### ثالثًا المرحلة السابقة للشتل Pretransplanting Stage (أو Stage III)

إن الهدف من هذه المرحلة هو تهيئة النموات المتضاعفة للصلاحية للشتل بتوفير الظروف التى تسمح بتجذيرها فى البيئات، الأمر الذى يتحقق بخفض تركيز السيتوكينين أو حذفه من إضافات البيئة، مع زيادة تركيز الأوكسين، فتلك ظروف تسمح بتكوين جذور جديدة مع استطالة النموات بعد أن كانت الظروف السابقة (التركيز العالى للسيتوكينين) تسمح بتضاعف النموات فقط، تستغرق هذه المرحلة نحو ٢-٤ أسابيع

### رابعًا مرحلة الشتلة Transplant Stage (أو Stage IV)

تتضمن هذه المرحلة نقل النبات الصغير من ظروف البيئات المعقمة إلى البيئة العادية فى الصوبات أولا ثم فى مكانه النهائى بعد ذلك تمر النباتات خلال تلك المرحلة بفترة أقلمة acclimation تجعلها قادرة على البقاء عند نقلها إلى الظروف الطبيعية الخارجية وفى بداية هذه المرحلة يُحافظ على نسبة عالية من الرطوبة النسبية حول النباتات، مع حمايتها من كافة الإصابات المرضية والحشرية، ويلى ذلك تعريض النباتات — تدريجيًا — إلى ظروف أقرب إلى الظروف الطبيعية (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣)

ويبين شكل (٦-١) تخطيطًا لمختلف مراحل الإكثار الدقيق

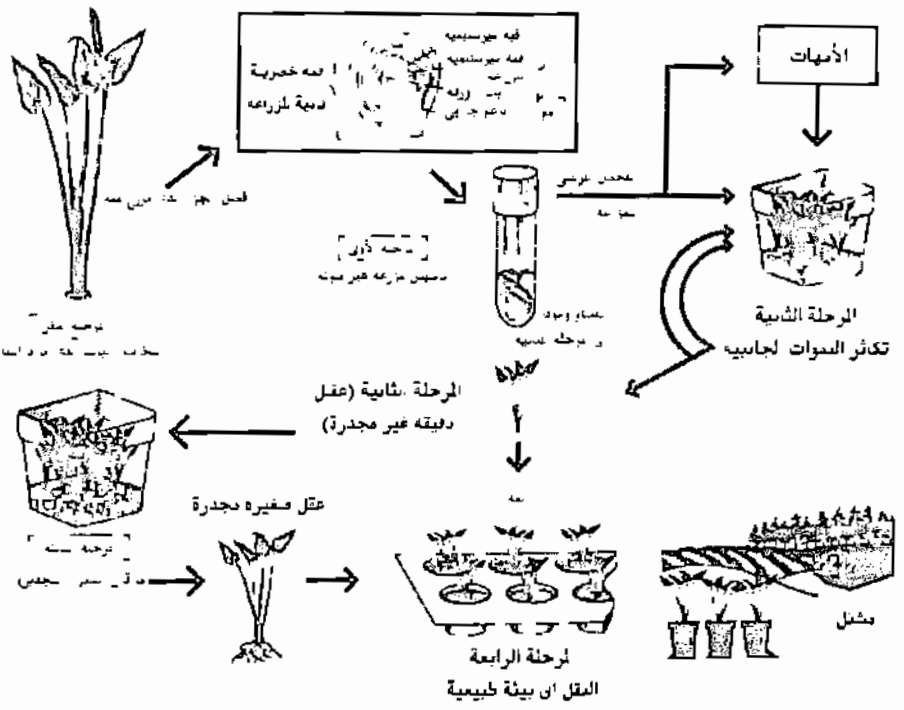
## طرق التكاثر وتجديد النمو فى مزارع الإكثار الدقيق

### مزارع الأنسجة والأعضاء النباتية

يحدث التكاثر وتجديد النمو regeneration فى مزارع الأنسجة والأعضاء النباتية بأحد خمس طرق (يتداخل بعضها معًا)، كما يلى

### أولاً من خلال النمو المباشر (من خلال تكاثر البراعم الخضرية وتحفيز النمو الجانبى)

يحدث النمو المباشر بتكاثر الميرستيم المتواجد أصلاً فى الجزء النباتى المزروع، كما فى مزارع القمة الميرستيمية، ومزارع القمة النامية الخضرية، ومزارع البراعم الإبطية، ومزارع العقدة المفردة




شكل (٦-١) مراحل الإكثار الدقيق (عن Kane ٢٠٠٥)

يمكن الحصول على الأجزاء النباتية التى تستعمل فى التكاثر إما من النباتات النشطة فى النمو، وإما من النباتات الساكنة

ولبدء زراعة البراعم تُزال الأوراق المحيطة بالبرعم بعناية، وبعد غسيلها بماء الصنبور، فإن البراعم تغسل بمحلول منظف مخفف جدًا، ثم تعقم فى محلول مخفف من كلوريد الزئبقيك أو هيبوكلوريت الصوديوم يحتوى على نقطة من مادة مبللة، مثل توين ٢٠، ثم تغسل عدة مرات بماء معقم قبل نقلها لبيئة الزراعة

ويلى ذلك نقل القمم البرعمية المطهرة سطحيًا إلى بيئة الإكثار، حيث تتكون فيها نموات جديدة عديدة، ويلى ذلك نقلها منفردة إلى بيئة التجذير، وتنقل بعد ذلك النباتات التى يتكون بها مجموعًا جذريًا قويًا إلى حيث تجرى أقلمتها وبتلك الطريقة يمكن زيادة معدل التكاثر من النبات الواحد بنحو ١٠٠٠٠ مرة فى المتوسط

يتحقق الإكثار السريع — من خلال النمو المباشر — بإحدى طريقتين تُحفَّز فى

أولاهما البراعم الإبطية التى توجد بالجزء النباتى المزروع، وفى آباط النموات الجديدة المتكونة تحفز للنمو إلى فروع جديدة، وذلك بتوفير تركيز عالٍ نسبيًا من سيتوكينين فى بيئة الزراعة. وبعد فترة مناسبة يتم فصل كل نمو جانبى جديد إلى بيئة طازجة جديدة لتكوين مزيد من النموات الجديدة. أما الطريقة الأخرى فإنها تناسب الأنواع التى لا يمكن أن يتحقق فيها التفريع الإبطى السريع، حيث ينمو فيها كل برعم إبطى إلى نمو خضرى واحد، حيث يتم فى هذه الحالة عمل عقل من تلك النموات تحتوى كل منها على عقدة واحدة (nodal segments)، وتزرع فى بيئة جديدة لمزيد من الإكثار

وتجدر الإشارة إلى أن تحفيز النمو لجانبى فى المزارع يتم بتوفير السيتوكينين فيها بتركيز معين، إما مع الأوكسين، وإما بدونه. ويؤدى استمرار توفر السيتوكينين فى المزرعة إلى نمو البراعم الجانبية التى تتكون فى القمة الميرستيمية التى تنمو من البراعم المزروعة (أى من الـ nodal segments)، ثم تنمو البراعم الجانبية التى تتكون فى القمم الميرستيمية الجديدة . وهكذا يؤدى استمرار هذه العملية — لعدة مرات — إلى تكون كتلة من النموات الجديدة.

وعلى الرغم من توقف تكاثر المزرعة الواحدة بهذه الطريقة بعد فترة . إلا أنه يمكن استمرار التكاثر — فى هذه المرحلة — بنقل أجزاء من المزرعة إلى مزارع أخرى جديدة، وبذلك يمكن استمرار التكاثر إلى مالا نهاية، إلى درجة أنه يمكن — على سبيل المثال — إنتاج من ١٥–٢٥ مليون نبات فراولة من نبات واحد فى العام؛ لأن كل نبات يكون قادرًا على إنتاج ١٠ نباتات جديدة كل أسبوعين.

هذا .. وبينما توجد الجذور — طبيعيًا — فى حالة التميز من الجنين الجنسى الذى يحتوى — بطبيعته — على جذير، فإن عملية التجذير تعد ضرورية فى الحالات التى تنمو فيها النباتات من الأجنة الجسمية. ولإحداث التجذير يلزم نقل النموات المتكونة إلى بيئة أخرى، تختلف فى مكوناتها الهرمونية عن بيئة التكاثر ويكون نقل النموات الخضرية — عادة — إلى هذه البيئات وهى بطول حوالى ١ سم، ثم تنقل النباتات بعد أن تتكون جذورها إلى أصص معقمة بحرص تام، وتتعهد بالرعاية إلى أن تكبر

هذا .. ويندرج تحت النمو المباشر الإكثار الدقيق بتكوين الدرنات في المزارع كما يلي:

يعد تكوين الدرنات في المزارع in vitro tuberization إحدى وسائل الإكثار الدقيق، وتجرى تلك الطريقة –في البطاطس – بزراعة نموات مزارع أنسجة البطاطس الخضرية في بيئة تحتوى على سيتوكينينات وتعريضها للضوء لمدة ٨ ساعات يوميًا في حرارة ٢٢م. وأهم ما يميز تلك الطريقة إمكان إنتاج الدرنات الصغيرة تلك في أى وقت من العام، مع إمكان شحنها من مكان لآخر بسهولة، وتخزينها لعدة شهور.

### ثانيًا: من خلال تكوين البراعم العرضية

بينما تنشأ النموات العادية من الميرستيم القمى أو من البراعم التى توجد فى آباط الأوراق، فإن النمو العرضى ينشأ من براعم عرضية تتكون إما مباشرة على الجزء النباتى المزروع، وإما بطريقة غير مباشرة من الكالوس الذى يتكون على الأجزاء المقطوعة لتلك الأجزاء المزروعة.

**ومن بين أنواع الأجزاء النباتية المزروعة التى يتكون منها نموات عرضية، ما يلي:**

١ – أجزاء الأوراق.

٢ – الفلقات، والسويقة الجنينية السفلى، وغيرهما من أجزاء البادرة.

٣ – أجزاء من نورات غير مكتملة التكوين وحواملها

٤ – التراكيب الورقية الإبرية كما فى المخروطيات

٥ – أوراق الأبصال، وهى التى تحتوى على حلقات من النسيج الميرستيمى فى قواعدها

٦ – أقراص من النسيج النباتى، مثل تلك التى تؤخذ من درنات البطاطس من نسيج القشرة – حول الأسطوانة الوعائية – وليس من النخاع.

يحدث النمو المباشر بتحول بعض الخلايا البرانشيمية (التى تقع فى البشرة أو تحتها مباشرة فى السيقان) إلى خلايا ميرستيمية، تعرف كل مجموعة منها باسم

meristemoid، وهى البراعم العرضية الحقيقية التى تستمر فى نموها لتعطى النموات الجديدة

أما النمو العرضى المباشر فإنه يتضمن أولاً تكوين كالس على الأجزاء المزروعة فى البيئة، تنمو من حواف هذا الكالوس النموات الجديدة التى لا تكون — فى بادئ الأمر — متصلة بالجهاز الوعائى للجزء النباتى المزروع ويمكن أن تعطى النموات العرضية من هذا الكالس معدلات عالية جدًا من التضاعف، تكون أعلى بكثير من تلك التى تنتج من النموات الجانبية ويقابل ذلك زيادة متوقعة فى نسبة النباتات المخالفة وراثيًا من بين التى تنشأ عرضيًا من الكالس (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣)

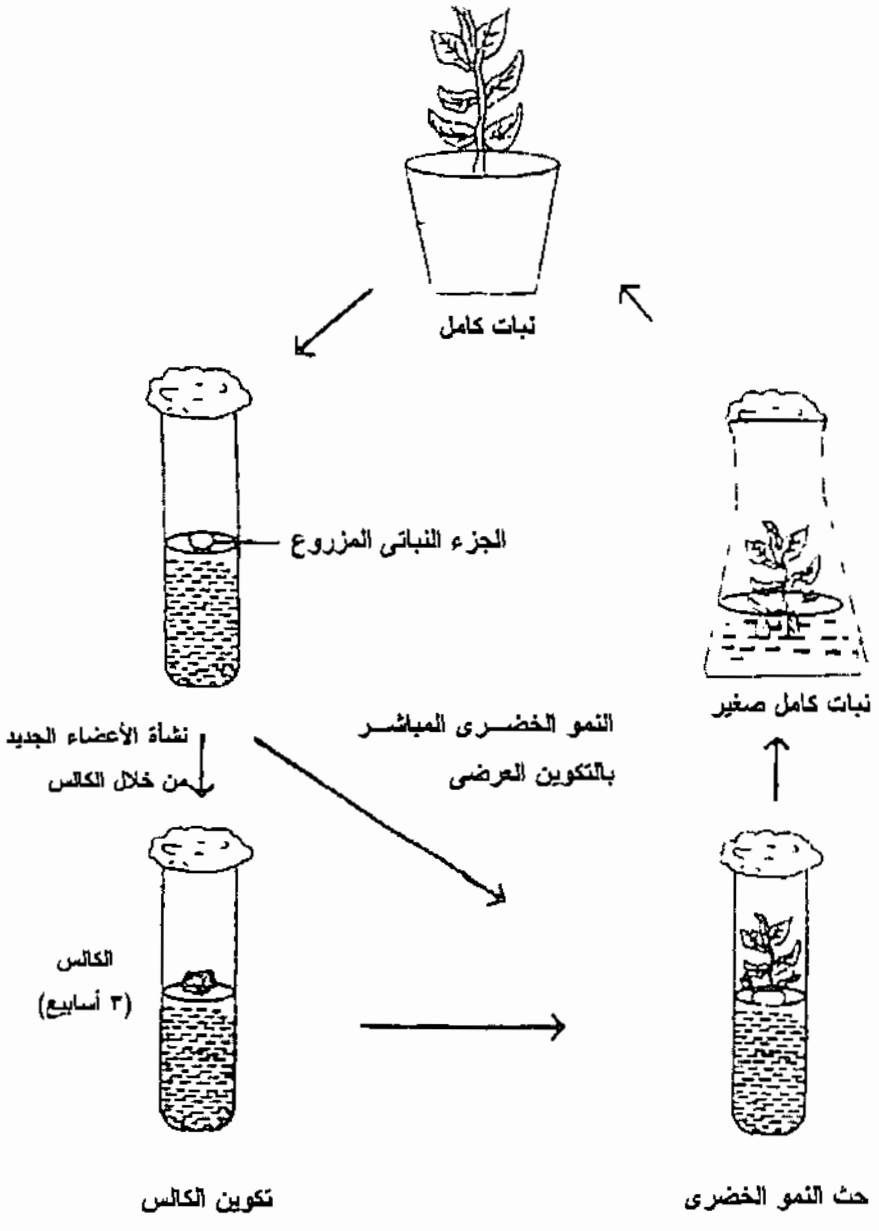
يحدث التميز فى خلايا الكالس إما بتكوين الجذور والنموات الخضرية مباشرة، وإما من خلال هذه الطريقة — وبسبب حالات التضاعف الكروموسومى والتباينات الوراثية التى ترافقها — لم يشع استخدامها سوى فى أنواع نباتية قليلة، مثل الموالح، والنخيل، والبن.

### ثالثًا. من خلال نشأة أعضاء جديدة

يعرف تجديد النمو الذى يعتمد على ظاهرة نشأة الأعضاء باسم organogensis، حيث تتكون أعضاء جديدة مفردة — مثل الجذور والنموات الخضرية - إما مباشرة من الأنسجة النباتية غير الميرستيمية المنتظمة التكوين (مثل مزارع أنصال الأوراق ومزارع الفلقات إلخ)، وإما بصورة غير مباشرة، تكون — بدورها — إما من الكالس أو الخلايا المفردة التى قد تنتج عن زراعة تلك الأجزاء غير الميرستيمية المنتظمة التكوين، وإما من مزارع الكالس ومزارع الخلايا ذاتها وتعرف الطريقة غير المباشرة لنشأة الأعضاء باسم de novo origin (شكل ٦-٢)

### رابعًا. من خلال تكوين الأجنة الجسمية

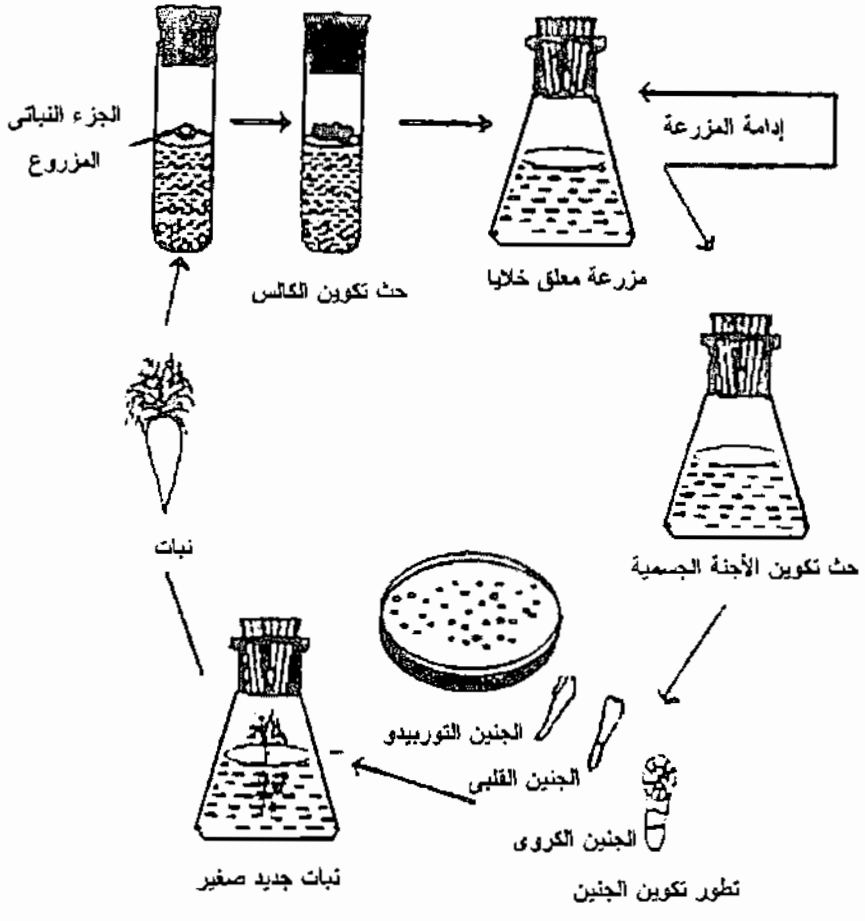
يعرف تجديد النمو الذى يعتمد على ظاهرة نشأة الأجنة الجسمية باسم somatic embryogensis (شكل ٦-٣)، بتكوين تراكيب ثنائية القطب الميرستيمى (bipolar) تعطى نموًا جذريًا وخضريًا معًا، وتعرف هذه الطريقة لنشأة الأجنة الجسمية باسم de novo origin




شكل (٦-٢): تجديد النمو الخضرى عن طريق نشأة أعضاء جديدة organogensis.

يمكن أن تنشأ الأجنة الجسمية فى مزارع الأنسجة من أنواع كثيرة من الأجزاء النباتية المستعملة فى الزراعة (explants)، مثل الأوراق، والأجزاء الزهرية، والنورات،

والمتوك. والأجنة غير المكتملة التكوين، والنيوسيلة . إلخ وتمر الأجنة الجسمية بذات المراحل التى تمر بها الأجنة الجنسية، وهى مراحل التكوين الكروى globular، والقلبى التكل heart-shaped، والتوربيدو torpedo، والفلقى cotyledonory فى ذوات الفلقتين، والكروى، والصفيحى أو الحرشفى scutellar، والغمدى coleoptilar فى ذوات الفلقة الواحدة




شكل (٦-٣) تجديد النمو عن طريق نشأة أجنة جسمية embryogensis فى الجزر

هذا وتتكون الأجنة الجسمية إما مباشرة دون المرور بمرحلة نمو كالوسى. وإما بطريقة غير مباشرة من خلال الكالس وفى كلتا الحالتين يمر تكوين الجنين الجسمى

بمرحلتين، حيث يستحث أولاً على تكوين خلايا ذات قدرة جنينية تنافسية (تعرف باسم proembryonic cell masses، أو clumps، أو proembryos) فى وجود تركيز عال من الأوكسين، ويلى ذلك تطور الكتل الجنينية (أو الـ proembryos) إلى أجنة فى غياب الأوكسينات أو فى وجود تركيز منخفض منها (عن Kaur وآخرين ٢٠٠٠).

وقد أمكن إنتاج أجنة جسمية فى أنواع مختلفة من المزارع لعدة أنواع محصولية، ومن أمثلتها ما يلى:

| المحصول | | العضو أو النسيج النباتى المستخدم كمصدر للجنين الجسمى |
|---|---|---|
| الثيف | *Allium schoenoprasum* | النواتان المساعدتان فى الكيس الجنينى |
| الرجلة | *Portulaca oleracea* | الإندوسبرم |
| الفراولة البرية | *Fragaria vesca* | النواتان المساعدتان |
| الفلفل من النوع | *Capsicum frutescens* | الجنين |
| الفلفل | *C. annuum* | التوك |
| الهندباء | *Cichorium endivia* | الجنين |
| الكوسة | *Cucurbita pepo* | السويقة الجنينية العليا – الفلقات |
| الأسبرجس | *Asparagus officinalis* | السويقة الجنينية العليا – الأوراق – التوك – الساق – الجنين – البروتوبلازم – الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة |
| الطماطم | *Lycopersicon esculentum* | الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة |
| الطماطم البرية | *L. pimpinellifolium* | الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة |
| الجزر | *Daucus carota* | الجنين – نسيج الكالس – السويقة الجنينية العليا – الأوراق – أعناق الأوراق – اللحاء – البروتوبلازم – الجذور – السيقان |
| الفينوكيا | *Foeniculum vulgare* | الساق – الجنين |

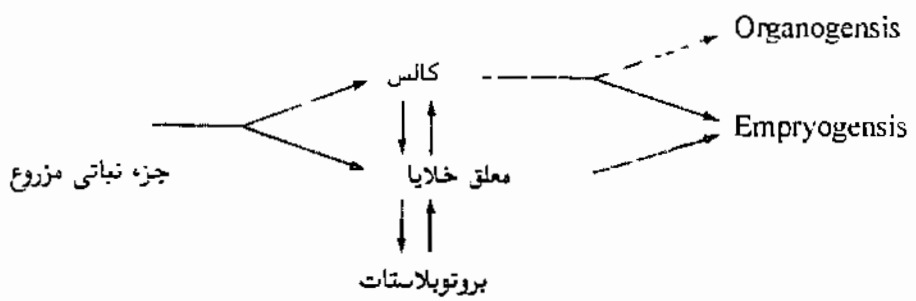
ولمزيد من التفاصيل عن هذا الموضوع .. يراجع Tisserat وآخرون (١٩٧٩).

## مزارع الكالس والخلايا والبروتوبلاست

إن زراعة الخلايا النباتية — إما على صورة نسيج كالس، وإما على صورة معلقات من الخلايا أو البروتوبلاستات — يوفر وسيلة هامة — قد تكون أساسية — لتجديد نمو نباتات كاملة، ولكن بسبب كثرة التباينات الوراثية التى تصاحب تلك النوعية من المزارع فإنها لا تستخدم كثيرا فى إكثار الأصناف، وإن كانت تستعمل فى الدراسات الوراثية، والتربية، والهندسة الوراثية وعلى الرغم من ذلك فهى تقدم وسيلة فعالة لتكوين الأجنة الجسمية بأعداد هائلة، وهى التى يمكن زراعتها حقليًا وهى محمولة فى السوائل (fluid drilling)

يبدأ حث تكوين الجذور والسيقان ومبادئ الأجنة proenbryoids بإعادة تميز مجموعات من الخلايا البرانشيمية مكونة مراكز للنشاط الميرستيمى، وقد أطلق عليها اسم meristemoids فى حالة الـ organogensis، و preembryonic masses فى حالة الـ embryogensis ويتوقف حدوث الـ organogensis أو الـ embryogensis على الجزء النباتى المزروع، ولكن الاتجاه قد يمكن التحكم فيه بالتحكم فى مكونات بيئة الزراعة (شكل ٦-٤)

كذلك تنتج الأجنة الجسمية إما مباشرة (مثلما يكون عليه الحال عند استعمال النسيج النيوسيلى لأصناف الموالح ذات البذور متعددة الأجنة، وبويضات العنب، وأجنة الكاكاو غير المكتملة التكوين)، وإما بصورة غير مباشرة من خلال نسيج الكالس أو مزارع الخلايا المعلقة وتنشأ الأجنة الجسمية من خلايا أحادية تقع داخل عناقيد من الخلايا الميرستيمية فى الكالس أو فى المعلق




شكل (٦-٤) تخطيط لمراحل الـ organogensis والـ embryogensis فى مزارع الكالس والخلايا والبروتوبلاست.

ونظرًا لسبق مناقشة موضوع مزارع البروتوبلاست بالتفصيل فى الفصل الرابع من هذا الكتاب، فإننا نقصر المناقشة على كل من مزارع الخلايا ومزارع الكالس فقط.

### مزارع الكالس

ينتج الكالس على الأجزاء النباتية المزروعة فى البيئات الصناعية نتيجة للجروح التى تحدث فيها، وذلك استجابة للهرمونات التى قد تتواجد طبيعيًا فى تلك الأجزاء المزروعة أو تزود بها بيئة الزراعة. هذا ويمكن فصل أى جزء نباتى (بذور أو سيقان أو جذور أو أوراق أو أعضاء تخزين أو ثمار) وتطهيره، وزراعته على سطح بيئة زراعة لإنتاج الكالس ويمكن استمرار إعادة زراعة أنسجة الكالس عدة مرات ولفترات طويلة بعيدا عن الجزء النباتى الأصلى المزروع

وأفضل البيئات وأكثرها استعمالاً فى إنتاج الكالس هى بيئة موراشيج وسكوج.

وعلى الرغم من أن نسيج الكالس المتكون فى البيئات يبدو لأول وهلة كأنه نسيج متجانس من الخلايا، إلا أنه فى حقيقة الأمر نسيج معقد يحتوى على تباينات كثيرة مورفولوجية، وفسيولوجية، ووراثية

يكون نمو الكالس لوغاريتميًا، حيث يمر بالمراحل التالية:

١ – فترة أولية من الانقسام الخلوى البطئ .. وهى فترة الحث induction period، وهى تتطلب تواجد الأوكسين.

٢ – فترة من الانقسام الخلوى السريع، مع التمثيل النشط لكل من الدنا والرنا والبروتين

٣ – فترة يتوقف فيها انقسام الخلايا، وتتميز فيها خلايا الكالس المتكونة إلى خلايا برانشيمية أكبر حجمًا وخلايا أخرى من طراز الخلايا الوعائية.

هذا .. ولا يحدث الانقسام الخلوى فى كل الكتلة الكالوسية، ولكنه يقع أساسًا فى طبقة ميرستيمية عند الحافة الخارجية لكتلة الخلايا. أما الأجزاء الداخلية للكالس فإنها تبقى ككتلة غير منقسمة من النسيج، وبمرور الوقت .. فإنها قد تتميز فسيولوجيًا ووراثيًا

عن خلايا الطبقة الخارجية. يقل الانقسام فى خلايا الطبقة الخارجية للكالس بعد فترة، وتظهر فيه عقد knobs (يصبح knobby) بعدما يصبح الانقسام محصورا فى أماكن منفصلة منه، هى التى تظهر فيها تلك العقد ويعنى ذلك أن خلايا الكالس تتباين فى أعمارها، حيث تكون الخلايا الوسطية أكبر عمرًا، بينما تكون خلايا الحافة ميرستيمية وأصغر عمرًا

## مزارع معلقات الخلايا

تعد مزارع معلقات الخلايا cell suspension culture امتدادًا لمزارع الأنسجة أو مزارع الكالس، حيث إنها تتكون من خلايا أو مجموعات منها منتشرة ونامية فى بيئة مغذية سائلة.

تتميز مزارع الخلايا عن مزارع الكالس فى أن الخلايا تكون — غالبا — مفردة، وتكون كل منها على اتصال مباشر بالبيئة، وتقل فيها كثيرًا ظهور التباينات الوراثية، مقارنة بمزارع الكالس

تبدأ مزرعة معلقات الخلايا بوضع قطعة من الكالس المفككة أو نسيج مجنس homogenized فى بيئة سائلة، بحيث تنفصل فيها الخلايا عن بعضها البعض. وقد توضع المزرعة فى دوراق على جهاز هزاز دوّار للسماح باختلاط الهواء مع البيئة السائلة، أو فيما يعرف باسم turbidostat الذى يحافظ على دوران البيئة داخل الدورق المخروطى بصورة دائمة. وفى طريقة ثالثة توضع الخلايا على ورقة ترشيح توضع بدورها على سطح بيئة سائلة توجد فى طبق بترى دونما حاجة إلى إحداث أى اهتزازات

يمر انقسام الخلايا بالمراحل التالية:

١ — فترة من الانقسام البطئ lag phase.

٢ — فترة من الانقسام السريع اللوغاريتمى exponential growth.

٣ — فترة من الانقسام الثابت linear growth.

٤ — فترة من التدهور فى الانقسام وفى أعداد الخلايا الحية deceleration phase

٥ — فترة نهائية من الثبات فى أعداد الخلايا stationary state

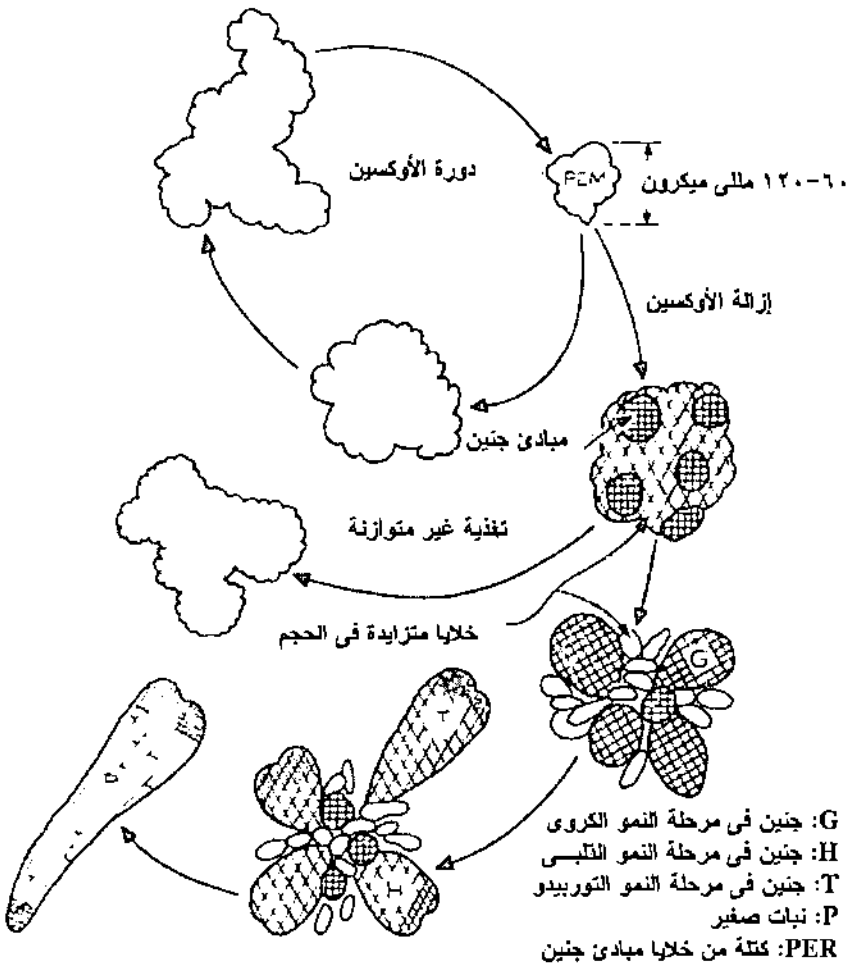
ويعرف منحنى النمو هذا بالمنحنى اللوغاريتمى، وهو يتكرر إذا ما جددت زراعة نفس الخلايا فى بيئة جديدة، ويمكن أن يستمر ذلك إلى مالا نهاية باستمرار إعادة الزراعة (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣).

تتكون الأجنة الجسمية Somatic Embryos، أو Embryoides فى مزارع الخلايا عندما تتوفر لها شروط معينة، تتعلق بمنظمات النمو (خاصة الأوكسينات والسيتوكينينات)، مع توفر مصدر للنيتروجين، وبعض العوامل الأخرى؛ ففى مزارع خلايا الجزر (شكل ٦-٥) يتكون الكالس عندما تكون البيئة غنية بالأوكسين (يستعمل عادة الأوكسين ٢، ٤-د بتركيز ٠,٥-١,٠ جزءًا فى المليون)؛ وإذا نقلت تجمعات من هذه الخلايا الميرستيمية إلى بيئة ذات محتوى شديد الانخفاض من الأوكسين (حوالى ٠,٠١-٠,١ جزءًا فى المليون)، أو خالية تمامًا منه .. فإنه تتميز فيها أجنة كاملة.

ويبدو أن وجود الأوكسين فى البيئة الأولى ضرورى لتكوين الأجنة فى البيئة الثانية؛ لأن الأنسجة التى تبقى دائمًا فى بيئة خالية من الأوكسين لا تتكون بها أجنة. أما مصدر النيتروجين فى البيئة .. فيفضل أن يكون على صورة مختزلة؛ مثل كلوريد الأمونيوم $NH_4Cl$ منفردة، أو مع نترات البوتاسيوم $KNO_3$ ومرد ذلك أن تكوين الأجنة يتطلب حدًا أدنى من أيون الأمونيا $NH_4^+$ داخل الخلايا، وهو ما لا يتحقق إلاّ إذا توفر أيون الأمونيا بتركيز منخفض (٢.٥ ملى مول/لتر)، أو أيون النترات $NO_3^-$ بتركيز مرتفع (٦٠ ملى مول/لتر) فى البيئة. ومن الشروط الأخرى الضرورية لتميز الأجنة توفر تركيز عالٍ من البوتاسيوم (٢٠ ملى مول/لتر) فى البيئة، وألا يزيد تركيز الأكسين الذائب عن ١,٥ مجم/لتر؛ لأن التركيز الأعلى من ذلك يشجع على تكوين الجذور.

وتجدر الإشارة إلى أن الأجنة المتكونة فى مزارع الخلايا تبقى على اتصال سيتوبلازمى مع الخلايا المجاورة لها فى البيئة خلال المراحل الأولى لتكوين الأجنة، ولا تنفصل عنها إلا فى مراحل متأخرة حينما يصبح الجنين مكونًا من عدة خلايا. وتكمل الأجنة نموها وتنبت مباشرة فى نفس البيئة، إلا أن الأنواع — التى تحتاج بذورها إلى المعاملة بالبرودة لكى تنبت — تتطلب نفس المعاملة، حتى تنبت أجنتها الجسمية المتكونة فى البيئات. هذا .. ويطلق على القدرة الموروثة فى الخلايا النباتية

لإنتاج نباتات كاملة – حتى بعد أن تكون هذه الخلايا قد تميزت نهائيًا فى جسم النبات الذى أخذت منه – اسم Totipotency (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)




شكل (٦-٥). تخطيط يبين مراحل تكوين الأجنة الجسمية فى مزارع الخلايا المعلقة للجذر (Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

## بيئات الزراعة المستخدمة فى الإكثار الدقيق

تتنوع بيئات الزراعة المستخدمة فى الإكثار الدقيق لمختلف الأنواع النباتية، ولكنها تعد – بصورة عامة – تباينات من بيئة موراشيج وسكوج.