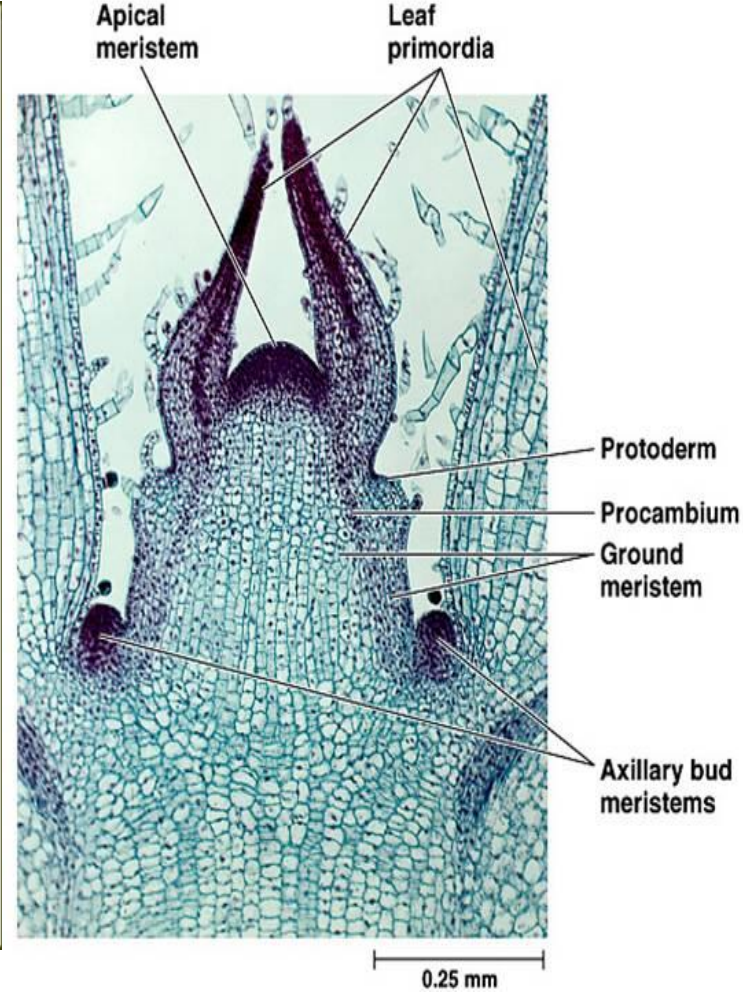
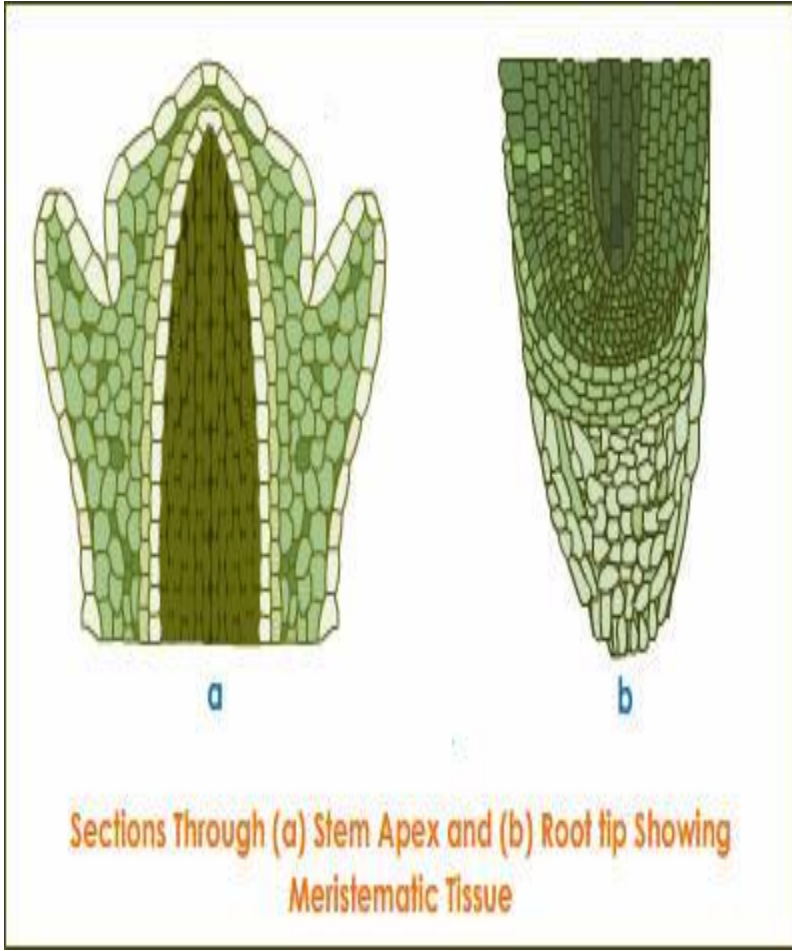
- African violet
- Begonia
- Snake plant



شكل-7- Leaf cuttings

Meristematic Cells الخلايا المرستيمية

تنشأ عملية النمو الجديدة بصورة عامة في النسجة المرستيمية والتي هي عبارة عن خلايا غير متميزه لم يتم برمجتها لنمو معين او لنموها الاخير. تقع هذه الخلايا في قمم السيقان والجذور وفي آباط الأوراق وفي منطقة الكميوم وعند حواف الأوراق وفي خلايا الكالس. وتحت تأثير التركيب الوراثي للنبات والموقع ودرجة الحرارة والضوء والغذاء والهرمونات وعوامل أخرى ، تتميز الخلايا المرستيمية الى أوراق أو سيقان أو جذور أو أعضاء أخرى وانسجة بطراز منتظم. اذن تعتبر الأنسجة المرستيمية هي الأساس لنمو وتطور النبات شكل-8.

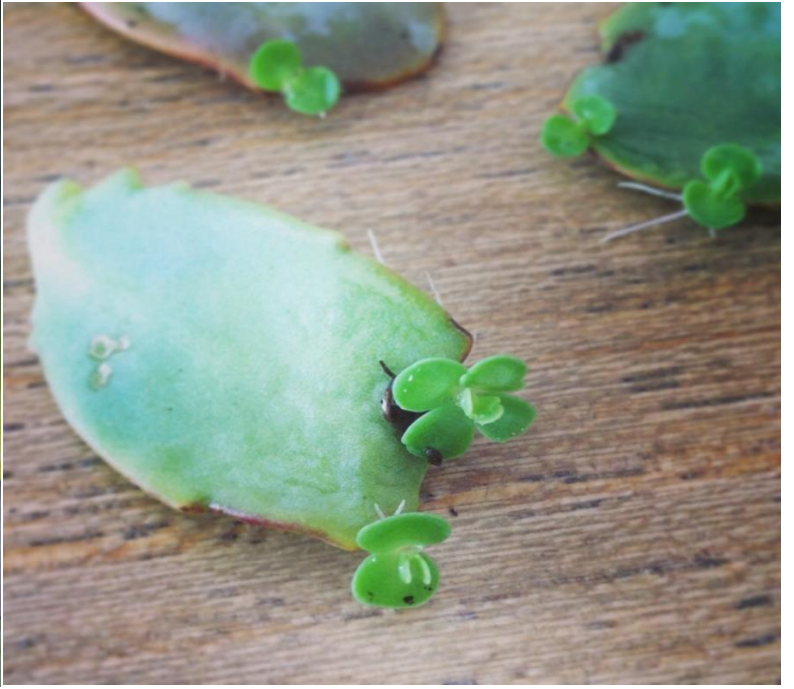


شكل -8- Meristematic Cells

الخلايا البرنكيمية Parenchyma Cells

وهي اكثر انواع الخلايا شيوعا في النبات . وهي عبارة عن خلايا ذات جدران رقيقة ولها القدرة والقابلية على التوالد والتمايز لتنشأ نمو جديد من الأنسجة او الأعضاء لاداء وظيفة خاصة.

وللخلايا البرنكيمية قدرة او قابلية على فقدان التمايز Dedeferantiation والتحول الى حالة عدم التمييز وهي سبب أساسي للنموات العرضية بدون وجود المرستيم ولذا يسمى بالنمو العرضي Adventitious Growth وتعني عملية نمو السيقان او البراعم او الجذور او الأوراق من مواقع غير مثالية وغير اعتيادية ومثال ذلك نمو الجذور الهوائية التي تنمو في الأجزاء الهوائية نمو البراعم من الجذور نشوء النباتات من الأوراق والسيقان والجذور الكالس شكل -9.



Adventitious growth in plant - شکل-9

هناك نوعين من عملية الانقسام ، الأول الانقسام الأعتيادي Mitosis والثاني هو الانقسام الأختزالي Meiosis فكل الخلايا الجسمية في النبات هي ثنائية العدد الكروموسومي $2N$ أي انها تحتوي على المجموعة الكاملة من الكروموسومات. خلال عملية الانقسام الأعتيادي تتضاعف عدد الكروموسومات ثم تنعزل فتكون كروموسومات الخلايا الناتجة من عملية الانقسام متطابقة ومتشابهة.

اما الانقسام الاختزالي وهي تكون في الخلايا التكاثرية. ففي كل خلية تكاثرية تحتوي في البدء على العدد الثنائي من الكروموسومات ثم تمر بالانقسام الثاني وهو الانقسام الاختزالي وفيه تنخفض عدد الكروموسومات الى النصف ثم تنعزل لتكون خلايا تحتوي على نصف العدد من الكروموسومات.

اينما تكون هناك عملية انقسام اذن تكون هناك احتمالية في حدوث الطفرات الوراثية. فلو افترضنا ان طفرة وراثية حدثت اثناء عملية الانقسام وقدر لهذه الطفرة ان تبقى فستكون هذه الطفرة محمولة في كل الخلايا المستقبليه. اذن يمكن تعريف الطفرة الوراثية Mutation هو حدوث تغيير في بعض الصفات الوراثية او عدد الكروموسومات وقد لايمكن تمييز الطفرة الوراثية فمعظم الطفرات الوراثية تسبب في موت النبات او تكون صفات وراثية غير مرغوب فيها مثل (عدم تكون الثمار) او حدوث تشوهات في الساق لذا دائما يتم ازالة مثل هذه النباتات اذا تم مشاهدتها شكل-10.



شكل-10- الطفرات الوراثية Mutation

المحاضرة الثالثة

الوسط الغذائي

مكونات الاوساط الغذائية Media ingredients

أن التركيب الأساسي للأوساط الغذائية الخاصة بالزراعة النسيجية قد تم اكتشافها عن طريق الأبحاث العلمية وذلك لمعرفة دور المغذيات المثالية المختلفة ومنظمات النمو في نمو وتطور النباتات المختلفة خارج الجسم الحي. وتعد التركيبة الغذائية المطوره من قبل العالمين مراهيكي وسكوك Murashige and Skoog في العام 1962 ويختصر بوسط (MS) من أهم وافضل التركيبات الغذائية القياسية والتي لازالت تستخدم الى يومنا الحاضر من قبل العاملين في المختبرات التجارية والبحثية. وتستعمل هذه الوصفه الغذائية لمعظم النباتات العشبية والخشبية على حد سواء. من الوصفات الأخرى الذي يسمى Gamborg mdium والذي يختصر بـ (B5) والذي وصف من قبل العالم Gamborg في سنة 1968 وان من الوصفات الأخرى المستخدمه للنباتات الخشبية المسمى بالـ Woody Plant Medium ويختصر بـ وسط (WPM) وهذا الوسط يستخدم لنمو النباتات الخشبية وقد اكتشف من قبل العالمين Brent McCown و Greg Lloyd سنة 1980.

على العموم ان عملية خلط المواد الكيماويه مع بعضها البعض لغرض تركيب وسط غذائي لزراعة النباتات خارج الجسم الحي هي بحد ذاتها مشابهه للوصفات الغذائية وكيفية طبخها. فالبرغم من اختلاف لغة المكونات الغذائية او الأجهزه المستخدمه في عمل الوسط، الا ان الوصفات يجب ان تتبع بدقه وذلك لان عدم اتباع هذا الوصفات بالدقه المطلوبه قد تؤثر على نشاط ونمو الخلايا المزروعه خارج الحي وربما لاتتميز هذه الخلايا بل وقد يسبب موت هذه الخلايا او الانسجة النباتيه.

تتكون الاوساط الغذائية المستخدمه في الزراعة النسيجية بصورة عامه من بعض المكونات الاساسيه يمكن اجمالها بما يلي:

- 1- المغذيات الاعضوية Inorganic nutrients
- 2- المغذيات العضوية Organic nutrients
- 3- الهرمونات النباتيه او منظمات النمو Phytohormones or Growth regulators

● المغذيات الاعضويه

والتي يطلق عليها ايضا بالاملاح وتنقسم الى مجموعتين وهي:
المغذيات الكبرى Macroelements ويقصد بها تلك العناصر التي يحتاجها النبات بكميات اكثر من 0,05 ملي مول /لتر. وهذه العناصر هي : النيتروجين والكالسيوم والبوتاسيوم والفسفور والحديد والمغنسيوم والكبريت. اما المغذيات الصغرى Microelements وهي المغذيات التي يحتاجها النبات بكميات صغيرة اقل من 0,05 ملي مول/لتر. وتشمل الكلور والكوبلت والنحاس واليود والموبلديوم والمنغنيز والزنك.

تعتبر الأملاح الموجودة او المتوفرة في الوسط الغذائي مهمه جدا اذ انها تعتبر كلبنة اساسية لتصنيع المركبات العضوية او انها تستخدم كمحفزات لأنزيمات التفاعل. كما وانها تلعب دورا مهما في عملية نقل الجزيئات المتأينه ولها دور في عملية التنظيم الأزموزي كما ولها اهمية في الحفاظ على القوه الألكتروتيه للنبات Electrochemical Potential .

هناك انواع مخلقة من الأوساط الغذائية المتوفرة لمختلف النباتات ولمختلف الأهداف ويمكننا ان نشترها جاهزة من السوق وبذا توفر المال والأيدي العاملة) وتكون هذه العملية مشابهة لعملية صنع الحلوى عن طريق شراء العلب الجاهزه). ولهذا لانحتاج لشراء كميات كبيرة من المكونات الغذائية كما وانها لاتخضع للاختلافات في تحضير المحاليل القياسية نتيجة اختلاف الطبيعة البشريه. لكن عملية تكوين او تجهيز وصفه جديده للأكثر نبات معين قد تحتاج هذه العملية الى شراء المكونات الغذائية المختلفة وذلك لبناء وصفه الأكثر.

التاثيرات البايولوجية للأملاح المعدنية Biological effects of mineral salts

1- المغذيات الكبرى:

الكالسيوم Ca

هو عنصر مهم و متمم لجدار الخلية Cell wall اذ تكون على شكل بكتات الكالسيوم ويلعب هذا العنصر دورا مهما في تكوين مادة البكتين (الصفحة الوسطى Middle lamella) وهذه المادة تربط الخلايا مع بعضها البعض. كما وانها تلعب دورا هاما في عملية السيطرة على نفاذية غشاء الخلية. وتسهل حركة الكربوهيدرات والأحماض الأمينية في النبات وتحفيز نشوء الجذور كذلك وتساعد في عملية النمو والتطور وفي تمثيل النيتروجين . يستخدم النيتروجين الكالسيوم على شكل $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ أو على شكل $Ca[NO_3] \cdot 4H_2O$ او على شكل $Ca_{10}[PO_4]_6[OH]$.

الحديد (Fe)

يستخدم الحديد في عملية تصنيع الكلورفيل كما ويساهم في عملية تحويل الطاقة في عملية التركيب الضوئي وعملية التنفس. نقصان الحديد يسبب أصفرار الأوراق الحديثة التكوين. يضاف الحديد على شكل $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ مع المادة المخليبية Na_2EDTA .

المغنيسيوم (Mg)

هذا العنصر مهم كونه يتوسط جزيئة الكلورفيل وكونه محفز للانزيم. نقصانه يسبب أصفرار الأوراق القديمه. يستخدم على شكل $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

النيتروجين (N)

يؤثر النيتروجين على نمو النبات كونه مهم جدا لبناء جزيئة الـDNA والبروتينات والكلورفيل والأحماض الأمينية وبعض الهرمونات النباتية. نقصانه يسبب ضعف او توقف نمو النبات وهناك نوعين من مصادر النيتروجين التي تضاف الى الوسط الغذائي هما الأمونيوم NH_4^+ و NO_3^- .

الفسفور (P)

يتوفر هذا العنصر بشكل كبير في الأنسجة المرستيمية أو الأنسجة السريعة النمو وايضا جزيئة الـDNA و ATP كما انه من العناصر الأساسية في عملية التركيب الضوئي وعملية التنفس كما وانه يؤثر على نضوج النبات وعلى نمو الجذور لذا يكون توقف النمو مع ظهور اللون الاحمر القرمزي هي من اعراض نقص الفسفور في الوسط الغذائي. يضاف الفسفور الى الوسط الغذائي على شكل $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ أو على شكل KH_2PO_4 .

البوتاسيوم (K)

يعد البوتاسيوم ضروري جدا في عملية الانقسام وتحفيز نشوء أو نمو المرستيمات ويلعب دورا هاما في الكثير من التفاعلات في النبات كما وانه يساعد في بناء الكاربوهيدرات والكلورفيل وفي اختزال النترات الى أمونيوم. لذا قلة البوتاسيوم يؤدي الى ضعف وتوقف نمو النبات، تبقع الأوراق وتجعد الورقة مع موت حافات الأوراق. يستخدم البوتاسيوم في الوسط الغذائي على شكل KH_2PO_4 .

الكبريت (S)

موجود في بعض البروتينات وهو مهم لنمو الجذور والأوراق الخضر الداكنه في الأشجار. يتم اضافته الى الوسط الغذائي على شكل مركبات السلفات SO_4^{-2} .

2- المغذيات الصغرى

البورون (B)

هو من المغذيات الأثرية الصغرى ويلعب دورا مهما في عملية نقل السكر والماء والهرمونات، كما وانه يدخل بعملية أيض النيتروجين وتكوين الثمار وانقسام الخلايا. أما نقص هذا العنصر فيؤدي الى ظهور أعراض مميزة كثيرا ماتكون على شكل تدهور الأنسجة الداخلية مثل تعفن بنجر السكر *Beta vulgaris* وانشقاق ساق الكرفس *Celery* (*Apium graveolens*) او مرض وجه القرد في الزيتون *Olea europaea* بالإضافة الى بعض الأعراض الأخرى مثل موت أطراف الأشجار Tip die-back. ظهور الأوراق الهشه والمتجعده والسميكة. أما زيادة هذا العنصر فيؤدي الى ظهور جروح في النبات او

الموت لذا فهو كثيرا ما يستخدم كمبيد للاعشاب. يضاف البورون في الزراعة النسيجية على شكل حامض البوريك H_3BO_3 .



مرض وجهه القرد في الزيتون

الكلور (Cl)

يبدو ان لهذا العنصر دور مهم في النمو اذ انه يحفز عملية التركيب الضوئي . اما اعراض نقص هذا العنصر فتتمثل بذبول الاوراق والتي تصبح ذات لون اصفر او برونزي ثم تموت. يحتاج النبات الى الكلور بكمية قليلة جدا. ولكنها تضاف بكميات كبيرة كبيرة في الوسط الغذائي مع الكالسيوم $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. ويبدو ان معظم النباتات تتحمل هذه الكمية من الكلور في الوسط الغذائي ولكن بعض الباحثين يحذرون من اضافة هذه الكميات الى الوسط الغذائي ويفضلون تجنب اضافتها باستخدام الكالسيوم من مصدر آخر.

الكوبلت (Co)

يدخل هذا العنصر في تركيب فيتامين B12 وهو مهم لتثبيت النيتروجين وتحويل النيتروجين الجوي الى نترات بواسطة البكتريا المثبتة للنيتروجين. يضاف الكوبلت على شكل كلوريد الكوبلت $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ وبكمية مقدارها 0,025 ملغم/لتر.

النحاس (Cu)

أن نقص النحاس يسبب تثبيط النمو وتشوه الاوراق والتفافها وكذلك تبقعها او موت الافرع. يعتقد ان للنحاس اهمية في تحويل الطاقه عندما تتحول من النحاسوز Cuprous احادية التكافوء الى النحاسيك (Cupric) Cu^{++} ثنائية التكافوء. كما ويدخل النحاس في تصنيع

وتركييب بعض الأنزيمات. يضاف النحاس الى الوسط الغذائي بتركيز 0,025 ملغم/لتر على شكل كبريتات النحاس المائية $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. وهو مهم لجميع النباتات المزروعة خارج الجسم الحي.

اليود (I)

يضاف اليود الى الوسط الغذائي على شكل يوديد البوتاسيوم (Potassium iodide (KI). وبصورة عامة لايعتبر اليود من العناصر الأساسية. ومع ذلك فأنها احد مكونات بعض الأحماض الأمينية. كما وقد وجد لليود تأثير سلبي على مزارع Rododendron ولذلك تم حذفها من الوسط الغذائي.

المولبدنيوم (Mo)

يعتقد ان للمولبدنيوم اهمية في تحويل النيتروجين الى امونيا وتساعد على عملية تثبيت النيتروجين. يحتاج النبات المولبدنيوم في عملية النمو الطبيعي وصناعة البروتين ويشك ان نقصانه يؤدي الى اصفرار ما بين العروق في الأوراق او ظهور مرض مقبض السوط Whiptail.



مرض مقبض السوط

المنغنيز (Mn)

هذا العنصر مهم جدا لاغشية البلاستيدة الخضراء وأعراض نقصه تتمثل بظهور الأصفرار المبرقش. يضاف الى الوسط الغذائي على شكل كبريتات المنغنيز $MnSO_4 \cdot H_2O$ وهذا العنصر مهم اضافته الى الوسط الزراعي في الزراعة النسيجية.

الزنك (Zn)

يعتبر الزنك ضروري كمحفز للأنزيمات المهمة في عملية تكوين الكلورفيل وكذلك في تكوين الهرمون الاوكسين Indole-3-acetic acid (IAA). انعدام وجود الزنك ربما

يؤدي الى حدوث تشوه في الجذور او تبرقش الاوراق او تشوهها. يضاف هذا العنصر الى الوسط الغذائي بشكل $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. أما الكميات الكبيرة فتكون سامه للنبات.

3- المكونات العضوية أو المغذيات العضوية Organic Nutrients

يمكن ان ينمو النبات المزرع خارج الجسم الحي فقط اذا تم تجهيز الوسط الغذائي بالمغذيات العضوية والتي تشمل الفيتامينات والاحماض الامينية والسكروز والهرمونات النباتي هاو كما يطلق عليها بـ (منظمات النمو).

أ- الفيتامينات Vitamines

الفيتامينات هي عبارة عن مواد تحتاجها الحيوانات بكميات كعوامل مساعده او اضافيه للغذاء. لكن غيابها من الغذاء يؤدي الى تعوق النمو والتطور وحدوث ظرف غير صحي. كذلك النبات او خلايا النبات تحتاج الكثير من هذه المواد كمواد اساسيه او كمحفزات ايضية. لكن النبات ليس كما الحيوان لها القابلية على تصنيع احتياجها من هذه المواد. لكن الخلايا والأنسجة المزروعه خارج الجسم الحي لها القابلية على ذلك كونها تحولت من ذاتية التغذية الى رمية التغذية لذا نموها وبقائها على قيد الحياة يعتمد على اضافة هذه المواد الى الوسط الغذائي.

تستخدم الفيتامينات بصورة متكرره في الزراعة النسيجية ومن اهمها:

هو الثيامين Thiamine (Vit. B1) وحامض النيكوتينك Nicotinic acid او يسمى بالنياسين Niacin والبايروتوكسين Pyridoxine (Vit. B6) بالاضافة الى المايوانويسيتول Myo-inositol وتعتبر هذه الفيتامينات اساسية في الزراعة النسيجة بينما الفيتامينات الأخرى غير متفق عليها كونها ضرورية او اساسية.

ان الفائدة من اضافة الثيامين قد تم اكتشافها من قبل العلماء Bonner و Robbins و Bartley والعالم White بنفس الوقت في العام 1937 اما حامض النيكوتينك ففتح تم اضافته في عام 1940 من قبل العالم Bonner و Gautheret في العام 1942 والعالم White سنة 1943.

اما الـ Pyridoxine فقد وجدا Robbins and Schmidt سنة 1939 ان اضافته ضروري لنمو جذور نبات الطماطه.

وعلى العموم تعتبر الفيتامينات الثلاثة B1 و B6 و Pyridoxine بالاضافة الى Myo-inositol هي احد اهم المكونات المهمه في الوسط الغذائي MS. وتستخدم لأغراض متعددة للزراعة النسيجية للعديد من النباتات بالأعتماد على طبيعة النبات ونوع الزراعة. فقد وجد Welander بان الفيتامينات لها تأثير تثبيطي لتكوين السيقان المباشر على السويقه الفلقية لنبات الـ Begonia بينما حصل كل من Roset و Bokelmann سنة 1976 في نبات Chrysanthemum فقط عندما كانت هذه الفيتامينات موجودة في الوسط الغذائي. اما باقي الباحثين فيعتقدون ان اضافة الفيتامينات الى الوسط الغذائي هي مشابهة لنظرية الحزام

والحماله Belt and Barces.اي اضافتها الى الوسط الغذائي هي كشي احتياطي لمنع فشل تجربة الزراعة النسيجية.

التاثيرات البايولوجية لبعض المركبات العضويه Biological Effects of Some Organic Compounds

- الأدينين(Adenine (6-amino-purine): مهم للخلية كونه يدخل في تركيب الماده النوويه DNA و RNA ولها تأثير ضعيف مثل تأثير السايوتوكاينين وتستخدم في الأوساط الغذائية على شكل كبريتات الأدينين أو سلفات الأدينين Adenine Sulfate وهي مهمة لتكوين السيقان.
- البايوتين(Vita. B8) Biotine: يستخدم بصوره شائعه في الأوساط الغذائية وهو مهم في ايض البروتينات والدهون والكربوهيدرات.
- (Vita. B9) Folic Acid: وجد هذا الفيتامين في الأوراق وبعض الأنسجه وهو مساعد للأنزيم.
- الانويسيتول Inositol او(Myo-Inositol): وهو سكر كحولي يضاف الى معظم الأوساط الغذائية على شكل فوسفات لذا يسمى Phosphate-Inositol يدخل هذا المركب في تركيب الأغشية الخلوية خصوصا تلك التابع لها و الخاصه بالعضيات المختلفه مثل البلاستيدات الخضراء. يعتبر الأنويسيتول أساسي للنمو وهو مفيد جدا لذا يضاف بتركيز 100 ملغم/لتر.
- Nicotnic Acid او يسمى الـ(Niacin) او (Vita. B3): هو احد مرافقات الانزيمات الفعالة في تفاعلات الضوء. لذا معظم الأوساط الغذائي تحتوي هذا الفيتامين بتركيز من 0,1-10 ملغم/لتر.
- (Vita. B5) D-Pantothenic Acid: هو احد مرافقات الأنزيمات الخاصه بأيض الدهون ويضاف على شكل املاح الكالسيوم ومن الأفضل تعقيمه بالنعقيم البارد.
- (Vita. B6) Pyridoxine: وهو احد مرافقات الأنزيمات الأيضية وعادة يضاف الى الوسط الغذائي على شكل Pyridoxine-HCl.
- (Vita. B1)Thiamine: هذا الفيامين اساسي في معظم الأوساط الغذائية في الزراعة النسيجية كونه احد مرافقات الأنزيمات الخاصه بدورة كريبس ويضاف بمقدار 0,4 ملغم/لتر.

ب- السكروز Sugar

جميع الأوساط الغذائية تحتوي على السكروز كمصدر للكربون وذلك لدعم نمو الأنسجة الغذائية خارج الجسم الحي، وذلك لكونها غير ذاتية التغذية وليس لها القابلية على القيام بعملية التركيب الضوئي بشكل كفوء نتيجة عدم حصول عملية التبادل الغازي بصورة جيدة كما وان تركيز ثاني اوكسيد داخل الأوعية الزراعية قد يكون عالي التركيز او بالعكس واطيء التركيز.بالأضافة الى ذلك قد تضاف الى الوسط الغذائي انواع اخرى

من السكريات مثل الكلوكوز او الفركتوز او غيرها: أما كمية السكروز المستخدمة في الوسط الغذائي فانها تعتمد على نوع القطعة النباتية وكذلك عمرها. لقد وجد Koch سنة 1996 بان للكربوهيدرات اهمية كبيره في التعبير الجيني في النبات اذ يستجيب النبات للتغيرات الطارئه في حالة الكربوهيدرات فبعضها تتحفز وبعضها تنتبط.

TABLE 3.1 Composition of the Five Inorganic Salt Stocks of the Murashige and Skoog Inorganic Formulation

Chemical	Concentration (g/liter stock)
Nitrate stock	
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	165.0
Potassium nitrate (KNO_3)	190.0
Sulfate stock	
Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	37.0
Manganous sulfate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.69
Zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.86
Cupric sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.0025
Halide stock	
Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	44.0
Potassium iodide (KI)	0.083
Cobalt chloride ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.0025
PBMo stock	
Potassium phosphate (KH_2PO_4)	17.0
Boric acid (H_3BO_3)	0.620
Sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.025
NaFeEDTA stock	
Ferrous sulfate ($\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.784
Ethylenediamineteraacetic acid, disodium salt (Na_2EDTA)	3.724

TABLE 3.2 Inorganic Salt Formulation of Several Commonly Used Basal Salts for Plant Tissue Culture in Milligrams per Liter of Medium^a

Chemical	White (1963)	B5 ^b	N6 ^c	WP ^d
NH ₄ NO ₃				400
(NH ₄) ₂ SO ₄		134	463	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	720	246	185	370
KCl	65			
KNO ₃	80	2528	2830	
KH ₂ PO ₄			400	170
K ₂ SO ₄				990
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	19	150		
Na ₂ SO ₄	200			
CaCl ₂ ·2H ₂ O		150	166	96
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	300			556
Na ₂ EDTA·2H ₂ O		37.2	37.2	37.2
FeSO ₄ ·7H ₂ O		27.8	27.8	27.8
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2.5			
H ₃ BO ₃	1.5	3	1.6	6.2
CoCl ₂ ·6H ₂ O		0.025		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.001	0.025		0.25
MnSO ₄ ·H ₂ O		10		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	7		4.4	22.3
MoO ₃	0.0001			
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		0.25		0.25
KI	0.75	0.75	0.8	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3	2	1.5	8.6

المحاضرة الرابعة

الهormونات النباتية (Plant Hormones (Phytohormones)

General Background نظرة عامه

الهormونات هي مجموعة من المركبات العضوية غير الغذائية والفيتامينات التي تنتج وتصنع داخل خلايا وانسجة النبات المختلفة وتؤثر في العمليات الفسلجية اللازمه لنمو النبات وتطوره وانتاجه. كلمة هرمون Hormone مشتقة من اللغة اليونانية وتعني ينشط To Excite وقد اطلق مصطلح الهormونات النباتية على المواد العضوية التي تنتج من اجزاء معينة من النبات في بداية القرن الماضي. في الحيوانات الهormونات عباره عن مواد تصنع بكميات قليلة في اجزاء معينه يطلق عليها الغدد ثم يتم نقلها عن طريق الدم الى الانسجة الهدف في الجسم حيث تظهر فعلها (اي ان هذه المواد تصنع في غدد خاصه ثم يتم نقلها الى مكان الفعل (النسيج او العضو الهدف) حيث تظهر فعلها هناك).

ويشذ النبات عن ذلك اذ ان تصنيع الهormونات لا يتم او لا يكون في انسجة محددة وربما يحدث في انسجة مختلفة وبالرغم من ان الهormونات النباتية تنقل الى امكان بعيده لكن كثيرا ماتعمل في موقع التصنيع. ومن الخصائص الأخرى للهormونات النباتية هو غياب الخصوصية Lack of Specity اذ انها تؤثر على مدى واسع من العمليات المختلفه.

وعلى سبيل المثال لا الحصر الأوكسين فقد وجد انه يحفز استطالة الخلايا وانقسام الخلايا وتكوين الأنسجة الوعائية الأولية وتكوين الجذور والشيخوخه ونمو البراعم الجانبية والتعبير الجنسي Sex Expression. وبسبب هذه الأختلافات بين الهormونات الحيوانية والنباتية لذا يرفض الكثير من العلماء استخدام كلمة هرمون للتعبير عن الهormونات النباتية وبدل عن ذلك يفضل استخدام مواد النمو النباتية Plant Growth Substances أو منظمات النمو Plant growth Regulators ومع ذلك لازال مصطلح الهormونات النباتية Plant Hormones يستخدم بشكل واسع

في الزراعة النسيجية تضاف الهormونات النباتية بتركيز معينه بغية تنظيم النمو، وبصورة رئيسية تستخدم لتحفيز نشوء الجذور او السيقان او الاجنة او البراعم العرضية كما تستخدم لتحفيز نمو البراعم الجانبية بالإضافة الى تحفيز نشوء الكالس.

انواع منظمات النمو النباتية

تقسم الهormونات النباتية الى اربع انواع رئيسية استنادا الى تركيبها وتأثيرها:

1- الأوكسينات Auxins:

الايوكسين حو حامض اندولي ذات نواة حقيقية مشبعه و الاوكسين مصطلح عام يطلق على مجموعة من المركبات التي تتميز بقابليتها على تحفيز واستطالة الخلايا ونمو الجذور وتثبيط نمو البراعم الجانبية. الأوكسينات هي اول الهرمونات النباتية المكتشفه. وكلمة اوكسين مشتقة من الكلمة اليونانية ومعناها ينمو To Grow. وهناك شروط يجب توفرها في تركيب لكي يطلق عليه اوكسينا ومن هذه الشروط هي:

- أ- أن تكون ذات تركيب حلقي ومثال عليها مركبات الأندول والبنزويك والنفثالين كما يشترط ان تكون الحلقة غير مشبعه أي توجد رابطة زوجيه واحده مجاوره للسلسلة الجانبية
 - ب- السلسلة الجانبية
- لوحظ انه لكي يحدث نشاط للاوكسين يجب ان توجد ذرة كاربون واحده على الأقل كقنطرة بين الحلقة ومجموعة الكاربوكسيل . ومن المعروف انه كلما زاد طول السلسلة الجانبية كلما قل نشاط الأوكسين للمركب فنجد ان IAA اقوى من IPA وهذا اقوى من IBA.

لقد اثبتت الدراسات ان أنتقال الأوكسين يكون في اتجاه قطبي اي يتميز بالخاصية القطبية أي الأنتقال من القمة المورفولوجيه الى القاعده المورفولوجيه وتعتمد هذه العملية على الطاقة ودرجة الحرارة وتتم هذه العملية ضد فروق التركيز .

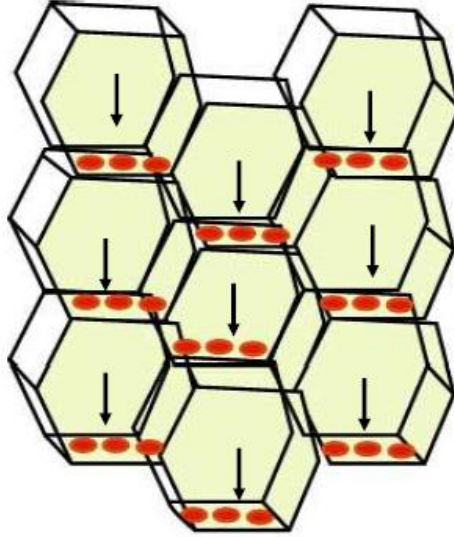
يكون دخول الاوكسين الى داخل الخلية اما عند طريق التنافذ او عن طريق النقل الفعال بواسطة الحامل AUX1 اذ يكون عملية دخول جزيئة الاوكسين بالتنافذ عن طريق عملية ذوبان الجزيئة خارج الغشاء البلازمي عن طريق عملية البرتنه Protonation وتعني اضافة بروتون H^+ الى جزيئة الاوكسين لتصبح IAAH بمقدار 15% وبسبب ان الوسط الحامضي للسايتوبلازم يساوي 7 سرعان ما يؤدي الى فقدان البروتون الحامضي وتحوله الى ايون سالب IAA^- والذي يحبس داخل الخلية ولايستطيع أن ينفذ من داخل الخلية Traped within the cells. وتكون عملية خروج الأوكسين من خلية الى اخرى عن طريق التناضح العكسي الفعال بواسطة ناقل بروتيني يسمى-PIN protien ويقع هذا البروتين في قاعدة الخلية لذا يكون النقل بين خلية واخرى قاعديا.

Auxin

Auxin transport proteins are located at the base of parenchyma cells.

Transport is not sensitive to gravity and always moves in a polar direction.

Polar auxin transport

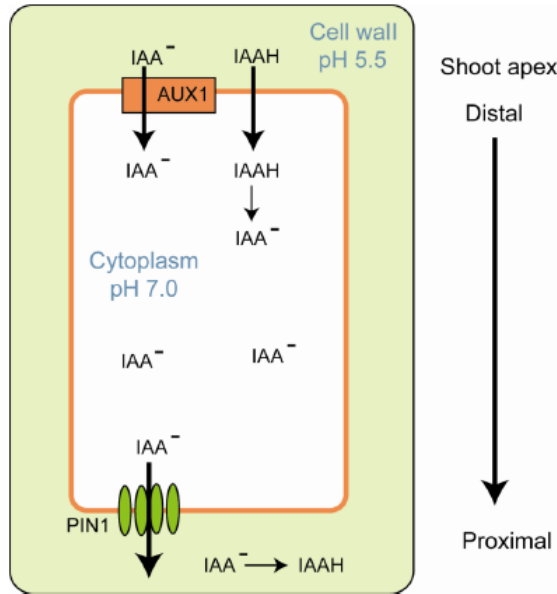


Auxin

Transporter proteins (PIN1) are only located at the proximal end of the cell.

Therefore, auxin can only move in one polar direction.

Mutations in the PIN protein result in embryos with poorly formed meristems showing how important polar transport and auxin gradients are for plant growth and development.



بعض الظواهر الفسيولوجية للاوكسينات:

- 1- الاستطالة والتوسع الخلوي Cellular Elongation and Enlargement
- 2- الأنقسام الخلوي Cell Division
- 3- السيادة القمية Apical Dominance
- 4- تحفيز تكوين الجذور Root Induction
- 5- الأزهار Flowering

6- تحديد الجنس

Sex Determination -7

انواع الاوكسينات

• الاندولات

Indole-3-acetic acid (IAA)

Indole-3-butyric acid (IBA)

• النفثالين

α -Naphthalene acetic acid (NAA)

• الكلوروفينوكسي

2,4-diclorophenoxyacetic acid (2,4-D)

2- السايوتوكاينينات Cytokinins

هي مجموعة من الهرمونات النباتية التي تنتج طبيعيا في قمم الجذور ثم تنتقل عن طريق اوعية الخشب الى الساق وتسبب انطلاق ونمو البراعم. تم اكتشاف الاول للسايتوتوكاينين في عام 1955 من قبل Miller و Skoog والمشتغلين معهم في مختبرات العالم Skoog في جامعة وسكانسن وهذا السايوتوكاينين هو الكاينتين Kinetin وهو 6- furfurylamino-purine وقد تم تحضيره من الـDNA حيامن سمك السردين كما واثبت وان لهذا السايوتوكاينين القابلية والقدرة على تحفيز الانقسام الخيطي في كالس انسجة نبات التبغ المزروعه خارج الجسم الحي.

تركيب السايوتوكاينين

السايتوتوكاينينات عبارة عن مشتقات القاعدة النيتروجينية ادينين مع السلسله الجانبية N^6 وتعتمد فعالية السايوتوكاينين على تركيب السلسله الجانبية عند الـ N^6 وبالاعتماد على المجموعة المعوضه الموجوده عند N^6 يصنف السايوتوكاينين الى نوعين اما Isoprenoid او Aromatic وتكون الفعالية البايولوجية لكلا النوعين من السايوتوكاينينات من الناحية النوعية متساوية لكنها تختلف من الناحية الكمية.

ان السايوتوكاينينات الاروماتية تتميز بان لها مجموعة بنزين وهذا النوع من السايوتوكاينين وجودها اقل من النوع الأول وهناك القليل من المعلومات حولها. وبسبب قابلية هذه السايوتوكاينينات على الثبات فهي تستخدم كثيرا في الزراعة النسيجية ومثلها البنزيل ادينين (BA) Benzyl adenine.

هناك بعض المواد التي ليس لها علاقه من الناحيه التركيبيه بما ذكر اعلاه لكن له فعاليه قويه مشابه لعمل الساييتوكاينين وهو مركب Phenylurea والذي يعرف بالـ—Thidiazuron.

أنتقال الساييتوكاينينات Cytokinins Transport

لا يعرف لحد الآن كثيرا عن حركة وأنتقال الساييتوكاينينات كما هو الحال في بناءها الحيوي فهي بعكس الجبرلينات والأوكسينات السريعة الحركة فهي تنتقل ببطيء شديد أو أنها لا تنتقا اي يكون تأثيرها موقعي.

وعلى العموم فان التحليلات والدراسات الحديثه حول توزيع وأنتشار وحركة زانتقال الساييتوكاينينات ان حركة هذا الهرمون تتم عن طريق اوعيه الخشب الى الساق مع حركة وانتقال الماء والعناصر الغذائية التي تمتصها الجذور وقد يكون لعملية النتح والظغط الجذري .

التأثيرات الفسيولوجية للساييتوكاينينات:

- 1- الأنقسام الخلوي
- 2- الأزهار
- 3- تكوين الكلوروبلاست
- 4- كسر السياهه القمية ونمو البراعم الجانبية
- 5- ميكانيكية فتح وغلق الثغور
- 6- كسر الكمون او طور السكون
- 7- التحورات الفسيولوجية والمورفولوجية والكيميائية للأعضاء النباتيه
- 8- تأخير الشيخوخه

3- الجبرلينات (GAs) Gibberellines

تعتبر الجبرلينات من اهم الهرمونات النباتية اذ تلعب دورا مهما او رئيسيا في نمو النباتات وتطورها خلال دورة حياتها العادية، وهي ثاني اهم اكتشاف بعد الأوكسينات.

في عام 1920 اكتشف العالم الياباني Kurosawa المتخصص في امراض النبات بعض التغييرات المورفولوجية لنبات الأرز مثل استطالة السوق لتصبح رفيعة السمك مصحوبة بشحوب الأوراق الشريطية في الخلفات القاعدية في الأطوار الأولى ثم تأخذ النموات الخضرية في الذبول والجفاف وتصبح سمراء اللون ويسمى هذا المرض بمرض البادرات الحمقاء او Bakanae Disease او يسمى بـ Foolish Seedlings Disease وان المسبب الرئيسي لهذا المرض هو الفطر *Gibberella fujikura* أو يسمى *Fusarium moniliformae*. وفي عام

1930 استطاع عالمان يابانيان من استخلاص وفصل المركب الذي يفرزه الفطر انف الذكر والذي يسبب هذه الأصابه بصوره نقيه واطلق عليه تسميه الجبرلين نسبة الى الفطر.

التركيب الكيماوي للجبرلين:

الجبرلينات هي مجموعة من المركبات العضوية التي لها هيكل كاربوني حلقي يطلق عليه بالجيبينات Gibbane Ring وانوعها حوالي 136 نوعا اي الجبرلينات ولكثرتها وعدم الخلط بينها تختصر بـ GA حيث يدل حرف الA على نوع الجبرلين وقد اعطيت الجبرلينات الأولى المعزولة من النباتات الراقية ارقاما A_1, A_2, A_3, A_4 وعلى العموم هناك صفات عامه للجبرلينات يجب ان تتوفر فيها وهي

1- هيكل كاربوني نوع Gibbane Ring

2- ان تكون ذات تاثير وفاعلية موجه تتوافق مع الأختيارات الخاصه بالكشف عن الجبرلينات وفعاليتها وتأثيراتها.

التاثيرات الفسيولوجية للجبرلينات

1- أنقسام واستطالة الخلايا

2- الأزهار

3- عقد ونمو الثمار

4- تكوين الأنزيمات خلال الأنبات

4- معوقات أو مثبطات النمو Plant Growth Inhibitors or Retardants

وهي مجموعة من المركبات العضوية غير الغذائية والفيتامينات والتي تؤدي الى أعاقه النمو بتراكيز قليلة جدا واهم هذه المواد هي حامض الأبسيسك Abscisic Acid و السايكوسيل Cycocel والكلتار او Paclobutrazol.

التاثيرات البايولوجية لمنظمات النمو في الزراعة النسيجية

أن التاثيرات البايولوجية لمنظمات النمو في الزراعة النسيجية هي ليست مطلقة ولاخاصه ولكن استجابة الخلايا او الانسجة او الاعضاء تختلف بالاعتماد على ظروف الزراعة نوع القطعة النباتية المستخدمه وكذلك الصنف النباتي. لكن من المميزات المهمه والجيدة والتي طورت كثيرا تقنية الزراعة النسيجية هي امكانية استخدامها بصورة منفرد أو كتوليفات او بشكل متسلسل. وبصورة عامه يتاخر طور النمو عند إجراء المعاملات المختلفه او تحتاج لبعض الوقت لحين ظهور تاثيرها. وفي ادناه يوضح انواع منظمات النمو المستخدمة في الزراعه النسيجية وتاثيراتها البايولوجية في الزراعة النسيجية :

1- Auxins: Indole-3-acetic acid (IAA), Indole-3-butyric acid (IBA), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), Picloram

- انقسام الخلايا
- تحفيز نمو الكالس
- تحفيز نمو الجذور
- تميز او عية الخشب
- تحفيز نشوء الاجنه الجسمية

2- Cytokinins: Zeatin, Kinetin, Benzyl adinen (BAP),
Thidiazuron(TDZ)

- أنقسام الخلايا (مع وجود توليفه من الأوكسين والساييتوكاينين)
- تكاثر الكالس او زيادة نمو الكالس
- توليد البراعم او السيقان العرضيه
- نمو البراعم الابطييه
- تحفيز نشوء الاجنة الجسمية

3- Gibberellins: GA₃ and in some cases GA_{4, 7, 9}.....

- استطالة السيقان
- محفز نمو بشكل عام

4- Growth Inhibitors: Absisic Acid (ABA)

- يحفز نضوج الاجنة الجسمية
- يساعد في تراكم أحتياطات التخزين
- الكمون

من المكونات الأخرى للوسط الغذائي هي:

1- الماء Water

يعتبر الماء من المكونات الرئيسية في الوسط الغذائي لذا من الضروري الأهتمام بهذا المكون من حيث النقاوه وخلوه من الأملاح.
تعد عملية تنقية الماء من الشوائب عملية معقده نوعا ما ويستخدم لهذا الغرض اجهزة التقطير لكن بعض المواد العضوية الطياره القليلة الوزن الجزيئي قد تتبخر مع الماء اثناء عملية التقطير ثم تنزوب وتنزل مع الماء لذا اقترح Bonga سنة 1982 بان يتم التخلص من الماء المقطر المتجمع خلال العشر دقائق الأولية من بدء التقطير. كما من الأفضل عدم خزن الماء المقطر لفترات طويله في حاويات مصنوعه من البولي اثلين حيث ان هذه الحاويات من الممكن ان تطلق مواد سامه للمزروعات.

2- الفحم المنشط Activated Charcoal

يقوم الفحم المنشط بادمصاص المواد العضويه و غير العضويه من الوسط الغذائي وتستخدم هذه الماده في انظمة الزراعة النسيجية بشكل كبير. اما تأثيره فهو غير معروف بصوره دقيقه ولكن يعتقد ان للفحم المنشط بعض الوظائف منها:

- 1- انه يزيل تأثير الملوثات من الأكر
 - 2- يزيل تأثير المواد الثانويه التي يفرزها النسيج النباتي اثناء النمو في الوسط الغذائي وخصوصا المواد الفينولية.
 - 3- ينظم تجهيز منظمات النمو
 - 4- يعطي اللون الأسود للوسط الغذائي مما يقربه من وسط التربه
 - 5- يحفز نمو الأجنه الخضرية
 - 6- يقوم بادمصاص المركبات السامه من الوسط الغذائي مثل 2-(Hydroxy methyl)-5-Furfural والناجح من تحلل السكروز أثناء التعقيم بجهاز الموصده.
- ومن المهم ذكره ان نوع الفحم المنشط المستخدم له اهمية كبيره في الزراعة النسيجية وذلك لان خصائص الأدمصاص تعتمد فيه على مصدر الفحم المنشط. فالفحم المنشط المحضر من الخشب (النباتات) يحتوي على كمية كبيره من الكاربون مقارنة بالآخر المحضر من العظام والذي يحتوي على بعض المكونات التي لها تأثير عكسي على الزراعة النسيجية.

المحاضرة الخامسة

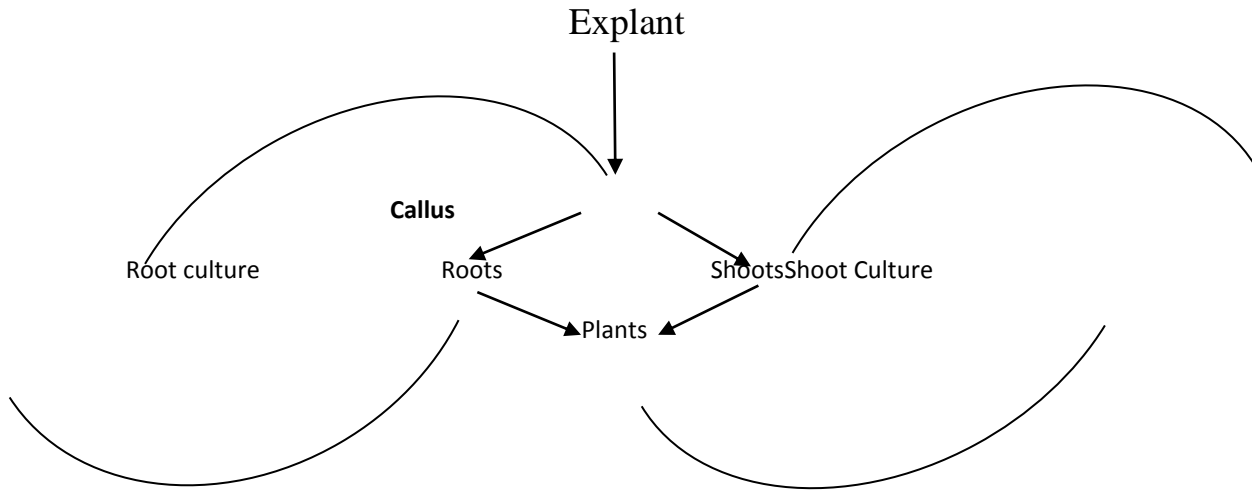
عملية تولد الأعضاء او التعضي وتولد النباتات Organogenesis and Plant Regeneration

قبل البدء في هذا الموضوع لابد لنا ان نفهم هذا المصطلح (الكالس Callus) ماذا يعني: قد يخلط بين مصطلح الكالس مع مصطلح نباتي آخر الكالوس Callose فالمصطلح الأخير يعود الى السكريات المتعددة التي تشترك مع الأنابيب المنخلية والتي تتكون بسرعة بعد حدوث الجروح في النبوب المنخلي والخلايا البارنكيمييه. الكالس Callus هو عبارة عن كتلة من نسيج غير منتظم مكون من خلايا غير متمسكة يتكون من مناطق الجروح من الأنسجة والأعضاء المختلفة في النبات. لا يحتوي الكالس على نموذج تنظيمي يمكن التنبأ به ولكنه يحتوي على مراكز مرستيمييه تظهر منه مناطق كامبيومييه أثريه مع المناطق المتميزه من الأوعيه . أما اهم العوامل التي تحفز نشوء الكالس على الجروح فهي الهرمونات الداخليه من الأوكسين والسايوتوكاينينات كما وقد ينشأ الكالس من الجروح الميكانيكيه في النبات او بعد عمليات الغزو او الأصابه بالحشرات، اما في الزراعة النسيجية فيكون الكالس نتيجة زراعة القطعة النباتيه على وسط غذائي يحتوي على تركيز معين من الأوكسين والسايوتوكاينينو على العموم يمكن تقسيم عملية تكوين الكالس الى ثلاثة مراحل وهي:

- 1- مرحلة التحفيز Induction stage
- 2- مرحلة انقسام الخلايا Cell division stage
- 3- مرحلة التميز Differentiation stage

أما تولد الاعضاء او الـ Organogenesis تعني عملية تحفيز او تكون السيقان او الجذور او حتى النباتات الكامله وبمعنى اخر هي عملية تكون الاعضاء Organ formation وتسمى هذه العملية بالتعضي Organogenesis ويمكن تقسيمها الى مجموعتين:

- أ- تكوين الجذور Rhizogenesis وتعني نشوء الجذور والتي كثيرا ما نراها تتكرر في اغلب الأنسجة المزروعه وتبدأ عملية تكون الجذور وتبدأ عملية تكوين الجذور عادة بعد عملية تكوين البراعم.
- ب- تكوين السيقان أو البراعم Calogenesis أو Caulogenesis وتعني عملية تكوين البراعم من منطقة ضيقة في الكالس على شكل قمم غير طبيعية ثم بعد ذلك تتكون الوريقات الأبتدائية حول هذه القمم غير الطبيعيه Abnormal Apices وبعد ان تنتقل هذه القمم الى اوساط غذائية خاصه يمكن ان تتميز هذه الأعضاء في غضون ثلاثة أيام وبعد تسعة أيام تتكون الأنسجة الوعائية الأولية ويمكن تلخيص عملية التكون العضوي او التعضي بالمخطط التالي



عملية التولد Regeneration

يمكن ان نعرف عملية التولد بالميل الذي يظهره الكائن الحي لتجديد اي جزء منه والذي عند أزالته او عزله فسيولوجيا ينتج كائن جديد. في عملية التولد تصبح الخلايا الناضجة أو القريبه من النضج جنينيه وتجتاز عمليات تجدد أو توزيع جديد للنسيج وفي هذه العمليه يزداد الساييتوبلازم في هذه الخلايا وتصبح نواتها بارزه وتدعى هذه العملية بعملية فقدان التمايز Dedifferentiation وتصبح هذه الخلايا الفاقده للتمايز خلايا مرستيميه ثم تتميز هذه الخلايا التي فقدت التميز مرة ثانية لتتكامل مع الوظيفة أو الموقع الجديد للتركيب الجديد المتولد. وعلى العموم تكون عملية التولد في النباتات الراقية الى ثلاثة انواع:

1- النوع الاول : إعادة التنصيب Reconstitution

وتتمتاز هذه العملية بأعادة تنظيم النسيج الجنيني بالشكل الذي يصلح مع التركيب الاصيلي وبصوره عامة هذا النوع ينطبق على المناطق الجنينيه مثل مناطق النمو او الاجنة الفتية.

2- النوع الثاني: إعادة التجديد Restoration

ويتضمن هذا النوع تطور الانسجة او الأعضاء المفقوده خلال الفعالية المرستيمية في المناطق المجاوره الى مناطق الانسجة المفقوده. خلال هذه العملية تصبح البراعم الكامن أو الاولية فعالة أو عملية تكوين الجذور خلال عملية التكاثر الخضري.

3- النوع الثالث Reproductive Regeneration

وهي عملية تكون فرد جديد من الجسم الخضري خلال عملية التكاثر الخضري .

أنماط التعضي والتوالد Organogenesis and Regeneration Patterns

تتوالد النباتات خارج الجسم الحي أما بواسطة عملية التعضي وهي عن طريق تكوين السيقان أو بواسطة عملية تكون الأجنة الخضرية الجسمية . وكلا العمليتين (التعضي وتكون الأجنة الجسمية) تستخدم قوة تطويرية ثابتة ومحدودة. فبواسطة استخدام عملية التعضي كنقطة نهائية فمن الممكن ان تصبح هذه العملية ثابتة تحت عوامل تحفيز معينة. فنسيج اللب الخاص بنبات التبغ يكون سيقانا فقط في قطع النسيج المزروعه والملاصقة الى الوسط الغذائي. فالخلايا ذات القوة الكامنه Totipotent Cells تمتلك مدى واسع او لها القابلية على تكوين مدى مختلف وواسع من الأعضاء النباتيه ولكن تحت ظروف خاصه من التجربه. ومع ذلك تتباين انواع اخرى او تنشذ عن هذه القاعده لعملية التشكل او التخلق Morphogenesis ويقصد بذلك تنشذ بعض النباتات في كفاءتها او قدرتها على التشكل واستجابتها للمحفزات المختلفه ويمكن تمييز ذلك من خلال تشكل الأعضاء سيقان او جذور فانها تعتمد على نوع الخلايا وظروف التحفيز.

ان عملية التشكل هذه مهمة جدا في الزراعة النسيجية فيمكن اعادة توليد النباتات خارج الجسم الحي باستخدام انسجة مرستيمية متمثلة بالقمم النامية والبراعم الأبضية أو انسجة غير مرستيمية متمثلة بالاوراق او قواعدها وغيرها من الانسجة.

فالفرق الاساسي بين النوع الأول والنوع الثاني من الانسجة ان الاول اي النسيج المرستيمي يحتوي على خلايا هي اصلا متوجهه للتطور الى نمط النبيتات. بينما النوع الثاني(الانسجة غير المرستيمية)تحتاج الى طرق متبادلة من النمو تتمثل اولا بفقدان التمييز وثانيا باعادة التمييز ثم التوجه الى نمط النباتات الكامله عندما يتم تعريضها الى وسط غذائي ملائم.

بعض المصادر النباتية المهمه للتعضي

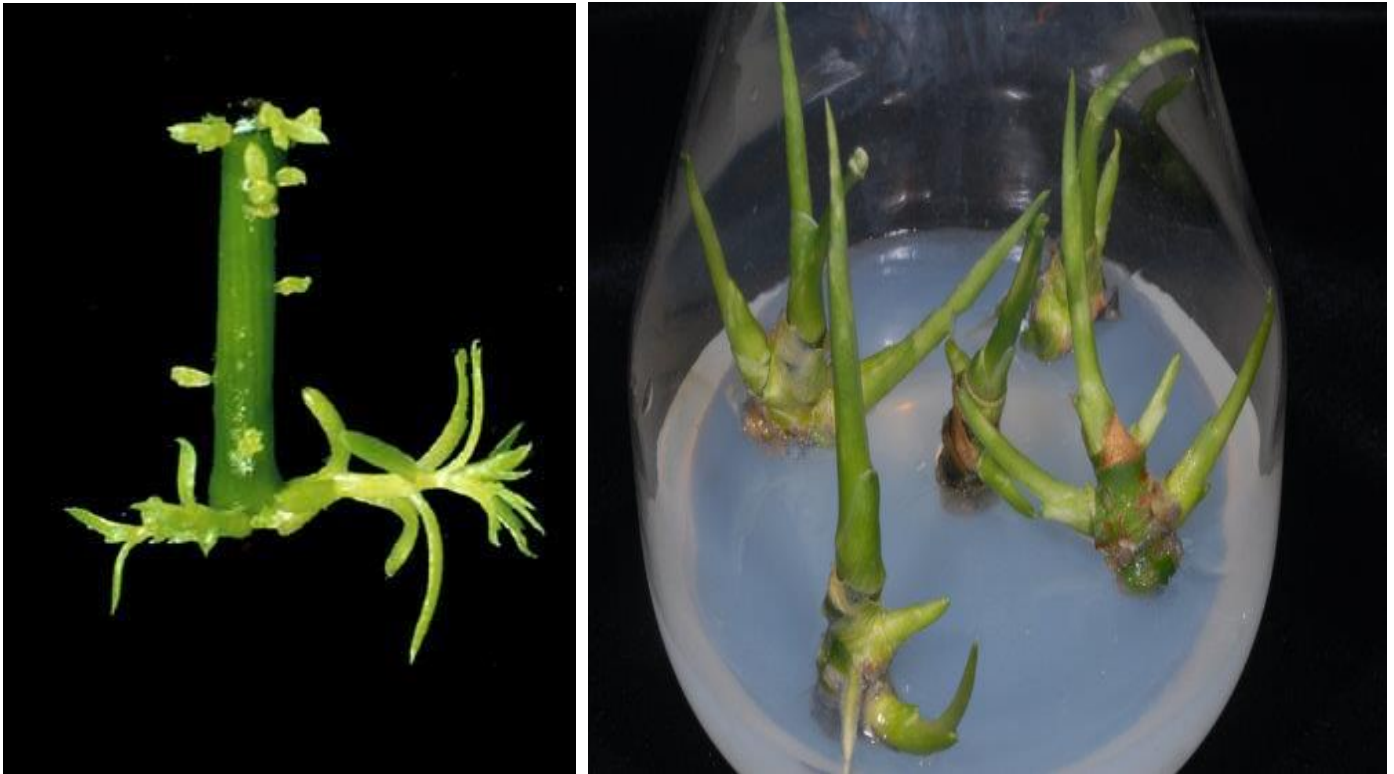
1- توفر درنات البطاطا مصدرا مهما لعملية التعضي في المزارع النسيجية بالرغم من انها تحتوي على خلايا مختلفة منها مرستيمية والأخرى غير مرستيمية.

2- من المصادر الاخرى السويقه تحت الفلجية وبالتحديد خلايا البشرة اذ لها القابلية على التحول مباشرة الى براعم.

3- بعض انواع الخلايا الماخوذه من مناطق التدرن التاجي Crown Gall Tumer وهو مرض يصيب أعضاء النباتات المختلفه وينتج عنه ظهور اورام نتيجة الأنقسام المفرط للخلايا فينتج عنه تشوه الأعضاء النباتيه وهذا المرض تسببه نوع من البكتريا تعرف بالـ Agrobacterium tumefaciens وتمتلك خلايا هذه الأورام قابلية على النمو غير المحدود ولكن ليس لها القدرة على على ان تتميز الى اعضاء نباتية وذلك لأنها فقدت قابليتها على التعضي وقد يعزى ذلك الى ان هذه الخلايا تفرط في انتاج السايبتوكاينين نتيجة اصابتها بالبكتريا اعلاه والتي تنقل البلازميد الذي يطلق عليه T-DNA وهو البلازميد المحفز للأورام ويطلق على هذه الأورام بالـ Treatoma. وقد يكون لبعض خلايا هذه الأورام القابلية على تكوين السيقان في بعض النباتات لكنها مع ذلك تكون غير طبيعيه.

الفرق بين عملية التعضي وعملية التولد الجنيني الجسمي

ت	عملية التعضي	عملية التكون الجنيني الجسمي
1	تكون ذات قطب واحد Monopolar	تكون ذات قطبين
2	تتطور من مجموعة من الخلايا	تتطور من خلية واحدة
3	لها ارتباط وعائي مع الكالس او قطعة النسيج التي تكونت منها	ليس لها ارتباط وعائي مع النسيج الذي تكونت منه
4	تكون النهاية القاعدية للبرعم مفتوحه	تكون النهاية القاعدية للجنين مغلقه



شكل يوضح عملية التعضي اليمين بوجود مرستيمات اليسار من خلايا البشرة او خلايا غير البشرة اليمين من مرستيمات موجوده (البراعم الأبطيه)

أهم العوامل المؤثرة على عملية التعضي Factors affecting organogenesis

1- منظمات النمو Growth Regulators

تلعب النسبة بين الهرمونين الأوكسين والسايبتوكاينين دورا هاما في عملية التعضي في النباتات ففي لب التبغ تؤدي النسبة العالية من الأوكسين الى السايبتوكاينين في تكوين الجذور بينما العكس يؤدي الى تكوين السيقان . أما النسب المتساوية من الاوكسين والسايبتوكاينين فيؤدي الى نمو الأنسجة بشكل غير منتظم .

2- العوامل الفيزيائية Physical Factors

أ- الاضاءة Light

تؤدي الاضاءة او شدة الاضاءة العالية الى تنشيط تكوين السيقان او البراعم اما الكالس الذي ينمو تحت الاضاءة المستمره العالية فيؤدي الى فقدان لونه ويتحول الى اللون الابيض ولا يظهر اي تعضي في المستقبل. اما في نبات ال Pelargonium فتتكون السيقان فقط عندما يكون هناك تبادل بين الاضاءة والظلام كما ان نوعية الاضاءة تؤثر في عملية التعضي. فالأضاءة الحمراء تؤدي الى تكوين الجذور اما الزرقاء فتؤدي الى تكوين البراعم.

ب- درجة الحرارة Temperature

يزداد نمو الكالس بزيادة درجة الحرارة الى أكثر من 30 درجة مئوية بينما تنشأ السيقان عند درجة حرارة 18 درجة مئوية.

المحاضرة السادسة

عملية التكون الجنيني الجسمي Somatic embryogenesis

لقد عرف Haccius سنة 1978 هذه الظاهرة بانها عملية تكون اجنة ثنائية القطب من انسجة جسمية بدون تزاوج الأمشاج الذكرية والأنثوية (طريقة تكاثر لاجنسية). وتتكون هذه الأجنة الجسمية من خلايا سبورية خضرية في النباتات وتتصرف او تسلك سلوك الجنين الزايكوتي من حيث التطور ولذا اطلق عليها عملية تكون الأجنة الجسمية تميزا لها عن عملية تكون الأجنة الجنسية او الزايكوتية.

لقد تم تحفيز او استحثاث هذه العملية في اكثر من 71 نوعا من نباتات مغطاة البذور وهي موزعة على 62 جنسا وتنتمي الى 28 عائلة نباتية . وقد تم استحثاث هذه العملية من أجزاء مختلفة من النباتات كالسيقان Stems والأوراق Leaves والجذور Roots والسويقه تحت الفلقية Hypocotyl والازهار Flowers والبراعم Buds والبذور Seeds والاجنة Embryo ونسيج الجوزاء Nucellus والسويداء Endosperm ايضا . وعلى العموم تتكون الاجنة الجسمية بطريقتين

1- مباشرة Direct Somatic embryogenesis

وتعني تطور الأجنة الجسمية مباشرة من النسيج الأصلي دون المرور بمرحلة الكالس ومن الانسجة التي لها القابلية على تكوين الأجنة مباشرة كنسيج الجوزاء وخلايا البشرة في السويقه تحت الفلقية.

2- غير المباشرة Indirect Somatic embryogenesis

وتتضمن تكوين الأجنة الجسمية من خلايا الكالس او معلق الخلايا والمهم في هذه الطريق أن الكالس يظهر قبل ظهور او تولد الأجنة الخضرية. ولفهم هذين العمليتين من تطور الاجنة الخضرية بالطريقة المباشرة او غير المباشرة فانها تعتمد بالدرجة الاساس على بعض الاحداث التي تؤدي الى تميز الخلايا خلال عملية الانقسام.

وبالرغم من ان عملية تكون الاجنة الجسمية المباشرة والغير مباشرة تعتمد على تحديد وتمييز بعض الخلايا في النسيج المزروع الى اجنة خضرية الا ان هناك اختلاف بين العمليتين يمكن اجمالها:

Indirect Embryogenesis	Direct embryogenesis	ت
يتكون الكالس قبل تطور هذه الأجنة	تتطور الأجنة مباشرة من الأنسجة	-1
عملية التطور الجنيني الجسمي الغير مباشر تحتاج الى عملية اعادة تحديد الخلايا المتميزة. فيتكون الكالس اولاً ثم يتم تعيين الخلايا الجنينية ويطلق على هذه الخلايا بالـ Induced embryogenic determined cells وتختصر بالـ IEDC(). وتحتاج هذه الخلايا الى بيئة خاصة لغرض فقدان التمييز اولاً ثم الى اعادة التميز مرة ثانية لغرض تحويلها الى الحالة الجنينية	عملية التطور الجنيني الجسمي مباشرة تتكون من خلايا جنينية محددة والتي يطلق عليها بالـ Pre-embryogenic determined cells وتختصر بـ (PEDC) وتحتاج هذه الخلايا فقط الى مواد محفزه لتزليل تأثير المواد المثبطة قبل ان تستأنف عملية الانقسام والتطور الى أجنة خضرية	-2

هذا وقد تطلق عدة مصطلحات على الاجنة الجسمية المتكونه في الزراعة النسيجية مثل Embryoids او Supernumerary embryoids او adventive embryos او accessory embryos بالاضافة الى الـ Somatic embryoids

تصنيف الاجنة

واستنادا الى Kohlenbach سنة 1978 يمكن تصنيف الأجنة الى نوعين:

- 1- الجنين الزايكوتي Zygotic embryos وهي الاجنة الناتجة من عملية تخصيب البويضه او الزايكوت
- 2- الجنين غير الزايكوتي Non-zygotic embryos وهي الأجنة المتكونه من خلايا غير الخلايا الزايكوتية وتصنف الى ثلاث انواع:
 - أ- الأجنة الجسمية Somatic embryos وهي الاجنة المتكونة من الخلايا السبوروية او الخضرية
 - ب- الأجنة العذرية Parthenogenic embryos وهي الاجنة المتكونه من البويضه غير المخصبة
 - ث- الاجنة الذكرية Androgenic embryos وهي الأجنة المتكونه من الكميت الذكري

تطور الجنين الجسمي Development of somatic embryos

في مزارع الكالس ينشأ الجنين الجسمي من خلية مرستيمية واحدة تتميز هذه الخلية عن الخلايا المجاورة لها او المحيط بها وتصبح بارزه صغيرة الحجم وذات سايتوبلازم كثيف ونواة بارزه ومن ثم تنقسم بطريقة تختلف عن انقسام الخلايا المجاورة لها فتصبح مايعرف بالجنين الأولي Pro-embryoid ثم يمر هذا الجنين بنفس مراحل التطور التي يمر بها الجنين الزايكوتي وهي الطور الكروي Globular والطور القلبي Heart shaped ومن ثم الطور التوربيدي Torpedo

تكون النباتات من الأجنة الجسمية Plant formation from somatic embryos

تنبت الأجنة الجسمية على وسط غذائي خالي من الهرمونات الى حين تكون النباتات الى الحجم المناسب.

من وجهة النظر الزراعية تعتبر الاجنة الجسمية احد اهم التطبيقات المهمة في الزراعة النسيجية حيث باستخدام هذه التقنية من الممكن توليد الأجنة الجسمية بشكل كبير وواسع وان احد اهم تطبيقات هذه التقنية في النباتات البستانية هو انتاج البذور الصناعية Artificial seeds وهي عملية تغليف الأجنة الجسمية باستخدام مادة الـ Alginate ويمكن بهذه الطريقة حفظ الأجنة الجسمية لفترة طويلة ويمكن استخدامها مباشرة لزراعتها في الحقل.

أهم العوامل المؤثرة في عملية التكون الجنيني الجسمي Factors affecting somatic embryogenesis

1- تأثير مواد النمو ومنظمات النمو Effect of growth regulators

يعتبر الأوكسين مهم جدا او اساسيا لتكوين الأجنة الخضرية فاذا بقى النسيج فترة في وسط يخلو من الهرمونات فلا تتكون الأجنة الأجنة الخضرية. لكن في انسجة الجوزاء المزروعة خارج الجسم الحي في نبات الحمضيات فيعتبر وجود الاوكسين IAA والساييتوكاينين Kinetin ضروري جدا لتمييز الأجنة الخضرية. في نبات الجزر ينشأ الكالس ويتكاثر في وسط غذائي يحتوي على اوكسين عالي وعلى هذا الوسط الغذائي يبدأ الكالس بالتمايز ليكون مجاميع او تجمعات مرستيمية او جنينية تسمى بالـ Embryogenic Clumps. في نبات القهوة العربية Coffea arabica تتكون الأجنة الخضرية فقط عندما ينمو الكالس على وسط غذائي يحتوي على الاوكسين 2,4-D ومن ثم ينقل الى وسط غذائي خالي منه كما ان وجود الساييتوكاينين BAP في الوسط الغذائي قد يؤدي الى تحفيز الانقسام ولكنه قد يثبط القوه الجنينية الكامنه لمزارع الكالس في الجزر كما وجد ان الجبرلين يثبط عملية التكوين الجنيني الجسمي.

2- المصدر النايتروجيني Nitrogen sources

تتأثر عملية التكون الجنيني الجسمي بمصدر او شكل النايتروجين المتوفر في الوسط الغذائي . ففي نبات الجزر البري وفي المزارع الناشئة في الوريقات او عنق الوريقات تتكون الأجنة الجسدية فقط عندما يحتوي الوسط الغذائي على النايتروجين المختزل

NH_4^+ . بينما في نبات القطن تنمو الاجنة الخضرية عندما يتعرض معلق الخلايا الى وسط غذائي يحتوي على الكلوتامين وهو حامض اميني.

3- البوتاسيوم Potassium

يعتبر وجود البوتاسيوم ضروري لعملية التكوين الجنيني الجسمي . فقد وجد ان عند تعريض كالس الجزر الى وسط غذائي يحتوي على زيادة في البوتاسيوم يؤدي الى زيادة عدد الاجنة الخضرية المتكونه بينما يؤدي نقصان البوتاسيوم الى اقل من 1 ملي مول الى زيادة نمو الخلايا فقط.

4- الاوكسجين المذاب Dissolved Oxygen

يسبب التركيز العالي من الاوكسجين في الوسط الغذائي الى تحفيز نمو الجذور بينما نقصانه يؤدي الى تحفيز تكون الاجنة الخضرية.

5- مثبطات عملية التكون الجنيني الجسمي Inhibitors of embryogenesis

يرى في الكثير من المزارع النسيجية عند اعادة زراعتها او عندعملية تكوين المزارع الفرعيه Subculturs ان عملية تكوين الاجنة الخضرية تنتبط او تقل ويعتقد ان السبب الرئيسي هو وجود المثبطات الكيمياويه.

المحاضرة السابعة

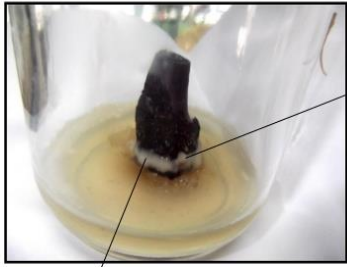
المشاكل المرتبطة بتقنية الزراعة النسيجية

هناك بعض الظواهر الفسيولوجية او بعض المشاكل المعقدة التي توافق هذه التقنية تحتاج الى وقفة لفهمها وايجاد الحلول المناسبة لها او تجنب حدوثها لما لها تأثير كبير في رفع كفاءة نظام الزراعة النسيجية وتجنب هدر المال ومن هذه المشاكل

1- التلوث الداخلي Internal contamination

يمثل هذا النوع من التلوث مشكلة حقيقية ويكون المسبب الرئيسي او الأساسي للكائنات الحية الدقيقة الموجودة داخل انسجة النبات نفسه والتي لا يمكن التخلص منها بأجراء التعقيم السطحي، وهناك آراء حول هذا الموضوع

CONTAMINATED!!



fungi (mycelium)

bacteria



Contaminating Bacteria Can Be Divided into

Epiphytes

Common

Disinfection can be enough

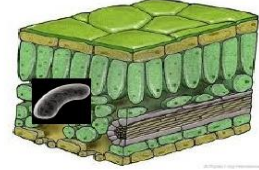


Endophytes

More problematic

Disinfection is not enough

Antibiotics are needed



➡ Pathogenic bacteria can be a contaminant

أ- الرأي الأول يرى أن هذه الكائنات الحية تأتي نتيجة عملية غسل قطعة النبات Explant بعد استئصاله من النسيج الأم بالماء الجاري لغسله من التربة والوساخ العالق به او استخدام المواد المضادة للأوكسده في الانواع التي تطلق مواد فينولية من الجروح التي تحدث نتيجة عملية الأستئصال قبل اجراء عملية التعقيم السطحي عليها مما يعطي فرصة لهذه الكائنات او لسبوراتها بالدخول عميقا داخل النسيج مما يصعب التخلص منها ولغرض تجنب حدوث ذلك فمن الأفضل ان يتم مسح النسيج المستاصل بدأ بالكحول 70% لغرض قتل هذه المايكروبات

كأجراء احترازي قبل إجراء عملية التعقيم السطحي. كما يجب استخدام المحاليل المضادة للأكسدة معقمه وذلك لغمس النسيج فيها.

ب- الرأي الثاني يرى بأن هذه الكائنات هي أصلا موجودة وتبقى كامنة داخل النسيج وتظهر فجأة بعد مرور فترة زمنية طويلة على زراعة النسيج مما يؤدي الى حدوث خسارة مادية كبيرة اضعف الى خسارة الجهد والوقت. ولتلافي حدوث هذين النوعين من التلوث يضاف المضاد الحيوي الى الوسط الغذائي لفترة وجيزة لضمان قتل هذه البكتيريا وعدم حدوث التلوث المفاجيء للأنسجة المزروعة خارج الجسم الحي.

ت- ا

Contaminating Bacteria May Originate from

Operators



ر

ا

ي

ال

ث

ال

ث

Mites and Thrips



ي

رى بان التلوث قد ياتي من الاشخاص العاملين في مجال الزراعة النسيجية او قد يكون التلوث ناتج من تاثير خارجي كوجود بعض الحشرات او الكائنات مفصلية الارجل مثل اللحم Mites أو الثربس Thrips

المضادات الحياتية Antibiotics

المضادات الحياتية هي عبارة عن مواد تنتج بواسطة الكائنات الدقيقة أو النباتات أو من الممكن تصنيعها مختبريا، والتي لها تأثير سمي على كائنات دقيقة أخرى. المضادات الحياتية لها القابلية على منع او تثبيط نمو الكائنات الحية الدقيقة أو

ربما قادرة على قتلها. ولا تستخدم المضادات الحياتية بشكل روتيني ضد التلوث في عملية الأكتار وذلك لأنها كثيرا ماتكون غير فعالة ومن الممكن ان تقتل الزروع النباتية أو من الممكن ان تحدث بعض الطفرات الوراثية. وعلى العموم قد يكون لبعض المضادات الحياتية اهمية او فائدة . ان من اكثر المضادات الحياتية الشائعة الاستخدام في تجارب نقل الجينات وذلك للسيطرة او القضاء على بكتريا Agrobacterium هي:

1- البنسلين Ampicillin: ويستخدم بتركيز 100-400 ملغم في مزارع البروتوبلاست لنبات Petunia

2- Cerbencillin واستخدم بتركيز 250 ملغم/لتر والمضاد الحيوي Augmentin ويستخدم بتركيز 500 ملغم/لتر واستخدم بشكل فاعل في

تجارب الهندسة الوراثية للسيطرة على نمو بكتريا Agrobacterium

3- المضاد الحيوي Cefotaxime سستخدم هذا المضاد الحيوي للقضاء على انواع محددة من البكتريا في النباتات الخشبية وسيستخدم بتركيز 25 ملغم/لتر

4- المضاد الحيوي Tetracycline ويستخدم لمنع نمو البكتريا في الوسط الغذائي ويستخدم بتركيز 6 ملغم /لتر ويفضل خلط هذا المضاد الحيوي مع

مضاد حيوي اخر هو Rifampicin وبنفس التركيز

5- المضاد الحيوي Gentamycine Sulfate وهذا المضاد الحيوي مقاوم للحرارة ويمكن تعقيمه باستخدام جهاز الموصده ويوصى باستخدامه بمقدار 50 ملغم /لتر

6- Methylourea ويستخدم كمضاد لنمو الخمائر وهو قابل للتعقيم بالاولوتوكليف

2- التلون البني Browning

لقد ثبت فيما يتعلق في بعض انسجة النبات ومنها النخيل ان للمركبات الفينولية دور مثبت للنمو حيث تتحول هذه المركبات بوجود انزيم البولي فينول اوكسيدز وانزيم البيروكسيدز الى مركبات سامه بفعل اكسدتها ومن هذه المركبات الكينون Quinone وهو مركب ناتج من تحول مجموعة المثيل CH الى كيتون C=O والذي يعمل على اسمرار الأنسجة وتحللها وموتها وتعد مشكلة التلون البني من اكبر المشاكل الفسيولوجية في مجال الزراعة النسيجية والتي تحد من نجاح عملية الأكتار.

أ- وتعتبر الفينولات من المركبات الثانوية والتي توجد في جميع اجزاء النبات بغزارة وهي من أكبر المجاميع التي لها اثر بيولوجي (لكنها لاتعتبر من المغذيات)

ب- يعتمد بناءها الحيوي على العديد من الانزيمات التي تؤثر في أكثر من مسار حيوي ومنها الفينولات الطبيعية والتي تعتبر عوامل دفاع طبيعية نشطة ضد انواع مختلفة من الجهاد والتي تنتج عن الاصابات المرضية او الطقس او الجروح.

ت- توجد الفينولات في الفجوة العصارية لذلك يحدث التلون البني او الاسمرار عند حدوث فقد في التنظيم الخلوي كنتيجة لحدوث الجروح.

أما لغرض التخلص من هذه الظاهرة فيعمد الى :

1- لا بد ان يتم تحضين المزارع في درجة حرارة 28 درجة مئوية مع الظلام التام في المراحل الاولى من الزراعة وحتى ظهور الأجنة الجسدية وتنقل النباتات للتحضين في ظروف الأضاءة بعد انبات الأجنة. ان ارتفاع درجة الحرارة وزيادة شدة الأضاءة يؤديان الى ظهور هذه الظاهرة وكذك تؤدي الى تراكم المواد السامة الناتجة من أكسدة الفينولات داخل البيئة الغذائية.

2- نقع القطع النسيجية في مزيج من حامض الستريك والاسكوربيك اثناء اعدادها وتعقيمها داخل كابينة الزرع . استخدام تراكيز عالية من المواد المعقمة تعمل على زيادة الافرازات الفينولية.

3- اضافة الفحم المنشط الى الوسط الغذائي الى الوسط الغذائي اذ يعمل على ادمصاص المركبات الفينولية وتقليل ظاهرة التلون البني وينصح في هذه الحالة اضافة تراكيز عالية من الهرمونات وذلك بسبب ادمصاص جزء منها على سطح الفحم المنشط.

4- استخدام مواد اخرى تحد من هذه الظاهرة مثل Polyvenyl pyrrolidone.

3- ظاهرة التزجج (Vitrification(Hyperhydricity)

تعد هذه الظاهرة من من اخطر المشاكل الفسيولوجية التي تصيب النباتات في مراحل الأكثر داخل مختبرات الزراعة النسيجية والتي تؤدي الى اضعاف النباتات وفقدان قدرتها على التضاعف والتجذير فتبدو فيها الاوراق والسيقان بمظهر باهت وشفاف

اضافة الى انتفاخها وتصبح سهلة الكسر وينتج عنها:

أ- استطالة انسجة النبات بالاضافة الى شحوبها

ب- زيادة المحتوى المائي للانسجة

ت- نقص الكلورفيل

ث- نقص القوة الميكانيكية لانسجة النباتات الناتجة

وكل هذه الاعراض تؤدي الى:

ضعف عملية تكوين نباتات طبيعية ناضجة من خلال هذا التكنيك



الاثر الفسيولوجي لهذه الظاهرة:

قلة نسبة المواد الكربوهيدراتية/المواد النيتروجينية (C/N Ratio) وقلة السكريز يؤدي بالتالي الى قلة السيللوز واللكتين مما يؤدي الى نقص الضغط الجذري ثم امتصاص الماء بمعدل اعلى وزيادة في الفجوة العصارية ومع نقص السكريات وقلة الطاقة يقل انتقال الذائبات لداخل الخلية ومن بين هذه الذائبات .K+Ca

العلاج

- 1- زيادة مستويات الكربوهيدرات في البيئة الغذائية وخفض تركيز الأمونيوم والسايوتوكاينين.
- 2- تغيير شدة الأضاءة
- 3- تعديل تركيزات المواد المصلبة للوسط الغذائي.

4- التباين الوراثي Genetic variation

من اهم المشكلات التي تعيق بعض طرق الأكتثار الخضري معمليا هو امكانية تباينات وراثية التي تنقسم الى تغييرات وراثية وأخرى غير وراثية .
التغيرات الوراثية Genetic معناها حدوث طفرة وراثية في عدد الكروموسومات سواء بالزيادة او النقصان او حدوث تغييرات نباتية في الكروموسومات.
التغيرات الغير وراثية Epigenetic وهذا النوع من التغيرات غير ضاره لانه بمجرد خروج النبات من ظروف الاجهاد داخل المختبر يعاود النبات نموه الطبيعي.
اسباب التغيرات الوراثية:

- 1- طول فترة الزراعة داخل المختبر
- 2- التعرض لمنظمات النمو ومنها الأوكسينات وخاصة الـ 2,4-D والذي يحفز النمو الغير منتظم أثناء تكوين وتضاعف الكالس الجنيني وهو مايعرف بتدهور الكالس.
ويقصد بتدهور الكالس هو تهشم الطبقة الخارجية للكالس وتحوله من الشكل الحبيبي الى الشكل الرخو وياخذ اللون المسمر ويصاب بمرض الشفافية وقد وجد ان هناك علاقة بين تغيير التركيب الوراثي وقدرة الكالس على اعطاء النباتات ويمكن ان يكون ذلك بسبب عوامل غذائية او هرمونية نتيجة استنفادها من البيئة.
ويمكن التأكد من الثبات الوراثي عن طريق التحليل الأنزيمي بتقنية الهجرة الكهربائية وذلك للتأكد من من التركيب الكيمياوي للنسيج الناتج من الزراعات ومقارنته مع النسيج الأم حيث انه معروف انه في حالة اعطاء تراكيب وراثية مشابهه للاحماض النووية او الأنزيمات بين النبات الأم والنباتات الناتجة بواسطة الزراعة النسيجية وهو مايعطي دلالة واضحة على ثبات التركيب الوراثي.

5- التجذير والأقلمه Rooting and Acclimatization

ان الهدف الاساسي لتطبيق تكنيك الزراعة النسيجية هو الحصول على نباتات كاملة مكونه من افرع خضرية محتوية على جذور وهذا يحدث من خلال بروتوكول يتم اجرائه على خطوتين او ثلاث :

أ- الخطوه الأولى :يتم اضافة تراكيز عالية من الأوكسين الى البيئة الغذائية بحدود 1 ملغم/لتر من NAA.

ب- الخطوه الثانية: يتم استخدام تراكيز منخفضة من الأوكسين 0,1 ملغم /لتر من NAA الى البيئة الغذائية .

اما فيما يخص عملية الأقلمه والتي معناها نقل النباتات للبيئة الخارجية فنجد حدوث بعض المشكلات التي تؤثر على على نجاح نقل النباتات الى البيئة الخارجية فنجد حدوث بعض المشكلات التي تؤثر على نجاح نقل النباتات الصغيرة الى الحياة الطبيعية مثل التلوث والجفاف.

ويمكن التغلب على مشكلة التلوث بتعقيم مخلوط التربة المستخدمة في الزراعة ومعاملة النباتات بعد غسلها من الأكر بمبيد فطري ويرجع حدوث الجفاف الى:

- 1- نقص سمك طبقة الكيوتكل على الأوراق
 - 2- بطيء تكيف الثغور مع البيئة لأنها تكون مفتوحة بصورة مستمرة مما يؤدي الى زيادة النتج.
 - 3- ضعف الأتصال الوعائي بين الجذور المتكونة حديثا والمجموع الخضري .
- لذا يتم رفع الرطوبة النسبية حول النباتات حتى تتأقلم وتنمو في الظروف الجديدة وذلك بتغطيتها بأغطية بلاستيكية داخل البيت البلاستيكي مع المحافظة على التهوية.

التهجين الجسمي Somatic Hybridization

يتم الاستفادة من التهجين في تضمين العديد من الصفات المرغوبه في التركيب الوراثي للمحاصيل الزراعية ولكن يوجد الكثير من المححدات التي تقف عائقا او حاجزا عن هذا النوع من التهجين اهمها حاجز النوع النباتي . ولكن بتطور تقانات الزراعة النسيجية تم التوصل الى طريقة أخرى تسمى عملية التهجين الجسمي Somatic Hybridization او يسمى بـ Parasexual hybridization يتم من خلالها الحصول على البروتوبلاست الذي يمكن ان نعرفه بانه خلية نباتية عارية(بدون جدار خلوي) وقد تم ازالة جدارها الخلوي اما بطريقة ميكانيكية او باستخدام الأنزيمات الهاضمة للجدار الخلوي. ثم يتم توجيه عملية الاندماج الجسمي بين البروتوبلاست الابوي اي تتم عملية التزاوج الجسمي وليس الجنسي. وبسبب عدم وجود الجدار الخلوي فمن الممكن ان تقترب بروتوبلاست من اخر وتحت ظروف معينة يبقى غشائهما ملاصق للاخر ثم يعقبها عملية الاندماج البروتوبلاستي. وتحت عملية الاندماج البروتوبلاستي اما تلقائيا Spontaneous او بوساطة المؤثرات الخارجية Induced. وتعد عملية الاندماج البروتوبلاستي او التهجين الجسمي من اهم التطبيقات المستخدمة في مجال تربية وتحسين النبات وبالاخص المحاصيل التي لاتنتج بذورا مثل نبات الموز او البطاطا . ويعتبر العالم Cocking اول من وضع الاسس لهذه التقانة في سنة 1972.

طرائق تحفيز الاندماج البروتوبلاستس

1- اولا الدمج الطبيعي (التلقائي) Spontaneous fusion

ويحدث هذا الاندماج بين بروتوبلاستين بصوره طبيعىة دون الحاجة الى محفزات خارجية الا ان نسبة نجاح ذلك قليلية جدا.

2- الاندماج المحفز

وهو الاندماج البروتوبلاستي الذي يحتاج الى محفزات لحدوث هذا الاندماج وهناك طريقتين لتحفيز هذا الاندماج هما: