وبينما يعد التضبيب أسهل وسيلة لرفع الرطوبة النسبية، فإنه يضعف عملية البناء الضوئى، ومن ثم يبطئ من عملية تجذير النباتات الصغيرة واعتمادها على ذاتها فى تحضير غذائها وامتصاصها لاحتياجاتها من الماء والعناصر. ومع تقدم عملية الأقلمة تُخفَّض – تدريجيًا – شدة التظليل ومعدلات التضبيب (عن Kozai ١٩٩١)

٦ – التباينات الوراثية التى تظهر فى مزارع الإكثار الدقيق.

بينما قد تكون تباينات مزارع الأنسجة أمرًا مرغوبًا فيه بالنسبة لمربى النبات الذى يسعى – دائمًا – إلى الحصول على تلك التباينات التى قد تفيده فى برامج التربية، إلاّ أنها لا تفيد – أبدًا – فى عملية الإكثار الدقيق التى يجب أن تعطى نباتات متجانسة وصادقة للصنف المكثر (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

تطبيقات الإكثار الدقيق فى مجال تربية النباتات وإكثارها

استعراض التطبيقات

إن من أهم تطبيقات مزارع الإكثار الدقيق التى تخدم تربية النبات، ما يلى:

١ – التخلص من الفيروسات

يتبع فى التخلص من الفيروسات الطرق التالية:

أ – المعاملة الحرارية:

تعرف تلك المعاملة باسم thermotherapy، وبمقتضاها تعرض النباتات لحرارة عالية نسبيًا، وهى تستخدم فى التخلص من الفيروسات والميكوبلازما، وقد تستعمل منفردة، أو مع المعاملة الكيميائية، أو مع مزارع القمة الميرستيمية، أو مزارع القمم النامية المجزأة.

ب – استعمال مضادات الفيروسات:

تعرف تلك المعاملة باسم chemotherapy، وبمقتضاها تعامل الأجزاء النباتية التى تؤخذ منها الأجزاء (explants) التى تستعمل فى الزراعة، وذلك قبل فصلها. هذا وقد تضاف تلك المركبات الكيميائية إلى بيئة الزراعة – كذلك – وذلك لأجل دعم عملية التخلص من الفيروسات ويستخدم لهذا الغرض مركبات مثل مالاشايت جرين malachite green، وفيراكسول virazole.

جـ – مزارع القمة الميرستيمية:

يتضمن الجزء النباتى explant الذى يستخدم فى مزارع القمة الميرستيمية القبة الميرستيمية، بالإضافة – عادة – إلى زوج من مبادئ الأوراق.

د – مزارع القمم النامية المجزأة fragmented shoot apices culture:

تستعمل مزارع القمم النامية المجزأة على نطاق واسع فى إكثار العنب.

هـ – التطعيم الدقيق فى البيئات الصناعية in vitro micrografting.

هذا .. ويجب أن نتذكر أن النباتات الناتجة من مزارع الإكثار الدقيق لا تكون – بالضرورة – خالية من الفيروسات وإنما هى غالبًا ما تكون خالية، ويلزم إجراء اختبارات عليها للتأكد من خلوها من الإصابات الفيروسية. ومن بين الاختبارات الشائعة الاستعمال لهذا الغرض اختبار إلايزا ELISA.

وعلى الرغم من احتمال إصابة النباتات بالفيروسات بعد نقلها إلى حقل الزراعة، إلاّ أن بدء زراعتها وهى خالية من الفيروسات يعطيها دفعة قوية من النمو.

٢ – الإكثار التجارى للنباتات الخضرية التكاثر:

يمكن إكثار نبات واحد إلى عدة ملايين من النباتات فى خلال عام واحد، الأمر الذى يستحيل تحقيقه بطرق التكاثر العادية، وبذا .. فإن الإكثار الدقيق يعد أدة غاية فى الأهمية لإسراع تكاثر الأنواع الخضرية التكاثر.

كذلك يفيد الإكثار الدقيق فى الإكثار التجارى للنباتات الخضرية التكاثر مع المحافظة على صفة التجانس، كما حدث بالنسبة لمحاصيل الخرشوف (إيطاليا)، والثوم (التشيك وسلوفاكيا)، والبطيخ الثلاثى (رومانيا)، والروبارب (بلجيكا)، وفجل الحصان (ألمانيا)، وغيرهم.

٣ – تسهيل إكثار الأجزاء النباتية المسنة – التى يصعب غالبًا إكثارها خضريًّا – بإعادة الحداثة إليها فى مزرعة أنسجة، ثم إكثارها بعد ذلك

٤ – غالبًا ما تكون النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة أقوى نموًّا عن مثيلاتها الناتجة من الإكثار العادى، بسبب استعادتها لحداثتها، أو لخلوها من الإصابات

الفيروسية، وبذا فإن الإكثار الدقيق يفيد فى استعادة النباتات المعمرة لحداثتها بعدما تكون قد وصلت إلى مرحلة الشيخوخة.

٥ — يعد الإكثار الدقيق وسيلة سهلة واقتصادية — كذلك — فى الأنواع التى يعد إكثارها معقدا وبطيئًا.

٦ — يمكن إكثار الجيرمبلازم بسهولة على صورة مزارع أنسجة، مع المحافظة عليه خاليًا من الإصابات الفيروسية، ودونما حاجة إلى إعادة تجديد الزراعة على فترات متقاربة، خاصة عند حفظ المزارع فى النيتروجين السائل (تراجع تفاصيل الموضوع تحت عنوان لاحق)

٧ — تسهيل مهمة انتقال الجيرمبلازم عبر الحدود بين الدول على صورة مزارع أنسجة خالية من الإصابات المرضية، دونما حاجة إلى إجراءات الحجر الزراعى

٨ — إن إنتاج الدرنات الصغيرة جدًا (الـ microtubers) فى البيئات الصناعية من أجزاء نباتية خالية من الفيرس أثبتت جدواه كطريقة فعالة لإكثار الجيرمبلازم، وتخزينه، وانتقاله من دولة لأخرى، على الأقل فى كل من البطاطس واليام

٩ — الإكثار التجارى السريع للنباتات البذرية التكاثر

يمكن فى النباتات البذرية التكاثر — وخاصة خلطية التلقيح منها — إكثار النباتات الفردية ذات الصفات المتميزة دونما حاجة إلى تأصيلها، مع إمكانية تخزينها، واستعمالها فى أغراض التربية، والحصول على انعزالات وراثية منها — فيما بعد — عندما نلجأ إلى إكثارها جنسيًا.

١٠ — يفيد الإكثار الدقيق فى المحافظة على التركيب الوراثى للنباتات المكثرة دونما تغيير، كما فى سلالات آباء الهجن فى القنبيط، وكذلك فى الإكثار السريع للأصناف الجديدة التى تنتج من برامج التربية

١١ — يمكن إكثار السلالات المزروعة فى البيئات فى أى وقت من السنة، حيث تعد بيئات الزراعة بمثابة مشتل دائم، الأمر الذى لا يمكن تحقيقه بوسائل الإكثار العادية

١٢ — الحد من الحاجة إلى الصوبات الزراعية فى عمليات الإكثار، مما يقلل من تكلفتها

١٣ – يفيد الإكثار الدقيق – كذلك – أثناء التربية الداخلية، التى تجرى لأجل تجانس السلالات، ومن ثم تحسين تجانس الهجن التى تستعمل تلك السلالات فى إنتاجها.

ويفيد الإكثار الدقيق – فى هذا الشأن – من بعض الوجوه، كما يلى:

أ – بعد إجراء التلقيح الذاتى – فى نهاية برنامج التربية الداخلية – يكون محصول بذور النباتات الفردية قليلاً للغاية، ولكن إذا ما أكثر النبات – الذى يرغب فى تلقيحه ذاتيًا – عن طريق مزارع الأنسجة، فإنه يمكن الحصول من النباتات المكثرة (وهى التى تكون متماثلة وراثيًا ويمكن تركها لتلقح بعضها بعضًا) على أعداد كبيرة من البذور، بما يسمح بإجراء الاختبارات اللازمة عليها؛ ومن ثم توسيع أساس الانتخاب، وإمكان استخدامها فى إنتاج الهجن مباشرة.

ب – يمكن عن طريق عملية الإكثار الدقيق إدامة السلالات المرباة داخليًا العقيمة الذكر دونما حاجة إلى سلالات الإدامة maintainer lines؛ مما يقلل من الوقت اللازم للانتهاء من برنامج التربية، مع تجنب مشكلة ظهور نباتات خصبة الذكر كانعزالات فى سلالة الأمهات العقيمة الذكر.

١٤ – للإكثار الدقيق أهمية كبيرة فى إنتاج هجن الجيل الأول من الخضر فمثلاً .. يستحيل فى النباتات وحيدة الجنس ثنائية المسكن – مثل الأسبرجس – إنتاج سلالات هجين دون اللجوء إلى الإكثار الدقيق. وفى الكرنب الذى يعتمد فيه إنتاج الهجن على خاصية عدم التوافق – وحيث يعتمد إكثار سلالات الآباء على التلقيح البرعمى الذى يفقدها قوة النمو – فإن مزارع الأنسجة يمكن أن تستخدم فى إكثار تلك السلالات.

١٥ – يمكن بالإكثار الدقيق عزل وإكثار الكيميرا والطفرات الطبيعية، والحصول على أفراد طفرية كاملة عندما تجرى المعاملة بالعوامل المطفرة فى المزرعة؛ ذلك لأن النباتات العرضية تنشأ – غالبًا – من خلية واحدة (تراجع تفاصيل الموضوع تحت عنوان لاحق).

١٦ – استنبات البذور:

إن استعمال البيئات الصناعية فى استنبات البذور قد يكون عمليًا مع البذور الصغيرة جدًا مثل بذور الأوركيد الذى استعملت المزارع الصناعية فى إكثاره تجاريًا بنجاح منذ

فترة طويلة نجد فى الطبيعة أن بذور الأوركيد تعتمد فى إنباتها على علاقة تبادل منفعة مع بعض الكائنات الدقيقة فى قلف الأشجار، حيث توفر لها بعض العناصر المغذية، وقد وجد أن من الممكن توفير تلك المغذيات فى البيئات الصناعية

١٧ – إمكان إنتاج البذور "الصناعية" artificial seeds عن طريق "كبسلة" الأجنة الجسمية التى تنتج فى مزارع الإكثار الدقيق (تراجع تفاصيل الموضوع تحت عنوان لاحق)

١٨ – مع إمكان تجديد نمو البروتوبلاست، والخلايا، والأنسجة فى المزارع، يكون من الممكن إجراء عملية التحول الوراثى (الهندسة الوراثية) للصفات الهامة

هذا وقد استخدمت تقنية الإكثار الدقيق – بالفعل – فى تطوير إنتاج أصناف جديدة محسنة مفتوحة التلقيح من القنبيط والكرفس، وفى إنتاج بعض هجن الكرنب وكرنب بروكسل، وفى إكثار بعض هجن الأسبرجس (عن Lerke & Bauch ١٩٩٢، و Pierik ١٩٩٣، و Chawla ٢٠٠٠).

التطبيقات فى مجال الإكثار التجارى

تستخدم طرق الإكثار الدقيق – حاليًا – فى الإكثار التجارى لعديد من الأنواع النباتية، نذكر منها ما يلى:

أولاً: الزهور ونباتات الزينة

يمكن تقسيم الزهور ونباتات الزينة – حسب مدى التوسع فى تطبيق تقنيات الإكثار الدقيق فى إنتاجها – إلى ثلاث مجموعات، كما يلى:

١ – نباتات تكثر بسهولة بطرق الإكثار الدقيق على مدار العام بجودة عالية، وتكون – غالبًا – خالية من مسببات الأمراض، مثل:

Alstomeria	*Anthurium*
Caladium	*Chrysanthemum*
Diffenbachia	*Drosera*
Gerbera	*Gloxinia*
Gypsophila	*Heliconia*
Freesia	*Musa*

Nepeta — *Nephrolepis*
Philodendron — *Rhododendron*
Rosa — *Santpaulia*

٢ — نباتات يمكن إكثارها بطرق الإكثار الدقيق، ولكنها بحاجة إلى مزيد من الاهتمام بتقنيات إكثارها، مثل:

Begonia — *Dianthus*
Gladiolus — *Haemanthus*
Hemerocallis — *Hosta*
Hyacinth — *Iris*
Lilium — *Pelargonium*
Petunia

٣ — نباتات تكثر ببعض الصعوبة، ومازالت بحاجة إلى تطوير لطرق إكثارها، مثل:

Acer — *Chamaecyparis*
Junipers — *Paeonia*
Potentilla — *Sequoia*
Taxus — *Howeia*
Grevilla

ثانيًا: نباتات الخضر

١ — الفراولة:

تنتج الملايين من شتلات الفراولة سنويًا بطرق الإكثار الدقيق فى مختلف أنحاء العالم، وتتبع طريقة زراعة الميرستيم مع المعاملة الحرارية للتخلص من الفيروسات.

٢ — الأسبرجس:

تكثر السلالات المتميزة من الأسبرجس بنجاح بطرق الإكثار الدقيق.

٣ — الثوم:

تستخدم مزارع القمة الميرستيمية فى إنتاج نباتات خالية من الفيروسات، وفى حفظ الجيرمبلازم.

٤ — يستخدم الإكثار الدقيق فى إنتاج تراكيب وراثية معينة — مثل السلالات العقيمة الذكر — من نباتات مثل الخيار، والطماطم، والبصل، وغيرها (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

٥ — البطاطس

يمكن أن تعطى تقنيات الإكثار الدقيق فى البطاطس حوالى ١٦٠٠ درنة من نبات بطاطس واحد سنويًا وربما أكثر من ذلك (George ١٩٨٦)

٦ القنبيط

أمكن باستخدام قرص القنبيط فى عملية إكثار دقيق الحصول على أكثر من ١٠٠٠٠ نبات صغير من كل قرص خلال فترة قصيرة للغاية لم تتعد عشرة أيام، وذلك فى دراسة استعمل فيها سبعة أصناف من المحصول. وتلخص الطريقة فيما يلى أزيلت الطبقة الميرستيمية للقرص ووضعت فى الخلاط لفترة قصيرة، بهدف فصل التجمعات الميرستيمية عن بعضها، ثم دُرِّجت حسب الحجم بإمرارها من مناخل ذات ثقوب متدرجة وبهذه الطريقة أمكن الحصول على أكثر من ٤٠٠٠٠٠ explant (قمة ميرستيمية) من الحجم الثانى (١ - ٣٠٠ مم) من كل قرص وقد حُصل من كل explant على ١-٣ نموات بعد زراعتها فى بيئة موارشيج وسكوج سائلة مزودة بـ ٢ مجم كينيتن، و ١ مجم إندول حامض البيوتريك لكل لتر وقد وصلت النموات إلى طول ١-٣ مم فى خلال ١٠ أيام بمعدل أكثر من ١٠٠٠٠ نمو نباتى من كل قرص وقد جذِّرت نحو ٨٠٪ من تلك النموات بعد ١٠ أيام من نقلها إلى بيئة موراشيج وسكوج شبه صلبه ومزودة بـ ١- ٣ مجم إندول حامض البيوتريك/لتر (Kieffer وآخرون ١٩٩٥)

٧ — تستخدم مزارع الأنسجة فى الإكثار الدقيق لعديد من المحاصيل الجذرية والدرنية، كما يلى:

المحصول	الـ explant المستعمل فى التكاثر
الكاسافا	القمة الميرستيمية
الكوكويام coco yam (*Xanthosoma* spp)	القمة الخضرية
البطاطا	القمة الميرستيمية
اليام الحلو sweet yam (*Amorphophallus*)	أجزاء من الكورمة
القلقاس	القمة الخضرية
اليام (*Discorea alata*)	القمة الخضرية

ثالثًا: نباتات الفاكهة

١ – التفاح

يقتصر استخدام زراعة الأنسجة فى التفاح – أساسًا – على إكثار الأصول الجذرية، مع ضرورة تقييم الطعوم التى تكثر بطرق الإكثار الدقيق – حقليًّا – قبل نشر زراعتها تجاريًّا

٢ – الكريز:

تتوفر تفاصيل طرق الإكثار – الدقيق للكريز بنوعية الحلو والحامض، وتستخدم التقنية لإكثار بعض الأصول الجذرية.

٣ – الخوخ والمشمش:

لم يكثر بطرق الإكثار – الدقيق سوى عدد محدود من أصناف الخوخ وأصوله، ولا يعرف سوى القليل جدًّا عن الإكثار الدقيق للمشمش. وتعد مشاكل التجذير وعدم انتظامه فى هذين المحصولين من أهم العقبات التى تواجه تطبيق تقنيات الإكثار الدقيق عليهما على النطاق التجارى.

٤ – الكمثرى

لم تتطور تقنيات الإكثار الدقيق للاستعمال التجارى فى الكمثرى

٥ - الراسبرى والبلاكبرى.

يُكثر كلا من الراسبرى والبلاكبرى باستعمال مزارع العقل ذات العقدة الواحدة، وتتوفر تفاصيل التقنيات الخاصة بتلك الطريقة.

٦ – البلوبرى

يتكاثر البلوبرى بسهولة بالعقل، ويمكن استعمال مزارع الأنسجة فى إكثار النباتات المتميزة -- مبدئيًّا -- قبل اللجوء إلى التكاثر بالعقل

٧ – العنب

يتوفر عدد من تقنيات مزارع الأنسجة لإكثار العنب تجاريًّا وتخليصه من الفيروسات، وهى تستعمل فى إكثار السلالات المنتخبة، والهجن والأصناف الجديدة، والأصول.

٨ – الفاكهة الاستوائية:

تستخدم تقنيات مزارع الأنسجة فى إكثار – عديد من نباتات الفاكهة الاستوائية، مثل

المانجو	الأناناس	الباباظ
التين	التوت	الموز

(عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

التطبيقات فى مجال التربية بالطفرات

يستفاد من مزارع الإكثار الدقيق فى برامج التربية بالطفرات بإحدى طريقتين، هما إما بأخذ الأجزاء النباتية التى تستعمل فى الإكثار (explants) من نباتات أو أجزاء نباتية سبق تعريضها للعوامل المطفرة، وإما بتعريض مزرعة الإكثار الدقيق ذاتها (القمة النامية، أو البراعم العرضية على الأجزاء النباتية المزروعة، أو النموات الجانبية المتضاعفة، أو العقل وحيدة العقدة single node cuttings . إلخ) تعريضها للعوامل المطفرة

وتجدر الإشارة إلى أن تعريض مزارع الإكثار الدقيق للإشعاع قد يُحدث تغيرات كيميائية غير مرغوب فيها فى بيئات الزراعة؛ ولذا .. يوصى بنقل المزرعة التى عُرِّضت للإشعاع إلى بيئة جديدة بعد معاملة الإشعاع.

وعند المعاملة بالمركبات الكيميائية المطفرة يتعين تعقيم محاليل تلك المركبات بالترشيح قبل استعمالها (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

التطبيقات فى مجال التكاثر بالبذور الصناعية من الأجنة العرضية

أهمية تميز الأجنة العرضية

تتحقق الاستفادة من مزارع الأنسجة والخلايا فى الحصول على اختلافات وراثية جديدة، حتى إن تميزت النموات الخضرية من أنسجة الكالس مباشرة، إلاّ أن الفائدة

من الاختلافات الوراثية تتضاعف إذا تميزت الأجنة العرضية Adventitious Embryos في هذه المزارع، وذلك للأسباب التالية:

١ تزداد فرصة العثور على الاختلافات الوراثية المرغوبة، نظرًا لأن كل خلية في المزرعة يمكن أن تتميز إلى جنين يعطى فردًا جديدا

٢ – ولنفس السبب السابق .. فإن جميع خلايا الأفراد المتكونة الحاملة للطفرات تكون بها هذه الطفرات، ولا تكون الطفرات على شكل كيميرا، مثلما يحدث في حالة تميز النموات الجديدة من نسيج الكالس مباشرة

٣ – يصعب – كثيرًا – في الحمضيات إنتاج نباتات خالية من الفيروسات عن طريق مزارع القمة النامية الميرستيمية، ولكنها تنتج بشكل روتيني من الأجنة اللاإخصائية التي تكون خالية تماما من الإصابات الفيروسية (تكون الأجنة الجنسية خالية – هي الأخرى – من الإصابات الفيروسية، ولكنها لا تصلح للإكثار التجاري)، إلا أن بعض أصناف الحمضيات تكون خالية من البذور، مثل البرتقال أبو سرة، والأصناف اللابذرية من اليوسفي والجريب فروت، وفي أصناف كهذه .. لا يمكن إنتاج نباتات خالية من الفيروسات إلا بطريق الأجنة العرضية، التي تتكون في مزارع الأنسجة والخلايا.

٤ – يحد تميز الأجنة العرضية من التغيرات الوراثية، التي تظهر عادة عند الإكثار الدقيق للأغراض التجارية، وهي التغيرات التي يزداد ظهورها عند تميز الأفراد الجديدة من نسيج الكالس مباشرة.

٥ – يفيد إنتاج الأجنة العرضية في تقصير فترة برنامج التربية في بعض الحالات. عندما تتجه النباتات التي تنمو من هذه الأجنة نحو الإزهار المبكر، ففي نبات الجنسنج ginseng . أعطت الأجنة العرضية التي أنتجت في مزارع كالس الجذور نباتات اتجهت مباشرة نحو الإزهار، وهو ما يعني توفير ثلاث سنوات في كل جيل من أجيال التربية بالنسبة لهذا النبات (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

هذا . ولبعض الأنواع النباتية قدرة فائقة على تكوين الأجنة الجسمية العرضية، ومن ذلك الجزر، الذي تكوّن بادراته أجنة جسمية لدى زراعتها في بيئة تحتوى على حامض الأبسيسك كمنظم نمو وحيد (Nishiwaki وآخرون ٢٠٠٠)

أهمية البذور الصناعية

يُستفاد من عملية إنتاج البذور الصناعية بتغليف (كبسلة capsulation) الأجنة الجسمية – ناتج مزارع الأنسجة – فى الأمور التالية.

١ – إكثار النباتات الخضرية التكاثر بذريًا، الأمر الذى لا يمكن تحقيقه فيها باللجوء إلى البذور الحقيقية؛ بسبب ما يحدث فيها من انعزالات وراثية تكون مختلفة عن التركيب الوراثى للنبات الأصلى.

٢ – إكثار النباتات العقيمة بذريًا.

٣ – إمكان إكثار وزراعة النباتات القيمة التى تنتج من عملية دمج البروتوبلاستات، مع المحافظة على جميع خصائص الهجين الجسمى.

٤ – إكثار النباتات التى ترتفع أسعار بذورها الحقيقية.

كبسلة (تغليف) الأجنة الجسمية

تستخدم أغلفة الهيدروجل hydrogel – مثل ألجينيت الصوديوم sodium alginate – فى إنتاج بذور صناعية وحيدة الأجنة لعديد من الأنواع النباتية، مثل الكرفس، والجزر، والقطن، والخس، والبرسيم الحجازى، والأرز، والذرة. وتعد أكثر الأنواع النباتية مناسبة لهذه التقنية تلك التى يمكن إنتاج أجنتها فى مزارع الأنسجة بأعداد وفيرة، مع ارتفاع أسعار بذورها أو أن يكون لاستعمالها أساس تجارى قوى

ويمكن تصنيف المحاصيل الزراعية حسب توفر التقنية، والجانب الاقتصادى المتعلق بأسعار البذور الصناعية إلى ثلاث فئات، كما يلى:

١ – أنواع تتوفر التقنية لها .. مثل: الكراوية، والجزر، والـ *Panicum*، و الـ *Pennisectum*

٢ – أنواع ترتفع أسعار بذورها وأجزائها المستعملة فى التكاثر، ولاستعمالها أساس تجارى قوى . مثل: الأسبرجس، والبيجونيا، والبروكولى، والقنبيط، والخيار، والثوم، والجيرانيم، والخس، والبيتونيا، والبطاطس، والجنسنج، والأرز، والسبانخ، وقصب السكر، والتبغ، والطماطم، والبطيخ. هذا .. إلا أنه لا تتوفر لهذه المجموعة أساس تقنى جيد لإنتاج أجنتها الجسمية وبذورها الصناعية.

٣ – أنواع تتوفر التقنيات الخاصة بإنتاج أجنتها الجسمية وبذورها الصناعية ولاستعمالها أساس تجارى قوى .. مثل: البرسيم الحجازى، والكرفس، والبن، والذرة، والقطن، والعنب، والمانجو (عن Redenbaygh وآخرين ١٩٩١).

ولقد حظى موضوع تجفيف وتخزين الأجنة الجسمية باهتمام بالغ من قبل الباحثين، إلا أن تغليف الأجنة فى صورة بذور صناعية لم يصل إلى نفس المستوى من التقدم.

ولمزيد من التفاصيل عن موضوع تغليف الأجنة والبذور الصناعية .. يراجع Redenbaugh وآخرون (١٩٩١).

خصائص الأجنة الجسمية المعلقة ومحدودات استعمالها لبذور صناعية

إن من أهم خصائص الأجنة الجسمية افتقارها إلى كل من الإندوسبرم والغلاف البذرى اللذان يتكونان بصورة طبيعية فى البذور الحقيقية. كذلك فإن تلك الأجنة الجسمية تكون صغيرة للغاية إلى درجة لا يمكن معها تداولها فى الزراعة أو ضمان نجاح زراعتها ولذا . يتعين تغليف تلك الأجنة بقالب من الإندوسبرم الصناعى يمكن أن يوفر لها حماية، ودعمًا غذائيًا أثناء الإنبات.

ولقد استخدم لهذا الغرض جل ألجينات الكالسيوم calcium algınate gels، بالإضافة إلى كل من أوكسيد البوليثيلين، والشيتوسان chitosan.

وبينما يمكن أن يوفر جل ألجينات الكالسيوم حماية للجنين، فإن فائدته فى توفير الدعم الغذائى له أثناء إنباته تعد محدودة للغاية.

هذا ويمكن للنشا – الذى يعد أحد أهم مكونات الإندوسبرم، وخاصة فى النباتات وحيدة الفلقة – أن يوفر كلا من الحماية والدعم الغذائى للجنين الجسمى فى البذور الصناعية، لكن يعيبه أنه أكثر نعومة من كل من الجرليت Gerlite والآجار، وألجينات الكالسيوم، الأمر الذى يؤدى إلى انطمار الجنين فى بيئة النشا. وللتغلب على تلك المشكلة يمكن خلط النشا بمواد جيلاتينية أكثر صلابة منه مثل الأجاروز agarose والجرليت (Sorvari وآخرون ١٩٩٧).

التطبيقات فى مجال حفظ الجيرمبلازم

أهمية حفظ الجيرمبلازم على صورة مزارع أنسجة

تسهل المحافظة على جيرمبلازم الأنواع التى تتكاثر جنسيًا على صورة بذور. أما حفظ جيرمبلازم الأنواع التى تتكاثر خضريًا . فهو أمر باهظ التكاليف؛ نظرًا لأنه يتطلب تواجد الجيرمبلازم ناميًا على الدوام فى حالة الأنواع المعمرة؛ كالتفاح والكمثرى، أو تجديد زراعتها سنويًا فى حالة الأنواع الحولية منها كالبطاطس هذا فضلاً على صعوبة المحافظة عليها خالية دائمًا من الإصابات الفيروسية أما حفظ هذه الأنواع على صورة بذور فإنه يؤدى إلى تغيرات وراثية كبيرة فى السلالات المحتفظ بها، ولا يفيد سوى فى المحافظة على"الجينات" المهمة التى توجد بكل من هذه السلالات

لأجل ذلك .. اتجه تفكير مربى النبات نحو مزارع الأنسجة لحفظ سلالات وأصناف الأنواع الخضرية التكاثر. وهو ما يحقق المزايا التالية:

١ — حفظ أعداد كبيرة من السلالات فى مساحة صغيرة للغاية بالمختبر، مع توفير النفقات التى تتطلبها زراعة وخدمة هذه السلالات فى الحقول، وتوفرها على مدار العام

٢ — بقاء السلالات المخزنة خالية من جميع الإصابات المرضية، خاصة الفيروسية منها

٣ — يمكن استخدام المزارع المحفوظة كتقاوى نواة لإكثارها وإنتاج أعداد كبيرة منها فى أى وقت حسب الحاجة

٤ — سهولة نقل مزارع السلالات من دولة إلى أخرى، نظرًا لخلوها من الإصابات المرضية

إن أهم الأمور التى تجب مراعاتها عند حفظ الجيرمبلازم على صورة مزارع أنسجة هو تجنب تكرار زراعتها على فترات قصيرة، حتى لا تتعرض للإصابات الميكروبية، أو للأخطاء البشرية ويتحقق هذا الهدف بحفظ المزارع إما مجمدة وإما مبردة

هذا .. ويحفظ الجيرمبلازم إما لفترات قصيرة تمتد من سنة واحدة إلى أربع سنوات، وإما لفترات غير محدودة فى النيتروجين السائل على -١٩٦م

يفيد التخزين لفترات قصيرة فى الحد كثيرًا من تكلفة حفظ الجيرمبلازم، ويجرى بخفض كل من درجة الحرارة وشدة الإضاءة، وتعديل بيئات الزراعة (وخاصة فيما يتعلق بزيادة الضغط الأسموزى أو مثبطات النمو).

هذا .. إلاّ أنه لا توجد — حاليًا — مجموعات للجيرمبلازم قائمة بالكامل على مزارع الأنسجة، وإن كانت هذه التقنية قد استخدمت على نطاق واسع فى حفظ الكثير من جيرمبلازم الأجناس *Solanum*، و *Fragaria*، و *Ipmoea*، و *Mentha*، و *Prunus*، و *Vaccinium*.

أما التخزين لفترات غير محدودة فى النيتروجين السائل فما يزال فى الدور التجريبى بالنسبة لغالبية الأنواع النباتية، ولكنه أصبح روتينيًّا فى نباتات محدودة، وخاصة أجناس *Rubus*، و *Pyrus*، و *Solanum*، و *Elaeis* (عن McCown ٢٠٠٣).

حفظ المزارع بالتبريد

يمكن حفظ المزارع فى درجات حرارة منخفضة، تتراوح بين ١ و ٩م، يعمل هذا المجال الحرارى على إبطاء تدهور النسيج النباتى، ولكنه لا يمنعه. ويعنى ذلك ضرورة إعادة زراعة النسيج على فترات متباعدة نسبيًّا. وتستخدم هذه الطريقة — حاليًا — فى تخزين جيرمبلازم الفراولة، وعديد من نباتات الفاكهة مثل التفاح والعنب.

ومن أمثلة حالات حفظ الجيرمبلازم بالتبريد، ما يلى (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣):

النوع النباتى	فترة التخزين	مدى احتفاظ المزرعة بحيويتها (٪)
Fragaria × ananassa	٧٢ شهرًا	١٠٠
F. virginiana	٧٢ شهرًا	١٠٠
F. vesca	٧٢ شهرًا	١٠٠
Lolium multiflorum	١٠–١١ شهرًا	١٠٠–٨٨
Lotus corniculatus	شهر واحد	٩٠
Malus domestica	١٢ شهرا	١٠٠
Medicago sativa	١٥–١٨ شهرا	٩٥–٩٤

النوع النباتى	فترة التخزين	مدى احتفاظ المزرعة بحيويتها (%)
Rubus sp.	١٤ شهرًا	٩٥
Trifolium pratense	١٥–١٨ شهرًا	٧٠–٨٦
T. repens	١٥–١٨ شهرًا	٨٩–٩٢
	١١ شهرًا	٩٠–١٠٠
Vitis vinifera	١٢ شهرًا	؟

حفظ المزارع بالتجميد الفائق (التخزين الكريوجينى)

يعنى بالتخزين الكريوجينى التخزين فى حرارة تنخفض إلى –١٣٠م أو أقل من ذلك وهى تعد طريقة آمنة وفعالة لتخزين الجيرمبلازم لفترات غير محدودة، سواء أكانت على صورة بذور، أم حبوب لقاح، أم أجنة، أم براعم، أم مزارع أنسجة. وبينما قد لا يكون تخزين البذور فى الحرارة الشديدة الانخفاض اقتصاديًا (حيث يمكن تخزينها بفاعلية على حرارة –٢٠م)، فإن تخزين مزارع الأنسجة يعد ضمانًا للمحافظة على جيرمبلازم السلالات الخضرية التى قد تتعرض للفقدان إذا ما استلزم الأمر إكثارها سنويًا. وعلى الرغم من إمكان تخزين مزارع البروتوبلاست ومزارع الخلايا فى الحرارة الشديدة الانخفاض، فإنها لا تخزن بصورة روتينية بتلك الطريقة

كذلك يمكن تخزين السلالات الخضرية — على صورة أجنة جسمية — فى الحرارة الشديدة الانخفاض، علمًا بأن الأجنة الجسمية لا تختلف عن الأجنة الجنسية فى القدرة على تحمل تلك الظروف التخزينية. ويعنى ذلك إمكان حفظ جيرمبلازم السلالات الخضرية التكاثر كما يحفظ الجيرمبلازم البذرى (عن Towill ٢٠٠٢)

تعتبر مزارع الأعضاء النباتية مثل مزارع القمة النامية، ومزارع الأجنة، ومزارع الإكثار الدقيق هى أنسب المزارع للحفظ بالتجميد الفائق للأسباب التالية:

١ – تجنب وجود أية اختلافات وراثية عند بدء التخزين، وهو الأمر الذى قد يحدث فى مزارع الكالس ومعلقات الخلايا.

٢ — تجنب التغيرات الوراثية الكثيرة، التى يمكن حدوثها فى مزارع الكالس، ومزارع معلقات الخلايا خلال فترة التخزين الطويلة.

٣ — تحتفظ مزارع الأعضاء بقدرتها على استمرار النمو لتكوين نباتات جديده خلال فترة التخزين، بينما تفقد الخلايا فى مزارع الخلايا قدرتها على إنتاج النباتات الجديدة (أى تفقد خاصية الـ totipotency) خلال فترات التخزين الطويلة هذا فضلا على أن مزارع الخلايا لم يمكن دفعها لإنتاج النموات الخضرية فى عديد من الأنواع النباتية

٤ — يمكن المحافظة على الحالة الأحادية فى النباتات الأحادية بسهولة وهى على صورة مزارع القمم الميرستيمية والبراعم الإبطية، بينما لا تبقى السلالات على الحاله الأحادية فى مزارع الكالس

٥ -- تكون خلايا القمم النامية والأجنة (وهى خلايا ميرستيمية) أكثر قدره على تحمل عمليتى التجميد والتفكك

وقد استخدمت طريقة التجميد الفائق فى حفظ الجيرمبلازم لفترات تجريبية قصيرة نسبيًا (تراوحت من خمس دقائق إلى شهرين) فى عدة أنواع نباتية، وكان منها الجزر، والفراولة، والطماطم، والتبغ، والبسلة. والبطاطس، والذره، ويلاحظ أن معظم هذه الأنواع تتكاثر جنسيًا. ولكنها تتميز بأن تقنيات مزارع القمم الميرستيمية أو مزارع الأجنة قد قطعت فيها شوطًا كبيرًا، إلى درجة سمحت بتجربة استخدامها فى تطوير تقنيات حفظها بالتجميد (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

ويبين جدول (٦-٤) أمثلة لبعض الأنواع النباتية التى نجح فيها تخزين الأنسجة الميرستيمية على -١٩٦م.

جدول (٦-٤): أمثلة على التخزين الفائق البرودة (-١٩٦م) للأنسجة الميرستيمية فى بعض النباتات الاقتصادية (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

المحصول	الجزء المخزن	تحضير الجزء المخزن وطريقة التجميد	القدرة على البقاء، والنمو، وتجديد النمو
الأسبرجس	القمة الخضرية	٤٪ DMSO، و ٣٪ جلوكوز لمدة ٣ أيام، ثم التجميد البطئ حتى -٤٠م، ثم فى النيتروجين السائل	بقاء (حياة) بنسبة ١٠٠٪ وتجديد كامل للنمو النباتى
التفاح	القمة الخضرية	تقسية لمدة ٢٠ يوم على -٣م	بقاء بنسبة ١٠٠٪ وتجديد نمو بنسبة ٧٥٪
الوز	خلايا جنينية	المعاملة بتركيز ٦٪ مانيتول لمدة ٢-٧ أيام، ثم التجميد البطئ حتى -٤٠م، ثم التجميد السريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٥٠٪
الوالح	أجنة جسمية	التجميد السريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٩٠٪
	أجنة جسمية	تجميد بطئ حتى -٤٠م، ثم تجميد سريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٣٠٪
الكاسافا	القمة الخضرية	١٠٪ جليسرول و ٥٪ سكروز، ثم تجميد سريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ١٣٪
الحمص	القمة الخضرية	٤٪ DMSO لمدة ٢٤ ساعة، ثم تجميد بطئ حتى -٤٠م، ثم تجميد سريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٤٠٪
البسلة	القمة الخضرية	١٠٪ جليسرول، و ١٠٪ سكروز لمدة ١٥ دقيقة، ثم التجميد السريع فى النيتروجين السائل	بقاء بنسبة ١٠٠٪ وتجديد نمو بنسبة ٦٠٪
البطاطس	النموات البرعمية للدرنات	٢-٧٪ DMSO لمدة يومين، ثم التجميد السريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ١٠-٢٠٪
قصب السكر	كالس	١٠٪ DMSO، و ٠,٥ مولار سوربيتول، ثم تجميد بطئ حتى -٤٠م، ثم تجميد سريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٩٧٪

هذا .. ويحتفظ — حاليًا — بعدد من سلالات الجيرمبلازم لبعض الأنواع الخضرية التكاثر، مجمدة على صورة مزارع قمة خضرية، فى دول مختلفة، كما يلى (عن Reed ٢٠٠٢):

النوع المحصولى	الدولة (والمؤسسة)[أ]	تقنية التجميد[ب]	عدد السلالات/والمكررات
التفاح	الصين (CI)	CF/E-D	٢٠ سلالة/٥٠ قمة خضرية لكل منها
البلاكبرى	الولايات المتحدة (NCGR)	CF	١٧ سلالة/١٠٠ قمة خضرية لكل منها
الكاسافا	كولومبيا (CIAT)	E-D	٩٥ سلالة/٣٠ قمة خضرية لكل منها
حشيشة الدينار	الولايات المتحدة (NCGR)	CF	سلالتان/١٠٠ قمة خضرية لكل منها
الكمثرى	الولايات المتحدة (NCGR)	CF	١٠٦ سلالات/١٠٠ قمة خضرية لكل منها
البطاطس	ألمانيا (DSM/FAL)	Droplet	٢١٩ سلالة/٤٠–٣٥٠ قمة خضرية لكل منها
	بيرو (CIP)	Vit	١٩٧ سلالة/٢٥٠ قمة خضرية لكل منها
الكشمش/عنب الثعلب	اسكوتلندا (UAD)	E-D	٣١ سلالة/٢٥–٣٠ قمة خضرية لكل منها

أ – المؤسسات:

CI: Changli Institute of Pomology.
NCGR: National Clonal Germplasm Repository, Corvallis.
CIAT: International Center for Tropical Agriculture.
DSM/FAL: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelkulturen/Institute fur Pflanzenbau. Buundesforsch-ungsanstalt fur Landwirtschaft.
CIP: International Potato Center.
UAD: University of Abertay-Dundee.

ب – التقنيات:

CF: Controlled freezing.
E-D: Encapsulation-dehydration.
Vit: Vitrification.

يستخدم فى التبريد الفائق مركبات تقوم بحماية المزارع من الحرارة الشديدة الانخفاض

وتُقسم تلك المركبات التى تحمى المزارع والأنسجة النباتية من التبريد الفائق (الـ cryoprotectants) – إلى ثلاث فئات – حسب مدى قدرتها على توفير تلك الحماية – كما يلى (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢)،

١ - مركبات توفر حماية قليلة وتشمل:

Acetyl glycine	Dimethyl acetamide
Glucosamine	Mannitol

٢ – مركبات توفر حماية متوسطة .. وتشمل:

Acetyl choline	Dimethyl urea
Glutamic acid	Hydroxyproline
Methyl acetamide	

٣ – مركبات توفر حماية عالية .. وتشمل:

Betaine	Dimethyl sulfoxide
Ethylene glycol	Glucose
Glyceraldehyde	Glycerol
Sorbitol	Sucrose

ولمزيد من التفاصيل عن استخدامات مزارع الأنسجة فى حفظ الجيرمبلازم .. يراجع Morel (١٩٧٥)، و Henshaw وآخرون (١٩٨٠، و ١٩٨٣)، و Withers (١٩٨٠، و ١٩٨٣)، و Bajaj (١٩٩٥)، وحسن (٢٠٠٥).

مصادر إضافية

للإطلاع على مزيد من التفاصيل فى موضوع الإكثار الدقيق .. يراجع ما يلى:

المرجع	الموضوع
Murashige (١٩٧٤)	الإكثار الدقيق
Hussey (١٩٨٠)	الإكثار الدقيق
Ingram & Helgeson (١٩٨٠)	إنتاج نباتات خالية من الفيروسات
Bottino (١٩٨١)	الإكثار الدقيق لمحاصيل الخضر
Evans وآخرون (١٩٨١)	تجديد النمو من مزارع الخلايا
Wetherell (١٩٨٢)	الإكثار الدقيق
Hussey (١٩٨٣)	الإكثار الدقيق
Hartmann & Kester (١٩٨٣)	الإكثار الدقيق للمحاصيل البستانية
George (١٩٨٦)	الإكثار الدقيق للبطاطس
Dhawan (١٩٩٣)	الإكثار الدقيق للأنواع الخشبية
Paranjothy (١٩٩٣)	الإكثار الدقيق لأنواع النخيل
Prakash وآخرون (١٩٩٣)	إنتاج نباتات خالية من الإصابات المرضية فى مزارع الأنسجة
Cassells (١٩٩٨)	إنتاج نباتات خالية من الإصابات المرضية