نبذة تاريخية على زراعة الأنسجة :

1. في عام 1839 أثبت كل من Schleiden and Schwann بأن الخلية هي وحدة البناء الأساسية للكائنات الحية .
2. كما أوضحوا أن الخلية هذه لها القدرة الذاتية على النمو اذا ما توفرت لها البيئة الملائمة لتعطي نبات كامل .
3. وفي عام 1902 وضح العالم الفسيولوجي الالماني Gottlieb Haberlandt فكرة زراعة الخلايا خارج الجسم الحي *In vitro* cell culture .
4. كذلك تمكن العالم أعلاه من من عزل خلايا مفردة كاملة التمايز Single fully differentiated من أنواع مختلفة من النباتات مثل الخلايا العمادية Palisade cells من أوراق نبات *Laminum purpureum* ومن الشعيرات الغدية Glandular hairs من نبات *Plumonaria* والخلايا النخاعية من سويقات الأوراق Petioles لنبات *Eicchornia crassiples* ، وزرعها في محلول ملحي محضر من قبل Knop (Knop's salt) مدعم بسكر الكلوكوز (Glucose) . أدت هذه الزراعة إلى زيادة حجم الخلايا وتراكم النشأ فيها ولكنها فشلت في تحفيزها على الانقسام . وبالتالي هذه التجربة أخفقت فكرة العالم Haberlandt حول امكانية الخلايا النباتية المزروعة على النمو والتطور والانقسام ومن ثم تكوين أجنة جسمية التي تكون نباتات كاملة عند نموها وانباتها . وهذا ما يطلق على الخلايا النباتية مصطلح القدرة الخلوية الكامنة Totipotency وهي قدرة الخلية النباتية المفردة على انتاج نبات كامل لكون الخلية النباتية المفردة تحمل جميع المعلومات الوراثية التي تؤدي الى انتاج نبات كامل . وأطلق مصطلح الـ Totipotency هذا من قبل العالم Steward عام 1968 .
5. بالرغم من فشل تنبوءات العالم Haberlandt حول امكانية الخلية النباتية المزروعة أن تنمو وتتطور وتنقسم ، أعتبر هذا الباحث هو مؤسس (الأب) الزراعة النسيجية Father of tissue culture .
6. في عام 1904 أستطاع العالم Hannig من زراعة الأنسجة الجنينية من خلال زراعة أجنة بذور ناضجة تعود للأنواع مختلفة من العائلة الصليبية ونجح في انماءها من خلال زراعتها محلول مكون من مجموعة من الاملاح المعدنية والسكروز .
7. تمكن في 1908 العالم Simon من استحثاث الكالس وتكوين الجذور والبراعم من زراعة القطع الساقية Stem segments لنبات *Poplar* .

8. خلال 30 عاما تقريبا أي حتى عام 1934 أجريت كثير من الدراسات حول زراعة الخلايا المرستيمية (الانشائية) لخلايا قمم الجذور والسيقان مثلا خارج الجسم الحي كما في دراسة Kolte (1922) و Robbins (1922) .
9. كل محاولات الابحاث والدراسات التي أجريت على زراعة الخلايا المعزولة لقمم الجذور والسيقان خلال تلك الفترة أدت الى نمو وتطور الكالس . وكان هنالك هدفان من هذه الدراسات أولهما هو الحصول على الكالس ومضاعفة كميته والهدف الثاني هو حث الكالس الناتج على توالد الأعضاء ومن ثم تكوين نباتات كاملة Whole plants .
10. بعد اكتشاف فيتامين ب (Pyridoxine) والاوكسينات الطبيعية Natural auxins الضرورية في النمو للانسجة المرستيمية المعزولة والمزروعة خارج الجسم الحي ، تحققت قفزة سريعة في أبحاث زراعة الأنسجة النباتية .
11. أوضح العالم White (1934) من خلال أبحاثه على زراعة أطراف جذور الطماطة ، لايمكنها النمو والتطور الا اذا تم تكرار اعادة زراعتها في اوساط غذائية جديدة Fresh medium مكونة من أملاح غير عضوية Inorganic salts مع خلاصة الخميرة Yeast extract . وفي عام 1937 أضاف الى ذلك الوسط الغذائي فيتامين B والثايمين وبرهن على دورها المهم في تشجيع النمو .
12. يعد العالم Fritz Went هو أول من أكتشف المجموعة من الأولى من منظمات النمو النباتية ، عن طريق اكتشافه لمنظم النمو IAA (Indole acetic acid) وهو هرمون طبيعي يقع ضمن المجموعة الأولى من منظمات النمو والتي يطلق عليها بالاوكسينات Auxins .
13. كما أن الباحثان Roger and Gautheret (1934) نجحا في انتاج الكالس من زراعة خلايا النسيج المولد Cambium cells لعدة أنواع من الأشجار . وقد بينا بأن الاوكسين قد زاد من اخلاف هذه الزروعات .
14. في عام 1937 نجح الباحث Nobecourt بانتاج الكالس من زراعة شرائح جذور نبات الجزر .
15. حصل White (1939) على نتائج مماثلة الأنسجة المتورمة (المنتفخة) لهجين نبات التبغ .
16. من خلال دراسة الباحث Johnes Van Overbeek (1941) على أنسجة نباتية شبيهة بالاجنة تم زراعتها على أوساط غذائية تحتوي على حليب جوز الهند بالاضافة الى الاملاح غير العضوية والفيتامينات والمغذيات ، وجد امكانية الحصول على بادرات كاملة .
17. تمكن Ernest Ball (1946) من زراعة جزء من مرستيم الفرع الخضري Part of shoot meristem على ذلك الوسط والحصول على نبات كامل .

18. بعد عام 1950 قاد الباحثين الى الاستنتاج بأن الوسط الغذائي المزود بحليب جوز الهند بالاضافة الى الاوكسين بأنه من المواد الضرورية في الوسط الغذائي المستخدم الى انتاج الكالس من نبات التبغ وهو لا ينتمي الى مجموعة الاوكسينات بل ينتمي الى مجموعة اخرى .
19. لقد وجد الباحثان Skoog and Tsui (1957) من خلال دراستهم خارج الجسم الحي امكانية استحثاث انقسام الخلايا وتكوين البراعم العرضية من زراعة اجزاء نباتية من التبغ في وسط غذائي مزود بالادنين Adenine . وهذا قاد الباحثان Skoog and Miller (1955) الى عزل الكاينتين Kinetin (6-furyl amino purine) المشتق من مركب الأدنين وهو أكثر المركبات تشجيعا لتكوين البراعم . وهو ينتمي الى مجموعة السايتوكانينات Cytokinins وهي تعمل على تحفيز انقسام الخلايا Cell division وتمايز الأنسجة Differentiated tissues . وعملا الباحثان Skoog and Miller(1957) بجد من أجل توالد الأعضاء . وبينت دراساتهم على زراعة نخاع نبات التبغ خارج الجسم الحي ان التركيز العالي من الاوكسينات يشجع التجذير Rooting والتراكيز العالية من الكاينتين يحفز تكوين البراعم العرضية والأفرع .
20. وفي عام 1962 حضر Murashige and Skoog وسط غذائي متكامل من الاملاح غير العضوية والتي زادت تراكيزها فيه حوالي 25 مرة ضعف الوسط الغذائي المعد من قبل Knop . وهذا الوسط الغذائي يطلق عليه MS وليومنا هذا يستخدم هذا الوسط الغذائي في زراعة الانسجة النباتية .
21. وجد Muir (1953-1954) امكانية تجزئة الكالس الى خلايا مفردة من خلال زراعته في وسط غذائي سائل (Liquid medium) مع تحريكه باستمرار بواسطة جهاز هزاز Shaker .
22. وفي عام 1960 أستطاع العالم Bergmann تنمية الخلايا المفردة بطريقة الزراعة المعلقة Filtering suspension culture ويمكن استعمال هذه الطريقة في تنمية البروتوبلاست المفرد .
23. تمكن الباحثان Vasil and Hilderbrandt ولأول مرة من انتاج نبيتات من خلايا مفردة معزولة من هجين التبغ .
24. وفي عام 1966 تمكن العالم Steward من استحثاث الأجنة الجسمية من زراعة خلايا مفردة حرة من زروعات معلق الجزر Carrot suspension cultures .
25. هذه التقنية (الزراعة النسيجية) مكنت من الاكثار السريع Rapid propagation للنبات من خلال زراعة كمية قليلة من الانسجة النباتية والحصول على الاف النباتات . وقد أستعمل الباحث هذه التقنية من الاكثار السريع في اكثار نباتي الاوركيد والداليا . ويعد هو أول عالم حصل على نباتي الاوركيد والداليا خالية من الفايروسات عند اكثارها بتقنية الاكثار الدقيق .

26.أن أول من أدخل الهندسة الوراثية في زراعة الانسجة النباتية هما Kanta and Maheshwari(1962) من خلال اجراء عملية الاخصاب داخل أنابيب الزراعة عن طريق زراعة البويضات Ovules وحبوب اللقاح Pollen grains في نفس الوسط الغذائي لغرض التغلب على ظاهرة عدم التوافق بينهما Incompatibility .

27.في عام 1966 تمكن الباحثان Guha and Maheshwari من زراعة الاسدية Anthers لنبات الداتورا والتي نمت وتطورت الى اجنة أدت الى انتاج نباتات احادية المجموعة الكروموسومية Haploid plants .

28.وفي عام 1960 تمكن الباحث Edward Cocking من عزل وانتاج البروتوبلاست عن طريق ازالة الجدار الخلوي للخلية Cell wall بطريقة الهضم الانزيمي للجدار الخلوي .

29.وتمكن Carlson (1972) من دمج البروتوبلاست العائد لنوعين من نبات التبغ والحصول على جنين جسمي هجين Somatic hybrid لنبات التبغ .

المحاضرة الثانية :

زراعة الخلايا والأنسجة النباتية Plant cells and tissues culture

يقصد بها أستعمال خلايا أو نسيج من أعضاء Organs نباتية للحصول على نباتات جديدة وبأعداد كبيرة في زمن أقل من ذلك الزمن الذي تستغرقه وسائل الإكثار التقليدية . حيث يتم زراعة هذه الخلايا أو الأنسجة النباتية على بيئة غذائية تحتوي تركيزات متوازنة من العناصر المعدنية (الكبرى والصغرى) ، والسكروز (كمصدر للكاربون) ، وبعض منظمات النمو والفيتامينات ، مع توفير جميع الظروف البيئية الملائمة (ضوء وحرارة ورطوبة وغيرها) ، وتتم عملية الزراعة في أوعية زجاجية وأحيانا بلاستيكية ، على أن تجرى جميع خطوات العمل تحت ظروف معقمة تماماً .

مميزات تقنية زراعة الخلايا ولأنسجة النباتية :

تنفرد هذه التقنية بالعديد من الميزات بالمقارنة مع طرق الإكثار الأخرى بما يلي :

1. صغر حجم الجزء النباتي المستخدم في الإكثار .
2. إمكانية تهيئة جميع الظروف البيئية المثلى التي تحتاجها النباتات للنمو على مدار العام .
3. يتم في حيز مكاني صغير نسبياً يمكن التحكم فيه .
4. يتم تحت ظروف معقمة تماماً وبعيدة عن كل مصادر التلوث .
5. يتم بعيداً عن جميع الكائنات الحية الضارة من بكتريا أو فطريات أو حشرات أو فيروسات .
6. تجنب التدهور الذي يصيب النباتات عند إكثارها خضرياً .
7. إمكانية نقل وحدات الإكثار للمناطق البعيدة .
8. إمكانية وسهولة إكثار بعض النباتات صعبة الإكثار بالطرق التقليدية .

بعض التطبيقات العلمية والعملية لتقنية زراعة الخلايا والأنسجة النباتية :

1. الإكثار السريع للأصناف الجديدة أو ذات المواصفات الخاصة : تستعمل تقنية زراعة الخلايا والأنسجة النباتية كوسيلة سريعة لإكثار الأصناف الجديدة والنباتات التي تستغرق وقتاً طويلاً عند إكثارها بالطرق التقليدية.
2. إنتاج نباتات خالية من الفايروس Virus-free plants : هناك كثير من النباتات تصاب بالأمراض الفايروسية ، وقد تمكنت هذه التقنية بنجاح في انتاج نباتات خالية من الفايروس من خلال زراعة القمم المرستيمية Apical meristems اذ أن الفايروسات تنتقل بصعوبة وبطء الى قمم النباتات وهي بالتالي غالباً ما تكون خالية من الفايروسات خاصة عندما تستأصل بأحجام مايكروسكوبية تتراوح من 0.2–0.5 ملم ثم زراعتها ومضاعفتها للحصول على نباتات كاملة منها .
3. انتاج نباتات بنصف العدد الكروموسومي (Haploid plants) : تعتبر هذه التقنية مهمة جداً في مجال تربية وتحسين النبات . وتتم هذه الطريقة بزراعة المتوك وحبوب اللقاح Anthers)

(Pollen grains culture and) وبالتالي الحصول على نباتات تحمل نصف العدد الكروموسومي الذي يتم مضاعفته بعدة طرق للحصول على نباتات نقية True to type plants بنسبة 100% من حيث الصفات الوراثية لنبات الأم (Homozygous) .

4. الحصول على تغيرات وراثية مرغوبة : مثل انتاج سلالات ممتازة مقاومة للظروف البيئية غير الملائمة مثل الملوحة أو الجفاف أو مقاومة للإصابة بالأمراض .
5. دراسة الهندسة الوراثية وطرق التلاعب بالجينات للحصول على نباتات جديدة تحمل صفات مرغوبة.
6. إنتاج بعض المواد الكيميائية الطبية والمواد الطبيعية الفعالة : اذ تستعمل هذه التقنية في انتاج بعض المكونات الثانوية في النباتات مثل القلويدات والاستيرويدات والجليكوسيدات التي تستعمل لأغراض طبية .

مصطلحات خاصة بتقنية زراعة الخلايا والأنسجة النباتية Plant cells and tissues culture terminology :

1. *In vitro* : وهي كلمة لاتينية يقصد بها التجارب العملية التي تجرى على الأعضاء النباتية في الأوعية الزجاجية تحت ظروف صناعية (Artificial conditions) لزراعة الخلايا والأنسجة النباتية .
2. *In vivo* : وهي كلمة لاتينية يقصد بها التجارب العملية التي تجرى على الأعضاء النباتية وهي ما زالت مرتبطة بأجزاء النبات الأخرى (مرتبطة بالنبات الأم) وذلك تحت الظروف الطبيعية .
3. Excise: هو عزل أو فصل أنسجة أو أعضاء أو قطاعات الأنسجة من النبات الأم كأجزاء نباتية للزراعة ، مثل عزل القمة النامية تحت المايكروسكوب وزراعتها في أوعية زجاجية (*In vitro*) تحت ظروف يمكن التحكم فيها.
4. Explant : هو عبارة عن النسيج أو الجزء النباتي الذي تم فصله من النبات الأم (يطلق عليه أيضاً المنفصل النباتي) لاستعماله في الزراعة من خلال تقنية زراعة الخلايا والأنسجة النباتية ، ويشمل هذا الجزء النباتي كل من أطراف الأفرع الخضرية Shoot tips وأطراف الجذور Root tips ومباديء الأوراق Leaf primordial ومباديء الأزهار Flower primordial والأجنة Embryos والبروتوبلاست Protoplast وغيرها .
5. Shoot apex or Shoot tip: هي عبارة عن طرف الفرع أو القمة الرمية أو قبية الشكل (Meristematic dome) بالأضافة الى مباديء الأوراق والأوراق المتكشفة (Emerging leaves) وبعض من خلايا استطالة الساق . ويجب عدم الخلط بين هذا المصطلح ومصطلح Meristem tip حيث أن الثاني يكون أصغر حجماً ويحتوي على القمة المرستيمية فقط .

6. Meristem: هو منطقة النمو والانقسام وتكوين وبناء البروتوبلاست ومنشأ الأنسجة الجديدة في النباتات وعادة تكون الخلايا المرستيمية خلايا غير متمايزة Undifferentiated cells ومنها تتكون الأنسجة المتخصصة وظيفيا أو فسيولوجياً . وتوجد المرستيمات في القمم النامية للأفرع الخضرية أو في قمم الجذور أو في آباط الأوراق وخلايا الكمبيوم الحزمي وأماكن النمو الأخرى مثل الأوراق الحديثة .
7. Meristemaid : هي كتلة أو خلايا عنقودية من خلايا مرستيمية لها قدرة على النمو والتطور ، وتحتوي على سايتوبلازم كثيف مع عديد من الفجوات العصارية .
8. Bud : هو عبارة عن البرعم الخضري أو الزهري وهو ما زال في حالة نشوء ولم يتكشف بعد ، وعادة يكون مغلف بعدة أوراق حرشفية تسمى Bud scale .
9. Axillary bud : هو عبارة عن برعم ينمو منه فرع خضري أبطي (يخرج من آباط الأوراق) ويتكون من خلايا مرستيمية ، وباستعمال بعض منظمات النمو النباتية التي تعمل على تثبيط السيادة القمية وتشجيع نمو الأفرع الجانبية Lateral shoots .
10. Callus – Calli – calluses : هي عبارة عن خلايا غير متمايزة (غير متكشفة) تتكون على الأجزاء المجروحة (المقطوعة) للأجزاء النباتية Explants وهي عبارة عن خلايا برنكيمية تختلف في درجة تلجننها وعادة لا يوجد بينها الصفيحة الوسطى (الطبقة اللاحمة) Middle lamella .
11. Embryogenesis : توالد الأجنة الجسمية وهي عملية تكوين الأجنة بطريقة لا جنسية ، وعادة تنمو الأجنة اللاجنسية مباشرة على الجزء النباتي بطريقة Direct embryogenesis method أو بطريقة غير مباشرة من الكالس وتدعى Indirect embryogenesis method .
12. Somatic hybrid : الهجين الجسمي (الجسدي) الناتج من دمج الخلايا أو البروتوبلاست لتكوين تركيب وراثي جديد .
13. Initiation : هو أو تغير ميكروسكوبي مرئي لتمايز الخلايا وتطورها إلى أعضاء .
14. Sub-culture : هي عملية اعادة الزراعة وتتم بنقل الخلايا أو الأنسجة أو الأعضاء المتكونة من البيئة الغذائية (الوسط الغذائي) التي كانت تنمو عليها الى بيئة جديدة وذلك بعد مرور مدة زمنية معينة وفي الغالب تكون البيئة الجديدة ذات تركيب مختلف في واحد أو أكثر من مكوناتها من أجل الحصول على شكل مورفولوجي معين جديد أو تطور للأعضاء . ويجب ان يميز هذا المصطلح عن مصطلح Re-culture ، اذ أن المصطلح الثاني يقصد به عند نقل الأنسجة أو الأعضاء الى بيئة زراعة غذائية جديدة لها نفس تركيب مكونات الوسط الغذائي السابق بغرض المحافظة على النسيج نتيجة لجفاف الوسط الغذائي السابق أو تغير درجة حموضته أو عدم صلاحيته نتيجة لاستنزاف المواد الغذائية الموجودة فيه ، ولكنها ستظل في نفس المرحلة من التطور .

15. Aseptic : يقصد به خلو الزروعات من الكائنات التي تسبب الأمراض والتلوث بالفطريات والبكتريا والفيروسات وغيرها ، أي خلو البيئة الغذائية من الكائنات الدقيقة وهو متطلب أساسي وضروري لضمان نجاح زراعة الخلايا والأنسجة النباتية .
16. Adventitious : هي أعضاء نباتية (براعم ، نموات خضرية ، جذور .. وغيرها) نتجت بطريقة عرضية في مكان غير طبيعي ، مثل تكوين النموات الخضرية على نسيج الكالس ، أو تكوين الأجنة العرضية من الكالس بدون مبيض أو بدون عمليات تلقيح وإخصاب .
17. Acclimatization : يشير هذا المصطلح الى عملية الأقلمة ويقصد بها تهيئة النباتات الناتجة من الزراعة معملياً *In vitro* لمواجهة التغيرات البيئية الخارجية . وفي هذه العملية يتم نقل النباتات من أوعية الزراعة الزجاجية الى أوعية بلاستيكية تحتوي على خليط من أوساط الزراعة (بيئات النمو) مثل البيت موس والبيرليت والفيرميوكيولايت والرمل ونشارة الخشب وغيرها .

أنواع مزارع الخلايا والأنسجة النباتية :

يمكن تقسيم المزارع الى أنواع مختلفة وفقاً للمادة النباتية المزروعة وكما يلي :

1. زراعة النبات Plant culture : ويقصد بها زراعة البادرات والنباتات الكاملة .
2. زراعة الأعضاء النباتية Organs culture : عبارة عن زراعة أعضاء نباتية يتم فصلها من النبات الام وتشمل أطراف الأفرع والجذور ومباديء الأوراق ومباديء الأزهار ومباديء الأجزاء الزهرية غير مكتملة النمو والثمار غير مكتملة النمو . وأهم ما يميز زراعة الأعضاء النباتية المختلفة هو احتفاظها بصفاتها النباتية واستمرارها بالنمو بنفس الوضع كما لو كانت متصلة بالنبات الأم .
3. زراعة الكالس Callus culture : زراعة الخلايا غير المتكشفة والتي تكونت على الأجزاء المجروحة والمقطوعة للأجزاء النباتية . وتنمى أنسجة الكالس (كتل خلايا الكالس) على بيئات صلبة . ويتوقف مكان ظهور الكالس على نوع العضو النباتي المستخدم في الزراعة فقد يتكون نسيج الكالس من الكامبيوم أو القشرة أو النخاع أو اللحاء الثانوي أو حتى من برنكيما الخشب . تتراوح المدة اللازمة لنمو نسيج الكالس من 3–8 أسابيع تصل كميته من 50 الى 100 ملغم . ويمكن مضاعفة هذه الكمية من خلال اعادة زراعتها في وسط غذائي جديد .
4. زراعة الأجنة Embryo culture : في هذه الحالة يتم زراعة الأجنة المفصولة (المعزولة) سواء كانت أجنة مكتملة أو غير مكتملة النمو .
5. زراعة الخلايا المعلقة (المزارع السائلة) Suspension culture : يقصد بها زراعة الخلايا سواء كانت منفردة أو على هيئة تجمعات خلوية صغيرة في وسط غذائي سائل . وهذا النوع من المزارع تختفي فيه الخصائص المميزة وسلوك النمو الذي يحدث في النبات الأم .

6. زراعة البروتوبلاست Protoplast culture : يقصد بها زراعة الخلايا المنزوعة الجدران الخلوية.
7. زراعة المتوك وحبوب اللقاح Anthers and pollen grains culture : ويقصد بها زراعة المتوك كاملة وبداخلها حبوب اللقاح أو زراعة حبوب اللقاح فقط وهي طريقة مهمة جداً في برامج تربية النبات.
8. زراعة البويضة Ovule culture : ويتم زراعة البويضات المفصولة .

المحاضرة الثالثة : زراعة الخلايا والأنسجة النباتية :

مراحل زراعة الخلايا والأنسجة النباتية :

قسم العالم (1974) Murashige مراحل أو أطوار الإكثار باستعمال تقانة زراعة الخلايا والأنسجة النباتية إلى ثلاث مراحل هي :

1. مرحلة الحصول على مزرعة نسيجية معقمة خالية من التلوث.
2. مرحلة انقسام وتضاعف النسيج النباتي.
3. مرحلة تكوين الجذور (التجذير) وأقلمة النباتات الجديدة الناتجة من زراعة الأنسجة.

وفي السنوات الاخيرة حدثت قفزة كبيرة في اكثار النباتات باستعمال هذه التقانة ، فقد اتفق العلماء والباحثين على اضافة مرحلتين جديدة الى المراحل الثلاثة السابقة التي وضعها Murashige والتي أصبحت كما يلي :

1. مرحلة اختيار واعداد النبات الأم : Selection and preparation of stock plants : من الضروري انتخاب نباتات الأم وبالمواصفات التالية :
   أ. يجب ان تكون سليمة وخالية من الأمراض والاصابات الحشرية .
   ب. يجب ان يكون نوع او صنف النبات المراد اكثاره (النبات الأم) مرغوبا ويحمل مواصفات جيدة .
   ت. يجب ان يكون نمو نبات الأم نشط .
   ث. يجب ان يكون النبات الأم متحمل وملائم للزراعة في ظروف المنطقة المراد اكثاره وزراعته بها .
   ج. تحديد البصمة الوراثية لنبات الأم ومطابقتها فيما بعد بالبصمة الوراثية للنباتات الجديدة الناتجة من زراعة الخلايا والأنسجة النباتية .
   ح. معرفة أفضل موعد لأخذ الأجزاء النباتية من نبات الأم .
2. مرحلة الحصول على مزرعة نسيجية معقمة خالية من التلوث : Establishment of aseptic culture : تعتمد نسبة نجاح زروعات الخلايا والانسجة بالدرجة الاساس على أسلوب الزراعة والنوع النباتي المستعمل وعلى كفاءة التخلص من الملوثات السطحية Surface contaminants الموجودة على الجزء النباتي المراد زراعته . والهدف الرئيس من هذه المرحلة هو الحصول على مزرعة نسيجية تحتوي على الجزء النباتي المفصول من النبات الأم بحالة معقمة وخالي من اي ملوثات مرضية . وتتضمن هذه المرحلة :
   أ. عملية تجهيز وفصل الجزء النباتي من النبات الأم .
   ب. تعقيم الجزء النباتي المستعمل والادوات المستعملة للزراعة والوسط الغذائي. للقضاء على جميع الكائنات الحية الدقيقة وكل انواع التلوث .

طريقة تعقيم الجزء النباتي المستعمل في الاكثار :

تتم عملية التعقيم للجزء النباتي حسب الخطوات التالية :

أ. غسل الجزء النباتي بماء الحنفية الجاري لمدة 1–2 ساعة لغرض التخلص من الاتربة والغبار العالق على سطوح الخارجية للاجزاء النباتية أولاً ولتقليل كثافة الأحياء الدقيقة الموجودة على السطح الخارجي للجزء النباتي ثانياً .

ب. غمر الجزء النباتي في محلول التعقيم للقضاء على ما تبقى من الاحياء الدقيقة العالقة على سطحه الخارجي . ويتم ذلك أما بغمر الاجزاء المفصولة في الكحول الاثيلي بتركيز 70% لمدة خمس دقائق ، ويجب الا تزيد عن ذلك حتى لا تؤدي الى نزع الماء من الخلايا وجفافها Dehydration الذي يؤثر على طبيعة نمو الجزء النباتي على الوسط الغذائي . ثم يتم غمره بعد ذلك في محلول هايبوكورات الصوديوم NaOCl بتركيز 1% لمدة 5–30 دقيقة حسب درجة حساسية الأنسجة . يفضل اضافة 3–5 قطرات من المادة الناشرة Tween20 لتقليل الشد السطحي (التوتر السطحي) للجزء النباتي المراد تعقيمه لغرض زيادة فعالية وكفاءة مادة التعقيم من خلال ضمان وصول وتبلل جميع السطوح الخارجية بمحلول التعقيم . يمكن استعمال محلول القاصر التجاري Clorax بتركيز 10–50% لمدة 10–20 دقيقة للتعقيم السطحي للاجزاء النباتية .

ج. غسل الجزء النباتي بماء مقطر معقم عدة مرات لازالة ما تبقى من المادة المعقمة على السطح الخارجي الجزء . بعد ذلك يتم استبعاد الاجزاء النباتية المعقمة والمتضررة من مادة التعقيم .

تعتمد كفاءة تعقيم الجزء النباتي على العوامل التالية :

أ. طبيعة نبات الام الذي يؤخذ منه الجزء النباتي .

ب. مصدر الجزء النباتي المزروع (ورقة ، جذر ، قطعة من الساق ، زهرة ..الخ).

ت. نوع وكفاءة المادة المعقمة .

ث. مدة التعقيم .

ج. تركيز محلول المادة المعقمة .

ويوضح الجدول التالي بعض المواد المستعملة في تعقيم الأنسجة النباتية :

ت	أسم المادة	التركيز (%)	مدة التعقيم (دقيقة)	التأثير
1	**Calcium hypochlorite**	10-9	30-5	جيد جدا
2	**Sodium hypochlorite**	2	30-5	جيد جدا
3	**Hydrogen peroxide**	12-10	15-5	جيد
4	**Bromine water**	2-1	10-2	جيد جدا
5	**Ethyl alcohol**	95-80	1-1/3	جيد جدا
6	**Silver nitrate**	1	30-5	جيد
7	**Mercuric chloride**	1-0.1	10-2	مقبول
8	**Antibiotics**	5-4	60-30	جيد

ملاحظة : يجب مراعاة الحذر الشديد عند استخدام كلوريد الزئبق حيث يعتبر من المواد المحظورة والسامة .

هناك بعض الاجزاء النباتية ملوثة داخليا مما يجعل عملية التعقيم السطحي لها غير كافية وللتغلب على هذه المشكلة يتم اضافة مادة Benomyl أو Benolate بتركيز واحد ملغم/لتر الى الوسط الغذائي حيث تعمل هذه المواد على الحد من نشاط وفاعلية الفطريات المسببة للتلوث لكنها قد تسبب بطء نمو الاجزاء النباتية . ومن الطرق الاخرى للقضاء على التلوث الداخلي هي اضافة بعض المضادات الحيوية Antibiotics الى الوسط الغذائي المعد للزراعة النسيجية لمنع نمو البكتيريا . وللمضادت الحيوية ضرر جانبي هو تأثيرها على نمو الاجزاء النباتية وخاصة المضادات التي تؤثر على الرايبوسوم Ribosome .

ملاحظة : يجب تعقيم المضادات الحيوية من خلال مرشحات التعقيم الدقيقة Sterilization micro-filters قبل اضافتها الى الوسط الغذائي المعقم وذلك لان الحرارة العالية لجهاز المؤصدة (المعقام) Autoclave تسبب تلف المضادت الحيوية .

التلون البني Browning :

قد يسبب تعقيم الاجزاء النباتية التلون البني لانسجتها وغالبا ما يحدث عند زراعة الاجزاء النباتية المفصولة من نبات الام بعد عدة ايام من الزراعة . يعمل هذا التلون البني على تثبيط النمو وموت الانسجة بعد ذلك . ويظهر هذا التلون في الانسجة التي تحتوي على مستويات عالية من التانينات Tanins او هيدروكسيد الفينولات Hydroxy phenols . ويرجع اللون البني الى تأثير فعل انزيمات

الاكسدة المحتوية على النحاس التي تنتج نتيجة لجرح الانسجة اثناء عملية الفصل (الاستئصال) والتعقيم .

ولغرض التخلص من المركبات الفينولية المتكونة اثناء عملية التلون البني تتخذ الخطوات التالية :

أ. اعادة زراعة للانسجة النباتية في اوساط غذائية جديدة على مدد قصيرة (1–5) أيام في الاسابيع الاولى من الزراعة النسيجية وذلك لتقليل تراكم كميات المواد الفينولية في مزارع الأنسجة .

ب. يضاف الى الوسط الزراعي بعض المركبات مثل الفحم النشط Activated charcoal أو مادة بولي فينيل بيروليدون Poly vinyl pyrolidon (PVP) وذلك لان هذه المواد ترتبط مع الفينولات فتجعلها مركبات غير حرة وبالتالي لا تؤثر سلبا على نمو الانسجة .

ت. غمر الاجزاء النباتية بعد التعقيم مباشرة في محلول معقم يحتوي على مضادات الأكسدة Antioxidants ومن اشهر هذه المركبات هي حامضي الاسكوربيك (فيتامين جـ) وحامض الستريك (Ascorbic and Citric acids) اذ تستخدم بتركيز 100 و 150 ملغم/لتر على التوالي . كما يمكن ان يستخدم L-cysteine أو Glutathione اذ تعمل على تثبيط عملية الاكسدة .

3. مرحلة انقسام وتضاعف الانسجة Multiplication of tissues : الهدف من هذه المرحلة هو حدوث عملية التضاعف السريع لتجمعات البراعم والخلايا نتيجة لزراعة الجزء النباتي في الوسط الغذائي المعد للتضاعف . وتؤدي في النهاية هذه المرحلة الى تكوين نموات خضرية Shoot أو نبيتات كاملة Plantlets.

وهناك عدة طرق متبعة في مرحلة التضاعف هي :

أ. تكوين (توالد) الأجنة الجسمية Somatic embryogenesis .

ب. تحفيز نمو البراعم الابطية والطرفية Enhancement of axillary and terminal buds.

ت. زراعة النسيج المرستيمي Meristem culture .

ث. تكوين (توالد) الافرع العرضية Adventitious shoots development أو توالد الأعضاء Organogenesis .

4. مرحلة تكوين الجذور (التجذير) In vitro rooting : تهدف هذه المرحلة الى تكوين الجذور على الافرع الخضرية التي تكونت في مرحلة التضاعف من خلال الزراعة الثانوية في وسط غذائي جديد معد للتجذير يحتوي على أحد الاوكسينات المشجعة لتكوين مباديء الجذور أو في وسط خالي من منظمات النمو في بعض من النباتات وتستغرق هذه المرحلة 3–4 أسابيع من الزراعة .

5. مرحلة الأقلمة Acclimatization stage : يقصد بالاقلمة هي تهيئة النباتات لمواجهة التغيرات في البيئة الخارجية . من خلال تشجيعه على تصنيع الغذاء بعملية البناء الضوئي والاعتماد على نفسه وتحفيز تكوين الطبقة الشمعية Cuticle التي تقلل من تبخر الماء من النبات .

المحاضرة الرابعة : زراعة الخلايا والأنسجة النباتية :

مكونات الوسط الغذائي المعد لزراعة الخلايا والأنسجة النباتية :

The components of plant cells and tissues culture media

أولاً: مكونات الوسط الغذائي غير العضوية (اللاعضوية) Inorganic medium components :

أن أنسجة وأعضاء النبات تنمو خارج الجسم الحي في الأوساط الغذائية الصناعية Artificial media المزودة بالمغذيات الضرورية للنمو .

النباتات السليمة ذات النمو النشيط تحتاج إلى المواد الضرورية للنمو من التربة هي :

أ. تحتاج النباتات بعض العناصر غير العضوية بكميات كبيرة وتدعى بالعناصر الغذائية الكبرى (المغذيات الكبرى) Major plant nutrients مثل عنصر النتروجين N والبوتاسيوم K والفسفور P والكالسيوم Ca والمغنيسيوم Mg والكبريت S .

ب. تحتاج إلى كميات قليلة من بعض العناصر الغذائية الصغرى Minor plant nutrients or Trace elements مثل الحديد Fe والنيكل Ni والكلورين Cl والمنغنيز Mn والخارصين Zn والبورون B والنحاس Cu والمولبدنم Mo .

طبقاً إلى ما أشار اليه Epstein (1971) يمكن أن يكون العنصر أساسي لنمو النبات اذا تحقق ما يلي :

1. يفشل النبات باكمال دورة حياته بدونه .
2. اذا كان دوره مهم في حياة النبات ولا يستطيع أي عنصر أن يحل محله أو يعوض عنه .
3. اذا كان ذو تأثير مباشر على الكائن الحي ولا يؤثر على البيئة .
4. اذا كان تركيبه الجزيئي أساسي النبات .

وحسب الشروط أعلاه فأنها تنطبق على ثلاثة عناصر أساسية موجودة بكميات وفيرة في الطبيعية هي : الكاربون C والهيدروجين H والأوكسجين O .

وهناك بعض العناصر التي لم نشير لها هي عناصر مهمة ومفيدة للعديد من أنواع النباتات مثل الكوبلت Co والألمنيوم Al والصوديوم Na واليود I .

وكل العناصر المعدنية (اللاعضوية) الشائعة التي ذكرت في أعلاه هي أدخلت في مكونات الوسط الغذائي المعد لزراعة الأنسجة النباتية من قبل العالمان Murashige and Skoog (1962) وهذا الوسط الغذائي الذي سمي بالوسط MS نسبة الى الحرفين الأوليين من أسمي العالمين ، سبب أفضل

وأمثل نمو وتطور لكالس التبغ . ويوضح الجدول التالي مكونات الوسط الغذائي MS من العناصر اللاعضوية . كما يوضح تركيزها في أنسجة النباتات النامية طبيعياً . المشكلة الأساسية التي تواجه مكونات العناصر الغذائية في الوسط الغذائي هي الترسيب Precipitation . إذ تترسب العناصر الغذائية خاصة بعد تعقيم الوسط الغذائي بجهاز المعقام (المؤصدة) .

Table 3.1 A comparison between the average concentrations of elements in plant shoots (dry weight basis) considered sufficient for adequate growth [from Epstein (1972), content of Ni is according to Brown *et al.* (1987)] and in MS. The elements that show striking differences between MS and 'plants' are indicated. For Na, no data were found, but in glycophytes grown in 1 mM Na, the endogenous level is 10 1000 mmol.kg^{-1} (Subbarao *et al.*, 2003)

	In tissue mmol kg^{-1}	In MS mmol l^{-1}	In tissue mol%	In MS mol%
N	1000	60	64.4	64.0
K	250	20	16.1	21.3
Ca	125	3	8.0	3.2
Mg	80	1.5	5.1	1.6
P	60	1.25	3.9	1.3
S	30	1.5	1.9	1.6
Cl	3	6	0.19	6.4
Fe	2	0.1	0.13	0.11
Mn	1	0.1	0.06	0.11
B	2	0.1	0.13	0.11
Zn	0.3	0.03	0.02	0.03
Cu	0.1	0.0001	0.0060	0.0001
Mo	0.001	0.001	0.0001	0.0011
Ni	0.001	0	0.0001	0.0000
Na		0.1	0.0000	0.1067

أ. العناصر الغذائية الكبرى:

1. النتروجين : النتروجين مهم في حياة النبات إذ يدخل في بناء البروتينات والأحماض النووية وصبغة الكلوروفيل . أن الصورة المهمة لامتصاص النتروجين هي بهيئة آيون النترات NO_3^- (Nitrate) ثم بعد امتصاصه يتختزل إلى آيون الأمونيوم NH_4^+ (Ammonium) أي يزال الأوكسجين ويحل محله الهيدروجين بالاختزال قبل أن يدخل في التركيب العضوي في جسم النبات . ويضاف النتروجين الى الوسط الغذائي بصورتي آيون النترات NO_3^- وآيون الأمونيوم NH_4^+ وذلك لأن pH الوسط الغذائي يتراوح بين 5.4–5.8 الذي يسبب زيادة جاهزية الامونيوم الى النسيج النباتي مما يؤدي الى انخفاض pH الى 4.2–4.6 والذي يثبط جاهزية آيون الأمونيوم مما يسبب جاهزية آيون النترات الى النسيج النباتي مسبباً ارتفاع pH مرة اخرى وهكذا . والسبب في تجنب اضافة آيون الأمونيوم لوحده بدون آيون النترات

كمصدر للنتروجين في الوسط الغذائي هو لكونه يصبح تأثيره سمي في التراكيز العالية منه أولا وصعوبة السيطرة على pH الوسط الغذائي . أن آيون النترات يتحول الى آيون النتريت NO^{-2} (Nitrite) في داخل الخلية بفعل انزيمين لاختزال النترات Nitrate reductase enzymes أحدهما يوجد في السايتوبلازم الخلوي والآخر يكون مرتبط بالأغشية الخلوية . بينما يختزل آيون النتريت الى آيون الأمونيوم بواسطة انزيم اختزال النتريت والذي يوجد في البلاستيدات.

2. الفسفور : الفسفور هو عنصر حيوي ومهم في النبات ويدخل في بناء الاحماض النووية والدهون المفسفرة والمرافقات الانزيمية Co-enzymes . وهو الذي يدخل في بناء مركبات الطاقة ATP . أن مجاميع الفوسفات المرتبطة مع مختلف السكريات تمنح الطاقة بعملية التنفس . كما تسهم في عملية البناء الضوئي لتكوين الكاربوهيدرات وترتبط مجاميع الفوسفات مع البروتينات لتزيد من نشاطها وفعاليتها . يمتص الفسفور بالأمتصاص الفعال (النشط) من قبل النبات على هيئة آيون الفوسفات آحادي وثنائي الشحنة السالبة Primary and Secondary orthophosphate anions ($H_2PO_4^{-1}$ and HPO_4^{-2}) أي يحتاج امتصاصها الى طاقة ناتجة من عملية التنفس . يضاف الفسفور في الوسط الغذائي على هيئة فوسفات آحادية و ثنائية الهيدروجين Mono and di-hydrogen phosphates . تعمل الأنسجة النباتية بالزراعة النسيجية على انتاج انزيمات الفوسفات phosphatase enzymes وتطرحها الى الخارج في الوسط الغذائي كي تؤدي الى تحرير ايونات الفوسفات . التراكيز العالية من الفوسفات الذائبة تعمل على خفض النمو نتيجة الى ترسيب الكالسيوم وبعض العناصر الغذائية الصغرى في الوسط الغذائي وبالتالي يقل امتصاصها وجاهزيتها من قبل النسيج النباتي.

3. البوتاسيوم : موجود على هيئة آيون موجب Positive ion (Cation) K^+ في سايتوبلازم الخلية وفي البلاستيدات الخضر . ايون البوتاسيوم له دور كبير في السيطرة على الضغط الازموزي للخلايا ويقوم بتنظيم اتساع الخلايا من خلال سيطرتة على انتفاخ الخلية Turgor ودوره الاساسي في عملية فتح وغلق الثغور . كما ان له دور كبير في تنظيم pH الخلية .

4. المغنيسيوم : هو مكون أساسي لجزيئة الكلوروفيل إذ هو ذرة تحتل مركز تركيب Porphyrin structure لجزيئة الكلوروفيل . وهو عامل مهم في تنشيط العديد من الانزيمات النباتية خصوصا الانزيمات المتعلقة بنقل مجموعة الفوسفات في بناء مركب الطاقة ATP . وايون المغنيسيوم هو ايون متحرك وينتقل بحرية داخل الخلايا كما في ايون البوتاسيوم .

5. الكبريت : ينتقل الكبريت الى النبات بهيئة ايون الكبريتات SO_4^{-2} وهذه الصورة مصدر مهم في الوسط الغذائي المعد للزراعة النسيجية . يدخل الكبريت في بناء بعض الاحماض الأمينية مثل السيستين Cysteine والميثيونين Methionine والتي تدخل في بناء البروتينات . كما يدخل الكبريت في بناء الدهون في النبات . ويحتل الكبريت المواقع الفعالة في بعض الانزيمات بهيئة (–SH group) . وأن

نقص الكبريت يسبب يعرقل بناء البروتينات في النبات كما يؤدي نقصه الى نحافة السيقان وهشاشتها وتكون عرضة للتكسر .

6. الكالسيوم : أن آيونات الكالسيوم Ca^{+2} (Cations) تدخل في بعملية التوازن الآيوني مع الايونات السالبة Anions والكالسيوم هو عنصر غير متحرك كما في ايون البوتاسيوم لكونه مرتبط مع جزيئات أخرى بروابط تساهمية اذ يدخل في تركيب الأغشية الخلوية Cell membranes والصفيحة الوسطى Middle lamella of cell wall . وايون الكالسيوم ينشط انزيم β(1→3)-glucan الذي له دور في بناء السليلوز . لا يتم بناء السليلوز في الخلايا المزروعة نسيجيا ما لم تكن هنال كمية كافية من ايونات الكالسيوم في الوسط الغذائي . ويدخل ايون الكالسيوم كعامل مساعد في تنشيط العديد من الانزيمات داخل الخلية النباتية وخاصة انزيمات التحلل المائي لجزيئة ATP .

ب. العناصر الغذائية الصغرى Micro nutrient elements :

1. المنغنيز Mn : يدخل في تركيب البروتينات المعدنية الخاصة بعمليتي البناء الضوئي والتنفس وله دور في فعالية ونشاط بعض الانزيمات ويدخل المنغنيز في بناء البلاستيدة الخضراء .

2. الخارصين Zinc : يدخل في تركيب الانزيمات المرتبطة بالعناصر المعدنية مثل alcohol dehydrogenase و Carbonic anhydrase و Superoxide dismutase و RNA-polymerase .

3. البورون B : وهو عنصر مهم لتحسين اداء الغشاء البلازمي وبناء الاحماض الفينولية وبناء اللجنين ويدخل كعامل مساعد لبعض الانزيمات وله دور مهم في بناء القواعد النتروجينية التي تدخل في بناء RNA . يضاف البورون الى الوسط الغذائي المعد للتضاعف بصورة حامض البوريك H_3BO_3 .

4. النحاس Cu: يوجد بصورتيه الاحادية التكافؤ وثنائية التكافؤ ويكون مرتبط ببعض الانزيمات مثل انزيم Cytochrom oxidase كما تدخل ذرة النحاس في بناء صبغة البلاستوسيانين Plastocyanin التي تنقل الالكترونات .

5. الكلورايد : ايون الكلورايد (Cl^-) ضروري لنمو النبات بتراكيز منخفضة جدا . وله دور في التنظيم الازموزي في الخلايا الحارسة

6. الصوديوم : النبات لا يحتاج الى آيونات الصوديوم لغرض النمو والتطور إذ أن كثير من النباتات تطرد آيونات الصوديوم الى الخارج من جذورها لتحافظ على تركيزه المنخفض داخل الخلايا . وهو عنصر مهم للحفاظ على الازموزية في الخلايا عن طريق تجمعه في الفجوات الخلوية في النباتات الملحية Halophytic plants وهذا نوع من التكيف مع البيئة التي تعيش بها هذه النباتات وخاصة

الترب الملحية التي يكون الجهد المائي واطيء فيها . عموما الصوديوم هو مهم للنباتات المقاومة للملوحة Salt tolerant plants مثل نباتات الـ CAM (Crassulacean acid metabolism) . وهذه النباتات يكون عنصر الصوديوم له أهمية في تثبيت CO_2 بعملية البناء الضوئي .

7. المولبدنم Mo : الصورة الجاهزة هي آيون المولبدنمات MoO_4^{-2} الذي يتكون من ملح Sodium molybdate . يدخل في بناء بعض الانزيمات مثل انزيمي Nitrate reductase and Nitrate nitrogenase . كما يدخل كعامل مساعد مع ايون الحديد .

8. الكوبلت Co : له دور مهم في التشكل (تكوين الشكل الظاهري) Morphogenesis والكوبلت هو مكون معدني لفيتامين B_{12} الذي له أهمية في بناء الاحماض النووية ويكون الكوبلت بهيئة ايون Co^{+2} .

9. الالمنيوم Al : هو عنصر ضروري لنمو بعض النباتات وليس ضروريا اضافته ف
ي الوسط الغذائي المعد لاكثار النبات بتقنية الزراعة النسيجية .

10. النيكل Ni : ويدخل في تركيب انزيم Urease enzyme المسؤول عن تحويل اليوريا الى أمونيا . النيكل يكون بصورة آيون Ni^{+2} . والنمو يكون بطيء بدون اضافة النيكل الى الوسط الغذائي .

11. اليود I : هو ليس ضروري في التغذية ولكن وجوده في النبات يحسن من نموه ولو بكميات قليلة جدا. وهو غالبا ما يضاف الى الوسط الغذائي المعد للزراعة النسيجية .

12. الحديد Fe : يضاف الحديد بهيئة مركبات مخلبية Chelating agents وهي عبارة عن مركبات معقدة Complexes مكونة من مركبات عضوية ترتبط بايونات معدنية عن طريق أواصر كيميائية . فترتبط المعادن ذات الايونات الموجبة مع المركبات المخلبية بواسطة الايونات السالبة فتصبح اكثر فعالية من الايونات الحرة . مثلا عند ارتباط ايون Cu^{+2} مع الاحماض الامينية يكون اكثر فعالية من ايوناته الحرة . تتأثر المركبات المخلبية بدرجة الحموضة للوسط pH فمثلا ايون النحاس Cu^{+2} المرتبط بالاحماض الامينية تحتاج الى pH مرتفع . عموما ان ايون الحديد ثلاثي التكافؤ Fe^{+3} المرتبط مع المركب العضوي المخلبي يكون أكثر استقرارا من ايون Cu^{+2} و Fe^{+2} . يضاف الحديد الى الوسط الغذائي على صورة مخلبية EDTA Chelate (Ethylene di amine tetra acetic acid) وعند اضافة هذه الاملاح المخلبية لا تبقى ثابتة وخصوصا بعد تعقيمها بواسطة جهاز المعقام إذ انها تتحد مع مركبات اخرى في الوسط الغذائي وتترسب بعد عدة ايام . وتم التغلب على هذه المشكلة باستخدام انواع اخرى من املاح الحديد التي لا تترسب مثل
Ferric sodium ethylene di amine tetra acetic acid (Fe Na EDTA)

Components of MS medium

Ingredient	mg/L
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2•2H_2O$	440
$MgSO_4•7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4•H_2O$	22.3
$ZnSO_4•H_2O$	8.6
KI	0.83
$NaMoO_4•2\ H_2O$	0.25
$CuSO_4•5H_2O$	0.025
$CoCl_2•6H_2O$	0.025
$FeSO_4•7H_2O$	27.85
$Na_2EDTA•2H_2O$	37.25

المحاضرة الخامسة :

زراعة الخلايا والأنسجة النباتية متقدم :

ثانياً : المكونات العضوية Organic components :

أن إضافة كمية من المكونات العضوية الى الوسط الغذائي ولو كانت قليلة فلها أثر كبير في نمو وتشكّل الخلية أو النسيج أو العضو المزروع . ومن أهم المكونات العضوية المضافة إلى الوسط الغذائي المعد للزراعة النسيجية هي:

1. **الفيتامينات Vitamins :** أن نقص الفيتامينات في الوسط الغذائي المعد للزراعة النسيجية يسبب شذوذ في النمو والتطور للنسيج النامي . في التجارب القديمة على زراعة الأنسجة النباتية كانوا يعوضون عن الفيتامينات (والتي لم تشخص في ذلك الوقت) كمكون أساسي في الوسط الغذائي عن طريق إضافة عصير الثمار وحليب جوز الهند ومستخلص الملت (مستخلص الشعير) والخميرة Malt and Yeast extracts والكازين هايدرولايسد Hydrolysed casein وهو عبارة عن مركب مكون من عدد قليل من جزيئات الأحماض الأمينية . أن هذه المكونات السابقة الذكر يمكن أن تجهز الوسط الغذائي بالفيتامينات والأحماض الأمينية ومنظمات النمو . وبعد إكتشاف وتشخيص الفيتامينات والاحماض الامينية ومنظمات النمو قلّت الضرورة في استخدام هذه المستخلصات والمواد الطبيعية ولجأ الباحثين إلى إضافتها مباشرة كمركبات كيميائية نقية Pure chemicals الى الوسط الغذائي وبكميات كافية لغرض سد احتياج النسيج النباتي منها لتحقيق أمثل نمو وتطور له . أن أهم الفيتامينات الذي يستعمل في الزراعة النسيجية هو الثيامين (Thiamine or Vitamin B_1) وحامض النيكوتينك Nicotinic acid أو Niacin والبايرودوكسين (Pyridoxine or Vit. B_6) ويمكن أن يضاف myo-inositol الى

الفيتامينات التي تنتمي الى فيتامين ب . لقد وجد Murashige (1974) أن الأنسجة غير المتمايزة تنمو ببطيء عند زراعتها نسيجيا في حال عدم إضافة الفيتامينات الى الوسط الغذائي . وعند إضافة كمية قليلة منها الى الوسط الغذائي سببت تحفيز الانقسام الخلوي Cell division .

أ. الثايمين : هو Thiamine pyrophosphate يعد كعامل مساعد Co-factor في أيض الكاربوهيدرات وله دور مباشر مهم في بناء بعض الأحماض الأمينية . وهو أكثر الفيتامينات أهمية والتي يجب أن تضاف في الوسط الغذائي . وعند عدم اضافته الى الزراعة المعلقة Suspension culture يؤدي الى موت الخلايا المعلقة وعدم نموها . وعند اضافته بصورة Thiamine HCl أدى الى زيادة نسبة الاجنة الجسمية المتكونة من 33% الى 58% عند زيادة تركيزه من 0.3 مايكرومول الى 5 مايكرومول . كما تؤدي اضافته الى استحثاث الكالس الجنيني Embryogenic callus . كما وجد من خلال الدراسات ضرورة اضافة الثايمين مع السايتوكاينين لتكوين ونمو الكالس ولا يحدث ذلك عند اضافة السايتوكاينين بدون اضافة هذا الفيتامين .

ب. الفيتامينات الأخرى التي يتم اضافتها مثل Pantothenic acid ويلعب هذا الفيتامين دور مهم في نمو الأنسجة المزروعة نسيجياً . فلقد وجد Morel (1946) عند دراسته عن اضافة هذا الفيتامين الى الوسط الغذائي المعد للزراعة النسيجية ادى الى أمثل نمو للكالس . كما شجع تكوين الأفرع العرضية من الاجزاء النباتية المزروعة خارج الجسم الحي .

ت. فيتامين ج (L-ascorbic acid or Vit. C) : يضاف هذا الفيتامين الى الوسط الغذائي للتخلص من الاسوداد Blacking للانسجة النباتية المزروعه وهو يعد مركب مضاد للاكسدة Anti-oxidant كما يلعب دور مهم في انقسام واستطالة الخلايا .

ث. حامض الفوليك Folic acid يشجع تكوين الأفرع في الاجزاء النباتية في الضوء لانه يكون متميء في الضوء PBA (p-amino benzoic acid) .

ج. الرايبوفلافين Riboflavin هو أحد الفيتامينات التي تضاف من أجل تثبيط تكوين الكالس وبالتالي يتجه الفيتامين الى تحفيز نمو وتكوين الأفرع الخضرية . كما يحفز هذا الفيتامين على تكوين الجذور العرضية على الأفرع الخضرية المزروعة نسيجياً . كما يشجع عند اضافته استحثاث الكالس الجنيني .

ح. الكلايسين : وهو حامض أميني يعامل كفيتامين في الزراعة النسيجية ويضاف في الوسط الغذائي .

خ. الادنين : Adenine أو Adenine sulphate اذ له تأثيرات مشابهة للسايتوكاينينات عند اضافته للوسط الغذائي .

2. مواد أخرى عضوية تضاف الى الوسط الغذائي وتدعى Undefined supplements :

أ. مستخلص اللحم والمالت والخميرة .

ب. عصير الثمار ومستخلصاتها . مثل الموز والطماطة .

ت. مستخلص الاجنة الجنسية .

ث. مستخلص البادرات أو أوراق النبات .

ج. مستخلص البطاطا المغلية أو الذرة .

ح. مستخلص الجذور والريزومات .

خ. البروتين عن طريق استخدام الكازين Casein hydrolysate والذي يحتوي على كل الاحماض الامينية التي تدخل في بناء البروتينات .

وتكون هذه المواد العضوية أعلاه هي مصدر للاحماض الأمينية والببتايدات والأحماض الدهنية والكاربوهيدرات والفيتامينات ومنظمات النمو النباتية .

مستخلص المالت Malt extract : ويستعمل هذا المستخلص في الزراعة النسيجية للحمضيات كمصدر رئيسي للكاربوهيدرات . وللمستخلص دور مهم في توالد الأجنة الجسمية المتكونة من زراعة الأنسجة النيوسيلية Nucellar tissues كما لها دور مهم في تضاعف الأفرع الخضرية Shoot multiplication وانبات الاجنة الجسمية وتكوين النبيتات . ويستخدم المستخلص بتركيز 0.5 - 1 غم/لتر .

لب ثمار الموز المهروس : يضاف مهروسه الى الوسط الغذائي المعد للزراعة النسيجية للاوركيد وهو مشجع للنمو.

حليب أو ماء جوز الهند Coco nut milk or water : أن اضافته الى الوسط الغذائي مع الاوكسين يسبب تحفيز انقسام الخلايا ونموها بسرعة . ويعد ماء جوز الهند أو سائل الاندوسبرم هو أفضل المواد العضوية غير المشخصة والتي يتم اضافتها مقارنة بالمواد العضوية المشخصة . ولقد وجد له اهمية في استحثاث الكالس في الزراعة المعلقة والتشكل الظاهري . ويضاف الى الوسط الغذائي MS بنسبة 15% . كما لوحظ أن اضافة حليب جوز الهند مع الاوكسين حفز على تكوين الدرينات في البطاطا .

3. **الأحماض العضوية Organic acids :**

ولها ثلاث فوائد إذ تعتبر مكون رئيسي للمركبات المخلبية التي لها دور في جاهزية العناصر الغذائية الصغرى أولاً(فقد وجد ان الاحماض العضوية ثنائية التكافؤ مثل حامض الستريك والماليك والماليك Maleic والمالونيك Malonic الموجودة في عصير الخشب والمتحدة مع الاحماض الامينية لها القابلية على الارتباط مع الايونات المعدنية لغرض نقلها لتصبح جاهزة فتعمل خلايا الأنسجة المزروعة على افراز هذه الاحماض مثل الستريك والماليك الى الخارج في الوسط الغذائي وترتبط مع الحديد غير المخلبي لتجعله جاهز (متوفر). وتعتبر محاليل منظمة buffer solutions ضد التغير في pH الوسط الغذائي ثانياً (اذ تعمل بعض الاحماض العضوية واملاحها للصوديوم والبوتاسيوم تعمل على تنظيم pH للمحليل المغذية فلقد وجد اضافة حامض الماليك بتركيز 100 ملغم/لتر وبوجود الكلوتامين والانين يؤدي الى حموضة الوسط التي تسبب التي تشجع نمو الاجنة. أن الاحماض العضوية تعمل على تنظيم pH ضمن المدى 5-6 ولكن التعقيم بجهاز المعقام يسبب تكوين سترات الصوديوم او حامض الستريك الذي يرفع (pH) ويمكن ان تكون كمغذيات مضافة في الوسط الغذائي ثالثاً مثلا تضاف الاحماض العضوية الخاصة بدورة كريبس الى الوسط الغذائي لتشجع أيض NH_4^+ ، وهذا ما لاحظاه Gamborg and Shyluk (1970) مثل حامض الستريك والبايروفيك والماليك والفيوماريك.

4. **السكريات Sugars :**

تلعب السكريات دور مهم في مكونات الوسط الغذائي اذ تعد مصدرغني وأساسي للكاربون والطاقة وهي تمثل العامل للازموزية . ولها دور أساسي في نمو الأعضاء المزروعة وتطورها خارج الجسم الحي. والسكروز هو الصورة المضافة للسكريات في الوسط الغذائي ويستخدم بشكل شائع في تحضير الاوساط الغذائية وعند وجوده في الوسط الغذائي يسبب تثبيط لتكوين الكلوروفيل والبناء الضوئي . يمكن استخدام الكلكوز والمالتوز والرافينوز glucose, maltose, raffinose واللاكتوز والفركتوز والمانوز lactose, fructose, mannose أقل استخداما في اضافتها الى الوسط الغذائي .

Table 4.2. The main sugars which can utilized by plants.
The value of as sugar for carbon nutrition is indicated by the size of the type.

SUGAR	Reducing Capacity	Products of hydrolytic/enzymatic breakdown
Monosaccharides		
Hexoses		
Glucose	Reducing sugar	None
Fructose	Reducing sugar	None
Galactose	Reducing sugar	None
Mannose	Reducing sugar	None
Pentoses		
Arabinose	Slow reduction	None
Ribose	Slow reduction	None
Xylose	Slow reduction	None
Disaccharides		
Sucrose	Non-reducing	Glucose, fructose
Maltose	Reducing sugar	Glucose
Cellobiose	Reducing sugar	Glucose
Trehalose	Non-reducing	Glucose
Lactose	Reducing sugar	Glucose, fructose
Trisaccharides		
Raffinose	Non-reducing	Glucose, galactose, fructose

امثل تركيز للسكروز المضاف الى الوسط الغذائي يتراوح من 2-4% .

5. **الأحماض الأمينية والأميدات : Amino acids and Amides**

تؤثر هذه المركبات في زيادة نمو الكالس وليس في تكوين الأعضاء . ويجب المراعاة في استخدام المرافق الايزوميري (L) وليس المشابه (D) لهذه المركبات . وقد تضاف الأحماض الأمينية للبيئة الغذائية على هيئة خليط يدعى الكازين المتحلل مائيا Casein hydrolysate بنسبة تتراوح بين 0.05 – 0.1 % ، وفي أغلب الأحيان يضاف كل من (L-glutamine) و (L-asparagine) للوسط الغذائي بمعدل 100 ملغم/لتر كمصدر للنتروجين . وقد تضاف مادة كبريتات الأدنين Adenine sulphate للوسط الغذائي لكي يتم تحفيز وتشجيع نمو وتكوين الأفرع .

6. **منظمات النمو Growth regulators**

تلعب منظمات النمو مثل الأوكسينات والسايتوكاينينات والجبرلينات دورا مهما في زراعة الأنسجة النباتية . لذا يجب اضافتها للوسط الغذائي من أجل تأثيرها على انقسام واستطالة الخلايا وتكشف الأعضاء النباتية . وجد الباحثين المختصين بزراعة الأنسجة أن زيادة نسبة الاوكسينات على حساب السايتوكايانات في الوسط الغذائي تحفز الاجزاء النباتية المزروعة على تكوين الجذور ، بينما تؤدي زيادة نسبة السايتوكاينينات الى الاوكسينات الى تكوين الأفرع الخضرية Shoots .

أهم منظمات النمو المستعملة في الزراعة النسيجية هي :

أ. الاوكسينات Auxins :

تلعب الاوكسينات دورا مهما في انقسام واستطالة خلايا النبات . ولها دور رئيسي في تشجيع تكوين الجذور وأمثلة IAA و IBA و NAA و 2,4-D و 2,3,5-T وأن IBA و NAA هما الاكثر استعمالا بالنسبة لتكوين الجذور واستطالتها . بينما 2,4-D و 2,3,5-T هما الاكثر تأثيرا في نمو وانتاج الكالس وتخصصه الى الانسجة والاعضاء النباتية المختلفة . كما لها دور مهم في نمو الاجنة العرضية . كما أن للـ 2,3,5-T له دور في استطالة المجموع الخضري .

ب. السايتوكاينينات Cytokinins :

يعتبر Zeatin احد السايتوكاينينات الاكثر فعالية والذي تم اكتشافه بعد Kinetin وتشجع السايتوكاينينات انقسام الخلايا وتكوين البراعم العرضية ومن الامثلة على السايتوكاينينات :

- البنزيل أدنين BA أو البنزيل أمينو بيورين BAP
- داي ميثيل اليل امينوبيورين 2iP .
- الكاينتين 6-furfuralamino purine (Kinetin) .
- الزياتين Zeatin .
- الايزوبنتانيل أدنين Isopentenyl adenine (IPA) .

ج. الجبرلينات Gibberellins :

تلعب دورا مهما ومؤثرا في نمو الاعضاء النباتية وتكوينها اذ يعوض عن احتياجات النبات للضوء ويساعد في الاسراع في تكوين الاعضاء وتكشفها وزيادة نمو الاجنة الخضرية ويعتبر النوع GA3 الاكثر استعمالا في الاوساط الغذائية .

د. أنواع أخرى تستعمل في زراعة الأنسجة مثل :

- ABA (Abscissic acid) .
- Colchicine .
- Paclobutrazol (PP333) .

7. الفحم النشط (الفعال) Activated charcoal :

عند اضافته الى الوسط الغذائي فأنه يساعد في تحفيز النمو وتكوين الأعضاء النباتية وتكوين الأجنة . ويضاف الفحم النشط الى الوسط الغذائي بمعدل يتراوح من 0.5 – 3 غم/لتر . ويعطي الفحم النشط البيئة المعتمة والتي تعد ملائمة للتجذير ، كما يعمل الفحم على ادمصاص الافرازات السامة التي يفرزها الجزء النباتي المزروع ، كما يعمل على عدم تلون الانسجة النباتية المزروعة باللون البني والناتج عن أكسدة المواد الفينولية والتي تسبب في حال تراكمها الى فشل نمو الجزء النباتي ، فهو يعمل على ادمصاص المواد الفينولية السامة ، كما يعمل الفحم على الموازنة في دخول منظمات النمو المضافة في الوسط الغذائي عند دخولها في الجزء النباتي المزروع وبالتالي يعمل هذا التنظيم في دخولها على اعطاء نتائج ايجابية في نمو النسيج النباتي المزروع .

8. الآجار Agar :

هو مادة عضوية مستخلصة من الطحالب البحرية الحمراء البنية وتضاف الى الوسط الغذائي بنسبة 0.7% الى الوسط الغذائي اي 7 غم/لتر ووفائدة اضافته الى الوسط هو للحصول على الاوساط الغذائية الصلبة Medium solid ويضاف الى مكونات الوسط الغذائي بعد اضافة جميع مكونات الوسط الغذائي وضبط pH الوسط الغذائي ضمن المدى 5.7-5.8 للحصول على وسط غذائي ملائم لنمو النسيج النباتي المزروع لأن وصول pH الوسط الى أعلى من 5.8 يؤدي الى تصلبه أكثر من الحد المسموح له بحيث يعرقل من حركة المواد الغذائية من الوسط الغذائي الى النسيج النباتي كما أنه يعرقل من زراعة النسيج ونمو الجذور اما في خالة انخفاضه عن 5.7 فأن ذلك يؤدي الى سيولة الوسط الغذائي وعدم استقرار النسيج النباتي فوق الوسط فيؤدي الى انغماسه داخل الوسط وبالتالي فشل الزراعة النسيجية عند ارتفاع أو انخفاض الاس الهيدروجيني عن المدى الأمثل للزراعة النسيجية. وبعد اضافة الآجار الى الوسط الغذائي يوضع على جهاز المغناطيسي الدوار Magnetic stirrer المزود بصفيحة تسخين Hot plate لكي يتم مزج مكونات الوسط الغذائي بشكل متجانس وترفع درجة حرارته الى 88-90 درجة مئوية لضمان اذابة الآجار بشكل تام والحصول على وسط غذائي متجانس.

فصل وزراعة البروتوبلاست Protoplast Isolation and Culture :

مقدمة عن فصل البروتوبلاست:

أن أول من فصل البروتوبلاست من أنسجة النباتات الراقية هو العالم Klercker عام 1892. أستعمل الطريقة الميكانيكية Mechanical Method في فصل البروتوبلاست من خلال استعمال سكين حاد لقطع الجدار الخلوي وتحرير البروتوبلاست والحصول على البروتوبلاست السليم وغير المتضرر من عملية القطع بالسكين الحاد. أن عزل البروتوبلاست بالطريقة الميكانيكية يمكن تطبيقه فقط على الأنسجة التي تحتوي على فجوات عصارية. وتعد هذه الطريقة غير مفضلة بالرغم من بساطتها لكون يتم من خلالها الحصول على عدد قليل من البروتوبلاست بسبب تضرر الكثير منه بعملية القطع بالسكين الحاد. في عام 1960 تمكن بعض من العلماء عزل عدد كبير من البروتوبلاست من أنسجة النباتات الراقية باستعمال الطريقة الأنزيمية Enzymatic Method. كان يستعمل محلول من انزيم السيليليز Cellulase Enzyme الذي تم استخلاصه من زروعات الفطر *Myrothecium verrucaria* لغرض هضم وتحطيم جدران الخلايا وتحرير البروتوبلاست. وفي عام 1968 أحرز العالم Cocking تقدما كبيرا في هذا المجال وأصبحت انزيمات Cellulase and Macerozyme متاحة ومتيسرة على نطاق تجاري. أن أول من أستعمل الانزيمات في عزل البروتوبلاست على نطاق تجاري هو Takebe *et al.* (1968). بعد ذلك تم عزل البروتوبلاست من خلايا نسيج الورقة الوسطي Mesophyll Tissue من قبل العديد من الباحثين من خلال اضافة انزيمين بصورة متوالية على نسيج الميزوفيل. اذ تم اضافة انزيم Macerozyme أولا لقطع الأوراق لتحرير الخلايا بعضها عن البعض بصورة مفردة ثم يتم بعد ذلك اضافة انزيم Cellulase ليتم معالجة هضم وتحطيم جدران الخلايا وتحرير البروتوبلاست من الخلايا المفردة. أن Power and Cocking عام 1968 بينا أمكانية اضافة كلا الانزيمين معا في وقت واحد لغرض عزل البروتوبلاست من نسيج الميزوفيل وذلك على اعتبار هذه الطريقة أسرع من اضافتهما بصورة متتالية كما في طريقة الهضم بالانزيمات وكذلك لغرض تقليل فرص التلوث الميكروبي عن طريق تقليل خطوات طريقة العمل بالمقارنة مع الطريقة الميكانيكية. معظم العاملين بمجال عزل البروتوبلاست يستعملون الطريقة الانزيمية لوقتنا هذا وهي الطريقة المبسطة المتألفة من خطوة واحدة والتي تم بها الحصول على عدد كبير من البروتوبلاست من نسيج الميزوفيل لنبات التبغ والعديد من

الأنسجة لنباتات اخرى. لقد ساهمت الطريقة الانزيمية المستعملة في عزل البروتوبلاست مساهمة فعالة في العديد من الانسجة النباتية المختلفة مثل البروتوبلاست الذي تم عزله من نسيج ميزوفيل النبيتات النامية خارج وداخل الجسم الحي *In vitro* and *In vivo* cultures ومن الشتلات المعقمة الخالية من التلوث الميكروبي وخلايا الام المولدة Microspore mother cells وكالس حبوب اللقاح والزروعات المعلقة الجنينية وغير الجنينية التي تم الحصول عليها من الكميتات الذكرية والأنثوية.

TABLE 12.1

Some commonly used commercially available enzymes for protoplast isolation

Enzyme	Source	Supplier
Cellulases		
Onozuka RS	*Trichoderma viride*	Yakult Honsha, Japan
Cellulase R-10	*T. viride*	Yakult Honsha, Japan
Cellulysine	*T. viride*	Calbiochem, USA
Driselase	*Irpex lactes*	Kyowa Hakko Kogyo, Japan
Meicelase-P	*T. viride*	Meiji Seik Kaisha, Japan
Hemicellulase		
Hemicellulase	*Aspergillus niger*	Sigma, USA
Rhozyme HP-150	*Aspergillus niger*	Rohm and Hass, USA
Zymolyase	*Arthrobacter luteus*	Sigma, USA
Pectinase		
Macerozyme R-10	*Rhizopus* sp.	Yakult Honsha, Japan
Macerase	*Rhizopus* sp.	Calbiochem., USA
Pectinase (purified)	*A. niger*	Sigma, USA
Pectolyase Y23	*A. japonicus*	Seishin Pharmaceutical, Japan
Pectinol	*A. niger*	Rohm and Hass, USA

العوامل التي تؤثر على انتاج وحيوية البروتوبلاست:

1. مصدر النسيج النباتي: تعد الورقة افضل نسيج نباتي للحصول على عدد كبير من البروتوبلاست دون الحاجة الى قتل النبات وكذلك طبيعة ترتيب الخلايا في نسيج الميزوفيل تسهل من عملية عزل البروتوبلاست فضلا عن سهولة وصول الانزيمات الهاضمة الى جدران الخلايا ليتم عزل البروتوبلاست. كما أن لعمر الورقة والظروف الخارجية الي نمت فيها تأثير بعملية عزل البروتوبلاست من الاوراق. ولغرض السيطرة على تلك الظروف تم اخذ نسيج الميزوفيل من أفرع خضرية تم تنميتها خارج الجسم الحي *In vitro* shoots كما ان هذه الاوراق لا تحتاج الى اجراء تعقيم سطحي لها Surface sterilants. كما تعتمد عملية الحصول على عدد كبير من

البروتوبلاست على معدل ومرحلة نمو الخلايا ويتم ذلك عندما تجرى الزراعة الثانوية Subculture كل 3–7 ايام بطريقة الزراعة المعلقة Suspension culture. وتعد طريقة زراعة البروتوبلاست الافضل في تكوين الاجنة الجسمية Somatic embryos بطريقة الزراعة المعلقة.

TABLE 12.2

Optimal conditions for the isolation of protoplasts from cultured cells of tobacco[a]

Parameter	Optimum condition
Plant material	4–5-day-old subculture
Cellulase	1% Onozuka R-10
Macerozyme	0.1–0.2% Onozuka R-10
pH of enzyme solution	4.7–5.7
Volume of enzyme solution/fresh weight of tissue	10 ml g^{-1}
Incubation period	2–3 h
Incubation temperature	22–37°C
Rate of agitation	50 rev. min^{-1}
Osmoticum	300–800 mmol l^{-1} mannitol

[a]After Uchimiya and Murashige (1974).

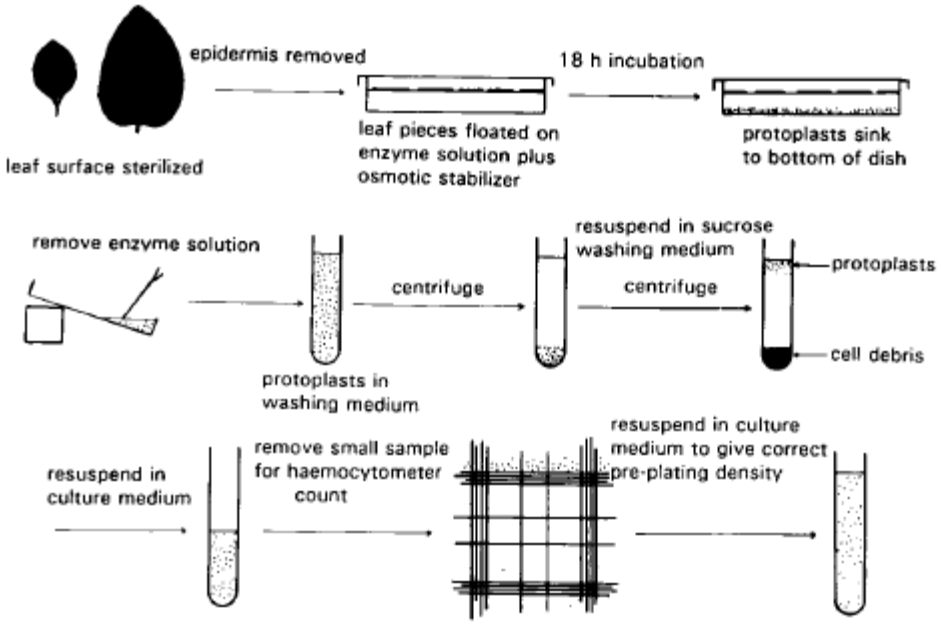


Fig. 12.1. Flow diagram for the isolation of mesophyll protoplasts (courtesy of E.C. Cocking, UK).

2. المعاملة ما قبل اضافة الانزيم Pre-enzyme treatment : وهي عملية ازالة طبقة البشرة السفلى من نصل الورقة ليلامس المحلول الانزيمي خلايا الميزوفيل لتسهيل تغلغل المحلول الانزيمي عبر المسافات البينية بين الخلايا Intercellular spaces of leaf اما اذا كان ذلك غير ممكن فيمكن تقطيع الورقة الى شرائح صغيرة بعرض 1-2 ملم. ويتم ازالة طبقة البشرة من خلال فرشاة ناعمة مع نصل حاد للمشرط لكي تسهل عملية تغلغل الانزيمات الهاضمة أو من خلال استعمال انزيم Cutinase لازالة طبقة البشرة.

3. المعاملة بالانزيمات Enzyme treatment: يعتمد عزل وتحرير البروتوبلاست من أنسجة ميزوفيل الورقة على طبيعة وتركيز الانزيمات المستعملة. يعد انزيمي Cellulase and Pectinase ضروريان لعزل البروتوبلاست من الخلايا النباتية. اذ ان انزيم Cellulase يعمل على تحطيم جدران الخلايا وانزيم Pectinase يعمل على تحلل طبقة الصفيحة الوسطى التي تربط الخلايا مع بعضها البعض. وهناك انزيمات عديدة باسماء تجارية تستعمل لهذا الغرض منها التي هي من أصل فطري مثل Onozuka cellulose SS وانزيم Onozuka macerozyme SS ولها اسماء تجارية مختلفة مثل Driselase ويضم Cellulase و Pectinase و Laminarinase و Xylanase والتي أثبتت كفاءتها في تحسين عزل البروتوبلاست من أنسجة النبات (Kao *et al*., 1974). كما استعملت الانزيمات النقية في هذا الخصوص مثل Cellulase R-10 والبكتينيز Pectinase (Okono and Furusawa, 1977; Slabas *et al*., 1979). وانزيم Pectolyase Y-23 الذي يعمل بكفاءة عالية مع انزيم Cellulase على عزل البروتوبلاست من نسيج ميزوفيل ورقة البازلاء خلال مدة 30 دقيقة (Nagata and Ishii, 1979) . بعض الأنسجة النباتية قد تتطلب اضافة انزيم اخر مثل Hemicellulase مع انزيمي Cellulase و Macerozyme. أذ أن عند اضافة انزيم Cellulase الى خلايا الاليرون Aleurone cells في الشعير لا يتم هضم الجدار الخلوي بشكل كامل اذ يبقى منه طبقة رقيقة وتسمى الخلية التي هضم جدارها بهذه الطريقة بـ Spheroplast لذلك يجب ان تعامل بانزيم Glusulase الذي يعمل على هضم ما تبقى من الجدار الخلوي (Taiz and Jones, 1971). أن الانزيمات التجارية الخام (غير النقية) The crude commercial enzymes مثل Nucleases و Proteases قد تسبب احيانا ضرر في البروتوبلاست الذي يؤدي الى ضعف حيويته لذلك يفضل استعمال الانزيمات النقية التي يتم

تنقيتها بواسطة Biogel او Sephadex G-25 (Constabel, 1982). في حين لاحظ الباحثان Arnold and Eriksson (1976) أن الانزيمات النقية قللت من حيوية البروتوبلاست بالمقارنة مع الانزيمات الخام التي اعطت عدد كبير من البروتوبلاست الاكثر حيوية.

يعتمد نشاط الانزيمات في عزل البروتوبلاست على درجة الحموضة. اذ ان درجة الحموضة المثلى الملائمة لنشاط انزيمي Onozuka cellulose R-10 و Macerozye R-10 كما موضح من قبل الشركة المصنعة هي 5-6 و 4-5 بالتتابع. من الجانب العملي يجب ان يكون pH المحلول الانزيمي يتراوح بين 4.7-6.0. أن درجة الحرارة المثلى لنشاط الانزيمات هي 40-50 مئوي والتي تعد درجة حرارة مرتفعة بالنسبة لخلايا النبات. عموما وجد ان درجة الحرارة 25-30 مئوي هي كافية لعزل البروتوبلاست بالطريقة الانزيمية. أن مدة المعاملة الانزيمية تتطلب 30 دقيقة وهي لكافية لعزل البروتوبلاست (Nagata and Ishii, 1979). كما ان نسبة حجم المحلول الانزيمي الى وزن النسيج النباتي الموضوع فيه يؤثر انتاجية البروتوبلاست وعزله. اذ ان 10 مل من المحلول الانزيمي لكل ا غرام من وزن النسيج النباتي يعطي نتائج مرضية. أن البروتوبلاست المتضرر من التحلل الانزيمي يسبب تحرير انزيمات Hydrolytic enzymes الذي يؤثر على حيوية البروتوبلاست السليم. وللتغلب على هذه المشكلة تم اضافة Potassium dextran sulphate (5% w/v) الى المحلول الانزيمي (Ochatt and Power, 1992). كما تم اضافة مضادات الاكسدة Antioxidant الى المحلول الانزيمي مثل مادة PVP 10 بمعدل 10000 وزن جزيئي الذي حسن من عزل عدد كبير من البروتوبلاست ذات الحيوية العالية في بعض انواع أشجار الفاكهة المتساقطة الاوراق (Revilla *et al.*, 1987).

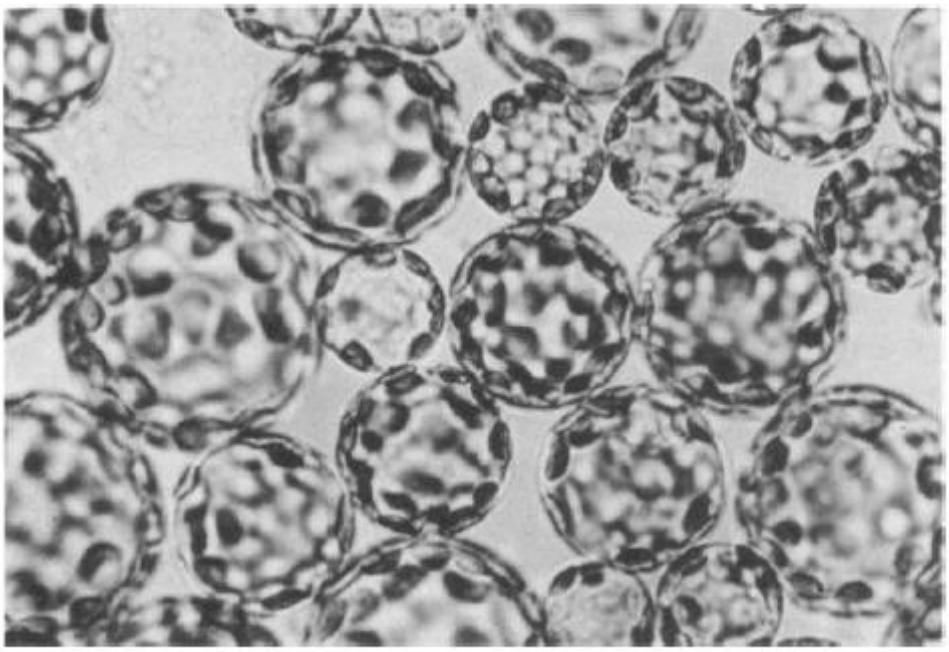


Fig. 12.2. Freshly isolated mesophyll protoplasts (courtesy of J.B. Power, UK).

4. الازموزية Osmoticum: أن الاستقرار الازموزي في المحلول الانزيمي هو يؤدي الى انتاج بروتوبلاست سليم ومعافى يأخذ شكلا كرويا طبيعيا. الازموزية العالية قد تمنع من انقسام البروتوبلاست المنتج عند زراعته لاحقا. وعند عدم الاستقرار الازموزي يجب اضافة مواد تستعمل لضبط الضغط الازموزي في المحلول الانزيمي المستعمل لعزل البروتوبلاست ومن المواد الاكثر تنظيما للازموزية هي Sorbitol و Mannitol والذي يضاف بمعدل 450-800 ميليمول. لاحظ كل من Uchimiya and Murashige عام 1974 أن بعض الذائبات مثل الكاربوهيدرات القابلة للذوبان التي تتمثل بالكلوكوز والفركتوز والجالكتوز والسوربيتول والمانيتول كانت اكثر تأثيرا في التنظيم الازموزي للبروتوبلاست. كما يمكن استعمال بعض الاملاح في التنظيم الازموزي مثل كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ 50-100 ميليمول/لتر والذي حسن من استقرار الغشاء البلازمي Plasma membrane. كما وجد Meyer (1974) و Bohnke and Kohlenbach (1978) ان المنظم ازموزي مثل KCl بتركيز 335 ميليمول و $MgSO_4.7H_2O$ بتركيز 40 ميليمول قد حسن من حيوية وانتاجية البروتوبلاست المعزول.

تنقية البروتوبلاست Protoplast purification:

بعد حضن القطع الورقية في المحلول الانزيمي لمدة كافية من الزمن تم اخراج البروتوبلاست بعناية من القطع الورقية وتحريرها. بعد عزل البروتوبلاست الصحي والسليم يبقى الخليط الانزيمي مع بقايا الجدار الخلوي وخلايا النسيج الوعائي والكلوروبلاست والخلايا غير المتضررة والبروتوبلاست المتضرر وذلك من خلال ترشيحها عن الملوثات والانسجة التالفة بواسطة غربال معدني او بلاستيكي قطر فتحاته تتراوح قطر فتحاته 30–100 مايكروميتر. ولزيادة تنقية البروتوبلاست تكرر مرتين على التوالي. بعد ذلك يتم ترسيب البروتوبلاست بواسطة جهاز الطرد المركزي بواقع 100 xg لمدة 5 دقائق. بعد ذلك يتم عمل معلق من البروتوبلاست ومحلول الغسل لغرض غسلها 3 مرات بعد ذلك توضع في جهاز الطرد المركزي على 50xg ولمدة 3 دقائق. ويتم ذلك من خلال وضع معلق البروتوبلاست والمحلول الانزيمي مع اضافة السكروز بتركيز 21% في جهاز المركزي على 100xg لمدة 10 دقائق. تظهر حزمة من البروتوبلاست النقي بين المحلول المعلق ومحلول السكروز 21% بينما يترسب البروتوبلاست المحطم في قاعدة الانبوب الزجاجي ويتم عزل البروتوبلاست النقي بواسطة ماصة بحذر شديد وتوضع في انبوبة طرد مركزي اخرى. تكرر العملية السابقة مرة اخرى لغرض تنقية البروتوبلاست. بعد ذلك يتم غسل البروتوبلاست المعزول لمدة 3 مرات. بعد ذلك تزرع البروتوبلاست بوسط زراعة معلق وبكثافة مناسبة.

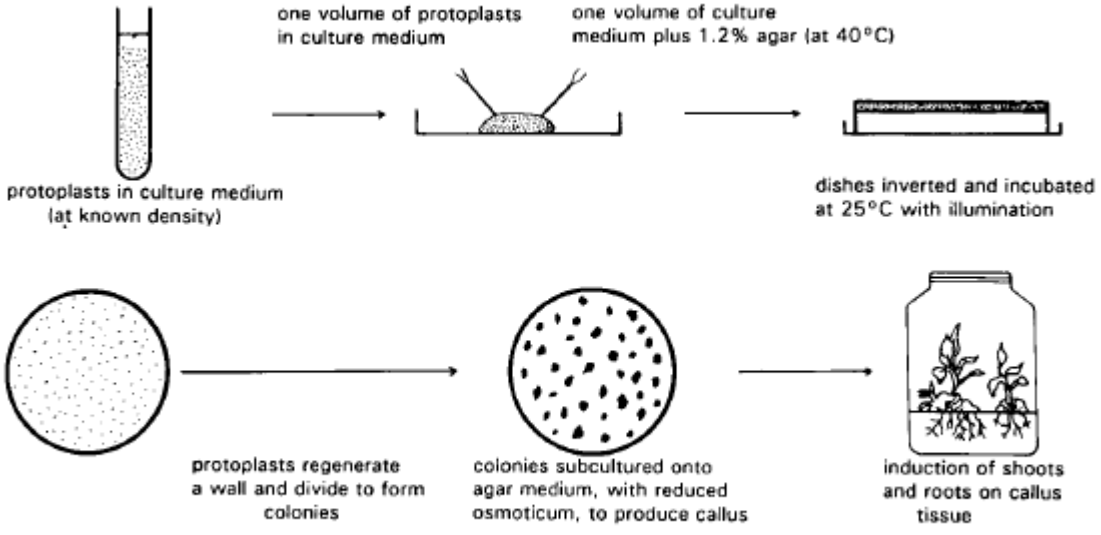


Fig. 12.3. Flow diagram for the culture of protoplasts (courtesy of E.C. Cocking, UK).

حيوية البروتوبلاست Protoplast Viability:

طرق قياس واختبار حيوية البروتوبلاست:

1. طريقة اختبار الدوران السايتوبلازمي Cytoplasmic Streaming وتعتمد على نشاط الميتابولزم Active metabolism. وهذه الطريقة غير ملائمة لانسجة الميزوفيل وذلك لاحتوائها على عدد كبير من البلاستيدات الخضر.
2. قياس الاوكسجين المستهلك Oxygen uptake ويعد مقياس للايض التنفسي Respiratory metabolism .
3. فعالية البناء الضوئي Photosynthetic activity.
4. صبغة Evan الزرقاء للاغشية السليمة Evan's blue dye by intact membranes.
5. صبغة Fluroescein di acetate وتعد هذه الطريقة هي الاكثر استعمالا في اختبار حيوية البروتوبلاست.

زراعة البروتوبلاست Protoplast Culture:

طرق زراعة البروتوبلاست المعزول هي تشبه طرق زراعة الخلايا المفردة. اذ يزرع البروتوبلاست على اوساط شبه صلبه. لكي يستقر البروتوبلاست في الوسط لكي ينتج منه نبيتات. لكن يفضل الزراعة في اوساط غذائية سائلة للاسباب التالية:

1. ان بعض بروتوبلاست بعض انواع من النباتات لا ينقسم الى خلايا جديدة اذا كان الوسط شبه صلب.
2. يمكن تخفيض الضغط الازموزي للوسط الغذائي السائل بعد ايام قليلة من الزراعة.
3. امكانية وسهولة تغيير الوسط الغذائي السائل نتيجة لافرازات البروتوبلاست السامة التي قد تؤدي الى قتل الخلايا السليمة.
4. يمكن تقليل كثافة الزراعة في الوسط الغذائي السائل بعد مدة زمنية وذلك بعزل خلايا الزروعات الكثيفة.

في الاوساط السائلة يتم زراعة البروتوبلاست بطرق مختلفة منها:

1. الزراعة المعلقة على شكل طبقة رقيقة في أطباق بتري.
2. الزراعة في فلاسك حجم 50–100 مل يوضع فيه معلق من البروتوبلاست بحجم 5 مل.
3. الزراعة في أطباق بتري توضع في كل طبق 50–100 قطرة من المعلق وتوضع في حاضنة مجهزة برطوبة عالية Humidified Chamber.

تكوين الجدار الخلوي Cell Wall Formation:

بعد 2–4 ايام من الزراعة يفقد البروتوبلاست شكله الكروي نتيجة لتكوين جدار الخلية. سرعة تكون الجدار الخلوي تختلف باختلاف نوع النبات ودرجة تمايز الخلايا التي عزل منها البروتوبلاست. اغلب نباتات العائلة الباذنجانية والصليبية تكون بروتوبلاست خلاياها والكالس والميزوفيل سريعة في تكوين جدار الخلية (24–40 ساعة). وبروتوبلاست محاصيل الحبوب وبروتوبلاست ميزوفيل العائلة البقولية يتكون جدارها الخلوي بعد اربعة ايام من الزراعة. بينما يتأخر تكوين جدار الخلايا في بروتوبلاست النباتات الخشبية الى 7 أيام من الزراعة.

انقسام الخلايا وتكوين الكالس Cell division and callus formation:

عندما يتكون الجدار الخلوي على البروتوبلاست تكون الخلايا مستعدة للانقسام. فقد يكون نسبة البروتوبلاست الذي يكون جدران خلوية من 0.1 – 80 %. يبدأ الانقسام الخلوي بعد 2–7 ايام في أغلب الزروعات ونادرا ما يتأخر الى 7–25 يوما. يستمر عادة الانقسام الخلوي السريع للزروعات حوالي 2–3 اسابيع. بعد ذلك يمكن نقل المستعمرات الخلوية المتكونة الى وسط غذائي أخر وتعد كانسجة نباتية جاهزة للاكثار الدقيق.

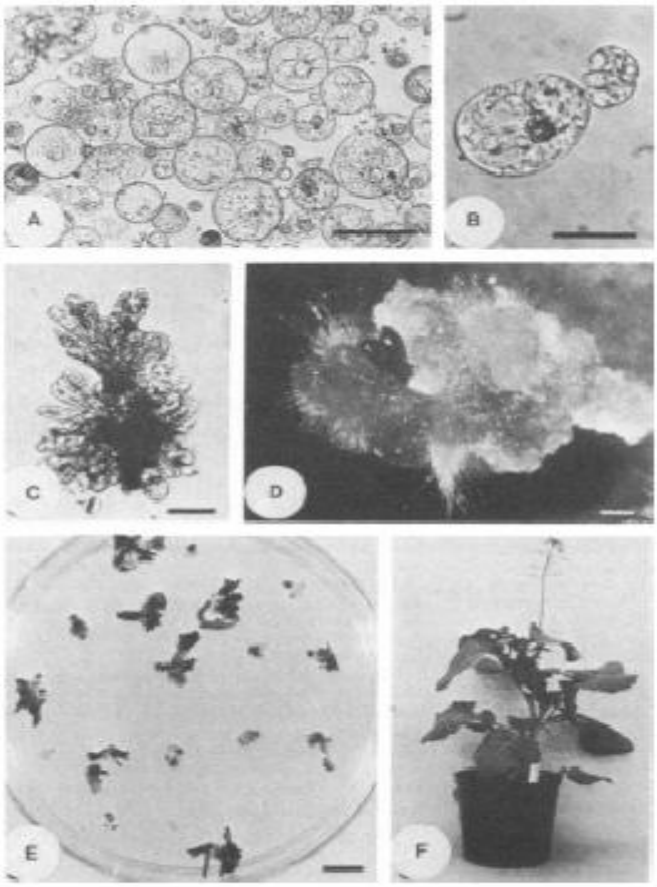


Fig. 12.4. Plant regeneration from hypocotyl protoplasts of *Brassica napus*. (A) Freshly isolated protoplasts of different sizes. (B) One-day-old protoplasts; both the protoplasts have regenerated wall but only the small one has divided. (C) Callus obtained from the protoplasts after 14 days of

هناك عوامل تؤثر على الانقسام الخلوي هي:

1. مكونات الوسط الغذائي Medium components: يعد الوسط الغذائي الاكثر استعمالا هو وسط MS والوسط B5 . والوسط المحور من قبل Kao et al.(1973) والمكون من اضافة واحد مليمول/لتر من $ClCa_2$ الى الوسط B5 والذي حسن من النسبة المئوية للانقسام الخلوي. بينما عندما اضيف 20 مليمول/لتر من NH_4NO_3 الى ذلك الوسط ادى الى تقليل الانقسام الخلوي لزروعات البروتوبلاست. اذ اثبتت الزراعة ان ايونات الامونيوم تعد ضارة لعملية الانقسام الخلوي. لذلك ينصح بتقليل تركيز نترات الامونيوم الى تراكيز قليلة بحيث لاتؤثر على عملية الانقسام الخلوي لزروعات البروتوبلاست. كذلك الفيتامينات والاحماض الامينية لها اهمية في تحفيز وتشجيع الانقسام الخلوي كذلك يمكن اضافة حليب جوز الهند والكازين هيدرولايسيت الى الوسط الغذائي. فضلا عن ذلك ان اضافة منظمات النمو النباتية وخاصة الاوكسينات والسايتوكاينينات لها اهمية كبيرة في حدوث الانقسام الخلوي وتشجيعه عند اضافتها الى الوسط

الغذائي. كما يمكن اضافة مضادات الاكسدة او الكلايسين او PVP-10 لتحسين الانقسام الخلوي ومنع حدوث التلون البني Browning نتيجة لتأكسد المواد الفينولية. وهناك مضادات اكسدة اخرى مثل n-Propyl-gallate (n-PG) ضروري اضافته لتشجيع الانقسام وتوالد الافرع Shoot regeneration. اما عند اضافة خليط من مضادات الاكسدة (Glutathione, Glutathione peroxidase and Phospholipase) ادى ذلك الى زيادة نمو وانقسام الكالس النامي من زروعات البروتوبلاست.

كما ان اضاف 2% من مادة Ficoll الى الوسط الغذائي ادت الى تضاعف سرعة الانقسام الخلوي للبروتوبلاست عند المقارنة للوسط الغذائي بدون اضافة تلك المادة.

2. الازموزية Osmoticum : يتطلب تنظيم ازموزي لوسط الزراعة لحماية البروتوبلاست من الضرر والتلف لذلك يضاف منظم ازموزي مثل المانيتول Mannitol او السوربيتول Sorbitol بتركيز 500-600 مليمول/لتر. كما استعمل السكروز كمنظم ازموزي لبروتوبلاست البطاطا والبطاطا الحلوة والكسافا. كما اثبتت الدراسات ان منظمات الازموزية الايونية ادت الى فشل حدوث الانقسام الطبيعي للبروتوبلاست لذلك يجب تجنبها. بعد 7-10 ايام من الانقسام الخلوي يجب نقل الزروعات الى اوساط غذائية جديدة خالية من المنظم الازموزي لان بقاءها لفترة طويلة يؤثر على استمرارية الانقسام الخلوي للزروعات النسيجية ويسبب توقفها.
3. كثافة الزراعة Density of culture: لها تأثير على الانقسام الخلوي. لذا تزرع البروتوبلاست بكثافة $1x\ 10^4$ الى $1x\ 10^5$ بروتوبلاست/مل من الوسط الغذائي. لان الكثافة العالية من الزراعة تسبب الاندماج بين البروتوبلاست وبالتالي تتغير الصفات الوراثية أوحدوث التباينات الوراثية. يفضل زراعة البروتوبلاست بكثافة منخفضة 100-500 بروتوبلاست/مل وذلك لتجنب حدوث تغايرات وراثية بسبب الاندماج البروتوبلاستي.
4. المعاملة الفيزيائية Physical treatment: المعاملة بالتيار الكهربائي 250-2000 فولت لمدة 10 ثواني له دور في تشجيع الانقسام الخلوي للبروتوبلاست. كذلك الصعقة الحرارية لها دور في تشجيع الانقسام الخلوي للبروتوبلاست كما في نبات الرز اذ يتم صعقها حراريا على درجة 45 مئوي ولمدة 5 دقائق.

5. ظروف حضن البروتوبلاست: يجب حضن البروتوبلاست في الظلام او بعيدا عن الضوء لمدة 5–7 ايام في بداية الحضن لتشجيع البروتوبلاست على الانقسام الخلوي. كما تحضن على درجة حرارة 25–30 مئوي على اعتبارها درجة حرارة مثلى لحدوث الانقسام الخلوي.
6. مصدر النسيج النباتي Plant material: ان الحالة الفسيولوجية للنسيج النباتي ونوع الجزء النباتي ونوع النبات له دور مهم في الانقسام الخلوي.

TABLE 12.3

A medium for culturing protoplasts at low density[a,b]

Constituents	Amount (mg l^{-1})	Constituents	Amount (mg l^{-1})
Mineral salts			
NH_4NO_3	600	KI	0.75
KNO_3	1900	H_3BO_3	3.00
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	600	$MnSO_4 \cdot H_2O$	10.00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	300	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.00
KH_2PO_4	170	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
KCl	300	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
Sequestrene 330 Fe[c]	28	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
Sugars			
Glucose	68400	Mannose	125
Sucrose	125	Rhamnose	125
Fructose	125	Cellobiose	125
Ribose	125	Sorbitol	125
Xylose	125	Mannitol	125
Organic acids (adjusted to pH 5.5 with NH_4OH)			
Sodium pyruvate	5	Malic acid	10
Citric acid	10	Fumaric acid	10
Vitamins			
Inositol	100	Biotin	0.005
Nicotinamide	1	Choline chloride	0.5
Pyridoxine-HCl	1	Riboflavin	0.1
Thiamine-HCl	10	Ascorbic acid	1
D-Calcium pantothenate	0.5	Vitamin A	0.005
Folic acid	0.2	Vitamin D_3	0.005
p-Aminobenzoic acid	0.01	Vitamin B_{12}	0.01
Hormones	Soybean × barley	Soybean × pea or *N. glauca*	
2,4-D	1	0.2	
Zeatin	0.1	0.5	
NAA	–	1	
Vitamin-free casamino acid[d]	125 mg l^{-1}		
Coconut water (from mature fruits; heated to 60°C for 30 min and filtered)	10 ml l^{-1}		

التهجين الجسمي Somatic hybridization:

أن أهم فوائد عزل البروتوبلاست هو امكانية استعماله في التهجين الجسمي بين الأنواع أو الأجناس المختلفة وحتى بين العائلات التي لا يمكن التهجين الجنسي بينها. ويسمى التهجين الجسمي لأنه يتم بين خلايا جسمية وليست جنسية.

فوائد التهجين الجسمي في مجال تحسين النبات:

1. اجراء التهجين بين الانواع أو الاجناس التي يصعب اجراء التهجين الجنسي بينها لتباعد القرابة الوراثية ، وذلك لانتاج أصناف جديدة ذات مواصفات مرغوبة.
2. اجراء التهجين بين النباتات المعمرة دون الانتظار لمرحلة التزهير اللازم لحدوث التهجين الجنسي.
3. التهجين بين النباتات ذات الاعضاء الجنسية غير الطبيعية او في حالة وجود عدم توافق ذاتي داخل النوع الواحد ، مما يعوق التهجين الجنسي بين النباتات.
4. انتاج نباتات متضاعفة من نفس النوع Polyploidy plants من نفس النوع مثل انتاج نباتات رباعية المجموعة الكروموسومية من الثنائية أو الثنائية من الآحادية.

دمج البروتوبلاست Protoplast fusion:

يجب دمج البروتوبلاست مع بعضها بسرعة قبل تكوين الجدار الخلوي من جديد ويتم الاندماج اما ذاتيا أو باحدى الوسائل التالية:

أ. استعمال المواد الكيميائية: حيث تستعمل مواد مثل نترات الصوديوم أو خليط من الاملاح مع تركيز عالي من الكالسيوم أو استعمال مادة بولي اثيلين كلايكول Poly ethylene glycol (PEG) . هذه المواد تسبب تغيرا في طبيعة الغشاء البلازمي المحيط بالبروتوبلاست في بعض المناطق مما يضعفه وبالتالي تقل الشحنه الكهربائية وتتلامس البروتوبلاست في تلك المناطق الضعيفة وبالتالي يمكن ان تندمج بسهولة.

ب. استعمال التيار الكهربائي: وذلك بوضع معلق البروتوبلاست في وعاء خاص وبين قطبين كهربائيين ثم يمرر تيار كهربائي ضعيف يسمح بتلامس البروتوبلاست ثم تعريضه لتيار كهربائي

شديد يؤدي الى حدوث خلل في مناطق التلامس مما يسمح لها بالاندماج. تعد هذه الطريقة هي الاكثر امانا من استعمال المواد الكيميائية.

انتخاب الهجن الجسمية Selection of somatic hybrids

يمكن لعملية الاندماج بين وحدات البروتوبلاست الناتجة من نوعين أ و ب مثلا تعطي المدمجات التالية:

(أ أ) و (ب ب) و (أ ب) ولذلك يجب انتخاب المدمج الهجين (أ ب).

خطوات التهجين الجسمي:

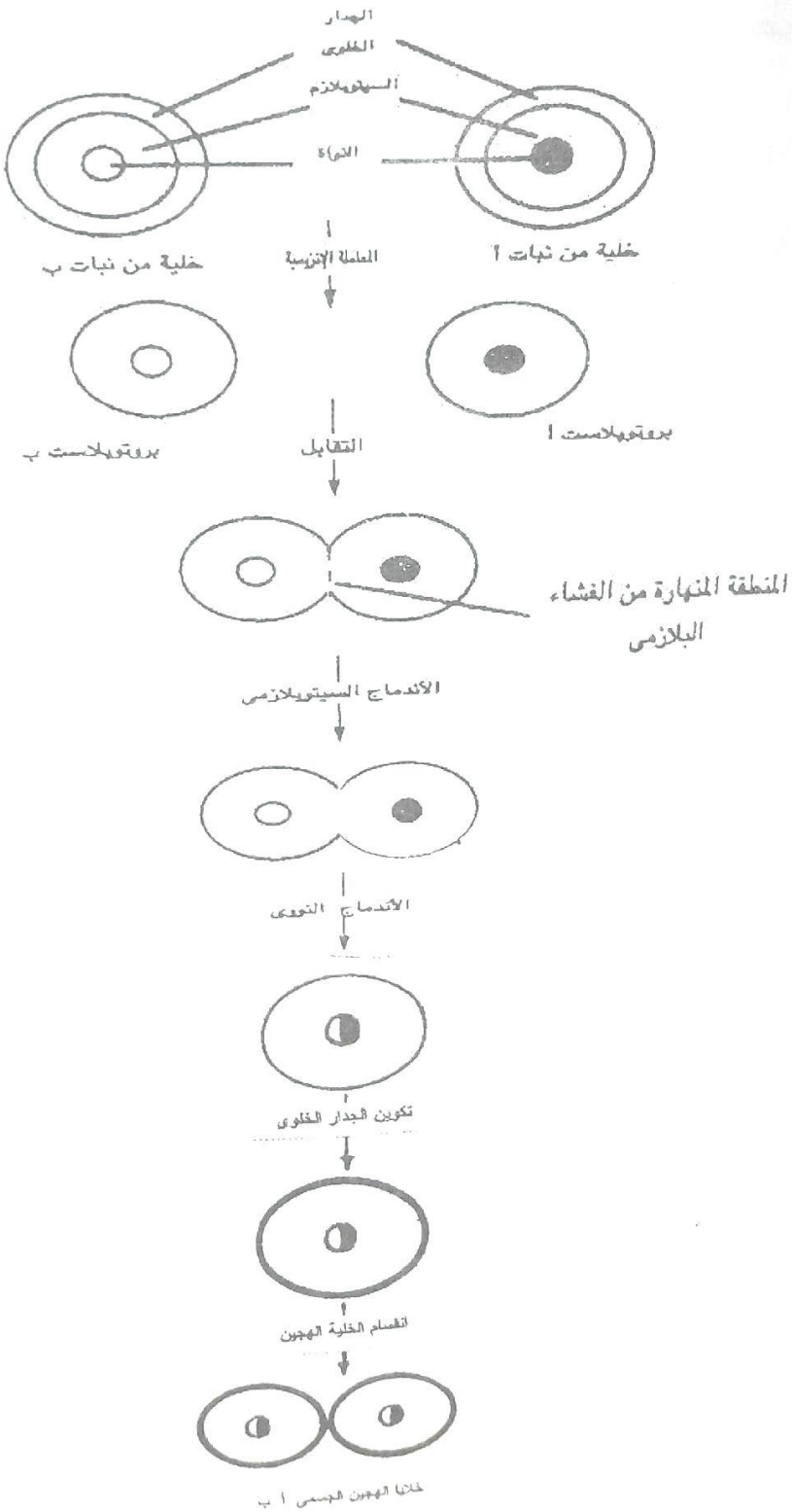
1. المعاملة الانزيمية.
2. انتاج البروتوبلاست
3. التقابل والتلامس بين وحدات البروتوبلاست المراد اندماجه
4. الاندماج السايتوبلازمي: ويحدث اندماج السايتوبلازم لوحدات البروتوبلاست
5. الاندماج النووي: يحدث اندماج نواتين وحدتي البروتوبلاست
6. تكوين الجدار الخلوي بعد اندماج البروتوبلاست
7. الانقسام الخلوي للهجين الجسمي المتكون

يمكن انتخاب الهجين الجسمي المطلوب (أ ب) من خلال اتباع الطرق التالية:

أ. الطريقة اللونية: وذلك عند دمج وحدات بروتوبلاست مختلفة مثل وحدات بها بلاستيدات خضر واخرى خالية منها ، أو يتم صبغ نوعي البروتوبلاست بصبغات خاصة مختلفة اللون وفي هذه الحالة يحتوي الهجين على نوعي الصبغة.

ب. الطرق الفيزيائية: وهي تعتمد على اختلاف بعض الخصائص الفيزيائية مثل الكثافة او الشحنة الكهربائية بين وحدات البروتوبلاست وكذلك المدمجات المختلفة.

ت. الطرق الفسيولوجية: وهو يعتمد على الهجين ذو التركيب الوراثي الذي يؤهله لتحمل بعض المؤثرات مثل المضادات الحيوية او هرمونات معينة او مستويات معينة من الحرارة والضوء في حين لا تتحملها وحدات بروتوبلاست اخرى.



خطوات التهجين الجسمى بين نباتين مختلفين

زراعة البروتوبلاست الهجين:

يجب عند زراعة البروتوبلاست الهجين ان تضبط كثافة وحدات البروتوبلاست عند الحد المناسب لضمان نجاح الزراعة. ويزرع البروتوبلاست الهجين باحدى طرق زراعة البروتوبلاست سابقة الذكر. ومن ثم تكوين الجدار الخلوي ويراعى توفير تراكيز عالية من الكالسيوم للمساعدة في تكوين الجدار الخلوي ويفضل استعمال الاجاروز بدلا من الاجار لاحتوائه على مواد قد تضر بوحدات البروتوبلاست. وعموما تستعمل نفس الاوساط الغذائية المستعملة في زراعة المعلقات الخلوية لنفس النوع النباتي. تختلف درجة الحرارة الملائمة لزراعة البروتوبلاست الهجين باختلاف نوع النبات. اما الضوء فزراعة البروتوبلاست يفضل في الظلام في المراحل الاولى وبعدها تتدرج شدة الاضاءة مع زيادة حجم المستعمرات الخلوية.

التخليق التجديدي لوحدات البروتوبلاست الهجين:

بعد نجاح الانقسام الخلوي لوحدات البروتوبلاست الهجين وتكوين الكالس تنقل الى اوساط غذائية جديدة لغرض التخليق التجديدي أما عن طريق توالد أفرع خضرية غير مباشر Indirect organogenesis من الكالس ثم يتم تجذيرها أو تكوين أجنة جسمية بصورة غير مباشرة من الكالس Indirect embryogenesis. وبعد ذلك يتم الحصول على النباتات الهجينة الجسمية التي يتم مقارنتها مع الاباء ويتم التأكد من تميزها بالصفات المرغوبة وثباتها في النباتات الجديدة الناتجة قبل اعتمادها أصناف جديدة.

التحسين الوراثي وحفظ المادة الوراثية:

التباينات الجسمية Somaclonal variations:

يعتمد استخدام تقنيات زراعة الانسجة في الاكثار الدقيق للنباتات على انتاج نباتات متماثلة مع بعضها ومع النبات الام في التركيب الوراثي True to type plants وذلك للحفاظ على صفات الصنف الاصلي. لكن غالبا ما يظهر بين النباتات الناتجة بعض النباتات الغريبة Off to type plants التي تختلف في مظهرها عن الصنف الاصلي. من الناحية الاقتصادية تعد النباتات الغريبة غير مرغوبة يجب استبعادها. او قد يستفاد منها في انتاج سلالات جديدة تحمل صفات وراثية جديدة مرغوبة لم تكن

موجودة في الصنف الاصلي. يطلق على كل التغيرات التي تطرأ على شكل او تركيب النباتات التي يتم انتاجها واكثارها خارج الجسم الحي مصطلح التباينات الجسمية Somaclonal variations وهذه التباينات تقسم الى نوعين هي وراثية وغير وراثية.

أ. **التباينات الوراثية Genetic variations:**

وهي التباينات التي تنشأ نتيجة حدوث تغير في المادة الوراثية للخلايا ولذلك فهي تنتقل من جيل الى اخر اي تورث وتقسم الى انواع هي:

أولا: تغيرات في عدد الكروموسومات وهي تقسم الى:

1. تغيرات عددية كاملة Polyploidy:

ويتم ذلك بزيادة مجموعة كاملة او اكثر من مجموعة الكروموسومات فتتحول الخلية من ثنائية المجموعة الكروموسومية Diploidy (2n) الى ثلاثية (3n) او رباعية (4n) او .... الخ من المجموعة الكروموسومية. وقد يسبب هذا التضاعف الى عقم في النباتات الجديدة كما هو الحال في المجاميع الفردية المتضاعفة من الكروموسومات مثل 3n و 5n.

2. تغيرات عددية ناقصة Aneuploidy:

وذلك يتم بزيادة او نقص كروموسوم واحد او عدد محدود من الكروموسومات وهذا النوع هو الاكثر شيوعا وقد يؤدي الى نقص في حيوية الخلايا او النباتات الناتجة منها كما قد يسبب تشوهات تركيبية او ضعفا في النمو ونقصا في المحصول.

ثانيا: تغيرات كروموسومية تركيبية Structural aberrations:

وتحدث في هيكل بناء الكروموسوم مثل نقص قطعة كاملة من كروموسوم ما او تكرارها او تغير في موضعها او حدوث تبادل بين قطعتين من كروموسوم. هذا النوع من التغيرات هو الأقل حدوثا من التغيرات العددية ويؤدي الى تغير في التوازن او التفاعل بين الجينات المحمولة على الكروموسوم مما يسبب تغييرا في التعبير الجيني وبالتالي على صفات الخلية والنبات الناتج.

ثالثا: طفرات جينية Gene mutations:

وتعني تغير في تركيب او بناء العامل الوراثي نفسه ، بالتالي تظهر صورة جديدة من العامل الوراثي تعبر عن صفه جديدة قد تكون مرغوبة او غير مرغوبة لذلك هذا النوع من التغيرات يغير صفه معينة في النبات.

ب. التباينات غير الوراثية Epigenetic variations:

وهي التغيرات المظهرية التي تنشأ نتيجة تغير ظروف الزراعة خارج الجسم الحي داخل المختبر وهي غير ثابته اذ تختفي بمجرد زوال هذه الظروف لذلك فهي لا تورث من جيل الى اخر ومن امثلتها:

1. تقزم الافرع مع غزارة التفريع نتيجة احتواء الوسط الغذائي على تراكيز عالية من السايتوكاينين مع نقص تركيز الاوكسين الذي يشجع التفريع واستطالة الفروع.
2. استعادة مظاهر الحداثة Juvenility في حالة النباتات الخشبية.
3. ظاهرة التزجج Vitrification في بعض النباتات نتيجة ارتفاع نسبة الرطوبة وقلة التهوية في اوعية الزراعة تظهر انسجة نباتات منتفخة وشبه شفافة سهلة الكسر.
4. تغيرات في تركيب الساق والاوراق مثل نقص سمك طبقة الكيوتكل وتشوه الثغور وزيادة حجم المسافات البينية بين الخلايا وذلك بسبب نقص الاضاءة وزيادة نسبة الرطوبة.

تختفي هذه التغيرات تدريجيا بعد نقل النباتات من غرفة النمو في المختبر الى مرحلة الاقلمة في البيت الزجاجي ومن ثم الى الحقل اذ يستعيد النبات خصائصه الظاهرية والتركيبية الطبيعية.

العوامل المؤثرة على ظهور التباينات الجسمية:

1. طريقة الاكثار Method of propagation:

عند الاعتماد على نمو البراعم الابطية لاكثار النباتات تكون نسبة حدوث التباينات الوراثية عند الحد الادنى. تظهر كثير من الانواع ثباتا وراثيا ملحوظا. على العكس عند نشوء النباتات من البراعم العرضية Organogenesis التي تتكون نتيجة وجود تراكيز عالية من السايتوكاينين او عند الاكثار بطريقة توالد الاجنة الجسمية (الخضرية) Embryogenesis تزداد نسبة التباينات الجسمية.

2. النوع النباتي Plant species:

تظهر بعض انواع النباتات ثباتا وراثيا عند اكثارها بالزراعة النسيجية عكس انواع اخرى التي تتصف بعدم الثبات الوراثي. كما يوجد ايضا اختلاف في معدل الثبات الوراثي بين الاصناف التابعة للنوع الواحد.

3. منظمات النمو Growth regulators:

ان الاوكسينات والسايتوكاينينات هي المسؤولة عن تنظيم انقسام ونمو الخلايا. لذلك فان نوع وتركيز منظمات النمو المستعملة في الاكثار النسيجي لها تأثير على معدل حدوث التباينات الجسمية. اذ يزيد المعدل كلما زاد التركيز المستعمل لمنظم النمو. كما ان بعض الاوكسينات مثل 2,4-D يشجع ظهور التباينات الجسمية اذا ما قورن بالاوكسين IBA . وكذلك الحال عند استعمال الكاينتين كسايتوكاينين يكون اكثر امانا من استعمال مركب BA.

4. تعدد مرات الزراعة الثانوية Number of subcultures:

تبين من الدراسات ان زيادة عدد الزروعات الثانوية في بعض الانواع النباتية يقود الى زيادة معدل حدوث التباينات الجسمية.

استحداث التباينات الوراثية Genetic variations induction:

يعد ظهور الطرز الوراثية الغريبة اثناء الاكثار خارج الجسم الحي من اهم عيوب هذا النوع من الاكثار خاصة اذا كانت هذه الطرز تحمل صفات غير مرغوب بها مثل ضعف النمو ونقص المحصول كما ونوعا. من ناحية اخرى يمكن الاستفادة من ظاهرة التباين الوراثي اثناء الاكثار الدقيق في انتخاب سلالات جديدة ذات صفات مرغوبة تتفوق على الصنف الاصلي. كما يمكن حدوث التباينات الجسمية تلقائيا او ذاتيا اثناء الاكثار الدقيق Micropropagation . او استحداث التباينات الجسمية الوراثية بتعريض الزروعات باختلاف انواعها الى معاملات فيزيائية او كيميائية تؤدي الى حدوثها خصوصا في الانواع التي يقل فيها حدوث التباينات الجسمية بطريقة ذاتية.

طرق استحداث التباينات الوراثية:

1. التشعيع Radiation:

تستعمل انواع عديدة من الاشعاعات مثل اشعة جاما والاشعة السينية (أشعة X) والاشعة فوق البنفسجية (UV) والاشعة النيوترونية واشعة الفا واشعة بيتا واشعة الليزر. يجب الحذر عند

التشعيع وذلك بتحديد الجرعة المناسبة لحدوث التباينات الجسمية مع اختيار المرحلة المناسبة من مراحل نمو الخلايا لتعريضها للاشعاع وكذلك اختيار ظروف بيئية ملائمة من حيث الاضاءة ةالحرارة والاوكسجين اثناء وبعد المعاملة بالاشعاع حتى لا تتأثر حيوية الخلية.

2. المواد الكيميائية المطفرة Chemical mutagens:

يتم تعريض الخلايا لمواد كيميائية خاصة وبتركيز معين ولمدة معينه ايضا. ثم تستبعد هذه المادة اما بالغسل او نقل الخلايا الى وسط خالي من هذه المادة. ان اهم هذه المواد المطفره هي: ايثيل ميثان سلفونات Ethyl methan sulfonate (EMS) وميثيل ميثان سلفونات Methyl methan sulfonate (MMS) ومادة أزايد الصوديوم Sodium azide وغيرها من المواد الكيميائية الاخرى.

يجب عند تعريض الخلايا للاشعاع او للمواد الكيميائية ان يتم انتخاب الطرز الجديدة المرغوبة بعد ذلك يتم نقلها الى اوساط غذائية جديدة ويعاد اختبارها لغرض التأكد منها. بعدها يتم الحصول على النباتات الجديدة من هذه الخلايا من خلال نقلها الى اوساط غذائية تشجع التكشف والتمايز للنباتات. بعد اكثارها يتم نقلها الى البيت الزجاجي ومن ثم الى الحقل.

التطبيقات العملية لاستعمال التباين الوراثي:

1. انتاج سلالات متحملة للملوحة: انتخاب سلالات جديدة من الرز والقمح والتبغ تتحمل مستويات عالية من الملوحة في التربة وماء الري.
2. انتاج سلالات مقاومة للامراض: انتخاب سلالات جديدة تتحمل امراض بكتيرية وفطرية لبعض النباتات الاقتصادية مثل الفراولة وقصب السكر والبطيخ والموز.
3. انتاج سلالات ذات محصول ذي قيمة غذائية عالية: انتخاب سلالات من الرز تحتوي حبوبها على محتوى عالي من الاحماض الامينية مثل السيرين والليسين والميثيونين والتايروسين.
4. انتاج سلالات مبكرة النضج: كما في محاصيل الشوفان والرز والقمح.

زراعة المتك وانتاج نباتات احادية المجموعة الكروموسومية:

Anther culture and the production of haploid plants:

المقصود بنباتات احادية المجموعة الكروموسومية هو تلك النباتات التي تحتوي خلاياها الجسمية على مجموعة واحدة من الكروموسومات (1N) بدلا من (2N) في الخلايا الطبيعية. أي أن خلايا النباتات الاحادية المجموعة الكروموسومية تحتوي على نسخة واحدة من كل كروموسوم ومن كل جين. تعد هذه النباتات عقيمة لفشل حدوث الانقسام الاختزالي أي لا تتكون بها كميتات جنسية فهي عديمة الفائدة. لكن هذه النباتات لها أهمية عند المختصين بتربية وتحسين النبات للاسباب التالية:

1. امكانية انتخاب عدد كبيرة من النباتات لان كل جين يعبر عن نفسه سواء كان سائد او متنحي.
2. امكانية احداث طفرات وراثية وبسهولة لان كل جين فيها يوجد بصورة مفردة.
3. انتاج نباتات متماثلة في كل عواملها الوراثية وذلك عند احداث تضاعف كروموسومي للنباتات الاحادية ، وهذه النباتات المتماثلة لها اهمية كبيرة في انتاج الهجن في برامج تحسين النباتات الاقتصادية.

زراعة المتك Anther culture:

للحصول على نباتات احادية المجموعة الكروموسومية لابد لنا من زراعة خلايا احادية المجموعة الكروموسومية مثل الخلايا التي توجد في المتوك (الاعضاء الذكرية). أن المتك هو الجزء الذكري من الزهرة المسؤول عن انتاج حبوب اللقاح اذ يحتوي المتك على الخلايا الامية لحبوب اللقاح كل منها لها القدرة على ان ينقسم اختزاليا على خطوتين:

1. يختزل عدد الكروموسومات بهذه الخطوة الى الصف اي تعطي خلية الام (2n) خليتين تحتوي كل منها على مجموعة واحدة من الكروموسومات (1n).
2. تنقسم كل من هاتين الخليتين الى انقسام خيطي فيكون الناتج هو اربع خلايا احادية المجموعة الكروموسومية (1n) هذه الخلايا تتطور لتعطي حبوب اللقاح Pollen grains.

اذا تم فصل المتك من البرعم الزهري في مرحلة مبكرة وتمت زراعته على بيئة غذائية في المختبر فأن الخلايا الاحادية سوف تنقسم وبدلا من ان تتطور لتعطي حبوب لقاح فأنها سوف تؤدي الى تكون اجنه احادية المجموعة الكروموسومية تظهر على سطح المتك بالطريقة المباشرة(Direct embryogenesis) او تنقسم الخلايا الاحادية المجموعة الكروموسومية لتنتج كالس على سطح المتك تنشأ منه بعد ذلك الاجنة الاحادية امجموعة الكروموسومية بالطريقة غير المباشرة (Indirect embryogenesis). كما

يمكن انتاج نباتات احادية المجموعة الكروموسومية من زراعة حبوب اللقاح وهذا أفضل لتجنب حدوث بعض المشاكل مثل التأثير المثبط لأنسجة جدار المتك على انقسام الخلايا الاحادية واحتمال اشتراك الخلايا الامية الثنائية المجموعة الكروموسومية الموجودة في المتك في عملية انتاج الاجنة الثنائية المجموعة الكروموسومية. لكن تعد طريقة زراعة حبوب اللقاح صعبة لكونها تحتاج الى ظروف خاصة جدا من المغذيات والعوامل الفيزيائية كالحرارة والرطوبة والضوء وصعوبة السيطرة على جمعها بعد عملية التعقيم السطحي لصغر حجمها.

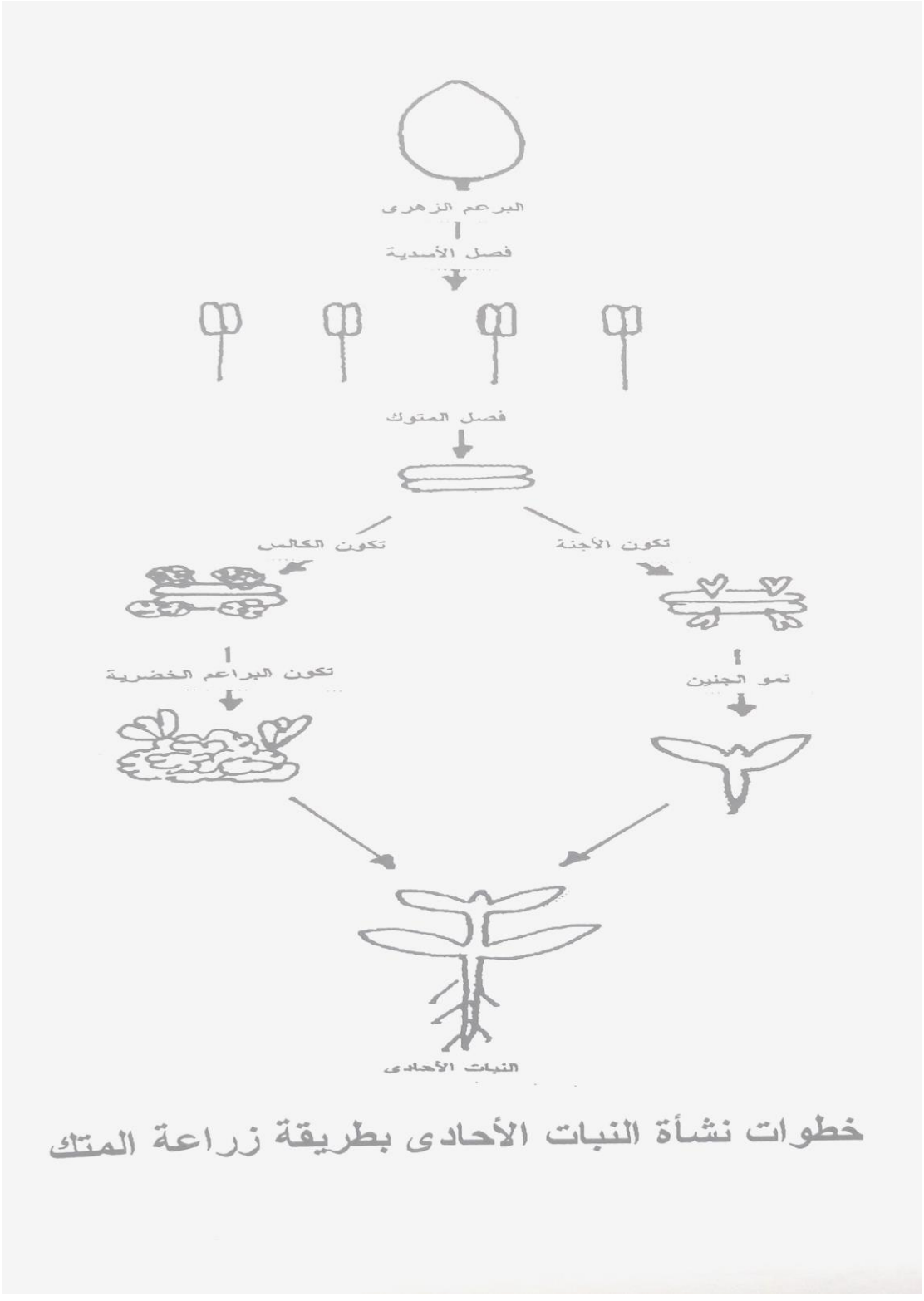
الخطوات والشروط اللازمة لزراعة المتوك لانتاج النباتات الاحادية:

1. تجمع البراعم الزهرية المقفلة في المرحلة المناسبة ويختار لذلك نباتات ذات نمو نشط وذلك في بداية موسم التزهير ثم توضع البراعم الزهرية في الثلاجة على درجة 5–7 °م ولعدة ايام 2–7 ايام.
2. اجراء التعقيم السطحي للبراعم الزهرية بمحلول التعقيم ثم يتم تشريحها لاستئصال المتوك مع مراعاة عدم حدوث اضرار وجروح فيها.
3. تزرع المتوك في أوساط غذائية صلبة تحتوي على الاجار Agar ومحتوية على الفحم المنشط Activated charcoal لتشجيع تكوين الاجنة أو تزرع في أوساط غذائية سائلة بطريقة الزراعة المعلقة Suspension culture.
4. تجمع الاجنة الناتجة من الزراعة وانباتها على اوساط غذائية مختلفة للحصول على نباتات احادية المجموعة الكروموسومية.
5. احداث التضاعف الكروموسومي باستعمال مواد كيميائية مثل مادة Colchicine بتركيز 0.5–1% لانتاج النباتات الثنائية المجموعة الكروموسومية المتماثلة Homozygous.

التلقيح والاخصاب خارج الجسم الحي In vitro pollination and fertilization:

يقوم مربي النبات باجراء التهجين الجنسي بين النباتات بهدف انتاج الهجن المختلفة وذلك ما يعرف بالتلقيح الصناعي Artificial pollination وهو نقل حبوب اللقاح من أزهار النبات الأب الى مياسم أزهار النبات الأم اذ تنبت حبة اللقاح وتنمو انبوبتها اللقاحية داخل القلم لتصل الى المبيض ثم الى البويضة فتدخل حتى تصل الى الكيس الجنيني وعندها يخرج من طرف الانبوبة اللقاحية نواتان ذكريتان احدهما تتحد مع البويضة فتتكون البويضة المخصبة Zygote التي تنمو لاحقا مكونة الجنين Embryo

والنواة الذكرية الاخرى تتحد مع النواتان القطبيتان التي توجد في وسط الكيس الجنيني لتكون نواة ثلاثية المجموعة الكروموسومية (3n) التي تنقسم لاحقا لتكون نسيج السويداء Endosperm الذي يغذي الجنين وبالنهاية سوف تتطور البويضة المخصبة لتعطي البذرة وبداخلها الجنين.



خطوات نشأة النبات الأحادى بطريقة زراعة المتك

هناك بعض الحالات التي يفشل بها التلقيح الصناعي للاسباب التالية:

1. فشل حبوب اللقاح في الانبات على الميسم.
2. بطء أو توقف نمو الانبوبة اللقاحية فلا تصل الى المبيض.
3. الاجهاض المبكر للمبيض قبل اكتمال الاخصاب وتكون البذرة.
4. حدوث خلل بين نمو الجنين وتطور الاندوسبيرم المغذي فيموت الجنين.

وللتغلب على هذه المشاكل تم اللجوء الى اجراء التلقيح والاخصاب خارج الجسم الحي.

خطوات التلقيح والاخصاب خارج الجسم الحي:

1. يتم اختيار أزهار نبات الام وهي في مرحلة البراعم وتشق وتستأصل منها الاسدية ثم تغطى بأكياس تمنع من تلقيحها من أزهار اخرى بعد التفتح.
2. بعد تفتح أزهار النبات الام تفصل منها الكرابل وتزرع على أوساط غذائية بعد تعقيمها أما على هيئة كرابل كاملة أو يستأصل منها الميسم والقلم ويزرع المبيض فقط أو تزرع البويضات مع المشيمة او تزرع البويضات فقط.
3. تجمع البراعم الزهرية للنبات الأب وتعقم ثم تفصل منها المتوك وتوضع في أطباق بتري معقمة وتترك حتى تنضج وتنتثر منها حبوب اللقاح.
4. تجمع حبوب اللقاح وتنثر على الاجزاء المؤنثة السابق زراعتها (على الميسم او على قمة المبيض او على البويضات)، فتبدأ حبوب اللقاح في الانبات وتتكون الانابيب اللقاحية ويتم حدوث الاخصاب Fertilization ويبدأ نمو الجنين وتتطور البويضة المخصبة لتصبح بذرة ناضجة محتوية على الجنين. بعد ذلك يتم انبات البذرة وينمو الجنين ليعطي النبات الهجين أو يفصل الجنين المتكون في مرحلة مبكرة ويزرع منفصلا لوحده ليكون النبات الهجين.

حفظ المادة الوراثية Germplasm preservation:

تتعرض النباتات البرية التي لا تزرع بطريقة منتظمة للانقراض وذلك عن طريق جمعها لاستعمالها في المجال الطبي مثل النباتات الطبية او ازالتها بغرض اصلاح الاراضي لزراعتها بالمحاصيل التقليدية. او انقرضها بفعل التعرض الى تلوث البيئة او ظروف بيئية قاسية مثل الجفاف الشديد او الملوحة. تعد هذه النباتات ثروة طبيعية يجب الحفاظ عليها نظرا لاحتوائها على تراكيب وراثية وميزات خاصة قد يحتاج

اليها الانسان في يوما ما ، اما عن طريق استعمالها مباشرة او قد يستعملها لنقل جينات خاصة منها بهدف التحسين الوراثي للنباتات الاقتصادية.

استعمال تقنيات زراعة الانسجة النباتية في حفظ المادة الوراثية:

تعد تقنيات زراعة الانسجة النباتية من الوسائل المهمة لحفظ الاصول الوراثية فيما تعرف ببنوك الجينات.

ومن مزايا استعمال هذه التقنيات هي:

1. المحافظة على الانواع النادرة والمعرضة للانقراض في مساحات مختبرية صغيرة.
2. المحافظة على النباتات العقيمة والتي لا تتكاثر جنسيا بالبذور او تلك النباتات التي تفقد بذورها الحيوية بعد التخزين او في حالة وجود مشاكل في انبات البذور اذ يجرى اكثارها لا جنسيا خارج الجسم الحي In vitro culture.
3. المحافظة على الانسجة بحالة سليمة بدون اي مسببات مرضية وهذا يضمن انتاج نباتات سليمة خالية من الامراض وذلك بتضاعف الانسجة خارج الجسم الحي.

شروط حفظ الانسجة خارج الجسم الحي:

عند حفظ الانسجة خارج الجسم الحي يجب المحافظة على بعض الخصائص طول مدة الحفظ وهذه الخصائص هي:

1. الثبات الوراثي للانسجة حتى لا يحدث تغير وراثي يسبب ظهور طفرات وراثية في الخلايا والنباتات الناتجة منها.
2. قدرة الانسجة المحفوظة على التضاعف النسيجي لانها تكون غير مفيدة في حالة عدم مقدرتها على انتاج نباتات كاملة عند الحاجة.
3. خلو الانسجة من الامراض طوال مدة الحفظ وذلك للحفاظ على حيويتها ولضمان الحصول على نباتات خالية من الامراض عند زراعة واكثار هذه الانسجة المحفوظة.
4. حيوية الانسجة بحيث يكون التالف منها اقل ما يمكن خاصة في حالة حفظ الانسجة النباتية لفترات طويلة.

طرق حفظ الاصول الوراثية خارج الجسم الحي:

يتم حفظ النباتات النادرة في المعمل اما بصورة مزارع للكالس او على هيئة اجنة او براعم خضرية مع تثبيط نموها عند الحد الادنى وبالتالي تكون الحاجة الى الزراعة الثانوية Subculture اقل ما يمكن.

ويتم تثبيط نمو الانسجة المحفوظة باحدى الطرق التالية:

1. خفض مستويات العناصر المعدنية والماء المتاح في الاوساط الغذائية.
2. اضافة مثبطات للنمو Growth inhibitors للاوساط الغذائية مثل السايكوسيل CCC وحامض الابسيسيك ABA.
3. خفض الضغط ومستوى الاوكسجين باستبداله بغاز النتروجين.
4. خفض درجات الحرارة (التبريد او التجميد) اذ يمكن حفظ الانسجة لفترات قصيرة بالتبريد على درجة حرارة 2–5 °م للنباتات المتساقطة الاوراق او عند 8–15 °م للنباتات الاستوائية وتحت الاستوائية. اما لحفظ الانسجة لفترات طويلة فيتم بالتجميد وذلك بحفظ الانسجة بالنتروجين السائل على درجة –196 °م. والتجميد يؤدي الى توقف النمو تماما طوال فترة التجميد.

ويراعى عند تجميد الانسجة ازالة اكبر كمية من الماء الموجود في الانسجة حتى لا يتحول الماء الى بلورات ثلجية في الخلايا وبالتالي تسبب تلف للانسجة المحفوظة. ويتم ذلك من خلال زراعة الانسجة على اوساط غذائية تمتص الماء مثل السكروز وال DMSO (dimethyl sulfoxide) والغليسرول. بعد التجميد يتم اعادة حيويتها وذلك بوضعها في حمام دافيء حتى تستعيد مرونتها وحيويتها. لقد تم حفظ العديد من البراعم الخضرية لنباتات مهمة مثل القرنفل والشليك والبطاطا والموز بطريقة الحفظ بالتبريد والتجميد.

تعد طريقة الحفظ للانسجة بالتبريد والتجميد من افضل الطرق المستعملة لحفظ الانسجة وذلك لقلة حدوث الطفرات الوراثية او الاصابات المرضية اثناء فترة الحفظ.

انتاج نباتات خالية من الأمراض:

معظم النباتات التي تتكاثر خضريا بالطرق التقليدية تحتوي على الفايروسات التي تؤثر في نموها وتقلل من انتاجيتها. ان المعاملة الحرارية للنباتات قد يكون لها تأثير في التخلص من الفايروسات ولكن البعض الاخر من الفايروسات يكون مقاوما لتلك المعاملة الحرارية. لذلك فأن افضل طريقة لانتاج نباتات خالية من كل الفايروسات والمسببات المرضية هي طريقة زراعة المرستيم القمي.

من المعروف أن هناك 800 فايروس نباتي تصيب الانواع النباتية المختلفة. وان لكل فايروس سلالات عديدة اي ان العدد سوف يزداد اضعاف المرات.

تصل الفايروسات الى النباتات بعدة طرق لاصابتها منها:

1. الانتقال الميكانيكي.
2. الانتقال عن طريق التكاثر الخضري والتطعيم.
3. الانتقال عن طريق البذور.
4. الانتقال عن طريق الحشرات.
5. الانتقال عن طريق النباتات المتطفلة.
6. الانتقال عن طريق التربة.

تتحرك الفايروسات مع عصارة النبات وتنتشر جهازيا وتسبب التلوث الداخلي للانسجة والتي من الصعب القضاء عليها باستعمال المواد الكيميائية.

الطرق المستعملة في انتاج نباتات خالية من الامراض الفايروسية:

1. زراعة المرستيم Meristem culture.
2. المعاملة الحرارية Heat therapy.
3. المعاملة الكيميائية Chemo therapy.
4. التخليق التجديدي Regeneration.
5. التطعيم الدقيق Micrografting.

هناك عدة احتياطات يجب اتباعها للحفاظ على النباتات بعيدا عن اي تلوث بالفايروسات هي:

1. يجب زراعة هذه النباتات في البيوت المحمية الخالية من النباتات المصابة وخالية من الحشرات الناقلة ومانعه لدخولها.

2. يجب مقاومة النواقل الفايروسية وخاصة الحشرات مثل حشرات المن والذبابة البيضاء وكذلك النيماتودا (الديدان الثعبانية) الموجودة في التربة.
3. يجب تعقيم الايدي والادوات اثناء التداول بالنباتات الخالية من الفايروسات حتى لا تصل اليها الاصابة.
4. يجب اجراء فحص دوري للنباتات والتخلص من النباتات المصابة بطرق امنه وباستمرار واجراء الاختبارات المختلفة للكشف عن الاصابات الفايروسية.
5. يجب الاعتماد على مصدر متجدد للنباتات الخالية من الفايروسات (مزارع الانسجة النباتية).

زراعة المرستيم Meristem culture:

استعملت هذه الطريقة لاول مرة في انتاج نباتات الداليا الخالية من الفايروسات. واصبحت هذه الطريقة الان هي الشائعة في اكثار النباتات البستنية لانتاج نباتات خالية من الفايروسات. اذ لوحظ من خلال الدراسات والابحاث ان فايروس موزاييك التبغ Tobacco mosaic virus يتوزع بطريقة غير متجانسة في المناطق المختلفة من الجذر لنبات التبغ. اذ لوحظ ان اعداد هذا الفايروس تقل كلما تقدمنا الى القمة النامية اذ ينعدم فيها. لتفسير هذه الحالة وضعت عدة فرضيات هي:

1. ان سرعة انقسام الخلايا المرستيمية وانتاج خلايا جديدة هي اكبر من سرعة تحرك الفايروس من خلية الى اخرى.
2. عدم وجود الروابط البلازمية Plasmodesmata في الخلايا المرستيمية والتي تعد المعبر الذي تمر منه الفايروسات من خلية الى اخرى.

يمكن زراعة اجزاء نباتية اخرى غير المرستيم القمي والتي تكون خالية من الفايروسات مثل البروتوبلاست والكالس والمبيض وبادئات الاجزاء الزهرية. لكن يعد المرستيم القمي هو الاكثر فعالية من الاجزاء النباتية المذكورة في اعلاه في انتاج نباتات خالية من الفايروسات. كما أن المرستيمات القمية يعاد توالدها بشكل اسرع من الانسجة التي تؤخذ من مصادر اخرى.

فصل وزراعة المرستيم القمي:

يتم اختيار النسيج المرستيمي من نباتات معروفة بصفاتها الوراثية الجيدة ومعدلات نموها العالية وذات الانتاجية العالية. اذ يتم فصل المرستيم القمي من افرع نامية بصورة جيدة والذي يتكون من منطقة مرستيمية وتحت المرستيمية. بعد فصلها يجب تنظيفها وتزال منها الاوراق قدر الامكان ثم تغمس بكحول

الايثانول تركيز 70% لازالة الفقاعات الهوائية الموجودة بين الأنسجة. ثم يتم اجراء التعقيم السطحي لتلك الانسجة في محلول هايبوكلورات الصوديوم المخفف. ثم تغسل المرستيمات عدة مرات بالماء المقطر المعقم لازالة الاثر المتبقي من المحلول المعقم. بعد ذلك تزال بقية الاوراق تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير 20–40 مرة. ثم يجرى تعقيم سطحي مرة اخرى للمرستيمات وبتركيز اقل من المحلول المعقم السابق ويتم غسله ايضا بالماء المقطر المعقم لعدة مرات ثم تزال مباديء الاوراق تحت المجهر الضوئي ثم تفصل القمة المرستيمية كلها وعليها واحد او اثنتان من مباديء الاوراق بواسطة مشرط معقم وتزرع مباشرة على الوسط الغذائي لتلافي حدوث الجفاف ويكون المرستيم القمي صغير جدا يتراوح قطرهه 0.1 ملم وطوله 0.2–0.4 ملم. يؤثر نوع البرعم (طرفي او جانبي) في نجاح زراعة القمة المرستيمية وكذلك موقع البرعم (قاعدي او طرفي). يعتمد نجاح المرستيم القمي في انتاج نباتات خالية من الفايروسات بالدرجة الاساس على حجمه فكلما كان صغيرا كلما النتيجة تكون افضل.

يراعى ما يلي عند زراعة المرستيم القمي:

1. يزرع المرستيم على وسط غذائي شبه صلب او في وسط غذائي سائل.
2. يجب ان يكون pH الوسط الغذائي بين 5.4–6.0.
3. يستعمل السكروز في الوسط الغذائي بتركيز 2–5%.
4. يضاف الى الوسط الغذائي فيتامين ب (Vitamin B) و Pyridoxin و Panthothenic و Nicotinic acid.
5. تضاف منظمات النمو بتراكيز منخفضة.
6. ضبط درجة حرارة النمو المثلى بين 21–25 °م وتحتاج الابصال الى درجة حرارة أقل.
7. يتم التحضين في مدة اضاءة يومية من 14–16 ساعة ضوء.

المعاملة الحرارية Heat therapy:

استعملت الحرارة العالية بشكل واسع لانتاج نباتات خالية من الفايروسات اذ يتم معاملة النباتات الام في البيوت المحمية بالحرارة العالية اي بدرجة حرارة 30–40 م لمدة 6–12 اسبوع . لذلك سوف تكون الافرع النامية بعد المعاملة خالية من الاصابات الفايروسية اذ تمنع الحرارة العالية من تضاعف الفايروسات لانها تثبط من تضاعف بروتيناته. فقد تم القضاء على فايروسي البقع الحلقية والتبرقش في نبات القرنفل بعد معاملته بدرجة حرارة 35–40 م لمدة 3–15 اسبوعا. تحتاج كل مجموعة من

الفايروسات لمدى حراري معين ليتم القضاء عليها في النباتات المصابة. تعد هذه الطريقة فعالة في القضاء على العديد من الفايروسات الا انها يعاب عليها لحساسية العديد من النباتات للتعرض الى الحرارة العالية او عدم تأثر بعض انواع الفايروسات بالحرارة العالية. لذلك من المهم تحديد درجة الحرارة ومدة المعاملة اللازمة التي لا تحدث الضرر بالنباتات وفي نفس الوقت تقضي على الفايروسات. لقد وجدت الدراسات ان اشجار الفاكهة تكون هذه الطريقة ملائمة لها وخصوصا اشجار الفاكهة التي يصعب اكثارها بطريقة زراعة المرستيم القمي.

المعاملة الكيميائية Chemo therapy:

لقد وجدت الدراسات ان اضافة بعض المواد الكيميائية الى الوسط الغذائي تكون كفيلة بالقضاء على الفايروسات الموجودة في النسيج المزروع. من هذه المواد هي Virazole و Ribavirine التي تثبط تضاعف الفايروس. لقد وجد اضافة 100 ملغم/لتر من Virazole الى الوسط الغذائي ادى القضاء على فايروس CMW من الانسجة المرستيمية لنبات التبغ. لكن يعاب على هذه الطريقة ان هذه المواد الكيميائية هي غالية الثمن وهي تؤثر في نمو الانسجة النباتية. كما يمكن تقليل تركيز المادة الكيميائية واستعمالها مع المعاملة الحرارية للقضاء على الفايروسات.

التخليق التجديدي Regeneration:

تكوين الاجنة الجسمية Somatic embryogenesis من نسيج النيوسيلة للحمضيات والتي تكون خالية من الفايروسات كما ان تكون الافرع العرضية Organogenesis لبعض النباتات تكون خالية من الفايروسات كما في العنب والتبغ والبيتونيا. كما لوحظ اختفاء الفايروسات من الكالس عند اجراء الزراعة الثانوية له Sub-culture ساهم في تخليق نباتات تبغ خالية من الفايروسات.

التطعيم الدقيق Micro-grafting:

يصعب في بعض الحالات نمو المرستيم وبالتالي يتطلب اجراء تطعيم ذلك المرستيم على اصل خالي من الفايروسات خارج الجسم الحي. يكون التطعيم الدقيق مهم جدا في النباتات الخشبية الذي يكون فيها زراعة المرستيم القمي في غاية من الصعوبة.

التعرف على الاصابة بالفايروسات:

من المعروف انه من الصعوبة التعرف على الاصابة الفايروسية بمجرد النظر بالعين المجردة فقد تكون الاصابة متخفية او يكون الفايروس كامنا Latent virus infection فلا تظهر اعراض للاصابة في حينها لذا يجب استعمال احدى الطرق التالية لغرض التعرف على النباتات الخالية من الفايروس:

1. طريقة نباتات الاختبار Test plants: ويتم في هذه الطريقه اخذ العصارة النباتية المحتوية على الفايروس من النبات المطلوب اختباره وعمل عدوى صناعية لعدد من النباتات المعروفة باسم نباتات الاختبار فاذا كانت مصابة بالفايروس فانها اعراض الاصابة سوف تظهر بعد عدة ايام من اهم النباتات المستعملة هي *Chenopodium quinoa* و *Nicotiana tabacum*. ومن عيوب هذه الطريقة احتياجها مدة زمنية طويلة لغرض معرفة نتيجة الاختبار. كما انها تحتاج الى تهيئة ظروف النمو مثل البيوت المحمية المحكمة ومانعة لدخول الحشرات ومتحكمة في السيطرة على درجة الحرارة كما تحتاج هذه الطريقة لعدد اكبر من النباتات لهذا الاختبار.
2. طريقة المجهر الالكتروني Electronic microscope: يتم بهذه الطريقة فحص قطرة من عصارة النبات المطلوب اختباره بعد اجراء تصبيغه بالصبغة السالبة للتحقق من وجود الجزيئات الفايروسية بداخل النبات . وتعد هذه الطريقة سريعة لعملية الكشف عن وجود الفايروسات في العصارة النباتية للنباتات المصابة.
3. طريقة الأمصال Serology: يتم حقن الارانب بالفيروس النقي الذي يعتبر مولدا مضادا Antigen فتكون اجسام مضادة Antibodies متخصصة في مصل دم الارنب ويعرف بالمصل المضاد Antiserum. تؤخذ قطرة من عصارة النبات المطلوب اختباره وتجرى لها بعد ذلك طرد مركزي بعدها تضاف الى نقطة من المصل المضاد. فاذا الفايروس كان موجودا فيحدث لها ترسيب مباشرة.
4. طريقة اختبار المصل المتخصص عن طريق المجهر الالكتروني Immunoelectronic microscope: يتم بهذه الطريقة الجمع بين طريقتي الامصال والفحص بالمجهر الالكتروني اذ تضاف قطرة من المصل المضاد الى قطرة من العصارة النباتية للنبات المراد اختباره ويتم فحصها تحت المجهر الالكتروني ويتم ملاحظة التفاعل Serology وفي نفس الوقت التعرف على وجود الجزيئات الفايروسية. وتعد هذه الطريقة على درجة عالية من الدقة في الكشف على الفايروس.

انتاج نباتات خالية من الامراض البكترية والفطرية:

يمكن الحصول على زروعات خالية من الاصابات المرضية البكتيرية والفطرية عن طريق زراعة القمة المرستيمية. أن اجناس البكتريا التي يجب ان يخلو النسيج المزروع خارج الجسم الحي هي :

Pseudomonas, Xanthomonas, Bacillus, Erwinia .

أما أجناس الفطريات التي يجب ان تخلو الانسجة النباتية منها خارج الجسم الحي هي:

Rhizoctonia, Fusarium, Verticillium, Phytophthora .

من السهل الكشف عن وجود الاصابة البكتيرية او الفطرية للنسيج النباتي حيث تبدا هذه الاحياء المجهرية بالنمو حول النسيج النباتي في الوسط الغذائي ويمكن رؤية الاصابة بالعين المجردة ويمكن فحصها بصورة ادق بالمجهر الضوئي لتشخيصها. ويمكن انتاج نباتات خالية من المسببات المرضية البكترية او الفطرية عن طريق استعمال المبيدات مثل البينليت.