العوامل المؤثرة فى عملية الإكثار الدقيق

تتأثر عملية الإكثار الدقيق بالعوامل التالية:

أولاً: بيئة الزراعة

تؤثر بيئة الزراعة فى عملية الإكثار خلال مختلف المراحل، كما يلى.

١ – بداية الزراعة وتضاعف النموات:

أثبت مخلوط أملاح بيئة موراشيج وسكوج صلاحية للإكثار الدقيق فى عديد من الأنواع المحصولية. وغالبًا ما يمكن استعمال البيئة ذاتها لكل من بدء الزراعة culture initiation، وتضاعف النموات الخضرية shoot multiplication

وتتباين احتياجات منظمات النمو تبعًا للكيفية التى تتضاعف بها النموات الخضرية، علمًا بأن تميز الأعضاء يعتمد على التوازن بين مجموعتين من الهرمونات والتركيز النسبى لهما، وهما: الأوكسينات والسيتوكينينات. وتبعًا لذلك . فإن نسبة السيتوكينين المرتفعة مقارنة بنسبة الأوكسين تحفز تكوين النموات الخضرية، بينما تحفز نسبة الأوكسين المرتفعة مقارنة بالسيتوكينين تكوين الجذور ولا يعنى ذلك أنه لتحفيز كل من التفريع الجانبى وتكوين الجذور ينبغى توفر كلاً من الهرمونين فى البيئة وعلينا أن نتذكر – كذلك – أن الاحتياجات الإضافية من الهرمونات التى يتعين تزويد بيئة الزراعة بها تتوقف على مستواها فى النبات المزروع، الأمر الذى يختلف باختلاف الجزء النباتى explant المستعمل فى الزراعة، والنوع النباتى، ومرحلة النمو النباتى ومن ثم فإن تضاعف النمو الخضرى لا يتطلب بالضرورة تزويد بيئة الزراعة بأوكسين إضافى وفى كثير من الأحيان يكفى تزويد البيئة بالسيتوكينين فقط لإحداث التضاعف المطلوب فى النموات الخضرية

ويتعين تحديد الاحتياجات الكمية من كل من السيتوكينين والأوكسين لإحداث أقصى تضاعف ممكن، الأمر الذى يتحدد – لكل نوع نباتى – بسلسلة من التجارب ولقد استعملت السيتوكينينات بتركيز ٥ ٠–٣٠ مجم/لتر، إلا أن تركيز ١–٢ مجم/لتر يعد مناسبًا فى معظم الحالات، علمًا بأن تركيزات السيتوكينيات الأعلى تستحث تكوين

البراعم العرضية بسرعة كبيرة؛ حيث يكون من الصعب تحديد أصل كل نمو منفرد عند تجديد الزراعة. وباستعمال تركيز منخفض من السيتوكينين (٥ مجم/لتر من 2-ip) .. فإن تكوين النموات العرضية ينخفض كثيرًا، ولكن يظل من الممكن تحقيق ٣-٦ تضاعفات فى النموات كل ٦ أسابيع من خلال تحفيز التفريع الجانبى. وفى النباتات التى لا تكون فيها البراعم العرضية مأمونة الجانب فى عملية الإكثار الدقيق، فإنه يتعين التضحية بالكمية لأجل النوعية الجيدة. كذلك فإن زيادة تركيز السيتوكينين قد يحدث تشوهات مورفولوجية، كالأوراق المشوهة فى البيجونيا.

وفى التركيزات العالية من السيتوكينينات قد تزداد أعداد النموات الخضرية المتكونة إلا أن نمو كل واحد منها يبقى مقيدًا؛ الأمر الذى قد يتطلب خطوة زراعة إضافية فى بيئة ذات محتوى منخفض من السيتوكينين — وربما فى وجود حامض الجبريلليك — لأجل تحفيز استطالة النموات، قبل محاولة تجذيرها (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

ومن بين مختلف الأوكسينات فإن إندول حامض الخليك IAA هو أكثرها ثباتًا؛ ولذا . فإن الأوكسينات المخلقة، مثل NAA، و IBA هى المفضلة للاستعمال فى بيئات مزارع الأنسجة ولأجل تضاعف النموات الخضرية ينبغى أن يتراوح تركيزها بين ٠.١ إلى ١ مجم/لتر. وبسبب تأثيره القوى فى تحفيز تكوين الكالوس .. فإن الـ 2,4-D لا يستخدم عند الرغبة فى إحداث تضاعف للنموات الخضرية من خلال التفريع الجانبى أو تكوين البراعم العرضية. ولكن يعد الـ 2,4-D أهم أوكسين للاستعمال عند الرغبة فى تحفيز تكوين الأجنة الجسمية.

ونظرًا لأن البيئات شبه الصلبة هى الأسهل فى عمليات التداول، لذا .. فإن بيئات الإكثار الدقيق يضاف إليها الآجار بتركيز ٠.٦-٠.٨٪، إلاّ أن بعض الأنواع النباتية تناسبها البيئات السائلة.

٢ — التجذير:

وجد أن البيئات ذات المحتوى المنخفض من الأملاح أكثر مناسبة لتجذير عدد كبير

من الأنواع النباتية عن تلك التى تحتوى على تركيز مرتفع من الأملاح، حيث تستعمل – عادة – بيئة موراشيج وسكوج بنصف قوتها، أو حتى بربع قوتها.

وقد ذكر أن الريبوفلافين يُحَسِّن من عملية التجذير فى النوع *Eucalyptus ficifolia*

ثانياً: الضوء

يؤثر الضوء فى عملية الإكثار الدقيق خلال مختلف مراحلها، كما يلى.

١ – بدء الزراعة وتضاعف النموات.

على الرغم من أن نموات المزارع تكون خضراء اللون، فإنها لا تعتمد على البناء الضوئى لتصنيع احتياجاتها من الغذاء، فهى تنمو كـ heterotrophs معتمدة فى كل غذائها العضوى وغير العضوى على بيئة الزراعة، وتقتصر الاحتياجات الضوئية لتلك المزارع – فقط – على عمليات التميز المورفولوجى، وتكفى لذلك إضاءة قوتها ١٠٠٠–٣٠٠٠ لكس، علمًا بأن ١٠٠٠ لكس هى القوة الأنسب لعدد كبير من الأنواع النباتية، وأن قوة تزيد عن ٣٠٠٠ لكس تعد مثبطة للنمو. أما الفترة الضوئية فهى ليست حرجة، ولكن يناسب معظم المزارع إضاءة مدتها ١٦ ساعة بالتبادل مع ٨ ساعات من الظلام

٢ – التجذير.

يعد التجذير فى المزارع ضروريًا للقيام بعملية الشتل وللتخفيف من صدمة الشتل ويعمل خفض مستوى السكروز إلى حوالى ١٪ مع زيادة شدة الإضاءة إلى ٣٠٠٠–١٠٠٠٠ لكس خلال مرحلة التجذير على تحويل النبات من الاعتماد على البيئة فى غذائه (heterotrophic) إلى الاعتماد على نفسه (autotrophic)، كما تحفز الإضاءة العالية التجذير الجيد، وتزيد من تقسية النباتات. وقد تبدو النباتات فى ظروف الإضاءة العالية أقل اخضرارًا وقوة فى النمو، إلا أنها تكون أقدر على تحمل عملية الشتل عن النباتات الطويلة الخضراء التى تبقى معرضة لإضاءة منخفضة (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

هذا . وقد وجد فى مزارع البطاطس أن إضاءة شدتها ١٠٠ لكس كانت مناسبة لبدء

المزرعة، مع إمكان زيادة شدة الإضاءة إلى ٢٠٠٠ لكس بعد أربعة أسابيع من التحضين. ومع بلوغ النمو الخضرى ١ سم طولاً .. تجب زيادة الإضاءة إلى ٤٠٠٠ لكس. وتعد الإضاءة العالية تلك مفيدة فى زيادة معدل بقاء المزرعة عندما تبدأ النموات فى الازدياد عددًا وطولاً، وبعد نقلها إلى بيئة التجذير. وتعد تلك القيم لشدة الإضاءة مناسبة لأنواع نباتية أخرى كثيرة، منها الأسبرجس، والجيربيرا *Gerbera*. وإن كان من الممكن زيادة شدة الإضاءة فى المرحلة الأخيرة حتى ١٠٠٠٠ لكس.

ونظرًا لأن الضوء يحفز التلون البنى فى الأجزاء المزروعة ذات المحتوى العالى من البولى فينول polyphenol، فإنه يوصى بخفض شدة الإضاءة إلى أقل من ١٠٠٠ لكس، أو تحضين المزرعة فى الظلام. وفى البلارجونيم *Pelargonium* يتحتم توفير ظلام كامل لفترة فى مزارع القمة الخضرية لتجنب التأثير المثبط لنشاط إنزيم البولى فينول أوكسيديز فى ظروف الإضاءة. وعلى العكس من ذلك .. فإن الإضاءة أفضل من الإظلام بالنسبة للبطاطس.

وللحصول على أكبر قدر من النمو ومنع دخول المزرعة فى حالة سكون تفضل — فى معظم الحالات — توفير فترة ضوئية طويلة تبلغ — عادة — ١٦ ساعة بالتبادل مع ٨ ساعات ظلام. وفى الغالب تتوفر الإضاءة من لمبات فلورسنتية بيضاء باردة، وقد تستعمل أحيانًا لمبات تونجستين صغيرة — بالإضافة إلى اللمبات الفلورسنتية — لتزويد المزرعة بكل من الضوء الأحمر والأشعة تحت الحمراء (عن Wang & Charles ١٩٩١).

ثالثًا: درجة الحرارة

تتباين درجة الحرارة المثلى المناسبة لمزارع الإكثار الدقيق باختلاف النوع النباتى — المزروع، وهى لا تختلف كثيرًا عن الاحتياجات الحرارية العادية تحت ظروف الزراعة الطبيعية، وغالبًا ما تتراوح حرارة تحضين المزارع بين ٢٠، و ٢٨°م، وتكون أكثرية الأنواع النباتية فى منتصف ذلك المدى. وفى أغلب الحالات تبقى الحرارة ثابتة على مدى اليوم، لكن بعض الأنواع يناسبها تباين قدره °٣ فى درجة الحرارة. ويؤدى ارتفاع الحرارة عن ٢٨°م إلى تكثف الماء على النباتات وجدران الأوعية؛ مما قد يحد من النمو.

وعادة لا يتم التحكم فى الرطوبة النسبية أثناء تحضين المزارع، وإذا تم التحكم فيها . فإنها تكون غالبًا بين ٦٠٪، و ٨٠٪، والأفضل ضبطها عند ٧٠٪ (Wang & Charles ١٩٩١).

التحديات التى تواجه عمليات الإكثار الدقيق

إن من أهم المشاكل التى قد تواجه عملية الإكثار الدقيق، ما يلى.

١ — التلوث الميكروبى.

يعد التلوث الفطرى والبكتيرى من أكبر المشاكل التى لا تسمح بنمو المزارع وتؤدى إلى حتمية التخلص منها. ويمكن التغلب على تلك المشكلة بتنمية النباتات التى يؤخذ منها الأجزاء التى تستعمل فى زراعة الأنسجة فى غرف نمو، مع التعقيم الجيد لتلك الأجزاء. وإجراء كل عمليات الزراعة فى البيئات فى Laminar Air Flow Cabinets مزودة بمرشحات HEPA (٠,٢ ميكروميتر)، واستعمال أدوات تشريح معقمة ويفيد تبخير حجرات الزراعة باستعمال محلول فورمالين مخفف فى تقليل حالات التلوث الميكروبى

٢ — تلون بيئات الزراعة باللون البنى.

تفرز الأجزاء النباتية المزروعة من بعض النباتات — مثل قصب السكر — مركبات فينولية فى بيئة الزراعة تؤدى إلى اكتسابها لونا بنيًا، وتقليل نمو الأجزاء النباتية المزروعة فيها. ويرجع هذا التلون إلى تأكسد المركبات الفينولية العديمة اللون وتحولها إلى مركبات أخرى بنية اللون. ويمكن الحد من ظاهرة التلون البنى بتزويد بيئة لزراعة بالفحم النباتى النشط بنسبة ٠,١—٠,٢٪، أو بحامض الستريك أو حامض الأسكوربيك بتركيز ٥٠٠—١٠٠٠ مجم/لتر، أو بالبولى فينيل بيروليدون polyvinylpyrrolidone (اختصارًا: PVP)

٣ — تكوين الكالس.

على الرغم من أن تكوين الكالس callusing قد يكون مرغوبًا فيه أحيانًا، إلاّ أنه غالبا ما يكون أمرا غير مرغوب فيه، نظرًا لأن كتلة خلايا الكالس غير المتميزة تؤثر فى