الفصل الثامن

التهجين فى البيئات الصناعية ومزارع الأجنة والإندوسبرم

إجراء التهجينات فى البيئات الصناعية

يوجد أربعة أنواع من التهجينات خارج النبات (in vitro)، كما يلى.

١ – إضافة حبوب اللقاح إلى البويضات المفصولة excised ovules، فيما يعرف باسم in vitro ovular pollination، وهو ما يطلق عليه التلقيح فى أنبوبة الاختبار test-tube pollination.

٢ – إضافة حبوب اللقاح إلى البويضات المتصلة بمشيمتها فى بيئة صناعية، فيما يعرف باسم in vitro placental pollination.

وتسمى المزارع فى الحالتين السابقتين باسم مزارع البويضات (مزارع البوييضات أو البذيرات) ovule culture.

٣ – إضافة حبوب اللقاح إلى مياسم الأزهار التى فصلت أمتعتها ووضعت فى بيئة صناعية، فيما يعرف باسم in vitro stigmatic pollination، كما تعرف المزارع فى هذه الحالة باسم مزارع المبايض ovary culture، وهى التى يمكن الرجوع إلى تفاصيلها فى Zenkteler (١٩٨٠)

٤ – إضافة حبوب اللقاح إلى مياسم الأزهار الكاملة التى فصلت عن النبات الأم ووضعت فى بيئة صناعية ، فيما يعرف – كذلك – باسم in vitro stigatic pollination، إلاّ أن هذه المزارع تعرف باسم مزارع الأزهار flower culture

إجراء التهجينات فى مزارع الأزهار

لم تلق مزارع الأزهار اهتمامًا كبيرًا من قبل الباحثين. ومن بين الحالات القليلة التى لاقت نجاحًا أنه أمكن تحفيز تكوين براعم على قطاعات طولية رقيقة من أعناق أزهار

١٥ صنفًا من الطماطم زرعت فى بيئة موراشيج وسكوج زودت بتركيزات مختلفة من الأوكسينات والسيتوكينينات، وكان الأيزاتين isatin (وهو: indole 2,3-dione، ويعتبر من بادئات الأوكسين الذى يتحول ببطء إلى أوكسين) .. كان أكثر مصادر الأوكسين فاعلية فى تكوين البراعم دون تكوين مسبق للجذور. كذلك كان الزياتين zeatin أكثر السيتوكينيات تأثيرًا فى تحفيز نمو وتطور البراعم. وقد تكونت – بصورة منتظمة – البراعم الزهرية التى تطورت إلى ثمار ناضجة فى الصنف Pixie Hybrid II مع المعاملة بالأيزاتين بتركيز ١٠ ميكرو مولار + الزياتين بتركيز ٣ ميكرو مولار. نمت الثمار فى بيئة الزراعة بكريًا ووصل قطرها إلى نحو ١٥مم، ونضجت سريعًا، وكان لونها وطعمها طبيعيين. كذلك تكونت براعم زهرية على قطاعات أعناق الصنفين Yellow Canary، و LA 2705، لكن باقى الأصناف المختبرة لم تنتج براعم زهرية (Kaur-Sawheny وآخرون ١٩٩٦).

ولقد أمكن الاستفادة من مزارع الأزهار فى إجراء التهجينات البعيدة، وعلى سبيل المثال .. يتطلب التهجين بين الفجل *Raphanus sativus* ولفت الزيت *Brassica napus* زراعة الأجنة الهجين فى مرحلة مبكرة من تكوينها؛ ليمكن المحافظة عليها؛ الأمر الذى يتطلب مهارة ووقتًا طويلين. ولكن أمكن إجراء هذا التهجين بنجاح دونما حاجة إلى إجراء أى زراعة للبويضات أو للجنين بإجراء التهجين الجنسى فى أزهار مزروعة فى بيئة صناعية خاصة (Metz وآخرون ١٩٩٥).

إجراء التهجينات فى مزارع البويضات

سبقت الإشارة إلى مزارع البويضات فى الفصل السابع فى معرض تناولنا لموضوع إنتاج النباتات الأحادية، وما يهمنا فى هذا المقام هو كيفية الاستعانة بمزارع البويضات فى إنتاج التهجينات البعيدة؛ إذ إنها تفيد فى التغلب على المشاكل السابقة للإخصاب فى هذه النوعية من التهجينات.

تخصى الأمهات قبل تفتح الأزهار بيومين، وتكيس، ثم تنقل الأزهار المخصية إلى المختبر بعد موعد تفتحها الطبيعى بيوم أو يومين؛ حيث يزال الكأس والتويج، ويغمس

المتاع وعنق الزهرة — إن وجد — سريعا فى ٧٠٪ كحولاً، ثم يطهران سطحيًا بأحد المطهرات المناسبة، ويغسلان جيدًا بماء مقطر معقم يُزال بعد ذلك كل من الميسم والقلم وجدار المبيض.

تستخدم المشيمة الكاملة التى تحمل البويضات فى حالات التلقيح المشيمى Placental Pollination وقد تقطع المشيمة إلى أجزاء، يحمل كل منها عددًا من البويضات، كما قد تزال المشيمة كلية فى حالات تلقيح البويضات Ovular Pollination أما فى حالات التلقيح الميسمى Stigmatic Pollination . فإن متاع الزهرة يبقى بأكمله، ويعقم سطحه الخارجى جيدًا، على ألا يلامس المطهر سطح الميسم وربما لا يحتاج متاع الزهرة إلى التعقيم إن كان مُغلّفًا بصورة جيدة، كما فى الذرة.

وتجمع متوك غير متفتحة من الآباء، وتحفظ فى طبق بترى معقم إلى أن تتفتح؛ حيث تنقل حبوب اللقاح بحرص، وتوضع على البويضات المزروعة، أو على مشيمتها، أو على مياسم المبايض المزروعة حسب الحالة.

هذا ويكون الهدف النهائى من هذه المزارع هو الحصول على بذور مكتملة التكوين من مزارع البويضات، سواء أكانت البويضات بمشيمة، أم كانت دون مشيمة، والحصول على ثمار كاملة ناضجة تحتوى على بذور مكتملة التكوين من مزارع المبايض وقد أمكن إنتاج بذور عدد من الهجن النوعية بواسطة مزارع البويضات بنوعيها، كما أمكن الحصول على ثمار ناضجة فى البيئات الصناعية من مزارع المبايض لعدد من المحاصيل الزراعية، منها الفراولة، والطماطم، والتبغ، والفاصوليا، والجركن، إلا أن الثمار كانت أصغر من نظيرتها التى تتكون طبيعيًا على النبات (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

بيئات مزارع المبايض والبويضات

تعد البيئة المناسبة للزراعة أهم العوامل التى تتحكم فى نجاح مزارع البويضات والمبايض .. علمًا بأن البيئة يجب أن تناسب إنبات حبوب اللقاح، إلى أن يتم الإخصاب، ثم تطور البويضات المخصبة إلى بذور كاملة تحتوى على أجنة مكتملة التكوين. هذا .. ولا يعد إنبات حبوب اللقاح فى البيئات الصناعية مشكلة، لأنها تنبت

بسهولة، كما يكون إنبات حبوب اللقاح طبيعيًّا على الميسم وداخل القلم – بعيدًا عن بيئة الزراعة – فى مزارع المبايض أما نمو البذور .. فإن له متطلبات خاصة، ويبين جدول (٨–١) تركيب واحدة من أكثر البيئات استعمالاً فى مزارع البويضات الملقحة وهى بيئة نتشه المحورة.

جدول (٨–١): تركيب بيئة Nitch المحورة التى يشيع استعمالها فى زراعة البويضات الملقحة culture of in vitro pollinated ovules (عن Bhojwani & Raste ١٩٩٦).

التركيب	التركيب (جزء فى المليون)
$CaNO_3.4H_2O$	٥٠٠
KNO_3	١٢٥
KH_2PO_4	١٢٥
$MgSO_4\ 7H_2O$	١٢٥
$CuSO_4.5H_2O$	٠,٠٢٥
Na_2MoO_4	٠,٠٢٥
$ZnSO_4.7H_2O$	٠,٥
$MnSO_4.4H_2O$	٣,٠
H_3BO_3	٠,٥
$FeC_6O_5H_7.5H_2O$	١٠,٠٠
Glycine	٧,٥
Ca-Pantothenate	٠,٢٥
Pyridoxine-HCl	٠,٢٥
Thiamine.HCl	٠,٢٥
Niacin	١,٢٥
Sucrose	٥٠٠٠٠
Agar	٧٠٠٠

أهمية مزارع المبايض والبويضات للمربى

يستفاد من مزارع المبايض والبويضات فى جوانب التربية التالية:

١ – إنتاج النباتات الأحادية، من خلال عملية التوالد الذاتى، وقد أسلفنا تفصيل ذلك فى الفصل السابع.

٢ – التغلب على حالات عدم التوافق (سواء أكان ذاتيًا، أم خلطيًا) فى مزارع البيضات نظرًا لأنه تتم إزالة أنسجة المبيض الأمية المسئولة عن حالة عدم التوافق.

٣ – التغلب على مشاكل العقم فى بعض الهجن النوعية البعيدة (بين أنوع من أجناس مختلفة من نفس العائلة intergeneric crosses)، أو من عائلات مختلفة interfamily crosses). وقد أمكن بالفعل إنتاج لاقحات zygotes تحتوى على هيئات كروموسومية لأنواع بعيدة، ونمت هذه اللاقحات إلى درجات مختلفة من التطور نحو تكوين الأجنة (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣، و Jain وآخرين ١٩٩٦، و Taji وآخرين ٢٠٠٢).

ونلقى – فيما يلى – الضوء على استخدام مزارع المبايض والبويضات فى إجراء التلقيحات الذاتية والتهجينات البعيدة:

● يوضح جدول (٨–٢) أمثلة عديدة لحالات ناجحة للتلقيح المشيمى، أو تلقيح البويضات الذاتى فى المزارع.

● يوضح جدول (٨–٣) أمثلة أخرى عديدة لحالات ناجحة لتلقيحات نوعية أو جنسية أجريت فى المزارع، ونتجت عنها أجنة حية ومكتملة التكوين.

● من أمثلة الهجن النوعية الصعبة التى أمكن إنتاجها بكل من مزارع المبايض، ومزارع البويضات الهجين *B. napus* x *B. juncea* (والهجين العكسى كذلك). وقد أظهرت نباتات الجيل الثانى تباينًا واسعًا فى الصفات (Bajaj وآخرون ١٩٨٦).

○ استخدمت تقنية مزارع البويضات والأجنة فى الحصول على هجين نوعى بين البصل والثوم؛ فبعد تلقيح أزهار البصل بلقاح الثوم، فصلت نحو ٣٠٠٠٠ بويضة من أزهار البصل بعد ٢–٣ أيام من التلقيح، وزرعت على بيئة صناعية، حث نمت إلى أجنة، زرع منها ٥٠ جنينًا أعطت نباتات صغيرة، أكمل النمو منها ١٨ نباتًا أنتجت أبصالاً كانت مماثلة فى الشكل للبصل، ولكنها احتوت على بادئ النكهة الرئيسى الخاص بكل من البصل (S-propenyl-L-cysteine sulfoxide)، والثوم (-S-allyl-L

cysteine sulfoxide)، وهو الأليين allin. وقد تأكد أن تلك النباتات الثمانى عشر كانت هجنًا بكل من الفحص المظهرى، وتحليل أيزوزيمات الإستيريز esterase، ودراسة الكروموسومات، واختبار الـ southern blotting مع استعمال الـ rDNA كـ "مجسّ" probe (Ohsumi وآخرون ١٩٩٢).

جدول (٨-٢). أمثلة لبعض الحالات الناجحة للتلقيح المثيمى أو تلقيح البويضات الذاتى فى المزارع، والتى نتج عنها بعض البذور القادرة على الإنبات (عن Bhojwani & Raste ١٩٩٦).

النوع النباتى	بيئة الزراعة: البيئة الأساسية[أ]	السكروز (٪)	الإضافات (مجم/لتر)
Brassica campestris	MS	٢	--
B. napus	MS	٢	—
B. oleracea	N	—	—
Zea mays	GP	٥	(١٠) GA_3
	LS	١٥	—
	MS	٧	(٠,٥) كينتين + (١) IAA + (٥٠٠) CH
	MS	٥	(١٠,٤) GA_3
	LS	١٥	—
	MS	٧	—
	MS	٥	(٥٠٠) CH
Glycine max	MS	٦	—
Trifolium repenses	MS	٣	(١٠٠) CH
Antirrhinum majus	N	٥	(٥٠٠) CH
Nicotiana rustica	N	٥	(٥٠٠) CH
N. tabacum	N	٥	(٥٠٠) CH
Petunia hybrida	N	٤	(٠,١) IAA + (٥٠٠) CH

أ - البيئات الأساسية .. MS، Murashige & Skoog، و N، Nitsch، و GP، Green & Phillips، و LS، Linsmaier & Skoog تتوفر المراجع الخاصة بتلك البيئات فى Bhojwani & Raste (١٩٩٦).

جدول (٨-٣): أمثلة لبعض الحالات الناجحة لتلقيحات نوعية أو جنسية أجريت فى المزارع، ونتجت عنها أجنة حية ومكتملة التكوين (عن Bhojwani & Raste ١٩٩٦).

التهجين	بيئة الزراعة		الإضافات
	الأساسية[أ]	السكروز (٪)	(مجم/لتر)
Brassica napus x *B. campestris*	MS	٢	—
B. campestris x *B napus*			—
B. chinensis x *B. pekinensis*			—
Zea mays x *Z. mexicana*	GP	٥	(١٠) GA_3
Nicotiana tabacum x *N. rustica*	N	٥	—
Melandrium album x *Viscaria vulgaris*	W	٢	—
M. album x *Silene schafta*	W	٢	—

أ – بيئات الزراعة .. MS: Murashige & Skoog، و GP: Green & Phillips، و W: White.
تتوفر المراجع الخاصة بتلك البيئات فى Bhojwani & Raste (١٩٩٦).

● أمكن إجراء التهجين بين النوعين *Cucurbita pepo*، و *C. moschata* من خلال مزارع البويضات ovule culture. وبينما لم تنبت الأجنة التى بداخل البويضات الكاملة عندما زرعت على بيئة صناعية، فإن إنبات الأجنة كان جيدًا عندما قطعت تلك البويضات. وقد كان معدل إنبات الأجنة أعلى فى حرارة ٢٧م منه فى حرارة ٢٣م، وحُصِل على أفضل النتائج فى بيئة موراشيج وسكوج بنصف التركيز، مع تزويدها بالسكروز بتركيز ٣٥ جم/لتر. وقد كان *C. pepo* أفضل كأم فى التهجين عن *C. moschata*، حيث أعطى نسبة أعلى من عقد الثمار، وتطورًا أفضل للأجنة. وبلغت نسبة إنبات الأجنة (للهجن التى استخدم فيها *C. pepo* كأم) التى بعمر ١٠ أيام ٤٠٪، ولكن تلك النسبة تناقصت سريعًا بعد ذلك (Hong وآخرون ١٩٩٤).

مزارع الأجنة

تستخدم مزارع الأجنة Embryo Cultures من قِبَل مربى النباتات لأجل التغلب على المشاكل اللاحقة للإخصاب فى التلقيحات البعيدة.

وتعد عملية فصل الأجنة الصغيرة، وتحديد بيئة الزراعة المناسبة أهم عاملين