إن المبدأ الأساسى فى ظاهرة التوالد الذكرى androgenesis هو وقف تطور خلية حبة اللقاح – التى تنتهى بتكوين جاميطة مذكرة – ودفعها نحو النمو المباشر لتكوين نبات كامل منها وهذا النمو غير الطبيعى لحبة اللقاح يمكن تحقيقه إذا ما أخذت خلية حبة اللقاح بعيدًا عن بيئتها الطبيعية فى النبات، ووضعت فى ظروف أخرى خاصة

كذلك لجأ الباحثون إلى مزارع المبايض ومزارع البويضات (التوالد الأنثوى gynogensis) لأجل إنتاج النباتات الأحادية المضاعفة فى عدد من الأنواع النباتية، مثل

Beta vulgaris	*Gerbera jamesonii*
Cucmis sativus	*Cucumis melo*
Allium cepa	*Helianthus annuus*

وقد اتبعت طريقة التهجينات الجنسية أو النوعية – التى تعقبها عملية استبعاد تلقائى للكروموسومات chromosome elemination فى الأجنة النامية – اتبعت فى إنتاج نباتات أحادية فى كل من الشعير، والقمح، والبطاطس، والقطن.

وحديثًا أصبحت مزارع الخلايا الجرثومية الصغيرة المعزولة isolated microspore culture أفضل وأكفا وسيلة لإنتاج نباتات أحادية مضاعفة من كل من الشعير، ولفت الزيت، ونباتات صليبية أخرى (عن Maluszynski وآخرين ١٩٩٦، و McCown ٢٠٠٣)

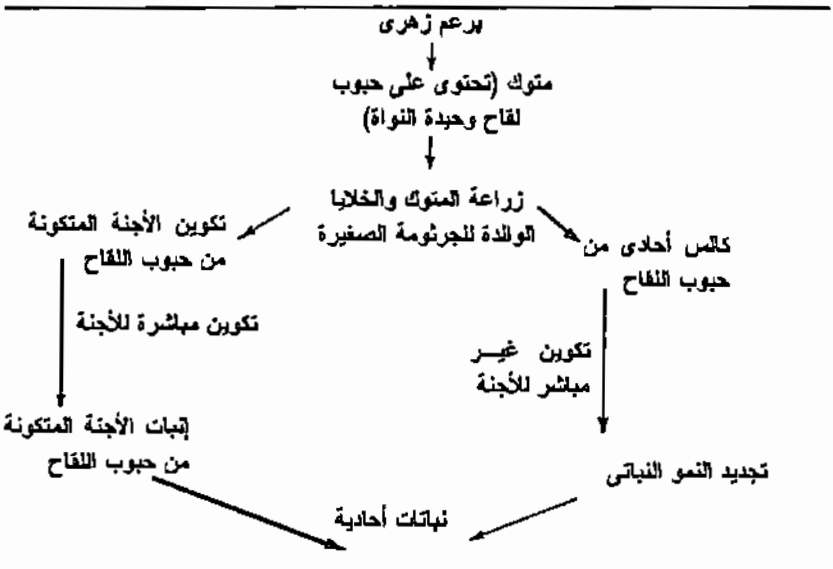
مزارع المتوك، وحبوب اللقاح، والخلايا الوالدة للجراثيم الصغيرة

خطوات تكوين النباتات الأحادية

أولاً: مزارع المتوك وحبوب اللقاح

تعد مزارع المتوك Anther culture من أكثر الطرق شيوعًا لإنتاج النباتات الأحادية ولقد تم تطوير هذه التقنية – لأول مرة – على نبات الداتورة بواسطة كل من Guha & Maheshwari فى عام ١٩٦٤. وفى هذه الطريقة .. يتم أولا جمع البراعم الزهرية وهى فى مرحلة مناسبة من التكوين من نباتات جيدة النمو. توضع البراعم فى أكياس

بلاستيكية على ٤°م لمدة ٧–١٠ أيام، فيما يعرف بمعاملة البرودة. يلى ذلك تعقيم البراعم الزهرية سطحيًا باستعمال ٠.١٪ كلوريد زئبق HgCl لمدة ٩–١٠ دقائق، ثم تفصل المتوك تشريحيًا بعناية من البراعم وتنقل إلى بيئة الزراعة، وتحضن على ٢٥ ± ١°م تحت إضاءة غير مباشرة. نجد غالبًا أن المتوك المزروعة تنتج كالس بعد ٢–٦ أسابيع، وبعد نحو شهر من تكوين الكالس فإنه يُحفَّز إلى تجديد النمو (شكل ٧–١).



شكل (٧–١): رسم تخطيطى يوضح عملية إنتاج النباتات الأحادية من خلال المتوك وما تحتويه من حبوب اللقاح وخلايا والدة للجراثيم الصغيرة microspores.

ويوضح شكل (٧–٢) مزيدًا من التفاصيل عن كيفية إنتاج النباتات الأحادية من حبوب اللقاح .. إما من خلال تكوين الأجنة pollen embryogensis، وإما من خلال كالس حبوب اللقاح pollen callusing (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

ثانيًا: مزارع الخلايا الجرثومية لحبوب اللقاح

تعتبر زراعة الخلايا الجرثومية – المفصولة – لحبوب اللقاح isolated microspores (الخلايا الجرثومية الصغيرة) أفضل من زراعة المتوك الكاملة. لأنها لا تعطى أى فرصة

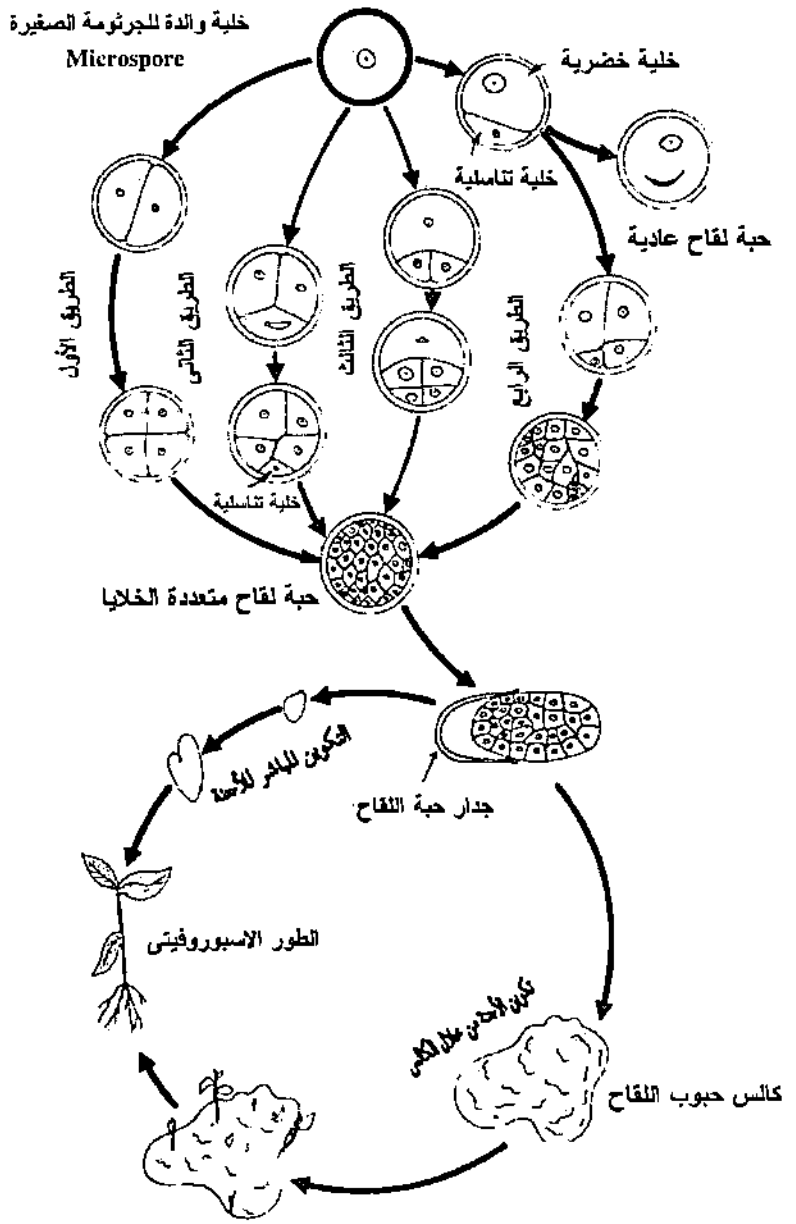
لظهور نباتات ثنائية العدد الكروموسومى، وهى التى قد تنشأ من خلايا جدر المتوك والأنسجة الرابطة بها وتنفصل الخلايا الجرثومية إما بصورة طبيعية بعد زراعة المتوك، وإما ميكانيكيًا بالضغط على المتوك حتى تبرز منها الخلايا الجرثومية

تمر الخلايا الجرثومية microspores – بعد زراعتها – بأشكال محتلفة من تجديد النمو – ذكريًا androgenesis – تقود إلى تكوين الأفراد الأحادية إما بصورة مباشرة، وإما بصورة غير مباشرة من خلال تكوين الكالس، علما بأن الطريق الأول بعد أفضل من لثانى بالنسبة للمربى

وعلى الرغم من أن تجديد النمو ذكريًا يمكن أن يحدث فى المزارع فى مرحلة الخلايا الأحادية الرابوع tetrad، أو فى مرحلة حبة اللقاح ذات النواتين (الذكرية والخضرية) فإن الخلايا الجرثومية الصغيرة microspores – فى مرحلة ما قبل الانقسام الميوزى الأول مباشرة أو عنده – هى الأفضل لتجديد النمو.

فى حالة تجديد النمو ذكريًا بصورة مباشرة تتطور الخلايا الجرثومية الصغيرة كما لو كانت زيجوتًا، حيث تمر بشتى مراحل تكوين الجنين كتلك التى تحدث بعد التلقيح والإخصاب وبعد وصول الأجنة إلى المرحلة الكروية globular stage فإنها تنطلق غالبا – من الجدار الخارجى لحبة اللقاح exine لتكمل نموها خارجيًا ويلى ذلك امتداد الفلقتين وبروز النبت الصغير من المتوك فى خلال ٤–٨ أسابيع

أما فى حالة تجديد النمو غير المباشر فإن الخلايا الجرثومية الصغيرة تنقسم عدة مرات لتكون كالس يندفع خارجًا من جدار المتك ويعقب ذلك إما تميز الكالس لتكوين أجنة أو جذور ونموات خضرية فى البيئه ذاتها، وإما أن ينقل إلى بيئة أخرى ليحدث التميز وغالبا ما تحتوى النباتات المتحصل عليها من الكالس على تباينات وراثية، وخاصة تلك التى يكون مردها إلى التعدد الكروموسونى، ولذا . فإنها لا يكون مرغوبا فيها (عن Bajaj ١٩٩٠).



شكل (٧-٢): تخطيط يبين نشأة النباتات الأحادية من حبوب اللقاح فى مزارع المتوك. يمكن أن تسلك الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة، أيا من الطرق الأربعة المبينة فى الشكل لتكوين حبة لقاح متعددة الخلايا، وهى التى يمكن أن تنتج بدورها جنينًا مباشرة، أو تنتج الطور الأسبورفيتى من خلال النمو الكالوسى.

العوامل المؤثرة فى عملية التوالد الذكرى

تتأثر عملية التوالد الذكرى androgensis بالعوامل التالية :

١ — التركيب الوراثى للنبات الذى تؤخذ منه المتوك المستعملة فى الزراعة

تظهر تباينات وراثية كبيرة بين الأجناس والأنواع، وحتى بين أصناف النوع الواحد فى استجابتها لزراعة المتوك، ولقد اقترح أن تلك الصفة يتحكم فيها جينات يمكن نقلها إلى التراكيب الوراثية التى تستجيب لزراعة المتوك

وللتدليل على مدى تأثر القدرة على تجديد النمو ذكريًا بالتركيب الوراثى داخل النوع النباتى الواحد وجد عندما استعمل ٤٣ صنفًا من الطماطم، و ١٨ سلالة من *Arabidopsis thaliana* أنه لم تنتج نباتات أحادية سوى من ثلاثة تراكيب وراثية من كل نوع. وقد حصل على نتائج متقاربة لتلك النتائج مع كل من أجناس محاصيل التبغ، والبطاطس، والراى (الجاودار) rye وفى القمح *Triticum aesativum* لم يُحصل على أنسجة أحادية إلاّ من ١٠ أصناف من بين ٢١ صنفًا استعملت فى الدراسة، ولم تختلف النتائج كثيرًا عما تقدم بيانه فى جنس محصول الأرز، وإن تباينات الأنواع فى هذا الشأن

ويبدو أن أحد الأسباب التى تكمن وراء فشل البعض فى الحصول على نباتات أحادية من مزارع المتوك أن الباحثين يقصرون عملهم على صنف واحد، ويتوقفون عن متابعة المحاولة إن لم ينجح هذا الصنف معهم. وإنه لمن المهم عمل حصر يتضمن عديدا من الأصناف، مع استخدام بيئات بسيطة؛ لأن البيئات المركبة الغنية فى منظمات النمو قد تحفز نمو خلايا جسمية من أنسجة المتوك.

هذا ومن المعلوم أن تجديد النمو ذكريًا صفة وراثية، ولا يوجد ما يمنع اختلاف أصناف النوع الواحد فى محتواها من الجين أو الجينات المسئولة عن تلك الخاصية ويمكن نقل تلك القدرة على تجديد النمو من التراكيب الوراثية الأكثر استجابة إلى التراكيب الأقل استجابة، وهو أمر تحقق بالفعل فى كل من البطاطس، والقمح (عن Bajaj ١٩٩٠)

٢ — الحالة الفسيولوجية للنبات الذى تؤخذ منه المتوك المستعملة فى الزراعة

تكون الأزهار الأولى فى التكوين أكثر نجاحًا فى مزارع المتوك، فضلا عن تأثر نجاح

الزراعة بعديد من العوامل التى تؤثر فسيولوجيًا على النبات الذى تؤخذ منه المتوك المستعملة فى الزراعة مثل عمره، والفترة الضوئية، وشدة الإضاءة، ودرجة الحرارة، والفترة من السنة، وحالة التغذية .. إلخ.

٣ — مرحلة تكوين الخلايا الأمية لحبوب اللقاح:

تعتبر المرحلة التى تتكون فيها الخلايا الأمية لحبوب اللقاح microspores — عند زراعة المتوك — من أهم العوامل التى تتحكم فى نجاح زراعة المتوك، وهى مرحلة تختلف باختلاف الأنواع النباتية، لكن تعتبر المرحلة المناسبة فى عديد من الأنواع هى عندما تحتوى المتوك على حبوب لقاح فى وقت مبكر إلى متوسط من مرحلة النواة المفردة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢). وبعبارة أخرى .. يجب أن يكون المتك فى مرحلة يحتوى فيها على خلايا جرثومية تتباين من مرحلة التكوين الرباعى tetrad إلى مرحلة اللقاح الثنائى النواة binucleate، علمًا بأنه بمجرد بدء ترسيب النشا فى الخلية الجرثومية فإنها لا تتطور أبدًا إلى نمو نباتى أحادى (عن Chawla ٢٠٠٠).

٤ — معاملات المتوك السابقة لزراعتها (الصدمات الحرارية والمعاملات الكيميائية):

تجرى معاملات للمتوك بهدف وقف التطور الطبيعى لحبوب اللقاح إلى جاميطة مذكرة، مثل:

أ — المعاملة بالحرارة المنخفضة، والتى تتراوح عادة بين ٣، و ٦°م لمدة ٣–١٥ يومًا

ب — المعاملة بالحرارة العالية، مثل ٣٥°م لمدة ٢٤ ساعة، أو ٤٠°م لمدة ساعة واحدة.

جـ – المعاملة ببعض المركبات الكيميائية، مثل الإثريل بتركيز ٤٠٠٠ جزء فى المليون

تعرف معاملات الحرارة المنخفضة والمرتفعة باسم الصدمات الحرارية.

من أمثلة الصدمات الحرارية المعاملة بالبرودة (٤–١٠°م لمدة أسبوع) أو الحرارة (٣٥°م لمدة ٥–١٥ دقيقة)؛ حيث تؤدى تلك المعاملات إلى وقف عمل الجينات المسئولة عن التكوين الطبيعى للطور الجاميطى.

لقد تمكن العلماء منذ عام ١٩٢٢ من الحصول على نباتات أحادية العدد

الكروموسومى من الداتورة بتعريض النباتات لحرارة منخفضة وقت إخصاب الأزهار، كما أمكن الحصول على نباتات أحادية من التبغ فى عام ١٩٣٧ بتعريض النباتات لأى من الحرارة العالية أو المنخفضة وأعقب ذلك فى عام ١٩٣٩ الحصول على نباتات أحادية من الشوفان بتعريضها لحرارة ٣°م وفى كل هذه الحالات كانت نشأة النباتات الأحادية من البويضات

وأمكن الاستفادة من تأثير الصدمة الحرارية بتطبيقها فى مزارع المتوك على كل من الطماطم، والتبغ، حيث أسفرت عن تحفيز تجديد النمو ذكريًا من كل من المتوك وحبوب اللقاح المعزولة. ويبدو أن تأثير الحرارة المنخفضة (٣-٥°م) هو تأثير غير مباشر حيث إنها تبقى على حيوية حبوب اللقاح لفترة أطول، مما يؤخر شيخوختها، ويمنع إجهاضها، ومن ثم يزداد عدد حبوب اللقاح التى يمكن أن تكوّن أجنة (عن Bajaj ١٩٩٠)

كذلك يوقف التعريض للحرارة المنخفضة العمليات الأيضية بحبة اللقاح، وإذا ما استمرت المعاملة لفترة كافية، فإن ذلك يجعل حبة اللقاح تغير من أيضها العادى إذا ما وضعت بعد المعاملة فى بيئة خاصة، حيث تعطى فى أول انقسام لها — حينئذ — نواتين متماثلتين بدلا من تكوين نواة خضرية وأخرى تناسلية تختلف المدة التى تلزم للتعريض للحرارة المنخفضة باختلاف الأنواع النباتية (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢، جدول ٧-١)

٥ — تركيب بيئة الزراعة:

قد يؤثر تركيب بيئة الزراعة على استجابة المتوك للزراعة، ومن أهم البيئات الأساسية المستعملة لهذا الغرض: N_6، و MS، و B_5، و Nitsch & Nitsch

تعد بيئة موراشيج وسكوج مناسبة لزراعة حبوب اللقاح وعلى الرغم من عدم أهمية العناصر والفيتامينات فى حث عملية التوالد الذكرى، فإن لها أهمية كبيرة فى تطور تكوين الجنين بعد ذلك، وللحديد المخلبى — خاصة — أهمية كبيرة فى تميز الأجنة فى مرحلة النمو الكروى وحتى طور النمو القلبى أما منظمات النمو فيتعين تجنب تواجدها فى مزارع المتوك وحبوب اللقاح

جدول (٧-١): معاملات الحرارة المنخفضة التي أخضعت لها المتوك أو البراعم الزهرية – قبل استخدامها فى مزارع المتوك – لأجل زيادة معدل التولد الذكرى androgensis – من المتوك المزروعة – فى أنواع نباتية مختلفة (عن Mantell وآخرين ١٩٨٥).

النوع النباتى	المعاملة السابقة للزراعة
Brassica campestris (اللفت)	٣ أيام على ٣٥م
B. napus (لفت الزيت)	١٤ يومًا على ٣٠م
Datura innoxia	٤ أيام على ٤م
D. metel	يومان على صفر م
Festuca arundinacea (العكرش)	٢٥ يومًا على ٥م
Hordeum vulgare (الشعير)	يومان على ٣م
Nicotiana tabacum (التبغ)	١٢ يومًا على ٧-٨م
Oryza sativa (الأرز)	١٠ أيام على ١٣م
Petunia hybrida (البيتونيا)	يومان على ٦م
Secale cereale (الراى)	٦-١٠ أيام على ٦م
Triticum aestivum (القمح)	٢-٨ أيام على ٣-٥م
T. aestivium x *T. cereale* (الترتيكيل)	٧ أيام على ٤م
Vitis sp. (العنب)	٣ أيام على ٤م
Zea mays (الذرة)	١٤ يومًا على ٨م وكذلك ٧ أيام على ٤م ثم ٧ أيام على ٨م

هذا .. وتعد البيئات السائلة أكثر مناسبة لمزارع المتوك وحبوب اللقاح، حيث يتحفز تكوين الأجنة فيها (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

٦ – الضوء:

بينما يحفز الظلام والضوء الأزرق عملية التوالد الذكرى، فإن الضوء الأبيض يعد مثبطًا لها. هذا بينما يقلل الضوء الأحمر الوقت الذى يلزم لإنتاج نباتات من حبوب اللقاح بنحو ٢٠٪ (عن Chahal ٢٠٠٢).

٧ – مستوى التضاعف فى النباتات الناتجة من مزارع المتوك:

قد يحدث تضاعف ذاتى للكروموسومات أثناء النمو الكالوسى للخلايا الأمية لحبوب اللقاح، مما يؤدى إلى إنتاج نباتات أحادية متضاعفة بصورة مباشرة، وهو أمر يتفاوت معدل حدوثه بين الأنواع النباتية، وحسب ظروف الزراعة. كذلك قد تنمو من الكالس

نباتات ثنائية عادية (ليست أحادية متضاعفة) عندما تتكون بعض خلايا الكالس من خلايا جدر المتوك الثنائية (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

بيئات الزراعة

استخدمت فى مزارع المتوك البيئات الأساسية لكل White، وموراشيج سكوج Murashuge and Skoog، و Nitsch & Nitsch مع تحويرات طفيفة وإضافات لمنظمات النمو، علمًا بأن المدى الطبيعى للسكروز يتراوح فى هذه البيئات بين ٢٪، و ٤٪ (جدول ٧-٢) كذلك يبين جدول (٧-٣) تركيبًا لبيئة استخدمها Nitsch لزراعة الخلايا الأمية لجرائيم التبغ الصغيرة.

يلعب الحديد فى البيئة دورًا هامًا جدًّا ولا غنى عنه وعلى الرغم من أن تجديد النمو ذكريًا يمكن أن يبدأ فى مزارع التبغ فى غير وجود الحديد، إلا أن مبادئ الأجنة proembryos المتكونة لا تتطور لأكثر من الطور الكروى. ويعد الحديد المخلوب، مثل FeEDTA، و FeEDDHA أكثر كفاءة -- كمصدر للحديد — عن سترات الحديد

وتعد الاحتياجات الغذائية للمتوك المفصولة والمزروعة أكثر بساطة من تلك التى تلزم الخلايا الجرثومية الصغيرة المعزولة، نظرًا لغياب كثير من العوامل التى تستحث تجديد النمو فى تلك الخلايا، بينما نجد أنها قد تتوفر فى المتوك، والتى يدخل ضمنه محتوى المتوك الطبيعى من كل من الأوكسين والسيتوكينين.

هذا وتتباين الأنواع النباتية فى احتياجاتها الدقيقة من مختلف مكونات البيئة، كما تتباين متطلبات تجديد النمو المباشر عن تلك التى يحدث فيها تجديد النمو غير المباشر ويعد السكر جزءًا أساسيًا من مكونات البيئة، حيث لا يشكل فقط مصدرا للكربون، ولكنه يفيد — كذلك — فى عملية التنظيم الأسموزى؛ فعلى الرغم من أن المدى الطبيعى لمحتوى السكر فى البيئة يجب أن يتراوح بين ٢٪، و ٤٪، فإن زيادة نسبة السكر فى البيئة إلى ٦٪ حتى ١٢٪ أعطى نتائج أفضل فى كل من القمح، والشعير، والأرز، والبطاطس، ويبدو أن تلك الاستجابة كان مردها إلى تأثير المحتوى العالى للسكر على الضغط الأسموزى، وليس بسبب أى حاجة إلى مستوى عال من المواد الكربوهيدراتية فى البيئة

جدول (٧-٢): مكونات بعض البيئات الأساسية فى مزارع المنوك (مجم/لتر).

N_6	Nitsch and Nitsch	Murashige and Skoog	White	
				العناصر الكبرى
—	—	—	٢٨٨	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$
٢٨٣٠	٩٥٠	١٩٠٠	٨٠	KNO_3
—	٧٢٠	١٦٥٠	—	NH_4NO_3
—	—	—	٦٥	KCl
٤٠٠	٦٨	١٧٠	—	KH_2PO_4
—	—	—	١٩	$NaH_2PO_4.4H_2O$
١٦٦	١٦٦	٤٤٠	—	$CaCl_2.2H_2O$
١٨٥	١٨٥	٣٧٠	٧٣٧	$MgSO_4.7H_2O$
—	—	—	٢٠٠	Na_2SO_4
٤٦٣	—	—	—	$(NH_4)_2SO_4$
				العناصر الصغرى
—	—	—	٢,٥	$Fe_2(SO)_3$
٢٧,٨	٢٧,٨	٢٧,٨	—	$FeSO_4.7H_2O$
٣٧,٣	٣٧,٣	٣٧,٣	—	$Na_2.EDTA$
٤,٤	٢٥	٢٢,٣	٦,٧	$MnSO_4.4H_2O$
١,٦	١٠	٦,٢	١,٥	H_3BO_3
١,٥	١٠	٨,٦	٢,٢	$ZnSO_4.4H_2O$
٠,٨	—	٠,٨٣	٠,٧٥	Kl
—	٠,٢٥	٠,٢٥	—	$Na_2MoO_4.2H_2O$
—	٠,٠٢٥	٠,٠٢٥	—	$CuSO_4.5H_2O$
—	—	٠,٠٢٥	—	$CoCl_2.6H_2O$
				مركبات عضوية
—	٠,٠٥	—	—	Biotin
٢	٢	٢,٠	٣,٠	Glycine
—	١٠٠	١٠٠	—	Inositol
٠,٥	٥	٠,٥	٠,٥	Nicotinic acid
٠,٥	٠,٥	٠,٥	٠,١	Pyridoxine-HCl
٠,٥	٠,٥	٠,١	٠,١	Thiamine-HCl
—	٥	—	—	Folic acid
٥٠٠٠٠	٢٠٠٠٠	٣٠٠٠٠	٢٠٠٠٠	Sucrose

جدول (٧-٣): تركيب بيئة استخدمها Nitch فى زراعة الخلايا الأمية للأبواغ الدقيقة فى التبغ (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

المكونات	التركيز (جم/لتر)
KNO_3	٩٥٠
NH_4NO_3	٧٢٥
$MgSO_4.7H_2O$	١٨٥
KH_2PO_4	٦٨
$CaCl\ 2H_2O$	١٦٦
Fe EDTA	٥ مل
جلوتامين Glutamine	٧٣٠
سيرين Serine	١٠٥
إينوريتول Inositol	٤٥٠٥
سكروز	٢٠٠٠٠
رقم الحموضة (pH)	٥,٨

كذلك أدت إضافة الفحم النباتى إلى البيئة إلى تحفيز النمو ذكريًا فى مزارع متوك التبغ، والبطاطس، والشوفان، والجزر وعلى الأقل فى التبغ كان مرد التأثير المحفز للفحم النباتى فى مزارع التبغ إلى امتصاص الفحم للمركب 5-hydroxymethyfurfural الذى يتكون أثناء تعقيم السكروز فى الأوتوكليف. وهو مركب له تأثير ضار؛ أى إن الفحم النباتى يمتص المركبات المثبطة، ومن ثم يقلل أعداد الأجنة الأحادية التى كانت عرضة للإجهاض فى وجود تلك المركبات (عن Bajaj ١٩٩٠) هذا فضلاً عن امتصاص الفحم للمركبات السامة التى تنتج عن تحلل التوك، ومثبطات النمو — مثل حامض الأبسيسك — التى تتواجد بتركيزات عالية فى المتوك وتمنع عملية التوالد الذكرى (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢)

خطوات الزراعة

يجب أن تؤخذ المتوك المستعملة فى الزراعة من نباتات حديثة الإزهار، ويكون ذلك فى مرحلة معينة من تكوين حبوب اللقاح قبل تفتح الزهرة، لذا .. فإنه تفضل دائمًا زراعة النباتات التى تؤخذ منها المتوك فى ظروف بيئية متحكم فيها، ليمكن الربط — إلى حد ما — بين المظهر الخارجى للبرعم الزهرى، والمرحلة المناسبة لتكوين حبوب اللقاح

تعد البراعم الزهرية المغلقة المتحصل عليها فى بداية مرحلة الإزهار — والتى توجد بها المتوك فى مرحلة الخلايا الجرثومية الوحيدة النواة — هى الأفضل للاستخدام فى مزارع المتوك وحبوب اللقاح. تقطع تلك البراعم الزهرية، وتعقم سطحيًا — وهى فى مجموعات تضم كل منها ٢٥ برعمًا — وذلك باستعمال محلول ٥٪ من الكلوراكس أو ١٪ هيبوكلوريت الكالسيوم لمدة ١٠ دقائق، ثم تغسل مرتين باستعمال ماء معقم ومقطر.

فى البداية .. يتم عمل شق على أحد جوانب البرعم الزهرى، وتسحب الأسدية خارجيًا باستعمال ملقط ذات أطراف مدببة، وتجمع فى طبق بترى معقم. ويلى ذلك إزالة الخيوط بحرص من الأسدية، وتنقل كل خمسة متوك معًا إلى وعاء بيئة الزراعة، وذلك بعد اختبار مرحلة تكوينها بسحق أحد المتوك فى صبغة أسيتوكارمن .. ويراعى أثناء فصل المتوك عدم الإضرار بها إطلاقًا؛ حيث يتعين استبعاد جميع المتوك المضارة، نظرًا لأنها تعطى غالبًا نسيج كالس من أجزاء غير حبوب اللقاح — مثل جدر المتوك — وهى خلايا ثنائية.

تزرع المتوك على بيئة آجار فى أنابيب زجاجية، أو فى أطباق بترى صغيرة، كما يمكن — كذلك — زراعتها فى بيئة سائلة فى دوارق مخروطية مع وضعها فى هزاز دائرى بطئ الحركة. كذلك يمكن اتباع تقنية خاصة توضع فيها حبوب اللقاح على قطعة من ورقة ترشيح تستند على متك كامل يستند — بدوره — على بيئة الزراعة؛ فيما يعرف بالمزرعة الحاضنة nurse culture، التى توفر فيها المتوك بعض المركبات الأساسية التى تلزم لنمو حبوب اللقاح (شكل ٧-٣).

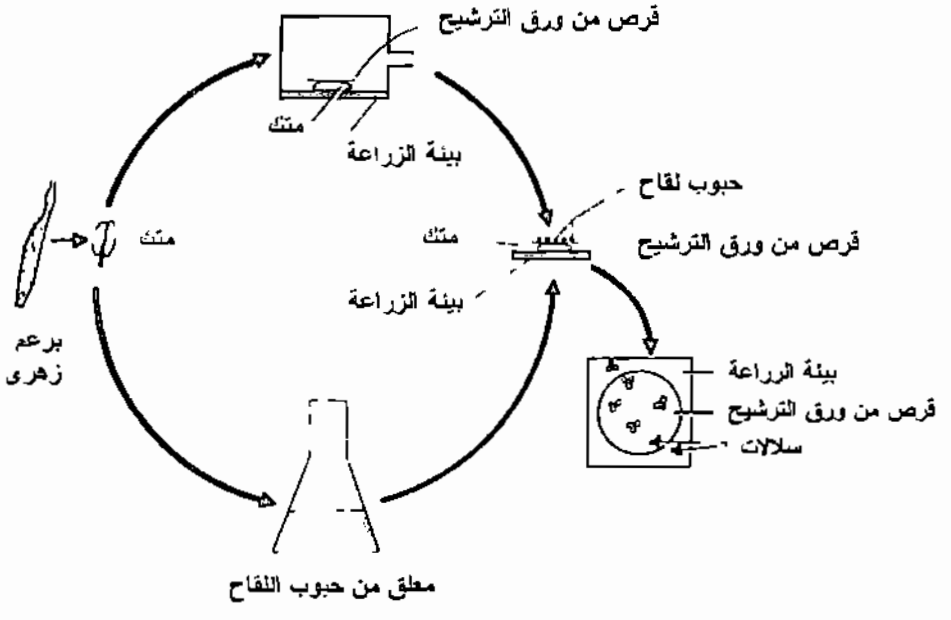
تحضن مزارع المتوك غالبًا فى الضوء (٥٠٠٠-١٠٠٠٠ لكس lux/م^{٢}) لمدة ١٢-١٨ ساعة على حرارة ٢٨°م بالتبادل مع فترة إظلام، مدتها ٦-١٢ ساعة على حرارة ٢٢°م.

تتحول جدر المتوك — تدريجيًا — إلى اللون البنى، ثم تتفتح فى خلال ٣-٨ أسابيع؛ بسبب الضغط الداخلى للكالس المتكون من حبوب اللقاح، أو بسبب النباتات الصغيرة Plantlets التى تنمو منها.

تفصل النباتات المفردة أو النموات الخضرية عن الكالس، بعد أن يصل طولها إلى نحو

٣-٥ سم، وتنقل إلى بيئة مناسبة للنمو الجذرى، ويلى ذلك نقل النباتات التى تكونت جذورها إلى أصص صغيرة معقمة وتحتوى على تربة معقمة ولتقليل الصدمات ومنع الجفاف يفضل تنكيس كأس زجاجى فوق كل نبات، مع وضع الأصص فى صوبة رطبة وجيدة الإضاءة

ترفع الكؤوس من على النباتات بعد حوالى أسبوع من الزراعة، ثم بعد نحو أسبوعين آخرين يتم نقلها مرة أخرى إلى أصص أكبر حجمًا، حيث تبقى فيها إلى حين اكتمال نموها وإزهارها (عن Bajaj ١٩٩٠)



شكل (٧-٣) تقنية المزارع الحاضنة nurse culture technique لإنتاج سلالات أحادية من مزارع حبوب اللقاح (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

قوائم بالأنواع النباتية التى أمكن إكثارها

أولا: مزارع المتوك وحبوب اللقاح:

نستعرض — فيما يلى — قوائم ببعض الأنواع النباتية التى أمكن إكثار نباتات أحادية منها من خلال مزارع المتوك وحبوب اللقاح.

● قائمة Chu (١٩٨٢)، و Bhojwani & Razdan (١٩٨٣):

العائلة والنوع النباتي	طريقة التكوين[أ]
Caricaceae	؟
Carica papaya	؟
Chenopodiaceae	
Beta vulgaris	؟
Compositae	
Gerbera jamesonii	C
Cruciferae	
Arabidopsis thaliana	C
Brassica campestris	E
B. chinensis	؟
B. oleracea	C
B. oleracea x *B. alboglabra* (F_1)	C
B. napus	E
B. pekinensis	؟
Euphorbiaceae	
Hevea brasiliensis	؟
Geraniaceae	
Pelargonium hortorum	C
Gesneriaceae	
Saintpaulia ionantha	E
Gramineae	
Aegilops caudata x *A. umbellata*	C
Bromus inermis	C
Coix lacryma	؟
Hordeum vulgare	C
Lolium multiflorum	C
L. multiflorum x *Festuca arundinaceae*	C
Oryza sativa	C, E
O. perennis	C
Secale cereale	C, E
Setaria italica	C
Triticale	C

العائلة والنوع النباتى	طريقة التكوين[أ]
Triticum aestivum	C, E
T. durum	؟
T. vulgare x *Agropyron glaucum*	C
Zea mays	C, E
Hippocastanaceae	
Aesculus hippocastanum	E
Leguminosae	
Trifolium alexandrium	C
Liliaceae	
Asparagus officinalis	C
Lilium longiflorum	C
Ranunculaceae	
Paeonia hybrida	E
Rutaceae	
Poncirus trifoliata	E
Salicaceae	
Populus nigra	C
P. assuriensis	C
P. simonni x *P. nigra*	C
Scrophulariaceae	
Digitalis purpurea	C
Solanaceae	
Atropa belladonna	E
Capsicum annum	C, E
Datura innoxia	E
D. metel	C, E
D. meteloides	E
D. muricata	E
D. Stramonium	E
D. wrightii	E
Hyoscyamus albus	E
H. niger	E, C

العائلة والنوع النباتى	طريقة التكوين[أ]
H. pusillus	E
Lycium halimifolium	E
Lycopersicon esculentum	C
Nicotiana alata	E
N. attenuata	E
N. clevelandii	E
N. glutinosa	E
N. knightiana	E
N. langsdorffii	E
N. otophora	E
N. paniculata	E
N. raimondii	E
N. rustica	E
N. sanderae	E
N. sylvestris	E
N. tabacum	E
Petunia axillaris	E
P. hybrida	C
P. axillaris x *P. hybrida*	C
Scopolia carniolica	E
S. lurida	E
S. physaloides	E
Solanum bulbocastanum	C, E
S. demissum	C, E
S. dulcamara	C, E
S. fendleri	C, E
S. hjertingii	E
S. melongena	C
S. nigrum	C
S. phureja	E
S. polytrichon	C, E

العائلة والنوع النباتى	طريقة التكوين[أ]
S. stenotomum	E
S. stoloniferum	E
S. surattense	C
S. tuberosum	C, E
S. verrucosum	C, E
S. verrucosum x *S. chacoense*	E
S. verrucosum x *S uberosum*	E

أ — E تكوين النباتات الأحادية من خلال التكوين الجنينى من حبوب اللقاح pollen embryogenesis، و C تكوين النباتات الأحادية من خلال النمو الكالوسى لحبوب اللقاح pollen callusing، و ؟ طريقة التكوين غير واضحة

● قائمة Bajaj (١٩٩٠)

قدمت قائمة Bajaj حصرًا بالأنواع النباتية التى أمكن الحصول منها على كالس أحادى المجموعة الكروموسومية، أو أجنة أو نباتات أحادية عن طريق مزارع المتوك أو حبوب اللقاح ومن بين الأنواع النباتية الهامة التى ورد ذكرها، ما يلى:

Arachis spp.	*Asparagus officinalis*
Beta vulgaris	*Brassica* spp
Capsicum spp.	*Cicer arietinum*
Coffea arabica	*Daucus carota*
Fragaria spp.	*Freesia* spp.
Gladiolus spp.	*Gossypium* spp.
Helianthus annuum	*Hordeum vulgare*
Jacaranda acutifolia	*Lycopersicon* spp.
Malus domestica	*Medicago sativa*
Oryza sativa	*Phaseolus aureus*
Pisum sativum	*Populus* spp
Psophocarpus tetragonolobus	*Secale cereale*
Solanum spp.	*Triticum* spp.
Triticale	*Vigna mungo*
Vitis vinifera	*Zea mays*

● قائمة Kalloo (١٩٨٨):

من بين محاصيل الخضر – والأنواع القريبة منها – التى أمكن الحصول فيها على أنسجة أو أجنة أو كالس أو نباتات كاتملة أحادية المجموعة الكروموسومية بالاستعانة بزراعة المتوك أو حبوب اللقاح، ما يلى:

Solanum tuberosum
S. verrucosum
S. melongena
Lycopersicon esculentum
Capsicum annuum
Asparagus officinalis
Pisum stivum
Phaseolus vulgaris
P. aureus
Vicia faba
Vigna unguiculata
Glycine max
Cucumis melo
Brassica oleracea var. *italica*
Brassica oleracea var. *gemmifera*

ثانيًا: مزارع الخلايا الوالدة للجراثيم الدقيقة:

من بين الأنواع النباتية التى أنتجت فيها أجنة (E) embryos أو نباتات كاملة plants (P) باستخدام مزارع الخلايا الوالدة للجراثيم (أو الأبواغ) الدقيقة microspore culture (مزارع الخلايا الجرثومية الصغيرة)، ما يلى (عن Dunwell ١٩٩٦):

Asparagus officinalis (P)
Brassica campestris (P)
Brassica carinata (P)
Brassica napus (P)
Brassica oleracea (P)
Camellia japonica (E)

Datura innoxia (P)
Ginkgo biloba (E)
Hordeum vulgare (P)
Lupinus albus (E)
Medicago sativa (E)
Nicotiana tabacum (P)
Oryza sativa (P)
Triticum aesativum (P)
Zea mays (P)

مزارع المبايض والبويضات

يُعرف إنتاج النباتات الأحادية من الخلايا الجرثومية الكبيرة megaspores باسم التوالد الأنثوى gynogensis؛ الأمر الذى يتم عن طريق مزارع المبايض ovary culture. وهى التى أجريت بداية على الذرة والباذنجان، ثم طبقت على محاصيل أخرى مثل الأرز والشعير ولقد وجدت تباينات وراثية فى تكوين الكالوس الـ gynogenic. ويتوقف نجاح الزراعة — كذلك — بصورة أساسية على مرحلة تكوين المبيض التى تتباين المرحلة المناسبة منها باختلاف الأنواع فيما بين مرحلة البويضة الأحادية النواة إلى مرحلة الكيس الجنينى المكتمل التكوين ويعد توفر منظمات النمو التى تحفز التوالد الأنثوى وسبط بضاعف الأنسجة الأمية أمرا حيويًا لنجاح زراعة المبايض، ومن أهم منظمات النمو المؤثرة فى ذلك الاتجاه 2-methyl, 4-chlorophenoxyacetic acid (اختصارًا MCPA)

وتعد مزارع المبايض أقل كفاءة فى إنتاج النباتات الأحادية من مزارع المتوك؛ نظرًا لوجود كيس جينيى واحد بكل مبيض، مقارنة بآلاف الخلايا الجرثومية لحبوب اللقاح التى قد تتواجد فى المتك الواحد

هذا . ويمكن أن تزرع المبايض ملقحة أو غير ملقحة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

ولقد نجحت مزارع المبايض غير الملقحة والبويضات فى كثير من الأنواع النباتية.