الفصل الثامن عشر

أوجه الاستفادة من مزارع الأنسجة في تربية النبات

أصبحت مزارع الأنسجة بأنواعها المختلفة (الخلايا والأنسجة ، والأعضاء) من الأدوات المهمة التي يستفيد منها مربي النبات في تحقيق أهداف برامج التربية . وقد درج المربي على الاعتماد على كثير من العلوم ، مثل الوراثة ، وفسيولوجيا النباتات ، وأمراض النبات ... إلخ (يراجع لذلك الفصل الأول) . ويعد علما زراعة الأنسجة ، والهندسة الوراثية أحدث علمين في هذه السلسلة من العلوم ، التي تعتمد عليها تربية النبات . ويعد هذا الفصل مكملاً للفصل السابق من حيث كونه يتناول الجوانب التطبيقية لمختلف أنواع المزارع التي جاء ذكرها من قبل .

مزارع الأنسجة كمصدر للاختلافات الوراثية

نتناول تحت هذا العنوان الاختلافات الوراثية بمفهومها الواسع ، الذي يتضمن الطفرات العاملية ، والتحورات الكروموسومية ، وحالات التعدد الكروموسومي التام وغير التام ، التي قد تنشأ بصورة طبيعية أو بعد تعريض المزارع للعوامل المطفرة .

١- الطفرات العاملية والتحورات الكروموسومية :

تتميز مزارع الخلايا بأن كل خلية فيها يكون لها القدرة على أن تصبح فرداً جديداً ،

ويعنى ذلك وجود احتمالات كبيرة للغاية ؛ لظهور الطفرات فى النباتات التى تتميز من هذه المزارع نظراً للأعداد الهائلة من الخلايا التى توجد بها ، فعلى سبيل المثال يحتوى كل ١٠٠ مل من مزرعة معلق خلايا الدخان على أكثر من ١ × ١٠ ^{٧} خلية . ولايحتاج الأمر إلى أكثر من تطوير طريقة مناسبة لتقييم هذه الخلايا للصفة أو الصفات المرغوب فيها ، بحيث لاتبقى فى المزرعة سوى الخلايا المحتوية على الطفرات المرغوبة ثم توفير الظروف التى تساعد على تميز الأجنة من هذه الخلايا المطفرة .

تحدث التغيرات الوراثية - تلقائيًا - فى جميع أنواع المزارع تقريباً ، وتعرف باسم Somaclonal Variation . وقد أمكن التعرف على اختلافات وراثية فى صفات المقاومة للأمراض ، وعدد الأيام إلى الإزهار ، والمحصول ، وحجم النبات ، وشكل الجزء الاقتصادى من النبات ... إلخ ، ولوحظت هذه التباينات فى مزارع محاصيل متنوعة ؛ مثل قصب السكر ، والبطاطس ، والدخان ، والأرز ، والذرة ، والشعير ، والبرسيم ، والجزر ، والأناناس ، والخس ، والثوم ، والصليبيات ، والقرنفل ... إلخ (عن Carlson وآخرين ١٩٨٤ ، و Daub ١٩٨٤) ولمزيد من التفاصيل عن الطفرات الوراثية التى تظهر طبيعياً فى مزارع الأنسجة .. يراجع Ledoux (١٩٧٥) ، و Maliga وآخرون (١٩٨٢) ، و Scowcroft (١٩٨٢) ، و Carlson وآخرون (١٩٨٤) ، Duncan & Widholm (١٩٨٦) . أما بخصوص استخدامات مزارع الأنسجة فى مجال الدراسات الوراثية .. فيراجع Griesbach(١٩٨٤) .

وقد انتخبت سلالات طفرية كثيرة من مزارع الخلايا mutant cell lines سواء أكان ذلك بعد تعريض المزارع للعوامل المطفرة ، أم بدون ذلك التعريض . وكانت أبسط طرق الانتخاب وأكثرها شيوعاً هى الانتخاب المباشر بتعريض مزرعة الخلايا لمستويات عالية - إلى درجة السمية - من مركبات معينة ، بحيث لاتبقى فى المزرعة سوى الخلايا المقاومة لهذه المركبات ؛ لتتكاثر ، وتصبح سلالات طفرية جديدة . ويمكن التأكد من مستوى المقاومة فى هذه الطفرات بإعادة زراعة السلالات الطفرية فى مستويات أعلى من هذه المركبات . وقد أمكن - باتباع هذه الطريقة - انتخاب طفرات مقاومة لمشابهات الأحماض الأمينية ، ومضادات الحيوية ، ومبيدات الحشائش ، وسموم الفطريات ، والبكتيريا المرضية ، وكلوريد الصوديوم ... إلخ ، وكذلك سلالات أعلى فى القيمة الغذائية . ويعيب

هذه الطريقة عدم صلاحيتها للانتخاب لعديد من الصفات المحصولية المهمة .

وتجدر الإشارة إلى كثرة ظهور الطفرات فى مزارع الخلايا والكالس ، دون الحاجة إلى تعريضها للعوامل المطفرة . كما لم يمكن – فى بعض الحالات – زيادة معدل حدوث الطفرات بمعاملة مزارع الأنسجة بالعوامل المطفرة . ولمزيد من التفاصيل عن هذا الموضوع .. يراجع Gonzales & Widholm (١٩٨٥) .

وبرغم أن مزارع البروتوبلازم تعد أكثر من مزارع الخلايا والكالس ثباتاً من الوجهة الوراثية .. إلا أنه تظهر بها أيضًا بعض التغيرات الوراثية التى تعطى عند إكثارها سلالات جديدة ، يطلق عليها اسم Protoclones . وقد انتجب بهذه الطريقة سلالات جديدة من صنف البطاطس رست بربانك Russet Burbank تميزت باختلافات نوعية وكمية عن الصنف الأصلى . وتكمن المشكلة الحقيقة لمزارع البروتوبلازم فى قلة الأنواع النباتية ، التى أمكن تمييز نباتات كاملة منها (عن Sink ١٩٨٤) . ولمزارع البروتوبلازم أهميتها الكبيرة فى إحداث التباينات الوراثية بالنسبة للنباتات العقيمة التى تكثر خضريًا ، والنباتات ذات دورات الحياة الطويلة جداً ؛ لأن التغيرات الوراثية التى تظهر فى هذه المزارع تكون طفيفة ؛ مما يسمح بالاستفادة منها فى تطوير المحصول بصورة تدريجية (Power & Chapman ١٩٨٥) . ولمزيد من التفاصيل عن هذا الموضوع .. يراجع Bright وآخرون (١٩٨٣) .

هذا .. ولمزارع حبوب اللقاح أهمية خاصة فى هذا الشأن ؛ ويرجع ذلك إلى أنها أحادية المجموعة الكروموسومية ، وهو ما يعنى ظهور الطفرات المتنحية بمجرد حدوثها ، ويلزم فى هذه الحالة تعريض حبوب اللقاح للعامل المطفر ، ثم زراعتها لإنتاج النباتات الأحادية التى تقيّم بدورها لتمييز النباتات الحاملة للطفرات المرغوب فيها ، وهى التى تضاعف – بعد ذلك – بالكولشيسين ؛ لإكثارها والمحافظة عليها . وتزداد أهمية النباتات الأحادية عند وجود أكثر من طفرة متنحية فى النبات الواحد ؛ حيث تظهر جميعها فى آن واحد ، دونما حاجة إلى إجراء التلقيح الذاتى ، وزراعة أعداد كبيرة من نباتات الجيل الطفرى الثانى ؛ للتعرف على النباتات التى تحمل جميع الطفرات المتنحية بحالة أصيلة مثلما يتطلب الأمر فى النباتات الثنائية .

ومن المزايا الأخرى لمزارع حبوب اللقاح .. أن الطفرات المتكونة تظهر فى جميع خلايا النبات الأحادى ، ولاتكون على صفورة كيميرا ، كما يحدث فى النباتات الثنائية المجموعة الكروموسومية . ويمكن إنتاج الطفرات إما بتعريض المتوك للعوامل المطفرة قبل زراعتها ، وإما بإنتاج نباتات أحادية من مزارع متوك غير معاملة ، ثم تحضير مزارع خلايا أوبروتوبلازم منها ، ومعاملتها بالعوامل المطفرة ؛ لإحداث الطفرات المقاومة لمركبات كيميائية معينة ، أو التى تتحمل ظروفاً بيئية خاصة ، ثم إنتاج نباتات كاملة منها .

وقد تعددت محاولات استخدام مختلف أنواع المزارع من قبل مربى النبات لانتخاب سلالات مقاومة للآفات ، أو لظروف بيئية معينة ، وعلى سبيل المثال .. تمكن Bourgeais (١٩٨٧) من زيادة القدرة على تحمل الملوحة فى مزارع صنف الطماطم St - Pierre بتكرار زراعتها أربع مرات فى بيئات تحتوى على تركيزات متزايدة من كلوريد الصوديوم ، وصلت إلى ١٠٠ ملى مول ، واستخدم فى هذه المزارع إما القمة الطرفية للسيقان ، وإما كالس حصل عليه من جذور وسيقان النباتات . ويذكر Stavarek & Rains (١٩٨٤) أنه أمكن انتخاب سلالات خلايا Cell Lines مقاومة للملوحة من مزارع الخلايا لعدة محاصيل زراعية ، منها الفلفل ، والبرتقال ، وقصب السكر ، والبن ، والأرز ، والقلقاس ، والبرسيم الحجازى ، والدخان . وتكمن المشكلة – فى برامج التربية التى من هذا النوع – فى صعوبة الحصول على نباتات كاملة من سلالات الخلايا المنتخبة لمقاومة الملوحة (أو غيرها من العوامل البيئية) ؛ ففى البرسيم الحجازى .. كانت المزرعة التى أجرى فيها الانتخاب قديمة ، وحدث فيها تغيرات وراثية فى صفات كثيرة إلى درجة لم تسمح بنمو النباتات التى تميزت منها لاختبار مقاومتها للملوحة وإكثارها ، وفى الأرز .. كانت النباتات المقاومة للملوحة الناتجة من سلالات الخلايا عقيمة بدرجة عالية ، ولكن أمكن الحصول على نباتات من مزارع الدخان كانت قادرة على النمو فى محلول مغذ يحتوى على ٢,٦٢ ٪ كلوريد صوديوم .

وفى مجال التربية لمقاومة التركيزات المرتفعة من عنصر الألومنيوم (حيث يصل العنصر لتركيزات عالية إلى درجة السمية فى الأراضى الحامضية) .. أمكن انتخاب عدة سلالات خلايا Cell Lines من صنف الطماطم مارجلوب Marglobe عند زراعتها فى بيئة مغذية ، تحتوى على ألومنيوم فى صورة Al - EDTA بتركيز ٢٠٠ ميكرومول ، لكن لم

يمكن إنتاج نباتات من هذه المزرعة لأن الكالس كان مسناً . وأمكن فى دراسة أخرى انتخاب سلالات خلايا من الجزر مقاومة للتركيزات المرتفعة من الألومونيوم ، وهو على صورة كلوريد الألومنيوم ، وأمكن إنتاج نباتات كاملة منها . وقد لقحت هذه النباتات ذاتيًا ، واختبرت بادراتها فى محلول مغذ ، يحتوى على تركيز مرتفع من كلوريد الألومونيوم ، ووجد أنها كانت على درجة عالية من المقاومة .

ولمزيد من التفاصيل عن استخدامات مزارع الأنسجة فى التربية للظروف البيئية القاسية .. يراجع Dix (١٩٨٠) ، و Stavarek & Rains (١٩٨٤) .

وقد أمكن كذلك الاستفادة من مزارع الخلايا فى إنتاج سلالات دخان مقاومة لفيرس التبرقش . وقد تحقق ذلك بعدوى أوراق نبات دخان أحادى المجموعة الكروموسومية بشكل متجانس تماما بإحدى سلالات الفيرس ، ثم تعريضها لأشعة جاما . وأخذت بعد ذلك أجزاء من نسيج هذه الأوراق ، وزرعت فى بيئة مغذية ، تحتوى على تركيز مرتفع من السيتوكينين ، وعرضت لإضاءة قوية . سمحت هذه الظروف بحدوث نمو غيرمتساو للخلايا المحتوية على الفيرس (القابلة للإصابة) والخالية منه (المقاومة التى حدثت بها الطفرات) بحيث أمكن التمييز بين الكالس الأصفر البطئ النمو (المصاب) ، والأخضر السريع النمو (المقاوم) ، وأمكن من بين ٣٢١٠ calli (جمع كالس) الحصول على سبعة نباتات كانت مقاومة للفيرس ، هذا .. بينما لم يُحصل على أية نباتات مقاومة للفيرس من الأوراق التى لم تعرض للأشعة . وقد استمرت المقاومة فى نسل هذه النباتات ، وظهرت على شكل نقص فى تركيز الفيرس ، وضعف حركته فى النبات مما أدى إلى تأخير ظهور الأعراض لمدة ٣ – ٨ أسابيع ، مقارنة بالنباتات غير المقاومة (عن Daub ١٩٨٤) .

كما استخدمت سموم المسببات المرضية فى انتخاب سلالات خلايا Cell Lines مقاومة لهذه المسببات وقد جذبت هذه الطريقة الانتباه إليها لسهولتها ، ولأن جميع الخلايا تعرض لمستوى واحد من سموم المسببات المرضية ، ولكن يعيبها أن نسبة بسيطة فقط من المسببات المرضية هى التى تنتج سموما ، وأن قليلاً من هذه السموم هو الذى أمكن عزله وتنقيته ، لاستخدامه فى الانتخاب للمقاومة ، كما أن بعض السموم تكون خاصة بعوائل معينة hos-specific ، وتحدث بها نفس الأعراض التى تحدثها المسببات المرضية ذاتها ، بينما تكون سموم أخرى ذات تأثير عام non-host-specific على عدد كبير من الانواع

النباتية ، ويكون دورها فى إحداث الأعراض المرضية أقل من سابقتها . ومن أمثلة سلالات الخلايا التى انتخبت لمقاومتها لسموم المسببات المرضية أو راشح بيئاتها Culture Filtrates ، والتى تميزت نباتات كاملة منها ما يلى :

أ- المقاومة للبكتريا *Pseudomonas syringe* فى الدخان .

ب- المقاومة لفطرى *Phytopthora infestans* ، و *Fusarium oxysporum* فى البطاطس .

جـ- المقاومة لفطر *Phoma lingam* فى *Brassica napus* (عن Daub ١٩٨٤) .

د- أمكن كذلك عزل سلالات من الذرة ، تحتوى على صفة العقم الذكرى الستوبلازمى مع المقاومة لسموم السلالة T من الفطر *Helminthosporium maydis* المسبب لمرض لفحة الأوراق الجنوبية ؛ بواسطة تعريض مزارع أنسجة من سلالات ذرة ، تحمل سيتوبلازم تكساس الخاص بالعقم الذكرى ، لسموم الفطر ، ووجد أن صفة المقاومة هذه تورث عن طريق الستيوبلازم ، وأن النباتات المنتخبة كانت مقاومة لدى اختبارها تحت ظروف الحقل ، وجدير بالذكر ، أن جميع أصناف الذرة التى تحتوى على سيتوبلازم تكساس العقيم الذكرTexas Male Sterile Cytaplasm تصاب بهذا الفطر بدرجة أكبر بكثير من الأصناف الأخرى . ويبدو أن سم هذا الفطر يؤثر فى المتيوكوندريا (عن Cooking & Riley١٩٨١) ولمزيد من التفاصيل عن دور مزارع الأنسجة فى الانتخاب لمقاومة الأمراض .. يراجع Earle & Gracen (١٩٨١) ، Daub (١٩٨٤) .

٢- حالات التعدد الكروموسومى غير التام :

على الرغم من أن حالات التعدد الكروموسومى غير التام aneuploidy نادراً ما تظهر فى الطبيعة إلا فى النباتات المتضاعفة بطبيعتها .. إلا أنها كثيرة الشيوع فى مزارع الأنسجة ، وظهرت فى مزارع عديد من النباتات ؛ مثل البسلة ، والدخان ، والجزر ، والفول . كما تنشأ حالات كثيرة من التعدد الكروموسومى غير التام ، والتام فى مزارع متوك بعض النباتات مثل الداتورة ، والشعير ، والأرز ، والبيتونيا .

٣ - حالات التضاعف الذاتى :

أمكن إحداث التضاعف الذاتى بسهولة فى مزارع الخلايا ؛ باضافة الكولشيسين إليها

مباشرة . فأمكن – على سبيل المثال – إنتاج ٤٨٠ نباتاً متضاعفاً بانتظام من مزرعة خلايا لأحد الهجن النوعية فى الجنس *Saccharum* كان قد أضيف إليها الكولشيسين بتركيز ٥٠ مجم / لتر لمدة ٤ أيام ويحدث التضاعف الكروموسومى الطبيعى بانتظام كذلك فى كثير من مزارع الخلايا ، وكثيرا ما وجدت حالات تضاعفت فيها الخلايا الثنائية إلى ٤ ن ، و ٨ ن ، وأحياناً إلى ١٦ ن .

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 فى هذه المزارع ؛ وذلك للأسباب التالية :

١– تزداد فرصة العثور على الاختلافات الوراثية المرغوبة ؛ نظراً لأن كل خلية فى المزرعة يمكن أن تتميز إلى جنين يعطى فرداً جديداً .

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

٣– يصعب – كثيراً – فى الحمضيات إنتاج نباتات خالية من الفيروسات ، عن طريق مزارع القمة النامية الميرستيمية ، ولكنها تنتج بشكل روتينى من الأجنة اللاإخصائية التى تكون خالية تماماً من الإصابات الفيروسية (تكون الأجنة الجنسية خالية – هى الأخرى – من الإصابات الفيرسية ، ولكنها لاتصلح للإكثار التجارى) ، إلا أن بعض أصناف الحمضيات تكون خالية من البذور ؛ مثل البرتقال أبو سرة ، والأصناف اللابذرية من اليوسفى والجريب فروت . وفى أصناف كهذه .. لايمكن إنتاج نباتات خالية من الفيروسات إلا بطريق الأجنة العرضية ، التى تتكون فى مزارع الأنسجة والخلايا .

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

٥– يفيد إنتاج الأجنة العرضية فى تقصير فترة برنامج التربية فى بعض الحالات ،